(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0086510
(43) 공개일자 2024년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/145 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 9/51 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/145 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0030332
(22) 출원일자 2023년03월08일
심사청구일자 2023년03월08일
(30) 우선권주장
1020220171770 2022년12월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김도경
서울특별시 성북구 화랑로 214, 106동 802호
김재훈
서울특별시 성북구 화랑로14길 88, 201호
엄혜지
경기도 남양주시 별내3로 23, 4410동 601호
(74) 대리인
위병갑

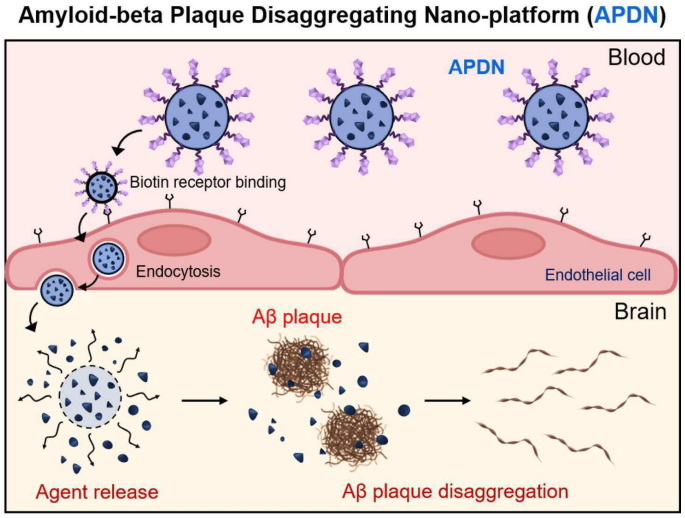
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **신규 아밀로이드-베타 응집체 분해제와 이를 이용한 뇌 표적화 약물 전달 시스템**

(57) 요 약

본 발명은 아밀로이드-베타 응집체를 분해할 수 있는 새로운 분자 및 이 분자를 탑재한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노 플랫폼에 관한 것으로, 본 발명에 따라 제조된 아밀로이드-베타 응집체 분해제는 높은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 보이며, 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노 플랫폼은 효과적으로 뇌를 표적화 및 뇌에 존재하는 아밀로이드-베타 응집체를 분해하는 효과를 가지므로, 아밀로이드-베타 응집체 관련 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도14



(52) CPC특허분류
A61K 9/5146 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465036238
과제번호 HI21C023902
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 질병중심중개연구사업
연구과제명 신경교종 특이적 대사체의 실시간 시각화 형광 탐침자 개발
기 여 율 40/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345352778
과제번호 NRF-2018-R1A6A1A03025124
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중점연구소 지원사업
연구과제명 활성산소 조절을 통한 만성질병 예방 치료에 관한 연구
기 여 율 20/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711171698
과제번호 NRF-2022-R1F1A1069954
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구 지원사업
연구과제명 단일-벤젠 기반 형광체 라이브러리 구축 및 이의 광물리적/생물학적 특성 규명
기 여 율 40/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2022.06.01 ~ 2023.02.28

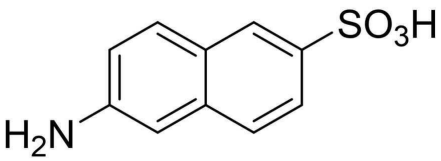
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환은 알츠하이머병, 다운증후군, 인지장애, 기억력 감퇴, 신경아밀로이드증, 아밀로이드맥관병증, 전신성 아밀로이드증, 더취(Dutch)형 아밀로이드증 또는 봉입체 구염으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 다공성 나노입자에 로딩된(loaded) 형태로 포함되는 것인, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 다공성 나노입자의 기공에 로딩되는 것인, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 다공성 나노입자는 염화칼슘(calcium chloride)으로 실링(sealing) 및 비오틴-폴리에틸렌글라이세롤(biotin-PEG)로 표면 개질된 다공성 실리콘 나노입자인 것인, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 뇌 표적화가 가능한 것인, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 가지는 것인, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

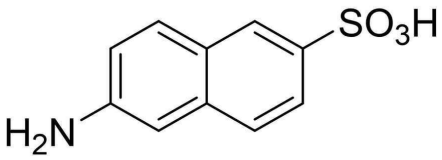
제1항에 있어서,

상기 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 생체 내에서 용혈 반응을 나타내지 않으며 낮은 독성 반응을 나타내는 것인, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물:

[화학식 1]



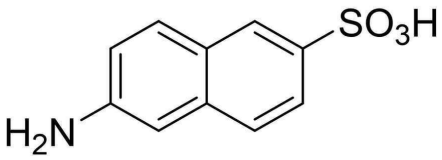
.

청구항 10

다공성 나노입자; 및

상기 다공성 나노입자의 기공에 로딩된(loaded) 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염;을 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자:

[화학식 1]



.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자는 뇌 표적화 약물 전달체인 것인, 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 다공성 나노입자는 표면이 염화칼슘(calcium chloride)으로 실링(sealing)되고, 비오틴-폴리에틸렌글라이세롤(biotin-PEG)로 기능화된 다공성 실리콘 나노입자인 것인, 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자.

청구항 13

다공성 실리콘 나노입자를 준비하는 단계;

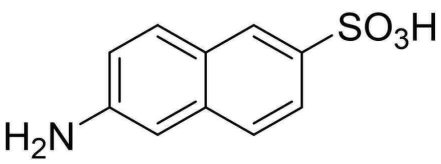
상기 다공성 실리콘 나노입자에 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 로딩하는 단계;

상기 로딩된 다공성 실리콘 나노입자의 표면을 염화칼슘(calcium chloride)으로 실링(sealing)하는 단계; 및

상기 코팅된 다공성 실리콘 나노입자를 비오틴-폴리에틸렌글라이세롤(biotin-PEG)로 표면 개질시키는 단계;를

포함하는, 제10항의 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자의 제조방법:

[화학식 1]



.

청구항 14

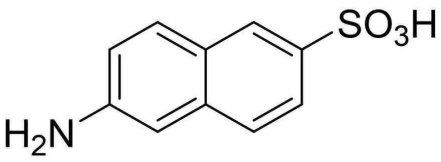
제13항에 있어서,

상기 염화칼슘으로 실링하는 단계는 다공성 실리콘 나노입자를 칼슘 또는 마그네슘과 반응시켜 이루어지는 것인, 제조방법.

청구항 15

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체를 분해하는 방법:

[화학식 1]



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 갖는 6-아미노-2나프탈렌설폰산(6-amino-2-naphthalenesulfonic acid; ANA) 및 이를 포함하는 뇌 표적화 다공성 실리콘 나노입자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계적으로 고령화 사회가 심화됨에 따라 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병률도 증가하고 있다. 그 중에서도 알츠하이머병은 매년 유병률이 빠르게 증가하고 있으며, 전체 치매의 50-60%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 1906년 알츠하이머병이 처음 보고된 이후 병인, 병변, 증상 및 치료 연구 분야에서 수많은 연구가 진행되었음에도 불구하고 정확한 원인과 치료법은 아직 명확하게 규명되지 않았다.

[0003] 알츠하이머의 원인으로 추정되는 가설들 중 아밀로이드 가설은 현재 알츠하이머병의 원인에 가장 근접해있다. 뇌를 포함한 모든 신체 부위에 존재할 수 있는 아밀로이드-베타 단량체는 알츠하이머병 환자의 뇌에 심각한 독성을 일으키는 아밀로이드-베타 응집체를 형성할 수 있다. 현재 아밀로이드 가설에 기초한 BACE1(β-secretase enzyme) 억제제 및 항아밀로이드-베타 항체 등 여러 치료 방법이 개발되고 있지만, 뇌에서의 아밀로이드-베타 응집체를 직접적으로 분해 및 제거하는 치료 방법을 개발하는 것이 무엇보다도 우선시되어야 할 문제이다.

[0004] 본 발명자들은 설폰산 기반의 20가지 물질들로 화학 라이브러리(Chemical library)를 구축하였으며, 이들 화합물 중에서 6-아미노-2나프탈렌설폰산(6-amino-2-naphthalenesulfonic acid; ANA) 및 이를 이용하여 제조된 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼(Amyloid-beta plaque disaggregation nano platform; APDN) 각각의 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 입증하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2021-0095413호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 새로운 아밀로이드-베타 응집체 분해제를 제공하는 것이다.

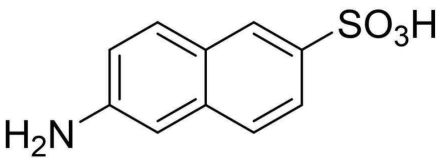
[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 아밀로이드-베타 응집체 분해제를 포함하는 뇌 표적화 약물 전달을 위한 나노입자를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0009] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0010] [화학식 1]

[0011] 

.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염은 나노 운반체에 탑재될 수 있으며, 바람직하게는, 뇌 표적화 가능한 다공성 나노입자에 로딩된(loaded) 나노 플랫폼(nano-platform)으로 개발될 수 있다.

[0014] 나아가, 본 발명은 다공성 나노입자; 및 상기 다공성 나노입자의 기공에 로딩된(loaded) 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염;을 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자를 제공한다.

[0015] 일 구현예에 있어서, 상기 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자는 다공성 실리콘 나노입자를 준비하는 단계; 상기 다공성 실리콘 나노입자에 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 로딩하는 단계; 상기 로딩된 다공성 실리콘 나노입자의 표면을 염화칼슘(calcium chloride)으로 실링(sealing)하는 단계; 및 상기 코팅된 다공성 실리콘 나노입자를 비오틴-폴리에틸렌글라이세롤(biotin-PEG)로 표면 개질시키는 단계;를 포함하는, 제조방법으로 제조되는 것일 수 있다.

[0016] 더 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체를 분해하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 화합물인 6-아미노-2나프탈렌설폰산(6-amino-2-naphthalenesulfonic acid; ANA)은 시험관 내 뿐만 아니라 생체 내에서 높은 효능으로 아밀로이드-베타 응집체를 분해할 수 있고, 이를 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼은 뇌에 직접적으로 약물을 전달할 수 있으며, 뇌에서의 아밀로이드-베타 응집체를 분해하여 실질적인 알츠하이머병의 병원을 제거할 수 있다는 장점을 가진다.

[0018] 또한 앞서 언급된 아밀로이드-베타 응집체 분해능은 낮은 농도에서도 높은 효능을 보이며, 낮은 독성과 함께 높은 효율을 보인다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 (a) 아밀로이드-베타 응집체 분해제(Aβ Plaque Disaggregating Agent) 후보 물질로서의 설폰산계 화합물 라이브러리(library); 및 (b) 각 화합물에 대하여 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 티오플라빈 티(Thioflavin T)를 이용하여 비교한 결과를 나타낸 그래프이다(평균±SEM, n=3).

도 2는 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)의 (a) 농도 변화 및 (b) pH 변화에 따른 아밀로이드-베타 응집체 분해능을 티오플라빈 티(Thioflavin T)를 이용하여 확인한 결과를 나타낸 그래프이다(평균±SEM, n=3).

도 3은 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)의 처리 유무에 따른 아밀로이드-베타 응집체에 대한 분해능을 (a) 투과 전자 현미경 및 (b) 공초점 현미경 이미지로 확인한 결과이다(축척 막대: 200nm; 여기 및 방출 채널: 520 nm, 548-617 nm).

