

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0022385

(43) 공개일자 2025년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/437 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)*A61P 25/02* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/437 (2013.01)*A23L 33/10* (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0103357

(22) 출원일자 2023년08월08일

심사청구일자 2023년08월08일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

정준양

서울특별시 동대문구 제기로 131 한신아파트 108-1810

(74) 대리인

특허법인지담

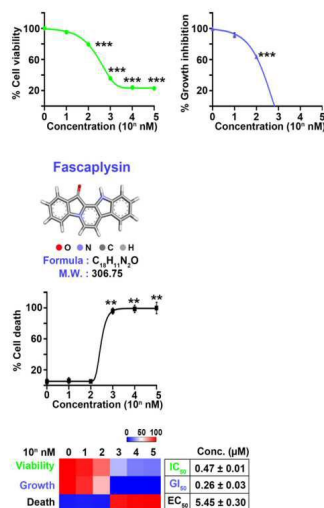
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명의 Fascaplysin은 신경퇴행 과정에서 나타나는 축삭의 분해 억제 및 슈반세포의 증식을 억제하는 데 관여함으로써, 말초신경 퇴행성 질환을 예방, 치료 또는 개선하는데 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1d



(52) CPC특허분류

A61P 25/02 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711183468
과제번호	2023R1A2C1003763
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	시스템신경해부학 분석기반 다중표적 말초신경퇴행억제제 개발 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

파스카플리신(fascaplysin) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 말초신경 퇴행성 질환은 당뇨병성 신경병증, 길리엄-바레 증후군, 샤르코-마리-투스 병, 먼쪽척수근위축증, 안면신경마비, 중증근무력증, 말초신경손상, 영양성 신경병증, 수근관증후군 또는 기타 유전성 신경병증인, 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 예방 또는 치료는 축삭의 분해 억제 및 슈반세포(Schwann cell)의 증식 억제에 의한 것인, 약학 조성물.

청구항 4

파스카플리신(fascaplysin) 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 포함하는, 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 말초신경 퇴행성 질환은 당뇨병성 신경병증, 길리엄-바레 증후군, 샤르코-마리-투스 병, 먼쪽척수근위축증, 안면신경마비, 중증근무력증, 말초신경손상, 영양성 신경병증, 수근관증후군 또는 기타 유전성 신경병증인, 건강기능식품.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 예방 또는 개선은 축삭의 분해 억제 및 슈반세포(Schwann cell)의 증식 억제에 의한 것인, 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 말초신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 중추신경은 손상을 받으면 손상 부위에 낭종이 형성되고, 별아교세포(astrocyte)에 의한 아교세포 흉터(glial scar)에 의해서 손상된 신경세포가 재생이 되지 않는다. 반면, 말초신경에서는 손상된 신경이 재생되는데, 이는 슈반세포(Schwann cell)라고 불리는 한 종류의 아교세포가 중추신경을 구성하는 아교세포인 별아교세포, 희소돌기아교세포(oligodendrocyte) 및 미세아교세포(microglia)의 기능을 대신 수행함으로써 신경손상 시 형성되는

미엘린 덩어리를 제거하며, 세포증식을 통하여 축삭의 재생에 전반적인 영향을 미치기 때문이다.

[0004] 상술한 바와 같이, 중추신경계 퇴행과 말초신경계 퇴행은 서로 다른 메커니즘을 가지므로, 중추신경 퇴행성 질환과 말초신경 퇴행성 질환은 서로 다른 질환으로 간주되며, 말초신경 퇴행성 질환의 치료 타겟 또한 중추신경 퇴행성 질환의 치료타겟과 달라, 상술한 두 질환의 치료제 개발은 다른 연구 접근방식이 필요하다.

[0005] 한편, 기존의 말초신경 퇴행을 억제하는 약물들은 축삭의 퇴행만을 억제하여 큰 효과를 얻지 못하였는 바, 본 발명자는 축삭의 분해 및 슈반세포의 증식을 억제하여 말초신경 퇴행을 효과적으로 억제하는 약물을 발굴하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2018-0031532호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일실시예는 파스카폴리신(fascaplysin) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 말초신경 퇴행성 질환은 당뇨병성 신경병증, 길리엄-바레 증후군, 샤르코-마리-투스 병, 먼쪽척수근위축증, 안면신경마비, 중증근무력증, 말초신경손상, 영양성 신경병증, 수근관증후군 또는 기타 유전성 신경병증일 수 있다.

[0015] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 예방 또는 치료는 축삭의 분해 억제 및 슈반세포(Schwann cell)의 증식 억제에 의한 것일 수 있다.

[0016] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 실시예는 파스카폴리신(fascaplysin) 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 포함하는 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0017] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 말초신경 퇴행성 질환은 당뇨병성 신경병증, 길리엄-바레 증후군, 샤르코-마리-투스 병, 먼쪽척수근위축증, 안면신경마비, 중증근무력증, 말초신경손상, 영양성 신경병증, 수근관증후군 또는 기타 유전성 신경병증일 수 있다.

