



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0030810
(43) 공개일자 2012년03월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2010-0092571
 (22) 출원일자 2010년09월20일
 심사청구일자 2010년09월20일
- (71) 출원인
경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
- (72) 발명자
최원재
 서울특별시 마포구 마포대로1길 21, 대림1차아파트 103동 801호 (용강동)
오유정
 서울특별시 종로구 세검정로 400, 벽산평창힐스 101동 302호 (평창동)
- (74) 대리인
손민

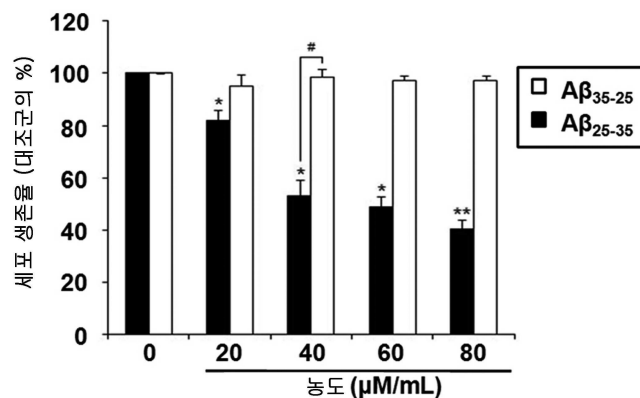
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **사이클로필린 B를 포함하는 아밀로이드원성 질환 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 사이클로필린 B(CypB) 단백질, CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 CypB 단백질 발현 재조합 벡터를 포함하는 아밀로이드원성 질환(amyloid diseases)을 치료 또는 예방하기 위한 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 사이클로필린 B를 포함하는 아밀로이드원성 질환 예방 및 치료용 조성물은 아밀로이드-β 펩티드가 다른 물질들과 침적을 이루어 신경반을 형성하고 이에 의해 신경독성작용을 일으켜 유발되는 아밀로이드원성 질환(amyloid diseases), 예를 들어, 노화 관련 인지 저하, 경증 인지 장애 ("MCI"), 혈관치매, 뇌 아밀로이드 혈관병증("CAA"), 유전성 뇌내출혈, 노인성 치매, 다운 증후군, 붕입체 근염("IBM"), 노화 관련 황반변성("ARMD"), 만성 염증(chronic inflammation), 다발성 골수종(multiple myeloma), II형 당뇨병(type II diabetes), 크로이펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease)을 효과적으로 치료할 수 있다.

대표도 - 도2a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A092125

부처명 보건복지부

연구사업명 보건복지부 보건의료연구개발사업

연구과제명 Beta Amyloid 단백질 독성으로 인한 활성산소발생 억제제 개발 및 자기공명영상을 이용한
억제효과 확인

주관기관 경희대학교

연구기간 2009.11.01 ~ 2012.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

사이클로필린 B(CypB) 단백질을 포함하는, 아밀로이드원성 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, CypB 단백질이 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것인 조성물.

청구항 3

사이클로필린 B(CypB) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는, 아밀로이드원성 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산이 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것인 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산이 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것인 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산이 CypB 단백질 발현 재조합 벡터인 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, CypB 단백질 발현 재조합 벡터가 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, CypB 단백질 발현 재조합 벡터가 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제3항에 있어서, 아밀로이드원성 질환은 노화 관련 인지 저하, 경증 인지 장애, 혈관치매, 뇌 아밀로이드 혈관병증, 유전성 뇌내출혈, 노인성 치매, 다운 증후군, 봉입체 근염, 노화 관련 황반변성, 만성 염증, 다발성 골수종, II형 당뇨병, 크로이펠트-야콥병 또는 알츠하이머 질환인 조성물.

청구항 10

- (a) CypB 단백질 발현 세포를 배양하는 단계,
- (b) 단계 (a)의 세포를 후보 화합물과 접촉시키는 단계,
- (c) 단계 (b)에서의 CypB 단백질의 발현량을 후보 화합물과 접촉시키지 않은 대조군의 발현량과 비교하는 단계, 및
- (d) CypB 단백질 발현량의 증가를 나타내는 화합물을 확인하는 단계를 포함하는, 아밀로이드원성 질환을 치료 또는 예방하는 약물을 스크리닝하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 사이클로필린 B(CypB) 단백질, CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 또는 CypB 단백질 발현 재조합 벡터를 포함하는 아밀로이드원성 질환(amyloid diseases)을 치료 또는 예방하기 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아밀로이드는 수많은 상이한 질환에 나타나는 다양한 특정 단백질 침착물(세포내 또는 세포외)로서, 이들의 발생에서의 다양성에도 불구하고, 모든 아밀로이드 침착물은 공통의 형태학적 특성을 갖고, 특정 염료(예를 들어, 콩고 레드)로 염색되며, 염색 후 편광에서 특징적인 적녹 복굴절 양상을 나타낸다. 또한, 이들은 공통의 초미세구조 및 공통의 X-선 회절 및 적외선 스펙트럼을 공유한다. 산이나 알칼리에 저항이 세고 유리질이나 콜로이드와 유사하며, 이것이 침착하면 아밀로이드 변성을 일으키게 되어 국소성 및 전신성 아밀로이드증이 나타난다.

[0003] 아밀로이드-β 펩티드(Aβ)는 베타 아밀로이드 전구체 단백질(beta amyloid precursor protein, "βAPP")로 알려진 거대 단백질에서의 단백질분해에 의해 유도된 39-43 아미노산 펩티드이다. Aβ 펩티드의 16 내지 21 영역인 KLVFFA는 β-시트 형성 및 원섬유발생 동안의 Aβ의 분자간 상호작용의 원인이 된다(Tjernberg L0, et al., J. Biol. Chem. 272, 12601-05 (1997); Findeis, et al., Biochemistry 38, 6791-6800 (1999); Findeis, et al., Amyloid, 231-41 (Dec 2001)).

[0004] 아밀로이드-β 펩티드는 다른 물질들과 침적을 이루어 신경반을 형성하고 이에 의해 신경독성작용을 일으켜, 아밀로이드원성 질환(amyloid diseases), 예컨대, 만성 염증(chronic inflammation), 다발성 골수종(multiple myeloma), II형 당뇨병(type II diabetes), 크로이펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease) 등을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 사이클로필린(Cyclophilins)은 이뮤노필린(immunophilin) 패밀리 중 하나로, 처음으로 면역억제제인 사이크로스포린 A (CsA)에 대한 세포 결합 단백질로서 알려졌다. 사이클로필린은 CypB, CypC, CypD, Cyp40 등으로 구분되며 특히 펩티딜-프롤릴 이성체 (PPIase) 활성이 있다고 보고되고 있다. PPIase 활성은 단백질 폴딩, 세포 사이 트래피킹, 멀티단백질 복합체 안전성의 유지를 촉진하는 분자 샤페론(chaperones)과 같은 역할을 한다. 사이클로필린 중에, CypB는 소포체로 향하는 신호 서열의 존재에 의해서 다른 것들과 구별된다. CypB는 소포체 뿐만 아니라 세포외 공간과 핵에서도 발견된다. 소포체로 향하는 25-아미노산 서열을 포함하는 21-kDa 단백질인 CypB는 소포체 스트레스 반응에서 중요한 역할을 하고 ER 스트레스로부터 세포를 보호한다. CypB 뿐만 아니라 CypA는 신경아교세포에 비해 신경세포에서 높은 함유량을 보인다.

[0006] 그러나, 아밀로이드-β 펩티드 침착으로 인한 신경독성으로 유발된 아밀로이드원성 질환에서 CypB의 신경보호 역할에 관해서는 전혀 밝혀진 바가 없었다.

[0007] 이러한 배경 하에서, 본 발명자는 이뮤노필린(immunophilin) 패밀리 중 하나로, 주로 신경세포에서 발견되는 PPIase 활성을 가지는 사이클로필린 B를 동정하고, 이를 아밀로이드원성 질환 치료 또는 예방에 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 사이클로필린 B(CypB) 단백질을 포함하는 아밀로이드원성 질환(amyloid diseases)을 치료 또는 예방하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는 아밀로이드원성 질환을 치료 또는 예방하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 CypB 단백질 발현 재조합 벡터를 포함하는 아밀로이드원성 질환을 치료 또는 예방하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 약리학적 유효량의 CypB 단백질, CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 CypB 단백질 발현 재조합 벡터를 아밀로이드원성 질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상에게 투여하여, 아밀로이드원성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 CypB 단백질의 발현을 촉진시키는 물질을 검정하여 아밀로이드원성 질환을 치료 또는

예방하는 약물을 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 하나의 양태로서, 본 발명은 사이클로필린 B(CypB)단백질을 포함하는, 아밀로이드원성 질환(amyloid diseases)을 치료 또는 예방하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명에 따라 치료 또는 예방하고자 하는 "아밀로이드증" 또는 "아밀로이드원성 질환"이란 아밀로이드 섬유의 존재를 특징으로 하는 병리 증상을 지칭한다. 아밀로이드는 수많은 상이한 질환에 나타나는 다양한 특정 단백질 침착물(세포내 또는 세포외) 군을 지칭하는 포괄적인 용어이다. 특히, 아밀로이드-β 펩티드(Aβ)는 베타 아밀로이드 전구체 단백질(beta amyloid precursor protein, "βAPP")로 알려진 거대 단백질에서의 단백질분해에 의해 유도된 39-43 아미노산 펩티드이다. 본 발명의 "아밀로이드증" 또는 "아밀로이드원성 질환"은 "아밀로이드-β 질환" 또는 "아밀로이드-β 관련 질환"을 포함한다. 용어 "아밀로이드-β 질환"이란 원인이 아밀로이드인 질환, 증상, 병리, 및 기타 뇌와 이의 구성요소의 구조 또는 기능 이상을 포함하고, 그로 인해, 기억력 감퇴, 안면 또는 손떨림 증상을 포함한다. 구체적으로는 아밀로이드-β 펩티드 침착으로 인한 신경독성으로 유발되는 질환을 포함한다. 아밀로이드-β 질환으로 영향을 받는 뇌 영역은 맥관계 또는 기능상의 또는 해부상의 부위를 포함하는 실질(parenchyma)을 포함하는 기질, 또는 신경세포 자체일 수 있다. 본 발명의 아밀로이드-β 질환은 노화 관련 인지 저하, 경증 인지 장애 ("MCI"), 혈관치매, 뇌 아밀로이드 혈관병증("CAA"), 유전성 뇌내출혈, 노인성 치매, 다운 증후군, 봉입체 근염("IBM"), 노화 관련 황반변성("ARMĐ"), 만성 염증(chronic inflammation), 다발성 골수종(multiple myeloma), II형 당뇨병(type II diabetes), 크로이펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease)일 수 있다. 아밀로이드-β 펩티드는 다른 물질들과 침적을 이루어 신경반을 형성하고 이에 의해 신경독성작용을 일으켜, 아밀로이드원성 질환(amyloid diseases)을 유발한다.
- [0015] 뇌 아밀로이드 혈관병증("CAA")은 세동맥, 피질 동맥 및 렘토민질(leptomeningeal) 동맥의 벽에서의, 및 모세혈관 및 정맥에서의 아밀로이드 원섬유의 특이적 침착을 지칭한다. CAA는 산발성으로 발생하거나 또는 유전성일 수 있다. 뇌내출혈과 임상적으로 관련되었다. 예시적인 CAA 장애로는, 이에 한정되지 않지만, 아이슬란드형의 아밀로이드증을 갖는 유전성 뇌내출혈(HCHWA-I); HCHWA의 더치(Dutch) 변형(HCHWA-D; Aβ에서의 돌연변이); Aβ의 플레미시(Flemish) 돌연변이; Aβ의 아크틱(Arctic) 돌연변이; Aβ의 이탈리아 돌연변이; Aβ의 아이오와 돌연변이; 가족성 브리티시(British) 치매; 및 가족성 데이니시(Danish) 치매를 포함한다.
- [0016] 노화 관련 황반변성("ARMĐ")은 노인에게 있어서 비가역적인 시력 감퇴의 원인이 된다.
- [0017] Aβ₂₅₋₃₅는 활성 독성 절편이고, 특히 Aβ₁₋₄₂의 수치는 아밀로이드원성 질환 환자의 뇌의 혈청 또는 섬유아세포에서 증가되고, 침착된 Aβ₁₋₄₂ 과 Aβ₂₅₋₃₅는 뇌로부터 분리된 쥐의 해마와 신경세포 모두에서 신경독성을 나타내었다.
- [0018] 본 발명의 조성물에 사용되는 CypB 단백질은 효모, 식물 또는 동물 유래의 모든 CypB 단백질을 포함한다. 야생형(wild type)의 CypB 단백질을 포함하여, 세포내에서 Aβ로부터 유발된 신경독성으로부터 세포를 보호하는 기능을 하는 한 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 CypB 단백질의 변이체를 포함한다. 하나의 구체적 예시로서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 CypB 단백질을 들 수 있으며, 이러한 서열의 치환, 삽입, 결실 변이체도 본 발명의 조성물에 사용할 수 있다.
- [0019] CypB 단백질의 변이체란 야생형의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 삽입은 통상적으로 약 1개 내지 20개 아미노산의 연속 서열로 이루어지나, 보다 큰 삽입도 가능할 수 있다. 결실은 통상적으로 약 1개 내지 30개의 잔기로 이루어지나, 일부의 경우에는 도메인 중 하나가 결실될 수 있는 것과 같이 보다 큰 결실 또한 가능할 수 있다. 이런 변이체는 당해 분야에 공지된 화학적 펩티드 합성방법 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다(Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2d Ed., 1989). 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.
- [0020] 또한, CypB 단백질은 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당

화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification) 될 수도 있다.

