

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0171226
(43) 공개일자 2023년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/341 (2006.01) A61K 31/353 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01) A61K 31/517 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/341 (2013.01)
A61K 31/353 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0071541

(22) 출원일자 2022년06월13일

심사청구일자 2022년06월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

재단법인 경기도경제과학진흥원

경기도 수원시 영통구 광교로 107 (이의동)

(72) 발명자

박해철

경기도 과천시 별양로 12, 337동 903호(원문동, 래미안 슈르)

이윤경

인천광역시 남동구 청능대로718번길 7(논현동, 소래마을풍림아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 무한

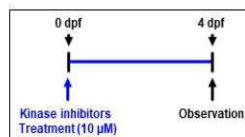
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 키나아제 저해제를 유효성분으로 포함하는 탈수초성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 탈수초성 질환 유도 제브라피쉬에서 운동성 회복 및 희소돌기아교세포 재생을 촉진하는 것으로 확인된 키나아제 저해제를 유효성분으로 포함하는 탈수초성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명은 현재 개발된 탈수초성 질환 치료제가 단순히 질환에 의해 나타나는 2차 증상만을 완화하는 것에 그치는 한계를 극복하고 탈수초성 질환의 근본적 치료에 기여할 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



1) 10 μM	2) 1 μM	3) 100 nM	4) 10 nM
- Hatching rate ≥ 90%	- 90% > Hatching rate ≥ 70 % - 40% > Malformation ≥ 20 % - 40% > Abnormal swimming pattern ≥ 20 %	- 70% > Hatching rate ≥ 50 % - 70% > Malformation ≥ 40 % - 70% > Abnormal swimming pattern ≥ 40 % - 40% > Mortality ≥ 20 %	- Hatching rate < 50 % - Mortality ≥ 40 %

(52) CPC특허분류

A61K 31/4709 (2013.01)

A61K 31/517 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

(72) 발명자

김수현

경기도 안산시 상록구 해양4로 31, 111동 302호(사동, 그랑시티자이)

최용문

경기도 용인시 기흥구 연남로29번길 30-3(연남동)

송명진

경기도 수원시 권선구 입북로 50, 117동 601호(입북동, 서수원 자이아파트)

김판수

경기도 수원시 장안구 천천로21번길 33, 612동 503호(정자동, 화서역 위너스 파크)

정귀완

경기도 용인시 수지구 만현로 99, 606동 1004호 (상현동, 만현마을쌍용3차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711170508
과제번호	2021M3H9A1097594
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	국가생명연구자원선진화사업(과기부)
연구과제명	형광리포터 제브라피쉬 협력센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.05.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

3BDO, ONO-7475, AZ12601011, 및 Theaflavin 3,3'-digallate으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 키나아제 저해제를 유효성분으로 포함하는 탈수초성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 운동성을 회복시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 희소돌기아교세포의 재생을 촉진하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 키나아제 저해제를 10 nM~10 μ M 농도로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탈수초성 질환 유도 제브라피쉬에서 운동성 회복 및 희소돌기아교세포 재생을 촉진하는 것으로 확인된 키나아제 저해제를 유효성분으로 포함하는 탈수초성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 탈수초성 질환 (demyelinating disease)은 축삭돌기를 둘러싼 수초가 손상되어 나타나는 신경계통 질환이다. 다발성 경화증 (multiple sclerosis)은 대표적인 탈수초성 질환으로, 인체 내 면역 조절 기능 장애로 인하여 자신의 미엘린 수초 (myelin sheath)를 공격하여 파괴하는 자가 면역 질환 (autoimmune disease), 또는 중추신경계에서 발생하는 염증성 탈수초성 질환 (inflammatory demyelinating disease)으로 알려져 있다. 이 질환은 전 세계적으로 250만명 가량, 국내에서는 2,500여명의 유병률을 보이고 있음에도 불구하고, 여전히 병인이 명확하지 않고, 현재 사용 중이거나 개발 중인 치료제들은 면역반응 조절을 통하여 질환의 재발 빈도를 낮추거나, 진행 정도만을 늦출 수 있어 손상된 수초는 회복시킬 수 없어 근본적이 치료가 불가능한 실정이다. 따라서 완전한 치료를 위해서는 기존의 방법인 자가 면역 반응의 억제와 더불어 탈수초화가 진행된 부위에서 희소돌기아교세포에 의한 재수초화를 촉진할 수 있는 치료제 개발이 필요하다.

[0004] 제브라피쉬는 인간 유전체와 높은 유전학적 및 기능적 유사성을 가진 척추동물로서, 인간의 질병 유전자와 80% 이상의 상동성을 보유하며, 신경계 및 각종 기관형성과정이 사람과 매우 유사하기에 인간의 질환연구를 위하여 세계적으로 많은 연구가 이루어지고 있는 중요한 동물모델이다. 이와 함께 제브라피쉬는 유전자 조작이 용이하여 knock-out 및 형질전환 모델 개발이 가능하며, 발생과정 중 배아가 투명하기 때문에 희소돌기아교세포 및 수초 특이적으로 형광단백질을 발현하는 형질전환 제브라피쉬를 이용할 경우, 생체 내에서 신경세포의 수초화 및 탈수초화 과정 관찰이 가능한 유일한 척추동물이기도 하다. 또한 대량의 배아 확보가 가능하기 때문에 질환 치료제 후보물질의 스크리닝에 매우 적합한 모델로 이러한 장점을 바탕으로 본 발명에서 제브라피쉬를

활용하였다.

[0005] 본 발명에서 활용한 제브라피쉬는 Q (QF2-QUAS) system을 적용하여 제조한 형질전환 제브라피쉬로, 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte)만을 특이적으로 사멸시키기 위하여 화학유전학 기법인 enhanced-potency nitroreductase (epNTR) / metronidazole (MTZ) system을 활용하였다. epNTR / MTZ system은 epNTR이 전구 약물 (pro-drug) 상태의 MTZ를 환원 (reduction)하여 세포독성 (cytotoxin)을 나타내는 물질로 전환시켜 희소돌기아교세포의 사멸을 유도할 수 있는 방법으로, 이를 통하여 형질전환 제브라피쉬에서 희소돌기아교세포의 사멸을 통해 탈수초화 유발 제브라피쉬 모델을 제조할 수 있다. 이렇게 제조된 모델은 탈수초성 질환 치료제 개발을 위한 후보물질들의 유효성 평가에 유용하게 활용 가능하다.

