

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0022802 (43) 공개일자 2017년03월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 31/185</i> (2017.01) <i>A61K 31/13</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>A61K 31/185</i> (2013.01) <i>A61K 31/13</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0118267 (22) 출원일자 2015년08월21일 심사청구일자 없음		(71) 출원인 삼성전자주식회사 경기도 수원시 영통구 삼성로 129 (매탄동) 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 이윤일 경기도 용인시 수지구 죽전로27번길 14-30, 602동 1302호 (죽전동, 꽃매마을한라프로방스아파트) 김수현 경기도 안산시 단원구 광덕서로 43, 108동 202호 (고잔동, 단원마을아파트) (뒷면에 계속) (74) 대리인 리엔목특허법인

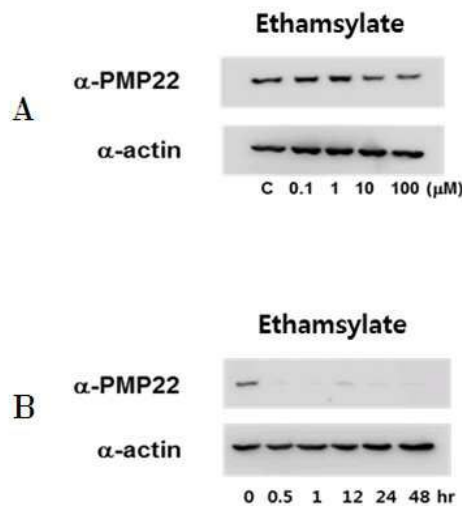
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 2,5-디히드록시벤젠술포산을 포함하는 신경세포의 수초화를 촉진하기 위한 조성물 및 그의 용도

(57) 요약

포유동물에서 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진시키기 위한 또는 탈수초화를 억제하기 위한 조성물, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기 위한 조성물, 포유동물의 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 방법, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 방법 및 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박해철

경기도 안산시 단원구 광덕동로 26, 108동 1101호
(고잔동, 고잔1차푸르지오아파트)

박상철

경기도 성남시 분당구 궁내로67번길 11, 206동 10
1호 (궁내동)

명세서

청구범위

청구항 1

2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물에서 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 질환은 PMP22의 과발현과 연관된 질병인 것인 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 질환은 다발경화증 (multiple sclerosis), 급성 감염성 다발성신경염 (Guillain-Barre Syndrome), 샤르코 마리 투스병 (Charcot Marie Tooth: CMT), 데제린-쉴타병(Dejerine-Sottas disease), 또는 압박마비 유전신경병(hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: HNPP)인 것인 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 CMT는 CMT1A 서브타입, CMT1E 서브타입, 또는 CMT3 서브타입인 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 디에틸아민 2,5-디히드록시벤젠술포네이트인 것인 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 신경세포는 PMP22를 과발현하는 것인 조성물.

청구항 7

2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진시키기 위한 또는 탈수초화를 억제하기 위한 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 신경세포는 PMP22의 과발현에 의하여 탈수초화되고 있거나 탈수초화된 상태인 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 신경세포는 PMP22를 과발현하는 것인 조성물.

청구항 10

2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기 위한 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 포유동물에서 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, PMP22의 과발현과 연관된 질병을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물인 것인 조성물.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 질환은 다발경화증 (multiple sclerosis), 급성 감염성 다발성신경염 (Guillain-Barre Syndrome), 샤르코 마리 투스병 (Charcot Marie Tooth: CMT), 데제린-숏타병(Dejerine-Sottas disease), 또는 압박마비 유전신경병(hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: HNPP)인 것인 조성물.

청구항 14

신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하여, 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 탈수초화는 PMP22의 과발현에 의하여 야기된 것인 방법.

청구항 16

청구항 14에 있어서, 상기 질환은 샤르코 마리 투스병 (Charcot Marie Tooth: CMT), 데제린-숏타병(Dejerine-Sottas disease), 또는 압박마비 유전신경병(hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: HNPP), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 또는 감염성 다발성신경염 (Guillain-Barre Syndrome)인 것인 방법.

청구항 17

포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제하기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하여, 포유동물에서 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 것에 의하여 탈수초화와 연관된 질병을 치료하는 것인 방법.

청구항 19

청구항 17에 있어서, 상기 신경세포는 PMP22의 과발현에 의하여 탈수초화되고 있거나 탈수초화된 상태인 것인 조성물.

청구항 20

포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하여, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

포유동물에서 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진시키기 위한 또는 탈수초화를 억제하기 위한 조성물, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기 위한 조성물, 포유동물의 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 방법, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 방법 및 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탈수초 질환 (demyelinating disease)은 뉴런의 수초 (myelin sheath)가 손상되는 신경계의 질환을 나타낸다. 이 손상은 손상된 신경의 신호 전달을 감소시킨다. 차례로, 이 전달 감소는 감각 (sensation), 운동 (movement), 인지 (cognition), 또는 신경에 의존하는 다른 기능의 감소를 야기시킨다. 상기 질환은 중추신경계에 영향을 주는 것과 말초신경계에 영향을 주는 것을 포함할 수 있다. 상기 말초신경계 탈수초 질환은 급성 감염성 다발성신경염 (Guillain-Barre Syndrome) 및 샤르코 마리 투스병 (Charcot Marie Tooth: CMT) 등을 포함한다. 상기 중추신경계 탈수초 질환은 다발경화증 (multiple sclerosis)을 포함한다. 현재 아스코르브산이 말초신경병증 동물모델에서는 효과가 있으나 임상시험에서 효과가 없는 것으로 확인되어 근본적 치료제가 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 일 양상은 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 억제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물에서 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공한다.

[0004] 다른 양상은 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 억제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진시키기 위한 또는 탈수초화를 억제하기 위한 조성물을 제공한다.

[0005] 다른 양상은 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 억제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기 위한 조성물을 제공한다.

[0006] 다른 양상은 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 억제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하여, 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0007] 다른 양상은 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제하기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 억제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하여, 포유동물에서 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 방법을 제공한다.

[0008] 다른 양상은 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 억제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하여, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 제1 양상은 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 억제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물에서 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공한다.

