



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0051238
(43) 공개일자 2023년04월17일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/665 (2006.01) A61K 31/375 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/665 (2013.01)
A61K 31/375 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7008543</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년09월17일
심사청구일자 2023년03월10일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2023년03월10일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/034211</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2022/059763
국제공개일자 2022년03월24일</p> <p>(30) 우선권주장
JP-P-2020-156457 2020년09월17일 일본(JP)</p> | <p>(71) 출원인
가부시끼가이샤 레조낙
일본국 도쿄도 미나토쿠 시바 다이몬 1초메 13반 9고</p> <p>(72) 발명자
나카가미, 유코
일본 1058518 도쿄도 미나토쿠 시바 다이몬 1초메 13반 9고 가부시끼가이샤 레조낙 내</p> <p>(74) 대리인
장수길, 오현식</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **오토파지 활성화제**

(57) 요약

아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 유효 성분으로서 함유하는 오토파지 활성화제 및 당해 오토파지 활성화제와 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는, 오토파지 활성화용 조성물.

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 유효 성분으로서 함유하는, 오토파지 활성화제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아스코르브산 유도체 또는 그의 염이, 인산아스코르빌, 인산아스코르빌의 지방산 에스테르, 에틸아스코르브산 및 아스코르브산글루코시드로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 아스코르브산 유도체 또는 그의 염인, 오토파지 활성화제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 아스코르브산 유도체 또는 그의 염이, 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염인, 오토파지 활성화제.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염이, 인산아스코르빌의 팔미트산에스테르 또는 그의 염인, 오토파지 활성화제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아스코르브산 유도체의 염을 유효 성분으로서 함유하고, 상기 아스코르브산 유도체의 염이, 아스코르브산 유도체의 마그네슘염 또는 나트륨염인, 오토파지 활성화제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, LC3 유전자의 발현을 촉진하는, 오토파지 활성화제.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현을 촉진하는, 오토파지 활성화제.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 알츠하이머병의 예방 또는 치료에 사용하는, 오토파지 활성화제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 오토파지 활성화제 및 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는, 오토파지 활성화용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 합계 함유량이, 오토파지 활성화용 조성물 전량에 대하여, 0.05 내지 15질량%인, 오토파지 활성화용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 오토파지 활성화제 및 오토파지 활성화용 조성물에 관한 것이다.

[0002] 본원은 2020년 9월 17일에, 일본에 출원된 특원 제2020-156457호에 기초하여 우선권을 주장하고, 그 내용을 여기에 인용한다.

배경 기술

- [0003] 오토파지(autophagy)는 기아, 성장 인자 결핍 및 병원체 감염 등의 세포 외 혹은 세포 내의 스트레스 및 시그널에 응답하고, 노후화 혹은 손상된 세포 내 물질 및 오르가넬라를 분해하는 것으로, 에너지의 재생산 및 손상 물질의 제거를 하는 메커니즘이며, 정상적인 세포의 항상성 유지에 중요하다. 과거의 연구로부터, 노화가 진행될수록 세포 내의 오토파지 활성이 급격히 감소한다고 보고되어 있다(비특허문헌 1). 또한, 오토파지를 억제할 경우, 세포 내에 노후 미토콘드리아나 잘못 접힌 단백질 등이 과잉으로 축적되고, 세포 내의 산화 스트레스가 증가함으로써 세포사가 유도되고, 결과로서 세포가 노화하게 된다.
- [0004] 따라서, 세포 내의 노화된 물질 및 오르가넬라를 분해하고, 그 분해 산물을 리사이클하는 오토파지를 활성화함으로써, 세포 내의 불필요한 물질을 신속하게 제거함으로써 세포의 항상성을 높일 수 있다.
- [0005] 한편, 노화가 오토파지에 미치는 영향으로서, 인간의 뇌에서는 가령(加齡)과 함께 ATG5, ATG7 및 Beclin 1 유전자의 발현량이 저하되는 것이 알려져 있다. 또한, 알츠하이머병 등의 신경 변성 질환에서는, 오토파지의 활성 저하가 확인된다고 여겨진다. 그 때문에, 오토파지의 활성화는 알츠하이머병을 비롯하여, 헌팅틴병, 파킨슨병 등의 신경 변성 질환의 치료 및 예방에 기여하는 것이 알려져 있다(비특허문헌 2, 3). 특히 알츠하이머병에서는 오토파지의 기능이 저해되어 있기 때문에, 아밀로이드 β라 불리는 응집 단백질이 생체 내에 축적되고, 이것이 발증에 관련되어 있는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 4). 또한, 뇌의 흑질 및 담창구에 있어서의 철의 침착과 대뇌의 위축을 수반하는 신경 변성 질환인 SENDA병(SENDA: static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood), 소화관에 위중한 염증 혹은 궤양을 야기하는 염증성 장질환인 크론병 및 암에 대해서도, 오토파지 관련 유전자나 선택적 오토파지에 관여하는 유전자의 변이가 영향을 미친다고 알려져 있다(비특허문헌 5).
- [0006] 오토파지의 과정은, 효모 및 포유류의 양쪽에서 연구되고 있고, 최대 36의 단백질이 이용되고 있다. 그 중에서도 오토파고솜의 형성으로부터 그 내용물의 분화까지는, 오토파지 관련 유전자(ATG)에 코딩되는 Atg 단백질에 의해 제어되고 있고, Atg12-Atg5 결합체, LC3-포스포타이딜에탄올아민(PE) 결합체를 포함하는 6개의 그룹으로 분류할 수 있고, 각각이 각 과정에서 단계적으로 작용하고 있다.
- [0007] 오토파지 활성화제로서는, 오토파지의 활성 상태의 마커인 LC3 관련 인자를 증가시켜서 오토파지를 활성화하는 화합물 및 오토파지 플럭스(오토파고솜의 리소솜에 대한 융합을 포함함)를 촉진하는 화합물·유효 성분이 보고되어 있다(특허문헌 1 내지 4).

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 국제공개 제2018/173653호
- (특허문헌 0002) 일본특허공개 제2018-80204호 공보
- (특허문헌 0003) 일본특허공표 제2018-510902호 공보
- (특허문헌 0004) 일본특허공표 제2019-529514호 공보

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Yogendra S. Rajawat et al., Aging: Central role for autophagy and the lysosomal degradative system. Ageing Research Reviews 8 (2009) 199-213.
- (비특허문헌 0002) Aaron Barnett et al., Autophagy in Aging and Alzheimer's Disease: Pathologic or Protective?. J Alzheimers Dis. 2011; 25(3): 385-394.
- (비특허문헌 0003) Marta M. Lipinski et al., Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2010, 107, 14164-14169.
- (비특허문헌 0004) Xiangqing Li et al., Cubeben induces autophagy via PI3K-AKT-mTOR pathway to protect

primary neurons against amyloid beta in Alzheimer's disease. Cytotechnology (2019) 71: 679-686.

(비특허문헌 0005) 카게야마 외, 「오토파지와 질환」, 영역 융합 리뷰, 2014년, 3, e006

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 상기한 바와 같이 알츠하이머병 등의 여러 가지 질환에 있어서 오토파지 기능이 저하되는 것이 알려져 있고, 오토파지를 효과적으로 활성화할 수 있는 약제가 요구되고 있다. 그러나, 종래 알려져 있는 약제로는, 그 효과는 아직 불충분하다고 할 수 있다.
- [0011] 그래서, 본 발명은, 오토파지를 효과적으로 활성화할 수 있는, 오토파지 활성화제 및 상기 오토파지 활성화제를 함유하는 오토파지 활성화용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 이하의 양태를 포함한다.
- [0013] (1) 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 유효 성분으로서 함유하는, 오토파지 활성화제.
- [0014] (2) 상기 아스코르브산 유도체 또는 그의 염이, 인산아스코르빌, 인산아스코르빌의 지방산 에스테르, 에틸아스코르브산 및 아스코르브산글루코시드로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 아스코르브산 유도체 또는 그의 염인, (1)에 기재된 오토파지 활성화제.
- [0015] (3) 상기 아스코르브산 유도체 또는 그의 염이, 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염인, (2)에 기재된 오토파지 활성화제.
- [0016] (4) 상기 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염이, 인산아스코르빌의 팔미트산에스테르 또는 그의 염인, (3)에 기재된 오토파지 활성화제.
- [0017] (5) 상기 아스코르브산 유도체의 염을 유효 성분으로서 함유하고, 상기 아스코르브산 유도체의 염이, 아스코르브산 유도체의 마그네슘염 또는 나트륨염인, (1) 내지 (4) 중 어느 한 항에 기재된 오토파지 활성화제.
- [0018] (6) LC3 유전자의 발현을 촉진하는, (1) 내지 (5) 중 어느 한 항에 기재된 오토파지 활성화제.
- [0019] (7) LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현을 촉진하는, (1) 내지 (6) 중 어느 한 항에 기재된 오토파지 활성화제.
- [0020] (8) 알츠하이머병의 예방 또는 치료에 사용하는, (1) 내지 (7) 중 어느 한 항에 기재된 오토파지 활성화제.
- [0021] (9) (1) 내지 (8) 중 어느 한 항에 기재된 오토파지 활성화제 및 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는, 오토파지 활성화용 조성물.
- [0022] (10) 상기 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 함계 함유량이, 오토파지 활성화용 조성물 전량에 대하여, 0.05 내지 15질량%인, (9)에 기재된 오토파지 활성화용 조성물.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따르면, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 유전자의 발현을 촉진하여, 오토파지를 효과적으로 활성화할 수 있는, 오토파지 활성화제 및 상기 오토파지 활성화제를 함유하는 오토파지 활성화용 조성물을 제공할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] (오토파지 활성화제)
- [0025] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 유효 성분으로서 함유한다.
- [0026] 여기서 「오토파지(autophagy)」란, 노후 또는 손상된 세포 내 물질 및 오르가넬라를 분해함으로써, 에너지의 재생산 및 손상 물질의 제거를 하는 메커니즘이다.

