(19) 대한민국 지식재산처(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2026-0103924
(43) 공개일자 2026년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/496 (2024.01) *A23K 20/137* (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/496 (2024.01)
A23K 20/137 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2025-0132493
(22) 출원일자 2025년09월16일
심사청구일자 2025년09월16일
(30) 우선권주장
1020240197149 2024년12월26일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
김지은
강원특별자치도 춘천시 모수물길 60, 101동 1504호 (소양로2가, 소양로현대아파트)
채세현
강원특별자치도 춘천시 모수물길 60, 101동 1504호 (소양로2가, 소양로현대아파트)
(74) 대리인
위병갑

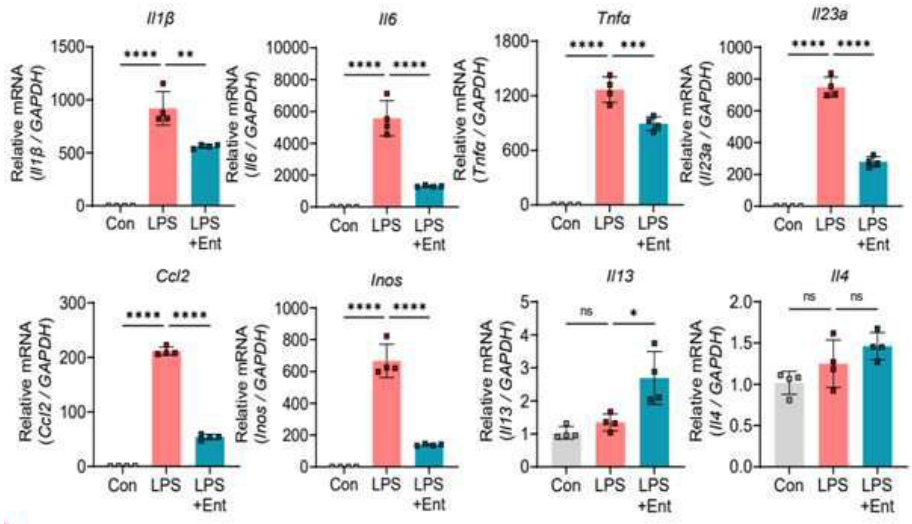
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **엔트렉티닙을 포함하는 뇌염증 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 뇌염증 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 뇌염증을 저해하며 기억 장애를 개선하는 효과를 나타냄으로써, 뇌염증 질환, 퇴행성 뇌질환, 기억 장애 등의 예방, 개선 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2022.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2710005226
과제번호 00351023
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 우수신진연구자지원사업
연구과제명 TrkB 활성 조절을 통한 신경염증 매개 뇌 노화 기전 규명 및 신규 항노화 치료제 개발
과제수행기관명 강원대학교
연구기간 2024.04.01 ~ 2027.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345375262
과제번호 00301850
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축사업
연구과제명 강원대학교 램프(LAMP) 사업단
과제수행기관명 강원대학교
연구기간 2023.10.01 ~ 2024.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711197471
과제번호 00253215
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기본연구자지원사업
연구과제명 다중오믹스 분석 기반 단백병증 뇌질환 병인기전 규명을 통한 신규 약물 타겟 발굴
과제수행기관명 강원대학교
연구기간 2023.06.01 ~ 2025.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환은 TRK(tropomysin receptor kinase) 활성이 증가된 환자군인 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 염증성 사이토카인을 감소시키고 항염증성 사이토카인을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 JNK, p38, AKT, NF-κB 또는 STAT3의 인산화를 억제하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 CD16/32의 발현을 감소시키고 CD206의 발현을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 아밀로이드 베타(Aβ) 응집체를 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 미세아교세포의 식세포작용(phagocytosis)을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환에서 유발되는 기억 장애를 예방 또는 개선하는 것인, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 픽병(Pick's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 치매(dementia), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 뇌졸중(stroke) 및 뇌경색(cerebral infarct)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 10

엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 동물용 사료 조성물.

청구항 12

엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 기억 장애는 신경 염증으로 유발된 것인, 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 조성물은 시냅스 단백질을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 15

엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 16

엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 개선용 동물용 사료 조성물.

청구항 17

엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌염증을 감소시키는 방법.

청구항 18

엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 기억 장애를 예방 또는 개선시키는 방법.

청구항 19

엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 조성물을 인 비트로(in vitro) 또는 인간을 제외한 개체에 처리하는 단계를 포함하는 미세아교세포(microglia)의 식세포작용을 증가시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 뇌염증 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 뇌염증 반응이란 알츠하이머병, 파킨슨병 등 대부분의 퇴행성 뇌질환에서 나타나는 대표적 병리현상 중 하나로서, 뇌염증 반응에 따라 면역세포로부터 생산되는 염증성 사이토카인(cytokine)이나 산화물질(ROS) 등 염증매개물질에 의해 신경세포 사멸이 촉진된다.

[0004] 알츠하이머는 주로 65세 이상 노년층에서 점진적인 기억력 감소와 인지기능 손상으로 특징되는 퇴행성 뇌질환이다. 병리수준에서는 베타-아밀로이드 단백질 침전물과 신경섬유 타우 단백질의 엉킴현상이 대표적인 병인이다. 알츠하이머는 그 진행과정에서 인지기능 저하뿐만 아니라 성격변화, 초조행동, 우울증, 망상, 환각, 공격성 증가, 수면 장애 등의 정신행동 증상이 흔히 동반되며 말기에 이르면 경직, 보행 이상 등의 신경학적 장애 또는 대소변 실금, 감염, 욕창 등 신체적인 합병증까지 나타나게 된다. 현미경으로 알츠하이머 치매 환자의 뇌 조직을 검사하였을 때 특징적인 병변인 신경반(neuritic plaque)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangle) 등이 관찰되고, 육안 관찰 시에는 신경세포 소실로 인해 전반적 뇌 위축 소견이 보인다. 이러한 뇌 병리 소견은 질병 초기에는 주로 기억력을 담당하는 주요 뇌 부위인 해마와 내후각뇌피질 부위에 국한되어 나타나지만 점차 두정엽, 전두엽 등을 거쳐 뇌 전체로 퍼져나간다. 이러한 뇌 병리 침범 부위의 진행에 따라 초기에는 기억력 저하가 주로 나타나다가 진행됨에 따라 점진적인 경과를 보이면서 임상 증상이 다양해지고 점점 더 심해지게 된다. 하지만, 현재 치매의 치료방법은 근본 원인의 해결이 아닌 증상 완화 목적의 처치에 불과하여, 알츠하이머의 발병의 억제, 지연 또는 치료를 위한 물질의 개발이 필요한 실정이다.

[0005] 미세아교세포(microglia)는 면역세포의 일종으로, 뇌의 대식세포로서 중추신경계(CNS)의 숙주 방어와 조직 회복에 중요한 역할을 한다. 정상 상태에서 신경교세포(glial cells)(즉, 별아교세포(astrocyte)와 미세아교세포(microglial cells))는 병원균으로부터 뉴런을 지지하고 보호하며, 시냅스 항상성(synaptic homeostasis)을 유지하는 작용도 한다. 미세아교세포는 학습과 기억을 관장하는 해마와 피질에서 주로 발견된다. 외부 자극에 의한 미세아교세포의 이상 활성화는 염증의 개시, 염증 촉진 매개체의 분비, 신경독성인자 및 여러 사이토카인을 포함한 광범위한 반응을 초래하며, 알츠하이머병, 파킨슨병 및 뇌졸중을 포함한 신경퇴행성 장애에 모두 관여된다. 따라서 미세아교세포의 이상 활성 억제는 염증 관련 질환의 치료에 가치 있는 치료 잠재력을 가질 수 있다. BV2 미세아교세포는 신약 후보물질 탐색을 위한 염증 촉진 사이토카인, 산화적 스트레스에 대한 반응을 조사하기 위해 신경 염증의 세포 모델로 광범위하게 사용되어 왔다.

[0006] 한편, 엔트렉티닙(entrectinib)은 NTRK 유전자 융합에 의해 발현되는 고형암의 치료에 사용되는 표적항암제로, 표적항암제는 정상세포와 차이를 보이는 암세포 표면의 특정 부분이나 암세포 내부의 신호전달 체계를 표적으로 인식하여 암세포의 증식이나 생존을 선택적으로 억제하는 항암제를 말한다. 일반적으로 항암 치료는 암이 발생한 위치에 따라 치료제를 결정하는데, 엔트렉티닙은 암이 발생한 위치와 관계없이 NTRK 유전자 변이를 표적으로 하여 치료하는 대표적인 암종 불문 항암제이다. 주로 특정 고형암과 비소세포폐암의 치료에 사용된다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 고형암 또는 비소세포폐암의 치료를 위한 항암제인 엔트렉티닙이 뇌염증을 저해하는 효과를 갖는 것을 확인함으로써 암 이외의 다른 질병의 치료제로서의 사용가능성을 확인함과 동시에 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2718538호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 동물용 사료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 개선용 동물용 사료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌염증을 감소시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 기억 장애를 예방 또는 개선시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 조성물을 인 비트로(in vitro) 또는 개체에 처리하는 단계를 포함하는 미세아교세포의 식세포작용을 증가시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 동물용 사료 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 조성물은 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환은 TRK(tropomysin receptor kinase) 활성이 증가된 환자군인 것일 수 있다.

[0024] 상기 조성물은 염증성 사이토카인을 감소시키고 항염증성 사이토카인을 증가시키는 것일 수 있다.

[0025] 상기 조성물은 JNK, p38, AKT, NF-κB 또는 STAT3의 인산화를 억제하는 것일 수 있다.