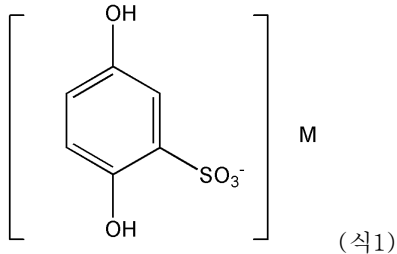
[0010] 제2 양상은 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 억제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진시키기 위한 또는 탈수초화를 억제하기 위한 조성물을 제공한다.

[0011] 제3 양상은 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 억제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기 위한 조성물을 제공한다.

[0012] 제1, 2, 및 3 양상에 있어서, 상기 2,5-디히드록시벤젠술폰산은 그의 억제학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있다. 상기 염은 약학 분야, 예를 들면 탈수초 질환 분야에서 사용되는 통상의 산 부가염, 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 술폰산, 인산 또는 질산과 같은 무기산으로부터 유도된 염 및 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 시트르산, 말레산, 말론산, 메탄술폰산, 타르타르산, 말산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔술폰산, 옥살산 또는 트리플루오로아세트산과 같은 유기산으로부터 유도된 염을 포함한다. 또한, 상기 염은, 암모늄, 디메틸아민, 모노메틸아민, 모노에틸아민, 디에틸

아민과 같은 염기 부가 염일 수 있다. 또한, 상기 염은 통상의 금속 염 형태, 예를 들면 리튬, 소듐, 칼륨, 마그네슘, 또는 칼슘과 같은 금속으로부터 유도된 염을 포함한다. 상기 산 부가염, 염기 부가염 또는 금속염은 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들면, 염기 부가염 또는 금속염은 2,5-디히드록시벤젠설포산의 이온 형태 즉, 2,5-디히드록시벤젠설포네이트를 적절한 염기 (예, 디에틸아민) 또는 금속 이온 (예, 칼슘, 또는 소듐) 과 반응시킴으로써, 얻어질 수 있다. 상기 염의 일 예는 디에틸아민 2,5-디히드록시벤젠설포네이트 (이하 "에탐실레이트(ethamsylate)"라고도 한다.)이다.

[0013] 상기 2,5-디히드록시벤젠설포산의 약제학적으로 허용가능한 염은 하기 식1의 구조를 갖는 것일 수 있다.



[0015] 식 1에서, M는 $[NH_{4-x}R_x]^+$ 이고, x는 0,1,2,3, 또는 4이고, R은 x>1인 경우 동일하거나 다를 수 있는 분지 또는 비분지된 C1-4-알킬-라디칼을 나타낸다.

[0016] 상기 2,5-디히드록시벤젠설포산은 또한 그의 용매화합물 (solvate)의 형태일 수 있다. "용매화물"이란 하나 이상의 용질 분자, 즉 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 하나 이상의 용매 분자에 의해 형성되는 복합체 또는 집합체를 의미한다. 용매화물은 예를 들면 물, 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세트산과 형성된 복합체 또는 집합체일 수 있다.

[0017]

[0018] 상기 2,5-디히드록시벤젠설포산은 또한 그의 입체이성질체의 형태일 수 있다. 상기 입체이성질체는 거울상 이성질체 (enantiomer) 및 부분입체이성질체 (diastereomer)와 같은 모든 입체이성질체를 포함한다. 상기 화합물은 입체이성질체의 순수 형태 (stereoisomerically pure form) 또는 하나 이상의 입체이성질체의 혼합물, 예를 들면 라세미 혼합물일 수 있다. 특정 입체이성질체의 분리는 당해 분야에 공지된 통상의 방법 중 하나에 의해 수행될 수 있다.

[0019] 상기 2,5-디히드록시벤젠설포산은 화학적으로 합성하거나, 상업적으로 구입할 수 있다.

[0020] 제1,2, 및 3 양상에서, 상기 조성물은 약학적 조성물일 수 있다. 상기 조성물은, 약제학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 조성물에 있어서, "약제학적으로 허용가능한 담체"는 활성 성분의 적용을 돕기 위하여 활성 성분과 조합되어 사용되는 물질, 일반적으로 불활성 물질을 나타낸다. 상기 담체는 통상적인 약제학적으로 허용가능한 부형제, 첨가제 또는 희석제를 포함한다. 상기 담체는 예를 들면 충전제 (filler), 결합제 (binder), 붕해제 (disintegrant), 버퍼, 보존제, 향산화제, 활택제, 향미제, 점증제 (thickener), 발색제 (coloring agent), 유화제, 현탁화제, 안정화제, 및 등장화제로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 상기 조성물은, 상기 2,5-디히드록시벤젠설포산 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 "치료학적 유효량"으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 조성물에 있어서, "치료학적 유효량"은 치료를 필요로 하는 개체에게 투여되는 경우 치료 효과를 나타내기 위해 충분한 양을 의미한다. 용어 "치료"는 개체, 예를 들면 사람을 포함한 포유류에서 질환 또는 의학적 증상을 예방, 즉, 환자의 예방적 치료; (b) 질환 또는 의학적 증상의 완화, 즉, 환자에서 질환 또는 의학적 증상의 제거 또는 회복 야기; (c) 질환 또는 의학적 증상의 억제, 즉, 개체에서 질환 또는 의학적 증상의 진행을 늦춤 또는 정지; 또는 (d) 개체에서 질환 또는 의학적 증상을 경감.

또한, 상기 조성물은 2,5-디히드록시벤젠술포산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 "포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진시키기에 또는 탈수초화를 억제하기에 유효량" 또는 "포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기에 유효량"으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 "유효량"은 당업자가 적절하게 선택할 수 있다. 상기 "유효량"은 0.01mg 내지 10,000mg, 0.1mg 내지 1000mg, 1mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 1000mg, 0.01mg 내지 100mg, 0.01mg 내지 10mg, 또는 0.01mg 내지 1mg일 수 있다. 상기 조성물은 2,5-디히드록시벤젠술포산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 활성 성분으로서 포함하는 것일 수 있다. "활성 성분"이란 상기 조성물에 언급된 기능을 수행하는 것을 의도한 것이며, 불순물로 소량으로 포함되어 있어서 상기 기능을 수행하지 않은 것을 제외한다.

