



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0096112
(43) 공개일자 2013년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0017667

(22) 출원일자 2012년02월21일

심사청구일자 2013년01월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

백자현

서울특별시 강남구 도곡2동 도곡렉슬아파트 201동 1902호

윤세현

서울특별시 동대문구 정릉천동로 36 래미안허브리츠아파트107동 503호

(74) 대리인

이처영

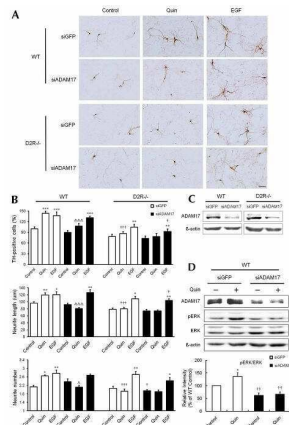
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 메탈로프로테아제 ADAM17에 의한 도파민성 신경세포로의 분화 조절 조성물

(57) 요약

본 발명은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 ADAM17의 활성을 증가 또는 억제시키는 단계를 포함하는, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 도파민성 신경세포로의 분화를 조절하는 방법 및 뇌신경계 질환치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법 및 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포에 대하여, ADAM17의 활성을 조절함으로써, 중뇌 부위에 도파민성 신경세포가 증가하도록 하여, 파킨슨 병과 같은 도파민성 신경세포의 사멸에 의하여 유도되는 질환의 치료효과를 얻을 수 있으며, 또한 활성을 억제함으로써, 중양과 같은 질환 치료 효능을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110015678

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자지원_핵심연구

연구과제명 뇌에서의 도파민 수용체-EGFR-ERK 활성화 신호를 통한 도파민성 신경정신 질환 조절 연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

신경줄기세포 또는 신경전구세포의 ADAM17의 활성을 증가 또는 억제시키는 단계를 포함하는, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 도파민성 신경세포로의 분화를 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, ADAM10의 활성을 추가로 증가 또는 억제시키는 것을 특징으로 하는 도파민성 신경세포로의 분화를 조절하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포 또는 신경전구세포는 중뇌의 신경줄기세포 또는 신경전구세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

ADAM17의 활성화제(activator)를 유효성분으로 함유하는 도파민성 신경세포의 분화촉진용 조성물.

청구항 5

ADAM17의 활성화제 또는 억제제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경계 질환 치료용 조성물.

청구항 6

제6항에 있어서, 상기 억제제는 siRNA 또는 antisense RNA인 것을 특징으로 하는 뇌신경계 질환치료용 조성물.

청구항 7

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가지는 ADAM17의 siRNA.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 ADAM17의 활성을 조절하여 도파민성 신경세포로의 분화(differentiation)를 조절하는 방법 및 ADAM17의 활성화제 또는 억제제를 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 도파민은 흑질(substantia nigra)과 척추 피개부를 포함한 뇌의 여러 영역에서 생산되며, 또한 시상 하부에 의해 분비되는 카테콜아민계 신경호르몬으로, 여러 가지 신경질환에 관여하고 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 파킨슨 증후군이나 정신 분열증, 약물 중독, 우울증 등이 도파민 신경전달 시스템의 결손으로 유발된다. 도파민은 뇌의 흑색질과 중개피질영역에 존재하는 중뇌신경세포에 의해 합성되며, 도파민성 신경세포들은 흑색질과 중

개피질영역 부분으로부터 선조체, 대뇌피질, 변연계 등으로 신경돌기를 전사하고 있어, 운동기능이나 보상회로 반응, 시상하부로부터 뇌하수체에 이르는 호르몬의 분비 조절 등 여러 가지 생리적 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 도파민은 심장 박동수와 혈압을 증가시키는 효과를 나타내어 교감신경계에 작용하는 정맥주사 약물로서 사용할 수 있으나, 도파민은 전구물질이 아닌 정상적인 상태에서는 혈액-뇌 장벽을 통과할 수 없기 때문에 직접적으로 중추신경계에 영향을 줄 수 없다.

[0004] 도파민 분비 조절에 이상이 발생하면, 예를 들어 도파민의 분비가 과다하거나 활발하면 조울증이나 정신 분열증(schizophrenia)을 일으키며, 도파민의 분비가 줄어들 경우 우울증(clinical depression)을 일으킨다. 또한, 도파민을 생성하는 신경세포가 손상되면 운동장애를 일으켜 파킨슨병(Parkinson's disease)을 유발한다. 흡연으로 인해 흡수되는 니코틴은 도파민을 활성화 시켜서 쾌감을 느끼게 해준다. 마약을 통해 느끼는 환각이나 쾌락 등도 도파민의 분비를 촉진 및 활성화 시켜서 얻게 되는 것이다. 따라서, 이러한 도파민의 작용을 조절하거나, 도파민성 신경세포의 손상을 억제하고 성장 유지되도록 하는 것이 질환치료에 중요한 치료방법이 될 수 있다.

[0005] 상기 도파민의 기능은 막수용체인 도파민 수용체(Dopamin Receptor)와 결합작용하여 이루어지게 되는데, 상기 수용체는 G-proteins (GTP-binding-proteins)과 결합작용하여 이차 신호전달자를 활성화시키거나 특정한 신호 전달체계를 활성화, 또는 억제시키며 생리적 반응에 이르는 것으로 알려져 있다. 현재까지 알려진 도파민 수용체로는 5개의 subtype이 있는데, 이들은 다시 그들의 구조와 약리학적 성질에 의해서 D1과 D5가 포함되며, adenylate cyclase를 활성화하여 세포 내 cAMP 형성을 촉진시키는 D1-like Receptor(이하, D1R) 그룹과, D3, D4 등이 포함되며, 상기 D1R과는 반대로 cAMP 형성을 억제하는 D2-like receptor(D2R) 그룹으로 분류될 수 있으며, D2R의 작용기전에 대해서는 아직 명확하지 않기 때문에, knockout mice 모델을 통한 여러 분자 또는 세포생물학적 방법을 이용한 분석으로 활발한 기전규명에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0006] D2R의 활성화는 ERK(extracellular signal-regulated kinases)를 인산화시키는데, 이 과정에서 EGF(epidermal growth factor)이 EGFR(epidermal growth factor receptor)과 결합하여 RAS, RAF를 통한 MAPK pathway를 통해 신경전구체 세포들의 도파민성 신경세포로의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있으나, D2R이 EGF를 활성화시키는 기전에 대해서는 명확한 기전이 밝혀져 있지 않다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 결과, 도파민의 D2R 기전을 규명하고자 예의 노력한 결과, 중뇌 부위에서 도파민성 신경세포의 분화촉진에 ADAM17이 관여함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 ADAM17의 활성을 조절하여 도파민성 신경세포로의 분화를 조절하는 방법을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 ADAM17의 활성화제(activator)를 유효성분으로 함유하는 도파민성 신경세포의 분화촉진용 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 ADAM17의 활성화제 또는 억제제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경계 질환 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가지는 ADAM17의 siRNA를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 ADAM17의 활성을 증가 또는 억제시키는 단계를 포함하는, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 도파민성 신경세포로의 분화를 조절하는 방법을 제공

한다.

