



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월06일
(11) 등록번호 10-2597711
(24) 등록일자 2023년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/445 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 25/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/445 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0110120
(22) 출원일자 2021년08월20일
심사청구일자 2021년08월20일
(65) 공개번호 10-2023-0027861
(43) 공개일자 2023년02월28일
(56) 선행기술조사문헌
European Journal of Neuroscience, 2007,
25(12), 3659-3666
The Journal of physiology, 2013. 591(10),
2429-2441

(73) 특허권자
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교천안캠퍼스내(안서동)
기초과학연구원
대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)
(72) 발명자
윤보은
경기도 용인시 기흥구 구성로53번길 20, 104동
703호(마북동, 효성해링턴플레이스)
이창준
대전광역시 유성구 엑스포로151번길 19, C동 32
1호(도룡동, 하우스디어반)
(74) 대리인
특허법인태백
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 6 항

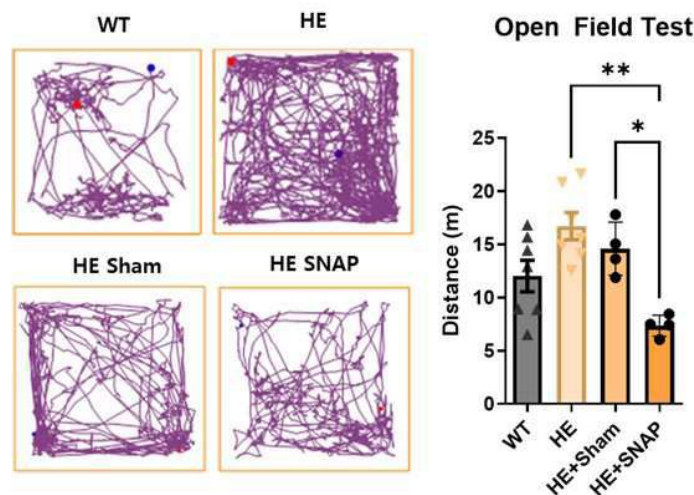
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 SNAP5114을 유효성분으로 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 SNAP5114을 유효성분으로 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, *Git1* 유전자 결손 헤테로 (+/-) 마우스에서는 과잉행동(hyperactivity)을 관장하는 뇌의 선조체(Striatum)에서 GABA의 양이 증가하는 것을 확인하여 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit / hyperactivity disorder, ADHD) 동물 모델로 사용될 수 있으며, *Git1* 유전자 결손 헤테로 (+/-) 마우스에 SNAP5114을 투여함에 따라 과잉행동(hyperactivity)이 개선되는 것을 확인함으로써, SNAP5114가 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit / hyperactivity disorder, ADHD)의 치료제로 제공된다.

대표도 - 도3



- (52) CPC특허분류
A61P 25/18 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

사문선

대전광역시 유성구 상대로 16, 510동 901호(상대동, 도안신도시5블록트리폴시티아파트)

- (72) 발명자
김유성
 충청남도 천안시 동남구 터미널9길 59, 206동 130 2호(신부동, 대림한들아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132502
과제번호	2019M3C7A1031455
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발(R&D)
연구과제명	신경발달장애의 성별 특이적 병리 기전 규명을 통한 제어기술개발
기 여 율	25.5/100
과제수행기관명	단국대학교(천안캠퍼스)
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315762
과제번호	2018R1D1A1B07045561
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	ADHD 동물 모델을 활용한 신경세포와 교세포의 상호작용 연구
기 여 율	25.5/100
과제수행기관명	단국대학교(천안캠퍼스)
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711134280
과제번호	IBS-R001-D2-2021-A00
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	기초과학연구원
연구사업명	기초과학연구원연구운영비지원(R&D)
연구과제명	교세포의 인지적 기능 연구
기 여 율	49/100
과제수행기관명	기초과학연구원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

