



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년12월02일
(11) 등록번호 10-0929372
(24) 등록일자 2009년11월24일

(51) Int. Cl.

A61K 38/10 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0045030

(22) 출원일자 2009년05월22일

심사청구일자 2009년05월22일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080084830 A*

KR1020040086422 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

강성만

서울시 서초구 잠원동 한강APT 1동 702호

윤은진

서울시 성북구 안암동 고려대학교 생명과학대학

임향숙

서울시 서초구 반포동 가톨릭대학교 의과대학원

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 4 항

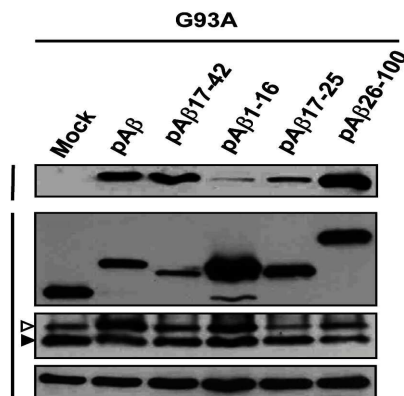
심사관 : 박정웅

(54) 아밀로이드 베타 단편을 유효성분으로 포함하는 돌연변이 SOD1에 의한 ALS 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신경질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 돌연변이 SOD1에 의해 유발된 근위축 측삭 경화증을 치료하기 위한 서열번호 2 내지 4의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편을 유효성분으로 함유하는 조성물 및 돌연변이 SOD1의 효율을 억제하는 신규한 근위축 측삭 경화증 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도11



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A080588-6

부처명 보건복지부

연구사업명 희귀질환 진단치료기술 연구사업

연구과제명 근위축성측삭경화증 발병기전 규명과 치료기법 개발 연구

주관기관 보건산업진흥원

연구기간 2008년 08월 01일 ~ 2009년 08월 01일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 돌연변이 SOD1과 상호결합하는, 서열번호 3 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편을 유효 성분으로 포함하는, 서열번호 1의 돌연변이 SOD1에 의해 유발된 가족성 근위축 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

서열번호 3 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, 약학적으로 유효한 양의 아밀로이드 베타 단편을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 서열번호 1의 돌연변이 SOD1에 의해 유발된 가족성 근위축 측삭 경화증 예방 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

서열번호 3 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, 약학적으로 유효한 양의 아밀로이드 베타 단편을 근위축 측삭 경화증에 걸린 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 서열번호 1의 돌연변이 SOD1에 의해 유발된 가족성 근위축 측삭 경화증 치료 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

1) 서열번호 1을 갖는 SOD1과 서열번호 3 내지 5 중 어느 하나의 서열을 갖는 아밀로이드 베타 및 피검 화합물을 접촉시키는 단계;

2) 피검 화합물을 처리하지 않은 대조군에 비해 SOD1의 활성을 감소시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 서열번호 1의 돌연변이 SOD1에 의해 유발된 가족성 근위축 측삭 경화증 치료제 후보물질 스크리닝 방법.

청구항 9

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 신경질환을 예방 및 치료하기 위한 조성물에 대한 것으로, 특히 돌연변이 SOD1에 의해 유발된 근위축 측삭 경화증(ALS)의 예방 및 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)은 1830년 Bell에 의해 처음으로 기술되었

으며, 1874년 Charcot에 의해 ALS로 명명되었다. ALS는 질환명이 의미하는 바와 같이 임상적으로 근위축, 근력 약화, 섬유축성연축 등을 특징으로 하는 퇴행성 신경계 병변이다. ALS에서는 대외 및 척수의 운동신경원이 선택적으로 파괴되기 때문에 "운동신경원 질환"으로도 불리며, 1930년대 이 질병을 앓았던 운동선수의 이름에 기원하여 "Lou Gehrig씨 병"으로도 불린다. 병태생리적으로 ALS에서는 중추신경계의 운동신경세포(motor neuron)가 파괴됨으로써 근육들이 운동신경의 자극에 대해 적절한 운동 기능을 나타내지 못하게 된다. 반면 신체에 분포된 감각신경, 자율신경 등은 거의 침범되지 않으므로 임상적으로 감각이상 또는 자율신경 장애는 거의 나타나지 않는다.

<3> 근위축성 측삭 경화증의 발병기전으로는 약 10%는 가족내 일정한 유전성을 보이지만, 대부분에서는 산발성 여러 퇴행성 신경계 병변에서와 마찬가지로 아직 명확하게 밝혀지지 않은 상태이다. 현재까지 알려진 발병기전은 다음과 같다.

<4> 첫째, 흥분성 독성물질을 들 수 있다. 대뇌, 뇌간 척수등 중추신경계에는 신호를 전달하는 신경세포(neuron)와 신경세포의 생물학적 기능을 유지하는데 필요한 신경아교세포(neuroglia)들로 구성되어 있으며, 이들 신경세포와 신경세포사이, 또는 신경세포와 신경아교세포 사이에는 특정한 신경전달물질의 역할이 중요하다. 지금까지의 몇몇 연구에 따르면 ALS에서는 운동 신경세포의 접합부 위치에 여러 신경전달물질 중 특히, 흥분성 신경전달물질인 글루탐산염이 고농도로 존재하며, 이 물질이 이차적으로 신경세포 등에 독성작용을 나타내어 운동신경세포를 파괴할 것이라는 설명이다. 이때 어떤 기전에 의해 글루탐산염의 농도가 비정상적으로 증가되며, 어떤 생물학적 과정을 통해 이들 글루탐산염이 운동신경세포에 과다한 흥분성 신경독성을 야기하며, 왜 신경계의 여러 세포들 중 특히 운동신경세포만 선택적으로 파괴되는지 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

<5> 둘째, 자가면역성 발병기전을 들 수 있다. 일반적으로 면역계는 세포성 또는 체액성 면역기전을 통해 내외 침입으로부터 신체를 보호한다. 그러나 특별한 경우에는 우리의 몸 속에 존재하는 항원에 대해 자가항체를 형성하게 된다. 즉, 다른 신체의 자가면역성 질환에서와 같이 ALS에서도 신체 내에 존재하는 항원에 대해 자가항체가 생성되며 이차적으로 운동신경세포가 손상 받게 될 것이라는 이론이다. ALS 환자에서 운동신경세포막에 위치한 "전위 의존성 칼슘통로"에 대한 항체(Anti-VGCC)가 형성되며, 이어 항원-항체 반응에 따른 일련의 생물학적 과정이 일어나며, 결국 운동신경세포가 파괴될 수 있을 것이다. Appel등은 산발성 ALS환자의 약 80%에서 항-VGCC 항체를 검출하였고 이들 항체 역가가 높을수록 질병의 진행이 빠르다고 주장한 바 있다. 그러나 자가면역성 발병기전도 아직 규명되어야 될 부분이 많은 것으로 평가되고 있다

<6> 셋째, 자유 라디칼을 발병원인으로 들 수 있다. 1933년 Rosen등이 가족성 ALS 환자에서 SOD(superoxide dismutase) 효소의 유전자 돌연변이(mutation) 현상을 보고한 이래, 이 분야에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다. 지금까지 SOD유전자 이식 마우스에 시술함으로써 인간의 ALS질병과 유사한 실험동물의 재현이 가능하였다. 최근 서울대학교병원 ALS 연구소에서는 돌연변이 유전자를 운동신경 포주에 감염시키는 등의 일련의 실험을 통하여 ALS 발병기전에서의 자유기 역할을 규명하고자 활발히 연구를 진행하고 있다. 현재 많은 연구자들은 ALS에서 운동신경세포가 손상 받는 여러 기전 중 자유기의 역할이 매우 중요하게 작용할 것으로 생각하고 있다.

