



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0003576
(43) 공개일자 2017년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/445 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/445 (2013.01)
A61K 31/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7031756
(22) 출원일자(국제) 2015년04월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년11월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/025733
(87) 국제공개번호 WO 2015/160796
국제공개일자 2015년10월22일
(30) 우선권주장
61/979,408 2014년04월14일 미국(US)
14/684,967 2015년04월13일 미국(US)

(71) 출원인
아미쿠스 세라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1
(72) 발명자
위스트먼, 브랜던 앨런
미국 92103 캘리포니아주 샌 디에고 포트 스타턴 드라이브 2020
(74) 대리인
양영준, 김영

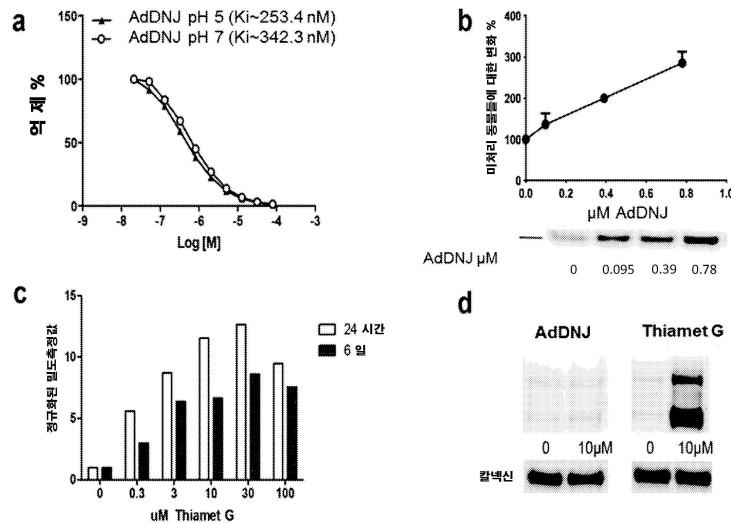
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 대뇌 아밀로이드증을 치료 및/또는 예방하기 위한 투여 요법

(57) 요약

본원에는 뇌 아밀로이드증, 예를 들어 알츠하이머병(AD) 및/또는 뇌 아밀로이드 혈관 병증(CAA)의 치료 및/또는 예방을 위한 투여 계획들과 키트가 기술되어 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 9/0053 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

알츠하이머병 및/또는 뇌 아밀로이드 혈관 병증으로 발달할 위험이 있거나, 알츠하이머병 및/또는 뇌 아밀로이드 혈관 병증으로 진단받은 환자에서, 상기 질병을 예방 및/또는 치료하는데에 사용하기 위한, 2-아세트아미도-1,2-디데옥시노지리마이신(AdDNJ)을 포함하는 제제로서,

상기 AdDNJ는 제1 효소 증강 기간 동안 유효량으로 환자에게 투여되고;

상기 AdDNJ는 기질 턴오버 기간 동안 투여되지 않으며; 이후

상기 AdDNJ는 제2 효소 증강 기간 동안 유효량으로 환자에게 투여되는 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 효소 증강 기간과 제2 효소 증강 기간은 지속 기간이 동일한 것인 제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 효소 증강 기간과 제2 효소 증강 기간 중 하나 이상은 약 1 일 내지 약 8 일의 기간인 제제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 효소 증강 기간과 제2 효소 증강 기간 중 하나 이상은 약 4 일 내지 약 6 일의 기간인 제제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AdDNJ는 제1 효소 증강 기간과 제2 효소 증강 기간 동안 매일 투여되는 것인 제제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AdDNJ는 경구 투여되는 것인 제제.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AdDNJ는 약 3 mg/kg/일 내지 약 300 mg/kg/일의 범위의 용량으로 투여되는 것인 제제.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AdDNJ는 약 100 mg/kg/일의 용량으로 투여되는 것인 제제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 48 시간 내지 약 96 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함하는 것인 제제.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 72 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함하는 것인 제제.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 효소 증강 기간은 약 5 일이고, 기질 턴오버 기간 동안

AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 72 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함하는 것인 제제.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,
제1 일에 상기 AdDNJ 유효량이 환자에 투여되고;
제2 일에는 상기 AdDNJ가 환자에 투여되지 않으며;
제3 일에 상기 AdDNJ 유효량이 환자에 투여되고;
제4 일에 상기 AdDNJ가 환자에 투여되지 않으며;
제5 일에 상기 AdDNJ 유효량이 환자에 투여되고; 이후
약 72 시간의 기간 동안 상기 AdDNJ가 투여되지 않는 것인 제제.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 24시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함하는 것인 제제.

청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 48시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함하는 것인 제제.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 효소 증강 기간은 약 3 일이고, 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 120 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 효소 증강 기간과 기질 턴오버 기간은 적어도 1 개월의 총 치료 시간 동안 교번되는 것인 제제.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 총 치료 시간은 적어도 3 개월인 제제.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 기질 턴오버 기간은 적어도 하나의 다른 기질 턴오버 기간과 지속 기간이 상이한 것인 제제.

청구항 19

2-아세트아미도-1,2-디데옥시노지리마이신(AdDNJ) 유효량을 포함하는 투여형 하나 이상; 및
제1 효소 증강 기간 동안 투여형을 투여하는 것;
기질 턴오버 기간 동안 투여형을 투여하지 않는 것; 그리고 이후
제2 효소 증강 기간 동안 투여형을 투여하는 것
을 위한 지침들
을 포함하는 키트.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제1 효소 증강 기간과 제2 효소 증강 기간은 지속 기간이 동일한 것인 키트.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 제1 효소 증강 기간과 제2 효소 증강 기간 중 하나 이상은 약 1 일 내지 약 8 일의 기간인 키트.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 48 시간 내지 약 96 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함하는 것인 키트.

청구항 23

2-아세트아미도-1,2-디데옥시노지리마이신(AdDNJ) 유효량을 포함하는 활성 투여형 하나 이상;

AdDNJ 유효량을 포함하지 않는 비활성 투여형 하나 이상; 그리고

제1 효소 증강 기간 동안 활성 투여형을 투여하는 것;

기질 턴오버 기간 동안 비활성 투여형을 투여하는 것; 그리고 이후

제2 효소 증강 기간 동안 활성 투여형을 투여하는 것

을 위한 지침들

을 포함하는 키트.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 제1 효소 증강 기간 및 상기 제2 효소 증강 기간은 지속 기간이 동일한 것인 키트.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 제1 효소 증강 기간 및 상기 제2 효소 증강 기간 중 하나 이상은 약 1 일 내지 약 8 일의 기간인 키트.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 48 시간 내지 약 96 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함하는 것인 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 인간의 뇌 아밀로이드증, 예를 들어 알츠하이머병 및/또는 뇌 아밀로이드 혈관 병증의 치료에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머병은 사회경제적 건강관리에 있어서 가장 큰 부담들 중 하나이다. 알츠하이머병은 진행성 치매에 의해 특징지어지고, 조직병리학적으로는 신경원섬유매듭(NFT) 및 초로성(노인성) 반의 존재에 의해 특징지어진다. 반은 아밀로이드-베타(A β)라고 칭하여지는 단백질로 이루어져 있으며, 매듭은 토투(tau)라고 칭하여지는 단백질로 구성된다.

[0003] 아밀로이드 반과 NFT는 둘 다 알츠하이머병(AD)의 전형적인 특징이다. 아밀로이드 전구체 단백질(APP)과 프레세닐린에 있어서의 돌연변이들은 알츠하이머병의 초기 발생 형태들을 유도하는데, 이는 APP의 가공이 또한 산발성 AD의 발병에서 중요한 역할을 할 수 있다는 가설을 뒷받침해준다. 또한 "아밀로이드 가설"은, A β 의 일부 독성 형태의 축적이 뇌에 치명적임을 예측한다. APP는 α -세크레타아제 및 β -세크레타아제 경로에 의해 가공될 수 있다. 현재 질병의 진행을 늦추는 AD 치료법을 개발하고자 하는 연구 노력의 대부분은, γ -세크레타아제 및 β -세크레타아제, 그리고 APP 대사를 억제하여 A β 펩티드를 형성하는 것, 또는 A β 생성을 줄이면서 α -세크레타아제 가공을 활성화하여 신경보호작용성 sAPP α 펩티드 생성을 증가시키는 것에 집중하고 있다. 부분적으로는

생체 내 β -세크레타아제 활성의 감소와 뇌 내 $A\beta$ 펩티드 감소 사이에 비선형 관계가 있는 것으로 보이므로, 특이적 β -세크레타아제 억제제의 개발에 어려움을 겪고 있다. 추가의 어려움은, γ -세크레타아제가 APP 이외에 노치 수용체(notch receptor)를 비롯한 다수의 기타 다른 기질을 가공하므로, 억제제, 즉 γ -세크레타아제 억제제 대부분의 낮은 뇌 투과율이 노치 억제(notch inhibition)와 연관된 중증 GI 부작용들로 인한 고통을 더욱 배가시킨다는 것이다. 뿐만 아니라 γ -세크레타아제 활성의 결핍은 신경퇴행을 유발하는 것으로 나타났으며, 이는 프레세닐린 1(즉, γ -세크레타아제 복합체의 활성 위치를 함유하는 γ -세크레타아제 복합체의 한 성분)에 있어서의 돌연변이에 의해 유발되는 상염색체 우성 초기 발생 알츠하이머병과 연관될 수 있다.

[0004] 알츠하이머병을 치료하는 것에 목표를 둔 노력들의 대부분은 AD의 증상들을 감소시키는 것에 집중되고 있다. 특히 AD 환자 전 뇌의 발병된 신경원들에서 콜린 아세틸기 전이효소의 더 낮은 농도로의 동정은, 시냅스 간극에서의 아세틸콜린 가수분해의 억제와, 시냅스에서의 아세틸콜린 수준의 상승에 목표를 둔 치료들을 이끌어냈다. 이와 같은 전략은 신경전달물질 수준의 적어도 부분적 교정을 초래하였지만, 치료적 이익은 작았다.

[0005] 또한 AD는 토우병증으로 분류된다. 토우병증은 토우의 응집과 NFT의 형성을 촉진하는 토우의 비정상 과인산화에 의해 유발된다. 토우 및 APP 돌연변이들 둘 다는 치매를 일으키므로, 이것들 중 어느 하나 또는 둘 다는 AD의 질병 진행에 기여할 수 있다. APP의 변경된 가공을 유도하는 돌연변이는 AD를 일으키는 것으로 잘 이해되고 있다. 현재 알츠하이머병의 진행을 늦추기 위한 치료법으로서 승인된 치료법은 없다. 그러므로 더욱 유리한 AD 치료에 대한 필요가 여전히 남아있다. 개발중인 치료법 대부분은 APP 대사 변경(예를 들어, β -세크레타아제 및 γ -세크레타아제 억제) 또는 토우 응집 차단에 초점을 맞춘 것인 한편, 본 발명은 하나 이상의 강글리오시디아제 및/또는 시알리다아제에 결합하여 sAPP α 의 생성을 증가시키고, $A\beta$ 및 과인산화 토우의 생성을 감소시키는 약리학적 샤프론이 사용되는 치료법을 제공한다.

[0006] 이와 유사하게, 뇌 아밀로이드 혈관 병증(CAA)은 중추 신경계 혈관 벽, 특히 연수막 및 대뇌피질 동맥에의 아밀로이드 축적에 의해 특징지어지는 질환이다. CAA는 대부분 노인들에서 산발성 병태로서 발생하는데, 이의 발생은 진입 연령과 연관되어 있다. 이와 같은 산발성 CAA 사례들은 APP의 단백질분해성 절단으로부터 기원하는 $A\beta$ 의 축적으로 말미암는다. CAA의 유전적 형태는 일반적으로 가족성으로서, 산발성 CAA보다 더욱 중증인데다가 더욱 빨리 발생하기도 한다. 최근 들어 CAA는 또한 AD 발달의 잠재적 병인으로서 인식되고 있기도 한다.

[0007] 본원에 인용된 모든 문헌들은 전체로서 참고문헌으로 포함된 것들이다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0008] β -헥소사미니다아제(β -hex)를 표적화하는 약리학적 샤프론은 뇌 아밀로이드증의 치료 및/또는 예방과 관련된 이점들 다수 개를 가질 수 있음이 관찰되었다. 특히 약리학적 샤프론 2-아세트아미도-1,2-디데옥시노지리마이신(AddNJ)은 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스에서 $GA\beta$ 병적 측면을 줄이고, 이러한 마우스의 행동 표현형을 용량 의존적 방식으로 교정하는 것으로 관찰되었다. AddNJ는 우수한 약학적 품질, 예를 들어 우수한 경구 생체 내 이용가능성, 뇌 투과성, 관용성, 선택성 및 낮은 세포독성을 가진다. 그러므로 AddNJ와, β -hex 활성을 증가시키기 위한 기타 다른 전략은 인간 뇌 아밀로이드증, 예를 들어 알츠하이머병(AD) 및/또는 뇌 아밀로이드 혈관 병증(CAA)의 관리를 도울 것으로 기대된다.

[0009] 그러므로 본 발명의 하나의 양태는, 2-아세트아미도-1,2-디데옥시노지리마이신(AddNJ) 유효량을 투여함으로써, 알츠하이머병 및/또는 뇌 아밀로이드 혈관 병증이 발달할 위험이 있거나 이것으로 진단된 환자에 있어서 상기 알츠하이머병 및/또는 뇌 아밀로이드 혈관 병증을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 이러한 양태의 하나 이상의 구현예에 있어서, 상기 방법은 제1 효소 증강 기간(enzyme enhancement period) 동안 AddNJ 유효량을 환자에 투여하고; 기질 턴오버 기간(substrate turnover period) 동안에는 AddNJ를 투여하지 않으며; 이후 제2 효소 증강 기간 동안 AddNJ 유효량을 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0010] 제1 효소 증강 기간 및 제2 효소 증강 기간은 지속 기간이 동일할 수 있거나, 또는 지속 기간이 상이할 수 있다. 다양한 구현예에서, 제1 효소 증강 기간 및 제2 효소 증강 기간 중 하나 이상은 약 1 일 내지 약 8 일의 기간, 예를 들어 약 4 일 내지 약 6 일의 기간이다. AddNJ는 제1 효소 증강 기간 및 제2 효소 증강 기간 중 하나 이상의 기간 동안에 매일 투여될 수 있다.

[0011] 하나 이상의 구현예에서, AddNJ는 경구 투여된다. 기타 다른 투여 경로는 비 내 투여를 포함하나, 이에 한정되

는 것은 아니다.

- [0012] 하나 이상의 구현예에 의하면, AdDNJ는 약 3 mg/kg/일 내지 약 300 mg/kg/일의 범위의 용량, 예를 들어 약 100 mg/kg/일의 용량으로 투여된다.
- [0013] 하나 이상의 구현예에서, 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은, 약 48 시간 내지 약 96 시간의 기간, 예를 들어 약 72 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함한다. 기타 다른 예시적 기질 턴오버 기간은 약 24 시간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것, 또는 약 48 시간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함한다.
- [0014] 효소 증강 기간 및 기질 턴오버 기간의 다양한 조합이 가능하다. 하나의 예시적 스케줄에서, 제1 효소 증강 기간은 약 5 일이고, 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 72 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함한다.
- [0015] 또 다른 예시적 스케줄은 제1 일에 AdDNJ 유효량을 환자에 투여하고; 제2 일에는 AdDNJ를 투여하지 않으며; 제3 일에 AdDNJ 유효량을 환자에 투여하고; 제4 일에 AdDNJ를 투여하지 않으며; 제5 일에 AdDNJ 유효량을 환자에 투여하고; 이후 약 72 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함한다.
- [0016] 1을 포함하는 또 다른 예시적 스케줄에서, 제1 효소 증강 기간은 약 3 일이고, 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것은 약 120 시간의 기간 동안 AdDNJ를 투여하지 않는 것을 포함한다.
- [0017] 본 방법은 추가의 기질 턴오버 기간 및/또는 추가의 효소 증강 기간을 포함할 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, 방법은 특정한 총 치료 시간, 예를 들어 적어도 1 개월의 치료 시간 동안 효소 증강 기간과 기질 턴오버 기간 간을 교번(alternating)하는 것을 포함한다. 총 치료 시간은 치료법에 적합한 임의의 시간의 기간, 예를 들어 적어도 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 10 개월, 11 개월 또는 12 개월이나, 1 년, 2 년, 3 년 또는 4 년일 수 있다. 다양한 구현예에서, AdDNJ는 무한한 시간의 기간 동안 투여된다. 각각의 효소 증강 기간 또는 각각의 기질 턴오버 기간은, 또 다른 효소 증강 기간 또는 기질 턴오버 기간과 각각 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태는 알츠하이머병 및/또는 CAA를 치료 및/또는 예방하기 위한 키트를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 키트는 AdDNJ 유효량을 포함하는 투여형 하나 이상과 본원에 기술된 방법들 중 임의의 방법에 따라서 투여형을 투여하기 위한 지침을 포함한다. 예를 들어 키트는 제1 효소 증강 기간 동안 투여형을 투여하고; 기질 턴오버 기간 동안 투여형을 투여하지 않으며; 이후 제2 효소 증강 기간 동안 투여형을 투여하기 위한 지침을 포함할 수 있다.
- [0019] 키트는 AdDNJ 유효량을 포함하지 않는 비활성 투여형 하나 또는 하나 이상을 포함할 수 있다. 키트는 제1 효소 증강 기간 동안 활성 투여형을 투여하고; 기질 턴오버 기간 동안 비활성 투여형을 투여하며; 이후 제2 효소 증강 기간 동안 활성 투여형을 투여하기 위한 지침을 포함할 수 있다.
- [0020] 효소 증강 기간(들) 및 기질 감소 기간(들)은 본원에 기술된 특징들 중 임의의 것을 가질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a 내지 1g는 β -hex 표적화 약리학적 샤프론 AdDNJ의 효능, 선택성 및 세포 독성 요약의 개요를 나타낸다. AdDNJ는 β -hex의 특이적 억제제이고(a), 100 μ M에서 O-GlcNAcase를 억제하지 않거나(c 및 d), 또는 시험된 농도들 중 가장 높은 농도인 10 μ M에서 리소좀 효소 β -글루코세레브로시다아제(GCase), α -갈락토시다아제(α -Gal) 또는 β -갈락토시다아제(β -Gal)를 억제하지 않는다(e). 추가로, AdDNJ는, 120 시간 이하 동안 1 mM만큼의 농도의 AdDNJ로 처리된 인간 피부 섬유아세포(f) 및 SH-SY5Y(g)에 대한 세포 생존 능력에 거의 영향을 미치지 않거나 전혀 영향을 미치지 않는다. AdDNJ는 섬유아세포에서 β -hex 수준을 3 배 증가시킨다. 건강한 인간 유래 섬유아세포가 AdDNJ(95 nM 내지 780 nM)로 5 일 동안 처리되면, 총 야생형 β -hex 수준의 3 배 이하만큼의 용량의존적 증가가 초래된다(b). 데이터는 평균 \pm s.e.m.으로 표현하였다.

도 2a 및 2b는 C57BL/J6 마우스에서 단일 용량 AdDNJ의 약동학적 연구를 나타낸다. 5 주령 수컷 C57BL/J6 마우스에는 β -hex 표적화 약리학적 샤프론 AdDNJ 100 mg/kg이 1 회 투여되었다. 혈장(a) 및 뇌(b)에서의 AdDNJ 프로파일. AdDNJ 100 mg/kg은 혈액 뇌 장벽을 통과하여, β -hex와 결합하여 이의 수준(342 nM 초과)을 증가시키기에 충분하고, 16 시간 이내에 β -hex에 대한 Ki(pH 5에서 253 nM) 수준 미만으로 강하시킬 것으로 예상되는 뇌 내 수준에 이르렀다(n = 시점당 마우스 5 마리). 데이터는 평균 \pm s.e.m.으로 표현하였다.

도 3a 및 3b는 C57BL/J6 마우스에서의 AdDNJ 반복 투여 및 용량 반응 연구를 나타낸다. 5 주령 수컷 C57BL/J6 마우스에는 비이클이나, β -hex 표적화 약리학적 사페론 AdDNJ 30 mg/kg, 100 mg/kg 또는 300 mg/kg이 매일 총 14 일 이하의 기간 동안 경구 위관영양공급되었다. 전체 뇌 Hex A&S(a) 및 Hex B(b) 활성(n = 시점당 마우스 5 마리). 데이터는 평균 \pm s.e.m.으로 표현하였다.

도 4a 내지 4c는 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스에서 AdDNJ 처리 후 증가한 뇌내 β -hex 수준을 나타낸다. 3 월령 수컷 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스는 미처리되었거나, 아니면 비이클이나 AdDNJ로 3 개월 동안 경구 투여되었다. AdDNJ 처리는 β -hex B(a), β -hex A&S(b) 및 총 β -hex 수준을 용량 의존적 방식으로 증가시킨다(미처리; n = 3, 비이클; n = 6, 3 mg/kg 및 10 mg/kg AdDNJ; n = 7, 30 mg/kg 및 100 mg/kg AdDNJ; n = 6). 데이터는 평균 \pm s.e.m.으로 표현하였다. 본페로니(Bonferoni) 사후 분석이 적용된 일원분산분석, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

도 5a 및 5b는 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스에서 AdDNJ 처리 후 감소된 불안증 및 학습 행동 결손 발생의 예방을 나타낸다. 3 월령 수컷 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스는 미처리되었거나(n = 15), 아니면 비이클(n = 15)이나 AdDNJ(3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg 또는 100 mg/kg AdDNJ; n = 13/처리군)로 3 개월 동안 경구 투여되었다. 고가식 십자 미로에 있어서 6 월령 비이클 처리된 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스는 3 월령 미처리 마우스보다 증가된 불안증을 나타내었는데, 이는 시험된 모든 용량의 AdDNJ가 사용되는 처리 후에 뒤집혔다(a). 3 월령 미처리 마우스는 그대로의 기억력을 나타내면서, 새로운(생소한) 물체를 익숙한(오래된) 물체보다 더 많이 탐색했던 반면, 6 월령 비이클 처리된 Dutch 유전자이식 마우스는 새로운 물체 인식(NOR)에 있어서 학습 행동 결손을 나타내었다. AdDNJ는 NOR 시험에 있어서 학습 장애의 발생을 용량 의존적 방식으로 막아준다(b). 데이터는 평균 \pm s.e.m.으로 표현하였다. * P < 0.05, *** P < 0.001.

도 6은 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스에서의 AdDNJ 처리 후 맥락 및 단서 공포 조건화 학습 행동을 나타낸다. 3 월령 수컷 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스는 3 개월 동안 미처리되거나(n = 15), 비이클이 경구 투여되거나(n = 15) 또는 AdDNJ(3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg 또는 100 mg/kg AdDNJ; 처리 n = 13/군)가 경구 투여된다. AdDNJ는 맥락 또는 단서 학습 행동에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 데이터는 평균 \pm s.e.m.으로 표현하였다.

도 7a 내지 7o는 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스에서 AdDNJ 3 개월 처리 후의 A β 및 올리고머 수준을 나타낸다. 3 월령 수컷 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스는 3 개월 동안 미처리되거나, 비이클이 경구 투여되거나 또는 AdDNJ(3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg 또는 100 mg/kg AdDNJ; 처리 n = 13/군)가 경구 투여된다. AdDNJ는 A β 40(a 내지 d), A β 42(e 내지 h), A β 42/40 비율(i 내지 l) 또는 A11 전 섬유성 A β (m), 또는 항체가 사용될 때의 올리고머(OC 또는 Nu-4, n 내지 o)(n = 5/군)에 어떠한 영향도 미치지 않았다. 데이터는 평균 \pm s.e.m.으로 표현하였다.

도 8a 내지 8f는 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스에서 AdDNJ의 처리 후에 A β 면역반응성이 감소되었음을 나타낸다. 3 개월 동안 비이클(a, c, e) 또는 AdDNJ 100 mg/kg(b, d, f)이 경구 투여된 수컷 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스로부터 유래하는 시상면 뇌 절편은 항체 6E10으로 염색되었다(비이클; n = 4, AdDNJ 100 mg/kg; n = 4). A β 면역반응성은 AdDNJ 처리된 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스의 해마이행부(a, b)에서는 덜 강하였지만, 시각 피질(c, d) 또는 해마의 CA1 영역(e, f)에서는 그렇지 않았다. 축척 바 a 내지 f는 200 μ M이다.

도 9a 내지 9p는 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스에서 AdDNJ 처리 후 감소된 강글리오사이드 결합 A β (GA β) 면역반응성을 나타낸다. 3 개월 동안 비이클(a, c, e, g, i) 또는 AdDNJ(b, d, f, h, j) 중 어느 하나가 투여된 수컷 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스로부터 유래하는 시상면 뇌 절편은 GA β (43696C)로 염색되었다(비이클; n = 4, AdDNJ 100 mg/kg; n = 4). 43696C 항체에 의해 검출되는 바와 같은 GA β 면역반응성은 해마이행부와 주변후각피질(k, i)에서 감소되었다. GA β 는 시각 피질, 측면 내후각 피질 및 해마의 CA1 영역(m, n, o)에서 변화하지 않았다. 축척 바 a 내지 j는 200 μ M이다. 혈관에서의 GA β 염색은 피질 영역(p)에서 검출 가능하였다. 데이터는 평균 \pm s.e.m.으로 표현하였다. * P < 0.05.

