



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2007-0027944

(43) 공개일자

2007년03월12일

(21) 출원번호 10-2005-0079927

(22) 출원일자 2005년08월30일

심사청구일자 2005년08월30일

(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

오구택

서울시 서초구 잠원동 신반포25차 아파트 344-1003

김재화

대전시 유성구 어은동 한빛아파트 132동 403호

최재훈

서울특별시 성북구 길음2동 길음뉴타운 402동 1002호

박성규

충남 공주시 계룡면 금대2리 157번지

(74) 대리인

손민

허은순

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) F I Z Z를 포함하는 천식 예방 또는 치료 조성물

(57) 요약

본 발명은 FIZZ(found in inflammatory zone)를 포함하는, 천식을 치료 또는 예방하기 위한 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 5

특허청구의 범위

청구항 1.

FIZZ(found in inflammatory zone) 단백질을 포함하는, 천식 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, FIZZ 단백질이 FIZZ1 또는 FIZZ2 단백질인 조성물.

청구항 3.

제2항에 있어서, FIZZ1 단백질이 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 조성물.

청구항 4.

FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는, 천식 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 5.

제4항에 있어서, FIZZ 단백질이 FIZZ1 또는 FIZZ2 단백질인 조성물.

청구항 6.

제5항에 있어서, FIZZ1 단백질이 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 조성물.

청구항 7.

제4항에 있어서, 핵산이 재조합 발현 벡터 형태인 조성물.

청구항 8.

제7항에 있어서, 벡터가 바이러스 벡터인 조성물.

청구항 9.

FIZZ 단백질 발현 재조합 바이러스를 포함하는, 천식을 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 10.

제9항에 있어서, FIZZ 단백질이 FIZZ1 또는 FIZZ2 단백질인 조성물.

청구항 11.

제10항에 있어서, FIZZ1 단백질이 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 FIZZ를 포함하는 천식을 치료 또는 예방하기 위한 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로는 FIZZ 단백질, FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 또는 FIZZ 단백질 발현 재조합 바이러스를 포함하는, 천식을 치료 또는 예방하기 위한 조성물에 관한 것이다.

천식이란, 주기적으로 일어나는 호흡곤란으로 심장천식과 기관지천식이 있다. 전자는 심장질환이나 고혈압 등에서 볼 수 있는 발작적 호흡곤란이고, 폐울혈이나 조직울혈로 인한 호흡중추의 과민상태로 인해 일어난다. 후자는 기관지의 연축, 협소, 점막종창 때문에 호흡도가 좁아져 일어나는 발작적 호흡곤란으로서 천명을 발하는 호식성 호흡곤란이 특징이다. 이 밖에도 호흡중추 영역의 장애로 인해 일어나는 뇌성 천식이나 신장병 환자에게 일어나는 요독증성 천식 등이 있다.

천식을 유도하는 가장 유력한 학설은 항원(집먼지 진드기, 꽃가루, 애완동물의 털, 곰팡이, 견과류 등)의 흡입, 섭취로 인해 기도의 과민반응이 유발되어 기도가 광범위하게 수축된다는 것이다.

천식은 만성적이고 재발이 많은 질환이지만, 장기적인 관리를 잘해주면 증상의 발생을 현저히 감소시킬 수 있다. 천식의 치료는 크게 회피요법, 면역치료요법, 약물치료요법으로 나눌 수 있는데 회피요법은 집먼지 진드기, 꽃가루, 애완동물의 털과 같이 알레르기를 유발할 수 있는 요소를 적절히 회피하거나 대기오염물질을 피하는 것이며, 면역치료요법은 항원을 아주 소량부터 피하 주사하여 서서히 증량시켜 나가는 것으로 적어도 3년에서 5년 이상의 오랜 기간을 필요로 하는 요법이다. 천식증상이 있는 대부분 환자들은 약물치료요법을 필요로 하는데 현재 시판중인 대부분의 천식 치료제들은 경구 투여제, 주사제, 또는 흡입기 타입으로 사용되고 있다.

FIZZ(found in inflammatory zone)는 마우스 천식모델에서 기도 염증(airway inflammation)과 기도 과민반응(airway hyperresponsiveness)이 일어날 때 발현이 증가되는 것으로 보고된 단백질이다.

