

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0009611

(43) 공개일자 2021년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)*A61P 25/16* (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/16 (2013.01)*A61K 38/177* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0086363

(22) 출원일자 2019년07월17일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

조성래

서울특별시 용산구 이촌로 347, 11동 103호(서빙고동, 신동아아파트)

조은주

서울특별시 용산구 이촌로 181, 104동 802호(이촌동, 한강대우아파트)

(74) 대리인

특허법인인벤싱크

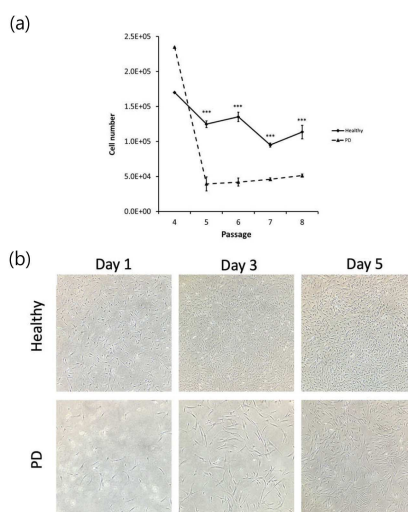
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물

(57) 요약

본 명세서에서는 킬린을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 25/16 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI16C1012
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	유전성 대사성 뇌백질 질환 동물모델에서 유전자가위 치료법의 전임상 적용 및 임상
기반 구축	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

릴린(reelin, RELN)을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은,

파킨슨 병, 치매 및 헌팅턴병인, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 릴린의 투여 농도는,

1 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 인, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은,

CD36 및 ITGA5 중 하나의 유효성분을 더 포함하는, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 릴린을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson disease, PD)은 중간뇌 흑질의 신경세포에서 도파민성 신경세포들이 점진적으로 소실되어가는 신경 퇴행성 질환이다. 파킨슨 병은 대개 65세 이상의 인구에서 2-3%비율로 발병되며, 유병률은 남성이 더 높은 것으로 나타난다. 증상으로는 떨림증(tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia), 자세의 불안정(postural instability) 등을 수반한다.

[0003] 이때, 파킨슨병은 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.

[0004] 파킨슨병의 증상을 경감시키는 약물로서, 엘-도파(l-dopa) 제제, 도파민 수용체 작용제, 항콜린 약제, 엘데프릴(Eldepryl)이 이용될 수 있다. 그러나, 이들 약물 대부분은 원인적인 치료가 아니라 증상을 조절하는 역할을 한다. 따라서, 파킨슨병 환자들은 꾸준하고 지속적인 약물들의 복용이 필요하다. 나아가, 이러한 약물들의 장기 투여는 약물 부작용의 문제점을 야기할 수 있다.

[0005] 이에 따라, 상기와 같은 부작용을 줄이고, 파킨슨병에 대하여 예방 및 치료 효과를 갖는 새로운 치료 시스템에 대한 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 파킨슨병을 유발하는 요인으로서, 노화가 가장 큰 연관이 있는 것으로 알려져 있고, 신경 독소들에 의한 환경적 요인, 활성 산소 그리고 유전적 요인 (5-10%) 등이 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한, 산화적 스트레스와 미토콘드리아 기능부전도 파킨슨병 발병 기작에 관련이 있을 것으로 추정되고 있다.
- [0008] 노화에 따른 뇌 변화는 대부분 정보를 수용/처리/전달하는 신경세포(neuron, 뉴런)와 신경교세포의 손실이다. 이러한 신경세포와 신경교세포는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC), 배아 줄기세포(embryonic stem cell, ESC) 및 신경 줄기세포(neural stem cell, NSC) 등의 줄기세포에 의해서 생성될 수 있다.
- [0009] 한편, 본 발명의 발명자들은 세포의 기질(extracellular matrix, ECM) 분자와 그 수용체가 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌신경 질환과 관련되어 있는 것에 주목하였다. 보다 구체적으로, 매트릭스 메탈로프로테이네이즈(matrix metalloproteinase)와 같은 세포의 기질 분해 효소의 전사 및 번역 수준의 조절이 파킨슨병 발병에 영향을 준다는 것을 인식할 수 있었다.
- [0010] 이에, 본 발명의 발명자들은 전사체 분석을 통하여, 세포의 기질 경로에 관련되어 있는 유전자가 파킨슨병 환자에서 특정 변화가 있는 것을 확인하였다. 나아가, 세포의 기질 관련 분자인 릴린(reelin, RELN), CD36 및 ITGA5를 발견할 수 있었다.
- [0011] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 세포의 기질 관련 분자인 릴린, CD36 및 ITGA5에 기초한 파킨슨 병을 치료하는 약제학적 조성물을 개발하기에 이르렀다.
- [0012] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 릴린을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다. 보다 바람직하게는, CD36 및 ITGA5 중 하나의 유효성분을 더 포함하는, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 실시예에서 따르면, 릴린을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0014] 본 명세서에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 뇌신경 질환의 발병을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 뇌신경 질환의 발전의 억제, 뇌신경 질환의 증상 완화 및 손상된 뇌기능의 회복을 의미한다.
- [0015] 본 명세서에서 사용되는 용어, "약제학적 조성물"은 약제학적 유효량의 유효성분 외에 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함할 수 있다. 여기서, "약제학적 유효량"은 상술한 유효성분의 효능 또는 활성을 달성하는데 충분한 양을 의미한다. 나아가, "약제학적 조성물"은 비경구 투여, 정맥 내 투여, 피하 투여, 국부 투여 및 경구 투여를 이용하여 투여할 수 있다. 그러나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 특징에 따르면, 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병, 치매 및 헌팅턴병이다. 그러나 이에 제한되지 않고, 다양한 뇌신경 질환을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 뇌졸중, 뇌성마비, 허혈성 뇌손상, 외상성 뇌손상 및 섬망 등이 포함될 수 있다. 더 나아가, 치매는 노인성 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 루이체 치매, 전측두엽 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 정상압 뇌수두증에 의한 치매, 두부 외상으로 인한 치매 및 물질로 유발된 치매가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 릴린의 투여 농도는 1 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 일 수 있다. 바람직하게, 효과를 극대화될 수 있는 릴린의 투여 농도는 0.5 내지 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니며, 릴린의 투여 농도는 제제화 방법, 투여 방식, 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 결정될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 약제학적 조성물은, CD36 및 ITGA5 중 하나의 유효성분을 더 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 약제학적 조성물은 릴린을 단독으로 포함하거나, CD36 및 ITGA5 중 하나의 유효성분이 릴린과 같이 조합으로 포함할 수 있다. 이때, 릴린, CD36 및 ITGA5는 파킨슨병 환자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에서 차별적으로 발현되는 세포의 기질 관련 분자로 세포의 증식 및 노화 억제에 대한 효과를

가지고 있는 분자일 수 있다.

