



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0026965
(43) 공개일자 2008년03월26일

(51) Int. Cl.

A61K 38/43 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0092254

(22) 출원일자 2006년09월22일

심사청구일자 2006년09월22일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울 광진구 군자동 98 세종대학교

(72) 발명자

김양희

서울 광진구 광장동 현대파크 1012동 1904호

임하나

서울 강남구 신사동 556-25번지 401호

(74) 대리인

이원희

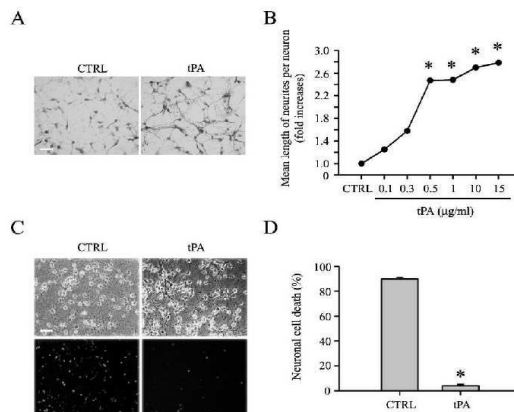
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물의 스크리닝방법

(57) 요약

본 발명은 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 구체적으로 annexin-II에 의해 매개되는 tPA(tissue plasminogen activator)의 신경영양성 효과를 가지는 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 스크리닝 방법은 신경세포 상의 annexin-II와 결합하여 신경영양성 효과와 연관된 세포내 신호 분자를 활성화시켜 신경세포돌기 성장 및 신경세포 생존율을 증가시키는 후보 화합물을 검색하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 피검 화합물을 annexin-II 발현 세포주에 처리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 세포주에서 신경영양성 관련 키나아제(kinase)의 인산화 활성을 측정하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 화합물을 처리하지 않은 annexin-II 발현 세포주와 비교하여 신경 영양성 관련 키나아제의 인산화 활성을 유의적으로 증가시키는 피검 화합물을 선별하는 단계를 포함하는, annexin-II을 활성화시키는 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물의 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 추가적으로

- 4) 인산화 활성의 증가가 annexin-II에 의해 매개되는 것인지 확인하기 위하여 annexin-II 결핍 세포주에 상기 피검 화합물을 처리하는 단계;
- 5) 단계 4)의 세포주에서 신경영양성 관련 키나아제의 인산화를 측정하는 단계; 및
- 6) 단계 5)의 결과를 대조군으로서 피검 화합물을 처리하지 않은 annexin-II 결핍 세포주와 비교하여 신경 영양성 관련 키나아제의 인산화 활성을 유의적으로 증가시키는 단계를 포함하는 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물의 스크리닝 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 단계 1)의 annexin-II 발현 세포주는 형질전환에 의해 annexin-II가 과발현되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 단계 2)의 신경영양성 관련 키나아제는 Raf, PKC(protein kinase C), ERK(extracellular-regulated protein kinase), 또는 PI(3)/Akt(phosphoinositide-3/Akt)인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 신경계질환 또는 신경손상은 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 간질, 중풍 또는 허혈성 뇌질환 등의 신경계질환과 사고 및 물리적 손상에 의한 신경손상을 포함하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 단계 2)의 인산화 활성 측정 방법은 웨스턴 블롯, MALDI-TOF/MS, ELISA, 방사성 동위원소 검출법, 알짜전하 차이에 의한 전기영동법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<33> 본 발명은 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 annexin-II에 의해 매개되는 tPA의 신경영양성 효과를 가지는 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

<34> tPA(tissue plasminogen activator)는 섬유소 분해를 조절하는 세린 단백질 분해 효소로 동정되었기 때문에 (Kane, *Ann Clin Lab Sci* 14(6):443-449, 1984; Danglot *et al.*, *FEBS Lett* 194(1):96-100, 1986; Sappino *et*

al., *J Clin Invest*, (2):679-685, 1993) tPA 생물학적 효과의 연구는 이의 단백질 분해 활성화에 초점이 맞추어져 있었으나 최근에는 단백질 분해효소-무관 tPA 활성 기능이 보고되고 있다. tPA는 섬유아세포에서의 성장 인자-유사 효과를 보이며(De Petro *et al.*, *Exp Cell Res*. 213(1):286-294, 1994), 미세아교세포를 활성화하고(Rogove *et al.*, *J Cell Sci*. 112(Pt 22):4007-4016, 1999), 대뇌 피질 신경세포 배양 시 시냅스 아연에 의해 매개되는 신경세포 죽음을 감소시킨다(Kim *et al.*, *Science* 294(5414):647-650, 1999). 또한 tPA는 해마에서 유도되는 기억과 학습에 중요한 장기 활성 과정에도 관여하며 이 때 LRP 활성이 중요 인자로 작용한다(Zhuo *et al.*, *J Neurosci*. 20(2):542-549, 2000).

<35> 이처럼 최근 연구에서는 중추 신경계에서 tPA의 다양한 생리학적 및 병리학적 기능이 밝혀지고 있다(Tsirka SE, *Biochem Soc Trans*, 30(2):222-225, 2002; Fernandez-Monreal *et al.*, *Mol Cell Neurosci*. 25(4):594-601, 2004; Melchor & Strickland, *Thromb Haemost*, 93(4):655-660, 2005). tPA는 신경세포돌기 성장 및 뇌의 발생 과정, 시냅스 가소성을 위한 경로 탐색에 관여한다(Sappino *et al.*, *J Clin Invest*. (2):679-685, 1993; Seeds *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(24):14118-14123, 1999; Zhang *et al.*, *J Neurosci* 25(7):1797-1805, 2005). 또한 tPA는 허혈과 발작, 물리적 손상 등을 포함하는 병리학적 뇌 손상과정에서 양날의 칼처럼 신경세포의 손상 및 보호 기능을 모두 나타낸다(Wang *et al.*, *Nat Med*. 4(2):228-231, 1998; Kim *et al.*, *Science* 284(5414):674-650, 1999; Nicole *et al.*, *Thromb Haemost*, 78(4):1249-1254, 2001). tPA는 단백질 분해에 의한 NMDA 수용체 조절에 의해 가벼운 흥분 독성을 악화시킬 수 있으며(Nicole *et al.*, *Nat Med* 7(1):59-64, 2001), 배양된 신경세포에 유도된 아연 독성을 놀라울 정도로 감소시키고, 랫트에서 발작-유도성 해마 신경세포 죽음을 단백질 분해효소 무관 방식으로 감소시킨다(Kim *et al.*, *Science* 284(5414):674-650, 1999).

<36> tPA의 단백질 분해효소-무관 효과는 대부분 LRP, MR(mannose receptor) 또는 annexin-II(Bu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 89(16):7427-7431, 1992; Otter *et al.*, *J Biol Chem*, 266:13931-13935, 1991; Siao & Tsirka, *J Neurosci*. 22(9):3352-3358, 2002)와 같은 세포 표면 수용체에 의해 매개된다(Bu *et al.*, *Blood* 83:3427-3436, 1994). LRP 및 MR은 tPA를 세포 안으로, 또는 BBB(blood-brain-barrier)를 통과시켜 뇌 조직으로 흡수하는 과정에 연관되어 있음이 알려져 있다(Warshawsky *et al.*, *Ann N Y Acad Sci* 737:70-87, 1994; Smedsrod *et al.*, *Thromb Haemost* 59(3):480-484, 1998; Yepes *et al.*, *J Clin Invest* 112(10):1533-1540, 2003). 반면에, annexin-II는 PC12-세포에서 NGF-유도성 신경세포돌기 성장을 도우며(Jacovina *et al.*, *J Biol Chem*. 276(52):49350-49358, 2001), 대뇌피질 신경세포에서는 신경세포 생존 및 신경세포돌기 성장을 돕는다(Zhang *et al.*, *Mol Pharmacol*. 45(5):846-853, 2005). 또한 LPS-유도성 미세아교세포 활성화에 기여한다(Siao & Tsirka, *J Neurosci*. 22(9):3352-3358, 2002). 이와 같이 tPA 막 수용체가 동정되었으나, 아래쪽(downstream) 신호 캐스케이드는 아직 정확히 밝혀진바 없다.