[0018] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 예방 또는 치료는 축삭의 분해 억제 및 슈반세포(Schwann cell)의 증식 억제에 의한 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명의 Fascaplysin은 신경퇴행 과정에서 나타나는 축삭의 분해 억제 및 슈만세포의 증식을 억제하는 데 관여함으로써, 말초신경 퇴행성 질환을 예방, 치료 또는 개선하는데 유용하게 활용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 Fas에 의한 말초 신경 퇴행의 감소를 확인한 것이다. 1a는 좌골 신경 이식편을 H₂S 경로 관련 억제제 유무에 관계없이 3DIV로 배양한 다음, 이식편을 스테레오현미경(왼쪽 패널)으로 시각화하였다. 스케일 바 = 600 μ m. 양적 그래프(오른쪽 패널)는 스테레오현미경 하에서 좌골 신경 섬유 2mm 이내의 가로 줄무늬 수를 보여준다(스프라이프 지수). n = 3마리 마우스. 1b는 3DIV에 대한 생체 외 좌골 신경에서 난형 형성에 대한 시험 약물의 효과를 나타낸 것이다(왼쪽 패널). 난형 구조는 DIC(Differential Interference Contrast) 여과 현미경으로 관찰되었다. 3DIV의 섬유는 난형과 같은 수초 조각화의 형성을 보여주었습니다. 스케일 바 = 50 μ m. 난형 지수(오른쪽 패널)는 난형 구조의 수를 나타낸다(n = 그룹당 마우스 3마리). 1c는 ChEMBL 데이터베이스를 사용하여 H₂S 관련 억제제(n = 3)의 타겟 정보를 나타낸다. 약물-표적 상호 작용을 표시하는 히트맵이다. 1d는 48시간 배양 후 SW10 Schwann 세포에 대한 Fas의 시험관내 항증식 활성을 나타낸다. 실험은 세 번 수행되었다. Fas의 화학 구조와 약물 정량 지수는 오른쪽 패널에 표시된다. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.
- 도 2는 Fas가 슈만 세포의 퇴행성 표현형을 조절하는 것을 나타낸 것이다. 좌골 신경 섬유는 (2a)신경필라멘트(NF; 축삭 마커, 녹색), (2b) 미엘린 염기성 단백질(MBP; 수초 마커, 빨간색), S100(Schwann 세포에 대한 마커, 녹색) 및 DAPI(파란색), (2c) 전사 조절인자, p-c-Jun(빨간색, 화살표는 p-c-Jun/DAPI 이중 양성 세포를 나타냄), (2h) 리소좀 관련 막 단백질 1(LAMP1)을 포함하는 탈분화된 Schwann 세포 마커(녹색) 및 (2i) 신경 성장 인자 수용체 p75(p75, 빨간색), 및 (2j) 세포 증식 마커인 Ki67(녹색, 화살표는 Ki67/DAPI 이중 양성 세포를 나타냄). 모든 실험은 Fas 및 대조군(손상 없음)의 부재 또는 존재 하에 3DIV에서 생체 외 좌골 신경을 사용하였다. (2d-2g, 2k-2m) 대조군, 3DIV 및 3DIV/Fas 처리의 양적 지표 및 강도는 각 이미지의 하단 패널에 표시된다. NF는 2d; MBP는 2e 및 2f; p-c-Jun은 2g; LAMP1은 2k; p75는 2l; Ki67은 2m. 스케일 바 = 50 μ m. n = 그룹당 3마리의 마우스. ***P < 0.001. (2n) 웨스턴 블롯 분석은 Fas의 존재 또는 부재 하에 생체 외 좌골 신경(n=3)에서 CDK4, CCND1, NF, p75, c-Jun 및 p-c-Jun의 단백질 발현을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명은 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 약학 조성물은 파스카플리신(fascaplysin) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.
- [0029] 본원에서 사용된 “약학적으로 허용되는”이라는 용어는 건강한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증이 없으며, 합리적인 이득/위험 비율에 상응하는, 인간의 조직과의 접촉에 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여형을 지칭하기 위한 것이다.
- [0030] 상기 “약학적으로 허용되는 염”은 모 화합물이 그의 산 또는 염기 염을 제조함으로써 변형된, 개시된 화합물의 유도체를 의미한다. 예를 들어, 아민과 같은 염기성 잔기의 무기 또는 유기산 염; 카복실산과 같은 산성 잔기의 알칼리 또는 유기 염; 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어 무독성 무기 또는 유기산으로부터 형성된 모 화합물의 통상적인 무독성 염 또는 4 차 암모늄염을 포함할 수 있다. 예를 들어, 그러한 통상적인 무독성 염은 염산, 브롬산, 황산, 설핼산, 인산, 질산 등과 같은 무기산으로부터 유도된 염; 아세트산, 프로피오닉산, 석시닉산, 글리콜릭산, 스테아릭산, 락틱산, 말산, 타르타르산, 시트릭산,

아스코빅산, 파모익산, 말레익산, 하이드록시말레익산, 페닐아세틱산, 글루타믹산, 벤조익산, 살리실산, 설파닐릭산, 2-아세톡시벤조익산, 퓨마릭산, 톨루엔설포닉산, 메탄설포닉산, 에탄 디설포닉산, 옥살릭산, 이세티오닉산, 등과 같은 유기산으로부터 얻어진 염을 포함할 수 있다.

- [0031] 화합물의 약학적으로 허용되는 염은 통상적인 화학적 방법에 의해 염기성 또는 산성 잔기를 함유하는 모 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 화합물의 유리산 또는 염기 형태를 물 또는 유기 용매 중 또는 이들의 혼합물 중 화학양론적 양의 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 일반적으로 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질이 바람직하다. 적합한 염 목록은 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418에 개시되어 있으며, 그 개시 내용은 그 전체가 본원에 참고로 인용되어 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 조성물은 fascaplysin의 약학적으로 허용되는 염 뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함하고, 가능한 모든 입체이성질체도 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 말초신경 퇴행성 질환은 말초신경계의 신경세포가 퇴화하고, 기능을 잃는 경우 나타나는 증상들과 관련된 질환을 의미한다. 상기 질환을 가진 환자들은 인지 또는 운동 능력에 있어서 극심한 퇴화를 겪을 수 있다.
- [0034] 상기 말초신경 퇴행성 질환은 예를 들어 당뇨병성 신경병증, 길리엄-바레 증후군, 샤르코-마리-투스 병, 먼쪽척수근위축증, 안면신경마비, 중증근무력증, 말초신경손상, 영양성 신경병증, 수근관증후군 또는 기타 유전성 신경병증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 상기 예방 또는 치료는 축삭의 분해 및 슈반세포(Schwann cell)의 증식 억제에 의한 것일 수 있다. 본 발명의 fascaplysin은 $H_2S/NRF2$, $H_2S/CGRP$ 또는 H_2S/CDK 신호에 관여하여 황화수소(H_2S) 생산을 억제함으로써 축삭의 분해 및 슈반세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함하며, 이는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 한편, 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 이에 한정되는 것이 아니며 1일 당 0.01-2000 mg/kg(체중)일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [0039] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명은 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명의 건강기능식품은 파스카플리신(fascaplysin) 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염을 포함한다.
- [0043] 본 발명의 건강기능식품에 포함되는 화합물, 이의 작용기전 및 말초신경 퇴행성 질환의 종류 또는 증상에 관하여는 전술한 바와 같다.
- [0044] 본 발명의 건강기능식품은 말초신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상,

환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

- [0045] 본 발명의 건강기능식품이라 함은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0046] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0047] 상기 식품 첨가물 공전에 수록된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 상기 화합물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.
- [0049] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 상기 화합물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 상기 화합물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0050] 환 형태의 건강기능식품은 상기 화합물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0051] 과립 형태의 건강기능식품은 상기 화합물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0052] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0053] 상기 건강기능식품은 영양제의 용도로 경구 적용될 수 있으며, 적용 형태는 특별히 제한되지 않는다.