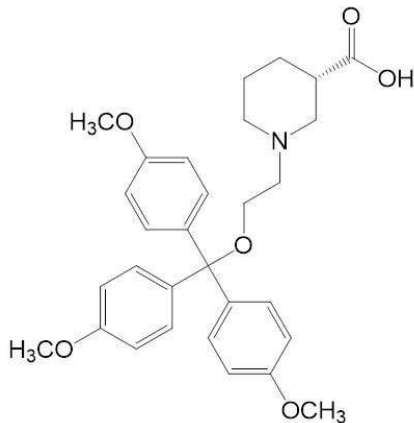
청구항 1

SNAP5114 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 SNAP5114는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 SNAP5114는 과잉행동을 개선시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 제형화를 위해 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

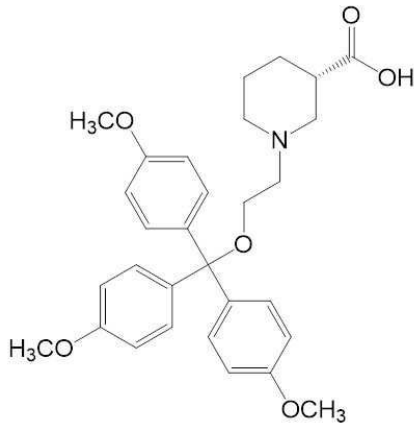
청구항 5

SNAP5114 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD)의 예방 또는 건강기능 식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 SNAP5114는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 건강기능 식품 조성물.

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SNAP5114을 유효성분으로 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD)는 유년기에 처음 나타나는 흔한 정신질환 중 하나이며, 이는 또한 성년기에 및 성년기 전반에 걸쳐 발생할 수도 있다. 9 내지 17세 유아의 대략 4.1%가 ADHD를 앓는다는 보고가 있다. ADHD를 앓는 유아는 어떠한 일에 집중해 있을 수 없고, 조용히 앉아 있을 수 없으며, 충동적으로 행동하고, 활동을 끝마칠 수 없다. 이를 치료하지 않으면, 유아의 상해율은 더욱 높아지고, 이 장애는 친구를 사귀는 유아의 능력 및 학교 및(또는) 공부에서의 유아의 직능에 장기적인 부정적 효과를 준다. 시간이 흐르면서, ADHD를 앓는 유아는 우울증, 자존심 박약 및 기타 감정적 문제를 일으킬 가능성이 증가한다.

[0003] 대부분의 경우에, ADHD를 앓는 유아 및 성인은 암페타민, 메틸페니데이트 및 페몰린과 같은 정신자극제로 치료한다. 또한, 노르에피네프린의 재흡수를 선택적으로 차단하는 작용을 하는 데시프라민과 같은 항우울제도 일부의 경우에 효과적이다. 또한, 노르에피네프린 및 세로토닌의 재흡수를 차단하는 아토목세틴과 같은 신규 약물도 상기 장애를 치료하는 데에 효과적일 수 있다. 정신자극제 및 모노아민 재흡수 억제제는 활동 수치 및 주의력을 제어하기는 하지만, ADHD와 연관되어서 동반 또는 수반되는 인지 기능 결핍증을 치료하는 데에는 효과적이지 못하다.

