



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0061184
(43) 공개일자 2021년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0149075

(22) 출원일자 2019년11월19일

심사청구일자 2019년11월19일

(71) 출원인

경북대학교 산학협력단

대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

(72) 발명자

석경호

대구광역시 수성구 동원로 123, 205동 1705호

박재용

서울특별시 성북구 안암로 145, B동 556

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

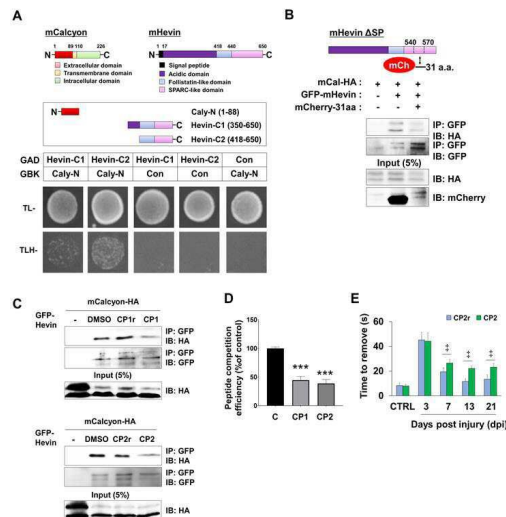
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 Calcyon 및 Hevin의 결합 조절제를 유효성분으로 포함하는 시냅스 형성 장애에 의한 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 Calcyon 및 Hevin의 결합 조절제를 유효성분으로 포함하는 시냅스 형성 장애에 의한 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서는 Calcyon과 Hevin이 상호 결합하여 시냅스 형성을 조절하는 것을 확인하였으며, Calcyon과 Hevin의 상호 결합 억제제 또는 상호 결합 촉진제는 비정상적인 시냅스의 형성을 억제하거나 시냅스의 형성을 촉진시킬 수 있는 바, 시냅스 형성 장애에 의한 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 시냅스 형성 조절 물질 스크리닝 방법, 시냅스 형성 조절용 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
C07K 14/00 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
G01N 2500/02 (2013.01)

김중헌

대구광역시 중구 달구벌대로443길 25-23

황은미

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

(72) 발명자

정현국

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

류훈

서울특별시 성북구 화랑로14길 5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711082484
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발사업
연구과제명	분비단백 및 광유전학 기반 뇌염증 진단 및 제어기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경북대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 3으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 Calcyon과 Hevin의 상호 결합을 억제하는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

Calcyon과 Hevin의 상호 결합을 억제하는 결합 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 결합 억제제는 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드인 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 결합 억제제는 Calcyon 및 Hevin 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA), Calcyon 및 Hevin 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 펩타이드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 신경질환은 시냅스 형성 장애에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 3항에 있어서, 상기 신경질환은 조현병, 뇌전증 및 신경병증성 통증으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

Calcyon과 Hevin의 상호 결합을 촉진하는 결합 촉진제를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 결합 촉진제는 Calcyon 및 Hevin 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 펩타이드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 신경질환은 시냅스 형성 장애에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제 8항에 있어서, 상기 신경질환은 자폐증 및 치매로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 신경질환의

예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

신경질환이 의심되는 대상체로부터 분리된 시료에 후보 약물을 처리하는 제 1단계;

상기 후보 약물의 투여 전과 후의 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 수준을 측정하는 제 2단계; 및

정상 대조군 시료와 비교하여 상기 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 수준을 증가시키거나 감소시키는 후보 약물을 선별하는 제 3단계;

를 포함하는 시냅스 형성 조절 물질 스크리닝 방법.