<37> 신경영양성 효과 연구는 신경세포의 분화 및 신경계 발달 과정을 이해하는 과정에도 중요한 정보를 제공하지만 이미 손상된 신경세포를 재생시키고 활성화시키기 위한 치료제 개발에도 응용할 수 있다. 대표적인 신경성장인자인 BDNF, NGF 등은 ALS(amyotrophic lateral sclerosis) 질환과 같은 퇴행성 신경 질환 치료 후보물질로서 많은 연구가 진행되고 있으며(Seeburger & Springer, *Exp Neurol*. 124(1):64-72, 1993; Lindsay, *Neurobiol Aging*, 15(2):249-251, 1994; Corse *et al.*, *Neurobiol. Dis.* 6(5):335-346, 1999; Cedarbaum & Stambler, *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 2(1):19-22, 2001; Kalra *et al.*, *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*. 4(1):22-26, 2003), 교통사고 등과 같은 물리적 뇌 손상 등에도 적용하려는 시도들이 이루어지고 있다(Ebadi *et al.*, *Neurochem Int*. 30(4-5):347-374, 1997; Schabitz *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab*. 17(5):500-506, 1997; Sharma, *Acta Neurochir Suppl*. 86:383-388, 2003). 따라서 신경영양성 효과를 관찰하고 그 작용기전을 규명하는 연구는 다양한 신경계 질환 및 신경손상을 줄이고 재생 및 회복 과정을 활성화시키는 데 크게 기여할 것이다.

<38> 이에 본 발명자들은 tPA가 신경세포 돌기 성장 및 신경세포 생존율을 증진시키는 신경영양성 효과를 가짐을 배양된 대뇌피질 신경세포, 를 이용하여 확인하였으며, 상기 tPA-유도 신경영양성 효과가 tPA와 annexin-II와의 결합을 통해 세포내 신경영양성 관련 신호분자의 인산화 활성으로 인해 이루어짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<39> 본 발명의 목적은 annexin-II를 활성화시키는 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <40> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 annexin-II를 활성화시키는 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물의 스크리닝 방법을 제공한다.
- <41>
- <42> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- <43> 본 발명자들은 마우스 대뇌피질 신경세포에 tPA(tissue plasminogen activator)를 처리하여 신경영양성 효과를 조사하였다. 그 결과 기존의 알고 있었던 tPA의 신경독성은 관찰할 수 없었으며, 신경세포돌기의 성장이 증가되었으며, 신경세포의 생존율이 증가함을 확인함으로써(도 2 참조), tPA가 신경영양성 효과를 가짐을 확인하였다.
- <44> 이후 tPA의 신경영양성 효과가 기존에 알려진 tPA의 단백질 분해효소인지 확인하기 위하여, 마우스 대뇌피질 신경세포에 tPA와 tPA의 단백질 분해효소 기능 저해제[PAI-1(plasminogen activator inhibitor-1) 또는 PMSF(Phenylmethylsulphonyl fluoride)]를 함께 처리하여 신경영양성 효과를 조사하였다. 그 결과, tPA의 단백질 분해효소 기능 저해제는 tPA-유도 신경세포돌기 성장 및 신경세포 생존율의 증가에 영향을 미치지 못함을 확인함으로써(도 3 참조) tPA-유도 신경영양성 효과가 tPA의 단백질 분해효소 기능에 의해 매개되는 것이 아님을 알 수 있었다.
- <45> 본 발명자들은 tPA 처리시 신경세포돌기 성장 및 신경세포 생존에 중요 인자로 작용하는 세포내 신호 분자[Raf, PKC(Protein kinase C), ERK(Extracellular-regulated kinase) 및 PI(3)K(phosphatidylinositol 3-kinase)]의 활성을 조사하였다. 그 결과, tPA를 처리한 후 빠른 시간 안(처리 후 5분)에 상기 세포내 신호 분자가 활성화됨을 확인하였다(도 4A 참조). 또한, tPA와 tPA의 단백질 분해효소 기능 저해제를 함께 처리했을 때 역시 상기 세포내 신호 분자가 활성화됨이 확인되었다(도 4B 참조). 이를 통하여 tPA-유도 신경영양성 효과는 신경영양성 효과가 연관된 세포내 신호 분자의 활성화에 의해 이루어짐을 알 수 있었으며, 이 역시 tPA 단백질 분해효소 기능이 관여하지 않음을 알 수 있었다.
- <46> 이 후, tPA-유도 신경영양성 효과에 필요한 세포내 신호 분자를 조사하였다. 대뇌피질 신경세포에 tPA와 함께 Raf, ERK, PKC 및 PI(3)K 저해제를 처리하여 신경세포돌기 성장을 관찰한 결과, 모두 tPA-유도 신경세포돌기 성장 증가가 저해되는 것이 확인되었다(도 5, 6, 7a 및 7b 참조). 이를 통해 tPA-유도 신경세포돌기 성장 증가 효과에는 상기 세포내 신호 분자가 필수적으로 필요함을 알 수 있다. 본 발명자들은 상기 조건으로 대뇌피질 신경세포에 처리한 후 신경세포 생존율을 조사하였다. 그 결과, tPA와 PI(3)K 저해제를 처리한 경우 신경세포의 죽음을 증가시켰으므로(도 7c 및 7d 참조), tPA에 의해 유도되는 신경세포 생존율에 있어서 PI(3)K 대사 경로가 필수적으로 필요함을 알 수 있다.
- <47> 본 발명자들은 tPA의 단백질 분해효소 기능이 신경영양성 효과를 매개하는 것이 아님을 확인한 후 tPA가 세포내 신호 분자를 어떻게 활성화시키는지를 조사하였다. 이에 본 발명자들은 tPA의 수용체로 동정된 LRP(low density lipoprotein receptor-related protein), MR(mannose receptor) 및 annexin-II를 대상으로 tPA-유도 신경영양성 효과와의 관계를 조사하였다. 본 발명자들은 대뇌피질 신경세포에 tPA와 상기 수용체들의 저해제를 함께 처리하여 tPA-유도 신경영양성 효과에 영향을 미치는 수용체를 선별하였다. 그 결과, annexin-II의 저해제(α A-II 또는 ACA) 처리시 신경영양성 효과가 저해됨이 관찰되었다(도 8 및 9 참조). 이를 통해 tPA가 annexin-II를 통하여 세포내 신호 분자의 활성을 유도함을 알 수 있었다. 이를 확인하기 위하여 대뇌피질 신경세포에 tPA와 annexin-II 저해제를 처리하여 세포내 신호 분자의 활성을 웨스턴 블롯으로 조사하였다. 그 결과, annexin-II 저해제를 처리했을 때 세포내 신경영양성 관련 신호 분자의 인산화가 감소됨을 확인하였다(도 10 참조).
- <48> 상기 결과를 통해, 본 발명자들은 대뇌피질 신경세포 상에서 tPA가 신경독성이 아닌 신경영양성 효과를 가지며, 상기 효과가 tPA의 단백질 분해효소 기능이 아닌 세포막 상의 annexin-II과 결합하여 세포내 신경영양성 관련 신호 분자를 인산화하여 활성화시켜 신경세포 돌기의 성장 및 신경세포 생존율을 증가시킴을 증명하였으며, 특이적으로 신경세포 생존에 PI(3)K 신호경로가 필수적임을 확인하였다.
- <49>
- <50> 상기 결과를 바탕으로 본 발명은 annexin-II를 활성화시키는 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화

합물의 스크리닝 방법을 제공한다.

