(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0128151
(43) 공개일자 2016년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0060051
(22) 출원일자 2015년04월28일
심사청구일자 2015년04월28일

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
삼육대학교산학협력단
서울특별시 노원구 화랑로 815, 산학협력단 (공릉동, 삼육대학교)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
신찬영
서울특별시 양천구 목동동로 350, 511동 604호 (목동, 목동신시가지아파트5단지)
한설희
서울특별시 서초구 서초대로34길 34, 103동 1204호 (방배동, 방배이편한세상)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

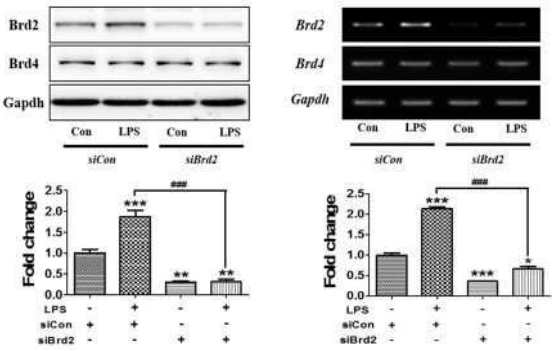
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **뇌신경 질환 치료 타겟으로서 Brd2 용도**

(57) 요 약

본 발명은 뇌신경 질환 치료 타겟으로서 Brd2 용도에 관한 것으로, PAI-1 과발현을 특징으로 보이는 뇌신경 질환에 있어서 Brd2를 치료 타겟으로서 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 31/7105 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(72) 발명자
정재훈
경기도 남양주시 퇴계원면 퇴계원로 141, 105동 1501호 (금호어울림)
류종훈
서울특별시 강남구 삼성로 150, 101동 609호 (대치동, 미도아파트)
유정수
서울특별시 동작구 상도로53길 8, 313동 1002호 (상도동, 래미안상도3차아파트)
최창순
서울특별시 광진구 아차산로26길 34, 205호 (자양동)

명 세 서

청구범위

청구항 1

Brd(브로모도메인 함유 단백질) 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 PAI-1 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 PAI-1은 리포폴리사카라이드(LPS)에 의하여 유도된 것을 특징으로 하는 PAI-1 억제용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 Brd 2 억제제는 화합물, 올리고뉴크레오타이드 및 단백질 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 PAI-1 억제용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 올리고뉴크레오타이드는 siRNA인 것을 특징으로 하는 PAI-1 억제용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 5 내지 8에 기재된 염기서열로 이루어진 것 중 하나인 것을 특징으로 하는 PAI-1 억제용 조성물.

청구항 6

Brd 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 뇌신경질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 Brd 2 억제제는 화합물, 올리고뉴크레오타이드 및 단백질 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 올리고뉴크레오타이드는 siRNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 5 내지 8에 기재된 염기서열로 이루어진 것 중 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

Brd 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 뇌신경질환 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 Brd 2 억제제는 화합물, 올리고뉴크레오타이드 및 단백질 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

성상교세포와 피험 화합물을 접촉시켜 배양한 후, 리포폴리사카라이드(LPS)를 처리한 후, 상기 세포에서 Brd 2의 발현량을 확인하여 피험화합물을 처리하지 않은 세포와 비교하여 Brd 2의 발현량이 감소한 경우에 그 피험화합물을 뇌신경질환 치료 후보물질로 판단하는 단계를 포함하는 뇌신경질환 치료 약물의 스크리닝 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 Brd 2의 발현량 확인은 RT-PCR 또는 웨스턴 블럿팅에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 뇌신경질환 치료 약물의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 뇌신경 질환 치료 타겟으로서 Brd2 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체 조직에 손상을 입거나 외부 자극 물질(병인)이 체내로 침입하였을 때 수 많은 단백질들의 활성화 및 분비가 일어나게 되며 이는 외부 침입 물질의 제거와 손상 된 조직의 치료를 위한 면역 반응 활성화를 유도하게 된다. 하지만 이러한 면역반응이 지속적으로 과 활성화 되게 되면 주변 세포의 기능 이상 및 세포 사멸을 유도하게 되므로, 이를 적절히 조절하는 것은 매우 중요한 문제이다.