도 4는 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)를 이용하여 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼(Amyloid-beta plaque disaggregation nano platform; APDN)으로서, Biotin-$CaCl_2$-ANA-pSiNPs(BCAP)의 제조 과정을 나타낸 모식도이다; pSiNPs: 다공성 실리콘 나노입자(porous silicon nanoparticles), CAP: ANA 로드 및 염화칼슘(calcium chloride)으로 실링(sealing)된 pSiNPs($CaCl_2$-ANA-pSiNPs), BCAP: 비오틴으로 기능화된 CAP(Biotin-$CaCl_2$-ANA-pSiNPs).

도 5는 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)를 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼의 제조 단계(ANA-pSiNP: $CaCl_2$ 실링 전의 ANA 로딩만 이루어진 pSiNP, CAP: $CaCl_2$-ANA-pSiNPs, BCAP: Biotin-$CaCl_2$-ANA-pSiNPs)에 따른 화학적 특성 변화를 (a) 평균 유체역학적 직경, (b) 제타 전위(다분산 지수: <0.3), (c) ATR-FTIR 분광 스펙트럼(ν = 스트레칭) 및 (d) 투과 전자 현미경 이미지(축척 막대: 100nm)를 통해 확인한 결과이다(평균±SEM, n=4).

도 6은 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)을 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼인 BCAP로부터 녹아져 나온 화합물 P(ANA)의 농도를 확인한 결과를 나타낸 (a) 420 nm에서의 ANA의 방출 강도 플롯(여기 파장: 338 nm) 및 이를 이용한 아밀로이드-베타 응집체 분해능을 아밀로이드-베타 응집체 탐침자인 티오플라빈 티(Thioflavin T)를 이용하여 나타낸 (b) 배양 시간에 따른 ThT 방출 스펙트럼이다(여기파장: 413 nm).

도 7은 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)을 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼의 생체 내에서의 독성 반응을 용혈 분석으로 확인한 결과이다(평균±SEM, n=3, ****<0.0001(Triton X-100 그룹 대비)).

도 8은 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)을 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼의 생체 내에서의 체내 분포 비율을 화합물 P(ANA)의 형광을 추적하여 확인한 결과를 나타낸 (a) FTIS 이미지(채널: 390-490nm 여기, 500-550nm 검출 채널) 및 (b) FTIS 이미지에서 각 장기의 복사 효율 플롯을 나타낸 그래프이다(평균±SEM, n=4, **<0.01(PBS 그룹 대비), ##<0.01(ANA 그룹 대비)).

도 9는 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)을 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼의 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 확인하기 위한 알츠하이머병(AD) 마우스 모델 제작 및 이를 이용한 동물 실험을 나타낸 개략도이다.

도 10은 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)과 이를 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼의 기억력 개선 효능을 확인한 Y-미로 동물 행동(자발적 교대) 실험 결과를 나타낸 그래프이다(평균±SEM, n=8, **<0.01(sharm 그룹 대비), #<0.05(PBS 그룹 대비)).

도 11은 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)과 이를 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼의 기억력 개선 효능을 확인한 수동 회피(PAT) 동물 행동 실험 결과를 나타낸 그래프이다(평균±SEM, n=8, ****<0.0001(sharm 그룹 대비), ###<0.001(PBS 그룹 대비)).

도 12는 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)과 이를 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼의 면역 인자에 대한 반응을 확인한 결과로, 인터루킨 6(IL-6)의 ELISA 분석 결과를 나타낸 그래프이다(평균±SEM, n=4, *<0.05(sharm 그룹 대비), #<0.05(PBS 그룹 대비)).

도 13은 본 발명에 따른 화합물 P(ANA)과 이를 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼의 실제 뇌의 해마지역에서의 아밀로이드-베타 응집체 분해능을 확인한 결과를 나타낸 ThS로 염색된 해마 절편의

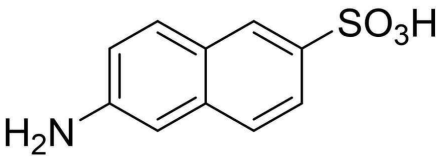
형광 이미지이다(빨간색 화살표: 아밀로이드-베타 응집체의 위치).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다:

화학식 1

[0022] 

[0023] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0024] 본 발명의 상기 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 질환은 알츠하이머병, 다운증후군, 인지장애, 기억력 감퇴, 신경 아밀로이드증, 아밀로이드맥관병증, 전신성 아밀로이드증, 더취(Dutch)형 아밀로이드증 또는 봉입체 구염으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유발되는 알츠하이머병, 인지장애 또는 기억력 감퇴로 이루어진 그룹에서 선택되는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 6-아미노-2나프탈렌설폰산 (6-amino-2-naphthalenesulfonic acid; ANA)으로 명명되는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 아밀로이드-베타 응집체를 농도 의존적으로 분해하는 효능을 나타내는 것일 수 있다. 상기 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능은 아밀로이드-베타 응집체를 특이적으로 분해하는 것으로써 물질의 체내 투여시 신체 모든 곳에서 나타날 수 있으며, 상기 특성은 나머지 부분보다 뇌에서 유의적으로 높은 효능이 발현될 수 있다.

[0027] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 뇌 표적화가 가능한 것일 수 있다. 본 발명에서 뇌 표적화란 뇌 부분에 특이적으로 물질을 전달하는 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 pH 3 내지 9의 조건에서 높은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 나타내는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 pH 7.4에서 가장 높은 효능을 보이는 것일 수 있다.

[0029] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 생체 내에서 용혈 반응을 나타내지 않으며 낮은 독성 반응을 나타내는 것일 수 있다.

[0030] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 시험관 내 뿐만 아니라 생체 내의 조건에서도 높은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 나타내는 것일 수 있다.

[0031] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 아밀로이드-베타 응집체에 결합하는 것일 수 있고, 이를 통해 아밀로이드-베타 응집체의 분해에 관여하는 것일 수 있다.

[0032] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 아밀로이드-베타 응집체의 분해제로 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명자들은 이전 연구에서 설폰산(Sulfonic acid)이 아밀로이드-베타 응집체에 관여할 수 있다는 결과를 바탕으로 설폰산 기반의 20가지 물질들로 화학 라이브러리(Chemical library)를 구축하였고, 라이브러리 기반 스크리닝을 통하여 6-아미노-2나프탈렌설폰산(ANA)을 최적의 아밀로이드-베타 응집체 분해제로 선정하였다. ANA는

시험관 내에서 낮은 농도에서도 높은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 보였다(실시예 1 참조).

[0034] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 뇌 표적화 물질을 접합한 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼(Amyloid beta plaque disaggregation nano-platform; APDN)으로 개발될 수 있다. 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼에는 어떤 종류의 나노 운반체도 사용될 수 있으며, 유효성분인 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 외에 다른 약물 등의 물질을 추가로 더 포함할 수 있다.

[0035] 바람직하게는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 다공성 나노입자에 로딩된(loaded) 형태로 포함되는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 다공성 나노입자의 기공에 로딩되는 것일 수 있다. 상기 다공성 나노입자는 염화칼슘(calcium chloride)으로 실링(sealing) 및 비오틴-폴리에틸렌글라이세롤(biotin-PEG)로 표면 개질된 다공성 실리콘 나노입자인 것일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 "로딩된(loaded)"이라는 표현은, 약물이 약물 전달체(나노입자 등)에 탑재, 봉입, 담지되는 것을 의미할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 "실링(sealing)"이라는 표현은, 코팅(coating)된 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0038] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 상기 나노입자는 아밀로이드-베타 응집체의 분해제로 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 상기 나노입자는 생체 내의 조건에서 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유도된 기억력 감퇴 및 면역수치 증가를 개선시키는 효능을 나타내는 것일 수 있다.

[0040] 본 발명의 실시예에서는 화학식 1로 표시되는 화합물(ANA)을 나노 운반체 중 하나인 다공성 실리콘 나노입자(porous silicon nanoparticlep, SiNPs)에 로딩(loading)하고 염화칼슘($CaCl_2$)으로 코팅(coating)한 뒤 비오틴-폴리에틸렌글라이세롤(biotin-PEG)로 표면 개질화를 진행해 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼을 개발하였으며 이를 BCAP(Biotin-$CaCl_2$-ANA-pSiNPs)이라고 명명하였다(실시예 4 참조). 또한, 본 발명의 BCAP은 뇌에 특이적으로 표적화 할 수 있는 특성을 보였으며, 따라서 아밀로이드-베타 응집체에 의해 유도되는 기억력 감퇴, 면역인자 상승 등에 대하여 ANA보다 더 효율적으로 개선시키는 효능을 나타낼 수 있음을 확인하였다(실시예 5 내지 9 참조).

[0041] 본 발명의 상기 조성물은 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산 또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 상기 용매는 물, THF, 메탄올, 에탄올, HI 수용액, N,N-디메틸포름아미드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또는 상기 조성물은 다른 약물 및 화학 분자와의 조합을 포함할 수 있다. 해당 약물은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 가지는 약물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 약물 및 화학 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

[0042] 일 측면에서, 본 발명은 다공성 나노입자; 및 상기 다공성 나노입자의 기공에 로딩된(loaded) 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염;을 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자를 제공한다.

[0043] 상기 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자는 뇌 표적화 약물 전달체인 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 상기 다공성 나노입자는 표면이 염화칼슘(calcium chloride)으로 실링(sealing)되고, 비오틴-폴리에틸렌글라이세롤(biotin-PEG)로 기능화된 다공성 실리콘 나노입자인 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 실시예에서는 화학식 1로 표시되는 화합물(ANA)를 탑재한 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼인 BCAP가 뇌에 특이적으로 표적화가 가능하며, 시험관 내 뿐만 아니라 아밀로이드-베타 응집체로 유도한 동물모델에서도 높은 생체 안정성과 함께 높은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 나타냄을 입증하였다.

[0046] 다른 측면에서, 본 발명은 다공성 실리콘 나노입자를 준비하는 단계; 상기 다공성 실리콘 나노입자에 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 로딩하는 단계; 상기 로딩된 다공성 실리콘 나노입자의 표면을 염화칼슘(calcium chloride)으로 실링(sealing)하는 단계; 및 상기 코팅된 다공성 실리콘 나노입자를 비오틴-폴리에틸렌글라이세롤(biotin-PEG)로 표면 개질시키는 단계;를 포

함하는, 상기 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0047] 상기 염화칼슘으로 실링하는 단계는 다공성 실리콘 나노입자를 염화칼슘이 아닌 칼슘 또는 마그네슘과 반응시켜 이루어지는 것일 수 있다.

[0048] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 아밀로이드-베타 응집체를 분해하는 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명에 따른 아밀로이드-베타 응집체를 분해하는 방법에 있어서 이는 시험관 내에서 행해지는 방법과 세포 및 생체 내에서 행해지는 방법 모두를 포함하며, 특정 부분에 있어서 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

[0050] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을을 약학적으로 유효한 양으로 도입하는 것을 의미한다.

[0051] 본 발명의 용어, "개체"는 상기 아밀로이드-베타 응집체가 생성되었거나 생성될 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 예방 또는 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0053] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 전술한 아밀로이드-베타 응집체 분해용 나노입자의 형태로 투여되는 것일 수 있다.

