



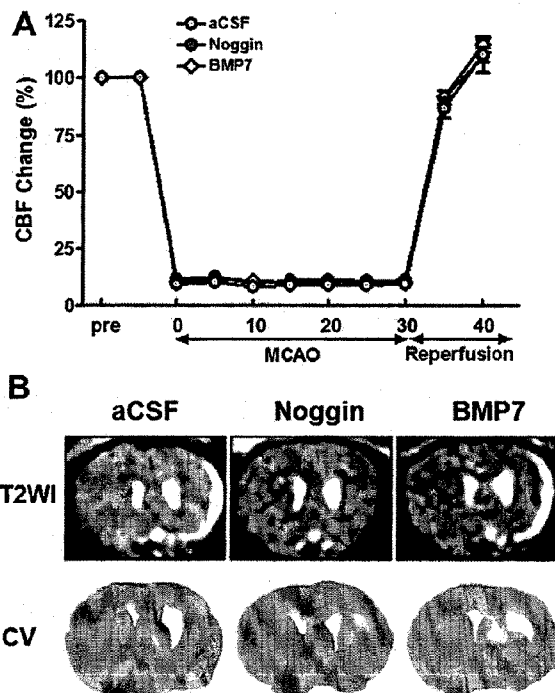
- (51) 국제특허분류:
A61K 48/00 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/003189
- (22) 국제출원일: 2015년 3월 31일 (31.03.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0003621 2015년 1월 9일 (09.01.2015) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박은미 (PARK, Eun-Mi); 158-710 서울시 양천구 안양천로 1071 이화여자대학교 의과대학, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION, CONTAINING NOGGIN AS ACTIVE INGREDIENT, FOR PROMOTING MICROGLIA ACTIVITY OR PREVENTING AND TREATING ISHEMIC DISEASES

(54) 발명의 명칭: 노킨을 유효성분으로 함유하는 소교세포 활성화 증진용, 또는 허혈성 질환 예방 및 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition, containing noggin as an active ingredient, for promoting microglia activity or preventing and treating ischemic diseases. It was verified in a middle cerebral artery occlusion (MCAO) animal model that, when administered for two weeks from two weeks after MCAO induction, noggin suppresses cerebral atrophy, promotes the expression of proteins associated with the restoration of brain tissue and the angiogenesis, and promotes microglia activity, thereby contributing to the restoration of brain tissue during the recovery from ischemic diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 노킨(Noggin)을 유효성분으로 함유하는 소교세포 활성화 증진용, 또는 허혈성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 노킨이 중뇌동맥협착(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 동물 모델에서 MCAO 유도 2주 후부터 2주 동안 투여하였을 때, 뇌 위축을 억제하고, 뇌 조직 복구와 관련된 단백질들의 발현 및 혈관 신생을 촉진하며, 소교세포의 활성을 증가시킴으로써 허혈성 뇌졸중에서 회복되는 동안 뇌 조직의 복구에 기여하는 것을 확인하였다.



규칙 4.17 에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】**【발명의 명칭】**

노킨을 유효성분으로 함유하는 소교세포 활성화 증진용, 또는 허혈성 질환 예방 및 치료용 조성물

5

【기술분야】

본 발명은 노킨(Noggin)을 유효성분으로 함유하는 소교세포(microglia) 활성화 증진용, 또는 허혈성 질환(ischemic disease) 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

10

【배경기술】

전세계적으로 사망의 주요 원인인 허혈성 뇌졸중(ischemic stroke)은 자발적인 또는 혈전을 용해하는 재관류가 시간 내에 발생하지 않는 한 심각한 기능 장애의 결과를 초래한다. 허혈성 뇌졸중에서 살아남은 환자는 손상 받은 뇌에서 신경 생성(neurogenesis), 축삭발아(axonal sprouting), 아교세포 발생(gliogenesis) 및 혈관신생(angiogenesis) 등의 내생적 신경수복(neuroreparative) 프로세스 정도에 따라 자연적인 회복의 차이가 나타난다(Cranner, 2008a; Gutierrez-Fernandez et al., 2012). 유일한 허혈성 뇌졸중 치료제인 혈전용해제는 치료창이 좁아 증상 발생 3시간 이내에만 사용할 수 있으므로 소수의 환자만이 치료를 받을 수 있고 대부분의 환자는 보존적 치료에 의존하게 된다. 현재 신경수복을 도울 수 있는 치료 방법은 부재하다.

15

20

25

뇌졸중으로부터의 기능 회복 정도는 조직 복구를 지연시키는 요인과 뇌 가소성 및 복구 촉진 요인 사이의 균형에 따라 달라진다(Popa-Wagner et al., 2011). 주로 반응성 성상세포(reactive astrocytes)로 구성된 신경교흔(glial scars)은 허혈성 뇌졸중 초기 단계에서 허혈성 영역의 경계를 표시하여 손상 조직을 보호하지만, 장기적으로는 조직 복구를 방해한다(Anderson et al., 2003; Roitbak and Sykova, 1999). 예를 들어, 노령 동물에서 허혈성 뇌졸중 후

증가된 신경교혼 형성이 젊은 동물과 비교하여 기능 회복 감소와
 연관되어있다(Badan et al., 2003). 다른 한편으로는 골수기질세포(bone marrow
 stromal cell) 투여, 간세포 성장인자 유전자의 이전 또는 허혈성 뇌졸중 후
 에리트로포에틴(erythropoietin)의 뇌실내 주입은 흉터 벽 두께를 감소시켜
 5 행동 개선이 되고 이러한 개선은 축삭 재생(axonal regeneration) 및
 혈관신생과 같은 뇌 복구 프로세스와 관련되어있다(Li et al., 2005; Reitmeir
 et al., 2011; Shimamura et al., 2006). 따라서, 허혈성 뇌에서 흉터 형성 및
 이의 치료와 관련된 분자의 역할을 확인하는 것은 새로운 신경회복 치료법의
 개발로 이어질 것이다.

10

뼈형성단백질(bone morphogenetic proteins, BMPs)과 이의
 내생적(endogenous) 길항제인 노긴(Noggin)은 척수 손상과 뇌 질환 후 복구
 과정에 관련되어 있다. 척수 및 뇌량(corpus callosum)의 탈수초성
 장애(demyelinating lesions) 부위에서 BMP 발현 증가는
 15 성상교세포증(astrogliosis) 및 희소돌기아교세포(oligodendrocyte) 전구
 세포의 분화로 성숙된 희소돌기아교세포의 억제와 관련되어있다(Dummula et al.,
 2011; Fuller et al., 2007; Wang et al., 2011). 또한, BMP는 신경 및
 희소돌기아교세포의 생성을 억제하는 동시에,
 희소돌기아교(oligodendroglial)-별아교(astroglial) 전구 세포 및
 20 신경줄기세포(neural stem cells)로부터 별아교세포로의 분화를 촉진한다(Mabie
 wt al., 1997; Xiao et al., 2010). 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)
 환자 및 알츠하이머병 마우스 모델에서 증가된 BMP 레벨은 해마 신경발생의
 감소와 연관되어 있다(Bonagui et al., 2008; Crews et al., 2010). 반면,
 탈수초(demyelination) 동안 노긴 주입은 별아교세포의 수를 감소시키지만, BMP
 25 신호전달의 하위단계인 Smad(Sma and Mad Related Family) 단백질의 인산화를
 막아서 희소돌기아교세포의 성숙 및 재생을 증가시킨다(Cate et al., 2010; Sabo
 et al., 2011).

허혈성 뇌에서 BMP와 노긴의 증가는 보고되어있으나(Chang et al., 2003;

Lei et al., 2012; Shin et al., 2012), 허혈성 뇌졸중 후의 만성기 시기 복구 프로세스에서의 이들의 역할은 명확히 밝혀지지않았다. 허혈성 질환 후 회복에 관여하는 것이 보고되어있는 BMP7(Chang et al., 2003; Chou et al., 2006)과 같은 BMP는 허혈성 뇌에서 BMP의 활성이 다를 수 있다는 가능성을 제기한다. 본 발명자들은 이전 연구에서 BMP 및 노킨의 발현에 있어서 시간적 변화가 허혈성 질환 후 신경회복 활성화에 대한 단서임을 제공한다. BMP 및 노킨은 일시적 허혈성 뇌졸중 후 처음 4주 동안 다르게 발현되고, 이들의 발현은 별아교세포흔(astroglial scar) 형성에 관여하는 것으로 여겨진다(Shin et al., 2012). 증가된 BMP2 및 BMP7의 발현은 허혈성 뇌졸중 후 첫 1주와 마지막 4주에 관찰되었고, 이러한 레벨은 성상교세포증(astrogliosis)과 관련되었다. BMP에 비해 노킨의 발현은 상대적으로 약하였으나, 허혈성 뇌졸중 2주 후에 유의적으로 증가하였고, 4주 후에는 더욱 증가하였다. 또한, BMP 및 노킨의 발현이 허혈성 뇌에서 각각 신경교섬유질산성단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP)-양성 성상세포 및 Iba-1(ionized calcium-binding adapter molecule-1) 양성 소교세포(microglia)와 연관되어있는 것을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 BMP 및 노킨이 허혈성 뇌졸중 후 만성 단계 동안의 복구 프로세스에서 서로 다른 역할을 하는 것을 나타낸다(Shin et al., 2012). 그러나 노킨이 허혈성 뇌졸중의 치료에 사용될 수 있는지에 대해서는 연구된 바가 없다.

이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위해 연구한 결과, MCAO를 유도한 허혈성 뇌졸중 동물 모델에서 노킨을 처리하여 확인한 결과, 뇌 위축이 감소하였고, 뇌 조직복구와 관련된 GAP-43 및 VEGF의 발현이 증가하였으며, 소교세포의 수를 증가시켰고, 이를 통해 소교세포의 대체 활성화를 증가시켜 허혈성 뇌졸중을 회복하는 동안 뇌 조직 복구에 기여하는 것을 확인함으로써, 노킨을 소교세포 활성화 증진용, 또는 허혈성 질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】**【기술적 과제】**

본 발명의 목적은 노긴(Noggin)을 유효성분으로 함유하는 소교세포(microglia) 활성 증진제, 또는 허혈성 질환(ischemic disease) 예방 및
5 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 노긴(Noggin) 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질을 유효성분으로 함유하는
10 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 노긴 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질을 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

또한, 본 발명은 노긴 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노긴
15 단백질을 유효성분으로 함유하는 소교세포 활성 증진제를 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 노긴 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질을 허혈성 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함한 허혈성 질환 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기
20 위한 노긴 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질의 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 허혈성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로 사용하기 위한 노긴 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질의 용도를 제공한다.

25 또한, 본 발명은 소교세포 활성 증진제로 사용하기 위한 노긴 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질의 용도를 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명은 노긴(Noggin)을 유효성분으로 함유하는 소교세포 활성 증진용, 또는 허혈성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 노긴이 중뇌동맥협착(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 동물 모델에서 MCAO 유도 2주 후부터 2주 동안 투여하였을 때, 뇌 위축을 억제하고, 뇌 조직 복구와 관련된 단백질들의 발현 및 혈관 신생을 촉진하며, 소교세포의 활성을 증가시킴으로써 허혈성 뇌졸중에서 회복되는 동안 뇌 조직의 복구에 기여하는 것을 확인하였다.

10 【도면의 간단한 설명】

도 1은 MCAO 유도 동물 모델에서 노긴 및 BMP7에 의한 pSmad1/5/8 발현 레벨 변화를 확인한 도이다:

Cont: 아무것도 처리하지 않은 대조군;

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군;

15 노긴 3 wks: 노긴을 3주 동안 주입한 군;

노긴 2 wks: 노긴을 2주 동안 주입한 군;

BMP7 3 wks: BMP7을 3주 동안 주입한 군; 및

BMP7 2 wks: BMP7을 2주 동안 주입한 군.

20 도 2는 MCAO 유도 동물 모델에서 노긴 및 BMP7을 주입한 후 노긴 및 BMP7 단백질 발현 변화를 확인한 도이다:

Cont: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

도 3은 MCAO 유도 동물 모델에서 노긴 및 BMP7을 주입한 후 뇌 혈류 변화(A) 및 뇌 이미지(B)를 확인한 도이다:

25 aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군; 및

pre: MCAO 유도 전.

도 4는 MCAO 유도 동물 모델에서 노긴 및 BMP7을 주입한 후 대측성 반구 부피(A) 및 동측 피질 부피(B)를 확인한 도이다:

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군; 및

pre: MCAO 유도 전.

도 5는 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨 및 BMP7을 주입한 후 신경학적 점수(A) 및 와이어 서스펜션 테스트(B)로 행동 테스트를 확인한 도이다:

5 aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군; 및

pre: MCAO 유도 전.

도 6은 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 신경교상흔(gliial scar) 형성 변화를 확인한 도이다:

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

10 도 7은 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 시냅토파이신(synaptophysin), GAP-43 및 VEGF의 발현 변화를 피질 및 피질 하부에서 확인한 도이다:

Control: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

15 도 8은 상기 도 7을 그래프로 나타낸 도이다:

Control: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

도 9는 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 CD31 면역반응에 의해 혈관 밀도를 확인한 도이다:

20 Control: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

도 10은 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 Iba-1의 발현 변화를 피질 및 피질 하부에서 확인한 도이다:

Control, Cont: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

25 aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

도 11은 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 Iba-1 및 CD169의 발현 변화를 피질 및 피질 하부에서 면역형광염색법으로 확인한 도이다:

Control, Cont: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

도 12는 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 활성화된 소교세포 M1 표현형의 마커인 CD86, 전염증매개체인 IL-1 β , IL-12, CCL2 및 TNF- α 의 발현 변화를 피질에서 확인한 도이다:

5 Control: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

도 13은 상기 도 12를 그래프로 나타낸 도이다:

Cont: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

10 도 14는 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 활성화된 소교세포 M2 표현형의 마커인 ARG1, CD206 및 YM1, 내생 IL-1 β 의 길항제인 IL-1ra, 염증성 사이토카인인 IL-10의 발현 변화를 피질에서 확인한 도이다:

Control: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

15 도 15는 상기 도 14를 그래프로 나타낸 도이다:

Cont: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

도 16은 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 전염증매개체인 IL-1 β 및 이의 길항제인 IL-1ra의 발현 변화를 피질에서 확인한 도이다:

20 Cont: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

도 17은 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 활성화된 소교세포 마커(Iba-1)와 활성화된 소교세포 표현형의 마커(IL12, CD86)의 발현 양상을 확인한 도이다:

25 Cont: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

도 18은 MCAO 유도 동물 모델에서 노킨을 주입한 후 활성화된 소교세포 마커(Iba-1)와 활성화된 소교세포 표현형의 마커(IL12, CD86)의 발현 양상을

확인한 도이다:

Cont: 아무것도 처리하지 않은 대조군; 및

aCSF: 인공 뇌척수액을 주입한 비교군.

5 【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 노긴(Noggin) 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는
노긴 단백질을 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적
10 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 노긴 유전자를 포함하는
유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질을 허혈성 질환에 걸린 개체에 투여하는
단계를 포함한 허혈성 질환 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기
15 위한 노긴 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질의 용도를
제공한다.

상기 노긴은 서열번호 1의 염기서열로 기재된 것이 바람직하다.

상기 유전자 전달체는 벡터 또는 재조합 바이러스인 것이 바람직하고,
상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것이
20 바람직하며, 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스,
아데노 부속 바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스로 구성된 군으로부터
선택된 어느 하나인 것이 바람직하다.

상기 세포는 조혈모세포(hematopoietic stem cell, HSC) 또는 수지상
세포(dendritic cell)인 것이 바람직하다.