[0027] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 오토파지 마커인 LC3 유전자, 그리고 오토파지세포에 포함되는 ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현을 촉진시킬 수 있어, 오토파지를 활성화시킬 수 있다.

[0028] <아스코르브산 유도체 또는 그의 염>

[0029] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 아스코르브산 유도체로서는, 아스코르브산의 적어도 하나의 수산기를 유도화한 아스코르브산 유도체를 들 수 있다.

[0030] 아스코르브산 유도체로서, 보다 구체적으로는, 아스코르브산의 수산기의 어느 것을 인산에스테르화시킨 인산아스코르빌(아스코르브산 인산에스테르라고도 함); 아스코르브산의 수산기의 어느 것을 인산에스테르화하고, 다른 수산기를 지방산에 의해 에스테르화시킨 인산아스코르빌의 지방산 에스테르; 아스코르브산의 수산기의 어느 것을 에톡시화시킨 에틸아스코르브산; 아스코르브산의 수산기의 어느 것을 글루코시드화시킨 아스코르브산글루코시드; 아스코르브산의 수산기의 어느 것을 아실화시킨 아실화아스코르브산; 아스코르브산의 수산기의 어느 것을 아실화하고, 다른 수산기를 인산에스테르화시킨 아실화 인산아스코르빌; 아스코르브산의 수산기의 어느 것을 글리세린으로 치환한 글리세릴아스코르브산; 인산을 통해 아스코르브산과 토코페롤이 각각 에스테르 결합으로 결합된 아스코르브산과 토코페롤의 인산디에스테르(구체적으로는, dl- α -토코페롤-2-L-아스코르브산인산디에스테르 등) 등을 들 수 있다.

[0031] 아스코르브산 유도체의 염으로서, 예를 들어, 아스코르브산 유도체와 무기 염기의 염, 아스코르브산 유도체와 유기 염기의 염 등을 들 수 있다.

[0032] 무기 염기와 염으로서, 예를 들어, 나트륨염, 칼륨염 등의 알칼리 금속염; 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리 토류 금속염; 알루미늄염; 암모늄염; 아연염 등을 들 수 있다.

[0033] 유기 염기와 염으로서, 예를 들어, 알킬암모늄염, 염기성 아미노산과의 염 등을 들 수 있다.

[0034] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 아스코르브산 유도체 또는 그의 염으로서, 상기한 것 중에서도, (i) 인산아스코르빌 또는 그의 염, (ii) 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염, (iii) 에틸아스코르브산 또는 그의 염, (iv) 아스코르브산글루코시드 또는 그의 염이 바람직하다.

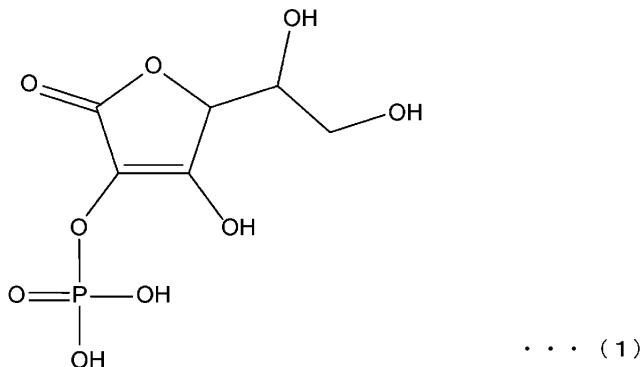
[0035] <<(i) 인산아스코르빌 또는 그의 염>>

[0036] · 인산아스코르빌

[0037] 인산아스코르빌은, 아스코르브산의 적어도 하나의 수산기에 인산기가 도입된 화합물이다.

[0038] 인산아스코르빌로서는, 하기 화학식 (1)로 표현되는 화합물을 적합하게 들 수 있다.

[0039] 하기 화학식 (1)로 표현되는 화합물은, 아스코르브산의 2위의 수산기를 인산에스테르에 의해 보호한, 아스코르브산-2-인산에스테르이다.



[0040]

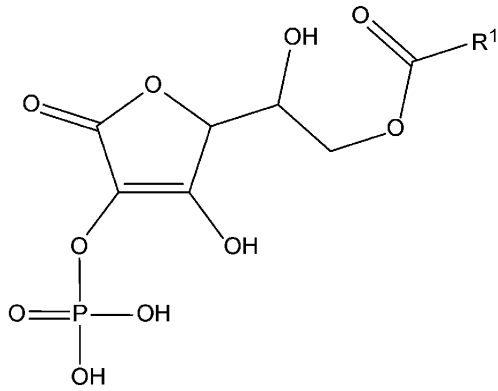
[0041] 인산아스코르빌에는, D체 및 L체의 입체 이성체, 그리고 라세미체의 DL체가 존재한다. 본 실시 형태에 있어서의 인산아스코르빌은, 이들 입체 이성체 중 어느 것이어도 되지만, 입수 용이성의 관점에서, L체인 것이 바람직하고, 구체적으로는, L-아스코르브산-2-인산에스테르가 바람직하다.

[0042] · 인산아스코르빌의 염

[0043] 인산아스코르빌의 염으로서, 예를 들어, 인산아스코르빌과 무기 염기의 염, 인산아스코르빌과 유기 염기의 염

등을 들 수 있다.

- [0044] 무기 염기와의 염으로서, 예를 들어, 나트륨염, 칼륨염 등의 알칼리 금속염; 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리 토류 금속염; 알루미늄염; 암모늄염; 아연염 등을 들 수 있다.
- [0045] 유기 염기와의 염으로서, 예를 들어, 알킬암모늄염, 염기성 아미노산과의 염 등을 들 수 있다.
- [0046] 인산아스코르빌의 염으로서, 상기한 것 중에서도, 알칼리 금속염 또는 알칼리 토류 금속염이 바람직하고, 나트륨염 또는 마그네슘염이 보다 바람직하고, 마그네슘염이 더욱 바람직하다.
- [0047] 인산아스코르빌의 마그네슘염은, 안정성이 높고, 또한 착색되기 어렵다는 관점에서 바람직하다.
- [0048] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 인산아스코르빌 또는 그의 염으로서, 상기한 것 중에서도, 안정성 향상의 관점에서, 인산아스코르빌의 염인 것이 바람직하고, 상기 화학식 (1)로 표현되는 화합물의 알칼리 금속염, 또는 상기 화학식 (1)로 표현되는 화합물의 알칼리 토류 금속염이 보다 바람직하고, 상기 화학식 (1)로 표현되는 화합물의 나트륨염, 또는 상기 화학식 (1)로 표현되는 화합물의 마그네슘염이 더욱 바람직하다.
- [0049] 상기 화학식 (1)로 표현되는 화합물의 마그네슘염은, 구체적으로는, L-아스코르브산-2-인산에스테르의 마그네슘염이 특히 바람직하다.
- [0050] 상기 화학식 (1)로 표현되는 화합물의 나트륨염은, 구체적으로는, L-아스코르브산-2-인산에스테르의 나트륨염이 특히 바람직하다.
- [0051] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 인산아스코르빌 또는 그의 염은, 1종 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용하여 사용해도 된다.
- [0052] 인산아스코르빌 또는 그의 염은, 공지의 제조 방법, 예를 들어 일본 특허 공개 평2-279690, 일본 특허 공개 평 6-345786에 기재된 방법 등에 의해 제조할 수 있다.
- [0053] 예를 들어, 인산아스코르빌의 구체적인 제조 방법으로서, 아스코르브산과, 옥시염화인 등을 반응시켜, 포스포릴화함으로써 얻을 수 있다.
- [0054] 또한, 인산아스코르빌의 염의 구체적인 제조 방법으로서, 인산아스코르빌 용액을, 산화마그네슘 등의 금속 산화물, 또는 수산화나트륨 등의 금속 수산화물 등으로 중화함으로써, 인산아스코르빌의 염을 얻을 수 있다.
- [0055] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 인산아스코르빌의 염의 시판예로서는, 쇼와 덴코사제의 아스코르브산 PS(화합물명; L-아스코르브산-2-인산에스테르의 나트륨염(L-아스코르브산-2-인산나트륨이라고도 함), 표시 명칭; 아스코르빌인산 Na), 쇼와 덴코사제의 아스코르브산 PM(화합물명; L-아스코르브산-2-인산에스테르의 마그네슘염(L-아스코르브산-2-인산마그네슘이라고도 함), 표시 명칭; 인산아스코르빌 Mg) 등을 들 수 있다.
- [0056] <<(ii) 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염>>
- [0057] · 인산아스코르빌의 지방산 에스테르
- [0058] 인산아스코르빌의 지방산 에스테르는, 인산아스코르빌의 적어도 하나의 수산기에 지방산이 에스테르 결합한 화합물이다. 해당 지방산으로서, 탄소 원자수 6 내지 22의 직쇄상 또는 분지쇄상의 지방산(즉, 카르복시기에 결합하는 직쇄상 또는 분지쇄상의 알킬기의 탄소 원자수가 5 내지 21인 지방산)인 것이 바람직하고, 탄소 원자수 10 내지 20의 직쇄상 또는 분지쇄상의 지방산인 것이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 12 내지 18의 직쇄상 또는 분지쇄상의 지방산인 것이 더욱 바람직하다.
- [0059] 인산아스코르빌의 지방산 에스테르로서는, 하기 일반식 (2)로 표시되는 화합물을 들 수 있다. 하기 일반식 (2)로 표시되는 화합물은, 아스코르브산의 2위의 수산기에 인산이 에스테르 결합하고, 6위의 수산기에 지방산이 에스테르 결합한, 아스코르브산-2-인산-6-지방산이다.



