

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 7월 20일 (20.07.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/123066 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/7016 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)
A61K 8/14 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
C07H 3/04 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
C07H 13/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000505

(22) 국제출원일: 2017년 1월 13일 (13.01.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0004383 2016년 1월 13일 (13.01.2016) KR

(71) 출원인: 주식회사 베네비오 (BENEBIOSIS CO., LTD.)
[KR/KR]; 03925 서울시 마포구 월드컵북로 402, 케이
지아이티 상암센터 1단지 911호, Seoul (KR).

(72) 발명자: 강승우 (KANG, Seung Woo); 03944 서울시 마
포구 성암로 7길 3, 202동 1203호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 윤대웅 (YOON, Dae Woong); 08793 서울시 관
악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS,
RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY,
TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

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

공개:

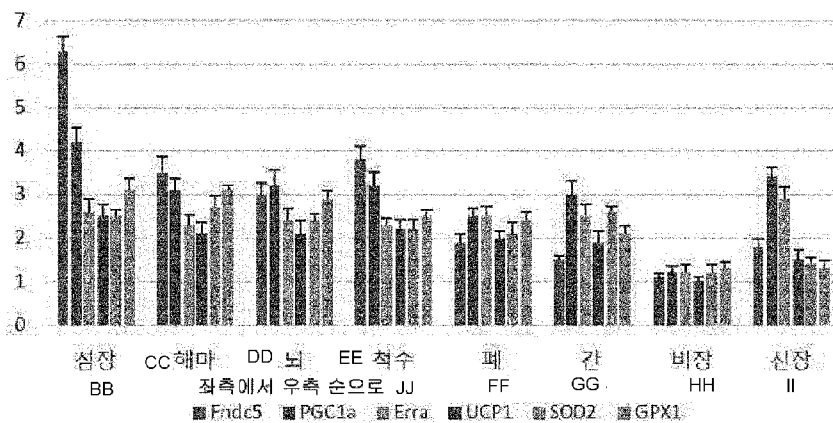
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR INCREASING EXPRESSION OF PGC-1 α

(54) 발명의 명칭: PGC-1 알파의 발현을 증가시키는 조성물

6'-SL 투여 전 대비 장기별 상대적인 유전자 발현 AA



AA ... Relative gene expression in each organ compared to when 6'-SL is not administered
BB ... Heart
CC ... Hippocampus
DD ... Brain
EE ... Spinal cord
FF ... Lung
GG ... Liver
HH ... Spleen
II ... Kidney
JJ ... In order from left to right

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating diseases or symptoms associated with a reduction in the expression of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha (PGC-1 α), the composition containing, as an active ingredient, a compound represented by the following general formula I, a salt thereof, or a solvate thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 유효성분으로서 다음 일반식 I로 표시되는 화합물, 그의 염, 또는 용매화물을 포함하는, 퍼옥시좀 증식촉진자-활성화된 수용체 조활성인자 1-알파(peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha: PGC-1 α)의 발현 감소와 연관된 질병 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물에 관한 것이다.

WO 2017/123066 A1



-
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를
접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙
48.2(h))

명세서

발명의 명칭: PGC-1알파의 발현을 증가시키는 조성물

기술분야

- [1] 본 특허출원은 2016년 1월 13일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2016-0004383호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 PGC-1 α 발현 감소에 따른 미토콘드리아 기능저하에 의한 다양한 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

배경기술

- [3] 세포의 운명은 세포생존을 유지하려는 요소와 사멸시키려는 요소와의 균형과 조합에 의하여 조절된다. 세포 사멸을 촉진하는 요소의 신호가 전달된다면 여러 정해진 루트를 통하여 세포사멸의 과정이 시작되는데 그 대표적 과정인 apoptosis이다. 크로마틴의 응축과 핵분열의 뚜렷한 형태의 변화 과정이 특징인 apoptosis의 사멸과정은 미토콘드리아 내막에서 분비되는 사멸촉진 요소의 분비로 인한 카스파제 (caspase) 효소의 활성을 통하여 이루어지는데 이 과정은 미토콘드리아 외막이 투과가 되기 시작하며 이루어진다 (Galluzzi et al., 2007; Kroemer et al., 2009)[1] (Chipuk et al., 2010; Youle and Strasser, 2008)[2]. 이러한 미토콘드리아를 통한 세포사멸은 발생학적 프로그램, DNA 손상, 성장요소와 영양분의 부족, 바이러스 감염, 산화 스트레스 등 다양한 자극에 의하여 시작된다(Youle and Strasser, 2008)[3]. 그러나 비정상적으로 세포 사멸을 유도하는 과정은 분명한 질병의 근원이 된다. 예를 들어 비정상적인 세포사멸을 유도하게 되면 신경퇴화, 허혈성재관류 손상 (ischemia reperfusion injury), 자가면역질환 등을 유발하게 된다 (Fadeel and Orrenius, 2005)[4]. 이에 관하여 최근의 연구 결과는 세포의 사멸과 생존에 있어서 PGC-1 α 의 기능과 PGC-1 α 의 조절장애가 초래할 수 있는 각종 질병에 관하여 확인하게 되었다.

[4]

- [5] 1. 신경퇴행성 질병

- [6] 알츠하이머 (AD), 파킨슨질병 (PD), 헌팅턴질병 (HD), 루게릭병 (amynotophic lateral sclerosis; ALS)과 같은 신경퇴행성 질환은 신경세포들의 점진적 기능 상실과 세포사멸에 의한 것이다 (Jones et al., 2012)[5]. 이들 질병의 전체적 징후는 특정 부분의 신경세포의 손실에 기인한다. PGC-1 α knock-out 마우스에서 볼 수 있는 신경퇴화로 인한 과다한 활동향진 (hyperactivity)과 대뇌피질부위에 적게 나타난 손상부위와 달리 뇌선상체에 두드러지게 나타난 손상부위로 이러한 신경퇴행성 질병에 PGC-1 α 가 직접적으로 관련이 있다는 사실을 알 수 있다 (Lin et al., 2004)[6]. 또한 이러한 발견과 더불어 PGC-1 α knock-out 마우스의 중추신경계에 나타난 액포손상 (vacuolar lesion)을 확인함으로써 PGC-1 α 가

신경세포 기능을 유지하는데 중요한 역할을 함을 알 수 있다(Leone et al., 2005)[7].

[7]

[8]

AD 환자 뇌의 미토콘드리아의 산화 기능장애, 생성저하, 뇌기능 저하 등 AD의 병리 생리학 현상은 미토콘드리아 기능 손상으로부터 기인한다 (Chaturvedi & Flint, 2013)[8]. 특히 AD 환자의 뇌의 PGC-1 α 발현양이 줄어 있으며 이는 감소된 미토콘드리아의 생성과 기능 그리고 증가된 산화적 스트레스로 인한 신경세포 사멸의 결과를 유발한다 (Katsouri et al., 2011; Qin et al., 2009)[9, 10]. PGC-1 α 의 발현 감소는 AD를 유발하는 아밀로이드의 전구 단백질을 분해절단하여 베타 아밀로이드를 생성하는 BACE1의 발현을 증가시키며 따라서 베타 아밀로이드의 양을 증가시켜 미토콘드리아의 기능 저하와 세포 사멸을 유발한다 (Wang et al., 2013)[11].

[9]

[10]

PGC-1 α 의 유전자 (PPARGC1A)의 단일 염기 변이는 PD와 HD에 걸릴 위험요소의 증가와 상당한 연관관계가 있다 (Clark et al., 2011; Weydt et al., 2009)[12, 13]. 마우스 HD 모델에서 뿐만 아니라 AD, PD, HD환자의 PGC-1 α 유전자 발현이 감소한다 (Cui et al., 2006; Qin et al., 2009; Ranganathan et al., 2009; Weydt et al., 2006; Xiang et al., 2011; Zheng et al., 2010)[14-19]. 따라서 HD 모델 세포배양에서 인위적인 PGC-1 α 의 발현은 신경세포의 사멸을 상당히 감소시킨다(Chaturvedi et al., 2009)[20]. 또한 PGC-1 α 의 과다발현은 ALS모델 마우스의 운동뉴론을 통한 운동기능을 향상시킨다 (Zhao et al., 2011)[21]. 이와 같은 신경퇴행성 질병들과 밀접한 연관을 가진 PGC-1 α 의 기능으로 인하여 PGC-1 α 를 약리적으로 활성화시키는 기작을 다양한 신경퇴행성 질병을 치유하는 새로운 방법으로 대두되고 있다.

[11]

[12]

2. 활성산소군(ROS)에 의한 노화현상

[13]

PGC1-산화적 스트레스 상황에서 방어기작을 시작하는데 중요한 역할을 한다(Chaturvedi & Flint, 2013)[22]. 이는 신경퇴행성 질병에서의 기능과 맞물리는 것으로서 미토콘드리아의 호흡기작관련 복합체와 uncoupling 단백질 (UCP)의 양이 PGC1- α 과다발현에 의하여 증가한다(St-Pierre et al., 2003)[23]. 이러한 증가는 미토콘드리아와 세포질내의 활성산소군(ROS)을 해독시키는 단백질군의 발현의 증가와 같이 이루어진다(Cowell et al., 2009)[24]. ROS 대사에서 PGC-1 α 의 역할을 밝힌 최초의 연구는 PGC-1 α 를 근육세포에서 다른 위치(ectopic) 발현시키면 superoxide를 제거하는 superoxide dismutase 2 (SOD2)와 hydrogen peroxide를 제거하는 glutathione peroxidase 1 (GPX1)의 발현이 증가한다는 것을 보고한 논문이다(St-Pierre et al., 2003)[23]. 그 이후 진행된 연구를 통해 미토콘드리아, 세포질, 퍼옥시좀 등 다양한 세포 내 기관에 존재하는 모든 종류의 ROX 해독효소가 PGC-1 α 에 의해 조절되는지 조사되었다 (St-Pierre et al.,

2006; Valle *et al.*, 2005)[25, 26]. 이들 연구 또한 PGC-1 α 가 조절하는 ROS 대사 프로그램의 생리학적 중요성을 밝혔다. 한편, PGC-1 α 의 발현을 막을 경우 ROS 해독 단백질군의 증가를 막기 때문에 산화적 스트레스 상황에서는 PGC-1 α 가 세포보호 기능을 수행함을 알 수 있다 (St-Pierre *et al.*, 2006)[25].

- [14] 또한 세포의 노화 또는 생명체의 노화현상은 노화관련 만성질환들, 예를 들면, 퇴행성뇌질환, 대사관련질환, 심혈관질환이 선행하게 된다. 이들 질병은 활성산소균에 의한 스트레스, 비세균성 염증(sterile inflammation), 미토콘드리아 기능부전, DNA 손상, 그리고 텔로메어(telomere) 기능부전과 길이가 짧아지는 현상이 증가하게 된다. 이제까지는 이러한 현상들의 공통적 메커니즘에 대한 이해가 불완전했으나 최근 PGC-1 α 를 제거하면 텔로메어의 길이가 짧아지고 DNA의 손상이 일어나 혈관의 노화 및 아테롬성 동맥경화증을 일으킨다는 것을 보여준 논문이 발표된 바 있다 (Xiong, S 2015)[27]. 이 논문에 의하면 PGC-1 α 를 제거하면 텔로메어의 길이를 유지하는 telomere reverse transcriptase(TERT)의 활성 및 발현량이 감소하고, p53의 발현량 및 활성은 증가했다. 이 연구는 PGC-1 α 가 노화 및 그에 따른 만성질환을 개선하는 데 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 보여주고 있다.

[15]

- [16] 3. 심혈관질환 또는 심장근육 관련

- [17] PGC-1 α 의 항산화 기능은 혈관내피 세포의 보호와도 연결된다. 신경모델에서와 마찬가지로 인간 혈관 내피 세포내의 PGC-1 α 발현을 증가시킬 경우 미토콘드리아의 생성과 활성 산소균 해독 효소군의 증가가 이루어진다 (Valle *et al.*, 2005)[26]. ROS를 소의 내피세포에 가할 경우 PGC-1 α 의 증가와 세포내 항산화 기능의 증가가 이루어진다 (Borniquel *et al.*, 2006)[28]. 인간혈관 내피 세포에서 PGC-1 α 를 과발현시킨 후 인위적인 산화적 스트레스를 가할 경우 세포내 ROS의 증가가 감소하고 caspase 3의 활성이 방해된다 (Valle *et al.*, 2005)[26]. 마우스 PGC-1 α 와 PGC-1 β double knock-out 모เดล에서는 생후 주요 사망원인이 심부전으로 나타나며(Lai *et al.*, 2008)[29] 충혈성 심부전 (congestive heart failure) 마우스 모เดล에서는 PGC-1 α 의 감소가 스트레스성 심부전과 심근세포 사멸과 연결된다 (Garnier *et al.*, 2003)[30]. 이와 같이 PGC-1 α 는 심근세포의 대사와 성장에 있어서 중요한 역할을 한다.

[18]

- [19] 4. 근육손실 및 관련질환

- [20] PGC-1 α 의 항산화 기능은 근육의 유지강화 기능과도 연결된다. 근육의 양이 줄어들고, 기능이 떨어지면 (노인성 근육손실증, Sarcopenia, 또는 근육기능부전증), 호르몬관련 질병부터 세포내 항상성 유지에 이르기까지 매우 넓은 범위에 악영향을 준다. 신경모델에서와 마찬가지로 근육세포에서 PGC-1 α 의 발현이 증가하면(운동 또는 유전자발현), 근육손실의 원인이 되는 미토콘드리아 기능부전이 해소되어 근육을 유지할 수 있다는 것이 여러 연구에

의해 밝혀진 바 있다[31-38].

[21]

[22] 5. 지방제거 및 체온유지

[23] PGC-1 α 가 결실된 마우스에서는 미토콘드리아 유전자의 발현이 감소하였는데, 이들 안에는 전자전달계(ETC)의 부품역할을 하는 다양한 유전자가 포함되어 있어, 호흡을 낮추었다 (Lin *et al.*, 2004; Leone *et al.*, 2005)[6, 7]. 이 감소한 미토콘드리아 기능은 미토콘드리아의 대사과정에 의존하는 생리학적 과정들에 손상을 주었다. 실제로 이 PGC-1 α 가 결실된 마우스는 추위에 노출되었을 때 발현이 증가되는 UCP1의 발현을 증가시킬 수 없어, 추위에 민감한 반응을 보였다 (Lin *et al.*, 2004; Leone *et al.*, 2005)[6, 7]. 이들 마우스는 정상 쥐와 비교해 볼 때, 운동능력도 감소했다 (Leone *et al.*, 2005)[7]. 이 PGC-1 α 가 결실된 마우스와는 대조적으로, 심장과 근육에서 PGC-1 α 이 과발현되는 트랜스제닉 마우스의 경우, 미토콘드리아 생성이 증가하였고, 미토콘드리아 유전자의 발현도 증가했다(Lehman *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2002b; Wende *et al.*, 2007). 이들 연구는 생체 내에서 PGC-1 α 가 있고 없음에 따라 미토콘드리아의 생리에 중요한 영향을 미친다는 것을 보여주고 있다. 또한 유사 갈색 지방전구세포 (Beige 또는 brite preadipocytes)에서 PGC-1 α 가 증가하면 유사갈색지방세포는 갈색지방세포로 분화되어 지방산을 산화시켜 ATP를 생성하는 것이 아니라 몸에서 열로 발산하는 기능을 증가시킨다. 또한 지방도 제거하는 기능을 하게 된다[39-42].

[24]

[25] 주지된 바와 같이 피하지방은 셀룰라이트(cellulite)로 둘러싸인 과립층으로 구성되어 있다. 이러한 피하지방은 운동을 통해 잘 분해되지 않는 특성이 있다. 이는 체내의 지방분해 효소가 상기한 셀룰라이트에 의해 차단되기 때문이다. 따라서 종래에는 침 바늘로 일컬어지는 카데타를 삽입하여 물리적으로 지방세포를 흡입하는 시술이 성행하였는데, 이러한 시술법은 피시술자에게 고통을 수반하기 때문에 대개 전신 마취를 선행한다. 그러나 전신 마취는 피시술자에게 위험 요소로 작용할 수 있음을 배제할 수 없으며, 카데타가 삽입되는 경우 내부 출혈 및 그에 따른 조직의 회복 기간이 길어지는 것은 불가피하다.

[26]

주사를 이용한 지방분해(Injection lipolysis)는 지방을 분해할 수 있는 약물을 지방부위에 직접 피하주사하여 지방을 녹여 배출하게 하는 방법으로서 대표적인 제품으로는 PPC 주사로 알려진 Lipostabil®, Lipodissolve, Lipo-zap, Flab-Jab 이 있다. 이들 PPC 주사제는 phosphatidylcholine과 이를 액상으로 유지시켜주는 deoxycholic acid로 구성되어 있으며, 간경변으로 혼수상태에 빠진 환자를 위해 간성혼수 치료 보조제로 최초 허가를 받은 전문의약품이다. 그러나, PPC 주사가 살이 많은 부위에 주사하면 지방세포를 분해해 살을 빼준다고 알려지면서 허가받지 않은 지방제거제로 오용되고 있다. Phosphatidylcholine은

세포막을 구성하는 주요 물질이며, 혈액에서 지방성분이 잘 용해되어 있게 만드는 효과가 있고, 지방 조직의 지방세포를 녹여서 이 안에 들어있는 지방을 세포 밖으로 배출시키는 효과가 있다고 생각되어 사용되었다. 이론적으로 생각할 때, PPC 주사는 국소적으로 한정된 적은 양의 피하지방 제거, 셀룰라이트 제거에 사용될 수 있으나, PPC 주사 자체가 지방을 제거하는 것은 아니다. 또한 PPC 주사의 작용기전은 밝혀지지 않았다. PPC 주사에 대한 연구 결과들이 대부분 환자의 주관적인 평가에 의존하고 있으며, 피하지방량의 변화를 객관적으로 나타내는 연구결과는 없다, 미국 FDA는 PPC 주사의 효능과 안전성에 대한 자료가 부족하기 때문에 phosphatidylcholine을 피하지방 감소에 사용하는 것에 대해 허가하고 있지 않으며, 이의 무분별한 사용을 경고하고 있다. 또한 지방간염, 피부 및 호흡기계에 대한 부작용을 보고하는 문헌이 있다.

[27] 이에, 본 발명자들은 이와 같이 의약품의 부작용과 만성질환의 문제점을 극복하고자 안전하게 체지방을 분해할 수 있는 물질을 개발하고자 노력하였다.

[28]

[29] 6. 노화관련

[30] 노화는 시간이 흐르면서 일어난 몇몇 변화를 아우르는, 복잡하고 서로 다른 종류로 이루어진(heterogeneous) 상태다. 실제로, 왕성한 요구(energetic demands)에 부응하지 못하는 경우, 몇몇 생리적 과정에서의 기능부전, 그리고 증가한 스트레스가 노화라는 상태에 기여한다. 미토콘드리아는 오랜 동안 노화설의 중심에 있어왔는데, 미토콘드리아의 기능이 노화에 따라 일반적으로 줄어들기 때문이다(Quinlan *et al.*, 2011)[43]. 예를 들어, 미토콘드리아 기능은 PGC-1 α 와 PGC1b와 함께, telomere의 기능부전 동안 감소하는데, 이 상황은 노화와 관련되어 있다(Sahin *et al.*, 2011)[44].

[31] 노화연구에서 가장 눈에 띄는 가설은 "노화의 자유 라디컬 가설"('free radical theory of ageing')인데, 미토콘드리아에 의한 ROS의 생성 증가와 이로 인한 산화적 손상이 노화를 결정하는 인자라는 설이다(Quinlan *et al.*, 2011)[43]. 특히 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 돌연변이는 노화와 연계된 미토콘드리아 기능의 저하에서 중심적인 역할을 하는 것으로 생각된다. 미토콘드리아 polymerase c (POLG) 마우스 모델(Kujoth *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2004)[45, 46]은 노화에 있어서 미토콘드리아의 중요성을 부각시키는데 도움을 주어왔다. POLG는 미토콘드리아에 위치하고 있는 DNA polymerase인데, 미토콘드리아 DNA의 복제(replication) 및 DNA 복구(repair)에 관여한다. POLG에 돌연변이를 지닌 마우스는 미토콘드리아 DNA에 돌연변이가 증가하고 탈모현상을 보이며(alopecia (hair loss)), 골다공증 및 심근증(cardiomyopathy)을 일으키는데, 이러한 증상들은 노화와 연계된 것이다(Kujoth *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2004)[45, 46]. PGC-1 α 발현을 통한 미토콘드리아의 증가가 POLG 마우스의 외적 형질(phenotype)을 개선할 수 있는 지를 시험하기 위해, 이 마우스를 MCK-PGC-1 α Tg 마우스와 교배했다(Lin *et al.*, 2002b)[47]. 돌연변이 POLG와

PGC-1 α 를 같이 발현하는 마우스는 심장과 골격근에서 미토콘드리아 활성이 증가되었는데, 이런 작용은 돌연변이 GOLG만을 발현하고 있는 쥐와 비교해서 이들 조직 기능의 개선을 가져왔다(Dillon *et al.*, 2012)[48]. 이들 데이터는 상승한 미토콘드리아 기능이 미토콘드리아 DNA의 돌연변이와는 무관하게 유익한 영향을 지니고 있다는 점을 부각하고 있다. 중요하게도 PGC-1 α 의 발현이 일생 동안 상승되어 있으면 근육량감소(sarcopenia (loss of muscle mass))와 같은 노화와 연관된 증상들의 시작이 지연된다(Wenz *et al.*, 2009)[49]. 이들 개선된 기능들은 나이에 따른 산화적 손상의 축적과 미토콘드리아 기능 저하를 낮춘 것에 기인한다(Wenz *et al.*, 2009)[49]. 종합적으로 이들 연구는 PGC-1 α 가 노화와 연관된 증상의 시작을 지연시키고 생겨난 산화적 손상의 영향을 누그러뜨린다는 것을 보여주고 있다.

[32]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[33] 본 발명자는 하기 일반식 1로 표시되는 유효성분을 함유하는 PGC-1 α 발현 감소에 따른 미토콘드리아 기능저하에 의한 다양한 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[34] 일반식 I: S-(MS)p-(MS)q

[35] 상기 일반식에서, S는 시알산, (MS)p 및 (MS)q는 서로 독립적으로 단당류 잔기이다.

[36] 본 발명의 실시예에 따른 목적은 PGC-1 α 등과 같은 미토콘드리아 관련 효소의 활성 및 생성을 증가시키고, 결과적으로 미토콘드리아의 활성 및 생성을 증가시킴으로써 예방 또는 개선, 치료되는 퇴행성 신경질환, 대사성 질환, 국소지방체거 및 지질 대사 관련 질환, 노화 및 노화에 기인한 질병, 근육감소(Sarcopenia, cachexia) 및 근육감소에 기인한 질병을 포함하는 병태, 장애 및/또는 질환의 치료 및/또는 관리를 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[37] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

과제 해결 수단

[38] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 유효성분으로서 다음 일반식 I로 표시되는 화합물, 그의 염, 수화물 또는 용매화물을 포함하는, 퍼옥시좀 증식촉진자-활성화된 수용체 조활성인자 1-알파(peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha: PGC-1 α)의 발현 감소와 연관된 질병 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공한다:

[39] 일반식 I: S-(MS)p-(MS)q

[40] 상기 일반식에서, S는 시알산이고, (MS)p 및 (MS)q는 서로 독립적으로 단당류

잔기이다.

[41] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 유효성분으로서 일반식 I로 표시되는 화합물을 포함하는 PGC-1 α 발현 감소에 따른 미토콘드리아 기능저하에 따른, 전사 조(助)활성인자인 peroxisome proliferator-activated receptor c coactivator 1-alpha (PGC-1 α)의 발현을 증가시키는 것에 의해 예방 또는 개선, 치료되는 퇴행성 신경질환, 대사성 질환, 국소지방제거 및 지질 대사 관련 질환, 노화 및 노화에 기인한 질병, 근육감소(Sarcopenia, cachexia) 및 근육감소에 기인한 질병을 포함하는 병태, 장애 및/또는 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[42] 이러한 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 미토콘드리아 기능저하에 의한 다양한 질환의 예방 또는 치료를 위한 조성물은 다음 일반식 I으로 표시되는 화합물을 유효 성분으로 함유한다.

[43] 일반식 I: S-(MS)p-(MS)q

[44] 상기 일반식에서, S는 시알산, (MS)p 및 (MS)q는 서로 독립적으로 단당류 잔기이다.

[45]

[46] 본 발명자는 다양한 질병의 근본인 PGC-1 α 발현 감소와 이에 따른 미토콘드리아의 기능 저하를 막아주는 물질을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 시알릴올리고당이 퇴행성 신경질환 모델 마우스에서 PGC-1 α 발현과 미토콘드리아의 기능을 증가를 유발하여 퇴행성 신경질환에 따른 행동의 향상을 유발하고, PGC-1 α 발현 감소와 미토콘드리아 기능 저하로 인한 퇴행성 신경질환, 근육손실 및 이에 따른 질환, 심혈관 질환, 노화 및 노화에 기인한 질병의 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하였다.

[47] 본 발명의 조성물에 있어서, 유효성분은 일반식 I의 화합물, 이의 염, 수화물 또는 용매화물이다. 일반식 I에서, S는 시알산을 나타낸다. 시알산은 다양한 방식으로, (MS)p에 결합되어 있을 수 있으나, α 2,3 결합 또는 α 2,6 결합으로 단당류 화합물 (MS)p에 결합된다. S에는 시알산 이외에, 변형된(modified) 시알산이 위치할 수 있다. 예를 들어, 시알산의 4번 탄소에 있는 -OH 기 중 H가 다른 치환기 또는 OH가 다른 치환기로 치환된 것이 S에 위치할 수 있다. 상기 치환은 (예컨대, H가 C1-C4 알킬기)로 치환된 것일 수 있다. 상기 C1-C4 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 또는 부틸일 수 있다. 가장 바람직하게는, 변형되지 않는 시알산이 S에 위치한다.

[48] (MS)p 및 (MS)q에 해당하는 단당류 화합물은 당업계에 공지된 어떠한 단당류 화합물도 해당될 수 있으며, 예를 들어, 4탄당(예컨대, 에리트로스 및 트레오오스), 5탄당(예컨대, 리보오스, 아라비노스, 자일로스 및 라이소오스) 및 6탄당(알로오스, 알트로오스, 글루코오스, 만노오스, 갈락토오스, 이도오스, 갈락토오스 및 탈로오스)을 포함한다. 바람직하게는, (MS)p 및 (MS)q에 위치하는 단당류 화합물은 5탄당 또는 6탄당이며, 보다 바람직하게는

6탄당이고, 보다 더 바람직하게는, 글루코오스, 만노오스 또는 갈락토오스이며, 가장 바람직하게는 글루코오스 또는 갈락토오스이다. (MS)p 및 (MS)q에 해당하는 단당류 화합물은 D- 또는 L-형태의 입체이성질체가 될 수 있고, 가장 바람직하게는 D-형태의 입체이성질체이다.

[49] (MS)p 및 (MS)q에는 동일한 또는 서로 다른 단당류 화합물이 결합될 수 있으며, 바람직하게는 서로 다른 단당류 화합물이 결합된다.

[50] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, (MS)p는 갈락토오스 또는 글루코오스이고, (MS)q는 글루코오스 또는 갈락토오스이며, 가장 바람직하게는 (MS)p는 갈락토오스, (MS)q는 글루코오스이다. (MS)p가 갈락토오스, (MS)q가 글루코오스인 경우, 이당류 화합물, 락토오스가 형성된다.

[51] (MS)p 및 (MS)q에 위치하는 단당류 화합물은 변형되거나 또는 변형되지 않은 것이다. 예를 들어, 변형된 단당류 화합물의 경우, -OH 기 중 H가 아세틸기 또는 -OH가 N-아세틸기로 치환될 수 있다. 바람직하게는, (MS)p 및 (MS)q에 위치하는 단당류 화합물은 변형되지 않는 단당류 화합물이다.

[52] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 유효성분으로 이용되는 일반식 I의 화합물은 시알릴락토오스이다. 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 시알릴락토오스는 시알산에 갈락토오스와 글루코오스가 순차적으로 결합되어 이루어진 화합물이다.

[53] 시알산은 다양한 방식으로, 갈락토오스에 결합되어 있을 수 있으며, 예컨대 $\alpha 2,3$ 또는 $\alpha 2,6$ 결합으로 결합된다. 시알산은 변형될 수 있으며, 예를 들어, 시알산의 4번 탄소에 있는 -OH 기 중 H가 다른 치환기 또는 OH가 다른 치환기로 치환된 것이 S에 위치할 수 있다. 상기 치환은 (예컨대, H가 C1-C4 알킬기로 치환)된 것일 수 있다. 상기 C1-C4 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 또는 부틸일 수 있다.

[54] 시알릴락토오스에 있는 갈락토오스와 글루코오스는 D- 또는 L-형태의 입체이성질체를 가질 수 있고, 가장 바람직하게는 D-형태의 입체이성질체이다. 시알릴락토오스에 있는 갈락토오스와 글루코오스는 변형되거나 또는 변형되지 않은 것이다. 예를 들어, 변형된 단당류 화합물의 경우, -OH 기 중 H가 아세틸기 또는 OH가 N-아세틸기로 치환될 수 있다. 바람직하게는, 시알릴락토오스에 있는 갈락토오스와 글루코오스는 변형되지 않는 단당류 화합물이다.

[55] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 시알릴락토오스는 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc 또는 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc이다[NeuNAc: N-Acetylneuraminyl, Gal:Galactose, Glc: Glucose]. α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc는 GM3 강글리오시드에서 발견되는 물질이며, α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc는 상기 물질의 이성질체이다.

[56] 보다 바람직하게는, 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 시알릴락토오스는 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc이다. 하기의 실시예에서 입증한 바와

같이, α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc는

α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc보다 효능이 우수하다.

- [57] 본 발명의 조성물에서 유효 성분으로 이용되는 것은 상기 화합물 자체뿐만 아니라, 그의 약제학적으로 허용 가능한 염, 수화물 또는 용매화물이다.
- [58] 용어, "약제학적으로 허용 가능한 염"은 소망하는 약리학적 효과, 즉 PGC-1 α 의 발현과 미토콘드리아의 기능을 증가시키는 상기 화합물의 염을 나타낸다. 이러한 염은 히드로클로라이드, 히드로브로마이드 및 히드로요오다이드와 같은 무기산, 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠술포네이트, p-톨루엔술포네이트, 비설페이트, 설파메이트, 설페이트, 나프틸레이트, 부티레이트, 시트레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 시클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 푸마레이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 2-히드록시에탄설페이트, 락테이트, 말리에이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 옥살레이트, 토실레이트 및 운테카노에이트와 같은 유기산을 이용하여 형성된다.
- [59] 용어, "약제학적으로 허용 가능한 수화물"은 소망하는 약리학적 효과를 갖는 상기 화합물의 수화물을 나타낸다. 용어, "약제학적으로 허용 가능한 용매화물"은 소망하는 약리학적 효과를 갖는 상기 화합물의 용매화물을 나타낸다. 상기 수화물 및 용매화물도 상기한 산을 이용하여 제조될 수 있다.
- [60] 상술한 일반식 I의 화합물, 그의 약제학적으로 허용 가능한 염, 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 PGC-1 α 의 발현과 미토콘드리아의 기능 증가를 초래하여, 궁극적으로 퇴행성 신경질환, 심혈관 질환, 노화 예방 또는 치료 활성을 나타낸다.
- [61] 본 명세서에서 사용되는 용어 "퇴행성 신경 질환(neurodegenerative Disease)"은 뇌와 척수의 특정 뇌세포 군이 서서히 그 기능을 잃고 뇌세포의 수가 감소하는 질환을 총칭한다. 뇌와 척수의 신경세포들은 그 위치에 따라 매우 다양한 기능을 하고 있기 때문에, 어느 부위의 신경세포들이 먼저 손상되고 기능을 잃어가는가에 따라, 또 이러한 기능장애가 어떤 형태로 진행되는 가에 따라 매우 다양한 임상 양상을 보이게 된다.
- [62] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 퇴행성 신경질환은 알츠하이머질병(Alzheimer's disease (AD)), 근위축성 측색 경화증, 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis (ALS)), 듀켄근이영양증(Duchenne muscular dystrophy), 파킨슨질병(Parkinson's disease (PD)), 헌팅턴질병(Huntington's disease (HD)), 픽병(Pick's disease), 커프병(Kuf's disease), 모르-트라네브야르그 증후군(Mohr-Tranebjaerg syndrome), 월슨병, 산발성 알츠하이머병, 산발성 근위축성 측색 경화증, 산발성 파킨슨병, 자율기능 변화, 수면 장애, 신경정신병학적 장애, 우울, 정신분열증, 분열정동 장애, 코르사코프 정신증, 조증, 불안 장애, 공포 장애, 학습 또는 기억 장애, 기억상실증 또는 연령 관련

기억 손실, 주의력 결핍 장애, 기분저하 장애, 주요 우울 장애, 강박인격 장애, 정신활성 물질 사용으로 인한 장애, 공황 장애, 양극성 정동장애, 편두통, 과잉행동 장애 및 운동 장애로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

[63] 보다 구체적으로 예를 들면, 본 발명의 퇴행성 신경질환은 급성, 아급성 또는 만성 신경변성 질환을 포함한다.

[64] 본 발명의 급성 신경변성 질환은 뇌졸중, 뇌경색, 뇌출혈, 두부손상 또는 척수손상을 포함하며, 상기 아급성 신경변성 질환은 탈수초성 질환, 신경계 부종양증후군, 아급성 연합 변성(subacute combined degeneration), 아급성 피사성 뇌염(subacute necrotizing encephalitis), 또는 아급성 경화성 범뇌염(subacute sclerosing encephalitis)을 포함한다. 본 발명의 만성 신경변성 질환은 노인성 치매, 혈관 치매, 미만성(diffuse) 백질 질환(빈스완거 질환), 내분비 또는 대사 기원 치매, 두부외상 및 미만성 뇌손상으로 인한 치매, 권투선수치매 및 전두엽 치매를 포함하는 기억 상실증, 알츠하이머 질환, 픽 질환, 미만성 루이소체 질환, 진행성 핵상 마비(스틸-리차드슨 증후군), 다계통위축증(multiple system degeneration), 신경변성과 관련된 만성 간질 상태, 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 조화운동불능, 피질 기저 변성, ALS-파킨슨-치매 복합증 (ALS Parkinson's- Dementia complex of Guam), 아급성 경화 범뇌염, 헌팅톤 질환, 파킨슨 질환, 시뉴클레인노페씨 (synucleinopathies), 일차 진행성 실어증 (primary progressive aphasia), 선조핵질 변성, 마카도-조셉 질환/척수소뇌성 실조증, 올리브교 변성을 포함하는 운동 신경세포 질환, 질 드 라 뚜렛 질환, 연수 및 거짓연수 마비, 척수 및 척수연수 근육 위축 (케네디 질환), 다발경화증, 원발 측삭 경화증, 유전성 연속성 대마비, 베르드니히-호프만 질환, 쿠젤베르그-웰란더 질환, 테이-삭스 질환, 샌드호프 질환, 유전성 강직성 질환, 울파르트-쿠젤베르그-웰란더 (Wohlfart-Kugelberg-Welander) 질환, 강직성 하반신마비, 진행성다초점백질뇌증, 유전성 자율신경 실조증 (릴리-데이 증후군), 크로이츠펠트-야콥, 게르스트만-스트라우슬러-샤인커 질환, 쿠루병 및 치명적 유전성 불면증을 포함하는 프리온 질환, 또는 뇌성마비를 포함한다.

[65] 본 발명의 대사성 질환, 지질 대사 관련 질환, 노화 및 노화에 기인한 질병, 근육감소(Sarcopenia, cachexia) 및 근육감소에 기인한 질병에는, 글루코스신생에 대한 변화, 연조직염, 여성유방증, 남성여성유방증, 지방이영양증, 노화, 광노화, 피부 외상, 상해의 재상피화, 피부의 탈수, 건조증, 각질화 장애, 굳은살(callous), 딱딱한 피부, 편평태선, 루푸스와 관련된 피부 병변, 지루성 피부염, 노인성피부염, 비듬, 유아 지방관(cradle cap), 지루, 여드름의 과다지루, 일광성 피부염, 지루성 각화증, 노인성 각화증, 광선 각화증, 광유도 각화증, 모낭 각화증, 보통 여드름, 모반, 섬유아세포의 기능 변화, 결절근막염, 경피증, 듀피트렌 구축(Dupuytren's contracture), 피지선의 장애, 여드름 장미증, 다형성 여드름, 면포, 다형증, 장미증, 결정낭성 여드름, 응괴성 여드름, 노인성 여드름, 어린선, 다리어병(Darier's disease), 수장족저 각피증, 백판증, 점막 태선, 피부

태선, 습진, 심상성 사마귀, 편평 사마귀, 사마귀양 포피이형성증, 구강 유두종증, 홍반성 루푸스, 수포성 질환, 수포성 유천포창, 경피증, 광선 각화증, 색소침착 장애, 백반증, 원형 탈모증, 루이 소체 질환(Lewy Body disease), 신경섬유 농축체, 로젠탈 섬유(Rosenthal fiber), 말로리 초자체(Mallory's hyaline), 중증근육무력증, 질 드 라 뚜렛 증후군, 다발성 경화증, 근위축성 축색 경화증, 진행성 핵상 마비, 간질, 크로이츠펠트-야콥병, 난청-근육긴장이상 증후군, 라이병(Leigh's disease), 레버 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy), 근육긴장이상, 운동 신경원 질환, 신경병증 증후군, 운동실조증 및 망막색소변성증, 모계 유전 라이병, 프리드리히 운동실조증, 유전성 강직성 대마비에 의해 형성된 군으로부터 선택된다.

- [66] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 용액, 현탁액, 시럽제, 에멀전, 리포솜, 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형제제 및 캡슐제로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [67] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 경구 투여용 조성물이고 리포솜을 포함한 약물 전달체 또는 서방형제제의 제형이다.
- [68] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물이 비경구 투여용 조성물인 경우 리포솜 및 초음파 조영제(ultrasound contrast agent)를 포함한 약물전달체 또는 서방형제제의 제형일 수 있다.
- [69] 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물, 화장품 및 기능성 식품(nutraceutical) 조성물 또는 식품 조성물로 제조될 수 있다.
- [70] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 일반식 I의 화합물의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.
- [71] 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 일반식 I의 화합물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [72] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [73] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구

투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 점막 투여 및 점안 투여 등으로 투여할 수 있다.

- [74] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 1일 당 0.0001-1000 mg/kg(체중)이고, 예를 들면, 0.001-800 mg/kg(체중), 또는 0.001-600 mg/kg(체중)이다. 또한, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.
- [75] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [76] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물의 제형은 용액, 현탁액, 시럽제, 에멀전, 리포솜, 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형제제 및 캡슐제이고, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [77] 구체적으로 투여경로에 따라, 경구 투여용 고체 제형으로는 캡슐제, 정제, 환제, 산제 및 과립제가 포함된다. 이러한 고체 제형에서, 활성 화합물은 하나 이상의 불활성 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체(예, 나트륨 시트레이트 또는 인산이칼슘) 및/또는 a) 충전제 또는 증량제(예, 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및 규산), b) 결합제(예, 카복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스 및 아라비아고무), c) 보습제(예, 글리세롤), d) 붕해제(예, 한천-한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염 및 탄산나트륨), e) 액상지연제(예, 파라핀), f) 흡수 촉진제(예, 사급 암모늄 화합물), g) 습윤제(예, 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트), h) 흡수제(예, 카올린 및 벤토나이트 점토) 및 i) 윤활제(예, 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트 및 이들의 혼합물)와 혼합될 수 있다. 캡슐제, 정제 및 환제의 경우에 제형은 또한 완충제를 포함할 수 있다.
- [78] 또한, 락토스 또는 밀크 슈가와 같은 부형제뿐만 아니라 고분자량의 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용한 연질 및 경질 젤라틴 캡슐에 충전제로서 사용될 수 있다.
- [79] 정제, 당의정, 캡슐제, 환제 및 과립제의 고체 투여형은 장용피 및 기타 약제 분야에 잘 알려진 피복과 같은 피복물 및 셀로 제조될 수 있다. 이들은 임의로 혼탁화제를 함유할 수 있으며, 또한 이들이 장관의 특정 부위에서 임의로 지연된 방식으로 활성 성분만을 방출하거나 활성 성분을 우선적으로 방출하도록 조성될 수 있다. 또한 필요한 경우 활성 화합물은 하나 이상의 상기된 부형제와 미세 캡슐 형태로 존재할 수 있다.

- [80] 경구 투여용 액체 제형으로는 약제학적으로 허용되는 에멀전, 용제, 현탁제, 시럽제 및 엘릭서제가 포함된다. 활성 화합물 이외에, 액체 제형은 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제(예, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸 포름아미드, 오일(특히, 면실유, 땅콩, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유 및 참깨유), 글리세롤, 테트라히드로푸릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 솔비탄의 지방산 에스테르 및 이들의 혼합물과 같이 본 분야에 흔히 사용되는 불활성 희석제를 함유할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 경구 조성물은 또한 습윤제, 유화제, 현탁화제, 감미제, 풍미제 및 방향제와 같은 보조제를 함유할 수 있다.
- [81] 직장 또는 질내 투여용 제형은 바람직하게는 본 발명의 화합물을, 실온에서 고체이나 체온에서는 액체여서 직장 또는 질에서 녹아 활성 화합물을 방출하는 적합한 비자극성 보조제 또는 담체(예, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜 또는 좌제용 왁스)와 혼합하여 제조할 수 있는 좌제이다.
- [82] 비경구 주사를 위해 적합한 제형은 생리학적으로 허용되는 멸균 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 에멀전, 및 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성하기 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 적합한 수성 및 비수성 담체, 희석제, 용매 또는 비히클의 예로는 물, 에탄올, 폴리올(프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 글리세롤 등), 식물성 기름(올리브유), 주사용 유기 에스테르(예, 에틸 올레에이트) 및 이들의 적합한 혼합물이 포함된다.
- [83] 또한, 본 발명의 조성물은 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 각종 항균제 및 항진균제(예, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 솔브산 등)에 의해 미생물의 작용을 억제할 수 있다. 또한 당, 염화나트륨 등과 같은 삼투압조절제를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 흡수 지연제(예, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴)를 사용하여 주사용 약제의 흡수를 지연시킬 수 있다.
- [84] 현탁제는 활성 화합물 이외에 현탁화제(예, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 솔비톨 및 솔비탄 에스테르, 미세결정 셀룰로스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 한천-한천 및 트라가칸트 또는 이들의 혼합물 등)를 함유할 수 있다.
- [85] 일부 경우에 약물의 효과를 지속시키기 위해, 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 서서히 하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 수용성이 낮은 결정형 또는 비결정형 물질의 액체 현탁액을 사용함으로써 달성될 수 있다. 이때 약물의 흡수 속도는 용해 속도에 좌우되며, 용해 속도는 결정 크기 및 결정 형태에 좌우된다. 한편, 비경구 투여된 약물 형태의 지연된 흡수는 약물을 오일 비히클 내에 용해시키거나 현탁시킴으로써 달성된다.
- [86] 주사용 데포우 형태는 약물의 미세캡슐 매트릭스를 폴리락티드-폴리글리콜라이드와 같은 생체분해성 중합체로 형성함으로써

- 제조된다. 약물 대 중합체의 비율 및 사용된 특정 중합체의 성질에 따라, 약물의 방출 속도를 조절할 수 있다.
- [87] 다른 생체분해성 중합체의 예로는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)이 포함된다. 또한, 데포우 주사용 제형은 약물을 체조직 적합성인 리포솜 또는 마이크로에멀전내에 포획시킴으로써 제조된다.
- [88] 주사용 제형은 예를 들면 세균-보유 필터를 통해 여과하거나, 멸균화제를 사용직전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사용 매질중에 용해시키거나 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태로 혼입시킴으로써 멸균시킬 수 있다.
- [89] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 경구 투여용 조성물이고 리포솜 또는 서방형제제의 제형이다.
- [90] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 비경구 투여용 조성물이고 리포솜 또는 서방형제제의 제형이다.
- [91] 본 발명의 약제학적 조성물이 경구투여 제형뿐만 아니라 비경구투여(바람직하게는 정맥 투여)제형으로 제조되는 경우, 그 제형은 리포솜 또는 서방형 제제이다.
- [92] 본 발명의 약제학적 조성물을 리포솜에 내포(encapsulation)시켜 약물 전달을 위한 제형의 안정성을 제공할 수 있다. 본 발명에 이용되는 리포솜은 폴리올, 계면활성제, 인지질, 지방산 및 물을 포함하는 혼합물에 의해 제조될 수 있다(Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, (XIV),p.33et seq.(1976)).
- [93] 리포솜에 이용되는 폴리올은 특히 제한되지 않으며, 바람직하게는 프로필렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 메틸프로판디올, 이소프로판글리콜, 펜틸렌글리콜, 에리스리톨, 자이리톨 및 솔비톨을 포함하며, 가장 바람직하게는 프로필렌 글리콜이다.
- [94] 리포솜의 제조에 이용되는 계면활성제는 당업계에 공지된 어떠한 것도 사용할 수 있으며, 예를 들어, 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용될 수 있고, 바람직하게는 음이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용된다. 음이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알킬아실글루타메이트, 알킬포스페이트, 알킬락타레이트, 디알킬포스페이트 및 트리알킬포스페이트를 포함한다. 비이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알콕시레이티드알킬에테르, 알콕시레이티드알킬에스테르, 알킬폴리글리코사이드, 폴리글리세릴에스테르 및 슈가에스테르를 포함한다. 가장 바람직하게는, 비이온성 계면활성제에 속하는 폴리솔베이트류가 이용된다.
- [95] 리포솜의 제조에 이용되는 또 다른 성분인 인지질은 양쪽친화성 지질로 이용된 것으로서, 천연 인지질 (예: 난황 레시틴 또는 대두 레시틴, 스펡고마이엘린) 및 합성 인지질 (예: 디팔미토일포스파티딜콜린 또는 수첨 레시틴)을 포함하며, 바람직하게는 레시틴이다. 보다 바람직하게는, 상기 레시틴은 대두 또는 난황에서 추출한 천연 유래의 불포화 레시틴 또는 포화 레시틴이다. 통상적으로

천연 유래의 레시틴은 포스파티딜 콜린의 양이 23-95%, 그리고 포스파티딜에탄올아민의 양이 20% 이하이다.

- [96] 리포솜 제조에 이용되는 지방산은 고급 지방산으로서, 바람직하게는 C12-22 알킬 체인의 포화 또는 불포화 지방산으로서, 예컨대, 라우린산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아린산, 올레산 및 리놀레산을 포함한다. 리포솜의 제조에 이용되는 물은 일반적으로 탈이온화된 증류수이다.
- [97] 리포솜의 제조는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으나, 가장 바람직하게는 상기 성분들을 포함하는 혼합물을 고압 호모게나이저에 적용하여 제조된다.
- [98] 이렇게 제조된 리포솜 시스템은 여러 종류의 난용성 물질을 녹임과 동시에 불안정한 물질을 안정화시켜 약물 전달을 극대화 하는 장점을 가지고 있다.
- [99] 본 발명의 약제학적 조성물은 지속적으로 유효성분의 유효 혈중농도를 유지함으로써 약제의 복용횟수를 줄여 복용순응도를 높일 수 있도록 서방형 제제로 제조될 수 있다.
- [100] 서방형제제는 본 발명의 유효성분 이외에 서방화 담체 및 기타 보조제를 포함하여 제제화된다. 본 발명에서 사용되는 서방화 담체는 당업계에 공지된 다양한 서방화 담체를 이용할 수 있으나, 바람직하게는 폴리에틸렌옥사이드이다.
- [101] 또한, 기타보조제로서 약제학적 분야에서 통상적으로 사용되는 희석 담체가 포함될 수 있다. 이러한 목적으로 사용되는 희석 담체의 예로는 락토오스, 텍스트린, 전분, 미세결정성 셀룰로오스, 인산일수소칼슘, 탄산칼슘, 당류 및 이산화규소 등이 있으며, 그밖에 유동성을 증가시키기 위해 스테아린산 아연 또는 마그네슘과 같은 활택제나 제약분야에서 사용가능한 다른 보조제를 포함시킬 수도 있다.
- [102]
- [103] 본 발명의 약제학적 조성물은 단독으로 이용될 수 있으나, 본 기술에서 언급한 신경질환, 심혈관질환, 노화, 근육손실에 사용되는 통상적인 유효성분을 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 경우 시너지 효과에 의해 보다 효과적인 조성물로 이용될 수 있다.
- [104] 본 발명의 조성물은 화장품학적 조성물의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 화장품학적 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 로션, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [105] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림, 로션, 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체,

폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

- [106] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로폴루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [107] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [108] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [109] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [110] 본 발명의 화장품학적 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분과 담체 성분 이외에, 화장품학적 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.
- [111] 본 발명의 조성물이 식품 조성물(또는 기능성 식품 조성물)로 제조되는 경우, 유효성분으로서 일반식 I의 화합물뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카리드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카리드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카리드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [112] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 일반식 I의 화합물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙,

두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[113]

[114] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 리포솜, 혼합 리포솜, 올레오솜, 니오솜, 에토솜, 밀리캡슐, 마이크로캡슐, 나노캡슐, 나노구조화된 지질 담체, 스폰지, 사이클로덱스트린, 소포 (vesicle), 미셀 (micelle), 계면활성제의 혼합 미셀, 계면활성제-인지질 혼합 미셀, 밀리스피어, 마이크로스피어, 나노스피어, 리포스피어, 마이크로에멀전, 나노에멀전, 미니입자, 밀리입자, 마이크로입자, 나노입자 및 고체 지질 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 식품학적, 화장품학적 또는 약제학적 전달 시스템 또는 지속 방출 시스템 내로 혼입되어 있는 것이다.

[115] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 나노캡슐은 마이크로에멀전을 함유한다.

[116] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 국소, 경구 또는 비경구 적용에 의해 사용하기 위한 것이다. 본 발명의 국소 투여는 구체적으로 예를 들면 경피 투여를 포함한다.

[117] 본 발명의 국소 적용, 구체적으로 예를 들어 경피 투여는 이온영동법, 초음파영동법, 전기천공법, 기계적 압력, 삼투압 구배, 폐색 관리(occlusive cure), 미세주사법, 압력에 의한 무바늘 주사, 미세전기 패치 이용, 안면 마스크 이용 또는 이들의 임의의 조합에 의해 수행될 수 있고, 이에 특별히 제한되지 않는다.

[118] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 PGC-1 α 의 발현을 증가시킨다. 이에 의해 PGC-1 α 감소와 관련된 증상 또는 질병을 예방, 개선 또는 치료하는 데 이용할 수 있다.

[119] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 피부의 치료 및/또는 관리에 사용하기 위한 것이다. 보다 구체적으로 상기 피부의 치료 및/또는 관리는 노화 및/또는 광노화의 징후를 감소, 지연 및/또는 예방하는 것이다.

[120] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 지방 조직의 부피를 감소시키는데 사용하기 위한 것이다.

[121] 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 지방 조직의 트리글리세라이드 함량을 감소시키는데 사용하기 위한 것이다.

[122] 보다 구체적으로 예를 들면, 본 발명의 지방 조직은 피하 지방 조직이다.

[123] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 본 발명의 피하 지방 조직은 대퇴부, 가슴, 목의 아랫부분, 목선(neckline), 둔부, 얼굴, 입술, 뺨, 눈꺼풀 및/또는 손의 피하 지방 조직이다.

[124] 본 발명의 또 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 지방 조직은 지방색전증(fat embolism)에 의해 형성된 지방조직을 포함한 신체 내에 발생할 수 있는 모든 지방조직이다.

[125] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 피부의 온도를 증가시키는데 사용하기 위한 것이다.

- [126] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 다른 양태들에 따른 적어도 하나의 일반식 I, 허용되는 염의 식품, 화장품학적 또는 약제학적 유효량, 및 적어도 하나의 식품, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 보조제를 포함하는 식품, 화장품학적 또는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [127] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 일반식 I, 이들의 혼합물 및/또는 이의 식품, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 염은 활석, 벤토나이트, 실리카, 전분 및 말토덱스트린에 의해 형성된 식품학적으로, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 고체 유기 중합체 또는 고체 광물 지지체 상에 흡착된 상태로 확인되는 것인 조성물이다.
- [128] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 크림, 다중 에멀전, 무수 조성물, 수성 분산액, 오일, 밀크, 발삼, 폼, 로션, 젤, 크림 젤, 함유알코올(hydroalcoholic) 용액, 히드로글리콜 용액, 히드로젤, 도찰제(liniment), 세라, 비누, 샴푸, 컨디셔너, 세럼, 연고, 무스, 폼, 파우더, 바, 펜슬, 스프레이, 에어로졸, 캡슐, 젤라틴 캡슐, 연질 캡슐, 경질 캡슐, 정제, 당의정, 과립, 추잉검, 용액, 현탁액, 에멀전, 시럽, 엘릭서제, 다당류 필름, 젤리 및 젤라틴에 의해 형성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제공된다.
- [129] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 언더아이 컨실러, 메이크업 파운데이션, 메이크업 제거 로션, 메이크업 제거 밀크, 아이 새도우, 립스틱, 립 글로스, 입술 보호제 및 파우더로 이루어진 군으로부터 선택되는 제품 내로 혼입된 상태로 확인되는 것이다.
- [130] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 일반식 I, 이들의 혼합물 및/또는 이의 식품, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 염은 직물, 부직포 또는 의료 장치 내로 혼입되어 있는 것이다.
- [131] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 직물, 부직포 또는 의료 장치는 붕대, 거즈, 티셔츠, 타이츠, 양말, 언더웨어, 거들, 장갑, 기저귀, 생리대, 드레싱, 베드스프레드, 물수건(wipe), 접착 패치, 비접착 패치, 폐색 패치, 미세전기 패치 및 안면 마스크로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다.
- [132] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 기타 다른 PGC-1 α 조절제, 기타 다른 PPAR γ 조절제, 지방세포의 트리글리세라이드 함량을 감소시키는 제제, 지방세포 분화를 지연시키는 제제, 지방분해제 또는 지방분해 자극제, 항셀룰라이트제, 지방생성제, 아세틸콜린-수용체 응집 억제제, 근육 수축 억제제, 항콜린성 제제, 엘라스타아제 억제제, 기질 금속단백질 분해효소 억제제, 멜라닌합성 자극제 또는 억제제 또는 탈색제(depigmenting agent), 전구색소침착제(propigmenting agent), 자가 태닝제, 노화방지제, NO-합성효소 억제제, 5 α -환원효소 억제제, 리실-하이드록실라아제 및/또는 프롤릴-하이드록실라아제 억제제, 항산화제, 자유 라디칼 포착제 및/또는 대기오염에 대한 제제, 반응성 카보닐종 포착제, 당화방지제(anti-glycation agent), 항히스타민제, 항바이러스제, 항기생충제, 유화제, 연화제(emollient), 유기 용매,

액체 추진제, 피부 컨디셔너, 습윤제, 수분 보유 물질, 알파 하이드록시산, 베타 하이드록시산, 보습제, 표피 가수분해 효소, 비타민, 아미노산, 단백질, 색소 또는 착색제, 염료, 생체고분자, 젤화폴리머, 증점제, 계면활성제, 유연제, 유화제, 결합제, 방부제, 주름방지제, 눈밑 처진 살을 감소 또는 치료할 수 있는 제제, 피부박리제(exfoliating agent), 각질박리제(desquamating agent), 각질용해제(keratolytic agent), 항균제, 항진균제, 정진균제(fungistatic agent), 살균제, 정균제(bacteriostatic agent), 진피 또는 자극제, 엘라스틴 합성 자극제, 데코린 합성 자극제, 라미닌 합성 자극제, 데펜신 합성 자극제, 샤페론 합성 자극제, cAMP 합성 자극제, 열충격 단백질, HSP70 합성 자극제, 열충격 단백질 합성 자극제, 아쿠아포린 합성 자극제, 히알루론산 합성 자극제, 피브로넥틴 합성 자극제, 시르투인(sirtuin) 합성 자극제, 각질층의 성분 및 지질의 합성 자극제, 세라마이드, 지방산, 콜라겐 분해 억제제, 엘라스틴 분해 억제제, 세린 단백질 분해 효소 억제제, 섬유아세포 증식 자극제, 각질세포 증식 자극제, 멜라닌세포 증식 자극제, 각질세포 분화 자극제, 아세틸콜린에스테라제 억제제, 피부 이완제, 글리코사미노글리칸 합성 자극제, 과다각화증 방지제, 면포용해제(comedolytic agent), DNA 수복제, DNA 보호제, 안정화제, 항소양제, 민감성 피부의 치료 및/또는 관리를 위한 제제, 펴밍제(firming agent), 재치밀화제(redensifying agent), 재구조화제, 임신선 방지제, 결합제, 피지 생성 조절제, 항발한제, 치유 자극제, 치유 공보조제(coadjuvant healing agent), 재상피화 자극제, 재상피화 공보조제(coadjuvant re-epithelialization agent), 사이토카인 성장 인자, 진정제, 항염증제, 마취제, 모세혈관 순환 및/또는 미세순환에 작용하는 제제, 혈관 투과성 억제제, 정맥긴장제(venotonic agent), 세포 대사에 작용하는 제제, 진피-표피 결합을 개선하기 위한 제제, 모발 성장 유도제, 또는 지연제, 방향제, 킬레이트화제, 식물 추출물, 에센셜 오일, 해양성 추출물, 생물발효 공정로부터 수득되는 제제, 광물염(mineral salt), 세포 추출물, 선택스크린 및 자외선 A 및/또는 B에 대해 활성을 갖는 유기 또는 광물 광보호제 또는 이들의 혼합물에 의해 형성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 보조제의 식품, 화장품학적 또는 약제학적 유효량을 추가로 포함하는 것이다.

- [133] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 보조제는 합성 기원이거나 식물 추출물이거나 생물발효 공정으로부터 또는 합성 및 바이오기술 공정의 조합으로부터 유래하는 것이다.
- [134] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 적어도 하나의 항당뇨병제의 약제학적 유효량을 추가적으로 더 포함한다.
- [135] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 보조제는 지방 조직의 트리글리세라이드 함량을 증가 또는 감소시키는 제제, 지방세포 분화를 증가 또는 지연시키는 제제, 지방분해제 및/또는 정맥긴장제로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [136] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 지방 조직의 트리글리세라이드

함량을 증가 또는 감소시키는 제제, 지방세포 분화를 지연시키는 제제, 항셀룰라이트제, 지방분해제 및/또는 정맥긴장제는 포스콜린, 카페인, 에스신(escin), 카르니틴, 코엔자임 A, 리파제, 글라우신, 에스쿨린, 비스나딘, 사르사사포게닌, 코페아 아라비카(*Coffea arabica*)의 추출물, 콜레우스 포스콜리(*Coleus forskohlii*)의 추출물, 아네마레나 아프쇼텔로이데스(*Anemarrhena asphodeloides*)의 추출물, 및 물, 글리세린, 레시틴, 카페인, 나도죽백(Butcher's broom; 루스쿠스 아쿨레아투스(*Ruscus Aculeatus*))의 추출물, 말토덱스트린, 실리카, 트리에탄올아민 히드로요오다이드, 프로필렌 글리콜, 아이비(헤데라 헬릭스(*Hedera Helix*))의 추출물, 카르니틴, 에스신, 트리펩티드-1, 잔탄 검, 카라기난(콘드루스 크리스푸스(*Chondrus crispus*)) 및 이나트륨 EDTA의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된다.

- [137] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 보조제는 펄핑제, 재치밀화제 및 재구조화제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다.
- [138] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 펄핑제, 재치밀화제 및 재구조화제는 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas*) 발효 추출물, 트리펩티드-10 시트룰린, 아세틸아르기닐트립토판 디페닐글리신, 헥사펩티드-10, 및 슈도알테로모나스 발효 추출물, 가수분해된 밀 단백질, 가수분해된 대두 단백질, 트리펩티드-10 시트룰린 및 트리펩티드-1의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [139] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 보조제는 임신선 방지제로부터 선택된다. 보다 구체적으로 예를 들면, 본 발명의 임신선 방지제는 센텔라 아시아티카(*Centella Asiatica*)의 추출물, 로사 카니나(*Rosa canina*)의 추출물, 로사 모샤타(*Rosa moschata*)의 추출물, 로사 루비기노사(*Rosa rubiginosa*)의 추출물, 및 물, 카프릴릴/카프릴 글루코사이드, 레시틴, 글리세린, 슈도알테로모나스 발효 추출물, 아세틸트리펩티드-30 시트룰린, 펜타펩티드-18, 잔탄 검 및 카프릴릴 글리콜의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [140] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 보조제는 주름방지제 및 노화방지제로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [141] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 주름방지제 또는 노화방지제는 아세틸 헥사펩티드-8, 아세틸 헵타펩티드-4, 아세틸 옥타펩티드-3, 펜타펩티드-18, 아세틸 헥사펩티드-30, 가수분해된 밀 단백질과 가수분해된 대두 단백질과 트리펩티드-1의 혼합물, 디아미노프로피오노일 트리펩티드-33, 트리펩티드-10 시트룰린, 슈도알테로모나스 발효 추출물과 가수분해된 밀 단백질과 가수분해된 대두 단백질과 트리펩티드-10 시트룰린과 트리펩티드-1의 혼합물, 아세틸 테트라펩티드-5, 아세틸 트리펩티드-30 시트룰린, 아세틸아르기닐트립토판 디페닐글리신, 아세틸 테트라펩티드-22, 디메틸메톡시 크로마놀, 디메틸메톡시 크로마닐 팔미테이트, 슈도알테로모나스 발효 추출물, 리신 HCl과 레시틴과 트리펩티드-9 시트룰린의 혼합물 및 리신 HCl과 레시틴과 트리펩티드-10 시트룰린의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[142]

[143] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 고체상(solid phase) 또는 용액 중에서 반응시키는 단계를 포함하는, 다음 일반식 I로 나타낸 화합물, 이의 식품학적으로, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 혼합물의 제조 방법을 제공한다:

[144] 일반식 I: $S-(MS)_p-(MS)_q$,

[145] 상기 일반식에서, S는 시알산이고, $(MS)_p$ 및 $(MS)_q$ 는 서로 독립적으로 단당류 잔기이다.

[146]

[147] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 유효성분으로서 다음 일반식 I로 표시되는 화합물을 포함하는 체지방 분해용 조성물을 제공한다:

[148] 일반식 I: $S-(MS)_p-(MS)_q$

[149] 상기 일반식에서, S는 시알산, $(MS)_p$ 및 $(MS)_q$ 는 서로 독립적으로 단당류 잔기이다.

[150] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 일반식 I에서, $(MS)_p$ 는 갈락토오스이고, $(MS)_q$ 는 글루코오스이다.

[151] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 일반식 I의 화합물은 시알릴락토오스이다.

[152] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 시알릴락토오스는 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc 또는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc이다.

[153] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 시알릴락토오스는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc이다.

[154] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물이다.

[155] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 용액, 현탁액, 시럽제, 에멀전, 리포솜, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형제제 및 캡슐제로 구성된 군으로부터 선택된 제형이다.

[156] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 비경구 투여용 조성물이고 리포솜 또는 서방형제제의 제형이다.

[157] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 경구투여용 조성물이고 리포솜 또는 서방형제제의 제형이다.

[158] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 기능성 식품(nutraceutical) 조성물 또는 식품 조성물이다.

[159]

[160] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 다른 일 양태 중 어느 하나에 따른 조성물을 이를 필요로 하는 객체(subject)에 투여하는 단계;를 포함하는, 객체에서 PGC-1 α 의 발현 감소와 연관된 질병 또는 증상을 예방 또는 치료 방법을 제공한다. PGC-1 α 의 발현 감소와 연관된 질병 또는 증상은 본

발명의 다른 일 양태들에서 설명한 바와 같다.

- [161] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 치료 방법은 상기 투여하는 단계 전에 객체로부터 분리된 시료로부터 세포 중 PGC-1 α 의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 더 포함한다. 본 발명의 PGC-1 α 의 발현 수준 측정은 종래 알려진 방법을 제한없이 이용하여 측정가능하다. 본 발명의 객체로부터 분리된 시료는 PGC-1 α 를 발현하는 세포를 포함하는 객체로부터 분리된 시료를 의미하고, 특별한 제한은 없다.
- [162] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 PGC-1 α 의 발현 수준이 정상 대조군 대비 감소되어 있는지 여부를 관찰하고, 감소된 경우 상기 객체에 대하여 상기 투여하는 단계를 수행한다.
- [163] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 정상 대조군은 정상인 또는 PGC-1 α 의 발현 수준의 감소와 연관된 질환 또는 증상을 보이지 않는 객체로부터 얻어진 세포이다.
- [164] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 시료는 특정 조직 또는 기관으로부터 얻어진 것이다. 본 발명의 특정 조직 또는 기관은 PGC-1 α 의 발현 수준의 감소와 연관된 질환 또는 증상과 관련된 조직 또는 기관을 의미하고, 상기 질환 또는 증상에 따라 적절하게 선택될 수 있다.
- [165] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 투여는 상기 측정된 PGC-1 α 의 발현 수준이 대조군 대비 감소된 특정 조직에 국소적으로 투여하는 것을 의미한다.
- [166]
- [167] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 다른 일 양태 중 어느 하나에 따른 조성물을 이를 필요로 하는 객체(subject)에 투여하는 단계;를 포함하는, 객체에서 체지방을 분해시키는 방법을 제공한다.
- [168] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 방법은 상기 투여하는 단계 전에 객체로부터 분리된 시료로부터 세포 중 PGC-1 α 의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 더 포함한다. 본 발명의 PGC-1 α 의 발현 수준 측정은 종래 알려진 방법을 제한없이 이용하여 측정가능하다. 본 발명의 객체로부터 분리된 시료는 PGC-1 α 를 발현하는 세포를 포함하는 객체로부터 분리된 시료를 의미하고, 특별한 제한은 없다.
- [169] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 PGC-1 α 의 발현 수준이 평균 체중군의 평균 PGC-1 α 발현량 대비 감소되어 있는지 여부를 관찰하고, 감소된 경우 상기 객체에 대하여 상기 투여하는 단계를 수행한다.
- [170] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 평균 체중군은 대상 객체와 동일 신장을 갖는 인구들의 평균 체중과 동일한 체중을 갖는 인구들의 집합을 의미하고, 평균 체중군의 체중을 측정하기 위한 표본 집단은 바람직하게 객체와 동일한 인종, 민족에 속한 인구에서 무작위 선택될 수 있고, 적어도 10인 이상, 바람직하게는 50인 이상, 더 바람직하게는 100인 이상일 수 있으며, 이들의 평균 체중을 측정하여 평균 체중군 선정을 위한 평균 체중으로 이용할 수 있다. 또한

대안적으로 종래 알려진 통계 수치를 이용하는 것이 가능하다.

[171] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 세포는 상술한 평균 체중군에 속한 객체로부터 얻어진 세포이다.

[172] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 시료는 특정 조직 또는 기관으로부터 얻어진 것이다. 본 발명의 특정 조직 또는 기관은 평균 체중군의 평균 체형과 비교하여, 지방 함유량이 높은 부위로부터 적절하게 선택이 가능하다.

[173] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 투여는 상기 측정된 PGC-1 α 의 발현 수준이 대조군 대비 감소된 특정 조직에 국소적으로 투여하는 것을 의미한다.

발명의 효과

[174] 본 발명에 따른 조성물은 각 질병 모델에 사용된 동물에서 독성을 나타내지 않을 뿐만 아니라 다양한 뇌질환 (AD, PD, HD 등), 뇌졸중, 노화촉진, 피부실험 동물 모델 시험군 및 정상 동물 시험군에 주입시켰을 경우, 뇌와 해마를 포함한 다양한 장기에서 미토콘드리아의 기능과 관련된 PGC-1 α 와 그와의 관련 유전자들 (Fncl5 (Fibronectin type III domain containing 5), Erra (estrogen-related receptor alpha, UCP-1 (uncoupling protein 1), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), SOD2 (superoxide dismutase 2), GPX1 (glutathione peroxidase 1)의 발현을 대조군과 비교하여 보다 현저하게 증가시킴과 동시에 각종 뇌질환 (AD, PD, HD 등)들의 기본 행동 테스트에서도 향상된 행동을 보여, PGC-1 α 관련 퇴행성 신경질환, 대사성 질환, 국소지방제거 및 지질 대사 관련 질환, 노화 및 노화에 기인한 질병, 근육감소(Sarcopenia, cachexia) 및 근육감소에 기인한 질병을 포함하는 병태, 장애 및/또는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[175] 도 1a, 도 1b 및 도 1c는 정상 쥐 모델에서의 6'-SL(sialyllactose) 조성물 처리에 의한 장기 (도 1a), 골격근 (도 1b) 및 복부지방 (도 1c)의 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 도 1d, 도 1e 및 도 1f는 정상 쥐 모델에서의 3'-SL 조성물 처리에 의한 장기 (도 1d), 골격근 (도 1e) 및 복부지방 (도 1f)의 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다.

[176] 도 2a 및 도 2b는 뇌와 해마에서의 PGC-1 α 단백질 발현 변화를 수치 (도 2a)와 웨스턴블롯 (도 2b)으로 나타낸 도면이다.

[177] 도 3은 신경 세포에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타내는 도면이다.

[178] 도 4는 C2C12 미성숙 근육세포에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타내는 도면이다.

[179] 도 5a 및 도 5b는 대조군 대비 뇌 혹은 해마의 상대적인 유전자 발현 변화는 각 장기들에서 ((알츠하이머 질환 모델)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양), ((알츠하이머 질환 모델+3'-SL)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)과

((알츠하이머 질환 모델+6'-SL)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)을 수치로 나타낸 것이다.

- [180] 도 6은 대조군, (알츠하이머 질환 모델)군, (알츠하이머 질환 모델+3'-SL) 그리고 (알츠하이머 질환 모델+6'-SL)군에 대하여 인지능력 테스트 (Morris water maze) 실험을 7일간 하여 인지 능력 테스트에서의 탈출 시간을 수치로 나타낸 것이다.
- [181] 도 7a 및 도 7b는 파킨슨 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL)조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다.
- [182] 도 8은 파킨슨병 동물 모델에 대한 행동 실험 결과를 나타낸 도면이다.
- [183] 도 9a 및 도 9b는 간질/경련 뇌질환 모델에서의 SL 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다.
- [184] 도 10a 및 도 10b는 헌팅톤 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다.
- [185] 도 11은 헌팅턴 질환 모델에 대한 로타로드 주행 실험의 결과를 나타낸 도면이다.
- [186] 도 12는 허혈 모델에서의 허혈 부피를 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.
- [187] 도 13은 ICH 유도 후 SL (3'-SL & 6'-SL) 처리에 의한 MLPT 시험 점수 변화를 나타낸 도면이다.
- [188] 도 14는 쥐 모델에서의 SL 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다.
- [189] 도 15는 쥐 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물을 국소 투여한 경우 피하지방 감소 효과를 보여주는 도면이다.
- [190] 도 16a 및 16b는 노화촉진 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다.
- [191] 도 17a와 17b는 세포내 H₂O₂ 측정 (ROS 수치)(도 17a) 및 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산 측정(도 17b)을 나타낸 도면이다.
- [192] 도 18a 및 18b는 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 투여에 의한 텔로메라아제 활성도를 측정한 결과를 나타낸다.
- [193] 도 19a 및 19b는 세포내 H₂O₂ 측정 (ROS 수치)(도 19a) 및 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산 측정(도 19b)의 결과를 나타낸 도면이다.
- [194] 도 20a 및 20b는 SL (3'-SL & 6'-SL)를 동맥경화증 모델 (ApoE^{-/-}; 도20a)과 MASMs (도 20b)들에 처리하여 텔로메라아제 활성도를 분석한 결과를 나타낸 도면이다.
- [195] 도 21a 및 21b는 피부실험 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다.
- [196] 도 22a 및 도 22b는 분화된 지방세포에서 6'-시알릴락토오스 (도 22a)와 3'-시알릴락토오스 (도 22b)가 투여된 경우 세포내 지방의 변화를 나타낸 도면이다.

- [197] 도 23a 및 도 23b는 분화된 지방세포에서 6'-시알릴락토오스 (도 23a)와 3'-시알릴락토오스 (도 23b)가 투여된 경우 세포내 지방의 변화를 나타내는 세포의 광학 현미경 사진이다.
- [198] 도 24는 분화된 지방세포에서 세포의 생존률에 미치는 6'-시알릴락토오스의 영향을 나타낸 도면이다.
- [199] 도 25는 분화된 지방세포에서 시알릴락토오스에 의한 glycerol 분비의 변화를 나타낸 도면이다.
- [200] 도 26a 및 26b는 시알릴락토오스 피하주사에 의한 고지방식이 마우스의 피부변화를 나타낸 도면이다.

[201]

발명의 실시를 위한 형태

- [202] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[203]

- [204] 실시예 1. 정상쥐 모델에서의 SL(3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 촉진 평가

- [205] SL (3'-SL & 6'-SL) 투여 전 대비 장기별 상대적인 유전자 발현 변화를 보기 위하여, 4 주령 C57BL/6 마우스를 Dooyeul biotech (대한민국)으로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 시판 중인 펠릿 먹이(Dooyeul biotech, 대한민국)를 2주일 동안 공급하였다. 6주령에서 마우스(초기체중 평균 21.4 ± 1.1 g)를 다음과 같이 3개의 군(각 군은 8 마리의 마우스로 구성됨)으로 무작위로 나누고 10주 동안 이들 식이를 유지하였다 (전체 24 마리 동물):

- [206] -대조군: 정상 식이 마우스 군

- [207] -3'-SL 투여군: 정상 식이군에 더하여 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma)를 별도로 투여 (마우스 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여)

- [208] -6'-SL 투여군: 정상 식이군에 더하여 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma)를 별도로 투여 (마우스 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여).

- [209] 시알릴락토오스 또는 증류수(Deionized Water)를 매일 경구투여 방식으로 투여해 주었다. 마우스를 10 주 동안 동물실에 보관하였고, 12 시간 절식한 다음 희생시켰다. 식이 섭취량 및 체중 변화량은 각각 5일 마다 측정하였다.