- [0013] 본 발명은 ADAM17의 활성화제(Activator)를 유효성분으로 함유하는 도파민성 신경세포의 분화촉진용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 ADAM17의 활성화제 또는 억제제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경계 질환 치료 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가지는 ADAM17의 siRNA를 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따르면, 신경줄기세포 또는 신경전구세포에 대하여, ADAM17의 활성을 조절함으로써, 중뇌 부위 내 도파민성 신경세포가 증가하도록 하여, 파킨슨 병과 같은 도파민성 신경세포의 사멸에 의하여 유도되는 질환의 치료효과를 얻을 수 있으며, 또한 활성을 억제함으로써, 종양과 같은 질환 치료 효능을 향상시킬 수 있다.
- [0017]

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 정상 쥐와 D2R-/- 쥐 유래 중뇌 신경세포에 대해 EGF에 의한 도파민성 신경세포(TH-positive cells)의 발달이 유도됨을 확인한 결과이다(A: 중뇌 신경세포와 대조군의 면역염색; B: TH-positive 세포수; C: 신경돌기 길이; D: 신경돌기 수; Scale bar: 100um (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 대조군 vs 약물처리 비교군; †, p<0.05; ††, p<0.01 정상쥐 vs D2R-/- 쥐)).
- 도 2는 정상 쥐와 D2R-/- 쥐 유래 중뇌 신경세포에 대해 D2R 작용제에 의한 도파민성 신경세포(TH-positive cells)의 발달이 유도됨을 확인한 결과이다(A: 중뇌 신경세포와 대조군의 면역염색; B: TH-positive 세포수; C: 신경돌기 길이; D: 신경돌기 수; Scale bar: 100um (*, p<0.05; **, p<0.01 대조군 vs 약물처리 비교군; †, p<0.05; ††, p<0.01; †††, p<0.001 정상쥐 vs D2R-/- 쥐)
- 도 3은 정상 쥐와 D2R-/- 쥐 유래 중뇌 신경세포에 대해, EGF에 의하여 ERK 인산화가 일어남을 확인한 결과이다(A: EGF, quinpirole 및 haloperidol 처리; B: EGF, quinpirole 및 AG1478의 조합처리; *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 대조군 vs 약물처리 비교군; †, p<0.05; †††, p<0.001 정상쥐 vs D2R-/- 쥐).
- 도 4는 정상 쥐와 D2R-/- 쥐 유래 중뇌 신경세포에 대해, ERK 인산화와 관련하여 D2R과 metalloprotease가 관여함을 확인한 결과이다(A: EGF 및 GM6001 조합처리; B: quinpirole 및 GM6001 조합처리; ***, p<0.001 대조군 vs 약물처리 비교군; †, p<0.05; †††, p<0.001 정상쥐 vs D2R-/- 쥐).
- 도 5는 정상 쥐와 D2R-/- 쥐 유래 중뇌 신경세포에 대해 D2R와 Metalloprotease에 의한 도파민성 신경세포(TH-positive cells)의 발달이 유도됨을 확인한 결과이다(A: 중뇌 신경세포와 대조군의 면역염색; B: TH-positive 세포수; C: 신경돌기 길이; D: 신경돌기 수; Scale bar : 100um (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 대조군 vs 약물처리 비교군; †, p<0.05; ††, p<0.01; †††, p<0.001 정상쥐 vs D2R-/- 쥐).
- 도 6은 태아시기 SN과 VTA에서 ADAM10과 ADAM17의 TH positive cell에서의 발현양상을 나타낸 사진이다(A: ADAM10; B: ADAM17).
- 도 7은 정상 쥐와 D2R-/- 쥐 유래 중뇌 신경세포에 대해, D2R의 ERK 인산화 및 이로 인한 도파민성 신경세포(TH-positive cells)의 발달은 ADAM17에 의한 것임을 확인한 결과이다((A: 중뇌 신경세포와 대조군의 면역염색; B: TH-positive 세포수; C: 신경돌기 길이; D: 신경돌기 수; Scale bar: 100um (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 대조군 vs 약물처리 비교군; †, p<0.05; ††, p<0.01; †††, p<0.001 정상쥐 vs D2R-/- 쥐).
- 도 8은 D2R 및 ADAM17을 매개로 하는 ERK 인산화에 의한 도파민성 신경세포 분과기전의 모식도이다(D2R: 도파민 D2 수용체; ADAM: a disintegrin and metalloprotease; HB-EGF: heparin-binding EGF-like growth factor; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; ERK: extracellular signal-regulated kinase).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 일 관점에서, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 ADAM17의 활성을 증가 또는 억제시키는 단계를 포함

하는, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 도파민성 신경세포로의 분화를 조절하는 방법에 관한 것이다.

[0020] 본 발명에서는 도파민성 신경세포로의 분화기전에 있어서, 도파민 D2 수용체 및 epidermal growth factor (EGF)에 의한 extracellular signal-regulated kinases (ERKs)를 인산화 작용이 주요 기전임을 확인하였으며, 특히 EGF의 활성화에 ADAM17이 관여한다는 것을 확인하였다.

[0021] 본 발명에서, 상기 신경줄기세포 또는 신경전구세포는 중뇌의 신경줄기세포 또는 신경전구세포인 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 용어 '줄기세포' 또는 '전구세포'란 조직을 구성하는 각 세포로 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포를 총칭한다. 줄기세포는 세포분열능이 있으며, 또한 분화자극이 가해지면, 특정 세포로 분화하는 능력이 있는데, 환경 또는 자극에 따라 분화되는 최종 세포의 특성이 달라지는 유연성(plasticity)을 가지고 있는 특성이 있으며, 또한 줄기세포는 발생기원에 따라, 배아줄기세포, 성체줄기세포로 분류될 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어, '신경세포'는 신경 체계의 세포이고, 용어 '뉴런' 또는 '뉴런 세포'로 서로 혼용할 수 있다.

[0024] 본 발명의 용어 '분화'는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 행태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 발생 과정에서 세포의 특이화를 이끄는 마지막 단계로서, 세포 분화는 각 세포들 내의 유전자 활성이 서로 달라져 유전자들이 서로 다른 방법으로 발현되는 현상이며, 그 결과 각 세포들은 구조적, 기능적으로 완전히 구별되는 특성을 가지게 된다.

