

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020년 6월 4일 (04.06.2020)



(10) 국제공개번호

WO 2020/111501 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A23L 33/18 (2016.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/013284

(22) 국제출원일:

2019년 10월 10일 (10.10.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0149639 2018년 11월 28일 (28.11.2018) KR

(71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 41566 대구시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교), Daegu (KR).

(72) 발명자: 김상룡 (KIM, Sang Ryong); 41566 대구시 북구 대학로 80, 경북대학교 생명공학관 311호, Daegu (KR).
신민상 (SHIN, Minsang); 41944 대구시 중구 국제보상로 680, 경북대학교 의과대학 미생물학교실 N314호,

Daegu (KR). 임은주 (LEEM, Eunju); 41566 대구시 북구 대학로 80, 경북대학교 생명공학관 311호, Daegu (KR).

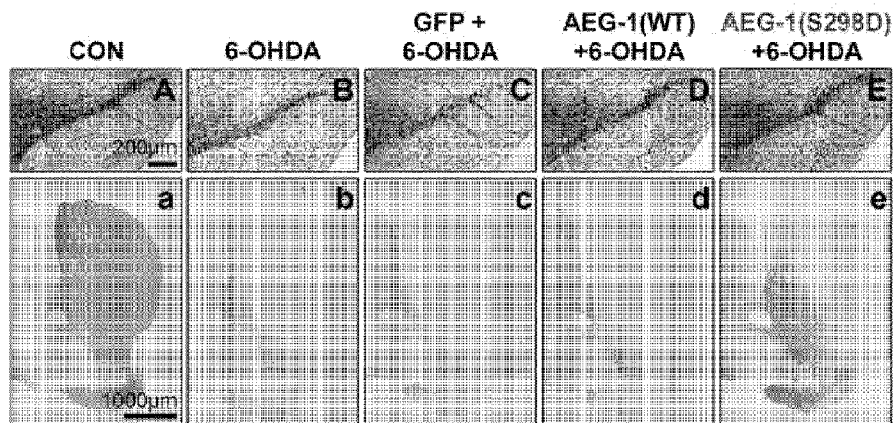
(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING PARKINSON'S DISEASE, CONTAINING AEG-1 S298D AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: AEG-1 S298D을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating Parkinson's disease, containing AEG-1 (S298D) as an active ingredient. In the present invention, it is ascertained that, when AEG-1(S298D), which is a constitutively active form, is induced by introducing a point mutation into AEG-1 and AAV-AEG-1(S298D) is produced and applied to an animal model of Parkinson's disease, a brain tissue protection effect is exhibited by preserving dopamine neurons and dopamine nerve fibers, and thus AEG-1 can be effectively used in a composition for preventing or treating Parkinson's disease, a health food composition for preventing or alleviating Parkinson's disease, and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 AEG-1(S298D)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서는 AEG-1에 점 돌연변이(point mutation)를 도입하여 구성적 활성(constitutively active) 형태인 AEG-1(S298D)을 유도하고, AAV-AEG-1(S298D)을 제조하여 파킨슨 질환 동물모델에 적용시킨 결과, 도파민 신경세포 및 도파민 신경 섬유를 보존함으로써 뇌 조직 보호 효과를 나타내는 것을 확인한 바, AEG-1은 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 조성물, 파킨슨 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

럼 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: AEG-1 S298D을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 AEG-1(astrocyte elevated gene-1)(S298D)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 파킨슨 질환(parkinson's disease; PD)은 알츠하이머 치매와 더불어 노년기에 나타나는 대표적인 퇴행성 신경질환의 하나로 65세 인구에서 약 1% 정도가 발병하며 나이가 들수록 그 발병률이 증가하는 것으로 알려져 있다. 파킨슨 질환은 운동성 장애를 나타내는데, 안정시 떨림증(tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia), 자세의 불안정(postural instability) 등이 대표적인 증상이다. 또한, 파킨슨 질환은 미세아교세포증(microgliosis), 성상교세포증(astrogliosis), 도파민성 뉴런의 진행적인 퇴화, 도파민성 뉴런에서 루이 소체(Lewy bodies)의 존재, 및 뇌흑질 치밀부(substantia nigra pars compacta)에서 알파-시누클레인(α -synuclein)이 축적되는 특징을 가진다.
- [3] 파킨슨 질환의 정확한 원인은 아직까지 명확하게 알려지지 않았으나, 농약 등과 같은 신경독소들에 의한 환경적 요인, 유전적 요인, 미토콘드리아의 기능 장애, 노화 등이 관련되어 있는 것으로 파악된다. 유전적 요인으로는 알파-시누클레인, 파킨(Parkin), PINK-1, UCH-L1, DJ-1 등과 같은 유전자 돌연변이와 연관되어 있다고 알려져 있다. 현재 파킨슨 질환의 증상을 경감시키는 약물이 다수 존재하나, 병의 진행을 막을 수 있는 약물은 아직까지 보고된 바 없으며, 약물의 만성적인 사용은 심신을 약화시키는 부작용을 초래할 위험성이 크다.
- [4] 파킨슨 질환의 치료를 위한 약물로는 엘-도파(L-dopa) 제제, 도파민 수용체 작용제, 항콜린 약제, 엘테프릴(Eldepryl) 등이 있다. 그러나, 이들 약물들 대부분은 원인적인 치료가 아니라 증상을 조절하는 역할을 하는 것으로 지속적인 약물의 복용을 필요로 한다. 이러한 약물들의 장기 투여는 약물 부작용의 문제점을 야기하게 된다. 예를 들어, 항콜린 약제들은 자율 신경계 이상이나 정신기능의 이상 등이 나타날 수 있어 고령의 환자들에게 지속적으로 투여하는 것에 한계가 있다. 또한, 엘-도파 제제의 경우, 장기간 동안의 복용에 따라 점차적으로 효과가 떨어지고, 몸이 뒤틀리거나 손, 발이 저절로 움직이는 이상 운동이 생기는 등의 부작용이 발생하게 된다. 기타, 고주파를 이용한 신경자극술 즉, 고주파 파괴술 또는 심부 뇌자극술 등의 수술 치료도 행해지고 있으나, 침습적인 수술을 필요로 하고 많은 비용이 소모되는 문제점이 있다.
- [5] 따라서, 파킨슨 질환은 그 병인이 정확히 알려져 있지 않아서 근본적인