[0022] 상기 조성물은 경구 투여하거나, 정맥내, 복강내, 피하, 직장 및 국소투여를 포함한 비경구로 투여될 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 정제, 캡슐제, 수성액제 또는 현탁제 등의 다양한 형태로 제제화될 수 있다. 경구용 정제의 경우 락토즈, 옥수수 전분 등의 부형제 및 마그네슘 스테아레이트와 같은 활택제가 통상 가해질 수 있다. 경구투여용 캡슐제의 경우, 락토즈 및/또는 건조 옥수수 전분이 회석제로서 사용될 수 있다. 경구용 수성 현탁제가 필요할 경우, 활성성분을 유화제 및/또는 현탁화제와 결합시킬 수 있다. 필요할 경우, 특정 감미제 및/또는 향미제를 가할 수 있다. 신경내, 근육내, 복강내, 피하 및 정맥내 투여의 경우, 활성성분의 멸균 용액이 통상 제조되며, 용액의 pH를 적합하게 조절하고 완충시켜야 한다. 정맥내 투여의 경우, 용질의 총 농도는 체제에 등장성이 부여되도록 조절되어야 한다. 상기 조성물은 pH가 7.4인 염수와 같은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 수용액제의 형태일 수 있다. 상기 용액은 국소 주사 (local bolus injection)로 환자의 근육내 또는 신경내 혈류에 도입될 수 있다.

[0023] 2,5-디히드록시벤젠술포산 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은 탈수초화를 억제하거나 탈수초화된 뉴론을 수초화된 뉴론으로 회복시키는 효과를 가질 수 있다.

[0024] 상기 조성물은 탈수초와 연관 질환을 치료하기 위한 하나 이상의 다른 치료제와 함께 조합될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 탈수초와 연관 질환을 치료하기 위한 다른 활성 성분을 포함하지 않고, 2,5-디히드록시벤젠술포산 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 것일 수 있다.

[0025] 상기 조성물은 포유동물의 신경세포에서 탈수초와 연관된 질환을 치료하기 위한 것일 수 있다. 상기 탈수초와 연관된 질환 (disease associated with demyelination of a neuron) (이하, "탈수초 질환 (demyelinating disease)"라고도 한다.)은 뉴론의 수초 (myelin sheath)가 손상되는 신경계의 질환을 나타낸다. 상기 손상은 뉴론에 결합되어 있는 수초가 이탈되거나, 그 양이 감소하거나, 그 구조가 변형되는 것을 포함한, 신경세포의 신호전달을 감소시키는 임의의 손상을 포함한다. 이 손상은 손상된 신경의 신호 전달을 감소시킨다. 차례로, 이 전달 감소는 감각 (sensation), 운동 (movement), 인지 (cognition), 또는 신경에 의존하는 다른 기능의 감소를 야기시킨다. 상기 질환은 중추신경계에 영향을 주는 것 (이하 "중추신경계 탈수초 질환"이라고도 한다.)과 말초신경계에 영향을 주는 것 (이하 "말초신경계 탈수초 질환"이라고도 한다.)을 포함할 수 있다. 상기 중추신경계 탈수초 질환은 다발경화증 (multiple sclerosis), Devic' disease, 염증성 탈수초 질환 (inflammatory demyelinating diseases), 비타민 B12 결핍에 의하여 발생한 것과 같은 CNS 신경병증 (neuropathies), 척수매독 (Tabes dorsalis)와 같은 골수병증 (myelopathies), 진행다초점백색질뇌증 (Progressive multifocal leukoencephalopathy)과 같은 백색질뇌증 (leukoencephalopathies), 백색질형성장애 (leukodystrophies), 급성 감염성 다발성신경염 (Guillain-Barre Syndrome)과 그의 만성 대응병인, 만성 염증성 탈수초 폴리신경병증 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy), 또는 그 조합을 포함한다. 상기 말초신경계 탈수초 질환은 Anti-MAG 말초신경병증 (peripheral neuropathy), 샤르코 마리 투스병 (Charcot Marie Tooth: CMT), 구리 결핍증 (copper deficiency), 진행성 염증성 신경병증 (progressive inflammatory neuropathy), 또는 그 조합일 수 있다. 상기 질환은 다발경화증 (multiple sclerosis), 급성 감염성 다발성신경염 (Guillain-Barre Syndrome), 샤르코 마리 투스병 (Charcot Marie Tooth: CMT), 또는 그 조합인 것일 수 있다. 상기 CMT는 CMT1A 서브타입, CMT1E 서브타입, 또는 CMT3 서브타입일 수 있다.

- [0026] 상기 조성물에 있어서, 상기 질환은 말단 수초 단백질 22 (peripheral myelin protein 22: PMP22)의 과발현에 의하여 야기되는 것일 수 있다. PMP22는 사람에서 PMP22 유전자에 의하여 코딩되는 단백질이다. 이 유전자에 의하여 코딩된 막내단백질 (integral membrane protein)은 슈반 세포 (Schwann cell)에서 주로 발현된 소수성, 테트라스판 글리코단백질 (hydrophobic, tetraspan glycoprotein)이며, 말초 신경 체계에서 콤팩트한 미엘린 (compact myelin)의 주요 구성 성분이다. 그러나, PMP22가 말초신경계에서 콤팩트한 미엘린 (compact myelin)의 주요 구성 성분이라고, 상기 조성물이 말초신경계의 신경세포에만 효과를 미치는 것은 아니며, 중추신경계의 신경세포에 대하여도 효과를 미칠 수 있으며, 본 발명자들은 이러한 효과를 실험을 통하여 확인하였다. PMP22는 미엘린 단백질 제로와 상호작용하는 것으로 알려져 있다. PMP22 유전자의 다양한 돌연변이는 CMT1A, 데제린-쉴타병 (Dejerine-Sottas disease), 또는 압박마비 유전신경병 (Hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: HNPP)를 야기할 수 있다. CMT1A는 모든 CMT 환자의 60% 이상을 차지하는 가장 흔한 형태의 CMT이다. CMT1A는 17번 염색체상의 PMP22 유전자의 배가 (duplication)에 의하여 야기된다. 두 카피의 유전자를 갖는 대신, 3 카피의 유전자, 즉 한 염색체 상에 2개 및 다른 염색체상에 한 카피를 갖는다.
- [0027] 상기 조성물에 있어서, 상기 포유동물은 사람일 수 있다. 상기 포유동물은 탈수초화된 신경 세포를 갖는 것일 수 있다. 상기 포유동물은 탈수초화와 연관된 질병을 갖는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 조성물에 있어서, 상기 신경세포는 PMP22를 과발현하거나 과발현되어 있는 것일 수 있다. 상기 신경세포는 PMP22의 과발현에 의하여 탈수초화되고 있거나 탈수초화된 상태인 것일 수 있다. 상기 신경세포는 말초신경계 (PNS)에 존재하는 것뿐만 아니라, 중추신경계 (CNS)에 존재하는 것일 수 있다. 상기 신경세포는 인 비보 또는 인 비트로에 존재하는 것일 수 있다.
- [0029] 다른 양상은 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포함하는, 포유동물에서 신경세포의 PMP22 과발현과 연관된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공한다. 본 명세서에 "PMP22 과발현"은 수초손상이 없는 정상적인 신경세포에 비하여 PMP22가 많이 발현된 것을 나타낸다. 상기 발현은 mRNA 또는 단백질 수준의 발현을 나타낼 수 있다.
- [0030] 다른 양상은 탈수초와 연관된 질병을 치료하는데 있어서의 상기에서 정의된 2,5-디히드록시벤젠술폰산 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물의 용도를 제공한다.
- [0031] 다른 양상은 탈수초와 연관된 질병을 치료하기 위한 의약을 제조하는데 있어서, 상기에서 정의된 2,5-디히드록시벤젠술폰산 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물의 용도를 제공한다.
- [0032] 제4 양상은 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하여, 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0033]
- [0034] 제5 양상은 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제하기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하여, 포유동물에서 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 방법을 제공한다.
- [0035] 제6 양상은 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하여, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의