도 10a 내지 10d는, Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스의 AdDNJ 처리가 TLC에 의해 평가되는 강글리오사이드 프로필에 검출 가능한 효과를 나타내지 않음을 나타낸다. 3 월령 수컷 Dutch 유전자이식 마우스는

미처리되었거나, 또는 이 마우스에 3 개월 동안 비이클이나 AdDNJ가 경구 투여되었다. 전체 전 뇌의 박층 크로마토그래피 분석은, AdDNJ 처리가 GM1, GM2 및 GM3 강글리오사이드 수준(a 내지 d)을 유의적으로 변경하지 않음을 밝혔다(비이클; n = 6, AdDNJ 100 mg/kg; n = 7).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] Aβ는 모든 생체 유체에서 발견되는 소수성 아미노산 38 개 내지 43 개로 이루어진 펩티드로서, 더욱 큰 제I형 막 단백질인 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 효소 절단으로부터 유도된다. 가족성 AD 환자들에 관한 계통 연구는 2 개의 유전자, 즉 APP와 프레세닐린에 있어서 APP의 비정상 대사와 Aβ의 응집 형태의 증가된 생성과 연관된 돌연변이 다수를 동정하였다. Aβ는 알츠하이머병의 병적 측면에서 유의적인 역할을 담당할 수 있는 독성 올리고머를 형성하는 것으로 생각된다(Shankar와 다수, 2008).
- [0023] 강글리오사이드는 뇌에서 Aβ의 신경 독성 형태(즉, 올리고머)의 생성을 촉진한다. 강글리오사이드는 세포막의 외부 소엽에서 발견되고, 특히 신경원의 세포 표면에 풍부한 시알산 함유 글리코스핑고지질이다. 강글리오사이드는 클러스터에 존재하여, 원형질막 표면에 마이크로도메인(microdomain)을 형성하는 것으로 공지되어 있다. 이와 같이 강글리오사이드의 특이적 편재화는 이 강글리오사이드가 다양한 생체 효과기, 예를 들어 당단백질, 펩티드 호르몬 및 성장 인자와 상호작용할 수 있도록 만든다. 또한 강글리오사이드(예를 들어, GM1 강글리오사이드)는 세포 분화를 촉진할 수 있고, 신경발생의 손실을 막을 수 있으며, 신경원 손상의 시험관 내 및 생체 내 모델에서 신경보호작용 역할을 할 수 있다.
- [0024] 강글리오사이드는 신경계에 가장 풍부하며, 신호 전달, 세포 부착 및 세포 분화의 매개를 비롯한 다양한 기능에 수반된다. 200 개 초과 강글리오사이드가 동정된 한편, 신경원 내 대부분의 강글리오사이드는 하나 이상의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제에 의해 이화된다.
- [0025] α-세크레타아제 활성의 생성물인 가용성 APP α (sAPP α)와 β-세크레타아제 활성의 생성물인 가용성 APP β (β APP β)는, Aβ의 처음 16 개 잔기가 sAPPα에 포함되는 점에서 상이하다. α-세크레타아제에 의한 APP의 절단은 Aβ 도메인을 둘로 가르므로, 반응 생성물들 중 어느 것도 아밀로이드를 생성하지 못한다. 그러므로 α-세크레타아제 활성의 활성화 또는 상향조절은 신경영양 및 신경보호작용 sAPPα의 발산을 증가시키면서 독성 Aβ 올리고머 및 아밀로이드 반의 형성을 막거나 감소시킨다는 가설이 세워진다. 재미있는 점은, 글리코스핑고지질 및 강글리오사이드의 합성이 억제되면, sAPP α의 발산은 활성화되는 것으로 나타났다는 점이다(Sawamura와 다수, 2004).
- [0026] APP에서의 돌연변이는 또한 가족성 알츠하이머병 및/또는 뇌 아밀로이드 혈관 병증(CAA)을 일으키기도 한다. 강글리오사이드 GM2, GM3 및 GD3는 구역 특이적 방식으로 뇌 내에서 발견되므로, 상기 강글리오사이드들은 국부 Aβ 축적을 조정할 수 있다(Yamamoto와 다수, 2006). 유전적 변이체 Dutch형 및 Italian형 Aβ β 및 Flemish형 Aβ의 조립은 각각 GM3 강글리오사이드와 GD3 강글리오사이드에 의해 가속화되었다. 주목될 점은, Dutch형 및 Italian형 Aβ β가 축적되는 뇌혈관 벽을 구성하는 뇌혈관 평활근 세포는 독점적으로 GM2 및 GM3를 발현한다는 점이다(Yamamoto와 다수, 2006). 그러므로 유전적 Aβ 변이체의 조립은 편재성 환경 요인, 예를 들어 뇌 내 특정 강글리오사이드들의 존재에 의해 가속화될 수 있다.
- [0027] 최근 들어 글리코스핑고지질 및 강글리오사이드는 신경퇴행 관련 단백질의 미스폴딩(misfolding) 및 응집에 연루되어 있음(예를 들어, 파킨슨병의 글루코세레브로시다아제 돌연변이에 대한 유전적 연계)이 밝혀졌다(Alcalay와 다수, 2012; Daniele와 다수, 2012). 점점 늘어나는 증거는, 강글리오사이드 대사의 이상이 뇌와 혈관구조에서 Aβ의 신경 독성 형태의 생성을 가속화함으로써 알츠하이머병(AD) 발병과 뇌 아밀로이드 혈관 병증(CAA)을 유발할 수 있음을 말해준다. 노화 및 신경퇴행이 진행되는 동안 막의 생리화학적 특성은 변화하고, 이로써 막 내 지질 비율의 불균형 및/또는 막 지질의 변경된 비율이 초래되는데, 이는 AD의 발병에 기여할 수 있다(Yanagisawa, 2007; Mutoh와 다수, 2006; Hayashi와 다수, 2004; Karcun와 다수, 1991; Brooksbank와 다수, 1989; Matsuzaki, 2007). 이러한 생각과 일치되게, 증가된 모노시알로강글리오사이드(GM1, GM2 및 GM3) 수준이 AD 뇌 피질에서 보고되었는데(Gyls와 다수, 2007), 이와 같은 수준 증가는 발병된 뇌의 전두, 측두 및 두정 피질에서 막의 마이크로도메인(세제 내성 막)에 명백하게 편재화되어 나타난다(Kracun와 다수, 1991; Molander-Melin와 다수, 2005). 또한 강글리오사이드 결합 Aβ(GAβ) 펩티드는 AD의 병적 측면의 가장 이른 단계만을 나타내는 뇌에서 검출되었는데(Yanagisawa와 다수, 1995; Yanagisawa와 다수, 1997; Yanagisawa와 다수, 1998), 이는 강글리오사이드가 AD의 발병 초기에 몇 가지 역할(들), 예를 들어 Aβ 피브릴의 시딩(seeding)을 수행할 수 있음을 시사한다(Yanagisawa와 다수, 2007; Yamamoto와 다수, 2005; Selkoe, 1995). 주목될 점은, Aβ의 일부 돌연변이체 형태들(특히 올리고머화를 유리하게 하는 돌연변이들)은 GM2 및 GM3의 응집을 지지하는 특성들에

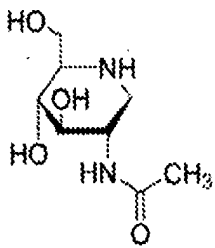
대해 특히 감수성을 나타낸다는 점이다(Yamamoto의 다수, 2005; Yamamoto의 다수, 2006).

[0028] β-헥소사미니다아제(β-Hex)는 GM2 강글리오사이드를 이화하고, 이의 결핍은 상 염색체 열성 리소좀 저장 질환인 테이삭스병 및 샌드호프병을 유발한다(Mahuran, 1999). 항Aβ 유사 면역반응성의 신경원 내 축적은 *HEXB* KO 마우스의 뇌 내에서 항체 4G8, 항α-시뉴클레인 유사 면역반응성 및 항pTau 유사 면역반응성을 이용하는 것으로 관찰되었다(Keilani의 다수., 2012). 생화학적 및 면역조직화학적 분석에서는, 신경원 내 4G8 면역반응성은 APP-CTF 및/또는 Aβ를 나타내되 전장 APP는 나타내지 않음이 확인되었다. 뿐만 아니라 지질 연관 분석에서는 (야생형 뇌에서 복구되는 Aβ40 및 Aβ42 펩티드 수준과 비교되었을 때) 증가된 Aβ40 및 Aβ42 펩티드의 수준이 관찰되었다. 강글리오사이드 결함 Aβ 면역반응성의 축적은 또한 GM1 및 GM2 강글리오사이드와 함께, 인간 피험체의 뇌와 *HEXB* KO 마우스의 뇌에서도 관찰되었다. 종합해보았을 때, 이러한 결과로 강글리오사이드 축적과 Aβ 축적 간 연관성이 추론된다.

[0029] GM2 및 GM3 강글리오사이드는 특히 올리고머화되는 경향이 있는 Dutch형, Iowa형 및 Italian형 돌연변이체 Aβ 펩티드의 시험관 내 조립을 촉진하는 것으로 나타났다(Yamamoto의 다수, 2005; Yamamoto의 다수, 2006). Aβ 올리고머가 뇌(특히 해마해부, 시각 피질 및 해마의 CA1 영역에 있는 신경원 내부)에 축적되는 Dutch APPE693Q 유전자이식 마우스의 생성 및 특성규명이 이루어진 결과, 이 마우스에서는 불안증과 학습 행동 결손이 나타나지만, 아밀로이드 반은 절대 생성되지 않았음이 확인되었다(Gandy의 다수, 2010). β-hex 표적화 "약리학적 샤프론"이 사용되어 β-hex 활성이 증가함에 따라서 GM2 수준이 감소하게 되면, Dutch APPE693Q 유전자이식 마우스에서는 Aβ 올리고머화도 감소하고, 행동 변화도 방지될 것이라는 가설이 세워졌다. 약리학적 샤프론은, 표적 단백질과 선택적으로 결합하고 이를 안정화하여 적절한 폴딩(folding)을 촉진하고, 미성숙 분해를 감소시키는 소형 분자로서 이의 작용에 있어서 신규한 치료 전략을 대표한다(Tropak의 다수, 2007; Maegawa 외 다수, 2007; Tropak의 다수, 2004; Rountree의 다수, 2009). 이러한 약리학적 샤프론은 단백질과 가역적으로 결합하여, 단백질 표적을 안정화하고, 이 단백질 표적의 반감기를 증가시키는 소형 분자이다. 낭포성 섬유증, 및 파브리병, 고셔병, 폼페병, 샌드호프병 및 테이삭스병을 포함한 몇몇 리소좀 저장 질환에 대한 약리학적 샤프론 치료법은 임상 실험을 통해 평가되었거나, 계속해서 평가되고 있다(Boyd의 다수, 2013; Wustman의 다수, 2012; Osher의 다수, 2011; Clarke의 다수, 2011).

[0030] 본 발명의 하나의 양태는 β-Hex에 표적화된 약리학적 샤프론을 사용하여 뇌 아밀로이드증, 예를 들어 알츠하이머병 및/또는 뇌 아밀로이드 혈관 병증을 치료 및/또는 예방하기 위한 투여 계획을 제공한다. 이러한 양태의 하나 이상의 구현예에서, 약리학적 샤프론은 2-아세트아미도-1,2-디데옥시노지리마이신(AdDNJ)이다.

[0031] 2-아세트아미도-1,2,5-트리데옥시-1,5-이미노-D-글루시톨로서도 공지된 AdDNJ는 하기 화학식을 가지는 화합물이다:



[0032]

[0033] AdDNJ는 상기 나타낸 바와 같은 유리된 형태로 투여될 수 있거나, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 용매 화물 또는 전구 약물의 형태로 투여될 수 있다.

[0034] 하나 이상의 구현예에서, AdDNJ는, AdDNJ의 샤프로닝(chaperoning) 및 억제 효과의 균형을 맞춘 독특한 투여 계획으로 투여된다. 예를 들어 AdDNJ는, AdDNJ가 적절한 폴딩(folding), 이주(trafficking), 비 응집(non-aggregation) 등을 가속화하여 β-hex 활성을 증강시키는 효소 증강 기간 동안에 투여될 수 있다. 효소 증강 기간 이후, 기질 턴오버 기간 동안 AdDNJ는 투여될 수 없어서, β-hex로부터 AdDNJ가 해리될 수 있도록 AdDNJ 농도가 억제 농도 미만으로 떨어지는 것이 허용되게 된다. 투여 계획은 제1 효소 증강 기간과 동일하거나 상이할 수 있는 제2 효소 증강 기간을 포함할 수 있다. 투여 계획은 제1 기질 턴오버 기간과 동일하거나 상이할 수 있는 제2 기질 턴오버 기간을 포함할 수 있다. 투여 계획은 또한 효소 증강 기간과 기질 턴오버 기간 간의 회전 반복을 포함할 수도 있다.

[0035] 예시적 효소 증강 기간은 수 시간으로부터 수 일에 이르는 범위에 있을 수 있다. 예를 들어 AdDNJ는 1 일에서

10 일의 기간 동안 하루에 1 회 또는 하루에 다수 회(2 회, 3 회, 4 회 등) 투여될 수 있다. 다양한 구현예에서, 효소 증강 기간은 약 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 8 시간, 10 시간, 12 시간, 24 시간, 36 시간, 48 시간, 60 시간, 72 시간, 96 시간, 120 시간, 또는 약 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 8 일, 9 일 또는 10 일이다.

[0036] 예시적 기질 턴오버 기간은 또한 수 시간으로부터 수 일에 이르는 범위에 있을 수 있다. 기질 턴오버 기간은, 연속적인 효소 증강 기간들 사이의 시간으로서 정의된다. 다양한 구현예에서, 효소 증강 기간은 약 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 8 시간, 10 시간, 12 시간, 24 시간, 36 시간, 48 시간, 60 시간, 72 시간, 96 시간, 120 시간, 또는 약 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 8 일, 9 일 또는 10 일이다. 예를 들어 만일 기질 턴오버 기간이 약 24 시간이고, 효소 증강 기간이 AdDNJ의 단일 투여로 이루어져 있다면, 연속적 AdDNJ 투여들 사이의 시간은 약 24 시간이다(즉, 하루에 1 회 투여). 이와 유사하게 만일 기질 턴오버 기간이 약 48 시간이고, 효소 증강 기간이 AdDNJ의 단일 투여로 이루어져 있다면, 연속적 AdDNJ 투여들 사이의 시간은 약 48 시간이다(즉, 이틀에 1 회 투여). 추가의 예들은 약 72 시간의 기질 턴오버 기간을 포함한다(예를 들어, 월요일과 목요일에 투여되되, 화요일과 수요일에는 투여되지 않음). 용어 "약 24 시간", "약 48 시간" 및 "약 72 시간"은 투여가 각 투여일의 동일한 시간에 이루어질 필요는 없으나, 다만 투여가 상이한 날에 이루어져야 함을 나타낸다.

[0037] 적합한 투여 계획의 예들은 하기와 같은 투여를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다:

[0038] a. 1 주일 중 5 연속일 동안(예를 들어, 월요일부터 금요일까지) 하루에 1 회, 2 회 또는 3 회;

[0039] b. 1 주일 중 7 일 동안(예를 들어, 월요일부터 일요일까지) 하루에 1 회, 2 회 또는 3 회;

[0040] c. 1 주일 중 3 연속일 동안(예를 들어, 월요일부터 수요일까지) 하루에 1 회, 2 회 또는 3 회;

[0041] d. 1 주일 중 3 불연속일 동안(예를 들어, 월요일, 수요일, 금요일) 하루에 1 회, 2 회 또는 3 회; 그리고

[0042] e. 하루에 1 회, 2 회 또는 3 회로 이틀마다.

[0043] 각각의 개별 투여는 AdDNJ, 이의 염, 용매화물 또는 전구 약물의 치료학적 유효량을 포함할 수 있다. 각각의 투여는 AdDNJ, 이의 염, 용매화물 또는 전구 약물 약 1 mg/kg 내지 약 1,000 mg/kg 범위의 양을 포함할 수 있다. 예시적 양은 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, 425 mg/kg, 450 mg/kg, 475 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg 및 1,000 mg/kg을 포함한다. 예시적 양은 또한 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1,000 mg, 1,100 mg, 1,200 mg, 1,300 mg, 1,400 mg, 1,500 mg, 1,600 mg, 1,700 mg, 1,800 mg, 1,900 mg, 2,000 mg, 2,500 mg, 3,000 mg, 3,500 mg, 4,000 mg, 4,500 mg, 5 g, 6 g, 7 g, 8 g, 9 g, 10 g, 11 g, 12 g, 13 g, 14 g, 15 g, 16 g, 17 g, 18 g, 19 g 및 20 g을 포함한다. 상이한 투여들 동안 투여된 양은 동일할 수 있거나, 또는 이와 같이 투여된 양은 다양할 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 양태는 β -Hex에 표적화된 약리학적 샤프론을 사용하여 뇌 아밀로이드증, 예를 들어 알츠하이머 병 및/또는 CAA를 치료 및/또는 예방하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 양태의 하나 이상의 구현예에서, 약리학적 샤프론은 2-아세트아미도-1,2-디데옥시노지리마이신(AdDNJ)이다. 키트는 약리학적 샤프론 유효량을 포함하는 투여형 하나 이상을 포함한다. 키트는 본원에 기술된 투여 계획들 중 임의의 것에 따른 약리학적 샤프론의 투여를 위한 지침을 포함할 수 있다. 키트는 또한 약리학적 샤프론을 포함하지 않는 비활성 투여형을 포함할 수도 있다. 활성 및/또는 비활성 투여형 중 어느 하나는 기타 다른 치료제, 예를 들어 조합 치료법에 적합한 치료제를 포함할 수 있다.

[0045] 약리학적 샤프론은 임의의 투여 경로에 적합하게 제제화될 수 있는데, 예를 들어 정제 또는 캡슐 또는 액체 형태의 경구 투여용, 또는 주사용 멸균 수용액 형태로 제제화될 수 있다. 약리학적 샤프론이 경구 투여용으로 제제화될 때, 정제 또는 캡슐은 약학적으로 허용 가능한 부형제, 예를 들어 결합제(예를 들어, 예비 젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들어, 락토스, 미세결정질 셀룰로스 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들어, 스테아르산마그네슘, 활석 또는 실리카); 붕해제(예를 들어, 감자 전분 또는 전분글리콜산나트륨); 또는 습윤제(예를 들어, 라우릴황산나트륨)와 함께 통상의 방법으로 제조

될 수 있다. 정제는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 코팅될 수 있다. 경구 투여용 액체 제제는, 예를 들어 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 가질 수 있거나, 아니면 사용 전 물이나 적합한 또 다른 비이클로 구성될 건조 생성물로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 제제는 약학적으로 허용 가능한 첨가제, 예를 들어 현탁제(예를 들어, 솔비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비이클(예를 들어, 아몬드 오일, 유질 에스테르, 에틸 알코올 또는 분별화된 식물성 오일); 또는 보존제(예를 들어, 메틸 또는 프로필 p-하이드록시벤조산염 또는 소르빈산)와 함께 통상의 방법으로 제조될 수 있다. 액체 제제는 또한 적절하게 완충제 염, 풍미제, 발색제 또는 감미제를 함유할 수도 있다. 경구 투여용 제제는 화합물이 제어 방출 또는 지연 방출되도록 적합하게 제제화될 수 있다.

[0046] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 화합물은 전신 분배 또는 흡수를 허용하는 투여형으로 투여되고, 그 결과 화합물은 신경원 세포에 효과가 발휘되도록 혈액뇌 장벽을 통과할 수 있게 된다. 이와 같이 전신 분배 또는 흡수를 허용하는 투여형은 경구 또는 비 경구 투여형일 수 있다. 몇몇 구현예에서, 화합물은 전신에(예를 들어, 혈액 뇌 장벽을 통과하여) 분배될 수 있다. 예를 들어 비 경구/주사용으로 사용되기 적합한 화합물의 약학 제제는 멸균 수용액(수용성인 경우), 또는 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 모든 경우, 형태는 멸균성이어야 하고, 용이하게 주사될 수 있을 정도로 유동성이어야 한다. 형태는 제조 및 보관 조건 하에서 안정적이어야 하며, 미생물, 예를 들어 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 캐리어는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 등), 이것들의 적합한 혼합물, 또는 식물성 오일을 함유하는 분산 매질 또는 용매일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅이 사용되고, 분산액의 경우에는 요구되는 입도가 유지되며, 또한 계면활성제가 사용됨으로써 유지될 수 있다. 미생물 활동의 억제제는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 벤질 알코올 및 소르빈산 등에 의해 이루어질 수 있다. 다수의 경우, 등장제, 예를 들어 당이나 염화나트륨을 포함하는 것이 합리적일 것이다. 주사 가능 조성물의 연장된 흡수는, 흡수를 지연시키는 제제의 조성물에, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 또는 젤라틴이 사용됨으로써 이루어질 수 있다.

[0047] 멸균 주사 용액은 필요에 따라서 상기 나열된 기타 다른 다양한 성분과 함께 화합물 필요량만큼을 적당한 용매에 혼합한 다음, 여과 또는 종말 멸균함으로써 제조된다. 일반적으로 분산액은, 기본이 되는 분산 매질 및 상기 나열된 것들로부터의 기타 다른 필요 성분들을 함유하는 멸균 비이클에, 멸균된 다양한 활성 성분들을 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액 제조용 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은, 활성 성분과 임의의 원하는 추가 성분의 분말을 이미 멸균 여과한 이것들의 용액으로부터 만들어내는 동결 건조 기술 및 진공 건조법이다.

[0048] 제제는 부형제를 함유할 수 있다. 제제에 포함될 수 있는, 약학적으로 허용 가능한 부형제는, 완충제, 예를 들어 시트르산염 완충제, 인산염 완충제, 아세트산염 완충제 및 중탄산염 완충제, 아미노산, 우레아, 알코올, 아스코르브산, 인지질; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 콜라겐 및 젤라틴; 염, 예를 들어 EDTA 또는 EGTA, 그리고 염화나트륨; 리포솜; 폴리비닐피롤리돈; 당, 예를 들어 텍스트란, 만니톨, 솔비톨 및 글리세롤; 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, PEG-4000, PEG-6000); 글리세롤; 글리신 또는 기타 다른 아미노산; 그리고 지질이다. 제제화에 사용되기 위한 완충제 계는 시트르산염; 아세트산염; 중탄산염; 및 인산염 완충제를 포함한다. 인산염 완충제가 통상적으로 사용되는 부형제이다.

[0049] 제제는 또한 비 이온성 세제를 함유할 수도 있다. 비 이온성 세제의 예들은 폴리솔베이트 20, 폴리솔베이트 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, 옥틸 α-글루코시드, 옥틸 β-글루코시드, Brij 35, Pluronic 및 Tween 20을 포함한다.

[0050] 치료제(들)는 경구 투여될 수 있거나, 정맥 내, 피하, 동맥 내, 복막 내, 안 내, 근육 내, 협측, 직장, 질 내, 안와 내, 뇌 내, 피 내, 두개 내, 척수 내, 뇌실 내, 초 내, 낭 내, 관절 낭 내, 폐 내, 비 내, 경 점막, 경 피로 또는 흡입을 통하여 비 경구 투여될 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에서, 치료제(들)는 경구 투여된다.

[0051] 치료제(들)의 투여는 제제 볼루스의 주기적인 주사에 의할 수 있거나, 아니면 저장기, 즉 외부 저장기(예를 들어, i.v. 백) 또는 내부 저장기(예를 들어, 생체 침식형 임플란트)로부터의 정맥 내 또는 복막 내 투여에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각 본원에 참고문헌으로 포함되어 있는 미국 특허 4,407,957 및 5,798,113을 참조한다. 폐 내 전달 방법 및 장치는, 예를 들어 미국 특허 5,654,007, 5,780,014 및 5,814,607(이 문헌들 각각은 본원에 참고문헌으로 포함됨)에 기술되어 있다. 기타 다른 유용한 비 경구 전달계는 에틸렌-비닐 아세트산염 공중합체 입자, 삼투 펌프, 이식 가능한 주입 계, 펌프 전달, 캡슐화된 세포 전달, 리포솜 전달, 바늘 전달 주사, 무 바늘 주사기, 분무기, 연무기, 전기침공 및 경피 패치를 포함한다. 무 바늘 전달 주사 디바이스는, 명세서가 본원에 참고문헌으로 포함되어 있는 미국 특허 5,879,327; 5,520,639; 5,846,233; 및 5,704,911에 기술되

어 있다. 상기 기술된 제제들 중 임의의 것은 이와 같은 방법들이 사용되어 투여될 수 있다.

[0052] 피하 주사는 자가 투여가 가능할 뿐만 아니라, 혈장 중 반감기가 정맥 내 투여에 비하여 연장된다는 이점을 갖는다. 더욱이 환자의 편의를 위해 디자인된 다수의 디바이스들, 예를 들어 리필 가능한 주사 펜 및 무 바늘 주사 디바이스는 본원에 논의된 본 발명의 제제와 함께 사용될 수 있다.

[0053] 적합한 약학 제제는 단위 투여형을 하고 있다. 이 제제는 이러한 형태일 때 적절한 양, 예를 들어 원하는 목표를 달성하는데 유효한 양의 활성 성분을 함유하는, 적합한 크기의 단위 용량으로 세분된다. 특정 구현예에서, 치료제(들)는 1 개 이상의 1 일 용량(예를 들어, 1 일 1 회, 1 일 2 회 또는 1 일 3 회)으로 투여된다. 특정 구현예에서, 치료제(들)는 간헐적으로 투여된다.

[0054] 본 발명의 하나 이상의 구현예에 의하면, 치료될 개체는 임의의 뇌 아밀로이드증이 발병할 수 있거나 발병할 위험이 있을 수 있다. 이와 같은 뇌 아밀로이드증은 알츠하이머병 및 뇌 아밀로이드 혈관 병증(CAA)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어 뇌 아밀로이드증은 조기 발생 가족성 알츠하이머병을 비롯한 알츠하이머병의 임의의 형태일 수 있다. 뇌 아밀로이드증은 또한 CAA의 유전적 형태를 비롯한 CAA의 임의의 형태, 그리고 알츠하이머병을 수반하는 CAA일 수도 있다. 개체는 뇌 아밀로이드증에 대한 위험 인자를 가질 수 있거나, 또는 뇌 아밀로이드증으로 발달할 위험이 있을 수 있다. 이러한 위험 인자들은, 알츠하이머병 및 CAA의 증가된 발달 위험과 연관된 아포리포단백질 E의 ApoE4 대립 형질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 개체는 이미 뇌 아밀로이드증으로 진단된 개체일 수 있다. 더욱이, 개체는 뇌 아밀로이드증으로 진단되지 않은 개체일 수 있지만, 질병들 중 어느 하나의 전형적 특징을 나타낸다. 추가의 구현예에서, 알츠하이머병은 다운 증후군에 의해 유발되거나 이와 연계되어 있다.

[0055] 또한 치료법은 하나 이상의 약리학적 샤프론의 조합을 포함할 수 있으며, 또한 기타 다른 공지의 알츠하이머 치료법 또는 기타 다른 뇌 아밀로이드증과 조합될 수도 있다. 치료는 또한 1 개, 2 개, 3 개 또는 이 이상의 약리학적 샤프론의 조합, 또는 글루코실세라마이드 합성효소의 하나 이상의 억제제와 1 개, 2 개, 3 개 또는 이 이상의 샤프론의 조합을 포함할 수도 있다. 글루코실세라마이드 합성효소의 하나 이상의 억제제와 함께 하나 이상의 샤프론을 포함하는 조합 치료법은 강글리오사이드 활성을 증가시키고 글루코실세라마이드 합성효소 활성을 감소시킬 수 있다.

[0056] 정의

[0057] 본 명세서에 사용된 용어들은 일반적으로 본 발명의 맥락 및 각각의 용어가 사용된 특정 맥락 중에서 당업계에 통상적인 의미를 가진다. 특정 용어들이 이하에, 또는 본 명세서의 다른 부분에 논의되어 있어서, 본 발명을 설명하고, 본 발명을 어떻게 달성해서 이용하느냐에 있어서 실무자에게 추가의 안내를 제공한다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "약리학적 샤프론"은, 하나 이상의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제, 또는 글루코세레브로시다아제에 특이적으로 결합하는 분자를 지칭하며, 다음과 같은 효과들 중 하나 이상을 가진다: (i) 단백질의 안정적인 분자 입체구조 형성의 증강; (ii) ER로부터 또 다른 세포 지역, 바람직하게는 원산 세포 지역으로의 단백질의 적절한 이주 증강, 즉 단백질의 ER-연관 분해 방지; (iii) 입체구조상으로 불안정적인, 즉 미스폴딩된 단백질 응집 방지; (iv) 단백질의 적어도 부분적인 야생형 기능, 안정성 및/또는 활성의 복구 또는 증강; 및/또는 (v) 세포의 표현형 또는 기능의 개선. 그러므로 강글리오시다아제 또는 시알리다아제에 대한 약리학적 샤프론은, 하나 이상의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제에 결합하여, 적절한 폴딩, 이주, 비 응집, 그리고 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제의 증가된 활성을 초래하는 분자이다. 상기 샤프론은 단백질 안정성을 증강하는 특이적 결합 분자, 예를 들어 활성 위치 특이적 샤프론, 억제제, 알로스테릭 결합제, 비활성 위치 결합제를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 약리학적 샤프론, 예를 들어 AdDNJ는 β -Hex에 특이적이다.