[0003] Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)은 중추 신경계 내 성상교세포에서 발현되는 유전자 중 하나로써 tissue plasminogen activator(tPA)의 활성을 억제하는 중요한 요인으로 알려져 있다 [B. Van De Craen, P.J. Declerck, A. Gils, Thrombosis research, 130 (2012) 576-585.]. tPA/PAI-1 체계는 중추 신경계 내에 광범위하게 작용을 하며, 시냅스 가소성, 신경 분지의 확장, 신경세포 전구체의 이동, 교세포 활성화 등에 관여하며, 이는 뇌졸중, 다발성 경화증, 알츠하이머병과 같은 중추신경계 질환의 발병에도 영향을 미치는 인자로 알려져 있다[E.E. Benarroch, Neurology, 69 (2007) 799-802;I. Gravanis, S.E. Tsirka, Glia, 49 (2005) 177-183;J.P. Melchor, S. Strickland, Thrombosis and haemostasis, 93 (2005) 655-660]. PAI-1은 직접적으로 뇌신경 질환의 발생 및 경과에 영향을 미칠 수도 있으며 또한 PAI-1(Plasminogen activator inhibitor-1)의 과발현은 tPA의 효소 활성을 억제함으로서 신경 가소성, 재생의 억제, 신경전구세포 이동 억제, amyloid clearance 저해 등에 의해 뇌졸중, 알츠하이머 및 다양한 뇌신경 질환의 발생 및 진행에 영향을 미칠 수 있다. PAI-1의 과도한 발현 증가는 외부 병인 침입에 의한 신경 면역 반응에서 지속적으로 보고되어 왔으나 현재 PAI-1의 과 활성화를 선택적으로 조절하는 약물은 개발되지 못하고 있는 실정이다 [J.W. Kim, S.H. Lee, H.M. Ko, K.J. Kwon, K.S. Cho, C.S. Choi, J.H. Park, H.Y. Kim, J. Lee, S.H. Han, L.J. Ignarro, J.H. Cheong, W.K. Kim, C.Y. Shin, Neurochemistry international, 58 (2011) 423-433].

[0004] BET(Bromodomain and exterminal domain) 단백질은 epigenetic reader로서 histone 의 acetylated lysine 잔기에 결합한다. 이를 통해 bromodomain-함유 단백질들은 직접적으로 크로마틴의 특정 부위에서 nuclear macromolecular complex를 이루고 DNA 복제, DNA damage repair, chromatin remodeling, 전사 조절과 같은 생물학적인 과정을 조절하게 된다. BET family 단백질들은 BRD2, BRD3, BRD4 그리고 Brdt가 있으며, 전사조절에서 역할이 잘 알려져 있다 [P. Filippakopoulos, S. Knapp, Drug discovery, 13 (2014) 337-356].

[0005] 그 중 Brd2(Bromodomain-containing protein 2)는 핵 안에 존재하는 신호전달 매개체 역할을 하는 인자로 포유류 세포에 광범위하게 발현하며, 세포 주기 조절, 전사 조절에 중요한 역할을 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 뇌졸중 또는 알츠하이머병과 같은 PAI-1의 과도한 발현을 동반하는 질환에서 새로운 치료 타겟을 제공하는 것이다.

[0007] [선행 특허 문헌]

[0008] 대한민국 특허공개번호 제1020130113944호

과제의 해결 수단

[0009] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Brd 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 PAI-1 억제용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 PAI-1은 리포폴리사카라이드(LPS)에 의하여 유도된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0011] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 Brd 2 억제제는 화합물, 올리고뉴크레오타이드 및 단백질 중에서 선택된 것이 바람직하고, 상기 올리고뉴크레오타이드는 siRNA인 것이 더욱 바람직하고, 상기 siRNA는 서열번호 5 내지 8에 기재된 염기서열로 이루어진 것 중 하나인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 또 본 발명은 Brd 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 뇌신경질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 Brd 2 억제제는 화합물, 올리고뉴크레오타이드 및 단백질 중에서 선택된 것이 바람직하고, 상기 올리고뉴크레오타이드는 siRNA인 것이 더욱 바람직하고, 상기 siRNA는 서열번호 5 내지 8에 기재된 염기서열로 이루어진 것 중 하나인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 또 본 발명은 Brd 2 억제제를 유효성분으로 포함하는 뇌신경질환 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 또 본 발명은 성상교세포와 피험 화합물을 접촉시켜 배양한 후, 리포폴리사카라이드(LPS)를 처리한 후, 상기 세포에서 Brd 2의 발현량을 확인하여 피험화합물을 처리하지 않은 세포와 비교하여 Brd 2의 발현량이 감소한 경우에 그 피험 화합물을 뇌신경질환 치료 후보물질로 판단하는 단계를 포함하는 뇌신경질환 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 Brd 2의 발현량 확인은 RT-PCR 또는 웨스턴 블럿팅에 의하여 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0017] 본 발명의 뇌신경질환은 신경 퇴행성 질환 또는 허혈성 뇌 질환일 수 있다.