[0006] 생체 내 단백질 및 지질 등의 분자는 인산화 (phosphorylation) 상태에 따라 활성 및 반응성, 다른 분자와의 결합력 등이 변화한다. 따라서 키나아제 (kinase)는 물질대사 및 세포간의 신호 전달 (cell signaling), 단백질 조절 (protein regulation), 세포 수송, 분비를 조절하는 모든 신호전달경로에서 매우 중요하여 다양한 질환에서 잠재적인 약물 타겟으로 연구되어 왔으며, 실제로 38개의 키나아제 저해제 (kinase inhibitor)가 치료제로 승인되었다. 또한 AKT 및 JNK1, FYN, RHO 키나아제를 비롯한 다양한 키나아제들이 희소돌기아교세포의 분화 및 이동, 수초화 형성 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 최근 Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor가 임상 2상 시험을 통하여 재발성 다발성 경화증 환자에서 효과적으로 탈수초화 장애를 감소시킨 것으로 보고되어 새로운 신약 후보로 제시되고 있다. 따라서 본 발명에서는 키나아제 저해제에 대한 탈수초성 질환 개선 효능 유효성 평가를 통한 유효물질 발굴을 목표로 하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) S. Kim, D. W. Lee, M. Schachner, H. C. Park, Scientific reports, v.11, no.1, 2021년, pp.5878

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 탈수초성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 형질전환 제브라피쉬를 이용한 탈수초성 질환 동물모델을 이용하여 탈수초성 질환 치료 약물 스크리닝 한 결과 최종 선정된 4종 키나아제 저해제를 탈수초성 질환의 예방 또는 치료 용도에 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 4종 키나아제 저해제로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 키나아제 저해제를 유효성분으로 포함하는 탈수초성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 탈수초성 질환이 발병하거나 상기 질환 발병 가능성이 높은 환자에 상기 4종 키나아제 저해제를 투여하는 단계를 포함하는 탈수초성 질환의 치료방법을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 탈수초성 질환 치료 물질로 선별된 4종의 키나아제 저해제는 3BDO, ONO-7475, AZ12601011, 및 Theaflavin 3,3'-digallate이다.

[0016] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 선별된 키나아제 저해제는 탈수초성 질환의 증상인 운동성 감소를 회복시킬 수 있다.

- [0017] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 선별된 키나아제 저해제는 회소돌기아교세포의 재생을 촉진할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 선별된 키나아제 저해제는 상기 개체에 1회/1일 10 nM ~ 10 μ M의 농도로 배아 배지에 녹여 4일간 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 회소돌기아교세포 특이적으로 형광을 발현하는 형질전환 제브라피쉬를 이용하여 탈수초화를 유발 후, 운동성 회복 및 회소돌기아교세포의 재생에 유의한 효과를 나타내는 4종의 키나아제 저해제 유효물질을 발굴하였는바, 선별된 상기 키나아제 저해제는 탈수초성 질환의 치료제로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 타크린(tacrine) 처리에 따른 탈수초성 질환 제브라피쉬 모델에서의 운동성 변화 확인을 위한 실험 모식도(A)와 실험의 결과이다(B).
- 도 2는 타크린(tacrine) 처리에 따른 탈수초성 질환 제브라피쉬 모델에서의 회소돌기아교세포의 사멸 및 재생 확인을 위한 실험 모식도(A)와 실험의 결과이다(B).
- 도 3은 키나아제 억제제의 독성 실험 모식도와 그 결과이다.
- 도 4는 탈수초성 질환 제브라피쉬 모델을 이용한 약물 스크리닝 실험의 모식도이다.
- 도 5는 탈수초성 질환 제브라피쉬에 처리된 총 160종 키나아제 저해제에 의한 제브라피쉬의 운동성 변화를 확인한 결과이다.
- 도 6은 탈수초성 질환 제브라피쉬에 처리된 총 17종 키나아제 저해제에 의한 제브라피쉬의 회소돌기아교세포의 정도를 확인한 결과이다.
- 도 7은 탈수초성 질환 치료 약물로 최종 선정된 4종 키나아제 억제제의 타겟을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명자들은 신경세포의 수초화 및 재수초화에 작용하는 신경 조절물질과 이의 기전을 연구하기 위하여 빠르고 효율적으로 탈수초화 질환을 유도할 수 있는 동물모델을 제조하고, 탈수초화가 진행된 질환의 발생 부위에서 회소돌기아교세포에 의한 재수초화를 촉진할 수 있는 치료제 개발을 위한 약물 후보물질의 유효성 검증에 상기 동물모델이 효과적으로 작동함을 확인하였다.
- [0024] 본 발명의 형질전환 제브라피쉬는 MBP 프로모터 하에서 작동하는 QF2 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터(구체적으로, mbpa:QF2pA plasmid)와 QUAS 프로모터 하에서 작동하는 epNTR 및 리포터 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터(구체적으로, QUAS:epNTR-p2a-mCherry plasmid)를 제브라피쉬의 수정란에 유전자전이효소(transposase)와 함께 미세주입(microinjection) 후 성체(F0)로 키운 후 야생형 제브라피쉬와 교배 후 확보된 제브라피쉬에서 형광 단백질을 발현하는 제브라피쉬(F1)을 선별함으로써 제조될 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명의 탈수초성 질환 동물모델은 상기 본 발명의 형질전환 제브라피쉬에 MTZ(metronidazole)를 처리함으로써 제조될 수 있다.
- [0026] 종래의 Gal4-UAS system을 이용하여 개발된 형질전환 제브라피쉬는 고농도의 MTZ (10 mM)를 60시간의 장시간 처리를 통해 회소돌기아교세포의 사멸이 유발되는 반면 본 발명의 상술한 형질전환 제브라피쉬는 저농도의 MTZ (2 mM)를 18시간의 단시간 처리를 통해 기존의 모델보다 강력한 수준으로 회소돌기아교세포의 사멸이 유발됨을 확인할 수 있었다. 본 발명의 형질전환 제브라피쉬는 종래의 그것보다 약물 사용량을 1/5 감소시킬 수 있으며, 1/3.3 감소된 시간 안에 효율적으로 탈수초성 질환을 유발할 수 있다.
- [0027] 이에, 본 발명은 본 발명의 탈수초성 질환 동물모델을 이용한 탈수초성 질환 치료 물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명자들은 제조한 탈수초성 질환 동물모델을 이용하여 탈수초성 질환의 증상인 운동성 감소를 회복시키고

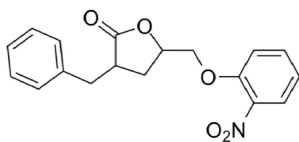
희소돌기아교세포의 사멸 억제 및/또는 그 재생을 촉진하는 4종 키나아제 저해제를 확인하고 이를 탈수초성 질환의 치료 용도로 제공한다.

[0029] 구체적으로, 본 발명자들은 제조된 탈수초성 질환 동물모델에 탈수초성 질환의 치료에 적용가능할 것으로 기대되는 총 160종의 키나아제 저해제를 처리하고 탈수초성 질환이 유도된 제브라피쉬의 운동성을 회복하는 17종 키나아제 저해제를 확인하였다. 그리고 행동기반 분석을 통해 선별된 17종 키나아제 저해제를 처리한 제브라피쉬를 이미징 기반 분석을 추가로 수행하였다. 그 결과 희소돌기아교세포의 재생을 촉진하는 최종 4종 키나아제 저해제를 확인하였다.

[0030] 최종적으로 탈수초성 질환의 치료제로 선별된 4종 키나아제는 3BDO, ONO-7475, AZ12601011, 및 Theaflavin 3,3'-digallate이다.