25 상기 허혈성 질환은 뇌경색(cerebral infarction), 뇌허혈(cerebral
ischemia), 뇌중풍(cerebrovascular accident), 뇌졸중(stroke)으로 구성된
군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 노긴 및 BMP7 재조합 단백질을 MCAO 유도 후 주입하여 확인한 결과, pSmad1/5/8 발현은 MCAO 유도 2주 후 2주 동안 하루에 1 μ g 단백질 주입에 의해 현저히 증가하였고, 상기 결과를 토대로 유효량 및 재조합 단백질 투여의 기간을 결정하여 앞으로의 실험은

5 MCAO 유도 2주 후 2주 동안 하루에 1 μ g씩 단백질을 주입한 후 수행하였으며(도 1 내지 도 2 참조), 또한, 본 발명자들은 노긴이 뇌 위축을 방지하고, 기능을 향상시키는 것을 확인하기 위해 뇌혈류 변화 및 이미지를 확인한 결과, 뇌혈류의 변화는 차이를 보이지 않았으나, 이미지에서는 노긴을 주입한 실험군은 동측 측뇌실이 커져있음에도 불구하고 동측 뇌의 상태는 상대적으로

10 보존되어있음을 확인하였고(도 3A 내지 도 3B 참조), 뇌 부피를 측정한 결과, 동측 반구, 동측 피질 및 피질 하부 부피 모두 노긴을 주입한 마우스에서 더 높게 나타나는 것을 확인하였으며(도 4A 내지 도 4B 참조), 행동에서 또한 노긴을 주입한 마우스에서 유의한 개선 효과를 확인하였다(도 5 참조). 상기 결과들로 허혈성 뇌졸중 이후 단계에서 노긴이 BMP 신호 전달을 억제하여, 뇌

15 위축 및 기능적 결과를 개선하는 것을 확인하였다.

또한, 본 발명자들은 노긴에 의한 신경교상흔(glial scar) 형성 변화를 확인한 결과, 노긴을 주입한 마우스에서 GFAP 양성 파이버가 약하게 염색되는 것을 확인하였고(도 6 참조), 뇌 조직 복구와 관련된 단백질의 발현 변화를 확인한 결과, 노긴을 처리한 군에서 GAP-43 및 VEGF의 발현이 증가하는 것을

20 확인하였으며(도 7 내지 도 8 참조), 혈관 신생 생성 증가를 확인하기 위해 혈관 밀도를 확인한 결과, 노긴을 처리한 군은 허혈성 뇌에서 혈관 밀도를 더 증가시키는 것을 확인하였고(도 9 참조), 소교세포의 활성화 변화를 확인한 결과, 노긴을 처리하였을 때 소교세포의 마커인 Iba-1 양성 세포의 수뿐만 아니라 세포당 발현 레벨도 증가하였으나, CD169 양성 세포는 차이가 보이지

25 않는 것을 확인하였다(도 11A 내지 도 11B). 상기 결과로 노긴으로 유도되는 뇌 복구 프로세스가 대식세포의 침윤보다 활성화된 소교세포의 증가에 의한 것임을 확인하였다.

또한, 본 발명자들은 활성화된 소교세포 M1 표현형의 마커(CD86) 및

전염증매개체(IL-1 β , IL-12, CCL2 및 TNF- α)의 활성을 확인한 결과, 노킨을 처리한 군에서 MCAO에 의해 증가된 M1 표현형의 마커 및 전염증매개체의 발현을 억제하는 것을 확인하였고(도 12 내지 도 13 참조), 활성화된 소교세포 M2 표현형의 마커(ARG1, CD206 및 YM1), 내생 IL-1 β 의 길항제인 IL-1ra, 염증성 사이토카인인 IL-10의 활성을 확인한 결과, 노킨을 처리한 군에서 M2 표현형의 마커(ARG1, CD206 및 YM1), 내생 IL-1 β 의 길항제인 IL-1ra, 염증성 사이토카인인 IL-10 모두 유의적으로 증가하는 것을 확인하였으며(도 14 내지 도 15 참조), 전염증매개체인 IL-1 β 및 이의 길항제인 IL-1ra의 발현을 확인한 결과, 노킨을 처리한 군은 IL-1 β 는 감소하였으나, IL-1ra는 증가하는 것을 확인하였고(도 16 참조), 활성화된 소교세포 마커(Iba-1)와 활성화된 소교세포 표현형의 마커(M1-IL12, CD86; M2-IL-10, CD206)의 발현을 확인한 결과, 노킨을 처리한 군은 M1 표현형 마커인 IL-12 및 CD86은 감소하였고, M2 표현형 마커인 IL-10 및 CD206은 증가하는 것을 확인하였으며, 상기 마커들의 발현은 Iba-1과 같은 위치에서 나타나는 것을 확인하였다(도 17 내지 도 18 참조). 상기 결과로 노킨 처리가 활성화된 소교세포의 M1 표현형을 M2 표현형으로 변화를 유도하고, 노킨에 의한 소교세포의 대체 활성화(M2)의 증가는 허혈성 뇌졸중을 회복하는 동안 뇌 조직 복구에 기여하는 것을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 노킨은 MCAO 동물 모델에서 MCAO 유도 2주 후부터 2주 동안 투여하였을 때, 뇌 위축을 억제하고, 뇌 조직 복구와 관련된 단백질들의 발현 및 혈관 신생을 촉진하며, 소교세포의 활성을 증가시킴으로써 허혈성 뇌졸중에서 회복되는 동안 뇌 조직의 복구에 기여하는 것을 확인함으로써, 상기 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질은 허혈성 질환 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

25

본 발명의 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질을 함유하는 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 5 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

10 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 노긴 유전자를 포함하는 15 유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 20 흔히 사용되는 단순희석제인 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, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 25 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로폴, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구

투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

- 5 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 구체적으로 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 본 발명의 조성물의 유효용량은 0.0001 ~ 10 g/kg일 수 있고, 구체적으로 0.001 ~ 1 g/kg일 수 있으며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다.
- 10 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수
- 15 있다.

또한, 본 발명은 노진 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노진 단백질을 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

- 20 또한, 본 발명은 허혈성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로 사용하기 위한 노진 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노진 단백질의 용도를 제공한다.

상기 노진은 서열번호 1의 염기서열로 기재된 것이 바람직하다.

- 상기 유전자 전달체는 벡터 또는 재조합 바이러스인 것이 바람직하고,
- 25 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것이 바람직하며, 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하다.

상기 세포는 조혈모세포 또는 수지상 세포인 것이 바람직하다.

상기 허혈성 질환은 뇌경색, 뇌허혈, 뇌졸중으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하다.

본 발명의 노킨은 MCAO 동물 모델에서 MCAO 유도 2주 후부터 2주 동안
 5 투여하였을 때, 뇌 위축을 억제하고, 뇌 조직 복구와 관련된 단백질들의 발현
 및 혈관 신생을 촉진하며, 소교세포의 활성을 증가시킴으로써 허혈성
 뇌졸중에서 회복되는 동안 뇌 조직의 복구에 기여하는 것을 확인함으로써,
 상기 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질은 허혈성
 질환 예방 및 개선을 위한 건강기능식품으로 유용하게 사용할 수 있음을
 10 확인하였다.

본 발명의 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨
 단백질이 상기와 같은 허혈성 질환 예방 및 개선을 위해 이용되기 위해서는,
 식품학 또는 약제학적 분야에서 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있으며
 15 그 자체 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여
 경구로 섭취할 수 있는 어떤 식품 형태로도 제조될 수 있다. 바람직하게는
 음료, 환, 과립, 정제 또는 캡셀 형태이다.

본 발명의 건강기능식품은, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되고
 식품학적으로 허용되는 성분을 더 포함할 수 있다. 예컨대, 음료수로
 20 제조되는 경우에는 본 발명의 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포
 또는 노킨 단백질 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙
 등에서 하나 이상의 성분을 추가로 포함시킬 수 있다.

본 발명에 따른 건강기능식품의 유효성분으로 포함될 수 있는 양은
 허혈성 질환 예방 및 개선을 원하는 사람의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의
 25 증상에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 g 내지
 10.0 g 정도로 포함되는 것이 좋으며, 이러한 함량을 갖는 건강기능식품을
 섭취함으로써 허혈성 질환 예방 및 개선 효과를 얻을 수 있다.

또한, 본 발명은 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질을 유효성분으로 함유하는 소교세포 활성화 증진제를 제공한다.

또한, 본 발명은 소교세포 활성화 증진제로 사용하기 위한 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질의 용도를 제공한다.

5 상기 노킨은 서열번호 1의 염기서열로 기재된 것이 바람직하다.

상기 유전자 전달체는 벡터 또는 재조합 바이러스인 것이 바람직하고, 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것이 바람직하며, 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스로 구성된 군으로부터
10 선택된 어느 하나인 것이 바람직하다.

상기 세포는 조혈모세포 또는 수지상 세포인 것이 바람직하다.

본 발명의 노킨은 MCAO 동물 모델에서 MCAO 유도 2주 후부터 2주 동안 투여하였을 때, 뇌 위축을 억제하고, 뇌 조직 복구와 관련된 단백질들의 발현 및 혈관 신생을 촉진하며, 소교세포의 활성을 증가시킴으로써 허혈성
15 뇌졸중에서 회복되는 동안 뇌 조직의 복구에 기여하는 것을 확인함으로써, 상기 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질은 소교세포 활성화 증진제로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

20 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

통계처리

실험결과는 평균±표준편차로 표기하였다. 두 그룹간의 비교는
25 unpaired Student's *t*-tests를 사용하여 분석하였고, 두 그룹 이상의 비교는 평균값의 집단 간 비교는 사후 피서의 최소유의차검정(Fisher's protected least significant difference tests)(Statview version 5, SAS Institute Ins., 미국)을 이용하여 ANOVA 단방향 분석으로 수행하였다. 신경학적 검사 및

와이어 서스펜션 테스트 점수는 Wilcoxon-Mann-Whitney *U*-tests(Prism 4, GraphPad Software Inc., 미국)를 사용하여 분석하였다. 유의성 있는 *p*값은 <0.05로 표기하였다.

5 <실시예 1> 중뇌동맥 협착(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 동물 모델의 제조

<1-1> 실험 동물의 준비

10 내지 11 주령 수컷 C57BL/6 마우스를 오리엔트 바이오(Orient Bio Inc., 대한민국)에서 구매하여 실험에 사용하였다. 모든 과정은 이화여자대학교 의과대학 실험동물운영위원회의 승인 및 실험동물의 윤리적인 사용을 위한 국제 가이드라인을 따랐다. 마우스는 실험하기 2주 전 조명 사이클을 12시간은 밝게, 12시간은 어둡게 설정하였고, 방은 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 온도로 적응시켰다.

<1-2> MCAO 동물 모델의 제조

15 상기 실시예 <1-1>의 실험 동물을 가지고, 실험을 위한 MCAO 동물 모델을 제조하였다.

구체적으로, MCAO 동물 모델은 이전에 알려진 방법을 사용하여 제조하였다(Shin et al., 2009). 마우스를 아이소플루레인(isoflurane)을 이용하여 마취시킨 후, 광섬유 측정소자(fiber optic probe)를 오른쪽 정수리 뼈(브레그마(bregma))를 기준으로 뒤로 2 mm, 옆으로 5 mm)에 부착하고, 광파이버형 레이저 도플러 혈류속계(laser Doppler flow meter)(Periflux System 5010, 스웨덴)에 연결하였다. 뇌혈류(cerebral blood flow, CBF)는 MCAO 및 재관류(reperfusion) 기간 동안 컴퓨터 기반 데이터 수집 시스템(Perisoft, 스웨덴)으로 연속적으로 기록하였다. 6-0 실리콘 코팅된 검은색 모노필라멘트 봉합사(Doccol Cooperation, 미국)는 노출된 오른쪽 외경동맥에 삽입되어, 25 내경동맥을 지나 대뇌동맥륜 속에 끼어들어가서 중뇌동맥의 기원을 막도록 삽입되었다. 상기 필라멘트를 30분 동안 방치한 후, 뇌혈류 재설정을 위해 회수하였다. MCAO 동안에는 동물 모델에서 뇌혈류가 최대 85% 감소하였고,

재관류 10분 후에는 80% 이상 회복되었다. 직장(rectal)의 온도는 수술 및 회복기간 동안 가열 패드를 이용하여 자동 온도조절 장치로 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 맞춰주었다.

5 <실시예 2> 노긴(noggin) 및 BMP7 투여 용량 및 기간 결정

허혈성 뇌의 BMP 신호 전달 경로에서 재조합 노긴과 BMP7의 효과를 알아보기 위해 상기 실시예 <1-2>에서 제조된 MCAO 동물모델에 재조합 노긴 및 BMP7을 투여하였다.

구체적으로, 재조합 인간 노긴(R&D Systems, 미국) 및 인간 BMP7(Biovision Inc., 미국)을 인공뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid, aCSF)(R&D Systems)에 용해시켰다. 각각의 단백질 또는 인공뇌척수액은 제조업체의 사용방법에 따라 ALZET 삼투 펌프(osmotic pumps)(DURECT Corporation, 미국)에 의해 동측 측내실로 전달하였다. 삼투 펌프에 결합된 캐놀라(cannula)(ALZET Brain infusion kit 3, DURECT Corporation)는 브레그마 10 0.5 mm 앞, 정중선으로부터 1 mm 옆 및 두개골 표면 3 mm 아래에 심었다. MCAO 유도 2주 후, 2주 동안 또는 MCAO 유도 1주 후, 3주 동안 하루에 0.5 또는 1 15 μg 의 단백질을 주입하였다. 테스트 용량은 이전 연구에 기초하여 결정하였다(Cate et al., 2010; Colak et al., 2008). 단백질을 주입한 마우스 각각의 뇌 반구로부터 피질 및 피질 하부 조직을 얻어 웨스턴 블랏팅(western blotting)을 수행하였다. 조직은 단백질 분해효소 억제제 cocktail(20 protease inhibitor cocktail)(Complete Mini, Roche, 독일)을 포함하는 10 ml SDS 완충용액(50 mM Tris-HCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.25% deoxycholic acid, 150 mM NaCl, 1 mM ethylene-diamine tetra acetic acid, 1 mM NaF, 0.1% sodium dodecyl sulfate, pH 7.4)으로 용해하였고, 20분 동안 얼음에 놓아둔 후, 4°C 에서 $15,700 \times g$ 로 25 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액의 단백질 농도를 확인한 뒤(Bio-Rad Laboratories, 미국), SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)를 위해 $80 \mu\text{g}$ 의 단백질을 로딩(loading)하였다. 전기영동한 단백질을 일렉트로블랏팅(electroblotting) 장치를 이용하여 Immobilon-P

transfer 멤브레인(Millipore Corporate, 미국)으로 이동시킨 뒤, 상기 멤브레인은 0.1% 트윈-20(Tween-20) 및 10% 분유를 포함하는 TBS(Tris-buffered saline)에 넣어 1시간 동안 블로킹(blocking)한 후, 인산화된 Smad1/5/8(pSmad1/5/8, 1:500)(Cell Signaling Technology Inc., 미국) 및

5 Smad1/5/8(1:500)(Santa Cruz Biotechnology, 미국) 항체를 넣고 밤새 반응시켰다. 그리고나서, 멤브레인은 0.1% 트윈-20을 포함하는 TBS로 20분씩 3번 세척하고, HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체를 넣고 1시간 동안 반응시킨 후, 0.1% 트윈-20을 포함하는 TBS로 20분씩 3번 세척하였다. 단백질 밴드는 웨스턴 블랏팅 루미놀 시약(luminol reagent)(Santa Cruz

10 Biotechnology)을 이용하여 시각화하였다. 정량은 Image J 소프트웨어(version 1.37, NIH, 미국)를 이용하여 인산화 및 비인산화 Smad1/5/8 농도의 합계로 평균화하여 나타내었다.

그 결과 도 1에 나타내 바와 같이, 노킨을 2주 또는 3주 동안 0.5 μg 처리하였을 때, pSmad1/5/8 발현 감소가 보이지 않았으나, 1 μg 노킨을 2주 동안

15 처리했을 때만 눈에 띄게 pSmad1/5/8 발현 감소를 확인하였다(인공뇌척수액과 비교하여 0.72배 변화, $p=0.02$). 또한, BMP7의 경우 2주 동안 1 μg 처리하였을 때, pSmad1/5/8 발현이 눈에 띄게 증가하는 것을 확인하였다(인공뇌척수액과 비교하여 1.70배 변화, $p < 0.01$)(도 1).

