

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 8월 14일 (14.08.2014)



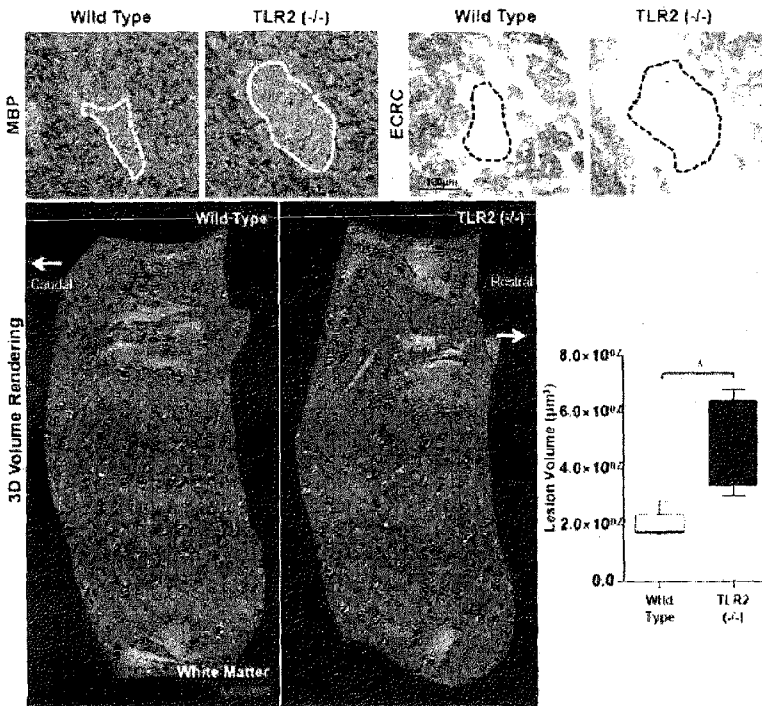
(10) 국제공개번호
WO 2014/123288 A1

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/68* (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/563 (2006.01)
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 153-803 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호, Seoul (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/007825
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (22) 국제출원일: 2013년 8월 30일 (30.08.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2013-0014520 2013년 2월 8일 (08.02.2013) KR
- (71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 443-749 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동), Gyeonggi-do (KR).
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 발명자: 김병곤 (KIM, Byung Gon); 135-905 서울시 강남구 압구정 1동 구현대아파트 87-1103, Seoul (KR). 최준영 (CHOI, Jun Young); 442-752 경기도 수원시 팔달구 우만 2동 우만주공 1단지아파트 113-503, Gyeonggi-do (KR).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BIOMARKER FOR DETECTING WHITE MATTER STROKE, CONTAINING TOLL-LIKE RECEPTOR 2, AND MEDICAL USE OF TOLL-LIKE RECEPTOR 2

(54) 발명의 명칭 : 톨 유사 수용체 2를 포함하는 백질 뇌졸중 검출용 바이오마커 및 톨 유사 수용체 2의 의학적 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a biomarker composition for detecting a white matter stroke, containing a toll-like receptor 2 (TLR2), and a medical use using the TLR2. The TLR2 can be used as a biomarker for a white matter stroke by defending against ischemic demyelination and oligodendrocyte death, and it is possible to treat or prevent ischemic white matter stroke by targeting the TLR2.

(57) 요약서: 본 발명은 톨 유사 수용체 2(TLR2)를 포함하는 백질 뇌졸중 검출용 바이오마커 조성물 및 TLR2를 이용한 의학적 용도에 관한 것으로, 상기 TLR2가 허혈성 탈수초화 및 올리고덴드로사이트 사에 대한 방어 역할을 수행함으로써 백질 뇌졸중의 바이오마커로서 이용할 수 있고, TLR2를 표적으로 하여 허혈성 백질 뇌졸중을 치료하거나 예방할 수 있다.

WO 2014/123288 A1



규칙 4.17 에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 톨 유사 수용체 2를 포함하는 백질 뇌졸중 검출용 바이오마커 및 톨 유사 수용체 2의 의학적 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 톨 유사 수용체 2를 포함하는 백질 뇌졸중 검출용 바이오마커 및 톨 유사 수용체 2를 이용한 의학적 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 피질하 백질과 관련된 허혈성 병변은 모든 허혈성 뇌졸중 유형의 20% 이상을 차지한다. 허혈성 백질 병변은 신경학적 결손이 거의 없는 Leukoaraiosis, 만신마비/감각 장애를 일으키는 국소적인 백질 경색 및 반복적인 허혈성 피질하 백질 손상으로 인한 혈관성 치매에 이르기까지 다양한 임상 양상을 띄게 되며, 피질에서 발생하는 허혈성 병변과는 달리 언어 장애나 심각한 기억력 장애는 드문 것으로 알려져 있다.
- [3] 탈수초화 및 올리고덴드로사이트(OL) 손상은 허혈성 백질 손상에 대한 압도적인 특징이기 때문에 허혈성 피질하 백질 손상 후 OL 손상은 중요한 치료 전략으로 고려되고 있다.
- [4] 현재까지 허혈성 뇌졸중에 대한 공인된 치료제는 혈관의 재관류 약물 밖에 없는 상태이며, 많은 시도/임상 시험이 있어왔던 허혈성 뇌졸중 치료제 대부분은 신경세포(Neuron)의 사멸을 막는 약물들이었으며, 탈수초화 및 올리고덴드로사이트(OL) 손상에 대한 방어 효과를 갖는 백질 뇌졸중 치료제에 대한 연구 개발은 부족한 실정이다.
- [5] 한편, 한국공개특허 제2012-0075457호에 따르면, 톨 유사 수용체에 대한 항체를 이용하여 염증성 및 자가면역 질환을 치료할 수 있다고 개시하고 있다.
- [6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 탈수초화 및 올리고덴드로사이트(OL) 손상에 대한 방어 효과를 갖는 백질 뇌졸중 치료제 개발을 위한 바이오마커를 규명하여 이를 이용한 의학적 용도를 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)를 포함하는 백질 뇌졸중 검출용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)에 특이적으로 결합하는 분자를 포함하는 백질 뇌졸중 진단 키트를 제공한다.
- [10] 상기 분자는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 기질, 리간드 또는 보조인자(cofactor)일 수 있다.

