(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월16일
(11) 등록번호 10-1473153
(24) 등록일자 2014년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0052788
(22) 출원일자 2014년04월30일
심사청구일자 2014년04월30일
(56) 선행기술조사문헌
WO2008089961 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
선웅
서울특별시 노원구 덕릉로71길 30, 205동 1501호 (중계동, 양지대림아파트)
최소연
서울특별시 노원구 덕릉로76길 29, 402동 508호(중계4동, 주공4단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

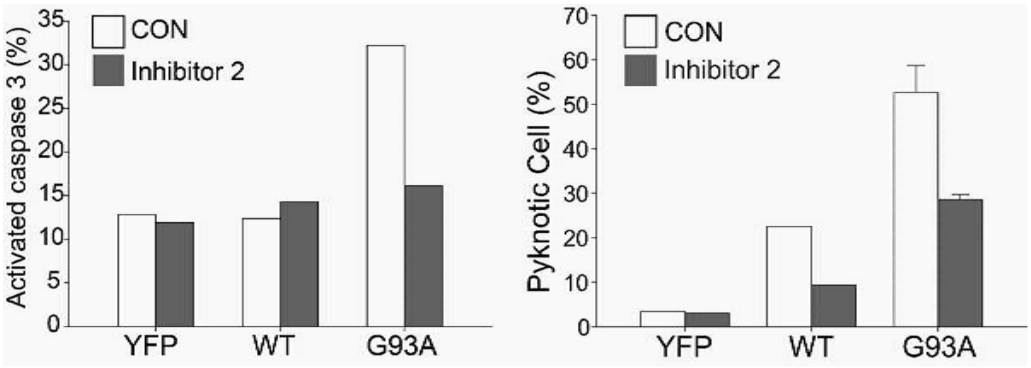
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **프로테인 포스파타아제 저해제 2의 신규 용도**

(57) 요 약

본 발명은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료와 관련한 프로테인 포스파타아제 저해제 2의 신규 용도를 제공한다. 본 발명에 따른 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터는 신경세포에서 나타나는 미토콘드리아의 단편화를 정상수준의 미토콘드리아 길이로 회복할 수 있을 뿐만 아니라, 신경세포의 세포사멸을 억제할 수 있다. 따라서, 이들은 근위축성측삭경화증을 비롯한 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료, 및 치료제 스크리닝을 위해 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도10



(72) 발명자

박해철

경기 안산시 단원구 고잔1동, 516번지 고려대학병원 1동 3511호 고잔 의과학연구소

김현

서울특별시 광진구 뚝섬로34길 67, A동 2901호(자양3동, 광진트라팰리스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012M3A9C6049933
부처명	미래과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발사업
연구과제명	성장, 대사, 환경 조절을 통한 신경줄기세포 재생최적화 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.10.01 ~ 2017.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 근위축성측삭경화증의 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질을 시험관 내에서 후보물질과 접촉시키고,

상기 후보물질이 상기 단백질의 기능 또는 활성을 증가시키는지 또는 감소시키는지를 판단하는 것을 포함하는

근위축성측삭경화증의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

청구항 6

프로테인 포스파타아제 저해제 2 유전자 또는 이를 발현하는 세포를 시험관 내에서 후보물질과 접촉시키고,

상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 증가시키는지 또는 감소시키는지를 판단하는 것을 포함하는

근위축성측삭경화증의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료와 관련한 프로테인 포스파타아제 저해제 2의 신규 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미토콘드리아는 지속적인 융합과 분열을 반복하며 세포질에 그물망 형태로 존재하면서, 세포 호흡을 통하여 세포의 생존에 필요한 에너지를 생산하는 세포내 소기관이다. 미토콘드리아는 세포내 에너지 대사의 중추이므로 미토콘드리아의 기능 이상은 다양한 질병을 유발한다. 미토콘드리아의 기능 이상에 의해 발생하는 질병으로는 근위축성측삭경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병과 같은 퇴행성 뇌질환을 들 수 있다.

[0003] 예를 들어, 근위축성측삭경화증의 병리적 현상 중, 운동신경세포내의 대표적인 특징 중 하나는 세포 내 에너지 생산을 담당하는 미토콘드리아의 기능 및 형태학적 변형이다. 근위축성측삭경화증의 병리적 현상이 일어나기 이전 시기부터 미토콘드리아의 비정상적인 단편화는 일어나기 시작하고, 이로 인해 미토콘드리아의 기능 저하뿐만 아니라, 더 나아가 세포 내 대사활동에 영향을 미치게 된다. 이러한 미토콘드리아의 비정상적인 형태적 변화는 근위축성측삭경화증 뿐만 아니라, 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머에서도 나타난다고 알려져 있다. (Hirai et al, J Neurosci, 21(9):3017-23, 2001; Santos et al, J Alzheimers Dis, 20:S401-12, 2010) 이러한 미토콘드리아의 형태적 변형은 대표적으로 Dynamin related protein 1 (DRP1)라는 단백질에 의해서 조절 받는다고 알려져 있

다. 최근 보고된 바에 따르면, 알츠하이머 모델 생쥐뿐만 아니라, 알츠하이머 환자의 대뇌 피질 조직에서 미토콘드리아의 형태 변형 단백질인 DRP1의 활성이 증가한다는 보고가 있다. (manczak et al, Hum Mol Genet, 21(11):2538-47) 게다가, DRP1의 비정상적인 활성은 축삭 내의 미토콘드리아의 기능을 저하시키고, 이로 인해 신경세포에 중요한 신경돌기의 성장을 방해하여 세포사멸을 유도한다는 보고 또한 있다. (Choi et al, FASEB, 27(1):51-62, 2013) 따라서 미토콘드리아의 비정상적인 형태적 변화는 미토콘드리아의 재생과 분열, 세포내의 이동과 분포에 밀접한 관련이 있으며, 이러한 형태적 변화와 관련된 단백질들의 비정상적인 활성은 신경세포의 손상을 초래할 수 있다(Su et al, Mol Neurobiol, 41(2-3):87-96, 2010).

[0004] 하지만, 현대의학의 발달에도 불구하고 아직까지 이러한 퇴행성 뇌질환의 병리기전조차 명확히 밝혀지지 않았고, 단지 증상의 진행을 늦추거나 완화시키는 수준에 머물러 있다. 현재 근위축성측삭경화증에 대해 FDA 승인을 받은 릴루졸(riluzole)이 유일하다. 하지만, 릴루졸은 근위축성측삭경화증에 대해 치료 효과를 나타내기보다는 수명을 연장시키는 수단에 불과하다. 따라서 퇴행성 뇌질환에 대한 발병 기전의 이해에 바탕한 조기 진단 및 치료법의 개발이 절실하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명에서는 퇴행성 뇌질환의 발병을 초기 단계에서 차단할 수 있는 새로운 치료제 및 이를 발굴하기 위한 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 미토콘드리아는 세포 내 에너지 생성을 위한 소기관으로, 근위측성측삭경화증, 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환에서 비정상적인 형태를 나타낸다. 미토콘드리아의 형태적 변화는 미토콘드리아의 질적, 양적 변화의 항상성을 유지하기 위한 매우 중요한 과정 중 하나이다.

[0007] 이에 본 발명에서는 퇴행성 뇌질환에 대한 치료제 발굴을 위해 미토콘드리아의 형태를 조절할 수 있는 후보물질을 탐색하는데 초점을 맞추었다.

[0008] 그 결과, 프로테인 포스파타아제 저해제 2가 미토콘드리아의 형태적, 기능적 변형과 신경계질환에 의한 세포 내 단백질의 변성을 억제하여 세포의 대사적 메카니즘의 흐름을 정상화함으로써 퇴행성 뇌질환에 대한 치료 효과를 나타낸다는 점을 확인하였다.

[0009] 따라서, 프로테인 포스파타아제 저해제 2의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료, 및 이에 대한 치료제 발굴에 활용할 수 있다.