- <51> 상기 스크리닝 방법은 하기의 단계를 포함한다: 1) 피검 화합물을 annexin-II 발현 세포주에 처리하는 단계; 2) 단계 1)의 세포주에서 신경영양성 관련 키나아제(kinase)의 인산화 활성을 측정하는 단계; 및 3) 단계 2)의 결과를 대조군으로서 피검 화합물을 처리하지 않은 annexin-II 발현 세포주와 비교하여 신경 영양성 관련 키나아제의 인산화 활성을 유의적으로 증가시키는 피검 화합물을 선별하는 단계.
- <52> 또한, 상기 방법에 있어서, 추가적으로 하기의 단계를 포함한다: 4) 인산화 활성의 증가가 annexin-II에 의해 매개되는 것인지 확인하기 위하여 annexin-II 결핍 세포주에 상기 피검 화합물을 처리하는 단계; 5) 단계 4)의 세포주에서 신경영양성 관련 키나아제의 인산화를 측정하는 단계; 및 6) 단계 5)의 결과를 대조군으로서 피검 화합물을 처리하지 않은 annexin-II 결핍 세포주와 비교하여 신경 영양성 관련 키나아제의 인산화 활성을 유의적으로 증가시키는 단계. 상기 추가 단계를 통해 당업자는 annexin-II가 매개하지 않으나, tPA-유도 신경영양성 효과를 가지는 신경계질환 또는 신경손상 치료제 후보 화합물을 스크리닝할 수 있다.
- <53> 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 1)의 피검 화합물은 단백질, 펩티드, 천연 화합물, 추출물, 합성 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 형태를 취하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- <54> 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2)의 annexin-II 발현 세포주는 정상적으로 annexin-II를 발현하는 조대 배양세포, annexin-II를 발현하면서 불사화된 확립된 세포주 또는 당업자에게 알려진 방법에 의하여 annexin-II 발현 재조합 벡터를 제작하여 숙주세포에 형질전환함으로써 제조되는 annexin-II 과발현 재조합 형질전환세포주를 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 숙주세포로는 신경세포 중 하나를 선택하여 사용하는 것이 바람직하며, 대뇌피질 신경세포, 내피세포(endothelia cell), 뇌조직의 성상세포(astrocyte), 미세아교세포(microglia), PC-12 세포주 및 각화세포(keratinocyte)를 숙주세포로 사용하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며, annexin-II가 정상적으로 발현할 수 있는 세포라면 어느 세포를 이용해도 무방하다.
- <55> 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 3) 및 5)의 신경 영양성 관련 카나아제는 Raf 키나아제, PKC, ERK, 및 PI(3)/Akt이다.
- <56> 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 4)의 annexin-II 결핍 세포주는 당업자에게 알려진 방법에 의하여 annexin-II의 siRNA 발현벡터를 제작하여 숙주세포에 형질전환하여 제작될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에게 알려진 annexin-II을 숙주세포에서 발현 결핍시키는 방법이라면 모두 사용할 수 있다. 상기 숙주세포로는 당업자가 신경세포 중 하나를 선택하여 사용하는 것이 바람직하며, 대뇌피질 신경세포를 숙주세포로 사용하는 것이 가장 바람직하다.
- <57> 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 2) 및 5)의 인산화 활성 측정 방법으로는 웨스턴 블롯, MALDI-TOF/MS, ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay), 방사성 동위원소 표지 방법 및 당해 업계의 당업자에게 공지된 다양한 표지 방법 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 웨스턴 블롯과 ELISA는 인산화된 기질 특이적인 항체를 이용하여 수행할 수 있으며, 방사성 동위원소 표지 방법은 [³²P] γ-ATP와 바이오틴(biotin)화된 키나아제 기질과 흡착력이 있으며, 아비딘이 흡착되어 있는 막(membrane)을 이용하여 인산화 활성 측정을 수행할 수 있다. 또한 방사성 동위원소를 사용하지 않으면서, 키나아제의 인산화 반응 후 기질의 알짜전하(net charge) 차이로 인한 전기영동 상의 이동차를 이용하여 인산화 활성 측정을 수행할 수 있으며, 당업자에게 알려진 인산화 활성 측정 방법이라면 모두 이용될 수 있다.
- <58> 상기 스크리닝 방법에 있어서, 신경계질환 또는 신경손상은 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 간질, 중풍 또는 허혈성 뇌질환 등과 같은 퇴행성 질환뿐만 아니라 물리적 손상에 의한 신경 손상 등을 포함한다. 신경영양성 인자들이 다양한 퇴행성 신경계 질환에 보호 효과를 나타낸다는 연구 결과들은 이미 상당수 보고 되어 있으며(Lindsay, *Neurobiol Aging*. 15(2):249-251, 1994; Schabitz *et al.*, *J Cereb Blood Flow Metab*. 17(5):500-506, 1997; Wang *et al.*, *J Neurosci*. 17(11):4341-4348, 1997; Pezet & Malcangio, *Expert Opin Ther Targets*. 8(5):391-399, 2004; Fumagalli *et al.*, *Pharmacogenomics J*. 6(1):8-15, 2006; Yasuhara *et al.*, *Front Biosci*. 11:760-775, 2006), 교통사고 등과 같은 물리적 손상에 의한 척수 손상 및 말초신경 손상 치료 연구에도 응용되고 있다(Kromer, *Science*. 235(4785):214-216, 1987; Ebadi *et al.*, *Neurochem Int*. 30(4-5):347-374, 1997; Cui, *Mol Neurobiol*. 33(2):155-179, 2006). 최근 신경 재생 연구의 한 분야인 줄기세포를 이용한 연구에도 이들 신경영양성 인자들의 작용을 통한 신경세포 분화 연구가 활발히 진행되고 있다(Goldman, *J Neurobiol*. 36(2):267-286, 1998; Blesch *et al.*, *Brain Res Bull*. 57(6):833-838, 2002; Lu *et*

al., Exp Neurol. 181(2):115-129, 2003; Kurozumi *et al., Mol Ther.* 9(2):189-197, 2004; Logan *et al., Brain.* 129(Pt 2)490-502, 2006).

<59>

<60> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<61> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<62> <실시예 1> 마우스 대뇌피질 신경세포 배양에서 tPA의 신경영양성 효과

<63> 마우스 대뇌피질 신경세포에서 tPA의 신경영양성 효과를 하기의 방법으로 조사하였다.

<64> <1-1> 마우스 대뇌피질 신경세포 배양 및 tPA 처리

<65> 대뇌피질 신경세포 배양은 발생 14-15일 된 마우스에서 Choi 등의 방법(Choi DW *et al., J Neurosci.* 7(2):357-368, 1987)에서 기술된 내용을 바탕으로 세포 밀도와 혈청 농도를 변화하여 분리하였다. 자세하게는 분리한 피질 세포를 폴리-L-루신/라미닌(poly-L-lusine/laminin)으로 코팅된 플레이트(Nunc, USA)에 75,000 세포/cm² 밀도로 배양배지[Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, GibcoBRL, USA), 20 mM glucose, 38 mM sodium bicarbonate, 2 mM glutamine, 2% fetal bovine serum]를 이용하여 분주하였다.

<66> 세포 분주 4시간 후, tPA(Actilyse, Boehringer Ingelheim, Germany)를 0.1, 0.3, 0.5, 1, 10 및 15 µg/ml의 농도로 배지에 첨가하였고, 24시간 후 배지를 배양배지로 세척하였으며, 추가적으로 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다(DIV3:three days in vitro). 비-신경세포 성장을 저지하기 위하여 싸이토신 아라비노사이드(Cytosine arabinoside; 10 µM)를 DIV3에 첨가하였다. 신경세포 생존율에 대한 tPA의 영향 조사를 위하여 세척 후 추가적으로 48시간 배양하였다(DIV4)(도 1).

<67> <1-2> tPA의 신경영양성 효과 조사

<68> 신경영양성 조사는 신경세포 돌기의 길이 및 신경세포 생존율 측정을 통해 수행되었다.