[0019] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은, 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공함으로써, 종래의 약물에 대한 부작용 및 한계점을 극복할 수 있다.

[0021] 보다 구체적으로, 신경세포의 이동, 수상 돌기 형성 및 시냅스 전달을 통한 뇌발달에서 중요한 역할인 릴린을 유효성분으로 포함함으로써 퇴행성 뇌신경 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 효과가 있다.

[0022] 나아가, 본 발명은 신경세포로 분화가 가능한 중간엽 줄기세포의 증식을 향상시키고, 노화를 억제시킴으로써 퇴행성 뇌신경 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 효과가 있다.

[0023] 더 나아가, 본 발명은 신경세포의 보호 효과를 향상시키고, 노화를 억제시킴으로써 퇴행성 뇌신경 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 효과가 있다.

[0024] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1a 내지 1b는 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포의 계대배양 주기 별 세포 증식 결과를 도시한 것이다.

도 2a 내지 2b는 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포의 RNA 분석 결과를 KEGG 경로 분석을 통하여 동정한 결과를 도시한 것이다.

도 3a 내지 3b는 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 대한 세포외 기질에 관련된 RNA의 발현 수준을 계대배양 주기 별로 도시한 것이다.

도 4a 내지 4b는 세포외 기질에 관련된 단백질을 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 처리하여 세포 증식 및 세포 노화를 측정한 결과를 도시한 것이다.

도 5a 내지 5c는 세포 독성물질에 의하여 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델에 세포외 기질에 관련된 단백질을 처리한 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0027] **실시예 1 : 파킨슨병 환자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에서 차별적으로 발현되는 세포외 기질 관련 분자_RELN, CD36, ITGA5**

[0028] 이하에서는 도 1a 내지 3b를 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 세포외 기질 관련 분자에 대하여 설명한다. 이때, 퇴행성 뇌신경 질환으로 파킨슨 병을 예로 들어 설명하나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 효과는 보다 다양한 퇴행성 뇌신경 질환에서 동일하거나 유사하게 나타날 수 있다.

[0029] 도 1a 내지 1b는 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포의 계대배양 주기 별 세포 증식 결과를 도시한 것이다.

[0030] 도 1a의 (a)를 참조하면, 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포의 계대배양 주기 별 세포 증식 결과가 도시된다. 파킨슨병 환자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포는 계대배양 5주기부터 급속히 세포 증식이 감소하는 것으로 나타난다. 또한, 계대배양 5주기부터 8주기까지에서 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포가 정상 피험자의 중간엽 줄기세포보다 세포 증식이 유의하게($p < 0.001$) 낮은 것으로 나타난다.

다.

- [0031] 도 1a의 (b)를 참조하면, 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포의 계대배양 8주기에서 경과일에 따른 세포 증식 이미지 결과가 도시된다. 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포는 정상 피험자의 중간엽 줄기세포보다 모든 경과일에서 낮은 세포 증식을 보이는 것으로 나타난다. 보다 구체적으로, 정상 피험자의 중간엽 줄기세포는 Day1에서 Day5로 시간이 경과할수록 세포가 증식되어 밀도가 높아지는 것으로 나타난다. 그러나, 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포는 정상 피험자의 중간엽 줄기세포에 비하여 각 경과일 마다 세포의 밀도도 낮은것으로 나타난다.
- [0032] 이러한 도 1a의 결과는, 파킨슨병 환자는 정상인에 비하여 중간엽 줄기세포의 세포 증식력이 낮은 것을 의미할 수 있다.
- [0033] 도 1b를 참조하면, SA- β -Gal 염색 검정을 통하여 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포의 세포 노화를 계대배양의 주기 별로 측정된 결과가 도시된다. SA- β -Gal(senescence associated beta-galactosidase)는 세포 노화의 표지로 세포의 노화가 진행 시 활성화되는 성분이다. 계대배양 4주기에서 중간엽 줄기세포의 밀도는 정상 피험자의 중간엽 줄기세포가 높으며, SA- β -Gal의 염색 발현도 낮은것으로 나타난다. 또한, 계대배양 8주기에서 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포가 정상 피험자의 중간엽 줄기세포보다 SA- β -Gal의 염색 발현도가 높은 것으로 나타난다. 아울러, 세포의 노화는 계대배양이 진행될수록 증가되는 것으로 나타난다. 이러한 결과는, 파킨슨병 환자가 정상인에 비하여 세포의 노화가 더 많이 진행된다는 것을 의미할 수 있다.
- [0034] 도 2a 내지 2b 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포의 RNA 분석 결과를 KEGG 경로 분석을 통하여 동정한 결과를 도시한 것이다.
- [0035] 도 2a를 참조하면, 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포의 RNA 분석 결과를 KEGG 경로 분석을 통하여 동정된 경로가 도시된다. 보다 구체적으로, 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포를 배양 후 배양된 모든 물질을 RNA-시퀀싱 분석하였다. 그 다음, 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포에서 세포 증식 및 노화와 관련된 물질을 찾기 위하여 KEGG 경로 분석을 통하여 RNA-시퀀싱 데이터를 동정하였다. 그 결과, 세포의 기질 수용체 상호작용(ECM-receptor interaction), P53 정보 전달 경로(P53 signaling pathway), 부정맥유발 우심실심근병증(Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy), 국소 접착(Focal adhesion) 및 내포작용(Endocytosis) 경로에 관련된 것으로 나타난다. 또한, 각 경로에 관련된 유전자들도 함께 도시되어 나타난다.
- [0036] 도 2b를 참조하면, KEGG 경로 분석에 기초한 세포의 기질-수용체 상호작용 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 파킨슨병 환자에서 하향 조절된 세포의 기질-수용체 상호작용 관련 유전자들이 세포의 기질 관련 인자들을 변화와 연관되어 있는 것으로 나타난다. 그 결과, 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포에서 하향된 CD36, ITGA5 및 RELN 유전자를 발견할 수 있었다.
- [0037] 즉, 파킨슨병의 치료 또는 예방에 있어서 CD36, ITGA5 및 RELN 단백질 수준의 증가는 파킨슨 병 발병에 영향을 주는 세포의 기질 관련 인자들을 조절하여 정상인에 비하여 낮은 파킨슨병 환자의 세포 증식력 및 노화를 억제시킬 수 있는 효과를 제공할 수 있다.
- [0038] 도 3a 내지 3b는 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 대한 세포의 기질에 관련된 RNA의 발현 수준을 계대배양 주기 별로 도시한 것이다.
- [0039] 도 3a를 참조하면, 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포의 CD36, ITGA5 및 RELN 유전자의 계대배양 주기별 mRNA 발현을 측정된 결과가 도시된다. 보다 구체적으로, 계대배양 4주기에서 CD36 및 ITGA5의 mRNA 형광 발현은 정상 피험자보다 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포에서 낮은 형광 발현 밴드를 보이는 것으로 나타난다. 나아가, 파킨슨 병 환자의 중간엽 줄기세포에서는 RELN의 mRNA의 형광 발현 밴드는 정상 피험자의 중간엽 줄기세포에 비해 희미한 형광 발현 밴드를 보이는 것으로 나타난다. 계대배양 8주기에서도 CD36 및 ITGA5의 mRNA 형광 발현은 정상 피험자보다 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포에서 낮은 형광 발현 밴드를 보이는 것으로 나타난다. 나아가, 파킨슨 병 환자의 중간엽 줄기세포에서는 RELN의 mRNA의 형광 발현 밴드는 정상 피험자의 중간엽 줄기세포에 비해 희미한 형광 발현 밴드를 보이는 것으로 나타난다. 또한, 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포에서 각 유전자의 mRNA 형광 발현 밴드는 계대배양의 주기가 높아질수록 밴드의 발현이 흐려지는 것으로 나타난다.
- [0040] 도 3b를 참조하면, 도 3a의 mRNA 발현 결과를 정량분석한 결과가 도시된다.
- [0041] 보다 구체적으로, 도 3b의 (a)를 참조하면, 계대배양 주기 별 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포