[0026] 상기 조성물은 CD16/32의 발현을 감소시키고 CD206의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0027] 상기 조성물은 아밀로이드 베타(Aβ) 응집체를 감소시키는 것일 수 있다.

[0028] 상기 조성물은 미세아교세포(microglia)의 식세포작용(phagocytosis)을 증가시키는 것일 수 있다.

[0029] 상기 조성물은 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환에서 유발되는 기억 장애를 예방 또는 개선하는 것일 수 있다.

[0030] 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 픽병(Pick's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 치매(dementia), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 뇌졸중(stroke) 및 뇌경색(cerebral infarct)으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 개선용 동물용 사료 조성물을 제공한다.

[0034] 상기 기억 장애는 신경 염증으로 유발된 것일 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌염증을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 기억 장애를 예방 또는 개선시키는 방법을 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙을 포함하는 조성물을 인 비트로(in vitro) 또는 인간을 제외한 개체에 처리하는 단계를 포함하는 미세아교세포의 식세포작용을 증가시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 엔트렉티닙을 포함하는 조성물은 뇌염증을 저해하며 기억 장애를 개선하는 효과를 나타냄으로써, 뇌염증 질환, 퇴행성 뇌질환, 기억 장애 등의 예방, 개선 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 LPS로 처리한 미세아교세포에 엔트렉티닙을 처리한 후 TRK 인산화에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다(n=4/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 2는 LPS로 처리한 미세아교세포에 엔트렉티닙을 처리한 후 p-TRK 발현의 면역형광분석 결과를 나타낸다(n=8/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 3은 LPS를 처리한 미세아교세포에 엔트렉티닙을 처리한 후 염증 유발 인자와 항염증 인자의 실시간 PCR 분석 결과를 나타낸다(n=4/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 4는 LPS를 처리한 미세아교세포에 엔트렉티닙을 처리한 후 JNK, P38 및 AKT 인산화 수준에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다(JNK, n=4-7/그룹; P38 및 AKT, n=4/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 5는 LPS를 처리한 미세아교세포에 엔트렉티닙을 처리한 후 세포질 및 핵 p-NF-kB 및 p-STAT3 수준에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다(n=3/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 6은 LPS를 처리한 미세아교세포에 엔트렉티닙을 처리한 후 반응성 및 보호성 미세아교세포 마커인 CD16/32 및 CD206에 대한 면역형광분석 결과를 나타낸다(n=8/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 7은 LPS, 엔트렉티닙 및 Aβ 올리고머를 처리한 BV2 미세아교세포에서의 식세포작용에 대한 라이브 영상 분석 결과를 나타낸다(n=8/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 8은 LPS 및 엔트렉티닙을 처리한 미세아교세포에서 식세포 작용 인자와 세포골격 유전자 발현의 실시간 PCR 분석 결과를 나타낸다(n=3/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 9는 엔트렉티닙 및 LPS 투여 후 마우스의 해마의 TRK 인산화의 웨스팅 블롯 분석(n=4/그룹) 및 면역 형광 염색 결과를 나타낸다(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 10은 엔트렉티닙 및 LPS 투여 후 마우스의 해마의 JNK, P38 및 AKT 인산화의 웨스팅 블롯 분석 결과를 나타낸다(n=4/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 11은 엔트렉티닙 및 LPS 투여 후 마우스의 해마의 미세아교세포 핵에서 p-NF-κB 및 p-STAT3에 대한 면역 형광 분석 결과를 나타낸다(n=3/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 12는 엔트렉티닙 및 LPS를 8일 동안 투여한 마우스의 Y-미로 및 NOR 검사 결과를 나타낸다(n=6-8/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 13은 엔트렉티닙 및 LPS를 16일 동안 투여한 마우스의 Y-미로 및 NOR 검사 결과를 나타낸다(n=6-8/그룹, *p

< 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 14는 엔트렉티닙 및 LPS를 8일 또는 16일 동안 투여한 마우스의 체중 변화를 나타낸다(n=6-8/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 15는 엔트렉티닙 및 LPS를 8일 동안 투여한 마우스의 시냅스 변화마커를 분석한 결과를 나타낸다(n=8/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

도 16은 엔트렉티닙 및 LPS를 16일 동안 투여한 마우스의 시냅스 변화마커를 분석한 결과를 나타낸다(n=8/그룹, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시태양 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시태양 및 실시예에 한정되지 않는다.

[0043] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0044] 본 발명은 엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 제공한다.

[0045] 본 발명의 "엔트렉티닙(entrectinib)"은 NTRK 유전자 융합에 의해 발현되는 고형암의 치료에 사용되는 표적항암제로, 암이 발생한 위치와 관계없이 NTRK 유전자 변이를 표적으로 하여 치료하는 대표적인 암종 불문 항암제이다. 주로 특정 고형암과 비소세포폐암의 치료에 사용된다.

[0046] 상기 뇌염증 질환은 뇌 실질의 염증성 질환을 의미하는 것으로, 원인에 따라 감염성, 혈관염성, 종양성, 화학성, 특발성 등으로 크게 분류할 수 있고, 알츠하이머 또는 파킨슨병을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0047] 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 픽병(Pick's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 치매(dementia), 경도인지장애(mild cognitive impairment), 뇌졸중(stroke) 또는 뇌경색(cerebral infarct)을 포함하나 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 뇌염증으로 인한 퇴행성 뇌질환일 수 있다.

[0048] 상기 조성물은 기억 장애를 예방 또는 개선하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환에서 유발되는 기억 장애를 예방 또는 개선하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 상기 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환은 TRK 활성이 증가된 환자군일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050] 상기 조성물은 TRK(tropomysin receptor kinase) 활성을 저해하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 신경 염증으로 증가된 TRK 활성을 저해하는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 미세아교세포에서의 TRK 활성을 저해하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 상기 조성물은 염증성 사이토카인을 감소시키고 항염증성 사이토카인을 증가시키는 것일 수 있고, 바람직하게는 신경 염증으로 증가 또는 감소된 염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인을 감소 또는 증가시키는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 미세아교세포에서의 염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인을 감소 또는 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 상기 염증성 사이토카인은 IL-1β, IL-6, TNF-α 등이 포함되고, 항염증성 사이토카인은 IL-4, IL-10, TGF-β 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 상기 조성물은 JNK, p38, AKT, NF-κB 또는 STAT3의 인산화를 억제하는 것일 수 있고, 바람직하게는 신경 염증으로 증가된 JNK, p38, AKT, NF-κB 또는 STAT3의 인산화를 억제하는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 미세아교세포에서의 JNK, p38, AKT, NF-κB 또는 STAT3의 인산화를 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 상기 조성물은 CD16/32의 발현을 감소시키고 CD206의 발현을 증가시키는 것일 수 있고, 바람직하게는 신경 염증으로 증가 또는 감소된 CD16/32 및 CD206의 발현을 감소 또는 증가시키는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 미세아교세포에서의 CD16/32 및 CD206의 발현을 감소 또는 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 상기 조성물은 미세아교세포의 식세포작용(phagocytosis)을 증가시키는 것일 수 있고, 바람직하게는 신경 염증으로 감소된 미세아교세포의 식세포작용을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 상기 조성물은 아밀로이드 베타(Aβ) 응집체를 감소시키는 것일 수 있고, 상기 감소는 아밀로이드 베타 응집체에 대한 식세포작용의 활성화로 인한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 본 발명의 약학 조성물은 분말, 과립, 정제, 피복정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 현탁액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 좌제, 에멀전제, 페이스트제(pastes), 연고제, 크림제, 로션제, 산제, 분무제 또는 현탁액으로 제형화될 수 있다. 상기 제제화를 위해 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 희석제 등의 부형제를 추가로 포함할 수 있으며, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구투여 또는 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 또한 상기 조성물의 치료적으로 유효한 양은 투여방법, 목적부위, 환자의 상태에 따라 달라질 수 있으며, 인체에 사용시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다.

[0059] 상기 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0061] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품, 유제품, 발효제품 또는 식품 첨가물일 수 있다. 상기 건강기능식품은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0062] 상기 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 액제, 페이스트, 겔, 또는 젤리 등의 형태를 포함하며, 각 제형의 식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 뇌염증 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 동물용 사료 조성물을 제공한다.

[0064] 본 발명의 동물용 사료 조성물은 사료 첨가제 형태로 따로 제조하여 사료에 혼합시키거나 사료 제조 시 직접 첨가하여 제조할 수 있으며, 사료의 보존성을 높일 수 있는 통상의 첨가제들을 추가로 포함할 수 있다.

[0065] 상기 동물용 사료 조성물에는 식물성으로는 곡물류, 근과류, 식품가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류, 곡물부산물류 등이 있으며, 동물성으로는 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질, 동물성 플랑크톤류, 남은 음식물 등이 있으며 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하며, 소화나 배성 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하고, 구체적으로는 극피동물, 갑각류, 연체동물, 어류, 양서류, 파충류, 조류, 포유류일 수 있다.

[0067] 상기 동물 사료용 조성물은 곡물, 식물성 단백질 사료, 동물성 단백질 사료, 당분 또는 유제품을 추가로 포함할 수 있으며, 추가로 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 또는 질병 예방제와 같은 성분을 함께 사용할 수 있다.