[0059] 용어 "약리학적 샤프론(PC)"은, 표적 단백질과 선택적으로 결합하여 이를 안정화함으로써 적절한 폴딩을 촉진하고, 미성숙 분해를 감소시키며, ER 수송의 효율을 증가시키는 소 분자를 지칭한다. 상기 소 분자는 단백질이 그것이 합성된 곳(ER)으로부터 벗어나 의도되는 지역(예를 들어, 리소좀 또는 세포 표면)으로 이동하는 것을 도와 주므로 "샤프론"이라 칭하여진다. 이 분자는, 단백질 표적에 결합하여 이를 안정화하고, 적절한 이주를 복구한 다음 해리되는 것을 도와, 단백질이 자체의 적절한 기능을 수행할 수 있도록 돕는 가역적 결합제이다. "약리학적"이라는 수식어는, 분자가 오로지 단일의 의도된 단백질 표적과만 상호작용하여 이를 안정화하도록 디자인되고, PC는 일반적으로 다수의 단백질 또는 세포 과정, 예를 들어 단백질 이주, ER의 품질 제어, 프로테아좀 기능, 또는 생체 샤프론(예를 들어, 열 충격 단백질)의 활성에 영향을 미치지 않을 때의 분자의 특이성을 의미한다.

다. 이 접근법은 특히 단백질(돌연변이체 또는 야생형)의 기능 증가가 치료 이익을 제공할 것으로 예측되는 질병들에 광범위하게 적용 가능하다.

- [0060] 잘못 폴딩된 단백질의 정체 및 미성숙 분해는 돌연변이체 단백질에 제한되지 않는다. 새로이 합성된 단백질 전부의 큰 분획(30% 이하)은 프로테아좀에 의한 미성숙 분해에 표적화되는 것이 확인되었다. 후속 연구들은, 약리학적 샤프론이 단백질 폴딩, 안정성 및 ER 수송을 촉진함으로써 다수의 야생형 단백질에 대한 세포 수준을 증가시킬 수 있음을 나타내었다.
- [0061] **분자 샤프론은 단백질 입체구조를 안정화한다.** 인간의 몸에서 단백질은 세포 기능의 거의 모든 양태에 수반된다. 특정 인간 질병은 단백질의 아미노산 서열 변화를 유발하는 돌연변이, 즉 단백질 자체의 안정성을 감소시키고, 단백질이 적절하게 폴딩되는 것을 막을 수 있는 돌연변이로 말미암는다. 덜 안정적이거나 미스폴딩된 단백질의 생성을 유도하는 유전자 돌연변이 대다수는 미스센스 돌연변이라고 칭하여진다. 이와 같은 돌연변이는 단백질 내 다른 아미노산에 대해 하나의 아미노산의 치환을 초래한다. 이와 같은 오류로 말미암아 미스센스 돌연변이는 종종 생체 활성 수준이 감소된 단백질을 만들어낸다. 미스센스 돌연변이 이외에도, 생체 활성 수준이 감소된 단백질을 만들어낼 수 있는 기타 다른 유형의 돌연변이들이 존재한다.
- [0062] 단백질은 일반적으로 소포체 또는 ER로 공지된 세포의 특이 영역에서 폴딩된다. 세포는, 일반적으로 단백질 이주라고 지칭되는 과정에 들어가기 전, 즉 단백질이 세포 내 ER에서 적절한 목적지로 이동할 수 있게 되기 전, 이 단백질이 자체의 올바른 3차원 모양으로 폴딩되는 것을 보장하는 품질 제어 기작을 갖는다. 미스폴딩되고/미스폴딩되거나 불안정적인 단백질은 종종 처음에는 ER 내에 머물러 있다가 품질 제어 기작에 의해 제거된다. 특정 경우에서, 미스폴딩된 단백질은 제거되기 전 ER 내에 축적될 수 있다.
- [0063] 미스폴딩된 단백질의 ER 내 정체는 이 단백질의 적절한 이주를 방해하고, 이로 말미암아 감소된 생체 활성은 손상된 세포 기능을 유도할 수 있으며, 궁극적으로는 질병을 유발할 수 있게 된다. 게다가 ER 내 미스폴딩된 단백질의 축적은 세포에 다양한 유형의 스트레스를 유도할 수 있는데, 이는 또한 세포 기능장애와 질병을 유발시킬 수도 있다.
- [0064] 내부 분자 샤프론은 실질적으로 모든 유형의 세포와 대부분의 세포 구획에 존재한다. 일부는 단백질 운반에 수반되고, 열 충격 및 글루코스 기아와 같은 스트레스 하에서도 세포가 생존하도록 허용한다. 내부 샤프론(분자 샤프론)들 가운데 BiP(면역글로불린 중쇄 결합 단백질, Grp78)는 가장 잘 특성규명된 ER의 샤프론이다. 기타 다른 샤프론과 마찬가지로, BiP는 단백질의 성숙 과정 전반에 걸쳐 ER 내 다수의 막 단백질 및 분비 단백질과 상호작용한다. 신생 단백질의 폴딩이 원활하게 진행될 때, 이와 같은 상호작용은 보통 약하면서 짧은 기간 동안 일어난다. 일단 원산 단백질의 입체구조가 달성되면, 분자 샤프론은 더 이상 단백질과 상호작용하지 않는다. 폴딩, 조립 또는 적절한 글리코실화에 실패한 단백질과 BiP의 결합은 안정적으로 되고, 일반적으로는 ER 연관 분해 경로를 통해 단백질의 분해를 유도한다. 이 과정은 오로지 적절하게 폴딩 및 조립된 단백질만이 추가의 성숙을 위해 ER로부터 운반되는 것을 보장하면서, ER에서 "품질 제어" 계로서의 역할을 하고, 부적절하게 폴딩된 단백질 또는 불안정적인 단백질은 추후의 분해를 위해 머물러있게 된다. 열역학적 단백질 폴딩 과정의 비효율성 및 ER 품질 제어계의 조합 작용으로 말미암아, 몇몇 야생형 단백질의 오로지 일부분만이 안정적인 입체구조로 폴딩되어 ER을 성공적으로 탈출하게 된다.
- [0065] **특이적 효소 억제제로부터 유도되는 약리학적 샤프론은 돌연변이체 효소를 구조하고, 야생형 효소를 증강시킨다.** 예를 들어 리소좀 축적 질병(LSD)과 연관된 효소의 소 분자 억제제의 결합은 돌연변이체 효소와 상응하는 야생형 효소 둘 다의 안정성을 증가시킬 수 있다(모두 본원에 참고문헌으로 포함되어 있는 미국 특허 6,274,597; 6,583,158; 6,589,964; 6,599,919; 6,916,829 및 7,141,582 참조). 특히 몇몇 표적 리소좀 효소에 대한 특이적이고 선택적인 경쟁적 억제제인 글루코스 및 갈락토스의 소 분자 유도체들의 투여는, 세포 내 효소의 안정성을 시험관 내에서 효과적으로 증가시키므로, 효소의 리소좀으로의 이주를 증가시켰음이 발견되었다. 따라서 리소좀 내 효소의 양이 증가하면, 효소 기질의 가수분해도 증가할 것으로 예상된다. 돌연변이체 효소 단백질은 ER 내에서 불안정적이므로, 효소 단백질은 정상 운반 경로(ER → 골지체 → 엔도솜 → 리소솜)에서 지연되어 미성숙하게 분해된다. 그러므로 돌연변이체 효소에 결합하여 이 돌연변이체 효소의 안정성을 증가시키는 특정 화합물은, 효소에 대한 "샤프론"으로서 사용될 수 있으며, ER을 탈출하여 리소솜으로 이동할 수 있는 효소의 양을 증가시킬 수 있다.
- [0066] 몇몇 효소 억제제가 효소의 촉매 중심("활성 위치")에 특이적으로 결합하여, 효소 입체구조의 시험관 내 안정화를 초래하는 것으로 공지되어 있으므로, 이와 같은 억제제들은 (다소 역설적이겠지만) ER로부터의 탈출, 리소솜으로의 이주, 가수분해 활성을 복구하는 것을 도울 수 있는 유효 샤프론인 것으로 제안되었다. 이와 같이 특이

적인 약리학적 샤프론은 특이적인 방식으로 효소의 활성 위치에 결합하였으므로, 상기 샤프론은 "활성 위치 특이적 샤프론(ASSC)" 또는 "특이적인 약리학적 샤프론"이라고 명명되었다. 소 분자는 경구 투여될 수 있고, 단백질 기반 치료법들과 비교되었을 때 월등한 생체분배능을 가질 수 있으므로, 약리학적 샤프론 치료법은 효소 대체 치료법(ERT)에 비하여 잠재적인 이점을 갖는다.

- [0067] 약리학적 샤프론은 돌연변이체 효소를 구조하는 것 이외에 야생형 효소의 활성 및 ER 분비를 증강한다. 그러므로 폴딩시 효소의 안정적인 분자 입체구조를 유도하는 화합물은 효소를 ER로부터의 탈출에 적절한 입체구조로 안정화하는 "샤프론"으로서 사용된다.
- [0068] 용어 "강글리오사이드" 또는 "시알로강글리오사이드"는, 하나 이상의 N-아세틸뉴라민산(시알산, NeuAc) 잔기를 보유하는 올리고당체 사슬과 N-아실스핑고신으로 이루어진 글리코스핑고지질을 지칭한다.
- [0069] 용어 "아시알로강글리오사이드"는, N-아세틸뉴라민산(시알산, NeuAc) 잔기를 가지지 않는 강글리오사이드를 지칭하고, LacCer, GA2 및 GA1(Ariga의 다수)을 포함한다.
- [0070] 용어 "강글리오시다아제"는, 아시알로강글리오사이드 및 강글리오사이드의 비 환원성 말단 단위로부터 개별 N-아세틸뉴라민산(시알산, NeuAc) 및 당 잔기를 연속하여 제거하는 엑소글리코하이드롤라아제 및 시알리다아제를 지칭한다. 이러한 분해는 주로 엔도시토시스-엔도솜-리소솜 경로를 통해 일어난다. 강글리오시다아제의 예들로서는 시알리다아제 2(뉴라미니다아제 2; NEU2), 시알리다아제 3(뉴라미니다아제 3; NEU3), 시알리다아제 4(뉴라미니다아제 4; NEU4), β -갈락토시다아제(GLB1), β -헥소사미니다아제 A(HEXA/HEXB), β -헥소사미니다아제 B(HEXB) 및 β -헥소사미니다아제 S(HEXS)를 포함한다.
- [0071] 용어 "시알리다아제"는, 당단백질, 올리고당체 및 강글리오사이드의 비 환원성 말단 단위로부터 개별 N-아세틸뉴라민산(시알산, NeuAc) 잔기를 제거하는 효소를 지칭한다. 용어 "시알리다아제"는 엔도솜-리소솜 경로에서 강글리오사이드로부터 개별 N-아세틸뉴라민산 잔기를 제거하는 효소 시알리다아제 2(뉴라미니다아제 2), 시알리다아제 3(뉴라미니다아제 3) 및 시알리다아제 4(뉴라미니다아제 4)와, 당단백질 및 올리고당체로부터 개별 N-아세틸뉴라민산 잔기를 제거하는 시알리다아제 1을 포함한다. 강글리오사이드 상에 있는 N-아세틸뉴라민산 잔기는 A β 결합 친화성을 증가시키고, β -시트 입체구조를 유도하는 경향을 증가시키는 것으로 확인되었다. 최근에는 APP/PSEN 마우스(APP^{swe} + PSEN1 AE9)에서 디시알로강글리오사이드 합성효소(GD3S)가 녹아웃(knockout)되면, APP/PSEN 마우스의 특징을 이루는 A β 축적 및 이로 말미암은 기억 결손의 발달 둘 다가 방지되는 것이 보고되었다. Bernardo, et al, Neurobiology of Aging. In Press, Corrected Proof, "Elimination of GD3 synthase improves memory and reduces amyloid- [beta] plaque load in transgenic mice". GD3S는 α -2,8-결합을 통해 시알산과 시알산을 연결하며, b-시리즈 및 c-시리즈 강글리오사이드 합성에 필요하다. 이러한 결과들은, 강글리오사이드 중 시알산 함량의 감소가 AD 치료에 유리할 수 있음을 시사한다.
- [0072] 리소솜 효소 " β -갈락토시다아제"는 아시알로- 및 시알로-강글리오사이드의 비 환원성 말단으로부터 β -1,3-갈락토스를 제거하는 엑소하이드롤라아제이다. β -갈락토시다아제 GLB1을 암호화하는 유전자의 돌연변이는, β -갈락토시다아제 활성 결핍 및 GA1 및 GM1 강글리오사이드의 축적으로 말미암은 리소솜 저장 질환 GM1 강글리오사이드증을 유발한다. Beutler, E.외 다수, Biol. Chem. 247(22): 7195-200 (1972). GM1 강글리오사이드는 세포 배양액 중 A β 의 생성 및 조립을 촉진하는 마이크로도메인의 주요 성분이고, GM1에 결합된 A β (β A β)는 AD 병적 측면의 초기 단계를 나타내는 뇌 내에서 발견되었다.
- [0073] 리소솜 효소 β -헥소사미니다아제 A 및 B는 아시알로- 및 시알로-강글리오사이드의 비 환원성 말단으로부터 β -결합된 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 가수분해한다. GM1 강글리오사이드는 지대한 관심을 받아오고 있는 한편, 기타 다른 a-시리즈 강글리오사이드(GD1A, GM2 및 GM3)는 또한 시험관 내에서 A β 와 결합하여 이의 조립을 촉진한다.
- [0074] β -헥소사미니다아제의 동질효소는 HEXA 및 HEXB로서 2 개 존재한다. HEXA는 α -서브유닛 및 β -서브유닛으로 이루어져 있는 한편($\alpha\beta$), HEXB는 β -서브유닛 2 개로 이루어져 있다($\beta\beta$). HEXA는 HEXA의 α -서브유닛을 암호화하고, HEXB는 HEXA와 HEXB의 β -서브유닛을 암호화한다. HEXA의 돌연변이는, HEXA 활성 결핍 및 GM2 축적으로 말미암은 리소솜 저장 질환 테이삭스병을 유발시킨다. HEXB 돌연변이는, HEXA 및 HEXB 활성 결핍과, GM2 및 GA2의 축적으로 말미암은 리소솜 저장 질환인 샌드호프병을 유발시킨다.
- [0075] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "특이적으로 결합하다"는, 약리학적 샤프론과, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제, 또는 글루코세레브로시다아제가 상호작용하는 것, 특히 약리학적 샤프론과, 약리학적 샤프론과의 접촉

에 직접 참여하는 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제, 또는 글루코세레브로시다아제의 아미노산 잔기가 상호작용하는 것을 지칭한다. 약리학적 샤프론은 표적 단백질, 예를 들어 β -헥소사미니다아제 B에 특이적으로 결합하여, 효소에 대해서 샤프론 효과를 발휘시키되, 관련 단백질 또는 관련되지 않은 단백질의 일반 군에 대해서는 샤프론 효과를 발휘시키지 않는다. 임의의 소정 약리학적 샤프론과 상호작용하는 β -헥소사미니다아제의 아미노산 잔기는 단백질의 "활성 위치" 내에 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있다. 특이적 결합은 통상의 결합 검정법(예를 들어, 억제, 열 안정성) 또는 구조 연구(예를 들어, 공결정화 및 NMR 등)를 통하여 평가될 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "안정성을 증강하다" 또는 "안정성을 증가시키다"는, 시험관 내에서, 또는 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제에 특이적인 약리학적 샤프론과 접촉한 세포 내에서의 비가역적 비활성화에 대한 효소의 내성을, (바람직하게는, 예를 들어 더욱 이른 시기에 있는, 상기 세포와 동일 세포 류 또는 동일 세포의) 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제에 특이적인 약리학적 샤프론과 접촉하지 않은 세포 내에서의 비가역적 비활성화에 대한 효소의 내성에 비해 증가시키는 것을 지칭한다. 단백질 안정성이 증가하면, ER 내 단백질의 반감기와, ER로부터 이주한 기능성 단백질의 양도 증가한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 야생형 강글리오시다아제 또는 시알리다아제, 또는 글루코세레브로시다아제의 안정성은 증강 또는 증가한다. 본 발명의 다른 양태에서, 돌연변이체 강글리오시다아제 또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 입체구조 안정성은 증강 또는 증가한다.

[0077] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이주를 증강하다" 또는 "이주를 증가시키다"는, 하나 이상의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제에 특이적인 약리학적 샤프론과 접촉한 세포의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 시토졸로의 운반(시알리다아제 2)의 효율이나, 엔도솜 및 리소솜의 운반의 효율을, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제에 특이적인 약리학적 샤프론과 접촉하지 않은 (바람직하게는, 예를 들어 더욱 이른 시기에 있는, 상기 세포와 동일 세포 류 또는 동일 세포의) 세포의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 운반의 효율에 비하여 증가시키는 것을 지칭한다.

[0078] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "활성을 증강하다" 또는 "활성을 증가시키다"는, 본원에 기술된 바와 같은 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의, 하나 이상의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제에 특이적인 약리학적 샤프론과 접촉한 세포 내에서의 활성을, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의, 하나 이상의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제에 특이적인 약리학적 샤프론과 접촉하지 않은 (바람직하게는, 예를 들어 더욱 이른 시기에 있는, 상기 세포와 동일 세포 류 또는 동일 세포의) 세포 내에서의 활성에 비하여 증가시키는 것을 지칭한다. 본 발명의 약리학적 샤프론은 또한 세포 내 효소의 총량을 증가시키고/증가시키거나 효소의 비활성(specific activity)을 증가시킴으로써 효소 활성을 증가시킬 수 있다.

[0079] 용어 "비 활성"이란, 단위 시간당 효소 제제 중 단백질 1 밀리그램당 효소가 전환하는 기질의 양을 지칭한다.

[0080] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "수준을 증강하다" 또는 "수준을 증가시키다"는, 하나 이상의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제에 특이적인 약리학적 샤프론과 접촉한 세포 내에서의 하나 이상의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 수준을, 하나 이상의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제에 특이적인 약리학적 샤프론과 접촉하지 않은 (바람직하게는, 예를 들어 더욱 이른 시기에 있는, 상기 세포와 동일 세포 류 또는 동일 세포의) 세포 내에서의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 수준에 비하여 증가시키는 것을 지칭한다.

[0081] 용어 "적절한 입체구조를 안정화하다"는, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 약리학적 샤프론이, 의도된 기능을 수행하는 야생형 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 입체구조와 기능상 동일한, 돌연변이체 또는 야생형 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 효소의 입체구조를 유도 또는 안정화하는 능력을 지칭한다.

[0082] 용어 "기능상 동일한"이란, 입체구조에 심각하지 않은 변이가 있을 수 있을 때(거의 모든 단백질은 생리적 상태에서 입체구조상 어느 정도 가요성을 보임), 입체구조상 가요성이, 야생형 단백질의 입체구조상 가요성에 비하여, (1) 단백질 응집, (2) 소포체 연관 분해 경로를 통한 제거, (3) 단백질 기능, 예를 들어 APP 대사 활성의 손상 및/또는 (4) 세포 내 부적절한 운반, 예를 들어 시토졸로의 편재화를 다소간 초래하지 않는 경우를 의미한다.

- [0083] 용어 "안정적인 분자 입체구조"는, 세포 내에서 적어도 부분적으로나마 야생형 기능을 제공하거나 야생형 기능을 증강하는 약리학적 샤프론에 의해 유도된, 단백질, 즉 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 입체구조를 지칭한다. 예를 들어 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 안정적인 분자 입체구조는, 미스폴딩 및 분해되고/분해되거나 의도된 기능을 수행하지 못하는 것이 아니라, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제가 ER을 떠나서 시토졸로 이주하는 경우의 상기 효소들의 분자 입체 구조일 것이다. 또한 돌연변이된 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 안정적인 분자 입체구조는 또한 전체 활성 또는 부분적 활성을 가질 수 있다. 그러나 안정적인 분자 입체구조가 야생형 단백질의 기능적 속성 모두를 가질 필요는 없다.
- [0084] 용어 "활성"은, 야생형 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 세포 내 의도된 정상 생리학적 기능을 지칭한다. 예를 들어 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 활성은 강글리오사이드의 이화를 포함하고, 글루코세레브로시다아제 활성은 글리코스핑고지질 글루코실세라미드의 이화를 포함한다. 이러한 기능성은 기능성을 정립하는 것으로 공지된 임의의 방법에 의해 시험될 수 있다.
- [0085] 용어 "강글리오사이드 이화"는, 세라미드가 형성됨과 아울러, 개별 시알산 및 당 잔기들이 시알리다아제 및 엑소글리코하이드롤라아제에 의해 아시알로- 및 시알로-강글리오사이드의 비 환원성 말단 단위로부터 연속 제거되는 것을 지칭한다. 이러한 분해는 주로 시토졸 내에 위치하는 시알리다아제 2가 제외된 엔도시토시스-엔도솜-리소좀 경로를 통하여 일어난다.
- [0086] 하나의 비 제한적 구현예에서, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 폴리펩티드는, 야생형 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제를 암호화하는 핵산 분자와, 50%, 60%, 70% 초과, 80% 초과 및 100% 이하의 상동성을 나타내는 임의의 핵산 분자, 그리고 표준 조건 하에서 이러한 서열들에 잡종화하는 임의의 서열에 의해 암호화될 수 있다. 다른 비 제한적 구현예에서, (상기 언급된 폴리펩티드 서열들과 동일한 기능적 특성 및 결합 친화성을 가지는) 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 폴리펩티드를 암호화하는 임의의 기타 다른 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 ER 내에서 기능적 입체구조를 달성하는 능력을 가지는 정상 개체의 대립 형질 변이체는 세포 내에서 적절한 편재화를 달성하고, 야생형 활성을 나타낸다.
- [0087] 본원에 사용된 용어 "돌연변이체" 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제는, 변경된 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 아미노산 서열을 생성하는 유전자 돌연변이를 함유하는 유전자로부터 번역된 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 폴리펩티드를 지칭한다. 하나의 구현예에서, 돌연변이는 ER 내에 정상적으로 조성되는 조건 하에서, 야생형 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 입체구조와 비교되었을 때, 원산 (native) 입체구조를 달성하지 못하거나, 또는 야생형 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 안정성 또는 활성과 비교되었을 때 감소된 안정성 또는 활성을 나타내는, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 단백질을 생성한다. 이와 같은 유형의 돌연변이는 본원에서 "입체구조 돌연변이"라 지칭되며, 이러한 돌연변이를 보유하는 단백질은 "입체구조 돌연변이체"라 지칭된다. 이와 같은 입체구조를 달성하는데 실패하면, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 단백질은, 단백질 운반 계의 정상적인 경로를 통해 자체의 세포내 원산 위치 또는 세포 외 환경으로 운반되 기보다는 분해 또는 응집된다. 몇몇 구현예에서, 돌연변이, 예를 들어 전사 효율, 스플라이싱 효율 및 mRNA 안정성 등에 영향을 미치는 돌연변이는 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제를 암호화하는 유전자의 비 암호화 부분에서 발생할 수 있고, 그 결과 단백질 발현 효율은 떨어지게 된다. 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 야생형 및 입체구조 돌연변이 변이체의 발현 수준이 증강될 때, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 약리학적 샤프론의 투여는 이와 같은 비효율적 단백질 발현으로 말미암은 결손을 경감시킬 수 있다.
- [0088] 특정 시험은 실제 생체 내 활성에 상응할 수 있거나 상응할 수 있지 않지만, 단백질 기능을 가지는 적절한 대응 물이기는 한 단백질의 속성을 평가할 수 있고, 이러한 시험에서 야생형의 행동은 본 발명의 단백질 폴딩 구조 또는 증강 기법을 지지하는 증거를 입증한다. 본 발명에 의한 이와 같은 활성 하나는 기능성 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제의 소포체로부터 시토졸로의 적절한 운반이다.
- [0089] 용어 "내부 발현" 및 "내부적으로 발현된"은, 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 결핍, 지배적 네가티브 돌연변이체의 과발현, 또는 기타 다른 결손, 예를 들어 발현, 활성 또는 안정성을 변경, 예를 들어 억제하는 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제 핵산 또는 폴

리펩티드 서열에서의 돌연변이와 연관된 질병 또는 질환이 발병하지 않았거나 발병한 것으로 의심되지 않는 개체에 있어서 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 세포 내 정상 생리학적 발현을 지칭한다. 이 용어는 또한 건강한 개체에 있어서 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제가 정상적으로 발현되는 세포 또는 세포 류 내에서의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 발현을 지칭하기도 하고, 건강한 개체에 있어서 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제가 발현되지 않는 세포 또는 세포 류, 예를 들어 종양 세포 내에서의 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제 또는 글루코세레브로시다아제의 발현을 포함하지 않는다.

- [0090] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "증가된 강글리오사이드"는, 개체, 환자 또는 환자 집단의 뇌 내 강글리오사이드 수준이 증가한 경우를 지칭한다. 강글리오사이드 수준은 세포 전반에 걸친 막뿐만 아니라, 마이크로도메인 내에서도 증가할 수 있다. 용어 "마이크로도메인" 또는 "지질 뗏목(lipid raft)"은, 콜레스테롤, 글리코스핑고지질 및 강글리오사이드가 풍부한 세포 막내에서 발견되는 세포 내성 구역을 지칭한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 약리학적 샤프론은 뇌 내에서 강글리오사이드를 이화하는 것으로 공지된 효소의 활성을 증가시킴으로써 마이크로도메인 또는 지질 뗏목 내 강글리오사이드 수준을 감소시키는데에 사용된다.
- [0091] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "운반 효율"은, 소포체로부터 나와서 자체의 세포 내 원산 위치, 세포막 또는 세포 외 환경으로 운반될 대의 단백질의 능력을 지칭한다.
- [0092] 효소의 "경쟁적 억제제"는, 효소 기질의 화학 구조 및 분자 기하학적 구조와 구조적으로 닮아서 기질의 효소 결합 지역과 거의 동일한 지역에서 효소와 결합하는 화합물을 지칭할 수 있다. 그러므로 억제제는 기질 분자의 활성 위치와 동일한 활성 위치에 대해 경쟁하는 관계로 Km을 증가시킨다. 만일 충분한 기질 분자가 억제제를 대체하는 것이 가능하면, 경쟁적 억제는 보통 가역적이다(다시 말해서 경쟁적 억제제는 가역적으로 결합할 수 있다). 그러므로 효소 억제 양은 억제제 농도, 기질 농도, 그리고 활성 위치에 대한 기질과 억제제의 상대적 친화성에 의존적이다.
- [0093] 비고전적 경쟁적 억제제는, 억제제가 효소의 활성 위치와 멀리 떨어진 곳에 결합하여 효소에 입체구조 변화를 일으키고, 그 결과 기질이 더 이상 효소와 결합하지 못하게 될 때 일어난다. 비고전적 경쟁적 억제에서, 활성 위치에서의 기질의 결합은 별도의 위치에서의 억제제의 결합을 막거나, 활성 위치에서의 억제제의 결합은 별도의 위치에서의 기질의 결합을 막는다. 이는 알로스테릭 억제를 포함한다.
- [0094] 효소의 "선형 혼합 억제제"는, 기질의 결합을 허용하되, 친화성은 감소시키고, 이에 따라 Km을 증가시키고 Vmax를 감소시키는, 일종의 경쟁적 억제제이다.
- [0095] "비 경쟁적 억제제"는, 효소와 강력한 결합을 형성하고, 과량의 기질이 첨가되더라도 대체될 수 없는 화합물을 지칭하는데, 다시 말해서 비 경쟁적 억제제는 비가역적일 수 있다. 비 경쟁적 억제제는 효소 또는 단백질의 활성 위치, 활성 위치 근처 또는 활성 위치와 멀리 떨어진 곳에서 효소 또는 단백질과 결합할 수 있고, 효소와 관련하였을 때 상기 비 경쟁적 억제제는 Km에 영향을 미치지 않지만, Vmax를 감소시킨다. 비 경쟁적 억제제는, 억제제가 오로지 효소-기질(ES) 복합체에만 결합하는 경우를 지칭한다. 효소는 억제제와 결합할 때 비활성이 된다. 이는, 기질의 부재 중에 효소와 결합할 수 있는 비고전적 경쟁적 억제제와 상이하다.
- [0096] 용어 "Vmax"는 (가령, 포화 기질 수준에서) 효소 촉매 반응의 최대 초속도를 지칭한다. 용어 "Km"은 Vmax의 2분의 1을 달성하는데 필요한 기질 농도이다.
- [0097] 효소 "증강제"는 강글리오시다아제 및/또는 시알리다아제에 결합하여, 효소 반응 속도를 증가시키는 화합물이다.
- [0098] 용어 "치료학적 유효 용량" 및 "유효량"은, (길항제의 경우) 적절한 세포 지역에서 이미 발현된 단백질을 억제하지 않거나, 또는 (작동제의 경우) 적절한 세포 지역으로부터 단백질의 리간드 매개 수용체 내부화를 유도하지 않으면서, (기능적 입체구조를 허용하는) ER 내에서 단백질 가공을 증강하고, 표적 단백질의 활성을 증강하여, 피험체 내 치료 반응을 달성하는데 충분한 양을 지칭한다. 치료 반응은, 사용자(예를 들어, 임상)가 치료법에 대한 유효 반응(앞서 말한 증상 및 대응 임상 마커를 포함함)으로서 인지할 임의의 반응일 수 있다. 그러므로 치료 반응은 일반적으로 질병 또는 질환, 예를 들어 알츠하이머병의 증상 하나 이상의 완화 또는 억제일 것이다.
- [0099] 어구 "약학적으로 허용 가능한"은, 분자 실체 및 조성물이 인간에 투여될 때 생리학적으로 관용성이고, 통상 부 반응을 일으키지 않는 경우를 지칭한다. 바람직하게 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약학적으로 허용 가능한"은, 동물, 더욱 구체적으로는 인간에 적용되는 것으로서 연방 또는 주 정부의 관리 기관에 의해 승인되

었거나, 미국 약전, 또는 일반적으로 공인된 기타 다른 약전에 나열되어 있음을 의미한다. 용어 "캐리어"는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 보조제, 부형제 또는 임의의 비이클을 지칭한다. 이러한 약학적 캐리어는, 예를 들어 멸균 액체, 예를 들어 물 및 오일일 수 있다. 물 또는 수용액인 염수 용액과 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액은, 특히 주사용 용액을 위한 캐리어로서 사용되는 것이 바람직하다. 적합한 약학적 캐리어는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, 18th Edition, 또는 이전 및 이후 판]에 기술되어 있다.