청구항 13

제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 시냅스 형성 조절용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Calcyon 및 Hevin의 결합 조절제를 유효성분으로 포함하는 시냅스 형성 장애에 의한 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Calcyon은 중추 신경계에서 발현되는 단일 막관통 단백질(single transmembrane protein)로, 뉴런 수상돌기(neuronal dendrites)와 수상돌기 가지(dendritic spines)에서 막 세포 내 구획에 위치한다. 비인간 영장류 및 설치류에서 Calcyon은 인지적 수행 기능(공간 주의, 전환 능력, 작업 기억 및 의사 결정)을 증대하는 전두엽 피질을 포함하여 여러 뇌 영역에서 높게 발현되며, 반대로 설치류의 선조체에서 Calcyon의 발현은 상대적으로 낮은 것으로 알려져 있다. Calcyon은 시냅스 가소성(synaptic plasticity)의 중요한 구성요소인 클라트린 매개 세포 내 이입(clathrin mediated endocytosis)과 관련되어 있다. 또한, Calcyon 유전자는 신경계 발달과 기능에 중요한 유전자로, 특히 조현병, 양극성 정동장애, 주의력 결핍 등과 관련성이 매우 높은 것으로 알려져 있다. Calcyon의 발현이 증가된 마우스에서는 과도한 행동 양상, 불안장애, 기억력 감퇴 등의 이상 행동을 보이며, Calcyon이 결핍된 마우스에서는 과도한 AMPA 수용체의 활성화로 인해 장기 기억 형성이 손상되는 것이 보고된 바 있다.

[0003] 한편, Hevin(SPARCL1)은 흥분성 시냅스의 시냅스 틈새에 위치하는 당단백질로 흥분성 시냅스를 연결하는 중요한 역할을 수행한다. Hevin은 신경계 발달 시기에 높게 발현되어 시냅스 형성을 촉진하고, 성체 신경계에서는 대뇌 피질 등의 뇌 부위에서 주로 발견되며 시냅스 항상성과 관련된 기능을 수행한다. Hevin의 하향 조절은 우울증, 조현병 등과 같은 신경장애와 관련되어 있고, Hevin 유전자 돌연변이는 자폐증 관련 유전자 107개 중 35번째로 고위험 유전자로 알려져 있다. 또한, Hevin은 뇌 손상 후 활성화된 성상교세포에서 발현이 증가되며, 흥분성 시냅스의 형성 시기 및 시냅스 성숙을 조절하는 것으로 알려져 있다. 흥분성 시냅스의 발달과 신경장애의 잠재적 연관성에 대한 Hevin의 근본적인 역할에도 불구하고 Hevin가 시냅스의 생성을 유도하는 방법은 현재까지 알려진 바가 없다.

[0004] 흥분성 시냅스의 밀도 조절은 신경정신학적 질병과 관련성이 매우 높다. 특히, 뇌 손상 후 흥분성 시냅스 밀도의 불균형은 발작, 뇌전증, 초조, 공격적 행동, 불안장애, 우울증 및 조증 등의 행동장애를 유발할 수 있다. 이에, 뇌 손상 후 시냅스 형성 장애에 의해 유발되는 질환 치료에 있어서 Calcyon 및 Hevin의 활용은 새로운 대안이 될 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0375018호 (2003.02.22. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 억제 펩타이드를 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 시냅스 형성 조절 물질 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 시냅스 형성 조절용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 Calcyon과 Hevin의 상호 결합을 억제하는 결합 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 Calcyon과 Hevin의 상호 결합을 촉진하는 결합 촉진제를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 신경질환이 의심되는 대상체로부터 분리된 시료에 후보 약물을 처리하는 제 1단계; 상기 후보 약물의 투여 전과 후의 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 수준을 측정하는 제 2단계; 및 정상 대조군 시료와 비교하여 상기 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 수준을 증가시키거나 감소시키는 후보 약물을 선별하는 제 3단계;를 포함하는 시냅스 형성 조절 물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 시냅스 형성 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에서는 Calcyon과 Hevin이 상호 결합하여 시냅스 형성을 조절하는 것을 확인하였으며, Calcyon과 Hevin의 상호 결합 억제제 또는 상호 결합 촉진제는 비정상적인 시냅스의 형성을 억제하거나 시냅스의 형성을 촉진시킬 수 있는 바, 시냅스 형성 장애에 의한 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 시냅스 형성 조절 물질 스크리닝 방법, 시냅스 형성 조절용 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 효모 단백질 잡종법을 이용한 단백질 결합 확인 방법을 모식도로 나타낸 것이다.

도 2A는 Calcyon과 Hevin의 상호 결합을 확인한 결과이고, 도 2B는 Calcyon이 수용체로서 작용하는 것을 확인한 결과이며, 도 2C는 Calcyon 또는 Hevin 녹다운에 의한 시냅스 수의 감소를 확인한 결과이며, 도 2D는 Calcyon 또는 Hevin 녹다운에 의한 행동학적 회복도 감소를 확인한 결과이다.