[0068] 상기 사료 조성물은 성분들의 분쇄 정도에 따라 경점성의 조립 또는 과립 물질로 제조될 수 있으며, 상기 조성물은 메쉬로 공급되거나 추가 가공 및 포장을 위해 원하는 분리된 형상으로 형성시킬 수 있으며, 저장을 위해 펠렛화, 팽창화 또는 압출 공정을 거칠 수 있으며, 저장의 용이성을 위해 바람직하게는 과잉의 물을 건조 제거될 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0070] 상기 기억 장애는 신경 염증으로 유발된 것일 수 있고, 바람직하게는 LPS로 유도된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 상기 조성물은 시냅스 단백질을 증가시키는 것일 수 있고, 바람직하게는 신경 염증으로 감소된 시냅스 단백질을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0072] 상기 시냅스 단백질은 SYP(synaptophysin), PSD95(postsynaptic density protein 95) 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0073] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0074] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 기억 장애의 예방 또는 개선용 동물용 사료 조성물을 제공한다.

[0075] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌염증을 감소시키는 방법을 제공한다.

[0076] 상기 개체는 뇌염증의 조절 또는 감소가 필요한 개체를 포함하며, 바람직하게는 인간을 제외한 개체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0077] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 기억 장애를 예방 또는 개선시키는 방법을 제공한다.

[0078] 상기 개체는 기억 장애의 예방 또는 개선이 필요한 개체를 포함하며, 바람직하게는 인간을 제외한 개체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0079] 또한, 본 발명은 엔트렉티닙(entrectinib)을 포함하는 조성물을 인 비트로(in vitro) 또는 개체에 처리하는 단계를 포함하는 미세아교세포(microglia)의 식세포작용을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0080] 상기 개체는 미세아교세포의 식세포작용의 조절 또는 증가가 필요한 개체를 포함하며, 바람직하게는 인간을 제외한 개체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0081] 본 발명에 사용된 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 질환 등을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"은 본 발명의 조성물을의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0082] 본 발명에서 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0083] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0085] **[준비예] 재료 및 방법**

[0086] 1. 엔트렉티닙과 LPS 처리

[0087] 모든 시험관 내(*in vitro*) 실험에서 PBS에 녹인 *Escherichia coli* (Sigma, Cat No. L2630, St. Louis, MO, USA)의 리포폴리사카라이드(LPS)를 사용하였다. 1차 및 BV2 미세아교세포는 200 ng/mL 농도의 LPS를 처리하였다. 생체 내(*in vivo*) 연구의 경우, 마우스에 8일 동안 하루에 한 번 250 μg/kg LPS를 복강 내(i.p.) 주사하여 염증 반응을 유도하였다.

[0088] 엔트렉티닙(Selleckchem, Cat No. S7998, Houston, TX, USA)은 달리 명시하지 않는 한 1차 및 BV2 미세아교세포에 1 μM 농도를 적용하여 시험관 내 처리를 위해 디메틸설폭사이드(DMSO)에서 제조되었다. 생체 내 실험의 경우, 대조군 용액은 탈이온수에 5% DMSO, 10% PEG, 20% Tween 80으로 구성되었다. 마우스에 엔트렉티닙을 10 mg/kg의 용량으로 투여하였다.

[0090] 2. BV2 미세아교세포

[0091] BV2 미세아교세포주는 Koram Bio Tech (서울, 대한민국)에서 구입하였다.

[0092] 세포는 고글루코스 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Cytiva, Cat No. SH30243.01, Marlborough,

MA, USA)에서 배양했으며, 5% 소태아혈청(FBS, Gibco, Cat No. 16000-044, Waltham, MA, USA), 100 U/mL 페니실린 G, 100 μg/mL 스트렙토마이신을 보충하였다. 배양은 5% CO_2인큐베이터의 37℃에서 유지되었다.

[0094] 3. 1차 미세아교세포 배양

[0095] 1차 아교세포는 출생 후 1일째 C57BL/6J 마우스 뇌에서 분리하였다. 대뇌를 차가운 HBSS에 넣은 후, 저농도의 글루코스 DMEM에서 두 번 세척한 후 뇌를 70-μm 나일론 망으로 여과하고, 5% CO_2 인큐베이터에서 10% FBS, 100 U/mL 페니실린, 100 μg/mL 스트렙토마이신이 포함된 저농도의 글루코스 DMEM에서 배양하였다. 14일째에 세포는 EDTA와 $CaCl_2$가 첨가된 저농도의 글루코스 DMEM에서 0.25% 트립신-EDTA를 사용하여 별아교세포를 제거하였다. 별아교세포층을 제거하기 위해 세척한 후, 1차 미세아교세포를 0.25% 트립신-EDTA로 분리하고 사용 전 2000rpm에서 10분 동안 두 번 원심분리하였다.

[0097] 4. CCK-8 분석

[0098] 세포를 96웰 플레이트에 웰당 1 Y 10^4개의 세포 밀도로 분주하고 FBS가 없는 배지에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 세포를 0.1, 1, 5 또는 10 μM 농도의 엔트렉티닙으로 처리하거나 1% DMSO를 대조군으로 사용하여 12, 24 및 48시간 동안 처리하였다. 각 시점에서 10% CCK-8 용액(Dojindo, Cat No. CK04, Kumamoto, Japan)을 FBS가 없는 배지에 첨가하고 세포를 추가로 2시간 동안 배양하였다. Multiskan Skyhigh 마이크로플레이트 분광광도계(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하여 세포 생존력을 확인하였다.

[0100] 5. 실시간 PCR

[0101] 염증 반응(*Il6, Il1β, Tnfa, Inos, Ccl2, Il-23a, Il10, Il13, Il4*), 식세포작용(*Trem2, Sorl1, Cd33, Cr2*), 세포골격(*Vav1, Cdc42*)과 관련된 유전자의 mRNA 수준은 1차 미세아교세포와 해마 조직에서 실시간 PCR을 사용하여 평가하였다. 제조업체 지침에 따라 Nucleozol (Macherey-Nagel, Cat No. 740404.200, Dueren, Germany)을 사용하여 1차 미세아교세포 또는 해마 조직에서 RNA를 추출하였다. Complementary DNA(cDNA)는 Superscript cDNA Premix Kit II (GeNetBio, Cat No. SR-5000, 대전, 대한민국)를 사용하여 합성하고 SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, Cat No. BIO-98050, Memphis, TN, USA)를 사용하여 CFX Duet Real-Time PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 40주기 실시간 PCR을 실시하였다. *Gapdh* 주기 임계값(Ct)은 정규화에 사용되었다. LPS 또는 LPS + 엔트렉티닙(entrectinib)으로 처리된 세포 또는 조직의 배수 변화는 대조군을 기준으로 계산하였다.

[0103] 6. 세포질 및 핵 분획

[0104] 인산화된 NF-κB(p-NF-κB) 및 인산화된 STAT3(p-STAT3)의 핵 수준은 200 ng/mL LPS 또는 인산염 PBS로 30분간 처리한 후 1 μM 엔트렉티닙 또는 1% DMSO(대조군)에 5.5시간 동안 노출시킨 1차 미세아교세포에서 평가하였다. 세포 용해를 위해 세포를 10 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM KCl 및 0.05% NP-40으로 구성된 세포질 분획 완충액에 현탁시키고 얼음 위에서 20분간 배양하였다. 그런 다음 세포를 4℃에서 10분 동안 14,000rpm으로 원심분리하였다. 세포질 분획을 나타내는 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 그 후 RIPA 용해 완충액(Thermo Scientific, Cat No. 89901)을 남은 펠릿에 첨가하고 이를 초음파 처리하여 핵 성분을 용해하였다. 얼음 위에서 10분간 더 배양한 후 핵 용해물을 4℃에서 10분간 14,000rpm으로 다시 원심 분리하였다. 획득한 핵 분획을 웨스턴 블롯 분석에 사용하여 핵 p-NF-κB 및 p-STAT3 수준을 검출하였다.

[0106] 7. 웨스턴 블롯

[0107] LPS 또는 PBS로 처리한 후 엔트렉티닙 또는 DMSO(대조군)로 처리한 1차 미세아교세포와 해마 조직에 대해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 샘플은 RIPA 용해 완충액(Thermo Scientific, Cat No. 89901)에서 용해하고 초음파로

분리 처리한 다음 12,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액의 단백질 농도는 표준 BSA 용액과 비교하여 정량화했으며, 실험 요구 사항에 따라 20 μg의 단백질이 8% 또는 10% SDS-PAGE 겔에서 로딩되었다. 단백질을 니트로셀룰로스 멤브레인(Amersham™ Protran™ 0.2 μm NC, Cytiva, Cat No. 10600001, Wilmington, DE, USA)으로 옮기고, 5% 탈지유 또는 5% BSA로 실온에서 1시간 동안 차단한 다음과 같은 다양한 항체와 함께 하룻밤 동안 배양하였다: anti-p-TRK (pan) (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 4621, Danvers, MA, USA), anti-TRK (pan) (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 92991), anti-p-JNK (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 9251), anti-JNK (1:1000, MyBioSource, Cat No. MBS8509129, San Diego, CA, USA), anti-p-P38 (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 4511), anti-P38 (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 8690), anti-p-AKT (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 9271), anti-AKT(1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 9272), anti-p-STAT3 (1:1000, Abcam, Cat No. ab32143, Cambridge, MA, USA), anti-STAT3 (1:1000, Abcam, Cat No. ab68153), anti-p-NF-κB (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 3033), anti-NF-κB (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 8242), anti-histone H3 (1:10,000, Cell Signaling Technology, Cat No. 9715), 및 anti-GAPDH (1:10,000 Cell Signaling Technology, Cat No. 2118) (4℃).