- [11] 또한, 본 발명은 백질 뇌졸중을 예방하거나 치료할 필요가 있는 개체로부터 얻어진 생물학적 샘플에서 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)의 발현 프로파일을 검출하는 단계; 및 상기 발현 프로파일을 정상대조군에서 TLR2의 발현 프로파일과 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 백질 뇌졸중 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 백질 뇌졸중을 예방하거나 치료할 필요가 있는 개체로부터 얻어진 생물학적 샘플에 임의의 화합물을 처리하는 단계; 및 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함하는 백질 뇌졸중 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2) 효능제를 유효성분으로 함유하는 백질 뇌졸중 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [14] 상기 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2) 효능제는 허혈성 탈수초화 및 올리고덴드로사이트 사(oligodendrocyte death; OL death)를 방어하는 효과를 가지며, Pam3CSK4, 지모산(Zymosan), 펩티도글리칸(Peptidoglycan), 비정형 리포폴리사카라이드 및 리포테이코산(Lipoteichoic acid)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [15] 본 발명에 따르면, TLR2가 허혈성 탈수초화 및 OL사에 대한 방어 역할을 수행하므로, TLR2를 백질 뇌졸중의 바이오마커로서 이용할 수 있고, TLR2를 표적으로 하여 허혈성 백질 뇌졸중을 치료하거나 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 TLR2 녹아웃 마우스에서의 ET-1 유도성 허혈성 탈수초 병변의 정도를 나타낸 것이고,
- [17] 도 2 및 도 4는 산소-글루코스 결핍(OGD) 유도성 OL사에 대한 TLR2의 영향을 각각 LDH 분비 및 TUNEL 염색 분석을 통해 검토한 것이고,
- [18] 도 3 및 도 5는 OGD 유도성 OL사에 대한 TLR2 효능제 처리에 의한 영향을 LDH 분비 및 TUNEL 염색 분석을 통해 검토한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [20] 본 발명자는 엔도텔린-1(endothelin-1, ET-1)을 내장의 후각으로 정위적 주입하여 백질 뇌졸중 마우스 모델을 개발하였고, 이러한 마우스 모델에서는 주입 부위에 국소적인 탈수초화 병변이 발생하고, 활성화된 대식세포가 짝 들어차는 것을 확인하였으며, 이러한 대식세포 침윤은 전염증성 사이토카인의 발현을 증가시켰다.
- [21] 한편, TLR2는 허혈성 뇌졸중 후 선천성 면역의 업스트림 조절자로서 허혈성 탈수초화된 병변에서 증가하였고, 탈수초화 병변의 정도는 야생형 마우스보다 TLR2 녹아웃 마우스에서 보다 증가하였으며, TLR2 (-/-) 마우스는 야생형

마우스에 비해 활성화된 카스파제 3(+) OL을 많이 발현하였다. 또한, TLR2 (-/-) 마우스는 야생형 마우스에 비해 TLR2의 다운스트림 신호 단백질 중 하나인 ERK 1/2의 인산화를 감소시켰다. 그리고, TLR2 (-/-) 마우스로부터 얻어진 배양된 OL은 산소-글루코스 결핍(OGD)에 대해 야생형 OL보다 더 감수성을 나타내었다. 그리고, 야생형 OL에 OGD 후 TLR 효능제인 Pam3CSK4를 처리한 경우 OGD-유도성 OL사(OL death)를 감소시켰다.

[22] 따라서, TLR2는 허혈성 탈수초화 및 OL사에 대한 방어 역할을 수행하므로, TLR2 조절을 통해 허혈성 백질 뇌졸중 치료제를 개발할 수 있다.

[23] 이에, 본 발명은 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)를 포함하는 백질 뇌졸중 검출용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[24] 상기 바이오마커의 검출은 인간의 조직 또는 체액으로부터 이차원 전기영동으로 바이오 마커 단백질의 존재를 직접 검출하거나, 인간의 조직 또는 체액을 본 발명의 항체와 접촉시켜 항원항체반응을 통해 바이오마커 단백질의 존재를 간접적으로 확인함으로써 수행할 수 있다. 항원항체반응으로서, 면역분석법은 효소면역측정법 (ELISA, Coated tube), 항체결합 마그네틱 입자를 이용한 마그네틱 입자법, 항체결합 라텍스를 이용한 라텍스 입자법 등을 포함한다.

[25] 또한, 본 발명은 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)에 특이적으로 결합하는 분자를 포함하는 백질 뇌졸중 진단 키트를 제공한다.

[26] 상기 분자는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 기질, 리간드 또는 보조인자(cofactor)일 수 있으며, 바람직하게는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 보다 바람직하게는 모노클로날 항체이다.

[27] 상기 폴리클로날 항체는 당업자에 알려진 방법에 따라 면역원인 바이오마커 단백질 또는 그 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 랫트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈청을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리정제한다.

[28] 상기 모노클로날 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 바이오마커 단백질을 마우스에 면역화시키거나 펩타이드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 마우스에 면역화시킨다. 마우스에서 분리된 항원-생산 B 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, 상기 하이브리도마 세포를 가지고 간접적인 ELISA 방법을 사용하여 모노클로날 항체의 생성여부를 알아보고 양성 클론을 택하여 배양한 후 항체를 분리정제하거나 랫트의 복강에 주입한 후 복수를 채취함으로써, 모노클로날 항체를 제조할 수 있다.

[29] 또한, 본 발명은 백질 뇌졸중을 예방하거나 치료할 필요가 있는 개체로부터

얻어진 생물학적 샘플에서 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)의 발현 프로파일을 검출하는 단계; 및 상기 발현 프로파일을 정상대조군에서 TLR2의 발현 프로파일과 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 백질 뇌졸중 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

- [30] 또한, 본 발명은 백질 뇌졸중을 예방하거나 치료할 필요가 있는 개체로부터 얻어진 생물학적 샘플에 임의의 화합물을 처리하는 단계; 및 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함하는 백질 뇌졸중 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [31] 또한, 본 발명은 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2) 효능제를 유효성분으로 함유하는 백질 뇌졸중 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [32] 상기 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2) 효능제는 허혈성 탈수초화 및 올리고덴드로사이트 사(oligodendrocyte death; OL death)를 방어하는 효과를 가지며, Pam3CSK4, 지모산(Zymosan), 펩티도글리칸(Peptidoglycan), 비정형 리포폴리사카라이드 및 리포테이코산(Lipoteichoic acid)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [33] 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [34] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [35] 상기 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [36] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.
- [37] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [38] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는

프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[39] 상기 약학조성물 중 유효성분의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중, 투여경로, 질병의 정도, 질병의 종류 등에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 따라서, 이러한 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[40] 상기 약학조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

[41]