[0031] 첫 번째 유효물질인 3BDO는 하기 화학식 1의 구조를 갖는 butyrolactone 유도체로서 mTOR를 통해 조절되는 autophagy를 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한, autophagy는 슈만세포와 희소돌기아교세포의 성숙 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고, 비정상적인 autophagy flux는 비정상적인 수초화를 특징으로 하는 다양한 신경 장애와 관련이 있기에 autophagy가 탈수초성 질환에 중요한 역할을 함과 동시에 치료 타겟으로의 가능성도 있다고 판단된다. 3BDO의 또 다른 타겟인 mTOR 신호전달도 수초화 과정과 매우 밀접한 것으로 보고되고 있다. 보고된 연구 결과에 따르면, 중추신경계의 희소돌기아교세포 특이적 mTOR knock-down 마우스에서 성숙한 희소돌기아교세포의 수가 감소하였고, 수초화의 개시 지연과 동시에 수초화 관련 단백질들의 발현 시기도 지연되어, mTOR가 희소돌기아교세포의 분화 및 수초화에 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

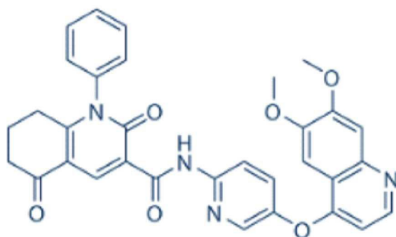
[0032] [화학식 1]



[0033]

[0034] 두 번째 유효물질인 ONO-7475는 하기 화학식 2의 구조를 가지며 Trk receptor를 타겟으로 하는 약물로, promyelinating molecule 중 하나인 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)는 Trk receptor를 통하여 수초화를 촉진하는 것으로 보고되어 있어 BDNF-Trk 신호전달은 탈수초화 후, 재수초화를 위한 희소돌기아교세포 전구세포의 생존 및 분화에 영향을 미칠 가능성이 있다.

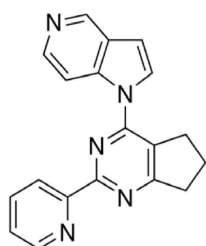
[0035] [화학식 2]



[0036]

[0037] 세 번째 유효물질인 AZ12601011은 하기 화학식 3의 구조를 가지며 TGF- β receptor를 타겟으로 하는 약물로, TGF- β 신호는 발달 중인 신경에서 슈만세포의 사멸과 증식을 조절하는 이중적인 역할을 하는 것으로 보고되어 있다.

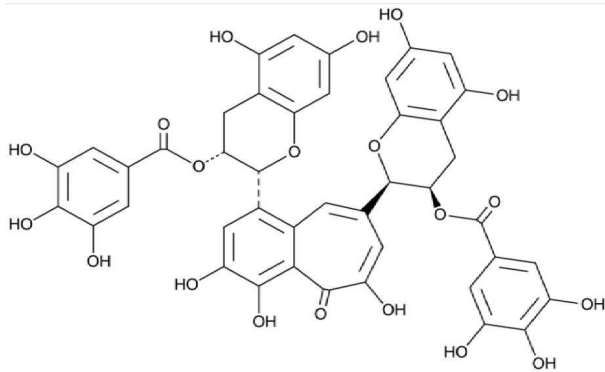
[0038] [화학식 3]



[0039]

[0040] 네 번째 유효물질인 Theaflavin 3,3'-digallate는 하기 화학식 4의 구조로 항암 효능이 알려져 있다. Akt 및 ERK, MEK, NF- κ B를 타겟으로 하며, 실제로 Akt 및 ERK, MEK은 수초화와 매우 밀접한 연관성이 있다. Akt는 말초신경계의 수초화뿐만 아니라 슈반세포에서 수초화 관련 단백질의 합성도 증가시키는데 관여하며, 희소돌기아교세포에서 ERK1/2의 활성화는 손상 후, 수초화 복구를 촉진하는 것으로 보고되어 있다. 또한, 활성화되지 않은 미세아교세포는 NF- κ B를 통해 희소돌기아교세포의 전구세포의 생존 및 성숙을 촉진하는 것으로 보고되어 있다.

[0041] [화학식 4]



[0042]

[0043] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0045] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0047] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0049] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0051] [실시예]

[0052] 실시예 1 : 제브라피쉬 사육 및 관리

[0053] 본 연구의 모든 실험 과정은 고려대학교 의과대학 동물실험 윤리위원회 (Korea University Institutional Animal Care & Use Committee, IACUC)의 승인을 받았으며, 국립수의과학 검역원의 동물 실험 규정에 따라 실험을 수행하였다. 본 연구에서는 야생형 제브라피쉬, Tg(mbp:QF2), Tg(QUAS:epNTR-p2a-mCherry) 형질전환 제브라피쉬가 사용되었으며, 성체 (adult) 및 배아 (embryo) 제브라피쉬는 명암주기 14:10 시간, 수온 28.5℃가 유지되는 시스템에서 사육되었다. 형태학적 특징을 정의하기 위하여 제브라피쉬 배아와 치어 (larvae)의 단계는 수정 후 며칠 (days post-fertilization, dpf)로 사용되었다.

[0055] **실시예 2 : Plasmid DNA 및 형질전환 제브라피쉬 제조**

[0056] 회소돌기아교세포 특이적으로 epNTR을 발현하는 형질전환 제브라피쉬를 제조하기 위하여 attB1과 attB2 시퀀스가 포함된 epNTR 유전자 특이적 프라이머를 제조 및 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 이를 통해 확보된 중합효소 연쇄반응 산물은 BP 클론 반응 효소 (BP clonase, Invitrogen)로부터 중간 진입 벡터 (middle entry vector)에 클로닝 되었다. 다음으로는 mbpa:QF2, QUAS:epNTR-p2a-mCherry plasmid construct를 제작하기 위하여 multi-site gateway LR 반응을 수행하였다. mbpa promoter가 포함된 5'-진입 벡터, QF2가 포함된 중간 진입 벡터, poly A 서열이 포함된 3'-진입 벡터, 그리고 목적 벡터 (destination vector)들을 LR 클론 반응 효소 (LR II clonase, Invitrogen)와 반응시켜 mbpa:QF2pA plasmid를 제작하였다. 또한, QUAS promoter가 삽입된 5'-진입 벡터, epNTR 유전자가 삽입된 중간 진입 벡터, P2A 펩타이드가 결합된 적색 형광단백질 (mCherry) 유전자가 삽입된 3'-진입 벡터 그리고 목적 벡터들을 LR 클론 반응 효소와 반응시켜 QUAS:epNTR-p2a-mCherry plasmid를 제작하였다. 이렇게 만들어진 plasmid DNA는 제브라피쉬 수정란 1세포기에 유전자전이효소 (transposase)와 함께 미세주입 (microinjection) 후, 성체 (Founder, F0)로 키웠고, 야생형 제브라피쉬와 교배하여 적색 형광단백질을 발현하는 제브라피쉬 (F1)를 선별하여 형질전환 제브라피쉬를 제조하였다. Plasmid DNA 제조에 사용된 프라이머는 다음과 같다.

[0057] attB1_epNTR_F:

[0058] GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCATGGATATTATTAGTGTGGCCCTGAAGAG

[0059] attB1_epNTR_R:

[0060] GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCCACCTCTGTCTAGTGTGATGTTCTGA

[0062] **실시예 3 : 키나아제 저해제의 농도 결정을 위한 독성 평가**

[0063] 야생형 제브라피쉬의 수정된 배아를 48-well plate 각 well마다 10개씩 분주하고, 10 μ M 키나아제 저해제를 4일 동안 처리 후, 명암주기 14:10 시간, 온도 28.5°C가 유지되는 배양기에서 사육되었다. 배아 독성 평가를 위하여 실체현미경 하에서 부화율, 생존율, 기형 발생율, 유형 이상 등을 관찰하여 독성이 나타나지 않는 농도를 선정하였다. 선정 기준은 도 1에 나타내었으며, 독성 평가 결과를 바탕으로 도 1에 나타낸 기준으로 처리 농도는 10 nM ~ 10 μ M으로 선정하였다.