도 3A는 Calcyon과 Hevin의 단편 펩타이드(Hevin-C1, Hevin-C2)의 상호 결합을 확인한 결과이고, 도 3B는 Hevin 단편 펩타이드(31CP)에 의한 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 억제를 확인한 결과이며, 도 3C는 재합성된 CP1 및 CP2에 의한 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 억제를 확인한 결과이며, 도 3D는 CP1 및 CP2의 상호 결합 억제도를 비교한 결과이며, 도 3E는 CP2에 의한 행동학적 회복도 감소를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 발명자들은 Calcyon과 Hevin이 상호 결합하고, 상기 상호 결합이 국소 뇌 손상 마우스 모델에서 시냅스의 수 및 행동학적 회복도를 조절하는 것을 확인한 바, 상기 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 억제제 또는 상호 결합 촉진제는 비정상적인 시냅스의 형성을 억제하거나 시냅스의 형성을 촉진하여 시냅스 형성 장애에 의한 신경질환 치료에 활용이 가능함을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

- [0019] 이에, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.
- [0020] 상기 펩타이드는 Calcyon과 Hevin의 상호 결합을 억제하여 시냅스 형성을 조절할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 Calcyon과 Hevin의 상호 결합을 억제하는 결합 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0023] 상기 결합 억제제는 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드일 수 있으며, 또는 Calcyon 및 Hevin 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA), Calcyon 및 Hevin 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 펩타이드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0024] 상기 신경질환은 시냅스 형성 장애에 의해 유도되며, 상기 신경질환은 조현병, 뇌전증 및 신경병증성 통증으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 Calcyon과 Hevin의 상호 결합을 촉진하는 결합 촉진제를 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 결합 촉진제는 Calcyon 및 Hevin 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩타이드, 펩타이드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0028] 상기 신경질환은 시냅스 형성 장애에 의해 유도되며, 상기 신경질환은 자폐증 및 치매로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0030] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 신경질환이 의심되는 대상체로부터 분리된 시료에 후보 약물을 처리하는 제 1단계; 상기 후보

약물의 투여 전과 후의 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 수준을 측정하는 제 2단계; 및 정상 대조군 시료와 비교하여 상기 Calcyon과 Hevin의 상호 결합 수준을 증가시키거나 감소시키는 후보 약물을 선별하는 제 3단계;를 포함하는 시냅스 형성 조절 물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 시냅스 형성 조절용 조성물을 제공한다.

[0038] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0040] 실시예 1: 플라스미드 제조 및 shRNA 제작

[0041] 마우스 hevin(GenBank accession no. NM_010607)과 Calcyon(NM_008430)을 발현하는 cDNA는 연쇄중합효소 반응법을 응용한 게이트웨이 클로닝 방법(gateway cloning method, Invitrogen)을 이용하여 획득하였다. Hevin과 calcyon의 돌연변이체는 EZchange site-directed mutagenesis kit(Enzymomics)를 이용하여 획득하였고, 제작된 플라스미드는 pDEST-GFP-N(#31796, Addgene), pDEST-HA-C(#15506, Addgene) 및 pDEST-mCherry-N(#31907, Addgene)에 게이트웨이 클로닝 시스템(gateway cloning system)을 이용하여 클론으로 제작하였다. Hevin과 Calcyon의 돌연변이체는 EZchange site-directed mutagenesis kit(Enzymomics)를 이용하여 획득하였다. Hevin과 Calcyon의 shRNA는 타겟 서열(mouse Hevin: 5'-gcagctttatgaaccaaacc-3', mouse Calcyon: 5'-ggacacgagagagaagaaga-3', Calcyon shRNA-insensitive form: 5'- agataccagggaaggaggga-3')을 이용하여 ADDGENE으로 부터 구입한 pSicoRmCherryempty vector(#21907)에 scrambled(Sc), Hevin, Calcyon에 대한 shRNA 서열을 삽입하였다. Calcyon shRNA-insensitive form은 Calcyon KD에 대한 rescue 용도로 제작하였다. DNA 서열분석을 통하여 정확한 서열이 삽입된 것을 확인한 다음, U6 promoter-loxP-shRNA-CMV-mCherry-loxP에 해당하는 서열을 PCR 방법으로 증폭하였다. 증폭된 서열은 MluI과 EcoRI 부위를 절단하는 효소를 사용하여 pAAV-MCS(Stratagene, USA)에 삽입하였다. DNA 서열분석으로 서열을 다시 확인한 다음, KIST virus facility에 의뢰하여 고농도(high titer)의 재조합 AAV 바이러스를 제작하였다. 간략하게, jetPEI(101-10N, Polyplus)를 이용하여 발현 벡터(expression vector)와 패키징 벡터(packaging vector)를 AAV 293 세포(632273, Clontech)에 공동 형질주입(co-transfection) 하였다. 형질주입 후 72시간 동안 획득된 바이러스를 HEK293T 세포에 감염시켜 형광 발현 여부를 확인하였다. 획득된 바이러스는 CsCl gradient 방법을 이용하여 순수 정제하였다. 대조 실험용으로 무작위 서열을 가진 shRNA(Scr)를 이용하였다.