[0018] 신경 퇴행성 질환(neurodegenerative disorders)이란 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 여러 가지 증상을 유발하는 질환으로 대부분 질병의 발병이 서서히 시작하며 출생 후 오랜 기간 정상적인 기능을 하다가 증상이 나타난다. 또한 일단 발병하면 사망 시까지 수년 또는 수십 년에 걸쳐 지속적으로 병이 진행하며, 가족력이 있는 경우가 많다. 본 발명의 신경 퇴행성 질환의 구체적인 예는 이에 한정되지 아니하나, 파킨슨병,헌팅턴 병, 알츠하이머 병, 경도인지장애, 노인성 치매, 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis),척수소뇌성 운동실조증(Spinocerebellar Atrophy), 뚜렛 증후군(Tourette`s Syndrome), 프리드리히 보행실조(Friedrich`s Ataxia), 마차도-조셉 병(Machado-Joseph`s disease), 루이 소체 치매(Lewy Body Dementia), 근육긴장이상(Dystonia), 진행성 핵상 마비(Progressive Supranuclear Palsy) 및 전두측두엽 치매(Frontotemporal Dementia)일 수 있다.

[0019] 허혈성 뇌 질환이란 뇌에 혈액을 공급하는 혈관에 여러가지 형태의 병리학적 이상이 발생되어 혈류가 완전히 차단되거나, 현저하게 감소한 상태로서, 산소부족, 기질공급의 감소, 대사산물의 축적이 동시에 진행되는 질환을 말한다. 허혈이 발생한 조직에는 기능 장애가 나타나, 혈관 폐색의 정도, 지속시간에 따라 조직은 위축, 변성, 괴사에 이르게 된다. 본 발명의 허혈성 뇌 질환의 구체적인 예로는 이에 한정되지 아니하나, 뇌졸중, 뇌일혈,뇌경색, 두부손상, 뇌순환 대사장애 일 수 있다.

[0020] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물로 제조될 수 있다.

[0021] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 화합물을 단독으로 함유하거나 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다.

[0022] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 화합물 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다.

[0024] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현택제 등을 추가로 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수

있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0025] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.

[0027] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨,만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로즈 등을 포함하는 셀룰로즈류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA,1995)에 기재되어 있다.

[0029] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1㎏ 당 약 0.01㎍ 내지 1,000mg, 가장 바람직하게는 0.1㎍ 내지 100mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[0030] 본 발명의 조성물은 식품 조성물로 제조될 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 식품 조성물은 두뇌 또는 인지기능 증진이나 뇌신경질환의 예방 또는 개선 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물 형태로 제조할 수 있으며, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태의 식품에 대한 조성물을 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 후박 추출물과 황금 추출물의 혼합 조성물이 함유된 껌, 비타민 복합체, 차, 주스 및 드링크 형태로 제조할 수 있으며, 후박 추출물과 황금 추출물을 유효성분으로 하는 식품 조성물을 과립화, 캡슐화 또는 분말화하여 섭취할 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함할 수 있다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 화합물 이외에 구연산, 액상과당,설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0033] 본 발명에서 정의되는 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충진제, 안정화제 등을 포함하며 하기에 예시한다.

[0034] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 것 외에는 액체 성분에는 특별한 제한 점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예로는 예를 들어, 포도당, 과당 등의 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 등의 디사카라이드, 덱스트린, 시클로덱스트린 등의 폴리사카라이드 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨,

소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0035] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0036] 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0037] 본 발명의 조성물 중 유효성분의 바람직한 함유량으로는 식품의 전체 중량에 대하여 약 0.1~50중량%를 포함할 수 있다. 바람직하게는 0.5mg/kg/day~5mg/kg/day의 양으로 섭취하는 경우 두뇌 또는 인지기능 증진 및 뇌 신경질환 예방 효과가 나타날 수 있다.