20 또한, 노킨 및 BMP7을 하루에 1 μg 씩 2주 동안 투여하였을 때 MCAO 유도 4주 후 허혈성 피질(ischemic cortex)에서 노킨 및 BMP7 단백질 레벨 변화를 확인하기 위해, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 MCAO 동물 모델을 사용하여 상기 서술한 바와 같이 노킨 및 BMP7을 MCAO 유도 2주 후부터 2주 동안 하루에 1 μg 씩 주입한 후, 웨스턴 블랏팅을 수행하였고, 이 때 노킨(1:200)(R&D Systems),

25 BMP7(1:500)(Abcam, 영국) 및 액틴(actin, 1:1000)(Santa Cruz Biotechnology) 항체를 사용하였다.

그 결과 도 2에 나타낸 바와 같이, 노킨의 경우 인공뇌척수액과 비교했을 때, 1.19 배 증가하였고, BMP7의 경우 1.17배 증가하였으며, 모든

p값은 <0.05이다(도 2).

노긴 또는 BMP7의 3주 처리 효과가 낮은 이유는 BMP 신호전달을 막거나, 강화하기에 충분했거나, BMP의 장시간 노출에 의해 BMP 수용체의 민감도가 바뀌었기 때문이다. pSmad1/5/8 발현은 MCAO 유도 2주 후 2주 동안 하루에 1 μ g 단백질 주입에 의해 현저히 증가하였고, 상기 결과를 토대로 유효량 및 재조합 단백질 투여의 기간을 결정하여 앞으로의 실험은 MCAO 유도 2주 후 2주 동안 하루에 1 μ g씩 단백질을 주입한 후 수행하였다.

10 <실시예 3> 허혈성 뇌졸중(ischemic stroke)에서 노긴의 기능 확인

<3-1> 뇌 위축(brain atrophy) 억제 효과 확인

MCAO를 유도한 허혈성 뇌졸중 동물 모델에서 노긴이 뇌 위축을 방지하고, 기능을 향상시키는 것을 확인하기 위해, 뇌혈류 변화 및 이미지를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 MCAO 동물모델에서 MCAO 유도 15 2주 후부터 2주 동안 하루에 노긴 및 BMP7 단백질 1 μ g을 각각 주입하고, 비교군으로 인공뇌척수액을 주입한 뒤, 뇌혈류 변화는 MCAO 및 재관류(reperfusion) 기간 동안 컴퓨터 기반 데이터 수집 시스템(Perisoft, 스웨덴)으로 연속적으로 기록하여 확인하였고, 뇌 이미지를 확인하기 위해 자기공명영상(Magnetic resonance imaging) 및 크레질 바이올렛(cresyl violet, 20 CV) 염색을 수행하였다. 자기공명영상은 MCAO 유도 4주 후 아이소플루레인(isoflurane)으로 마취하여, 3.0-Teslar whole body system(Intera, Philips Healthcare, 네덜란드)를 사용하여 수행하였다. 주입 펌프는 MR 스캔 전 제거하였다. 관상면(coronal) T2-weighted images(T2WIs)는 반복시간(repetition time, TR)/반사시간(echo time, TE)=4000/100 ms, 25 관측시야(field of view, FOV) 50×50, 1.0 mm 슬라이스 두께, 200×200 매트릭스 및 5분 4초 스캔시간(scan time)으로 획득하였다. 직장 온도, 심장 박동 및 호흡수는 스캔하는 동안 관찰되었다. 또한, 크레질 바이올렛 염색은 세포핵을 염색하는 것으로, 상기 마우스를 안락사시키고, 뇌를 적출하여 냉동시키고

크라이오스탯(cryostat)으로 절단하였다(30 μm 두께). 뇌 절편은 600- μm 간격으로 수거하고, 크레질 바이올렛으로 염색하여 뇌 단면을 염색하였다.

그 결과 도 3A에 나타낸 바와 같이, 뇌혈류의 변화는 인공뇌척수액을 주입한 비교군이나, 노킨 또는 BMP7 단백질을 주입한 실험군에서 차이를 보이지않았으나(도 3A), 도 3B에 나타낸 바와 같이, 뇌 이미지에서는 인공뇌척수액을 주입한 비교군은 동측 측뇌실이 커졌고, 동측 반구의 측면 공간이 뇌척수액으로 채워져있어 심한 뇌위축을 나타내었으나, 노킨을 주입한 실험군은 동측 측뇌실이 커져있음에도 불구하고 동측 뇌의 상태는 상대적으로 보존되었고, 이와 대조적으로 BMP7을 주입한 실험군은 인공뇌척수액을 주입한 비교군과 같은 결과를 보이는 것을 확인하였다(도 3B).

<3-2> 뇌 부피(brain volume) 감소 억제 확인

MCAO를 유도한 허혈성 뇌졸중 동물 모델에서 노킨이 뇌 위축을 방지하고, 기능을 향상시키는 것을 확인하기 위해, 뇌 부피를 측정하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 노킨 및 BMP7을 처리한 후, 크레질 바이올렛으로 염색하였다. 허혈성 뇌 부피는 MCAO 유도 4주 후 성상교세포증(astrogliosis)에 의해 감소되므로, 동측 반구 부피는 경색증 부분이 아닌 뇌 부피의 손실로 정의하여 측정하였다. 각 반구 및 동측 피질 부피는 이미지 분석기(image analyzer)(Axiovision LE 4.1, Carl Zeiss, 독일)로 측정하였다. 동측 피질 하부의 부피는 동측 반구 부피로부터 동측 피질 부피를 빼서 측정하였다.

그 결과 도 4에 나타낸 바와 같이, 대측성 반구 부피는 차이가 없으나, 동측 반구 부피는 인공뇌척수액을 주입한 마우스($91.20 \pm 3.68 \text{ mm}^3$, $p < 0.01$) 보다 노킨을 주입한 마우스($109.07 \pm 2.68 \text{ mm}^3$)에서 유의하게 높은 것을 확인하였다(도 4A). 또한, 동측 피질 부피는 인공뇌척수액을 주입한 마우스($49.46 \pm 2.46 \text{ mm}^3$, $p < 0.01$) 보다 노킨을 주입한 마우스($59.13 \pm 2.07 \text{ mm}^3$)에서 높게 나타났고, 또한, 피질 하부 부피도 인공뇌척수액을 주입한 마우스($41.84 \pm 1.76 \text{ mm}^3$, $p < 0.01$)보다 노킨을 주입한 마우스(49.94 ± 1.18

mm³)에서 더 높게 나타나는 것을 확인하였다(도 4B). 그러나, BMP7을 처리한 경우에는 뇌 부피의 감소를 억제하지 않았다.

<3-3> 행동 테스트(behavioral tests)로 변화 확인

5 MCAO를 유도한 허혈성 뇌졸중 동물 모델에서 노킨이 뇌 위축을 방지하고, 기능을 향상시키는 것을 확인하기 위해, 행동 테스트로 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 MCAO 동물모델에, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 조건으로 노킨 및 BMP7을 처리하였다. 와이어 서스펜션 테스트에서 신경학적 점수 및 성능은 MCAO 유도 전과 후 매주
10 측정하였다. 신경학적 점수는 4점 등급 평가 시스템을 기반으로 하였다(Li et al., 2004): 0=장애없음, 1=앞다리 약화되고, 몸통은 꼬리에 의해 동측에 의지, 2=영향을 받는 쪽으로 돛, 3=영향을 받는 쪽의 무게를 견딜 수 없음 및 4=자발적인 운동 활성 또는 배럴 롤링(barrel rolling) 없음. 와이어 서스펜션 테스트는 이전 연구(Takahashi et al., 2009)를 수정하여 진행하였다. 두 개의
15 지지대 사이에 길이 60 cm, 직경 2 mm이고, 표면으로부터 60 cm 높이에 위치한 와이어의 중간지점에 마우스를 30초 동안 올려놓았다. 행동은 다음과 같은 점수로 평가하였다: 0=와이어에서 떨어짐, 1=두 앞발로 와이어에 매달림, 2=두 앞발로 와이어에 매달리고, 와이어에 올라가려고 시도함, 3=두 앞발과 하나 또는 두 뒷발로 와이어에 매달림, 4=꼬리로 와이어를 감싸며, 네 발 모두
20 와이어에 매달림, 5=지지대로 탈출함. 세 번 실험하여 이의 평균 점수를 계산하였다. 또한, 체중도 MCAO 유도 후 4주 동안 매주 측정하였다.

그 결과 도 5에 나타낸 바와 같이, MCAO 유도 전이나 단백질을 처리시작점인 MCAO 유도 2주차까지는 행동에 차이가 없었고, MCAO 유도 4주 후, 비교군 마우스는 상기 증상이 개선되지 않았으나, 노킨을 주입한 마우스는
25 행동에서 유의한 개선(신경학적 점수에서 $p=0.04$, 와이어 서스펜션 테스트에서 $p<0.01$)을 확인할 수 있었다(도 5). BMP7은 결과에 영향을 미치지않았다.

또한, 마우스의 체중은 MCAO 유도 2주 후에도 각 군별로 차이가 없었으나(비교군: 23.13 ± 0.24 g, 노킨 처리군: 23.75 ± 0.34 g, BMP7 처리군:

23.13±0.45 g), MCAO 유도 4주 후에는 비교군(24.57±0.28 g) 또는 BMP7 처리군(24.40±0.57 g)에 비해 노킨 처리군(25.58±0.31 g)의 체중이 더 증가한 것을 확인하였다(비교군 대비 p=0.02).

- 5 이는 허혈성 뇌졸중의 후기 단계 동안 노킨이 BMP 신호 전달을 억제하여, 뇌 위축을 감소시키고, 뇌의 기능을 개선하는 것을 나타낸다.

<실시에 4> 허혈성 뇌에서 노킨의 회복 효과 확인

<4-1> 신경교상흔(glial scar)의 확인

- 10 본 발명자들의 이전 연구에서 MCAO 유도 4주 후 허혈성 뇌에서 성상교세포증이 유지되는 것을 확인하였다(Shin et al., 2012). 이에 신경교상흔 형성을 노킨이 조절하는지 확인하기 위해 액화(liquefied) 및 낭성 공동화(cystic cavitation) 형성된 허혈성 중심(core)의 벽에서 흉터 두께를 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 염색을 통해 측정하였다.

- 15 구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 MCAO 동물모델에, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 조건으로 노킨 및 BMP7을 처리하였다. MCAO 유도 4주 후 마우스에 펜토바비탈나트륨(sodium pentobarbital, 120 mg/kg)을 복강 내 주사하여 마취시킨 후, 생리식염수와 차가운 4% 포르말데히드(formaldehyde)가 들어있는 0.1 M 인산나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer, pH 7.2)을 경심관류(transcardially)로 관류시켰다. 뇌를 적출한 뒤 밤새 고정시킨 다음
20 30% 수크로스(sucrose) 용액에 보관하였다. 크라이오스탯을 이용하여 브레그마로부터 +1.4부터 -1.0 mm 위치를 관상면으로 뇌를 절단하고(두께 20 µm, 간격 600-µm), 젤라틴 코팅된 슬라이드에 올려 고정하였다. 뇌 절편은 0.1% Triton X-100, 5% 일반혈청(nomal serum) 및 1% 소혈청알부민(bovine serum albumin)이 들어있는 TBS에 1시간 동안 넣어두고, 1차 항체 GFAP(1:1000)(Sigma-Aldrich, 미국)를 첨가하여 밤새 반응시켰다. 그 후, 2차 항체인
25 플루오레세인(fluorescein)이 결합된 이소티오시아네이트(isothiocyanate)(1:1000)(Vector Laboratories Inc.,

미국)를 넣고 1시간 동안 반응시켰다. 절편은 모든 단계 사이에 TBS로 세척하였으며, 핵 염색용 DAPI(Vector Laboratories Inc.)를 포함하는 Vectashield mounting medium을 커버슬립을 올리기 전에 뇌 절편에 처리하였다. 형광 이미지는 488 및 543 nm 파장으로 세팅된 필터를 가진 공초점 현미경(confocal microscope)(LSM5 PASCAL; Carl Zeiss)을 사용하여 절편의 z 축으로부터 4- μ m 간격, 20 μ m의 전체 깊이를 덮는 부분에서 얻었다.

또한, 신경교상흔의 두께를 측정하기 위해 calibration bar(AxioVision LE 4.3)을 이용하여 허혈성 중심 부분의 강하게 염색된 GFAP 양성 정상세포 파이버(fibers)와 평행하게 수평으로 측정하였다. 각각의 마우스에서 순차적인 두개의 뇌 절편이 사용되었고, 측정은 동측 선조체(striatum)에서 홍터 둘레(border)의 세 필드(fields)에서 수행하였다. 마우스당 6군데로부터 평균 두께를 측정하였다.

그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 인공뇌척수액을 주입한 비교군에서 구멍(cavity)을 둘러싼 GFAP 양성 파이버가 강하게 염색되었으나(74.79 $\pm$ 9.51 μ m 두께), 노킨을 주입한 마우스에서 GFAP 양성 파이버가 약하게 염색되는 것(29.21 $\pm$ 6.86 μ m 두께)을 확인하였다(비교군 대비 $p < 0.01$)(도 6).

<4-2> 뇌 조직 복구와 관련된 단백질 발현 변화 확인

시냅토파이신(synaptophysin)은 시냅스형성(synaptogenesis)에 관련된 전시냅스 소포 단백질(pre-synaptic vesicle protein)이고, GAP-43은 신경돌기 성장(neurite growth)에 관련된 성장 돌기 단백질(growth cone protein)이다. 이단백질들은 허혈성 뇌졸중으로부터 회복되는 동안 증가되고(up-regulated), 신경 가소성(neuronal plasticity)의 마커로 사용된다(Stroemer et al., 1995). 또한, VEGF는 허혈성 이후 혈관 복구 및 혈관 신생에 관련된다(Greenberg and Jin, 2013; Hermann and Zechariah, 2009). 이에, 허혈성 질환 이후 뇌 조직 복구와 관련된 단백질인 시냅토파이신(synaptophysin), GAP-43 및 VEGF의 발현 변화를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 MCAO 동물모델에, 상기

실시에 <3-1>과 동일한 조건으로 노킨 및 BMP7을 처리하였다. 또한, 상기 <실시에 2>와 동일한 방법으로 시냅토파이신(1:5000)(Millipore Corporation, 미국), GAP-43(1:1000)(Millipore Corporation) 및 VEGF(1:500)(Santa Cruz Biotechnology) 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.

- 5 그 결과 도 7 내지 도 8에 나타낸 바와 같이, MCAO 유도 4주 후에 아무것도 처리하지 않은 대조군, 인공뇌척수액을 주입한 비교군 및 노킨을 처리한 군에서 시냅토파이신의 발현은 비슷한 레벨인 것을 확인하였고, GAP-43은 대조군에 비해 비교군이 피질하부($p=0.07$)보다 허혈성 피질(1.34 배 변화, $p < 0.01$)에서 더 많이 발현되는 것을 확인하였으며, 노킨을 처리한 군은
- 10 허혈성 피질(비교군 대비 1.17 배 변화, $p=0.03$)과 피질하부(비교군 대비 1.51 배 변화, $p < 0.01$) 모두에서 GAP-43의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, VEGF는 대조군에 비해 비교군이 허혈성 피질(1.27 배 변화, $p=0.01$) 및 피질하부(1.60 배 변화, $p=0.01$)에서 발현 레벨이 더 높았고, 노킨을 처리한 군은 GAP-43과 비슷하게 허혈성 피질(비교군 대비 1.24 배 변화, $p=0.04$)과
- 15 피질하부(비교군 대비 1.53 배 변화, $p < 0.01$)에서 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 7 내지 도 8).