[0108] 그 후 막을 HRP 결합 염소 항-마우스 IgG(1:10,000 Invitrogen, Cat No. 31430, Carlsbad, CA, USA) 또는 항-토끼 IgG(1:10,000 Promega, Cat No. W4011, Madison, WI, USA) 항체로 1시간 동안 배양하였다. 검출은 ECL™ Prime Western Blotting System (Cytiva, Cat No. RPN2232)을 사용하여 수행하였다. 동일한 막에서 추가 단백질을 검출하기 위해 Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, Cat No. 21059)를 사용하였다. 이미지는 ChemiDoc MP™ Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 수집 및 분석하였다.

[0110] 8. 면역세포화학

[0111] 면역세포화학을 위해 세포를 4% 파라포름알데히드에 10분간 고정하고 PBS로 3번 세척하였다. 그런 다음 FBS가 포함된 PBS에서 다음의 1차 항체를 사용하여 하루 동안 배양하였다: anti-p-TRK (pan) (1:500, Cell Signaling Technology, Cat No. 4621), anti-p-JNK (1:100, Cell Signaling Technology, Cat No. 9251), anti-p-P38 (1:100, Cell Signaling Technology, Cat No. 4511), anti-p-AKT (1:1000, Cell Signaling Technology, Cat No. 9271), anti-p-STAT3 (1:100, Abcam, Cat No. ab32143), anti-p-NF-κB (1:100, Cell Signaling Technology, Cat No. 3033), anti-CD11b (1:100, Cell Signaling Technology, Cat No. 46512), anti-CD16/32 (1:100, Cell Signaling Technology, Cat No. 80366), 및 anti-CD206 (1:100, Cell Signaling Technology, Cat No. 24595). 배양 후 세포를 PBS로 세척하고 Alexa Fluor 488- 또는 594-접합 2차 항체로 실온에서 2시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 다시 세 번 세척하고 DAPI 용액(Thermo Scientific, Cat No. 62248)에서 10분 동안 배양하였다. DAPI 염색 후, 세포를 세척하고 형광을 유지해주는 솔루션(Dako, Cat No. S3023, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 슬라이드에 장착하고 A1/Ni-E 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)으로 이미지를 촬영하였다. ImageJ 소프트웨어를 사용하여 이미지 분석을 수행하였다.

[0113] 9. 동물 및 면역 형광 염색

[0114] 수컷 C57BL6/J 마우스(8주령; Orient-Bio Company, 경기도, 한국)는 병원균이 없는 환경에서 22±2℃, 50±5% 습도, 12시간 명암 주기를 유지했으며, 사료와 물을 자유롭게 섭취하였다. 마우스는 무작위로 대조군, LPS, LPS+엔트렉티닙의 세 그룹으로 나누었다. 그룹에 따라, 마우스는 8일 동안 매일 복강 내 주사로 10 mg/kg 엔트렉티닙 또는 비히클 용액(5% DMSO, 10% PEG, 20% Tween 80 in deionized water)을 투여받았다. 8일차 최종 주입 후 30분 후에 250 μg/kg LPS 또는 PBS를 복강 내 투여하였다. 주입 후 8시간 후에 마우스를 PBS와 4% 파라포름알데히드로 관류 및 고정하였다. 뇌 조직을 4℃에서 4% 파라포름알데히드에 24시간 동안 보관한 다음 30% 수크로스의 PBS에 72시간 동안 담근 후 cryostat microtome (Leica CM1850, Wetzlar, Germany)을 사용하여 30 μm 절편으로 잘라냈다. 절편은 5% 정상 염소 혈청(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 실온에서 2시간 동안 차단한 다음 1차 항체로 4℃에서 하루동안 면역 염색하였다: anti-p-TRK (1:150, Cell Signaling Technology, Cat No. 4621), anti-CD11b (1:500, Cell Signaling Technology, Cat No. 46512), anti-p-NF-kB (1:500, Cell Signaling Technology, Cat No. 3033), anti-p-STAT3 (1:200, Abcam, Cat No. ab32143), anti-

CD16/32 (1:200, Cell Signaling Technology, Cat No. 80366), 및 anti-CD206 (1:50, Cell Signaling Technology, Cat No. 24595). 절편을 PBST 완충액으로 세척하고 Alexa 555- 또는 Alexa 488-접합 2차 항체와 함께 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 절편을 PBST 완충액으로 다시 3번 세척하고 DAPI 용액(Thermo Scientific, Cat No. 62248)에서 10분 동안 배양하였다. DAPI 염색 후 형광용 VectaShield 솔루션(Vector Labs, Cat No. H-1000, Burlingame, CA, USA)을 처리한 후, DMi8 현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 사용하여 형광 현미경 이미지를 캡처하고 ImageJ 소프트웨어(US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 분석하였다.

[0116] 10. 식세포작용 검정 및 라이브 세포 이미징

[0117] BV2 미세아교세포의 식세포작용은 Aβ 클리어런스를 통해 관찰되었다. Aβ에 노출되기 전에 BV2 미세아교세포를 200 ng/mL LPS 또는 PBS로 30분간 처리한 다음 1 μM 엔트렉티닙 또는 1 % DMSO(대조군)로 23.5시간 동안 처리하였다. 배양하는 동안 250 nM의 Alexa Fluor 488 접합 $A\beta_{1-42}$(Anaspec, Cat No. AS-60479-01, Fremont, CA, USA)를 혈청이 없는 배지에서 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 BV2 미세아교세포를 미리 만들어 둔 $A\beta_{1-42}$에 1시간 동안 노출시켰다. 그 후 세포를 4% 파라포름알데히드에 20분간 고정하고 PBS로 3번 세척한 다음 DAPI 용액에 10분간 배양하였다. DAPI 염색 후 세포를 세척하고 형광 솔루션(Dako, Cat No. S302380-2, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 슬라이드 유리에 장착하였다. 이 실험의 모든 단계는 최소 광원 조건에서 수행하였다. A1/Ni-E 현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 이미지를 캡처하고, ImageJ 소프트웨어를 사용하여 이미지 분석을 하였다.

[0118] BV2 미세아교세포에 의한 Aβ 클리어런스의 라이브 이미징이 유사한 조건에서 관찰되었다. BV2 미세아교세포를 공초점 디쉬에서 배양하고 200 ng/mL LPS 또는 PBS로 30분 동안 처리한 다음 Aβ 처리 전 23.5시간 동안 1 μM 엔트렉티닙 또는 1% DMSO(비히클)로 처리하였다. 그런 다음 BV2 미세아교세포를 공초점 현미경으로 검사하기 직전에 1시간 동안 미리 배양한 $A\beta_{1-42}$에 노출시켰다. 라이브 이미지는 CO_2와 온도 조절 챔버(5% CO_2 및 37℃)가 부착된 Dragonfly 502w 고속 공초점 현미경 시스템(Andor Technology, Befast, UK)으로 캡처하였다. Imaris 분석 소프트웨어를 사용하여 비디오를 녹화하고 스냅샷을 캡처하였다.

[0120] 11. Y-미로

[0121] 야생형 마우스에서 LPS로 유도된 단기 및 공간 기억 장애를 개선시키는 엔트렉티닙의 효능은 Y-미로 테스트를 사용하여 평가하였다. Y-미로는 각각 35cm x 7cm x 15cm 크기의 3개 팔로 구성되어 있으며, 120° 각도로 배열되었다. 각 테스트 세션 동안 개별 마우스는 5분 동안 미로를 자유롭게 탐색하였다. Exovision XT(Noldus, Leesburg, VA, USA) 비디오 카메라로 마우스의 움직임을 기록했으며, 이후 이를 수동으로 계산하였다. 교대 비율은 다음 공식을 사용하여 결정하였다.

[0122] 교대 비율(%) = (교대 횟수 / 교대 시도 횟수) Y 100%

[0124] 12. 새로운 대상 인식(NOR) 테스트

[0125] 엔트렉티닙이 장기 기억과 인식 기억에 미치는 영향을 평가하기 위해 새로운 대상 인식(NOR) 테스트를 사용하였다. NOR 장치는 40cm x 40cm x 25cm 크기의 개방형 상자로 구성되었다. 테스트는 훈련과 테스트의 두 단계로 진행되었으며, 두 단계 사이에 24시간 간격을 두었다. 훈련 단계에서는 상자 안에 동일한 물체 두 개를 배치하고, 한 마리의 마우스가 5분 동안 탐색하도록 하였다. 이후 테스트 단계에서는 마우스를 상자에 다시 넣어 익숙한 물체 하나와 새로운 물체 하나를 두고 5분 동안 마우스가 탐색하도록 두었다. 테스트 단계에서 물체의 위치는 위치 편향을 제어하기 위해 동일한 위치로 설치하였다. 냄새 신호를 제거하기 위해 시험 사이에 상자와 물체를 70% 에탄올로 세척하였다. 탐색 시간은 각 세션의 비디오 영상을 검토하여 자동으로 기록하였다. 탐색 행동은 마우스가 코를 물체 쪽으로 향하게 하는 것으로 정의하였다. 새로운 물체에 대한 물체 선호도는 다음 공식을 사용하여 계산하였다.

[0126] 물체 선호도(%) = $\{T_{Novel}/(T_{Framiliar}+T_{Novel})\}$ Y 100 %

[0127] 여기서 T_{Novel}은 새로운 물체를 탐색하는 데 소요된 시간을 나타내고 $T_{Framiliar}$는 익숙한 물체를 탐색하는 데 소요된 시간을 나타낸다.

[0129] 13. 통계 분석

[0130] 데이터 분석은 GraphPad Prism 9 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 두 그룹을 비교하기 위해 Welch's correction을 적용한 쌍이 없는 양측 T-검정(*T*-test)을 사용하였다. 다중 비교의 경우 일원 분산 분석(one-way ANOVA)과 Tukey 검정(Tukey's test)을 사용하였다. 차이는 $p < 0.05$에서 유의한 것으로 간주하였다. 결과는 평균 ± SD(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, **** p < 0.0001)로 표현하였다.

