

신규 화합물 라말린의 항치매 활성기전  
규명

Evaluation on MOA(mode of action) of Ramalin



성균관대학교 산학협력단  
(위탁연구책임자 : 조 동 규)

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “ 극지생물 유래 유용 대사체 활용기반 구축” 과제의 위탁연구  
“신규 화합물 라말린의 항치매 활성기전 규명” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



총괄연구책임자 : 임 정 한

위탁연구기관명 : 성균관대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 조 동 규

위탁참여연구원 : 최 보 윤

“ : 최 유 리

“ : 김 학 균

“ : 설 재 훈

## 보고서 초록

위탁연구과제명	신규 화합물 라말린의 항치매 활성기전 규명				
위탁연구책임자	조 동 규	해당단계 참여연구원수	4	해당단계 연구비	30,000,000
연구기관명 및 소속부서명	성균관대학교 약학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	48
<ul style="list-style-type: none"> <li>● 양극해 해양생물유래 항치매물질인 라말린(Ramalin)의 BACE1 조절기전 확인               <ol style="list-style-type: none"> <li>1. BACE1 promoter에 라말린의 작용가능을 확인                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 라말린은 BACE1 promoter에 작용하지 않음을 확인함</li> </ul> </li> <li>2. 라말린의 BACE1 활성조절 여부 확인                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 라말린은 BACE1 활성 조절능력이 낮음을 확인함.</li> </ul> </li> <li>3. 라말린의 BACE1 mRNA의 stability 조절 가능 여부 확인                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 라말린은 BACE1의 mRNA의 stability에 조절에 관여하지 않음을 확인함</li> </ul> </li> </ol> </li>   <li>● 라말린의 추가 타겟 발굴을 위한 연구               <ol style="list-style-type: none"> <li>1. GPScreen으로 확인된 타겟 candidate들에 대한 siRNA 제작 및 라말린과의 관계확인                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- spliceosome과 관련이 있을 것으로 예상하는 CWC15에 라말린이 영향을 주는 것으로 판단됨</li> </ul> </li> <li>2. 라말린의 HDACs 효소 저해효과 확인                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- HDAC 1, 2, 4, 6에 대한 저해 효능 확인</li> <li>- 전체 HDACs에 대한 panel test를 통하여 HDAC6의 저해 효능 입증</li> </ul> </li> <li>3. 라말린의 HDAC6 저해 효과에 대한 기능평가 수행                   <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항염증 효과를 TNF<math>\alpha</math> 발현저해능으로 확인</li> <li>- 대표적인 기질인 acetylated tubulin의 acetylation 지속효과 확인</li> <li>- mitochondria의 운동능력 개선 확인</li> </ul> </li> </ol> </li> </ul>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	치매, 라말린, 타겟, 베타-시크리타제, 히스톤 탈아세틸효소, 항염증			
	영 어	Alzheimer's disease, Ramalin, BACE1, HDACs, anti-inflammation			

# 요 약 문

## I. 체 목

신규 화합물 라말린의 항치매 활성기전 규명

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 목적

양극해 천연 해양생물자원인 Ramalin의 항치매 활성기작 규명

### 2. 필요성

- 현재 알츠하이머 (Alzheimer) 치매에 효과적인 약물은 도네프질과 같은 콜린성 신경계 조절 약물이 유일함. 그러나 콜린성 치료제들은 초기 중기 환자의 증상을 다소간 완화시키는 효능을 나타내지만 증상의 진전을 억제 할 수 없는 근원적 치료제가 아님. 그러므로 근본적인 원인치료가 가능한 치료 약물의 개발이 절실한 실정임.
- 해양유래의 천연물인 라말린은 항치매효과를 in-vitro, in-vivo에서 확인한 바 이에 대한 정확한 기전을 밝힘으로 추후 신약 개발시에 필요한 근거자료를 확보할 필요가 있음. 또한 추가 기전에 대한 탐색으로 추가 적응증 확대를 위한 근거를 확보할 필요가 존재함.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

### 1. 양극해 해양생물유래 항치매 물질인 라말린(Ramalin)의 BACE1 조절기전 확인

가. BACE1 promoter에 라말린의 작용가능을 확인

- BACE1 단백질 생산에 관여하는 BACE1의 promoter를 다양하게 제작함

- 각각의 promoter 발현 하에 라말린에 의한 BACE1 단백질 감소 효과를 luciferase assay 및 western blot을 통하여 확인

나. 라말린의 BACE1 활성조절 여부 확인

- FRET based in-vitro enzyme assay를 통하여 라말린의 효소활성 저해효과 확인
- Merck사에서 임상 3상을 진행중인 MK8931을 reference로 사용하여 라말린과 대조함.

다. 라말린의 BACE1 mRNA stability 조절 가능 여부 확인

- BACE1 mRNA의 UTR (untranslated region)에 대한 다양한 construct 제작
- 각각의 UTR 존재 혹은 deletion된 조건에서 라말린에 의한 BACE1 단백질 감소 효과를 western blot을 통하여 확인

## 2. 라말린의 추가 타겟 발굴을 위한 연구

가. GPScreen으로 확인된 candidate들에 대한 연구

- 가능성이 높은 5종의 siRNA를 제작하여 BACE1 발현 조절여부 확인
- siRNA 발현 하에 라말린을 처리하여 라말린과의 상관관계를 확인
- Candidate의 저해제가 존재하는 경우에는 저해제 처리를 통한 효과와 Ramalin의 효과를 비교함.

나. 라말린의 HDACs 효소 저해효과 확인

- HDAC 1, 2, 4, 6에 대한 in-vitro enzyme assay를 통하여 라말린의 저해효과 확인
- Reaction Biology사에 전체 HDACs에 대한 저해 효과 위탁연구를 통하여 추가적인 저해 효과입증.

다. 라말린의 HDAC6 저해효과에 대한 기능평가 수행

- 항염증효과 확인을 위한 TNF $\alpha$  발현 조절능 확인
- HDAC6의 대표적 기질인 tubulin의 acetylation 지속효과를 western blot으

로 확인하고, histone에 대한 acetylation을 확인함으로 selectivity 입증

- mitochondria의 움직임을 확인함으로 라말린의 신경세포 기능 활성화를 확인.

#### IV. 연구개발결과

성과목표	세부목표		달성 주요내용
1. 라말린의 항치매 활성기작 규명	1-1	BACE1 promoter연구를 통한 Ramalin Target 검증	- 다양한 BACE1 promoter variant를 제작 - qPCR을 통한 Ramalin의 BACE1 mRNA의 변화량 확인
	1-2	Ramalin의 BACE1 조절 검증 및 target 검증	- Ramalin의 직접적인 BACE1 단백질 활성 조절여부 확인 - Ramalin의 splicing 조절 능력 확인
	1-3	Ramalin의 BACE1 mRNA stability 조절능 확인	- 3' 5' UTR의 존재 여부에 따른 BACE1 단백질 안정화 여부 확인 - UTR의 존재 여부 하에 Ramalin 처리시 BACE1 발현양 조절능력 확인
2. 라말린의 추가 타겟 발굴을 위한 연구	2-1	GPScreen을 통한 추가 타겟 가능성 확인	- GPScreen을 통해 얻어진 가능성 있는 5개의 타겟에 대한 siRNA 제작 - siRNA제작 후 세포에 transfection한 후 라말린 처리시에 BACE1 변화량 측정 확인
	2-2	Ramalin의 HDAC효소 저해능 확인	- GPScreen으로 확인된 타겟들의 siRNA 제작 및 Ramalin과의 상관관계 확인 - HDAC효소 저해능 확인
	2-3	HDAC6 저해에 따른 기능평가 확인	- TNF $\alpha$ 발현 조절능 확인 - Tubulin acetylation 확인 및 Histone acetylation 확인을 통한 선택성 검증 - Ramalin의 Mitochondria movement 개선능 확인

## V. 연구개발결과의 활용계획

고령화 사회로 가는 세계적인 추세로 인해 노화와 밀접히 연관된 퇴행성뇌질환 환자들이 급격하게 증가하고 있음. 노화와 더불어 발생하는 이러한 신경계 질환은 환자뿐만 아니라 환자를 돌보아야 하는 가족의 경제적, 정신적 고통을 수반하고 노령인구의 꾸준한 증가로 인해 사회적으로도 천문학적인 비용을 요구하고 있음. 본 연구팀의 연구결과 Ramalin의 BACE1 단백질의 감소 및 HDAC6 저해제로서의 기전을 확인하였음. 본 연구는 급격하게 증가하고 있는 노인성 치매, 특히 AD의 효율적 예방 및 치료약물 개발의 핵심지식과 기술을 제공함으로써 국가 의약산업 및 경제발전에 큰 기여를 할 것임.



# S U M M A R Y

## (영 문 요 약 문)

### I. Title

Evaluation on MOA(mode of action) of Ramalin

### II. Purpose and Necessity of R&D

#### 1. Purpose

Target evaluation and characterization on efficacy of Ramalin which is derived from polar ocean

#### 2. Necessity

There are no effective drug for the Alzheimer's disease in now. The donepezil which are acetylcholinesterase inhibitor, has been treated to patients, however efficacy of donepezil is limited to MCI (mild cognitive impairment) patients. Ramalin which is derived from polar ocean, was already defined anti dementia effect from in-vivo study and evaluated on reducing BACE1 protein expression from in-vitro and in-vivo study. However the mechanism of Ramalin is still unclear. Therefore target identification study of Ramalin have to be performed for further drug development process.

### III. Contents and Extent of R&D

#### 1. Evaluation of efficacy of Ramalin for reducing BACE1 expression

##### A. Study on BACE1 promoter

- Plasmid construction of various BACE1 promoters.
- Through luciferase assay and western blot analysis, BACE1 protein expression was investigated under Ramalin treatment.

##### B. BACE1 enzymatic assay

- BACE1 enzyme assay was performed for defining BACE1 inhibitory effect of Ramalin.
- MK8931 which is on Phase 3 clinical trail for Alzheimer's disease, was used for reference.

#### C. mRNA stability study for Ramalin's effect

- various constructs which have or deleted 3' and 5' of UTR (untranslated region) were generated.
- After transfection of various constructs, BACE1 expression is tested under Ramalin treatment by western blot analysis.

### 2. Additive target validation study

#### A. Evaluation of candidates from GPScreen

- 5 siRNAs for probable candidates were generated and analysed by western blot analysis.
- with and without Ramalin, BACE1 protein expression was investigated using siRNA transfected cell line.

#### B. HDAC inhibitory activity of Ramalin

- Using in-vitro enzymatic assay, Ramalin's inhibitory activity was evaluated against HDAC 1, 2, 4, and 6.
- Inhibitory activity of Ramalin against HDAC6 was confirmed by Reaction Biology Corp. in USA.

#### C. Functional assay for HDAC6 inhibitory efficacy by Ramalin

- Inhibitory effect of TNF $\alpha$  expression by Ramalin
- Increasing tubulin acetylation by Ramalin
- Improvement of mitochondria movement by Ramalin

#### IV. R&D Results

Purpose	Detailed assignment		Achieved results
1. Evaluation of efficacy of Ramalin for reducing BACE1 expression	1-1	Study on BACE1 promoter	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasmid construction of various BACE1 promoters.</li> <li>- There are no effect to BACE1 promoter by Ramalin</li> </ul>
	1-2	BACE1 enzymatic assay	<ul style="list-style-type: none"> <li>- BACE1 enzyme assay was performed by recombinant BACE1 protein.</li> <li>- There are no effect to BACE1 enzymatic activity by Ramalin</li> </ul>
	1-3	mRNA stability study	<ul style="list-style-type: none"> <li>- various constructs which have or deleted 3' and 5' of UTR (untranslated region) were generated.</li> <li>- There are no effect to BACE1 mRNA stability by Ramalin</li> </ul>
2. Additive target validation study	2-1	Evaluation of candidates from GPScreen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5 siRNSs for probable candidates were generated and analysed by western blot analysis.</li> <li>- 1 candidate were suggested probable candidate by Ramalin.</li> </ul>
	2-2	HDAC inhibitory activity of Ramalin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ramalin has inhibitory activity against HDAC 1, 2, 4, and 6.</li> <li>- Inhibitory activity of Ramalin against HDAC6 was confirmed by Reaction Biology Corp. in USA.</li> </ul>
	2-3	Functional assay for HDAC6 inhibitory efficacy by Ramalin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ramalin has inhibitory effect of TNF<math>\alpha</math> expression.</li> <li>- Ramalin increased tubulin acetylation with selectivity.</li> <li>- Ramalin improved mitochondria movement.</li> </ul>

#### V. Application Plans of R&D Results

Due to the global trend toward an aging society, neuro-degenerative disease such as the Alzheimer's disease has been rapidly increasing. These neuro-degenerative diseases which occur with aging, are accompanied by the economic and psychological distress of family as well as the patients who need to care for the patients. They are demanding socially astronomical costs for the steady increase in the elder population. In this study, we confirmed the reduction of BACE1

protease which is key molecule for A $\beta$  production, by Ramalin(polar ocean derived natural molecule) and also Ramalin's HDAC6 inhibitory mechanism for anti-inflammatory efficacy. This study will contribute to the national pharmaceutical field and economic development by providing the core knowledge and skills for the effective prevention and treatment of Alzheimer's disease, especially the aging dementia.