치료보다 주로 증상 개선을 위한 치료방법들이 이용되고 있는 바, 파킨슨 질환의 예방 및 치료를 위해, 보다 효과적인 새로운 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 AEG-1 S298D 돌연변이 단백질, 이를 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 데에 있다.
- [7] 본 발명의 다른 목적은 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 AEG-1(astrocyte elevated gene-1) 단백질의 전체 아미노산 서열에서 N 말단으로부터 298번째 세린(serine, S)이 아스파르트산(aspartic acid, D)으로 치환된 서열번호 1로 표시되는 AEG-1 S298D 돌연변이 단백질을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 AEG-1 S298D 돌연변이 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 단백질, 유전자, 또는 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 상기 단백질, 유전자, 또는 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명에서는 AEG-1에 점 돌연변이(point mutation)를 도입하여 구성적 활성(constitutively active) 형태인 AEG-1(S298D)을 유도하고, AAV-AEG-1(S298D)을 제조하여 파킨슨 질환 동물모델에 적용시킨 결과, 도파민 신경세포 및 도파민 신경섬유를 보존함으로써 뇌 조직 보호 효과를 나타내는 것을 확인한 바, AEG-1은 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 조성물, 파킨슨 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 pBL-AEG-1(S298D)-HA의 벡터 맵을 도시하여 나타낸 것이다.
- [16] 도 2는 C57BL/6 마우스 흑질에 AAV-AEG-1(S298D)-HA(HA-tag) 투여 3주 후, 뇌 조직을 HA-tag 염색(좌측 Scale bar, 500 μ m; 우측 Scale bar, 50 μ m) 또는 HA-tag 및 도파민 신경세포(TH)(Scale bar, 50 μ m)로 이중 형광 염색한 결과이다.
- [17] 도 3은 C57BL/6 마우스 흑질에 AAV-AEG-1(S298D) 투여 3주 후, 6-OHDA를 투여하여 파킨슨 질환을 유도하고, AEG-1(S298D)에 의한 신경 보호 효과를 TH 염색 및 크레실 바이올렛 염색으로 확인한 결과이다(A: 대조군 중뇌 흑질, B:

6-OHDA를 투여한 마우스의 중뇌 흑질, C: AAV-GFP 투여 3주 후 6-OHDA를 투여한 마우스의 중뇌 흑질, D: AAV-AEG-1(WT) 투여 3주 후 6-OHDA를 투여한 마우스의 중뇌 흑질, E: AAV-AEG-1(S298D) 투여 3주 후 6-OHDA를 투여한 마우스의 중뇌 흑질; a: 대조군 대뇌 선조체, b: 6-OHDA를 투여한 마우스의 대뇌 선조체, c: AAV-GFP 투여 3주 후 6-OHDA를 투여한 마우스의 대뇌 선조체, d: AAV-AEG-1(WT) 투여 3주 후 6-OHDA를 투여한 마우스의 대뇌 선조체, e: AAV-AEG-1(S298D) 투여 3주 후 6-OHDA를 투여한 마우스의 대뇌 선조체; 상단 Scale bar, 200 μ m; 하단 Scale bar, 1000 μ m).

[18] 도 4는 C57BL/6 마우스 흑질에 AAV-AEG-1(S298D) 투여 3주 후, 6-OHDA를 투여하여 파킨슨 질환을 유도하고, AEG-1(S298D)에 의한 균형감각 및 운동 학습 능력을 Rota-rod test로 확인한 결과이다(단위: 초).

[19] 도 5는 SD 랫드의 우측 중뇌 흑질에 AAV/DJ- α -Synuclein(A53T)와 AAV-AEG-1(S298D) 동시 투여하고, 12주 후 AEG-1(S298D)에 의한 운동 활동성 능력을 Cylinder test로 확인한 결과이다(단위: 회수).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[20] 본 발명의 발명자들은 AEG-1에 점 돌연변이를 도입하여 구성적 활성 형태인 AEG-1(S298D)을 유도하고, AAV-AEG-1(S298D)을 제작하여 파킨슨 질환 동물모델에 적용시킨 결과, 도파민 신경세포 및 도파민 신경섬유를 보존하고, 균형감각 및 운동 학습 능력, 운동 활동성을 향상시키는 것을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

[21]

[22] 이에, 본 발명에서는 AEG-1(astrocyte elevated gene-1) 단백질의 전체 아미노산 서열에서 N 말단으로부터 298번째 세린(serine, S)이 아스파르트산(aspartic acid, D)으로 치환된 서열번호 1로 표시되는 AEG-1 S298D 돌연변이 단백질을 제공한다.

