(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025 년 1 월 9 일 (09.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2025/009945 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/4965 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/009678

(22) 국제출원일: 2024 년 7 월 8 일 (08.07.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0087847 2023 년 7 월 6 일 (06.07.2023) KR

(71) 출원인: 재단법인대구경북과학기술원 (**DAEGU GYEONGBUK INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**) [KR/KR]; 42988 대구광역시 달성군 현풍읍 테크노중앙대로 333, Daegu (KR).

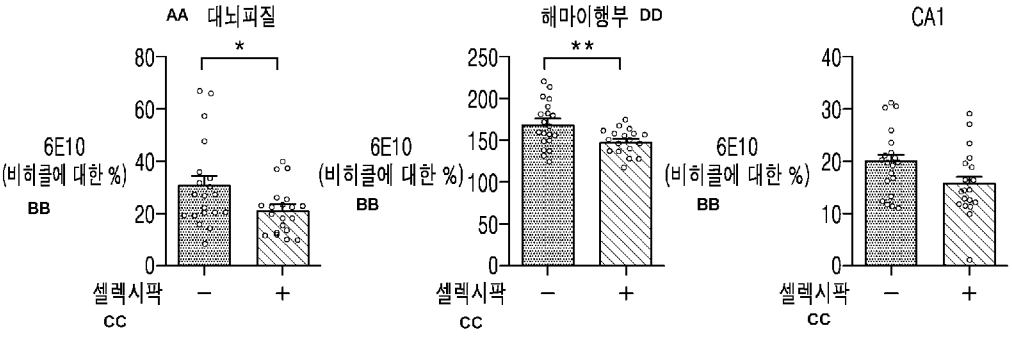
(72) 발명자: **허향숙 (HOE, Hyang-Sook)**; 41073 대구광역시 동구 반야월북로 167, 207동 1502호, Daegu (KR). **황정우 (HWANG, Jeong-Woo)**; 41421 대구광역시 북구 동천로 155, 102동 907호, Daegu (KR). **정유주 (JEONG, Yoo Joo)**; 41069 대구광역시 동구 첨복로 33, 1410호, Daegu (KR). **박진희 (PARK, Jin-Hee)**; 41456 대구광역시 북구 태전로7길 10-17, 101동 603호, Daegu (KR). **장지영 (JANG, Ji-Yeong)**; 51673 경상남도 창원시 진해구 병암로 20, 108동 501호, Gyeongsangnam-do (KR). **김정하 (KIM, Jeongha)**; 42101 대구광역시 수성구 동대구로50길 37, 109동 401호, Daegu (KR). **조아란 (JO, A Ran)**; 37615 경상북도 포항시 북구 성실로 50, 206동 1201호, Gyeongsangbuk-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인더웨이브 (THEWAVE IP LAW FIRM)**; 06097 서울특별시 강남구 선릉로 602 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF DEGENERATIVE BRAIN DISEASES COMPRISING SELEXIPAG

(54) 발명의 명칭: 셀렉시팍을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for the prevention or treatment of degenerative brain diseases, comprising selexipag or a pharmaceutically acceptable salt thereof as an active ingredient. Selexipag inhibits the expression and production of pro-inflammatory or inflammatory cytokines in brain tissue, inhibits the activity of microglia or astrocytes, inhibits NLRP3 inflammasome activity and CDK6 expression, reduces amyloid plaques, increases the expression of the amyloid beta-degrading enzyme IDE, and inhibits the hyperphosphorylation of tau protein and the expression of tau kinase, and thus can be effectively used as a novel therapeutic agent for the prevention or treatment of degenerative brain diseases, cognitive disorders, learning disabilities, or memory disorders.

(57) 요약서: 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 셀렉시팍은 뇌 조직 내 전염증성 또는 염증성 사이토카인의 발현 및 생성을 억제하고, 미세아교세포 또는 성상세포의 활성을 억제하며, NLRP3 인플라마좀 활성 및 CDK6 발현을 억제하며, 아밀로이드 플라크를 감소시키고, 아밀로이드 베타 분해 효소 IDE 의 발현 증가시킬 뿐만 아니라, 타우 단백질의 과인산화 및 타우 카이네이즈의 발현을 억제하므로, 퇴행성 뇌질환, 인지장애, 학습장애 또는 기억력 장애의 예방 또는 치료를 위한 새로운 치료제로서 유용하게 사용할 수 있다.

WO 2025/009945 A1

[다음 쪽 계속]

MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 셀렉시팍을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 퇴행성 뇌질환은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 운동 및 감각기능의 손상, 기억, 학습, 연산 추리 등의 고차적 원인 기능의 저해와 같은 여러 가지 증상을 유발하는 질환이다. 퇴행성 뇌질환의 종류로는 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease: AD), 파킨슨 질환(Parkinson's disease) 및 기억 장애 등 이 있다. 퇴행성 뇌질환은 급격히 또는 천천히 진행되는 괴사(necrosis)나 세포자멸사(아폽토시스, apoptosis)에 의한 신경세포의 사멸이 나타난다.

[4] 중추신경계(CNS)에서의 염증, 즉 신경염증(neuroinflammation)은 퇴행성 뇌질환을 유발하고 중추신경계의 신경교세포(glia)에 의한 사이토카인 및 케모카인의 방출에 의해 매개된다. 신경교세포는 미세아교세포(microglia)와 성상세포(astrocyte)의 2가지 유형으로 나뉘며, 이들은 뉴런 유지 및 병원균을 탐색하고 방어하는 중요한 역할을 수행한다.

[5] 한편, 미세아교세포와 성상세포의 활성은 퇴행성 뇌신경질환의 발병과 진행에 관련되어 있다고 보고되고 있으며, 미세아교세포는 중추신경계에 상주하는 면역세포로 외부의 자극에 의해 활성화되어 면역반응과 염증반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 미세아교세포는 중추신경계에서 일차적인 면역 기능을 수행하는 세포로서, 가늘고 긴 가지와 얇은 세포체의 모양을 유지하고 있다가 외부에서 유입되거나 내부에서 발생되는 독소들이 존재하게 되면 이들 독소로부터 신경세포를 보호하기 위해 굵고 짧은 가지와 뚱뚱한 세포체를 가지는 활성화된 모양으로 변화하게 된다.

[6] 그러나, 박테리아의 내독소인 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide: LPS), 인터페론-γ, 베타아밀로이드 또는 갱글리오사이드와 같은 물질로 미세아교세포가 활성화가 되면 정상상태의 미세아교세포와는 달리 포식작용을 활발히 하고, 세포증식을 하며 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 등과 같은 사이토카인, 케모카인, iNOS(inducible nitric oxide synthase), COX-2(cyclooxygenase-2) 등의 유전자를 발현시켜 염증매개물질들을 생성한다. 이러한 미세아교세포의 활성화는 손상된 세포를 제거하고 외부에서 침입하는 박테리아나 바이러스로부터 신경세포를 보호하는 일면이 있으나 iNOS에 의해 생성되는 일산화질소(NO)와 COX-2에 의해 생성되는 프로스타글란딘, TNF-α 등은 신경세포에도 독성을 나타내기 때문에

결과적으로 미세아교세포의 활성화는 신경세포의 손상을 악화시키게 된다. 따라서 미세아교세포의 적절한 활성화 억제는 퇴행성 뇌질환을 치료할 수 있는 또 다른 방법이 될 수 있다.

[7] 또한, 퇴행성 뇌질환은 특정 뇌세포의 사멸 또는 퇴화가 일시적 또는 오랜 기간에 걸쳐 진행하는 것이 있는데, 한번 죽은 뇌세포는 재생이 되지 않기 때문에 결국 치명적인 뇌기능의 손실로 이어져 발생하는 것으로 알려져 있고, 특히, 인지기능, 감각기능, 운동기능, 전신기능의 진행성 저하를 수반하는 뇌기능 부전은 결국 성격과 행동의 변화를 가져오고, 환자들이 스스로 자신을 돌볼 수 없는 지경에 이르게 한다. 이러한 뇌세포 사멸의 주요 경로로는 산화적 스트레스에 의한 산화적 독성, 흥분적 독성, 세포자멸사 등이 제시되고 있으며, 각각은 특이한 신호전달과정을 통하여 세포사멸을 유발하게 된다. 구체적으로, 뇌졸증, 뇌손상, 알츠하이머병, 파킨슨병 환자에서 뇌세포 사멸의 주원인으로 활성 산소종(Reactive Oxygen Species)의 축적 후 단백질, 핵산, 지질의 산화적인 손상이 제시되었고, 특히 자유 라디칼에 의한 산화적 스트레스는 체내의 각 조직에서 일어나는 세포 사멸의 주원인으로 보고되고 있으며, 뇌신경질환에서 나타나는 세포사멸의 주기전의 하나로도 제시되어 왔다(Schapira, A.H., Curr. Opin. Neurol., 9(4):260-264, 1996).

[8] 또한, 성상세포는 뇌의 발생과정 뿐만 아니라 정상적인 뇌 활동을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 뇌의 성상세포는 신경세포가 분비하는 신경전달물질을 적절하게 제거하거나 뇌의 이온농도를 조절하면서 신경세포 활성을 보조하는 것으로 밝혀져 있고, 이 외에도 신경줄기세포가 신경세포로 분화하는데 도움을 주는 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀진 바 있다.

[9] 그러나 성상세포는 뇌에 상해를 입었을 때, 증식이 활발해지고 스웰링(swelling)이 일어나며 성상교세포증(astrogliosis)과 같은 반응성 성상세포로 활성화가 된다. 이러한 반응성 성상세포는 에이즈성 치매, 뇌 손상, 허혈성 뇌질환, 알츠하이머병 등에서 관찰되어지고 있다. 따라서 지속적인 성상세포의 활성화는 결국 신경세포의 사멸을 초래한다. 따라서 성상세포의 적절한 활성화 억제 역시 퇴행성 뇌질환을 치료할 수 있는 또 다른 방법이 될 수 있다.

[10] 현재 퇴행성 뇌질환을 치료하기 위해 사용되고 있는 치료법으로는 약물치료법, 수술치료법 및 물리치료법 등이 있는데, 약물치료의 경우, 일반적으로 뇌에서 부족해진 도파민을 보충해주고, 도파민의 부족으로 인한 신경전달물질의 불균형을 맞춰주며, 신경세포의 파괴를 예방 또는 지연시키고자 하는 목적과 기타 우울증 등의 증상을 조절하기 위한 약물들이 사용되고 있다.

[11] 그러나 이러한 약물은 죽어버린 신경세포를 다시 살릴 수 없기 때문에 완치를 목적으로 하는 것이 아니라 증상의 조절을 목적으로 한다는 한계가 있어, 보다 효과적으로 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료할 수 있는 새로운 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

[12] 한편, 셀렉시팍(selexipag)은 현재 업트라비(Uptravi)라는 이름으로 시판되고 있는 폐동맥 고혈압(pulmonary arterial hypertension: PAH)의 치료제이다. 셀렉시팍 및 이의 활성 대사산물인 ACT-333679(또는 MRE-269)는 프로스타사이클린 수용체의 작용제로서 폐 순환에서 혈관 확장을 유도하는 것으로 알려져 있다(특허문헌 0001 참조).

[13] 본 발명에서는 기존에 폐동맥 고혈압 치료제로 알려진 셀렉시팍이 LPS로 유도된 뇌 조직 내 전염증성 또는 염증성 사이토카인의 발현 및 생성을 억제하고, 미세아교세포 또는 성상세포의 활성을 억제하며, NLRP3 인플라마좀 활성 및 CDK6 발현을 억제함을 확인하고, 셀렉시팍의 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료 용도를 제안하게 되었다.

[14]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[15] 본 발명의 목적은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 다른 목적은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 인지장애, 학습장애 또는 기억력 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 신경세포에서의 과도한 염증반응에 의해 손상된 신경세포 보호용 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 본 발명의 또 다른 목적은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성화 억제용 시약 조성물을 제공하는 것이다.

[19] 본 발명의 또 다른 목적은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 타우 인산화 억제용 시약 조성물을 제공하는 것이다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 셀렉시팍 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 신경염증 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 셀렉시팍 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 인지기능, 학습능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.

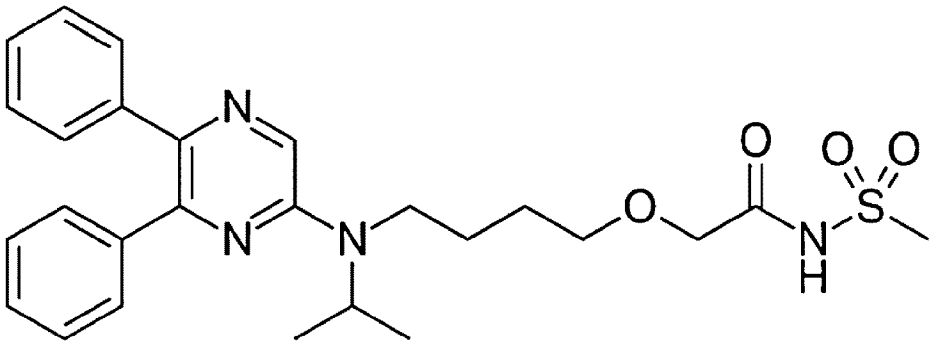
[22]

과제 해결 수단

[23] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[24] 또한, 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 인지장애, 학습장애 또는 기억력 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[25] 셀렉시팍(selexipag)은 하기 구조식을 갖는 화합물로서, 이의 화학명은 2-[4-[(5,6-다이페닐피라진-2-일)-프로판-2-일아미노]부톡시]-N-메틸설포닐아세트아마이드이며, 프로스타사이클린 수용체 작용제(prostacyclin receptor agonist)이다.

[26] 

[27] 셀렉시팍은 폐 혈관에 혈관 확장을 유발하여 폐동맥 고혈압(PAH)의 치료제로서 현재 업트라비(Uptravi)라는 상표명으로 시판되고 있다.

[28] 본 발명의 약학 조성물은 유효성분으로 셀렉시팍 뿐만 아니라 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 사용할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 인간에 대한 독성이 낮아야 하며, 모 화합물의 생물학적 활성 및 물리화학적 특성에 임의의 부정적인 영향을 주지 않아야 한다. 예를 들어, 상기 약학적으로 허용가능한 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염을 사용할 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테

이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다. 구체적으로, 상기 셀렉시팍은 소듐 염 형태인 셀렉시팍 소듐(selexipag sodium) 형태로 사용될 수 있다.

[29] 본 발명에서 셀렉시팍은 하기 중 어느 하나 이상의 활성을 가질 수 있다:

[30] (i) 뇌 조직 내 전염증성 사이토카인 또는 염증성 사이토카인의 수준 억제;

[31] (ii) 뇌 조직 내 인플라마좀(inflammasome)의 형성 또는 사이클린-의존성 카이네이즈의 수준 억제;

[32] (iii) 뇌 조직 내 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제;

[33] (iv) 뇌 조직 내 아밀로이드 플라크 감소 또는 아밀로이드 베타 단백질 축적 억제; 또는

[34] (v) 뇌 조직 내 타우 카이네이즈의 발현 또는 활성의 억제, 또는 타우 단백질의 과인산화 억제.

[35] 일 구체예에 있어서, 셀릭시팍은 항염증 활성을 가질 수 있으며, 구체적으로, 뇌 조직내 염증 반응을 억제 또는 완화할 수 있다.

[36] 일 구체예에 있어서, 셀렉시팍은 뇌 조직내 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인 또는 염증성 사이토카인의 발현 및 생성을 억제할 수 있다. 구체적으로, 셀렉시팍은 LPS에 의해 유도된 염증 인자(예를 들어, COX-2, IL-6, IL-1β, 또는 TNF-α)를 감소시키거나 항염증성 사이토카인(예를 들어, TGF-β, 또는 IL-10)을 증가시킬 수 있다.

[37] 본 발명의 실시예에서는, 셀렉시팍이 뇌 조직 내에서, 염증유발 인자로 알려진 LPS에 의해 유도되는 염증성 사이토카인 및 전염증성 사이토카인의 발현 및/또는 생성을 효과적으로 억제하는 활성이 있음을 확인하였으며, 구체적으로 LPS에 의한 COX-2, IL-1β, IL-6, 또는 TNF-α의 생성 억제 활성이 있음을 확인하였다. 여러 가지 염증유발 인자 중에서, 내독소의 하나인 LPS는 전염증성 사이토카인의 분비를 증진시키고 이로 인해 산화질소, 프로스타글란딘 등의 염증매개 물질이 분비되며, 과도한 염증반응에 의해 다양한 염증질환이 발병된다.

[38] 일 실시예에 있어서, 셀렉시팍은 LPS에 의한 전염증성 반응을 억제하여, 뇌 조직내 과도한 염증반응으로 유발될 수 있는 퇴행성 뇌질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[39] 셀렉시팍은 뇌 조직내 인플라마좀(inflammasome)의 형성 또는 사이클린-의존성 카이네이즈(cyclin-dependent kinase: CDK)의 수준을 억제할 수 있다. 구체적으로, 셀렉시팍은 LPS 등으로 인해 유도된 염증반응에 의해 생성되는 NLRP3(nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein-3)의 발현을 감소시키거나 억제함으로써, NLRP3 인플라마좀 경로를 억제하거나 CDK6의 발현을 감소시키거나 억제함으로써, CDK4/6의 저해제로 작용할 수 있다.

[40] 인플라마좀(inflammasome)은 NLRP3, NLRC4, AIM2, NLRP6 등을 포함한 여러 단백질로 이루어진 단백질 복합체 군으로서, 세균감염, 스트레스 및 손상 신호에 반응하여 카스파제-1을 직접 활성화시켜서, 강력한 전염증 사이토카인(예를 들어, IL-1β 또는 IL-18)의 분비를 유도하고, 염증성 세포사인 파이롭토시스를 일으킨다. 또한, CDK4/6는 세포주기 조절 단백질로, 세포주기에 관련하여 세포의 DNA 합성 및 분열을 조절할 수 있으나, CDK4/6의 과활성이 신경세포의 생존과 세포주기 조절에 영향을 미쳐, 아밀로이드 베타 축적에 영향을 주며, 신경세포의 변성을 유도한다. 이에, CDK4/6 저해제는 염증 질환, 신경 및 신경변성 질환, 및 알츠하이머병 치료효과가 보고된다.

[41] 일 실시예에 있어서, 셀렉시팍은 뇌 조직 내에서 LPS에 의한 NLRP3 및 CDK6의 발현 또는 수준을 억제함으로써, 뇌 조직내 과도한 염증반응으로 유발될 수 있는 퇴행성 뇌질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있음을 확인하였다.

[42] 셀렉시팍은 미세아교세포 또는 성상세포의 활성을 억제할 수 있다. 구체적으로, 활성화된 미세아교세포 또는 활성화된 성상세포가 신경세포에 미치는 손상을 억제할 수 있다.

[43] 뇌에서 대식세포의 역할을 하는 미세아교세포는 중추신경계(central nervous system: CNS)내 면역반응을 조절하는 중요한 효과세포(effector cell)이다. 이들의 활성화는 약물이나 독소에 의한 이물질을 제거하고 신경 성장 인자를 분비하여 CNS의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 그러나, 손상된 뉴런으로부터 발생하는 신호, 외부 자극에 의해 변형된 비정상적인 형태의 단백질의 축적, 병원체의 침투와 같은 유해한 스트레스에 노출되면 미세아교세포의 활성이 지나치게 증가되어 신경세포의 손상을 유발함으로써 알츠하이머 질환, 파킨슨질환, 다발성 경화증, 뇌경색 등과 같은 퇴행성 신경질환을 일으킬 수 있다. 구체적으로, 과도하게 활성화된 미세아교세포는 정상 상태의 미세아교세포와는 달리 포식작용을 활발히 하고, 세포증식을 하며, TNF-α, IL-1β, IL-6 등과 같은 사이토카인, 케모카인, COX-2 등의 유전자를 발현시켜 염증매개 물질을 생성한다. 미세아교세포의 활성화는 손상된 세포를 제거하고 외부에서 침입하는 박테리아나 바이러스로부터 신경세포를 보호하는 일면이 있으나, 일산화질소(NO)와 COX-2에 의해 생성되는 프로스타글란딘, TNF-α 등은 신경세포에 독성을 나타내기 때문에 결과적으로 미세아교세포의 활성화는 신경세포의 손상을 악화시키게 되며, 퇴행성 뇌질환 또는 퇴행성 신경질환의 원인으로 작용한다. 또한, 성상세포 역시 정상적인 뇌활동을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 특히 신경세포의 시냅스 형성, 시냅스 숫자 조절, 시냅스 기능, 신경줄기세포의 신경으로의 분화에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 성상세포가 과도하게 반응성을 가지게 되면, 즉 과도한 활성화 상태를 유지하게 되면 신경세포의 사멸을 초래하고 이웃한 신경세포의 사멸도 유도하는 등, 퇴행성 뇌질환의 원인으로 작용하게 된다. 미세아교세포 및 성상세포의 과도한 활성화 원인물질로는

염증반응을 유발시킬 수 있는 박테리아의 내독소인 LPS, 인터페론-γ, 베타아밀로이드, 및 갱글리오사이드가 있다.

[44] 본 발명의 일 실시예에서는, 셀렉시팍이 뇌 조직 내에서 미세아교세포 및/또는 성상세포의 과도한 활성화 상태를 억제할 수 있음을 확인하였고, 따라서 셀렉시파그는 뇌 조직내 과도한 염증반응으로 유발될 수 있는 퇴행성 뇌질환을 예방, 개선 또는 치료하는데 유용할 수 있다.

[45] 셀렉시팍, 및 이의 약학적으로 허용가능한 염은 아밀로이드-베타의 응집을 억제하거나 응집체를 분해하고, 타우 단백질의 응집을 억제하거나 응집체를 분해할 뿐만 아니라, 타우 단백질의 인산화를 억제하는 효과가 우수하므로, 상기 셀렉시팍 또는 이를 포함하는 약학 조성물은 아밀로이드-베타의 응집 억제 및/또는 응집체의 분해, 타우 단백질의 응집 억제 및/또는 응집체의 분해, 및/또는 타우 단백질의 인산화 억제와 관련된 질환, 예컨대 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[46] 일 구체예에 있어서, 본 발명에 따른 약학 조성물은,

[47] (1) 아밀로이드-베타의 응집 수준이 정상보다 높거나 높을 위험이 있는 개체(환자);

[48] (2) 타우 단백질의 응집 수준이 정상보다 높거나 높을 위험이 있는 개체(환자);

[49] (3) 타우 단백질의 인산화 수준이 정상보다 높거나 높을 위험이 있는 개체(환자); 및

[50] (4) 상기 (1) 내지 (3) 중 2 가지 이상에 해당하는 개체(환자)

[51] 로 이루어진 군으로부터 선택된 개체(환자)에게 투여하기 위한 것일 수 있다.

[52] 본 발명의 일 실시예에서는, 셀렉시팍이 아밀로이드 과발현 알츠하이머 동물 모델에서 아밀로이드 베타 분해효소인 인슐린 분해효소(insulin degrading enzyme: IDE) 발현을 조절함으로써 아밀로이드 베타의 축적을 감소시킴을 확인하였다. 또한, 셀렉시팍이 또다른 알츠하이머병 동물모델인 타우 과발현 동물모델에서 타우 인산화효소인 DYRK1A(dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A) 및 p-CDK5 발현 및 활성도를 저해하여 타우과인산화를 억제함을 확인하였다.

[53] 본 명세서에서 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 화합물 또는 약학 조성물의 투여로 상기 질환의 발생, 확산 및 재발을 저해시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명에 따른 화합물 또는 약학 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[54] 본 명세서에서 용어 "정상"은 상기 약학 조성물의 적용 개체와 동종의 개체 중에서 상기 정의한 "퇴행성 뇌질환"을 갖지 않는 개체 또는 상기 개체로부터 분리 및/또는 배양된 뇌조직 또는 뇌세포 (뇌신경세포)일 수 있다.

[55] 본 명세서에서 용어, "억제"는 유전자의 전사, mRNA 프로세싱, 번역, 전좌 및 성숙 중 임의의 단계를 저해하거나, 단백질과 단백질간의 결합, 단백질의 활성화 또는 이를 통한 신호전달의 억제를 의미한다.