[0038] 이하 본 발명을 설명한다.

[0039] 본 발명은 Brd2 단백질의 작용의 억제를 통해 과 발현된 염증 반응 촉진 사이토카인 유전자 및 tPA/PAI-1 체계의 억제 효과를 증명함으로써, Brd2를 뇌신경질환 치료분야에서 효과적인 치료제 후보로서 제시하고자 한다.

[0040] 본 발명은 일차 배양한 성상교세포에 LPS를 처리하여 면역 과 활성화 모델을 만들고 Brd2 siRNA에 의해 면역 반응 억제 효과가 나타나는지 확인하였다.

[0041] 본 발명은 LPS를 통해 유도한 면역반응에서 과도하게 활성화 된 PAI-1의 선택적 조절제로 Brd2가 그 역할을 할 수 있다는 가능성을 일차 배양 신경교세포 모델에서 제시하였다. 본 발명은 뇌졸중 또는 알츠하이머병과 같은 PAI-1의 과도한 발현을 동반하는 질환에서 Brd2가 새로운 치료 타겟이 될 수 있음을 나타내며, 이를 통해 해당 질환들의 새로운 치료 타겟 발굴과 신약개발에의 토대를 마련한 것으로 사료된다.

[0042] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0043] 본 발명자들은 생후 2일 된 마우스의 두뇌로부터 일차 배양한 성상교세포에 LPS를 10, 100, 1000 ng/ml의 농도로 처리한 후 24시간 배양하여 Brd2와 Brd4의 mRNA 발현 및 단백질 발현 변동을 RT-PCR과 Western blot을 통해 각각 확인하였다. LPS 처리에 의해 Brd2의 mRNA와 단백질 발현이 증가함이 확인되었으나 용량 의존적인 반응은 없었다. Brd4의 mRNA 발현변화는 없었다 (도 1 참조)

[0044] 과 발현된 Brd2를 억제하면 면역 활성화 반응이 감소하는지 확인하기 위하여 마우스 Brd2 small-interfering RNA(Brd2 siRNA) 처리 후 면역 관련 유전자의 발현 변동을 확인하였다. Brd2 siRNA 100 nM을 성상교세포에 처리하였으며, 대조군에는 Control siRNA 100 nM를 처리하였다. 처리16시간 후, media를 DMEM/F12 media와 LPS 100 ng/ml이 들어있는 DMEM/F12 media로 바꿔주었으며, 대조군에는 LPS가 없는 DMEM/F12를 넣어주었다. Media를 바꿔 준 후 24시간 뒤 Brd2와 Brd4의 mRNA 및 단백질 발현을 RT-PCR과 Western blot을 통해 확인한 결과, LPS에 의해 증가되어 있던 Brd2 mRNA와 단백질이 siRNA 처리에 의해 선택적으로 감소되어 있는 것을 확인하였으며, 이를 통해 siRNA가 잘 작용하고 있는 것을 확인하였다 (도 2 참조).

[0045] 위에서 얻은 샘플을 이용해 면역관련 유전자인 iNOS, Interleukin-6(Il-6), Interleukin-1β (Il-1β), Tumor necrosis factor-alpha(Tnf-α)의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 결과, LPS에 의해 과발현된 위 유전자들이 Brd2 siRNA에 의해 변동이 없음을 확인하였다 (도 3 참조).

[0046] 본 발명자들은 Brd2의 억제가 LPS 처리에 의한 tPA/PAI-1 체계 이상을 정상적으로 되돌려 놓는지 확인하고자 RT-PCR을 이용해 mRNA 발현을, inverse zymography를 이용해 tPA와 PAI-1 단백질의 활성을 측정하였다. 실험결과, LPS 자극에 의해 증가되었던 PAI-1 mRNA가 대조군 수준으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한 Zymography 실험을 통해 LPS에 의해 감소한 tPA 활성이 Brd2 siRNA 처리를 통해 대조군 수준으로 회복되었으며, LPS에 의해 증가한 PAI-1 활성이 Brd2 siRNA 처리를 통해 LPS처리 군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였다 (도 4 참조).