<7> 넷째, 신경영양인자의 결핍을 들 수 있다. 다른 신체내의 세포들과 마찬가지로 운동신경세포도 원활한 기능을 유지하기 위해서는 적절한 신경영양인자의 역할이 필요하다. 경우에 따라서는 이들 신경영양인자의 공급이 차단되거나 이용이 제한될 수 있으며 따라서 운동신경세포가 파괴될 수 있다는 것이다. 운동신경 세포의 발달, 재생, 치유에 중요한 대표적인 신경영양인자 물질로 IGF-1, CNTF, BDNF등이 있으며, 특히 IGF-1은 신경의 발아과정에 매우 중요한 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다.

<8> 마지막으로 운동신경세포의 골격의 이상을 들 수 있다. ALS 환자의 척수 운동신경세포 미세구조에서는 정상적으로 관찰되지 않는 응집(aggregate) 또는 신경세사(neurofilaments)가 관찰된다. 그러나 실제 이들이 ALS의 원인적 요소로 작용한 것인지, 또는 ALS 병변의 진행에 따른 산물인지는 분명하지 않다. 결론적으로 근위축성 측삭 경화증이 어떤 원인에 의해 시작되며, 어떤 과정에 의해 점차 악순환의 회로를 밟게되며, 여러 세포들 중 운동신경세포가 선택적으로 파괴되는지 등에 대한 의문을 해결해야 한다. ALS에서의 병리적 소견, 전각세포 및 척수로 병변이 뚜렷하다. 아마도 ALS는 생물학적으로 취약한 상태에 있는 개인이, 특정한 외부적 환경에 노출되고, 앞서 언급한 여러 원인인자에 노출됨으로써 운동신경세포가 손상 받게 되는 "다발성 발병기전"에 의한 것으로 생각되고 있다. 근위축성 측삭 경화증의 약 10%는 가족내 일정한 유전성을 보이지만, 대부분에서는 산발성으로 발병된다.

<9> 이러한 ALS중에서, 가족성 근위축 경화증(Familial amyotrophic lateral sclerosis: ALS)은 ALS가 유

전적으로 전달되어 발병하는 것을 말한다. 최근의 발표에 따르면 ALS는 멘델의 법칙에 따라 유전되는 복합성 유전적 질병으로 ALS 환자의 10%는 유전적(가족력)인 원인에 의해 발병하며 이 중 20%는 Cu-Zn superoxide dismutase 1(SOD1) 유전자와 관련되어 있다고 밝혀져 있다.

<10> 특히 SOD(Superoxide dismutase)는 초과산화이온이 가지고 있는 자유 라디칼 음이온은 세포에 해로운 영향을 미치기 때문에, 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔 줌으로써 독성으로부터 세포를 방어하는 역할을 한다. 산소에 노출되는 거의 모든 세포에서 이러한 SOD에 의한 항산화방어기작이 중요하며, 일부 유산균들의 경우 다른 방어기작을 사용하는 것으로 알려져 있다. SOD는 구성물질로 서로 다른 금속을 사용하는 몇 가지 종류의 SOD가 존재한다. 거의 모든 진핵세포의 시토솔(cytosol)에는 구리와 아연을 가지는 SOD가 존재하며 대부분의 미토콘드리아와 많은 종류의 박테리아에는 망가니즈를 가지는 SOD가 존재한다. 또 다른 많은 종류의 박테리아들은 철을 구성물질로 하는 SOD를 가진다. 사람에게에는 SOD1, SOD2, SOD3 세 종류의 SOD가 존재한다. SOD1은 세포질에 존재하며 SOD2는 미토콘드리아에, SOD3는 세포 바깥쪽에 존재한다. SOD1은 이량체를 이루며 SOD2와 SOD3는 사량체를 형성한다. 또 SOD1, SOD3은 구리와 아연을 가지고 SOD2는 망가니즈를 가지고 있다. SOD1은 염색체 21q arm22.1~22.2에 존재하며, SOD1 유전자의 돌연변이는 현재까지 전세계적으로 90종 이상의 다른 돌연변이 형들이 보고 되고 있으며 SOD1 유전자의 135개의 아미노산기(amino acid residues) 중 약 40개에서 발견되었다(Roland LP, Shneider NA. Medical progress; Amyotrophic lateral sclerosis, N .N Engl J Med 2001; 344: 1688-1700 및 Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu/Zn superoxide dismutase.Science,1993;261:1047-1051). 또한, SOD1은 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

<11> 최근의 발표에 따르면 ALS는 멘델의 법칙에 따라 유전되는 복합성 유전적 질병으로 ALS환자의 10%는 유전적(가족력)인 원인에 의해 발병하며 이 중 20%는 Cu-Zn superoxide dismutase 1 (SOD1)유전자와 관련되어 있다고 밝혀져 있다. 산발적인 것(sporadic) 유전적(familial) ALS는 같은 뉴런에 비슷한 방식으로 질병을 유발하기 때문에 우리는 이러한 유전자의 결합이 어떻게 작용하는지 이해하면 산발성 ALS와 familial ALS 치료제 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. SOD1은 항산화효소이며 세포질, 미토콘드리아, 핵에서 발견되며 153개 아미노산으로 구성되어 있으며 32 kDa homodimer로 작용한다. 현재까지 ALS를 야기하는 SOD1 내의 돌연변이가 105개 이상이 알려져 있다. 돌연변이 항산화효소 SOD1은 기능상실(Loss of function)이 아니라 기능획득(Gain of function)으로 운동뉴런의 사멸을 야기하는 것으로 보고되었다. SOD1의 기능획득으로 인해, 돌연변이 SOD1은 미토콘드리아의 기능적 결함, 단백질의 미스폴딩(misfolding), 유비퀴틴 프로테아좀 시스템의 약화(ubiquitin proteasome system), 다른 단백질의 기능 저하, 부적절한 성장요소의 신호체계(growth factor signalling)와 같은 여러 가지 메커니즘의 조합을 통해서 운동신경의 사멸을 야기할 것으로 추정되고 있다.