[0055] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0057] 재료 및 방법

[0058] 1. 화합물

[0059] Arcyiaflavin A(Arc A, #2457)와 SU9516[SU, (3Z)-3-(1H-imidazol-5-ylmethylidene)-5-methoxy-1H-indol-2-one, #2907]은 Tpcris(Bristol, UK)에서 구입하였다. Brusatol(Bru, #FB30016)은 Carbosynth(Compton, UK)에서 구입하였다. Trans-4-[[6-(Ethylamino)-2-[[1-phenylmethyl]-1H-indol-5-yl]amino]-4-pyrimidinyl]amino]-cyclohexanol(CINK4, #SML1352), purvalanol B(Pur B, #P5234), PD0332991(PD, #PZ0199) 및 trigonelline(Tri, #T5509)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

[0061] 2. 동물

[0062] 마우스 실험의 모든 절차는 경희대학교 동물 실험 위원회의 승인을 받아 Kyung Hee University Committee on Animal Research의 지침에 따라 고통을 최소화하고 동물의 수를 최소화하였다(프로토콜 번호 #KHSASP-21-463). 5주 된 C57BL/5 수컷 마우스들은 OrientbioTM(Seongnam, South Korea)에서 구입하였다. 모든 실험용 마우스는 습도(50%)와 온도(23 ± 1℃)가 조절된 환경에서 12시간 주/야간 주기로 생활하며, 먹이와 물에 자유로운 접근이 제공되었다.

[0064] 3. 면역조직화학

[0065] 슬라이드에 있는 폴린 신경 섬유들은 4% PFA로 사후고정되고 PBS로 세척되었다. 슬라이드는 PBS-T(0.3% Triton X-100 포함)로 투과되었다. 샘플 슬라이드는 PBS-T를 포함하는 5% 소혈청알부민(BSA)으로 차단되었다. 1차 항체, 항-neurofilament(NF; #841001, Biolegend, San Diego, CA, USA), 항-myelin basic protein(MBP; #ab980, Millipore, Burlington, MA, USA), 항-S100-β(#S2532, Sigma-Aldrich), 항-lysosomal-associated membrane protein 1(LAMP1; #sc-19992, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), 항-nerve growth factor receptor p75 (p75; #07-476, Millipore), 항-androgen receptor (AR; #ab133273, Abcam, Cambridge, UK), 및 항-Ki67 (#ab16667, Abcam)는 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션되었다.

[0066] 2차 항체는 Invitrogen[Alexa fluor-488 donkey anti-mouse (#A32766), 57 alexa fluor-488 donkey anti-rabbit (#A32790), alexa fluor-594 donkey anti-mouse (#A10037), 및 alexa fluor-594 donkey anti-rabbit (#A10042), Waltham, Massachusetts, US]으로부터 구매하였으며, 빛이 보호된 환경에서 실온에서 2시간 동안 적용되었다. 레이저 스캐닝 공초점 현미경(LSM 700, Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 슬라이드의 면역형광을 감지하였다. 상대적 강도의 정량은 각각의 강도 단위를 보여주는 픽셀의 상대적 개수를 세어서 수행되었다.

[0068] 4. 세포 배양

[0069] SW10 세포는 마우스 신경 Schwann 세포주로, 미국 ATCC (American Type Culture Collection, #CRL-2766TM, Manassas, VA, USA)로부터 구입하였고, 10% FBS로 보충된 DMEM으로 33 ℃에서 유지되었다.

[0070] LNCaP 클론 FGC 세포는 인간 전립선암 세포주로, 한국 세포주 뱅크(KCLB, #21740, Seoul, South Korea)로부터 구입하였고, 10% FBS로 보충된 RPMI-1640 배지 (HyClone의 #SH30027.01)에서 37℃에서 유지되었다. 모든 세포 주들은 5% CO₂와 함께 지정된 온도에서 유지되었다.

[0072] 5. 웨스턴 블롯 분석

[0073] 웨스턴 블롯은 이전의 방법에 따라 수행되었다. 1차 항체, 항-cyclin dependent kinase 4 (CDK4; #sc-56277, Santa Cruz Biotechnology), 항-cyclin D1 (CCND1; #ma5-1451, Invitrogen), 항-NF (#n2787, Sigma-Aldrich), 항-p75 (#07-476, Millipore), 항-phospho-c-Jun (#sc-822, Santa Cruz Biotechnology), 항-phospho-c-Fos (Cat#5348S, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) 및 항-AR (#ab133273, Abcam)가 RT에서 1시간 동안 blot에 적용되었다. Horseradish peroxidase-연결된 2차 항체는 RT에서 1시간 동안 적용되었다. 특정 신호는 제조사의 지시에 따라 증강화된 화학발광법(ECL Select™웨스턴 블롯 검출 시약, Cat#RPN2235, Amersham™ Amersham, UK)을 사용하여 시각화되었으며, 로딩 컨트롤로 β-액틴 (#a5441, Sigma-Aldrich)이 사용되었다.

[0075] 6. 좌골 신경 이식편 배양

[0076] 좌골 신경 이식편 배양은 이전의 방법에 따라 마우스를 사용하여 수행되었다. 간략히 설명하면, 5주 된 C57BL/6 수컷 마우스로부터 a fine iris scissor (Fine Science Tools, Foster City, CA, USA)를 사용하여 절개를 수행하고, 살균된 수술 조건에서 좌골 신경을 분리하였다. 신경 섬유 주변의 결합 조직은 인산염 완충 식염수 (PBS) 내에서 스테레오펜미경 아래에서 제거되었다. 각 신경은 그런 다음 fine iris scissors로 2-3mm 길이로 3-4조각으로 절단되었다. 이 신경 이식편은 배지[Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM), #SH30243.01, HyClone, Logan, UT, USA]에 10% 소태아혈청(FBS)과 1% 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 후, 3일간 37 ℃와 5% CO₂가 있는 가슴 배양기 내에서 화합물과 함께 또는 없이 처리되었다. 면역조직화학을 위해, 좌골 신경은 4% 냉동 파라포르말데히드(PFA)로 PBS 내에서 16시간 동안 4℃에 고정되었다. 크라이오-단면 조직을 위해, 좌골 신경은 회전 방식의 크라이오스탯(CM1520, LEICA, Wetzlar, Germany)을 사용하여 16 μm 두께의 단면으로 횡단 및 종단 방향으로 절단되었다. 찢어진 신경 준비를 위해, 신경에서 결합 덮개를 제거하고 젤라틴으로 코팅된 슬라이드 위에서 신경 다발로부터 찢어진 부분을 조심스럽게 분리하였다.