[23] 또한, 본 발명은 상기 AEG-1 S298D 돌연변이 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[24] 상기 AEG-1(astrocyte elevated gene-1)은 티미딜산 합성효소(thymidylate synthase; TS) 유도 및 DNA 생합성에 관여하는 종양 유전자인 후기 SV40 인자(LSF/TFCP2)를 유도하고, 상기 LSF/TFCP2는 알츠하이머, 염증, 알러지 반응, 항암 내성에 다각적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[25] 본 발명에서는 AEG-1 유전자에 점 돌연변이(point mutation)를 도입하여 298번째 세린(serine, S)이 아스파르트산(aspartic acid, D)으로 치환된 구성적 활성(constitutively active) 형태인 AEG-1(S298D)을 유도하였으며, 이를 이용하여 AAV-AEG-1(S298D)을 제조한 후 C57BL/6 마우스 흑질에 투여한 결과, 흑질 부위 및 도파민 신경세포에서 발현되는 것을 확인하였다.

[26] 또한, C57BL/6 마우스 흑질에 AAV-AEG-1(S298D)을 투여한 후, 6-OHDA를

투여하여 파킨슨 질환 동물모델을 유도한 결과, 상기 AAV-AEG-1(S298D)이 도파민 신경세포 및 도파민 신경섬유를 보존하고, 균형감각 및 운동 학습 능력을 향상시키는 것을 확인하였다.

[27] 또한, SD 랫드의 우측 중뇌에 AAV/DJ- α -Synuclein(A53T)와 AAV-AEG-1(S298D)를 동시 투여한 결과, 상기 AAV-AEG-1(S298D)이 손상된 도파민 신경 시스템에 작용하여 운동 활동성을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

[28] 본 발명에서 사용된 용어 “점 돌연변이”란 하나의 뉴클레오타이드가 변환되어 나타나는 돌연변이로 DNA 전사 단계에서 특정 단백질의 생성을 막거나 변형시키는 것을 의미한다. 대부분 같은 푸린 계열인 아데닌과 구아닌의 잘못된 전사, 또는 같은 피리미딘 계열인 시토신과 티민의 잘못된 전사로 인해 일어나며, 이러한 점 돌연변이는 코돈의 정보를 파괴하거나 변형시키는 것으로 알려져 있다.

[29]

[30] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[31] 상기 발현 벡터는 아데노 부속 바이러스 벡터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[32]

[33] 또한, 본 발명은 상기 단백질, 유전자, 또는 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[34] 상기 조성물은 도파민 신경세포 및 도파민 신경섬유를 보존하고, 균형감각 및 운동 학습 능력을 향상시켜 파킨슨 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[35]

[36] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[37] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한,

단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[38] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당 업자에 의해 적절하게 선택될 수 있는 바, 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 50 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[39]

[40] 또한, 본 발명은 상기 단백질, 유전자, 또는 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[41]

[42] 본 발명의 조성물이 건강식품 조성물인 경우, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[43] 또한, 상기 건강식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 식품첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[44] 상기 식품첨가물공전에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[45] 이때, 건강식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 조성물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[46] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[47]

[48] 실시예 1: AAV-AEG-1(S298D)의 제조

[49] 1-1. pBL-AEG-1(S298D) 재조합 벡터 제조

[50] pBL 플라스미드(HA-tag)에 AEG-1(astrocyte elevate gene-1)(S298D) 유전자를 도입하여, AEG-1(S298D) 유전자가 도입된 pBL-AEG-1(S298D) 재조합 벡터를 제조하였으며, 이의 벡터 맵은 도 1에 나타내었다.

[51]

[52] 1-2. AAV-AEG-1(S298D)의 제조

[53] AAV(adeno-associated virus)-AEG-1(S298D)은 University of North Carolina Vector Core에 의뢰하여 제작하였으며, 유전적 역가는 3.7×10^{12} viral genomes/ml이었다. 동일한 바이러스 백본(backbone)에 활성화된 GFP(greenfluorescent protein) 또는 야생형 AEG-1을 서브클로닝하여 대조군으로 사용하였다.

[54]

[55] 실시예 2: 파킨슨 질환 동물 모델에서 AEG-1(S298D)의 효과 분석

[56] 2-1. 실험 동물 및 AAV-AEG-1(S298D) 투여

[57] 8주령의 수컷 C57BL/6 마우스 또는 SD 랫드(Sprague-Dawley rat)는 Daehan Biolink(Eumseong, Korea)에서 구입하였다. 각 마우스 또는 랫드에 케타민(ketamine, 115 mg/kg, Yuhan) 및 롬퐀(rompun, 23 mg/kg, Bayer Korea Ltd.) 혼합물을 복강 내(intraperitoneal; IP) 투여하여 마취시킨 후, 스테레오택식 프레임(stereotaxic frame, David Kopf Instrument, Tujunga, CA, USA)에 위치시켰다. 공지된 실험 방법(Paxinos and Watson, 1998)에 따라, 시린지 펌프(KD Scientific, NewHope, PA)가 붙어있는 10 μ l 해밀턴 시린지(Hamilton syringe, 30S needle)를 이용하여 각 마우스의 중뇌 흑질(substantia nigra; SN) 오른쪽 부위[AP(anterior-posterior): 0.35 cm; ML(medial-lateral): +0.11 cm; DV(dorsal-ventral): 0.37 cm, relative to bregma] 또는 랫드의 중뇌 흑질[AP: -0.60 cm; ML: -0.23 cm; DV: -0.76 cm, relative to bregma]에 AAV-AEG-1(S298D)을 주사하였다. 투여 후, 바늘을 천천히 회수하기 전에 추가적으로 5분간 유지시켰다. 이 때 2 μ l의 바이러스 벡터 현탁액을 0.1 μ l/분의 속도로 20분 간 투여하였다.