<12> 현재 ALS 치료제에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나, ALS 그 자체의 근본적인 치료법은 존재하지 않는다. 하지만 ALS에 관한 연구가 조금씩 진전되고 있으며, 병의 진행을 지연시킬 수 있게 되었다. 앞서 발병원인 항목에서 언급된 바와 같이 ALS를 일으키는 명확한 원인은 밝혀져 있지 않으며 뚜렷한 치료법도 개발되지 않은 상태이다. 일반적으로 ALS 환자들에게는 환자들이 호소하는 증세를 완화시키기 위한 대증요법이 추천된다. 현재 임상에서 처방되는 약물들로는, ALS 병의 진행을 지연시키는 약제로서 해외에서 생명을 연장시키는 효과가 있다고 인정되기 시작한 ALS 치료제로 '리루졸' 이 있다. '리루졸'은 운동 신경세포(neuron)를 파괴하는 원인의 하나로 여겨지는 과도한 글루타민산을 억제시키는 약이다. 글루타민산은 아미노산의 일종으로 몸 곳곳에 존재하고 있다. 그 대부분이 몸을 움직이는데 필요한 에너지와 몸에 필요한 단백질을 만들고 있다. 또한 글루타민산은 뇌로부터 발신되는 전기신호를 근육에 전달하는 중요한 역할을 하고 있다. 그런데 이 글루타민산이 지나치게 많아지면 신경을 파괴하게 된다. ALS 환자분들의 혈액이나 뇌척수액을 조사해보면 글루타민산 농도가 높아져 있는 것을 알 수 있다. 리루졸이라는 약은 글루타민산이 신경을 파괴하는 것을 막는 약으로 ALS의 진행을 억제시킨다고 알려져 있다. 그렇지만 일단 파괴된 신경은 원래대로 돌아오지 않기 때문에, 리루졸을 복용함으로써 ALS 환자 분의 증상이 멈추거나 원래의 건강한 상태로 돌아오지는 않습니다.

<13> 아직까지 ALS병을 치료할 수 있는 근원적인 방법이 밝혀지지 않고 있고 최근 보편적인 치료법은 발병이 오기 전에 호흡에 도움을 주는 보조 장치를 달거나 음식을 삼키기 어려울 때 대체 약품을 주는 것이 고작이다. 그러므로 ALS의 발병에 대한 연구는 국민건강, 경제, 사회, 문화적 측면에서 꼭 필요하다.

<14> 이에 본 발명자들은 아밀로이드 베타 단편이, ALS를 야기하는 돌연변이 G93A SOD1와 특이적 결합하고, 또한, SOD1의 기능을 억제한다는 사실을 확인하고, 이렇게 G93A1에 특이적으로 결합하는 아밀로이드 베타 단편이 근위축 측삭 경화증의 치료제로 사용될 수 있는 것을 밝힘으로서 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<15> 본 발명의 목적은 신경질환 중 SOD1의 돌연변이에 의해 유발되는 근위축 측삭 경화증의 예방 및 치료제를 개발하는 데 있고, 새로운 예방 및 치료제를 개발하기 위한 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <16> 상기 목적을 달성하기 위하여,
- <17> 본 발명은 서열번호 1의 돌연변이 SOD1과 상호결합하는, 서열번호 2 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편을 유효 성분으로 포함하는, 근위축 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- <18> 또한, 본 발명은 서열번호 2 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, 약학적으로 유효한 양의 아밀로이드 베타 단편을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 근위축 측삭 경화증 예방 방법을 제공한다.
- <19> 또한, 본 발명은 서열번호 2 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, 약학적으로 유효한 양의 아밀로이드 베타 단편을 근위축 측삭 경화증에 걸린 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 근위축 측삭 경화증 치료 방법을 제공한다.
- <20> 아울러, 본 발명은 1) 서열번호 1을 갖는 SOD1과 서열번호 2 내지 5 중 어느 하나의 서열을 갖는 아밀로이드 베타 및 피검 화합물을 접촉시키는 단계;
- <21> 2) 피검 화합물을 처리하지 않은 대조군에 비해 SOD1의 활성을 감소시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 근위축 측삭 경화증 치료제 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

효 과

<22> 본 발명은 돌연변이 SOD1과 특이적으로 강한 결합을 보이는 아밀로이드 베타 단편을 이용하여, 돌연변이 SOD1에 의해 유발되는 가족성 근위축 측삭 경화증을 치료할 수 있는 치료제를 제공하며, 이와 더불어 새로운 치료제 개발을 위한 스크리닝 방법을 제공하므로 가족성 근위축 측삭 경화증을 겪는 환우들의 고통을 완화시킬 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <23> 이하, 본 발명에서 사용되는 용어를 정의한다.
- <24> 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 ALS를 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- <25> 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 ALS 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- <26> 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- <27> 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 ALS 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- <28> 본 발명에서 사용되는 용어 "유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- <29> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <30>
- <31> 본 발명은 서열번호 1의 돌연변이 SOD1과 상호결합하는, 서열번호 2 내지 5로 구성된 군에서 선택되는

어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편을 유효 성분으로 포함하는, 근위축 측삭 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

<32> 또한, 상기 근위축 측삭 경화증은 서열번호 1의 돌연변이 SOD1에 의해 유발된 것이 바람직하다.

<33> 또한, 근위축 측삭 경화증은 가족성 근위축 측삭 경화증(Familiar Amyotrophic lateral sclerosis, FALS)인 것이 바람직하다.

<34> 가족성 근위축 측삭 경화증(이하, FALS라고 한다.)과 관련되어 있는 돌연변이 중에서, SOD1의 93번째 위치가 G(Gly, 글라이신)에서 A(Ala, 알라닌)으로 치환된 G93A 돌연변이 SOD1이 쥐에서 ALS를 유발한다. 이러한 G93A SOD1(서열번호 1)은 비정상적으로 집합체를 이루고, SOD1의 활성이 증가하게 되는데, 본 발명자들은 이러한 비정상적으로 결합된 집합체 형성을 억제하여 FALS를 예방 할 수 있는 물질을 찾고자 실험하였다.

<35> 그런데, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease, AD)에서 산화적 손상에 관련된 것이 SOD1이라는데 보고가 있었다는데 착안하여, 아밀로이드 베타 및 SOD1에 대한 연구를 진행하였다.

<36> 본 발명자는 SOD1과 아밀로이드 베타의 관계를 밝히고자, 아밀로이드 베타 단편 및 SOD1 및 G93A 돌연변이 SOD1을 제작하였다(도 1, 2 및 5 참조). 그 결과 아밀로이드 베타는 SOD1 및 G93A 돌연변이 SOD1과 강하게 결합함을 알 수 있었다(도 6 참조). 또한, 다른 신경단백질(시누클레인, Synuclein) 및 아밀로이드 중에서 아밀로이드 베타가 없는 부분(Non A β component of AD Amyloid, NAC)과 SOD1과의 결합여부를 확인하였으나, 결합되지 않음을 확인하였다(도 7 참조). 즉, SOD1은 아밀로이드 베타에 특이적으로 결합함을 확인할 수 있었다. 또한, 실제로 세포내에서 SOD1과 아밀로이드 베타가 결합함을 확인하기 위하여 HEK293 세포에서 발현위치를 확인한 결과, SOD1과 아밀로이드 베타의 발현 위치가 동일함을 확인하였다(도 8 참조).

<37> 아밀로이드 베타와 SOD1이 결합하는 것을 확인하였으나, 구체적으로 아밀로이드 베타의 어느 부위가 SOD1의 결합에 중요한지 확인하기 위하여 여러가지 아밀로이드 베타 단편을 제작하였다(도 9 참조). 이러한 단편을 제작하여 야생형 SOD1 및 G93A 돌연변이 SOD1과 결합여부를 확인하였다. 그 결과 서열번호 2 내지 5의 아밀로이드 베타 서열이 야생형 SOD1 및 G93A 돌연변이 SOD1과 결합함을 알 수 있었다(도 10 및 11 참조). 특히 야생형 SOD1 보다 돌연변이에서 SOD1에서 더욱 강하게 결합함을 알 수 있었으며, 바람직하게는 서열번호 5가 야생형 및 돌연변이 SOD1과 강하게 결합함을 알 수 있었다(도 11 참조).