[0132] **[실시예 1] 뇌염증 저해 효과 확인**

[0133] 1-1. TRK 저해 활성

[0134] 엔트렉티닙은 TRK(tropomysin receptor kinase)에 길항하는 것으로 알려져 있으며, 엔트렉티닙이 미세아교세포에서 TRK를 저해하는지 확인하고자 하였다. 배양한 1차 미세아교세포를 200 ng/ml의 LPS 또는 PBS로 15분간 처리한 다음 1 μM의 엔트렉티닙 또는 1% DMSO로 30분간 처리하였다.

[0135] 웨스턴 블롯을 수행하여 단백질 수준을 확인한 결과, 엔트렉티닙이 LPS로 처리한 1차 미세아교세포에서 인산화를 감소시켜 TRK를 유의하게 저해하는 것을 확인하였다(도 1). 또한 LPS로 처리한 1차 미세아교세포에서 엔트렉티닙 노출 후 TRK의 표면 인산화가 유의하게 감소한 것을 확인하였다(도 2).

[0136] 따라서 엔트렉티닙이 TRK와 표적 수용체에 모두 길항작용함으로써 미세아교세포 기능에 영향을 미치는 것을 확인하였다.

[0138] 1-2. 염증 반응 조절 활성

[0139] 미세아교세포 염증 반응에 대한 엔트렉티닙의 효과를 확인하기 위해, 마우스 1차 미세아교세포에 200 ng/ml의 LPS 또는 PBS를 30분간 처리한 다음 1 μM의 엔트렉티닙 또는 1% DMSO를 5.5시간 동안 처리하였다.

[0140] 실시간 PCR을 수행하여 염증성 사이토카인의 유전자 발현 수준을 확인한 결과, 엔트렉티닙이 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 *Il1β*, *Il6*, *Tnfa*, *Il23a*, 케모카인 *Ccl2*, *Inos* 분자의 증가를 유의하게 감소시키고, 항염증성 사이토카인 *il13*을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다(도 3).

[0141] 따라서 엔트렉티닙이 미세아교세포의 TRK 활성을 조절하는 신경 염증 인자를 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0143] 1-3. JNK, P38 및 AKT 인산화 조절 활성

[0144] 미세아교세포에서 여러 신경 염증 매개 신호 전달이 확인되었고, 미세아교세포에서 염증의 주요 경로는 전염증성 또는 항염증성 사이토카인이나 케모카인을 활성화하는 MyD88-MAPK(JNK, P38, ERK 등) 또는 PI3K-AKT 경로로 알려져 있다. 미세아교세포 조절에 대한 엔트렉티닙의 효과에 관여하는 신호 분자를 확인하기 위해 미세아교세포에서 엔트렉티닙 치료 후 LPS 유도 염증 분자의 인산화 수준을 조사하였다.

[0145] 이를 확인하기 위해, 마우스의 1차 미세아교세포에 200 ng/ml LPS 또는 PBS를 15분간 처리한 다음 1 μM의 엔트렉티닙 또는 1 % DMSO로 30분간 후처리하였다.

[0146] 세포를 용해하고 웨스턴 블롯을 실시한 결과, LPS 처리는 p-JNK, p-P38 및 p-AKT를 유의하게 증가시켰고, 엔트렉티닙은 이러한 인산화 수준을 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다(도 4).

[0147] 따라서 엔트렉티닙은 1차 미세아교세포에서 p-JNK, p-P38, p-AKT 단백질 수준을 감소시킴으로써 신경 염증 생성물을 조절하는 것을 확인하였다.

[0149] 1-4. NF-κB 및 STAT3 신호 전달 경로 조절 확인

[0150] 엔트렉티닙은 미토겐 활성화 단백질 키나아제(MAPK) 및 AKT를 포함한 LPS로 자극된 염증 관련 신호 분자를 감소시키므로 신경 염증과 관련된 전사 인자의 관련성을 조사하였다.

[0151] 이를 확인하기 위해, 1차 미세아교세포를 200 ng/ml LPS 또는 PBS로 30분 동안 처리하고 LPS 또는 PBS 처리 후 1 μM의 엔트렉티닙 또는 1% DMSO로 5.5시간 동안 배양하였다. 핵 및 세포질 분획을 수행하여 인산화 수준을 검출하였다.

[0152] 웨스턴 블롯을 수행한 결과, 엔트렉티닙이 LPS로 자극된 핵 p-NF-κB 및 p-STAT3 수준 증가를 유의하게 감소시켰으나, 세포질 인산화 수준은 LPS 처리에 비해 엔트렉티닙 처리 후에 증가한 것으로 나타났다(도 5). 이는 LPS가 미세아교세포에서 p-NF-κB 및 NF-κB를 세포질에서 핵으로 이동시켜 신경 염증 관련 유전자를 전사하는 NF-κB 경로를 자극한다는 것을 시사한다.

[0153] 따라서 엔트렉티닙이 1차 미세아교세포에서 Trk 연결 NF-κB/STAT3 경로를 하향 조절함으로써 LPS로 유발된 미세아교세포의 염증 유발 및 항염증 인자를 조절하는 것을 확인하였다.

[0155] 1-5. CD16/32 및 CD206 발현 조절 확인

[0156] 엔트렉티닙은 MAPK, AKT 관련 p-NF-κB 및 p-STAT3 수치를 억제하여 미세아교세포의 신경 염증 반응을 하향 조절한다. 이전 연구에서는 미세아교세포의 다양한 단계를 개발했지만 미세아교세포의 각 단계는 뇌의 염증 관련 항상성을 조절하는 역할을 한다. 다양한 표현형 중에서 염증 유발 관련 활성 상태와 항염증 반응 상태에 대한 시스템 및 효과를 회복하는 것이 잘 발달되어 있다. 따라서 엔트렉티닙이 LPS 조건에서 미세아교세포 특성을 조절하는지 여부는 그 효과를 명확히 하는 중요한 단서가 될 수 있다.

[0157] 이를 확인하기 위해, 1차 미세아교세포를 200 ng/ml LPS 또는 PBS로 30분간 처리한 다음 1 μM의 엔트렉티닙 또는 1% DMSO로 23.5시간 동안 노출시켰다. 면역형광분석은 반응성 및 항염증 관련 미세아교세포 마커인 CD16/32 및 CD206을 사용하여 수행하였다.

[0158] 그 결과, 엔트렉티닙에 노출되면 LPS로 자극된 CD16/32 형광 강도가 유의하게 감소하는 것으로 나타났고, CD206 형광 강도는 LPS 처리에 비해 엔트렉티닙 처리 후에 유의하게 증가한 것으로 나타났다(도 6).

[0159] 따라서 엔트렉티닙이 1차 미세아교세포에서 CD16/32를 감소시키지만 CD206 관련 미세아교세포 상태를 증가시켜 미세아교세포증을 조절하는 것을 확인하였다.

[0161] **[실시예 2] 식세포작용 증가 효과 확인**

[0162] 엔트렉티닙은 TRK 관련 염증 경로를 조절하여 미세아교세포 표현형을 조절할 수 있는 잠재력이 있으므로, 미세아교세포 식세포작용에 대한 엔트렉티닙의 영향을 조사하였다.

[0164] 2-1. 아밀로이드 베타(Aβ) 제거 활성

[0165] BV2 미세아교세포를 사용하여 LPS로 유도된 신경 염증 조건에서 미세아교세포 식세포작용에 대한 엔트렉티닙의 영향을 확인하였다.

[0166] BV2 미세아교세포를 200 ng/mL LPS 또는 PBS로 30분 동안 처리한 다음 1 μM 엔트렉티닙 또는 1% DMSO로 23.5시간 동안 처리하고 $A\beta_{1-42}$ 올리고머를 1시간 동안 처리하였다. 1시간 동안 미세아교세포의 세포 내 막에서 Alexa 488 형광이 감지되었다.

[0167] $A\beta_{1-42}$ 올리고머 처리 1시간 후의 데이터는 엔트렉티닙이 LPS로 유도된 $A\beta_{1-42}$ 형광 강도 감소를 유의하게 증가시킨 것으로 나타났으며, 이를 통해 $A\beta_{1-42}$ 올리고머가 BV2 미세아교세포의 세포질 영역에 위치하는 것을 확인하였다(도 7).

[0168] 따라서 엔트렉티닙이 미세아교세포의 아밀로이드 베타 응집체에 대한 식세포작용을 증가시키는 것을 확인하였다.

[0170] 2-2. 식세포작용 조절 활성

[0171] 엔트렉티닙이 BV2 미세아교세포에서 LPS로 유도된 식세포작용의 기능 장애를 구제한다는 사실을 고려하여 식세포작용과 관련된 요인의 관련성을 조사하였다.

[0172] 이를 확인하기 위해, 1차 미세아교세포를 200 ng/ml LPS 또는 PBS로 30분 동안 처리한 다음 1 μM의 엔트렉티닙 또는 1% DMSO로 23.5시간 동안 노출시키고 실시간 PCR을 수행하였다.

[0173] 그 결과, *Trem2, Sorl1, Cd33, Cr2*와 같은 식세포작용 수용체와 세포골격 인자 *Vav1* 및 *Cdc42* 유전자 발현이 LPS 처리군과 비교하여 엔트렉티닙 노출 후 유의하게 증가한 것으로 나타났다(도 8).

[0174] 따라서 엔트렉티닙이 신경 염증 관련 신호 전달 경로를 억제하여 미세아교세포의 M2 단계를 상향 조절함으로써 미세아교세포 식세포작용 능력을 증가시키는 것을 확인하였다.

