(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월16일
(11) 등록번호 10-2821650
(24) 등록일자 2025년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2024.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7012902
(22) 출원일자(국제) 2019년09월30일
심사청구일자 2021년04월28일
(85) 번역문제출일자 2021년04월28일
(65) 공개번호 10-2021-0068104
(43) 공개일자 2021년06월08일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2019/038530
(87) 국제공개번호 WO 2020/071318
국제공개일자 2020년04월09일
(30) 우선권주장
JP-P-2018-186759 2018년10월01일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
EP02573192 A1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
미야자키 토루
일본, 도쿄 162-8666, 신주쿠-구, 가와다-초, 8-1,트윈스, 더 인스티튜트 포 에이아이엠 메디슨 씨/오
(72) 발명자
미야자키 토루
일본, 도쿄 162-8666, 신주쿠-구, 가와다-초, 8-1,트윈스, 더 인스티튜트 포 에이아이엠 메디슨 씨/오
(74) 대리인
안소영

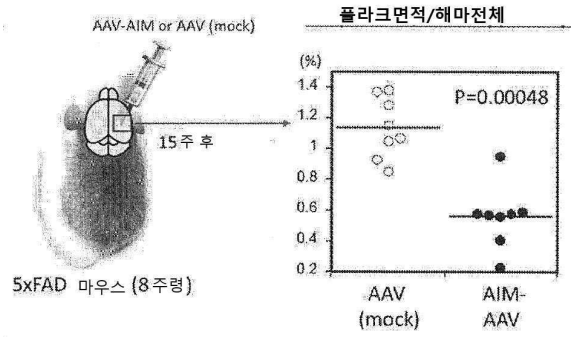
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 **신경변성 질환 치료제**

(57) 요 약

본 발명은 Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 포함하는, 신경변성 질환의 치료 또는 예방제를 제공한다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 38/02 (2013.01)
A61K 38/1761 (2020.05)
A61P 25/00 (2018.01)

(56) 선행기술조사문헌
US20180078539 A1*
JP2004500101 A
PNAS. 2011. Vol.108, No.29, pp.12072-12077.
KR101870246 B1
US20150094268 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

마크로파지의 아포토시스 억제자(Apoptosis inhibitor of macrophage, AIM) 또는 상기 AIM을 코딩하는 핵산을 포함하는 신경변성 질환의 치료 또는 예방제로서, 상기 신경변성 질환은 뇌에 있어서의 아밀로이드 축적을 수반하는 질환인, 치료 또는 예방제.

청구항 2

제1항에 있어서,

AIM을 코딩하는 핵산은 바이러스 벡터에 통합되어 있는 것을 특징으로 하는 치료 또는 예방제.

청구항 3

제2항에 있어서,

바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스, 아데노바이러스, 렌티 바이러스, 및 센다이 바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는 바이러스 벡터인, 치료 또는 예방제.

청구항 4

제3항에 있어서,

바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스인, 치료 또는 예방제.

청구항 5

제4항에 있어서,

아데노 연관 바이러스는 AAV 혈청형 5(AAV5) 또는 AAV 혈청형 9(AAV9)인, 치료 또는 예방제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

신경변성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 루이소체 치매, 다계통 위축증, 픽병, 대뇌피질 기저핵 변성증, 진행성 핵상성 마비, 근위축성 측삭경화증, 구척수성 근위축증, 헌팅턴병, 척수소뇌변성증, 및 치아적핵담창구루이체 위축증으로 이루어지는 군에서 선택되는, 치료 또는 예방제.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경변성 질환의 치료제 등에 관한 것으로, 상세하게는, Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM)을 유효 성분으로 하는 신경변성 질환의 치료제 및 이를 이용한 신경변성 질환의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머병이나 운동뉴런병 등의 신경변성 질환은 특정 신경이 변성되고 탈락함으로써, 진행성 그리고 난치성의 인지 기능 장애 및 운동 기능 장애를 보이는 질환이다. 신경변성 질환은 여러 가지가 알려져 있는데, 이러한 신경변성 질환에 공통된 병리학적 특징은 비정상 단백질의 축적이고, 이러한 축적이 신경변성의 중심적인 병태라고 생각되고 있다. 따라서, 신경변성 질환의 치료 또는 예방적 접근으로서, 이러한 비정상 단백질의 축적을 제거 또는 억제하는 수단의 구축이 검토되고 있다.

[0003] 신경변성 질환에 포함되는 대표적 질환의 하나로서 알츠하이머병을 들 수 있다. 알츠하이머병 환자의 뇌내에서는, 첫째로 아밀로이드 β의 플라크 형성이 생기고, 이어서, 타우 단백질의 아세틸화와 응집이나 프롤릴 이성화 효소 Pin1의 상실 등이 생기는 것이 알려져 있다. 따라서, 상기 질환의 초기 단계에 있어서의 아밀로이드 β의 축적을 제거하는 수단, 및/또는 상기 단백질의 축적을 억제하는 수단에 의해, 알츠하이머병의 치료 및/또는 예방이 가능해진다고 생각되고 있으며, 실제로 알츠하이머병 치료제의 후보가 되는 물질이 다수 보고되고 있다(특허문헌 1 내지 3).

[0004] AIM(CD5L라고도 칭해진다)은 본 발명자들이 동정한 대식세포가 특이적으로 생산되고, 대식세포 자신의 아포토시스를 억제하는 인자이고(비특허문헌 1), 지금까지 몇몇 질환과의 관련이 시사되어 있다. 예를 들면, AIM은 비만에 따라 혈중 농도가 상승하고, CD36을 통한 엔도사이토시스에 의해 지방 세포에 도입되고, 축적되어 있는 중성지방의 분해(lipolysis)를 유도하기 때문에, 항비만과의 관계가 시사되어 있다(비특허문헌 2). 또, AIM은 중성지방의 분해에 의해 지방 세포로부터 유리 지방산을 방출시키고, 방출된 지방산이 toll-유사 수용체의 자극을 통하여 지방 조직에 만성 염증을 야기/유지한다. 메타볼릭 신드롬은 비만에 따른 인슐린 저항성 획득이 그 기반이 되는데, 지방 조직에 있어서의 만성 염증이 중요하기 때문에, AIM이 메타볼릭 신드롬과 관계가 있다고 되어 있다(비특허문헌 3). 본 발명자들도 또한 AIM이 지방 전구 세포의 성숙 지방 세포로의 분화를 억제하고, 지방 세포에 있어서의 지방 방울의 분해를 유도한다는 것을 밝혀내고, AIM의 비만에 대한 적용 가능성을 보고하였다(특허문헌 4). 그리고, 본 발명자들은 고칼로리식을 부하한 비만 AIM knockout(KO) 마우스가, 비만, 지방간, 간실질의 섬유화, 발암과 같은 인간 NASH 병태에 근사한 병태를 나타낸다는 것을 밝혀내고, AIM의 간장질환에 대한 적용 가능성을 보고하였다(특허문헌 5). 아울러, 본 발명자들은 양측성의 일과성 신허혈 재관류를 수행한 AIM KO 마우스에 급성 신부전이 생기고, 괴사한 요세관 세포의 축적과 그에 따른 신장애의 급속한 진행과, 전신 상태의 악화가 생기고, 높은 빈도의 사망을 확인할 수 있었다는 것을 밝혀내었다. 그리고, 발명자들은 상기 AIM KO 마우스에 AIM을 투여한 바, BUN 값이 개선되고 신기능의 급속한 개선을 보였으며, 그에 따른 전신 증상과 사망율의 개선이 있음을 나타내고, AIM의 보충에 의한 급성 신부전의 치료 및 만성 신질환의 예방 또는 치료 가능성을 보고하였다(특허문헌 6). 그러나, 지금까지 AIM과 신경변성 질환 간의 관계에 관한 보고는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 일본 특허 5765857호 공보

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 일본 특허 5692073호 공보

(특허문헌 0003) 특허문헌 3: 국제공개 제00/24392호

(특허문헌 0004) 특허문헌 4: 국제공개 2010/140531호

(특허문헌 0005) 특허문헌 5: 국제공개 2013/162021호

(특허문헌 0006) 특허문헌 6: 국제공개 2015/119253호

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Miyazaki, J Exp Med 189: 413-422, 1999

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Kurokawa, Cell Metab 11: 479-492, 2010

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Kurokawa, PNAS 108: 12072-12077, 2011

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 AIM 단백질을 이용한 신경변성 질환의 신규 치료 방법 또는 예방 방법을 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자는 상기 과제에 대하여 심도 있게 검토한 결과, (1)뇌내의 대식세포인 미세아교세포는 AIM을 생산하지 않는 것, (2)AIM은 혈액뇌관문(BBB)을 투과할 수 없는 것, (3)알츠하이머병의 질환 모델 마우스(5XFAD 마우스)의 뇌내에, 재조합 AIM 단백질을 마이크로인젝션으로 투여하면, 상기 AIM 단백질은 아밀로이드 플라크에 집적되는 것, (4)아데노 연관 바이러스를 이용하여, 5XFAD 마우스의 해마 영역에 있어서 AIM을 발현시킴으로써, 아밀로이드 플라크가 현저하게 감소하는 것, (5)In vitro에 있어서 다량체의 아밀로이드 β에 재조합 AIM 단백질을 결합시키면, 뇌유래의 미세아교세포에 의한 다량체의 아밀로이드 β의 탐식이 현저하게 촉진되는 것 등을 알아내고, 이러한 발견에 의거하여 더욱 연구를 진행함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 즉 본 발명은 이하와 같다.

[0009] [1] Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 포함하는, 신경변성 질환의 치료 또는 예방제.

[0010] [2] AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산은 바이러스 벡터에 통합되어 있는 것을 특징으로 하는 [1]에 기재된 치료 또는 예방제.

[0011] [3] 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스, 아데노바이러스, 렌티 바이러스, 및 센다이 바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는 바이러스 벡터인, [2]에 기재된 치료 또는 예방제.

[0012] [4] 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스인, [3]에 기재된 치료 또는 예방제.

[0013] [5] 아데노 연관 바이러스는 AAV 혈청형 5(AAV5) 또는 AAV 혈청형 9(AAV9)인, [4]에 기재된 치료 또는 예방제.

[0014] [6] 신경변성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 루이소체 치매, 전두측두엽 치매, 다계통 위축증, 픽병, 대뇌피질 기저핵 변성증, 진행성 핵상성 마비, 근위축성 측삭경화증, 구척수성 근위축증, 척수성 진행성 근위축증, 헌팅턴병, 척수소뇌변성증, 해마경화증, 진행성 근간대성 간질, 및 치아적핵창백핵루이체위축증으로 이루어지는 군에서 선택되는, [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 기재된 치료 또는 예방제.

[0015] [7] AIM, AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 대상에 투여하는 것을 포함하는, 신경변성 질환의 치료 또는 예방 방법.

[0016] [8] AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산은 바이러스 벡터에 통합되어 있는 것을 특징으로 하는, [7]에 기재된 치료 또는 예방 방법.

[0017] [9] 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스, 아데노바이러스, 렌티 바이러스, 및 센다이 바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는 바이러스 벡터인, [8]에 기재된 치료 또는 예방 방법.

[0018] [10] 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스인, [8]에 기재된 치료 또는 예방 방법.

[0019] [11] 아데노 연관 바이러스는 AAV 혈청형 5(AAV5) 또는 AAV 혈청형 9(AAV9)인, [10]에 기재된 치료 또는 예방 방법.

[0020] [12] 신경변성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 루이소체 치매, 전두측두엽 치매, 다계통 위축증, 픽병, 대뇌피질 기저핵 변성증, 진행성 핵상성 마비, 근위축성 측삭경화증, 구척수성 근위축증, 척수성 진행성 근위축증, 헌팅턴병, 척수소뇌변성증, 해마경화증, 진행성 근간대성 간질, 및 치아적핵담창구루이체 위축증으로 이루어지는 군에서 선택되는, [7] 내지 [11] 중 어느 하나에 기재된 치료 또는 예방 방법.

[0021] [13] 신경변성 질환의 치료 또는 예방 방법에 있어서의 사용을 위한, Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산.

[0022] [14] AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산은 바이러스 벡터에 통합되어 있는 것을 특징으로 하는, [13]에 기재된 Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산.

[0023] [15] 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스, 아데노바이러스, 렌티 바이러스, 및 센다이 바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는 바이러스 벡터인, [2]에 기재된 Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산.

[0024] [16] 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스인, [15]에 기재된 Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산.

[0025] [17] 아데노 연관 바이러스는 AAV 혈청형 5(AAV5) 또는 AAV 혈청형 9(AAV9)인, [16]에 기재된 Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산.