- [0021] 상기 변이체 또는 수식체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이나, 필요에 따라서는 이의 단백질의 특성을 변형시킨 변이체 또는 수식체일 수 있다. 바람직하게는 아미노산 서열상의 변이와 수식에 의해서 단백질의 열, pH등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질이다.
- [0022] CypB 단백질은 당 분야에 널리 공지된 방법으로 천연에서 추출 및 정제하여 얻을 수 있다. 달리, CypB 단백질의 서열이 밝혀져 있으므로 화학적 합성(Merrifield, J. Amer. chem. Soc., 85:2149-2156, 1963)하거나 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩타이드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, CypB를 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 CypB이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 CypB를 회수하는 과정으로 수득할 수 있다.
- [0023] CypB 단백질을 발현시키기 위한 발현벡터는 통상의 모든 발현 벡터를 다 사용할 수 있다. 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다. 사용될 수 있는 숙주세포로는 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.
- [0024] 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다. (Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1982); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989); Deutscher, M., *Guide to Protein Purification Methods Enzymology*, vol. 182. Academic Press. Inc., San Diego, CA(1990)).
- [0025] 뇌에서 생체내 생리학적 효과를 발휘하는 본 발명의 조성물은 뇌의 표적 세포에 접근하게 된다면 더 유용할 수 있다. 뇌 세포의 예는 뉴런, 아교세포(성상세포, 희소돌기아교세포, 미세아교세포), 뇌혈관세포(근육세포, 내피세포), 및 수막을 구성하는 세포이나 이에 제한되지 않는다. 혈액 뇌 장벽(BBB)는 뇌 실질을 전신 순환으로부터 분리하는 물리적 및 기능적 장애물로서 작용함으로써 뇌 세포로의 접근을 전형적으로 제한한다(예를 들면, 문헌 [Pardridge, et al., *J. Neurovirol.* 5(6), 556-69 (1999); Rubin, et al., *Rev. Neurosci.* 22, 11-28 (1999)] 참조). 순환 분자는 보통 자유 확산에 의한 BBB를 통한 지질-매개 수송, 또는 능동(또는 촉매화) 수송의 두 가지 과정 중 하나에 의해 뇌 세포에 접근할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 조성물이 BBB를 통과하는 수송을 촉진하기 위하여, 조성물은 BBB 수송 벡터에 커플링될 수 있다(BBB 수송 벡터 및 기전의 검토를 위해서는 문헌[Bickel, et al., *Adv. Drug Delivery Reviews* 46, 247-79 (2001)]을 참조). 예시적 수송 벡터는 양이온화된 알부민 또는 트랜스페린 수용체에 대한 OX26 모노클로날 항체를 포함하고; 이 단백질들은 각각 BBB를 통한 흡수-매개 및 수용체-매개 트랜스사이토시스(transcytosis)를 수행한다.
- [0027] 또 다른 양태로서, 본 발명은 CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는 아미노이드 원성 질환을 치료 또는 예방하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 조성물에서 CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0029] CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, *Angew Chem IntEd Engl.*, 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리에스테르, 포스파이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.
- [0030] CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 대한 하나의 구체적 예시로서 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 들 수 있으며, 서열번호 2의 서열을 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴

클레오타이드 서열로서 예시할 수 있다.

- [0031] 상기한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다.
- [0032] 바람직한 양태에서, CypB 단백질 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 이를 발현하는 벡터에 작동가능하게 연결된 제조합 발현 벡터에 제공된다.
- [0033] 본 발명에서 "벡터"란 목적 유전자를 코딩하는 핵산 서열(예: DNA, RNA 등)을 숙주 세포로 도입하기 위한 수단을 의미한다. 본 발명에서 "발현 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [0034] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 제조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 제조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0035] 본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함한다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인헨서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 표적 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.
- [0036] CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 당 분야의 공지 방법, 예를 들어 벡터 형태의 네이키드 DNA로 직접 주사하거나 (Wolff et al., Science, 247:1465-8, 1990; Wolff et al., J Cell Sci. 103:1249-59, 1992), 리포솜(Liposome), 양이온성 고분자(Cationic polymer)등을 이용하여 아밀로이드원성 질환의 치료 또는 예방의 목적으로 환자 세포 안으로 전달될 수 있다. 리포솜은 유전자 전달을 위하여 DOTMA나 DOTAP등의 양이온성 인지질을 혼합하여 제조한 인지질 막으로, 양이온성의 리포솜과 음이온성의 핵산이 일정 비율로 혼합하면 핵산-리포솜 복합체가 형성된다 이 복합체는 세포내로 엔도사이토시스 되어 엔도솜 내에 체류하게 되다(Schaefer-Ridder M et al., Science. 215(4529):166-168, 1982; Hodgson et al., Nat Biotechnol., 14(3):339-342, 1996). 엔도솜에서 유입된 유전자가 세포질을 거쳐 핵으로 이동하는 정도가 유전자 전이와 치료 효율을 결정하게 된다. 이런 유전자 전이 방법은 면역원성이 낮아서 반복 투여가 가능하고 안전성이 높은 장점이 있다. 유전자 수송에 사용되는 양이온성 고분자로는 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 스퍼민(spermine), 폴리에틸레민(PEI: polyethylenimine), 키토산(chitosan)등이 있다(Hashida, Br J Cancer., 90(6):1252-1258, 2004; Wiseman, Gene Ther., 10(19):1654-1662, 2003; Koping-Hoggard, Gene Ther.,8(14):1108-1121, 2001). 유전자를 양이온성 고분자와 복합체 형태로 체내 투여할 경우 유전자의 체내 체류시간 및 발현 지속시간이 네이키드 DNA(naked DNA)에 비하여 현저히 증가하는 것으로 밝혀졌다.
- [0037] 또 다른 양태로서, 본 발명은 CypB 단백질 발현 제조합 벡터를 포함하는 아밀로이드원성 질환을 치료 또는 예방하기 위한 조성물을 제공한다. 상기 CypB 단백질 발현 제조합 벡터는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.
- [0038] A β 에 의한 독성을 일으킨 세포에서 CypB를 발현하도록 조작된 제조합 벡터를 환자 세포로 트랜스펙션시킬 경우, 그 발현 효율을 증대시킬 수 있기 때문에 치료 효과가 우수하다.
- [0039] 유전자 요법에서 사용하는 벡터는 바이러스 벡터일 수 있으며 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 복제결손 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관된 바이러스가 포함된다. 바이러스 벡터는 다음의 기준을 충족해야한다: (1)벡터는 원하는 세포에 감염할 수 있어야 하며 이에 따라 적절한 숙주 범위를 갖는 바이러스 벡터가 선택되어야 하고; (2)전달된 유전자는 적절한 기간 동안 세포에서 보존되고 발현될 수 있어야 하며; (3) 벡터는 숙주에 안전해야 한다. 세포 내로 유전자 전달을 위해 사용할 수 있는 다른 바이러스 벡터로는 몰로니 뮤린 류케미아 바이러스(MMLV)와 같은 레트로바이러스; JC, SV40, 폴리오마, 아데노바이러스와 같은 파코바바이러스

러스; 엡스타인-바르 바이러스(EBV); 보바인 파필로마 바이러스 타입 I(BPV)와 같은 파필로마 바이러스; 백시니아 및 폴리오바이러스 및 기타 사람 및 동물 바이러스가 포함된다. 다른 방법으로서, 비바이러스성 및 비단백질성 벡터, 바이러스성 벡터(예, 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스, 백시니아, 레트로바이러스), 리포솜에 캡슐화된 DNA, 지질 전달 비히클 및 네이키드 DNA를 포함한 많은 방법 및 전달 비히클이 사용될 수 있다.

[0040] 숙주 발현 시스템은 본 발명이 속하는 분야에 잘 알려져 있으며 한 양태로 사용된다. 포유동물 프로모터는 포유동물 RNA 폴리머라제와 결합하고 사이클로필린 단백질의 코딩 서열을 mRNA로 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 DNA 서열은 어느 것도 가능하다.

[0041] 프로모터는 보통 코딩 서열의 5' 말단에 근접하여 위치하고 있는 전사 개시 영역 및 전사 개시 부위의 상류에 위치한 25 내지 30개의 염기쌍을 이용하는 TATA 박스를 갖는다. TATA 박스는 정확한 위치에서 RNA 합성이 이루어지도록 RNA 폴리머라제 II를 지시하는 것으로 여겨진다. 포유동물 프로모터는 또한 전형적으로 TATA 박스의 100 내지 200개 염기쌍 상류에 위치한 상류 프로모터 요소를 함유한다. 상류 프로모터 요소는 전사 개시 속도를 결정하며 어느 방향으로든 작용할 수 있다. 포유동물 프로모터로 특별히 사용될 수 있는 것은 포유동물 바이러스 유전자로부터 유래된 프로모터인데 그 이유는 바이러스 유전자가 흔히 고도로 발현되고 넓은 숙주 범위를 갖고 있기 때문이다. 이의 예로는 SV40 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 메이저 후기 프로모터 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 프로모터를 들 수 있다.

[0042] 하나의 예로서, 사이클로필린 유전자를 T7 발현 벡터(Rosenberg, et al., Gene, 56:125-135, 1987)와 같이 아주 치밀하게 조절되는 프로모터에 작동적으로 연결시킴으로써 달성할 수 있다. 강력한 벡터의 삽입은 사이클로필린 유전자의 양쪽 말단 근처에 간편한 제한 표적과 그 프로모터 근처에 벡터상에 적격한 제한 표적을 동정하고 사이클로필린 유전자가 그 강력한 프로모터의 전사 및 해독 조절하에 배향하도록 벡터내로 삽입시켜 달성할 수 있다. 다른 방법으로서, 사이클로필린 유전자는 이 유전자의 상류에 강력한 리보솜 결합 부위를 설정하여 유전자의 발현을 증가시킴으로써 과발현될 수 있다(Shine and Dalgarno, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:1342-1346, 1974).

[0043] 전형적으로 포유동물 세포에 의해 인지되는 전사 종결 및 폴리아데닐화 서열은 해독 종결 코돈의 3'에 위치한 조절 영역이며, 이에 따라 프로모터 요소와 함께 코딩 서열에 인접한다. 성숙 mRNA의 3' 말단은 부위-특정 해독 후 절단 및 폴리아데닐화에 의해 형성된다. 전사 터미네이터 및 폴리아데닐화 시그날의 예로는 SV40으로부터 유래된 것을 들 수 있다.

[0044] 또 다른 양태로서, 본 발명은 약리학적 유효량의 CypB 단백질, CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 CypB 단백질 재조합 벡터를 아밀로이드원성 질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상에게 투여하여, 아밀로이드원성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 본 발명의 치료방법에 사용되는 CypB 단백질, CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 CypB 단백질 발현 재조합 벡터는 상술한 바와 같다.

[0045] 본 발명의 치료방법은 척추동물의 아밀로이드원성 질환의 예방 또는 치료를 위한 것으로서, 척추동물에는 사람, 가축 등과 같은 포유동물을 포함한다.

[0046] 상기한 바와 같은 CypB 단백질, CypB 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산 또는 CypB 단백질 발현 재조합 벡터를 포함하는 본 발명의 조성물은 아밀로이드원성 질환을 치료 또는 예방하는데 사용할 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[0048] 본 발명의 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 조성물은 국부, 경구, 비경구, 비내, 정맥내, 근육내, 피하, 안내, 경피 등으로 투여 될 수 있고, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다. 바람직한 제형은 주사제이다. 주사는 피하주사, 근육내 주사 및 정맥 주사등이 가능하다.

[0049] 본 발명의 조성물은 치료학적 또는 예방학적 유효량으로 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 질병 종류 및 중

증도, 연령, 성별, 투여방법, 표적 세포, 발현정도 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0050] 또 다른 양태에서, 본 발명은(a) CypB 단백질 발현 세포를 배양하는 단계, (b) 단계 (a)의 세포를 후보 화합물과 접촉시키는 단계, (c) 단계 (b)에서의 CypB 단백질의 발현량을 후보 화합물과 접촉시키지 않은 대조군의 발현량과 비교하는 단계, 및 (d) CypB 단백질 발현량의 증가를 나타내는 화합물을 확인하는 단계를 포함하여, 아밀로이드원성 질환을 치료 또는 예방하는 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 상기한 방법에서, CypB 단백질의 발현량의 차이는 단백질 수준 또는 mRNA 수준에서 확인할 수 있다. 상기 스크리닝된 약물을 이용하여, 세포 내 CypB 발현량을 증가시킬 수 있으며, 바람직하게는 신경 세포 내 CypB 발현량을 증가시킬 수 있다.

[0051] 단백질 발현량의 수준은 각각의 단백질을 겔에 로딩한 후 전기 영동을 통해서 확인할 수 있으나, 바람직하게는 CypB 단백질에 대한 항체를 이용한 항원-항체 복합체 형성량을 통해 면역검정법으로 확인할 수 있다. 이러한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, RIA, 면역침전 분석법 등이 있다.

[0052] 상기 검출 방법에서 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정 가능하다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 항원-항체 복합체 형성을 검출하기 위해 비색법(colorimetric method), 전기화학법(electrochemical method), 형광법(fluorimetric method), 발광법(luminometry), 입자계수법(particle counting method), 육안측정법(visual assessment) 및 섬광계수법(scintillation counting method)으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 방법을 이용할 수 있으며, 반드시 이들로만 제한되는 것은 아니다.

[0053] mRNA 발현량의 수준은 CypB 단백질에 특이적인 프라이머를 이용하여 확인할 수 있다. 구체적인 분석 방법으로는 RT-PCR 또는 노던 블롯 등이 있다. 밴드의 패턴과 강도를 확인함으로써 CypB의 mRNA로의 전사를 정량적으로 측정할 수 있는 간편한 분석방법인 RT-PCR이 바람직하다.

[0054] 본 발명의 구체적 실시예에서, 면역조직화학과 면역세포화학적 방법을 통해서 CypB가 정상 래트와 마우스 뇌 조직의 대뇌피질, 해마, 치아이랑 신경세포의 세포질에서 신경세포-특이적으로 발현된다고 확인되었다. 또한, CypB는 신경세포에서 산화환원반응조절을 통해서 Aβ에 의해 유도된 신경세포 사멸을 억제한다는 것이 확인되었다. 구체적으로, 과발현된 CypB는 Aβ₂₅₋₃₅에 의해 유도된 신경독성으로부터 신경 세포를 보호한다는 것을 확인하였고, 과발현된 CypB가 세포내 ROS의 발생을 줄이는 것을 통해서 Aβ₂₅₋₃₅에 의해 유도된 신경독성을 감소시킨다는 것을 확인하였다.

