



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0118955
(43) 공개일자 2024년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)
A61P 25/16 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2020.05)
A23L 33/17 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0010853

(22) 출원일자 2023년01월27일

심사청구일자 2023년01월27일

(71) 출원인

재단법인대구경북과학기술원

대구 달성군 현풍읍 테크노중앙대로 333

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)

(72) 발명자

최영식

대구광역시 동구 첨단로 61(신서동)

백순봉

대구광역시 동구 첨단로 61(신서동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

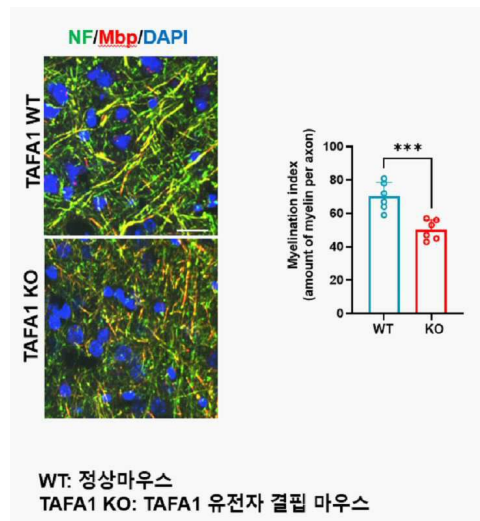
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 Dip2a 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 Dip2a 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 노화 및 퇴행성 뇌질환에 동반되는 뇌병변에 일어나는 탈수초화 현상, 나아가 백질의 변화의 개선에 효과가 있다. 본 발명은 Dip2a 수용체의 반응성을 증대시키는 상호작용 물질로써 수초화 생성 세포 전환과 관련한 유전자 발현을 유도할 수 있으며, 특히 TFAF1 펩타이드의 처리하여 Dip2a의 활성화를 통한 재수초화 작용으로써 탈수초화가 나타나는 신경손상 병증의 예방 또는 치료에 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/16 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
G01N 33/5058 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)

(72) 발명자

이건호

광주광역시 동구 경양로 234, 108동 906호(계림동,
 그랜드센트럴)

최규영

광주광역시 광산구 임방울대로 727-19, 105동 304
 호(월계동, 침단삼능아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2203050000
과제번호	22-BR-03-05
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국뇌연구원
연구사업명	한국뇌연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명	서남권치매협력연구
기 여 율	60/100
과제수행기관명	한국뇌연구원
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711172977
과제번호	2022R1A5A2029546
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	비위(脾胃)조절기반 Gut-Brain 시스템 제어 한의과학 연구센터
기 여 율	40/100
과제수행기관명	동신대학교
연구기간	2022.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 Dip2a 리간드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 TAFA1, FST1L, TGFB1 및 FST로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 탈수초화 동반 신경병증은 노화, 허혈성 뇌졸중, 다발성경화증, 치매, 근위축성측생경화증, 파킨슨 질환 및 외상유도된 신경병증으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 Dip2a 리간드는 Bcas1 또는 Mbp 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 Dip2a 리간드는 Dip2a와 상호작용하여 회돌기세포의 분화를 통해 재수초화를 유도시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

- (1) 탈수초화 동반 신경병증 세포에 시험물질에 접촉시키는 단계;
- (2) 상기 시험물질을 접촉시킨 탈수초화 동반 신경병증 세포에서 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- (3) 대조군의 치료와 비교하여 상기 Dip2a 리간드의 발현 또는 활성 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 치료제 스크리닝 방법.

청구항 7

Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는, 회돌기세포의 분화를 통한 재수초화 유도용 시약 조성물.

청구항 9

청구항 7에 있어서,

상기 Dip2a 리간드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 TAFA1 펩타이드 TAFA1, FST1L, TGFB1 및

FST로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 시약 조성물.

청구항 10

청구항 7에 있어서,

상기 Dip2a 리간드는 Bcas1 또는 Mbp 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 시약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Dip2a 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

배경 기술

[0002] 수초(myelin)는 신경축삭을 감싸는 지질 절연체로써 신경의 전기신호 전달을 촉진하고 외부환경으로부터 신경돌기를 보호한다. 뇌신경의 손상으로써 일어나는 탈수초화는 다발성경화증뿐만 아니라 노화나 치매, 루게릭병과 같은 퇴행성뇌질환에서 공통적으로 일어나는 과정으로, 신경세포 다발의 흥분성 전도의 억제와 형태적 변형을 초래함으로써 신경세포의 소멸, 운동 및 인지장애 등의 뇌기능 소실에 이르게 한다.

[0003] 수초화는 회돌기세포 전구체의 뇌발달 과정에서 형태 및 성질 변화를 일어나는 분화과정과 함께 신경세포골격의 인지, 세포 분극화 이후 축삭돌기를 감싸는 세포막 지질체로 특이화되는 복합적인 절차를 포함한다. 이러한 회돌기세포 전구체는 성인이 된 후에도 중추 및 말초신경계에 존재하며 휴지상태를 유지하다 뇌손상을 유발하는 환경변화에 대응하여 수초화 기전을 재활성화 시켜 신경기능의 손실을 억제하는 역할을 한다. 회돌기세포 전구체 성숙과정에서의 주요한 변환점마다 특이적인 세포막 수용체를 발현하며 이는 신경 분비성 인자 등과 같은 외부 신호를 받아들여 수초화 유도 유전자 발현을 촉진하는 세포내의 세포신호전달을 turn-on함으로써 수초 생성 회돌기세포로 성숙된다. 따라서 회돌기세포 특이적인 주요 수용체의 발굴 및 활성화는 탈수초화를 동반하는 다양한 신경 질환의 병증완화에 주요한 표적이 될 수 있다.