- [0078] 7. 형태 측정 지수
- [0079] 말초신경 변성의 정도를 형태학적으로 검증하기 위해 스트라이프 지수는 2mm 길이의 신경에서 가로 줄무늬의 수를 세어 넓은 지표로 선정되었다. 미엘린 편화를 나타내는 난형 지표인 난형 구조의 수는 200 μ m 길이의 신경 섬유에서 측정하였다.
- [0081] 8. 세포 생존율 분석
- [0082] SW10 세포주의 세포 생존율은 테트라졸륨 화합물인 MTS(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium)를 사용하여 결정되었다. 이것은 Promega(CellTiter 96@Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, #G3582, Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 간략하게, 세포는 Fas(10 nM ~ 100 μ M)와 혼합된 5% FBS가 보충된 100 μ L DMEM에서 웰당 5.0×10^3 세포의 밀도로 96-웰, 바닥이 평평한 마이크로플레이트(#3628, Corning Life Sciences, Corning, NY, US)에 플레이팅되고 가습 인큐베이터(5% CO₂, 33°C)에서 배양되었다.
- [0083] DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해된 2 mg/mL MTS 용액을 사용하여 48시간 동안 Fas 처리 후 세포 생존력을 평가하였다. 세포를 20 μ L MTS 용액과 함께 33°C에서 2시간 동안 배양하였다.
- [0084] MULTISKAN FC 마이크로플레이트 판독기(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 백분율 세포 생존율은 다음과 같이 계산되었다.
- [0085]
$$\frac{A(\text{treated}) - A(\text{background})}{A(\text{untreated}) - A(\text{background})} \times 100$$
- [0086] 처리 시점에 A(untreated)를 사용하여 정규화된 성장률 억제(GI)를 평가하였다. 최대 억제 농도의 반(IC₅₀), 최대 유효 농도의 반(EC₅₀), 세포 증식의 최대 억제의 50% 농도(GI₅₀) 및 50% 세포 독성 농도(CC₅₀)는 이전과 같이 선형 회귀 분석에 의해 계산되었다.
- [0087] 실험은 독립적으로 3번 반복되었다. 데이터는 Graph Pad Prism 소프트웨어 버전 9.0(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)으로 분석 및 플로팅되었다.
- [0089] **결과**
- [0090] 1. 시험관 내, 생체 외 및 생체 내에서 PND(peripheral neurodegenerative diseases)에 대한 Fascaplysin(Fas)의 억제 효과
- [0091] CSE는 Schwann 세포에서 H₂S를 생성하고 그 다운스트림 요인은 여러 세포 이벤트에 관여한다. 먼저, H₂S 신호 전달 경로와 관련된 억제제를 스크리닝한 후 다른 경로에 미치는 영향을 조사하고 분자 표적을 예측하고 억제제와 새로운 표적 간의 상호 작용을 평가하였다.
- [0092] NRF2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)는 항산화 단백질의 합성을 조절하는 기본 류신 지퍼 단백질로 H₂S에 의해 발현이 조절된다. Schwann 세포의 H₂S/NRF2 경로가 말초 신경 손상 예방과 관련이 있는지 알아보기 위해 Bru 및 Tri가 PND에 미치는 영향을 평가하였다. 칼시토닌 유전자 관련 펩티드(CGRP)는 칼시토닌 계열의 펩티드에 속하며, H₂S와 산화질소(NO)는 CGRP 발현을 유도한다. 특히 α -CGRP는 신경계에서 신경펩티드로 기능한다. H₂S/CGRP와 PND 사이의 관계를 평가하기 위해 BIBN, BMS 및 MK를 사용하였다. CDK는 사이클린에 결합하여 세포 주기 진행을 조절한다. H₂S/CDK가 PND에 미치는 영향을 조사하기 위해 Arc A, Fas, NSC, SU, PD, Pur A 및 Pur B를 사용하였다.
- [0093] PND 동안 좌골 신경의 가로 줄무늬(폰타나 밴드)가 3DIV에서 사라졌다. 체외 배양을 사용하여 약리학적 활성 분석을 수행하였다. H₂S/NRF2 또는 H₂S/CGRP 신호 경로와 관련된 Bru, Tri, BIBN, BMS 및 MK는 3DIV에서 좌골 신경 이식편에서 가로 줄무늬의 소실을 억제하지 못하였다(도 1a). 화합물 중 Fas만이 3DIV에서 좌골 신경 이식편의 가로 줄무늬가 사라지는 것을 억제하였다(도 1a). 다음, PND의 주요 표현형인 수초 조각화를 형태학적으로

식별하기 위해 난형 지수를 계산하였다. $H_2S/NRF2$, $H_2S/CGRP$ 또는 H_2S/CDK 경로와 관련된 화합물 중에서 Fas는 수초(myelin) 조각화로 인한 난형 형성을 억제하였다(도 1b). Fas는 $\geq 10 \mu M$ 에서 상당한 약리학적 활성을 보였기 때문에(도 1b), 후속 실험에서 $10 \mu M$ Fas를 사용하였다. 모든 결과는 Fas가 PND 동안 H_2S/CDK 경로를 조절한다는 것을 나타낸다.

[0094] ChEMBL 데이터베이스를 사용하여 히트맵으로 Fas-표적 상호 작용을 시각화하였다. Fas는 CDK4/cyclin D1과 강력하게 상호작용하고 CDK5와 적당히 상호작용하였다(도 1c). SW10 Schwann 세포에서 MTS 분석은 $IC_{50}(0.71 \mu M)$, $EC_{50}(0.47 \mu M)$, $GI_{50}(0.26 \mu M)$ 및 $CC_{50}(3.02 \mu M)$ 값을 산출하여 $0.26 \mu M$ Fas가 체외에서 Schwann 세포 증식을 억제함을 나타낸다(도 1d).

