(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 3 월 22 일 (22.03.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/052193 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 33/50 (2006.01) *C12N 5/0793* (2010.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/008531

(22) 국제출원일: 2017 년 8 월 8 일 (08.08.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0118205 2016 년 9 월 13 일 (13.09.2016) KR

(71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR]; 04348 서울시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).

(72) 발명자: 장종욱 (CHANG, Jong Wook); 04728 서울시 성동구 금호로 117, 104동 306호, Seoul (KR). 이나경 (LEE, Na Kyung); 10070 경기도 김포시 김포한강10로134번길 77, 307동 803호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 리앤목 특허법인 (Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS); 06292 서울시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층, Seoul (KR).

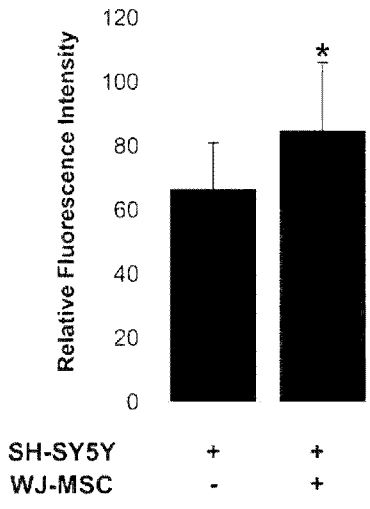
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR SCREENING UBIQUITIN PROTEASOME REGULATOR BY USING MESENCHYMAL STEM CELL OR PROTEIN RELEASED THEREFROM

(54) 발명의 명칭: 중간엽줄기세포 또는 그로부터 분비되는 단백질을 이용한 유비퀴틴 프로테아좀 조절제를 스크리닝하는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening a ubiquitin proteasome regulator, for example, a therapeutic agent for degenerative brain diseases, by using mesenchymal stem cells or a protein released therefrom. A screening method according to one aspect has the effect of using mesenchymal stem cells or a protein released thereform in screening a protein or material capable of regulating a ubiquitin proteasome system.

(57) 요약서: 중간엽줄기세포 또는 그로부터 분비되는 단백질을 이용한 유비퀴틴 프로테아좀 조절제, 예를 들면, 퇴행성 뇌질환 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 일 양상에 따른 스크리닝 방법은 중간엽줄기세포 또는 그로부터 분비되는 단백질을 이용하여 유비퀴틴 프로테아좀 시스템을 조절할 수 있는 단백질, 또는 물질을 스크리닝할 수 있는 효과가 있다.

WO 2018/052193 A1

명세서

발명의 명칭: 중간엽줄기세포 또는 그로부터 분비되는 단백질을 이용한 유비퀴틴 프로테아좀 조절제를 스크리닝하는 방법

기술분야

[1] 중간엽줄기세포를 이용한 유비퀴틴 프로테아좀 조절제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 퇴행성 뇌질환은 나이가 들어감에 따라 발생하는 퇴행성 질환 중에서도 뇌에서 발생하는 질환을 의미하며, 주요 증상과 침범되는 뇌부위를 고려해 구분할 수 있는데, 알츠하이머 질환이나 파킨슨 질환 등이 포함된다. 퇴행성 뇌질환은 노화에 따른 신경퇴화와 유전적 및 환경적 요인들로 인해 단백질이 응집돼 신경세포가 사멸해 야기되는 것으로 알려져 있지만, 아직 정확한 원인은 밝혀지지 않아 원인 규명을 위한 기초 연구가 활발히 진행되고 있는 상황이다.

[3] 한편, 미국의 어윈 로즈와 이스라엘의 아론 치카노베르, 아브람 헤르슈코 박사는 유비퀴틴(ubiquitin)이라는 분자가 붙어있는 단백질을 유비퀴틴 프로테아좀 시스템 (Ubiquitin-proteasome system; UPS)이 선택적으로 분해하는 과정을 밝혀내 2004년 노벨 화학상을 수상 하였다. 유비퀴틴 프로테아좀 시스템은 진핵 세포에서 불량 단백질 제거, 세포 분열, 손상된 DNA 수리와 같은 생체 과정에 관여한다. 퇴행성 뇌질환과 같은 질병에서 유비퀴틴 프로테아좀 시스템이 이상이 생기게 되면 독성 단백질이 생체 내 축적이 되는 현상을 일으키게 된다. 특히, 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머병에서, 아밀로이드 단백질이 유비퀴틴 프로테아좀 시스템에 활성을 억제하고, 알츠하이머병 동물 모델에서 뇌의 프로테아좀 활성이 감소된다는 것이 보고된바 있다(비특허 문헌 1 내지 6 참조).

[4] 이에 본 발명자들은, 뇌의 유비퀴틴 프로테아좀 활성을 조절하는 물질을 찾기 위해 노력한 결과, 중간엽줄기세포가 신경 세포의 프로테아좀 활성을 증가시킨다는 것을 확인하였고, 프로테아좀 활성 조절 단백질인 AgRP(Agouti related peptide)을 분비한다는 것을 동정함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 일 양상은 중간엽줄기세포를 이용하여 유비퀴틴 프로테아좀 활성 조절제, 예를 들면, 유비퀴틴 프로테아좀 활성 증가제, 또는 유비퀴틴 프로테아좀 활성 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[6] 일 양상은 중간엽줄기세포를 이용하여 유비퀴틴 프로테아좀 활성 조절제, 예를 들면, 유비퀴틴 프로테아좀 작용제, 길항제, 또는 퇴행성 뇌질환 치료제를

스크리닝하는 방법을 제공한다.

[7] 본 명세서에서 용어 "유비퀴틴 프로테아좀 조절제(ubiquitin proteasome regulating agents)"는 유비퀴틴 프로테아좀 시스템을 조절하는 물질을 의미할 수 있다. 예를 들면, 상기 조절은 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시키거나 감소시키는 물질을 포함할 수 있다. 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시키는 유비퀴틴 프로테아좀 작용제는 퇴행성 뇌질환 치료제일 수 있다.

[8] 본 명세서에서 용어 "퇴행성 뇌질환(neurodegenerative disease)"은 노화가 진행됨에 따라 뇌조직 또는 뇌세포의 구조 또는 기능이 퇴화되어 발생하는 질병을 의미할 수 있다. 상기 퇴행성 뇌질환의 예로는 알츠하이머병(노인성 치매), 치매, 파킨슨병, 루게릭병, 픽병, 헌팅턴병 또는 타우병증을 포함할 수 있다.

[9] 본 명세서에서 용어, "알츠하이머병"이란 노인성 치매와 호환적으로 사용되고, 노인성 플라크, 신경염증 엉킴(tangles), 및진행성 신경 손실로 특징되는 특정 퇴행성 뇌질환과 관련된 정신적인 퇴화를 수반하는 질병을 의미할 수 있다.

[10] 본 명세서에서 용어 "파킨슨병"이란 종종 운동 기능 및 언어능력을 손상시키는 중추 신경계의 만성 및 진행성 퇴행성 질환을 의미할 수 있다.

[11] 본 명세서에서 용어 "헌팅턴병"이란 헌팅턴 단백질을 암호화하는 유전자 내 3염기 반복 팽창에 의해 야기되어, 무도증, 정신이상, 치매 등이 수반되는 신경퇴행성 질환을 의미할 수 있다.

[12] 본 명세서에서 용어 "루게릭병"이란 운동신경세포만 선택적으로 사멸되는 질환으로 대뇌 피질의 상위운동신경세포와 뇌간 및 척수의 아래운동신경세포 모두가 점차적으로 파괴되는 질환을 의미할 수 있다.

[13] 본 명에서에서 용어 "픽병(pick's disease)"는 뇌의 신경세포의 진행성 파괴를 나타내는 질환을 의미할 수 있다.

[14] 본 발명의 용어 "타우병증"이란 타우 단백질(세포 내 마이크로튜불-관련 단백질과 밀접하게 관련된 패밀리)이 뇌조직에 비정상적으로 축적됨에 의하여 뇌신경이 손상되는 신경퇴행성 질환을 의미할 수 있다.

[15]

[16] 상기 방법은, (1) 중간엽줄기세포를 신경 세포와 접촉시키는 단계; (2) 상기 신경 세포의 유비퀴틴 프로테아좀 활성을 측정하는 단계로서, 상기 단계는 중간엽줄기세포로부터 분비 또는 발현되는 단백질을 확인하면서 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하거나, 또는 후보 물질을 상기 단계 (1)에서 신경 세포에 함께 처리한 후 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하는 것인 단계; 및 (3) 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 변화시킨 중간엽줄기세포로부터 분비 또는 발현되는 단백질 또는 무처리 대조군에 비해 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 변화시킨 후보 물질을 유비퀴틴 프로테아좀 조절제로서 선별하는 단계를 포함하는 유비퀴틴 프로테아좀 조절제를 스크리닝하는 방법일 수 있다.

[17] 또한, 예를 들면, 상기 방법은, (1) 중간엽줄기세포를 인 비트로(*in vitro*) 상에서

신경 세포와 접촉시키거나, 또는 중간엽줄기세포를 인 비보(*in vivo*) 상에서 실험 동물에 투여하는 단계; (2) 상기 신경 세포 및 실험 동물의 뇌의 유비퀴틴 프로테아좀 활성을 측정하는 단계로서, 상기 단계는 중간엽줄기세포로부터 분비되는 단백질을 확인하면서 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하거나, 또는 후보 물질을 상기 단계 (1)에서 함께 신경 세포 또는 실험 동물에 처리한 후 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하는 것인 단계; 및 (3) 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 변화시킨 단백질 또는 무처리 대조군에 비해 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 변화시킨 후보 물질을 유비퀴틴 프로테아좀 조절제로서 선별하는 단계를 포함하는 유비퀴틴 프로테아좀 조절제를 스크리닝 하는 방법일 수 있다.

[18] 또한, 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 (1) AgRP(Agouti-related ppeptide) 또는 그의 활성 단편을 신경 세포와 접촉시키는 단계; (2) 상기 신경 세포의 유비퀴틴 프로테아좀 활성을 측정하는 단계로서, 상기 단계는 후보 물질을 상기 단계 (1)에서 신경 세포에 함께 처리한 후 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하는 것인 단계; 및 (3) 무처리 대조군에 비해 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 변화시킨 후보 물질을 유비퀴틴 프로테아좀 활성 조절제로서 선별하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 구체예에 있어서, 상기 AgRP 또는 그의 활성 단편은 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시키는 것일 수 있다.