[0010] 그러므로, 본 발명은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터의 의약적 용도, 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물, 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 유효량으로 대상체에 투여하는 것을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질의 처리 시 근위축성측삭경화증을 유발하는 돌연변이 유전자를 갖는 세포에서 발생한 미토콘드리아의 단편화를 정상 수준으로 회복시키고, 세포사멸을 억제함을 알 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질의 처리시 퇴행성 뇌질환 모델에서의 신경세포 사멸을 억제하는 것으로 확인되었다.

[0012] 따라서, 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료를 위한 유효성분으로 사용할 수 있다.

[0013] 본 발명의 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질은 천연형 또는 재조합 프로테인 포스파타아제 저해제 2, 이들과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질을 포함한다. 상기 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질에는 천연형/재조합 프로테인 포스파타아제 저해제 2와 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다.

[0014] 상기 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질의 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실

또는 부가된 아미노산 서열 변형체로서 천연형 프로테인 포스파타아제 저해제 2와 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다.

[0015] "기능적 유도체"는 상기 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질로서 천연형 프로테인 포스파타아제 저해제 2와 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 것을 의미한다.

[0016] 본 발명의 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질은 포유동물, 바람직하게는 인간, 생쥐, 랫트 등으로부터 기원하는 단백질이며, 예컨대, 사람 유래의 GenBank accession no. NM_006241 등으로 공지된 서열을 가진 단백질을 말한다. 본 발명의 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질은 이들 공지의 서열로부터 당업자에게 공지된 유전공학적 방법으로 제조할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0017] 천연형의 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질은 유전자 재조합 방법에 의하여 단백질을 제조하는 경우 대장균(E.coli)이나 곤충 세포를 이용하는 것보다 포유동물 세포를 이용하는 경우가 단백질의 활성도나 용해성 측면에서 천연형의 것과 유사할 것으로 여겨진다.

[0018] 상기 재조합 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질은 통상의 컬럼 크로마토그라피 방법 등을 이용하여 분리할 수 있다. 또한 단백질의 정제 정도는 소듐 도데실 술페이트-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE))등으로 확인할 수 있다.

[0019] 본 발명의 조성물은 또한 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 사용할 수 있다.

[0020] 본 발명에서, "발현벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 상기 발현 벡터는 예를 들어 바이러스 벡터일 수 있다. 더욱 바람직하게는 유전자 전달의 높은 효율, 미분화세포로 유전자를 전달하는 능력 및 높은 역가의 바이러스 저장물 제조의 용이성을 가지는 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 아데노바이러스 벡터는 복제에 필수적인 일련의 유전자들을 삭제시키고, 프로모터 활성의 수준이 높은 사이토메갈로바이러스(CMV) 또는 로우스 사르코마 바이러스(RSV) 프로모터를 넣어 치료 목적 단백질의 생체 내에서의 높은 발현을 유도할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 "프로모터"는 적당한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 다른 핵산 서열의 발현을 조절하는 핵산 서열을 의미하며, 본 발명에서 "작동가능하게 연결(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0022] 상기 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있으며, 바람직하게는 특정한 조직에서 특이적으로 활성화될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 신경세포에 대해 특이적으로 활성화되는 프로모터(예컨대, HB9)일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 용어 “퇴행성 뇌질환”은 예를 들어 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병과 같이 미토콘드리아의 형태 변형으로 인해 세포사멸이 일어나는 질환을 모두 포함한다.

[0024] 본 발명에 따른 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터는 공지의 퇴행성 뇌질환에 대한 치료제와 병행하여 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 의약 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, '약제학적으로 허용가능한 담체'는 투여용 약제학적 활성 화합물을 제형화할 경우에 유용하고 사용 조건하에 사실상 비독성 및 비민감성인 공지된 약제학적 부형제를 의미한다. 이러한 부형제의 정확한 비율은 유효성분의 용해도와 화학적 특성, 선택된 투여경로뿐만 아니라, 표준 약제학적 관행에 의해 결정된다.

[0026] 한편, 본 발명에 있어서, '대상체'는 특정 질병, 장애 또는 질환에 걸린 포유동물과 같은 온혈 동물을 의미하며, 예를 들어, 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이

들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 또한 '치료'는 증상을 경감시키거나, 증상의 원인을 일시적 또는 영구적으로 제거하거나 증상의 출현 및 상기한 질병, 장애 또는 질환의 진행을 예방 또는 둔화시키는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 치료를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝을 위한 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질의 용도, 상기 단백질을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝용 조성물, 및 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질을 시험관 내에서 후보물질과 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 단백질의 기능 또는 활성을 증가시키는지 또는 감소시키는지를 판단하는 것을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0030] 마찬가지로, 본 발명은 또한 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝을 위한 프로테인 포스파타아제 저해제 2 유전자의 용도, 상기 유전자 또는 이를 발현하는 세포를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝용 조성물, 및 프로테인 포스파타아제 저해제 2 유전자 또는 이를 발현하는 세포를 시험관 내에서 후보물질과 접촉시키고, 상기 후보물질이 상기 유전자의 발현을 증가시키는지 또는 감소시키는지를 판단하는 것을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0031] 상기 단백질 또는 유전자와 후보물질 간의 반응 확인은 단백질-단백질, 단백질-화합물, DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질, DNA-화합물, RNA-단백질, RNA-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다. 예를 들면, 생체 외부에서(in vitro) 상기 유전자와 후보 물질 사이의 결합 여부를 확인하기 위한 혼성화 시험, 포유류 세포와 시험대상물질을 반응시킨 후 노던 분석, 정량적 PCR, 정량적 실시간 PCR 등을 통한 상기 유전자의 발현율 측정 방법, 또는 상기 유전자에 리포터 유전자를 연결시켜 세포 내로 도입한 후 시험대상물질과 반응시키고 리포터 단백질의 발현율을 측정하는 방법, 상기 단백질과 후보 물질을 반응시킨 후 활성을 측정하는 방법, 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), Idbf 단백질에 결합하는 파지 디스플레이 펩티드 클론(phage-displayed peptide clone)의 검색, 천연물 및 화학물질 라이브러리(chemical library) 등을 이용한 HTS(high throughput screening), 드럭 히트 HTS(drug hit HTS), 세포 기반 스크리닝(cell-based screening), 또는 DNA 어레이(DNA array)를 이용하는 스크리닝법 등을 사용할 수 있다.

[0032] 상기 스크리닝용 조성물은 상기 단백질 또는 유전자 외에도, 핵산 또는 단백질의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다. 또한 상기 스크리닝용 조성물은 생체 내(in vivo) 실험을 위해, 상기 단백질 또는 유전자를 발현하는 세포, 또는 전사율을 조절할 수 있는 프로모터 하에 상기 유전자를 발현하는 플라스미드를 함유하는 세포 등을 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 시험대상물질은 통상적인 선정방식에 따라 신경세포에 대한 조절 기능을 가진 의약으로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 펩타이드, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.

[0034] 본 발명에서 유전공학적 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따른 프로테인 포스파타아제 저해제 2 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 상기 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현벡터는 신경세포에서 나타나는 미토콘드리아의 단편화를 정상수준의 미토콘드리아 길이로 회복할 수 있을 뿐만 아니라, 신경세포의 세포사멸을 억제할 수 있다. 따라서, 이들은 근위축성측삭경화증을 비롯한 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 근위축성 측삭 경화증 모델인 SOD1 G93A 생쥐의 척수에서 병리적 현상이 나타나기 이전 시기에, 프로테인 포스파테아제 1의 활성이 증가함을 나타낸 것이다.

도 2는 근위축성 측삭 경화증 모델인 SOD1 G93A 생쥐의 척수에서 병리적 현상이 나타나기 이전 시기에, 면역조직화학법으로 운동신경세포에서 프로테인 포스파테아제 1의 활성이 증가함을 나타낸 것이다.