에서 CD36 유전자의 발현이 도시된다. 중간엽 줄기세포의 CD36 유전자의 발현은 계대배양 4주기 및 8주기에서 파킨슨환자의 줄기세포가 더 낮은 것으로 나타난다. 나아가, 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포에서 CD36 유전자의 발현은 계대배양 주기가 높아 질수록 낮아지는 것으로 나타난다.

[0042] 도 3b의 (b)를 참조하면, 계대배양 주기 별 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포에서 ITGA5 유전자의 발현이 도시된다. 중간엽 줄기세포의 ITGA5 유전자의 발현은 계대배양 4주기 및 8주기에서 파킨슨환자의 줄기세포가 더 낮은 것으로 나타난다. 나아가, 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포에서 ITGA5 유전자의 발현은 계대배양 주기가 높아 질수록 낮아지는 것으로 나타난다.

[0043] 도 3b의 (c)를 참조하면, 계대배양 주기 별 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포에서 RELN 유전자의 발현이 도시된다. 중간엽 줄기세포의 RELN 유전자의 발현은 계대배양 4주기 및 8주기에서 파킨슨환자의 줄기세포가 더 낮은 것으로 나타난다.

[0044] 이러한 결과는, 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포는 세포의 기질 수용체 상호작용 관련 유전자인 CD369, ITGA5 및 RELN 유전자들이 정상 피험자에 비하여 하향되어 있다는 것을 의미할 수 있다.

[0045] 이상의 실시예 1의 결과로, 본 발명의 다양한 실시예에서 이용되는 세포의 기질 관련 유전자인 RELN, CD36 및 ITGA5가 파킨슨병 환자에게서 차별적으로 발현되어 있는 것으로 나타난다. 특히, 파킨슨병 환자에서 하향 조절된 RELN, CD36 및 ITGA5 유전자가 세포의 기질 관련 인자들을 변화시키는 것으로 나타난다. 이에, 세포의 기질이 세포의 생존력과 표현형을 유지하는데 구조적 및 기능적으로 중요한 역할을 하며, 파킨슨병에서의 세포의 기질의 문제가 세포 생존력에 영향을 미친다는 것을 의미할 수 있다. 따라서, RELN, CD36 및 ITGA5의 투여는 파킨슨병의 치료에 효과적일 수 있다.

[0046] 실시예 2: 세포의 기질 관련 단백질의 세포생존률 향상 및 노화 억제 효과_중간엽 줄기세포

[0047] 이하에서는 도 4a 내지 4b를 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 중간엽 줄기세포에서 세포의 기질 관련 단백질의 세포 증식 및 노화 억제에 대한 효과를 설명한다.

[0048] 도 4a 내지 4b는 세포의 기질에 관련된 단백질을 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 처리하여 세포 증식 및 세포 노화를 측정된 결과를 도시한 것이다.

[0049] 도 4a는 세포의 기질에 관련된 단백질을 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 처리하여 세포 증식을 측정된 결과를 도시한 것이다.

[0050] 보다 구체적으로, 도 4a의 (a)를 참조하면, 중간엽 줄기세포에 세포의 기질 관련 단백질을 처리하는 세포배양 계획이 도시된다. 먼저, 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포를 파종(seeding)한다. 그 다음, 파종 후 1일째에 무혈청 배지(serum free media)로 배지를 교체한다. 그 다음, 파종 후 2일째에 무혈청 배지로 배지 교체와 동시에 세포의 기질 관련 단백질을 처리한다. 이때, 처리된 세포의 기질 관련 단백질은 RELN, CD36 및 ITGA5이며, 대조군(control group)으로 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)가 사용될 수 있다. 또한, 각 세포의 기질 관련 단백질들은 1 μ g/ml 및 2 μ g/ml 씩 처리한다. 그 다음, 파종 후 3일째에 세포 증식 및 노화를 측정한다.