[0025] 본 발명의 용어 '치료'는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 증상의 완화, 병소의 감소, 악화 억제, 질병의 진행 속도의 지연, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 등을 나타내며, 이에 한정되지는 않는다. 또한 '치료'는 치료받지 않았을 때, 예상되는 생존율과 비교하여 생존율을 늘리는 것을 의미할 수도 있다. '치료'는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방 조치방법 모두를 가리킨다. 상기 치료는 예방되는 장애뿐만 아니라, 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다.

[0026] 본 발명의 용어 '도파민성 신경세포'는 티로신 수산화효소(tyrosine hydroxylase, TH)를 발현하는 신경세포로서, 중간 뇌 흑색질에 특이적으로 위치하고, 생체 내에서 선조체, 변연계 및 신경질을 자극하여 자세 반사, 운동, 및 보상관련 거동을 조절한다. 특히 실제로 체내에서 도파민성 신경세포로 기능하기 위해서는 중뇌 특성을 나타내야만 한다.

[0027] 본 발명은 다른 관점에서, ADAM17의 활성화제(Activator)를 유효성분으로 함유하는 도파민성 신경세포의 분화촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본 발명의 분화방법 및 도파민성 신경세포로의 분화촉진용 조성물에서는 ADAM17뿐만 아니라, ADAM10의 활성을 증가 또는 억제시키는 활성화제 또는 억제제를 추가로 사용하여 조절할 수 있다.

[0029] ADAM(a disintegrin and a metalloproteinase)-family의 하나인 ADAM17은 CD156b, cSVP, MGC71942, 또는 TACE(tumor necrosis factor converting enzyme)로 알려져 있으며, α-secretase 활성을 가지고, ADAM10과는 서열상 30%의 상동성을 가지는 특징이 있다.

[0030] ADAM17 및 ADAM 10은 TAPI-1, TAPI-2, GI254023, GW280264에 의하여 활성이 조절될 수 있으며, 이에 한정된 것은 아니다.

[0031] 본 발명은 또 다른 관점에서, ADAM17의 활성화제 또는 억제제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경계 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0032] 본 발명에서의 상기 '뇌신경계 질환'은 파킨슨병, 신경통, 관절염, 두통, 정신분열증, 간질, 뇌졸중, 분면증, 치매, 우울증, 디스키네시아, 알츠하이머 질환, 루이제 치매, 헌팅톤 질환, 뚜렛 증후군, 불안, 학습 및 기억 손상, 퇴행성 신경질환 등의 신경계의 기능 감소 또는 이상으로 인하여, 뇌 또는 신경계에 나타나는 질환을 포함한다.

- [0033] 본 발명에서의 상기 '활성화제'는 ADAM 17 또는 ADMA10의 활성을 아고니스트를 사용하여 향상시키는 것이며, 바람직하게는 도파민성 신경세포의 사멸에 의하여 야기되는 뇌 질환 치료일 경우에 적용할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서의 상기 '억제제'는 ADAM 17 또는 ADMA10의 활성을 길항제를 사용하여 억제시키는 것이며, 바람직하게는 종양 등과 같은 ADAM17의 활성화에 의해 야기되는 질환에 대해 적용할 수 있다.
- [0035] 상기 억제제는 또한, ADAM17 또는 ADAM10의 서열을 인지하는 siRNA 또는 antisense RNA인 것이 바람직하다.
- [0036] 본 발명은 또 다른 관점에서 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가지는 ADAM17의 siRNA에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명에 따른 ADAM17 및 ADAM10의 발현을 억제하는 siRNA 또는 antisense RNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 특히 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이러한 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로(in vitro) 또는 인비보(in vivo)에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다. 상기 siRNA를 세포 내로 도입하면, ADAM17의 mRNA 수준이 감소하고, 따라서 ADAM17의 활성이 감소한다.
- [0038] siRNA는 shRNA 분자를 사용하여 세포 내로 도입할 수 있으며, shRNA 구축물은 스템-루프(stem-loop) RNA를 코딩한다. 세포 내로 도입된 후에, 상기 스템-루프 RNA는 그의 서열이 원래의 RNA 분자의 스템에 상응하는 이중가닥 RNA로 프로세싱되며, 상기 이중가닥 RNA는 당업계에 공지된 임의의 방법에 따라 제조할 수 있다.
- [0039] siRNA 또는 antisense RNA의 생체 내 투여를 위해, shRNA 또는 antisense RNA는 플라스미드에 삽입되어 AAV 벡터, 레트로바이러스 벡터, 특히 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터로 제조하여 생체 투여에 사용될 수 있으며, 정맥내 경로, 근육내 경로, 피하 조직 또는 통상적인 용례에 따라 선택된 표적 조직 내로의 직접 주사를 비롯한 상이한 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0040] siRNA 또는 antisense RNA의 투여 경로는 국소의 직접 전달로부터 전신 정맥내 투여까지 달라진다. 국소 전달의 잇점은 분자가 표적 조직 내로 또는 그 부근에 주사되기 때문에, 효능을 위해 요구되는 siRNA의 용량이 실질적으로 적다는 것이다. 또한, 국소 투여는 siRNA의 집중 전달을 허용한다. 그러한 직접 전달을 위해, 네이키드(naked) siRNA가 사용될 수 있다. "네이키드 siRNA"는 염수 또는 다른 간단한 부형제, 예를 들어 5% 텍스트로스 내에서 siRNA (비변형된 또는 변형된)의 전달을 나타낸다. 그러한 분자는 그의 제형화 및 투여가 용이하기 때문에 매력적인 치료 방안이다. 또한, 네이키드 DNA는 지질, 특히 리포솜 내로 제형화될 수 있다.
- [0041] siRNA 또는 antisense RNA의 전신 적용은 종종 덜 침습성이고, 보다 중요하게는 외부로부터 충분히 접근가능한 조직에 제한되지 않는다. 전신 전달을 위해, siRNA는 콜레스테롤 접합체, 리포솜 또는 중합체-기반 나노입자와 함께 제형화될 수 있다. 리포솜은 증가된 약동학 특성 및/또는 감소된 독성 프로필을 제공하기 위해 전통적으로 사용된다. 이들은 유익하고 반복적인 성공적 생체내 전달을 허용한다. 현재, 특히 간세포에 대한 siRNA의 전신 전달을 위한 지질-기반 제형의 사용이 RNAi 치료제의 개발을 위한 가장 유망한 가까운 장래의 기회 중 하나를 제시할 것으로 보인다. 중합체, 예를 들어 동적 폴리접합체 (예를 들어, 간세포 표적화를 위해 N-아세틸글루코사민에 결합된) 및 시클로텍스트린-기반 나노입자를 사용한 제형화는 표적화된 전달 및 엔도솜 회피 (escape) 메커니즘 모두를 허용한다. 아텔로콜라겐 및 키토산과 같은 다른 중합체는 피하 종양 이중이식편 및 뼈 전이에 대한 치료 효과를 허용한다.
- [0042] siRNA는 또한 표적화 전달을 돕기 위해 설계된 분자 엔티티(entity)와 직접 접합될 수 있다. siRNA 이중체의 성질을 고려하여, 불활성 또는 센스 스트랜드의 존재는 접합을 위한 이상적인 부위로 향한다. 접합체의 예는 친지성 접합체, 예를 들어 콜레스테롤, 또는 앵타머 (aptamer)-기반 접합체이다.
- [0043] 또한, siRNA 이중체의 음대전된 인산염 백본 (backbone)과 복합체를 형성하기 위해 양이온성 펩티드 및 단백질이 사용될 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 치료용 조성물은 치료학적 유효성분인 ADAM17 및 ADAM10의 활성화제, 억제제. 이의 siRNA 및 antisense RNA와 더불어 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약학조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스,

