



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0056106
(43) 공개일자 2025년04월25일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/713</i> (2006.01) <i>A61P 25/28</i> (2006.01)
 <i>C12Q 1/6883</i> (2018.01) <i>G01N 33/50</i> (2017.01)
 <i>G01N 33/68</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/713</i> (2013.01)
 <i>A61P 25/28</i> (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-0124847
 (22) 출원일자 2024년09월12일
 심사청구일자 2024년09월12일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020230137927 2023년10월16일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 홍성희
 서울특별시 광진구 아차산로70길 62, 광장현대3단지아파트 305동 1401호</p> <p>신정모
 서울특별시 성북구 고려대로10길 39, 101호 (안암동3가)</p> <p>(74) 대리인
 파도특허법인유한회사</p> |
|--|---|

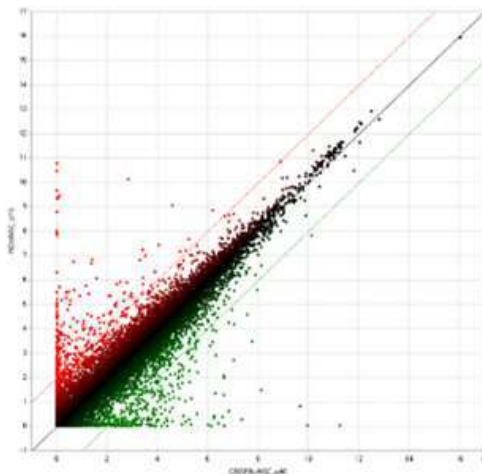
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **Lin28A 억제제를 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병 지연 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 Lin28A 억제제를 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병 지연 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 본 발명은 헌팅턴병 특이적으로 많이 분비되는 Lin28A의 발현을 억제함으로써, 헌팅턴병 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있는 다양한 억제제 및 이의 스크리닝 방법에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/5008 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711183820
 과제번호 2020R1A2C1101294
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 헌팅톤병의 병리기전 규명 및 치료 인자 발굴 연구
 과제수행기관명 고려대학교
 연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465038418
 과제번호 00060247
 부처명 보건복지부
 과제관리(전문)기관명 (재단)범부처재생의료기술개발사업단
 연구사업명 범부처재생의료기술개발사업
 연구과제명 난치성 시신경척수염범주질환의 신경재생 및 재발억제를 위한 유도신경줄기세포 치

료제 개발

과제수행기관명 고려대학교산학협력단
 연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711153758
 과제번호 2019M3E5D5065399
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 바이오의료기술개발
 연구과제명 환자세포-유래 유도신경줄기세포의 안전성과 유효성 검증을 통한 실용화 연구
 과제수행기관명 고려대학교
 연구기간 2022.01.01 ~ 2023.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

Lin28A(Lin-28homolog A)의 발현 억제제 또는 Lin28A 단백질의 활성 억제제를 포함하는 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Lin28A의 발현 억제제는 Lin28A 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀RNA(short hairpin RNA; shRNA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Lin28A 단백질의 활성 억제제는 Lin28A 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 Lin28A의 발현 억제제는 서열번호 2 내지 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 siRNA를 포함하는 것인, 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

1) Lin28A(Lin-28homolog A) 단백질 또는 LIN28 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;

2) 상기 1)의 세포에서의 Lin28A 단백질의 활성 또는 LIN28 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

3) 상기 2)에서 Lin28A 단백질의 활성 또는 LIN28 유전자의 발현이 감소되는 경우, 상기 시험 물질을 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 후보 물질로 선발하는 단계를 포함하는 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 시험 물질은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, DNase, PNA, 항체, 앵타머, 천연 추출물 및 합성 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 Lin28A 단백질 또는 LIN28 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction: real-time PCR), 웨스턴 블롯(western blot), 노던 블롯(northern blot), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis) 및 유세포 분석법(Fluorescence-activated cell sorting: FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행

되는 것인, 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 Lin28A 단백질 활성 수준을 측정하는 방법은 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 헌팅턴병 환자에서 과발현되는 Lin28A(Lin-28homolog A)의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 헌팅턴병 지연 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 헌팅턴병(Huntington's disease)은 유전 질환으로써, 4번 염색체에 존재하는 헌팅틴(HTT) 유전자의 돌연변이로 인한 과도하게 증가된 CAG repeat에 의해 발병되는 유전성 뇌신경 퇴행성 질환이다. 보통 성인기에 발병하는 헌팅턴 병의 일반적인 증상으로는 불수의적 움직임, 비정상적인 걸음걸이, 늘어지는 말투, 음식을 제대로 삼킬 수 없는 연하 곤란, 인지 장애, 성격 장애 등이 있다. 헌팅턴병은 대표적인 신경 퇴행성 뇌 질환 중 하나로, 운동 장애 및 인지 장애를 동반한다. 병이 진행됨에 따라 비정상적 운동 장애는 더 심화되며 환자는 일상적인 행동을 하기 어려워진다. 대부분 헌팅턴병 환자는 증상 발현 이후 15년에서 20년 정도 생존한다.

