(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0138482
(43) 공개일자 2018년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0275 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0078755
(22) 출원일자 2017년06월21일
심사청구일자 2017년06월21일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
허영범
서울특별시 송파구 양재대로 1218 243동 901호 (방이동, 올림픽선수촌아파트)
정준양
서울특별시 동대문구 경희대로 26 경희대학교 해부학교실 (회기동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

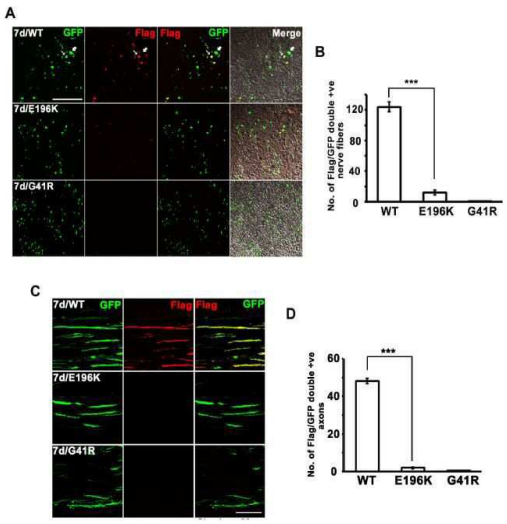
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **DI-CMTC 동물 모델 제조 방법 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 티로실-tRNA 합성효소(tyrosyl-tRNA synthetase, YARS)를 포함하는 벡터를 이용한 DI-CMTC 형 동물 모델 제조 방법에 관한 것으로, 본 발명에서 제공하는 DI-CMTC 동물 모델 제조 방법은 샤르코-마리에-투스 질환과 관련한 말초신경병증에 대한 분자해부학적 원인을 구명하는 학술적 효과를 가질 수 있으며, 샤르코-마리에-투스 질환을 치료하는 치료기술 분야의 발전에 기여할 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 9/93 (2013.01)
C12Y 601/01001 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
A01K 2217/07 (2013.01)
A01K 2267/0318 (2013.01)
C12N 2015/8536 (2013.01)
(72) 발명자
송인옥
서울특별시 중구 서애로1길 17 제일병원 산부인과

정나영
부산광역시 서구 대신공원로 32 동아대학교 구덕캠퍼스 해부학세포생물학교실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011-0030072
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 활성산소에 대한 생체반응 기초의과학 연구센터
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 티로실-tRNA 합성효소(tyrosyl-tRNA synthetase, YARS)의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 196번째 아미노산인 글루탐산(Glutamic acid)이 라이신(Lysine)으로 변이된 YARS 변이체를 발현하는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및

2) 상기 벡터를 동물에 주입하는 단계를 포함하는 우성 중간형 샤르코-마리에-투스 신경병증 C형(dominant intermediate CMT neuropathy type C, DI-CMTC) 동물 모델의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 벡터는 아데노바이러스, AAV바이러스 및 렌티바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전인자인 것인, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 2)단계는 벡터를 동물의 신경에 주입하는 것인, 제조방법.

청구항 4

티로실-tRNA 합성효소(tyrosyl-tRNA synthetase, YARS)의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 196번째 아미노산인 글루탐산(Glutamic acid)이 라이신(Lysine)으로 변이된 YARS 변이체를 발현하는 유전자 또는 이를 함유하는 벡터를 포함하는 DI-CMTC 동물 모델 제조용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 DI-CMTC 동물 모델.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 동물 모델은 좌골신경에서 변이체의 발현이 척수 또는 배근신경절의 발현보다 낮은 것인, 동물 모델.

청구항 7

1) 제5항의 DI-CMTC 동물 모델에 후보물질을 투여하는 단계; 2) 상기 1)단계의 동물 모델의 축삭과 후보물질을 투여하지 않은 대조군 동물 모델의 축삭을 비교하여 축삭 퇴행이 개선된 경우, 후보물질을 DI-CMTC 예방 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 DI-CMTC 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 티로실-tRNA 합성효소(tyrosyl-tRNA synthetase, YARS)를 포함하는 벡터를 이용한 DI-CMTC 동물 모델 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 유전성 말초 신경병은 크게 유전운동감각신경병(hereditary motor and sensory neuropathy; HMSN), 유전운동신경병(herediatary motor neuropathy; HMN) 및 유전감각신경병(herediatary sensory neuropathy; HSN)의 3가지로 구분된다. 이 중 유전운동감각신경병이 대부분을 차지하며, 이는 샤르코-마리에-투스 질환(Charcot-Marie-Tooth disease; CMT)으로 더 잘 알려져 있다. 샤르코-마리에-투스 질환은 신경전도검사상 운동신경과 감각신경에 이상이 있는 모든 유전질환을 총칭하며, 희귀질환 중 가장 높은 발병 빈도(2,500명 중 1명)를 갖는다. 과거에는 하지 원위부의 근육위축으로 인하여 샴페인 병을 거꾸로 세운 듯한 다리 모양을 하는 질환으로 비교적 단순하게 인식되어 왔으나, 현재는 단일 질환 보다는 하나의 질환군(syndrome)으로 인식되고 있다. 최근에는 CMT의 새로운 발병 기전들이 많이 밝혀져서 병태 생리학적 연구뿐만 아니라 복잡한 임상형과 유전형의 분류에 큰 도움을 주었다 (Kennerson, M. L., et al., The American Journal of Human Genetics 69.4 (2001): 883-888.).

[0004] 샤르코-마리에-투스 질환 중 하나인 우성 중간형 샤르코-마리에-투스 신경병증 C형(dominant intermediate CMT neuropathy type C, DI-CMTC)은 CMT1형과 2형의 중간형으로 신경병증의 느린 진행 속도, 중간 수준의 신경 전도속도를 나타내며 탈수초성 특징과 축삭형 신경병증의 특징을 모두 가진다.

[0005] 현재 DI-CMTC의 동물 모델은 유전자 변형 생쥐를 사용하고 있으나, 이는 수정란에 유전자를 도입하여 생쥐를 수득하는 방식으로 시간과 비용이 많이 들 뿐만 아니라 도입된 유전자가 다양한 유전적/환경적 요인에 의해 표현형이 나타나지 않는 경우도 발생하기 때문에 DI-CMTC 동물 모델을 간편하게 구축하기 위한 기술이 필요한 실정이다.