[0004] 노화 과정에서 회돌기세포 전구체의 분화능의 점진적인 소실로써 뇌영역의 수초화와 관련된 항상성 유지에 문제가 야기되어 수초화 신경이 집합되어 있는 백질 영역에서의 다방면의 변화가 나타난다. 또한, 회돌기세포는 수초화 과정에서 많은 에너지 소비와 대사변화를 일으켜 주변환경에 의한 염증 및 DNA 손상에 취약하다. 따라서 허혈성 뇌졸중이나 신경퇴행성 질환 등의 뇌손상 영역에서 탈수초화 현상을 보인다. 알츠하이머 질환 환자들의 MRI를 통한 뇌신경 이미지는 질환 초기 단계에 백질의 영역의 변화가 보이는데 이는 아밀로이드가 세포 외에 침착되기 전에 신경세포 내 아밀로이드 올리고머에 의해 시냅스 손상과 함께 수초 훼손을 일으키는 것으로 나타난다. 뇌 면역세포인 미세아교세포는 탈수초화 과정에서 생기는 뇌의 수초 잔해들을 식세포작용을 통해 제거하여 온전한 신경 외부환경을 유지하는데 노화 또는 지속적인 신경퇴행 병증은 미세아교세포의 기능 손실 및 만성 염증반응을 일으킴으로써 탈수초화 현상과 함께 백질영역의 소실을 오히려 더욱 촉진시키게 된다. 따라서 재수초화 반응 촉진을 통한 뇌신경 환경의 온전함의 유지가 뇌 항상성 복구 및 병증 억제에 중요하다.

[0005] 탈수초화 증상의 대표적 질환인 다발성 경화증과 관련하여 유일하게 FDA 승인을 받은 약물은 Ocrelizumab으로 약물을 투여하지 않은 환자에 비하여 약간의 증상 완화 효과를 보인다. 정맥주사 투입하는 또 다른 약물로는 Natalizumab, Alemtuzumab 등 있으며, 그 밖에 다른 경구 투여제로 Fingolimod, Dimethyl fumarate, Teriflunomide, Siponimod 등의 약물이 시판되고 있다. 이러한 약물들은 면역세포를 표적으로 염증반응을 억제시켜 증상을 완화시키거나 간 손상, 혈압 상승, 두통 등의 부작용을 보인다.

[0006] 면역억제 약물들은 근본적으로 탈수초화 반응을 역전시킬 수는 없으므로 회돌기세포 전구체를 표적으로 재수초화를 촉진시키는 Miconazole 과 Clobetasol 약물들이 개발되었다. 덧붙여, 회돌기세포를 활성화하는 신호로 NRG1-ERBB4, Nogo-A-Nogo receptor 등이 있으며 Nogo 수용체와 결합하는 LINGO-1의 경우 항체 약물(Oppicinumab)이 임상 진행 중이다. M1 muscarinic 수용체를 억제함으로써 회돌기세포 전구체의 분화를 촉진하는 PIPE-307는 유일하게 수초 재생을 촉진하는 약물로 임상 연구가 진행 중이다. 그러나 이러한 약물들이 아직까지 재수초화의 촉진을 통하여 극적인 병증 완화의 효과를 보이지는 못하고 있어 회돌기세포 전구체의 성숙 및 활성 유도 기전에 작용하여 면역체계에 관여하지 않고 수초 수리를 강화시켜주는 약물의 발굴로써 탈수초화를 동반한 신경질환 환자에 대한 치료법 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제10-2021-0074869호(2021.06.22. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 (1) 탈수초화 동반 신경병증 세포에 시험물질에 접촉시키는 단계; (2) 상기 시험물질을 접촉시킨 탈수초화 동반 신경병증 세포에서 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 (3) 대조군의 시료와 비교하여 상기 Dip2a 리간드의 발현 또는 활성 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (1) 탈수초화 동반 신경병증 세포에 시험물질에 접촉시키는 단계; (2) 상기 시험물질을 접촉시킨 탈수초화 동반 신경병증 세포에서 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 (3) 대조군의 시료와 비교하여 상기 Dip2a 리간드의 발현 또는 활성 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 Dip2a 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 노화 및 퇴행성 뇌질환에 동반되는 뇌병변에 일어나는 탈수초화 현상, 나아가 백질의 변화의 개선에 관한 것으로 희돌기세포의 수초화 촉진을 통한 신경 활성화의 유지 및 손상억제에 유용하다. 특히 희돌기세포의 분화 및 성숙에 직접적으로 영향을 미치는 세포막 수용체를 이용함으로써 리간드 처리를 통한 간단하고 빠른 반응성으로써 수초화를 유도 할 수 있다. 본 발명은 Dip2a 수용체의 반응성을 증대시키는 상호작용 물질로써 수초화 생성 세포 전환과 관련한 유전자 발현을 유도할 수 있으며, 특히 TFAA1 펩타이드의 처리하여 Dip2a의 활성화를 통한 재수초화 작용으로써 탈수초화가 나타나는 신경손상 병증의 예방 또는 치료에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 TFAA1 결핍 마우스의 대뇌 피질영역에서 수초화 신경의 비율이 감소한 것을 확인한 것이다.