[0176] **[실시예 3] 동물 실험을 통한 뇌염증 저해 효과 확인**

[0177] 엔트렉티닙은 시험관 내에서 LPS로 매개된 신경 염증 반응을 하향 조절하므로, 생체 내에서 신경 염증에 대한 엔트렉티닙의 영향을 확인하였다.

[0178] 8주령 수컷 마우스에 10 mg/kg의 엔트렉티닙 또는 vehicle(탈이온수 내 5% DMSO, 10% PEG, 20% Tween 80)를 복강 내(i.p.) 주사하고 30분 후에 LPS(250 ng/kg, i.p.) 또는 PBS를 8일 동안 매일 투여하였다. 마지막 날에 마우스 뇌를 희생시키고 해마를 분리한 다음, 웨스턴 블롯과 면역 형광 염색을 실시하였다.

[0179] 그 결과, 엔트렉티닙은 해마에서 LPS로 자극된 TRK 인산화를 유의하게 감소시키는 것으로 나타났다(도 9). 시험관 내 결과와 일치하게, LPS로 유도된 JNK, P38, AKT 인산화는 엔트렉티닙에 의해 유의하게 하향 조절된 것으로 나타났다(도 10).

[0180] 또한, 면역형광 염색 결과, LPS가 마우스 뇌 해마에서 p-NF-κB와 p-STAT3 수준을 유의하게 상향 조절하였으나 이러한 증가는 엔트렉티닙 처리에 의해 유의하게 하향 조절된 것으로 나타났다(도 11).

[0181] 따라서 엔트렉티닙이 생체 내 MAPK/AKT와 NF-κB/STAT3 인산화를 비활성화함으로써 신경 염증 반응에 기여하는 것을 확인하였다.

[0183] **[실시예 4] 동물 실험을 통한 기억 장애 개선 효과 확인**

[0184] 엔트렉티닙은 해마에서 LPS 매개 신경 염증 반응을 변화시켰으므로, LPS를 주입한 마우스에서 신경 염증으로 유발된 기억 장애에 대한 엔트렉티닙의 효과를 확인하고자 하였다.

[0186] 4-1. 기억 장애 개선 효과

[0187] 엔트렉티닙 투여 후 신경 염증으로 유발된 기억 장애가 개선되는지 확인하기 위해, 8주령 수컷 마우스에 LPS(1 mg/kg) 또는 PBS를 복강 내 주사하고, 주사 후 30분 후에 8일 또는 16일 동안 매일 엔트렉티닙 10 mg/kg 또는 PBS를 투여하였다. 7~8일 또는 15~16일째에 Y-미로 및 새로운 대상 인식(NOR) 검사를 이용한 행동 평가를 실시하였다.

[0188] 그 결과, 엔트렉티닙 투여 후 8일과 16일째에 Y-미로 검사와 NOR 검사에서 자발적 교대 비율(%)과 물체 선호도가 각각 유의미하게 증가한 것으로 나타났다(도 12 및 13). 또한, 모든 마우스가 행동 검사 시점에 체중을 회복한 것을 확인하였다(도 14).

[0189] 따라서 엔트렉티닙이 마우스에서 신경 염증으로 유발된 기억 장애를 개선시키는 것을 확인하였다.

[0191] 4-2. 시냅스 변화 확인

[0192] 기억 장애는 마우스 뇌에서 해마 신경 세포 척추 형성과 시냅스 가소성의 변화와 관련이 있는 것으로 알려져 있

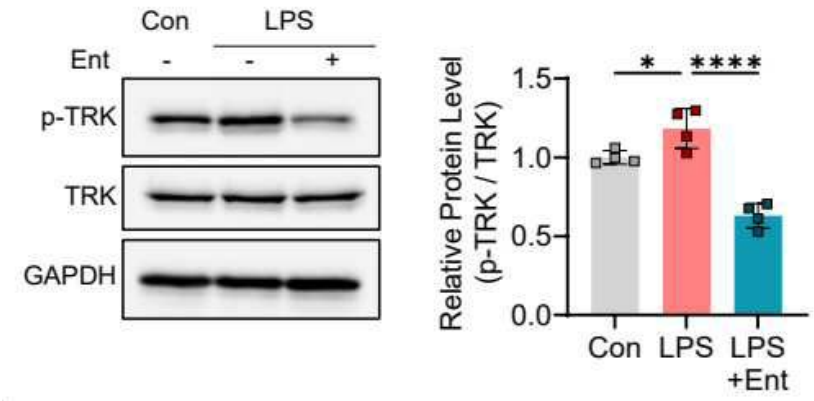
다. 이에 엔트렉티닙과 관련된 시냅스 변화를 조사하기 위해, 행동 검사 후 마우스의 해마 조직을 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 대표적인 시냅스 전 마커인 SYP(synaptophysin)와 시냅스 후 마커인 PSD95(postsynaptic density protein 95)를 사용하였다.

[0193] 그 결과, LPS 노출로 인해 감소된 PSD95와 SYP 수치는 엔트렉티닙을 매일 투여한 8일과 16일 후에 유의미하게 회복되었다(도 15 및 16).

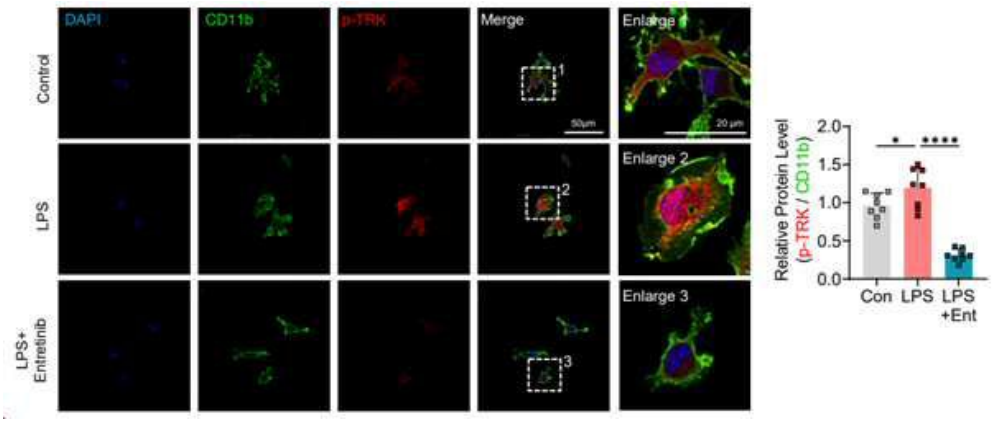
[0194] 따라서 엔트렉티닙이 마우스 해마에서 시냅스 단백질의 상향 조절을 통해 신경 염증으로 유발된 기억 장애를 개선시키는 데 기여하는 것을 확인하였다.