도 3은 운동신경세포에 특이적으로 프로테인 포스파테아제 1의 발현이 높음을 나타낸 것이다.

도 4는 DRP1의 인산화가 병리적 현상 이전 시기에 감소되었음을 나타낸 것이다.

도 5는 감소된 DRP1의 인산화가 운동신경세포 내에 특이적으로 나타난 것을 보여준다.

도 6은 DRP1의 탈인산화는 PP1과 PP2A에 의해서 일어남을 나타낸 것이다

도 7은 SOD1 G93A에 의해 유도된 DRP1의 탈인산화는 PP1과 PP2A 억제제를 처리함으로써 억제될 수 있음을 나타낸 것이다.

도 8은 DRP1의 탈산화는 PP1에 의해서 일어남을 나타낸 것이다.

도 9는 돌연변이 SOD1 G93A에 의해 유도되는 미토콘드리아 단편화에 대한 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 억제효과를 나타낸 것이다.

도 10은 돌연변이 SOD1 G93A에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 억제효과를 나타낸 것이다.

도 11은 돌연변이 SOD1 G93A에 의해 유도되는 신경돌기의 변성을 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2가 감소시킴을 나타낸 것이다.

도 12는 근위축성축삭경화증 모델인 제브라피쉬 모델 (SOD1 G93A, TDP-43 Q331K)에서 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 효과를 나타낸 것이다

도 13은 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 Amyloid-beta에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 억제효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0038] **[실시예]**

[0039] **<실시예 1> 근위축성측삭경화증 동물 모델에서 발병 시기 프로테인 포스파테아제 1의 활성 증가**

[0040] 근위축성측삭경화증의 생쥐 모델인 SOD1 G93A를 이용하여, 병리적 증상이 나타나기 이전 시기에 프로테인 포스파테아제 1의 활성을 관찰하였다. SOD1 G93A 생쥐 모델은 태어난 지 90일정도가 되면 근위축성측삭경화증의 병리적 현상 중 하나인 하지반사(hindlimb reflex)의 저하 등이 나타나기 시작하는데, 그 이전 시기인 60일 생쥐의 척수를 적출하여 급속히 조직을 냉각시켰다. 프로테인 포스파테아제 1의 활성은 320번 아미노산의 인산화에 의하여 억제된다고 알려져 있다(Dohadwala *et al.*, *PNAS*, 91:6408-6412, 1994). 이에, 프로테인 포스파테아제 1의 활성을 알아보기 위하여, 척수의 허리부(lumbar level)를 분리하여 웨스턴블랏팅을 실시하였다.

[0041] 프로테인 프로파테아제 1의 비활성 상태를 나타내는 프로테인 포스파테아제 1의 인산화 정도를 웨스턴블랏팅을 통해 관찰하였다. 그 결과, 도 1A에서 볼 수 있는 바와 같이, 근위축성측삭경화증의 병리적 증상이 나타나기 이전 시기인 생후 60일부터 프로테인 포스파테아제 1의 단백질 발현 수준이 다소 낮아져 있었으나, 그 인산화 정도가 매우 낮아져 있는 것을 알 수 있었으며, 이에 따라서 조직 내 프로테인 포스파테아제 1의 활성화 수준이

SOD1 G93A 그룹에서 다소 높아져 있음을 알 수 있었다.

[0042] 프로테인 포스파테아제 1의 활성 정도를 직접적으로 측정하기 위하여, 병리현상이 나타나기 시작한 생쥐의 허리 부 부위의 척수를 적출하여, -80도의 아이소펜탄에서 급속히 냉각시켰다. 얼린 척수 조직은 프로테인 포스파테아제 1의 활성을 측정하기 위한 완충용액에 넣은 뒤, 조직분쇄기와 초음파분쇄기를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄된 조직에 프로테인 포스파테아제 1의 기질을 넣어준 뒤 효소 활성을 측정하였다. 그 결과, 도 1B에서 볼 수 있는 바와 같이, 근위축성측삭경화증 생쥐의 척수에서 프로테인 포스파테아제 1의 활성이 대조군에 비하여 월등히 높아져 있음을 알 수 있었다.

[0043] 척수에는 근위축성 측삭 경화증에 의해서 주로 손상 받는 운동신경세포뿐만 아니라, 개재뉴런(interneuron), 아교세포(astrocytes), 희소돌기교세포(oligodendrocytes) 등이 포함되어있어, 운동신경세포에서의 프로테인 포스파테아제 1의 활성을 직접적으로 알 수 없다. 그러므로 면역조직화학법을 이용하여 운동신경세포의 프로테인 포스파테아제 1의 인산화 정도를 분석, 운동신경세포에서 그 활성화 정도를 간접적으로 조사하였다.

[0044] 면역조직화학법을 이용하기 위해서, 60일된 야생형 및 SOD1 G93A 생쥐에 우레탄 5cc/100g을 복강 주사하여 마취를 실시하였고, 흉부 부위를 절개하여 좌심방에 링거 바늘을 꽂아 0.9% 생리식염수 100 ml 정도를 관류하여 혈액을 제거하였다. 이 후 4% 파라포름알데하이드가 포함된 인산완충식염수를 심장을 통해 몸 전체로 흘려 보낸 뒤, 척수를 적출하여, 48시간 동안 4% 파라포름알데하이드가 포함된 인산완충식염수에서 후고정을 실시하였다. 고정된 조직은 30% 설탕이 포함된 인산완충식염수에 넣은 뒤, 48시간 동안 처치하였다. 이 후 척수 조직은 OCT 합성물과 함께 주형물에 넣은 뒤 드라이 아이스 위에서 얼렸으며, 실험에 사용되기 전까지 -80도에서 보관하였다. 얼려진 조직은 냉동절편기계에 의해 40 um의 두께로 절편 하였으며, 3% 소혈청 알부민이 포함된 PBS-T (1% triton X-100이 포함된 인산완충식염수)에 30분간 처치하여 비특이성 결합을 억제하였다. 다음으로 조직을 인산화된 프로테인 포스파테아제 1을 표지하는 항체(p-PP1)와 운동신경세포를 표지하는 ChAT 항체를 포함한 블로킹 액체에 24시간 동안 처리하여 일차항체반응을 수행하였다. 일차항체반응이 끝난 조직은 인산완충식염수로 세 차례 씻어낸 후, FITC-anti Rabbit과 Cy3-anti goat IgG를 이용하여 2차 항원-항체반응을 30분 동안 실시하였다. 이차항체반응이 끝난 뒤, 조직은 다시 인산완충식염수로 3차례 씻어내고, 슬라이드 글라스 위에 편평하게 봉입하고, 10분간 상온에서 건조 한 뒤, crystal mount 용액을 도포한 뒤 커버슬라이드로 덮어 표본을 준비하였다. 준비된 표본은 형광 표지 신호를 레이저공초점현미경(Cal Zeiss LSM 700 microscope)을 이용하여 관찰하였다.

[0045] 실험 결과, 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이 생후 60일된 SOD G93A 생쥐의 운동신경세포에서 인산화된 프로테인 포스파테아제 1의 발현 정도가 정상생쥐의 발현보다 낮음을 알 수 있었다. 이러한 프로테인 포스파테아제 1의 인산화 변화는 병리적 증상이 일어나기 시작한 생후 90일째에도 계속 유지되었다. 또한 도 3에서도 보여지듯이, 총 프로테인 포스파테아제 1을 표지 할 수 있는 항체를 이용하여 발현부위를 알아본 결과, 흥미롭게도 운동신경세포에서 매우 강하게 발현되고 있음을 알 수 있었다. 이는 근위축성측삭경화증에서 운동신경세포가 프로테인 포스파테아제 1의 활성 변화에 다른 세포에 비하여 보다 민감할 가능성을 시사한다. 이처럼 정상 생쥐보다 근위축성측삭경화증 생쥐의 운동신경세포에서 프로테인 포스파테아제 1의 활성이 증가되어 있으므로, 그 하위에 있는 다양한 단백질의 번역 후 변화에 영향을 미칠 것으로 예상할 수 있으며, 이는 운동신경세포의 퇴행 및 사멸에 원인을 제공할 가능성을 제기한다.