[0026] [18] 신경변성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 루이소체 치매, 전두측두엽 치매, 다계통 위축증, 픽병, 대뇌피질 기저핵 변성증, 진행성 핵상성 마비, 근위축성 측삭경화증, 구척수성 근위축증, 척수성 진행성 근위축증, 헌팅턴병, 척수소뇌변성증, 해마경화증, 진행성 근간대성 간질, 및 치아적핵담창구루이체 위축증으로 이루어지는 군에서 선택되는, [13] 내지 [17] 중 어느 하나에 기재된 Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산.

[0027] [19] 신경변성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의, Apoptosis inhibitor of macrophage(AIM), AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산의 사용.

[0028] [20] AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산은 바이러스 벡터에 통합되어 있는 것을 특징으로 하는 [19]에 기재된 사용.

[0029] [21] 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스, 아데노바이러스, 렌티 바이러스, 및 센다이 바이러스로 이루어지는 군에서 선택되는 바이러스 벡터인, [20]에 기재된 사용.

[0030] [22] 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스인, [21]에 기재된 사용.

[0031] [23] 아데노 연관 바이러스는 AAV 혈청형 5(AAV5) 또는 AAV 혈청형 9(AAV9)인, [22]에 기재된 사용.

[0032] [24] 신경변성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 루이소체 치매, 전두측두엽 치매, 다계통 위축증, 픽병, 대뇌피질 기저핵 변성증, 진행성 핵상성 마비, 근위축성 측삭경화증, 구척수성 근위축증, 척수성 진행성 근위축증, 헌팅턴병, 척수소뇌변성증, 해마경화증, 진행성 근간대성 간질, 및 치아적핵담창구루이체 위축증으로 이루어지는 군에서 선택되는, [19] 내지 [23] 중 어느 하나에 기재된 사용.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따르면, 대상의 뇌에 있어서의 비정상 단백질의 축적을 억제하는 것이 가능해진다. 그 결과, 알츠하이머병을 비롯한 비정상 단백질의 축적에 기인하는 신경변성 질환의 치료 또는 예방이 가능해진다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 뇌에 있어서의 AIM의 발현 확인을, 마우스 뇌 전체의 라이세이트를 이용한 웨스턴 블롯팅에 의해 검토하

였다. 야생형 C57BL/6 마우스(Lane 1: Wild-type), AIM 결손 마우스(Lane 2: AIM-KO)의 뇌 라이세이트(20 ng/lane) 및 포지티브 컨트롤로서 재조합 AIM 단백질(50 ng)을 SDS-PAGE로 분획하고, 항AIM 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 야생형 마우스, AIM 결손 마우스 모두 뇌에 AIM의 발현은 보이지 않았다.

도 2는 뇌에 있어서의 AIM의 발현 확인을, 면역조직화학적으로 검토하였다. 야생형 C57BL/6 마우스의 뇌조직 절편(세로 조각)을, 항AIM 항체를 이용하여 면역염색을 수행하였다. 퍼옥시다제 반응을 이용한 DAB 발색법으로 검출하였지만, AIM의 발현은 보이지 않았다.

도 3은 야생형 C57BL/6 마우스(WT)의 뇌 전체(Lane 1), AIM 결손 마우스(AIM-KO)의 뇌 전체(Lane 2), WT 마우스의 간장(포지티브 컨트롤, Lane 3), AIM-KO 마우스의 간장(Lane 4), WT 마우스 신생아 뇌로부터 단리하여 증식시킨 미세아교세포(Lane 5), AIM-KO 마우스 신생아 뇌로부터 단리하여 증식시킨 미세아교세포(Lane 6), 각각으로부터 토탈 RNA를 추출하고, quantitative RT-PCR법에 의해 AIM의 발현을 간장에 있어서의 발현을 1로 한 relative expression으로 해석하였다. 그 결과, 뇌 전체 및 미세아교세포 단독에서도 AIM의 유의미한 발현은 보이지 않았다.

도 4는 5XFAD 마우스의 우뇌의 해마 영역에, PBS에 용해된 재조합 마우스 AIM(rAIM) 10 μg(PBS 10μL에 용해)을 마이크로인젝션하고, 3시간 후에 뇌조직을 단리하여 절편으로 한 다음, AIM(녹색)과 아밀로이드 Aβ(적색)에 대한 항체를 이용하여 면역염색법에 의해 공염색을 수행하고, 형광현미경으로 관찰하였다. AIM과 아밀로이드 Aβ 플라크는 같이 존재하는 부분이 많이 보여졌다(상부도: 적색과 녹색이 겹쳐서 황색으로 되어 있는 부분, 및 적색과 녹색이 동일한 부위로 보이는 부분). 또, 다른 부분을 고배율 확대(x400)하고, AIM과 아밀로이드 Aβ를 각각 별개로 촬영하면(하부도), 같이 존재하는 것이 더욱 명확히 나타났다.

도 5는 8주령의 5XFAD 마우스에 마우스 AIM을 발현하는 adeno-associated virus(AAV) 혈청형 5(AAV5)와 블랭크의 AAV5(mock)를, 동일한 바이러스량으로 마우스의 해마 영역에 마이크로인젝션하였다(n=7~8). 15주 후에 뇌를 적출하여 절편을 항아밀로이드 Aβ 항체로 염색하고, 해마 전체의 면적에 대한 아밀로이드 Aβ 양성 부분(아밀로이드 플라크)의 면적을 %로 비교하였다. AIM을 발현하는 AAV를 감염시킨 개체는 mock AAV를 감염시킨 개체와 비교하여, 유의미한 아밀로이드 플라크의 감소를 보였다(T-test).

도 6은 N 말단을 Cy5로 표식한 Ab(아밀로이드 β) 42 펩티드를 다량체화하도록 하고, AIM-KO 마우스 신생자 뇌로부터 단리·배양한 미세아교세포를 포함하는 세포 집단에 rAIM(50 mg/mL) 있음 (+ rAIM) 없음 (+ PBS)의 조건으로, DMEM 배지 + 10% FBS 중에서 37℃, 1시간 반응시켰다. 세포를 세정한 후, 항F4/80 항체로 염색하고, 유세포 분석기로 해석하였다. F4/80 고양성인 미세아교세포에 있어서의, Cy5의 형광 강도, 즉 Ab42 다량체의 흡수량을 해석한 바, rAIM 존재 하에서는 비존재 하와 비교하여, Cy5 양성의 미세아교세포가 현저하게(16%→84%) 증가하였다.

도 7은 7주령의, 전이 유전자를 갖지 않는 (Non-TG) 5xFAD 마우스와 TG(+) 5xFAD 마우스에 있어서의, 뇌 전체에 대한 Aβ(아밀로이드) 플라크 면적(%)을 비교한 그래프이다.

도 8은 7주령의, Non-TG 5xFAD 마우스, TG(+) 5xFAD 마우스, 및 야생형 C57BL/6 마우스의 해마 영역에 있어서의, AIM과 Aβ 플라크의 공재를 나타낸 사진도이다.

도 9는 인간 PDGF-B promoter 하에서 뇌신경세포에 마우스 AIM을 발현하는 전이 유전자의 맵을 나타낸 도면이다. 각각의 프래그먼트의 길이를 Kb(킬로 베이스)로 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0036] 1. 신경변성 질환의 치료 또는 예방제

[0037] 본 발명은 AIM, AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 포함하는, 신경변성 질환의 치료 또는 예방제(이하, "본 발명의 제제"라고 지칭하기도 함)를 제공한다.

[0038] 본 발명에 이용되는 AIM은 서열 번호 1(인간 유래 AIM 단백질의 아미노산 서열)로 표시되는 아미노산 서열과 동일, 또는 이것과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단백질이다. AIM은 예를 들면, 온혈 동물(예를 들면, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 양, 돼지, 소, 말, 고양이, 개, 원숭이, 침팬지, 새 등)의 면역 세포인 대식세포로부터 단리·정제되는 단백질이어도 무방하다. 또, 화학합성 혹은 무세포 번역계에서 생화학적으로 합성된 단백질이어도 무방하고, 혹은 상기 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 핵산을 도입된 형질전환체

로부터 생산되는 재조합 단백질이어도 무방하다. 본 발명에 이용되는 AIM의 유래가 되는 생물종은 신경변성 질환에 걸리는 대상의 생물종과 일치시키는 것이 바람직한 경우가 있다. 예를 들면, 본 발명의 제제의 적용 대상이 인간인 경우는 인간 AIM을 이용하는 것이 바람직하다.

[0039] 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열로는, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 약 60% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상, 특히 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열 등을 들 수 있다. 여기에서 "동일성"이란 해당 기술 분야에 있어서 공지의 수학적 알고리즘을 이용하여 2개의 아미노산 서열을 얼라인한 경우의, 최적의 얼라인먼트(바람직하게는 상기 알고리즘은 최적의 얼라인먼트를 위하여 서열의 한쪽 또는 양쪽으로의 갭의 도입을 고려할 수 있는 것이다)에 있어서의, 오버랩하는 전체 아미노산 잔기에 대한 동일 아미노산 및 유사 아미노산 잔기의 비율(%)을 의미한다. 또, "유사성"이란 2개의 아미노산 서열을 얼라인먼트하였을 때에 그 양쪽의 서열에 동일 또는 유사 아미노산 잔기가 존재하는 위치의 수의 전장 아미노산 잔기수에 대한 비율(%)을 의미한다. "유사 아미노산"이란 물리화학적 성질에 있어서 유사한 아미노산을 의미하고, 예를 들면, 방향족 아미노산(Phe, Trp, Tyr), 지방족 아미노산(Ala, Leu, Ile, Val), 극성 아미노산(Gln, Asn), 염기성 아미노산(Lys, Arg, His), 산성 아미노산(Glu, Asp), 수산기를 갖는 아미노산(Ser, Thr), 측사슬이 작은 아미노산(Gly, Ala, Ser, Thr, Met) 등의 동일 그룹으로 분류되는 아미노산을 들 수 있다. 이와 같은 유사 아미노산에 의한 치환은 단백질의 표현형에 변화를 가져오지 않는(즉 보존적 아미노산 치환이다) 것이 예측된다. 보존적 아미노산 치환의 구체적인 예는 당해 기술 분야에서 주지이고, 여러 문헌에 기재되어 있다(예를 들면, Bowie 등, Science, 247: 1306-1310 (1990)을 참조).

[0040] 본 명세서에 있어서의 아미노산 서열의 동일성 또는 유사성은 동일성 또는 유사성 계산 알고리즘 NCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)을 이용하고, 이하의 조건(기대값=10; 갭을 허용함; matrices=BLOSUM62; 필터링=OFF)으로 계산할 수 있다. 아미노산 서열의 동일성 또는 유사성을 결정하기 위한 다른 알고리즘으로는, 예를 들면, Karlin 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877 (1993)에 기재된 알고리즘[상기 알고리즘은 NBLAST 및 XBLAST 프로그램(version 2.0)에 통합되어 있다(Altschul 등, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997))], Needleman 등, J. Mol. Biol., 48: 444-453 (1970)에 기재된 알고리즘[상기 알고리즘은 GCG 소프트웨어 패키지 중의 GAP 프로그램에 통합되어 있다], Myers 및 Miller, CABIOS, 4: 11-17 (1988)에 기재된 알고리즘[상기 알고리즘은 CGC 서열 얼라인먼트 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램(version 2.0)에 통합되어 있다], Pearson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444-2448 (1988)에 기재된 알고리즘[상기 알고리즘은 GCG 소프트웨어 패키지 중의 FASTA 프로그램에 통합되어 있다] 등을 들 수 있고, 이들도 마찬가지로 바람직하게 이용될 수 있다. 보다 바람직하게는, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열이란, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 약 60% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상, 특히 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열이다.

[0041] 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 단백질로는, 예를 들면, 상기의 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 아울러, 야생형 AIM이 갖는 생물학적 활성과 실질적으로 동질의 활성을 갖는 단백질을 들 수 있다. 야생형 AIM이 갖는 생물학적 활성으로는, 예를 들면, 대식세포(미세아교세포를 포함함)에의 엔도사이토시스 활성, 대식세포의 아포토시스 억제 활성, 동맥경화의 유지/촉진 활성, 지방세포 분화 억제 활성, 지방세포의 지방방울 융해 활성, 지방세포 축소 활성, CD36 결합 활성, 지방세포에의 엔도사이토시스 활성, FAS 결합 활성, FAS 기능 억제 활성, 항비만 활성, 간질환(지방간, NASH, 간경변, 간암)의 예방 또는 치료 활성, 신질환(급성 신부전, 만성 신장염, 만성 신부전, 네프로제 증후군, 당뇨병성 신증, 신경화증, IgA 신증, 고혈압성 신증, 교원병에 따른 신증 또는 IgM 신증)의 예방 또는 치료 활성 등을 들 수 있는데, 본 발명에 있어서는, 특히 대식세포에의 엔도사이토시스 활성이 바람직한 지표가 될 수 있다. 상기 활성은 본원의 실시예에 있어서 상세히 기술되는, 인 비트로에 있어서의 대식세포(또는 미세아교세포)의 탐식 시험을 이용하여 확인할 수 있는데, 이것에 한정되는 것은 아니다. 또, 본 명세서에 있어서 "실질적으로 동질"이란 이들의 활성이 정성적(예를 들면, 생리학적 또는 약리학적)으로 동일하다는 것을 나타낸다. 따라서, 상기 활성은 동등한 것이 바람직하지만, 이들의 활성 정도(예를 들면, 약 0.1 내지 약 10배, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 2배)나 단백질의 분자량 등의 양적 요소는 상이해도 무방하다. 상기 활성의 측정은 자체 공지의 방법에 준하여 수행할 수 있다.