<69> 신경세포돌기 길이를 측정하기 위하여, 실시예 1-1에서 배양된 세포(DIV3)를 DIV3에서 항-β III-튜브린 항체(Sigma, USA)를 이용하여 면역 염색하였다. 구체적으로 분주 52시간 후(DIV3), 신경세포돌기(neurite)의 길이를 측정하기 위하여, 배양한 신경세포를 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 이용하여 4℃에서 30 분간 고정하였고, 그 후 0.2% Triton X-100을 이용하여 세척하였다. 이후 정상 당나귀 혈청(normal donkey serum)을 포함하는 PBS로 차단하고, 세포를 항-β III-튜브린 항체 (0.01 µg/ml)와 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 이후 신호를 시각화하기 위하여 Immunoperoxidase ABC kit(Vector Laboratories, USA) 및 DAB(diaminobenzidine; Ventr Laboratories, USA)를 이용하여 제조사의 방법대로 염색한 후, 항-β III-튜브린으로 염색된 배양배지의 형광 사진을 무작위로 선택하였다. 현미경 필드 상의 전체 신경세포돌기 길이는 이미지 분석 소프트웨어(ImagePro, Media cybernetics, USA)를 이용하여 마우스 커서와 함께 각 단계별로 추적하여 측정되었다. 평균 신경세포돌기 길이는 전체 신경세포돌기 길이를 신경세포수로 나누어서 정량하였다. 단일 현미경 필드(X200)일 경우 약 100 여개의 신경세포가 검출되었다. 데이터는 통계 비교를 위하여 4개의 다른 자매 배양세포에서 수집하였고, 모든 실험은 다른 플레이트를 이용한 배양으로 최소한 3회 반복하였다.

<70> 그 결과, tPA(0.5 µg/ml) 처리시, 마우스 대뇌피질 신경세포의 신경세포돌기가 신장되는 것을 관찰할 수 있었다(도 2A). 또한 신경세포돌기의 길이 측정시 마우스 대뇌피질 신경세포에서 0.5 µg/ml 농도의 tPA가 신경영양성 효과에 적합한 농도임을 알 수 있었다(도 2B).

<71> 이후 본 발명자들은 세포의 형태학적 평가 후, PI(propidium iodide) 염색을 통하여 세포 죽음(cell death)을 측정하였다. 구체적으로 5 µg/ml PI를 배양 배지에 첨가하여 세포막 붕괴를 형광 현미경(IX70, Exciter filter BP510-550/Barrier filter B590; Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 각각의 실험에서 얻은 전체 세포수와 죽은 세포수는 현미경 사진 관찰을 통해 카운팅하고, 신경세포 죽음의 퍼센트는 PI 염색 세포수를 전체 세포수로 나누어서 계산하였다. 자매 배양에서 획득된 데이터는 통계 비교시 이용하였으며, 실험은 최소한 3회 반복하였다.

<72> 그 결과, tPA를 처리하지 않은 세포에서 신경세포의 죽음은 DIV4에서 관찰되는 반면, tPA를 0.5 µg/ml의 농도로 대뇌피질 신경세포에 처리 후, 24시간 동안 배양하고 대조군과 비교했을 때 신경세포 죽음이 감소되

어 tPA를 처리한 신경세포는 생존율이 연장됨이 관찰되었다(도 2C). 또한 세포 카운팅 결과 tPA가 대조군보다 90% 넘게 세포 죽음을 감소시켰다(도 2D). 이를 통해 tPA가 낮은 밀도의 대뇌 피질 신경세포에서 신경영양성 기능을 가짐을 알 수 있었다.

<실시예 2> 신경영양성 효과와 tPA의 단백질 분해효소 기능의 관련성 여부 실험

본 발명자들은 마우스 대뇌피질 신경세포에서 tPA의 단백질 분해효소 기능 저해제를 tPA와 함께 처리하여 tPA의 단백질 분해효소 기능과 tPA-유도 신경영양성 간의 관련성을 하기와 같은 방법으로 조사하였다.

<2-1> tPA 단백질 분해효소 활성 억제제 첨가량 결정

tPA의 단백질 분해효소 기능을 차단하기 위하여, 1 mg/ml tPA에 1 mg/ml PAI-1(Plasminogen activator inhibitor-1: USA) 또는 3 mM PMSF(Phenylmethylsulphonylfluoride: Sigma, USA)를 첨가한 후, 37℃ 항온조에서 30분 동안 함께 배양하였다. 여분의 PMSF는 탈염화 칼럼(desalting column: PD10; Pharmacia, USA)으로 제거하고, 차단 효율은 Spectrozyme TPA(American Diagnostica Inc., USA)로 확인하였다. 그 결과, 37℃에서 10분 후, tPA, tPA+PAI-1 및 tPA+PMSF를 A₄₁₀(410 nm에서의 흡광도)에서 각각 0.1380, 0.0052 및 0.0050으로 관찰되어 상기 양의 PAI-1 및 PMSF가 완벽하게 tPA 단백질 분해효소 활성을 차단함을 확인하였다.

<2-2> tPA 단백질 분해효소 기능저해제에 의한 신경영양성 효과 변화 조사

실시예 1-1과 같이 마우스 대뇌피질 신경세포를 배양한 후, tPA의 단백질 분해효소 기능 저해제인 PAI-1(0.5 µg/ml, Calbiochem, USA) 및 tPA 단백질 분해효소 기능의 화학적 저해제인 PMSF(3 mM, Sigma, USA)를 tPA(0.5 µg/ml)와 함께 배양배지에 처리하였다. DIV3에서 실시예 1-2와 같이 신경세포돌기 길이 및 신경세포 생존율을 측정된 결과, tPA-유도 신경세포돌기 성장 및 신경세포 생존율 증가는 tPA의 단백질 분해효소 기능 저해제인 PAI-1 및 PMSF에 의해 저해되지 않았다(도 3). 이를 통해 tPA-유도 신경세포돌기 성장 및 신경세포 생존율 증가는 모두 tPA의 단백질 분해효소 활성에 의해 매개되지 않음을 알 수 있었다.

<실시예 3> tPA에 의한 신경영양성 관련 키나아제 활성화 확인

tPA가 신경세포돌기 성장 및 신경세포 생존에 중요 인자로 알려진 ERK(extracellular-regulated kinase), PKC(Protein kinase C) 및 PI(3)K(phosphatidylinositol 3-kinase)의 활성화에 미치는 영향을 하기와 같이 조사하였다(Price *et al.*, *Br J Pharmacol.* 140(5):825-829, 2003; Thompson *et al.*, *Mol Cell Neurosci.* 27(4):441-452, 2004; Hao *et al.*, *J Biol Chem.* 270(31):18219-18226, 2004; Neiiendam *et al.*, *J Neurochem.* 97(4):920-935, 2004; Lallemend *et al.*, *J Cell Sci.* 118(Pt 19):5411-5425, 2005).

<3-1> 웨스턴 블롯

실시예 1-1의 방법으로 마우스 대뇌피질 신경세포를 배양한 후, 실시예 2-2의 방법과 같이 tPA 및 tPA의 단백질 분해효소 기능 저해제인 PAI-1과 PMSF를 함께 세포에 처리하였다. 이 후 정해진 시간대(처리 후 5, 10, 30, 60 및 120분)에서 세포를 수득하였고, 용해 완충액(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 2 mM EGTA, 15 Triton X-100, 0.5% SDS; pH7.4)에서 세포를 용해하여 세포 용해액을 준비하였다. 전체 단백질 30 µg을 SDS-PAGE(8%)로 전기영동을 수행하여 분리하였고, 이 후 적합한 항체[anti-phospho-Raf kinase, anti-Raf kinase, anti-phospho-Akt kinase, anti-Akt kinase(Cell signaling technology Inc., USA), anti-PKC(pan)(Upstate Biotechnology, USA)]를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 액틴의 웨스턴 블롯은 대조군으로 사용하였다. 면역 활성 밴드를 확인하기 위하여 Enhanced chemiluminescence(Intron, South Korea)를 이용하여 시각화하였다.

그 결과, 마우스 대뇌피질 신경세포는 tPA에 5분 동안 노출된 후, Raf 키나아제, ERK, pan-PKC 및 Akt 키나아제의 활성화가 검출되었으며, tPA-유도 키나아제 활성화는 60분 동안 유지되었다가 사라졌다(도 4A). 또한, tPA와 PAI-1 또는 PMSF를 함께 처리하여 tPA의 단백질 분해효소로서 기능을 차단한 경우에도 Raf 키나아제, ERK, pan-PKC 및 Akt 키나아제의 활성화가 검출되었다(도 4B). 이를 통해 tPA의 단백질 분해효소 활성이 세포 내 신호 키나아제 활성화를 유도하지 않음을 알 수 있었다.