[0054] 본 발명의 일구현예에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여할 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 또한, 단일 또는 다중 투여할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0055] 또한, 상기 투여의 방법으로는 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적인 예로, 상기 투여는 일반적으로 1일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으나, 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0056] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0057] **준비예 1. 아밀로이드-베타 응집체의 준비**

[0058] 아밀로이드-베타 응집체(plaques)를 준비하기 위하여, 아밀로이드-베타(Aβ) 1-42(Anaspec, AS-20276, MW = 4514.1, 1mg)를 1× PBS 완충액(pH 7.4, 1mL)에 최종 농도 222μM로 용해하였다. 이 용액을 37℃에서 3일 동안 배양(200rpm)하였고, 형성된 아밀로이드-베타 응집체(Aβ 플라크)를 추가 정제 없이 하기 체외(in vitro) 실험에 사용하였다.

[0059] **준비예 2. 동물 모델 준비**

[0060] 6주령 수컷 balb/c 마우스는 (주)디비엘(대한민국 인천)에서 구입하였다. 각 케이지에는 일정한 온도(23±1℃) 및 상대 습도(60±10%)에서 12시간 명/암 주기(07:30-19:30에 조명 켜짐)의 동물실에서 5마리의 마우스(27×22×14cm)가 수용되었고, 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있도록 하였다. 마우스는 실험 전 일주일 동안 동물실에 머물렀다. 경희대학교의 동물 관리 및 사용 지침에 따라 동물 치료 및 유지 관리를 수행하였다. 모든 실험 프로토콜은 경희대학교 동물실험실 관리위원회의 승인(승인번호: KHSASP-22-024)을 받아 진행하였다.

[0061] **참고예 1. 통계처리**

[0062] 본 발명의 실시예의 데이터들은 평균±평균의 표준 오차(S.E.M)로 표시하였다. ThS 강도는 짝이 없는 t-테스트

로 분석되었다. IVIS 데이터, 용혈 테스트, Y-maze 테스트, PAT 및 ELISA 분석 결과는 투키(Tukey's) 다중 비교 테스트와 일원 분산 분석(ANOVA)으로 분석되었다. 모든 통계 결과는 Prism 8.0 소프트웨어(GraphPad, La Jolla, CA, USA)로 분석하였다.

[0063] **실시예 1. 아밀로이드-베타 응집체 분해제 후보물질들의 스크리닝을 통한 히트 화합물의 효과 확인**

[0064] 효과적으로 아밀로이드-베타 응집체 분해를 유도할 수 있는 화합물을 발견하기 위해, 다양한 설폰산(sulfonic acid) 화합물을 후보 물질로하여 아밀로이드-베타 응집체 분해제 라이브러리(Aβ Plaque Disaggregating Agent library)를 형성 후 스크리닝(screening)을 진행하였다. 라이브러리는 A부터 T까지 하기 표 1의 20가지 화합물을 포함하며, 도 1a에 상기 라이브러리에 포함되는 아밀로이드-베타 응집체 분해제 후보 물질들 각각의 구조를 나타내었다.

표 1

[0065]

분류	화합물	화합물명	분류	화합물	화합물명
지방족 (aliphatic) 설폰산 유사체	A	4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진프로판설폰산 (EPPS)	벤젠 (benzene) 설폰산 유사체	K	설파닐산
	B	2-[4-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설폰산 (HEPES)		L	3-아미노-4-하이드록시벤젠설폰산
	C	설팜산	나프탈렌 (naphthalene) 설폰산 유사체	M	나프탈렌
	D	아미노메탄설폰산		N	2-나프탈렌설폰산
	E	2-아미노에탄설폰산		O	2-나프톨-6-설폰산
	F	2-아미노에탄설폰산		P	6-아미노-2-나프탈렌설폰산 (ANA)
	G	설폰산		Q	4-아미노-1-나프탈렌설폰산
	H	3-히드록시프로판설폰산		R	5-아미노-1-나프탈렌설폰산
벤젠 (benzene) 설폰산 유사체	I	벤젠설폰산		S	6-아미노-4-히드록시-2-나프탈렌설폰산
	J	4-하이드록시벤젠설폰산		T	6-아미노-1-나프톨-3-설폰산

[0066] 상기 형성된 라이브러리에서 아밀로이드-베타 응집체의 탐침자인 티오플라빈 티(thioflavin T, ThT)를 이용한 형광 분석법을 통해 히트 화합물(hit compound)을 확인하였다. 구체적으로, 각각의 아밀로이드-베타 응집체 분해 후보 물질(100 μM) 을 아밀로이드-베타 응집체(10 μM) 및 ThT(10 μM)와 섞어주고, 37℃에서 24시간 동안 배양한 뒤 482nm에서의 ThT의 형광 세기 변화를 확인하였다(여기 파장: 413 nm). ThT의 흡수 및 방출 스펙트럼은 UV/vis 흡수 분광법(Agilent, California, USA) 및 spectrofluorophotometer(Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 사용하여 얻었다.

[0067] 아밀로이드-베타 응집체 분해제 후보물질들의 아밀로이드-베타 응집체 분해 정도를 티오플라빈 티를 이용하여 형광 분석한 결과를 도 1b에 그래프로 나타내었다. 화합물 P에 해당하는 6-아미노-2나프탈렌설폰산(6-amino-2-naphthalenesulfonic acid, ANA)이 대조군과 비교하였을 시 23%의 가장 큰 형광 강도 변화를 보였다. 따라서, A-T 후보물질 중에서 화합물 P에 해당하는 물질인 ANA가 가장 높은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 보여, 히트 화합물임을 확인하였다.

[0068] **실시예 2. 화합물 P(ANA)의 여러 조건하에서의 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능 확인**

[0069] 상기 실시예 1에서 확인된 히트 화합물인 화합물 P(ANA)에 대하여, 다양한 농도 조건 및 pH 조건에서의 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 ThT 분석법을 통해 확인하였고, ThT(10 μM)의 482nm에서의 방출 강도 플롯을 도 2에 나타내었다(여기 파장: 413 nm).

[0070] 도 2a는 다양한 농도(10-100 μM)의 ANA와 아밀로이드-베타 응집체(10 μM)의 반응 후 ThT의 형광 강도 변화를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. ANA는 10 μM 부터 100 μM 전체 농도에서 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 농도 의존적으로 보여주었으며, 낮은 농도인 10 μM에서도 유의적으로 높은 아밀로이드 베타 응집체 분해 효능이 확인되었다.

[0071] 도 2b는 다양한 pH 조건하에서 ANA의 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 확인하기 위해 ThT를 이용하여 형광 변화를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. ANA는 모든 pH 조건인 pH 3, 5, 7, 7.4, 9에서 아밀로이드-베타 응집

체 분해 효능을 보였고, 특히 뇌의 pH 조건인 pH7.4 조건에서 가장 높은 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능이 확인되었다.

[0072] **실시예 3. 화합물 P(ANA)의 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능의 시각적 확인**

[0073] ANA가 아밀로이드-베타 응집체를 분해할 수 있다는 것을 시험관 내에서 확인한 뒤, 이를 시각적으로 직접 확인하기 위해 투과 전자 현미경(TEM)과 공초점 현미경을 이용하여 시각 이미지를 확인하였다.

[0074] TEM 분석을 위하여, 실온에서 구리 그리드에 아밀로이드-베타 응집체(20 μM), 또는 아밀로이드-베타 응집체(20 μM) 및 화합물 P(ANA, 100 μM)를 처리하였다. 샘플(Aβ plaques 또는 Aβ plaques+ANA)이 처리된 각 그리드를 DI H_2O로 세 번 세척한 후, 우라닐 아세테이트(1% w/v DI H_2O, 5 μL)로 1분 동안 염색하였다. 우라닐 아세테이트를 제거하고 그리드를 실온에서 20분 동안 건조시킨 다음, 아밀로이드-베타 응집체의 형태를 투과 전자 현미경(TEM, Tecnai, G2 F30ST, FEI Company, OR, USA) 영상으로 분석하였다.

[0075] 도 3a는 ANA 처리 전 후의 아밀로이드-베타 응집체의 투과 전자 현미경 이미지로, 응집체를 이루고 있던 아밀로이드-베타 응집체는 ANA (100 μM) 처리 후 분해되어 단량체로 풀어진 모습이 확인되었다.

[0076] 또한, 아밀로이드-베타 응집체(Aβ plaques)의 존재 및 ANA와 24시간 동안 배양에 따른 아밀로이드-베타 응집체 분해 형태 변화를 평가하기 위하여, 아밀로이드-베타 응집체의 탐침자인 티오플라빈 S(ThS)를 추가로 처리하여 공초점 현미경을 이용한 형광 분석에 의해 변화를 확인하였다. 상기 샘플(Aβ plaques, Aβ plaques+ANA)을 ThS(0.5%) 용액 1mL에 첨가한 뒤, 각 혼합물을 슬라이드 유리에 피펫팅하고 실온에서 밤새 건조시켰다. 그 다음, 레이저 스캐닝 공초점 현미경(CLSM, LSM800, Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 형광 이미지를 얻었다. 공초점 이미지는 검출기(GaAsP, 검출기 게인: 680V, 검출기 파장: 548-617nm)를 사용하여 520nm(레이저 출력: 3.00%)에서 여기 하에서 얻었다.

[0077] 도 3b는 ANA 처리 전 후의 아밀로이드-베타 응집체의 공초점 현미경 이미지로, 아밀로이드-베타 응집체만 있을 때에 증가된 ThS의 형광 세기가 ANA를 처리한 후 현저하게 감소되었으며 이러한 결과들을 통해 ANA가 아밀로이드-베타 응집체를 분해할 수 있다는 것을 시각적으로 확인하였다.

[0078] **실시예 4. 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼(APDN)으로써의 BCAP 제조 과정**

[0079] 알츠하이머병의 병원성 물질로 예상되고 있는 아밀로이드-베타 응집체는 우리 몸 전체에 고루 분포되어 있지만, 실질적으로 뇌에 존재하는 아밀로이드-베타 응집체만이 뇌에 독성을 유발하여 알츠하이머병을 유발할 수 있다. 따라서 알츠하이머병을 치료하기 위한 아밀로이드-베타 응집체 분해제는 반드시 뇌에서 아밀로이드-베타 응집체를 분해할 필요가 있다.

[0080] 이를 위해, 본 발명자들은 상기 화합물 P(ANA)를 뇌로 전달시킬 수 있는 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼(Amyloid-beta plaque disaggregation nano platform; APDN)을 개발하였다. APDN은 아밀로이드-베타 응집체 분해제와 이 분해제를 전달할 수 있는 나노 운반체, 뇌 표적화 분자로 이루어지도록 설계하였다.

[0081] 본 발명자들은 도 4에 나타난 바와 같이, ANA를 아밀로이드-베타 응집체 분해제로 하여, 염화칼슘($CaCl_2$) 존재하에 상기 ANA를 나노 운반체인 다공성 실리콘 나노입자(porous silicon nanoparticles; pSiNPs)에 로딩(loading)한 뒤, 염화칼슘($CaCl_2$)을 이용하여 코팅(coating)하고, 비오틴-폴리에틸렌글라이세롤(biotin-PEG)로 표면 개질화를 진행하여, 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼을 개발하였으며, 이를 Biotin-$CaCl_2$-ANA-pSiNPs(BCAP)이라고 명명하였다. BCAP의 구체적인 제조방법은 다음과 같다.