[42] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[43] <실시예 1> 뇌 조직 준비 및 면역조직적 분석

[44] 1) 동물 및 수술절차

[45] 성체 암컷 C57BL/6 마우스와 C57BL/6 백그라운드를 갖는 TLR2 녹아웃 마우스를 각각 25-28g 체중을 지닌 것으로 사용하였다. 동물 핸들링과 수술절차는 아주대학 동물실험 관련 위원회에 의해 정해진 규칙에 따라 수행되었다. 클로랄 하이드레이트(400 mg/kg, 복강투여)로 마취시킨 후, 동물을 정위적 구조물(stereotactic frame) 상에 놓고, 드릴을 이용하여 두개골 절제술을 수행한 후 32-게이지 바늘릴을 이용하여 오른쪽 내낭(후방, 전정으로 1.0 mm; 측방에서 중앙으로 2.8mm; 등쪽에서 전정으로 4.3mm; 각도 20°에 엔도텔린-1(endothelin-1; ET-1)을 주입하였다. 이때, 각도 20°는 1차 운동피질, 해마 및 뇌실 손상을 방지하기 위함이었다. ET-1 주입 후, 역류를 방지하기 위해 바늘을 10분 동안 놓아둔 후, 천천히 뇌에서 제거하였다.

[46] 2) 조직 가공 및 면역조직학적 분석

[47] PBS를 동물의 심장 내로 주입하여 먼저 관류시킨 후, 0.1M 인산완충액(pH 7.4)에 용해된 4% 파라포름알데히드로 다시 관류시켰다. 뇌를 제거하고 2시간 동안 후고정한 후, 다양한 농도의 수크로즈 용액에 담구었다. 뇌의 관상면 절편(20 μm)을 크라이오스탯(Leica CM3050S; Wetzlar, Germany)을 이용하여 1:10 시리즈로 자르고, SuperFrost Plus 슬라이드(Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa) 상에 놓았다.

[48] 탈수초화된 백질 영역을 정량하기 위하여, 관상면 뇌 절편을 에리오크롬 시아닌(eriochrome cyanine)으로 염색하였다. 3% 염산에 용해된 0.2% 에리오크롬

시아닌 RC(Sigma) 240 ml와 10% FeCl₃·6H₂O(Sigma) 10 ml로 이루어진 염색 용액 중에 관상면 절편을 8분 동안 담구었다. 그후, 상기 절편을 흐르는 수도물로 세정한 후, 1% 수용성 NH₄OH에서 분화시켰다.

- [49] 면역조직적 분석을 위해, 관상면 뇌 절편을 항-NG2 (rabbit polyclonal; 1:200; Millipore), 항-APC-CC1 (mouse monoclonal; 1:200; Abcam), 항-MBP (rat monoclonal; 1:200; Abcam), 항-Iba-1 (rabbit polyclonal; 1:500; Wako), 항-활성화 Caspase 3 (rabbit polyclonal; 1:100; Millipore)로 처리하고 4 °C에서 밤새도록 배양시켰다. 뇌 절편을 세정한 후 적절한 바이오티닐레이티드 되거나 Alexa Fluor 488 또는 594 태깅된 2차 항체(Molecular Probes, Eugene, OR)로 1시간 동안 실온에서 배양시켰다. 항원-항체 반응의 발색 분석을 위해, 30분 동안 아비딘-바이오티닐레이티드 복합체를 형성시킨 후, 원하는 강도로 발전할 때까지 퍼옥시다아제 기질(DAB)과 배양시켰다. 형광 염색을 위해, 커버슬립을 글리세롤계 마운팅 배지(Biomedex, Foster City, CA)를 갖는 슬라이드 상에 올리고, 올림푸스 공초점 레이저 현미경(FV 300, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.
- [50] 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이 TLR2 녹아웃 마우스에서는 정상대조군에 비해 ET-1 유도성 허혈성 탈수초 병변의 크기를 크게 증가시켰다.
- [51] <실시예 2> 초대 올리고덴드로사이트(OL) 배양물 준비 및 산소-글루코스 결핍(OGD)에 대한 효과 검토
- [52] 1) 초대 올리고덴드로사이트(OL) 배양물 준비
- [53] 초대 OL 배양물은 O'Meara R 등이 Journal of Visualized Experiment에 보고한 방법과 같이 출생후 0일(P0)-P1 신생 C57BL/6 및/또는 TLR2 (-/-) 마우스의 피질로부터 준비하였다. 인비트로에서 9-10일 후, 컨플루언트하게 혼합된 글리아 배양물을 얻었다. 혼합된 글리아 배양물은 마이크로글리아를 제거하기 위하여 37°C에서 1시간 동안 200 rpm에서 진탕시켰다. 그후, 아스트로사이트 단일층으로부터 OL을 제거하기 위하여 37°C에서 18시간 동안 250 rpm에서 2차 진탕시켰다. 이렇게 얻어진 세포 현탁액을 박테리아 급 페트리디쉬 상에 1시간 동안 분주하여 남아있는 마이크로글리아와 아스트로사이트를 OL로부터 분리시켰다. 정제한 OL을 폴리-D-라이신 코팅된 12웰(1.5 x 10⁵cells/well)또는 96웰(1.5 x 10⁴cells/well)또는 9 mm 커버슬립(1.0 x 10⁴cells/coverslips)상에 분주하였다. 이렇게 얻어진 배양물은 신경세포나 아스트로사이트를 함유하지 않으며 OL의 순도가 95% 이상이었다.
- [54] 2) 산소-글루코스 결핍(OGD) 및 약물 처리
- [55] OGD를 수행하기 위하여, 정제 OL을 1일 동안 혈청 없는 분화 배지에서 배양한 후, PBS로 3회 세정하였으며 무산소 챔버(Forma Scientific, Marietta, OH)로 옮겼다. 그후, 상기 배지를 혈청 및 글루코스 없는 OL 분화 배지로 변경시켰고, 이때 상기 분화 배지는 1시간 동안 질소 가스로 포화시킨 것을 사용하였다. OGD를 2시간 동안 수행한 후, 세포를 정상산소 챔버로 옮기고 글루코스과 Pam3CSK4 (1μg/ml, invivogen), U0126 (10μM, Calbiochem) 및/또는 LY294002

(10 μ M, Calbiochem) 함유 배지로 변경시켰다.