[56] 본 명세서에서 용어 "약학 조성물"은, 대상체로의 투여 시에 몇몇 유리한 효과를 부여하는 분자 또는 화합물을 지칭할 수 있다. 유리한 효과는 진단적 결정을 가능하게 하는 것; 질병, 증상, 장애 또는 병태의 개선; 질병, 증상, 장애 또는 질환의 발병의 감소 또는 예방; 및 일반적으로 질병, 증상, 장애 또는 병태의 대응을 포함할 수 있다.

[57] 본 명세서에서 용어 "퇴행성 뇌질환"은 뇌의 퇴행성 변화와 관련된 모든 질환, 특히, 뇌 및/또는 뇌신경세포에서의 아밀로이드-베타의 응집 등의 요인에 의하여 유발될 수 있는 모든 질환(뇌질환)을 포괄적으로 기재하기 위하여 사용된다.

[58] 일 구체예에서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병(Huntington's disease), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 노인성 치매, 다발성 경화증, 다발성 신경위축, 간질, 뇌병증(encephalophathy), 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 아밀로이드-베타의 응집(aggregation), 타우 단백질의 응집, 및/또는 타우 단백질의 인산화에 기인한 질병이라면 어느 질병이라도 대상이 될 수 있다.

[59] 본 명세서에서 용어 "인지"는 사고, 경험 및 감각을 통해 지식과 이해를 얻는 정신적 활동 또는 과정일 수 있다. 여기에는 지식, 주의, 기억 및 작업 기억, 판단 및 평가, 추론 및 계산, 문제 해결 및 의사 결정, 언어의 이해 및 생성과 같은 과정이 포함될 수 있다. 상기 인지 장애는 학습, 기억, 지각 및 문제 해결에 주로 영향을 끼치는 정신 건강 장애의 범주로서, 기억상실증, 치매 및 섬망(delirium)을 포함할 수 있다.

[60] 상기 기억력 개선은 신경해부학적 구조의 손상의 결과, 기억의 저장, 보유 및 재수집을 개선하는 것을 의미할 수 있다. 또한, 진행성일 수 있는 기억력 장애(알츠하이머병을 포함)를 개선하는 것을 의미할 수 있다.

[61] 본 발명에서, "기억력 개선" 및 "인지능력 개선"은 신체적인 피로, 수면 부족, 지나친 알코올 섭취, 치매 등에 의해 뇌가 위축되고 뇌 신경세포의 파괴가 이루어질 때 일어나는 기억력 감퇴, 기억력 장애 또는 인지능력 감소를, 뇌 세포를 손상시키는 유해물질을 조절하여 인지능력을 유지하거나, 뇌의 신경전달물질을 조절하여 저하된 인지능력을 개선하는 효과를 의미한다. 상기 기억력은 필요한 정보를 받아들여 뇌 속에 저장했다가 필요할 때 꺼내어 사용하는 능력이며, 인지능력은 사물을 분별하여 인지할 수 있는 능력을 말한다.

[62] 본 발명의 약학 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[63] 상기 약학 조성물은, 상기 유효성분에 더하여, 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제, 충진제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 유화제(계면활성제), 윤활제, 감미제, 향미제, 현탁제, 보존제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 상기 약학 조성물이 적용되는 제형에 따라 적절히 조절될 수 있으며, 약제학 분야에서 통상적으로 사용될수 있는 모든 보조제들 중에서 하나 이상 선택하여 사용할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 약물의 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가 적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과 립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가, 당해 기술분야의 적정한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[64] 상기 유효성분의 유효량 또는 상기 약학 조성물은 임상투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강 (Nasal), 흡입, 안구 또는 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있고, 병변부위 국소 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 상기 약학 조성물은 활성성분이 위에서의 분해되지 않도록 하기 위하여 활성 성분을 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호 가능한 제형으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 상기 약학 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[65] 또한, 본 명세서에서 용어 "유효성분"은 본 명세서에서 언급된 물질이 본 명세서에서 언급된 약리학적 활성(예를 들면, 퇴행성 뇌질환 치료)을 달성하기 위해 사용되는 생리활성 물질을 의미하는 것일 수 있고, 이는 본 명세서에서 언급된 질병을 치료하기 위해 상기 물질을 단독 투여하거나, 다른 물질과 함께 병용 투여, 또는 부가적으로 투여하는 것과는 구분된다. 즉, 상기 셀렉시팍은 퇴행성 뇌질환의 직접적인 치료 효과를 위한 단독의 유효성분으로 투여되거나 다른 약물과 병용 투여될 수 있다.

[66] 상기 약학 조성물은 수성 또는 유성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 등의 형태로 제제화될 수 있으며, 제제화를 위하여 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 약학 조성물을 제제화할 경우에 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리

에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(Witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[67] 상기 약학 조성물은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산 또는 글루타치온과 같은 항산화제, 킬레이트화제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제 가 약제로 사용될 수 있다.

[68] 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 그 투여 용량에 특별한 제약은 없고, 체내 흡수도, 체중, 환자의 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수있다. 본 발명의 약학 조성물은 유효량 범위를 고려하여 제조하도록 하며, 이렇게 제형화된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 약제의 투여를 감시하거나 관찰하는 전문가의 판단과 개인의 요구에 따라 전문화된 투약법을 사용하거나 일정 시간 간격으로 수회 투여될 수 있다. 약학 조성물의 투여량은 1일 1 ug/kg/일 내지 1,OOO mg/kg/일일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 1일 또는 1회 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[69] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 퇴행성 뇌질환의 치유를 필요로 하는 개체일 수 있다.

[70] 또한, 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료하기 위한 용도를 제공한다.

[71] 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 인지장애, 학습장애 또는 기억력 장애를 예방 또는 치료하기 위한 용도를 제공한다.

[72] 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[73] 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 인지장애, 학습장애 또는 기억력 장애의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 용도를 제공한다.

[74] 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함하는, 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[75] 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 대상에 투여하는 것을 포함하는, 인지장애, 학습장애 또는 기억력 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[76]

[77] 또한, 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 신경세포에서의 과도한 염증반응에 의해 손상된 신경세포 보호용 조성물을 제공할 수 있다. 앞서 기술한 바와 같이, 셀렉시팍은 신경세포 또는 뇌

조직에서 과도한 염증반응을 억제할 수 있어, 염증반응에 의한 신경세포의 손상을 억제할 수 있다.

[78] 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 염증반응에 의한 신경세포의 손상을 억제하기 위한 용도를 제공한다.

[79] 또한 본 발명은 염증반응에 의한 신경세포 손상의 억제를 필요로 하는 개체에게 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 투여하는 것을 포함하는, 염증반응에 의한 신경세포의 손상을 억제하는 방법을 제공한다.

[80]

[81] 나아가, 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 미세아교세포 또는 성상세포의 활성화 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[82] 다른 양상으로, 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 신경염증 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

[83] 또 다른 양상으로, 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 인지기능, 학습능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

[84] 또 다른 양상으로, 본 발명은 셀렉시팍 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 타우 단백질의 응집 억제, 타우 단백질 응집체의 분해 및/또는 타우 단백질 인산화 억제를 위한 건강기능성 식품을 제공한다.

[85] 상기 건강 기능성 식품은 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분(이하, '기능성 원료')을 사용하여 제조한 식품으로, 건강을 유지하거나 소정의 질병 또는 증상을 예방 및/또는 개선하는데 도움을 주는 모든 식품을 의미하며, 최종 제품 형태에는 특별한 제한이 없다. 예컨대, 상기 건강 기능성 식품은 각종 식품, 음료 조성물, 식품 첨가제 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[86] 상기 건강 기능성 식품에 함유된 유효성분의 함량은 식품의 형태, 소망하는 용도 등에 따라 적절하게 특별한 제한이 없다. 상기 건강 기능성 식품은 단독 또는 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 함량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 명세서의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다.

[87] 상기 건강 기능성 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 또는 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 중진제 (치즈, 초콜릿등), 펙트산 또는 그의 염, 알긴산 또는 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 함유할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 전체 건

강 기능성 식품 100 중량부 당 0.001 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[88]

발명의 효과

[89] 본 발명에서 셀렉시팍은 LPS에 의해 유발된 뇌 조직 내 전염증성 또는 염증성 사이토카인의 발현 및 생성을 억제하고, 미세아교세포 또는 성상세포의 활성을 억제하며, NLRP3 인플라마좀 활성 및 CDK6 발현을 억제하였다. 또한, 셀렉시팍을 투여한 아밀로이드 과발현 알츠하이머 동물 모델에서 아밀로이드 베타 분해 효소인 IDE 발현을 조절함으로써 아밀로이드 베타의 축적을 감소시키고, 이와 동시에 알츠하이머 동물 모델에서 미세아교세포와 성상세포의 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 또 다른 알츠하이머병 동물모델인 타우 과발현 동물 모델에서 타우 인산화효소인 DYRK1A 및 p-CDK5 발현 및 활성도를 저해하여 타우과인산화를 억제함을 확인하였다. 이러한 실험결과에 비추어 볼 때, 셀렉시팍은 퇴행성 뇌질환, 인지장애, 학습장애 또는 기억력 장애의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

[90]

도면의 간단한 설명

[91] 도 1은 셀렉시팍의 처리 농도에 따른 미세아교세포 BV2에 대한 세포독성을 MTT 어세이를 통해 분석한 그래프이다.

[92] 도 2a 및 2b는 셀렉시팍 처리((a) 1μM 및 (b) 5μM)에 따른 LPS에 의해 유도된 BV2 미세아교세포의 전염증성 사이토카인의 발현 수준을 실시간 PCR로 분석한 그래프이다.

[93] 도 3a 및 3b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 염증이 유도된 미세아교세포의 활성 수준을 면역 형광 염색(항-Iba-1 항체)을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[94] 도 4a 및 4b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 염증이 유도된 성상교세포의 활성 수준을 면역 형광 염색(항-GFAP 항체)을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[95] 도 5a 및 5b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 COX-2의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[96] 도 6a 및 6b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 IL-6의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[97] 도 7a 및 7b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 IL-1β의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[98] 도 8a 및 8b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 TNF-α의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[99] 도 9a 및 9b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 NLRP3의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[100] 도 10a 및 10b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 CDK6의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[101] 도 11a, 11b 및 11c는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 치매 동물 모델(5xFAD)에서 아밀로이드 플라그 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1).

[102] 도 12a, 12b 및 12c는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 치매 동물(5xFAD)에서 IDE의 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[103] 도 13a 및 13b는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 치매 동물(5xFAD)에서 미세아교세포의 활성 수준을 면역 형광 염색(항-Iba-1 항체)을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[104] 도 14a 및 14b는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 치매 동물(5xFAD)에서 GFAP의 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[105] 도 15a 및 15b는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 치매 동물(5xFAD)에서 IL-1β의 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[106] 도 16a 및 16b는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 치매 동물(5xFAD)에서 NLRP3의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[107] 도 17a 및 17b는 셀렉시팍 처리에 따른 타우 과발현 치매 동물(PS19)에서 타우 과인산화 정도를 AT8 항체를 이용하여 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[108] 도 18a 및 18b는 셀렉시팍 처리에 따른 타우 과발현 치매 동물(PS19)에서 타우 과인산화 정도를 AT180 항체를 이용하여 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[109] 도 19a 및 19b는 셀렉시팍 처리에 따른 타우 과발현 치매 동물(PS19)에서 타우 카이네이즈 DYRK1A 발현 정도를 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[110] 도 20a 및 20b는 셀렉시팍 처리에 따른 알츠하이머병 동물 모델(PS19)에서 타우 카이네이즈의 p-CDK5 발현 정도를 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[111]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[112] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다. 실시예들은 다양한 변환을 가할 수 있는 바, 실시예들은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 다양한 형태로 구현될 수 있다.

[113]

[114] 실험방법

[115] **1.** 시약

[116] LPS(Sigma, Cat no: L2630, Escherichia coli) 시약은 *in vivo* 실험을 위해 PBS에 용해시켜 사용하였다. *in vivo* 실험에서 신경염증을 포함한 중추신경계 면역 반응을 유도하기 위해 10mg/kg의 LPS를 8시간 간격으로 처리하였다. 또한, 셀렉시팍(selexipag; Invivochem, Cat no: V8461, Libertyville, IL, USA)은 시험관 내 실험을 위해 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시켜 사용하였고, *in vivo* 실험에서는 비히클(1% DMSO가 용해된 식염수)에 용해시켜 사용하였다.

[117]

[118] **2.** 세포주 및 배양조건

[119] BV2 미세아교세포(BV2 microglial cells; Dr. Kyung-Ho Suk 박사로부터 입수)를 고함량 글루코스 DMEM(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 배지를 이용하여 배양하였으며, 상기 배지에는 5% 태아 소 혈청(FBS, Invitrogen), 100U/mL의 페니실린 및 100μg/mL의 스트렙토마이신이 포함되어 있으며, 배양은 5 % CO_2 및 37℃의 온도가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

[120]

[121] **3.** 면역 형광 염색

[122] 야생형 C57BL6 마우스(수컷, 8주령)를 무병원균 상태의 22±2℃, 50±5% 습도, 12시간 명/암 주기 조건에서 사료와 물의 접근을 자유롭게 한 상태로 사육하였다. 마우스는 대조군(Veh), LPS 처리군(LPS) 및 1mg/kg 셀렉시팍과 LPS 처리군(Sel+LPS)의 3개의 실험군으로 무작위 할당하였다. 각 실험군의 마우스에는 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클(1% DMSO in saline)을 7일 동안 매일 복강 내(i.p.) 투여하였다. 7일째 마지막 투여하고 30분 후, 10mg/kg LPS 또는 PBS를 복강내로 투여한 다음, 8시간 후, 마우스를 관류시키고 각각 PBS 및 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다.

[123] 또한, 알츠하이머병 동물 모델 마우스인 아밀로이드 과발현 치매동물 5xFAD 및 타우과발현 치매동물 PS19 마우스(수컷, 4개월령)를 무병원균 상태의 22±2℃, 50±5% 습도, 12시간 명/암 주기 조건에서 사료와 물의 접근을 자유롭게 한 상태로 사육하였다. 마우스는 대조군 (Veh) 및 1 mg/kg 셀렉시팍 2개의 실험군으로 무작위 할당하였다. 각 실험군의 마우스에는 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클(생리식염수 중 1% DMSO)을 14일 동안 매일 복강 내(i.p.) 투여하였다. 14일째 마지막 투여 2시간 후 마우스를 관류시키고 각각 PBS 및 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 면역 형광 염색을 위한 뇌 절편의 수득을 위해, 4℃에서 24시간 동안 4% 파라포름알데히드에 보관된 뇌 조직을 30% 수크로스가 함유된 PBS에 72시간 동안 담근 다음, 동결절편기(Leica CM1850, 베츨러, 독일)를 이용하여 30 ㎛ 두께가 되도록 절편화시켰다. 뇌 절편은 실온에서 10% 정상 염소 혈청(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 2시간 동안 차단한 후, 일차 항체로 밤새도록 4℃에서 면역염색을 수행하였다. 그런 다음, 뇌 절편은 PBST 버퍼로 세척하고 Alexa 594- 또는 Alexa 488-컨쥬게이션된 2차 항체로 실온에서 2시간 동안 반응하였다. DAPI(Vector Labs, Burlingame, CA)가 포함된 벡타쉴드(Vectashield) 마운팅 용액을 이용하여 유리 슬라이드에 장착한 후 면역염색된 조직의 형광 현미경 이미지를 얻었고(DMi8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), 이미징 분석을 수행하였다(ImageJ, US National Institutes of Health, 베데스다, 메릴랜드, 미국).

[124]

[125] **4. 통계분석**

[126] 데이터 분석은 Graphpad Prism 8 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 2개 실험군의 비교는 t-test, 3개 실험군의 비교는 일원 ANOVA 및 Tukey 테스트를 사용하여 수행하였다. $p<0.05$을 보이는 값에 대해 유의미한 것으로 간주하였고, 결과는 평균 ± 표준편차(SD)로 표시하였다(*:$p < 0.05$, **:$p < 0.01$, ***:$p < 0.001$).

[127]

[128] **실시예 1. 셀렉시팍의 세포 독성 분석**

[129] 셀렉시팍의 미세아교세포 BV2 세포주에 대한 세포독성이 있는지 여부를 확인하기 위해 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT) 분석법 분석을 수행하였다.

[130] 구체적으로, BV2 미세아교세포에 비히클 또는 셀렉시팍을 농도별(1, 5, 10, 25 또는 50 μM)로 24시간 동안 처리하여 농도별 셀렉시팍의 세포 생존력을 분석하였다. 이를 위해, BV2 미세아교세포를 먼저 1시간 동안 96-웰 플레이트($2x10^5$ 세포/웰)에서 FBS가 없는 배지로 배양하였고, 이후 1, 5, 10, 25 및 50 μM의 셀렉시팍을 농도별로 24시간 동안 처리하였으며, 대조군으로는 1% DMSO(비히클)를 처리한 군을 사용하였다. 이후 세포를 MTT 용액과 함께 2시간 동안 배양한 다음, DMSO를 처리하여 포르마잔 생성물을 용해시켰다. 20분 후, SPECTROstar

Nano 마이크로플레이트 판독기(BMG Labtech, 독일)를 사용하여 570nm(기준 파장 660nm)에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[131] 도 1은 셀렉시팍의 처리 농도에 따른 미세아교세포 BV2에 대한 세포독성을 MTT 어세이를 통해 분석한 그래프이다.

[132] 도 1에 나타낸 바와 같이, 셀렉시팍을 농도별로 처리한 BV2 미세아교세포에서 세포 독성이 유발되지 않은 것으로 나타났다. 따라서, 셀렉시팍이 처리 농도에 관계없이 세포에 유해한 독성을 유발하지 않음을 알 수 있었다.

[133]

[134] **실시예 2. BV2 미세아교세포에서 셀렉시팍의 LPS 유도 전염증성 사이토카인의 수준 감소**

[135] 셀렉시팍이 LPS(Lipopolysaccharid)로 매개되는 전염증성 사이토카인의 수준을 조절할 수 있는지를 확인하기 위해, BV2 미세아교세포를 셀렉시팍(1μM, 5μM) 또는 1% DMSO(비히클)로 30분 동안 처리하고, 이후 200 ng/mL LPS 또는 PBS로 5.5시간 동안 처리한 후, 실시간 PCR을 수행하여 전염증성 사이토카인인 COX-2, IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 발현 수준을 분석하였다. 구체적으로, Superscript cDNA Premix Kit II(GeNetBio)로 합성된 cDNA는 Fast SYBR Green Master Mix(Thermo Fisher Scientific, CA, USA) 및 QuantStudio째 5 시스템(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 40 사이클의 실시간 PCR로 분석하였다. GAPDH(housekeeping gene) 사이클의 역치(Ct) 값으로 정규화하였다. LPS 단독 처리군 및 LPS와 셀렉시팍을 함께 처리한 군에서의 배수 변화는 대조군(비히클 처리)을 기준으로 계산하였다. 그 결과를 도 2a 및 2b에 나타내었다.

[136] 도 2a 및 2b는 셀렉시팍 처리((a) 1μM 및 (b) 5μM)에 따른 LPS에 의해 유도된 BV2 미세아교세포의 전염증성 사이토카인의 발현 수준을 실시간 PCR로 분석한 그래프이다.

[137] 도 2a 및 2b에 나타낸 바와 같이, 각각 1μM 또는 5μM 셀렉시팍을 처리한 군에서는 비히클을 처리한 대조군에 비해 LPS에 의한 전염증성 사이토카인인 COX-2, IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 발현수준이 모두 감소된 것으로 나타났고, 5μM 셀렉시팍 처리군에서 1μM 셀렉시팍 처리 군에 비교하여 전염증성 사이토카인의 수준이 더욱 감소됨을 확인할 수 있었다.

[138]

[139] **실시예 3. 야생형 마우스에서 셀렉시팍에 의한 LPS 매개 미세아교세포 및 성상세포의 활성 억제**

[140] 다음으로, 마우스 동물모델에서 LPS로 유도되는 미세아교세포증(microgliosis) 및 성상교세포증(astrogliosis)에 대한 셀렉시팍의 효능을 분석하는 실험을 수행하였다.

[141] 구체적으로, 8주령 야생형 마우스에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 7일 동안 매일 복강 투여하고, 7일째에 셀렉시팍 또는 비히클의 복강 투여 30분 후, LPS(10 mg/kg) 또는 PBS를 복강 투여하였다. 그 다음, LPS 주입 8시간 후, 마우스로부

터 수득한 뇌절편을 대상으로 항-Iba-1(Wako, 019-19741, 1:500, rabbit) 또는 항-GFAP 항체(Invitrogen, 13-0300, 1:500, Rat)로 상기 실험방법에서 언급한 방법으로 면역 형광 염색을 수행하였다. 그 결과를 각각 도 3a 및 3b와 도 4a 및 4b에 나타내었다.

[142] 도 3a 및 3b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 염증이 유도된 미세아교세포의 활성 수준을 면역 형광 염색(Iba-1 항체)을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[143] 도 4a 및 4b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 염증이 유도된 성상교세포의 활성 수준을 면역 형광 염색(GFAP 항체)을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[144] 도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이, 1 mg/kg 셀렉시팍 처리 군의 경우, 대뇌피질 및 해마 CA1 영역에서 미세아교세포의 활성화 지표인 Iba-1의 형광 강도 및 Iba-1의 백분율 면적은 상당히 감소되어 있는 것으로 나타났다. 그러나, 1 mg/kg의 셀렉시팍을 처리한 군의 대뇌피질 및 해마에서는 Iba-1-양성 세포의 수에 변화가 없음을 확인하였다.

[145] 도 4a 및 4b에 나타낸 바와 같이, 1 mg/kg 셀렉시팍 처리 군의 경우, 성상세포의 활성화 지표인 GFAP의 형광 강도 및 GFAP의 면적 백분율은 대뇌피질 및 해마 CA1 영역에서 유의미하게 감소하였다. 또한, 1 mg/kg 셀렉시팍의 처리는 대뇌피질 및 해마 DG 영역에서 GFAP-양성 세포의 수를 감소시키는 것으로 나타났다.

[146] 이로부터 셀렉시팍이 야생형 마우스에서 LPS 매개의 미세아교세포 및 성상세포의 활성화를 조절할 수 있음을 알 수 있었고, 특히 LPS에 의해 유도된 이들 세포의 활성화 억제를 통해 미세아교세포증 및 성상교세포증을 개선 및 완화시킬 수 있음을 확인하였다.

[147]

[148] **실시예 4. 야생형 마우스에서 셀렉시팍에 의한 LPS 매개 COX-2 및 IL-6 발현 억제**

[149] 셀렉시팍이 LPS에 의해 유도되는 전염증성 사이토카인인 COX-2 및 IL-6 발현을 억제할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 8주령 야생형 마우스에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 7일 동안 매일 복강 투여하고, 7일째에 셀렉시팍 또는 비히클의 복강 투여 30분 후, LPS(10 mg/kg) 또는 PBS를 복강 투여하였다. 그 다음, LPS 주입 8시간 후, 항-COX-2(Abcam, ab15191, 1:200, rabbit) 또는 항-IL-6 항체(Santa Cruz, SC57315, 1:50, mouse)로 마우스의 분리된 뇌 절편에 대한 면역 형광 염색을 수행하였다. 그 결과를 도 5a 및 5b와 도 6a 및 6b에 나타내었다.

[150] 도 5a 및 5b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 COX-2의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색으로 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[151] 도 6a 및 6b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 IL-6의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색으로 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[152] 도 5a 및 5b와 도 6a 및 6b에 나타낸 바와 같이, 1 mg/kg 셀렉시팍 처리군의 경우, 야생형 마우스의 대뇌피질 및 해마에서 LPS로 유도된 COX-2 및 IL-6 발현이 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

[153] 이상의 결과로부터 셀렉시팍이 생체 내에서 LPS로 유도되는 전염증성 사이토카인인 COX-2 및 IL-6의 발현을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[154]

[155] **실시예 5. 야생형 마우스에서 셀렉시팍에 의한 LPS 매개 IL-1β 및 TNF-α 발현 억제**

[156] 셀렉시팍이 LPS에 의해 유도되는 전염증성 사이토카인인 IL-1β 및 TNF-α 발현을 억제할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 8주령 야생형 마우스에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 7일 동안 매일 복강 투여하고, 7일째에 셀렉시팍 또는 비히클의 복강 투여 30분 후, LPS(10 mg/kg) 또는 PBS를 복강 투여하였다. 그 다음, LPS 주입 8시간 후, 항-IL-1β (Abcam, ab9722, 1:200, rabbit) 또는 항-TNF-α 항체 (Novus, NBP-19532, 1:200, rabbit)로 마우스의 분리된 뇌 절편에 대한 면역 형광 염색을 수행하였다. 그 결과를 각각 도 7a 및 7b와 도 8a 및 8b에 나타내었다.