[0004] 헌팅턴병의 발병 원인으로는 헌팅틴 단백질의 다중 글루타민 영역에서 글루타민의 반복 횟수가 40회 이상으로 늘어나면서 단백질의 변이가 생겨 줄무늬체 뇌 영역(Striatum)의 신경세포가 소실되면서 발병하는 것으로 알려져 있다. 아직까지 헌팅턴병의 증상을 개선할 수 있는 치료제는 없으나 약물 치료를 통해 무도증상, 움직임 둔화, 이상 성격 등을 완화할 수 있다.

[0005] 헌팅턴병을 치료하기 위한 다양한 치료제가 개발중에 있으며, 효과적인 치료를 위하여 유전자 교정 등의 유전자 치료법이 연구되고 있다. 특히 헌팅턴병 치료 타겟이 되는 유전자의 발굴 및 이의 교정을 통해 효과가 우수한 치료 방법을 개발하는 것이 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 출원 제 10-2016-0124720호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 헌팅턴병 환자에서 Lin28A(Lin-28homolog A)가 비정상적으로 높게 발현되고 있음을 확인하였으며, 이를 통해 신경 세포의 발현이 억제될 수 있다는 점을 발견하여, 상기의 Lin28A의 억제를 통해 헌팅턴병의 발병을 지연시켜 예방하고, 치료하기 위한 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 Lin28A(Lin-28homolog A)의 발현 억제제 또는 Lin28A 단백질의 활성 억제제를 포함하는 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 Lin28A(Lin-28homolog A)의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 양태로서, 본 발명은 Lin28A(Lin-28homolog A)의 발현 억제제 또는 Lin28A 단백질의 활성 억제제를 포함하는 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대한 것이다.
- [0013] 본 발명에서 상기 Lin28A(Lin-28homolog A)는 RNA 결합 단백질로서, LIN28 유전자에 의해 암호화되며, 세포 성장, 분화 및 대사 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. let-7 miRNA는 세포 분화 및 발달을 촉진하는 역할을 하는데 Lin28A가 이를 억제하여 세포 미분화 상태를 유지, 세포 성장 및 증식을 촉진한다고 알려져 있다.
- [0014] 본 발명에서 상기 Lin28A를 암호화하는 LIN28 유전자는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 상기 LIN28 유전자 및 단백질 서열은 예시적인 것이며, 상기 서열들에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열이 본 발명의 범주에 포함될 수 있다. 여기서 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 또 다른 서열과의 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타냄을 의미함은 당업자에게 자명한 것이다.
- [0015] 상기 Lin28A의 발현 억제제는 Lin28A를 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀RNA(short hairpin RNA; shRNA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, Lin28A 단백질의 활성 억제제는 Lin28A 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명에서는, 헌팅턴병 환자에게서 특이적으로 많이 분비되는 Lin28A의 발현을 억제함으로써, 상기 억제제의 헌팅턴병 치료제로서의 가능성을 확인하였다. In vitro에서 신경줄기세포에서 발현되는 Lin28A를 억제할 경우, 뉴런의 생성 및 재생, 중간크기 가시 뉴런(Mediumspiny neuron)의 전구체의 발현이 증가되었음을 확인하였다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에서, Lin28A를 암호화하는 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 서열번호 2 내지 서열번호 5로 표시되는 염기 서열 중에서 선택된 siRNA를 이용하여 신경줄기세포에서 Lin28A mRNA의 발현을 억제한 결과, 신경 세포의 분화가 촉진되어, 뉴런 생성 및 재생이 증가되는 것을 확인하였으므로, Lin28A 억제제를 이용하여 헌팅턴병의 예방 또는 치료 용도로 사용할 수 있음을 알 수 있다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 "예방"은 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 헌팅턴병에 대한 증상을 억제하거나, 발병을 지연시킬 수 있는 모든 행위를 의미한다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 "치료"는 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0020] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등의 비경구 투여 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 제형화에 필요한 담체 혹은 부형제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 유효 성분에 추가로 포함될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 포함된다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0022] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 유효 성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에도 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [0023] 경구투여를 위한 액상제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0024] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비

수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위캡슐, 마크로콜, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니며, 일 양상에 따른 약학적 조성물은 당해 기술분야의 공지된 방법이라면 제한 없이 사용하여 목적에 맞게 제제화할 수 있다.

[0025] 상기 약학적 조성물의 유효 투여량은 환자의 나이, 성별 체중에 따라 달라질 수 있으나 0.0001 내지 100mg/kg으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0026] 다른 양태로서, 본 발명은 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법으로서, 하기의 과정을 포함하는 방법에 대한 것이다.

[0027] 1) Lin28A(Lin-28homolog A) 단백질 또는 LIN28 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시험 물질을 처리하는 단계;

[0028] 2) 상기 1)의 세포에서의 Lin28A 단백질의 활성 또는 LIN28 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0029] 3) 상기 2)에서 Lin28A 단백질의 활성 또는 LIN28 유전자의 발현이 감소되는 경우, 상기 시험 물질을 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 후보 물질로 선발하는 단계.

