



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0176098
(43) 공개일자 2024년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) A61P 25/16 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/1709 (2020.05)
A61K 39/0007 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0076022

(22) 출원일자 2023년06월14일
심사청구일자 2023년06월14일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김명욱

경상남도 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호 (호탄동, 대동디지털황토아파트)

최경환

서울특별시 구로구 경인로 382, 106동 1701호 (개봉동, 한마을아파트)

박준성

경상남도 진주시 진주대로404번길 10-1, 203호 (가좌동)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 14 항

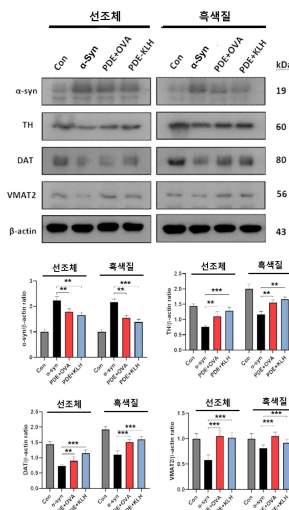
(54) 발명의 명칭 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명의 유효성분인 알파-시누클레인 에피토프는 알파-시누클레인 펩티드 VAEKTKEQVT를 포함하며, N-말단은 아세틸화(acetylation)시키고, C-말단은 시스테인을 링커로 사용하여 캐리어 단백질 [KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin)]이 결합된 것이다.

상기 알파-시누클레인 에피토프를 파킨슨병을 유도한 동물모델 및 *in vitro* 모델에서, 파킨슨병의 예방 및 치료 효과가 있다는 것을 확인하였으므로, 본 발명의 유효성분은 파킨슨병의 예방 또는 치료용 의약품, 및 백신으로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 47/643 (2017.08)

A61P 25/16 (2018.01)

C07K 14/47 (2013.01)

C07K 2319/31 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711119484

과제번호 2020M3E5D9080660

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오 의료기술개발 사업 (뇌질환극복연구사업)

응용 연구과제명 면역제어 타겟 신규 물질발굴 및 효능 검증 ; 신개념 파킨슨병 예방치료제 개발에

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경상국립대학교

연구기간 2020.07.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 알파 시누클레인 에피토프는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드; 또는 (b) 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있으며 (a)로부터 유도된 펩타이드;인 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드; 또는 (b) 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있으며 (a)로부터 유도된 펩타이드;는 N-말단이 아세틸화(acetylation)되고, C-말단은 티올기를 포함하는 아미노산 링커에 의해 캐리어 단백질이 결합된 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 티올기를 포함하는 아미노산 링커는 시스테인(cysteine)인 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 캐리어 단백질은 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin)인 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드; 또는 (b) 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있으며 (a)로부터 유도된 펩타이드;의 N-말단은 아세틸화(acetylation)되고, C-말단은 티올기를 포함하는 시스테인(cysteine) 링커에 의해 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin) 단백질이 결합된 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 유효성분은 항-알파 시누클레인 항체를 유도하는 항원인 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료방법.

청구항 11

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 펩타이드는 N-말단은 아세틸화(acetylation)되고, C-말단은 티올기를 포함하는 시스테인(cysteine) 링커에 의해 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin) 단백질이 결합된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 13

알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 알파 시누클레인 에피토프는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드; 또는 (b) 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있으며 (a)로부터 유도된 펩타이드;인 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병은 알츠하이머병 다음으로 흔한 대표적인 퇴행성 뇌 질환으로, 중뇌에 위치한 흑질이라는 뇌 특정 부위의 신경세포에서 분비되는 도파민이라는 신경물질이 원인을 알 수 없이 서서히 소실되는 질환으로, 도파민은 뇌 신경 세포들 간의 신호전달을 위해 분비되는 신경전달물질 가운데 하나이며, 분비 조절에 문제가 생기면 손이 떨리는 증상으로부터 시작해 차츰 보행 장애, 평형감각상실, 우울증 등을 겪게 된다.

[0003] 전형적인 병리적 특징으로 도파민을 분비하는 신경세포가 선택적으로 사멸되며 알파 시누클레인이 주요성분인 루이소체(Lewy body)라 불리는 비정상적인 단백질 응집체(inclusion body)가 발견되고 있으며, 이러한 비정상적 단백질 응집체의 제거를 위해 여러 가지 연구가 진행되고 있으나 아직 확실하게 제거할 수 있는 기술이 알려지지 않은 실정이다. 일반적인 천연물질이 아닌 인간 B 세포에서 생산된 알파 시누클레인에 특이적인 단클론항체에 관한 연구가 진행되고 있으나, 부작용으로 인해 임상시험이 중단된 상황이고, 정제하는 방식이 아닌, 체내 자체에서 B 세포를 이용한 체액성 면역을 이용하여, 알파 시누클레인 단백질을 제거하는 연구가 새로이 각광받고 있으며, 아직까지 시작단계에 불과하다.

