

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

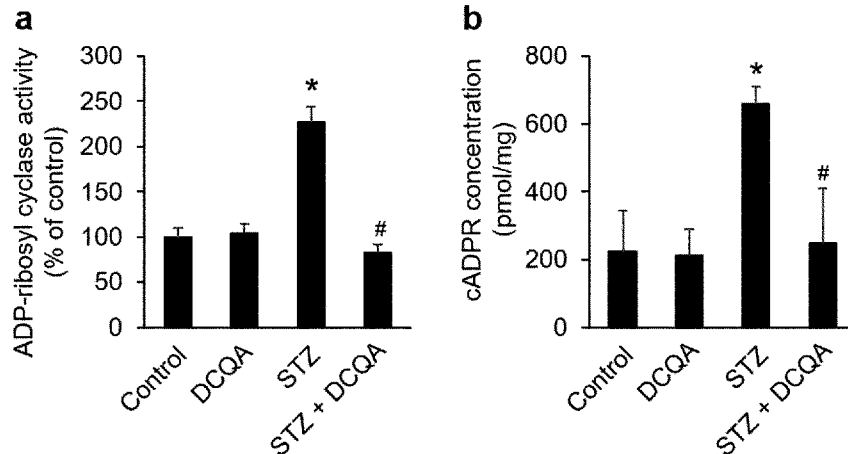
WO 2020/262983 A1

2020 년 12 월 30 일 (30.12.2020) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *C12N 9/10* (2006.01) *A61P 13/12* (2006.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/008283
- (22) 국제출원일: 2020 년 6 월 25 일 (25.06.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0076979 2019 년 6 월 27 일 (27.06.2019) KR
10-2020-0076635 2020 년 6 월 23 일 (23.06.2020) KR
- (71) 출원인: 전북대학교 산학협력단 (INDUSTRIAL CO-OPERATION FOUNDATION CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 54896 전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567, Jeollabuk-do (KR).
- (72) 발명자: 김우현 (KIM, Uh-Hyun); 54823 전라북도 전주시 덕진구 솔대로 120, 402동 503호, Jeollabuk-do (KR).
남태식 (NAM, Tae-Sik); 55028 전라북도 전주시 덕진구 인교9길 21-8, 309호, Jeollabuk-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베텔회관 8층, Seoul (KR).
- (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: NOVEL ADP-RIBOSYL CYCLASE AND INHIBITOR THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규한 에이디피-라이보실 사이클라아제 및 이의 저해제



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising an inhibitor against the expression or activation of novel ADP-ribosyl cyclase or a naturally occurring mutant thereof as an active ingredient for preventing or treating an ADP-ribosyl cyclase-mediated disease. In addition, the present invention relates to a composition for diagnosis of an ADP-ribosyl cyclase-mediated disease, the composition comprising an agent for measuring a gene expression level or protein level of the ADP-ribosyl cyclase or a naturally occurring mutant thereof. The composition of the present invention has the effect of inhibiting the calcium increase in splenocytes, which is attributed to angiotensin II-induced ADP-ribosyl cyclase expression or activation, and as such can be advantageously used as a therapeutic agent for ADP-ribosyl cyclase-mediated diseases, particularly a renal disease.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준을 측정하는 제제 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 안지오텐신 II에 의한 새로운 에이디피-라이보실 사이클라아제의 발현 또는 활성 증가로 인한 신장 세포 내 칼슘 증가를 억제하는 효과가 있어, 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환, 특히 신장질환의 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.



(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, ST, 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).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규한 에이디피-라이보실 사이클라아제 및 이의 저해제

기술분야

- [1] 본 발명은 NAD⁺를 사이클릭 ADP-라이보오스로 변환시키는 신규한 에이디피-라이보실 사이클라아제 및 이의 저해제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] ADPRC는 NAD⁺로부터 사이클릭 에이디피 라이보오스 (cyclic ADP-ribose; cADPR)를 합성하고, NADP⁺로부터 니코틴산 아데닌 디뉴클레오티드 인산 (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate; NAADP)를 합성하는 효소로써, 식물에서부터 포유동물에 이르기까지 광범위하게 존재한다. 이 ADPRC는 세포내 칼슘저장고로부터 세포질로 칼슘을 유리시킴으로써 세포의 다양한 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다 [Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Nat Rev Mol Cell Biol. 4, 517-529, 2003; Lee HC, Mol. Med. 12 317-323, 2006].
- [3] 안정한 상태에서는 세포 내 칼슘농도는 10⁻⁷ M 이하로 기저치로 유지된다. 그러나 세포가 활성화된 상태에서는 세포 내 칼슘농도가 기저치의 10 배 정도까지 증가되며, 병적인 상태에서 칼슘농도가 지속적으로 높게 유지되는 경우에는 세포의 많은 기능이 영향을 받게 되며, 결과적으로 세포의 정상기능을 소실하게 된다.
- [4] 고혈압 또는 고혈압을 동반한 당뇨병, 비만, 치매, 허혈, 세포증식을 동반한 질환에서도 세포내의 칼슘대사조절에 이상이 생겨, 세포내의 칼슘농도가 정상보다 높게 유지된다 [Resnick LM. Am. J. Hypertens. 6:123S-134S, 1993].
- [5] 일 예로 고혈압과 같은 만성질환자를 살펴보면, 여러 가지 유전적, 환경적 혹은 어떤 질병의 이차적인 원인에 의해서 혈관 평활근세포내의 칼슘농도가 지속적으로 정상치보다 높은 수치를 나타내며, 그 결과 혈관 평활근의 수축을 유발시켜 말초혈관의 저항이 증가되어, 이로 인해 혈압이 정상혈압보다 상승된 상태로 지속적으로 유지되어 고혈압이 초래된다.
- [6] 이와 같이 상승된 혈압은 이차적으로 혈관평활근세포와 섬유조직의 증식과 비대를 초래하고, 그 결과, 말초 혈관 저항과 혈압을 더욱 증가시켜, 심혈관계, 뇌 및 신장 등의 장기 기능이 저해되어 심근경색, 협심증, 중풍 및 만성 심부전증 등으로 사망에 이르게 한다고 알려져 있다 [Cowley AW Jr. Physiol Rev. 72:231-300, 1992].
- [7] 췌장으로부터 인슐린 분비에는 ADPRC의 일종인 CD38 활성화에 의한, 즉 cADPR에 의한, 칼슘증가가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 당뇨병 유발은 안지오텐신의 생성을 증가시키는데 이 펩타이드 호르몬은 신장질환, 고혈압 및 심장병을 유발시킬 뿐만 아니라 ADPRC를 활성화시키는 것으로 잘

알려져 있다.

- [8] 따라서 ADPRC는 면역세포, 심장근세포, 췌장 베타세포, 신장근세포 및 신경세포 등에 존재하면서 여러 호르몬의 수용체와 연관되어 세포내 칼슘농도의 증가 및 여러 생리활성을 조절함으로써 이 ADPRC의 발현 또는 활성 조절에 이상이 있으면 생리현상 (면역, 신장기능, 인슐린분비, 심혈관 기능) 조절에 이상을 일으킬 수 있다.
- [9] 이 같은 ADPRC는 여러 호르몬에 의하여 활성화되며 이 효소는 기질 NAD^+ 로부터 산물인 cADPR을 생성하는데 이 cADPR은 거의 모든 장기에서 세포내 칼슘을 증가시킨다. 또한 ADPRC의 활성화에 의한 칼슘의 이상증가는 인슐린분비 (insulin secretion) [Kim BJ, Park KH, Yim CY, Takasawa S, Okamoto H, Im MJ, Kim UH. Diabetes. 57: 868-878, 2008], 세포비대 (hypertrophy) [Gul R, Park JH, Kim SY, Jang KY, Chea JK, Ko JK, Kim UH. Cardiovasc Res. 81: 582-591, 2009], 세포증식 (proliferation) [Kim SY, Gul R, Rah SY, Kim SH, Park SK, Im MJ, Kwon HJ, Kim UH. Am J Physiol Renal Physiol. 294: F989-F989, 2008] 등 다양한 생체병리에 요인으로 알려져 왔다.
- [10] 현재까지 가장 잘 연구가 된 ADPRC는 T-세포 표면 항원인 CD38로서 이 분자는 면역세포 뿐만 아니라 여러 장기에 널리 발현되어 있다.
- [11] 그러나 심장, 신장, 뇌에는 CD38과 다른 ADPRC가 발현된다고 밝혀졌다 [Partida-Sanchez S, Cockayne DA, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, Garvy B, Kusser K, Goodrich S, Howard M, Harmsen A, Randall TD, Lund FE. Nat Med 7:1209-16, 2001].
- [12] 따라서 조직 특이적 ADPRC의 발현조절은 세포내 칼슘증가로 유발된 병을 치료하는데 도움이 될 것이다. 또한 ADPRC의 활성기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

[13]

- [14] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [15] 본 발명자는 포유동물에서 알려져 있는 기존의 ADPRC (CD38, CD157)가 아닌 새로운 종류의 ADPRC의 효소를 발견 및 이의 활성을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [16]
- [17] 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 에이디피-라이보실 사이클라아제 (ADP-ribosyl cyclase; ADPRC) 또는 이의 천연적으로 발생된(naturally occurred) 변이체를 제공하는데 있다.

- [18] 본 발명의 다른 목적은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체를 코딩하는 핵산분자를 제공하는데 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공하는데 있다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는데 있다.
- [21] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체, 이를 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는, NAD⁺를 사이클릭 ADP-라이보오스 (cyclic ADP-ribose; cADPR)로 변환시키는 촉매 조성물을 제공하는데 있다.
- [22] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.
- [23] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는데 있다.
- [24] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 헤테로 타입(hetero type) 유전자 결손된 동물 모델을 제공하는데 있다.
- [25] 본 발명의 또 다른 목적은 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단에 대한 정보 제공방법을 제공하는데 있다.
- [26] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준을 측정하는 제제 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단용 조성물을 제공하는데 있다.
- [27] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준을 측정하는 제제 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단 키트를 제공하는데 있다.
- [28] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.
- [29]
- [30] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결 수단

- [31] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 (ADP-ribosyl cyclase; ADPRC) 또는

이의 천연적으로 발생된(naturally occurred) 변이체를 제공한다.