FIZZ는 10 또는 11개의 시스테인 잔기를 가진 12.5kDa의 분자량을 갖는 사이토카인으로서, 주로 염증 부위에서 발견되어 FIZZ란 이름이 붙여졌다. 현재까지 FIZZ1, 2, 3이 밝혀졌으며, 이 중 FIZZ1과 2는 각각 레지스틴-유사 분자(resistin-like molecule; RELM) alpha와 RELM beta로도 불린다. FIZZ3은 당뇨병과 밀접한 관계를 가지고 있으며 레지스틴이라는 이름으로 불린다. 최근, FIZZ1 및 FIZZ2는 인터류킨-4(IL-4)와 인터류킨-13(IL-13)에 의해 발현이 증가되는 것으로 보고 되어 Th2 염증반응과 밀접하게 관련되어 있음이 밝혀졌으며, 당뇨병 모델동물인 db/db마우스의 지방조직에서 발현이 매우 감소되어 있는 것으로 보아 지질생성(adipogenesis)에도 관련이 있는 것으로 생각되나, FIZZ의 각 질병에서의 역할에 대해서는 현재까지 많이 밝혀지지 않은 상태이다.

천식은 기도 내에 호산구, 비만세포, T 임파구 등의 활성화된 염증세포가 침착되어 있는 특징적인 소견을 보이는데, 호산구는 골수에서 만들어지고 기도 내로 이동하여 활성화되고 이런 과정에 T helper(Th) 세포에서 분비하는 사이토카인이 중요한 역할을 한다. 특히 Th2 세포는 호산구의 이동 및 활성화에 중요한 역할을 하는데, Th2 세포가 분비하는 IL-4 및 IL-13에 의해 STAT6을 활성화되면서 FIZZ 발현이 증가되는 것으로 밝혀졌다. 그러나 천식 발병의 분자생물학적 기작에서 FIZZ의 발현이 증가된다는 것만 확인되었을 뿐, FIZZ 발현 증가와 천식 유발과의 직접적인 관계는 규명되지 않은 상태이다.

이에 본 발명자는 FIZZ 발현 증가와 천식 유발과의 직접적인 관계를 규명하기 위하여, FIZZ1 단백질이 과발현되는 형질전환 마우스를 제작하여 기도과민성을 비형질전환된 마우스와 비교한 결과, 메타콜린으로 기도과민성을 유도하였을 때, FIZZ가 과발현되는 마우스의 기도저항성이 그렇지 않은 마우스에 비해 현저하게 낮은 것을 확인하고, FIZZ 단백질의 과발현은 천식을 억제시키므로 FIZZ 단백질을 천식 치료 또는 예방용 조성물로 사용할 수 있음을 밝히고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 하나의 목적은 FIZZ (found in inflammatory zone) 단백질을 포함하는 천식 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는 천식 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 FIZZ 단백질 발현 재조합 바이러스를 포함하는 천식 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성

하나의 양태로서, 본 발명은 FIZZ(found in inflammatory zone) 단백질을 포함하는 천식 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

FIZZ(found in inflammatory zone)는 마우스 천식모델에서 기도 염증(airway inflammation)과 기도 과민반응(airway hyperresponsiveness)이 일어날 때 발현이 증가되는 것으로 보고 된 단백질이다. 이 때, FIZZ 단백질 발현은 IL-4와 IL-13과 같은 Th2 사이토카인에 의해 영향을 받는 것으로 확인되었다. 미국공개 특허 US2004/0198686호에는 알레르겐에 의해 FIZZ 단백질, 즉 FIZZ1 및 FIZZ2 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하고, 이의 발현을 억제시킴으로써 면역과민 반응(allergic response)을 완화시킴으로써 천식 등의 질환을 치료하는 조성물 및 방법에 대하여 기재하고 있다. 이와 같이 지금까지의 연구는 알레르겐 처리에 의하여 FIZZ 단백질의 발현이 증가하므로 FIZZ 단백질이 천식을 유발할 것이라고 유추한 것이다.