발명의 효과

[0055] 본 발명의 사이클로필린 B를 포함하는 아밀로이드원성 질환 예방 및 치료용 조성물은 아밀로이드-β 펩티드가 다른 물질들과 침적을 이루어 신경반을 형성하고 이에 의해 신경독성작용을 일으켜 유발되는 아밀로이드원성 질환(amyloid diseases), 예를 들어, 노화 관련 인지 저하, 경증 인지 장애 ("MCI"), 혈관치매, 뇌 아밀로이드 혈관병증("CAA"), 유전성 뇌내출혈, 노인성 치매, 다운 증후군, 봉입체 근염("IBM"), 노화 관련 황반변성("ARMD"), 만성 염증(chronic inflammation), 다발성 골수종(multiple myeloma), II형 당뇨병(type II diabetes), 크로이펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease)을 효과적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1은 사이클로필린 B가 주로 신경세포에서 특이적으로 발견됨을 나타내는 결과이다.
- 도 2는 과발현된 사이클로필린 B가 Aβ₂₅₋₃₅에 의해 유도된 세포사멸을 감소시킨다는 것을 나타내는 결과이다.
- 도 3은 과발현된 사이클로필린 B가 Aβ₂₅₋₃₅에 의해 유도된 아포토시스를 감소하고 ROS 발생을 억제한다는 것을 나타내는 결과이다.
- 도 4는 과발현된 사이클로필린 B가 Aβ₂₅₋₃₅에 의해 유도된 아포토시스 신호 전달을 줄인다는 것을 나타내는 결과이다.
- 도 5는 웨스턴 블롯팅에 의하여 사이클로필린-siRNA의 킥다운(knockdown) 효율을 분석한 결과이다.

도 6은 웨스턴 블롯팅에 의하여 사이클로필린-siRNA의 녹다운(knockdown) 효율을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0058] **실험재료 및 방법**

[0059] **실시예 1: 재료**

[0060] 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil) 마우스 (3주령)와 스프라그-다우레이(Sprague-Dawley, SD; 3개월령) 랫트는 중앙실험동물(Seochu, Seoul, KR)에서 구입하였고, 대뇌피질, 치아이랑(DG), 해마 재료의 수집은 경희대학교 의료센터에서 제공하였다. 태아 소 혈청(Fetal bovine serum) 과 RPMI 1640 배지는 Lonza (Walkersville, MD, USA)에서 구입하였다. 말 혈청 (horse serum) 과 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000)은 Gibco, Invitrogen (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. PC12 세포주는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(the American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)로부터 구입하였다. Aβ₂₅₋₃₅ 와 Aβ₃₅₋₂₅ 는 Bachem (Torrance, CA, USA)로부터 구입하였다. 2',7'-디클로로플루오레세인 디아세테이트(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA), 알렉사 플루오르 488 항-염소와 토끼(Alexa Fluor 488 anti-goat and rabbit), 알렉사 플루오르 594 항-마우스 항체(Alexa Fluor 594 anti-mouse antibody), 호체스트 33342(Hochest 33342), DAPI 핵산염색은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다. 마우스 항-신경 핵(Neun) 단일클론 항체(Mouse anti-neuronal nuclei (Neun) monoclonal antibody)는 Chemicon International, Inc. (Temecula, CA, USA)에서 구입하였다. 정상 말 혈청(normal horse serum)과 ABC kit는 Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA)에서 구입하였다. AKT에 대한 항체들은 Abcam (Cambridge, UK)에서, Bax, Bcl-2, Bcl-xL, α-액티닌, 액틴은 Santa cruz Technology (Santa cruz, CA, USA)에서, caspase-3 와 PARP 는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서, ERK1/2, JNK 과 p38 는 Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA)에서 구입하였다. 2.3% 크리스탈 바이올렛 용액(crystal violet solution), 3-(4, 5-다이메틸티아졸-3-일)-2, 5-다이페닐 테트라졸리움 브로마이드(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT), 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde), 36.5% 포름알데하이드(formaldehyde), 콜라겐 (유형 I), 에탄올, 과산화수소, 메탄올, 인산염완충식염수(phospho buffered saline, PBS), 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 소듐 도데실 황산(sodium dodecyl sulfate, SDS), 트리톤(Triton) X-100, 자일렌(xylene), 다른 갖가지의 화학물질은 표시하지 않는 한은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0061] **실시예 2: 면역조직화학법**

[0062] 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil) 마우스 (3주령)과 SD 랫트 (3개월령)의 뇌는 즉시 꺼냈다. 전체 뇌는 4% (w/v) 파라포르말데하이드(paraformaldehyde)가 녹아있는 0.1 M PBS 에 넣어 고정, 탈수하였고 4℃에서 밤새 파라핀에 넣었다. 바이브라톱(vibratome, Leica VT 1000S; Nussloch, DE)으로 30 μm-두께 면을 만들어, 대뇌피질, 해마, 치아이랑을 포함하는 프리-플로팅 코로날 섹션(free-floating coronal sections)은 1% (v/v) 과산화수소로 15분 동안 내인성의 과산화효소를 차단했다. 다음으로 5분 동안 0.1 M PBS로 3번 세척, 1차 CypB (1:200) 항체와 특별한 신경 표지자인 Neun (1:500)는 5% (v/v) 정상 염소 혈청, 2% (w/v) BSA, 0.1% (v/v) 트리톤(Triton) X-100와 함께 4℃에서 밤새 배양했다. 2차는 비오틴화된 HRP 시스템(biotinylated HRP system)을 사용하였고, 면역조직화학 염색은 아딘비-비오틴 복합면역과산화효소 방법(avidin-biotin compleximmunoperoxidase method, ABC kit, Vector Laboratories Inc.; Burlingame, CA)을 사용하였다. 발색은 다이아미노벤자이드(diaminobenzidine, DAB) 홍당무 과산화효소 시스템(horseradish peroxidase system)을 사용하였다.

[0063] **실시예 3: 면역세포화학법**

[0064] 마우스와 랫트의 뇌 조직은 4% (w/v) 파라포르말데하이드(paraformaldehyde)가 녹아있는 0.1 M PBS 에서 30분 동안 실온에서 고정하였다. 세포는 3% (w/v) BSA 와 0.1% (v/v) 트리톤(Triton) X-100을 포함한 PBS에서 30분 동안 실온에서 투과하였고, 그런 다음 항-CypB 항체 (1:200)와 알렉사 플루오르 488 토끼(Alexa Fluor 488

rabbit), 항-Neun 항체 (1:500) 와 알렉사 플루오르 594 마우스(Alexa Fluor 594 mouse), DAPI (1:1000)에서 배양했다. 미세관 네트워크는 100과 400 배율로 형광 공초점 레이저 현미경(fluorescence confocal laser microscope, META 510; Zeiss)을 이용하여 시각화하였다.

[0065] **실시예 4: 베타 아밀로이드 절편** ²⁵⁻³⁵(beta amyloid fragment ²⁵⁻³⁵)과 **베타 아밀로이드 절편** ³⁵⁻²⁵(beta amyloid fragment ³⁵⁻²⁵)의 준비

[0066] 베타 아밀로이드(Aβ)의 원료인 Aβ²⁵⁻³⁵ 와 Aβ³⁵⁻²⁵ 는 Bachem (Torrance, CA)에서 구입하여 준비하였고 1 mM의 농도로 이온을 제거한 증류수에 녹였고 -80°C에 저장하기 위해 밀봉하였다. Aβ²⁵⁻³⁵와 Aβ³⁵⁻²⁵ 는 사용하기 전에 37°C의 습기 있는 함에서 숙성하였고 배양 배지에 첨가하였다.

[0067] **실시예 5: 세포 배양 및 처리**

[0068] PC12 세포는 12.5% (v/v) 열-비활성화된 말 혈청(heat-inactivated horse serum), 2.5% (v/v) 태아 소 혈청 (fetal bovine serum) 및 1% (v/v) 항생제: 페니실린 G 소듐 100mg/ml, 스트렙토마이신 황산 0.25mg/ml(antibiotics: penicillin G sodium 100mg/ml, streptomycin sulfate 0.25mg/ml, Gibco; Grand Island, NY, USA)가 보충된 RPMI 1640 배지에서 37°C, 5% 습한 이산화탄소 가스, 95% 공기 상태에서 배양하였다. 세포는 실험 전에 균중(confluence)의 70-80%에 도달하면 이전에(Morishima Y., et al. (2002) Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. J. Neurosci. 21, 7551-7560.) 기술한 것처럼 콜라겐 (Sigma; Saint Louis, MO, USA)이 미리 덮인 100mm 디쉬(dish)에 뿌렸다. 배지는 2-3일 마다 바꿔주었고 지수증식기 동안에 트립신 처리하고 그런 다음 5x10⁴ cells/cm²의 밀도에서 웨스턴 블롯 분석과 클론원성 분석을 위해서 콜라겐이 덮인 60mm 디쉬(dish)에, 세포 생존율 분석을 위해서 24-웰 플레이트(well plates)에 1x10⁶ cells/cm², ROS 분석과 유세포분석(flowcytometry)을 위해서 6-웰 플레이트(well plates)에 1x10⁵ cells/cm², 면역세포화학을 위해서 2x10⁶ cells/cm² 폴리-L-라이신(poly-L-lysine)이 덮인 12-웰 플레이트(well plates)에서 재부유하였다. 24시간 후에, 세포 성장은 1% (v/v) 태아 소 혈청이 제공된 RPMI 1640에서 한 시간 동안 전-배양에서 정지하였고 그런 다음 20에서 100 μM/mL의 Aβ²⁵⁻³⁵ 또는 다음 48시간 동안 역 펩타이드 Aβ³⁵⁻²⁵ 와 함께 배양하였다. 각 실험은 세 개의 샘플에서 수립하였고 배양은 열린 세포의 신선한 일정부분을 녹인 계대의 경우 2달 후에 대체하였다.

[0069] **실시예 6: 플라스미드와 트랜스펙션**

[0070] 야생형 인간 사이클로필린 B (CypB/WT)는

[0071] forward primer, 5'-TTAAGCTTATGCTGCGCTCTCCGAACG- 3'(HindIII) (서열번호 3); reverse primer 1, 3'-TATGGGTAGATATCCTCCTTGGCGATGGCA- 5'(EcoRV) (서열번호 4); reverse primer 2, 5'-CCCTCGAGAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGAT- 3'(XhoI) (서열번호 5); C-terminal end에서 tagging HA tag 5'-TACCCATACGACGTCAGACTACGCT- 3' (서열번호 6)에 의해 RT-PCR에 의한 전체 RNA 표본으로부터 증폭하였다. PPIase-불안정한 돌연변이 CypB/R95A 는 다음 프라이머: 5'-CAAATCCAT GCG GTAATCAAG- 3' (서열번호 7); 3'-CTTGATGC CG ATGGAATTG- 3'(서열번호 8)를 사용하여 arginine 잔기 (R95)가 Alanine (A)으로 돌연변이가 되어 준비되었다. DNA 트랜스펙션은 제조사의 프로토콜에 따라서 리포펙타민 2000(Lipofectamine 2000) 약품과 함께 PC12 세포 안으로 실시하였다. 세포는 분주로부터 48시간 후에 Aβ²⁵⁻³⁵, Aβ³⁵⁻²⁵ 또는 H₂O₂를 48시간 동안 처리하였다.

[0072] **실시예 7: RNAi 간섭 (interference)**

[0073] 사이클로필린 B(si-CypB)이나 스크램블 서열(scrambled siRNA)에 특이한 small 간섭 RNAs (siRNA)는 Dharmacon (Chicago, IL, USA)에서 구입하였다. CypB siRNA 트랜스펙션은 동일한 DNA 구성으로 실시하였고 배양 72시간

후에, A β ₂₅₋₃₅, A β ₃₅₋₂₅ 또는 H₂O₂는 48시간 동안 처리였다. CypB의 생산에서 siRNA 간섭의 효율은 웨스턴 블롯 분석으로 분석하였다.

[0074] **실시예 8: 세포 생존능력 분석 (MTT 환원)**

[0075] 3-(4, 5-다이메틸티아졸-3-일)-2, 5-다이페닐 테트라졸리움 브로마이드(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 분석은 A β 에서 세포 생존능력을 결정하는데 실행하였다. 세포는 24 웰 플레이트(well plates)에 이전의 상태처럼 뿌렸고 24시간 후에, A β ₂₅₋₃₅ 또는 A β ₃₅₋₂₅는 홀로 처리하거나 24시간 동안 pcDNA3, CypB/WT, CypB/R95A 또는 48시간 동안 si-RNA와 si-CypB/WT 의 트랜스펙션 후에 처리하였다. MTT 는 각 웰에 PBS에 0.5 mg/ml의 농도로 넣었다. 마이크로플레이트 판독기(microplate reader, Bio-Rad; Hercules, CA, USA)에서 595 nm의 흡광도를 측정하였다. 대조군은 미처리 세포와 A β ₃₅₋₂₅ 처리 세포를 사용하였고 미처리 세포 관련된 흡광도의 비율로 표시하였다.

[0076] **실시예 9: 클론원성 분석**

[0077] 클론원성 분석은 다음과 같은 조건을 바탕으로 자라나는 세포에서 실행하였다: 1) PC12 세포는 각각 위에서 설명한 대로 분주하였고 A β ₂₅₋₃₅, A β ₃₅₋₂₅ 또는 없이 48시간동안 처리하였다. 2) PC12 세포는 각각 위에서 설명한 대로 분주하였고 pcDNA3, CypB/WT, CypB/R95A를 24시간 동안 트랜스펙션하였고 그런 후에 A β ₂₅₋₃₅ 있거나 없이 48시간 동안 처리하였다. 3) PC12 세포는 각각 위에서 설명한 대로 분주하였고 si-control과 si-CypB/WT를 48시간 동안 트랜스펙션시켰고 그런 후에 A β ₂₅₋₃₅ 있거나 없이 48시간 동안 처리하였다. 세포는 트립신 처리하고 정상 성장 배지에서 세포를 1:100 희석하여 분주하였다. 14에서 17일 안에, 50에서 60 콜로니들이 형성되었다. 콜로니들은 100% 메탄올로 고정하고 2.3% (v/v) 크리스탈 바이올렛 용액(crystal violet solution)으로 30분 동안 염색하고 뒤이어 10분 마다 PBS로 여러 번 세척하였다.

[0078] **실시예 10: 웨스턴 블롯 분석**

[0079] 전체 세포 용해 표본을 위해서, 세포는 LIPA 완충용액(150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4, 1% Na-deoxycholate, 1% NP-40, 5 mM EDTA 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF) 으로 균질화하였다. 단백질 샘플들(30 μ g)의 동일한 양은 9~14% (v/v) 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에서 SDS-PAGE를 이용하여 분리하였고 나이트로셀룰로오즈(nitrocellulose) 막으로 옮겼다. 그런 다음 막은 5% (w/v) 탈지유가 포함된 TBST에서 한 시간 동안 차단하였고 1차 항체들을 4°C에서 밤새 배양하였고, 다음으로 2차 항체를 한 시간 동안 배양하였다. 검출을 위해서, 강화된 화학발광 약품 (Santa cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였다. 특별한 것을 제외하고, α -액티닌과 액틴 단백질은 샘플 단백질의 양을 표준화하기 위해 면역탁본 하였다.