[0082] 4-1. 다공성 실리콘 나노입자(pSiNPs)의 제조

[0083] 나노 운반체로서 적용된 다공성 실리콘 나노입자(pSiNPs)는 pSiNP는 p^{++}형 단결정 실리콘 웨이퍼(붕소가 많이 도핑된)의 전기화학적 에칭에 의해 제조되었다. 구체적으로, (i) 실리콘 웨이퍼(silicon wafer)를 전해질(48% 수성 HF/무수 에탄올(absolute EtOH), 3:1, v:v)에서 전기화학적으로 에칭하였다. (ii) 상기 실리콘 웨이퍼를 3:1(v:v) 48% 수성 HF/에탄올 전해질로 다공성 희생층에서 전기화학적으로 에칭하여 다공성 실리콘(porous silicon; pSi) 층을 준비하였다. (iii) 생성된 pSi 층을 2M 수산화칼륨 용액(KOH)을 사용하여 제거하였다. 이때, 1.8초 동안 46mA cm^{-2} 이하의 전류 밀도 펄스 및 0.4초 동안 334mA cm^{-2}이상의 전류 밀도 펄스를 300 주기 동안 반복하는 천공 에칭 파형을 적용하였다. 그 다음, 다공성 Si 필름을 에탄올 중 7.5% HF 수용액에서 300초 동안 3mA cm^{-2}의 전류 밀도 펄스를 적용하여 실리콘 웨이퍼에서 분리하였다. (iv) 프리스탠딩(freestanding)

pSi 필름을 탈이온수(DI H_2O, 6 mL)가 들어 있는 밀봉된 유리 바이알(22.18 mL 크기, VWR, 제품 번호 66011-143, Radnor, PA, USA)에 넣고 24시간 동안 초음파 수조(VWR, Model No. VWRA142-0307, Radnor, PA, USA)에서 나노입자로 파쇄하였다. (v) 초음파 처리로 수득된 나노입자를 DI H_2O(12mL)에서 3일 동안 25℃에서 추가로 인큐베이팅하여 표면에 실리콘 산화물 층을 형성한 다음 0.22㎛ 주사기 필터(Millipore, Millex 시린지 필터 장치, 220nm, 모델 번호 SLGP033RS, Burlington, MA, USA)를 통해 다공성 실리콘 나노입자(pSiNPs)를 여과하였다. (vi) 여과된 pSiNPs를 원심분리(14000rpm, 15분)로 수집하고 EtOH로 재분산/세척(3회)하였다.

[0084]

[0085] 4-2. BCAP의 제조

[0086] 상기 실시예 4-1에서 제조된 다공성 실리콘 나노입자(pSiNPs)를 DI H_2O에 분산시켜 용액을 준비하였다. 그 다음, ANA 원액(10mg/mL DMSO, 100㎕)을 상기 DI H_2O(400㎕)에 분산된 pSiNP(1mg) 용액에 첨가하였다. 혼합물을 vortex mixer(600 rpm, Scientific industry, Inc., VortexGenie 2, Model No. SI-0246, Bohemia, NY, USA)를 사용하여 실온에서 2시간 동안 4 M 염화칼슘($CaCl_2$) 스톡 용액(500 ㎕)과 반응시킴으로써, 기공에 ANA가 로딩 및 염화칼슘으로 표면이 코팅된 다공성 실리콘 나노입자($CaCl_2$-ANA-pSiNPs; CAP)를 생성하였다. $CaCl_2$-ANA-pSiNPs(CAP)를 원심분리(14000rpm, 15분)로 수집하고 DI H_2O(1mL)로 3회 세척하였다. 그 후, EtOH(900㎕)에 분산된 CAP 용액에 실란-PEG-비오틴(5000Da) 스톡 용액(100㎕, 10mg/mL, EtOH)을 첨가하고 실온에서 2시간 동안 볼텍스 믹서를 사용하여 혼합하여 CAP의 표면을 비오틴-폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 기능화하였다. 2시간 후, 생성된 Biotin-$CaCl_2$-ANA-pSiNPs(비오틴-PEG로 표면 개질된 CAP; BCAP)를 EtOH(1mL)를 사용하여 3회 세척하고 원심분리(14000rpm, 15분)로 수집하였다.

[0087] **실시예 5. BCAP의 화학적 특성 확인**

[0088] 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼인 BCAP은 상기 실시예 4의 방법으로 다공성 실리콘 나노입자(pSiNPs)부터 단계별 변화를 거쳐서 제조하였다. 이러한 단계별 변화에 따른 BACP의 화학적 특성 및 구조적 변화를 확인하기 위하여, pSiNPs, CAP 및 BCAP 각각의 평균 유체역학적 직경(나노 입도) 및 제타 전위(zeta potential)는 Malvern Instruments Zetasizer Nano를 사용하여 동적 광산란(dynamic light scattering; DLS)을 통해 분석하였으며, ATR-FTIR(Attenuated total reflection Fourier transform infrared) 분광법을 사용하여 적외선 흡수 스펙트럼을 분석하였다. pSiNPs, CAP 및 BCAP 각 제제 및 $CaCl_2$로 코팅되기 전 ANA만 로딩된 다공성 실리콘 나노입자(ANA_pSINPs)의 구조적 변화를 관찰하기 위해 투과전자현미경(TEM)을 이용한 이미지 기반 분석을 실시하였다.

[0089] 도 5a는 다공성 실리콘 나노입자(pSiNPs)로부터 BCAP이 되기까지의 단계별 변화를 거치면서 pSiNPs, CAP 및 BCAP 각각의 입자 크기 변화를 나타내며, 각 단계를 거쳐가면서 평균 유체역학적 직경의 크기가 조금씩 커지는 것이 확인되었다.

[0090] 도 5b는 동적 광산란(DLS)에 의해 분석된 pSiNPs, CAP 및 BCAP 각각의 단계별 변화에 따른 제타 전위(zeta potential)를 확인한 결과이며, 처음 -22.8 mV였던 전위는 $CaCl_2$로 코팅된 후 염화칼슘에 의해 -12.1 mV로 변화하였고, biotin-PEG에 의해 표면 개질화 된 후 다시 -29.4 mV로 음전하가 강해지는 것이 확인되었다.

[0091] 도 5c는 ATR-푸리에 변환 적외선 분광기(ATR-FTIR spectroscopy)를 이용하여 각 단계별 반응에 따른 작용기 변화를 확인한 결과이다. 해당 결과에서 BCAP은 다공성 실리콘 나노입자에서 관측되는 O-H기, ANA에서 관측되는 N-H기, biotin-PEG에서 관측되는 C-H기가 모두 나타나면서 이러한 작용기들이 단계별로 추가됨을 확인되었다.

[0092] 도 5d는 pSiNPs, CAP 및 BCAP 각각의 단계별 변화에 따른 투과 전자 현미경 결과이며, ANA가 로딩되어 있는 단계(ANA_pSiNPs)까지는 열려있는 다공성 실리콘 나노입자의 구멍이 관찰되었으나 염화칼슘에 의해 코팅된 후(CAP 및 BCAP)에는 구멍이 닫혀있음이 확인되었다.

[0093] 이러한 결과들로 다공성 실리콘 나노입자를 이용한 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼이 예상 모식도대로 형성되었음이 확인되었다.

[0094] **실시예 6. BCAP에서의 ANA 방출(release) 확인과 방출된 ANA에서의 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능 검증**

[0095] 앞서 형성된 BCAP은 ANA가 로딩되어 있음을 간접적으로 보여주었지만, 얼마나 많은 양의 ANA가 로딩되어있는지

그리고 이러한 로딩 과정을 거치면서 ANA의 효능이 변성되진 않았는지는 확인되지 않았다. 이러한 검증을 위해, 형성된 BCAP을 PBS 상에 풀어준 뒤 37℃, 흔들리는 배양기에서 배양하여 시간 경과에 따른 ANA 방출양을 확인하였다.

[0096] 구체적으로, BCAP(1 mg)을 PBS(1 mL, pH 7.4)에 분산시키고 용액을 120분(시간 간격: 30분씩, 0-120분) 동안 37℃에서 배양하였다. 각 시간 간격(30분, 60분, 90분 및 120분)에서 BCAP를 14000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 수상에서 제거하였다. BCAP에 로딩된 ANA의 방출 프로파일 측정을 위하여, 상기 원심분리로 얻어진 상등액(supernatant)을 1cm 표준 석영 셀(내부 부피 1mL, Hellma Analytics, Germany)에 넣고 분광형광광도계(Shimadzu Corp. RF-6000, Kyoto, Japan)를 통해 ANA의 형광 신호를 추적하여 420nm에서 BCAP로부터 방출된 ANA의 양을 계산하여 방출 강도 플롯(여기 파장: 338 nm)을 측정하였다.

[0097] 도 6a는 시간 경과에 따른 ANA 방출양을 확인한 결과이다. ANA는 BCAP으로부터 90분만에 약 0.87 mg/mL이 방출되었으며, 최대 로딩양은 약 0.88 mg/mL임이 확인되었다.

[0098] 또한, 상기 결과에서 방출된 ANA를 아밀로이드-베타 응집체(10 μM)에 처리하고 ThT(10 μM)를 이용하여 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 검증하였다.

[0099] 도 6b는 BCAP(PBS 버퍼, pH 7.4, 25℃)의 상층액(ANA 함유)의 존재 하에서 각 배양 시간에서 얻은 ThT(10 μM)의 방출 스펙트럼을 나타낸 것으로(여기 파장: 413 nm), 해당 결과에서 ANA는 여전히 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 가지고 있었으며, 해당 결과 역시 농도 의존적으로 나타남이 확인되었다.

[0100] **실시예 7. 용혈 반응을 통한 BCAP의 생체 독성 확인**

[0101] BCAP의 실제 동물에서의 실험을 진행하기에 앞서 동물에서 독성이 나타나지 않음이 확인되어야 하므로, 본 발명자들은 이러한 검증을 위해, 준비예 2의 동물로부터 혈액을 채혈하여 적혈구만을 분리하여, BCAP을 농도별로 처리하여 반응시킨 후, 용혈 테스트를 수행하였다. 구체적으로, 이소플루오란으로 마취된 마우스의 심장에서 혈액을 채취하였다. 적혈구(RBC)를 4℃(3,000rpm, 3분)에서 원심분리하여 추출하고 1×차가운 PBS(2회)로 세척하였다. 0.03, 0.1, 0.3, 1 및 3mg/mL 농도의 ANA 또는 BCAP를 정제된 RBC(차가운 1×PBS에서 8% 작업 농도, v/v)에 처리하였다. 양성 대조군으로는 0.1%(작업 농도, v/v) Triton X-100을 사용하였다. 혼합물을 진탕 배양기(200 rpm, 37℃)에서 1시간 동안 배양한 다음 4℃에서 3000 rpm으로 원심분리하였다. 상청액에 대하여 450 nm에서 흡수하에 용혈 활성(hemolysis activity)을 측정하였다.