발현을 감소시키는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다.

- [0036] 제4, 5, 및 6 양상에 있어서, "신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기에 유효한 양"은 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체에게 투여되는 경우 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료 효과를 나타내기에 충분한 양을 의미한다. "포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제하기에 유효한 양"은 수초 재생을 필요로 하는 개체 또는 탈수초화를 억제할 필요가 있는 개체에게 투여되는 경우 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제하는 효과를 나타내기에 충분한 양을 의미한다. 제4, 5, 및 6 양상에 있어서, 제1, 2, 및 3 양상에 사용된 동일한 용어는 달리 언급이 없으면, 제1, 2, 및 3 양상에서 언급된 내용과 동일한 의미로 해석된다.
- [0037] 제4 양상에 있어서, 상기 탈수초화는 중추신경계 또는 말소신경계의 신경세포에 존재하는 것일 수 있다. 상기 탈수초화는 PMP22의 과발현에 의하여 야기된 것일 수 있다. 상기 질환은 샤르코 마리 투스병 (Charcot Marie Tooth: CMT), 데제린-삿타병(Dejerine-Sottas disease), 또는 압박마비 유전신경병(hereditary neuropathy with liability to pressure palsy: HNPP), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 또는 감염성 다발성신경염 (Guillain-Barre Syndrome)인 것일 수 있다.
- [0038] 제5 양상에 있어서, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 것에 의하여 탈수초화와 연관된 질병을 치료하는 것일 수 있다. 상기 신경세포는 PMP22의 과발현에 의하여 탈수초화되고 있거나 탈수초화된 상태인 것일 수 있다. 상기 탈수초화는 중추신경계 또는 말소신경계의 신경세포에 존재하는 것일 수 있다.
- [0039] 제6 양상에 있어서, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 것에 의하여 탈수초화와 연관된 질병을 치료하는 것일 수 있다. 상기 신경세포는 PMP22의 과발현에 의하여 탈수초화되고 있거나 탈수초화된 상태인 것일 수 있다. 상기 탈수초화는 중추신경계 또는 말초신경계의 신경세포에 존재하는 것일 수 있다.
- [0040] 제4, 5, 및 6 양상에 있어서, 상기 방법에 있어서, 당업자는 투여시 투여경로는 환자의 상태에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 상기 투여는 경구, 비경구, 또는 국부 투여일 수 있다. 상기 국부 투여는 신경계, 예를 들면, 뇌에 투여하는 것일 수 있다.
- [0041]
- [0042] 상기 방법에 있어서, 투여량은 전술한 바와 같이 환자의 상태, 투여 경로, 주치의의 판단 등과 같은 다양한 인자들에 따라서 다양해진다. 효과적인 투여량은 체외실험 또는 동물 모델 시험에서 얻어진 용량-반응곡선으로부터 추정할 수 있다. 투여되는 조성물에 존재하는 본 발명의 화합물의 비율 및 농도는 화학적 특성, 투여 경로, 치료적 투여량 등에 따라 결정될 수 있다. 상기 투여량은 개체에게 약 1 μ g/kg 내지 약 1 g/kg per day, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 500 mg/kg per day의 유효량으로 투여될 수 있다. 상기 용량은 개체의 나이, 체중, 감수성, 또는 증상에 따라 변경될 수 있다.
- [0043] 제4, 5, 및 6 양상에 있어서, 상기 방법은 상기 투여 전에 개체의 신경세포에서 탈수초화와 관련된 정보를 수집하는 단계를 더 포함할 수 있다. 탈수초화와 관련된 정보는 탈수초화된 정도, 탈수초화 속도, 탈수초화 형태 등일 수 있다. 상기 탈수초화와 관련된 정보는 신경세포를 광학 또는 형광 현미경과 같은 가시화하여 측정하거나, 수초 특이적 마커를 사용하여 측정할 수 있다. 따라서, 제4, 5, 및 6 양상의 방법은, 신경세포에서 탈수초화를 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 신경세포는 탈수초화와 연관된 질환을 가지고 있거나 가질 것으로 의심되는 개체 유래의 것일 수 있다. 또한, 상기 방법은 상기 탈수초화와 관련된 정보를 수집하는 단계에 의하여 수집된 정보에 근거하여, 대조군에 비하여 탈수초화가 진행되었거나 진행되고 있는지를 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 대조군은 탈수초 질환을 가지고 있지 않은 개체로부터 유래된 정상적인 신경세포의 수초화