[0051] 도 4a의 (b)를 참조하면, 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 세포의 기질 단백질을 1 μ g/ml 농도로 처리한 세포 증식 결과가 도시된다. 세포 증식 결과는 생존력으로 표현하여 나타내었고, 생존력이 높을수록 세포 증식 능력이 좋은 것을 의미한다. RELN 처리군은 대조군보다 생존력이 유의하게($p<0.05$) 증가한 것으로 나타나고, CD36 처리군도 대조군보다 생존력이 유의하게($p<0.001$) 증가한 것으로 나타난다. ITGA5 처리군은 대조군과의 통계적인 차이가 나타나지 않았다.

[0052] 도 4a의 (c)를 참조하면, 정상 피험자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 세포의 기질 단백질을 2 μ g/ml 농도로 처리한 세포 증식 결과가 도시된다. 2 μ g/ml 농도에서는 RELN 처리군에서만 대조군보다 생존력이 유의하게($p<0.01$) 증가한 것으로 나타나고, CD36 및 ITGA5 처리군에서는 대조군과의 통계적인 차이가 나타나지 않았다.

[0053] 도 4a의 (d)를 참조하면, 파킨슨병 환자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 세포의 기질 단백질을 1 μ g/ml 농도로 처리한 세포 증식 결과가 도시된다. RELN 처리군은 대조군보다 생존력이 유의하게($p<0.05$) 증가한 것으로 나타나고, CD36 처리군은 대조군보다 생존력이 유의하게($p<0.05$) 감소한 것으로 나타난다. ITGA5 처리군은 대조군과의 통계적인 차이가 나타나지 않았다.

- [0054] 도 4a의 (e)를 참조하면, 파킨슨병 환자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 세포외 기질 단백질을 2 μ g/ml 농도로 처리한 세포 증식 결과가 도시된다. RELN 처리군은 대조군보다 생존력이 유의하게($p<0.001$) 증가한 것으로 나타난다. 그러나, CD36 처리군은 대조군보다 생존력이 유의하게($p<0.01$) 감소한 것으로 나타나며, ITGA5 처리군도 대조군보다 생존력이 유의하게($p<0.05$) 감소한 것으로 나타난다.
- [0055] 이러한 결과는, 세포외 기질 관련 단백질인 RELN, CD36 및 ITGA5가 세포 증식에 관여한다는 것으로 나타난다. 특히, 세포외 기질 관련 단백질인 RELN은 파킨슨병 환자 및 정상 피험자의 중간엽 줄기세포에서 생존력을 증가시키는 것으로 나타난다. 이에, RELN에 의하여 세포의 생존력이 향상될 수 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0056] 도 4b는 세포외 기질에 관련된 단백질을 파킨슨병 환자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 처리하여 세포 노화를 측정된 결과를 도시한 것이다.
- [0057] 보다 구체적으로, 도 4b는 세포외 기질 관련 단백질인 RELN, CD36 및 ITGA5를 처리한 중간엽 줄기세포의 계대배양 8주기에 SA- β -Gal 염색 검정을 통하여 세포의 노화를 측정된 결과이다.
- [0058] 도 4b의 (a)를 참조하면, 파킨슨병 환자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 세포외 기질 단백질을 1 μ g/ml 농도로 처리한 뒤 계대배양 8주기에 세포 노화를 측정된 결과가 도시된다. 세포 노화 결과는 SA- β -Gal 발현 양성 세포 비율로 나타내었고, SA- β -Gal 발현 양성 세포 비율이 높을수록 세포가 노화된 것을 의미한다. RELN 처리군은 대조군보다 SA- β -Gal 발현 양성 세포가 유의하게($p<0.01$) 낮은 것으로 나타난다. CD36 처리군 및 ITGA5 처리군은 대조군과의 통계적인 차이가 나타나지 않았다.
- [0059] 도 4b의 (b)를 참조하면, 도 4b의 (a)에서의 SA- β -Gal 발현 양성 세포를 현미경으로 관측한 이미지가 도시된다.
- [0060] 도 4b의 (c)를 참조하면, 파킨슨병 환자의 지방세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포에 세포외 기질 단백질을 2 μ g/ml 농도로 처리한 뒤 계대배양 8주기에 세포 노화를 측정된 결과가 도시된다. RELN 처리군, CD36 처리군 및 ITGA5 처리군 모두에서 대조군보다 SA- β -Gal 발현 양성 세포가 유의하게($p<0.01$) 낮은 것으로 나타난다.
- [0061] 도 4b의 (d)를 참조하면, 도 4b의 (c)에서의 SA- β -Gal 발현 양성 세포를 현미경으로 관측한 이미지가 도시된다.
- [0062] 이러한 결과는, 세포외 기질 관련 단백질인 RELN, CD36 및 ITGA5가 세포 노화에 관여한다는 것으로 나타난다. 특히, RELN은 저농도인 1 μ g/ml에서도 파킨슨병 환자의 중간엽 줄기세포에서 노화를 억제시키는 것으로 나타난다. 이에, RELN, CD36 및 ITGA5에 의하여 세포의 노화가 억제될 수 있다는 것을 의미한다.
- [0063] 이상의 실시예 2의 결과로, 본 발명의 다양한 실시예에서 이용되는 세포외 기질 관련 단백질인 RELN, CD36 및 ITGA5가 세포의 증식 및 노화에 관여한다는 것으로 나타난다. 이에, 중간엽 줄기세포의 증식 및 노화 억제 능력이 저하되어 있는 파킨슨병 환자에서 RELN, CD36 및 ITGA5 단백질이 저하되어 있는 세포의 기능을 향상시킬 수 있다는 것을 의미할 수 있다. 특히, RELN은 저 농도인 1 μ g/ml에서도 유의한 차이를 나타낸 것으로 보아, 가장 효과적으로 세포의 생존력 및 노화 억제 능력을 향상시킬 수 있는 것으로 나타난다.
- [0064] **실시예 3: 세포외 기질 관련 단백질의 신경세포 보호 효과_중간엽 줄기세포**
- [0065] 이하에서는 도 5a 내지 5c를 참조하여, 본 발명의 다양한 실시예에 따른 파킨슨병 신경세포 모델에서 세포외 기질 관련 단백질의 신경세포 독성 물질에 대한 보호 효과를 설명한다.
- [0066] 도 5a 내지 5c는 세포 독성물질에 의하여 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델에 세포외 기질에 관련된 단백질을 처리한 결과를 도시한 것이다.
- [0067] 보다 구체적으로, 도 5a의 (a)를 참조하면, 신경세포 모델에 세포외 기질 관련 단백질인 RELN을 처리하고, 세포 독성물질을 이용해 파킨슨병을 유도한 신경세포배양 계획이 도시된다. 먼저, 신경세포 모델인 인간 유래 SHSY5Y 세포를 파종(seeding)한다. 그 다음, 파종 후 1일째에 세포외 기질 관련 단백질인 RELN을 농도 별로 처리하고, 20분 뒤에 MPP⁺(1-methyl-4-phenylpyridinium)을 2.5mM의 농도로 처리하여 신경세포에 파킨슨 병을 유도한다. 이때, MPP⁺(1-methyl-4-phenylpyridinium)는 신경세포 독성 물질로 신경세포의 손상을 유발하여 신경세포를 파킨슨병 모델로 만들 수 있다. 그 다음, 24시간 경과 후 세포의 생존력을 측정한다.
- [0068] 도 5a의 (b)를 참조하면, 세포 독성물질에 의하여 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델에서 전체길이 (full length)의 RELN 단백질을 농도 별로 처리한 세포 생존력 결과가 도시된다. 전체길이 (full length)의 RELN 단