[19] 본 명세서에서 용어 "중간엽줄기세포(Mesenchymal Stem Cells:MSCs)는 자기재생능력(self-renewal)과 줄기세포능(stemness maintenance)을 유지하고 다양한 간엽 조직으로 분화할 수 있는 세포를 의미할 수 있고, 포유류, 예를 들면 인간을 포함한 동물의 중간엽줄기세포를 포함할 수 있다. 또한, 상기 중간엽줄기세포는 탯줄 유래, 골수 유래, 태반 유래, 또는 지방 유래 중간엽줄기세포인 것일 수 있다. 상기 탯줄은 포유류의 태아가 태반에서 성장할 수 있도록 모체와 배를 연결해주는 줄을 의미할 수 있으며, 일반적으로 와튼 젤리(Wharton's Jelly)로 둘러싸인 3개의 혈관, 즉, 2개의 배꼽 동맥과 1개의 배꼽 정맥으로 구성된 조직을 의미할 수 있다. 따라서, 본 명세서에서 상기 중간엽줄기세포는 제대 또는 제대혈 유래 중간엽줄기세포일 수 있다. 중간엽줄기세포의 분리는 통상의 당업자에게 자명한 방법으로 수행될 수 있으며, 예를 들면, Pittenger 등(Science 284: 143, 1997)와 van 등(J. Clin. Invest., 58: 699, 1976)의 문헌들에 개시되어 있다. 상기 중간엽줄기세포는 AgRP(Agouti-related ppeptide) 또는 그의 활성 단편을 분비하거나, AgRP 또는 그의 활성 단편을 과발현, 또는 분비하도록 유전적으로 조작된 것일 수 있다.

[20] 본 명세서에서 용어 "AgRP(Agouti-related ppeptide)"는 AgRP/NPY 뉴런에 의해 뇌에서 생산되는 신경 펩티드를 의미할 수 있다. 상기 AgRP는 인간을 포함한 척추동물, 예를 들면, 포유류, 어류, 양서류, 조류, 또는 파충류 유래의 AgRP를 포함할 수 있다. 또한, 상기 AgRP는 AgRP의 전구체도 포함하는 의미일 수 있다(예를 들면, 인간의 경우, 132개의 아미노산 서열의 AgRP 유전자

산물(AgRP의 전구체)에서 N-말단으로부터 20개 아미노산 잔기인 신호 펩티드 도메인이 제거되어 112개의 아미노산 잔기로 구성된 AgRP가 생산된다). 또한 상기 AgRP 또는 그의 활성 단편은 상기 AgRP 또는 그의 활성 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전적으로 조작된 숙주 세포로 사용될 수 있다.

[21] 또한, 본 명세서에서 용어 "유전적 조작 (genetic engineering)" 또는 "유전적으로 조작된 (genetically engineered)"은 세포에 대하여 하나 이상의 유전적 변형 (genetic modification)을 도입하는 행위 또는 그에 의하여 만들어진 세포를 나타낸다. 예를 들면, 상기 중간엽줄기세포 또는 숙주 세포는 AgRP 또는 그의 활성 단편의 발현 또는 활성이 증가되도록 유전적으로 조작된 것, 예를 들면, AgRP 또는 그의 활성 단편을 코딩하는 외인성 유전자를 포함하는 것일 수 있다. 상기 활성 증가는 주어진 유전적으로 조작되지 않은 모세포(예, 야생형)가 갖지 않는 또는 갖는 내재적 단백질 또는 효소의 활성에 비해, 동일한 타입의 단백질 또는 효소의 활성이 보다 더 높은 활성을 갖는 것을 의미할 수 있다. 상기 외인성 유전자는, 상기 중간엽줄기세포 또는 숙주 세포에서 그 모세포에 비하여 언급된 단백질의 활성이 증가되기에 충분한 양으로 발현된 것일 수 있다. 상기 외인성 유전자는 발현 벡터를 통하여 모세포 내로 도입된 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 선형 폴리뉴클레오티드 형태로 모세포 내로 도입된 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 세포 내에서 발현 벡터 (예, 플라스미드)로부터 발현되는 것일 수 있다. 또한, 상기 외인성 유전자는 안정적인 발현을 위하여 세포 내의 유전물질 (예, 염색체)에 삽입되어 발현되는 것일 수 있다.

[22]

[23] 상기 단계 (1)은 중간엽줄기세포, AgRP 또는 그의 활성 단편을 신경 세포에 처리, 또는 접촉시키는 단계를 의미할 수 있다. 상기 처리 또는 접촉은 중간엽줄기세포를 신경 세포와 공배양하거나, 또는 중간엽줄기세포, AgRP 또는 그의 활성 단편을 실험 동물, 예를 들면 동물의 뇌, 예를 들면, 해마에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 처리 또는 접촉은 AgRP 또는 그의 활성 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포와 신경 세포와 접촉시키거나, 예를 들면, 공배양하거나, 또는 상기 숙주 세포를 실험 동물, 예를 들면, 동물의 뇌, 예를 들면, 해마에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 공배양 및 투여는 통상의 당업자가 목적하는 효과, 예를 들면, 중간엽줄기세포 또는 AgRP 또는 그의 활성 단편이 신경 세포에 영향을 미칠 수 있도록 하는 방법 및 기간 동안 수행될 수 있다.

[24] 상기 단계 (2)에 있어서, 유비퀴틴 프로테아좀 활성의 측정은 유비퀴틴 프로테아좀 경로(ubiquitin-proteasome pathway:UPP)의 확인을 의미할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "유비퀴틴 프로테아좀 경로(ubiquitin-proteasome pathway:UPP)"는 세포 내에서 일어나는 단백질 분해 경로 중의 하나로서, 단백질이 유비퀴틴(Ubiquitin: Ub)에 의해 표지된 후 프로테아좀에 의해 세포질 또는 핵에서 분해되는 과정을 의미할 수 있다. 따라서, 상기 유비퀴틴

프로테아좀 활성은 UPP에 의해 분해되는 단백질, 예를 들면, 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양을 확인함으로써 측정될 수 있다. 또한, 다른 구체예에 있어서, 예를 들면, 형광 모이어티가 결합된 프로테아좀 기질을 신경 세포에 과발현 시키고, 형광 세기의 측정을 통해 프로테아좀의 활성을 측정할 수도 있고, 레이바이오 사이토킨 어세이(Raybio cytokine assay)를 사용하여 측정할 수도 있다.

[25] 상기 방법에 있어서, 중간엽줄기세포를 신경 세포에 처리 후에, 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하는 단계는, 프로테아좀 활성조절 단백질의 동정을 위해 중간엽줄기세포로부터 분비되는 단백질을 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 중간엽줄기세포로부터 분비되는 단백질의 확인은 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하는 단계 전 또는 후에 수행될 수 있다.

[26] 또한 상기 방법에 있어서, 중간엽줄기세포로부터 분비되는 단백질 이외에, 추가적으로 프로테아좀 활성 조절의 후보 물질을 스크리닝할 수도 있다. 예를 들면, 상기 단계 (1)에서 후보 물질을 같이 처리하여, 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하는 것일 수 있다. 상기 후보 물질은, 예를 들면, 피검 화합물 또는 피검 조성물은 저분자 화합물, 항체, 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA), 핵산, 단백질, 펩티드, 기타 추출물 또는 천연물을 포함할 수 있다.

[27] 이후에, 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시킨 단백질 또는 무처리 대조군에 비해 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 변화시킨 후보 물질을 유비퀴틴 프로테아좀 조절제로서 선별하는 단계가 수행될 수 있다. 예를 들면, 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시킨 단백질, 예를 들면, 상기 형광 세기를 감소시킨 단백질, 또는 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양을 감소시킨 단백질은 대조군, 예를 들면, 신경 세포와 접촉시키지 않은 중간엽줄기세포에서 분비 또는 발현되는 단백질에 비해 더 많이 분비 또는 발현된 단백질일 수 있다.

[28] 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시킨 단백질 또는 후보 물질은 유비퀴틴 프로테아좀 작용제이고, 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 감소시킨 단백질 또는 후보 물질은 유비퀴틴 프로테아좀 길항제인 것일 수 있다.

[29] 다른 구체예에 있어서, 상기 방법은 동정된 단백질 또는 후보 물질이 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 조절하는지 더 확인하기 위해, 상기 중간엽줄기세포로부터 분비되는 단백질 및 후보 물질이 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 농도 의존적으로 조절하는지, 감소시키는지 또는 증가시키는지 여부, 예를 들면, 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양을 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 농도 의존적으로 증가시키는지 여부를 확인하는 단계는 유비퀴틴 프로테아좀 활성 억제제, 예를 들면, MG-132를 함께 처리하여 확인하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[30] 일 양상에 따른 방법에 의하면, 중간엽줄기세포 또는 그로부터 분비되는 단백질을 이용하여 유비퀴틴 프로테아좀 시스템을 조절할 수 있는 단백질, 또는 물질을 스크리닝할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[31] 도 1은 인간 제대 중간엽줄기세포가 신경 세포의 프로테아좀을 활성을 증가시킨다는 것을 확인한 도면이다; 도 1a: 키모트립신 유사 형광기질 활성화 측정, 도 1b: 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양 측정.

[32] 도 2는 인간 제대 중간엽줄기세포가 AgRP 단백질을 분비하는 것을 확인한 도면이다; 도 2a: 레이바이오 사이토킨 어세이 결과, 도 2b: 정량적 실시간 PCR 결과.

[33] 도 3은 인간 제대 중간엽줄기세포가 분비하는 AgRP가 신경 세포의 프로테아좀 활성을 증가시키는 것을 확인한 도면이다; 도 3a: 키모트립신 유사 형광기질 활성화 측정, 도 3b: 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양 측정.

[34] 도 4는 인간 제대 중간엽줄기세포가 분비하는 AgRP 단백질이 동물 모델의 해마 유래 세포의 프로테아좀 활성을 증가시키는 것을 확인한 도면이다; 도 4a: Ub 컨쥬게이트의 웨스턴 블랏팅 측정, 도 4b: Ub conjugate의 상대적 발현 값.

[35] 도 5는 인간 제대 중간엽줄기세포가 분비하는 AgRP 단백질이 동물 모델에서 프로테아좀 활성을 증가시키는 것을 확인한 도면이다; 도 5a: 키모트립신 유사 형광기질 활성화 측정, 도 5b: 실험 프로토콜, 도 5c: 키모트립신 유사 형광기질 활성화 측정, 도 5d: 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양 측정.