# 목 차

제 1 장 서론 (Introduction) .....	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황 (Trend in research) .....	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 (Research process & Results) .....	24
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도 (Achievement of study and contribution of results to science) .....	40
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 (Perspective on the use of results) .....	43
제 6 장 참고문헌 (References) .....	45



# 제 1장. 서론

## 제 1절. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

양극해 해양생물 유래 생리활성 물질인 라말린이 지니고 있는 A $\beta$  생성 secretase 발현 조절 기전을 규명하여 라말린의 항치매 활성기작을 이해하여 나아가 치매치료 제로의 개발을 목적으로 함.

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 알츠하이머 질환 (Alzheimer's disease)

- 알츠하이머 질환은 1907년 독일 정신과의사인 Alois Alzheimer에 의해 보고된 질환으로 대뇌피질에서 발견된 특이한 질환(about a peculiar disease of the cerebral cortex)이라고 처음 소개된 후 100년이 넘었지만 여전히 효과적인 치료제가 없는 상황임.
- 세계보건기구(WHO)에 따르면, 전 세계 65세 이상 인구는 2010년 5.2억명(7.6%)에서 2050년 15.2억명(16.2%)으로 증가할 것으로 예상함. 알츠하이머 질환의 가장 큰 원인인 고령화로 인하여 알츠하이머 질환 환자가 증가할 것으로 예상됨. 알츠하이머 질환은 치매(Dementia)의 약 70-80%를 차지하고 있고, 긴 시간 동안 의료 요양비용이 소요되는 심각한 질환임.
- 세계 치매인구는 2013년 4400만명에서 2030년 7600만명, 2025년에는 1억 3500만명으로 증가할 전망이나, 현재까지 효과적인 치료법이 개발되어 있지 않은 medical unmet need가 높은 분야임 (표 1).
- 지금까지 개발된 알츠하이머 질환 치료제는 질환의 진행속도를 소폭 지연시키는

데 불과하고 말기보다는 초기환자에 효과적임. 이는 1970-80년대에 ‘cholinergic hypothesis’가 대두되면서 본격적으로 개발된 약물로, cholinesterase 저해제가 개발되었음.

- 현재 ‘cholinergic hypothesis’ 이후 ‘amyloid cascade hypothesis’가 신약개발에 근간이 되고 있으며, 이 가설은 베타-아밀로이드(Aβ)의 생성 및 축적이 뇌에 신경세포를 손상시키고 기억력 인지력 장애를 유발한다고 하는 가설임 (그림 1). 이를 바탕으로 Aβ 생성에 중요한자인 β secretase 및 γ secretase의 저해제 개발이 활발하게 이루어 졌으나, 현재까지 FDA에 승인된 약물은 없음.
- 하지만, 현재까지 amyloid cascade hypothesis가 가장 정설로 인식되어 있으며, 이에 따른 Aβ의 생성억제를 통한 질환 극복을 여러 제약사에서 노력하고 있음.

Table 1. 지역별 치매인구 추정

(단위 : 백만명)

지역	치매인구(비중)		
	2013	2030	2050
G8	14.02(32%)	20.38(27%)	28.91(21%)
G20	33.93(76%)	56.40(75%)	96.61(71%)
OECD	18.08(41%)	27.98(37%)	43.65(32%)
선진국	17.00(38%)	25.86(34%)	39.19(29%)
개도국	27.84(62%)	49.76(66%)	96.27(71%)
세계	44.35	75.62	135.46

Alzheimer’s Disease International(2013), “Policy brief for heads of government: The global impact of dementia 2013-2050”

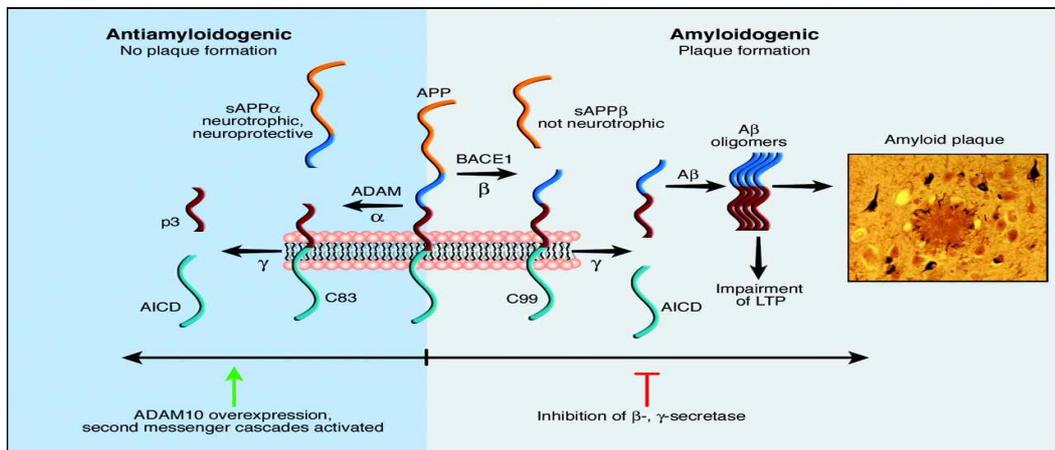


Figure 1. Amyloid cascade hypothesis: procedure of Aβ production in Alzheimer’s disease

## 나. $\beta$ secretase (BACE1)

- 알츠하이머성 치매에 원인이 되는 아밀로이드 베타( $A\beta$ )의 생성을 담당하는 단백질분해 효소중 하나로써, 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein; APP)을 절단하여 sAPP $\beta$ 와 C99 fragment 생성시킴.(그림 1)
- BACE1 Knock-out mice 뇌에서의  $A\beta$  측정 결과 알츠하이머성 치매의 원인이 되는  $A\beta$ 양이 현격히 감소하였으며 non-amyloidogenic pathway에서 많이 생성되는 sAPP $\alpha$  생성이 증가함.
- BACE1 knock-out mice 뇌의 phenotype이 정상군의 뇌와 비슷한 형태를 보이고 있으며 발생 및 생식도 비교적 정상적이었음. 따라서 **BACE1의 억제**는 뇌에 **별 다른 영향 없이 알츠하이머성 치료제로 개발 할 수 있는 효과적인 치료 타겟**이 됨. 이러한 이유로 현재 거대 제약사들의 가장 중요한 알츠하이머 병 치료 타겟이 되고 있음.
- BACE1은 일종의 stress protein으로써 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 비롯한 다양한 스트레스에 대해 민감한 발현증가를 나타냄. 이러한 BACE1의 발현 증가는 결국  $A\beta$ 의 생성을 증가시킴.

## 다. 라말린 (Ramalin)

- 극지 유래 천연 해양생물자원인 라말린은 이끼에서 분리된 물질로 생리활성물질로 알려져 있음.
- 본 연구단에서 라말린에 의한  $A\beta$  감소 효과를 in-vitro, in-vivo 실험을 통하여 입증하였고, 이러한 기전은 BACE1 단백질 분해효소의 감소에 따른 효과임을 확인하였음.
- 추후 라말린 항치매 치료제로의 개발을 위하여, BACE1의 단백질 분해효소 감소에 대한 정확한 이해 및 라말린의 다양한 생리활성 효과에 근거한 추가 기전을 밝히기 위한 연구를 추진함.

## 제 2장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 알츠하이머 치료제의 최근 연구 동향

#### 1. 알츠하이머 치료제의 종류

대표적으로 알츠하이머성 치매는 아직 정확한 원인이 밝혀지지 않고 있으며 효과적인 치료법도 개발되어 있지 않다. 종합적으로 볼 때, 현재 치매의 치료는 증상을 조기에 발견해 치료함으로써 진행을 늦추는데 목표를 두고 있으며, 현 단계에서 치매의 진행을 억제하거나 예방할 수 있는 약물은 없다. 특히 알츠하이머병의 경우 아직 발병 기전이 확실히 규명되지 않아 원인적 치료가 불가능한 것이 사실이다. 이처럼 아직까지는 완치는 어렵지만 악화되는 것을 막을 수 있는 치료제들이 많이 개발되어 효과를 보이고 있다.

앞서 언급한 cholinergic hypothesis에 따른 병의 증세를 완화하거나 진행을 둔화시키기 위하여 아세틸콜린의 농도를 높이는 여러 가지 콜린성 약물들(콜린에스테라제 억제제)이 개발되었다. 보통 시냅스에 존재하며, 아세틸콜린을 신속히 절단하여 신경전달을 막는 아세틸콜린 에스테라제(AChE)라는 효소를 불활성화하는 기전을 가지고 있으며, 실제로 그러한 콜린에스테라제 억제제들이 미국 FDA의 승인을 받아 전 세계적으로 시판 중이다 (tacrine, donepezil, rivastigmine, galanthamine) (표 2). 1993년 미국 FDA가 승인한 인지기능 개선제인 tacrine은 기억력 등 인지기능의 장애를 완화시키거나 치매의 진행속도를 늦추는 효과가 있다. 대표적인 약물로는 일본 에자이사에서 개발한 donepezil(아리셉트), 여성호르몬, 셀레질린과 비타민E의 병합투여 등을 들 수 있다. 이들은 뇌속에서 기억력을 관장하는 신경전달물질인 아세틸콜린의 분해를 막아주어 농도를 올려줌으로써 치매 악화를 늦춘다. 이러한 약물들은 치매의 진행 속도를 평균 1~2년 정도 늦추며 4명 중 1명꼴로 기억력이 조금 좋아지는 효과를 얻을 수 있다. 그러나 조기에 사용해야 효과를 볼 수 있으며, 중증 치매의

경우엔 효과가 없다. 비록 중증에는 효과가 약하고, 독성 때문에 사용에 논란의 여지가 많은 상태이긴 하지만 현재까지 다른 기전을 갖는 어떤 뇌기능 개선제보다 알츠하이머병을 예방하거나 초기 치매증상을 완화하는데 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 이 계통의 약물만 FDA에서 승인을 받아서 치료에 사용되고 있다.

**Table 2.** 현재 FDA 승인된 알츠하이머 질환 치료제

Drug name	Brand name	Approved For	FDA Approved
1. donepezil	Aricept	All stages	1996
2. galantamine	Razadyne	Mild to moderate	2001
3. memantine	Namenda	Moderate to severe	2003
4. rivastigmine	Exelon	Mild to moderate	2000
5. tacrine	Cognex	Mild to moderate	1993

이외에 승인된 약물은 존재하지 않으며 많은 연구를 통하여 신규 target을 발굴하고 이에 따른 약물의 개발이 진행되고 있다. 대표적으로  $\beta$ -secretase의 저해를 통한 A $\beta$ 생성을 막기 위한 노력들이 이루어져 왔다. 치매 단계를 특정하지 않은 대규모 임상 3상에서 이러한 BACE1 저해제의 효과를 입증하지 못한 상태이며, 이에 경도인 지장애 환자만을 대상으로 임상을 진행하고 있다.  $\gamma$ -secretase의 저해제는 target에 대한 독성이 문제 됨이 확인이 된 상태이며, 이로 인하여  $\gamma$ -secretase에 대한 저해제 개발은 중단된 상태이다. 이 외에 A $\beta$ 의 응집 저해제 개발이 small molecule 및 antibody를 이용한 접근이 이루어지고 있다.

최근에는 여러 유전자의 돌연변이에 따른 산발형 알츠하이머 질환을 이해하고자 하는 노력들이 이루어지고 있으며, 그 예로 BIN1, CLU, ABCA7, CR1, SORL1, TERM2등이 보고되고 있다.