백질에서는 2 내지 10 nM의 농도에서 대조군보다 세포 생존력이 유의하게 높은 것으로 나타나며, 5nM의 농도에서 가장 높은 생존율로 나타난다. 이에, 전체길이 (full length)의 RELN 단백질을 4 내지 7 nM의 농도로 처리하였을 때, 세포의 생존력을 개선하는 것에 보다 효과적일 수 있다.

[0069] 도 5a의 (c)를 참조하면, 세포 독성물질에 의하여 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델에서 c-term의 RELN 단백질을 농도 별로 처리한 세포 생존력 결과가 도시된다. c-term의 RELN 단백질에서는 1 μ g/ml(=2.577nM)의 농도에서만 대조군보다 세포 생존력이 높은 것으로 나타나며, 2 내지 5 μ g/ml의 농도에서는 대조군보다 세포 생존력이 낮은 것으로 나타난다. 이에, c-term의 RELN 단백질에서는 0.5 내지 1.5 μ g/ml의 농도를 처리하였을 때, 세포의 생존력을 개선하는 것에 보다 효과적일 수 있다.

[0070] 이러한 도 5a의 결과로, 다양한 실시예에서 이용되는 RELN 단백질이 파킨슨병 신경세포의 사멸에 대한 보호에 관여한다는 것으로 나타난다. 즉, 파킨슨병 환자의 신경세포가 RELN 단백질을 통하여 세포의 사멸로부터 세포를 보호하는 능력이 향상된다는 것을 의미할 수 있다.

[0071] 또한, 도 5b의 (a)를 참조하면, 신경세포 모델에 세포의 기질 관련 단백질인 CD36 및 ITGA5를 처리하고, 세포 독성물질을 이용해 파킨슨 병을 유도한 신경세포배양 계획이 도시된다. 먼저, 신경세포 모델인 인간 유래 SHSY5Y 세포를 파종한다. 그 다음, 파종 후 1일째에 세포의 기질 관련 단백질인 CD36 및 ITGA5를 각각 농도 별로 처리하고, 20분 뒤에 MPP^+ (1-methyl-4-phenylpyridinium)을 2.5mM의 농도로 처리하여 신경세포에 파킨슨 병을 유도한다. 그 다음, 24시간 경과 후 세포의 생존력을 측정한다.

[0072] 도 5b의 (b)를 참조하면, 세포 독성 물질에 의하여 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델에서 CD36 단백질을 농도 별로 처리한 세포 생존력 결과가 도시된다. 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델은 CD36 단백질의 농도가 1 내지 5 μ g/ml일때 대조군보다 세포 생존력이 높은 것으로 나타나며, 1 μ g/ml의 농도에서 가장 높은 생존율로 나타난다. 이에, CD36 단백질을 0.5 내지 1.5 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때, 세포의 생존력을 개선하는 것에 보다 효과적일 수 있다.

[0073] 도 5b의 (c)를 참조하면, 세포 독성물질에 의하여 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델에서 ITGA5 단백질을 농도 별로 처리한 세포 생존력 결과가 도시된다. 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델은 ITGA5 단백질의 농도가 1 내지 5 μ g/ml의 농도에서 대조군보다 세포 생존력이 높은 것으로 나타나며, 5 μ g/ml까지 농도가 증가할수록 생존율도 증가하는 것으로 나타난다. 이에, ITGA5 단백질은 4 내지 6 μ g/ml의 농도로 처리하였을 때, 세포의 생존력을 개선하는 것에 보다 효과적일 수 있다.

[0074] 이러한 도 5b의 결과로, 세포의 기질 관련 단백질인 CD36 및 ITGA5이 파킨슨병 신경세포의 사멸에 대한 보호에 관여한다는 것으로 나타난다. 즉, 파킨슨병 환자의 신경세포가 CD36 및 ITGA5 단백질을 통하여 세포의 사멸로부터 세포를 보호하는 능력이 향상된다는 것을 의미할 수 있다.

[0075] 또한, 도 5c의 (a)를 참조하면, 신경세포 모델에 세포의 기질 관련 단백질인 RELN, CD36 및 ITGA5를 조합하여 처리하고, 세포 독성물질을 이용해 파킨슨 병을 유도한 신경세포배양 계획이 도시된다. 먼저, 신경세포 모델인 인간 유래 SHSY5Y 세포를 파종한다. 그 다음, 파종 후 1일째에 세포의 기질 관련 단백질인 RELN과 함께 CD36 및 ITGA5 중 하나의 단백질을 더 처리하고, 이때 세포의 기질 관련 단백질인 RELN, CD36 및 ITGA5의 농도는 1 μ g/ml로 처리한다. 그 다음, 20분 뒤에 MPP^+ (1-methyl-4-phenylpyridinium)을 2.5mM의 농도로 처리하여 신경세포에 파킨슨 병을 유도한다. 그 다음, 24시간 경과 후 세포의 생존력을 측정한다.