[0030] 상기 시험 물질은 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, DNase, PNA, 항체, 앵타머, 천연 추출물 및 합성 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0031] 또한, 상기 Lin28A 단백질 또는 LIN28 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction: real-time PCR), 웨스턴 블롯(western blot), 노던 블롯(northern blot), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis) 및 유세포 분석법(Fluorescence-activated cell sorting: FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것이 바람직하나, 당업자에게 알려진 유전자 발현 정도 또는 단백질 발현 정도를 측정하는 방법이면 제한 없이 적용될 수 있다.

[0032] 또한, Lin28A 단백질 활성 수준을 측정하는 방법은 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것이 바람직하나, 당업자에게 알려진 단백질 활성 정도를 측정하는 방법이면 제한 없이 적용될 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명은 Lin28A 억제제를 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병 지연 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 본 발명은 헌팅턴병 특이적으로 많이 분비되는 Lin28A의 발현을 억제함으로써, 헌팅턴병 치료제로의 가능성을 확인하였다. 그 결과, in vitro에서 뉴런의 생성 및 재생, 중간 크기 가시 뉴런(Medium spiny neuron)의 전구체의 발현이 증가함을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1 및 도 2는 헌팅턴병 환자의 섬유아세포(Fibroblast)에서 유래한 신경줄기세포(HDciNSC)와 헌팅턴병 환자의 섬유아세포에서 CAG 반복 수를 CRISPR-cas9 system을 통해 교정한 신경줄기세포(CRI3_6) 사이의 RNA염기서열분석(RNA-seq) 결과이다.

도 3은 헌팅턴병 환자의 섬유아세포에서 유래한 신경줄기세포(HD ciNSC)와 헌팅턴병 환자의 섬유아세포에서 CAG 반복 수를 CRISPR-cas9 system을 통해 교정한 신경줄기세포(CRI3_6)의 면역세포화학(immunocytochemistry) 형광 염색 사진이다.

도 4는 헌팅턴병 환자의 섬유아세포에서 유래한 신경줄기세포(HD ciNSC)와 헌팅턴병 환자의 섬유아세포에서 CAG 반복 수를 CRISPR-cas9 system을 통해 교정한 신경줄기세포(CRI3_6)의 Lin28A, BMP4, PRTG, DKK1 4개의 유전자

의 mRNA 발현량을 qPCR(실시간 중합효소 연쇄반응) 통해 확인한 결과이다.

도 5은 헌팅턴병 모델 쥐인 R6/2 transgenic mouse의 뇌와 정상 쥐의 뇌에서 해당 4개의 유전자의 발현을 면역 세포화학(immunocytochemistry) 형광 염색을 통해 확인한 결과이다.

도 6은 헌팅턴병 환자의 섬유아세포에서 유래한 신경줄기세포(HD iPSC derived NPC)와 정상인의 섬유아세포에서 유래한 신경줄기세포(WT iPSC derived NPC)의 Lin28A mRNA 발현량 및 신경 세포(neuron)로의 분화 과정 동안의 Lin28A mRNA 발현량을 확인한 결과이다.

도 7은 헌팅턴병 신경줄기세포에 4가지 서열의 siRNA를 이용해 Lin28A의 발현을 억제(knockdown)한 결과이다.

도 8은 헌팅턴병 신경줄기세포에서 Lin28A를 knockdown 하기 위한 플라스미드(plasmid) 맵을 나타낸 것이다.

도 9는 상기 도8의 플라스미드를 lentiviral packaging 후 헌팅턴병 신경줄기세포에 바이러스 감염(viral induction) 후 Lin28A mRNA 발현량을 확인한 결과이다.

도 10은 헌팅턴병 신경줄기세포에서 Lin28A의 발현을 억제한 후 신경 생성 (neurogenesis) 관련 인자인 miR-9/9*, REST-complex 및 EZH2의 mRNA 발현량을 확인한 것이다.

도 11은 헌팅턴병 신경줄기세포에서 Lin28A의 발현을 억제한 후 신경 세포로 분화를 진행하는 동안의 광학 현미경 사진이다.

도 12는 상기 도11의 분화 과정 동안 7일차, 14일차, 21일차에 각각 sample을 확보하여 신경 생성 (neurogenesis) 관련 인자인 miR-9/9*, REST-complex, EZH2의 mRNA 발현량을 확인한 결과이다.

도 13은 상기 도11의 분화 과정 중 7일차에 각 그룹에서 미성숙 신경 표지자(immature neuronal maker)인 TUJ1의 면역 형광 염색 사진 및 상대적 mRNA 발현량을 측정한 것이다.

도 14 내지 도 16은 도11의 분화 과정 중 21일차에 각 그룹에서 성숙 신경 표지자(mature neuronal maker)인 MAP2, 가바성 신경 표지자(GABAergic neuronal marker)인 GABA 및 GAD67, 중간 가지 뉴런(medium spiny neuron) 표지자인 FoxP1 및 DARPP-32의 면역 형광 염색 사진 및 mRNA 발현량을 측정한 것이다.

도 17은 도13 내지 도16의 면역 형광 염색 사진에서 각각의 표지자들의 비율을 확인한 결과이다.

