

## 명세서

### 발명의 명칭: 신규한 마그네슘-세리네이트 화합물 및 이의 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 마그네슘-세리네이트 (magnesium-serinate) 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, L-세린 (serine)에 마그네슘 원자가 킬레이트 결합된 신규한 마그네슘-세리네이트 화합물과 중추신경계 질환 (centralnervous system diseases) 등과 관련된 이의 의약 용도 등에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 마그네슘은 인체에서 네 번째로 풍부한 무기염류이다. 약 50 %는 뼈에 저장되는 반면, 나머지 50 %는 주로 신체 조직과 장기의 세포 내부에 존재한다 [Jahnen-Dechent and Ketteler, 2012; Farruggia et al., 2014]. 세포 내에서 마그네슘은 수백 가지 효소들의 보조인자 (cofactor)로 작용하기 때문에, 마그네슘은 주요한 세포 반응들에 관련되어 있다. 특히, 마그네슘은 ATP-생성 반응들에 관여하는 다수의 효소들의 안정화에 요구되어 에너지 신진 대사에 연관되어 있다 [Swaminathan, 2003; Saris et al., 2000; Romani, 2013]. 특히, 최근에는 세포 내 마그네슘의 주요 저장소인 미토콘드리아에서 마그네슘 항상성이 미토콘드리아 내막의  $Mg^{2+}$  수송체인 MRS2의 작용에 의해 조절되며, 이때, MRS2의 결합에 따른 마그네슘 항상성의 유지에 실패할 경우에는, 미토콘드리아의 에너지 대사 및 형태의 변화와 함께 ATP 생산이 저해되며, 스트레스에 대한 세포의 저항성이 감소되는 것으로 보고되었다 [Yamanaka et al., 2016]. 이러한 연구결과는 미토콘드리아 내의 마그네슘 항상성 조절이 세포 내 에너지 대사와 스트레스에 대한 세포의 저항성 결정에 중요한 역할을 함을 시사한다.
- [3] 또한, 신경계의 질환들을 개선 및 완화하는 마그네슘의 잠재적인 신경보호 역할에 대해서는 거의 지난 30 년 동안에 걸쳐 인식되어 왔지만, 임상 분야에서 마그네슘의 치료 효과와 관련된 정확한 해석은 여전히 부족한 실정이다. 최근 등장하고 있는 연구결과들은 마그네슘이 두통, 스트레스, 알코올/약물 중독, 급성 뇌 손상, 발작, 파킨슨 병 및 알츠하이머 병을 포함한 여러 신경 질환적 상태와 관련하여 중요한 역할을 한다는 것을 계속적으로 시사하고 있다 [Vink, 2016].
- [4] 뿐만 아니라, 최근에 수행된 여러 연구들에서는, 경구를 통한 마그네슘의 공급이 인체의 뇌의 가소성 (brain plasticity)을 증가시켜 학습 (learning), 기억 (memory) 및 인지 기능 (cognitive function)을 향상시킨다고 보고된 바 있다 [Slutsky et al., 2010]. 뇌의 노화 회복과 관련하여서는, 마그네슘을 섭취한 사람들의 경우는 뇌 노화를 9~14 년 정도까지 반전시켜 뇌 기능을 회복시키는 것으로 나타났다 [Liu et al., 2015].
- [5] 그러나, 인체 내에서 마그네슘의 뇌 흡수율 및 세포 내 투과율이 낮은 문제점은

여전히 개선되어야 할 연구대상으로 남아 있다. 매사추세츠 공과 대학 (MIT)의 연구자들은 마그네슘-L-트레오네이트 (magnesium-L-threonate)라는 화합물을 테스트하여 마그네슘-L-트레오네이트가 무기마그네슘염 (inorganic magnesium salts)에 비해 높은 생체 이용률과 뇌 마그네슘 증진 기능을 가지고 있어서 뇌 마그네슘 수치를 약 15 % 증가시킬 수 있음을 발견했다 [Mickley et al., 2013]. 이러한 연구 결과는 무기 금속염 형태의 마그네슘에 비해 당산 (sugar acid)의 일종인 트레온산 (threonic acid)과 유기결합된 마그네슘의 세포 내 투과율 및 중추 신경계의 흡수율이 더 높다는 것을 시사한다.

- [6] 한편, 아미노산의 일종인 L-세린은 생체 내에서 단백질의 구성원으로서 뿐만 아니라, 글리신과 시스테인 등의 아미노산의 생합성, DNA 전구체인 퓨린 및 피리미딘의 생합성, 세포막 인지질인 포스파티딜세린 (phosphatidylserine)의 생합성, 그리고 뇌에서의 스핑고미엘린 (sphingomyeline), 세레브로시드 (cerebrosides) 및 D-세린 (D-serine) 등의 생합성에도 중요하게 관여한다. 따라서, 세포 내 L-세린의 농도는 세포의 분열증식에 따른 성장에 직접적으로 기여하며, 또한, L-세린으로부터 유래하는 글리신 및 시스테인은 세포 내 주된 항산화 물질로 알려진 글루타치온 (glutathione, GSH)의 구성원들이므로 [Pompella et al., 2003], L-세린은 세포 내 GSH 생성에 요구되는 전구물질의 공급원으로서의 작용을 통하여, 활성산소종 (reactive oxygen radicals, ROS)에 의한 손상으로부터 세포를 보호하는 방어기전에도 중요하게 기여할 수 있다 [Aoyama et al., 2008; Zhou et al., 2017].
- [7] 이와 같이, 인체 세포가 필요로 하는 L-세린은 세포질 내에서 일어나는 인산화 경로 (phosphorylated pathway)를 통해 생합성될 수 있다. 그러나, 질병이나 스트레스 조건 하에서 세포 내에서 생합성되는 L-세린은 그 생성량이 세포가 필요로 하는 L-세린의 양에 비해 충분하지 않으므로, 음식을 통한 체외 공급이 요구되는 준필수 아미노산 (conditionally essential amino acid)으로 분류되고 있다. 특히, 선천성 L-세린 생합성 대사의 유전적 결함은 혈관-뇌 관문 (blood-brain barrier, BBB)의 투과 효율이 비교적 낮은 L-세린의 특성과 맞물려서, 뇌에서의 L-세린 결핍증을 유발하여 소뇌증, 심각한 뇌전증, 지적 장애 등의 질병을 초래하는 것으로 알려져 있다 [Smith et al., 1987; Boado et al., 1999; De Koning et al., 2002].
- [8] 선천성 세린 생합성 대사의 유전적 결함이 뇌에서의 L-세린 결핍에 따른 중추신경계의 심각한 질병을 일으키는 이유로서는, L-세린이 신경세포의 신경영양인자 (neurotrophic factor)로 작용할 뿐만 아니라 [Furuya et al., 2000], N-메틸-D-아스파르테이트 수용체 (N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)에 대해 글루탐산과 함께 공작용제 (co-agonist) 역할을 하는 글리신 및 D-세린의 공급원으로 작용하여, 뇌 신경발달, 시냅스 정교화 (synapse refinement), 신경 가소성 (neuronal plasticity) 및 흥분세포독성 (excitotoxicity) 등에 중요하게 기여하는 점들을 들 수 있다 [De Miranda et al., 2000].