본 발명자는 FIZZ 발현 증가가 천식을 유발하는지에 대한 직접적인 관계를 규명하기 위하여, FIZZ 발현량에 따른 기도와민 반응 수준을 분석하였다. 이를 위하여 기관지 상피세포(Bronchial epithelial cell)와 과립폐포세포(type 2 pneumocyte) 및 기관지 평활근세포(bronchial smooth muscle cell)에서 FIZZ1 단백질의 발현이 비형질전환 마우스에 비하여 현저히 증가된 형질전환 마우스를 제작하고, 형질전환 마우스의 기도과민성을 비형질전환 마우스와 비교하여 살펴 보았다. 그 결과, 메타콜린으로 기도과민성을 유도하였을 때, Tg(Transgenic) 마우스의 기도저항성이 Non-Tg에 비해 상대적으로 낮다는 것을 확인할 수 있었다.

상기한 바와 같이, 본 발명자는 천식 발병 기작에서 증가하는 FIZZ 단백질이 천식 유도에 관여할 거라는 지금까지의 가정과 달리 실제로는 천식 완화에 관여한다는 것을 발견하였으며, FIZZ 단백질의 과발현은 천식발병을 억제시키므로 FIZZ 단백질을 천식 치료 또는 예방용 조성물로 사용할 수 있음을 밝혔다.

본 발명의 조성물에 사용되는 FIZZ 단백질은 인간과 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물 유래의 모든 FIZZ 단백질을 포함한다. 보다 바람직한 양태로서, FIZZ 단백질은 천식 발병기작에서 증가하는 것으로 밝혀진 FIZZ1 또는 FIZZ2이고, 보다 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질이다.

또한, 본 발명의 FIZZ 단백질은 이의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 FIZZ 단백질의 변이체를 포함한다.

FIZZ 단백질의 변이체란 야생형의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. FIZZ 단백질의 변이체란 FIZZ의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 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.

또한, FIZZ 단백질은 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification) 될 수도 있다.

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.

FIZZ 단백질 또는 이의 변이체는 당 분야에 널리 공지된 방법으로 천연에서 추출 및 정제하여 얻을 수 있다. 달리, FIZZ 단백질의 서열이 밝혀져 있으므로 화학적으로 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, FIZZ를 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 FIZZ가 발현되도록 숙주 세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 FIZZ를 회수하는 과정으로 수득할 수 있다. 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심 분리, 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.

또 다른 양태로서, 본 발명은 FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 포함하는, 천식 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물에서 FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 FIZZ 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.

FIZZ 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, 포스페이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토프라이머 방법, 고체 지지체상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 들 수 있다.

보다 바람직한 양태로서, FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 FIZZ1 또는 FIZZ2 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이고, 보다 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이다. 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서 예시할 수 있다.

상기한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA 또는 합성) 또는 RNA 분자일 수 있다.

바람직한 양태에서, FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산은 FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 이를 발현할 수 있는 벡터와 작동적으로 연결된 재조합 발현 벡터형태이다.

본 발명에서 “벡터”란 목적 유전자를 코딩하는 핵산 서열(예: DNA, RNA 등)을 숙주 세포로 도입되기 위한 수단을 의미한다. 본 발명에서 “발현 벡터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

본 발명에서 “작동가능하게 연결된(operably linked)”은 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. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

본 발명의 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함하고, 바람직하게는 바이러스 벡터이다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 번역원성 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, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.

바이러스 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 예를 들어 HIV(Human immunodeficiency virus) MLV(Murine leukemia virus) ASLV(Avian sarcoma/leukosis), SNV(Spleen necrosis virus), RSV(Rous sarcoma virus), MMTV(Mouse mammary tumor virus) 등, 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노 관련 바이러스(Adeno-associated virus), 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 등의 바이러스 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

상기한 FIZZ 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 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). 유전자를 양이온성 고분자와 복합체 형태로 체내 투여할 경우 유전자의 체내 체류시간 및 발현 지속시간이 네이키드 DNA(naked DNA)에 비하여 현저히 증가하므로 보다 유익하다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 FIZZ 단백질 발현 재조합 바이러스를 포함하는, 천식을 치료 또는 예방하기 위한 조성물을 제공한다.

세포 내에서 FIZZ를 발현하도록 조작된 감염성 바이러스 입자를 환자 세포로 감염시킬 경우, 그 발현 효율을 증대시킬 수 있기 때문에 치료 효과가 우수하다.

본 발명의 재조합 바이러스 포함 조성물에 사용될 수 있는 재조합 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 등을 포함하며 이로 제한되지 않는다. 바람직하게는, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스, 보다 바람직하게는 아데노바이러스가 사용될 수 있다.

