



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년03월07일

(11) 등록번호 10-2371269

(24) 등록일자 2022년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A61K 31/4375 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/24 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/50 (2017.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/179 (2013.01)

A61K 31/4375 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0030038

(22) 출원일자 2020년03월11일

심사청구일자 2020년03월11일

(65) 공개번호 10-2021-0114661

(43) 공개일자 2021년09월24일

(56) 선행기술조사문헌

JP2019184237 A*

KR1020180120476 A*

KR1020030094395 A

KR1020060097000 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김원주

서울특별시 강남구 언주로30길 57, 에프동 2106호(도곡동, 타워팰리스)

정경훈

경기도 고양시 덕양구 덕수천2로 150, 207동 1205호(동산동, 이편한세상시티2차)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 6 항

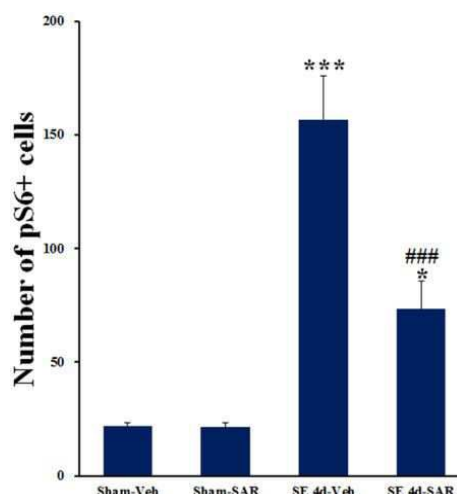
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 VEGFR-3 발현 조절을 통한 mTOR 관련 질환의 예방 또는 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 mTOR 신호결핍 관련질환 및 mTOR(mammalian target of rapamycin) 매개 질환의 예방 또는 치료용 조성물과 이들의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명은 VEGFR-3의 발현 조절이 mTOR 신호 경로의 활성 조절로 이어진다는 새로운 발견에 기반하여, mTOR의 과도한 활성 또는 활성 결핍을 원인으로 하는 다양한 질환에 대한 효율적인 치료 타겟을 제공한다. 본 발명은 특히 VEGFR-3 활성화를 통해 뇌전증에서의 과흥분상태를 차단하고 신경을 보호함으로써, 난치성 질환인 중첩성 뇌전증의 근원적인 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4b



(52) CPC특허분류

A61P 19/00 (2018.01)
A61P 21/00 (2018.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 25/24 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
G01N 33/5058 (2013.01)
G01N 33/6872 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2018R1D1A1B07046708
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인기초연구지원사업
연구과제명	뇌전증지속상태 동안 chloride cotransporter 조절의 효과 규명
기 여 율	60/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2018R1D1A1B07047059
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학 개인기초연구지원사업-기본연구
연구과제명	해마 과립세포분산화에서 With No lysine Kinase 3 (WNK3)의 역할 규명에 대한 연구
기 여 율	40/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

VEGFR-3 단백질 또는 VEGFR-3 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는 mTOR 신호 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 mTOR 신호결핍 관련 질환은 뇌전증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

VEGFR-3 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, VEGFR-3 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드의 발현을 억제하는 핵산 분자 및 SAR131675로 구성된 군으로부터 선택되는 VEGFR-3 단백질의 억제제를 유효성분으로 포함하는 mTOR 신호 과다 질환의 예방 또는 치료용 조성물로서, 상기 mTOR 신호 과다 질환은 성상교세포증(actrocytosis)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 4 항에 있어서, 상기 성상교세포증(actrocytosis)은 신경교종(glioma), 교아종(glioblastoma), 성상세포종(astrocytoma), 뇌졸중(stroke), 외상성 뇌손상(traumatic brain injury) 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 mTOR 신호 활성화제의 스크리닝 방법:

- (a) VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- (2) 상기 시료 내 VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,

상기 VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 증가한 경우, 상기 시험물질은 mTOR

신호 활성화제로 판정한다.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 mTOR 신호 억제제의 스크리닝 방법:

- (a) VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
 - (2) 상기 시료 내 VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,
- 상기 VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험물질은 mTOR 신호 억제제로 판정한다.

청구항 12

제 10 항 또는 제 11 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 성상교세포(astrocyte)를 포함하는 생물학적 시료인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 VEGFR-3의 발현 조절이 mTOR(mammalian target of rapamycin) 신호 경로의 활성을 조절한다는 새로운 발견에 기반하여, VEGFR-3의 억제제 또는 활성화제를 이용하여 mTOR 관련 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 뇌전증은 기질적 병변 또는 기능적 장애로 인하여 뇌신경 세포의 발작적인 방전으로 간헐적인 신경계의 장애를 일으키고, 신경증상, 의식상실, 경련, 감각장애 등의 증상을 나타내는 질환이다. 알츠하이머병(Alzheimer) 및 뇌졸중(Stroke)에 이어 세 번째로 흔한 신경계 질환으로, 전 세계 인구의 약 0.5 - 2%가 뇌전증을 앓고 있다. 또한, 전 세계적으로는 매년 10만명 당 45명 정도로 새로운 환자가 발생하고 있고, 우리나라의 경우 약 30-40만 명의 뇌전증 환자가 있는 것으로 추정되고 있다. 뇌전증 환자의 연령 분포를 살펴보면, 전체 뇌전증의 70%가 소아 청소년 연령에서 시작되고, 특히 유아기에 발병률이 높은 것으로 알려져 있다. 또한, 발병률과 유병률은 생후 1년 이내에 가장 높았다가 급격히 낮아지고, 60세 이상의 노년층에서 다시 급격히 증가하는 U자 형태를 보이며, 일생 동안 발작을 경험하는 유병률은 10 - 15%에 이른다.

[0004] 뇌전증은 뇌전증 발작(epileptic seizure)이 반복적으로 발생하는 만성화된 질환으로서, 그 원인이 매우 다양하여 정확한 병인은 밝혀져 있지 않다. 다만, 최근 신경영상검사 기술의 발달에 따라 과거에는 관찰할 수 없었던 뇌의 미세한 병리적 변화들을 관찰할 수 있게 되면서 뇌전증의 원인에 대한 규명이 점차 확대되고 있다. 2012년 대한뇌전증학회 발간 뇌전증 역학 조사서에 의하면, 뇌전증 환자의 2/3 이상이 특별한 원인이 없는 특발성이나 잠재성이고, 나머지 경우가 원인을 찾을 수 있는 중후성 원인에 해당된다. 즉, 뇌졸중, 선천기형, 두부 외상, 뇌염, 뇌종양, 퇴행성 뇌병증, 분만손상, 중추신경계 발달장애 및 유전적 성향과 같은 신경 병리적 변화나 뇌손상의 과거 병력이 있는 경우, 뇌전증이 유발될 수 있다고 알려져 있다.

[0005] 한편 뇌전증의 치료는 크게 약물치료와 약물외 치료, 즉 수술이나 케톤식이요법, 미주신경자극술 등으로 분류할 수 있다. 다만, 약물외 치료는 약물에 저항성을 보이는 환자에 대해서만 시행되고 있는 바, 뇌전증 치료를 위한 주요한 방법으로 약물치료가 이용되어왔다. 종래의 약물들로 페니토인(Phenytoin: Dilantin®발프로에이트(Valproate: Orfil®Depakine®Depakote®카바마제핀(Carbamazepine: Tegretol®페노바비탈(Phenobarbital: Luminal®에토숙시마이드(Ethosuximide: Zarontin®등이 있으며, 최근에는 토피라메이트(Topiramate: topamax®라모트리진(Lamotrigine: Lamictal®비가바트린(Vigabatrin: Sabril®옥스카바제핀(Oxcarbazepine: Trileptal®등이 개발되어 상용화되어 있다.

[0006] 그러나, 이러한 약물 치료에도 불구하고 뇌전증 환자의 30% 이상은 여러 가지 작용 기전의 약물을 사용해도 발작이 조절되지 않는 약제 불응성 뇌전증(drug refractory 간질)에 해당되며, 일부 약물들은 면역 과민 반응에

의한 난치성 피부 발진, 약물에 의한 위장 자극, 및 어지럼증 등과 같은 부작용을 나타내고 있고, 종래 약물 사용에 의한 정신장애 유발 및 자살 등의 사례 등이 보고되어 있는 바, 효과적인 뇌전증 치료에 어려움을 겪고 있는 실정이다.