<실시예 4> 키나아제 활성 저해에 따른 tPA-유도 신경영양성 효과 조사

실시예 1-1과 같은 조건으로 세포를 배양한 후 tPA와 Raf 키나아제 저해제(Raf-I, 10 µM: Calbiochem, USA), MEK 저해제(PD98059, 10 µM: Calbiochem, USA; U01126, 20 µM: Calbiochem, USA), PKC 저해제(GF109203X, 20 µM: Calbiochem, USA), 또는 PI(3) 키나아제 저해제(LY294002, 3 µM 또는 wortmannin,

300 μ M: Calbiochem, USA)를 배양 배지에 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양배지로 세척하였고 추가로 24시간 동안 배양하였다. 이를 실시예 1-2와 같은 방법으로 신경세포돌기 길이를 측정한 결과, Raf 키나아제, MEK, PKC, 및 PI(3) 키나아제 활성 저해제 처리시 tPA-유도 신경세포돌기 성장 효과가 저해됨을 확인하였다(도 5, 6, 7a 및 7b).

<86> 또한 실시예 1-3와 같은 방법으로 신경세포 생존율을 측정한 결과, Raf 키나아제, MEK, PKC 활성 저해제는 생존율을 변화시키지 못하였으나, PI(3) 키나아제 활성 저해제를 처리시 tPA-유도 신경세포 생존율 증가 효과가 저해됨을 확인하였다(도 7c 및 7d).

<87> <실시예 5> tPA의 신경영양성 효과와 수용체간의 연관관계 조사

<88> 본 발명자들은 tPA의 막 수용체로 알려진 LRP(low density lipoprotein receptor-related protein), MR(mannose receptor) 및 annexin-II를 대상으로 하여 tPA의 신경영양성 효과와의 연관성을 조사하였다. 구체적으로 실시예 1-1과 같은 조건으로 대뇌피질 신경세포를 배양한 후, LRP, MR 및 annexin-II의 기능저해제인 락토페린(Lactoferrin 10-30 μ g/ml: 이하 “LRP 저해제”라 칭함: Sigma, USA), 덱스트란(dextran, 10 mg/ml: Sigma, USA) 또는 기능 차단 항체(α -MR, 1 μ g/ml: 네덜란드 Erasmus University의 Dr. Rijken으로부터 기증: 이하 “MR 저해제”라 칭함) 또는 ACA(ϵ -aminocaproic acid, 300 μ M: Sigma, USA)또는 기능 차단 항체(α -AII, 25 μ g/ml: Transduction Laboratories, USA: 이하 “annexin-II 저해제”라 칭함)을 tPA와 함께 배양 배지에 첨가하였다.

<89> 이를 실시예 1-2와 같은 방법으로 세포의 신경세포돌기의 길이를 측정한 결과, LRP 또는 MR의 저해제를 tPA와 처리했을 때에는 tPA-유도 신경영양성 효과에 영향을 주지 못했으나, annexin-II의 저해제를 tPA와 처리했을 때에는 신경세포돌기 길이 및 신경세포 생존율이 감소함을 관찰할 수 있었다(도 8 및 9).

<90> 또한, 실시예 3-1의 방법과 같이 상기에서 배양한 세포를 대상으로 세포내 신호분자 활성을 조사한 결과, 신경영양성 효과와 연관된 키나아제의 인산화 활성이 annexin-II의 저해에 의해 함께 감소됨이 관찰되었다(도 10).

<91> 따라서, tPA는 annexin-II와의 결합을 통해 키나아제의 인산화를 매개함을 확인하였다.

발명의 효과

<92> 본 발명의 스크리닝 방법은 annexin-II와 결합하여 신경영양성 효과와 연관된 세포내 신호 분자를 활성화시켜 신경세포돌기 성장 및 신경세포 생존율을 증가시키는 후보 화합물을 검색함으로써 신경계질환 또는 신경손상 치료제를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 신경세포돌기 길이 및 신경세포 생존율 측정 과정을 간단하게 나타낸 모식도이다.

<2> 도 2는 tPA(tissue plasminogen activator)에 의한 신경영양성 효과를 조사한 결과이다:

<3> A : tPA 처리에 의한 마우스 대뇌피질 신경세포에서의 신경세포돌기 길이를 관찰한 세포 그림;

<4> B : tPA 농도별 처리에 의한 마우스 대뇌피질 신경세포에서의 신경세포돌기 길이를 측정한 그래프;

<5> C : tPA 처리에 의한 마우스 대뇌피질 신경세포에서 신경세포 생존율을 조사한 세포 사진; 및

<6> D : tPA 처리에 의한 마우스 대뇌피질 신경세포에서 신경세포 생존율을 조사한 그래프.

<7> 도 3은 tPA의 단백질 분해효소 기능 저해에 따른 신경영양성 효과를 조사한 결과이다:

<8> A : tPA의 단백질 분해효소 기능 저해에 의한 마우스 대뇌피질 신경세포에서의 신경세포돌기 길이를 관찰한 세포 그림;

<9> B : tPA의 단백질 분해효소 기능 저해에 의한 마우스 대뇌피질 신경세포에서의 신경세포돌기 길이를 측정한 그래프;

<10> C : tPA의 단백질 분해효소 기능 저해에 의한 마우스 대뇌피질 신경세포에서 신경세포 생존율을 조사한 세포 사진; 및

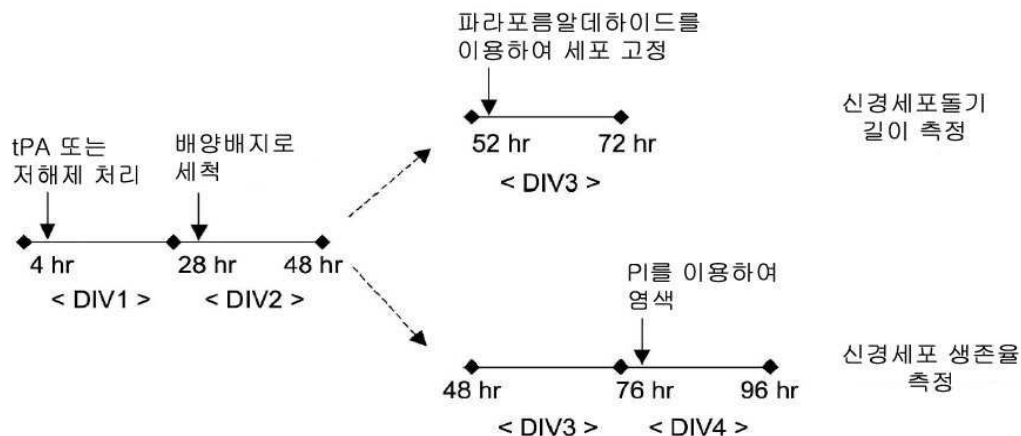
<11> D : tPA의 단백질 분해효소 기능 저해에 의한 마우스 대뇌피질 신경세포에서 신경세포 생존율을 조사한 그

래프.