레트로바이러스의 경우, 숙주세포의 염색체내로 비가역적으로 융합되기 때문에 유전자 발현이 장기간 지속되는 장점이 있다. 아데노바이러스의 경우, 일반적인 유전자 치료 연구에서 가장 많이 사용되어 온 시스템으로 다양한 종류의 포유류 세포에 사용가능하다. 아데노 관련 바이러스의 경우, 유전자를 전달하는 숙주 세포의 범위가 넓고 반복 투여시 면역 부작용이 적으며 유전자 발현 기간이 긴 장점이 있다. 헤르페스 심플렉스 바이러스의 경우 신경조직에 친화성이 큰 바이러스로서, 신경세포의 정상기능에 영향을 미치지 않고 핵 중에서 염색체 외부에 안정한 염색체 부체(episomal element)로 존재한다.

본 발명은 FIZZ 단백질, FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 또는 FIZZ 단백질 발현 재조합 바이러스를 포함하는 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하여 인체 또는 수의용의 적절한 제형으로 제조된다.

투여 방식 및 제형에 적합한 제제는 공지되어 있고, 전형적으로 막을 통과한 이동을 용이하게 하는 계면활성제를 포함한다. 이러한 계면활성제는 스테로이드에서 유도된 것이거나 N-[1-(2,3-디올레오일)프로필-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(DOTMA) 등의 양이온성 지질, 또는 콜레스테롤 헤미숙시네이트, 포스파티딜 글리세롤 등의 각종 화합물 등이 있다.

경구 투여시에는 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 조성물은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양한 제형으로 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.

또 다른 양태로서, 본 발명은 약제학적 유효량의 FIZZ 단백질, FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 또는 FIZZ 단백질 발현 재조합 바이러스를 천식 환자에게 투여하여, 천식을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 치료방법에 사용되는 FIZZ 단백질, FIZZ 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 또는 FIZZ 단백질 발현 재조합 바이러스는 상술한 바와 같다.

본 발명에서 용어, "환자"는 본 발명의 조성물을 투여에 의하여 증상이 호전될 수 있는 천식 질환을 가진 인간과 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물을 모두 포함한다. 본 발명의 조성물을 환자에게 투여할 경우, 알레르겐에 의한 기도 과민 반응이 억제되면서 천식의 발병을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물을 기존의 천식 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.

본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여로 천식의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여로 발병한 호흡곤란, 기침, 천명, 객담, 흉부 압박감 등의 천식 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 비경구 투여시 정맥내, 근육내, 피하, 안내, 경피 등으로 투여될 수 있고 바람직한 제형은 주사제이다.

본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다.

본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

실시예 1: FIZZ1 발현 벡터의 제조

서열번호 2의 단백질을 코딩하는 서열번호 1의 FIZZ1의 cDNA를 pCAGGS(LMBP 2453, CABRI, USA)의 EcoRI 염기서열에 클로닝하여 FIZZ1을 과발현 시킬 수 있도록 형질전환 벡터를 제작하였다. pCAGGS는 Miyazaki(일본 동경대학교) 교수가 CABRI(Common Access to Biological Resources and Information)에 제공한 것을 사용하였다. 제작된 pCAGGS-FIZZ1 벡터는 도 1에 나타난 바와 같이 CMV 인핸서(enhancer), 닭의 베타-액틴 프로모터, FIZZ1 cDNA, 폴리아데닐레이션 시그널을 포함하고 있었다.

실시예 2: FIZZ1 단백질을 과발현하는 형질전환 마우스의 제조 및 확인

C57BL/6 마우스의 수정란에 실시예 1에서 제작된 형질전환 벡터를 미세 주입하여 FIZZ1이 과발현되는 마우스를 제작하였다. FIZZ1 형질전환 마우스의 유전자형 분석은 마우스 꼬리에서 게놈 DNA를 추출한 후 서열번호 3과 4의 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응을 통해 분석하였다(도 2).

서열번호 3(Forward primer): 5'-ATG AAG ACT ACA ACT TGT TCC CTT-3'

서열번호 4(Reverse primer): 5'-TTA GGA CAG TTG GCA GCA GCG GGC-3'

도 2에서 M은 분자량 마커, (+)는 양성 대조군의 유입된 FIZZ DNA, (-)는 음성 대조군의 C57BL6 마우스의 꼬리 DNA를 나타낸다. 유전자형 분석을 통해 2개의 FIZZ1 형질전환 마우스주(transgenic mouse line)를 확립하였다.