- [9] 선천성 L-세린 생합성 대사의 결함으로서 L-세린 생합성 효소 유전자들인 3-포스포글리세레이트 디하이드로게나아제 (3-phosphoglycerate dehydrogenase, PHGDH), 포스포세린 아미노트랜스페라아제 (phosphoserine aminotransferase, PSAT)와 포스포세린 포스파타아제 (phosphoserine phosphatase, PSP)의 돌연변이가 진단되며, L-세린 생합성 대사 결함이 있는 영아들에게 L-세린을 100~600 mg/kg/day 또는 L-세린 200~700 mg/kg과 글리신 200~300 mg/kg을 동시에 장기적인 경구 투여하면, 부작용 없이 뇌전증과 신경발달장애가 호전되고, 뇌백질 볼륨과 수초화가 회복된 것이 보고되었다 [Pineda et al., 2000; De Koning et al., 2002; ElHattab, 2016]. 또한, 3-포스포글리세레이트 디하이드로게나아제 변이에 의한 L-세린 생합성 대사 결함이 있는 청소년들에게 L-세린 100~150 mg/kg/day을 투여하면 뇌전증, 행동장애, 기분장애가 호전됨이 보고되었다 [Tabatabaie et al., 2011]. 따라서, 선천성 L-세린 생합성 대사 결함에 의해 결핍되는 L-세린을 중추신경계에 필요한 수준으로 체외에서 공급하는 것은 관련 질환의 효과적인 치료 방안으로 밝혀지게 되었다.
- [10] 최근, 성인 신경질환에 대한 치료제로 L-세린의 활용성이 크게 확대되는 계기가 되는 임상연구 결과로서,  $\beta$ -N-메틸아미노-L-알라닌 ( $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, L-BMAA)에 의한 광인의 근위축성 측색 경화증 (Guamanian amyotrophic lateral sclerosis, ALS)/파킨슨증 치매 복합체 (Parkinsonism dementia complex, PDC) 치료와 근위축성 측색 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis) 치료에서 L-세린의 긍정적인 효과가 보고되었다 [Dunlop et al., 2018].
- [11] 한편, L-세린과 마그네슘은 미토콘드리아 기능 유지에 필수적인 역할을 한다 [Lucas et al., 2018; Yamanaka et al., 2016]. 미토콘드리아의 생성과 조절은 신경발생과 신경가소성에서 주된 역할을 하며, 자폐스펙트럼장애, 다운증후군, 레트증후군, 취약X증후군 등 인지 및 적응장애와 관련된 다양한 신경발달장애의 핵심병인임이 밝혀져 미토콘드리아 기능 활성화가 새로운 치료법이 될 수 있음이 제시되었다 [Valenti et al., 2014]. 대부분의 다운증후군 환자는 뇌가 알츠하이머 환자와 비슷한 병리학적 소견을 보이며 50 세 이상이 되면 75 %가 치매를 앓게 되는데, 이는 미토콘드리아 기능장애와 깊은 관련이 있으므로 조기에 미토콘드리아 기능 활성화와 관련된 치료를 시작할 경우 치매 발생율을 낮출 수 있음이 제시되었다 [Pinar et al., 2012]. 또한, 알츠하이머병 (Alzheimer) [Wang et al., 2014], 파킨슨병 (Parkinson's Disease) [Franco-Iborra et al., 2018], 헌팅턴병 (Huntington's disease) [Jodiriri et al., 2017], 근위축성 측색 경화증 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) [Cozzolino and Carri, 2012]과 같은 퇴행성신경질환의 발병 원인이 미토콘드리아의 손상에 따른 산화적 스트레스에 의한 신경세포사멸에 기인한다고 보고되고 있다. 미토콘드리아는 세포의 사멸 (apoptosis) 또는 괴사 (necrosis)의 실행기관으로서 외부 환경적 스트레스로부터 세포 항상성 유지를 위해 미토콘드리아의 분열 및 융합과 같은 미토콘드리아

수의 양적 조절을 수행하여 세포를 보호하거나 손상된 세포를 회복 또는 제거한다 [Youle and van der Bliek, 2012; Ni et al., 2014].

- [12] 특히, 신경세포는 타 조직의 세포에 비해 높은 에너지 대사를 요구하고, 과산화(oxidation)되기 쉬운 지방산과 금속이온 비율이 높으면서 세포 항산화 수준이 비교적 낮은 분열 후 비증식 세포 (post-mitotic non-proliferating cell)로서, 활성산소종이나 활성질소종에 의한 산화적 스트레스에 매우 취약하다 [Ogawa et al., 2007; Bhat et al., 2015]. 이와 같은 신경세포의 특징에 기인하여, 주 발병 원인은 서로 다르나, 자폐스펙트럼장애, 다운증후군, 레트증후군, 취약X증후군과 같은 신경 발달 장애와, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축성 측색 경화증과 같은 퇴행성 신경 질환에 있어 공통적 증상은 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아 기능장애 (mitochondrial dysfunction)라고 보고되고 있다.

[13] [선행기술문헌]

[14] [비특허문헌]

- [15] Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. *J Pharmacol sci.* 2008;108(3):227-38.
- Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganie SA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother.* 2015; 74:101-110.
- Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96 (21):12079-12084.
- Cozzolino M, Carri MT. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Prog Neurobiol.* 2012; 97(2): 54-66.
- De Koning TJ, Duran M, Van Maldergem L, Pineda M, Dorland L, Gooskens R, Jaeken J, Poll-The BT. Congenital microcephaly and seizures due to 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency: outcome of treatment with amino acids. *J Inherit Metab Dis.* 2002;25(2):119-125.
- De Koning TJ, Snell K, Duran M, Berger R, Poll-The BT, Surtees R. L-serine in disease and development. *Biochem J.* 2003; 371(Pt 3):653-661.
- De Miranda J, Santoro A, Engelender S, Wolosker H. Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis. *Gene.* 2000;256(1-2):183-8.
- Doyle KM, Kennedy D, Gorman AM, Gupta S, Healy SJ, Samali A. Unfolded proteins and endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disorders. *J Cell Mol Med.* 2011; 15(10): 2025-2039.
- Dranka BP, Hill BG, Darley-Usmar VM. Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: The impact of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(7):905-914.

- [16] Dunlop RA, Powell JT, Metcalf JS, Guillemin GJ, Cox PA. L-Serine-mediated neuroprotection includes the upregulation of the ER stress chaperone protein disulfide isomerase (PDI). *Neurotox Res.* 2018;33(1):113-122.
- El-Hattab AW. Serine biosynthesis and transport defects. *Mol Genet Metab.* 2016;118(3):153-159.
- Farruggia G, Castiglioni S, Sargenti A, Marraccini C, Cazzaniga A, Merolle L, Iotti S, Cappadone C, Maier JA. Effects of supplementation with different Mg salts in cells: is there a clue? *Magnes Res.* 2014;27(1):25-34.
- Franco-Iborra S, Vila M, Perier C. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: Focus on Parkinson's disease and Huntington's disease. *Front Neurosci.* 2018;12:342.
- Furuya S, Tabata T, Mitoma J, Yamada K, Yamasaki M, Makino A, Yamamoto T, Watanabe M, Kano M, Hirabayashi Y. L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(21):11528-11533.
- Jahnen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *Clin Kidney J* 2012;5: i3-14.
- Lench AM, Massey PV, Pollegioni L, Woodhall GL, Jones RS. Astroglial d-serine is the endogenous co-agonist at the presynaptic NMDA receptor in rat entorhinal cortex. *Neuropharmacology.* 2014;83:118-127.
- Liu G, Weinger JG, Lu ZL, et al. Efficacy and safety of MMFS-01, a synapse density enhancer, for treating cognitive impairment in older adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Alzheimers Dis.* 2015;49(4):971-90.
- Metcalf JS, Dunlop RA, Powell JT, Banack SA, Cox PA. L-Serine: a Naturally-occurring amino acid with therapeutic potential. *Neurotox Res.* 2018;33(1):213-221.

- [17] Mickley GA, Hoxha N, Luchsinger JL, et al. Chronic dietary magnesium-L-threonate speeds extinction and reduces spontaneous recovery of a conditioned taste aversion. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;106:16-26.
- Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol.* 2015;4:6-13.
- Ogawa S, Kitao Y, Hori O. Ischemia-induced neuronal cell death and stress response. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(5):573-587.
- Pineda M, Vilaseca MA, Artuch R, Santos S, García González MM, Aracil A, Van Schaftingen E, Jaeken J. 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency in a patient with West syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 2000;42(9):629-633.
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(8):1499-1503.
- Romani AMP. Magnesium homeostasis in mammalian cells. *Met Ions Life Sci* 2013; 12: 69-118.
- Saris NEL, Mervaala E, Karppanen H, Khavaja JA, Lewenstam A. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 2000; 294:1-26.
- Shahbah D, Hassan T, Morsy S, Saadany HE, Fathy M, Al-Ghobashy A, Elsamad N, Emam A, Elhewala A, Ibrahim B, Gebaly SE, Sayed HE, Ahmed H. Oral magnesium supplementation improves glycemic control and lipid profile in children with type 1 diabetes and hypomagnesaemia. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(11):e6352.
- Slutsky I, Abumaria N, Wu LJ, et al. Enhancement of learning and memory by elevating brain magnesium. *Neuron.* 2010;65(2):165-77.