[0046] **<실시예 2> 근위축성측삭경화증 생쥐의 척수에서 인산화된 Dynamin related protein 1 (DRP 1)의 감소**

[0047] 미토콘드리아는 전자전달계를 통한 세포호흡의 기능이 감소할 때 단편화 등 형태적 변화가 일어나고, 직접적으로 형태적 변화를 일으키는 단백질의 활성을 억제하였을 때도 미토콘드리아의 막전위가 탈분극이 관찰되는 등 그 기능과 형태간의 긴밀한 관련이 보고된 바 있다(Choi *et al.*, *FASEB*, 27:51-62, 2013; Dickey and Strack, *J Neurosci*, 31:15716-15726). 미토콘드리아의 형태적 변화를 일으키는 핵심적인 단백질은 DRP1이다(Praefcke and McMahon, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5:133-147, 2004). 최근 보고에 따르면, 근위축성 측삭 경화증 동물모델의 초기에 미토콘드리아의 단편화가 진행됨이 관찰된 바 있으며(Boillee *et al*, *Neuron*, 52:39-59, 2006), 세포배양 모델에서 DRP1의 활성을 억제하면, 미토콘드리아의 정상적인 길이 유지와 세포사멸을 억제한다는 보고가 있었다(Song *et al.*, *Neurobiol Dis*. 51:72-81, 2013). 따라서 근위축성측삭경화증 생쥐의 척수에서 미토콘드리아의 형태 변화에 관련된 단백질인 DRP1의 인산화 변화를 웨스턴블랏팅으로 확인하였다. <실시예 1>와, 동일한 방법으로 조직을 적출하였으며, SOD1 G93A 생쥐의 척수는 병리적 증상 진행에 따라 생후 60일, 90일, 200일에 시료를 채취하였다. SOD1 G93A 생쥐에서 DRP1의 인산화 감소는 프로테인 포스파타아제 1의 활성이 증가되는 생후 60일부터 관찰되었으며, 이는 프로테인 포스파타아제 1의 비정상적 활성 증가가 미토콘드리아

의 비정상적인 형태 변화와 기능적 저하를 유발할 가능성을 시사한다. 또한, Drp1 단백질의 인산화 변화가 프로테인 포스파타아제 1의 활성이 특이적으로 증대되는 운동신경세포 내에서 진행되는지 관찰하기 위하여, <실시예 1>과 동일한 방법으로 정상 생쥐와 SOD1 G93A 형질 전환 생쥐의 척수를 적출하여 면역조직화학법으로 분석하였다.

[0048] 실험 결과, 도 4와 도 5에서 보여지는 바와 같이 DRP1의 인산화는 SOD1 G93A 생쥐의 운동신경세포에서 선택적으로 감소되어 있음을 관찰하였다. 이는 근위축성측삭경화증의 비정상적인 프로테인 포트파타아제의 활성 증대가 Drp1 단백질을 조절하여, 미토콘드리아의 비정상적인 단편화와 미토콘드리아 전자절달계의 활성 감소를 일으킬 가능성을 시사한다.

[0049] **<실시예 3> 프로테인 포스파테아제 1의 DRP1 탈인산화 효과**

[0050] 미토콘드리아의 형태적 변화를 일으키는 DRP1의 탈인산화에 프로테인 포스파테아제 1이 작용하는지 조사하기 위해서, 선택적 포스파테아제 억제제를 대뇌피질 신경세포에 처리하였다. 대뇌피질의 신경세포를 배양하기 위해서 17일된 정상 생쥐의 배아를 꺼내어, 배아의 뇌를 적출한 뒤, HBSS (Hank's balanced salt solution) 용액 속에서 대뇌피질만을 분리하였다. 분리된 대뇌피질은 0.05% trypsin-EDTA을 처치하여 단일 세포로 분리하였으며, 분리된 대뇌피질 신경세포는 B27 (Gibco), 1% penicillin/streptomycin과 글루타민이 포함된 Neurobasal media (Gibco)에서 배양하였다. 배양 10일째 대뇌피질 신경세포는 프로테인 포스파테아제 1과 프로테인 포스파테아제 2B를 억제하는 오카다익산(Okadaic acid) 또는 켄사라이딘 (Cantharidine)을 각각 1시간 동안 처리한 후 DRP1의 인산화 정도를 관찰하였다.

[0051] 그 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, DRP1의 인산화는 각각의 약물의 농도에 따라 증가함을 나타내었고, 프로테인 포스파타아제1의 억제가 가능한 비교적 고농도에서 특히 인산화 증가 효과가 두드러졌다. 이는 DRP1의 탈인산화가 주로 프로테인 포스파테아제 1에 의하여 매개됨을 시사한다.

[0052] 또한, 배양된 신경세포에서 근위축성측삭경화증에 관련된 유전자 클론을 과발현시킨 후 DRP1 단백질의 인산화를 관찰하였다. 배양 10일째 신경세포에 GFP가 표지된 근위축성측삭경화증에 관련된 돌연변이 SOD1 유전자들(G93A, G85R, G37R)을 Lipofectamine 2000을 이용하여 과발현 시킨 후, 24시간뒤 켄사라이딘을 1시간동안 처리하였다.

[0053] 그 결과, 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, 켄사라이딘을 처리하지 않은 그룹에서 돌연변이 SOD1 클론들이 과발현된 신경세포에서는 DRP1의 인산화가 감소됨이 관찰된 반면, 켄사라이딘을 처리한 그룹에서는 DRP1의 인산화 감소가 강력히 억제됨이 관찰되었다.

[0054] 또한, 프로테인 포스파테아제 1만 억제할 수 있는 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2 단백질을 처리한 후 DRP1 단백질의 인산화 패턴을 웨스턴블롯을 통해 관찰한 결과, 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, DRP1의 인산화가 처치 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 따라서 DRP1의 탈인산화는 프로테인 포스파테아제 1에 의하여 매개되는 과정임을 확인하였다. .

[0055] **<실시예 4> 근위축성측삭경화증에 의해 유도되는 병리적 현상의 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2에 의한 감소**

[0056] 프로테인 포스파테아제 1의 비정상적 활성 억제가 근위축성측삭경화증에 대한 치료 효과가 있는지 검증하기 위하여 대뇌피질 신경세포를 배양한 후, 배양 9일 후에 미토콘드리아를 표지 할 수 있는 클론과 SOD1 G93A 돌연변이 유전자와 GFP가 부착된 융합유전자를 각각 신경세포에 유전자 도입한 뒤 24시간 후에 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정한 뒤 면역세포화학법을 실시하였다. 고정된 신경세포는 3% 소 혈청이 포함된 PBS-T(0.2% Triton X-100이 포함된 인산완충식염수)로 블롯킹을 실시한 후, GFP를 표지할 수 있는 일차항체를 이용하여 돌연변이 SOD1 단백질이 과발현된 세포를 표지하였다. 준비된 표본은 공초점 현미경 (Cal Zeiss LSM 510)를 이용하여 GFP가 표지된 세포의 미토콘드리아의 이미지를 얻었다.

[0057] 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, SOD1 G93A 유전자를 과발현시킨 신경세포의 미토콘드리아는 비정상적인 과단편화가 일어난 반면, 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2를 처리한 그룹에서는 미토콘드리아의 길이가 감소가 억제되어, 정상 수준으로 회복되는 것을 볼 수 있다.