[0080] **실시예 11: 호체스트 33342(Hochest 33342) 염색**

[0081] PC12 세포는 상기에서 설명된 것처럼 간단하게 24-웰 플레이트(well plates)에서 폴리-L-라이신이 덮인 커버글라스 위에 분주하였고 커버글라스에 부착된 세포는 신선한 배지를 포함하는 새롭게 폴리-L-라이신이 덮인 24-웰 플레이트(well plates)로 꺼냈다. A β ₂₅₋₃₅(50 μ M/mL)은 단일 처리하거나 48시간 동안 pcDNA3, CypB/WT, CypB/R95A 또는 72시간 동안 si-CypB의 트랜스펙션 24시간 후에 처리하였다. 세포는 PBS로 세척한 다음에 PBS에 녹인 4% (v/v) 포르말데하이드(formaldehyde)로 20°C에서 10분 동안 고정하였다. 그 후에 세포는 호체스트 33342(Hochest 33342, 1:1000)으로 30분 동안 염색하였고 그런 다음에 형광 공초점 레이저 현미경(fluorescence confocal laser microscope, META 510; Zeiss)을 이용하여 시각화하였다.

[0082] **실시예 12: 세포내 reactive oxygen species 의 측정**

[0083] ROS의 세포내 발생을 측정하기 위해서, 형광 탐침(probe)인 2',7'-디클로로플루오레스세인 디아세테이트(2',7'-

dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA)를 사용하였다. PC12 세포는 상기에서처럼 분주하였고 pcDNA3, CypB/WT, CypB/R95A 24시간 동안 또는 si-control과 si-CypB/WT를 48시간 동안 트랜스펙션하였다. 다음날, 세포는 A β ₂₅₋₃₅ (50 μ M/mL) 있거나 없게 3시간 동안 처리하였고 그 후에 10 μ M DCF-DA는 한 시간 동안 37°C에서 넣었다. 세포는 PBS로 두 번씩 세척하였고 1500 g로 5분 동안 원심 분리하였다. ROS 발생은 Flow Cytometry (Beckman Coulter)로 검출하였다.

[0084] 실시예 13: 유세포분석(flowcytometry)으로 세포자멸 PC12 세포의 검출

[0085] 유세포분석(flowcytometry)으로 아포토시스 세포를 검출하기 위해서, PC12 세포는 pcDNA3, CypB/WT, CypB/R95A 24시간 동안 또는 si-control과 si-CypB/WT를 48시간 동안 트랜스펙션하였다. 24시간 후에, 세포는 A β ₂₅₋₃₅ (50 μ M/mL)에 48시간 동안 노출하였고 두 번 세척하였고 70% 에탄올로 한 시간 동안 고정하였다. 그 후에 세포는 0.5 mL PBS에서 부유시켜 수확하여 1500 g로 5분 동안 원심 분리하였다. 세포는 0.05 mg/mL PI 가 포함된 0.5 mL PBS에서 재부유시켰고 RNase 2 μ l/mL (stock 10 mg/mL)는 첨가되어 37°C에서 30분 동안 배양되었다. 샘플은 PBS로 두 번 세척하였고 0.5~1 mL PBS에서 부유시켰다. DNA 함유량은 아포토시스 비율을 분석하기 위해서 유세포분석(flowcytometry, Beckman Coulter)로 검출하였다.

[0086] 실시예14 :통계 분석

[0087] 실시예들에서 결과는 최소한 세 개의 독립적인 실험에서 얻은 자료를 평균 \pm 표준 편차 (SD)로 표시하였으며 부터 스트던트 티-테스트(Student t-test)을 이용하여 통계 분석하였다. P* <0.05 value 와 P** <0.001 를 유의한 것으로 보았다.

[0088] 결과

[0089] 1. 신경세포에서 신경세포-특이적으로 위치하는 사이클로필린 B

[0090] 사이클로필린 B (cypB)가 정상 래트와 마우스 뇌 조직의 대뇌피질, 해마, 치아이랑신경 세포의 세포질에서 루프-홀드(loop-holed) 형태로 많이 존재하는지 확인하려고, 면역조직화학을 통해서 cypB의 조직학적 평가를 하였다. 그 결과를 도 1a에 나타내었다.

[0091] 신경 세포와 cypB는 위치가 같을 것이라는 관점에서 뇌 세포 핵에 대한 신경세포의 수는 신경세포-특이적인 핵 단백질 마커(marker)인 Neun(neuronal nuclei)에 의해 나타내었다. cypB가 신경세포-특이적일 수 있다는 가능성을 평가하기 위해서 각각의 신경세포에서 신경세포의 핵과 cypB가 정확하게 겹쳐지는 것에서 신경세포와 cypB가 직접적으로 위치하는지 보기 위해서, 면역세포화학을 실행하였다. 그 결과를 도 1b에 나타내었다. 이러한 결과는 생쥐의 뇌에서도 일어났다(도 1b). 그러나, DAPI로 염색된 세포는 Neun 이나 cypB로 염색된 세포와 연관되어 있지 않다는 것은 대뇌피질, 해마, 치아이랑의 연속된 섹션(section) 에서 세포의 약 90%는 신경세포이고 cypB는 신경세포-특이적이라는 것을 알 수 있다.

[0092] 2. PC12 세포에서 베타 아밀로이드₂₅₋₃₅(beta amyloid₂₅₋₃₅)에 의해 유도된 신경독성에서 과발현된 사이클로필린 B의 효과

[0093] 베타 아밀로이드(A β ₂₅₋₃₅)에 의해 유도된 신경독성은 MMT 분석을 통해 측정하였다. A β ₂₅₋₃₅ (20-100 μ M/mL) 을 48시간 동안 처리한 후의 PC12 세포의 생존율은 용량-의존적 방식으로 각각 81.98% (20 μ M/mL), 53.02% (40 μ M/mL), 48.80% (60 μ M/mL), 40.35 (80 μ M/mL)으로 감소하였다(도 2a). 48시간 동안 50 μ M/mL의 A β ₂₅₋₃₅를 처리한 후에, PC12 세포에서 세포 생존율은 대조군의 36.81%로 감소하였다(도 2b). 또한 A β ₂₅₋₃₅ 에 의해 유도된 세포 사멸은 원래보다 400배로 확대한 것으로 클론원성 분석을 통해서 현미경 상에서 관찰되었고(도 2c), MTT 환원 분석에서도 48시간 동안 50 μ M/mL 의 A β ₂₅₋₃₅ 처리는 91%인 A β ₃₅₋₂₅ 대조군의 생존율이 42%로 줄어든 비슷한 결과를 보였다. 그러나, A β ₂₅₋₃₅의 역 펩타이드인, A β ₃₅₋₂₅는 PC12 세포의 생존율에 영향을 미치지 못하였다.

생존율의 비율은 $A\beta$ -처리된 샘플 OD/대조군 OD 로 계산하였다. $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성에서 사이클로필린 B(CypB)의 효과를 실험하기 위해서, PC12 세포에서 HA-tagged CypB/WT, 또는 PPIase 활성에 결함이 있는 HA-tagged CypB/R95A를 과발현하였다. CypB/WT와 CypB/R95A 모두 트랜스펙션을 확립한 후에, CypB/WT와 CypB/R95A의 발현 수치는 웨스턴 블롯 분석을 통해서 분석하였다(도 2e). 두 개의 단백질의 관련된 과발현 수치는 α -액티닌과 액틴에 따라서 농도계적으로 정량화하였다. 과발현 수치에서는 어떤 차이도 볼 수 없었다. 도 2f 는 과발현된 CypB/WT에서 48시간 동안 50 μ M/mL 의 $A\beta_{25-35}$ 처리 후에 PC12 세포의 생존율이 유의미하게 증가하였다. 그러나, 가상(mock) 과발현 또는 과발현된 CypB/R95A 돌연변이 단백질은 $A\beta_{25-35}$ 처리한 PC12 세포를 구하지 못하였다. 또한, $A\beta_{35-25}$ 처리 그룹의 생존능력에서 어떤 차이도 볼 수 없었다. 또한 클론원성 분석에서 과발현된 CypB/WT는 세포의 생존율을 86%까지 구하였으나, 가상(51%) 또는 CypB/R95A(57%) 과발현은 구하지 못했다. 이러한 결과에서 과발현된 CypB는 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성으로부터 PC12 세포를 보호한다는 것을 알 수 있다.

[0094] **3. PC12 세포에서 베타 아밀로이드₂₅₋₃₅(beta amyloid₂₅₋₃₅)에 의해 유도된 아포토시스에서 과발현된 사이클로필린 B(Cyp B)의 효과**

[0095] DNA 절편화를 인지하여 형광 뉴클레오티드를 가지는 $A\beta_{25-35}$ (50 μ M/mL) 처리한 세포의 핵들의 염색을 통한 Hoechst 33342 염색으로 검출할 수 있는 염색질 수축과 절편화는 아포토시스의 잘 알려진 특징이다. 48 시간 동안 $A\beta_{25-35}$ (50 μ M/mL) 처리는 30%까지 아포토시스로 인식되는 특징들을 보였고 대조군과 $A\beta_{35-25}$ 는 그렇지 못하였다(도 3a). 또한, 과발현된 CypB/WT는 가상(mock, 42%) 또는 CypB/R95A 발현된 것(53%)와 비교해서 염색질 수축과 절편화를 보이지 않았다(도 3b).

[0096] $A\beta_{25-35}$ 은 알츠하이머 질병 모델 시스템에서 금속이온 환원을 통해서 H_2O_2 형성을 유도할 수 있으므로(Huang X., et al. (1999) The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. Biochemistry. 38, 7609-7616.), $A\beta_{25-35}$ 처리한 후에 CypB/WT-과발현된 PC12 세포에서 ROS 발생을 측정하였다. 세포내 ROS의 발생 수치는 DCF-DA를 사용하여 측정하였다. 도 3e 과 3f에서 제시한 것처럼, $A\beta_{25-35}$ 처리한 PC12 세포에서 ROS 축적을 증명하려고, 3 시간 동안 $A\beta_{25-35}$ (50 μ M/mL) 처리한 후에 PC12 세포로 DCF-DA의 넣어주어 미처리 세포 (35.89%)와 $A\beta_{35-25}$ 처리 세포 (57.13%)를 비교하면 DCF 양성 세포 (86.80%)의 유의미한 증가를 나타내었다. 200 μ M/mL H_2O_2 -처리 세포 (98.72%)는 양성 대조군으로 사용하였다. 놀랍게도, CypB/WT-과발현된 PC12 세포는 $A\beta_{25-35}$ 처리한 후에 ROS 축적이 유의미하게 감소하였고, 이는 과발현된 CypB가 세포내 ROS의 발생을 줄이는 것을 통해서 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성을 감소시킨다는 것을 알 수 있다(도 3e와 3f). 그러나, CypB/R95A 돌연변이-과발현된 PC12 세포는 세포내 ROS의 발생을 줄이지 못하였다.

[0097] 다음, FACS 분석은 $A\beta_{25-35}$ 에 노출된 후에 pcDNA, CypB/WT, CypB/R95A 트랜스펙션에서 아포토시스의 지표처럼 각각의 세포에서 일어나는 DNA 절편화를 평가하기 위해서 실행하였다. 첫 번째, 세포주기의 sub-G1 상에서 세포 분할은 48시간 동안 50 μ M/mL의 $A\beta_{25-35}$, 50 μ M/mL $A\beta_{35-25}$ 또는 200 μ M/mL H_2O_2 처리 후에 결정되었다. 200 μ M/mL H_2O_2 는 아포토시스의 세포 죽음을 위한 양성 대조군으로 사용하였다. 도 3c에서 제시한 것처럼, sub-G1 군 최고점(population peak)은 50 μ M/mL의 $A\beta_{25-35}$ 처리한 후에 명백하였고, 반면에 미처리 또는 $A\beta_{35-25}$ 처리 세포는 최고점이 보이지 않았다. $A\beta_{25-35}$ 처리 세포(25.04%)는 각각 미처리 대조군(2.72%)과 $A\beta_{35-25}$ 처리 세포(5.55%)와 비교해서 거의 아포토시스의 세포 죽음의 9.2배와 4.5배를 보였다(도 3c). 그래서, 우리는 $A\beta_{25-35}$ 에 노출된 후에 pcDNA, CypB/WT, CypB/R95A 트랜스펙션에서 아포토시스를 측정하였다. pcDNA과 CypB/R95A 트랜스펙션에서보다 CypB/WT 트랜스펙션에서 적은 아포토시스의 세포 죽음을 보았다 (도 3d). 도 3d에서 제시한 것처럼, 과발현된 CypB/WT는 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 아포토시스를 12.99%까지 줄였고, 반면에 pcDNA(24.22%) 또는 과발현된 CypB/R95A 돌연변이(22.06%)는 줄이지 못하였다.

[0098] 기대했던 것처럼, $A\beta_{25-35}$ 는 48시간에 노출되었을 때 caspase-3 와 PARP 분할은 $A\beta_{25-35}$ 처리 세포에서 명백하

였고, Bax 와 Bcl-2, Bcl-xL 는 반대로 나타났다(도 3g와 3h). 그러나, caspase-3 분할은 과발현된 CypB/WT에 의해 억제되었지만, 과발현된 CypB/R95A 돌연변이에 의해서는 그렇지 못하였다(도 3i). PARP 분할은 116 kDa 뉴클리어 폴리(nuclear poly, ADP-ribose) 폴리머라이즈 효소로부터 유도된 89 kDa 절편(fragment)의 출현에 의해 $A\beta_{25-35}$ 에 노출된 세포에서 명백하였고, Bax 와 Bcl-2, Bcl-xL 는 반대로 나타났다(도 3j).

[0099] **4. 베타 아밀로이드(β amyloid $_{25-35}$)에 의해 유도된 아포토시스 신호에서 과발현된 사이클로필린 B(Cyp B)의 효과**

[0100] $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성의 아포토시스 신호 경로에서 과발현된 CypB의 효과를 이해하기 위해서, 여러 연구에서 $A\beta$ 가 유도한 MAPK와 PI-3K/AKT1 경로를 포함하는 여러 가지 신호 경로를 지적한 이래로, MAPK와 PI-3K/AKT1 경로와 같은 스트레스 신호 변환 경로를 연구하였다. 세포 유형과 상태 가운데서 조화에 의존해서 MAPK와 PI-3K/AKT1는 세포 사멸과 세포 생존을 조절한다. $A\beta_{25-35}$ (50 μ M/mL) 처리한 웨스턴 블롯 분석의 결과는 p-JNK, p-p38, ERK1/2와 AKT1를 시간 의존적인 방식으로 활성화하였다(도 4a와 4b). 그러나, 과발현된 CypB/WT은 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 p-JNK, p-p38, ERK1/2와 AKT1를 차단하였고, 반면에 과발현된 CypB/R95A 돌연변이는 그렇지 않았다(도 4c와 4d). 종합해 보면, 이러한 결과로 과발현된 CypB는 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성에 대하여 PC12 세포를 보호한다는 것을 알 수 있다.