[0006] 이에 본 발명자들은 샤르코-마리에-투스 질환에 대한 맞춤형 의료기술을 개발하기 위해 노력한 결과, hYARS 단백질의 196번째 글루탐산(Glutamic acid)이 라이신(Lysine)으로 치환된 변이체 hYARS(E196K) 단백질을 발현하는 벡터가 주입된 생쥐의 좌골신경 축삭의 퇴행을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 1) 티로실-tRNA 합성효소(tyrosyl-tRNA synthetase, YARS)의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 196번째 아미노산인 글루탐산(Glutamic acid)이 라이신(Lysine)으로 변이된 YARS 변이체를 발현하는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및 2) 상기 벡터를 동물에 주입하는 단계를 포함하는 우성 중간형 샤르코-마리에-투스 신경병증 C형(dominant intermediate CMT neuropathy type C, DI-CMTC) 동물 모델의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 E196K 변이 YARS 유전자 또는 이를 함유하는 벡터를 포함하는 DI-CMTC 동물 모델 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조된 DI-CMTC 동물 모델을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 1) DI-CMTC 동물 모델에 후보물질을 투여하는 단계; 2) 상기 1)단계의 동물 모델의 축삭과 후보물질을 투여하지 않은 대조군 동물 모델의 축삭을 비교하여 축삭 퇴행이 개선된 경우, 후보물질을 DI-CMTC 예방 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 DI-CMTC 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 1) 티로실-tRNA 합성효소(tyrosyl-tRNA synthetase, YARS)의 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 196번째 아미노산인 글루탐산(Glutamic acid)이 라이신(Lysine)으로 변이된 YARS 변이체를 발현하는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및 2) 상기 벡터를 동물에 주입하는 단계를 포함하는 우성 중간형 샤르코-마리에-투스 신경병증 C형(dominant intermediate CMT neuropathy type C, DI-CMTC) 동물 모델의 제조방법을 제공한다.

[0014] 이하, 본 발명에서의 DI-CMTC형 동물 모델 제조방법을 구체적으로 설명한다.

[0015] 본 발명에서 사용되는 용어, "티로실-tRNA 합성효소(tyrosyl-tRNA synthetase, YARS)"는 tRNA의 아미노아실화를 촉매하는 효소로서 단백질 생합성에 필수적인 역할을 하는 효소이다.

[0016] 상기 YARS 단백질을 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다.

[0017] 본 발명에서 YARS는 당해 활성을 가지는 한 특별히 제한되지 않으나, N-말단으로부터 196번째 아미노산이 글루탐산인 아미노산 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 YARS는 N-말단으로부터 196번째 아미노산이 글루탐산인 아미노산 서열을 가지는 한, 아미노산 서열에 한정되지 않으나, 서열번호 1의 아미노산 서열 및 이와 80%이상, 구체적으로는 90% 이상, 더욱 구체적으로는 95% 이상, 보다 더욱 구체적으로는 97% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 이러한 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 가지는 단백질과 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 경우도 본 발명의 범위에 포함됨은 자명하다.

[0018] 본원에서 "아미노산 서열을 포함하는 단백질"은 "아미노산 서열을 가지는 단백질", 또는 "아미노산 서열로 구성되는 단백질"이라는 표현과 혼용되어 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명에서 YARS를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이라면 본 발명의 범주에 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 이와 80%이상, 구체적으로는 90%이상, 더욱 구체적으로는 95%이상, 보다 더욱 구체적으로는 97%이상의 상동성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있다. 또한, 상기 YARS를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인하여 또는 상기 YARS를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 코딩영역으로부터 발현되는 YARS의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다.

[0020] 또한, 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이드리드화하여, 상기 3-디하이드로퀴네이트 디하이드라타제, 2-디하이드로-3-데옥시포스포헵토네이트 알돌라제, 포스포에놀피루베이트 신테타제, 트랜스케톨라제 및 3-디하이드로퀴네이트 신타제 효소 단백질의 활성을 가지는 단백질을 암호화하는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0021] 본원에 사용된 용어 "상동성"은 주어진 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건(stringent condition)하에서 썼던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다. 상기에서 용어 "엄격한 조건"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 예를 들어, 이러한 조건은 문헌 (예컨대, J. Sambrook et al., 상동)에 구체적으로 기재되어 있다.

[0022] 본 발명의 YARS는 N-말단으로부터 196번째 아미노산이 글루탐산인 아미노산 서열을 가지는 한, 유래에 한정되지 않으나, 구체적으로 인간, 원숭이, 돼지, 소, 말, 양, 개, 토끼 또는 생쥐 등의 유래일 수 있으며, 더욱 구체적으로 인간 유래일 수 있다.

[0023] 본 발명의 YARS 변이체는 YARS를 구성하는 아미노산 서열에서 N-말단으로부터 196번째 아미노산이 글루탐산에서 라이신으로 변이된 YARS를 의미한다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어, “벡터(vector)”는 DNA 재조합 실험에 있어서 목적하는 DNA 단편을 숙주균 등에 도입시켜 주고 증식할 수 있는 DNA로서 클로닝 운반체(cloning vehicle)라고도 한다. 벡터는 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있다. "복제단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 말한다. 또한 목적하는 단편의 발현 조절을 위한 프로모터를 벡터에 함께 포함시킬 수 있다. 본 발명의 벡터는 YARS 변이체를 코딩하는 유전자를 가지고 있어, 상기 벡터가 목적 동물에 주입되었을 경우 YARS 변이체가 발현되어, DI-CMTC 동물 모델이 제조될 수 있다.

[0025] 상기 벡터에 포함되는 프로모터는 신경 특이적으로 발현하기를 원하는 목적 유전자의 발현을 크게 증가시킬 수 있어 본 발명의 YARS 유전자를 신경 특이적으로 발현시킬 수 있다.

[0026] 구체적으로, 본 발명의 벡터에 포함되는 프로모터는 신경 특이적 발현의 조절요소이며 콜린 특이적 인핸서와 뉴런 제한적 사일렌서 요소를 포함하는 콜린 아세틸트랜스퍼레이즈(Choline acetyltransferase, ChAT) 프로모터일 수 있다.