[0065] **실시예 4 : 회소돌기아교세포 사멸 유도**

[0066] MTZ (2 mM, Sigma-Aldrich)는 0.08% 다이메틸 설펝사이드 (dimethyl sulfoxide, DMSO)가 포함된 배아 배지에 용해하여 제조하였고, 형질전환 제브라피쉬 수정 후, 5일째 (5 dpf) 치어에 2 mM MTZ를 18시간 동안 처리하여 회소돌기아교세포의 사멸을 유도하였다.

[0068] **실시예 5 : 키나아제 저해제 처리**

[0069] 2 mM MTZ를 18시간 동안 처리하여 회소돌기아교세포의 사멸이 유발된 제브라피쉬는 ① 배아 배지 (E3)로 옮겨 회복기를 갖는 그룹, ② 배아 배지에서 2일 동안 회복기를 가진 후, 양성 물질인 250 nM tacrine이 처리되는 그룹, ③ 키나아제 저해제가 처리되는 그룹으로 나뉜다. 키나아제 저해제는 배아독성 평가를 통해 결정된 농도로 4일 동안 처리되었다.

[0071] **실시예 6 : 제브라피쉬의 운동성 분석**

[0072] 5 dpf에 2 mM MTZ에 18시간 노출된 형질전환 제브라피쉬는 3일 동안 배아 배지에서 회복기를 가진 후, 9 dpf 시기에 운동성 측정을 수행하였다. 운동성 측정을 위하여, 9 dpf 형질전환 제브라피쉬는 48-well plate에 1마리씩 (500 μ l/well) 분주되어 행동실험실에서 2시간 동안의 적응시간이 주어졌으며, 2시간 후, 48-well plate를 DanioVision (BOM-DV-SYS-EDU, Noldus)로 옮겨 장비 안에서 30분의 적응시간을 주었다. 적응이 완료된 후, 5분

동안 장비에 연결된 카메라와 EthoVision XT software를 통해 제브라피쉬의 움직임이 촬영 및 분석되었으며, 운동성은 1분마다 총 5분간 측정하여, 최종적으로 1분간 움직인 거리 (distance moved, 단위 mm)의 평균치로 대조군과 실험군을 비교하였다.

[0074] **실시예 7 : 회소돌기아교세포 이미징**

[0075] 5 dpf에 2 mM MTZ에 18시간 노출된 형질전환 제브라피쉬는 6일 동안 배아 배지에서 회복기를 가진 후, 12 dpf 시기에 회소돌기아교세포의 세포사멸 및 재생 관찰을 위한 이미징을 수행하였다. 이미징을 위해 12 dpf 형질전환 제브라피쉬는 glass-bottomed 35-mm dish (MatTek)에서 0.03% tricaine (Sigma-Aldrich)로 마취시킨 후, 0.8% low-melting-point agarose (SeaPlaque™ GTG™ Agarose)로 고정시켰다. 회소돌기아교세포는 Nikon A1Si laser-scanning confocal microscope (Nikon)을 이용하여 20x 배율, 568 nm 레이저에서 NIS-Elements AR Analysis 4.30 software (Nikon)의 Z-Stack 기능을 통해 0.9 μ m의 간격으로 20-25장 정도 촬영하였다. 촬영된 이미지들은 software를 통해 합쳐 하나의 이미지로 만들었으며, 살아있는 회소돌기아교세포 수를 측정하여 대조군과 실험군을 비교하였다.

[0077] **실시예 8 : 통계적 분석**

[0078] 운동성 및 탈수초화의 정량적 분석을 위해서 대조군 및 실험군 두 그룹간의 비교분석은 t-Test를 수행하였고, 약물 처리군이 추가될 시, 세 그룹 이상의 비교분석은 one-way analysis of variance (ANOVA)와 post-hoc Tukey's Multiple Comparison Test를 수행하였다. 모든 데이터에서 통계적 유의성은 P 양측 검정 (two-tailed probability) 값이 0.05 미만일 때 유효성을 가지는 것으로 판단하였으며, 모든 통계분석은 GraphPad Prism 7 software를 통해 수행하였다.

[0080] **[실험예]**

[0081] **실험예 1. 약물 스크리닝 플랫폼으로서 탈수초성 질환 제브라피쉬의 유효성 확인**

[0082] 탈수초성 질환 제브라피쉬 모델에서의 운동성 변화 관찰 및 이에 대한 tacrine (Tocris)의 효능을 확인하기 위하여 실험을 진행하였으며, 실험 모식도는 도 1A에 나타내었다.

[0083] 5 dpf 형질전환 제브라피쉬는 대조군과 MTZ 처리 후, 배아 배지 (E3)에서 회복시킨 그룹, MTZ 처리 후, 250 nM tacrine에서 회복시킨 3 그룹으로 분리하였다. 대조군은 배아 배지에서 유지되었고, 나머지 두 실험군은 2 mM MTZ를 18시간 동안 처리 후, 배아 배지로 옮겨 회복기를 주었다. 두 실험군 중 한 실험군은 회복기 2일째에 250 nM tacrine이 포함된 배아 배지로 옮겨 유지되었다. 3 그룹 모두 회복기 1일째부터 1일 간격으로 운동성 측정을 하였으며, MTZ가 처리된 그룹에서는 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 운동성이 감소함을 확인하였다. 또한, 두 실험군이 대조군 수준으로 운동성이 회복되는 시간을 확인한 결과, MTZ에 의해 감소된 운동성이 대조군 수준으로 회복되는데 있어, 배아 배지에서 회복된 그룹 (6일) 보다 tacrine이 포함된 배아 배지에서 회복된 그룹 (4일)이 2일 더 빠르게 회복됨을 확인하였다 (도 1B).

[0084] 다음으로 위 3 그룹에서 동일한 방법으로 MTZ와 tacrine을 처리 후, 1일 간격으로 회소돌기아교세포의 사멸 및 재생을 관찰하였다 (도 2A). 그 결과, MTZ에 의해 회소돌기아교세포의 사멸이 유발되었으며, 대조군 수준으로 회소돌기아교세포가 재생되는 시간을 확인한 결과, 배아 배지에서 회복된 그룹 (11일) 보다 tacrine이 포함된 배아 배지에서 회복된 그룹 (8일)이 3일 더 빠르게 재생됨을 확인하였다 (도 2B).