도 18은 중간 가지 뉴런 전구체(medium spiny neuron precursor)인 FoxP1의 mRNA 발현량을 분화 과정 동안 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세히 설명한다. 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지는 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0037] 실시예 1. 헌팅턴병 환자유래 세포의 유전자 발현 분석

[0038] 헌팅턴병 환자의 섬유아세포(Fibroblast)에서 유래한 신경줄기세포(HDciNSC)와, 헌팅턴병 환자의 섬유아세포에서 CAG 반복 수를 CRISPR-cas9 system을 통해 교정한 신경줄기세포(CRI3_6)에 대하여, 각각 RNA 염기 서열분석(RNA-seq)을 통해 두 그룹 사이에 mRNA 발현량의 차이가 있는 유전자를 선별하였다. 도 1 및 도 2에서 확인되는 바와 같이, 약 109개의 유전자에서 mRNA 발현량의 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

[0039] 이 중에서, 각 그룹 사이에 mRNA 발현량 차이가 4배 이상, p-value 값이 0.01 이하인 유전자들을 선별했을 때, Lin28A, BMP4, PRTG, DKK1 4개의 유전자가 헌팅턴병 환자의 세포에서 정상 세포에 비해 비정상적으로 높게 발현하고 있음을 알 수 있었다. 이는 면역세포화학(immunocytochemistry) 형광 염색 사진(도 3) 및 qPCR(도 4) 결과에서도 확인할 수 있다.

[0041] 실시예 2. 헌팅턴병 유발 마우스의 유전자 발현 분석

[0042] 헌팅턴병 모델 마우스(R6/2 transgenic mouse)의 뇌와 정상 쥐의 뇌에서 Lin28A, BMP4, PRTG, DKK1의 유전자 발현 양상을 면역 세포화학(immunocytochemistry) 형광 염색을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 5에서 보듯이,

Lin28A, BMP4, PRTG, DKK1 4개의 유전자 모두 세포 수준에서와 같이 헌팅턴병 모델에서 정상 모델에 비해 높게 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0044] 실시예 3. 줄기세포 분화 과정에서 Lin28A 발현량 변화

[0045] 헌팅턴병의 발병 및 진행과 관련된 Lin28A의 기능을 확인하기 위하여, 헌팅턴병 환자의 섬유아세포에서 유래된 신경 줄기세포(iPSC derived NPC)와 정상인의 섬유아세포에서 유래한 신경 줄기세포(WT iPSC derived NPC)의 Lin28A mRNA 발현량 및 신경세포(neuron)로의 분화과정 동안의 Lin28A mRNA 발현량을 확인하였다.

[0046] 그 결과, 도 6에서 보듯이, 신경 줄기세포(NPC)에서 신경 세포로 분화되는 과정에서 헌팅턴병 환자 유래 신경 줄기세포와 정상 세포 사이의 Lin28A mRNA 발현량의 차이가 커짐을 확인할 수 있었으며, 헌팅턴병 환자 유래 신경 줄기세포의 경우 Lin28A mRNA 발현량이 정상에 비해 높게 유지됨을 알 수 있었다.

[0048] 실시예 4. siRNA를 이용한 Lin28A 발현 억제 효과

[0049] 헌팅턴병 환자의 섬유아세포로부터 유도된 신경줄기세포에 하기 표 1의 4가지 서열의 siRNA를 이용해 Lin28A의 발현을 억제(knockdown)하였다.

표 1

No.	명칭	서열
서열번호 2	siRNA#1	CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG
서열번호 3	siRNA#2	CCAGCCCAAGAAGTGCCACTT
서열번호 4	siRNA#3	CCTGGTGGAGTATTCTGTATT
서열번호 5	siRNA#4	ACCTACTTTCGAGAGGAAGAA

[0051] 헌팅턴병 환자 섬유아세포로부터 만들어진 유도 만능 줄기세포(iPSC)에서 유래된 헌팅턴병 신경전구세포(iPSC derived Huntington's disease neural progenitor cell)에 상기 #1~#4의 Lin28A siRNA를 전기천공법(electroporation)으로 형질 주입(transfection)하고, Lin28A의 발현량을 관찰하였다. 그 결과, Lin28A의 발현량이 정상 신경 전구세포 수준으로 낮아진 것을 확인할 수 있었다(도 7A).

[0052] 또한, Lin28A siRNA로 인한 신경 재생 억제 관련 인자들의 발현도 함께 감소함을 확인하였다. 도 7B와 같이, Lin28A 발현 억제로 인해 신경 재생 관련 후성 유전학적 요인(epigenetic factor)인 miR-9/9*의 발현이 증가하고, 이에 따라 라 EZH2와 신경 재생 억제 관련 전사 인자(transcription factor)인 REST-complex

[0053] 발현이 감소된 것을 확인하였다.

[0055] 실시예 5. Lin28A 억다운 및 형질 전환에 의한 효과

[0056] 5-1. Lin28A 억다운을 위한 플라스미드 제작 및 형질도입

[0057] siRNA를 이용한 Lin28A의 발현 억제 시, 신경 재생 억제 관련 인자의 발현이 감소됨을 앞서 확인한 바, Lin28A 억다운 시, 신경줄기세포에서 신경 생성에 관여하는 다양한 인자의 발현 감소 여부를 확인하기 위한 실험을 진행하였다.