정도, 또는 평균적인 개체의 신경세포의 수초화 정도일 수 있다. 또한, 상기 방법은 상기 결정하는 단계에 대조군에 비하여 탈수초화가 진행되었거나 진행되고 있는 것으로 결정된 개체에 대하여, 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0044] 또한, 제4, 5, 및 6 양상에 있어서, 상기 방법은 상기 투여 전에 개체의 신경세포에서 PMP22 발현 수준을 측정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 PMP22 발현 수준은 mRNA 또는 단백질 수준의 발현일 수 있다. 상기 PMP22 발현 수준은 mRNA에 특이적 프라이머 핵산을 사용한 증폭 (예, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)), 서던 블로팅, 또는 서열 분석에 의하여 또는 PMP22 발현 단백질의 분리, 웨스턴 블로팅 등의 방법에 의하여 측정될 수 있다. 상기 신경세포는 탈수초화와 연관된 질환을 가지고 있거나 가질 것으로 의심되는 개체 유래의 것일 수 있다. 또한, 상기 방법은 상기 측정하는 단계에 의하여 측정된 PMP22 발현 수준이 대조군에 비하여 높은지를 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 대조군은 탈수초 질환을 가지고 있지 않은 개체로부터 유래된 정상적인 신경세포의 수초화 정도, 또는 평균적인 개체의 신경세포의 수초화 정도일 수 있다. 또한, 상기 방법은 상기 결정하는 단계에서 PMP22 발현이 대조군에 비하여 높은 것으로 결정된 개체에 대하여, 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0045] 다른 양상은 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제하기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물의 신경세포와 접촉시켜, 포유동물에서 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 방법을 제공한다. 상기 신경세포는 개체로부터 분리된 것이거나, 인 비트로에 존재하는 것일 수 있다.

[0046] 다른 양상은 PMP22의 발현을 감소시키기에 유효한 양의 2,5-디히드록시벤젠술폰산, 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 그의 용매화물을 포유동물의 신경세포와 접촉시켜, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 단계;를 포함하는, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 신경세포는 개체로부터 분리된 것이거나, 인 비트로에 존재하는 것일 수 있다.

[0047] 상기 방법에서, 상기 접촉은 액체 매질, 예를 들면, 상기 신경세포의 배양 배지, 또는 버퍼에서 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0048] 일 양상에 따른 포유동물에서 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물에 의하면, 포유동물에서 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 가진다.

[0049] 다른 양상에 따른 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진시키기 위한 또는 탈수초화를 억제하기 위한 조성물에 의하면, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진시키기 위한 또는 탈수초화를 억제하는 효과를 가진다.

[0050] 다른 양상에 따른 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키기 위한 조성물에 의하면, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 효과를 가진다.

[0051] 다른 양상에 따른 포유동물의 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 의하면, 포유동물의 신경세포의 탈수초화와 연관된 질환을 효율적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0052] 다른 양상에 따른 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 촉진 또는 탈수초화를 억제시키는 방법에 의하면, 포유동물의 신경세포에서 재수초화를 효율적으로 촉진 또는 탈수초화를 효율적으로 억제시킬 수 있다.

[0053] 다른 양상에 따른 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시키는 방법에 의하면, 포유동물의 신경세포에서 PMP22의 발현을 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 ES 존재하에서 PMP22 과발현 래트 슈반 세포주의 PMP22 유전자 발현을 웨스턴 블롯에 의하여 측정된 결과를 나타낸다.

도 2는 Zebrafish (Mbp:gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)를 공초점 레이저 현미경을 사용하여 촬영한 것을 나타낸 도면이다.

도 3은 여러 조건에서 배양된 제브라피쉬(Mbp:gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)의 말초신경 후부측면 신경 (posterior lateral line nerve:PLL)의 축삭을 싸고 있는 수초를 공초점 레이저 현미경을 사용하여 GFP 형광을 촬영한 결과를 나타낸다.

도 4는 여러 조건에서 배양된 제브라피쉬(ClaudinK:gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)의 말초신경계의 수초를 공초점 레이저 현미경 (Olympus)을 사용하여 GFP 유래 녹색 형광 및 아세틸화-투블린에 대한 면역염색 유래 적색 형광을 촬영한 결과를 나타낸다.

도 5는 도 4의 형광 사진으로부터 얻어진 형광 강도에 근거하여 측정된 액손 중 수초화된 액손의 비율을 나타낸다.

도 6은 여러 조건에서 배양된 제브라피쉬(ClaudinK:gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)의 중추신경 마우트너 축삭(mauthner axon)과 수초를 공초점 레이저 현미경을 사용하여 GFP 형광과 축삭에 특이적으로 발현된 아세틸화-투블린에 대한 면역염색 유래 적색 형광을 촬영한 결과를 나타낸다.

도 7은 신경 섬유 지름에 대한 액손 지름의 비인 g-비율(ratio)의 정의를 도식으로 나타낸 것이다.

도 8은 도 6의 결과로부터 확인된 g-비율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 실시예 1: 에탐실레이트의 신경세포에서 수초 재생에 미치는 효과

[0057] (1) 에탐실레이트가 신경세포에서 PMP22 발현에 미치는 영향

[0058] 래트 슈반(schwann) 세포주를 10% FBS, 100 units/ml 페니실린(penicillin) 및 100 units/ml 스트렙토미신(streptomycin) 함유 DMEM 배지 2ml를 포함한 12-웰 플레이트의 각 웰에 10^5 cells/ml의 농도로 접종하고, 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 세포밀도가 60 내지 65%될 때까지 배양하였다. 그 후, 각 웰에 에탐실레이트 [디에틸암모늄 2,5-디히드록시벤젠술폰산: ES] (Selleckchem, TX)를 각각 여러 농도로 첨가하고, 동일한 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 세포주는 신경 기능 (neuronal function)과 분화의 인 비트로 모델로부터 종종 사용된다. 래트 슈반 세포주는 세포주에 렌티바이러스를 이용하여 사람 PMP22 유전자가 항상 과발현되도록 염색체에 삽입 (integration)시킨 후 푸로마이신 저항성을 선택적으로 마커로 사용하여 새로운 래트 슈반 PMP22 세포 모델을 구축하였다. 래트 슈반 세포주 즉, ATCC (CRL-2768)는 ATCC로부터 구입하였다.