[0100] 용어 "약" 및 "대략적으로"는 일반적으로 측정치의 성질 또는 정확도에 주어진, 측정된 양에 대하여 허용 가능한 오차의 정도를 의미할 것이다. 통상 예시적 오차의 정도는 소정의 값 또는 값의 범위의 20 퍼센트(%) 이내, 바람직하게는 10% 이내, 더욱 바람직하게는 5% 이내이다. 대안적으로, 그리고 특히 생체 계에서 용어 "약" 및 "대략"은 소정 값의 10 배 이내, 바람직하게는 5 배 이내, 더욱 바람직하게는 2 배 이내의 값을 의미할 수 있다. 본원에 주어진 수치상의 양은 달리 진술되지 않는 한 근사치로서, 이는 명백히 진술되지 않았을 때 용어 "약" 또는 "대략적으로"가 추론될 수 있음을 의미한다.

[0101] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "분리된"이란, 기준 물질이 그것이 보통 발견되는 환경으로부터 제거된 경우를 의미한다. 그러므로 분리된 생체 물질은 세포 성분, 즉 이 물질이 발견 또는 생성되는 세포의 성분을 가지지 않을 수 있다. 핵산 분자의 경우, 분리된 핵산은 PCR 생성물, 겔 상 mRNA 밴드, cDNA 또는 제한 단편을 포함한다. 다른 구현예에서, 분리된 핵산은 이 핵산이 발견될 수 있는 염색체로부터 절제되는 것이 바람직하고, 이 핵산 분자가 염색체에서 발견될 때 분리된 핵산 분자에 의해 함유된 유전자의 상류 또는 하류에 위치하는, 비 조절, 비 암호화 영역 또는 기타 다른 유전자에 더 이상 결합하지 않는 것이 더욱 바람직하다. 또 다른 구현예에서, 분리된 핵산은 하나 이상의 인트론을 포함하지 않는다. 분리된 핵산은 플라스미드, 코스미드 및 인공 염색체 등에 삽입되는 서열을 포함한다. 그러므로 특정 구현예에서, 재조합 핵산은 분리된 핵산이다. 분리된 단백질은 기타 다른 단백질 또는 핵산, 또는 이것들 둘 다와 결합할 수 있거나, 세포 내에서 상기 분리된 단백질과 결합하는 것과 결합할 수 있거나, 아니면 만일 상기 단백질이 막 결합 단백질이면 세포막과 결합할 수 있다. 분리된 세포 소기관, 세포 또는 조직은 유기체 내에서 이것들이 발견되는 해부학적 위치로부터 제거된다. 분리된 물질은 정제될 수 있으나, 반드시 그래야하는 것은 아니다.

[0102] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "정제된"은, 관련없는 물질, 즉 오염물질이 감소 또는 제거되는 조건 하에 분리된 물질, 예를 들어 강글리오시디아제 및/또는 시알리디아제 핵산 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어 정제된 단백질은 실질적으로 세포 내에서 그것과 결합하고 있는 기타 다른 단백질 또는 핵산을 포함하지 않는 것이 바람직하다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로 포함하지 않는"은, 물질의 분석 시험의 맥락에서 조작 시 사용된다. 오염물질을 실질적으로 포함하지 않는 정제된 물질은 적어도 50% 순수한 것이 바람직하고; 적어도 90% 순수한 것이 더욱 바람직하며; 적어도 99% 순수한 것이 훨씬 더 바람직하다. 순도는 통상의 방법, 예를 들어 크로마토그래피, 겔 전기영동, 면역검정법, 조성 분석, 생체 검정법, 그리고 당업계에 공지된 기타 다른 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0103] 용어 "토우병증"은, 인간의 뇌에서 신경원섬유매듭(NFT)을 형성하는 토우 단백질의 병리학적 응집으로 말미암은 임의의 병태를 지칭하고, 전두측두 치매, 알츠하이머병, 진행성 핵상 마비, 피질기저핵 퇴행 및 전두측두엽 퇴행(픽병)과 같은 질병(이에 한정되는 것은 아님)을 포함한다

[0104] 용어 "뇌 아밀로이드증"은 뇌 또는 뇌의 혈관 내에 아밀로이드가 침착 또는 축적되는 병태를 지칭한다. 뇌 아밀로이드증의 예들은 알츠하이머병과 뇌 아밀로이드 혈관 병증(CAA)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0105] 용어 "알츠하이머병" 또는 "AD"는 서서히 진행되는 치매 및 총 뇌 피질 위축에 의해 특징지어지는 병태를 지칭한다. β -아밀로이드 초로성 반, 신경원 내 신경원섬유 매듭 및 아밀로이드 혈관 병증의 존재는 AD의 전형적 특징으로서, 부검시 관찰된다. AD는 가족간에 발현되는 것으로서 유전될 수 있는 것일 수 있거나, 또는 산발성일 수 있다. 본원에서 AD는 가족성 및 산발성 AD뿐만 아니라, 표현형 발현을 바탕으로 하였을 때 상기 가족성 및 산발성 AD의 중간을 이루는 AD, 그리고 이러한 AD들의 하위 군을 포함한다. 가족성 AD는 통상적으로 조기 발생성(65 세 이전)인 한편, 산발성 AD는 통상적으로 후발성(65 세 이후)이다. 비 제한적 구현예에서, 가족성 AD는 프레세닐린 1(인간 프레세닐린 1, 유전자 은행 등록 번호 NM_000021, NM_007318 및 NM_007319; 쥐과 동물 프레세닐린 1, 유전자 은행 등록 번호 NM_008943; 및 래트 프레세닐린 1, 유전자 은행 등록 번호 NM_019163), 프레세닐린 2(인간 프레세닐린 2, 유전자 은행 등록 번호 NM_000447 및 NM_012486; 쥐과동물 프레세닐린 2, 유전자 은행 등록 번호 NM_011183; 및 래트 프레세닐린 2, 유전자 은행 등록 번호 NM_031087), 그리고 아밀로이드 전구체 단백질(APP)(인간 APP, 유전자 은행 등록 번호 NM_201414, NM_201413 및 NM_000484; 쥐과 동물 APP, 유전자

은행 등록 번호 NM 007471; 및 래트 APP, 유전자 은행 등록 번호 NM_019288)을 포함하는 군으로부터 선택되는 유전자 하나 이상에서의 돌연변이들과 연관될 수 있다. 산발성 AD는 직접적으로 시험될 수는 없지만, 특정 위험 인자들은 개체의 산발성 AD 발달에 대한 감수성을 증가시킬 수 있다. 하나의 비 제한적 구현예에서, 아포리포단백질 E(APOE)(인간 APOE, 유전자 은행 등록 번호 NM 000041; 쥐과 동물 APOE, 유전자 은행 등록 번호 NM 009696; 및 래트 APOE, 유전자 은행 등록 번호 NM_138828)의 e4 대립 형질의 복사체 적어도 하나를 가지는 개체는 후발 산발성 AD가 발달할 위험이 있다.

[0106] 이 용어는 또한 삼중 염색체 21, 즉 다운 증후군(DS)이 발생한 개체, (30 년 또는 40 년 이내에) AD의 임상학적 및 신경병리학적 특징, 예를 들어 뇌 아밀로이드(Aβ) 반 및 신경원섬유 매듭(NFT), 알츠하이머병(AD)의 특징적인 병변과 동일한 임상학적 및 신경병리학적 특징을 갖는 치매가 발달한 개체를 포함하기도 한다. 최근 연구들은, Aβ42가 다운증후군 환자의 뇌에 축적되는 단백질의 가장 초기의 형태로서, 12 세 정도의 연령의 피험체에서 확인될 수 있음과, 가용성 Aβ는 임신 21 주령, 즉 Aβ 반이 형성되기 한참 전에 DS 피험체 뇌 내에서 검출될 수 있음을 나타내었다(Gyure et al, Archives of Pathology and Laboratory Medicine 125: 489-492 (2000)).

[0107] 본 발명을 위하여, "신경학적 질환"은, 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 β-아밀로이드 생성 과정과 연관된 임의의 중추신경계(CNS) 또는 말초 신경계(PNS)의 질병을 지칭한다. 이는 신경원 세포 또는 신경아교세포 결손, 예를 들어 신경원 손실, 신경원 퇴행, 신경원 탈수초, 신경아교종(즉, 성상교세포종), 또는 비정상 단백질 또는 독소(예를 들어, 아밀로이드-β)의 신경원 축적 또는 신경원의 축적(이에 한정되는 것은 아님)을 초래할 수 있다.

[0108] 하나의 예시적 신경학적 질환은 콩고 레드 친화성 혈관 병증이라고도 지칭되는 뇌 아밀로이드 혈관 병증(CAA)이다. 이 질환은 알츠하이머병과 연관된 아밀로이드 단백질과 동일한 아밀로이드 단백질, 즉 아밀로이드-β(Aβ)가 연수 막 및 뇌의 천 대뇌 피질 혈관의 벽에 침착되는 혈관 병증의 한 형태이다. 아밀로이드 침착은, 상기 혈관들이 기능을 하지 못하게 하여 출혈성 뇌졸중 위험을 증가시키는 성향을 띠도록 만든다. 상기 아밀로이드 단백질은 알츠하이머 치매와 연관된 아밀로이드 단백질과 동일한 아밀로이드 단백질이므로, 이러한 뇌 출혈은 알츠하이머병을 앓고 있는 사람들에서 더 일반적이지만, 뇌출혈은 또한 치매 병력이 없는 사람들에서도 일어날 수 있다. 뇌 내 출혈은 보통 특정 염에 한정되어 일어나고, (출혈성 뇌졸중(즉, 뇌 출혈)의 더욱 일반적인 원인인) 높은 혈압(고혈압)으로 말미암아 일어나는 뇌 출혈과는 약간 상이하다. CAA는 또한 일시적인 허혈성 심장마비, 지주막하 출혈, 다운 증후군, 방사선 치료 후 괴사, 다발성 경화증, 백색질뇌증, 해면뇌병증 및 권투선수 치매와도 연관된다. 본 발명의 구현예들에 의해 치료될 수 있는 CAA의 예시적 형태들은 유전성 CAA(가족성 CAA라고도 공지됨) 및 아밀로이드증 동반 유전성 뇌 출혈 - Dutch형(HCHWA-D)을 포함한다. 몇몇 구현예에서, 유전성 CAA는 APP에서의 돌연변이에 의해 발생된다.

[0109] 용어 "개체", "환자" 또는 "환자 집단"은, 본원에 기술된 다양한 질병들 중 어느 하나가 발병하였거나 어느 하나로 발달할 위험이 있는 것으로 진단된 사람(들)을 지칭한다. 예를 들어 개체는 가족성 AD로 진단될 수 있거나 가족성 AD로 발달할 위험이 있을 수 있다. 다른 경우에 있어서, 개체는 산발성 AD가 발병한 것으로 진단되거나 산발성 AD로 발달할 위험이 있는 것으로 진단된다. AD의 진단은 개체에 의해 나타내어지는 유전자형 특징 또는 표현형 특징을 바탕으로 이루어질 수 있다. 예를 들어 프레세닐린 1, 프레세닐린 2 또는 APP의 돌연변이 변이체를 가지는 개체는 가족성 AD로 발달할 위험이 있다. 다른 비 제한적 예에서, APOE의 E4 변이체를 가지는 개체는 산발성 AD로 발달할 위험이 있다.

[0110] 개체는 AD와 연관된 표현형을 나타냄으로써, AD가 발병한 것으로 진단될 수 있거나, 아니면 AD로 발달될 위험이 있는 것으로 진단될 수 있다. AD와 연관된 표현형은 인지적 표현형 또는 정신 의학적 표현형일 수 있다. 인지적 표현형의 예들은 건망증, 실어증, 실행증 및 실인증을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 정신 의학적 표현형의 예들은 인격 변화, 우울증, 환각 및 망상을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 하나의 비 제한적 예로서, 정신 장애 진단 및 통계 편람(제4판)(DSM-IV-TR)(미국 정신 의학회 발간)은 다음과 같은 알츠하이머 형 치매에 대한 기준의 세트를 포함한다:

[0111] A. 기억 장애와, 실어증, 실행증, 실인증 및 실행 기능 장애 중 하나 이상 둘 다의 경우에 의해 발현되는 다발성 인지 결손의 발달;

[0112] B. 이전 기능의 쇠퇴로서 표현되고, 사회적 및 직업적 기능의 유의적 장애를 유발하는 인지 결손;

[0113] C. 점진적 발생과 지속적 쇠퇴에 의해 특징지어지는 경과;

- [0114] D. 기억과 인지의 진행성 결손을 유발하는 기타 다른 중추신경계의 병태, 전신성 병태 또는 물질 유도성 병태로 말미암지 않는 인지 결손; 그리고
- [0115] E. 다른 정신 의학적 질환에 의해 더 잘 설명되는 것은 아닌 장애.
- [0116] 또 다른 비 제한적 예는, 다음과 같은 알츠하이머병에 대한 NINDS-ADRDA(The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke- Alzheimer's disease and Related Disorder Association) 기준이다:
- [0117] A. 확정적 알츠하이머병(Definite Alzheimer): 잠정적 알츠하이머병에 대한 기준을 충족하고, 부검 또는 생검을 통한 알츠하이머병의 조직병리학적 증거를 가짐.
- [0118] B. 잠정적 알츠하이머병(Probable Alzheimer): 임상 시험 및 신경정신의학적 시험에 의해 정립된 치매로서,
- [0119] (a) 기억을 비롯한 인지를 담당하는 구역들 2 개 이상에서 확인되는 진행성 결손,
- [0120] (b) 40 세에서 90 세 사이에 발생, 그리고
- [0121] (c) 섬망을 비롯한 치매 증후군을 일으킬 수 있는 전신성 질병 또는 기타 다른 뇌 질병의 부재를 수반함.
- [0122] C. 의심성 알츠하이머병(Possible Alzheimer): 비전형적 발생, 임상발현 또는 진행을 보이고, 알려진 병인은 보이지 않는 치매 증후군(치매를 일으킬 수 있는 임의의 우울증병은 원인이 되지 않는 것으로 생각됨).
- [0124] D. 가능성이 낮은 알츠하이머병(Unlikely Alzheimer): 병의 경과 중 갑작스러운 발생, 국소성 신경학적 징후, 또는 초기에 나타나는 발작이나 보행 장애 중 임의의 증상을 보이는 치매 증후군.
- [0125] AD의 표현형적 발현은 또한, 예를 들어 아밀로이드- β 반의 직접 검출(영상화) 또는 간접 검출(생화학적 검출)에 의해 확인되는 것과 같이 물리적인 것일 수 있다. 말초 혈액 중 아밀로이드- β (1 내지 40)의 정량은, 선형 이온 트랩에서의 탠덤 질량 분광분석법과 함께 행하여지는 고성능 액체 크로마토그래피가 사용되어 구현되었다(Du et al, J Biomol Tech. 16(4):356-63 (2005)). 알츠하이머 환자의 뇌척수액 중 단일 β -아밀로이드 단백질 응집체의 형광 상관 분광분석법에 의한 검출은 또한 문헌[Pitschke et al, Nature Medicine 4: 832-834 (1998)]에 기술되어 있다. 미국 특허 5,593,846은, 가용성 아밀로이드- β 를 검출하기 위한 방법을 기술하고 있다. 항체가 사용되는, 진행된 당화 반응 최종 생성물(RAGE)에 대한 수용체 및 아밀로이드- β 펩티드의 간접적 검출도 또한 기술되어 있다. 마지막으로, 발색 기질이 사용되는, 뇌척수액 중 증가된 BACE-1 활성의 생화학적 검출도 또한 AD의 진단 또는 예후 지표로서 상정되었다(Verheijen의 다수, Clin Chem. Apr 13 [Epub.] (2006)).
- [0126] β -아밀로이드의 생체 내 영상화는 조영제로서 방사성 요오드화된 플라본 유도체(Ono의 다수, J Med Chem. 48(23):7253-60 (2005)), 그리고 혈관 뇌 장벽을 통과하여 α β 반에 결합하는 것으로 나타난 아밀로이드 결합 염료, 예를 들어 40 잔기 방사성 요오드화된 A 펩티드에 접합된 푸트레세인(125 I-PUT-A 1-40을 이룸)이 사용되어 달성될 수 있다. Wengenack의 다수, Nature Biotechnology. 18(8):868-72 (2000). β -아밀로이드의 영상화는 또한 스틸벤 SB-13 및 벤조티아졸 6-OH-BTA-1(PIB라고도 공지됨)을 사용하여 나타내어진다. Nicholaas의 다수, Am J Geriatr Psychiatry, 12:584-595 (2004).
- [0127] **실시예**
- [0128] 본 발명은 이하 제공된 실시예에 의해 추가로 기술된다. 이러한 실시예를 이용하는 것은 오로지 예시적인 것일 뿐 결코 본 발명의 범위와 의미, 또는 예시된 임의의 용어의 범위와 의미를 제한하고자 하는 것은 아니다. 이와 유사하게, 본 발명은 본원에 기술된 임의의 바람직한 특정 구현예들에 제한되는 것은 아니다. 실제로 본 발명의 변경 및 변형 다수는 당업자가 본 명세서를 읽을 때 당업자에게 명백할 것이다. 그러므로 본 발명은 청구범위에 권리가 부여되는 균등물들의 전체 범위와 아울러, 첨부된 청구범위의 용어들에 의해서만 제한된다.
- [0129] **실시예 1: AdDNJ는 BBB를 통과하여, 생존 능력에 영향을 미치지 않으면서 β -hex를 증가시킨다**
- [0130] Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스를 치료하기 위한 치료 전략으로서 β -hex 표적화 약리학적 샤프론 AdDNJ를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 우선 표적 관여(target engagement) 및 세포 생존 능력에 대한 효과를 평가하기 위한 연구를 수행하였다. 또한 본 발명자들의 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스 개념 증명(POC) 연구에서 이용

될, 적절한 투여 계획과 여기에서 적용할 적절한 용량을 결정하기 위해, 본 발명자들은 C57B16 마우스를 사용하여 AdDNJ에 대한 약동학적 연구 및 용량 반응/시간 경과 연구를 완결하였다. 약동학적 연구 및 용량 반응/시간 경과 연구의 목적은, AdDNJ가 혈액 뇌 장벽(BBB)을 통과하는 것을 확인하는 것, 그리고 AdDNJ 농도가 억제 농도 미만으로 간헐적으로 떨어질 수 있도록 하여 β -hex로부터의 헤리 및 기질의 턴오버를 가능하게 하는 한편 C57BL/J6 마우스에서 내부 야생형 β -hex의 뇌 내 수준을 가장 많이 증가시키는 1일 용량의 최단 지속시간과 최소 용량을 결정하는 것이다.

[0131] **재료 및 방법**

[0132] **세포 생존 능력에 대한 AdDNJ의 효과.** 인간 섬유아세포(CRL2076) 및 인간 신경아세포종(SH-SY5Y) 세포를 다양한 농도의 AdDNJ에 오랜 기간 동안 노출시킨 후, 이 세포들의 생존 능력을 시험하였다. AdDNJ를 농도 1 mM까지 증가시키면서 함유하는 완전 배지들 중의 96웰 평판에서 섬유아세포를 항온처리하였다(72 시간 또는 120 시간, 37°C, 가습화 8% CO₂ 항온 처리기). 제조자의 지침에 따라서 테트라졸륨-포르마잔 전환 방법을 사용하여 살아있는 세포를 정량하였다(Promega 비 방사성 96웰 적정 검정법, TB112). SH-SY5Y 세포를 섬유아세포에 적용된 방식과 동일한 방식으로 시험하되, 다만 이 SH-SY5Y 세포를 콜라겐이 코팅된 평판(Nunc #152036) 상에 도말하였다. 살아있는 SH-SY5Y 세포를 AdDNJ에 24 시간, 48 시간 및 120 시간 노출시킨 후 전술된 바와 같이 정량하였다. 모든 용량의 농도에 대해 3 회 반복 실시하였다.

[0133] **효소 활성 및 AdDNJ 선택성.** 헥소사미니디아제(Total Hex, Hex A/S 및 Hex B) 및 3 개의 기타 다른 리소좀 하이드롤라아제, 즉 알파-갈락토시다아제, 베타-갈락토시다아제 및 글루코세레브로시다아제의 효소 활성에 대한 AdDNJ의 효과를 측정하여 AdDNJ 선택성을 평가하였다. 효소 검정법을 위하여 pH 5 용해 완충액(인산염/시트르산염, 0.25% 토우오로콜레이트, 0.1% TX100) 200 μ l로 야생형 섬유아세포(CRL2076) 펠릿(약 2.5e6 세포/펠릿)을 용해하였다. 섬유아세포 용해물을, 적절한 4-메틸움벨리페틸(4-MU) 기질 2 mM을 함유하는 pH 5 반응 완충액(TX100을 포함하지 않는 용해 완충액) 중 1:200으로 희석한 다음, 37°C에서 1 시간 동안 항온처리하고 나서, 0.5 M 탄산나트륨으로 반응을 중지시켰다. Perkin Elmer Victor 5x 형광 평판 판독기(ex355/em460)를 사용하여, 방출된 4-MU를 측정하였다. 4-메틸움벨리페틸 베타-N-아세틸글루코사미니드(MUG)를 사용하여 총 Hex 활성을 측정하였고; 4MU-베타-N-아세틸글루코사민-6-황산염(MUGS)을 사용하여 Hex A/S 활성을 측정하였으며; Hex B 활성은 총 Hex 활성과 Hex A/S 활성 사이의 차이로서 산정하였고; 4MU-알파-D-글루코피라노시드를 사용하여 알파-갈락토시다아제 활성을 측정하였으며; 4MU-베타-D-갈락토시드를 사용하여 베타-갈락토시다아제 활성을 측정하였고; 4MU-베타-D-글루코피라노시드를 사용하여 글루코세레브로시다아제 활성을 측정하였다. 효소 억제에 대한 포지티브 대조군으로서 다음과 같은 화합물들 100 μ M씩을 사용하였다: 알파-갈락토시다아제의 경우, 1-테옥시갈락토노지리마이신; 베타-갈락토시다아제의 경우, N-부틸-1-테옥시갈락토노지리마이신; 글루코세레브로시다아제의 경우, 이소과가민. 베타-헥소사미니디아제 증강 검정법을 위하여, 섬유아세포를 5 일 동안 0 nM, 95 nM, 390 nM 및 780 nM의 AdDNJ에 노출시킨 다음, 베타-헥소사미니디아제 활성을 측정하였다. 효소 활성을 2 회 반복 측정하였다.

[0134] **O-GlcNAcase 활성에 대한 AdDNJ의 효과.** 세포 O-GlcNAcase 활성에 대한 AdDNJ의 효과를 야생형 섬유아세포(AG07059, Coriell) 및 SH-SY5Y 세포 둘 다에서 시험하였다. 10 μ M AdDNJ 또는 Thiamet G의 존재 또는 부재 하에 완전 배지 중에서 섬유아세포를 24 시간 동안 항온처리하였다(37°C, 가습화 8% CO₂ 항온 처리기). SH-SY5Y 세포에 있어서, 여러 농도(0 μ M에서 100 μ M)의 AdDNJ 및 Thiamet G를 사용하였다. 세포 펠릿을 RIPA 완충액 중에서 용해하고 나서, 웨스턴 블롯을 사용하여 총 단백질 연관 O-GlcNAc 수준을 측정하였다. 요약하면, 총 단백질 40 μ g을 분리한 다음, 이를 PVDF로 옮긴 후, 항 O-GlcNAc 항체(18B10.C7, Pierce)로 프로빙하였다. Alpha Innotech FluoroChem Q 영상화 장치를 사용하여 화학발광을 영상화한 다음, AlphaView SA 소프트웨어(Alpha Innotech)를 사용하여 농도계로 정량하였다. 블롯을 스트립핑한 다음, 이를 항 칼넥신 항체(ab22595, Abcam)로 다시 프로빙하였다. O-GlcNAc 정량을 위하여, 전체 레인 O-GlcNAc 농도계를 배경 제거하고 나서, 칼넥신 로드 대조군 밴드에 대해 정규화하였다.

[0135] **AdDNJ를 대상으로 용량/용량-반응 및 PK 연구를 반복.** 5 주령 C57BL/J6 마우스(n = 5 마리 마우스/군, Taconic Farms, Germantown, NY)에 비이클(물) 또는 AdDNJ(30 mg/kg, 100 mg/kg 또는 300 mg/kg)를 경구 위관영양을 통해 총 14 일 동안 매일 투여하였다. 제15 일에 마우스를 안락사시키고 나서 분석을 위해 뇌/혈장을 수집하였다. 단일 용량 PK 연구를 위해 5 주령 C57BL/J6 마우스(n = 5 마리 마우스/군, Taconic Farms, Germantown, NY)에 AdDNJ를 100 mg/kg 용량으로 1 회 (경구 위관영양) 투여하였으며, 뇌 및 혈장 분석을 위해 투여 후 0.5 시간, 1 시간, 2 시간, 4 시간, 8 시간, 16 시간, 24 시간 및 48 시간 경과시 군의 동물들을 안락사시켰다. 전술된 바와

같이, 전체 뇌 조직(10 mg 내지 15 mg)을 pH 5 용해 완충액 1 ml 중에서 균질화하여 베타-헥소사미니다아제 활성을 측정하였다. LC-MS/MS를 사용하여 혈장 및 뇌 시료 중 AdDNJ 수준을 측정하였다.