## 제 2절 국내외 기술개발현황

### 1. 연구개발중인 치매 조절약물

### 가. 승인된 알츠하이머 치료제

최초의 치매 치료제로 공인받은 타크린 이후로 현재까지 아세틸콜린에스테라아제 억제제인 도네페질, 갈란타민, 리바스티그민과 NMDA 수용체 길항제인 메만틴 등 4종류의 치료제가 상용되고 있다 (표 3). 그러나 이들 약제는 치매의 진행 속도를 완화시키거나 정지시킬 수 없기 때문에 근본적인 치료제는 아니다. 이중 상대적으로 효과적인 약물은 도네페질과 같은 콜린성 신경계 조절 약물이 유일하다. 그러나 콜린성 치료제들은 초기 중기 환자의 증상을 다소간 완화시키는 효능을 나타내지만 증상의 진전을 억제 할 수 없는 근원적 치료제가 아니다. 그러므로 근본적인 원인치료가 가능한 치료약물의 개발이 절실한 실정이다.

Table 3. 현재 알츠하이머 질환에 사용되는 약물들 및 그 특징

AD 치료제	 ARICEPT (donepezil HCl) tablet	 EXELON (risperidone)	 Razadyne ER (galantamine HBr) extended-release capsules	 Namenda (memantine HCl)
회사	Eisai/Pfizer	Novartis	J&J/Shire	Forest/Merz/Lundbeck
작용기전	AChEI	AChEI and BuChEI	AChEI and nAChR agonist	NMDA receptor antagonist
FDA 적응증	Mild, moderate, and severe AD	Mild to moderate AD, PD	Mild to moderate AD	Moderate to severe AD
일반적 치료용도	First-line all disease severities	First- or second-line mild to moderate	First or second line mild to moderate	Monotherapy or adjunct to Aricept moderate to severe
제형	Oral	Oral or transdermal	Oral	Oral
복용	Once daily	Twice daily capsules or once daily patch	Once daily	Twice daily
2010 판매	\$3,757m	\$1,003m	\$443m	\$1,694m
비고	Gold-standard AD 약물	Patch - Greater tolerability profile	A common second-line alternative to Aricept	Severe AD patients

### 나. 알츠하이머 치료제 신약 개발 현황

근본적인 원인 치료를 위한 개발을 위하여 앞서 언급한 Aβ의 생성을 막기 위한 BACE1 저해제 개발 및 antibody등을 이용한 응집억제, 혹은 vaccine의 개발을 다국적사에서 시도 중이다. 하지만 Aβ vaccine의 경우 임상에서 실패하였고, antibody 제제들도 임상 2상 혹은 3상에서의 효능입증에 실패하고 있는 실정이다. 현재는 질환의 진행사항을 고려하여 경도인지장애 환자(Mild cognitive impairment, MCI)를 대상으로 임상을 재개시 하고 있는 실정이다. 이와는 별도로 BACE1 저해제로 개발 중인 Merck사의 MK8931의 경우 앞서 실패했던 Eli Lilly 사의 LY2886721 약물의

간독성은 해결한 것으로 확인되고 있고, 2019년 대규모 임상 3상 결과를 기대하고 있다 (표 4).

Table 4. 알츠하이머 질환 원인 치료제 개발 현황

Drug (generic/code)	Mode of action	Pathway	Formulation	Companies	Highest Phase
Namenda XR (memantine)	NMDA receptor antagonist	Neurotransmitter	Oral	Merz, Forest	Approved
Aricept patch (donepezil)	Acetylcholinesterase inhibitor	Neurotransmitter	Transdermal	Eisai, Teikoku Seiyaku	Pre-registration
AN-1792	Beta amyloid Vaccine	Beta amyloid	Intravenous	Janssen & Pfizer	Phase II Fail (Feb 2003)
Bapineuzumab (AAB-001)	Beta amyloid mAb	Beta amyloid	Intravenous	Elan, Johnson & Johnson, Pfizer	Phase III Fail (July 2012)
Bapineuzumab (AAB-001)	Beta amyloid mAb	Beta amyloid	subcutaneous	Elan, Johnson & Johnson, Pfizer	Phase II (extended) SC New formulation으로 임상2상 진행중
Gammagard (immunoglobulin)	Polyvalent human IgG preparation	Beta amyloid	Intravenous	Baxter	Phase III Fail (May 2013)
Solanezumab (LY2062430)	Beta amyloid mAb	Beta amyloid	Intravenous	Eli Lilly	Phase III Fail (Aug 2012)
					Mild 환자를 대상으로 Phase III expedition 다시 진행중
Crenezumab	Beta amyloid mAb	Beta amyloid	Intravenous	Genentech, NH	Extended Phase II
Gantenezumab	Beta amyloid mAb	Beta amyloid	subcutaneous	Roche	Phase III
ELND-005 (AZD-103)	Beta amyloid aggregation inhibitor	Beta amyloid	oral	Elan	Phase III
Avagacestat (BMS-708163)	$\gamma$ -secretase inhibitor	Beta amyloid	oral	BMS	Phase II Fail (Dec 2012)
MK 8931	BACE1 inhibitor	Beta amyloid	oral	Merck & Co.	Phase III

#### 다. 알츠하이머 질환의 치료제 개발 향후 전망 및 필요성

- 알츠하이머병 환자 뇌에 침착되는 A $\beta$ 를 치료 표적으로 많은 연구가 진행되고 있지만 효과적인 치료법이 개발되지 않았음.
- 알츠하이머병은 광범위한 연구들을 통해 매우 다양한 메커니즘과 치료 표적들이 밝혀졌고 이를 통해 여러 가지 치료제가 개발 되었지만 모두 임상시험을 통과하지 못했음.
- 이는 지금까지 밝혀진 알츠하이머 발병 기전을 바탕으로 개발된 치료제들이 충분한 신경보호 효과를 보이지 못하여 공통적으로 염증 반응과 다량의 신경세포 사멸이 나타났고, 이러한 결과로 뇌기능에 심각한 문제를 초래하였음.
- 이러한 병에서 보이는 신경세포사멸의 분자적 메커니즘에 대한 이해가 아직도

매우 부족한 상태임을 의미함.

- 그러므로 알츠하이머병의 가장 중요한 타겟인 Aβ생성 secretase 조절 기작 및 조절물질 발굴에 대한 지속적인 연구와 함께, 아직 밝혀지지 않은 새로운 알츠하이머 발병 기작 및 타겟연구가 동반되어야 함.

## 2. 국내외 개발 및 시장동향

현재 치매와 관련된 연구에도 전 세계적으로 막대한 비용이 들어가고 있으며 임상 2상 단계 이후에 있는 다수의 후보 약물이 존재한다. 이 중 acetylcholine과 관련한 약물이 서방형에 해당하는 약물이다. 이외에도 베타-아밀로이드의 작용을 억제한다든지, 호르몬을 이용한다든지, 면역체계를 이용하는 등 다양한 방식으로 치매를 치료하는 노력들이 행해지고 있다. 이러한 치료제들이 개발에 성공하면서 기작이 비슷한 것들은 일부 병행하겠지만, 경쟁이 불가피한 것으로 전망된다. 하지만, 기작이 다른 경우 기존의 치료제와 병행 투여되는 등, 시장을 확대시킬 가능성이 크다.

국내의 경우는 천연물과 줄기세포를 이용한 연구개발이 활발하게 진행되고 있다. 천연물 신약의 경우 대형 제약회사를 중심으로 연구개발 및 임상시험이 진행되고 있으며, 동아SD, 일동제약, 제일약품 등이 천연물을 이용한 치매치료제의 임상연구를 진행 중에 있다 (표 5). 메디포스트의 경우 체대혈 유래 줄기세포를 기반으로 뉴로시스템을 개발하여 임상을 진행 중이다.

Table 5. 국내 치매치료제 신약개발 주요 현황(2015년 기준)

기관	연구개발 주요내용	연구개발단계
경상대학교	천연단백물질(Osmotin) 추출 기술 한국파마로 기술이전 국내 특허 출원 등록 및 국제 PCT 출원, 미국특허 출원	기술이전
대웅제약	알츠하이머형 치매 신약 후보물질 'DWP 09031	임상1상
동아쏘시오그룹	동아치매센터를 중심으로 천연물 신약 개발 진행	임상 2상 예정
메디포스트	줄기세포 치매치료제 '뉴로시스템'을 개발하여 임상1상을 마치고 치료제 형태를 변경하여 삼성서울병원에서 임상 1/2a상을 진행	임상1상 2상 전기 진행
일동제약	천연물 신약 ID1201(비임상 시험 종료), 유럽 주요 5개국과 일본, 중국에서 특허 취득	임상2상 예정
제일약품	천연물에서 유래한 DHED (Dehydroevodiamine)	임상1상
SK케미칼	리바스티그민을 이용한 치매 치료 패치 제품인 SID710을 세계 최초로 개발하고 유럽 수출	-

치매의 경우, 정확한 원인이나 기작이 밝혀지지 않았다. 게놈 프로젝트이후, 급속하게 발달하고 있는 생물 과학에 힘입어, 미국을 포함한 선진국들은 치매에 관한 연구에 막대한 투자를 하고 있다. 이러한 연구의 결과로 원인이나, 타겟물질, 기작 등이 밝혀질 경우, 효과적인 치료제가 새롭게 시장에 진입하여 급격한 시장 규모의 확대가 예상되기도 한다.

국내 치매 치료제 시장은 2009년 720억원에서 2012년 4,000억원으로 급격히 성장하고 있고, 향후 성장률은 20%정도로 예상되어 2020년에는 약 2조원 수준으로 확대될 것으로 예상되어 진다 (표 6). 국내에서 사용되는 대표적인 치매치료제는 Aricept, Exelon, Reminyl, Ebixa가 가장 많이 사용되고 있다.

Table 6. 2014년 치매치료제 원외처방액 현황

(단위:억원)

제품명	제조사	2013년	2014년	증감율
Aricept	에자이	398	415	4.1%
Exelon	노바티스	147	149	1.3%
Ebixa	룬드백	59	54	-8.8%
Reminyl	얀센	62	43	-29.7%

2012년 국내 치매노인 인구는 54만명으로 2030년에는 120만명을 넘을것으로 추정하고 있다. 20년을 주기로 약 2배씩 증가할 것으로 추산되고 있다 (그림 2). 치매환자 중 알츠하이머 질환은 약 71.3%, 혈관성 치매는 16.9%가 차지하고 있으며, 이중 최경도 치매는 17.4%, 경도치매 41.4%, 중증도 치매 25%, 중증치매 15.5%로 보고되고 있다 (그림 3). 치료가 가능하다고 판단되는 최경도, 경도 치매가 전체에서 58.8%를 차지한다. 이러한 환자들을 발병 후에도 오랜 기간 생존하여 그 사회 경제적 비용이 막대하게 소요된다. 현재 국내 치매와 관련된 사회 경제적 비용은 2013년 기준 11조 7,000억원 수준이며, 2050년에는 43조 2,000억원까지 증가할 것으로 예측되어 진다 (표 7).