[0060]

[0061] [식 중, R¹은 탄소 원자수 5 내지 21의 직쇄상 또는 분지쇄상의 알킬기이다.]

[0062] 상기 일반식 (2) 중, R¹은 탄소 원자수 5 내지 21의 직쇄상 또는 분지쇄상의 알킬기이다. 구체적으로는 직쇄상 또는 분지쇄상의 펜틸기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 헥실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 헵틸기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 옥틸기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 노닐기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 운데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 도데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 트리데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 테트라데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 펜타데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 헥사데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 헵타데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 옥타데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 노나데실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 이코실기, 직쇄상 또는 분지쇄상의 헨이코실기를 들 수 있다.

[0063] 상기 일반식 (2) 중, R¹은 상기한 것 중에서도, 탄소 원자수 9 내지 19의 직쇄상 또는 분지쇄상의 알킬기인 것이 바람직하고, 탄소 원자수 11 내지 17의 직쇄상 또는 분지쇄상의 알킬기인 것이 보다 바람직하고, 탄소 원자수 13 내지 15의 직쇄상 또는 분지쇄상의 알킬기인 것이 더욱 바람직하고, 원료 입수성 등의 관점에서, 탄소 원자수 15의 직쇄상 알킬기(직쇄상의 펜타데실기)인 것이 특히 바람직하다.

[0064] 즉, 상기 일반식 (2)로 표시되는 화합물로서는, 6-O-팔미토일아스코르브산-2-인산에스테르(아스코르브산-2-인산-6-팔미트산이라고도 함)가 특히 바람직하다.

[0065] 인산아스코르빌의 지방산 에스테르에는, D체 및 L체의 입체 이성체, 그리고 라세미체의 DL체가 존재한다. 본 실시 형태에 있어서의 인산아스코르빌의 지방산 에스테르는, 이들 입체 이성체 중 어느 것이어도 되지만, 입수 용이성의 관점에서, L체인 것이 바람직하고, 구체적으로는 L-아스코르브산-2-인산에스테르의 지방산 에스테르가 바람직하다.

[0066] · 인산아스코르빌의 지방산 에스테르염

[0067] 인산아스코르빌의 지방산 에스테르염으로서, 예를 들어 인산아스코르빌의 지방산 에스테르와 무기 염기의 염, 인산아스코르빌의 지방산 에스테르와 유기 염기의 염 등을 들 수 있다.

[0068] 무기 염기와의 염으로서, 예를 들어 나트륨염, 칼륨염 등의 알칼리 금속염; 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리 토류 금속염; 알루미늄염; 암모늄염; 아연염 등을 들 수 있다.

[0069] 유기 염기와의 염으로서, 예를 들어 알킬암모늄염, 염기성 아미노산과의 염 등을 들 수 있다.

[0070] 인산아스코르빌의 지방산 에스테르염으로서, 상기한 것 중에서도, 알칼리 금속염 또는 알칼리 토류 금속염이 바람직하고, 나트륨염 또는 마그네슘염이 보다 바람직하고, 나트륨염이 더욱 바람직하다.

[0071] 인산아스코르빌의 지방산 에스테르나트륨염은, 안정성 및 제제에 대한 배합 용이성의 관점에서 바람직하다.

[0072] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염으로서, 상기한 것 중에서도, 안정성 및 제제에 대한 배합 용이성의 관점에서 인산아스코르빌의 지방산 에스테르염인 것이 바람직하고, 상기 일반식 (2)로 표시되는 화합물의 알칼리 금속염, 또는 상기 일반식 (2)로 표시되는 화합물의 알칼리 토류 금속염이 보다 바람직하고, 상기 일반식 (2)로 표시되는 화합물의 나트륨염, 또는 상기 일반식 (2)로 표시되는 화합물의 마그네슘염이 더욱 바람직하고, 상기 일반식 (2)로 표시되는 화합물의 나트륨염, 구체

적으로는 L-아스코르브산-2-인산-6-팔미트산의 나트륨염이 특히 바람직하다.

[0073] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염은 1종 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용하여 사용해도 된다.

[0074] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염은 공지된 제조 방법, 예를 들어 특허 6265550에 기재된 방법 등에 의해 제조할 수 있다.

[0075] 예를 들어, 인산아스코르빌의 지방산 에스테르의 구체적인 제조 방법으로서, 상술한 인산아스코르빌의 제조 방법과 마찬가지로의 방법으로 인산아스코르빌을 제조한 후, 해당 인산아스코르빌과, 지방산 또는 그 에스테르를 축합 반응시킴으로써 얻을 수 있다.

[0076] 또한, 인산아스코르빌의 지방산 에스테르염의 구체적인 제조 방법으로서, 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 용액을, 산화마그네슘 등의 금속 산화물, 또는 수산화나트륨 등의 금속 수산화물 등으로 중화함으로써, 인산아스코르빌의 지방산 에스테르염을 얻을 수 있다.

[0077] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 인산아스코르빌의 지방산 에스테르염의 시판예로서는, 쇼와 덴코 사체의 아프레시에(등록 상표)(APPS)(화합물명; L-아스코르브산-2-인산-6-팔미트산의 나트륨염(L-6-O-팔미토일 아스코르브산-2-인산에스테르의 나트륨염이라고도 함), 표시 명칭; 팔미트산아스코르빌인산 3Na) 등을 들 수 있다.

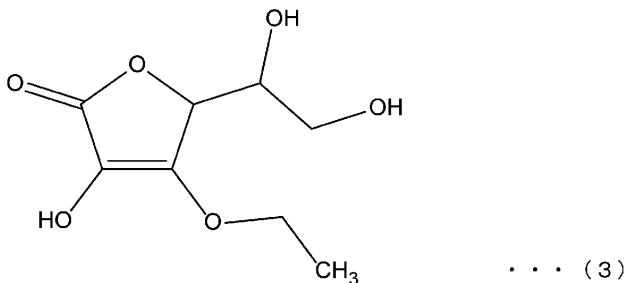
[0078] <<(iii) 에틸아스코르브산 또는 그의 염>>

[0079] · 에틸아스코르브산

[0080] 에틸아스코르브산은, 아스코르브산의 적어도 하나의 수산기에 에틸기가 도입된 화합물이다.

[0081] 에틸아스코르브산으로서, 하기 화학식 (3)으로 표시되는 화합물을 적합하게 들 수 있다.

[0082] 하기 화학식 (3)으로 표시되는 화합물은, 아스코르브산의 3위의 수산기인 수소 원자를 에틸기에 의해 치환한, 3-O-에틸아스코르브산이다.



[0083]

[0084] 에틸아스코르브산에는, D체 및 L체의 입체 이성체, 그리고 라세미체의 DL체가 존재한다. 에틸아스코르브산은 이들 입체 이성체 중 어느 것이어도 되지만, 입수 용이성의 관점에서, L체인 것이 바람직하고, 구체적으로는 L-3-O-에틸아스코르브산(3-O-에틸-L-아스코르브산이라고도 함)이 바람직하다.

[0085] · 에틸아스코르브산의 염

[0086] 에틸아스코르브산의 염으로서, 예를 들어 에틸아스코르브산과 무기 염기의 염, 에틸아스코르브산과 유기 염기의 염 등을 들 수 있다.

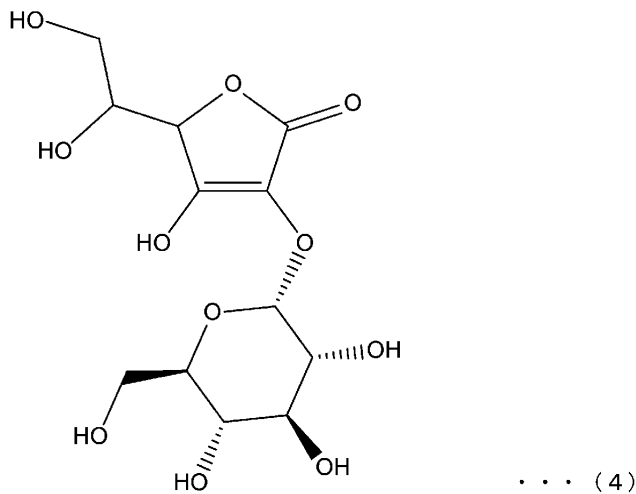
[0087] 무기 염기와 염으로서, 예를 들어 나트륨염, 칼륨염 등의 알칼리 금속염; 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리 토류 금속염; 알루미늄염; 암모늄염; 아연염 등을 들 수 있다.

[0088] 유기 염기와 염으로서, 예를 들어 알칼리암모늄염, 염기성 아미노산과의 염 등을 들 수 있다.

[0089] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 에틸아스코르브산 또는 그의 염으로서, 상기한 것 중에서도, 입수 용이성의 관점에서, 에틸아스코르브산인 것이 바람직하고, L-3-O-에틸아스코르브산이 보다 바람직하다.

[0090] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 에틸아스코르브산 또는 그의 염은 1종 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용하여 사용해도 된다.