[32]

[33] 본 발명자는 NAD⁺를 사이클릭 ADP-라이보오스 (cyclic ADP-ribose; cADPR)로 전환시키는 효소로서, 종래에 알려진 에이디피-라이보실 사이클라아제 외에 신규한 에이디피-라이보실 사이클라아제를 발굴하고자 예의 노력을 한 결과 본 발명을 완성하였다.

[34]

[35] 본 명세서에서 용어 “에이디피-라이보실 사이클라아제” 또는 “ADP-ribosyl cyclase (ADPRC)”는 NAD⁺를 사이클릭 ADP-라이보오스 (cyclic ADP-ribose; cADPR)로 변환시키는 효소를 의미한다.

[36]

본 명세서에서 용어 “에이디피-라이보실 사이클라아제의 변이체”는 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제의 일부 아미노산 서열이 천연적 또는 인공적으로 치환, 결실, 첨가된 변이체를 의미하며, NAD⁺를 사이클릭 ADP-라이보오스 (cyclic ADP-ribose; cADPR)로 변환시키는 촉매의 활성을 보유한 에이디피-라이보실 사이클라아제의 변이체를 의미한다.

[37]

명세서에서 용어 “에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 (naturally occurred) 변이체”는 상기 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체로서, NAD⁺를 사이클릭 ADP-라이보오스 (cyclic ADP-ribose; cADPR)로 변환시키는 촉매의 활성을 보유한 에이디피-라이보실 사이클라아제의 변이체를 의미한다.

[38]

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체는 중간 변이체(species variants), 종의 상동체(species homologs), 아이소폼(isoforms), 대립유전자 변이체(allelic variants), 입체 배열에 의한 변이체(conformation variants), 스플라이스 변이체(splice variants) 및 점 돌연변이 변이체(point mutant variants)로 구성된 군으로부터 선택되는 천연적으로 발생된 변이체인 것이다.

[39]

본 발명의 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제와 바람직하게는 50% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 60% 이상의 상동성, 보다 더 바람직하게는 70% 이상의 상동성, 보다 더욱 더 바람직하게는 80% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 갖는다.

[40]

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체는 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류로 구성된 군으로부터 선택되는 생물에서 발생된 것이다.

[41]

본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제와 비교하여, 포유류의 경우 70% 이상, 조류,

과충류 및 양서류의 경우 60% 이상, 어류의 경우 50% 이상의 상동성을 갖는 것으로 확인되었다.

[42] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제와 비교하여, 인간 및 래트는 96%, 챔팬지는 93%, 기니피그 및 말은 91%, 개, 염소 및 양은 90%, 토끼는 89%, 돼지는 88%, 소는 78%, 닭은 70%, 개구리는 63%, 칠면조는 62%의 높은 상동성을 나타내어 종간 보존적 서열의 비중이 매우 높은 효소임을 확인하였다(도 4).

[43] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체는 서열목록 제2서열 내지 제21서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것이다.

[44]

[45] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체를 코딩하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터 또는 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[46] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. "단리된 핵산"은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 "작동가능하게 연결된"은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[47] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 핵산분자는 cDNA인 것이다.

[48] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생(exogenous) 또는 이종(heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드,

코스미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

- [49] 본 명세서에서 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.
- [50] 본 명세서에서 용어 "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.
- [51] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 세균(bacteria)세포, 이스트(yeast), 동물 또는 인간 세포(CHO 세포, HeLa 세포, HEK293 세포, MES13 세포, BHK-21 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, NIH3T3 세포 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [52]
- [53] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체, 이를 코딩하는 핵산분자 또는 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는, NAD⁺를 사이클릭 ADP-라이보오스 (cyclic ADP-ribose; cADPR)로 변환시키는 촉매 조성물을 제공한다.
- [54] 본 발명의 촉매 조성물은 NAD⁺가 cADPR로 변환되는 과정을 효율적으로 촉매한다.
- [55]
- [56] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [57] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이다.
- [58] 본 발명의 약제학적 조성물은 (a) 상기 발현 억제제 또는 활성 억제제; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.
- [59] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물이다.
- [60]

- [61] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 억제학적 조성물의 억제학적 유효량을 대상(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [62]
- [63] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 치료 용도로 사용하기 위한(for use in therapy), 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 제공한다.
- [64]
- [65] 본 발명이 예방 또는 치료하고자 하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 종류는 제한되지 않으며, 바람직하게는 당뇨병 또는 신장질환인 것이고, 보다 바람직하게는 신부전(renal failure), 신증(nephropathy), 신염(nephritis), 신장 섬유증(renal fibrosis) 또는 신장경화증(nephrosclerosis)인 것이다.
- [66] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 신부전은 만성 신부전(Chronic Renal Failure), 급성 신부전(Acute Renal Failure), 또는 투석 전의 정도 신부전인 것이다.
- [67] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 신증은 신증 증후군(Nephropathy Syndrome), 리포이드 신증(Lipoid Nephropathy), 당뇨병성 신증(Diabetic Nephropathy), 면역글로빈A 신증(IgA Nephropathy), 진통제 신증(Analgesic Nephropathy) 또는 고혈압성 신증(Hypertensive Nephropathy)인 것이다.
- [68] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 체중 대비 신장 무게의 유의미한 감소, 크레아틴 청소율의 유의미한 증가, 소변 알부민양의 유의미한 감소를 통해서 만성신부전이나 당뇨병성 신증을 포함하는 신장질환 치료제의 후보로서의 가능성을 확인하였으며(도 6); 추가적으로 ADP-ribosyl cyclase 활성 및 cADPR의 농도를 정상 수준으로 낮추고(도 7); TGF- β 1, Fibronectin, Collagen IV의 발현량을 정상 수준으로 낮추며(도 8); 사구체 비후, 염증세포의 침윤, 이형상피세포의 형성을 정상 수준으로 회복시켜 신장의 병리조직학적 변화를 회복시키는 능력도 보유하며(도 9); 고혈압 모델에서도 크레아틴 청소율 유의미하게 증가하여 고혈압성 신증에의 적용 가능성도 확인한 바(도 11b), 신장 기능 이상 또는 손상에 의해 발생하는 다양한 종류의 신장질환 치료제로서의 가능성을 갖는다.
- [69] 본 명세서에서 용어 “발현 억제제”는 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제의 발현을 억제하는 물질을 의미하며, 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제의 구조 및 기능으로부터 통상의 기술자는 이를 용이하게 제작할 수 있다.
- [70] 본 발명의 발현 억제제는 제한되지 않으나, 바람직하게는 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide), siRNA, shRNA, miRNA, ribozyme, DNase 및 PNA(protein nucleic acid)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인

것이다.

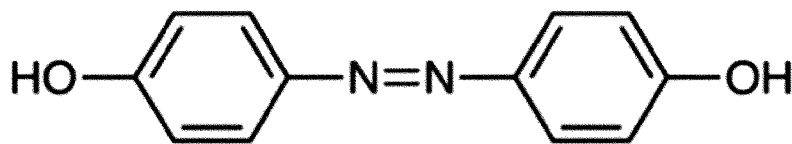
[71] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 siRNA는 서열목록 제22서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것이다.

[72] 본 명세서에서 용어 “활성 억제제”는 상기 발현된 에이디피-라이보실 사이클라아제 단백질의 활성을 억제하는 물질을 의미하며, 바람직하게는 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 유사체(mimetics), 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것이다.

[73] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 화합물은 4,4'-디하이드록시아조벤젠(4,4'-dihydroxyazobenzene), 2-(1,3-벤조옥사졸-2-일아미노)-1-메틸퀴나졸린-4(1H)-온(2-(1,3-benzoxazol-2-ylamino)-1-methylquinazoline-4(1H)-one) 및 디카페올리퀴닉 산(Dicaffeoylquinic acid, DCQA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다.

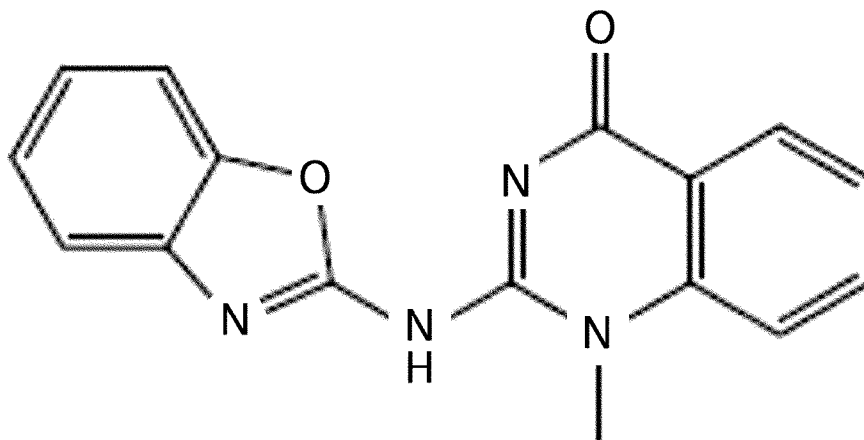
[74] 본 발명의 4,4'-디하이드록시아조벤젠은 바람직하게는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

[75] [화학식1]