실시예 3: FIZZ1 mRNA의 발현 비교

형질전환 마우스와 비형질전환 마우스(non-transgenic mouse)의 폐장에서 트리졸 시약(Trizol reagent, Gibco BRL)을 이용하여 총 RNA를 추출하여 노던 블롯팅을 실시하여 FIZZ1 mRNA의 발현을 조사하였다. 그 결과, 비형질전환 마우스에 비해 형질전환 마우스에서 FIZZ1 mRNA의 발현이 현저히 증가되어 있는 것을 확인하였다(도 3).

실시에 4: FIZZ1 단백질의 발현 비교

FIZZ1 단백질에 특이적인 항체를 제작하여 FIZZ1 단백질에 대한 면역형광염색을 폐장에서 실시한 결과 도 4와 같이 형질 전환 마우스의 기관지 상피세포(Bronchial epithelial cell)(화살표 머리로 표시)와 과립폐포세포(type 2 pneumocyte) 및 기관지 평활근세포(bronchial smooth muscle cell)(화살표로 표시)에서 FIZZ1 단백질이 대조군에 비해 발현이 현저히 증가되어 있었다.

실시에 5: 형질전환 마우스의 기도과민성 실험

천식에서 가장 중요한 임상 증상중의 하나인 기도과민성(airway hyperresponsiveness)에 있어서 FIZZ1의 기능을 알아보기 위해, 메타콜린(metacholine)에 의한 기도과민성의 변화를 FIZZ1 형질전환(Tg) 마우스와 비형질전환(Non-Tg) 마우스에서 비교하였다. FIZZ1 Tg 마우스와 non-tg 마우스를 홀 바디 플레티스모그래피(whole body Plethysmography, Buxco chamber)(도 5A)에 넣고 메타콜린을 20, 40, 80, 160 mg/dl의 농도로 증가시키면서 챔버에 분무기를 통해 흡입시킨 후, 모니터 상에서 마우스의 기도 저항변화를 관찰하였다. 도 5B는 암컷 0011 마우스주의 실험결과를 나타낸 그래프이고, C는 수컷 1800 마우스주의 실험결과를 나타낸 그래프이며, D는 암컷 1800 마우스주의 실험결과를 나타낸 그래프이다. 그 결과 전체적으로 두 형질전환주에서 Tg 마우스의 기도저항이 Non-tg에 비해 상대적으로 낮은 것을 확인할 수 있었다.

이를 통하여 천식 유도시 과발현된 FIZZ1이 기도과민성 억제에 영향을 미치고 있다는 것을 알 수 있었다.

발명의 효과

본 발명의 FIZZ를 포함하는 천식 치료 조성물은 호흡곤란, 기침, 천명, 객담, 흉부 압박감 등의 다양한 증세가 동반되어 일어나는 호흡기 질환을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 FIZZ1의 cDNA를 클로닝하여 제작된 FIZZ1 발현 벡터이다.

도 2는 형질전환 벡터를 주입하여 형질전환시킨 마우스의 꼬리에서 DNA를 분리하여 형질전환 여부를 분석한 PCR 결과이다; M은 분자량 마커, (+)는 양성 대조군의 유입된 FIZZ DNA, (-)는 음성 대조군의 C57BL6 마우스의 꼬리 DNA.

도 3은 형질전환된 마우스의 FIZZ1 mRNA 발현을 비형질전환된 마우스와 비교한 결과이다.

도 4는 FIZZ1 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 형질전환된 마우스 조직에서의 FIZZ1 단백질 발현을 비형질전환된 마우스와 확인한 결과이다. BL은 기관지 루멘, VL은 혈관 루멘을 나타내고, 화살표는 기관지 평활근세포, 화살표 머리는 기관지 상피세포를 나타낸다.