[0059] 배양액 2ml를 제거하고 인산완충액(phosphate buffered saline: PBS)으로 세척한 후 파쇄액 (lysis solution)인 PBS 중 0.5% triton X-100를 첨가하고, 스크래퍼를 이용해 세포를 분리하고 30분 얼음에 둔 후 세포를 파쇄하였다. BCA (bicinchoninic acid) 단백질 정량 방법에 의하여, 각 시료 중에 단백질의 양이 1ug/ul이 되게 만든 후, 이 시료에 대하여 SDS-PAGE (Invitrogen)를 수행하고 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 이때, 1차 항체로는 토끼 항-PMP22 항체(Novus biological) 및 토끼 항-액틴(actin) 항체 (Sigma)를 사용하고, 2차 항체로서 호스 래디쉬 퍼옥다제(horseradish peroxidase: HRP)가 접합된 항-토끼 항체를 사용하였다.

[0060] 도 1은 ES 존재하에서 PMP22 과발현 래트 슈반 세포주의 PMP22 유전자 발현을 웨스턴 블롯에 의하여 측정한 결과를 나타낸다. 도 1은 모두 웨스턴 블롯 사진(A, 및 B)이며, A는 DMSO 중 ES를 0.1, 1, 10, 및 100uM가 되게 웰 중의 배지에 첨가하고 24시간 동안 배양한 후 세포를 채취하여 분석한 것이며, C는 ES 대신 용매인 DMSO를 처리한 대조군이다. 실험은 4배수 (n=4)로 진행하였다. B는 A에서 언급된 ES 농도 중 10uM로 배지 중에 첨가하고 배양 시간 (0, 0.5, 1, 12, 24, 및 48 시간)을 달리한 것이다. 0 시간은 ES를 처리하지 않은 대조군이다.

- [0061] 도 1에 나타난 바와 같이, ES의 농도가 높아짐에 따라, 발현된 PMP22 단백질의 양은 감소하였다(도1의 A). 또한, 10uM ES가 존재하는 배지에서 세포를 배양한 경우 0.5, 1, 12, 24, 및 48 시간에서 PMP22 단백질의 발현은 대조군에 비하여 발현양이 적어진 것을 확인하였다 (도1의 B).
- [0062] (2) 에탐실레이트가 PMP22 발현에 미치는 영향 인 비보
- [0063] 미엘린 염기성 단백질 (myelin basic protein: MBP) 유전자와 Claudink 유전자의 프로모터를 이용하여 수초에 특이적으로 발현하여 형광을 발하는 Mbp:EGFP, 및 claudink:EGFP 융합 단백질을 코딩하는 유전자가 각각 형질전환된 제브라피쉬(zebrafish)를 제조하였다. NfsB 독성유전자는 니트로레덕타제(nitroreductase: NTR) 효소를 코딩한다. 통상적인 제브라피쉬에서 NTR은 아무런 세포독성을 나타내지 않지만, 메트로니다졸(metronidazole: Mtz)이 투여되는 경우 세포는 Mtz를 세포독성 물질로 전환시키고, 이 세포 독성물질에 의하여 세포사멸이 유도된다. 분화된 수초에서 특이적으로 작동하여 그에 연결된 유전자를 수초에 특이적으로 발현시키는 mbp 유전자의 프로모터 및 claudink 유전자의 프로모터와 Gal4-UAS 트랜스액티베이터 시스템 (transactivator system)을 이용하여 분화된 회소돌기아교세포와 슈반세포에 특이적으로 nfsB 독성유전자를 발현시키는 형질전환된 제브라피쉬를 제조하였다. 다음으로, 상기 형질전환된 제브라피쉬에서, nfsB 독성 유전자가 수초 특이적으로 발현된다는 것을 확인하였다.
- [0064] 다음으로, 제조된 회소돌기아교세포(oligodendrocyte), 및 슈반세포 특이적으로 nfsB 독성유전자가 발현되는 형질전환된 제브라피쉬에 Mtz 기질을 배양 매질 중에 첨가하였을 때, 형질전환된 제브라피쉬에서 mbp 유전자의 프로모터와 claudink 유전자의 프로모터가 특이적으로 작동하는 회소돌기아교세포 및 슈반세포가 특이적으로 세포사멸이 유도되어, 탈수초화가 유발되는 것을 확인하였다. 그 결과, Mtz 존재하에서 탈수초화가 유발되는 동물모델을 확립하였다. 이하 이 모델을 제브라피쉬(Mbp(또는 claudink):gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)라고도 한다. 또한 배양 매질로부터 첨가된 Mtz 기질을 제거하고 Mtz를 포함하지 않은 배양 배지 중에서 형질전환된 제브라피쉬를 다음에 1일 동안 배양하여 회복기간을 주었을 때, 탈수초화된 중추신경계와 말초신경계가 자연적으로 다시 재수초화되고 있는 것을 확인하였고, ES 약물이 재수초화 촉진에 미치는 효과를 확인하였다.
- [0065] 구체적으로, 제브라피쉬(Zebrafish)를 수초에서 1L의 물 중에서 100마리를 28.5℃에서 출생일로부터 4.5 dpf (days post-fertilization) 동안 난수(egg water) 또는 배아 배지 (embryo medium: EM)(15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 0.15 mM KH₂PO₄, 0.05 mM NH₂PO₄, 및 0.7 mM NaHCO₃)에서 배양하고 0.2% DMSO가 포함된 배아 배지에 녹인 MTZ (Sigma) 10mM을 36시간 동안 탈수초화를 위해 첨가하였다. 96웰 플레이트의 각각의 약물이 들어있는 웰로 1마리씩 옮기고 28.5℃에서 배양하였다(도 2의 B 참조). 일부는 출생일로부터 6dpf에 제브라피쉬를 배아 배지로 세 번 세척하여 배아 배지 중의 Mtz를 제거하여 재수초화(remyelination)가 되도록 하였다(도 2의 C 참조). 다른 일부는 배아 배지 중에 ES를 10uM 첨가하고 동일한 조건에서 배양하였다 (도 2의 D 참조). 대조군은 MTZ 첨가 대신 0.2% DMSO를 첨가한 것을 제외하고는 동일하게 실험하였다.
- [0066] 도 2는 Zebrafish (Mbp:gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)를 공초점 레이저 현미경(Olympus)을 사용하여 촬영한 것을 나타낸 도면이다. 도 2에서, 흰 점선 박스는 중추신경계와 말초신경계의 수초 중 재수초화 모니터링 부분을 나타낸다. 도 2에서, 중앙의 가장 밝은 부위가 중추신경계이고, 중추신경계 밑의 옅은 부분이 말초신경계이다. 도 2의 하단은 실험 과정을 도식화한 것으로서, Zebrafish는 출생일로부터 3 dpf로부터 수초화가 진행되며(A), 4.5dpf에 MTZ를 처리하고 (B), 6dpf에 MTZ를 세척하여 제거하거나 (이하 "Recovery 1 day"라고도 한다)(C), ES를 10uM 첨가하는 것(D)을 나타낸다. 실험은 7dpf까지 진행하였다. 실험은 18배수 (n=18)로 진행하였다. 도 2에서, "Zebrafish (Mbp(claudink):gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)"에서 "Mbp(claudink)"는 "Mbp" 또는 "claudink" 프로모터를 사용한 zebrafish에 대하여 각각 동일하게 적용된다는 것을 나타낸다.
- [0067] 도 3은 여러 조건에서 배양된 제브라피쉬(Mbp:gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)의 말초신경 후부측면 신 신경 (posterior lateral line nerve:PLL)의 축삭을 싸고 있는 수초를 공초점 레이저 현미경을 사용하여 GFP 형광을 촬영한 결과를 나타낸다. 도 3에서, A, B, C, 및 D는 도 2의 A, B, C, 및 D 및 상기한 설명과 같은 실험 과정에 따라 실험 결과를 나타낸다. 도 3에서, A는 대조군으로서 MTZ 및 ES 중 어느 것도 포함하지 않은 배지에서 배양한 것을 나타낸다. 도 3A에 나타난 바와 같이, MTZ 존재하에서 제브라피쉬를 배양한 경우, 제브라피쉬의 말초신경계의 수초는 충분하게 존재하였고(도 3의 A), 4.5dpf 내지 7dpf 동안 (2.5일) MTZ 존재하에서 제브라피쉬를 배양한 경우 GFP의 녹색 형광은 거의 관찰되지 않아 수초가 대부분 제거되었다(도 3의 B). 또한,