[0004] ADHD의 원인으로 유전적 요인, 납 수치와 인스턴트식품의 식품첨가물에 대한 반작용으로 보는 생화학적 요인, 뇌에 전달하는 자극을 적절히 선택하는데 문제가 있다고 보는 견해, 환경적 요인 즉 부모와 자녀와의 관계나 부모의 사회적 지위, 임신 중 산모의 흡연과 알콜 남용 등을 언급하기도 하였으나 아직 원인에 대한 논의는 분분하다. 그러나 사회심리적인 요인보다 신경생물학적 요인이 중요하다고 여겨지고 있으며 이에 따라 이 질환의 약물치료와 생물학적 요인에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 생물학적 요인으로 단일한 신경계의 발달 이상 보다는 고위 인지기능을 담당하는 여러 뇌 영역의 상호연관성의 이상으로 초래되는 비 균일한 질환균일 가능성이 제시되고 있다. 최근까지의 ADHD 환아를 대상으로 한 구조적, 기능적 뇌영상연구를 보면, 대체로 ADHD의 병태생리가 전두-선조회로(fronto-striatal tract)의 기능장애와 연관되어 있으며 메틸페니데이트(Methylphenidate, 이하 MPH)에 의한 약물 효과는 이 영역에서의 도파민계의 기능변화와 연관되어 있다고 알려져 있다. ADHD 증상은 도파민성 신경 외에도 전두엽의 신경회로를 조절하는 노르아드레날린성 신경의 조절과 연관이 있다. ADHD의 행동이 노르아드레날린성 신경과 도파민성 신경의 조절간에 불균형으로 초래된다는 연구도 보고된 바 있다. 포괄적으로는 Glutamatergic neurons와 GABA (g-aminobutyric acid)성 신경을 지배하는 카테콜라민류가 시냅스 후부에 미치는 영향력이 감소되는데 따른 것으로 이해된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2005-0085538호 (2005. 08. 29. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 과잉 행동 장애를 개선할 수 있는 효과를 나타내는 성분을 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애 (ADHD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 SNAP5114 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애 (ADHD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 SNAP5114 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애 (ADHD)의 예방 또는 건강기능 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, *Git1* 유전자 결손 헤테로 (+/-) 마우스에서는 과잉행동(hyperactivity)을 관장하는 뇌의 선조체(Striatum)에서 GABA의 양이 증가하는 것을 확인하여 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit / hyperactivity disorder, ADHD) 동물 모델로 사용될 수 있으며, *Git1* 유전자 결손 헤테로 (+/-) 마우스에 SNAP5114를 투여함에 따라 과잉행동(hyperactivity)이 개선되는 것을 확인함으로써, SNAP5114가 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit / hyperactivity disorder, ADHD)의 치료제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 ADHD(attention deficit / hyperactivity disorder) 동물 모델에서 GABA의 양 변화를 형광면역염색 (Fluorescent Immunohistochemistry; fIHC)으로 평가한 결과이다.

도 2는 ADHD(attention deficit / hyperactivity disorder) 동물 모델에서 GABA 양의 변화를 전기생리학적 측정(Patch clamp recording)으로 평가한 결과이다.

도 3은 ADHD(attention deficit / hyperactivity disorder) 동물 모델에서 SNAP5114 투여에 따른 과잉행동 변화를 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0012] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0013] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은

모든 수치 범위를 포함할 것이다.

[0014]

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015]

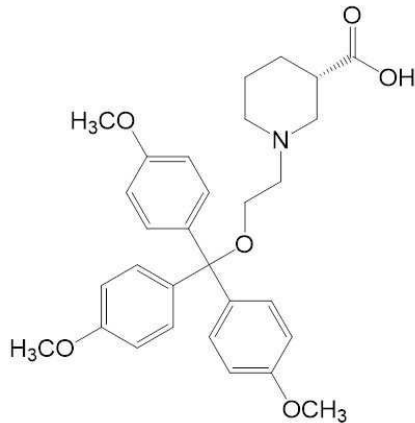
본 발명은 SNAP5114 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애 (ADHD)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016]

상기 SNAP5114는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이며, 구체적으로 (S)-1-(2-(트리스(4-메톡시페닐)메톡시)에틸)피페리딘-3-카르복실산((S)-1-(2-(tris(4-methoxyphenyl)methoxy)ethyl)piperidine-3-carboxylic acid)이다.

[0017]

[화학식 1]



[0018]

상기 SNAP5114는 ADHD(attention deficit / hyperactivity disorder) 동물 모델에서 과잉행동을 개선시키는 효과가 있다.