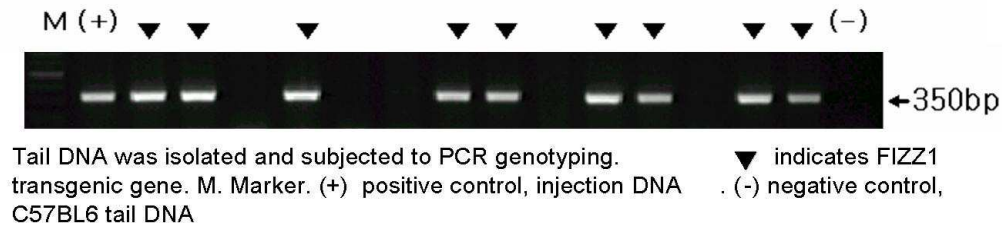
도 5A는 기도과민반응(AHR, airway hyperresponsiveness)을 측정하기 위한 홀 바디 플레티스모그래프(whole body plethysmography)의 개략도를 나타내고, B, C 및 D는 이를 이용하여 형질전환 마우스의 기도 과민성을 비형질전환 마우스와 비교 분석한 결과이다.

도면

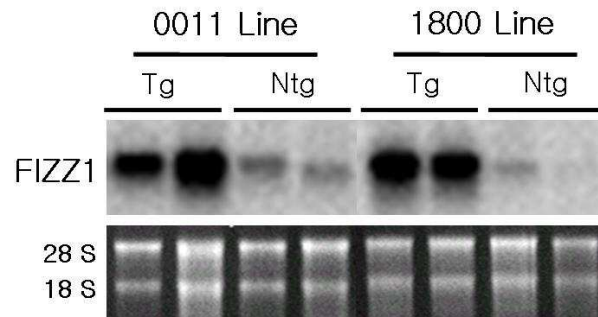
도면1



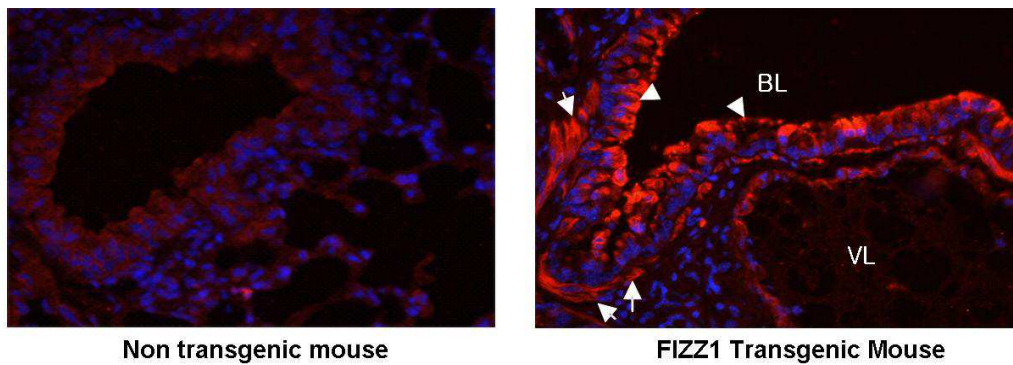
도면2



도면3

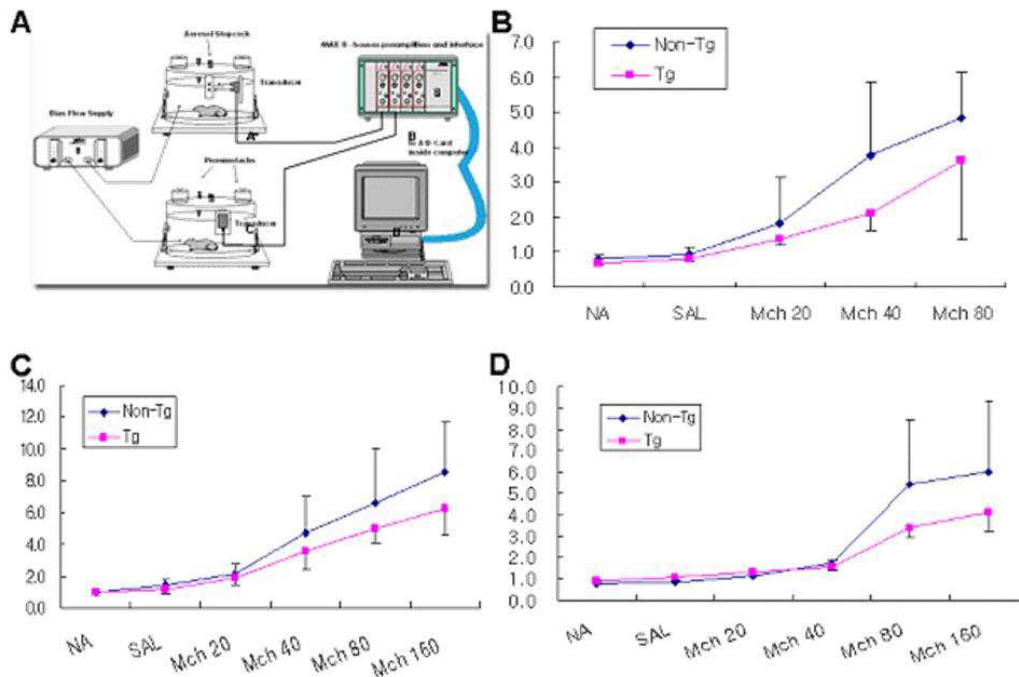


도면4



•Arrows indicate **bronchial smooth muscle cells**. Arrow heads indicate bronchial epithelial cells. BL, Bronchial lumen; VL, vessel lumen

도면5



서열목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration

<120> Composition for preventing or treating asthma comprising Fizz

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 531

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (36) .. (368)

<400> 1

```

gaattccggg cccaggatg ccaactttga atagg      atg aag act aca act      50
Met Lys Thr Thr Thr
1                      5

tgt tcc ctt ctc atc tgc atc tcc ctg ctc cag ctg atg gtc cca gtg      98
Cys Ser Leu Leu Ile Cys Ile Ser Leu Leu Gln Leu Met Val Pro Val
10                      15                      20

aat act gat gag acc ata gag att atc gtg gag aat aag gtc aag gaa      146
Asn Thr Asp Glu Thr Ile Glu Ile Ile Val Glu Asn Lys Val Lys Glu

```

25	30	35	
ctt ctt gcc aat cca gct aac tat ccc tcc act gta acg aag act ctc			194
Leu Leu Ala Asn Pro Ala Asn Tyr Pro Ser Thr Val Thr Lys Thr Leu			
40	45	50	
tct tgc act agt gtc aag act atg aac aga tgg gcc tcc tgc cct gct			242