<4-3> 혈관신생(angiogenesis) 촉진 확인

- 노킨을 처리함에 따라 혈관신생이 증가하는 것을 확인하기 위해, 동측
- 20 피질의 주변 허혈 부위에서 내피세포 마커인 CD31 면역반응성(immunoreactivity)에 의한 혈관 밀도 변화를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로 1차 항체로 CD31(1:100)(BD Bioscience, 미국)을 사용하여 확인하였다.

- 혈관의 밀도 분석을 위해, 절편당 미리 정해놓은 영역(픽셀, fixels)에서
- 25 CD31 면역반응성(녹색)의 픽셀 강도는 AxioVision LE 4.3 프로그램을 사용하여 각 마우스로부터 두 연속적인 뇌 절편의 허혈성 피질 근처에서 측정되었다. 마우스당 두 개 영역의 평균 강도는 면적 백분율로 나타내었다(Sun et al., 2003)

그 결과 도 9에 나타난 바와 같이, MCAO 유도 4주 후 대조군($1.51 \pm 0.03\%$)에 비해 인공뇌척수액을 주입한 비교군($2.04 \pm 0.07\%$, $p < 0.01$)에서 CD31 면역반응성이 더 높게 나타났고, 노킨을 처리한 군은 허혈성 뇌에서의 혈관 밀도를 더 증가시키는 것(비교군 대비 $3.91 \pm 0.13\%$, $p < 0.01$)을 5 확인하였다(도 9).

상기 <실시에 4>의 결과를 통해 노킨은 허혈성 손상으로부터의 회복동안 흉터 형성의 해결, 축삭 발아 및 혈관신생과 같은 뇌 복구 프로세스를 증가시키고, 이러한 프로세스는 기능 회복과 뇌 위축의 감소와 연관됨을 10 확인하였다.

<실시에 5> 노킨에 의한 소교세포(microglia) 활성화 증가 확인

<5-1> 웨스턴 블랏팅을 이용한 소교세포의 활성화 증가 확인

최근 연구에서 활성화된 소교세포(microglia)가 신경이 망가진 후 신경 15 가소성(neural plasticity) 및 신경 복원(neurorestoration)에 관여하는 것이 알려졌다(Kettenmann et al., 2011). 이에, 노킨을 처리하였을 때 소교세포의 활성화를 변화시키는지 확인하기 위해 활성화된 소교세포의 마커인 Iba-1 단백질의 발현을 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 MCAO 동물모델에, 상기 20 실시예 <3-1>과 동일한 조건으로 노킨 및 BMP7을 처리하였다. 또한, 상기 <실시에 2>와 동일한 방법으로 Iba-1(1:500)(Wako Pure Chemical Industries, 일본) 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.

그 결과 도 10에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 인공뇌척수액을 주입한 비교군이 허혈성 피질(1.39 배 변화, $p=0.01$) 및 피질 하부(1.88 배 변화, 25 $p=0.02$) 모두에서 Iba-1 발현이 더 높게 나타났고, 노킨을 처리한 군은 허혈성 피질에서만 Iba-1 발현이 유의하게 증가하는 것(비교군 대비 1.53 배 변화, $p < 0.01$)을 확인하였다(도 10).

<5-2> 면역형광염색을 이용한 소교세포의 활성화 증가 확인

노킨을 처리하였을 때 소교세포의 활성화를 변화시키는지 확인하기 위해 활성화된 소교세포의 마커인 Iba-1 단백질의 발현을 확인하였고, 혈관 주위 대식세포의 허혈성 뇌로 침투 여부를 확인하기 위해 대식세포의 면역반응 마커인 CD169의 발현을 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로 1차 항체로 Iba-1(1:500)(Wako Pure Chemical Industries) 또는 CD169(1:500)(Serotec)를 이용하여 면역형광염색법을 수행하였다.

정량을 위해, 둥글고 세포체가 커진 강하게 염색된 Iba-1 또는 CD169 양성 세포는 각각의 마우스로부터 두 개의 연속된 뇌 절편에서 수량화하였고, 정량은 각각의 뇌 절편에서 동측 피질 및 피질 하부에서 3개의 다른 허혈성 근처 위치($500 \mu\text{m}^2$)에서 수행하였다. 6개 영역의 세포 수의 평균은 각각의 마우스에서 계산하였다(Shin et al., 2010).

그 결과 도 11A에 나타난 바와 같이, 노킨을 처리하였을 때 허혈성 피질에서 둥글고, 세포체가 커지고, 굵고 짧아진 과정의 Iba-1 양성 세포의 수가 증가하는 것(비교군 대비 1.42 배 변화, $p=0.01$)을 확인하였고, Iba-1 양성 세포의 수뿐만 아니라 세포당 Iba-1 발현 레벨도 강하게 증가하는 것을 확인하였고(도 11A), 그 결과 도 11B에 나타난 바와 같이, 강하게 염색된 적은 수의 CD169 양성 세포는 허혈성 피질 하부에서만 관찰되었고, 비교군이나 노킨을 처리한 군에 따른 차이가 보이지 않는 것($p=0.33$)을 확인하였다(도 11B).

상기 <실시예 5>의 결과를 토대로 노킨은 허혈성 피질에서 활성화된 소교세포의 수를 증가시키고, 이러한 결과는 Iba-1 양성 세포의 대다수가 거주하는 소교세포(resident microglia)일지도 모를 것을 나타내며, 이는 최근 연구에서 보여주는 허혈성 뇌의 급성 단계에서 신경교증(microgliosis)에 연관된 세포가 거주하는 소교세포의 증식으로부터 대부분 유도되는 것(Li et al., 2013)임을 뒷받침해주며, 노킨으로 유도되는 뇌 복구 프로세스가 대식세포

침윤보다 활성화된 소교세포의 증가에 의한 것임을 확인하였다.

<실시에 6> 노신의 활성화된 소교세포 표현형 조절 효과 확인

활성화된 소교세포는 고전적 활성화(classically activated, M1) 또는 대체 활성화(alternatively activated, M2) 소교세포로 분류된다(Henkel et al., 2009). M1 표현형은 조직 손상에 관여하는 반면, M2 표현형은 상처 및 조직 복구에 역할을 한다(Shechter and Schwartz, 2013). 이에, 노신에 의한 활성화된 소교세포의 증가를 이해하기 위해, 허혈성 피질에서 활성화된 소교세포 표현형의 마커를 확인하였다.

10

<6-1> 고전적 활성화(classically activated, M1) 소교세포 마커의 활성화 조절 확인

활성화된 소교세포 M1 표현형의 마커인 CD86, 전염증매개체인 IL-1 β , IL-12, CCL2 및 TNF- α 의 활성을 피질에서 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다.

15

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 MCAO 동물모델에, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 조건으로 노신 및 BMP7을 처리하였다. 또한, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 IL-1 β (1:100)(R&D Systems), IL-12(1:250)(Santa Cruz Biotechnology), CCL2(1:250)(Santa Cruz Biotechnology), TNF- α (1:500)(Santa Cruz Biotechnology), CD86(1:500)(BD Bioscience, 미국) 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.

20

그 결과 도 12 내지 도 13에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비해 인공뇌척수액을 주입한 비교군에서 전염증매개체인 IL-1 β (2.62 배 변화), IL-12(1.54 배 변화), CCL2(2.0 배 변화) 및 TNF- α (3.31 배 변화), 및 M1 표현형 마커인 CD86(4.23 배 변화)(모든 변화 $p < 0.01$)의 발현이 높게 나타나는 것을 25 확인하였고, 노신을 처리한 군은 이러한 증가를 억제하는 것(비교군 대비 IL-1 β 는 0.69배 변화, $p < 0.01$; IL-12는 0.76배 변화, $p=0.02$; CCL2는 0.63배 변화, $p=0.01$; TNF- α 는 0.62배 변화, $p < 0.01$; CD86은 0.58배 변화)을 확인하였다(도 12 내지 도 13).

<6-2> 대체 활성화(alternatively activated, M2) 소교세포 마커의 활성 조절 확인

활성화된 소교세포 M2 표현형의 마커인 ARG1, CD206 및 YM1, 내생
5 IL-1 β 의 길항제인 IL-1ra, 염증성 사이토카인인 IL-10의 활성을 피질에서 웨스턴 블랏팅으로 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에서 제조한 MCAO 동물모델에, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 조건으로 노킨 및 BMP7을 처리하였다. 또한, 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 IL-1ra(1:200)(R&D Systems),
10 IL-10(1:250)(Abcam), ARG1(1:1000)(Santa Cruz Biotechnology), CD206(1:500)(Serotec Kidlington, 영국), YM1(1:1000)(Stem Cell Technologies, 캐나다) 항체를 이용하여 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.

그 결과 도 14 내지 도 15에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 인공뇌척수액을 주입한 비교군이 내생 IL-1 β 의 길항제인 IL-1ra(1.77 배
15 변화), 및 M2 표현형의 마커인 ARG1(2.54 배 변화), CD206(2.48 배 변화)(모든 변화 $p < 0.01$)의 발현이 높게 나타났으나, 염증성 사이토카인인 IL-10($p=0.11$) 및 다른 M2 표현형의 마커인 YM1($p=0.79$)의 발현은 변화가 없는 것을 확인하였고, 이와 반대로 노킨을 처리한 군은 비교군과 비교하여 IL-1ra(1.24 배 변화), IL-10(1.63 배 변화), ARG1(2.17 배 변화), CD206(1.40 배 변화) 및
20 YM1(2.72 배 변화)(모든 변화 $p < 0.01$) 모두 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 14 내지 도 15).

<6-3> 전염증매개체의 단백질 발현 변화 확인

전염증매개체인 IL-1 β 및 이의 길항제인 IL-1ra의 발현을
25 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)로 확인하였다.

구체적으로, ELISA는 Quantikine[®] ELISA kit(R&D Systems)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 진행하였다. 상기 <실시예 2>와 동일한 방법으로 피질 조직을 준비하여 이로부터 50 μ l(8 μ g/ μ l) 상층액을 얻고, IL-1 β 또는 IL-1ra에

특이적인 단일클론항체가 코팅된 마이크로플레이트(microplate)에 로딩(loaded)하였다. 이를 세척한 후, 마우스 IL-1 β 또는 IL-1ra에 특이적인 효소 결합된 다클론항체를 첨가한 뒤, 이를 세척한 후, 기질용액(substrate solutions)을 첨가하였다. 효소 반응의 강도는 분광기(spectrometer)를 이용하여 450 nm에서 측정하였다. 마우스 당(n=3) 두 개의 웰(wells)로부터 측정하여 평균치를 구하였다.

그 결과 도 16에 나타낸 바와 같이, 노킨을 처리한 군은 비교군과 비교하여 IL-1 β 는 감소하였고(0.65 배 변화), IL-1ra는 증가하는 것(8.42 배 변화)($p < 0.01$)을 확인하였다(도 16).

10

<실시에 7> 활성화된 소교세포 및 소교세포 표현형의 발현 확인

활성화된 소교세포 마커(Iba-1)와 활성화된 소교세포 표현형의 마커(M1-IL12, CD86; M2-IL-10, CD206)의 발현 양상을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로 이중면역형광염색을 수행하였고, 이때, 1차 항체로 IL-12(1:250), CD86(1:500) 또는 IL-10(1:250), CD206(1:500)과 함께 Iba-1(1:500)을 사용하였고, 2차 항체로 Alexa Fluor[®]568(1:1000)(Molecular Probes, 미국)을 사용하였다.

그 결과 도 17 내지 도 18에 나타낸 바와 같이, 상기 <실시에 6>의 결과와 동일하게 노킨을 처리한 군은 비교군과 비교하여 M1 표현형 마커인 IL-12 및 CD86은 감소하였고, M2 표현형 마커인 IL-10 및 CD206은 증가하는 것을 확인하였으며, 상기 마커들의 발현은 Iba-1과 같은 위치에서 나타나는 것을 확인하였다(도 17 내지 도 18).

상기 <실시에 6> 내지 <실시에 7>의 결과는 노킨 처리가 활성화된 소교세포의 M1 표현형을 M2 표현형으로 변화를 유도하고, 노킨에 의한 소교세포의 대체 활성화(M2)의 증가는 허혈성 뇌졸중을 회복하는 동안 뇌 조직 복구에 기여하는 것을 나타낸다.

25

【청구의 범위】**【청구항 1】**

노긴(Noggin) 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노긴 단백질을 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

5

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 노긴은 서열번호 1의 염기서열로 기재된 것을 특징으로 하는 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

10 **【청구항 3】**

제 1항에 있어서, 상기 유전자 전달체는 벡터 또는 재조합 바이러스인 것을 특징으로 하는 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 4】

15 제 3항에 있어서, 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 5】

20 제 4항에 있어서, 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

25 **【청구항 6】**

제 1항에 있어서, 상기 세포는 조혈모세포 또는 수지상 세포인 것을 특징으로 하는 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 7】

제 1항에 있어서, 상기 허혈성 질환은 뇌경색(cerebral infarction), 뇌허혈(cerebral ischemia), 뇌중풍(cerebrovascular accident), 뇌졸중(stroke)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 8】

노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질을 유효성분으로 함유하는 허혈성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

10

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 노킨은 서열번호 1의 염기서열로 기재된 것을 특징으로 하는 허혈성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

【청구항 10】

제 8항에 있어서, 상기 허혈성 질환은 뇌경색, 뇌허혈, 뇌중풍, 뇌졸중으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 허혈성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

【청구항 11】

노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질을 유효성분으로 함유하는 소교세포 활성 증진제.

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 상기 노킨은 서열번호 1의 염기서열로 기재된 것을 특징으로 하는 소교세포 활성 증진제.

【청구항 13】

약학적으로 유효한 양의 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질을 허혈성 질환에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함한 허혈성 질환 치료 방법.

5 **【청구항 14】**

허혈성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질의 용도.

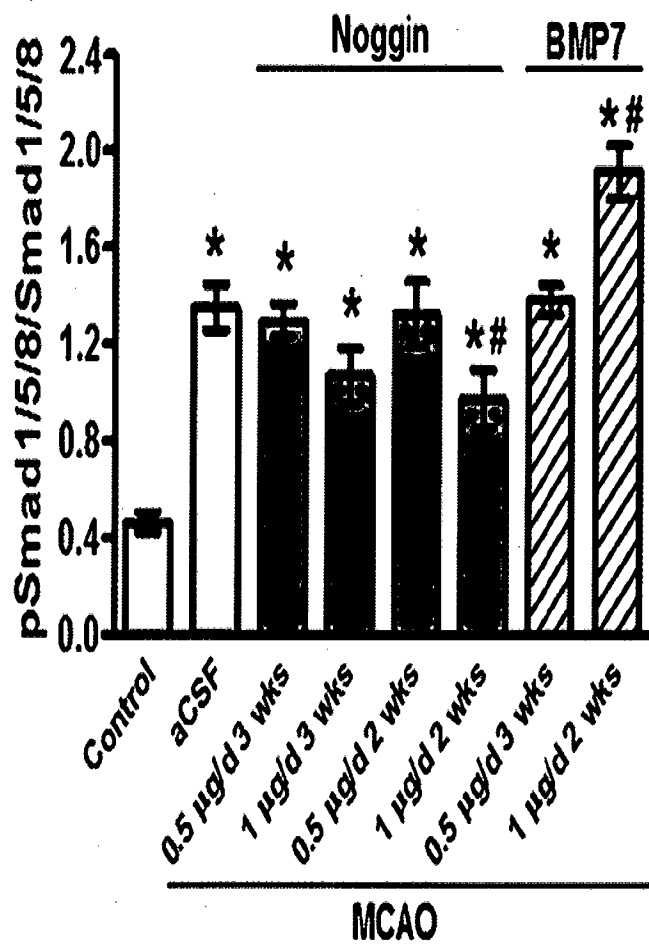
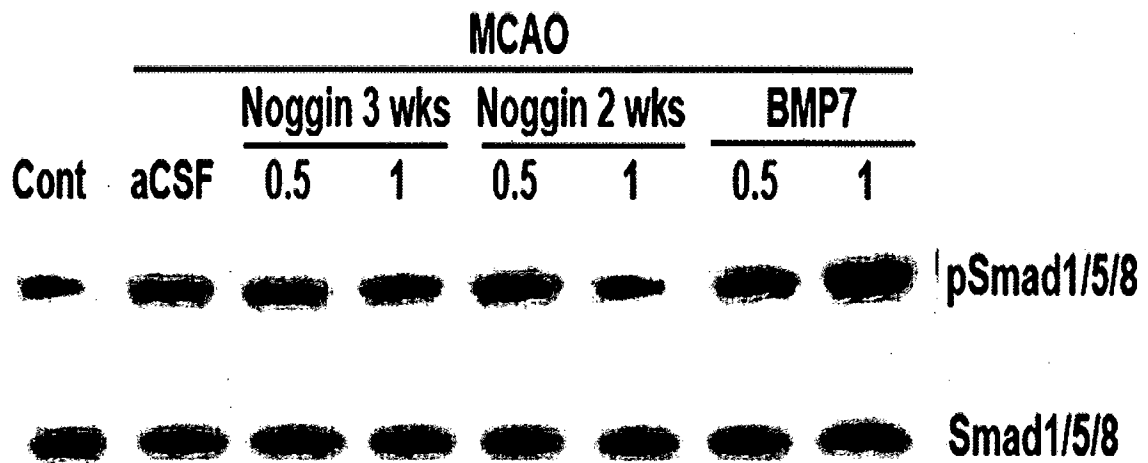
【청구항 15】

10 허혈성 질환 예방 및 개선용 건강기능식품으로 사용하기 위한 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질의 용도.