도 2는 희돌기세포에 TFAA1 펩타이드를 처리하였을 때 수초화 관련된 Bcas1 및 Mbp 유전자의 발현이 증가함을 확인한 것이다.

도 3은 플래그 태깅된 TFAA1 발현 벡터를 HEK293 세포주에 감염 후 TFAA1 단백질을 면역침전법을 통하여 분리하여 단백질 번역 후 변형을 질량분석법을 통하여 분석한 결과를 확인한 것이다.

도 4는 열안전성 온도(52℃)와 불안전성 온도(62℃)에서 TFAA1에 특이적으로 결합하는 단백질을 질량 분석한 결

과를 확인한 것이다.

도 5는 TAF1A1 펩타이드는 Dip2a와의 상호작용을 통하여 희돌기세포 성숙 및 수초화 촉진 여부를 확인한 것이다.

도 6은 TAF1A1 처리 시 증가한 수초화 유전자들의(Bcas1, Mbp, CNPase 및 APC) 발현이 Dip2a 발현 억제에 의해 변화하는지 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0018] 본 발명은 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 Dip2a 리간드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 TAF1A1, FST1L, TGFBI 및 FST로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 상기 탈수초화 동반 신경병증은 노화, 허혈성 뇌졸중, 다발성경화증, 치매, 근위축성측생경화증, 파킨슨 질환 및 외상유도된 신경병증으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0021] 상기 Dip2a 리간드는 Bcas1 또는 Mbp 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0022] 상기 Dip2a 리간드는 Dip2a와 상호작용하여 희돌기세포의 분화를 통해 재수초화를 유도시킬 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리고올과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로스테라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 본 발명은 (1) 탈수초화 동반 신경병증 세포에 시험물질에 접촉시키는 단계; (2) 상기 시험물질을 접촉시킨 탈수초화 동반 신경병증 세포에서 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 (3) 대조군의 시료와 비교하여 상기 Dip2a 리간드의 발현 또는 활성 정도가 증가한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 탈수초화 동반 신경병증 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0027] 또한, 본 발명은 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는 탈수초화 동반 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다. 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 Dip2a[disconnected(disco)-interacting protein homolog 2a] 리간드를 유효성분으로 포함하는, 희돌기세포의 분화를 통한 재수초화 유도용 시약 조성물을 제공한다.
- [0031] 상기 Dip2a 리간드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 TAF1, FST1L, TGFBI 및 FST로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 상기 Dip2a 리간드는 Bcas1 또는 Mbp 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0036] <실시 예 1> TAF1 결핍 마우스의 수초화 비율 감소 확인
- [0037] 마우스의 TAF1 지놈 DNA의 Exon2 영역에 LazZ DNA 서열을 삽입함으로써 TAF1 유전자 발현의 하나의 염색체에서 삭제시킨 TAF1^{-/-}마우스를 교배하여 두 염색체에서 TAF1의 발현을 모두 삭제한 TAF1 결핍(knock-out) 마우스를 이용하였다. 생후 4개월 후 정상(WT) 마우스와 TAF1 결핍 마우스의 뇌 조직을 해부한 후 4% 파라포름알데하이드(PFA)에 담귀 4℃에서 16시간 동안 고정 시킨 후, 생리식염수에 10분간 5회 씻어준 후 20% 수크로오스에서 16시간 동안 4℃에서 탈수화 시켰다. 뇌조직을 수크로오스에서 꺼내어 적정온도절편 레진(OCT) 혼합물에 임베딩 시킨 후 20μm 두께로 동결 절단하여 시각피질의 영역에 조직절편을 얻었다. 조직절편의 면역염색을 위하여 생리식염수에 1% triton X-100를 녹인 PBST용액에 Mbp와 NF(neurofilament)항체를 1:100로 희석하여 조직절편에 분주한 뒤 16시간 동안 4℃에서 항체 반응을 유도하였다. PBST에서 10분간 2번 씻어낸 후 형광물질이 결합된 2차 항체를 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 DAPI(4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)를 이용 1μg/ml의 농도로 상온에서 10분간 세포핵을 염색시켰다.
- [0038] 그 결과, 도 1에 따르면, 면역염색 결과 TAF1 결핍 마우스의 시각 피질영역은 정상 마우스(WT)에 비하여 수초화 마커인 Mbp가 감소하고 있는 신경(N)의 비율이 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0040] <실시 예 2> TAF1 펩타이드 처리시 수초화 관련 유전자의 발현 증가 확인
- [0041] 임신 13일 차 마우스 배아의 대뇌피질영역을 해부한 후 10ml 0.5% 트립신에 37℃에서 15분간 조직을 해리시킨 후 10% Fetal bovine serum/DMEM F-12 10ml을 넣고 트립신을 비활성화 시켰다. 2000rpm에 5분간 세포를 원심분리를 통해 모은 후 희돌기세포 분화 배지(Neurobasal media/1x B-27/1mM, HEPES/1mM, L-Glutamine/100U/ml,