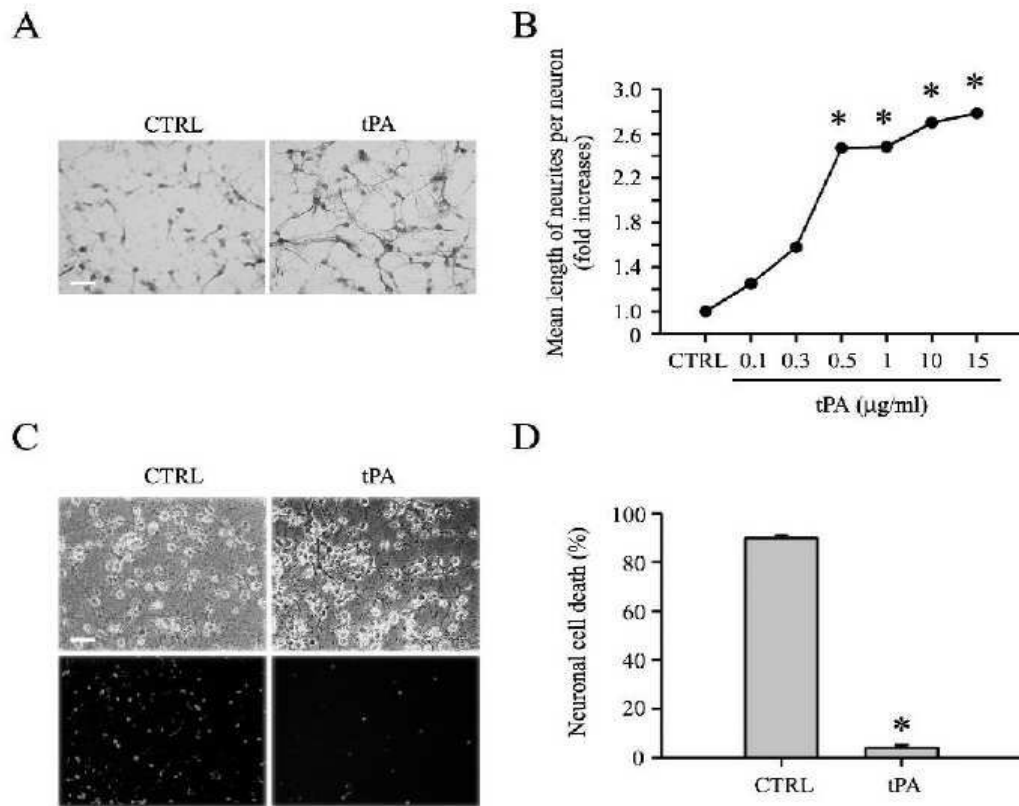
- <12> 도 4는 tPA 또는 tPA의 단백질 분해효소 기능 저해에 의한 세포내 신호 분자의 인산화 활성을 조사한 결과이다:
- <13> A : tPA 처리시 세포내 신호 분자의 인산화 활성을 조사한 웨스턴 블롯 결과; 및
- <14> B : tPA와 tPA의 단백질 분해효소 기능 저해제를 함께 처리시 세포내 신호 분자의 인산화 활성을 조사한 웨스턴 블롯 결과.
- <15> 도 5는 Raf 키나아제 및 MEK 저해제 처리시 신경세포돌기 길이의 결과이다:
- <16> A : tPA와 Raf 키나아제 및 MEK 저해제 처리시 신경세포돌기 길이를 관찰한 세포 그림; 및
- <17> B : tPA와 Raf 키나아제 및 MEK 저해제 처리시 신경세포돌기 길이를 측정된 그래프.
- <18> 도 6은 PKC 저해제 처리시 신경세포돌기 길이의 결과이다:
- <19> A : tPA와 PKC 저해제 처리시 신경세포돌기 길이를 관찰한 세포 그림; 및
- <20> B : tPA와 PKC 저해제 처리시 신경세포돌기 길이를 측정된 그래프.
- <21> 도 7은 tPA 및 PI(3)K 저해제 처리시 신경영양성 효과를 조사한 결과이다:
- <22> A : tPA와 PI(3)K 저해제 처리시 신경세포돌기의 길이를 관찰한 세포 그림;
- <23> B : tPA와 PI(3)K 저해제 처리시 신경세포돌기의 길이를 측정된 그래프;
- <24> C : tPA와 PI(3)K 저해제 처리시 신경세포 생존율을 관찰한 세포 그림; 및
- <25> D : tPA와 Raf, MEK, PKC 및 PI(3)K 저해제 처리시 신경세포 생존율을 측정된 그래프.
- <26> 도 8은 tPA와 그의 대표적 수용체들의 저해제 처리시 신경세포돌기 성장을 조사한 결과이다:
- <27> A : tPA와 annexin-II 기능 저해제 처리시 신경세포돌기 성장을 관찰한 그림; 및
- <28> B : tPA와 그의 대표적 수용체들의 기능 저해제 처리시 신경세포돌기 성장을 측정된 그래프.
- <29> 도 9는 tPA와 그의 대표적 수용체들의 저해제 처리시 신경세포 생존율을 조사한 결과이다:
- <30> A : tPA와 annexin-II 기능 저해제 처리시 신경세포 생존을 관찰한 그림; 및
- <31> B : tPA와 그의 대표적 수용체들의 기능 저해제 처리시 신경세포 생존을 측정된 그래프.
- <32> 도 10은 tPA와 annexin-II 저해제 처리 시 세포내 신호 분자의 인산화 활성 조사 결과이다.

