



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0056824
(43) 공개일자 2019년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/216 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/216 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0154151
(22) 출원일자 2017년11월17일
심사청구일자 2017년11월17일

(71) 출원인
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
이기중
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 211호
황순재
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 214호 면역 및 조직병리학 연구실
조민정
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 연세대학교 원주캠퍼스 미래관 214호 면역 및 조직병리학 연구실
(74) 대리인
김보민

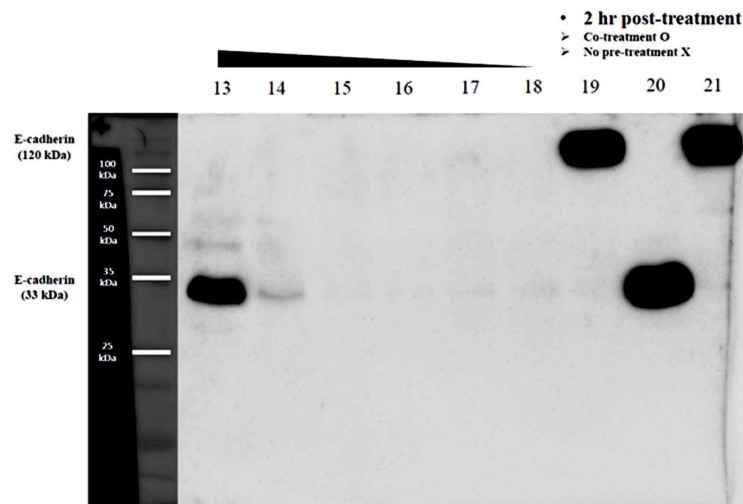
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아밀로이드증 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아밀로이드증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase inhibitor)로 작용하여 감마-세크레타제에 의한 아밀로이드 베타 생성을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 아밀로이드증 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017H1A2A1045727

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌박사펠로우십

연구과제명 장독소성 박테로이디스 프라질리스균에 의해 유발되는 장염의 기전 및 면역세포의 역할 규명

기여율 1/3

주관기관 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1A02018088

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 Th17면역반응으로 촉진되는 대장용종 형성 wild-type 마우스 모델 개발을 통해 고염식과 대장암 간에 상관관계 규명 및 병태생리적 메커니즘 연구

기여율 1/3

주관기관 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A9B4919711

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업(줄기세포연구사업)

연구과제명 세포미세환경 조절을 통한 생체모사 3차원 심혈관 조직재생 기술 개발

기여율 1/3

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2016.07.01 ~ 2021.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아밀로이드증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아밀로이드증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아밀로이드증(amyloidosis)은 단일 질환(single disease entity)이 아니라, 하나 이상의 기관 또는 신체 내에 축적되는, 아밀로이드로 불리는 밀랍상(waxy), 전분-유사 단백질의 세포외 조직 침착물(deposit)을 특징으로 하는 진행성 질환 과정의 다양한 그룹이다. 상기 아밀로이드 침착물이 축적되면서, 기관 또는 신체의 정상 기능을 방해하기 시작한다. 적어도 15개의 상이한 유형의 아밀로이드증이 존재한다. 주된 형태는 공지된 선행징후(antecedent)가 없는 원발성 아밀로이드증(primary amyloidosis), 일부 다른 병태(condition)에 따르는 속발성 아밀로이드증(secondary amyloidosis), 및 유전성 아밀로이드증(hereditary amyloidosis)이다.

[0003] 많은 노화 질환은 아밀로이드-유사 단백질에 기반하거나 이와 관련되고, 질환의 발병기전뿐만 아니라 진행에 기여하는 아밀로이드 또는 아밀로이드-유사 물질의 세포외 침착물의 형성을 일부 특징으로 한다. 이들 질환으로, 신경계 장애, 예컨대 알츠하이머병(AD), 루이 소체 치매(Lewy body dementia), 다운증후군(Down's syndrome), 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형)(hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch type)); 괄 파킨슨-치매 복합증(Guam Parkinson-Dementia complex)을 포함한다. 아밀로이드-유사 단백질에 기반하거나 또는 이와 관련된 다른 질환으로는 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 다발성 경화증(multiple sclerosis); 크로이츠펠트 야콥병(Creutzfeldt Jacob disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), HIV-관련 치매, ALS(근위축측가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis)), 성인 발병형 당뇨병(Adult Onset Diabetes); 노인성 심아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis); 내분비 종양, 및 황반 변성(macular degeneration)을 포함하는 그 밖의 질환이 있다.