[56] 3) 젯산 탈수소효소(LDH) 분석

[57] OGD 유도 OL사(death)의 정량을 위해, LDH 분석 키트(Takara Bio, Inc., Madison, WI)를 이용하여 24시간 OGD 후 배싱배지(bathing medium)에서 손상된 OL로부터 온 LDH를 측정하였다. 일반 세포사와 관련된 LDH 수준을 24시간 동안 1.5% 트리톤 X-100에 노출된 시스터배지에서 측정 (Complete cell death, CD)하였다. 기준 LDH 수준은 OL없이 단지 배지에서 측정(Baseline, BL)하였다. 각 실험조건에서의 세포사 %는 다음 식을 사용하여 산출하였다.

[58] $\{\% \text{ of OL사} = (\text{실험값} - \text{BL}) \times 100 / (\text{CD} - \text{BL})\}$

[59] 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이 TLR2 녀아웃 OL은 정상대조군에 비해 OGD에 따라 LDH 분비가 크게 증가하는 것으로 나타남에 따라 TLR2 녀아웃 OL은 정상대조군에 비해 OGD에 보다 감수성이 있는 것으로 확인되었다. 한편, 도 3과 같이 TLR2 효능제인 Pam3CSK4를 처리한 결과, OGD 유도성 OL사를 크게 감소시켰다.

[60] 4) 면역세포화학 및 TUNEL 염색 분석

[61] OL사를 조사하기 위해, 정제 OL을 OL 분화 배지 내 폴리-D-라이신 코팅된 9 mm Aclar 플로로카본플라스틱 커버슬립 상에서 성장시켰다. 이렇게 얻어진 세포를 3회 PBS로 세정한 후, 20분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. in situ 세포사 검출 키트(ApopTag, Millipore)를 이용하여 앞서 고정된 OL에 대한 TUNEL 염색을 수행하였다.

[62] 그 결과, 도 4에 도시된 바와 같이 TLR2 녀아웃 OL은 정상대조군에 비해 OGD에 따라 TUNEL 염색이 크게 증가하는 것으로 나타남에 따라 TLR2 녀아웃 OL은 정상대조군에 비해 OGD에 보다 감수성이 있는 것으로 확인되었다. 한편, 도 5와 같이 TLR2 효능제인 Pam3CSK4를 처리한 결과, OGD 유도성 OL사를 크게 감소시켰다.

[63] <실시예 3> 웨스턴 블롯 분석

[64] ET-1 주입 7일 후 얻은 ET-1 주입 뇌 조직은 아이스콜드 라이시스 완충액[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1mM 디티오트레이톨, 0.1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드 및 단백질분해효소/인산분해효소 억제제 콕테일을 포함]에서 균질화시켰다. 배양된 세포는 PBS로 2회 세정한 후, 동일 라이시스 완충액을 이용하여 모았다. 조직 또는 세포 용출물을 20,000g에서 4°C, 20분 동안 원심분리 하였고, 상등액 단백질을 브레드포드 분석법으로 측정하였다. 10% 겔 또는 4-20% 농도단계별 겔을 이용하여 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 PVDF 멤브레인(Immobilion-P; Millipore)으로 옮겼다. 상기 멤브레인을 실온에서 1시간 동안 5% 무지방유 또는 소혈청 알부민으로 처리하여 블로킹 시킨 후, 항체 즉, 항-phospho ERK1/2 (rabbit monoclonal; 1:1000; Cell signaling), 항-total ERK1/2 (rabbit monoclonal; 1:1000; Cell signaling), 항-phospho Akt (rabbit monoclonal; 1:1000; Cell signaling), 항-total Akt (rabbit

monoclonal; 1:1000; Cell signaling) 및 항- β 액틴 (1:20,000)와 반응시켰다. 세정 후, 멤브레인을 실온에서 2시간 동안 호스래디쉬 퍼옥시다제 접합 2차 항체와 반응시켰다. 마지막으로, ECL(enhanced chemiluminescence) 검출 시약을 이용하여 멤브레인을 시각화하였다. 그 결과 도 6과 같이 TLR2 (-/-) 생쥐에서는 ERK1/2의 인산화가 정상대조군에 비해 유의미하게 감소하였다.

[65] <실시예 4> RT-PCR 및 정량 실시간 RT-PCR(qRT-PCR) 분석

[66] 트리졸(Gibco, Gaithersburg MD)을 이용하여 총 RNA를 배양 세포 또는 ET-1 주입 뇌 조직으로부터 추출하였다. 이렇게 얻어진 RNA는 260 nm에서 분광분석기로 정량하였다. 표준 RT 프로토콜을 이용하여 RNA 1 μ g을 cDNA로 역전사 시켰다. 1 μ l의 cDNA를 10pM의 상응하는 프라이머 쌍과 함께 PCR 반응 예비혼합물(GenDEPOT, Barker, TX, USA)에 첨가하였다. 이때, 다음과 같은 프라이머를 사용하였다.

[67] 18S ribosomal, 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'(forward, 서열1),
5'-TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC-3' (backward, 서열2),

[68] TLR2, 5'-CTCCCACTTCAGGCTCTTTG-3'(forward, 서열3),
5'-TCAGGAAGTGGGTGGAGAAC-3' (backward, 서열4),

[69] TNF-a, 5'-AGCAAACCACCAAGTGGAGGA-3' (forward, 서열5),
5'-GCTGGCACCAGTGTGGTTGT-3' (backward, 서열6),

[70] IL-1 β , 5'-TTGTGGCTGTGGAGAAGCTGT-3' (forward, 서열7),
5'-AACGTCACACACCAGCAGGTT-3' (backward, 서열8),

[71] IL-6, 5'-TCCATCCAGTTGCCTTCTTGG-3' (forward, 서열9),
5'-CCACGATTTCCAGAGAACATG-3' (backward, 서열10).

[72] qRT-PCR은 Applied Biosystem SYBR Green PCR 키트의 프로토콜을 따라 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 시행하였다. 증폭은 94°C에서 30초 동안, 55-64°C에서 31초 동안, 72°C에서 60초 동안 34주기로 수행되었으며, CT 값은 Applied Biosystem 7500 을 이용하여 정량하였으며, 규격화는 18s ribosomal RNA를 내적 대조군으로 사용하여 시행하였다.

[73] 그 결과, 도 7에서와 같이 정상 대조 생쥐에서 ET-1 주입 후 병변 부위에서 TLR2의 mRNA가 유의미하게 증가하였고, 염증 사이토카인인 TNF-a, IL-1 β , IL-6는 TLR2 (-/-) 생쥐와 정상 대조 생쥐간의 유의미한 차이가 없었다.