[0096] 2. 말초신경퇴행성 표현형에 대한 Fas의 약리학적 효과

[0097] 말초 신경에서 주요 구조는 말초 신경 축색 돌기와 Schwann 세포이며, Schwann 세포는 PND와 재생의 핵심 조절자이다. 따라서 PND 동안 Schwann 세포의 표현형에 대한 Fas의 영향을 조사하였다. Fas가 축삭 분해 및 탈수초화를 억제하는지 여부를 조사하기 위해 생체 외 마우스 좌골 신경 이식편 배양을 사용하여 NF(축삭 마커) 및 MBP(미엘린 칼집 마커)에 대한 항체로 면역염색을 수행하였다. NF 면역염색은 제어 신경 섬유에서 연속적인 선(녹색)을 보인 반면, 3DIV의 신경 섬유는 깨진 연속 선의 수가 증가한 것으로 나타났다(도 2a). Fas 처리된 신경 섬유의 라인은 온전하였다(도 2a 및 2d). MBP 염색은 연속적인 이중선으로 관찰되는 반면, 3DIV의 신경 섬유는 절단선과 MBP 염색의 불규칙한 마진을 나타내어 Schwann 세포 탈수초화를 나타낸다(도 2b). 그러나, 3DIV에서 Fas로 처리된 신경 섬유는 생체 외 배양 동안 대조군, 연속 라인 및 규칙적인 마진과 동일한 패턴을 보였다(도 2b, e 및 f).

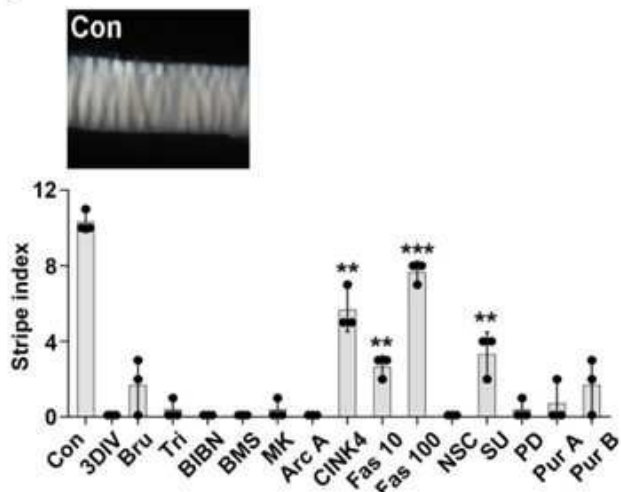
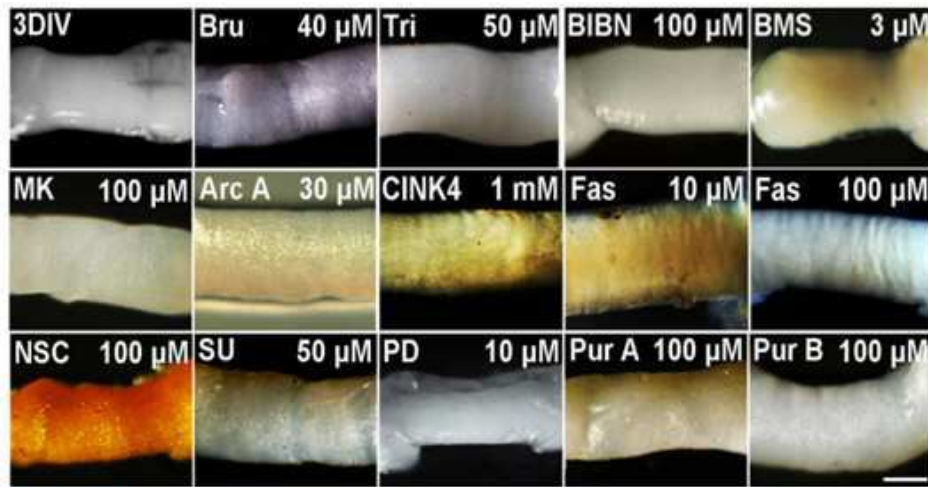
[0098] 전사 조절은 정상 및 퇴행성 조건에서 Schwann 세포 표현형을 제어한다. Fas가 PND 동안 전사 조절에 영향을 미치는지 평가하기 위해 수초(myelin) 유지의 음성 전사 조절 인자로서 p-c-Jun에 대한 샘플을 면역 염색하였다. P-c-Jun은 정상적인 조건에서 발현되지 않았지만 3DIV에서 처리되지 않은 Schwann 세포의 핵에서 높게 발현되었다(도 2c). Fas 처리된 신경 섬유는 처리되지 않은 섬유와 비교하여 3DIV에서 Schwann 세포에서 p-c-Jun 핵 발현의 변화를 보이지 않았다(도 2c 및 2g).

[0099] PND 동안 Schwann 세포는 Schwann 세포 역분화로 알려진 말초 신경 발달 동안 미성숙 Schwann 세포와 유사한 요구 사항을 갖는다. Fas가 PND 동안 Schwann 세포 탈분화를 조절하는지 여부를 결정하기 위해 Schwann 세포에서 탈분화 마커 LAMP1 및 p75NTR의 발현을 조사하였다. 면역염색은 LAMP1과 p75NTR이 3DIV에서 Fas에 의해 억제됨을 보여주었다(도 2h, i, k 및 l). PND 동안 Schwann 세포 증식에 대한 Fas의 효과를 확인하기 위해 항-Ki67 항체로 체외 좌골 신경 섬유를 면역 염색하였다. Ki67은 대조군 섬유에서 면역염색되지 않았다. 퇴화 신경 섬유는 3DIV에서 DAPI/Ki67에 대해 이중 양성인 반면, Fas 처리된 신경 섬유는 3DIV에서 Ki67을 발현하지 않았다(도 2j 및 m).