[0086] **실험예 2. 탈수초성 질환 제브라피쉬를 이용한 약물 스크리닝**

[0087] 실험예 1의 결과를 통해 본 기술을 통해 제조된 형질전환 제브라피쉬에서 탈수초성 질환 표현형이 명확히 나타남을 확인하였고, 약물의 효능 검증도 가능한 모델로 평가되어 총 160종의 키나아제 저해제에 대한 유효성 평가를 도 3에 따라 수행하였다. 160종 키나아제 저해제 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0088]

Well ID	Product Name	Target
001_A02	cFMS Receptor Inhibitor II	c-Fms
001_A03	(-)-BAY-1251152	CDK
001_A04	Umbralisib (hydrochloride)	PI3K
001_A05	SCH-1473759 (hydrochloride)	Aurora Kinase
001_A06	Sulfatinib	FGFR; VEGFR
001_A07	Pamapimod	Autophagy; p38 MAPK
001_A08	CP-547632 (hydrochloride)	FGFR; VEGFR
001_A09	BI-1347	CDK
001_A10	AS2863619 (free base)	CDK; STAT
001_A11	PI-828	Casein Kinase; PI3K
001_B02	EB-3D	AMPK; Apoptosis
001_B03	(Rac)-GSK547	RIP kinase
001_B04	N-Oleoyl glycine	Akt; Cannabinoid Receptor; Endogenous Metabolite
001_B05	YKL-5-124 (TFA)	CDK
001_B06	GSK319347A	IKK
001_B07	SU3327	JNK
001_B08	CMPD101	PKC; ROCK
001_B09	CKI-7 (free base)	Casein Kinase; CDK; Ribosomal S6 Kinase (RSK); SGK
001_B10	AZD7507	c-Fms
001_B11	Narciclasine	ROCK
001_C02	Daphnoretin	Influenza Virus; PKC
001_C03	MS4078	ALK; PROTAC
001_C04	CDK12-IN-3	CDK
001_C05	WHI-P258	JNK
001_C06	AZD4573	CDK
001_C07	SR-4835	Apoptosis; CDK
001_C08	Theliatinib	EGFR
001_C09	GSK 650394	Influenza Virus; SGK
001_C10	SY-1365	CDK
001_C11	Vorolanib	PDGFR; VEGFR
001_D02	Rivaciclib hydrochloride	Apoptosis; CDK
001_D03	PLX5622	c-Fms
001_D04	IRAK4-IN-4	IRAK
001_D05	Curculigoside	JAK; NF-κB; STAT
001_D06	α-Linolenic acid	Akt; PI3K
001_D07	Miransertib	Akt; Parasite
001_D08	Nitidine (chloride)	Apoptosis; ERK; FAK; NF-κB; p38 MAPK; Parasite; STAT; Topoisomerase
001_D09	Fangchinoline	Apoptosis; Autophagy; FAK; HIV
001_D10	3BDO	Apoptosis; Autophagy; mTOR
001_D11	ONO-7475	TAM Receptor; Trk Receptor
001_E02	CDK9-IN-7	Apoptosis; CDK
001_E03	AZ12601011	TGF-β Receptor
001_E04	TG101209	Apoptosis; Autophagy; FLT3; JAK; RET
001_E05	Theaflavin 3,3'-digallate	Akt; ERK; MEK; NF-κB
001_E06	Bisindolylmaleimide I	PKC
001_E07	RIPK1-IN-7	RIP kinase
001_E08	BMS-509744	Itk
001_E09	CHMFL-BMX-078	BMX Kinase
001_E10	G-5555	PAK
001_E11	SRPKIN-1	SRPK
001_F02	GMB-475	Apoptosis; Bcr-Abl; PROTAC
001_F03	Esculentoside H	JNK; NF-κB
001_F04	Oroxin B	Apoptosis; Autophagy; PI3K; PTEN
001_F05	SIAIS178	Bcr-Abl; PROTAC

001_F06	Glumetinib	c-Met/HGFR
001_F07	KX1-004	Src
001_F08	Peretinoin	Autophagy; HCV; RAR/RXR; SPHK
001_F09	Voruciclib (hydrochloride)	CDK
001_F10	AZ304	Autophagy; Raf
001_F11	PRN1008	Btk
001_G02	AZD-7648	DNA-PK
001_G03	CG-806	Btk; FLT3
001_G04	PF-06700841 (P-Tosylate)	JAK
001_G05	SU1498	VEGFR
001_G06	Tomivosertib	MNK; PD-1/PD-L1
001_G07	Evobrutinib	Btk
001_G08	Canertinib	EGFR
001_G09	ALW-II-41-27	Ephrin Receptor
001_G10	Midostaurin	PKC
001_G11	R112	Syk
001_H02	A-674563 (hydrochloride)	Akt
001_H03	SK1-IN-1	SPHK
001_H04	Tyrosine kinase inhibitor	c-Met/HGFR
001_H05	Pralsetinib	RET
001_H06	CHIR-99021 (monohydrochloride)	Autophagy; GSK-3; Wnt; β -catenin
001_H07	LY294002	Apoptosis; Autophagy; Casein Kinase; DNA-PK; PI3K
001_H08	BMS-986142	Btk
001_H09	MRX-2843	FLT3
001_H10	BQR-695	Parasite; PI4K
001_H11	CP-466722	ATM/ATR
002_A02	YS-49	Adrenergic Receptor; Akt; Angiotensin Receptor; PI3K
002_A03	Bucladesine (calcium)	Apoptosis; Phosphodiesterase (PDE); PKA
002_A04	PD 407824	Checkpoint Kinase (Chk); Wee1
002_A05	GSK1904529A	Apoptosis; IGF-1R; Insulin Receptor
002_A06	IPI-3063	PI3K
002_A07	Mps1-IN-3	Mps1
002_A08	trans-Zeatin	Endogenous Metabolite; ERK; MEK
002_A09	SPP-86	RET
002_A10	Sophocarpine	Akt; Apoptosis; Autophagy; Influenza Virus; PI3K
002_A11	Go 6983	PKC
002_B02	Harmine	5-HT Receptor; DYRK
002_B03	LDN-192960 (hydrochloride)	DYRK; Haspin Kinase
002_B04	PD0166285	Apoptosis; Wee1
002_B05	Tyrphostin AG1433	PDGFR; VEGFR
002_B06	AZ7550 Mesylate	Drug Metabolite; EGFR; IGF-1R
002_B07	ALK2-IN-2	TGF- β Receptor
002_B08	5'-Fluoroindirubinoxime	FLT3
002_B09	Tyk2-IN-8	JAK
002_B10	GSK-626616	DYRK
002_B11	GSK-25	Ribosomal S6 Kinase (RSK); ROCK
002_C02	(R)-*?CR8 (trihydrochloride)	Apoptosis; CDK
002_C03	JNJ-7706621	Apoptosis; Aurora Kinase; CDK
002_C04	Selumetinib (sulfate)	Apoptosis; MEK
002_C05	GW788388	TGF- β Receptor
002_C06	Rheb inhibitor NR1	mTOR
002_C07	Fostamatinib	Syk
002_C08	Sodium dichloroacetate	Apoptosis; NKCC; PDHK; Reactive Oxygen Species
002_C09	Tyrphostin AG30	EGFR
002_C10	Naquotinib (mesylate)	EGFR
002_C11	Polyphyllin I	Akt; Apoptosis; Autophagy; JNK; mTOR; PDK-1
002_D02	5-Iodo-indirubin-3'-monoxime	CDK; GSK-3
002_D03	NVP-QAV-572	PI3K