- [0091] 에틸아스코르브산 또는 그의 염은 공지된 제조 방법으로 제조할 수 있다.
- [0092] 예를 들어, 에틸아스코르브산의 제조 방법으로서, 아스코르브산을 디메틸설폭시드(DMSO) 중에서 나트륨메톡시드 존재 하에 할로겐화알킬에 의해 알킬화하는 방법; 일본 특허 공개 평8-134055, 일본 특허 공개 평1-228977에 기재된 방법 등에 의해 제조할 수 있다.
- [0093] 또한, 에틸아스코르브산의 염의 구체적인 제조 방법으로서, 에틸아스코르브산 용액을, 산화마그네슘 등의 금속 산화물, 또는 수산화나트륨 등의 금속 수산화물 등으로 중화함으로써, 에틸아스코르브산의 염을 얻을 수 있다.
- [0094] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 에틸아스코르브산의 시판예로서는, 후지 필름 와코 준야쿠사제의 3-0-에틸-L-아스코르브산(표시 명칭; 3-0-에틸아스코르브산) 등을 들 수 있다.
- [0095] <<(iv) 아스코르브산글루코시드 또는 그의 염>>
- [0096] · 아스코르브산글루코시드
- [0097] 아스코르브산글루코시드는, 아스코르브산의 적어도 하나의 수산기가 글루코시드화된 화합물이다. 글루코시드 결합은 α-글루코시드 결합인 것이 바람직하다.
- [0098] 아스코르브산글루코시드로서는, 하기 화학식 (4)로 표시되는 화합물을 적합하게 들 수 있다.
- [0099] 하기 화학식 (4)로 표시되는 화합물은, 아스코르브산의 2위의 수산기에 글루코오스가 결합한, 아스코르브산2-글루코시드이다.



- [0100]
- [0101] 아스코르브산에는, D체 및 L체의 입체 이성체, 그리고 라세미체의 DL체가 존재한다. 아스코르브산글루코시드 중의 아스코르브산은, 이들 입체 이성체 중 어느 것이어도 되지만, 입수 용이성의 관점에서, L체인 것이 바람직하고, 아스코르브산글루코시드는 구체적으로는 L-아스코르브산-2-글루코시드가 바람직하다. 아스코르브산글루코시드 중의 글루코오스는 D체여도 L체여도 되지만, 입수 용이성의 관점에서, D체인 것이 바람직하다.
- [0102] · 아스코르브산글루코시드의 염
- [0103] 아스코르브산글루코시드의 염으로서, 예를 들어 아스코르브산글루코시드와 무기 염기의 염, 아스코르브산글루코시드와 유기 염기의 염 등을 들 수 있다.
- [0104] 무기 염기와 염으로서, 예를 들어 나트륨염, 칼륨염 등의 알칼리 금속염; 칼슘염, 마그네슘염 등의 알칼리 토류 금속염; 알루미늄염; 암모늄염; 아연염 등을 들 수 있다.
- [0105] 유기 염기와 염으로서, 예를 들어 알킬암모늄염, 염기성 아미노산과의 염 등을 들 수 있다.
- [0106] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 아스코르브산글루코시드 또는 그의 염으로서, 상기한 것 중에서도, 입수 용이성의 관점에서, 아스코르브산글루코시드인 것이 바람직하고, L-아스코르브산2-글루코시드가 보다 바람직하다.
- [0107] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제 있어서의 아스코르브산글루코시드 또는 그의 염은 1종 단독으로 사용해도 되

고, 2종 이상을 병용하여 사용해도 된다.

- [0108] 아스코르브산글루코시드 또는 그의 염은, 예를 들어 일본 특허 공개 평03-139288에 기재된 방법 등에 의해 제조할 수 있다.
- [0109] 예를 들어, 아스코르브산글루코시드의 구체적인 제조 방법으로서, 아스코르브산의 2위의 수산기에 글루코오스 1분자를 효소 반응으로 α -글루코시드 결합시킴으로써 제조할 수 있다.
- [0110] 또한, 아스코르브산글루코시드의 염의 구체적인 제조 방법으로서, 아스코르브산글루코시드 용액을, 산화마그네슘 등의 금속 산화물, 또는 수산화나트륨 등의 금속 수산화물 등으로 중화함으로써, 아스코르브산글루코시드의 염을 얻을 수 있다.
- [0111] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 아스코르브산글루코시드의 시판예로서는, 하야시바라사제의 아스코르브산2-글루코시드(화합물명; L-아스코르브산2-글루코시드, 표시 명칭; 아스코르빌글루코시드) 등을 들 수 있다.
- [0112] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 아스코르브산 유도체 또는 그의 염은, 1종 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용하여 사용해도 된다.
- [0113] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제에 있어서의 아스코르브산 유도체 또는 그의 염으로서, 상기한 것 중에서도, 보다 오토파지를 활성화할 수 있는 관점에서, (i) 인산아스코르빌 혹은 그의 염 또는 (ii) 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 혹은 그의 염인 것이 바람직하고, (ii) 인산아스코르빌의 지방산 에스테르 또는 그의 염인 것이 보다 바람직하다.
- [0114] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병 등의 신경 변성 질환의 치료의 목적으로, 그 자체를 환자에게 투여하여 사용할 수 있다. 또한, 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 오토파지를 활성화할 목적으로, 의약품이나 화장품에 배합하여 사용할 수도 있다. 또한, 후술하는 오토파지 활성화용 조성물에 배합하여 사용해도 된다.
- [0115] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, LC3 유전자의 발현을 촉진함으로써, 오토파지를 효과적으로 활성화할 수 있다.
- [0116] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, ATG5 유전자의 발현을 촉진함으로써, 오토파지를 효과적으로 활성화할 수 있다.
- [0117] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, ATG7 유전자의 발현을 촉진함으로써, 오토파지를 효과적으로 활성화할 수 있다.
- [0118] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, Beclin 1 유전자의 발현을 촉진함으로써, 오토파지를 효과적으로 활성화할 수 있다.
- [0119] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 오토파지를 효과적으로 활성화할 수 있으므로, 알츠하이머병의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다.
- [0120] 아밀로이드 β 는, 신경 세포에 있어서의 오토파지의 저하를 야기하는 것이 알려져 있다. 또한, 아밀로이드 β 는, 오토파지의 저하와 그것에 의한 신경 세포의 아포토시스라고 불리는 세포사를 유인하는 것으로 알려져 있다.
- [0121] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 아밀로이드 β 존재 하에서의 LC3 유전자 발현을 촉진시킬 수 있다.
- [0122] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 아밀로이드 β 존재 하에서의 ATG5 유전자 발현을 촉진시킬 수 있다.
- [0123] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 아밀로이드 β 존재 하에서의 ATG7 유전자 발현을 촉진시킬 수 있다.
- [0124] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 아밀로이드 β 존재 하에서의 Beclin 1 유전자 발현을 촉진시킬 수 있다.
- [0125] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 아밀로이드 β 존재 하에서의 아포토시스를 억제할 수 있다.
- [0126] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 특히 신경 세포에 있어서, 아밀로이드 β 존재 하에서의 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 유전자의 발현을 촉진시킬 수 있다. 또한, 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 특히 신경 세포에 있어서, 아밀로이드 β 존재 하에서의 아포토시스를 억제할 수 있다.

- [0127] 아밀로이드 β 존재 하에서 LC3 유전자 발현을 촉진시킨다는 것은, 아밀로이드 β 존재 하에 있어서, 본 실시 형태의 오토파지 활성화제를 투여함으로써, 상기 오토파지 활성화제를 투여하지 않은 경우와 비교하여, LC3 유전자의 발현량이 상승하는 것을 의미한다. ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자에 대해서도 마찬가지이다.
- [0128] 아밀로이드 β 존재 하에서 아포토시스를 억제한다는 것은, 아밀로이드 β 존재 하에 있어서, 본 실시 형태의 오토파지 활성화제를 투여함으로써, 상기 오토파지 활성화제를 투여하지 않은 경우와 비교하여, 아포토시스가 억제되는 것을 의미한다.
- [0129] LC3(microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha: NCBI Gene ID: 84557)은, 오토파지의 시그널 전달 상류에서 포스포티딜에탄올아민을 부가받아, 오토파고솜막에 유인되는 LC3-II로 변환되어, 오토파고솜막에 결합한다. LC3은, 오토파고솜의 마커로서 사용된다. 인간 LC3 유전자의 염기 서열로서는, 예를 들어 NCBI Reference Sequence 데이터베이스에 등록되어 있는 NM_032514.4 및 NM_181509.3 등을 들 수 있다.
- [0130] ATG5(autophagy related 5: NCBI Gene ID: 9474)는, ATG12와 결합하여, 유비퀴틴 유사 공액계에서 E1 유사 활성화 효소로서 기능한다. 인간 ATG5 유전자의 염기 서열로서는, 예를 들어 NCBI Reference Sequence 데이터베이스에 등록되어 있는 NM_001286106.1, NM_001286107.1, NM_001286108.1, NM_001286111.1 및 NM_004849.4 등을 들 수 있다.
- [0131] ATG7(autophagy related 7: NCBI Gene ID: 10533)은, ATP 의존적으로 LC3 및 ATG12를 활성화하는 E1 유사 활성화 효소로서 기능한다. 인간 ATG7 유전자의 염기 서열로서는, 예를 들어 NCBI Reference Sequence 데이터베이스에 등록되어 있는 NM_001136031.3, NM_001144912.2, NM_001349232.2, NM_001349233.2, NM_001349234.2 등을 들 수 있다.
- [0132] Beclin 1(NCBI Gene ID: 8678)은, ATG14L, Vps34mp150과 함께 크레스(cres) III PI3K 복합체를 형성하여, 오토파고솜 형성의 정의 제어 인자로서 기능한다. 인간Beclin 1 유전자의 염기 서열로서는, 예를 들어 NCBI Reference Sequence 데이터베이스에 등록되어 있는 NM_001313998.2, NM_001313999.1, NM_001314000.1 및 NM_003766.4 등을 들 수 있다.
- [0133] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병 등의 신경 변성 질환의 발증 리스크가 높은 환자에게 투여하여, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병 등의 신경 변성 질환을 예방하기 위해 사용해도 된다. 또한, 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병 등의 신경 변성 질환을 발증한 환자에게 투여하여, 신경 변성 질환의 진행이나 악화를 억제하기 위해 사용해도 된다.
- [0134] 본 실시 형태의 오토파지 활성화제는, 후술하는 오토파지 활성화용 조성물과 마찬가지로의 방법으로 환자에게 투여할 수 있고, 경구적으로 투여해도 되고, 비경구적으로 투여해도 되고, 정맥 내, 동맥 내, 근육 내, 피내, 피하, 복강 내 등에 투여해도 되고, 좌제로서 직장 내 투여해도 되고, 피부 외용제로서 피부에 투여해도 된다.
- [0135] (오토파지 활성화용 조성물)
- [0136] 본 실시 형태의 오토파지 활성화용 조성물은, 상술한 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 함유하는, 오토파지 활성화제와, 약학적으로 허용되는 담체를 함유한다.
- [0137] 본 실시 형태의 오토파지 활성화용 조성물은, 통상의 방법(예를 들어, 일본 약전에 기재된 방법)에 따라, 상술한 오토파지 활성화제, 약학적으로 허용되는 담체 및 경우에 따라서는 다른 성분을 혼합하여 제제화함으로써 제조할 수 있다.
- [0138] 본 명세서에 있어서, 「약학적으로 허용되는 담체」란, 유효 성분의 생리 활성을 저해하지 않고, 또한 그 투여 대상에 대하여 실질적인 독성을 나타내지 않는 담체를 의미한다.
- [0139] 또한, 「실질적인 독성을 나타내지 않는다」란, 그 성분이 통상 사용되는 투여량에 있어서, 투여 대상에 대하여 독성을 나타내지 않는 것을 의미한다.
- [0140] 약학적으로 허용되는 담체로서는, 특별히 제한되지 않고, 부형제, 결합제, 붕괴제, 활택제, 안정제, 희석제, 주사제용 용제, 보습제, 감촉 향상제, 계면 활성제, 고분자·증점·겔화제, 용제, 분사제, 산화 방지제, 환원제, 산화제, 킬레이트제, 산, 알칼리, 분체, 무기염, 물, 금속 함유 화합물, 불포화 단량체, 다가 알코올, 고분자 첨가제, 습윤제, 증점제, 점착 부여 물질, 유성 원료, 액상 매트릭스, 지용성 물질, 고분자 카르복실산염 등을 들 수 있다.