3'-시알릴락토오스(3'-N-Acetylneuraminyl-D-lactose, 3'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-DGlc) 또는

6'-시알릴락토오스(6'-N-Acetylneuraminyl-lactose, 6'-Sialyl-D-lactose 또는

α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[210]

- [211] 상기와 같은 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 투여에 의한 유전자 발현 변화를, 8가지 주요 장기 (심장, 해마, 뇌, 척수, 폐, 간, 비장, 및 신장)와 3가지 골격근 그리고 복부지방 등에서 정량 비교를 하였다. 트리졸 시약(TRIzol agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 RNA와 역전사 시스템(Promega, 미국)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 및 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, SOD2, 및 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머와 프로브(Applied biosystems; PGC-1 α , Mm00447181_m1, GAPDH, 및 Mm99999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [212] 도 1에서, SL (3'-SL & 6'-SL) 투여 전 대비 장기별 상대적인 유전자 발현 변화는 각 장기들에서 (SL 투여군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)을 수치로 나타낸 것이다. 6'-SL의 경우, 대부분의 장기 (도 1a), 골격근 (도 1b) 그리고 복부지방 (도 1c)에서 알 수 있는 바와 같이, 여러 신체 부위들에서 6'-SL 투여군은 음성 대조군에 비해 PGC-1 α 를 포함한 여러 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, 및 UCP1)의 발현 정도가 매우 높았다. 즉, 6'-SL이 정상 쥐의 여러 장기, 근육과 지방에서 PGC-1 α 와 관련된 유전자들의 발현을 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다. 3'-SL의 경우, 대부분의 장기 (도 1d), 골격근 (도 1e) 그리고 복부지방 (도 1f)에서 알 수 있는 바와 같이, 여러 신체 부위들에서 3'-SL 투여군은 음성 대조군에 비해 여러 분석 대상의 발현 정도가 약간 증가하긴 하였지만, 6'-SL에 비하여 그 효과가 적었다.
- [213] 도 1a, 도 1b 및 도 1c는 정상 쥐 모델에서의 6'-SL 조성물 처리에 의한 장기 (도 1a), 골격근 (도 1b) 및 복부지방 (도 1c)의 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 도 1d, 도 1e 및 도 1f는 정상 쥐 모델에서의 3'-SL 조성물 처리에 의한 장기 (도 1d), 골격근 (도 1e) 및 복부지방 (도 1f)의 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 도 1a 내지 도 1f에서 세로축은 대조군 대비 상대적인 유전자 발현비를 나타낸다.
- [214]
- [215] 실시예 2. 노령 쥐모델의 뇌와 해마에서의 SL(3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 PGC-1 α 단백질 발현 촉진 평가
- [216] SL (3'-SL & 6'-SL) 투여 전 대비 뇌에서의 상대적인 단백질 발현을 보기 위하여, 4 주령 ICR 마우스를 중앙실험동물 (대한민국)로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 시판 중인 펠릿 먹이(Dooyeul biotech, 대한민국)를 2주일 동안 공급하였다. 6주령에서 마우스(초기체중 평균 20.3 \pm 1.5 g)를 다음과 같이 3개의 군(각 군은 8 마리의 마우스로 구성됨)으로 무작위로 나누고 42주 동안 이들 식이를 유지하였다 (전체 24 마리 동물):
- [217] -대조군: 정상 식이 마우스군
- [218] -3'-SL 투여군: 정상 식이군에 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma) 처리 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여)

- [219] -6'-SL 투여군: 정상 식이군에 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma) 처리 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여)
- [220] 시알릴락토오스 또는 DW를 매일 경구투여 방식으로 투여해 주었다. 마우스를 42 주 동안 동물실에 보관하였고, 12 시간 절식한 다음 희생시켰다. 식이 섭취량 및 체중 변화량은 각각 5일 마다 측정하였다.
3'-시알릴락토오스(3'-N-Acetylneuraminyl-D-lactose, 3'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-DGlc) 또는
6'-시알릴락토오스(6'-N-Acetylneuraminyl-lactose, 6'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.
- [221] 도 2는 뇌와 해마에서의 PGC-1 α 단백질 발현 변화를 수치 (도 2a)와 웨스턴블롯 (도 2b)으로 나타낸 도면이다. 도 2b에서 BB1 6'은 6'-SL이다. 각 부위들에서 'PGC-1 α 단백질 발현양'과 'GAPDH 단백질 발현양'을 정량해서 그 값의 상대적인 비 (PGC-1 α 단백질 발현양)/(GAPDH 단백질 발현양)를 대조군, 3'-SL 투여군, 6'-SL 투여군에 대해서 수치로 나타내었다. 뇌와 해마 모두에서 6'-SL 투여군은 음성 대조군에 비해 PGC-1 α 발현 정도가 매우 높았다. 즉, 6'-SL이 정상 쥐의 뇌의 여러 부분에서 PGC-1 α 단백질의 발현을 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [222]
- [223] 도 2는 노화 쥐 모델에서의 SL 조성물 투여에 의한 뇌와 해마 부분의 PGC-1 α 단백질 발현 변화를 나타낸다. 생후 6주 수컷 ICR 마우스에게 군당 8 마리로 하여 대조군과 6'-SL 투여군을 만들어 42주간 식이 조절 실험을 하였고, 마우스를 희생시켜 뇌와 해마를 적출하였다. 뇌는 대뇌 피질을 적출하였다. 적출된 뇌와 해마에서의 PGC-1 α 단백질 발현 변화를 수치 (도 2a)와 웨스턴블롯 (도 2b)으로 나타내었다.
- [224]
- [225] 실시예 3. 신경 세포 실험에서의 SL(3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 촉진 평가
- [226] SL (3'-SL & 6'-SL)이 신경 세포에서도 PGC-1 α 유전자와 관련 유전자들의 발현을 촉진하는 효과가 있는지를 알아보기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [227] 뉴로블라스트 (Neuro-2a, American Type Culture Collection, USA)는 6-웰 플레이트의 웰 중 10% 소태아혈청, 100U 페니실린 및 0.1mg/mL의 스트렙토미신을 포함하는 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂/95% 대기 조건에서 배양하였다. Neuro-2a 세포는 빠르게 자라는 생쥐 신경아세포종 세포주(neuroblastoma cell line)이다. 웰 당 6000개의 밀도로 시딩 후에, Neuro-2a 세포가 5x10⁶ cells/ml 정도의 컨플루언시를 보이는 웰 중에 SL을 0.1mg/ml의 농도로 첨가하고 동일한 조건에서 24시간 배양하였다. SL(3'-SL 또는 6'-SL)은 실시예1에 기재된 것과 동일한 것을 사용하였다. 이하 달리 언급이 없으면, SL

(3'-SL 또는 6'-SL) 및 그 사용 농도는 실시예1에 기재된 것과 동일한 것으로 이해된다. 음성 대조군은 생리식염수를 배지 부피의 1/1000로 처리하였다. 각 샘플을 처리한 세포들을 37°C에서 24시간 배양한 후, 차가운 식염수로 2회 세척하고, 트리졸 시약(TRIZOL agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 합성된 cDNA 및 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머(Primer)와 프로브(probe)(Applied biosystems; PGC-1 α , Mm00447181_m1, GAPDH, 및 Mm99999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[228]

[229] 도 3은 신경 세포에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타내는 도면이다. 도 3에 나타낸 바와 같이, Neuro-2a 세포에 SL (3'-SL & 6'-SL)을 24시간 처리한 투여군과 처리하지 않은 대조군과 비교한 결과, SL (3'-SL & 6'-SL) 투여군은 음성 대조군에 비해 PGC-1 α 을 포함한 여러 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)에 대하여 유의성 있는 발현양 증가를 보여주었다. 6'-SL이 신경세포에서 PGC-1 α 와 관련된 유전자들의 발현을 매우 촉진시켰고, 3'-SL은 촉진 효과가 6'-SL보다 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

[230]

[231] 실시예 4. 근육 세포 실험에서의 SL(3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 촉진 평가

[232] SL이 실제 근육세포에서 PGC-1 α 유전자의 발현을 촉진하는 효과가 있는지를 알아보기 위해, 다음과 같은 시험을 수행하였다.

[233] C2C12 미성숙 근육세포를 ATCC(American Tissue Culture Collection, 미국)로부터 구입하여 준비하였으며, 10% FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco, 미국)가 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium, 지브코, 미국) 배지에서 이들에 한번씩 배지를 교환하면서 70% 융합(confluent) 할 때까지 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 근육 세포로의 분화는 2% HS(Horse Serum, 지브코, 미국)를 포함한 배지에서 배양하여 유도하였다. 2% HS를 포함한 배지에서 4일 동안 배양한 근육 세포에 다양한 농도의 SL을 처리하였다. 음성 대조군은 생리식염수를 배지 부피의 1/1000로 처리하였다. 각 샘플을 처리한 세포들을 37°C에서 24시간 배양한 후, 차가운 식염수로 2회 세척하고, 트리졸 시약(TRIZOL agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 1 μ g/ μ l의 RNA와 역전사 시스템(Promega, 미국)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

[234] 합성된 cDNA 및 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, SOD2, 및 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머와 프로브(Applied biosystems; PGC-1 α ,

Mm00447181_m1, GAPDH, 및 Mm99999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

- [235] 도 4는 C2C12 미성숙 근육세포에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타내는 도면이다. C2C12 미성숙 근육세포에 SL (3'-SL & 6'-SL)을 24시간 처리한 투여군과 처리하지 않은 대조군과 비교한 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, SL (3'-SL & 6'-SL) 투여군은 음성 대조군에 비해 PGC-1 α 를 포함한 여러 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)에 대하여 유의성 있는 발현양 증가를 보여주었다. 6'-SL이 C2C12 미성숙 근육세포에서 PGC-1 α 와 관련된 유전자들의 발현을 매우 촉진시켰고, 3'-SL은 촉진 효과가 6'-SL보다 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

[236]

- [237] 실시예 5. 알츠하이머 뇌질환 모델에서의 SL(3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 촉진 평가 및 인지능력 테스트 개선 평가

- [238] 알츠하이머 뇌질환 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 및 인지능력 테스트 변화를 보기 위하여, 6주령 마우스를 중앙실험동물(대한민국)로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 시판 중인 펠릿 먹이(Dooyeul biotech, 대한민국)를 2주일 동안 공급하였다. 8주령에서 마우스를 다음과 같이 3개의 군(각 군은 8 마리의 마우스로 구성됨)으로 분류하였다: 생후 8주 수컷 c57/BL6 마우스 (정상쥐; 초기체중 평균 35.6 \pm 3.3g)에게 정상 식이 처리한 군 8마리를 대조군으로 하고, 생후 8주 수컷 알츠하이머 질환 모델 마우스 (3xTg; 초기체중 평균 33.9 \pm 2.8g)에게 군당 8 마리로 하기 3개의 상이한 식이 처리군으로 무작위로 나누고 10주 동안 이들 식이를 유지하였다 (전체 32 마리 동물):

- [239] -대조군: SL이 투여되지 않은 정상 식이를 먹은 정상쥐 (8마리)

- [240] -(알츠하이머 질환 모델)군: SL이 투여되지 않은 정상 식이를 먹은 알츠하이머 모델 (8마리)

- [241] -(알츠하이머 질환 모델+3'-SL)군: 정상 식이군에 더하여 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma)를 별도로 투여하 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 알츠하이머 모델 (8마리)

- [242] -(알츠하이머 질환 모델+6'-SL)군: 정상 식이군에 더하여 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma)를 별도로 투여한 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 알츠하이머 모델 (8마리)

- [243] 시알릴락토오스 또는 DW를 매일 경구투여 방식으로 투여해 주었다. 마우스를 10 주 동안 동물실에 보관하였고, 12 시간 절식한 다음 희생시켰다. 식이 섭취량 및 체중 변화량은 각각 5일 마다 측정하였다.

3'-시알릴락토오스(3'-N-Acetylneuraminy-D-lactose, 3'-Sialyl-D-lactose 또는

α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-DGlc) 또는
 6'-시알릴락토오스(6'-N-Acetylneuraminyllactose, 6'-Sialyl-D-lactose 또는
 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[244]

[245] SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를, 뇌질환 관련 2가지
 주요 장기 (해마 및 뇌)들에서 정량 비교를 하였다. 뇌는 대뇌 피질이다. 트리졸
 시약(TRIzol agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여
 정량한 RNA와 역전사 시스템(Promega, 미국)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.
 합성된 cDNA 및 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및
 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머와 프로브(Applied biosystems; PGC-1 α ,
 Mm00447181_m1, GAPDH, 및 Mm99999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현
 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene
 3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 5에
 나타내었다.

[246]

[247] 도 5는 알츠하이머 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자
 발현 변화를 나타내는 도면이다. 도 5에서, 대조군 대비 뇌 혹은 해마의 상대적인
 유전자 발현 변화는 각 장기들에서 ((알츠하이머 질환 모델)군 유전자
 발현양)/(대조군 유전자 발현양), ((알츠하이머 질환 모델+3'-SL)군 유전자
 발현양)/(대조군 유전자 발현양)과 ((알츠하이머 질환 모델+6'-SL)군 유전자
 발현양)/(대조군 유전자 발현양)의 수치로 나타낸 것이다. 생후 8주 수컷
 알츠하이머 모델 (3xTg) 마우스에게 군당 8 마리로 하여 SL 투여한 군과
 투여하지 않은 군을 만들어 10주간 식이 조절 실험하여 정상식이 정상쥐
 (c57/BL6)의 유전자 발현 양과 비교하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 정상식이의
 정상쥐 대조군을 기준으로 했을 때, 6'-SL이 투여된 (알츠하이머 질환
 모델+6'-SL)군은 정상 대조군에 비해서는 뇌 (도 5a)와 해마 (도 5b)에서
 PGC-1 α 를 포함한 여러 분석 대상(Fndc5, Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)의
 발현 정도가 약간 떨어지지만, SL이 투여되지 않은 (알츠하이머 질환 모델)군에
 비해 발현 정도가 매우 높았다. 3'-SL은 관련 유전자 발현 촉진 효과가 6'-SL에
 비해서 상대적으로 떨어짐을 알 수 있었다. 즉, 6'-SL이 알츠하이머 질환 모델
 쥐의 뇌와 해마에서 PGC-1 α 와 관련된 유전자들 (Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1,
 BDNF, SOD2, 및 GPX1)에 대하여 가장 유의성 있는 발현양 증가를 보여주었다.

[248]

[249] 도 6은 대조군, (알츠하이머 질환 모델)군, (알츠하이머 질환 모델+3'-SL)
 그리고 (알츠하이머 질환 모델+6'-SL)군에 대하여 인지능력 테스트 (Morris water
 maze) 실험을 7일간 하여 인지 능력 테스트에서의 탈출 시간을 수치로 나타낸
 것이다. SL이 투여되지 않은 (알츠하이머 질환 모델)군은 실험시간이 지나도
 인지능력 테스트 탈출시간이 거의 개선 되지 않고 일정한데 반하여, 6'-SL이

투여된 (알츠하이머 질환 모델+6'-SL)군은 테스트 탈출시간이 확연히 빨라지고, 정상식이의 정상쥐 대조군보다 약간 떨어짐을 알 수 있다. 3'-SL은 인지능력 개선 효과가 6'-SL에 비해서 상대적으로 떨어짐을 알 수 있었다. 즉, 6'-SL이 알츠하이머 질환 모델 쥐에서 가장 잘 인지능력을 개선시키는 것을 확인할 수 있었다.

[250]

[251] 실시예 6. 파킨슨 뇌질환 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 촉진 평가 및 행동실험 개선 평가

[252] 파킨슨 뇌질환 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 및 행동실험 개선 변화를 보기 위하여, 13 주령 정상 SD rat 및 파킨슨 뇌질환 모델을 중앙실험동물 (대한민국)로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 시판 중인 펠릿 먹이(Dooyeul biotech, 대한민국)를 일주일 동안 공급하였다. 14주령에서 SD rat을 다음과 같이 4개의 군(각 군은 8 마리로 구성됨)으로 분류하였다: 생후 14주 수컷 SD rat (정상쥐; 초기체중 평균 $355.6 \pm 32.3g$)에게 정상 식이 처리한 군 8마리를 대조군으로 하고, 생후 8주령에 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 투여하여 13주령에 공급된 6-OHDA induced SD rat 파킨슨 질환 모델에 군당 8 마리로 하기 3개의 상이한 식이 처리군으로 무작위로 나누고 14주령(초기체중 평균 $363.6 \pm 29.8g$)부터 10주 동안 이들 식이를 유지하였다 (전체 32 마리 동물):

[253] -대조군: SL가 투여되지 않은 정상 식이를 먹은 정상쥐 (8마리)

[254] -(파킨슨 질환 모델)군: SL가 투여되지 않은 정상 식이를 먹은 파킨슨 모델 (8마리)

[255] -(파킨슨 질환 모델+3'-SL)군: 정상 식이군에 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 파킨슨 모델 (8마리)

[256] -(파킨슨 질환 모델+6'-SL)군: 정상 식이군에 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 파킨슨 모델 (8마리)

[257] 시알릴락토오스 또는 DW를 매일 경구투여 방식으로 투여해 주었다. Rat을 10 주 동안 동물실에 보관하였고, 12 시간 절식한 다음 희생시켰다. 식이 섭취량 및 체중 변화량은 각각 5일 마다 측정하였다.

3'-시알릴락토오스(3'-N-Acetylneuraminy-D-lactose, 3'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-DGlc) 또는

6'-시알릴락토오스(6'-N-Acetylneuraminy-lactose, 6'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[258]

[259] SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를, 뇌질환 관련 2가지 주요 장기 (해마, 뇌)들에서 정량 비교를 하였다. 트리졸 시약(TRIZol agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 RNA와 역전사 시스템(Promega, 미국)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 및 분석

대상 (Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머와 프로브(Applied biosystems; PGC-1 α , Mm00447181_m1, GAPDH, 및 Mm99999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 7a 및 도 7b에 나타내었다.

- [260] 도 7a 및 도 7b는 파킨슨 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL)조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 생후 8주령에 6-OHDA 투여하여 13주령에 공급된 6-OHDA induced SD rat 파킨슨 질환 모델에게 군당 8 마리로 하여 SL (3'-SL & 6'-SL)을 투여한 군과 투여하지 않은 군을 만들어 8주간 식이 조절 실험하여, 생후 13주 수컷 SD rat (정상쥐)에게 정상 식이 처리한 대조군의 유전자 발현 양과 비교하였다. 도 7a 및 도 7b에서, 뇌 혹은 해마의 정상쥐 대비 유전자 발현 변화는 각 장기들에서 ((파킨슨 질환 모델)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양), ((파킨슨 질환 모델+3'-SL)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양) 그리고 ((파킨슨 질환 모델+6'-SL)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)의 수치로 나타내었다. 그 결과, 도 7a 및 도 7b에 나타낸 바와 같이, 정상식이의 정상쥐 대조군을 기준으로 했을 때, 6'-SL이 투여된 (파킨슨 질환 모델+6'-SL)군은 정상 대조군에 비해서 뇌 (도 7a)와 해마 (도 7b)에서 PGC-1 α 를 포함한 여러 분석 대상 (Fndc5, Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)의 발현 정도가 약간 떨어지지만, SL이 투여되지 않은 (파킨슨 모델)군에 비해 발현 정도가 매우 우수하였다. 3'-SL은 유전자 발현 촉진 효과가 6'-SL에 비해서 상대적으로 떨어짐을 알 수 있었다. 즉, 6'-SL이 파킨슨 질환 모델 쥐의 뇌와 해마에서 PGC-1 α 와 관련된 유전자들에 대하여 유의성 있는 발현양 증가를 보여주었다.

[261]

- [262] 도 8은 파킨슨병 동물 모델에 대한 행동 실험 결과를 나타낸 도면이다. 도 8에서, 세로축은 대조군, (파킨슨 질환 모델)군, (파킨슨 질환 모델+3'-SL)군 그리고 (파킨슨 질환 모델+6'-SL)군에 대하여 수직의 쇠창살 기구를 이용하여 행동 능력 실험(코너 돌기 & 내려가기)을 한 결과, 코너 돌기 시간과 내려가기 시간의 수치이다. 수직의 쇠창살 기구는 5cm X 55cm X 8cm의 열린 상자 형태이며, 앞면은 0.8cm X 0.8cm의 와이어이고, 나머지 면은 검은색의 플렉시글라스이며, 안전성을 위하여 바닥은 5cm 길게 제작되었다. 실험시, 마우스는 기기 꼭대기에서 3cm 떨어진 위치에 위를 향하는 방향으로 놓여졌고, 시험하기 전에 2일간 3번 기기에 순응시켰다. 쥐가 60초 안에 내려오지 못하면 다시 반복했었다. 코너 돌기 시간은 위로 향하던 쥐가 아랫 방향으로 향하게 돌아서는데 걸리는 시간이며, 내려가기 시간은 쥐가 코너를 돌아서 바닥에 내려온 전체 실험시간에서 코너 돌기 시간을 뺀 시간이었다.

- [263] 도 8에 나타낸 바와 같이, 정상식이의 정상쥐 대조군에 비하여, SL이 투여되지 않은 (파킨슨 질환 모델)군은 코너 돌기 시간과 내려가기 시간이 2~3배 이상 오래

결련데 비해서, 6'-SL이 투여된 (파킨슨 질환 모델+SL)군은 코너 돌기 시간과 내려가기 시간이 대조군과 거의 비슷했었다. 즉, 6'-SL이 파킨슨 질환 모델 쥐에서 행동 능력 (코너 돌기 혹은 내려가기)을 개선시키는 것을 확인할 수 있었다. 3'-SL은 행동 능력 개선 효과가 6'-SL에 비해서 상대적으로 떨어짐을 알 수 있었다.

[264]

[265] 실시예 7. 간질/경련 뇌질환 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 촉진 평가

[266] 간질/경련 뇌질환 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 보기 위하여, 생후 4주령 정상 SD rat 및 간질/경련 뇌질환 모델 (NER (Noda Epileptic Rat)을 중앙실험동물 (대한민국)로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 시판 중인 펠릿 먹이(Dooyeul biotech, 대한민국)를 2주일 동안 공급하였다. 6주령에서 SD rat을 다음과 같이 4개의 군(각 군은 8마리로 구성됨)으로 분류하였다: 생후 6주 수컷 SD rat (정상쥐; 초기체중 평균 $176.3 \pm 13.3g$)에게 정상 식이 처리한 군 8마리를 대조군으로 하고, 생후 6주령 간질/경련 뇌질환 모델(초기체중 평균 $181.8 \pm 11.3g$)에 군당 8마리로 하기 3개의 상이한 식이 처리군으로 무작위로 나누고 6주령부터 10주 동안 이들 식이를 유지하였다 (전체 32 마리 동물):

[267] -대조군: SL가 투여되지 않은 정상 식이를 먹은 정상쥐 (8마리)

[268] -(간질/경련 뇌질환 모델)군: SL가 투여되지 않은 정상 식이를 먹은 간질/경련 뇌질환 모델 (8마리)

[269] -(간질/경련 뇌질환 모델+3'-SL)군: 정상 식이군에 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 간질/경련 뇌질환 모델 (8마리)

[270] -(간질/경련 뇌질환 모델+6'-SL)군: 정상 식이군에 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 간질/경련 뇌질환 모델 (8마리)

[271] 시알릴락토오스 또는 DW를 매일 경구투여 방식으로 투여해 주었다. Rat을 10주 동안 동물실에 보관하였고, 12 시간 절식한 다음 희생시켰다. 식이 섭취량 및 체중 변화량은 각각 5일 마다 측정하였다.

3'-시알릴락토오스(3'-N-Acetylneuraminy-D-lactose, 3'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-DGlc) 또는

6'-시알릴락토오스(6'-N-Acetylneuraminy-lactose, 6'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[272]

[273] SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를, 뇌질환 관련 2가지 주요 장기 (해마, 뇌)들에서 정량 비교를 하였다. 트리졸 시약(TRIzol agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 RNA와 역전사

시스템(Promega, 미국)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 및 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머와 프로브(Applied biosystems; PGC-1 α , Mm00447181_m1, 999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[274]

[275] 도 9a 및 도 9b는 간질/경련 뇌질환 모델에서의 SL 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 도 9a 및 도 9b에서, 세로축은 대조군 대비 뇌 혹은 해마의 상대적인 유전자 발현 변화는 각 장기들에서 ((간질/경련 뇌질환 모델)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양), ((간질/경련 뇌질환 모델+3'-SL)과 ((간질/경련 뇌질환 모델+6'-SL)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)의 수치이다. 생후 6주령 간질/경련 질환 모델에게 군당 8 마리로 하여 SL 투여한 군과 투여하지 않은 군을 만들어 10주간 식이 조절 실험하여, 생후 6주 수컷 SD rat (정상쥐)에게 정상 식이 처리한 대조군의 유전자 발현 양과 비교하였다. 그 결과, 도 9a 및 도 9b에 나타낸 바와 같이, 정상 식이의 정상쥐 대조군을 기준으로 했을 때, SL이 투여된 (간질/경련 질환 모델+SL)군은 정상 대조군에 비해서는 뇌 (도 9a)와 해마 (도 9b)에서 PGC-1 α 를 포함한 여러 분석 대상(Fndc5, Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)의 발현 정도가 약간 떨어지지만, SL이 투여되지 않은 (간질/경련 모델)군에 비해 발현 정도가 매우 우수하였다. 즉, 6'-SL이 간질/경련 질환 모델 쥐의 뇌와 해마에서 PGC-1 α 와 관련된 유전자들에 대하여 유의성 있는 발현양 증가를 보여주었다. 3'-SL은 유전자 발현 촉진 효과가 6'-SL에 비해서 상대적으로 떨어짐을 알 수 있었다.

[276]

[277] 실시예 8. 헌팅톤 뇌질환 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 촉진 평가 및 로타로드 주행시간 개선 평가

[278] 헌팅톤 뇌질환 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 및 인지능력 테스트 변화를 보기 위하여, 4 주령 마우스를 중앙실험동물 (대한민국)로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 시판 중인 펠릿 먹이(Dooyeul biotech, 대한민국)를 일주일 동안 공급하였다. 5주령에서 마우스를 다음과 같이 3개의 군(각 군은 8 마리의 마우스로 구성됨)으로 분류하였다: 생후 5주 수컷 c57/BL6 마우스 (정상쥐; 초기체중 평균 25.3 \pm 4.3g)에게 정상 식이 처리한 군 8마리를 대조군으로 하고, 생후 5주 수컷 헌팅톤 질환 모델 마우스 (R6/2 계열 (B6CBATg(HDexon1)62Gpb/3J, 111 CAGs)의 트랜스제닉 HD 마우스; 초기체중 평균 26.9 \pm 4.8g)에게 군당 8 마리로 하기 3개의 상이한 식이 처리군으로 무작위로 나누고 10주 동안 이들 식이를 유지하였다 (전체 32 마리 동물):

[279] -대조군: SL가 투여되지 않은 정상 식이를 먹은 정상쥐 (8마리)

[280] -(헌팅톤 질환 모델)군: SL가 투여되지 않은 정상 식이를 먹은 헌팅톤 모델

(8마리)

- [281] -(헌팅톤 질환 모델+3'-SL)군: 정상 식이군에 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 헌팅톤 모델 (8마리)
- [282] -(헌팅톤 질환 모델+6'-SL)군: 정상 식이군에 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 헌팅톤 모델 (8마리)
- [283] 시알릴락토오스 또는 DW를 매일 경구투여 방식으로 투여해 주었다. 마우스를 10 주 동안 동물실에 보관하였고, 12 시간 절식한 다음 희생시켰다. 식이 섭취량 및 체중 변화량은 각각 5일 마다 측정하였다.
3'-시알릴락토오스(3'-N-Acetylneuraminy-D-lactose, 3'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-DGlc) 또는
6'-시알릴락토오스(6'-N-Acetylneuraminy-lactose, 6'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.
- [284]
- [285] SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를, 뇌질환 관련 2가지 주요 장기 (해마, 뇌)들에서 정량 비교를 하였다. 트리졸 시약(TRIZol agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 RNA와 역전사 시스템(Promega, 미국)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 및 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머와 프로브(Applied biosystems; PGC-1 α , Mm00447181_m1, GAPDH, 및 Mm99999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [286]
- [287] 도 10a 및 도 10b는 헌팅톤 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 도 10a 및 도 10b에서 세로축은 정상쥐 대조군 대비 뇌 혹은 해마의 유전자 발현 변화는 각 장기들에서 ((헌팅톤 질환 모델)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양), ((헌팅톤 질환 모델+3'-SL)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양) 그리고 ((헌팅톤 질환 모델+6'-SL)군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)의 수치이다. 생후 5주 수컷 헌팅톤 모델 마우스에게 군당 8 마리로 하여 SL (3'-SL & 6'-SL)을 투여한 군과 투여하지 않은 군을 만들어 10주간 식이 조절 실험하여 정상식이 정상쥐 (c57/BL6)의 유전자 발현 양과 비교하였다. 그 결과, 도 10a 및 도 10b에 나타낸 바와 같이, 정상식이의 정상쥐 대조군을 기준으로 했을 때, 6'-SL이 투여된 (헌팅톤 질환 모델+6'-SL)군은 정상 대조군에 비해서는 뇌 (도 10a)와 해마 (도 10b)에서 PGC-1 α 을 포함한 여러 분석 대상 (Fndc5, Erra, UCP1, BDNF, SOD2, 및 GPX1)의 발현 정도가 약간 떨어지지만, SL이 투여되지 않은 (헌팅톤 질환 모델)군에 비해 발현 정도가 매우 높았다. 즉, SL이 헌팅톤 질환 모델 쥐의 뇌와 해마에서 PGC-1 α 와 관련된 유전자들에 대하여 유의성 있는 발현양 증가를 보여주었다.

3'-SL은 유전자 발현 촉진 효과가 6'-SL에 비해서 상대적으로 떨어짐을 알 수 있었다.

[288]

[289] 또한, 정상식이의 정상쥐 대조군 대비 (헌팅톤 질환 모델)군, (헌팅톤 질환 모델+3'-SL)군 그리고 (헌팅톤 질환 모델+6'-SL)군의 로타로드 주행 시간 변화를 통해 행동개선을 평가하였다. 로타로드 주행실험은 ((헌팅톤 질환 모델)군의 로타로드 주행시간)/(대조군 로타로드 주행시간)과 ((헌팅톤 질환 모델+3'-SL)군의 로타로드 주행시간)/(대조군 로타로드 주행시간) 그리고 ((헌팅톤 질환 모델+6'-SL)군의 로타로드 주행시간)/(대조군 로타로드 주행시간)의 수치들의 변화를 확인하는 실험이다. 로타로드 주행시간은 로타로드 장치 (3분의 시간에 걸쳐 4 내지 40 rpm의 회전 스피드로 가속하는 로드; Jungdo Instruments, Korea)를 이용하여 측정하였다. 4주령 쥐에 로타로드 시험 연습을 한 뒤, 5주령부터 로타로드 시험을 수행하여, 떨어질 때까지 평균 시간을 측정하였다.

[290]

[291] 도 11은 헌팅톤 질환 모델에 대한 로타로드 주행 실험의 결과를 나타낸 도면이다. 도 11에서, 세로축은 ((헌팅톤 질환 모델)군의 로타로드 주행시간)/(대조군 로타로드 주행시간)과 ((헌팅톤 질환 모델+3'-SL)군의 로타로드 주행시간)/(대조군 로타로드 주행시간) 그리고 ((헌팅톤 질환 모델+6'-SL)군의 로타로드 주행시간)/(대조군 로타로드 주행시간)의 수치를 나타낸다. 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 정상식이의 정상쥐 대조군과 비교하여, (헌팅톤 질환 모델)군, (헌팅톤 질환 모델+3'-SL)군 그리고 (헌팅톤 질환 모델+6'-SL)군에 대하여 로타로드 주행 실험을 비교했을 때, 6'-SL이 투여된 (헌팅톤 질환 모델+6'-SL)군은 SL이 투여되지 않은 (헌팅톤 질환 모델)군에 비해서 로타로드 주행시간이 증가한 것으로 나타났고, 3'-SL의 주행시간 증가 효과는 6'-SL에 비해서 적었다. 즉, 6'-SL이 헌팅톤 질환 모델에서 행동개선을 가장 잘 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다.

[292]

[293] 실시예 9. 뇌졸중 모델에서의 SL(3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 허혈부피 및 MLPT 점수 변화

[294] 뇌졸중 모델에서 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 허혈부피 및 MLPT(Modified limb placing test) 점수 변화를 보기 위하여, 4 주령 마우스를 중앙실험동물 (대한민국)로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 사판 중인 펠릿 먹이(Dooyeul biotech, 대한민국)를 일주일 동안 공급하였다. 임시 및 영구 MCA(middle cerebral artery) 폐색 및 뇌내출혈 (intracerebral hemorrhage: ICH)을 포함하는 뇌졸중 모델은 6주령 수컷 Sprague-Dawley rat(체중 평균 185.3 ± 15.8 g) 및 수컷 BALB/c 마우스(체중 평균 24.6 ± 3.8 g)를 사용하여 제조되었다. SL 투여 효과를 비교하기 위하여, 뇌졸중 유발 후 1시간에 군당 8

마리로 하기 3개의 상이한 복강 투여군으로 무작위로 나누고 (전체 24 마리 동물) 복강 투여하였다:

- [295] - 대조군: 용해 완충액 대조군 매체 복강 투여군 (8마리)
- [296] - 3'-SL 처리: 3'-SL 용해 완충액 매체 복강 투여군 (8마리)
- [297] - 6'-SL 처리: 6'-SL 용해 완충액 매체 복강 투여군 (8마리)
- [298] 국소대뇌경색 마우스모델은 추가적인 뇌경색 모델로 활용되었으며, 이 모델에서는 뇌경색 유발 후 3시간에 SL (3'-SL & 6'-SL)을 복강 투여하였다.
- [299] - 대조군: 용해 완충액 대조군 매체 복강 투여군 (8마리)
- [300] - 3'-SL 처리: 3'-SL 용해 완충액 매체 복강 투여군 (8마리)
- [301] - 6'-SL 처리: 6'-SL 용해 완충액 매체 복강 투여군 (8마리)
- [302] 허혈 부피 측정은 허혈유도 24시간 경과 후에 허혈부피 (경색 및 경계영역)의 부피를 TTC (2,3,7-triphenyltetrazolium chloride)를 이용하여 아래와 같이 수행하였다. 뇌를 적출한 다음에 전두엽을 1mm 두께로 자르고 2% TTC 용액에 침지하였다. 이어 염색된 절편을 PBS-4% 파라 포름알데히드로 고정된 후 각 절편의 허혈발생부위 및 반구 영역을 이미지 분석 시스템으로 측정하였다. 뇌 부종으로 인한 값을 아래와 같이 보정하였다: 교정된 허혈부피값: 측정된 허혈면적 $\times 1 - \{[(\text{ipsilateral hemisphere area} - \text{contralateral hemisphere area}) / \text{contralateral hemisphere}]\}$. 허혈부피는 총 반구부피에 대한 백분율로 나타냈다.

[303]

- [304] 도 12는 허혈 모델에서의 허혈 부피를 관찰한 결과를 나타낸 도면이다. 도 12의 결과는 3'또는 6'-SL을 임시 또는 영구의 MCA (middle cerebral artery) 폐색이 가해진 마우스 모델에 처리했을 때, 인비보에서 SL에 의한 허혈성 신경 손상에 보호효과를 관찰한 결과이다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 6'-SL 처리에 의한 허혈부피 감소가 국소 소뇌 영구 허혈 모델 (50%), 국소 소뇌 임시 허혈 모델 (60%) 및 국소 대뇌 영구 폐색 모델 (40%) 모두에서 절반 정도가 되었다. 3'-SL의 허혈성 신경 손상에 보호효과는 6'-SL에 비해서 상대적으로 떨어짐을 알 수 있었다.

[305]

- [306] 또한, ICH 모델에서 SL (3'-SL & 6'-SL)에 의한 신경 퇴행 억제력을 보기 위해서, MLPT 테스트를 수행하였다. MLPT 테스트는 ICH 유도 하루 전, 하루 후 및 3일 후에 다음과 같이 수행되었다. 모델을 테이블에서 10cm 떨어진 곳에 매단 후 테이블로의 앞다리의 스트레치 정도를 평가하였다 (정상 0점, 비정상적 구부림 1점). 이어 모델의 앞발이 가장자리를 거쳐 움직이도록 하고, 각 앞 다리를 부드럽게 아래로 잡아당기고, 회수 정도를 평가하였다 (두 번째 실험: 앞 다리; 세 번째 실험: 뒷 다리). 마지막으로 래트를 테이블의 가장자리에 두고 앞다리를 옆으로 위치하는 것에 대하여 평가하였다. 3회의 평가 결과에 대하여 다음과 같이 점수를 매겼다: 정상, 0 점; 지연 (적어도 2초) 및/또는 불완전 수행, 1 점;

수행하지 못함, 2 점. 총 7점이 최대의 신경성 결핍을 나타내고, 0점은 정상을 나타낸다.

[307]

[308] 도 13은 ICH 유도 후 SL (3'-SL & 6'-SL) 처리에 의한 MLPT 시험 점수 변화를 나타낸 도면이다. 도 13에 나타낸 바와 같이, ICH 모델에서 6'-SL 처리를 하였을 때, ICH 모델 유도 후 1일째와 3일째 결과에서 보듯이, 대조군보다 MLPT 테스트 점수가 낮아졌다. 즉 6'-SL 처리에 의한 신경 퇴행 억제 효과가 있는 것이다. 3'-SL의 신경 퇴행 억제 효과는 6'-SL에 비해서 상대적으로 떨어짐을 알 수 있었다.

[309]

[310] 실시예 10. SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 복부지방 유전자 발현 변화 및 국소 지방 제거 평가

[311]

[312] 쥐 모델에서 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화 및 국소 지방 제거 효과를 보기 위하여, 4 주령 수컷 ob 마우스 (C57BL/6J-ob/ob) 모델을 중앙실험동물 (대한민국)로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 고지방 사료 (Rodent Diet with 60kcal% fat)를 2주일 동안 공급하였다. 생후 6주 수컷 ob 마우스 (C57BL/6J-ob/ob) 모델 (초기체중 평균 $34.2 \pm 3.7g$)에게 군당 8 마리로 하기 3개의 상이한 식이 처리군으로 무작위로 나누고, 10주 동안 이들 식이를 유지하였다 (전체 24마리 동물):

[313] -대조군: SL가 처리되지 않은 고지방 사료 (Rodent Diet with 60kcal% fat) 식이를 먹은 모델 (8마리)

[314] -3'-SL 투여군: 고지방 식이군에 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 모델 (8마리)

[315] -6'-SL 투여군: 고지방 식이군에 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 모델 (8마리)

[316] 시알릴락토오스 또는 DW를 매일 경구투여 방식으로 투여해 주었다. 마우스를 10 주 동안 동물실에 보관하였고, 12 시간 절식한 다음 희생시켰다. 식이 섭취량 및 체중 변화량은 각각 5일 마다 측정하였다.

3'-시알릴락토오스(3'-N-Acetylneuraminy-D-lactose, 3'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-DGlc) 또는

6'-시알릴락토오스(6'-N-Acetylneuraminy-lactose, 6'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[317]

[318] SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를, 복부에서 정량 비교를 하였다. 트리졸 시약(TRIZOL agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 RNA와 역전사 시스템(Promega, 미국)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 및 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1,

SOD2, 및 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머와 프로브(Applied biosystems; PGC-1 α , Mm00447181_m1, GAPDH, 및 Mm99999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[319]

[320] 도 14는 쥐 모델에서의 SL 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 도 14에서 세로축은 고지방 사료 식이를 먹는 모델에서 SL 투여 전 대비 복부지방 유전자 발현비로서, 복부지방에서 (3'-SL 투여군의 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)과 (6'-SL 투여군의 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)의 수치이다. 생후 6주 수컷 마우스에게 군당 8 마리로 하여 대조군과 SL 투여군을 만들어 10주간 고지방 식이 조절 실험을 하였다. 그 결과, 도 14에 나타낸 바와 같이, 6'-SL 투여된 실험군은 음성 대조군에 비해 여러 분석 대상 (Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, SOD2, 및 GPX1)에 대하여 2배정도의 유의성 있는 발현양 증가를 보여주었다. 3'-SL은 PGC-1 α 와 관련된 유전자들의 발현 촉진 효과가 6'-SL에 비해서 상대적으로 약간 떨어짐을 알 수 있었다.

[321]

[322] 또한, SL을 처리되지 않은 고지방 사료 식이를 먹는 상기 ob 마우스 (C57BL/6J-ob/ob) 모델 쥐에서, 매조 롤러(0.5mm, 인투엠알, (주)인투메디)를 이용하고 SL (3'-SL & 6'-SL) 투여에 의한 국소 지방 제거 효과를 확인하였다. 구체적으로, 쥐의 등쪽에 있는 털을 잘라내고 노출 피부에 대하여 식염수 버퍼 중 0.1 M 농도의 SL를 피부에 바른 후 상기 매조 롤러를 마찰시켜 피부를 통하여 흡수하게 하였다. 대조군은 SL이 없는 상기 버퍼를 사용한 것을 제외하고 동일하였다. 그 결과를 도 15에 나타내었다. 도 15는 쥐 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물을 국소 투여한 경우 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 도 15에서, 3'-SL, 6'-SL, 및 CTL은 각각 3'-SL 투여군, 6'-SL 투여군 및 대조군으로서, 10주간 고지방 식이를 먹인 후 매조 롤러를 사용하여 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물을 0일과 4일에 국소 투여한 후, 7일에 더모스코피(Dermoscopy)로 관찰한 결과이다.

[323] 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, 매조 롤러에 의하여 6'-SL이 투여된 부분은 투여되지 않은 음성 대조 부분에 비해 국소 지방이 제거됨을 확인할 수 있었다. 3'-S는 국소 지방 제거 효과가 6'-SL에 비해서 상대적으로 약간 떨어짐을 알 수 있었다.

[324] 실시예 11. 노화촉진 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 신체 부위별 유전자 발현 변화와 telomere 기능과 ROS 조절에 의한 노화 관련 만성질환 방지 효과

[325] 노화촉진 모델에서 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 신체 부위별 유전자 발현 변화를 보기 위하여, 생후 4주 수컷 노화촉진 모델 마우스 (SAM P1/Sku

Slc)를 중앙실험동물 (대한민국)로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 시판 중인 펠릿 먹이(Dooyeul biotech, 대한민국)를 일주일 동안 공급하였다. 생후 6주 수컷 노화촉진 모델 마우스 (초기체중 평균 $28.8 \pm 2.3g$)에게 군당 8 마리로 하기 3개의 상이한 식이 처리군으로 무작위로 나누고, 12주 동안 이들 식이를 유지하였다 (전체 24 마리 동물):

- [326] -대조군: SL가 투여되지 않은 정상 식이를 먹은 정상쥐 (8마리)
- [327] -3'-SL 투여군: 정상 식이군에 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 노화 촉진 모델 (8마리)
- [328] -6'-SL 투여군: 정상 식이군에 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 노화 촉진 모델 (8마리)
- [329] 시알릴락토오스 또는 DW를 매일 경구투여 방식으로 투여해 주었다. 마우스를 14 주 동안 동물실에 보관하였고, 12 시간 절식한 다음 희생시켰다. 식이 섭취량 및 체중 변화량은 각각 5일 마다 측정하였다.
3'-시알릴락토오스(3'-N-Acetylneuraminy-D-lactose, 3'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-DGlc) 또는
6'-시알릴락토오스(6'-N-Acetylneuraminy-lactose, 6'-Sialyl-D-lactose 또는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.
- [330]
- [331] SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를, 8가지 주요 장기 (심장, 해마, 뇌, 척수, 폐, 간, 비장, 신장)과 3가지 골격근 (가자미근, 대퇴사두근, 장딴지근) 등에서 정량 비교를 하였다. 트리졸 시약(TRIZol agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 RNA와 역전사 시스템(Promega, 미국)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 및 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, SOD2, 및 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머와 프로브(Applied biosystems; PGC-1 α , Mm00447181_m1, GAPDH, 및 Mm99999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene 3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 16에 나타내었다.
- [332] 도 16a 및 16b는 노화촉진 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 생후 6주 수컷 노화촉진 모델 마우스 (SAM P1/Sku Slc)에게 군당 8 마리로 하여 대조군, 3'-SL 투여군 그리고 6'-SL 투여군을 만들어 12주간 식이 조절 실험하였다. 도 16a 및 16b에서 세로축은 SL (3'-SL & 6'-SL) 투여 전 대비 신체 부위별 상대적인 유전자 발현 변화로서, 각 신체 부위들에서 (3'-SL 투여군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)와 (6'-SL 투여군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)의 수치이다. 그 결과, 도 16a 및 16b에 나타낸 바와 같이, 3'-SL (도 16a)와 6'-SL (도 16b) 모두 대부분의 장기와 골격근에서 여러 분석 대상 (Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, SOD2, 및 GPX1)에 대하여 유의성 있는 발현양 증가를 보여주었고, 다만 3'-SL는 분석 대상의

유전자 발현 촉진 효과가 6'-SL에 비해서 상대적으로 약간 떨어짐을 알 수 있었다.

[333]

[334] 또한, 세포차원의 실험을 위해서, SL이 투여되지 않은 고지방 사료 (Rodent Diet with 60kcal% fat) 식이를 먹은 대조군에서, MASMs (mouse 대동맥 평활근 세포들)들을 분리하였고 (Griendling et al., 1991), SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물을 배양액에 첨가하고 배양하고, 세포내 H₂O₂ 측정 (ROS 수치)을 위해서, 0.1% 송아지 혈청에 잠긴 12-well 배양 플레이트에서 1일 배양하였다. 세포내 ROS 수치들은 H2DCFDA를 이용해서 측정되었다. 어세이를 위하여, 세포들은 HBSS 버퍼속에서 H2DCFDA와 함께 30분간 배양되었다. 세포들을 트립신 처리하고 세척해서 HBSS에 녹였다. 형광값이 CytoFluor 플레이트 리더에 의해 즉시 측정되었다 (도 17a).

[335]

[336] 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산 측정을 위해서, 미토콘드리아의 ROS는 MitoSOX Red (미토콘드리아 초산화물 형광 표지자)를 이용해 측정되었다. MASMs을 추출해서 MitoSOX (4 μ M)와 함께 암실에서 37도에서 20분간 배양하였다. MitoSOX 형광은 형광 플레이트 리더를 이용하여 나온 세포의 형광세기에 의해 정량되었다 (480 nm 흥분 / 580 nm 방출) (도 17b).

[337]

[338] 도 17a와 17b에서, MASMs을 노화촉진 모델 마우스 대조군에서 추출해서, SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물을 배양액에 넣어서 비교하였다. 세포내 H₂O₂ (ROS 수치)를 측정하기 위해서 H2DCFDA와 함께 배양했고 (도 17a), 미토콘드리아의 ROS를 측정하기 위해서 MitoSOX Red (미토콘드리아 초산화물 형광 표지자) (도 17a)를 함께 배양하였다. 세포내 H₂O₂와 미토콘드리아 superoxide 생산은 형광 플레이트 리더로 정량 되었다. 조성물이 ROS 수치를 떨어뜨리고, 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산을 억제함을 알 수 있었다.

[339]

[340] 도 17a와 17b는 세포내 H₂O₂ 측정 (ROS 수치)(도 17a) 및 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산 측정(도 17b)을 나타낸 도면이다. MASMs을 노화촉진 모델 마우스 (SAM P1/Sku Slc)에서 추출해서, SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물을 배양액에 넣어서 비교하였다. 세포내 H₂O₂를 측정하기 위해서 H2DCFDA와 함께 배양했고 (도 17a), 미토콘드리아의 ROS를 측정하기 위해서 MitoSOX Red (미토콘드리아 초산화물 형광 표지자) (도 17a)와 배양하였다. 세포내 H₂O₂와 미토콘드리아 superoxide 생산은 형광 플레이트 리더로 정량 되었다. SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물이 ROS 수치를 떨어뜨리고, 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산을 억제함을 알 수 있었다.

[341]

[342] 도 18a 및 18b에서, 텔로메라아제 활동성의 측정은 TRAP 프로토콜 (Wright et

al., 1995)로 측정된다. 요약하면, 세포 펠렛을 CHAPS 분해 용매 (ribonuclease 억제제 포함)에 녹인 뒤에 4도에서 30분간 배양한다. 세포 추출물 (1mg)을 TRAPeze 반응 믹스 (텔로메라아제 기질 (TS) 프라이머, 형광-라벨의 RP (reverse) 프라이머, 대조 표준 원형, 그리고 sulforhodamine-라벨의 대조 표준 K2 프라이머)와 혼합한다. TS 프라이머는 30도에서 30분간 연장된 후, PCR을 실행한다. 이렇게 나온 TRAP 생성물은 형광 플레이트 리더기로 형광을 측정하여 텔로메라아제 활동성을 정량한다. 상대적인 텔로메라아제 활동성은 sulforhodamine (내부 대조 표준) 대비 순 플루오레세인의 비율에 의해 정규화시켜지고, 퍼센티지로 표현된다. Fluorescein (M0250)은 Marker Gene Technologies, Inc에서 구입하였다. H2-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)는 from Molecular Probes에서 구입하였다. MitoSOXTM Red, MitoTracker Green FM, 그리고 MitoTracker® Orange CMTM Ros (MTO)는 Invitrogen에서 구입하였다. 10,000x SYBR® Gold dye 는 Molecular Probes, Inc.에서 구입하였다. Nuclear/Cytosol fractionation kit (K266-100)는 BioVision에서 구입하였다. TRAPeze® XL telomerase detection kit (S7707)는 MILLIPORE에서 구입하였다. Telomere PNA FISH Kit/Cy3 (K5326)는 Dako에서 구입하였다.

[343]

[344] 도 18a 및 18b는 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 투여에 의한 텔로메라아제 활동성을 측정한 결과를 나타낸다. 이 수치를 통해 TERT와 ARE/ERE (antioxidant/electrophile-responsive element) 신호 경로 활성화를 추론할 수 있었다 (Xiong et al., 2015, Cell Reports 12, 1391-1399). SL (3'-SL & 6'-SL)를 노화 촉진 모델 (도 18a)과 MASM s (도 18b)들에 처리하여 텔로메라아제 활동성을 분석하였다. 도 18a는 대조군, 3'-SL 투여군 그리고 6'-SL 투여군에서 추출된 대동맥 샘플로 텔로메라아제 활동성을 in vivo로 분석한 데이터이다. 도 18b 는 대조군의 평활근 세포들을 분리하여 (Griendling et al., 1991), MASM s들을 SL (3'-SL & 6'-SL)가 처리된 12-well 배양 플레이트에서 1일 배양하여 텔로메라아제 활동성을 in vitro로 분석하였다. 실험 결과 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 투여가 텔로메라아제 활동성 증가를 보여주었다. 이러한 결과는 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물이 PGC-1 α 증가에 의하여 TERT 기능이상 및 DNA 손상 복구귀 (텔로메라아제 활동성 증가-TERT 발현)과 관련될 수 있음을 추론할 수 있는 근거를 주었다.

[345]

[346] 실시예 12. 동맥경화증 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 telomere 기능과 ROS 조절에 의한 노화 관련 만성질환 방지 효과

[347] 최근에 PGC-1 α 유전자가 제거되면, 혈관노화, 아테로마성 동맥경화증, telomere 기능장애와 길이 감소, DNA 손상, TERT (telomerase reverse transcriptase)의 발현 및 활동성 감소, 그리고 p53 증가로 발생한다는 논문이 발표되었다 (Xiong et al., 2015, Cell Reports 12, 1391-1399).

[348]

[349] 일반적으로 ApoE^{-/-} 쥐가, 산화성 스트레스와 염증에 대한 민감성을 증가시키고, 사람들에서 관찰되는 죽상경화증 상처를 빠르게 발달시키기 때문에, 동맥경화증의 대표적인 모델로 사용되므로 (Weiss et al., 2001), ApoE^{-/-} 쥐 (C57BL/6 기반)를 Jackson Laboratory에서 구매하였다. 유전자형은 tail DNA를 이용한 PCR로 확인되었다.

[350]

[351] 동맥경화증 노화 모델에서 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 telomere 기능과 DNA 손상 조절에 의한 노화 관련 만성질환 방지 효과를 보기 위하여, 2가지의 생후 24주 수컷 모델 마우스 (PGC-1 α ^{+/+}ApoE^{-/-})에게 군당 8 마리로 하기 3개의 상이한 식이 처리군으로 무작위로 나누고, 6 주 동안 이들 식이를 유지하였다 (전체 24 마리 동물):

[352] -대조군: 고지방 사료 (Rodent Diet with 60kcal% fat) 식이를 먹은 동맥경화증 모델 (8마리)

[353] -3'-SL 투여군: 고지방 사료 식이군에 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 동맥경화증 모델 (8마리)

[354] -6'-SL 투여군: 고지방 사료 식이군에 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 동맥경화증 모델 (8마리)

[355]

[356]

[357] *세포차원의 실험을 위하여서, SL이 투여되지 않은 고지방 사료 (Rodent Diet with 60kcal% fat) 식이를 먹은 대조군에서, MASMs (mouse 대동맥 평활근 세포들)들을 분리하였고 (Griendling et al., 1991), SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물을 배양액에 처리하여 비교하였다. 세포내 H₂O₂ 측정 (ROS 수치)을 위해서, 0.1% 송아지 혈청에 잠긴 12-well 배양 플레이트에서 1일 배양하였다. 세포내 ROS 수치들은 H2DCFDA를 이용해서 측정되었다. 어세이를 위하여, 세포들은 HBSS 버퍼속에서 H2DCFDA 와 함께 30분간 배양되었다. 세포들을 트립신 처리하고 세척해서 HBSS에 녹였다. 형광값이 CytoFluor 플레이트 리더에 의해 즉시 측정되었다 (도 19a).

[358] 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산 측정을 위해서, 미토콘드리아의 ROS 는 MitoSOX Red (미토콘드리아 초산화물 형광 표지자)를 이용해 측정되었다. MASMs을 추출해서 MitoSOX (4 μ M)와 함께 암실에서 37도에서 20분간 배양하였다. MitoSOX 형광은 형광 플레이트 리더를 이용하여 나온 세포의 형광세기에 의해 정량되었다 (480 nm 흥분 / 580 nm 방출) (도 19b).

[359] 도 19a와 19b에서, MASMs을 모델 마우스 (PGC-1 α ^{+/+}ApoE^{-/-}) 대조군에서 추출해서, SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물을 배양액에 넣어서 비교하였다. 세포내 H₂O₂ (ROS 수치)를 측정하기 위해서 H2DCFDA와 함께 배양했고 (도 19a), 미토콘드리아의 ROS를 측정하기 위해서 MitoSOX Red (미토콘드리아 초산화물

형광 표지자) (도 19a)를 함께 배양하였다. 세포내 H_2O_2 와 미토콘드리아 superoxide 생산은 형광 플레이트 리더로 정량되었다. 조성물이 ROS 수치를 떨어뜨리고, 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산을 억제함을 알 수 있었다.

[360]

[361] 도 19a 및 19b는 세포내 H_2O_2 측정 (ROS 수치)(도 19a) 및 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산 측정(도 19b)의 결과를 나타낸 도면이다. MASMs을 모델 마우스 (PGC-1 $\alpha^{+/+}$ ApoE $^{-/-}$)에서 추출해서, SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물을 배양액에 넣어서 비교하였다. 세포내 H_2O_2 를 측정하기 위해서 H2DCFDA와 함께 배양했고 (도 19a), 미토콘드리아의 ROS를 측정하기 위해서 MitoSOX Red (미토콘드리아 초산화물 형광 표지자) (도 19a)와 배양하였다. 세포내 H_2O_2 와 미토콘드리아 superoxide 생산은 형광 플레이트 리더로 정량되었다. SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물이 ROS 수치를 떨어뜨리고, 미토콘드리아의 초산화물 (Superoxide) 생산을 억제함을 알 수 있었다.

[362]

[363] 도 20에서, 텔로메라아제 활동성의 측정은 TRAP 프로토콜 (Wright et al., 1995)로 측정된다. 요약하면, 세포 펠렛을 CHAPS 분해 용매 (ribonuclease 억제제 포함)에 녹인 뒤에 4도에서 30분간 배양한다. 세포 추출물 (1mg)을 TRAPeze 반응 믹스 (텔로메라아제 기질 (TS) 프라이머, 형광-라벨의 RP (reverse) 프라이머, 대조 표준 원형, 그리고 sulforhodamine-라벨의 대조 표준 K2 프라이머)와 혼합한다. TS 프라이머는 30도에서 30분간 연장된후, PCR을 실행한다. 이렇게 나온 TRAP 생성물은 형광 플레이트 리더기로 형광을 측정하여 텔로메라아제 활동성을 정량한다. 상대적인 텔로메라아제 활동성은 sulforhodamine (내부 대조 표준) 대비 순 플루오레세인의 비율에 의해 정규화시켜지고, 퍼센티지로 표현된다. Fluorescein (M0250) 은 Marker Gene Technologies, Inc에서 구입하였다. H2-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)는 from Molecular Probes.에서 구입하였다. MitoSOXTM Red, MitoTracker Green FM, 그리고 MitoTracker® Orange CMTMRos (MTO)는 Invitrogen에서 구입하였다. 10,000x SYBR® Gold dye 는 Molecular Probes, Inc.에서 구입하였다. Nuclear/Cytosol fractionation kit (K266-100)는 BioVision에서 구입하였다. TRAPeze® XL telomerase detection kit (S7707)는 MILLIPORE에서 구입하였다. Telomere PNA FISH Kit/Cy3 (K5326)는 Dako에서 구입하였다.

[364]

[365] 도 20a 및 20b에서, SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 투여에 의한 텔로메라아제 활동성을 측정하였다. 이 수치를 통해 TERT와 ARE/ERE (antioxidant/electrophile-responsive element) 신호 경로 활성화를 추론할 수 있었다 (Xiong et al., 2015, Cell Reports 12, 1391-1399).

[366] 도 20a 및 20b은 SL (3'-SL & 6'-SL)를 동맥경화증 모델 (ApoE $^{-/-}$; 도20a)과

MASMs (도 20b)들에 처리하여 텔로메라아제 활성성을 분석한 결과를 나타낸 도면이다. 도 20a에서 대조군, 3'-SL 투여군 그리고 6'-SL 투여군에서 추출된 대동맥 샘플로 텔로메라아제 활성성을 *in vivo*로 분석하였다. 도 20b에서 대조군의 평활근 세포들을 분리하여 (Griendling et al., 1991), MASMs들을 SL (3'-SL & 6'-SL)가 처리된 12-well 배양 플레이트에서 1일 배양하여 텔로메라아제 활성성을 *in vitro*로 분석하였다. 실험 결과 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 투여가 텔로메라아제 활성성 증가를 보여주었다. 이러한 결과는 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물이 PGC-1 α 증가에 의하여 TERT 기능이상 및 DNA 손상 복귀 (텔로메라아제 활성성 증가- TERT 발현)과 관련될 수 있음을 추론할 수 있는 근거를 주었다.

[367]

[368] 실시예 13. 피부실험에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 신체 부위별 유전자 발현 변화

[369] 피부실험 모델에서 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 신체 부위별 유전자 발현 변화를 보기 위하여, 생후 6주 수컷 피부실험 모델 (HRM2) 마우스 (멜라닌 포함한 Hairless의 외관)에게 군당 8 마리로 하기 3개의 상이한 식이 처리군으로 무작위로 나누고 (전체 24 마리 동물) 10주 동안 이들 식이 (AIN-76A 미국 Dyets社)를 유지하며 휴대용 색차계 (CR-10 일본 Minolta社)등을 이용하여 자외선조사 (검버섯, 주름 실험), 피부감수성 실험, 피부자극성 실험, 피하흡수 실험 등을 하였다:

[370]

[371] - 대조군: 정상 식이를 먹은 군 (8마리)

[372] - 3'-SL 투여군: 정상 식이군에 3'-시알릴락토오스(3'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 모델 (8마리)

[373] - 6'-SL 투여군: 정상 식이군에 6'-시알릴락토오스(6'-SL, Sigma) 처리된 (쥐 무게 kg 당 1일 당 0.1mg 경구 투여) 모델 (8마리)

[374]

[375] SL (3'-SL & 6'-SL) 투여군이 대조군에 비하여 자외선조사 (검버섯, 주름 실험), 피부감수성 실험, 피부자극성 실험, 피하흡수 실험 등에서 피부가 훨씬 개선되어있음을 알 수 있었다. 또한 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를, 8가지 주요 장기 (심장, 해마, 뇌, 척수, 폐, 간, 비장, 신장)과 3가지 골격근 (가자미근, 대퇴사두근, 장딴지근) 등에서 정량 비교를 하였다. 트리졸 시약(TRIZol agent, Invitrogen)으로 RNA를 추출하였다. 상기에서 추출하여 정량한 RNA와 역전사 시스템(Promega, 미국)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 및 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, SOD2, 및 GPX1)에 대해 미리 디자인된 프라이머와 프로브(Applied biosystems; PGC-1 α , Mm00447181_m1, GAPDH, 및 Mm99999915_q1)를 이용하여 PGC-1 α 들의 발현 양상을 측정하였다. PCR 반응과 분석은 로터-유전자 3000 시스템(Rotor-Gene

3000 system)(Corbett Research, 시드니, 호주)을 이용하였고 그 결과를 도 21a 및 21b에 나타내었다.

[376]

[377] 도 21a 및 21b에서, SL (3'-SL & 6'-SL) 투여 전 대비 신체 부위별 상대적인 유전자 발현 변화는 각 신체 부위들에서 (3'-SL 투여군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)와 (6'-SL 투여군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)을 수치로 나타낸 것이다. 여러 신체 부위들에서 6'-SL 투여군은 음성 대조군에 비해 PGC-1 α 를 포함한 여러 분석 대상(Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, SOD2, 및 GPX1)의 발현 정도가 매우 우수하였다. 즉, 6'-SL이 정상 쥐의 여러 장기와 근육에서 PGC-1 α 와 관련된 유전자들의 발현을 촉진시키는 것을 확인할 수 있었다. 3'-SL는 분석 대상의 유전자 발현 촉진 효과가 6'-SL에 비해서 상대적으로 약간 떨어짐을 알 수 있었다

[378]

[379] 도 21a 및 21b는 피부실험 모델에서의 SL (3'-SL & 6'-SL) 조성물 처리에 의한 유전자 발현 변화를 나타낸 도면이다. 생후 6주 수컷 피부실험 모델 (HRM2) 마우스 에게 군당 8 마리로 하여 대조군과 SL (3'-SL & 6'-SL) 투여군을 만들어 10주간 식이 조절 실험하였다. SL (3'-SL & 6'-SL) 투여 전 대비 상대적인 유전자 발현 변화는 각 신체 부위들에서 'SL 투여군 유전자 발현양'과 '대조군 유전자 발현양'을 정량해서 그 값의 상대적인 비 (3'-SL 투여군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)와 (6'-SL 투여군 유전자 발현양)/(대조군 유전자 발현양)를 수치로 나타낸 것이다. 대부분의 장기와 골격근에서 여러 분석 대상 (Fndc5, PGC-1 α , Erra, UCP1, SOD2, 및 GPX1)에 대하여 유의성 있는 발현양 증가를 보여주었다. 3'-SL (도 21a)는 분석 대상의 유전자 발현 촉진 효과가 6'-SL (도 21b)에 비해서 상대적으로 약간 떨어짐을 알 수 있었다.

[380]

[381] 실시예 14. 시알릴락토오스 (3'-SL & 6'-SL) 조성물이 분화된 지방세포(adipocyte)에 미치는 영향

[382] (1) 3T3-L1 세포배양 및 분화

[383] 3T3-L1 지방세포를 한국세포주은행으로부터 구입하여 사용하였다. 3T3-L1 지방세포의 배양과 유지는 10% bovine calf serum(FCS, 웰진, 한국)을 넣은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, 웰진, 한국) 배지로 5% CO₂, 37°C에서 계대배양 하였다. 3T3-L1 지방세포를 다음과 같이 여섯 개의 군으로 분류하였다: NT; 정상 분화 세포군(대조군), 시알릴락토오스 실험군; 시알릴락토오스(SL, Sigma-Aldrich, 미국)가 처리된 실험군으로서 1, 10, 100, 1000, 및 10000 μ M 실험군. 세포분화는 6-well plate에 웰 당 2x10⁵cells 을 분주하여 세포가 100% 밀집되게 배양하였다. 2일 후 10% fetal bovine serum(FBS, 웰진, 한국)와 MDI solution(0.5 mM isobutylmethylxanthine(IBMx, Sigma-Aldrich, 미국), 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich, 미국), 1 μ g/mL insulin(Sigma-Aldrich,

미국))을 포함한 DMEM 배지를 실험군에 2일동안 처리하였고 다시 10% FBS와 1 $\mu\text{g/mL}$ insulin,을 포함한 DMEM으로 2일동안 처리하였다. 그 후 10% FBS와 가 첨부된 DMEM 배지로 2일마다 배지를 교체하며 지방세포로 분화시켰다. 분화가 끝난 시점에 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에 3'-시알릴락토오스 또는 6'-시알릴락토오스를 0, 0.01, 0.1, 1, 및 10mM 농도로 10일간 처리하였다

[384] **(2) Oil-Red O 염색**

[385] 6-well pleat에서 분화된 후, 3'-시알릴락토오스 또는 6'-시알릴락토오스가 처리되던 3T3-L1 지방세포를 PBS로 2회 세척 후 2ml의 10% formalin(Sigma-Aldrich, 미국)을 넣고 10분간 상온에서 고정시킨다. 고정된 세포를 건조시킨 후 1ml Oil Red O 염색시약(Sigma-Aldrich, 미국)을 세포에 20분간 처리한 후 증류수로 Oil Red O 염색시약을 4번에 걸쳐 충분히 세척한 후 1ml의 100% isopropanol(Sigma-Aldrich, 미국)을 넣어 염색된 지방구를 유출시킨 후 500nm에서의 흡광도를 이용하여 축적된 지방의 양을 측정하였다.

[386] **(3) Free glycerol의 측정**

[387] 6-well pleat에서 분화된 3T3-L1 지방세포에 6'-시알릴락토오스를 0, 0.01, 0.1, 1, 및 10mM 농도로 처리하여 10일동안 배양 한 배지를 eppendorf tube에 샘플링 한 후 glycerol cell-based assay kit(cayman, 10011725, 미국)을 사용하여 free glycerol을 분석하였다. 25ul 배지에 free glycerol reagent 100uL을 첨가하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[388] **(4) 세포 생존률(cell viability) 측정**

[389] 분화된 후 6'-시알릴락토오스가 처리된 3T3-L1 지방세포를 cell counting kit-8(Dojindo Molecular Technologies, Inc. 미국)를 이용하여 세포 생존률을 측정하였다. 약물 처리 후 CCK-8 reagent 10uL을 첨가하여 2시간 동안 배양한 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다

[390] 도 22와 도 23에서 확인할 수 있듯이, 분화된 지방세포에서 시알릴락토오스를 첨가에 의해 세포내 지방이 감소하였고, 특히 6'-시알릴락토오스를 첨가한 실험군에서 세포내 지방이 크게 감소하였다.

[391]

[392] 도 22a 및 도 22b는 분화된 지방세포에서 6'-시알릴락토오스 (도 22a)와 3'-시알릴락토오스 (도 22b)가 투여된 경우 세포내 지방의 변화를 나타낸 도면이다. NT는 대조군이며, 0.01, 0.1, 1, 및 10mM은 6'-시알릴락토오스 (도 22a)와 3'-시알릴락토오스 (도 22b)를 각각 0.01, 0.1, 1, 10mM 실험군을 나타낸다.

[393] 도 23a 및 도 23b는 분화된 지방세포에서 6'-시알릴락토오스 (도 23a)와 3'-시알릴락토오스 (도 23b)가 투여된 경우 세포내 지방의 변화를 나타내는 세포의 광학 현미경 사진(Oil red O 실험)이다. 도면에서, NT는 대조군이며, 0.01, 0.1, 1, 및 10mM은 6'-시알릴락토오스 (도 23a)와 3'-시알릴락토오스 (도 23b)를 0.01, 0.1, 1, 및 10mM 실험군을 나타낸다.

[394]

- [395] 한편, 도 24에서 확인할 수 있듯이, 시알릴락토오스는 분화된 지방세포에 10mM까지 세포 생존률(cell viability)에 영향을 주지 않았다.
- [396]
- [397] 도 24는 분화된 지방세포에서 세포의 생존률에 미치는 6'-시알릴락토오스의 영향을 나타낸 도면이다. NT는 대조군이며, 0.01, 0.1, 1, 10, 및 100mM은 6'-시알릴락토오스를 각각 0.01, 0.1, 1, 10, 및 100mM 실험군을 나타낸다.
- [398]
- [399] 또한 도 25에서 확인할 수 있듯이 시알릴락토오스는 지방세포의 glycerol 분비를 농도의존적으로 증가시켜 세포내 지방을 감소시켰다
- [400] 시알릴락토오스는 분화된 지방세포(adipocyte)에서 세포 생존률에 영향없이 glycerol 분비를 촉진하여 세포내 지방을 감소시켰으며, 특히 6'-시알릴락토오스가 크게 세포내 지방을 감소시켰다.
- [401] 도 25는 분화된 지방세포에서 시알릴락토오스에 의한 glycerol 분비의 변화를 나타낸 도면이다. 도면에서, NT는 대조군이며, 0.01, 0.1, 1, 및 10mM은 3'-시알릴락토오스를 각각 0.01, 0.1, 1, 및 10mM 실험군을 나타낸다.
- [402]
- [403] 실시예 15. 시알릴락토오스 (3'-SL & 6'-SL) 조성물 피하주사에 의한 고지방식이 마우스의 피하지방 변화
- [404] (1) 고지방 식이 마우스
- [405] 4 주령 C56BL/6 마우스를 Dooyeul biotech (대한민국)로부터 구입하였다. 물은 자유로이 공급하여 주었고, 시판 중인 펠릿 먹이(Dooyeul biotech, 대한민국)를 일주일 동안 공급하였다. 28일간 Research Diets 사(New Brunswick, U.S.A)로부터 구입한 고지방(60% 지방) 식이를 공급하여 지방이 축적된 생쥐를 구축하였다.
- [406] (2) 시알릴락토오스 피하주사
- [407] 인산완충용액에 녹인 100mM 3'-시알릴락토오스 또는 6'-시알릴락토오스 0.5ml을 고지방 식이로 지방축적을 유도한 마우스의 등 4~5곳에 2회(0, 4일) 피하주사하여 4일, 및 7일에 피부를 육안과 dermoscopy로 관찰하였다. 대조군(CTL)으로 인산완충용액을 사용하였다.
- [408] 도 26a 및 26b에서 확인할 수 있듯이 시알릴락토오스 피하주사는 고지방식이 마우스의 피하 지방을 감소시켜 피부 표면의 주름을 유도하였다. 특히 6'-시알릴락토오스가 크게 피하 지방을 감소시켰다.
- [409]
- [410] 도 26a 및 26b는 시알릴락토오스 피하주사에 의한 고지방식이 마우스의 피부변화를 나타낸 도면이다. 피부변화를 육안 및 dermoscopy (도 26a 및 26b)로 확인한 사진이다. CTL은 대조군이며 3'-시알릴락토오스(3'-SL), 6'-시알릴락토오스(6'-SL)은 실험군을 나타낸다.
- [411]
- [412] 참고문헌

- [413] 1. Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 14, 1237-1243.
- [414] 2. Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R., 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol. Cell* 37, 299-310.
- [415] 3. Youle, R.J., Strasser, A., 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 47-59.
- [416] 4. Fadeel, B., Orrenius, S., 2005. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* 258, 479-517.
- [417] 5. Aleck W.E. Jones, Zhi Yao, Jose Miguel Vicencio, Agnieszka Karkucinska-Wieckowska, Gyorgy Szabadkai, 2012. PGC-1 family coactivators and cell fate: Roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signaling. *Mitochondrion.* 12, 86-99.
- [418] 6. Lin, J. et al. Spiegelman, B.M., 2004. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 119, 121-135.
- [419] 7. Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., Chen, Z., Holloszy, J.O., Medeiros, D.M., Schmidt, R.E., Saffitz, J.E., Abel, E.D., Semenkovich, C.F., Kelly, D.P., 2005. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* 3, e101.
- [420] 8. Chaturvedi RK & Flint Beal M (2013) Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic Biol Med* 63, 1-29.
- [421] 9. Katsouri L, Parr C, Bogdanovic N, Willem M & Sastre M (2011) PPARgamma co-activator-1alpha (PGC-1alpha) reduces amyloid-beta generation through a PPARgamma-dependent mechanism. *J Alzheimers Dis* 25, 151-162.
- [422] 10. Qin W, Haroutunian V, Katsel P, Cardozo CP, Ho L, Buxbaum JD & Pasinetti GM (2009) PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol* 66, 352-361.
- [423] 11. Wang R, Li JJ, Diao S, Kwak YD, Liu L, Zhi L, Bueler H, Bhat NR, Williams RW, Park EA et al. (2013) Metabolic stress modulates Alzheimer's beta secretase gene transcription via SIRT1-PPARgamma-PGC-1 in neurons. *Cell Metab* 17, 685-694.
- [424] 12. Clark, J., Reddy, S., Zheng, K., Betensky, R., Simon, D., 2011. Association of PGC-1alpha polymorphisms with age of onset and risk of Parkinson's disease. *BMC Med. Genet.* 12, 69.
- [425] 13. Weydt, P., Soyal, S., Gellera, C., DiDonato, S., Weidinger, C., Oberkofler, H., Landwehrmeyer, G.B., Patsch, W., 2009. The gene coding for PGC-1alpha modifies age at onset in Huntington's Disease. *Mol. Neurodegener.* 4, 3.

- [426] 14. Cui, L., Jeong, H., Borovecki, F., Parkhurst, C.N., Tanese, N., Krainc, D., 2006. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell* 127, 59-69.
- [427] 15. Qin W, Haroutunian V, Katsel P, Cardozo CP, Ho L, Buxbaum JD & Pasinetti GM (2009) PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Arch Neurol* 66, 352-361.
- [428] 16. Ranganathan, S., Harmison, G.G., Meyertholen, K., Pennuto, M., Burnett, B.G., Fischbeck, K.H., 2009. Mitochondrial abnormalities in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 27-42.
- [429] 17. Weydt, P., Pineda, V.V., Torrence, A.E., Libby, R.T., Satterfield, T.F., Lazarowski, E.R., Gilbert, M.L., Morton, G.J., Bammler, T.K., Strand, A.D., Cui, L., Beyer, R.P., Easley, C.N., Smith, A.C., Krainc, D., Luquet, S., Sweet, I.R., Schwartz, M.W., La Spada, A.R., 2006. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1alpha in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab.* 4, 349-362.
- [430] 18. Xiang, Z., Valenza, M., Cui, L., Leoni, V., Jeong, H.-K., Brilli, E., Zhang, J., Peng, Q., Duan, W., Reeves, S.A., Cattaneo, E., Krainc, D., 2011. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α contributes to dysmyelination in experimental models of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 31, 9544-9553.
- [431] 19. Zheng, B., Liao, Z., Locascio, J. J., Lesniak, K. A., Roderick, S. S., Watt, M. L., Eklund, A. C., Zhang-James, Y., Kim, P. D., Hauser, M. A. et al. (2010). PGC-1a, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 2, 52ra73.
- [432] 20. Chaturvedi, R.K., Adihetty, P., Shukla, S., Hennessy, T., Calingasan, N., Yang, L., Starkov, A., Kiaei, M., Cannella, M., Sassone, J., Ciammola, A., Squitieri, F., Beal, M.F., 2009. Impaired PGC-1alpha function in muscle in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3048-3065.
- [433] 21. Zhao, W., Varghese, M., Yemul, S., Pan, Y., Cheng, A., Marano, P., Hassan, S., Vempati, P., Chen, F., Qian, X., Pasinetti, G., 2011. Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) improves motor performance and survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.* 6, 51.
- [434] 22. Chaturvedi RK & Flint Beal M (2013) Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic Biol Med* 63, 1-29.
- [435] 23. St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P.T., Yang, R., Newgard, C.B., Spiegelman, B.M., 2003. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J. Biol.Chem.* 278, 26597-26603.