[157] 도 7a 및 7b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 IL-1β의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다.

[158] 도 8a 및 8b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 TNF-α의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다.

[159] 도 7a 및 7b에 나타낸 바와 같이, 1 mg/kg 셀렉시팍 처리군의 경우, 야생형 마우스의 대뇌피질 및 해마에서 LPS로 유도된 IL-1β 발현이 효과적으로 억제됨을 확인하였다.

[160] 도 8a 및 8b에 나타낸 바와 같이, 1 mg/kg 셀렉시팍 처리군의 경우, 야생형 마우스의 해마 CA1 부위에서 LPS로 유도된 TNF-α 발현이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다.

[161] 이상의 결과는 셀렉시팍이 생체 내에서 LPS로 유도되는 IL-1β 및 TNF-α 발현을 조절할 수 있음을 의미하며, 이들 전염증성 사이토카인의 발현을 억제할 수 있음을 시사한다.

[162]

[163] **실시예 6. 야생형 마우스에서 셀렉시팍에 의한 LPS 유도 NLRP3/CDK6 발현 수준 감소**

[164] LPS에 의한 전염증성 사이토카인 유도에 따른 NLRP3 인플라마좀 형성촉진 및 CDK6 발현을 셀렉시팍이 억제함으로써 뇌염증을 조절할 수 있는지 여부를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[165] 구체적으로, 8주령 야생형 마우스에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 7일 동안 매일 복강 투여하고, 7일째에 셀렉시팍 또는 비히클의 복강 투여 30분 후, LPS(10 mg/kg) 또는 PBS를 복강 투여하였다. 그 다음, LPS 주입 8시간 후, 항-NLRP3 항체(Novus, NBP-12446, 1:500, rabbit) 또는 항-CDK6 항체(Invitrogen, PA5-27978, 1:200, rabbit) 로 마우스로부터 분리된 뇌조직 절편을 면역 형광 염색하였다. 그 결과를 도 9a 및 9b와 도 10a 및 10b에 나타내었다.

[166] 도 9a 및 9b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 NLRP3의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다.

[167] 도 10a 및 10b는 셀렉시팍 처리에 따른 LPS에 의해 유도된 CDK6의 발현 억제 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다.

[168] 도 9a 및 9b와 도 10a 및 10b에 나타낸 바와 같이, 셀렉시팍 (1 mg/kg, i.p.)의 처리는 야생형 마우스의 대뇌피질에서 LPS에 의한 NLRP3 발현을 유의하게 감소시킬뿐만 아니라, 대뇌피질 및 해마영역에서 LPS로 자극된 CDK6 발현을 유의하게 억제하는 것으로 나타났다.

[169] 이는 셀렉시팍이 생체 내에서 LPS로 유도되는 NLRP3 인플라마좀 형성 및 CDK6 발현도 억제할 수 있음을 의미한다.

[170]

[171] **실시예 7. 아밀로이드 과발현 치매 동물에서 셀렉시팍에 의한 아밀로이드 플라크 감소**

[172] 야생형 마우스에서 확인한 셀렉시팍의 효능을 알츠하이머병 동물 모델을 이용하여 알츠하이머병의 대표적인 지표인 아밀로이드 베타 발현 수준 감소에 대해 분석하는 실험을 수행하였다.

[173] 구체적으로, 3~4개월령 알츠하이머병 동물 모델 마우스(5xFAD)에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 14일 동안 매일 복강 투여하고, 14일째에 셀렉시팍 투여하였다. 2시간 후, 항-6E10 항체(Biolegend, 803002, 1:500, mouse)를 이용하여 면역 형광 염색을 하고, 그 결과를 도 11a, 11b 및 11c에 나타내었다.

[174] 도 11a, 11b 및 11c은 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 동물에서 아밀로이드 플라크(6E10) 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1).

[175] 도 11a, 11b 및 11c에 나타낸 바와 같이 셀렉시팍(1 mg/kg, i.p.)의 처리는 아밀로이드 과발현 동물의 대뇌피질 및 해마이행부(subiculum) 영역에서 아밀로이드 플라크 (6E10) 수가 유의하게 감소시켰다. 이는 셀렉시팍이 알츠하이머병 동물 모델의 생체 내에서 6E10이 표지하는 아밀로이드 플라크 발현을 억제할 수 있음을 의미한다.

[176]

[177] **실시예 8. 아밀로이드 과발현 동물에서 셀렉시팍에 의한 아밀로이드 베타 분해 효소 IDE의 발현 증가**

[178] 다음으로, 아밀로이드 과발현 동물 모델에서 셀렉스팍에 의한 아밀로이드 플라크를 저해하는 분자기전을 규명하기 위한 실험을 수행하였다.

[179] 구체적으로, 3~4개월령 아밀로이드 과발현 동물(5xFAD)에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 14일 동안 매일 복강 투여하고, 14일째에 셀렉시팍 투여 2시간 후, 마우스로부터 수득한 뇌절편을 대상으로 IDE 항체(Abcam,ab32216, 1:200, rabbit)를 이용하여 면역 형광염색을 하였다. 그 결과를 도 12a, 12b 및 12c에 나타내었다.

[180] 도 12a, 12b 및 12c는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 동물에서 IDE의 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[181] 도 12a, 12b 및 12c에 나타낸 바와 같이 셀렉시팍(1 mg/kg, i.p.)의 처리는 아밀로이드 과발현 동물의 해마 영역의 CA1과 DG 부위에서 IDE의 발현을 유의미하게 증가시키는 것으로 나타났다.

[182] 이는 셀렉시팍이 아밀로이드 과발현 동물에서 아밀로이드 베타 분해 효소인 IDE의 발현을 증가시킴으로써 아밀로이드 플라크가 감소할 수 있음을 의미한다.

[183]

[184] **실시예 9. 아밀로이드 과발현 동물에서 셀렉시팍에 의한 미세아교세포 및 성상세포의 활성 억제**

[185] 다음으로, 아밀로이드 과발현 동물에서 셀렉시팍에 의한 미세아교세포증 및 성상교세포증에 대한 효능을 분석하는 실험을 수행하였다.

[186] 구체적으로, 3~4개월령 아밀로이드 과발현 동물(5xFAD)에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 14일 동안 매일 복강 투여하고, 14일째에 셀렉시팍 투여 2시간 후, 마우스로부터 수득한 뇌절편을 대상으로 Iba-1(Wako, 019-19741, 1:500, rabbit) 또는 GFAP 항체(Invitrogen, 13-0300, 1:500, Rat)를 이용하여 면역 형광 염색을 수행하였다. 그 결과를 각각 도 13a 및 13b와 도 14a 및 14b에 나타내었다.

[187] 도 13a 및 13b는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 동물에서 미세아교세포의 활성 수준을 면역 형광 염색(Iba-1 항체)을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[188] 도 14a 및 14b는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 동물에서 성상교세포의 활성 수준을 면역 형광 염색(GFAP 항체)을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[189] 도 13a 및 13b에 나타낸 바와 같이, 1 mg/kg 셀렉시팍 처리 군의 경우, 대뇌피질 및 해마 CA1과 DG 영역에서 미세아교세포의 활성화 지표인 Iba-1의 형광 강도, Iba-1의 백분율 면적 및 Iba-1-양성 세포수가 감소되었다.

[190] 또한, 도 14a 및 14b에 나타낸 바와 같이, 1 mg/kg 셀렉시팍 처리 군의 경우, 성상세포의 활성화 지표인 GFAP의 형광 강도, GFAP의 백분율 면적 및 GFAP 양성 세포수는 대뇌피질 및 해마 CA1과 DG 영역에서 유의미하게 감소하였다.

[191] 이로부터 셀렉시팍이 아밀로이드 과발현 동물에서 미세아교세포 및 성상세포의 활성화를 조절할 수 있음을 알 수 있고, 특히 아밀로이드 과발현 동물에서 미세아교세포 및 성상세포 활성화 억제를 통해 미세아교세포증 및 성상교세포증을 개선 및 완화시킬 수 있음을 확인하였다.

[192]

[193] **실시예 10. 아밀로이드 과발현 동물에서 셀렉시팍에 의한 IL-1β 및 NLRP3 발현 수준 감소**

[194] 다음으로, 아밀로이드 과발현 동물에서 퇴행성 뇌 질환과 연관이 깊다고 알려진 전염증성 사이토카인인 IL-1β 발현 및 IL-1β를 활성화시키는 NLRP3 인플라마좀 형성 감소에 대한 셀렉시팍의 효능을 분석하는 실험을 수행하였다.

[195] 구체적으로, 3~4개월령 아밀로이드 과발현 동물(5xFAD)에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 14일 동안 매일 복강 투여하고, 14일째에 셀렉시팍 투여 2시간 후, 마우스로부터 수득한 뇌절편을 대상으로 IL-1β(Abcam, ab9722, 1:200, rabbit) 및 NLRP3(Adipogen, AG-20B-0014-100c, 1:200, mouse) 항체를 이용하여 면역 형광 염색 을 수행하였다. 그 결과를 도 15a 및 15b와 도 16a 및 16b에 나타내었다.

[196] 도 15a 및 15b는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 동물에서 전염증성 사이토카인인 IL-1β의 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[197] 도 16a 및 16b는 셀렉시팍 처리에 따른 아밀로이드 과발현 동물에서 NLRP3 인플라마좀의 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[198] 도 15a 및 15b에 나타낸 바와 같이 셀렉시팍(1 mg/kg, i.p.)의 처리는 아밀로이드 과발현 동물의 대뇌피질 및 해마의 CA1 및 DG영역에서 전염증성 사이토카인인 IL-1β의 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다.

[199] 도 16a 및 16b에 나타낸 바와 같이 셀렉시팍(1 mg/kg, i.p.)의 처리는 아밀로이드 과발현 동물의 대뇌피질 영역에서 NLRP3 인플라마좀의 발현을 유의미하게 감소시키는 것으로 나타났다.

[200] 이는 셀렉시팍이 아밀로이드 과발현 동물의 생체 내에서 전염증성 사이토카인인 IL-1β 및 NLRP3 인플라마좀의 발현을 억제할 수 있음을 의미한다.

[201]

[202] **실시예 11. 타우 과발현 동물에서 셀렉시팍에 의한 타우 과인산화 지표인 AT8 및 AT180 발현 수준 감소**

[203] 야생형 마우스에서 검증된 셀렉시팍의 효능을 또다른 알츠하이머병 동물 모델인 타우 과인산화 마우스 모델(PS19)에서 타우 과인산화 지표인 AT8 및 AT180의 발현 수준에 대한 셀렉시팍의 효능을 분석하는 실험을 수행하였다.

[204] 구체적으로, 3~4개월령 타우 과발현 동물(PS19)에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 14일 동안 매일 복강 투여하고, 14일째에 셀렉시팍 투여 2시간 후, 마우스로부터 수득한 뇌절편을 대상으로 항-AT8(Invitrogen, mn1020, 1:200, mouse) 및

항-AT180(Invitrogen, mn1040, 1:200, mouse)로 상기 실험방법에서 언급한 방법으로 면역 형광염색 하였다. 그 결과를 도 17a 및 17b와 도 18a 및 18b에 나타내었다.

[205] 도 17a 및 17b는 셀렉시팍 처리에 따른 타우 과발현 동물에서 타우 과인산화 지표인 AT8의 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[206] 도 18a 및 18b는 셀렉시팍 처리에 따른 타우 과발현 동물에서 타우 과인산화 지표인 AT180 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[207] 도 17a 및 17b에 나타낸 바와 같이 셀렉시팍(1 mg/kg, i.p.)의 처리는 타우 과발현 동물(PS19)의 해마 CA1과 DG영역에서 타우 과인산화 지표인 AT8의 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다.

[208] 또한, 도 18a 및 18b에 나타낸 바와 같이 셀렉시팍(1 mg/kg, i.p.)의 처리는 타우 과발현 동물의 대뇌피질 및 해마의 CA1과 DG 영역에서 타우 과인산화 지표인 AT180의 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다.

[209] 이로부터 셀렉시팍이 타우과발현 동물에서 타우 과인산화 지표인 AT8 및 AT180의 발현을 억제함을 알 수 있다.

[210]

[211] **실시예 12. 타우 과발현 동물에서 셀렉시팍에 의한 타우 인산화효소인 DYRK1A 및 p-CDK5 발현 수준 감소**

[212] 다음으로, 타우 과발현 동물에서 타우 인산화효소인 DYRK1A 및 p-CDK5의 발현변화에 대한 셀렉시팍의 효능을 분석하는 실험을 수행하였다.

[213] 구체적으로, 3~4개월령 타우 과발현 동물(PS19)에 셀렉시팍(1 mg/kg) 또는 비히클을 14일 동안 매일 복강 투여하고, 14일째에 셀렉시팍 투여 2시간 후, 마우스로부터 수득한 뇌절편을 대상으로 항-DYRK1A(Abcam, ab180910, 1:200, rabbit) 및 항-p-CDK5(LSbio, LS-c354604-100, 1:200, rabbit)로 상기 실험방법에서 언급한 방법으로 면역 형광염색 하였다. 그 결과를 도 19a 및 19b와 도 20a 및 20b에 나타내었다.

[214] 도 19a 및 19b는 셀렉시팍 처리에 따른 타우 과발현 동물에서 타우 인산화효소인 DYRK1A의 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다 (CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[215] 도 20a 및 20b는 셀렉시팍 처리에 따른 타우 과발현 동물 모델에서 타우 인산화효소인 p-CDK5의 발현 수준을 면역 형광 염색을 통해 분석한 이미지 및 그래프이다(CA1: Cornu Ammonis 1, DG: Dentate Gyrus).

[216] 도 19a 및 19b에 나타낸 바와 같이 셀렉시팍(1 mg/kg, i.p.)의 처리는 타우 과발현 동물의 대뇌피질 및 해마의 CA1 및 DG영역에서 타우 인산화효소인 DYRK1A의 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다.

[217] 또한, 도 20a 및 20b에 나타낸 바와 같이 셀렉시팍(1 mg/kg, i.p.)의 처리는 타우 과발현 동물의 대뇌피질 및 해마의 CA1 영역에서 타우 인산화효소인 p-CDK5의 발현을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다.

[218] 이는 셀렉시팍이 타우과발현 동물에서 타우 인산화효소인 DYRK1A 및 p-CDK5의 발현을 억제할 수 있음을 의미한다.

[219]

[220] 이상의 결과를 통해, 셀렉시팍은 LPS에 의해 유발된 뇌 조직 내 전염증성 또는 염증성 사이토카인의 발현 및 생성을 억제하고, 미세아교세포 또는 성상세포의 활성을 억제하며, NLRP3 인플라마좀 활성 및 CDK6 발현을 억제한다. 또한 , 셀렉스팍을 투여한 아밀로이드 과발현 동물(5xFAD)에서 아밀로이드 플라크 억제 및 아밀로이드 베타 분해 효소 IDE의 발현 증가 및 전염증성 사이토카인의 발현 및 생성을 억제하고 미세아교세포 또는 성상세포의 활성을 억제한다. 뿐만 아니라, 셀렉스팍을 투여한 타우 과발현 동물 (PS19)에서 타우 과인산화 및 타우 인산화효소의 발현을 억제한다. 상기 결과를 토대로 셀렉시팍은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료를 위한 새로운 치료제로서 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

[221]

[222] 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 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

[청구항 1] 셀렉시팍(selexipag) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 하기 중 어느 하나 이상의 활성을 갖는 것인, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물:
(i) 뇌 조직 내 전염증성 사이토카인 또는 염증성 사이토카인의 수준 억제;
(ii) 뇌 조직 내 인플라마좀(inflammasome)의 형성 또는 사이클린-의존성 카이네이즈의 수준 억제;
(iii) 뇌 조직 내 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제;
(iv) 뇌 조직 내 아밀로이드 플라크 감소 또는 아밀로이드 베타 단백질 축적 억제; 또는
(v) 뇌 조직 내 타우 카이네이즈의 발현 또는 활성의 억제, 또는 타우 단백질의 과인산화 억제.

[청구항 3] 청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 노인성 치매, 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia), 다발성 경화증, 다발성 신경위축, 간질, 뇌병증(encephalophathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 4] 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 인지장애, 학습장애 또는 기억력 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 5] 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 신경세포에서의 과도한 염증반응에 의해 손상된 신경세포 보호용 조성물.

[청구항 6] 셀렉시팍 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 미세아교세포 또는 성상세포의 활성화 억제용 시약 조성물.

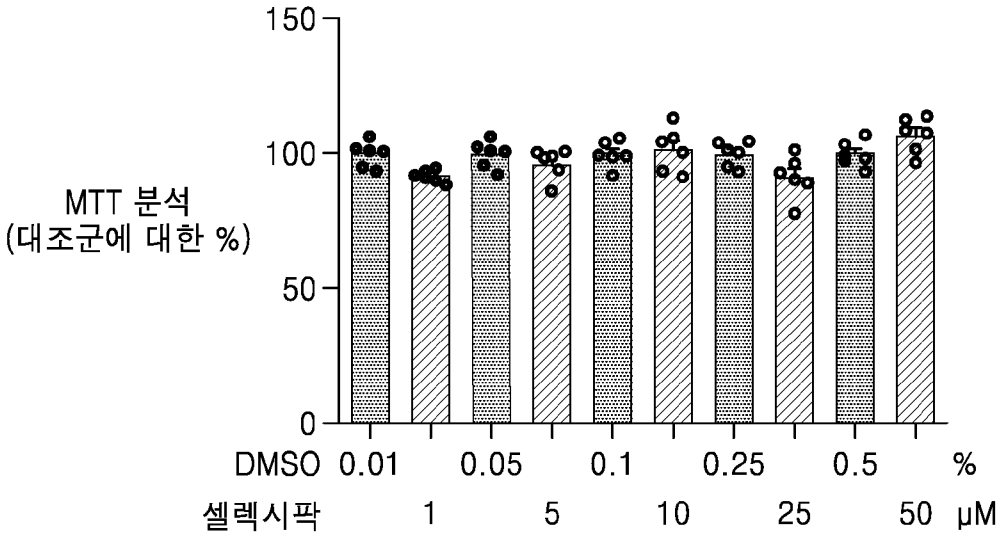
[청구항 7] 셀렉시팍 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 신경염증 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품.

[청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병 (Huntington's disease), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 노인성 치매, 다발성 경화증, 다발성 신경위축, 간질, 뇌병증(encephalophathy), 전두측두엽 치매(frontotemporal dementia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품.

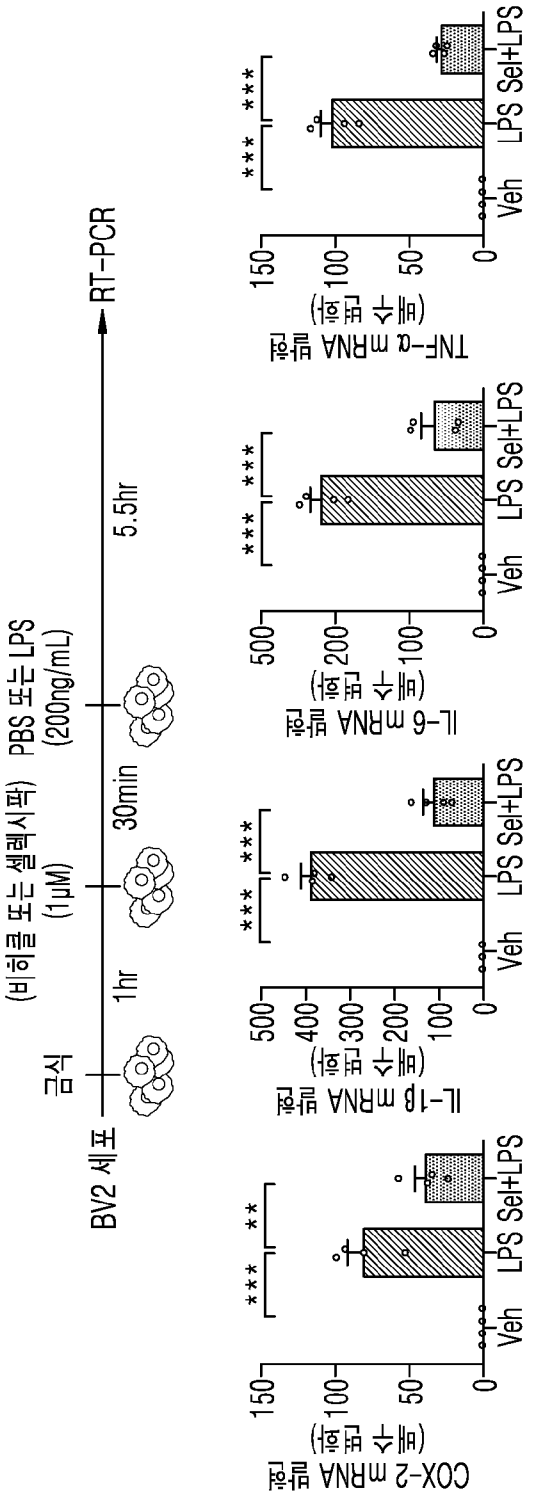
[청구항 9] 셀렉시팍 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 인지기능, 학습능력 또는 기억력 개선용 건강기능성 식품.

[청구항 10] 셀렉시팍(selexipag) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 개체에게 투여함을 포함하는, 퇴행성 뇌질환을 예방 또는 치료하는 방법.