[0042] 또, 본 발명에 이용되는 AIM에는 예를 들면, (1)서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중에서 1 또는 2개 이상(바람직하게는 1 내지 100개 정도, 바람직하게는 1 내지 50개 정도, 더욱 바람직하게는 1 내지 10개 정도, 특히

바람직하게는 1 내지 수(2, 3, 4 또는 5)개)의 아미노산이 결실된 아미노산 서열, (2)서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열에 1 또는 2개 이상(바람직하게는 1 내지 100개 정도, 바람직하게는 1 내지 50개 정도, 더욱 바람직하게는 1 내지 10개 정도, 특히 바람직하게는 1 내지 수(2, 3, 4 또는 5)개)의 아미노산이 부가된 아미노산 서열, (3)서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열에 1 또는 2개 이상(바람직하게는 1 내지 50개 정도, 바람직하게는 1 내지 10개 정도, 더욱 바람직하게는 1 내지 수(2, 3, 4 또는 5)개)의 아미노산이 삽입된 아미노산 서열, (4)서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중에서 1 또는 2개 이상(바람직하게는 1 내지 50개 정도, 바람직하게는 1 내지 10개 정도, 더욱 바람직하게는 1 내지 수(2, 3, 4 또는 5)개)의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산 서열, 또는 (5)이들을 조합한 아미노산 서열을 포함하는 단백질 등도 포함된다. 상기와 같이 아미노산 서열이 삽입, 결실 또는 치환되어 있는 경우, 그 삽입, 결실 또는 치환의 위치는 상기 단백질의 원하는 생물학적 활성(예를 들면, 대식세포(미세아교세포를 포함함)에의 엔도사이토시스 활성)이 유지되는 한, 특별히 한정되지 않는다.

[0043] 본 발명의 AIM은 바람직하게는 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 인간 AIM 단백질(GenBank 액션 번호: AAD01446), 또는 다른 포유 동물에 있어서의 그 동족체[예를 들면, GenBank에 액션 번호: AAD01445로서 등록되어 있는 마우스 동족체 등]이고, 보다 바람직하게는 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 인간 AIM 단백질이다.

[0044] 본 명세서에 있어서, 단백질 및 펩티드는 펩티드 표기의 관례에 따라서 좌단이 N 말단(아미노 말단), 우단이 C 말단(카복실 말단)으로 기재된다. 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 비롯한, 본 발명에 이용되는 AIM은 C 말단이 카복실기(-COOH), 카복실레이트($-COO^-$), 아미드($-CONH_2$) 또는 에스테르(-COOR) 중 어느 것이어도 무방하다.

[0045] 여기에서 에스테르에 있어서의 R로는, 예를 들면, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸 등의 C_{1-6} 알킬기; 예를 들면, 시클로펜틸, 시클로헥실 등의 C_{3-8} 시클로알킬기; 예를 들면, 페닐, α-나프틸 등의 C_{6-12} 아릴기; 예를 들면, 벤질, 페네틸 등의 페닐-C_{1-2} 알킬기; α-나프틸메틸 등의 α-나프틸-C_{1-2} 알킬기 등의 C_{7-14} 아랄킬기; 피바로일옥시메틸기 등이 이용된다.

[0046] 본 발명에 이용되는 AIM이 C 말단 이외에 카복실기(또는 카복실레이트)를 갖고 있는 경우, 카복실기가 아미드화 또는 에스테르화되어 있는 것도 본 발명의 단백질에 포함된다. 이 경우의 에스테르로는, 예를 들면 상기한 C 말단의 에스테르 등이 이용된다.

[0047] 게다가, 본 발명에 이용되는 AIM에는 N 말단의 아미노산 잔기의 아미노기가 보호기(예를 들면, 포르밀기, 아세틸기 등의 C_{1-6} 알카노일 등의 C_{1-6} 아실기 등)로 보호되어 있는 것, 생체 내에서 절단되어 생성할 수 있는 N 말단의 글루타민 잔기가 피로글루타민산화된 것, 분자 내의 아미노산의 측사슬 상의 치환기(예를 들면 -OH, -SH, 아미노기, 이미다졸기, 인돌기, 구아니디노기 등)이 적당한 보호기(예를 들면, 포르밀기, 아세틸기 등의 C_{1-6} 알카노일기 등의 C_{1-6} 아실기 등)로 보호되어 있는 것, 또는 당사슬이 결합된 소위 당 단백질 등의 복합 단백질 등도 포함된다.

[0048] 본 명세서에 있어서 "AIM"이란 야생형 AIM 뿐만 아니라, 야생형 AIM의 생물학적 활성과 실질적으로 동질 또는 향상된 활성을 갖는 이들의 개변체 등도 포함하는 개념으로 한다. 여기에서 "실질적으로 동질의 활성"이란 상기와 동의어를 나타낸다. 또, "실질적으로 동질의 활성"의 측정은 AIM의 경우와 마찬가지로 수행할 수 있다.

[0049] AIM의 개변체의 일례로는, 이하를 들 수 있는데, 이들에 한정되지 않는다.

[0050] 본 발명의 변이형 인간 AIM은 바람직하게는 이하의 (1b) 내지 (5b) 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

[0051] (1b)서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 번호 191의 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열.

[0052] (2b)서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 번호 300의 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열.

[0053] (3b)서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 번호 191의 시스테인이 세린으로 치환되고, 아울러 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 번호 300의 시스테인이 세린으로 치환된 아미노산 서열.

[0054] (4b)(1b) 내지 (3b) 중 어느 하나의 아미노산 서열과 실질적으로 동일하고, 아울러 (1b) 내지 (3b) 중 어느 하나의 아미노산 서열에 존재하는 시스테인 및 상기 치환된 세린은 남겨져 있는, 아미노산 서열.

[0055] (5b)(1b) 내지 (3b) 중 어느 하나의 아미노산 서열에 존재하는 시스테인 및 상기 치환된 세린 이외의 부위에 있어서, 부가적으로 1 내지 여러 개의 아미노산을 결실, 부가, 삽입 또는 치환 또는 그 조합을 포함하는 아미노산 서열.

[0056] 한편, 야생형 재조합 AIM과 동등 또는 향상된 기능을 갖는 AIM 개변체에 대해서는, 일본 특허출원 2017-220733 등에 개시되는 것을 이용할 수 있다.

[0057] 또, 본 발명의 제제의 성분으로는, AIM 뿐만 아니라, AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편을 이용하는 것도 가능하다. AIM 단편이 야생형 AIM의 생물학적 활성을 갖는지의 여부는 상기한 방법에 의해 결정해도 무방하다.

[0058] AIM 단편의 일례로는, 예를 들면, 인택트 AIM 단백질은 시스테인을 많이 포함하는 3개의 SRCR(Scavenger-Receptor Cysteine-Rich) 도메인을 포함하고 있기 때문에, 각각의 SRCR 도메인을, 야생형 AIM이 갖는 생물학적 활성과 실질적으로 동질의 활성을 갖는 AIM 단편의 예로서 들 수 있다. 보다 구체적으로는, 예를 들면, 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중에서, SRCR1 도메인(서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중에서, 아미노산 번호 24～125), SRCR2 도메인(서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중에서, 아미노산 번호 138～239), SRCR3 도메인(서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중에서, 아미노산 번호 244～346)을 각각 포함하는 부분 아미노산 서열이나 SRCR 도메인의 임의의 조합을 포함하는 부분 아미노산 서열을 갖는 것 등을, AIM 단편으로서 이용할 수 있다. 야생형 AIM의 생물학적 활성과 실질적으로 동질의 활성을 갖는 AIM 단편은 상기의 기능 도메인을 포함하는 한, 그 사이즈에 특별히 제한은 없지만, 바람직하게는 50개 이상의 부분 아미노산 서열을 포함하는 것, 보다 바람직하게는 100개 이상의 부분 아미노산 서열을 포함하는 것, 더욱 바람직하게는 200개 이상의 부분 아미노산 서열을 포함하는 것을 들 수 있다. 상기 부분 아미노산 서열은 1개의 연속된 부분 아미노산 서열이어도 무방하고, 또는 연속되지 않는 복수의 부분 아미노산 서열이 연결된 것이어도 무방하다.

[0059] 또, 본 발명에 이용되는 AIM 단편은 C 말단이 카복실기(-COOH), 카복실레이트($-COO^-$), 아미드($-CONH_2$) 또는 에스테르(-COOR) 중 어느 것이어도 무방하다. 여기에서 에스테르에 있어서의 R로는, AIM에 대하여 상기한 것과 마찬가지의 것을 들 수 있다. 본 발명의 부분 펩티드가 C 말단 이외에 카복실기(또는 카복실레이트)를 갖고 있는 경우, 카복실기가 아미드화 또는 에스테르화되어 있는 것도 본 발명의 부분 펩티드에 포함된다. 이 경우의 에스테르로는, 예를 들면, C 말단의 에스테르와 유사한 것 등을 이용할 수 있다.

[0060] 게다가, 본 발명에 이용되는 AIM 단편에는 상기한 AIM과 마찬가지로, N 말단의 아미노산 잔기의 아미노기가 보호기로 보호되어 있는 것, N 말단의 글루타민 잔기가 피로글루타민산화된 것, 분자 내의 아미노산의 측사슬 상의 치환기가 적당한 보호기로 보호되어 있는 것, 또는 당사슬이 결합된 소위 당 펩티드 등의 복합 펩티드 등도 포함된다.

[0061] 본 발명에 이용되는 AIM(AIM 단편을 포함함)은 염의 형태여도 무방하다. 예를 들면, 생리학적으로 허용되는 산(예: 무기산, 유기산)이나 염기(예: 알칼리 금속염) 등과의 염이 이용되고, 특히 생리학적으로 허용되는 산부가염이 바람직하다. 이와 같은 염으로는, 예를 들면, 무기산(예를 들면, 염산, 인산, 브롬화 수소산, 황산)과의 염, 또는 유기산(예를 들면, 아세트산, 포름산, 프로피온산, 푸말산, 말레인산, 호박산, 타르타르산, 구연산, 사과산, 옥살산, 안식향산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산)과의 염 등이 이용된다.

[0062] AIM은 상술한 포유 동물의 대식세포로부터 자체 공지의 단백질 정제 방법에 의해 제조할 수 있다. 구체적으로는, 포유 동물의 대식세포를 호모게나이즈하고, 저속 원심에 의해 세포 파편을 제거한 후, 상청을 고속 원심하여 세포막 함유 획분을 침전시키고, 상기 상청을 역상 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 어피니티 크로마토그래피 등의 크로마토그래피 등에 붙임으로써 AIM 또는 그 염을 조제할 수 있다.

[0063] AIM(AIM 단편을 포함함)은 공지의 펩티드 합성법에 따라서 제조하는 것도 가능하다. 펩티드 합성법은 예를 들면, 고상 합성법, 액상 합성법 중 그 어느 것이어도 무방하다. AIM을 구성할 수 있는 부분 펩티드 또는 아미노산과 잔여 부분을 축합하고, 생성물이 보호기를 갖는 경우는 보호기를 탈리함으로써, 목적으로 하는 단백질을 제조할 수 있다.

[0064] 여기에서, 축합이나 보호기의 탈리는 자체 공지의 방법, 예를 들면, 이하의 (1) 및 (2)에 기재된 방법에 따라서 수행된다.

[0065] (1)M. Bodanszky 및 M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966년)

[0066] (2)Schroeder 및 Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965년)

[0067] 이와 같이 하여 얻어진 AIM은 공지의 정제법에 의해 정제 단리할 수 있다. 여기에서, 정제법으로는, 예를 들면, 용매 추출, 증류, 칼럼 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피, 재결정, 이들의 조합 등을 들 수 있다.