- [436] 24. Cowell, R.M., Talati, P., Blake, K.R., Meador-Woodruff, J.H., Russell, J.W., 2009. Identification of novel targets for PGC-1 α and histone deacetylase inhibitors in neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 578-582.
- [437] 25. St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jager, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R., Spiegelman, B.M., 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127, 397-408.
- [438] 26. Valle, I., Alvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S., Monsalve, M., 2005. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 66, 562-573.
- [439] 27. Xiong, S., Patrushev N., Forouuzandeh, F., Hilenski, L., Alexander, R.W., 2015. PGC-1 α modulates telomere function and DNA damage inprotecting against age-related chronic diseases. *Cell Report* 12, 1391-1399.
- [440] 28. Borniquel, S., Valle, I., Cadenas, S., Lamas, S., Monsalve, M., 2006. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α . *The FASEB journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20, pp. 1889-1891.
- [441] 29. Lai, L., Leone, T.C., Zechner, C., Schaeffer, P.J., Kelly, S.M., Flanagan, D.P., Medeiros, D.M., Kovacs, A., Kelly, D.P., 2008. Transcriptional coactivators PGC-1 α and PGC-1 β control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev.* 22, 1948-1961.
- [442] 30. Garnier, A., Fortin, D., Delomenie, C., Momken, I., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., 2003. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol.* 551, 491-501.
- [443] 31. Ljubicic V, Joseph A, Saleem A, et al: Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800:223-234.
- [444] 32. Gouspillou G, Picard M, Godin R, Burelle Y, Hepple R: Role of peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) in denervation-induced atrophy in aged muscle: facts and hypotheses. *Longev Healthspan* 2013;2:13.
- [445] 33. Johnson ML, Robinson MM, Nair KS: Skeletal muscle aging and the mitochondrion. *Trends Endocrin Met* 2013;24:247-256.
- [446] 34. Marzetti E, Calvani R, Cesari M, et al: Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45:2288-2301.
- [447] 35. Calvani R, Joseph A, Adihetty PJ, et al: Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem* 2013; 394:393-414.

- [448] 36. Wallace DC: A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005;39:359.
- [449] 37. Finck BN, Kelly DP: PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 2006;116: 615-622
- [450] 38. Tina Wenz, Susana G. Rossi, Richard L. Rotundo, Bruce M. Spiegelman, and Carlos T. Moraes. 2009, Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging, *PNAS* 106, 20405-20410.
- [451] 39. Rolfe, D. F. and Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77, 731-758.
- [452] 40. Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R. and Brand, M. D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 47, 53-67.
- [453] 41. Fukui Y, Masui S, Osada S, Umesono K, Motojima K. 2000. A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR- γ activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAy obese mice. *Diabetes* 49: 759-767
- [454] 42. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar J, Czech MP, Corvera S. 2004. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 114: 1281-1289.
- [455] 43. Quinlan, C. L., Treberg, J. R. and Brand, M. D. (2011). Mechanisms of mitochondrial free radical production and their relationship to the aging process. In *Handbook of the Biology of Aging (Seventh Edition)* (ed. J. M. Edward and N. A. Steven), pp. 47-61. San Diego, CA: Academic Press.
- [456] 44. Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Mu"ller, F. L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A. J., Walkey, C. et al. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359-365.
- [457] 45. Kujoth, G. C., Hiona, A., Pugh, T. D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S. E., Hofer, T., Seo, A. Y., Sullivan, R., Jobling, W. A. et al. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481-484.
- [458] 46. Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly-Y, M., Gidlo"ff, S., Oldfors, A., Wibom, R. et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-423.
- [459] 47. Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E. N. et al. (2002b). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797-801.
- [460] 48. Dillon, L. M., Williams, S. L., Hida, A., Peacock, J. D., Prolla, T. A., Lincoln, J. and Moraes, C. T. (2012). Increased mitochondrial biogenesis in muscle improves

- aging phenotypes in the mtDNA mutator mouse. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2288-2297.
- [461] 49. Wenz, T., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., Spiegelman, B. M. and Moraes, C. T. (2009). Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20405-20410.
- [462]

청구범위

- [청구항 1] 유효성분으로서 다음 일반식 I로 표시되는 화합물, 그의 염, 수화물 또는 용매화물을 포함하는, 퍼옥시좀 증식촉진자-활성화된 수용체 조활성인자 1-알파(peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1- α : PGC-1 α)의 발현 감소와 연관된 질병 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물:
일반식 I: S-(MS)p-(MS)q,
상기 일반식에서, S는 시알산이고, (MS)p 및 (MS)q는 서로 독립적으로 단당류 잔기이다.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, PGC-1 α 의 발현 감소와 연관된 질병 또는 증상은 퇴행성 신경질환, 대사성 질환, 국소지방제거 및 지질 대사 관련 질환, 노화 및 노화에 기인한 질병, 근육감소(Sarcopenia, cachexia) 및 근육감소에 기인한 질병으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 화합물은 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc인 것인 조성물.
- [청구항 4] 제 2 항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머질병(Alzheimer's disease (AD)), 근위축성 측색 경화증, 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis (ALS)), 듀켄근이영양증(Duchenne muscular dystrophy), 파킨슨질병(Parkinson's disease (PD)), 헌팅턴질병(Huntington's disease (HD)), 픽병(Pick's disease), 커프병(Kuf's disease), 모르-트라네브야르그 증후군(Mohr-Tranebjaerg syndrome), 윌슨병, 산발성 알츠하이머병, 산발성 근위축성 측색 경화증, 산발성 파킨슨병, 자율기능 변화, 수면 장애, 신경정신병학적 장애, 우울, 정신분열증, 분열정동 장애, 코르사코프 정신증, 조증, 불안 장애, 공포 장애, 학습 또는 기억 장애, 기억상실증 또는 연령 관련 기억 손실, 주의력 결핍 장애, 기분저하 장애, 주요 우울 장애, 강박인격 장애, 정신활성 물질 사용으로 인한 장애, 공황 장애, 양극성 정동장애, 편두통, 과잉행동 장애 및 운동 장애에 의해 형성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 급성, 아급성 또는 만성 신경변성 질환을 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서, 상기 급성 신경변성 질환은 뇌졸중, 뇌경색, 뇌출혈, 두부손상 또는 척수손상을 포함하며, 상기 아급성 신경변성 질환은 탈수초성 질환, 신경계 부종양증후군, 아급성 연합 변성(subacute combined degeneration), 아급성 괴사성 뇌염(subacute necrotizing encephalitis), 또는 아급성 경화성 범뇌염(subacute sclerosing encephalitis)을 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 7] 제 5 항에 있어서, 상기 만성 신경변성 질환은 노인성 치매, 혈관 치매,

미만성(diffuse) 백질 질환(빈스완거 질환), 내분비 또는 대사 기원 치매, 두부외상 및 미만성 뇌손상으로 인한 치매, 권투선수치매 및 전두엽 치매를 포함하는 기억 상실증, 알츠하이머 질환, 픽 질환, 미만성 루이소체 질환, 진행성 핵상 마비(스틸-리차드슨 증후군), 다계통위축증(multiple system degeneration), 신경변성과 관련된 만성 간질 상태, 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 조화운동불능, 피질 기저 변성, ALS-파킨슨-치매 복합증 (ALS Parkinson's- Dementia complex of Guam), 아급성 경화 범뇌염, 헌팅톤 질환, 파킨슨 질환, 시뉴클레이노패씨 (synucleinopathies), 일차 진행성 실어증 (primary progressive aphasia), 선조핵질 변성, 마카도-조셉 질환/척수소뇌성 실조증, 올리브교 변성을 포함하는 운동 신경세포 질환, 질 드 라 뚜렛 질환, 연수 및 거짓연수 마비, 척수 및 척수연수 근육 위축 (케네디 질환), 다발경화증, 원발 측삭 경화증, 유전성 연속성 대마비, 베르드니히-호프만 질환, 쿠겔베르그-웰란더 질환, 테이-삭스 질환, 샌드호프 질환, 유전성 강직성 질환, 올파르트-쿠겔베르그-웰란더 (Wohlfart-Kugelberg-Welander) 질환, 강직성 하반신마비, 진행성다초점백질뇌증, 유전성 자율신경 실조증 (릴리-데이 증후군), 크로이츠펠트-야콥, 게르스트만-스트라우슬러-샤인커 질환, 쿠루병 및 치명적 유전성 불면증을 포함하는 프리온 질환, 또는 뇌성마비를 포함하는 것인 조성물.

[청구항 8] 제 2 항에 있어서, 상기 대사성 질환, 지질 대사 관련 질환, 노화 및 노화에 기인한 질병, 근육감소(Sarcopenia, cachexia) 및 근육감소에 기인한 질병에는, 글루코스신생에 대한 변화, 연조직염, 여성유방증, 가성여성유방증, 지방이영양증, 노화, 광노화, 피부 외상, 상해의 재상피화, 피부의 탈수, 건조증, 각질화 장애, 굳은살(callous), 딱딱한 피부, 편평태선, 루푸스와 관련된 피부 병변, 지루성 피부염, 노인성피부염, 비듬, 유아 지방관(cradle cap), 지루, 여드름의 과다지루, 일광성 피부염, 지루성 각화증, 노인성 각화증, 광선 각화증, 광유도 각화증, 모낭 각화증, 보통 여드름, 모반, 섬유아세포의 기능 변화, 결절근막염, 경피증, 듀피트렌 구축(Dupuytren's contracture), 피지선의 장애, 여드름 장미증, 다형성 여드름, 면포, 다형증, 장미증, 결정낭성 여드름, 응괴성 여드름, 노인성 여드름, 어린선, 다리어병(Darier's disease), 수장족저 각피증, 백판증, 점막 태선, 피부 태선, 습진, 심상성 사마귀, 편평 사마귀, 사마귀양 표피이형성증, 구강 유두종증, 홍반성 루푸스, 수포성 질환, 수포성 유천포창, 경피증, 광선 각화증, 색소침착 장애, 백반증, 원형 탈모증, 루이 소체 질환(Lewy Body disease), 신경섬유 농축체, 로젠탈 섬유(Rosenthal fiber), 말로리 초자체(Mallory's hyaline), 중증근육무력증, 질 드 라 뚜렛 증후군, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 진행성 핵상 마비, 간질, 크로이츠펠트-야콥병,

난청-근육긴장이상 증후군, 라이병(Leigh's disease), 레버 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy), 근육긴장이상, 운동 신경원 질환, 신경병증 증후군, 운동실조증 및 망막색소변성증, 모계 유전 라이병, 프리드리히 운동실조증, 유전성 강직성 대마비에 의해 형성된 군으로부터 선택되는 조성물.

[청구항 9] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 용액, 현탁액, 시럽제, 에멀전, 리포솜, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형 제제 및 캡슐제로 구성된 군으로부터 선택된 제형인 것인 조성물.

[청구항 10] 제 9 항에 있어서, 상기 조성물은 경구 투여용 조성물이고 리포솜을 포함한 약물 전달체 또는 서방형제제의 제형인 것인 조성물.

[청구항 11] 제 9 항에 있어서, 상기 조성물은 비경구 투여용 조성물이고 리포솜 및 초음파 조영제(ultrasound contrast agent)를 포함한 약물 전달체 또는 서방형제제의 제형인 것인 조성물.

[청구항 12] 제 1 항에 있어서, 약제학적 조성물, 기능성 화장품학적 조성물, 기능성 식품(nutraceutical) 조성물 또는 식품 조성물인 것인 조성물.

[청구항 13] 제 1 항에 있어서, 상기 염은 약학적으로 허용가능한, 화장품학적으로 허용가능한, 또는 식품학적으로 허용가능한 염인 것인 조성물.

[청구항 14] 제 12 항에 있어서, 상기 조성물은 리포솜, 혼합 리포솜, 올레오솜, 니오솜, 에토솜, 밀리캡슐, 마이크로캡슐, 나노캡슐, 나노구조화된 지질 담체, 스폰지, 사이클로덱스트린, 소포 (vesicle), 미셀 (micelle), 계면활성제의 혼합 미셀, 계면활성제-인지질 혼합 미셀, 밀리스피어, 마이크로스피어, 나노스피어, 리포스피어, 마이크로에멀전, 나노에멀전, 미니입자, 밀리입자, 마이크로입자, 나노입자 및 고체 지질 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택되는 식품학적, 화장품학적 또는 약제학적 전달 시스템 또는 지속 방출 시스템 내로 혼입되어 있는 것인 조성물.

[청구항 15] 제 14 항에 있어서, 상기 나노캡슐은 마이크로에멀전을 함유하는 것인 조성물.

[청구항 16] 제 14 항에 있어서, 국소, 경구 또는 비경구 적용에 의해 사용하기 위한 것인 조성물.

[청구항 17] 제 16 항에 있어서, 국소 적용은 이온영동법, 초음파영동법, 전기천공법, 기계적 압력, 삼투압 구배, 폐색 관리(occlusive cure), 미세주사법, 압력에 의한 무바늘 주사, 미세전기 패치 이용, 안면 마스크 이용 또는 이들의 임의의 조합에 의해 수행되는 것인 조성물.

[청구항 18] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 PGC-1 α 의 발현을 증가시키는 것인 조성물.

[청구항 19] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 피부의 치료 및/또는 관리에 사용하기 위한 것인 조성물.

[청구항 20] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 지방 조직의 부피를 감소시키는 데

- 사용하기 위한 것인 조성물.
- [청구항 21] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 지방 조직의 트리글리세라이드 함량을 감소시키는데 사용하기 위한 것인 조성물.
- [청구항 22] 제 20 항 또는 제 21 항에 있어서, 상기 지방 조직은 피하 지방 조직인, 조성물.
- [청구항 23] 제 22 항에 있어서, 상기 피하 지방 조직은 대퇴부, 가슴, 목의 아랫부분, 목선(neckline), 둔부, 얼굴, 입술, 뺨, 눈꺼풀 및/또는 손의 피하 지방 조직인, 조성물.
- [청구항 24] 제 20 항 또는 제 21 항에 있어서, 상기 지방 조직은 지방색전증(fat embolism)에 의해 형성된 지방조직을 포함한 신체 내에 발생할 수 있는 모든 지방조직인, 조성물.
- [청구항 25] 제 19 항에 있어서, 상기 치료 및/또는 관리는 노화 및/또는 광노화의 징후를 감소, 지연 및/또는 예방하는 것인 조성물.
- [청구항 26] 제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 피부의 온도를 증가시키는데 사용하기 위한 것인 조성물.
- [청구항 27] 고체상(solid phase) 또는 용액 중에서 반응시키는 단계를 포함하는, 다음 일반식 I로 나타낸 화합물, 이의 식품학적으로, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 혼합물의 제조 방법.
일반식 I: $S-(MS)_p-(MS)_q$,
상기 일반식에서, S는 시알산이고, (MS)_p 및 (MS)_q는 서로 독립적으로 단당류 잔기이다.
- [청구항 28] 제 12 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나의 일반식 I, 허용되는 염의 식품, 화장품학적 또는 약제학적 유효량, 및 적어도 하나의 식품, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 보조제를 포함하는 식품, 화장품학적 또는 약제학적 조성물.
- [청구항 29] 제 12 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 있어서, 일반식 I, 이들의 혼합물 및/또는 이의 식품, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 염은 활석, 벤토나이트, 실리카, 전분 및 말토덱스트린에 의해 형성된 식품학적으로, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 고체 유기 중합체 또는 고체 광물 지지체 상에 흡착된 상태로 확인되는 것인 조성물.
- [청구항 30] 제 12 항 내지 제 26 항, 제 28 항 및 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 크림, 다중 에멀전, 무수 조성물, 수성 분산액, 오일, 밀크, 발삼, 폼, 로션, 젤, 크림 젤, 함수알코올(hydroalcoholic) 용액, 히드로글리콜 용액, 히드로젤, 도찰제(liniment), 세라, 비누, 샴푸, 컨디셔너, 세럼, 연고, 무스, 포마드, 파우더, 바, 펜슬, 스프레이, 에어로졸, 캡슐, 젤라틴 캡슐, 연질 캡슐, 경질 캡슐, 정제, 당의정, 과립, 츄잉검, 용액, 현탁액, 에멀전, 시럽, 엘릭서제, 다당류 필름, 젤리 및 젤라틴에 의해 형성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제공되는 것인 조성물.

- [청구항 31] 제 12 항 내지 제 26 항, 제 28 항 및 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 언더아이 컨실러, 메이크업 파운데이션, 메이크업 제거 로션, 메이크업 제거 밀크, 아이 새도우, 립스틱, 립 글로스, 입술 보호제 및 파우더로 이루어진 군으로부터 선택되는 제품 내로 혼입된 상태로 확인되는 것인 조성물.
- [청구항 32] 제 12 항 내지 제 26 항, 제 28 항 및 제 29 항 내지 제 31 항 중 어느 한 항에 있어서, 일반식 I, 이들의 혼합물 및/또는 이의 식품, 화장품학적으로 또는 약제학적으로 허용되는 염은 식물, 부직포 또는 의료 장치 내로 혼입되어 있는 것인 조성물.
- [청구항 33] 제 33 항에 있어서, 상기 식물, 부직포 또는 의료 장치는 붕대, 거즈, 티셔츠, 타이츠, 양말, 언더웨어, 거들, 장갑, 기저귀, 생리대, 드레싱, 베드스프레드, 물수건(wipe), 접착 패치, 비접착 패치, 폐색 패치, 미세전기 패치 및 안면 마스크로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 34] 제 12 항 내지 제 26 항, 제 28 항 및 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 기타 다른 PGC-1 α 조절제, 기타 다른 PPAR γ 조절제, 지방세포의 트리글리세라이드 함량을 감소시키는 제제, 지방세포 분화를 지연시키는 제제, 지방분해제 또는 지방분해 자극제, 항셀룰라이트제, 지방생성제, 아세틸콜린-수용체 응집 억제제, 근육 수축 억제제, 항콜린성 제제, 엘라스타아제 억제제, 기질 금속단백질 분해효소 억제제, 멜라닌합성 자극제 또는 억제제 또는 탈색제(depigmenting agent), 전구색소침착제(propigmenting agent), 자가 태닝제, 노화방지제, NO-합성효소 억제제, 5 α -환원효소 억제제, 리실-하이드록실라아제 및/또는 프롤릴-하이드록실라아제 억제제, 항산화제, 자유 라디칼 포착제 및/또는 대기오염에 대한 제제, 반응성 카보닐종 포착제, 당화방지제(anti-glycation agent), 항히스타민제, 항바이러스제, 항기생충제, 유화제, 연화제(emollient), 유기 용매, 액체 추진제, 피부 컨디셔너, 습윤제, 수분 보유 물질, 알파 하이드록시산, 베타 하이드록시산, 보습제, 표피 가수분해 효소, 비타민, 아미노산, 단백질, 색소 또는 착색제, 염료, 생체고분자, 젤화폴리머, 증점제, 계면활성제, 유연제, 유화제, 결합제, 방부제, 주름방지제, 눈밑 처진 살을 감소 또는 치료할 수 있는 제제, 피부박리제(exfoliating agent), 각질박리제(desquamating agent), 각질용해제(keratolytic agent), 항균제, 항진균제, 정진균제(fungistatic agent), 살균제, 정균제(bacteriostatic agent), 진피 또는 자극제, 엘라스틴 합성 자극제, 데코린 합성 자극제, 라미닌 합성 자극제, 데펜신 합성 자극제, 샤페론 합성 자극제, cAMP 합성 자극제, 열충격 단백질, HSP70 합성 자극제, 열충격 단백질 합성 자극제, 아쿠아포린 합성 자극제, 히알루론산 합성 자극제, 피브로넥틴 합성 자극제, 시르투인(sirtuin) 합성 자극제, 각질층의 성분 및 지질의 합성

자극제, 세라마이드, 지방산, 콜라겐 분해 억제제, 엘라스틴 분해 억제제, 세린 단백질 분해효소억제제, 섬유아세포 증식 자극제, 각질세포 증식 자극제, 멜라닌세포 증식 자극제, 각질세포 분화 자극제, 아세틸콜린에스테라제 억제제, 피부 이완제, 글리코사미노글리칸 합성 자극제, 과다각화증 방지제, 면포용해제(comedolytic agent), DNA 수복제, DNA 보호제, 안정화제, 항소양제, 민감성 피부의 치료 및/또는 관리를 위한 제제, 펴밍제(firming agent), 재치밀화제(redensifying agent), 재구조화제, 임신선 방지제, 결합제, 피지 생성 조절제, 항발한제, 치유 자극제, 치유 공보조제(coadjuvant healing agent), 재상피화 자극제, 재상피화 공보조제(coadjuvant re-epithelialization agent), 사이토카인 성장 인자, 진정제, 항염증제, 마취제, 모세혈관 순환 및/또는 미세순환에 작용하는 제제, 혈관 투과성 억제제, 정맥긴장제(venotonic agent), 세포 대사에 작용하는 제제, 진피-표피 결합을 개선하기 위한 제제, 모발 성장 유도제, 또는 지연제, 방향제, 킬레이트화제, 식물 추출물, 에센셜 오일, 해양성 추출물, 생물발효 공정으로부터 수득되는 제제, 광물염(mineral salt), 세포 추출물, 선스크린 및 자외선 A 및/또는 B에 대해 활성을 갖는 유기 또는 광물 광보호제 또는 이들의 혼합물에 의해 형성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 보조제의 식품, 화장품학적 또는 약제학적 유효량을 추가로 포함하는 것인 조성물.

- [청구항 35] 제 34 항에 있어서, 상기 보조제는 합성 기원이거나 식물 추출물이거나 생물발효 공정으로부터 또는 합성 및 바이오기술 공정의 조합으로부터 유래하는 것인 조성물.
- [청구항 36] 제 34 항 또는 제 35 항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 하나의 항당뇨병제의 약제학적 유효량을 추가적으로 더 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 37] 제 35 항 또는 제 36 항에 있어서, 상기 보조제는 지방 조직의 트리글리세라이드 함량을 증가 또는 감소시키는 제제, 지방세포 분화를 증가 또는 지연시키는 제제, 지방분해제 및/또는 정맥긴장제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 38] 제 37 항에 있어서, 상기 지방 조직의 트리글리세라이드 함량을 증가 또는 감소시키는 제제, 지방세포 분화를 지연시키는 제제, 항셀룰라이트제, 지방분해제 및/또는 정맥긴장제는 포스콜린, 카페인, 에스신(escin), 카르니틴, 코엔자임 A, 리파제, 글라우신, 에스쿨린, 비스나딘, 사르사사포게닌, 코페아 아라비카(*Coffea arabica*)의 추출물, 콜레우스 포스콜리(*Coleus forskohlii*)의 추출물, 아네마레나 아프쇼델로이데스(*Anemarrhena asphodeloides*)의 추출물, 밋 물, 글리세린, 레시틴, 카페인, 나도죽백(*Butcher's broom*; 루스쿠스 아쿨레아투스(*Ruscus Aculeatus*))의 추출물, 말토덱스트린, 실리카, 트리에탄올아민 히드로요오다이드, 프로필렌 글리콜, 아이비(헤데라

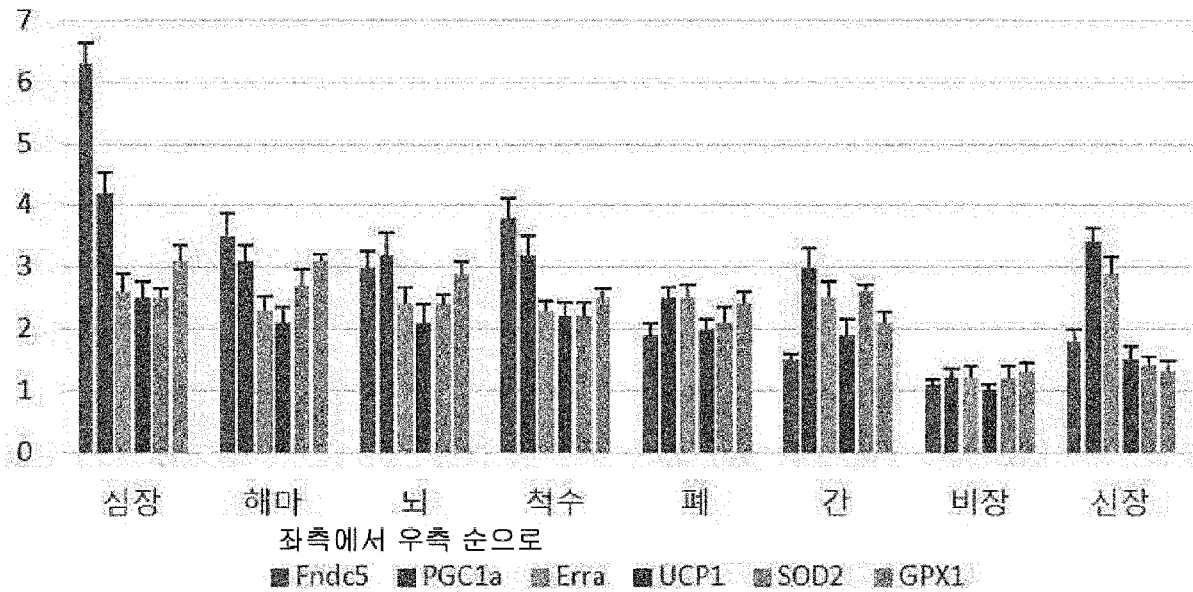
- 헬릭스(*Hedera Helix*))의 추출물, 카르니틴, 에스신, 트리펩티드-1, 잔탄 검, 카라기난(*콘드루스 크리스푸스(Chondrus crispus)*) 및 이나트륨 EDTA의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 39] 제 38 항에 있어서, 상기 보조제는 펄빙제, 재치밀화제 및 재구조화제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 40] 제 39 항에 있어서, 상기 펄빙제, 재치밀화제 및 재구조화제는 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas*) 발효 추출물, 트리펩티드-10 시트룰린, 아세틸아르기닐트립토판 디페닐글리신, 헥사펩티드-10, 및 슈도알테로모나스 발효 추출물, 가수분해된 밀 단백질, 가수분해된 대두 단백질, 트리펩티드-10 시트룰린 및 트리펩티드-1의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 41] 제 39 항 또는 제 40 항에 있어서, 상기 보조제는 임신선 방지제로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 42] 제 41 항에 있어서, 상기 임신선 방지제는 센텔라 아시아티카(*Centella Asiatica*)의 추출물, 로사 카니나(*Rosa canina*)의 추출물, 로사 모샤타(*Rosa moschata*)의 추출물, 로사 루비기노사(*Rosa rubiginosa*)의 추출물, 및 물, 카프릴릴/카프릴 글루코사이드, 레시틴, 글리세린, 슈도알테로모나스 발효 추출물, 아세틸트리펩티드-30 시트룰린, 펜타펩티드-18, 잔탄 검 및 카프릴릴 글리콜의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 43] 제 41 항 또는 제 42 항에 있어서, 상기 보조제는 주름방지제 또는 노화방지제로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 44] 제 43 항에 있어서, 상기 주름방지제 또는 노화방지제는 아세틸 헥사펩티드-8, 아세틸 헵타펩티드-4, 아세틸 옥타펩티드-3, 펜타펩티드-18, 아세틸 헥사펩티드-30, 가수분해된 밀 단백질과 가수분해된 대두 단백질과 트리펩티드-1의 혼합물, 디아미노프로피오노일 트리펩티드-33, 트리펩티드-10 시트룰린, 슈도알테로모나스 발효 추출물과 가수분해된 밀 단백질과 가수분해된 대두 단백질과 트리펩티드-10 시트룰린과 트리펩티드-1의 혼합물, 아세틸 테트라펩티드-5, 아세틸 트리펩티드-30 시트룰린, 아세틸아르기닐트립토판 디페닐글리신, 아세틸 테트라펩티드-22, 디메틸메톡시 크로마놀, 디메틸메톡시 크로마닐 팔미테이트, 슈도알테로모나스 발효 추출물, 리신 HCl과 레시틴과 트리펩티드-9 시트룰린의 혼합물 및 리신 HCl과 레시틴과 트리펩티드-10 시트룰린의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 45] 유효성분으로서 다음 일반식 I로 표시되는 화합물을 포함하는 체지방 분해용 조성물:
일반식 I: $S-(MS)_p-(MS)_q$

- 상기 일반식에서, S는 시알산, (MS)_p 및 (MS)_q는 서로 독립적으로 단당류 잔기이다.
- [청구항 46] 제 45 항에 있어서, 상기 일반식 I에서, (MS)_p는 갈락토오스이고, (MS)_q는 글루코오스인 것인 조성물.
- [청구항 47] 제 46 항에 있어서, 상기 일반식 I의 화합물은 시알릴락토오스인 것인 조성물.
- [청구항 48] 제 46 항에 있어서, 상기 시알릴락토오스는 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc 또는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc인 것인 조성물.
- [청구항 49] 제 48 항에 있어서, 상기 시알릴락토오스는 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc인 것인 조성물.
- [청구항 50] 제 45 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 것인 조성물.
- [청구항 51] 제 45 항에 있어서, 상기 조성물은 용액, 현탁액, 시럽제, 에멀전, 리포솜, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 서방형제제 및 캡슐제로 구성된 군으로부터 선택된 제형인 것인 조성물.
- [청구항 52] 제 51 항에 있어서, 상기 조성물은 비경구 투여용 조성물이고 리포솜 또는 서방형제제의 제형인 것인 조성물.
- [청구항 53] 제 51 항에 있어서, 상기 조성물은 경구투여용 조성물이고 리포솜 또는 서방형제제의 제형인 것인 조성물.
- [청구항 54] 제 45 항에 있어서, 상기 조성물은 기능성 식품(nutraceutical) 조성물 또는 식품 조성물인 것인 조성물.
- [청구항 55] 제 1 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항의 조성물을 이를 필요로 하는 객체(subject)에 투여하는 단계;를 포함하는, 객체에서 PGC-1 α 의 발현 감소와 연관된 질병 또는 증상을 예방 또는 치료하는 방법.
- [청구항 56] 제 55 항에 있어서, 상기 투여하는 단계 전에, 객체로부터 분리된 시료로부터 세포 중 PGC-1 α 의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 더 포함하는, 방법.
- [청구항 57] 제 56 항에 있어서, 상기 PGC-1 α 의 발현 수준이 정상 대조군 대비 감소되어 있는지 여부를 관찰하고, 감소된 경우 상기 객체에 대하여 상기 투여하는 단계를 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 58] 제 57 항에 있어서, 상기 정상 대조군은 정상인 또는 PGC-1 α 의 발현 수준의 감소와 연관된 질환 또는 증상을 보이지 않는 객체로부터 얻어진 세포인 것인 방법.
- [청구항 59] 제 56 항에 있어서, 상기 시료는 특정 조직 또는 기관으로부터 얻어진 것인 방법.
- [청구항 60] 제 55 항에 있어서, 상기 투여는 상기 측정된 PGC-1 α 의 발현 수준이 대조군 대비 감소된 특정 조직에 국소적으로 투여하는 것인 방법.
- [청구항 61] 제 45 항 내지 제 54 항 중 어느 한 항의 조성물을 이를 필요로 하는 객체에

- 투여하는 단계;를 포함하는, 객체에서 체지방을 분해시키는 방법.
- [청구항 62] 제 61 항에 있어서, 상기 투여하는 단계 전에, 객체로부터 분리된 시료로부터 세포 중 PGC-1 α 의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가적으로 더 포함하는, 방법.
- [청구항 63] 제 62 항에 있어서, 상기 PGC-1 α 의 발현 수준이 정상 대조군 대비 감소되어 있는지 여부를 관찰하고, 감소된 경우 상기 객체에 대하여 상기 투여하는 단계를 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 64] 제 63 항에 있어서, 상기 정상 대조군은 정상인 또는 PGC-1 α 의 발현 수준의 감소와 연관된 질환 또는 증상을 보이지 않는 객체로부터 얻어진 세포인 것인 방법.
- [청구항 65] 제 62 항에 있어서, 상기 시료는 특정 조직 또는 기관으로부터 얻어진 것인 방법.
- [청구항 66] 제 61 항에 있어서, 상기 투여는 상기 측정된 PGC-1 α 의 발현 수준이 대조군 대비 감소된 특정 조직에 국소적으로 투여하는 것인 방법.

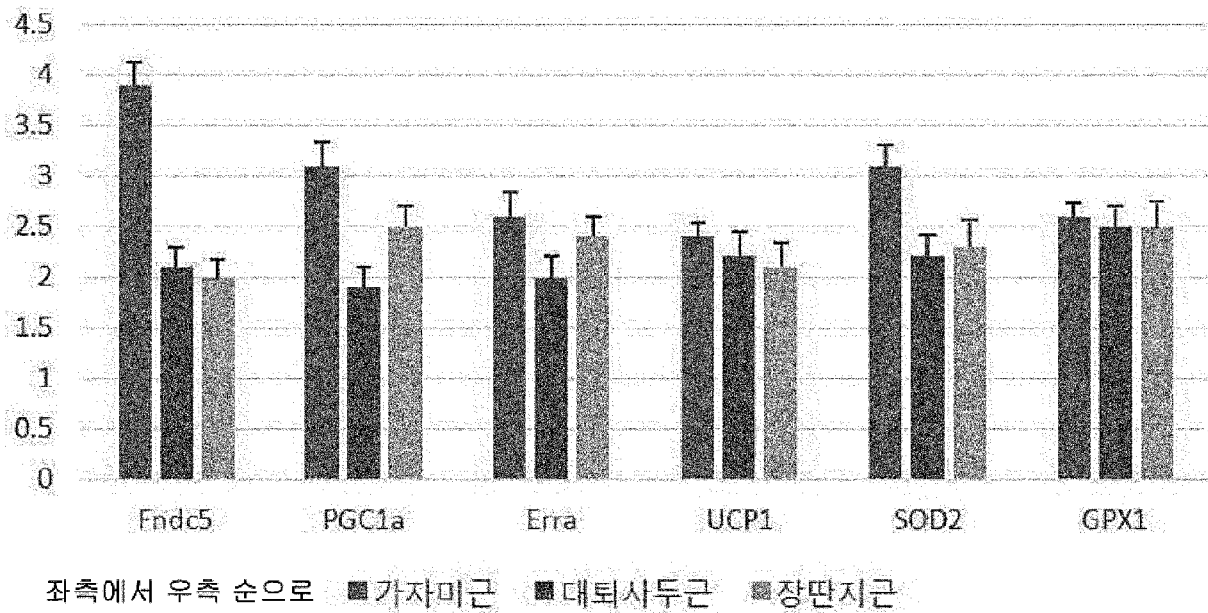
[도1a]

6'-SL 투여 전 대비 장기별 상대적인 유전자 발현

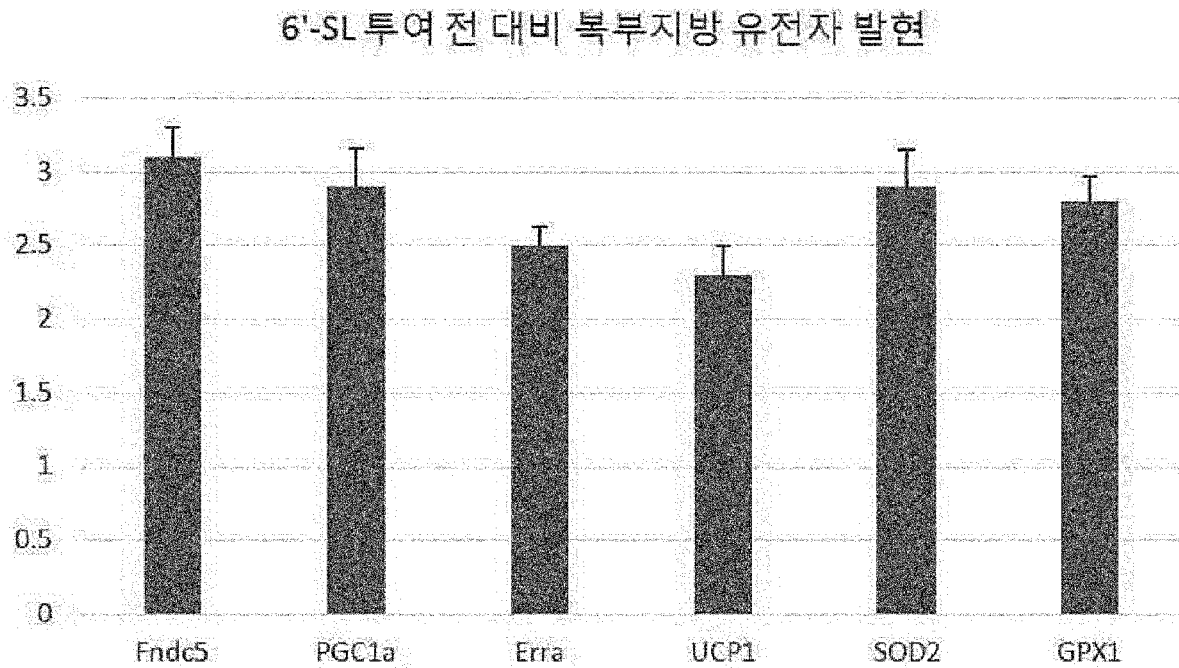


[도1b]

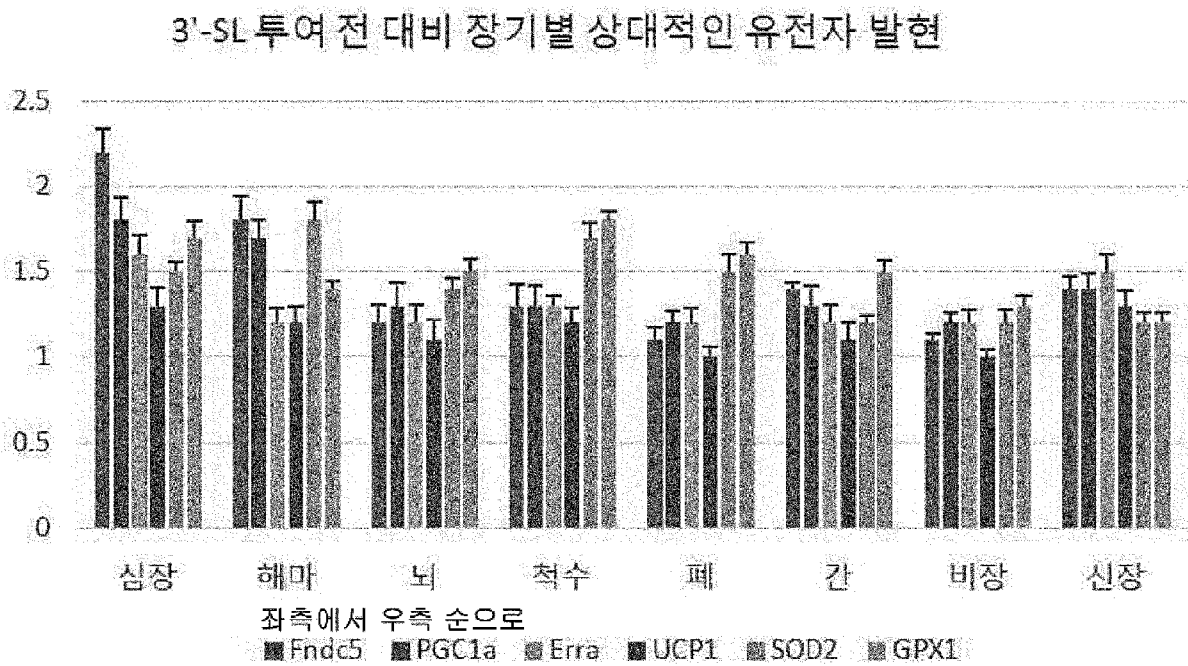
6'-SL 투여 전 대비 골격근별 상대적인 유전자 발현



[도1c]

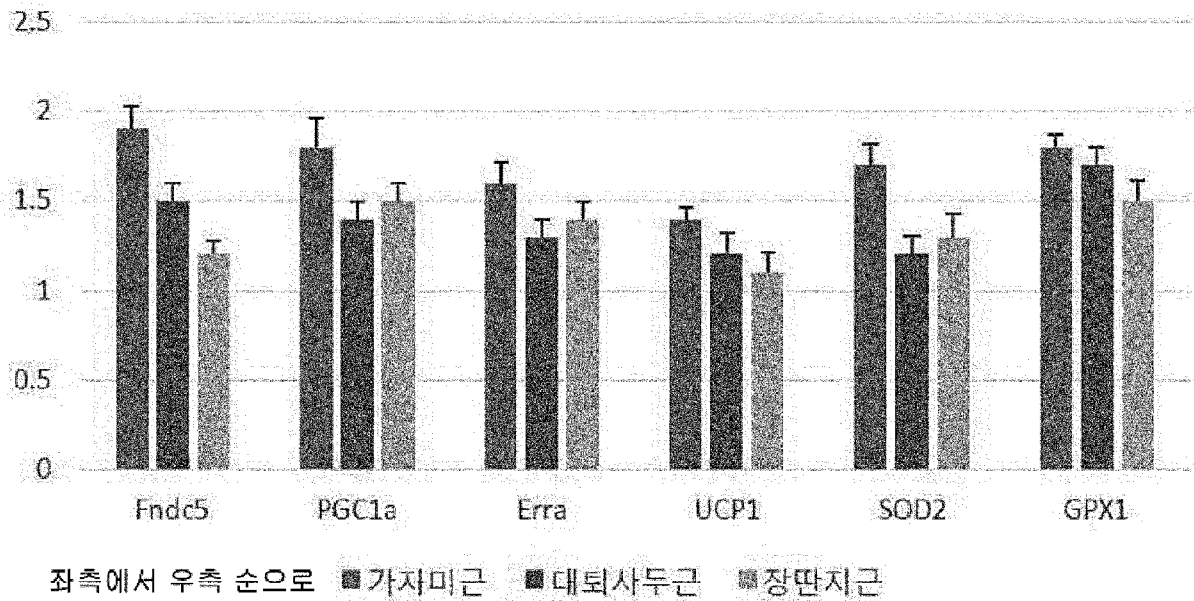


[도1d]



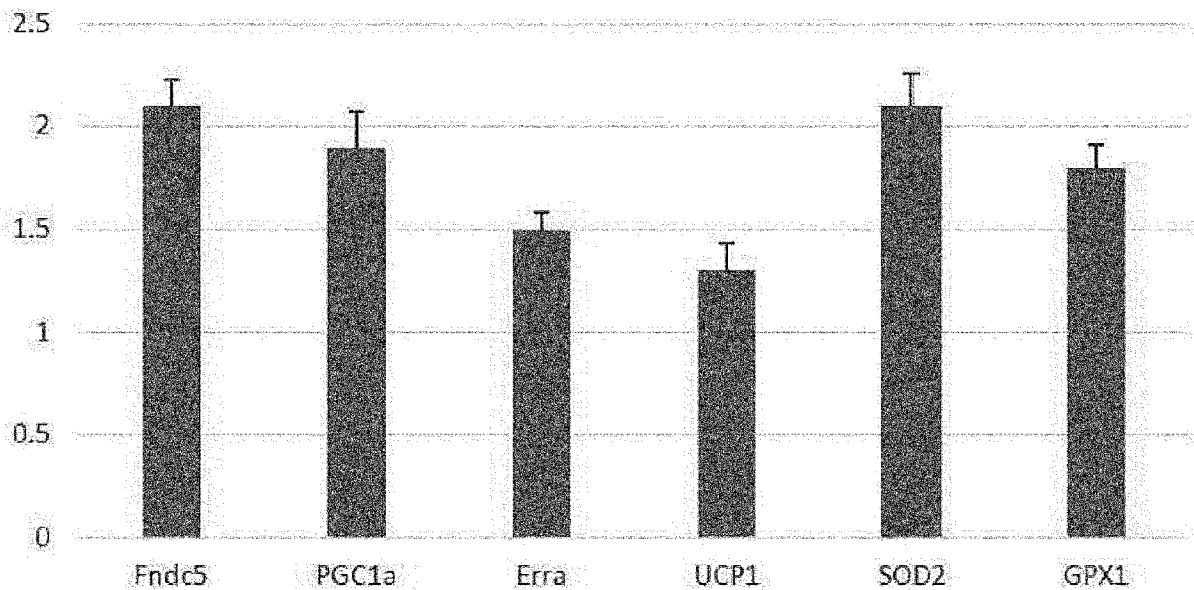
[도 1e]

3'-SL 투여 전 대비 골격근별 상대적인 유전자 발현

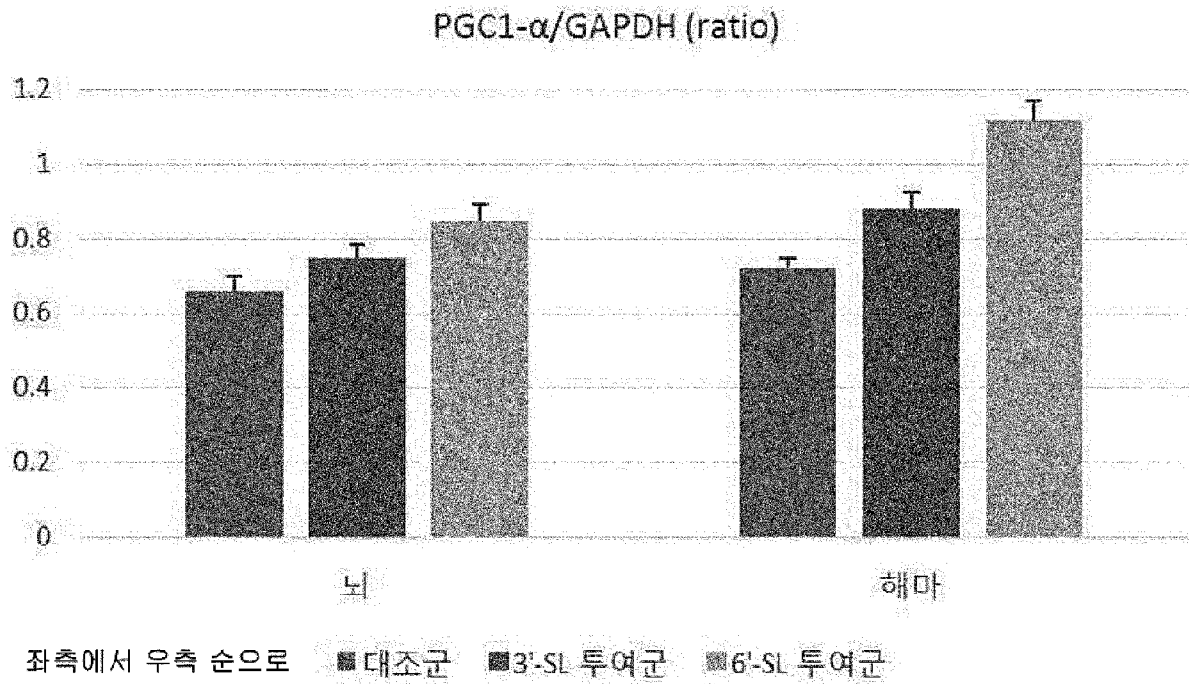


[도 1f]

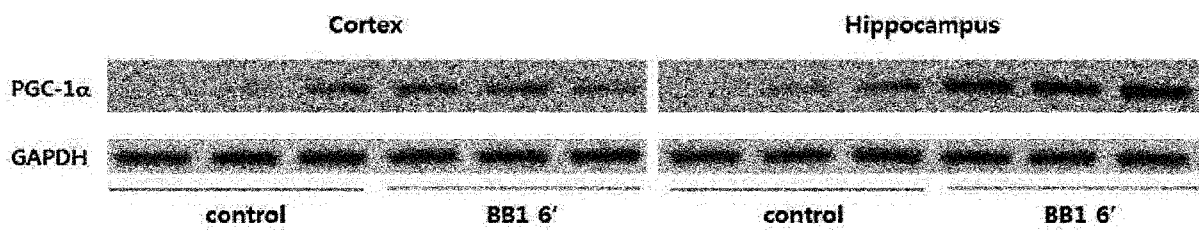
3'-SL 투여 전 대비 복부지방 유전자 발현



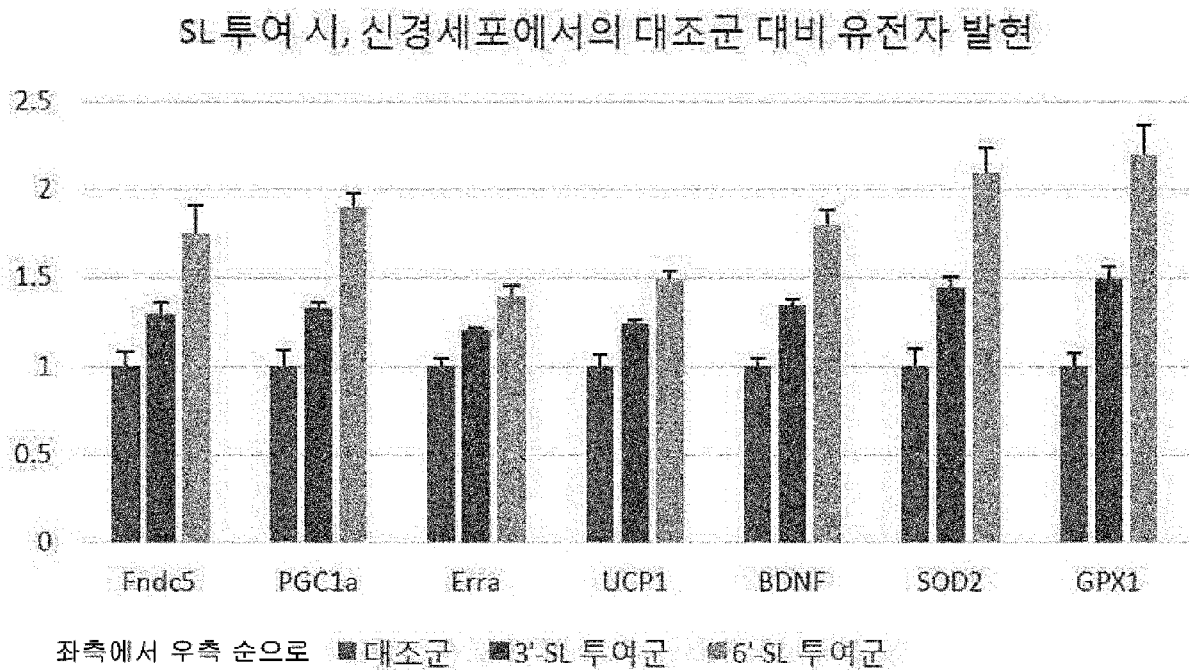
[도2a]



[도2b]

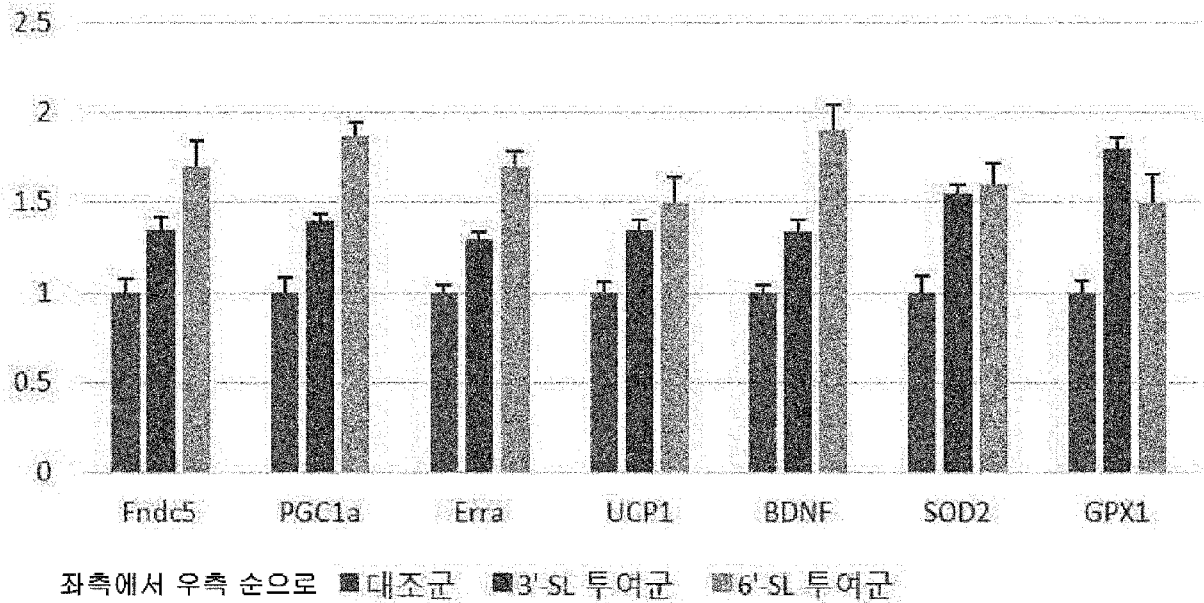


[도3]



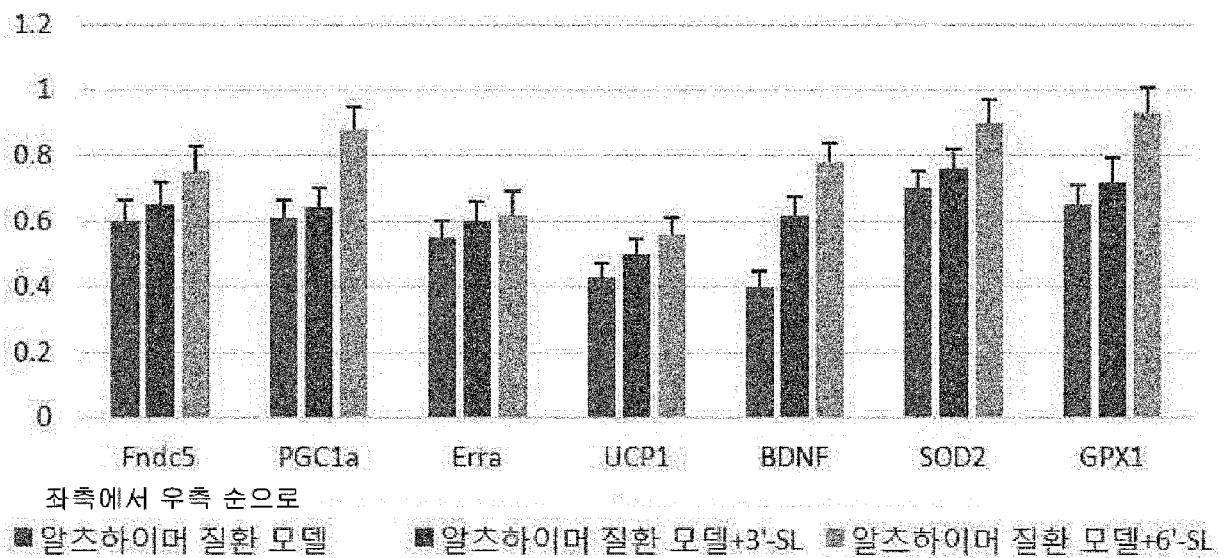
[도4]

SL 투여 시, 근육세포에서의 대조군 대비 유전자 발현



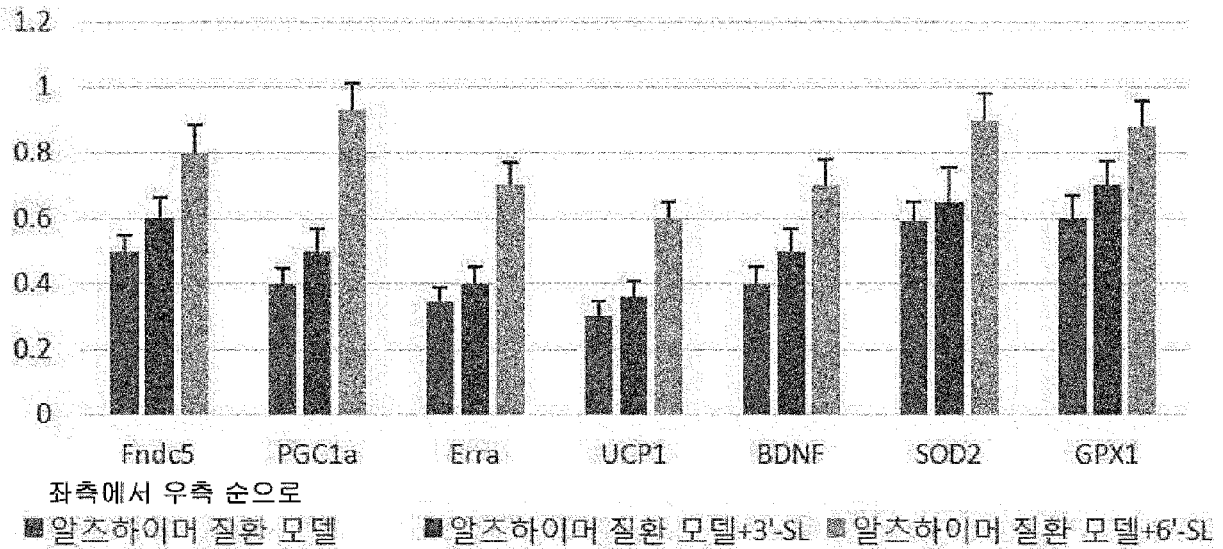
[도5a]

뇌에서의 정상쥐 대비 유전자 발현



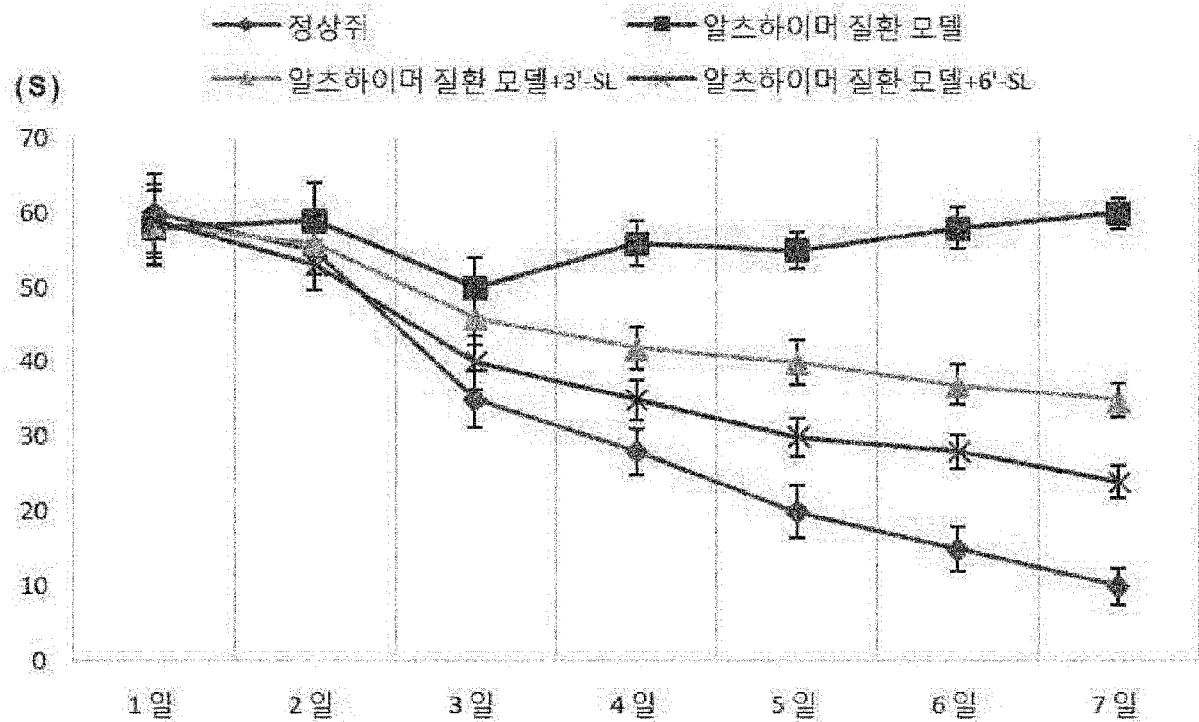
[도5b]

해마에서의 정상쥐 대비 유전자 발현



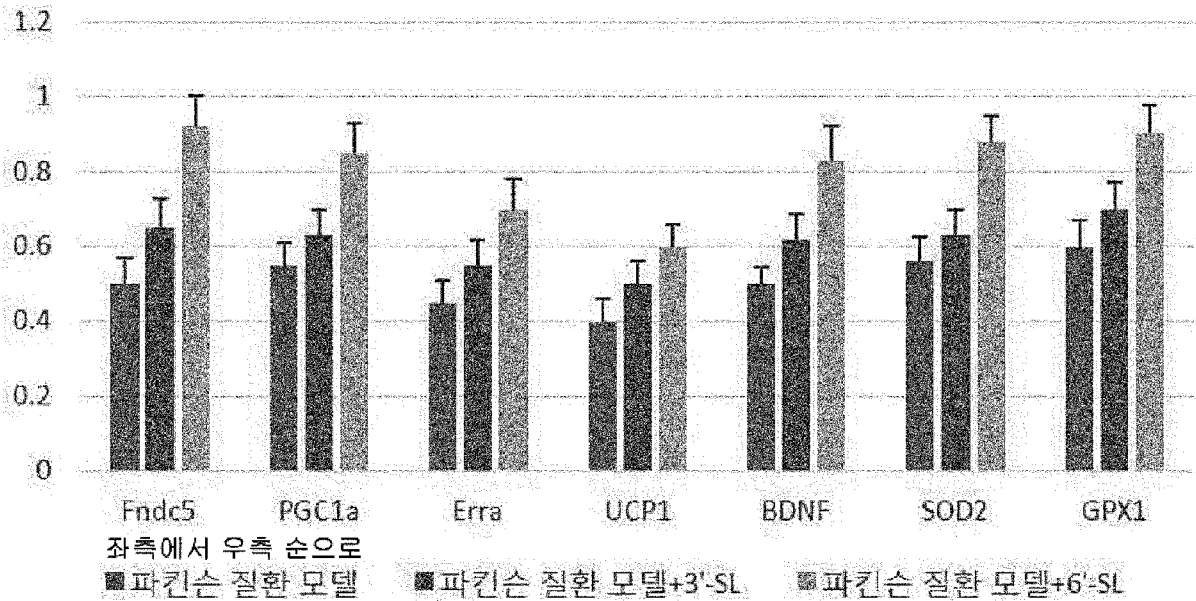
[도6]

인지능력 테스트에서 탈출 시간 (s)



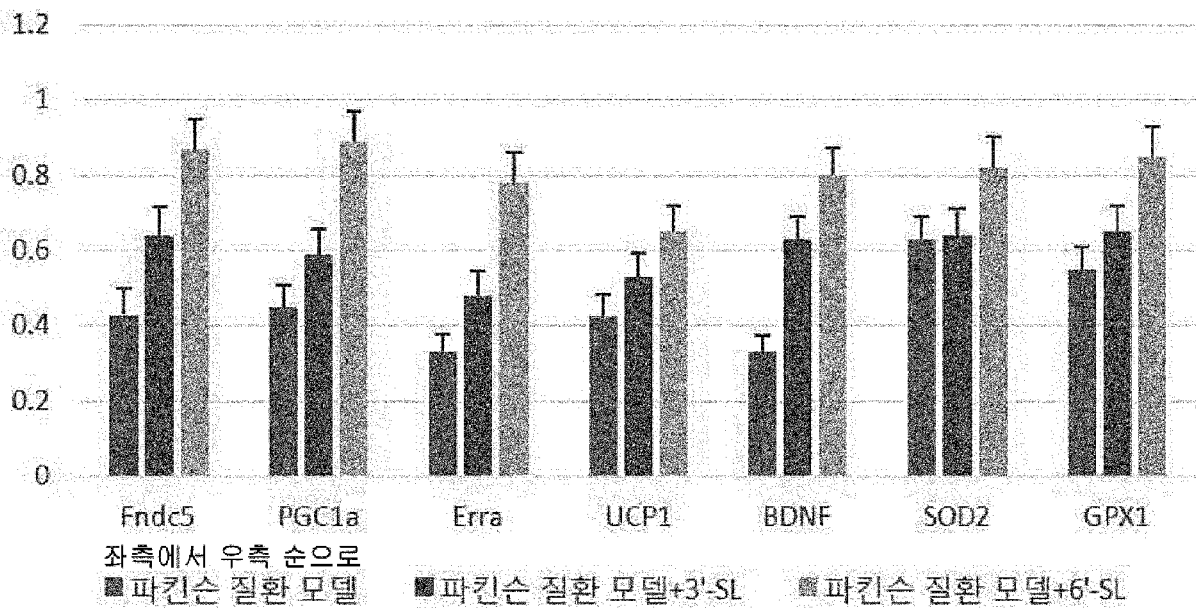
[도7a]

뇌에서의 정상쥐 대비 유전자 발현



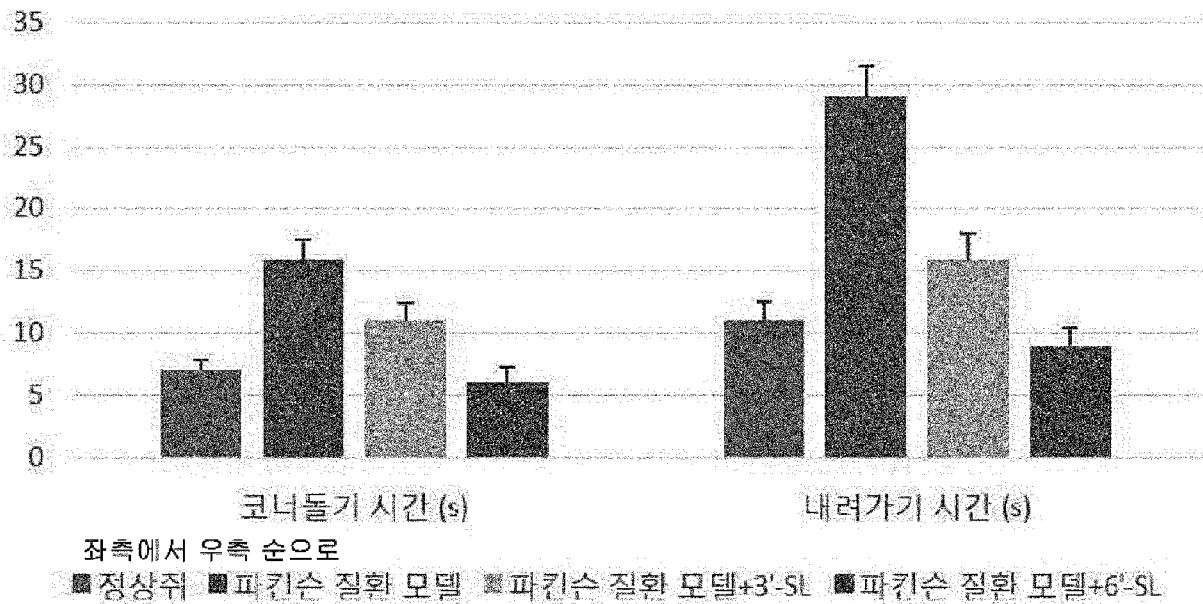
[도7b]

해마에서의 정상쥐 대비 유전자 발현



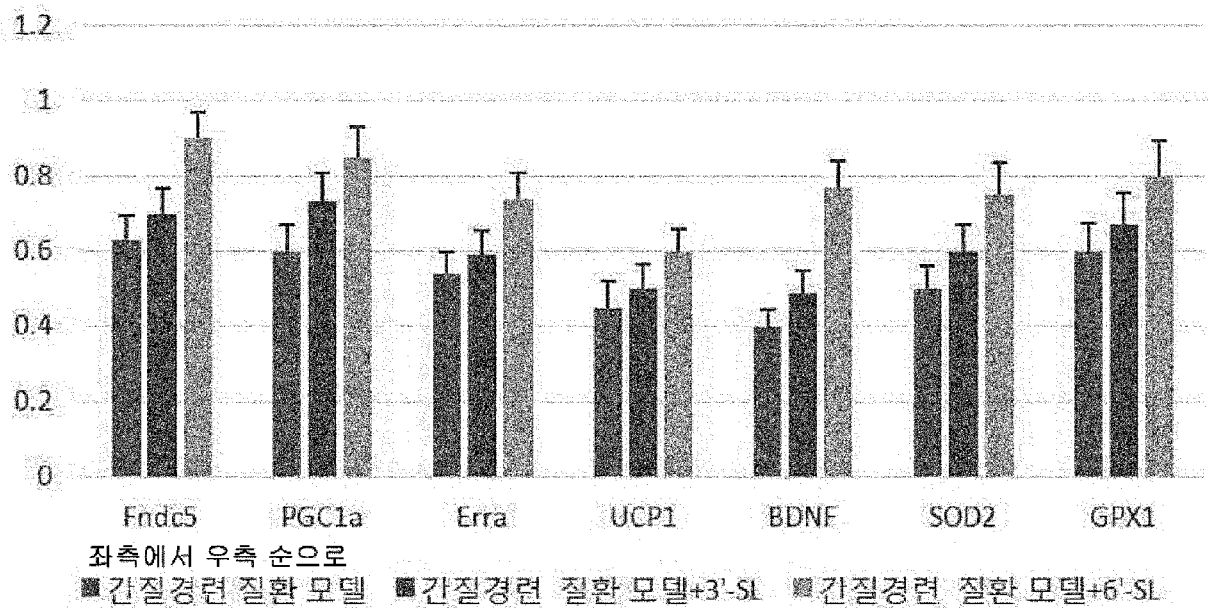
[도8]

파킨슨병 동물모델 행동실험



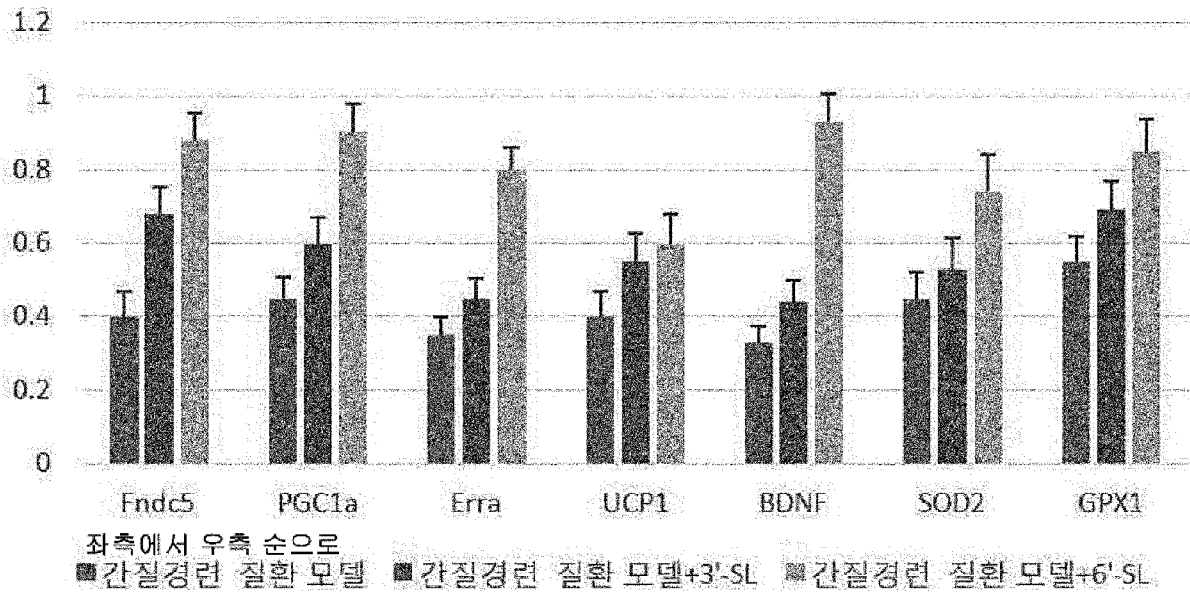
[도9a]

뇌에서의 정상쥐 대비 유전자 발현



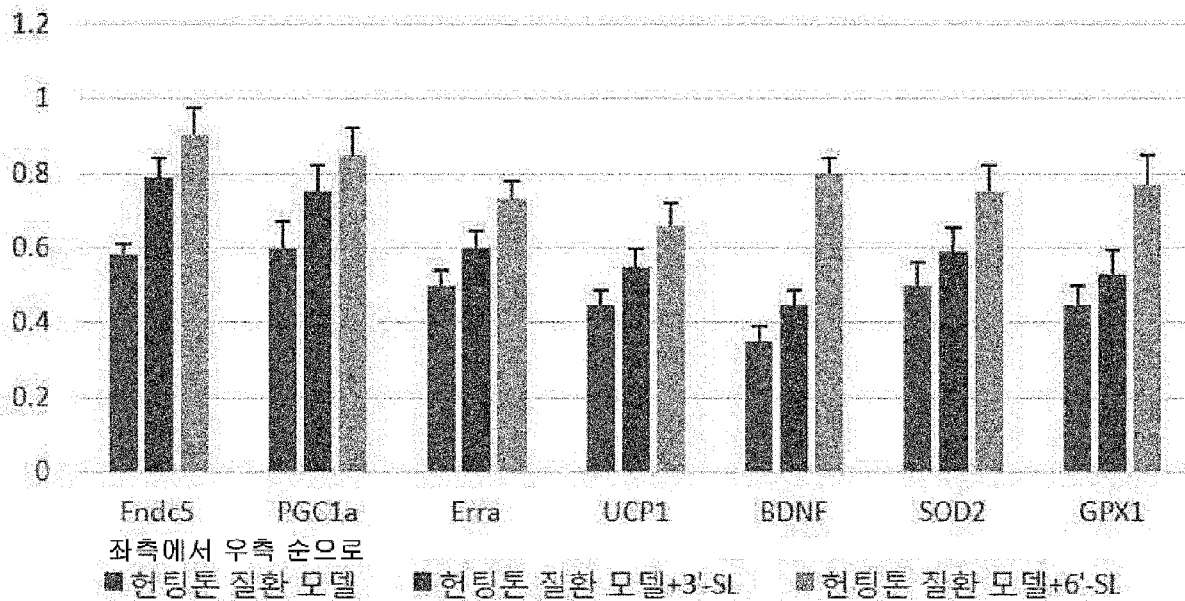
[도9b]