발명의 실시를 위한 형태

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

[37]

[38] **실시예. 인간 중간엽줄기세포를 이용한 퇴행성 뇌질환 치료 효능을 갖는 단백질의 스크리닝 및 그에 의해 동정된 단백질의 활성 분석**

[39]

[40] **1. 인간 중간엽줄기세포를 이용한 퇴행성 뇌질환 치료 효능을 갖는 단백질 스크리닝**

[41] **1.1. 인간 제대 중간엽줄기세포의 신경 세포에 대한 활성 확인**

[42] 인간 제대 중간엽줄기세포(Wharton's Jelly-MSC: WJ-MSCs)가 신경 세포의 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시킨다는 것을 확인하기 위해 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[43] 인간 제대 중간엽줄기세포는 본원에서 승인한 IRB (IRB# 2015-09-023-003)의 기준에 따라 삼성서울병원 산부인과와의 협업 연구를 통하여 탯줄을 확보한 후 기존에 보고된 프로토콜에 따라 중간엽줄기세포 분리 진행을 하였다(Choi, M,

Lee, HS, Naidansaren, P, Kim, HK, O, E, Cha, JH, *et al.* (2013). Proangiogenic features of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal/stem cells and their ability to form functional vessels. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 560-570). 구체적으로, 탯줄을 3-4 cm 길이 자른 다음, 조직을 잘게 자르고 콜라게나아제 용액(Gibco, USA)을 이용하여 세포외기질을 분해하기 위해 60-90 분 동안 처리 해준 다음, 0.25% 트립신 (Gibco, USA)을 추가하여 30분 동안, 37℃에서 분해를 더 유도하였다. 이후에, 소태아혈청(FBS; Biowest, USA)을 첨가하여, 1000g에서 10분 동안 원심분리를 이용하여 세포를 얻고, 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco Modified Eagle Medium) (DMEM; Biowest, USA) 에 20% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco,USA)이 첨가된 배지를 이용하여 37 ℃, 5% CO_2 환경에서 세포를 배양하였고, passage 5 에서 6 이된 WJ-MSC를 실험에 사용하였다.

[44] 신경 세포는 SH-SY5Y(ATCC, USA)를 사용하였다. 먼저, 6 웰 플레이트(BD Falcon, USA)에서 SH-SY5Y (ATCC, USA)세포가 90% confluency가 되었을 때, transwell insert (BD Falcon, USA)를 각 웰에 삽입하여, insert chamber에 인간 제대 중간엽줄기세포($1X10^5$/1mL)를 분주하여 혈청이 첨가 되지 않은 Minimal Essential Medium alpha 1X (MEMα1x; Gibco-Invitrogen, USA)에서 24시간 동안, 37 ℃, 5% CO_2 환경에서, 공동 배양을 하였다.

[45] 이후에, 인간 제대 중간엽줄기세포가 신경 세포의 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시키는지 확인하기 위해, 세포에서의 프로테아좀의 주요 분해 활성인 키모트립신 유사 활성, 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양, 및 형광 기질이 도입된 신경세포에서의 형광 세기를 측정하였다. 대조군으로는 중간엽줄기세포와 공동배양하지 않은 신경세포를 사용하였다.

[46] 구체적으로, 수집된 세포를 레틱 버퍼(retic buffer) (30 mM Tris (pH 7.8), 5mM MgCl2, 5mM KCl, 0.5mM DTT, 2 mM ATP)를 이용하여 초음파 처리(ultra-sonication)를 한 이후에, 5 μg의 단백질과 키모트립신 유사 형광기질인 Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Enzo, Republic of Korea)을 200 μM (최종 농도: 100 μM)으로 96 웰 블랙/클리어 플레이트(black/clear plate) (BD Falcon, USA)에 넣고, 37 ℃에서 4시간까지 배양하였다. 반응은 에탄올을 첨가하여 정시시켰다. 키모트립신 유사 형광기질 활성화는 플루오로미터(fluorometer) (Glomax, Promega, USA)를 사용하여 측정을 수행하였고, 그 결과를 도 1a에 나타내었다.

[47] 프로테아좀 시스템으로 분해되는 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양의 측정은 웨스턴 블랏팅을 통해 확인하였다. 웨스턴 블랏팅은 먼저, 레틱 버퍼(retic buffer)로 초음파 처리한 단백질을 우레아 버퍼(urea buffer) 와 1:1로 혼합하였다. 이후에, 원심분리를 하여, 상층액을 모아서 Bradford assay (Bio-rad, USA)를 이용하여 단백질 정량을 하였다. 각 샘플에서 10 μg에 단백질을 겔에 로딩한 후, SDS를 이용하여 전기영동을 수행하였다. 단백질을 니트로셀룰로오스 막으로 트랜스퍼시킨 이후에, 5% 탈지유(BD Difco, USA)에 1% TBST (Tris-buffered

saline with 0.1% Tween 20) 이 첨가된 용액에 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 이후에, 유비퀴틴 컨쥬게이트 (Ub, 1:1000; Santa Cruz, USA) 와 베타 액틴(1:5000; Santa Cruz, USA) 항체를 처리하였고, 4 ℃°C에서 하룻밤동안 배양하였다. 이후, 이차 항체(goat anti-mouse IgG-HRP; Ab frontier, USA)를 한 시간 동안 상온에서 처리하고, 블랏들은 ECL (Advansta, USA) 를 이용하여 발달시켰고, 그 결과를 도 1b에 나타내었다.

[48] 형광기질이 도입된 신경세포에서의 형광 세기의 측정은 GFP가 붙어 있는 프로테아좀의 기질은 GFP-degron을 신경 세포에 리포펙타민 2000 (Life Technologies, USA) 형질전환 방법으로 과발현하고, 공초좀 현미경 (LSM 700; Carl Zeiss AG, Jena, Germany)으로 관찰한 후 형광 세기를 Image-J (NIH, USA) 분석 프로그램을 이용하여, 측정하였고 그 결과를 도 1c에 나타내었다.

[49] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 공동 배양을 한 신경 세포에서 프로테아좀의 주요 분해 활성인 키모트립신 유사 활성이 공동 배양을 하지 않은 신경 세포 보다 높고, 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양이 공동 배양을 한 신경 세포에서 감소하였으며, 공동 배양을 한 신경 세포에서 공동 배양을 하지 않은 신경 세포 대비 형광 세기가 줄어드는 것을 확인하였다. 상기의 결과로, 인간 제대 중간엽줄기세포를 신경 세포와 공동 배양시, 신경 세포의 프로테아좀 활성이 높아지는 것을 알 수 있다.

[50]

[51] **1.2. 인간 제대 중간엽줄기세포로부터 분비되는 단백질의 동정**

[52] 인간 제대 중간엽줄기세포를 신경 세포와 공동 배양하였을 시, 분비되는 단백질을 동정하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[53] 구체적으로 인간 제대 중간엽줄기세포로부터 분비되는 단백질을 확인하기 위해 레이바이오 사이토킨 어세이(Raybio cytokine assay) 및 정량적 실시간 PCR(real time quantitative reverse transcription PCR)을 수행하였다.

[54] 레이바이오 사이토킨 어세이를 하기 위해 공동배양을 한 후 배지를 제거하고, 센트리콘(centricon) (Millipore, USA)을 사용하여 농축하였다. 농축한 배지 샘플들은 509 분비단백질 분석이 가능한 RayBio® Human Cytokine Antibody Arrays - Biotin-Label Based G Series (Raybiotech, USA)를 이용하여 분석을 수행하였다. WJ-MSC 공동배양을 통해 10배 분비가 증가된 단백질들을 하기 수학식 1로 분석을 하였고, 그 결과를 도 2a에 나타내었다.

[55] [수학식 1]

[56]
$$\frac{\left[\left(\text{SH-SY5Y cells co-cultured with WJ-MSCs}\right) - \left(\text{SH-SY5Y alone}\right)\right]}{\left(\text{WJ-MSC alone}\right)}$$

[57]

[58] 정량적 실시간 PCR은 먼저 배양한 세포에서 TRIzol (Life Technologies, USA) 를

이용하여 RNA 추출을 하였고, SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA)를 사용하여 cDNA 합성을 하였다. PCR를 진행 하기 위해 다음과 같은 프라이머들을 제작 및 사용을 하였다;

[59] AGRP Forward (FOR): AGT CAC GTG TGG CCC TTC AT(서열번호 1)

[60] AGRP Reverse (REV): TCC GGG ATT CTT GCC TAG AG(서열번호 2)

[61] GAPDH FOR: CGA GAT CCC TCC AAA ATC AA(서열번호 3)

[62] GAPDH REV: CCT TCT CCA TGG TGG TGA A(서열번호 4).

[63] Step ONE Plus system (AB, USA) 과 2X Power SYBR Green Master Mix (AB, USA)를 사용하여 PCR을 수행하였고, 그 조건은 다음과 같았다: 95 ℃ 10 분, 95 ℃ 15초, 59℃ 30초(40 cycles). AGRP 발현 분석은 Livak 과 Schmittgen의 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법(Leitch, AE, Lucas, CD, Marwick, JA, Duffin, R, Haslett, C, and Rossi, AG (2012). Cyclin-dependent kinases 7 and 9 specifically regulate neutrophil transcription and their inhibition drives apoptosis to promote resolution of inflammation. *Cell Death Differ* 19: 1950-1961.)으로 수행하였고, 그 결과를 도 2b에 나타내었다.

[64]

[65] 그 결과 도 2에 나타낸 바와 같이, 인간 제대 중간엽줄기세포를 신경 세포와 공동 배양을 하였을 때, AgRP라는 단백질을 분비한다는 것을 확인하였다.

[66]

[67] **2. 동정된 단백질의 활성 분석**

[68] **2.1. 동정된 단백질이 신경 세포에서 유비퀴틴 프로테아좀 활성에 미치는 영향 분석**

[69] 상기 실시예 1.2.에서 동정된 단백질인 AgRP가 신경 세포에서 유비퀴틴 프로테아좀 활성에 미치는 영향을 분석하기 위해 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[70] 구체적으로, 신경 세포 SH-SY5Y (ATCC, USA)세포가 90% confluency가 되었을 때, 혈청이 첨가되지 않은 Minimal Essential Medium alpha 1X (MEMα1x; Gibco-Invitrogen, USA)에 1, 10, 20, 50ng/mL AgRP (R&D, USA) 를 처리하고, 24시간 동안, 37 ℃, 5% CO_2 환경에서 배양을 하였다. 대조군으로는 1, 10, 20, 50ng/mL의 PBS 중 0.1% BSA를 사용하였다.