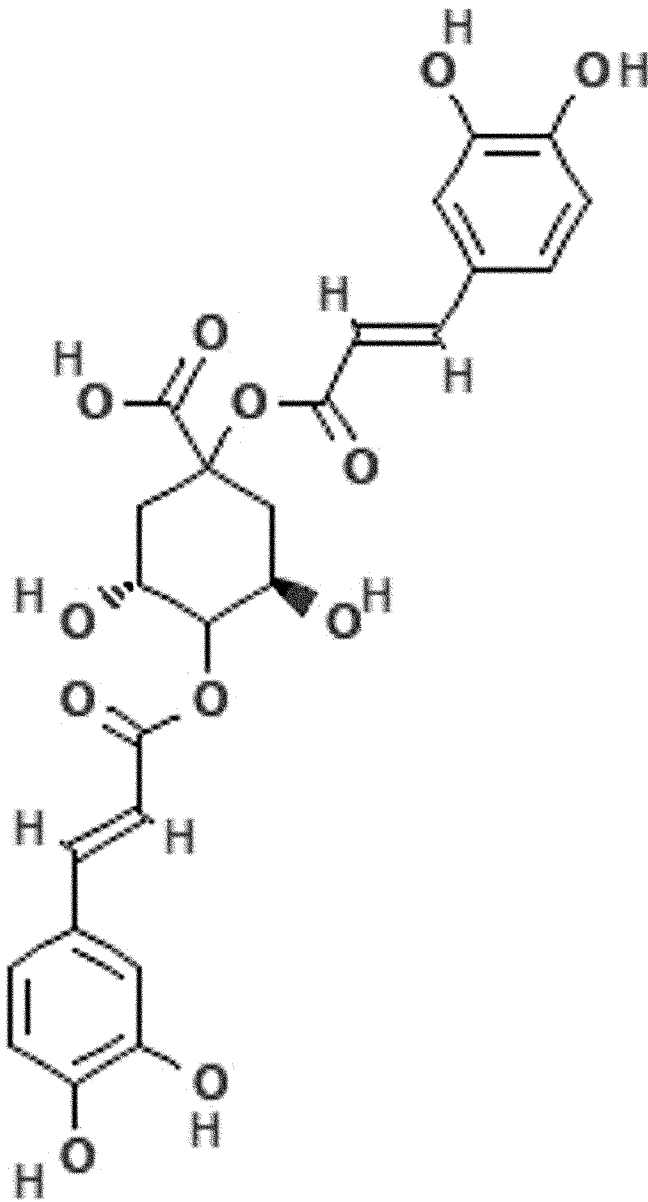
[76] 본 발명의 2-(1,3-벤조옥사졸-2-일아미노)-1-메틸퀴나졸린-4(1H)-온은 바람직하게는 하기 화학식 2로 표시될 수 있다:

[77] [화학식2]

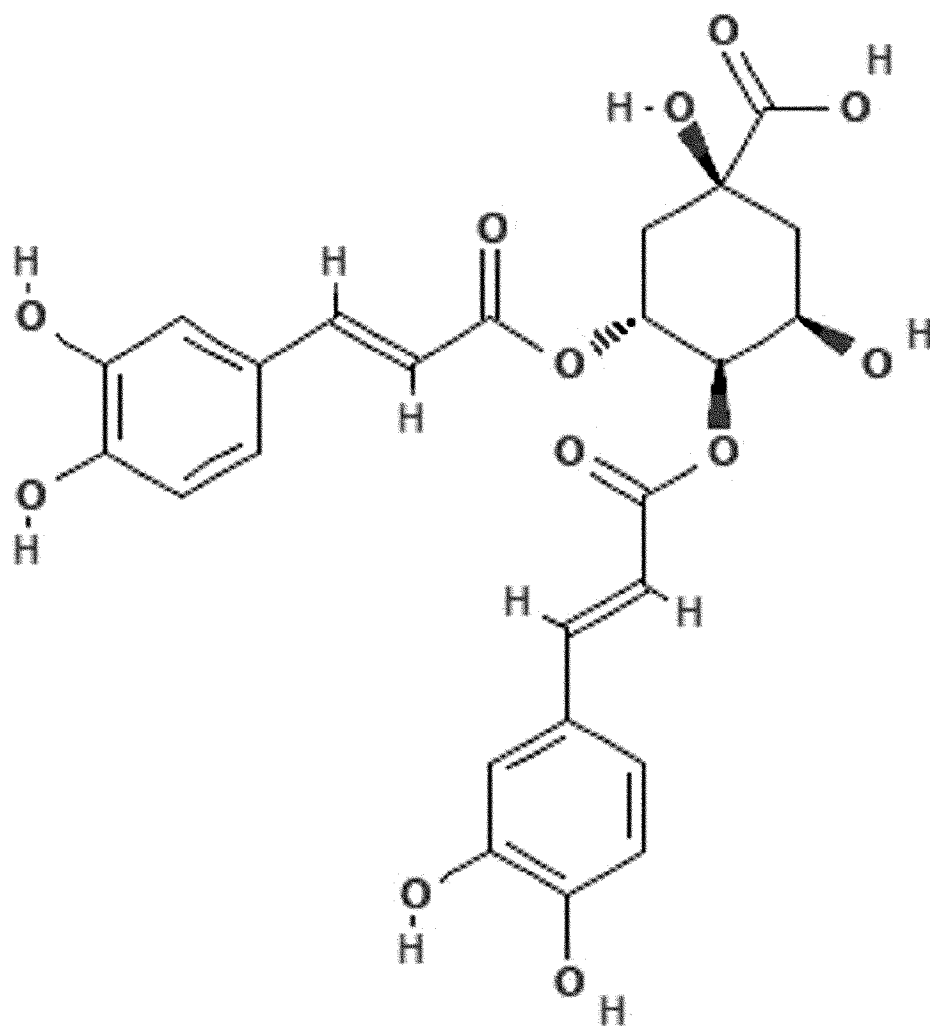


[78] 본 발명의 디카페올리퀴닉 산(Dicaffeoylquinic acid, DCQA)은 하기 화학식 3 내지 8(1,4-DCQA, 3,4-DCQA, 3,5-DCQA, 4,5-DCQA, 1,3-DCQA 및 1,5-DCQA)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물로 표시될 수 있다:

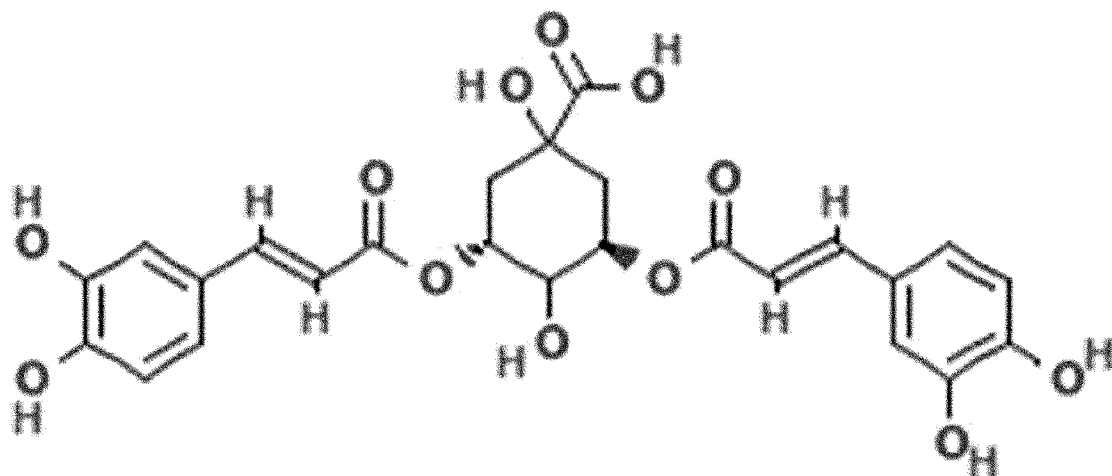
[79] [화학식 3]



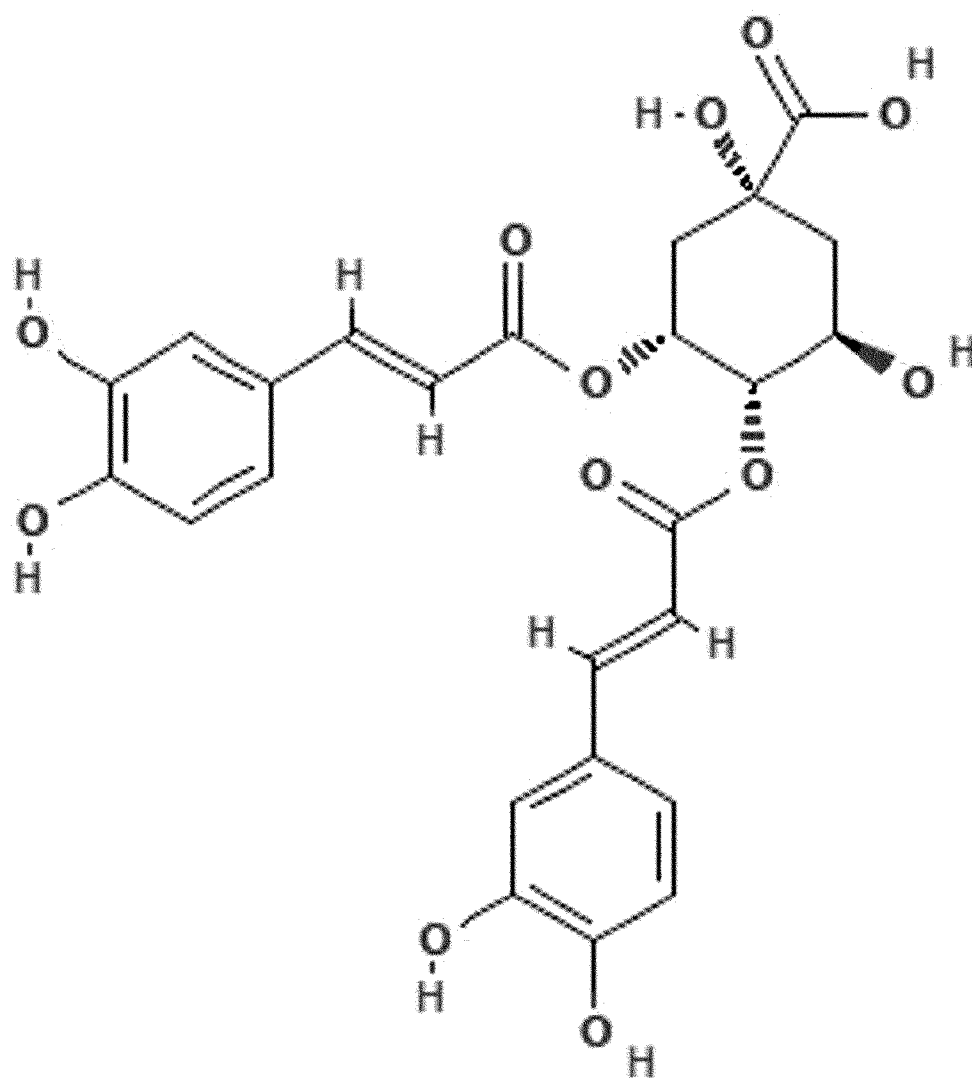
[80] [화학식4]