[58]

[59] 2-2. 면역조직화학 염색(Immunohistochemical staining)

[60] 공지된 실험 방법(Kim et al., 2011; Kim et al., 2012; Leem et al., 2018)을 변형하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 각 마우스에 경심관류를 수행한 후,

조직을 고정시키고, 30 μm 두께로 뇌 조직을 섹션(section)하였다. 조직 섹션을 PBS로 세척한 후, 1차 항체와 함께 48시간 동안 상온에서 배양하였다. 1차 항체로는 rabbit anti-tyrosine hydroxylase(TH, 1:2000; Pel-Freez, Brown Beer, WI) 및 mouse anti-HA(1:100; Cell-signaling, Beverly, MA)를 사용하였다. 배양 후, 조직 섹션을 PBS로 다시 세척한 다음 2차 항체와 함께 배양하고, avidin-biotin complex kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA) 시약을 처리하였다. 상기 조직 섹션을 0.5 mg/ml 3,3'-다이아미노벤지딘(diaminobenzidine)(Sigma, St. Louis, MO)이 포함된 0.1 M 인산완충액(phosphate buffer; PB, 0.003% H_2O_2 가 포함)과 배양하여 신호를 검출하였다. 염색된 시료는 명시야 현미경(bright-field microscope, Carl Zeiss, Göttingen, Germany)을 이용하여 분석하였다.

[61] 또한, 면역형광 라벨링(immunofluorescence labeling)을 위하여, 뇌 조직 섹션을 PBS로 세척한 후, 1차 항체와 밤새 배양하였다. 1차 항체로는 rabbit anti-tyrosine hydroxylase(TH, 1:2000; Pel-Freez, Brown Beer, WI) 및 mouse anti-HA(1:100; Cell-signaling, Beverly, MA)를 사용하였다. 다음 날, 조직 섹션을 PBS로 다시 세척한 다음 Texas Red conjugated anti-rabbit IgG(1:400; Vector Laboratories) 및 FITC-conjugated anti-rabbit IgG(1:200; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)와 함께 1시간 동안 배양하고, 다시 세척하였다. 이를 Vectashield mounting medium(Vector Laboratories)으로 마운트하였다. 염색된 시료는 형광 현미경(LSM700, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 분석하였다.

[62] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, AAV-AEG-1(S298D)이 투여된 흑질 부위(SNpc)에 AAV-AEG-1(S298D)이 발현되고 있음을 HA-tag 염색을 통해 확인하였으며(도 2의 위), 도파민 신경세포[티로신 하이드록실라제(tyrosine hydroxylase; TH)-양성세포, 적색]에서 AEG-1(S298D) 유전자(HA-tag, 녹색)가 발현됨을 확인할 수 있었다(도 2의 아래).

[63]

[64] 2-3. 6-OHDA 병변(lesion)

[65] 상기 실시예 2-1과 같이, 각 마우스 흑질에 AAV-AEG-1(S298D)을 투여하고 3주 후, 6-하이드록시도파민(6-Hydroxydopamine; 6-OHDA)의 비 특이적인 흡수를 막기 위해 데시프라민(desipramine, 25 mg/kg, Sigma, St. Louis, MO.)을 전처리하였다. 각 마우스에 케타민(115 mg/kg) 및 럼폰(23 mg/kg) 혼합물을 복강 내(i.p) 투여하여 마취시킨 후, 스테레오택식 프레임에 위치시켰다. 이후, 마이크로리터 시린지를 이용하여 0.5 μl /분의 속도로 15 μg /3 μl 농도의 6-OHDA(5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 0.9% NaCl/0.02% ascorbate) 용액을 투여하여 파킨슨 질환을 유도하였다. 투여은 오른쪽 선조체(striatum)에 수행되었다(AP: +0.09 cm; ML: +0.22 cm; DV: 0.25 cm relative to bregma). 투여 후, 바늘을 천천히 회수하기 전에 추가적으로 5분간 유지시켰다. 각 마우스에서 뇌 조직을 분리한 후, 상기 실시예 2-2와 동일한 방법으로 TH 염색을 수행하였다. 또한, 니슬(Nissl) 염색을 위하여, SN 조직 시료를 젤라틴 코팅된 슬라이드에 마운트한 후, 0.5% 크레일

바이올렛(cresyl violet, Sigma)으로 염색하였다. 그 후, 명시야 현미경을 이용하여 분석하였다.

[66] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 신경독성 물질인 6-OHDA만 투여된 마우스(B) 또는 GFP 투여 3주 후 6-OHDA가 투여된 마우스(C) 또는 AEG-1(WT) 투여 3주 후 6-OHDA가 투여된 마우스(D)에 비하여, AEG-1(S298D) 투여 3주 후 6-OHDA가 투여된 마우스(E)에서 상대적으로 더 많은 도파민 신경세포(갈색)가 남아있는 것을 확인하였으며, 남아있는 도파민 신경세포의 크기도 보존되어 있는 것을 확인하였다.

[67] 또한, 신경독성 물질인 6-OHDA만 투여된 마우스(b) 또는 GFP 투여 3주 후 6-OHDA가 투여된 마우스(c) 또는 AEG-1(WT) 투여 3주 후 6-OHDA가 투여된 마우스(d)에 비하여, AEG-1(S298D) 투여 3주 후 6-OHDA가 투여된 마우스(e)에서 상대적으로 더 많은 도파민 신경섬유(갈색)가 남아있는 것을 확인하였다.