[0027] 상기 벡터는 예를 들어, 파지 벡터 또는 코스미드 벡터로서 pWE15, M13, MBL3, MBL4, IXII, ASHII, APII, t10, t11, Charon4A, 및 Charon21A 등을 사용할 수 있으며, 플라스미드 벡터로서 pBR계, pUC계, pBluescriptII계, pGEM계, pTZ계, pCL계 및 pET계 등을 사용할 수 있다. 구체적으로는 pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC 벡터 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 벡터는 아데노바이러스, AAV바이러스 및 렌티바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 유전인자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 상기 동물 모델 제조방법 2)단계는 상기 벡터를 동물의 신경에 주입하는 것일 수 있다. 상기 신경은 유전운동감각신경병과 관련된 신경세포라면 모두 제한 없이 포함될 수 있으나, 구체적으로 슈반 세포(schwann cell), 말초신경 축삭돌기(peripheral nerve axons), 감각/운동 신경세포체(sensory/motor nuron cell body), 척수 등/배쪽 뿔(spinal dorsal/ventral horn), 신경근접합부(neuromuscular junction), 좌골신경(sciatic nerve)일 수 있으며 더욱 구체적으로 좌골신경일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에서는 전사영역 E1 및 E3 가 이중 결실된 초나선 아데노바이러스 골격 벡터에 신경 특이적 발현을 위한 ChAT 프로모터를 삽입하고 Flag가 표지된 각각의 인간 YARS유전자(WT, E196K, G41R)를 삽입하여 상동 재조합체를 제작하였다. 또한, 상기 벡터 및 벡터에 도입된 유전자의 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 이용하여 그 발현을 확인한 결과, 각 hYARS 유전자(WT, E196K, G41R)가 도입된 벡터 모두 표지된 Flag 단백질이 검출되어 벡터가 정상적으로 기능하는 것을 확인하였다.

[0033] 본 발명에서 사용되는 용어, “우성 중간형 샤르코-마리에-투스 신경병증 C형(dominant intermediate CMT neuropathy type C, DI-CMTC)”은 샤르코-마리에-투스 질환 중 하나인 CMT1형과 2형의 중간형으로 신경병증의 느린 진행 속도, 중간 수준의 신경 전도 속도를 나타내며 탈수초성 특징과 축삭형 신경병증의 특징을 모두 가진다.

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어, “동물 모델”은 사람에서와 같이 특유한 질환의 병증을 나타내는 것이 가능한 질환 모델 동물을 통해 질환을 나타낸 질환 모델을 의미하며, 대표적인 예로 인슐린의존성 당뇨병의 모델로서 BB 쥐나 자연발증 당뇨생쥐(비비만 당뇨병생쥐, NOD mouse)가 있다.

[0035] 본 발명의 DI-CMTC 동물 모델은 도입된 본 발명의 벡터로 인해 YARS 변이체가 발현된 동물로서, 축삭의 퇴행 및 말초신경의 기능 저해를 특징으로 하는 동물일 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 실시예에서는 E196K 변이 YARS의 신경세포 특이적 발현을 확인하기 위해 면역형광염색법을 통해 신경조직(척수, 배근신경절, 좌골신경)에서 벡터 및 각각의 hYARS 유전자의 발현을 GFP와 Flag 표지로 측정한 결과, E196K군이 척수 및 배근신경절에서는 정상 발현이 되나, 좌골신경에서 발현이 되지 않는 것을 확인함으로서 E196K 변이 hYARS 유전자를 갖는 아데노바이러스 벡터를 주입한 생쥐에서 축삭 퇴행이 일어난 것을 확인하였다. 다만, 동일한 조건에서 실험한 G41R군의 경우, Flag 발현을 측정할 수 없어 축삭의 퇴행에 대해서는 확인할 수 없었다.

[0037] 본 발명의 DI-CMTC 동물 모델은 신경병증의 일환으로 축삭이 퇴행될 수 있으며 척수에 비해 말초신경의 기능이 저해될 수 있다. 따라서, 상기 동물 모델은 좌골신경에서 변이체의 발현이 척수, 배근신경절의 발현보다 낮을 수 있다.

[0038] 본 발명에서 DI-CMTC 동물 모델은 YARS 변이에 의한 DI-CMTC 동물 모델일 수 있다. YARS 변이에 의한 동물 모델 내의 유전자 프로파일은 DI-CMTC 원인 유전자 네트워크 및 발병(pathogenesis) 연구에 사용될 수 있다.

[0039] 상기 동물 모델은 DI-CMTC를 유도하여, DI-CMTC의 치료 후보 물질 또는 치료제의 효과를 판정할 수 있는, 인간을 제외한 동물을 포함할 수 있다.

[0040] 상기 동물은 이에 제한되지는 않으나, 예컨대 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 생쥐, 소, 양, 돼지, 염소 등을 포함한다. 본 발명의 일 실시예에서는 생쥐를 사용하였으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 벡터를 유리모세관 피펫을 이용하여 생쥐의 좌골신경에 미세주입하는 방법으로 DI-CMTC 질환을 유발하여 동물 모델을 제조하였다.

[0042] 본 발명에서 “주입”은 본 발명의 벡터를 동물에 도입시킬 수 있는 한 제한되지 않으며, 당업계에 통상적으로 사용되는 방법을 이용할 수 있다.

[0044] 다른 양태로서, 본 발명은 E196K 변이 YARS 유전자 또는 이를 함유하는 벡터를 포함하는 DI-CMTC 동물 모델 제조용 조성물을 제공한다.

[0045] 상기 “YARS”, “DI-CMTC”, “동물 모델”은 전술한 바와 같다.

[0047] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 DI-CMTC 동물 모델을 제공한다.

[0048] 상기 “DI-CMTC”, “동물 모델”은 전술한 바와 같다.

[0050] 또 다른 양태로서, 본 발명은 1) DI-CMTC 동물 모델에 후보물질을 투여하는 단계; 2) 상기 1)단계의 동물 모델의 축삭과 후보물질을 투여하지 않은 대조군 동물 모델의 축삭을 비교하여 축삭 퇴행이 개선된 경우, 후보물질을 DI-CMTC 예방 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 DI-CMTC 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0051] 상기 “DI-CMTC”, “동물 모델”은 전술한 바와 같다.

[0052] 본 발명에서 사용되는 용어, “후보물질(test agent)”은 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실재물(entity) 또는 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 이들로 한정되지는 않으나, 단백질, 폴리펩티드, 소 유기분자(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함한다. 또한, 천연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다.

[0053] 본 발명의 후보물질은 이에 제한되지는 않으나, 예컨대 말초신경의 수초 이상 또는 축색의 손상을 완화시키거나, 예방, 지연시킬 수 있는 모든 물질을 포함한다.