[0136] **결과**

[0137] AdDNJ는 β -hex의 유력하고 특이적인 억제제였는데(pH 5에서 $K_i = 253.4$ nM; pH 7에서 $K_i = 342.3$ nM; 도 1a), 100 μ M 이하의 농도에서 O-GlcNAcase를 억제하지 않았거나(도 1c 및 도 1d), 또는 시험한 최고 농도인 10 μ M에서 리소좀 효소 β -글루코세레브로시다아제(GCase), α -갈락토시다아제(α -Gal) 또는 β -갈락토시다아제(β -Gal)를 억제하지 않았다(도 1e). 뿐만 아니라, AdDNJ는, 1 mM의 농도의 AdDNJ로 120 시간 이하의 시간 동안 처리된 인간 피부 섬유아세포 및 SH-SY5Y의 세포 생존 능력에 거의 영향을 미치지 않았거나 전혀 영향을 미치지 않았다(도 1f 및 도 1g). 건강한 인간의 피부 섬유아세포를 5 일 동안 95 nM, 390 nM 또는 780 nM의 AdDNJ로 처리하였을 때 β -hex 수준은 3 배 이하까지 용량 의존적 방식으로 증가하였는데(도 1b), 이는 AdDNJ가 이의 표적 β -hex에 관여하는 능력을 입증한다.

[0138] 단일 용량(경구 위관영양) 약동학적 연구에서, 본 발명자들은 AdDNJ 100 mg/kg 용량이 BBB를 통과하여, 16 시간 이내에 ER의 중성 pH 환경에서 β -hex의 결합을 유리하게 만들기 위해 충분할 것으로 예상되는, 뇌 내 수준(342 nM, pH 7에서 β -hex 억제에 대한 AdDNJ의 K_i)에 도달하였으며, 리소좀 β -hex를 억제할 것으로 예상되는 수준(즉, 253 nM, pH 5에서 β -hex 억제에 대한 AdDNJ의 K_i) 이하로 떨어졌음을 발견하였다(도 2a 및 2b). 뿐만 아니라, AdDNJ의 1 일 용량, 즉 30 mg/kg, 100 mg/kg 및 300 mg/kg의 위관영양을 통한 14 일간의 투여는, 전체 뇌 추출물 중 GM2 수준을 증가시키지 않고(도 10a 및 10c), β -hex 수준을 용량 의존적으로 증가시켰음(도 3a 및 3b)을 입증하였다. 이와 같은 용량들에서 β -hex 수준은 처리 약 5 일 만에 가장 많이 증가하였다(도 3a 및 3b). 뇌 내 증가한 β -hex 수준의 반감기는 약 2 일이었으므로(데이터는 나타내지 않음), 본 발명자들은 β -Hex 증강을 최대화하기 위해 1 일에 1 회 총 5 일 동안 마우스를 처리하고, 그 다음(AdDNJ 부재 하에서 기질 턴오버를 최대화하기 위해) 2 일 동안 약을 투여하지 않는 처리 전략을 선택하였다. 모든 용량은 마우스에 의해 잘 관용되었다.

[0139] **실시예 2: AdDNJ 개념 증명 연구**

[0140] 그 다음, 본 발명자들은 AdDNJ가 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스 내 강글리오사이드 결합 A β 의 병적 측면을 감소시키는지 평가하기 위해 POC 연구를 수행하였다.

[0141] **동물 및 연구 디자인.** Dutch APPE693Q 마우스 유전자 이식 마우스의 제조와 특성규명은 문헌[Gandy, S.외 다수, "Days to criterion as an indicator of toxicity associated with human Alzheimer amyloid-beta oligomers." *Annals of neurology* **68**, 220-230 (2010)]에 기술되어 있다. 3 월령 수컷 Dutch APP^{E693Q} 마우스 유전자 이식 마우스에 비이칼(물)(n = 15) 또는 AdDNJ 3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg 또는 100 mg/kg(n = 13)를 3 개월 동안 경구 위관영양 주입하였다(1 주일에 5 일씩). 모든 동물 연구들은 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 수행하였다. 마우스를 12 시간의 명기/암기를 주면서 무 병원체 환경에 두고, 먹이와 물은 자유롭게 공급하였다. 6 월령 처리 군과, 3 월령 미처리 기준 군(n = 15)을 대상으로 NOR, EPM 및 FC 시험에서 인지 평가 하였다. 마지막 투여 후 48시간 경과시 마우스에 얼음 냉각된 PBS(1 \times)를 관류하였다. 뇌를 꺼내어 2 개의 반구로 나누었다. 한쪽 반구는 드라이 아이스에서 스냅 동결시켜 생화학 연구를 위해 -80 $^{\circ}$ C에 보관하여 두었으며; 다른 쪽 반구는 최후에 4% 파라포름알데히드 중에 담가 고정된 후 바이브라툼 상에서 화살촉 비슷하게 30 μ m 절편으로 절개하고 나서, 조직학적 분석을 수행할 때까지 4 $^{\circ}$ C에서 보관 완충액 중에 보관하여 두었다.

[0142] **행동 시험.** 시험 1 시간 전, 마우스를 시험실에 넣어서 마우스를 시험실 환경에 적응시켰다. 모든 시험은, AdDNJ 최종 투여 전까지 2 주 동안 화요일에 시작하여 금요일(오전 8 시에서 오후 3 시)에 마쳤다. 모든 장비는 동물들마다 세정하여 사용하였다.

[0143] **새로운 물체 탐색 실험(NOR).** 제1 일에, 마우스를 NOR 아레나(지름 20 cm)에 10 분 동안 넣어두어 마우스가 익숙해지도록 만들었다. 제2 일에는, 마우스를 2 개의 단계로 이루어진 시험 단계에 투입하였다. 제1 시험 단계 동안, 마우스를 아레나에 넣고 나서, 10 분 동안 2 개의 익숙치 않은 동일 물체 2 개를 탐색하도록 놔두었다. 이후 마우스를 자신의 우리로 복귀시켜 1 시간의 탐색 공백기를 주었다. 이 시간 동안, 이전에 마우스에게 탐색할 기회가 주어졌던 물체 2 개 중 하나를 치우고, 새로운 물체를 다시 넣어주었다. 제2 시험 단계 동안, 마우스를 다시 아레나로 넣고 나서, 4 분 동안 익숙한 물체와 새로운 물체를 탐색하도록 놔두었다. 실험 과정은 오버헤드 카메라를 사용하여 비디오로 녹화하였다. 그 다음, ANY-미로(Stoelting, Wood Dale, IL)를 사용하여 물체

를 탐색하는데 소요된 시간을 측정하였다.

- [0144] **고가식 십자 미로 실험(EPM)**. 십자("+") 모양을 가지고, 2 개의 개방형 암(open arm)(35 × 5 × 0 cm)이 서로 교차하며, 2 개의 폐쇄형 암(closed arm)(35 × 5 × 16 cm)과 수직을 이루고, 중앙에는 중립 대역(neutral zone)을 가지는 미로(Stoelting, Wood Dale, IL)를 사용하였다. 마우스를 중립 대역에 넣어 8분 동안 탐색하도록 놔두었다. 각 실험 과정은 오버헤드 카메라를 사용하여 비디오로 녹화하였으며, 이를 기반으로 ANY-미로(Stoelting, Wood Dale, IL)를 사용하여 개방형 암과 폐쇄형 암에서 소요된 시간의 길이에 대해 점수를 매겼다. "암에 들어간다"는 것은 머리와 두 개의 앞발이 암에 들어갈 때로 정의하였다.
- [0145] **공포 조건화**. 문헌[Steele, J.W.외 다수. "Early fear memory defects are associated with altered synaptic plasticity and molecular architecture in the TgCRND8 Alzheimer's disease mouse model." *The Journal of comparative neurology* (2014)]에 이미 기술된 바와 같이, ANY-미로 공포 조건화 계(Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA)를 사용하여 맥락 및 단서 공포 조건화를 평가하였다.
- [0146] **Aβ 검정법**. 문헌[Kawarabayashi, T.외 다수. "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *J Neurosci* **21**, 372-381 (2001)]에 따라서 시차 제제 가용화를 통해 오른쪽 뇌 반구를 처리하였다. 원산 올리고머 Aβ 단백질 구조의 분석을 위해 TBS 가용물로부터 얻은 원산 단백질 시료 2 μl 내지 4 μl를, 활성화/예비 습윤화 PVDF 막(0.22 μm; Millipore)에 스폿팅(spotting) 후 건조하였다. 단백질 스폿팅 후, 막을 실온에서 1 시간 동안 0.1% w/v Tween-20 함유 TBS(Fisher Scientific; TBS-T) 중 5% w/v 무 지방 우유(Santa Cruz) 중에서 차단하였다. 그 다음, 막을 (5% 우유/TBS-T 중) 지정된 1차 항체 중에서 밤새도록 4°C에서 항온처리하고, TBS-T 중에서 4 회 세정한 후, (5% 우유/TBS-T 중) 중 특이적 HRP 접합 2차 항체 중에서 1 시간 동안 항온 처리한 다음(실온), 다시 TBS-T 중에서 4 회 세정하였다. 그 다음, 후지필름 LAS-3000 현상기를 사용하여 막을 ECL 웨스턴 블롯팅 기질(Pierce)로 현상하였다. 이후, 막을 TBS-T 중에서 1 회 세정한 후, 격렬하게 진탕하면서 저 pH 스트립핑 완충액 [25 mM 글리신 HCl, pH 2.0 및 1% w/v SDS] 중에서 스트립핑하여 1차 항체 및 2차 항체를 제거한 다음, TBS-T 중에서 3 회 세정한 후, 실온에서 1 시간 동안 (5% 우유/TBS-T 중에서) 차단하고 나서, 1차 항체로 프로빙하였다. MultiGauge 소프트웨어(FujiFilm)를 사용하여 면역반응성 점들의 통합된 밀도를 측정하고, 대조군%(비이클)에 대해 정규화하였다. 토끼 pAβ A11(항 전 섬유 올리고머, 0.5 μg/ml), 토끼 pAβ OC(항 원섬유 올리고머 및 피브릴; 0.25 μg/ml) 및 마우스 mAβ Nu-4(항 올리고머; 1 μg/ml)의 제조, 정제 및 특성규명은 이미 문헌[Tomic, J.L., Pensalfini, A., Head, E. & Glabe, C.G. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiology of disease* **35**, 352-358 (2009)]; [Lambert, M.P.외 다수 Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *Journal of neurochemistry* **100**, 23-35 (2007)]에 기술되었다. 총 APP/Aβ 신호에 대한 정규화는, 마우스 mAβ 6E10(1:1000; Covance)을 이용하는 인간 APP 이식유전자 대사물질의 검출에 의해 달성되었다. 퍼옥시다아제 접합 염소 항 토끼 IgG(H+L; 1:20,000; Vector Labs) 또는 염소 항 마우스 IgG(H+L; 1:20,000; Vector Labs)를 검출에 사용하였다. 모노머 Aβ 수준을 정량하기 위해, 제조사의 지침에 따라서 인간/랫트 Aβ 1-40/1-42 ELISA 키트(Wako)를 사용하였다. 모노머 또는 올리고머 Aβ의 절대 농도는 분석 전 조직의 초기 중량에 대해 정량화하였다.
- [0147] **조직학**. 이미 기술된 바와 같이(20) mAβ 6E10(1:1000; Covance)을 이용하는 자유 부동성 면역조직화학 방법을 통하여 Aβ를 평가하였다. 이미 기술된 바와 같이(19) 마우스 항GAβ, 클론 4396C(1:100)(카츠히코 야나기사와 박사 기증)를 이용하는 자유 부동성 면역조직화학 방법을 통하여 GAβ를 평가하였다. 영상을, Olympus DP71 카메라가 장착된 Olympus BX61 정립 현미경에 담았다. Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland)를 사용하여 GAβ 염색의 통합된 밀도를 측정하였다.
- [0148] **행동, 생화학적 및 조직학적 결과에 대한 통계학적 분석**. 모든 데이터는 평균 ± s.e.m.으로 제시된다. 본페로니 사후 검정 분석(GraphPad Prism, San Diego, CA)과 아울러 스튜던트 t 테스트 또는 일원분산분석을 사용하여 통계학적 유의성(P < 0.05)을 결정하였다.
- [0149] **결과**
- [0150] **AdDNJ는 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스 내 β-hex 수준을 증가시켰다.**
- [0151] 본 발명자들은 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스에서 AdDNJ가 자체의 표적 β-hex에 관여하는지 평가하고 싶었다. 본 발명자들은, AdDNJ가 최고 용량으로 투여되었을 때, AdDNJ의 3 개월간의 투여 과정이 총 뇌 β-hex 수준

을 용량 의존적 방식으로 증가시켰음을 관찰하였다(도 4c). AdDNJ는 또한 용량 의존적 방식으로 β -hex B(도 4a) 및 β -hex A&S(도 4b)도 증가시켰다. 전 뇌 추출물의 TLC 분석은 강글리오사이드 수준에 어떠한 변화도 없었음을 밝혔는데, 이는 AdDNJ 100 mg/kg가 투여된 지 3 개월 후 조차에도 일반적으로는 β -hex가 뇌 전반에 걸쳐 억제되지 않았음을 말해주는 것이다(도 10a 내지 10d). AdDNJ에 대하여 제안된 약리학적 샤프론의 작용 기작을 바탕으로, 본 발명자들은 GM2 강글리오사이드 감소를 관찰하게 될 것으로 예상하였다. 그러나, 도 10a 내지 10d의 TLC 분석은 강글리오사이드 수준에 비교적 작은 변화를 보이기에 충분히 감수성이 아니었고, 다만 TLC 분석은 β -hex의 일관된 억제가 예상될, 강글리오사이드 수준의 상당 규모의 증가를 보일 것으로 예상할 것이다. 또한, 오로지 전체 뇌 균질물만이 평가된 관계로 국부 변화들이 차폐되었을 수 있다. 해마이행부와 주변 후각 피질 영역에 대해 $\text{GA}\beta$ 의 가장 유의적인 감소가 관찰되었는데, 이는 균질물 제조에 사용된 뇌의 총 용적의 매우 낮은 %를 차지할 것이다.

[0152] AdDNJ는 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스의 행동 표현형을 교정하였다.

[0153] 본 발명자들은 고가식 십자 미로 실험(EPM)에서 불안증을 평가하였으며, 6 월령 비이클 처리 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스가 3 월령 미처리 마우스보다 더욱 불안해하였음을 관찰하였다(도 5a). 본 발명자들은 AdDNJ 3 개월 투여 과정은 모든 시험 용량에서 감소된 불안증과 연관되었음을 관찰하였다(도 5a).

[0154] 본 발명자들은 새로운 물체 탐색 실험(NOR)을 사용하여 학습 행동을 평가하였다. 3 월령 미처리 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스는, 이 마우스가 익숙한 물체를 탐색할 때에 비하여 새로운 물체를 탐색할 때 유의적으로 더욱 긴 시간을 소요하는 것에 의해 손상되지 않은 학습 행동을 나타내었던 한편, 6 월령 비이클 처리 마우스는 학습 행동 결손을 나타내었다(도 5b). AdDNJ 3 개월 투여 과정 후, 본 발명자들은 NOR 시험에서 감소된 불안증을 나타내었던 마우스와 동일한 마우스(여기서는 6 월령 마우스)도 또한 더 많은 용량에서 통상의 연령 관련 학습 행동 결손이 방지됨을 나타내었음을 관찰하였다(도 5b). 30 mg/kg 또는 100 mg/kg 용량의 AdDNJ로 처리된 6 월령 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스는, 이 마우스 나이의 절반에 해당하는 나이의 마우스의 학습 행동을 나타내었다. 이와는 반대로 AdDNJ는 맥락 또는 단서 공포 조건화에 아무런 영향을 미치지 않았다(도 6).

[0155] AdDNJ는 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스에서 $\text{A}\beta$ 및 강글리오사이드 결합 $\text{A}\beta$ 병적 측면을 감소시켰다.

[0156] 그 다음, 본 발명자들은 AdDNJ 3 개월 처리 후 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스에서 $\text{A}\beta$ 와 강글리오사이드 결합 $\text{A}\beta$ ($\text{GA}\beta$)을 평가하였다. 본 발명자들은 시험된 AdDNJ의 그 어떠한 용량에서도 $\text{A}\beta$ 40(도 7a 내지 7d), $\text{A}\beta$ 42(도 7e 내지 7h), $\text{A}\beta$ 42/40 비율(도 7i 내지 7l), 전 섬유 $\text{A}\beta$ (도 7m), 또는 $\text{A}\beta$ 올리고머 수준(도 7n, 7o)에 변화가 없음을 발견하였다. 그 다음, 본 발명자들은 계속해서 $\text{A}\beta$ 및/또는 $\text{GA}\beta$ 의 국부 변화를 찾았다. 면역조직화학 분석은, 특히 해마이행부 내에서 $\text{A}\beta$ 축적의 영역 특이적 정성적 감소를 규명하였으나(도 8a 및 8b), 100 mg/kg AdDNJ가 투여된 Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스의 시각 피질(도 8c 및 8d)뿐만 아니라 해마의 CA1 영역(도 8e 및 8f)에서는 어떠한 차이도 관찰되지 않았다.

[0157] $\text{A}\beta$ 의 영역 특이적 감소는 해마이행부(도 9a, 9b, 9k) 및 주변 후각 피질(도 9c, 9d, 9i)(NOR에 수반되는 뇌의 구역) 내 $\text{GA}\beta$ 의 놀라운 정량적 감소를 동반하였다. 측면 내후각 피질(도 9e, 9f, 9m), 즉 NOR에 수반되는 다른 뇌 영역에서 $\text{GA}\beta$ 감소에 대한 경향이 관찰되었다. $\text{GA}\beta$ 의 감소는 시각 피질(도 9g, 9h, 9n) 또는 해마의 CA1 영역(도 9l, 9j, 9o)에서의 유의도에 이르지 못하였다. $\text{GA}\beta$ 유사 면역반응성은 또한 대뇌 피질 혈관에서 용이하게 검출될 수 있었다(도 9p).

[0158] 검토

[0159] GM2 및 GM3 강글리오사이드는, 시험관 내 올리고머화에 대한 감수성이 큰 $\text{A}\beta$ 의 돌연변이체 형태(Dutch $\text{A}\beta$)의 조립을 촉진한다(Yamamoto와 다수, 2005). GM2 및 GM3 강글리오사이드는 뇌 혈관 내에서 선택적으로 발견되고, Dutch 돌연변이체 $\text{A}\beta$ 의 조립뿐만 아니라 Iowa형 및 Italian형 돌연변이체 $\text{A}\beta$ 펩티드(이것들은 모두 가족성 CAA의 기저를 이룸)의 조립도 촉진하는 것으로 보인다(Yamamoto와 다수, 2005; Yamamoto와 다수, 2006). 강글리오사이드 편재화의 수렴, 그리고 강글리오사이드 가수화 응집에 감수성이 돌연변이체 펩티드의 영역 특이적 축적은 이러한 데이터가 가족성 CAA 및 AD에 대한 구체적인 암시를 가질 가능성을 높인다. Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스는, AD 초기 단계에 관찰되는 신경원 내 $\text{A}\beta$ 를 축적한다.

[0160] 본 연구에서, 본 발명자들은 약리학적 샤프론 AdDNJ는 BBB를 통과하고, 야생형 C57BL/J6 마우스의 뇌 내 야생형

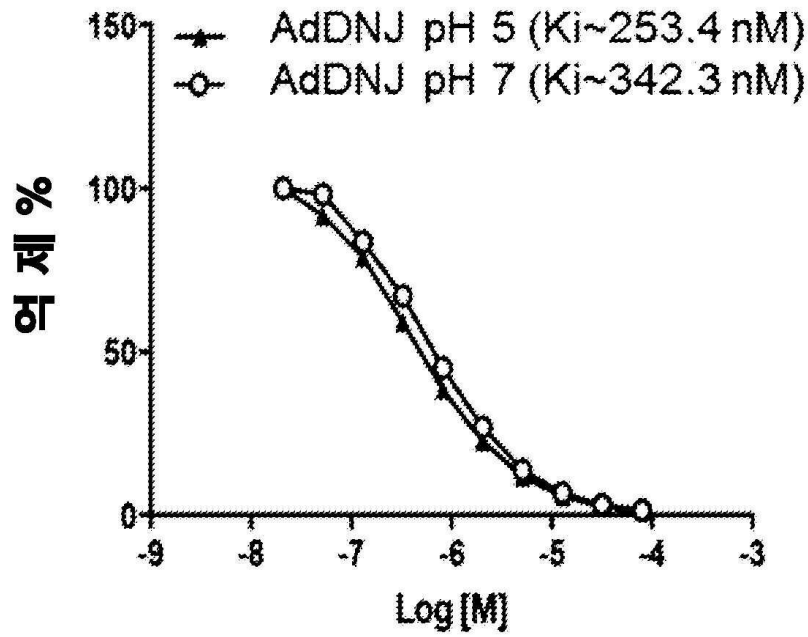
β -hex 수준을 증가시킨다는 것을 입증하였다. 그 다음, 본 발명자들은 계속해서 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스를 대상으로 A β 및 GA β 침착과 불안증 발생, 그리고 학습 행동 결손에 AdDNJ가 미치는 영향을 평가하였다. 본 발명자들은, Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스는 불안증과 학습 행동에 있어서 노화 의존적 결손을 보였으며, 기억 결손이 시작되는 나이는 6 월령임을 확인하였다. Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스는 3 월령일 때 NOR 실험에서의 손상되지 않은 학습 행동을 보였던 한편, 6 월령 비이클 처리 마우스는 장애 학습 행동을 보였다. 6 월령 Dutch APP^{E693Q} 유전자이식 마우스에서 관찰된 기능 장애는, 특히 해마이행부 내 원신경, 시각 피질, 그리고 해마의 CA1 영역 내 A β 축적과 연관되었다. 상기 영역들은, 본 발명자들이 이전에 Dutch 돌연변이체 APP^{E693} 마우스가 가장 명확한 노화 의존적 A β 침착물을 축적한다는 것을 입증하였던 뇌의 영역들이다. 가장 강력한 A β 유사 면역반응성이 해마이행부에서 관찰되었다. 최근 연구들은, 특히 마우스를 대상으로 한 NOR 실험에서 기억에 해마이행부가 관여함을 암시하였는데, 이때 본 발명자들은 Dutch APP^{E693} 유전자이식 마우스에서 결손을 확인하였다(Chang외 다수, 2012).

[0161] 본 발명자들은 또한 β -hex 표적화 약리학적 샤프론은, A β 및 GA β 축적의 명백한 감소와 연관하여, Dutch APP^{E693} 유전자이식 마우스의 행동 표현형의 2가지 특징을 교정하는 것을 관찰하였다. AdDNJ의 3 개월 투여 과정은 Dutch APP^{E693} 유전자이식 마우스의 뇌 내 β -hex 수준을 3 배 증가시키는 것과 연관되었는데, 이는 AdDNJ가 자체의 표적에 관여하고 있음을 보여주는 것이다. NOR에 수반되는 뇌 내 구역인 해마이행부와 주변 후각 피질 내에서는 GA β 의 놀라운 정량적 감소가 관찰되었다. GA β 감소는 또한 측면 내후각 피질, 시각 피질 및 해마의 CA1 영역에서도 관찰되었지만, 그 감소는 통계학적 유의성에는 이르지 못하였다.

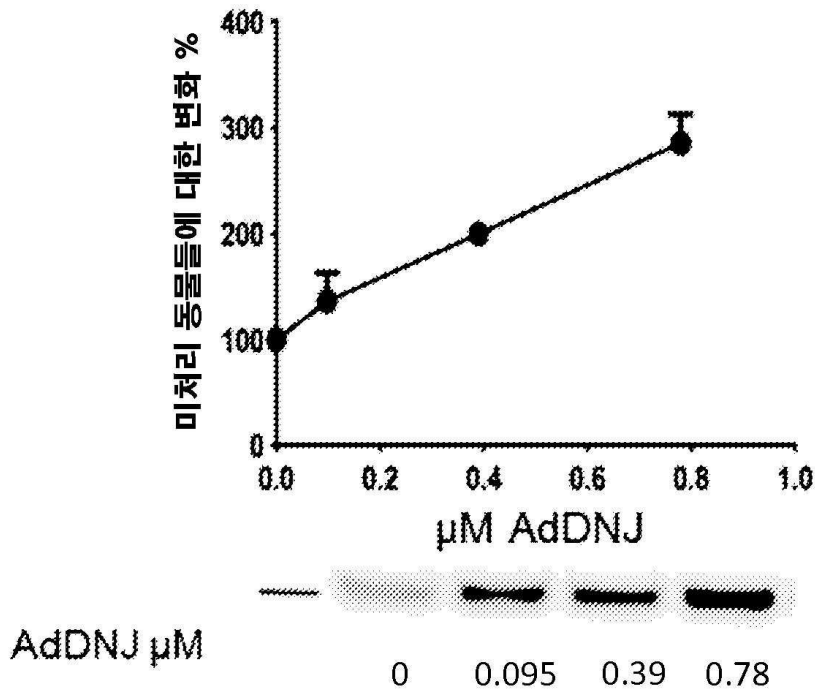
[0162] 본 발명자들의 연구는, β -hex 표적화 약리학적 샤프론이 β -hex 수준을 증가시키는 한편, 가장 큰 A β 면역반응성을 나타내는 영역에서는 GA β 의 병적 측면을 감소시킨다는 제1 증거를 제공한다. 이와 같은 분자 상 변화 및 조직학적 변화는 행동 표현형의 2가지 양태(즉, 불안증과 학습 행동)의 교정과 연관되어 일어난다. 이러한 데이터는, 표적화된 약리학적 샤프론이 사용되었을 때 증가하는 β -hex 활성의 잠재적으로 유리한 효과를 강조한다. 이와 같은 화합물 군은 뇌 아밀로이드증 완화에 대한 희망을 나타내고, 특히 아밀로이드 혈관 병증과 APP/A β 돌연변이와 연관된 인간 뇌 아밀로이드증의 관리에 유리한 것으로 예상된다. AdDNJ는 우수한 생체 내 이용 가능성, BBB 투과성, β -hex에 대한 높은 선택성 및 낮은 세포 독성을 가져서, AdDNJ가, Dutch APP 돌연변이가 일어난 환자 집단을 대상으로 행하여진 임상 실험을 위해 신속하게 개발될 수 있었던 탁월한 약물 후보가 되도록 만들어주고, Dutch APP^{E693Q} 유전자 이식 마우스에서 관찰된 결과들을 특히 유의미하도록 만든다.