- [0141] 이들 성분의 구체예로서는, 예를 들어 국제 공개 공보 제2016/076310호에 기재된 것 등을 들 수 있다. 또한, 고분자·중점·겔화제의 구체예로서는, 메타클로릴옥시에틸포스포릴콜린, 메타크릴산부틸 또는 이것들의 중합체 등을 들 수 있다.
- [0142] 본 실시 형태의 오토파지 활성화용 조성물에 있어서의 약학적으로 허용되는 담체는, 1종을 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용해도 된다.
- [0143] 또한, 다른 성분으로서는, 특별히 제한되지 않고, 방부제, 항균제, 자외선 흡수제, 미백제, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염 이외의 비타민류 및 그의 유도체류, 소염제, 항염증제, 육모용 약제, 혈행 촉진제, 자극제, 호르몬류, 주름 방지제, 항노화제, 당김제, 냉감제, 온감제, 창상 치유 촉진제, 자극 완화제, 진통제, 세포 부활제, 식물·동물·미생물 엑기스, 종자유, 진양제, 각질 박리·용해제, 땀 억제제, 청량제, 수렴제, 효소, 핵산, 향료, 색소, 착색제, 염료, 안료, 소염 진통제, 항진균제, 항히스타민제, 췌면 진정제, 정신 안정제, 항고혈압제, 강압 이노제, 항생 물질, 마취제, 항균성 물질, 항간질제, 관 혈관 확장제, 생약, 가려움 방지제, 각질 연화 박리제, 자외선 차단제, 살균제, 항산화 물질, pH 조정제, 첨가제, 금속 비누 등을 들 수 있다. 이들 성분의 구체예로서는, 예를 들어 국제 공개 공보 제2016/076310호에 기재된 것 등을 들 수 있다. 또한, 식물·동물·미생물 엑기스의 구체예로서는, 서양개보리뿌리(Lapsana communis) 꽃/잎/줄기, 차나무 잎 등을 들 수 있다. 종자유의 구체예로서는, 모링가 종자유를 들 수 있다. 향료의 구체예로서는, 페틸알데히드를 들 수 있다.
- [0144] 다른 성분은, 1종을 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용해도 된다.
- [0145] 본 실시 형태의 오토파지 활성화용 조성물은, 상기 오토파지 활성화제를 치료적 유효량 함유할 수 있다. 「치료적 유효량」이란, 환자의 질환의 치료 또는 예방을 위해 유효한 약제의 양을 의미한다. 치료적 유효량은, 투여 대상의 질환의 상태, 연령, 성별 및 체중 등에 따라 변동될 수 있다.
- [0146] 본 실시 형태의 오토파지 활성화용 조성물에 있어서, 상기한 오토파지 활성화제의 치료적 유효량은, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염이, 오토파지를 활성화할 수 있는 양일 수 있다. 또한, 상기한 오토파지 활성화제의 치료적 유효량은, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염이, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1종의 유전자의 발현을 촉진할 수 있는 양이다. 또한, 상기 오토파지 활성화제의 치료적 유효량은, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염이, 아밀로이드 β의 존재 하에서, 아포토시스를 억제할 수 있는 양일 수 있다.
- [0147] 본 실시 형태의 오토파지 활성화용 조성물에 있어서의 상기 오토파지 활성화제의 치료적 유효량(아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 합계 함유량)은, 오토파지 활성화용 조성물 전량에 대하여, 예를 들어 0.05 내지 15질량%여도 되고, 예를 들어 0.1 내지 10질량%여도 되고, 예를 들어 0.5 내지 5질량%여도 된다.
- [0148] 또한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 합계 함유량이란, 1종의 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 단독으로 사용하는 경우에는 그 화합물의 함유량을 의미하고, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 2종 이상 조합하여 사용하는 경우에는, 이들 화합물의 합계의 함유량을 의미한다.
- [0149] 본 실시 형태의 오토파지 활성화용 조성물은, 의약 조성물이어도 되고, 화장품여도 된다.
- [0150] (의약 조성물)
- [0151] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은, 상술한 오토파지 활성화제 및 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는, 오토파지 활성화용 의약 조성물을 제공한다.
- [0152] 본 실시 형태의 의약 조성물에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체로서는, 특별히 제한되지 않고, 상기에 예로 든 것 외에 의약품에 일반적으로 사용되는 담체를 사용할 수 있다. 예를 들어, 일본 약전, 일본 약전의 의약품 규격, 의약품 첨가물 규격 2013(야쿠지 닛포사, 2013년), 의약품 첨가물 사전 2016(일본 의약품 첨가제 협회편, 야쿠지 닛포사, 2016년), Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th edition(Pharmaceutical Press, 2012년) 등에 기재되어 있는 일반적인 원료를 사용할 수 있다.
- [0153] 약학적으로 허용되는 담체는, 1종을 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용해도 된다.
- [0154] 본 실시 형태의 의약 조성물은, 상기 오토파지 활성화제 및 약학적으로 허용되는 담체에 더하여, 다른 성분을 함유하고 있어도 된다. 다른 성분으로서, 특별히 제한되지 않고, 일반적인 의약품 첨가물을 사용할 수 있다. 또한, 다른 성분으로서, 상술한 오토파지 활성화제 이외의 활성 성분을 사용할 수도 있다. 다른 성분으로서의 의약품 첨가물 및 활성 성분으로서, 상기에 예로 든 것 외에, 예를 들어 일본 약전, 일본 약전의 의약품

규격, 의약품 첨가물 규격 2013(야쿠지 닛포사, 2013년), 의약품 첨가물 사전 2016(일본 의약품 첨가제 협회편, 야쿠지 닛포사, 2016년), Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th edition(Pharmaceutical Press, 2012년) 등에 기재되어 있는 일반적인 원료를 사용할 수 있다. 다른 성분은, 1종을 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용해도 된다.