<38> 이러한 결합이 실제로 야생형 및 돌연변이 SOD1의 활성에 영향을 미치는지 확인한 결과, 실제로 아밀로이드 베타 단편이 SOD1의 활성을 감소시킴을 확인하였다(도 12 참조).

<39> 그러므로, 서열번호 2 내지 5의 아밀로이드 베타의 단편이 G93A 돌연변이 SOD1과 강하게 결합하므로, 서열번호 2 내지 5의 아밀로이드 베타 단편을 포함하는 조성물을 투여하여 서열번호 1의 G93A 돌연변이 SOD1의 집합체에 의해 유발되는 근위축 측삭 경화증을 예방 할 수 있음은 당업자라면 용이하게 알 수 있을 것이다.

<40>

<41> 또한, 아밀로이드 베타가 뇌세포에서 축적되어 알츠하이머 병을 유발한다고 알려져 있다. 그러나, 이러한 아밀로이드 베타의 축적은 APP(amyloid precursor protein)과 관련성이 높다. APP는 type I 막단백질로서 신경세포의 발생과 분화 및 생존에 주요한 역할을 하는 것으로 보고되어 졌다 (Perez et al., 1997). 이러한 APP는 신경세포에서는 특이적으로 APP695 형태의 단백질을 발현하는데 다른 조직에서는 APP751, APP770 형태의 단백질을 발현하고 있다. APP의 대사 경로를 보면 정상인의 경우, 베타아밀로이드의 생성이 차단되어지는 non-amyloidogenic pathway가 진행되어지는데 이때에는 알파 시크리테아제라는 단백질 분해효소가 제일 먼저 작동하게 된다. 알파 시크리테아제에 의해 APP NTF (sAPP α)와 APP CTF (C83)가 생성되어지고 이것이 다시 감마 시크리테아제에 의해 절단될 경우에는 노인반점에 침착되지 않는 P3라는 A β 보다 짧은 펩타이드와 APP intracellular domain (AICD) fragment가 만들어 진다. AD 환자에게서 나타나는 노인반점의 주요 성분인 A β 를 생성하려면 APP가 베타 시크리테아제에 의하여 먼저 절단이 일어나게 되어 APP NTF (sAPP β)와 APP CTF (C99)를 만들면서 amyloidogenic pathway로 접어들게 된다. 베타 시크리테아제에 의하여 잘려진 APP CTF (C99)는 다시 감마 시크리테아제에 의해 절단되어지고 이것은 뇌 조직에 침착되어 노인반점을 만드는 A β 와 AICD를 생성하게 된다.

<42> 결국, 본원 발명에서 아밀로이드 베타의 단편은 이미 알파 시크리테아제의 절단부위에서 절단된 형태이므로(도 9 참조), 이러한 아밀로이드 베타의 투여는 알츠하이머로 질환을 유발할 수 없으며, 정상세포내에 존재하는 것이므로 세포에서 특정 독성을 유발할 위험도 없다.

- <43> 그러므로, 본 발명의 서열 2 내지 5의 아밀로이드 베타 단편은, G93A SOD1의 활성을 억제할 수 있는바, G93A SOD1의 집합체에 의해 유발된 ALS를 예방하는데 이용될 수 있다.
- <44> 본 발명의 ALS 예방 및 치료용 조성물은 서열번호 2 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- <45> 본 발명의 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 아밀로이드 베타 단편을 0.1 내지 50 중량 %로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- <46> 본 발명의 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 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 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 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, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 비경구 투여시 패취, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통할 수 있다.
- <47> 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 바람직하기로는 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 mg ~ 100 mg/kg이고, 바람직하기로는 0.001 mg ~ 50 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <48>
- <49> 또한, 본 발명은 서열번호 2 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, 약학적으로 유효한 양의 아밀로이드 베타 단편을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 근위축 측삭 경화증 예방 방법을 제공한다.
- <50> 또한, 본 발명은 서열번호 2 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는, 약학적으로 유효한 양의 아밀로이드 베타 단편을 근위축 측삭 경화증에 걸린 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 근위축 측삭 경화증 치료 방법을 제공한다.
- <51> 서열번호 2 내지 5로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편은 비정상적으로 증가된 SOD1의 활성을 억제할정도로 G93A 돌연변이 SOD1과 강하게 결합하므로, 상기 아밀로이드 베타 단편을 인간을 제외한 포유류에 투여하면 G93A 돌연변이 SOD1의 활성이 억제되어 근위축 측삭 경화증을 억제하여 예방할 수 있다.
- <52> 또한, 근위축 측삭 경화증에 걸린 인간을 제외한 포유류에 상기 아밀로이드 베타 단편을 투여하면, 비정상적으로 증가된 SOD1 집합체 형성을 억제하므로 상기 질환을 치료할 수 있다.
- <53> 아울러, 1) 서열번호 1을 갖는 SOD1과 서열번호 2 내지 5 중 어느 하나의 서열을 갖는 아밀로이드 베타 및 피검 화합물을 접촉시키는 단계;
- <54> 2) 피검 화합물을 처리하지 않은 대조군에 비해 SOD1의 활성을 감소시키는 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 근위축 측삭 경화증 치료제 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- <55> 단계 1)의 아밀로이드 베타 서열은 2 내지 5가 가능하나, 바람직하게는 서열번호 5를 적용할 수 있다. 그러나, 이러한, 서열은 서열번호 2 내지 5에 한정되는 것이 아니며, 아밀로이드 베타의 일부분으로서 SOD1과 결합할 수 있다면 이러한 폴리 펩타이드 또한 가능할 것이다. 서열번호 2 내지 5의 아밀로이드 베타에 비해

G93A SOD1 돌연변이의 활성을 억제시킬 수 있는 물질의 경우 이러한 물질은 SOD1과 강하게 결합한다는 것이 예상된다. 그러므로 이렇게 스크리닝된 물질은 G93A에 유발되는 ALS의 예방 및 치료용 물질이 될 수 있으므로, 상기의 스크리닝 방법으로 대량의 ALS 예방 및 치료용 물질을 스크리닝할 수 있음을 알 수 있다.

실시예

<56> 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

<57> 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기의 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 플라스미드의 제작

<59> 림포사이트로부터 전체 RNA 및 를 추출하여, 역전사 효소로 cDNA를 제작하였다. 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)의 아밀로이드 베타(amyloid beta, A β) 및 C 말단 100(C-terminal 100, 이하 C100이라 한다)의 cDNA는 Pfu 전사효소 (StratageneTM)를 이용하여 PCR을 통하여 수득하였다. A β 및 C100을 얻기 위한 프라이머는 하기와 같다.

<60> A β 및 C말단100을 얻기 위한 정방향 프라이머(서열번호 6):

<61> 5'-GCGCTCGAGCCGGATCCGCCATGGATGCAGAATTC-3'

<62> A β 를 얻기 위한 역방향 프라이머(서열번호 7):

<63> 5'-GCGCAAGCTTGTGCGACCTACGTATGACAACAACC-3'

<64> C100을 얻기 위한 역방향 프라이머(서열번호 8):

<65> 5'-GCGCAAGCTTGTGCGACCTAGTTCTGCATCTGCTC-3'

<66> 상기 프라이머로 증폭된 DNA 단편은 pcDNA 3.0GFP 벡터에다 삽입하여 각각의 벡터가 A β 및 C100을 발현할 수 있게 하였다. 이렇게 A β 및 C100의 DNA를 만들 수 있도록 제작된 것을 pA β 및 pC100이라고 한다. 이와 더불어 pA β 및 pC100을 이용하여 pGFP-A β -1-16, 17-25, 17-42 및 26-100의 서열을 갖는 플라스미드를 제작하였다.