- [0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제10-2013-0065646호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 뇌전증을 비롯하여 mTOR 신호 경로의 활성화 부족을 원인으로 하는 다양한 질환에 대한 효과적이고 근원적인 치료 조성물을 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 해마 내 성상교세포에서의 VEGFR-3의 발현과 mTOR 신호 활성화가 밀접하게 관련되어 있으며, VEGFR-3이 발현 또는 활성을 증가시킬 경우 GLT-1(glutamate transporter 1)의 발현이 증가하고 mTOR 신호 경로가 활성화되면서 mTOR 불활성화를 원인으로 하는 질환의 병인을 효과적으로 제거한다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 mTOR 신호 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 mTOR 매개 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 VEGFR-3 단백질, VEGFR-3 단백질을 인코딩하는 핵산 분자 및 VEGFR-3의 활성화제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 mTOR 신호 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명자들은 뇌전증을 비롯하여 mTOR 신호 경로의 활성화 부족을 원인으로 하는 다양한 질환에 대한 효과적이고 근원적인 치료 조성물을 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 해마 내 성상교세포에서의 VEGFR-3의 발현과 mTOR 신호 활성화가 밀접하게 관련되어 있으며, VEGFR-3이 발현 또는 활성을 증가시킬 경우 GLT-1(glutamate transporter 1)의 발현이 증가하고 mTOR 신호 경로가 활성화되면서 mTOR 불활성화를 원인으로 하는 질환의 병인을 효과적으로 제거한다는 사실을 발견하였다.
- [0019] mTOR(mammalian target of rapamycin)는 PIKK(PI3K-related kinase) 패밀리에 속하는 세린(serine)/트레오닌(threonine) 인산화효소로 mTOR C1(mTOR Complex 1)과 mTOR C2(mTOR Complex 2)라고 불리는 2개의 단백질 복합체를 이루며, 성장인자, 영양, 스트레스 자극 등 외부환경의 신호에 따라 진행세포의 세포의 성장과 증식, 자가포식(autophagy), 단백질 합성 등의 신진대사를 조절한다. 본 명세서에서 용어 “mTOR 신호 결핍 관련 질환”은 이러한 포괄적인 세포 대사과정을 광범위하게 조절하는 mTOR의 신호 경로가 정상적으로 작동하지 못함을 원인으로 하는 일련의 질환을 포괄하는 의미이다.
- [0020] 본 발명에 따르면, VEGFR-3로 매개된 mTOR 활성화에 의해 성상교세포에서의 GLT-1의 발현이 증가되면서 뇌전증에서의 과흥분 상태(hyperexcitability)가 차단되고 신경보호 효과가 발휘되는 것으로 확인되었다. 또한, mTOR의 활성화를 통해 BMP 유발 근비대를 촉진시키고 근위축을 예방할 수 있고, 골격근의 단백질 합성을 촉진하는 것으로 보고되었다(Gazzerro E, et al., *Rev Endocr Metab Disord* 2006; 7:51-65). 아울러, 우울증을 비롯한 기분장애에서 mTOR 신호전달의 감소가 관찰되었고, mTOR 신호전달은 시냅스의 신호전달(neurotransmission)과 가소성을 일으키며 우울증 동물모델에 mTOR의 발현을 증가시킴으로써 항우울 효과가 발휘되는 것이 관찰되었다

(Yang C, Hu YM, et al., *Ups J Med Sci* 2013;118:3-8). 이와 더불어 mTOR 신호전달은 연골세포에서 성장에 필요한 인자의 합성을 유도하여 사지 골격 성장을 촉진시키고, mTOR 신호 결핍에 의해 팔다리 중간엽 세포(limb mesenchymal cells) 성장 저해 및 연골형성에 관련된 전사 인자의 발현을 억제하여 골격 발달 장애를 유발시킬 수 있다고 보고되었다(Jiang M, Fu X, et al., *J Cell Biochem.* 2017;118(4):748-753).

- [0021] 이에, 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 mTOR 신호 결핍 관련 질환은 뇌전증, 근위축증, 우울증 및 골질환으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 “골질환”은 병리학적 또는 물리적인 원인에 의해 골 또는 연골 조직의 양적인 소실로 이어지는 골 또는 연골 조직의 변성 또는 손상이 발생된 모든 질환을 의미하며, 예를 들어 골다공증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 암세포의 골전이로 인한 골손상, 무형성 골질환, 대사성 골질환 및 퇴행성 관절염을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 VEGFR-3 단백질의 억제제를 유효성분으로 포함하는 mTOR 매개 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 “억제제”는 타겟 단백질의 활성 또는 발현의 저하를 야기시키는 물질을 의미하며, 이에 의해 타겟 단백질의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, 타겟 단백질의 생물학적 기능이 유의하게 저하될 수 있을 정도로 활성 또는 발현을 저하시키는 물질을 의미한다.
- [0026] VEGFR-3 단백질의 억제제는 예를 들어 당업계에서 이미 그 코딩 뉴클레오타이드 서열이 공지된 VEGFR-3의 발현을 유전자 수준에서 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 타겟 유전자를 인식하는 가이드 RNA를 포함하는 CRISPR 시스템과, VEGFR-3를 단백질 수준에서 억제하는 항체 또는 앵타머 뿐 아니라, 이들의 활성을 억제하는 화합물, 펩타이드 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되지 않고 당업계에 공지된 모든 유전자 및 단백질 수준의 억제수단이 사용될 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA)”는 인 비보 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지면서 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성되며, 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization)를 통해 이중가닥을 형성하여 타겟 유전자의 발현을 조절한다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 mRNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다.

안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당솔포네이 등으로 변형될 수 있다.

- [0033] 본 명세서에서 용어 “gRNA(guideRNA)”는 타겟 유전자를 인식하여 핵산분해효소(nuclease)를 유도함으로써 인식된 분위를 특이적으로 절단하는 유전자 편집 시스템에 사용되는 RNA 분자를 의미한다. 이러한 유전자 편집 시스템에는 대표적으로 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템이 있다.
- [0034] 본 발명에 따르면, 본 발명의 발현 억제제는 상기 유전자들이 코딩하는 단백질의 활성을 저해하는 특이적 항체일 수 있다. 목적 단백질을 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [0035] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 제조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al., *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984에 상세하게 기재되어 있다.
- [0036] 본 발명은 항체 대신 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용하여 이의 활성을 억제할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0038] 본 명세서에서 용어 “mTOR 매개 질환”은 mTOR 신호 경로의 과활성화를 원인으로 하는 일련의 질환을 포괄하는 의미이다.
- [0039] 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명자들은 VEGFR-3의 선택적 억제제를 투여할 경우 mTOR 경로가 억제되면서 경우 GLT-1 발현 및 성장교세포의 반응성을 저해됨을 발견하였다.
- [0040] 한편, 다수의 암환자에서 mTOR 경로가 과활성되어있음이 관찰되었으며, 주요 종양억제 유전자인 TP53과 LKB1는 mTORC1의 상위 조절자 인TSC1과 TSC2를 억제하는 것으로 나타났을 뿐 아니라 mTOR 신호는 또한 세포사멸을 억제하면서 포도당 흡수 및해당작용과 같은 증식과정을 유도하는 Akt를 활성화시킴으로써 종양 형성 과정에 기여한다. 이에, VEGFR-3의 억제를 통한 mTOR의 억제는 유의한 항암 타겟이 될 수 있다.
- [0041] 아울러, mTOR 경로는 지질대사의 동화작용(anabolic pathway)과 이화작용(catabolic pathway)의 중심 기전으로서, mTOR의 과도한 활성화는 비만, 인슐린 저항성 등의 대사작용의 이상을 초래하는 것으로 보고되었다(Zoncu R, et al., *Molecular Cell Biology* 2011;12:21-35). 또한 뉴런에서 mTOR는 액손의 성장과 수상돌기의 형성을 통해 시냅스 연결에 기여를 하는데, mTOR 신호가 과도하게 증가하면 기억 저장 능력의 저하를 가져오고, 다양한 신경퇴행성 질환들의 진행을 야기한다(Bove J, et al., *NATURE REVIEWS* 2011;12:437-52).
- [0042] 한편, 라파마이신을 비롯한 mTOR의 억제제들은 성장 인자에 의해 유도되는 T세포의 증식을 억제함으로써 강한 면역억제 기능을 가지며, 이에 mTOR의 억제는 과도하거나 원치 않는 면역반응을 원인으로 하는 다양한 염증성 질환 또는 자가면역질환의 치료 타겟이 될 수 있다.
- [0043] 따라서, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 mTOR 매개 질환은 암, 신경퇴행성 질환(Neurodegenerative disease), 대사질환(metabolic disorder), 염증성 질환 및 성장교세포증(actrocytosis)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0044] 보다 구체적으로는, 상기 암은 신장암, 유방암, 폐암, 위암, 방광암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 림프종, 백혈병 및 골수형성이상증후군(myelodysplastic syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0045] 보다 구체적으로는, 상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측삭 경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis), 중증 근

무력증(myasthenia gravis) 및 피크병(Pick's disease)으로 구성된 군으로부터 선택된다.