도면

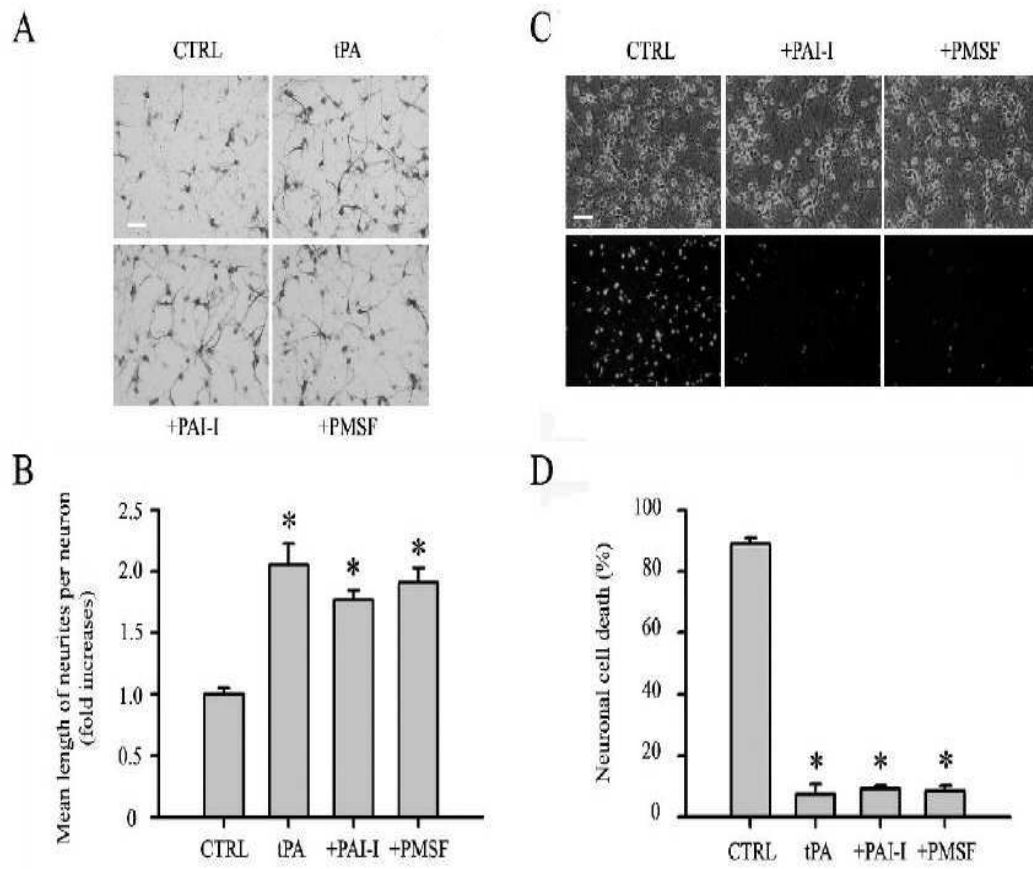
도면1



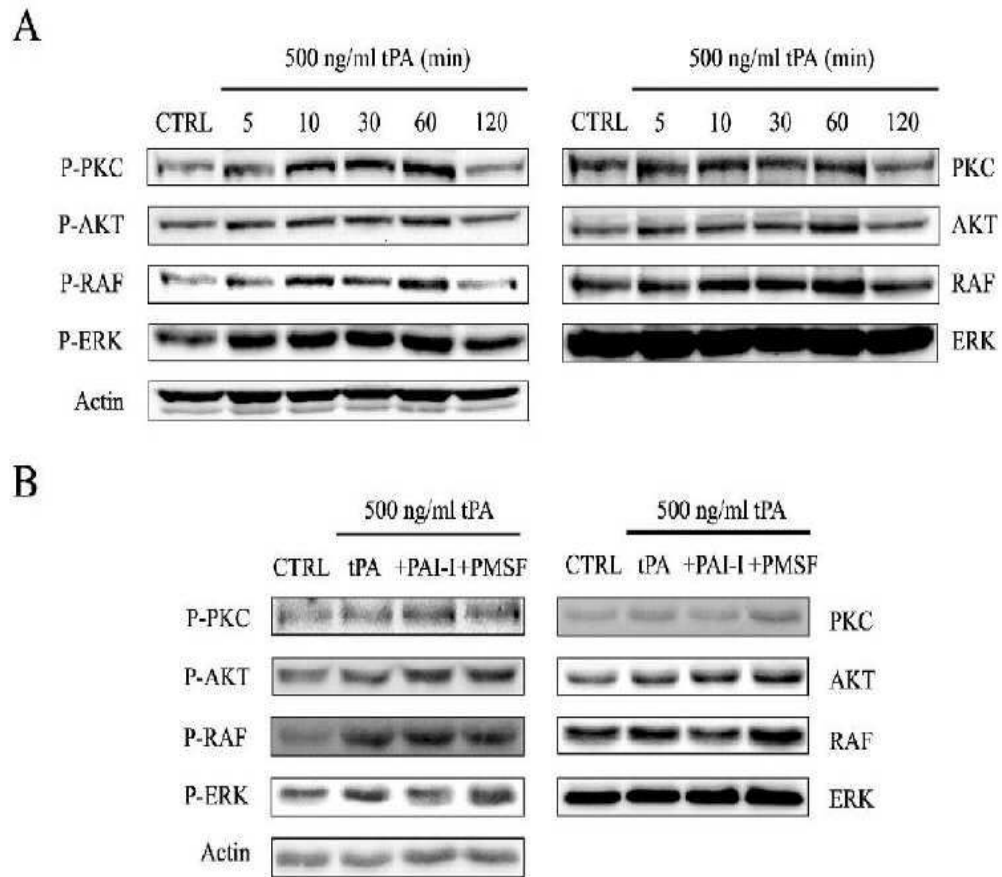
도면2



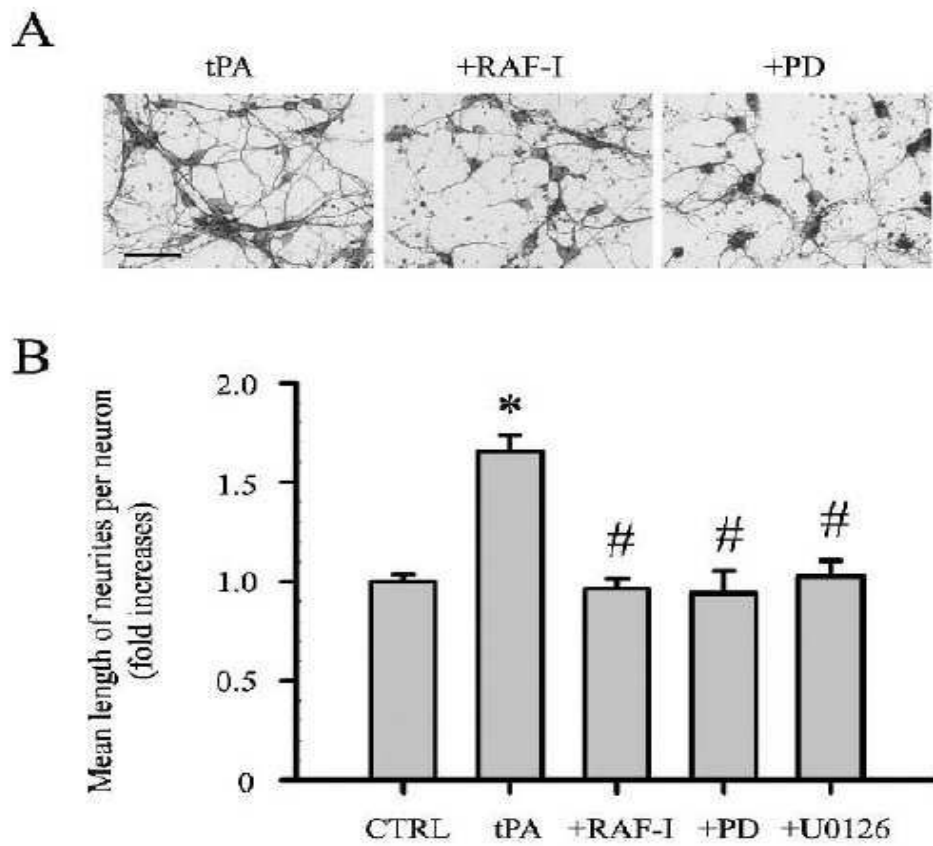
도면3



도면4

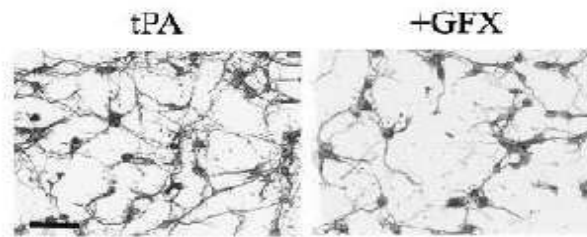


도면5