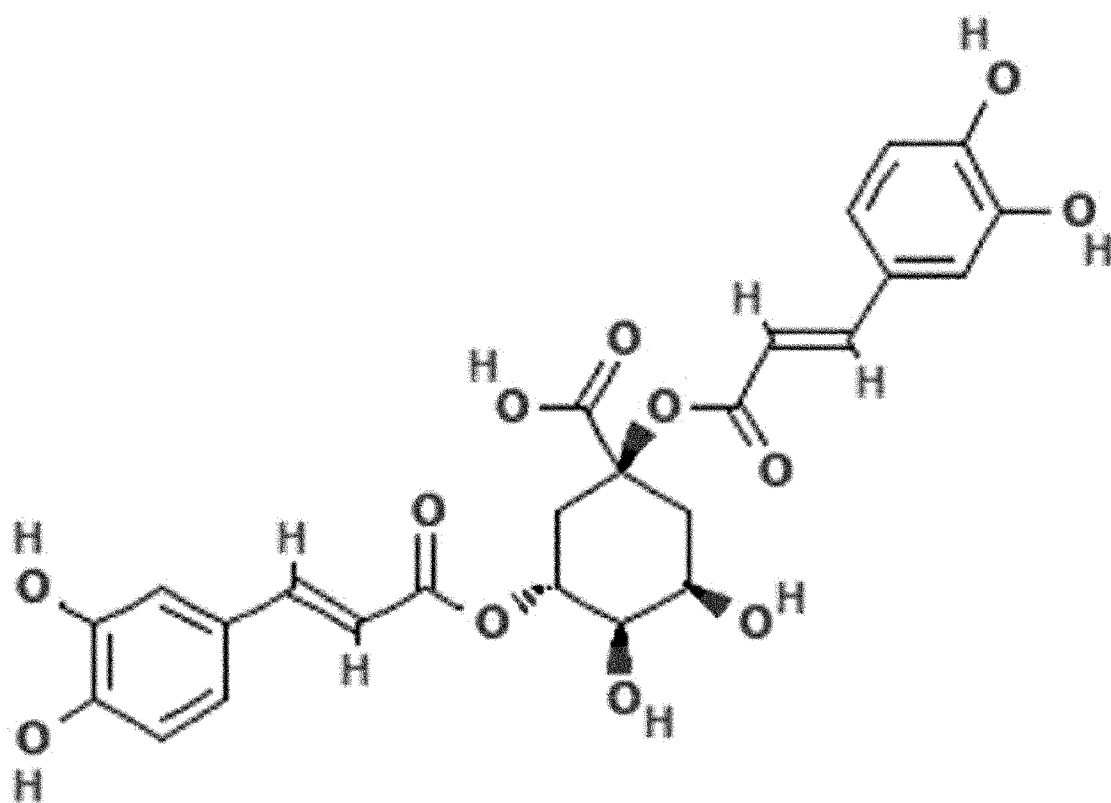
[81] [화학식5]



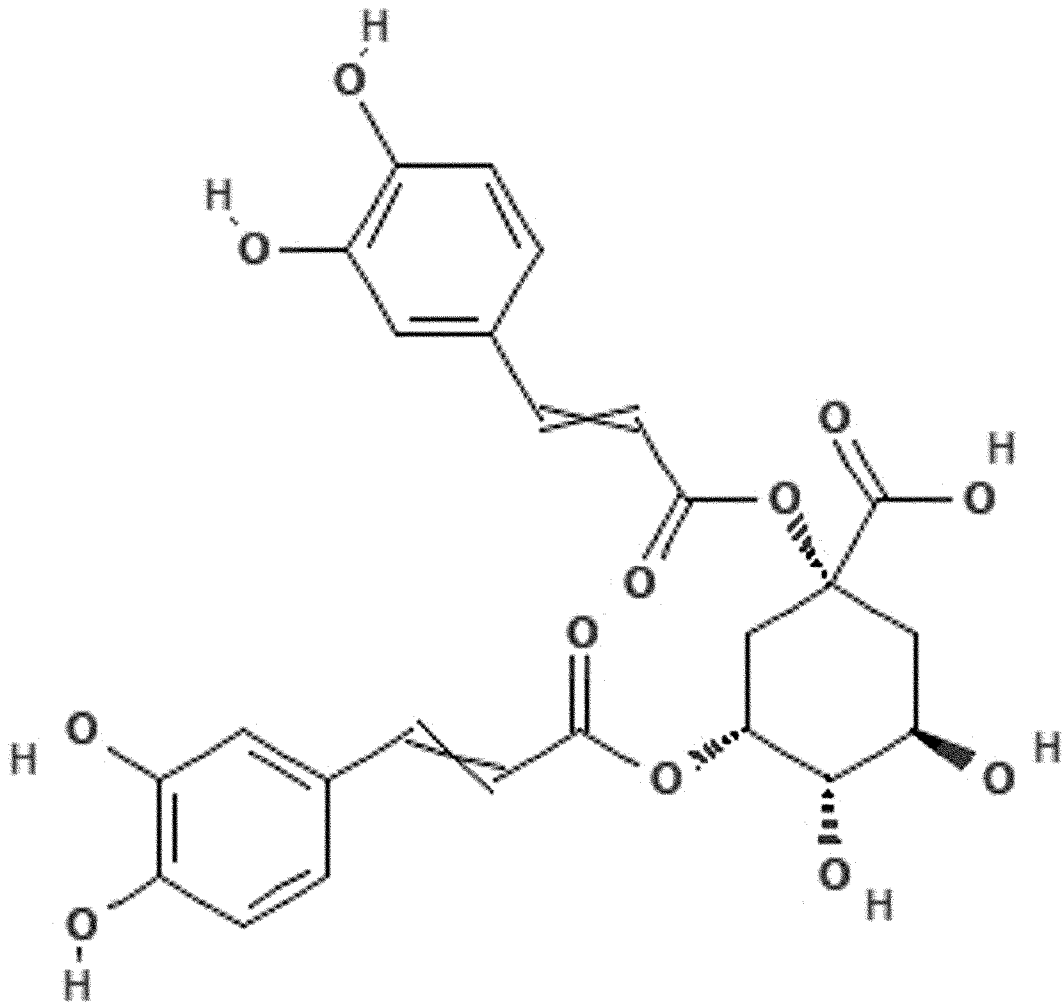
[82] [화학식6]



[83] [화학식 7]



[84] [화학식8]



[85] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 새로운 에이디피-라이보실 사이클라아제에 대한 발현 억제제 또는 활성 억제제는 ADPRC의 발현 또는 활성을 조절하는 기전을 경유하여 신장질환을 억제하는데 기여하는 것으로 확인되었다.

[86] 따라서, 본 발명의 새로운 에이디피-라이보실 사이클라아제에 대한 발현 억제제 또는 활성 억제제는 임상적으로 유용한 각 세포별 선택적 억제제, 나아가 신장내 질병 예방, 개선 및/또는 치료제로 사용할 수 있다.

[87] 본 발명의 조성물은 유효성분인 새로운 ADPRC의 발현 억제제 또는 활성 억제제 뿐만 아니라 기존에 공지된 ADPRC 관련 질환의 치료제와 함께 사용될 수도 있다.

[88] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약제학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 담체를 말한다.

[89] 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 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [90] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 비경구 투여이며, 예컨대, 정맥 내 주입, 국소 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다.
- [91] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다.
- [92] 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 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [93] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제에 대한 발현 억제제 또는 활성 억제제 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 [예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [94] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 에이디피-라이보실 사이클라아제에 대한 발현 억제제 또는 활성 억제제 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액,

감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

- [95] 본 발명의 식품 조성물은, 신장 관련 다양한 병리적 형태 관련 인자의 조절(체중 대비 신장 무게의 유의미한 감소, 크레아틴 청소율의 유의미한 증가, 소변 알부민양의 유의미한 감소; TGF- β 1, Fibronectin, Collagen IV의 발현양을 정상 수준으로 감소; 사구체 비후, 염증세포의 침윤, 이형상피세포의 형성을 정상 수준으로 회복)을 통해 신장질환을 개선하는데 매우 우수한 작용을 한다.

[96]

- [97] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 에이디피-라이보실 사이클라아제 (ADP-ribosyl cyclase; ADPRC) 또는 이의 천연적으로 발생된(naturally occurred) 변이체의 헤테로 타입(hetero type) 유전자 결손된 동물 모델을 제공한다.

[98]

- [99] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 동물은 인간을 제외한 포유류, 조류, 파충류, 양서류 또는 어류인 것이다.

[100]

- [101] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환 여부의 확인방법을 제공한다: (a) 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 헤테로 타입 유전자 결손 동물 모델과 야생형(wild-type) 동물 모델에 특정 질환을 유도하는 단계; 및 (b) 상기 동물 모델 간 차이를 확인하는 단계.

[102]

- [103] 상기 동물 모델을 이용하면 특정 질환(예를 들어, 당뇨병, 신장 질환, 고혈압, 비만 등)이 에이디피-라이보실 사이클라아제와 매개하여 발생된 것인지, 아니면 에이디피-라이보실 사이클라아제와 무관하게 발생된 것인지를, 상기 동물 모델 간 차이(예를 들어, 체중, 신장 무게, 혈압, 크레아틴 청소율, 혈당, 염증, 사구체의 비후 정도 등의 차이)를 이용하여 확인할 수 있다.