술비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 갈슘 포스페이트, 갈슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0047] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 갈슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.

[0048] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0049] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0050] 본 발명에서 사용하는 ADAM17 및 ADAM10의 활성화제, 억제제. 이의 siRNA 및 antisense RNA의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다.

[0051] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 비강, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다

[0053] 실시예1: EGF의 도파민성 신경세포 발달 유도능 확인

[0054] (1) EGF 처리에 의한 도파민성 신경세포 발달유도능 확인

[0055] 정상쥐와 D2R-/- 쥐로부터 유래된 중뇌 신경세포에 대하여, EGF, EGF+haloperidol, EGF+AG1478, EGF+PD98059을 처리한 후, 면역세포 염색법으로 TH를 염색하고, 중뇌 신경세포의 TH 신경세포수, 신경돌기의 길이, 신경돌기 수를 비교하여 도파민성 신경세포의 발달 유도능을 확인한 결과, 정상쥐와 D2R-/- 쥐의 중뇌신경세포 모두에서 EGF에 의한 도파민성 신경세포의 발달이 촉진되고 있음을 확인하였고, 이러한 효과는 EGFR의 억제제인 AG1478과 MAPK 억제제인 PD98059에 의해 완전히 차단되지만 D2R의 길항제인 haloperidol에 의해서는 차단되지 않음을 확인하였다(도 1).

[0056] (2) D2R 작용제에 의한 도파민성 신경세포 발달유도능 확인

[0057] 정상 쥐와 D2R-/- 쥐로부터 유래된 중뇌 신경세포에 대하여, quinpirole, EGF와 quinpirole, quinpirole과 AG1478, EGF와 quinpirole과 AG1478, EGF와 quinpirole과 haloperidol을 처리한 후, 면역세포 염색법으로 TH를 염색하고, 중뇌 신경세포의 TH 신경세포수, 신경돌기의 길이, 신경돌기 수를 비교하여 도파민성 신경세포의 발달 유도능을 확인한 결과, EGF와 D2R의 작용제인 quinpirole을 함께 처리하더라도 정상쥐의 중뇌 도파민성 신경세포 수의 증가에 있어서는 상승 작용적 효과는 관찰되지 않았으며, EGF+Quinpirole에 의한 도파민성 신경세포의 발달은 정상쥐와 D2R-/-쥐 모두에서 haloperidol에 의해 저해되지 않았으나 AG1478에 의해서는 기저수준으로 저해되었다(도 2). 상기 결과는 D2R이 EGF보다 상위신호체계에 위치하여 EGFR을 통해 도파민성 신경세포의 발

달을 유도하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0058] 실시예2: EGF에 의한 ERK 인산화

[0059] (1) D2R 및 EGF에 의한 ERK 인산화능의 확인

[0060] D2R 및 EGFR을 통한 도파민성 신경세포의 발달과정이 ERK 신호전달체계를 통하여 이루어지고 있는 것인가를 확인하기 위하여 EGF와 quinpirole을 haloperidol, AG1478과 함께 처리하여 ERK의 인산화 관찰하였다. 그 결과 EGF에 의한 ERK 인산화가 대조군과 비교하여 417% 증가되었으며 이러한 효과는 haloperidole에 의해 저해되지 않았다. 이에 반해 quinpirole에 의한 ERK 인산화(194%)는 AG1478에 의해 저해되고 있음을 확인하였다(그림 3). 이를 통해 도파민 D2 수용체가 EGFR 의존적으로 ERK를 인산화시킴으로써 도파민성 신경세포의 발달을 촉진시키고 있음을 확인하였다.

[0061] (2) D2R의 EGFR 활성화에 metalloprotease작용 확인

[0062] D2R을 통한 도파민성 신경세포의 발달과정이 ERK 신호전달체계를 통하여 이루어지고 있는 것인가를 확인하기 위하여, D2R을 통한 EGFR의 활성화에 metalloprotease가 관여하는지 확인하기 위하여, metalloprotease 억제제인 GM6001를 EGF 혹은 quinpirole과 함께 처리하여 ERK의 인산화를 관찰하였다. EGF에 의한 ERK 인산화는 GM6001에 의해 영향을 받지 않으나 quinpirole에 의한 ERK의 인산화는 기저수준으로 저해되었다(그림 4). 또한 도파민성 신경세포의 발달에 있어서도 GM6001에 의해 EGF에 의한 효과는 저해되지 않았으나 quinpirole에 의한 효과는 저해되고 있음을 확인하였다(그림 5).

[0063] 실시예3: D2R 및 EGFR에 의한 ERK 인산화에 있어서의 ADAM17의 작용확인

[0064] 본 연구팀은 EGFR과 관련하여 뇌에서 가장 연구가 활발히 이루어지고 있는 ADAM10과 ADAM17에 대하여 면역조직형광염색법을 실시하여 마우스 태아시기 14일에서의 흑색질 부위와 중개피질영역에서의 도파민성 신경세포 특이적 단백질인 tyrosine hydroxylase (TH)와 발현양상을 비교하였다.

[0065] 그 결과, ADAM10과 ADAM17 모두 일부의 TH positive 세포에서 발현되고 있음이 확인되었다(도 6).

[0066] 또한, ADAM17이 D2R이 EGFR을 활성화시켜 도파민성 신경세포의 발달을 유도하고 ERK를 인산화시키는데 관여하는지를 확인하기 위해 제작된 ADAM17 siRNA (서열번호1: siADAM17)를 일차배양된 중뇌신경세포에 트랜스펙션한 뒤 quinpirole과 EGF에 의한 도파민성 신경세포의 발달과 quinpirole에 의한 ERK의 인산화를 관찰하였다. 그 결과, glycosylated ADAM17 (100kDa)이 knockdown되었을 때, EGF에 의한 도파민성 신경세포 발달은 영향을 받지 않지만 quinpirole에 의한 효과가 일부 감소하고 있음을 확인하였고(그림 7의 A 및 B), quinpirole에 의한 ERK의 인산화 또한 억제되는 것으로 나타났다(그림 7의 D). 이러한 결과들을 통해 D2R 활성화에 의한 ERK의 인산화에 ADAM17이 관여하고 있음을 확인하였다.