[0102] 그 결과, 도 7에 도시된 바와 같이, BCAP은 0.03-3 mg/mL까지의 모든 농도에서 어떠한 독성 반응도 나타내지 않았다. 해당 실험 결과를 바탕으로 농도를 0.25 mg/mL로 설정하여 동물 실험을 진행하였다.

[0103] **실시예 8. BCAP의 뇌 표적화 효능 확인**

[0104] BCAP의 알츠하이머병 치료 효능을 확인하기에 앞서 BCAP의 뇌 표적화 효능을 입증할 필요가 있었고, 본 발명자들은 ANA와 BCAP(10 mg/kg, i.v.)을 알츠하이머병 유발 마우스(실시예 9-1)에 투여 후 2시간의 약물 체내 순환 시간이 지난 후에 마우스를 마취시키고 PBS(pH 7.4)로 경심 관류시키고 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 마우스로부터 주요 장기들(뇌, 심장, 폐, 비장, 신장 및 간)을 적출하여 각 장기의 형광 세기를 비교 분석하였다. 형광 조직 이미징 시스템(FTIS, VISQUE® InVivo Elite, Vieworks Co. Ltd., 대한민국)을 생체외 조직 형광 이미징에 사용하였으며, 이미징 실험은 암실에서 수행되었다. 형광 세기 데이터는 ANA(채널: 390-490nm 여기, 500-550nm 검출 채널)의 형광 신호를 추적하여 수집하였다.

[0105] 도 8a는 해당 실험에 대한 모식도와 적출된 장기에서의 형광 세기를 보여주는 FTIS 이미지 결과이며, 도 8b는 형광 이미지 결과로 확인된 형광 세기(복사 효율, radiant efficiency, %)를 그래프화 한 결과이다. 해당 실험 결과에서 BCAP은 ANA만 투여하였을 때와 비교하여 뇌에서만 유의미적인 차이를 보였으며, 이에 따라 BCAP가 뇌를 표적화 할 수 있음이 확인되었다.

[0106] **실시예 9. BCAP의 동물에서의 알츠하이머병 치료 효능 확인**

[0107] 본 발명자들은 BCAP의 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 통해 알츠하이머병 치료 효과가 나타나는지 확인하고자 하였다. 마우스에서의 BCAP의 알츠하이머병 치료 효능을 확인하기 위하여, 아밀로이드 베타 응집체로 유도된 알츠하이머병 마우스 모델을 제작하였고, BCAP을 투여(3-7일차, 매일 투여)하면서 동물 행동 실험인 Y-미로(5일차)와 수동 회피 실험(6-7일차)을 진행하였으며 이후 마우스를 희생시켜 인터루킨 6(IL-6) 수준 분석(7일차)과 ThS를 이용한 뇌 조직 염색(7일차)을 진행하였다. 분석 실험 진행 모식도를 도 9에 나타내었다.

[0108] 9-1. 알츠하이머병 마우스 모델

[0109] 아밀로이드 베타 응집체로 유도된 알츠하이머병 마우스 모델을 제작하기 위하여, 준비예 1의 아밀로이드-베타 응집체(222 μM)를 해밀턴 마이크로시린지를 사용하여 정위(stereotaxically) 투여를 통해 이소플루란으로 마취된 마우스(준비예 2)에 뇌실내(- 0.2mm 전후방(AP), - 1mm 내외측(ML) 및 - 2.4mm 등배쪽(DV), intracerebroventricular; i.c.v.) 주사(1 μL/min, 5분)하였다. 정위 투여는 난방 시스템이 마우스의 체온을 조절(36-37℃로 유지)하는 별도의 난방실에서 수행되었다. 마취 중 체온 강하가 타우 인산화를 유발할 수 있으므로 온도계를 사용하여 정기적으로 온도를 모니터링하였다.

[0110] 약물(PBS, ANA, CAP 또는 BCAP)의 주입(10 mg/kg, i.v.)은 아밀로이드-베타 응집체 주입 후 3일에서 7일 사이에 매일 시행되었다.

[0111] 9-2. Y-미로 실험

[0112] 본 발명의 뇌 표적화 아밀로이드-베타 응집체 분해 나노 플랫폼이 알츠하이머병 마우스 모델에서 아밀로이드-베타 응집체로 유도된 기억력 감퇴를 개선시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, Y-미로 실험(Y-maze test)을 수행하였다.

[0113] Y-미로는 서로 120도 각도로 배치된 3개(A, B, C)의 어두운 불투명 폴리비닐 플라스틱 팔(arm, 40×3×12cm)으로 구성되었다. Y-미로 테스트 1시간 전에 PBS, ANA, CAP, BCAP의 마지막 투여가 이루어졌으며, 샴(Sharm) 그룹은 ANA 대신 vehicle 솔루션을 처리하였다. 각 마우스는 처음에 임의의 한 팔에 배치하였고 팔 진입 순서(예: ABC, CAB 등)를 비디오 카메라 기반 EthoVision System(Noldus, 네덜란드)을 사용하여 8분에 걸쳐 기록하였다. 각 테스트 사이에 70% EtOH 스프레이를 사용하여 Y-미로 암의 잔류 냄새와 잔류물을 제거하였다. 실제 교대(alternation)는 A, B 및 C 3개의 부문 모두에 연속적으로 진입하는 것으로 정의되었다(즉, ABC, BAC 또는 CAB 순서 등이 해당, BCC 또는 CCA는 아님). 실제 교대는 투여군 종류를 알지 못하는 사람이 수동으로 관찰하였다. 각 마우스의 자발적 교대 점수(spontaneous alternation score, %)는 하기 식에 표시된 대로 가능한 교대 수(동물이 미로 팔에 들어가는 총 횟수에서 2를 뺀 값으로 정의됨)에 대한 실제 교대 수의 비율에 100을 곱한 값으로 계산하였다.

[0114] 자발적 교대(%) = [(실제 교대 수)/(총 팔에 들어가는 횟수-2)] × 100.

[0115] Y-미로 테스트 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 BCAP은 아밀로이드-베타 응집체로 유도된 기억력 감퇴를 유의미적으로 개선시킬 수 있음이 확인되었다.

[0116] 9-3. 수동 회피 실험

[0117] 알츠하이머병 마우스 모델의 장기 기억을 측정하기 위하여, 수동 회피 실험(Passive avoidance test, PAT)을 진행하였다.

[0118] 수동 회피 테스트는 문(5×5 cm)으로 연결된 두 개의 부착된 챔버(20×20×20 cm)로 구성된 장치에서 학습 시험(acquisition trial) 및 정체 시험(retention trial)을 위해 연속 2일 동안 수행되었다. 한 방은 밝은 방(50W 전구)이었고 다른 방은 광원이 없는 어두운 방이었으며, 각 챔버 바닥에는 1cm 간격으로 2mm 스테인리스 스틸 막대를 설치하였다.

[0119] 첫날에는 학습 시험(acquisition trial)이 진행됐다. 마우스를 가벼운 챔버에 부드럽게 넣은 다음, 라이트 챔버와 다크 챔버 사이의 문은 10초 후에 열리고 마우스가 다크 챔버에 들어간 후 자동으로 닫히도록 하였다. 마우스가 다그 챔버에 들어간 다음 스테인레스 스틸 바를 통해 쥐의 발에 전기 충격(0.5mA, 3초)을 가했다. 마우스가 60초 이내에 다크 챔버에 들어가지 않으면 강제로 암실에 들어가게 하고 잠복기를 60초로 기록하였다.

[0120] 학습 시험 24시간 후에 정체 시험(retention trial)을 이어서 수행하였다. 마우스를 라이트 챔버에 넣고 학습 실험과 동일한 조건에서 10초 후에 문을 열었다. 쥐가 다크 챔버에 들어가는 데 걸리는 시간을 기록했고 이번에는 쥐에게 전기 충격을 주지 않았다. 최대 대기 시간은 300초로 설정하여, 문이 열린 후 마우스가 다크 챔버에 들어가지 않으면 대기 시간을 300초로 기록하였다.

[0121] 수동 회피 실험 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, Y-미로의 결과와 같은 맥락으로 BCAP이 아밀로이드-베타 응집체로 유도된 기억력 감퇴를 유의미적으로 개선시킬 수 있음이 확인되었다.

[0122] 이러한 결과는 알츠하이머병의 주요 증상 중 하나인 기억력 감퇴를 BCAP이 개선시킬 수 있는 잠재적 효능을 가

지고 있음을 의미한다.

[0123] 9-4. IL-6 ELISA 분석

[0124] 아밀로이드-베타 응집체는 인터루킨 6(Interleukin 6; IL-6)의 수치를 증가시킨다고 잘 알려져 있다. 이에, BCAP 처리에 따른 알츠하이머병 마우스 모델의 IL-6의 수치를 효소면역측정법 중 하나인 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 분석하였다. 마우스 모델에서 채혈한 혈액은 3,000rpm, 4℃에서 3분간 원심분리한 후 단백질 분석을 위해 혈장(상층액)을 채취하였다. ELISA 키트(Novex, Model No. KMC0061, US)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 마우스 모델의 혈장 내 IL-6 수준을 측정하였다.

[0125] 도 12는 IL-6 변화에 대한 ELISA 결과로, 아밀로이드-베타 응집체로 유도 증가된 IL-6의 수치 또한 BCAP에 의해 유의미적으로 개선될 수 있음이 확인되었다.

[0126] 이러한 면역 결과는 BCAP이 알츠하이머병의 다른 증상들 또한 개선시킬 수 있음을 반증하는 결과이다.

[0127] 9-5. 뇌 절편의 ThS 조직 염색

[0128] 마지막으로, 뇌 조직 중 알츠하이머병 및 기억력과 가장 밀접한 관련이 있다는 해마 부분의 아밀로이드-베타 응집체를 ThS를 이용하여 형광 이미지를 확인하였다. 구체적으로, 수동 회피 시험(실시예 9-3) 후 마우스를 희생시키고 PBS(50mM, pH 7.4)로 관류 및 고정(4% 파라포름알데히드)시켰다. 관류 후, 뇌를 4℃에서 하룻밤 후고정으로 제거하고 4℃에서 30% 수크로스에서 배양하였다. 순차적으로 25㎛ 두께의 관상 절편을 저온 유지 장치(CM1850; Leica, Wetzlar, Germany)로 준비하고 4℃에서 보관하였다. 자유 부유 절편을 50% 에탄올에 용해된 1% 티오플라빈 S에서 10분 동안 배양한 다음, 50% 에탄올로 각각 5분 동안 두 번 세척하고 증류수로 5분 동안 한 번 세척하였다. 그런 다음 마운팅 매체를 적용하여 섹션을 염색하여 형광 이미지를 확인하였다.