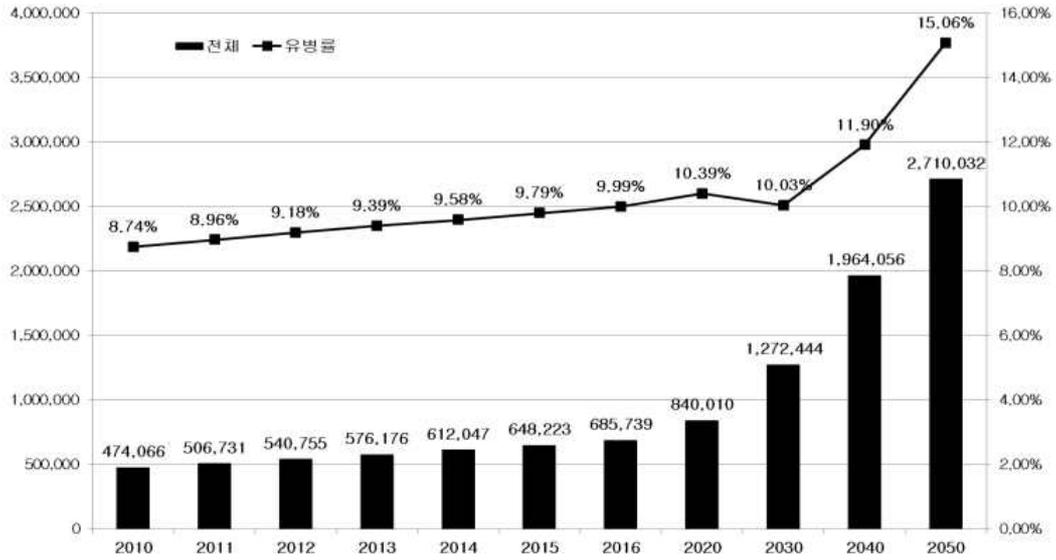


Figure 2. 국내 치매노인 증가 추이 및 전망

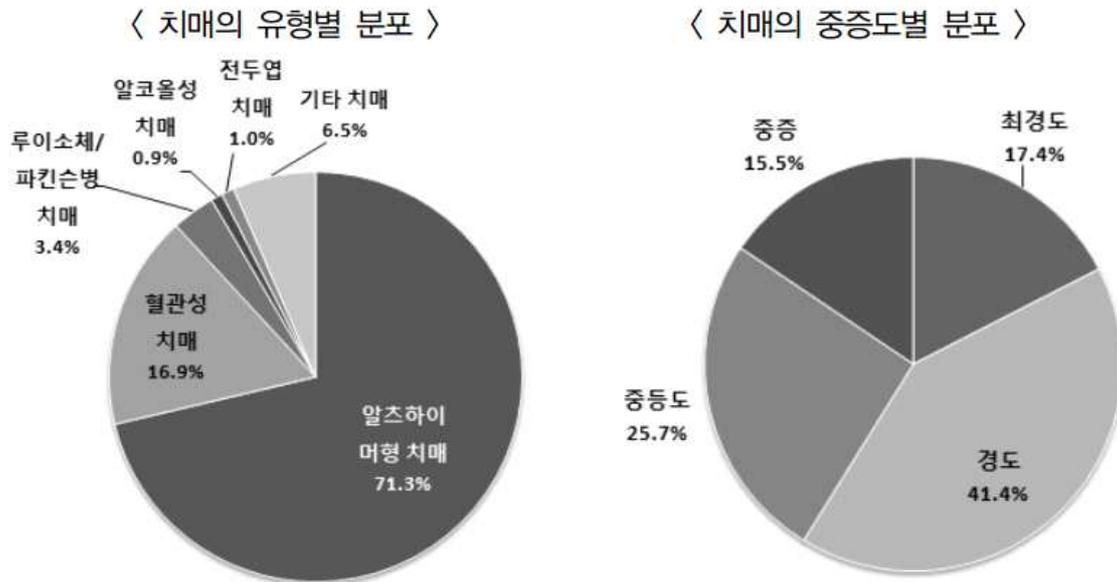


Figure 3. 국내 치매 유형별 증증도별 분포

Table 7. 치매로 인한 사회적 비용 (국내)

(단위:조원)

구분	2013년	2020년	2030년	2040년	2050년	
실질GDP	1,134.9	1,471.3	1,938.6	2,384.7	2,787.8	
치매의 사회적 비용	실질비용	11.7	15.2	23.1	34.2	43.2
	GDP대비 비율	1.0%	1.0%	1.2%	1.4%	1.5%

#### 나. 국외개발 및 시장동향

글로벌 치매 치료제 시장 규모는 그 조사기관 마다 차이가 있지만, 2014년 129억 달러이며, 연평균 8.6%의 성장을 보이고 있어 2020년에는 212억 달러를 상회할 것으로 예측하고 있다. 2015년까지 아리셉트, 엑셀론등의 기존 치매치료제가 특허가 만료되어 시장의 규모가 정체기에 있지만, 차세대 치료제들의 개발로 인하여 시장은 지속적으로 성장할 것으로 보인다 (그림 4).

[단위:억달러]

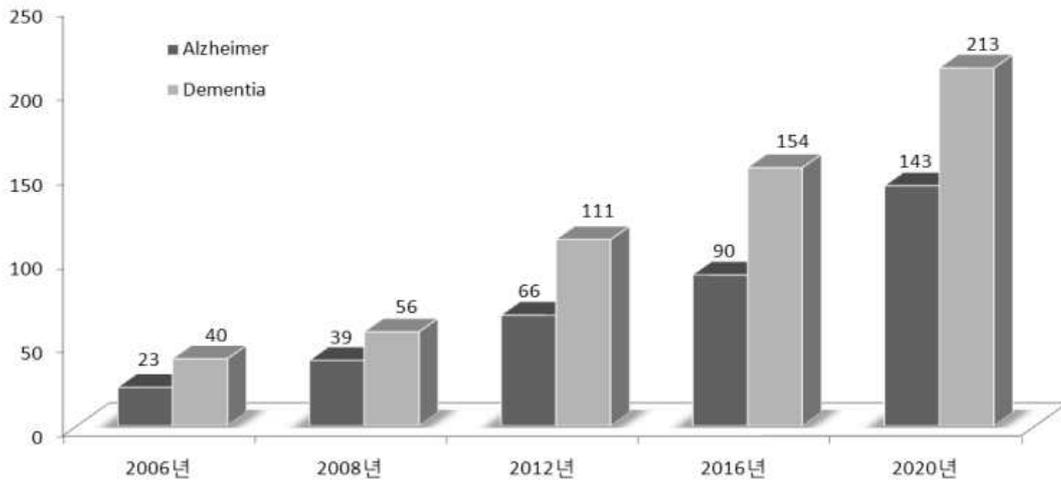
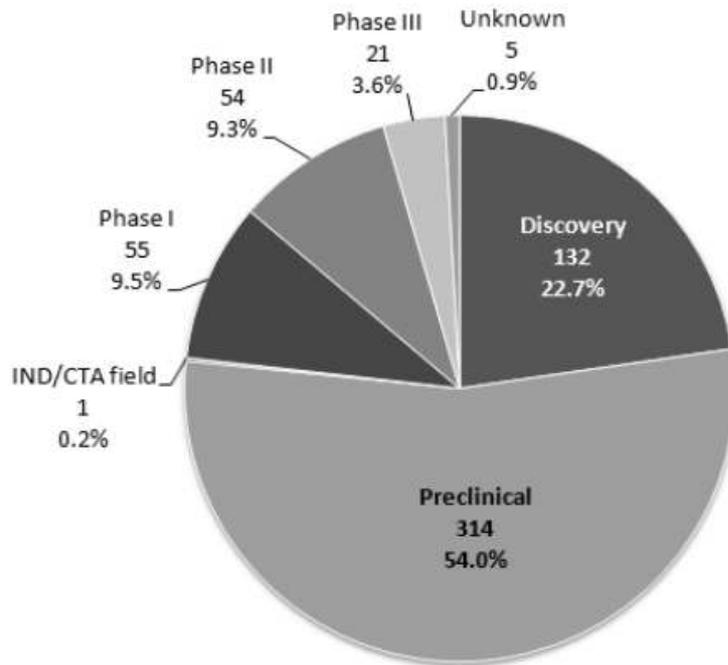


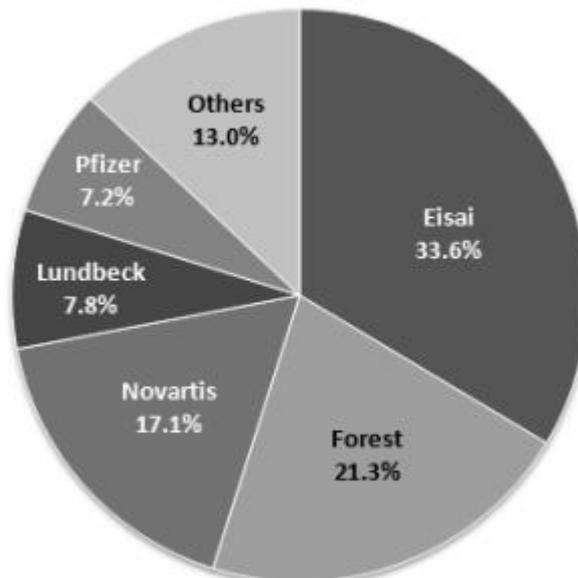
Figure 4. 치매 및 알츠하이머 치료제 시장규모

현재 진행중인 알츠하이머 치료제 파이프라인은 583건으로 보고되어지나 77%가 기초연구 및 비임상연구와 같은 초기단계이다. 3상연구는 21건이 보고되어지고 대부분 저분자 화합물이 속한다 (그림 5). 하지만 치매치료제의 경우 임상 성공률이 지나치게 낮아 실제로 신규로 승인이 될 경우 그 시장의 성장 및 독점이 예상된다. 실제 치매치료제의 임상 실패 비율은 99.6%로 타 분야 약제의 평균실패율 (81%)에 비해 높은 수준이다.



**Figure 5.** 알츠하이머 치료제 연구 단계별 현황

결과적으로 알츠하이머질환 치료제 시장의 주요제품들은 Aricept, Exelon/Exelon patch, Razadyne/ER, Namenda 등이다 (그림 6).



**Figure 6.** 알츠하이머 질환 치료제 시장 점유율

## 제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구내용 및 결과

#### 1. 라말린의 항치매 활성기작 규명

##### 가. BACE1 promoter 연구를 통한 Ramalin Target 검증

(1) 다양한 BACE1 promoter variant들 제작 및 이를 통한 Ramalin 기전 확인

(가) 연구내용

- ① BACE1 단백질의 promoter 부분을 cloning하여 luciferase 발현 vector에 sub-cloning. (그림 7)
- ② Promoter 부분을 순차적으로 절단하여 luciferase 발현 vector에 각각 sub-cloning 완료. (그림 7)
- ③ 4종의 vector를 신경세포에 transfection 한 후 Ramalin의 유무에 따른 luciferase activity 측정을 통하여 promoter의 기능 조절 여부 확인.

(나) 연구결과

- ① BACE1 promoter를 full sequence, -1150, -815, -731, -619 부분부터 coding sequence까지 각각 cloning하여 luciferase vector의 5' region에 sub-cloning 완료 및 sequencing을 통한 확인 완료.
- ② Full promoter를 가지고 있는 luciferase vector를 transformation 후 Ramalin의 효과확인 실험 결과, Ramalin은 luciferase의 activity를 변화시키지 못함. (그림 8)
- ③ 순차적으로 절단된 promoter들도 luciferase의 activity가 Ramalin에 의해 조절되지 않음을 확인. (그림 9)

(다) 결론

① Ramalin은 BACE1 promoter 조절 능력이 없음을 luciferase assay를 통하여 간접적으로 확인함.

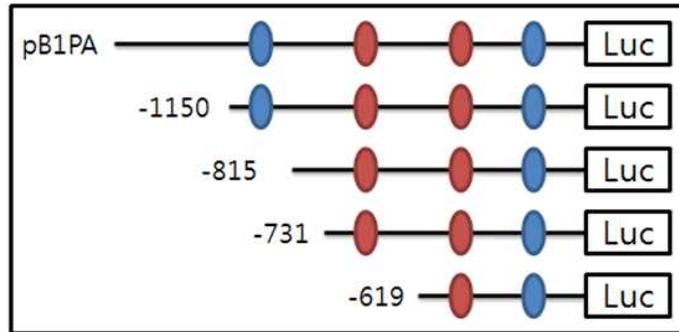


Figure 7. Construct of BACE1 promoter variants

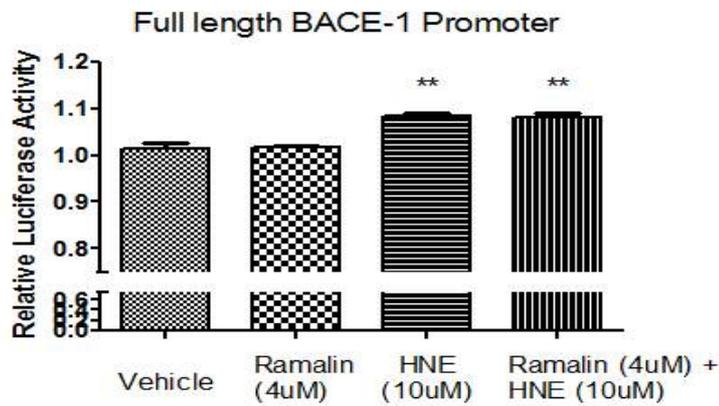


Figure 8. Ramalin does not affect BACE1 full length promoter

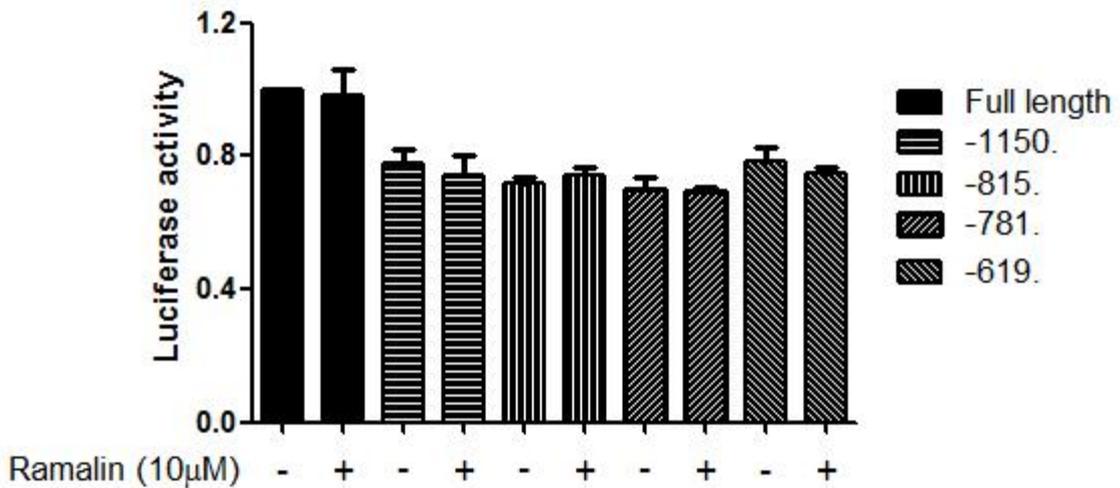


Figure 9. Ramalin does not affect BACE1 promoter variants.