[0101] **5. siRNA knock down에서 과발현된 사이클로필린 B(Cyp B)의 효과**

[0102] 더 나아가서 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성에 대한 CypB의 보호 역할의 원인이 되는 생화학적 원리를 조사하고 확인하기 위해서, PC12 세포에서 CypB 단백질 수치를 knock down하려고 siRNA를 이용하여 RNA 간섭 실험을 수행하였고, 그런 다음 $A\beta_{25-35}$ 처리한 후에 세포 생존을 평가하였다. 이번 실험에서, siRNA의 효율성은 웨스턴 블롯 분석으로 평가하였다. 내생의 CypB의 발현 수치는 유의미하게 특이적인 siRNA 간섭으로 억제되었다(도 5a). CypB는 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성을 줄이는데 필요하다고 제시하기 위해서, MTT 환원 분석(도 5b)과 클론원성 분석(도 5c)에서 제시한 것처럼, $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 신경독성은 $A\beta_{25-35}$ 처리한 후에 대조군-siRNA 트랜스팩션과 비교해서 CypB knock down에서 유의미하게 증가하였다. 이번 실시예에서, 대조군-siRNA를 발현시킨 MTT 환원 분석은 대조군에 비해 세포 생존율의 50%를 보여주었고 si-CypB는 39% 였고 클론원성 분석은 대조군-siRNA(56%) 과 si-CypB(39%)을 나타내었다. 그러나, $A\beta_{35-25}$ 는 세포의 생존율에 영향을 미치지 못했다.

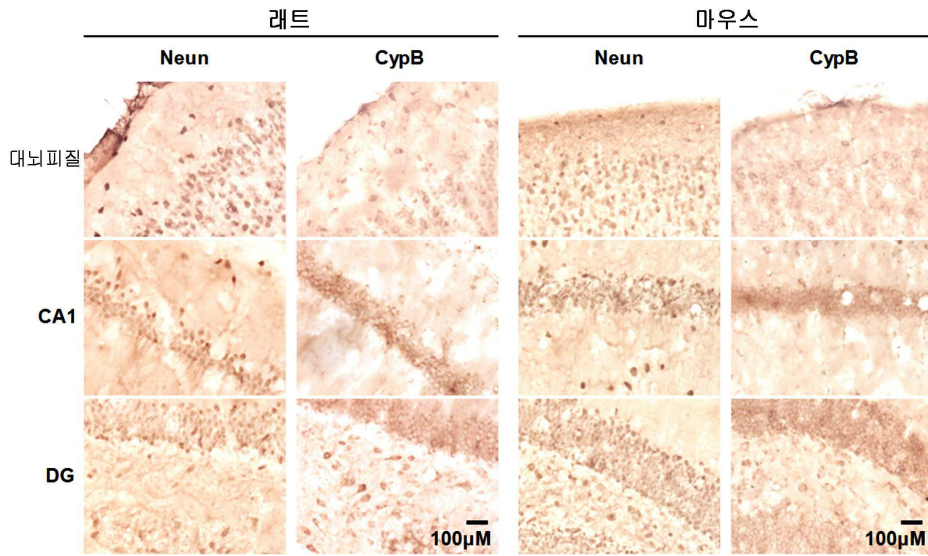
[0103] 도 5d에서 예측된 것처럼, 세포 안에서 신경독성 뿐만 아니라 아포토시스 요소에 영향을 받는 것으로 보이는 염색질 응축과 핵 취약(fragile)는 대조군 siRNA와 비교해서 knockdown에서 더 나타났다. Caspase-3와 PARP의 분할은 Bax에서처럼 cypB의 knock down 후에 극적으로 활성화되었고 그러나 Bcl-2는 반대로 나타났다(도 5e와 5f). 이는 Bcl-2 단백질 간의 생존 경로를 보여준다.

[0104] **6. 베타 아밀로이드(β amyloid $_{25-35}$)에 의해 유도된 아포토시스 신호에서 사이클로필린 B(Cyp B) knock down의 효과**

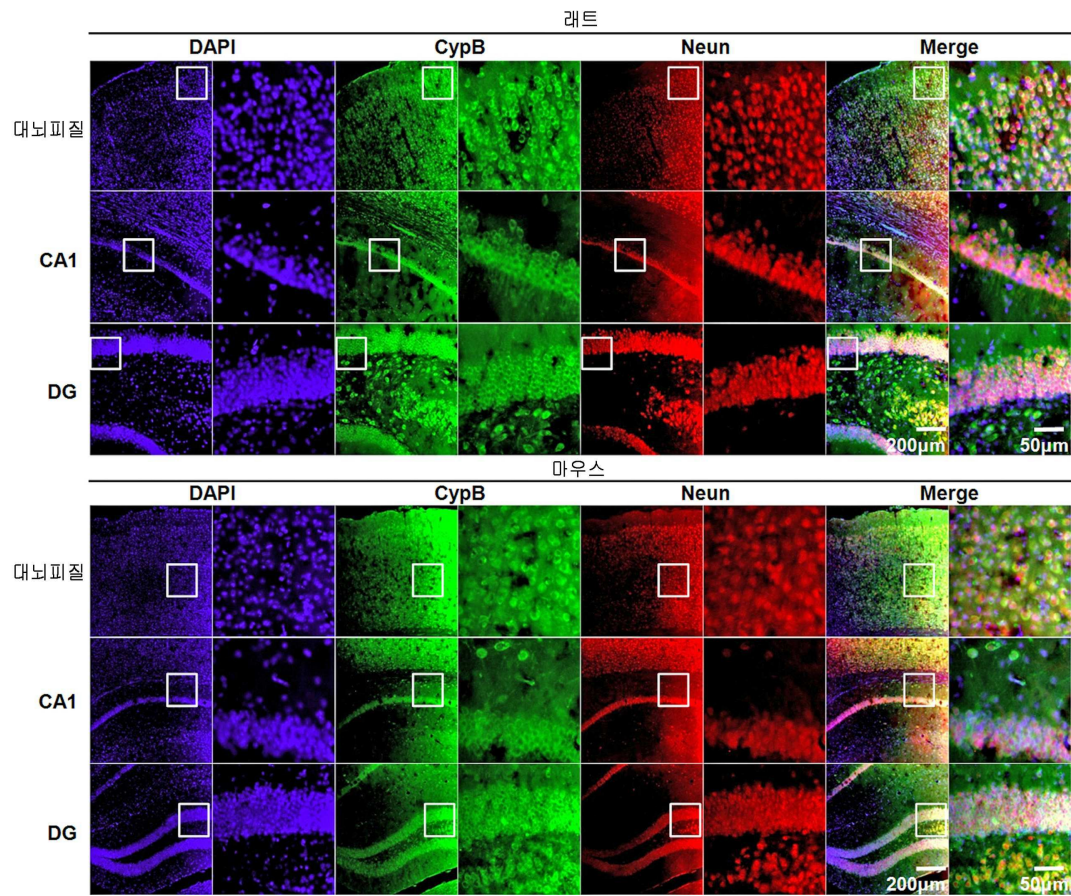
[0105] MAPK와 PI-3K/AKT1가 $A\beta_{25-35}$ 에 의해 유도된 세포 사멸에서 중요한지 결정하기 위해서, CypB의 knock down에 의한 MAPK와 PI-3K/AKT1 신호에서의 CypB의 효과를 실험하였다. cypB-siRNA knockdown의 실행으로 또한 PC12 세포에서 MAPK와 PI-3K/AKT1 수치가 증가하였다(도 6a와 6b). 48시간 동안 $A\beta_{25-35}$ (50 μ M/mL)를 처리하였을 때, p-JNK, p-p38, p-ERK1/2와 AKT1의 함유량은 대조군-siRNA와 비교해서 증가를 나타냈다. 이번 결과를 보면, MAPK와 PI-3K는 $A\beta$ 가 매개하는 아포토시스 세포 죽음과 관련이 있고 cypB는 항산화 효소 활성화와 다른 사이토카인의 수치를 억제해서 $A\beta$ 가 유도한 변화를 막는다는 것을 알 수 있다.