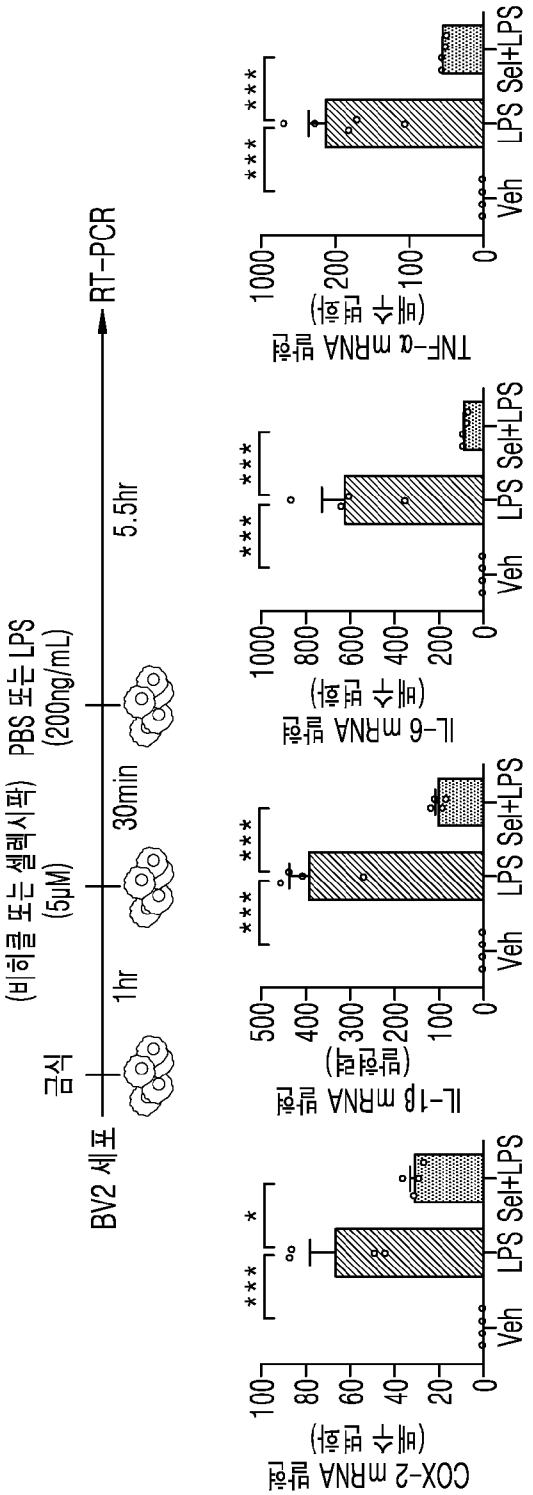
[도1]


150
100
50
0
MTT 분석
(대조군에 대한 %)
DMSO 0.01 0.05 0.1 0.25 0.5 %
셀렉시팍 1 5 10 25 50 μM

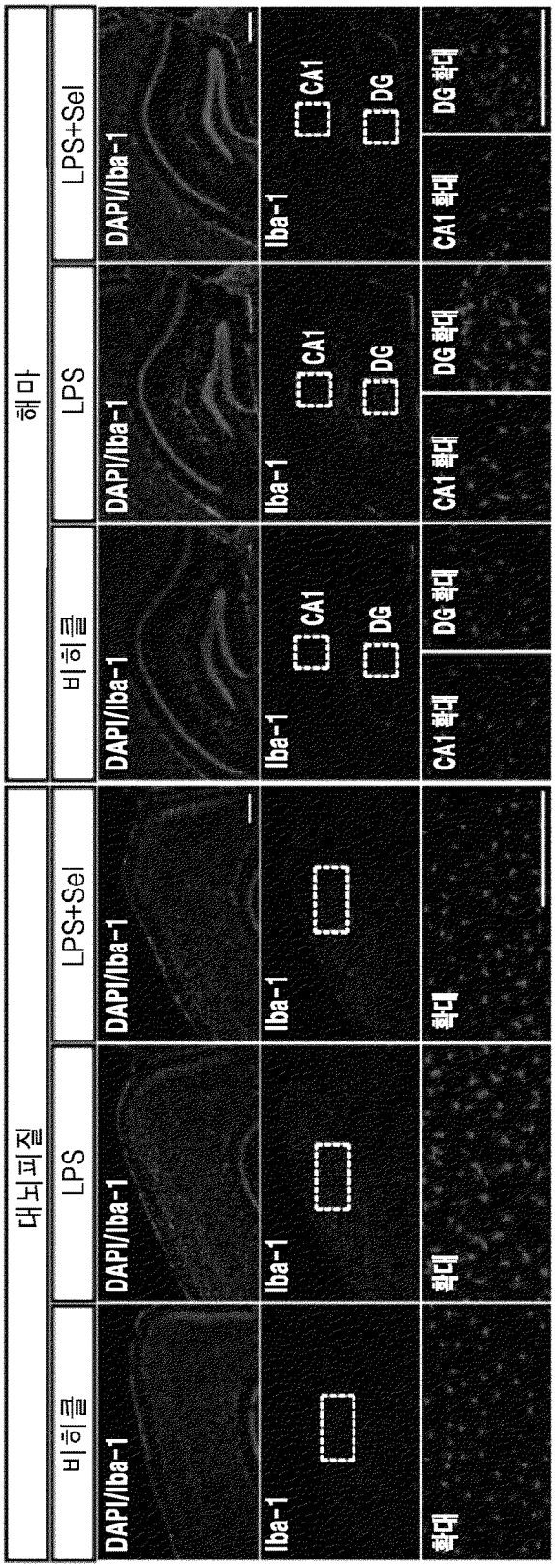
[도2a]


BV2 세포
금식
1hr
(비히클 또는 셀렉시팜)
(1μM)
30min
PBS 또는 LPS
(200ng/mL)
5.5hr
RT-PCR
COX-2 mRNA 발현
IL-1β mRNA 발현
IL-6 mRNA 발현
TNF-α mRNA 발현
(배수 변화)
Veh
LPS
Sel+LPS
***
**

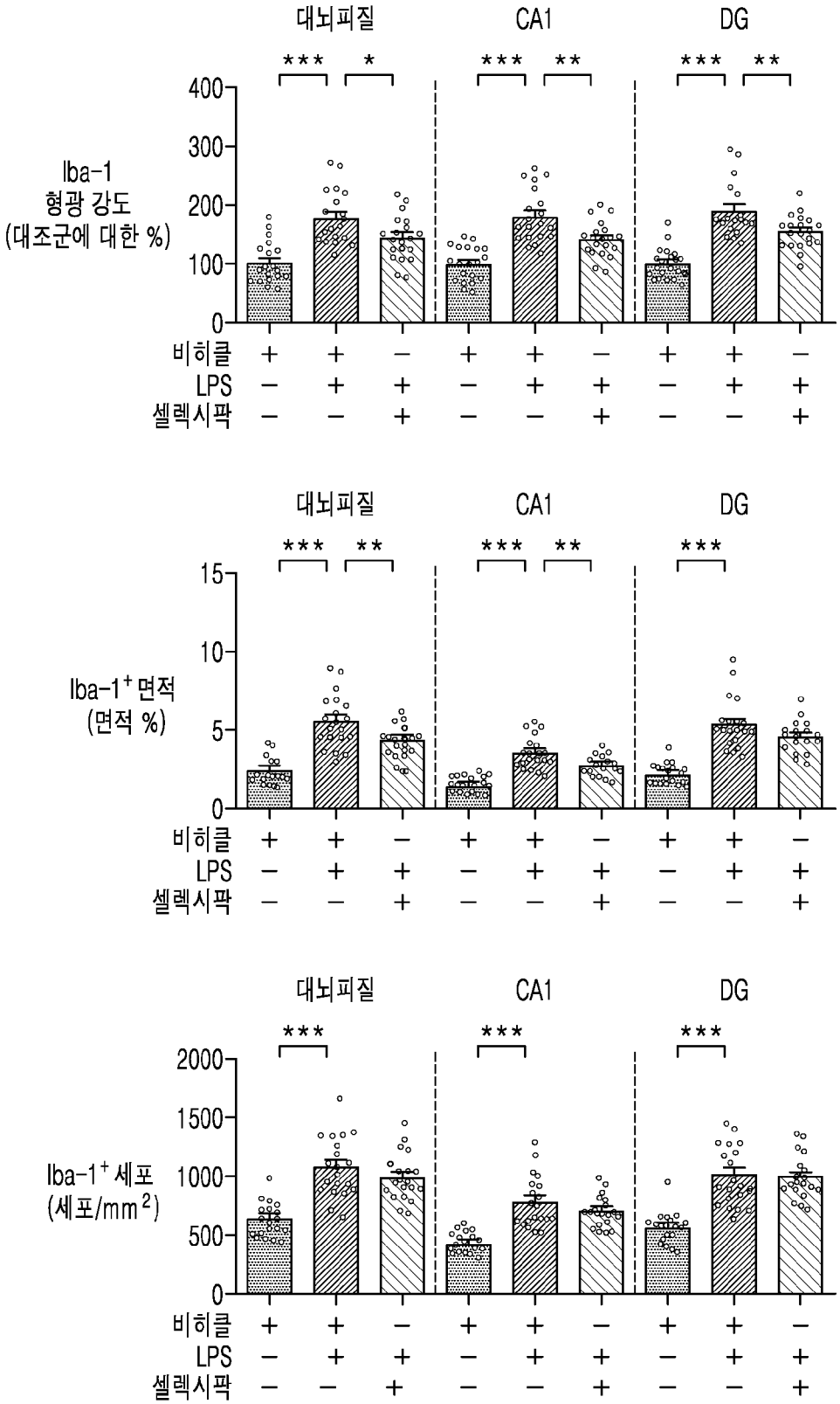
[도2b]


BV2 세포
금식
1hr
(비히클 또는 셀렉시팜) (5μM)
30min
PBS 또는 LPS (200ng/mL)
5.5hr
RT-PCR
COX-2 mRNA 발현 (배수 변화)
IL-1β mRNA 발현 (발현량)
IL-6 mRNA 발현 (배수 변화)
TNF-α mRNA 발현 (배수 변화)
Veh
LPS
Sel+LPS

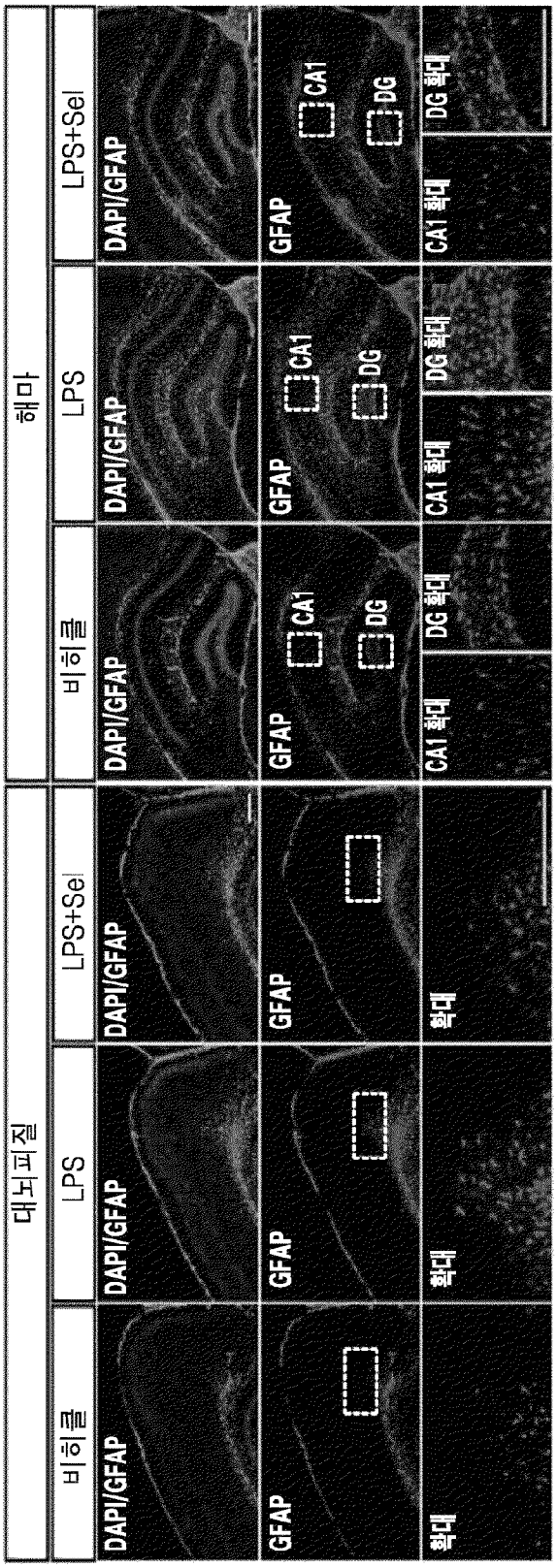
[도3a]


대뇌피질
비히클
LPS
LPS+Sel
해마
비히클
LPS
LPS+Sel
DAPI/Iba-1
Iba-1
CA1
DG
확대
CA1 확대
DG 확대

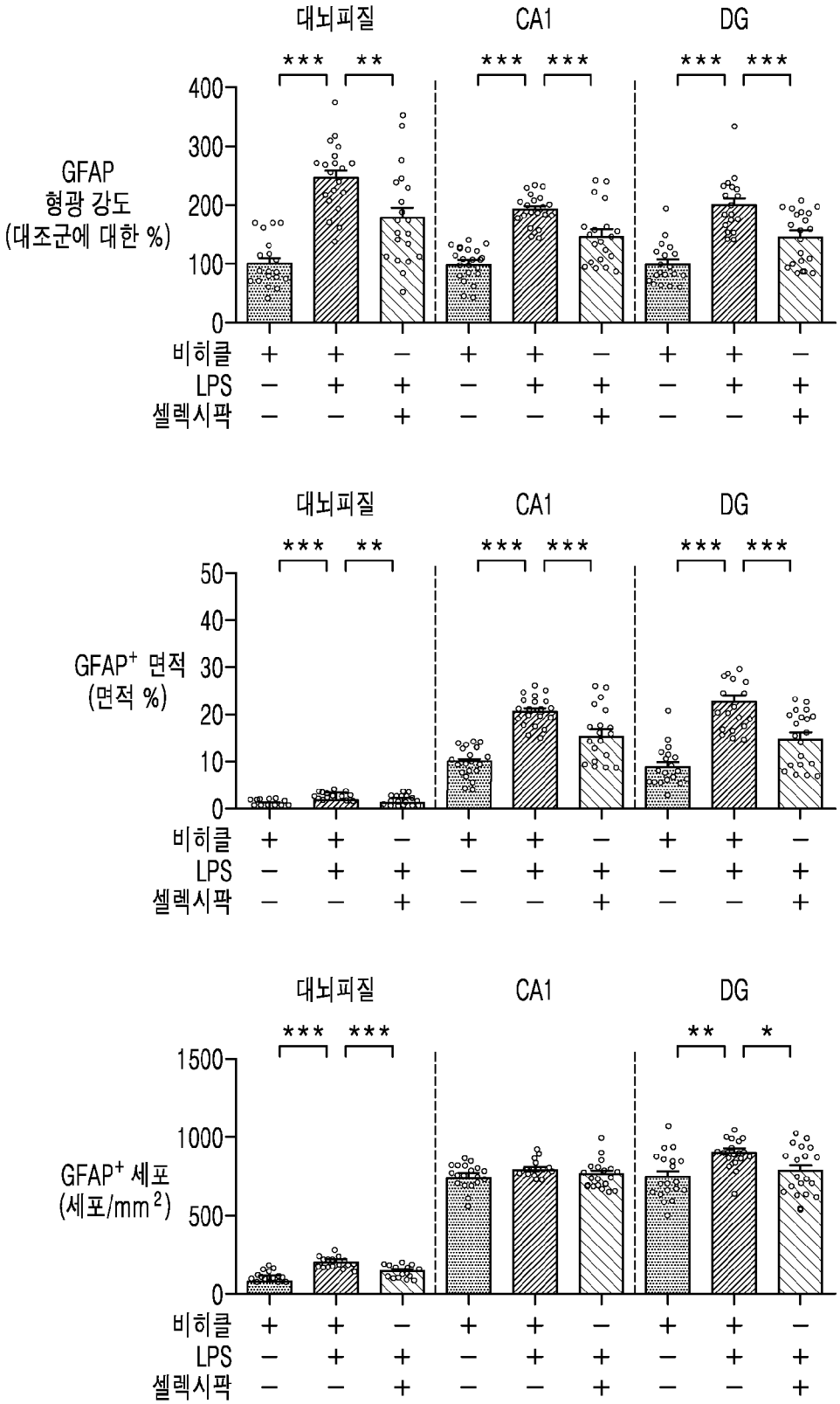
[도3b]


대뇌피질
CA1
DG
***
*
**
Iba-1
형광 강도
(대조군에 대한 %)
400
300
200
100
0
비히클
LPS
셀렉시팍
Iba-1+ 면적
(면적 %)
15
10
5
Iba-1+ 세포
(세포/mm2)
2000
1500
1000
500

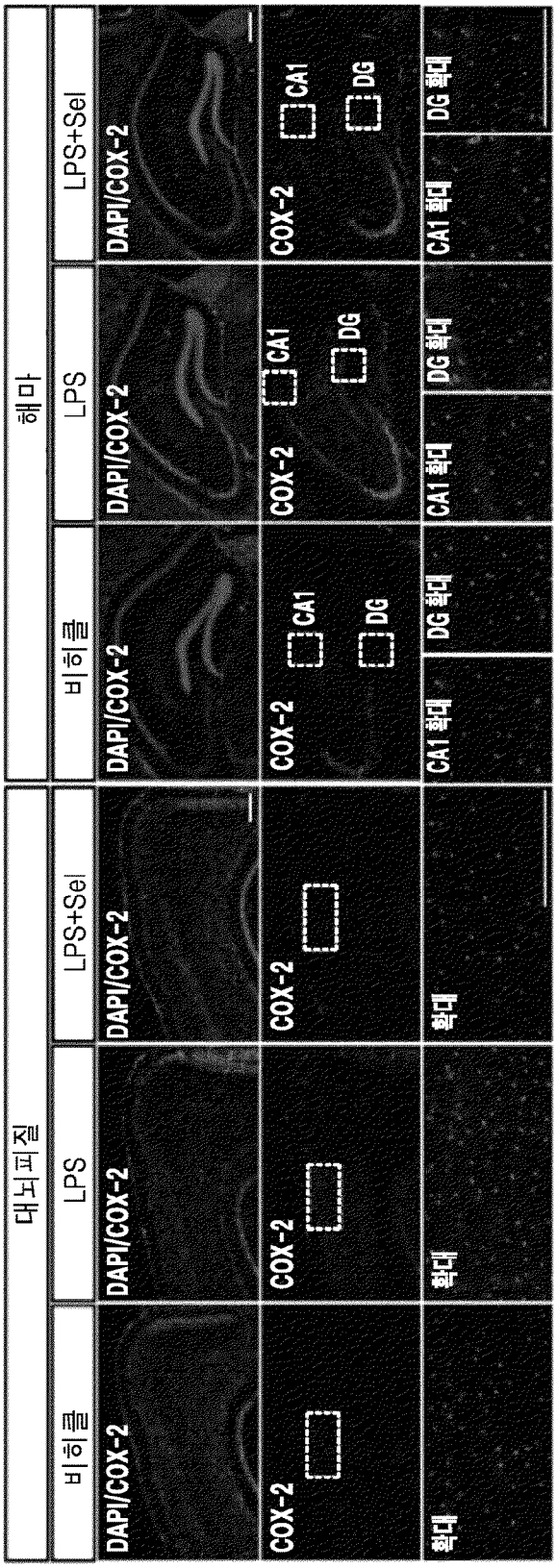
[도4a]


대뇌피질
해마
비히클
LPS
LPS+Sel
비히클
LPS
LPS+Sel
DAPI/GFAP
GFAP
확대
CA1
DG
CA1 확대
DG 확대

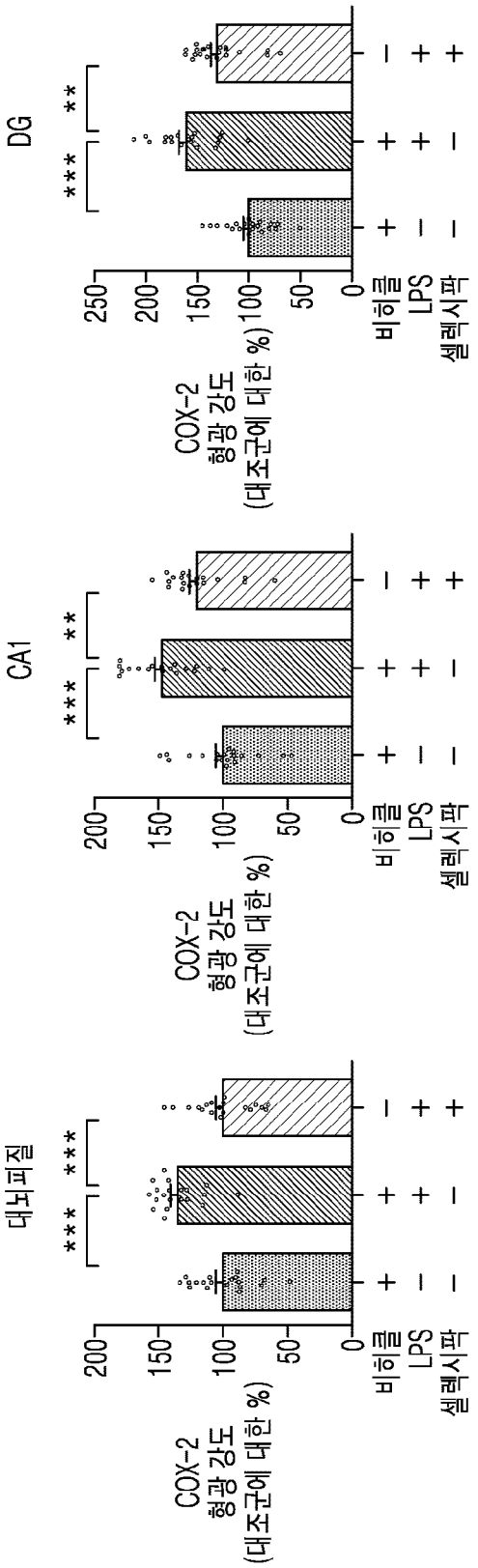
[도4b]


대뇌피질
CA1
DG
GFAP
형광 강도
(대조군에 대한 %)
GFAP+ 면적
(면적 %)
GFAP+ 세포
(세포/mm2)
비히클
LPS
셀렉시팍

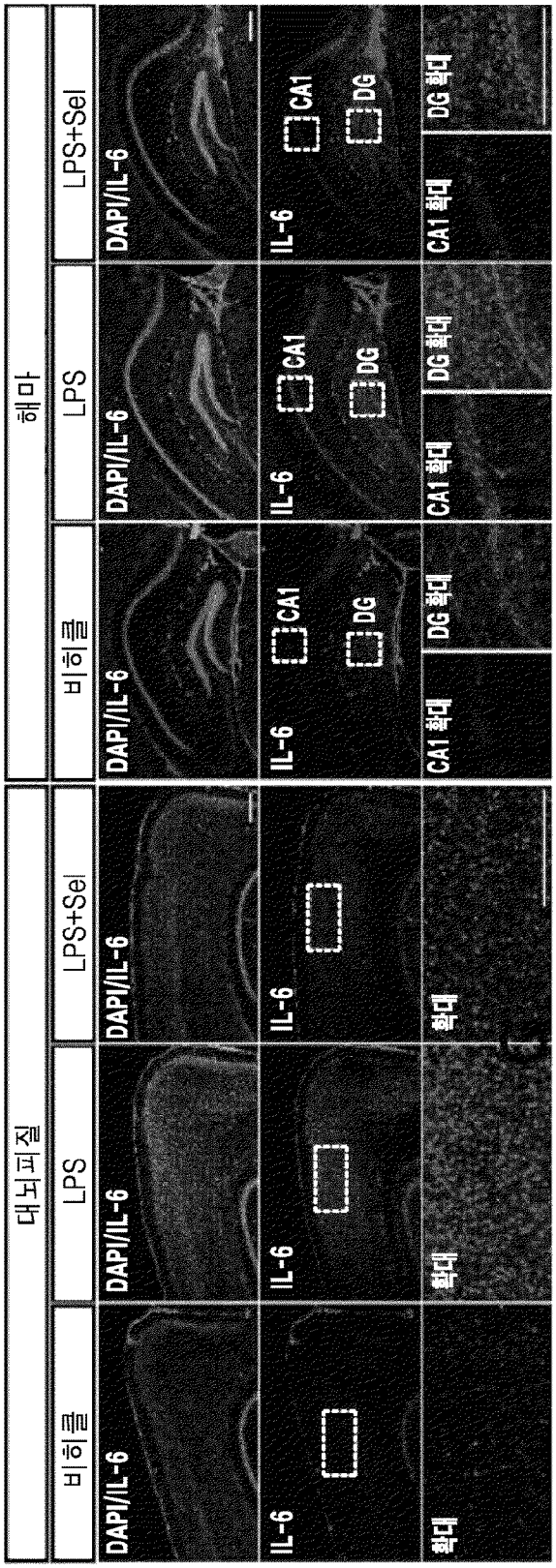
[도5a]


대뇌피질
해마
비히클
LPS
LPS+Sel
비히클
LPS
LPS+Sel
DAPI/COX-2
COX-2
확대
CA1
DG
CA1 확대
DG 확대

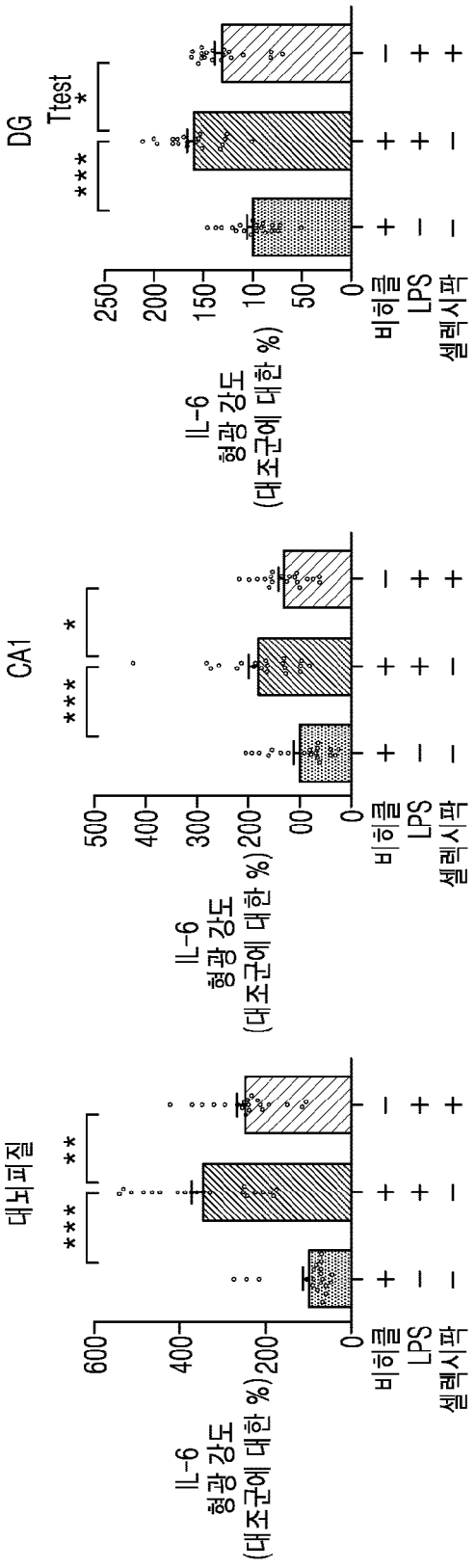
[도5b]