[0068] 상기 방법으로 얻어지는 AIM이 유리체(遊離體)인 경우에는 상기 유리체를 공지의 방법 또는 그것에 준하는 방법에 의해 적당한 염으로 변환할 수 있고, 반대로 AIM이 염으로서 얻어진 경우에는 상기 염을 공지의 방법 또는 그에 준하는 방법에 따라 유리체 또는 다른 염으로 변환할 수 있다.

[0069] 게다가, AIM은 그것을 코딩하는 핵산을 함유하는 형질전환체를 배양하고, 얻어지는 배양물로부터 AIM을 분리 정제함으로써 제조하는 것도 가능하다. AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산은 DNA여도 RNA여도 무방하고, 또는 DNA/RNA 키메라여도 무방하다. 바람직하게는 DNA이다. 또, 상기 핵산은 이중사슬이어도, 단일사슬이어도 무방하다. 이중사슬의 경우는 이중사슬 DNA, 이중사슬 RNA 또는 DNA:RNA의 하이브리드여도 무방하다. 단일사슬의 경우는 센스 사슬(즉 코딩 사슬)이어도, 안티센스 사슬(즉 비코딩 사슬)이어도 무방하다.

[0070] AIM(AIM 단편을 포함함)을 코딩하는 DNA로는, 게놈 DNA, 온혈 동물(예를 들면, 인간, 소, 원숭이, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 모르모트, 래트, 마우스, 토끼, 햄스터, 새 등)의 대식세포 유래의 cDNA, 합성 DNA 등을 들 수 있다. AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 게놈 DNA라면, 상기 동물의 모든 세포[예를 들면, 간세포, 비장세포, 신경세포, 글리어 세포, 췌장 β 세포, 골수세포, 메산지움 세포, 랑게르한스 세포, 표피세포, 상피세포, 배상세포, 내피세포, 평활근세포, 섬유아세포, 섬유세포, 근세포, 지방세포, 면역세포(예, 대식세포, T 세포, B 세포, 내추럴 킬러 세포, 비만세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 단구), 거핵구, 활막세포, 연골세포, 골세포, 골아세포, 파골세포, 유선세포, 간세포 또는 간질세포, 또는 이들 세포의 전구 세포, 줄기 세포 또는 암 세포 등] 또는 이들 세포가 존재하는 모든 조직[예를 들면, 뇌, 뇌의 각 부위(예, 후구, 편도핵, 대뇌기저구, 해마, 시상, 시상하부, 대뇌피질, 연수, 소뇌), 척수, 하수체, 위, 췌장, 신장, 간장, 생식선, 갑상선, 담낭, 골수, 부신, 피부, 폐, 소화관(예, 대장, 소장), 혈관, 심장, 흉선, 비장, 악하선, 말초혈, 전립선, 고환, 난소, 태반, 자궁, 골, 관절, 지방조직(예, 갈색 지방조직, 백색 지방조직), 골격근 등]으로부터 조제한 게놈 DNA 획분을 주형으로서 이용하고, Polymerase Chain Reaction(이하, "PCR법"이라고 약칭함)에 의해 직접 증폭할 수 있고, AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 cDNA이라면, 대식세포로부터 조제한 토탈 RNA 또는 mRNA 획분을 각각 주형으로서 이용하고, PCR법 및 Reverse Transcriptase-PCR(이하, "RT-PCR법"이라고 약칭함)에 의해 직접 증폭하는 것도 가능하다. 또는, AIM 또는 그 펩티드 단편을 코딩하는 게놈 DNA 및 cDNA는 상기한 게놈 DNA 및 토탈 RNA 또는 mRNA의 단편을 적당한 벡터 중에 삽입하여 조제되는 게놈 DNA 라이브러리 및 cDNA 라이브러리로부터, 콜로니 또는 플라크 하이브리다이제이션법 또는 PCR법 등에 의해, 각각 클로닝하는 것도 가능하다. 라이브러리에 사용하는 벡터는 박테리오파지, 플라스미드, 코스미드, 파지미드 등 그 어느 것이어도 무방하다.

[0071] AIM을 코딩하는 핵산으로는, 예를 들면, 서열 번호 2로 표시되는 염기 서열과 동일 또는 실질적으로 동일한 염기 서열을 포함하는 핵산 등을 들 수 있다. 서열 번호 2로 표시되는 염기 서열과 실질적으로 동일한 염기 서열을 포함하는 핵산으로는, 예를 들면, 서열 번호 2로 표시되는 염기 서열과 약 60% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상, 특히 바람직하게는 약 90% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 염기 서열을 함유하고, 상기한 AIM과 실질적으로 동질의 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 핵산 등을 이용할 수 있다. 일양태에 있어서, 서열 번호 2로 표시되는 염기 서열과 실질적으로 동일한 염기 서열을 포함하는 핵산은 서열 번호 2로 표시되는 염기 서열과 약 60% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상, 특히 바람직하게는 약 90% 이상의 동일성을 갖는 염기 서열을 함유하고, 아울러 상기한 AIM과 실질적으로 동질의 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 핵산이다. AIM을 코딩하는 핵산에는 적용 대상이 되는 생물에서의 발현 효율을 높일 목적에서, 코돈 최적화를 수행한 핵산 서열 등도 포함된다.

[0072] 본 명세서에 있어서의 염기 서열의 동일성 또는 유사성은 동일성 또는 유사성 계산 알고리즘 NCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool)을 이용하고, 이하의 조건(기대값=10; 갭을 허용함; 필터링=ON; 매치 스코어=1; 미스매치 스코어=-3)으로 계산할 수 있다. 염기 서열의 동일성 또는 유사성을 결정하기 위한 다른 알고리즘으로는, 상기한 아미노산 서열의 상동성 계산 알고리즘이 마찬가지로 바람직하게 예시된다.

[0073] AIM을 코딩하는 핵산은 바람직하게는 서열 번호 2로 표시되는 염기 서열에서 나타나는 인간 AIM 단백질을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 핵산(GenBank 액션 번호: AF011429) 또는 다른 포유 동물에 있어서의 그 동족체[예를 들면, GenBank에 액션 번호: AF011428로서 등록되어 있는 마우스 동족체 등]이다.

[0074] 게다가, 본 발명의 제제의 성분으로는, AIM, 또는 AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 이

용하는 것도 가능하다.

[0075] 본 발명에 이용되는 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산은 서열 번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 일부와 동일 또는 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 것이라면 그 어떠한 것이어도 무방하다. 구체적으로는, AIM 단편을 코딩하는 핵산으로는, 예를 들면, (1)서열 번호 2로 표시되는 염기 서열의 부분 염기 서열을 포함하는 핵산, 또는 (2)서열 번호 2로 표시되는 염기 서열의 부분 염기 서열을 포함하는 핵산과 약 60% 이상, 바람직하게는 약 70% 이상, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상, 특히 바람직하게는 약 90% 이상의 동일성 또는 유사성을 갖는 염기 서열을 포함하고, 상기한 AIM과 실질적으로 동질의 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 핵산 등이 이용된다.

[0076] AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산은 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 염기 서열의 일부분을 갖는 합성 DNA 프라이머를 이용하여 PCR법에 의해 증폭하거나, 또는 적당한 발현 벡터에 통합한 DNA를, AIM의 일부 또는 전체 영역을 코딩하는 DNA 단편 또는 합성 DNA를 표지(標識)한 것과 하이브리다이제이션함으로써 클로닝할 수 있다. 하이브리다이제이션은 자체 공지의 방법 또는 그것에 준하는 방법, 예를 들면, 몰레큘러 클로닝(Molecular Cloning) 제2판(J. Sambrook et al., Cold Spring HarborLab. Press, 1989)에 기재된 방법 등에 따라서 수행할 수 있다. 또, 시판의 라이브러리를 사용하는 경우, 하이브리다이제이션은 첨부의 사용설명서에 기재된 방법에 따라서 수행할 수 있다. 하이브리다이제이션은 바람직하게는 엄격한 조건에 따라서 수행할 수 있다.

[0077] 고차원의 엄격한 조건으로는, 예를 들면, 6×SSC(sodium chloride/sodium citrate) 중 45℃에서의 하이브리다이제이션 반응 후에, 0.2×SSC/0.1% SDS 중 65℃에서의 1회 이상의 세정 등을 들 수 있다. 당업자는 하이브리다이제이션 용액의 염 농도, 하이브리다이제이션 반응의 온도, 프로브 농도, 프로브의 길이, 미스매치의 수, 하이브리다이제이션 반응의 시간, 세정액의 염농도, 세정의 온도 등을 적절히 변경함으로써, 원하는 엄격한 정도를 용이하게 조절할 수 있다. 또, 시판의 라이브러리를 사용하는 경우, 하이브리다이제이션은 상기 라이브러리에 첨부된 사용설명서에 기재된 방법에 따라서 수행할 수 있다.

[0078] AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산은 뇌 특이적으로 발현하는 프로모터를 갖는 발현 벡터 등에 기능적으로 연결시켜도 무방하다. AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터를 뇌내에 송달함으로써, 뇌 특이적으로 AIM 또는 AIM 단편을 발현하도록 할 수 있다. 뇌 특이적인 프로모터에는, SCG10, GFAP 프로모터, synapsin 1 프로모터, tubulin α1 프로모터, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II 프로모터, neuron-specific enolase 프로모터, PDGF(platelet-derived growth factor beta)-β chain 프로모터 등이 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0079] 또, 바람직한 일 양태에 있어서, AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 바이러스 벡터에 탑재해도 무방하다. 바람직한 바이러스 벡터로는, 아데노 연관 바이러스, 아데노바이러스, 렌티 바이러스, 및 센다이 바이러스를 들 수 있는데, 이들에 한정되지 않는다. 유전자 치료에 있어서의 이용을 고려하면, 도입 유전자를 장기간에 걸쳐 발현시킬 수 있다는 점이나 비병원성 바이러스 유래로 안전성이 높다는 등의 이유로, 아데노 연관 바이러스가 바람직하다. 또, 아데노 연관 바이러스의 혈청형으로는, 본 발명의 원하는 효과가 얻어지는 한은 특별히 한정되지 않고, 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10 중 어느 것을 이용해도 무방하다. 특별히 신경조직에서 발현 효율이 높다는 것을 고려하면, 혈청형 1, 2, 5, 9, 또는 10이 바람직하고(AAV의 다양한 혈청형에 관해서는 WO2005/033321을 참조), 게다가, 높은 발현 효율의 관점에서 AAV5가, 혈관뇌관문을 효율적으로 투과하는 특성을 구비한다는 관점에서, 혈청형 9(AAV9)가 보다 바람직하다(Iwata N et al, Sci Rep. 2013; 3: 1472). 한편, 본 발명에 이용되는 바이러스 벡터에는 그 파생물도 포함된다. 바이러스 벡터의 파생물이란 캡시드를 개변한 것 등이 공지이고, 특히 AAV의 파생물로는, 예를 들면, WO2012/057363 등에 개시되는 것이 예시되지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0080] 바이러스 벡터에 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 탑재할 때에, AIM 또는 AIM 단편이 목적으로 하는 뇌내에 있어서 특이적으로 발현되도록 하는 목적으로, AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산의 발현을 제어하는 프로모터로서, 뇌특이적인 프로모터를 이용하는 것이 바람직하다. 이러한 뇌특이적인 프로모터에는, SCG10, GFAP 프로모터, synapsin 1 프로모터, tubulin α1 프로모터, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II 프로모터, neuron-specific enolase 프로모터, PDGF(platelet-derived growth factor beta)-β chain 프로모터 등이 포함되는데, 이들에 한정되지 않는다. 또, 프로모터에 더하여, Poly A 부가 시그널, Kozak 컨센서스 서열, 태그 서열, 링커 서열, 및 NLS 등의 공지의 서열을, 목적에 따라서 적절히 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산과 합쳐서 바이러스 벡터에 탑재해도 무방하다.

[0081] AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터는 공지의 방법에 의해 조제할 수 있다. 간결하게

는 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산과, 필요에 따라서 원하는 기능을 갖는 핵산(예, 뇌특이적 프로모터 등)을 삽입한 바이러스 발현용 플라스미드 벡터를 조제하고, 이것을 적절한 숙주 세포에 트랜스펙트하고, 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 일과성으로 생산하도록 하고, 이것을 회수하면 무방하다.