[0043] 실시예 2: 효모 단백질 잡종법(yeast two hybridization assay)

[0044] 도 1에 나타난 바와 같이, Calcyon의 N-말단부는 GAL4 DNA binding domain(BD)을 코딩하는 pGBKT7[트립토판(tryptophan) 발현 가능, cat. no. 630443, TaKaRa]에 접합시켰고, Hevin의 C-말단부 또는 N-말단부는 activation domain(AD)을 발현하는 pGADT7[류신(Leucine) 발현 가능, cat. no. 630442, TaKaRa]에 접합시켰다. AH109 효모를 상기 두 플라스미드로 형질전환(transformation)한 뒤 mating하고, 트립토판과 류신이 결핍된 배지(TL-)를 이용하여 두 플라스미드를 발현하는 효모만 살아남게 하였다. 단백질 상호 결합을 확인하기 위해, 히스티딘(H)이 결핍된 배지(TLH-)에 배양하여 단백질의 상호 결합이 있을 경우에만 히스티딘을 합성할 수 있게 함으로써 생존할 수 있게 하였다.

[0046] 실시예 3: 세포 배양

[0047] HEK293T 세포는 한국 세포주은행(Seoul National University)에서 분양받았으며, 10% 우태아혈청(Invitrogen) 및 100 units/ml의 페니실린-스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지(Invitrogen)를 이용하여 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0049] **실시예 4: 면역세포화학염색법**

[0050] Calcyon의 N-말단 또는 C-말단에 헤마글루티닌(hemagglutinin; HA)이 결합된 플라스미드를 HEK293T 세포에 발현시켰다. 계면활성제를 넣은 버퍼(permeable)와 넣지 않은 버퍼(non-permeable)에 HA에 대한 항체(monoclonal mouse anti-HA, sc-7392, Santacruz)를 희석하여 세포와 12시간 동안 반응시킨 후 형광이 표지된 2차 항체(FITC conjugated anti-mouse)와 반응시켰다. DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 모든 세포의 핵을 염색하여 배경염색으로 사용하였다.

[0052] **실시예 5: 광혈전 유도 뇌 손상 마우스 모델**

[0053] 성체 C57BL/6 마우스(생후 8주)를 이소플루레인(3~5% for induction, 1~1.5% for maintaining in a 70% N₂O/30% O₂ mixture)로 마취 후 로즈벵갈(Rose bengal; 100 mg/kg)을 복강 주사하였다. 10분 뒤 녹색 레이저(540 nm, 20 mW)를 직경 약 2 mm로 입체 정위기구를 이용하여 감각 운동 대뇌피질 위치(대뇌 정중앙으로부터 우측 1.5 mm)에 20분간 조사하였다.

[0055] **실시예 6: AAV-shRNA 바이러스의 뇌 주입**

[0056] 뇌 손상 24시간 후 마우스를 이소플루레인으로 마취시킨 뒤 입체 정위기구를 이용하여 대뇌 정중앙 기준점을 기준으로 우측 1.5 mm에 3 mm의 구멍을 만든 다음, 3 μ l의 AAV-shRNA 바이러스를 micro-injector(Thomas Scientific, USA)를 통해 주입하였다.