[0076] 도 5c의 (b)를 참조하면, 세포 독성 물질에 의하여 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델에서 세포의 기질 단백질인 RELN과 함께 CD36 및 ITGA5 중 하나의 단백질 더 처리한 세포 생존력 결과가 도시된다. 파킨슨병이 유도된 신경세포 모델은 세포의 기질 단백질이 처리되었을 때 대조군보다 세포 생존력이 높은 것으로 나타나며, RELN을 단독으로 처리하였을 때 가장 높은 생존율로 나타난다. 이에, RELN 단백질은 세포의 생존력을 개선하는 것에 보다 효과적일 수 있다.

[0077] 이러한 도 5c의 결과로, 세포의 기질 관련 단백질인 RELN, CD36 및 ITGA5의 조합도 파킨슨병 신경세포의 사멸에 대한 보호에 관여한다는 것으로 나타난다. 즉, 파킨슨병 환자의 신경세포가 RELN, CD36 및 ITGA5 단백질 조합을 통하여 세포의 사멸로부터 세포를 보호하는 능력이 향상된다는 것을 의미할 수 있다.

[0078] 이에, 세포의 기질 관련 단백질을 함유하는 본 발명의 약제학적 조성물은, 퇴행성 뇌신경 질환에 적용되었을 때 신경세포 및 신경세포로 분화 가능한 중간엽 줄기세포에 대하여 세포 증식 및 노화 억제에 우수한 효과를 제공할 수 있다. 그 결과, 본 발명의 약제학적 조성물은, 퇴행성 뇌신경 질환 치료시 보다 나은 치료 예후를 제공

할 수 있는 효과가 있다.

[0079] 이에, 본 발명은, 킬린을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제 공함으로써, 종래의 증상을 경감시키는 약물의 한계점을 극복할 수 있다. 예를 들어, 종래의 약물은 원인 치료 가 아닌 증상을 완화하는 역할을 하였다. 그러나, 본 발명의 약제학적 조성물은 신경세포 및 신경세포로 분화 가능한 중간엽 줄기세포를 증식을 향상시키고, 세포의 노화를 억제시킴으로써 퇴행성 뇌신경 질환의 원인에 대 하여 치료 효과 및 예방 효과를 갖을 수 있다.

[0080] 본 발명의 약제학적 조성물은, 전술한바와 같이 퇴행성 뇌신경 질환인 파킨슨병, 치매 및 헌팅턴병 뿐만 아니라 뇌졸중, 뇌성마비, 허혈성 뇌손상, 외상성 뇌손상 및 섬망과 같은 다양한 뇌신경 질환 치료에 적용될 수 있다.

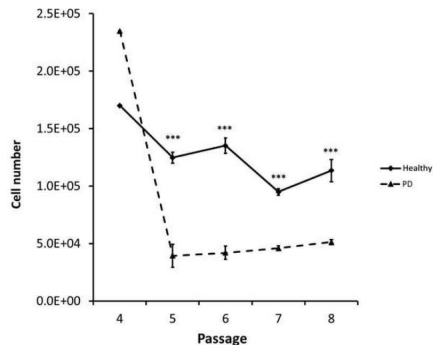
[0081] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자 가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적 으로 실 시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.

[0082] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실 시예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범 위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위 는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

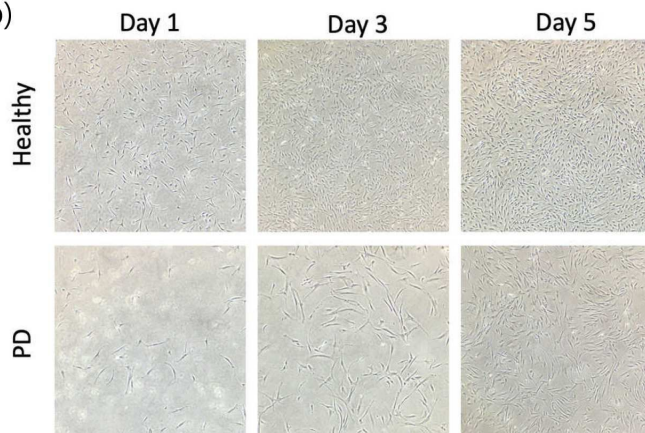
도면

도면1a

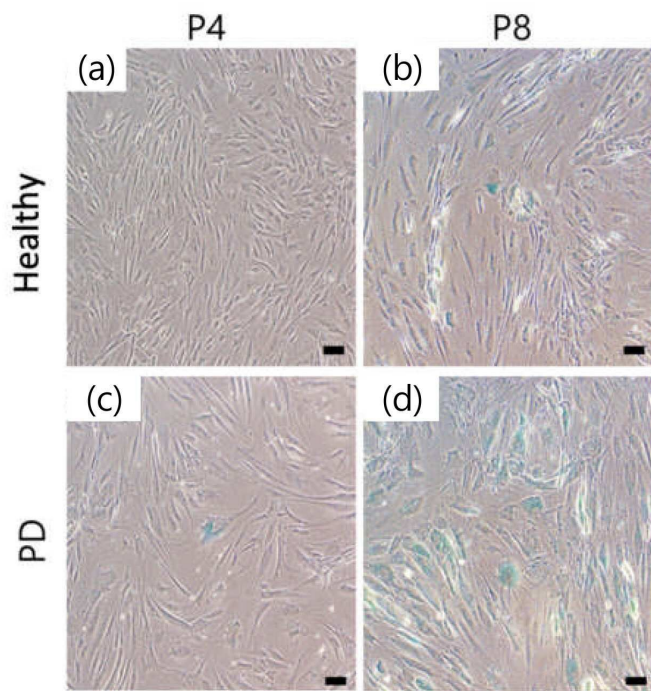
(a)



(b)