- [18] Smith QR. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J Nutr.* 2000;130(4S Suppl):1016S-1022S.
- Swaminathan R. Magnesium metabolism and its disorders. *Clin Biochem Rev* 2003; 24: 47-66.
- Tabatabaie I., Klomp I.W., Rubio-Gozalbo ME., Spaapen I.J., Haagen AA, Dorland I., De Koning TJ. Expanding the clinical spectrum of 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):181-184.
- Valenti D, de Bari L, De Filippis B, Henrion-Caude A, Vacca RA. Mitochondrial dysfunction as a central actor in intellectual disability-related diseases: an overview of Down syndrome, autism, Fragile X and Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;46 Pt 2:202-217.
- Vink R. Magnesium in the CNS: recent advances and developments. *Magnes Res.* 2016;29(3):95-101.
- Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(8):1240-1247.
- Wolosker H, Panizzutti R, De Miranda J. Neurobiology through the looking-glass: D-serine as a new glial-derived transmitter. *Neurochem Int.* 2002;41(5):327-332.
- Yamanaka R, Tabata S, Shindo Y, Hotta K, Suzuki K, Soga T, Oka K. Mitochondrial Mg(2+) homeostasis decides cellular energy metabolism and vulnerability to stress. *Sci Rep.* 2016;6:30027.
- Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012;337(6098):1062-1065.
- Zhou X, He L, Wu C, Zhang Y, Wu X, Yin Y. Serine alleviates oxidative stress via supporting glutathione synthesis and methionine cycle in mice. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61(11).

## 발명의 상세한 설명

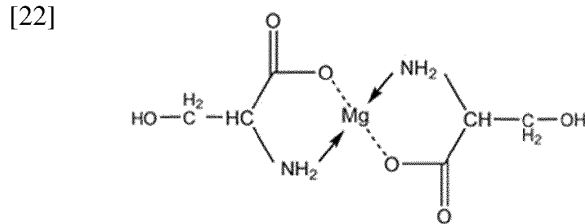
### 기술적 과제

- [19] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는, 필요에 따라 인체 내에 마그네슘과 L-세린을 동시에 전달하여, 마그네슘과 L-세린의 세포 내 투과율뿐만 아니라, 뇌에서의 마그네슘과 L-세린의 농도를 증가시키는 효과를 나타내고, 미토콘드리아 기능 활성화에 도움이 되는 신규한 마그네슘-세리네이트 화합물과 그 제조 방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [20] 본 발명에서 해결하고자 하는 또 다른 과제는 상기 마그네슘-세리네이트 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 인지장애, 지적장애, 소뇌증, 뇌전증, 신경발달장애, 치매, 자폐스펙트럼장애,

다운증후군, 레트증후군, 취약X증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 근위축성 측색 경화증 등의 미토콘드리아 기능장애로 인한 중추신경계 질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물 등을 제공하고자 하는 것이다.

### 과제 해결 수단

- [21] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 (I)의 화합물, 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 이성질체를 제공한다:



- [23] (I)
- [24] 또한, 본 발명은 L-세린에 MgO를 반응시켜 제조되는 상기 화학식 (I)의 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [25] 상기 반응은 70~80 °C에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [26] 또한, 본 발명은 L-세린에 MgH<sub>2</sub>를 반응시켜 제조되는 상기 화학식 (I)의 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [27] 상기 반응은 상온에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [28] 상기 반응은 70~80 °C에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [29] 또한, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 중추신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [30] 상기 중추신경계 질환은 인지장애, 지적장애, 소뇌증, 뇌전증, 신경발달장애, 치매, 자폐스펙트럼장애, 다운증후군, 레트증후군, 취약X증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 근위축성 측색 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [31] 또한, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 중추신경계 질환의 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.
- [32] 상기 중추신경계 질환은 인지장애, 지적장애, 소뇌증, 뇌전증, 신경발달장애, 치매, 자폐스펙트럼장애, 다운증후군, 레트증후군, 취약X증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 근위축성 측색 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [33] 또한, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 사료첨가용 조성물을 제공한다.
- [34] 또한, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한

염을 포함하는 신경세포사멸 억제용 시약 조성물을 제공한다.

- [35] 또한, 본 발명은 인 비트로 (*in vitro*) 상에서, 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 신경세포에 처리하는 것을 포함하는 신경세포의 세포사멸 억제 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [36] 본 발명의 제조 방법으로부터 수득되는 신규한 마그네슘-세리네이트 화합물은 기기분석의 결과로서 ~10 %의 마그네슘과 ~90 %의 세린으로 이루어졌음을 확인하였고, 상온의 물에 pH 6.0~pH 10.0 범위에서 ~500 mg/ml 농도로 가용화되었으며, 수용액 상태로 침전물의 생성없이 유지되었으며, 또한 생리식염수 (phosphate-buffered saline, PBS) 용액에서도 상온에서 침전물의 생성없이 ~500 mg/ml 농도로 가용화되는 것으로 나타나, 인체에 경구 및 주사제로 투여하기에 적절한 성질을 지닌 것으로 확인되었고, 상기 화합물은 미토콘드리아의 산소 소비율을 향상시킴으로써 미토콘드리아 기능 및 신경세포의 증식을 활성화시키고, 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아 막전위 손상 및/또는 소포체 스트레스에 따른 신경세포사멸을 억제하는 신경세포 보호 효과를 나타내었으며, 개선된 혈관-뇌 관문의 투과 효율을 나타냄으로써 인지장애, 지적장애, 소뇌증, 뇌전증, 신경발달장애, 치매, 자폐스펙트럼장애, 다운증후군, 레트증후군, 취약X증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 근위축성 측색 경화증 등의 중추신경계 질환의 예방, 치료 및 개선의 효과가 우수하므로, 의약 산업 등에 매우 유용한 발명이다.

### 도면의 간단한 설명

- [37] 도 1은 L-세린의 <sup>1</sup>H-NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [38] 도 2는 본 발명의 마그네슘-세리네이트(하기 실시예 1의 합성법에 따라 수득되는 화합물로서, 이하, 'AST-011'로 명명됨)의 <sup>1</sup>H-NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [39] 도 3은 본 발명의 마그네슘-세리네이트(하기 실시예 2의 합성법에 따라 수득되는 화합물로서, 'AST-014'로 명명됨)의 <sup>1</sup>H-NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [40] 도 4는 L-세린의 <sup>13</sup>C-NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [41] 도 5는 본 발명의 마그네슘-세리네이트(AST-011)의 <sup>13</sup>C-NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [42] 도 6은 본 발명의 마그네슘-세리네이트(AST-014)의 <sup>13</sup>C-NMR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [43] 도 7은 L-세린의 FT-IR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 8은 본 발명의 마그네슘-세리네이트(AST-011)의 FT-IR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [45] 도 9는 본 발명의 마그네슘-세리네이트(AST-014)의 FT-IR 분석 결과를 나타낸

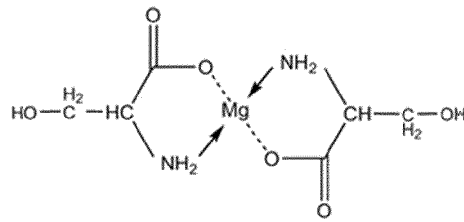
것이다.

- [46] 도 10은 본 발명의 마그네슘-세리네이트(하기 실시예 3의 합성법에 따라 수득되는 화합물로서, 'AST-016'으로 명명됨)의 FT-IR 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [47] 도 11은 본 발명의 마그네슘-세리네이트(AST-011)의 처리 농도에 따른 mouse hippocampal neuronal HT-22 cells의 세포 활성화를 보여준다. (A)는 세린/글라이신 결핍 배지에서의 cell viability를 나타내고, (B)는 완전 배지에서의 cell viability를 나타낸다.
- [48] 도 12는 본 발명의 마그네슘-세리네이트(AST-011)의 mouse hippocampal neuronal HT-22 cells에서의 미토콘드리아 에너지 생성계와 호흡계의 metabolic capacity에 대한 영향을 Seahorse Extracellular Flux(XF) analyzer로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [49] 도 13은 본 발명의 마그네슘-세리네이트(AST-011)의 처리 농도에 따른 DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone)가 처리된 mouse hippocampal neuronal HT-22 cells의 세포 보호 효과를 나타낸 것이다.
- [50] 도 14는 본 발명의 마그네슘-세리네이트(AST-011)를 ICR 마우스에 투여한 후, 혈액과 뇌에 분포하는 농도를 정량하고, 뇌/혈중 비율을 구하여 약물의 혈관-뇌 관문 투과력을 나타낸 것이다.

#### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [51] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [52] 본 발명의 발명자들은 필요에 따라 인체내에 마그네슘과 L-세린을 동시에 전달하여, 마그네슘과 L-세린의 세포 내 투과율뿐만 아니라, 뇌에서의 마그네슘과 L-세린의 농도 증가 효과를 나타낼 수 있는 새로운 화합물을 개발하는 것을 목적으로, 아미노산인 L-세린에 마그네슘염 (MgO 혹은  $MgH_2$ )을 처리하여 아미노산 L-세린에 마그네슘이 결합된 금속 아미노산 킬레이트 형태로서, 마그네슘 세리네이트를 제조하였다. 제조된 마그네슘 세리네이트는 상온의 물에 pH 6.0~pH 10.0 범위에서 ~500 mg/ml 농도로 가용화되었으며, 수용액 상태로 침전물의 생성없이 유지되는 것으로 나타났다. 또한, 제조된 마그네슘 세리네이트는 염화나트륨 (NaCl)과 인산염 (phosphate)이 함유되어 있는 상온의 생리식염수 용액에서도 침전물의 생성 없이 ~500 mg/ml 농도로 가용화되었다.
- [53] 따라서, 본 발명은 하기 화학식 (I)의 화합물, 상기 화합물의 약제학적으로 허용 가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 이성질체를 제공한다:

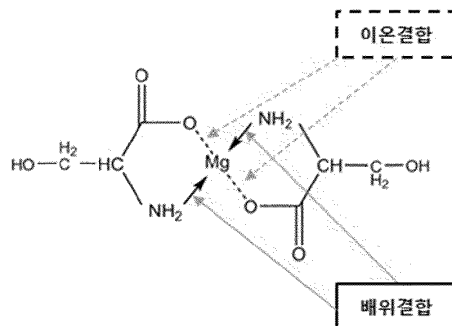
[54]



[55] (I)

[56] 상기 화학식 (I)의 화합물은 하기 구조식과 같이, 2 분자의 세린이 1 분자의 마그네슘과 이온결합 및 배위결합을 한 구조이다.

[57]



[58] 상기 화학식 (I)의 화합물은 염기-부가 염 또는 산-부가 염의 형태로 존재할 수 있다. 상기 부가 염은 본 발명의 일부에 포함된다. 상기 염은 유리하게는 약학적으로 허용가능한 산에 의해 제조되지만, 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물을 정제하거나 분리하는데 유용한 다른 산들의 염도 역시 본 발명의 일부에 포함된다. 상기 산은, 예를 들어, 피크르산, 옥살산 또는 광학활성산, 예컨대, 타르타르산, 디벤조일타르타르산, 만델산 또는 캄페선포산, 및 생리학적으로 허용가능한 염, 예컨대, 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 설페이트, 히드록젠 설페이트, 디히드록젠 포스페이트, 말레이트, 푸마레이트, 2-나프탈렌설포네이트 또는 파라-톨루엔설포네이트를 형성하는 산일수 있다. 생리학적으로 허용가능한 염에 대해서는, 문헌 [Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002)]을 참조할 수 있다.

[59] 상기 용매화물 또는 수화물은 합성 과정 이후에 직접 획득될 수 있으며, 화합물 (I)은 수화물, 예컨대, 일수화물 또는 반수화물의 형태로 분리되거나, 또는 반응 또는 정제 용매의 용매화물의 형태로 분리될 수 있다.

[60] 또한, 상기 화학식 (I)의 화합물은 이성질체, 예를 들어, 회전이성질체의 형태로 존재할 수 있다. 상기 화학식 (I)의 화합물의 회전이성질체는 본 발명의 일부에 포함된다.

[61] 본 발명의 상기 화학식 (I)의 화합물은 하기와 같은 제조 방법에 의하여 높은 수율과 순도로 합성될 수 있다.

- [62] 따라서, 본 발명은 L-세린에 MgO를 반응시켜 제조되는 상기 화학식 (I)의 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [63] 상기 화학식 (I)의 화합물은 아래의 화학 반응식에 따라 합성되며, 합성 반응은 70~80 °C에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [64] 
$$2 \text{ L-serine} + \text{MgO} \rightarrow \text{Serine-Mg-Serine} + \text{H}_2\text{O}$$
- [65] 구체적으로, 증류수가 들어있는 반응 용기에 L-세린을 투입하여 녹이고, 분쇄한 MgO를 한꺼번에 첨가하여 교반하면서 약 2시간 동안 반응시켜 상기 화학식 (I)의 화합물을 수득할 수 있다. 반응 용기 내의 상기 화학식 (I)의 화합물을 회수 및 정제하는 방법은 일반적인 유기 합성 반응 후의 분리 및 정제 방법에 따를 수 있다.
- [66] 또한, 본 발명은 L-세린에 MgH<sub>2</sub>를 반응시켜 제조되는 상기 화학식 (I)의 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [67] 상기 화학식 (I)의 화합물은 아래의 화학 반응식에 따라 합성되며, 합성 반응은 상온 또는 70~80 °C에서 수행되는 것이 바람직하다.
- [68] 
$$2 \text{ L-Serine} + \text{MgH}_2 \rightarrow \text{Serine-Mg-Serine} + 2\text{H}_2$$
- [69] 구체적으로, 증류수가 들어있는 반응 용기에 L-세린을 투입하고, 상온 (상온 반응)에서, 또는 70~80 °C로 승온 (가온 반응)시켜 MgH<sub>2</sub>를 소량씩 첨가하여 교반하면서, 상온 반응의 경우에는 약 14 시간 동안, 가온 반응의 경우에는 약 6 시간 동안 H<sub>2</sub> 가스가 발생하지 않을 때까지 반응시켜 상기 화학식 (I)의 화합물을 수득할 수 있다. 반응 용기 내의 상기 화학식 (I)의 화합물을 회수 및 정제하는 방법은 일반적인 유기 합성 반응 후의 분리 및 정제 방법에 따를 수 있다.
- [70] 본 발명의 상기 마그네슘-세리네이트 화합물은 필요에 따라 인체 내에 마그네슘과 L-세린을 동시에 전달하여, 마그네슘과 L-세린의 낮은 혈관-뇌 관문 투과력을 개선하고, 선천성 신경 질환 및 퇴행성 신경 질환 등 중추신경계와 관련된 질환에 효과를 나타낼 수 있는 의약 용도로서 적용될 수 있다.
- [71] 따라서, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 중추신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [72] 본 발명의 유효성분은 의약 용도로서 중추신경계 관련 질환에 적용될 수 있으며, 상기 중추신경계 질환은 인지장애, 지적장애, 소뇌증, 뇌전증, 신경발달장애, 치매, 자폐스펙트럼장애, 다운증후군, 레트증후군, 취약X증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 근위축성 측색 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [73] 상기 유효성분은 신경세포 증식 활성화를 유도하는 것이 바람직하다. 상기 용어 "신경세포 증식 활성화"는 신경세포의 세포 분열을 촉진시키는 작용, 신경세포의 사멸이나 괴사를 억제할 수 있는 작용을 모두 포함하는 것으로 이해될 수 있다.