도면

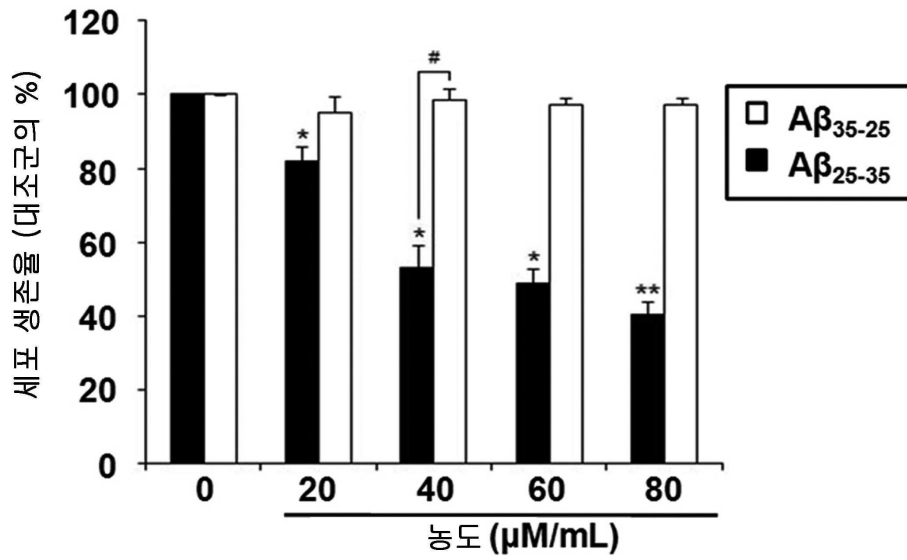
도면1a



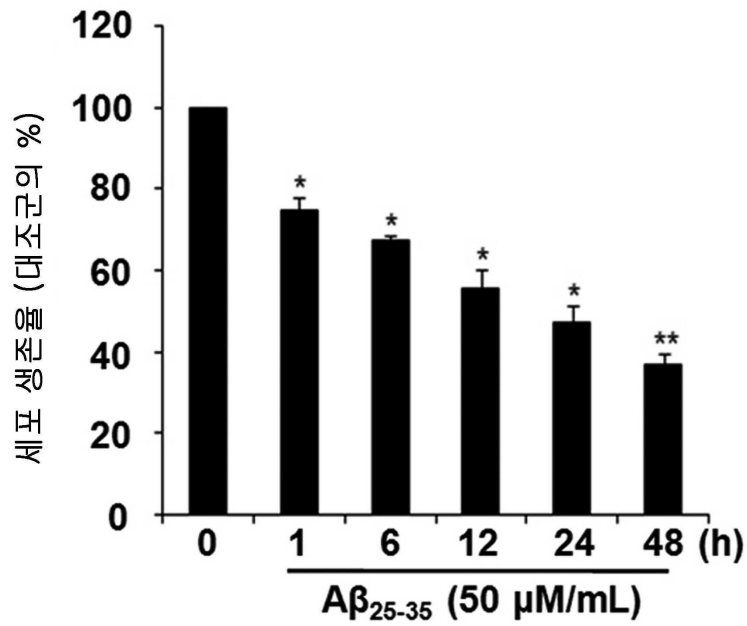
도면1b



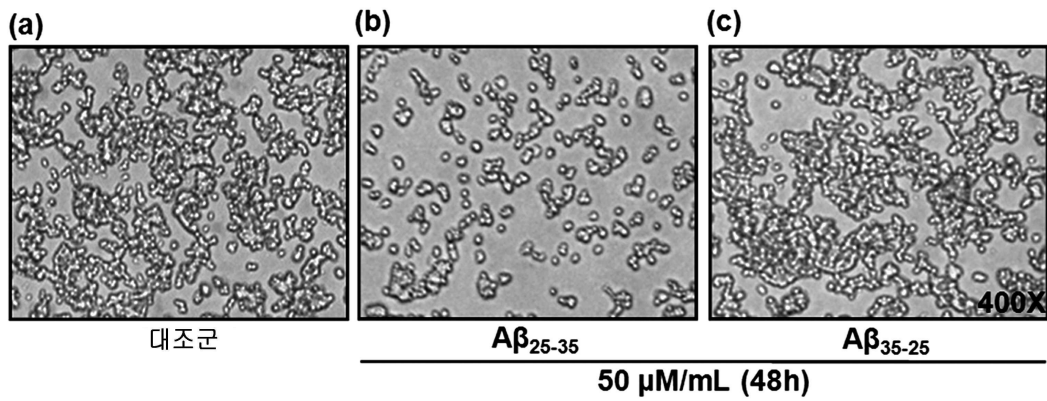
도면2a



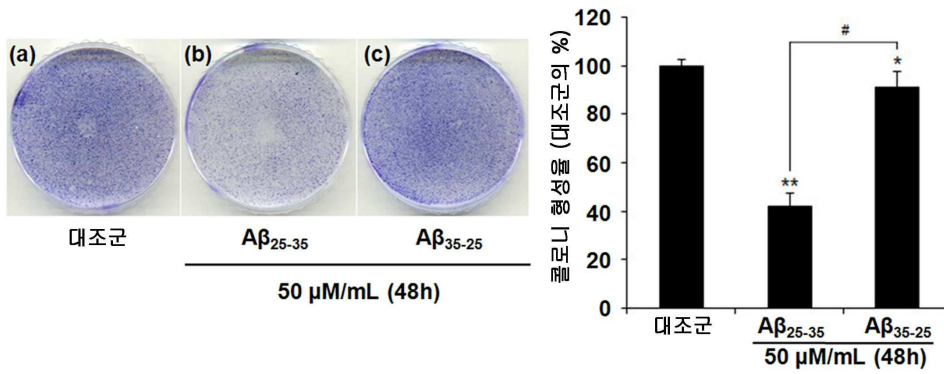
도면2b



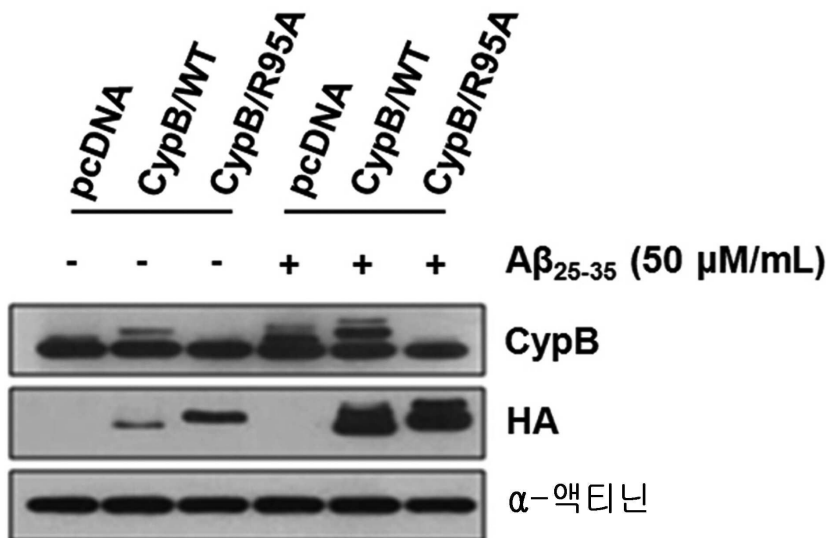
도면2c



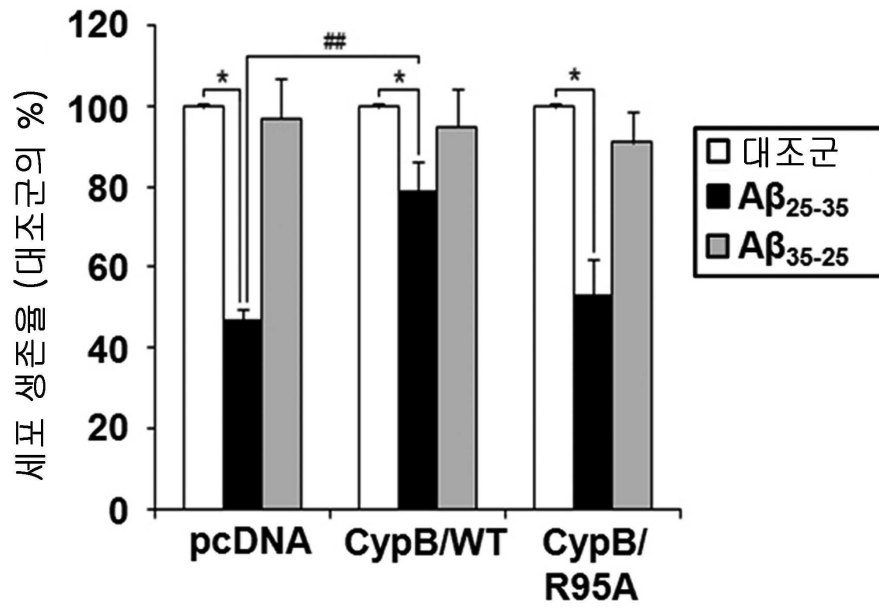
도면2d



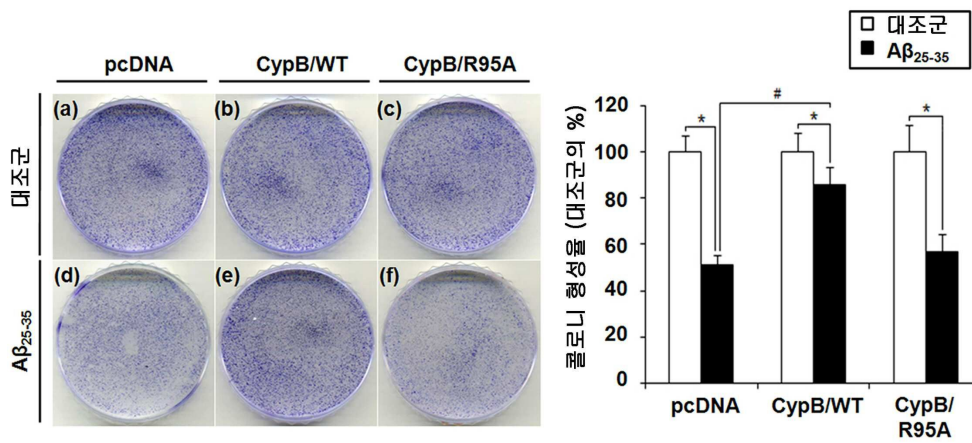
도면2e



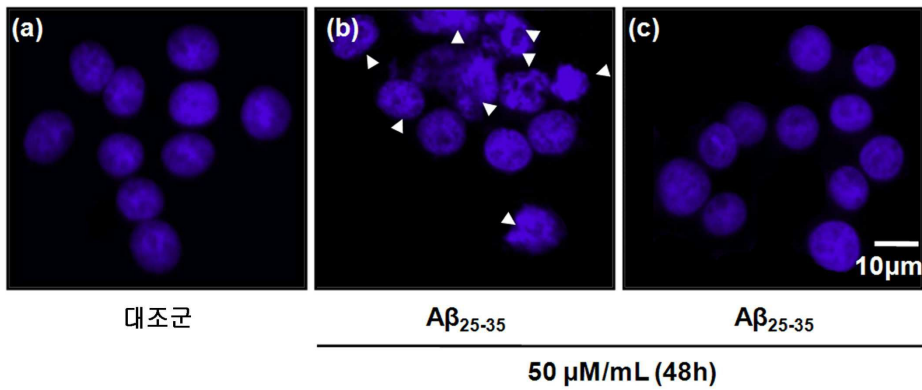
도면2f



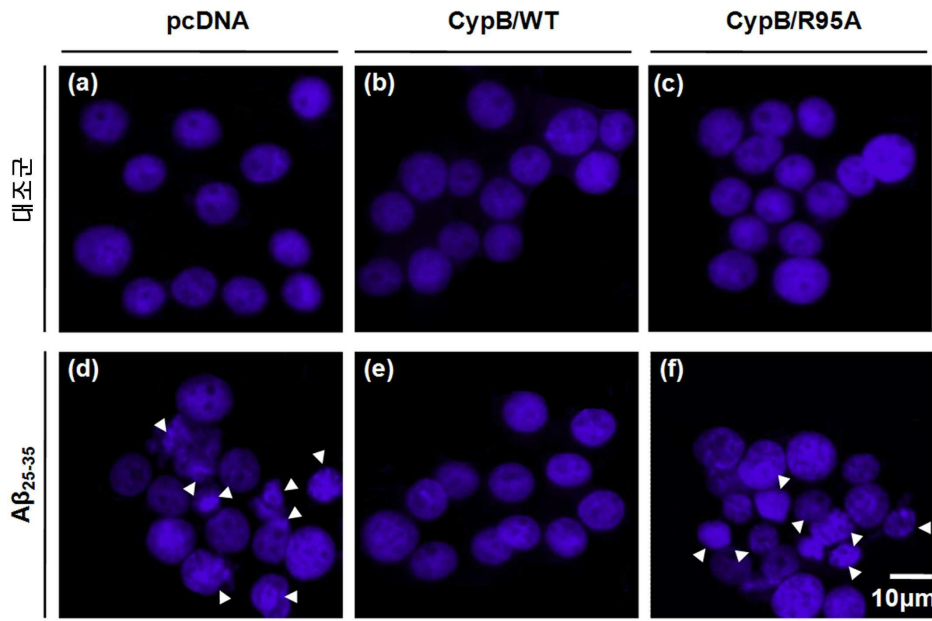
도면2g



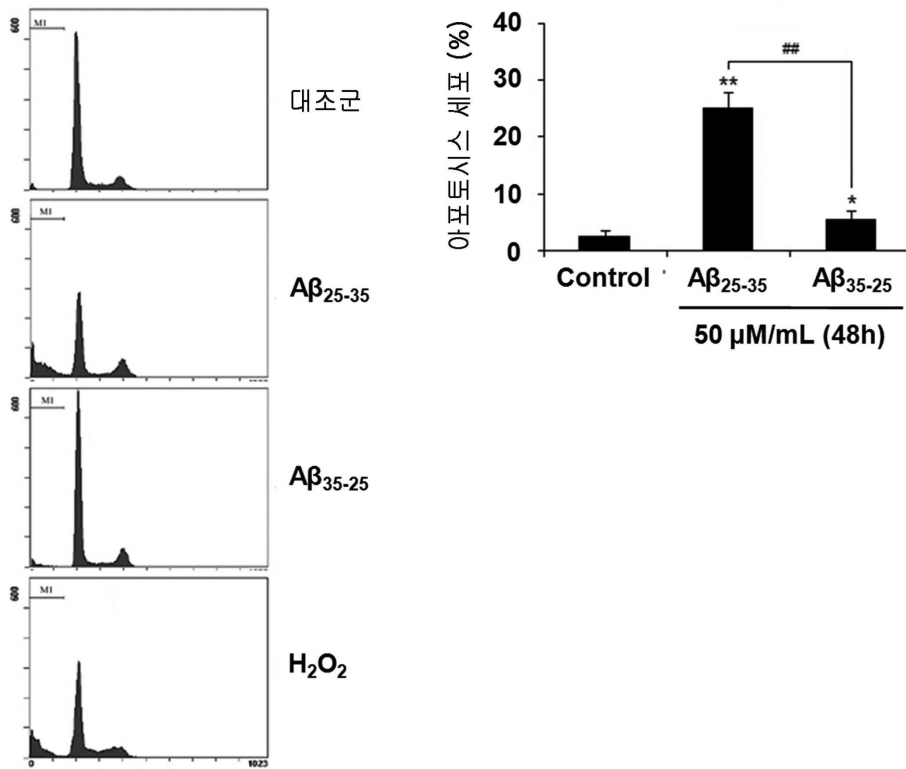
도면3a



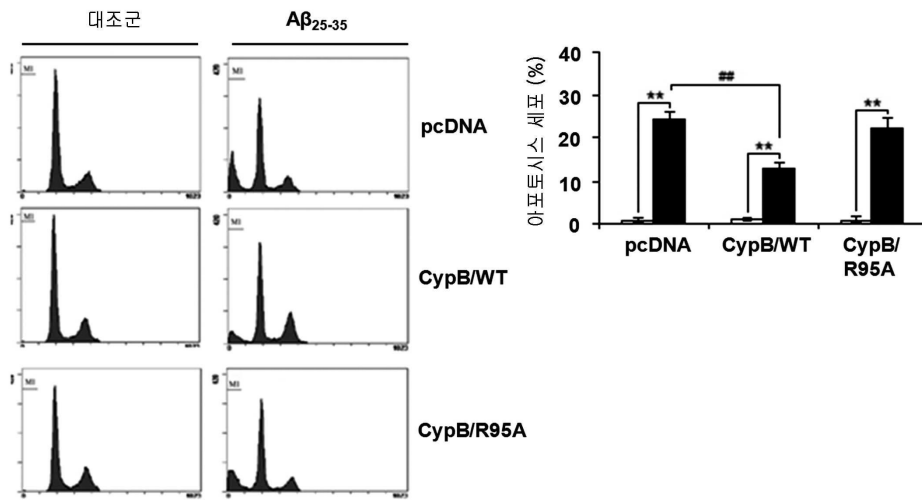
도면3b



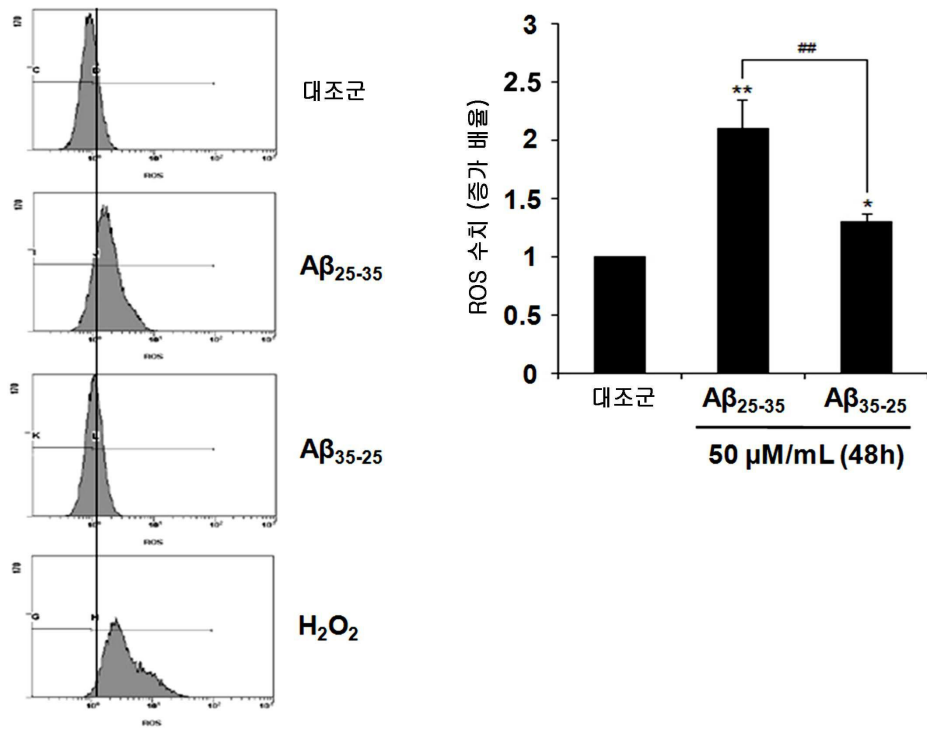
도면3c



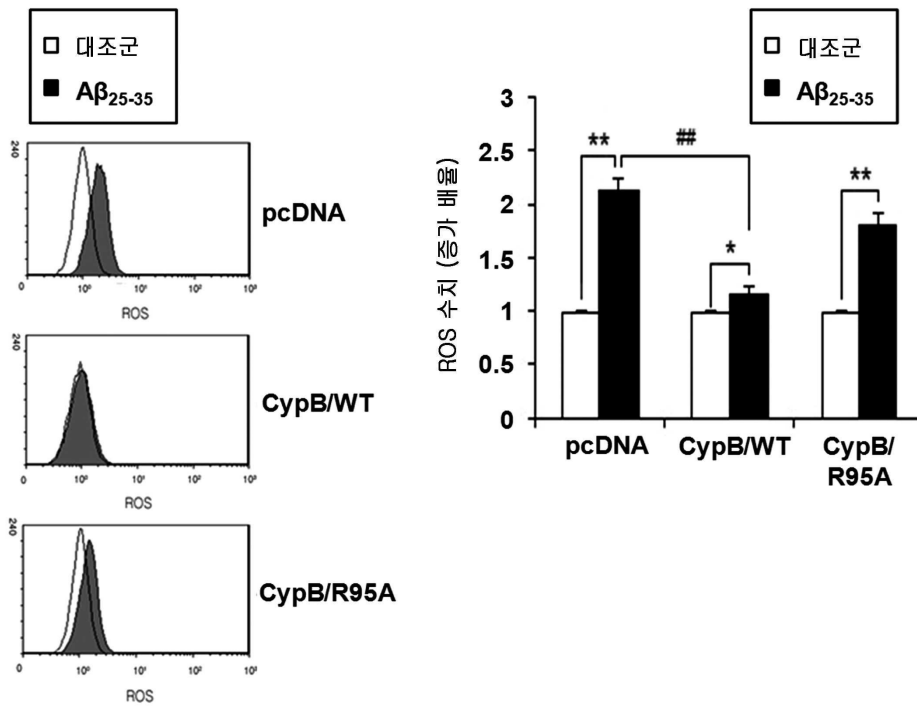
도면3d



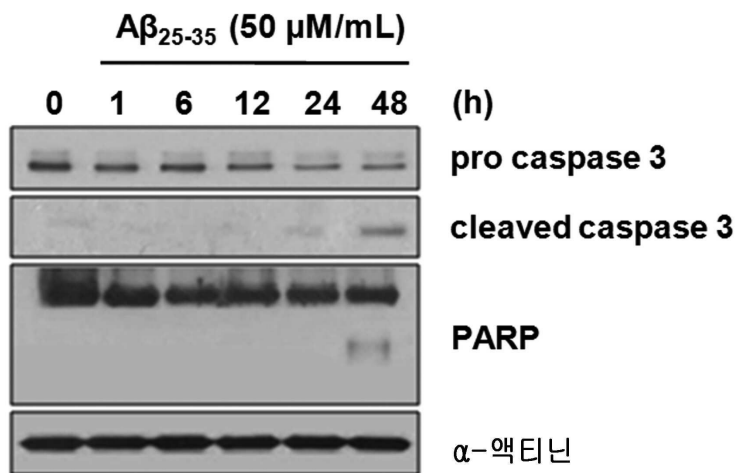
도면3e



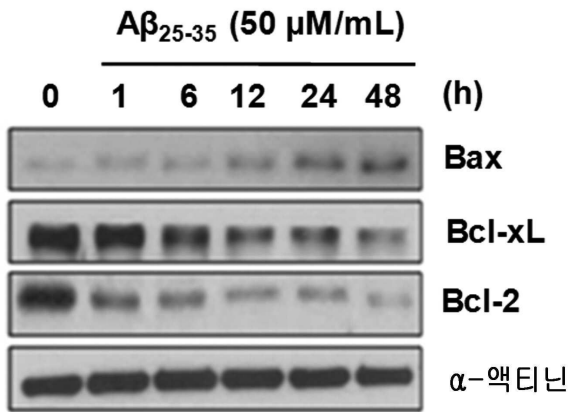
도면3f



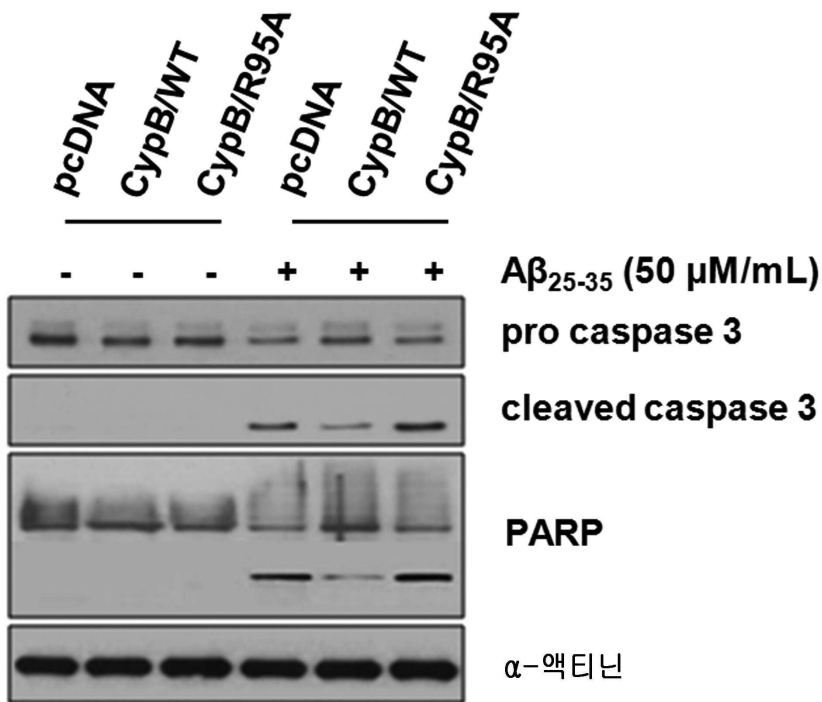
도면3g



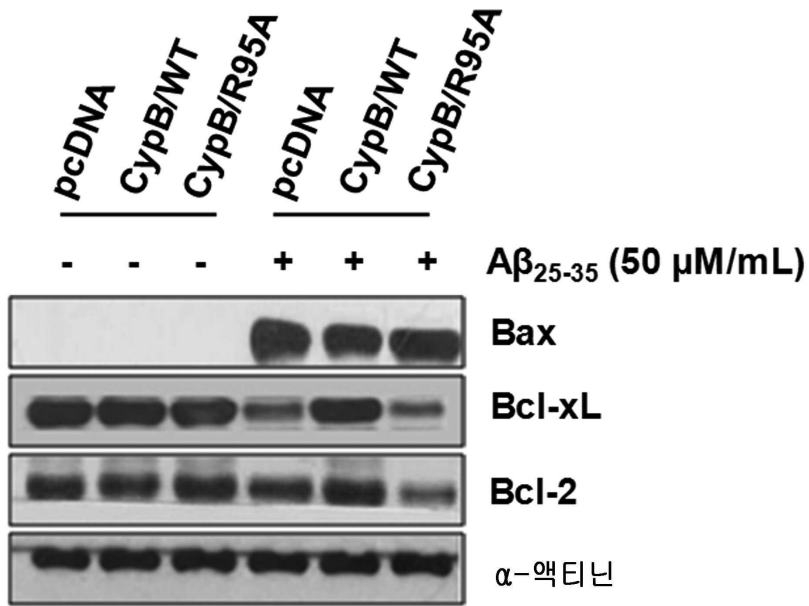
도면3h



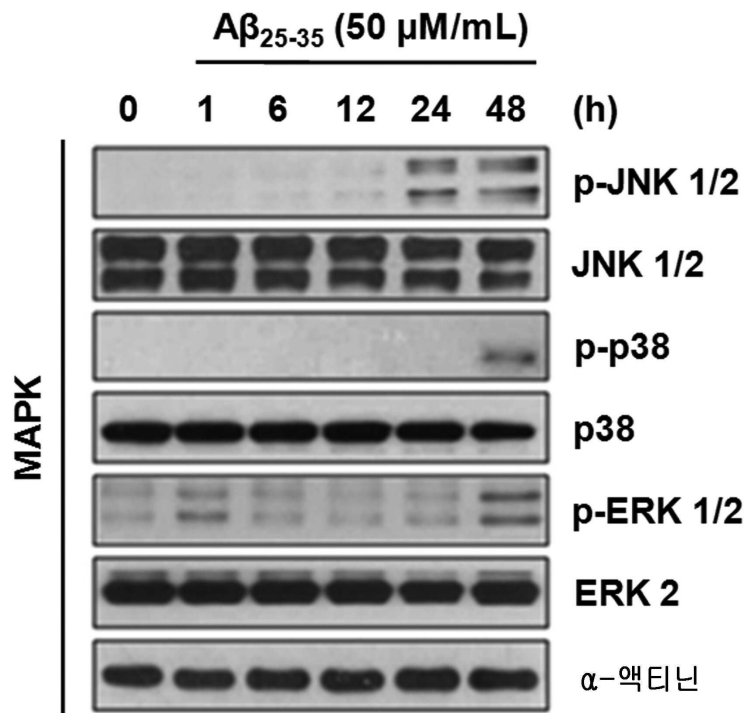
도면3i



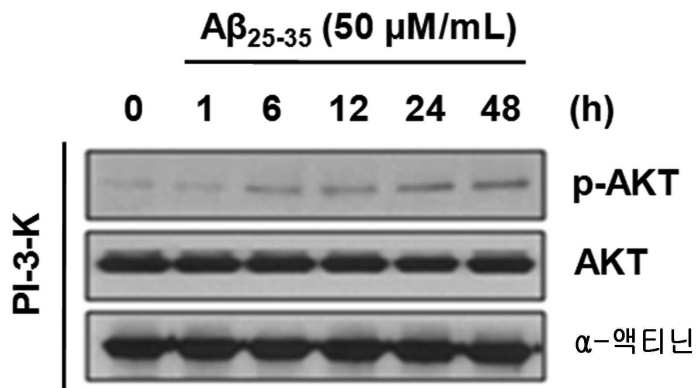
도면3j



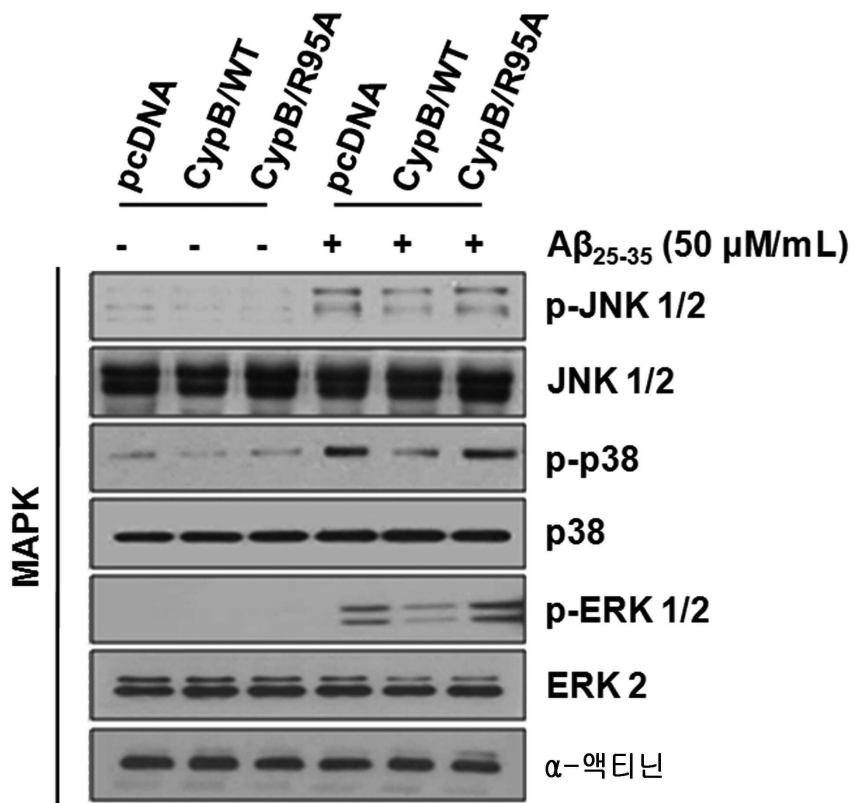
도면4a



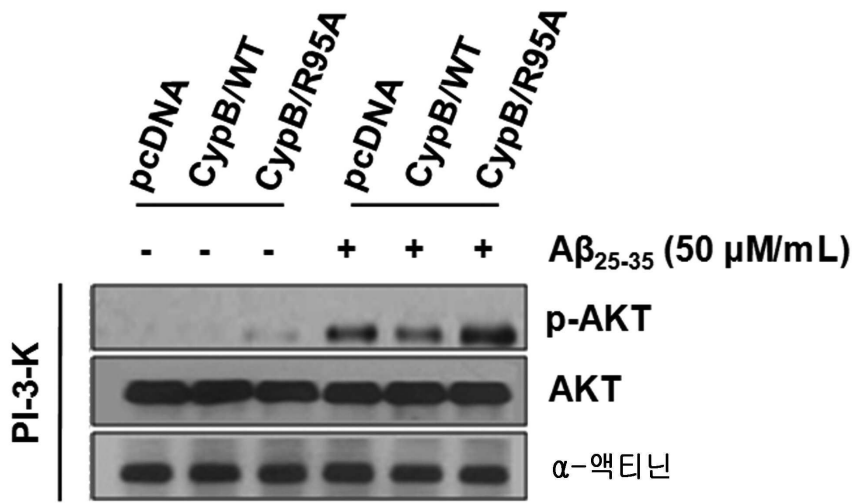
도면4b



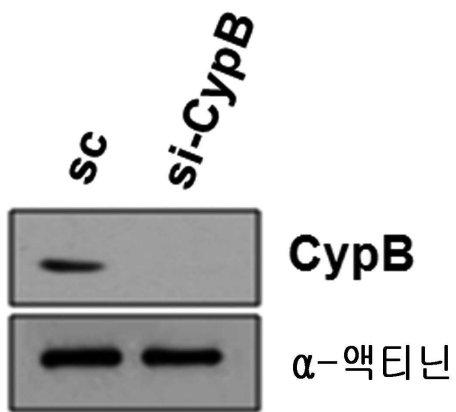
도면4c



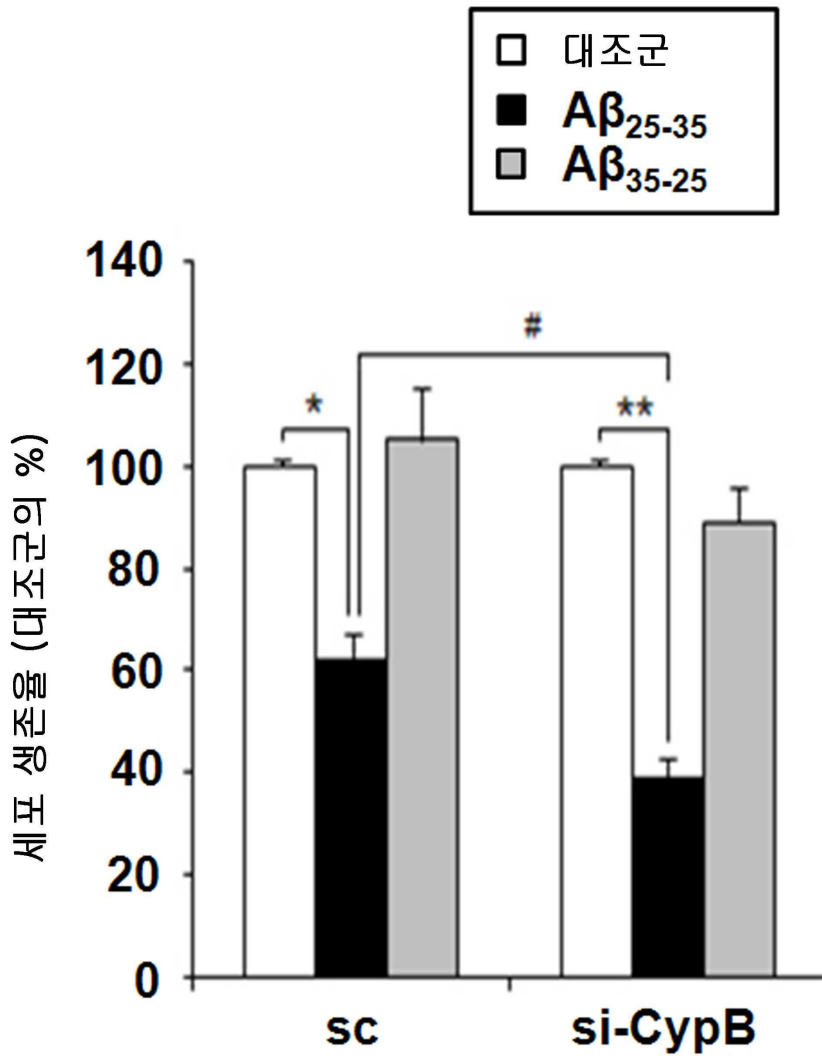
도면4d



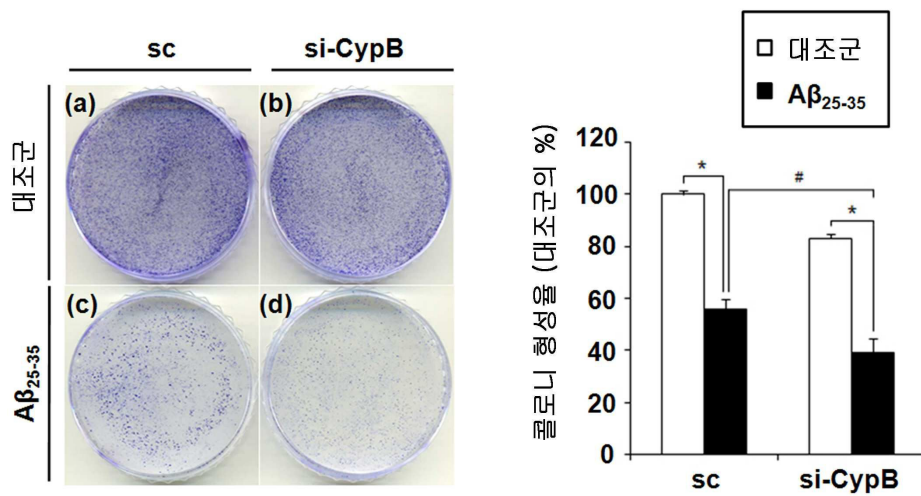
도면5a



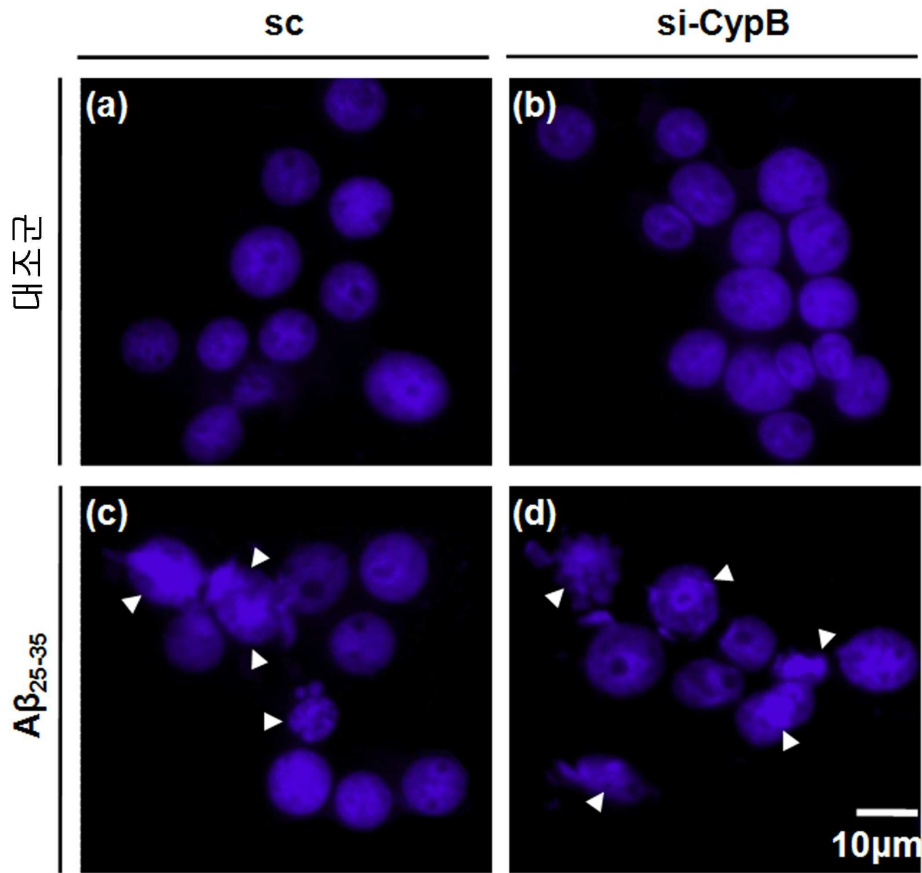
도면5b



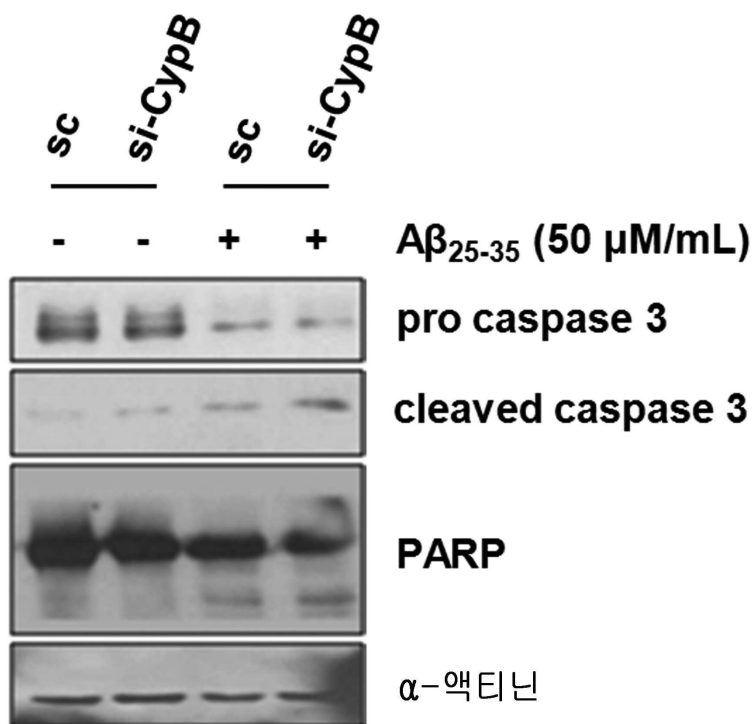
도면5c



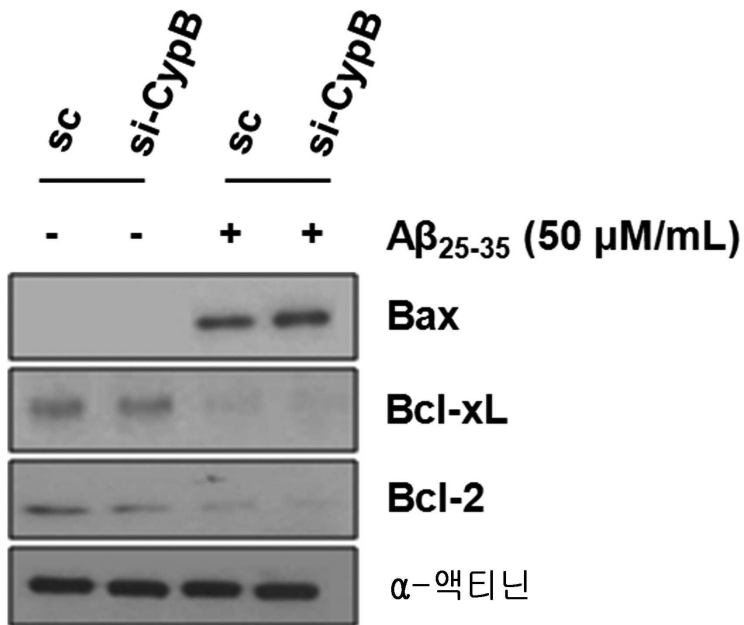