[71] 프로테아좀의 활성은 상기 실시예 1.1과 동일한 방법으로 키모트립신 유사 활성을 확인하였고, 그 결과를 도 3a에 나타내었다. 또한, 상기 실시예 1.1과 동일한 방법으로 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양을 확인하였고, 그 결과를 도 3b 및 3c에 나타내었다.

[72] 신경 세포 SH-SY5Y (ATCC, USA)세포가 90% confluency가 되었을 때, serum이 첨가 되지 않은 Minimal Essential Medium alpha 1X (MEMα1x; Gibco-Invitrogen, USA)에 농도별 (0-50 ng/mL)로 AgRP를 처리하고, 24시간 동안, 37 ℃, 5% CO_2 환경에서 배양을 하였다. 대조군으로는 PBS 중 0.1% 소태아 혈청(BSA)을 동일한 농도로 SH-SY5Y에 처리 하였다.

[73] 추가적으로, 무혈청 DMEM (Biowest, USA)배지에서 생쥐 해마 유래 세포(HT22; 백남인 교수님, 경희대학교)에 프로테아좀 활성 저해제인 MG-132(Calbiochem, USA)를 1 μM의 농도로 처리하였고, AgRP를 농도 별로 (1,10,20,50 ng/mL) 같이 처리하고 24시간 동안, 37 ℃, 5% CO_2 환경에서 배양을 하였다. 이후에, 상기 실시예 1.1.과 동일한 방법으로 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양을 확인하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다

[74]

[75] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, AgRP를 처리한 신경세포가 대조군인 정상 세포에 비해 키모트립신 유사 활성(Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC:SUC)이 증가하였고, 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 발현 양이 AgRP 농도 의존적으로 감소된 것을 확인하였다.

[76] 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, 프로테아좀 저해제인 MG-132를 AgRP와 같이 처리하여 주었을 때, AgRP가 농도 의존적으로 유비퀴킨 컨쥬게이트 단백질의 발현 양이 감소시키는 것을 확인하였다.

[77] 상기의 결과로, AgRP가 신경 세포에서 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

[78]

[79] **2.2. 동정된 단백질이 동물 모델에서 프로테아좀 활성에 미치는 영향 분석**

[80] AgRP가 동물 모델에서 프로테아좀 활성에 미치는 영향을 분석하기 위해 하기의 실험을 수행하였다. 동물 모델로서는 정상 마우스(C57BL6/J; 10-13개월; Jackson Laboratories, USA) 및 10-13 개월령의 알츠하이머병 동물 모델 5XFAD (Jackson Laboratories, USA)를 사용하였다.

[81] 먼저, 정상 마우스의 해마에 2 X 10^5 세포수(2 X 10^5/3μl)의 인간 제대 중간엽줄기세포를, 그리고 AgRP (1000ng/kg)을 stereotaxic기계 (Harvard apparatus, USA) 를 이용하여, bregma 좌표를 잡은 후 0.5 μl/min 속도로 해마에 투여 하였다 (A/P -2.3mm, M/L -1.3mm, and D/V -2.0 mm). 대조군으로는 PBS만 투여한 마우스를 사용하였다. 투여 1주일 후에, 정상 마우스를 관동맥 관류로 안락사 시킨 후, 해마를 제거하였다. 제거된 해마를 약사발로 갈은 다음, 상기 실시예 1.1과 동일한 방법으로 단백질을 추출하였다. 프로테아좀 활성은 상기 실시예 1.1.과 동일한 방법으로 측정하였고, 그 결과를 도 5a에 나타내었다.

[82] 그 결과, 인간 제대 중간엽줄기세포 와 AgRP를 투여한 군들이 PBS만 투여를 한 군에 비해 프로테아좀 활성이 증가한 것을 확인하였다.

[83] 이러한 정상 마우스에서의 실험 결과를 바탕으로 알츠하이머병 동물 모델인 5XFAD에서의 실험을 진행하였다. 실험은 도 5b에 나타낸 바와 같은 좌표를 이용하여 대조군으로 인산완충식염수를 3μl의 용량을 투여하였고, 실험군으로서는 인간 제대 중간엽줄기세포 및/또는 AgRP를 각각 2X10^5/3μl, 1000ng/kg의 용량으로 상기와 동일한 방법으로 동물 모델의 해마에 투여하였다. 투여 1주일 후에, 상기 정상 마우스에서의 실험과 동일한 방법으로 단백질을

추출하였다. 프로테아좀 활성은 상기 실시예 1.1.과 동일한 방법으로 키모트립신 유사 활성을 측정하였고, 그 결과를 도 5c에 나타내었다.

[84] 기존에 보고된 실험들과 동일하게 같은 개월 수 정상 쥐에 비해, 알츠하이머병 동물 마우스 모델 (5XFAD)에서 프로테아좀 활성이 줄어든 것을 확인하고자 예비 실험을 진행 하였다. 6개월 된 정상과 5XFAD 쥐를 안락사 시킨후, 해마를 적출하여 상기와 동일한 방법으로 단백질을 추출하여 프로테아좀 활성은 상기 실시예 1.1.과 동일한 방법으로 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양을 측정하였고, 그 결과를 도 5d에 나타내었다.

[85]

[86] 그 결과, 인간 제대 중간엽줄기세포 와 AgRP를 투여한 군들은 대조군에 비하여 SUC 활성이 증가하였고, 인간 제대 중간엽줄기세포 및 AgRP를 모두 투여해준 군들의 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양이 대조군에 비해 감소한 것을 확인하였다. 또한 6개월 정상쥐 해마의 비해, 6개월 5XFAD 해마에서 SUC 활성이 낮고 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양이 높다는 것을 관찰하였다.

[87]

[88] 상기의 결과로, 일 구체예에 따른 방법을 사용하여 뇌의 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 조절하는 물질을 스크리닝 할 수 있으며, 또한 이에 의해 스크리닝된 물질은 뇌의 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시켜 퇴행성 뇌질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있음을 할 수 있다.

청구범위

[청구항 1] (1) 중간엽줄기세포를 신경 세포와 접촉시키는 단계;
(2) 상기 신경 세포의 유비퀴틴 프로테아좀 활성을 측정하는 단계로서, 상기 단계는 중간엽줄기세포로부터 분비 또는 발현되는 단백질을 확인하면서 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하거나, 또는 후보 물질을 상기 단계 (1)에서 신경 세포에 함께 처리한 후 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하는 것인 단계; 및
(3) 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 변화시킨 중간엽줄기세포로부터 분비 또는 발현되는 단백질, 또는 무처리 대조군에 비해 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 변화시킨 후보 물질을 유비퀴틴 프로테아좀 활성 조절제로서 선별하는 단계를 포함하는 유비퀴틴 프로테아좀 활성 조절제를 스크리닝 하는 방법.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시킨 단백질 또는 후보 물질은 유비퀴틴 프로테아좀 작용제이고, 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 감소시킨 단백질 또는 후보 물질은 유비퀴틴 프로테아좀 길항제인 것인 방법.

[청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 유비퀴틴 프로테아좀 작용제는 퇴행성 뇌질환 치료제인 것인 방법.

[청구항 4] 청구항 3에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병, 치매, 파킨슨병, 루게릭병, 픽병, 헌팅턴병 및 타우병증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

[청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 중간엽줄기세포로부터 분비 또는 발현되는 단백질 및 후보 물질이 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 농도 의존적으로 증가 또는 감소시키는지 여부를 확인하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

[청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 농도 의존적으로 증가시키는지 여부를 확인하는 단계는 유비퀴틴 프로테아좀 활성 억제제를 함께 처리하여 확인하는 것인 방법.

[청구항 7] 청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성은 유비퀴틴 컨쥬게이트 단백질의 양을 확인하는 것인 방법.

[청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 AgRP(Agouti-related ppeptide) 또는 그의 활성 단편을 분비하거나, AgRP 또는 그의 활성 단편을 분비하도록 유전적으로 조작된 것인 방법.

[청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 중간엽줄기세포는 제대 유래, 제대혈 유래, 골수 유래, 태반 유래, 또는 지방 유래 중간엽줄기세포인 것인 방법.

[청구항 10] 청구항 1에 있어서, 상기 후보 물질은 저분자 화합물, 항체, 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA), 핵산, 단백질, 펩티드, 및 천연물로 이루어진

군으로부터 선택된 어느 하나 인 것인 방법.

[청구항 11] (1) AgRP(Agouti-related ppeptide) 또는 그의 활성 단편을 신경 세포와 접촉시키는 단계;

(2) 상기 신경 세포의 유비퀴틴 프로테아좀 활성을 측정하는 단계로서, 상기 단계는 후보 물질을 상기 단계 (1)에서 신경 세포에 함께 처리한 후 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 측정하는 것인 단계; 및

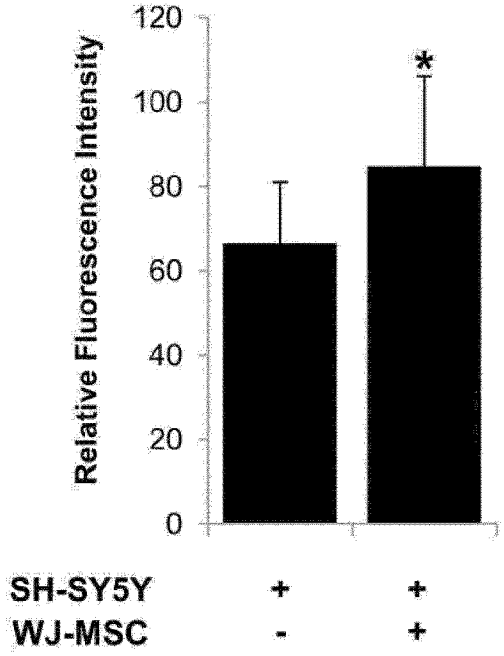
(3) 무처리 대조군에 비해 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 변화시킨 후보 물질을 유비퀴틴 프로테아좀 활성 조절제로서 선별하는 단계를 포함하는 유비퀴틴 프로테아좀 활성 조절제를 스크리닝 하는 방법.