002_D04	Hematein	Akt; Apoptosis; Casein Kinase; Wnt
002_D05	Btk inhibitor 2	Btk
002_D06	CHIR-99021	Autophagy; GSK-3; Wnt; β -catenin
002_D07	Pentagamavunon-1	Apoptosis; COX; NF- κ B; VEGFR
002_D08	MKC3946	IRE1
002_D09	Metformin (hydrochloride)	AMPK; Autophagy; Mitophagy
002_D10	Cromolyn (sodium)	Calcium Channel; GSK-3
002_D11	HMN-214	Polo-like Kinase (PLK)
002_E02	Infigratinib	FGFR
002_E03	MLN120B	IKK
002_E04	(E)-Necrosulfonamide	Mixed Lineage Kinase
002_E05	PD318088	MEK
002_E06	Rociletinib	EGFR
002_E07	Oglufanide	Endogenous Metabolite; HCV; VEGFR
002_E08	Olmotinib	EGFR
002_E09	Bikinin	GSK-3
002_E10	AT7867 (dihydrochloride)	Akt; PKA; Ribosomal S6 Kinase (RSK)
002_E11	Rigosertib (sodium)	Apoptosis; PI3K; Polo-like Kinase (PLK)
002_F02	PI-3065	PI3K
002_F03	SU14813 (maleate)	c-Kit; PDGFR; VEGFR
002_F04	TCS7010	Apoptosis; Aurora Kinase
002_F05	ZM-447439	Apoptosis; Aurora Kinase
002_F06	SB 202190	Apoptosis; Autophagy; Ferroptosis; p38 MAPK
002_F07	CC-115	DNA-PK; mTOR
002_F08	AMG319	PI3K
002_F09	Cediranib (maleate)	Autophagy; PDGFR; VEGFR
002_F10	TG003	CDK
002_F11	Ro 5126766	MEK; Raf
002_G02	TAS-301	PKC
002_G03	CH5183284	FGFR
002_G04	Binimetinib	Autophagy; MEK
002_G05	Dovitinib (lactate)	c-Kit; FGFR; FLT3; PDGFR; VEGFR
002_G06	BI-78D3	JNK
002_G07	Tyrphostin A9	Influenza Virus; VEGFR
002_G08	GW 441756	Apoptosis; Trk Receptor
002_G09	Src Inhibitor 1	Src
002_G10	NMS-1286937	Apoptosis; Polo-like Kinase (PLK)
002_G11	GSK1838705A	ALK; IGF-1R; Insulin Receptor
002_H02	Pim1/AKK1-IN-1	Pim
002_H03	1-Naphthyl PP1 (hydrochloride)	Src
002_H04	Torin 2	Apoptosis; Autophagy; DNA-PK; mTOR
002_H05	Imatinib (Mesylate)	Autophagy; Bcr-Abl; c-Kit; PDGFR
002_H06	PP2	Src
002_H07	PF-04217903 (methanesulfonate)	c-Met/HGFR
002_H08	Flumatinib	Bcr-Abl; c-Kit; PDGFR
002_H09	Pazopanib (Hydrochloride)	Autophagy; c-Fms; c-Kit; FGFR; PDGFR; VEGFR
002_H10	Bentamapimod	JNK
002_H11	Refametinib	MEK

[0089]

5 dpf 형질전환 제브라피쉬는 ① 대조군과 ② MTZ 처리 후, 배아 배지에서 회복시킨 그룹, ③ 250 nM tacrine이 포함된 배아 배지에서 회복시킨 그룹, ④ 키나아제 저해제가 포함된 배아 배지에서 회복시킨 그룹 총 4 그룹으로 분리하였다. 대조군은 배아 배지에서 유지되었고, 나머지 세 실험군은 2 mM MTZ를 18시간 동안 처리 후, 배아 배지로 옮겨 2일 동안 회복기를 주었다. 세 실험군 중 두 실험군은 회복기 2일째에 250 nM tacrine이 포함된 배아 배지, 키나아제 저해제가 포함된 배아 배지로 옮겨 각각 유지되었다. 각각의 배지로 옮긴 후, 1일째에 4 그룹 모두 운동성을 측정하였다 (도 4). MTZ가 처리된 그룹에서 나타난 운동성 감소 현상을 유의하게 회복시키는 키나아제 저해제를 선별하였다. 총 160종의 키나아제 저해제 중에서 통계적으로 유의하게 운동성을 회복시키

는 17종을 확인하였다 (도 5). 상기 운동성 회복 효과를 나타내는 17종 키나아제 저해제는 아래 표 2과 같다.

표 2

Well ID	Product Name	Target
001_B6	GSK319347A	IKK
001_C4	CDK12-IN-3	CDK
001_D4	IRAK4-IN-4	IRAK
001_D6	α -Linolenic acid	Akt; PI3K
001_D9	Fangchinoline	Apoptosis; Autophagy; FAK; HIV
001_D10	3BDO	Apoptosis; Autophagy; mTOR
001_D11	ONO-7475	TAM Receptor; Trk Receptor
001_E3	AZ12601011	TGF- β Receptor
001_E4	TG101209	Apoptosis; Autophagy; FLT3; JAK; RET
001_E5	Theaflavin 3,3'-digallate	Akt; ERK; MEK; NF- κ B
001_E11	SRPKIN-1	SRPK
001_F2	GMB-475	Apoptosis; Bcr-Abl; PROTAC
001_F10	AZ304	Autophagy; Raf
002_A2	YS-49	Akt; PI3K
002_A6	IPI-3063	PI3K
002_B6	AZ7550 Mesylate	EGFR; IGF-1R
002_B8	5'-Fluoroindirubinoxime	FLT3

행동 기반 분석을 통해 선별된 17종에 대해서는 이미징 기반 분석을 통해 추가적으로 유효성 검증을 진행하였다. 위 4 그룹에서 동일한 방법으로 MTZ와 tacrine, 키나아제 저해제를 처리 후, 4일째에 회소돌기아교세포의 사멸 및 재생을 관찰하였다. 그 결과, MTZ에 의해 회소돌기아교세포의 사멸이 유발되었으며, 17종 중에서 4종의 약물이 통계적으로 유의하게 회소돌기아교세포의 재생을 촉진하는 것으로 확인되었다 (도 6). 신경세포의 재생을 촉진하는 4종 키나아제 저해제는 아래 표 3과 같다.

표 3

Well ID	Product Name	Target
001_D10	3BDO	Apoptosis; Autophagy; mTOR
001_D11	ONO-7475	TAM Receptor; Trk Receptor
001_E3	AZ12601011	TGF- β Receptor
001_E5	Theaflavin 3,3'-digallate	Akt; ERK; MEK; NF- κ B

위 체브라피쉬 기반 유효성 평가 시스템을 통한 2차 검증을 통하여 총 4종의 유효물질 3BDO, ONO-7475, AZ12601011, Theaflavin 3,3'-digallate을 도출하였으며, 각 약물의 타겟은 도 5와 같다.

본 연구진의 결과와 보고된 연구 결과를 바탕으로, 4종의 키나아제 저해제가 탈수초성 질환 개선 또는 치료를 위한 용도로 사용될 수 있음을 제시한다.