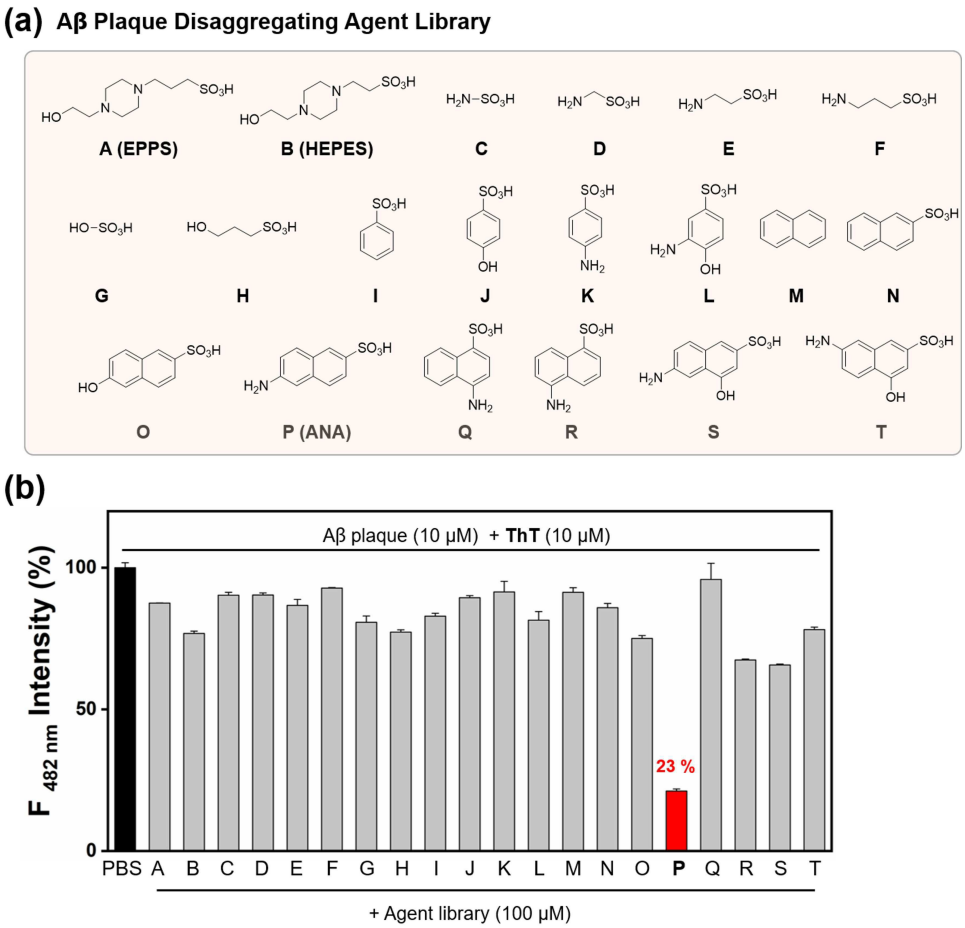
[0129] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 알츠하이머병 마우스 모델의 해마에서 많은 양의 아밀로이드-베타 응집체가 발견된 반면, BCAP이 투여된 알츠하이머병 마우스 모델의 해마 부분에서는 아밀로이드-베타 응집체가 거의 나타나지 않았다.

[0130] 이러한 결과들로 앞선 시험관 내 결과와 더불어 BCAP이 생체 내에서도 유의미적인 아밀로이드-베타 응집체 분해 효능을 가지고 있음이 확인되었다.

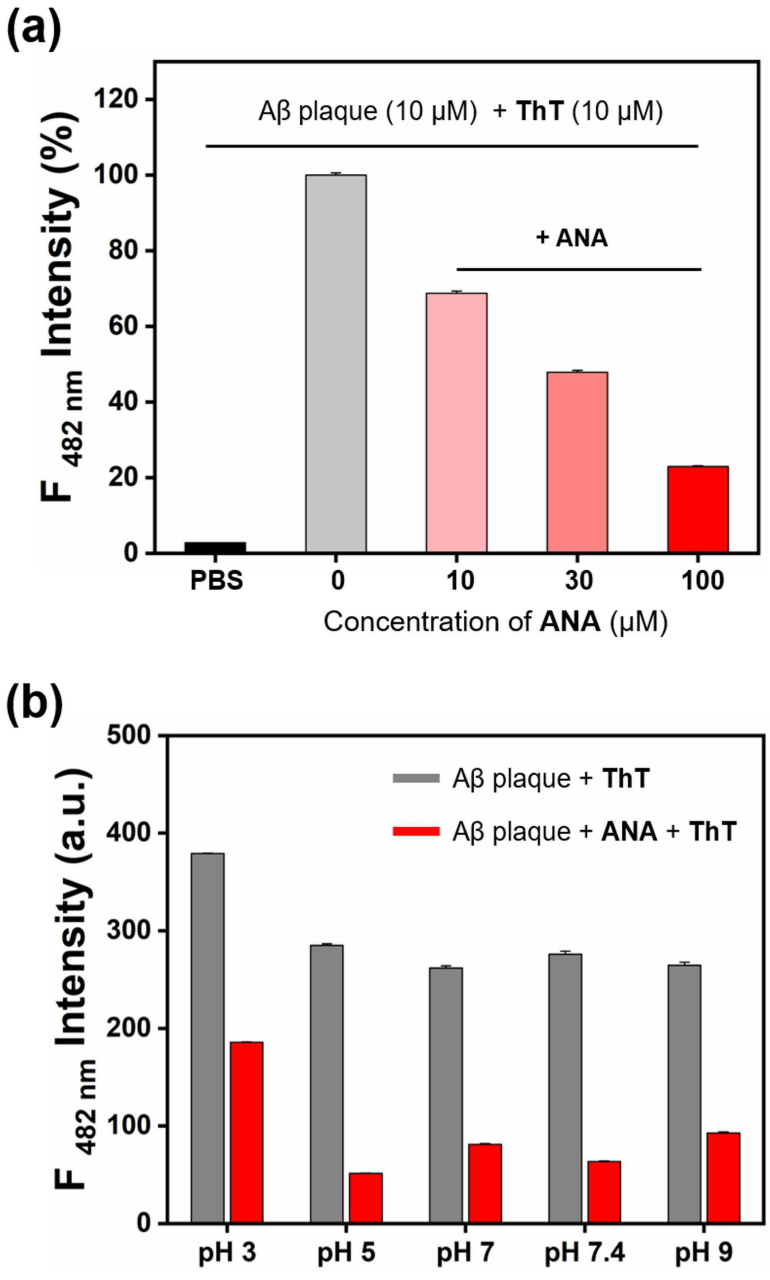
[0131] 상기 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

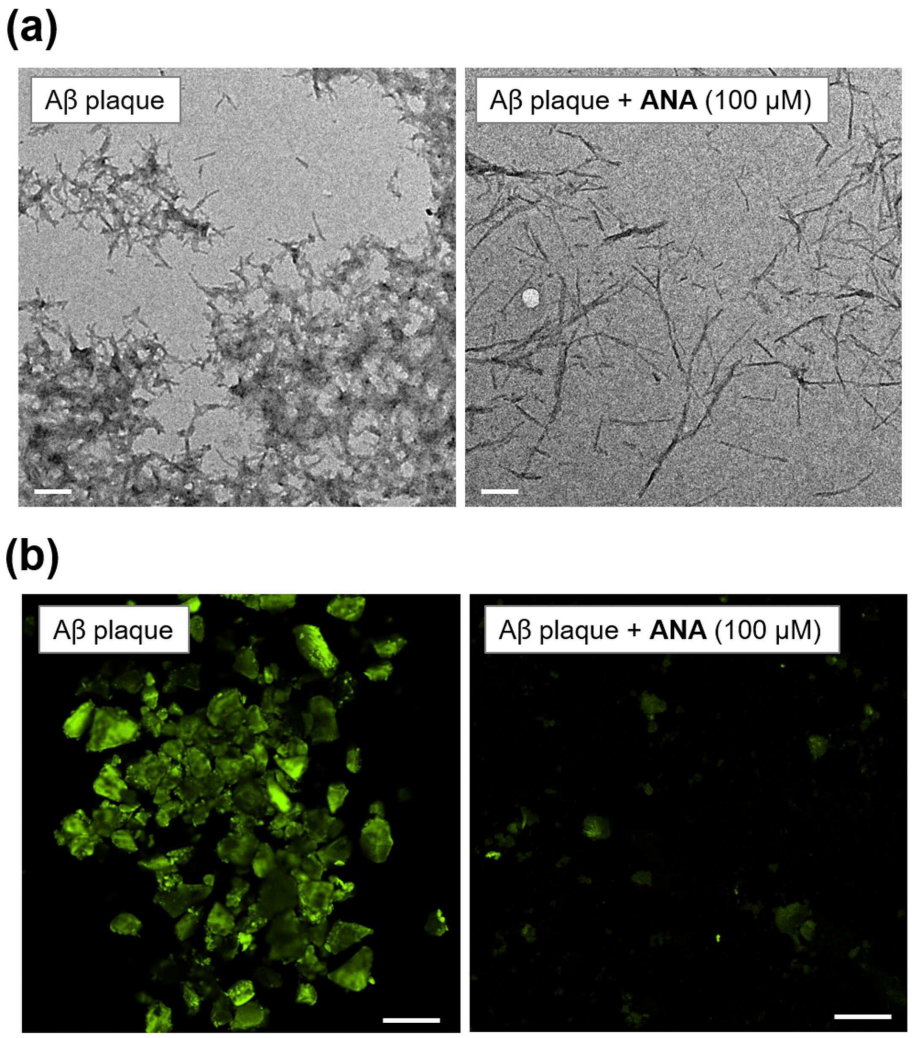
도면1


(a) Aβ Plaque Disaggregating Agent Library
A (EPPS)
B (HEPES)
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P (ANA)
Q
R
S
T
(b)
Aβ plaque (10 μM) + ThT (10 μM)
F 482 nm Intensity (%)
100
50
0
23 %
PBS A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T
+ Agent library (100 μM)

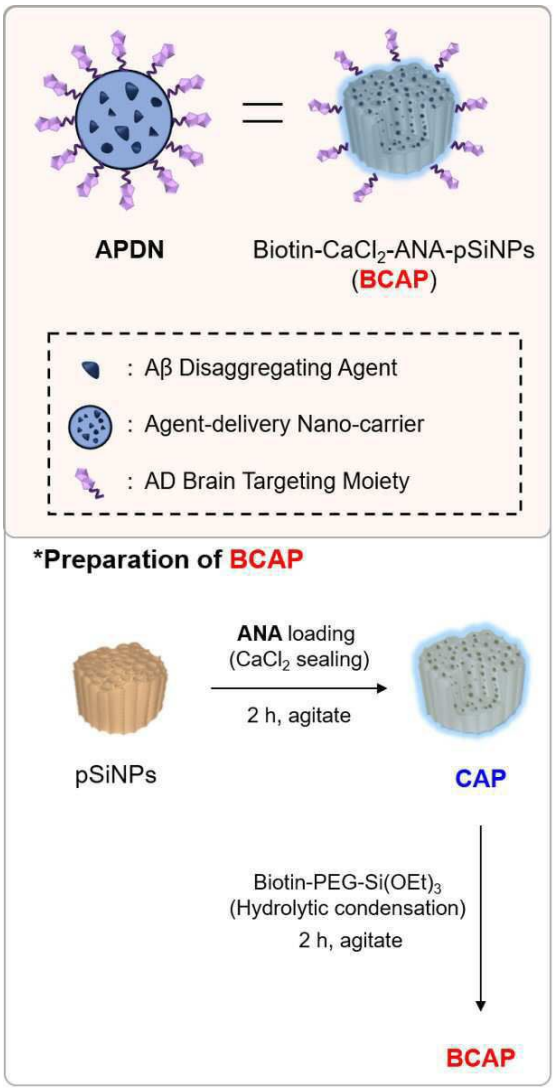
도면2


(a)
Aβ plaque (10 μM) + ThT (10 μM)
+ ANA
F 482 nm Intensity (%)
120
100
80
60
40
20
0
PBS
0
10
30
100
Concentration of ANA (μM)
(b)
Aβ plaque + ThT
Aβ plaque + ANA + ThT
F 482 nm Intensity (a.u.)
500
400
300
200
100
0
pH 3
pH 5
pH 7
pH 7.4
pH 9