[0004] 비록 이들 질환의 발병기전은 다양할 수 있지만, 이들의 특징적인 침착물은 종종 많은 공통적인(shared) 분자 성분을 함유한다. 이는 전염증성(pro-inflammatory) 경로의 국부적 활성화에 상당한 정도로 기여할 수 있어, 활성화된 보체 성분(complement component), 급성기 반응물질(acute phase reactant), 면역 조절물질(immune modulator), 및 다른 염증 매개체(inflammatory mediator)가 동시 침착을 가져올 수 있다.

[0005] 알츠하이머병(AD)은 뇌 내 단백질의 이상 침착물의 축적물인 아밀로이드 플라크에 기인하는 것으로 알려진 신경계 장애이다. 감마-세크레타제(γ -secretase)는 주로 알츠하이머병의 치료에 연구되는 단백질로, 알츠하이머병의 주원인으로 알려진 아밀로이드 베타 펩티드(amyloid beta peptides)를 생성하는데 중요한 역할을 한다. 감마-세크레타제는 4개의 단백질, 예를 들어 프레세닐린(presenilin), 니카스트린(nicastrin), pen-2, aph-1로 이루어진 공동 복합체 단백질 분해 활성화제이다. 프레세닐린은 감마-세크레타제의 활성화에 필수성분이고, 이들 기질의 트랜스 맴브레인에서 분열하여 스스로 폴리토픽(polytopic) 맴브레인 단백질이 되는 변칙적인 아스파르트 프로테아제의 새로운 그룹을 나타낸다. 니카스트린은 비교적 큰 분자량의 단백질로 세포막에 존재하는 감마-세크

레타제의 구성 단위이며, 세포 표면에 존재할 경우에는 니카스트린에 세포 외부로 향해 있으면서 수용체 구실을 한다. 또한, 세포막에 존재하는 몇몇 세포들과 결합을 형성하는데 이 가운데는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein; APP)도 포함된다. 일단 결합을 형성하고 나면 아밀로이드 전구체 단백질을 감마-세크레타제의 활성 부위로 이동시키고 여기서 단백질이 두 부위로 쪼개지면서 아밀로이드-베타는 세포 밖으로 배출되고 다른 한 부위는 세포 내부에 남는다. 세포 밖으로 분비된 아밀로이드-베타가 뇌에 축적되어 플라크(plaque)를 만들면 바로 알츠하이머병의 대표적인 특징이 생기게 된다.

[0006] 이러한 연구결과에 근거하여 알츠하이머병 치료제로 감마-세크레타제를 억제하는 약물을 개발하기 위한 노력을 기울이고 있으나, 이들 약물에서 상당한 부작용이 발견되고 있어 부작용이 없는 약물의 개발이 필요한 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 부작용이 적은 아밀로이드증 치료제로서 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase inhibitor)를 개발하기 위해 노력한 결과, 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 농도가 40 ~ 80 μ M일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하는 것을 확인하여, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 아밀로이드증 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2012-0039468호

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Wolfe MS (2006) The γ -Secretase Complex: Membrane-Embedded Proteolytic Ensemble. Biochemistry 45(26): 7931-9

(비특허문헌 0002) & Paul Greengard (2010) Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. Nature 467:95-98.

(비특허문헌 0003) Wu, S., Lim, K.-C., Huang, J., Saidi, R. F. and Sears, C. L. (1998) Bacteroides fragilis enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 14979-14984.

(비특허문헌 0004) Shaoguang Wu, Ki-Jong Rhee, Ming Zhang, Augusto Franco and Cynthia L. Sears (2007) Bacteroides fragilis toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and γ -secretase-dependent E-cadherin cleavage. Journal of Cell Science 120(11): 1944-1952.