[104]

- [105] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단에 대한 정보 제공방법을 제공한다:

- [106] 1) 피검체로부터 분리된 시료 내 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

- [107] 2) 상기 단계 1)의 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 또는 활성 수준을 정상 대조군과 비교하여 사이클라아제 매개 질환에 걸릴 위험을 가진 개체로 판단하는 단계.

[108]

- [109] 본 명세서에서 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 에이디피-라이보실 사이클라아제 관련 또는

매개 질환이 현재 발병하였거나 또는 발병할 가능성을 확인하는 것이다.

- [110] 에이디피-라이보실 사이클라아제는 여러 호르몬에 의하여 활성화되며 이 효소는 기질 NAD^+ 로부터 산물인 cADPR을 생성하는데 이 cADPR은 거의 모든 장기에서 세포내 칼슘을 증가시킨다. 또한 에이디피-라이보실 사이클라아제의 활성화에 의한 칼슘의 이상증가는 인슐린분비 (insulin secretion), 세포비대 (hypertrophy), 세포증식 등 다양한 생체병리의 요인으로 알려져 있다. 따라서, 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제의 발현 또는 활성 수준의 측정을 통하여 세포내 칼슘증가로 유발된 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단에 대한 유용한 정보의 제공이 가능하다.

[111]

- [112] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준을 측정하는 제제 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단용 조성물을 제공한다.

[113]

- [114] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 유전자 발현 수준을 측정하는 제제는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것이다.

- [115] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 단백질 수준을 측정하는 제제는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것이다.

- [116] 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체에 특이적으로 결합하기 때문에 이를 이용하면 샘플 중에 포함된 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 양을 정확하게 측정 가능하다.

- [117] 본 발명의 진단용 조성물을 이용하면 항원항체 결합반응을 통하여 상기 항체에 대한 항원을 분석함으로써 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 양을 정량할 수 있으며, 상기 항원항체 결합반응은 통상의 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA(Radioimmunoassay), 샌드위치 측정법(Sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯(Western Blot), 면역블롯 분석(Immunoblot assay) 및 면역조직화학염색 방법(Immunohistochemical staining)으로 이루어지는 군에서 선택되는 것이 바람직하나 이에 제한되지 않는다.

- [118] 항원-항체 결합 반응을 위한 고정체로는 니트로셀룰로오스 막, PVDF막, 폴리비닐(Polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(Polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(Well plate) 및 유리로 된 슬라이드 글라스(Slide glass)로 이루어지는

균으로부터 선택되는 것이 사용될 수 있으나, 이제 제한되는 것은 아니다.

- [119] 2차 항체는 발색반응을 하는 통상의 발색제로 표지되는 것이 바람직하며, HRP(Horseradish peroxidase), 알칼리성 인산분해효소(Alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(Coloid gold), FITC(Poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(Rhodamine-B-isothiocyanate) 등의 형광물질(Fluorescein) 및 색소(Dye)로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나의 표지체가 사용될 수 있다. 발색을 유도하는 기질은 발색반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 및 OPD(o-phenylenediamine)로 이루어지는 균으로부터 선택되는 어느 하나를 사용하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[120]

- [121] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준을 측정하는 제제 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단 키트를 제공한다.

[122]

- [123] 본 발명의 진단키트는 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치나 이에 대한 사용설명서를 더 포함하여 구성될 수 있다.

[124]

- [125] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:

- [126] 1) 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체를 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계; 및

- [127] 2) 상기 후보물질의 처리에 의해 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

- [128] 3) 상기 유전자 발현 수준 또는 단백질 수준이 후보물질을 처리하지 않는 대조군과 비교하여 감소한 경우 상기 후보물질을 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료 물질로 선별하는 단계.

[129]

- [130] 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 면역침강법 (immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법

(ELISA), 면역조직화학, RT-PCR, 웨스턴 블롯 (Western Blotting) 및 유세포 분석법 (FACS)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 방법으로 측정되는 것이다.

- [131] 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 단백질 수준의 측정은 이에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 SDS-PAGE, 면역형광법, 효소면역분석법 (ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 방법으로 측정되는 것이다.

발명의 효과

- [132] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [133] (i) 본 발명은 신규한 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [134] (ii) 또한, 본 발명은 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준을 측정하는 제제 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단용 조성물을 제공한다.
- [135] (iii) 본 발명의 조성물은 안지오텐신 II에 의한 새로운 에이디피-라이보실 사이클라아제의 발현 또는 활성 증가로 인한 신장 세포 내 칼슘 증가를 억제하는 효과가 있어, 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환, 특히 신장질환의 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [136] 도 1은 HEK293 세포와 MES13 세포에서 새로운 ADPRC의 엔에디-글라이코하이드롤라아제 (NADase) 활성을 측정한 도면이다.
- [137] 도 2는 정제된 FLAG-ADPRC의 cADPR 합성능을 평가한 도면이다.
- [138] 도 3은 MES13 세포에서 안지오텐신 II로 자극을 했을 때 새로운 ADPRC에 의한 세포 내 cADPR 생성을 측정한 도면이다.
- [139] 도 4는 본 발명의 에이디피-라이보실 사이클라아제의 중간 서열의 상동성을 얼라인먼트를 통하여 비교한 결과이다 (마우스를 기준으로 인간(96%), 래트(96%), 개(90%), 돼지(88%), 토끼(89%), 양(90%), 닭(70%), 소(78%), 침팬지(93%), 말(91%), 개구리(63%), 염소(90%), 칠면조(62%), 기니피그(91%), 에키노코쿠스 그라눌로수스(27%), 시스토조마 헤마토비움(22%), 트리키넬라 스피랄리스(22%), 초파리(19%), 제브라피쉬(56%)).
- [140] 도 5는 새로운 ADPRC의 엔에디 글라이코하이드롤라아제 (NADase) 활성을 억제하는 새로운 억제제의 효과를 측정한 도면이다.
- [141] 도 6은 당뇨병성 신장질환 마우스 모델의 혈당(도 6a), 신장무게(kidney weight)와 체중(body weight)의 비율(도 6b), 크레아티닌 청소율(도 6c) 및 소변

- 알부민양(도 6d)에서 Dicafeoylquinic acid (DCQA)의 효과를 측정하는 도면이다.
- [142] 도 7은 당뇨병성 신장질환 마우스 모델 신장조직에서 ADPRC의 활성화(도 7a) 및 cADPR 농도(도 7b)에 대한 DCQA의 효과를 측정하는 도면이다.
- [143] 도 8은 당뇨병성 신장질환 마우스 모델 신장조직에서 TGF- β 1, Fibronectin 및 Collagen IV의 발현변화에 대한 DCQA의 효과를 측정하는 도면이다.
- [144] 도 9는 당뇨병성 신장질환 마우스 모델 신장조직에서 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색을 통한 병리조직학적 변화를 관찰하는 도면이다.
- [145] 도 10은 정상 마우스와 ADPRC hetero (ADPRC (+/-)) 마우스의 당뇨병성 신장질환 모델의 혈당(도 10a), 신장무게와 체중의 비율(도 10b) 및 크레아티닌 청소율(도 10c)을 측정하는 도면이다.
- [146] 도 11은 정상 마우스와 고혈압 마우스 모델의 혈압(도 11a) 및 크레아티닌 청소율(도 11b)에서 DCQA의 효과를 측정하는 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [147] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [148]
- [149] 실시예
- [150] 실시예 1. 새로운 ADPRC의 엔에디-글라이코하이드롤라아제 (NADase) 효소 활성화
- [151] 서열목록 제1서열의 에이디피-라이보실 사이클라아제 (ADPRC)의 활성을 확인하기 위하여, 상기 ADPRC를 코딩하는 cDNA 서열을 FLAG-CMV-2 벡터에 라이게이션하여 FLAG-ADPRC 플라스미드를 만들고, 이를 HEK293 세포 또는 MES13 세포에 형질감염 시약 (transfection reagent)을 이용하여 새로운 ADPRC의 과발현을 유도하였다. 상기 과발현된 새로운 ADPRC를 용해 완충액 (lysis buffer)으로 용해하였다. 용해된 시료 45 μ l에 2 mM ϵ -NAD (Nicotinamide 1,N6-ethenoadenine dinucleotide) 5 μ l를 처리하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 10% 삼염화아세트산 (Trichloroacetic acid)을 50 μ l 처리하여 효소-기질 반응이 멈추도록 하였다. 10분간 원심분리를 통해 상층액 80 μ l를 720 μ l의 0.1 M 인산나트륨 완충액 (sodium phosphate buffer)에 넣은 후 excitation 297 nm, emission 410 nm에서 형광분석기로 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [152]
- [153] 실시예 2. 새로운 ADPRC의 cADPR 합성능 평가
- [154] 상기 ADPRC의 cADPR 합성능 평가는 Graeff R et al [Graeff R, Lee HC. Biochem. J. 361:379-384, 2002]에 의해 보고된 방법에 의해 제조하였다.