도면5d



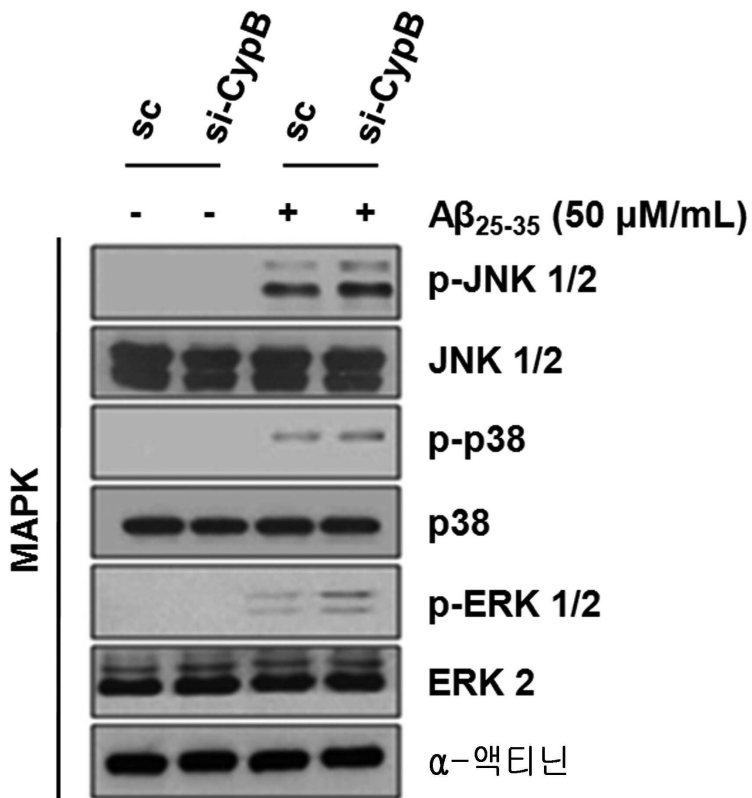
도면5e



도면5f



도면6a



85 90 95

Ile Lys Asp Phe Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe Thr Arg Gly Asp Gly

100 105 110

Thr Gly Gly Lys Ser Ile Tyr Gly Glu Arg Phe Pro Asp Glu Asn Phe

115 120 125

Lys Leu Lys His Tyr Gly Pro Gly Trp Val Ser Met Ala Asn Ala Gly

130 135 140

Lys Asp Thr Asn Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val Lys Thr Ala

145 150 155 160

Trp Leu Asp Gly Lys His Val Val Phe Gly Lys Val Leu Glu Gly Met

165 170 175

Glu Val Val Arg Lys Val Glu Ser Thr Lys Thr Asp Ser Arg Asp Lys

180 185 190

Pro Leu Lys Asp Val Ile Ile Ala Asp Cys Gly Lys Ile Glu Val Glu

195 200 205

Lys Pro Phe Ala Ile Ala Lys Glu

210 215

<210> 2

<211> 1045

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

actatccggc gccgagccgg aggggggaaa cggcgcccg cgcccgccg gagcccgcga 60

gcaaccccag tccccccac ccgcgcgtgg cggcgccggc tcctagcca ccgcggcccc 120

accctcttcc ggcctcagct gtccgggctg ctttcgctc cgctgtgga tgctgcgct 180

ctccgaacgc aacatgaagg tgctccttgc cggcgcctc atcgcggggt ccgtcttctt 240

cctgtgctg cggggacctt ctgcggccga tgagaagaag aaggggcccc aagtcaccgt 300

caagggtgat ttgacctac gaattggaga tgaagatga ggccgggtga tctttggtct 360

cttcggaaag actgttccaa aaacagtgga taattttgtg gccttagcta caggagagaa 420