[0058] 또한 면역세포화학법을 이용하여 아폽토시스에 의한 세포사멸의 표지자인 active-caspase 3 단백질의 발현과 핵응축이 나타난 세포의 수를 세어 세포사멸에 미치는 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 활성을 조사한 결과,

도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2를 처리한 그룹에서는 SOD1 G93A 유전자 과발현에 의해 일어나는 세포사멸이 유의하게 억제되는 것을 관찰하였다.

[0059] 근위축성측삭경화증 등 퇴행성 뇌질환과 밀접하게 관련된 병리적 현상 중 하나는 신경세포의 축삭변성이 일어나 신경망 기능에 장애가 발생하는 것이다. 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2에 대한 신경세포의 축삭변성 억제 효과를 조사하기 위하여, 일차배양한 신경세포에 SOD1 G93A 돌연변이를 과발현시킨 후 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2을 처리하고 24시간 뒤에 신경돌기의 형태를 관찰하였다. 신경세포는 도 7에서 시행한 면역세포화학법을 이용하여 돌연변이유전자와 함께 도입한 GFP 신호를 기반으로 신경돌기 형태를 계측하여 분석하였다. 획득한 신경돌기 이미지는 ImageJ 프로그램을 이용한 영상 분석을 통하여 길이를 계산하였다. 분석 결과, 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이, 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 처치는 SOD1 G93A 돌연변이 유전자 과발현에 의하여 일어난 축삭성장 장애를 유의하게 개선하였다.

[0060] 종합하면, 배양세포 모델에서 프로테인 포스파타아제 1의 억제는 신경세포의 미토콘드리아 단편화, 축삭성장 장애, 세포사멸 등 핵심적인 병리적 변성 현상을 모두 강력하게 개선하는 효과를 보였다.

[0061] **<실시예 5> 제브라 피쉬 근위축정측삭경화증 모델에서 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 질환 개선 효과**

[0062] 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 효과를 개체 수준에서 알아보기 위하여 제브라 피쉬 근위축성측삭 경화증 모델을 이용하였다. Human SOD1 G93A 돌연변이 클론을 Addgene에서 구매하여 T7 RNA 중합효소로 sense RNA를 합성하였다. 운동신경세포와 축삭의 가시화가 가능한 형질전환(olig2:egfp) 제프라 피쉬의 1 세포 단계의 배아를 생산하여, 각 배아에 1.76 ng의 합성한 RNA를 미세주사하였다. 이후 24시간 동안 배양된 배아에 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2를 20 - 30 nM의 농도로 배아 배양액에 처리하고, 2일간 추가 배양하였다. 이미지 분석은 3일 째 배아를 0.03% Tricaine (Sigma-Aldrich)로 마취시킨 후 0.8% low-melting agarose에 표본화하여 레이저 공초점주사현미경(LSM5 laser scanning confocal microscope, Zeiss)를 이용하여 수행하였다.

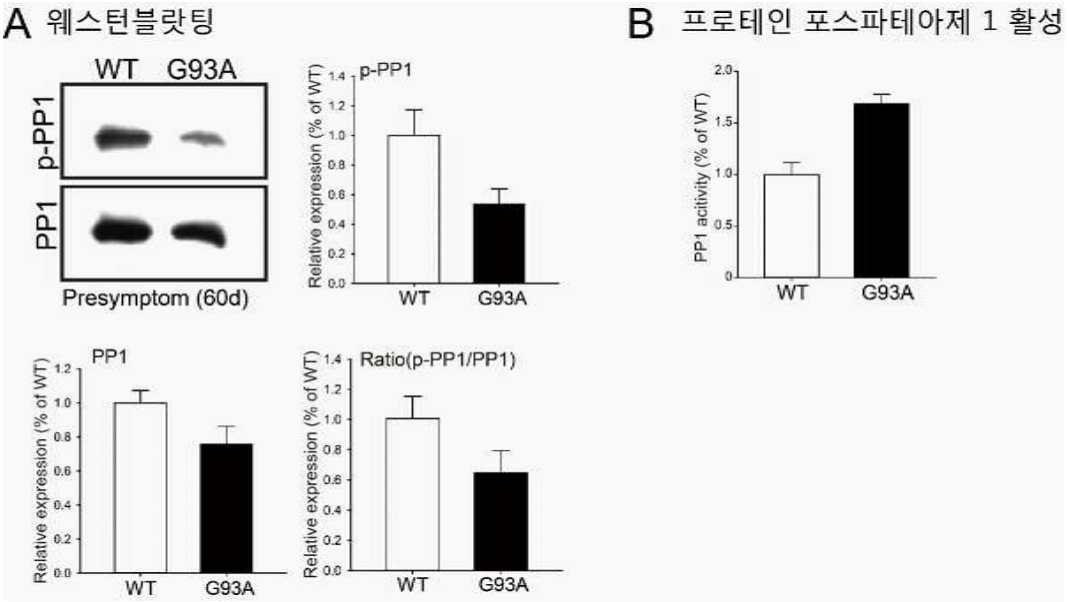
[0063] 그 결과, 도 12에서 볼 수 있는 바와 같이, SOD1 G93A를 과발현시킨 배아의 운동신경세포의 축삭의 경우 짧고 변성이 일어나고 신경근육접합 부위 또한 변성이 나타남을 알 수 있다. 뿐만 아니라, 등쪽으로 뻗은 운동신경세포의 축삭 또한 변성이 일어남을 볼 수 있다. 그러나 이러한 근위축성측삭경화증 모델에 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2를 처리한 그룹과 프로테인 포스파테아제 1의 화학적 억제제인 오까다익엑시드 (Okdaic acid)를 처리한 그룹에서 운동신경세포의 축삭 손상이 줄어들었음을 알 수 있다. 또한, 근위축성축삭경화증에 관련된 또 다른 유전자인 돌연변이TDP-43를 과발현시킨 제브라피쉬 모델에서도 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2를 처리한 그룹과 오까다익엑시드를 처리한 그룹에서 운동신경 세포의 축삭변성이 억제됨을 알 수 있었다. 이처럼, 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2는 근위축성측삭경화증의 병리적 현상인 미토콘드리아의 비정상적인 기능을 회복시키고, 이로 인해 축삭변성이 억제되어 운동신경세포의 기능적 향상과, 더 나아가 세포사멸을 억제하는 효과를 보인다.

[0064] **<실시예 6> 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 Amyloid-beta에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 억제 효과**