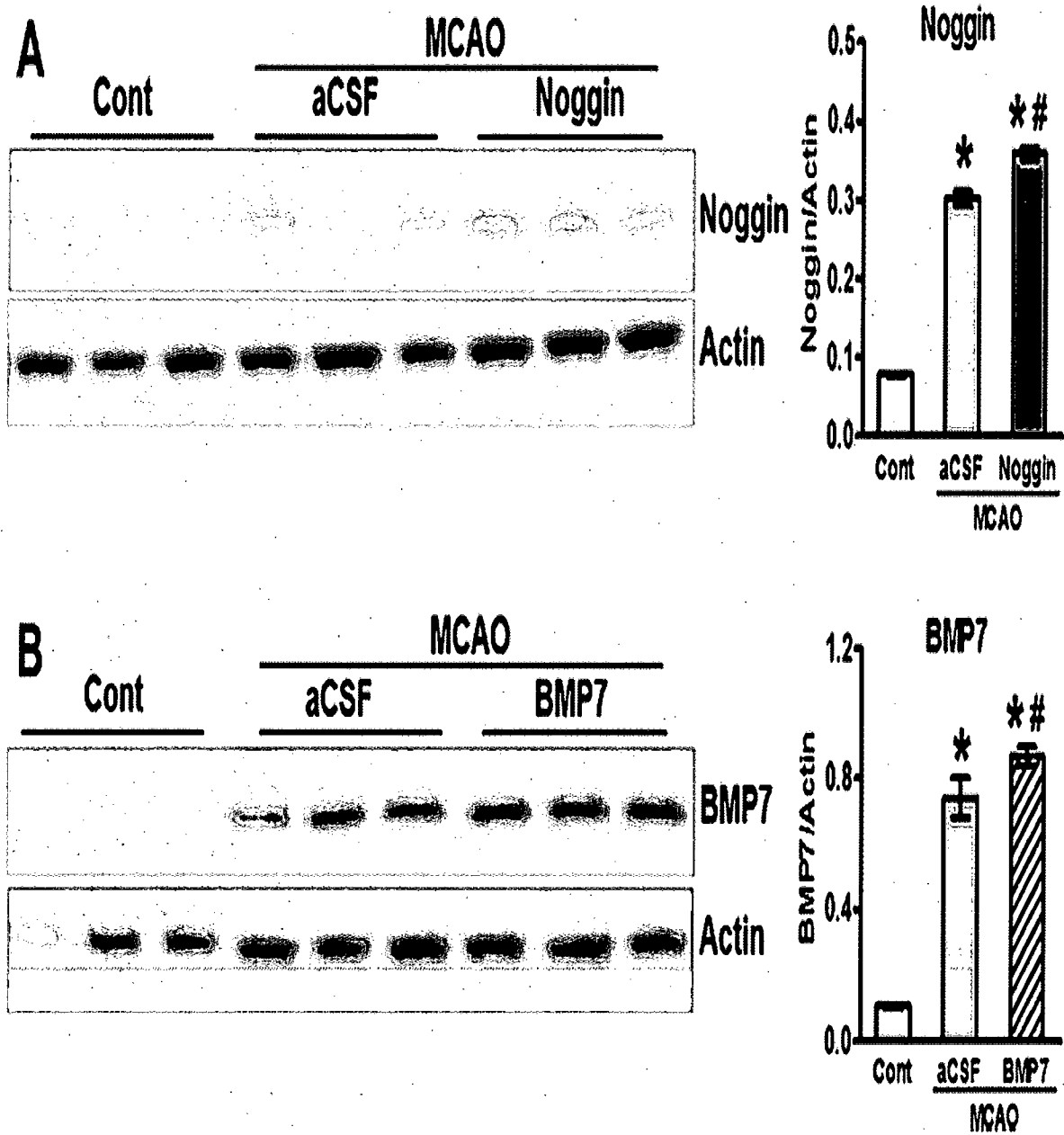
【청구항 16】

15 소교세포 활성 증진제로 사용하기 위한 노킨 유전자를 포함하는 유전자 전달체, 세포 또는 노킨 단백질의 용도.

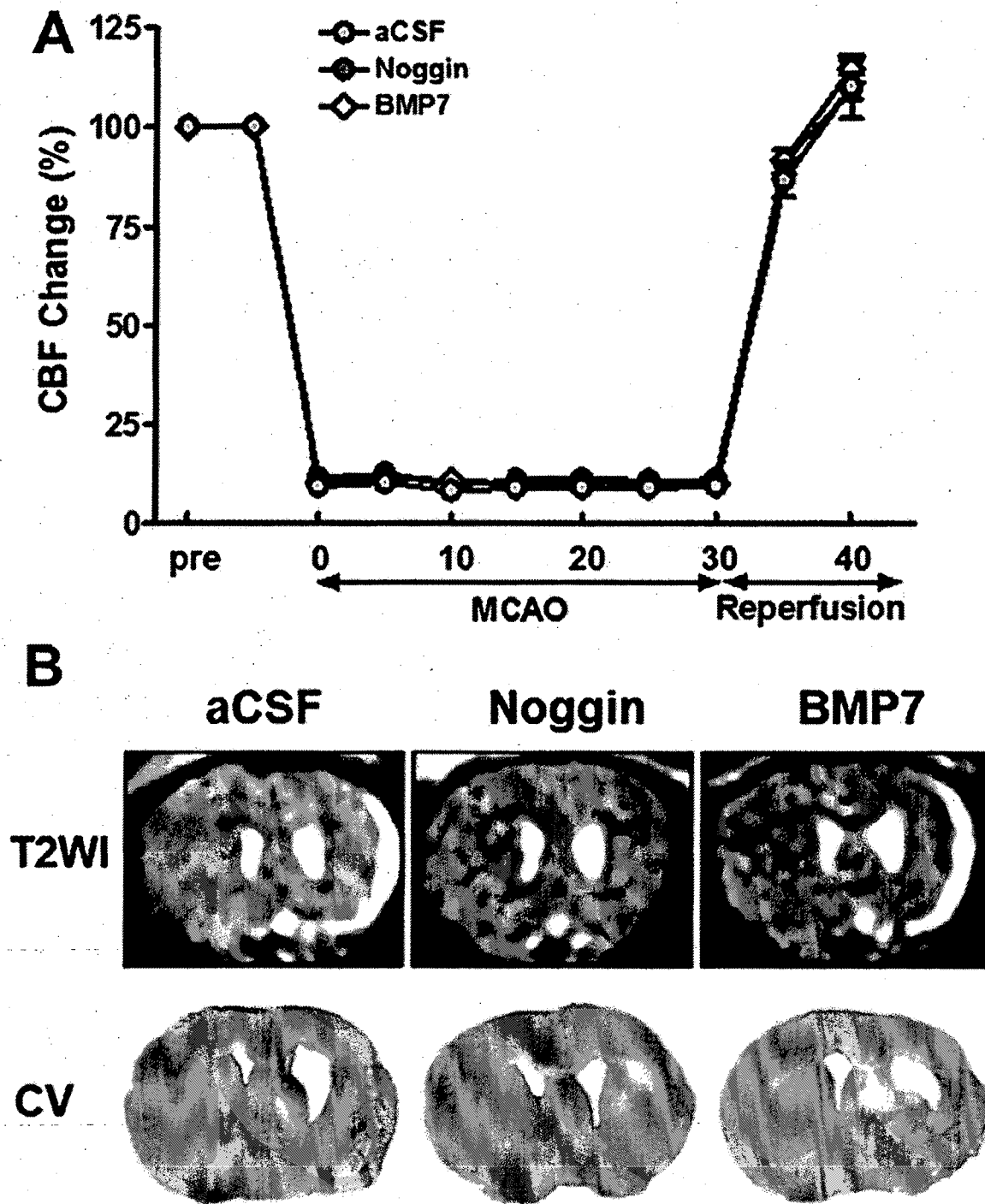
[도 1]



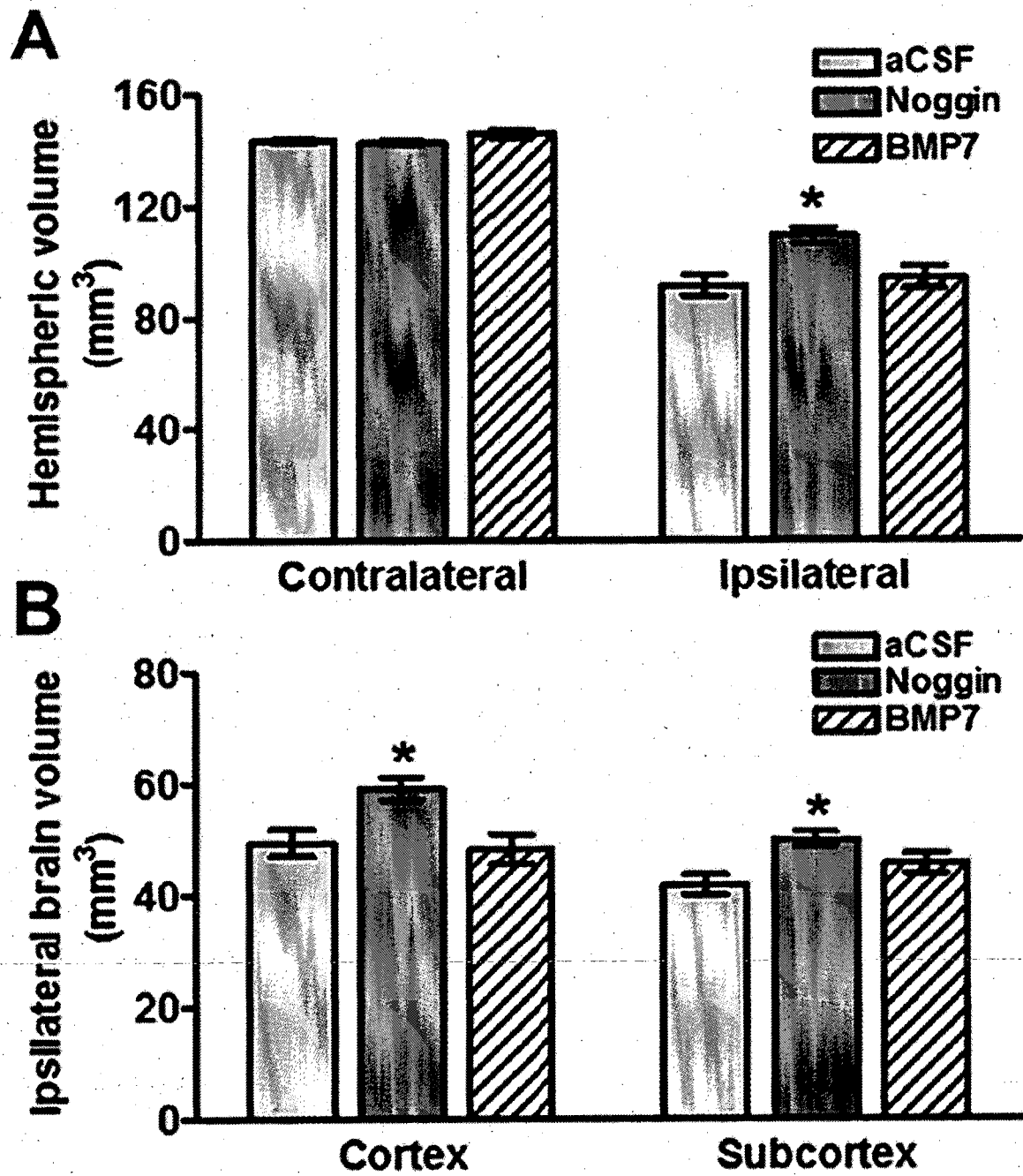
[도 2]



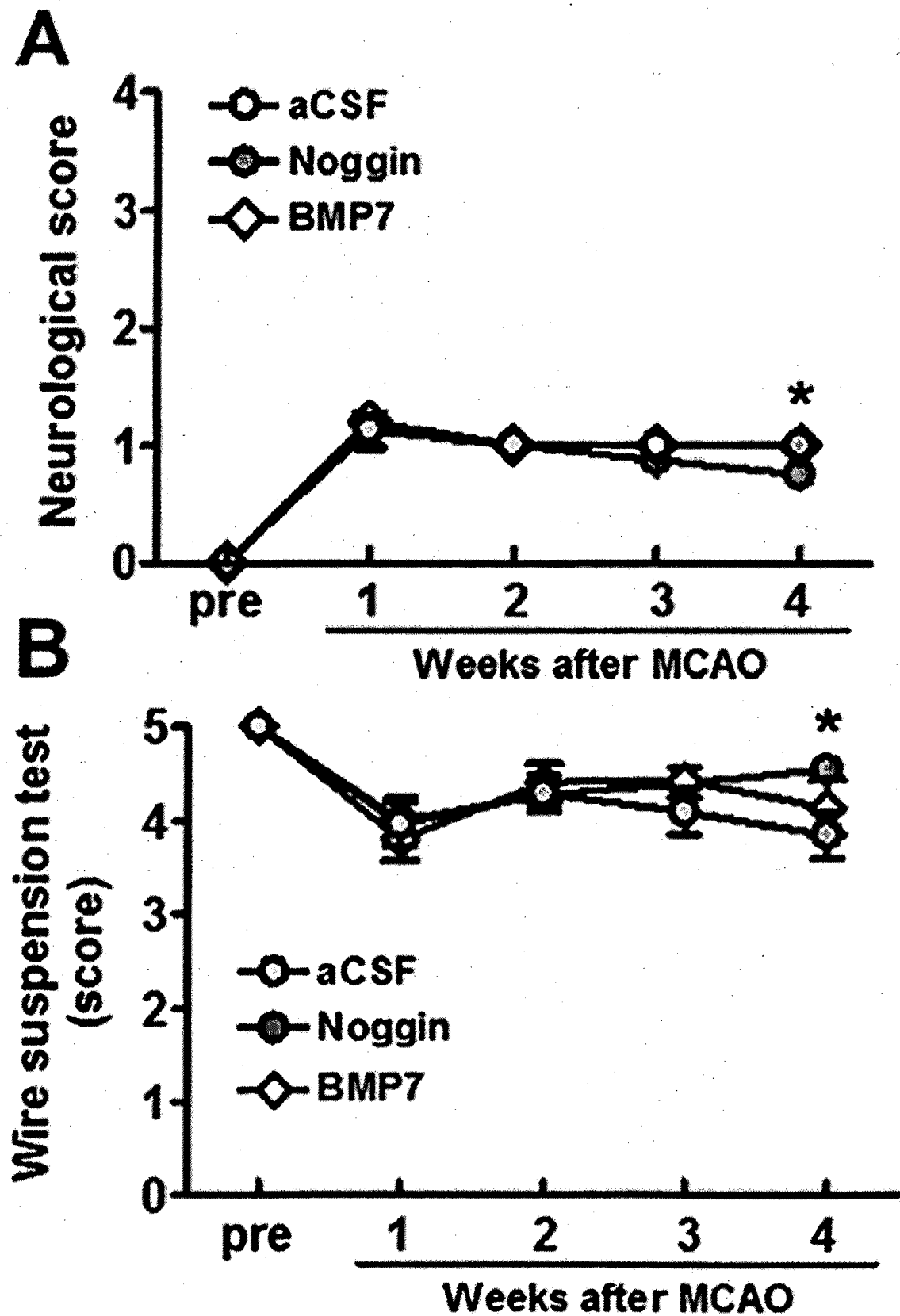
[도 3]