- [155] 구체적으로는 HEK293 세포에 FLAG-ADPRC 플라스미드를 형질감염 시약을 이용하여 과발현 한 후, 용해 완충액으로 용해하였다. 용해된 시료를 FLAG-agarose 컬럼을 이용하여 과발현된 FLAG-ADPRC를 정제하였다. 정제된 시료에 100 μ M β -NAD를 처리하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 삼염화아세트산 (Trichloroacetic acid)을 최종 농도 0.6 M이 되도록 처리하여 cADPR을 추출한 뒤, 0.1 ml의 추출물과 0.1 ml의 cADPR 표준용액에 ADPR cyclase (0.3 μ g/ml), 니코틴아미드 (nicotinamide, 30 mM), 인산나트륨 (sodium phosphate, 100 mM) 혼합용액 50 μ l를 넣고, 상온에서 30분간 반응시켰다.
- [156] 이 혼합액에 에탄올 (ethanol, 2%), 알코올디하이드로게나아제 (alcohol dehydrogenase, 100 μ g/ml), 레자주린 (resazurin, 20 μ M), 디아포라아제 (diaphorase, 10 μ g/ml), FMN (10 μ M), 니코틴아미드 (10 mM), 우혈청알부민 (BSA, 0.1 mg/ml), 인산나트륨 (100 mM)을 넣고, 2-4시간 동안 반응시켰다. 반응물은 544 nm와 590 nm 사이의 형광분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [157]
- [158] 실시예 3. MES13 세포에서 ADPRC에 의한 세포내 cADPR 농도의 변화
- [159] 상기 ADPRC에 의한 세포내 cADPR 농도 변화는 Graeff R et al [Graeff R, Lee HC. Biochem. J. 361:379-384, 2002]에 의해 보고된 방법에 의해 제조하였다.
- [160] 구체적으로는 MES13 세포에 새로운 ADPRC의 작은 간섭 RNA (small interfering RNA, 서열목록 제22서열)를 형질감염 시약으로 ADPRC의 발현을 억제하였다. ADPRC의 발현을 억제한 세포에 150 nM의 안지오텐신 II를 60 초간 처리한 후 0.6 M 삼염화아세트산 (Trichloroacetic acid)을 이용하여 cADPR을 추출한 뒤, 0.1 ml의 추출물과 0.1 ml의 cADPR 표준용액에 ADPR cyclase (0.3 μ g/ml), 니코틴아미드 (nicotinamide, 30 mM), 인산나트륨 (sodium phosphate, 100 mM) 혼합용액 50 μ l를 넣고, 상온에서 30분간 반응시켰다.
- [161] 이 혼합액에 에탄올 (ethanol, 2%), 알코올디하이드로게나아제 (alcohol dehydrogenase, 100 μ g/ml), 레자주린 (resazurin, 20 μ M), 디아포라아제 (diaphorase, 10 μ g/ml), FMN (10 μ M), 니코틴아미드 (10 mM), 우혈청알부민 (BSA, 0.1 mg/ml), 인산나트륨 (100 mM)을 넣고, 2-4시간 동안 반응시켰다. 반응물은 544 nm와 590 nm 사이의 형광분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [162]
- [163] 실시예 4. 새로운 ADPRC의 엔에이디 글라이코하이드롤라아제 (NADase) 활성을 억제하는 새로운 억제제의 효과
- [164] 서열목록 제1서열의 새로운 에이디피-라이보실 사이클라아제 (ADPRC)의 활성을 억제하는 억제제를 찾기 위해, 4,4'-dihydroxyazobenzene (4-DHAB, TCI (일본)), 2,2'-dihydroxyazobenzene (2-DAB, Sigma-Aldrich (미국)), 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one (Quercetin, Sigma-Aldrich

(미국)), San4825 (kannt A et al [Kannt A, Sicka K, Kroll K, Kadereit D, Gogelein H. Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol. 385:717-727, 2012], 합성 (중국))와 화합물 스크리닝을 통해 새롭게 발견한

2-(1,3-benzoxazol-2-ylamino)-1-methylquinazoline-4(1H)-one (2-BMQ, 합성 (중국)), 1,4-Dicaffeoylquinic acid (1,4-DCQA, Biopurify (중국), 이하 DCQA)를 새로운 ADPRC 40 μ l에 억제제 5 μ l를 얼음물에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 2 mM ϵ -NAD (Nicotinamide 1,N6-ethenoadenine dinucleotide) 5 μ l를 처리하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 10% 삼염화아세트산 (Trichloroacetic acid)을 50 μ l 처리하여 효소-기질 반응이 멈추도록 하였다. 10분간 원심분리를 통해 상층액 80 μ l를 720 μ l의 0.1 M 인산나트륨 완충액 (sodium phosphate buffer)에 넣은 후 excitation 297 nm, emission 410 nm에서 형광분석기로 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이, Control과 대비하여, 4-DHAB는 42.40%, 2-BMQ는 36.49%, 그리고 DCQA는 무려 79.64%의 비율로 엔에이디 글라이코하이드롤라아제 (NADase) 활성을 억제함을 확인할 수 있었다.

[165]

[166] 실시예 5. 신장질환 마우스 모델의 혈당, 신장무게와 체중의 비율, 크레아틴 청소율 및 소변 알부민양에서 **DCQA**의 효과

[167] 신장질환 마우스 모델에서의 혈당, 신장과 체중의 비율, 크레아티닌 청소율 및 소변 알부민양 측정은 Kim SY et al [Kim SY, Park KH, Gul R, Jang KY, Kim UH. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 296:F291-F297, 2009]에 의해 보고된 방법에 의해 제조되었다.

[168] 구체적으로는 C57BL/6J 마우스에 50 mM 시트레이트 완충액 (citrate buffer, pH 4.8)을 0.2 ml씩 복강 주사한 군 (Control군과 DCQA군)과 50 mM 시트레이트 완충액에 스트렙토조토신 (Streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich (미국)))을 5 mg/ml로 녹인 후 200 μ l씩 복강 주사한 군 (STZ군과 STZ+DCQA군)으로 나누었다. STZ 주사 후 2일째부터 혈당을 측정하여 혈당 수치가 300 mg/dL인 마우스를 STZ군 및 STZ+DCQA군으로 분류한 후 사용하였다. 혈당이 올라간 마우스에 상기 실시예 5에서 신규한 ADPRC에 대한 억제효과가 가장 뛰어났던 DCQA를 다이메틸 설펍사이드 (Dimethyl Sulfoxide)에 9 mg/ml로 녹인 후, 식염수에 9 μ g/ml로 희석시킨 후 100 μ l씩 6주간 매일 복강주사 하였다. 6주 마지막 날에 마우스를 메타볼릭케이지에 넣고 24시간동안 소변을 얻었다.

[169] 24시간동안 소변을 얻은 후 마우스의 체중을 측정하고, 혈당을 측정하였다(도 6a). 또한 신장질환 치료제로서의 가능성을 확인하기 위해 마취제를 이용하여 희생시켜 혈청을 얻고 신장을 적출하였다. 적출한 신장을 이용하여 신장무게(kidney weight)와 체중(body weight)의 비율을 측정 후(도 6b), 일부 신장은 형광염색 및 H&E 염색을 위해 10% 포르말린에 넣어 고정하고, 나머지 신장은 여러 조각으로 나누어 엔에이디피알 사이클라아제 활성 및 cADPR 농도를

측정하였다. 소변과 혈청의 크레아티닌을 크레아티닌 측정 kit (BioAssay System, 미국)를 이용하여 측정하여 크레아티닌 청소율을 계산하고(도 6c), 소변 알부민양을 알부민 측정 kit (BioAssay System, 미국)를 이용하여 측정하였다(도 6d). 그 결과를 도 6에 나타내었다.

- [170] 상기 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, STZ에 의해 유발된 당뇨병 마우스 모델에서 STZ+DCQA 군의 경우 대조군(STZ) 대비 혈당은 감소하지 않았음에도 불구하고(도 6a), 체중 대비 신장 무게의 유의미한 감소(도 6b), 크레아틴 청소율의 유의미한 증가(도 6c), 소변 알부민양의 유의미한 감소(도 6d)를 통해서 만성신부전이나 당뇨병성 신증과 같은 신장질환 치료제의 후보로서의 가능성을 확인하였다.
- [171] 실시예 6. 신장질환 마우스 모델 신장조직에서 ADPRC의 활성 및 cADPR 농도에 대한 DCQA의 효과
- [172] 신장질환 마우스 모델의 신장조직에서의 ADPRC 활성과 cADPR 농도측정은 Kim SY et al [Kim SY, Park KH, Gul R, Jang KY, Kim UH. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 296:F291-F297, 2009]에 의해 보고된 방법에 의해 제조되었다.
- [173] 구체적으로는 C57BL/6J 마우스에 50 mM 시트레이트 완충액 (citrate buffer, pH 4.8)을 0.2 ml씩 복강 주사한 군 (Control군과 DCQA군)과 50 mM 시트레이트 완충액에 스트렙토조토신 (Streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich (미국)))을 5 mg/ml로 녹인 후 200 μ l씩 복강 주사한 군 (STZ군과 STZ+DCQA군)으로 나누었다. STZ 주사 후 2일째부터 혈당을 측정하여 혈당 수치가 300 mg/dL인 마우스를 STZ군과 STZ+DCQA군으로 분류하여 사용하였다. 혈당이 올라간 마우스에 상기 실시예 5에서 신규한 ADPRC에 대한 억제효과가 가장 뛰어났던 DCQA를 다이메틸 설펑사이드 (Dimethyl Sulfoxide)에 9 mg/ml로 녹인 후, 식염수에 9 μ g/ml로 희석시킨 후 100 μ l씩 6주간 매일 복강주사 하였다. 신장질환 치료제로서의 가능성을 확인하기 위해 마취제를 이용하여 희생시켜 혈청을 얻고 신장을 적출하였다.
- [174] 각 군의 적출한 신장조직의 일부를 용해 완충액 (lysis buffer)으로 용해한 후, 용해된 시료 45 μ l에 2 mM NGD (Nicotinamide guanine dinucleotide) 5 μ l를 처리하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 10% 삼염화아세트산 (Trichloroacetic acid)을 50 μ l 처리하여 효소-기질 반응이 멈추도록 하였다. 10분간 원심분리를 통해 상층액 80 μ l를 720 μ l의 0.1 M 인산나트륨 완충액 (sodium phosphate buffer)에 넣은 후 excitation 297 nm, emission 410 nm에서 형광분석기(Hitachi, 일본)로 흡광도를 측정하였다.
- [175] 또한 각 군의 적출한 신장조직의 일부에 0.6 M 삼염화아세트산 (Trichloroacetic acid) 0.2 ml을 처리하여 cADPR을 추출한 뒤, 0.1 ml의 추출물과 0.1 ml의 cADPR 표준용액에 ADPR cyclase (0.3 μ g/ml), 니코틴아미드 (nicotinamide, 30 mM), 인산나트륨 (sodium phosphate, 100 mM) 혼합용액 50 μ l를 넣고, 상온에서 30분간 반응시켰다. 이 혼합액에 에탄올 (ethanol, 2%), 알코올디하이드로게나아제