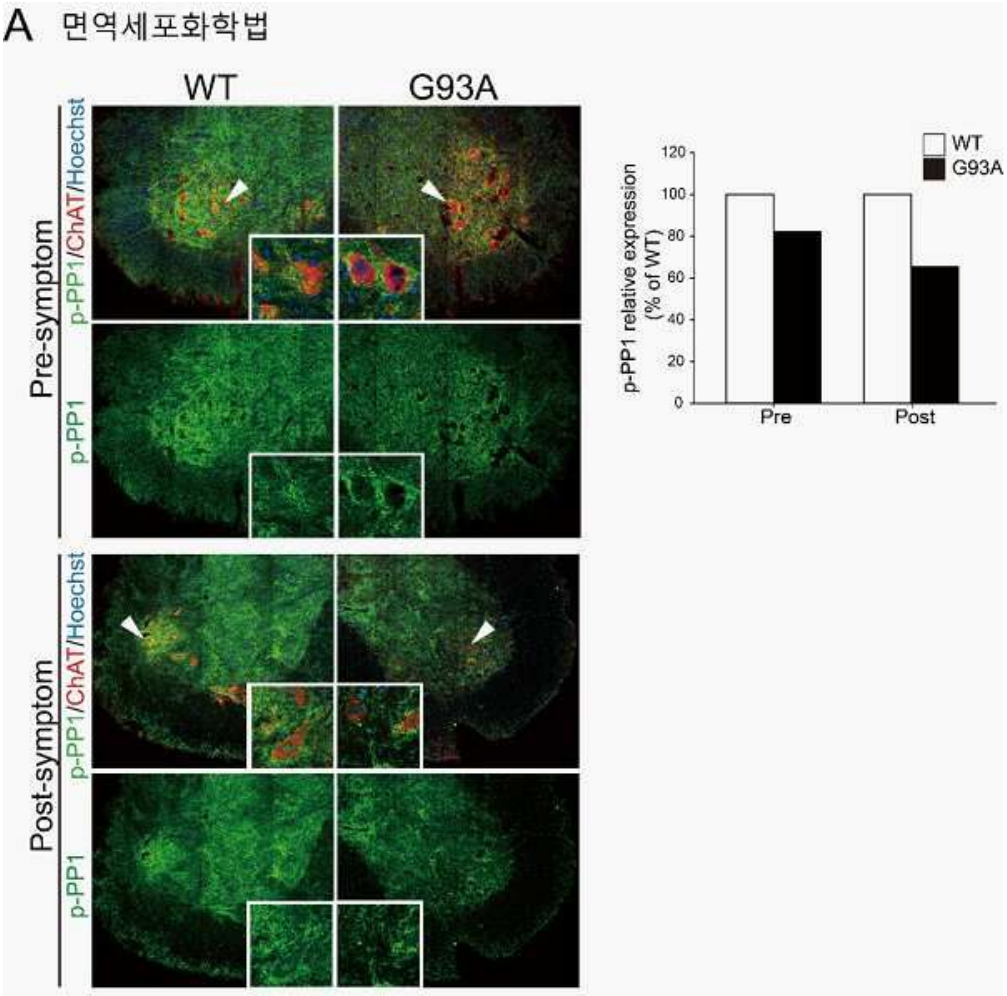
[0065] 알츠하이머 치매 관련 독성 단백질로 알려진 아밀로이드 베타 (1-42)를 배양신경세포에 처리하여 세포사멸을 유도한 뒤, 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2의 효과를 조사하였다. <실시예 3>과 같은 방법으로 세포를 배양시킨 뒤, 아밀로이드 베타 (A-beta)와 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2를 동시에 처리한 뒤 세포사멸을 관찰하였다. 세포사멸을 측정하기 위해서 세포사멸 표지자로 잘 알려진 active caspase 3 단백질의 발현을 면역세포화학법을 이용하여 검출하였고, 전체 세포 중 active caspase 3를 발현하고 있는 세포를 백분율로 표시하였다. 도 13에서 볼 수 있는 바와 같이, 아밀로이드-베타에 의해 유도되는 세포사멸은 프로테인 포스파테아제 1 억제제 2를 처리함으로써 감소되었다. 이와 같이 프로테인 포스파테아제 1 억제제는 근위축성측삭경화증 뿐만 아니라, 다양한 퇴행성 뇌질환에서도 신경세포 생존을 높이는 효과를 보임을 시사한다.

도면

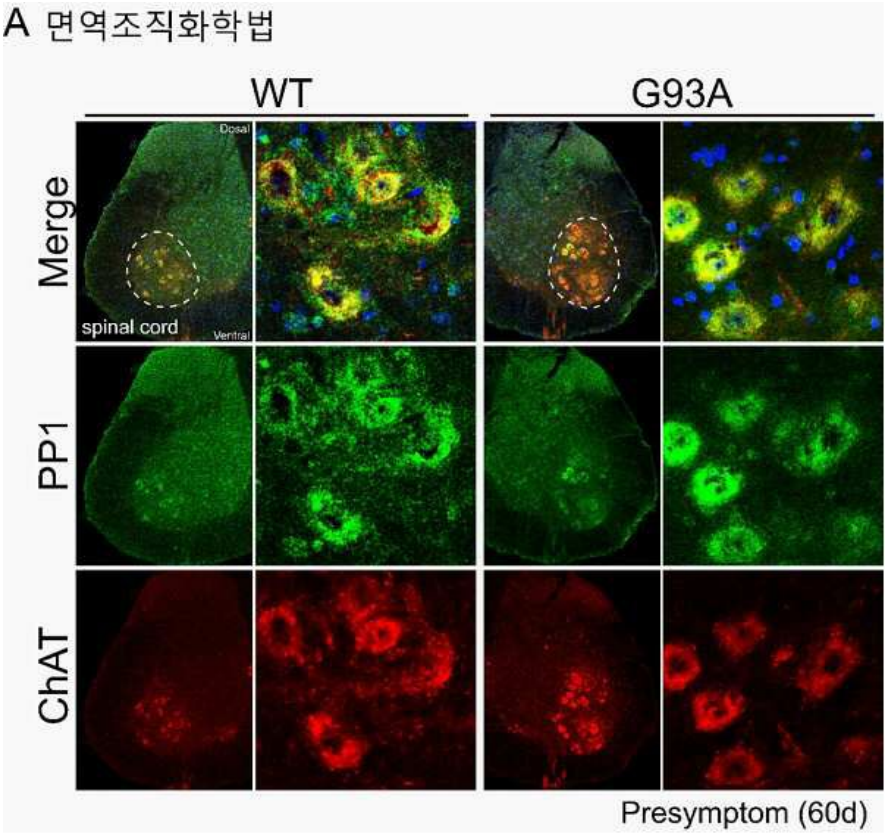
도면1


A 웨스턴블랏팅
WT G93A
p-PP1
PP1
Presymptom (60d)
p-PP1
Relative expression (% of WT)
WT G93A
PP1
Relative expression (% of WT)
WT G93A
Ratio(p-PP1/PP1)
Relative expression (% of WT)
WT G93A
B 프로테인 포스파테아제 1 활성
PP1 acitivity (% of WT)
WT G93A

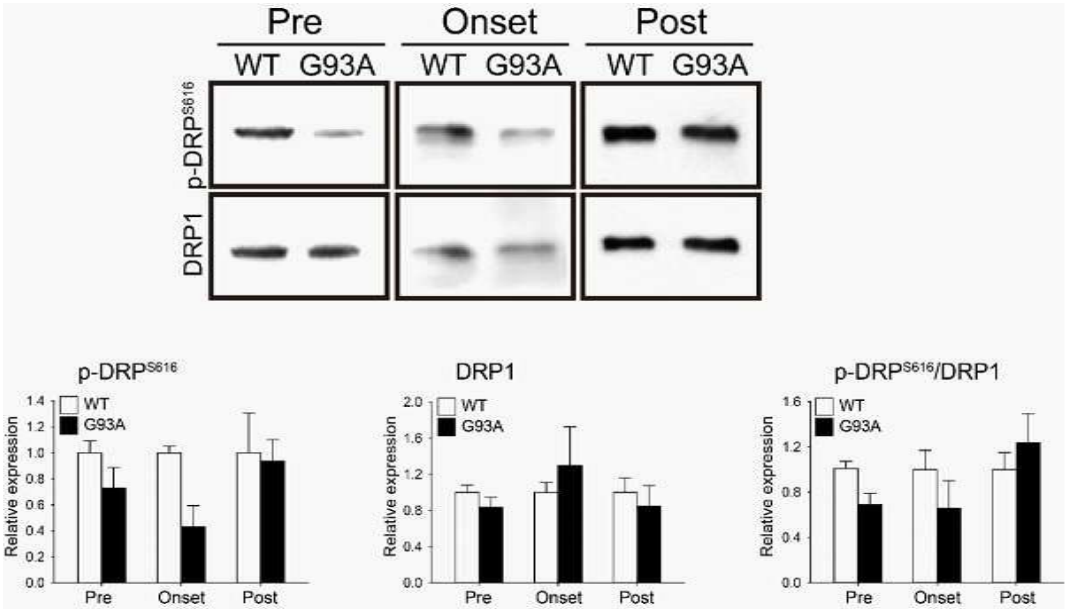
도면2


A 면역세포화학법
WT G93A
Pre-symptom
p-PP1/ChAT/Hoechst
p-PP1
Post-symptom
p-PP1/ChAT/Hoechst
p-PP1
p-PP1 relative expression (% of WT)
WT
G93A
Pre
Post