[0082] 예를 들면 AAV 벡터를 조제하는 경우, 먼저, 야생형 AAV의 게놈 서열 중에서 양단의 ITR을 남기고, 그 이외의 Rep 단백질 및 캡시드 단백질을 코딩하는 DNA 대신에, AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 삽입한 벡터 플라스미드를 작성한다. 한편, 바이러스 입자의 형성에 필요한 Rep 단백질 및 캡시드 단백질을 코딩하는 DNA는 별도의 플라스미드에 삽입한다. 게다가, AAV의 증식에 필요한 아데노바이러스의 헬퍼 작용을 담당하는 유전자(E1A, E1B, E2A, VA, 및 E4orf6)를 포함하는 플라스미드를, 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드로서 작성한다. 이들 3종의 플라스미드를, 숙주 세포에 트랜스펙션함으로써, 상기 세포 내에 있어서 재조합 AAV(즉, AAV 벡터)가 생산되게 된다. 숙주 세포로는, 상기 헬퍼 작용을 담당하는 유전자의 유전자 산물(단백질) 중의 일부를 공급할 수 있는 세포(예를 들면, 293 세포 등)을 이용하는 것이 바람직하고, 그러한 세포를 이용하는 경우에는 상기 숙주 세포로부터 공급 받을 수 있는 단백질을 코딩하는 유전자를, 상기 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드에 탑재할 필요가 없다. 생산된 AAV 벡터는 핵내에 존재하기 때문에, 숙주 세포를 동결 융해하여 회수하고, 염화 세슘을 이용한 밀도 구배 초원심법이나 칼럼법 등에 의해 분리 및 정제를 수행함으로써 원하는 AAV 벡터가 조제된다.

[0083] 본 발명의 제제를 이용하여 대상의 신경변성 질환을 치료 또는 예방하는 경우, 그 투여 경로는 유효 성분이 되는 AIM 단백질의 뇌내로의 송달이 실현되는 한, 특별히 한정되지 않는다. 일 양태에 있어서, 본 발명의 제제에 함유되는 성분이 AIM 단백질인 경우는 AIM 단백질이 혈관뇌관문(Blood-Brain Barrier, BBB)을 투과하지 않는 것을 고려하여, 대상의 두개골에 핀홀을 뚫고, 뇌조직에 본 발명의 제제를 마이크로인젝션 등의 자체 공지의 방법에 의해 직접 도입해도 무방하다. 또는 혈관뇌관문을 투과 가능하게 개변된 리포솜 중에 AIM 단백질을 봉입하고, 이것을 정맥 투여 등에 의해 대상에 투여함으로써도, AIM 단백질을 뇌내에 송달할 수 있다. 또, 본 발명의 제제에 함유되는 성분이 AIM 단백질을 코딩하는 핵산인 경우에도, 대상의 두개골에 마련한 핀홀로부터 직접 본 발명의 제제를 도입하는 방법이나 상술한 리포솜을 이용한 방법 등에 의해 뇌내에 AIM 단백질을 코딩하는 핵산을 송달할 수 있다.

[0084] 본 발명의 제제의 성분이, AIM을 코딩하는 핵산을 탑재한 바이러스 벡터인 경우는 대상의 두개골에 핀홀을 마련하고, 상기 핀홀을 경유하여 뇌조직에 본 발명의 제제를 마이크로인젝션 등의 자체 공지의 방법에 의해 직접 도입할 수 있다. 또, 상술한 바와 같이, AAV9을 이용하면, 대상의 두개골에 핀홀을 마련하지 않고, 본 발명의 제제를 순환 혈액에 주입하는 것만으로 AIM을 대상의 뇌내 특이적으로 발현시킬 수 있기 때문에, 매우 바람직하다. 즉 리포솜이나 AAV9 등의 혈관뇌관문을 투과할 수 있는 수단을 이용한 양태에 있어서는, 본 발명의 제제는 비경구로 투여되고, 예를 들면, 정맥내 투여, 동맥내 투여, 피하 투여, 복강내 투여할 수 있다.

[0085] 본 발명의 제제가 비경구 투여용으로 제제화되는 경우, 예를 들면, 주사제, 좌제 등으로서 제제화할 수 있다. 주사제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등의 제형을 포함해도 무방하다. 이러한 주사제는 공지의 방법에 따라서 조제할 수 있다. 주사제의 조제 방법으로는, 예를 들면, AIM, AIM을 코딩하는 핵산, 및/또는 AIM을 코딩하는 핵산을 탑재한 바이러스 등의 성분을 통상 주사제에 이용되는 무균의 수성액, 또는 유성액에 용해, 현탁 또는 유화함으로써 조제할 수 있다. 주사용 수성액으로는, 예를 들면, 생리식염수, 포도당이나 기타 보조약을 포함하는 등장액 등이 이용되고, 적당한 용해 보조제, 예를 들면, 알코올(예, 에탄올), 폴리알코올(예, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 비이온 계면활성제〔예, 폴리소르베이트 80, HCO-50(polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕등과 병용해도 무방하다. 유성액으로는, 예를 들면, 참기름, 콩기름 등이 이용되고, 용해 보조제로서 안식향산 벤질, 벤질 알코올 등을 병용해도 무방하다. 조제된 주사액은 적당한 앰플에 충전되는 것이 바람직하다.

[0086] 본 발명의 제제에 의해 치료 또는 예방될 수 있는 신경변성 질환은 뇌내에 있어서의 비정상 단백질의 축적에 기인하는 것이라면 특별히 한정되지 않는다. 한편, 본 명세서에 있어서의 "비정상 단백질"이란 유전자 변이나 화학 수식 등에 기인하는 입체 구조 변화 등에 의해 본래의 생물학적 기능이 상실되거나, 저감되거나, 항진되거나, 또는 변화된 결과, 질환의 원인이 될 수 있는 단백질을 포함하고, 또, 그 자체로는 정상 단백질과 동일하더라도, 비정상적으로 응집 또는 축적되고, 전체적으로 비정상 단백질 응집체가 되어, 결과적으로 질환의 원인이 될 수 있는 단백질 응집체도 포함한다. 본 발명의 제제를 이용하여 치료 또는 예방될 수 있는 신경변성 질환에는, 예를 들면, 알츠하이머병, 파킨슨병, 루이소체 치매, 전두측두엽 치매, 다계통 위축증, 픽병, 대뇌피질 기저핵 변성증, 진행성 핵상성 마비, 근위축성 측삭경화증, 구척수성 근위축증, 척수성 진행성 근위축증, 헌팅턴병, 척수소뇌변성증, 해마경화증, 진행성 근간대성 간질, 및 치아적핵담창구루이체 위축증이 포함되는데,

이들에 한정되지 않는다. 일 양태에 있어서, 본 발명의 제제의 적용 질환은 알츠하이머병이다.

[0087] 본 발명의 제제의 대상에의 투여량은 치료 및/또는 예방 유효량인 한, 특별히 한정되지 않고, 유효 성분의 종류 및 형태, 대상의 연령 및 체중, 투여 스케쥴, 및 투여 방법 등에 따라서 적절히 최적화하면 무방하다.

[0088] 본 발명의 제제를 신경변성 질환에 걸리는 대상에 적용함으로써, AIM 또는 AIM 단편이, 대상의 뇌내에 송달되거나, 또는 대상의 뇌내에 있어서 발현된다. 뇌내의 AIM 또는 AIM 단편은 뇌내에 존재하는 비정상 단백질에 결합되고, 상기 단백질을 제거 대상으로서 마킹한다. 상기 마킹된 비정상 단백질은 미세아교세포에 의한 탐식에 의해, 신속하게 뇌내에서 제거된다. 그 결과, 대상에 있어서의 신경변성 질환을 치료 및/또는 예방하는 것이 가능해진다.

[0089] 한편, 본 명세서에 있어서의 질환의 "치료"에는 질환의 치유뿐만 아니라, 질환의 관해 및 질환 정도의 개선도 포함될 수 있다.

[0090] 또, 본 명세서에 있어서의 질환의 "예방"에는 질환의 발증을 막는 것에 더하여, 질환의 발증을 늦추는 것이 포함된다. 게다가, 본 명세서에 있어서의 질환의 "예방"에는 치료 후의 상기 질환의 재발을 막는 것, 또는 치료 후의 상기 질환의 재발을 늦추는 것도 포함될 수 있다.

[0091] 2. 신경변성 질환의 치료 또는 예방 방법

[0092] 본 발명은 또한, AIM, AIM의 생물학적 활성을 갖는 AIM 단편, 또는 상기 AIM 또는 AIM 단편을 코딩하는 핵산을 대상에 투여하는 것을 포함하는, 신경변성 질환의 치료 또는 예방 방법(이하, "본 발명의 방법"이라고 칭할 수 있다)을 제공한다.

[0093] 본 발명의 방법에 있어서의, 유효 성분으로서 이용되는 AIM 등, 각 성분 마다의 투여 수단 등에 대해서는 "1. 신경변성 질환의 치료 또는 예방제"에서 설명한 것과 마찬가지이다.

[0094] 본 발명의 방법을 적용하는 대상에는 신경변성 질환에 걸릴 수 있는 모든 생물이 포함될 수 있고, 구체적으로는 인간, 소, 원숭이, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 모르모트, 래트, 마우스, 토끼, 햄스터, 새 등의 온혈 동물이 예시된다. 한편, 상술한 바와 같이, 적용 대상과 투여되는 AIM 등의 유래는 일치시켜 두는 것이 바람직하다.

[0095] 본 발명의 바람직한 일 양태에 있어서, AIM을 코딩하는 핵산을 탑재한 바이러스 벡터로 하는 것도 가능하다. 이용할 수 있는 바이러스 벡터 등에 대해서는, "1. 신경변성 질환의 치료 또는 예방제"에서 설명한 것과 마찬가지이다.

[0096] 또, 본 발명의 방법에 의해 치료 또는 예방되는 신경변성 질환도 또한 "1. 신경변성 질환의 치료 또는 예방제"에서 설명한 것과 마찬가지이다.

[0097] 본 발명의 방법에 있어서의 AIM 등의 각 성분의 대상에의 투여량은 치료 및/또는 예방 유효량인 한, 특별히 한정되지 않고, 유효 성분의 종류 및 형태, 대상의 연령 및 체중, 투여 스케쥴, 및 투여 방법 등에 따라서 적절히 최적화하면 무방하다.

[0098] 이하의 실시예에 있어서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하는데, 본 발명은 이들 예에 의해 조금도 한정되는 것은 아니다.

[0099] **실시예**

[0100] [실시예 1] 야생형 마우스의 뇌에 있어서의 AIM 단백질의 발현 확인

[0101] 야생형 C57BL/6 마우스(Lane 1: Wild-type), AIM 결손 마우스(Lane 2: AIM-KO)의 뇌 전체를 Lysis Buffer 중에서 homogenize하여 라이세이트를 제작하고, 단백질 분량으로 하여 20 ng를, 포지티브 컨트롤의 rAIM 단백질(50 ng)과 함께 SDS-PAGE 상에서 분획한 후, polyvinyliden fluoride(PDVF) 막에 전사하여 항IM 항체(토끼 항마우스 AIM 항혈청)를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0102] 결과를 도 1에 나타낸다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 야생형 마우스, AIM 결손 마우스 모두 뇌에 있어서 AIM의 발현은 보이지 않았다.

[0103] [실시예 2] 야생형 마우스의 뇌의 면역염색

[0104] 야생형 C57BL/6 마우스의 뇌조직을 4% 파라포름알데히드로 고정하고 파라핀 블록화한 후, 뇌의 주요 부위를 포

괄하는 두께 4㎛의 절편을 제작하였다. 탈파라핀 처리를 한 다음, 항AIM 항체(토끼 항마우스 AIM 항혈청: 면역염색에 사용한 실적이 있는 항체)를 이용하여 면역염색을 수행하고, 퍼옥시다제 반응을 이용한 DAB 발색법으로 검출을 시도하였다.

[0105] 결과를 도 2에 나타낸다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 야생형 마우스의 뇌 전체에 있어서, AIM의 발현은 보이지 않았다.

[0106] [실시예 3] 야생형 마우스의 뇌에 있어서의 AIM mRNA의 확인

[0107] 야생형 C57BL/6 마우스(WT)의 뇌 전체(Lane 1), AIM 결손 마우스(AIM-KO)의 뇌 전체(Lane 2), WT 마우스의 간장(포지티브 컨트롤, Lane 3), AIM-KO 마우스의 간장(Lane 4), WT 마우스 신생아 뇌로부터 단리하여 증식시킨 미세아교세포(Lane 5), 상기 AIM-KO의 미세아교세포(Lane 6), 각각으로부터 RNA를 추출하고, quantitative RT-PCR법에 의해 AIM의 발현을 해석하였다. 간장에 있어서의 발현을 1로 하고, 각 검체에 있어서의 발현을 relative expression으로서 수치화하였다.

[0108] 결과를 도 3에 나타낸다. 도 3에 나타낸 바와 같이, 야생형 마우스의 뇌 전체, 및 뇌내의 미세아교세포 그 어느 것에 있어서나 AIM의 mRNA의 전사는 보이지 않았다.

[0109] 실시예 1 내지 3의 결과를 정리하면, 뇌에 있어서는 AIM 유전자는 전사되지 않고, 또, AIM 단백질은 혈관뇌관문(BBB)에서 블록킹되어, 뇌내에는 이행하지 않는다고 생각된다.