[0058] 먼저, 헌팅턴병 환자에게서 유래된 신경줄기세포에서 Lin28A를 억다운(knockdown)하기 위한 플라스미드(plasmid)를 도 8과 같이 제작하였다. Lin28A를 억다운 하기 위한 타겟 서열은 CCTGGTGGAGTATTCTGTATT(서열번호 4)이다. 상기 타겟 서열은 도 7의 4개의 siRNA 서열 중 Lin28A 발현 억제 효과가 가장 큰 서열로 선정하였다.

[0059] 상기 제작된 플라스미드를 렌티바이러스를 이용하여 헌팅턴병 줄기세포에 바이러스 감염 후, Lin28A mRNA 발현량을 확인하였다(도 9). 헌팅턴병 유도만능줄기세포(iPSC) 유래의 신경 전구세포(iPSC-derived Huntington's disease neural progenitor cell)에 Lin28A shRNA 렌티바이러스를 형질 도입(lentivirus transduction)하였을 때, Lin28A의 발현량이 정상 신경 전구세포 수준으로 낮아져 있음을 확인하였다. 이는 헌팅턴병 환자 유래 신경 줄기세포에서 Lin28A의 발현이 효과적으로 억제되었음을 알 수 있는 결과이다.

[0061] **5-2. Lin28A 억다운에 의한 신경 생성 관련 인자의 발현량 비교**

[0062] 위와 같이 Lin28A를 억다운 시킨 신경줄기세포로부터, 신경 생성(neurogenesis) 관련 인자인 miR-9/9*, REST-complex 및 EZH2의 mRNA발현량의 변화를 확인하였다. 도 10에서 확인되는 바와 같이, Lin28A 발현의 억제로 인해 miR-9/9*의 발현이 증가하고 연쇄적으로 REST complex와 EZH2의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다.

[0063] 위와 같은 결과로부터, Lin28A의 발현이 억제된 헌팅턴병 신경줄기세포에서 신경 생성이 보다 활발해질 수 있다는 점을 예측할 수 있다.

[0065] **5-3. Lin28A 억다운에 의한 세포 사멸 영향**

[0066] Lin28A를 억다운 시킨 신경줄기세포의 경우, 세포사멸(apoptosis) 인자인 p53의 발현도 Lin28A 발현 억제로 인해 함께 감소함을 확인할 수 있었다. 도 11에서와 같이, 헌팅턴병 신경줄기세포에서 Lin28A의 발현을 억제한 후 신경세포로 분화를 진행하는 동안의 광학 현미경 사진을 관찰한 결과, 정상그룹(WT), Lin28A 억다운 그룹(KD), 헌팅턴병 그룹(HD)으로 갈수록 사멸되는 세포의 수가 많아지고 신경 돌기(neurite)의 수가 감소함을 확인할 수 있었다.

[0068] **실시예 6. 신경세포 분화 과정에서의 변화 관찰**

[0069] 상기 실시예 5에서와 같이, 형질 감염을 통해 Lin28A를 억다운 시킨 신경 줄기세포의 분화 과정을 날짜별로 관찰하여 다양한 인자의 발현 여부를 아래와 같이 확인하였다.

[0070] **6-1. 신경 생성 관련 인자의 발현량 변화**

[0071] 도 12는 신경 줄기세포의 분화 7일차, 14일차, 21일차에 sample을 확보하여 이로부터 각각 신경생성(neurogenesis) 관련인자인 miR-9/9*, REST-complex, EZH2의 mRNA 발현량을 확인한 결과이다. 신경세포로의 분화가 진행되어 가면서 Lin28A 억 다운으로 인해 신경 생성 관련 인자인 miR-9/9*, REST-complex, EZH2의 mRNA 발현량이 정상 그룹 쪽으로 이동함을 확인할 수 있었다.

[0072] 또한, 분화 7일차에 각 그룹에서 미성숙 신경 표지자(immature neuronal maker)인 TUJ1의 면역 형광 염색 사진 및 상대적 mRNA 발현량을 확인한 결과, Lin28A 억다운에 의해 미성숙 신경 표지자의 발현량이 정상화되어 가는 것을 확인할 수 있었다.

[0073] **6-2. 신경 표지자 및 중간 가시뉴런 전구체 발현 확인**

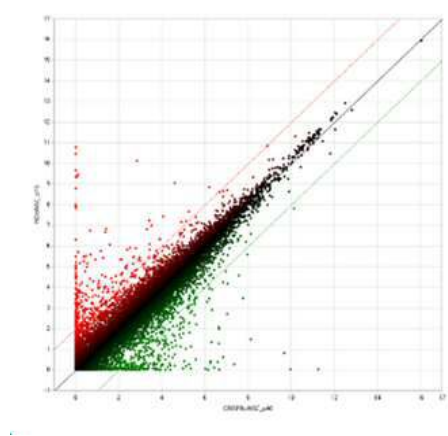
[0074] 분화 21일차 이후, 각 그룹에서 성숙 신경 표지자(mature neuronal maker)인 MAP2, 가바성 신경 표지자(GABAergic neuronal marker)인 GABA 및 GAD67, 중간 가시 뉴런(medium spiny neuron) 표지자인 FoxP1 및 DARPP-32의 면역 형광 염색 사진 및 상대적 mRNA 발현량을 확인해 볼 수 있었다.