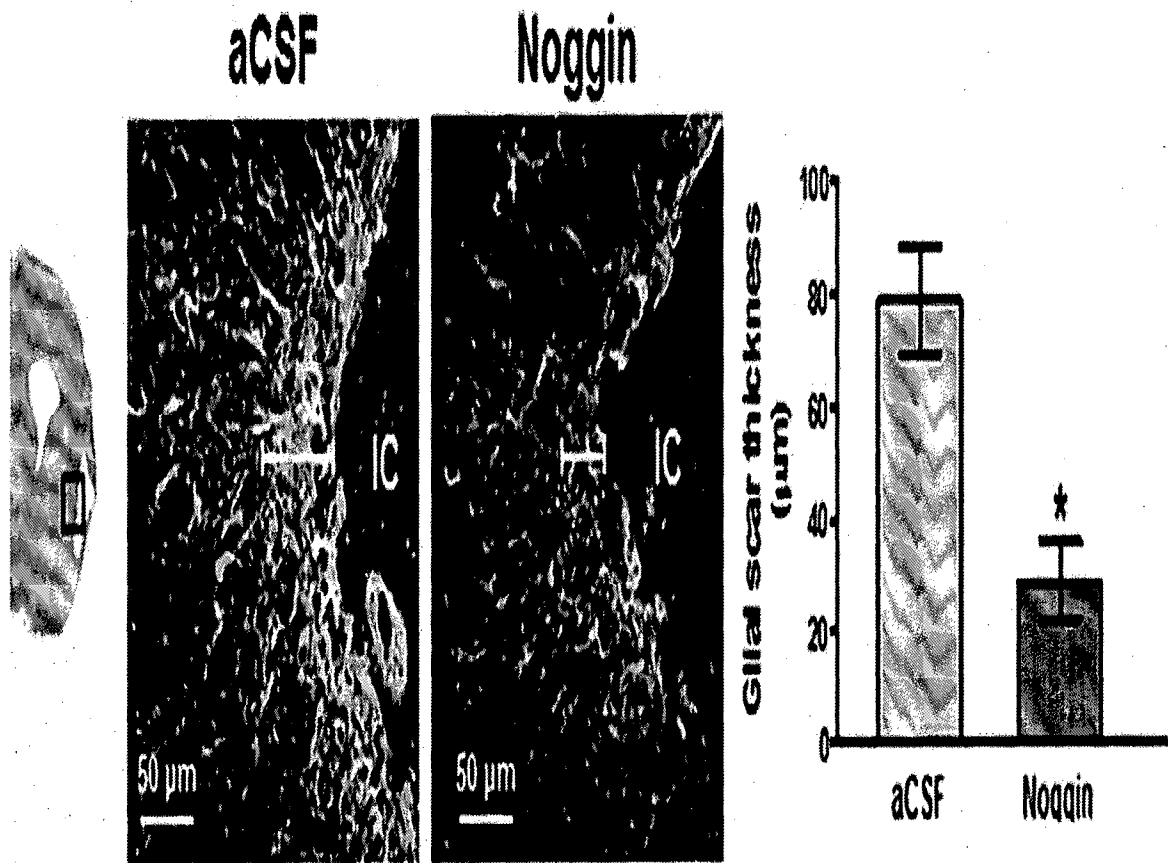
[도 4]



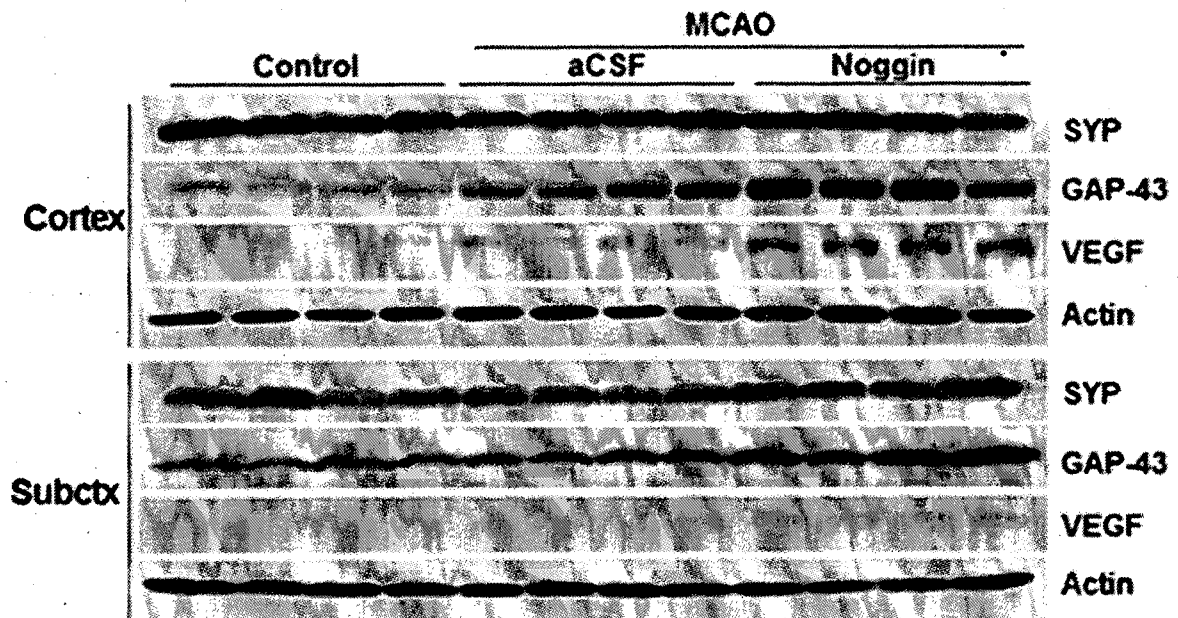
[도 5]



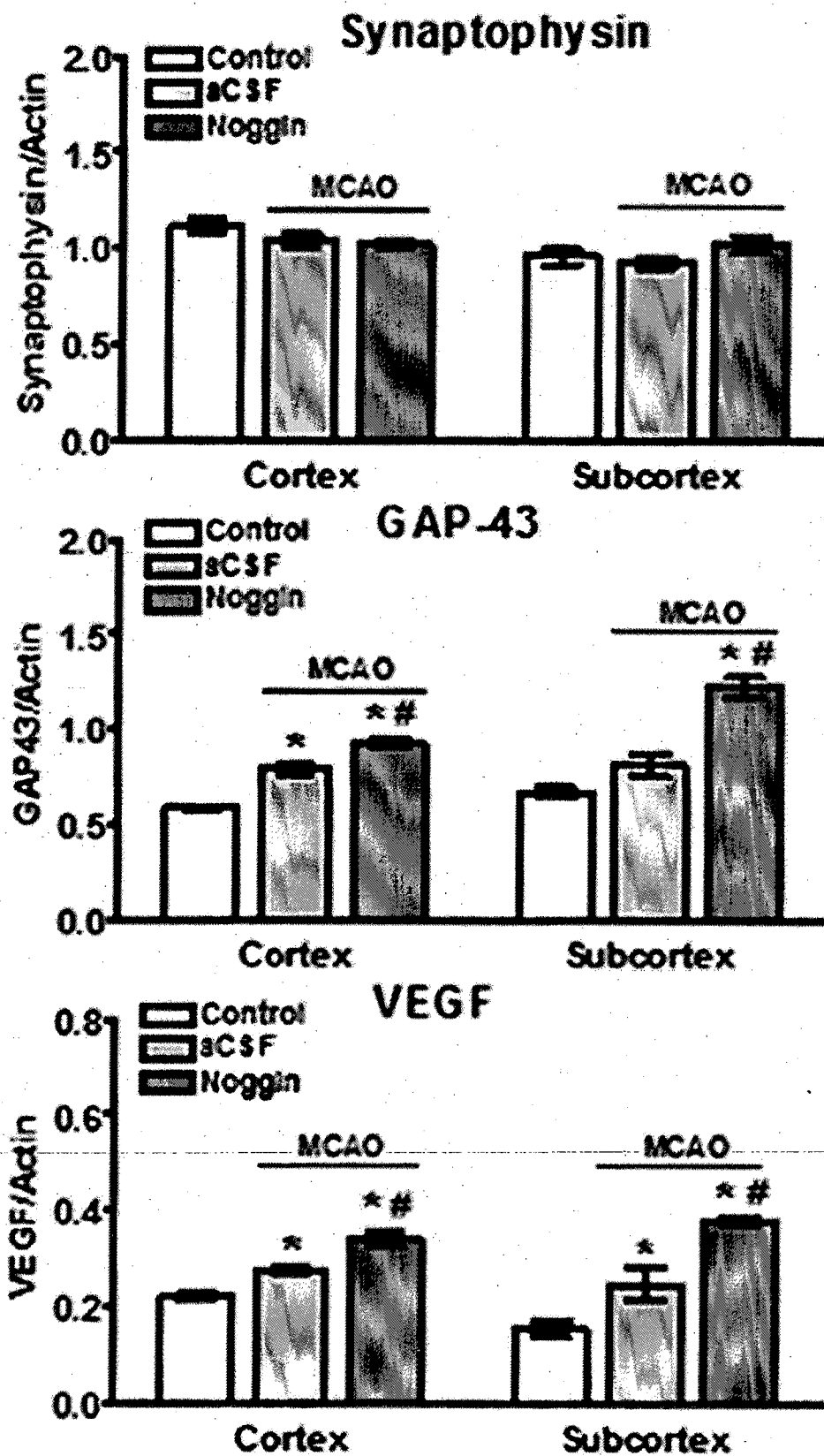
[도 6]



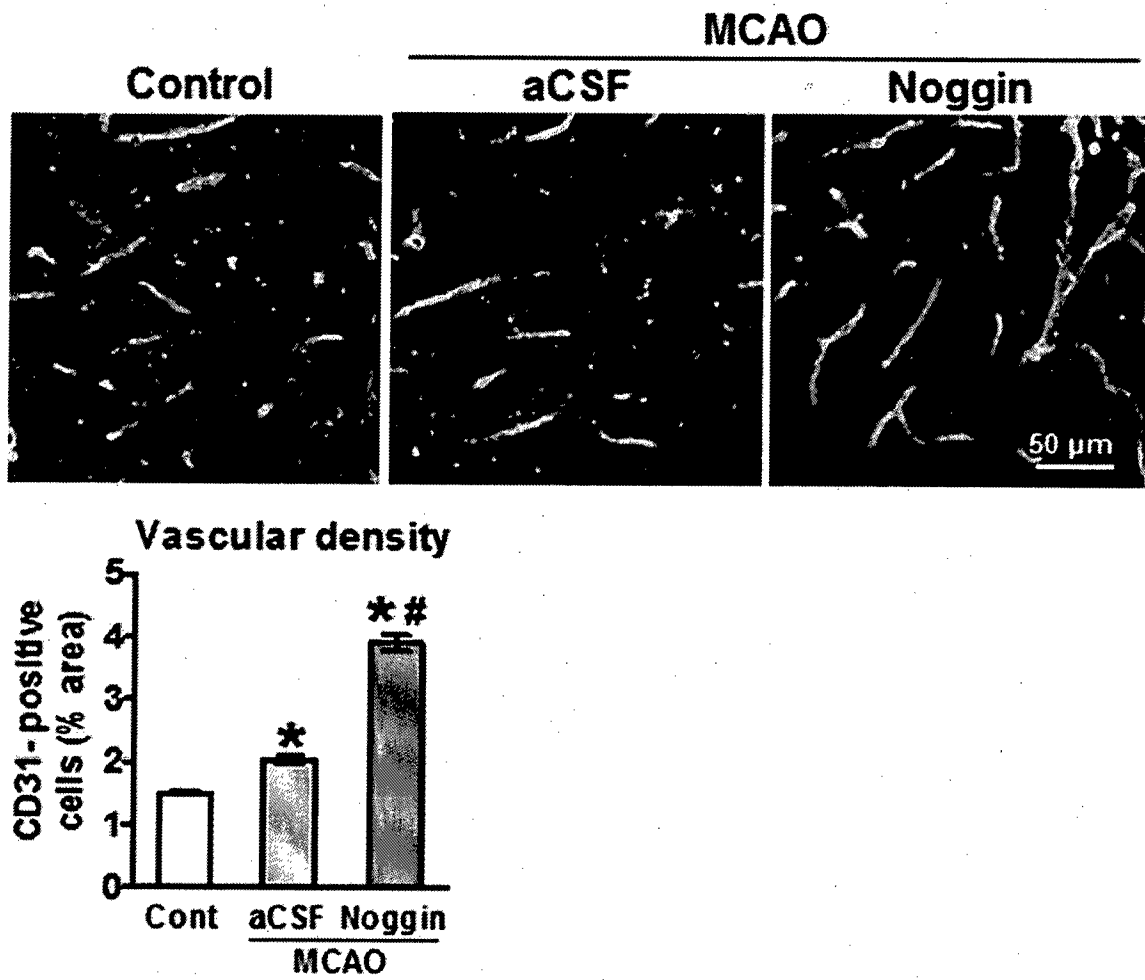
[도 7]



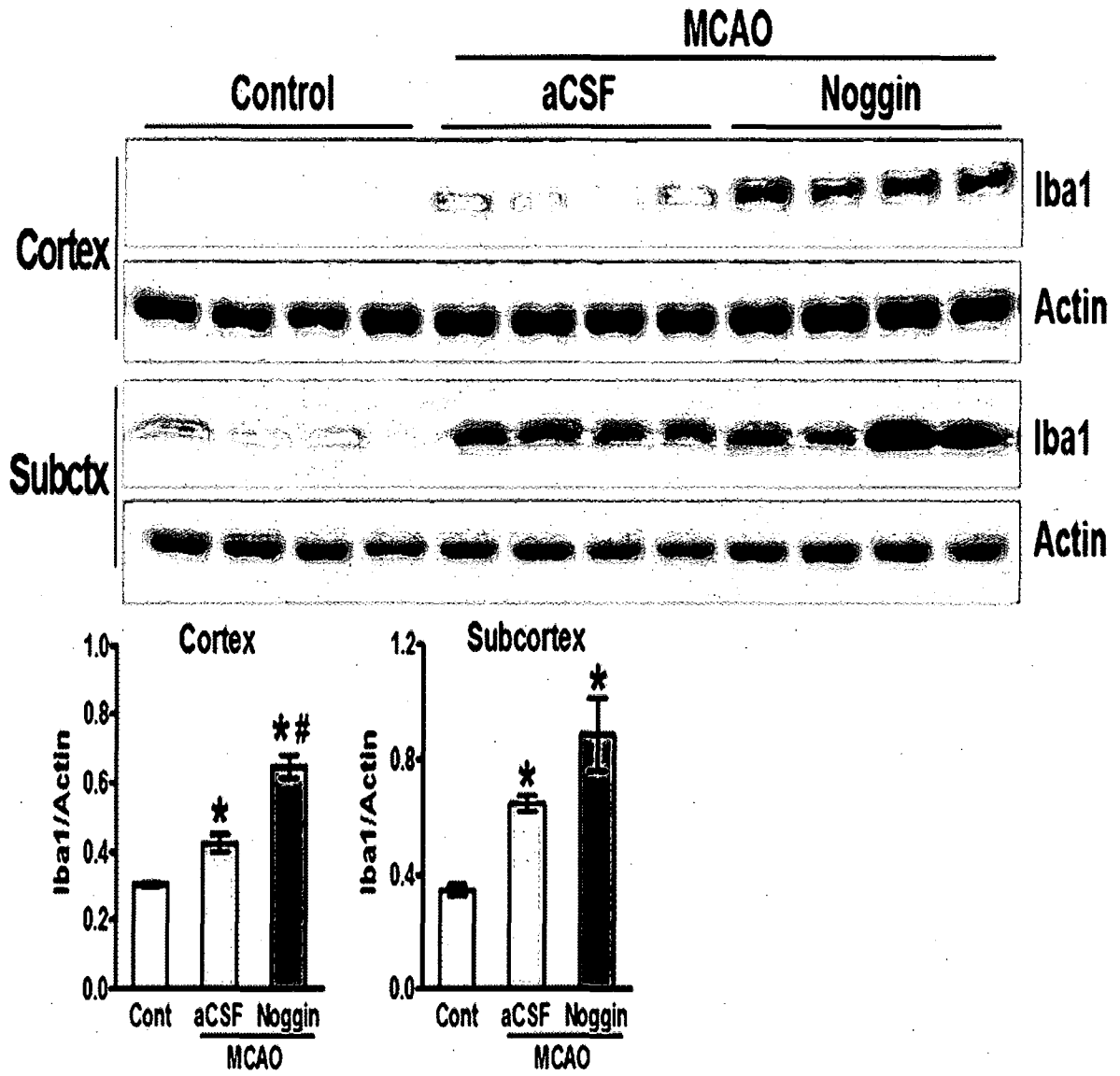
[도 8]