[0110] [실시예 4] AIM의 뇌내로의 도입과 아밀로이드 플라크의 존재

[0111] 마취 하에서 두정부 두개골을 노출한 알츠하이머병의 모델 마우스인 5XFAD 마우스를 스테레오탁식(또는 정위 고정 장치)으로 고정하고, 우뇌의 해마 영역에 실체 현미경 하에서 재조합 마우스 AIM(rAIM, 서열 번호 4) 10 μg (PBS 10 μL에 용해)을 마이크로인젝션하였다. 3시간 후에 뇌조직을 단리하여 4% 파라포름알데히드 고정을 실시한 후, 동결 절편을 제작하고, AIM(녹색)과 아밀로이드 베타(Aβ:적색)에 대한 항체를 이용하여 면역염색법에 의해 공염색을 수행하고, 형광현미경으로 관찰하였다.

[0112] 결과를 도 4에 나타낸다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 5XFAD 마우스의 해마 영역에 도입된 재조합 AIM은 아밀로이드 플라크와 함께 존재하고 있음이 확인되었다.

[0113] [실시예 5] 뇌내에서의 AIM의 발현에 의한 아밀로이드 플라크의 감소

[0114] 스테레오탁식(또는 정위 고정 장치)으로 고정한 8주령의 5XFAD 마우스의 뇌해마 영역에, 마우스 AIM을 발현하는 adeno-associated virus 혈청형 5(AAV-AIM)와 블랭크의 AAV5(AAV-mock)를 동일한 바이러스량, 마이크로인젝션하였다(n=7~8). 15주 후에 뇌를 적출하고, 4% 파라포름알데히드 고정하고 파라핀 절편을 항Ab 항체로 염색하고, Aβ 양성 부분(아밀로이드 플라크)의 면적을 NIHimageJ 소프트웨어를 이용하여 계측하였다. 해마 전체의 면적에 대한 아밀로이드 플라크의 면적을 %로 나타내고, AAV-AIM을 감염시킨 마우스와 AAV-mock를 감염시킨 마우스에서 비교하였다.

[0115] 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5에 나타낸 바와 같이, AIM을 발현하는 아데노 연관 바이러스를 감염시킨 개체는 mock AAV를 감염시킨 개체와 비교하여, 현저하게 아밀로이드 플라크가 감소하였다(n=7~8, P=0.00048, T-test). 본 결과로부터, AIM 단백질을 뇌내에 송달함으로써, 뇌내의 비정상 단백질을 효율적으로 감소시킬 수 있다는 것이 나타났다.

[0116] [실시예6] AIM의 결합에 의한 다량체 아밀로이드 β의 제거

[0117] N 말단을 Cy5로 표지한 Ab(아밀로이드 β) 42 펩티드(Asp - Ala - Glu - Phe - Arg - His - Asp - Ser - Gly - Tyr - Glu - Val - His - His - Gln - Lys - Leu - Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - Val - Gly - Ser - Asn - Lys - Gly - Ala - Ile - Ile - Gly - Leu - Met - Val - Gly - Gly - Val - Val - Ile - Ala: 서열 번호3)를 다량체화하도록 하고, AIM-KO 마우스 신생아 뇌로부터 단리, 배양한 미세아교세포 집단에 마우스 rAIM(50 mg/mL) 있음 (+ rAIM) 없음 (+ PBS)의 조건으로, DMEM 메디움 + 10% FBS 중에서 37℃ 1시간 반응시켰다. 세포를 세정한 후, 항F4/80 항체로 염색하고 유세포 분석기로 해석하였다.

[0118] 결과를 도 6에 나타낸다. F4/80 고양성인 미세아교세포에 있어서의, Cy5의 형광 강도, 즉 다량체 Ab42의 흡수도를 해석한 바, rAIM 존재 하에서는 비존재 하에 비하여, Cy5 양성의 미세아교세포가 현저하게(16%→84%) 증가하였다. 즉 AIM에 의해 비정상 단백질인 다량체 Ab42를 마킹함으로써, 미세아교세포에 의한 다량체 Ab42의 흡수가 현저히 항진된 것이 나타났다.

[0119] 이론에 구속되는 것을 바라는 것은 아니지만, 이상의 결과는 다음과 같은 메커니즘을 의미하는 것이라 생각된다. 즉 통상적으로는 뇌에는 AIM은 존재하지 않는다. 따라서, 알츠하이머병의 원인이 되는 다량체 아밀로이드 β가 축적되더라도, 미세아교세포는 그것을 효율적으로 제거할 수 없다. 그러나, 어떠한 방법을 이용하여 AIM을 뇌내에 송달 또는 뇌내에서 발현하게 하면, AIM은 다량체 아밀로이드 β를 비정상 단백질로서 마킹한다. 이에 따라, 미세아교세포가 효율적으로 다량체 아밀로이드 β를 제거하는 것이 가능해지고, 결과적으로 알츠하이머병의 치료 또는 예방이 달성된다.

[0120] [실시예 7] AIM의 발현에 의한 Aβ(아밀로이드) 플라크 면적의 감소

[0121] 5xFAD 마우스와, 인간 PDGF-B promoter 하에서 뇌신경세포에 마우스 AIM을 발현하는 트랜스제닉 마우스(TG)를 하이브리드하고, 전이 유전자를 갖지 않는 (Non-TG) 5xFAD 마우스와 전이 유전자를 갖는 (TG(+)) 5xFAD 마우스를 작성하였다. 한편, 인간 PDGF-B promoter 하에서 뇌신경세포에 마우스 AIM을 발현하는 트랜스제닉 마우스(TG)의 제작에 이용한 전이 유전자의 맵을 도 9에 나타낸다. 한편, 인간 PDGF-B promoter 서열(Xba I - Hind III)(서열 번호 6)은 "PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. Sasahara M, Fries JW, Raines EW, Gown AM, Westrum LE, Frosch MP, Bonthron DT, Ross R, Collins T. Cell. 1991 Jan 11; 64(1): 217-227."에 상세히 기술된다).

[0122] 7주령의 시점에서, 이 마우스에 있어서의 뇌 전체에 대한 Aβ(아밀로이드) 플라크 면적(%)을 비교하였다. 그 결과를 도 7에 나타낸다. 도 7에 나타낸 바와 같이, TG(+) 5xFAD 마우스에서 유의미한 플라크의 감소를 보였다(T-검정).

[0123] [실시예 8] 뇌조직에 있어서의 AIM과 Aβ(아밀로이드) 플라크가 함께 존재

[0124] 7주령의, Non-TG 5xFAD 마우스, TG(+) 5xFAD 마우스, 및 야생형 C57BL/6 마우스의 뇌조직을 단리하여 절편을 작성하였다. AIM(적색)과 Aβ(녹색)에 대한 항체를 이용한 면역염색법에 의해 AIM과 Aβ의 공염색을 수행하고, 이들 단백질의 존재를 형광현미경으로 관찰하였다. 결과를 도 8에 나타낸다. 도 8에 나타낸 바와 같이, TG(+) 5xFAD 마우스에 있어서는, AIM과 Aβ 플라크는 같이 존재해 있는 부분이 많이 보여졌다(상부도: 적색과 녹색이 겹쳐서 황색으로 되어 있는 부분, 및 적색과 녹색이 동일한 부위로 보이는 부분). 한편, 사진은 해마 영역이지만, 뇌 전체에서 이와 같은 AIM과 Aβ 플라크가 같이 존재하고 있는 것이 확인되었다.

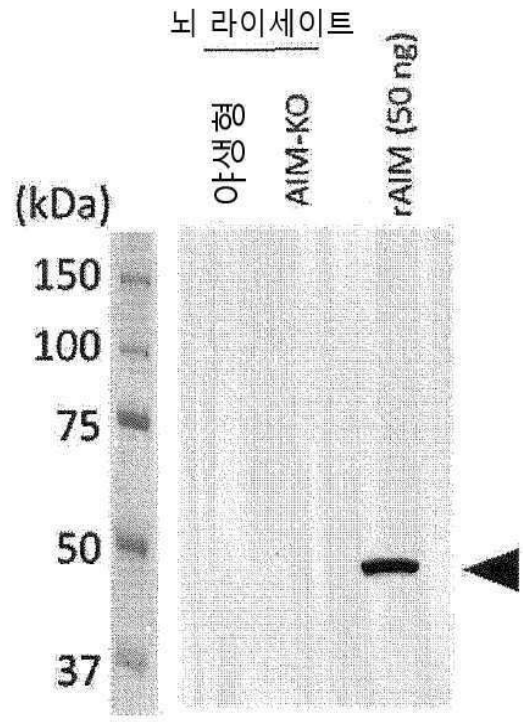
[0125] [산업상의 이용 가능성]

[0126] 본 발명에 따르면, 알츠하이머병을 비롯한 신경변성 질환을 치료 및/또는 예방할 수 있기 때문에, 의료 분야에 있어서 아주 유용하다.

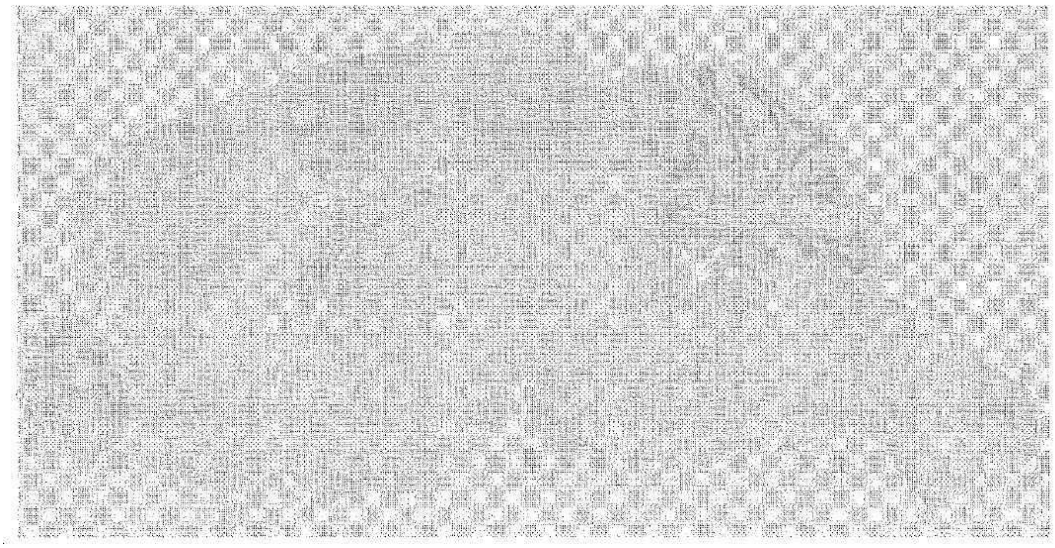
[0127] 본 출원은 일본에서 출원된 특허출원 2018-186759(출원일: 2018년 10월 1일)을 기초로 하고 있으며, 그 내용은 본 명세서에 모두 포함되는 것이다.