[0004] 체내에 생성되는 알파 시누클레인을 제거하기 위해, 알파 시누클레인을 투여하여 그것에 대한 항체를 생성시킨 다음, 향후 알파 시누클레인이 생성되었을시, 빠르게 처리할 수 있는 것이 체액성 면역 기반 단백질 제거의 원리이다. 하지만 전체 서열을 투여하여 항체를 생성하기에는 여러 면역 세포를 자극하여 부작용을 일으킬 수 있는 원인이 되므로, B 세포 특이적인 단백질 서열을 찾는 것이 필요하고, 펩타이드 서열은 비교적 짧은 서열이므로, 안정적으로 B 세포 수용체와 결합할 수 있는 화학적 변형도 필요한 상황이다.

[0005] 한국등록특허 제1517447호에 루이 소체 질병을 치료하기 위한 알파-시누클레인 에피토프의 미토프의 용도에 관하여 개시되어 있고, 한국공개특허 제2020-0099160호에 항-알파 시누클레인 항체가 개시되어 있으나, 아직까지는 본 발명의 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물에 대하여 언급된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고, 본 발명의 유효성분이 파킨슨병이 유도된 동물모델을 이용한 열린공간 시험에서 총 이동거리를 증가시키고, 로타로드 시험에서는 실린더 위에서 떨어지지 않고, 유지하는 시간이 증가하였으며, α -Syn 발현량을 감소시키고, TH(Tyrosine hydroxylase), DAT(Dopamine transporter) 및 도파민 수송 단백질인 VMAT2(Vesicular monoamine transporter 2) 단백질의 발현량은 증가시키는 효과가 있다는 것을 확인하였을 뿐만 아니라, 비장 및 혈장에서의 IgG 생성량을 증가시키고, 혈장에서 IL-10의 생성량을 감소시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명의 유효성분인 알파-시누클레인 에피토프는 알파-시누클레인 펩티드 VAEKTKEQVT를 포함하며, N-말단은 아세틸화(acetylation)시키고, C-말단은 시스테인을 링커로 사용하여 캐리어 단백질 [KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin)]이 결합된 것이다.

[0013] 상기 알파-시누클레인 에피토프를 파킨슨병을 유도한 동물모델 및 *in vitro* 모델에서, 파킨슨병의 예방 및 치료 효과가 있으므로, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 의약품; 및 백신;으로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 알파 시누클레인 항원 PEP1의 구조 및 Docking 시뮬레이션을 통한 B 세포에서 상호작용하는 알파 시누클레인 단백질 잔기를 확인한 결과이다.

도 2는 알파 시누클레인 항원 동물실험 일정을 나타낸 개요도이다.

도 3은 파킨슨병 동물 모델에서, 본 발명의 알파 시누클레인 항원의 투여에 따른 열린공간시험 결과로 마우스의 총 이동거리를 나타낸 것이다. Con은 정상군이고, α -Syn은 알파 시누클레인 단백질을 투여하여 파킨슨병을 유도한 군이고, PDE-OVA는 파킨슨병을 유도하기 전에 오발부민을 결합시킨 알파-시누클레인 항원(Ac-VAEKTKEQVTC-OVA)을 투여한 군이고, PDE-KLH는 파킨슨병을 유도하기 전에 KLH(keyhole limpet hemocyanin)을 결합시킨 알파-시누클레인 항원(Ac-VAEKTKEQVTC-KLH)을 투여한 군이다. 이하 도면에서도 동일하게 적용하였다.

도 4는 파킨슨병 동물 모델에서, 본 발명의 알파 시누클레인 항원의 투여에 따른 로타로드 시험 결과로 마우스가 실린더 위에서 떨어지는데 걸린 시간(sec)을 나타낸 것이다.