(alcohol dehydrogenase, 100 µg/ml), 레자주린 (resazurin, 20 µM), 디아포라아제 (diaphorase, 10 µg/ml), FMN (10 µM), 니코틴아미드 (10 mM), 우혈청알부민 (BSA, 0.1 mg/ml), 인산나트륨 (100 mM)을 넣고, 2-4시간 동안 반응시켰다. 반응물은 544 nm와 590 nm 사이의 형광분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

- [176] 도 7a에 나타낸 바와 같이, 본원발명의 DCQA는 STZ에 의해 증가된 ADP-ribosyl cyclase 활성을 대조군(control) 수준 이하로 낮추었으며, 도 7b에 나타낸 바와 같이 본원발명의 DCQA는 STZ에 의해 증가된 cADPR의 농도를 대조군(control) 수준으로 낮추었는 바, DCQA가 신장질환과 관련하여 신장의 기능 이상 또는 손상에 의해 발생하는 ADPRC의 활성과 cADPR의 농도를 낮추는 능력을 확인하였다.
- [177] 실시예 7. 신장질환 마우스 모델 신장조직에서 TGF-β1, Fibronectin 및 Collagen IV의 발현변화에 대한 1,4-DCQA의 효과
- [178] 신장질환 마우스 모델에서의 신장조직에서의 TGF-β1, Fibronectin 및 Collagen IV의 발현변화는 Kim SY et al [Kim SY, Park KH, Gul R, Jang KY, Kim UH. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 296:F291-F297, 2009]에 의해 보고된 방법에 의해 제조되었다.
- [179] 구체적으로는 C57BL/6J 마우스에 50 mM 시트레이트 완충액 (citrate buffer, pH 4.8)을 0.2 ml씩 복강 주사한 군 (Control군과 DCQA군)과 50 mM 시트레이트 완충액에 스트렙토조토신 (Streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich (미국)))을 5 mg/ml로 녹인 후 200 µl씩 복강 주사한 군 (STZ군과 STZ+DCQA군)으로 나누었다. STZ 주사 후 2일째부터 혈당을 측정하여 혈당 수치가 300 mg/dL인 마우스를 STZ군과 STZ+DCQA군으로 사용하였다. 혈당이 올라간 마우스에 상기 실시예 5에서 신규한 ADPRC에 대한 억제효과가 가장 뛰어났던 DCQA를 다이메틸 설펍사이드 (Dimethyl Sulfoxide)에 9 mg/ml로 녹인 후, 식염수에 9 µg/ml로 희석시킨 후 100 µl씩 6주간 매일 복강주사 하였다. 신장질환 치료제로서의 가능성을 확인하기 위해 마취제를 이용하여 희생시켜 혈청을 얻고 신장을 적출하였다. 적출한 신장의 일부를 10% 포르말린에 넣어 고정하였다. 10% 포르말린에 고정된 신장조직을 동결조직절편기를 이용하여 슬라이드 글라스에 신장조직절편을 올리고 TTBS(Tris-buffered saline (TBS) with 0.1% Tween 20) 완충액로 씻어 준 후, 1% 우혈청알부민 (BSA)이 들어있는 TTBS 완충액으로 1시간동안 반응시킨다. 1% 우혈청알부민 (BSA)이 들어있는 TTBS 완충액에 1차항체 (TGF-β1 (Santa Cruz, 미국), Fibronectin (Santa Cruz, 미국), Collagen IV (Abcam, 영국))를 1:200으로 희석시켜 4°C에서 12시간 이상 반응시킨다. TTBS 완충액으로 1차항체를 반응시킨 조직을 3번 씻어준 후, FITC가 붙어있는 2차항체를 1:200으로 TTBS 완충액에 희석시켜 어두운 장소의 실온에서 1시간동안 반응시킨다. 2차항체 반응 후 TTBS 완충액으로 3번 씻어준 후, 마운팅용액을 이용하여 커버글라스를 붙인다. 염색된 신장 조직을

녹색형광을 관찰하는 형광현미경 (Carl Zeiss, 독일)을 이용하여 관찰하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

- [180] 도 8에 나타낸 바와 같이, 본원발명의 DCQA는 STZ에 의해 증가된 TGF- β 1, Fibronectin, Collagen IV의 발현양을 대조군(control) 수준으로 낮추었는 바, DCQA가 신장질환과 관련하여 신장의 기능 이상 또는 손상에 의해 발생하는 TGF- β 1, Fibronectin, Collagen IV의 발현양을 낮추는 능력을 확인하였다.

[181]

- [182] 실시예 8. 신장질환 마우스 모델 신장조직에서 **Hematoxylin and Eosin (H&E)** 염색을 통한 병리조직학적 변화

- [183] 신장질환 마우스 모델에서의 신장조직에서의 병리조직학적 변화는 Shu B et al [Shu B, Feng Y, Gui Y, Lu Q, Wei W, Xue X, Sun X, He W, Yang J, Dai C. Cell. Signal. 42:249-258, 2018]에 의해 보고된 방법에 의해 제조되었다.

- [184] 구체적으로는 C57BL/6J 마우스에 50 mM 시트레이트 완충액 (citrate buffer, pH 4.8)을 0.2 ml씩 복강 주사한 군 (Control군과 DCQA군)과 50 mM 시트레이트 완충액에 스트렙토조토신 (Streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich (미국)))을 5 mg/ml로 녹인 후 200 μ l씩 복강 주사한 군 (STZ군과 STZ+DCQA군)으로 나누었다. STZ 주사 후 2일째부터 혈당을 측정하여 혈당 수치가 300 mg/dL인 마우스를 STZ군과 STZ+DCQA군으로 사용하였다. 혈당이 올라간 마우스에 상기 실시예 5에서 신규한 ADPRC에 대한 억제효과가 가장 뛰어났던 DCQA를 다이메틸 설펍사이드 (Dimethyl Sulfoxide)에 9 mg/ml로 녹인 후, 식염수에 9 μ g/ml로 희석시킨 후 100 μ l씩 6주간 매일 복강주사 하였다. 신장질환 치료제로서의 가능성을 확인하기 위해 마취제를 이용하여 희생시켜 혈청을 얻고 신장을 적출하였다. 적출한 신장의 일부를 10% 포르말린에 넣어 고정하였다. 10% 포르말린에 고정된 신장조직을 동결조직절편기를 이용하여 슬라이드 글라스에 신장조직절편을 올리고 흐르는 물에 5분간 씻고, Hematoxylin에 5분간 염색한다. 염색 후, 흐르는 물에 5분간 씻고, 157 mM 염산에 빠르게 2번 담궈다가 뺀 후, 흐르는 물에 5분간 씻는다. 0.25% 암모니아수에 1번 빠르게 담궈다가 뺀 후, 다시 흐르는 물에 5분간 씻고, Eosin에 약 30초간 염색한 후, 70% 에탄올 30초, 80% 에탄올 30초, 90% 에탄올 30초, 1차 100% 에탄올 30초, 2차 100% 에탄올 30초, 3차 100% 에탄올 30초동안 반응 시킨다. 마지막으로 1차 Xylene에 5분간 반응시킨 후 2차 Xylene에 5분이산 반응시킨 후 마운팅용액을 이용하여 커버글라스를 붙인다. 염색된 신장 조직을 광학현미경 (Lieca, 독일)을 이용하여 관찰하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

- [185] 도 9에 나타낸 바와 같이, 본원발명의 DCQA는 STZ에 의해 증가된 사구체 비후, 염증세포의 침윤, 이형상피세포의 형성이 대조군(control)과 비슷한 수준으로 회복시킨된 바, DCQA가 신장질환과 관련하여 신장의 기능 이상 또는 손상에 의해 발생하는 신장의 병리조직학적 변화를 회복시키는 능력을 확인하였다.

[186]

[187] 실시예 9. 정상 마우스와 ADPRC hetero (ADPRC (+/-)) 마우스의 신장질환 모델의 혈당, 신장과 체중의 비율 및 크레아티닌 청소율의 비교

[188] 신장질환 마우스 모델에서의 혈당, 신장과 체중의 비율 및 크레아티닌 청소율 측정은 Kim SY et al [Kim SY, Park KH, Gul R, Jang KY, Kim UH. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 296:F291-F297, 2009]에 의해 보고된 방법에 의해 제조되었다.

[189] 구체적으로는 129S1/SvImJ 마우스 (wild type, WT)와 The Jackson Laboratory (미국)로부터 제작한 ADPRC hetero knockout (ADPRC(+/-)) 마우스에 50 mM 시트레이트 완충액 (citrate buffer, pH 4.8)에 스트렙토조토신 (Streptozotocin (STZ))을 5 mg/ml로 녹인 후 200 μ l씩 복강 주사를 하였다. 주사 후 2일째부터 혈당을 측정하여 혈당 수치가 300 mg/dL인 마우스를 사용하였다. 혈당이 올라간 때부터 6주 후 마우스를 메타볼릭케이지에 넣고 24시간동안 소변을 얻었다.

[190] 24시간동안 소변을 얻은 후 마우스의 체중을 측정하고, 혈당을 측정하였다(도 10a). 마취제를 이용하여 희생시켜 혈청을 얻고 신장을 적출하였다. 적출한 신장을 이용하여 신장 무게(kidney weight) 및 체중(body weight)의 비율을 측정하였다(도 10b). 소변과 혈청의 크레아티닌을 크레아티닌 측정 kit (BioAssay System, 미국)를 이용하여 측정하여 크레아티닌 청소율을 계산하였다(도 10c). 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[191] 도 10에 나타낸 바와 같이, STZ에 의해 유발된 당뇨병 마우스 모델에서 대조군 대비 (ADPRC(+/-)에서 혈당은 감소하지 않았으나(도 10a), 본원발명의 ADPRC(+/-)+STZ군의 체중 대비 신장 무게가 WT+STZ군 대비 유의미한 감소를 보였다(도 10b). 또한 STZ에 의한 크레아티닌 청소율의 감소가 ADPRC(+/-)+STZ군에서 감소하지 않은 바(도 10c), 만성신부전이나 당뇨병성신증과 같은 신장질환에 새로운 ADPRC의 중요성도 확인하였다.