4.5dpf 내지 6dpf 동안 MTZ 존재하에서 제브라피쉬를 배양한 후 세척하여 MTZ를 제거하고 ES를 첨가하지 않은 배지에서 6dpf 내지 7dpf 동안 (1일) 배양한 경우 제브라피쉬의 말초신경계의 수초는 여전히 재생되지 않은 부분이 존재하였다(도 3의 C의 회색 점선 원 부분 참조). 반면, 4.5dpf 내지 6dpf 동안 MTZ 존재하에서 제브라피쉬를 배양한 후 세척하여 MTZ를 제거하고 ES를 첨가한 배지에서 6dpf 내지 7dpf 동안 (1일) 배양한 경우 제브라피쉬의 말초신경계의 수초는 완전하게 재생되어, GFP 유래 녹색 형광이 관찰되지 않은 부분을 발견할 수 없었다(도 3의 D). 도 3에서 녹색 형광강도는 수초화의 정도와 비례한다.

[0068] 도 4는 여러 조건에서 배양된 제브라피쉬(Claudink:gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)의 말초신경계의 수초를 공초점 레이저 현미경 (Olympus)을 사용하여 GFP 유래 녹색 형광 및 아세틸화-투불린에 대한 면역염색 유래 적색 형광을 촬영한 결과를 나타낸다. Claudink 프로모터는 Mbp 프로모터에 비하여 수초에서 더 특이적으로 작동하여서 신경세포의 탈수초화 및 재수초화를 더 정량적으로 관찰하는데 사용될 수 있다. 도 4에서, claudink 및 ac-tubulin은 각각 claudink 프로모터에 의하여 수초에 특이적으로 발현된 GFP의 녹색 형광을 촬영한 것 및 축삭(axon)에 특이적으로 발현된 아세틸화-투불린(acetylated-tubulin)에 대하여 면역염색한 결과 면역염색 유래 적색 형광을 촬영한 것이고, merge는 상기 두 이미지를 융합한 것이다. 아세틸화-투불린(acetylated-tubulin)에 대한 면역염색은 1차 항체로서 마우스 항-아세틸화-투불린을 사용하고, 2차 항체로서 Alexa647 접합된 항-마우스 항체를 사용하여 청색 형광을 측정한 후, 녹색과 대비하기 위하여 적색 전환 (red conversion)하여 적색 형광에 대하여 촬영하여 분석하였다. 이하 아세틸화-투불린(acetylated-tubulin)에 대한 면역염색은 상기와 동일하였다. 도 4에서 PLL myelin은 말초신경 후부측면 선신경 (posterior lateral line nerve:PLL)의 축삭을 싸고 있는 수초를 나타낸다. 도 4에 나타난 바와 같이, ES에 의해 재수초화가 촉진됨을 알 수 있다. 도 4에서, A, B, 및 D는 도 2의 A, B 및 D와 동일한 조건으로 실험한 것이다.

[0069] 도 5는 도 4의 형광 사진으로부터 얻어진 형광 강도에 근거하여 측정된 액손 중 수초화된 액손의 비율을 나타낸다. 도 5에서, Cont, MTZ, 및 ethamsylate는 각각 도 4의 A, B, 및 C에 해당하는 결과이다. 액손 중 수초화된 액손의 비율은 도 5에서 얻어진 축삭(axon)에 특이적으로 발현된 아세틸화-투불린에 대한 면역염색 유래 적색 형광 강도에 대한 claudink 프로모터에 의하여 수초에 특이적으로 발현된 GFP의 녹색 형광의 백분율 비로 나타내었다.

[0070] 도 4 및 5에 나타난 바와 같이, ES가 존재하는 경우, 그렇지 않은 경우에 비하여 액손 중 수초화된 액손의 비율이 현저하게 높았다. 이는 ES가 탈수초화된 신경세포에서 수초화를 촉진한다는 것을 나타낸다.