(2) qPCR(Quantitative real time polymerase chain reaction)의 방법을 통한 mRNA 변화 확인

(가) 연구내용

- ① Ramalin의 promoter 조절능이 없음을 검증하기 위하여 qPCR(Quantitative real time polymerase chain reaction)의 방법으로 BACE1 mRNA 변화량 측정
- ② Ramalin의 유무에 따른 신경세포에서 RNA를 prep하고, cDNA를 합성 후 유전자의 발현량을 확인함.
- ③ 두 가지 primer set을 이용하여 BACE1의 mRNA 발현양을 조사하고, 동일 시료를 western의 방법을 통하여 단백질 변화 여부 확인.

(나) 연구결과

- ① Ramalin은 BACE1 mRNA의 조절능력이 없음을 확인함. (그림 10)
- ② 동일 시료를 western의 방법으로 단백질 변화량을 측정했을 때, Ramalin에 의해 BACE1 단백질의 감소를 확인. (그림 11)

다. 결론

- ① Ramalin은 BACE1 단백질 조절능력은 Promoter에 의한 mRNA 변화에 의한 효과가 아님을 증명함.

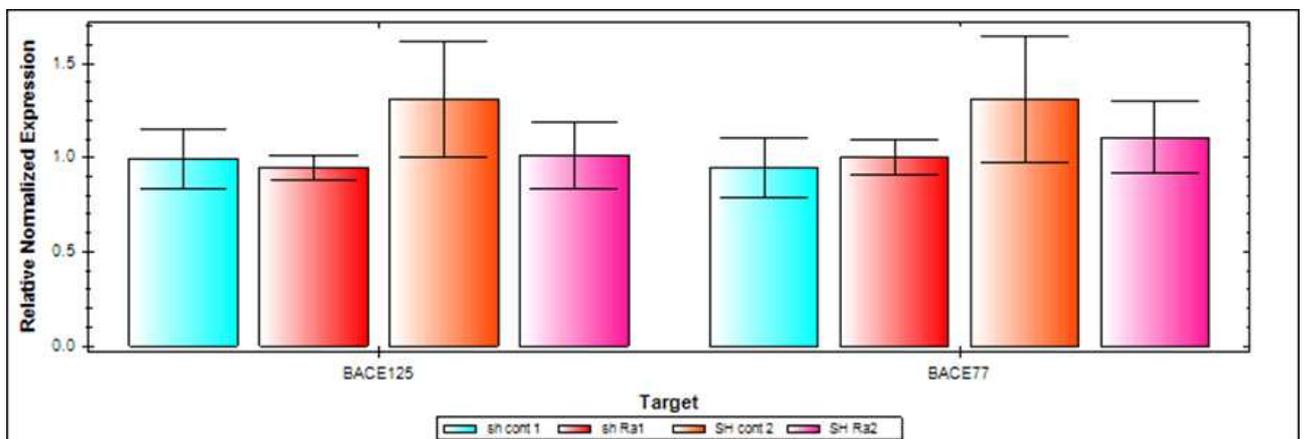


Figure 10. qPCR result with Ramalin in neuronal cell line

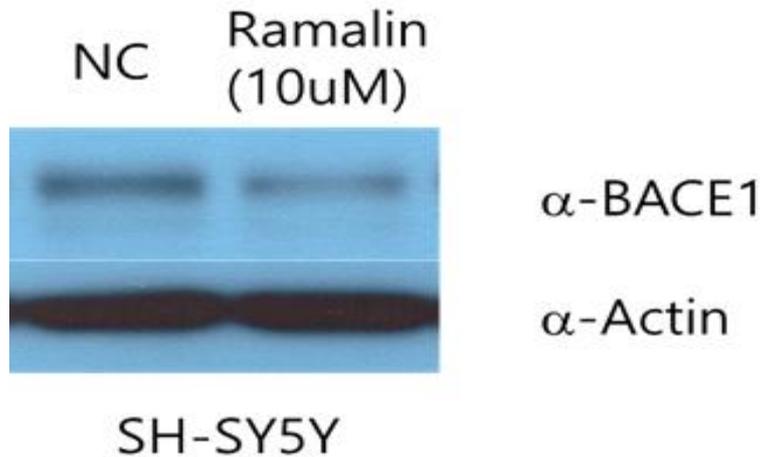


Figure 11. Ramalin decreases BACE1 protein expression in neuronal cell

연구 내용	연구 결과
다양한 BACE1 promoter variant 를 제작 및 이들을 이용한 Ramalin의 mRNA 조절능 확인	- 4종의 luciferase vector 제작 - Ramalin에 의한 유의미한 변화 없음
qPCR을 통한 Ramalin의 BACE1 mRNA의 변화량 확인	- qPCR을 통하여 Ramalin의 mRNA 조절능 없음을 재확인.

#### 나. Ramalin의 BACE1 조절 검증 및 target 검증

##### (1) Ramalin의 BACE1 enzyme 저해활성 여부 확인

###### (가) 연구내용

- ① Ramalin의 BACE1 단백질 분해효소 저해 능력을 확인함.
- ② FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 방식의 peptide 기질 및 recombinant BACE1 enzyme을 이용하여 Ramalin의 BACE1 효소활성 저해능력을 측정함. (그림 12)
- ③ Merck 사에서 3상 실험까지 진행한 MK8931을 control로 사용함.

###### (나) 연구결과

① Ramalin은 BACE1 단백질 분해효소를 10% 정도 유의하게 저해함을 확인.  
(그림 13)

② 최대 저해능력이 10%정도이며, IC50를 산출했을 때 204 $\mu$ M로 산출되어 potency는 매우 낮음을 확인함. 이때 MK8931은 문헌에 보고된 바와 같이 13.2nM의 IC50값 산출됨. (그림 14)

(다) 결론

① Ramalin은 BACE1 단백질 분해효소 저해능력은 낮음을 확인.

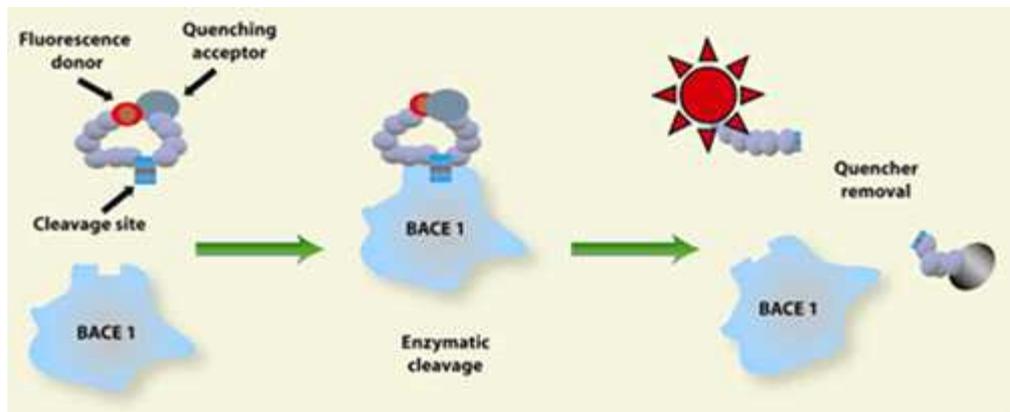


Figure 12. The scheme of BACE1 enzyme assay

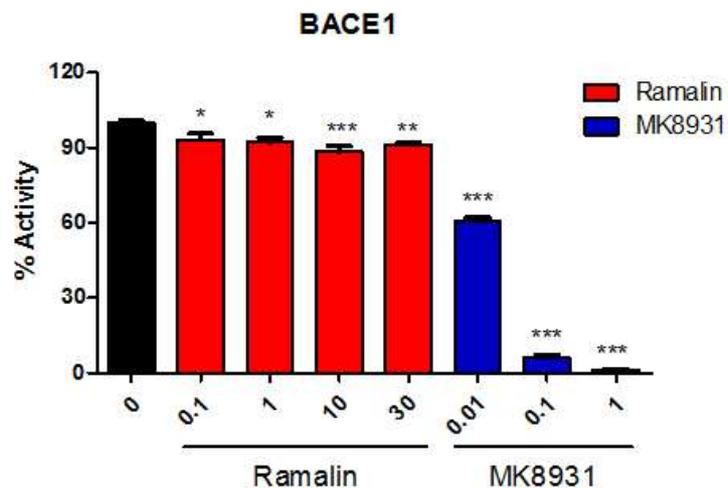


Figure 13. Ramalin decreases BACE1 enzyme activity

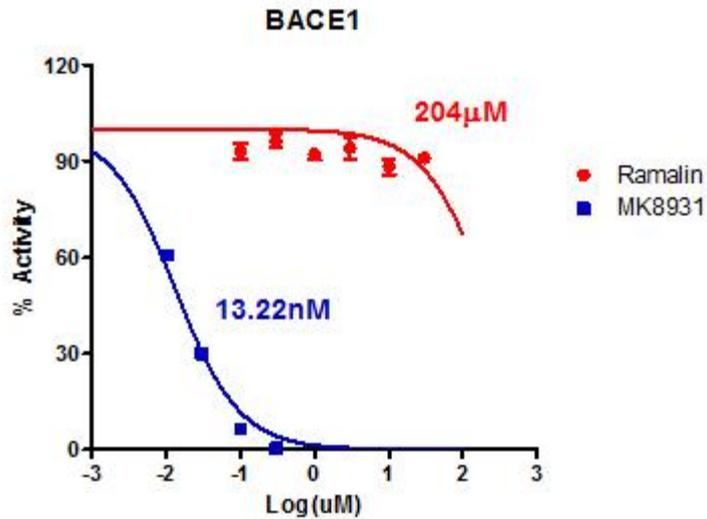


Figure 14. IC50 calculation with Ramalin against BACE1

(2) Ramalin의 UTR에 의한 mRNA stability 조절 능력 확인

(가) 연구내용

- ① Ramalin에 의한 BACE1 발현조절능력이 UTR에 의한 조절을 확인하고자 함.
- ② BACE1의 5'UTR, 3'UTR을 각각 제거한 plasmid와 둘을 모두 제거한 plasmid를 두 개의 UTR을 모두 가지고 있는 BACE1 plasmid와 같이 신경세포에 transfection 한 후 Ramalin에 의한 효과를 확인. (그림 15a)
- ③ UTR에 의한 효과인지를 확인하기 위하여 BACE1 유전자를 GFP로 대체하여 같은 실험을 진행함. (그림 15b)
- ④ 이러한 효과를 western의 방법을 통하여 확인함.

나. 연구결과

- ① Ramalin에 의하여 각각의 construct들에 의한 BACE1의 감소효과를 유의적으로 확인함. (그림 16)
- ② Ramalin에 의한 BACE1 감소효과를 확인하였지만, UTR에 의한 조절은 아님을 확인함. (그림 17)

③ BACE1의 UTR부분은 BACE1 단백질 발현양에 큰 영향을 줌을 확인함.

(그림 16)

다. 결론

① Ramalin은 UTR에 stability 조절에 관여하지 않음을 확인함.

② Ramalin은 mRNA에 영향을 주지 않음을 3가지 실험을 통하여 확인함.

③ 추후 UTR 조절능을 이용한 신규 drug screening 가능성이 있음을 확인함.