[68]

[69] 2-4. Rota-rod test

[70] 공지된 실험 방법(Kim et al., 2016; Leem et al., 2018)을 변형하여 Rota-rod test를 수행하였다. 각 마우스는 6-OHDA 투여 3일 전부터 10 rpm의 속도로 회전하는 축에 적응하는 훈련을 하루 1회 10분간 수행하였다. 각 마우스는 6-OHDA 투여 5일차부터 7일차까지 하루 2회씩 5분간 4-40 rpm으로 가속화되는 축 위에 놓고, 축에서 떨어지는 시점을 측정하여 각 마우스의 운동 수행 능력을 평가하였다. 총 3일간 수행된 실험을 통해 얻어진 값은 각 마우스가 축에서 떨어지는 시간의 평균값을 구하는 것에 활용되었고, 각 마우스가 축에서 떨어지는 평균 시간은 각 군에서 이탈하는 평균 시간을 구하는 것에 활용되었다.

[71] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 신경독성 물질인 6-OHDA만 투여된 마우스 또는 GFP 투여 3주 후 6-OHDA가 투여된 마우스 또는 AEG-1(WT) 투여 3주 후 6-OHDA가 투여된 마우스에 비하여, AEG-1(S298D) 투여 3주 후 6-OHDA가 투여된 마우스가 더 오래 축 위에 머물러있는 것을 확인하였다. AEG-1(S298D) 투여 3주 후 6-OHDA가 주입된 마우스가 축 위에 머무른 시간은 정상 대조군 마우스가 축 위에 머무른 시간과 유사한 수준이었다.

[72]

[73] 2-5. α -Synuclein 병변(lesion)

[74] 동물모델에서 α -Synuclein의 축적은 운동 활동성 감퇴를 유도하는 바, 우측 뇌 내에 α -Synuclein의 축적은 좌측 전구의 운동성을 감퇴시켜 비대칭적인 운동성을 나타낸다.

[75] 이에, 파킨슨 질환 동물모델에서 운동 활동성을 분석하기 위해, 상기 실시예 2-1과 같은 방법으로 AAV/DJ- α -Synuclein(A53T)를 각 랫드의 우측 중뇌 흑질에 주사하였다. 바이러스 대조군으로는 AAV/DJ-EGFP를 사용하였다.

[76]

[77] 2-6. Cylinder test

[78] 공지된 실험 방법(Won et al., 2016)를 변형하여 Cylinder test를 수행하였다. 바이러스 주입 12주 후, 랫드를 직경 30cm, 높이 50cm의 원통형 투명한 유리관에 넣고 5분 동안 좌측과 우측 앞발의 운동 활동성을 평가하였다. 좌측과 우측 앞발의 유리벽 접촉수의 총 합이 20회가 될 때 우측 앞발 접촉수와 좌측 앞발 접촉수의 비율을 하기 식으로 계산하였다.

[79] [계산식 1]

[80]
$$((\text{우측 앞발 접촉수 백분율}) - (\text{좌측 앞발 접촉수 백분율})) / ((\text{우측 앞발 접촉수 백분율}) + (\text{좌측 앞발 접촉수 백분율})) \times 100$$

[81]

[82] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 정상 대조군(CON) 랫드에서는 좌측과 우측 앞발의 운동 활동성이 비슷하여 비대칭성이 현저히 낮았으나, α -Synuclein(A53T)이 단독 투여된 랫드에서는 좌측 앞발의 활동성이 감퇴하여 우측 앞발의 활동성이 집중됨에 따라 비대칭성이 매우 높게 관찰되었다. 또한 α -Synuclein(A53T)과 AEG-1(S298D)가 같이 투여된 랫드에서는 좌측 앞발과 우측 앞발의 활동성이 비슷하여 대칭에 근접한 운동성을 나타내는 것을 확인하였다. 바이러스 대조군으로 EGFP가 투여된 랫드에서도 좌측과 우측 앞발의 운동 활동성이 대칭에 가까운 것을 확인하였다.

[83]

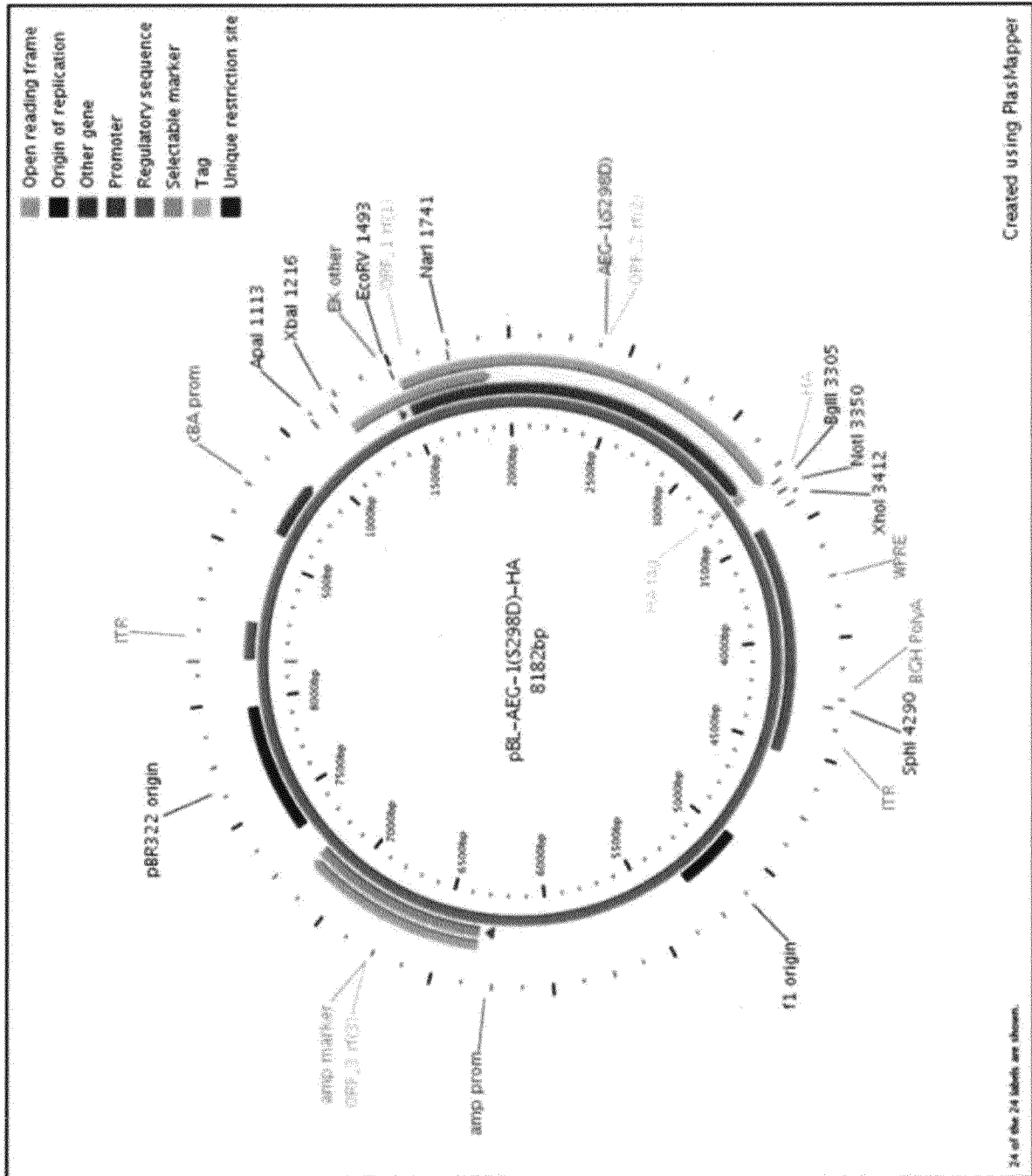
[84] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[85] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