- [74] 상기 신경세포 증식 활성화는 미토콘드리아의 산소 소비율 증가에 따른 효과인 것이 바람직하다.
- [75] 상기 유효성분은 신경세포 보호 활성을 갖는 것이 바람직하다. 상기 용어 "신경세포 보호"는 신경세포가 외부적 요인이나 세포 내부적 요인에 의하여 세포사멸이나 괴사가 발생하는 것을 억제할 수 있는 작용을 의미하는 것이다.
- [76] 상기 신경세포 보호는 산화적 스트레스로부터의 보호인 것이 바람직하다. 상기 용어 "산화적 스트레스"는 세포가 활성 산소종에 의하여 정상적이지 않은 상태에 놓인 것을 의미한다.
- [77] 상기 산화적 스트레스로부터의 보호는 미토콘드리아 막전위 손상에 따른 세포사멸의 억제에 의한 것이 바람직하다.
- [78] 상기 산화적 스트레스로부터의 보호는 소포체 스트레스에 따른 세포사멸의 억제에 의한 것이 바람직하다.
- [79] 상기 유효성분은 혈관-뇌 관문에 대한 투과력을 갖는 것이 바람직하다. 본 발명의 유효성분은 L-세린이 갖는 낮은 혈관-뇌 관문 투과도를 현저히 개선시킨 것으로서, L-세린 생합성 결함을 갖는 환자에 투여시 뇌로 효과적으로 전달될 수 있는 효과가 있다.
- [80] 본 발명의 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [81] 이러한 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다.
- [82] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유효제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.
- [83] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [84] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며,

단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [85] 바람직한 구체예로서, 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 당 1 내지 5,000 mg, 바람직하게는 100 내지 3,000 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3 회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [86] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [87] 본 발명에서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.
- [88] 본 발명에서 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [89] 상기 설명된 의약 용도 이외에도 본 발명의 마그네슘-세리네이트 화합물은 건강 기능 식품의 용도로서 사용될 수 있다.
- [90] 따라서, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 중추신경계 질환의 예방 또는 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.
- [91] 상기 중추 신경계 질환은 인지장애, 지적장애, 소뇌증, 뇌전증, 신경발달장애, 치매, 자폐스펙트럼장애, 다운증후군, 레트증후군, 취약X증후군, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 근위축성 측색 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [92] 본 발명의 건강 기능 식품은 중추신경계 관련 질환의 예방과 개선에 효과적인 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- [93] 본 발명의 유효성분을 포함하는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [94] 본 발명의 유효성분은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g,

바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

- [95] 본 발명의 건강 기능 식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제, 예컨대, 천연 탄수화물 및 다양한 향미제 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [96] 상기 천연 탄수화물의 예로는 포도당, 과당 등의 단당류, 말토오스, 수크로오스 등의 이당류 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 다당류와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등의 당알코올이 있다.
- [97] 상기 향미제로는 타우마틴, 레바우디오시드 A, 글리시르히진, 사카린, 아스파르탐 등을 사용할 수 있다. 상기 향미제의 비율은 본 발명의 건강 기능 식품 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g을 사용한다.
- [98] 상기 외에 본 발명의 건강 기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [99] 그 밖에 본 발명의 건강 기능 식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 상기 활성 분획물 100 중량부 당 0.01 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [100] 본 발명의 마그네슘-세리네이트 화합물은 생체 내에 효과적으로 마그네슘과 세린을 공급할 수 있으므로, 이를 사료에 적용할 수 있다.
- [101] 따라서, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 사료첨가용 조성물을 제공한다.
- [102] 상기 사료첨가용 조성물은 동물용일 수 있다. 상기 "동물"은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하며, 소화나 배설 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하고, 구체적으로는 극피동물, 갑각류, 연체동물, 어류, 양서류, 파충류, 조류, 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 성계류 또는 해삼류와 같은 극피동물, 게, 새우, 대하 등의 갑각류를 포함하는 절지동물, 두족류, 복족류 또는 이매패류 등의 연체동물, 참돔, 도미, 대구, 가자미, 넙치 등의 어류, 뱀 또는 닭 등의 가금류를 포함하는 조류 또는 돼지, 소, 양, 말, 염소, 개, 고양이 등의 포유류일 수 있다.
- [103] 상기 사료첨가용 조성물은 본 발명의 유효성분에 곡물, 식물성 단백질 사료, 동물성 단백질 사료, 당분 또는 유제품을 추가로 포함할 수 있다. 상기 곡물은 구체적으로는 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀일 수 있고, 상기 식물성 단백질 사료는 구체적으로는 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 것일 수 있으며, 상기 동물성 단백질 사료는 구체적으로는 혈분, 육분, 골분 및 생선분일 수 있고, 상기 당분 또는 유제품은 구체적으로는 각종 분유 및 유장

분말로 이루어지는 건조성분일 수 있다.

- [104] 상기 사료첨가용 조성물은 추가로 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 또는 질병 예방제와 같은 성분을 함께 사용할 수 있다.
- [105] 본 발명의 사료첨가용 조성물은 사료의 사용목적 및 사용조건에 따라 달라질 수 있으며, 일 예로 최종 생산된 사료 1kg을 기준으로 상기 사료첨가용 조성물이 0.1 내지 100 g 포함될 수 있다.
- [106] 또한, 상기 사료첨가용 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 물이 건조 제거될 수 있다.
- [107] 한편, 본 발명의 마그네슘-세리네이트는 신경세포사멸을 효과적으로 억제하므로 세포, 바람직하게는, 신경세포에 세포사멸을 유도시키는 시약으로서 적용될 수도 있다.
- [108] 따라서, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 연구용 시약 조성물, 바람직하게는 신경세포사멸 억제용 시약 조성물을 제공한다.
- [109] 상기 신경세포는 프라이머리 신경세포, 형질전환 신경세포, 또는 신경세포주일 수 있다.
- [110] 상기 시약은 신경세포 증식 활성화, 미토콘드리아의 산소 소비율 증가에 따른 신경세포 증식 활성화, 신경세포 보호, 산화적 스트레스에 기인한 신경세포 손상의 억제, 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아 막전위 손상에 따른 신경세포사멸의 억제, 산화적 스트레스에 의한 소포체 스트레스에 따른 신경세포사멸의 억제의 용도로서 적용될 수 있을 것이다.
- [111] 또한, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 본 발명의 시약을 신경세포에 처리하는 것을 포함하는 신경세포의 세포사멸 억제 방법을 제공한다.
- [112] 상기 방법에 의하여 신경세포의 증식, 미토콘드리아의 산소 소비율 증가에 따른 신경세포 증식 활성화, 신경세포 보호, 산화적 스트레스에 기인한 신경세포 손상의 억제, 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아 막전위 손상에 따른 신경세포사멸의 억제, 산화적 스트레스에 의한 소포체 스트레스에 따른 신경세포사멸의 억제의 효과를 얻을 수 있을 것이다.
- [113] 상기 방법에 있어서, 세포 배양법, 시약 처리법 등은 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 사항이며, 특히, 시약의 처리 농도 등은 본 명세서에 기재된 사항의 범위 내 또는 그 효과가 변화되지 않는 범위 내에서의 적절한 변형이 가능하다.
- [114] 상기 방법은 인 비트로 (*in vitro*) 상에서 수행되는 것이 바람직하다.