Penicillin, streptomycin)에 10ng/ml FGF(fibroblast growth factor) 및 10ng/ml EGF(epidermal growth factor)를 첨가하여 미부착성 세포 배양 플라스크에 6일간 미부착 배양하였다. 6일 후 회돌기세포 분화 배지에 10ng/ml FGF(fibroblast growth factor), 10ng/ml EGF(epidermal growth factor) 및 10ng/ml Shh(Sonic hedgehog)를 6일간 미부착 배양 후 부착성 세포 배양 접시에 회돌기세포를 분화배지에 10ng/ml EGF(epidermal growth factor), 10ng/ml Shh (Sonic hedgehog), 10ng/PDGF(platelet-derived growth factor)-AA를 함께 첨가하여 넣고 3일간 초대 회돌기세포 분화 배양하였다. 3일 후 해당조건에서 매일 1% DMSO(대조군) 혹은 10ng/μl의 TFAF1 펩타이드(실험군)를 24시간씩 3일간 처리 후 RIPA 버퍼에 1x Protease 억제제를 처리하여 회돌기세포의 세포 분해 후 단백질을 획득하여 면역 블롯을 수행하였다.

[0042] 그 결과, 도 2에 따르면, 회돌기세포 전구체 유전자인 Pdgfra 및 NG2 발현은 대조군과 실험군에서 차이나 나타나지 않고, TFAF1 펩타이드를 처리하였을 때 수초화 관련 유전자인 Bcas1 및 Mbp 발현이 크게 증가되는 것을 확인하였다.

[0044] <실시 예 3> TFAF1 단백질 활성화와 아미노산의 인산화간 관계 확인

[0045] Flag-TFAF1 발현 벡터를 20 μg과 2M CaCl₂를 1ml DW(증류수)에 섞어준 후 2 x HBS 1ml과 섞어서 상온에서 10분간 둔 후 150mm x 15mm 배양접시에 80% 채우도록 20ml 10% FBS/DMEM F12 배지에 배양한 HEK 293T 세포에 처리하였다. 20시간 후 동일 배지 25ml로 배양액을 갈아준 후, 72시간 동안 배양 후 NP40 버퍼에(20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% tripton X-100, PMSF, protease inhibitor) 세포 분해 후 단백질을 획득하였다. 해당 단백질 1mg에 FLAG M2 마그네틱 비드(magnetic bead) 10 μl를 16시간 동안 4℃에서 결합시킨 후 마그네틱을 이용하여 비드를 분리한 후 5% BSA/PBST 용액 500 μl에 세 번 씻어냈다. 마지막으로 RIPA 버퍼 50 μl에 비드에 붙은 단백질을 녹인 후 100℃에서 10분 동안 끓여 비드에서 단백질을 완전히 제거시켰다. 분리된 단백질은 단백질 질량 분석을 통하여 TFAF1에 번역 후 단백질 번역에 대하여 분석하였다.

[0046] 그 결과, 도 3에 따르면 109번째 트레오닌 아미노산의 특이적으로 인산화 변형이 100% 나타나는 결과를 확인하여 해당 아미노산의 인산화가 단백질 활성화에 중요하다는 것이 나타났다.

[0048] <실시 예 4> TFAF1에 결합하는 단백질 및 결합온도 확인

[0049] 실시예 2과 같이 배양한 회돌기세포를 Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells(Thermo Scientific #78840)을 이용하여 원형직말 단백질을 해리하여 획득하였다. 해당 막단백질 500 μg에 5ng의 TFAF1 펩타이드를 2분간 상온에서 섞어 준 후 52℃, 52.8℃, 54.3℃, 56.6℃, 59.3℃, 61.6℃, 63.1℃ 및 64℃에서 3분간 열을 가하여 준 후 면역 블롯 분석으로써 TFAF1이 안정한 온도를 확인하였다. 다음으로 TFAF1에 결합하는 단백질을 발굴하기 위하여 2 μg TFAF1 항체를 4시간 동안 4℃에서 30 μl Dynabeads™ Protein G과 결합시킨 bead 30 μl를 52℃와 및 62℃에서 가열한 각 TFAF1 펩타이드가 포함된 막단백질 추출물에 넣어준 후 4시간 동안 4℃에서 결합시켰다. 마그네틱을 이용하여 비드를 분리한 후 5% BSA/PBST 용액 500 μl에 세 번 씻어냈다. 마지막으로 RIPA 버퍼 50 μl에 비드에 붙은 단백질을 녹인 후 100℃서 10분간 끓여 비드에서 단백질을 완전히 제거시킨 후 단백질 질량 분석을 통하여 TFAF1에 결합하여 TFAF1을 안정화시킨 단백질을 분석하였다.