(비특허문헌 0005) Shaoguang Wu, Patrice J. Morin, Djik Maouyo and Cynthia L. Sears (2003) Bacteroides fragilis Enterotoxin Induces c-Myc Expression and Cellular Proliferation. Gastroenterology 124(2): 392-400.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아밀로이드증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아밀로이드증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아밀로이드증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아밀로이드증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명은 BFT(Bacteroides fragilis toxin)을 처리하여 감마-세크레타제(gamma-secretase)의 활성화를 유도한 세포에서 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester)가 감마-세크레타제 활성을 저해하는 것을 확인하였으므로, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 아밀로이드증 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 HCT116 대장암 세포주에 CAPE 또는 DMSO, 및 recom ET 또는 recom NT를 동시에 1시간 동안 처리한 후 E-cadherin의 분절 양상을 확인한 도이다:

- 1: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10);
- 2: DMSO + recom ET (1:10);
- 3: CAPE (80 μ M) + recom NT (1:10);
- 4: DMSO + recom NT (1:10);
- 5: DMSO + BHIB (1:10); 및
- 6: DMSO + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지(serum free media).

도 2는 HCT116 대장암 세포주에 CAPE, DMSO 또는 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase inhibitor), 및 recom ET를 동시에 30분 또는 1시간 동안 처리한 후 E-cadherin의 분절 양상을 확인한 도이다:

- 7: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 8: DMSO + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 9: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 10: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 11: DMSO + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 12: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 13: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 14: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리; 및
- 15: DMSO + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리.

도 3은 HT29/C1 대장암 세포주에 CAPE, DMSO 또는 감마-세크레타제 저해제, 및 recom ET를 동시에 30분 또는 1시간 동안 처리한 후 E-cadherin의 분절 양상을 확인한 도이다:

- 12: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 30분 처리;

- 13: DMSO + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 14: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10), 30분 처리;
- 15: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 16: DMSO + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 17: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10), 1시간 처리;
- 18: DMSO + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리
- 19: CAPE (80 μ M) + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리; 및
- 20: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지, 1시간 처리.

도 4는 HT29/C1 대장암 세포주에 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M 또는 5 μ l의 CAPE, 80 μ M의 DMSO 또는 1.5 μ M의 감마-세크레타제 저해제, 및 recom ET를 동시에 2시간 동안 처리한 후 E-cadherin의 분절 양상을 확인한 도이다:

- 13: CAPE (80 μ M) + recom ET (1:10);
- 14: CAPE (40 μ M) + recom ET (1:10);
- 15: CAPE (20 μ M) + recom ET (1:10);
- 16: CAPE (10 μ M) + recom ET (1:10);
- 17: CAPE (5 μ M) + recom ET (1:10);
- 18: DMSO + recom ET (1:10);
- 19: DMSO + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지;
- 20: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + recom ET (1:10); 및
- 21: 감마-세크레타제 저해제 (1.5 μ M) + FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

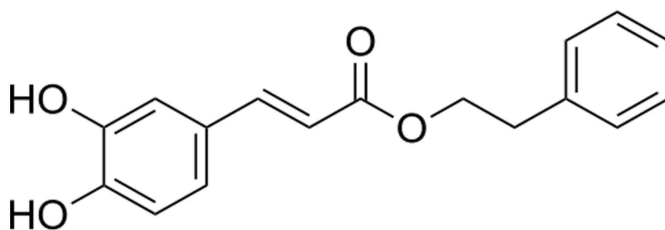
이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르(caffeic acid phenethyl ester) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아밀로이드증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명에서 카페인산 페네틸 에스테르는 당업계에 공지된 추출 및 분리 방법을 사용하여 벌집, 벌꿀 또는 프로폴리스(Propolis)로부터 추출 및 분리하여 수득하거나, 화학적 합성으로 합성한 것 모두 무방하게 사용될 수 있다.

또한, 상기 카페인산 페네틸 에스테르는 하기 [화학식 1]로 기재되는 화합물인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 카페인산 페네틸 에스테르 유도체도 본 발명에 포함된다.

[화학식 1]