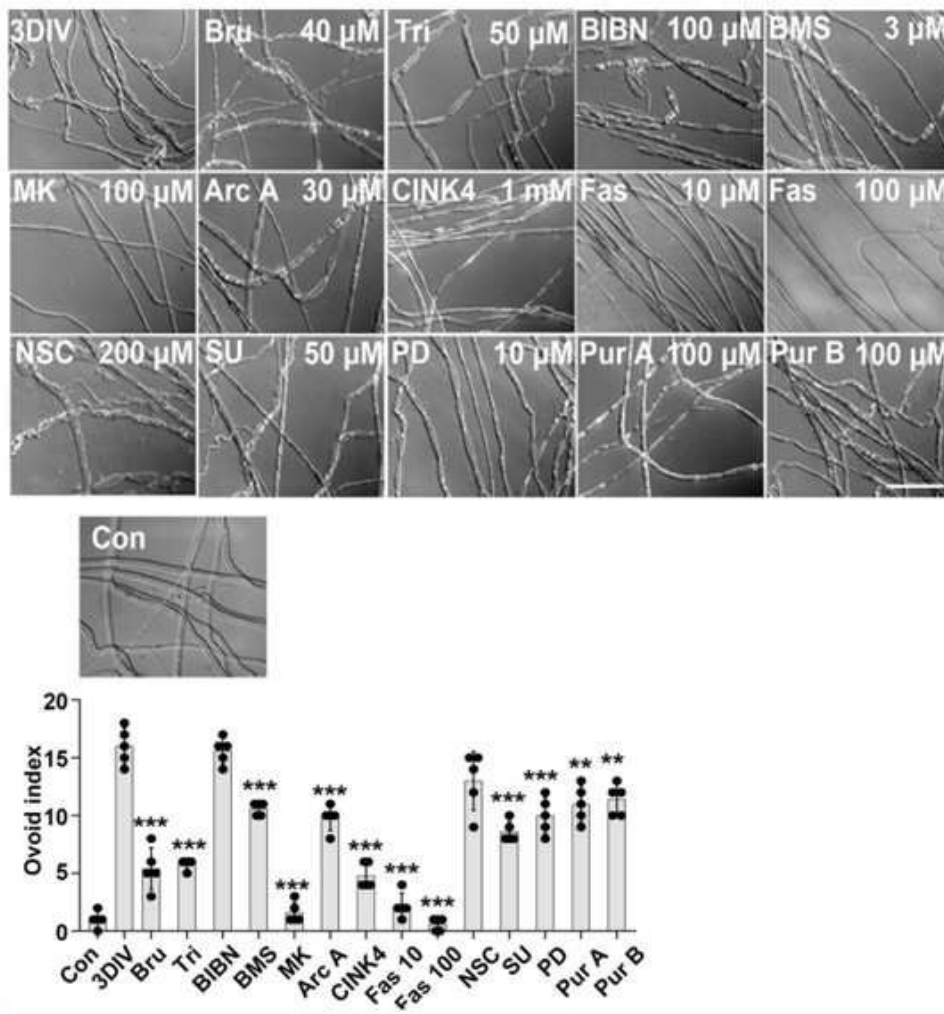
[0100] NF, p75NTR 및 pc-Jun에 대한 정량적 웨스턴 블로팅은 Fas가 축삭 분해, 탈분화 및 음성 조절을 억제하고 CDK4/CCND1 복합체가 Fas의 주요 표적임을 보여주었다(도 2n). 따라서 Fas는 PND 동안 퇴화하는 슈반 세포의 형태학적 및 생화학적 표현형의 발생을 방지한다.

도면

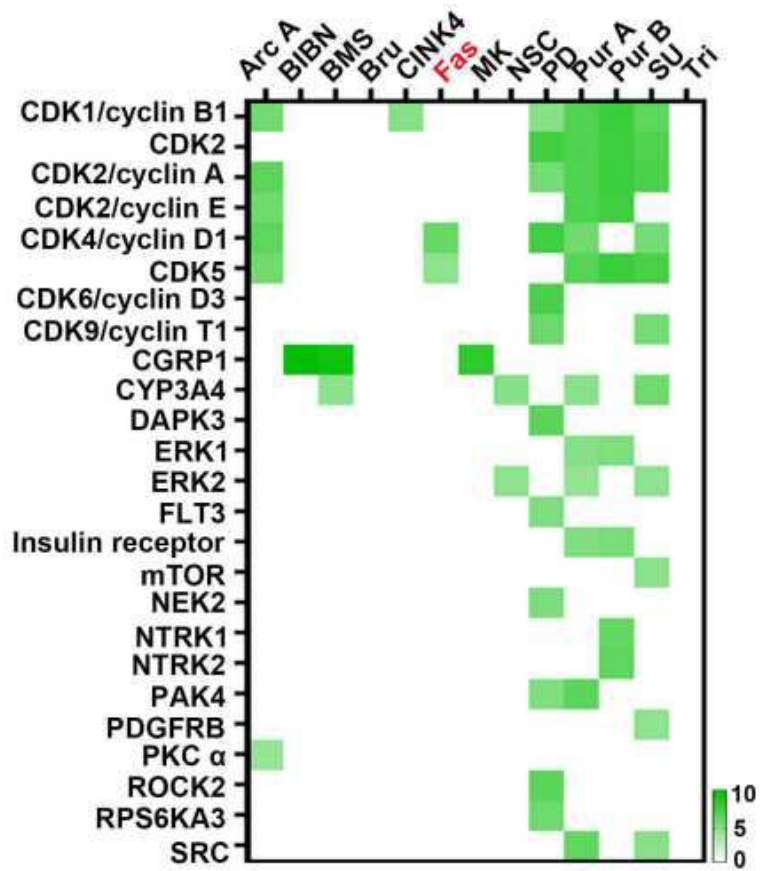
도면1a



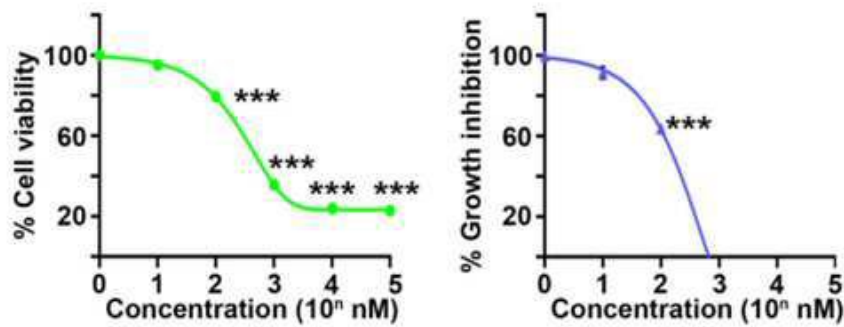
도면1b



도면1c



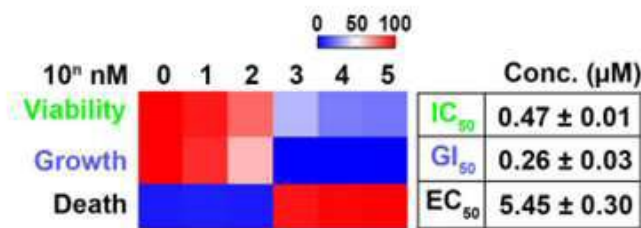
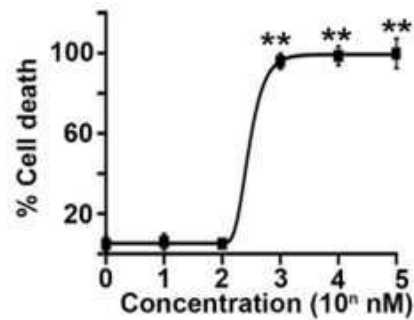
도면1d