[0050] 그 결과, 도 4에 따르면, TFAF1이 열안정성 온도(52℃)와 불안정성 온도(62℃)에서 TFAF1에 특이적으로 결합하는 단백질을 질량 분석한 결과, 열안정성을 가지는 52℃에 Dip2a 단백질과 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[0052] <실시 예 5> TFAF1 처리 시와 Dip2a 발현 억제시의 Mbp 발현변화 확인

[0053] 실시예 2과 같이 배양한 회돌기세포에 Lipfectamine RNAiMAX reagent를 9 μl과 25pmol siRNA cotrol 또는 Dip2a를 타겟하는 siRNA (antisense-CUCACACGUGCGUAA)를 각각 150pmol DMEM F-12에와 혼합한 후 siRNA/DMEM F-12 혼합물과 Lipfectamine RNAiMAX reagent/DMEM F-12 혼합물을 섞어서 상온에서 5분간 둔 후 6웰에 회돌기 세포 배양액 2ml에 처리 하였다. 24시간 후 배양액을 교체하면서 1% DMSO(대조군) 혹은 10ng/μl의 TFAF1 펩타이드(실험군)를 24시간씩 3일간 처리 후 면역염색을 실시하였다.

[0054] 그 결과, 도 5에 따르면, siControl 상황에서 TFAF1 처리 시 증가한 수초화 유전자 Mbp가 Dip2a를 발현 억제하

였을 때 증가하지 않는 것을 확인하였다.

[0056] <실시 예 6> TAFAl 처리 시와 Dip2a 발현 억제시의 수초화 유전자의 발현변화 확인

[0057] 실시예 5과 같이 배양한 siRNA와 TAFAl 펩타이드를 처리한 초대 회돌기세포의 RNA를 eCube Tissue RNA mini kit(Philekorea, #EP52200)을 이용하여 추출한 후 Oligo dT primer 50pmol/RNA 500ng/10mM dNTP 1μl을 넣고 10μl 양이 되게 DW(증류수)를 넣어준 후 65℃에서 5분간 둔 후 얼음에 식혔다. 다음으로 10μl 역전사 혼합물 (4μl 5 x PrimeScript buffer 버퍼/RNase inhibitor 20unit/PrimeScript Reverse Transcriptase 100unit/up to 10μl DW(증류수))을 섞어준 후 42℃에서 60분간 cDNA를 합성 후 50μl DW(증류수)를 넣고 희석시켰다. 그 후 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 qRT-PCR분석을 수행하였고, 회돌기세포 전구체 유전자들과(Pdgfra, NG2 및 Olig2) 수초 생성 세포로의 분화 유전자들(Bcas1, Mbp, CNPase 및 APC)의 발현변화를 확인하였다.

표 1

[0059]

프라이머 서열		
	정방향(5' - 3')	역방향(5' -3')
Pdgfra	TGTGCAGCTGAATTCGCCT	GGAGGCGTTAACCACTTCCA
NG2	ACGATCCACCTCGCATCATC	GTTCCACAGGGACACCAGAG
Olig2	ATCTTCCTCCAGCACCTCCT	GATGTTGAGGTCGTGCATGC
Bcas1	GGAGACATAGTCGACGCG	TGGAGCTGCTGTTCTCTGTG
APC	CGTGCACAGCGAAGAATAGC	CTTCATGGGAGGCAGCATCA
CNPase	ACCTGAAGAAGCTGAAGCCC	GAAGGCCTTGTGATTCCCCA
MBP	CAGAAGAGACCCCTCACAGCG	TAAAGAAGCGCCCGATGGAG
Dip2a	ATCCTCTGCATCCTCCACCT	GGACGCTCGTAGGATGAGTG
GAPDH	TGCGACTTCAACAGCAACTC	ATGTAGGCCATGAGGTCCAC

[0060]

그 결과, 도 6에 따르면, siControl 상황에서 TAFAl 처리 시 증가한 수초화 유전자들의(Bcas1, Mbp, CNPase 및 APC) 발현이 Dip2a 발현 억제하였을 때 증가하지 않음을 확인하였고, 도 5 결과와 상응하게 TAFAl 펩타이드는 Dip2a와의 상호작용을 통하여 회돌기세포의 수초화 반응을 촉진시킴 것을 알 수 있었다.

[0062]