[0067] siRNA17 (antisense): 5' -GGCAGACUUUAGAUGCUCUUTT-3' (서열번호 1)

[0068] 상기 ADAM17이 D2R과 EGFR의 시그널링에 작용하는 기전은 EGF 전구체를 해리상태로 만드는 작용을 하여, EGFR의 활성화에 의존적으로 ERK의 인산화를 조절하여 도파민성 신경세포의 분화를 조절하고 있음을 확인할 수 있었다(그림 8).

[0069] 이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백한 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다..

부호의 설명

AG1478은 EGFR의 억제제이다.

PD98059는 MAPK 억제제이다.

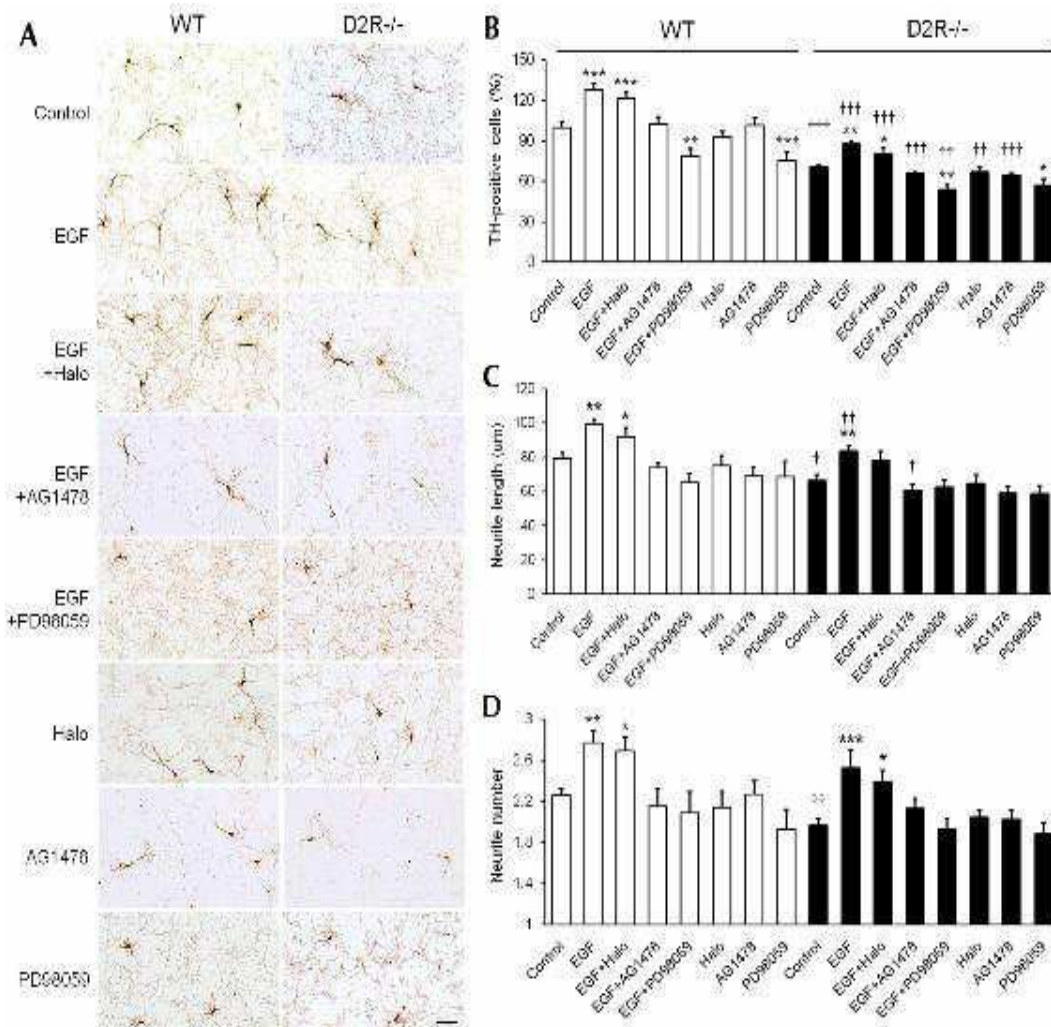
GM6001는 Metalloprotease 억제제이다.

Quinpirole은 D2R 작용제이다.

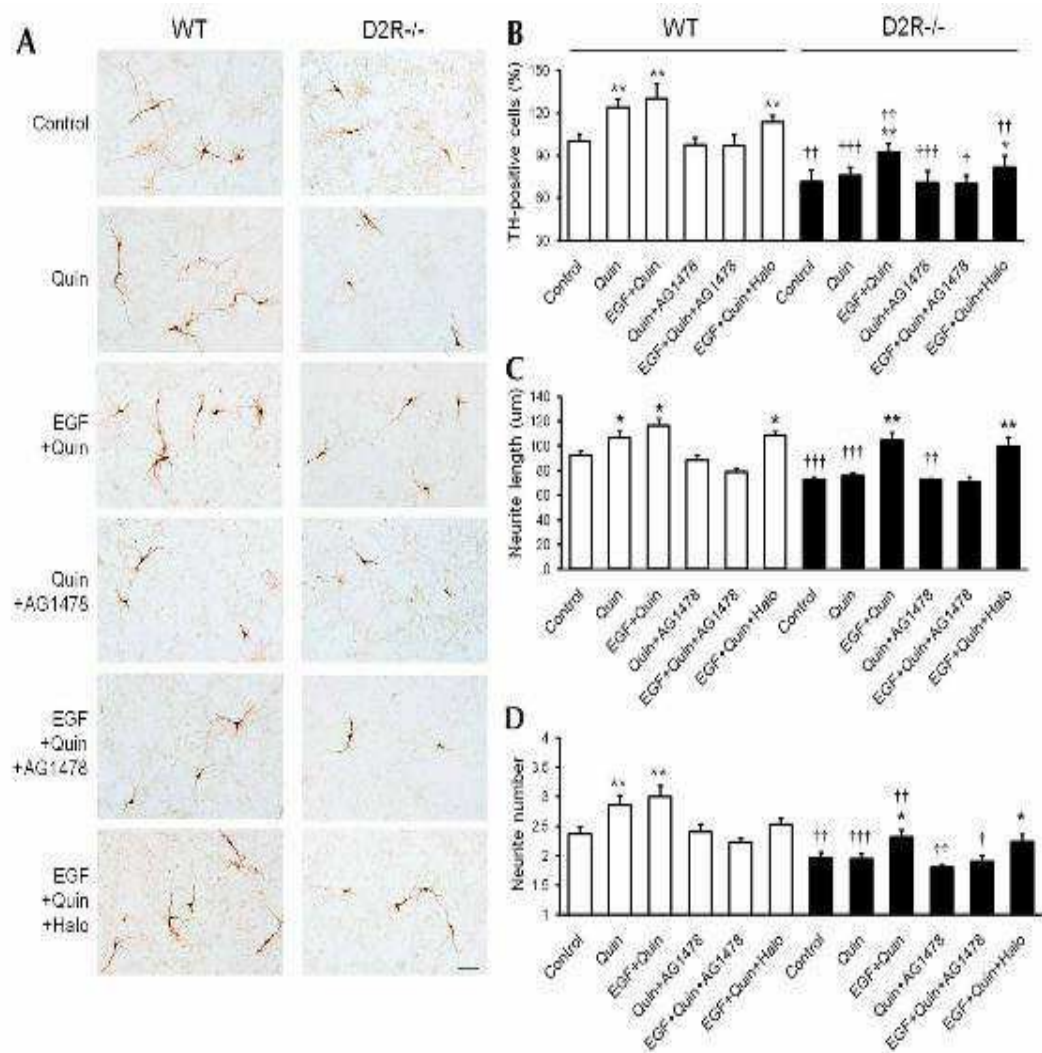
Haloperidol은 D2R 길항제이다.