도면

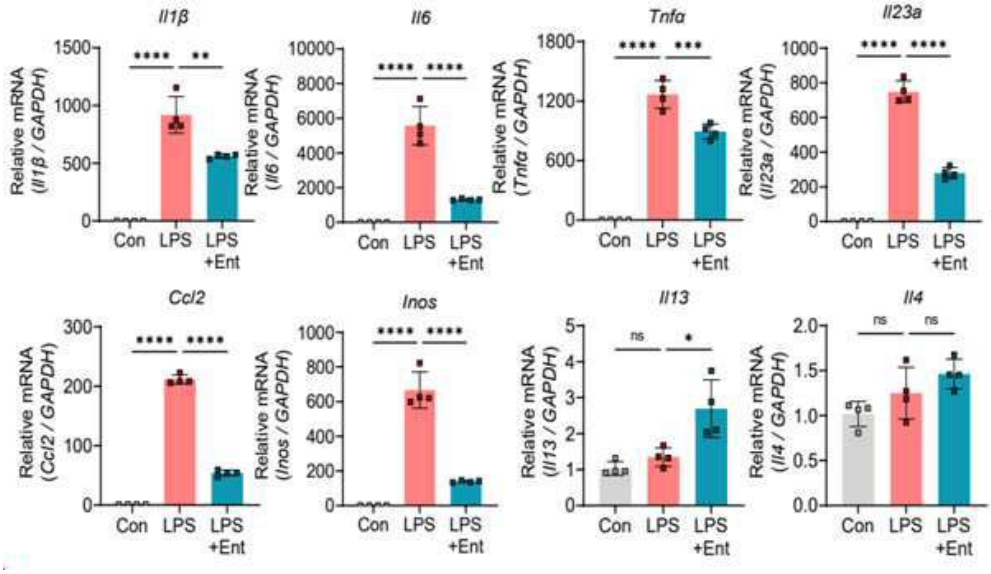
도면1



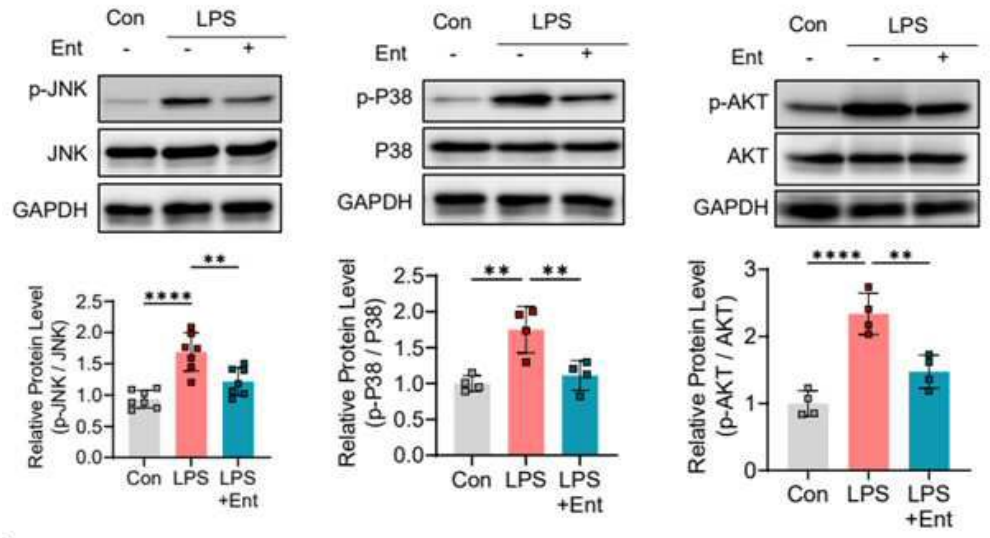
도면2



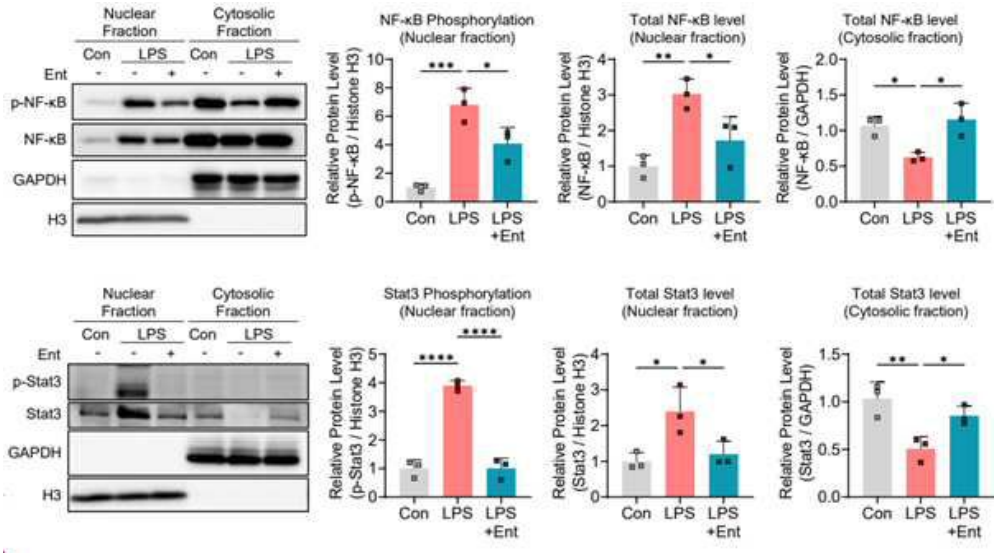
도면3


Il1β
Il6
Tnfα
Il23a
Ccl2
Inos
Il13
Il4
Relative mRNA (Il1β / GAPDH)
Relative mRNA (Il6 / GAPDH)
Relative mRNA (Tnfα / GAPDH)
Relative mRNA (Il23a / GAPDH)
Relative mRNA (Ccl2 / GAPDH)
Relative mRNA (Inos / GAPDH)
Relative mRNA (Il13 / GAPDH)
Relative mRNA (Il4 / GAPDH)
Con
LPS
LPS +Ent

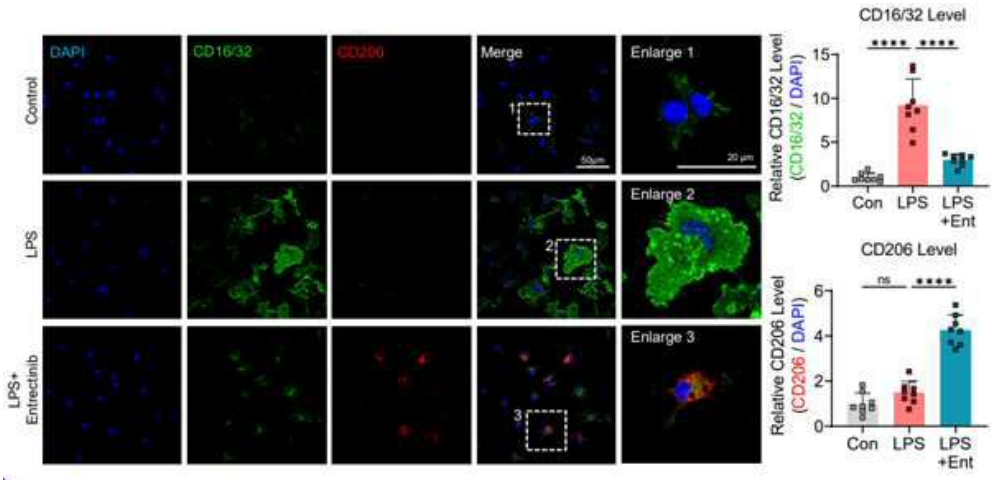
도면4


Con
LPS
Ent
p-JNK
JNK
GAPDH
p-P38
P38
p-AKT
AKT
Relative Protein Level (p-JNK / JNK)
Relative Protein Level (p-P38 / P38)
Relative Protein Level (p-AKT / AKT)
LPS +Ent

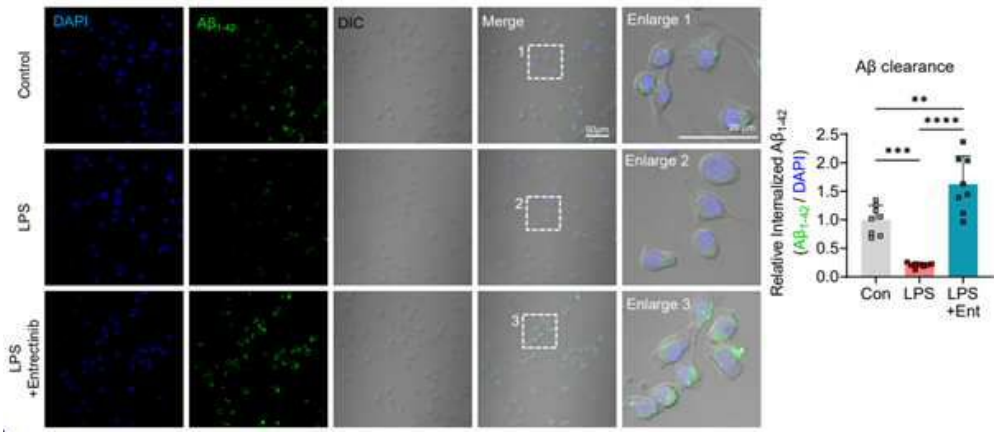
도면5


Nuclear Fraction
Cytosolic Fraction
Con
LPS
Ent
p-NF-κB
NF-κB
GAPDH
H3
NF-κB Phosphorylation (Nuclear fraction)
Relative Protein Level (p-NF-κB / Histone H3)
Total NF-κB level (Nuclear fraction)
Relative Protein Level (NF-κB / Histone H3)
Total NF-κB level (Cytosolic fraction)
Relative Protein Level (NF-κB / GAPDH)
LPS +Ent
p-Stat3
Stat3
Stat3 Phosphorylation (Nuclear fraction)
Relative Protein Level (p-Stat3 / Histone H3)
Total Stat3 level (Nuclear fraction)
Relative Protein Level (Stat3 / Histone H3)
Total Stat3 level (Cytosolic fraction)
Relative Protein Level (Stat3 / GAPDH)

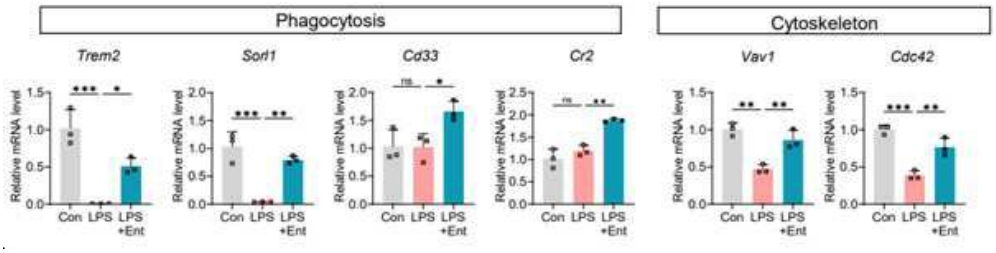
도면6


DAPI
CD16/32
CD206
Merge
Enlarge 1
Enlarge 2
Enlarge 3
Control
LPS
LPS+ Entrectinib
CD16/32 Level
Relative CD16/32 Level (CD16/32 / DAPI)
CD206 Level
Relative CD206 Level (CD206 / DAPI)
Con
LPS
LPS +Ent

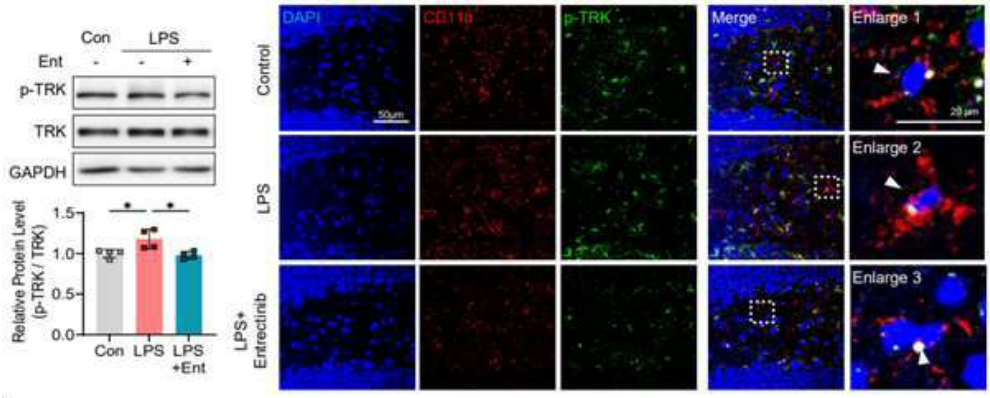
도면7


DAPI
Aβ1-42
DIC
Merge
Enlarge 1
Enlarge 2
Enlarge 3
Control
LPS
LPS +Entrectinib
Aβ clearance
Relative Internalized Aβ1-42 (Aβ1-42 / DAPI)
Con
LPS
LPS +Ent