도 5는 알파 시누클레인을 주입하여 유도된 파킨슨병 모델에서의 선별된 PDE-OVA 및 PDE-KLH 투여에 의해 α -Syn, TH(Tyrosine hydroxylase), DAT(Dopamine transporter) 및 도파민 수송 단백질인 VMAT2(Vesicular monoamine transporter 2) 단백질의 발현량 변화를 확인한 결과이다. **, ***은 비교군 간의 차이가 통계적으로 유의미하다는 것으로, **은 $p<0.01$ 이고, ***은 $p<0.001$ 이다.

도 6은 알파 시누클레인 주입하여 유도된 파킨슨병 모델에서의 선별된 PDE-OVA 및 PDE-KLH 투여에 의해 비장에서의 IgG 생성량 변화(A) 및 혈장에서의 IL-10 및 IgG 발현량 변화(B)를 확인한 결과이다. ****은 비교군 간의 차이가 통계적으로 유의미하다는 것으로, $p<0.0001$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0016] 상기 알파 시누클레인 에피토프는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드; 또는 (b) 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있으며 (a)로부터 유도된 펩타이드;인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 상기 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드; 또는 (b) 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있으며 (a)로부터 유도된 펩타이드;는 N-말단이 아세틸화(acetylation)되고, C-말단은 티올기를 포함하는 아미노산 링커에 의해 캐리어 단백질이 결합된 것이지만 이에 한정하지 않는다. 상기 티올기를 포함하는 아미노산 링커는 시스테인(cysteine)인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0017] 상기 캐리어 단백질은 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin)인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [0018] 본 발명의 유효성분인 상기 알파 시누클레인 에피토프의 가장 바람직한 일례로는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드; 또는 (b) 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있으며 (a)로부터 유도된 펩타이드;의 N-말단은 아세틸화(acetylation)되고, C-말단은 티올기를 포함하는 시스테인(cysteine) 링커에 의해 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin) 단백질이 결합된 것이지만 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0019] 상기 유효성분은 항-알파 시누클레인 항체를 유도하는 항원인 것이 특징이다.
- [0020] 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 함유할 수 있으며, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 함유할 수 있다.
- [0021] 상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구의 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는 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, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메칠파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충전제, 향

응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물의 유효한 양은 동물의 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강상태 또는 성별에 따른 본 발명의 유효성분에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 수의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[0025] 상기 파킨슨병의 예방 또는 치료방법에서, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분인 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드; 또는 (b) 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있으며 (a)로부터 유도된 펩타이드;의 N-말단은 아세틸화(acetylation)되고, C-말단은 티올기를 포함하는 시스테인(cysteine) 링커에 의해 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin) 단백질이 결합된 것을 특징으로 한다.

[0026] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드에 관한 것이다. 상기 펩타이드는 N-말단은 아세틸화(acetylation)되고, C-말단은 티올기를 포함하는 시스테인(cysteine) 링커에 의해 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin) 단백질이 결합된 것이 바람직하지만 이에 제한하지 않는다.

[0027] 또한, 본 발명은 알파 시누클레인 에피토프를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본 발명의 백신 조성물에서, 상기 알파 시누클레인 에피토프는 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드; 또는 (b) 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 잔기가 치환, 결실 또는 삽입되고, 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있으며 (a)로부터 유도된 펩타이드;일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 또한, 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 백신 조성물은 당업자에 공지된 기술에 따라 약리학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 보존제 및 면역 보조제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 상기 약리학적으로 허용 가능한 담체는 활성 성분의 생물학적 활성의 유효성을 방해하지 않고, 화학적으로 불활성이며, 투여되는 피험체에게 독성을 띠지 않는 담체 매질을 의미한다. 각종 담체들이 당 기술분야에 공지되어 있으며, 증류수, 염수 또는 미네랄수 등이 포함될 수 있고, 보존제로는, 예컨대, EDTA염, 메티올레이트 등이 포함될 수 있으며, 면역 보조제로, 예컨대, 수산화알루미늄과 같은 광물겔, 리조레시틴과 같은 계면활성제, 사포닌이나 사포닌 유도체와 같은 글리코시드, 란티딘, 아브리딘(avridine), 카보폴(carbopol), 폴리포스파젠, DDA(dimethyldioctadecylammonium bromide), 퀴 에이(quil A), 암피젠, 광물유 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0032] 실시예 1. IEDB(The Immune Epitope Database) 시스템을 이용하여 신규 알파 시누클레인 항원 선정

[0033] 본 실시예 1에서는 세 가지 이론적 분석을 이용하여, B 세포 특이적 알파 시누클레인을 생성할 수 있는 신규 알파 시누클레인 항원을 선정하였다.