[0075] 도 14내지 도 16과 같이, 성숙 신경 표지자들의 발현량이 Lin28A 억다운에 의해 증가되며, 정상 범위에 가까워지고 있는 것이 관찰되었으며, 이들의 비율을 나타낸 그래프에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었다. (도 17, 도 18)

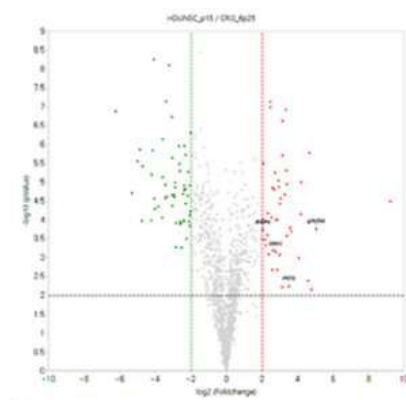
[0077] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

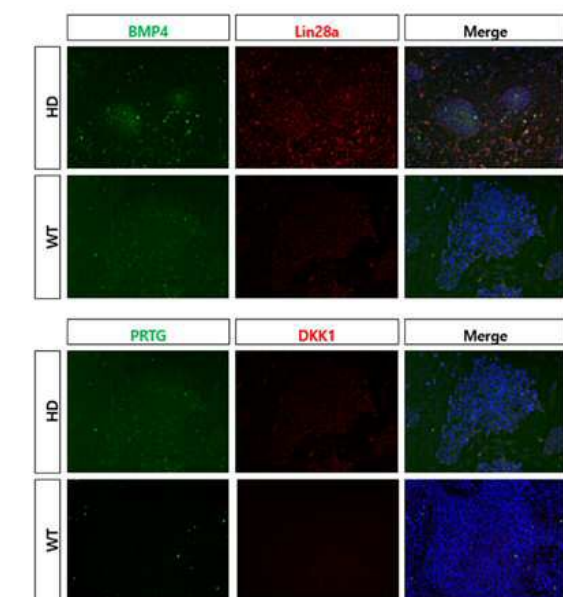
도면1



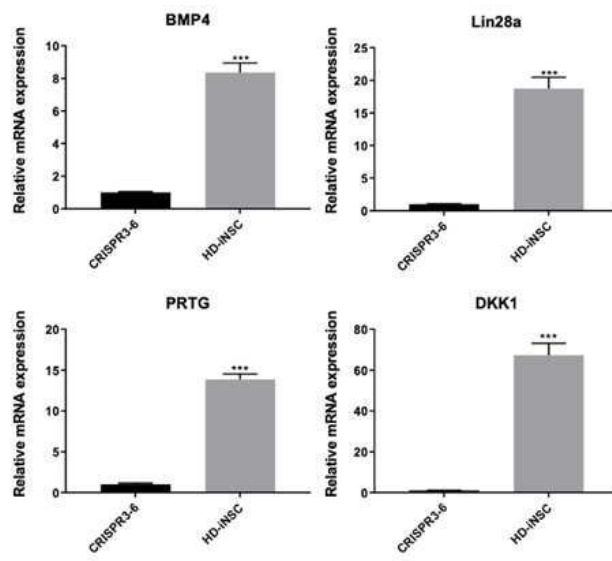
도면2