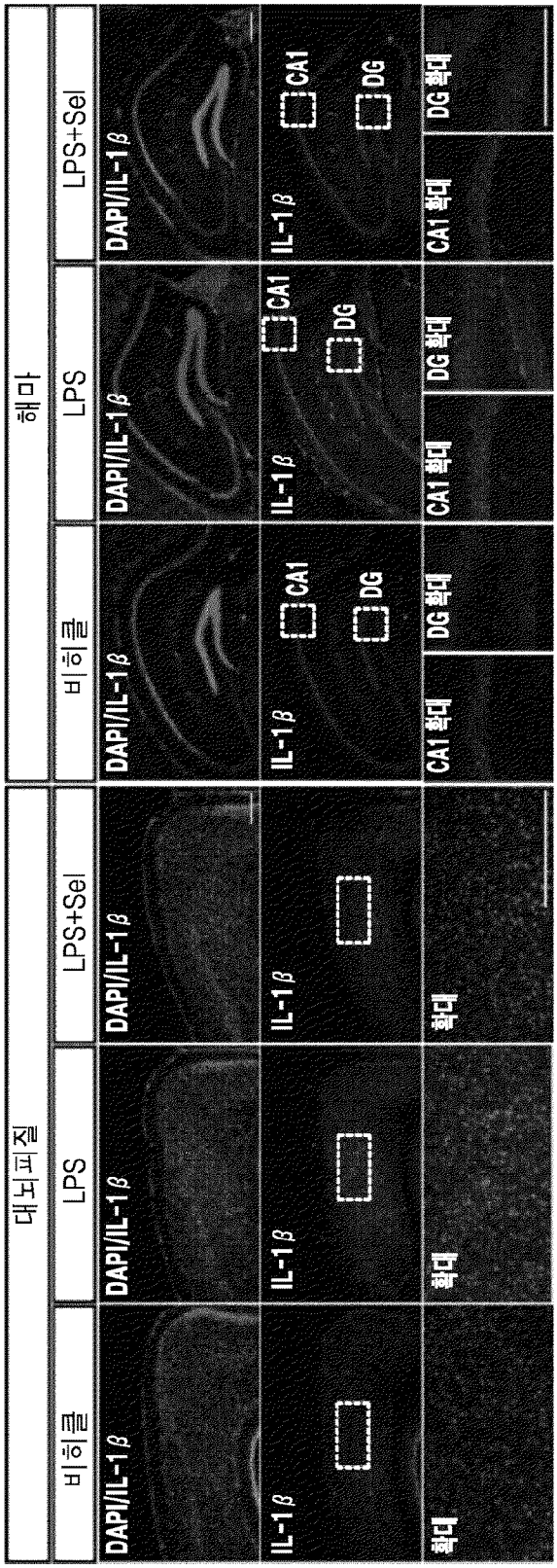
[도6a]


대뇌피질
비히클
LPS
LPS+Sel
해마
비히클
LPS
LPS+Sel
DAPI/IL-6
IL-6
확대
CA1
DG
CA1 확대
DG 확대

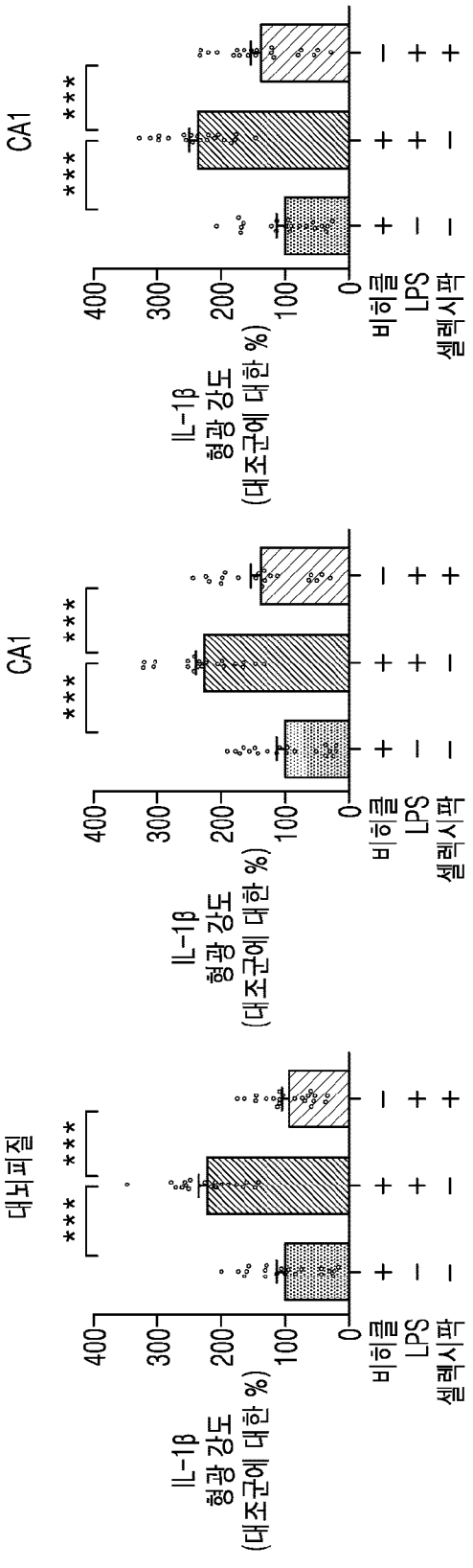
[도6b]



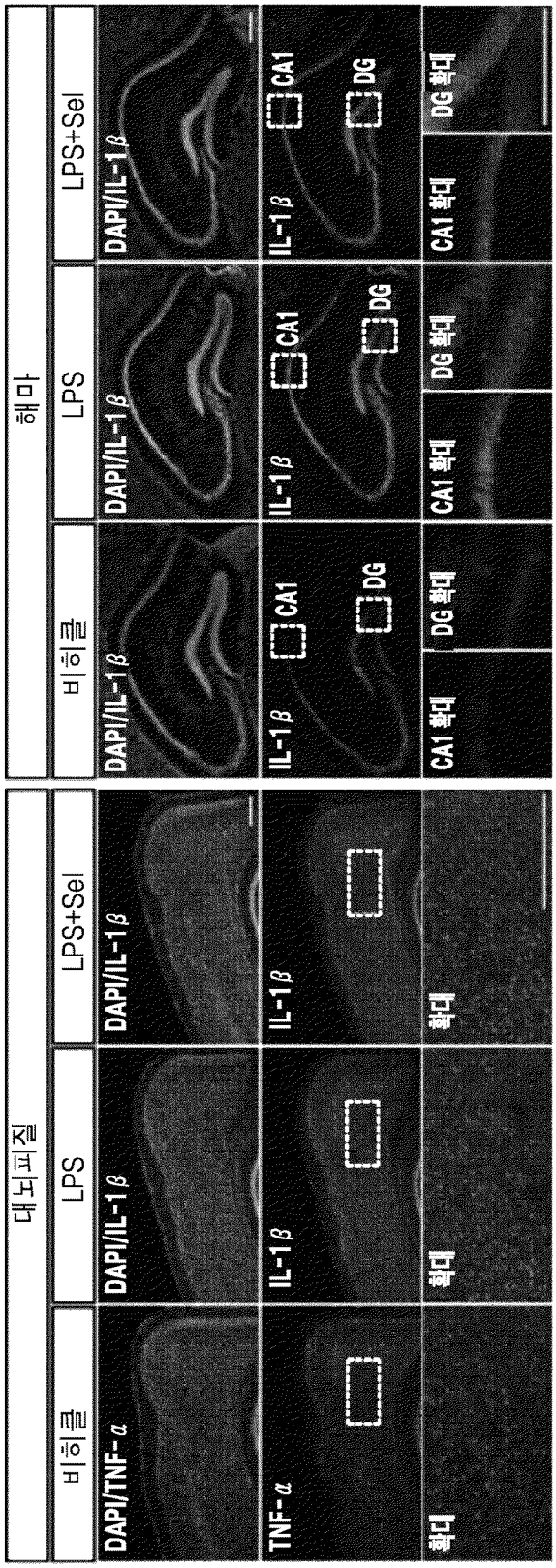
[도7a]



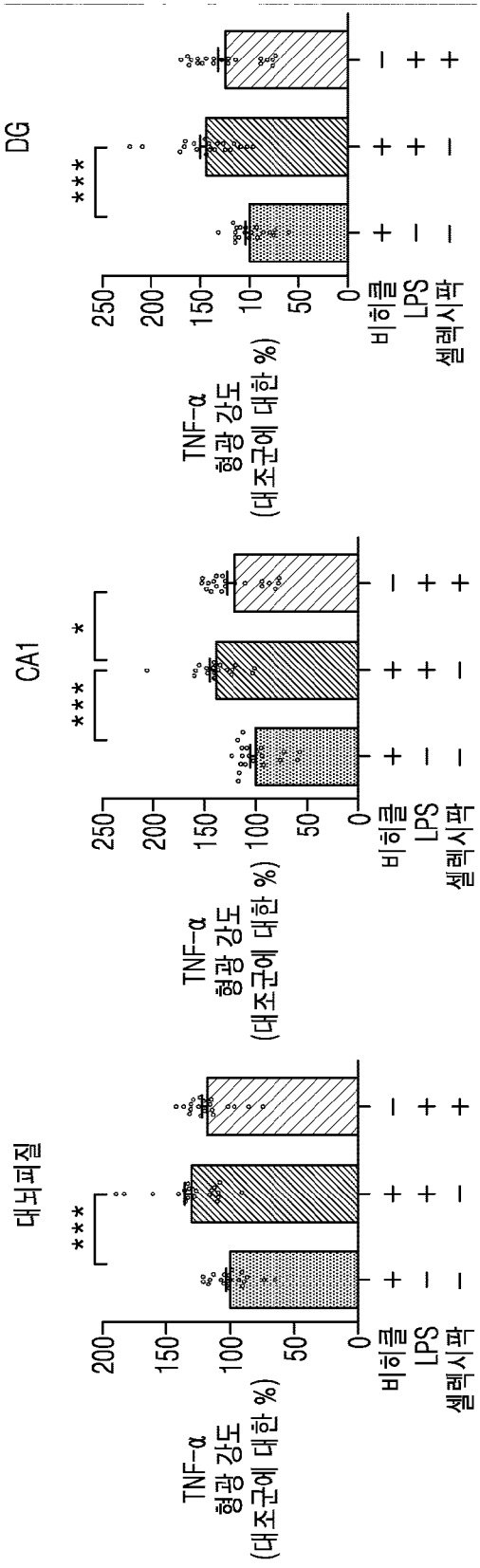
[도7b]



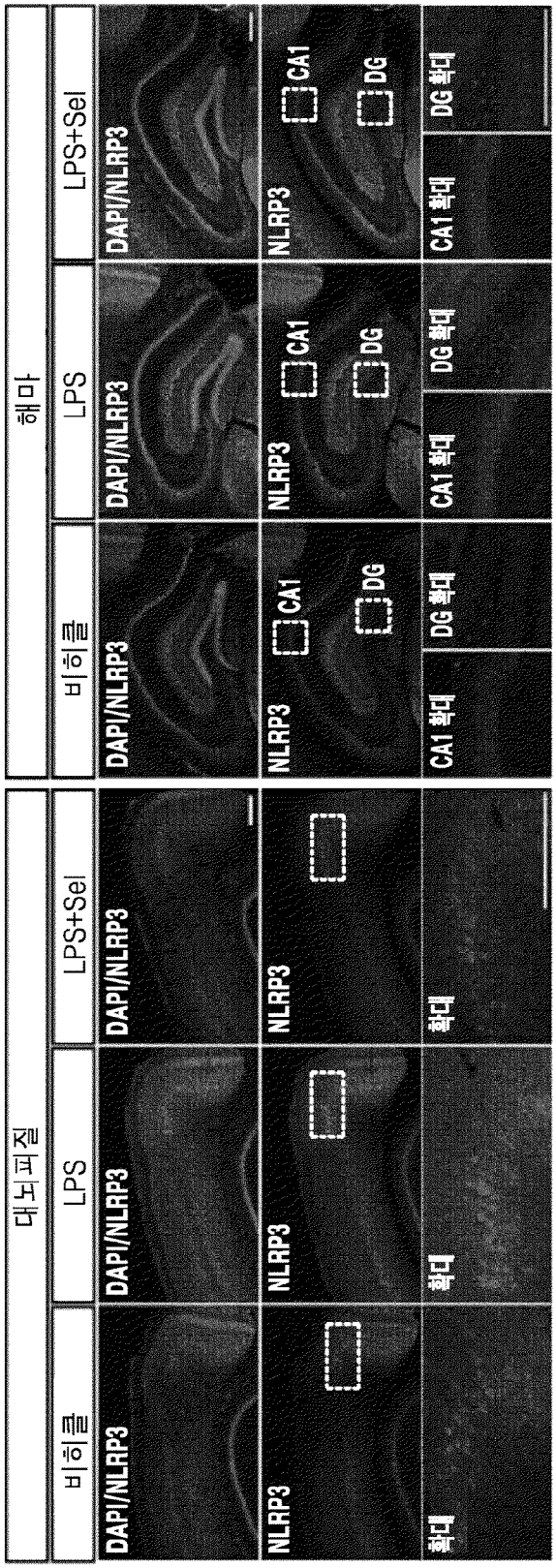
[도8a]


대뇌피질
비히클
LPS
LPS+Sel
DAPI/TNF-α
TNF-α
확대
DAPI/IL-1β
IL-1β
해마
비히클
LPS
LPS+Sel
CA1
DG
CA1 확대
DG 확대

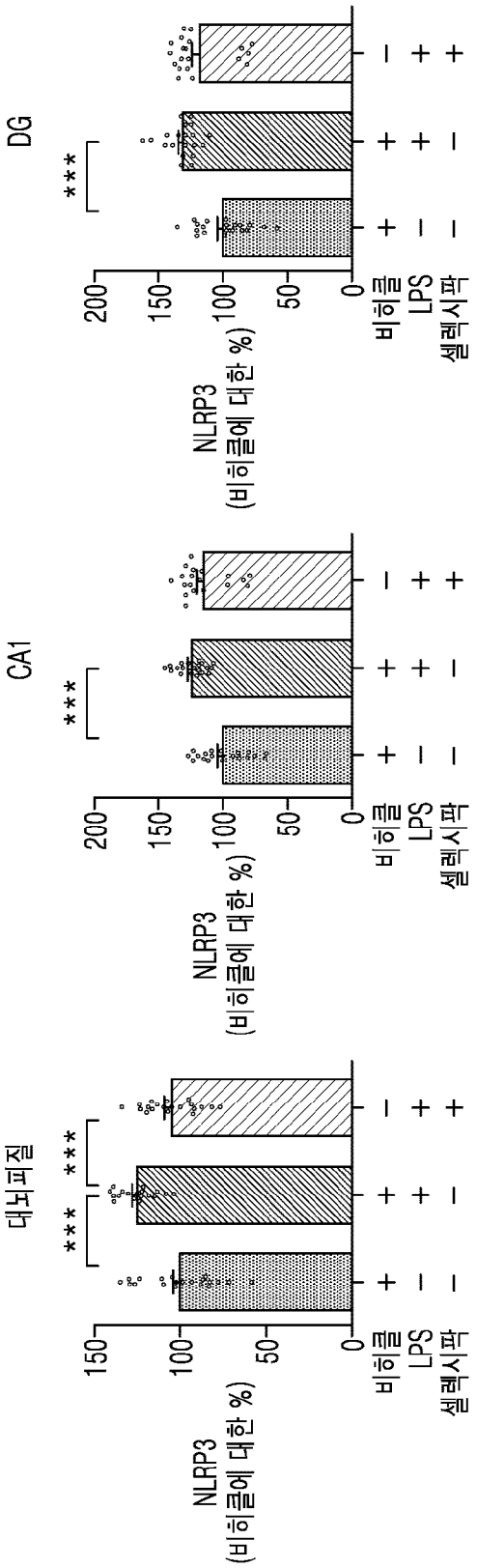
[도8b]



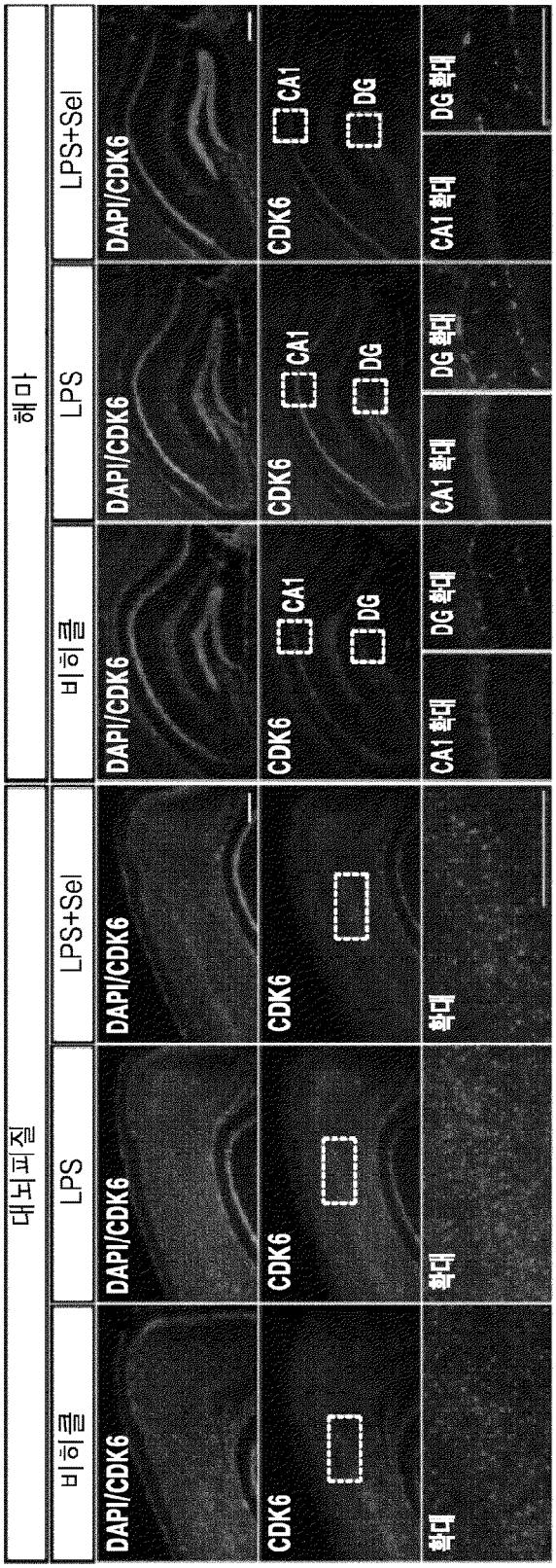
[도9a]



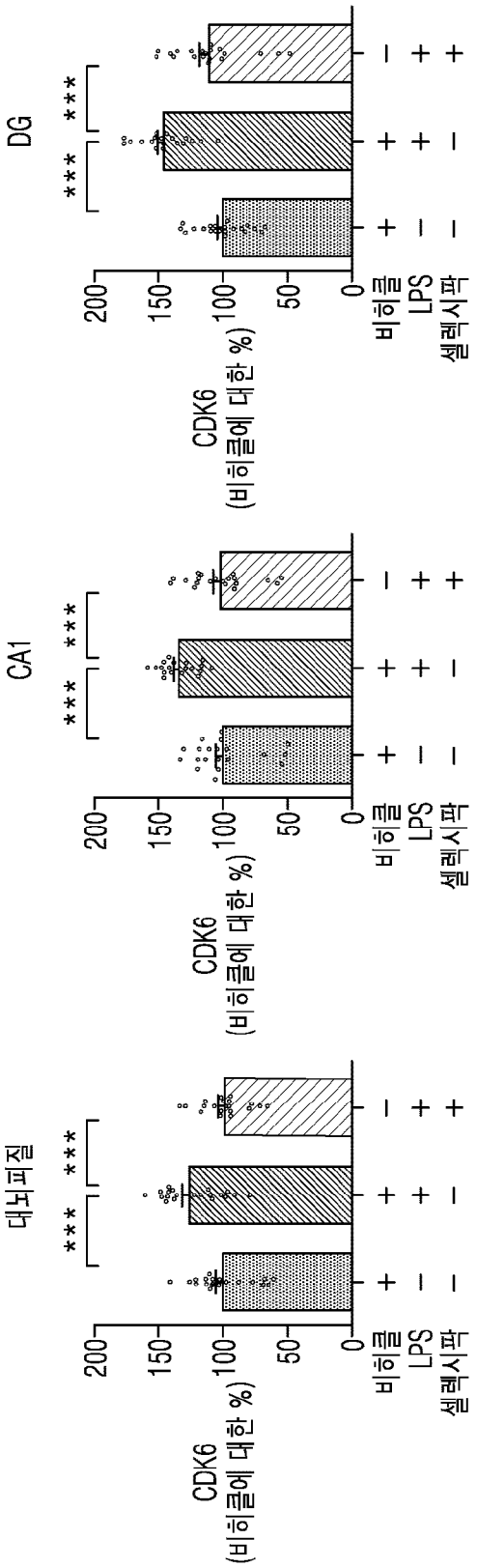
[도9b]



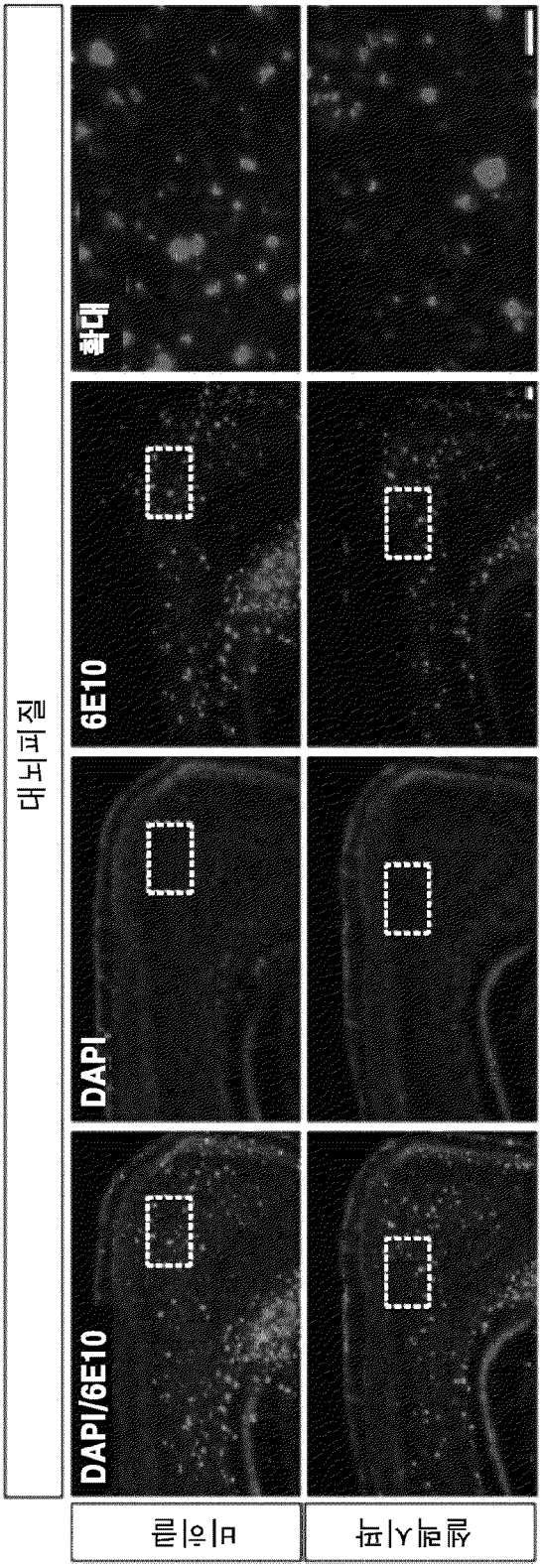
[도10a]