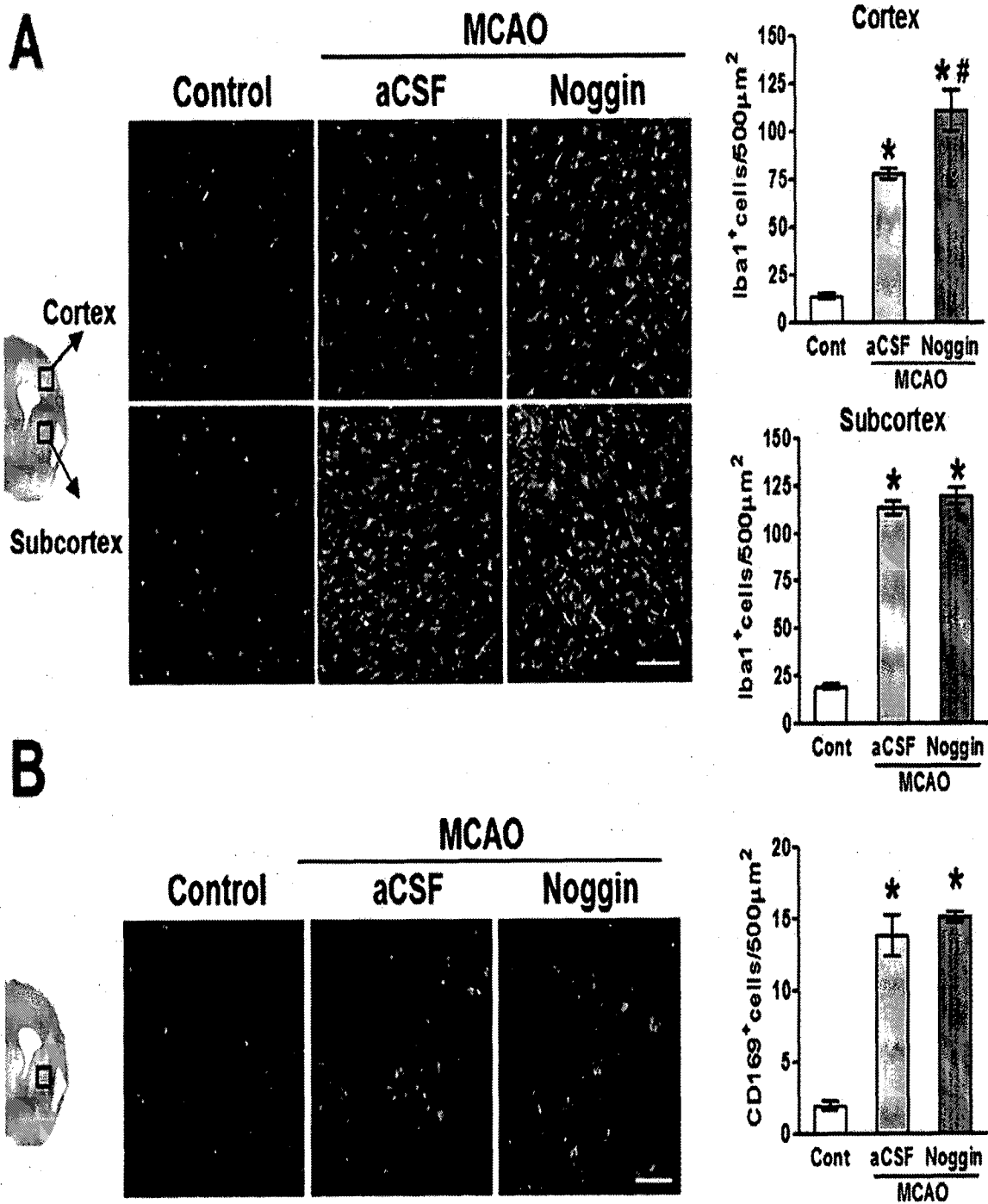
[도 9]



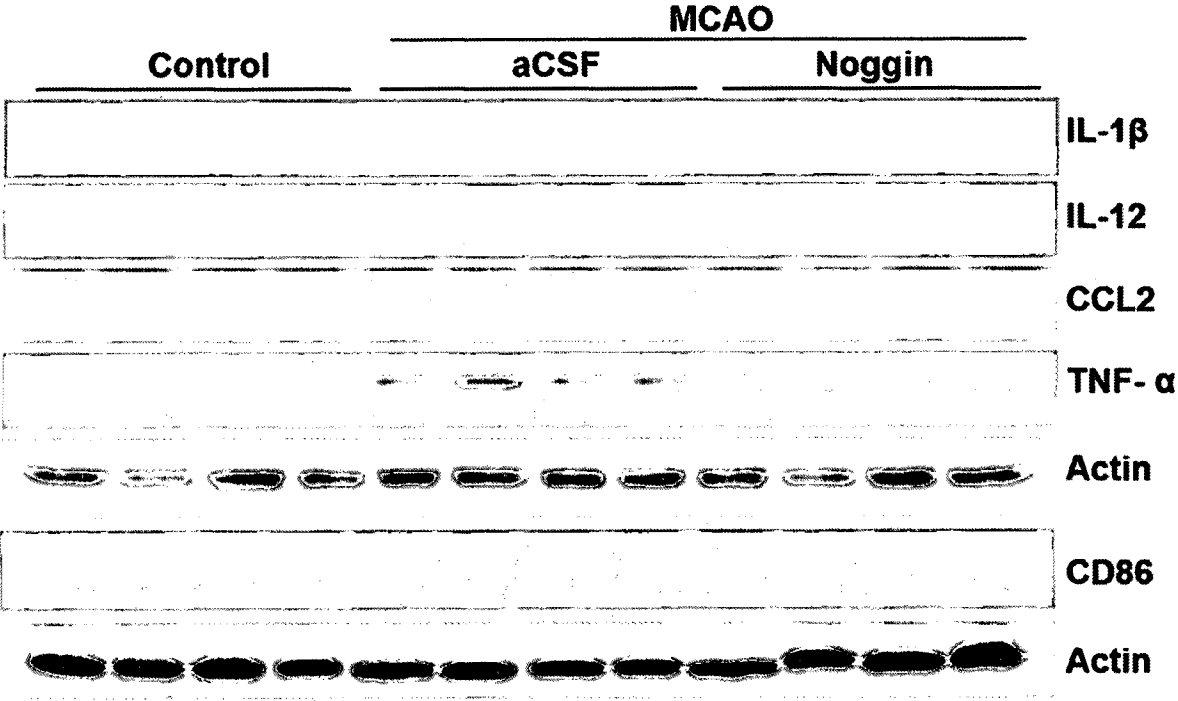
[도 10]



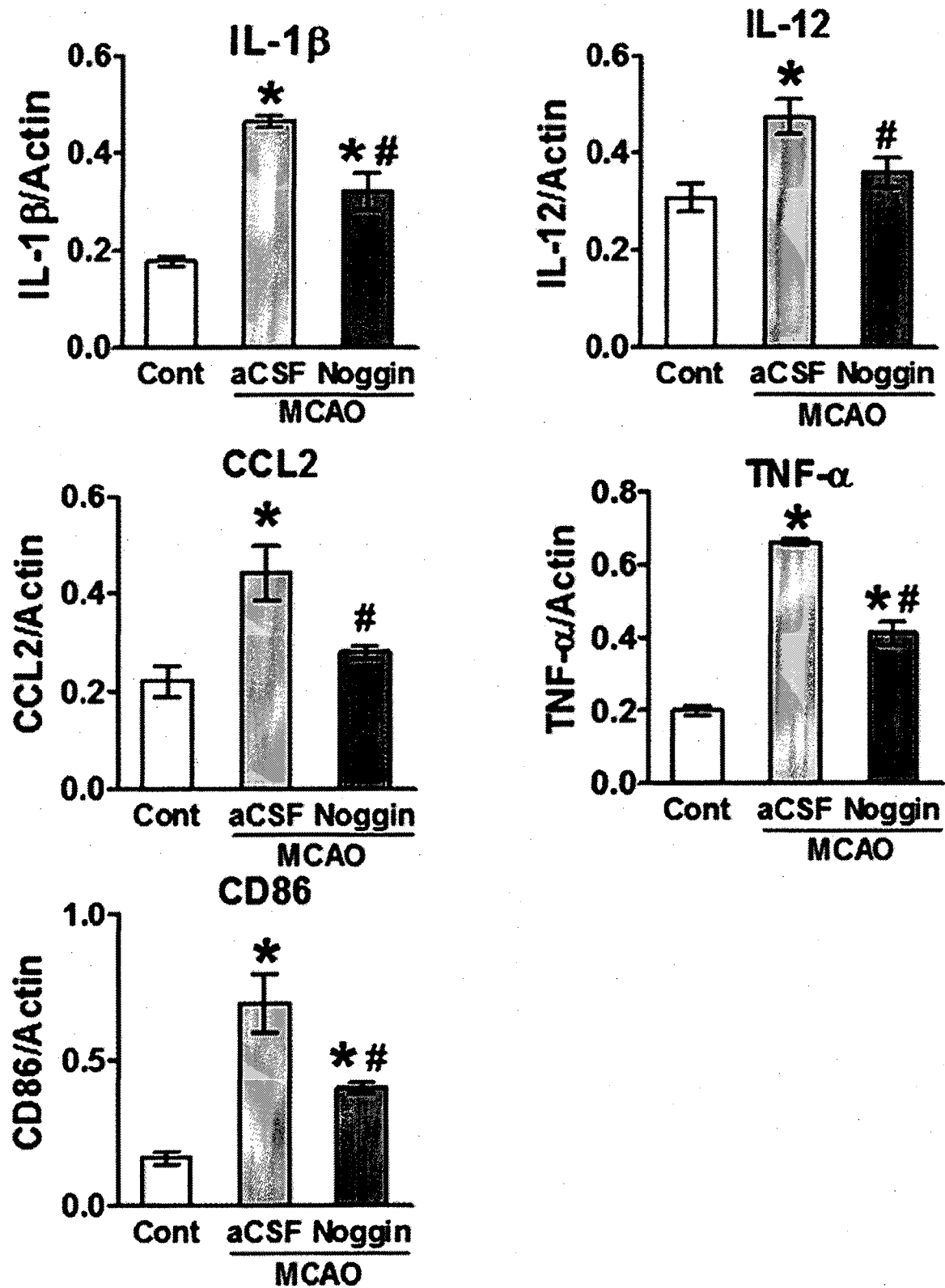
[도 11]

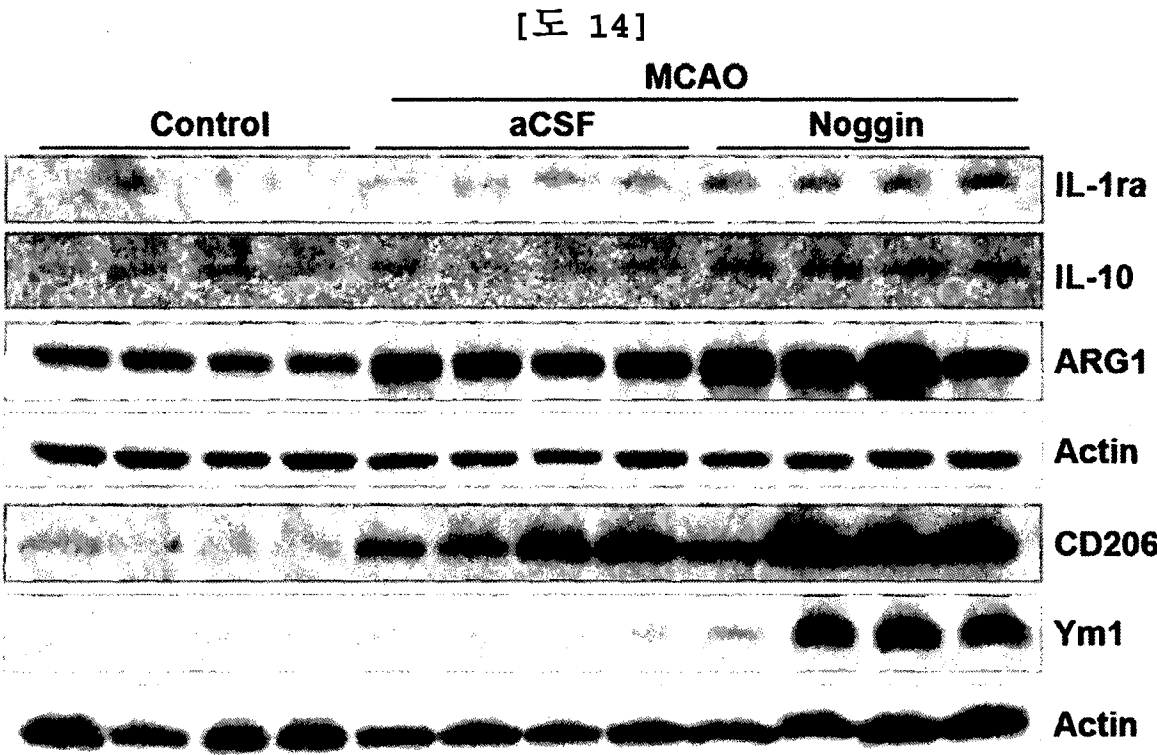


[도 12]