[0020]

상기 약학적으로 허용 가능한 염은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염을 의미하고, 약학적으로 허용 가능한 염은 의약품계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 칼슘, 포타슘, 소듐 또는 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염, 염산, 질산, 인산, 브롬산, 요오드산, 과염소산 또는 황산 등으로 제조된 무기산염; 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 시트르산, 말레산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만델산, 프로피온산, 젖산, 글리콜산, 글루콘산, 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산, 글루쿠론산, 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산 또는, 바닐릭산 등으로 제조된 유기산염; 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산 또는 나프탈렌설폰산 등으로 제조된 설폰산염; 글리신, 아르기닌, 라이신 등으로 제조된 아미노산염; 또는 트라이메틸아민, 트라이에틸아민, 암모니아, 피리딘, 피콜린 등으로 제조된 아민염 등이 있으나, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다.

[0021]

본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0022]

상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0023]

본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0024]

상기 약학적 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 외용제 형태로 제형화될 수 있다.

[0025]

본 발명의 약학적 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있

다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 대상 체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0026] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제 (troches), 로젠지 (lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율, 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000 mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.
- [0028] 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 SNAP5114 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 주의력결핍 과잉행동장애 (ADHD)의 예방 또는 건강기능 식품 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.
- [0031] 상기 식품보조 첨가제는 당업계에 통상적인 식품첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함하며 하기에 예시한다.
- [0032] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능 식품"이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0033] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0034] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [0035] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0036] 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능 식품 중 경질캡슐제는 통상의 경질캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡슐제는 본 발명에 따른 조성물의 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0037] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0038] 본 발명에서 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말

한다. 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 “개선”이란 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 질환의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0040] **실시예 1. ADHD 동물 모델 준비**

[0041] 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit / hyperactivity disorder, ADHD) 동물 모델로 *Git1* 유전자 결손 헤테로 (+/-) 마우스를 준비하였다. 야생형 마우스와 *GIT1* 유전자 결손 녹-아웃 타입(KO type)인 마우스를 교배하여 *GIT1* 유전자 결손 헤테로 타입인 마우스를 얻는다. 얻어진 헤테로 타입 마우스끼리의 mating cage를 만든 후, 유전형질분석(genotyping)을 수행하여 헤테로 타입인 마우스를 분리하였다.

[0042] SNAP5114는 50 ug/kg의 농도로 실험하기 전 7일 동안 복강 주사(intraperitoneal, i.p)로 투여하였다. SNAP5114는 10% DMSO에 녹인 다음, 실험하기 직전에, 90%에 해당하는 Saline에 녹여 사용하였다.

[0043] Open field test를 수행하여 행동학적 형태를 평가하고, 과잉행동(hyperactivity)을 관장하는 대표적인 뇌 부위인 선조체(Striatum)에서 tonic GABA의 특성을 확인하고자 형광면역염색(Immunohistochemistry)과 전기생리학적 측정(patch clamp recording)을 진행하였다.

[0044] **실시예 2. ADHD 동물 모델에서 ADHD 개선 효과 평가**

[0045] 1) 형광면역염색 (Fluorescent Immunohistochemistry; fIHC)

[0046] 형광면역염색(Fluorescent Immunohistochemistry; fIHC)을 진행하기 위해서, 마우스에서 관류(perfusion)를 진행하였다. PBS(Phosphate-buffered saline)로 1차 관류를 진행한 다음, 4% PFA(Paraformaldehyde)에 0.05%의 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 추가하여 고정하였다. 이후, 마우스의 두개골(skull)에서 뇌를 수집한 후, 4% PFA에 담가 4℃에서 만나질 동안 보관하였다. 고정된 마우스의 뇌는 30% 수크로오스(sucrose) 용액에 넣어 2일 동안 건조 과정을 거쳤다. 건조가 완료된 뇌는 OCT compound에 넣어 -80℃에서 몰드(mold) 형태로 보관하였다. 몰드를 만든 후, 냉동조직절편기(Cryotome)를 이용하여 30 μm의 두께로 해마(hippocampus)와 선상체(striatum)를 절편하였다. 절단한 슬라이스는 PBS로 5분 동안 3회 세척하고, triton-X100과 normal goat serum을 이용하여 1시간 동안 혼합하였다. 일차 항체로 S100β과 GABA 사용하여 4℃에서 만나질 동안 반응시켰다. 항체 반응한 후, PBS로 5분 동안 3회 세척하고, 이후 형광 결합된 2차 항체로 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. PBS로 5분 동안 3회 세척하고, DAKO mounting solution을 이용하여 뇌 조직을 슬라이드 글라스에서 염색하였다.