[0034] (1) B 세포를 인지하는 항원 서열의 선별,

[0035] (2) 항원 서열의 결합 친화력(binding affinity), 안정성 및 독성 분석 및

[0036] (3) 파킨슨병 동물 모델에서의 생화학 및 행동학적 검증을 통해 신규 알파 시누클레인 항원을 채택하였다.

[0037] 알파 시누클레인의 서열 중, B 세포에 결합하여 체액성 면역을 자극하는 항원 부위를 찾기 위해, IEDB(The Immune Epitope Database)를 사용하여 서열을 예측하였다.

[0038] 알파 시누클레인 전체 서열 [MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTK

EGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA(서열 번호 4)]을 소프트웨어에 입력한 다음, IEDB에 있는 B 세포 에피토프(epitope) 대표 예측 알고리즘 3가지(Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0, Bepipred Linear Epitope Prediction 및 Emini Surface Accessibility Prediction)를 이용하였다.

[0039] 그 결과, 알파 시누클레인의 140개의 아미노산 서열 중에서, 중간 부분의 서열이 B 세포와 결합할 수 있는 항원 부위로 예측되었고, 일차적으로 알파 시누클레인 서열 3개(PEP1, PEP2, PEP3)를 후보군으로 선별하였다. Gold(Genetic optimization for ligand docking)을 통해 Gold 스코어로 결합모드의 클러스터링 형성 정보를 얻고, 분자도킹 시뮬레이션(molecular docking simulation)으로 결합 친화도(Binding affinity) 및 안정성(stability)을 계산하여, 상위 3개의 펩타이드(PEP1, PEP2, PEP3)를 선별하였고(표 1), 교차 검증을 위해 GalaxyPepdock 웹 서버에서 에피토프의 결합 친화도를 예측하였다.

표 1

[0040] 선별된 3개의 후보 알파 시누클레인 항원의 GOLD(Genetic optimization for ligand docking) 스코어

	PEP1: VAEKTKEQVT (서열번호 1)	PEP2: AEKTKEQVTN (서열번호 2)	PEP3: EKTKEQVTNV (서열번호 3)
1	122.65	106.89	96.84
2	119.29	105.21	96.46
3	115.51	100.00	93.50
4	106.80	99.63	88.53
5	104.59	95.97	88.37
6	101.97	95.97	87.25
7	101.43	95.40	83.59
8	101.14	91.63	83.05
9	100.38	91.53	82.76
10	90.26	90.46	81.13

[0041] 10번의 GOLD를 시도하여, 나온 GOLD 스코어의 평균값이 가장 높은 PEP1을 Toxinpred 서버를 이용하여 독성이 없는 것을 확인한 후, PEP1을 알파 시누클레인 항원으로 선정하였다.

[0042] 실시예 2. 안정성과 독성 검사

[0043] 상기 실시예 1에서 선정한 PEP1 서열을 기반으로 안정성과 독성 검사를 실시하였다.

표 2

[0044] 선정된 알파 시누클레인 항원 PEP1의 독성

펩타이드 서열(PEP1)	돌연변이 위치	QM 스코어	독성 예측	소수성	Hydropathicity	친수성	charge	분자량
VAEKTKEQVT	돌연변이 없음	-10.9	Non-toxin	-0.32	-0.95	0.79	0	1132.42

[0045] 실시예 3. 선정된 후보 알파시누클레인 펩타이드의 변형

[0046] 생체 내 알파 시누클레인이 B 세포 수용체에 특이적이거나, 생체 내 전달하기까지의 과정이 매우 복잡하고, B 세포 기반 체액성 면역을 안정적으로 도출하기 위해서는 펩타이드 변형 과정이 필요하다. 면역 체계는 전체 펩타이드-단백질 접합체에 반응하므로 일부 항체는 항상 펩타이드, 링커 및 캐리어 단백질에 대해 생성 유발되는데, 이는 면역을 좀 더 촉진할 수 있는 발화점이 되므로, 본 발명의 후보 알파 시누클레인 펩타이드에 대하여 각각 캐리어 단백질을 결합시켰다.