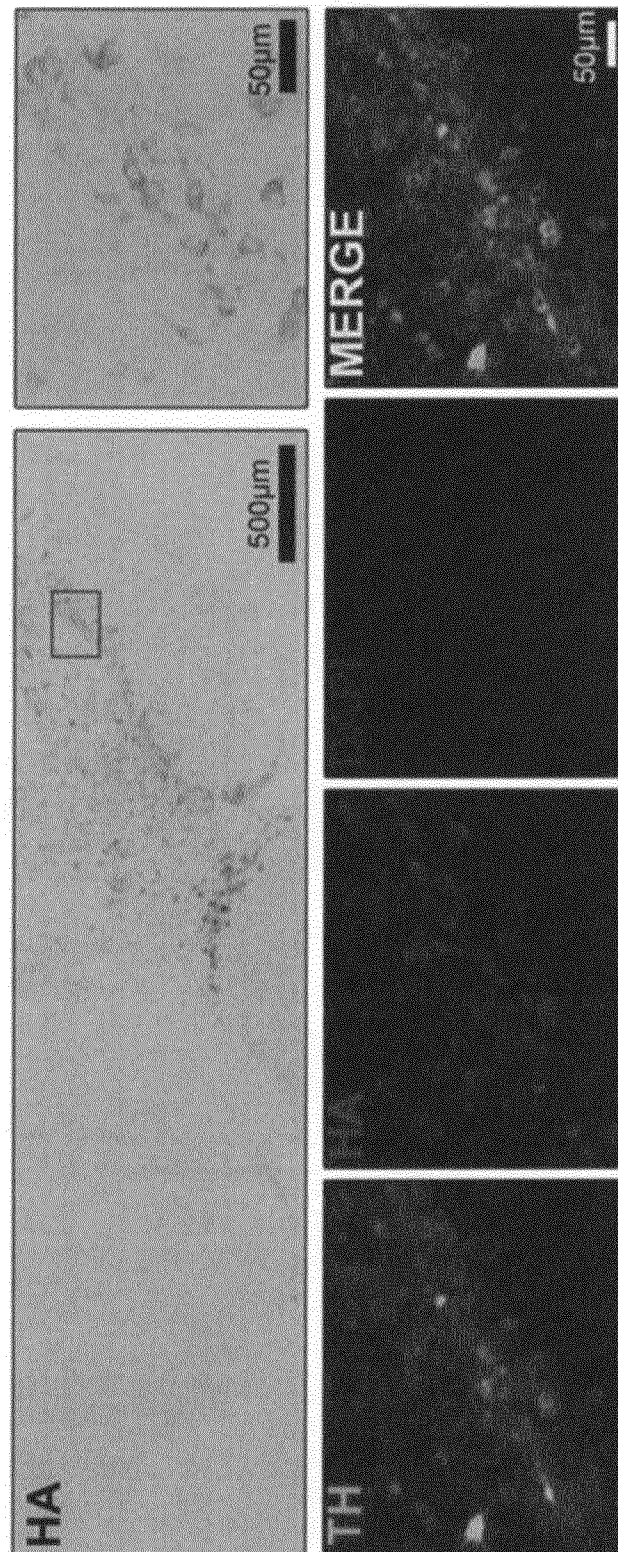
청구범위

- [청구항 1] AEG-1(astrocyte elevated gene-1) 단백질의 전체 아미노산 서열에서 N 말단으로부터 298번째 세린(serine, S)이 아스파르트산(aspartic acid, D)으로 치환된 서열번호 1로 표시되는 AEG-1 S298D 돌연변이 단백질.
- [청구항 2] 제 1항의 AEG-1 S298D 돌연변이 단백질을 코딩하는 유전자.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 유전자.
- [청구항 4] 제 2항 또는 제 3항의 유전자를 포함하는 발현 벡터.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 발현 벡터는 아데노 부속 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 발현 벡터.
- [청구항 6] 제 1항의 단백질, 제 2항 또는 제 3항의 유전자, 또는 제 4항의 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 조성물은 도파민 신경세포 및 도파민 신경섬유를 보존하고, 균형감각 및 운동 학습 능력을 향상시키는 것을 특징으로 하는 파킨슨 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 제 1항의 단백질, 제 2항 또는 제 3항의 유전자, 또는 제 4항의 발현 벡터를 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