[0047] 도 1에 나타난 바와 같이, *Git1* hetero type (+/-) 마우스의 정상교세포 내에 있는 GABA의 양이 증가하는 것을 확인하였다. 도 1의 왼쪽 사진은 *Git1* wild type과 hetero type 마우스 뇌 선조체 부위 절편을 고정하고, 특이적 항체를 이용한 형광조직면역염색 후에 공초점 현미경으로 촬영한 형광사진으로, DAPI는 핵을, s100b는 정상교세포를, GABA는 gamma amino butyric acid로 중추신경계 주요 억제성 신경전달물질을 나타낸다. 도 1의 오른쪽 그래프는 공초점 현미경 사진을 ImageJ에서 분석한 것으로, S100b의 intensity를 분석한 바 그래프에서는 유의성이 나타나지 않았으나, S100b positive GABA, 즉, 정상교세포내 GABA의 intensity의 경우 *Git1* hetero type에서 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 전체 GABA intensity 및 정상교세포의 GABA level도 전반적으로 *Git1* hetero type에서 증가하는 것으로 나타났다.

[0048] 2) 전기생리학적 측정(patch clamp recording)

[0049] 전기생리학적 측정(Patch clamp recording)은 마우스의 선조체(Striatum)를 300 um의 두께로 절편하여 진행하였다. O₂ 95%, CO₂ 5%의 혼합가스로 버블링(bubbling)을 진행한 후에 aCSF (단위 mM: 130 NaCl, 24 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 3.5 KCl, 1.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 및 10 D(+)?glucose, pH 7.4)에 배양하였다. 측정액(135 CsCl, 4 NaCl, 0.5 CaCl₂, 10 HEPES, 5 EGTA, 2 Mg-ATP, 0.5 Na₂-GTP, 및 10 QX-314를 포함함. CsOH로 pH 7.2로 맞춤.)을 피펫에 채워 전기생리학적 상태를 측정하였다.

[0050] 도 2에 나타난 바와 같이, 선조체(Striatum)에서 측정한 tonic GABA의 양이 wild type (+/+)에 비하여 hetero type (+/-)과 knock-out type (-/-)에서 감소하는 경향을 나타냈다. 도 2의 왼쪽 상단은 patch clamp recording을 수행한 뇌 부위인 선조체를 포함하는 절편 (brain slice)과 recording pipette 위치를 나타낸다.

도 2의 오른쪽 상단 그래프는 wild type, hetero type, knock-out type의 선조체의 medium spiny neuron에서 측정된 tonic GABA current의 trace를 나타낸다. 회색 막대는 GABA를 처리해서 Full activation current를 유도한 것이며, 빨간색 막대는 GABA-A 수용체의 antagonist인 bicuculine을 처리한 시간을 나타낸다. bicuculine 처리에 의해 base line current가 blocking 되는데 하늘색 화살표로 나타낸 것처럼 full current와 tonic current를 측정하였다. 도 2의 하단은 기록된 모든 trace들의 amplitude, frequency를 평균 내고 유의성을 분석한 그래프로, 하단 맨 오른쪽 tonic GABA current amplitude (pA)는 wild type에서 가장 크고 hetero type에서 유의하게 감소하였으며, knock-out type이 가장 작은 값을 나타냈다. 두번째 그래프인 full activation current (pA)와 세번째 그래프인 % of full activation의 경우, tonic GABA current와 유사한 경향을 나타냈다.