<67> SOD1의 cDNA도 인간의 첫번째 가닥의 cDNA를 주형으로하여 Pfu 폴리머라제(StratageneTM)를 이용하여 PCR로 증폭하였다. SOD1을 얻기 위한 프라이머는 하기와 같다.

<68> 정방향 프라이머(서열번호 9): 5'-GCGCGAATTCATGGCGACGAAGGCCGTGTGC-3'

<69> 역방향 프라이머(서열번호 10): 5'-GCGCGGTACCTTGGGCGATCCCAATTACACCA-3'

<70> 상기의 프라이머로 증폭된 SOD1의 단편은 pcDNA3.0-Flag 벡터에 삽입하여 pcDNA-Flag-SOD1 벡터를 제작하였다. 또한, SOD1의 93번째 글라이신을 알라닌으로 치환한 돌연변이 형태를 제작하기 위하여 QuickChange site Directed Matagenesis Kit(StratageneTM)을 사용하였다.

<실시예 2> 형질 전환을 시키기 위한 세포 배양, 형질 전환 및 항체의 부착.

<72> 인간 배아 신장 세포(Human embryonic kidney 293 cell, HEK 293 cell) 및 인간 신경아메바증(neuroglioma) H4 세포(American Type Culture Collection, ATCC)를 5% CO₂ 배양기에서 37°C에서 배양하였다. 상기 세포는 8%(v/v) 열 불화성화된 우태혈청(fetal bovine serum), 50units/mL 페니실린 및 50ug/mL 스트렙토마이신이 포함된 DMEM(GibcoTM)에서 배양하였다.

<73> HEK293 세포나 H4 세포에 플라스미드를 형질전환 시키기 위하여, PEI 형질전환 방법(Sigma, <http://www.pathology.washington.edu/research/labs/oshima/Lishan/PEI%20transfection293.pdf>)을 이용하여 형질전환 시켰다. 형질전환 후에 5% CO₂ 배양기에서 37°C에서 20 - 30시간 배양하였다. 여러가지 분석을 위해 세포들을 획득하였다. 또한, 이뮤노블롯(immunoblots)을 위해, anti-GFP, anti-SOD1 및 anti-LexA 항체(이상 Santa Cruz Biotechnology)를 이용하였으며, anti-P-JNK1/2, anti-P-JNK 항체(이상 Cell Singlaing), anti β -actin, anti Flag 항체(이상 Sigma) 및 anti-PARP 항체(이상 Phamingen)를 이용하였다.

<74> <실시예 3> 면역 침강 분석을 이용한 SOD1과 Aβ 결합 분석

<75> 면역 침강 분석(co-immunoprecipitation)을 위하여, 형질 전환된 HEK293세포를, 프로테아제 억제제 (aprotinin 및 leupeptin 각각 2ug/mL 와 0.1mM PMSF)가 포함된 라이시스 버퍼(lysis buffer, 0.2% digitonin, 20mM HEPES(pH 7.5), 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 50mM MgCl₂ 및 1mM DTT)를 이용하여 분쇄한 뒤, 얼음에서 1시간 배양하였다. 단백질을 추출물(1mg)을 Protein G Sepharose A Fast Flow(Amersham Biotechnology)를 이용하여 전처리한후, 4℃에서 1시간간 흔들어준 후, anti-GFP(1ug/mL) 또는 anti-LexA(1ug/mL)과 4℃에서 3시간 반응시켰다. 면역복합체(immunocomplexes)는 Protein G Sepharose 4 Fast Flow에서 4℃에서 2시간 배양시킨 후 원심분리를 이용하여 분리하였다. 침강된 세포로즈 비즈는 PBS로 3회 세척하고, 면역침강된 생성물은 샘플 버퍼 (60mM Tris-HCl(pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM β-mercaptoethanol 및 0.1% bromophenol blue)에서 끓여서 비드로 부터 추출하였다. 추출된 단백질은 15% SDS-PAGE하에서 anti-SOD1, anti-GFP 및 anti-LexA 항체를 이용한 면역분석(immunoblot)을 이용하여 분석하였다.

<76> 상기 블릿은 5%의 탈지분유(non-fat dried milk)와 TBST(10mM Tris-HCL(pH 7.5), 150mM NaCl 및 0.1%Tween-20)하에서 상온으로 1시간 동안 블럭시켰다. 이렇게 블럭된 막은 1차 항체로 1시간 내지 3시간 동안 배양시킨 뒤에 2차 항체로 1시간 가량 처리하였다. 항원-항체 복합체는 Enhanced chemiluminescence(ECL) kit(Santa Cruz BiotechnologyTM)을 이용하여 측정하였다.

<77> <실험예 1> 면역형광 측정을 통한 SOD1 과 Aβ 결합 분석

<78> 형질전환된 세포를 PBS로 세척한 뒤, 상온에서 5분간 4% 포름알데히드용액에서 고정시켰다. 그후 PBS로 간단히 세척하였다. 상기 세포를 50mM NH₄Cl이 포함된 PBS에 10분간 담가두었다가, PBS로 3회 세척하여주었다. 세포의 투과성을 높이기 위하여, 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS에서 5분간 배양한 뒤, PBS로 세척하여 준다. 상기 세포들은 2% BSA가 들어있는 PBS로 1시간 동안 블럭킹을 시켰다. 블럭킹후 블럭킹 솔루션안에서 3시간 동안 anti-Flag(1:1000)으로 배양시키고, Cy3-결합된 anti-mouse IgG(1:500)을 이용하여 2시간 동안 배양시켰다. 블럭킹 솔루션으로 세척한후, 세포를 5분동안 PBS로 세척하고, 2ug/mL DAPI 용액에 5분간 방치하였다. 이후 GFP-Amyloid β 및 SOD1의 위치는 형광 현미경(Carl ZeissTM)을 이용하여 분석하였다. 그 결과 아밀로이드 베타와 야생형 SOD1 및 돌연변이 G93A SOD1이 결합함을 알 수 있었으며(도 6 참조), SOD1이 신경에서 발현되는 단백질은 시누클레인이나 아밀로이드 베타가 없는 아밀로이드와는 결합하지 않음을 확인하였다(도 7 참조). 또한, 아밀로이드 베타의 단편만으로도 야생형 SOD1 및 돌연변이 G93A SOD1에 결합가능함을 알 수 있었다(도 10 및 11 참조).

<79> <실험예 2> SOD의 활성 측정

<80> H4 세포를 라이시스 버퍼(20mM HEPES(pH7.2), 1mM EGTA, 210mM 만니톨 및 70mM 수크로즈)에서 4℃로 10분간 배양하였다. 세포 펠렛(pellet)은 초음파 기기로 1분간 (35%, on-off time; 2 sec) 처리하여 분쇄하였다. 라이솜(lysate)은 원심분리기를 이용하여 수집되었고, anti-Flag 및 anti-SOD1을 이용하여 면역침강 시켰다. SOD1 활성 분석은 Superoxide Dismutase Assay Kit II(CalbiochemTM)을 이용하여 수행하였다. 그 결과 아밀로이드 베타가 야생형 SOD1 및 돌연변이 G93A SOD1의 활성을 특이적으로 억제함을 알 수 있었다(도 12 참조).