도면

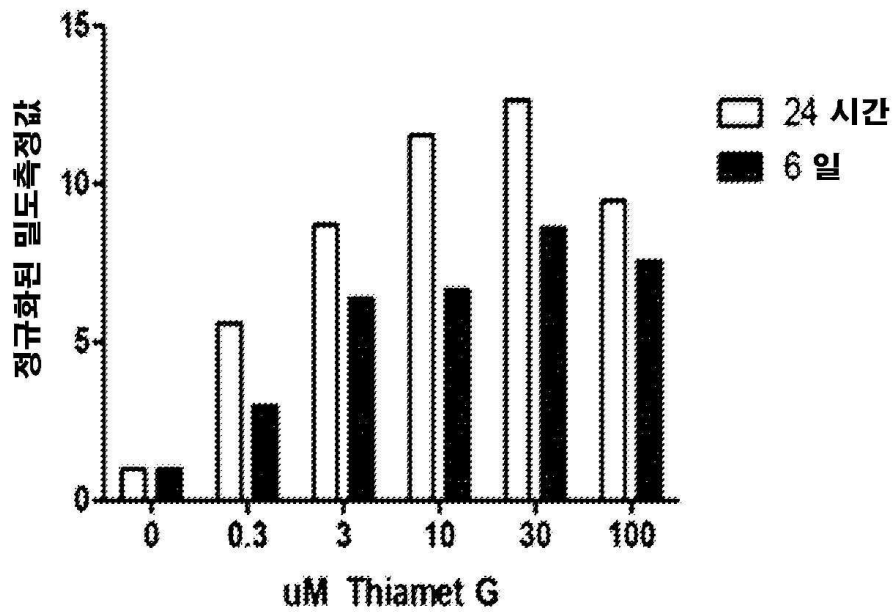
도면1a



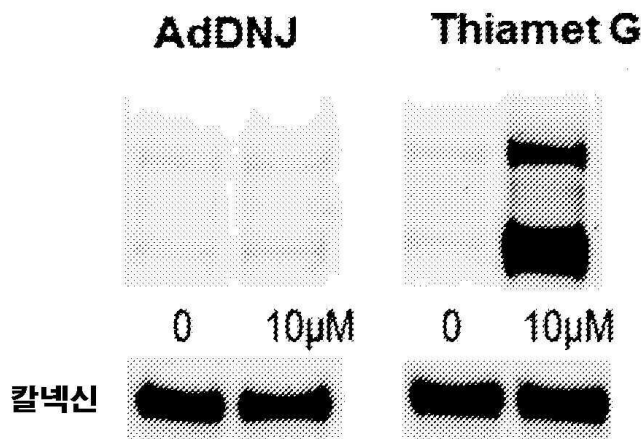
도면1b



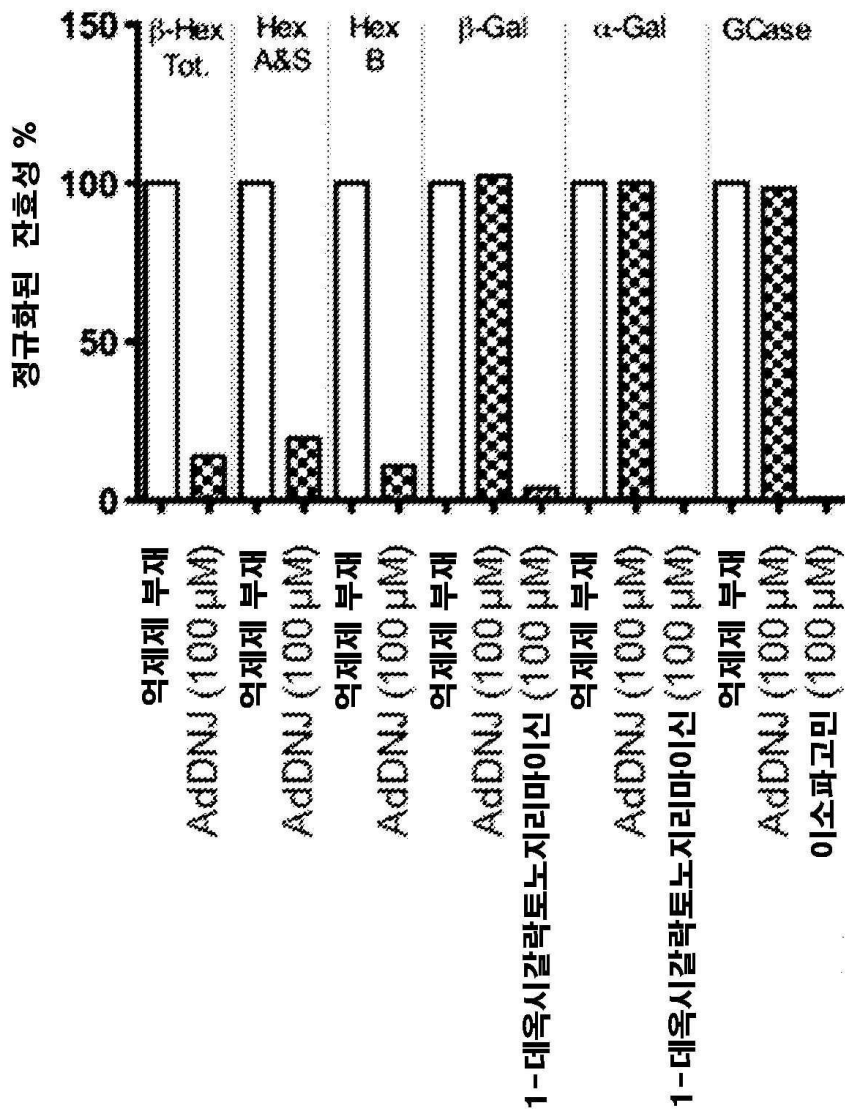
도면1c



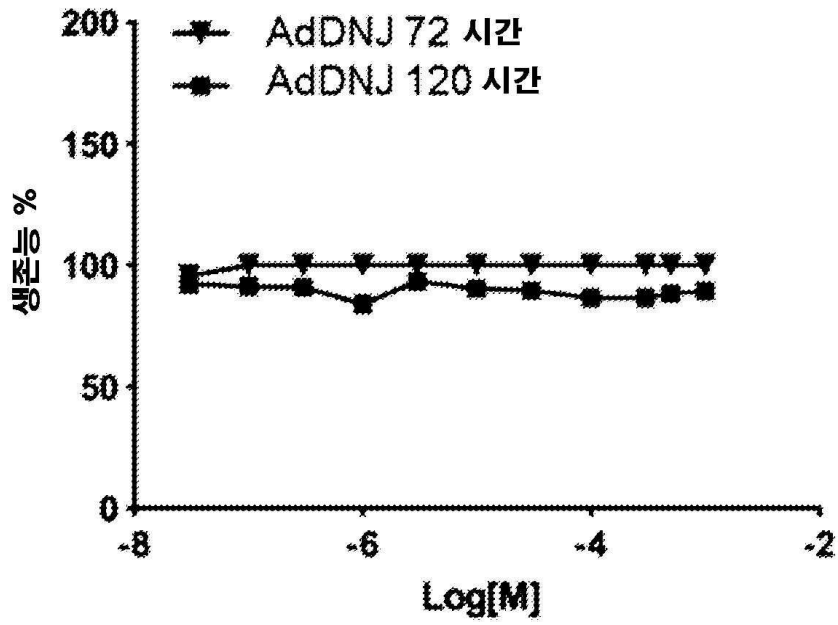
도면1d



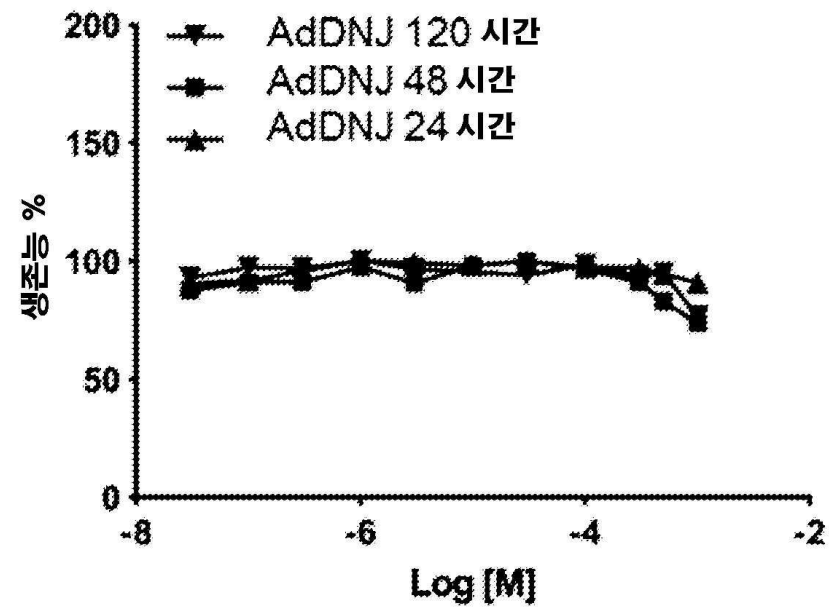
도면1e



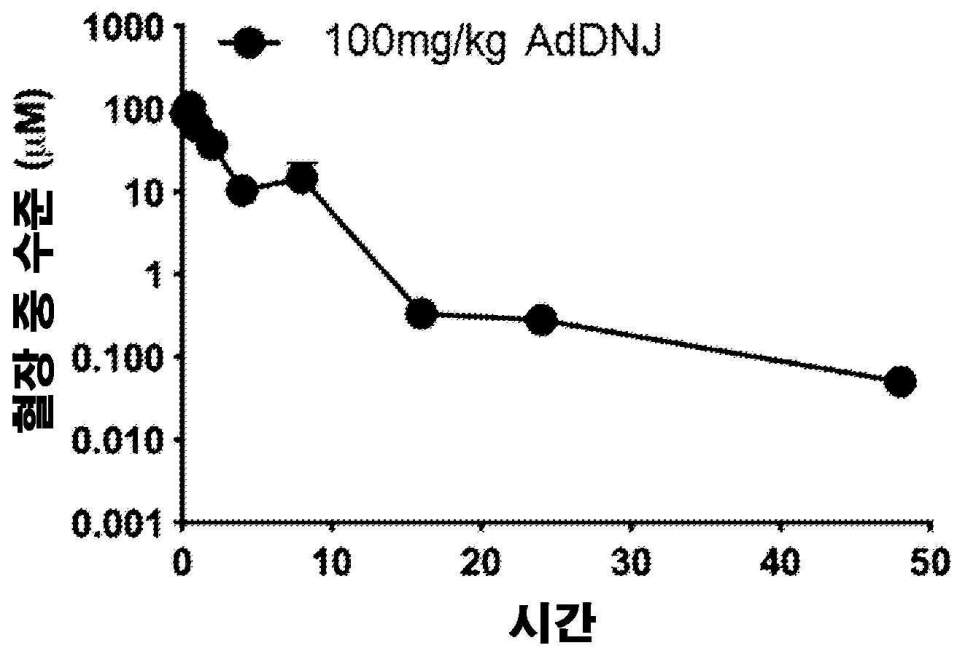
도면1f



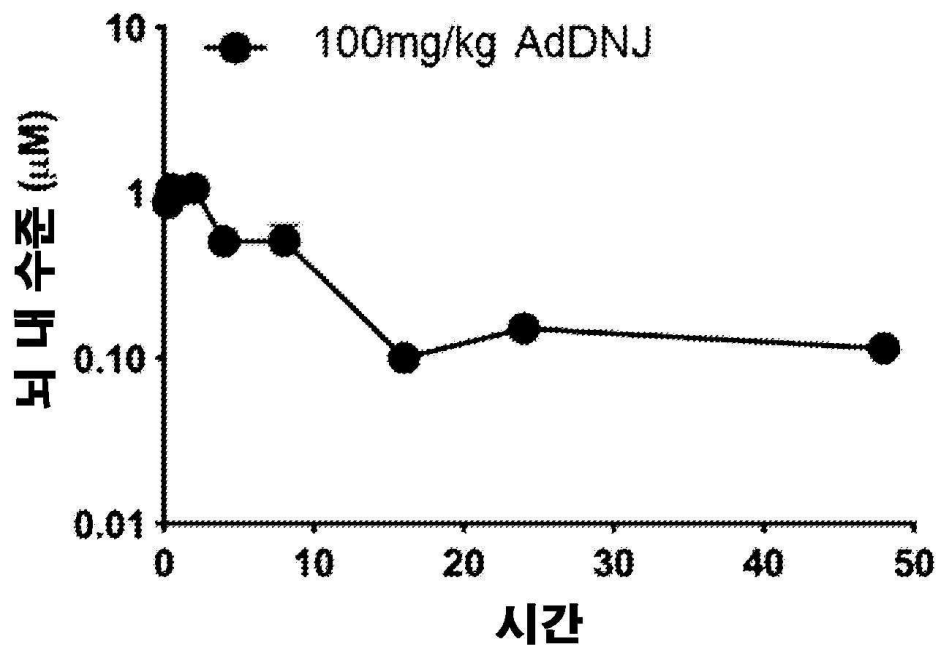
도면1g



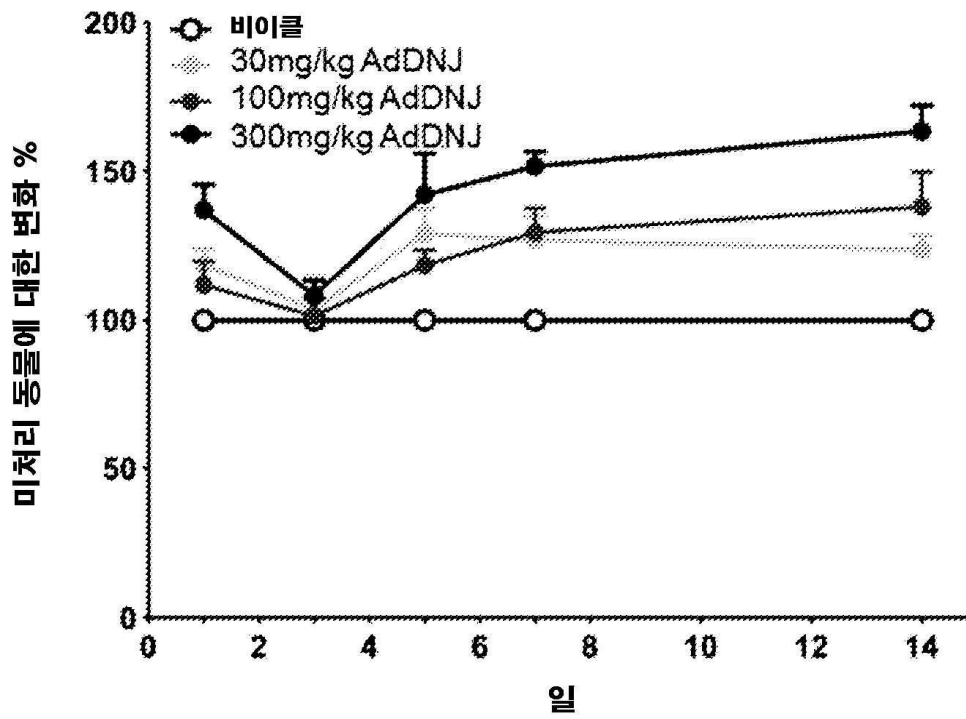
도면2a



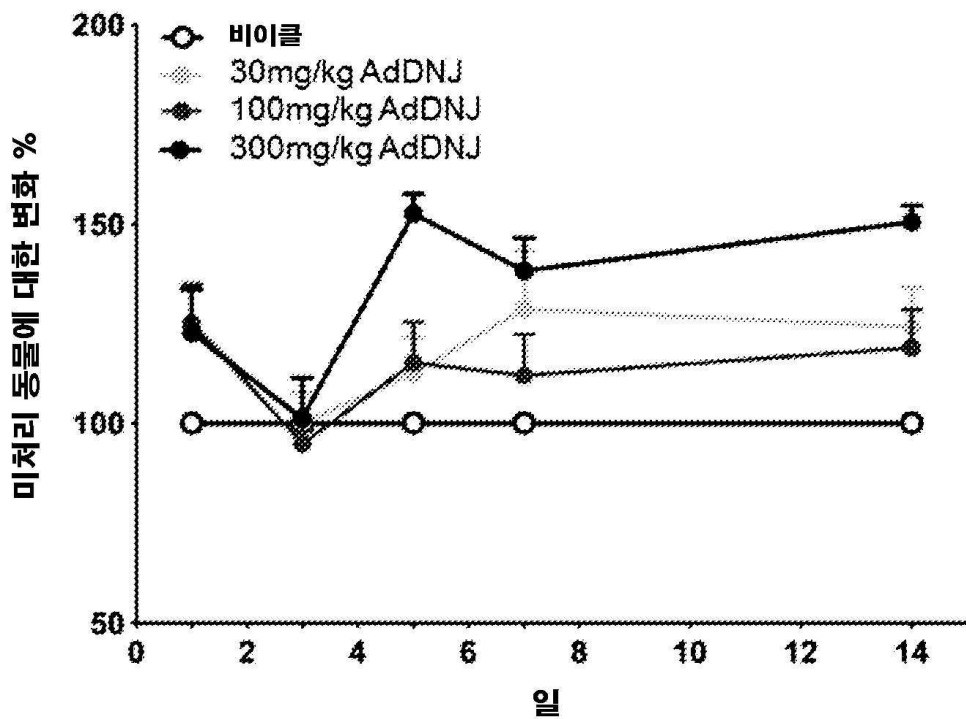
도면2b



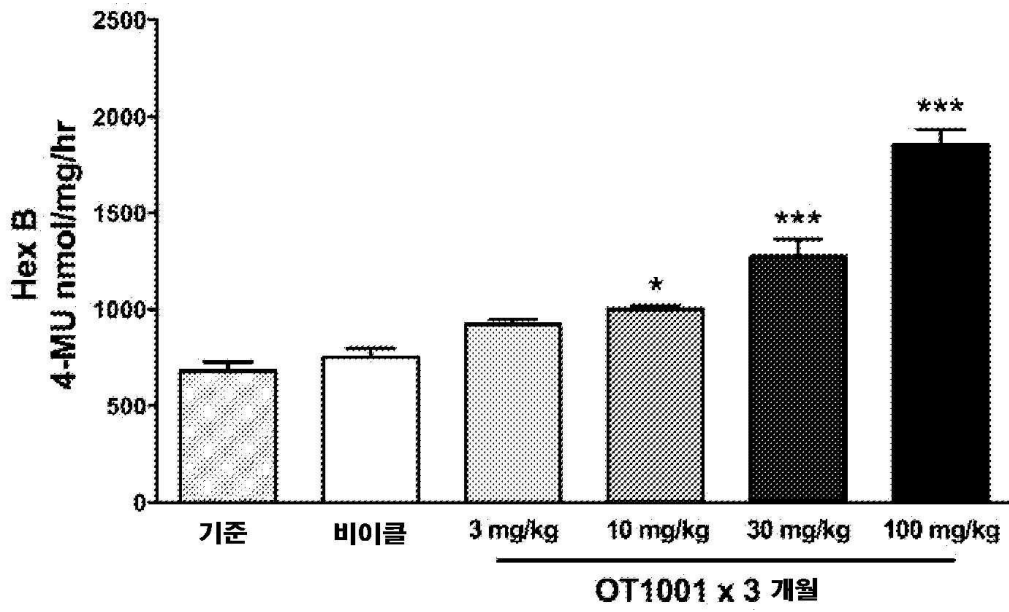
도면3a



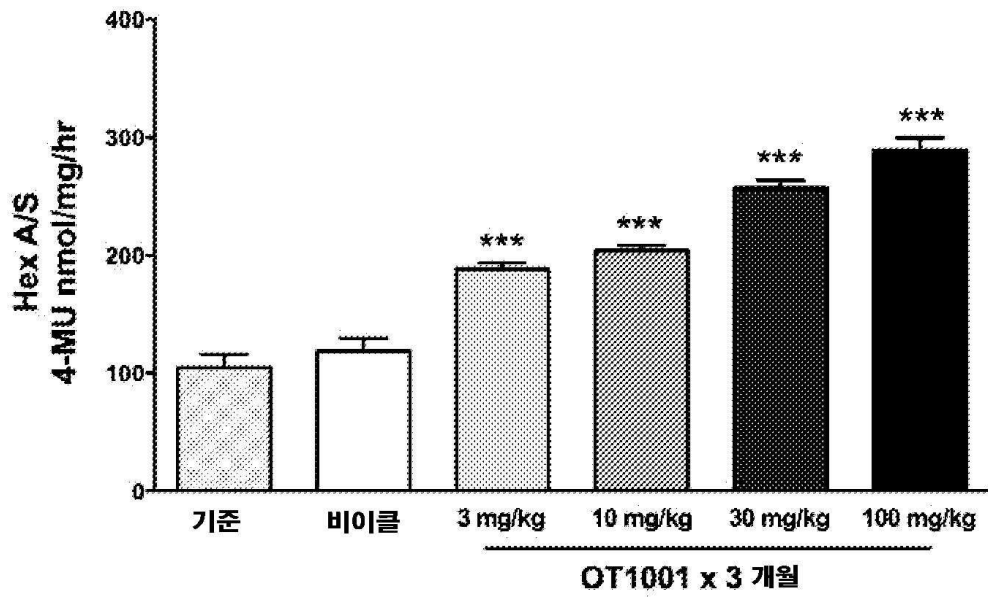
도면3b



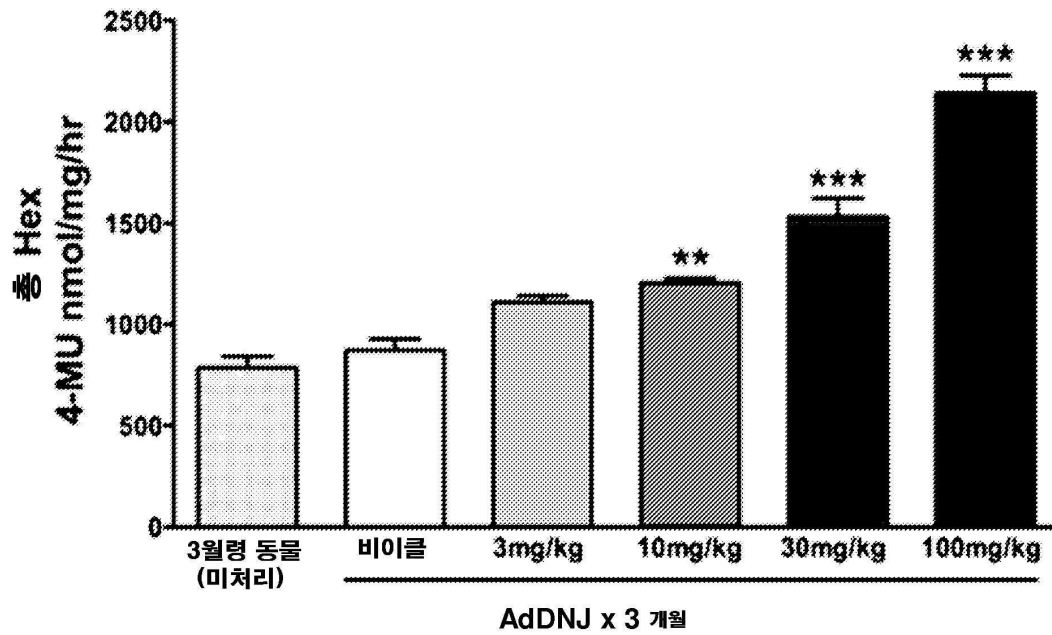
도면4a



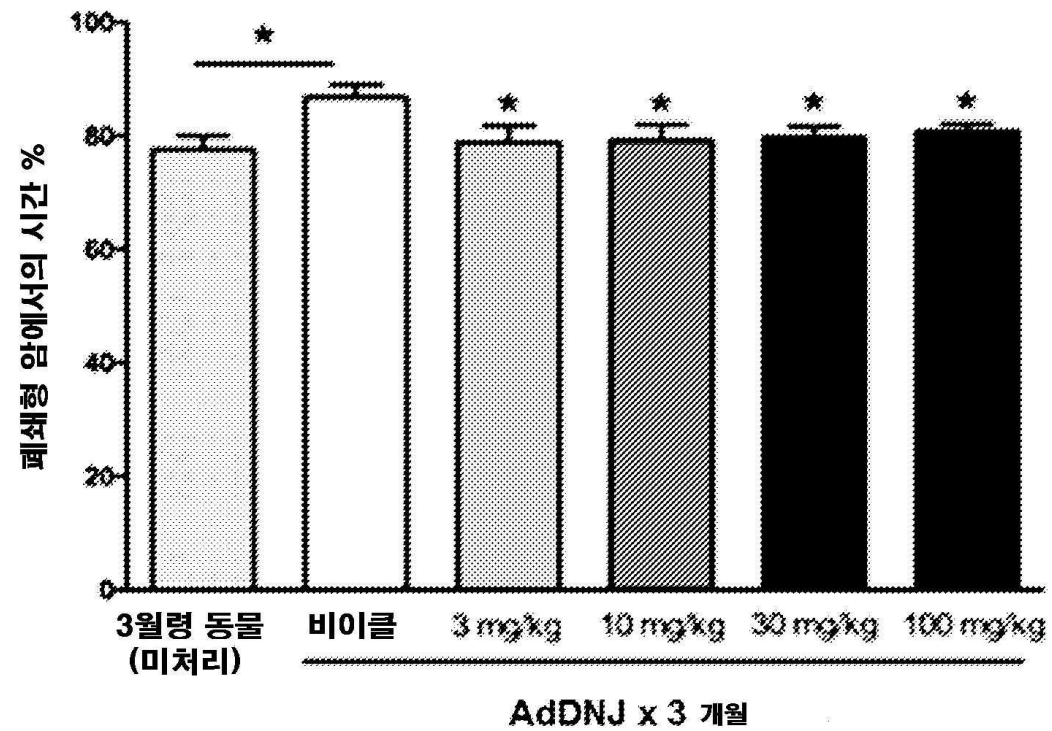
도면4b



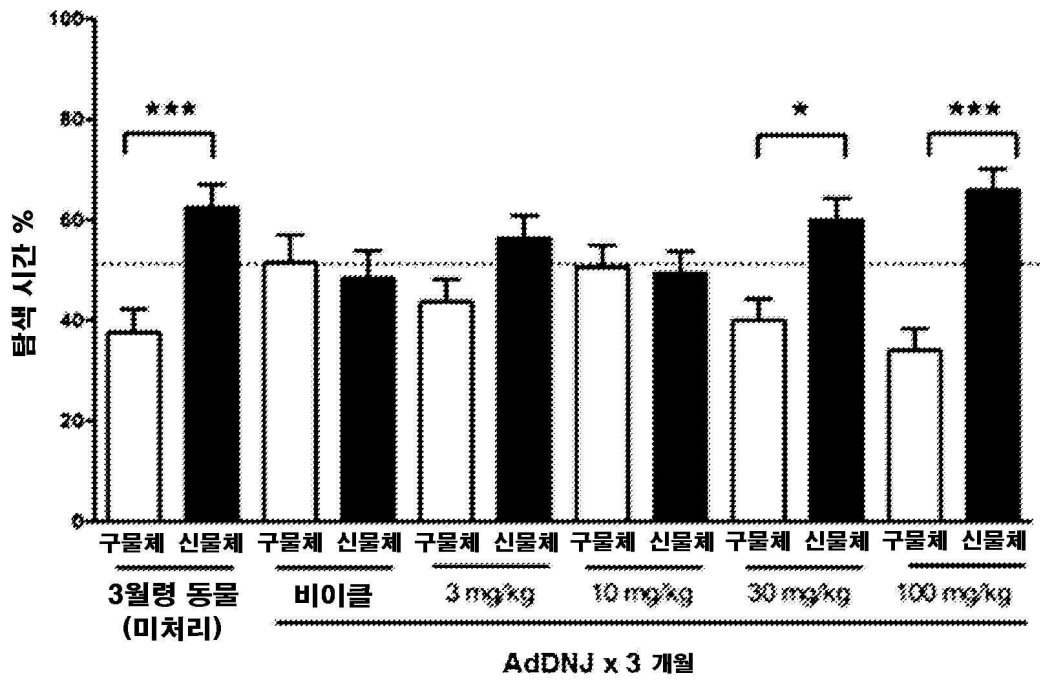
도면4c



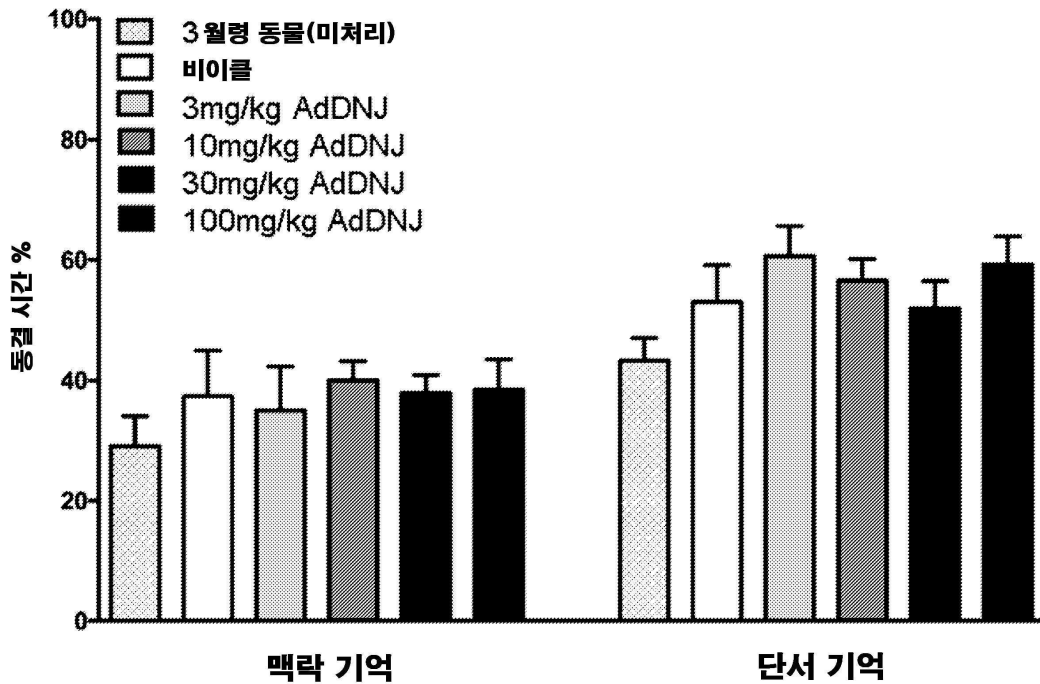
도면5a



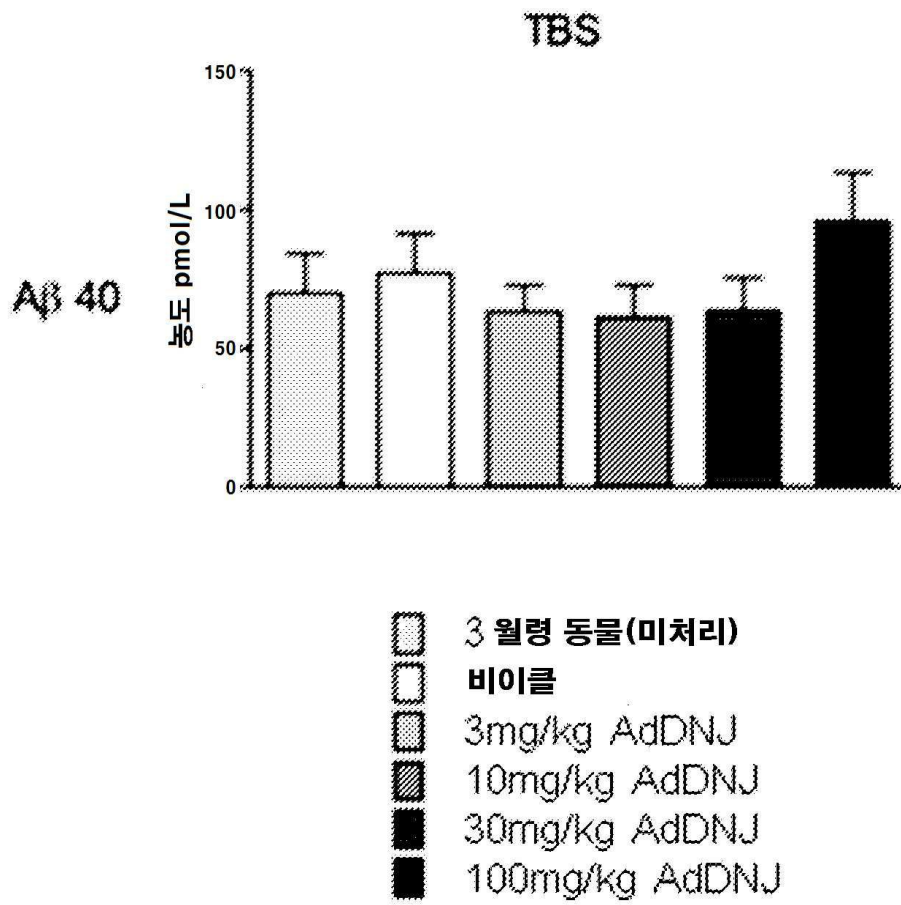
도면5b



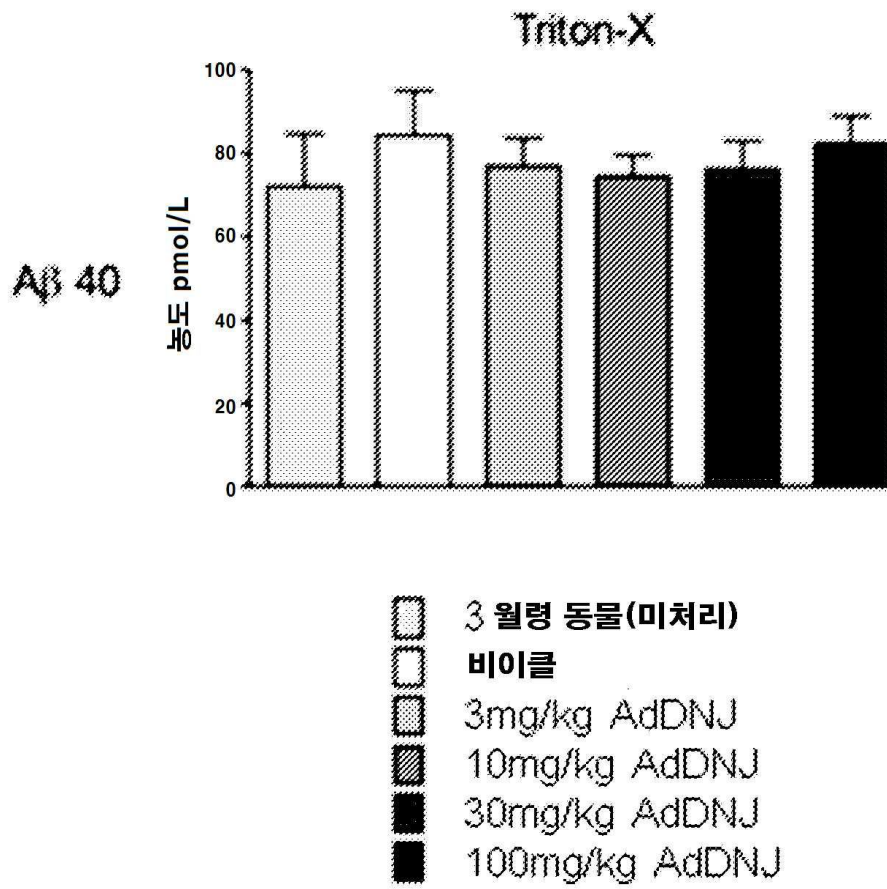
도면6



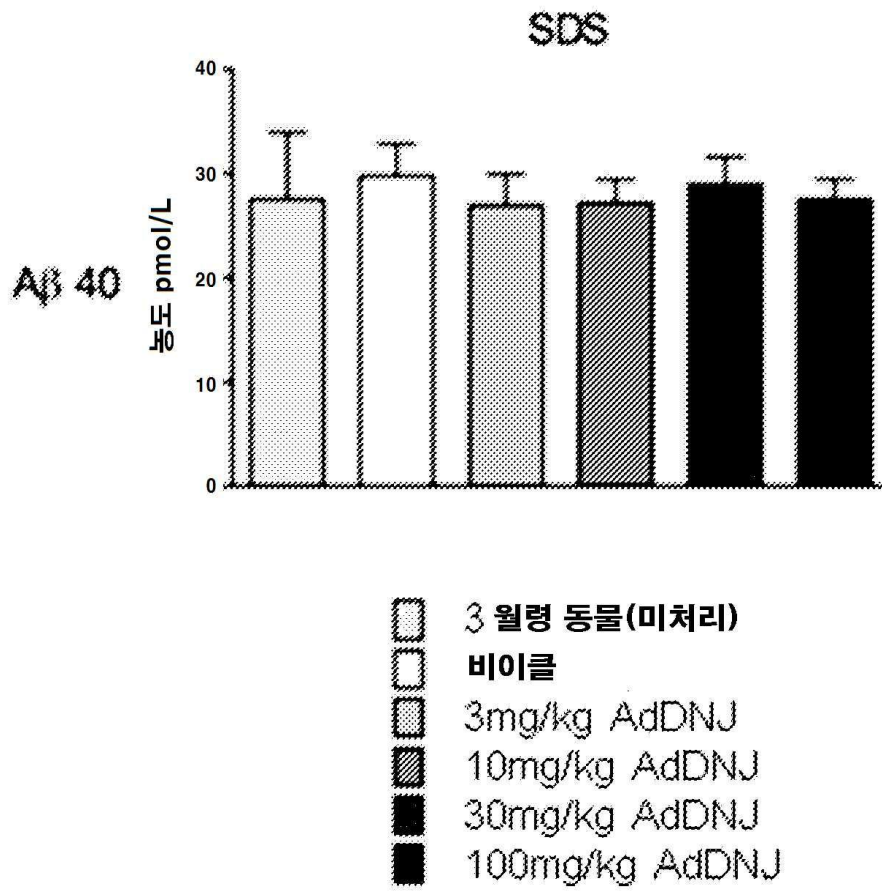
도면7a