### 발명의 실시를 위한 형태

- [115] 이하에서는, 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 일 구체예를 기재한 것이며, 하기 실시예에 기재된 내용에 의하여 본 발명의 권리범위가 한정되어 해석되는 것이 아님은 명백하다.
- [116] [실시예]
- [117] 1. 마그네슘-세리네이트 (Mg-Serinate)의 제조
- [118] 1.1. 마그네슘-세리네이트 (Mg-Serinate, AST-011) 제조
- [119] 500 ml 삼각플라스크에 증류수 100 ml을 넣고, 70~80 °C의 온도로 끓인 다음, 이 증류수에 L-세린 (MW 105.1) 50 g (~0.48 moles)을 칭량하여 자석교반기 (magnetic stirrer)로 교반하면서 용해시켰다. MgO (MW 40.3)를 막자사발에서 작은 입자로 분쇄한 후 9.7 g (~0.24 moles) 칭량하여, L-세린 수용액에 70~80 °C의 온도로 교반하면서 소량씩 첨가하여 넣고, 삼각플라스크에 환류냉각장치를 부착하여 2 시간 같은 조건하에서 반응시켰다.
- [120] 식히지 않은 채로 바로 10 분간 6,000 rpm에서 원심분리하여 상등액 130 ml을 회수하였다. 상등액에 에탄올을 첨가하여 최종농도가 75 v/v%가 되도록 첨가한 다음, 자석교반기를 이용해 상온에서 14 시간 동안 교반하며 침전시켰다. 상등액은 따르서 제거하고, 침전물만 회수하여 동결건조시켜 마그네슘-세리네이트의 고형물을 얻었다.
- [121] 동결건조로 회수된 마그네슘-세리네이트 고형물을 막자사발을 이용하여 작은 입자로 분쇄하여, 최종적으로 마그네슘-세리네이트 분말 (AST-011)을 얻었다. 이때 회수된 마그네슘-세리네이트 분말은 53.1 g 이었으며 회수율은 ~89% 정도였다.
- [122] 1.2. 상온 반응에 의한 마그네슘-세리네이트 (Mg-Serinate, AST-014) 제조
- [123] 삼각플라스크 (2,000 ml) 에 증류수 500 ml에 넣고, 이 증류수에 L-세린 (MW 105.1) 75 g (~0.71 moles)을 칭량하여 상온에서 교반하면서 용해시켰다. MgH<sub>2</sub> (MW 26.3) 9.5 g (~0.36 moles)을 칭량하여, L-세린 수용액에 상온에서 교반하면서 소량씩 첨가하여 넣고, 상온에서 14 시간 동안 자석교반기로 교반하면서 H<sub>2</sub> 가스가 발생하지 않을 때까지 반응시켰다.
- [124] 반응액을 여과지 (Whatmann 3MM Filter Paper, GE Healthcare, Life Sciences, USA)를 이용하여 여과한 다음, 여과액을 감압농축기 (Heidolph LR 4000, Germany)를 이용하여 ~200 ml로 농축하였다. 농축액 (~200 ml)에 에탄올 600 ml을 첨가하여 최종 농도가 75v/v%로 되도록 하고 자석교반기를 이용하여 14 시간 교반 침전시켰다. 이어서 상등액을 따르서 제거하고, 침전물을 마그네슘-세리네이트로 회수하여 동결건조하였다.
- [125] 동결건조로 회수된 마그네슘-세리네이트 고체를 막자사발을 이용하여 작은 입자로 분쇄하여, 최종적으로 마그네슘-세리네이트 분말 (AST-014)을 얻었다.

이때 회수된 마그네슘-세리네이트 분말은 48.3 g 이었으며 회수율은 ~57.3%였다.

- [126] 1.3. 가온 반응에 의한 마그네슘-세리네이트 (Mg-serinate, AST-016) 제조
- [127] 삼각플라스크 (1,000 ml) 에 증류수 200 ml을 넣고, 70~80 °C로 미리 가온하였다. 이 가온한 증류수에 L-세린 (MW 105.1) 60 g (~0.57 moles)을 칭량하여 교반하면서 용해시켰다. MgH<sub>2</sub> (MW 26.3) 7.5 g (~0.285 moles)을 칭량하여 L-세린 수용액에 자석교반기로 교반하면서 소량씩 첨가하여 넣은 다음, 삼각플라스크에 환류냉각장치를 부착하여 같은 70~80 °C에서 자석교반기로 교반하면서 H<sub>2</sub> 가스가 발생하지 않을 때까지 6 시간 동안 반응시켰다.
- [128] 반응액을 여과지 (Whatman 3MM Filter Paper, GE Healthcare, Life Sciences, USA)를 이용하여 여과한 다음, 여과액 ~220 ml을 감압농축기 (Heidolph LR 4000, Germany)를 이용하여 ~100 ml로 농축하였다. 농축액 (~100 ml)에 에탄올을 첨가하여 최종 농도가 75v/v%로 되도록 하고 자석교반기를 이용하여 14 시간 교반하면서 침전시켰다. 이어서 상등액을 따르서 제거하고, 침전물을 75v/v% 에탄올 300 ml에 8 시간 동안 담구어 세척한 후, 침전물을 동결건조하여 마그네슘-세리네이트를 회수하였다.
- [129] 동결건조로 회수된 마그네슘-세리네이트 고체를 막자사발을 이용하여 작은 입자로 분쇄하여, 최종적으로 마그네슘-세리네이트 분말 (AST-016)을 얻었다. 이때 회수된 마그네슘-세리네이트 분말은 62.6 g 이었으며 회수율은 ~92.8%였다.
- [130] 2. 합성된 마그네슘-세리네이트의 기기 분석
- [131] 2.1. 마그네슘-세리네이트 내의 마그네슘 함량 분석
- [132] 각 킬레이트화 금속의 마그네슘 함량은 유도 결합 플라즈마 질량분석기 (Inductively coupled plasma-optical emission spectrometry, ICP-OES) (Optima 7300DV, PerkinElmer, USA)를 사용하여 분석하였다. 실험조건은 주파수 40 MHz, 무기물 분석에 사용된 파장은 285.213 nm이 이용되었다.
- [133] (1) 시료 약 0.1~0.2 g을 분취하여 정확히 무게를 측정한 후 질산 25~30 g을 첨가하였다.
- [134] (2) UltraWAVE (Milestone, Italy) 장치를 이용하여 220 °C에서 25 분간 처리한 후 2 % 질산으로 희석하고 분석하였다.
- [135] 그에 대한 분석 평균값을 표 1에 나타내었다.
- [136] [표 1] 마그네슘-세리네이트 AST-011, AST-014 및 AST-016의 마그네슘 함량
- [137]

| 시료      | 시료 무게 (g) | 첨가한 질산 용액 무게 (g) | 전처리 후 덜어낸 시료 무게 (g) | 2% 질산 용액 첨가 무게 (g) | 시료 내 마그네슘의 농도값 (%) | 수분제외한 Mg 함량 (%) | 평균 Mg 함량 (%) |
|---------|-----------|------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------|--------------|
| AST-011 | 0.17      | 30.55            | 1.11                | 24.98              | 8.15               | 9.62            | 9.63         |
|         | 0.10      | 29.77            | 1.11                | 29.77              | 8.16               | 9.63            |              |
| AST-014 | 0.15      | 27.90            | 1.12                | 48.53              | 8.68               | 10.21           | 10.06        |
|         | 0.12      | 30.75            | 1.11                | 48.41              | 8.28               | 9.90            |              |
| AST-016 | 0.21      | 25.85            | 1.10                | 49.09              | 8.95               | 10.59           | 10.77        |
|         | 0.12      | 27.40            | 1.04                | 49.96              | 9.26               | 10.95           |              |

- [138] 2.2. 마그네슘-세리네이트 내의 구성아미노산 함량 분석
- [139] 각 마그네슘 세리네이트 내의 구성 아미노산 함량은 아미노산 자동 분석장치 (L-8900, Hitachi, Japan)를 사용하여 확인하였다.
- [140] (1) 시료 0.05 g에 2 ml의 6 N HCl을 넣고 질소 충전하여 110 °C에서 24 시간 동안 가수분해시켰다.
- [141] (2) 산가수분해 후 80 °C로 24 시간 정도 열을 가하여 건조시켰다.
- [142] (3) 산가수분해 용액을 0.02 N HCl로 1,000 배 희석한 다음, 아미노산자동분석기로 분석하였다.
- [143] 그에 대한 분석값을 표 2에 나타내었다.
- [144] [표 2] 마그네슘-세리네이트 AST-011, AST-014 및 AST-016의 세린 함량
- [145]

| Amino acid    | AST-011 (mg/g) | AST-014 (mg/g) | AST-016 (mg/g) |
|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Aspartic acid | ND             | ND             | ND             |
| Threonine     | ND             | ND             | ND             |
| Serine        | 890.1          | 890.5          | 895.1          |
| Glutamic acid | ND             | ND             | ND             |
| Glycine       | ND             | ND             | ND             |
| Alanine       | ND             | ND             | ND             |
| Cystine       | ND             | ND             | ND             |
| Valine        | ND             | ND             | ND             |
| Methionine    | ND             | ND             | ND             |
| Isoleucine    | ND             | ND             | ND             |
| Leucine       | ND             | ND             | ND             |
| Tyrosine      | ND             | ND             | ND             |
| Phenylalanine | ND             | ND             | ND             |
| Lysine        | ND             | ND             | ND             |
| Ammonia       | ND             | ND             | ND             |
| Histidine     | ND             | ND             | ND             |
| Arginine      | ND             | ND             | ND             |
| Proline       | ND             | ND             | ND             |

ND: Non-detect

- [146] 2.3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)에 의한 마그네슘-세리네이트의 분석
- [147] 각 마그네슘-세리네이트들 (AST-011, AST-014, 및 AST-016) 및 authentic L-Serine (ICN Biomedicals, OH, USA)을 <sup>1</sup>H NMR 및 <sup>13</sup>C NMR을 이용하여 분석하였다. 각 시료 100 mg을 D<sub>2</sub>O 0.7 ml에 녹여 24.85 °C (298 K)에서 NMR

spectroscopy (Bruker Avance II 500 MHz with CyroBBO probe, Bruker, Germany)를 사용하여 측정하였다.