해마에서의 정상쥐 대비 유전자 발현



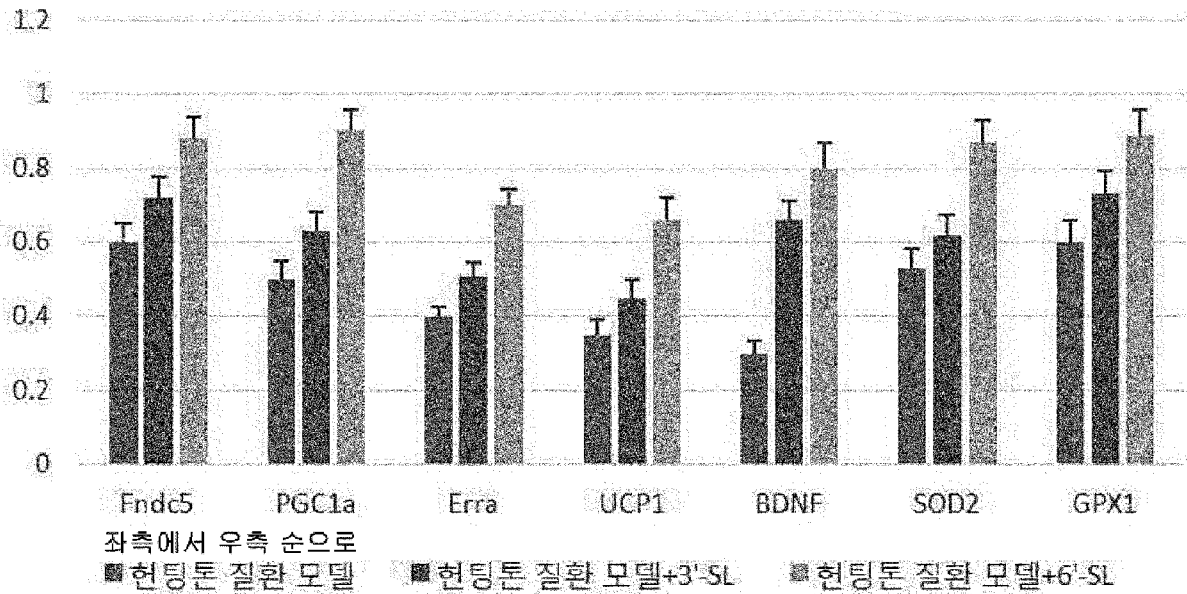
[도10a]

뇌에서의 정상쥐 대비 유전자 발현



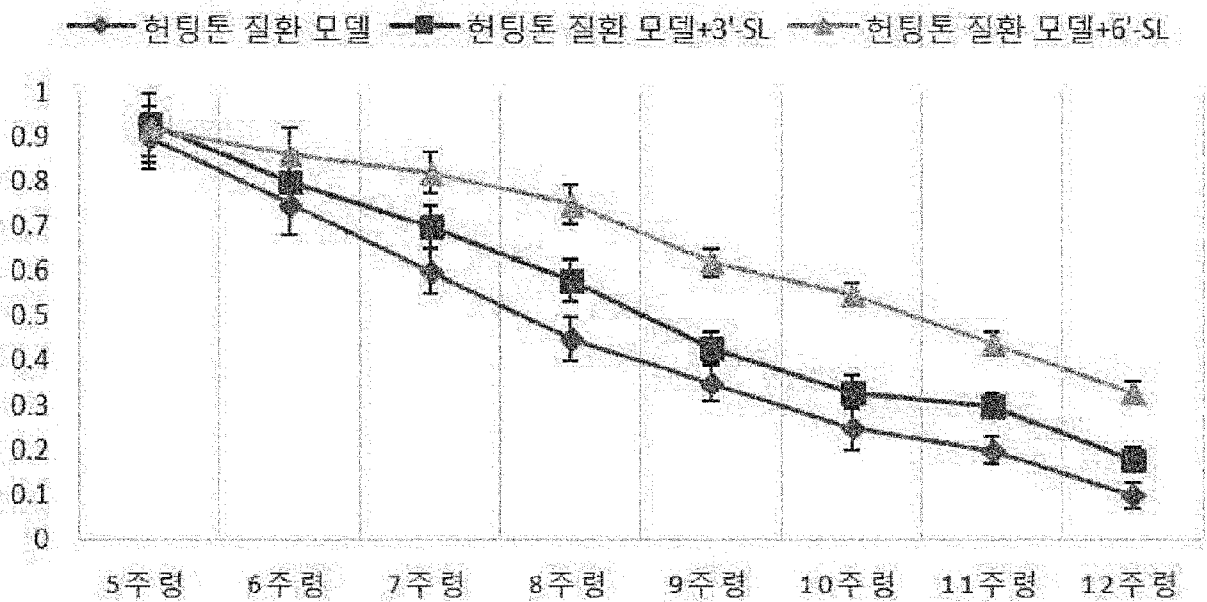
[도10b]

해마에서의 정상쥐 대비 유전자 발현

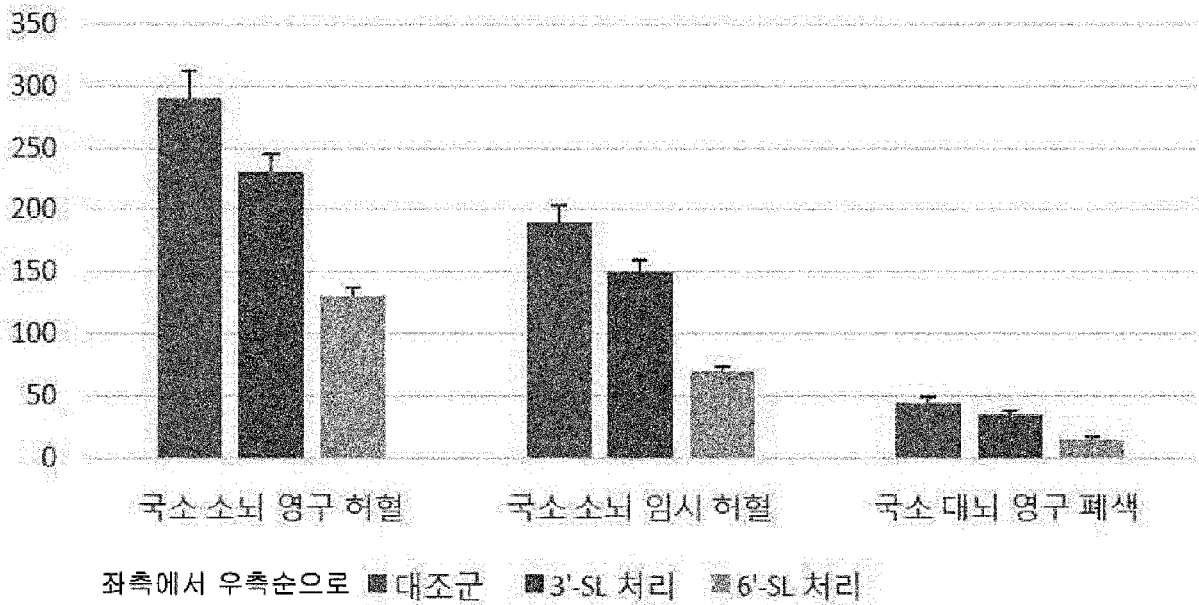


[도11]

정상쥐 대비 로타로드 주행시간 비율

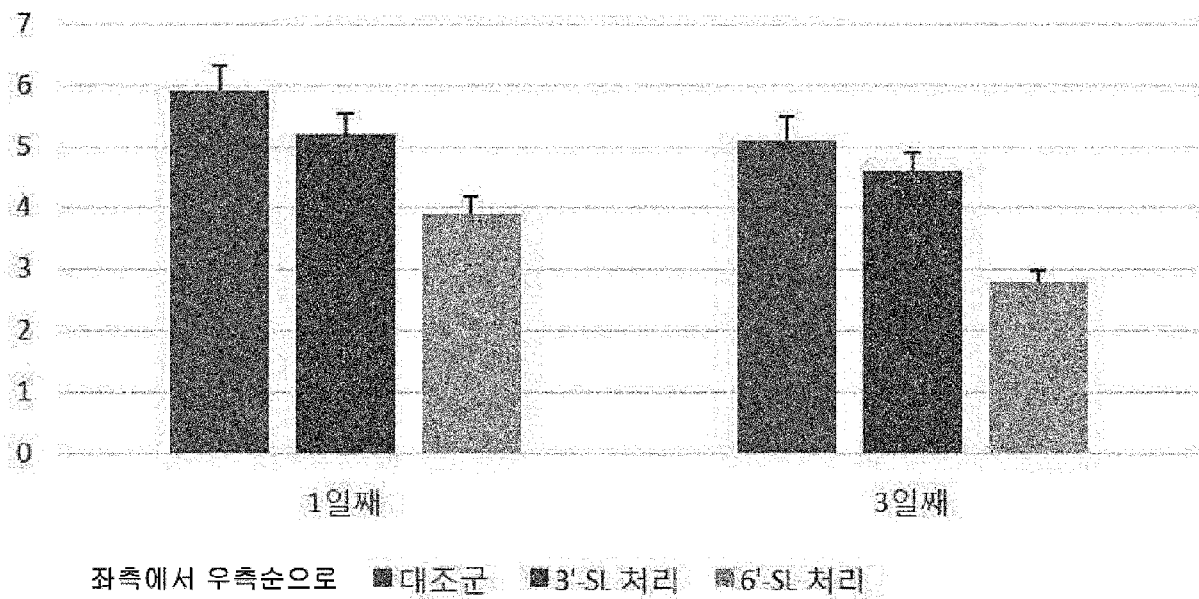


[도12]

허혈 모델에서의 허혈부피 (mm³)

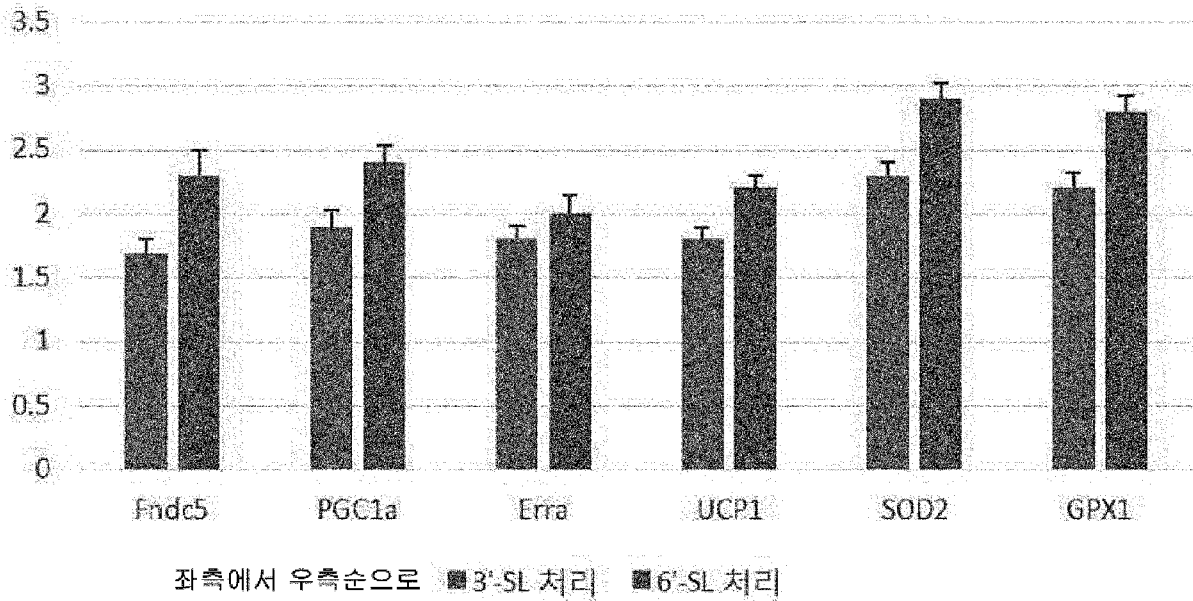
[도13]

ICH 유도 후 MLPT 시험 점수

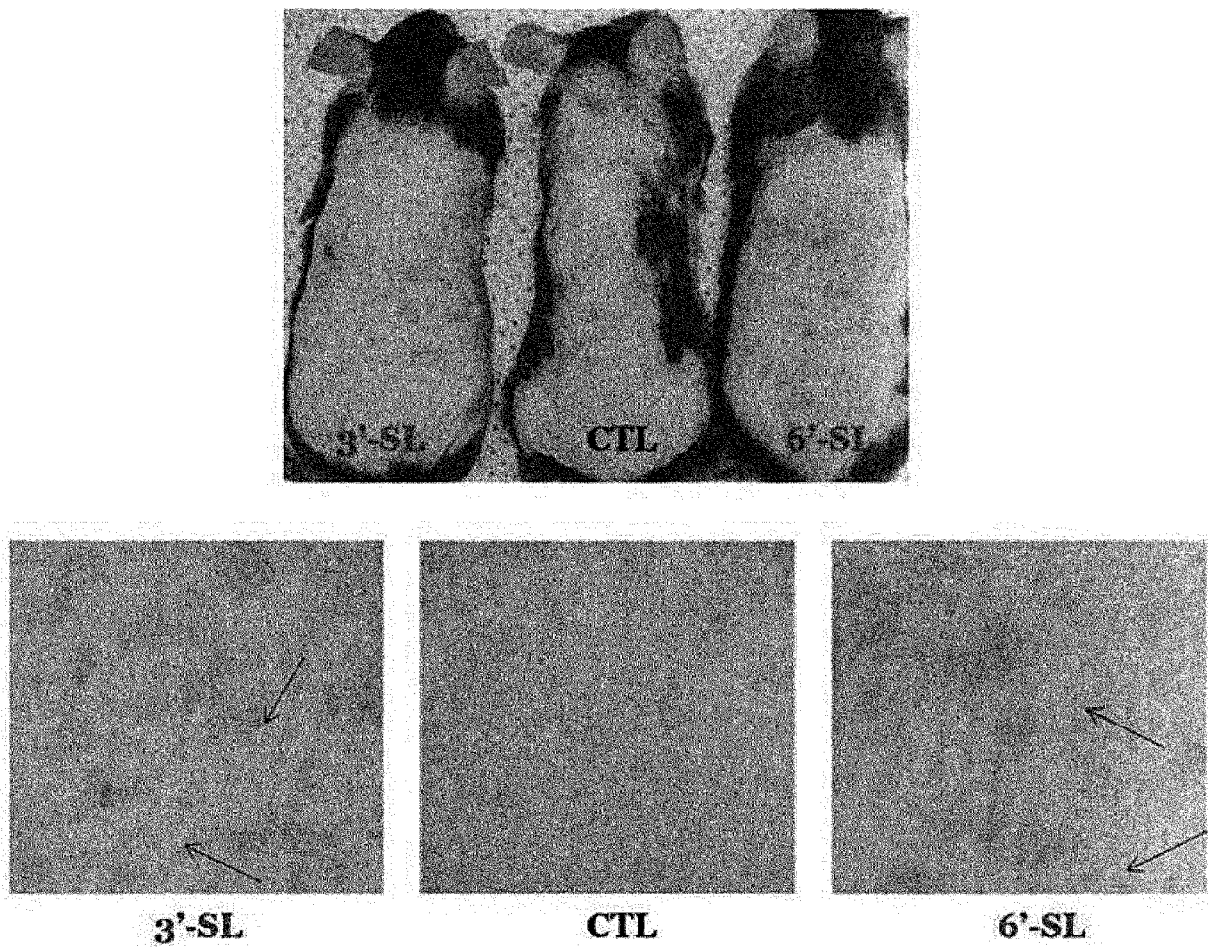


[도14]

SL 투여 전 대비 복부지방 유전자 발현 비

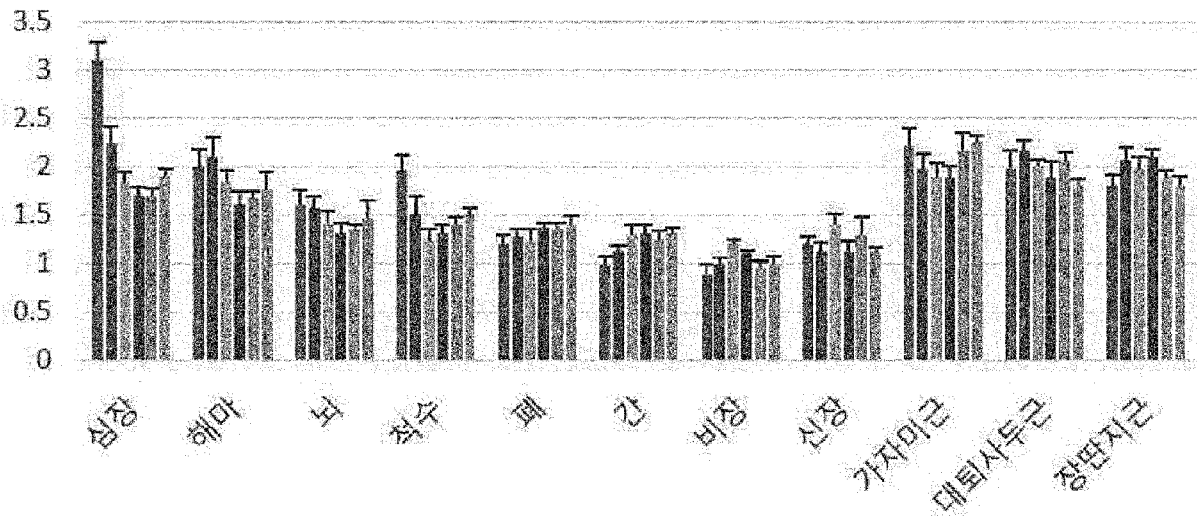


[도15]



[도16a]

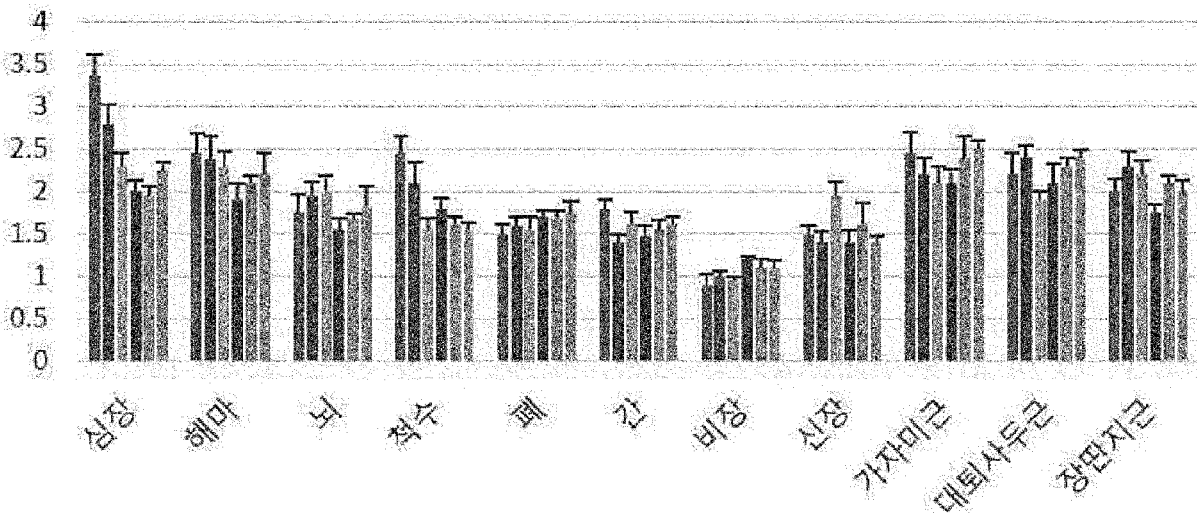
3'-SL 투여 전 대비 신체 부위별 상대적인 유전자 발현



좌측에서 우측순으로 ■ Fndc5 ■ PGC1a ■ Erra ■ UCP1 ■ SOD2 ■ GPX1

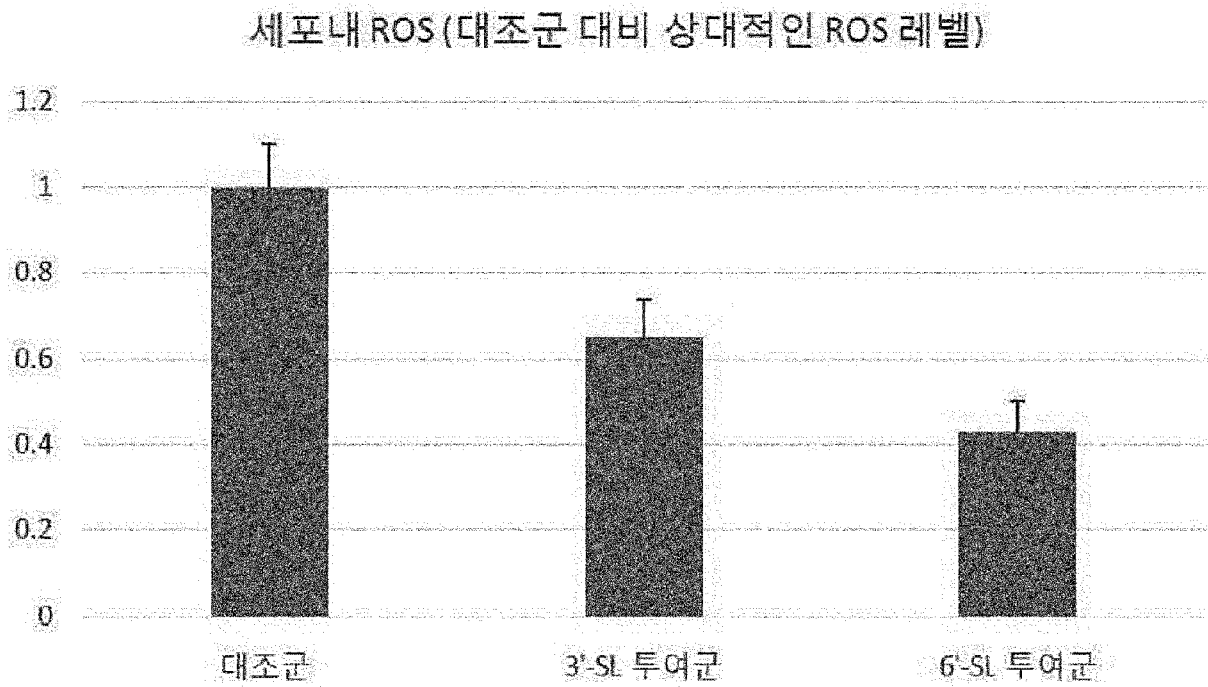
[도16b]

6'-SL 투여에 의한 신체 부위별 상대적인 유전자 발현

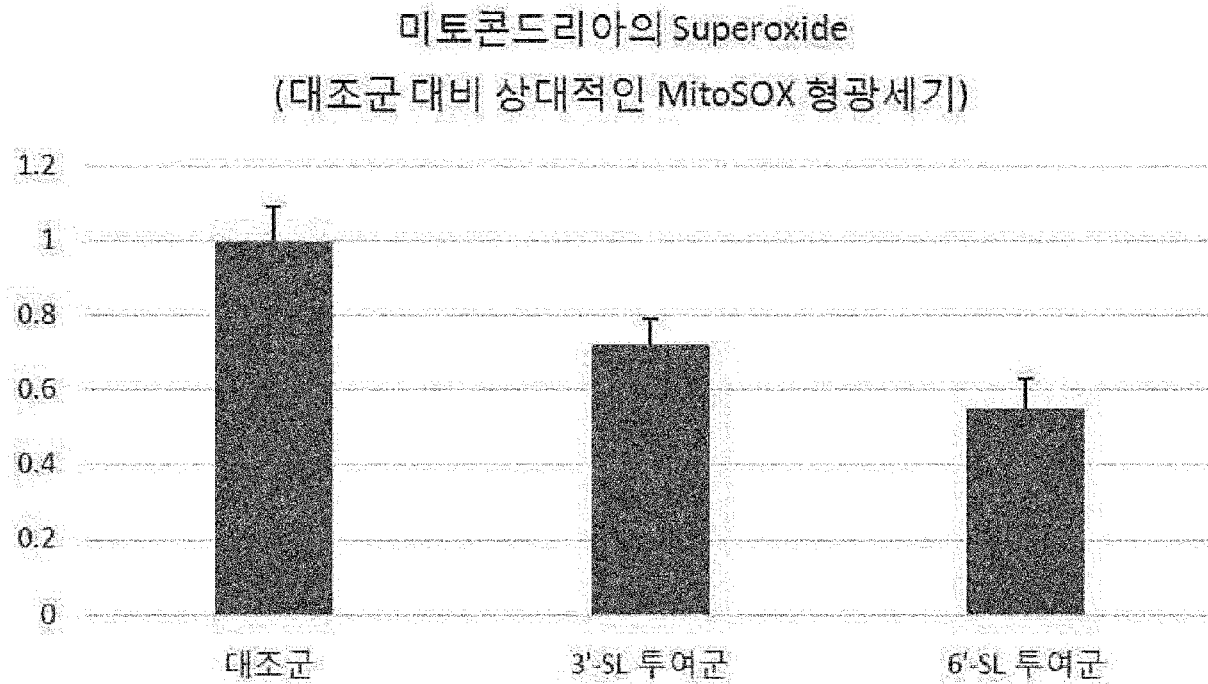


좌측에서 우측순으로 ■ Fndc5 ■ PGC1a ■ Erra ■ UCP1 ■ SOD2 ■ GPX1

[도17a]

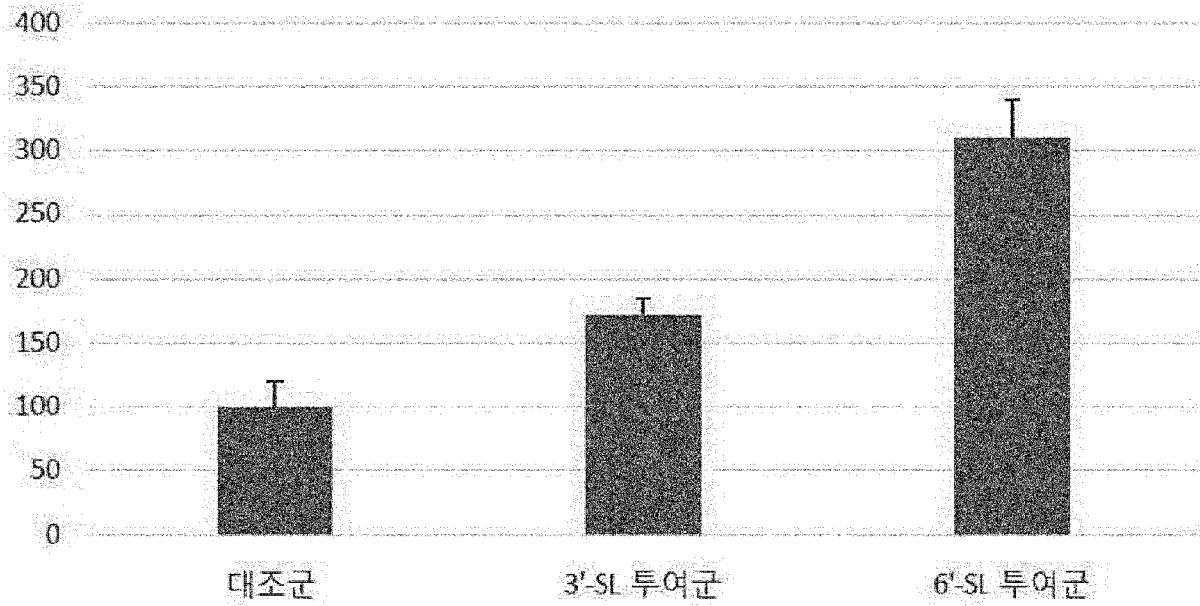


[도17b]



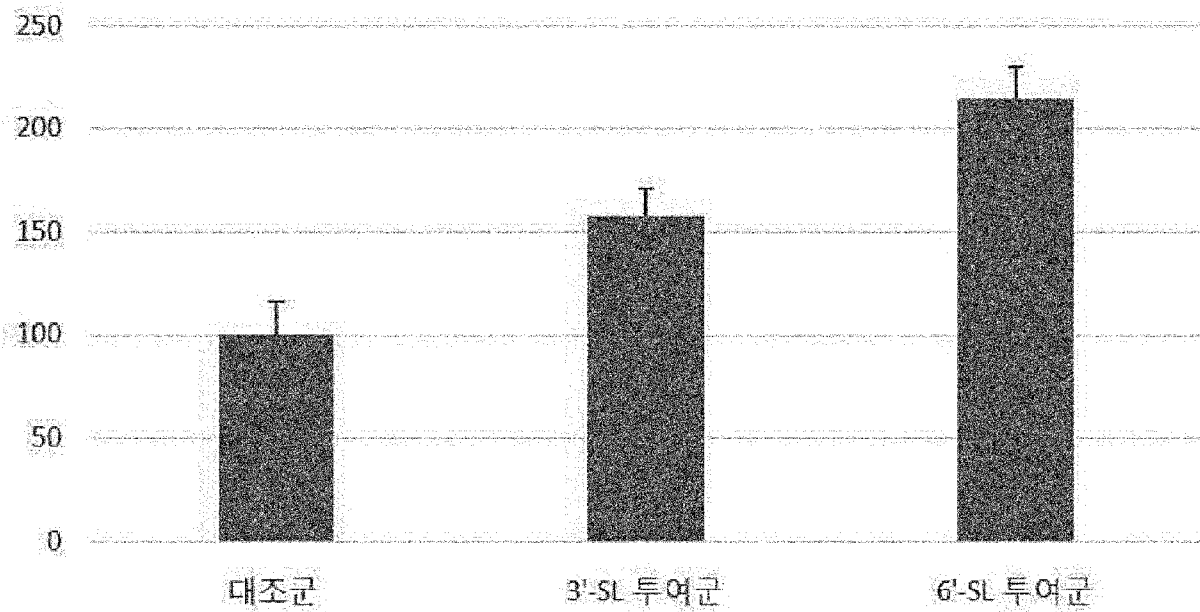
[도18a]

in vivo에서 대조군 대비 상대적인 텔로메라아제 활동성 (%)

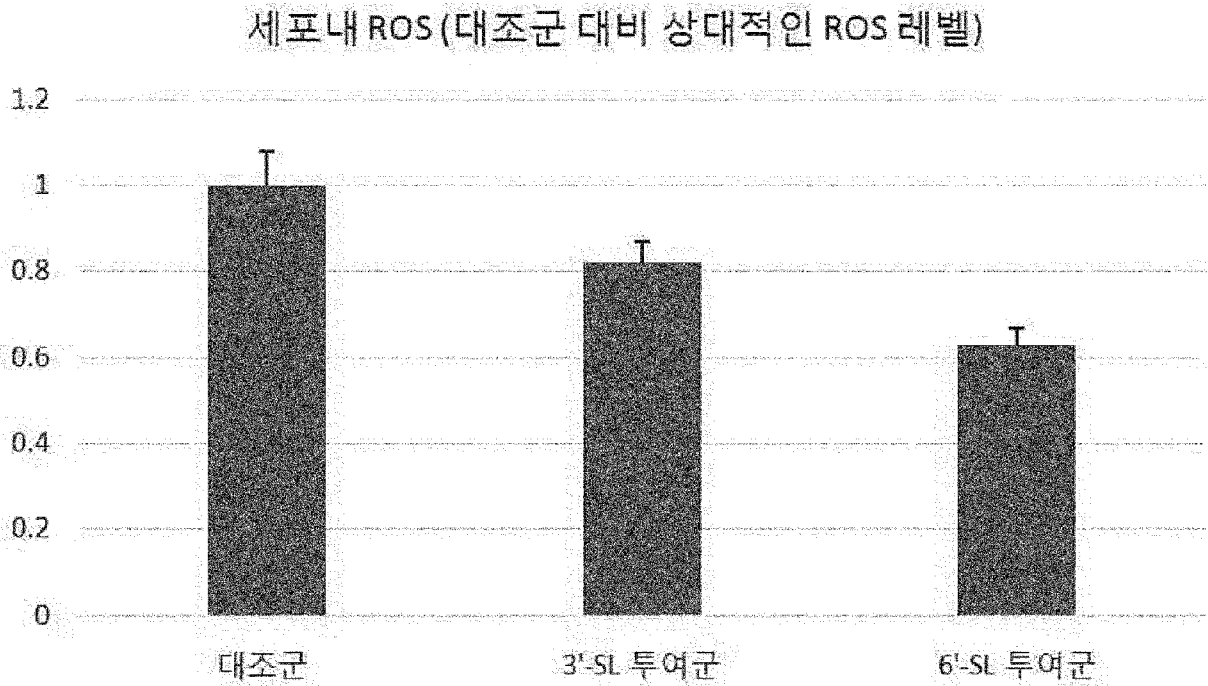


[도18b]

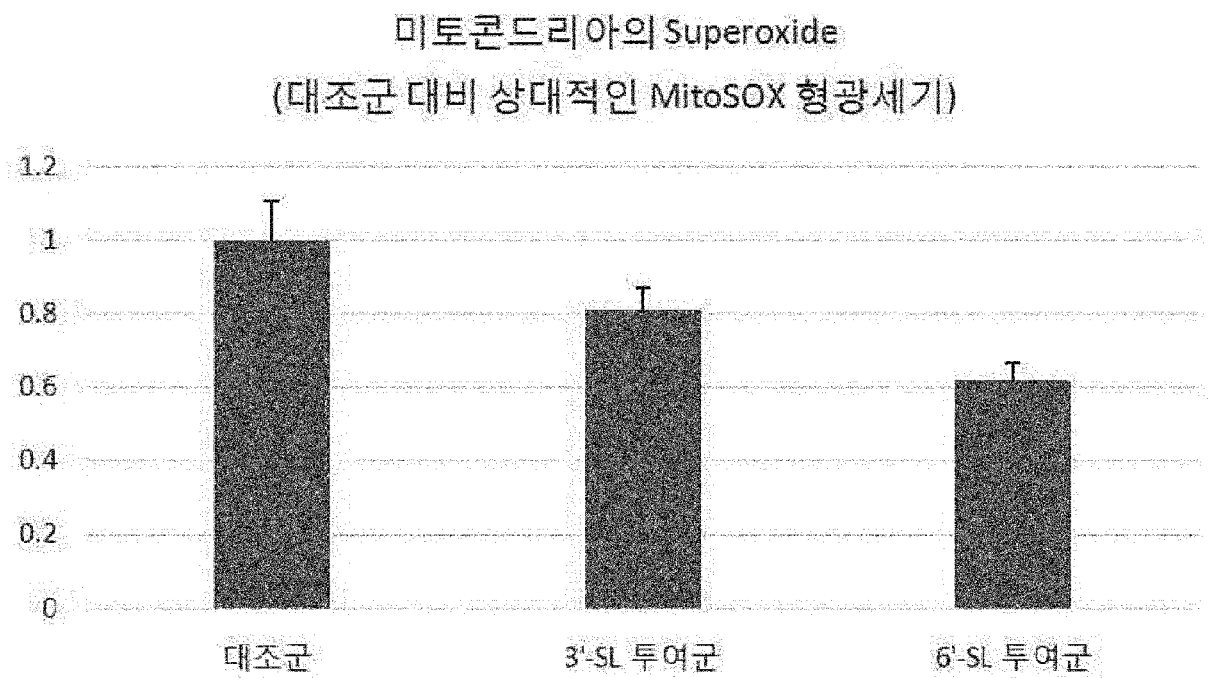
in vitro에서 대조군 대비 상대적인 텔로메라아제 활동성 (%)



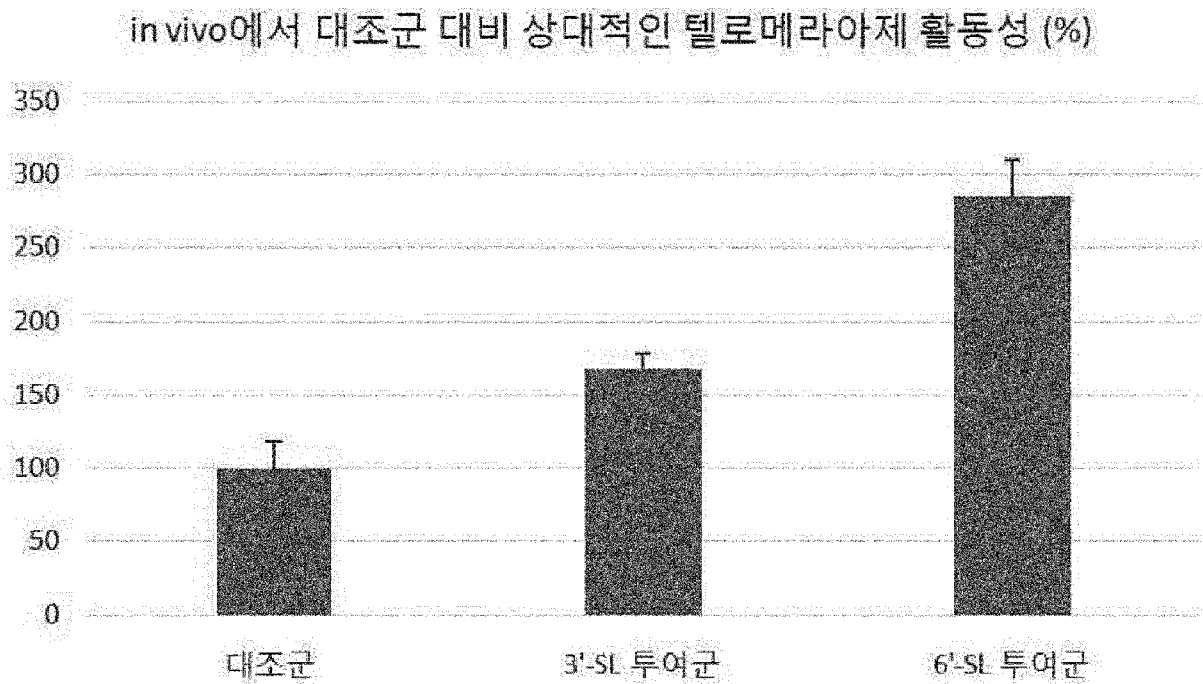
[도19a]



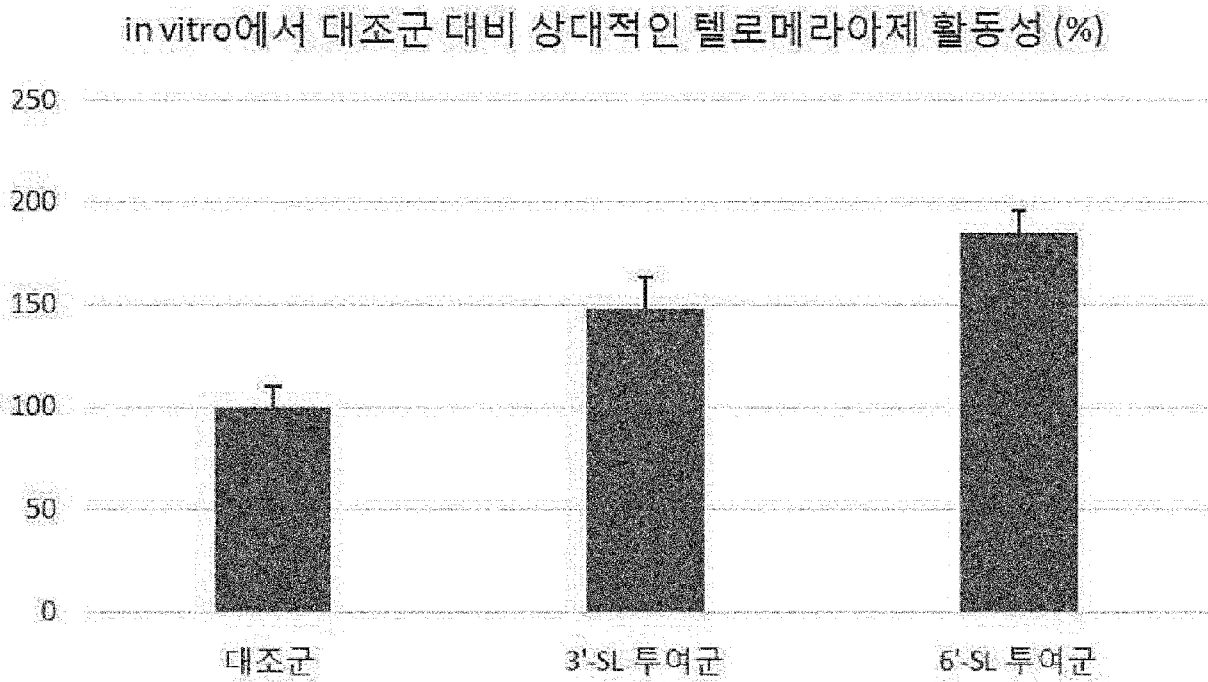
[도19b]



[도20a]

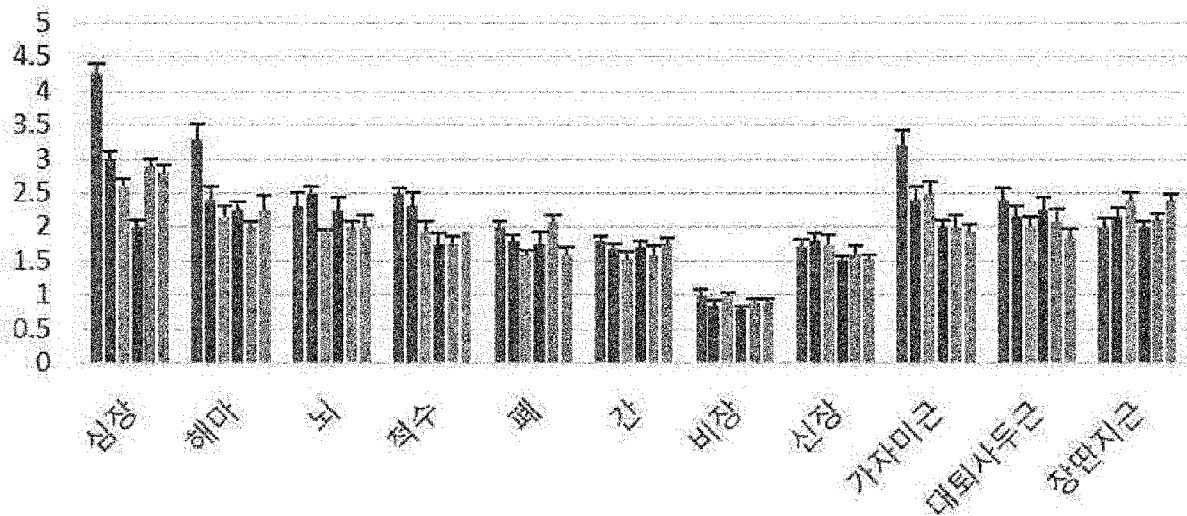


[도20b]



[도21a]

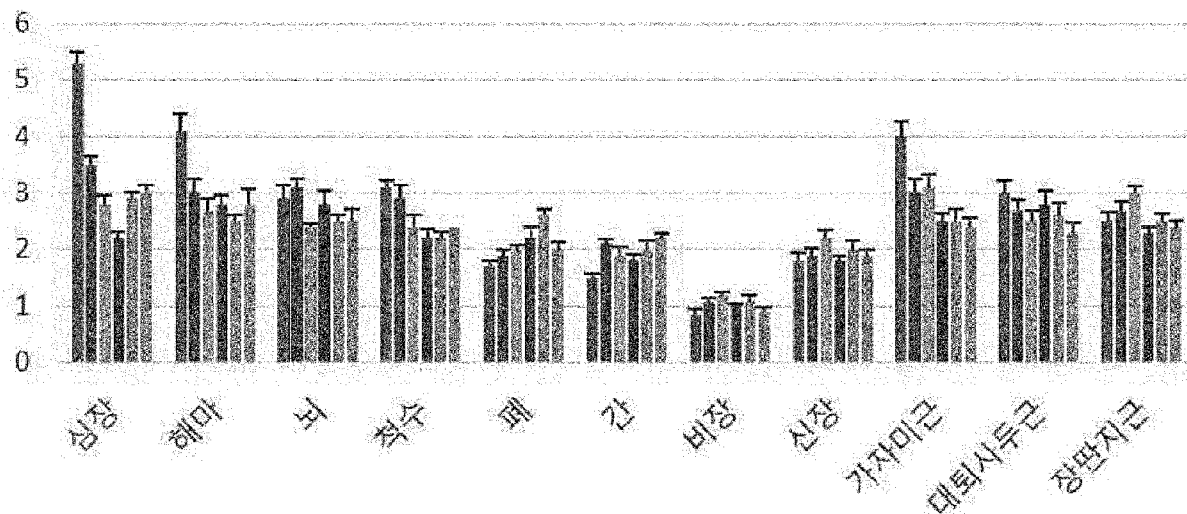
3'-SL 투여 전 대비 신체 부위별 상대적인 유전자 발현



좌측에서 우측순으로 ■ Fndc5 ■ PGC1a ■ Erra ■ UCP1 ■ SOD2 ■ GPX1

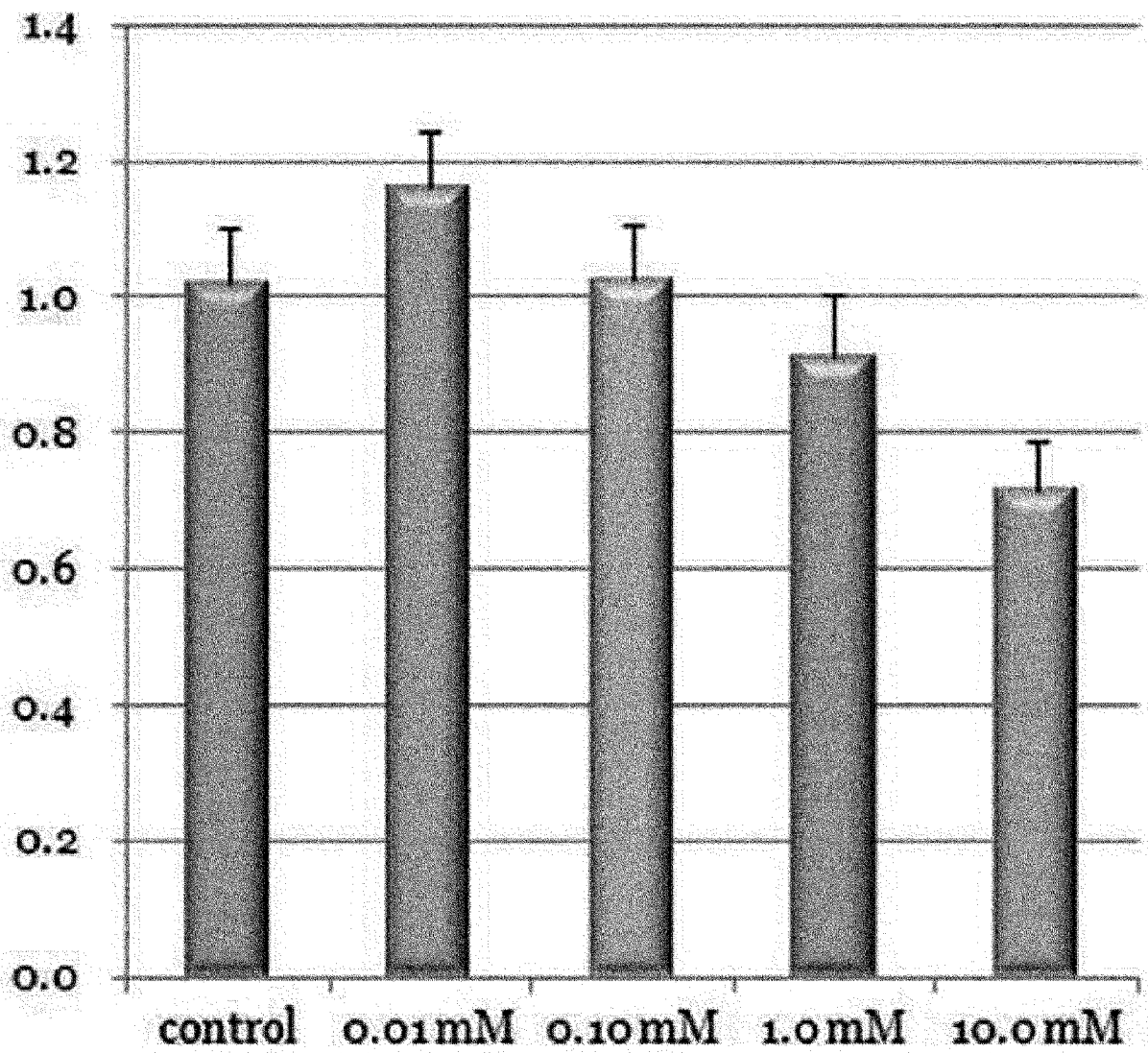
[도21b]

6'-SL 투여 전 대비 신체 부위별 상대적인 유전자 발현

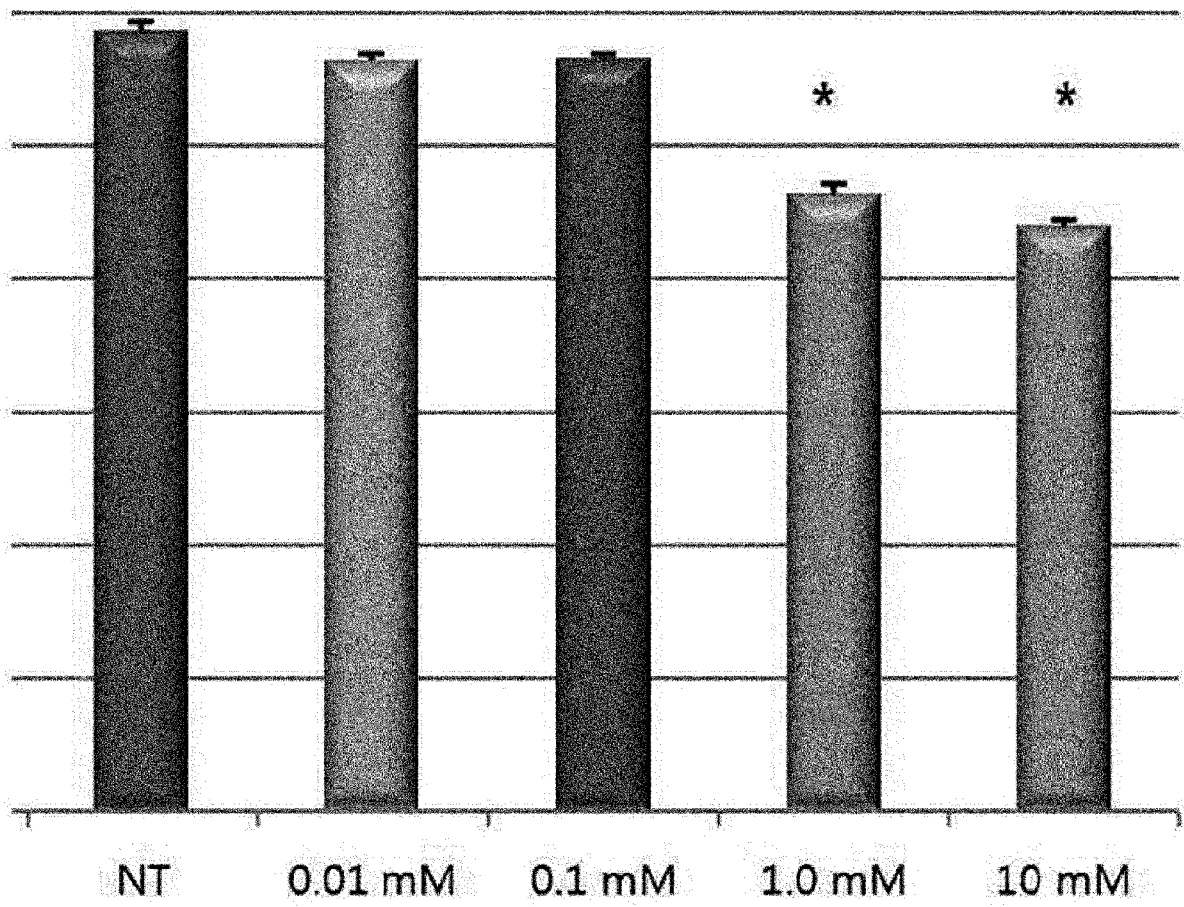


좌측에서 우측순으로 ■ Fndc5 ■ PGC1a ■ Erra ■ UCP1 ■ SOD2 ■ GPX1

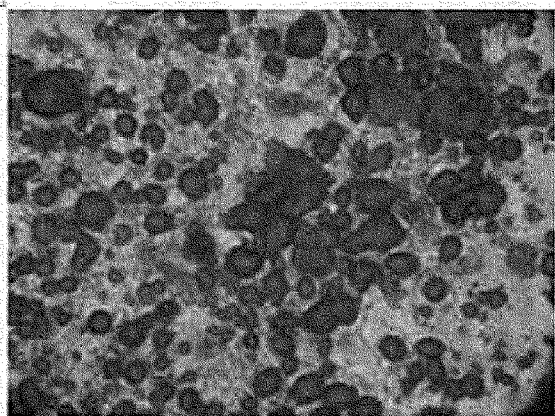
[도22a]



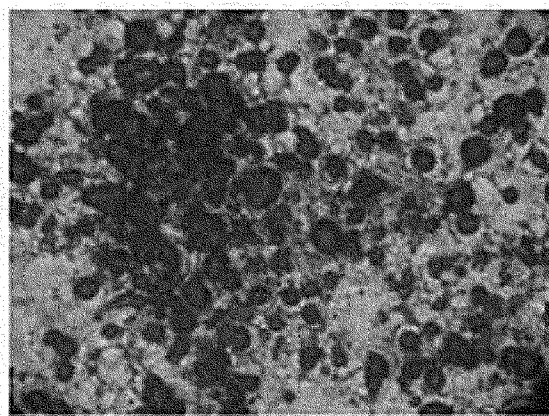
[도22b]



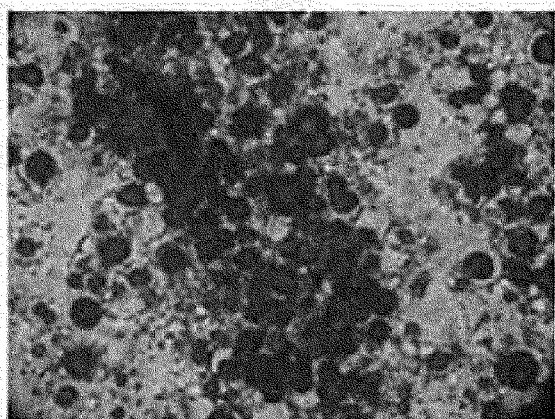
[도23a]



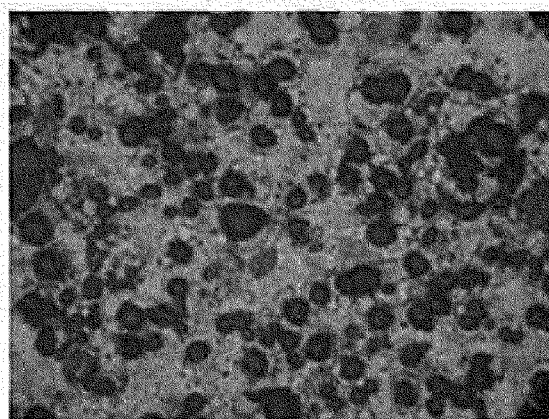
NT



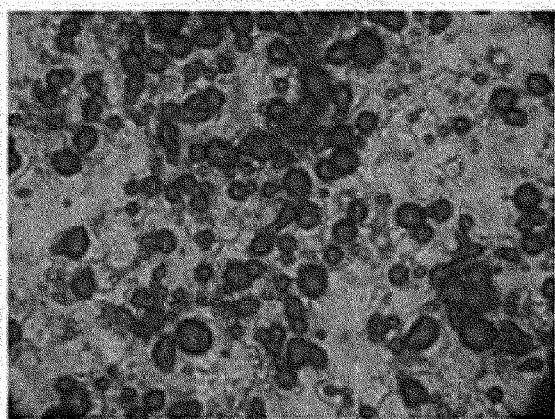
0.01 mM



0.10 mM

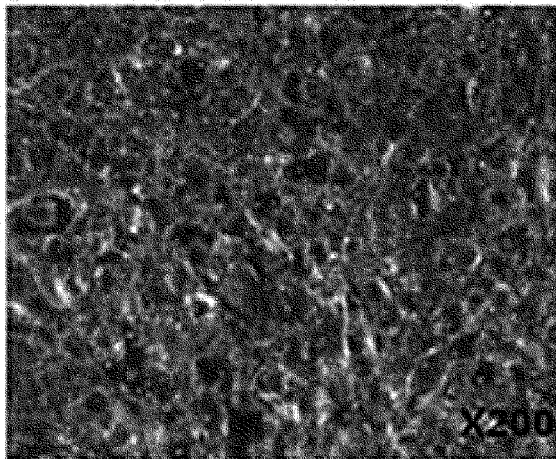


1.0 mM

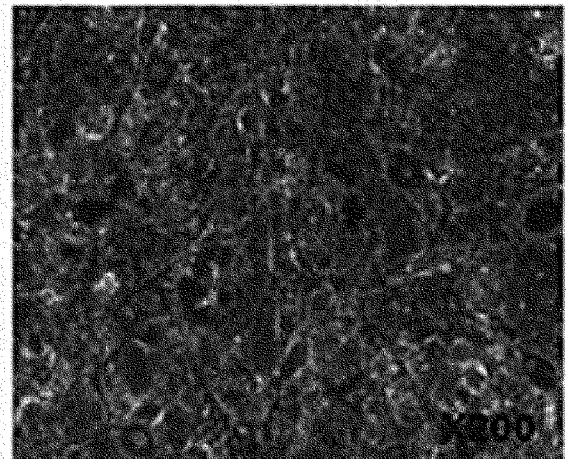


10.0 mM

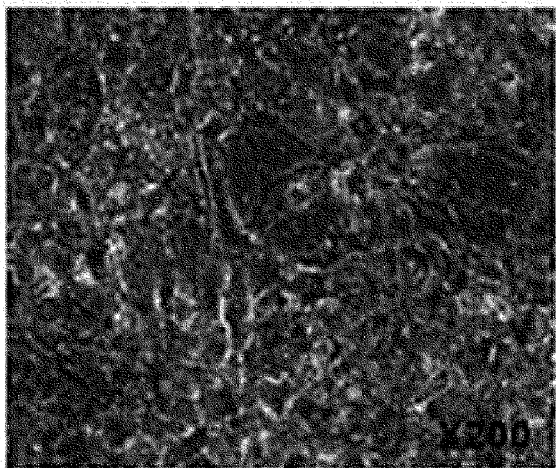
[도23b]



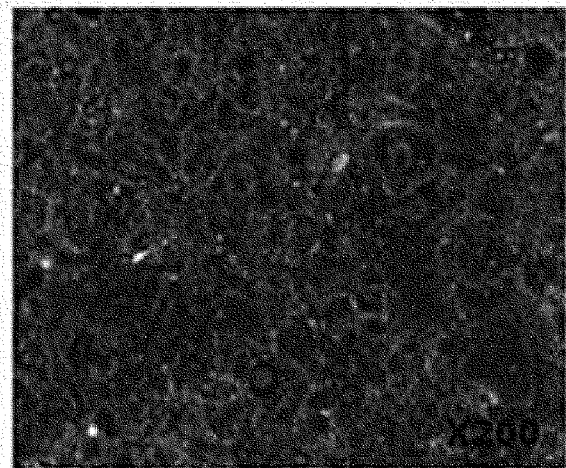
NT



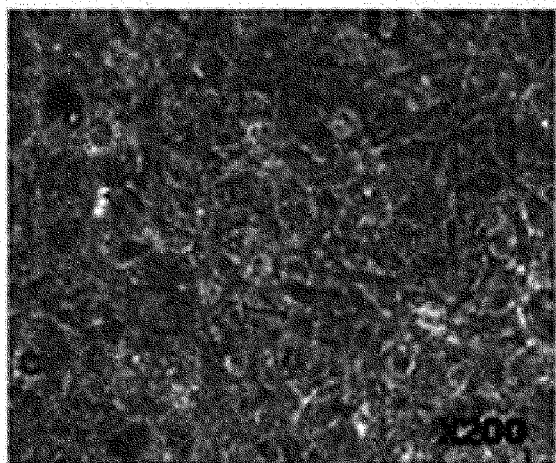
0.01mM



0.1mM

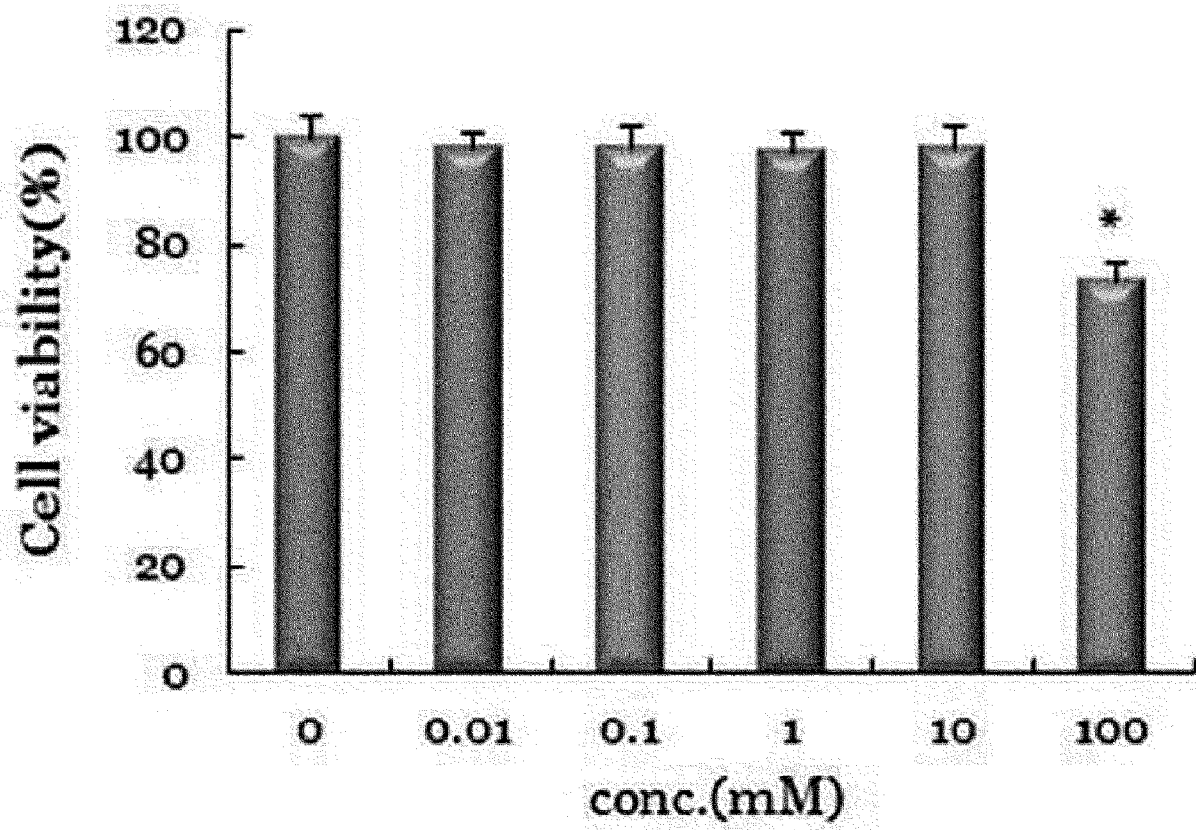


1mM

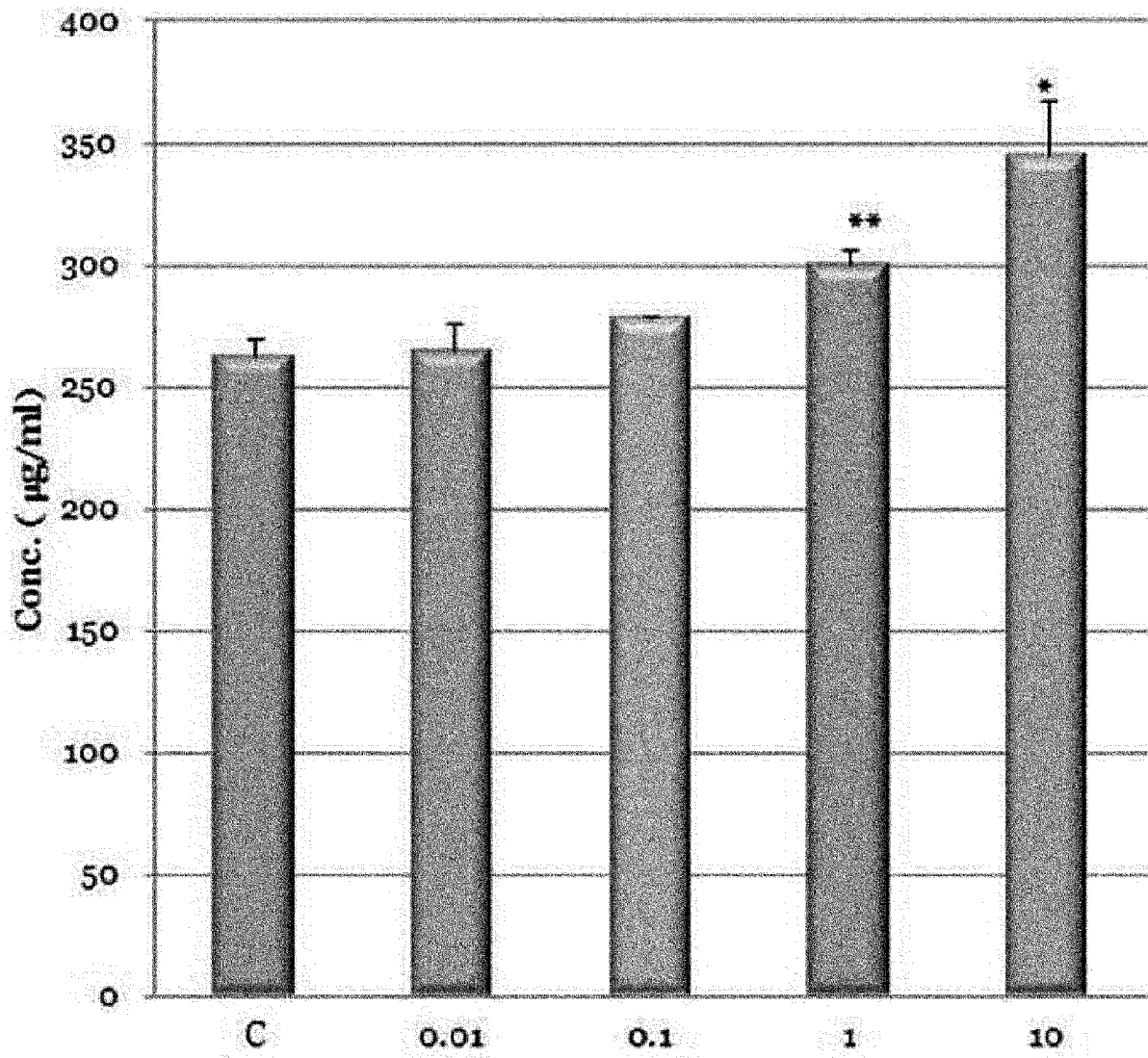


10mM

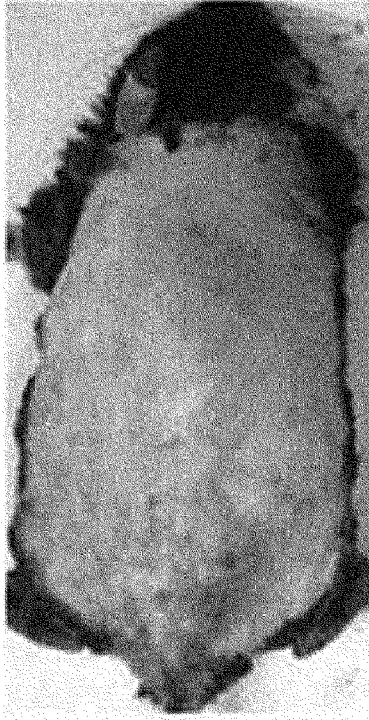
[도24]



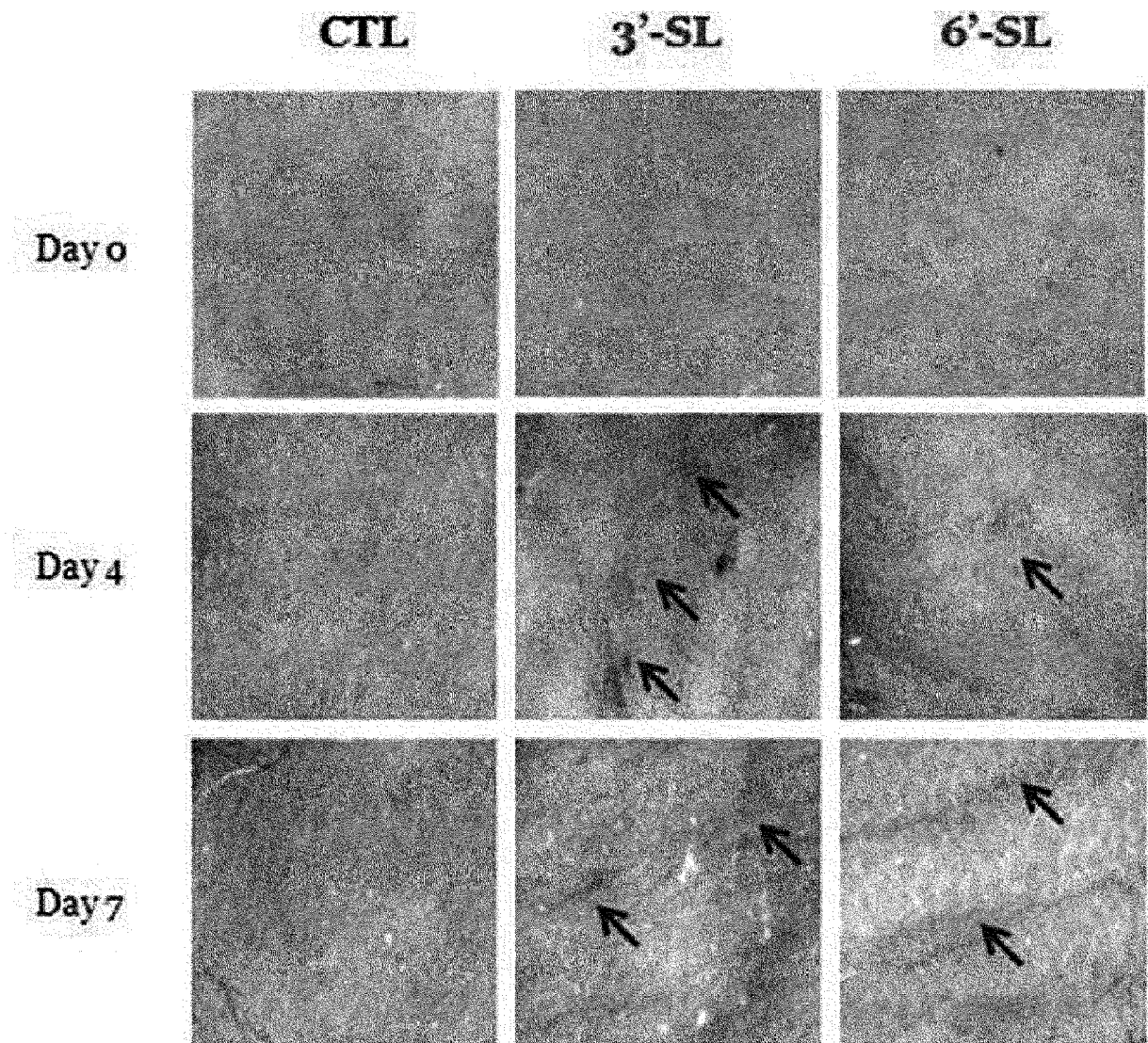
[도25]



[도26a]

CTL**3'-SL****6'-SL**

[도26b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000505

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7016(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A61K 8/14(2006.01)i, C07H 3/04(2006.01)i, C07H 13/02(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61K 9/51(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/7016; A61K 31/715; A61P 3/06; A61K 8/60; A61K 8/14; C07H 3/04; C07H 13/02; A61K 9/127; A61K 9/51; A23L 33/10; A61Q 19/08

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: sialic lactose, PGC-1α, human body fat, obesity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2010-0014098 A (BENEBIOSIS CO., LTD.) 10 February 2010 See abstract; claims 1-11; paragraphs [0031], [0056], [0077]-[0123].	27,45-54
Y		1-26
Y	LIANG, H. et al., "PGC-1α: a Key Regulator of Energy Metabolism", Advances in Physiology Education, 2006, vol. 30, pages 145-151 See abstract; figure 1.	1-26
A	TARR, A. J. et al., "The Prebiotics 3' Sialyllactose and 6' Sialyllactose Diminish Stressor-induced Anxiety-like Behavior and Colonic Microbiota Alterations: Evidence for Effects on the Gut-brain Axis", Brain, Behavior, and Immunity, 2015, vol. 50, pages 166-177 See the entire document.	1-27,45-54
A	YONEKAWA, T. et al., "Sialyllactose Ameliorates Myopathic Phenotypes in Symptomatic GNE Myopathy Model Mice", Brain, 2014, vol. 137, pages 2670-2679 See the entire document.	1-27,45-54



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 MAY 2017 (11.05.2017)

Date of mailing of the international search report

11 MAY 2017 (11.05.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000505

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHU, L. et al., "PGC-1 α is a Key Regulator of Glucose-induced Proliferation and Migration in Vascular Smooth Muscle Cells", PloS One, 2009, vol. 4, no. 1, paper no. e4182, inner pages 1-7 See the entire document.	1-27,45-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000505

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **55-66**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 55-66 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.: **33, 35, 38-40, 42, 44, 56-60**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 33 refers to itself, and thus the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. Therefore, claim 33 does not meet the requirement of PCT Article 6.
Claims 35, 38-40, 42, 44, and 56-60 refer to claims which violate the manner of claiming multiple dependent claims under PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: **28-32, 34, 36-37, 41, 43, 55**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The invention of group 1: claims 1-44 pertain to a composition for preventing or treating diseases or symptoms relating to reduction of PGC-1 α expression, the composition comprising a compound, which is represented by general formula I (S-(MS)p-(MS)q, in the general formula, S is a sialic acid, (MS)p and (MS)q are independently a monosaccharide residue), as an active component, and to a preparation method of the compound.