- [0046] 보다 구체적으로는, 상기 대사질환은 비만, 당뇨, 이상지방혈증(dyslipidemia), 지방간 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0047] 본 명세서에서 용어 “대사질환”은 신진대사 이상을 원인으로 발생하는 각종 심혈관 질환과 제2형 당뇨병의 위험 요인들이 서로 군집을 이루는 현상을 한 가지 질환군으로 개념화시킨 것으로 인슐린 저항성 및 이와 관련된 복잡하고 다양한 여러 대사이상과 임상 양상을 모두 포괄하는 개념이다.
- [0048] 본 명세서에서 용어 “비만(obesity)”은 장기간에 걸쳐 에너지 섭취량이 에너지 소비량을 초과하여 잉여 에너지가 지방으로 저장됨으로써 체내에 지방조직이 과다해지는 상태를 의미한다. 통상 체질량지수(Body mass index: 체중(kg)/[신장(m)]²)가 25 이상이면 임상적으로 비만으로 정의된다.
- [0049] 본 명세서에서 용어 “당뇨”는 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방되는 당뇨는 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β -세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다.
- [0050] 본 명세서에서 용어 “이상지방혈증(dyslipidemia)”은 혈액 내의 지방농도 수치가 정상범위 밖에 있는 병적 상태(pathologic condition)를 의미하며, 예를 들어 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 저-HDL-콜레스테롤혈증 및 고-LDL-콜레스테롤혈증 외에도 지단백의 대사 이상을 원인으로 하는 비정상적 지질상태를 모두 포함한다.
- [0051] 본 명세서에서 용어 “지방간”은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.
- [0052] 본 명세서에서 용어 “인슐린 저항성”은 혈당을 낮추는 인슐린의 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 상태를 의미한다. 인슐린 저항성이 높을 경우, 인체는 너무 많은 인슐린을 만들어 내고 이로 인해 고혈압이나 이상지방혈증은 물론 심장병, 당뇨병 등까지 초래할 수 있다. 특히 제2형 당뇨병에서는 근육과 지방조직에서 인슐린의 증가를 알아채지 못하여, 인슐린의 작용이 일어나지 않는다. 용어 “인슐린 저항성 증후군”은 상기 인슐린 저항성에 의하여 유발된 질환을 총칭하는 개념으로 인슐린 작용에 대한 세포의 저항성, 고인슐린혈증 및 초저밀도지단백(very low density lipoprotein, VLDL)과 중성지방의 증가, 고밀도지단백(high density lipoprotein, HDL)의 감소 및 고혈압 등을 특징으로 하는 질환을 의미하며, 심혈관질환과 제2형 당뇨병의 위험인자로 인식되고 있는 개념이다(Reaven GM, Diabetes, 37: 1595-607, (1988)).
- [0053] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 이상지방혈증은 고지혈증이다.
- [0054] 본 명세서에서 사용되는 용어 “고지혈증”은 중성지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 높은 지질농도가 유지되어 유발되는 질환을 의미한다. 보다 구체적으로 고지혈증이란 혈액내의 중성지방, LDL 콜레스테롤, 인지질 및 유리 지방산 등의 지질 성분이 증가된 상태로 발생빈도가 높은 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증을 포함한다.
- [0055] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 지방간은 비알콜성 지방간이다.
- [0056] 본 명세서에서 용어 “비알콜성 지방간(Non-alcoholic fatty liver, NAFL)”은 알코올 흡수와 무관하게 간세포에 과도한 양의 지방이 축적되는 질환을 의미하고, 여기에는 단순지방간(steatosis)과 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)이 포함된다. 단순 지방간은 임상적으로 예후가 양호한 편이나, 염증 혹은 섬유화를 동반하는 NASH는 진행성 간질환으로 간경변 또는 간암을 유발하는 전구질환으로 인지되고 있다. 비만과 인슐린저항성은 대표적인 비알콜성 지방간질환의 위험인자이다. 간섬유증 진행의 위험인자로는 가령, 비만(BMI>30), 혈중 간기능지표 비율(AST/ALT >1) 및 당뇨를 들 수 있고, 특히 C형 간염 보균자가 비알콜지방간일 경우 간암까지 진행될 수 있다. 비알콜성 지방간 환자의 69-100%는 비만환자이고, 비만환자의 20-40%는 비알콜성 지방간을 동반하며, 특히 유럽, 미국, 아시아의 비만아동의 10~77%가 비알콜성 지방간 병변을 보이는데, 이는 비알콜성 간질환의 가장 중요한 위험인자가 비만이기 때문이다.
- [0057] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 염증성 질환(또는 자가면역 질환)은 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환, 조르젠신

드롬(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon), 베첷병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease), 원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis), 원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis), 궤양성대장염(ulcerative colitis) 또는 크론병(Crohn's disease)이다.

- [0058] 본 명세서에서 용어 “성상교세포증(astrocytosis)”은 중추신경계의 외상, 종양에 의한 조직 손상, 감염, 허혈, 뇌졸중, 신경퇴행성 질환 등에서 인접한 뉴런의 손상을 원인으로 하여 성상교세포(astrocyte)의 비정상적인 증가 또는 활성화가 야기되는 모든 병적 상태를 포괄하는 의미이다. 다양한 원인에 의해 뇌 조직이 손상된 병변 부에서 활성화되거나 증식된 성상교세포는 뇌조직의 재생 과정에 일부 보호작용을 하기도 하지만, 손상 후 나타나는 성상교세포의 증가는 다양한 염증 물질을 분비하면서 재생 과정을 저해한다.
- [0059] 보다 구체적으로는, 상기 성상교세포증(astrocytosis)은 신경교종(glioma), 교아종(glioblastoma), 성상세포종(astrocytoma), 뇌졸중(stroke), 외상성 뇌손상(traumatic brain injury) 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis: ALS)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0060] 본 명세서에서 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0061] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 VEGFR-3의 활성 또는 발현량을 억제하거나 증가시키으로써 mTOR 신호경로를 조절, mTOR 활성이 결핍되거나 과도함으로써 발생하는 다양한 질환의 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0062] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0063] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0064] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0065] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0066] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0067] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 경구, 정맥, 피하 또는 복강 투여될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.
- [0069] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 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, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분

산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0070] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 mTOR 신호 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0071] (a) VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0072] (2) 상기 시료 내 VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,
- [0073] 상기 VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 증가한 경우, 상기 시험물질은 mTOR 신호 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.
- [0074] 본 발명에서 스크리닝된 조성물이 예방 또는 치료하고자 하는 mTOR 신호 결핍 관련 질환에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0075] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, VEGFR-3를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 VEGFR-3를 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 VEGFR-3의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 VEGFR-3의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 측정 결과, VEGFR-3의 발현량 또는 활성이 증가된 경우 상기 시험물질은 mTOR 신호 결핍 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정될 수 있다.
- [0077] 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 증가”는 VEGFR-3에 의해 매개되는 mTOR 활성화가 측정 가능한 수준으로 증가될 정도로 VEGFR-3의 발현량 또는 VEGFR-3의 생체 내 고유한 기능이 증가하는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 증가한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 증가한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 증가한 상태를 의미할 수 있다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 mTOR 매개 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0080] (a) VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0081] (2) 상기 시료 내 VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,
- [0082] 상기 VEGFR-3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험물질은 mTOR 매개 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.
- [0083] 본 발명에서 스크리닝된 조성물이 예방 또는 치료하고자 하는 mTOR 매개 질환에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0084] 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 감소”는 VEGFR-3에 의해 매개되는 mTOR 활성화가 측정 가능한 수준으로 감소될 정도로 VEGFR-3의 발현량 또는 VEGFR-3의 생체 내 고유한 기능이 저해되는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 생물학적 시료는 정상교세포(astrocyte)를 포함하는 생물학적 시료이다.

발명의 효과

- [0087] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0088] (a) 본 발명은 mTOR 신호결핍 관련질환 및 mTOR(mammalian target of rapamycin) 매개 질환의 예방 또는 치료용 조성물과 이들의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0089] (b) 본 발명은 VEGFR-3의 발현 조절이 mTOR 신호 경로의 활성 조절로 이어진다는 새로운 발견에 기반하여, mTOR의 과도한 활성 또는 활성 결핍을 원인으로 하는 다양한 질환에 대한 효율적인 치료 타겟을 제공한다
- [0090] (c) 본 발명은 특히 VEGFR-3 활성화를 통해 뇌전증에서의 과흥분상태를 차단하고 신경을 보호함으로써, 난치성

질환인 중첩성 뇌전증의 근원적인 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0092]

도 1은 필로카르핀으로 뇌전증 중첩증 유발 후 해마에서 pS6와 VEGFR-3의 시간별 발현 양상을 보여주는 그림이다. 패널 A, E는 pS6 양성 뉴런-유사 세포가 정상 대조군 해마에서 발현됨을 보여준다. 패널 B, F는 pS6 양성 신호가 뇌전증 중첩증 유발 후 1일째 정상대조군과 비교하여 미세하게 증가하며, 비신경세포 형태의 pS6 양성 세포가 뇌전증 중첩증 유발 후 4일째 두드러지게 증가함을 보여주는 그림이다. 패널 D, H는 뇌전증 중첩증 7일째, pS6 양성반응이 이전 시간보다 감소함을 보여준다. 스케일바 = 100 μ m, 20 μ m. 도 1b는 pS6, S6, VEGFR-3, GFAP의 웨스턴 블롯 분석을 통해 단백질 발현 변화가 면역조직염색 결과와 동일하게 나타남을 확인한 결과를 보여준다. * P < 0.05, ** P < 0.01 및 *** P < 0.001 경우 대조군과 그룹과 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다(일원분산분석 후 Tukey's *post-hoc* 검정, 각 그룹 당 n = 5). 모든 값은 평균 \pm 표준오차로 표시하였다.