[148] 2.3.1.  $^1\text{H}$  NMR 분석

[149] 도 1 내지 도 3에서 나타난 바와 같이,  $^1\text{H}$  NMR 분석법을 통하여 분석한 결과로서 Authentic L-세린의 경우는 carboxyl group과 amino group을 가지는  $\alpha$  carbon으로 판단되는 peak가 3.7~3.8 ppm 대에, 그리고 hydroxyl group을 가지는  $\beta$  carbon으로 판단되는 peak는 3.6~3.7 ppm 대에서 나타났다. 이때, AST-011의 경우는 carboxyl group과 amino group을 가지는  $\alpha$  carbon으로 판단되는 peak가 3.5~3.6 ppm 대에 나타났으며, hydroxyl group을 가지는  $\beta$  carbon으로 판단되는 peak는 3.2 ppm 대에 나타났고, AST-014의 경우에도 carboxyl group과 amino group을 가지는  $\alpha$  carbon으로 판단되는 peak가 3.5~3.6 ppm 대에, 그리고, hydroxyl group을 가지는  $\beta$  carbon으로 판단되는 peak는 3.2 ppm 대에서 확인되었다.

[150] 결론적으로, AST-011 및 AST-014 두 시료들 모두에서 공통적으로 Authentic L-세린과 매우 유사한 chemical shift를 가지는  $^1\text{H}$  NMR peaks가 확인되었다. 이때, Authentic L-세린의  $^1\text{H}$  NMR peak와는 달리, AST-011 및 AST-014의 경우에는 3.4~3.5 ppm 대에서 ethanol의  $\text{CH}_2$  peak와 1.00 ppm 대에서 ethanol의  $\text{CH}_3$  peak가 확인되었는데, 이는 AST-011 와 AST-014의 제조공정 중 ethanol precipitation 단계에서 사용된 ethanol이 동결건조 후에도 고체 시료 속에 소량으로 잔존하기 때문인 것으로 판단된다.

[151] 2.3.2.  $^{13}\text{C}$  NMR 분석

[152] 도 4 내지 도 6에서 나타난 바와 같이,  $^{13}\text{C}$  NMR 분석법을 통하여 분석한 결과로서 AST-011의 경우는 Authentic L-세린 내의  $\alpha$  carbon의 carboxyl group으로 판단되는  $\text{C}=\text{O}$  peak가 177.885 ppm 대에,  $\beta$  carbon의 hydroxyl group의  $\text{C}-\text{O}$  peak는 62.607 ppm 대에,  $\alpha$  carbon과  $\beta$  carbon의  $\text{C}-\text{C}$  peak는 56.151 ppm 대에서 나타났다. 또한, AST-014의 경우는  $\alpha$  carbon의 carboxyl group으로 판단되는  $\text{C}=\text{O}$  peak가 179.838 ppm 대에,  $\beta$  carbon의 hydroxyl group의  $\text{C}-\text{O}$  peak는 63.784 ppm 대에,  $\alpha$  carbon과  $\beta$  carbon의  $\text{C}-\text{C}$  peak는 56.892 ppm 대에서 나타남을 확인하였다.

[153] 결론적으로, AST-011 및 AST-014 두 시료들 모두에서 공통적으로 Authentic L-세린과 매우 유사한  $^{13}\text{C}$  NMR peaks가 확인되었다. 한편, AST-011의 경우는 56.391 ppm 대와 15.732 ppm 대에서, 그리고 AST-014의 경우는 57.334 ppm 대와 16.692 ppm 대에서 나타나는 작은 높이의 peaks는  $^1\text{H}$  NMR 분석에서도 검출되었던 ethanol peak로 확인되었다.

[154] 2.3.3. NMR 분석 결과

[155] 이상의  $^1\text{H}$  NMR 및  $^{13}\text{C}$  NMR을 이용한 두 가지 분석 결과들을 종합하면, 제조한 마그네슘-세리네이트 시료인 AST-011 및 AST-014 내에는 L-세린이 함유되어 있음을 확인해 준다.

[156] 2.4. Fourier transform infrared (FT-IR)에 의한 마그네슘-세리네이트의 분석

- [157] 각 마그네슘-세리네이트들 (AST-011, AST-014, 및 AST-016) 및 authentic L-Serine (ICN Biomedicals, OH, USA)을 FT-UV-VIS-IR Spectroscopic Imaging Microscope (Vertex 80, Bruker, Germany)을 이용하여 분석하였다. 이 분석 결과를 통해 제조된 마그네슘-세리네이트들의 킬레이트화 화합물로서의 합성여부를 조사하였다.
- [158] 이때, 각 시료 30~40 mg을 ATR (Attenuated Total Reflectance) 기법을 이용하여 Resolution 4  $\text{cm}^{-1}$ 으로 샘플당 3 회씩 측정하여 분석하였다. Spectral 범위는 600~4000  $\text{cm}^{-1}$ 이고, DLaTGS 디텍터를 사용하였다.
- [159] 도 7은 대조구인 L-세린만을 단독으로 하여 측정한 IR 분석결과로서, 쯔비터 이온의 영향으로 -COO-를 나타내는 finger print가 800~1400  $\text{cm}^{-1}$ , 1600  $\text{cm}^{-1}$ 에서 나타났고, -NH<sup>3+</sup>의 특성 밴드가 ~2100  $\text{cm}^{-1}$ 에서 형성됨을 확인하였다. 이를 도 8 내지도 10과 비교하였을 때, 800~1400  $\text{cm}^{-1}$ 에서 형성되는 -COO- finger print가 변화되어 몇 개의 peak로 단순화되었고, 특히 -NH<sup>3+</sup>의 특성 밴드를 나타내는 ~2100  $\text{cm}^{-1}$ 에 형성된 peak가 완전히 사라진 것을 확인할 수 있었다.
- [160] 이와 같이, FT-IR 분석을 수행한 결과, L-세린의 아민기와 카르복실기의 peak 변화를 통해서 두 작용기 모두 마그네슘과 유기적으로 결합에 관여하고 있음을 간접적으로 확인하였다.
- [161] 3. 마그네슘-세리네이트의 신경세포 증식 활성 평가
- [162] 3.1. Cell viability assay
- [163] Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES)와 스트렙토마이신-페니실린 (streptomycin-penicillin) 등의 세포 배양용 시약들은 Gibco BRL사 (Grand Island, USA)에서 구입하였다.
- [164] Murine hippocampal neuronal cell line HT-22은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 fetal bovine serum (FBS) 10 %와 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamycin을 가한 배지에서 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere 환경 하에서 배양하였다. 본 실시예에서는 세포계대 회수 15 회 이하인 세포를 사용하였다.
- [165] 세포 증식 활성은 cell viability를 측정하는 MTT assay로 조사하였다. 먼저, hippocampal neuronal cell HT-22 ( $1 \times 10^4$  cells)를 단계별로 희석한 시료용액과 함께 96-well plates에서 16 시간 incubation시킨 다음, 50  $\mu\text{l}$ 의 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazolyl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 용액 (1.1 mg/ml)과 혼합한 후, 4 시간 동안 더 배양하였다. 형성된 formazan crystal을 150  $\mu\text{l}$ 의 DMSO 용액으로 용해시키고, 이를 plate reader를 이용하여 540 nm에서 OD를 측정하였다.
- [166] 3.2. 신경세포 증식 활성 평가 결과
- [167] 선별된 본 발명의 마그네슘-세리네이트 (AST-011)의 신경세포 증식 활성을 평가하기 위하여, AST-011과 함께 L-세린을 대조구로 하여 세포 증식에 개한 각 물질을 (25~10,000  $\mu\text{g}$ )로 첨가하여 비교하였다. 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 완전 배지에서 L-세린은 크게 세포 증식을 활성화시키지 않은데 반해,

AST-011은 처리농도 1 mg/ml 에서 최대 112 %의 세포생존율을 보였다 (도 11의 B). 그리고, 세린과 글라이신이 결핍된 배지에서도 L-세린이 500  $\mu$ g/ml 첨가시 125 %의 생존율을 보일 때, AST-011은 129 %를 보여 (도 11의 A), AST-011 약물이 hippocampal HT-22 세포 증식을 활성화시킴을 확인하였다.