[0047] 본 실시예 3에서는 PEP1 서열(VAEKTKEQVT)을 기반으로 N 말단에 아세틸화(Acetylation)하였고, C 말단에는 캐리어 단백질을 결합시키기 위하여, 티올기(Thiol group)가 포함된 시스테인(Cysteine; C)을 추가한 후, 캐리어 단백질인 KLH(keyhole limpet hemocyanin) 또는 OVA(ovalbumin)를 결합시킴으로써, 여러가지 분해 효소에 대한 펩타이드의 안정성과 생체 내 생물학적 면역활성을 증가시켰다. 이후 변형된 PEP1을 PDE-OVA(Ac-VAEKTKEQVTC-

OVA) 및 PDE-KLH(Ac-VAEKTKEQVTC-KLH)로 명명하였고, 파킨슨병에 대한 효능을 분석하는데 사용하였다.

[0048] 실시예 4. PEP1 서열(VAEKTKEQVT)과 B 세포 사이의 분자도킹 시뮬레이션

[0049] PEP1 서열(VAEKTKEQVT)과 B 세포 간의 도킹 시뮬레이션을 통해 알파 시누클레인 항원으로 선정한 PEP1이 B 세포의 어떤 잔기들과 결합하는지 확인하였다.

[0050] 그 결과, 본 발명의 알파 시누클레인 항원과 B 세포의 상호작용하는 결합관계 및 잔기를 확인하였다(도 1).

[0051] 실시예 5. PEP1 서열로 이루어진 알파 시누클레인 항원의 파킨슨병 동물모델의 행동분석 변화 확인

[0052] [동물 모델]

[0053] 25~30g의 8주령 수컷 C57BL/6N 마우스를 샘타코 바이오로부터 구입하여 12시간 명/암 주기 및 23℃의 온도 조건에서 1주일 동안 순화시켰다. 동물실험에 대하여 경상국립대학교 동물윤리위원회의 승인(승인번호: 125)을 받아 실시하였다.

[0054] 합성된 알파 시누클레인 항원을 이용하여, 생체 내 실험을 다음과 같이 진행하였다. 마우스 체중(g)당 15μg의 알파 시누클레인 항원을 4주 동안(6~10주령) 복강내 주사(Intraperitoneal; IP)로 주 1회 투여하였다. 4주 후에 1×PBS에 용해시킨 2μg/μl의 알파 시누클레인(α-Syn) 용액을 2μl씩 뇌실 주입 후, 1주일의 회복 기간을 거친 파킨슨병 동물 모델을 확립하였다(도 2).

[0055] (1) 열린공간 시험(Open field test)

[0056] 16개의 동일한 크기로 이루어진 정육면체(40×40×40cm)이고, 중심에 4개의 상자와 이를 둘러싼 12개의 주변 상자로 구성된 흰색의 플렉시글라스(Plexiglas)에서 locomotor 활성을 측정하였다. 추적 소프트웨어 3.0을 이용하여 마우스의 움직임을 기록하였고, 실험 전 몇시간동안 새로운 환경에 적응하기 위하여 각 마우스를 박스의 중심에 배치하였다. 이상행동을 방지하기 위하여 조용하고 불이 켜진 방에서 수행하였고, 챔버는 10% 에탄올을 이용하여 냄새를 제거하고 실험을 실시하였다.

[0057] 그 결과, 열린공간 시험에서 파킨슨병이 유도된 동물군은 정상군에 비해 낮은 수준의 운동활동을 보였으나, 이에 대비하여 알파 시누클레인 항원을 투여한 군에서는 운동활동 수준이 통계적으로 유의미하게 개선된 것을 확인하였다. 특히, PDE-KLH 처리군이 가장 극적으로 회복되는 것을 확인하였다(도 3).

[0058] (2) 로타로드 테스트(Rotarod test)

[0059] 사지 협응능력 및 균형능력을 측정하여 운동조절 능력을 판단하는 로타로드 테스트를 실시하였다. 로타로드 테스트는 회전하는 실린더 위에서 걷는 행동과 균형을 요구하므로, 정상군(Con) 대비 운동신경에 이상이 있는 파킨슨병 유도군(α-Syn)은 상태적으로 빨리 균형을 잃고, 회전하는 실린더 위에서 빨리 떨어지는 결과가 나타났다. 하지만 이에 대비하여 본 발명의 알파 시누클레인 항원(PDE-OVA 또는 PDE-KLH)을 투여한 군에서는 실린더 위에서 떨어지는데 걸린 시간이 통계적으로 유의미하게 증가한 것을 확인하였다(도 4).