도 2는 뇌전증 중첩증 유발 후 VEGFR-3 양성인 반응성 성상교세포 내 pS6의 발현을 확인한 결과를 보여주는 그림이다. 패널 A-C는 정상대조군에서 대부분의 pS6 발현(녹색)은 GFAP 양성 성상교세포(청색)에서 확인되지 않지만, 일부 VEGFR-3 발현(적색)이 GFAP 양성 성상교세포 표면에서 관찰됨을 보여준다. 패널 D-F는 뇌전증 중첩증 유발 후 4일째에 활성화된 성상교세포 내 pS6 발현이 VEGFR-3 발현과 일치함을 확인한 그림이다. 스케일바 = 20 μ m

도 3은 mTOR 활성화를 억제함으로써 성상교세포의 VEGFR-3 발현이 감소함을 보여주는 그림이다. 도 3a는 VEGFR-3(적색)와 NeuN(녹색)의 이중 면역형광염색 결과로, 뇌전증 중첩증 유발 후 4일째 해마의 CA1 영역에서 성상교세포 VEGFR-3의 발현이 정상대조군보다 증가됨을 확인한 결과를 보여준다. 하지만, mTOR 억제제인 라파마이신이 투여된 뇌전증 동물 모델의 해마에서 VEGFR-3 발현 세포가 현저하게 감소하였다. 스케일바 = 50 μ m. 도 3b는 VEGFR-3 발현 세포 수에 대한 정량분석을 실시한 해마 서브피라미드 영역을 도식화한 그림이다. 도 3c는 표시된 해마 서브피라미드 영역에서 VEGFR-3 발현의 정량분석 결과를 보여주는 그림으로, 뇌전증 중첩증 유발에 의해 증가된 VEGFR-3 양성 성상교세포의 수가 라파마이신 투여에 의해 유의미하게 감소함을 확인하였다. 도 3d는 웨스턴 블롯을 통해 VEGFR-3 단백질 발현 양상을 분석한 결과로서, 뇌전증 중첩증 유발에 의해 증가된 VEGFR-3의 발현이 라파마이신 투여에 의해 다시 감소함을 보여준다. 도 3e는 VEGFR-3 단백질 밴드(β -액틴에 대해 정규화됨)에 밀도에 기반한 정량 분석 결과를 히스토그램으로 나타낸 그림으로, 역시 뇌전증 중첩증에 의한 VEGFR-3 발현의 증가가 라파마이신 투여에 의해 유의미하게 감소됨을 보여준다. * P < 0.05 및 *** P < 0.001인 경우 SE 4d-Veh 그룹과 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다(일원분산분석 후 Tukey's *post-hoc* 검정, 각 그룹 당 n = 5). 모든 값은 평균 \pm 표준오차로 표시하였다.

도 4는 뇌전증 중첩증 유발 후 해마에서의 VEGFR-3 발현을 억제하면 성상교세포에서의 mTOR 활성화가 감소됨을 보여주는 그림이다. 도 4a는 성상교세포 pS6 면역반응(적색)이 뇌전증 중첩증 유발 4일째 해마 CA1 영역에서 확연하게 증가하지만, VEGFR-3 억제제인 SAR131675 (SAR) 투여에 의해 pS6 발현이 감소를 보여준다. 스케일바 = 50 μ m. 도 4b는 정량분석 결과 뇌전증 중첩증에 의해 증가된 성상교세포 pS6 양성 세포수가 SAR 투여에 의해 유의미하게 감소함을 확인함을 보여주는 그림이다. 도 4c는 SAR 투여에 의한 pS6 발현 변화를 보여주는 웨스턴 블롯 분석 결과로서, 뇌전증 중첩증에 의해 증가된 pS6 단백질 발현이 SAR 투여에 의해 현저하게 억제됨을 확인하였다. * P < 0.05인 경우 SE 4d-Veh 그룹과 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다(일원분산분석 후 Tukey's *post-hoc* 검정, 각 그룹 당 n = 5). 모든 값은 평균 \pm 표준오차로 표시하였다.

도 5는 VEGFR-3의 억제가 뇌전증 중첩증 유발 후 해마에서 GLT-1 발현과 성상교세포의 활성화를 약화시킴을 보여주는 그림이다. 도 5a에서 보는 바와 같이, GLT-1 발현(적색)은 정상대조군 해마 CA1 영역의 파라미드 신경세포층에서 확인되는 반면, 뇌전증 중첩증 유발 후 4일째 해마에서 성상교세포 GLT-1 발현의 증가가 관찰되었다. 스케일바 = 50 μ m. 도 5b는 정량분석 결과 정상대조군과 비교하여 뇌전증 중첩증 유발 후 해마에서 GLT-1 발현 세포수가 두드러지게 증가하지만, SAR 투여로 인해 VEGFR-3가 억제되자 성상교세포의 GLT-1 발현이 감소함을 보여주는 그림이다. 도 5c SAR 투여가 GLT-1 단백질 발현을 감소시킴을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과를 나타낸다. 도 5d는 GFAP 양성 성상교세포(녹색)가 필로카르핀으로 유도된 뇌전증 중첩증에 의해 두드러지게 활성화되며, VEGFR-3 억제제인 SAR 투여에 의해 GFAP 양성 성상교세포 발현이 감소됨을 보여주는 면역형광염색 결과를 보여준다. 스케일바 = 50 μ m. 도 5e는 면역형광염색 결과와 동일하게, 웨스턴 블롯 분석에서 GFAP 발현이 SAR 투여에 의해 유의미하게 감소됨을 검증한 결과를 보여주는 그림이다. * P < 0.05인 경우 SE 4d-Veh 그룹과 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다(일원분산분석 후 Tukey's *post-hoc* 검정, 각 그룹 당 n = 5). 모

든 값은 평균 \pm 표준오차로 표시하였다.