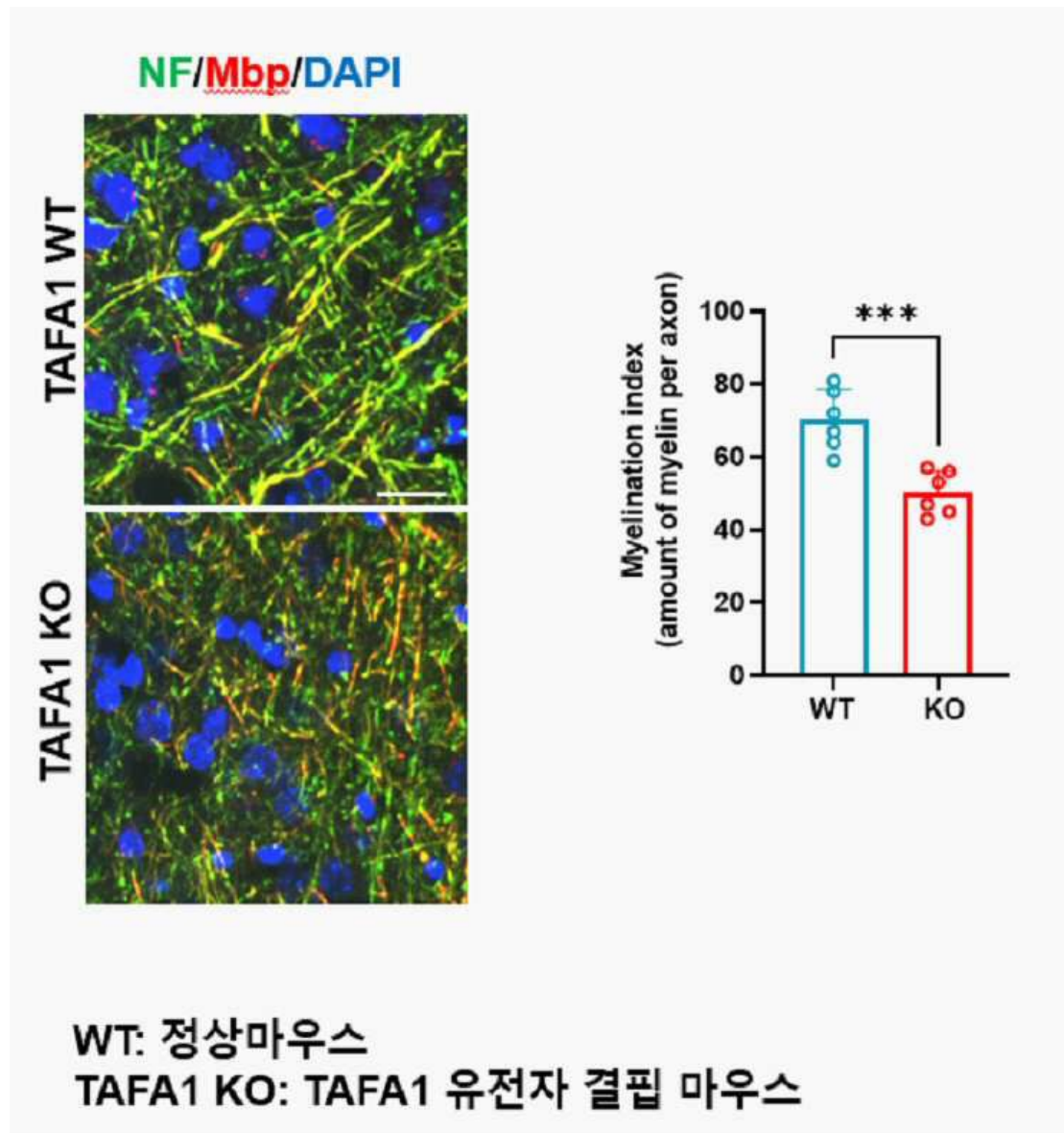
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

[0063]

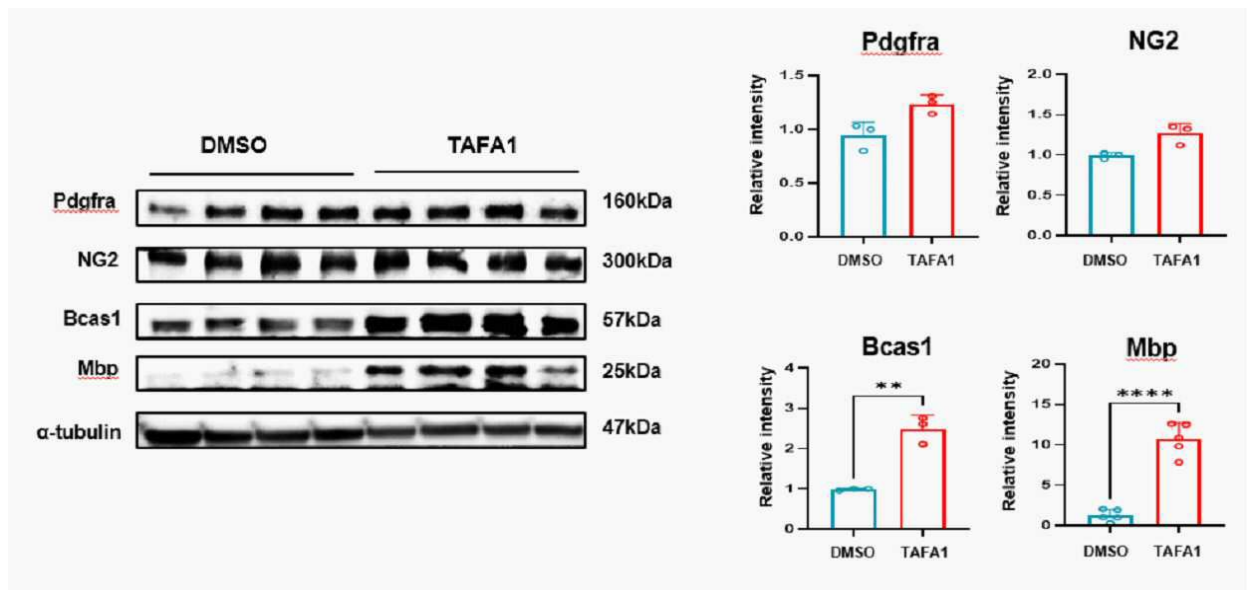
본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