[청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 증가시킨 단백질 또는 후보 물질은 유비퀴틴 프로테아좀 작용제이고, 유비퀴틴 프로테아좀의 활성을 감소시킨 단백질 또는 후보 물질은 유비퀴틴 프로테아좀 길항제인 것인 방법.

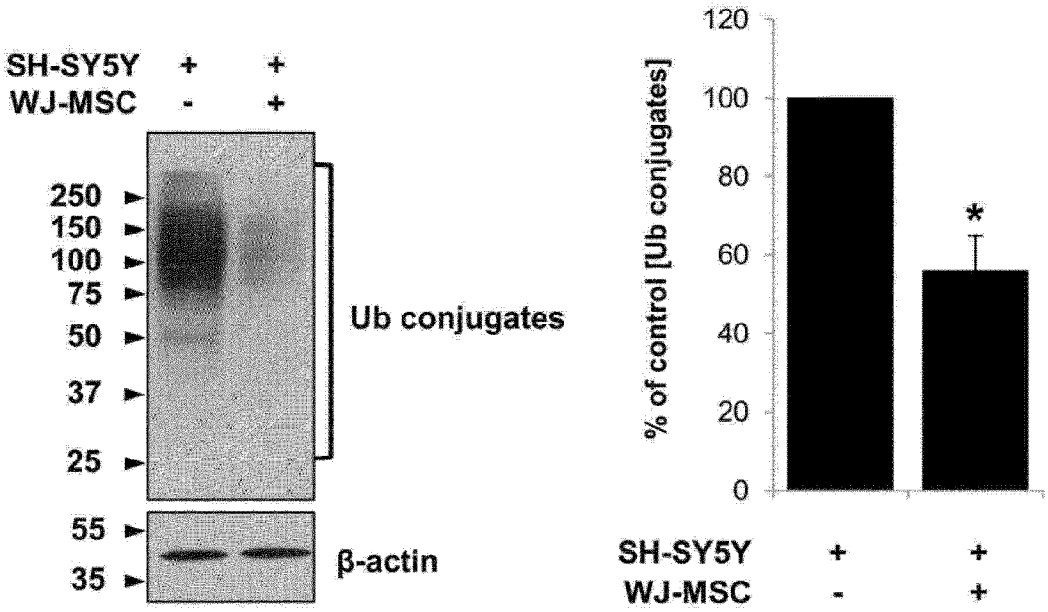
[청구항 13] 청구항 12에 있어서, 상기 유비퀴틴 프로테아좀 작용제는 퇴행성 뇌질환 치료제인 것인 방법.

[청구항 14] 청구항 11에 있어서, 상기 AgRP 또는 그의 활성 단편과 신경 세포의 접촉은 AgRP 또는 그의 활성 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 숙주 세포와 신경 세포를 접촉시키는 것인 방법.

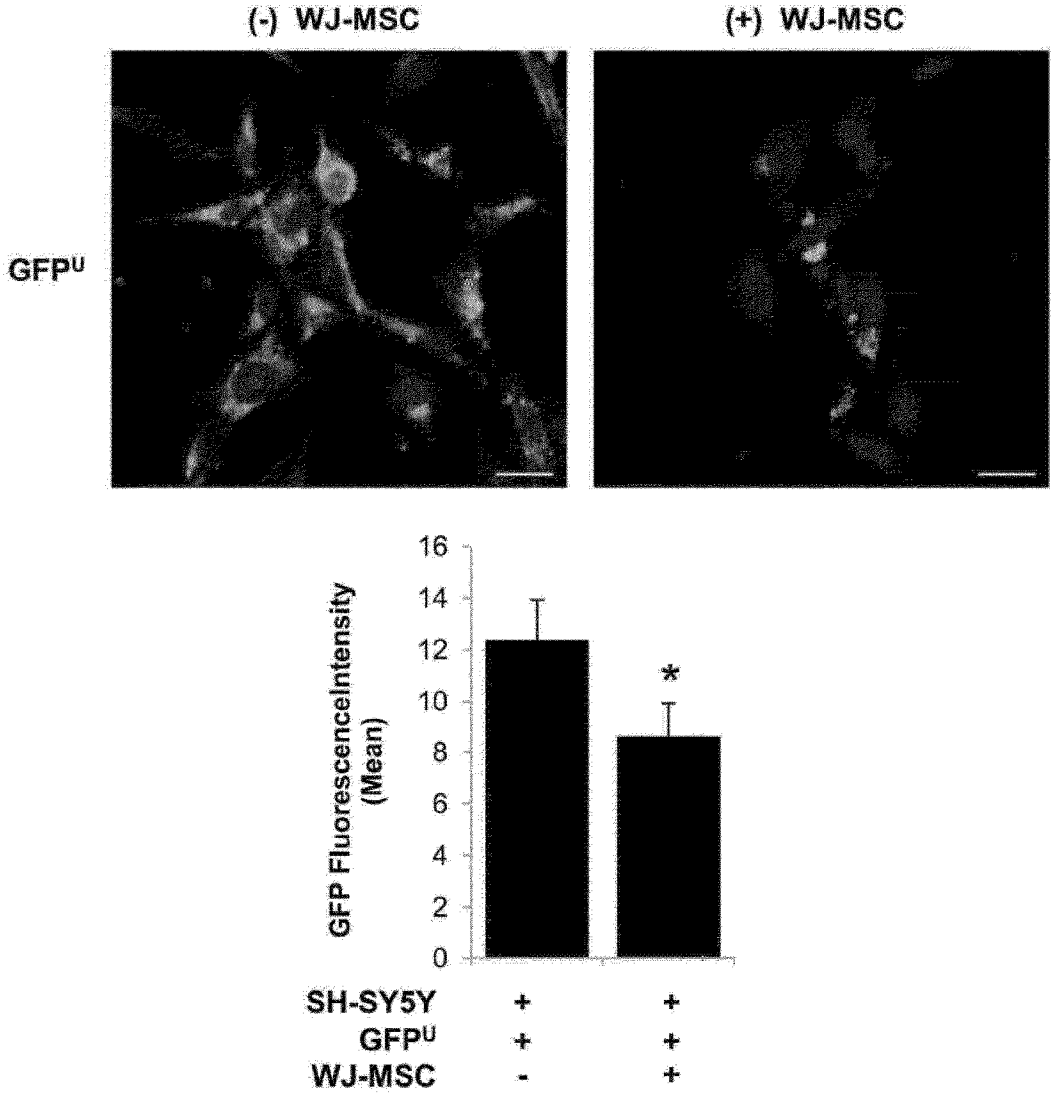
[도1a]


Relative Fluorescence Intensity
120
100
80
60
40
20
0
*
SH-SY5Y + +
WJ-MSC - +

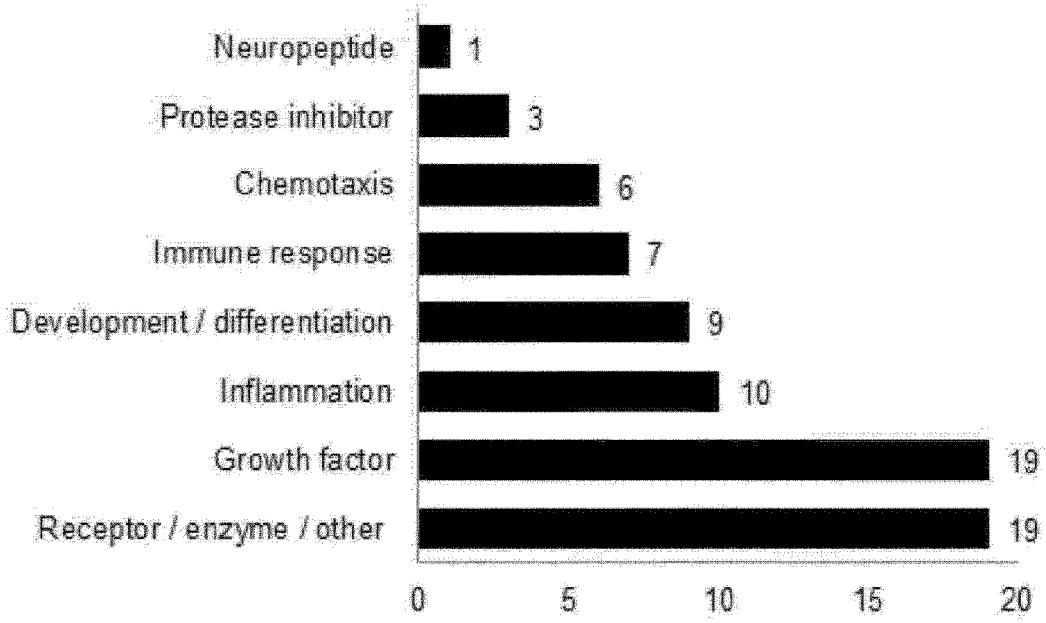
[도1b]


SH-SY5Y + +
WJ-MSC - +
250
150
100
75
50
37
25
Ub conjugates
55
35
β-actin
% of control [Ub conjugates]
120
100
80
60
40
20
0
*
SH-SY5Y + +
WJ-MSC - +

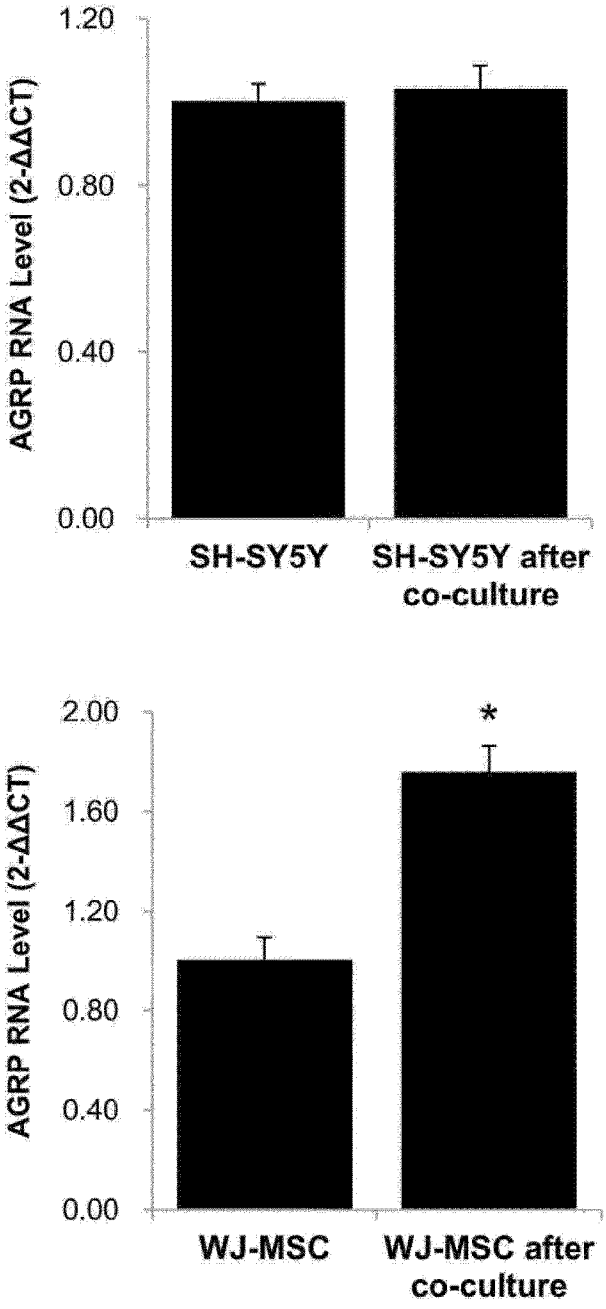
[도1c]