도 6은 SE 유도 이후 반응성 성상교세포에서 VEGFR-3의 증가가 미치는 영향을 보여주는 그림이다. VEGFR-3 증가는 같은 장기간의 발작 행동 후의 반응성 성상교세포에서의 mTOR 활성화에 영향을 미친다. 나아가, VEGFR-3-매개된 mTOR 활성화는 성상교세포의 GLT-1 발현을 증가시킴으로써 간질 아급성기(회색 화살표) 동안의 SE-유도된 과흥분을 감소시킬 수 있다. 이를 종합하면, 반응성 성상교세포에서의 VEGFR-3 증가는 해마에서의 과도한 흥분을 진정시키는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0093] 이하, 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.
- [0095] **실시예**
- [0096] **실험방법**
- [0097] **실험동물**
- [0098] 수컷 C57BL/6 마우스(8주령, Orient Bio, Gyeonggi, Korea)를 표준 온도($22 \pm 1^\circ\text{C}$) 및 습도($50 \pm 1\%$)하에서 광-조절 환경(오전 8:00부터 오후 8:00까지 광조건)에서 먹이와 식수에 자유롭게 접근하도록 하면서 사육하였다. 모든 실험은 연세대학교 동물실험윤리위원회의 지침에 따라 시행하였다고 하며 실험동물의 수 및 공통이 최소화되도록 하였다.
- [0100] **필로카르핀을 이용한 SE 유도**
- [0101] 필로카르핀(pilocarpine)으로 유도된 뇌전증 중첩증(status epilepticus, SE) 마우스 모델을 종래에 보고된 방법으로 확립하였다(Cho et al., 2019; Jeong, Lee, Kim, & Cho, 2011). 요약하면, 아트로핀 메틸 니트레이트(1 mg/kg ; i.p.; Sigma-Aldrich) 처리 30분 뒤 마우스에 필로카르핀 염화수소($280\text{--}300 \text{ mg/kg}$; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) 또는 또는 식염수(정상 대조군)를 복강주사하였다. 필로카르핀 처리 후, Racine 스케일(Racine, 1972)에 따라 발작 단계를 결정하였다. 4단계(뒷다리로 서기, rearing) 및 5단계(뒷다리로 서기 및 넘어짐, rearing and falling)에 도달하고 일반적인 긴장간대발작(tonic-clonic seizure)을 나타내는 동물은 뇌전증 중첩증(SE)을 가지는 것으로 간주하고 추가 연구를 위해 선정하였다. SE 유도 2시간 뒤에, 디아제팜(10 mg/kg ; i.p.)을 투여하여 발작을 종료시켰다. 회복 측진을 위해 모든 실험동물에 5% 글루코스 용액을 복강 주사하고 물에 적신 먹이를 공급한 뒤 인큐베이터($30 \pm 1^\circ\text{C}$)에 넣어 생리적 체온을 유지하였다. 모든 실험 마우스는 필로카르핀 또는 식염수 처리 후 1, 4 또는 7일 뒤에 희생시켰다.
- [0103] **라파마이신 및 SAR131675 처리**
- [0104] mTOR 신호를 억제하기 위해, 필로카르핀 처리 1시간 전에 라파마이신(RA; LC laboratories; Woburn, MA, USA)을 최초 투여(6 mg/kg ; i.p.)하고 SE 유도 후 1일째 되는 날부터 3일간 매일 투여하였다(3 mg/kg ; i.p.). 종래 보고된 방법에 따라(L.-H. Zeng, Rensing, & Wong, 2009), 라파마이신을 100% 에탄올에 용해시키고 주사 직전에 5% Tween 80, 5% 폴리에틸렌글리콜 400(Sigma-Aldrich) 및 4% 에탄올을 함유하는 비이클 용액에서 희석하였다. VEGFR-3 억제제인 SAR131675(SAR; Selleck Chemicals; Munich, Germany)를 종래 보고된 방법에 따라(Bhuiyan, Kim, Hwang, Lee, & Kim, 2015) 5% DMSO에 식염수와 함께 용해시켰다. RA 투여 방법과 마찬가지로, SAR를 필로카르핀 처리 1시간 전에 투여하고(50 mg/kg ; i.p.), 필로카르핀으로 SE를 유도한 뒤 1일 후부터 3일간 매일 주사하였다(25 mg/kg ; i.p.).
- [0106] **면역조직화학 및 면역형광 염색**
- [0107] 면역조직화학 염색을 위해 마우스를 15% 클로랄 하이드레이트로 마취하고 식염수와 뒤이어 0.1 M 인산 완충액(PB; pH 7.4)에 용해된 4% 파라포름알데히드를 심장 관류하였다. 이후, 종래에 보고된 방법(Cho et al., 2019)대로 신속하게 뇌를 적출하고 30% 수크로스 용액으로 3일간 동결방지하였다. 다음으로, 시료를 액체질소로 신속하게 동결시켰다. 연속 절편 ($20 \mu\text{m}$ 두께)을 관상으로 $120 \mu\text{m}$ 간격으로 잘랐다(총 $720 \mu\text{m}$, 매 7번째 절편에서 대천문으로부터 -1.58 및 -2.30 사이)(Franklin & Paxinos, 2008). 모든 절편은 0.01 M PBS(pH 7.4)로 세척하였다. 면역조직화학을 위해, 절편을 0.01M PBS에서 3% H_2O_2 및 10% 메탄올과 배양하여 내인성 퍼옥시다제 활성을 제거하였다. 다음으로, 절편을 0.01M PBS에 용해된 10% 고트 혈청(VectorLaboratories; Burlingame,

CA, USA)으로 1시간 동안 고정하고 4℃에서 항-phospho S6 리보솜 단백질 항체(pS6; 1:200; Cell Signaling Technology; Beverly, MA, USA)와 함께 밤새 배양하였다. 다음날, 절편을 바이오틴화된 항-래빗 IgG(1:200; Vector Laboratories)와 함께 2시간 동안 상온에서 배양하고 아비딘-바이오틴 퍼옥시다제 복합 용액(Vector Laboratories)에 1시간 동안 넣어두었다. 마지막으로, 절편을 0.05M Tris-HCl(pH7.4)에 용해된 0.1% 디아미노 벤지딘 테트라하이드로클로라이드 및 0.005% H₂O₂로 염색하였다. 염색 절편을 광학현미경(BX51; Olympus; Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

[0108] 다중-면역형광 분석을 위해, 절편을 항-뉴런 핵(NeuN; 1:100; Millipore; Temecula, CA, USA), 항-아교세포섬 유산성 단백질(glial fibrillary acidic protein) (GFAP; 1:400; Millipore), 항-VEGFR-3(1:500; Abnova; Taipei, Taiwan, China), 항-VEGFR-3(1:100; Abcam; Cambridge, A, USA), 항-pS6 (1:200; Cell Signaling Technology), 및 항-GLT-1 (1:200; Thermo Scientific; Rockford, IL, USA) 항체와 함께, 그리고 이어서 Cy3-(1:500; Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA), Cy5- (1:500; Jackson ImmunoResearch) 및 Alexa fluor 488-접합 IgG(1:300; Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) 항체와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 절편을 마운팅하고 공초점 현미경(LSM 700; Carl Zeiss; Thornwood, NY, USA)으로 관찰하였다.

[0110] *아교-유사 VEGFR-3, pS6 및 GLT-1-발현 세포의 정량 분석*

[0111] 정상대조군 및 발작 유도 4일 뒤 동물의 해마에서 VEGFR-3, pS6 및 GLT-1-양성 세포의 발현 변화를 분석하기 위해, 6개의 관상 절편을 수득하였다. 세포 수를 종래에 보고된 방법에 따라 측정하였다(Cho et al., 2019; Jeong et al., 2011). VEGFR-3, pS6 및 GLT-1-양성 세포의 수를 방사층(stratum radiatum), 소강분자층(lacunosum moleculare) 및 치아이랑(dentate gyrus) 분자층을 포함하는 영역에서 측정하였다(도 3b). 각 절편에서 VEGFR-3, pS6 및 GLT-1-표지된 세포의 수는 ZEN 이미지 검사 소프트웨어(Carl Zeiss)를 이용하여 측정하였다.

[0113] **웨스턴 블롯 분석**

[0114] 웨스턴 블롯 분석을 위한 뇌조직 시료는 종래 보고된 방법으로 준비하였다(Jeong, Lee, & Kim, 2015). 마우스 해마 조직을 균질화하고 4℃에서 15분간 14,000g로 원심분리하였다. 상등액을 새 튜브로 옮기고, 비친코닉산(bicinchoninic acid) 어세이 키트(Thermo Scientific)을 이용하여 농도를 측정하였다. 단백질을 젤 전기영동으로 분리한 뒤 전기영동 이동 시스템(Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)을 이용하여 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(Millipore)으로 옮겼다. 막을 4℃에서 다음의 1차 항체와 함께 밤새 배양하였다: 항-VEGFR-3(Abcam), 항-pS6(Cell Signaling Technology), 항-S6(Cell Signaling Technology), 항-GFAP(Millipore), 항-GLT-1(Thermo Scientific), 및 항-β-액틴(Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA). 세척 후, 막을 다시 2차 항체(Enzo Life Science; Farmingdale, NY, USA)와 배양하고, ECL 웨스턴 블롯팅 검출 시약(Amersham Biosciences; Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 블롯팅을 하였다. 컴퓨터 이미지 장비 및 관련 소프트웨어(Fuji Film; Tokyo, Japan)를 이용하여 밴드의 밀도를 측정하였다.

[0116] *통계적 분석*

[0117] 모든 통계적 분석은 IBM SPSS statistics Version 25 (SPSS; Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였다. 데이터는 평균 ± 표준오차(SEM)로 나타내고 일원분산분석 후 Tukey *post-hoc* 검정을 수행하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계적 유의성을 가지는 것으로 간주하였다.

[0119] **실험결과**

[0120] *SE 후 해마에서의 pS6 및 VEGFR-3 발현의 변화*

[0121] 인산화된 리보솜 단백질인 S6(pS6)의 발현은 종종 mTOR 활성화의 표지자로 활용된다(Deli et al., 2012; Macias et al., 2013; L.-H. Zeng et al., 2009). 필로카르핀으로 SE가 유도된 후 해마에서 mTOR 활성화의 변화를 확인하기 위하여, pS6 발현에 대한 면역조직화학을 수행하였다. 그 결과, 정상 대조군 동물에서의 pS6 면역반응성은 CA1 및 CA3 서브필드의 피라미드 뉴런 및 몇몇 치아과립(dentate granule) 뉴런에서 주로 관찰되었으며(도 1a의 패널 A), CA1 서브필드의 방사층 및 소강분자층의 산재된 세포에서도 검출되었다(도 1a의 패널 E). 아교-유사 pS6 발현은 SE 유도 1일 뒤 방사층 및 소강분자층 CA1 서브필드에서 조금 증가하였다(도 1a의 패널 B 및 F). 아교-유사 pS6 발현은 SE 유도 후 4일 째에 최대수준에 이르렀으며(도 1a의 패널 C 및 G) SE 유도 후 7일 째부터 서서히 감소하였다(도 1a의 패널 D 및 H). 면역염색 결과와 마찬가지로, 웨스턴 블롯 분석결과 pS6의 발현수준은 SE 유도 4일 뒤부터 해마에서 정상 대조군 마우스에 비해 유의하게 증가하였다(정상 대조

군(sham)대비 $P=0.001$; 도 1b). 본 발명자들의 종래 연구결과와 유사하게(Cho et al., 2019), 면역블롯팅 결과 VEGFR-3의 단백질 수준이 SE 유도 4일 뒤부터 해마에서 정상 대조군 마우스에 비해 유의하게 증가함을 확인하였다(정상 대조군(sham)대비 $P=0.04$; 도 1b). GFAP 단백질 수준은 SE 유도 후 4일(정상 대조군 대비 $P=0.003$; 도 1b) 및 7일(정상 대조군 대비 $P=0.001$; 도 1b)째에 유의하게 증가하였다.