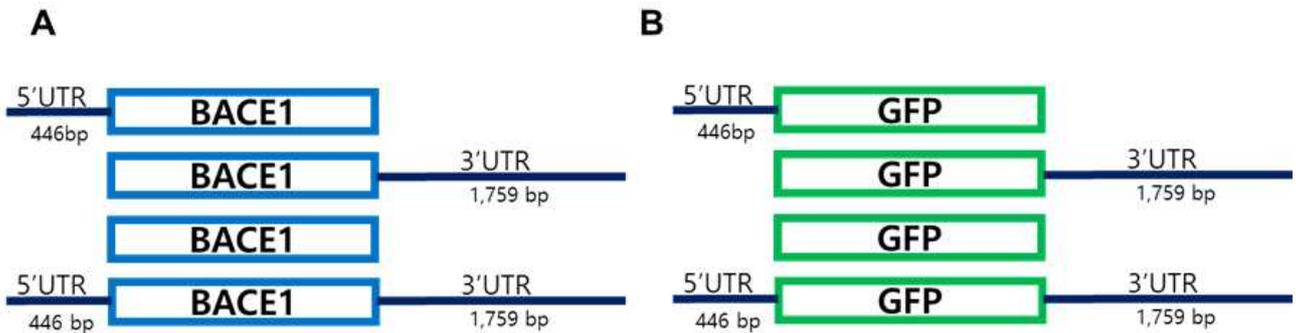
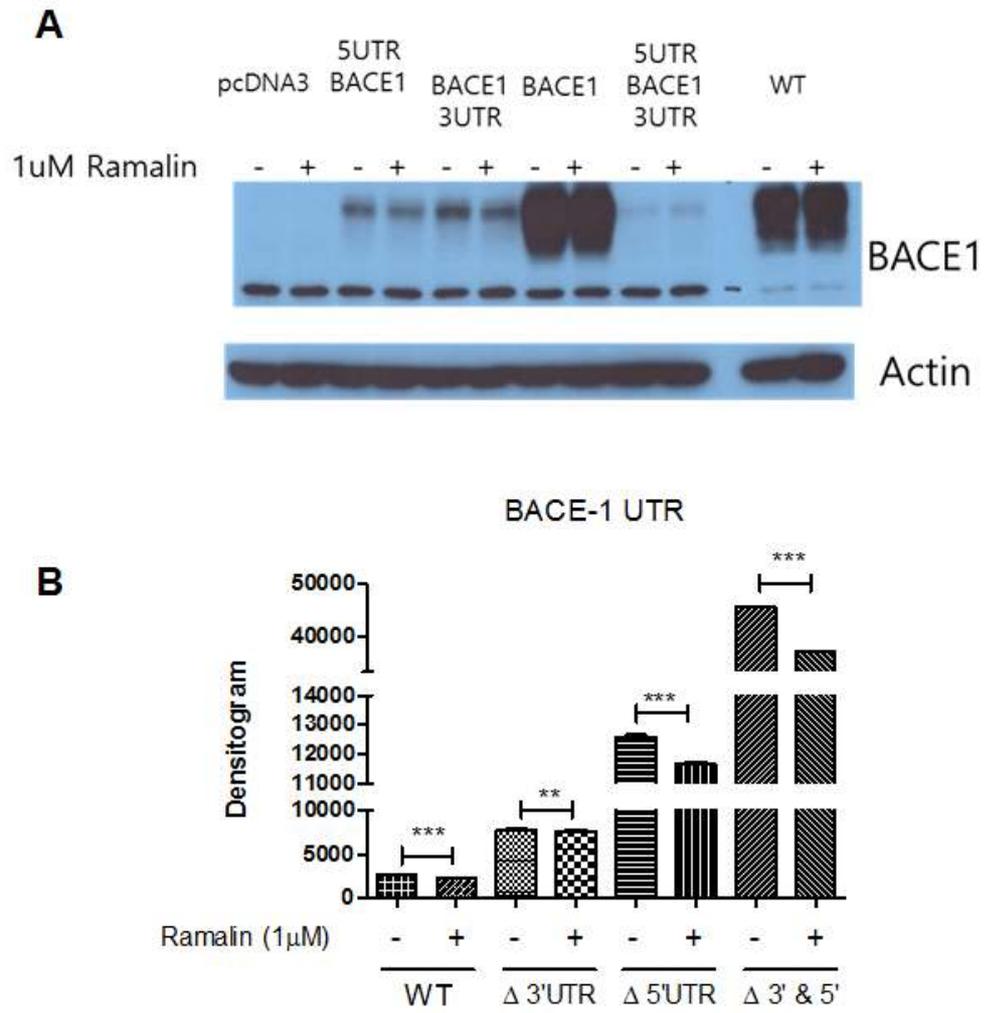
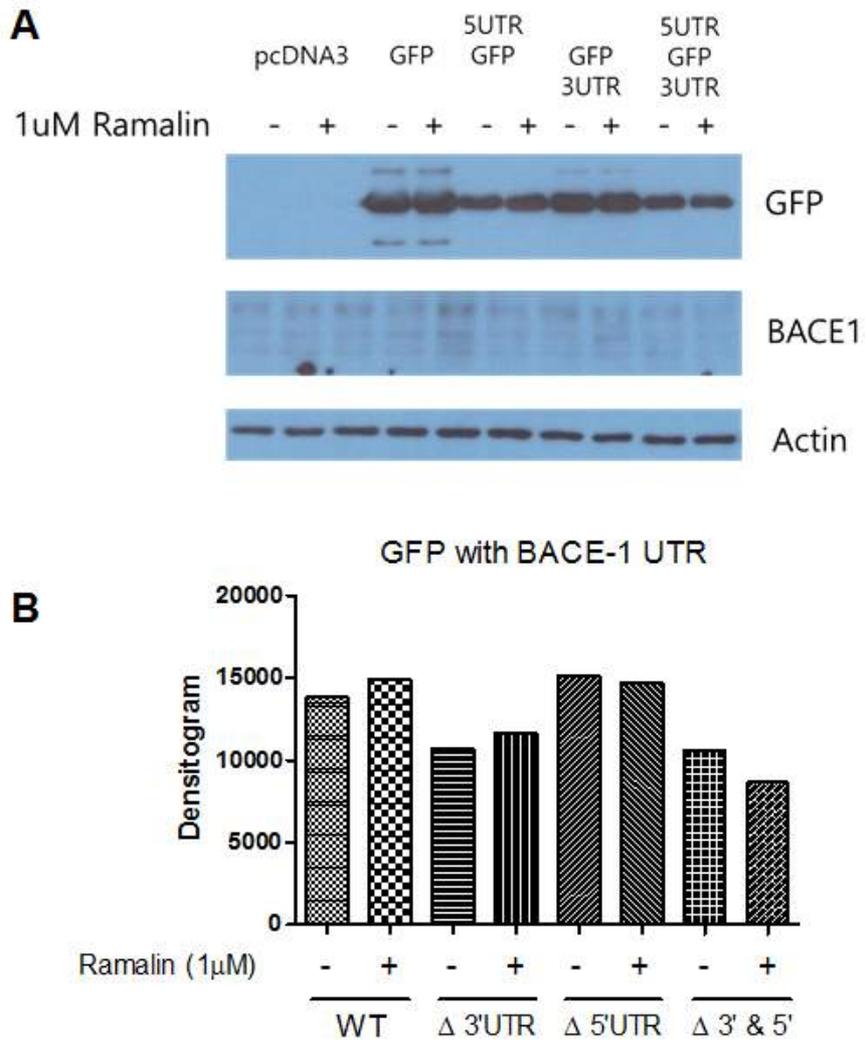


Figure 15. constructs of BACE1 UTR deletion mutants with BACE1 and GFP genes



**Figure 16** Effect of BACE1 expression with Ramalin according to BACE1 UTR



**Figure 17.** Effect of GFP expression by Ramalin on BACE1 UTR

연구 내용	연구 결과
Ramalin의 BACE1 enzyme 저해 활성 여부 확인	in-vitro BACE1 enzyme activity assay
Ramalin의 UTR에 의한 mRNA stability 조절 능력 확인	Ramalin의 post-transcriptional modification을 확인하기 위해 5'UTR, 3'UTR deletion mutant 제작. BACE1과 GFP 발현량 비교관찰. BACE1만 변화 있음

## 다. Ramalin의 타겟 발굴을 위한 추가 연구

(1) GPSScreen으로 확인된 타겟들의 siRNA 제작 및 Ramalin과의 상관관계 확인

(가) 연구내용

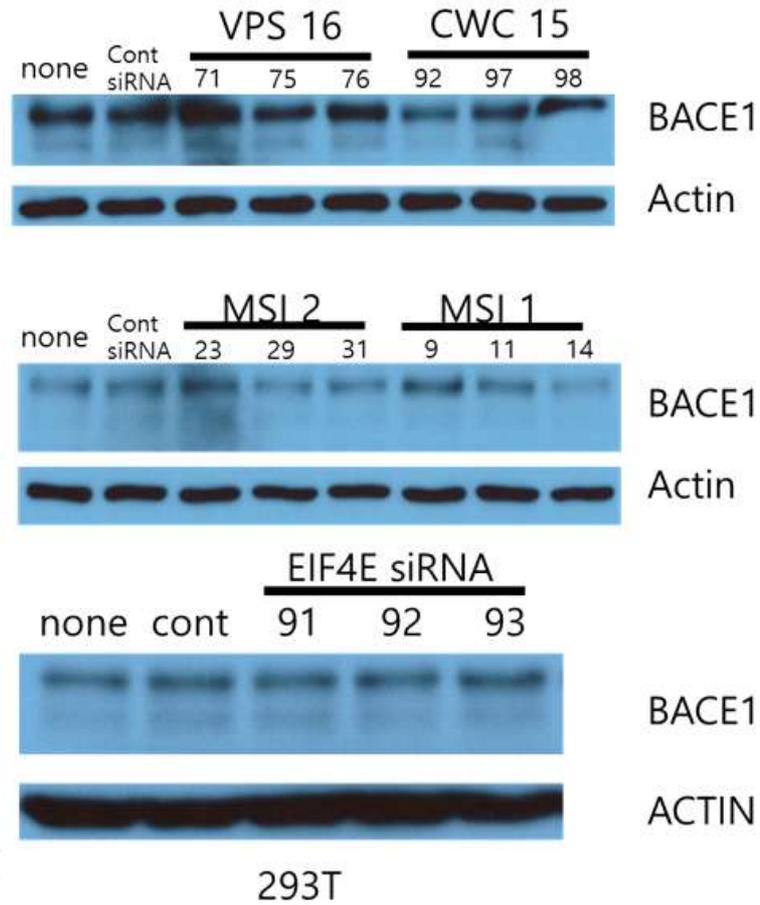
- ① 대표적으로 5종의 candidate target에 대한 siRNA를 제작함.
- ② 각각의 siRNA를 HEK293 세포에 transfection한 후 Ramalin의 효과를 확인함.
- ③ BACE1의 단백질 발현양을 western 방법으로 확인함.
- ④ candidate중 하나인 SCD (stearoyl-CoA desaturase)의 선택적 저해제를 처리하여 Ramalin과 같은 효과를 보이는지 두 종의 세포에서 확인

(나) 연구결과

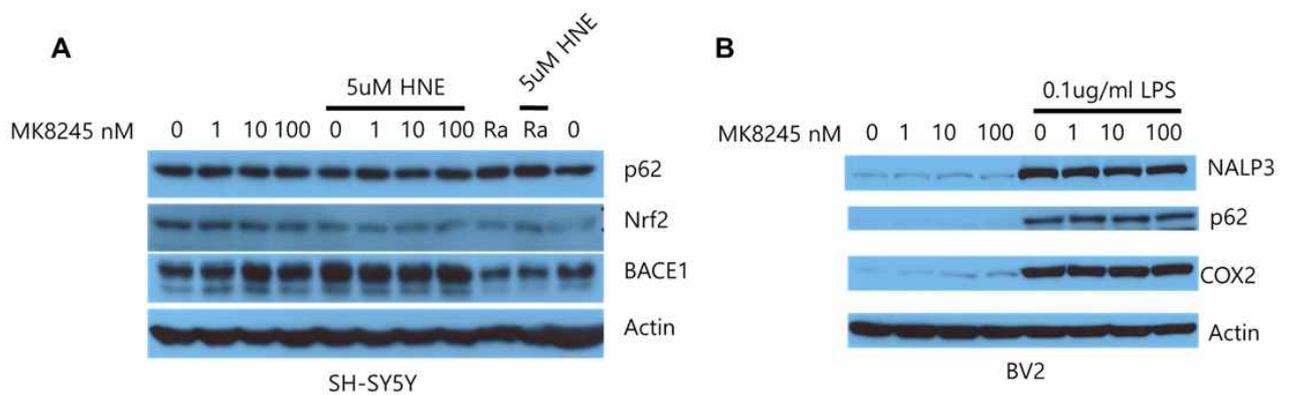
- ① VPS16, CWC15, MSL1, MSL2, ELF4E 중 CWC15에 의해 BACE1의 감소를 확인함. (그림 18)
- ② SCD의 선택적 저해제인 MK8245에 의하여 BACE1 단백질 감소효과를 확인할 수 없었음. (그림 19)

(다) 결론

- ① CWC15의 감소에 의해 BACE1의 감소효과에 대한 추후 연구가 필요함. 또한 이 경우 Ramalin과의 상관관계에 대한 후속연구가 필요함.
- ② SCD의 경우 Ramalin의 타겟이 아님을 증명함.