<81> <제조예> : 약학적 제제의 제조

<82> 1. 산제의 제조

<83> 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편 10 mg

<84> 유당 15 mg

<85> 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<86> 2. 정제의 제조

<87> 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편 10 mg

<88> 옥수수전분 15 mg

<89> 유 당 15 mg

- <90> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <91> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- <92> 3. 캡슐제의 제조
- <93> 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편 10 mg
- <94> 옥수수전분 15 mg
- <95> 유 당 15 mg
- <96> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <97> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- <98> 4. 환의 제조
- <99> 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편 10 mg
- <100> 유당 15 mg
- <101> 글리세린 10 mg
- <102> 자일리톨 5 mg
- <103> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- <104> 5. 과립의 제조
- <105> 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편 10 mg
- <106> 대두 추출물 5 mg
- <107> 포도당 10 mg
- <108> 전분 50 mg
- <109> 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 10 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- <110> 6. 주사제의 제조
- <111> 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 아밀로이드 베타 단편 10 mg
- <112> 폴리에틸렌글리콜 5 mg
- <113> 에탄올 5 ml
- <114> 상기의 성분을 혼합한 후, 인산화 생리식염수 400 ml에 가온하여 용해시킨 후 냉각시킨 다음, 인산화 생리식염수를 첨가하여 500 ml가 되도록 하여 멸균여과기로 여과하여 통상적인 공정에 따라 1 ml씩 바이알을 충전하였다.

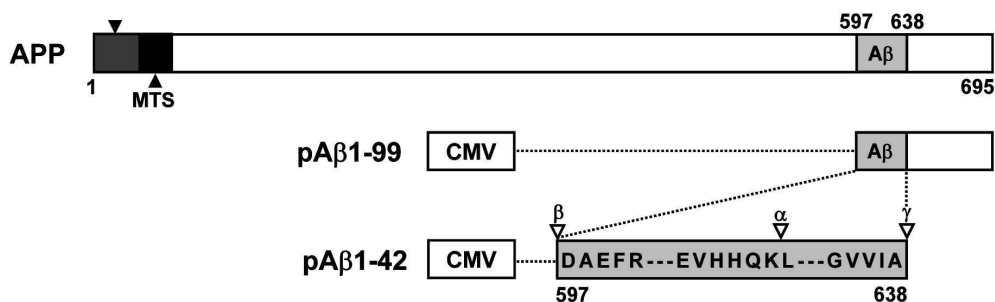
도면의 간단한 설명

- <115> 도 1은 APP(amyloid precursor protein)의 모식도 및 아밀로이드 베타 단편의 모식도 이다.
- <116> 1-36aa는 소포체(endoplasmic reticulum, ER) 타겟팅 서열을 나타낸다.
- <117> 36-61aa는 미토콘드리아 타겟팅 서열(a mitochondrial targeting sequence, MTS)을 나타낸다.
- <118> 597-638aa은 아밀로이드 베타 부위를 나타낸다.
- <119> α , β , γ 는 α , β , γ secretase 절단 부위를 의미한다.
- <120> 도 2는 GFP와 결합된 재조합 아밀로이드 베타 단편 및 C100에 대한 모식도이다.
- <121> 도 3은 A β 및 C100의 발현에 따른 PARP 절단 및 p53의 발현을 증가시켜주는 것을 보여주는 도면이다.

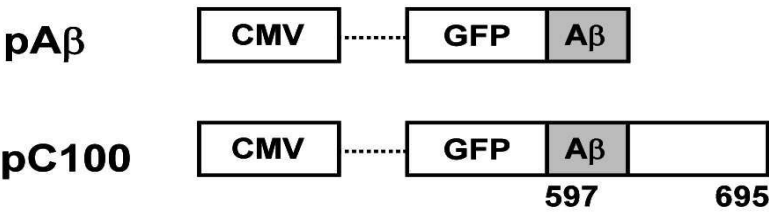
- <122> 도 4는 A β 및 C100이 핵 주변 및 세포질에서 결집된 것을 보여주는 도면이다.
- <123> 도 5는 야생형 SOD1 및 돌연변이 G93A SOD1의 모식도이다.
- <124> 이미다졸 리간드가 결합되는 위치 : His63
- <125> 구리 이온이 결합되는 위치 : His46, His48 및 His120
- <126> 아연 이온이 결합되는 위치 : His71, His80 및 His83
- <127> 도 6은 세포내 아밀로이드 베타와 SOD1 및 돌연변이 SOD1이 상호 결합하는 것을 보여주는 도면이다.
- <128> ► : endogenous SOD1
- <129> ▷ : Flag-tagged wild type SOD1 또는 SOD1 G93A 돌연변이
- <130> 도 7은 시누클레인(Synuclein)과 NAC(non A β component of AD amyloid)는 LexA와 결합되어 있는데, 이것은 SOD1 또는 돌연변이 SOD1과 결합하지 않음을 보여주는 도면이다.
- <131> 도 8은 HEK293세포에서 아밀로이드 베타가 야생형 SOD1 및 돌연변이 SOD1과 세포내에서 동일한 위치에 존재함을 보여주는 도면이다.
- <132> 도 9는 아밀로이드 베타의 단편을 나타내주는 모식도이다.
- <133> 도 10은 야생형 SOD1과 아밀로이드 베타의 단편과의 결합 여부를 보여주는 도면이다.
- <134> 도 11은 돌연변이 SOD1과 아밀로이드 베타의 단편과의 결합 여부를 보여주는 도면이다.
- <135> ► : endogenous SOD1
- <136> ▷ : Flag-tagged wild type SOD1 또는 SOD1 G93A 돌연변이
- <137> 도 12는 야생형 SOD1 및 돌연변이 SOD1의 활성이 세포내 아밀로이드 베타와의 결합에 따라 변화하는 것을 보여주는 도면이다.