[0058] **실시예 7: Hevin-Calcyon 결합에 대한 경쟁적 저해 펩타이드 제작**

[0059] Hevin의 1-650 아미노산 중 540-570 아미노산에 대한 서열(RSKVKKIYLDEKRLLAGDHPIELLLRDFKKN)을 가진 재조합 단백질 mCherry-31 아미노산(31CP)을 제작하였고, 보다 짧은 형태인 RSKVKKIYLDEKRL의 펩타이드(CP1)와 IELLLRDFKK의 펩타이드(CP2)를 펩타이드 합성 전문 회사(Pepton, 대한민국)에 의뢰하여 제작하였다. 이에 대한 대조 펩타이드로서 CP1 및 CP2 펩타이드의 서열 순서를 반대로 제작한 reverse 펩타이드 LRKEDLYIKKVKSR(CP1r)과 KKFDRLLLEI(CP2r)를 제작하였다.

[0061] **실시예 8: Hevin-Calcyon 결합에 대한 경쟁적 저해 펩타이드의 뇌 주입**

[0062] 뇌 손상 후 7일째에 마우스를 이소플루레인으로 마취시킨 뒤 입체 정위기구를 이용하여 대뇌 정중앙 기준점을 기준으로 우측 1.5 mm에 3 mm의 구멍을 만든 다음, ALZET Brain infusion kit 1(Alzet, #0004760)과 micro-osmotic pump(Alzet, 1007D)를 이용하여 경쟁적 저해 펩타이드를 주입하였다.

[0064] **실시예 9: 신경 행동 검사**

[0065] 대뇌의 감각운동능을 확인하기 위해 adhesive removal test(tape test)를 수행하였다. 작은 테이프(0.35 X 0.45 cm)를 마우스 앞 발바닥에 부착시키고 케이지에 둔 다음 120초 동안 관찰하여 테이프를 제거하는 시간을 측정하였다.

[0067] **실시예 10: 면역침강법**

[0068] HEK293T 세포를 용해 버퍼(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF 및 1% NP-40, protease inhibitor cocktail)로 용해한 뒤 면역결합체 protein A/G PLUS Agarose(Santa Cruz Biotechnology)와 항-GFP 항체(1:200, B-2; Santa Cruz Biotechnology)를 이용하여 냉장 상태에서 24시간 동안 면역 반응하였다. 용해 버퍼로 3회 세척한 후 단백질을 10% 또는 15% SDS-PAGE 겔에서 분리하고, PVDF(polyvinylidene fluoride) 막으로 이동시켰다. 항-HA 항체(1:1000)와 항-GFP 항체(1:1000)와 반응시킨 후 HRP가 접합된 항-랫드 항체, 항-마우스 IgG 항체와 반응시켰으며, ECL(enhanced chemo-luminal; Amersham Biosciences)를 이용하여 면역 반응

성을 관찰하였다.

[0070] 실험예 1: Hevin과 Calcyon의 상호 결합

[0071] Hevin과 Calcyon의 상호 결합 여부를 확인하기 위해, Hevin의 N-말단부(acidic domain, 아미노산 서열 위치 1-417) 또는 C-말단부(아미노산 서열 위치 418-650) 및 Calcyon의 N-말단부(extracellular domain, 아미노산 서열 위치 1-88)를 효모에 발현하여 효모 단백질 잡종법으로 상호 결합을 확인하였다. 그 결과, 도 2A에 나타낸 바와 같이, TLH- 배지에서 Calcyon의 N-말단부와 Hevin의 C-말단부를 발현시킨 경우에만 효모가 생존하는 것을 관찰하였고, 즉, 두 단백질이 상호 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[0072] Calcyon이 수용체로 작용하는지 여부를 확인하기 위해, Calcyon의 N-말단 또는 C-말단에 헤마글루티닌(hemagglutinin; HA)를 결합하여 면역세포화학법으로 염색을 수행하였다. 항체가 세포막을 투과하지 못하게 계면 활성제를 넣지 않고 세포 표면에 있는 HA 항원을 염색한 결과, 도 2B에 나타낸 바와 같이, Calcyon의 N-말단이 염색되어 세포 밖에 위치하는 것을 확인할 수 있었다.