**Figure 18.** Evaluation of BACE1 expression level using VPS16, CWC15, MSI1, MSI2 and EIF4E siRNAs



**Figure 19.** Evaluation of BACE1 expression level and anti-inflammatory effect using SCD inhibitor MK8245

(2) Ramalin의 HDACs (Histone DeAcetylases) 효소 저해효과 확인

(가) 연구내용

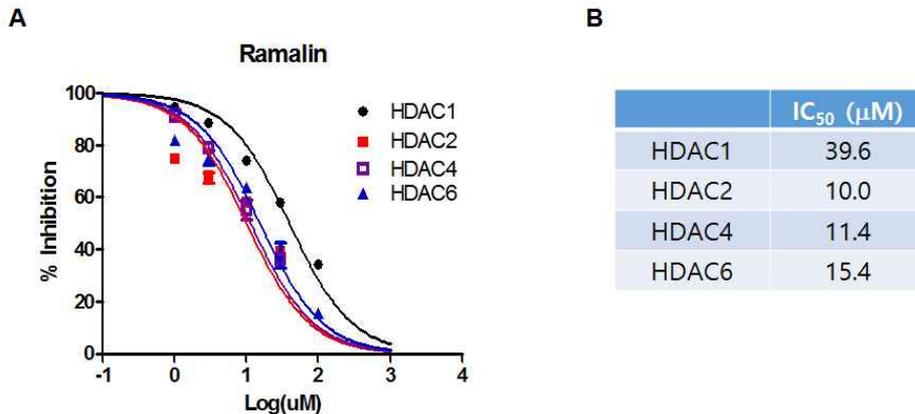
- ① GPScreen에서 Ramalin의 acetylation 조절 가능성 확인
- ② 대표적으로 연구가 되고 있는 HDAC 1, 2, 4, 6에 대한 Ramalin의 저해효과 확인
- ③ 추가적으로 Reaction Biology에 HDAC의 모든 subtype에 대한 Ramalin의 저해효과 확인

(나) 연구결과

- ① Ramalin은 in-house 실험을 통하여 HDAC1, 2, 4, 6에 대해 39.6 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 11.4 $\mu$ M, 15.4 $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값으로 각각 저해함을 확인함. (그림 20)
- ② Reaction Biology에서 추가 확인을 통하여 HDAC6에 대해서 25uM의 IC<sub>50</sub> 값을 가지고, HDAC8에 대해서 84uM의 IC<sub>50</sub> 값을 가짐을 확인. (그림 21)

(다) 결론

- ① Ramalin은 in-house와 Reaction Biology의 의뢰시험을 통하여 HDAC6의 저해 효과가 15.4uM ~ 25 uM 정도의 IC<sub>50</sub> 값을 가지면서 저해함을 확인함.
- ② Ramalin의 경우 동물 실험의 PK 결과를 볼 때 충분한 노출을 확인하였고, 그 노출시에 HDAC6의 저해 효과를 가질 수 있다고 판단됨.



**Figure 20.** Ramalin inhibits HDAC1, HDAC2, HDAC4 and HDAC6.



Figure 21. Panel assay against 11 isotype of HDACs by Reaction biology

### (3) HDAC6 저해에 따른 functional assay 진행

#### (가) 연구내용

- ① HDAC6 저해제가 나타내는 항염증 효과를 확인하기 위한 TNF $\alpha$  분비능 감소효과를 확인함
- ② HDAC6의 기질인  $\alpha$ -tubulin의 acetylation 증가효과를 확인함.
- ③ HDAC6의 Tau에 대한 deacetylation으로 인한 hyper-phosphorylation 증가 효과에 따른 microtubule 기능 저하 효과를 Ramalin이 개선하는지 여부를 확인하기 위하여 mitochondria의 movement를 확인.

#### (나) 연구결과

- ① Ramalin은 HDAC6 저해제가 나타내는 항염증 효과를 확인하기 위한 TNF  $\alpha$  분비능 감소효과를 유의적으로 확인함. (그림 22)
- ② Ramalin은 HDAC6의 기질인  $\alpha$ -tubulin의 acetylation을 농도 상관성 있게 증가함을 확인하였고, 다른 HDAC들의 기질인 histone의 acetylation 변화

가 없음을 확인함. 이러한 효과는 Ramalin이 HDAC6의 선택적인 저해제임을 확인함. (그림 23)

- ③ Ramalin은 Aβ를 처리하여 세포내 mitochondria의 움직임을 저해한 조건에서 mitochondria의 움직임을 개선하는 효과가 있음을 입증. (그림 24)

(다) 결론

- ① Ramalin은 HDAC6 저해제의 효과를 가짐을 확인함.
- ② HDAC6 저해제가 가지는 항염증 효과 및 microtubule 안정 효과를 통한 신경세포 보호효과를 Ramalin도 보유하고 있는 것으로 판단됨.

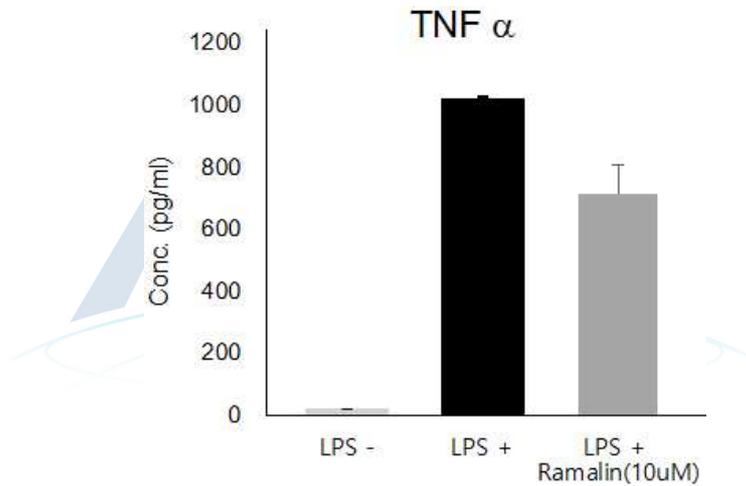


Figure 22. Ramalin has anti-inflammatory effect

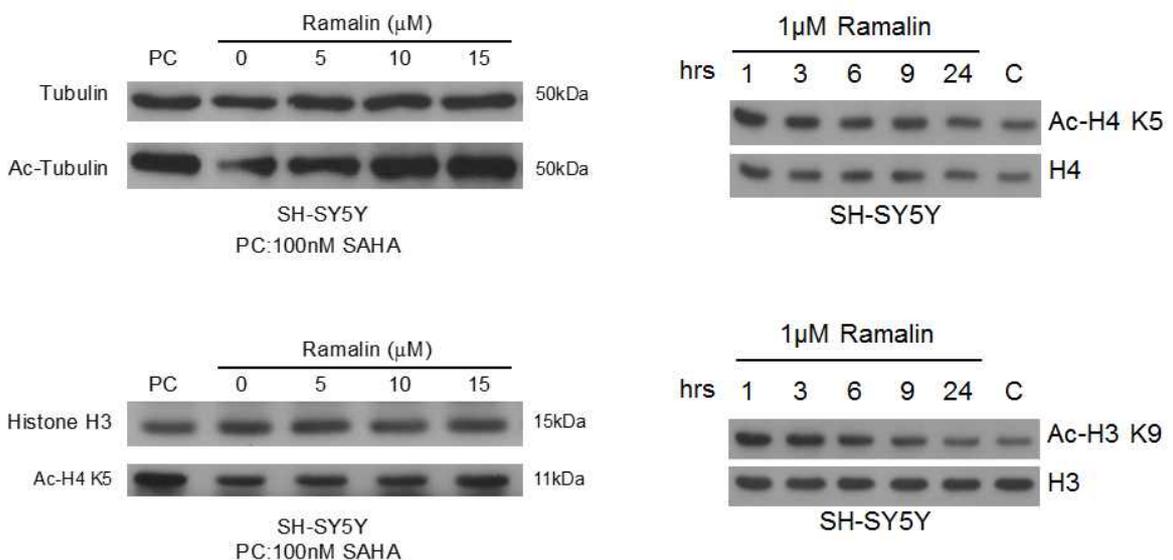
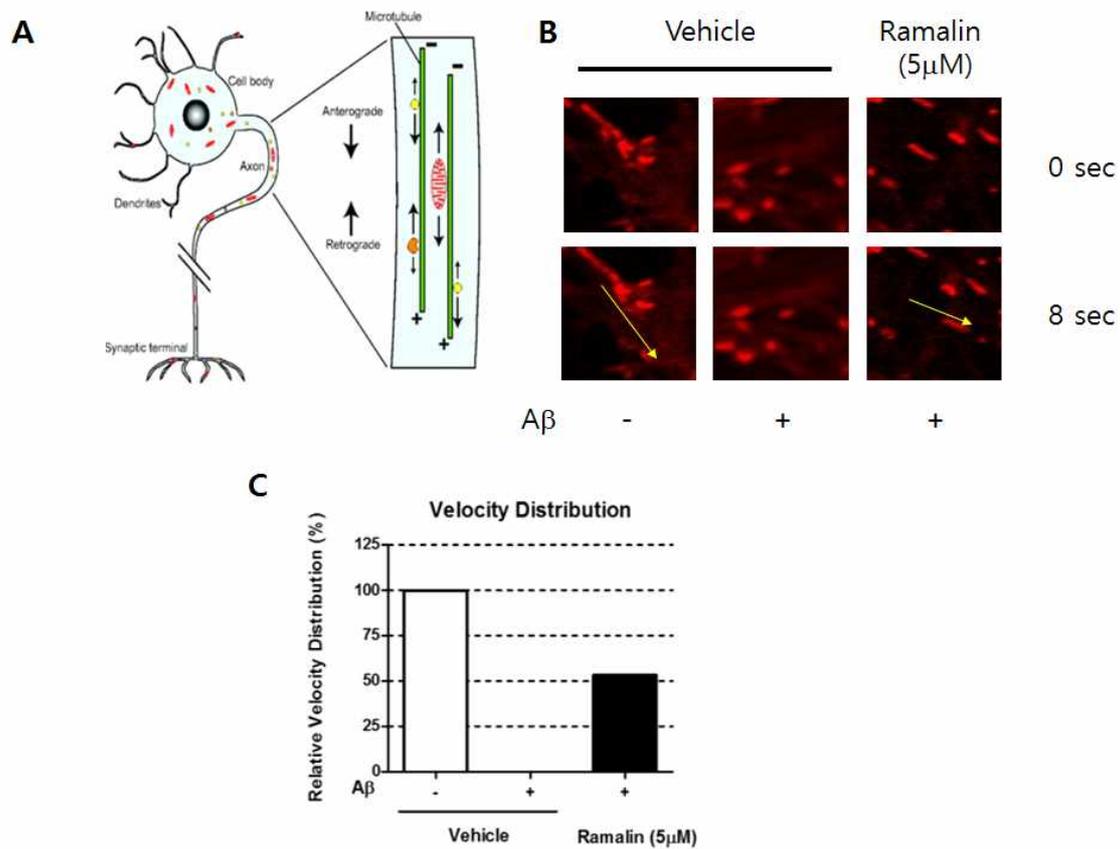


Figure 23. Acetylated histones and tubulin level under Ramalin treatment



**Figure 24.** Ramalin improve mitochondria movement which deteriorated by A $\beta$  in primary hippocampal neuron

연구 내용	연구 결과
GPScreen으로 확인된 타겟들의 siRNA 제작 및 Ramalin과의 상관관계 확인	GPscreening의 target 유전자의 siRNA 제작, BACE1 감소능 확인. 몇몇 타겟의 추가검증 필요
Ramalin의 HDACs 효소 저해 효과 확인	Ramalin의 HDACs 저해효과 확인을 위하여 대표적으로 1,2,4,6에 대한 저해효과를 확인하였고, Reaction biology에 추가 검증 및 다른 sub-type에 대한 저해 효과를 확인함.
HDAC6 저해에 따른 functional assay 진행	HDAC6 저해시 나타나는 TNF- $\alpha$ 분비감소 효과, Tubulin 탈인산화 감소, Mitochondria movement 개선 효과 확인.