발명의 효과

[0047] 본 발명을 통하여 본 발명자들은 LPS에 의해 유도된 면역 체계 과 활성화 시 증가한 PAI-1 mRNA 및 단백질이 Brd2 발현 억제를 통해 선택적으로 감소함을 증명하였으며, 이를 바탕으로 본 발명은 PAI-1 과발현을 특징으로 보이는 뇌신경 질환에 있어서, Brd2가 치료 타겟으로서의 가능성이 있음을 밝혔다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 LPS에 의한 성상교세포 내 면역활성화 반응에 있어서 Brd2 및 Brd4의 발현 변화를나타낸 그림으로, 1a는 LPS에 의한 Brd2 및 Brd4의 mRNA 발현 변화, 1b는 LPS에 의한 Brd2의 단백질 발현 변화를 나타냄,

도 2는 Brd2 siRNA를 transfection 한 일차배양 성상교세포에서 LPS에 의한 Brd2 및 Brd4 mRNA와 단백질 발현에 대한 결과,

도 3은 Brd2 siRNA를 transfection 한 일차배양 성상교세포에서 LPS에 의한 염증 전 사이토카인 유전자의 mRNA 발현을 확인한 결과,

도 4는 Brd2 siRNA를 transfection 한 일차배양 성상교세포에서 LPS에 의한 tPA, PAI-1 의 발현 이상을 확인한 결과로, 4a는 LPS에 의한 tPA, PAI-1의 mRNA 발현 변화. 4b는 LPS에 의한 tPA, PAI-1의 단백질 활성 변화

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0050] 실시예 1: 마우스 일차 배양 성상교세포에서 LPS에 의한 Brd2의 유전자 및 단백질 발현 변동

[0051] 생후 2일령 된 마우스의 뇌로부터 배양한 성상교세포에 10, 100, 1000 ng/ml LPS를 처리하여 24 시간 배양 후 Brd2의 mRNA 및 단백질 발현을 RT-PCR 및 Western blot을 통해 확인하였다. LPS에 의해 Brd2의 mRNA 및 단백질 발현이 증가하였으며, 농도 의존적인 반응은 없었다. Brd2 관계 유전자인 Brd4의 mRNA 발현은 변화가 없었다.

[0052] 실시예 2: 과발현 된 Brd2 억제에 의한 면역 과 활성화 억제 효과에 대한 결과

[0053] 생후 2일령 된 마우스의 뇌로부터 배양한 성상교세포의 media를 FBS가 없는 serum free media로 교체하고 3시간 뒤, Dharmafect reagent 1을 이용해 control siRNA(UGGUUUACAUGUCGACUAA(서열번호 1), UGGUUUACAUGUUGUGUGA(서열번호 2), UGGUUUACAUGUUUUCUGA(서열번호 3), UGGUUUACAUGUUUUCCUA(서열번호 4))와 Brd2 siRNA(GAAACAUCGUGGCCGAAUU(서열번호 5), GAGCUUGAGCGAUAUGUUU(서열번호 6), GGAAAGGGCUCAUCGCCUA(서열번호 7), UAUCUAAGCCCAAGCGGAA(서열번호 8))를 각각 transfection 하고 16시간 동안 배양하였다. 배양 16 시간 뒤, media를 제거하고 serum free media로 교체하였으며, LPS를 처리하여 Brd2의 발현량을 RT-PCR과 Western blot을 통해 확인하였다. LPS에 의한 면역 자극을 통해 대조군에서는 Brd2의 mRNA 및 단백질 발현이 증가하였으나, Brd2 siRNA를 처리한 군에서는 Brd2의 과 발현이 억제되었다.

[0054] 실시예 3: Brd2 siRNA 처리에 의한 면역 관련 유전자 과발현 조절 효과

[0055] 상기 실시예 2에서 얻은 샘플을 이용하여 면역 관련 사이토카인 유전자 (iNOS, Il-6, Il-1β, Tnf-α)들이 발현 변동을RT-PCR 기법을 이용해 확인한 결과, Brd2 siRNA처리한 군에서도 LPS 처리에 의해 증가한 사이토카인 유전자의 발현이 지속적으로 증가되어 있는 것을 확인하였다.

[0056] 실시예 4: 과 발현 된 Brd2 억제에 의한 tPA/PAI-1 체계 정상화 효과에 대한 결과

[0057] 일차 배양한 성상교세포에서 LPS에 의해 변화 된 tPA/PAI-1 활성에 대한 Brd2 siRNA의 효과를 확인하였다.