도면

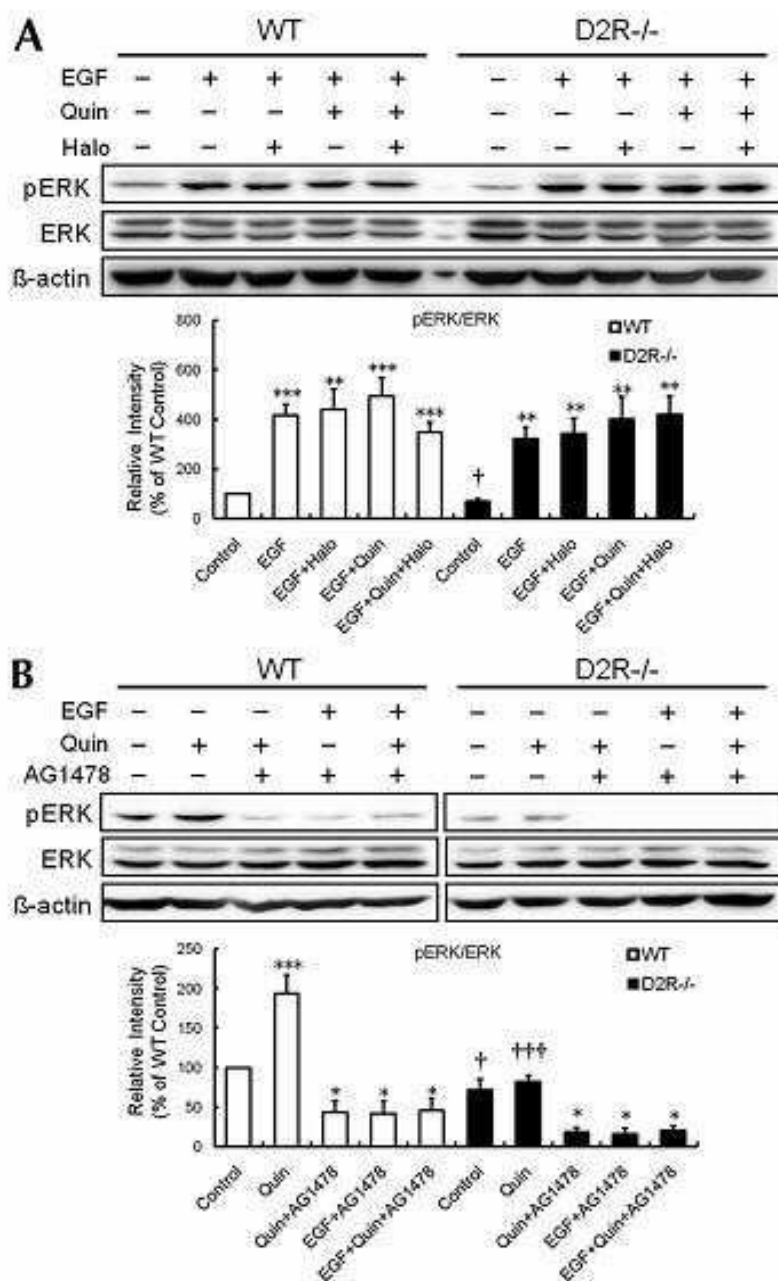
도면1



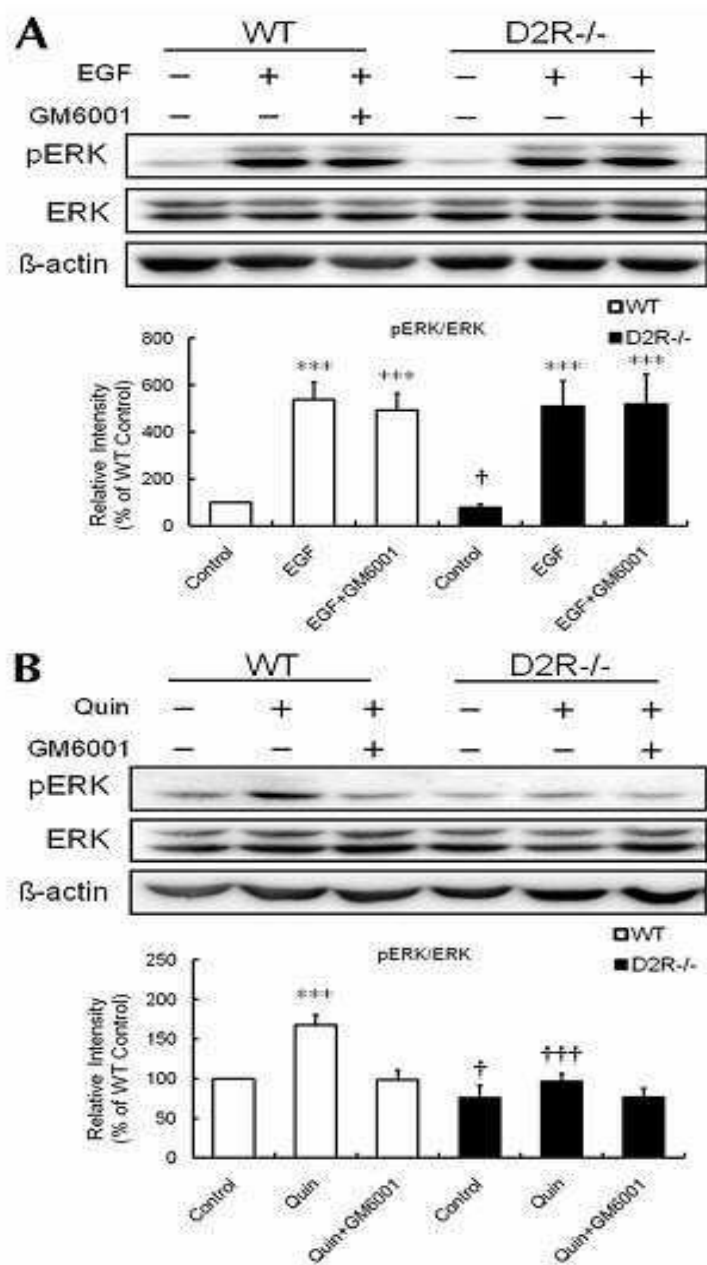
도면2



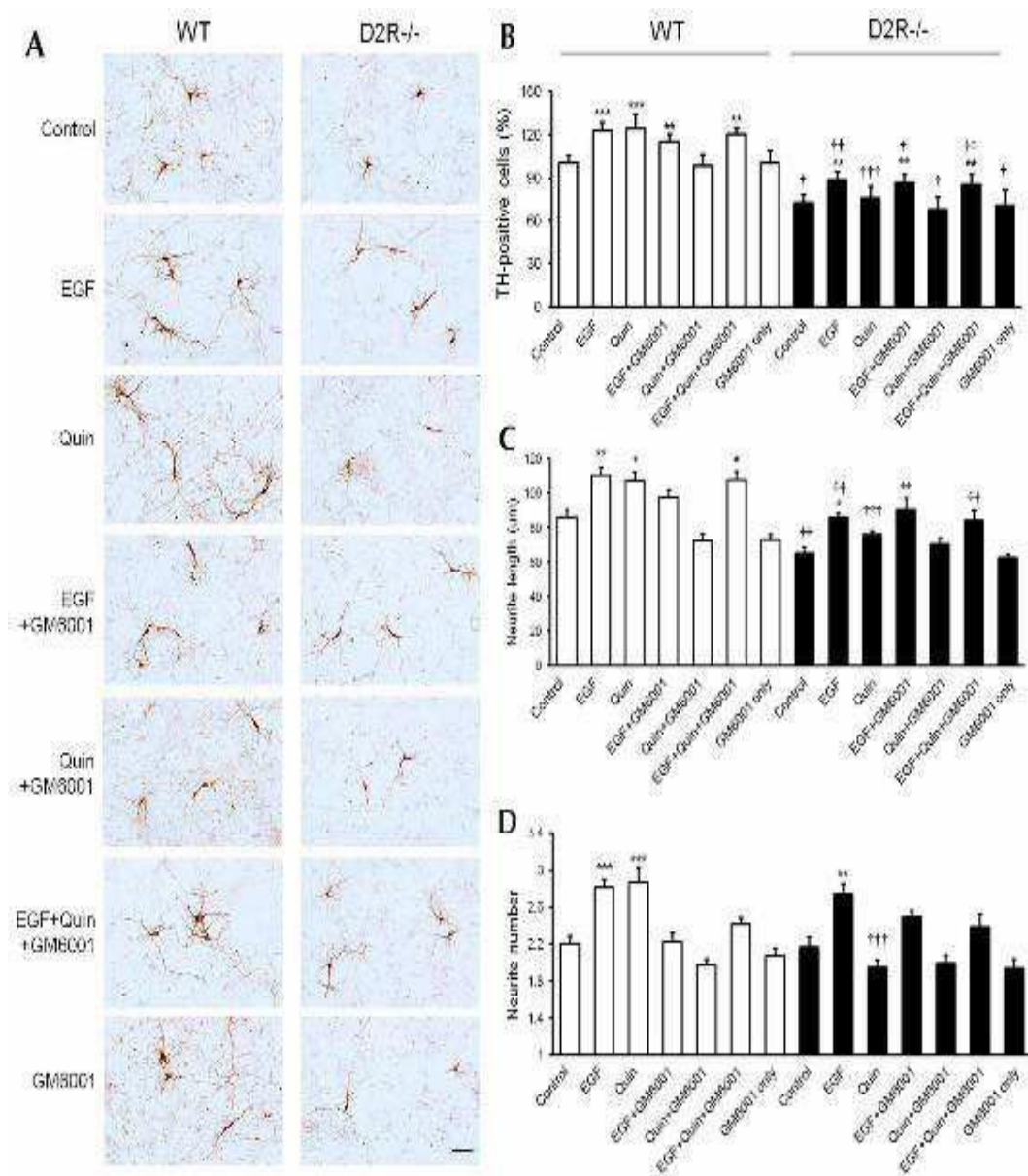
도면3



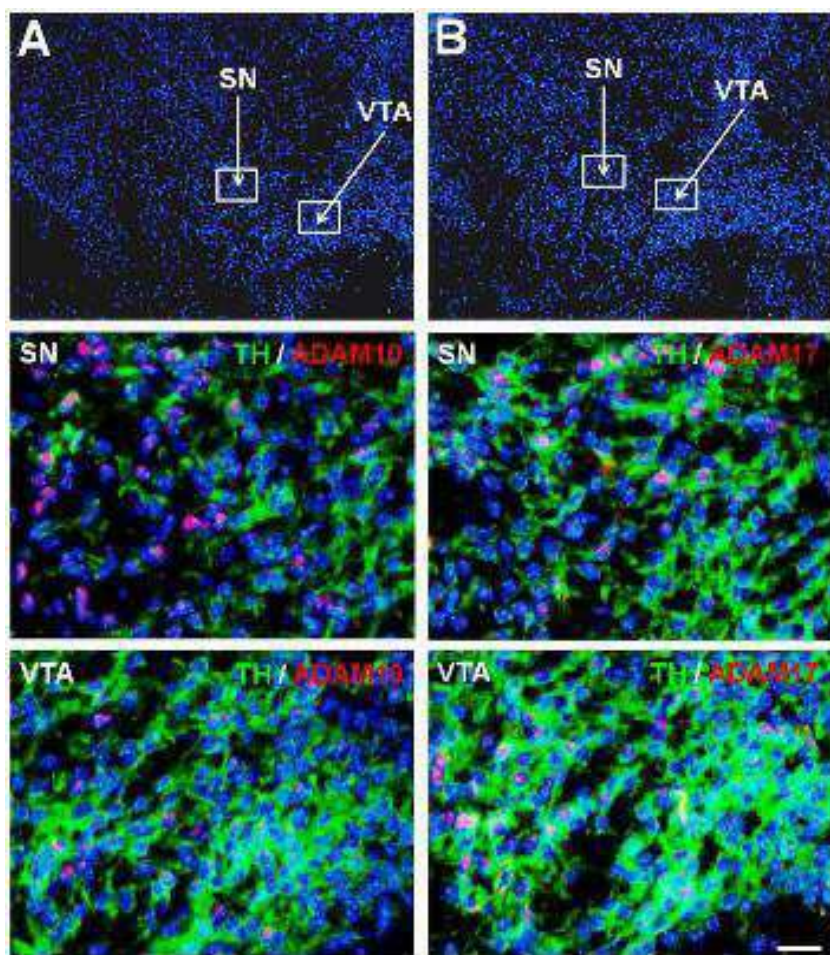