## 제 2절 목표달성을 위한 연구수행 방법

성과목표	세부목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
라말린의 항치매 활성기작 규명	BACE1 promoter연구 를 통한 Ramalin target 검증	1. 다양한 BACE1 promoter를 제작	serial deletion mutant 제작
		2. 다양한 BACE1 promoter를 이용한 Ramalin의 타겟 검증	luciferase와 qPCR을 통해 BACE1 mRNA 발현량 비교
	Ramalin의 BACE1 조절 검증 및 target 검증	3. Ramalin이 BACE1 enzyme activity를 inhibition 하는 것인지 확인	in-vitro BACE1 enzyme activity assay
		4. Ramalin의 splicing 조절 능력 확인	UTR deletion construct 제작 BACE1과 다른protein(GFP)의 UTR에 의한 발현량 비교
		5. GPScreen으로 확인된 타겟들의 siRNA 제작 및 Ramalin과의 상관관계 확인	GPscreening의 target 유전자의 siRNA제작, BACE1 감소능 확인
	Ramalin의 추가 타겟 검증	6. Ramalin의 HDACs 효소 저해 효과 확인	4종의 HDAC 저해능 확인 후 11종의 HDAC inhibition에 대한 panel assay
		7. HDAC6 저해에 따른 functional assay 진행	TNF $\alpha$ 발현 조절 확인 Tubulin acetylation 확인 mitochondria movement 관찰

## 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제 1절 연구개발목표 및 달성도

#### 1. 연도별 연구목표 및 평가착안점

년도	성과목표	세부목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도(2016)	라 말 린 의 항치매 활 성기작 규 명	○ BACE1 promoter연구를 통한 Ramalin Target 검증	30	1. luciferase assay와 realtime PCR을 통해 Ramalin이 BACE-1의 mRNA는 조절하지 않음을 밝힘
		○ Ramalin의 BACE1 조절 검증 및 target 검증	30	1. Ramalin은 그 자체로 BACE-1 단백질의 활성을 조절하지 않음 2. UTR에 의해 BACE-1의 발현이 크게 조절되는 것으로 보아 UTR 조절 약물의 개발이 항치매치료제로써 쓰일 수 있는 가능성을 염
		○ Ramalin의 타겟 발굴을 위한 추가 연구	40	1. GPsreen의 타겟 유전자중 추가 연구가 필요한 것으로 사료되는 CWC15를 동정함 2. HDAC 효소의 저해제로써 mitochondria운동 개선과 함께 타겟 단백질의 아세틸레이션 정도 및 튜블린의 아세틸레이션 정도를 확인함 3. 추가적으로 11종의 HDAC에 대한 저해정도를 assay함

## 2. 연구개발목표 및 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 라말린의 항치매 활성기작 규명	1-1	BACE1 promoter연구를 통한 Ramalin Target 검증 - 다양한 BACE-1 promoter variant를 제작 - qPCR을 통한 Ramalin의 BACE-1 mRNA의 변화량 확인	100
	1-2	Ramalin의 BACE1 조절 검증 및 target 검증 - Ramalin의 직접적인 BACE-1 단백질 활성 조절여부 확인 - Ramalin의 splicing 조절 능력 확인	100
	1-3	Ramalin의 HDAC효소 저해능 확인 - GPScreen으로 확인된 타겟들의 siRNA 제작 및 Ramalin과의 상관관계 확인 - HDAC효소 저해능 확인 - HDAC6 저해에 따른 functional assay 진행	100

## 제 2절 대외기여도

# 극지연구소

### 1. 학술적 파급효과

- 이전 실험을 통하여 Ramalin의 항치매 효과를 확인하였고, 이는 BACE1 단백질의 양을 줄이는 효과에 의한 것임을 확인함.
- 본 연구를 통하여 BACE1 단백질의 양을 줄이는 기전은 mRNA 감소에 의한 발현 억제 효과가 아닌, post-translational modification에 의한 것임을 간접적으로 증명함
- Ramalin의 항염증 효과는 HDAC의 조절로 인함을 규명하고, 이는 치매환자의 뇌조직안의 염증을 조절하여 추가적인 항치매효과를 기대 할 수 있다고 판단됨.
- 이러한 Ramalin의 기전 규명을 통하여 알츠하이머 치료제 개발의 근거를 확보함.

## 2. 경제적 파급효과

- Ramalin의 기전을 확보함으로써 항염증효과의 추가 특허 출원 가능성에 대한 근거자료 확보
- 추가 기전 확인을 위한 다양한 실험기법 확보 및 개발
- 알츠하이머 질환 중개 연구자 인적·물적 네트워크 구축을 통한 연구역량 강화
- 본 연구를 통하여 세포생물학적, 분자생물학적, 생화학적인 다방면의 지식과 기술을 습득
- 기전연구를 통한 다양한 가능성의 확인을 통한 훈련은 참여연구원의 창의성 및 독창성을 가진 연구자로 성장함.



## 제 5장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절 추가연구의 필요성

#### 1. 추가연구의 추진전략 및 체계

본 연구팀은 이번 연구과제를 수행함에 있어 Ramalin의 기전을 확보할 수 있었다. Ramalin은 치매 원인 물질인 A $\beta$ 를 감소하는 효과가 A $\beta$ 를 생성하는 BACE1 단백질의 post-translational modification을 통하여 그 발현정도를 억제하는 것으로 확인하였다. 또한 항염증효과가 HDAC의 저해를 통한 효과임을 확인 할 수 있었다. 실제 기능적으로도 mitochondria의 움직임 개선을 확인하였고, 또한 TNF $\alpha$ 의 발현 억제를 확인 할 수 있었다. 현재까지 치매모델에서 Ramalin의 효능에 대해 확인 하였는바 다음과 같이 연구추진 전략을 가지고 있음

- 본 연구과제는 생물정보학, 분자신경생물학, 생화학 그리고 약학 전공 연구자가 참여함으로써 다학제간의 강점을 최대한 활용함.
- 치매 동물모델로 Ramalin의 BACE1 조절기전 및 항염증효과를 확인함을 근거로 다양한 적응증에 대한 시도를 추구함
- 미국 NIH/NIA (Mark Mattson), 대만 National Taiwan University Hospital (Sung-Chun Tang), 미국 FDA (Sic Chan), 호주 Queensland 대학 (Thiruma V. Arumugam) 등의 전문가들과 심도 깊은 연구자문 및 논의를 통해 연구 장애 요소를 신속하게 보완함.

### 제 2절 추가연구 목표달성 방법

#### 1. 적응증 확대를 위한 동물모델 구축

가. 자가면역질환 동물 모델을 이용한 라말린의 항염증 효능 검증

- Adjuvant-induced arthritis (AIA) mouse model을 이용한 항염증 효과 검증
- TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid) induced IBD model 확보 및 항염증 효과 검증

(1) 연구방법

- 대표적인 자가면역 질환 모델인 AIA model 및 TNBS IBD model을 이용하여 단기 및 장기 약효효과를 입증한다.
- 관절염 및 대장염 지표를 이용하여 clinical score를 확인하며, micro-CT, 조직 검사등을 통하여 객관화된 치료 수치를 확인한다.
- 기존에 사용되고 있는 methotrexate와의 약효를 비교 하고, 또한 병용시에 추가적인 약효가 있는지 확인한다.
- TNF $\alpha$  항체들과의 약효를 비교하여 고가의 TNF $\alpha$  항체 치료제의 대체 가능성을 확인한다.



## 제 6장 참고문헌

- [1] A. S. Association, 2010 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's Dement.* 6(2010) 158-194.
- [2] F. Assal, J. Cummings, Neuropsychiatric symptoms in the dementias, *Curr. Opin. Neurol.* 15 (2002) 445-450
- [3] E. Zayas, G. Grossberg, Treating the agitated Alzheimer's patient, *J. Clin. Psychiatry* 7 (57 Suppl) (1996) 46-51, discussion 52-44.
- [4] P. Tiraboschi, L.A. Hansen, L. J. Thal, J. Corey-Bloom, The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD, *Neurology* 62 (2004) 1985-1989.
- [5] J. Hardy, D. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : progress and problems on the road to therapeutics, *Science* 297 (2002) 253-356.
- [6] D. Selkoe, Alzheimer's disease is synaptic failures, *Science* 298 (2002) 789-791.
- [7] Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (July 2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 26 (27): 7212 - 21.
- [8] Turner PR, O' Connor K, Tate WP, Abraham WC (May 2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 70 (1): 1 - 32.
- [9] Duce JA et al. (2010). Iron-Export Ferroxidase Activity of  $\beta$ - Amyloid Precursor Protein Is Inhibited by Zinc in Alzheimer's Disease. *Cell* 142 (6): 857 - 67.
- [10] Yoshikai S, Sasaki H, Doh-ura K, Furuya H, Sakaki Y (March 1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene.

Gene 87 (2): 257 - 63.

- [11] Lamb BT, Sisodia SS, Lawler AM, Slunt HH, Kitt CA, Kearns WG, Pearson PL, Price DL, Gearhart JD (September 1993). Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice [corrected]. *Nat. Genet.* 5 (1): 22 - 30
- [12] Matsui T, Ingelsson M, Fukumoto H, Ramasamy K, Kowa H, Frosch MP, Irizarry MC, Hyman BT (August 2007). Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1161: 116 - 23.
- [13] Zheng H, Koo EH (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1 (1): 5.
- [14] Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (February 1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349 (6311): 704 - 6
- [15] Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (October 1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254 (5028): 97 - 9.
- [16] Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J (October 1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353 (6347): 844 - 6
- [17] Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (December 1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360 (6405): 672 - 4.
- [18] Hussain I, et al. Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as  $\beta$ -secretase. *Mol Cell Neurosci* 1999;14:419 - 27.

- [19] Vassar R, et al.  $\beta$ -Secretase cleavage of Alzheimer' amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science 1999;286:735 - 41.
- [20] Yan R, et al. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer' disease  $\beta$ -secretase activity. Nature 1999;402:533 - 37.
- [21] Sinha S, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein  $\beta$ -secretase from human brain. Nature 1999;402:537 - 40.
- [22] Lin X, et al. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the  $\beta$ -secretase site of  $\beta$ -amyloid precursor protein. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:1456 - 460.
- [23] Cole SL, Vassar R. The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the  $\beta$ -secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. J Biol Chem 2008;283:29621 - 9625.
- [24] I. Hussain, D. Powell, D. Howlett, D. Tew, T. Meek, C. Chapman, I. Gloger, K. Murphy, C. Southan, D. Ryan, T. Smith, D. Simmons, F. Walsh, C. Dingwall, G. Christie, Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase, Mol. Cell. Neurosci. 14 (1999) 419 - 27.
- [25] 치매분야 국가연구개발 조사분석 보고서, 한국보건산업진흥원 (2015)
- [26] Alzheimer's Disease International, "Policy brief for heads of government: The global impact of dementia 2013-2050", 2013, p.2
- [27] World Health Organization, "Global health and aging", 2011, p.6
- [28] Margolis et al., "The health status of community based elderly in the United Arab Emirates," Archives of Gerontology and Geriatrics 37, 2003, p.2
- [29] 한국보건산업진흥원, "고령친화산업 현황 및 전망", 2012, p.3
- [30] 통계청, UN Population Database; 삼성경제연구소, "고령화에 따른 노동시장 '3S' 현상 진단", 2011, p.1

- [31] 김상우 등, “치매관리사업의 현황과 개선과제”, 국회예산정책처, 2014, p.10
- [32] Alzheimer’s Association, “2016 Alzheimer’s disease facts and figures”, Alzheimer’s & Dementia 12, p.459
- [33] Schneider et al., Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer’s disease: an appraisal from 1982 to 2014, Journal of Internal Medicine 275(3), 2014, p.269
- [34] Cummings et al., Alzheimer’s disease drug-development pipeline: few candidates, frequent failures, Alzheimer’s Research & Therapy 6(37), 2014, p.5
- [35] Biotechnology Innovation Organization, “Clinical development success rates”, 2016, p.10-11
- [36] Carroll J., “Pfizer, J&J Alzheimer’s drug bapineuzumab flunks out in big Ph III”, FierchBiotech, 2012
- [37] Levin J., Lilly provides update on next step for solanezumab, FierchBiotech, 2012.12.12.
- [38] World Alzheimer Report 2015 (2015)
- [39] 2012 전국치매 유병률 조사 (2013)
- [40] 치매치료제 개발을 위한 R&D 전략 수립 기획 연구(기획과제) 및 최근 기사 발  
췌 등
- [41] Alzheimer’s Disease - Global Drug Forecast and Market Analysis to 2023 (2015)
- [42] Global Alzheimer Prevalence and Drugs Demand (2011)
- [43] Alzheimers Drugs Market 2012-2017, Roots Analysis(2013)
- [44] ChosunBiz (2011)



## 주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.