[0058] <A> Brd2 siRNA에 의한 tPA, PAI-1 mRNA 변동

[0059] 상기 실시예 2에서 얻은 샘플을 이용하여 RT-PCR 기법을 통해 tPA, PAI-1 유전자의 발현을 확인한 결과 LPS에 의해 증가한 PAI-1 유전자의 발현이 Brd2 siRNA 처리에 의해 유의적으로 감소함을 확인하였다. tPA 유전자 발현

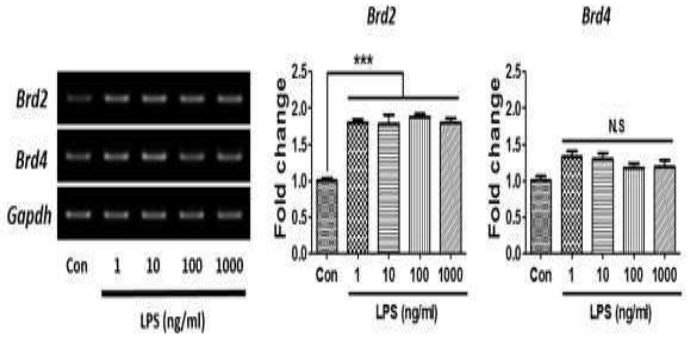
은 변화가 없었다.

[0060] <B> Brd2 siRNA에 의한 tPA, PAI-1 단백질 활성의 변동

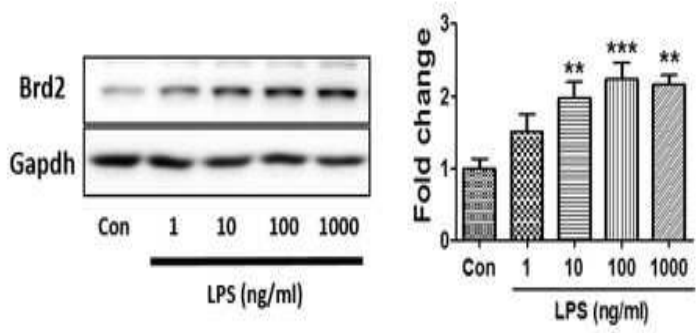
[0061] 본 발명자들은 Brd2의 억제가 LPS 처리에 의한 tPA/PAI-1 체계 이상을 정상적으로 되돌려 놓는지 확인하고자 inverse zymography를 이용해 tPA와 PAI-1 단백질의 활성을 측정하였다. 실험 결과, Zymography 실험을 통해 LPS에 의해 감소한 tPA 활성이 Brd2 siRNA 처리를 통해 대조군 수준으로 회복되었으며, LPS에 의해 증가한 PAI-1 활성이 Brd2 siRNA 처리를 통해 LPS처리 군에 비해 유의적으로 감소함을 확인하였다.