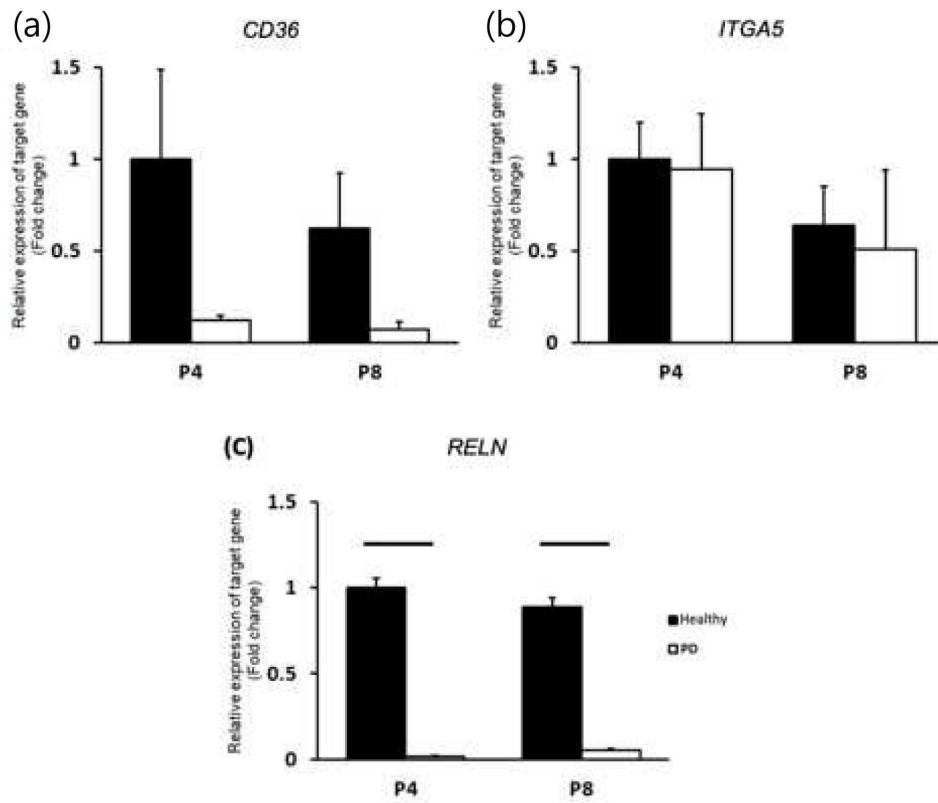
도면1b



도면2a

KEGG pathway	Count	%	p	Genes
ECM-receptor interaction	10	0.120	0.007	CD36, ITGA5, LAMA5, ITGA8, COL6A3, COL6A2, ITGA1, DAG1, RELN, COL5A3
P53 signaling pathway	8	0.096	0.021	STEAP3, ZMAT3, CD82, BAX, SHISA5, MDM2, CCNG2, GADD45A
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	8	0.096	0.037	ITGA5, ITGA8, ITGA1, DAG1, GJA1, CACNB3, TCF7L2, TCF7L1
Focal adhesion	15	0.181	0.038	CAV1, TLN1, ITGA1, COL5A3, CAPN2, MYL9, DOCK1, LAMA5, ITGA5, ITGA8, COL6A3, COL6A2, PDGFRB, RELN, ZYX
Endocytosis	14	0.168	0.041	GIT1, ARFGAP1, CHMP2A, PLD1, ERBB3, RUFY1, ASAP3, EPS15, FAM125A, AP2A1, VPS24, VPS4A, MDM2, VPS28

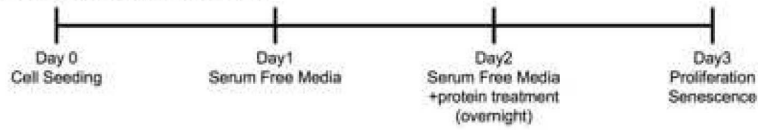
도면3b



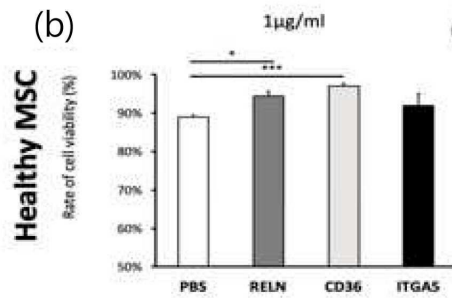
도면4a

(a)

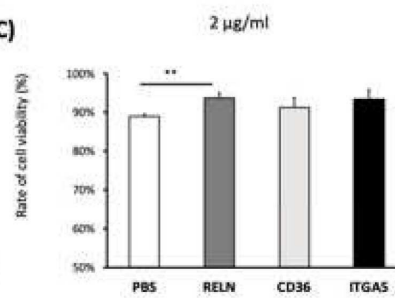
Experimental Schedule



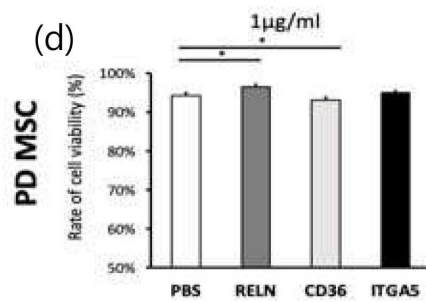
(b)



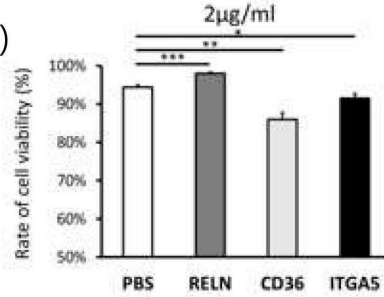
(c)



(d)

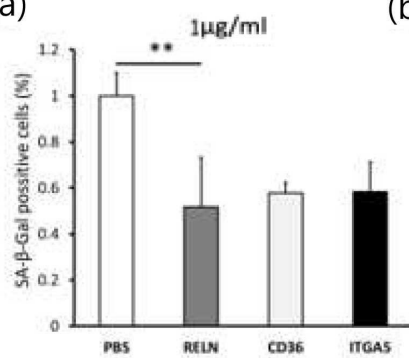


(e)

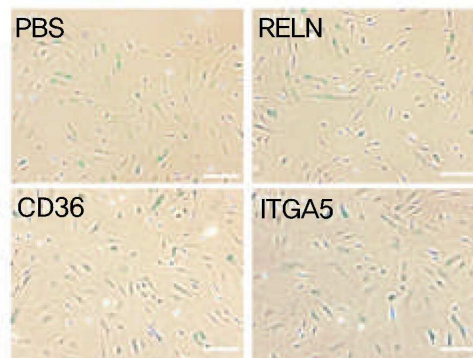


도면4b

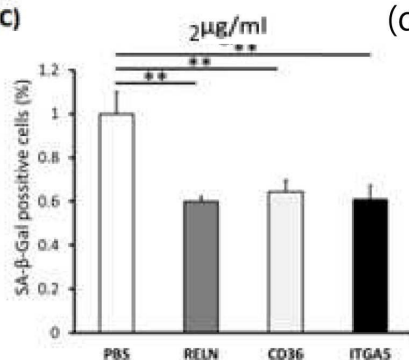
(a)