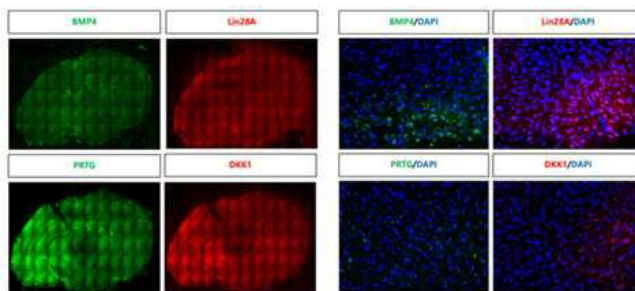
도면3



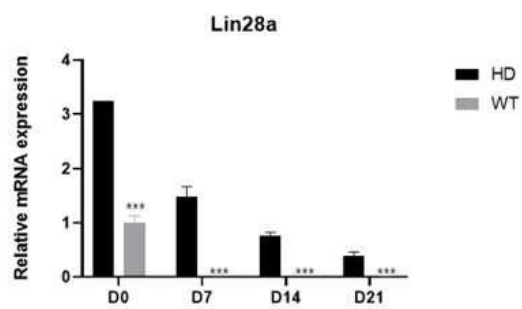
도면4



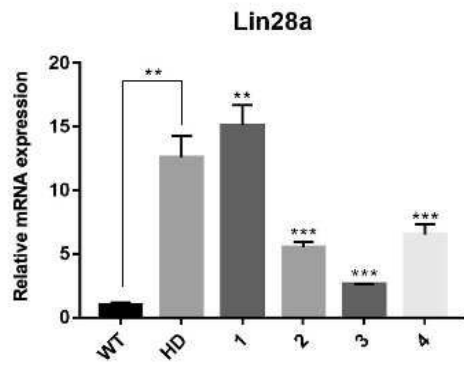
도면5



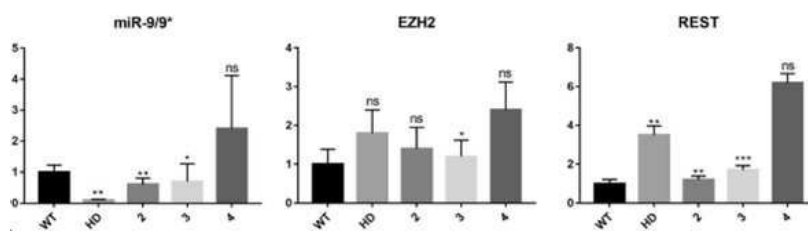
도면6



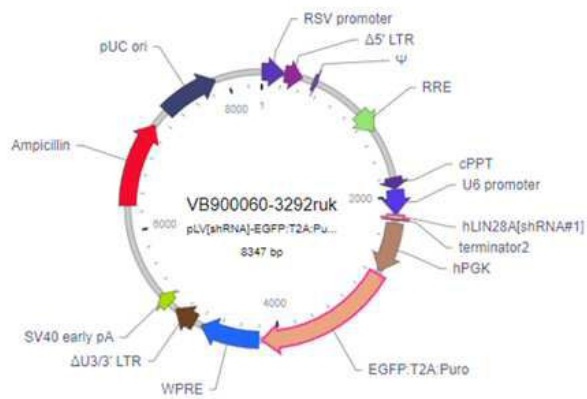
도면7a



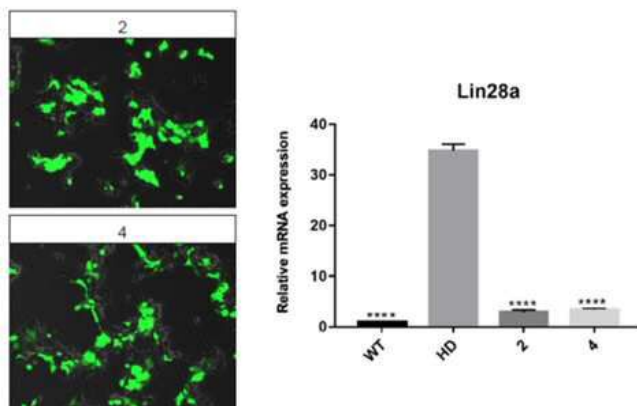
도면7b



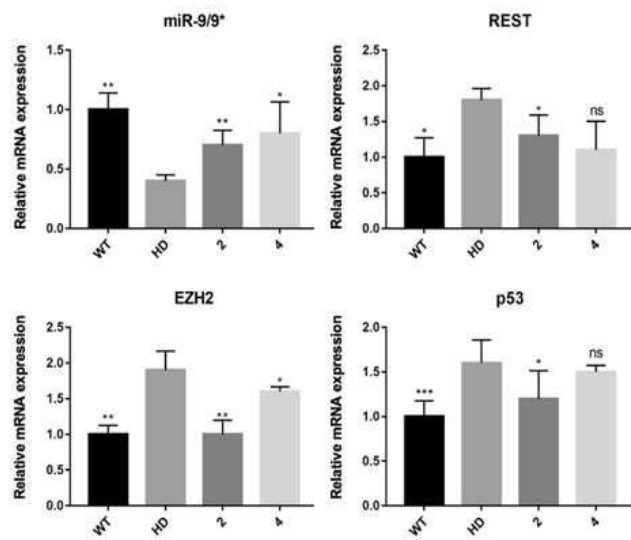
도면8



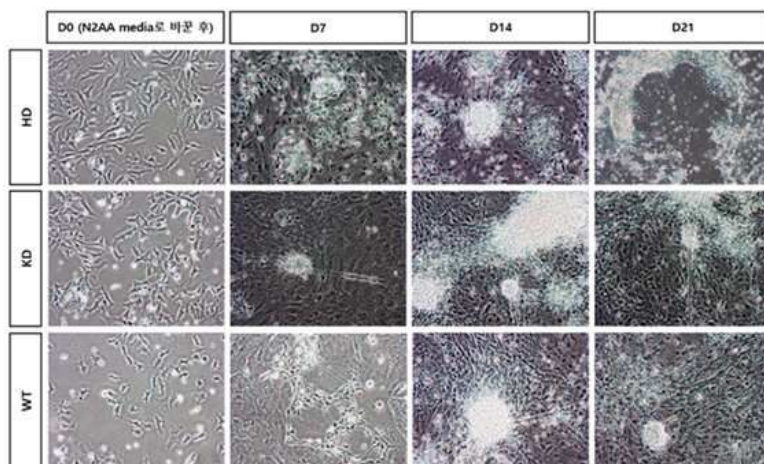
도면9



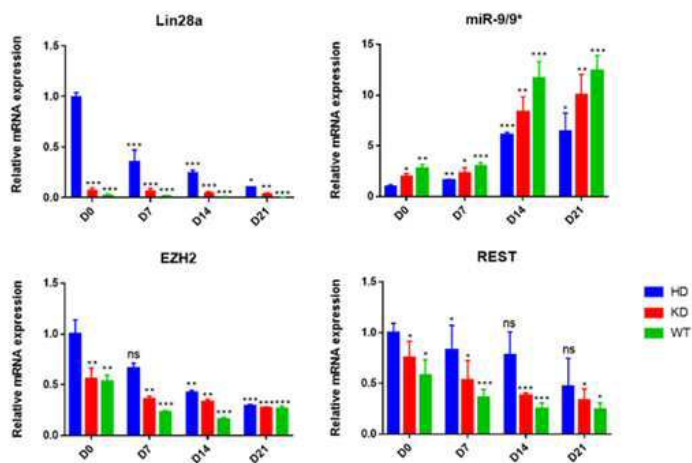