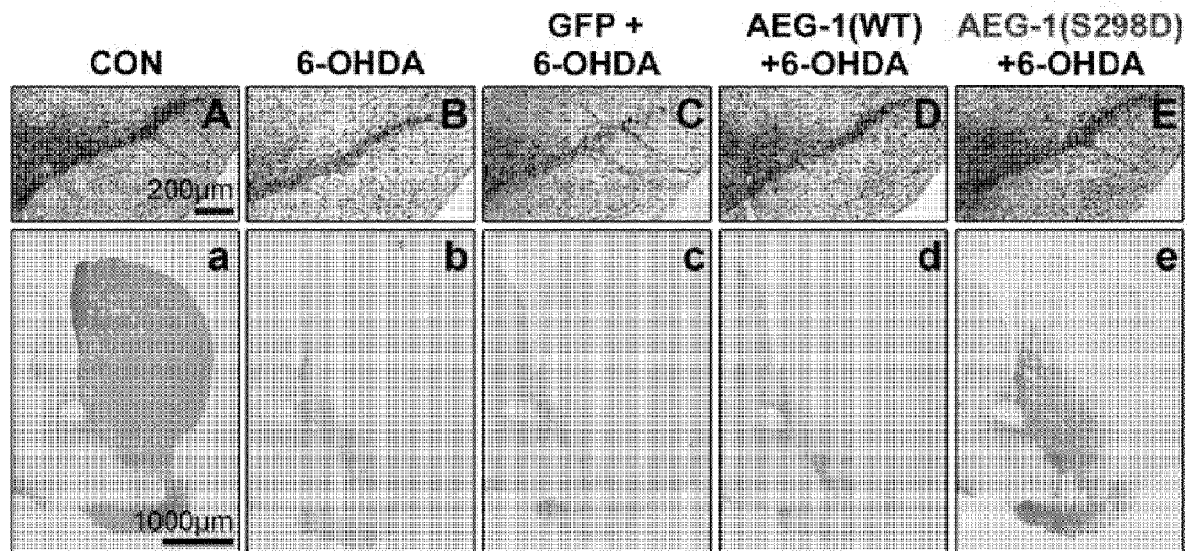
[도 1]



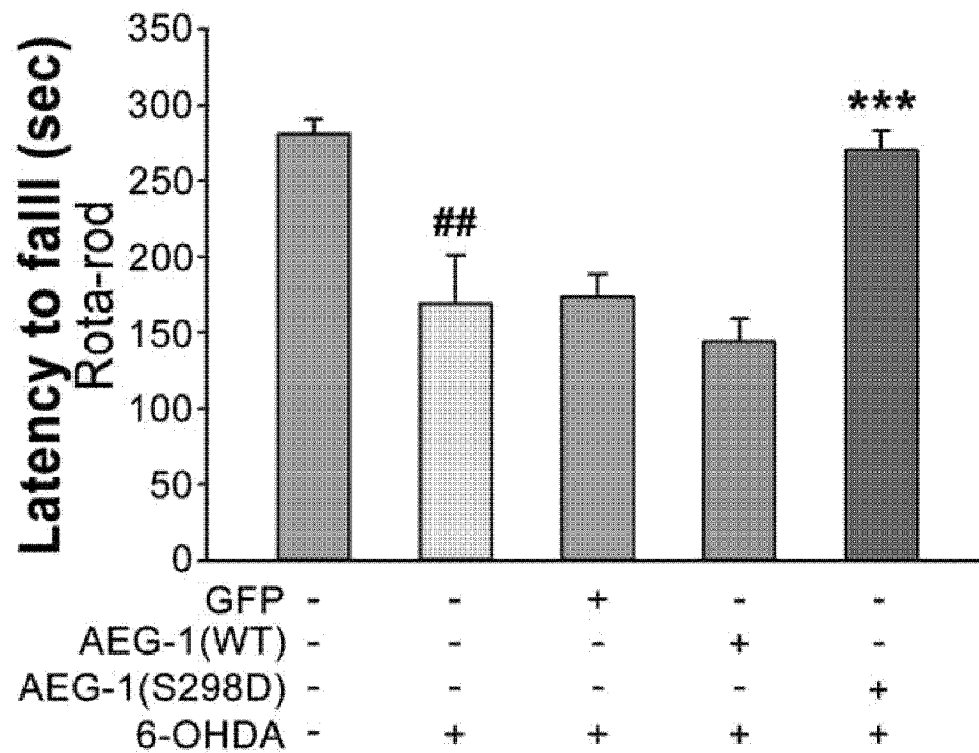
[도 2]