(-) WJ-MSC
(+) WJ-MSC
GFP^U
GFP Fluorescence Intensity (Mean)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
SH-SY5Y + +
GFP^U + +
WJ-MSC - +

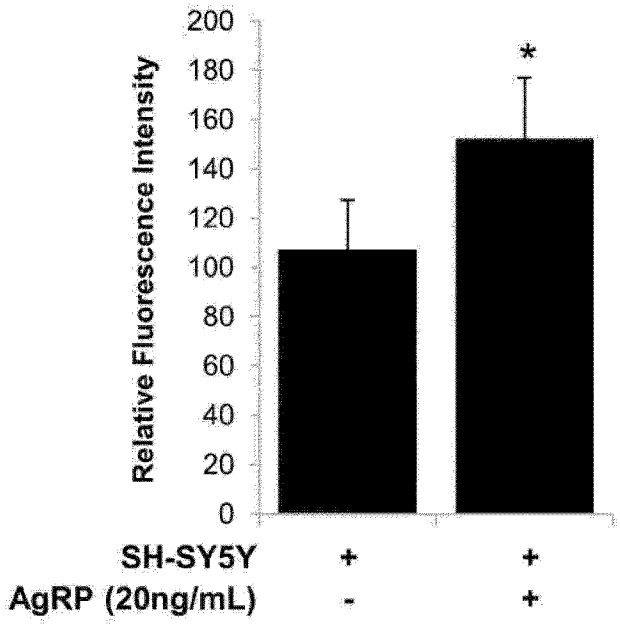
[도2a]


Neuropeptide 1
Protease inhibitor 3
Chemotaxis 6
Immune response 7
Development / differentiation 9
Inflammation 10
Growth factor 19
Receptor / enzyme / other 19
0
5
10
15
20

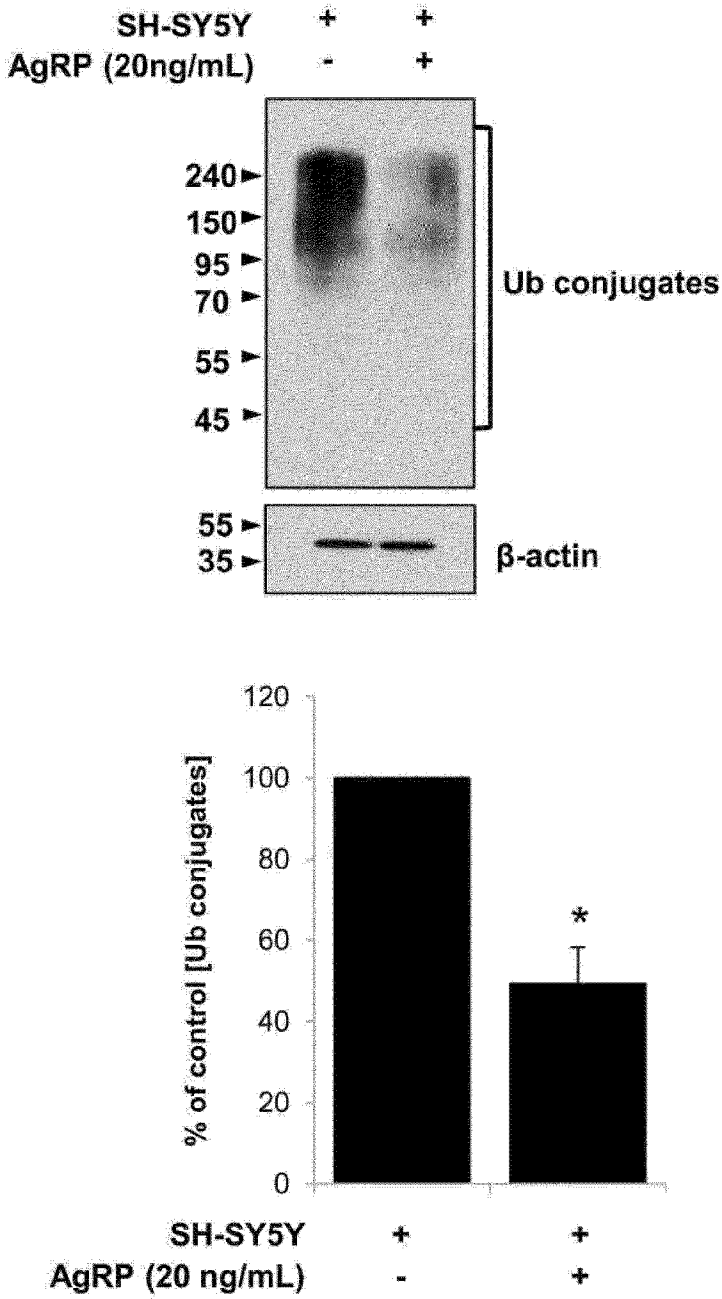
[도2b]


AGRP RNA Level (2-ΔΔCT)
1.20
0.80
0.40
0.00
SH-SY5Y
SH-SY5Y after co-culture
AGRP RNA Level (2-ΔΔCT)
2.00
1.60
1.20
0.80
0.40
0.00
*
WJ-MSC
WJ-MSC after co-culture

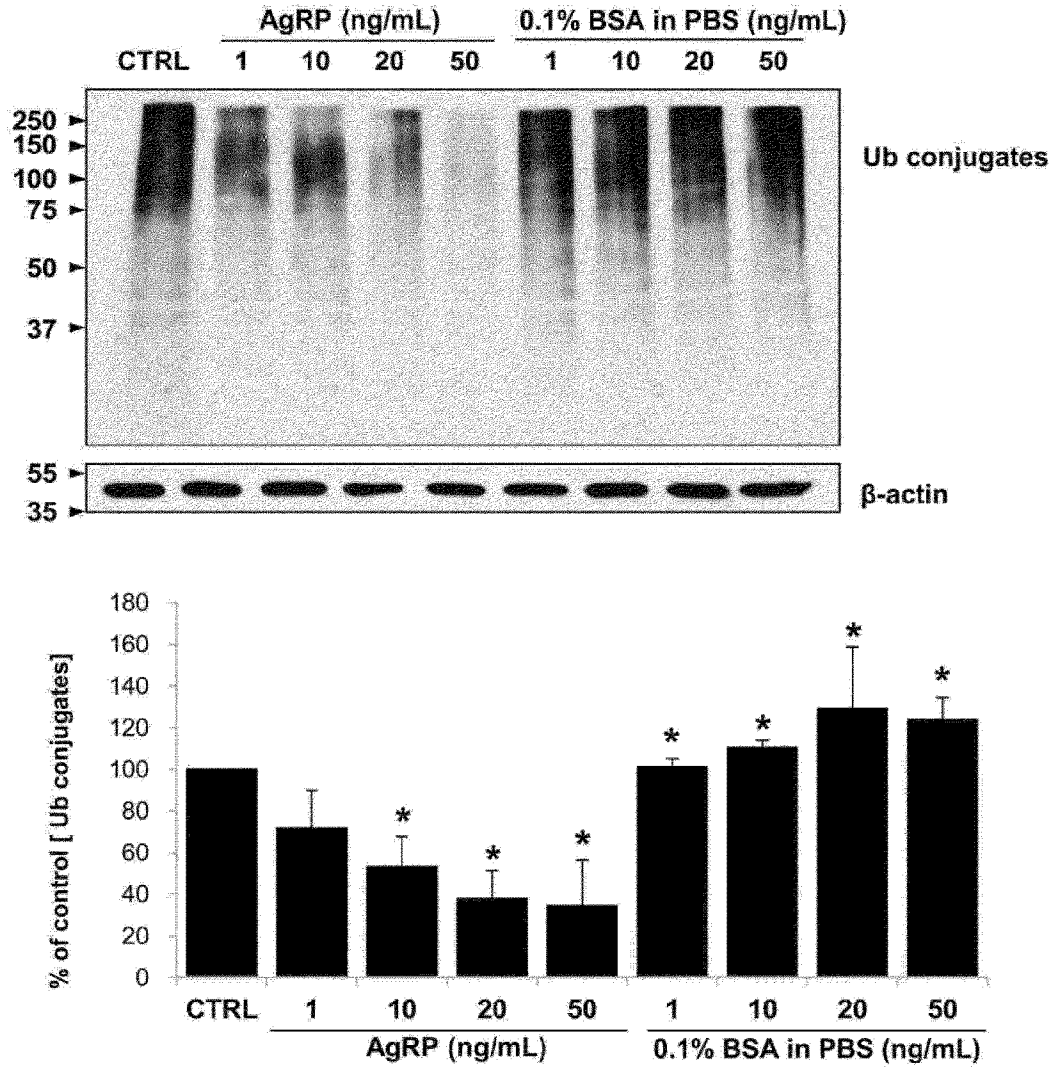
[도3a]


Relative Fluorescence Intensity
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
SH-SY5Y + +
AgRP (20ng/mL) - +