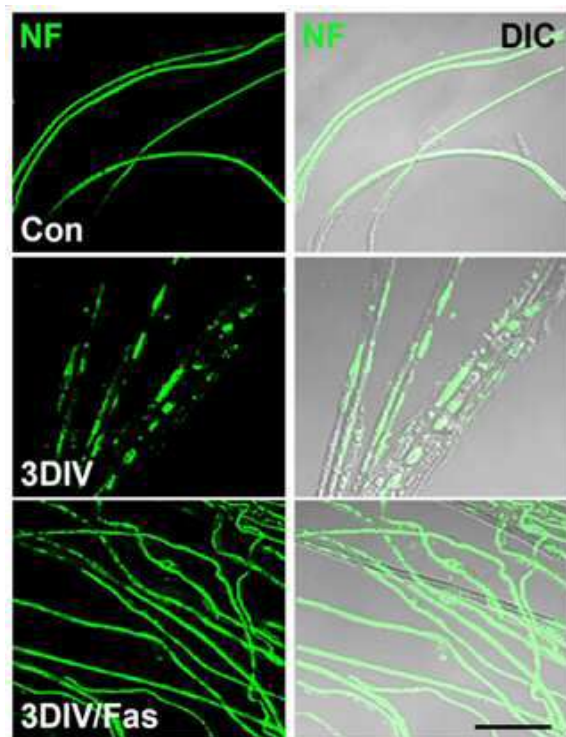
Fascaplysin



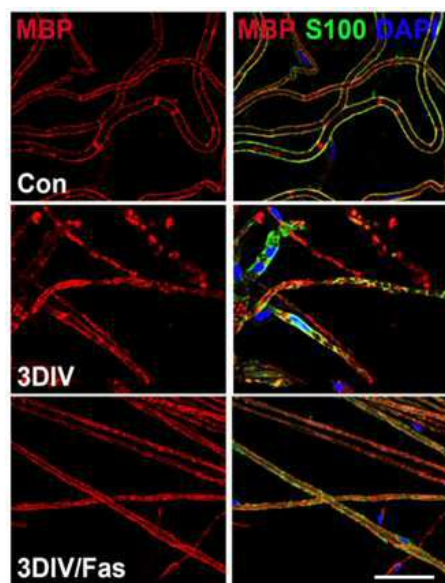
● O ● N ● C ● H
Formula : C₁₈H₁₁N₂O
M.W. : 306.75