대뇌피질
해마
비히클
LPS
LPS+Sel
비히클
LPS
LPS+Sel
DAPI/CDK6
CDK6
CA1
DG
확대
CA1 확대
DG 확대

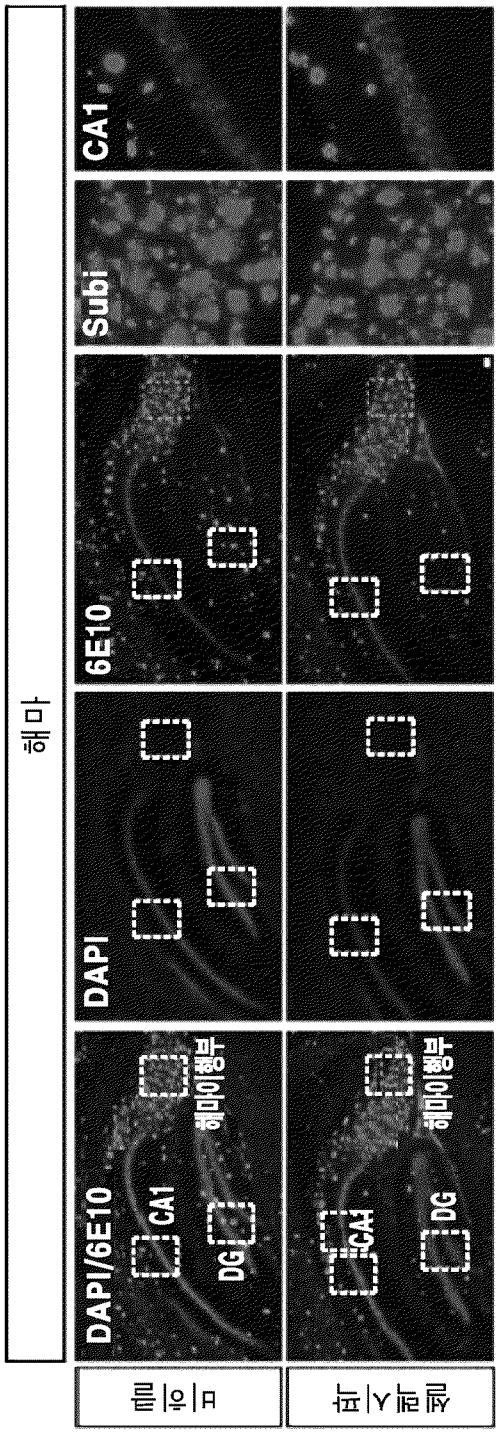
[도10b]



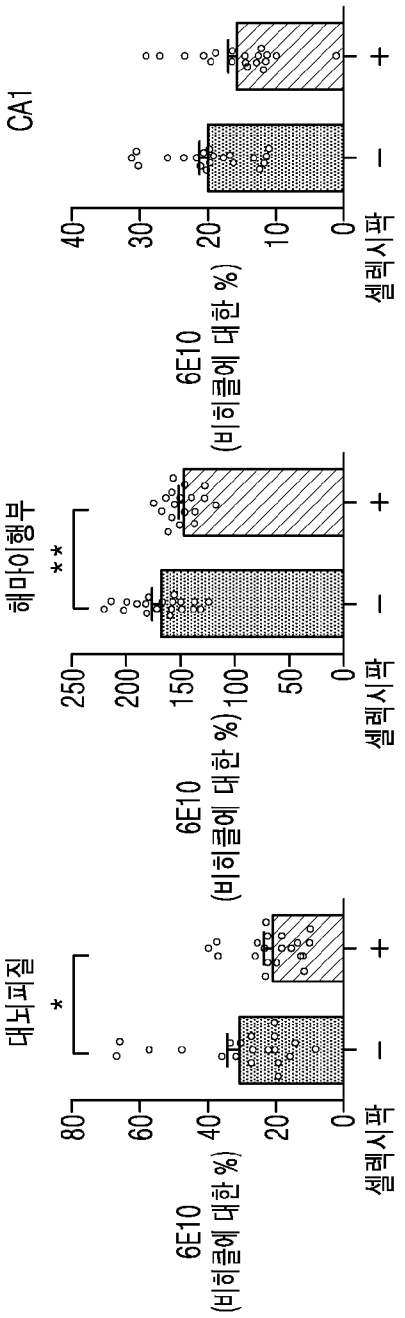
[도11a]



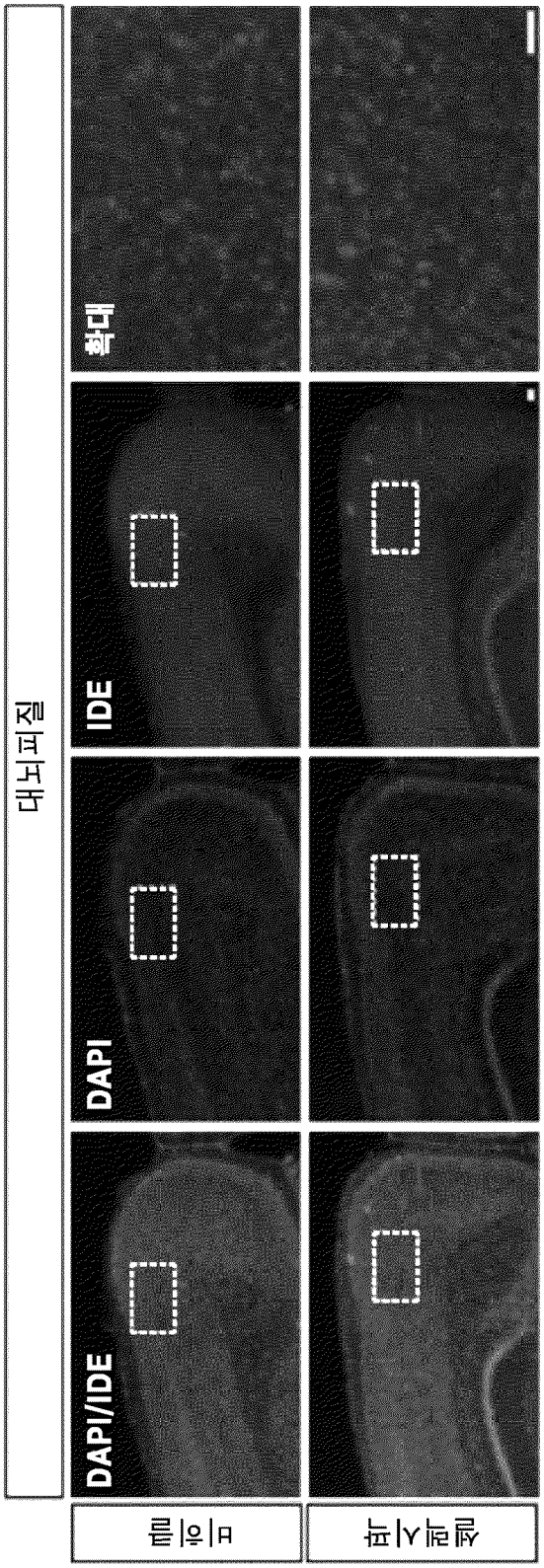
[도11b]



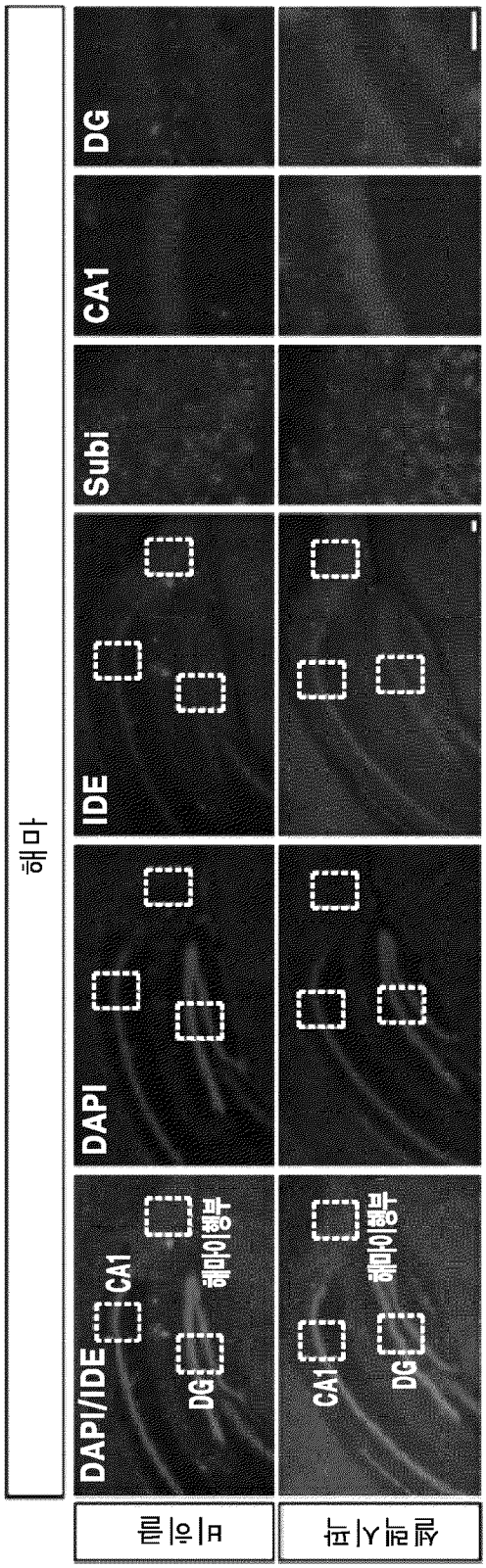
[도11c]


대뇌피질
*
6E10
(비히클에 대한 %)
80
60
40
20
0
-
+
셀레시파
해마이행부
**
6E10
(비히클에 대한 %)
250
200
150
100
50
0
-
+
셀레시파
CA1
6E10
(비히클에 대한 %)
40
30
20
10
0
-
+
셀레시파

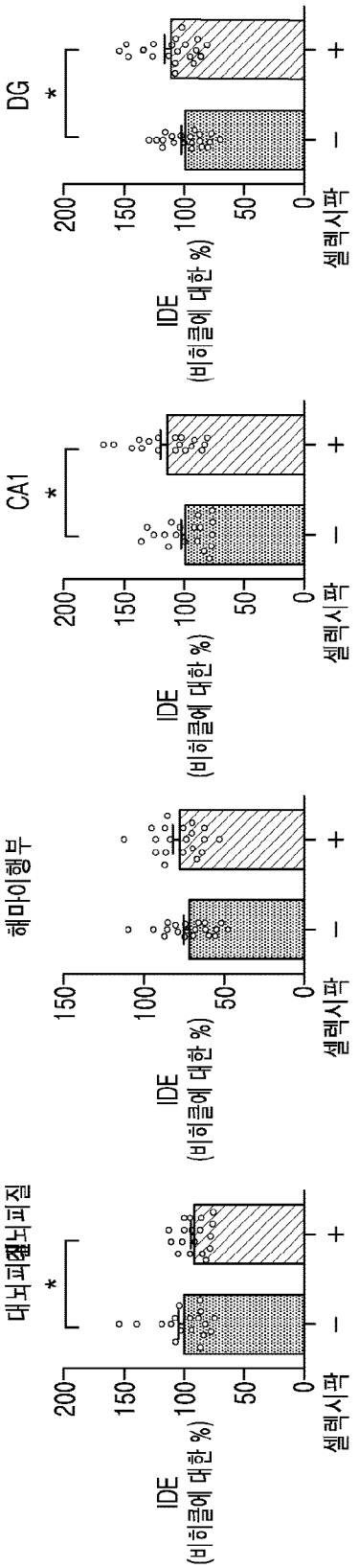
[도12a]



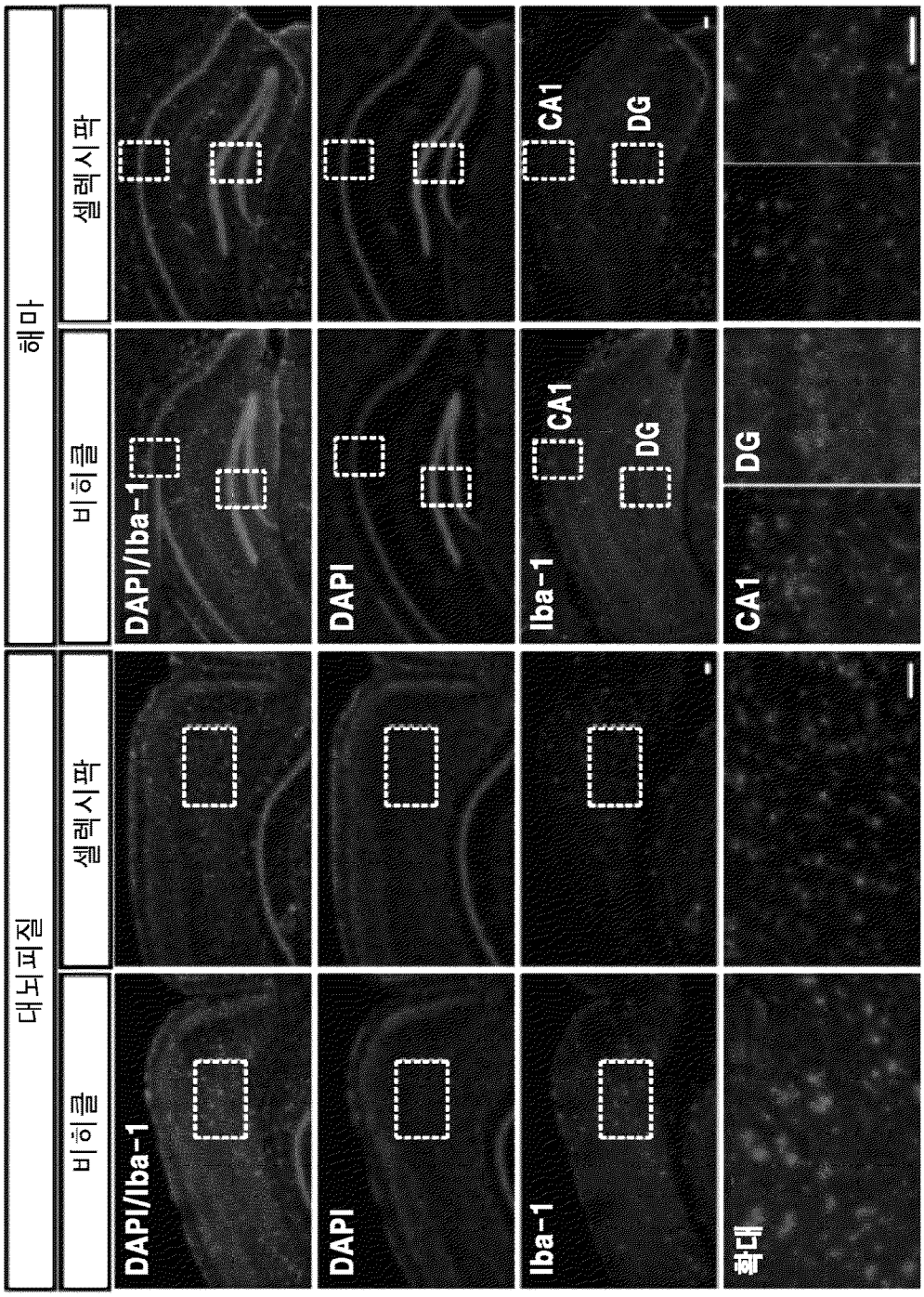
[도12b]



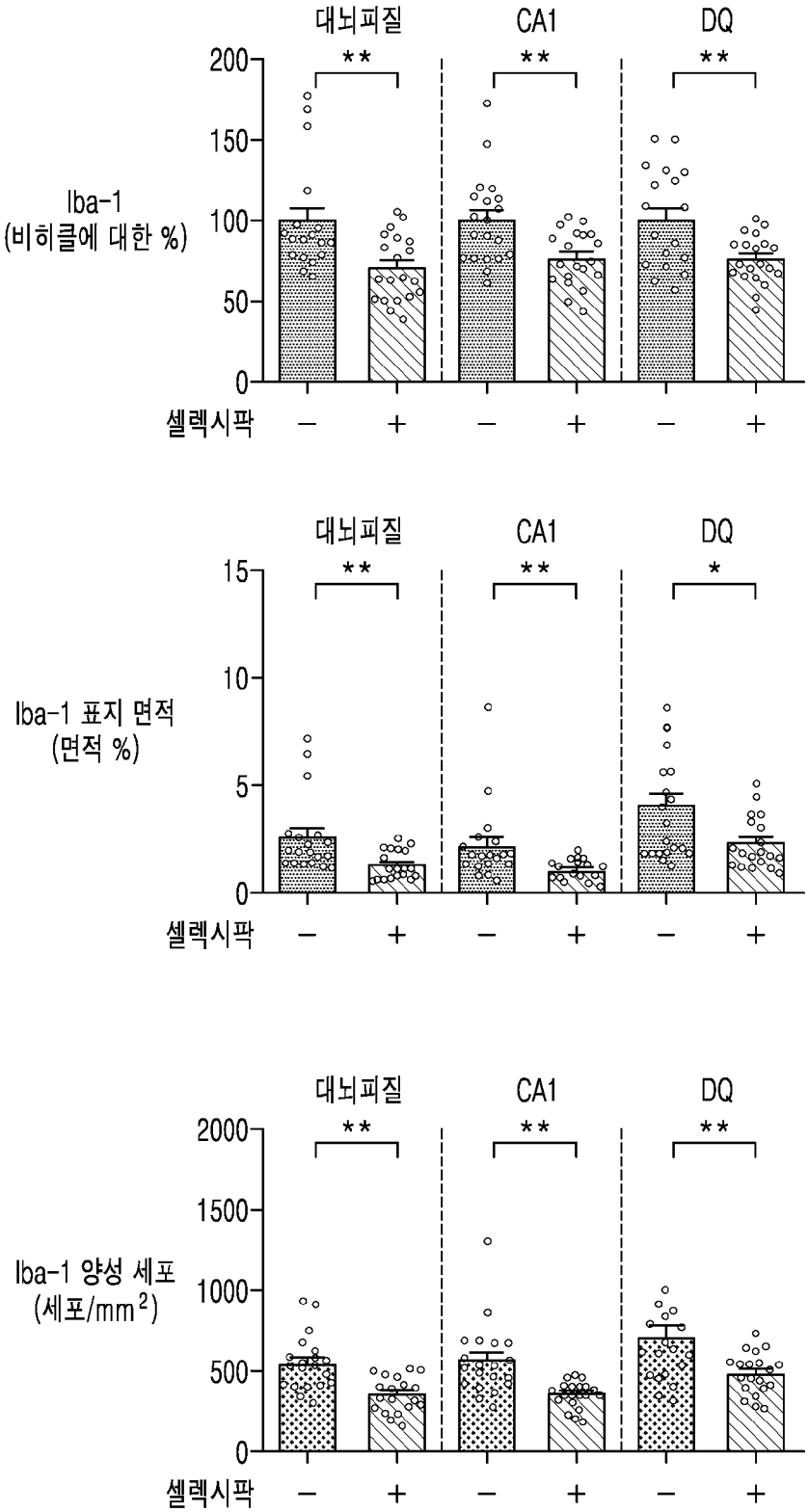
[도12c]



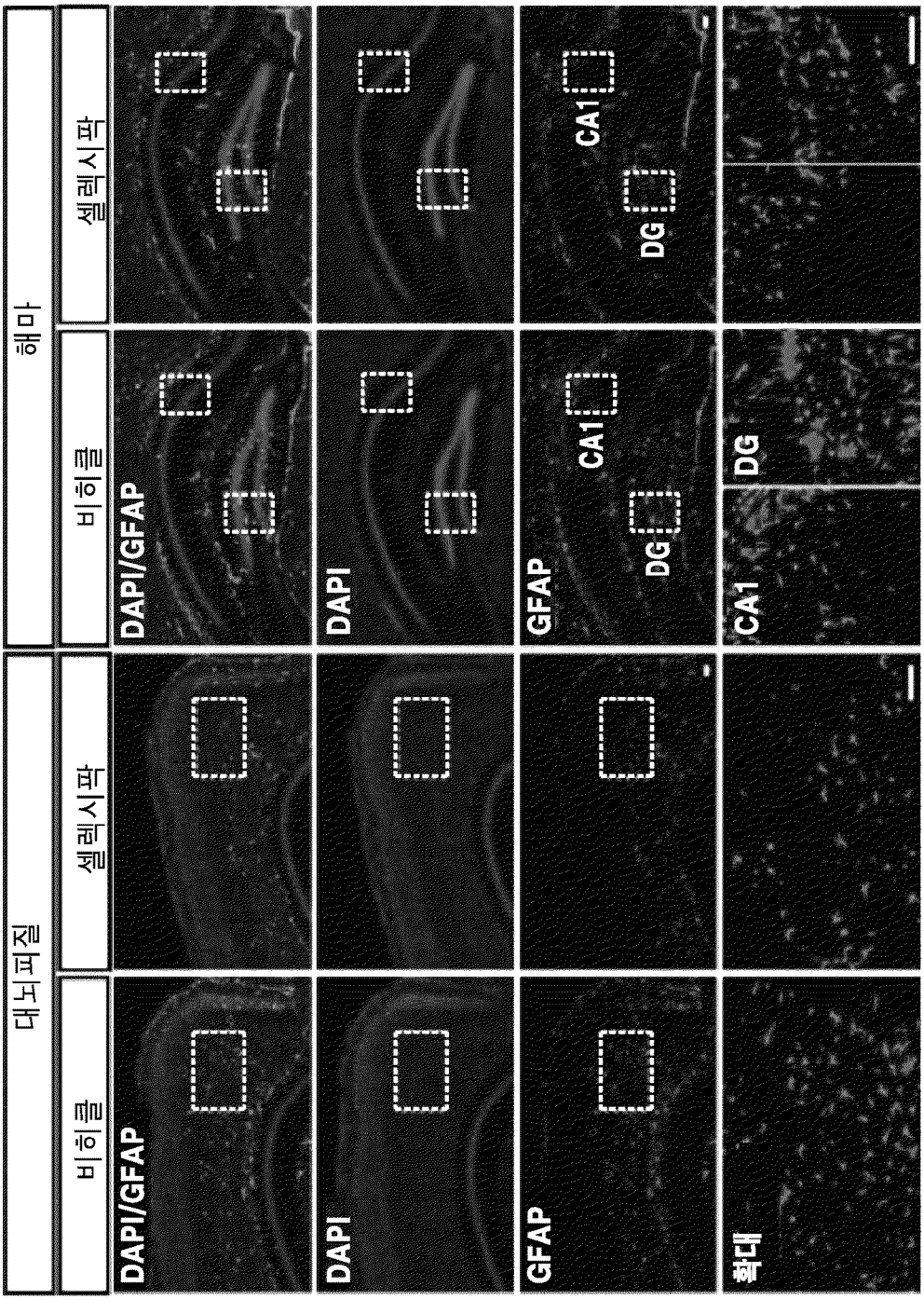
[도13a]


대뇌피질
해마
비히클
셀렉시파
비히클
셀렉시파
DAPI/Iba-1
DAPI
Iba-1
확대
DAPI/Iba-1
DAPI
Iba-1
CA1
DG
CA1
DG