[74]

[75] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

산업상 이용가능성

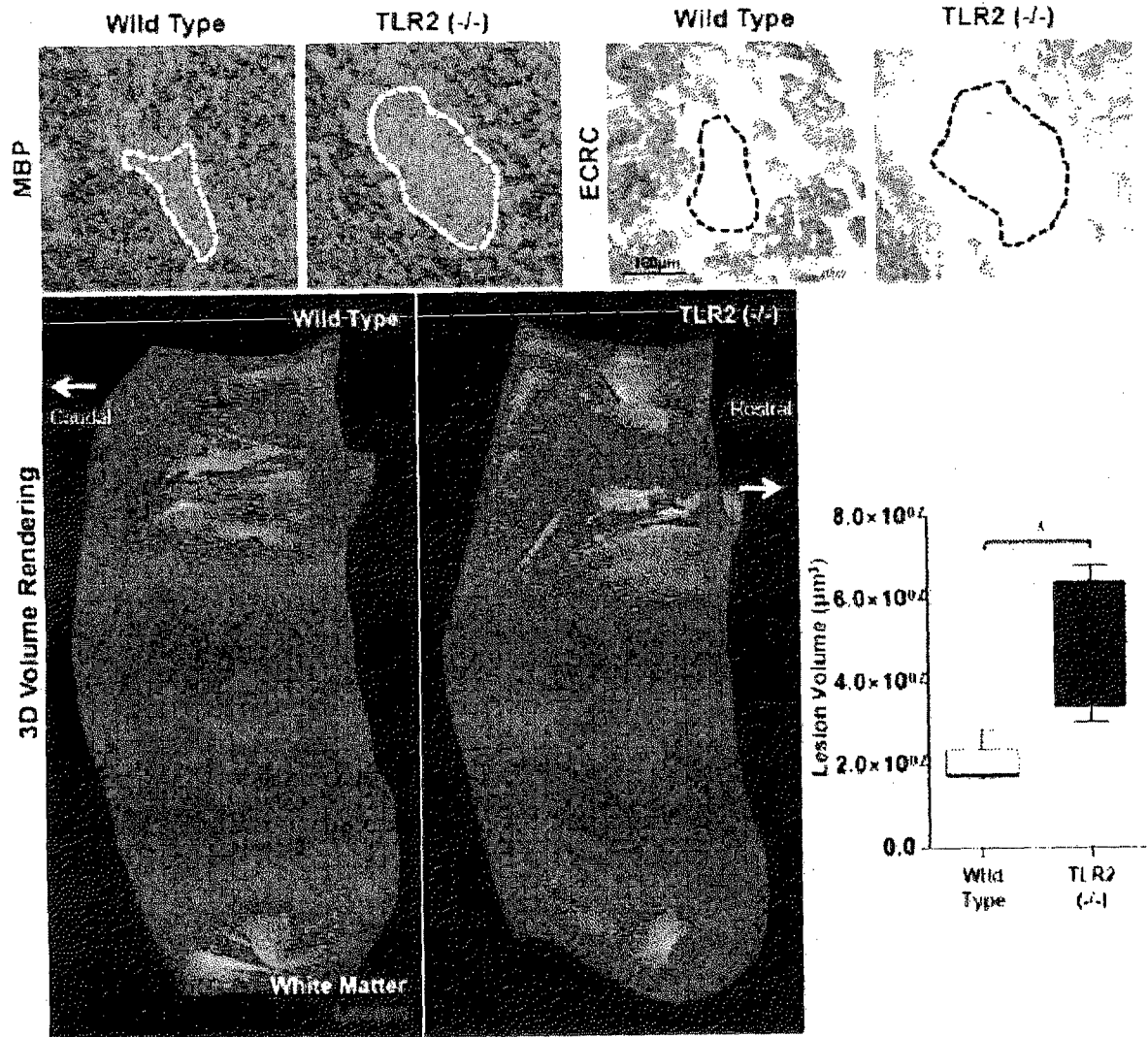
[76] 본 발명은 툴 유사 수용체2를 포함하는 백질 뇌졸중 검출용 바이오 마커로서 툴 유사 수용체2에 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 백질 뇌졸중 진단 키트로 이용 가능하며, 툴 유사 수용체2의 발현 수준을 확인하여 백질 뇌졸중을 예방 및 치료 할 수 있는 치료제와 그 치료제의 스크리닝 방법으로 이용할 수 있다.

[77]