도면10



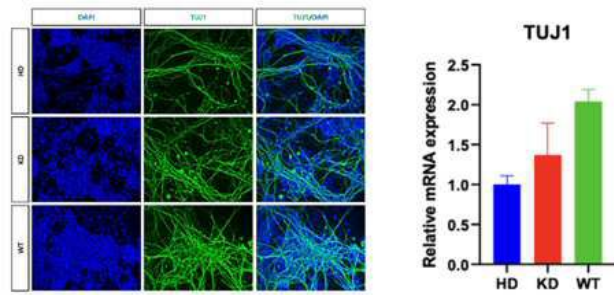
도면11



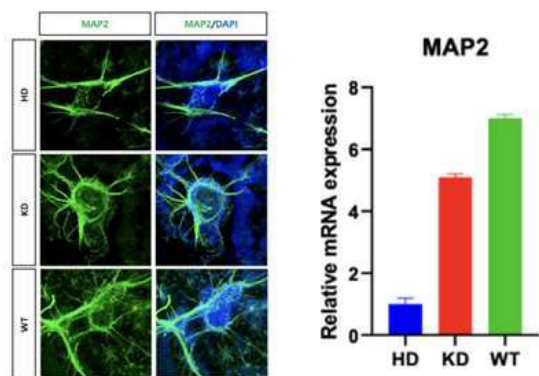
도면12



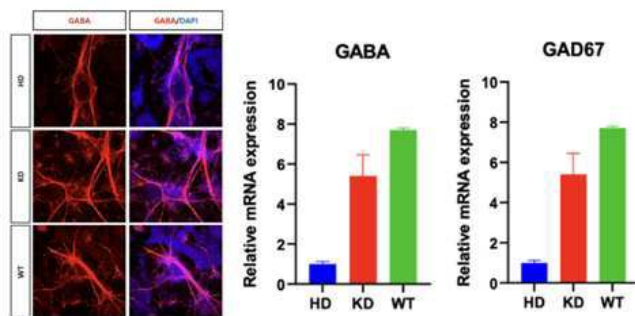
도면13



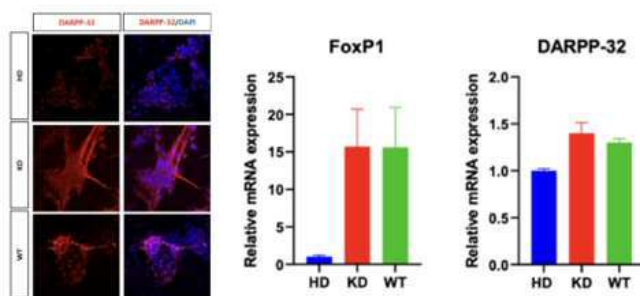
도면14



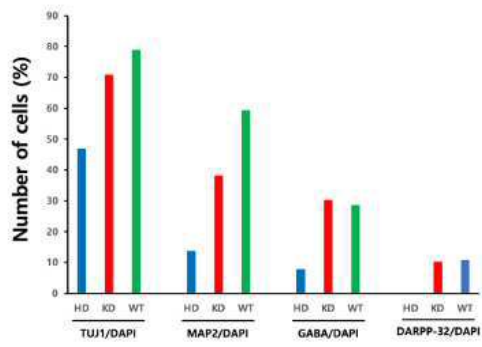
도면15



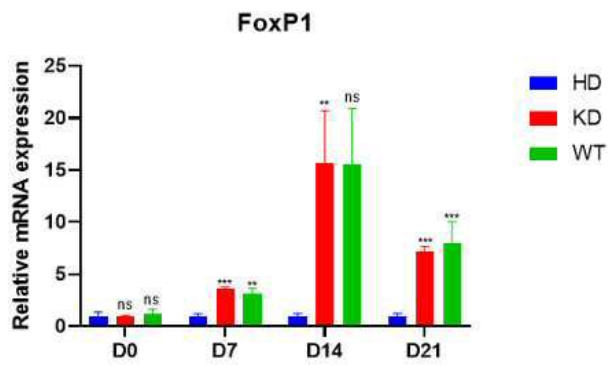
도면16



도면17



도면18



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.