[0054] 상기 후보물질을 투여하는 방법으로는 경구 투여, 정맥 투여, 스와빙(swabbing), 피하 투여, 피내 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장 투여 또는 복강 투여 등이 이용될 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 실험 동물의 증상 또는 후보물질의 성질 등에 맞추어 적당히 선택할 수 있다. 또한, 후보물질의 투여 시기나 투여 회수 등의 투여 조건은 후보물질의 성질, 시험 및 평가 목적 등에 따라 적절하게 최적이 되도록 설정하면 되며 특별히 제한되지 않는다. 예컨대, 투여 시기에 대해서는 모델 동물 제작 직후부터 30분 마다 수회 투여한 후, 그 다음 1시간 마다 수회 투여하고, 그때마다 증상의 변화를 관찰, 평가하는 방법이 많이 이용된다. 투여 회수에 대해서는 후보물질의 성질에 따라 다르고, 1회 이상 수회가 될 수도 있다. 본 발명의 모델 동물을 이용한 후보물질의 스크리닝 방법은 원하는 목적을 달성시키는 방법이면 어떠한 방법을 이용할 수도 있다

[0055] 본 발명에서 사용된 용어, “대조군”은 상기 후보 물질이 처리되지 않은 동물 모델을 의미한다.

[0056] 본 발명에서 사용되는 용어, “축삭”은 신경세포의 축색소구에서 나오는 돌기상의가늘고 긴 신경섬유이며, 원형질의 축삭형질을 중심으로, 쉬반 세포(Schwann's cell)로 이루어지는 나선상의 신경초가 그 주위를 둘러싸는

구조를 이루고 있다. 신경세포에서 일어난 활동전위를 그 말초에 전달한다.

[0057] 상기 축삭 퇴행은 손과 발의 근육 위축으로 인한 근력 저하 및 형태 변화를 표현형으로 나타낼 수 있는 것으로, 후보물질을 동물 모델에 투여시 손과 발의 근력 저하 또는 형태 변화가 개선된 경우 상기 후보물질을 DI-CMTC 예방 또는 치료제로 선별할 수 있다.

[0058] 이러한 스크리닝 방법에 의하여 얻어진 물질은 이후의 DI-CMTC 예방 또는 치료제 개발 과정에서 선도 물질(leading compound)로 작용하게 되며, 선도 물질을 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 신경병증의 예방 또는 치료제를 개발할 수 있다.

[0059] 따라서, 본 발명에 따른 스크리닝 방법은 인간을 포함하는 동물의 DI-CMTC와 관련된 생리학적, 분자생물학적, 생화학적 연구의 수행에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0061] 본 발명에서 제공하는 DI-CMTC 동물 모델 제조 방법은 샤르코-마리에-투스 질환과 관련한 말초신경병증에 대한 분자해부학적 원인을 구명하는 학술적 효과를 가질 수 있으며, 샤르코-마리에-투스 질환을 치료하는 치료기술 분야의 발전에 기여할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 제조된 각각의 아데노바이러스 프로모터 및 발현 유닛(YARS WT, E196K, G41R)의 도식화를 나타낸다.

도 2는 웨스턴 블롯을 통해 분석된 아데노바이러스 감염 생쥐의 좌골 신경 유래 단백질 용해물을 나타낸다 (Con, 바이러스 없음; WT, hYARS 야생형; (-), ChAT 프로모터가 없는 빈 바이러스; E, E196K 변이 hYARS; (+) ChAT 프로모터를 가진 빈 바이러스; G, G41R 변이 hYARS.)

도 3은 척수 내 hYARS 단백질의 분포 패턴을 나타낸다; (A) GFP 발현(녹색) 및 Flag의 면역형광 표지(적색)를 이용한 척수 절편 내 야생형 hYARS의 신경 특이적 발현; 황색은 적색 및 녹색 신호가 겹쳐진 것을 의미한다. GFP/Flag 이중 양성 신호는 척수 내 Flag 표지된 hYARS 융합 단백질의 발현을 의미한다 (Empty, 삽입되지 않은 빈 바이러스; WT, 야생형; E196K, E196K변이 hYARS; G41R, G41R 변이 hYARS; 척도: 500㎛), (B) 척수 내 E196K와 G41R 변이 hYARS 발현 결과를 확대한 사진 (척도: 100㎛.)

도 4는 좌골신경 내 hYARS 단백질의 신경 특이적 발현을 나타낸다; (A) GFP 발현(녹색) 및 Flag의 면역형광 표지(적색)를 이용한 좌골신경 횡단면 내 hYARS 단백질의 신경 특이적 발현; 황색은 Flag 표지된 hYARS 융합 단백질에 의해 적색 및 녹색 신호가 겹쳐진 것을 의미한다 (GFP/Flag 이중 염색, 가는 화살표), 두꺼운 화살표는 Flag 발현이 없는 GFP 발현 신경 섬유를 표시한다 (척도: 40㎛), (B) 300 × 300 μm^2 확대 면적에서의 GFP/Flag 이중 양성 신경 섬유의 정량 (P***<0.0001, 야생형(n=5)과 비교한 유의성), (C) 좌골신경의 횡단면 내 감염된 야생형 유전자, E196K, G41R 변이에서 항-Flag 항체를 포함하는 면역형광 단계; 황색은 Flag 표지된 hYARS 융합 단백질에 의해 적색 및 녹색 신호가 겹쳐진 것을 의미한다 (척도: 50㎛), (D) 야생형 및 변이 내 Flag/GFP 이중 양성 액손의 수; 300 × 300 μm^2의 면적에서 측정을 진행하였다 (P***<0.0001; n=5).

도 5는 배근신경절(DRG) 신경세포체 내 Flag 표지된 hYARS 융합 단백질의 발현을 나타낸다; (A) 배근신경절 신경세포체 내 Flag 표지된 hYARS 융합 단백질의 발현. DRG 내 Flag(적색) 및 GFP(녹색) 발현의 면역형광 분석을 나타냄 (척도: 40㎛), (B) 전체 아데노바이러스에서 Flag/GPF 이중 양성 DRG 뉴런의 백분율; 300 × 300 μm^2 확대 면적에서의 정량.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0066] **실시예 1. 실험동물의 준비**

[0067] 모든 실험에 사용된 6주령의 C57BL/6 생쥐는 습도 및 온도가 조절되며 물과 음식을 자유롭게 섭취할 수 있는 환경에서 사육되었다. 모든 동물 실험 절차 및 희생은 대한의학회의 가이드라인 및 경희대학교 동물 연구 위원회의 승인 (KHUASP[SE]-16-043)에 의해 진행되었다.