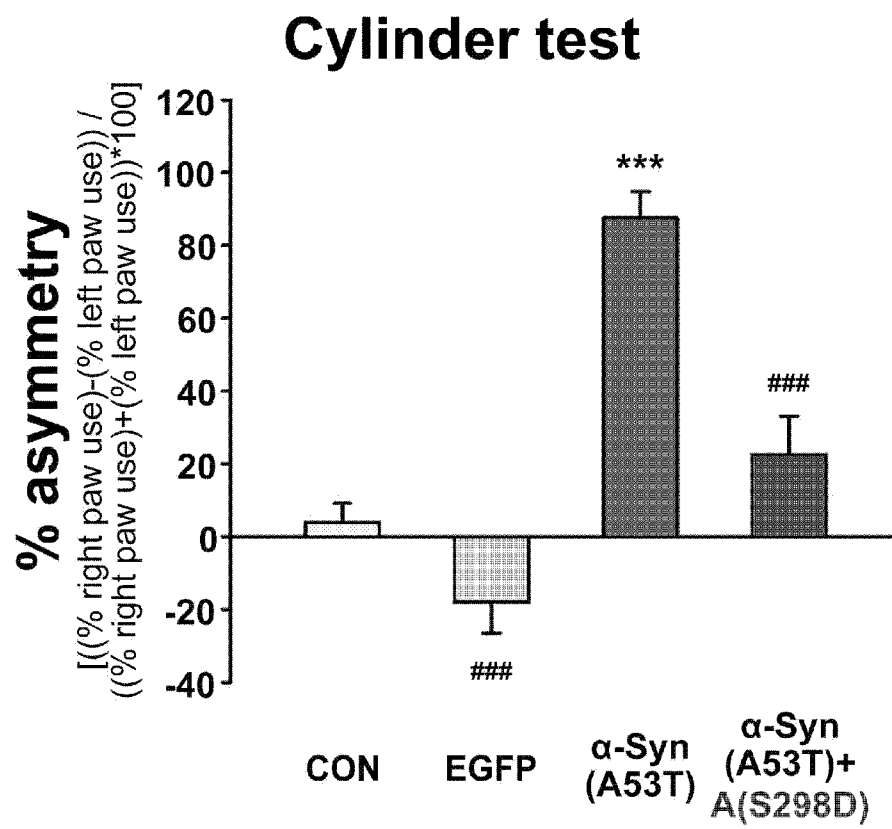
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/013284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47(2006.01)i, C12N 15/86(2006.01)i, A23L 33/18(2016.01)i, A61P 25/16(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/47; A61K 38/16; A61K 38/17; G01N 33/50; C12N 15/86; A23L 33/18; A61P 25/16; A61K 38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: AEG-1(astrocyte elevated gene-1), Metadherin, LYRIC, S298D, parkinson, dopamine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1639198 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION et al.) 13 July 2016 See abstract; paragraph [0021]; sequence identifier nos. 1-2; claims 1, 3-7.	1-8
Y	KRISHNAN, R. K. et al. Quantitative analysis of the TNF- α -induced phosphoproteome reveals AEG-1/MTDH/LYRIC as an IKK β substrate. Nature communications. 2015, vol. 6, thesis no.: 6658, pages 1-15 See abstract; figure 7; table 1; pages 4, 6.	1-8
Y	NOCH, E. et al. The role of AEG-1/MTDH/LYRIC in the pathogenesis of central nervous system disease. Advances in cancer research. 2013, vol. 120, pages 159-192, NIH Public Access Author Manuscript Version. internal pages 1-27 See abstract; page 6.	1-8
Y	KR 10-2018-0082084 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY et al.) 18 July 2018 See abstract; sequence identifier nos. 1-2; claims 1-8.	1-8
Y	LEEM, E. et al. Upregulation of neuronal astrocyte elevated gene-1 protects nigral dopaminergic neurons in vivo. Cell death & disease. 18 April 2018, vol. 9, thesis no.: 449, pages 1-15 See abstract; figure 6; pages 1-2, 12.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 FEBRUARY 2020 (07.02.2020)

Date of mailing of the international search report

07 FEBRUARY 2020 (07.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/013284

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1639198 B1	13/07/2016	KR 10-2015-0135867 A	04/12/2015
KR 10-2018-0082084 A	18/07/2018	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/47(2006.01)i, C12N 15/86(2006.01)i, A23L 33/18(2016.01)i, A61P 25/16(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/47; A61K 38/16; A61K 38/17; G01N 33/50; C12N 15/86; A23L 33/18; A61P 25/16; A61K 38/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: AEG-1(astrocyte elevated gene-1), Metadherin, LYRIC, S298D, 파킨슨(parkinson), 도파민(dopamine)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1639198 B1 (경북대학교 산학협력단 등) 2016.07.13 요약; 단락 [0021]; 서열번호 1-2; 청구항 1, 3-7	1-8
Y	KRISHNAN, R. K. 등, `Quantitative analysis of the TNF- $\alpha$ -induced phosphoproteome reveals AEG-1/MTDH/LYRIC as an IKK $\beta$ substrate`, Nature communications, 2015, 6권, 논문번호: 6658, 페이지 1-15 초록; 도면 7; 표 1; 페이지 4, 6	1-8
Y	NOCH, E. 등, `The role of AEG-1/MTDH/LYRIC in the pathogenesis of central nervous system disease`, Advances in cancer research, 2013, 120권, 페이지 159-192, NIH Public Access Author Manuscript Version internal pages 1-27 초록; 페이지 6	1-8
Y	KR 10-2018-0082084 A (경희대학교 산학협력단 등) 2018.07.18 요약; 서열번호 1-2; 청구항 1-8	1-8
Y	LEEM, E. 등, `Upregulation of neuronal astrocyte elevated gene-1 protects nigral dopaminergic neurons in vivo`, Cell death & disease, 2018.04.18, 9권, 논문번호: 449, 페이지 1-15 요약; 도면 6; 페이지 1-2, 12	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 02월 07일 (07.02.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 02월 07일 (07.02.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



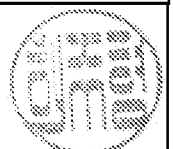
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-1639198 B1

2016/07/13

KR 10-2015-0135867 A

2015/12/04

KR 10-2018-0082084 A

2018/07/18

없음