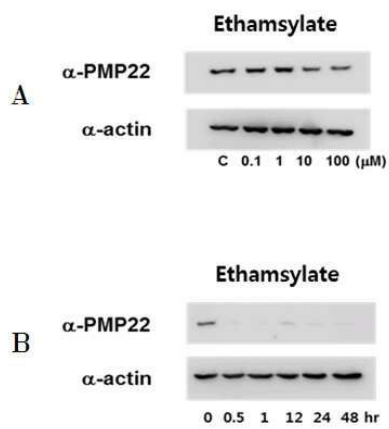
[0071] 도 6은 여러 조건에서 배양된 제브라피쉬(Claudink:gal4::UAS:nfsB (NTR, toxin)::UAS:gfp)의 중추신경 마우트너 축삭(mauthner axon)과 수초를 단층으로 절단(section)한 후 공초점 레이저 현미경을 사용하여 GFP 형광과 축삭에 특이적으로 발현된 아세틸화-투불린에 대한 면역염색 유래 적색 형광을 촬영한 결과를 나타낸다. 도 6에서, A, B, 및 C는 도 2 및 도 3의 A, B, 및 D와 동일한 실험 과정에 따라 실험한 결과를 나타낸다. 도 6에서, A는 대조군으로서 MTZ 및 ES 중 어느 것도 포함하지 않은 배지 중에서 배양한 것을 나타낸다. 도 6으로부터 액손 지름과 섬유(fiber) 지름은 Image J 프로그램을 통하여 GFP 형광과 액손 적색 지름을 측정하여 구하였다.

[0072] 도 7은 신경 섬유 지름에 대한 액손 지름의 비인 g-비율(ratio)의 정의를 도식으로 나타낸 것이다.

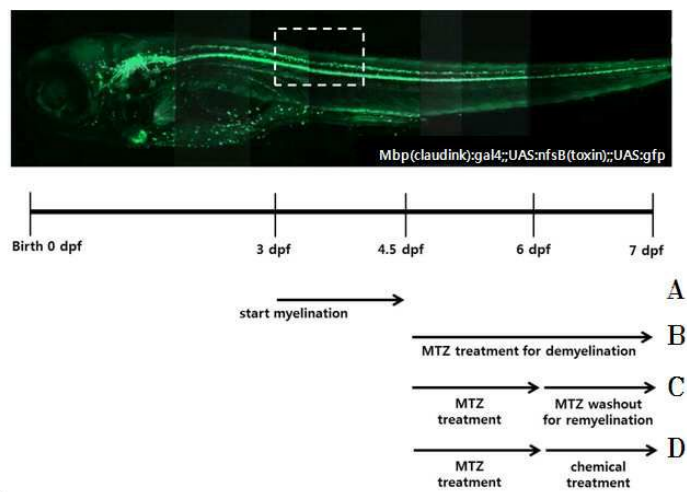
[0073] 도 8은 도 6의 결과로부터 확인된 g-비율을 나타낸다. 도 8에서, Cont, MTZ 및 ethamsylate는 도 6의 A, B, 및 C에 해당하는 결과이다. 도 8에 나타난 바와 같이, MTZ 처리군에 비하여 에탐실레이트 처리군에서 g-비율이 현저하게 감소하였으며, 이는 액손의 수초층이 현저하게 두꺼워졌다는 것을 나타낸다. 도 6 및 8에 나타난 바와 같이, 제브라피쉬의 중추신경계의 신경세포의 수초가 MTZ 존재하에서의 배양에 의하여 손상된 후 에탐실레이트의 존재하에서 배양한 경우, 그렇지 않은 경우에 비하여 현저하게 효율적으로 재생되었다.

도면

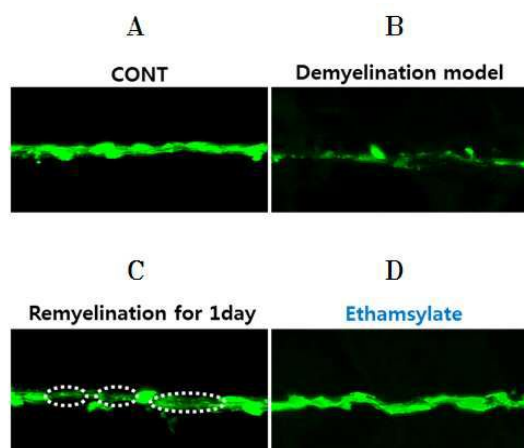
도면1



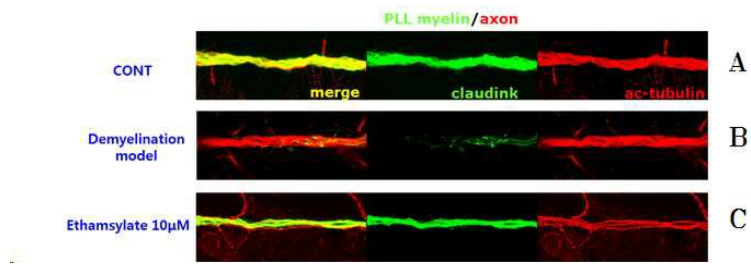
도면2



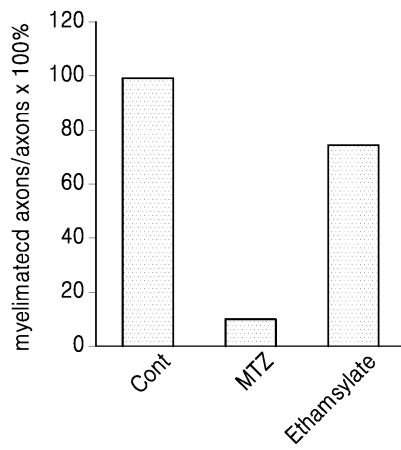
도면3



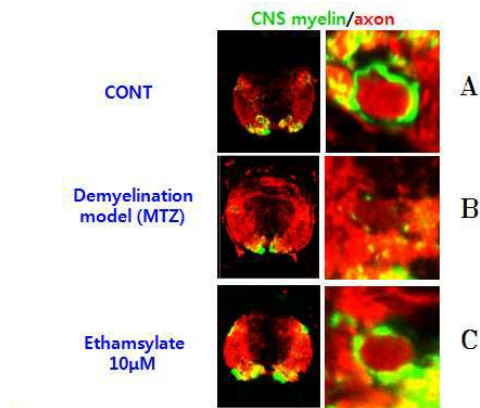
도면4



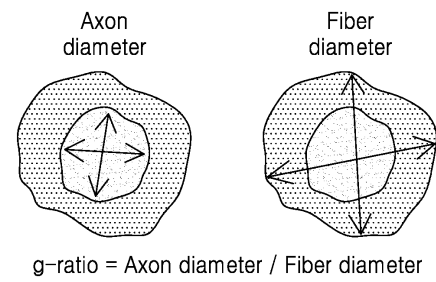
도면5



도면6



도면7



도면8