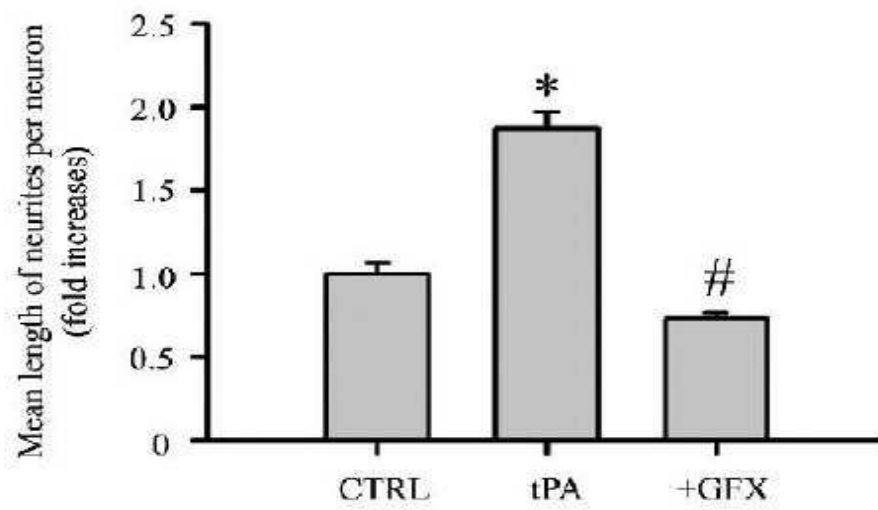


도면6

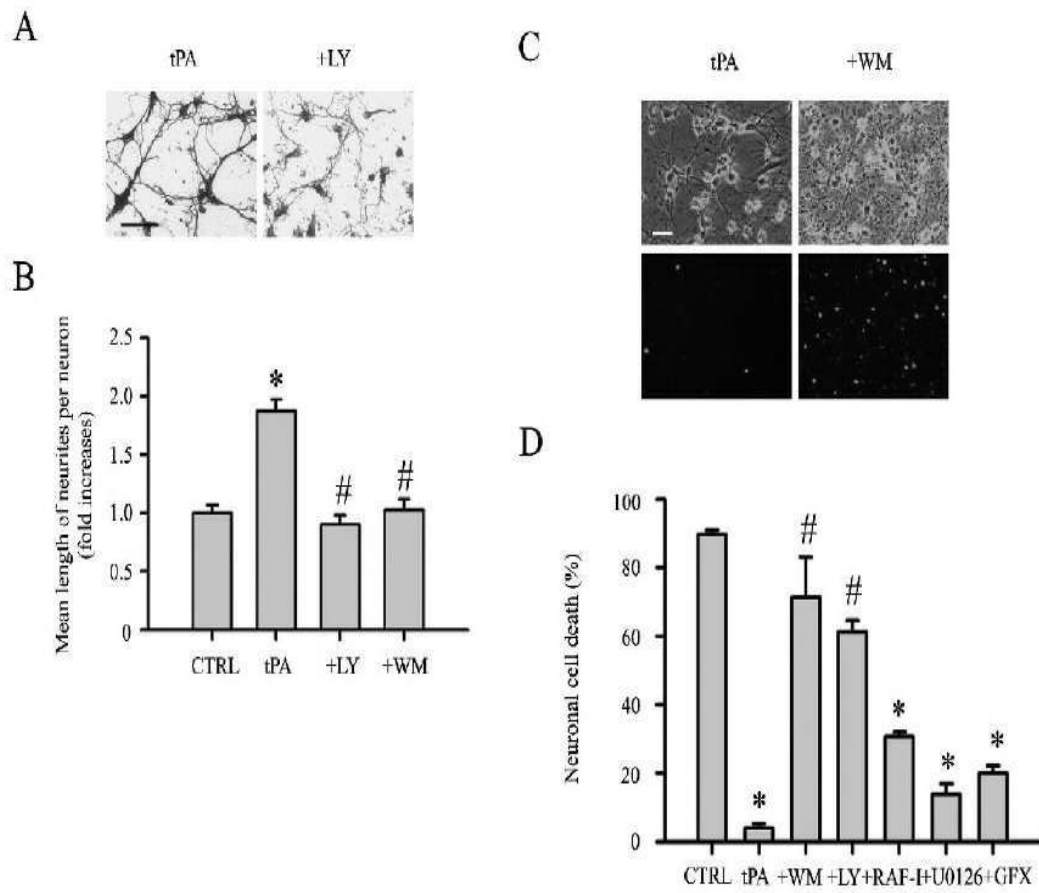
A



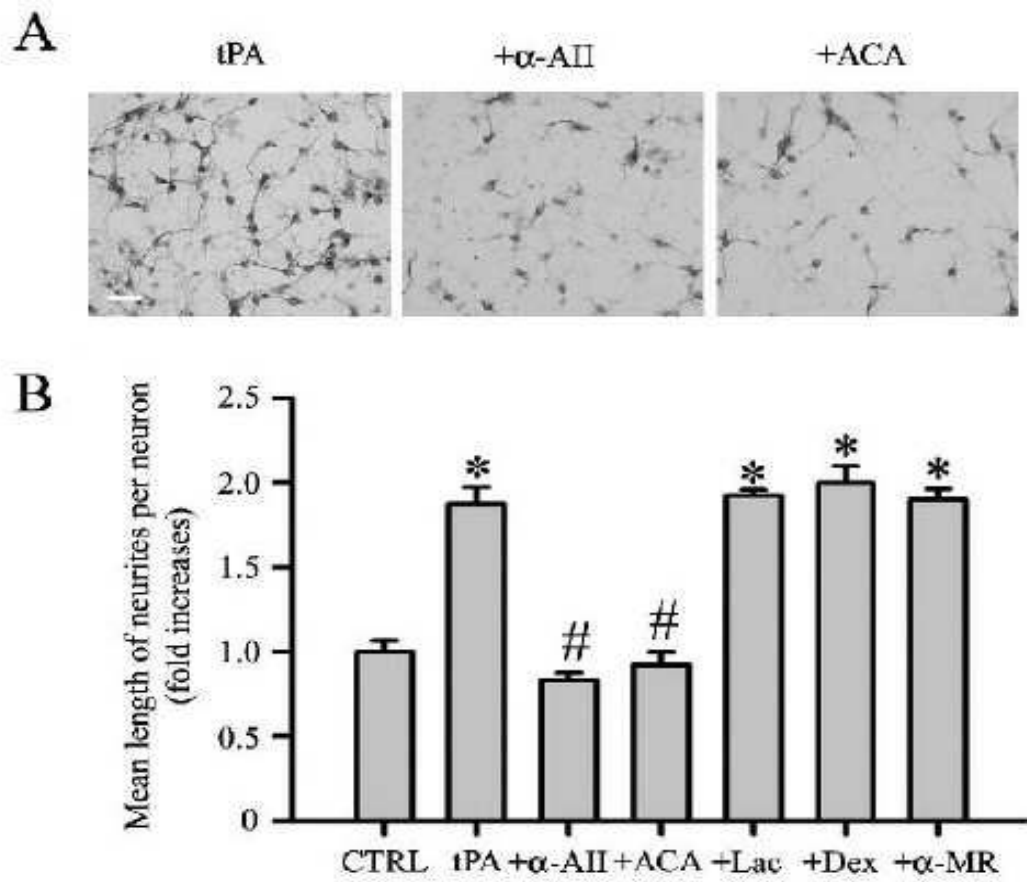
B



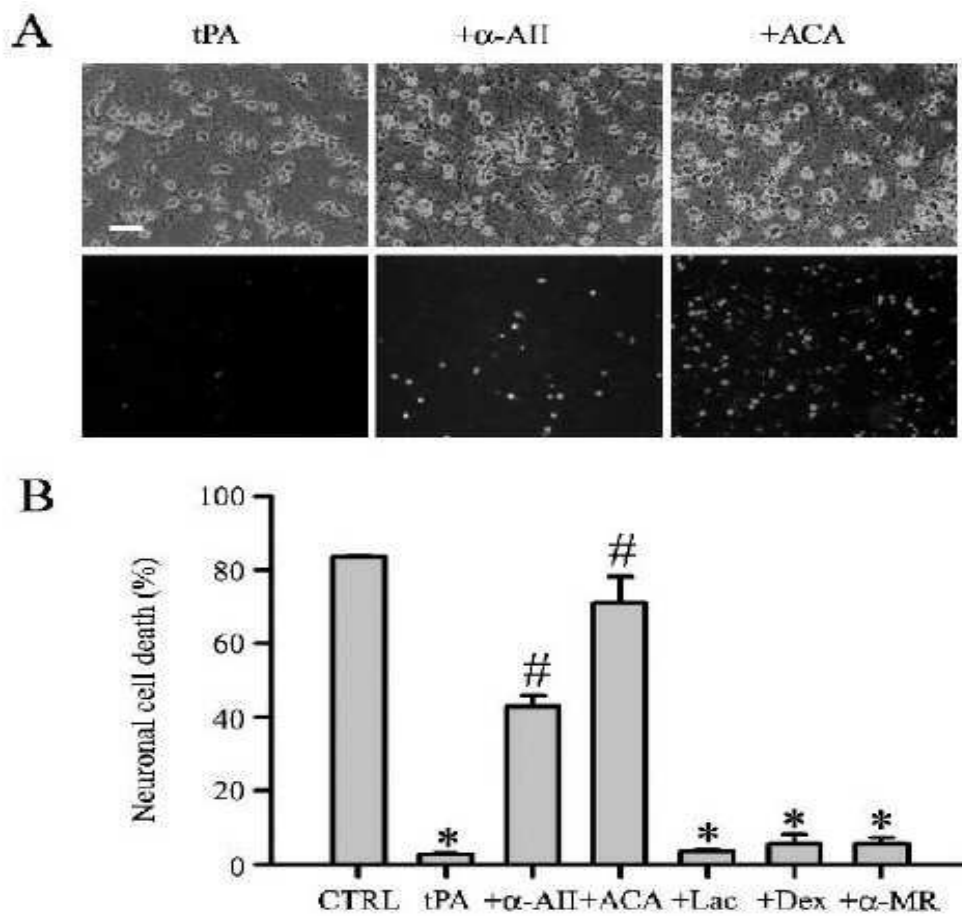
도면7



도면8



도면9



도면10