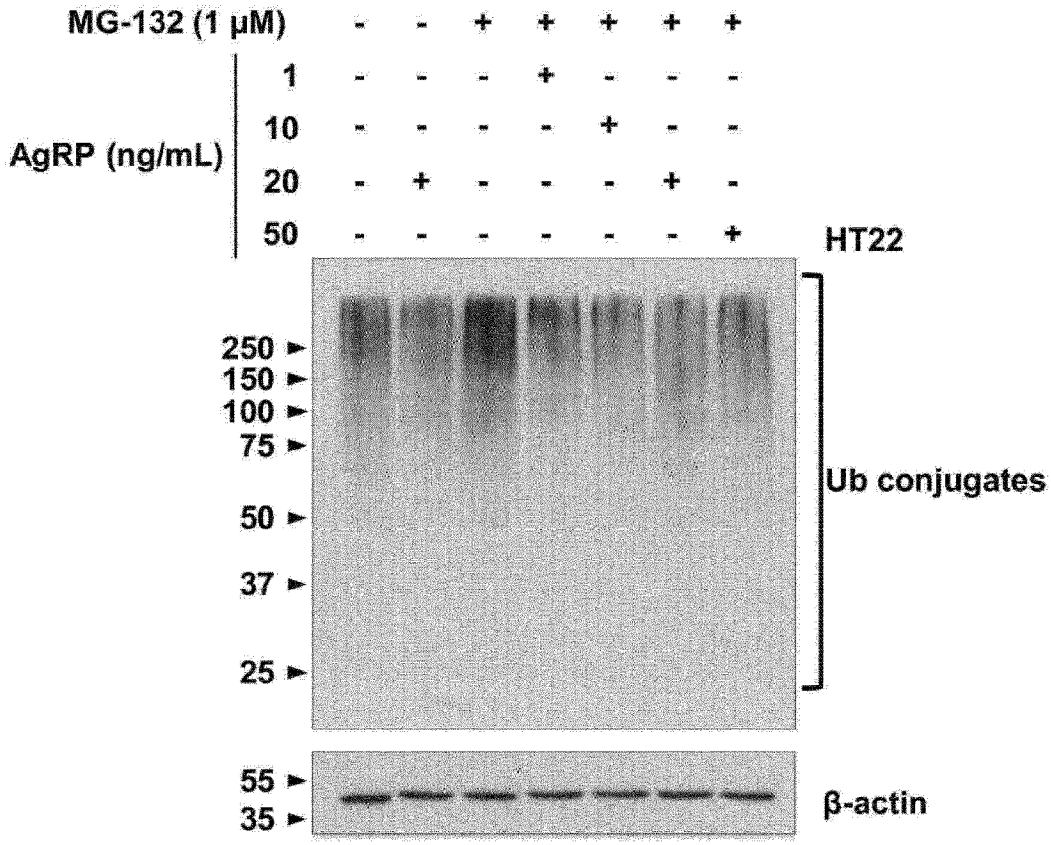
[도3b]


SH-SY5Y + +
AgRP (20ng/mL) - +
240
150
95
70
55
45
Ub conjugates
55
35
β-actin
120
100
80
60
40
20
0
% of control [Ub conjugates]
*
SH-SY5Y + +
AgRP (20 ng/mL) - +

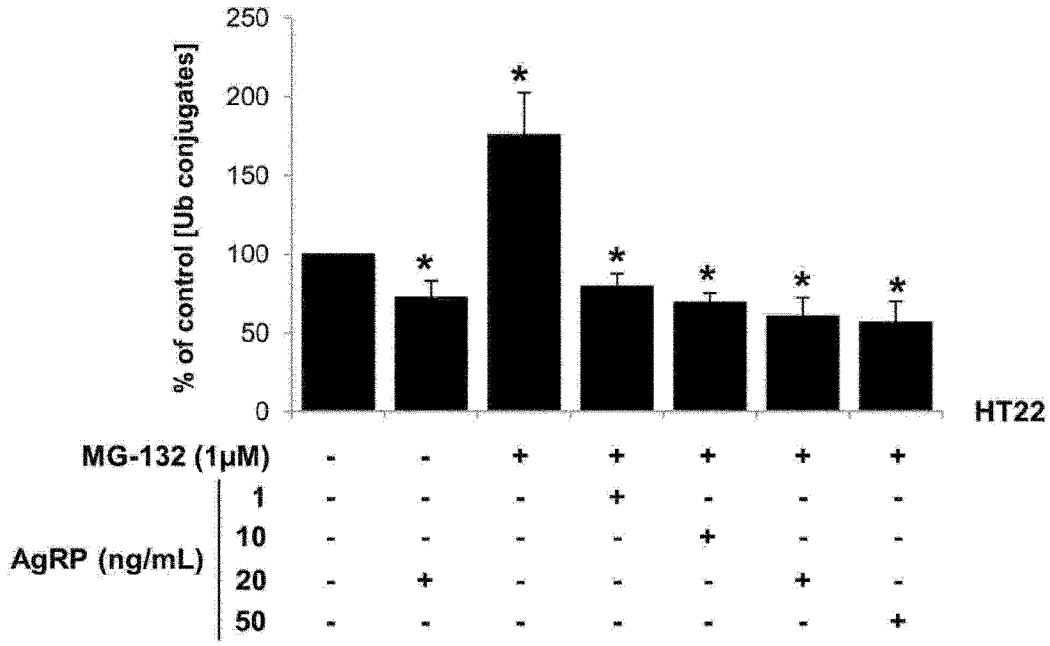
[도3c]


AgRP (ng/mL)
0.1% BSA in PBS (ng/mL)
CTRL
1
10
20
50
1
10
20
50
250
150
100
75
50
37
Ub conjugates
55
35
β-actin
% of control [Ub conjugates]
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
CTRL
1
10
20
50
1
10
20
50
AgRP (ng/mL)
0.1% BSA in PBS (ng/mL)

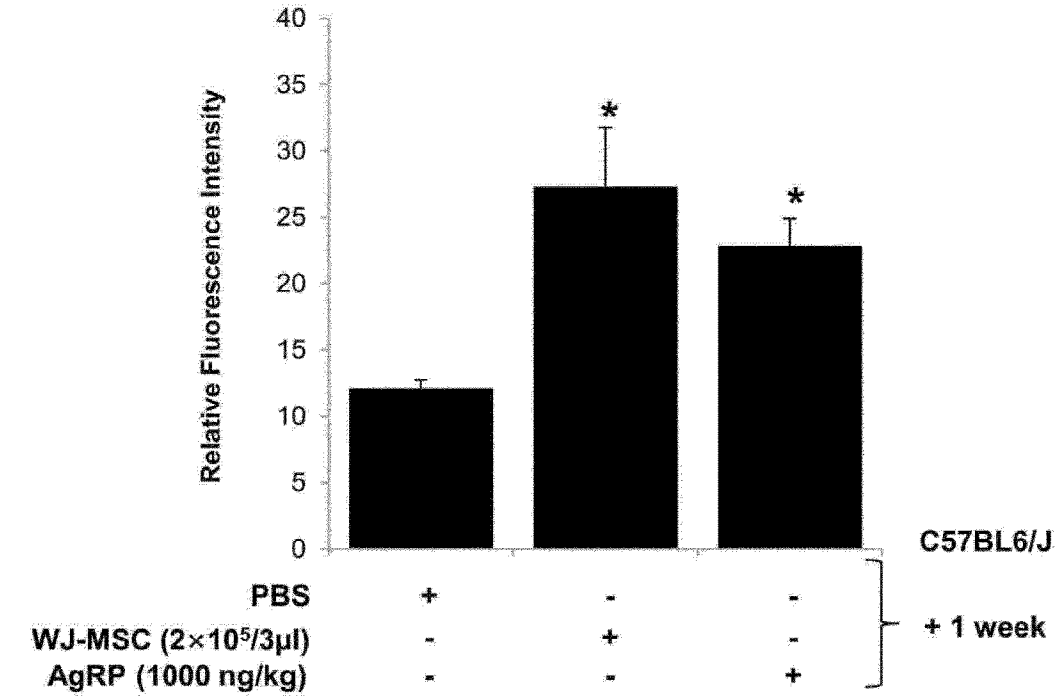
[도4a]


MG-132 (1 μM) - - + + + + +
AgRP (ng/mL)
1 - - - + - - -
10 - - - - + - -
20 - + - - - + -
50 - - - - - - +
HT22
250
150
100
75
50
37
25
Ub conjugates
55
35
β-actin

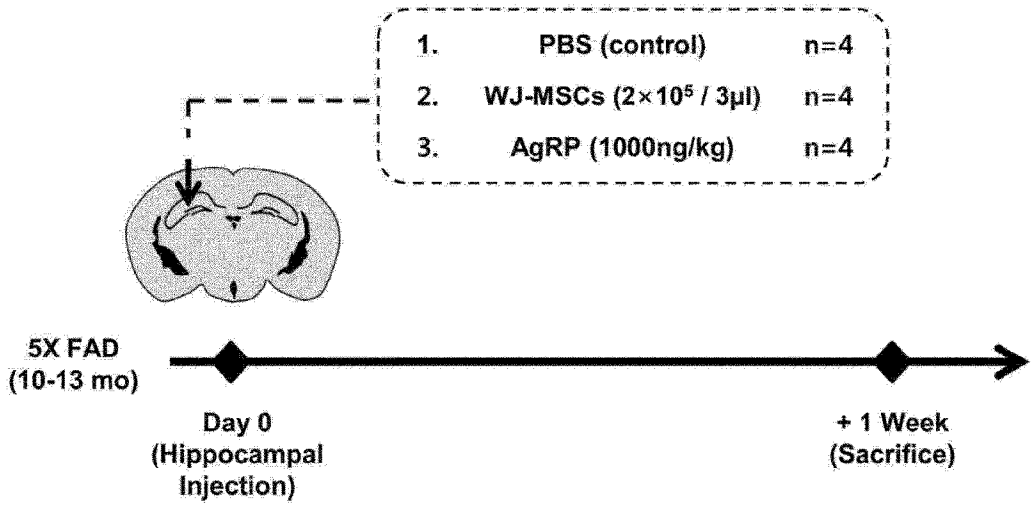
[도4b]


% of control [Ub conjugates]
250
200
150
100
50
0
HT22
MG-132 (1μM) - - + + + + +
AgRP (ng/mL)
1 - - - + - - -
10 - - - - + - -
20 - + - - - + -
50 - - - - - - +