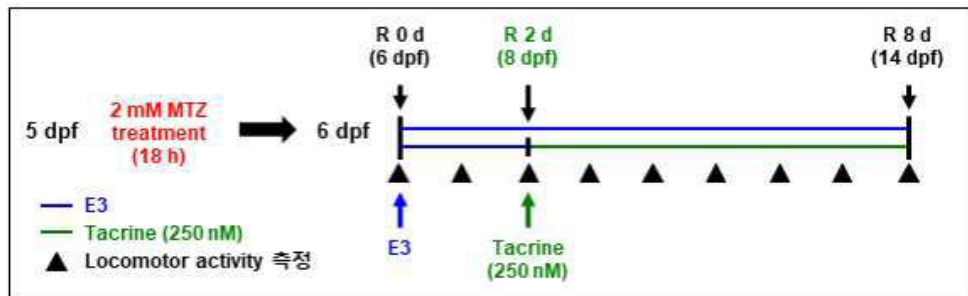
이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

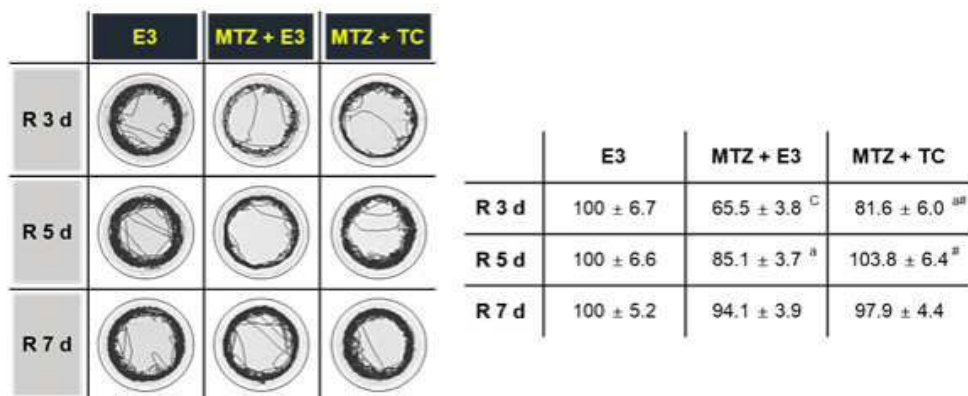
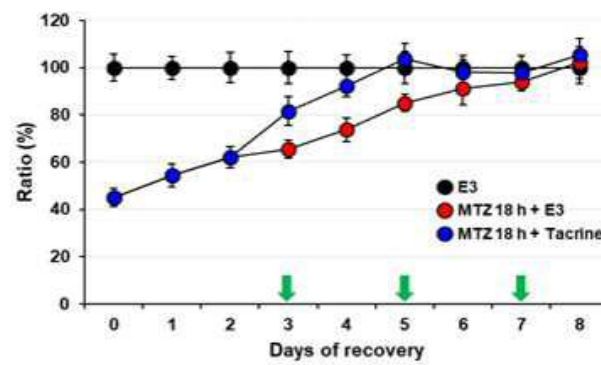
도면

도면1

A

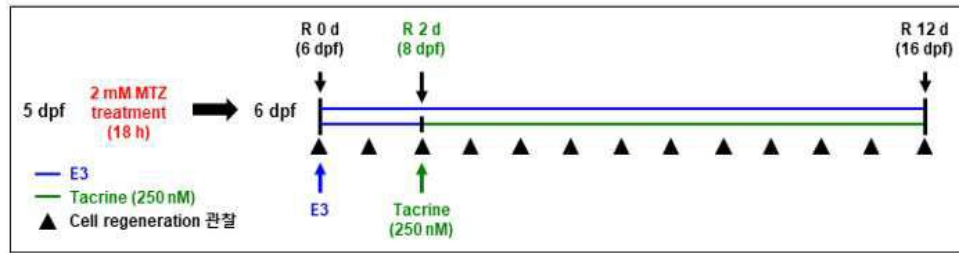


B

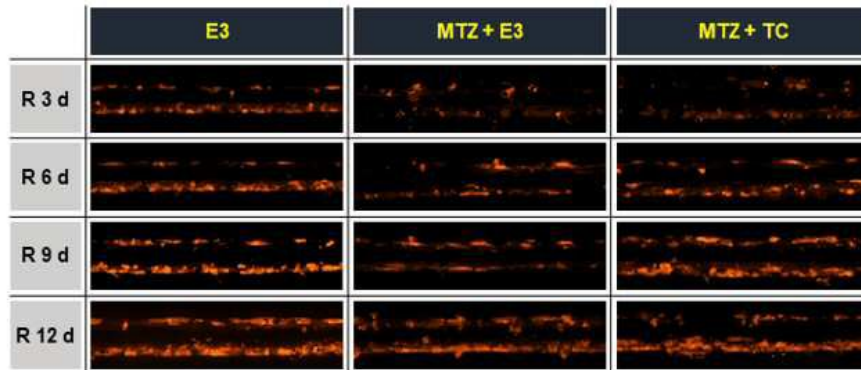


도면2

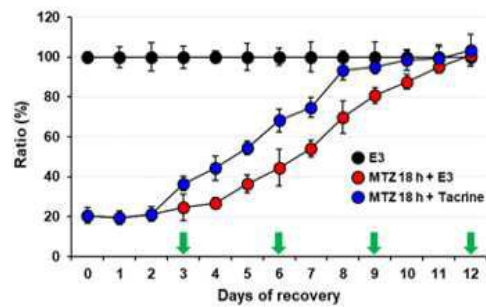
A



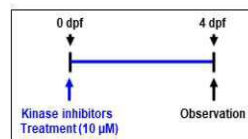
B



	E3	MTZ + E3	MTZ + TC
R 3 d	100 ± 5.5	24.6 ± 6.5 ^C	36.5 ± 3.7 ^C
R 6 d	100 ± 4.2	44.5 ± 9.2 ^C	68.2 ± 5.8 ^{B#}
R 9 d	100 ± 7.5	80.6 ± 4.1 ^a	95.0 ± 3.3 [#]
R 12 d	100 ± 4.7	100.9 ± 3.3	103.5 ± 7.9