- [0022] 본 발명에서, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 20 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 바람직하고, 40 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 보다 바람직하며, 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase inhibitor)로서, 감마-세크레타제(gamma-secretase) 활성을 억제하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 20 μ M 미만 또는 80 μ M 초과하여 함유할 경우 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로서 작용하지 못하여 치료 효과가 미비할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, 상기 아밀로이드증은 예를 들어, 알츠하이머병(AD), 경증 인지 손상(mild cognitive impairment, MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 광 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펠트 야콥 병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발 병형 당뇨병, 노인성 심아밀로이드증, 황반 변성, 드루젠-관련 시각 신경병증(drusen-related optic neuropathy), 또는 베타-아밀로이드 침착에 의한 백내장(cataract)을 포함하는 다양한 안질환(eye disease)과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 다른 질환을 포함하는 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 대장암 세포주에 ETBF가 분비하는 활성 BFT(*Bacteroides fragilis* toxin)와 카페인산 페네틸 에스테르를 동시에 처리한 결과, 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 33 kDa의 E-cadherin 절편을 생성함으로써, ETBF에 의하여 세포에 분포하는 E-cadherin 이 분절되어 분해되는 것을 억제하는 것을 확인하였고, 특히 40 ~ 80 μ M 농도에서 카페인산 페네틸 에스테르가 감마-세크레타제 저해제로 작용함을 확인하였다(도 1 내지 도 4 참조).
- [0025] 따라서, 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 농도가 40 ~ 80 μ M일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 감마-세크레타제에 의한 아밀로이드 베타 생성을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 아밀로이드증 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 [화학적 1]로 표시되는 카페인산 페네틸 에스테르뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세미체, 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.
- [0027] 본 발명의 [화학적 1]로 표시되는 카페인산 페네틸 에스테르는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 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, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 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, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.
- [0028] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, [화학적 1]로 표시되는 카페인산 페네틸 에스테르를 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

- [0029] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0030] 상기 조성물을 제제화할 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0031] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화학식 1로 표시되는 카페인산 페네틸 에스테르에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0032] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0033] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0035] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 mg 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0036] 또한, 본 발명은 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 아밀로이드증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0037] 본 발명에서, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 0.1 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 바람직하고, 20 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 보다 바람직하며, 40 ~ 80 μ M로 함유하는 것이 보다 더 바람직하고, 감마-세크레타제 저해제로서, 감마-세크레타제 활성을 억제하는 것이 바람직하다.
- [0038] 본 발명에서, 상기 아밀로이드증은 예를 들어, 알츠하이머병(AD), 경증 인지 손상(mild cognitive impairment, MCI), 루이 소체 치매, 다운증후군, 아밀로이드증성 유전성 뇌출혈(네덜란드형), 팜 파킨슨-치매 복합증과 같은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하는 질환 또는 병태, 진행성 핵상 마비, 다발성 경화증, 크로이츠펔트 야콥 병, 파킨슨병, HIV-관련 치매, ALS(근육위축가쪽경화증), 봉입체 근염(inclusion-body myositis, IBM), 성인발병형 당뇨병, 노인성 심아밀로이드증, 황반 변성, 드루젠-관련 시각 신경병증(drusen-related optic neuropathy), 또는 베타-아밀로이드 침착에 의한 백내장(cataract)을 포함하는 다양한 안질환(eye disease)과 같은 아밀로이드-유사 단백질에 기인하거나 또는 이와 관련되는 다른 질환을 포함하는 질환과 같은 속발성 아밀로이드증 및 연령-관련 아밀로이드증을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0039] 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 농도가 40 ~ 80 μ M일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 감마-세크레타제에 의한 아밀로이드 베타 생성을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 아밀로이드증 예방 또는 개선용 건강기능식품의 유효성분으로 이용할 수 있다.
- [0040] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0041] 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 화합물을 함유하는 것 외에는 다른 성분에 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르트름 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 15 g이다.
- [0043] 상기 외에 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 카페인산 페네틸 에스테르 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0044] 이하 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.
- [0045] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] <실시예 1> BFT(*Bacteroides fragilis* toxin)를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE에 의한 감마-세크레타제 활성 저해 효과 확인
- [0047] ETBF(Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*)가 분비한 BFT(*Bacteroides fragilis* toxin)에 의하여 세포에 분포하는 E-cadherin이 분절되어 분해되며, 이 때 감마-세크레타제(γ -secretase)가 33 kDa 크기의 E-cadherin 절편을 28 kDa 크기의 E-cadherin 절편으로 분절하여 세포 내에서 빠르게 분해된다고 알려져 있다. 따라서, BFT를 처리하여 감마-세크레타제의 활성화를 유도한 대장암 세포주에서 CAPE의 효과를 알아보기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.
- [0048] <1-1> BFT를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE에 의한 감마-세크레타제 활성 저해 효과 확인