- [168] 4. 마그네슘-세리네이트의 미토콘드리아 산소 소비율 평가
- [169] 4.1. Seahorse XF Cell Mito Stress test
- [170] 세린과 마그네슘-세리네이트 (AST-011)의 hippocampal neuron cell line인 HT-22에 있어서, 미토콘드리아의 산소 소모율 (OCR)에 대한 영향을 Seahorse XF Cell Mito Stress Tests (Seahorse, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 검정하였다. 모든 과정은 Mito Stress Test Kit의 프로토콜에 준하여 진행하였다. 먼저, hippocampal neuronal HT-22 세포를  $8 \times 10^3$ /well의 농도로 XP-96 cell culture plate에 seeding한 후, DMEM 배지에서 37 °C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 12 시간 배양한 뒤, 세린과 AST-011 약물을 농도별로 처리하였다. 약물을 4 시간 처리한 뒤, 새 배지로 갈아주고, 37 °C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 12 시간 동안 추가 배양하였다. 12 시간의 배양이 끝난 세포를 assay medium (10 mM glucose, 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, pH 7.4)로 2 회 씻어준 후, 180  $\mu$ l의 medium을 가한 뒤, 37 °C, non-CO<sub>2</sub> 배양기에서 1 시간 배양하고 Seahorse Extracellular Flux (XF) Analyzer로 분석하였다. OCR 값은 1  $\mu$ M oligomycin, 0.5  $\mu$ M fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazone (FCCP) 및 0.5  $\mu$ M rotenone/antimycin A에 반응하여 분석하였고, 각 시료 당 3 개의 동일한 well에서 실험을 수행하여 평균치로 결과를 도출하였다.
- [171] 4.2. 미토콘드리아 산소 소비율 평가 결과
- [172] L-세린과 마그네슘-세리네이트 (AST-011)의 세포 증식 활성화가 미토콘드리아 기능 향상과 연관되어 있는지를 조사하기 위하여, 산소 소비율 (oxygen consumption rate)을 재료 및 방법에 기술한 방법으로 조사하였다. 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, L-세린과 AST-011 두 약물에 의해 OCR 값이 증가하여 미토콘드리아의 기능이 향상되는 것을 확인할 수 있었는데, L-세린은 처리농도 100  $\mu$ g/ml까지는 OCR 값이 증가하다가 500  $\mu$ g/ml에서 약간 감소하는데 반하여 (도 12의 A), AST-011은 처리농도 500  $\mu$ g/ml까지 OCR 값이 증가하는 것으로 나타나 (도 12의 B) 도 11의 세포 증식 활성화 실험 결과와 일치함을 확인하였다.
- [173] 5. 마그네슘-세리네이트의 신경세포 보호 활성
- [174] 5.1. Flow cytometry 분석
- [175] 먼저,  $1 \times 10^6$  세포를 2 %의 FBS를 함유한 PBS 용액으로 3 회 수세한 후, 수세된 세포를 70 % ethanol에 현탁하고, 4 °C에서 1시간 동안 고정하였다. 고정된 세포를 다시 같은 용액으로 2 회 세척한 후, 50  $\mu$ g/ml 농도의 RNase A 용액 250  $\mu$ l에 현탁하고, 37 °C에서 30 분 동안 처리하여 세포 내 RNA를 제거하고, 50  $\mu$ g/ml의 propidium iodide/1.12 % sodium citrate buffer (pH 8.45) 용액 250  $\mu$ l를 가해 37 °C에서 20 분 동안 세포 내 DNA를 염색하였다. 이를 flow cytometer (FACS

Calibur)로 분석하여 각 세포 내 염색된 DNA의 함량을 기준으로 세포주기의 분포를 조사하였다.

[176] 5.2. 신경세포 보호 활성 평가 결과

[177] 마그네슘-세리네이트 (AST-011)의 DMNQ에 의해 유도되는 oxidative stress에 대한 세포 보호 활성을 DiOC<sub>6</sub> 염색법으로 비교한 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, DMNQ (10  $\mu$ M) 단독 처리시 세포 손상율이 77.8 %인데 반해, AST-011를 0.5, 1, 5 mg/ml 농도로 처리하면 66.5 %, 65.9 %와 64.6 %로 미토콘드리아 막전위 손상이 보호됨을 확인하였다. 이상의 결과로부터, AST-011 약물이 L-세린보다 세포 증식을 활성화시킬 뿐만 아니라, 산화적 스트레스로부터 신경세포를 보호하는 활성도 우수함을 알 수 있었다.

[178] 6. 마그네슘-세리네이트의 혈관-뇌 관문 (BBB) 투과력 검정

[179] 6.1. Blood-Brain Barrier(BBB) 투과력 검정

[180] L-세린과 AST-011을 600 mg/kg로 7 주령의 ICR 마우스 (n = 3)에 투여한 후, 뇌 조직과 혈액을 채취하여 LC/Ms를 이용하여 혈액과 뇌에 분포하는 L-세린의 농도를 정량하고, 뇌/혈중 비율을 구하여 약물의 BBB 투과력을 비교하였다.

[181] 6.2. 마그네슘-세리네이트의 BBB 투과력 평가 결과

[182] AST-011의 뇌로 이행 여부를 L-세린과 비교하였으며, 그 결과를 도 14 및 표 3에 나타내었다. 도 14와 표 3에 나타난 바와 같이, AST-011 약물의  $C_{\text{brain}}/C_{\text{plasma}}$  수치는 L-세린의  $18.29 \pm 2.43$ 보다 높은  $21.85 \pm 4.28$ 로 나타났다. 이는 뇌 조직에서 L-세린이  $11,410 \pm 1299$ , AST-011이  $12,296 \pm 610$ 으로 나타난 결과와 플라스마에서 L-세린이  $636 \pm 55.2$ , AST-011이  $578 \pm 103$ 으로 나타난 결과와 일치하는 것으로서 본 발명의 마그네슘-세리네이트는 L-세린보다 BBB 투과력이 매우 향상되었음을 확인하였다.

[183] [표 3] male ICR mice에서 Brain/plasma ratio (600 mg/kg, P.O., mean  $\pm$  SD, n = 4)

[184]

| Compounds    | Concentration (ng/ml or ng/g) |                  | $C_{\text{brain}}/C_{\text{plasma}}$ |
|--------------|-------------------------------|------------------|--------------------------------------|
|              | Plasma                        | Brain tissue     |                                      |
| Acetonitrile | $588 \pm 91.2$                | $9713 \pm 1594$  | $16.72 \pm 3.11$                     |
| L-serine     | $636 \pm 55.2$                | $11410 \pm 1299$ | $18.29 \pm 2.43$                     |
| AST-011      | $578 \pm 103$                 | $12296 \pm 610$  | $21.85 \pm 4.28$                     |

[185] [이 발명을 지원한 국가연구개발사업]

[186] [과제고유번호] S2611222

[187] [부처명] 중소벤처기업부

[188] [연구관리 전문기관] 중소기업기술정보진흥원

[189] [연구사업명] 창업성장-기술개발사업

[190] [연구과제명] 자폐스펙트럼장애 개선 기능성 식품 개발

[191] [기여율] 1/1

[192] [주관기관] 주식회사 아스트로젠

**WO 2020/040382****PCT/KR2019/001647**

[193]      [연구기간] 2018.06.29 ~ 2019.06.28