- [0155] 본 실시 형태의 의약 조성물의 제형으로서는, 특별히 제한되지 않고, 의약품 제제로서 일반적으로 사용되는 제형으로 할 수 있다. 예를 들어, 정제, 피복 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 액제, 현탁제, 유제 등의 경구적으로 투여하는 제형; 및 주사제, 좌제, 피부 외용제 등의 비경구적으로 투여하는 제형 등을 들 수 있다. 이들 제형의 의약 조성물은, 통상적인 방법(예를 들어, 일본 약전에 기재된 방법)에 따라, 제제화할 수 있다.
- [0156] 본 실시 형태의 의약 조성물의 투여 방법은, 특별히 제한되지 않고, 의약품의 투여 방법으로서 일반적으로 사용되는 방법으로 투여할 수 있다. 예를 들어, 정제, 피복 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 액제, 현탁제, 유제 등으로서 경구 투여해도 되고, 주사제, 수액 제제 등으로서, 단독으로, 또는 포도당액, 링거액 등의 일반적인 수액과 혼합하여, 정맥 내, 동맥 내, 근육 내, 피내, 피하, 복강 내 등에 투여해도 되고, 좌제로서 직장 내 투여해도 되고, 피부 외용제로서 피부에 투여해도 된다.
- [0157] 본 실시 형태의 의약 조성물의 투여량은, 치료적 유효량으로 할 수 있다. 치료적 유효량은, 환자의 증상, 체중, 연령 및 성별 등, 그리고 의약 조성물의 제형 및 투여 방법 등에 의해 적절히 결정하면 된다.
- [0158] 예를 들어, 본 실시 형태의 의약 조성물의 투여량은, 경구 투여의 경우에는, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 합계 함유량으로서 투여 단위 형태당 0.01 내지 500mg, 주사제의 경우에는, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 합계 함유량으로서 투여 단위 형태당 0.02 내지 250mg, 좌제의 경우에는, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 합계 함유량으로서 투여 단위 형태당 0.01 내지 500mg, 피부 외용제의 경우에는, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 합계 함유량으로서 투여 단위 형태당 0.01 내지 500mg 등을 들 수 있다.
- [0159] 본 실시 형태의 의약 조성물의 투여 간격은, 환자의 증상, 체중, 연령 및 성별 등, 그리고 의약 조성물의 제형 및 투여 방법 등에 의해 적절히 결정하면 된다. 예를 들어, 1일 1회 또는 2 내지 3회 정도 등으로 할 수 있다.
- [0160] 본 실시 형태의 의약 조성물은, 오토파지 활성의 저하에 기인하는 질환의 치료 또는 예방을 위해 사용할 수 있다. 그러한 질환으로서는, 예를 들어 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병, SENDA병 등의 신경 변성 질환; 크론병 등의 염증성 장질환; 암 등을 들 수 있다.
- [0161] 본 실시 형태의 의약 조성물은, 예를 들어 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병, SENDA병 등의 신경 변성 질환; 크론병 등의 염증성 장질환; 또는 암 환자에게 투여하여, 신경 변성 질환, 염증성 장질환, 또는 암의 진행을 억제하기 위해 사용할 수 있다. 또한, 본 실시 형태의 의약 조성물은, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병, SENDA병 등의 신경 변성 질환; 크론병 등의 염증성 장질환; 또는 암 환자에게 투여하여, 신경 변성 질환, 염증성 장질환, 또는 암을 치료하기 위해 사용할 수 있다. 또한, 본 실시 형태의 의약 조성물은, 아밀로이드 β에 기인하는 질환을 치료하기 위해 사용할 수 있다. 또한, 본 실시 형태의 의약 조성물은, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자, 또는 Beclin 1 유전자의 발현량 저하에 기인하는 질환을 치료하기 위해 사용할 수 있다.
- [0162] 본 실시 형태의 의약 조성물은, 상기한 것 중에서도, 특히 알츠하이머병을 치료하기 위해 적합하게 사용할 수 있다.
- [0163] 본 실시 형태의 의약 조성물은, 알츠하이머병을 비롯하여, 헌팅턴병, 파킨슨병, SENDA병 등의 신경 변성 질환의 발증 리스크가 높은 환자에게 투여하여, 신경 변성 질환을 예방하기 위해 사용할 수도 있다. 또한, 본 실시 형태의 의약 조성물은, 크론병 등의 염증성 장질환의 발증 리스크가 높은 환자에게 투여하여, 염증성 장질환을 예방하기 위해 사용할 수도 있다. 또한, 본 실시 형태의 의약 조성물은, 암의 발증 리스크가 높은 환자에게 투여하여, 암을 예방하기 위해 사용할 수도 있다.
- [0164] (화장료)
- [0165] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은, 상술한 오토파지 활성화제 및 약학적으로 허용되는 담체를 함유하는, 오토파지 활성화를 위한 화장료를 제공한다.
- [0166] 본 실시 형태의 화장료에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체로서는, 특별히 제한되지 않고, 상기에 예로 든 것 외에 화장료에 일반적으로 사용되는 담체를 사용할 수 있다. 예를 들어, 화장품 원료 기준 제2판 주해(일본 공정서 협회편, 야쿠지 닛포사, 1984년), 화장품 원료 기준의 성분 규격(후생성 약무국 심사과 감수, 야쿠지 닛포사, 1993년), 화장품 원료 기준의 성분 규격 후보(追補)(후생성 약무국 심사과 감수, 야쿠지 닛포사, 1993년),

화장품 중별 허가 기준(후생성 약무국 심사과 감수, 야쿠지 닛포사, 1993년), 화장품 원료 사전(닛코 케미컬즈사, 1991년), International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook 2002 Ninth Edition Vol.1 내지 4, by CTFA 등에 기재되어 있는 일반적인 원료를 사용할 수 있다.

- [0167] 약학적으로 허용되는 담체는, 1종을 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용해도 된다.
- [0168] 본 실시 형태의 화장료는, 오토파지 활성화제 및 약학적으로 허용되는 담체에 더하여, 다른 성분을 함유하고 있어도 된다. 다른 성분으로서, 특별히 제한되지 않고, 일반적인 화장품 첨가물을 사용할 수 있다. 또한, 다른 성분으로서, 상술한 오토파지 활성화제 이외의 활성 성분을 사용할 수도 있다. 다른 성분으로서의 화장품 첨가물 및 활성 성분으로서, 상기에 예로 든 것 외에, 예를 들어 화장품 원료 기준 제2판 주해(일본 공정서협회편, 야쿠지 닛포사, 1984년), 화장품 원료 기준외 성분 규격(후생성 약무국 심사과 감수, 야쿠지 닛포사, 1993년), 화장품 원료 기준외 성분 규격 후보(후생성 약무국 심사과 감수, 야쿠지 닛포사, 1993년), 화장품 중별 허가 기준(후생성 약무국 심사과 감수, 야쿠지 닛포사, 1993년), 화장품 원료 사전(닛코 케미컬즈사, 1991년), International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook 2002 Ninth Edition Vol.1 내지 4, by CTFA 등에 기재되어 있는 일반적인 원료를 사용할 수 있다. 다른 성분은, 1종을 단독으로 사용해도 되고, 2종 이상을 병용해도 된다.
- [0169] 본 실시 형태의 화장료의 형태로서는, 특별히 제한되지 않고, 화장료로서 일반적으로 사용되는 형태로 할 수 있다. 예를 들어, 샴푸, 린스, 이발제 등의 모발용 화장료; 세안료, 클렌징제, 화장수, 유액, 로션, 크림, 젤, 썬 스크린제, 팩, 마스크, 미용액 등의 기초 화장료; 파운데이션류, 화장 기초, 립스틱류, 립글로스, 볼터치류 등의 메이크업 화장료; 보디 세정료, 보디 파우더, 방취 화장료 등의 보디 화장료 등을 들 수 있다. 이들 화장료는, 통상적인 방법에 따라 제조할 수 있다.
- [0170] 또한, 본 실시 형태의 화장료의 제형으로서, 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 수중유(O/W)형, 유중수(W/O)형, W/O/W형, O/W/O형 등의 유화형, 유화 고분자형, 유성, 고품, 액상, 연상(練狀), 스틱상, 휘발성 유형, 분상, 젤리상, 젤상, 페이스트상, 크림상, 시트상, 필름상, 미스트상, 스프레이형, 에어로졸상, 다층상, 기포상, 플레이크상 등을 들 수 있다.
- [0171] 본 실시 형태의 화장료의 사용량은, 특별히 제한되지 않지만, 오토파지를 활성화하는 데 유효한 양으로 할 수 있다.
- [0172] 예를 들어, 본 실시 형태의 화장료의 사용량은, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 합계 함유량으로서 1회의 사용당 0.01 내지 500mg이고, 예를 들어 0.15 내지 300mg이어도 되고, 예를 들어 0.15 내지 200mg이어도 되고, 예를 들어 0.2 내지 100mg이어도 된다.
- [0173] 본 실시 형태의 화장료의 사용 간격은, 특별히 제한되지 않지만, 예를 들어 1일 1회 또는 2 내지 3회 정도로 할 수 있다.
- [0174] 본 실시 형태의 화장료는, 오토파지 활성화의 저하에 기인하는 증상을 완화하기 위해 사용할 수 있다. 또는, 오토파지 활성화의 저하에 기인하는 증상의 발증을 예방하기 위해, 이들 발증 리스크가 높은 피험자에 의해 일상적인 스킨케어나 메이크업에 사용되어도 된다.
- [0175] (기타 실시 형태)
- [0176] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 대상으로 투여하는 공정을 포함하는, 오토파지를 활성화하는 방법을 제공한다.
- [0177] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 대상으로 투여하는 공정을 포함하는, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자, 또는 Beclin 1 유전자의 발현을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0178] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 대상으로 투여하는 공정을 포함하는, 아밀로이드 β 존재 하에서의 아포토시스를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0179] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 오토파지를 활성화하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 제공한다.
- [0180] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자, 또는 Beclin 1 유전자의 발현을 촉진하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 제공한다.