도면

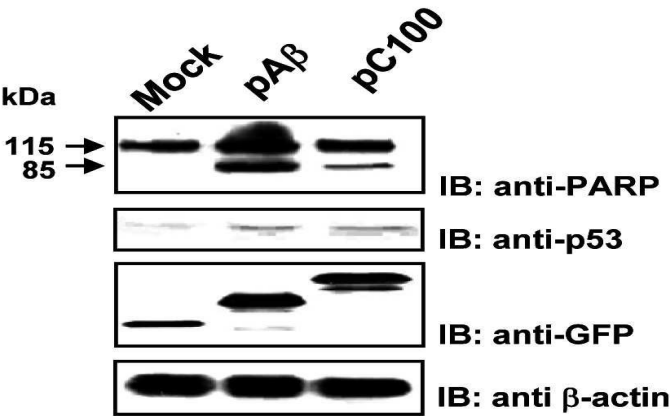
도면1



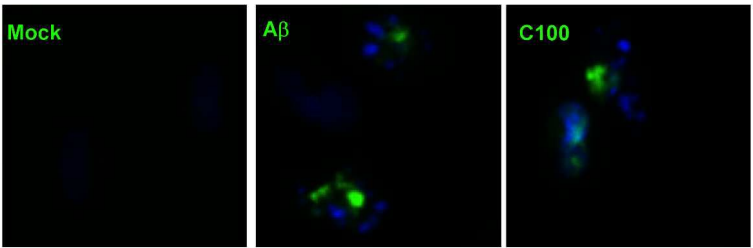
도면2



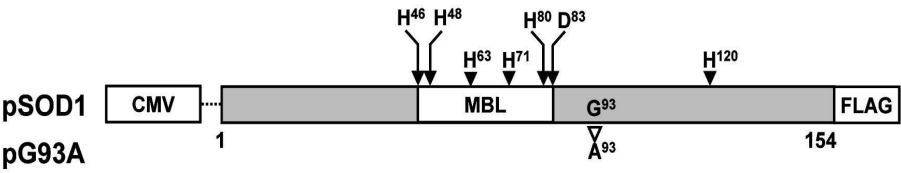
도면3



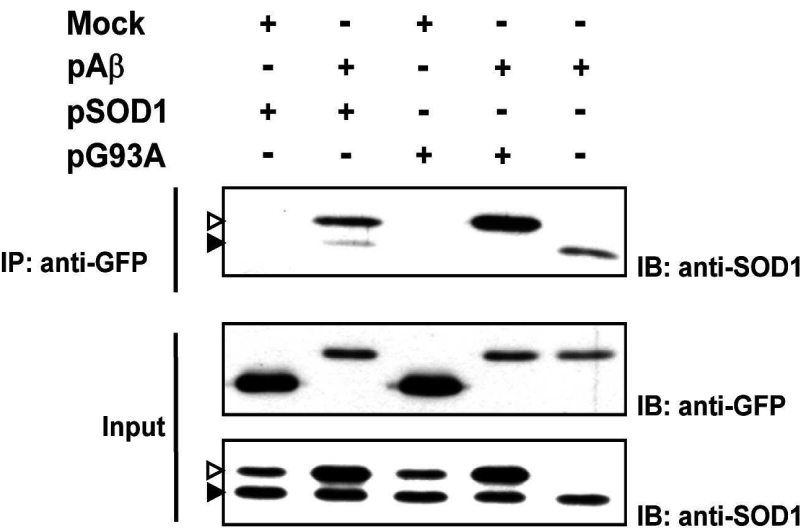
도면4



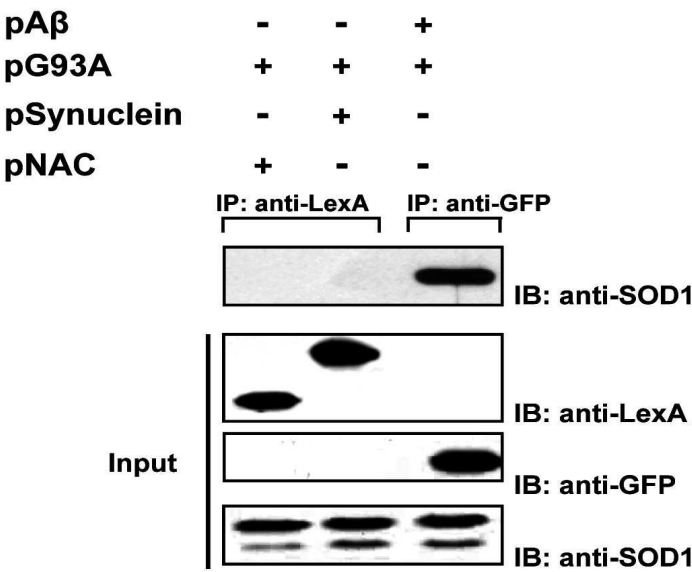
도면5



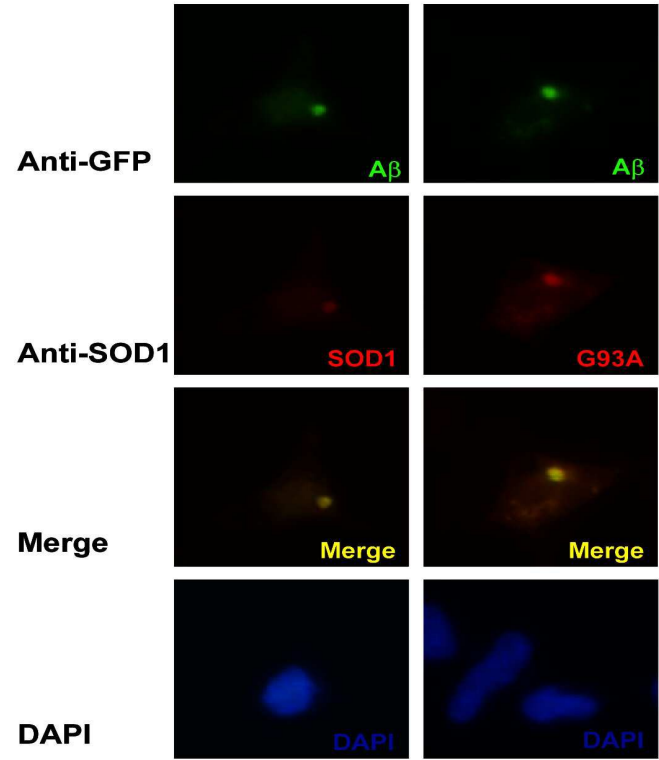
도면6



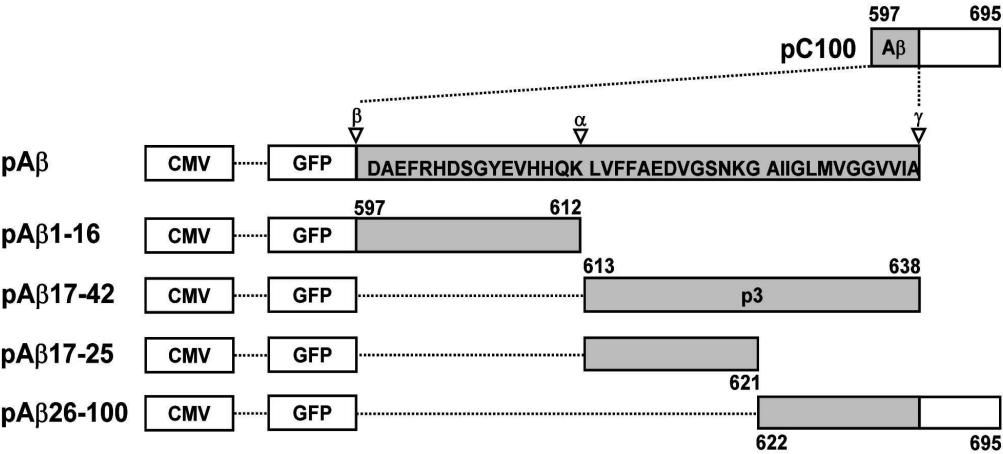
도면7



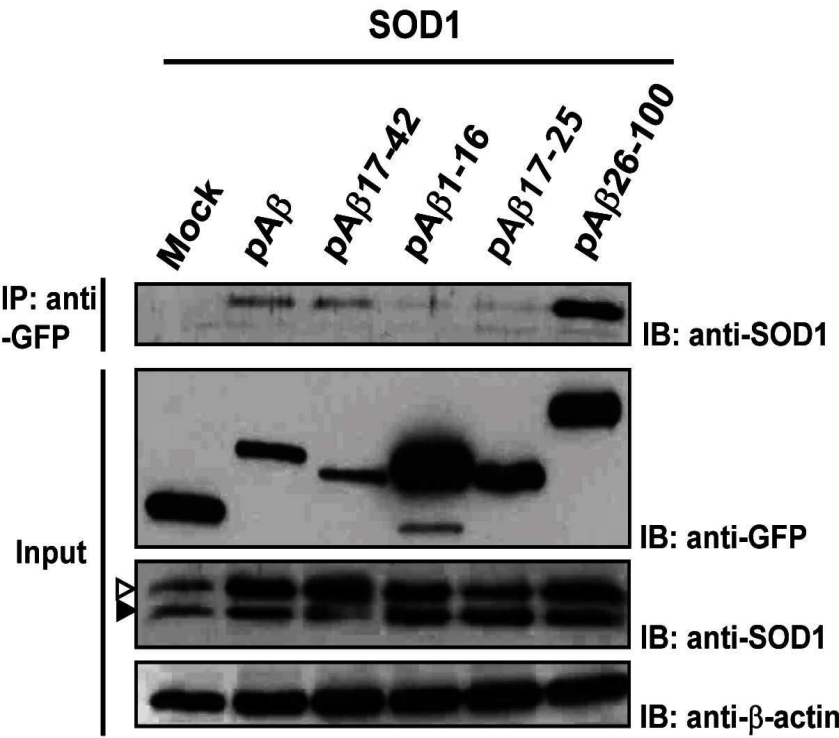
도면8



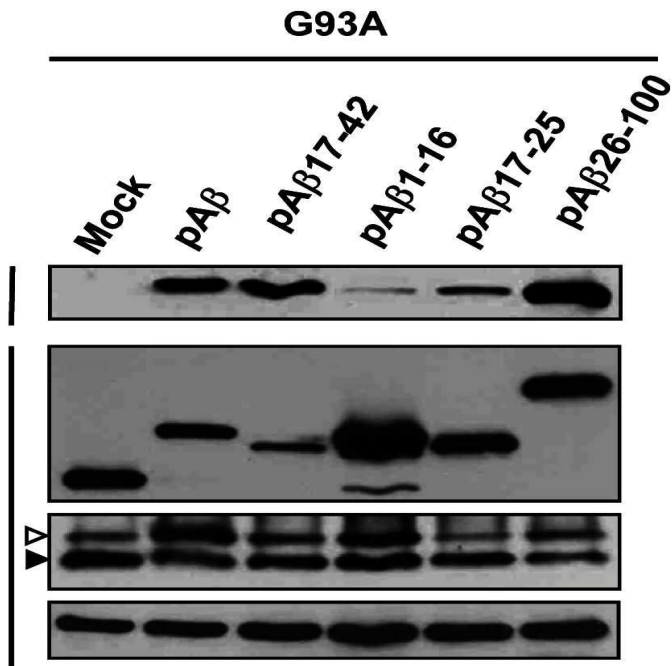
도면9



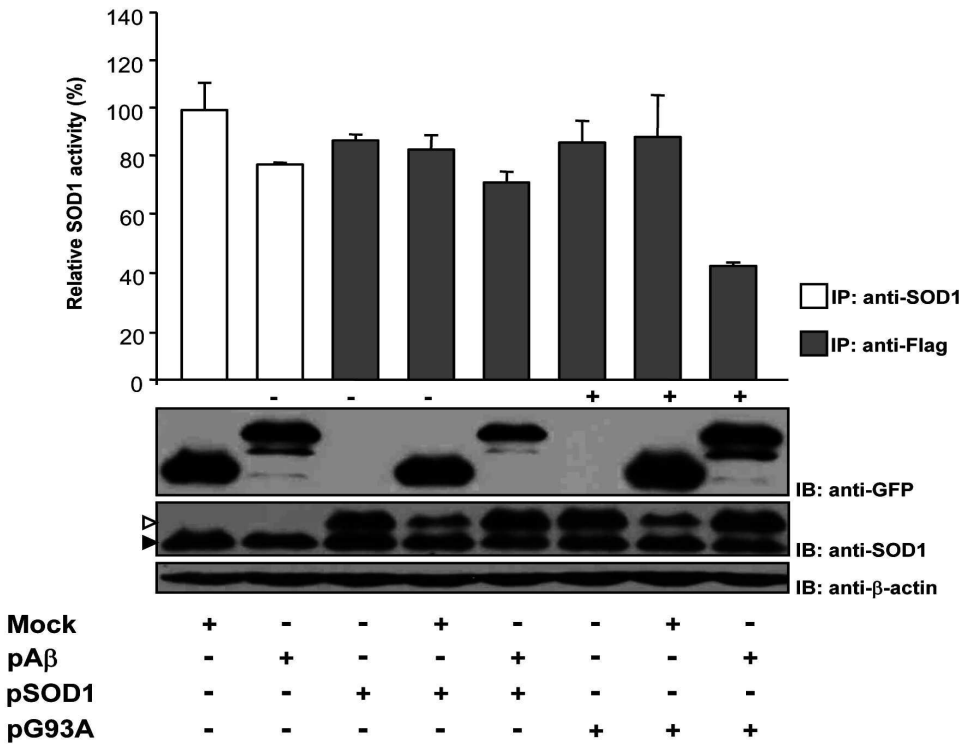
도면10



도면11



도면12



서열 목록

<110> Korea University
 <120> Composition for preventing and treating ALS by mutant SOD1 comprising amyloid beta fragment

<130> 9p-03-35

<160> 10

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> G93A SOD1 mutant form

<220>
 <221> SITE
 <222> (1)
 <223> Start codon, Methionine, is deleted since the researcher defining the SOD mutant form numbered the SOD mutant without start codon.

<400> 1
 Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln Gly
 1 5 10 15
 Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp
 20 25 30
 Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His
 35 40 45
 Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His Phe
 50 55 60
 Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg His
 65 70 75 80
 Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Ala Val Ala Asp

85

90

95

Val Ser Ile Glu Asp Ser Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys Ile
100 105 110

Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys
115 120 125

Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg Leu
130 135 140

Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln
145 150

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fragment 1 to 16 of amyloid beta

<400> 2
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

<210> 3
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> fragment 17 to 42 of amyloid beta

<400> 3
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
1 5 10 15

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

20 25

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> fragment 17 to 25 of amyloid beta

<400> 4
 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly
 1 5

<210> 5
 <211> 74
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> fragment 26 to 100 of amyloid beta

<400> 5
 Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile
 1 5 10 15

Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr
 20 25 30

Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro
 35 40 45

Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro
 50 55 60

Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
 65 70

<210> 6
 <211> 35
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer to obtain amyloid beta and C100

<400> 6

gcgctcgagc cggatccgcc atggatgcag aattc

35

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer to obtain amyloid beta

<400> 7

gcgcaagctt gtcgacctac gctatgacaa caac

34

<210> 8

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer to obtain C100

<400> 8

gcgcaagctt gtcgacctag ttctgcatct gctc

34

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer to obtain SOD1

<400> 9

gcgcgaattc atggcgacga aggccgtgtg c 31

<210> 10
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer to obtain SOD1

<400> 10
 gcgcggtacc ttggcgatc ccaattacac ca 32