- [0049] BFT(Bacteroides fragilis toxin)를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE가 감마-세크레타제 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같이 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다.
- [0050] 구체적으로, HCT116 대장암 세포주를 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신이 포함된 DMEM 배지로, 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 그 다음, 상기 세포에 CAPE(tokyo chemical industry, JP) 또는 DMSO 80 μM, 및 재조합을 통해 활성화된 BFT인 recom ET (HCT116 대장암 세포주 : recom ET = 1:10) 또는 재조합을 통해 비활성화된 돌연변이 BFT인 recom NT(HCT116 대장암 세포주 : recom NT = 1:10)를 동시에 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다.
- [0051] 상기 recom ET는 상기 <실시예 1>에 기재된 방법에서 WT-ETBF 균주 대신 활성화된 BFT 유전자를 포함하는 플라스미드로 재조합된 *B. fragilis* NCTC 9343 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하고 원심분리한 후 회수한 상층액을 말한다. 상기 recom NT는 상기 <실시예 1>에 기재된 WT-ETBF 균주 대신 *B. fragilis* H352Y 균주를 이용하는 것을 제외하고 나머지 과정은 동일하게 진행하고 원심분리한 후 회수한 상층액을 말한다.
- [0052] 또한, 대조군으로 이용하기 위하여 상기 세포에 DMSO 5 μl, 및 BHIB (HCT116 대장암 세포주 : BHIB = 1:10) 또는 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지(serum free media)를 동시에 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다.
- [0053] 그 다음, 프로테아제 및 포스포타아제 억제제 (Roche, Basel, Switzerland)가 풍부한 RIPA 완충액을 사용하여 상기 회수한 세포를 용해하여 단백질을 분리하였다. 상기 세포의 단백질 용해물(30 μg)을 SDS-PAGE로 전기영동한 후, 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membranes)(PALL Life Sciences)으로 전달시켰다. 그 다음, 일차 항체로 항-E-cadherin 항체, 항-GAPDH를 처리하여 반응시킨 후, 상기 막에 붙은 일차 항체에 HRP-접합 이차 항체를 붙이고, 이를 ECL(BIO-RAD, USA)을 이용하여 확인하였다. 이미지는 FUSION SOLO S chemiluminescence & optional fluorescence imaging (VILBER, France)을 이용하였다(도 1).
- [0054] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, CAPE와 BFT를 동시에 처리한 대장암 세포주에서는 33 kDa의 E-cadherin 절편이 생성되는 것을 확인하였다(도 1).
- [0055] 이에, CAPE가 감마-세크레타제 활성을 억제하는지 알아보기 위하여, 다음과 같이 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다.
- [0056] 구체적으로, 상기 HCT116 대장암 세포주에 CAPE 80 μM, DMSO 5 μl 또는 감마-세크레타제 저해제(gamma-secretase inhibitor, L-685, 458; Calbiochem, SanDiego, CA) 1.5 μM, 및 recom ET (HCT116 대장암 세포주 : recom ET = 1:10)를 동시에 30분 또는 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다. 또한, 대조군으로 이용하기 위하여, 상기 HCT116 대장암 세포주에 CAPE 80 μM, DMSO 5 μl 또는 감마-세크레타제 저해제 1.5 μM, 및 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지(serum free media)를 동시에 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다. 그 다음, 상기에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다(도 2).
- [0057] 또한, 또 다른 대장암 세포주인 HT29/C1 세포주에 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신이 포함된 DMEM 배지로, 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 그 다음, 상기에 기재된 방법과 동일한 방법으로 CAPE, DMSO 또는 감마-세크레타제 저해제, 및 recom ET 또는 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지를 동시에 30분 또는 1시간 동안 처리한 후 세포를 회수하여 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다(도 3).
- [0058] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, HCT116 대장암 세포주에서 CAPE 및 BFT를 동시에 처리한 그룹과 감마-세크레타제 저해제 및 BFT를 동시에 처리한 그룹 모두 33 kDa의 E-cadherin 절편을 형성하는 것을 확인하였다(도 2, 라인 7, 9, 10 및 12). 또한, HT29/C1 대장암 세포주에서도 CAPE 및 BFT를 동시에 처리한 그룹과 감마-세크레타제 저해제 및 BFT를 동시에 처리한 그룹 모두 33 kDa의 E-cadherin 절편을 형성하는 것을 확인하였다(도 3, 라인 12, 14, 15 및 17). 따라서, 상기 결과를 통해 CAPE가 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하여 BFT에 의해 E-cadherin이 분해되는 것을 억제함을 확인하였다.
- [0059] <1-2> BFT를 처리한 대장암 세포주에서 CAPE 처리 농도에 의한 감마-세크레타제 활성 억제 효과 확인
- [0060] CAPE의 농도에 따른 감마-세크레타제 활성 억제 효과를 알아보기 위하여, 다음과 같이 웨스턴 블롯팅 분석을

수행하였다.