[0069] **실시예 2. 신경 특이적 재조합 아데노바이러스 제작**

[0070] YARS의 E196K 및 G41R 변이체를 가진 아데노바이러스를 제작하기 위해, 본 발명은 신경 특이적 발현의 조절요소이며 콜린 특이적 인핸서와 뉴런 제한적 사일렌서 요소(neuron-restrictive silencer element, NRSE)를 포함하는 생쥐 콜린 아세틸트랜스퍼레이즈(Choline acetyltransferase, ChAT) 프로모터(Gene bank 번호 NC_000080)를 사용하였다. 추가로, pAD Track-ChAT-CMV/GFP 벡터에 들어가는 인간 티로실-tRNA 합성효소(human tyrosyl-tRNA synthetase, hYARS) 클론이 사용되었다. 재조합을 위해 전사 영역 중 E1 및 E3이 이중 결실된 초나선 아데노바이러스 골격 벡터(pADEasy-1, Stratagene; Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 야생형 hYARS(서열번호 1)가 삽입된 pADTrack-ChAT-hYARS^{WT}-CMG/GFP, E196K 변이체를 포함하는 hYARS가 삽입된 pADTrack-ChAT-hYARS^{E196K}-CMG/GFP, 및 G41R 변이체를 포함하는 hYARS가 삽입된 pADTrack-ChAT-hYARS^{G41R}-CMG/GFP의 안정된 상동 재조합체가 생성되었다. 실험에 사용된 역가는 각각 Ad/ChAT 6.3 × 109 (pfu/mL), AdhYARS^{WT}/ChAT 4.8 × 109 (pfu/mL), AdhYARS^{E196K}/ChAT 4.3 × 109 (pfu/mL), AdhYARS^{G41R}/ChAT 7.1 × 109 (pfu/mL)이다.

[0072] **실시예 3. DI-CMTC 동물 모델 제조**

[0073] 모든 생쥐들은 졸레틸(Vibrac; Carrors Seedees, France) 30mg/kg 및 롬푼(Bayer; Leverkusen, Germany) 10mg/kg을 이용하여 마취시켰다. 대둔근 표면(musculus gluteus superficialis)의 절개를 통해 좌골신경(sciatic nerve)을 노출시켰으며, 입체경을 이용하여 해밀턴 주사기와 유리 마이크로피펫을 통해 좌골신경에 재조합 아데노바이러스를 주입하였다. 0.1%의 fast green(트레이서)을 포함하는 AdhYARS^{WT}/ChAT (1㎕), AdhYARS^{E196K}/ChAT (1㎕), AdhYARS^{G41R}/ChAT (1㎕)의 희석된 바이러스 용액이 각 동물의 좌골신경에 주입되었으며, 절개된 피부는 Silkam 4.0 sutures를 이용하여 봉합하였다.

[0075] **실시예 4. 동물 조직 적출**

[0076] 바이러스 투여 7일 후, 생쥐에서 좌골신경, L4/L5 배근신경절(DRG), 척수를 적출하였다. 조직 시료는 면역조직화학(immunohistochemistry) 과정을 위해 0.1M 인산 완충액(PB) 내에 준비된 4% 파라포름알데히드(PFA)를 이용하여 4℃에서 밤새 고정되었다. 그 후, 0.1M PB 내의 30% 자당(sucrose)으로 옮겨져 3일간 침지하였으며, 최종적으로 OCT 화합물(Leica Biosystems Richmond, Inc. USA)에 끼워넣었다. 시료는 드라이 아이스를 사용하여 얼렸으며 동결절편(16㎛)으로 잘려 젤라틴 코팅된 유리슬라이드에 배치하였다. 인산완충식염수를 사용하여 좌골신경초(sciatic nerve sheaths)를 제거하였다. 척수의 경우, L_4-L_6 부분을 잘라내었다 (등쪽 뿔(dorsal horn) 및 배쪽 뿔(ventral horn)).

[0078] **실험예 1. hYARS 유전자 발현 확인을 위한 웨스턴 블롯 분석**

[0079] 단백질 용해물을 분리하기 위해 생쥐의 베타-액틴(1:5000, Sigma; St. Louis, MO, USA)과 rabbit anti-Flag(1:1000, Cell Signaling Technology) 일차 항체를 이용하여 10% 도데실 황산 나트륨 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 절차가 진행되었다. 일차 항체 염색을 진행한 후, Tween 20을 포함하는 트리스 완충 식염수(tris-buffered saline with Tween 20, TBST)에서 3회 세척한 다음, 일차 항체와 어울리는 horseradish peroxidase(HRP)-결합 이차 항체 염색을 진행하였다. 그 후, 화학 발광 증폭 (enhanced chemiluminescence, ECL) 절차(Amersham; Buckinghamshire, England)를 적용하여, SDS-PAGE를 위한 막을 완성하였다.

[0080] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 아데노바이러스 벡터에 삽입된 야생형과 E196K 및 G41R 변이 hYARS 유전자

에 표지된 Flag가 모두 발현한 것을 확인하여 벡터가 정상적으로 hYARS 유전자를 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

[0082] **실험예 2. 면역형광염색법을 이용한 발현 확인**

[0083] **2-1. 척수 내 hYARS 단백질의 발현 분석**

[0084] 면역형광염색을 위해, 젤라틴 코팅된 유리슬라이드에 배치된 조직 절편을 4% PFA에 10분간 고정시킨 후 PBS에 3회 세척하였다. 세척한 조직은 0.3% Triton-X 100을 포함하는 PBS에서 투과시켰다. 그 후, 4℃에서 밤새 10% 소혈청 알부민 (BSA)으로 차단하였다. 다음으로, 슬라이드를 일차 항체로 사용된 rabbit anti-flag (1:1000, Cell Signaling Technology; Danvers, MA, USA)에서 한 시간 동안 상온에 배양한 후, PBS에 3회 세척하였다. 그 후, 시료는 Alexa-Fluor 594 donkey anti-rabbit secondary antibody (1:1000, Invitrogen, Life Technologies; Madison, WI, USA)에 상온에서 두 시간 동안 침지한 후 PBS로 3회 세척하고 고정 겔을 이용하여 고정되었다. 슬라이드의 면역형광을 찾기 위해 레이저 현미경(LSM 700, Carl Zeiss; Oberkochen, Germany)이 사용되었다.