[0122] SE 유도 후의 pS6 및 VEGFR-3 발현변화를 확인한 뒤, pS6 및 VEGFR-3가 성상교세포 내에서 함께 존재하는지 여부를 삼중-면역형광 염색으로 조사하였다(도 2). 정상 대조군 동물에서, GFAP-발현 성상교세포 내의 pS6 발현은 관찰되지 않았으나, GFAP-발현 성상교세포 표면에서 VEGFR-3 발현은 다소간 관찰되었다(도 2 패널 A-C). 그러나, SE-유도 pS6 발현은 SE 유도 4일 후 해마의 VEGFR-3-발현 반응성 성상교세포에서 크게 증가되었다(도 2 패널 D-F). 이러한 결과는 mTOR 활성화가 SE 유도 후 성상교세포가 활성화되는 동안의 VEGFR-3 발현 증가와 관련되어 있음을 시사한다.

[0124] SE 유도 후 반응성 성상교세포에서의 mTOR 활성화 및 VEGFR-3 발현 간의 상호작용

[0125] 다음으로, 라파마이신(RA) 처리에 의한 mTOR 활성화 억제제가 해마에서 성상교세포의 VEGFR-3 발현 변화를 유도하는지를 조사하였다. 면역형광 염색 결과 성상교세포의 VEGFR-3 발현은 필로카르핀으로 SE를 유도한 뒤 4일 후 해마의 서브피라미드 영역에서 sham-Veh 및 sham-RA 그룹에 비해 눈에 띄게 증가하였으며, RA 처리는 해마의 서브피라미드 영역에서 성상교세포의 VEGFR-3 발현을 현저히 약화시켰다(도 3a). 해마 서브피라미드 영역의 VEGFR-3-양성 세포수를 정량하자(도 3b), VEGFR-3-발현 세포의 수가 sham-Veh 군에 비해 SE4d-Veh 군에서 유의하게 증가하였음을 확인하였다(sham-Veh 대비 $P<0.001$; 도 3c). 그러나, RA 처리는 발작 유도 4일째 되는 동물에 비해 해마 서브피라미드 영역에서 VEGFR-3-면역반응성 세포의 수를 유의하게 감소시켰다(SE 4d-Veh 대비 $P<0.001$; 도 3c). 면역염색 결과와 유사하게, 웨스턴 블롯 결과는 SE 유도 4일 뒤 VEGFR-3의 단백질 수준이 비이클-처리 정상 대조군에 비해 유의하게 증가함을 보여주었다(Sham-Veh 대비 $P<0.001$; 도 3d 및 3f); 그러나, VEGFR-3 수준은 RA 처리에 의해 유의하게 약화되었다(SE 4d-Veh 대비 $P=0.02$; 도 3d 및 3f).

[0126] SE 유도 후 반응성 성상교세포에서의 VEGFR-3 발현과 mTOR 활성화 간의 상관관계를 추가적으로 확인하기 위해, VEGFR-3 특이적 억제제인 SAR131675(SAR) (Alam et al., 2012)에 의한 VEGFR-3의 억제가 발작 유도 4일째 동물의 해마에서 성상교세포의 pS6 발현 변화를 유도하는지를 면역형광 염색 및 웨스턴 블롯팅으로 조사하였다. 면역형광 염색 결과 해마의 성상교세포에서 pS6 발현이 증가함을 확인한 반면, SE로 유도된 아교세포의 pS6 발현은 SAR가 처리된 발작 유도 4일째 동물(SE 4d-SAR)의 해마에서 현저히 감소하였다(도 4a). 정량분석 결과 역시 SAR 처리가 SE 유도 4일 뒤 해마에서 pS6를 발현하는 아교세포 수를 유의하게 감소시킴을 보여준다(SE 4d-Veh 대비 $P<0.001$; 도 4b). 마찬가지로, 웨스턴 블롯 결과 SE에 의해 유도된 pS6 단백질 발현은 SAR 처리에 의해 현저히 약화됨을 보였다($P=0.032$ versus SE 4d-Veh; 도 4C). 이들 결과를 통해 성상교세포의 VEGFR-3 발현 증가는 SE 유도 후의 해마에서 mTOR 활성화와 관련이 있음을 알 수 있었다.

[0128] VEGFR-3 특이적 억제제가 SE 유도 후 반응성 성상교세포중에 미치는 영향

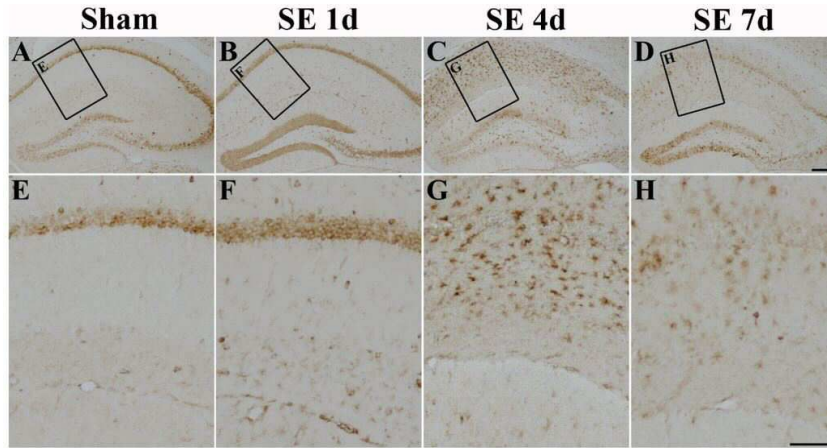
[0129] PI3K/Akt/mTOR 경로는 성상교세포의 1차 배양에서 GLT-1 조절에 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다(Wu, Kihara, Akaike, Niidome, & Sugimoto, 2010). 본 발명의 연구 결과가 성상교세포의 활성화에 있어 VEGFR-3 유도 및 mTOR 활성화 간의 상호작용을 시사하였으므로(도 3 및 4), 본 발명자들은 VEGFR-3의 억제가 SE 유도 후 해마에서 GLT-1 발현 및 성상교세포의 활성화 여부를 변동시킬 수 있을지를 조사하였다. 면역형광 염색 결과, SE 유도 4일 뒤 해마에서 아교-유사 GLT-1 면역반응성은 sham-Veh 및 sham-SAR 군에 비해 유의하게 증가함을 확인하였다(도 5a). 그러나, 증가된 아교-유사 GLT-1 발현은 SAR 처리에 의해 다시 감소하였다(SE4d-SAR; 도5a). 이러한 결과와 일치하여, 정량분석 결과 아교 GLT-1-양성 세포의 수는 SE 유도 4일 뒤 해마 서브피라미드 영역에서 Sham-Veh 그룹에 비해 유의하게 증가하였고(Sham-Veh 대비 $P<0.001$; 도 5b), 이러한 증가는 해마에서 SAR 처리에 의해 다시 약화되었다(SE 4d-Veh 대비 $P=0.005$; 도 5b). GLT-1에 대한 웨스턴 블롯 결과 비이클을 처리한 정상 대조군(sham-manipulated)과 비이클을 처리한 발작 유도 4일째 마우스 간의 유의한 차이는 없었으나, SAR 처리에 의해 전체 GLT-1 단백질의 수준이 유의하게 감소하였다(SE 4d-Veh 대비 $P=0.023$; 도 5c). 또한, 면역형광 염색 결과 GFAP-발현 반응성 성상교세포가 SE 유도 후 해마에서 증가하였고, SAR 처리에 의해 다시 감소함을 확인하였다(도 5d). 이중-면역형광 염색 결과와 마찬가지로, 웨스턴 블롯 분석 결과는 SE에 의해 유도된 GFAP 발현 수준이 SAR 처리에 의해 SE 4d-Veh 그룹 대비 유의하게 감소하였음을 보여준다(SE 4d-Veh에 대해 $P=0.042$; 도 5e). 이러한 결과는 SE 이후 성상교세포의 VEGFR-3 발현이 해마에서의 GLT-1 발현 및 성상교세포의 활성화에 관여할 가능성을 시사한다.