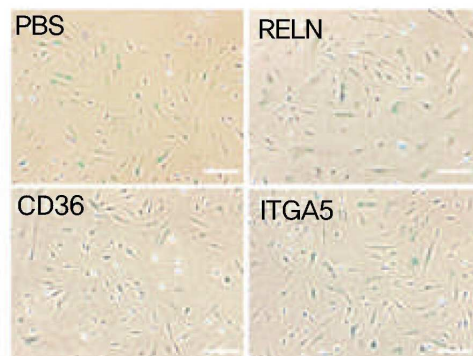
(b)



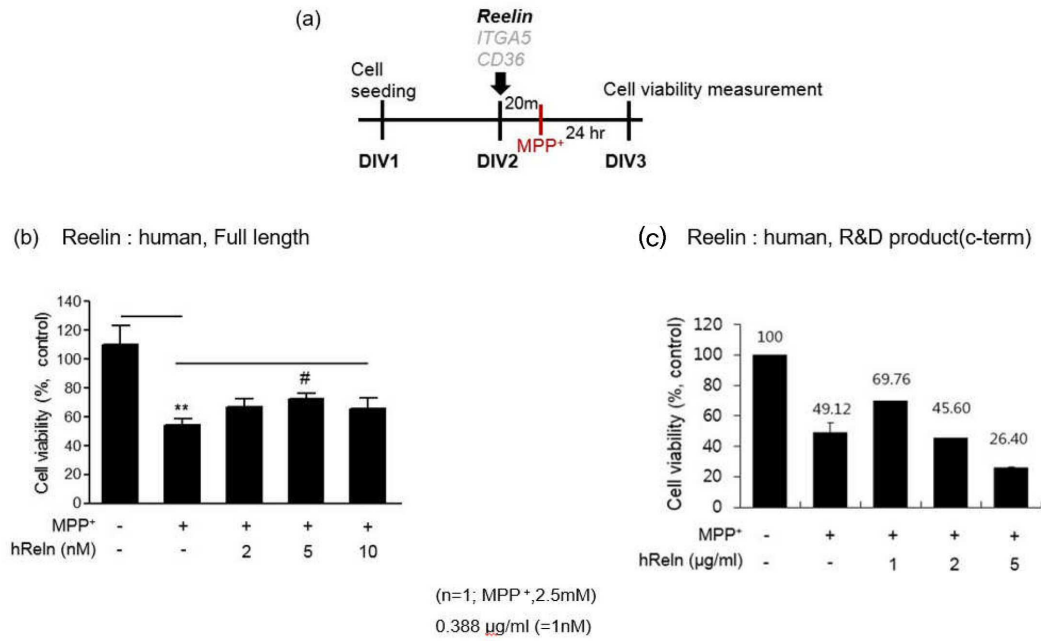
(c)



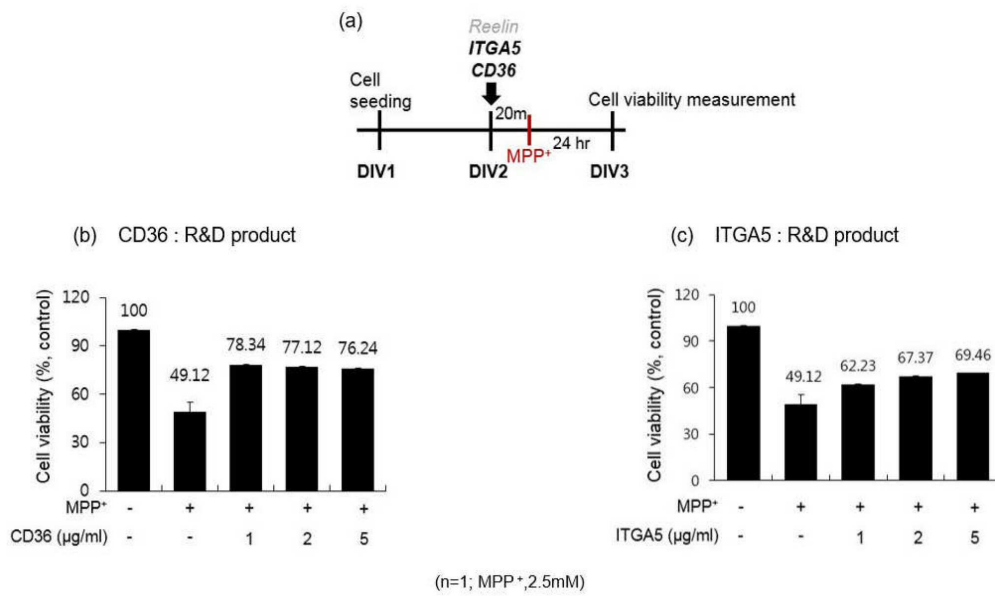
(d)



도면5a

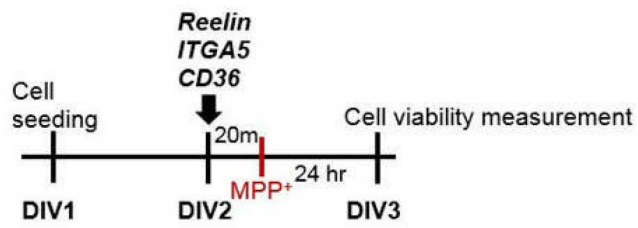


도면5b

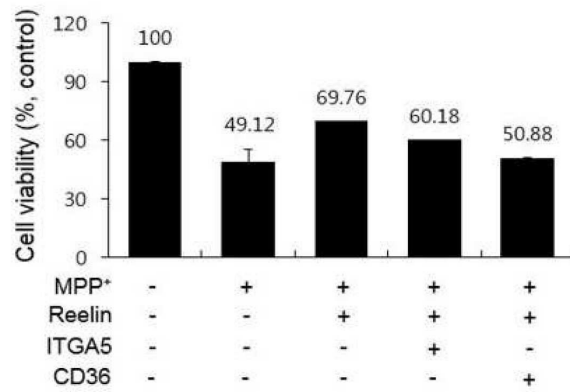


도면5c

(a)



(b)



(n=1; MPP⁺, 2.5mM(n=3))

R&D Product [Con.] = 1 (μg/ml)