The invention of group 2: claims 27 and 45-54 pertain to a preparation method of a compound of general formula I (S-(MS)p-(MS)q, in the general formula, S is a sialic acid, (MS)p and (MS)q are independently a monosaccharide residue), and to a lipolysis composition comprising the compound.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/000505

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2010-0014098 A	10/02/2010	CN 102112134 A	29/06/2011
		CN 102112134 B	26/03/2014
		EP 2332552 A2	15/06/2011
		EP 2332552 B1	24/06/2015
		JP 2011-529877 A	15/12/2011
		JP 5566384 B2	06/08/2014
		US 2011-0135717 A1	09/06/2011
		WO 2010-013978 A2	04/02/2010
		WO 2010-013978 A3	27/05/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/7016(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A61K 8/14(2006.01)i, C07H 3/04(2006.01)i, C07H 13/02(2006.01)i, A61K 9/127(2006.01)i, A61K 9/51(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/7016; A61K 31/715; A61P 3/06; A61K 8/60; A61K 8/14; C07H 3/04; C07H 13/02; A61K 9/127; A61K 9/51; A23L 33/10; A61Q 19/08

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 시알락토오스, PGC-1a, 체지방, 비만

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2010-0014098 A (주식회사 베네비오) 2010.02.10 요약; 청구항 1-11; 단락 [0031], [0056], [0077]-[0123] 참조.	27,45-54
Y		1-26
Y	LIANG, H. 등, 'PGC-1a: a key regulator of energy metabolism' Advances in Physiology Education, 2006년, 30권, 페이지 145-151 초록; 도면 1 참조.	1-26
A	TARR, A. J. 등, 'The prebiotics 3' Sialyllactose and 6' Sialyllactose diminish stressor-induced anxiety-like behavior and colonic microbiota alterations: Evidence for effects on the gut-brain axis' Brain, Behavior, and Immunity, 2015년, 50권, 페이지 166-177 전체 문헌 참조.	1-27,45-54
A	YONEKAWA, T. 등, 'Sialyllactose ameliorates myopathic phenotypes in symptomatic GNE myopathy model mice' Brain, 2014년, 137권, 페이지 2670-2679 전체 문헌 참조.	1-27,45-54

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 05월 11일 (11.05.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 05월 11일 (11.05.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	<p>ZHU, L. 등, 'PGC-1α is a key regulator of glucose-induced proliferation and migration in vascular smooth muscle cells'</p> <p>PloS One, 2009년, 4권, 1호, 논문번호 e4182, 내부페이지 1-7</p> <p>전체 문헌 참조.</p>	1-27, 45-54

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 55-66
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 55-66은 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☒ 청구항: 33, 35, 38-40, 42, 44, 56-60
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 33은 자기 자신을 인용하고 있으므로, 발명의 보호를 받고자 하는 범위가 불명료 하여 PCT 제6조의 규정을 충족하지 않습니다.
청구항 35, 38-40, 42, 44 및 56-60은 PCT 규칙 6.4(a)에 따른 다중종속항 기재방식을 위반하고 있는 항을 인용합니다.
3. ☒ 청구항: 28-32, 34, 36-37, 41, 43, 55
이 청구항은 종속청구항이나 PCT 규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

제1군 발명: 청구항 1-44는 일반식 I (S-(MS)_p-(MS)_q, 상기 일반식에서, S는 시알산, (MS)_p 및 (MS)_q는 서로 독립적으로 단당류 잔기)로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 PGC-1 α의 발현 감소와 연관된 질병 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 조성물 및 상기 화합물의 제조방법에 관한 것이고

제2군 발명: 청구항 27, 45-54는 일반식 I (S-(MS)_p-(MS)_q, 상기 일반식에서, S는 시알산, (MS)_p 및 (MS)_q는 서로 독립적으로 단당류 잔기)의 화합물의 제조방법과, 상기 화합물을 포함하는 체지방 분해용 조성물에 관한 것입니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☒ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2010-0014098 A

2010/02/10

CN 102112134 A

2011/06/29

CN 102112134 B

2014/03/26

EP 2332552 A2

2011/06/15

EP 2332552 B1

2015/06/24

JP 2011-529877 A

2011/12/15

JP 5566384 B2

2014/08/06

US 2011-0135717 A1

2011/06/09

WO 2010-013978 A2

2010/02/04

WO 2010-013978 A3

2010/05/27



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108472305 A

(43)申请公布日 2018.08.31

(21)申请号 201780006641.X

(22)申请日 2017.01.13

(30)优先权数据

10-2016-0004383 2016.01.13 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2017/000505 2017.01.13

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/123066 KO 2017.07.20

(71)申请人 BENEBIOSIS株式会社

地址 韩国首尔

(72)发明人 康丞雨

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51)Int.Cl.

A61K 31/7016(2006.01)

A61K 8/60(2006.01)

A61K 8/14(2006.01)

C07H 3/04(2006.01)

C07H 13/02(2006.01)

A61K 9/127(2006.01)

A61K 9/51(2006.01)

A23L 33/10(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

权利要求书6页 说明书41页 附图28页

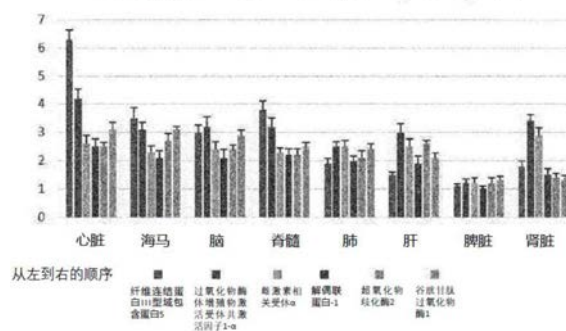
(54)发明名称

使过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达增加的组合物

(57)摘要

本发明涉及用于预防或治疗与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1- α :PGC1- α)的减少相关的疾病或症状,包含由下述通式I表示的化合物、其盐、或溶剂化物作为有效成分。

相对于给药6'-唾液乳糖前的各脏器的相对基因表达



1. 一种组合物,用于预防或治疗与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少有关的疾病或症状,其特征在于,包含由下述通式I表示的化合物、其盐、水合物或溶剂化物作为有效成分:

通式I: $S-(MS)_p-(MS)_q$,

在上述通式中,S为唾液酸,(MS) $_p$ 及(MS) $_q$ 相互独立地为单糖残基。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少有关的疾病或症状选自自由退行性神经疾病、代谢性疾病、局部脂肪去除及脂质代谢相关疾病、老化及由老化引起的疾病、肌肉减少及由肌肉减少引起的疾病组成的组中。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述化合物为 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc。

4. 根据权利要求2所述的组合物,其特征在于,上述退行性神经疾病选自自由阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化症、肌萎缩侧索硬化、假肥大型肌营养不良症、帕金森氏症、亨廷顿病、皮克氏病、库夫斯病、耳聋肌张力障碍综合征、威尔逊氏病、散发性阿尔茨海默病、散发性肌萎缩侧索硬化症、散发性帕金森氏症、自主功能改变、睡眠障碍、神经精神障碍、抑郁、精神分裂症、分裂情感性障碍、柯萨科夫精神病、躁症、焦虑症、恐惧症、学习或记忆障碍、失忆症或年龄相关的记忆丧失、注意力缺陷障碍、心境恶劣障碍、重性抑郁障碍、强迫性人格障碍、精神活性物质所致精神障碍、恐慌症、双相情感障碍、偏头痛、多动症及运动障碍组成的组中。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其特征在于,上述退行性神经疾病包括急性、亚急性或慢性神经变性疾病。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其特征在于,上述急性神经变性疾病包括脑卒中、脑梗死、脑出血、头部损伤或脊髓损伤,上述亚急性神经变性疾病包括脱髓鞘疾病、神经类副肿瘤性神经综合征、亚急性混合变性、亚急性坏死性脑炎、或亚急性硬化性脑炎。

7. 根据权利要求5所述的组合物,其特征在于,上述慢性神经变性疾病包括:

失忆症,包括老年痴呆、血管性痴呆、弥漫性白质病(宾斯万格病)、内分泌或代谢起源痴呆、头部创伤和弥漫性脑损伤引起的痴呆、拳击手痴呆及额叶痴呆;

运动神经细胞疾病,包括阿尔茨海默病、皮克氏病、弥漫性莱维小体病、进行性核上性麻痹(斯梯尔理查德森综合征)、多系统变性病、与神经变性相关的慢性癫痫状态、肌萎缩侧索硬化症、运动不协调、皮质基底节变性、肌萎缩侧索硬化-帕金森-痴呆综合征、亚急性硬化性全脑炎、亨廷顿病、帕金森氏症、共核蛋白病、原发性进行性失语症、纹状体黑质变性、马查多-约瑟夫病/脊髓小脑性共济失调、橄榄体脑桥变性;

朊病毒病,包括抽动秽语综合征、延髓性及假性延髓性麻痹、脊髓及脊髓延髓肌萎缩(肯尼迪病)、多发性硬化症、原发性侧索硬化症、遗传性挛缩性对麻痹、沃德尼格-霍夫曼病、库格尔贝格-韦兰德病、泰-萨克斯病、山德霍夫病、遗传性痉挛性疾病、沃尔法特-库格尔贝格-韦兰德病、痉挛性截瘫、进行性多病灶脑白质病、遗传性自主神经异常(赖利-戴综合征)、克罗伊茨费尔特-雅各布、格斯特曼-斯特劳斯勒-谢因克病、库鲁病及致命性遗传性失眠症;或

脑瘫。

8. 根据权利要求2所述的组合物,其特征在于,上述代谢性疾病、脂质代谢相关疾病、老化及由老化引起的疾病、肌肉减少(少肌症、恶病质)及由肌肉减少引起的疾病选自葡萄糖新生变化、软组织炎、女性乳房症、假性女性乳房症、脂肪营养不良、老化、光老化、皮肤外伤、伤害的再上皮化、皮肤脱水、干燥症、角质化障碍、硬茧、硬皮、扁平苔藓、与狼疮相关的皮肤病变、脂溢性皮炎、老年性皮炎、头皮、乳痂、皮脂漏、痤疮的过多皮脂漏、日光性皮炎、皮脂漏性角化症、老人角化症、光线角化症、光诱导角化病、毛囊角化病、普通痤疮、痣、成纤维细胞的功能变化、结节筋膜炎、硬皮病、杜普征氏掌挛缩、皮脂腺障碍、痤疮红斑痤疮、多形性痤疮、粉刺、多型症、红斑痤疮、结晶性囊肿性痤疮、聚合性痤疮、老年性痤疮、蛇皮癣、滤泡角化症、表皮松解掌跖角质化、白板症、粘膜苔癣、皮肤苔癣、湿疹、寻常疣、扁平疣、疣状表皮发育不良、口腔乳头状瘤病、红斑性狼疮、疱疹病、大疱性类天疱疮、硬皮病、光线角化症、色素沉着症、白斑症、斑秃、路易体病、神经纤维浓缩剂、罗森塔尔纤维、马洛里玻璃样变、重症肌无力症、抽动秽语综合征、多发性硬化症、肌萎缩性腋窝硬化症、进行性核上性麻痹、癫痫、克罗伊茨费尔特-雅各布病、耳聋-肌肉紧张综合症、雷氏病、莱伯遗传性视神经病、肌肉紧张异常、运动神经元疾病、神经病综合征、运动失调症及网膜色素变性症、母性遗传雷氏病、弗里德里希运动失调症、遗传性痉挛性大麻痹组成的组中。

9. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物选自溶液、悬浮液、糖浆剂、乳液、脂质体、散剂、粉末剂、颗粒剂、片剂、缓释制剂及胶囊剂组成的组中。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其特征在于,上述组合物为口服给药型组合物且为包含脂质体的药物载体或缓释制剂。

11. 根据权利要求9所述的组合物,其特征在于,上述组合物为非口服给药型组合物且为包含脂质体及超声造影剂的药物载体或缓释制剂。

12. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物为药剂学组合物、功能性化妆品组合物、功能性食品组合物或食品组合物。

13. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述盐为药剂学上能够接受的盐、化妆品学上能够接受的盐或食品学上能够接受的盐。

14. 根据权利要求12所述的组合物,其特征在于,上述组合物被掺入选自脂质体、混合脂质体、油质体、类脂质体、外来体、毫胶囊、微胶囊、纳米胶囊、纳米结构化的脂质载体、海绵、环糊精、小泡、胶束、表面活性剂的混合胶束、表面活性剂磷脂混合胶束、毫球、微球、纳米球、脂质球、微乳液、纳米乳液、小粒子、毫粒子、微粒子、纳米粒子及固体脂质纳米粒子组成的组中的食品学、化妆品学或药剂学传递系统或持续释放系统中。

15. 根据权利要求14所述的组合物,其特征在于,上述纳米胶囊为含有微乳液。

16. 根据权利要求14所述的组合物,其特征在于,用于局部、口服或非口服的适用。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其特征在于,局部适用由离子电泳法、超声波电泳法、电穿孔、机械压力、渗透压梯度、闭塞性管理、微注射法、借助压力的无针注射、使用微电子贴片、使用面膜或它们的任何组合来施行。

18. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物使过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达增加。

19. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物用于治疗 and/或管理皮肤。

20. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物用于减少脂肪组织的体积。

21. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物用于减少脂肪组织的甘油三酯含量。

22. 根据权利要求20或21所述的组合物,其特征在于,上述脂肪组织为皮下脂肪组织。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其特征在于,上述皮下脂肪组织为大腿部、胸、脖子底部、脖颈、臀部、脸、嘴唇、脸颊、眼皮和/或手的皮下脂肪组织。

24. 根据权利要求20或21所述的组合物,其特征在于,上述脂肪组织为包括由脂肪栓塞形成的脂肪组织在内的能够在身体中产生的所有脂肪组织。

25. 根据权利要求19所述的组合物,其特征在于,上述治疗和/或管理为减少、延缓和/或预防老化和/或光老化的迹象。

26. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物用于增加皮肤的温度。

27. 一种由下述通式I表示的化合物、其食品学、化妆品学或药剂学上能够接受的盐、或它们的混合物的制备方法,其特征在于,包括在固相或溶液中进行反应的步骤:

通式I: $S-(MS)_p-(MS)_q$,

在上述通式中,S为唾液酸,(MS)_p及(MS)_q相互独立地为单糖残基。

28. 一种食品、化妆品学或药剂学组合物,其特征在于,包括权利要求12至26所述的至少一种通式I、能够接受的盐的食品、化妆品学或药剂学有效量及至少一种食品、化妆品学或药剂学上能够接受的赋形剂或佐剂。

29. 根据权利要求12至26中任一项所述的组合物,其特征在于,通式I、它们的混合物和/或其食品、化妆品学或药剂学上能够接受的盐被确认为处于由滑石、膨润土、二氧化硅、淀粉及麦芽糊精形成的食品学、化妆品学或药剂学上能够接受的固体有机聚合物或吸附在固体矿物质支撑体上的状态。

30. 根据权利要求12至26、28及29中任一项所述的组合物,其特征在于,上述组合物以选自自由乳霜、多重乳液、无水组合物、水性分散液、油、牛奶、香脂、泡沫、乳液、凝胶、乳霜、凝胶、水醇溶液、乙二醇溶液、水凝胶、擦剂、树液、肥皂、洗发水、护发素、精华液、软膏、摩丝、润发油、散粉、杆、笔、喷雾、气雾剂、胶囊、明胶胶囊、软胶囊、硬胶囊、片剂、糖衣片、颗粒、口香糖、溶液、悬浮液、乳液、糖浆、酞剂、多糖类膜、阿胶及明胶组成的组中的剂型来提供。

31. 根据权利要求12至26、28及29中任一项所述的组合物,其特征在于,上述组合物被确认为处于掺入选自自由眼部遮瑕膏、化妆粉底、卸妆乳液、卸妆霜、眼影、口红、唇彩、护唇剂及粉饼组成的组中的产品中的状态。

32. 根据权利要求12至26、28及29至31中任一项所述的组合物,其特征在于,通式I、它们的混合物和/或其食品、化妆品学或药剂学上能够接受的盐被掺入织物、无纺布或医疗装置中。

33. 根据权利要求33所述的组合物,其特征在于,上述织物、无纺布或医疗装置选自绷带、纱布、T恤衫、紧身衣、袜子、内衣、腰带、手套、尿布、卫生巾、敷料、床铺、湿巾、粘性贴剂、无粘性贴剂、闭塞贴剂、微电贴剂及面膜组成的组中。

34. 根据权利要求12至26、28及29中任一项所述的组合物,其特征在于,上述组合物还包含选自自由其他过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 调节剂、其他过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ 调节剂、减少脂肪细胞的甘油三酯含量的制剂、推迟脂肪细胞分化的制剂、脂肪分解剂或脂肪分解刺激剂、抗脂肪团剂、脂肪生成剂、乙酰胆碱-受体凝集抑制剂、

肌肉收缩抑制剂、抗胆碱性抑制剂、胰肽酶抑制剂、底物金属蛋白分解酶抑制剂、黑色素合成刺激剂或抑制剂或脱色剂、色素原沉着剂、日晒黑剂、抗老化剂、NO-合成酶抑制剂、5 α -还原酶抑制剂、赖氨酰羟化酶和/或脯氨酰羟化酶抑制剂、抗氧化剂、与自由基捕捉剂和/或对空气污染的制剂、反应性羰基类捕捉剂、抗糖化剂、抗组胺剂、抗病毒剂、抗寄生虫剂、乳化剂、软化剂、有机溶剂、液体推进剂、皮肤调理剂、湿润剂、保湿物质、 α 羟酸、 β 羟酸、保湿剂、表皮水解酶、维生素、氨基酸、蛋白质、色素或着色剂、染料、生物聚合物、凝胶聚合物、增稠剂、表面活性剂、柔软剂、乳化剂、结合剂、防腐剂、防皱剂、能够减少或治疗眼底下垂的制剂、皮肤剥离剂、角质剥离剂、角质溶解剂、抗菌剂、抗真菌剂、抑制真菌剂、消毒剂、抑菌剂、真皮或刺激剂、弹性蛋白合成刺激剂、核心蛋白聚糖合成刺激剂、层粘连蛋白合成刺激剂、防御素合成刺激剂、伴侣蛋白合成刺激剂、环磷酸腺苷合成刺激剂、热冲击蛋白质、HSP70合成刺激剂、热冲击蛋白质合成刺激剂、水通道蛋白合成刺激剂、透明质酸合成刺激剂、纤维连接蛋白合成刺激剂、长寿蛋白合成刺激剂、角质层的成分及脂质的合成刺激剂、神经酰胺、脂肪酸、胶原分解抑制剂、弹性蛋白分解抑制剂、丝氨酸蛋白质分解酶抑制剂、成纤维细胞增殖刺激剂、角质细胞增殖刺激剂、黑色素细胞增殖刺激剂、角质细胞分化刺激剂、乙酰胆碱酯酶抑制剂、皮肤松弛剂、糖胺聚糖合成刺激剂、抗过多角化症剂、粉刺溶解剂、脱氧核糖核酸收复剂、脱氧核糖核酸保护剂、稳定化剂、止痒剂、用于治疗/或管理敏感皮肤的制剂、固化剂、再缩合剂、再结构化剂、抗妊娠纹剂、结合剂、皮脂生成调节剂、抗发汗剂、治愈刺激剂、辅助愈合剂、再上皮化刺激剂、辅助再上皮化剂、细胞因子生长因子、镇静剂、抗炎剂、麻醉剂、对毛细血管循环和/或微循环起作用的制剂、血管渗透性抑制剂、静脉紧张剂、作用于细胞代谢的制剂、用于改善真皮表皮结合的制剂、头发生长诱导剂或延迟剂、芳香剂、螯合剂、植物提取物、精油、海洋提取物、从生物发酵工序获得的制剂、矿物盐、细胞提取物、对防晒及紫外线A和/或B具有活性的有机或矿物光保护剂或它们的混合物形成的组中的至少一种佐剂的食物、化妆品学或药剂学有效量。

35. 根据权利要求34所述的组合物,其特征在于,上述佐剂来源于合成或植物提取物或者从生物发酵工序或合成及生物技术工序的组合。

36. 根据权利要求34或35所述的组合物,其特征在于,上述组合物额外地还包含至少一种抗糖尿病剂的药剂学有效量。

37. 根据权利要求35或36所述的组合物,其特征在于,上述佐剂选自使脂肪组织的甘油三酯含量的增加或减少的制剂、使脂肪细胞的分化增加或延缓的制剂、脂肪分解剂和/或静脉紧张剂组成的组中。

38. 根据权利要求37所述的组合物,其特征在于,上述使脂肪组织的甘油三酯含量的增加或减少的制剂、推迟脂肪细胞分化的制剂、抗脂肪团剂、脂肪分解剂和/或静脉紧张剂选自毛喉素、咖啡因、七叶素、肉毒碱、辅酶A、脂肪酶、海罂粟碱、七叶树素、维司那定、洋菝葜皂甙元、咖啡树的提取物、毛喉鞘蕊花的提取物、知母的提取物及水、甘油、卵磷脂、屠户扫帚树(假叶树)的提取物、麦芽糊精、二氧化硅、三乙醇胺氢碘酸盐、丙二醇、常春藤(洋常春藤)的提取物、肉毒碱、七叶素、三肽-1、黄原胶、卡拉胶(角叉菜)及乙二胺四乙酸二钠的混合物组成的组中。

39. 根据权利要求38所述的组合物,其特征在于,上述佐剂选自固化剂、再缩合剂及再结构化剂组成的组中。

40. 根据权利要求39所述的组合物,其特征在于,上述固化剂、再缩合剂及再结构化剂选自自由假交替单胞菌发酵提取物、三肽-10瓜氨酸、乙酰精氨酸色氨酸二苯甘氨酸、六肽-10及假交替单胞菌发酵提取物、水解小麦蛋白、水解大豆麦蛋白、三肽-10瓜氨酸及三肽-1的混合物组成的组中。

41. 根据权利要求39或40所述的组合物,其特征在于,上述佐剂选自抗妊娠纹剂。

42. 根据权利要求41所述的组合物,其特征在于,上述抗妊娠纹剂选自落得打的提取物、玫瑰果的提取物、麝香玫瑰的提取物、锈红蔷薇的提取物及水、辛酸/辛酸葡萄糖苷、卵磷脂、甘油、假交替单胞菌发酵提取物、乙酰三肽-30瓜氨酸、五肽-18、黄原胶及辛二醇的混合物组成的组中。

43. 根据权利要求41或42所述的组合物,其特征在于,上述佐剂选自防皱剂或抗老化剂。

44. 根据权利要求43所述的组合物,其特征在于,上述防皱剂或抗老化剂选自自由乙酰六肽-8、酰基七肽-4、乙酰八肽-3、五肽-18、乙酰六肽-30、水解小麦蛋白及水解大豆麦蛋白及三肽-1的混合物、二氨基丙酰三肽-33、三肽-10瓜氨酸、假交替单胞菌发酵提取物及水解小麦蛋白及水解大豆麦蛋白及三肽-10瓜氨酸及三肽-1的混合物、乙酰四肽-5、乙酰三肽-30瓜氨酸、乙酰精氨酸色氨酸二苯甘氨酸、乙酰四肽-22、二甲基甲氧基色原烷醇、二甲基甲氧基甘氨酸棕榈酸酯、假交替单胞菌发酵提取物、赖氨酸盐酸及卵磷脂及三肽-9瓜氨酸的混合物及赖氨酸盐酸及卵磷脂及三肽10瓜氨酸的混合物组成的组中。

45. 一种体脂肪分解用组合物,其特征在于,包含由下述通式I表示的化合物作为有效成分:

通式I: $S-(MS)_p-(MS)_q$

在上述通式中,S为唾液酸,(MS)_p及(MS)_q相互独立地为单糖残基。

46. 根据权利要求45所述的组合物,其特征在于,在上述通式I中,(MS)_p为半乳糖,(MS)_q为葡萄糖。

47. 根据权利要求46所述的组合物,其特征在于,上述通式I的化合物为唾液乳糖。

48. 根据权利要求46所述的组合物,其特征在于,上述唾液乳糖为 α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc或 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc。

49. 根据权利要求48所述的用组合物,其特征在于,上述唾液乳糖为 α -NeuNAc-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc。

50. 根据权利要求45所述的组合物,其特征在于,上述组合物为药剂学组合物。

51. 根据权利要求45所述的组合物,其特征在于,上述组合物为选自溶液、悬浮液、糖浆剂、乳液、脂质体、散剂、粉末剂、颗粒剂、片剂、缓释制剂及胶囊剂组成的组中的剂型。

52. 根据权利要求51所述的组合物,其特征在于,上述组合物为非口服给药型组合物且为脂质体或缓释制剂的剂型。

53. 根据权利要求51所述的组合物,其特征在于,上述组合物为口服给药型组合物且为脂质体或缓释制剂的剂型。

54. 根据权利要求45所述组合物,其特征在于,上述组合物为功能性食品组合物或食品组合物。

55. 一种预防或治疗与客体中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减

少相关的疾病或症状的方法,其特征在于,包括向需要权利要求1至44中的任一项组合物的客体给药的步骤。

56.根据权利要求55所述的预防或治疗在客体中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少相关的疾病或症状的方法,其特征在于,在上述给药步骤之前,还包括从客体分离的试样测定细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平的步骤。

57.根据权利要求56所述的预防或治疗在客体中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少相关的疾病或症状的方法,其特征在于,观察相对于正常对照组的上述过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平是否有所减少,在减少的情况下,对上述客体施行上述给药的步骤。

58.根据权利要求57所述的预防或治疗在客体中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少相关的疾病或症状的方法,其特征在于,上述正常对照组为从正常人或不显示与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平的减少相关的疾病或症状的客体获得的细胞。

59.根据权利要求56所述的预防或治疗在客体中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少相关的疾病或症状的方法,其特征在于,上述试样从特定组织或器官获得。

60.根据权利要求55所述的预防或治疗在客体中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少相关的疾病或症状的方法,其特征在于,上述给药是向上述所测定的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平相对于对照组有所减少的特定组织局部给药。

61.一种在客体中分解体脂肪的方法,其特征在于,包括将权利要求45至54中的任一项所述的组合物施用于有需要的客体的步骤。

62.根据权利要求61所述的在客体中分解体脂肪的方法,其特征在于,在上述给药步骤之前,还包括从客体分离的试样测定细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平的步骤。

63.根据权利要求62所述的在客体中分解体脂肪的方法,其特征在于,观察相对于正常对照组上述过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平是否有所减少,在减少的情况下,对上述客体施行上述给药的步骤。

64.根据权利要求63所述的在客体中分解体脂肪的方法,其特征在于,上述正常对照组为从正常人或不显示与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平的减少相关的疾病或症状的客体获得的细胞。

65.根据权利要求62所述的在客体中分解体脂肪的方法,其特征在于,上述试样从特定组织或器官获得。

66.根据权利要求61所述的在客体中分解体脂肪的方法,其特征在于,上述给药是向上述所测定的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平相对于对照组有所减少的特定组织局部给药。

使过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达增加的组合物

技术领域

[0001] 本专利申请对2016年1月13日在韩国专利厅提出的韩国专利申请第10-2016-0004383号主张优先权,上述专利申请的公开内容作为参照并入本说明书中。

[0002] 本发明提供用于预防或治疗根据过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 表达减少的由线粒体功能下降引起的多种疾病的组合物。

背景技术

[0003] 细胞的命运由用于维持细胞生存的因子和用于死亡的因子的均衡及组合来调节。若传递促进细胞死亡的因子的信号,则细胞死亡的过程通过各种指定的途径来开始,但是其典型的过程为细胞凋亡(apoptosis)。以染色质的凝缩与核分裂的明显的形态的变化过程为特征的细胞凋亡的凋亡过程是通过基于在线粒体内膜分泌的凋亡促进因子的分泌的半胱天冬酶(caspase)酶的活性来进行,此过程在线粒体外膜开始渗透时发生(Galluzzi et al.,2007;Kroemer et al.,2009) [1] (Chipuk et al.,2010;Youle and Strasser,2008) [2]。通过这种线粒体的细胞凋亡由多种刺激引起,如胚胎学计划、脱氧核糖核酸损伤、缺乏生长因子和营养素、病毒感染、氧化应激(Youle and Strasser,2008) [3]。但是,异常诱导细胞凋亡的过程是明确疾病的根源。例如,若异常诱导细胞凋亡,则会诱发神经退化、缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury)、自身免疫性疾病等(Fadeel and Orrenius,2005) [4]。为此,最近的研究结果表明,在细胞的凋亡与生存中,确认可能导致过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的功能和过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的调节状态的各种疾病。

[0004] 1.神经退行性疾病

[0005] 阿尔茨海默(AD)、帕金森氏症(PD)、亨廷顿病(HD)、肌萎缩侧索硬化(amynotophic lateral sclerosis;ALS)等神经退行性疾病由多个神经细胞的功能逐渐丧失和细胞凋亡引起的(Jones et al.,2012) [5]。这些疾病的总体征兆是基于特定部分的神经细胞的损失。可知,作为在过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 基因敲除(knock-out)小鼠中看到的由神经退化引起的活动过度(hyperactivity)和与少出现在大脑皮质部位的损伤部位不同显著出现在脑纹状体的损伤部位,过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 与对这种神经退行性疾病直接相关(Lin et al.,2004) [6]。并且,随着这些发现,可通过确认出现在过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 基因敲除小鼠的中枢神经系统中的液泡损伤(vacuolar lesion),来知道过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 对维持神经细胞功能起到重要的作用(Leone et al.,2005) [7]。

[0006] 阿尔茨海默的病理生理学现象,如阿尔茨海默患者大脑的线粒体的氧化功能障碍、生成减少、脑功能下降基于线粒体功能损伤(Chaturvedi&Flint,2013) [8]。尤其,阿尔茨海默患者的大脑的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 表达量可能减少,这导致线粒体的生成和功能降低以及由于氧化应激而引起的神经细胞凋亡的结果(Katsouri

ey al.,2011;Qin et al.,2009) [9,10]。过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少分解切割诱发阿尔茨海默的淀粉样蛋白的前蛋白,从而使生成 β 淀粉样蛋白的 β 位淀粉样前体蛋白裂解酶1 (BACE1) 的表达增加,进而通过增加 β 淀粉样蛋白的量来诱发线粒体的功能下降和细胞凋亡(Wang et al.,2013) [11]。

[0007] 过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的基因 (PPARGC1A) 的单碱突变与患帕金森氏症和亨廷顿病的危险因素的增加有显著相关性(Clark et al.,2011;Weydt et al.,2009) [12,13]。不仅在小鼠亨廷顿病模型中而且阿尔茨海默、帕金森氏症、亨廷顿病患者的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 基因表达减少(Cui et al.,2006;Qin et al.,2009;Ranganathan et al.,2009;Weydt et al.,2006;Xiang et al.,2011;Zheng et al.,2010) [14-19]。因此,在亨廷顿病模型细胞培养中,人为的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达显著降低神经细胞的凋亡(Chaturvedi et al.,2009) [20]。并且,过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的过表达提高通过肌萎缩侧索硬化模型小鼠的运动神经元的运动功能(Zhao et al.,2011) [21]。由于与这种神经退行性疾病密切相关的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的功能,因此以药理学方式活化过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的机制被成为治愈多种神经退行性疾病的新的方法。

[0008] 2. 基于活性氧组 (ROS) 的老化现象

[0009] 对在过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1-氧化应激情况下开始防御机制起到重要的作用(Chaturvedi&Flint,2013) [22]。这与神经退行性疾病中的功能正好对上,线粒体的呼吸机制相关复合体和解偶联(uncoupling) 蛋白质(UCP) 的量根据过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 过表达增加(St-Pierre et al.,2003) [23]。这种增加与解毒线粒体和细胞质内的活性氧组的蛋白质组的表达的增加一同进行(Cowell et al.,2009) [24]。首次表明活性氧组代谢中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的作用的研究是报告如下内容的论文,即,若在肌肉细胞中异位(ectopic) 表达过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α ,则去除超氧化物(superoxide) 的超氧化物歧化酶2 (superoxide dismutase 2,SOD2) 与去除过氧化氢(hydrogen peroxide) 的谷胱甘肽过氧化物酶1(glutathione peroxidase 1,GPX1) 的表达增加(St-Pierre et al.,2003) [23]。此后,通过进展的研究调查了存在于各种细胞内器官的所有种类的ROX解毒酶,如线粒体、细胞质、过氧化物酶体是否通过过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 来进行调节(St-Pierre et al.,2006;Valle et al.,2005) [25,26]。这些研究还表明了过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 调节的活性氧组代谢计划的生理重要性。另一方面,在抑制过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达的情况下,由于抑制活性氧组解毒蛋白质组的增加,因此可知,在氧化应激情况下,过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 执行细胞保护功能(St-Pierre et al.,2006) [25]。

[0010] 并且,细胞的老化或生命体的老化现象导致多个老化相关慢性疾病,例如,退行性脑疾病、代谢相关疾病、心血管疾病。这些疾病使由活性氧组引起的应激、无菌炎症(sterile inflammation)、线粒体功能障碍、脱氧核糖核酸损伤、端粒(telomere) 功能障碍及长度变短的现象增加。到目前为止,对这些现象的共同基质的理解不完整,但是,最近发表了一篇论文,其显示若去除过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α ,则端粒的长度

变短且引发脱氧核糖核酸的损伤,从而导致血管的老化及动脉粥样化性动脉硬化症(Xiong,S 2015) [27]。在此论文中,若去除过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α ,则保持端粒的长度的端粒逆转录酶(telomere reverse transcriptase,TERT)的活性及表达量减少,而p53的表达量及活性增加。此研究表明,过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 对改善老化及基于其的慢性疾病起到重要的作用。

[0011] 3. 心血管疾病或心脏肌肉相关

[0012] 过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的抗氧化功能还与血管内皮的保护有关。如在神经模型中一样,当增加人血管内皮细胞中的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 表达时,进行线粒体的生成和活性氧组解毒酶组增加(Valle et al.,2005) [26]。当将活性氧组施加到牛的内皮细胞时,进行过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的增加与细胞中抗氧化功能的增加(Borniquel et al.,2006) [28]。在人血管内皮细胞中过表达过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 后,在施加人为的氧化应激的情况下,细胞中活性氧组的增加减少且抑制蛋白酶3(caspase 3)的活性(Valle et al.,2005) [26]。在小鼠过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 和小鼠过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- β 双基因敲除(PGC-1 β double knock-out)模型中出生后主要死亡原因为心力衰竭(Lai et al.,2008) [29],在充血性心力衰竭(congestive heart failure)小鼠模型中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的减少与应激性心力衰竭和心肌细胞凋亡有关(Garnier et al.,2003) [30]。像这样,过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 在心肌细胞的代谢和生长中起到重要的作用。

[0013] 4. 肌肉损失及相关疾病

[0014] 过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的抗氧化功能还与肌肉的维持强度功能有关。若肌肉的量减少、功能下降(老年肌肉损失症、少肌症(Sarcopenia)、或肌肉功能障碍),则从激素相关疾病到细胞内稳态维持在非常广泛的范围产生不利影响。已被多项研究揭示,如在神经模型中一样,若在肌肉细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达增加(运动或基因表达),则成为肌肉损失的原因的线粒体功能障碍得到缓解,从而可维持肌肉[31-38]。

[0015] 5. 去除脂肪及保持体温

[0016] 在缺失过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的小鼠中线粒体基因的表达减少,但是,其中包含有起到电子传递体系(ETC)的部件作用的多种基因,从而降的呼吸(Lin et al.,2004;Leone et al.,2005) [6,7]。此降低的线粒体功能损害了依赖于线粒体的代谢过程的多个生理学过程。实际上,当缺失这种过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的小鼠暴露在寒冷中时,不可能增加解偶联蛋白-1(UCP1)的表达,因此具有对寒冷敏感的反应(Lin et al.,2004;Leone et al.,2005) [6,7]。与正常的鼠相比,这些小鼠的运动能力下降(Leone et al.,2005) [7]。与缺失这种过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的小鼠相反,在心脏和肌肉中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 过表达的转基因小鼠的情况下,线粒体生成增加且线粒体基因的表达也增加(Lehman et al.,2000;Lin et al.,2002b;Wende et al.,2007)。这些研究表明,在活体中根据过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的有无对线粒体的生理起到重要的作用。并且,若在类似棕色脂肪前体细胞(米色或(Beige)白棕色脂肪前体细胞(brite preadipocytes))中过氧

化酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 增加,则类似棕色脂肪细胞分化为棕色脂肪细胞,通过氧化脂肪酸来增加从身体散发出热量的功能,而不是生成腺苷三磷酸(ATP)。并且,还具有去除脂肪的功能[39-42]。

[0017] 众所周知,皮下脂肪由脂肪团(cellulite)包围的颗粒层构成。这种皮下脂肪的特性在于,不易通过运动来分解。这是因为体内的脂肪分解酶被脂肪团阻隔。因此,以往流行通过插入被称为针的导液管来物理洗去脂肪细胞的手术,但是,由于这种手术法会给被手术者带来痛苦,因此先进行全身麻醉。然而,不可能排除全身麻醉对被手术者起到危险因素的作用,当插入导液管时,不可避免内部出血及由此引起的组织的恢复时间变长。

[0018] 利用注射的脂肪分解(Injection lipolysis)是通过在脂肪部位直接皮下注射可分解脂肪的药物来溶解脂肪并将其排出的方法,作为典型的产品包括被称为磷脂酰胆碱(PPC)注射的保脂妥(Lipostabil®)、溶脂针(Lipodissolve)、脂溶消除(Lipo-zap)、松弛戳刺(Flab-Jab)。这些磷脂酰胆碱注射剂由磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)和将其保持为液相的脱氧胆酸(deoxycholic acid)构成,是作为肝昏迷治疗佐剂首次批准的专门医药品,用于肝硬变引起的昏迷的患者。但是,随着磷脂酰胆碱被注射被公知为在肥胖区注射时通过分解脂肪细胞来得以减肥,被滥用为未经批准的去除脂肪剂。磷脂酰胆碱是构成细胞膜的主要物质,具有使脂肪成分很好地溶解在血液中的效果,并且具有通过溶解脂肪组织的脂肪细胞来将其中的脂肪释放在细胞外的效果来使用。理论上认为,磷脂酰胆碱注射可使用于局部有限的少量的皮下脂肪去除、脂肪团去除,但并不是磷脂酰胆碱注射本身去除脂肪。并且,没有揭示磷脂酰胆碱注射的作用机制。对于磷脂酰胆碱注射的研究结果依赖于大多数患者的主观评价,然而没有客观示出皮下脂肪量的变化的研究结果。美国食品药品监督管理局(FDA)由于对磷脂酰胆碱注射的功效率和安全性资料不足,而不批准在减少皮下脂肪中使用磷脂酰胆碱,由此警告盲目使用。并且,具有报告对脂肪肝炎、皮肤及呼吸体系有副作用的文献。

[0019] 为此,本发明人为了克服这种医药品的副作用和慢性疾病的问题点,致力于开发可安全分解体脂肪的物质。

[0020] 6. 老化相关

[0021] 老化是包括随时间引起的一些变化的复杂且由互不相同的种类(各种各样的(heterogeneous))形成的状态。实际上,在无法满足旺盛的需求(energetic demands)的情况下,在一些生理过程中的功能障碍和增加的应激有助于老化状态。线粒体一直处于老化论的中心,因为线粒体的功能随着老化通常减少(Quinlan et al., 2011) [43]。例如,线粒体功能与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 和过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1-b (PGC1b)一同,在端粒的功能障碍期间减少,此情况与老化有关(Sahin et al., 2011) [44]。

[0022] 在老化研究中最显眼的假设为“老化的自由基假设”(‘free radical theory of ageing’),是基于线粒体的活性氧组的生成增加和基于其的氧化损伤为决定老化的因子的论(Quinlan et al., 2011) [43]。尤其,认为线粒体脱氧核糖核酸(mtDNA)的突变在与老化相关的线粒体功能的下降中起到中心作用。线粒体聚合酶c (polymerase c) (聚合酶 γ (POLG))小鼠模型(Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2004) [45, 46]有助于在老化中强调线粒体的重要性。聚合酶 γ 是位于线粒体的脱氧核糖核酸聚合酶,参与线粒体脱氧

核糖核酸的复制(replication)及脱氧核糖核酸恢复(repair)。在聚合酶 γ 中具有突变的小鼠在线粒体脱氧核糖核酸中突变增加且具有脱毛现象(秃病 alopecia)(脱发(hair loss)))、引起骨质疏松及心肌病(cardiomyopathy),这些症状与老化有关(Kujoth et al.,2005;Trifunovic et al.,2004) [45、46]。为了测试通过过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 表达的线粒体的增加是否可以改善聚合酶 γ 小鼠的表型(phenotype),将此小鼠与肌酸激酶-过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 基因改造的(MCK-PGC-1 α Tg)小鼠进行交配(Lin et al.,2002b) [47]。同时表达突变聚合酶 γ 和过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的小鼠在心脏和骨骼肌中线粒体活性增加,与仅表达突变聚合酶 γ 的鼠相比,这些作用改善了组织功能(Dillon et al.,2012) [48]。这些数据强调上升的线粒体功能具有有益的影响,而与线粒体脱氧核糖核酸的突变无关。重要的是若过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的表达上升一辈子,则延缓与肌肉量减少(少肌症(loss of muscle mass))等老化有关的症状的开始(Wenz et al.,2009) [49]。这些所改善的功能归因于由年龄引起的氧化损伤的堆积和线粒体功能下降(Wenz et al.,2009) [49]。综上所述,这些研究表明,过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 延缓与老化有关的症状的开始且减轻氧化损伤的影响。

发明内容

[0023] 技术问题

[0024] 本发明人提供用于预防或治疗与包含由下述通式1表示的有效成分的过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的表达减少有关的由线粒体功能下降引起的多种疾病的组合物。

[0025] 通式I:S-(MS)_p-(MS)_q

[0026] 在上述通式中,S为唾液酸,(MS)_p及(MS)_q相互独立地为单糖残基。

[0027] 本发明的实施例的目的在于,提供如下的组合物,即,增加过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 等线粒体相关酶的活性及生成,结果,通过增加线粒体的活性及生成来治疗和/或管理得以预防或改善、治疗的病态、障碍,包括退行性神经疾病、代谢性疾病、局部脂肪去除及脂质代谢相关疾病、老化及由老化引起的疾病、肌肉减少(少肌症、萎靡不振(cachexia))及由肌肉减少引起的疾病。

[0028] 在整个本说明书中参照了多个专利文献并标记了其引用。所引用的专利文献的公开内容通过参照整体并入本说明书中,以便更加明确地说明本发明所属技术领域的水平及本发明的内容。

[0029] 解决问题的方案

[0030] 在本发明的一实施方式中,本发明提供用于预防或治疗与过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1- α :PGC1- α)的表达减少有关的疾病或症状的组合物,包含由下述通式I表示的化合物、其盐、水合物或溶剂化物作为有效成分:

[0031] 通式I:S-(MS)_p-(MS)_q

[0032] 在上述通式中,S为唾液酸,(MS)_p及(MS)_q相互独立地为单糖残基。

[0033] 在本发明的一实施方式中,本发明提供如下的组合物,根据与包含由通式I表示的

化合物作为有效成分的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 表达减少有关的由线粒体功能下降,通过增加作为转录助活性因子的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达,来预防或治疗病态、障碍和/或疾病,包括得以预防或改善、治疗的退行性神经疾病,代谢性疾病、局部脂肪去除及脂质代谢相关疾病、老化及由老化引起的疾病、肌肉减少(少肌症、萎靡不振)及由肌肉减少引起的疾病。

[0034] 为了实现这些目的,本发明的用于预防或治疗由线粒体功能下降引起的多种疾病的组合物包含由下述通式I表示的化合物作为有效成分。

[0035] 通式I: S-(MS)_p-(MS)_q

[0036] 在上述通式中,S为唾液酸,(MS)_p及(MS)_q相互独立地为单糖残基。

[0037] 本发明人致力于开发抑制成为多种疾病的根源的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的减少和基于其的线粒体的功能下降的物质。其结果确认,唾液低聚糖在退行性神经疾病模型小鼠中通过诱发过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 表达和线粒体生物功能来诱发根据退行性神经疾病的行为的改善,并且可以预防或治疗过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 表达减少和由线粒体功能下降引起的退行性神经疾病、肌肉损失及基于其的疾病、心血管疾病、老化及由老化引起的疾病。

[0038] 在本发明的组合物中,有效成分为通式I的化合物、其盐、水合物或溶剂化物。在通式I中,S表示唾液酸。唾液酸可由多种方式与(MS)_p相结合,但是以 α 2,3键合或 α 2,6键合来与单糖类化合物(MS)_p相结合。除了唾液酸之外,变形的(modified)唾液酸可位于S。例如,-OH基中H被另一取代基或OH被另一取代基所取代的可位于唾液酸的第四号碳。上述取代可以为,例如,H被C1-C4烷基取代。上述C1-C4烷基可以为甲基、乙基、丙基、或丁基。最优选地,未变形的唾液酸位于S。

[0039] 对应于(MS)_p及(MS)_q的单糖类化合物可以为在本技术领域中公知的任何单糖类化合物,例如,包括四碳糖(如,赤藓糖及苏糖)、五碳糖(如,核糖,阿拉伯糖,木糖及来苏糖)及六碳糖(阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、古罗糖、艾杜糖、半乳糖及塔罗糖)。优选地,位于(MS)_p及(MS)_q的单糖类化合物为五碳糖或六碳糖,更优选为六碳糖,更加优选为葡萄糖、甘露糖或半乳糖,最优选为葡萄糖或半乳糖。对应于(MS)_p及(MS)_q的单糖类化合物可以为D-形态的立体异构体或L-形态的立体异构体最优选为D-形态的立体异构体。

[0040] (MS)_p及(MS)_q可与相同的或不同的单糖类化合物相结合,优选地与不同的单糖类化合物相结合。

[0041] 在本发明的优选的实例中,(MS)_p为半乳糖或葡萄糖,(MS)_q为葡萄糖或半乳糖,最优选地,(MS)_p为半乳糖,(MS)_q为葡萄糖。在(MS)_p为半乳糖、(MS)_q为葡萄糖的情况下,形成二糖类化合物乳糖。

[0042] 位于(MS)_p及(MS)_q的单糖类化合物是变形的或未变形的。例如,在变形的单糖类化合物的情况下,-OH基中H可被乙酰基或-OH被N-乙酰基取代。优选地,位于(MS)_p及(MS)_q的单糖类化合物为未变形的单糖类化合物。

[0043] 在本发明的优选的实例中,用作有效成分的通式I的化合物为唾液乳糖。在本发明中用作有效成分的唾液乳糖是在唾液酸与半乳糖和葡萄糖依次相结合形成的化合物。

[0044] 唾液酸可以由多种方式与半乳糖相结合,如以 α 2,3或 α 2,6键合来结合。可以对唾液酸作出变形,例如,位于唾液酸的第四号碳的-OH基中H被另一取代基或者OH被另一取代

基取代的可位于S。上述取代可以为,例如,H被C1-C4烷基取代。上述C1-C4烷基可以为甲基、乙基、丙基、或丁基。

[0045] 位于唾液乳糖的乳糖和葡萄糖可具有D-形态的立体异构体或L-形态的立体异构体,最优选为D-形态的立体异构体。位于唾液乳糖的半乳糖和葡萄糖为变形的或未变形的。例如,在变形的单糖类化合物的情况下,-OH基中H可被乙酰基或者OH被N-乙酰基取代。优选地,位于唾液乳糖的半乳糖和葡萄糖为未变形的单糖类化合物。

[0046] 在本发明的优选的实例中,在本发明中用作有效成分的唾液乳糖为 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc[NeuNAc:N-乙酰神经氨酸(N-Acetylneuraminy),Gal:半乳糖(Galactose),Glc:葡萄糖(Glucose)]。 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc是在GM3神经节苷脂中发现的物质, α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc为上述物质的异构体。

[0047] 更优选地,在本发明中用作有效成分的唾液乳糖为 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc。如下述实施例证实, α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc的功效优于 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc。

[0048] 在本发明的组合物中用作有效成分的不仅有上述化合物本身,而且还有其药剂学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0049] 术语,“药剂学上可接受的盐”是表示具有所需的药理学效果,即,使过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的表达和线粒体的功能增加的上述化合物的盐。这种盐通过利用无机酸,如盐酸盐、氢溴酸盐及氢碘酸盐;有机酸,如醋酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、硫酸氢盐、氨基磺酸盐、硫酸盐、萘酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、2-羟基乙烷硫酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、甲苯磺酸盐及十一酸盐来形成。

[0050] 术语,“药剂学上可接受的水合物”表示具有所需的药理学效果的上述化合物的水合物。术语,“药剂学上可接受的溶剂化物”表示具有所需的药理学效果的上述化合物的溶剂化物。上述水合物及溶剂化物和可以利用上述酸来制备。

[0051] 包含上述的通式I的化合物、其药剂学上可接受的盐、水合物或溶剂化物作为有效成分的本发明的组合物通过使过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的表达和线粒体的功能增加,来最终具有退行性神经疾病、心血管疾病、老化预防或治疗活性。

[0052] 在本说明书中所使用的术“退行性神经疾病(neurodegenerative Disease)”是指大脑和脊髓特定脑细胞株逐渐失去其功能且脑细胞数减少的疾病。由于大脑和脊髓的多个神经细胞根据其位置具有非常多的功能,因此根据哪一个部位的神经细胞先得到损伤且失去功能,并根据这种功能障碍进行到某种形态,临床表现多样。

[0053] 在本发明一实施例中,本发明的退行性神经疾病是选自由阿尔茨海默病(Alzheimer's disease(AD))、肌萎缩性侧索硬化症、肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis(ALS))、假肥大型肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy)、帕金森氏症(Parkinson's disease(PD))、亨廷顿病(Huntington's disease(HD))、皮克氏病(Pick's disease)、库夫斯病(Kuf's disease)、耳聋肌张力障碍综合征(Mohr-

Tranebjaerg syndrome)、威尔逊氏病、散发性阿尔茨海默病、散发性肌萎缩侧索硬化症、散发性帕金森氏症、自主功能改变、睡眠障碍、神经精神障碍、抑郁、精神分裂症、分裂情感性障碍、柯萨科夫精神病、躁症、焦虑症、恐惧症、学习或记忆障碍、失忆症或年龄相关的记忆丧失、注意力缺陷障碍、心境恶劣障碍、重性抑郁障碍、强迫性人格障碍、精神活性物质所致精神障碍、恐慌症、双相情感障碍、偏头痛、多动症及运动障碍组成的组中的一种。

[0054] 更具体地,例如,本发明的退行性神经疾病包括急性、亚急性或慢性神经变性疾病。

[0055] 本发明的急性神经变性疾病包括脑卒中、脑梗死、脑出血、头部损伤或脊髓损伤,上述亚急性神经变性疾病包括脱髓鞘疾病、神经类副肿瘤性神经综合征、亚急性混合变性(subacute combined degeneration)、亚急性坏死性脑炎(subacute necrotizing encephalitis)、或亚急性硬化性脑炎(subacute sclerosing encephalitis)。本发明的慢性神经变性疾病包括:失忆症,包括老年痴呆、血管性痴呆、弥漫性(diffuse)白质病(宾斯万格病)、内分泌或代谢起源痴呆、头部创伤和弥漫性脑损伤引起的痴呆、拳击手痴呆及额叶痴呆;运动神经细胞疾病,包括阿尔茨海默病、皮克氏病、弥漫性莱维小体病、进行性核上性麻痹(斯梯尔理查德森综合征)、多系统变性病(multiple system degeneration)、与神经变性相关的慢性癫痫状态、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)、运动不协调、皮质基底节变性、肌萎缩侧索硬化-帕金森-痴呆综合征(ALS Parkinson's-Dementia complex of Guam)、亚急性硬化性全脑炎、亨廷顿病、帕金森氏症、共核蛋白病(synucleinopathies)、原发性进行性失语症(primary progressive aphasia)、纹状体黑质变性、马查多-约瑟夫病/脊髓小脑性共济失调、橄榄体脑桥变性;朊病毒病,包括抽动秽语综合征、延髓性及假性延髓性麻痹、脊髓及脊髓延髓肌萎缩(肯尼迪病)、多发性硬化症、原发性侧索硬化症、遗传性挛缩性对麻痹、沃德尼格-霍夫曼病、库格尔贝格-韦兰德病、泰-萨克斯病、山德霍夫病、遗传性痉挛性疾病、沃尔法特-库格尔贝格-韦兰德(Wohlfart-Kugelberg-Welander)疾病、痉挛性截瘫、进行性多病灶脑白质病、遗传性自主神经异常(赖利-戴综合征)、克罗伊茨费尔特-雅各布、格斯特曼-斯特劳斯勒-谢因克病、库鲁病及致命性遗传性失眠症;或脑瘫。

[0056] 本发明的代谢性疾病、脂质代谢相关疾病、老化及由老化引起的疾病、肌肉减少(少肌症,萎靡不振)及由肌肉减少引起的疾病选自葡萄糖新生变化、软组织炎、女性乳房症、假性女性乳房症、脂肪营养不良、老化、光老化、皮肤外伤、伤害的再上皮化、皮肤脱水、干燥症、角质化障碍、硬茧(callous)、硬皮、扁平苔藓、与狼疮相关的皮肤病变、脂溢性皮炎、老年性皮炎、头皮、乳痂(cradle cap)、皮脂漏、痤疮的过多皮脂漏、日光性皮炎、皮脂漏性角化症、老人角化症、光线角化症、光诱导角化病、毛囊角化病、普通痤疮、痣、成纤维细胞的功能变化、结节筋膜炎、硬皮病、杜普征氏掌挛缩(Dupuytren's contracture)、皮脂腺障碍、痤疮红斑痤疮、多形性痤疮、粉刺、多型症、红斑痤疮、结晶性囊肿性痤疮、聚合性痤疮、老年性痤疮、蛇皮癣、滤泡角化症(Darier's disease)、表皮松解掌跖角质化、白板症、粘膜苔癣、皮肤苔癣、湿疹、寻常疣、扁平疣、疣状表皮发育不良、口腔乳头状瘤病、红斑性狼疮、疱疹病、大疱性类天疱疮、硬皮病、光线角化症、色素沉着症、白斑症、斑秃、路易体病(Lewy Body disease)、神经纤维浓缩剂、罗森塔尔纤维(Rosenthal fiber)、马洛里玻璃样变(Mallory's hyaline)、重症肌无力症、抽动秽语综合征、多发性硬化症、肌萎缩性腋窝硬化

症、进行性核上性麻痹、癫痫、克罗伊茨费尔特-雅各布病、耳聋-肌肉紧张综合症、雷氏病 (Leigh's disease)、莱伯遗传性视神经病 (Leber's hereditary optic neuropathy)、肌肉紧张异常、运动神经元疾病、神经病综合征、运动失调症及网膜色素变性症、母性遗传雷氏病、弗里德里希运动失调症、遗传性痉挛性大麻痹组成的组中。

[0057] 在本发明一实例中,本发明的组合物选自自由溶液、悬浮液、糖浆剂、乳液、脂质体、浸膏剂、散剂、粉末剂、颗粒剂、片剂、缓释制剂及胶囊剂组成的组中。

[0058] 在本发明一实例中,本发明的组合物为口服给药型组合物且为包含脂质体的药物载体或缓释制剂。

[0059] 在本发明一实例中,在本发明的组合物为非口服给药型组合物的情况下,可以为包含脂质体及超声造影剂 (ultrasound contrast agent) 的药物载体或缓释制剂的剂型。

[0060] 本发明的组合物可制备成药剂学组合物、化妆品及功能性食品 (nutraceutical) 组合物或食品组合物。

[0061] 在本发明的优选的实例中,本发明的组合物是药剂学组合物,包含:(a) 上述的本发明的通式I的化合物的药剂学有效量;及(b) 药剂学上可接受的载体。

[0062] 在本说明书中,术语“药剂学有效量”是指足以实现上述的通式I的化合物的功效或活性的量。

[0063] 在将本发明的组合物制备成药剂学组合物的情况下,本发明的药剂学组合物包含药剂学上可接受的载体。包含在本发明的药剂学组合物的药剂学上可接受的载体包含制剂时通常使用的,例如,乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、海藻酸钠、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁及矿物油,但并不局限于此。除了上述成分之外,本发明的药剂学组合物还可包含润滑剂、湿润剂、甜味剂、调味剂、乳化剂、悬浮剂、保存剂等。适当的药剂学上可接受的载体及制剂详细记载于雷明顿药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences) (19th ed.,1995) 中。

[0064] 本发明的药剂学组合物可以口服或非口服给药,在非口服给药的情况下,可以静脉内注入、皮下注入、肌肉注入、腹腔注入、经皮给药、粘膜给药及局部给药等方式给药。

[0065] 本发明的药剂学组合物的适当的给药量可根据制剂化方法、给药方式、患者的年龄、体重、性别、病态、饮食、给药时间、给药途径、排泄速度及过敏反应等因素开各种各样的处方。优选地,本发明的药剂学组合物的给药量以成人为基准每日0.0001~1000mg/kg (体重),例如,0.001~800mg/kg (体重) 或0.001~600mg/kg (体重)。并且,还可根据医生或药师的判断每隔一定时间每日分一次或数次给药。

[0066] 根据本发明所属的技术领域的普通技术人员可容易地实施的方法,利用药剂学上可接受的载体和/或赋形剂来进行制剂化,从而制备成单位容量形态或者装入多容量容器来制备本发明的药剂学组合物。

[0067] 在本发明的优选的实例中,本发明的组合物的剂型为溶液、悬浮液、糖浆剂、乳液、脂质体、浸膏剂、散剂、粉末剂、颗粒剂、片剂、缓释制剂及胶囊剂,还可包括分散剂或稳定化剂。

[0068] 具体地,根据给药途径,口服给药用固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂及颗粒剂。在这些固体剂型中,活性化合物可与一种以上的惰性药剂学上可接受的赋形剂或载体

(如,柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或a)填充剂或增量剂(如,淀粉,乳糖,蔗糖,葡萄糖,甘露醇及硅酸)、b)结合剂(如,羧甲基纤维素、海藻酸钠、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖及阿拉伯胶)、c)保湿剂(如,甘油)、d)崩解剂(如,琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、特定硅酸盐及碳酸钠)、e)液相缓凝剂(如,石蜡)、f)吸收促进剂(如,季铵盐化合物)、g)湿润剂(如,十六醇及甘油单硬脂酸酯)、h)吸收剂(如,高岭土及膨润土黏土)及i)润滑剂(如,滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及它们的混合物)混合。在胶囊剂、片剂及丸剂的情况下,剂型也可包括缓冲剂。

[0069] 并且,在使用乳糖或奶糖等赋形剂及高分子量的聚乙二醇等的软质及硬质明胶胶囊中可用作填充剂。

[0070] 片剂、糖衣片、胶囊剂、丸剂及颗粒剂的固体给药型可制备成肠溶衣及其他药剂领域中公知的包衣等包衣物及外壳。这些可任意含有混浊剂,并且,可将这些制备成以任何延缓的方式在肠管的特定部位仅释放活性成分或者优先释放活性成分。并且,在需要的情况下,活性化合物可由上述的赋形剂和微胶囊形态存在。

[0071] 作为口服给药用液体剂型包括药剂学上可接受的乳液、溶剂、悬浮剂、糖浆剂及酞剂。除了活性化合物之外,可含有本领域中常用的惰性稀释剂,如液体剂型可包括水或其他溶剂、增溶剂及乳化剂(如,乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(尤其,棉籽油、花生、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油及芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇及山梨糖醇的脂肪酸酯及它们的混合物。除了惰性稀释剂之外,口服组合物还可含有佐剂,如湿润剂、乳化剂、助悬剂、甜味剂、风味剂及芳香剂。

[0072] 优选地,直肠或质内给药用剂型是栓剂,可通过混合本发明的化合物与适当的非刺激性佐剂或载体(如,可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡)来制成,上述适当的非刺激性佐剂或载体在室温下为固体而在体温下是液体,因此溶解于直肠或质并释放活性化合物。

[0073] 用于非口服给药的适当的剂型可包括生理学上可接受的灭菌水性及非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液、及重新构成灭菌注射溶液或分散液的灭菌粉末。作为适当的水性及非水性载体、稀释剂、溶剂或载体的例,包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油等),植物油(橄榄油)、注射用有机酯(如,油酸乙酯)及它们的适当的混合物。

[0074] 并且,本发明的组合物可包括佐剂,如保存剂、湿润剂、乳化剂及分散剂。可通过各种抗菌剂及抗真菌剂(如,防腐剂,氯丁醇,苯酚,山梨酸等)来抑制微生物的作用。并且,优选地,可包括渗透压调节剂,如糖、氯化钠。可通过使用吸收缓凝剂(如,单硬脂酸铝及明胶)来延缓吸收注射用药剂的吸收。

[0075] 除了活性化合物之外,悬浮剂还可含有助悬剂(如,乙氧基异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇及山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂-琼脂及黄蓍或它们的混合物等)。

[0076] 在一些情况下,为了持续药物的效果,优选地,可以从皮下或肌肉内注射使药物的吸收变得缓慢。这可通过使用水溶性低的结晶型或非结晶型物质的液体悬浮液来实现。此时,药物的吸收取决于溶解速度,溶解速度取决于结晶大小及结晶形态。另一方面,非口服给药的药物的形态的延缓的吸收通过在油载体中溶解或悬浮药物来实现。

[0077] 通过以可生物降解的聚合物如聚乳酸-聚乙醇酸交酯的方式形成将微胶囊基质来制备注射用库形态。可根据药物与聚合物之比及所使用的特定聚合物的性质来调节药物的

释放速度。

[0078] 作为其他可生物降解的聚合物的例,包括聚(原酸酯)及聚(酸酐)。并且,通过在作为体组织适合性的脂质体或微乳液中捕获药物来制成库注射用剂型。

[0079] 注射型剂型能够以例如通过保留细菌的过滤器来进行过滤,或者通过将灭菌剂掺入灭菌固体组合物的形态来进行灭菌,上述灭菌固体组合物使用前将灭菌剂溶解或分散于灭菌水或其他灭菌注射用介质中。

[0080] 在本发明的优选的实例中,本发明的组合物为口服给药型组合物且为脂质体或缓释制剂的剂型。

[0081] 在本发明的还有一优选的实例中,本发明的组合物为非口服给药型组合物且为脂质体或缓释制剂的剂型。

[0082] 在将本发明的药剂学组合物制成口服剂型及非口服剂型(优选为静脉给药)的情况下,其剂型为脂质体或缓释制剂。

[0083] 可通过脂质体中封装(encapsulation)本发明的药剂学组合物来提供用于药物传递的剂型的稳定性。使用于本发明的脂质体可由包含多元醇、表面活性剂、磷脂、脂肪酸及水的混合物来制备(Prescott,Ed.,Methods in Cell Biology,(XIV),p.33et seq.(1976))。

[0084] 对用于脂质体的多元醇没有特别限制,优选地包含丙二醇、二丙二醇、1,3-丁二醇、甘油、甲基丙二醇、异戊二醇、戊二醇、赤藓糖醇、木糖醇及山梨糖醇,最优选为丙二醇。

[0085] 使用于脂质体的制备的表面活性剂可使用本技术领域中公知的任一种,例如,可使用阴离子性表面活性剂、阳离子性表面活性剂、两性表面活性剂及非离子性表面活性剂,优选地使用阴离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂。作为阴离子性表面活性剂的具体例包括烷基酰基谷氨酸盐、磷酸烷基酯、烷基乳酸盐、二磷酸烷基酯及三磷酸烷基酯。作为非离子性表面活性剂的具体例包括烷氧基化烷基醚、烷氧基化烷基酯、烷基葡萄糖苷、聚甘油酯及糖酯。最优选地使用属于非离子性表面活性剂的聚山梨酯类。

[0086] 使用于脂质体的制备的作为另一成分的磷脂被用作两亲和性脂质,包括天然磷脂(例如:蛋黄卵磷脂或大豆卵磷脂,鞘磷脂)及合成磷脂(例如:二棕榈酰磷脂酰胆碱或氢化卵磷脂),优选为卵磷脂。更优选地,上述卵磷脂是从大豆或蛋黄中提取的天然来源的不饱和卵磷脂或饱和卵磷脂。通常,天然来源的卵磷脂的磷脂酰胆碱的量为23~95%,而且磷脂酰乙醇胺的量为20%以下。

[0087] 使用于脂质体制备的脂肪酸为高级脂肪酸,优选为C12-22烷基链的饱和或不饱和脂肪酸,例如,包括月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸及亚油酸。使用于脂质体的制备的水一般为脱离子化的蒸馏水。

[0088] 脂质体的制备可通过本技术领域中公知的多种方法来进行,但是最优选地,将包含上述成分的混合物适用于高压均浆器来制备。

[0089] 这样制备的脂质体系统具有溶解各种难溶性物质的同时通过稳定化不稳定的物质来使药物传递极大化的优点。

[0090] 可将本发明的药剂学组合物制备成缓释制剂,以使可通过持续保持有效成分的有效血中浓度来减少药剂的服用次数来增加服药顺应度。

[0091] 除了本发明的有效成分之外,缓释制剂包含释放化载体及其他佐剂来制剂化。使

用于本发明的释放化载体可使用本技术领域中公知的多种释放化载体,但优选为聚环氧乙烷。

[0092] 并且,作为其他佐剂可包括在药剂学领域中通常使用的稀释载体。用于此目的的稀释载体的例有乳糖、糊精、淀粉、微晶纤维素、磷酸一氢钙、碳酸钙、糖类及二氧化硅等,此外,为了增加流动性,可包含硬脂酸锌或镁等滑泽剂或者可适用于制药领域的其他佐剂。

[0093] 可单独使用本发明的药剂学组合物,但是还可包含在本技术中提及的使用于神经病、心血管疾病、老化、肌肉损失的普通的有效成分,在这种情况下,通过协同效果可用作更有效的组合物。

[0094] 本发明的组合物可制备成化妆品学组合物的形态。本发明的化妆品学组合物可制备成本技术领域通常制备的任何剂型,例如,可剂型化成溶液、悬浮液、乳浊液、糊剂、凝胶、乳霜、乳液、粉饼、香皂、含表面活性剂的清洁剂、油、粉状粉底、乳浊液粉底、蜡状粉底及喷雾剂,但并不局限于此。更详细地,可制成柔软化妆水、营养化妆水、乳液、营养乳霜、按摩霜、精华液、眼霜、洁面霜、洗面奶、卸妆水、面膜、喷雾剂或粉饼的剂型。

[0095] 在本发明的剂型为糊剂,乳霜,乳液,或凝胶的情况下,作为载体成分可使用动物油、植物油、蜡、石蜡、淀粉、胺黄树胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅、膨润土、二氧化硅、滑石或氧化锌等。

[0096] 在本发明的剂型为粉饼或喷雾剂的情况下,作为载体成分可使用乳糖、滑石、二氧化硅、氢氧化铝、硅酸钙或聚酰胺粉饼,尤其,在喷雾剂的情况下,还可包含推进剂,如氯氟碳氢化合物、丙烷/丁烷或二甲醚。

[0097] 在本发明的剂型为溶液或乳浊液的情况下,作为载体成分使用溶剂、增溶剂或助悬剂,例如有水、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁基乙二醇油、甘油脂族酯、聚乙二醇或山梨糖醇的脂肪酸酯。

[0098] 在本发明的剂型为悬浮液的情况下,作为载体成分可使用液相稀释剂,如水、乙醇或丙二醇;悬浮剂,如乙氧基异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇酯及聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯;微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂或胺黄树胶等。

[0099] 在本发明的剂型为含表面活性剂的清洁剂的情况下,作为载体成分可使用脂肪族醇硫酸酯、脂肪族醇醚硫酸盐、磺基琥珀酸单酯、羟乙基磺酸钠、咪唑啉衍生物、牛磺酸甲酯、肌氨酸盐、脂肪酸酰胺醚硫酸盐、烷基酰胺甜菜碱、脂肪醇、脂肪酸甘油酯、脂肪酸二乙醇酰胺、植物油、羊毛脂衍生物或乙氧基化甘油脂肪酸酯等。

[0100] 除了有效成分和载体成分之外,包含在本发明的化妆品学组合物中的成分包含通常使用于化妆品学组合物的成分,例如,可包含普通的佐剂,如抗氧化剂、稳定化剂、增溶剂、维生素、颜料及香料。

[0101] 在将本发明的组合物制成食品组合物(或功能性食品组合物)的情况下,作为有效成分不仅包含通式I的化合物,而且还包含制备食品时通常添加的成分,例如,蛋白质,碳水化合物,脂肪,营养素,调味剂及调味剂。作为上述的碳水化合物的例,具有普通的糖,例如,单糖,如葡萄糖、果糖等;二糖,如麦芽糖、蔗糖、寡糖等;及多糖,如糊精、环糊精等;以及糖醇,如木糖醇、山梨糖醇、赤藓糖醇。作为调味剂可使用天然调味剂[索马甜、甜菊提取物(例如,莱鲍迪苷A、甘草甜素等)]及合成调味剂(糖精、阿斯巴甜等)。

[0102] 例如,在将本发明的食品组合物制成口服液的情况下,除了本发明的通式I的化合

物之外,还可包含柠檬酸、液体果糖、糖、葡萄糖、醋酸、苹果酸、果汁、桑树提取物、大枣提取物、甘草提取物等。

[0103] 在本发明一实例中,本发明的组合物被掺入选自由脂质体、混合脂质体、油质体、类脂质体、外来体、毫胶囊、微胶囊、纳米胶囊、纳米结构化的脂质载体、海绵、环糊精、小泡(vesicle)、胶束(micelle)、表面活性剂的混合胶束、表面活性剂磷脂混合胶束、毫球、微球、纳米球、脂质球、微乳液、纳米乳液、小粒子、毫粒子、微粒子、纳米粒子及固体脂质纳米粒子组成的组中的食品学、化妆品学或药剂学传递系统或持续释放系统中。

[0104] 在本发明一实例中,本发明的纳米胶囊含有微乳液。

[0105] 在本发明一实例中,本发明的组合物用于局部、口服或非口服的适用。本发明的局部给药具体地例如包括经皮给药。

[0106] 本发明的局部适用,具体地,例如经皮给药可根据离子电泳法、超声波电泳法、电穿孔法、机械压力、渗透压梯度、闭塞性管理(occlusive cure)、微注射法、借助压力的无针注射、使用微电子贴片、使用面膜或它们的任何组合来进行,并不特别限制于此。

[0107] 在本发明一实例中,本发明的组合物使过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达增加。为此,可用于预防、改善或治疗与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 减少相关的症状或疾病。

[0108] 在本发明一实例中,本发明的组合物用于治疗 and/或管理皮肤。更具体地,上述皮肤的治疗和/或管理用于减少、延缓和/或预防老化和/或光老化的迹象。

[0109] 在本发明一实例中,本发明的组合物用于减少脂肪组织的体积。

[0110] 在本发明的再一实例中,本发明的组合物用于减少脂肪组织的甘油三酯含量。

[0111] 更具具体地,例如,本发明的脂肪组织为皮下脂肪组织。

[0112] 本发明的一具体例中,本发明的皮下脂肪组织为大腿部、胸、脖子底部、脖领(neckline)、臀部、脸、嘴唇、脸颊、眼皮和/或手的皮下脂肪组织。

[0113] 在本发明的另一具体例中,本发明的脂肪组织为包括由脂肪栓塞(fat embolism)形成的脂肪组织在内的可在身体中产生的所有脂肪组织。

[0114] 在本发明一实例中,本发明的组合物用于增加皮肤的温度。

[0115] 在本发明的另一实施方式中,本发明提供包含本发明的另一实施方式的至少一种通式I、可接受的盐的食品、化妆品学或药剂学有效量及至少一种食品、化妆品学或药剂学上可接受的赋形剂或佐剂的食品、化妆品学或药剂学组合物。

[0116] 本发明的一实例中,本发明的通式I、它们的混合物和/或其食品学、化妆品学或药剂学上可接受的盐为被确认为处于由滑石、膨润土、二氧化硅、淀粉及麦芽糊精形成的食品学、化妆品学或药剂学上可接受的固体有机聚合物或吸附在固体矿物质支撑体上的状态的组合物。

[0117] 在本发明一实例中,本发明的组合物以选自由乳霜、多重乳液、无水组合物、水性分散液、油、牛奶、香脂、泡沫、乳液、凝胶、乳霜、凝胶、水醇(hydroalcoholic)溶液、乙二醇溶液、水凝胶、擦剂(liniment)、树液、肥皂、洗发水、护发素、精华液、软膏、摩丝、润发油、散粉、杆、笔、喷雾、气雾剂、胶囊、明胶胶囊、软胶囊、硬胶囊、片剂、糖衣片、颗粒、口香糖、溶液、悬浮液、乳液、糖浆、酞剂、多糖类膜、阿胶及明胶组成的组中的剂型来提供。

[0118] 在本发明一实例中,本发明的组合物被确认为处于掺入选自由眼部遮瑕膏、化妆

粉底、卸妆乳液、卸妆霜、眼影、口红、唇彩、护唇剂及粉饼组成的组中的产品中的状态。

[0119] 在本发明一实例中,通式I、它们的混合物和/或其食品、化妆品学或药剂学上可接受的盐掺入织物、无纺布或医疗装置中。

[0120] 在本发明一实例中,本发明的织物,无纺布或医疗装置选自由绷带、纱布、T恤衫、紧身衣、袜子、内衣、腰带、手套、尿布、卫生巾、敷料、床铺、湿巾(wipe)、粘性贴剂、无粘性贴剂、闭塞贴剂、微电贴剂及面膜组成的组中。