[0061] 구체적으로, HT29/C1 세포주에 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신이 포함된 DMEM 배지로, 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 그 다음, 상기 세포주에 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM 또는 80 μM의 CAPE, 5 μl의 DMSO 또는 1.5 μM의 감마-세크레타제 저해제, 및 recom ET (HCT116 대장암 세포주 : recom ET = 1:10)를 동시에 2시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다. 또한, 대조군으로 이용하기 위하여, 상기 HT29/C1 대장암 세포주에 DMSO 80 μM 또는 감마-세크레타제 저해제 1.5 μM, 및 FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지(serum free media)를 동시에 2시간 동안 처리한 후 세포를 회수하였다. 그 다음, 상기 실시예 <3-2>에 기재된 방법과 동일한 방법으로 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다(도 4).

[0062] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, CAPE를 40 ~ 80 μM로 처리한 경우 33 kDa의 E-cadherin 절편이 생성되는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 결과를 통해 CAPE 농도가 40 ~ 80 μM일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용함을 확인하였다(도 4).

[0063] 따라서, 상기 <실시예 1>의 결과를 통해 CAPE 농도가 40 ~ 80 μM일 경우에 감마-세크레타제 활성을 저해하는 감마-세크레타제 저해제로 작용하여, 감마-세크레타제에 의한 아밀로이드 베타 생성을 억제할 수 있음을 확인하였으므로, 상기 CAPE를 아밀로이드증 치료에 이용할 수 있다.

[0064] 이하, 본 발명에 따른 각 제제의 제조예를 예시한다. 하기 제조예는 본 발명의 실시예에 대한 이해를 돕기 위한 것이지 본 발명에 따른 제형의 제조방법이 하기 제조예로 한정되는 것을 의미하지 않는다.

[0065] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0066] <1-1> 산제의 제조

[0067]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	2 g
[0068]	유당	1 g

[0069] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0070] <1-2> 정제의 제조

[0071]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	10 mg
[0072]	옥수수전분	100 mg
[0073]	유 당	100 mg
[0074]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0075] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0076] <1-3> 캡슐제의 제조

[0077]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	10 mg
[0078]	옥수수전분	100 mg
[0079]	유 당	100 mg
[0080]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0081] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0082] <1-4> 환의 제조

[0083]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	1 g
[0084]	유당	1.5 g
[0085]	글리세린	1 g
[0086]	자일리톨	0.5 g
[0087]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.	

[0088] <1-5> 과립의 제조

[0089]	CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염	1 g
[0090]	포도당	200 mg
[0091]	전분	600 mg
[0092]	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 200 mg을 첨가하여 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	

[0093] <제조예 2> 건강식품의 제조

[0094] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0095] <2-1> 밀가루 식품의 제조

[0096] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 0.5 내지 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0097] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0098] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 0.1 내지 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0099] <2-3> 유제품(dairy products)의 제조

[0100] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 5 내지 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0101] <2-4> 전식의 제조

[0102] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0103] 감정콩, 감정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0104] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0105] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0106] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

- [0107] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
 [0108] CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염(3 중량부),
 [0109] 영지(0.5 중량부),
 [0110] 지황(0.5 중량부)

[0111] <제조예 3> 건강음료의 제조

[0112] <3-1> 건강음료의 제조

- [0113] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0114] <3-2> 야채 주스의 제조