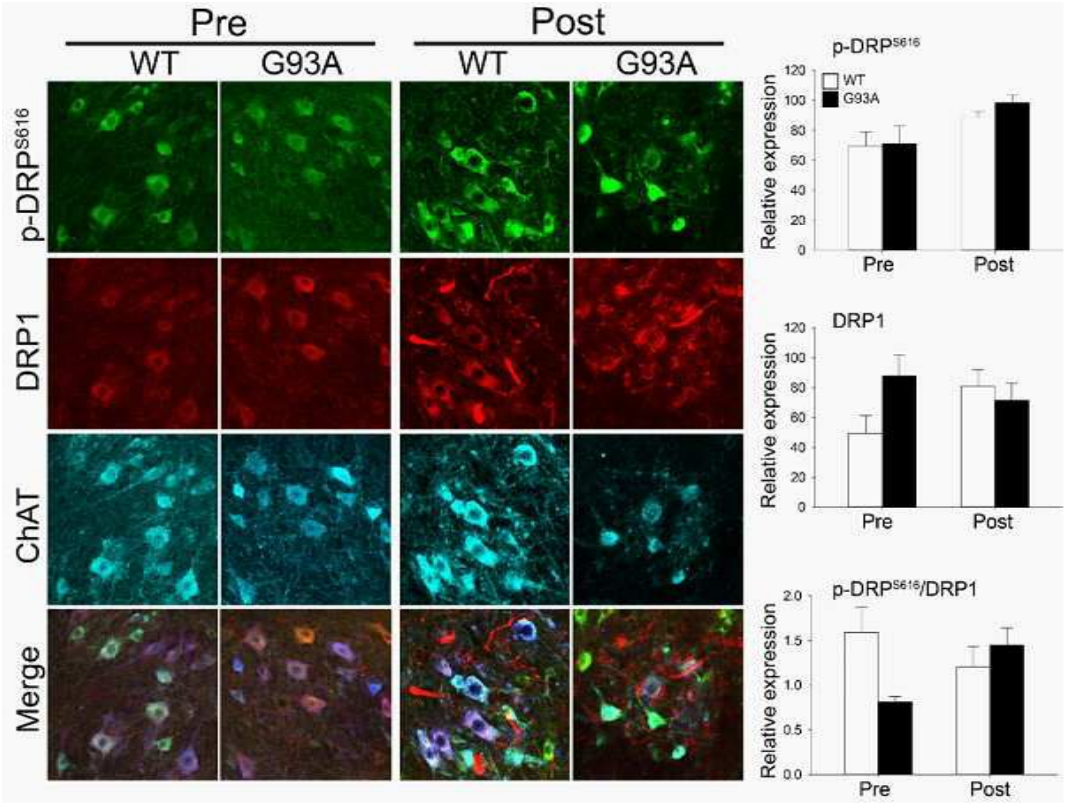
도면3


A 면역조직화학법
WT
G93A
Merge
PP1
ChAT
Dosal
spinal cord
Ventral
Presymptom (60d)

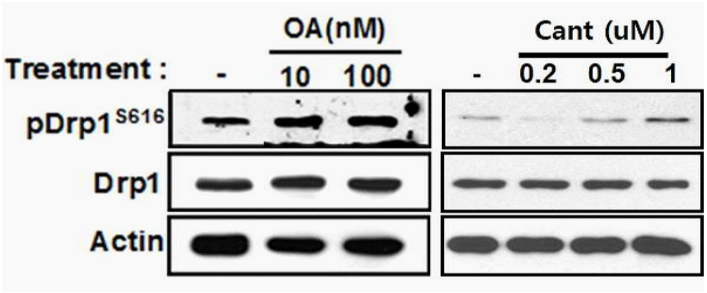
도면4


Pre
Onset
Post
WT G93A WT G93A WT G93A
p-DRP^{S616}
DRP1
p-DRP^{S616}
DRP1
p-DRP^{S616}/DRP1
Relative expression
WT
G93A
Pre
Onset
Post

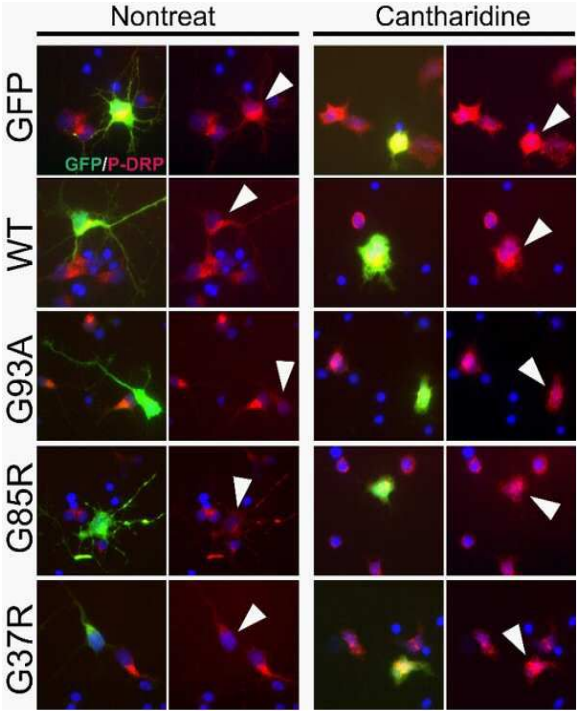
도면5


Pre
Post
WT
G93A
WT
G93A
p-DRP^{S616}
DRP1
ChAT
Merge
p-DRP^{S616}
WT
G93A
Relative expression
Pre
Post
DRP1
p-DRP^{S616}/DRP1