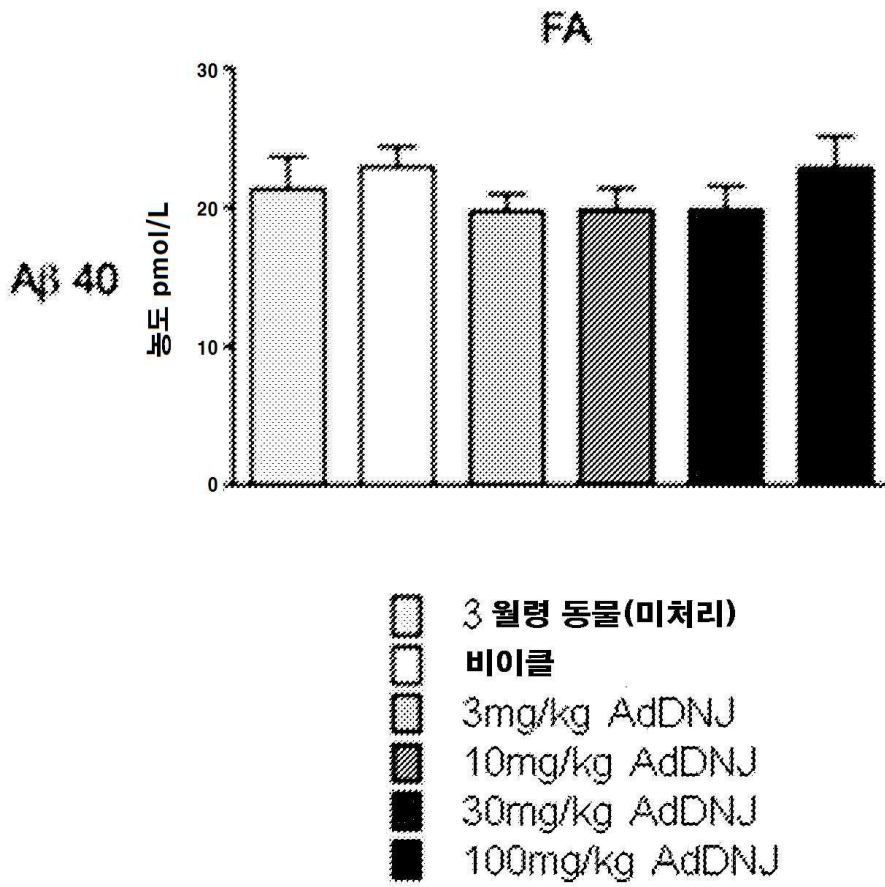
도면7b



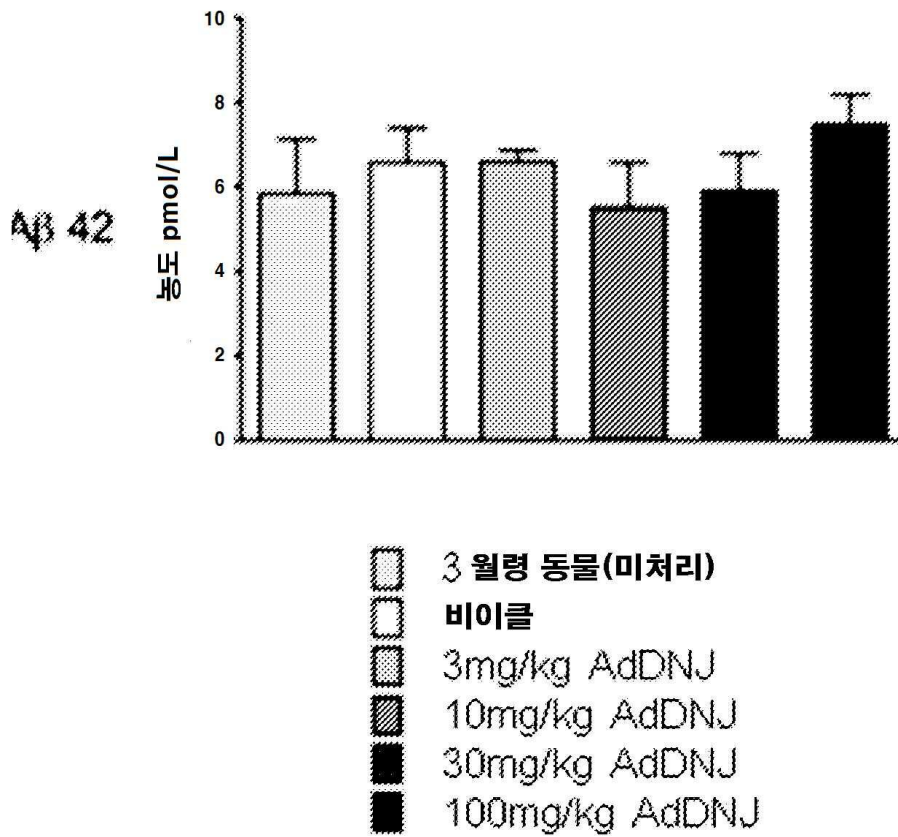
도면7c



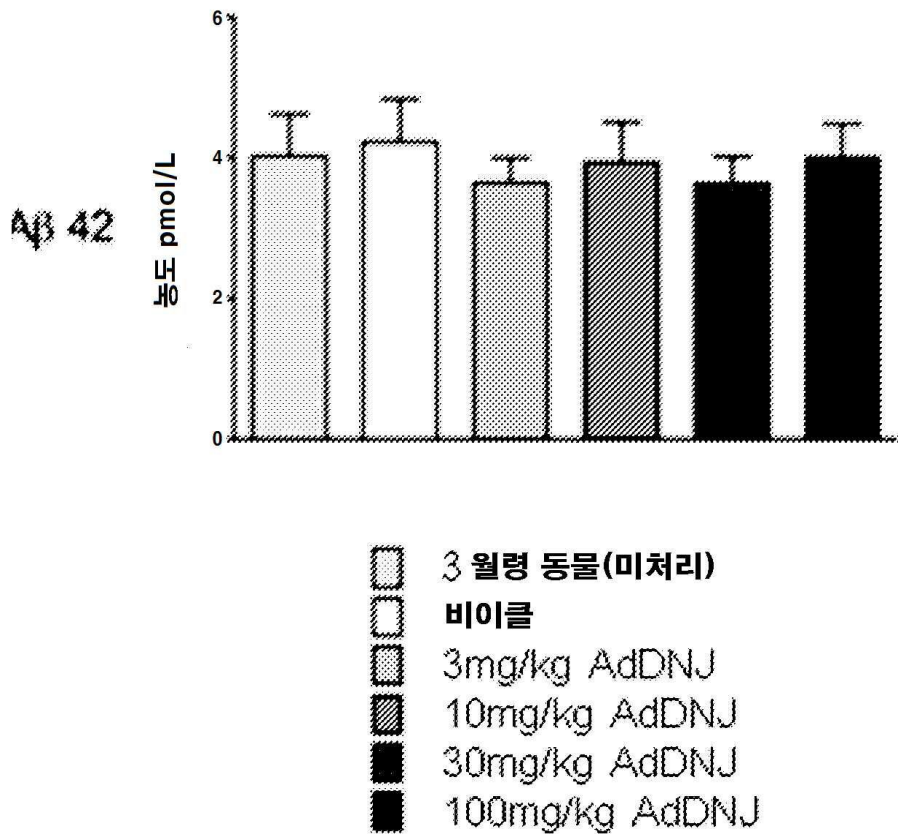
도면7d



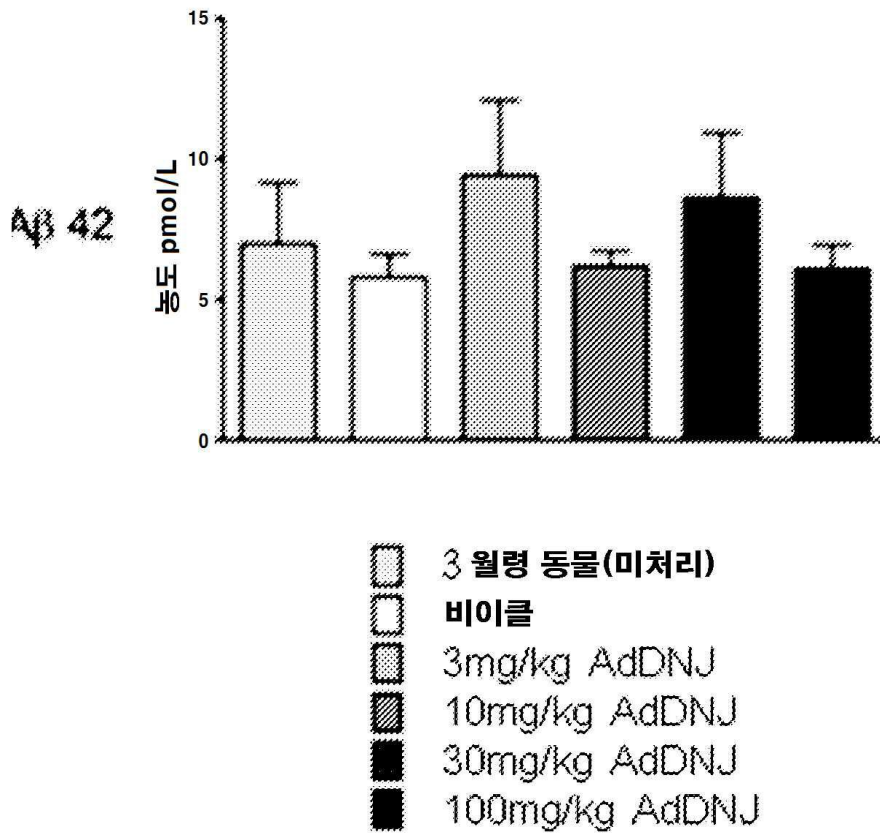
도면7e



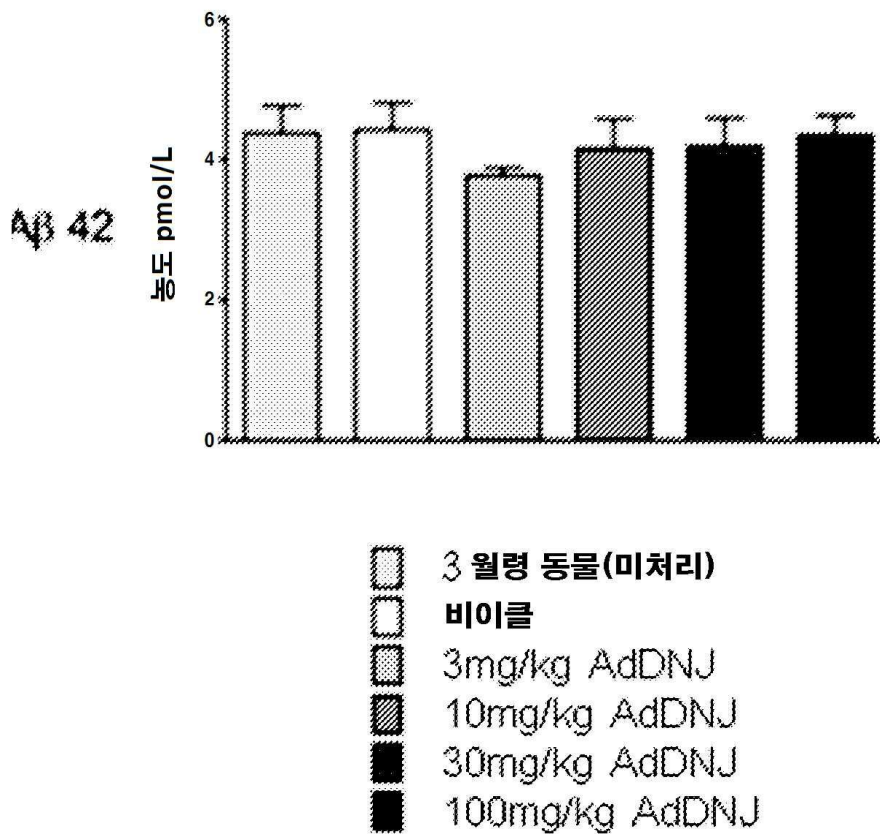
도면7f



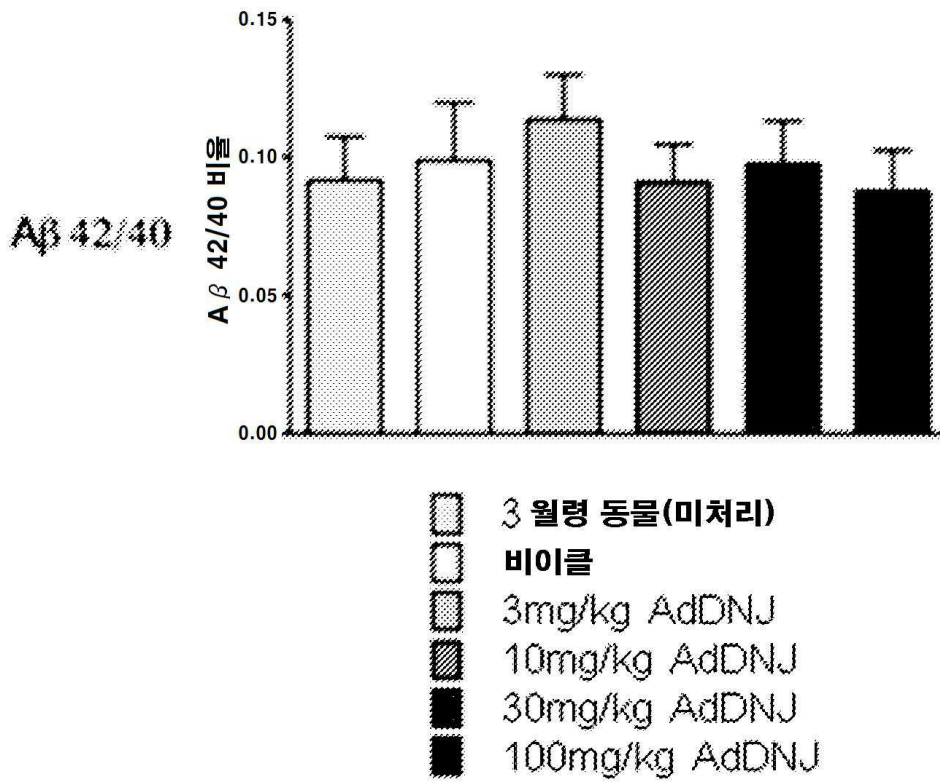
도면7g



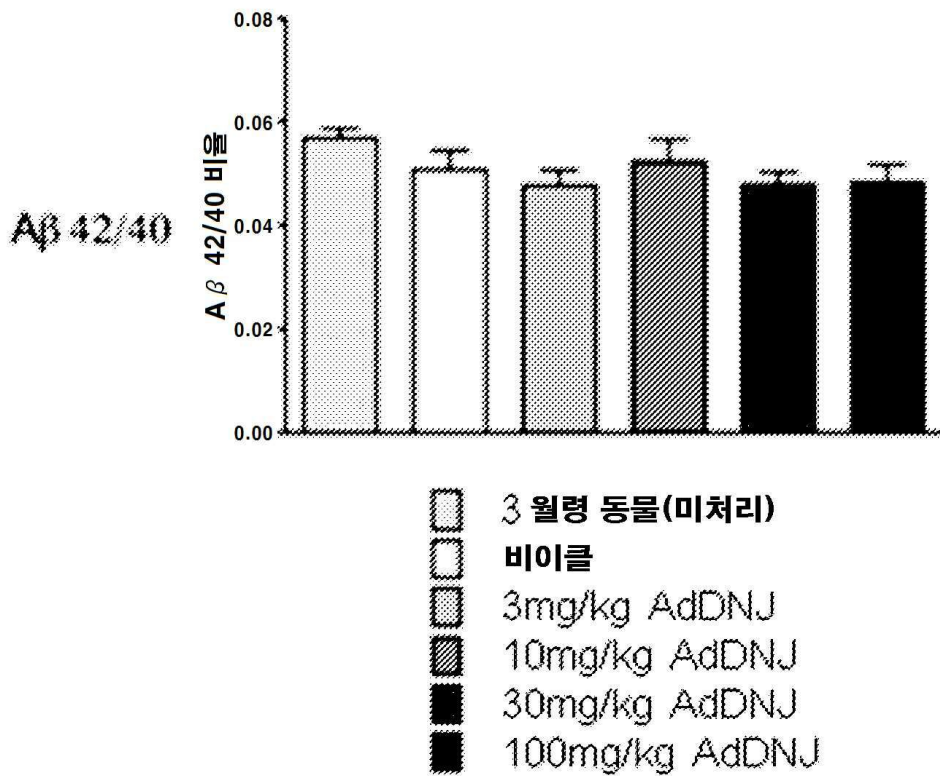
도면7h



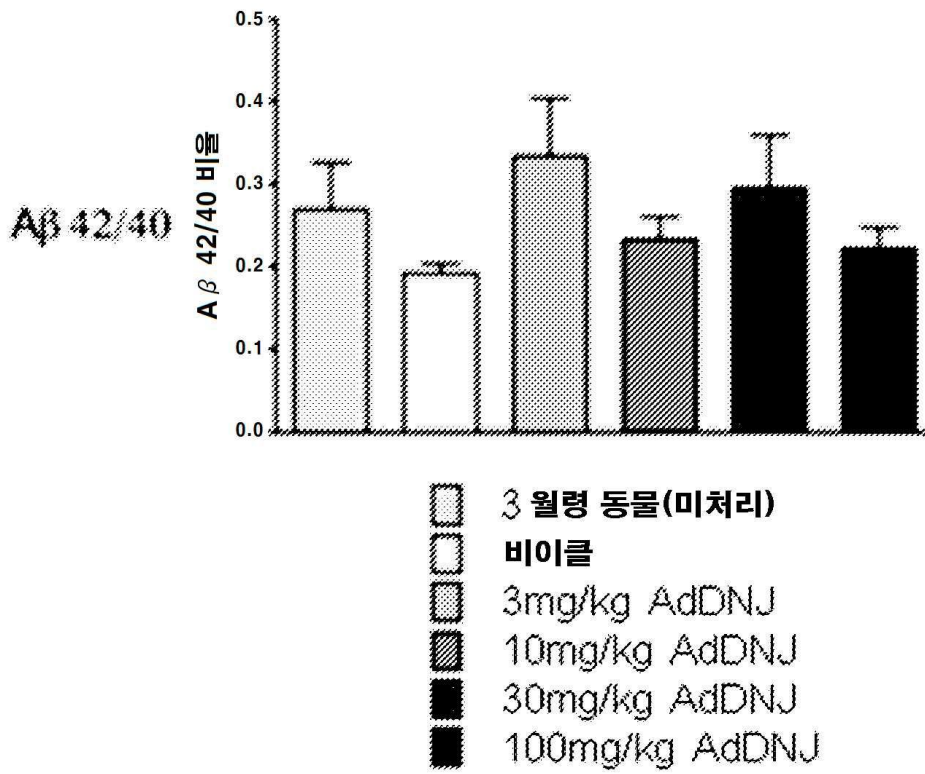
도면7i



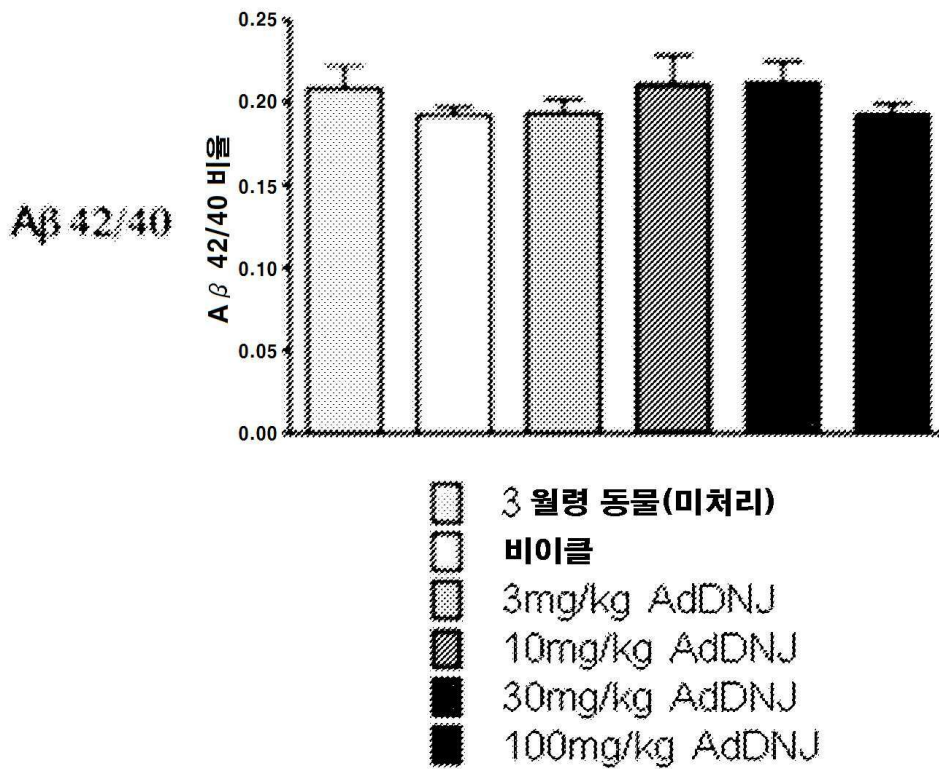
도면7j



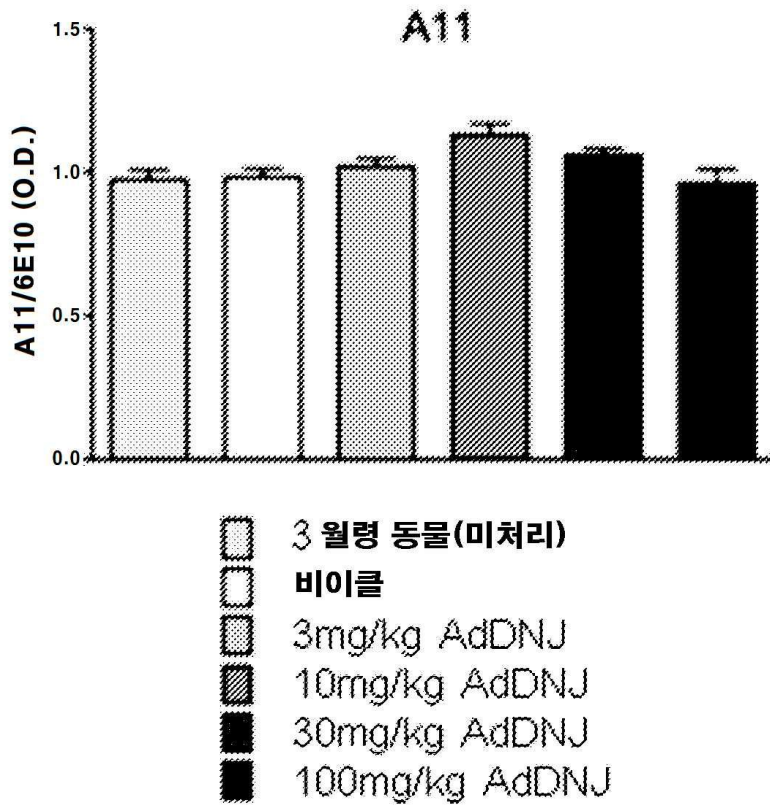
도면7k



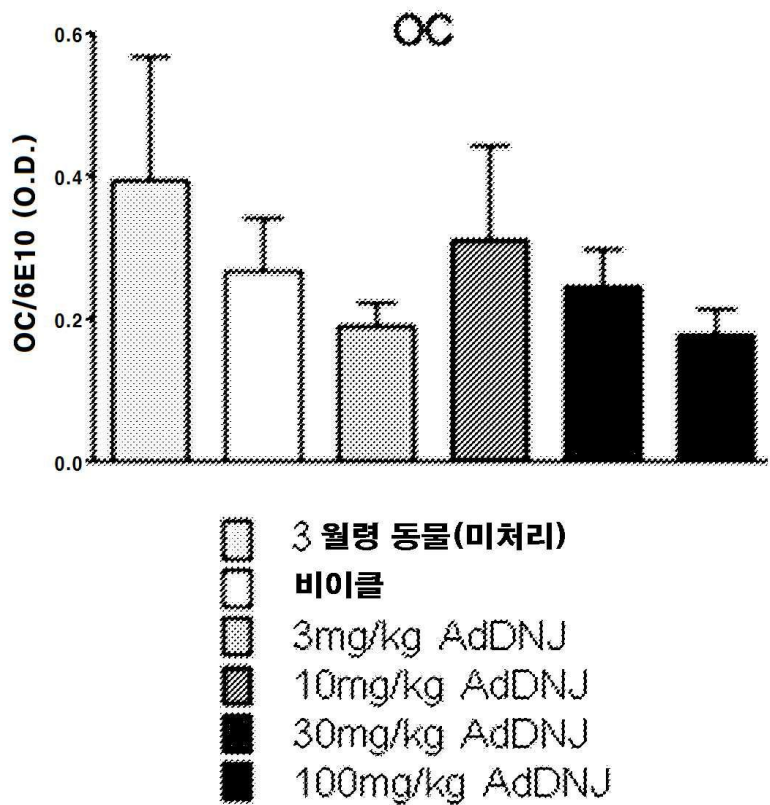
도면7l



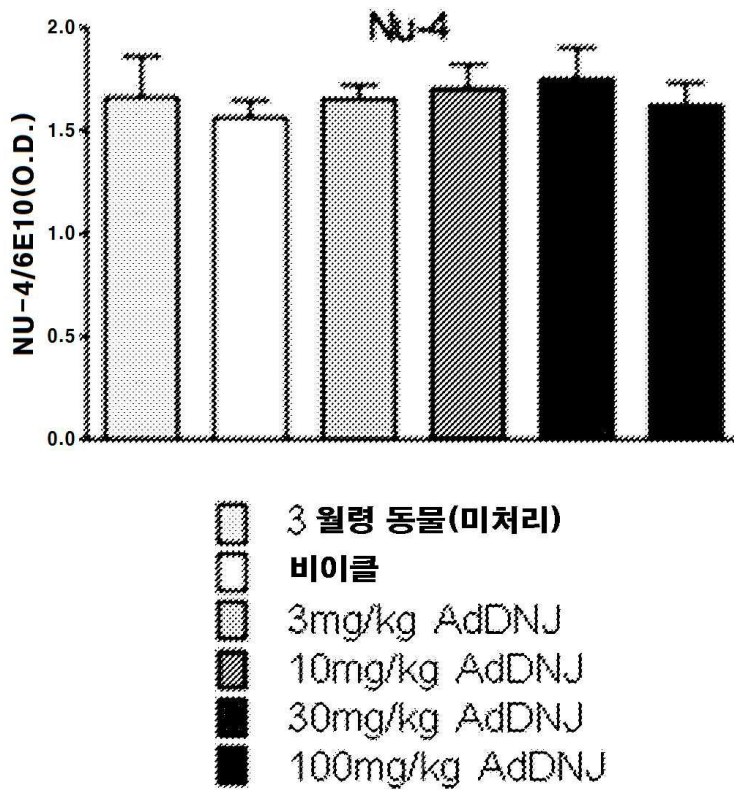
도면7m



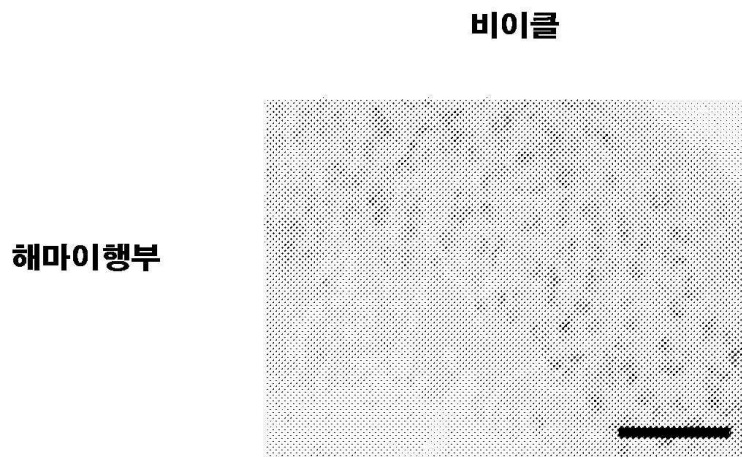
도면7n



도면7o



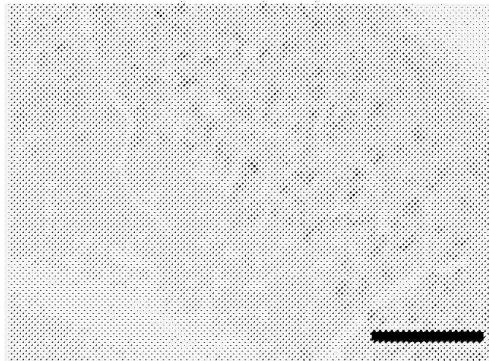
도면8a



도면8b

100mg/kg AdDNJ

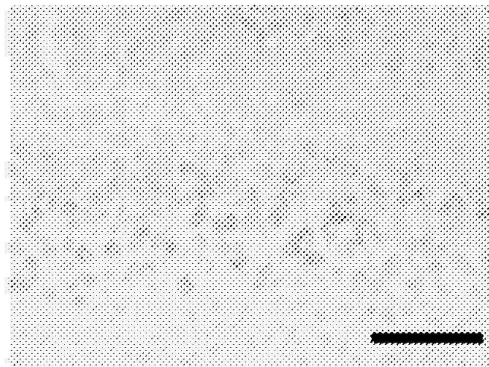
해마이행부



도면8c

비이클

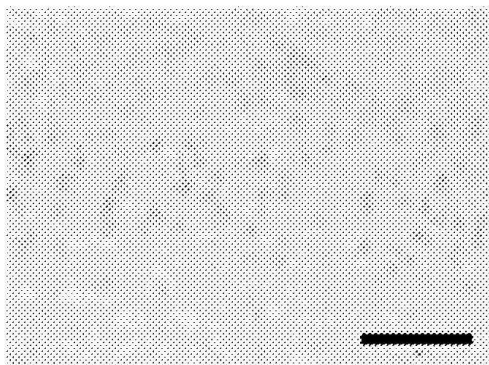
시각 피질



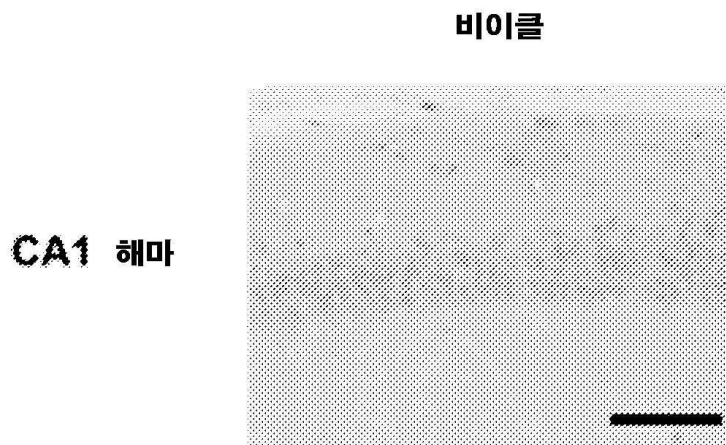
도면8d

100mg/kg AdDNJ

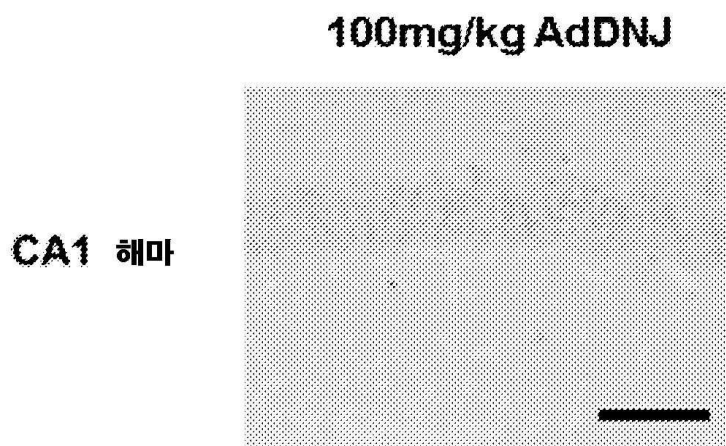