- [0181] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 아밀로이드 β 존재 하에서의 아포토시스를 억제하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 제공한다.
- [0182] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병, SENDA병, 크론병, 또는 암을 예방 또는 치료하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 제공한다.
- [0183] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 오토파지 활성화제를 제조하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 사용을 제공한다.
- [0184] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자, 또는 Beclin 1 유전자 발현의 촉진제를 제조하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 사용을 제공한다.
- [0185] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 아밀로이드 β 존재 하에서의 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자, 또는 Beclin 1 유전자 발현의 촉진제를 제조하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 사용을 제공한다.
- [0186] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 아밀로이드 β 존재 하에서의 아포토시스의 억제제를 제조하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 사용을 제공한다.
- [0187] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 오토파지 활성화용 조성물을 제조하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 사용을 제공한다.
- [0188] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자, 또는 Beclin 1 유전자 발현의 촉진용 조성물을 제조하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 사용을 제공한다.
- [0189] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 아밀로이드 β 존재 하에서의 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자, 또는 Beclin 1 유전자 발현의 촉진용 조성물을 제조하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 사용을 제공한다.
- [0190] 일 실시 형태에 있어서, 본 발명은 아밀로이드 β 존재 하에서의 아포토시스의 억제용 조성물을 제조하기 위한, 아스코르브산 유도체 또는 그의 염의 사용을 제공한다.
- [0191] 실시예
- [0192] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이들 예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0193] [아스코르브산 유도체 또는 그의 염]
- [0194] 이하의 실시예 및 처방예에서는, 하기의 아스코르브산 유도체 또는 그의 염을 사용했다.
- [0195] APM: L-아스코르브산-2-인산에스테르의 마그네슘염(표시 명칭; 인산아스코르빌 Mg, 제품명; 아스코르브산 PM, 쇼와 덴코사제)
- [0196] APPS: L-아스코르브산-2-인산-6-팔미트산의 나트륨염(표시 명칭; 팔미트산 아스코르브인산 3Na, 제품명; 아프레시에(APPS), 쇼와 덴코사제)
- [0197] AG: L-아스코르브산2-글루코시드(표시 명칭; 아스코르빌글루코시드, 제품명; 아스코르브산2-글루코시드, 하야시 바라사제)
- [0198] AE: 3-O-에틸-L-아스코르브산(표시 명칭; 3-O-에틸아스코르브산, 제품명; 3-O-에틸-L-아스코르브산, 후지 필름 와코 준야쿠사제)
- [0199] <인간 노화 섬유 아세포에 있어서의 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현 촉진 효과의 평가>
- [0200] 인위적으로 노화를 유발한 세포를 제작하기 위해, 섬유 아세포를 사용하여 시험을 행하였다. 노화 섬유 아세포는, 이하의 수순에 의해 제작하였다.
- [0201] <<노화 섬유 아세포의 제작>>
- [0202] 10% 소 태아 혈청(MP Biomedicals사제)을 첨가한 D-MEM 배지(Sigma-Aldrich사제)에서, 인간 정상 섬유 아세포(NB1RGB; RIKEN BRC 셀뱅크)를 콘플루언트가 될 때까지 배양하였다. 그 후, 250 μ M 과산화수소수로 2시간 처리하고, 새로운 10% 소 태아 혈청을 첨가한 D-MEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이 과산화수소수에 의한 처리와 세포 배양의 조작을 3회 반복하여, 얻어진 섬유 아세포를 노화 섬유 아세포로 하였다.

- [0203] <<유전자의 발현 촉진 효과의 평가 시험>>
- [0204] 제작한 노화 섬유 아세포를, 10000개/cm²의 파종 밀도로 준비하고, 10% 소 태아 혈청(MP Biomedicals사제)을 첨가한 D-MEM 배지(Sigma-Aldrich사제)에서 24시간 배양하였다. 이어서, 실시예 1에서는, APM의 최종 농도가 10 μM가 되도록, 정제수에 녹인 APM을 배지에 첨가했다. 실시예 2에서는, APPS의 최종 농도가 1 μM가 되도록, 정제수에 녹인 APPS를 배지에 첨가했다. 실시예 3에서는, APPS의 최종 농도가 10 μM가 되도록, 정제수에 녹인 APPS를 배지에 첨가했다. 실시예 4에서는, AG의 최종 농도가 100 μM가 되도록, 정제수에 녹인 AG를 배지에 첨가했다. 실시예 5에서는, AE의 최종 농도가 100 μM가 되도록, 정제수에 녹인 AE를 배지에 첨가했다.
- [0205] 또한, 비교예 1에서는, 배지에 정제수만을 첨가했다.
- [0206] 이어서, 각각의 배지를, 24시간, 37℃, 5% CO₂ 하에서 배양하였다.
- [0207] 한편, 참고예 1로서는, 상기 인간 정상 섬유 아세포를, 10000개/cm²의 파종 밀도로 준비하고, 10% 소 태아 혈청(MP Biomedicals사제)을 첨가한 D-MEM 배지(Sigma-Aldrich사제)에서 24시간 배양하고, 해당 배지에 정제수만을 첨가하였다. 이어서, 해당 배지를, 24시간, 37℃, 5% CO₂ 하에서 배양하였다.
- [0208] 그 후, Nucleospin(등록 상표) RNA 키트(다카라 바이오사제)를 사용하여, 각 예의 노화 섬유 아세포, 또는 인간 정상 섬유 아세포로부터 RNA를 추출하고, 얻어진 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 이어서, 이 cDNA를 템플릿에, 정량 리얼타임 PCR에서, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자에 특이적인 프라이머(다카라 바이오사제)를 각각 사용하여, 각 유전자의 발현량을 정량하였다.
- [0209] 내부 표준 유전자로서 화합물 첨가에 의해 유전자 발현에 변동이 보이지 않는 하우스키핑 유전자의 GAPDH(프라이머; 다카라 바이오사제)의 발현량을 정량하고, 그 값에 따라 각 유전자의 발현량을 표준화하였다. 상기 각 예에 있어서의 유전자 발현량에 대해서, 비교예 1에 있어서의 각 유전자의 발현량을 각각 1.00으로 했을 때의, 상대 유전자 발현량을 구하였다. 그 결과를 표 1에 나타냈다.

표 1

	오토파지 활성화제 또는 정제수	세포	상대 유전자 발현량			
			LC3	ATG5	ATG7	Beclin1
참고예1	정제수	정상 섬유 아세포	3.10	1.12	2.06	1.13
비교예1	정제수	노화 섬유 아세포	1.00	1.00	1.00	1.00
실시예1	10 μM APM		3.59	0.64	2.69	2.22
실시예2	1 μM APPS		2.03	1.29	2.46	1.45
실시예3	10 μM APPS		3.14	1.21	3.05	1.58
실시예4	100 μM AG		2.88	0.99	2.47	1.11
실시예5	100 μM AE		1.54	0.75	1.27	0.81

- [0210] 표 1에 나타낸 바와 같이, 참고예 1 및 비교예 1에 있어서, 각각 정제수만 첨가하여 배양한 인간 정상 섬유 아세포 및 노화 섬유 아세포에서는, 노화 섬유 아세포의 쪽이, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현량이 모두 저하되어 있는 것이 확인되었다.
- [0211] 한편, 실시예 1 내지 5의 오토파지 활성화제를 첨가하여 배양한 노화 섬유 아세포에서는, 비교예 1의 정제수만 첨가하여 배양한 노화 섬유 아세포에 비해, 특히 LC3 유전자의 발현량이 높아, LC3 유전자의 발현 촉진 효과가 확인되었다.
- [0212] 또한, 그 중에서도, 실시예 1 내지 3의 오토파지 활성화제를 첨가한 경우는, 아스코르브산 유도체(APM 및 APPS)가 저농도라도, LC3 유전자의 발현량이 높아, 현저한 LC3 유전자의 발현 촉진 효과가 확인되었다.
- [0213] 또한, 실시예 2 및 3에서는, APPS가 매우 저농도라도, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 어느 것의 발현량도 향상시킬 수 있고, APPS는, 특히 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현 촉진 효과가 우수한 것이 확인되었다.
- [0214] <인간 신경 아세포종에 있어서의 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현 촉진 효과

의 평가>

- [0216] 오토파지 활성화제 존재 하에서, 인간 신경 아세포종(SH-SY5Y; ATCC로부터 입수)에 있어서의 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현량을 이하의 시험 방법으로 측정하고, 오토파지 활성화제에 의한 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현 촉진 효과를 평가하였다.
- [0217] 이하의 실시예 및 비교예에서는, 신경 세포에 있어서의 오토파지의 저하를 야기하는 것이 알려져 있는 아밀로이드 β 를 각 배지에 첨가하여 시험을 행하였다.
- [0218] 상기 SH-SY5Y 세포를 10000개/cm²의 파종 밀도로 준비하고, 10% 소 태아 혈청(MP Biomedicals사제)을 첨가한 D-MEM/Ham's F-12 배지(Sigma-Aldrich사제)에서 24시간 배양하였다. 이어서, 실시예 6에서는, APM의 최종 농도가 10 μ M가 되도록, 정제수에 녹인 APM을 배지에 첨가했다. 실시예 7에서는, APPS의 최종 농도가 1 μ M가 되도록, 정제수에 녹인 APPS를 배지에 첨가했다. 실시예 8에서는, APPS의 최종 농도가 10 μ M가 되도록, 정제수에 녹인 APPS를 배지에 첨가했다. 실시예 9에서는, AG의 최종 농도가 100 μ M가 되도록, 정제수에 녹인 AG를 배지에 첨가했다. 실시예 10에서는, AE의 최종 농도가 100 μ M가 되도록, 정제수에 녹인 AE를 배지에 첨가했다.
- [0219] 또한, 비교예 2에서는, 배지에 정제수만을 첨가했다.
- [0220] 이어서, 아밀로이드 β (Sigma-Aldrich사제)를 0.01%(V/V) DMSO에 녹인 아밀로이드 β 용액을 조제하고, 각 배지에 있어서의 아밀로이드 β 의 최종 농도가 20 μ M이 되도록, 해당 아밀로이드 β 용액을 각 배지에 첨가하였다.
- [0221] 또한, 참고예 2에서는 정제수만 첨가하고, 아밀로이드 β 용액은 첨가하지 않았다.
- [0222] 이어서, 각각의 배지를, 48시간, 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다.
- [0223] 그 후, Nucleospin(등록 상표) RNA 키트(다카라 바이오사제)를 사용하여, 각 예의 SH-SY5Y 세포로부터 RNA를 추출하고, 얻어진 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 이어서, 이 cDNA를 템플릿에, 정량 리얼타임 PCR로, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자에 특이적인 프라이머(다카라 바이오사제)를 각각 사용하여, 각 유전자의 발현량을 정량하였다.
- [0224] 내부 표준 유전자로서 화합물 첨가에 의해 발현에 변동이 보여지지 않는 하우스키핑 유전자의 GAPDH(프라이머: 다카라 바이오사제)의 발현량을 정량하고, 그 값에 따라 각 유전자의 발현량을 표준화하였다. 상기 각 예에 있어서의 유전자 발현량에 대해서, 참고예 2에 있어서의 각 유전자의 발현량을 각각 1.00으로 했을 때의, 상대 유전자 발현량을 구하였다. 그 결과를 표 2에 나타냈다.