도면

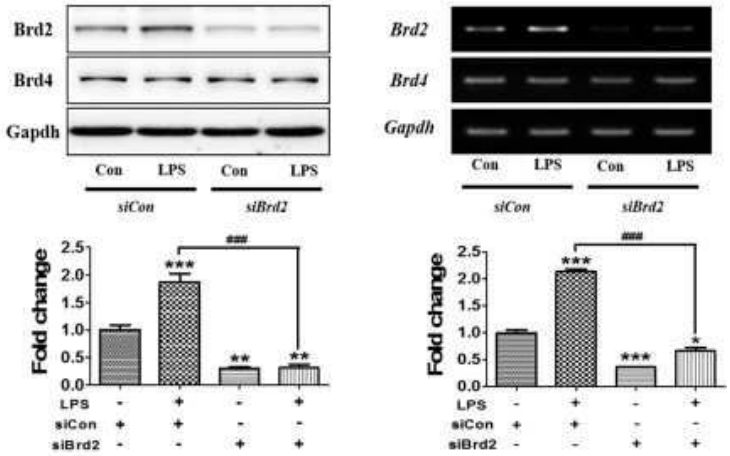
도면1a



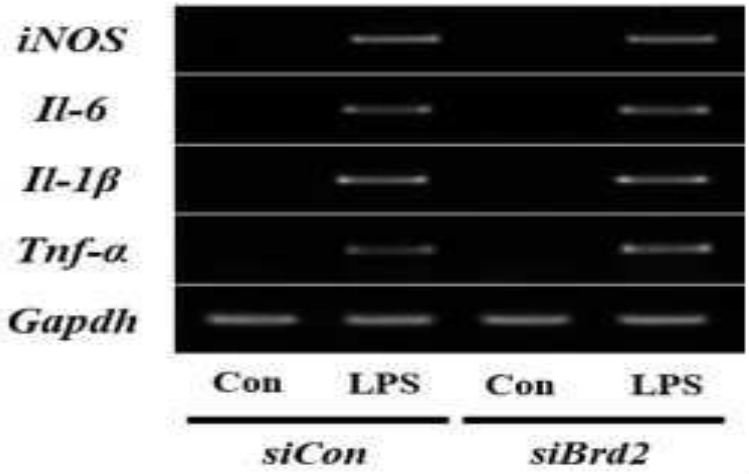
도면1b



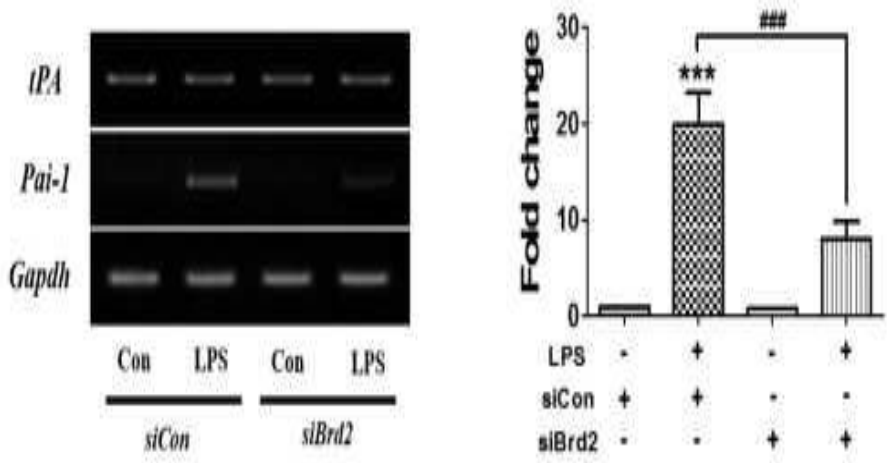
도면2


Brd2
Brd4
Gapdh
Con
LPS
Con
LPS
siCon
siBrd2
Fold change
LPS
siCon
siBrd2

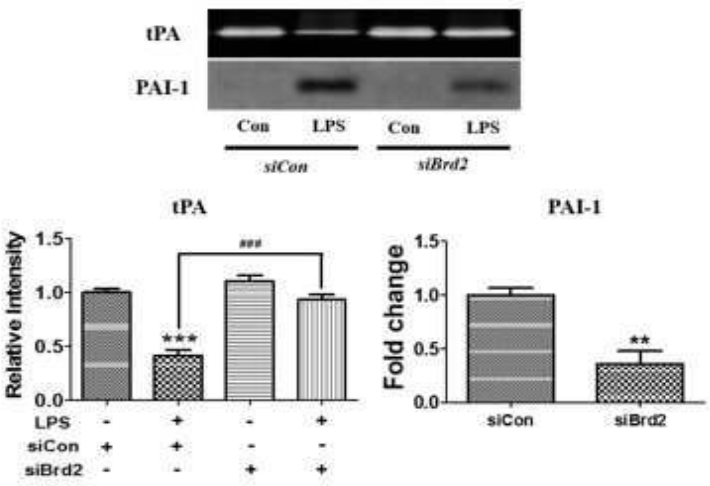
도면3


iNOS
Il-6
Il-1β
Tnf-α
Gapdh
Con
LPS
Con
LPS
siCon
siBrd2

도면4a


tPA
Pai-1
Gapdh
Con
LPS
Con
LPS
siCon
siBrd2
Fold change
LPS
siCon
siBrd2

도면4b



서 열 목 록

<110> Konkuk University Industrial Cooperation Corp

University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

Sahmyook University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Potential role of Brd2 as regulation target of Cerebral Nervous System

<130> HY150451

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 1

ugguuuacau gucgacuaa 19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 2

ugguuuacau guuguguga 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 3

ugguuuacau guuuucuga 19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 4

ugguuuacau guuuuccua 19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 5

gaaacaucgu ggccgaauu 19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 6

gagcuugagc gauauguuu 19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 7

ggaaagggcu caucgccua 19

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siRNA

<400> 8

uaucuaagcc caagcggaa 19