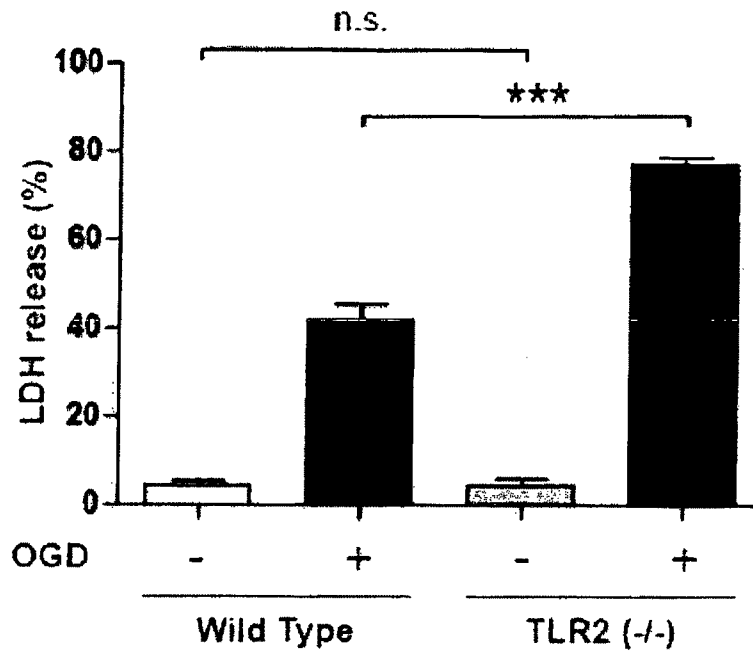
청구범위

- [청구항 1] 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)를 포함하는 백질 뇌졸중 검출용 바이오마커 조성물.
- [청구항 2] 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)에 특이적으로 결합하는 분자를 포함하는 백질 뇌졸중 진단 키트.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서, 상기 분자는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 기질, 리간드 또는 보조인자(cofactor)인 것을 특징으로 하는 백질 뇌졸중 진단 키트.
- [청구항 4] 백질 뇌졸중을 예방하거나 치료할 필요가 있는 개체로부터 얻어진 생물학적 샘플에서 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)의 발현 프로파일을 검출하는 단계; 및 상기 발현 프로파일을 정상대조군에서 TLR2의 발현 프로파일과 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 백질 뇌졸중 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 5] 백질 뇌졸중을 예방하거나 치료할 필요가 있는 개체로부터 얻어진 생물학적 샘플에 임의의 화합물을 처리하는 단계; 및 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2)의 발현 수준을 확인하는 단계를 포함하는 백질 뇌졸중 치료제의 스크리닝 방법.
- [청구항 6] 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2) 효능제를 유효성분으로 함유하는 백질 뇌졸중 예방 또는 치료용 약학조성물.
- [청구항 7] 청구항 6에 있어서, 상기 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2) 효능제는 허혈성 탈수초화 및 올리고덴드로사이트 사(oligodendrocyte death)를 방어하는 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 백질 뇌졸중 예방 또는 치료용 약학조성물.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 톨 유사 수용체2(Toll-like receptor 2; TLR2) 효능제는 Pam3CSK4, 지모산(Zymosan), 펩티도글리칸(Peptidoglycan), 비정형 리포폴리사카라이드 및 리포테이코산(Lipoteichoic acid)으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 백질 뇌졸중 예방 또는 치료용 약학조성물.

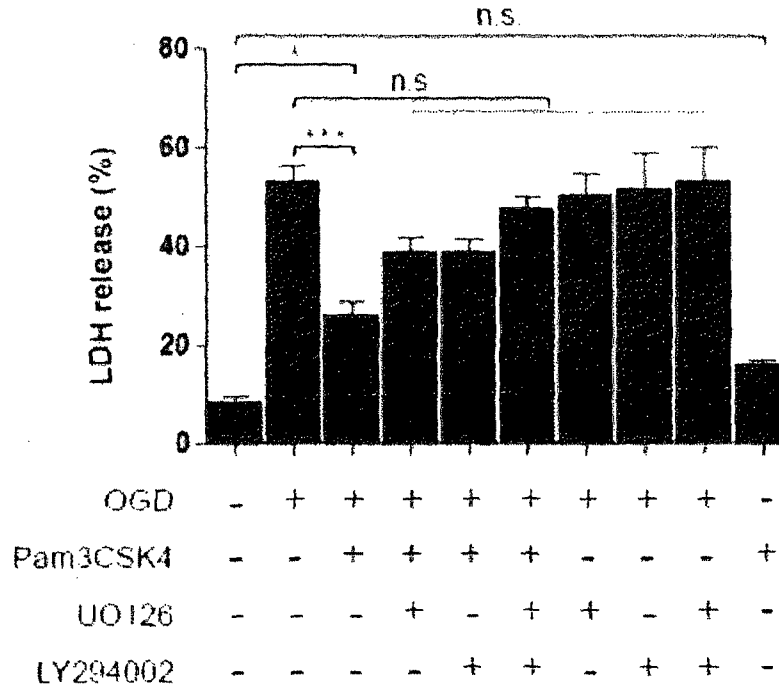
[Fig. 1]



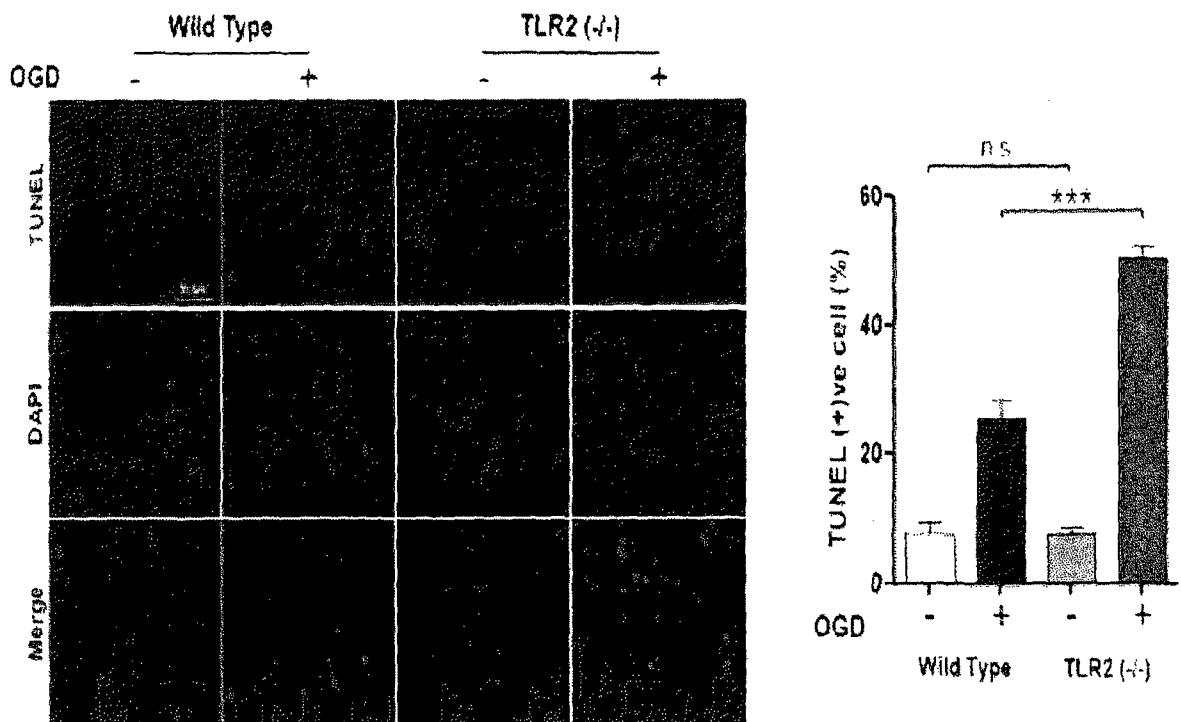
[Fig. 2]



[Fig. 3]