도면

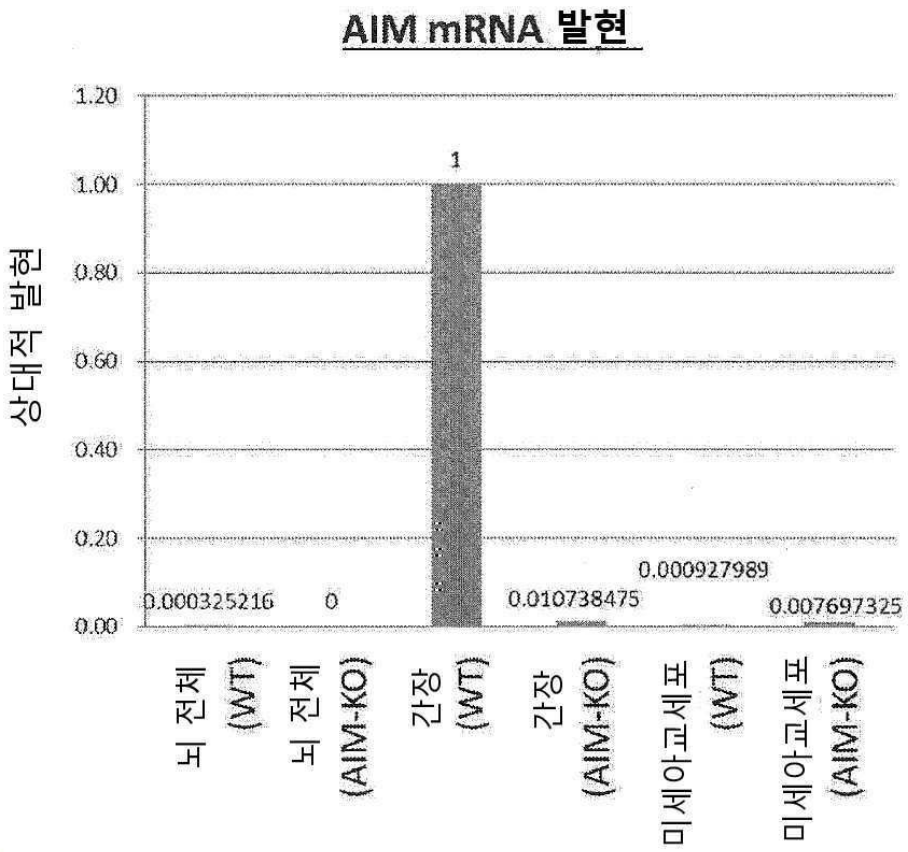
도면1



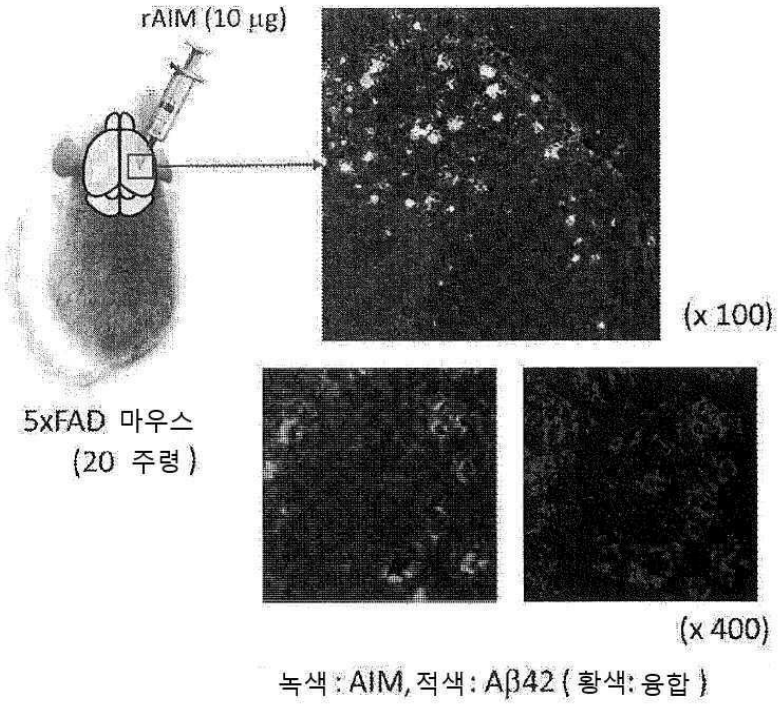
도면2



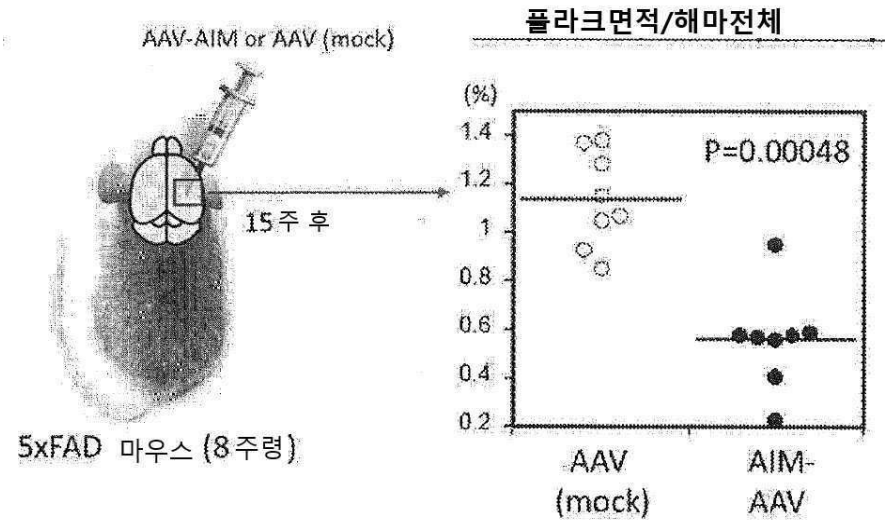
도면3


AIM mRNA 발현
상대적 발현
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1
0.000325216
0
0.010738475
0.000927989
0.007697325
뇌 전체 (WT)
뇌 전체 (AIM-KO)
간장 (WT)
간장 (AIM-KO)
미세아교세포 (WT)
미세아교세포 (AIM-KO)

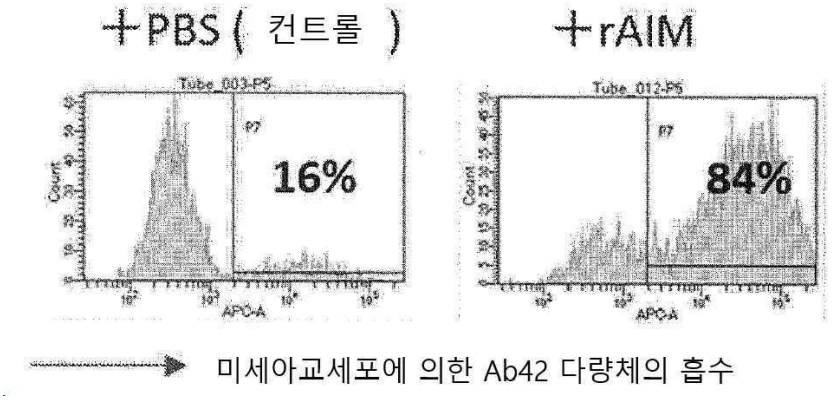
도면4


rAIM (10 μg)
5xFAD 마우스
(20 주령)
(x 100)
(x 400)
녹색 : AIM, 적색 : Aβ42 (황색: 융합)

도면5

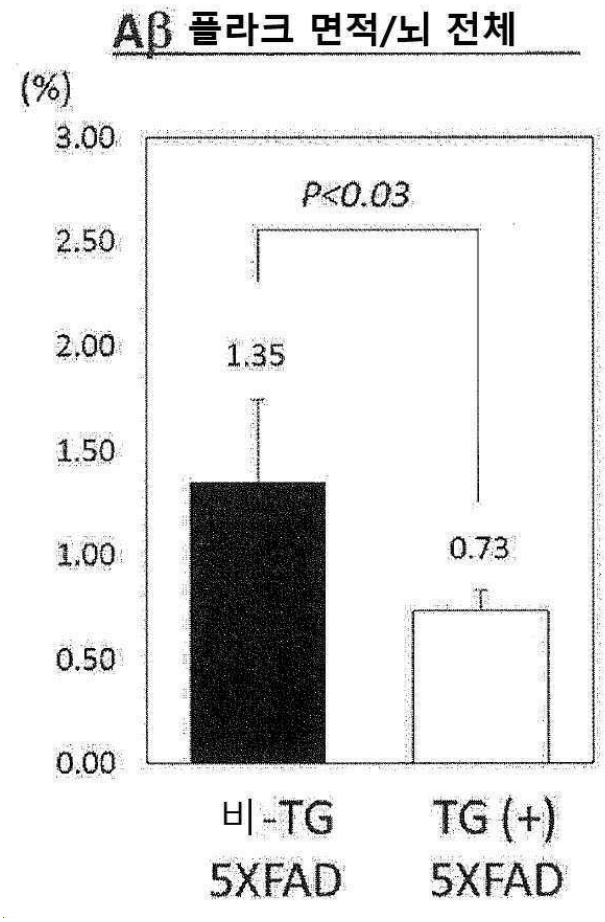


도면6

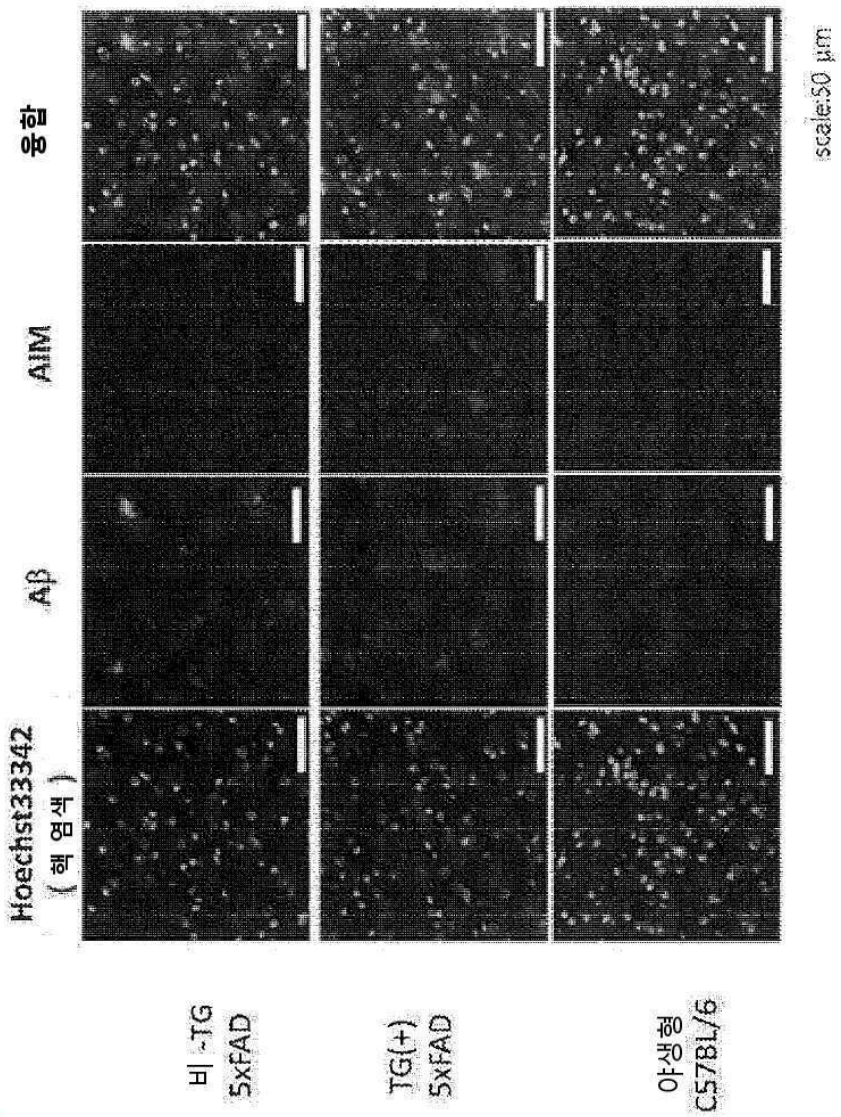


→ 미세아교세포에 의한 Ab42 다량체의 흡수

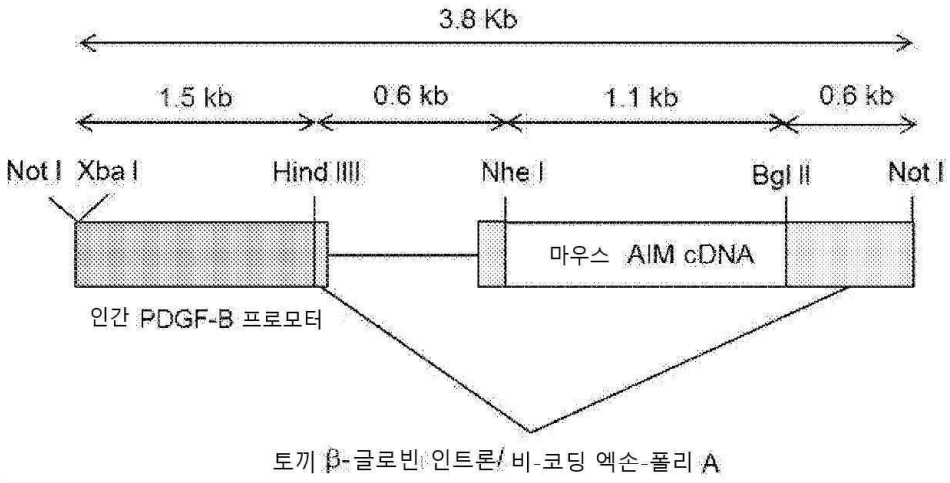
도면7


Aβ 플라크 면적/뇌 전체
(%)
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
P<0.03
1.35
0.73
비-TG 5XFAD
TG (+) 5XFAD

도면8


융합
AIM
Aβ
Hoechst33342
(핵 염색)
scale:50 μm
비 -TG
5xFAD
TG(+)
5xFAD
야생형
C57BL/6

도면9


3.8 Kb
1.5 kb
0.6 kb
1.1 kb
0.6 kb
Not I
Xba I
Hind III
Nhe I
Bgl II
Not I
마우스 AIM cDNA
인간 PDGF-B 프로모터
토끼 β-글로빈 인트론/ 비-코딩 엑손-폴리 A