[0073] 다음으로 마우스에 국소적인 뇌 손상을 유발시킨 뒤 AAV 바이러스를 이용하여 Calcyon과 Hevin 유전자를 각각 녹다운 시킨 마우스(Caly KD, Hevin KD)와 스크램블(Scr)을 발현시킨 마우스의 운동 회복도를 비교한 결과, 도 2C에 나타낸 바와 같이, 회복되는 시냅스 수가 대조군(Scr)에 비해 감소되고, shRNA Caly에 의한 Caly 유전자의 녹다운을 shRNA Caly insensitive form을 이용하여 회복시킨 경우 시냅스의 감소가 저해되는 것을 확인하였다. 또한, 각 유전자의 녹다운은 도 2D에 나타낸 바와 같이, 뇌 손상 후 행동학적 회복도가 대조군(Scr)에 비해 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0075] 실험예 2: Hevin과 Calcyon의 상호 결합 억제 펩타이드

[0076] Hevin의 단편 펩타이드가 Hevin과 Calcyon의 상호 결합을 억제하는지 여부를 확인하기 위해, Calcyon의 N-말단부 및 Hevin의 단편 펩타이드인 C1(Hevin C-terminal peptide 1, 아미노산 서열 위치 350-650) 또는 C2(Hevin C-terminal peptide peptide 2, 아미노산 서열 위치 418-650)를 효모에 발현하여 효모 단백질 잡종법으로 상호 결합을 확인하였다. 그 결과, 도 3A에 나타낸 바와 같이, Calcyon의 N-말단부와 Hevin-C1 또는 Hevin-C2 펩타이드가 서로 상호 결합하는 것을 확인하였다. 즉, 상기 결과로부터 Calcyon의 N-말단부와 Hevin의 C 말단부가 상호 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[0077] 또한, 도 3B에 나타낸 바와 같이, Hevin C-말단부의 31개의 아미노산에 상응하는 단백질인 mCherry-31 펩타이드(31CP)에 의해 Hevin과 Calcyon의 결합이 억제되는 것을 공동면역침강법으로 확인하였으며, 도 3C에 나타낸 바와 같이, mCherry-31 펩타이드보다 짧은 재조합 펩타이드인 CP1(Competitive peptide 1) 또는 CP2(Competitive peptide 2)가 Hevin(GFP-Hevin)과 Calcyon(mCalcyon-HA)의 상호 결합을 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 도 3D에 나타낸 바와 같이, CP1에 비해 CP2의 상호 결합 억제도가 더 우수한 것을 확인하였다.

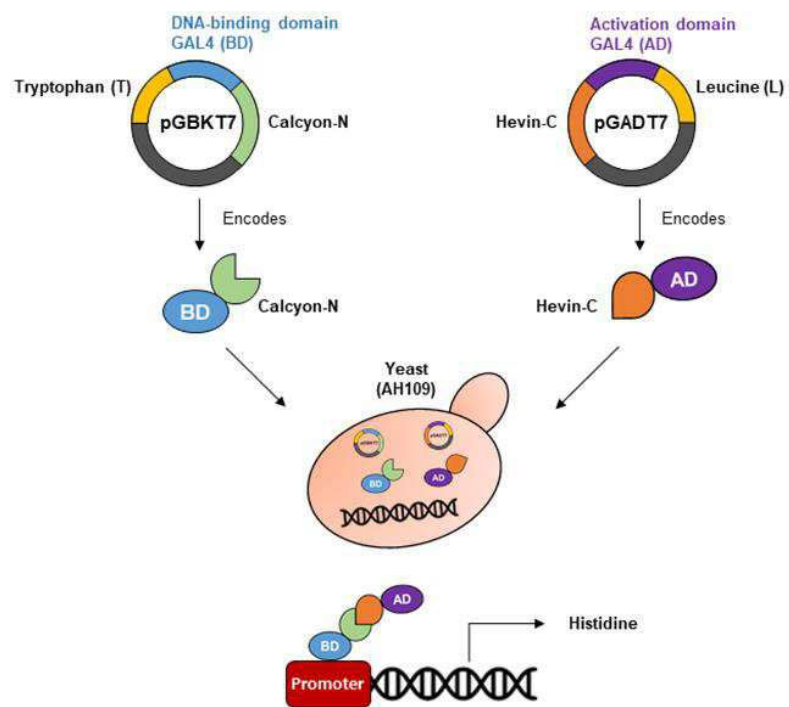
[0078] 다음으로 마우스에 국소적인 뇌 손상을 유발시켜 앞다리의 감각과 운동 조절을 담당하는 뇌 부위를 손상시킨 뒤 CP2 펩타이드를 국소 주사한 결과, 도 3E에 나타낸 바와 같이, 회복 시기에 발바닥의 테이프를 제거하는 시간이 대조군(CP2r)에 비해 지연되는 것으로 보아 행동학적 회복도가 저해되는 것을 확인하였다.