Ser Cys Thr Ser Val Lys Thr Met Asn Arg Trp Ala Ser Cys Pro Ala			
55	60	65	
ggg atg act gct act ggg tgt gct tgt ggc ttt gcc tgt gga tct tgg			290
Gly Met Thr Ala Thr Gly Cys Ala Cys Gly Phe Ala Cys Gly Ser Trp			
70	75	80	85
gag atc cag agt gga gat act tgc aac tgc ctg tgc tta ctc gtt gac			338
Glu Ile Gln Ser Gly Asp Thr Cys Asn Cys Leu Cys Leu Leu Val Asp			
90	95	100	
tgg acc act gcc cgc tgc tgc caa ctg tcc ta agaatgaaga ggtggagaac			390
Trp Thr Thr Ala Arg Cys Cys Gln Leu Ser			
105	110		
ccagctttga tatgatgaat ctaacaaaaa ctgcagtctc aatttggaac tctgactcat			450
gtgccttttaa atgtgttcat attgcccatt taccctgctt cttgaaatgc ttcttgaaaa			510
ataaagacaa atttgcattgt g			531
<210>	2		
<211>	111		
<212>	PRT		
<213>	Mus musculus		
<400>	2		
Met Lys Thr Thr Thr Cys Ser Leu Leu Ile Cys Ile Ser Leu Leu Gln			
1	5	10	15
Leu Met Val Pro Val Asn Thr Asp Glu Thr Ile Glu Ile Ile Val Glu			
20	25	30	
Asn Lys Val Lys Glu Leu Leu Ala Asn Pro Ala Asn Tyr Pro Ser Thr			
35	40	45	
Val Thr Lys Thr Leu Ser Cys Thr Ser Val Lys Thr Met Asn Arg Trp			
50	55	60	
Ala Ser Cys Pro Ala Gly Met Thr Ala Thr Gly Cys Ala Cys Gly Phe			
65	70	75	80
Ala Cys Gly Ser Trp Glu Ile Gln Ser Gly Asp Thr Cys Asn Cys Leu			
85	90	95	

Cys Leu Leu Val Asp Trp Thr Thr Ala Arg Cys Cys Gln Leu Ser
 100 105 110

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer

<400> 3
 atgaagacta caacttggtc cctt 24

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer

<400> 4
 ttaggacagt tggcagcagc gggc 24