표 2

	오토파지 활성화제 또는 정제수	아밀로이드 β	상대 유전자 발현량			
			LC3	ATG5	ATG7	Beclin1
참고예 2	정제수	없음	1.00	1.00	1.00	1.00
비교예 2	정제수	있음	0.25	0.87	0.69	0.73
실시예 6	10 μ M APM		0.96	1.71	1.37	1.25
실시예 7	1 μ M APPS		1.97	1.55	2.12	1.12
실시예 8	10 μ M APPS		2.15	1.99	2.58	1.77
실시예 9	100 μ M AG		1.01	1.13	1.45	1.08
실시예 10	100 μ M AE		0.82	1.09	1.65	1.12

- [0225]
- [0226] 표 2에 나타낸 바와 같이, 참고예 2 및 비교예 2에 있어서, 정제수만 첨가하여 배양한 SH-SY5Y 세포에 비하여, 추가로 아밀로이드 β 를 첨가하여 배양한 SH-SY5Y 세포에서는, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현량이 모두 저하되어 있는 것이 확인되었다. 또한, 그 중에서도, 특히 LC3 유전자의 발현량이 저하되어 있는 것이 확인되었다.
- [0227] 한편, 실시예 6 내지 10의, 오토파지 활성화제와 아밀로이드 β 용액을 첨가하여 배양한 SH-SY5Y 세포에서는, 비교예 2의, 정제수와 아밀로이드 β 용액을 첨가하여 배양한 SH-SY5Y 세포에 비해, 특히 LC3 유전자의 발현량이 높고, 실시예 6 내지 10의 오토파지 활성화제에 의한 LC3 유전자의 발현 촉진 효과가 확인되었다.

- [0228] 또한, 실시예 6 내지 10의, 오토파지 활성화제와 아밀로이드 β 용액을 첨가하여 배양한 SH-SY5Y 세포는, 참고예 2의 정제수만 첨가하여 배양한 SH-SY5Y 세포보다도, ATG5, ATG7 및 Beclin 1 유전자의 발현량이 높아지는 것이 확인되었다.
- [0229] 실시예 중에서도, 실시예 6 내지 8에서는, 아스코르브산 유도체(APM 및 APPS)가 저농도라도, LC3 유전자의 발현량이 높아, 현저한 LC3 유전자의 발현 촉진 효과가 확인되었다.
- [0230] 또한, 실시예 7 및 8에서는, APPS가 매우 저농도라도, LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 어느 것의 발현량도 향상시킬 수 있고, 특히 LC3 유전자, ATG5 유전자, ATG7 유전자 및 Beclin 1 유전자의 발현 촉진 효과가 우수한 것이 확인되었다.
- [0231] <인간 신경 아세포종에 있어서의 아밀로이드 β에 기인하는 아포토시스 억제 작용의 평가> 오토파지 활성화제 존재 하에서의 인간 신경 아세포종(SH-SY5Y; ATCC로부터 입수)에 있어서의 아포토시스 세포의 비율을 이하의 시험 방법으로 측정하고, 오토파지 활성화제에 의한 아포토시스 억제 작용을 평가하였다.
- [0232] 이하의 실시예 및 비교예에서는, 오토파지의 저하와 그것에 의한 신경 세포의 아포토시스라고 불리는 세포사를 유인하는 것으로 알려져 있는 아밀로이드 β를 각 배지에 첨가하여 시험을 행하였다.
- [0233] SH-SY5Y 세포를 50000개/cm²의 파종 밀도로 준비하고, 10% 소 태아 혈청(MP Biomedicals사제)을 첨가한 D-MEM/Ham's F-12 배지(Sigma-Aldrich사제)에서 24시간 배양하였다. 이어서, 실시예 11에서는, APM의 최종 농도가 10 μM가 되도록, 정제수에 녹인 APM을 배지에 첨가했다. 실시예 12에서는, APM의 최종 농도가 100 μM가 되도록, 정제수에 녹인 APM을 배지에 첨가했다. 실시예 13에서는, APPS의 최종 농도가 1 μM가 되도록, 정제수에 녹인 APPS를 배지에 첨가했다. 실시예 14에서는, APPS의 최종 농도가 10 μM가 되도록, 정제수에 녹인 APPS를 배지에 첨가했다. 실시예 15에서는, AG의 최종 농도가 100 μM가 되도록, 정제수에 녹인 AG를 배지에 첨가했다. 실시예 16에서는, AE의 최종 농도가 100 μM가 되도록, 정제수에 녹인 AE를 배지에 첨가했다.
- [0234] 또한, 비교예 3으로서는, 배지에 정제수만을 첨가했다.
- [0235] 이어서, 아밀로이드 β(Sigma-Aldrich사제)를 0.01%(V/V) DMSO에 녹인 아밀로이드 β 용액을 조제하고, 각 배지에 있어서의 아밀로이드 β의 최종 농도가 30 μM이 되도록, 해당 아밀로이드 β 용액을 각 배지에 첨가하였다.
- [0236] 또한, 참고예 3에서는, 정제수만 첨가하고, 아밀로이드 β 용액은 첨가하지 않았다.
- [0237] 이어서, 각각의 배지를, 48시간, 37℃, 5% CO₂ 하에서 배양하였다.
- [0238] 그 후, 배지를 제거한 각 SH-SY5Y 세포에 10 μM Hoechst33342(Sigma-Aldrich사제) 수용액을 첨가하고, 실온(25℃)에서 10분간 정치하였다. 용액을 제거 후, 각 SH-SY5Y 세포를 인산 완충액(PBS, 후지 필름 와코 준야쿠사제)으로 세정하고, 형광 현미경 하에서 크로마틴 응집에 의한 아포토시스와 같은 강한 Hoechst 형광이 보이는 세포수(Hoechst(+) 세포)를 계측하였다. 독립 시행의 4실험으로, 각 시야 5000세포 이상을 계측하고, 해당 4시험에 있어서의 Hoechst(+) 세포의 비율의 평균값을, 아포토시스를 일으키고 있는 세포의 비율로 하였다. 각 예에 대해서, 참고예 3에 있어서의 아포토시스 세포의 비율을 1.00으로 했을 때의 상대값을 산출하고, 그 결과를 표 3에 나타냈다.

표 3

	오토파지 활성화제 또는 정제수	아밀로이드 β	아포토시스 세포의 비율
참고예 3	정제수	없음	1.00
비교예 3	정제수	있음	4.66
실시예 11	10 μM APM		3.27
실시예 12	100 μM APM		1.98
실시예 13	1 μM APPS		4.27
실시예 14	10 μM APPS		3.18
실시예 15	100 μM AG		1.23
실시예 16	100 μM AE		1.33

[0239]

- [0240] 표 3에 나타난 바와 같이, 참고예 3 및 비교예 3에 있어서, 정제수만 첨가하여 배양한 참고예 3의 SH-SY5Y 세포에 비해, 아밀로이드 β를 더 첨가하여 배양한 비교예 3의 SH-SY5Y 세포에서는, 아포토시스 세포의 비율이 증가하는 것이 확인되었다.
- [0241] 한편, 실시예 11 내지 16의, 오토파지 활성화제와 아밀로이드 β 용액을 첨가하여 배양한 SH-SY5Y 세포에서는, 비교예 3의 정제수와 아밀로이드 β 용액을 첨가하여 배양한 SH-SY5Y 세포에 비해, 아포토시스 세포의 비율이 저하되는 것이 확인되었다.
- [0242] [처방예]
- [0243] 오토파지 활성화용 조성물로서, 외용제의 처방예 1 내지 4를 표 4에 나타냈다.

표 4

재료	처방예 1 (질량%)	처방예 2 (질량%)	처방예 3 (질량%)	처방예 4 (질량%)
APM	3.0	-	-	-
APPS	-	1.0	-	-
AG	-	-	2.0	-
AE	-	-	-	3.0
글리세린	4.0	4.0	4.0	4.0
BG (1,3-부틸렌글리콜)	4.0	-	4.0	4.0
1,2- 헥산디올	-	4.0	-	-
EDTA4Na	-	0.2	-	-
염화나트륨	-	0.2	-	-
시트르산 K	5.1	-	5.1	5.1
메틸파라벤	0.1	0.1	0.1	0.1
1질량% 히알루론산 Na 수용액	4.0	4.0	4.0	4.0
글리틸리틴산 디칼슘	0.2	0.1	0.2	0.2
물	79.6	86.4	80.6	79.6
계	100	100	100	100

[0244]

산업상 이용가능성

- [0245] 본 발명에 의해, 오토파지를 효과적으로 활성화 할 수 있는 오토파지 활성화제 및 상기 오토파지 활성화제를 함유하는 오토파지 활성화용 조성물이 제공된다.
- [0246] 이상, 본 발명의 바람직한 실시예를 설명했지만, 본 발명은 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 취지를 일탈하지 않는 범위에서, 구성의 부가, 생략, 치환 및 기타의 변경이 가능하다. 본 발명은 전술한 설명에 의해 한정되지 않고, 첨부된 클레임 범위에 의해서만 한정된다.