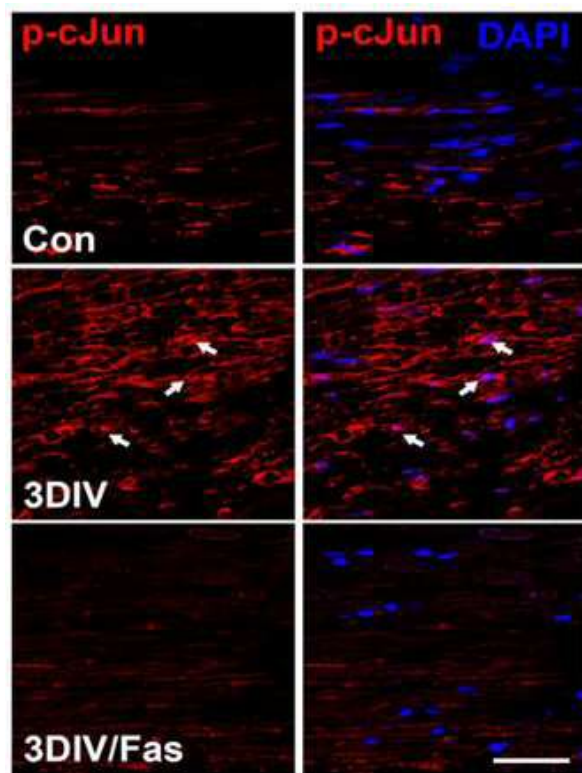
도면2a



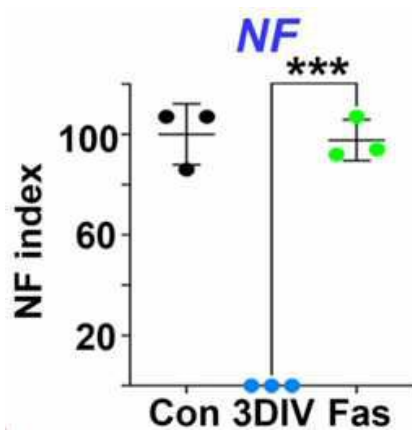
도면2b



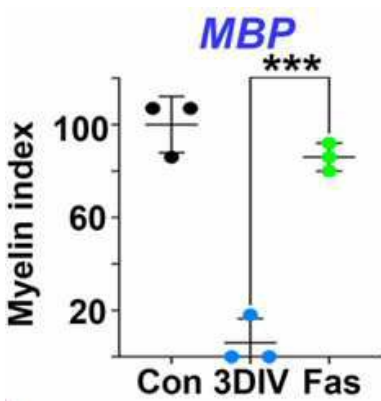
도면2c



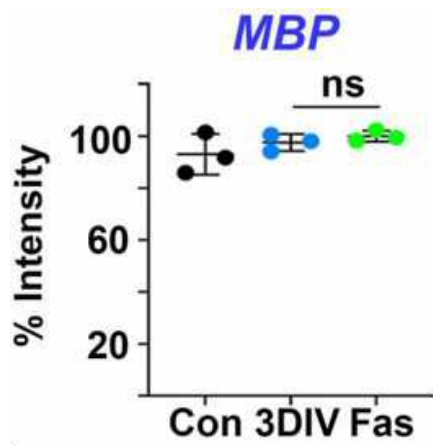
도면2d



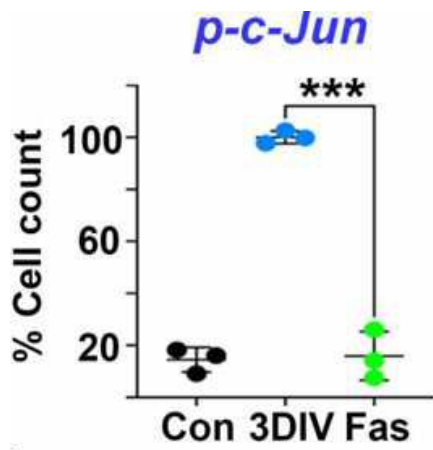
도면2e



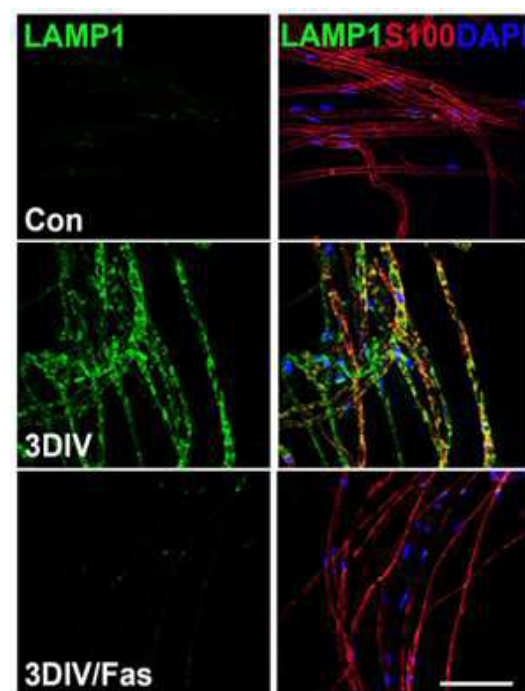
도면2f



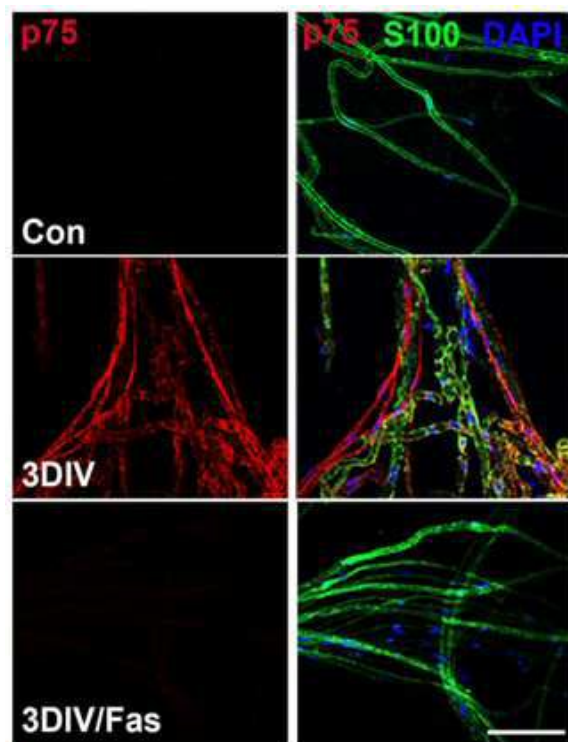
도면2g



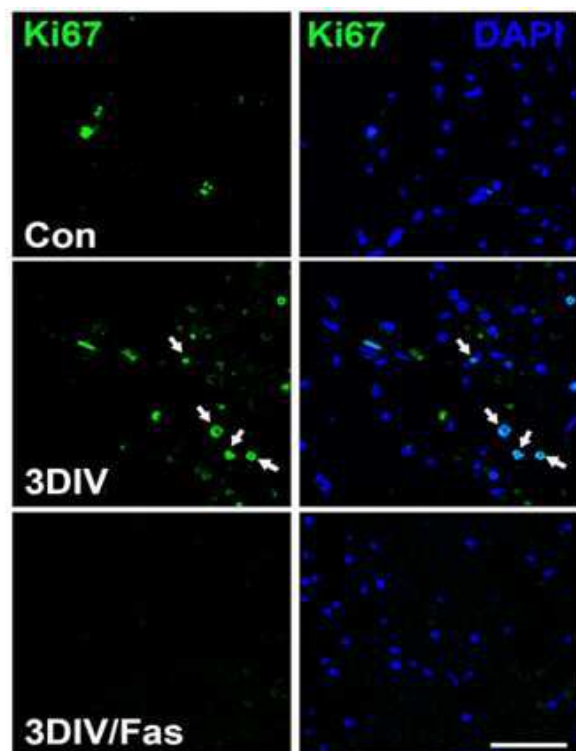
도면2h



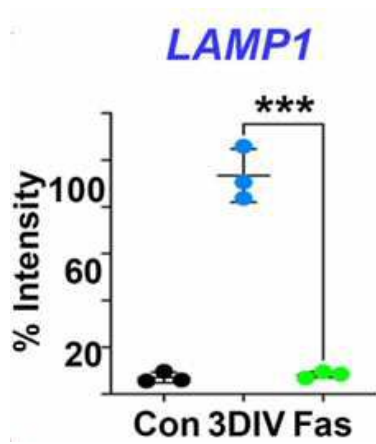
도면2i



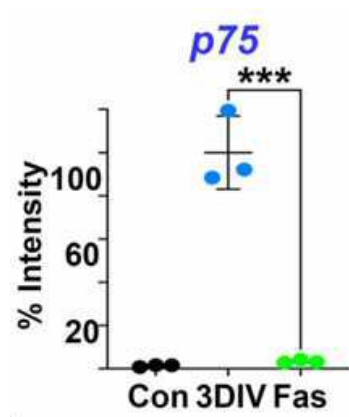
도면2j



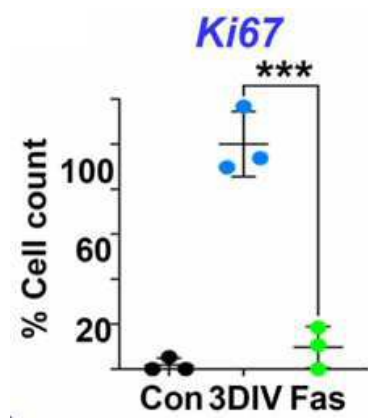
도면2k



도면2l



도면2m



도면2n