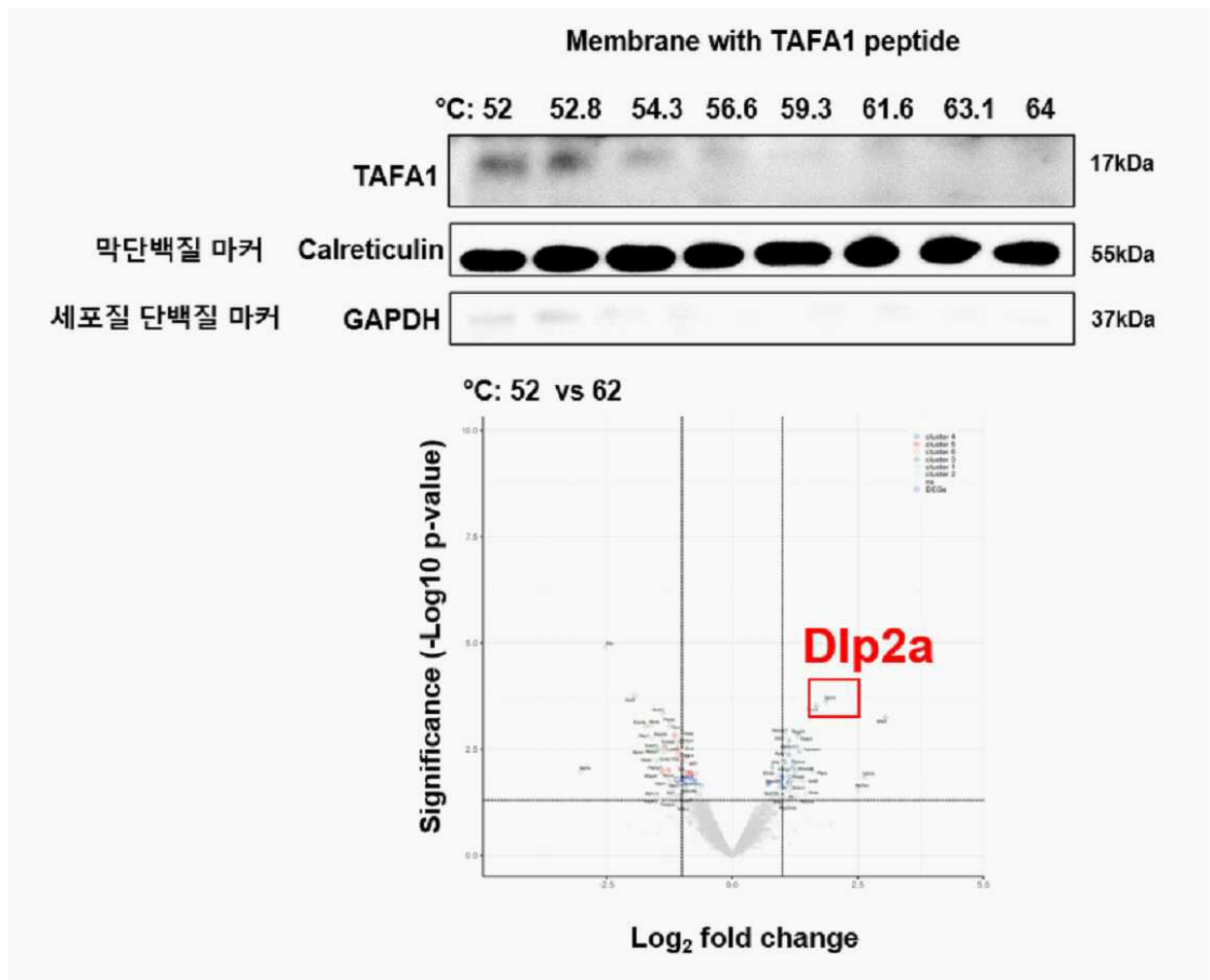
도면2



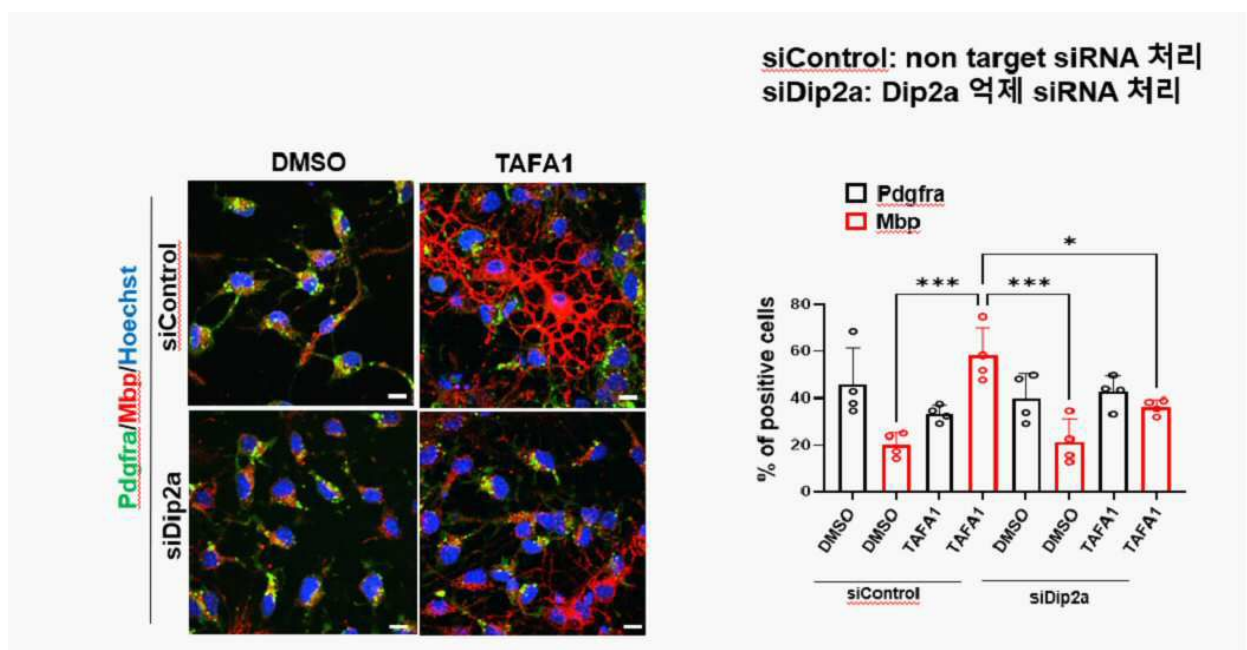
도면3