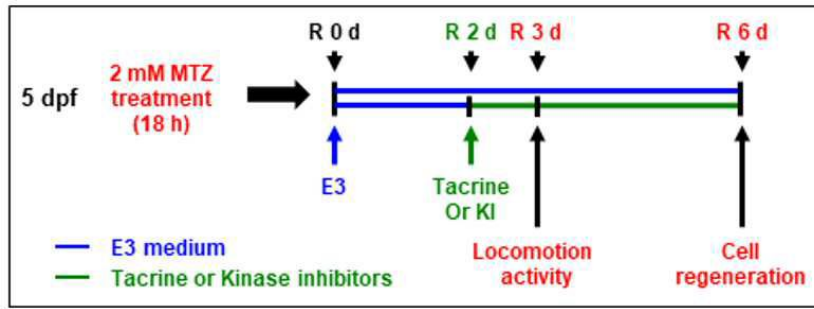


도면3

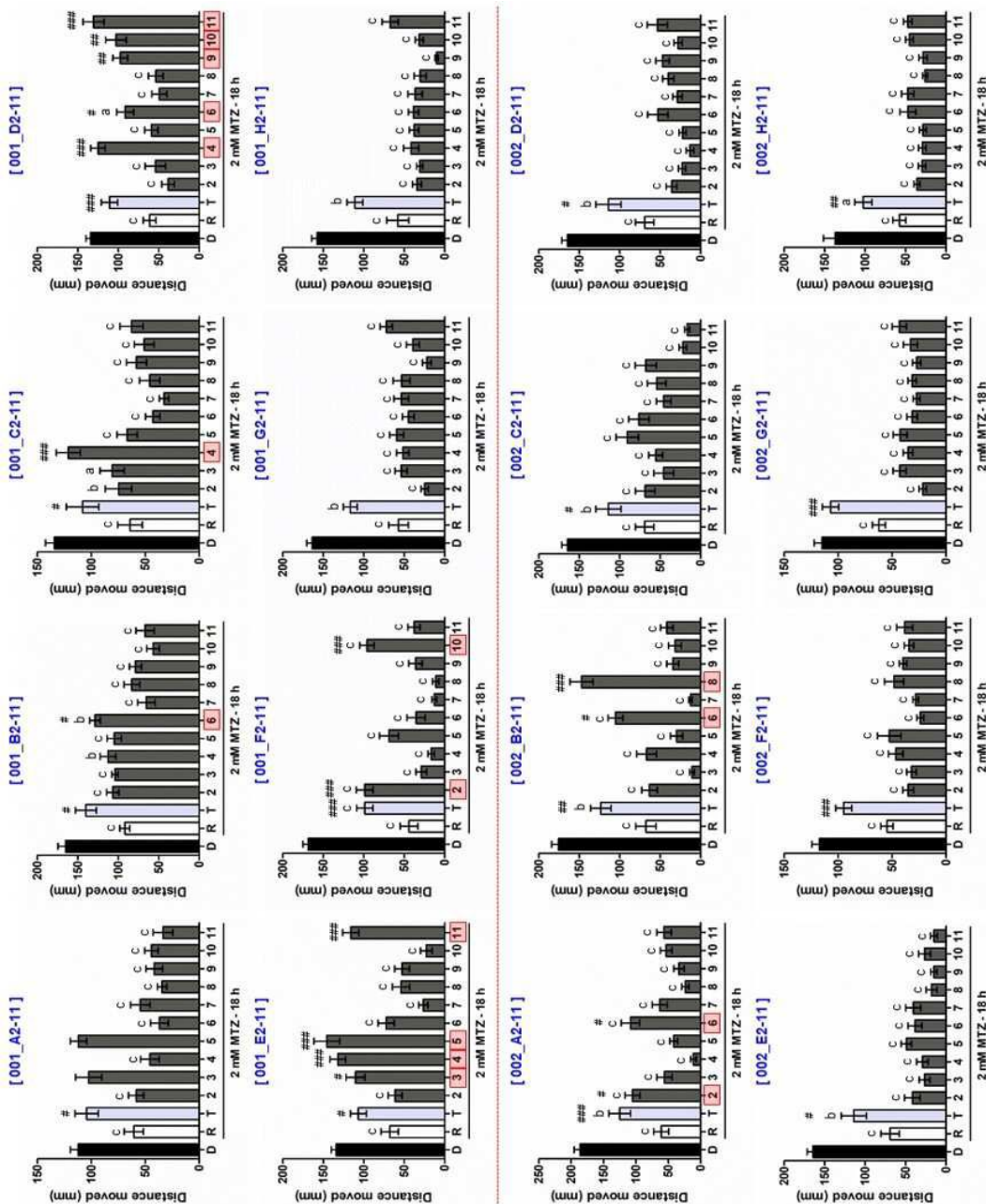


1) 10 μM	2) 1 μM	3) 100 nM	4) 10 nM
- Hatching rate ≥ 90 %	- 90 % > Hatching rate ≥ 70 % - 40 % > Malformation ≥ 20 % - 40 % > Abnormal swimming pattern ≥ 20 %	- 70 % > Hatching rate ≥ 50 % - 70 % > Malformation ≥ 40 % - 70 % > Abnormal swimming pattern ≥ 40 % - 40 % > Mortality ≥ 20 %	- Hatching rate < 50 % - Mortality ≥ 40 %

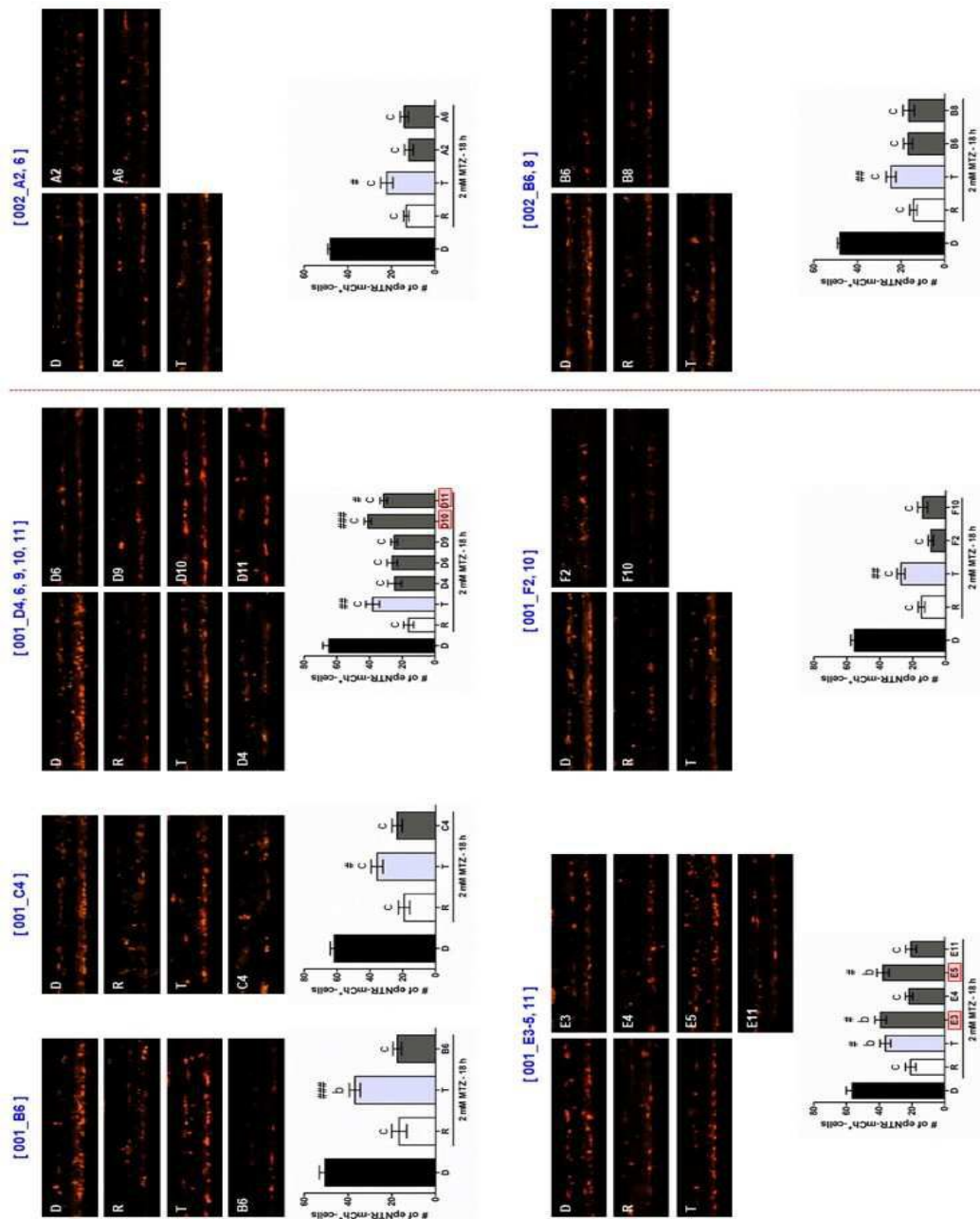
도면4



도면5



도면6



도면7

Well ID	Product Name	Target
001_D10	3BDO	Apoptosis; Autophagy; mTOR
001_D11	ONO-7475	TAM Receptor; Trk Receptor
001_E3	AZ12601011	TGF-β Receptor
001_E5	Theaflavin 3,3'-digallate	Akt; ERK; MEK; NF-κB