[0085] 그 결과, 도 3A에 나타난 바와 같이, 모든 실험군에서 GFP 표지를 통해 척수 내 발현이 되어 아데노바이러스 벡터가 정상적으로 기능한 것을 확인할 수 있다. 그러나 Flag 표지의 경우, 아데노바이러스 벡터 내 hYARS 유전자의 발현 유무를 확인할 수 있는 표지로서 hYARS유전자가 없는 음성대조군(Empty)를 제외한 야생형, E196K군, G41R군이 유전자를 가지고 있으나 G41R군은 발현이 일어나지 않은 것을 확인할 수 있다. 도 3B에서도 마찬가지로 E196K에서는 Flag 표지의 발현을 확인할 수 있으나, G41R에서는 발현하지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0087] **2-2. 좌골신경 내 hYARS 단백질의 발현 분석**

[0088] 실험예 2-1과 동일한 방법으로 분석을 진행하였다.

[0089] 그 결과, 도 4A 및 4C에 나타난 바와 같이, 모든 실험군에서 GFP는 좌골신경 내 발현이 나타나 아데노바이러스 벡터가 정상적으로 기능한 것을 확인하였다. 그러나 Flag 표지의 경우, G41R은 발현이 일어나지 않았으며, E196K에서도 발현이 거의 일어나지 않은 것을 확인할 수 있다. 이를 정량화하여 나타낸 도 4B 및 4D를 통해 발현의 정도를 자세히 확인할 수 있다.

[0091] **2-3. 배근신경절(dorsal root ganglia) 내 hYARS 단백질의 발현 분석**

[0092] 실험예 2-1과 동일한 방법으로 분석을 진행하였다.

[0093] 그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, 모든 실험군에서 GFP는 배근신경절 내 발현이 나타나 아데노바이러스 벡터가 정상적으로 기능한 것을 확인하였다. 그러나 Flag 표지의 경우, 야생형과 E196K군은 발현을 나타내고 있으나 G41R군은 발현이 일어나지 않은 것을 확인하였다.

[0094] 상기 실험예 2-1 내지 2-3의 결과를 종합해보면, 야생형의 경우, 척수, 좌골신경, 배근신경절 모두에서 GFP/Flag 이중 양성을 나타내어 아데노바이러스 벡터와 hYARS유전자가 정상적으로 기능함을 보여주었다. 그러나 G41R군의 경우, GFP는 모든 신경 부위에서 확인이 가능하지만 Flag는 확인되지 않아, hYARS의 G41R 아미노산 변이에 의해 발현이 저해됨을 확인하였다. E196K군의 경우, 척수 및 배근신경절에서는 GFP/Flag 이중 양성을 나타내었으나 좌골신경에서는 Flag의 발현이 매우 낮은 것을 확인하였다. 이는 주 신경에서는 정상 발현을 하지만 주변 신경에서는 발현하지 않는 것이므로, 뉴런 부분에서 문제가 생긴 것으로 판단가능하며, 특히 배근신경절 내에서는 발현한 유전자가 신경 섬유에서 발현하지 않은 것은 축삭의 기능에 문제가 생긴 것인바, 이는 축삭 퇴행을 의미한다.

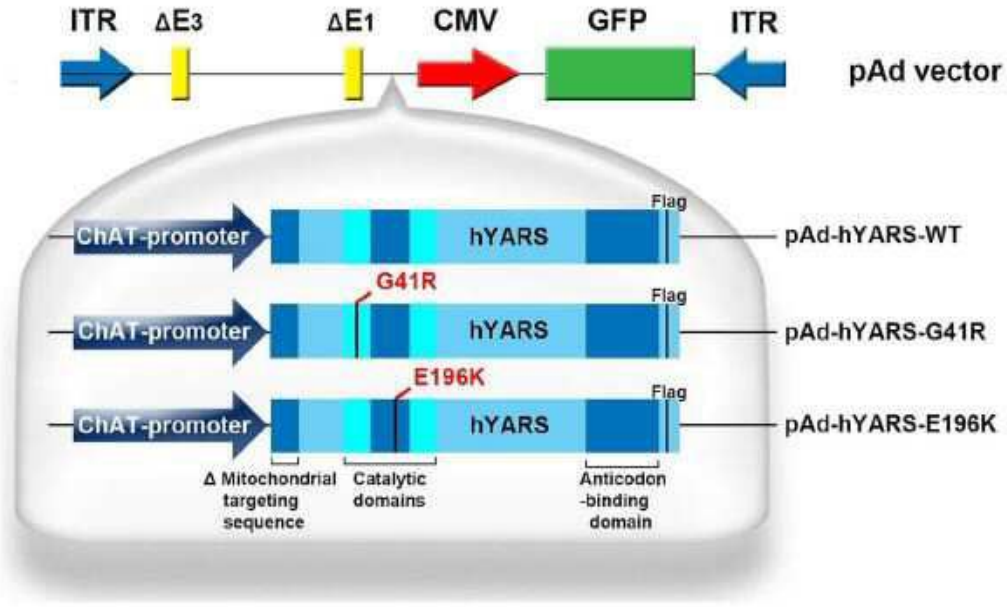
[0095] 이를 통해, G41R 변이 hYARS 유전자와 달리, E196K 변이 hYARS 유전자를 동물의 신경에서 발현시키는 경우, DI-CMTC 동물 모델을 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

[0097] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서

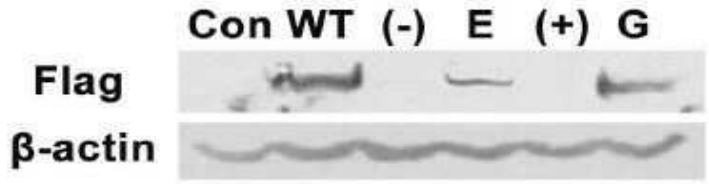
기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