[0051] 3) 행동학적 평가(Open field test)

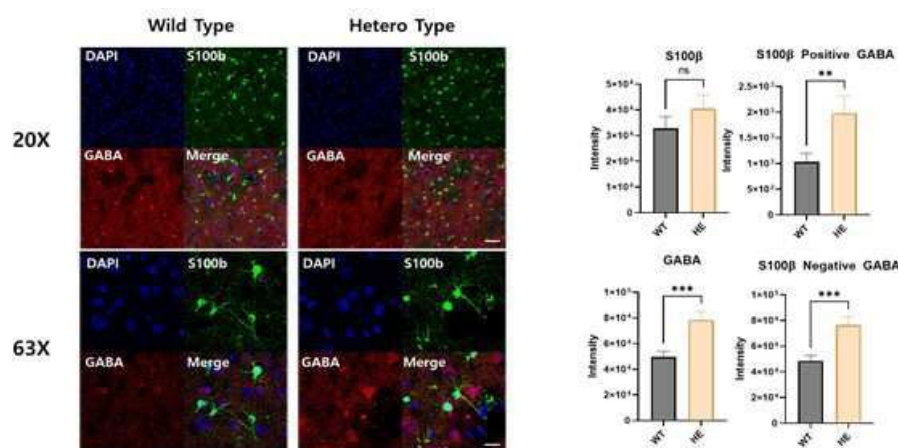
[0052] ADHD 모델 마우스에서의 정상교세포와 연관된 GABA의 양의 변화가 GABA를 정상교세포의 안으로 들여보내는 수송 단백질과 관련이 있음을 고려하여, GABA transporter 3의 inhibitor인 SNAP5114를 처리하여 행동실험을 진행하였다. 행동학적 개선 여부를 평가하기 위해 Open field test를 수행하였다. Open field test를 진행하기 5일 전 handling을 하여, 마우스가 실험자에게 느끼는 스트레스를 최소화하였다. 마우스를 open field test cage(30 X 30 X 30 cm)의 중앙에 넣은 뒤, 10분 동안 움직임을 측정하였다. 측정된 동영상은 ANYmaze를 통하여 locomotor activity를 분석하였다.

[0053] 도 3의 왼쪽은 open field 에서의 마우스 움직임을 추적한 것으로 마우스가 움직인 거리와 활동정도를 나타낸다. 도 3의 오른쪽은 실험에 사용된 각 개체들의 움직인 거리의 평균값을 그래프로 나타낸 것이다. 도 3에 나타난 바와 같이, *Git1* hetero type (+/-) 마우스(HE)가 wild type (+/+) 마우스(WT)에 비하여 더 많은 움직임을 나타내는 과잉 행동 장애(hyperactivity)를 나타내는 것을 확인하였다. *Git1* hetero type (+/-) 마우스에 SNAP5114를 처리한 경우(HE SNAP) 과잉행동장애가 WT의 수준으로 개선되는 것으로 나타났다.

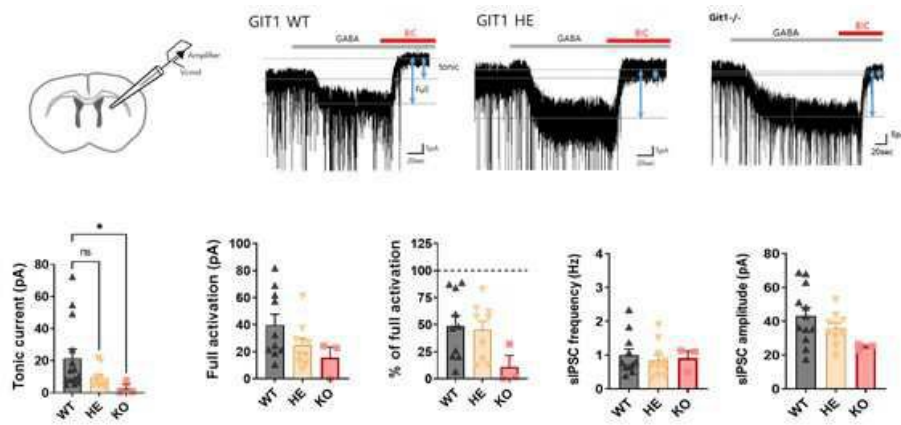
[0054] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

도면1



도면2



도면3