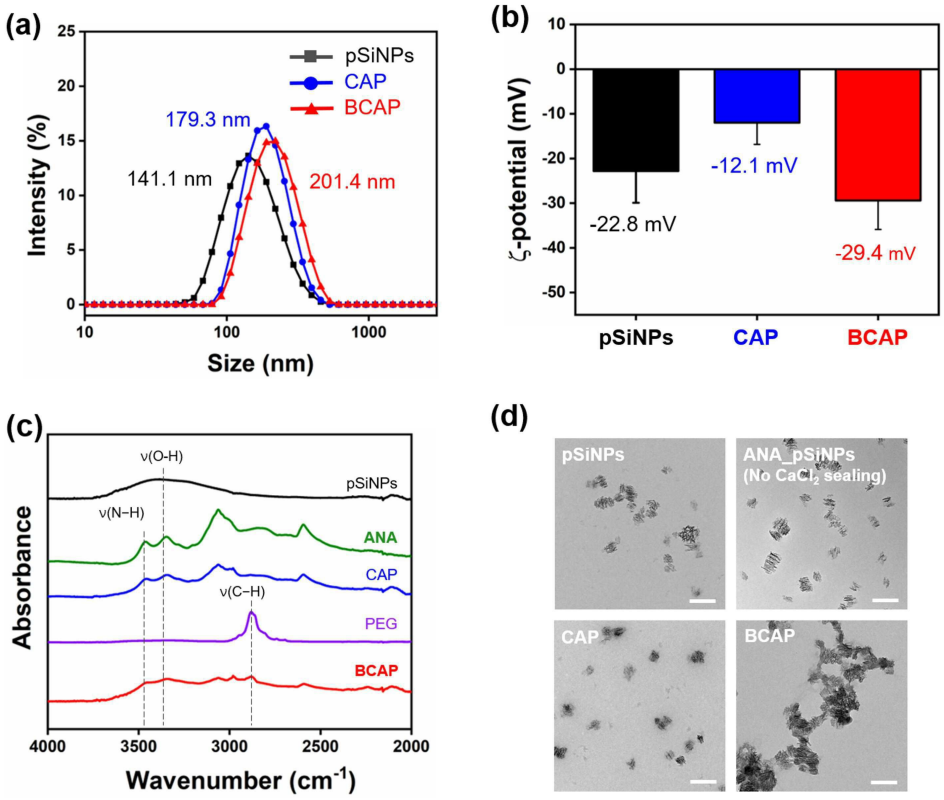
도면3


(a)
Aβ plaque
Aβ plaque + ANA (100 μM)
(b)
Aβ plaque
Aβ plaque + ANA (100 μM)

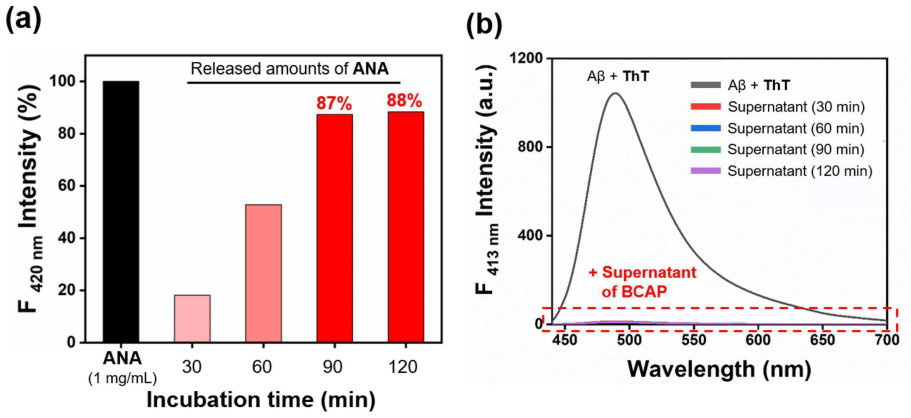
도면4


APDN
Biotin-CaCl2-ANA-pSiNPs
(BCAP)
: Aβ Disaggregating Agent
: Agent-delivery Nano-carrier
: AD Brain Targeting Moiety
*Preparation of BCAP
ANA loading
(CaCl2 sealing)
2 h, agitate
pSiNPs
CAP
Biotin-PEG-Si(OEt)3
(Hydrolytic condensation)
2 h, agitate
BCAP

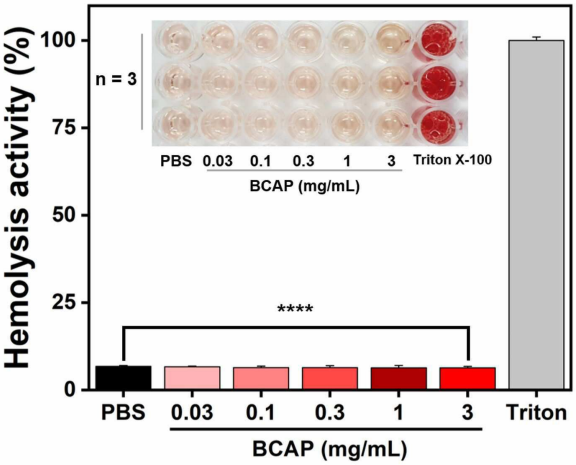
도면5


(a)
pSiNPs
CAP
BCAP
179.3 nm
141.1 nm
201.4 nm
Intensity (%)
Size (nm)
(b)
ζ-potential (mV)
-22.8 mV
-12.1 mV
-29.4 mV
pSiNPs
CAP
BCAP
(c)
ν(O-H)
ν(N-H)
ν(C-H)
pSiNPs
ANA
CAP
PEG
BCAP
Absorbance
Wavenumber (cm-1)
(d)
pSiNPs
ANA_pSiNPs
(No CaCl2 sealing)
CAP
BCAP

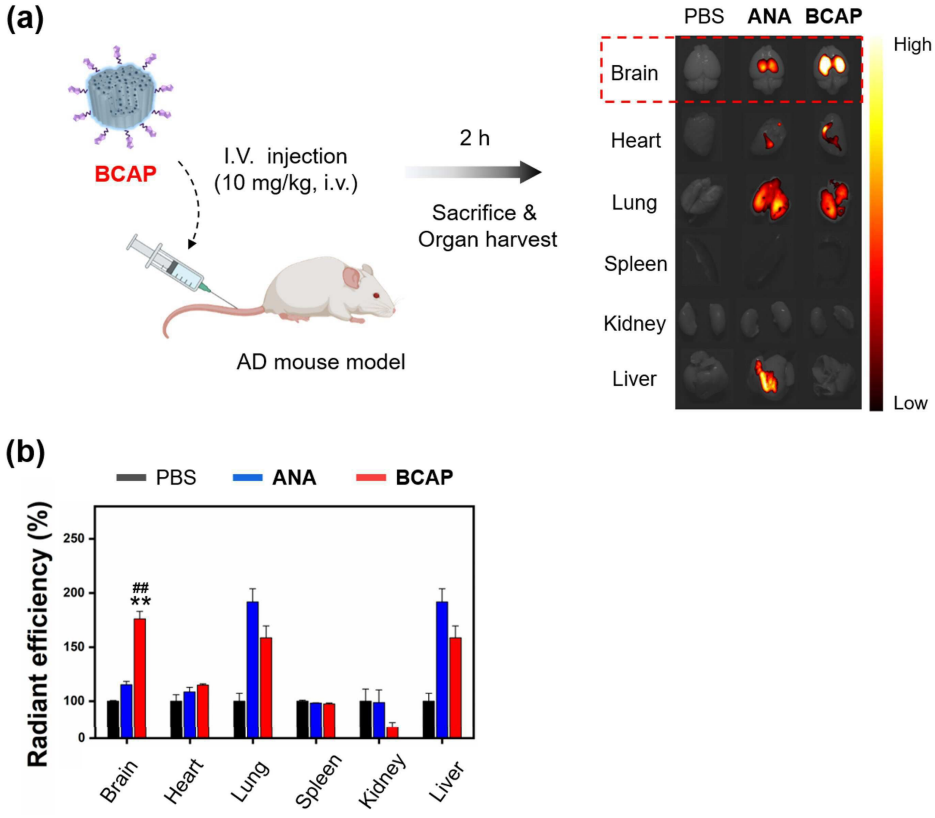
도면6


(a)
Released amounts of ANA
87%
88%
F 420 nm Intensity (%)
ANA
(1 mg/mL)
Incubation time (min)
(b)
Aβ + ThT
Aβ + ThT
Supernatant (30 min)
Supernatant (60 min)
Supernatant (90 min)
Supernatant (120 min)
+ Supernatant
of BCAP
F 413 nm Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)

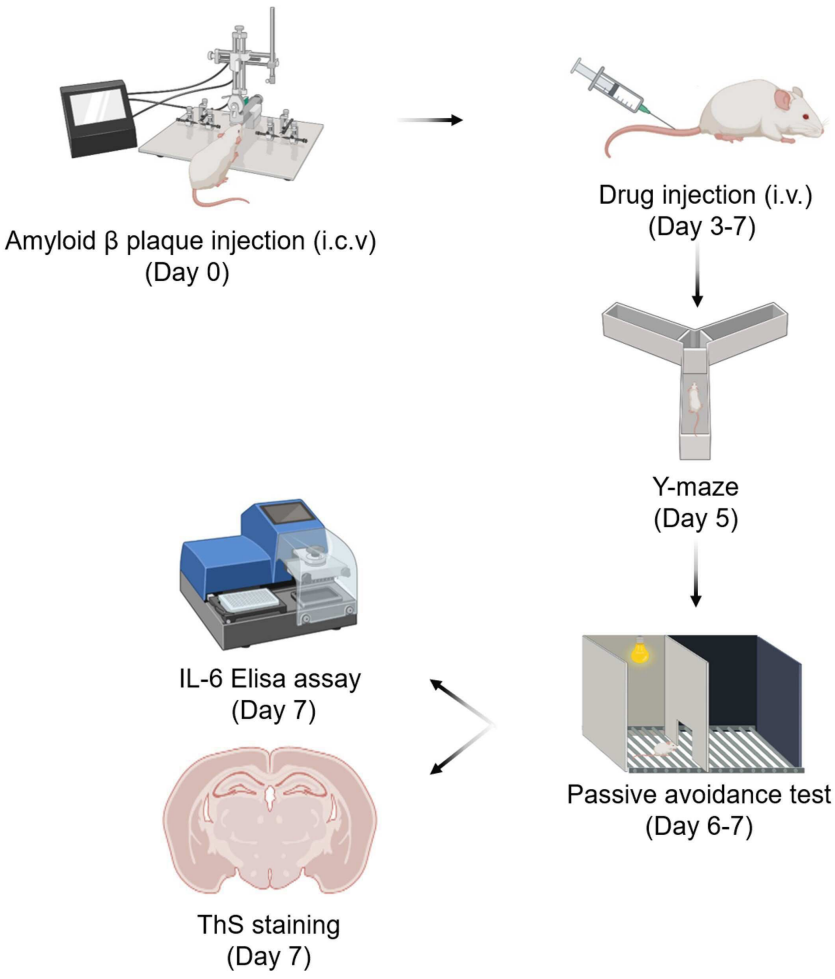
도면7


Hemolysis activity (%)
100
75
50
25
0
n = 3
PBS 0.03 0.1 0.3 1 3 Triton X-100
BCAP (mg/mL)
****
PBS
0.03
0.1
0.3
1
3
Triton
BCAP (mg/mL)