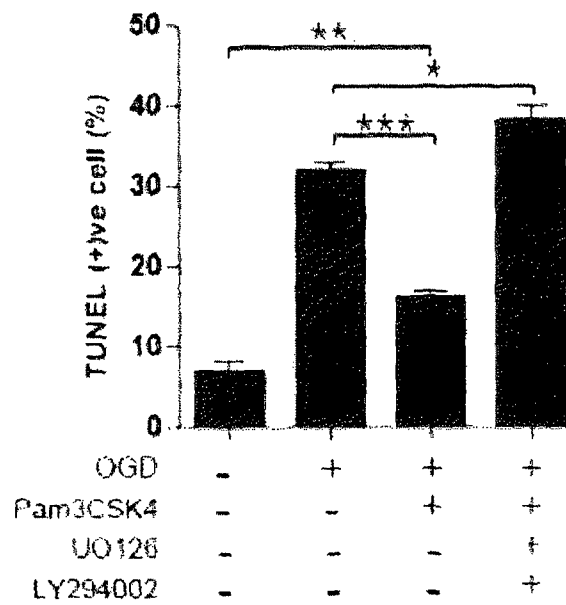
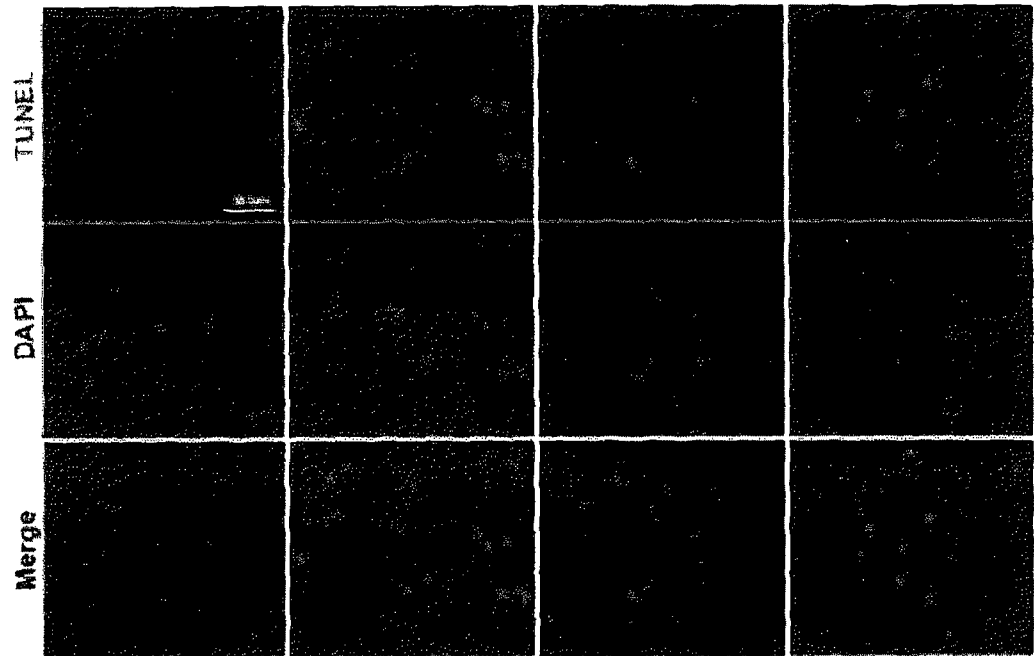


[Fig. 4]

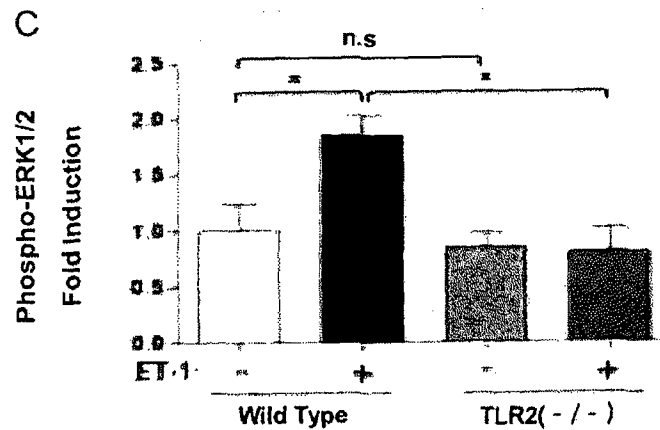
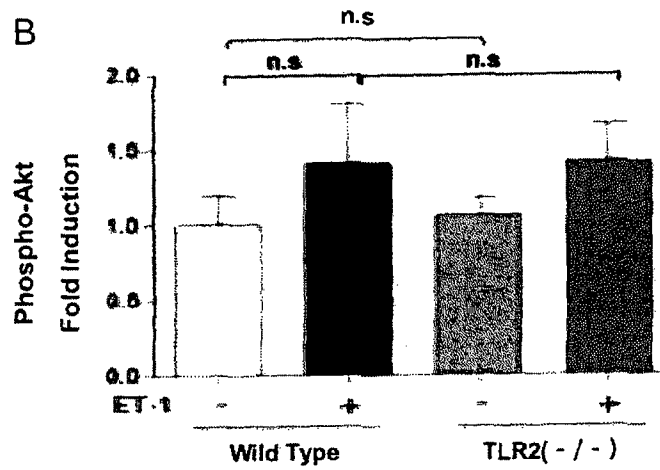
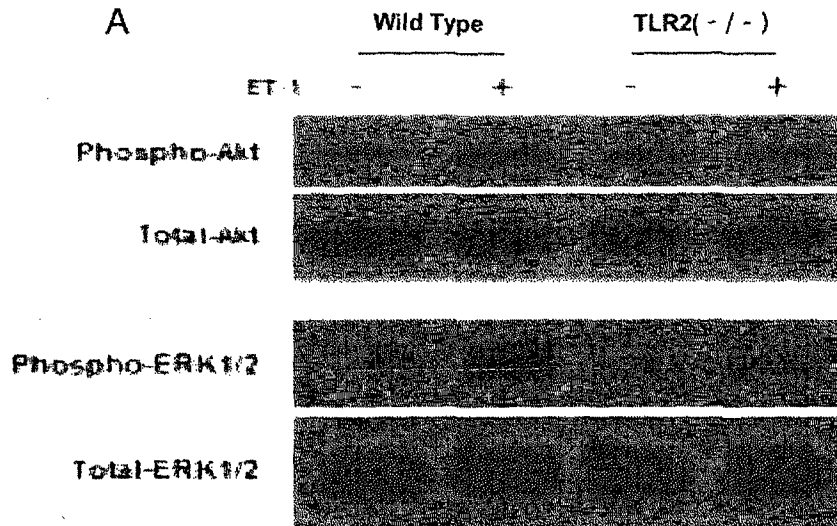


[Fig. 5]