[0060] 실시예 6. 본 발명의 알파-시누클레인 항원의 처리에 따른 알파 시누클레인 단백질의 발현량 및 도파민 관련 단백질의 발현량 변화 확인

[0061] (1) 마우스 뇌로부터 단백질 분리

[0062] 행동분석 실험을 마친 마우스를 케타민(Ketamine)/자일라진(xylazine)으로 마취시키고 희생시켰다. 뇌조직을 제거하고, 흑색질(Substantia Nigra; SNpc) 및 선조체(Striatum)을 각각 분리하여 PRO-PREPTM 추출용액 내에서 조직파쇄하였다. 이후, 시료는 4℃에서 13,000rpm의 속도로 25분동안 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 획득한 상층액은 -80℃에 보관하였다.

[0063] (2) 웨스턴 블랏

[0064] 단백질 농도는 브래드포드 어세이를 이용하여 측정하였고, 동일한 양의 단백질 시료를 SDS-PAGE에서 전기영동한 후, PVDF 멤브레인으로 이동시켰다. 비특이적 결합을 방지하기 위하여, 상기 PVDF 멤브레인은 5% 스킴밀크로 블로킹하였고, 1차 항체 처리후 4℃에서 밤샘 반응시켰다. 이후, 막을 1×TBST(3회×10분)로 세척하고 고추냉이-퍼옥시다아제(horseradish-peroxidase)가 결합된 2차 항체로 차단한 후 1×TBST에 1시간 동안 희석한 후 1×TBST(4회×2분)로 세척하였다. 단백질은 제조업체의 지침에 따라 ECL 검출 시약을 사용하여 검출되었다. 면역항체 밴드는 X선 필름을 사용하여 획득되었다. X선 필름을 스캔하고 컴퓨터 기반 Sigma Gel 프로그램 버전

1.0(SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 밴드의 광학 밀도를 밀도 측정을 통해 분석하였다.

[0065] 그 결과, 정상군 대비 파킨슨병이 유발된 마우스군의 α -Syn 발현량이 증가하였으며, 이에 대비하여 본 발명에 따른 알파 시누클레인 항원(PDE-OVA 또는 PDE-KLH)을 투여한 마우스군의 알파 시누클레인 단백질(α -Syn) 발현량이 감소하였다.

[0066] 상기 알파 시누클레인 항원(PDE-OVA 또는 PDE-KLH)) 투여 시, α -Syn의 발현량의 감소는 파킨슨병이 유발된 마우스에서 체액성 면역 반응에 따른 알파 시누클레인의 제거가 일어난 것으로 판단하였다.

[0067] 또한, 도파민 합성효소인 TH(Tyrosine hydroxylase), DAT(Dopamine transporter) 및 도파민 수송 단백질인 VMAT2(Vesicular monoamine transporter 2) 단백질의 발현량은 정상군 대비 파킨슨병 유도군에서 발현량이 감소하였고, 이에 대비하여 본 발명의 알파 시누클레인 항원을 투여한 경우 통계적으로 유의미하게 TH(Tyrosine hydroxylase), VMAT2(Vesicular monoamine transporter 2) 및 DAT(Dopamine transporter)의 발현량이 증가하였다(도 5).

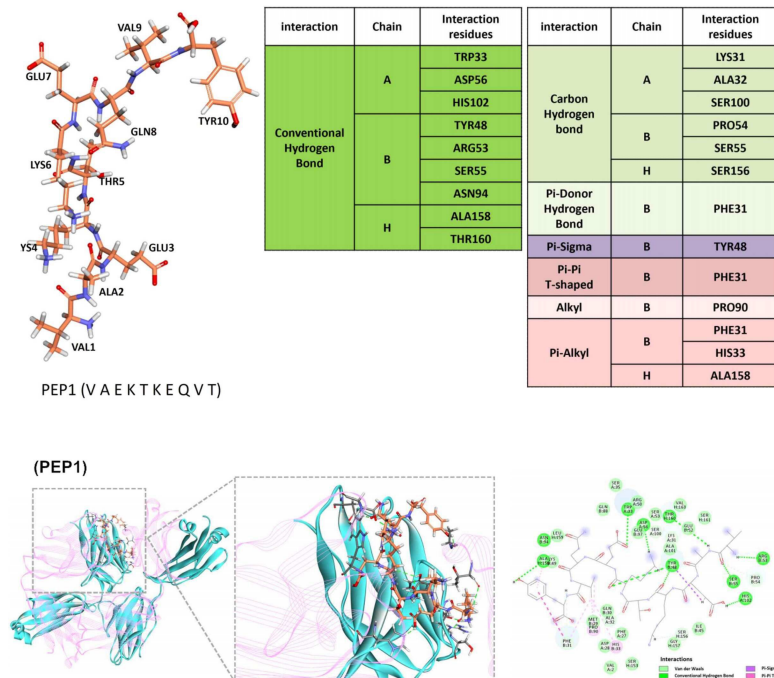
[0068] 실시예 7. 파킨슨병 모델의 비장과 혈장에서의 IgG 레벨 확인