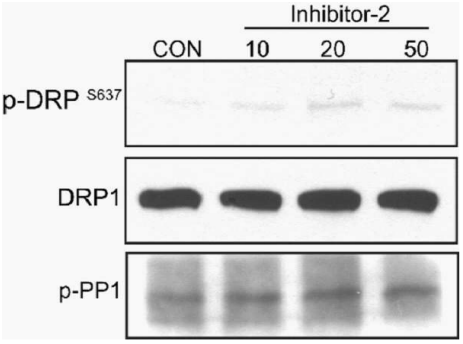
도면6


OA(nM)
Cant (uM)
Treatment :
-
10
100
-
0.2
0.5
1
pDrp1^{S616}
Drp1
Actin

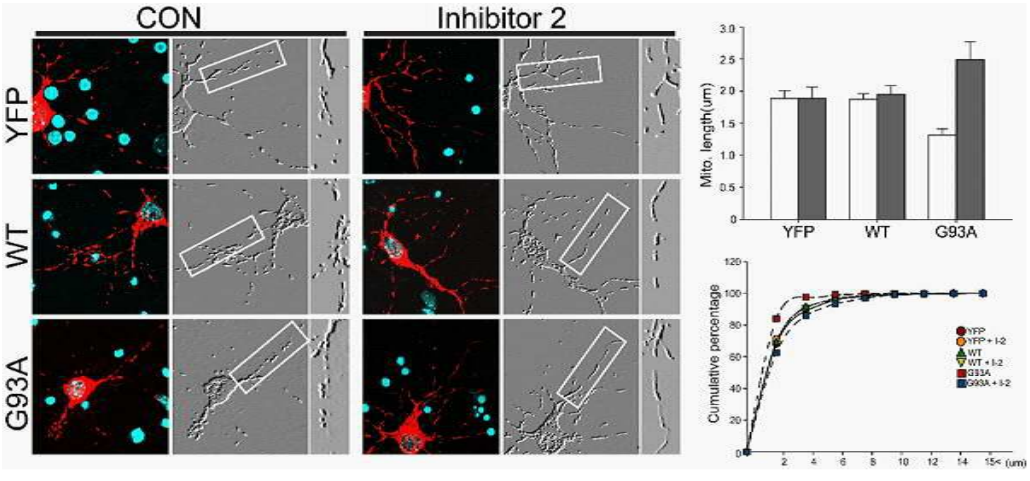
도면7


Nontreat
Cantharidine
GFP
WT
G93A
G85R
G37R
GFP/P-DRP

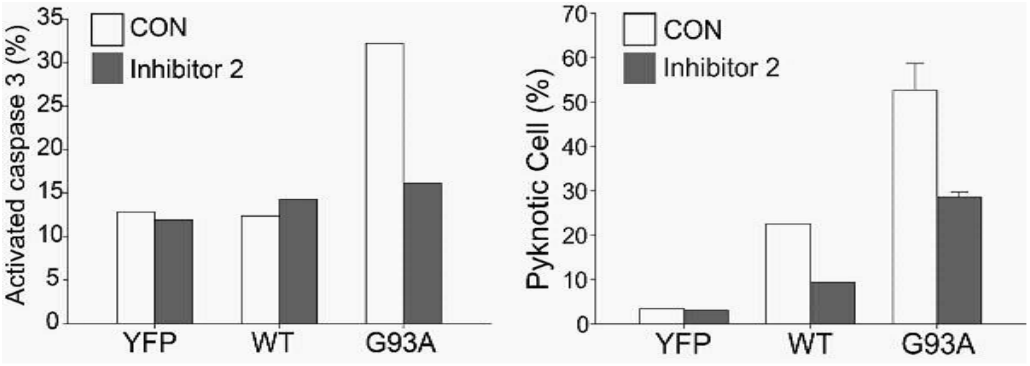
도면8


Inhibitor-2
CON
10
20
50
p-DRP S637
DRP1
p-PP1

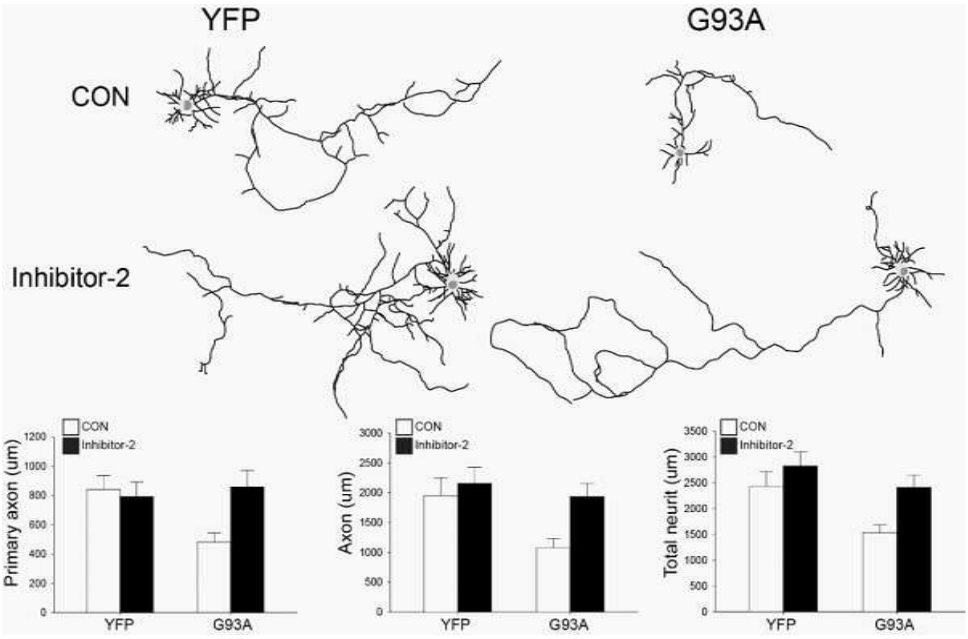
도면9


CON
Inhibitor 2
YFP
WT
G93A
Mito. length(um)
YFP
WT
G93A
Cumulative percentage

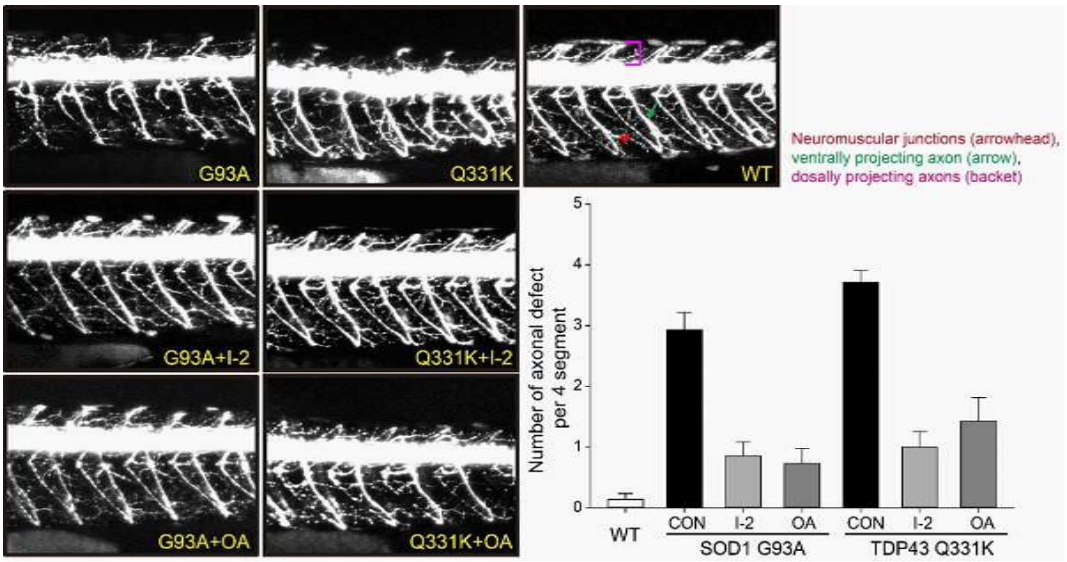
도면10


Activated caspase 3 (%)
CON
Inhibitor 2
YFP
WT
G93A
Pyknotic Cell (%)
CON
Inhibitor 2
YFP
WT
G93A

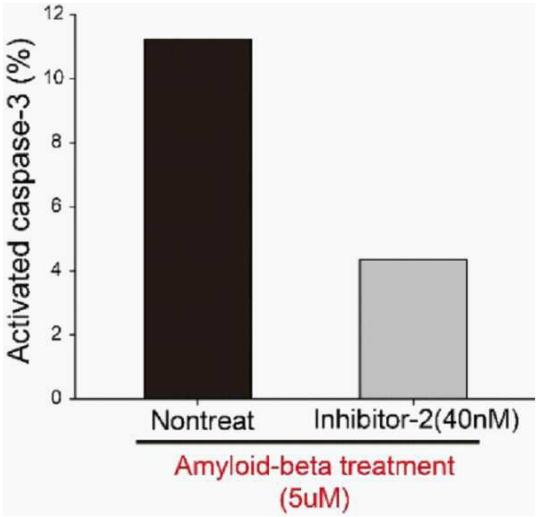
도면11


YFP
G93A
CON
Inhibitor-2
Primary axon (um)
CON
Inhibitor-2
YFP
G93A
Axon (um)
CON
Inhibitor-2
YFP
G93A
Total neurit (um)
CON
Inhibitor-2
YFP
G93A

도면12


G93A
Q331K
WT
Neuromuscular junctions (arrowhead),
ventrally projecting axon (arrow),
dosally projecting axons (backet)
G93A+I-2
Q331K+I-2
G93A+OA
Q331K+OA
Number of axonal defect per 4 segment
0
1
2
3
4
5
WT
CON
I-2
OA
CON
I-2
OA
SOD1 G93A
TDP43 Q331K

도면13


Activated caspase-3 (%)
0
2
4
6
8
10
12
Nontreat
Inhibitor-2(40nM)
Amyloid-beta treatment
(5uM)