[0121] 在本发明一实例中,本发明的组合物还包含选自由其他过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 调节剂、其他过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPAR γ) 调节剂、减少脂肪细胞的甘油三酯含量的制剂、推迟脂肪细胞分化的制剂、脂肪分解剂或脂肪分解刺激剂、抗脂肪团剂、脂肪生成剂、乙酰胆碱-受体凝集抑制剂、肌肉收缩抑制剂、抗胆碱性抑制剂、胰肽酶抑制剂、底物金属蛋白分解酶抑制剂、黑色素合成刺激剂或抑制剂或脱色剂(depigmenting agent)、色素原沉着剂(propigmenting agent)、日晒黑剂、抗老化剂、NO-合成酶抑制剂、5 α -还原酶抑制剂、赖氨酰羟化酶和/或脯氨酰羟化酶抑制剂、抗氧化剂、与自由基捕捉剂和/或对空气污染的制剂、反应性羰基类捕捉剂、抗糖化剂(anti-glycation agent)、抗组胺剂、抗病毒剂、抗寄生虫剂、乳化剂、软化剂(emollient)、有机溶剂、液体推进剂、皮肤调理剂、湿润剂、保湿物质、 α 羟酸、 β 羟酸、保湿剂、表皮水解酶、维生素、氨基酸、蛋白质、色素或着色剂、染料、生物聚合物、凝胶聚合物、增稠剂、表面活性剂、柔软剂、乳化剂、结合剂、防腐剂、防皱剂、可减少或治疗眼底下垂的制剂、皮肤剥离剂(exfoliating agent)、角质剥离剂(desquamating agent)、角质溶解剂(keratolytic agent)、抗菌剂、抗真菌剂、抑制真菌剂(fungistatic agent)、消毒剂、抑菌剂(bacteriostatic agent)、真皮或刺激剂、弹性蛋白合成刺激剂、核心蛋白聚糖合成刺激剂、层粘连蛋白合成刺激剂、防御素合成刺激剂、伴侣蛋白合成刺激剂、环磷酸腺苷(cAMP)合成刺激剂、热冲击蛋白质、HSP70合成刺激剂、热冲击蛋白质合成刺激剂、水通道蛋白合成刺激剂、透明质酸合成刺激剂、纤维连接蛋白合成刺激剂、长寿蛋白(sirtuin)合成刺激剂、角质层的成分及脂质的合成刺激剂、神经酰胺、脂肪酸、胶原分解抑制剂、弹性蛋白分解抑制剂、丝氨酸蛋白质分解酶抑制剂、成纤维细胞增殖刺激剂、角质细胞增殖刺激剂、黑色素细胞增殖刺激剂、角质细胞分化刺激剂、乙酰胆碱酯酶抑制剂、皮肤松弛剂、糖胺聚糖合成刺激剂、抗过多角化症剂、粉刺溶解剂(comedolytic agent)、脱氧核糖核酸收复剂、脱氧核糖核酸保护剂、稳定化剂、止痒剂、用于治疗 and/或管理敏感皮肤的制剂、固化剂(firming agent)、再缩合剂(redensifying agent)、再结构化剂、抗妊娠纹剂、结合剂、皮脂生成调节剂、抗发汗剂、治愈刺激剂、辅助愈合剂(coadjuvant healing agent)、再上皮化刺激剂、辅助再上皮化剂(coadjuvant re-epithelialization agent)、细胞因子生长因子、镇静剂、抗炎症剂、麻醉剂、对毛细血管循环和/或微循环起作用的制剂、血管渗透性抑制剂、静脉紧张剂(venotonic agent)、作用于细胞代谢的制剂、用于改善真皮表皮结合的制剂、头发生长诱导剂或迟延剂、芳香剂、螯合剂、植物提取物、精油、海洋提取物、从生物发酵工序获得的制剂、矿物盐(mineral salt)、细胞提取物、对防晒及紫外线A和/或B具有活性的有机或矿物光保护剂或它们的混合物组成的组中的至少一种佐剂的食品、化妆品学或药剂学有效量。

[0122] 在本发明一实例中,本发明的佐剂来源于合成或植物提取物或者从生物发酵工序或合成及生物技术工序的组合。

[0123] 在本发明一实例中,本发明的组合物额外地还包含至少一种抗糖尿病剂的药剂学有效量。

[0124] 在本发明一实例中,本发明的佐剂选自由使脂肪组织的甘油三酯含量的增加或减少的制剂、使脂肪细胞的分化增加或延缓的制剂、脂肪分解剂和/或静脉紧张剂组成的组中。

[0125] 在本发明一实例中,本发明的使脂肪组织的甘油三酯含量的增加或减少的制剂、推迟脂肪细胞分化的制剂、抗脂肪团剂、脂肪分解剂和/或静脉紧张剂选自由毛喉素(forskolin)、咖啡因、七叶素(escin)、肉毒碱(carnitine)、辅酶A、脂肪酶、海罂粟碱(Glaucine)、七叶树素(aesculin)、维司那定(visnadine)、洋菝葜皂甙元(Sarsasapogenin)、咖啡树(Coffea arabica)的提取物、毛喉鞘蕊花(Coleus forskohlii)的提取物、知母(Anemarrhena asphodeloides)的提取物及水、甘油、卵磷脂(lecithin)、咖啡因、屠户扫帚树(Butcher's broom;假叶树(Ruscus Aculeatus))的提取物、麦芽糊精、二氧化硅、三乙醇胺氢碘酸盐(Triethanolamine hydroiodide)、丙二醇、常春藤(洋常春藤(Hedera Helix))的提取物、肉毒碱、七叶素、三肽-1、黄原胶、卡拉胶(角叉菜(Chondrus crispus))及乙二胺四乙酸二钠(EDTA)的混合物组成的组中。

[0126] 在本发明一实例中,本发明的佐剂选自由固化剂、再缩合剂及再结构化剂组成的组中。

[0127] 在本发明一实例中,本发明的固化剂、再缩合剂及再结构化剂选自由假交替单胞菌(Pseudoalteromonas)发酵提取物、三肽-10瓜氨酸(Tripeptide-10citrulline)、乙酰精氨酸色氨酸二苯甘氨酸(Acetyl arginyl tryptophyl diphenyl glycine)、六肽-10及假交替单胞菌发酵提取物、水解小麦蛋白、水解大豆麦蛋白、三肽-10瓜氨酸及三肽-1的混合物组成的组中。

[0128] 在本发明一实例中,本发明的佐剂选自抗妊娠纹剂。更具体地,例如,本发明的抗妊娠纹剂选自由落得打(Centella Asiatica)的提取物、玫瑰果(Rosa canina)的提取物、麝香玫瑰(Rosa moschata)的提取物、锈红蔷薇(Rosa rubiginosa)的提取物及水、辛酸/辛酸葡萄糖苷、卵磷脂、甘油、假交替单胞菌发酵提取物、乙酰三肽-30瓜氨酸、五肽-18、黄原胶及辛二醇的混合物组成的组中。

[0129] 在本发明一实例中,本发明的佐剂选自由防皱剂及抗老化剂组成的组中。

[0130] 在本发明一实例中,本发明的防皱剂或抗老化剂选自由乙酰六肽-8、酰基七肽-4、乙酰八肽-3、五肽-18、乙酰六肽-30、水解小麦蛋白和水解大豆麦蛋白和三肽-1的混合物、二氨基丙酰三肽-33、三肽-10瓜氨酸、假交替单胞菌发酵提取物和水解小麦蛋白和水解大豆麦蛋白和三肽-10瓜氨酸和三肽-1的混合物、乙酰四肽-5、乙酰三肽-30瓜氨酸、乙酰精氨酸色氨酸二苯甘氨酸、乙酰四肽-22、二甲基甲氧基色原烷醇、二甲基甲氧基色甘酸棕榈酸酯、假交替单胞菌发酵提取物、赖氨酸盐酸和卵磷脂和三肽-9瓜氨酸的混合物及赖氨酸盐酸和卵磷脂和三肽10瓜氨酸的混合物组成的组中。

[0131] 在本发明的另一实施方式中,本发明提供由下述通式I表示的化合物、其食品学、化妆品学或药剂学上可接受的盐或它们的混合物的制备方法,包括在固相(solid phase)或溶液中进行反应的步骤:

[0132] 通式I: S-(MS)_p-(MS)_q,

[0133] 在上述通式中,S为唾液酸,(MS)_p及(MS)_q相互独立地为单糖残基。

[0134] 在本发明的另一实施方式中,本发明提供包含由下述通式I表示的化合物作为有效成分的体脂肪分解用组合物:

[0135] 通式I: S-(MS)_p-(MS)_q

[0136] 在上述通式中,S为唾液酸,(MS)_p及(MS)_q相互独立地为单糖残基。

[0137] 在本发明一实例中,在本发明的通式I中,(MS)_p为半乳糖,(MS)_q为葡萄糖。

[0138] 在本发明一实例中,本发明的通式I的化合物为唾液乳糖。

[0139] 在本发明一实例中,本发明的唾液乳糖为 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc。

[0140] 在本发明的一具体例中,本发明的唾液乳糖为 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc。

[0141] 在本发明一实例中,本发明的组合物为药剂学组合物。

[0142] 在本发明一实例中,本发明的组合物为选自由溶液、悬浮液、糖浆剂、乳液、脂质体、散剂、粉末剂、颗粒剂、片剂、缓释制剂及胶囊剂组成的组中的剂型。

[0143] 在本发明一实例中,本发明的组合物为非口服给药型组合物且为脂质体或缓释制剂的剂型。

[0144] 在本发明一实例中,本发明的组合物为口服给药型组合物且为脂质体或缓释制剂的剂型。

[0145] 在本发明一实例中,本发明的组合物为功能性食品(nutraceutical)组合物或食品组合物。

[0146] 在本发明的另一实施方式中,本发明提供预防或治疗与客体中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少相关的疾病或症状的方法,包括向需要本发明的另一实施方式中任一组合物的客体(subject)给药的步骤。与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达减少有关的疾病或症状如在本发明的另一实施方式中所述。

[0147] 在本发明一实例中,本发明的治疗方法在上述给药步骤之前,还包括从客体分离的试样测定细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平的步骤。本发明的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平测定可通过使用任何现有的公知的方法来测定。从本发明的客体分离的试样是指从包含表达过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的细胞的客体分离的试样,并没有特别的限制。

[0148] 在本发明一实例中,观察相对于正常对照组的本发明的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平是否有所减少,在减少的情况下,对上述客体施行上述给药的步骤。

[0149] 在本发明一实例中,正常对照组为从正常人或不显示与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平的减少相关的疾病或症状的客体获得的细胞。

[0150] 在本发明一实例中,本发明的试样从特定组织或器官获得。本发明的特定组织或器官是指与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平的减少有关的疾病或症状相关的组织或器官,可根据上述疾病或症状适当进行选择。

[0151] 在本发明一实例中,本发明的给药是向上述所测定的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平相对于对照组有所减少的特定组织局部给药。

[0152] 本发明的另一实施方式中,本发明提供在客体中分解体脂肪的方法,包括向需要本发明的另一实施方式中任一组合物流用于有需要的客体的步骤。

[0153] 在本发明一实例中,本发明的方法在上述给药步骤之前,还包括从客体分离的试样测定细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平的步骤。本发明的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平测定可通过使用任何现有的已知的方法来测定。从本发明的客体分离的试样是指从包含表达过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的细胞的客体分离的试样,并没有特别的限制。

[0154] 在本发明一实例中,观察相对于平均体重组的平均过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 表达量,本发明的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平是否有所减少,在减少的情况下,对上述客体施行上述给药的步骤。

[0155] 在本发明一实例中,本发明的平均体重组是指具有与对象客体相同的身高的人群的平均体重和相同的体重的人群的集合,优选地,用于测定平均体重组的体重的样本组可在属于与客体相同的种族、民族的人群中随机选择,至少为10人以上,优选为50人以上,更优选地可以为100人以上,通过测定他们的平均体重来用于选定平均体重组的平均体重。并且,代替性地,可利用现有的已知的统计数值。

[0156] 在本发明一实例中,本发明的细胞是从属于上述的平均体重组的客体获得的细胞。

[0157] 在本发明一实例中,本发明的试样是从特定组织或器官获得的。与平均体重组的平均体型相比,本发明的特定组织或器官可从脂肪含有量高的部位适当进行选择。

[0158] 在本发明一实例中,本发明的给药是向上述测定的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达水平相对于对照组有所减少的特定组织局部给药。

[0159] 发明的效果

[0160] 本发明的组合物不仅在使用用于各疾病模型动物中不显示毒性,而且在将其注入各种脑疾病(阿尔茨海默、帕金森氏症、亨廷顿病等)、脑卒中、老化促进、皮肤实验动物模型试验组及正常动物试验组的情况下,相对于对照组,使在多种脏器包括大脑和海马中与线粒体的功能相关的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 和除此之外的多个相关基因(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5(Fibronectin type III domain containing 5, Fndc5)、雌激素相关受体 α (estrogen-related receptor alpha, Erra)、解偶联蛋白1(uncoupling protein 1, UCP-1)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、超氧化物歧化酶2、谷胱甘肽过氧化物酶1的表达显著增加,同时可有用地用于预防或治疗病态、障碍和/或疾病的药剂学组合物,上述病态、障碍和/或疾病包括各种脑疾病(阿尔茨海默、帕金森氏症、亨廷顿病等)的基本行为测试中也具有有所改进的行为,过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 相关退行性神经疾病、代谢性疾病、局部脂肪去除及脂质代谢相关疾病、老化及由老化引起的疾病、肌肉减少(少肌症、萎靡不振)及由肌肉减少引起的疾病。

附图说明

[0161] 图1a、图1b及图1c为示出基于正常鼠模型中的6'-唾液乳糖(6'-SL(sialyllactose))组合物处理的脏器(图1a)、骨骼肌(图1b)及腹部脂肪(图1c)的基因表

达变化的图。图1d、图1e及图1f为示出基于正常鼠模型中的3'-唾液乳糖组合物处理的脏器(图1d)、骨骼肌(图1e)及腹部脂肪(图1f)的基因表达变化的图。

[0162] 图2a及图2b为利用数值(图2a)和蛋白质印迹法(图2b)示出大脑和海马中的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 蛋白质表达变化的图。

[0163] 图3为示出基于神经细胞中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化的图。

[0164] 图4为示出基于C2C12未成熟肌肉细胞中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化的图。

[0165] 图5a及图5b为相对于对照组大脑或海马的相对基因表达变化在各脏器中由((阿尔茨海默病模型)组基因表达量)/(对照组基因表达量)、((阿尔茨海默病模型+3'-唾液乳糖)组基因表达量)/(对照组基因表达量)和((阿尔茨海默病模型+6'-唾液乳糖)组基因表达量)/(对照组基因表达量)数值表示。

[0166] 图6为对于对照组、(阿尔茨海默病模型)组、(阿尔茨海默病模型+3'-唾液乳糖)和(阿尔茨海默病模型+6'-唾液乳糖)组剂型七天的认知能力测试(Morris water maze)实验并用使用示出认知能力测试中的逃离时间。

[0167] 图7a及图7b为示出基于帕金森模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化的图。

[0168] 图8为示出与帕金森氏症动物模型有关的行为实验结果的图。

[0169] 图9a及图9b为示出基于癫痫/惊厥脑疾病模型中的唾液乳糖组合物处理的基因表达变化的图。

[0170] 图10a及图10b为示出基于亨廷顿模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化。

[0171] 图11为示出与亨廷顿疾病模型有关的转棒运转实验的结果。

[0172] 图12为示出观察缺血模型中的缺血体积的结果的图。

[0173] 图13为示出脑出血(ICH)诱导后基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)处理的修改肢体放置测试(MLPT)实验分数变化的图。

[0174] 图14为示出基于鼠模型中的唾液乳糖组合物处理的基因表达变化的图。

[0175] 图15为示出局部给药鼠模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物时皮下脂肪减少效果的图。

[0176] 图16a及图16b为示出基于老化促进模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化的图。

[0177] 图17a及图17b为示出测定细胞中H₂O₂(活性氧组数值)(图17a)及测定线粒体的超氧化物生成(图17b)的图。

[0178] 图18a及图18b为示出测定基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物给药的端粒酶活性的结果。

[0179] 图19a及图19b为示出测定细胞中H₂O₂(活性氧组数值)(图19a)及测定线粒体的超氧化物生成(图19b)的结果的图。

[0180] 图20a及图20b为示出通过在动脉硬化症模型(载脂蛋白E(ApoE)-/-;图20a)和MASMs(图20b)中处理唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)来分析端粒酶活性的结果的

图。

[0181] 图21a及图21b为示出基于皮肤实验模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化的图。

[0182] 图22a及图22b为示出分化脂肪细胞中给药6'-唾液乳糖(图22a)和3'-唾液乳糖(图22b)时细胞中脂肪的变化的图。

[0183] 图23a及图23b为示出分化的脂肪细胞中给药6'-唾液乳糖(图23a)和3'-唾液乳糖(图23b)时细胞中脂肪的变化的细胞的光学显微镜照片。

[0184] 图24为示出影响分化的脂肪细胞中细胞的存活率的6'-唾液乳糖的影响的图。

[0185] 图25为示出分化的脂肪细胞中基于唾液乳糖的甘油分泌的变化的图。

[0186] 图26a及图26b为示出基于唾液乳糖皮下注射的高脂饮食小鼠的皮肤变化的图。

具体实施方式

[0187] 以下,通过实施例进一步详细说明本发明。这些实施例仅用于具体说明本发明,对于本发明所属领域的普通技术人员而言,根据本发明的要旨,本发明的范围并不局限于这些实施例是显而易见的。

[0188] 实施例1.正常鼠模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达促进评价

[0189] 为了观察相对于给药唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)之前,按各脏器的相对基因表达变化,4周龄的C57BL/6小鼠购自Dooyeul生物技术(韩国)。水自由供给,销售的颗粒饲料(韩国Dooyeul生物技术)供给2周。6周龄时,将小鼠(初始体重平均 21.4 ± 1.1 g)随机分为如下的三组(每组由8只小鼠组成)并维持了它们的饮食10周(共24只动物):

[0190] 对照组:正常饮食小鼠组

[0191] 3'-唾液乳糖给药组:除正常饮食组外,额外给药3'-唾液乳糖(3'-唾液乳糖,西格玛)(以小鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)

[0192] 6'-唾液乳糖给药组:除正常饮食组外,额外给药6'-唾液乳糖(6'-唾液乳糖,西格玛)(以小鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)。

[0193] 以每天口服给药的方式给药唾液乳糖或蒸馏水(Deionized Water)。在动物室中保管小鼠10周,并绝食12小时后牺牲小鼠。每隔5天测定饮食摄取量及体重变化量。3'-唾液乳糖(3'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖(3'-N-Acetylneuraminyl-D-lactose)、3'-唾液酸D-乳糖(3'-Sialyl-D-lactose)或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc)或6'-唾液乳糖(6'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖(6'-N-Acetylneuraminyl-lactose)、6'-唾液酸D-乳糖(6'-Sialyl-D-lactose)或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc)购自西格玛奥德里奇(西格玛-Aldrich)。

[0194] 在八种主要脏器(心脏、海马、脑、脊髓、肺、肝脏、脾脏和肾脏)和三种骨骼肌和腹部脂肪等中定量比较如上所述的基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物给药的基因表达变化。由三唑试剂(TRIZol agent,英杰(Invitrogen))提取核糖核酸(RNA)。使用如上提取定量的核糖核酸和逆转录系统(美国普洛麦格(Promega))来合成互补脱氧核糖核酸(cDNA)。利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白1、超氧化

物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物和探针(应用生物系统(Applied biosystems);过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、Mm00447181_m1、磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)及Mm99999915_q1)来测定过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的表达形态。聚合酶链式反应(PCR)和分析使用了转子基因3000系统(Rotor-Gene 3000system)(澳大利亚悉尼科贝特研究(Corbett Research)),其结果如图1所示。

[0195] 在图1中,相对于给药唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)之前,按各脏器的相对基因表达变化是由数值表示在各脏器中(唾液乳糖给药组基因表达量)/(对照组基因表达量)。在6'-唾液乳糖的情况下,如大部分的脏器(图1a)、骨骼肌(图1b)和腹部脂肪(图1c)所示,在多个身体部位中,相对于6'-唾液乳糖给药组阴性对照组,包含过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的多个分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 及解偶联蛋白1)的表达程度非常高。即,可以确认6'-唾液乳糖促进正常鼠的多个脏器、肌肉和脂肪中与过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 相关的多个基因的表达。在3'-唾液乳糖的情况下,大部分的脏器(图1d)、骨骼肌(图1e)和腹部脂肪(图1f)中可以看出,相对于阴性对照组,在多个身体部位中3'-唾液乳糖给药组的多个分析对象的表达程度略有增加,但是相对于6'-唾液乳糖其效果少。

[0196] 图1a、图1b及图1c为示出基于正常鼠模型中的6'-唾液乳糖组合物处理的脏器(图1a)、骨骼肌(图1b)及腹部脂肪(图1c)的基因表达变化的图。图1d、图1e及图1f为示出基于正常鼠模型中的3'-唾液乳糖组合物处理的脏器(图1d)、骨骼肌(图1e)及腹部脂肪(图1f)的基因表达变化的图。图1a至图1f中纵轴表示相对于对照组的相对基因表达比。

[0197] 实施例2.基于老龄鼠模型的大脑和海马中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖&6'-唾液乳糖)组合物处理的过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 蛋白质表达促进评价

[0198] 为了观察相对于给药唾液乳糖(3'-唾液乳糖&6'-唾液乳糖)之前的相对蛋白质表达,4周龄的ICR小鼠购自中央实验动物(韩国)。水自由供给,销售的颗粒饲料(韩国Dooyeul生物技术)供给2周。6周龄时,将小鼠(初始体重平均 20.3 ± 1.5 g)随机分为如下的三组(每组由8只小鼠组成)并维持了它们的饮食42周(共24只动物):

[0199] 对照组:正常饮食小鼠组

[0200] 3'-唾液乳糖给药组:向正常饮食组处理3'-唾液乳糖(3'-唾液乳糖,西格玛(Sigma))(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)

[0201] 6'-唾液乳糖给药组:向正常饮食组处理6'-唾液乳糖(6'-SL,西格玛) (以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)

[0202] 每天以口服给药的方式给药唾液乳糖或蒸馏水。在动物室中保管小鼠42周,并绝食12小时后牺牲小鼠。每隔5天测定饮食摄取量及体重变化量。3'-唾液乳糖(3'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、3'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc)或6'-唾液乳糖(6'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、6'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc)购自西格玛奥德里奇。

[0203] 图2为用数值(图2a)和蛋白质印迹法(图2b)示出大脑和海马中的过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 蛋白质表达变化的图。在图2b中,BB1 6'为6'-唾液乳糖。在各部位中,通过定量'过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 蛋白质表达量'和'磷酸甘

油醛脱氢酶蛋白质表达量'来示出其值的相对比(过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 蛋白质表达量)/(磷酸甘油醛脱氢酶蛋白质表达量)对于对照组、3'-唾液乳糖给药组、6'-唾液乳糖给药组由数值示出。在所有大脑和海马中,相对于阴性对照组,6'-唾液乳糖给药组的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 表达程度非常高。即,可以确认6'-唾液乳糖促进正常鼠的大脑的多个部分中过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 蛋白质的表达。

[0204] 图2为示出基于老化鼠模型中的唾液乳糖组合物给药的大脑和海马部分的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 蛋白质表达变化。对生后6周的雄性ICR小鼠以每组为8只分为对照组和6'-唾液乳糖给药组进行饮食调节实验42周,牺牲小鼠并取出大脑和海马。大脑是取出大脑皮质。利用数值(图2a)和蛋白质印迹法(图2b)表示取出的大脑和海马中的过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 蛋白质表达变化。

[0205] 实施例3.基于神经细胞实验中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达促进评价

[0206] 为了确认唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)是否在神经细胞中也具有促进过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 基因相关基因的表达的效果,进行如下试验。

[0207] 成神经细胞(小鼠神经母细胞瘤(Neuro-2a),美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, USA))是在6-孔板的孔中包含10%的牛胎儿血清、100U的青霉素及0.1mg/mL的链霉素的DMEM培养基中,在37℃、5%的CO₂/95%的大气条件下培养。小鼠神经母细胞瘤细胞为快速生长的小鼠神经母细胞瘤细胞瘤细胞系(neuroblastoma cell line)。以每孔6000个密度接种后,将小鼠神经母细胞瘤细胞为 5×10^6 细胞/ml程度融合的孔中添加0.1mg/ml的浓度的唾液乳糖并在相同的条件下培养24小时。唾液乳糖(3'-唾液乳糖或6'-唾液乳糖)使用与实施例1中记载的相同的。除非另有说明,应理解为唾液乳糖(3'-唾液乳糖或6'-唾液乳糖)及其使用浓度与实施例1中所记载的相同。以培养基体积的1/1000处理阴性对照组用生理食盐水。在37℃的温度下培养处理各样品的多个细胞后,冷食盐水清洗两次,并用三唑试剂(英杰)提取核糖核酸。通过利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5,过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物(Primer)和探针(probe)(应用生物系统;过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、Mm00447181_m1、磷酸甘油醛脱氢酶及Mm99999915_q1)来测定过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达形态。聚合酶链式反应和分析利用了转子基因3000系统(澳大利亚悉尼科贝特研究),其结果如图3所示。

[0208] 图3为示出基于神经细胞中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化的图。如图3所示,比较对小鼠神经母细胞瘤细胞处理唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)24小时的给药组和未进行处理的对照组的结果,与阴性对照组相比,唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)给药组对包含过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的各种分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)表达量显著增加。6'-唾液乳糖大大促进了在神经细胞中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 行管的多个基因的表达,并可以确认3'-唾液乳糖

的促进效果小于6'-唾液乳糖。

[0209] 实施例4. 基于肌肉细胞实验中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达促进评价

[0210] 为了确认唾液乳糖是否在实际肌肉细胞中具有促进过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 基因的表达的效果,进行了如下试验。

[0211] C2C12未成熟肌肉细胞购自美国组织细胞收藏中心(American Tissue Culture Collection, ATCC), 在含有10%的FBS(牛胎儿血清培养基(美国吉卜卡(Gibco)))的DMEM(达尔伯克改良伊格尔培养基(美国吉卜卡))培养基中每隔两天换一次培养基并在37℃、5%的CO₂培养器中培养直至融合(confluent) 70%。肌肉细胞的分化在含有2%的HS(马血清, 美国吉卜卡)的培养基中培养诱导。在包含2%的马血清的培养基中培养4天的肌肉细胞处理各种浓度的唾液乳糖。对阴性对照组处理培养基体积的1/1000的生理食盐水。在37℃的温度下培养处理各样品的细胞24小时后, 用冷食盐水清洗两次, 并用三唑试剂(英杰)提取核糖核酸。利用在上述企图的定量的1 μ g/ μ l的核糖核酸和逆转录系统(美国普洛麦格)合成互补脱氧核糖核酸。

[0212] 利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白1、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物和探针(应用生物系统; 过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、Mm00447181_m1、磷酸甘油醛脱氢酶及Mm99999915_q1)测定多个过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的表达形态。聚合酶链式反应和分析利用了转子基因3000系统(澳大利亚悉尼科贝特研究), 其结果如图4所示。

[0213] 图4为示出基于C2C12未成熟肌肉细胞中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化的图。比较对C2C12未成熟肌肉细胞处理唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)24小时的给药组和未进行处理的对照组的结果, 如图4所示, 相对于阴性对照组, 唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)给药组对包含过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的各种分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达量显著增加。6'-唾液乳糖促进了C2C12未成熟肌肉细胞中与过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 相关的多个基因的表达, 并可以确认3'-唾液乳糖的促进效果低于6'-唾液乳糖。

[0214] 实施例5. 基于阿尔茨海默脑疾病模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达促进评价及认知能力测试改善评价

[0215] 为了确认基于阿尔茨海默脑疾病模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达及认知能力测试变化, 6周龄的小鼠购自中央实验动物(韩国)。水自由供给, 销售的颗粒饲料(韩国Dooyeul生物技术)供给2周。8周龄时将小鼠分为如下三组(每组由8只小鼠组成): 将对生后8周的雄性c57/BL6小鼠(正常鼠; 初始体重平均35.6 \pm 3.3g)处理正常饮食的组以8只小鼠为对照组, 将生后8周的雄性阿尔茨海默病模型小鼠(3 \times Tg; 初始体重平均33.9 \pm 2.8g)以每组为8只随机分为下述三个不同的饮食处理组并保持它们的饮食10周(共32只动物):

[0216] 对照组: 未给药唾液乳糖的摄取正常饮食的正常鼠(8只)

[0217] (阿尔茨海默病模型)组:未给药唾液乳糖的摄取正常饮食的阿尔茨海默模型(8只)

[0218] (阿尔茨海默病模型+3'-唾液乳糖)组:除正常饮食组外,额外给药3'-唾液乳糖(3'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)阿尔茨海默模型(8只)

[0219] (阿尔茨海默病模型+6'-唾液乳糖)组:除正常饮食组外,额外给药6'-唾液乳糖(6'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)阿尔茨海默模型(8只)

[0220] 每天以口服给药的方式给药唾液乳糖或蒸馏水。在动物室中保管小鼠10周,并绝食12小时后牺牲小鼠。每隔5天测定饮食摄取量及体重变化量。3'-唾液乳糖(3'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、3'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc)或6'-唾液乳糖(6'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、6'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc)购自西格玛奥德里奇。

[0221] 在脑疾病相关两种主要脏器(海马及大脑)中定量比较基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化。大脑为大脑皮质。利用三唑试剂(英杰)提取核糖核酸。利用上述中提取定量的核糖核酸和逆转录系统(美国普洛麦格)合成互补脱氧核糖核酸。利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物和探针(应用生物系统;过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、Mm00447181_m1,磷酸甘油醛脱氢酶及Mm99999915_q1)测定多个过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达形态。聚合酶链式反应和分析利用了转子基因3000系统(澳大利亚悉尼科贝特研究),其结果如图5所示。

[0222] 图5为示出基于阿尔茨海默模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物的基因表达变化的图。在图5中,相对于对照组大脑或海马的相对基因表达变化由各脏器中((阿尔茨海默病模型)组基因表达量)/(对照组基因表达量)、((阿尔茨海默病模型+3'-唾液乳糖)组基因表达量)/(对照组基因表达量)与((阿尔茨海默病模型+6'-唾液乳糖)组基因表达量)/(对照组基因表达量)的数值比表示。将生后8周雄性阿尔茨海默模型(3 \times Tg)小鼠每组为8只,分成给药唾液乳糖的组和未给药的组,经10周的饮食调节实验比较了正常饮食正常鼠(c57/BL6)的基因表达量。如图5所示,以正常饮食的正常鼠对照组为基准时,与正常对照组相比,给药6'-唾液乳糖的(阿尔茨海默病模型+6'-唾液乳糖)组在大脑(图5a)和海马(图5b)中包含过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的各种分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达程度略有下降,但是相对于未给药唾液乳糖的(阿尔茨海默病模型)组,表达程度非常高。可知,相对于6'-唾液乳糖,3'-唾液乳糖的相关基因表达促进效果相对下降。即,6'-唾液乳糖对阿尔茨海默病模型鼠的大脑和海马中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 相关的多个基因(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达量最显著性增加。

[0223] 图6为对于对照组、(阿尔茨海默病模型)组、(阿尔茨海默病模型+3'-唾液乳糖)和(阿尔茨海默病模型+6'-唾液乳糖)组进行7天的认知能力测试(Morris water maze)实验

并用数值示出认知能力测试中的逃离时间。即使经过试验时间未给药唾液乳糖的(阿尔茨海默病模型)组的认知能力测试逃离时间几乎没有得到改善,但是相反,可知给药6'-唾液乳糖的(阿尔茨海默病模型+6'-唾液乳糖)组的测试逃离时间明显加快,与正常饮食的正常鼠对照组相比略有下降。可知与6'-唾液乳糖相比,3'-唾液乳糖的认知能力改善效果相对下降。即,可知6'-唾液乳糖在阿尔茨海默病模型鼠中最佳地改善认知能力。

[0224] 实施例6.基于帕金森脑疾病模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达促进评价及行为实验改善评价

[0225] 为了观察基于帕金森脑疾病模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖&6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达及行为实验改善变化,13周龄的正常SD大鼠及帕金森脑疾病模型购自中央实验动物(韩国)。水自由供给,销售的颗粒饲料(韩国Dooyeul生物技术)供给1周。14周龄时,将SD大鼠分为如下4组(每组由8只形成):将对生后14周的雄性SD大鼠(正常鼠;初始体重平均 355.6 ± 32.3 g)处理正常饮食的组以8只为对照组,通过生后8周龄时给药6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)来在13周龄时给药6-羟基多巴胺诱导SD大鼠帕金森氏症模型以每组为8只随机分为如下三个不同的饮食处理组,从14周龄(初始体重平均 363.6 ± 29.8 g)开始保持这些饮食10周(共32只动物):

[0226] 对照组:未给药唾液乳糖的摄取正常饮食的正常鼠(8只)

[0227] (帕金森氏症模型)组:未给药唾液乳糖的摄取正常饮食的帕金森模型(8只)

[0228] (帕金森氏症模型+3'-唾液乳糖)组:在正常饮食组处理3'-唾液乳糖(3'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)帕金森模型(8只)

[0229] (帕金森氏症模型+6'-唾液乳糖)组:在正常饮食组处理6'-唾液乳糖(6'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)帕金森模型(8只)

[0230] 每天以口服给药的方式给药唾液乳糖或蒸馏水。在动物室中保管小鼠10周,并绝食12小时后牺牲小鼠。每隔5天测定饮食摄取量及体重变化量。3'-唾液乳糖(3'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、3'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc)或6'-唾液乳糖(6'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、6'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc)购自西格玛奥德里奇。

[0231] 在脑疾病相关两种主要脏器(海马、大脑)中定量比较基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化。用三唑试剂(英杰)提取核糖核酸。利用上述中提取定量的核糖核酸和逆转录系统(美国普洛麦格)合成互补脱氧核糖核酸。利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物和探针(应用生物系统;过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、Mm00447181_m1,磷酸甘油醛脱氢酶及Mm99999915_q1)测定多个过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达形态。聚合酶链式反应和分析利用了转子基因3000系统(澳大利亚悉尼科贝特研究),其结果如图7a及图7b所示。

[0232] 图7a及图7b为示出基于帕金森模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化。通过生后8周龄时给药6-羟基多巴胺来在13周龄供给6-羟基多巴胺诱导SD大鼠帕金森氏症模型以每组为8只分成给药唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)的组和未给药的组,进行8周的饮食调节实验,与对生后13周的雄性SD大鼠(正常

鼠)正常饮食处理的对照组的基因表达量进行了比较。在图7a及图7b中,相对于大脑或海马的正常鼠基因表达变化在脏器中由((帕金森氏症模型)组基因表达量)/(对照组基因表达量)、((帕金森氏症模型+3'-唾液乳糖)组基因表达量)/(对照组基因表达量)和((帕金森氏症模型+6'-唾液乳糖)组基因表达量)/(对照组基因表达量)的数值表示。其结果,如图7a及图7b所示,以正常饮食的正常鼠对照组为基准时,与正常对照组相比,给药(帕金森氏症模型+6'-唾液乳糖)组在大脑(图7a)和海马(图7b)中包含过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的各种分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达程度略有下降,但是相对于未给药唾液乳糖的(帕金森模型)组,表达程度非常优秀。可知,相对于6'-唾液乳糖,3'-唾液乳糖的相关基因表达促进效果相对下降。即,6'-唾液乳糖对帕金森氏症模型鼠的大脑和海马中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 相关的多个基因的表达量显著增加。

[0233] 图8为示出对帕金森氏症动物模型的行为实验结果的图。在图8中,纵轴为对对照组、(帕金森氏症模型)组、(帕金森氏症模型+3'-唾液乳糖)组和(帕金森氏症模型+6'-唾液乳糖)组利用垂直的窗棂工具进行行为能力实验(转角及下去)的结果,是转角和下去时间的数值。垂直的窗棂工具为5cm×55cm×8cm的开放的箱子形态,正面是0.8cm×0.8cm的金属线,剩余面是黑色的有机玻璃,并将底部制成5cm长,以确保安全。当进行实验时,将小鼠朝上放置距设备顶部3cm的位置,在试验前,顺应其装置三次于两天。若属在60秒内下不来,则重复进行。转角时间为朝上的鼠转身朝下所需时间,下去的时间为从鼠转角后下来的整个实验时间减去转角时间的时间。

[0234] 如图8所示,相对于正常饮食的正常鼠对照组,未给药唾液乳糖的(帕金森氏症模型)组转角时间和下去时间花了2~3倍以上,相反,给药6'-唾液乳糖的(帕金森氏症模型+唾液乳糖)组转角时间和下去时间与对照组几乎类似。即,可以确认6'-唾液乳糖具有改善帕金森氏症模型鼠中行为能力(转角或下去)。可知与6'-唾液乳糖相比,3'-唾液乳糖的行为能力改善效果相对下降。

[0235] 实施例7.基于癫痫/惊厥脑疾病模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达促进评价

[0236] 为了观察基于癫痫/惊厥脑疾病模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化,生后4周龄的正常SD大鼠及癫痫/惊厥脑疾病模型(野田癫痫大鼠(Noda Epileptic Rat,NER)购自中央实验动物(韩国)。水自由供给,销售的颗粒饲料(韩国Dooyeul生物技术)供给2周。6周龄时,将SD大鼠分为如下4组(每组由8只形成):将对生后6周龄雄性SD大鼠(正常鼠;初始体重平均 176.3 ± 13.3 g)处理正常饮食的组以8只为对照组,将生后6周龄的癫痫/惊厥脑疾病模型(初始体重平均 181.8 ± 11.3 g)以每组8只随机分成下述三个不同饮食处理组,从6周龄开始保持这些饮食10周(共32只动物):

[0237] 对照组:未给药唾液乳糖的摄取正常饮食的正常鼠(8只)

[0238] (癫痫/惊厥脑疾病模型)组:未给药唾液乳糖的摄取正常饮食的癫痫/惊厥脑疾病模型(8只)

[0239] (癫痫/惊厥脑疾病模型+3'-唾液乳糖)组:在正常饮食组中处理3'-唾液乳糖(3'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)癫痫/惊厥脑疾病模型(8只)

[0240] (癫痫/惊厥脑疾病模型+6'-唾液乳糖)组:在正常饮食组中处理6'-唾液乳糖(6'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)癫痫/惊厥脑疾病模型(8只)

[0241] 每天以口服给药的方式给药唾液乳糖或蒸馏水。在动物室中保管大鼠10周,并绝食12小时后牺牲大鼠。每隔5天测定饮食摄取量及体重变化量。3'-唾液乳糖(3'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、3'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc)或6'-唾液乳糖(6'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、6'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc)购自西格玛奥德里奇。

[0242] 在脑疾病相关两种主要脏器(海马、大脑)中定量比较基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化。用三唑试剂(英杰)提取核糖核酸。利用上述中提取定量的核糖核酸和逆转录系统(美国普洛麦格)合成互补脱氧核糖核酸。利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5/过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α /雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物和探针(应用生物系统;过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α ,Mm00447181_m1、999915_q1)测定多个过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达形态。聚合酶链式反应和分析利用了转子基因3000系统(澳大利亚悉尼科贝特研究),其结果如图9所示。

[0243] 图9a及图9b为示出基于癫痫/惊厥脑疾病模型中的唾液乳糖组合物处理的基因表达变化图。在图9a及图9b中,纵轴为相对于对照组大脑或海马的相对基因表达变化在各脏器中((癫痫/惊厥脑疾病模型)组基因表达量)/(对照组基因表达量)、((癫痫/惊厥脑疾病模型+3'-唾液乳糖)组((癫痫/惊厥脑疾病模型+6'-唾液乳糖)组基因表达量)/(对照组基因表达量)的数值。分为生后6周龄的癫痫/惊厥疾病模型以每组8只给药唾液乳糖的组和未给药的组进行10周的饮食调节实验,与对生后6周雄性SD大鼠(正常鼠)处理正常饮食的对照组的基因表达量进行比较。其结果,如图9a及图9b所示,正常饮食的正常鼠对照组为基准时,与正常对照组相比,给药唾液乳糖的(癫痫/惊厥疾病模型+唾液乳糖)组在大脑(图9a)和海马(图9b)中包含过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的各种分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达程度略有下降,但是与未给药唾液乳糖的(癫痫/惊厥模型)组相比,表达程度非常优秀。即,6'-唾液乳糖在癫痫/惊厥疾病模型鼠的大脑和海马中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 相关的基因的表达量显著增加。可知与6'-唾液乳糖相比,3'-唾液乳糖的基因表达促进效果相对下降。

[0244] 实施例8.基于亨廷顿脑疾病模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达促进评价及转棒运转时间改善评价

[0245] 为了观察基于亨廷顿脑疾病模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达及认知能力测试变化,4周龄的小鼠购自中央实验动物(韩国)。水自由供给,销售的颗粒饲料(韩国Dooyeul生物技术)供给1周。5周龄时,将小鼠分成如下三组(每组由8只小鼠组成):将对生后5周雄性c57/BL6小鼠(正常鼠;初始体重平均 25.3 ± 4.3 g)处理正常饮食的组以8只为对照组,对生后5周的雄性亨廷顿病模型小鼠(R6/2系列(B6CBATg(HDexon1)62Gpb/3J、111CAGs)的转基因亨廷顿病小鼠;初始体重平均 26.9 ± 4.8 g)以每组8只随机分成下述三个不同饮食处理组,保持这些饮食10周1(共32只动物):

[0246] 对照组:未给药唾液乳糖的摄取正常饮食的正常鼠(8只)

[0247] (亨廷顿病模型)组:未给药唾液乳糖的摄取正常饮食的亨廷顿模型(8只)

[0248] (亨廷顿病模型+3'-唾液乳糖)组:在正常饮食组中处理3'-唾液乳糖(3'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)亨廷顿模型(8只)

[0249] (亨廷顿病模型+6'-唾液乳糖)组:在正常饮食组中处理6'-唾液乳糖(6'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)亨廷顿模型(8只)

[0250] 每天以口服给药的方式给药唾液乳糖或蒸馏水。在动物室中保管小鼠10周,并绝食12小时后牺牲小鼠。每隔5天测定饮食摄取量及体重变化量。3'-唾液乳糖(3'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、3'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc)或6'-唾液乳糖(6'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、6'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc)购自西格玛奥德里奇。

[0251] 在脑疾病相关两种主要脏器(海马及大脑)中定量比较基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化。用三唑试剂(英杰)提取核糖核酸。利用上述中提取定量的核糖核酸和逆转录系统(美国普洛麦格)合成互补脱氧核糖核酸。利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物和探针(应用生物系统;过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α ,Mm00447181_m1、磷酸甘油醛脱氢酶及Mm99999915_q1)测定多个过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达形态。聚合酶链式反应和分析利用了转子基因3000系统(澳大利亚悉尼科贝特研究),其结果如图10所示。

[0252] 图10a及图10b为示出基于亨廷顿模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化的图。在图10a及图10b中,纵轴为相对于正常鼠对照组大脑或海马的基因表达变化在各脏器中((亨廷顿病模型)组基因表达量)/(对照组基因表达量)、((亨廷顿病模型+3'-唾液乳糖)组基因表达量)/(对照组基因表达量)和((亨廷顿病模型+6'-唾液乳糖)组基因表达量)/(对照组基因表达量)的数值。将生后5周雄性亨廷顿模型小鼠以每组为8只分成给药唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)的组和未给药的组来进行饮食调节实验10周,并与正常饮食正常鼠(c57/BL6)的基因表达量进行比较。其结果,如图10a及图10b所示,当以正常饮食的正常鼠为对照组时,与正常对照组相比,给药6'-唾液乳糖的(亨廷顿病模型+6'-唾液乳糖)组中的大脑(图10a)和海马(图10b)中包含过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的各种分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、脑源性神经营养因子、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达程度略有下降,但是,与未给药唾液乳糖的(亨廷顿病模型)组相比,表达程度很高。即,唾液乳糖对亨廷顿病模型鼠的大脑和海马中与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 相关的多个基因的表达量显著增加。可知3'-唾液乳糖与6'-唾液乳糖相比,6'-唾液乳糖的基因表达促进效果相对较低。

[0253] 并且,相对于正常饮食的正常鼠对照组,通过计算(亨廷顿病模型)组、(亨廷顿病模型+3'-唾液乳糖)组和(亨廷顿病模型+6'-唾液乳糖)组的转棒运转时间变化对行为改善进行评价。转棒运转实验是确认((亨廷顿病模型)组的转棒运转时间)/(对照组转棒运转时间)与((亨廷顿病模型+3'-唾液乳糖)组的转棒运转时间)/(对照组转棒运转时间)和((亨

廷顿病模型+6'-唾液乳糖)组的转棒运转时间)/(对照组转棒运转时间)的数值的变化的实验。转棒运转时间利用转棒装置(在3分钟时间内以4rpm至40rpm的旋转速度加速的棒;韩国正都仪器(Jungdo Instruments))测定。对4周龄的鼠进行转棒试验后,从5周龄开始进行转棒试验测定直至掉下去的平均时间。

[0254] 图11为示出对亨廷顿疾病模型的转棒运转实验的结果的图。在图11中,纵轴表示((亨廷顿病模型)组的转棒运转时间)/(对照组转棒运转时间)与((亨廷顿病模型+3'-唾液乳糖)组的转棒运转时间)/(对照组转棒运转时间)和((亨廷顿病模型+6'-唾液乳糖)组的转棒运转时间)/(对照组转棒运转时间)的数值。其结果,如图11所示,与正常饮食的正常鼠对照组相比,对(亨廷顿病模型)组、(亨廷顿病模型+3'-唾液乳糖)组和(亨廷顿病模型+6'-唾液乳糖)组比较转棒运转实验时,与未给药唾液乳糖的(亨廷顿病模型)组相比,给药6'-唾液乳糖的(亨廷顿病模型+6'-唾液乳糖)组的转棒运转时间有所增加,3'-唾液乳糖的运转时间增加的效果小于6'-唾液乳糖。即,可知6'-唾液乳糖在亨廷顿病模型中可以最能促进行为改善。

[0255] 实施例9.基于脑卒中模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的缺血体积及修改肢体放置测试分数变化

[0256] 为了确认脑卒中模型中基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的缺血体积及修改肢体放置测试(Modified limb placing test, MLPT)分数变化,4周龄的小鼠购自中央实验动物(韩国)。水自由供给,销售的颗粒饲料(韩国Dooyeul生物技术)供给1周。包括临时及永久大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)闭塞及脑出血(intracerebral hemorrhage: ICH)的脑卒中模型使用6周龄雄性斯普拉-道来大鼠(Sprague-Dawley rat)(体重平均 185.3 ± 15.8 g)及雄性BALB/c小鼠(体重平均 24.6 ± 3.8 g)制成。为了比较唾液乳糖给药效果,诱发脑卒中后,以每组8只随机分成三个不同的腹腔给药组(共24只动物)腹腔给药1小时:

[0257] 对照组:溶解缓冲液对照组媒介腹腔给药组(8只)

[0258] 3'-唾液乳糖处理:3'-唾液乳糖溶解缓冲液媒介腹腔给药组(8只)

[0259] 6'-唾液乳糖处理:6'-唾液乳糖溶解缓冲液媒介腹腔给药组(8只)

[0260] 局部脑梗死小鼠模型进一步使用成脑梗死模型,在此模型中诱发脑梗死后,将唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)腹腔给药3小时。

[0261] 对照组:溶解缓冲液对照组媒介腹腔给药组(8只)

[0262] 3'-唾液乳糖处理:3'-唾液乳糖溶解缓冲液媒介腹腔给药组(8只)

[0263] 6'-唾液乳糖处理:6'-唾液乳糖溶解缓冲液媒介腹腔给药组(8只)

[0264] 缺血体积测定通过使用红四氮唑(TTC, 氯化2,3,7-三苯基四唑(2,3,7-triphenyltetrazolium chloride))对缺血诱导24小时后缺血体积(梗塞及边界区域)的体积如下进行。抽取大脑后,以1mm的厚度切割前额并浸渍于2%的红四氮唑溶液中。接着,用PBS-4%的多聚甲醛固定染色的切片后,用图像分析系统测定切片的缺血产生部位及未产生区域。如下校准基于脑肿的值:校准的缺血体积值:测定的缺血面积 $\times 1 - \{[(\text{同侧未产生区域} - \text{对侧未产生区域}) / \text{对侧未产生区域}]\}$ 。缺血体积由总未产生体积的百分比表示。

[0265] 图12为示出观察缺血模型中的缺血体积的结果的图。图12的结果为将3'-唾液乳糖或6'-唾液乳糖处理在施加临时或永久的大脑中动脉闭塞的小鼠模型时,观察体内基于

唾液乳糖的缺血性神经损伤保护效果的结果。如图12所示,基于6'-唾液乳糖处理的缺血体积减少在局部小脑永久缺血模型(50%)、局部小脑临时缺血模型(60%)及局部大脑永久闭塞模型(40%)中均为一半左右。可知与6'-唾液乳糖相比,对3'-唾液乳糖的缺血性神经损伤的保护效果相对下降。

[0266] 并且,为了观察脑出血模型中基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)的神经退行性抑制,进行了修改肢体放置测试。修改肢体放置测试脑出血诱导一天前、一天后及三天后如下进行。将模型悬吊在离桌10cm的位置后,对将前腿伸向桌子的程度进行评价(正常为0分、不正常弯曲为1分)。接着,使模型的前脚通过边缘移动,轻轻拉下每个前腿,评价回收程度(第二次实验:前腿;第三次实验:后腿)。最后,将大鼠放置在桌子的边缘,评价前腿的侧位。对三次评价的结果评分如下:正常,0分;延缓(至少2秒)和/或不完全进行,1分;未进行,2分。共7分显示最大神经性缺陷,0分表示正常。

[0267] 图13为示出脑出血诱导后基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)处理的修改肢体放置测试试验分数变化的图。如图13所示,在脑出血模型中处理6'-唾液乳糖时,如脑出血模型诱导第一天和第三天结果所示,与对照组相比,修改肢体放置测试分数下降。即,具有基于6'-唾液乳糖处理的神经退行抑制效果。可知与6'-唾液乳糖相比,3'-唾液乳糖的神经退行抑制效果相对下降。

[0268] 实施例10. 基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的腹部脂肪基因表达变化及局部脂肪去除评价

[0269] 为了观察鼠模型中基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化及局部脂肪去除效果,4周龄的雄性ob小鼠(C57BL/6J-ob/ob)模型购自中央实验动物(韩国)。水自由供给,供给高脂肪饲料(啮齿动物饮食60卡路里百分比的脂肪(Rodent Diet with 60kcal%fat))2周。对生后6周的雄性ob小鼠(C57BL/6J-ob/ob)模型(初始体重平均 34.2 ± 3.7 g)以每组为8只随机分成下述三个不同的饮食处理组,并保持这些饮食10周(共24只动物):

[0270] 对照组:摄取未处理唾液乳糖的高脂肪饲料(啮齿动物饮食60卡路里百分比的脂肪)饮食的模型(8只)

[0271] 3'-唾液乳糖给药组:对高脂肪饮食组处理3'-唾液乳糖(3'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)模型(8只)

[0272] 6'-唾液乳糖给药组:对高脂肪饮食组处理6'-唾液乳糖(6'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)模型(8只)

[0273] 每天以口服给药的方式给药唾液乳糖或蒸馏水。在动物室中保管小鼠10周,并绝食12小时后牺牲小鼠。每隔5天测定饮食摄取量及体重变化量。3'-唾液乳糖(3'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、3'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc)或6'-唾液乳糖(6'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、6'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc)购自西格玛奥德里奇。

[0274] 在腹部定量比较基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因变化。利用三唑试剂(英杰)提取核糖核酸。利用上述中提取定量的核糖核酸和逆转录系统(美国普洛麦格)合成互补脱氧核糖核酸。利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关

受体 α 、解偶联蛋白-1、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物和探针(应用生物系统;过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、Mm00447181_m1、磷酸甘油醛脱氢酶及Mm99999915_q1)测定多个过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的表达形态聚合酶链式反应和分析利用了转子基因3000系统(澳大利亚悉尼科贝特研究),其结果如图14所示。

[0275] 图14为示出基于鼠模型中的唾液乳糖组合物处理的基因表达变化的图。在图14中,纵轴为在摄取高脂肪饲料饮食的模型中相对于唾液乳糖给药前的腹部脂肪基因表达,在腹部脂肪(3'-唾液乳糖给药组的基因表达量)/(对照组基因表达量)和(6'-唾液乳糖给药组的基因表达量)/(对照组基因表达量)的数值。将生后6周的雄性小鼠以每组为8只分成对照组和唾液乳糖给药组,进行10周的高脂肪饮食调节实验。其结果,如图14所示,与阴性对照组相比,给药6'-唾液乳糖的实验组对各种分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达量显著性增加两倍左右。可知,与6'-唾液乳糖相比,3'-唾液乳糖的与过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 相关的多个基因的表达促进效果略有下降。

[0276] 并且,在摄取未处理唾液乳糖的高脂肪饲料饮食的上述ob小鼠(C57BL/6J-ob/ob)模型鼠中,利用装配辊(0.5mm,INTO MR,(株)intomedi)确认基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)给药的局部脂肪去除效果。具体地,剃掉鼠的背部毛并对暴露皮肤涂抹食盐水平缓冲液中0.1M浓度的唾液乳糖后,摩擦上述装配辊来通过皮肤进行吸收。对照组除了使用没有唾液乳糖的上述缓冲液之外相同。其结果如图15所示。图15为示出局部给药鼠模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物的情况下基因表达变化的图。在图15中,3'-SL、6'-SL及CTL分别为3'-唾液乳糖给药组,6'-唾液乳糖给药组及对照组,使摄取高脂肪饮食10周后,通过使用装配辊来在0天和4天局部给药唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物后,在第7天利用皮肤镜(Dermoscopy)观察的结果。

[0277] 其结果,如图15所示,可以确认与未给药的阴性对照部分相比,借助装配辊给药6'-唾液乳糖的部分局部去除了脂肪。可知与6'-唾液乳糖相比,3'-S的局部脂肪去除效果相对下降。

[0278] 实施例11.基于老化促进模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的按身体部位的基因表达变化和基于端粒功能和活性氧组调节的老化相关慢性疾病防止效果

[0279] 为了在老化促进模型中确认基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的按身体部位的基因表达变化,生后4周的雄性老化促进模型小鼠(SAM P1/Sku Slc)购自中央实验动物(韩国)。水自由供给,销售的颗粒饲料(韩国Dooyeul生物技术)供给1周。将对生后6周的雄性老化促进模型小鼠(初始体重平均 28.8 ± 2.3 g)以每组为8只随机分为三个不同的饮食处理组,保持这些饮食10周(共24只动物):

[0280] 对照组:未给药唾液乳糖的摄取正常饮食的正常鼠(8只)

[0281] 3'-唾液乳糖给药组:对正常饮食组处理3'-唾液乳糖(3'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)老化促进模型(8只)

[0282] 6'-唾液乳糖给药组:对正常饮食组处理6'-唾液乳糖(6'-SL,西格玛)的(以鼠体

重每公斤每天口服给药0.1mg) 老化促进模型 (8只)

[0283] 每天以口服给药的方式给药唾液乳糖或蒸馏水。在动物室中保管小鼠14周,并绝食12小时后牺牲小鼠。每隔5天测定饮食摄取量及体重变化量。3'-唾液乳糖 (3'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、3'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-DGlc) 或6'-唾液乳糖 (6'-N-乙酰神经氨酸D-乳糖、6'-唾液酸D-乳糖或 α -NeuNAc-(2 \rightarrow 6)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc) 购自西格玛奥德里奇。

[0284] 在8种主要脏器(心脏、海马、脑、脊髓、肺、肝、脾、肾)和3中骨骼肌(比目鱼肌,股四头肌,腓肠肌)等中定量比较基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的基因表达变化,。利用三唑试剂(英杰)提取核糖核酸。利用上述中提取定量的核糖核酸和逆转录系统(美国普洛麦格)合成互补脱氧核糖核酸。利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物和探针(应用生物系统;过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、Mm00447181_m1、磷酸甘油醛脱氢酶及Mm99999915_q1)测定多个过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 的表达形态。聚合酶链式反应和分析利用了转子基因3000系统(澳大利亚悉尼科贝特研究),其结果如图16所示。

[0285] 图16a及图16b为示出基于老化促进模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物的基因表达变化的图。将对生后6周的雄性老化促进模型小鼠(SAM P1/Sku Slc)以每组为8只分成对照组、3'-唾液乳糖给药组和6'-唾液乳糖给药组,进行12周的饮食调节实验。在图16a及16b中纵轴为相对于给药唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)前按身体部位的相对基因表达变化,在各身体部位中(3'-唾液乳糖给药组基因表达量)/(对照组基因表达量)和(6'-唾液乳糖给药组基因表达量)/(对照组基因表达量)的数值。其结果,如图16a及16b所示,3'-唾液乳糖(图16a)和6'-唾液乳糖(图16b)均在大部分的脏器和骨骼肌中各种分析对象(纤维连结蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达量显著增加,但是,可知与6'-唾液乳糖相比,3'-唾液乳糖的分析对象的基因表达促进效果略有下降。

[0286] 并且,为了细胞水平的实验,在摄取未给药唾液乳糖的高脂肪饲料(啮齿动物饮食60卡路里百分比的脂肪)饮食的对照组中,分离了MASMs(多个小鼠大动脉平滑肌细胞)(Griendling et al.,1991),在培养基中添加唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物进行培养,为了测定细胞中H₂O₂(活性氧组数值),在浸泡在0.1%的小牛血清的12孔培养板中培养一天。利用H2DCFDA进行测定细胞中多个活性氧组数值。为了试验,在HBSS缓冲液中与H2DCFDA一同培养多个细胞30分钟。对多个细胞处理胰蛋白酶并清洗后溶解于Hank's平衡盐溶液(HBSS)中。用CytoFluor读板器立即测定荧光值(图17a)。

[0287] 为了测定线粒体的超氧化物生成,利用线粒体超氧化物红色(MitoSOX Red)(线粒体超氧化物荧光标记物)测定线粒体的活性氧组。通过提取MASMs与线粒体超氧化物(4 μ M)一同在暗室37℃的温度下培养20分钟。利用荧光板读板器获得的细胞的银光大小来定量线粒体超氧化物荧光(480nm激发/580nm释放)(图17b)。

[0288] 在图17a和图17b中,在老化促进模型小鼠对照组中提取液MASMs,将唾液乳糖(3'-

唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合物放入培养液进行比较。为了测定细胞中H₂O₂ (活性氧组数值) 与H₂DCFDA一同培养(图17a), 为了测定线粒体的活性氧组一同培养线粒体超氧化物红色(线粒体超氧化物荧光标记物) (图17a)。用荧光板读板器定量细胞中H₂O₂和线粒体超氧化物生成。可知, 组合物降低活性氧组数值, 并抑制线粒体的超氧化物生成。

[0289] 图17a和图17b为示出细胞中H₂O₂测定(活性氧组数值) (图17a) 及线粒体的超氧化物生成测定(图17b) 的图。在老化促进模型小鼠 (SAM P1/Sku Slc) 中提取MASMs, 并在培养液中放入唾液乳糖 (3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合物来进行比较。为了测定细胞中H₂O₂ 与H₂DCFDA一同培养(图17a), 为了测定线粒体的活性氧组与线粒体超氧化物红色(线粒体超氧化物荧光标记物) 一同培养(图17a)。利用荧光读板器定量细胞中H₂O₂和线粒体超氧化物生成。可知, 唾液乳糖 (3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合物降低活性氧组数值, 并抑制线粒体的超氧化物生成。

[0290] 在图18a及图18b中, 端粒酶活性的测定利用TRAP协议 (Wright et al., 1995) 测定。简要如下, 将细胞颗粒溶解于3-[3-(胆酰胺丙基) 二甲氨基] 丙磺酸内盐 (CHAPS) 分解溶剂 (包含核糖核酸酶 (ribonuclease) 抑制剂) 后如4图培养30分钟。将细胞提取物 (1mg) 与TRAPeze反应混合物 (端粒酶基质 (TS) 引物、荧光标签RP (反向) 引物、对照标准圆形及硫氰酸盐 (sulforhodamine) 标签对照标准K2引物) 一同混合。在30℃的温度下延伸端粒酶基质引物30分钟后进行聚合酶链式反应。对这样形成的TRAP产物用荧光板读取荧光来测定端粒酶活性。与硫氰酸盐 (内部对照标准) 相比, 由纯荧光素的比率归一化相对的端粒酶活性, 并由百分比表示。荧光素 (Fluorescein) (M0250) 购自标记基因技术 (Marker Gene Technologies, Inc) 公司。H₂-二氯荧光素二乙酸酯 (H₂-dichlorofluorescein diacetate) (DCFDA) 购自分子探针 (from Molecular Probes)。MitoSOXTM Red、MitoTracker Green FM 和MitoTracker® Orange CMTMRos (MTO) 购自英杰。10000x SYBR® Gold dye购自分子探测公司 (Molecular Probes, Inc.)。核/胞浆分馏试剂盒 (Nuclear/Cytosol fractionation kit) (K266-100) 购自BioVision。TRAPeze® XL端粒酶检测试剂盒 (TRAPeze® XL telomerase detection kit) (S7707) 购自密理博 (MILLIPORE)。端粒PNA鱼类试剂盒/Cy3 (Telomere PNA FISH Kit/Cy3 (K5326)) 购自达阔 (Dako)。

[0291] 图18a及图18b为示出测定基于唾液乳糖 (3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合物给药的端粒酶活性的结果。通过此数值可推测端粒逆转录酶和抗氧化剂/亲电子响应元件 (antioxidant/electrophile-responsive element, ARE/ERE) 信号途径活性化。(Xiong et al., 2015, Cell Reports 12, 1391-1399)。在老化促进模型 (图18a) 和MASMs (图18b) 中处理唾液乳糖 (3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 来分析端粒酶活性。图18a为利用对照组、3'-唾液乳糖给药组和6'-唾液乳糖给药组中提取的大动脉样品在活的有机体内分析端粒酶活性的数据。图18b为通过分离对照组的平滑肌细胞 (Griendling et al., 1991), 在处理MASMs的唾液乳糖 (3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 的12孔培养板中培养一天来在生物体外分析端粒酶活性。实验结果显示, 唾液乳糖 (3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合物给药使端粒酶活性增加。这种结果提供可推测唾液乳糖 (3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合物可能通过过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1-α增加来与端粒逆转录酶功能异常及脱氧核糖核酸损伤恢复 (端粒酶活性增加-端粒逆转录酶表达) 相关的依据。

[0292] 实施例12. 基于动脉硬化症模型中的唾液乳糖 (3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合

物处理的基于端粒功能和活性氧组调节的老化相关慢性疾病防止效果

[0293] 最近,发表了如下论文,即,若去除过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- α 基因,则形成血管老化、动脉粥样硬化性动脉硬化症、端粒功能障碍和长度减少、脱氧核糖核酸损伤、端粒逆转录酶(telomerase reverse transcriptase)的表达及活动减少及p53增加(Xiong et al.,2015,Cell Reports 12,1391-1399)。

[0294] 由于ApoE^{-/-}鼠一般使氧化应激和炎症的敏感性增加,并快速发达在人中所观察到的动脉粥样硬化症伤口,因此被用作动脉硬化症的代表性的模型(Weiss et al.,2001),ApoE^{-/-}鼠(基于C57BL/6)购自杰克逊实验室(Jackson Laboratory)。使用尾部脱氧核糖核酸的聚合酶链式反应确定基因型。

[0295] 为了观察动脉硬化症老化模型中基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的端粒功能和基于脱氧核糖核酸损伤调节的老化相关慢性疾病防止效果,对两种生后24周的雄性模型小鼠(过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- $\alpha^{+/+}$ ApoE^{-/-})以每组为8只随机分为下述三个不同的饮食处理组,并保持这些饮食6周(共24只动物):

[0296] 对照组:摄取高脂肪饲料(啮齿动物饮食60卡路里百分比的脂肪)的动脉硬化症模型(8只)

[0297] 3'-唾液乳糖给药组:对高脂肪饲料饮食组处理3'-唾液乳糖(3'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)动脉硬化症模型(8只)

[0298] 6'-唾液乳糖给药组:对高脂肪饲料饮食组处理6'-唾液乳糖(6'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg)动脉硬化症模型(8只)

[0299] *为了细胞水平的实验,在摄取未给药唾液乳糖高脂肪饲料(啮齿动物饮食60卡路里百分比的脂肪)饮食的对照组中,分离了MASMs(多个小鼠大动脉平滑肌细胞)(Griendling et al.,1991),在培养基中添加唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物进行比较。为了测定细胞中H₂O₂(活性氧组数值),在浸泡在0.1%的小牛血清的12孔培养板中培养一天。利用H₂DCFDA进行测定细胞中多个活性氧组数值。为了试验,在HBSS缓冲液中与H₂DCFDA一同培养多个细胞30分钟。对多个细胞进行胰蛋白酶处理并清洗后溶解于Hank's平衡盐溶液中。用CytoFluor读板器立即测定荧光值(图19a)。

[0300] 为了测定线粒体的超氧化物生成,利用线粒体超氧化物红色(线粒体超氧化物荧光标记物)测定线粒体的活性氧组。通过提取MASMs与MitoSOX(4 μ M)一同在暗室37℃的温度下培养20分钟。利用荧光板读板器获得的细胞的银光大小来定量MitoSOX荧光(480nm激发/580nm释放)(图19b)。

[0301] 在图19a和图19b中,在模型小鼠(过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- $\alpha^{+/+}$ ApoE^{-/-})对照组中提取MASMs,并在培养液中放入唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物来进行比较。为了测定细胞中H₂O₂(活性氧组数值)与H₂DCFDA一同培养(图19a),为了测定线粒体的活性氧组一同培养线粒体超氧化物红色(线粒体超氧化物荧光标记物)一同培养(图19a)。用荧光板读板器定量细胞中H₂O₂和线粒体超氧化物生成。可知,组合物降低活性氧组数值,并抑制线粒体的超氧化物生成。

[0302] 图19a及图19b为示出细胞中H₂O₂测定(活性氧组数值)(图19a)及线粒体的超氧化物生成测定(图19b)的结果的图。在模型小鼠(过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1- $\alpha^{+/+}$ ApoE^{-/-})中提取MASMs,并在培养液中放入唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合

物来进行比较。为了测定细胞中H₂O₂与H₂DCFDA一同培养(图19a),为了测定线粒体的活性氧组与线粒体超氧化物红色(线粒体超氧化物荧光标记物)一同培养(图19a)。用荧光读板器定量细胞中H₂O₂和线粒体超氧化物生成。可知,唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物降低活性氧组数值,并抑制线粒体的超氧化物生成。

[0303] 在图20中,利用TRAP协议(Wright et al.,1995)测定。简要如下,将细胞颗粒溶解于3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐分解溶剂(包含核糖核酸酶抑制剂)后如4图培养30分钟。将细胞提取物(1mg)与TRAPEze反应混合(端粒酶基质(TS)引物、荧光标签RP(反向)引物、对照标准圆形及硫氰酸盐(sulforhodamine)标签对照标准K2引物)一同混合。在30℃的温度下延伸端粒酶基质引物30分钟后进行聚合酶链式反应。对这样形成的TRAP产物用荧光板读取荧光来测定端粒酶活性。与硫氰酸盐(内部对照标准)相比,由纯荧光素的比率归一化相对的端粒酶活性,并由百分比表示。荧光素(M0250)购自标记基因技术公司。H₂-二氯荧光素二乙酸酯(DCFDA)购自分子探针。MitoSOXTM Red、MitoTracker Green FM和MitoTracker® Orange CMTMRos(MT0)购自英杰。10000x SYBR® Gold dye购自分子探测公司(Molecular Probes, Inc.)。核/胞浆分馏试剂盒(Nuclear/Cytosol fractionation kit)(K266-100)购自BioVision。TRAPEze® XL端粒酶检测试剂盒(TRAPEze® XL telomerase detection kit)(S7707)购自密理博(MILLIPORE)。端粒PNA鱼类试剂盒/Cy3(Telomere PNA FISH Kit/Cy3(K5326))购自达阔(Dako)。

[0304] 在图20a及20b中,测定基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物给药的端粒酶活性。可通过此数值来推测端粒逆转录酶和端粒逆转录酶和抗氧化剂/亲电子响应元件信号途径活性化(Xiong et al.,2015,Cell Reports 12,1391-1399)。

[0305] 图20a及图20b为示出在动脉硬化症模型(ApoE-/-;图20a)与MASMs(图20b)中处理唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)来分析端粒酶活性的结果的图。在图20a中利用对照组、3'-唾液乳糖给药组及6'-唾液乳糖给药组中提取的大动脉样品在活的有机体内分析端粒酶活性。在图20b中通过分离对照组的平滑肌细胞(Griendling et al.,1991)、MASMs并在处理唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)的12孔培养板中培养一天,在生物体外分析端粒酶活性。实验结果显示,唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物给药使端粒酶活性增加。这种结果提供可推测唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物可能通过过氧化物酶体增植物激活受体共激活因子1-α增加来与端粒逆转录酶功能异常及脱氧核糖核酸损伤恢复(端粒酶活性增加-端粒逆转录酶表达)相关的依据。

[0306] 实施例13.基于皮肤实验中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的按身体部位的基因表达变化

[0307] 为了观察在皮肤实验模型中基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物处理的按身体部位的基因表达变化,对生后6周的雄性皮肤实验模型(HRM2)小鼠(包含黑色素的无毛(Hairless)的外观)以每组为8只随机分成下述三个不同的饮食处理组(共24只动物)并保持这些饮食10周,利用(AIN-76A美国戴茨公司(Dyets社))、便携式色差计(CR-10日本美能达公司(Minolta社))等进行紫外线照射(疙瘩、皱纹实验)、皮肤敏感性实验、皮肤刺激性实验、皮下吸收实验等:

[0308] 对照组:摄取正常饮食的组(8只)

[0309] 3'-唾液乳糖给药组:对正常饮食组处理3'-唾液乳糖(3'-SL,西格玛)的(以鼠体

重每公斤每天口服给药0.1mg) 模型 (8只)

[0310] 6'-唾液乳糖给药组:对正常饮食组处理6'-唾液乳糖(6'-SL,西格玛)的(以鼠体重每公斤每天口服给药0.1mg) 模型 (8只)

[0311] 可知与对照组相比,唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 给药组在紫外线照射(疙瘩、皱纹实验)、皮肤敏感性实验、皮肤刺激性实验、皮下吸收实验等中更加改善皮肤。并且,在8种主要脏器(心脏、海马、脑、脊髓、肺、肝、脾、肾)和3种骨骼肌(比目鱼肌、股四头肌、腓肠肌)等定量比较基于唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合物处理的基因表达变化。利用三唑试剂(英杰)提取核糖核酸。利用上述中提取定量的核糖核酸和逆转录系统(美国普洛麦格)合成互补脱氧核糖核酸。利用对合成的互补脱氧核糖核酸及分析对象(纤维连接蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)预先设计的引物和探针(应用生物系统;过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、Mm00447181_m1、磷酸甘油醛脱氢酶及Mm99999915_q1)测定多个过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的表达形态聚合酶链式反应和分析利用了转子基因3000系统(澳大利亚悉尼科贝特研究),其结果如图21a及图21b所示。

[0312] 在图21a及图21b中,与给药唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)前相比按身体部位的相对基因表达在个身体部位中(3'-唾液乳糖给药组基因表达量)/(对照组基因表达量)和(6'-唾液乳糖给药组基因表达量)/(对照组基因表达量)用数值表示。与阴性对照组相比,在各种身体部位中6'-唾液乳糖给药组的包含过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 的各种分析对象(纤维连接蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达程度非常优秀。即,可以确认6'-唾液乳糖在正常鼠的各种脏器和肌肉中促进与过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 相关的基因的表达。与6'-唾液乳糖相比,3'-唾液乳糖分析对象的基因表达促进效果相对略有下降。

[0313] 图21a及图21b为示出基于皮肤实验模型中的唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合物处理的基因表达变化图。对生后6周的雄性皮肤实验模型(HRM2)小鼠以每组为8只分成对照组和唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 给药组进行10周的饮食调节实验1。相对于给药唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)前相对的基因表达变化在个身体部位中通过定量'唾液乳糖给药组基因表达量'与'对照组基因表达量';来用数值表示作为其值的相对比(3'-唾液乳糖给药组基因表达量)/(对照组基因表达量)和(6'-唾液乳糖给药组基因表达量)/(对照组基因表达量)。在大部分的脏器和骨骼肌中各种分析对象(纤维连接蛋白III型域包含蛋白5、过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α 、雌激素相关受体 α 、解偶联蛋白-1、超氧化物歧化酶2及谷胱甘肽过氧化物酶1)的表达量显著增加。可知,与6'-唾液乳糖(图21b)相比,3'-唾液乳糖(图21a)的分析对象的基因表达促进效果相对下降。

[0314] 实施例14.唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖) 组合物对分化的脂肪细胞(adipocyte)的影响

[0315] (1) 3T3-L1细胞培养及分化

[0316] 3T3-L1脂肪细胞购自韩国细胞系银行。3T3-L1脂肪细胞的培养和保持用加入10%

的小牛血清 (bovine calf serum) (FCS, 韩国威健 (welgene)) 的达尔伯克改良伊格尔培养基 (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium, 韩国威健) 在5%的CO₂、37℃的温度下传代培养。将3T3-L1脂肪细胞分成如下6个组: NT; 正常分化细胞组 (对照组)、唾液乳糖实验组; 处理唾液乳糖 (唾液乳糖, 美国西格玛奥德里奇) 的实验组的1μM、10μM、100μM、1000μM及10000μM的实验组。细胞分化是将细胞每孔接种 2×10^5 细胞并使细胞100%的密集来在6孔板中培养。2天后, 在实验组处理包含10%的胎牛血清 (FBS, fetal bovine serum, 韩国威健) 和MDI溶液 (0.5mM的异丁基 (isobutylmethylxanthine) (IBMX, 美国西格玛奥德里奇)、1μM的地塞米松 (dexamethasone) (美国西格玛奥德里奇)、1μg/mL的胰岛素 (insulin) (美国西格玛奥德里奇)) 的DMEM培养基2天, 再利用包含10%的FBS和1μg/mL的胰岛素的DMEM处理2天。随后, 利用添加有10%的FBS的DMEM培养基每隔2天替换培养基并分化脂肪细胞。在结束分化的时间点, 在添加有10%的FBS的DMEM培养基中处理0mM、0.01mM、0.1mM、1mM及10mM的3'-唾液乳糖或6'-唾液乳糖10天。

[0317] (2) 油红O (Oil Red O) 染色

[0318] 在6孔板中分化后, 利用PBS清洗处理3'-唾液乳糖或6'-唾液乳糖的3T3-L1脂肪细胞2次, 然后加入2mL的10%的福尔马林 (formalin) (美国西格玛奥德里奇) 并在常温下固定10分钟。干燥固定的细胞后, 在细胞处理1mL的油红O染色试剂 (美国西格玛奥德里奇) 20分钟后, 用蒸馏水彻底清洗油红O 4次后, 加入1mL的100%的异丙醇 (isopropanol) (美国西格玛奥德里奇) 排出被染色的脂肪球后, 利用500nm下的吸光度测定所堆积的脂肪的量。

[0319] (3) 游离甘油 (Free glycerol) 的测定

[0320] 将对6孔板中分化的3T3-L1脂肪细胞处理0mM、0.01mM、0.1mM、1mM及10mM浓度的6'-唾液乳糖来培养10天的培养基用埃彭道夫管 (eppendorf tube) 取样后, 使用甘油细胞检测试剂盒 (glycerol cell-based assay kit) (美国开曼 (cayman), 10011725) 分析了游离甘油。在25μL的培养基中添加100μL的游离甘油试剂 (free glycerol reagent), 在常温下反应15分钟后, 在540nm下测定吸光度。

[0321] (4) 细胞存活率 (cell viability) 测定

[0322] 利用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8) (美国东仁化学科技有限公司 (Dojindo Molecular Technologies, Inc.)) 测定分化后处理6'-唾液乳糖的3T3-L1脂肪细胞的细胞存活率。药物处理后, 添加10μL的CCK-8试剂培养2小时后, 在450nm下测定吸光度。

[0323] 可从图22和图23中确认, 在分化的脂肪细胞中随着唾液乳糖的添加细胞中脂肪减少, 尤其, 在添加6'-唾液乳糖的实验组中细胞中脂肪大大减少。

[0324] 图22a及图22b为示出在分化的脂肪细胞中给药6'-唾液乳糖 (图22a) 和3'-唾液乳糖 (图22b) 的情况下细胞中脂肪的变化的图。NT为对照组, 0.01mM、0.1mM、1mM及10mM表示分别处理0.01mM、0.1mM、1mM及10mM的6'-唾液乳糖 (图22a) 和3'-唾液乳糖 (图22b) 的实验组。

[0325] 图23a及图23b为示出在分化的脂肪细胞中给药6'-唾液乳糖 (图23a) 和3'-唾液乳糖 (图23b) 的情况下细胞中脂肪的变化的细胞的光学显微镜照片 (红油O实验)。在附图中, NT为对照组, 0.01mM、0.1mM、1mM及10mM表示0.01mM、0.1mM、1mM及10mM的6'-唾液乳糖 (图23a) 和3'-唾液乳糖 (图23b) 的实验组。

[0326] 另一方面, 可从图24中确认, 唾液乳糖在分化的脂肪细胞中不影响细胞存活率 (cell viability) 高达10mM。

[0327] 图24为在分化的脂肪细胞中影响细胞的存活率的6'-唾液乳糖的影响的图。NT为对照组,0.01mM、0.1mM、1mM、10mM及100mM表示分别为0.01mM、0.1mM、1mM、10mM及100mM的6'-唾液乳糖的实验组。

[0328] 并且,可从图25中确认,唾液乳糖以浓度依赖性地增加脂肪细胞的甘油分泌来减少细胞中脂肪。

[0329] 唾液乳糖促进分化的脂肪细胞中甘油分泌来减少细胞中脂肪,而不影响细胞存活率,尤其,6'-唾液乳糖大大减少了细胞中脂肪。

[0330] 图25为示出在分化的脂肪细胞中借助唾液乳糖的甘油分泌变化的图。在附图中,NT为对照组,0.01mM、0.1mM、1mM及10mM分别表示0.01mM、0.1mM、1mM及10mM的3'-唾液乳糖的实验组。

[0331] 实施例15.借助唾液乳糖(3'-唾液乳糖及6'-唾液乳糖)组合物皮下注射的高脂饮食小鼠的皮下脂肪变化

[0332] (1) 高脂肪饮食小鼠

[0333] 4周龄的C56BL/6小鼠购自Dooyeul生物技术(韩国)。水自由供给,销售的颗粒饲料(韩国Dooyeul生物技术)供给1周。将购自高脂饮食(Research Diets)公司(美国新不伦瑞克省)的高脂肪(60%的脂肪)饮食供给28天来构建堆积脂肪的鼠。

[0334] (2) 唾液乳糖皮下注射

[0335] 将0.5ml的溶解于磷酸缓冲溶液的100mM的3'-唾液乳糖或6'-唾液乳糖高脂肪饮食诱导脂肪堆积的小鼠的背部4~5处皮下注射2次(0天、4天),在第4天及第7天肉眼和皮肤镜观察皮肤。作为对照组(CTL)使用了磷酸缓冲溶液。

[0336] 可从图26a及图26b中确认,唾液乳糖皮下注射通过减少高脂饮食小鼠的皮下脂肪来诱导了皮肤表面的皱纹。尤其,6'-唾液乳糖大大减少了皮下脂肪。

[0337] 图26a及图26b为示出借助唾液乳糖皮下注射的高脂饮食小鼠的皮肤变化的图。肉眼和皮肤镜(图26a及26b)确认皮肤变化的照片。CTL为对照组,3'-唾液乳糖(3'-唾液乳糖)、6'-唾液乳糖(6'-唾液乳糖)表示实验组。

[0338] 参考文献

[0339] 1.Galluzzi,L.,Maiuri,M.C.,Vitale,I.,Zischka,H.,Castedo,M.,Zitvogel,L.,Kroemer,G.,2007.Cell death modalities:classification and pathophysiological implications.Cell Death Differ.14,1237-1243.