[0069] 본 발명의 알파 시누클레인 항원(PDE-OVA, PDE-KLH) 투여 시, 파킨슨병 모델의 비장과 혈장에서의 IgG 생성량 확인을 통해 항체 생성 정도를 평가하였고, 혈장(plasma) 내, IL-10 수치 확인을 통해 항체 생성에 따른 염증 정도를 평가하였다.

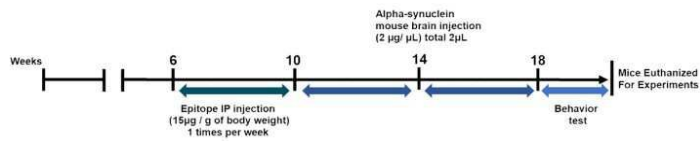
[0070] 그 결과 도 6에 개시한 바와 같이, 본 발명에서 선별된 항원(PDE-OVA, PDE-KLH) 투여 시, 비장과 혈장에서 IgG 수치가 증가한 것을 확인하였다. 이를 통해 선별된 항원이 B 세포에 결합하여 알파 시누클레인 항체를 생성한 것으로 판단하였고, 혈장 내 IL-10 수치의 감소를 통해 항체 생성에 의해 염증 수치가 감소한 것으로 판단하였다.

도면

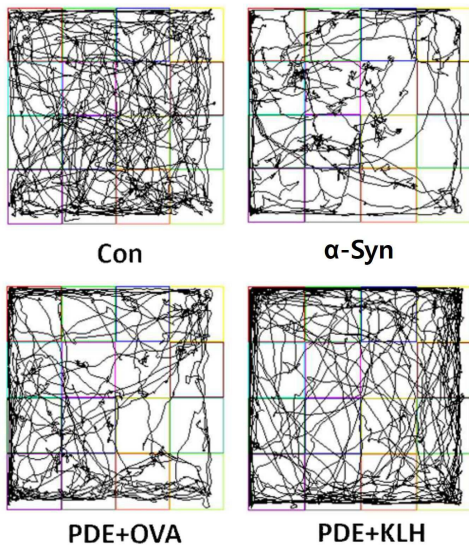
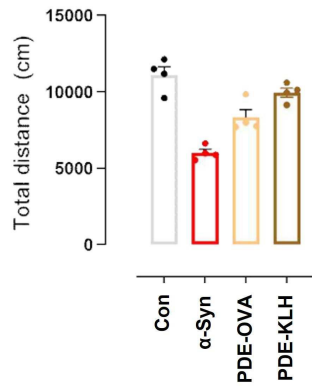
도면1