도면4



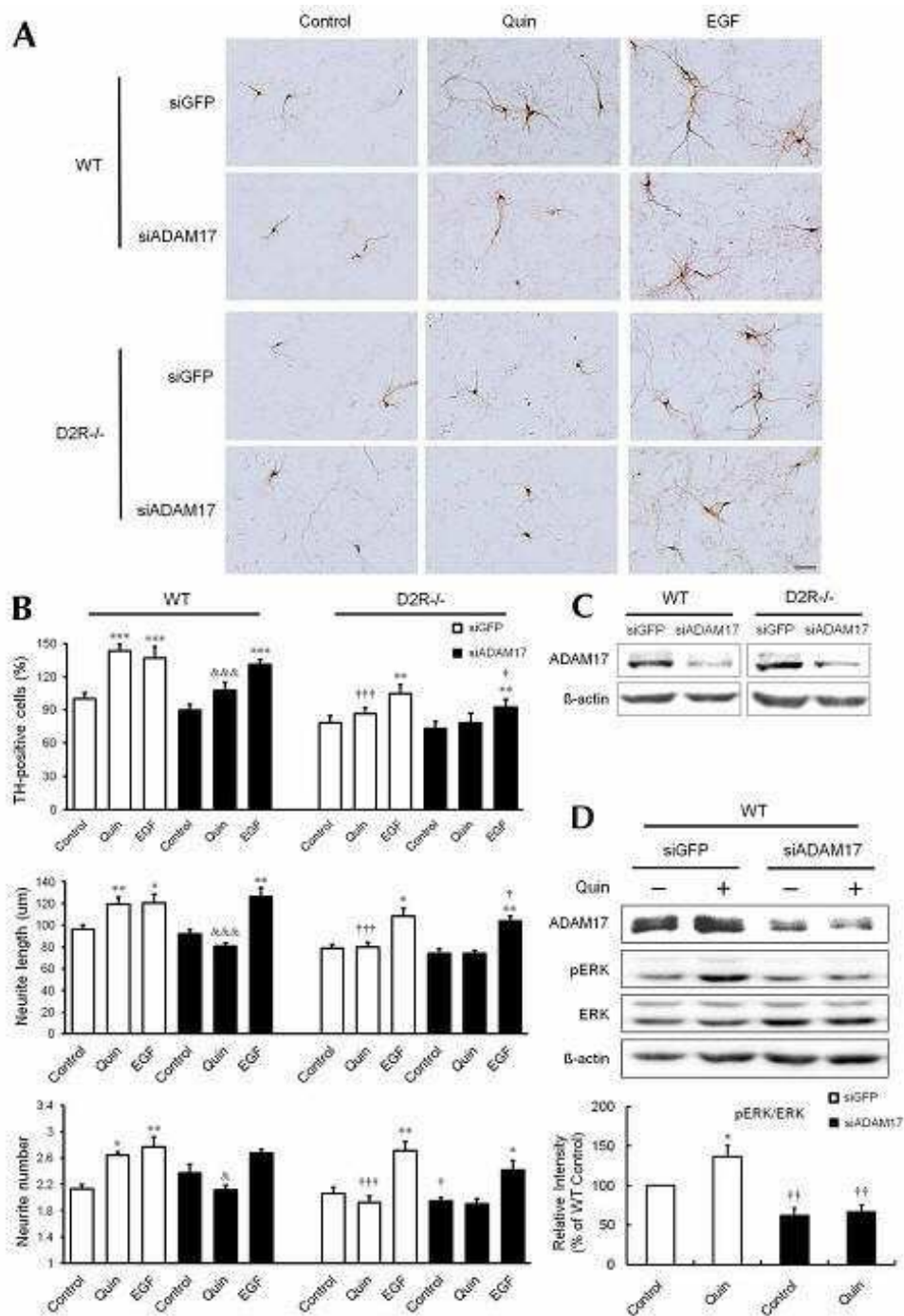
도면5



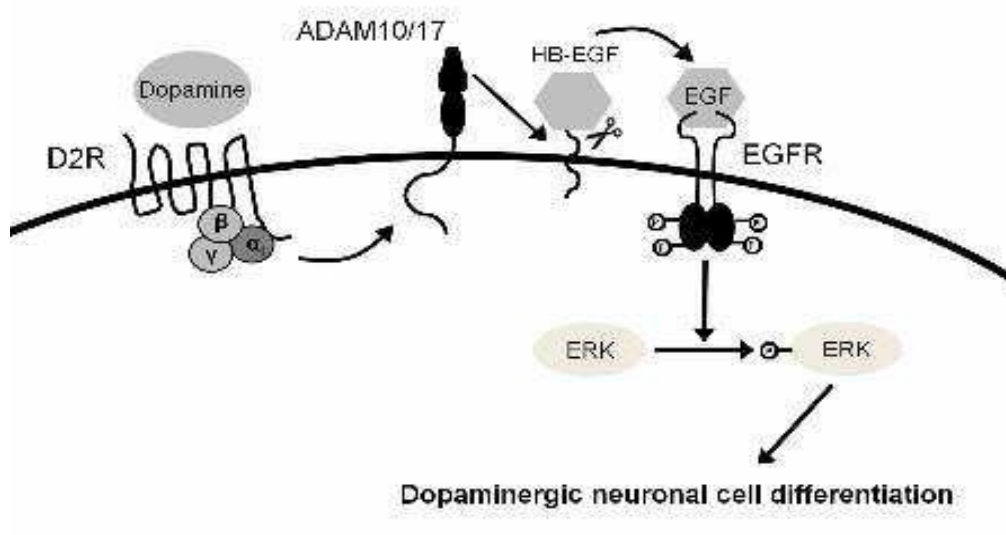
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Korea University
 <120> Method for Regulating Differentiation into Dopaminergic Neurons
 by ADAM17
 <160> 1
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ADAM17 siRNA antisense
 <220><223> siRNA
 <400> 1
 ggcagacuuu agaugcuucu utt