[0080] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

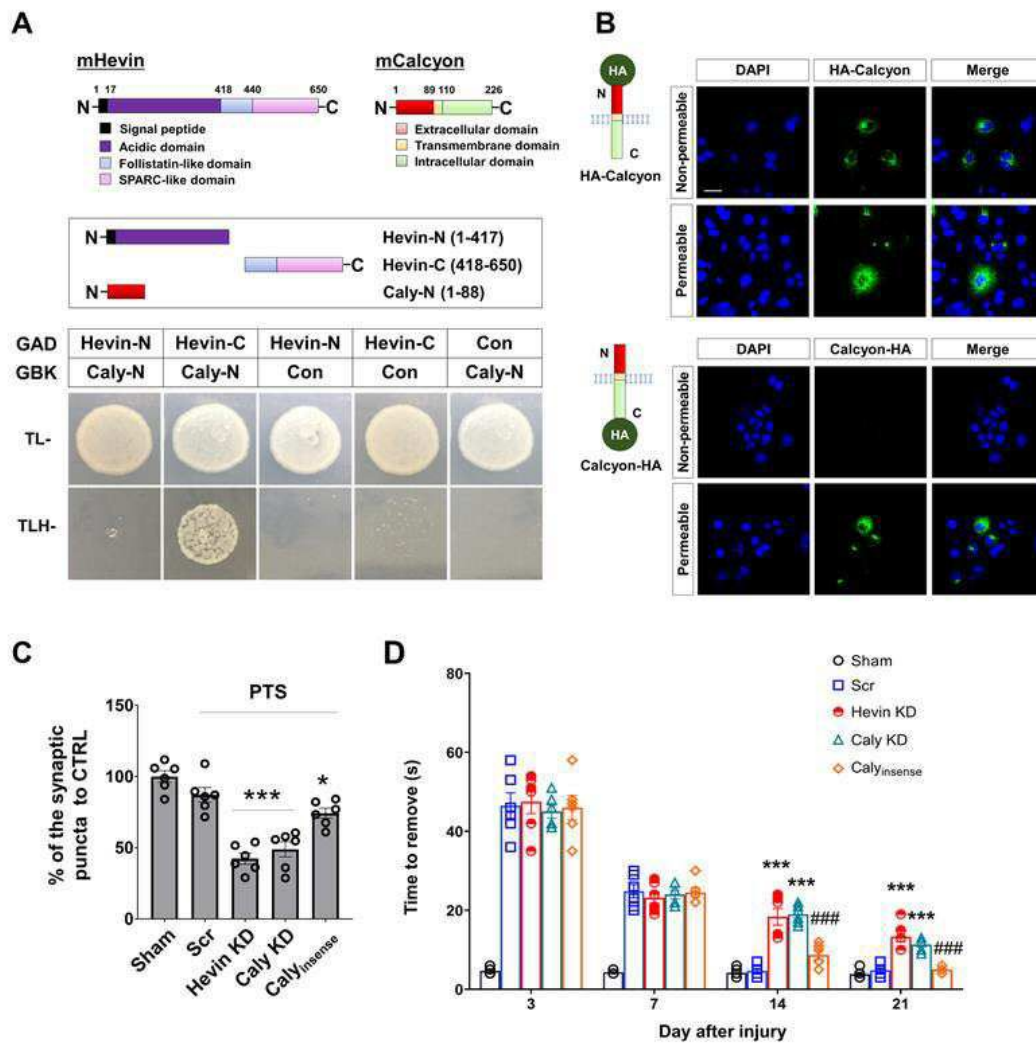
[0081] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