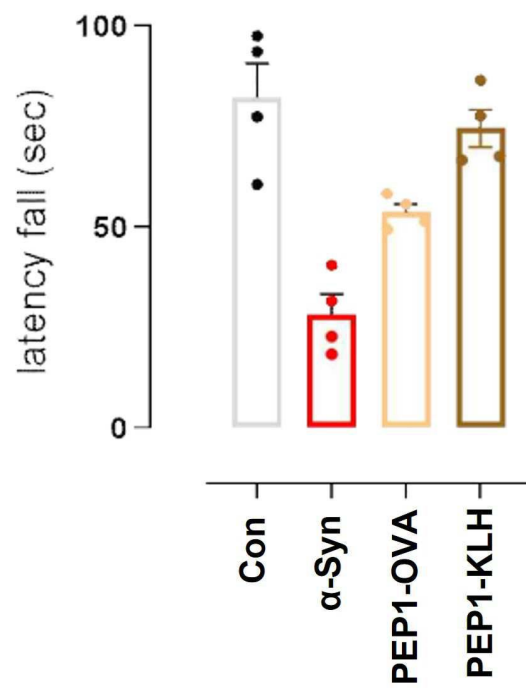
도면2



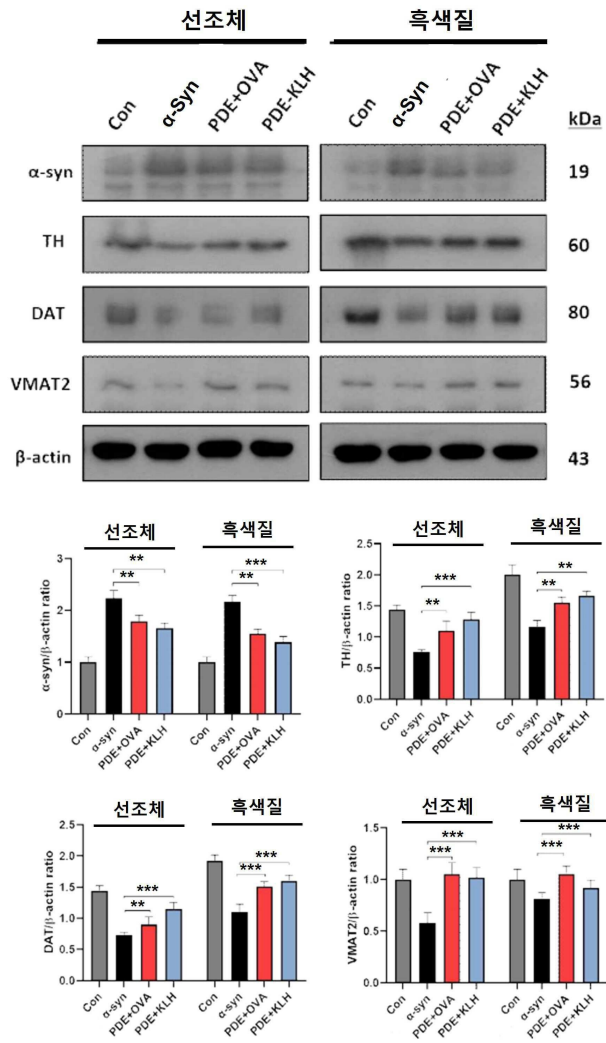
도면3



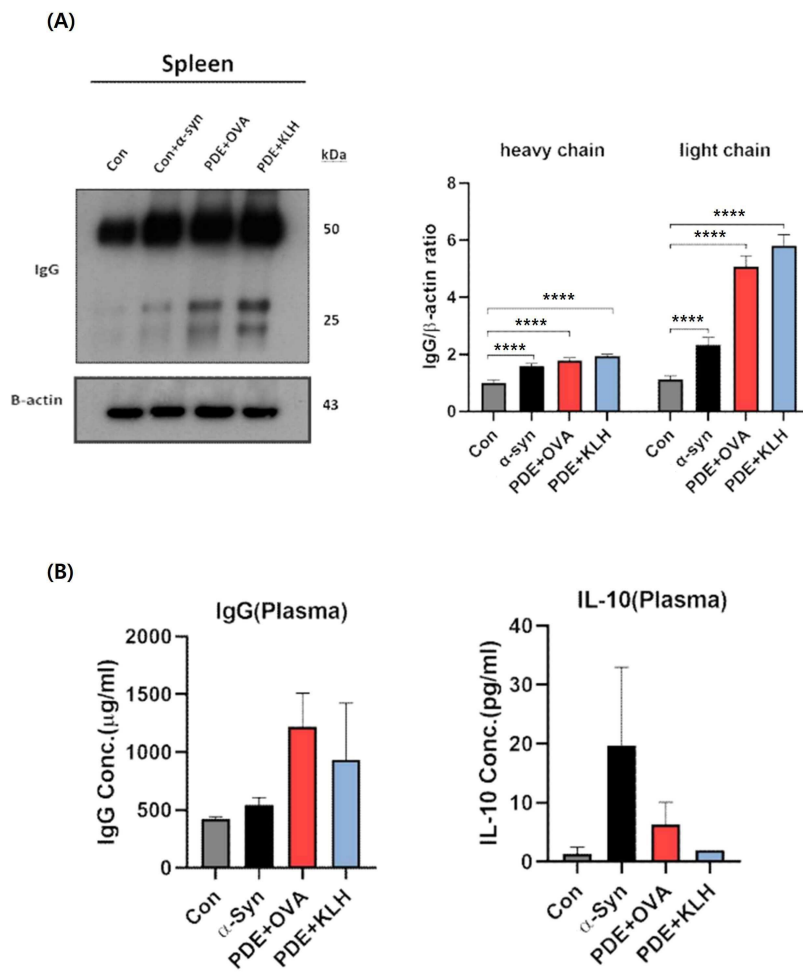
도면4



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.