[0131] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한

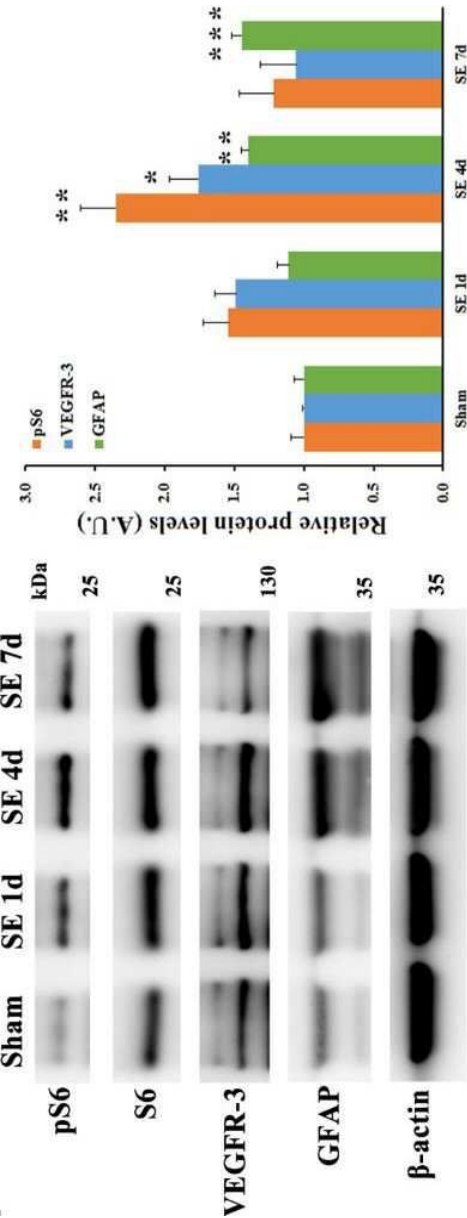
구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