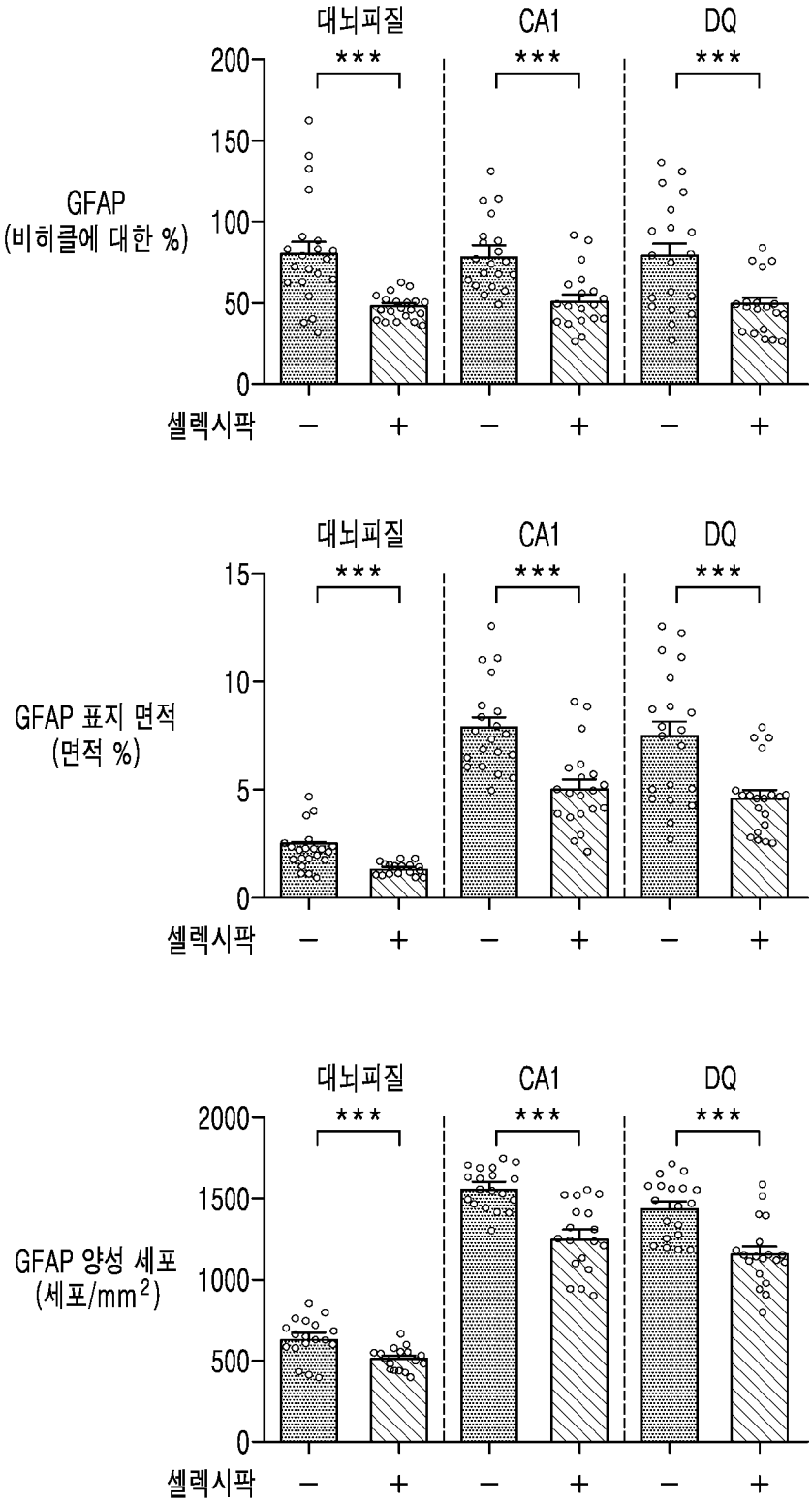
[도13b]


대뇌피질
CA1
DQ
**
**
**
200
150
100
50
0
Iba-1
(비히클에 대한 %)
셀렉시팍 − + − + − +
대뇌피질
CA1
DQ
**
**
*
15
10
5
0
Iba-1 표지 면적
(면적 %)
셀렉시팍 − + − + − +
대뇌피질
CA1
DQ
**
**
**
2000
1500
1000
500
0
Iba-1 양성 세포
(세포/mm2)
셀렉시팍 − + − + − +

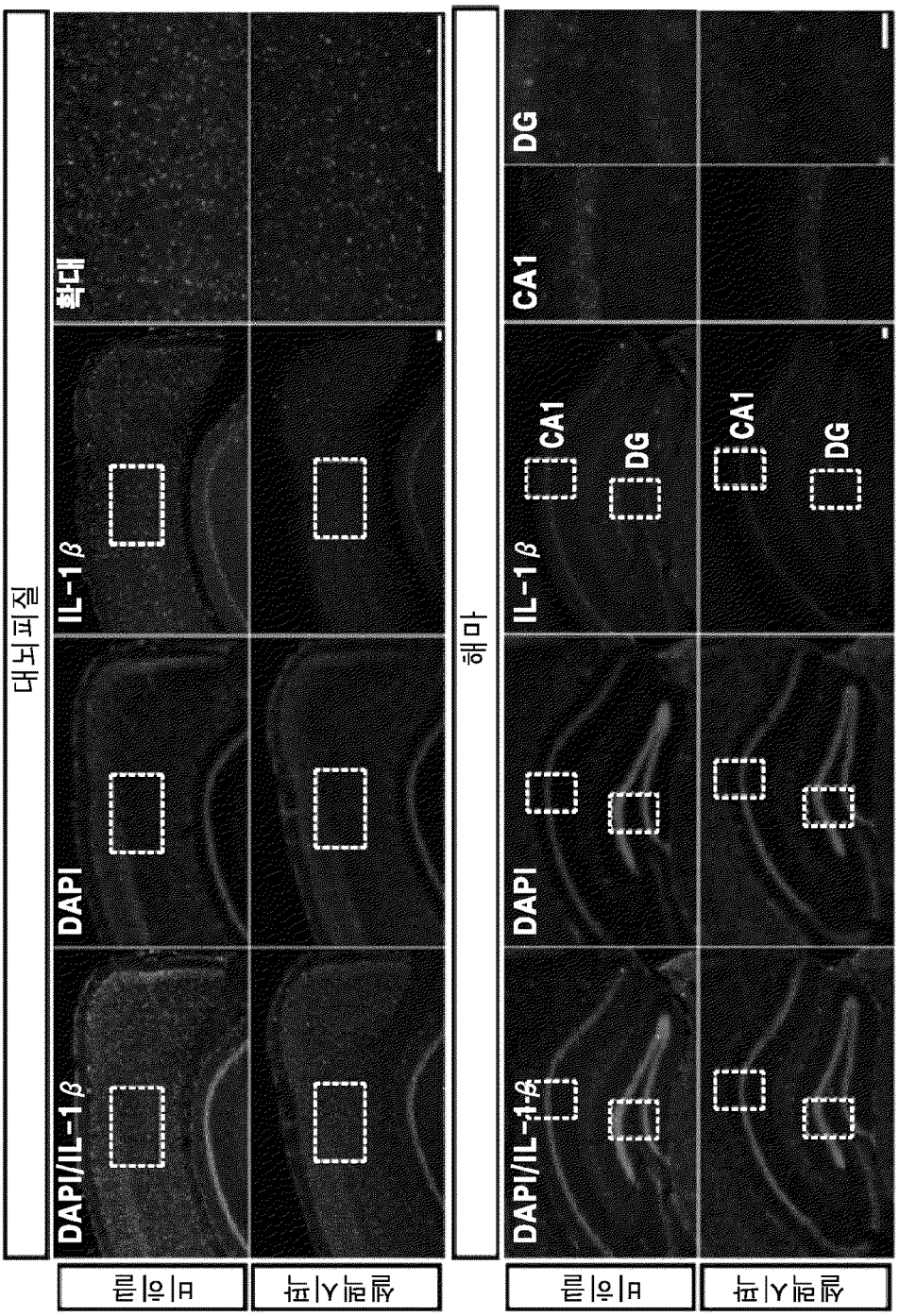
[도14a]



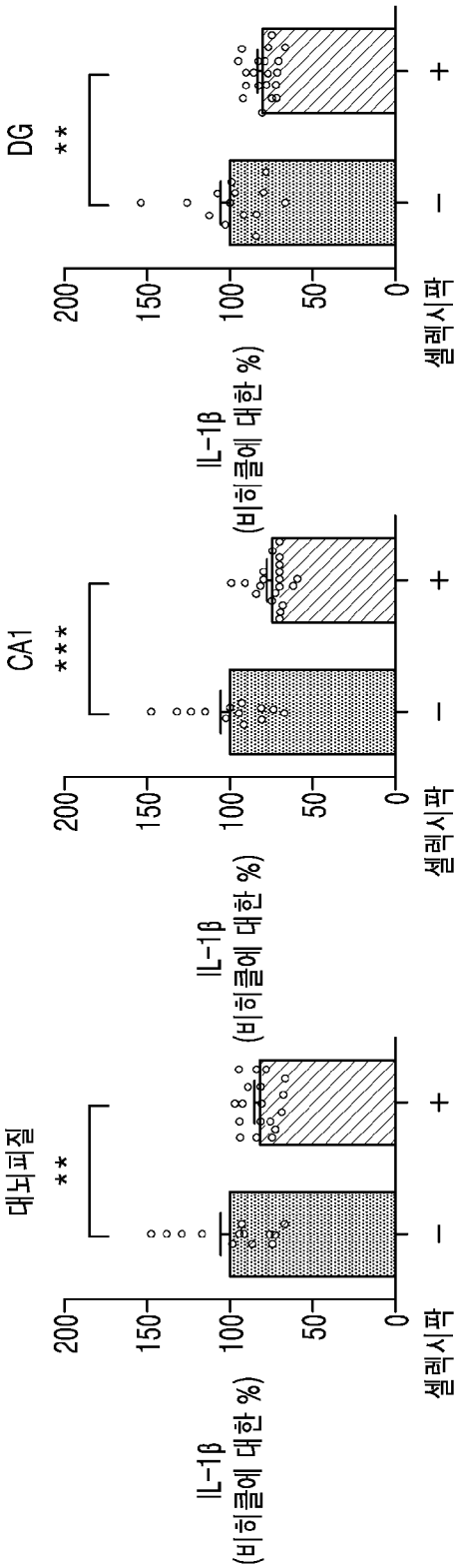
[도14b]


대뇌피질
CA1
DQ
***
GFAP
(비히클에 대한 %)
200
150
100
50
0
셀렉시팍 − + − + − +
GFAP 표지 면적
(면적 %)
15
10
5
0
GFAP 양성 세포
(세포/mm2)
2000
1500
1000
500
0

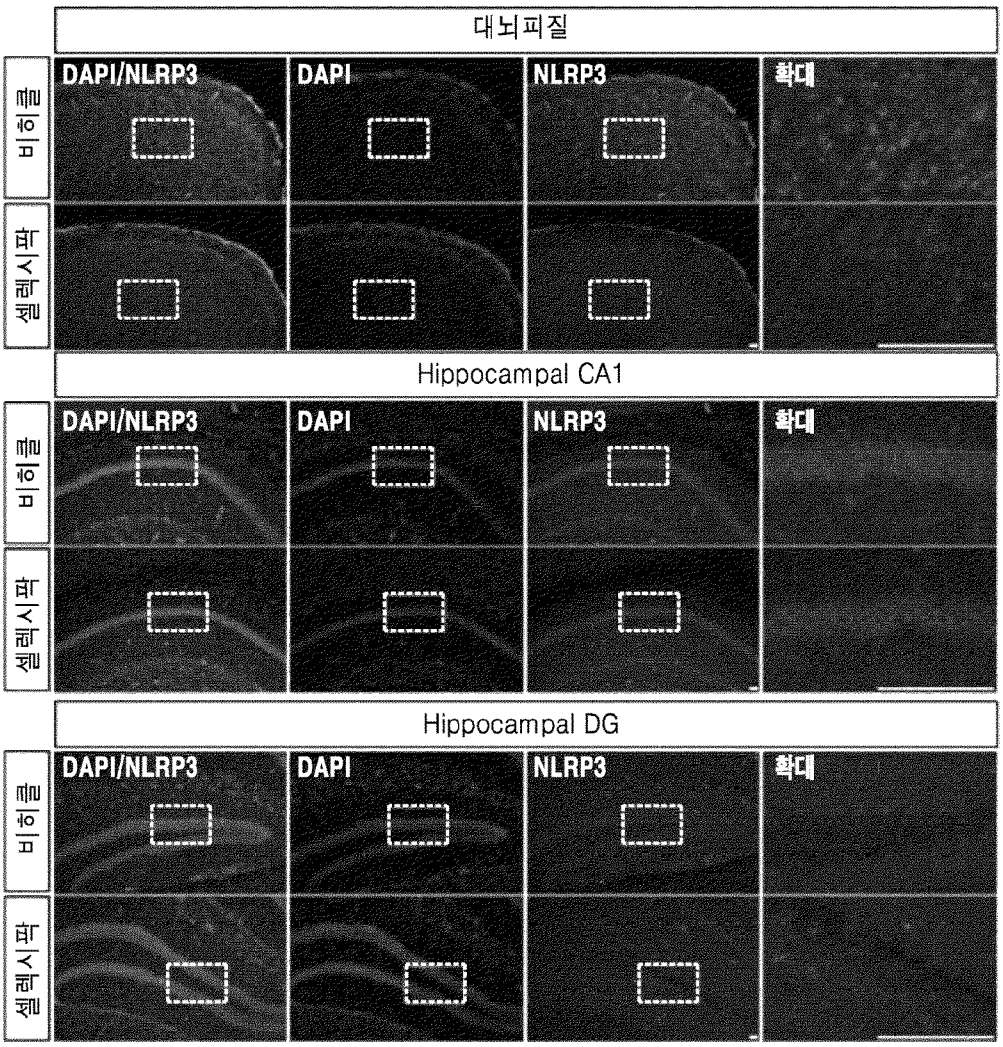
[도15a]



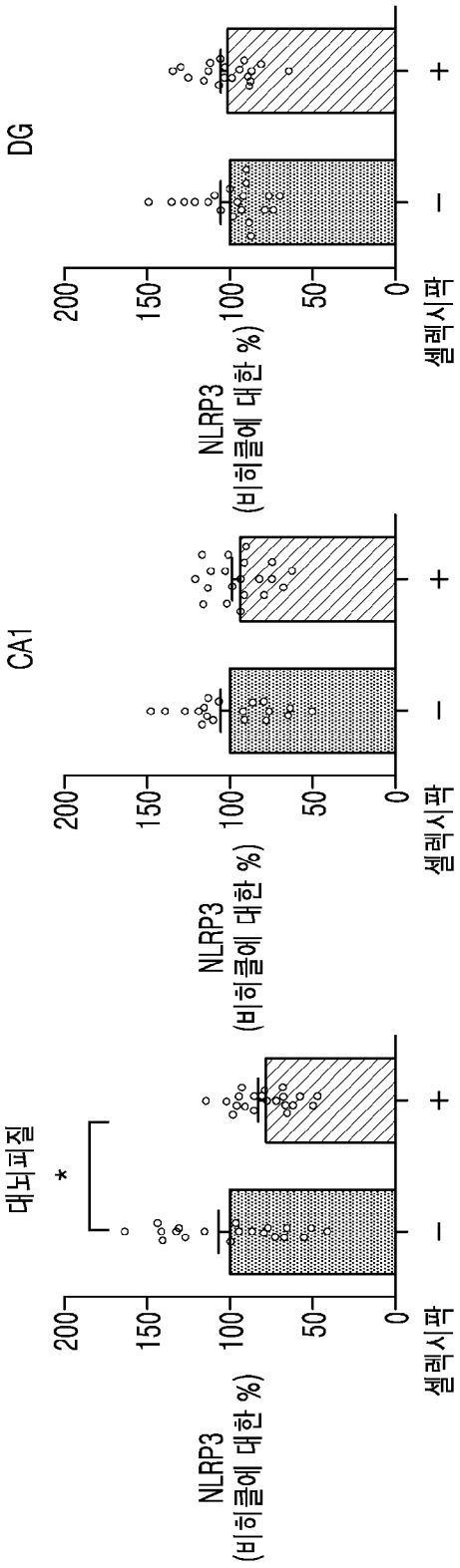
[도15b]



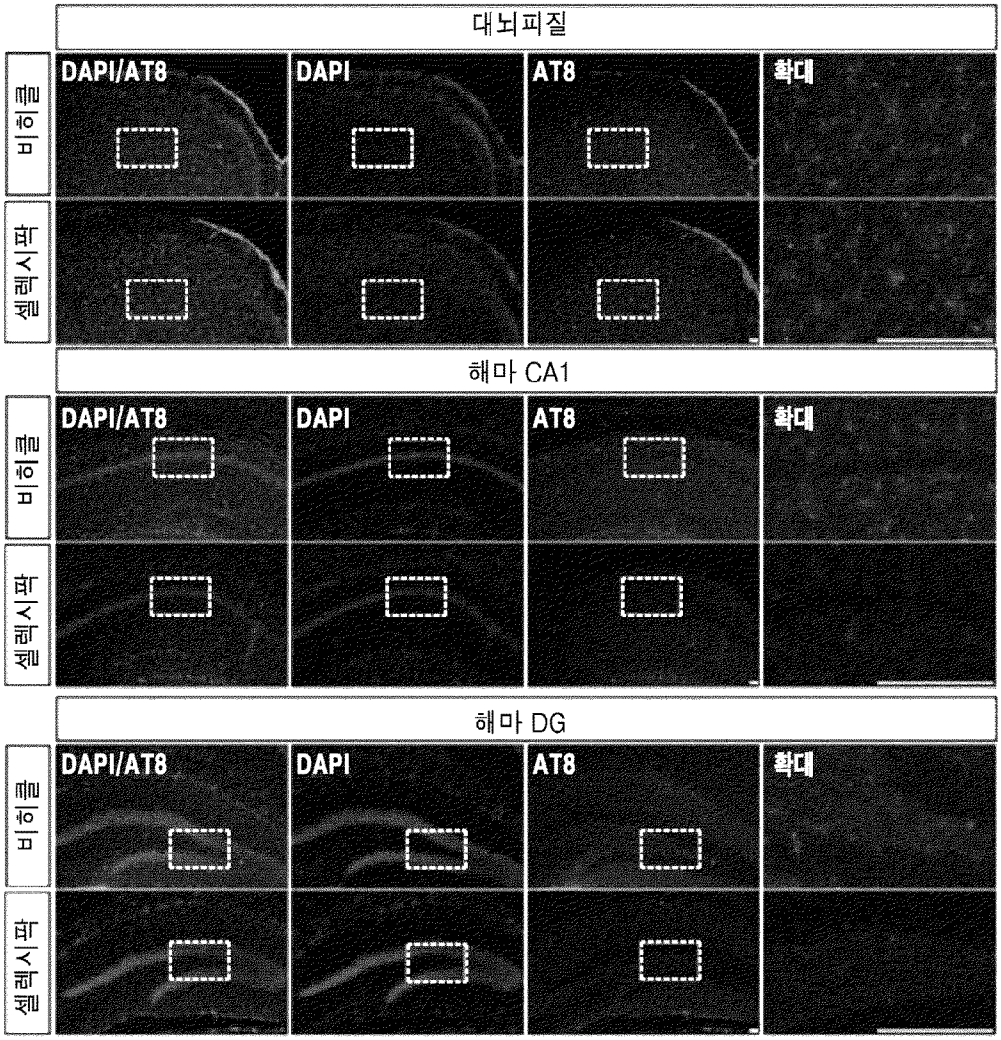
[도16a]


대뇌피질
비히클
셀렉시파
DAPI/NLRP3
DAPI
NLRP3
확대
Hippocampal CA1
비히클
셀렉시파
DAPI/NLRP3
DAPI
NLRP3
확대
Hippocampal DG
비히클
셀렉시파
DAPI/NLRP3
DAPI
NLRP3
확대

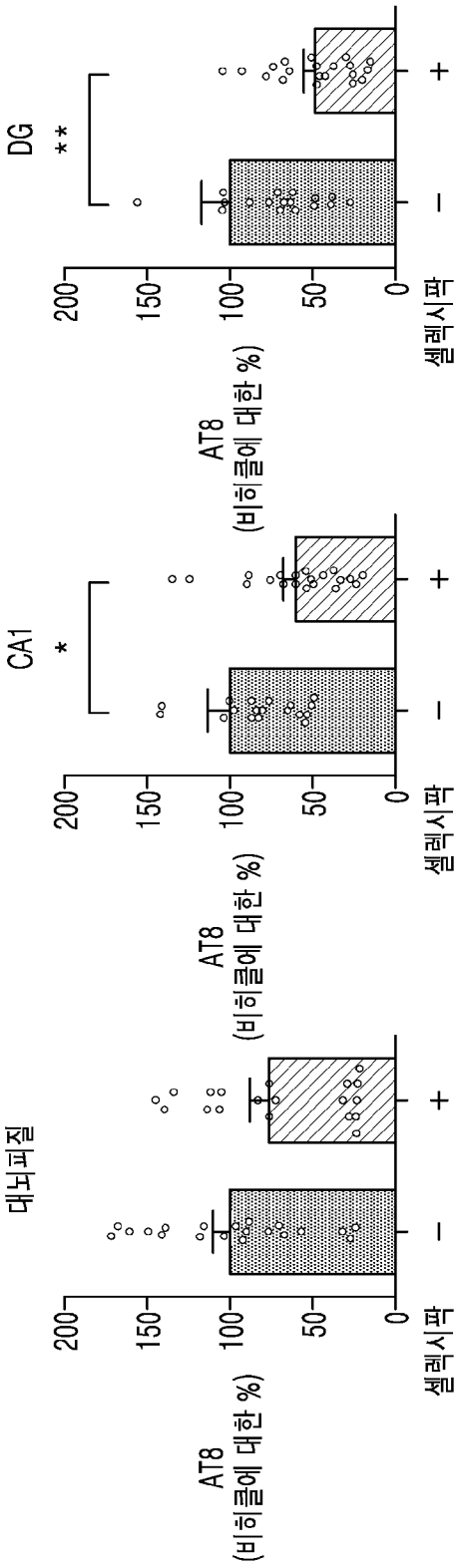
[도16b]



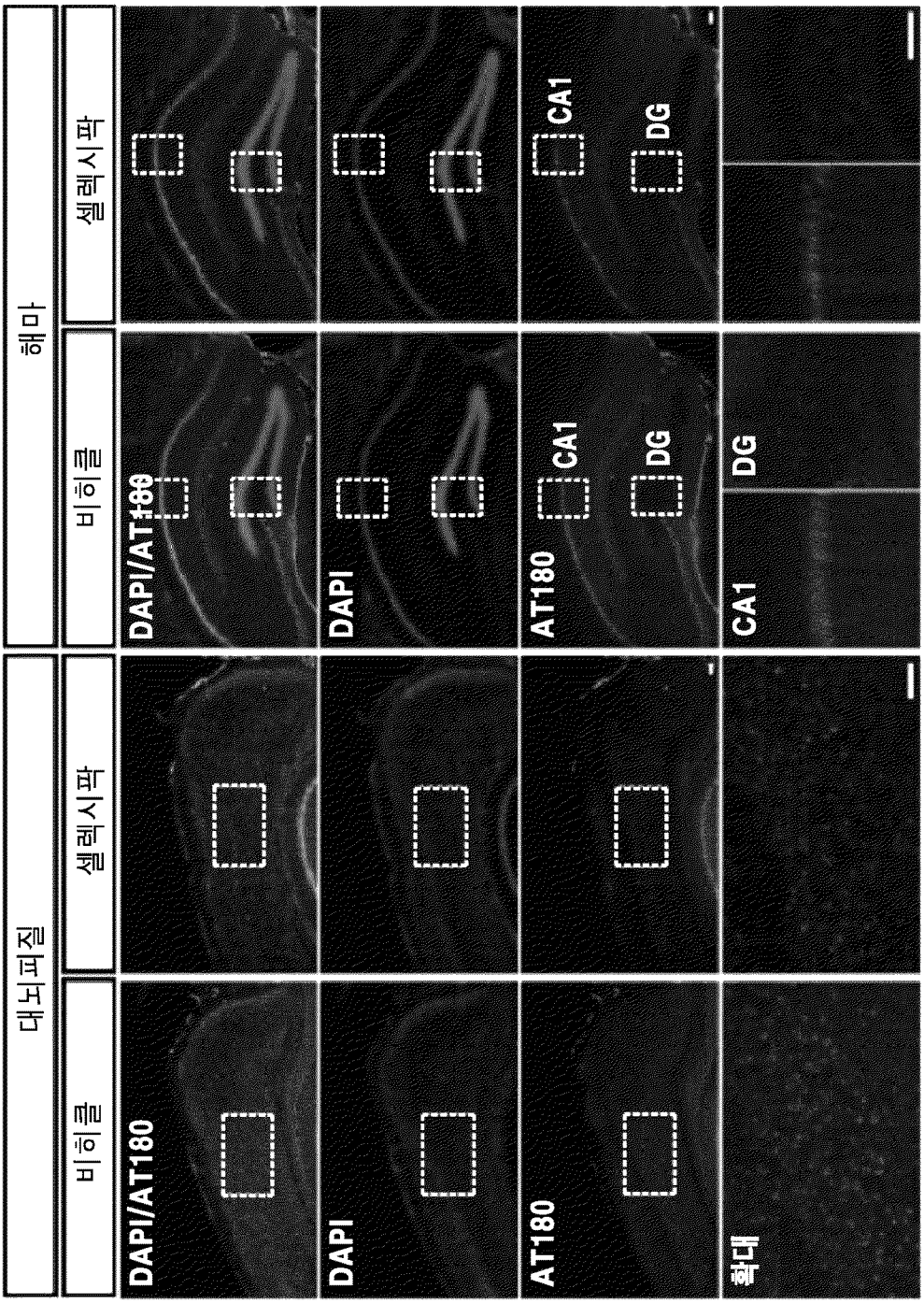
[도17a]