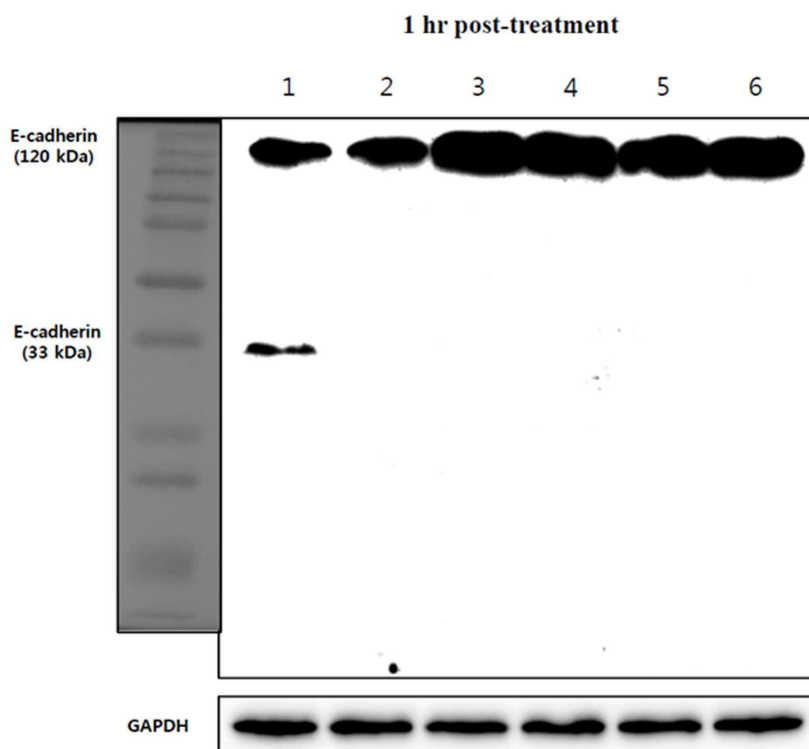
- [0115] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0116] <3-3> 과일 주스의 제조

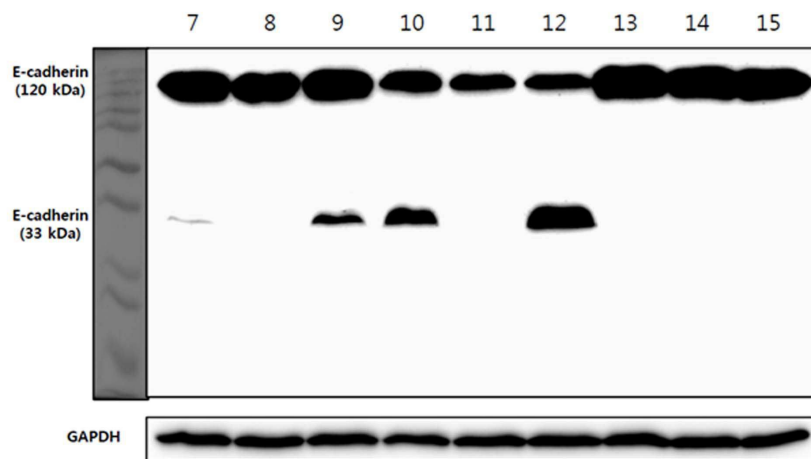
- [0117] 본 발명의 CAPE 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

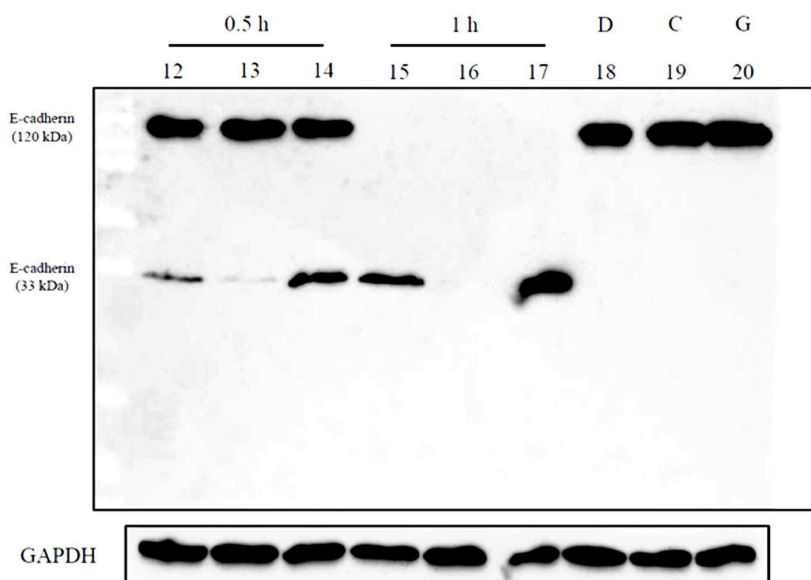
도면1



도면2



도면3



도면4