시각 피질



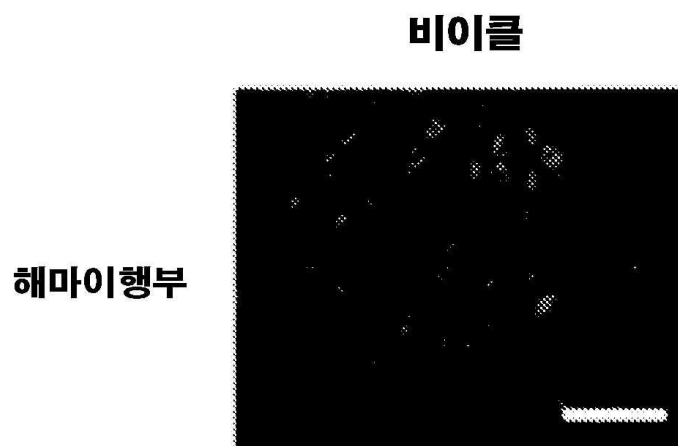
도면8e



도면8f



도면9a



도면9b

100mg/kg AdDNJ

해마이행부



도면9c

비이클

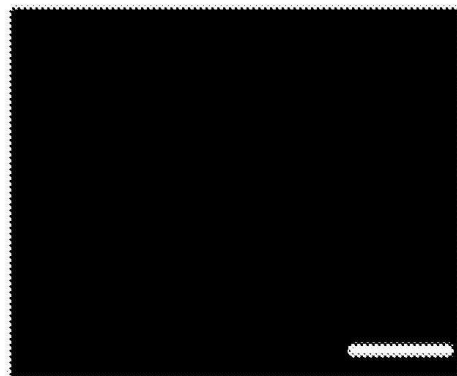
주변 후각 피질



도면9d

100mg/kg AdDNJ

주변 후각 피질



도면9e

비이클

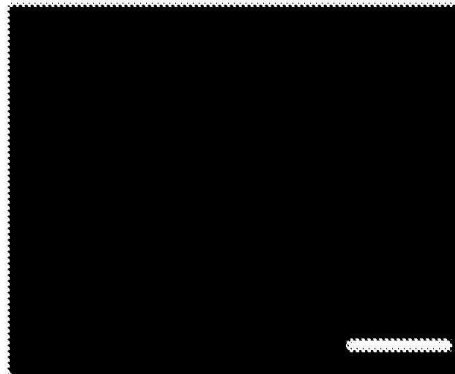
측면 내후각 피질



도면9f

100mg/kg AdDNJ

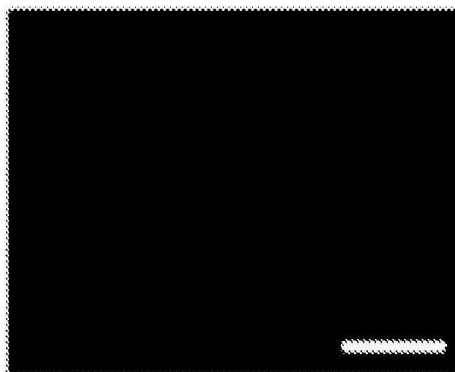
측면 내후각 피질



도면9g

비이클

시각 피질



도면9h

100mg/kg AdDNJ

시각 피질



도면9i

비이클

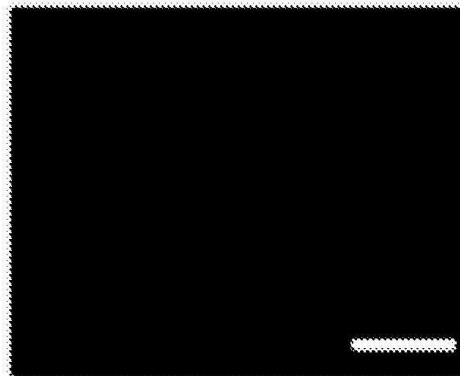
CA1 해마



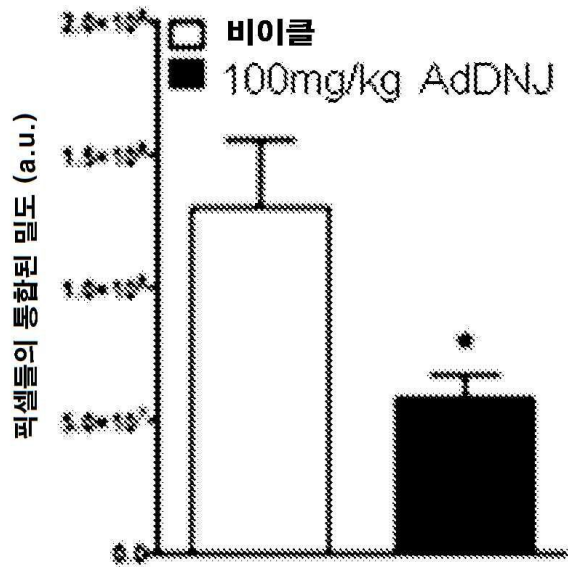
도면9j

100mg/kg AdDNJ

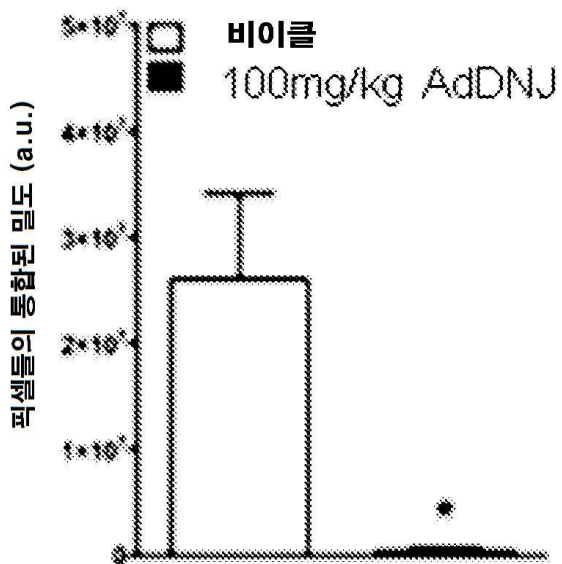
CA1 해마



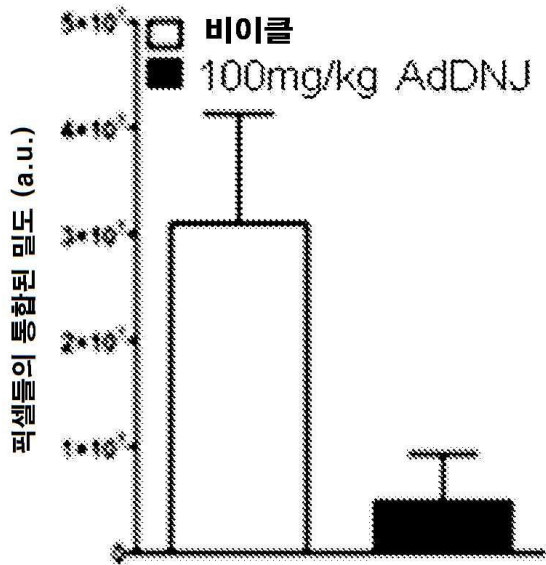
도면9k



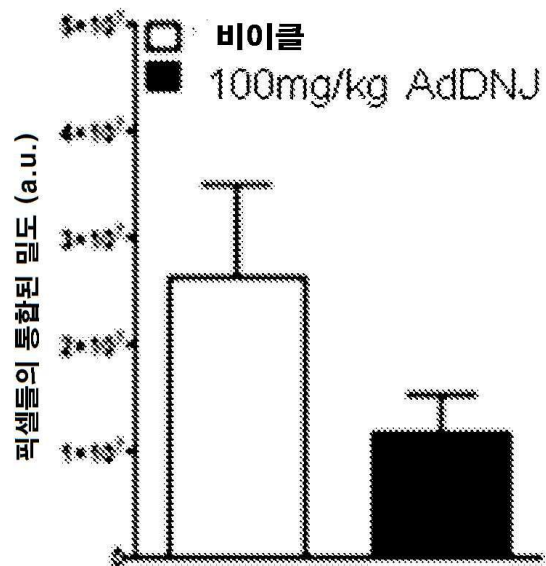
도면9l



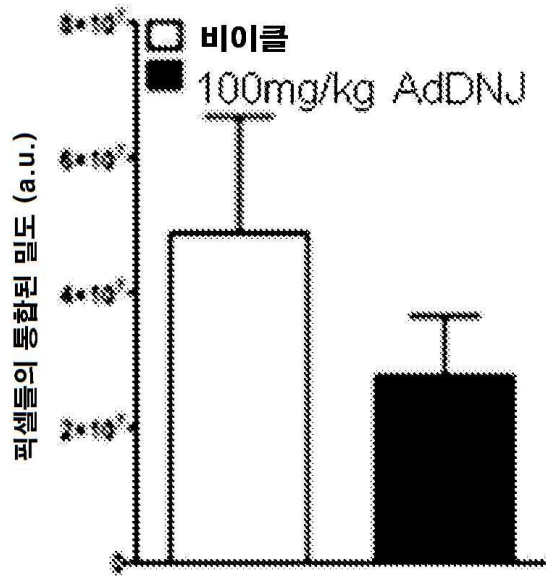
도면9m



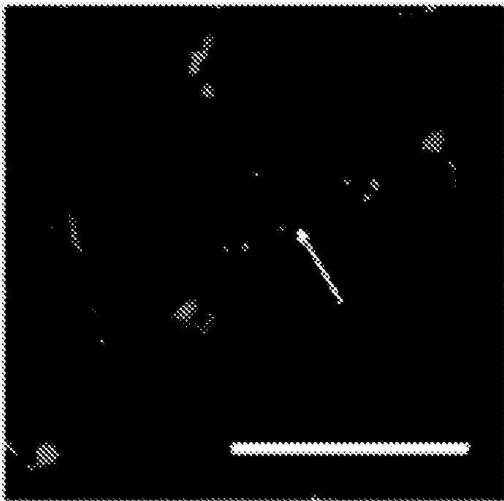
도면9n



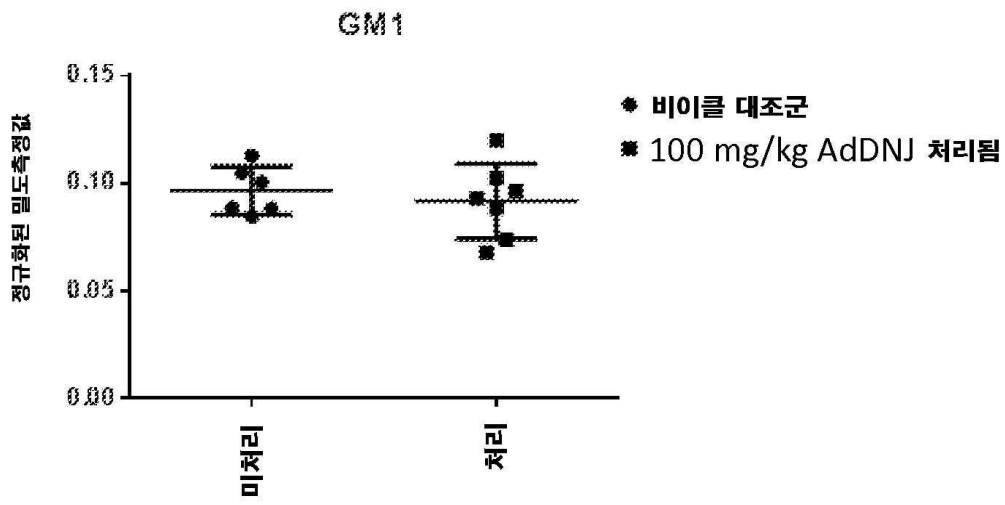
도면9a



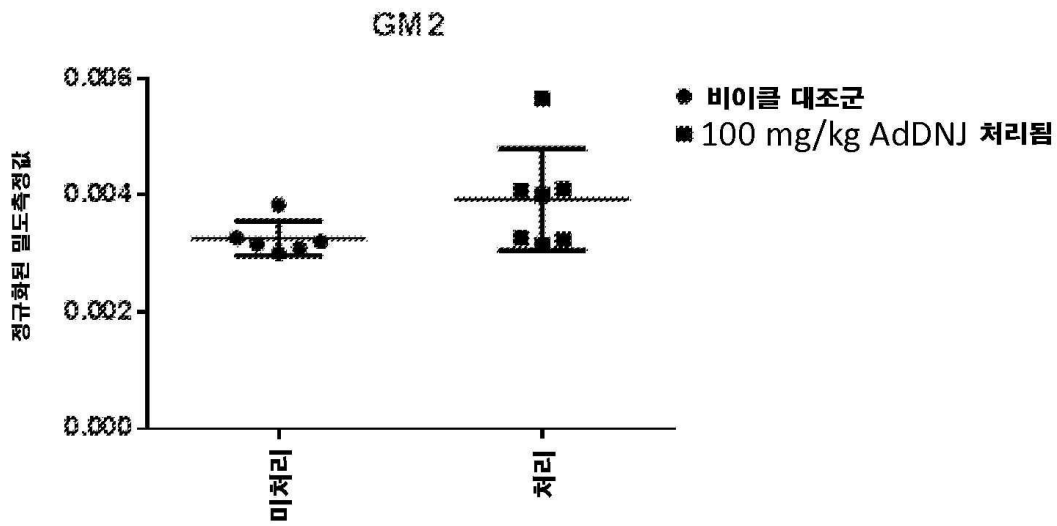
도면9b



도면10b



도면10c



도면10d