[0340] 2.Chipuk,J.E.,Moldoveanu,T.,Llambi,F.,Parsons,M.J.,Green,D.R.,2010.The BCL-2family reunion.Mol.Cell 37,299-310.

[0341] 3.Youle,R.J.,Strasser,A.,2008.The BCL-2protein family:opposing activities that mediate cell death.Nat.Rev.Mol.Cell Biol.9,47-59.

[0342] 4.Fadeel,B.,Orrenius,S.,2005.apoptosis:a basic biological phenomenon with wide ranging implications in human disease.J.Intern.Med.258,479-517.

[0343] 5.Aleck W.E.Jones,Zhi Yao,Jose Miguel Vicencio,Agnieszka Karkucinska-Wieckowska,Gyorgy Szabadkai,2012.PGC-1 family coactivators and cell fate: Roles in cancer,neurodegeneration,cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signaling.Mitochondrion.12,86-99.

- [0344] 6.Lin,J.et al.Spiegelman,B.M.,2004.Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice.Cell 119, 121-135.
- [0345] 7.Leone,T.C.,Lehman,J.J.,Finck,B.N.,Schaeffer,P.J.,Wende,A.R., Boudina,S.,Courtois,M.,Wozniak,D.F.,Sambandam,N.,Bernal-Mizrachi,C.,Chen,Z., Holloszy,J.O.,Medeiros,D.M.,Schmidt,R.E.,Saffitz,J.E.,Abel,E.D.,Semenkovich, C.F.,Kelly,D.P.,2005.PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements:muscle dysfunction,abnormal weight control and hepatic steatosis.PLoS Biol.3,e101.
- [0346] 8.Chaturvedi RK&Flint Beal M(2013)Mitochondrial diseases of the brain.Free Radic Biol Med 63,1-29.
- [0347] 9.Katsouri L,Parr C,Bogdanovic N,Willem M&Sastre M(2011)PPARgamma co-activator-1alpha (PGC-1alpha) reduces amyloid-beta generation through a PPARgamma-dependent mechanism.J Alzheimers Dis 25,151-162.
- [0348] 10.Qin W,Haroutunian V,Katsel P,Cardozo CP,Ho L,Buxbaum JD&Pasinetti GM(2009)PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia.Arch Neurol 66,352-361.
- [0349] 11.Wang R,Li JJ,Diao S,Kwak YD,Liu L,Zhi L,Bueler H,Bhat NR,Williams RW,Park EA et al.(2013)Metabolic stress modulates Alzheimer's beta secretase gene transcription via SIRT1-PPARgamma-PGC-1 in neurons.Cell Metab 17,685-694.
- [0350] 12.Clark,J.,Reddy,S.,Zheng,K.,Betensky,R.,Simon,D.,2011.Association of PGC-1alpha polymorphisms with age of onset and risk of Parkinson's disease.BMC Med.Genet.12,69.
- [0351] 13.Weydt,P.,Soyal,S.,Gellera,C.,DiDonato,S.,Weidinger,C.,Oberkofler, H.,Landwehrmeyer,G.B.,Patsch,W.,2009.The gene coding for PGC-1alpha modifies age at onset in Huntington's Disease.Mol.Neurodegener.4,3.
- [0352] 14.Cui,L.,Jeong,H.,Borovecki,F.,Parkhurst,C.N.,Tanese,N.,Krainc,D., 2006.Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration.Cell 127,59-69.
- [0353] 15.Qin W,Haroutunian V,Katsel P,Cardozo CP,Ho L,Buxbaum JD&Pasinetti GM(2009)PGC-1alpha expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia.Arch Neurol 66,352-361.
- [0354] 16.Ranganathan,S.,Harmison,G.G.,Meyertholen,K.,Pennuto,M.,Burnett, B.G.,Fischbeck,K.H.,2009.Mitochondrial abnormalities in spinal and bulbar muscular atrophy.Hum.Mol.Genet.18,27-42.
- [0355] 17.Weydt,P.,Pineda,V.V.,Torrence,A.E.,Libby,R.T.,Satterfield,T.F., Lazarowski,E.R.,Gilbert,M.L.,Morton,G.J.,Bammler,T.K.,Strand,A.D.,Cui,L., Beyer,R.P.,Easley,C.N.,Smith,A.C.,Krainc,D.,Luquet,S.,Sweet,I.R.,Schwartz,

M.W.,La Spada,A.R.,2006.Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration.*Cell Metab.*4,349-362.

[0356] 18.Xiang,Z.,Valenza,M.,Cui,L.,Leoni,V.,Jeong,H.-K.,Brilli,E.,Zhang,J.,Peng,Q.,Duan,W.,Reeves,S.A.,Cattaneo,E.,Krainc,D.,2011.Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α contributes to dysmyelination in experimental models of Huntington's disease.*J.Neurosci.*31,9544-9553.

[0357] 19.Zheng,B.,Liao,Z.,Locascio,J.J.,Lesniak,K.A.,Roderick,S.S.,Watt,M.L.,Eklund,A.C.,Zhang-James,Y.,Kim,P.D.,Hauser,M.A.et al. (2010).PGC-1 α , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease.*Sci.Transl.Med.*2,52ra73.

[0358] 20.Chaturvedi,R.K.,Adihetty,P.,Shukla,S.,Hennessy,T.,Calingasan,N.,Yang,L.,Starkov,A.,Kiaei,M.,Cannella,M.,Sassone,J.,Ciammola,A.,Squitieri,F.,Beal,M.F.,2009.Impaired PGC-1 α function in muscle in Huntington's disease.*Hum.Mol.Genet.*18,3048-3065.

[0359] 21.Zhao,W.,Varghese,M.,Yemul,S.,Pan,Y.,Cheng,A.,Marano,P.,Hassan,S.,Vempati,P.,Chen,F.,Qian,X.,Pasinetti,G.,2011.Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) improves motor performance and survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.*Mol.Neurodegener.*6,51.

[0360] 22.Chaturvedi RK&Flint Beal M(2013)Mitochondrial diseases of the brain.*Free Radic Biol Med* 63,1-29.

[0361] 23.St-Pierre,J.,Lin,J.,Krauss,S.,Tarr,P.T.,Yang,R.,Newgard,C.B.,Spiegelman,B.M.,2003.Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1 α and 1 β (PGC-1 α and PGC-1 β) in muscle cells.*J.Biol.Chem.*278,26597-26603.

[0362] 24.Cowell,R.M.,Talati,P.,Blake,K.R.,Meador-Woodruff,J.H.,Russell,J.W.,2009.Identification of novel targets for PGC-1 α and histone deacetylase inhibitors in neuroblastoma cells.*Biochem.Biophys.Res.Comm.*379,578-582.

[0363] 25.St-Pierre,J.,Drori,S.,Uldry,M.,Silvaggi,J.M.,Rhee,J.,Jager,S.,Handschin,C.,Zheng,K.,Lin,J.,Yang,W.,Simon,D.K.,Bachoo,R.,Spiegelman,B.M.,2006.Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators.*Cell* 127,397-408.

[0364] 26.Valle,I.,Alvarez-Barrientos,A.,Arza,E.,Lamas,S.,Monsalve,M.,2005.PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells.*Cardiovasc.Res.*66,562-573.

[0365] 27.Xiong,S.,Patrushev N.,Forouzanmehr,F.,Hilenski,L.,Alexander,R.W.,

2015.PGC-1 α modulates telomere function and DNA damage inprotecting against age-related chronic diseases.Cell Report 12,1391-1399.

[0366] 28.Borniquel,S.,Valle,I.,Cadenas,S.,Lamas,S.,Monsalve,M.,2006.Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α .The FASEB jou核糖核酸1:Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 20,pp.1889-1891.

[0367] 29.Lai,L.,Leone,T.C.,Zechner,C.,Schaeffer,P.J.,Kelly,S.M.,Flanagan,D.P.,Medeiros,D.M.,Kovacs,A.,Kelly,D.P.,2008.Transcriptional coactivators PGC-1 α and PGC-1 β control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart.Genes Dev.22,1948-1961.

[0368] 30.Garnier,A.,Fortin,D.,Delomenie,C.,Momken,I.,Veksler,V.,Ventura-Clapier,R.,2003.Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles.J.Physiol.551,491-501.

[0369] 31.Ljubicic V,Joseph A,Saleem A,et al:Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: effects of exercise and aging.Biochim Biophys Acta 2010;1800:223-234.

[0370] 32.Gouspillou G,Picard M,Godin R,Burelle Y,Hepple R:Role of peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC1- α) in denervation-induced atrophy in aged muscle:facts and hypotheses.Longev Healthspan 2013;2:13.

[0371] 33.Johnson ML,Robinson MM,Nair KS:Skeletal muscle aging and the mitochondrion.Trends Endocrin Met 2013;24:247-256.

[0372] 34.Marzetti E,Calvani R,Cesari M,et al:Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging:from signaling pathways to clinical trials.Int J Biochem Cell Biol 2013;45:2288-2301.

[0373] 35.Calvani R,Joseph A,Adhihetty PJ,et al:Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy.Biol Chem 2013;394:393-414.

[0374] 36.Wallace DC:A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases,aging,and cancer:a dawn for evolutionary medicine.Annu Rev Genet 2005;39:359.

[0375] 37.Finck BN,Kelly DP:PGC-1 coactivators:inducible regulators of energy metabolism in health and disease.J Clin Invest 2006;116:615-622

[0376] 38.Tina Wenz,Susana G.Rossi,Richard L.Rotundo,Bruce M.Spiegelman,and Carlos T.Moraes.2009,Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging,PNAS106,20405-20410.

[0377] 39.Rolfe,D.F.and Brown,G.C.(1997).Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals.Physiol.Rev.77,731-758.

- [0378] 40. Jastroch, M., Divakaruni, A.S., Mookerjee, S., Treberg, J.R. and Brand, M.D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 47, 53–67.
- [0379] 41. Fukui Y, Masui S, Osada S, Umesono K, Motojima K. 2000. A new thiazolidinedione, NC-2100, which is a weak PPAR- γ activator, exhibits potent antidiabetic effects and induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of KKAY obese mice. *Diabetes* 49:759–767
- [0380] 42. Wilson-Fritch L, Nicoloso S, Chouinard M, Lazar MA, Chui PC, Leszyk J, Straubhaar J, Czech MP, Corvera S. 2004. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 114:1281–1289.
- [0381] 43. Quinlan, C.L., Treberg, J.R. and Brand, M.D. (2011). Mechanisms of mitochondrial free radical production and their relationship to the aging process. In *Handbook of the Biology of Aging (Seventh Edition)* (ed. J.M. Edward and N.A. Steven), pp. 47–61. San Diego, CA: Academic Press.
- [0382] 44. Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C. et al. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359–365.
- [0383] 45. Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A. et al. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481–484.
- [0384] 46. Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R. et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417–423.
- [0385] 47. Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N. et al. (2002b). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797–801.
- [0386] 48. Dillon, L.M., Williams, S.L., Hida, A., Peacock, J.D., Prolla, T.A., Lincoln, J. and Moraes, C.T. (2012). Increased mitochondrial biogenesis in muscle improves aging phenotypes in the mtDNA mutator mouse. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2288–2297.
- [0387] 49. Wenz, T., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., Spiegelman, B.M. and Moraes, C.T. (2009). Increased muscle PGC-1 α expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20405–20410.

相对于给药6'-唾液乳糖前的各脏器的相对基因表达

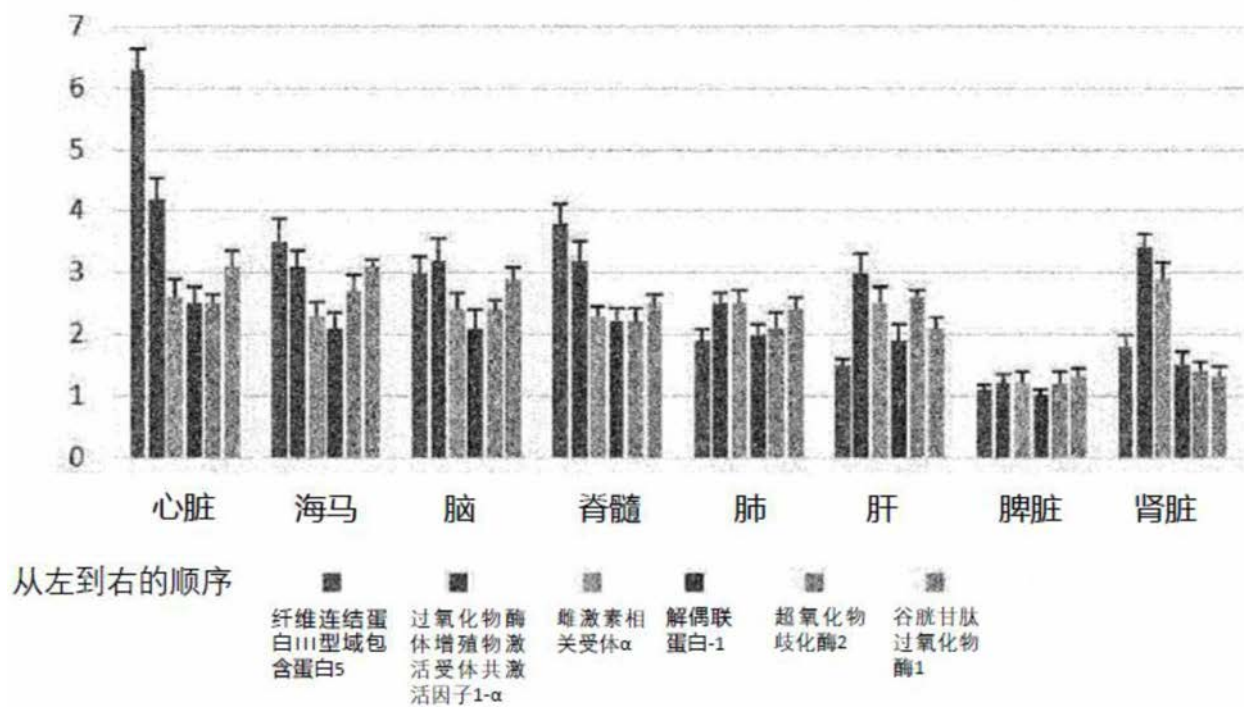


图1a

相对于给药6'-唾液乳糖前的各骨骼肌的相对基因表达

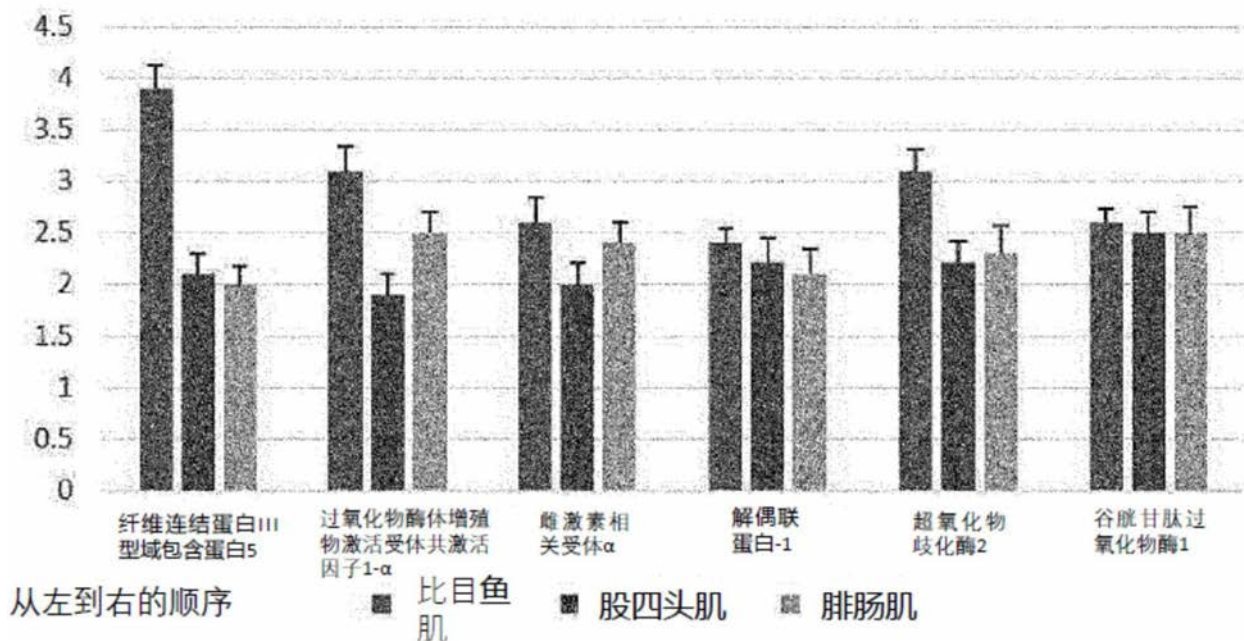


图1b

相对于给药6'-唾液乳糖前的腹部脂肪基因表达

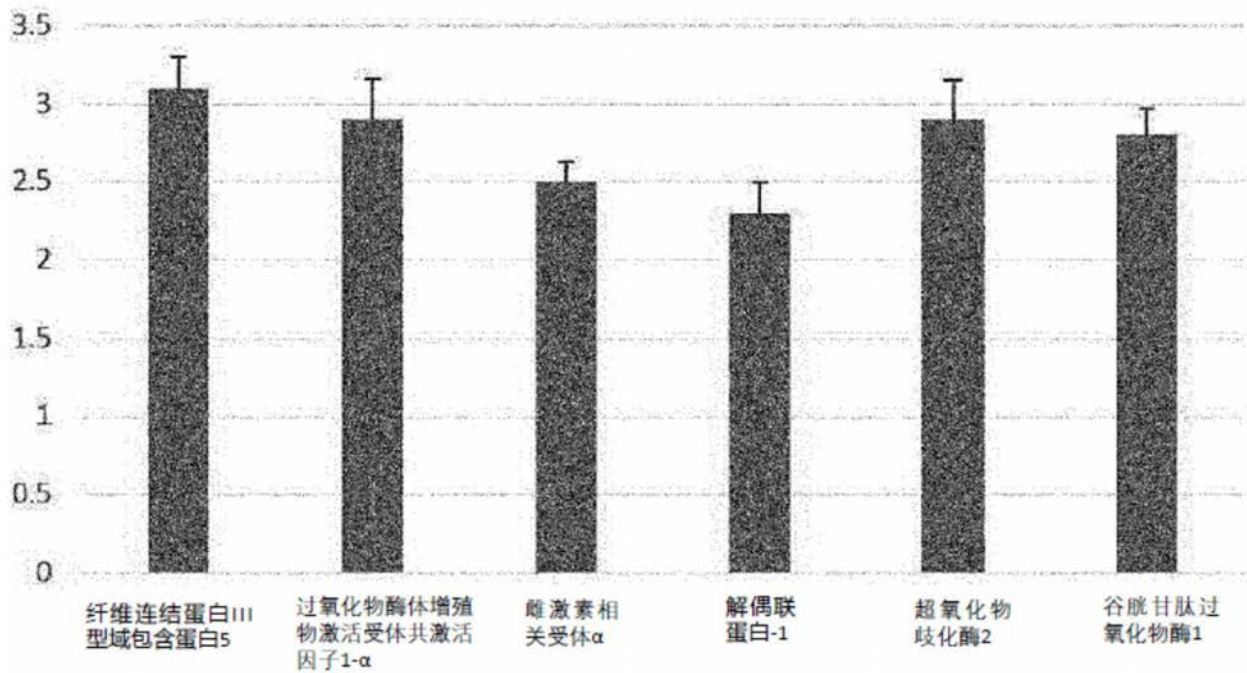


图1c

相对于给药3'-唾液乳糖前的各脏器的相对基因表达

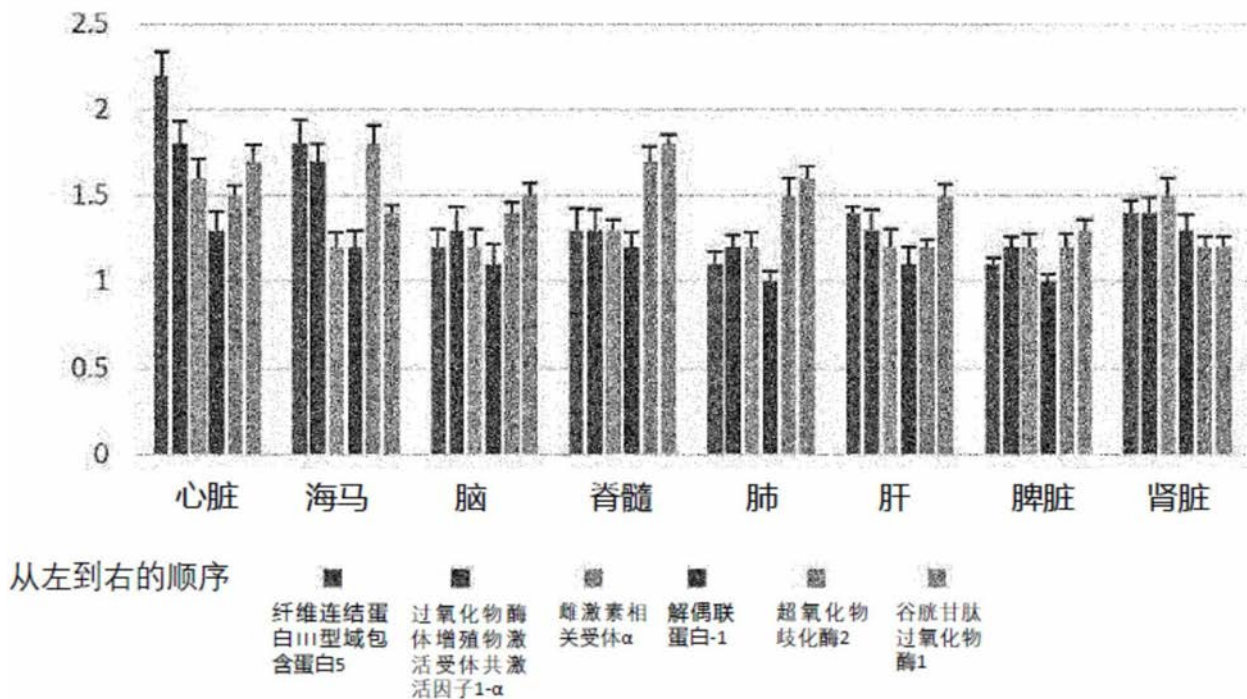


图1d

相对于给药3'-唾液乳糖前的各骨骼肌的相对基因表达

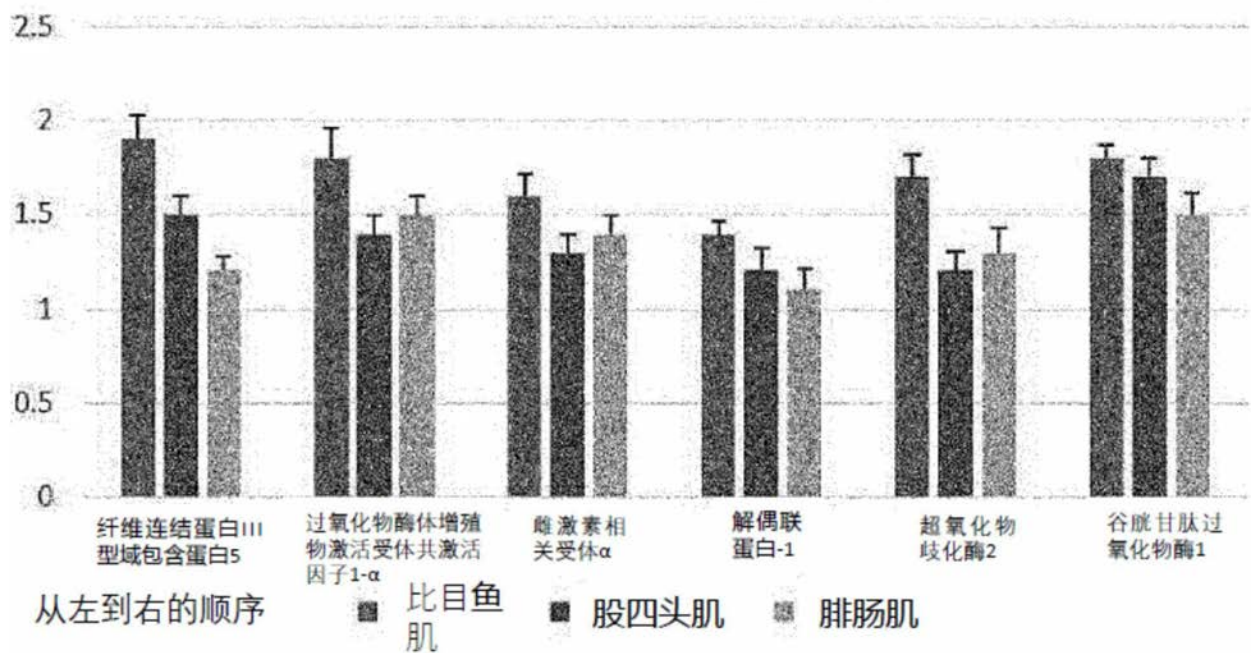


图1e

相对于给药3'-唾液乳糖前的腹部脂肪基因表达

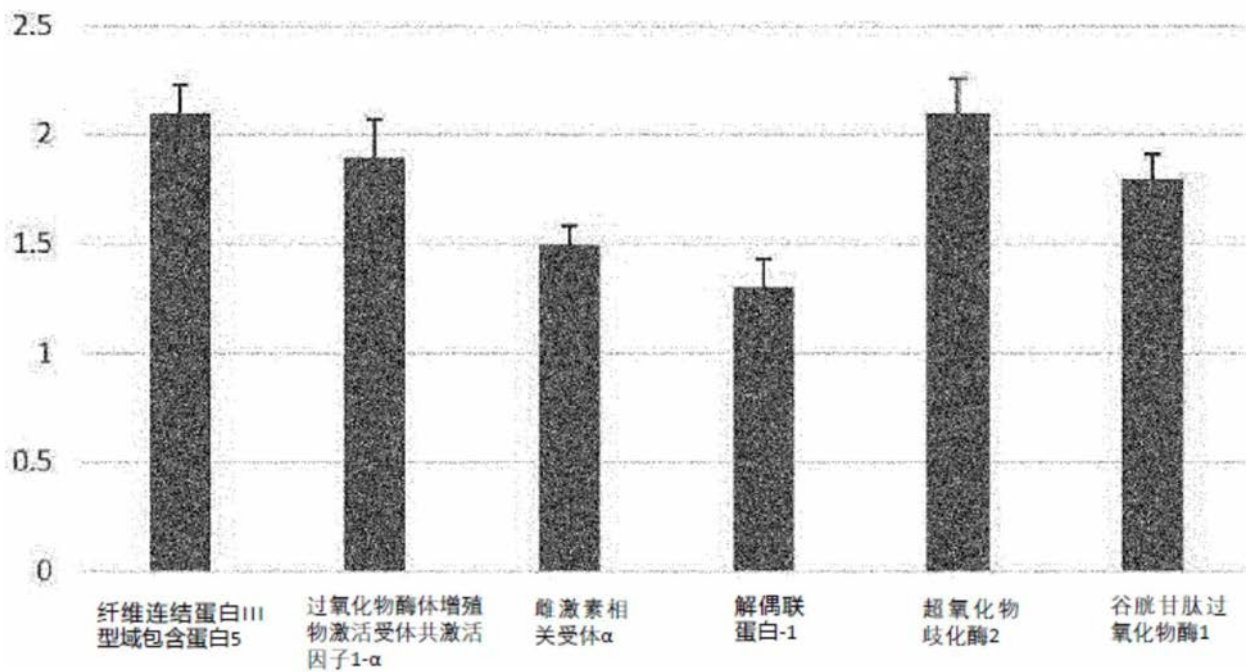


图1f

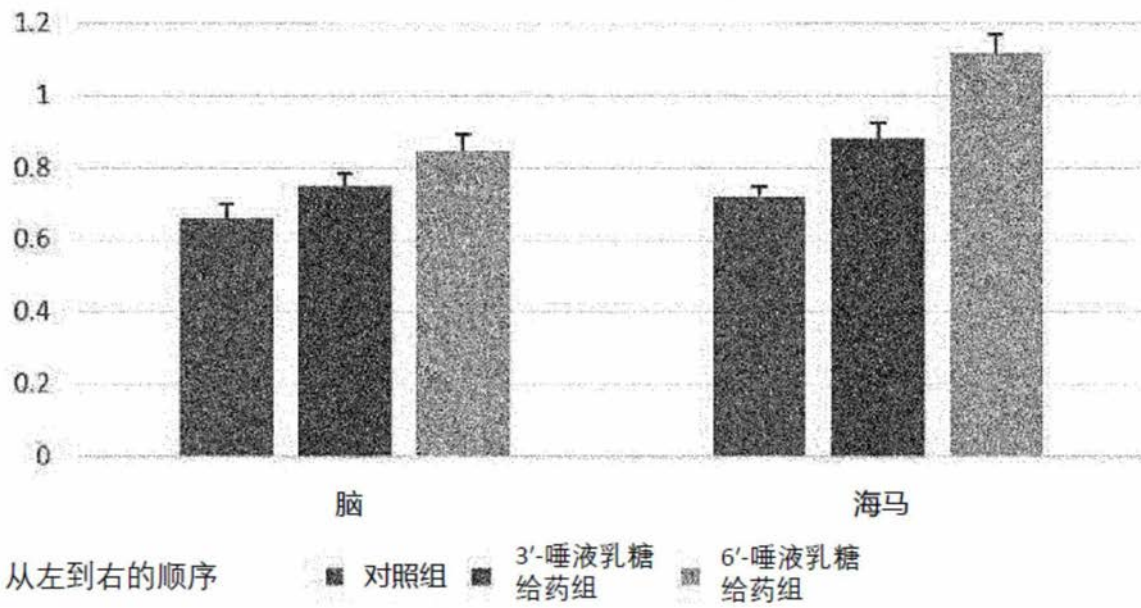
过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1- α /磷酸甘油醛脱氢酶 (比率)

图2a

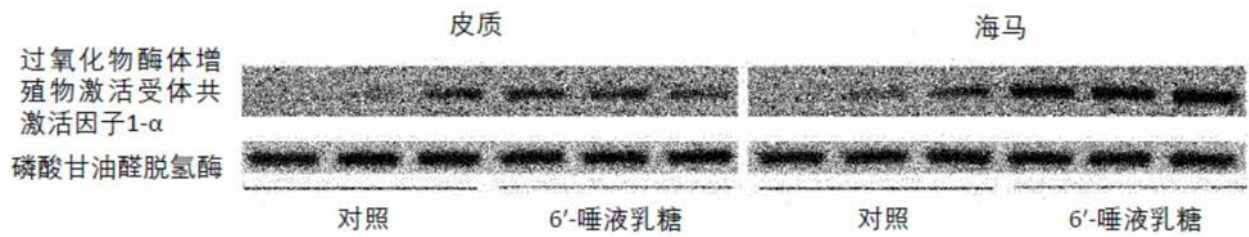


图2b

给药唾液乳糖时，神经细胞中的相对于对照组的基因表达

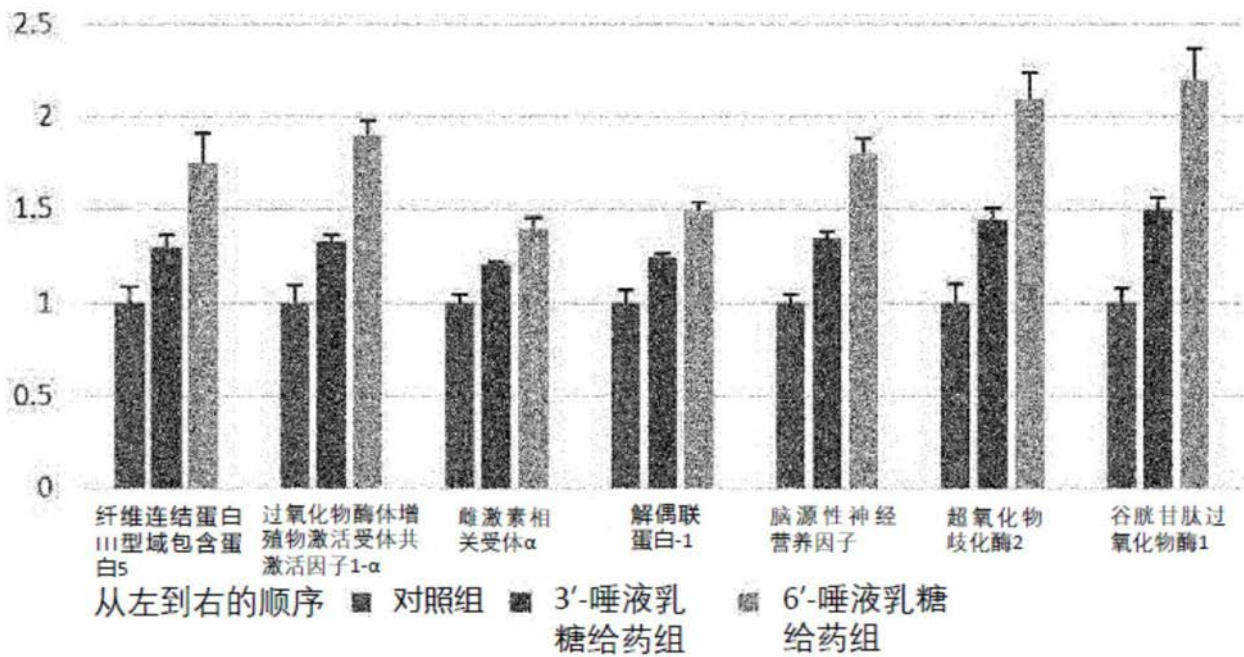


图3

给药唾液乳糖时，肌肉细胞中的相对于对照组的基因表达

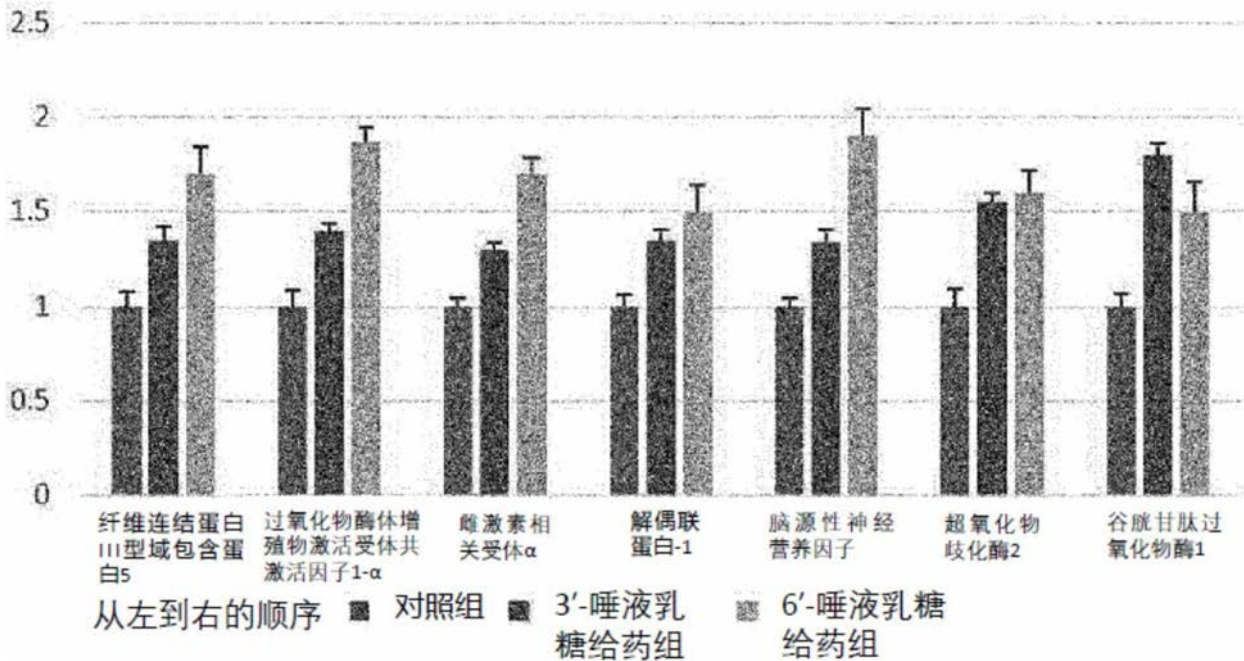


图4

脑中相对于正常鼠的基因表达

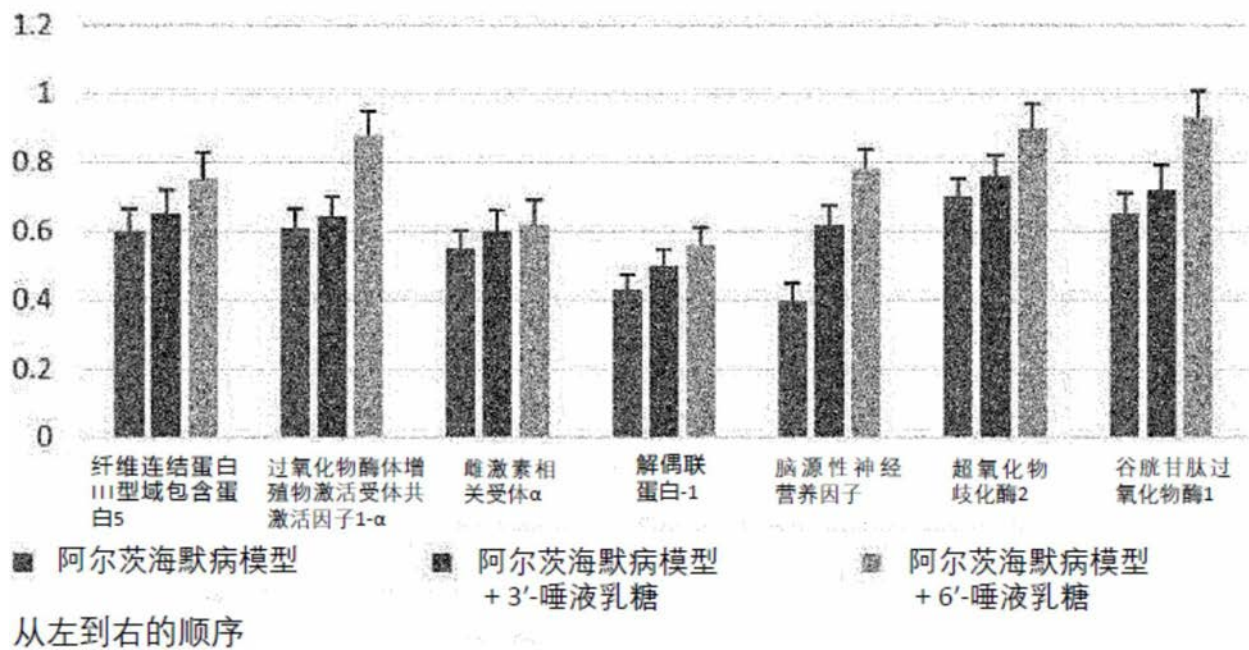


图5a

海马中的相对于正常鼠的基因表达

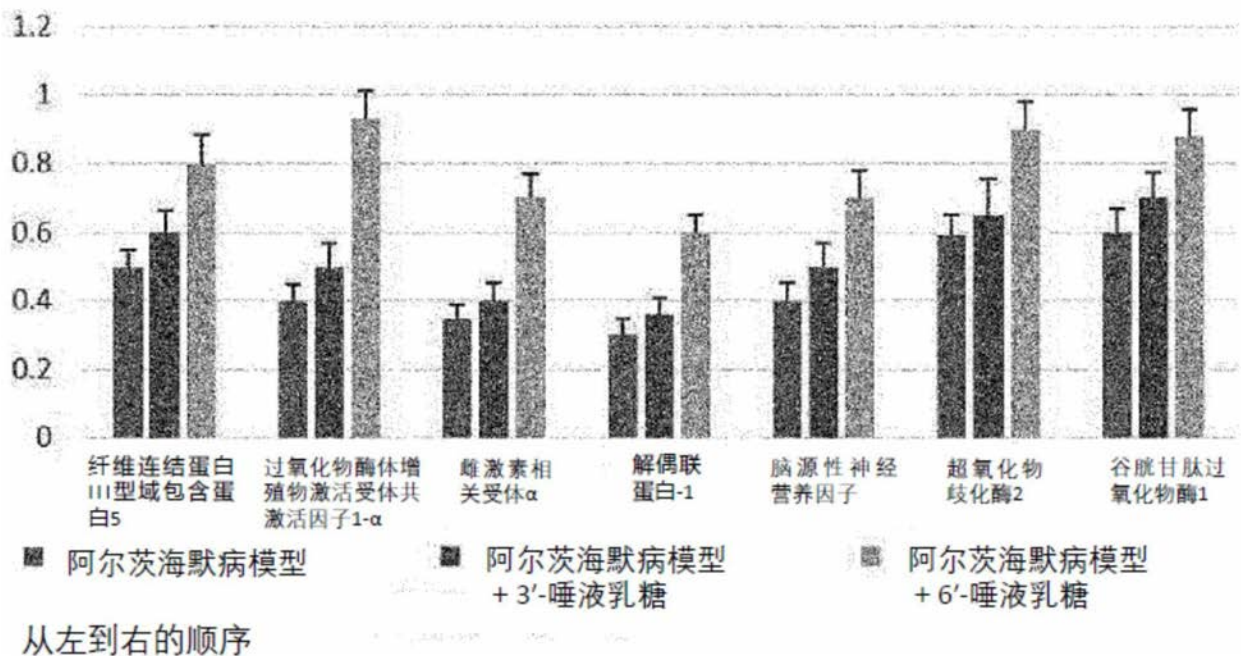


图5b

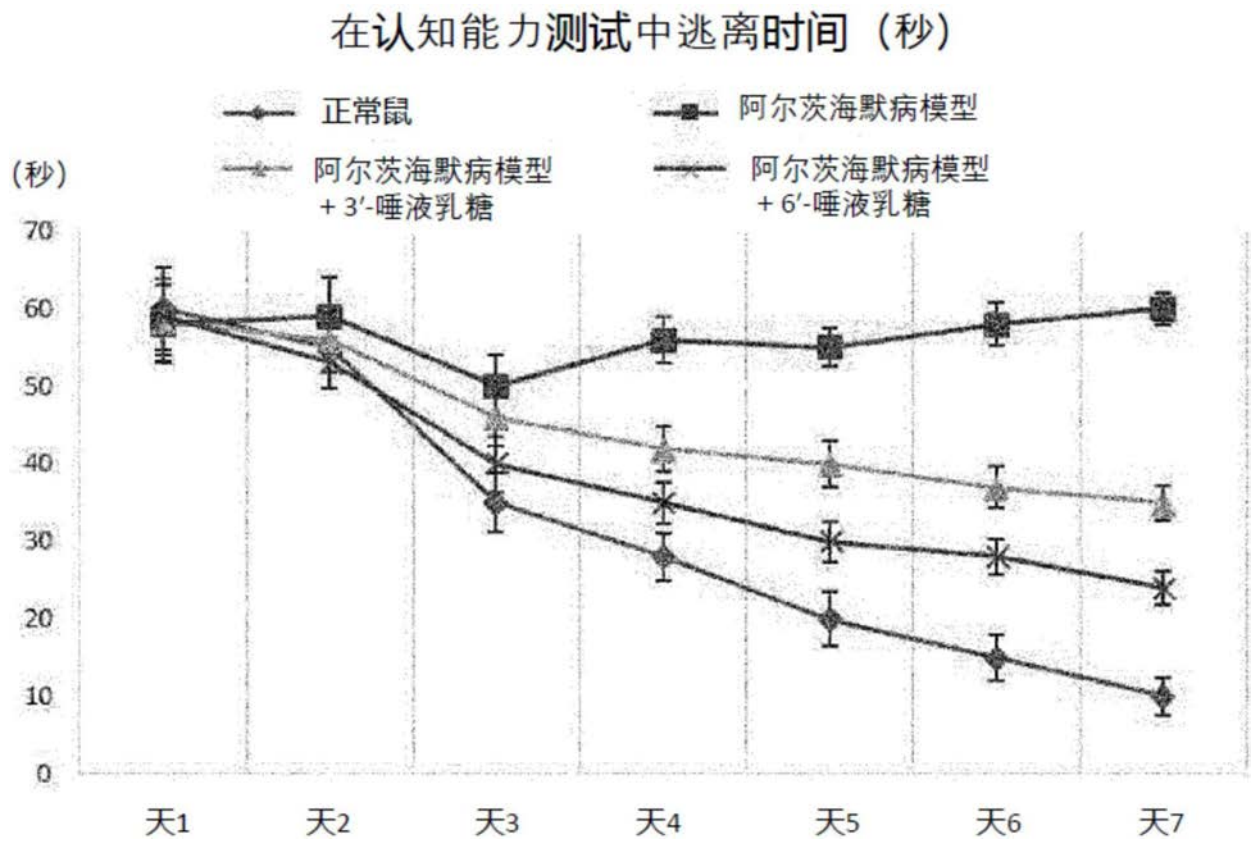


图6

脑中的相对于正常鼠的基因表达

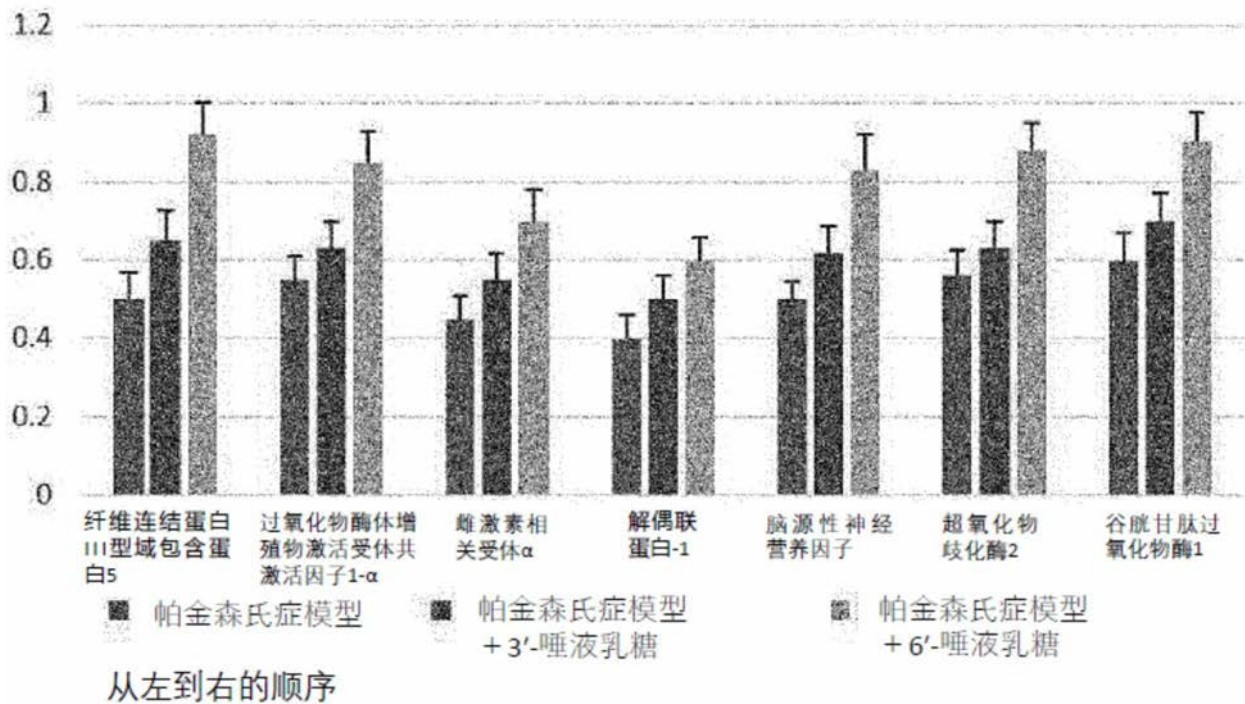


图7a

海马中的相对于正常鼠的基因表达

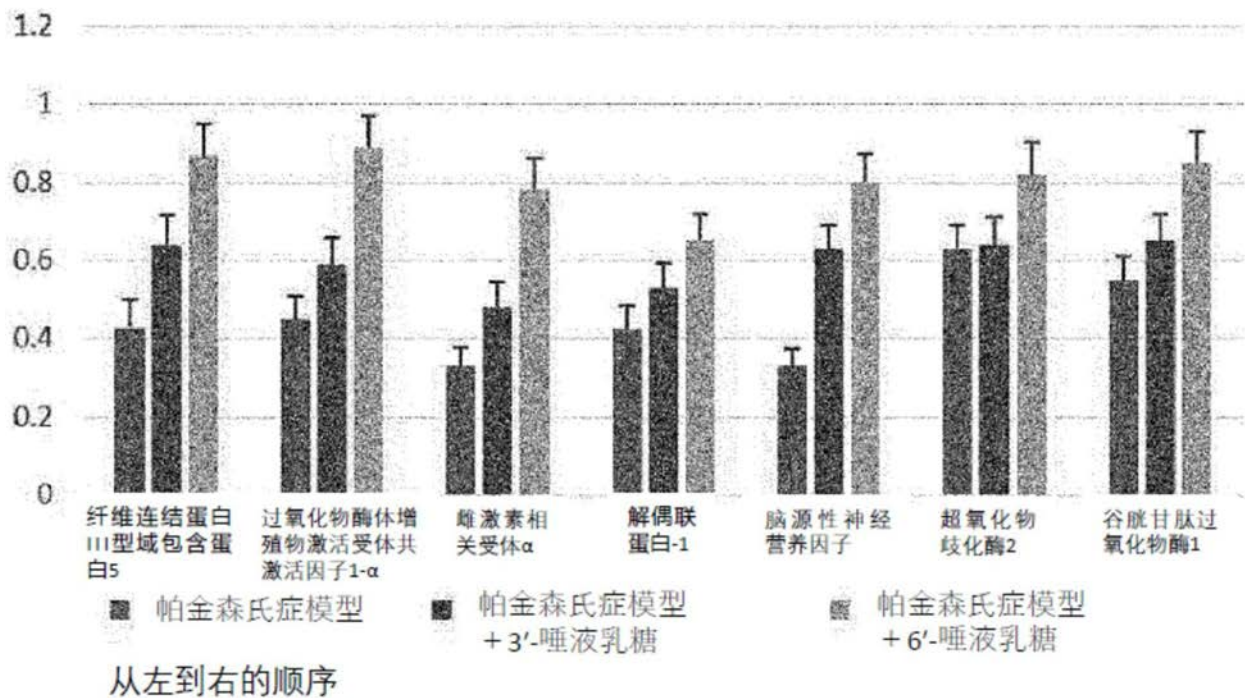


图7b

帕金森氏症动物模型行为实验

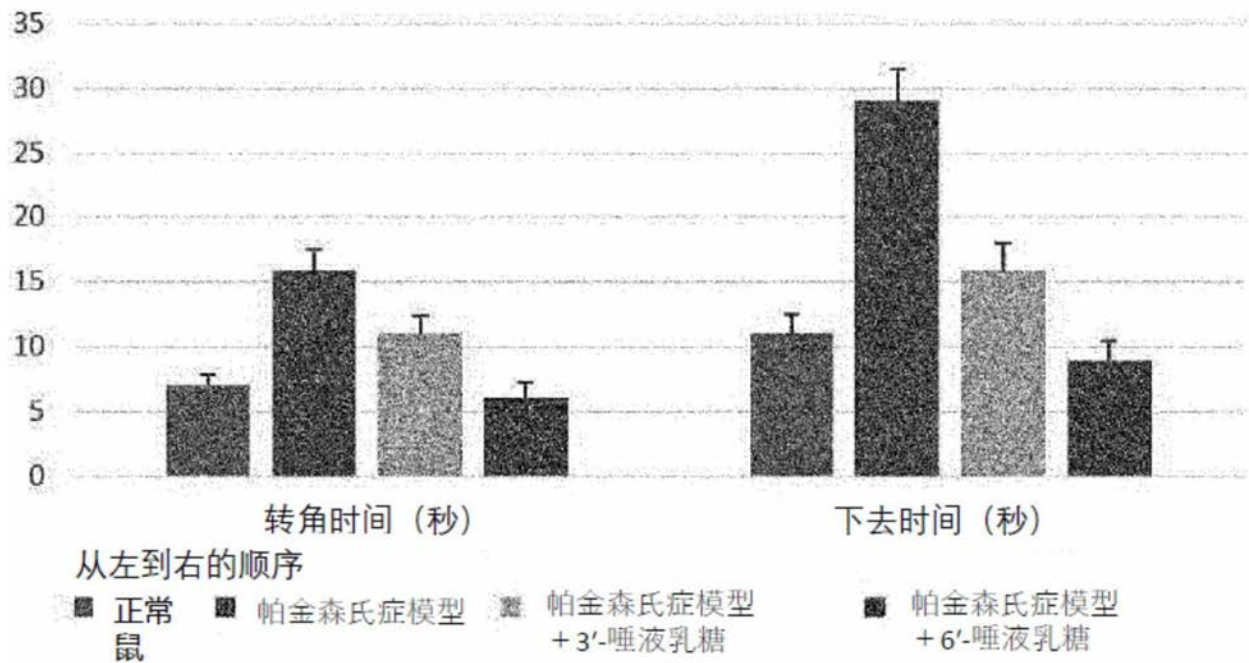


图8

脑中的相对于正常鼠的基因表达

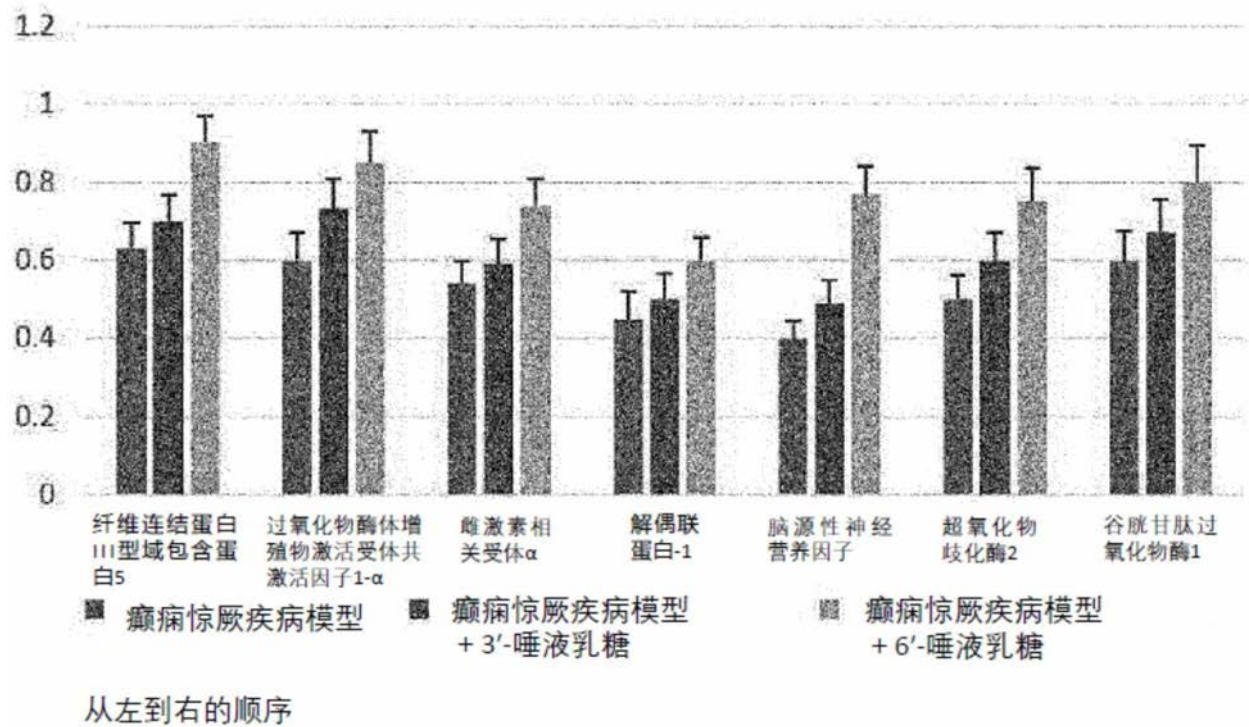
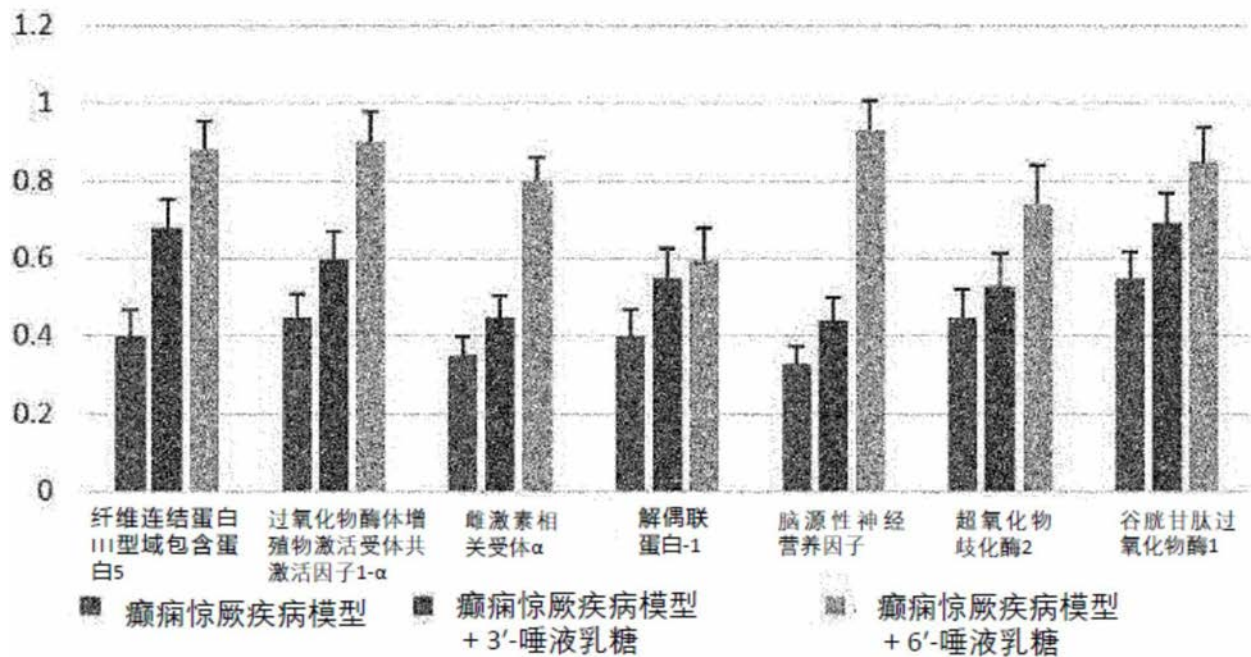