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Miyazaki, Toru

<120> Therapeutic agent for a neurodegenerating disease

<130> 092953

<150> JP2018-186759

<151> 2018-10-01

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 347

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ile Leu Ala Ile Cys Thr Arg Pro Gly
1 5 10 15

Phe Leu Ala Ser Pro Ser Gly Val Arg Leu Val Gly Gly Leu His Arg
20 25 30

Cys Glu Gly Arg Val Glu Val Glu Gln Lys Gly Gln Trp Gly Thr Val
35 40 45

Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ile Lys Asp Val Ala Val Leu Cys Arg Glu
50 55 60

Leu Gly Cys Gly Ala Ala Ser Gly Thr Pro Ser Gly Ile Leu Tyr Glu
65 70 75 80

Pro Pro Ala Glu Lys Glu Gln Lys Val Leu Ile Gln Ser Val Ser Cys
85 90 95

Thr Gly Thr Glu Asp Thr Leu Ala Gln Cys Glu Gln Glu Glu Val Tyr
100 105 110

Asp Cys Ser His Asp Glu Asp Ala Gly Ala Ser Cys Glu Asn Pro Glu
115 120 125

Ser Ser Phe Ser Pro Val Pro Glu Gly Val Arg Leu Ala Asp Gly Pro
130 135 140

Gly His Cys Lys Gly Arg Val Glu Val Lys His Gln Asn Gln Trp Tyr

145 150 155 160

Thr Val Cys Gln Thr Gly Trp Ser Leu Arg Ala Ala Lys Val Val Cys
165 170 175
Arg Gln Leu Gly Cys Gly Arg Ala Val Leu Thr Gln Lys Arg Cys Asn
180 185 190
Lys His Ala Tyr Gly Arg Lys Pro Ile Trp Leu Ser Gln Met Ser Cys
195 200 205
Ser Gly Arg Glu Ala Thr Leu Gln Asp Cys Pro Ser Gly Pro Trp Gly
210 215 220

Lys Asn Thr Cys Asn His Asp Glu Asp Thr Trp Val Glu Cys Glu Asp
225 230 235 240
Pro Phe Asp Leu Arg Leu Val Gly Gly Asp Asn Leu Cys Ser Gly Arg
245 250 255
Leu Glu Val Leu His Lys Gly Val Trp Gly Ser Val Cys Asp Asp Asn
260 265 270
Trp Gly Glu Lys Glu Asp Gln Val Val Cys Lys Gln Leu Gly Cys Gly
275 280 285

Lys Ser Leu Ser Pro Ser Phe Arg Asp Arg Lys Cys Tyr Gly Pro Gly
290 295 300
Val Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asn Val Arg Cys Ser Gly Glu Glu Gln
305 310 315 320
Ser Leu Glu Gln Cys Gln His Arg Phe Trp Gly Phe His Asp Cys Thr
325 330 335
His Gln Glu Asp Val Ala Val Ile Cys Ser Gly
340 345

<210> 2

<211> 1044

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggctctgc tattctcctt gatccttgcc atttgcacca gacctggatt cctagcgtct 60

ccatctggag tgcggctggt ggggggcctc caccgctgtg aagggcgggt ggaggtggaa 120

cagaaaggcc agtggggcac cgtgtgtgat gacggctggg acattaagga cgtggctgtg 180

ttgtgccggg agctgggctg tggagctgcc agcggaaccc ctagtggtat tttgtatgag 240

ccaccagcag aaaaagagca aaaggtcctc atccaatcag tcagttgcac aggaacagaa 300

gatacattgg ctcagtgtga gcaagaagaa gtttatgatt gttcacatga tgaagatgct 360

ggggcatcgt gtgagaaccc agagagctct ttctccccag tcccagaggg tgtcaggctg 420

gctgacggcc ctgggcattg caagggacgc gtggaagtga agcaccagaa ccagtggtat 480

accgtgtgcc agacaggctg gagcctccgg gccgcaaagg tggtgtgccg gcagctggga 540

tgtgggaggg ctgtactgac tcaaaaacgc tgcaacaagc atgcctatgg ccgaaaaccc 600

atctggctga gccagatgtc atgctcagga cgagaagcaa cccttcagga ttgcccttct 660

gggccttggg ggaagaacac ctgcaaccat gatgaagaca cgtgggtcga atgtgaagat 720

ccctttgact tgagactagt aggaggagac aacctctgct ctgggcgact ggaggtgctg 780

cacaagggcg tatggggctc tgtctgtgat gacaactggg gagaaaagga ggaccaggtg 840

gtatgcaagc aactgggctg tgggaagtcc ctctctccct ccttcagaga ccggaaatgc 900

tatggccctg gggttggccg catctggctg gataatgttc gttgctcagg ggaggagcag 960

tccctggagc agtgccagca cagattttgg gggtttcacg actgcaccca ccaggaagat 1020

gtggctgtca tctgctcagg atag 1044

<210> 3

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Amyloid beta 42

<400> 3

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

35 40

<210> 4

<211> 352

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Pro Leu Phe Asn Leu Met Leu Ala Ile Leu Ser Ile Phe Val
1 5 10 15

Gly Ser Cys Phe Ser Glu Ser Pro Thr Lys Val Gln Leu Val Gly Gly
20 25 30

Ala His Arg Cys Glu Gly Arg Val Glu Val Glu His Asn Gly Gln Trp
35 40 45

Gly Thr Val Cys Asp Asp Gly Trp Asp Arg Arg Asp Val Ala Val Val
50 55 60

Cys Arg Glu Leu Asn Cys Gly Ala Val Ile Gln Thr Pro Arg Gly Ala
65 70 75 80

Ser Tyr Gln Pro Pro Ala Ser Glu Gln Arg Val Leu Ile Gln Gly Val
85 90 95

Asp Cys Asn Gly Thr Glu Asp Thr Leu Ala Gln Cys Glu Leu Asn Tyr
100 105 110

Asp Val Phe Asp Cys Ser His Glu Glu Asp Ala Gly Ala Gln Cys Glu
115 120 125

Asn Pro Asp Ser Asp Leu Leu Phe Ile Pro Glu Asp Val Arg Leu Val
130 135 140

Asp Gly Pro Gly His Cys Gln Gly Arg Val Glu Val Leu His Gln Ser
145 150 155 160

Gln Trp Ser Thr Val Cys Lys Ala Gly Trp Asn Leu Gln Val Ser Lys
165 170 175

Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Arg Ala Leu Leu Thr Tyr Gly
180 185 190

Ser Cys Asn Lys Asn Thr Gln Gly Lys Gly Pro Ile Trp Met Gly Lys
195 200 205

Met Ser Cys Ser Gly Gln Glu Ala Asn Leu Arg Ser Cys Leu Leu Ser
210 215 220

Arg Leu Glu Asn Asn Cys Thr His Gly Glu Asp Thr Trp Met Glu Cys

225 230 235 240

Glu Asp Pro Phe Glu Leu Lys Leu Val Gly Gly Asp Thr Pro Cys Ser

245 250 255

Gly Arg Leu Glu Val Leu His Lys Gly Ser Trp Gly Ser Val Cys Asp

260 265 270

Asp Asn Trp Gly Glu Lys Glu Asp Gln Val Val Cys Lys Gln Leu Gly

275 280 285

Cys Gly Lys Ser Leu His Pro Ser Pro Lys Thr Arg Lys Ile Tyr Gly

290 295 300

Pro Gly Ala Gly Arg Ile Trp Leu Asp Asp Val Asn Cys Ser Gly Lys

305 310 315 320

Glu Gln Ser Leu Glu Phe Cys Arg His Arg Leu Trp Gly Tyr His Asp

325 330 335

Cys Thr His Lys Glu Asp Val Glu Val Ile Cys Thr Asp Phe Asp Val

340 345 350

<210> 5

<211> 1059

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

atggctccat tgttcaactt gatgctggcc atcttgagca tttttgttgg atcgtgtttt 60

tcagagtctc caaccaaagt gcagctagtg ggaggtgccc accgctgtga agggcgagtg 120

gaggtggaac acaatggcca gtgggggact gtgtgtgatg atggctggga ccggcgtgat 180

gtggctgtgg tgtgccgaga gctcaattgt ggagcagtca tccaaacccc gcgtggcgca 240

tcatatcagc caccagcatc agagcaaaga gttcttattc aaggggttga ctgcaacgga 300

acggaagaca cgttggctca atgtgagcta aattacgatg tttttgactg ctcacatgaa 360

gaagatgctg gggcacagtg tgagaaccca gacagtgacc tcctcttcat tccagaggat 420

gtgcgtctag tagatggccc ggggcactgc cagggtcgag tggaggtgct ccaccagtcc 480

cagtggagca ctgtgtgtaa agcaggctgg aacttacagg tctcaaaggt ggtgtgcagg 540

cagctcgggt gtgggcgggc attactgacc tacggaagct gcaacaagaa tactcagggc 600

aaaggaccca tctggatggg caagatgtcg tgttctggac aagaagcaaa ccttcggtct 660

tgccttttga gtcgtttgga gaacaactgt acccatggcg aggacacatg gatggaatgt 720

gaagatcctt ttgagctgaa gctggtggga ggagacaccc cctgctctgg gaggttggag 780

gtgctgcaca agggttcctg gggctccgtc tgtgatgaca actggggaga aaaggaggac 840

caagtggtct gcaagcaact gggttgtggg aagtccctcc atccatcccc caaaacccgg 900

aaaatctatg ggcctggggc aggccgcatc tggctggatg acgtcaactg ctcagggaag 960

gaacagtctc tggagttctg ccggcacagg ttgtgggggt accacgactg tacccacaag 1020

gaagatgtgg aggtgatctg cacagacttt gatgtgtga 1059

<210> 6

<211> 1497

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220><223> Human PDGF-B promoter sequence (Xba I - Hind III)

<400> 6

tctagaggat ccacagtctc ctgagtagct gggactacag gagcttgtta ccacacccag 60

ctccagttta taaattcatc tccagtttat aaaggaggaa accgaggtac tgagaggtta 120

aaaaaccttc ctgcagacac ttgtccagca agtggccact ccaggatttg gaccaaggtg 180

atgtgtcttc aggctgtgtc tctgccactg tgccacgctg ctgggtggta ggcagcagtg 240

ggtgggtgcc tgcagtggtc tgtaaagacc acctgagatg tccttcctcc tctgttccac 300

cctgtccagg tccaagaaga cagtctatga agagagagca ggtgtgactc tctcagtgtg 360

ctcctctgtg agaagcaggc tgacatccca aagggaaggg cggataacag agacagtgca 420

agcggaggag atgagggtgc ctcaaagccg ggaggctggg tgatgcagga gcctgcgtgt 480

cccgaggggg gtgctgggcc cagtgtgagt acgtgtgact gtgactgaga cagtgtgact 540

gctgaaggca gggacacagc agctccctga ctgggggcag aaggcgttaa ctgtgtgaag 600

gctggttgtg ggtgggtggg ctctgggcct cgaacccggg ggctgaggga gatagtaaac 660

agcagggtga ctgacgggaa gatcatgttg gtagccctgc gaagatgctg cagggctgtg 720

ggggtttgtg tgactttgca gttcaacaaa ttcaaattca gccaacgctg gcagggcctg 780

ttgtgccagg caaccagcta ggaggaggag actcggaccc agcttgcagc tgaagggcgc 840

tggctgccgg gttctgtggg ttcaccttgc ggtgtcttcc cttgctaaca ctgagtcctt 900

acaatagccc catctccagg ttgaggctag atggagggga cagagggaag tgacttgccc 960

aaggtgaccc aaactcccga gtgccagggc aggatctgaa ttcaggctct cagactgcag 1020

agcctgagtc cctccctgcc atgcctgtgc cagggtggaa atgtctggtc ctggagggga 1080

gcgtggactc ctggccttgg ctctggagac atccccctag accacgtggg ctcctaacct 1140

gtccatggtc actgtgctga ggggcgggac ggtgggtcac ccctagttct tttttcccca 1200

gggccagatt catggactga agggttgctc ggctctcaga gacccccctaa gcgccccgcc 1260

ctggccccaa gccctccccc agctcccgcg tccccccccc cctggcgctg actccgggcc 1320

agaagaggaa aggctgtctc cacccacctc tcgcactctc ccttctcctt tataaaggcc 1380

ggaacagctg aaagggtggc aacttctcct cctgcagccg ggagcggcct gcctgcctcc 1440

ctgcgcaccc gcagcctccc ccgctgcctc cctagagtcg acctgcagcc caagctt 1497