aggatttggc taaaaaaca gcaaatcca tcgtgtaac aaggacttca tgatccaggg 480

cggagacttc accaggggag atggcacagg aggaaagagc atctacggtg agcgcttccc 540

cgatgagaac ttcaaaactga agcactacgg gcctggctgg gtgagcatgg ccaacgcagg 600
 caaagacacc aacggctccc agtttctcat cacgacagtc aagacagcct ggctagatgg 660
 caagcatgtg gtgtttggca aagtcttaga gggcatggag gtggtgcgga aggtggagag 720
 caccaagaca gacagccggg ataaaccct gaaggatgtg atcatcgag actgcggcaa 780
 gatcgaggtg gagaagcctt ttgccatgc caaggatag ggcacagga catcttctt 840
 tgagtaccg tctgtcagg ccctgtagtc cgccacagg ctctgagctg cactggcccc 900

 ggtgctggca tctggtggag cggaccact ccctcacat tccacaggcc catggactca 960
 cttttgtaac aaactctac caacactgac caataaaaaa aaatgtgggt ttttttttt 1020
 ttaatataaa aaaaaaaaaa aaaaa 1045

 <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

 <400> 3
 ttaagcttat gctgcgctc tccgaacg 28

 <210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

 <400> 4
 tatgggtaga tatcctcctt ggcgatggca 30

 <210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

 <400> 5
 ccctcgagag cgtagtctgg gacgtcgtat ggtagat 38

 <210> 6
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HA tag

<400> 6

taccatacgc acgtcccaga ctacgct

27

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

caaattccat gcgtaatca ag

22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cttgattgcc gcatggaatt g

21