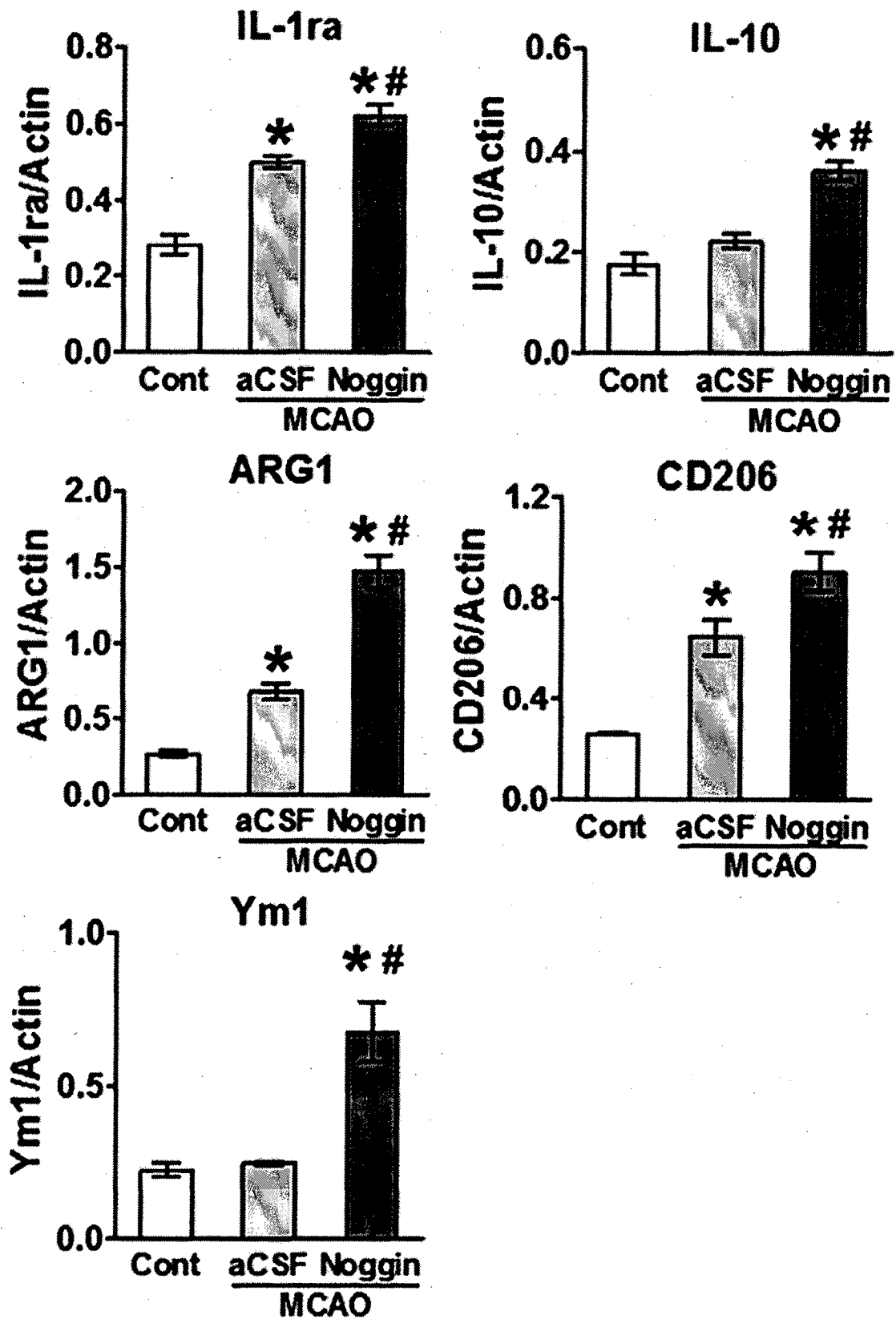


[도 13]

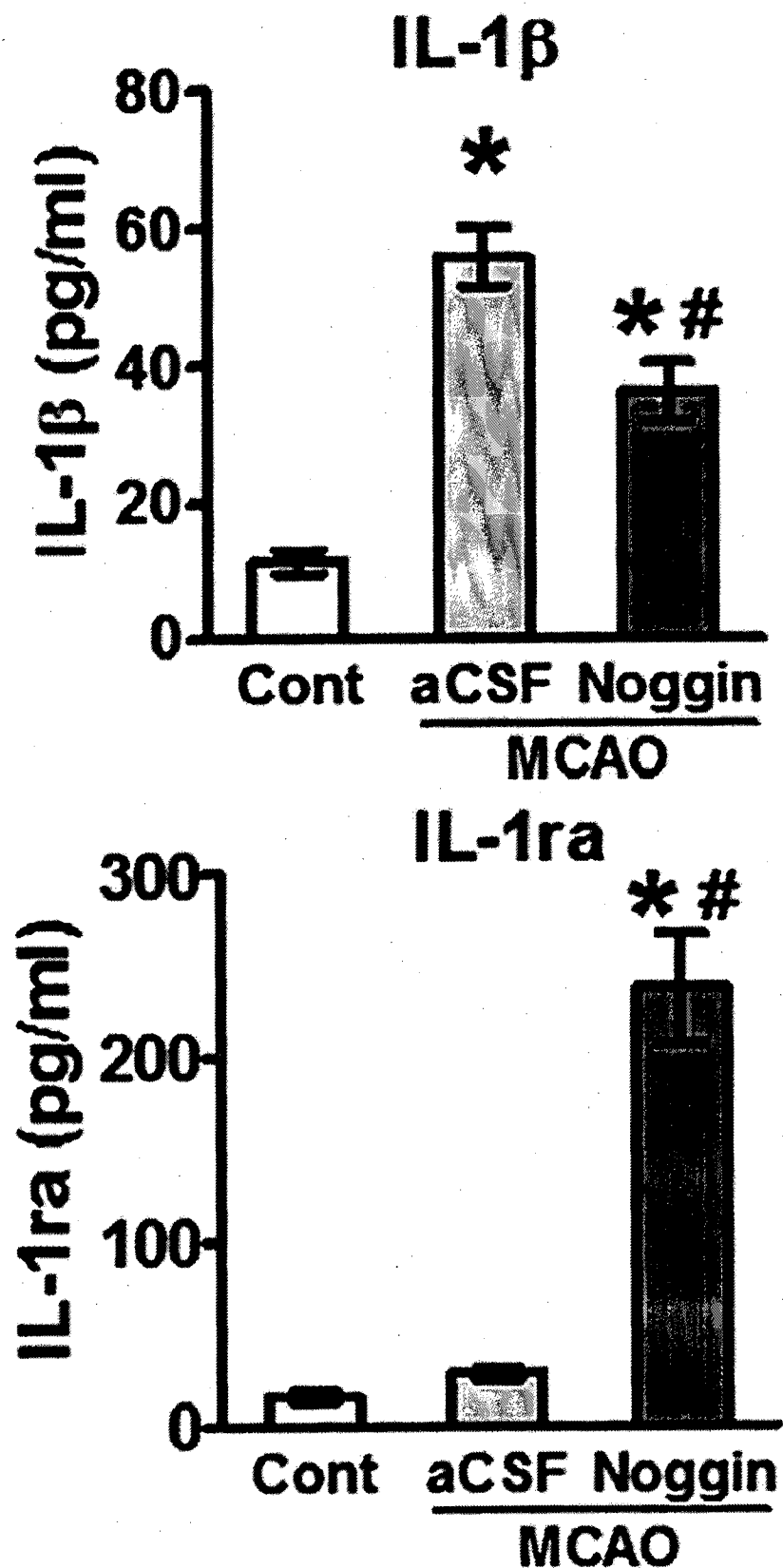




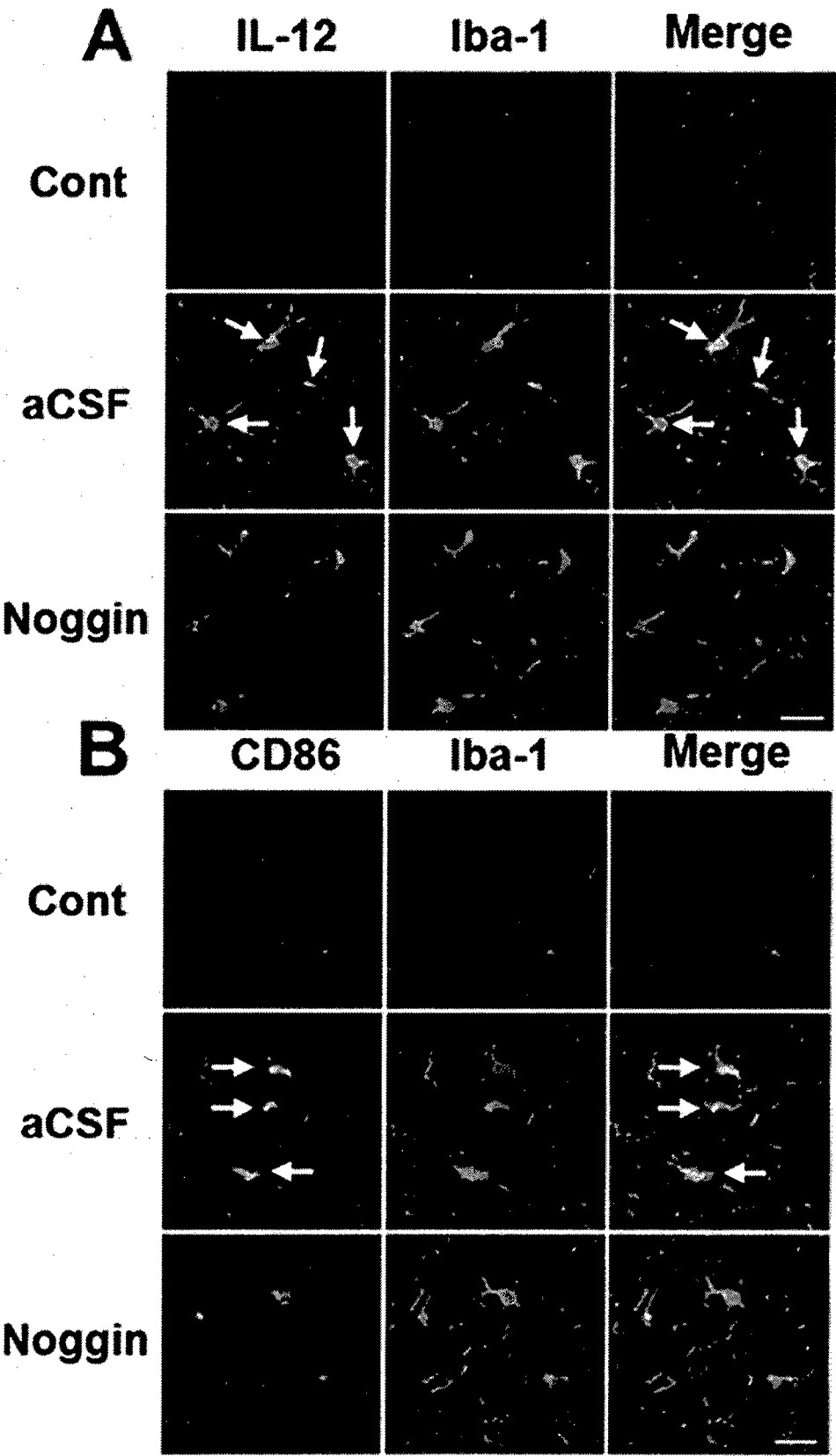
[도 15]



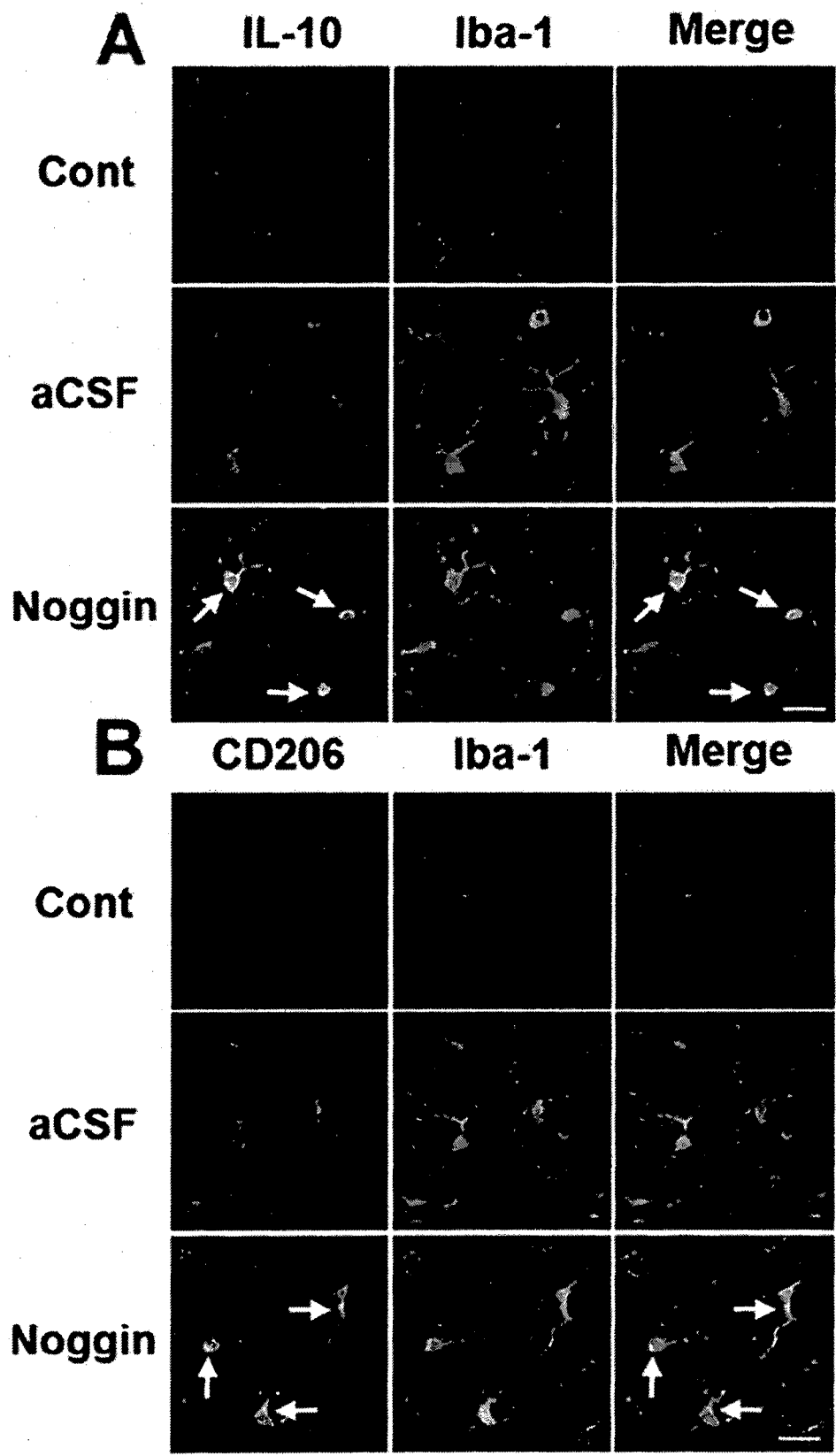
[도 16]



[도 17]



[도 18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/003189**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 48/00(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)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)

A61K 48/00; A61K 47/48

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: Noggin, Noggin, ischemic disease, cerebral stenosis, vector, virus, hematopoietic stem cell, dendritic cell, stroke, microglia activity enhancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAMANTA, Jayshree et al., "Noggin Protects Against Ischemic Brain Injury in Rodents", Stroke, Vol. 41, No. 2, pp. 357-362, (February 2010 Publication) See abstract	1,3-8,10-11,14-16
Y		2,9,12
Y	GenBank Accession No. U31202.1(13 December 1995 Publication) See sequence	2,9,12



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

05 OCTOBER 2015 (05.10.2015)

Date of mailing of the international search report

05 OCTOBER 2015 (05.10.2015)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/003189

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 13 claims a "method for treating ischemic diseases, comprising a step of administering active ingredients into the human body", and claim 13 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/003189

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 48/00(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 48/00; A61K 47/48

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: 노긴, Noggin, 허혈성 질환, 뇌동맥협착, 벡터, 바이러스, 조혈모세포, 수지상 세포, 뇌줄종, 소교세포 활성화증진제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Jayshree Samanta 외 4명, "Noggin Protects Against Ischemic Brain Injury in Rodents", Stroke, Vol.41, No.2, p.357-362, (2010년2월 공개) 초록 참고	1,3-8,10-11,14-16
Y		2,9,12
Y	GenBank Accession No. U31202.1(1995.12.13. 공개) 서열 참고	2,9,12

☐ 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

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

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

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

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 10월 05일 (05.10.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 10월 05일 (05.10.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

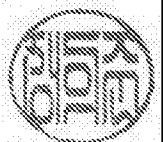
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

정의준

전화번호 +82-42-481-8148



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13은 '체내에 유효성분을 투여하는 단계를 포함하는 허혈성 질환의 치료방법'을 청구하고 있고, 이는 인간의 질병의 치료방법에 관한 것이므로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음