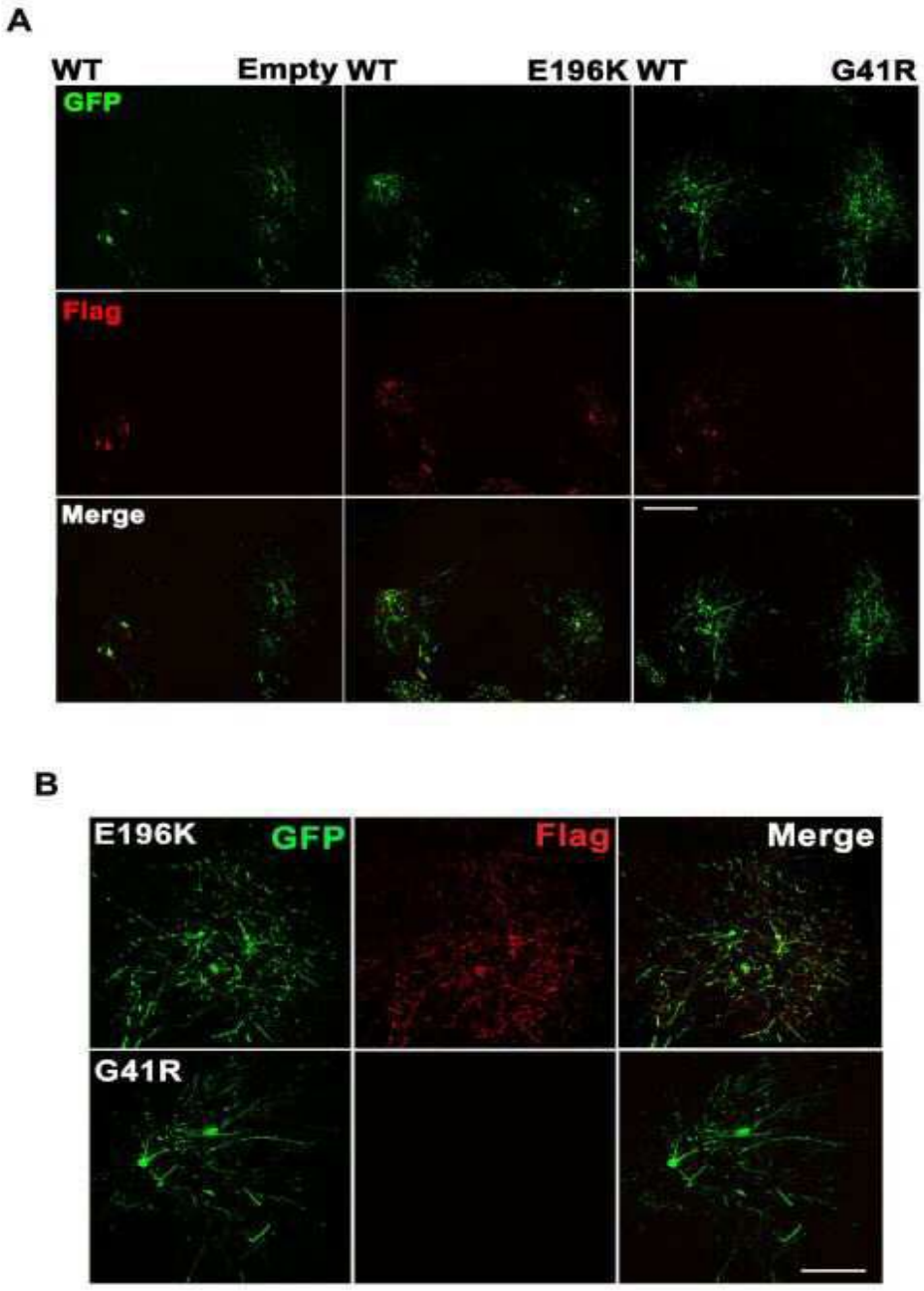
도면1



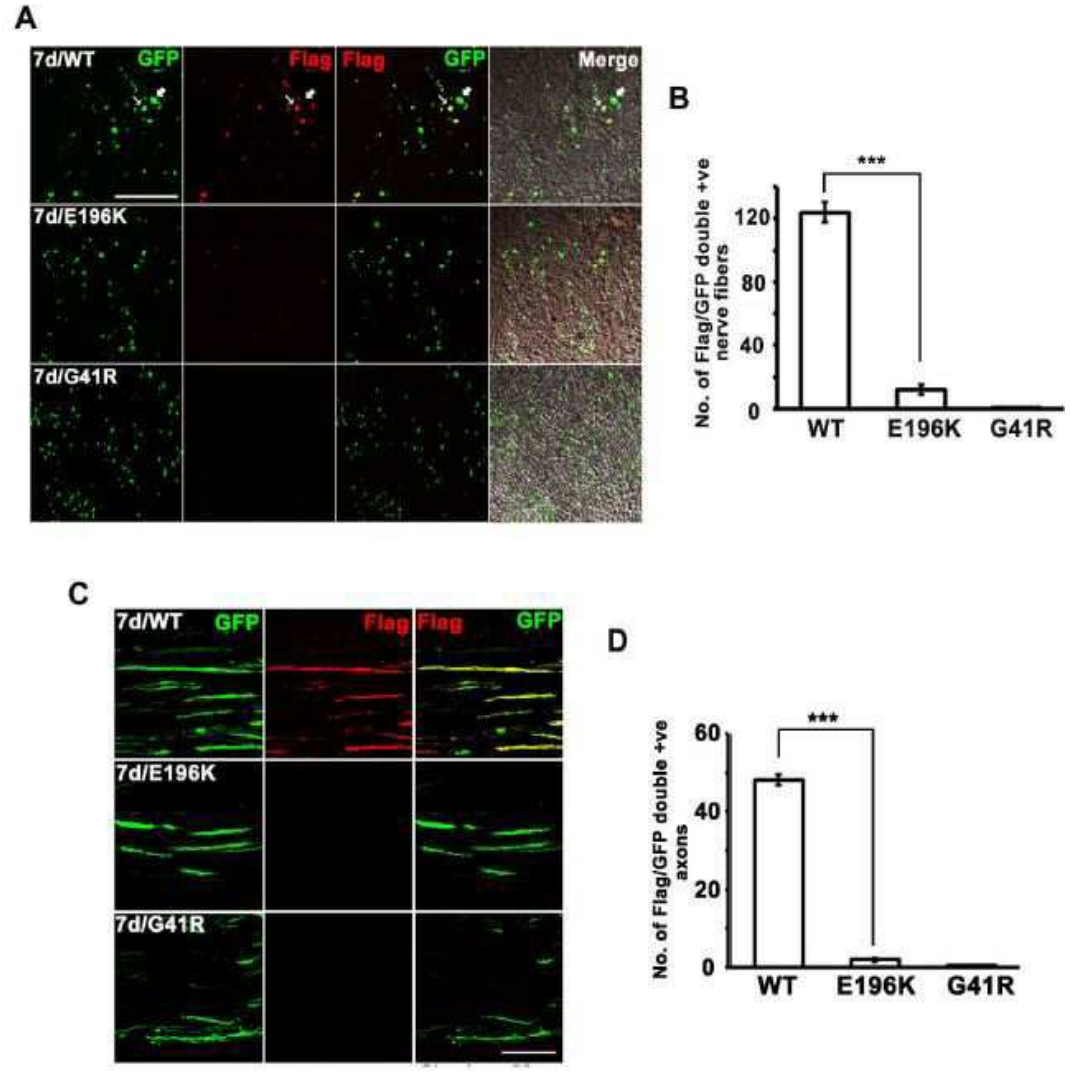
도면2



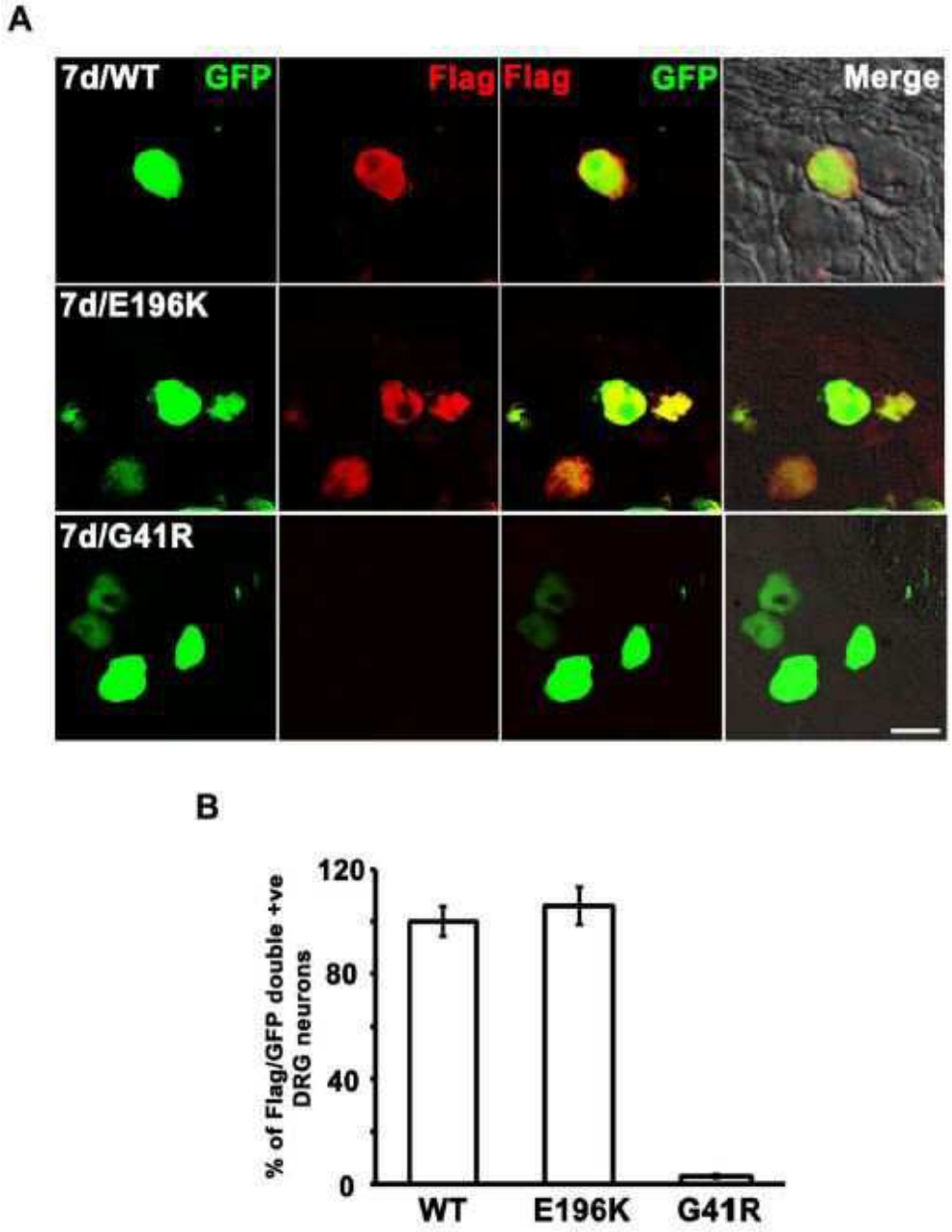
도면3


A
WT
Empty WT
E196K WT
G41R
GFP
Flag
Merge
B
E196K
GFP
Flag
Merge
G41R

도면4


A
7d/WT
GFP
Flag
Flag
GFP
Merge
7d/E196K
7d/G41R
B
No. of Flag/GFP double +ve nerve fibers
120
80
40
0
***
WT
E196K
G41R
C
7d/WT
GFP
Flag
Flag
GFP
7d/E196K
7d/G41R
D
No. of Flag/GFP double +ve axons
60
40
20
0
***
WT
E196K
G41R

도면5



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Producing method of dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease type C animal model and uses thereof

<130> KPA170084-KR

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 528

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg
1 5 10 15

Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys
20 25 30

Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro
35 40 45

His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys
50 55 60

Ala Gly Cys Glu Val Thr Ile Leu Phe Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Asp Asn Met Lys Ala Pro Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr
85 90 95

Tyr Glu Asn Val Ile Lys Ala Met Leu Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu
100 105 110

Glu Lys Leu Lys Phe Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Glu
115 120 125

Tyr Thr Leu Asp Val Tyr Arg Leu Ser Ser Val Val Thr Gln His Asp
130 135 140

Ser Lys Lys Ala Gly Ala Glu Val Val Lys Gln Val Glu His Pro Leu
145 150 155 160

Leu Ser Gly Leu Leu Tyr Pro Gly Leu Gln Ala Leu Asp Glu Glu Tyr
165 170 175

Leu Lys Val Asp Ala Gln Phe Gly Gly Ile Asp Gln Arg Lys Ile Phe
180 185 190

Thr Phe Ala Glu Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val
195 200 205

His Leu Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser
210 215 220

Ser Ser Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp

225 230 235 240

Val Lys Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu
245 250 255
Asn Asn Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys
260 265 270
Ser Glu Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr
275 280 285
Tyr Thr Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val
290 295 300
His Pro Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu

305 310 315 320
Leu Asp Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu
325 330 335
Ala Ser Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys
340 345 350
Gly Pro Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu
355 360 365
Asp Ile Arg Val Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala
370 375 380

Asp Ser Leu Tyr Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg
385 390 395 400
Thr Val Val Ser Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu Glu Leu Gln
405 410 415
Asp Arg Leu Val Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln Lys Met Arg
420 425 430
Gly Val Glu Ser Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile Glu Gly Ile
435 440 445
Asn Arg Gln Val Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser Ala Pro Gly

450 455 460
Glu His Val Phe Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro Asp Glu Glu
465 470 475 480

Leu Lys Pro Lys Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala Asp Phe Lys
485 490 495
Ile Ser Glu Glu Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn Phe Met Thr
500 505 510
Lys Leu Gly Ser Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly Asn Ile Ser
515 520 525