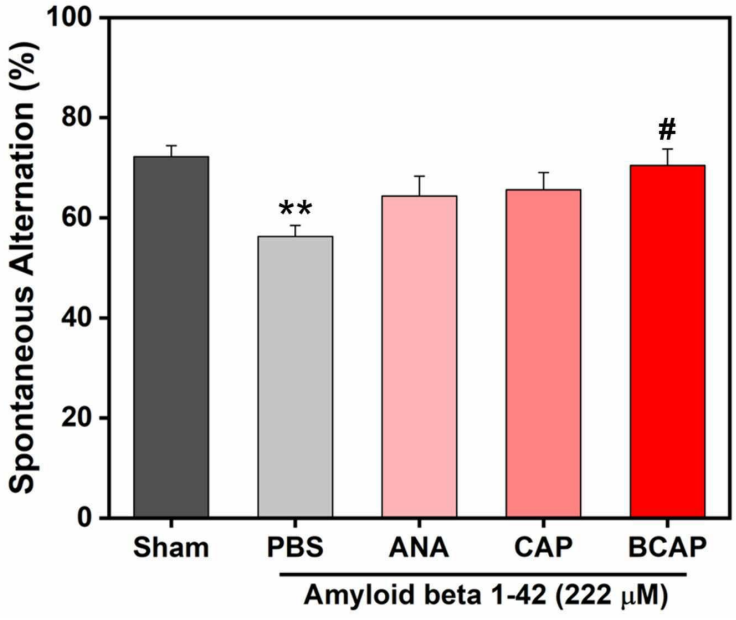
도면8


(a)
BCAP
I.V. injection
(10 mg/kg, i.v.)
2 h
Sacrifice &
Organ harvest
AD mouse model
PBS ANA BCAP
Brain
Heart
Lung
Spleen
Kidney
Liver
High
Low
(b)
PBS
ANA
BCAP
Radiant efficiency (%)
250
200
150
100
0
##
**
Brain
Heart
Lung
Spleen
Kidney
Liver

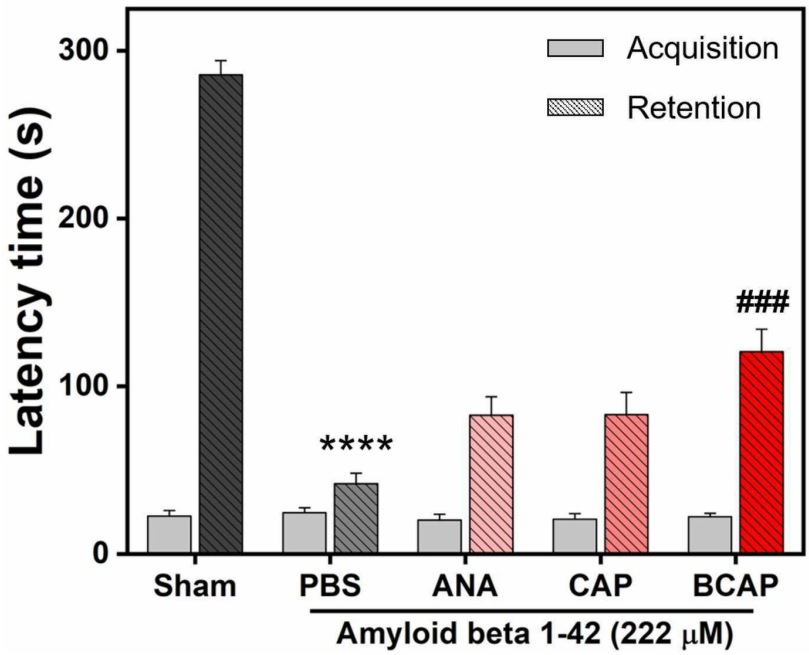
도면9


Amyloid β plaque injection (i.c.v)
(Day 0)
Drug injection (i.v.)
(Day 3-7)
Y-maze
(Day 5)
Passive avoidance test
(Day 6-7)
IL-6 Elisa assay
(Day 7)
ThS staining
(Day 7)

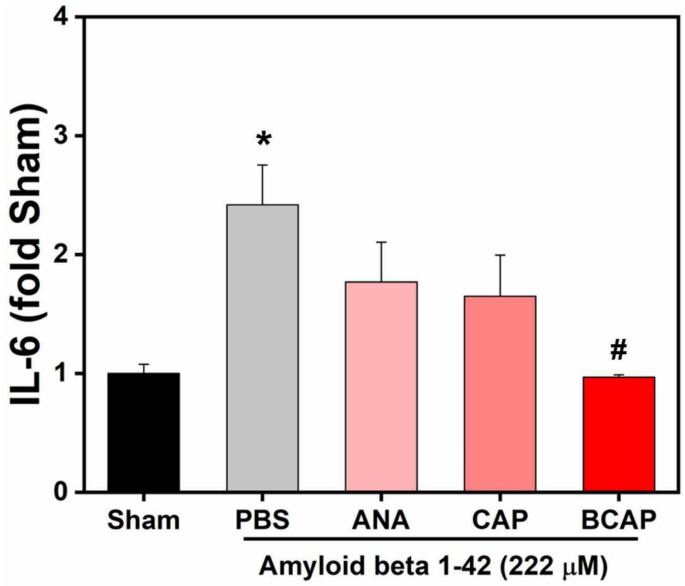
도면10


Spontaneous Alternation (%)
100
80
60
40
20
0
**
#
Sham
PBS
ANA
CAP
BCAP
Amyloid beta 1-42 (222 μM)

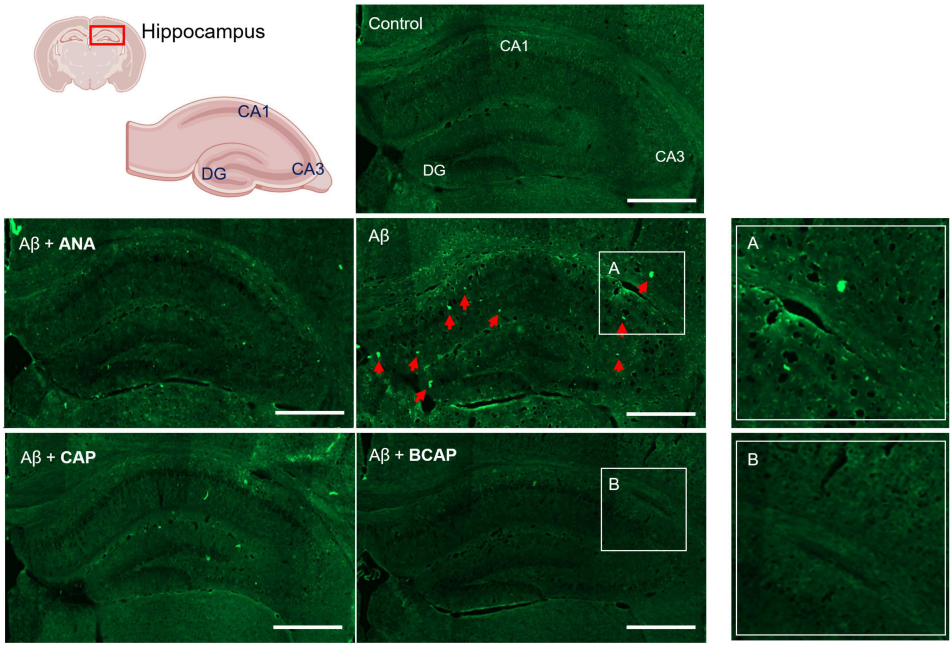
도면11


Acquisition
Retention
Latency time (s)
300
200
100
0
****
###
Sham
PBS
ANA
CAP
BCAP
Amyloid beta 1-42 (222 μM)

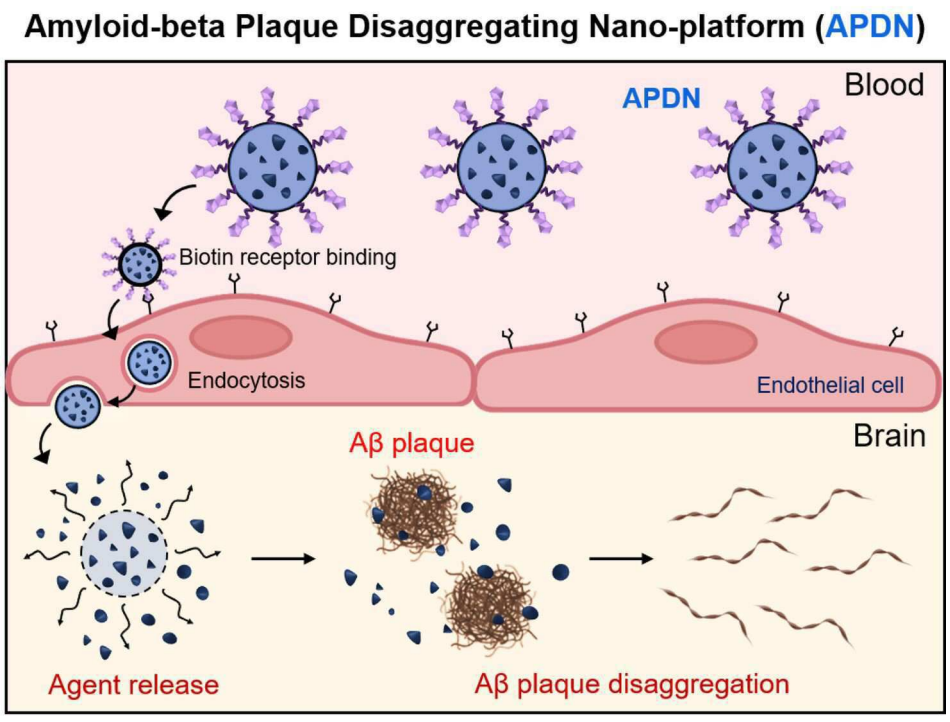
도면12


IL-6 (fold Sham)
4
3
2
1
0
*
#
Sham
PBS
ANA
CAP
BCAP
Amyloid beta 1-42 (222 μM)

도면13


Hippocampus
CA1
DG
CA3
Control
CA1
DG
CA3
Aβ + ANA
Aβ
A
A
Aβ + CAP
Aβ + BCAP
B
B

도면14


Amyloid-beta Plaque Disaggregating Nano-platform (APDN)
APDN
Blood
Biotin receptor binding
Endocytosis
Endothelial cell
Brain
Aβ plaque
Agent release
Aβ plaque disaggregation