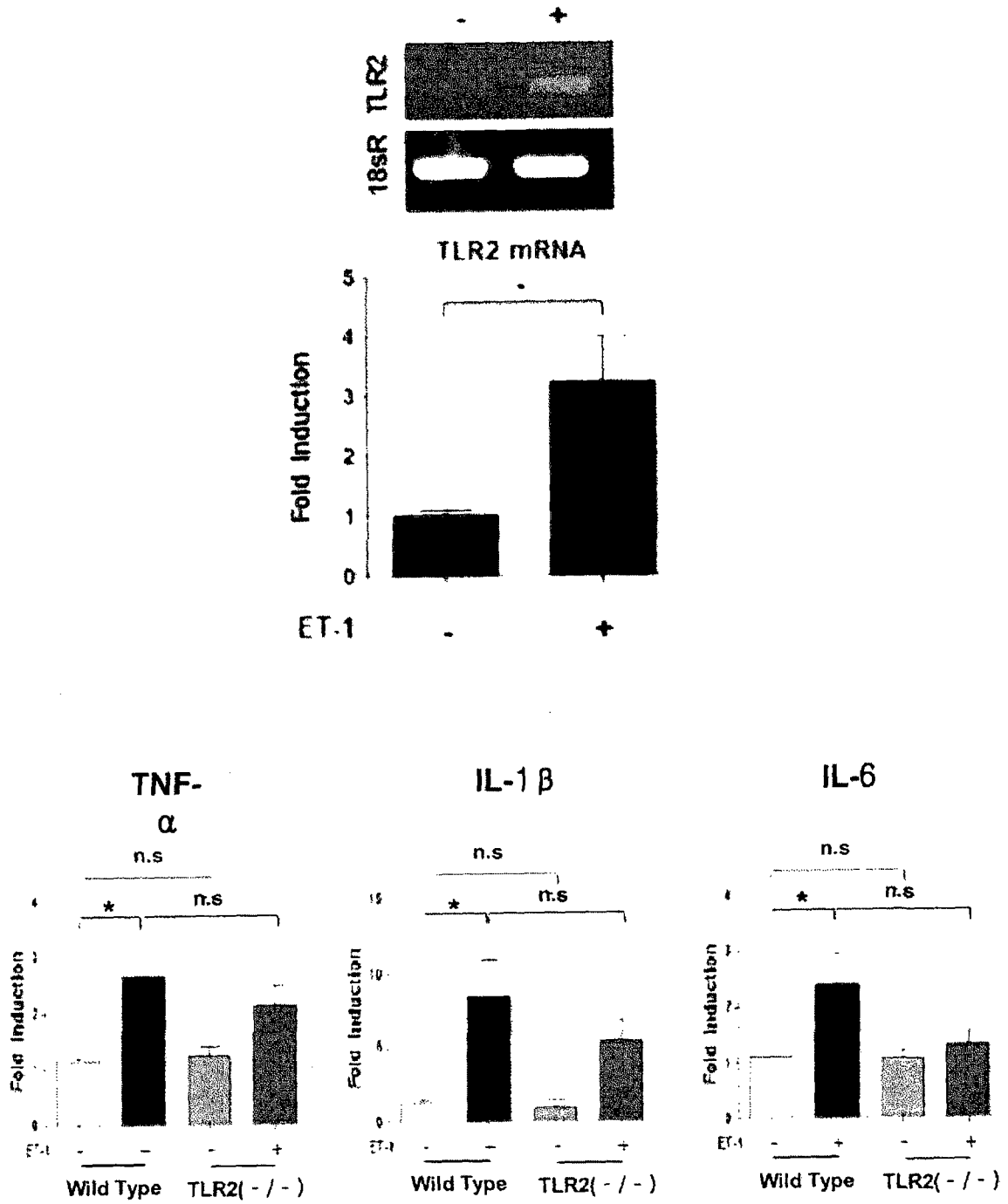
LY294002	-	-	-	+
UO126	-	-	-	+
Pam3CSK4	-	-	+	+
OGD	-	+	+	+



[Fig. 6]



[Fig. 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/007825

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/563(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/68; G01N 33/563; G01N 33/53

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: TLR2, white-matter, stroke, ischemic, screening and biomarker

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OKUN et al., "Toll-like receptors in neurodegeneration" Brain Research Reviews, vol. 59, issue 2, pp. 278-292 (2009) See abstract; pp. 283-284, and figure 2.	1-8
A	HAYAKAWA et al., "High-mobility group box 1 from reactive astrocytes enhances the accumulation of endothelial progenitor cells in damaged white matter" Journal of Neurochemistry, vol. 125, issue 2, pp. 273-280 (published on online on 28 December 2012) See the entire document.	1-8
A	LEUNG et al., "It's all in the family: multiple Toll-like receptors offer promise as novel therapeutic targets for stroke neuroprotection" Future Neurology, vol. 4, no. 2, pp. 201-208 (March 2009) See the entire document.	1-8
A	URRA et al., "Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke" Stroke, vol. 40, no. 4, pp. 1262-1268 (2009) See the entire document.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 NOVEMBER 2013 (11.11.2013)

Date of mailing of the international search report

12 NOVEMBER 2013 (12.11.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/007825

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARIK et al., "Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity?" Brain, vol. 130, no. 11, pp. 2800-2815 (2007) See the entire document.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/007825

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/563(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/68; G01N 33/563; G01N 33/53

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TLR2, white-matter, stroke, ischemic, screening and biomarker

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	OKUN 외, `Toll-like receptors in neurodegeneration` Brain Research Reviews, Vol.59, Issue 2, pp.278-292 (2009) 요약; pp.283-284, 및 도면 2 참조.	1-8
A	HAYAKAWA 외, `High-mobility group box 1 from reactive astrocytes enhances the accumulation of endothelial progenitor cells in damaged white matter` Journal of Neurochemistry, Vol.125, Issue 2, pp.273-280 (온라인 공개 2012.12.28) 전체 문헌 참조.	1-8
A	LEUNG 외, `It`s all in the family: multiple Toll-like receptors offer promise as novel therapeutic targets for stroke neuroprotection` Future Neurology, Vol.4, No.2, pp.201-208 (2009.03) 전체 문헌 참조.	1-8
A	URRA 외, `Monocytes are major players in the prognosis and risk of infection after acute stroke` Stroke, Vol.40, No.4, pp.1262-1268 (2009) 전체 문헌 참조.	1-8

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌
 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2013년 11월 11일 (11.11.2013)	국제조사보고서 발송일 2013년 11월 12일 (12.11.2013)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371
---	------------------------------------

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MARIK 외, `Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity?` Brain, Vol.130, No.11, pp.2800-2815 (2007) 전체 문헌 참조.	1-8

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

서면

전자적 형태

b. 제출시기

출원시 국제출원에 포함

전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음