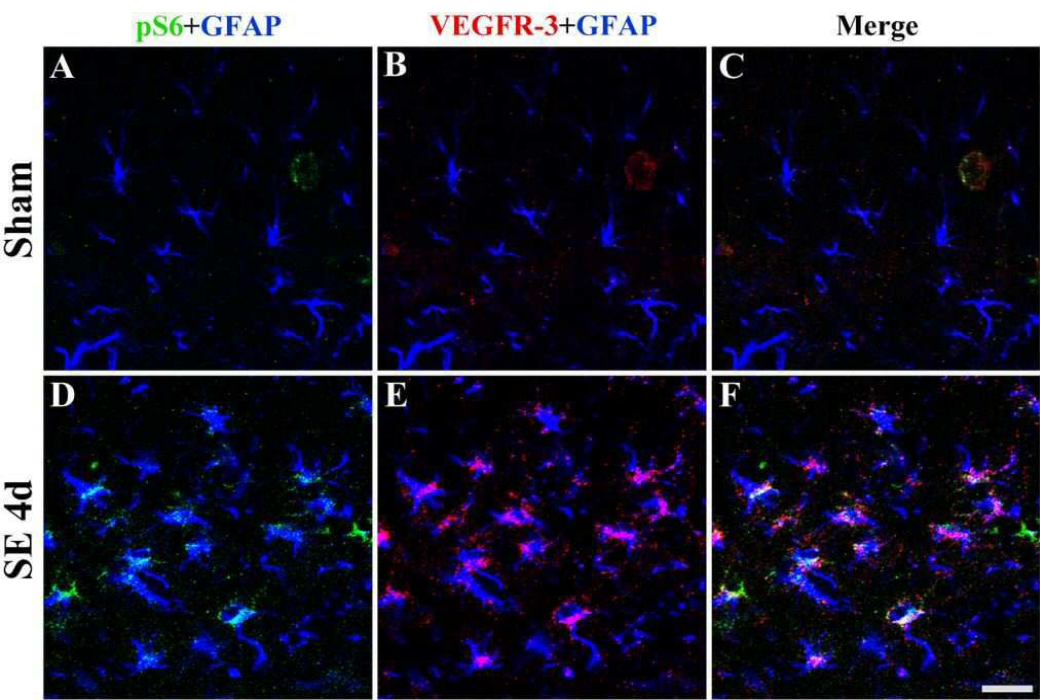
도면1a



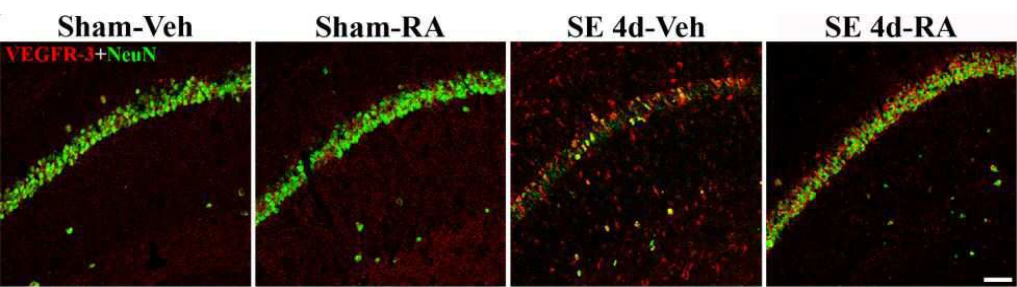
도면1b



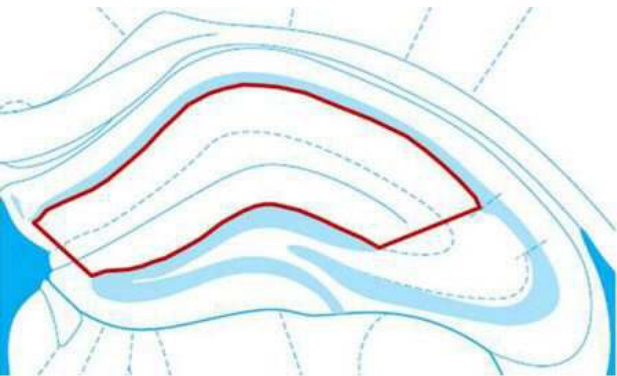
도면2



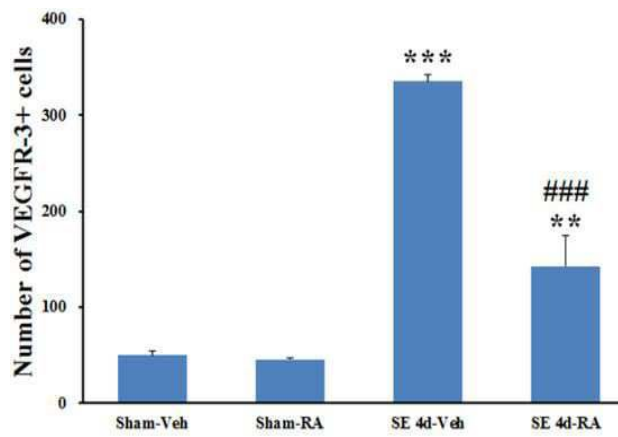
도면3a



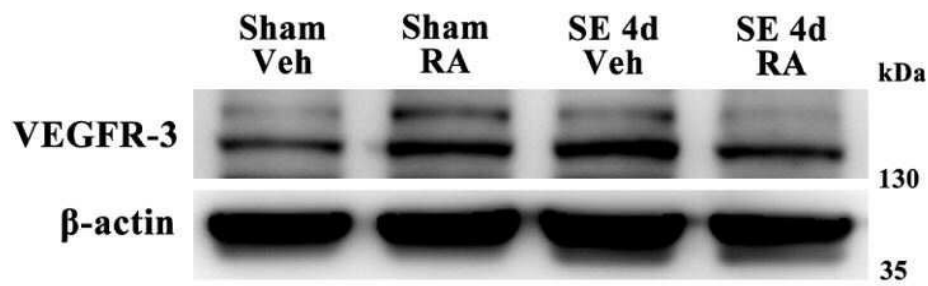
도면3b



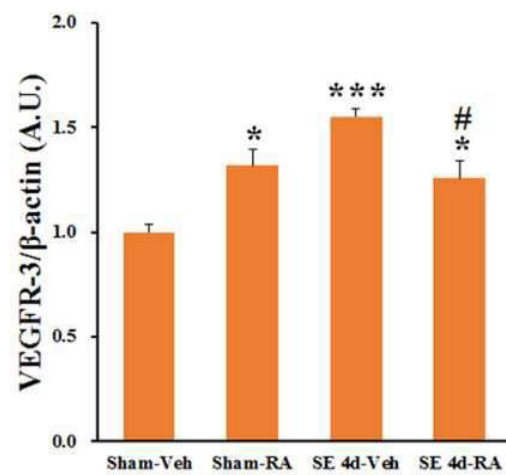
도면3c



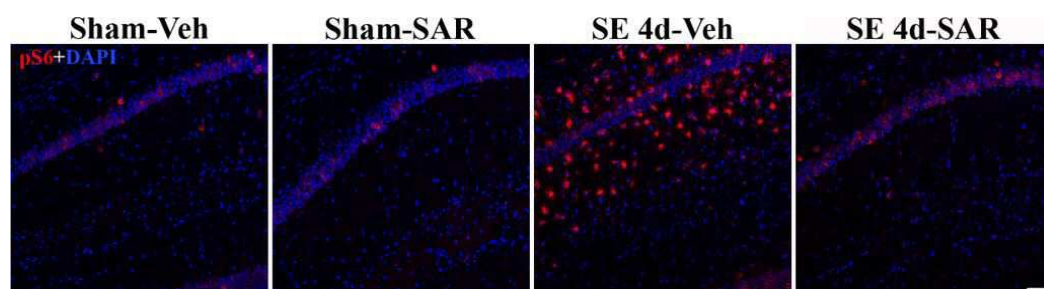
도면3d



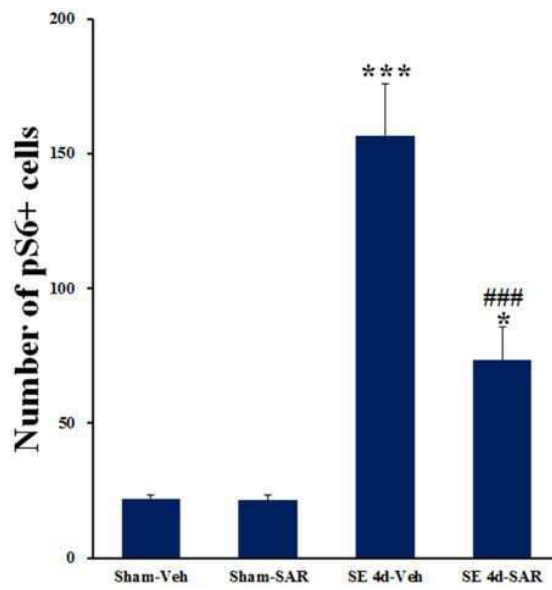
도면3e



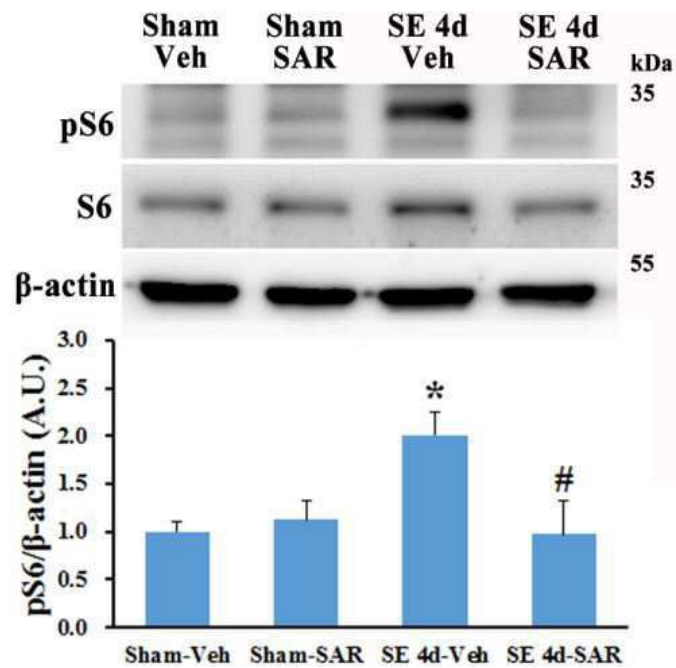
도면4a



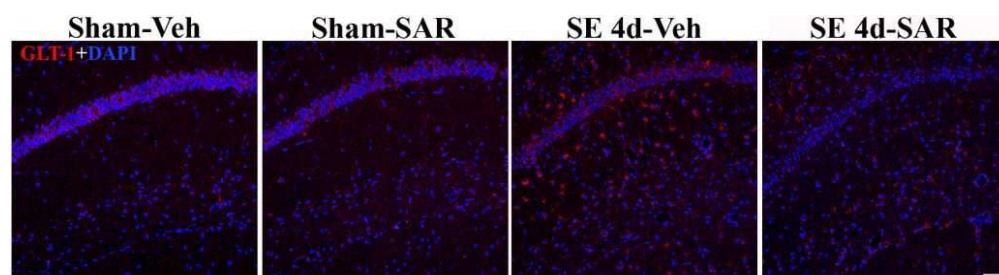
도면4b



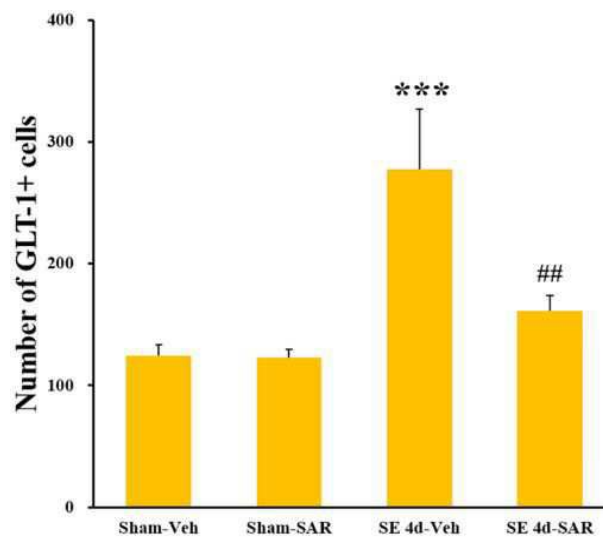
도면4c



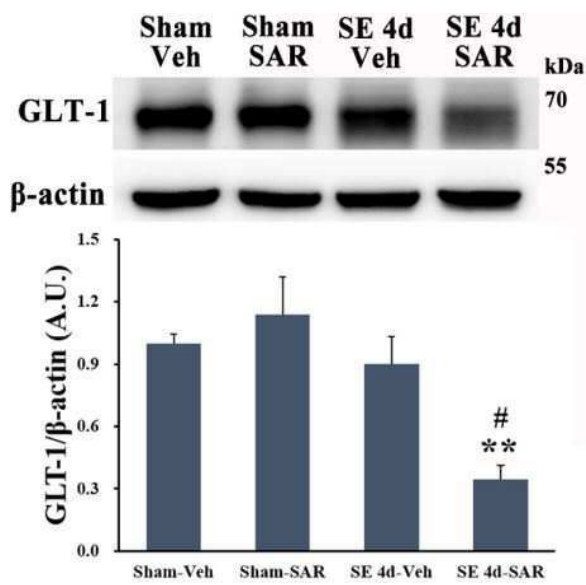
도면5a



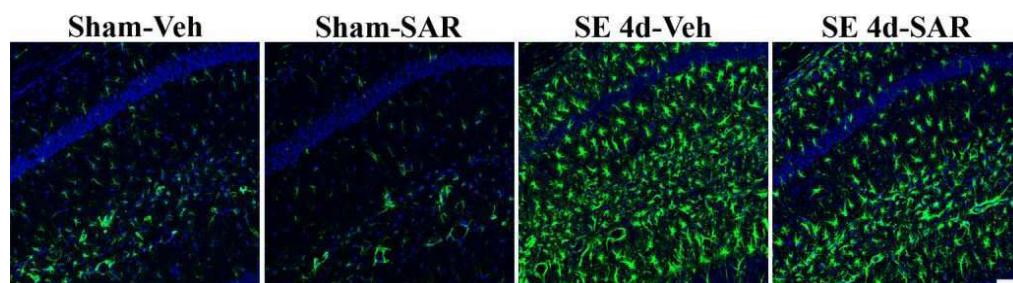
도면5b



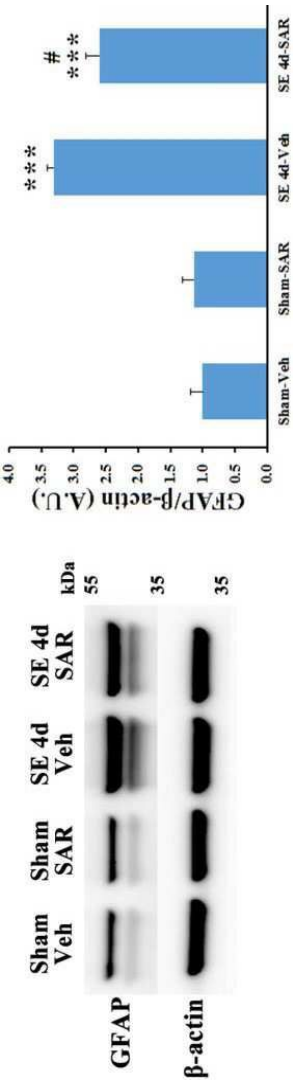
도면5c



도면5d



도면5e



도면6