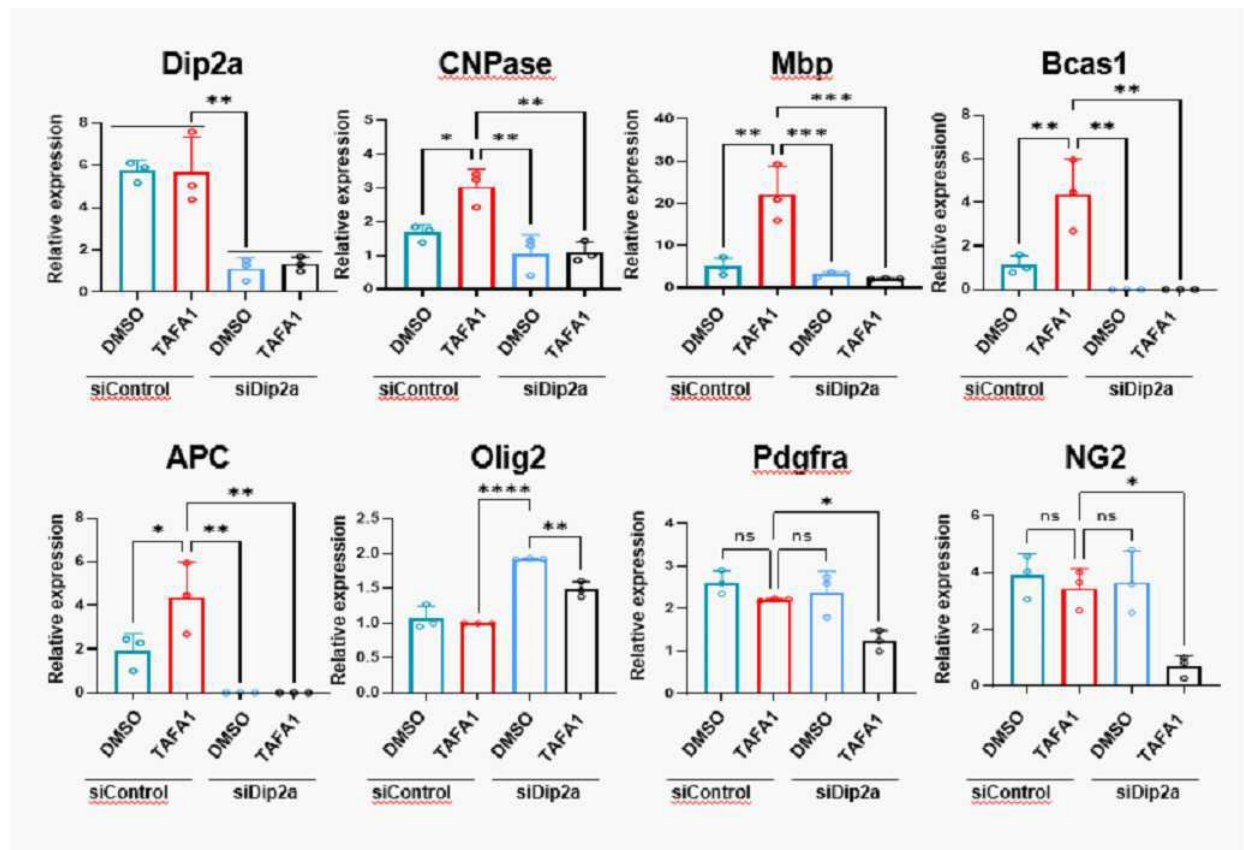
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.