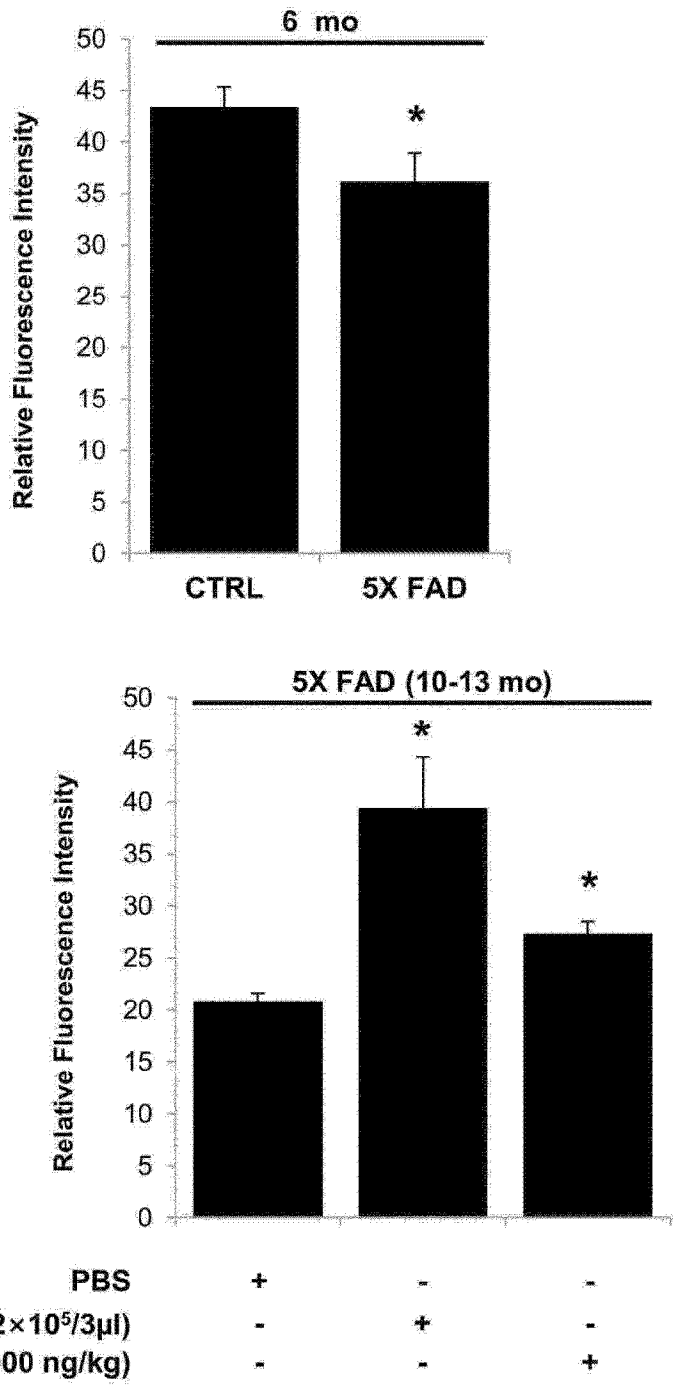
[도5a]


Relative Fluorescence Intensity
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
*
C57BL6/J
PBS + - -
WJ-MSC (2×10⁵/3μl) - + -
AgRP (1000 ng/kg) - - +
+ 1 week

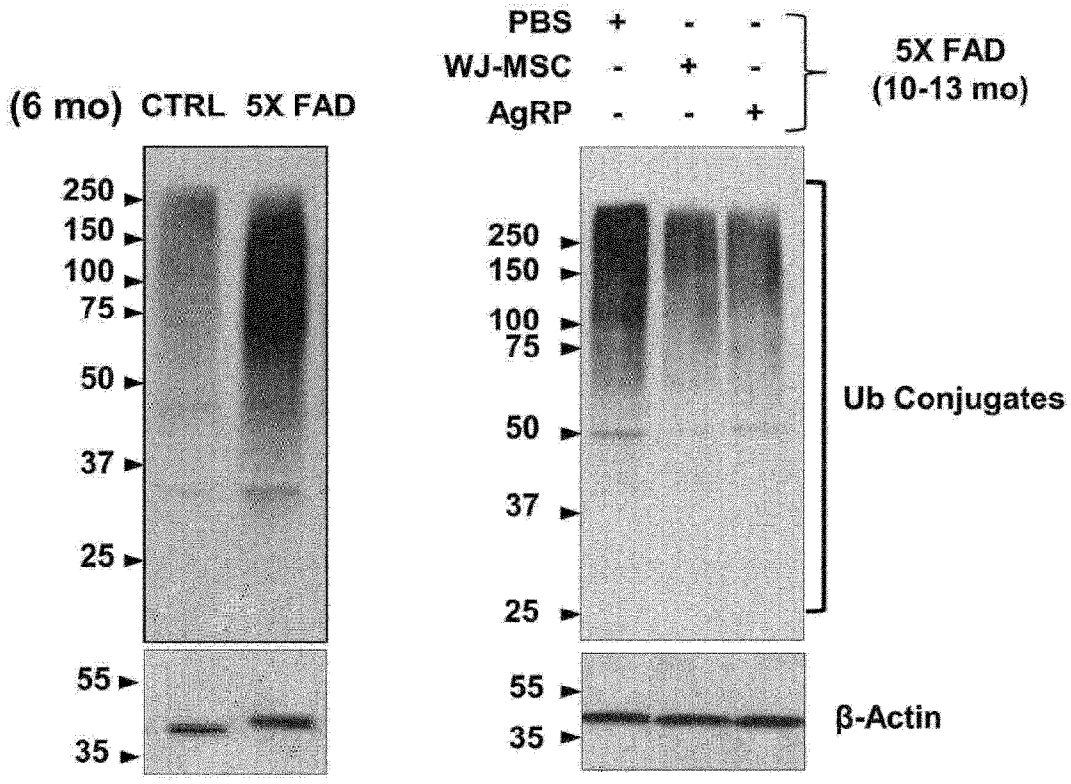
[도5b]


1. PBS (control) n=4
2. WJ-MSCs (2×10⁵ / 3μl) n=4
3. AgRP (1000ng/kg) n=4
5X FAD
(10-13 mo)
Day 0
(Hippocampal
Injection)
+ 1 Week
(Sacrifice)

[도5c]


6 mo
Relative Fluorescence Intensity
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
CTRL
5X FAD
5X FAD (10-13 mo)
Relative Fluorescence Intensity
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
*
PBS + - -
WJ-MSC (2×10⁵/3μl) - + -
AgRP (1000 ng/kg) - - +

[도5d]


(6 mo) CTRL 5X FAD
250
150
100
75
50
37
25
55
35
PBS + - -
WJ-MSC - + -
AgRP - - +
5X FAD
(10-13 mo)
Ub Conjugates
β-Actin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/008531

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C12N 5/0793(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N 33/50; G01N 33/68; C12M 3/00; C12N 5/0793

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: mesenchymal stem cells, nerve cell, ubiquitin-proteasome, AgRP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0143170 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 23 December 2015 See claims 11-20.	1-14
A	LUARTE, Alejandro et al., "Potential Therapies by Stem Cell-derived Exosomes in CNS Diseases: Focusing on the Neurogenic Niche", Stem Cells International, 19 April 2016, vol. 2016, thesis no. 5736059 (internal pages 1-16) See the entire document.	1-14
A	LEE, Phil Hyu et al., "Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell Therapy as a Candidate Disease-modifying Strategy in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy", Journal of Clinical Neurology, 2009, vol. 5, pages 1-10 See the entire document.	1-14
A	CASTORINA, Alessandro et al., "Mesenchymal Stem Cells-based Therapy as a Potential Treatment in Neurodegenerative Disorders: Is the Escape from Senescence an Answer?", Neural Regeneration Research, 2015, vol. 10, no. 6, pages 850-858 See the entire document.	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 DECEMBER 2017 (28.12.2017)	**28 DECEMBER 2017 (28.12.2017)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/008531

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HONG, Liang et al., "Relationship between Amyloid-beta and the Ubiquitin-proteasome System in Alzheimer's Disease", Neurological Research, 2014, vol. 36, no. 3, pages 276-282 See the entire document.	1-14
PX	LEE, Na Kyung et al., "Agouti Related Peptide Secreted via Human Mesenchymal Stem Cells Upregulates Proteasome Activity in an Alzheimer's Disease Model", Scientific Reports, 04 January 2017, vol. 7, thesis no. 39340 (internal pages 1-9) See abstract; pages 2-5.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/008531

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0143170 A	23/12/2015	KR 10-1658638 B1	22/09/2016
		US 2015-0362480 A1	17/12/2015

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/008531

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/50(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C12N 5/0793(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/50; G01N 33/68; C12M 3/00; C12N 5/0793

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 중간엽줄기세포, 신경 세포, 유비퀴틴 프로테아좀, AgRP

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2015-0143170 A (한국과학기술연구원) 2015.12.23 청구항 11-20 참조.	1-14
A	LUARTE, ALEJANDRO 등, 'Potential therapies by stem cell-derived exosomes in CNS diseases: focusing on the neurogenic niche' Stem Cells International, 2016.04.19, 2016권, 논문번호 5736059 (내부 페이지 1-16) 전체 문헌 참조.	1-14
A	LEE, PHIL HYU 등, 'Bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a candidate disease-modifying strategy in Parkinson`s disease and multiple system atrophy' Journal of Clinical Neurology, 2009, 5권, 페이지 1-10 전체 문헌 참조.	1-14
A	CASTORINA, ALESSANDRO 등, 'Mesenchymal stem cells-based therapy as a potential treatment in neurodegenerative disorders: is the escape from senescence an answer?' Neural Regeneration Research, 2015, 10권, 6호, 페이지 850-858 전체 문헌 참조.	1-14

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2017년 12월 28일 (28.12.2017)	2017년 12월 28일 (28.12.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
김선희
전화번호 +82-42-481-5405

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/008531

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HONG, LIANG 등, 'Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease' Neurological Research, 2014, 36권, 3호, 페이지 276-282 전체 문헌 참조.	1-14
PX	LEE, NA KYUNG 등, 'Agouti related peptide secreted via human mesenchymal stem cells upregulates proteasome activity in an Alzheimer's disease model' Scientific Reports, 2017.01.04, 7권, 논문번호 39340 (내부 페이지 1-9) 요약; 페이지 2-5 참조.	1-14

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/008531

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0143170 A	2015/12/23	KR 10-1658638 B1	2016/09/22
		US 2015-0362480 A1	2015/12/17