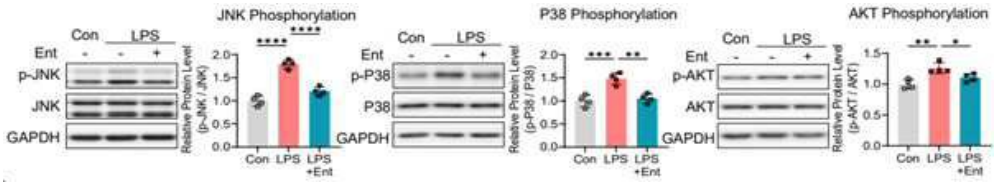
도면8



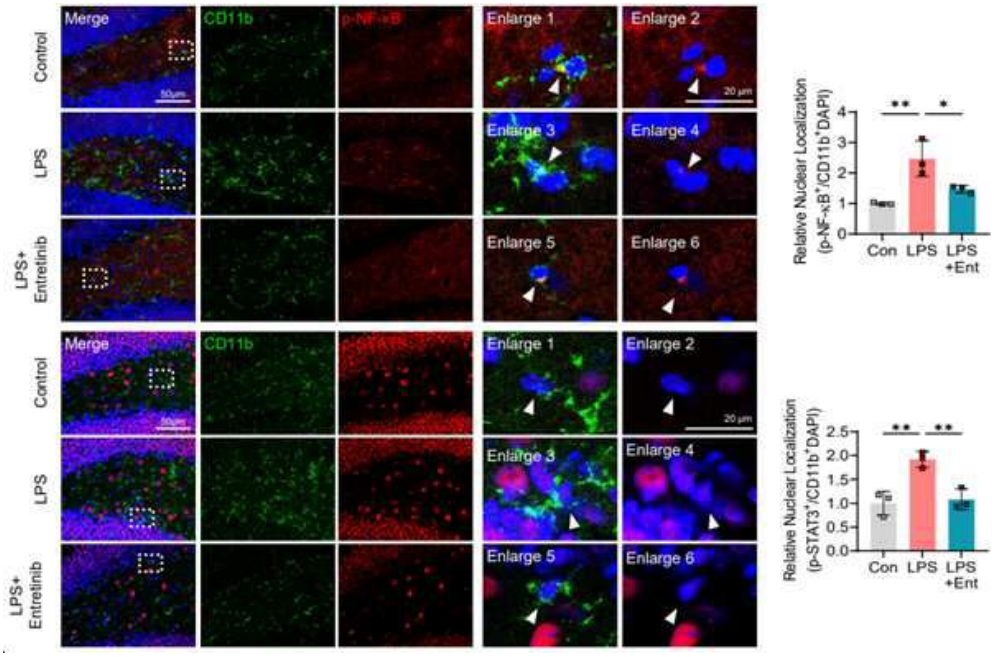
도면9



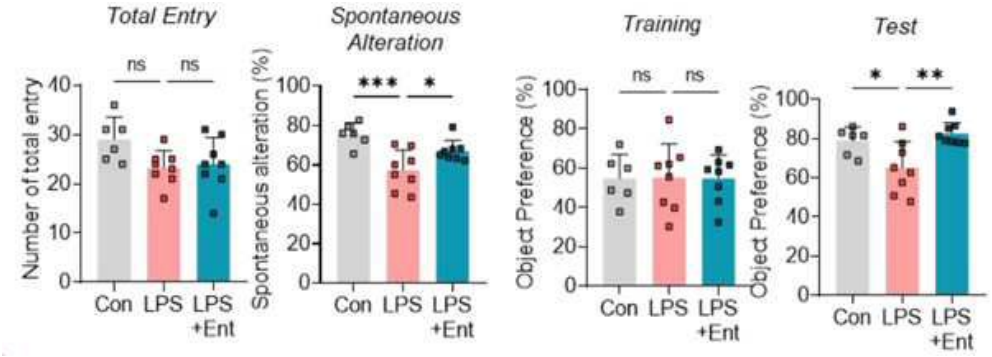
도면10



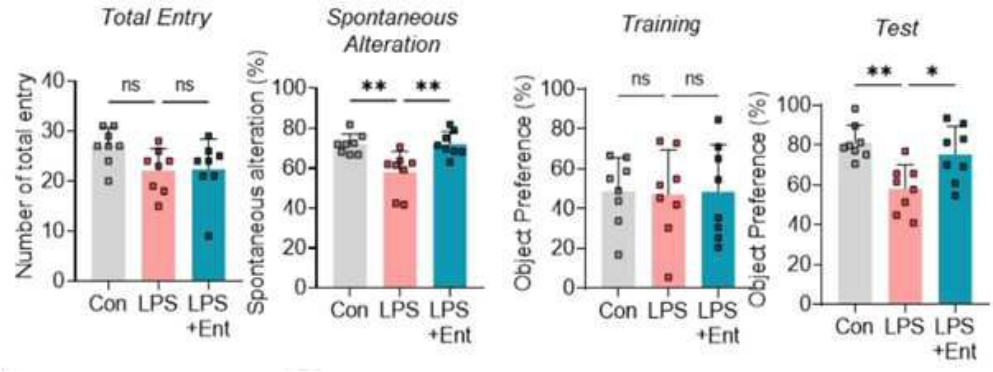
도면11



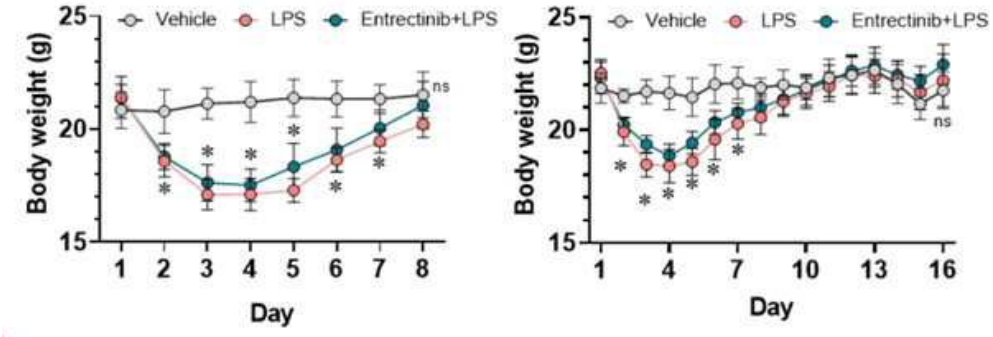
도면12



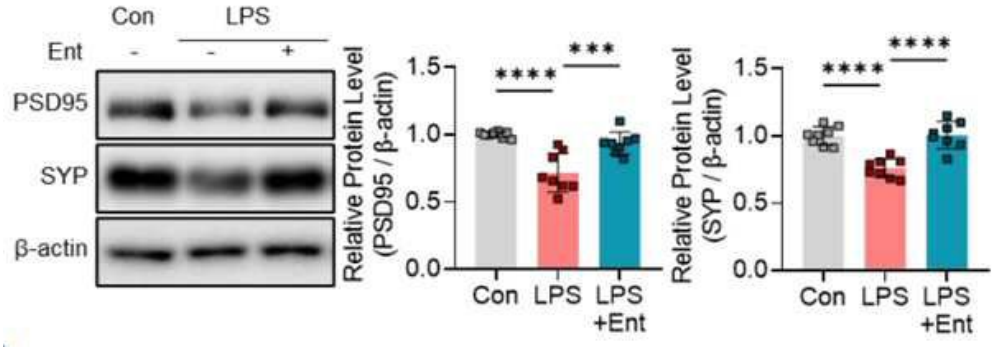
도면13



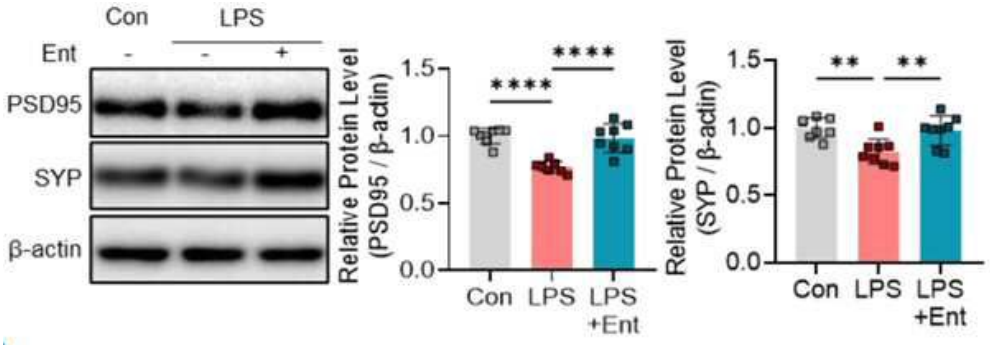
도면14



도면15



도면16


Con
LPS
Ent
-
-
+
PSD95
SYP
β-actin
Relative Protein Level (PSD95 / β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
****
****
Con
LPS
LPS +Ent
Relative Protein Level (SYP / β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
Con
LPS
LPS +Ent