图9a

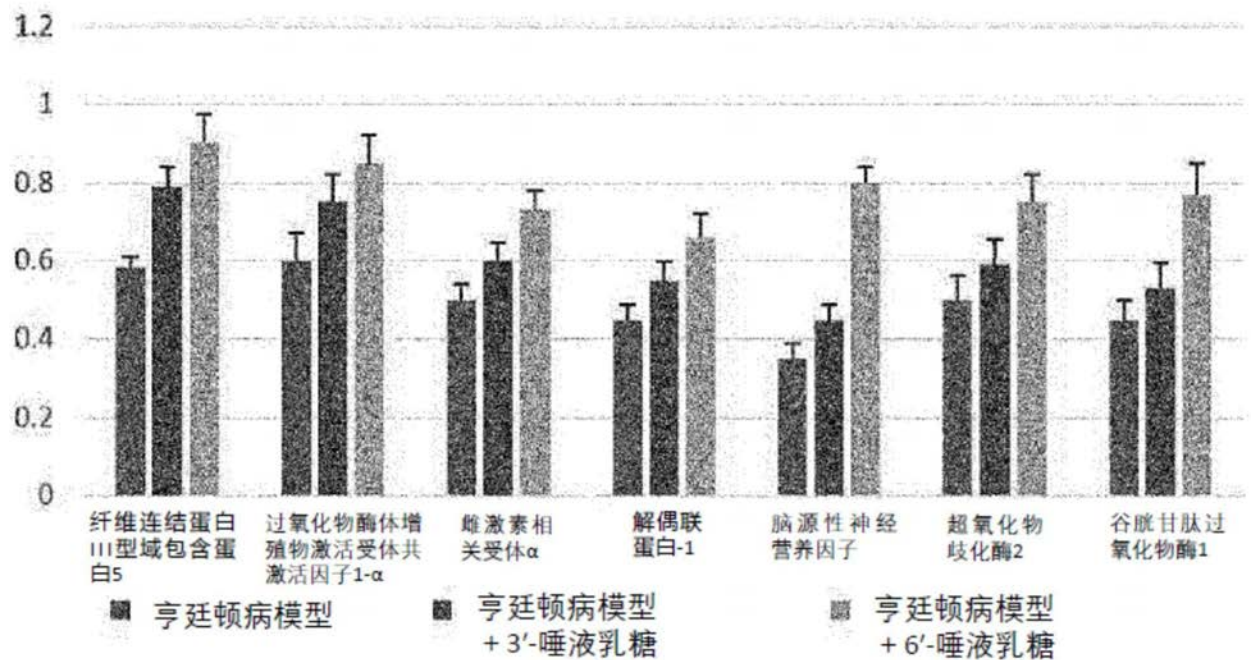
海马中的相对于正常鼠的基因表达



从左到右的顺序

图9b

脑中的相对于正常鼠的基因表达



从左到右的顺序

图10a

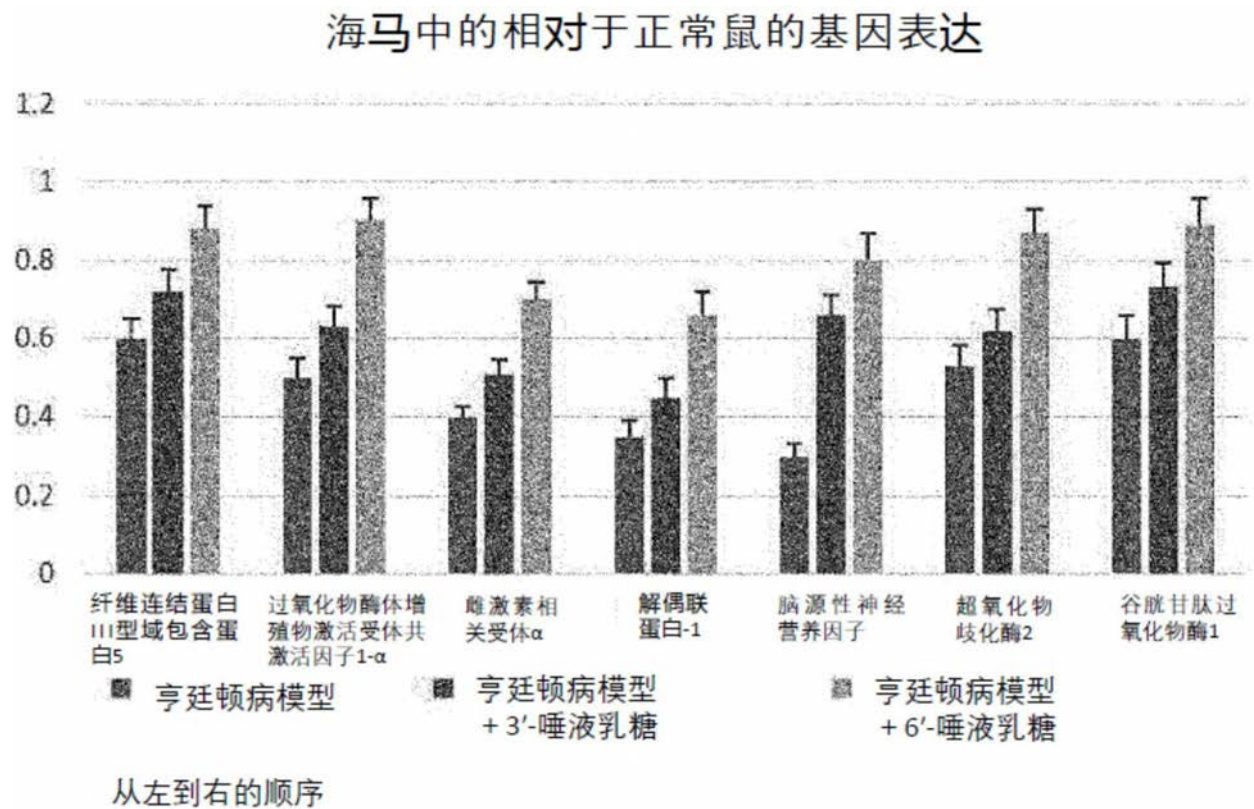


图10b

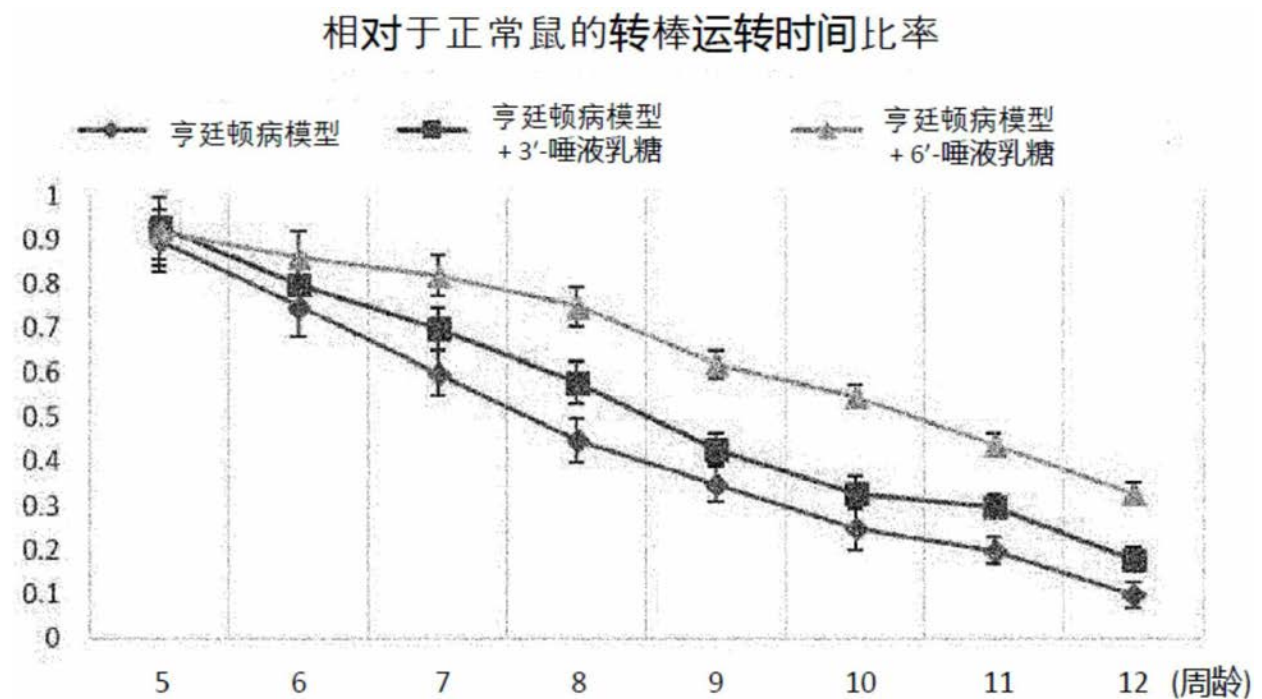


图11

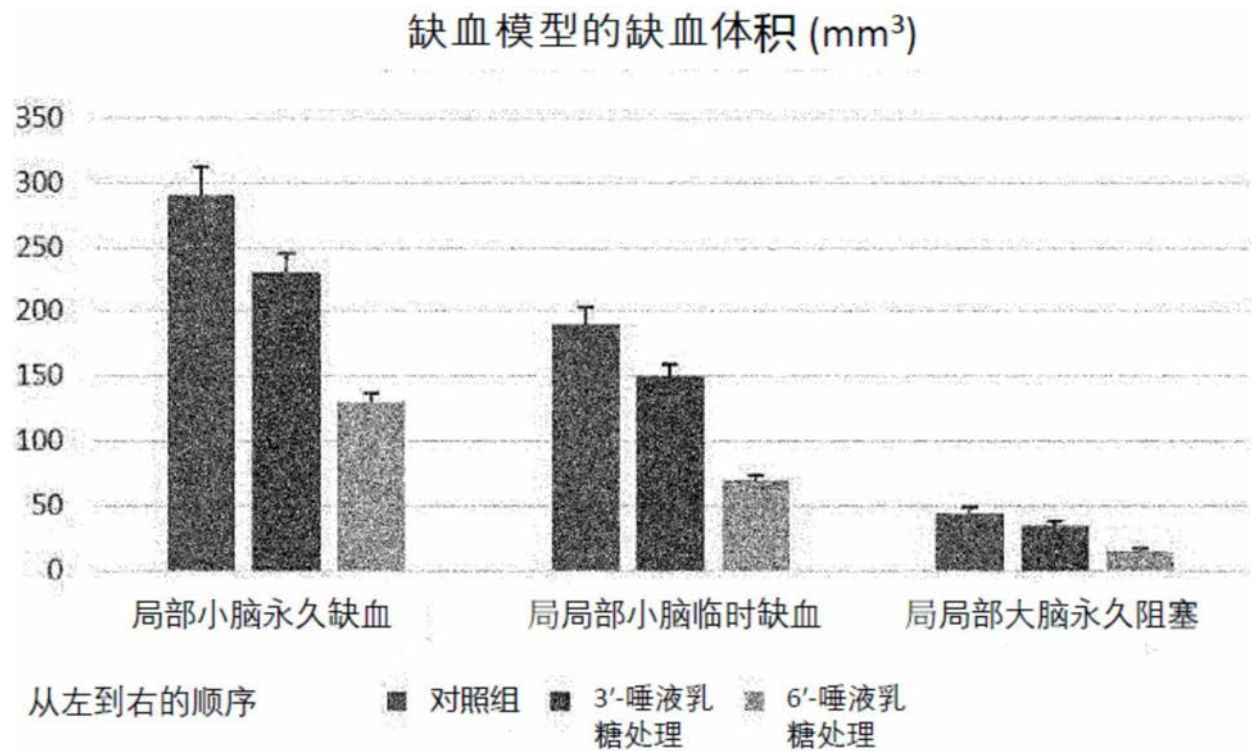


图12

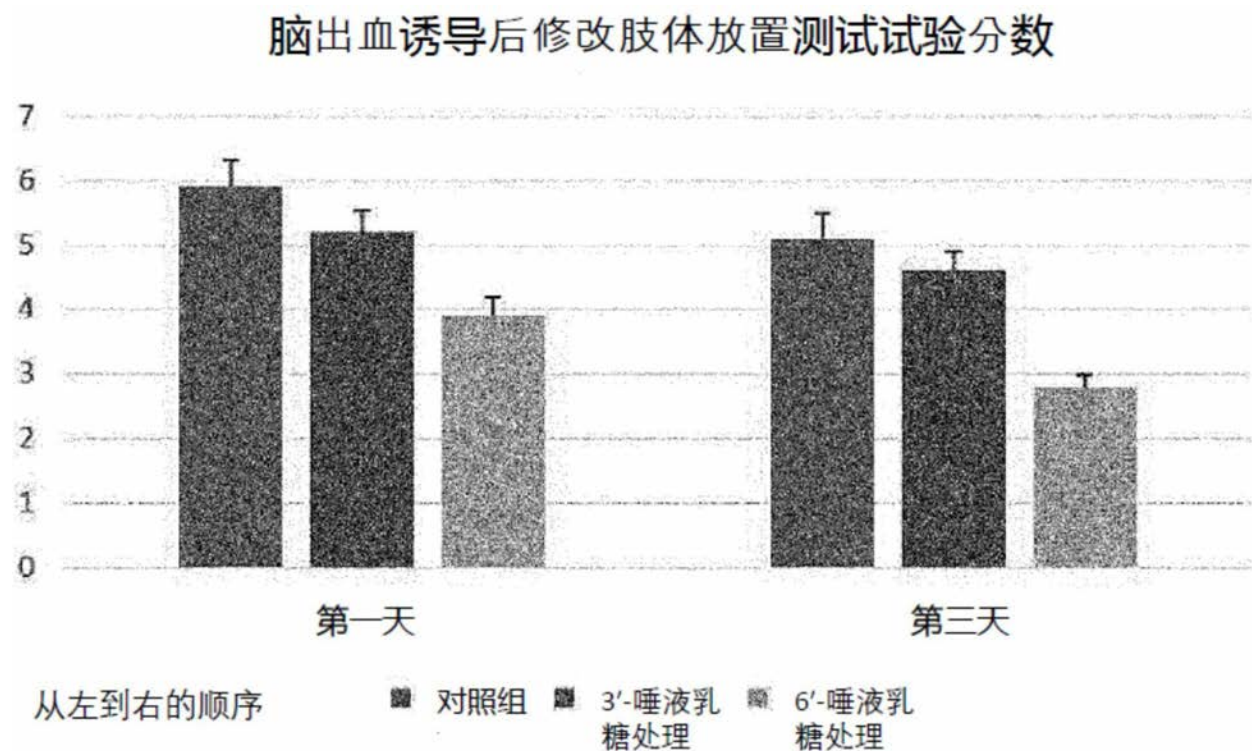


图13

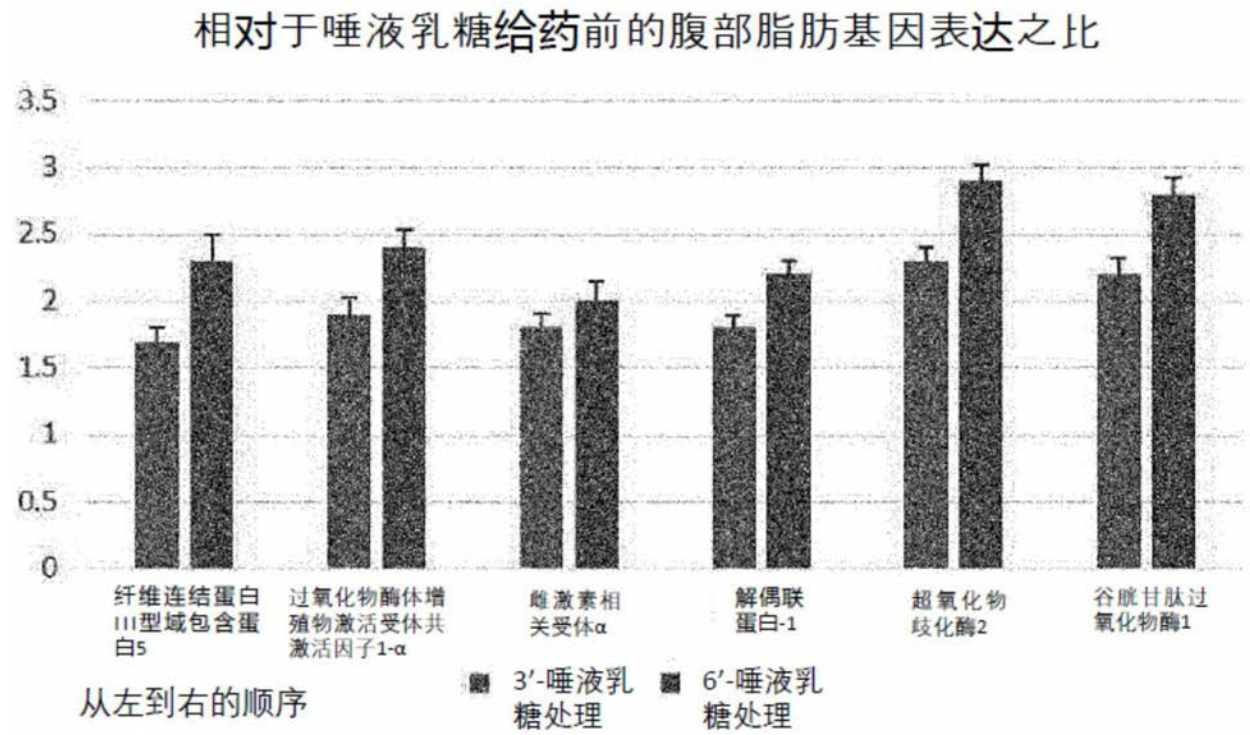


图14

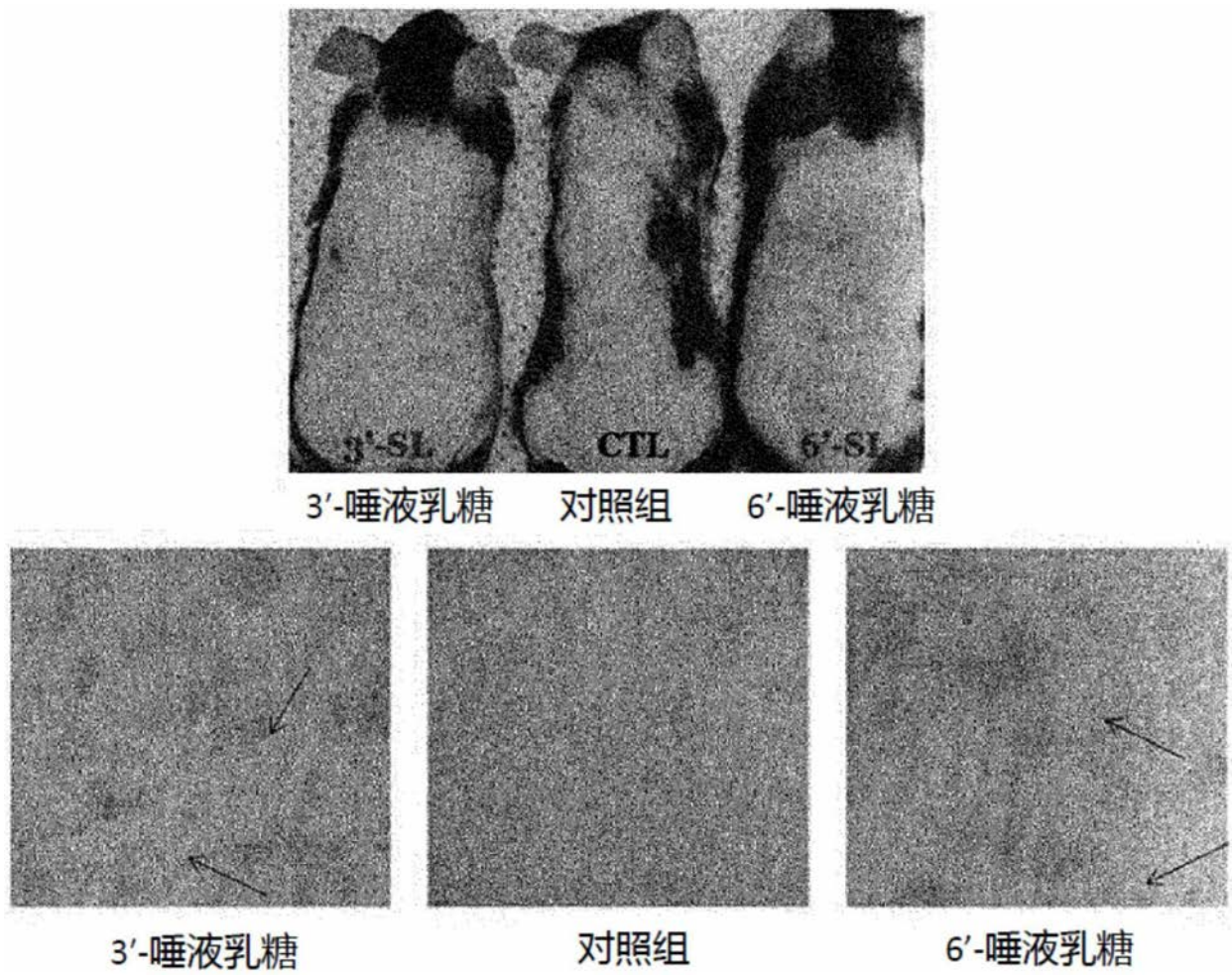


图15

相对于3'-唾液乳糖给药前的按身体部位的相对基因表达

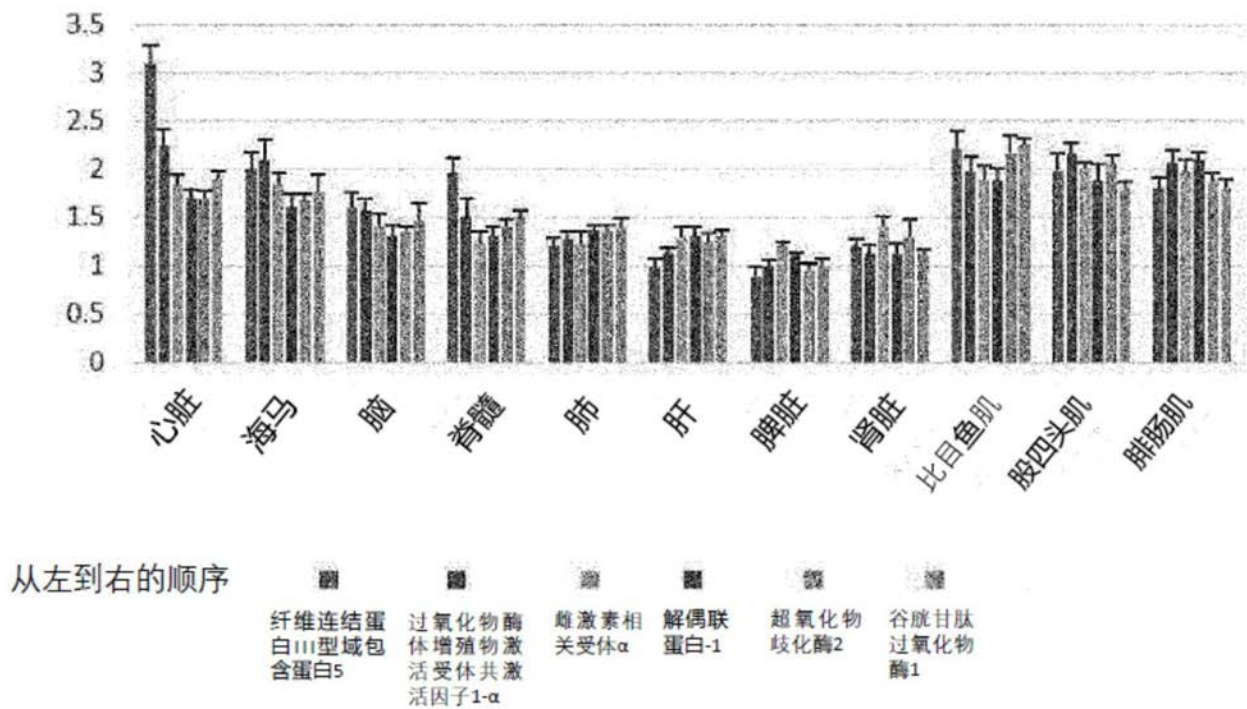


图16a

相对于6'-唾液乳糖给药前的按身体部位的相对基因表达

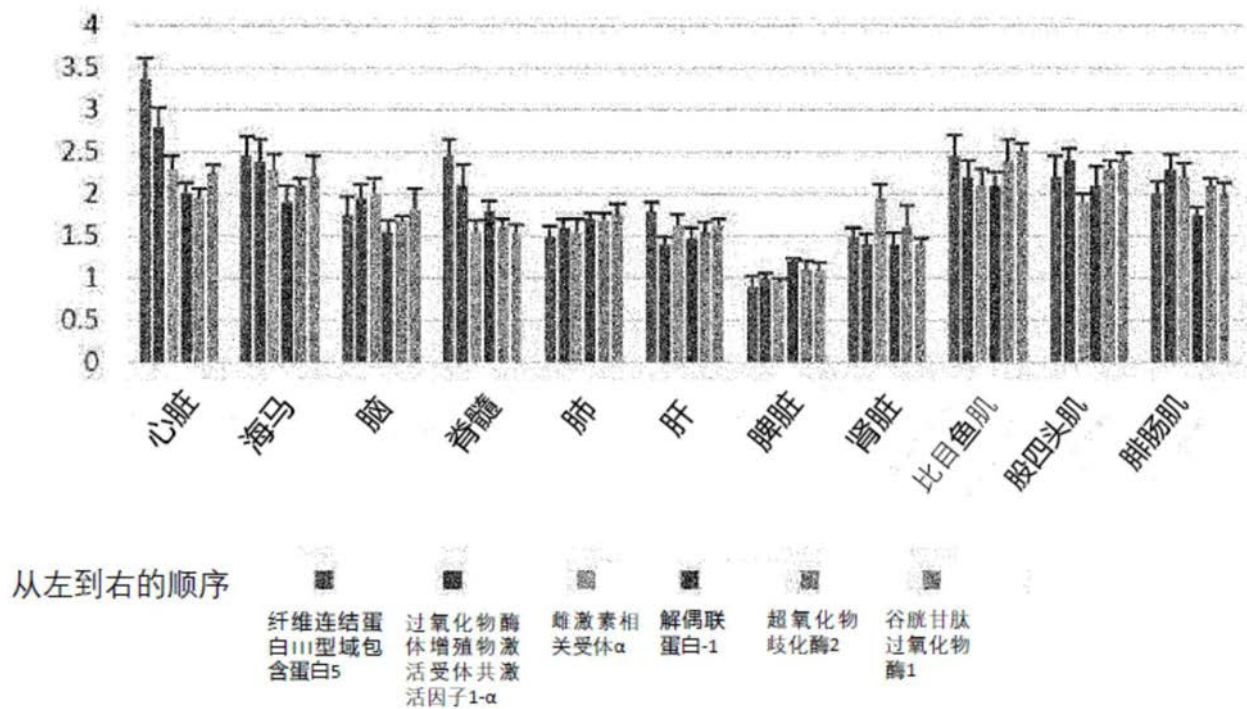


图16b

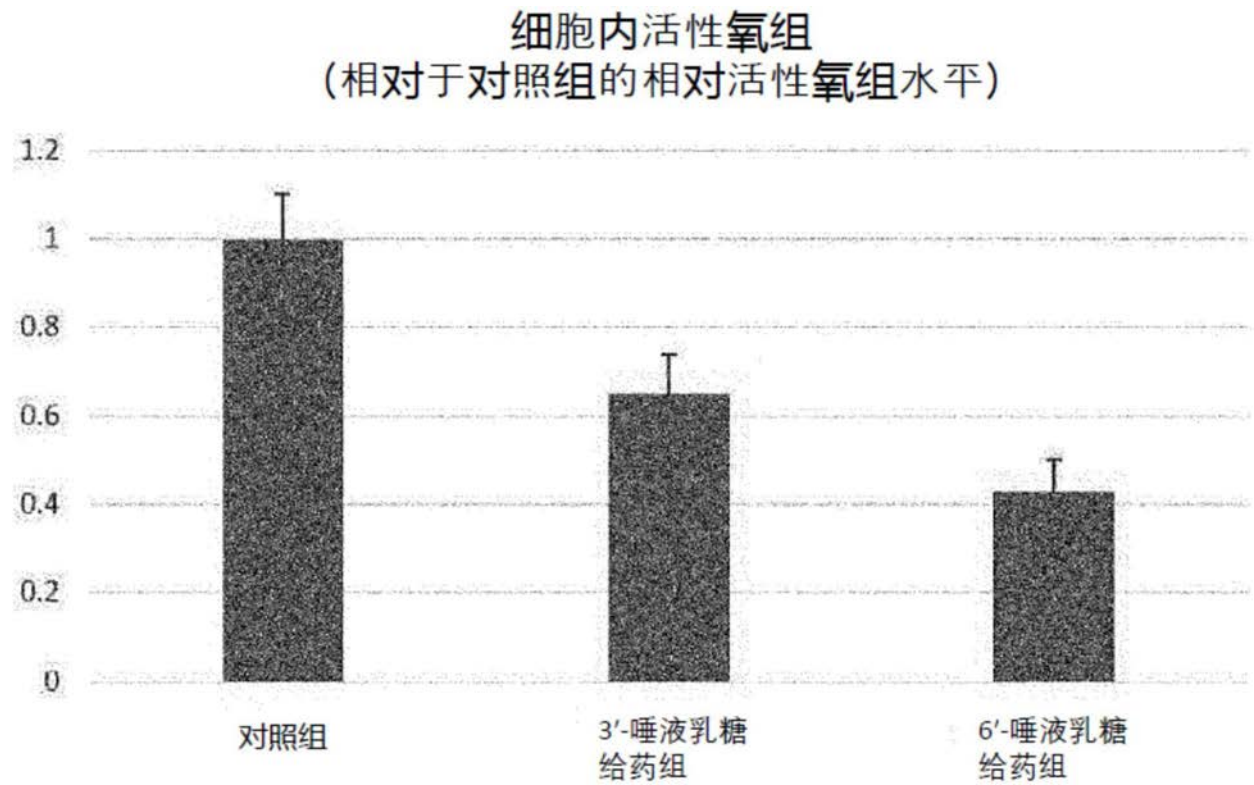


图17a

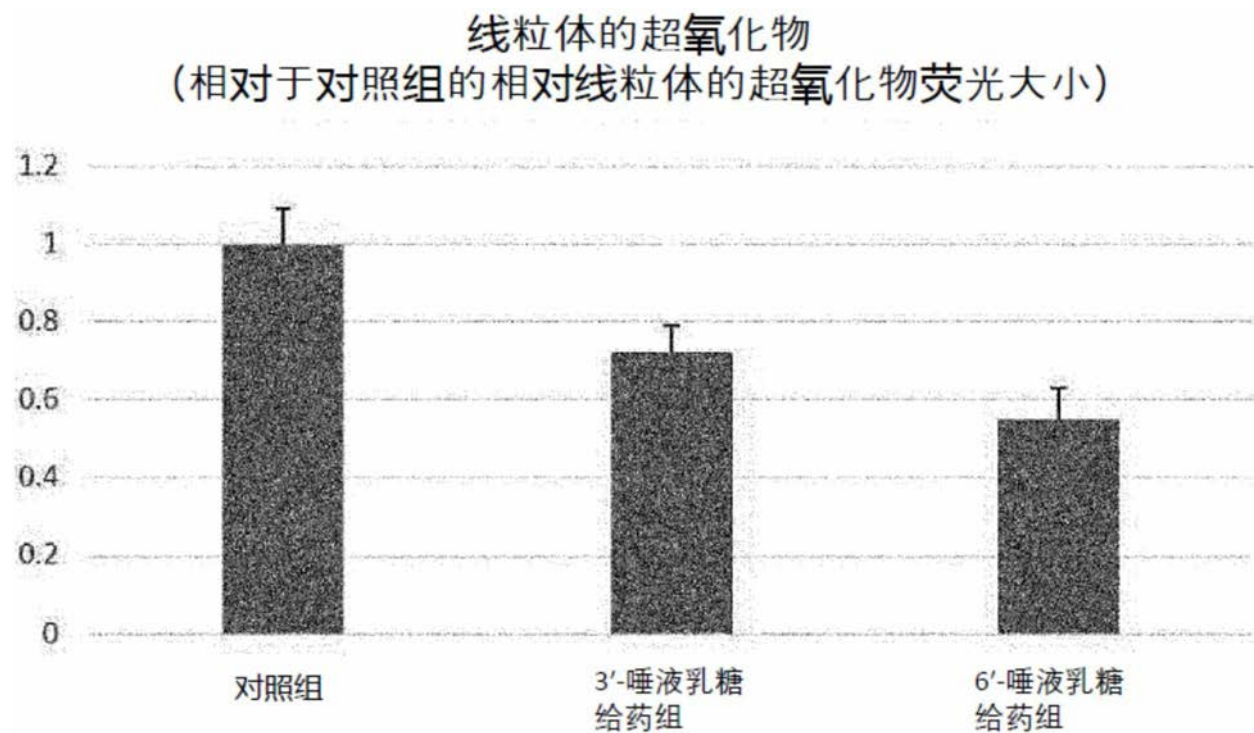


图17b

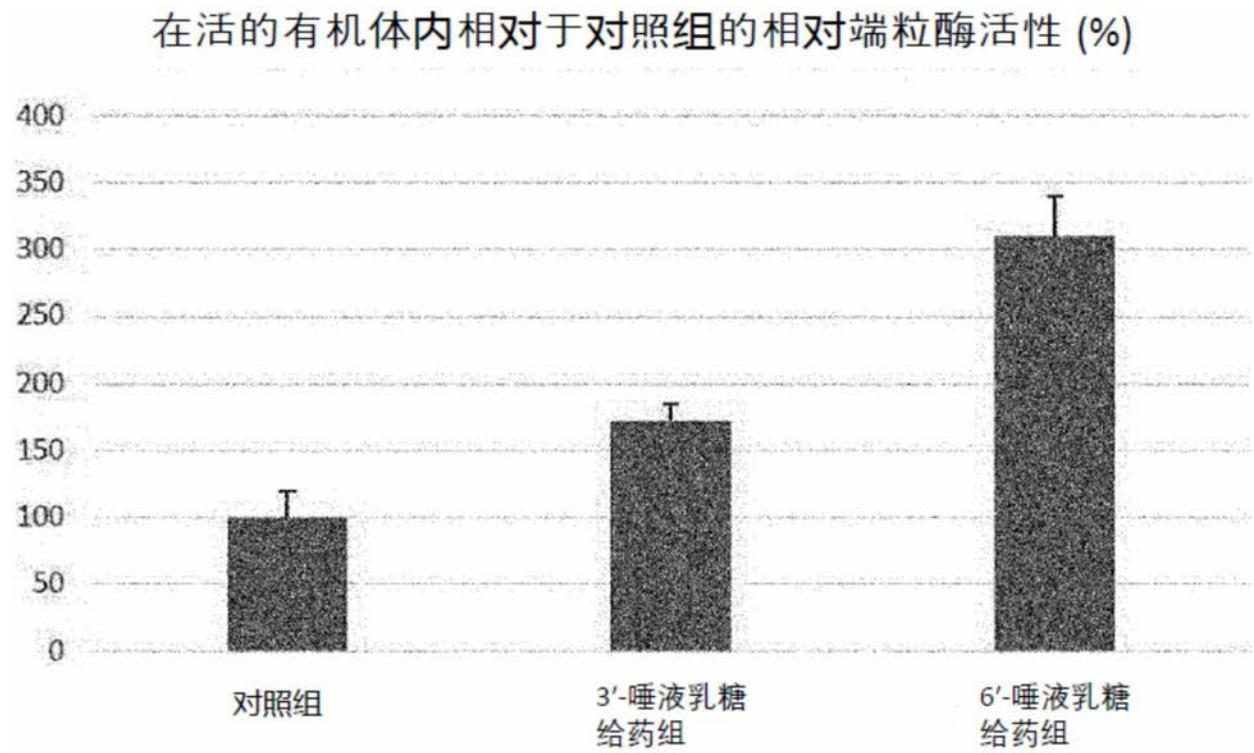


图18a

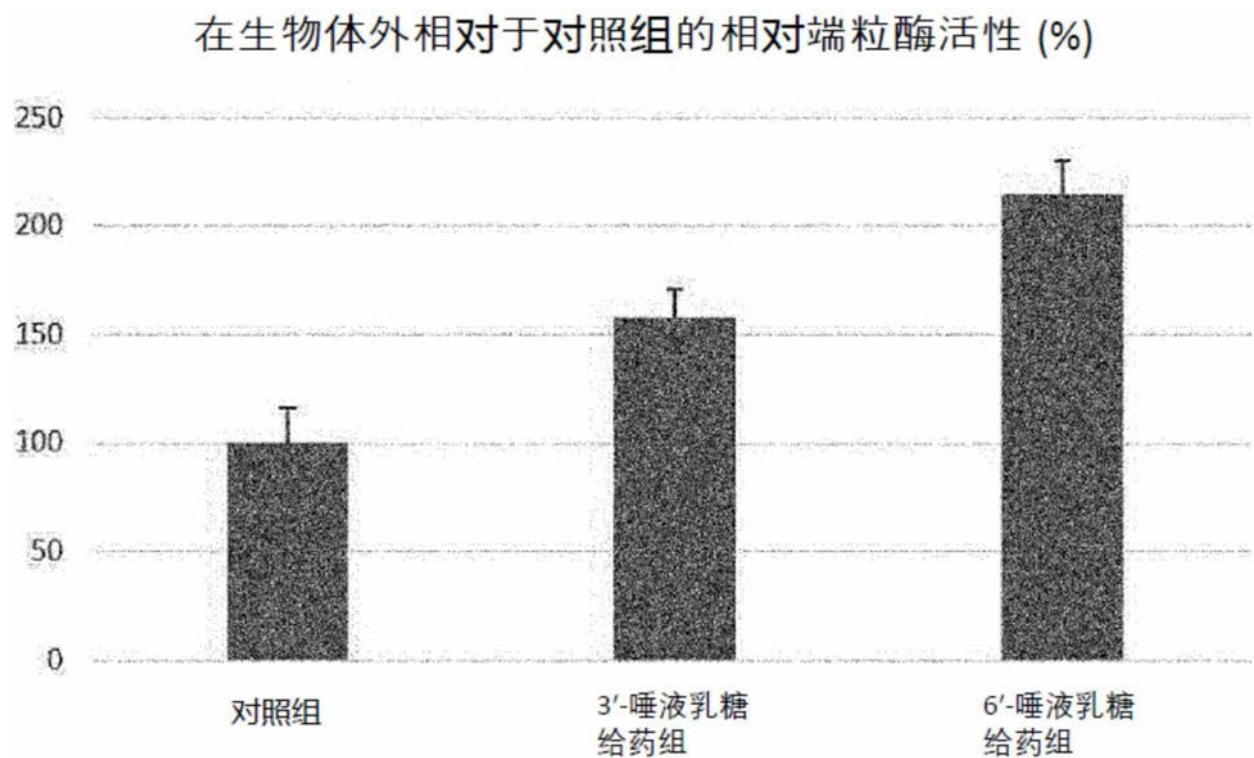


图18b

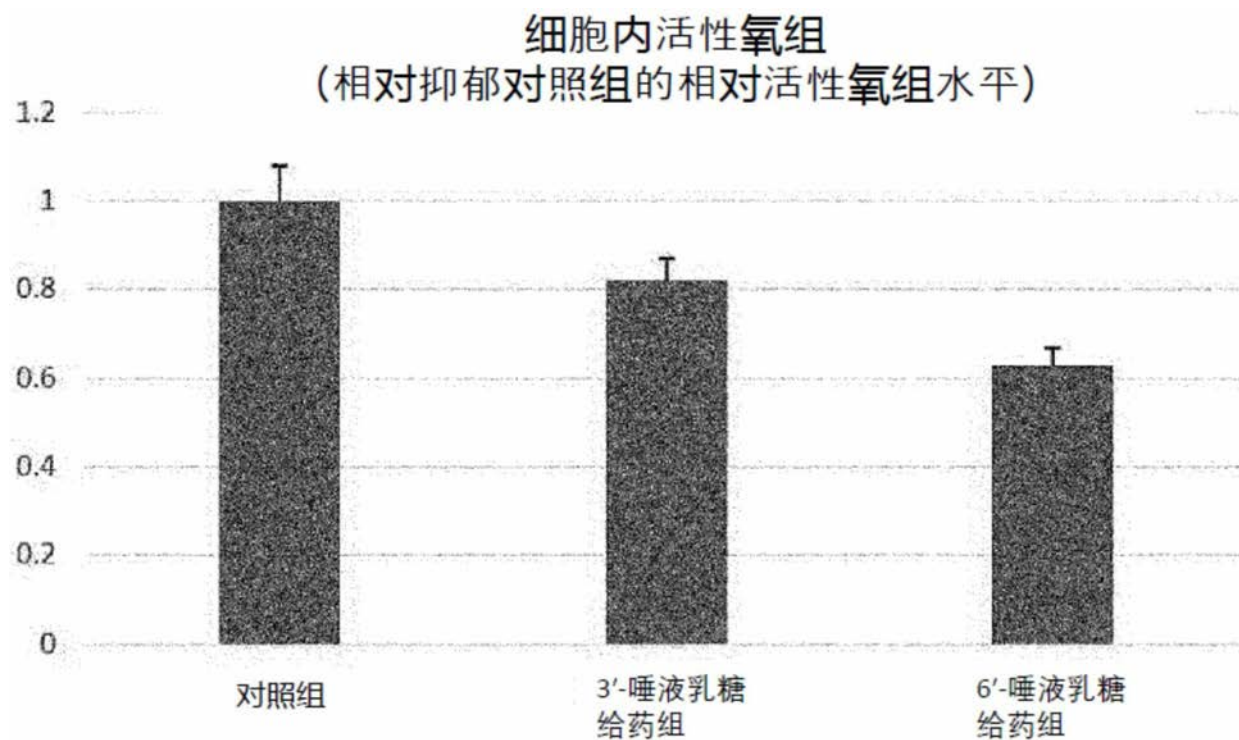


图19a

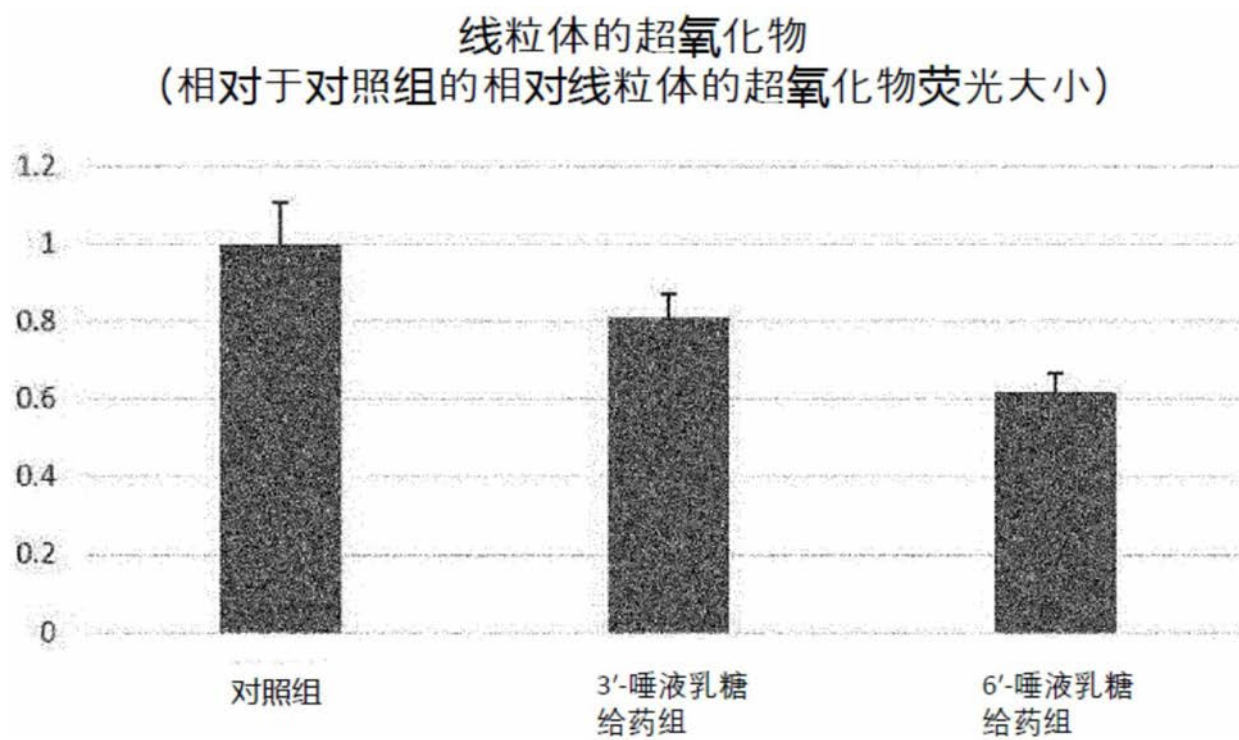


图19b

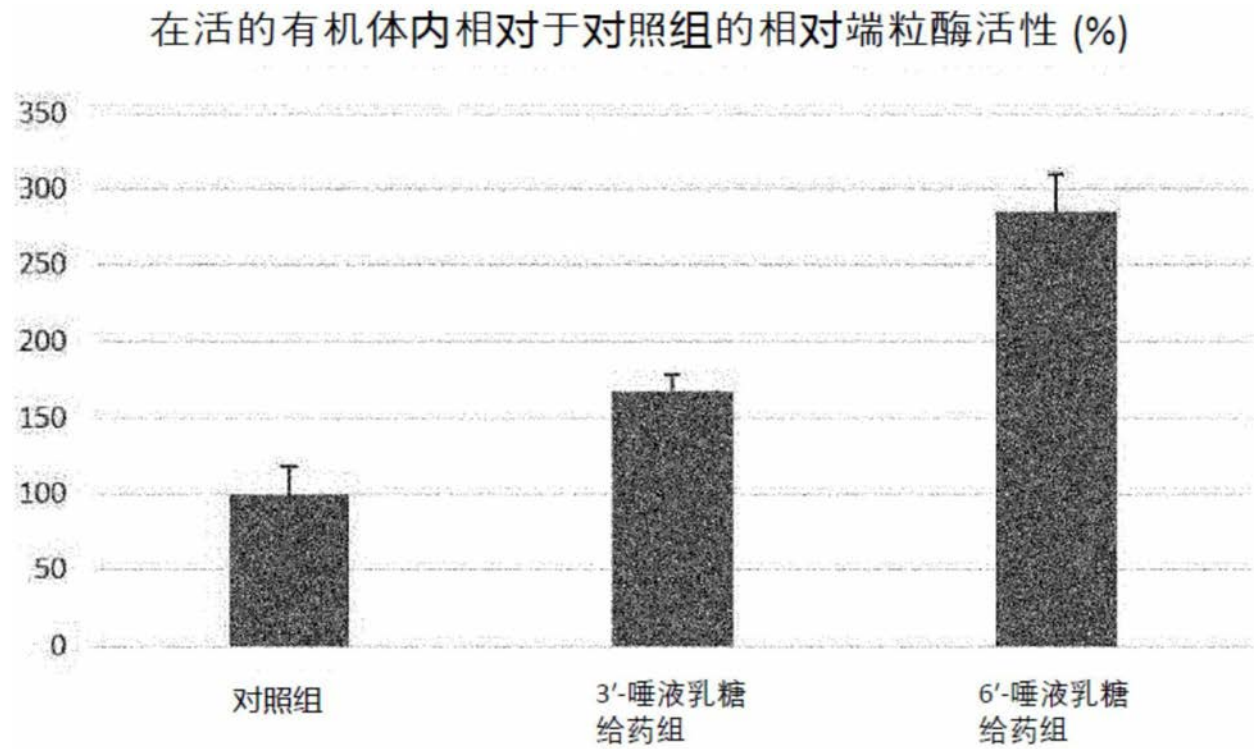


图20a

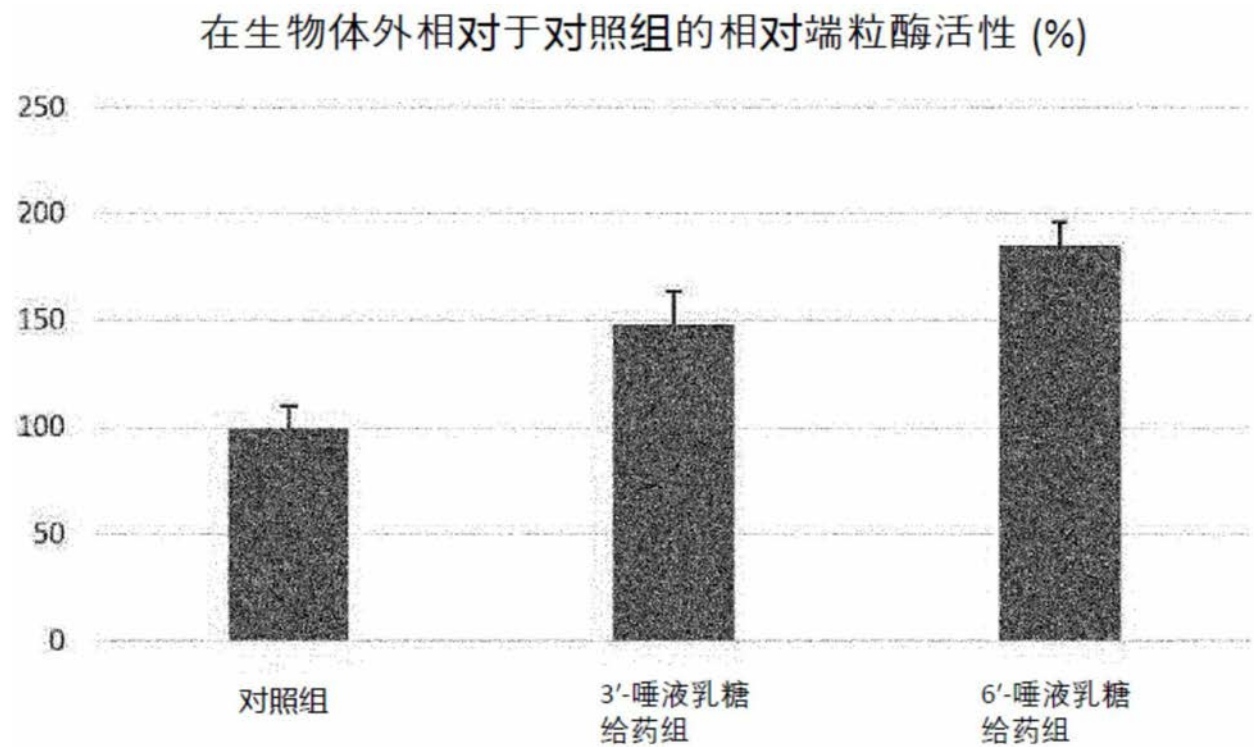


图20b

相对于3'-唾液乳糖给药前的按身体部位的相对基因表达

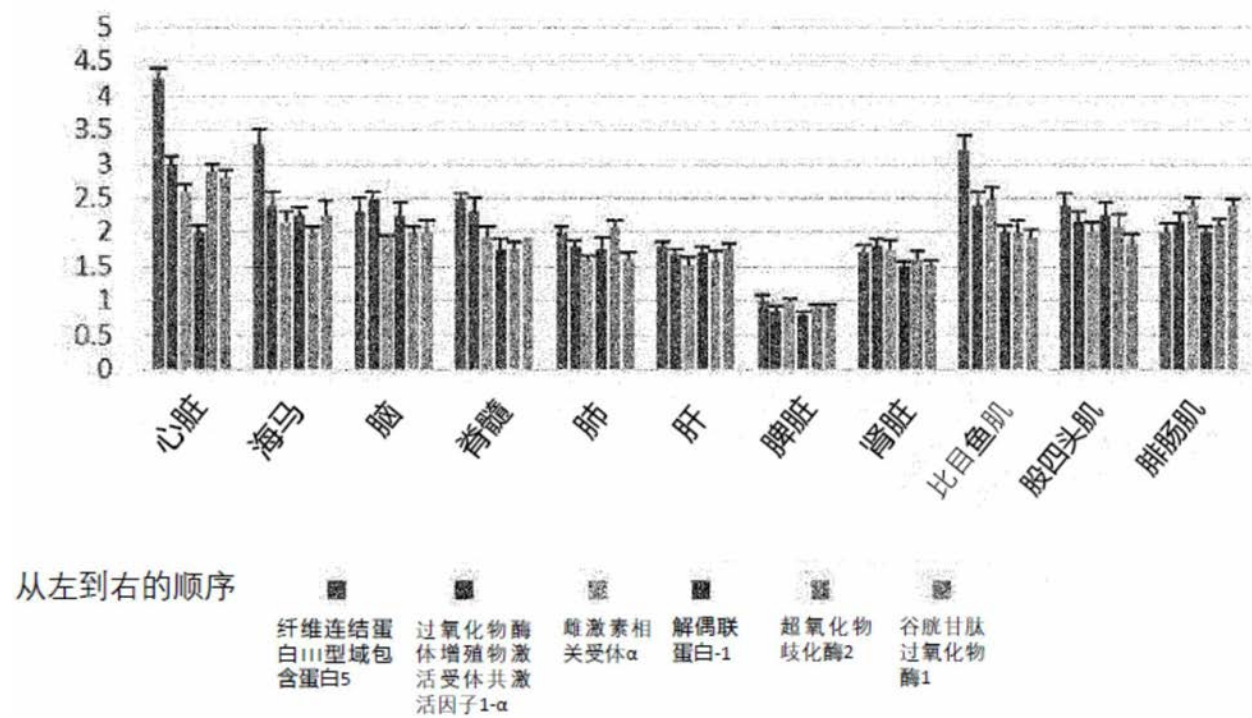


图21a

相对于6'-唾液乳糖给药前的按身体部位的相对基因表达

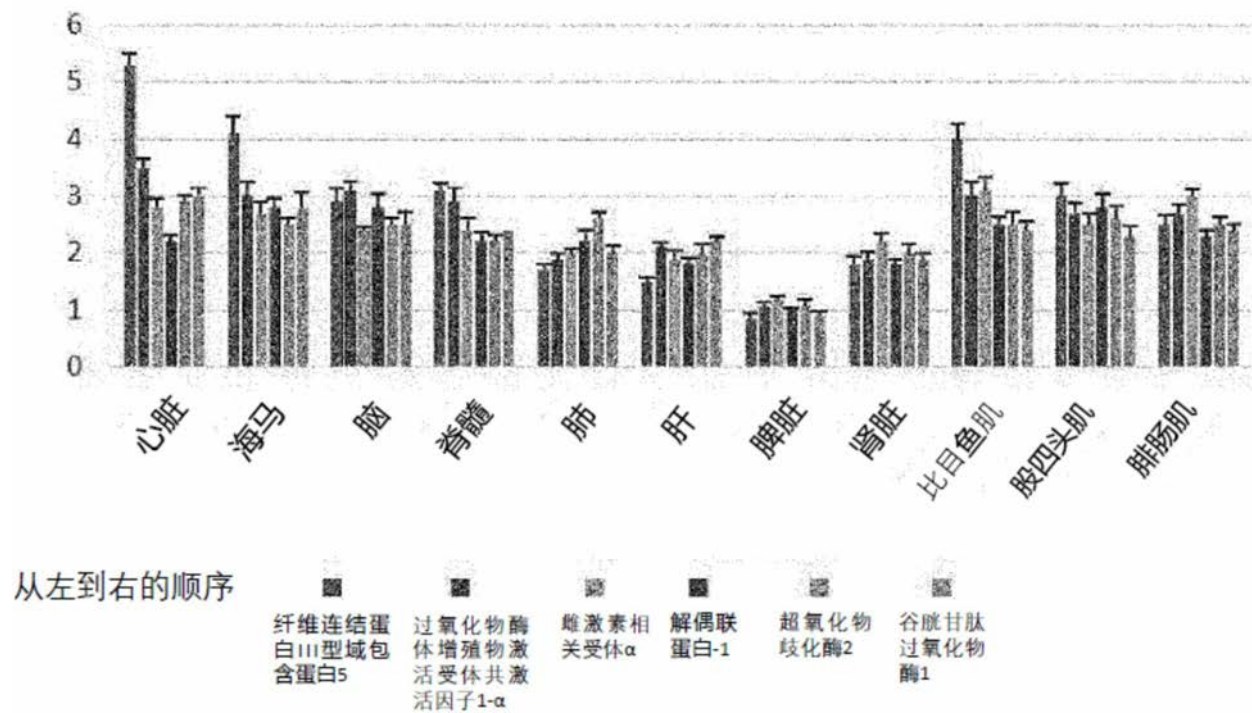


图21b

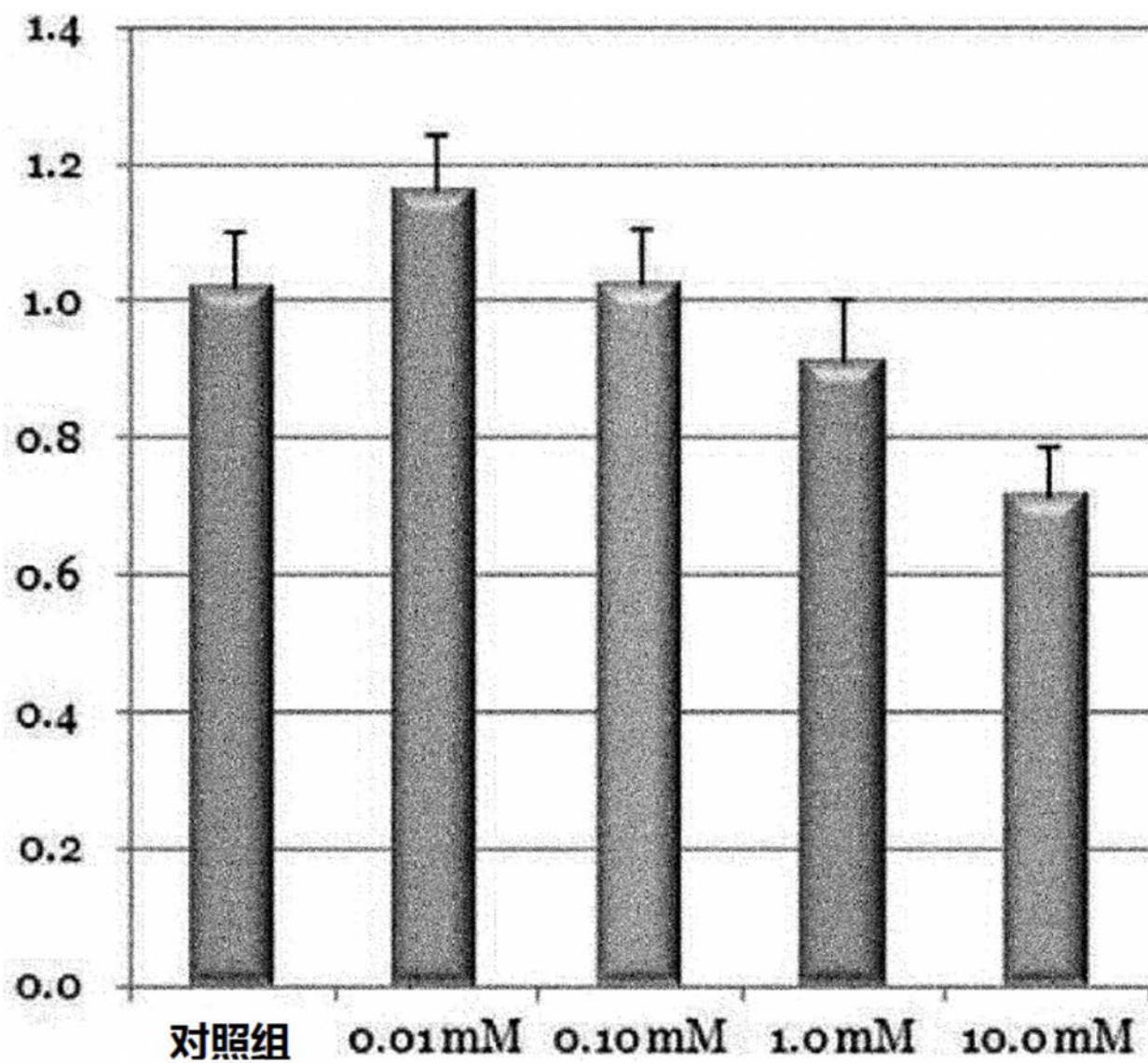


图22a

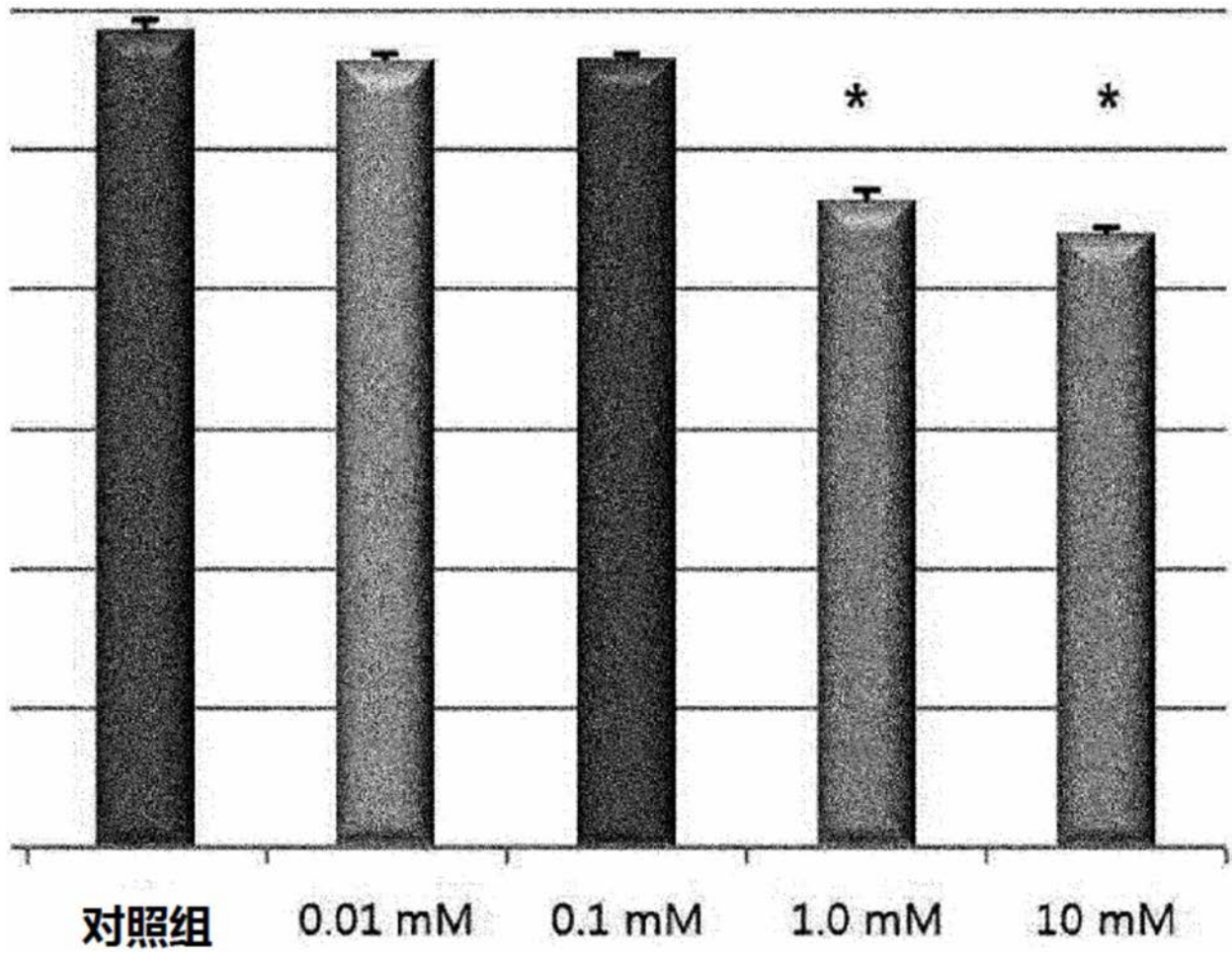


图22b

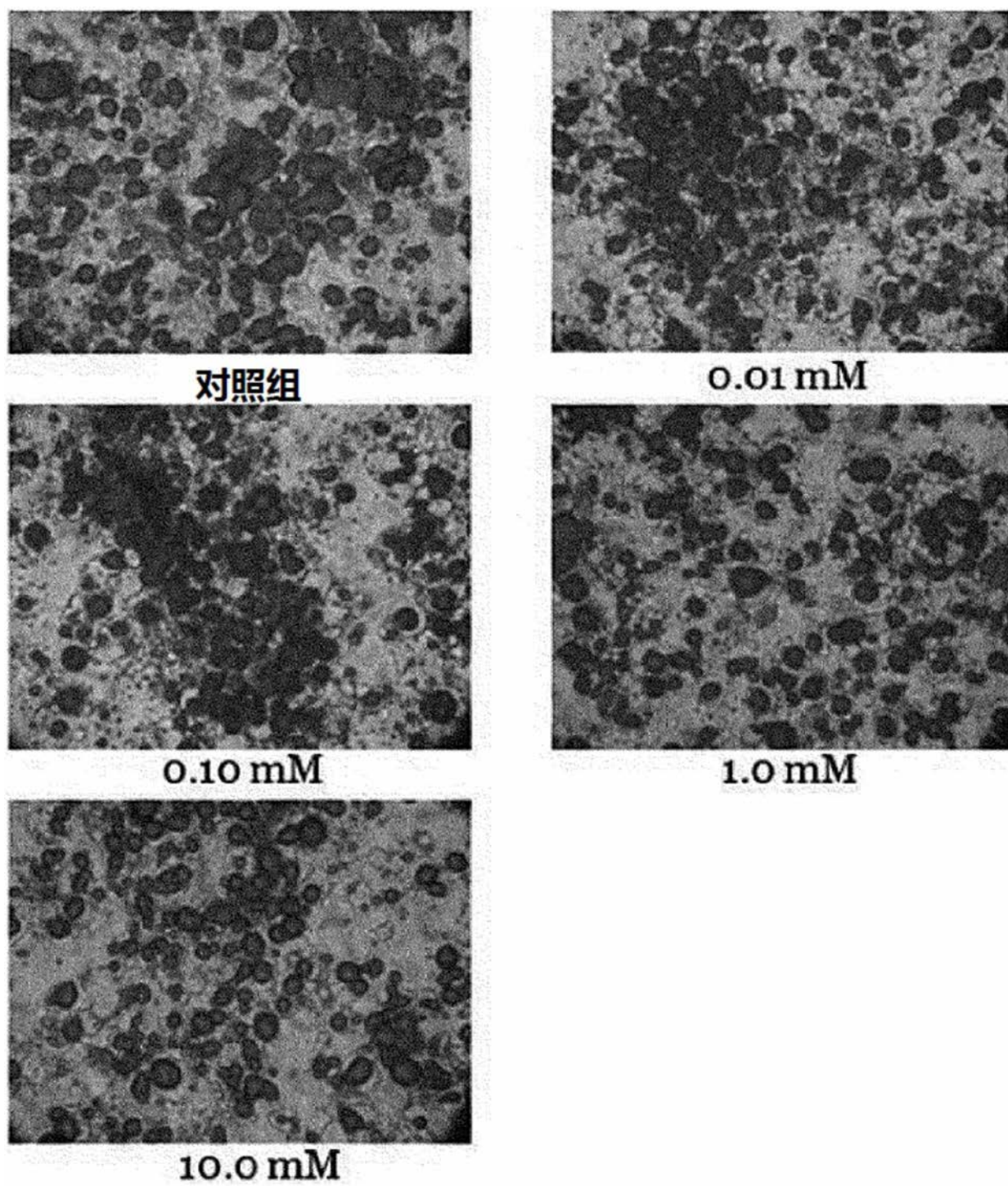


图23a

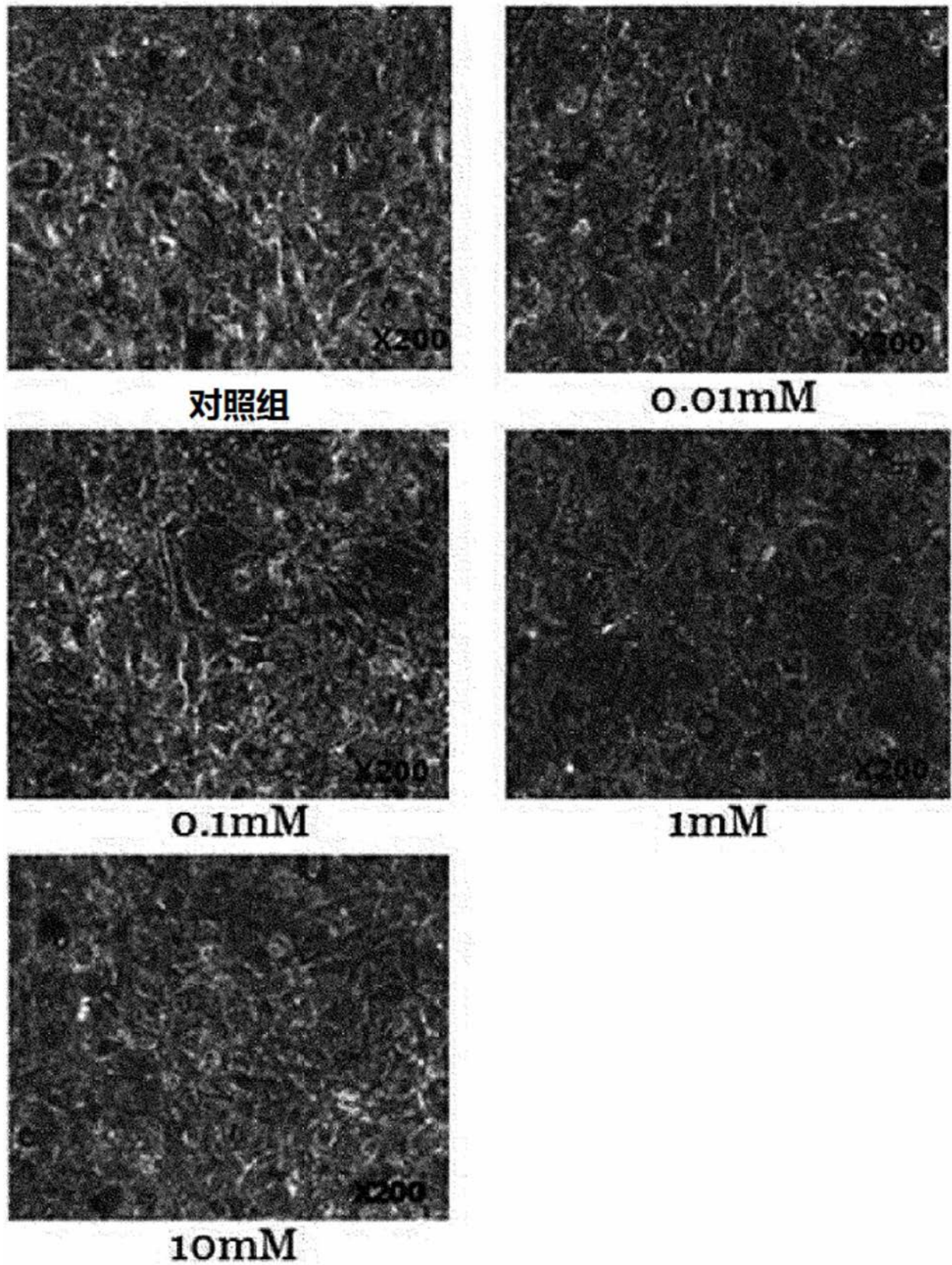


图23b

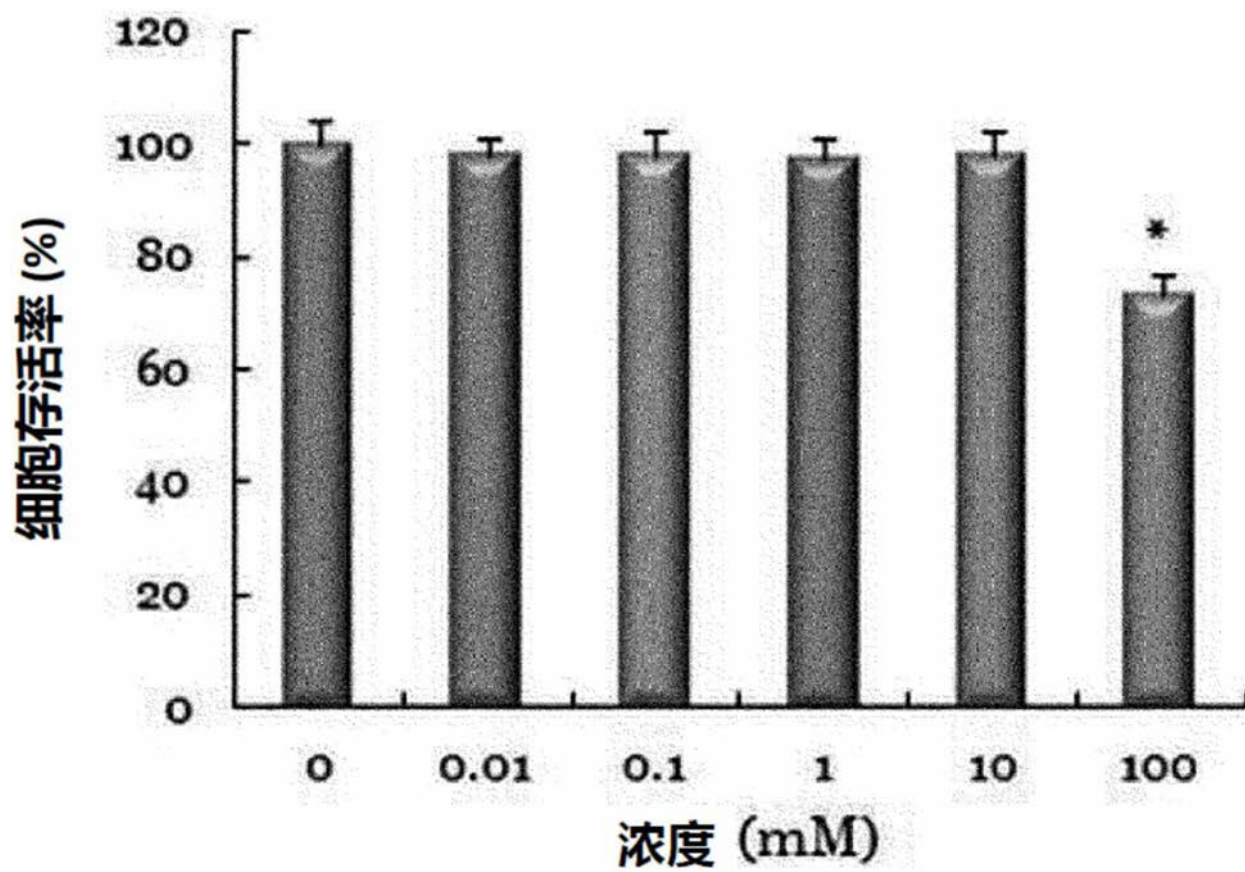


图24

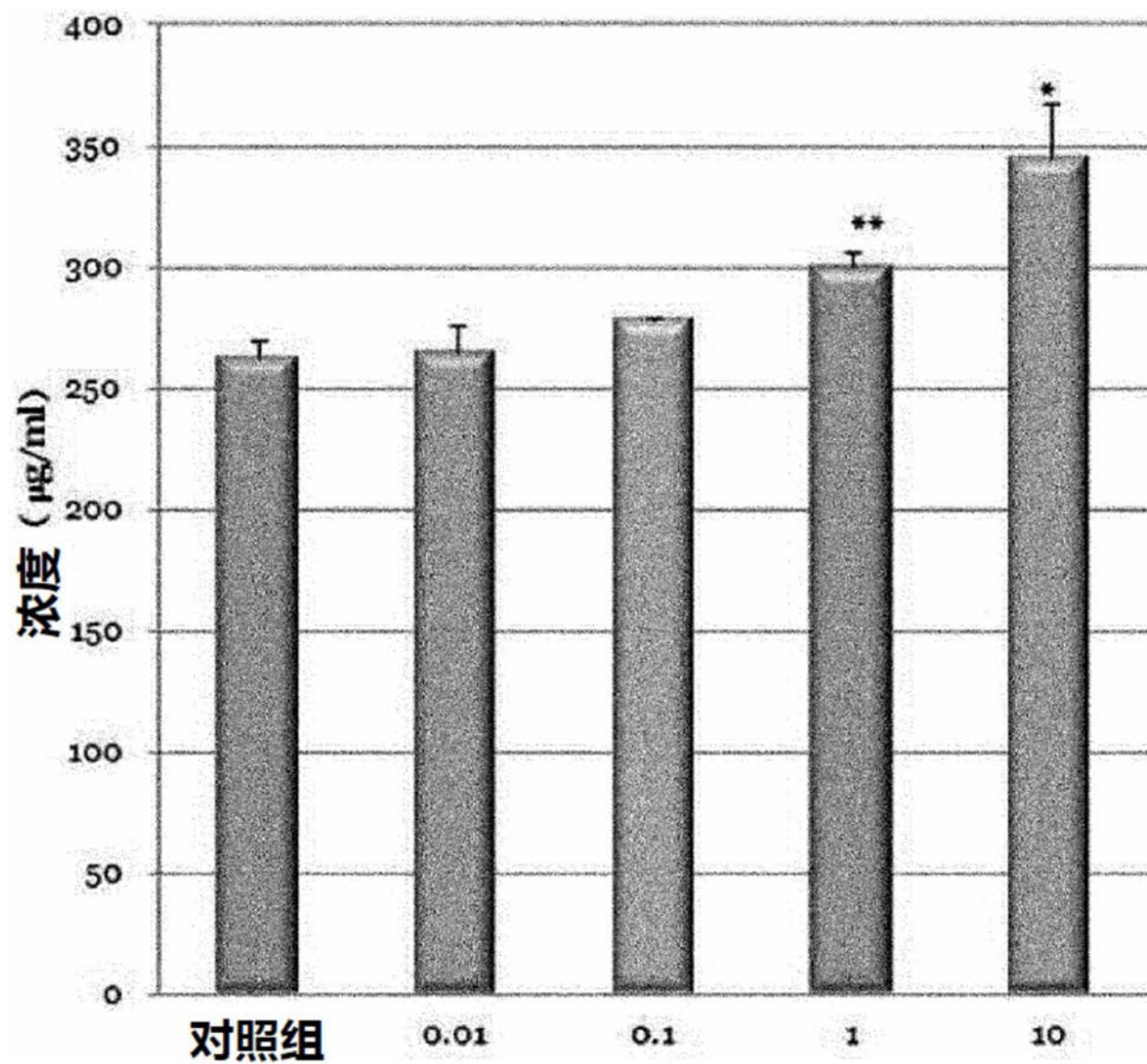


图25

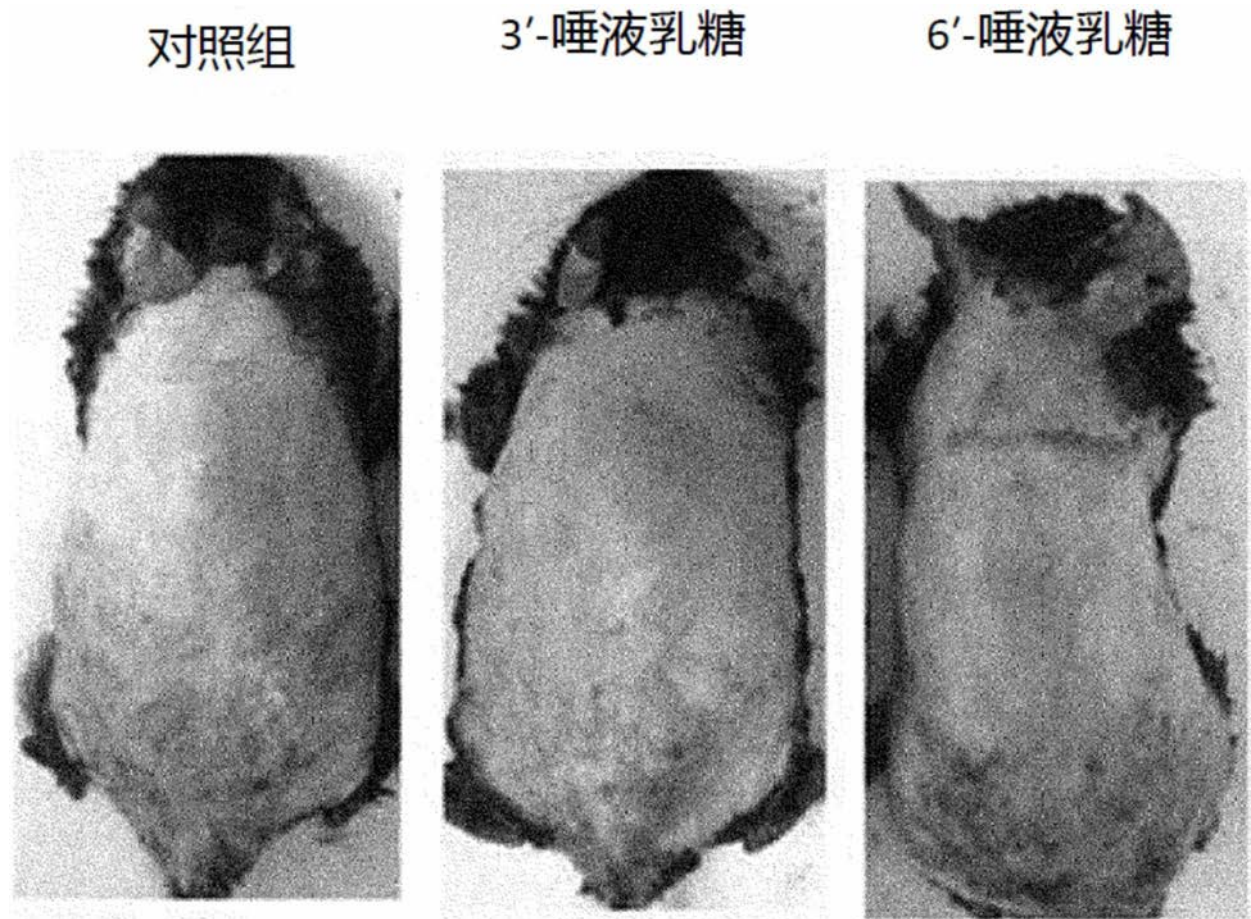


图26a

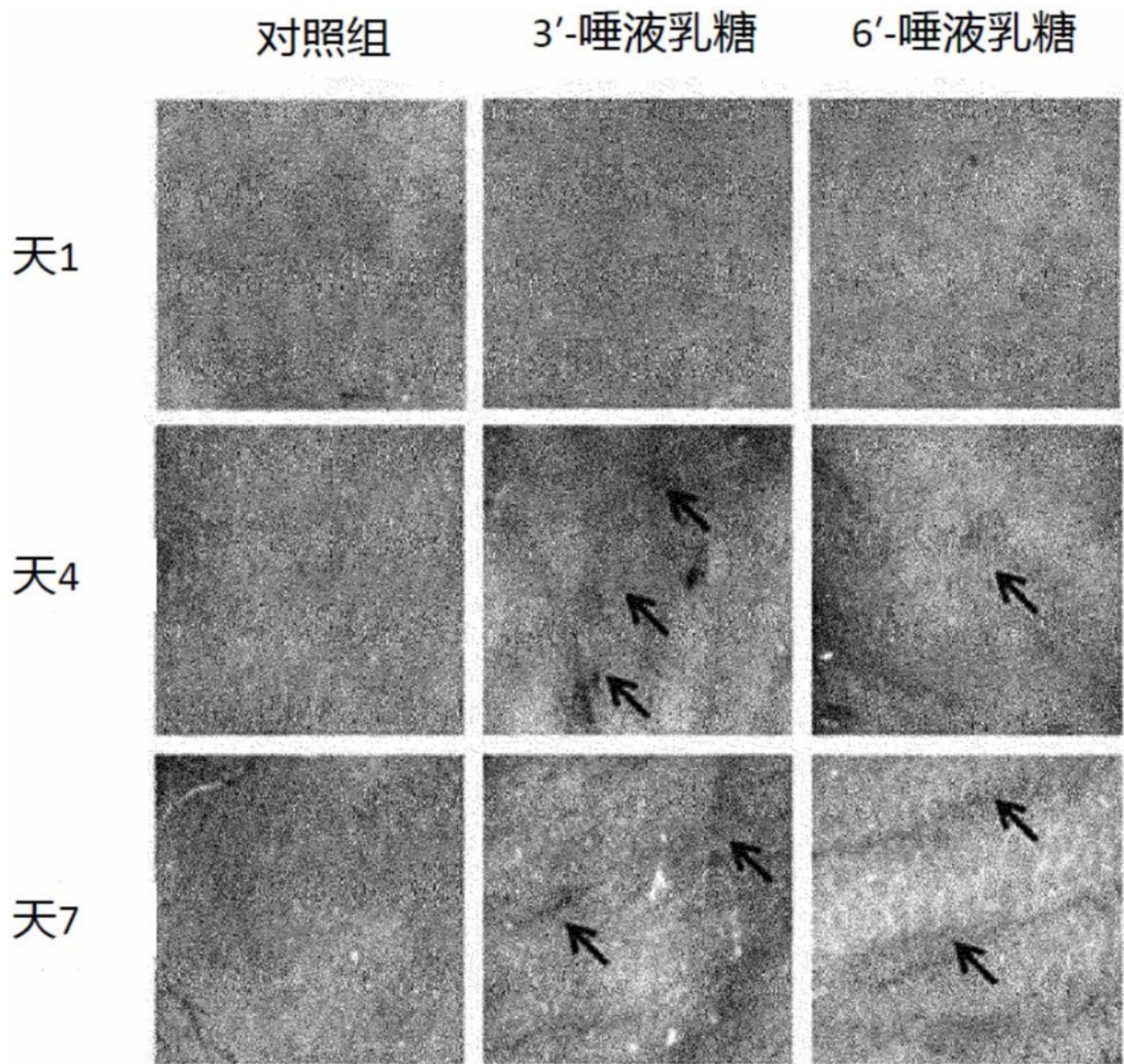


图26b