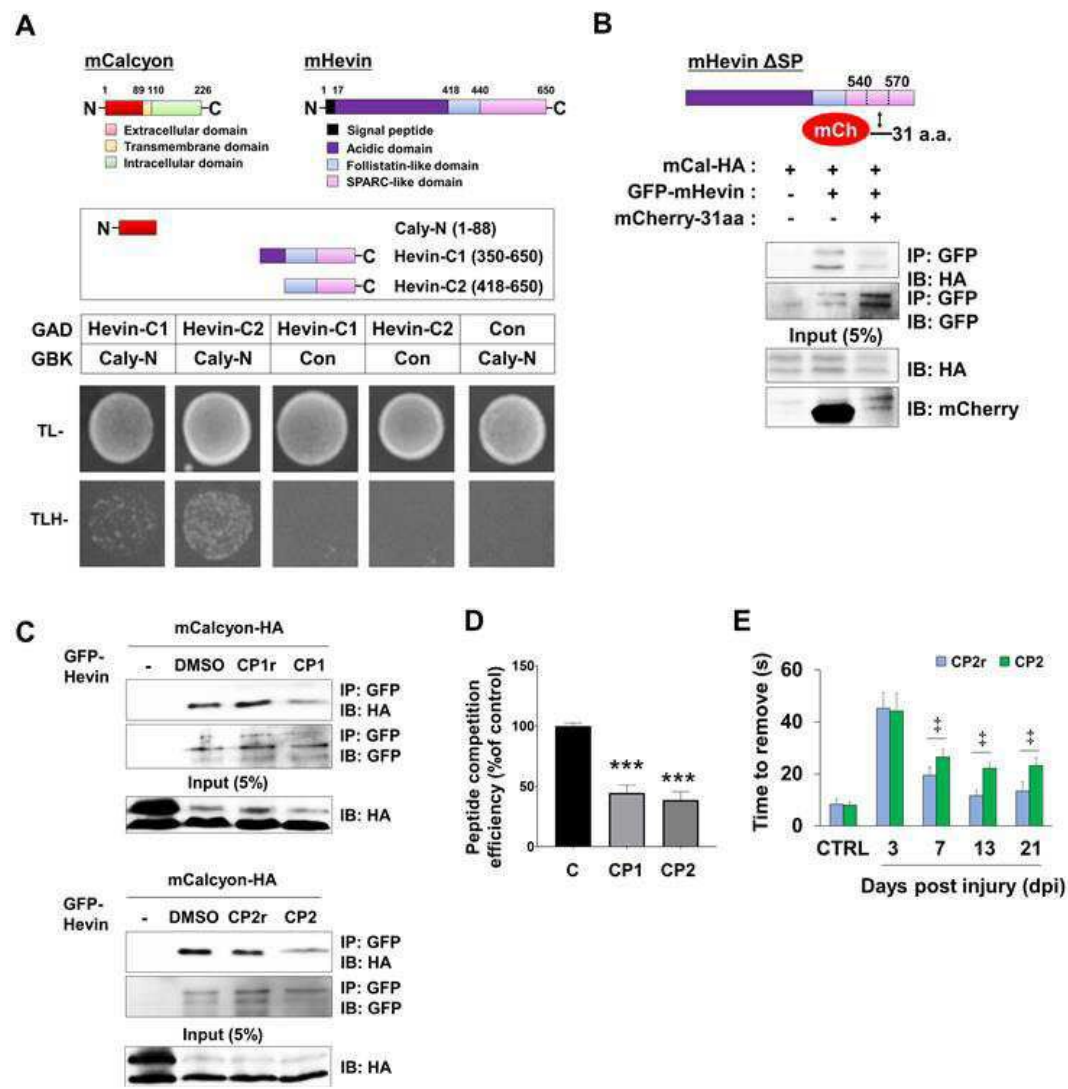
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for preventing or treating neurological disorders
induced by synaptic formation dysfunction comprising binding
modulator of Calcyon and Hevin
- <130> ADP-2019-0187
- <160> 3
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 1

<400> 1

Arg Ser Lys Val Lys Lys Ile Tyr Leu Asp Glu Lys Arg Leu Leu Ala

1 5 10 15

Gly Asp His Pro Ile Glu Leu Leu Leu Arg Asp Phe Lys Lys Asn

20 25 30

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 2

<400> 2

Arg Ser Lys Val Lys Lys Ile Tyr Leu Asp Glu Lys Arg Leu

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 3

<400> 3

Ile Glu Leu Leu Leu Arg Asp Phe Lys Lys

1 5 10