대뇌피질
비히클
셀렉시팜
DAPI/AT8
DAPI
AT8
확대
해마 CA1
비히클
셀렉시팜
DAPI/AT8
DAPI
AT8
확대
해마 DG
비히클
셀렉시팜
DAPI/AT8
DAPI
AT8
확대

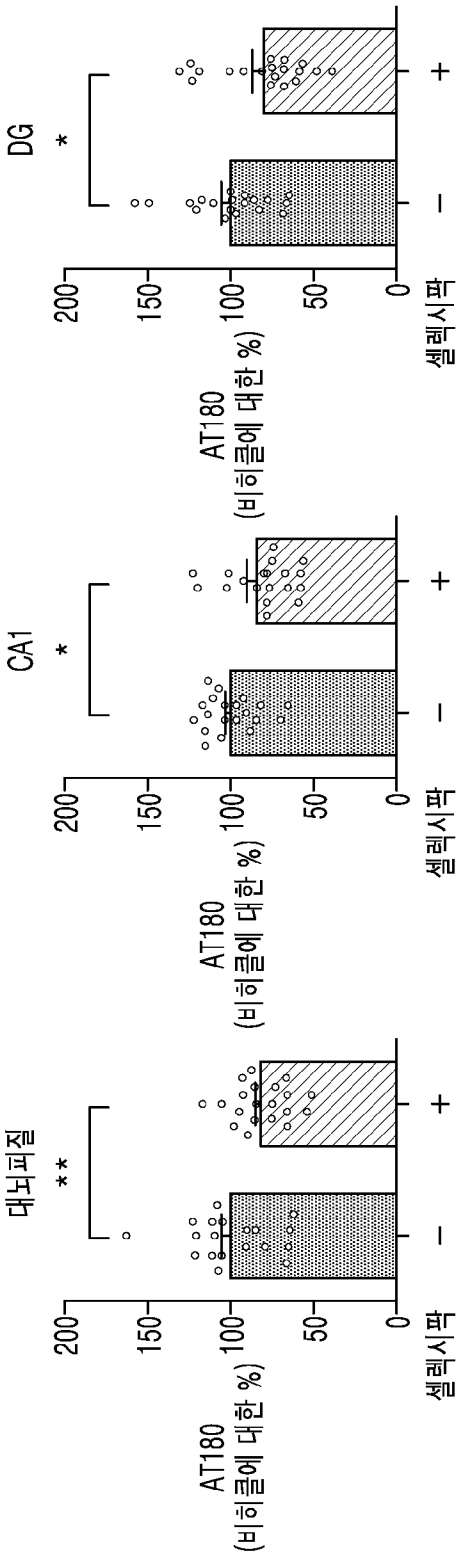
[도17b]



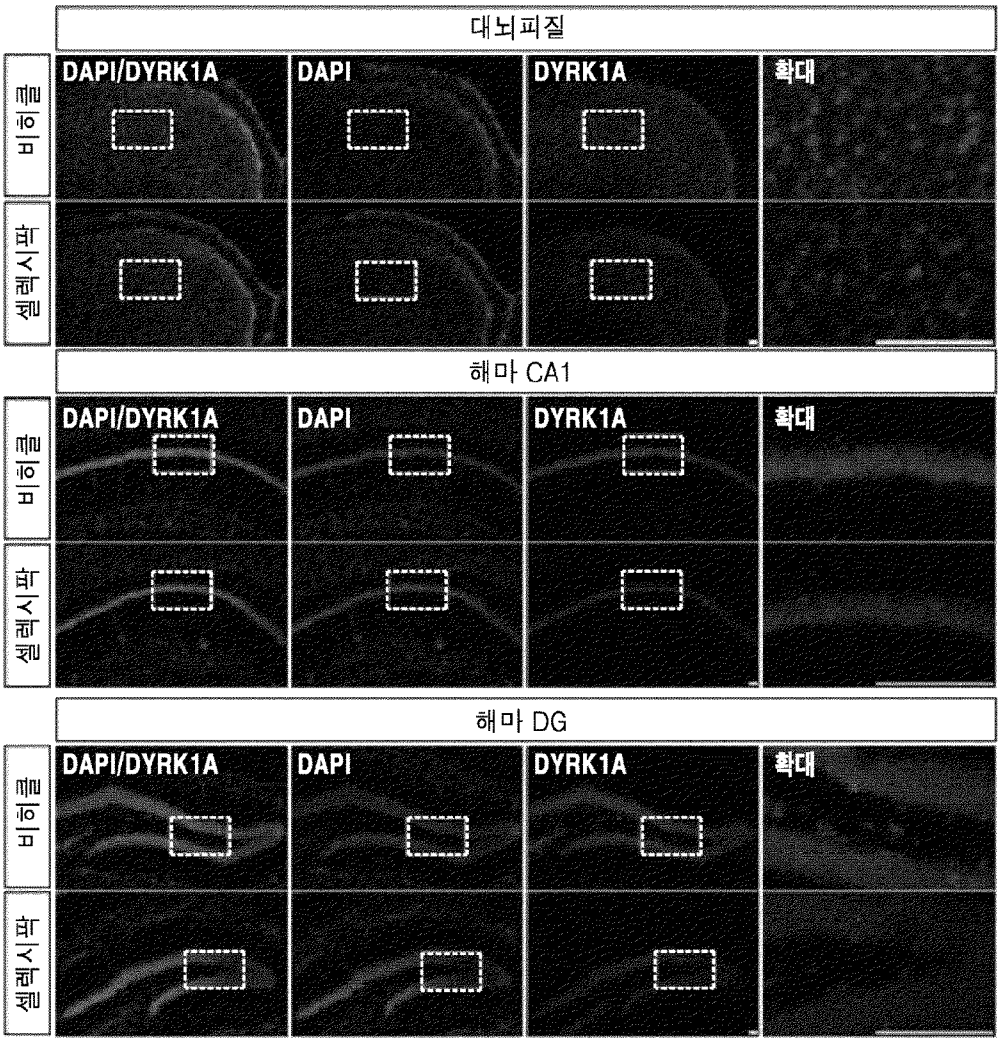
[도18a]


대뇌피질
해마
비히클
셀렉시팍
비히클
셀렉시팍
DAPI/AT180
DAPI
AT180
확대
DAPI/AT180
DAPI
AT180
CA1
DG
CA1
DG

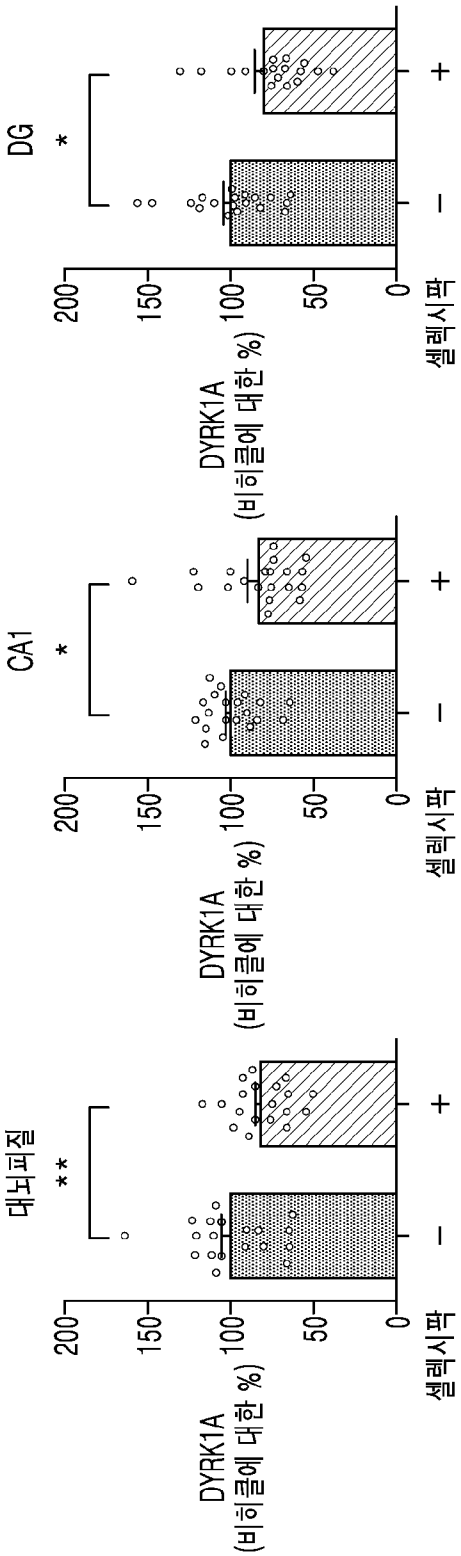
[도18b]



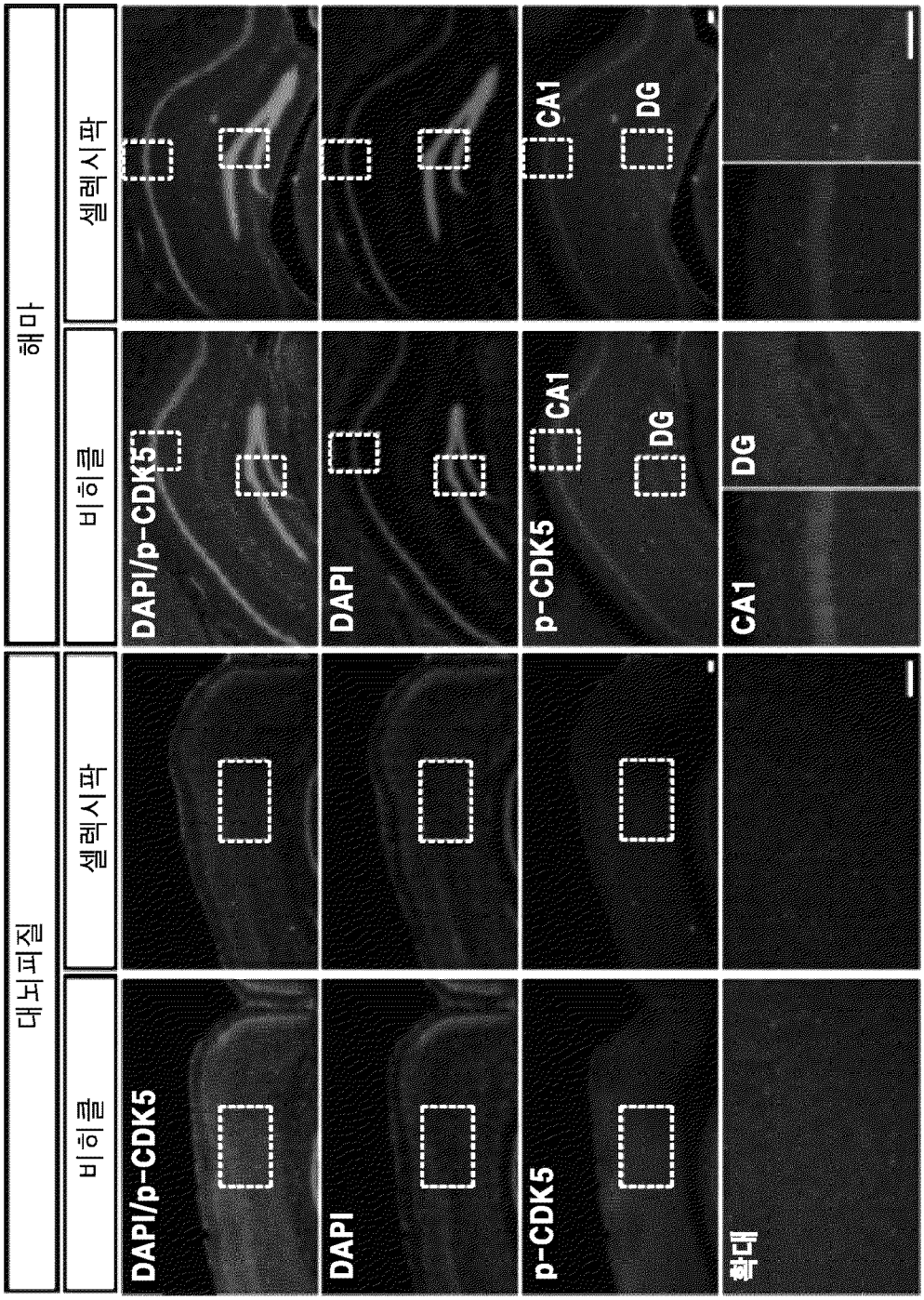
[도19a]


대뇌피질
비히클
셀렉시팍
DAPI/DYRK1A
DAPI
DYRK1A
확대
해마 CA1
비히클
셀렉시팍
DAPI/DYRK1A
DAPI
DYRK1A
확대
해마 DG
비히클
셀렉시팍
DAPI/DYRK1A
DAPI
DYRK1A
확대

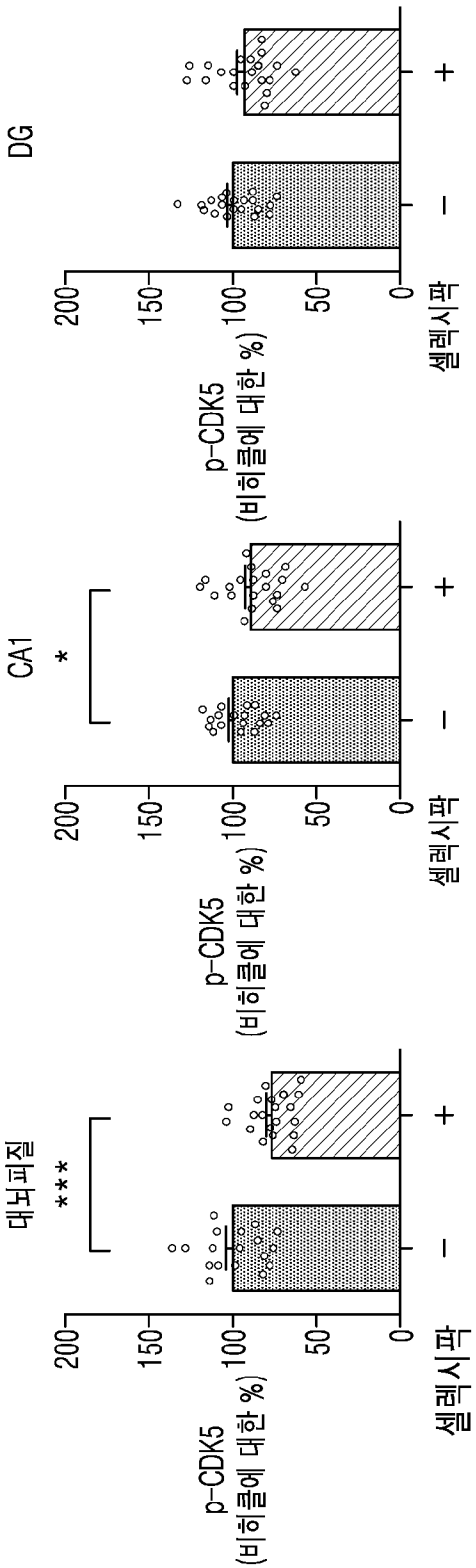
[도19b]



[도20a]



[도20b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/009678

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/4965(2006.01)i; **A61P 25/28**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/4965(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 31/27(2006.01); A61K 31/4406(2006.01); A61K 47/10(2006.01); A61K 9/127(2006.01); A61K 9/20(2006.01)

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: 셀렉시팍(selexipag), 퇴행성 뇌질환(degenerative brain disease), 미세아교세포(microglia), 성상세포(astrocyte), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	US 2020-0129506 A1 (ACTELION PHARMACEUTICALS LTD.) 30 April 2020 (2020-04-30)	
X	See claim 1; and paragraphs [0001], [0003] and [0092].	1,3,4,7-9
Y		2
A		5,6
	YANG, C. et al. Sustained Neurological Recovery after Stroke in Aged Rats Treated with a Novel Prostacyclin Analog. Stroke. 2017, vol. 48, pp. 1948-1956.	
X	See abstract; pages 1950-1952; and figures 1 and 3.	5
Y		2
	US 2021-0113464 A1 (OSAKA UNIVERSITY et al.) 22 April 2021 (2021-04-22)	
X	See claims 1, 2, 4 and 13.	1
	KR 10-2022-0119169 A (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.) 26 August 2022 (2022-08-26)	
A	See abstract; and claim 1.	1-9

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
10 October 2024	**14 October 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2022-0022444 A (DAEGU GYEONGBUK INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 25 February 2022 (2022-02-25) See claims 1, 2, 4 and 5.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/009678

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.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 10 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a 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.:
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:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/009678

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2020-0129506 A1	30 April 2020	AR 111570 A1	31 July 2019
		AU 2018-229750 A1	12 September 2019
		AU 2018-229750 B2	23 November 2023
		BR 112019018420 A2	14 April 2020
		CA 3055010 A1	13 September 2018
		CL 2019002511 A1	17 January 2020
		CN 110430900 A	08 November 2019
		CN 110430900 B	19 September 2023
		CO 2019009221 A2	30 August 2019
		CR 20190455 A	12 November 2019
		DO P2019000250 A	15 September 2020
		EA 201992074 A1	27 February 2020
		EC SP19072294 A	30 November 2019
		EP 3592391 A1	15 January 2020
		EP 3592391 B1	21 April 2021
		ES 2880009 T3	23 November 2021
		IL 269061 A	28 November 2019
		JP 2020-509070 A	26 March 2020
		JP 6964679 B2	10 November 2021
		KR 10-2019-0122803 A	30 October 2019
		KR 10-2593075 B1	23 October 2023
		MA 47816 A	15 January 2020
		MX 2019010598 A	15 October 2019
		NI 201900090 A	11 March 2020
		PE 20191492 A1	21 October 2019
		PH 12019502033 A1	15 June 2020
		PL 3592391 T3	02 November 2021
		SG 11201907804 A	27 September 2019
		TW 201842910 A	16 December 2018
		TW I764996 B	21 May 2022
		WO 2018-162527 A1	13 September 2018
US 2021-0113464 A1	22 April 2021	EP 3718537 A1	07 October 2020
		EP 3718537 A4	10 November 2021
		US 2024-0082154 A1	14 March 2024
		WO 2019-102606 A1	31 May 2019
KR 10-2022-0119169 A	26 August 2022	AU 2018-227842 A1	19 September 2019
		AU 2018-227842 B2	02 May 2024
		AU 2024-203156 A1	30 May 2024
		CA 3054835 A1	07 September 2018
		CN 110582271 A	17 December 2019
		CN 110582271 B	14 June 2022
		EP 3589274 A1	08 January 2020
		EP 3589274 B1	13 October 2021
		EP 3977985 A1	06 April 2022
		EP 3977985 B1	06 September 2023
		ES 2897024 T3	28 February 2022
		ES 2965069 T3	11 April 2024
		IL 268997 A	31 October 2019
		IL 268997 B1	01 May 2023
		IL 268997 B2	01 September 2023

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/009678

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2020-510660 A	09 April 2020
		JP 2022-070923 A	13 May 2022
		JP 7023559 B2	22 February 2022
		JP 7498202 B2	11 June 2024
		KR 10-2019-0124261 A	04 November 2019
		KR 10-2432505 B1	12 August 2022
		MA 47686 A	12 May 2021
		US 11123298 B2	21 September 2021
		US 11826471 B2	28 November 2023
		US 2019-0240159 A1	08 August 2019
		US 2021-0378965 A1	09 December 2021
		WO 2018-160882 A1	07 September 2018
KR 10-2022-0022444 A	25 February 2022	KR 10-2601028 B1	10 November 2023

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/009678

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/4965(2006.01)i; **A61P 25/28**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/4965(2006.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 31/27(2006.01); A61K 31/4406(2006.01); A61K 47/10(2006.01); A61K 9/127(2006.01); A61K 9/20(2006.01)

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: 셀렉시팍(selexipag), 퇴행성 뇌질환(degenerative brain disease), 미세아교세포(microglia), 성상세포(astrocyte), 알츠하이머병(alzheimer's disease), 파킨슨병(parkinson's disease)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2020-0129506 A1 (ACTELION PHARMACEUTICALS LTD) 2020.04.30 청구항 1; 단락 [0001], [0003], [0092]	1,3,4,7-9
Y		2
A		5,6
X	YANG, C. 등, "Sustained Neurological Recovery after Stroke in Aged Rats Treated with a Novel Prostacyclin Analog", Stroke, 2017, 48권, 페이지 1948-1956 초록; 페이지 1950-1952; 도면 1, 3	5
Y		2
X	US 2021-0113464 A1 (OSAKA UNIVERSITY 등) 2021.04.22 청구항 1, 2, 4, 13	1
A	KR 10-2022-0119169 A (아레나 파마슈티칼스, 인크.) 2022.08.26 요약; 청구항 1	1-9

☑ 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
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년10월10일(10.10.2024)	**2024년10월14일(14.10.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/009678

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2022-0022444 A (재단법인대구경북과학기술원) 2022.02.25 청구항 1, 2, 4, 5	1-9

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/009678

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: **10**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 10은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/009678

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2020-0129506 A1	2020/04/30	AR 111570 A1	2019/07/31
		AU 2018-229750 A1	2019/09/12
		AU 2018-229750 B2	2023/11/23
		BR 112019018420 A2	2020/04/14
		CA 3055010 A1	2018/09/13
		CL 2019002511 A1	2020/01/17
		CN 110430900 A	2019/11/08
		CN 110430900 B	2023/09/19
		CO 2019009221 A2	2019/08/30
		CR 20190455 A	2019/11/12
		DO P2019000250 A	2020/09/15
		EA 201992074 A1	2020/02/27
		EC SP19072294 A	2019/11/30
		EP 3592391 A1	2020/01/15
		EP 3592391 B1	2021/04/21
		ES 2880009 T3	2021/11/23
		IL 269061 A	2019/11/28
		JP 2020-509070 A	2020/03/26
		JP 6964679 B2	2021/11/10
		KR 10-2019-0122803 A	2019/10/30
		KR 10-2593075 B1	2023/10/23
		MA 47816 A	2020/01/15
		MX 2019010598 A	2019/10/15
		NI 201900090 A	2020/03/11
		PE 20191492 A1	2019/10/21
		PH 12019502033 A1	2020/06/15
		PL 3592391 T3	2021/11/02
		SG 11201907804 A	2019/09/27
		TW 201842910 A	2018/12/16
		TW I764996 B	2022/05/21
		WO 2018-162527 A1	2018/09/13
US 2021-0113464 A1	2021/04/22	EP 3718537 A1	2020/10/07
		EP 3718537 A4	2021/11/10
		US 2024-0082154 A1	2024/03/14
		WO 2019-102606 A1	2019/05/31
KR 10-2022-0119169 A	2022/08/26	AU 2018-227842 A1	2019/09/19
		AU 2018-227842 B2	2024/05/02
		AU 2024-203156 A1	2024/05/30
		CA 3054835 A1	2018/09/07
		CN 110582271 A	2019/12/17
		CN 110582271 B	2022/06/14
		EP 3589274 A1	2020/01/08
		EP 3589274 B1	2021/10/13
		EP 3977985 A1	2022/04/06
		EP 3977985 B1	2023/09/06
		ES 2897024 T3	2022/02/28
		ES 2965069 T3	2024/04/11
		IL 268997 A	2019/10/31
		IL 268997 B1	2023/05/01
		IL 268997 B2	2023/09/01

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/009678

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2020-510660 A	2020/04/09
		JP 2022-070923 A	2022/05/13
		JP 7023559 B2	2022/02/22
		JP 7498202 B2	2024/06/11
		KR 10-2019-0124261 A	2019/11/04
		KR 10-2432505 B1	2022/08/12
		MA 47686 A	2021/05/12
		US 11123298 B2	2021/09/21
		US 11826471 B2	2023/11/28
		US 2019-0240159 A1	2019/08/08
		US 2021-0378965 A1	2021/12/09
		WO 2018-160882 A1	2018/09/07
KR 10-2022-0022444 A	2022/02/25	KR 10-2601028 B1	2023/11/10