[192]

[193] 실시예 10. 정상 마우스와 고혈압 마우스 모델의 혈압 및 크레아티닌 청소율에서 DCQA의 효과

[194] 고혈압 마우스 모델에서의 혈압 및 크레아티닌 청소율 측정은 Allagnat et al [Allagnat F, Haefliger JA, Lambelet M, Longchamp A, Berard X, Mazzolai L, Corpataux JM, Deglise S. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 51:733-742, 2016]과 Kim SY et al [Kim SY, Park KH, Gul R, Jang KY, Kim UH. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 296:F291-F297, 2009]에 의해 보고된 방법에 의해 제조되었다.

[195] 구체적으로는 C57BL/6J 마우스에 8 mg L-NAME (N ω -nitro-L-arginine-methyl-ester, Sigma-Aldrich, 미국)을 1 ml 식염수에 녹인 후 0.2 ml씩 매일 경구투여 하였다. 경구투여 7일째와 14일째에 마우스의 혈압을 꼬리에서 측정하였고, 혈압이 높아진 것을 확인 후 상기 실시예 5에서 신규한 ADPRC에 대한 억제효과가 가장 뛰어났던 DCQA를 다이메틸 설펍사이드 (Dimethyl Sulfoxide)에 9 mg/ml로 녹인 후, 식염수에 9 μ g/ml로 희석시킨 후 100

μl씩 7일간 DCQA를 매일 복강주사하고 L-NAME을 경구투여하였다. DCQA처리 6일 후 마우스를 메타볼릭케이지에 넣고 24시간동안 소변을 얻었다.

[196] 24시간동안 소변을 얻은 후 마우스의 혈압을 측정하였다(도 11a). 마취제를 이용하여 희생시켜 혈청을 얻었다.

[197] 소변과 혈청의 크레아티닌을 크레아티닌 측정 kit (BioAssay System, 미국)를 이용하여 측정하여 크레아티닌 청소율을 계산하였다(도 11b). 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[198] 도 11a에서 나타낸 바와 같이, DCQA은 고혈압 모델에서는 혈압을 낮추는 효과는 없는 것으로 확인되었다. 하지만 크레아티닌 청소율이 DCQA에 의해 증가한 바 고혈압성신증과 같은 신장질환에 치료제의 후보로서의 가능성도 확인하였다(도 11b).

[199]

[200] <참고문헌>

[201] 1. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:517-529, 2003.

[202] 2. Lee HC. Structure and enzymatic functions of human CD38. *Mol Med.* 12:317-323, 2006.

[203] 3. Resnick LM. Ionic basis of hypertension, insulin resistance, vascular disease, and related disorders. The mechanism of "Syndrome X". *Am. J. Hypertens.* 6:123S-134S, 1993.

[204] 4. Cowley AW Jr. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol. Rev.* 72:231-300, 1992.

[205] 5. Kim BJ, Park KH, Yim CY, Takasawa S, Okamoto H, Im MJ, Kim UH. Generation of nicotininc acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose by glucagon-like peptide-1 evokes Ca²⁺ signal that is essential for insuline secreation in mouse pancreatic islets. *Diabetes.* 57: 868-878, 2008.

[206] 6. Gul R, Park JH, Kim SY, Jang KY, Chea JK, Ko JK, Kim UH. Inhibition of ADP-ribosyl cyclase attenuates antiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 81: 582-591, 2009.

[207] 7. Kim SY, Gul R, Rah SY, Kim SH, Park SK, Im MJ, Kwon HJ, Kim UH. Molecular mechanism of ADP-ribosyl cyclase activation in angiotensin II signaling in murine mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 294: F989-F989, 2008.

[208] 8. Partida-Sanchez S, Cockayne DA, Monard S, Jacobson EL, Oppenheimer N, Garvy B, Kusser K, Goodrich S, Howard M, Harmsen A, Randall TD, Lund FE. Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo. *Nat Med* 7:1209-1216, 2001.

[209] 9. Graeff R, Lee HC. A novel cycling assay for cellular cADP-ribose with nanomolar

sensitivity. *Biochem. J.* 361:379-384, 2002.

- [210] 10. Kim SY, Park KH, Gul R, Jang KY, Kim UH. Role of kidney ADP-ribosyl cyclase in diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 296:F291-F297, 2009.
- [211] 11. Shu B, Feng Y, Gui Y, Lu Q, Wei W, Xue X, Sun X, He W, Yang J, Dai C. Blockade of CD38 diminishes lipopolysaccharide-induced macrophage classical activation and acute kidney injury involving NF- κ B signaling suppression. *Cell. Signal.* 42:249-258, 2018.
- [212] 12. Allagnat F, Haefliger JA, Lambelet M, Longchamp A, Berard X, Mazzolai L, Corpataux JM, Deglise S. Nitric oxide deficit drives intimal hyperplasia in mouse models of hypertension. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 51:733-742, 2016.
- [213] 13. Kannt A, Sicka K, Kroll K, Kadereit D, Gogelein H. Naunyn. Schmiedeberg's. *Arch. Pharmacol.* 385:717-727, 2012.
- [214]
- [215] 이 상 으 로 본 발 명 의 특 정 한 부 분 을 상 세 히 기 술 하 였 는 바, 당 업 계 의 통 상 의 지 식 을 가 진 자 에 게 있 어 서 이 러 한 구 체 적 인 기 술 은 단 지 바 람 직 한 구 현 예 일 뿐 이 며, 이 에 본 발 명 의 범 위 가 제 한 되 는 것 이 아 닌 점 은 명 백 하 다. 따 라 서, 본 발 명 의 실 질 적 인 범 위 는 첨 부 된 청 구 향 과 그 의 등 가 물 에 의 하 여 정 의 된 다 고 할 것 이 다.

청구범위

- [청구항 1] 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 (ADP-ribosyl cyclase; ADPRC) 또는 이의 천연적으로 발생된(naturally occurred) 변이체.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체는 중간 변이체(species variants), 종의 상동체(species homologs), 아이소폼(isoforms), 대립유전자 변이체(allelic variants), 입체 배열에 의한 변이체(conformation variants), 스플라이스 변이체(splice variants) 및 점 돌연변이 변이체(point mutant variants)로 구성된 군으로부터 선택되는 천연적으로 발생된 변이체인 것을 특징으로 하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체는 포유류, 조류, 파충류, 양서류 및 어류로 구성된 군으로부터 선택되는 생물에서 발생된 것을 특징으로 하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제의 천연적으로 발생된 변이체는 서열목록 제2서열 내지 제21서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 변이체는 NAD⁺를 사이클릭 ADP-라이보오스 (cyclic ADP-ribose; cADPR)로 변환시키는 것을 특징으로 하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체.
- [청구항 6] 제 1 항의 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체를 코딩하는 핵산분자.
- [청구항 7] 제 6 항의 핵산분자를 포함하는 벡터.
- [청구항 8] 제 7 항의 벡터를 포함하는 숙주세포.
- [청구항 9] 제 1 항의 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체, 제 6 항의 핵산 분자 또는 제 7 항의 벡터를 포함하는, NAD⁺를 사이클릭 ADP-라이보오스 (cyclic ADP-ribose; cADPR)로 변환시키는 촉매 조성물.
- [청구항 10] 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 억제제는 안티센스

- 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide), siRNA, shRNA, miRNA, ribozyme, DNAzyme 및 PNA(protein nucleic acid)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서, 상기 siRNA는 서열목록 제22서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.
- [청구항 13] 제 10 항에 있어서, 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 활성 억제제는 화합물, 펩티드, 펩티드 유사체(mimetics), 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서, 상기 화합물은 4,4'-디하이드록시아조벤젠(4,4'-dihydroxyazobenzene), 2-(1,3-벤조옥사졸-2-일아미노)-1-메틸퀴나졸린-4(1H)-온(2-(1,3-benzoxazolin-2-ylamino)-1-methylquinazoline-4(1H)-one) 및 디카페올리퀴닉산(Dicaffeoylquinic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.
- [청구항 15] 제 10 항에 있어서, 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환은 신장질환인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.
- [청구항 16] 제 15 항에 있어서, 상기 신장질환은 신부전(renal failure), 신증(nephropathy), 신염(nephritis), 신장 섬유증(renal fibrosis) 또는 신장경화증(nephrosclerosis)인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서, 상기 신부전은 만성 신부전(Chronic Renal Failure), 급성 신부전(Acute Renal Failure), 또는 투석 전의 정도 신부전인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.
- [청구항 18] 제 16 항에 있어서, 상기 신증은 신증 증후군(Nephropathy Syndrome), 리포이드 신증(Lipoid Nephropathy), 당뇨병성 신증(Diabetic Nephropathy), 면역글로빈A 신증(IgA Nephropathy), 진통제 신증(Analgesic Nephropathy) 또는 고혈압성 신증(Hypertensive Nephropathy)인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.
- [청구항 19] 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 20] 제 1 항의 에이디피-라이보실 사이클라아제 (ADP-ribosyl cyclase; ADPRC) 또는 이의 천연적으로 발생된(naturally occurred) 변이체의 헤테로 타입(hetero type) 유전자 결손된 인간을 제외한 동물 모델.
- [청구항 21] 하기의 단계를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환 여부의 확인방법:
(a) 제 20 항의 동물 모델과 야생형(wild-type) 동물 모델에 특정 질환을

유도하는 단계; 및

(b) 상기 동물모델 간 차이를 확인하는 단계.

[청구항 22] 하기의 단계를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단에 대한 정보 제공방법:

1) 피검체로부터 분리된 시료 내 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

2) 상기 단계 1)의 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 발현 또는 활성 수준을 정상 대조군과 비교하여 사이클라아제 매개 질환에 걸릴 위험을 가진 개체로 판단하는 단계.

[청구항 23] 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준을 측정하는 제제 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단용 조성물.

[청구항 24] 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준을 측정하는 제제 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 진단 키트.

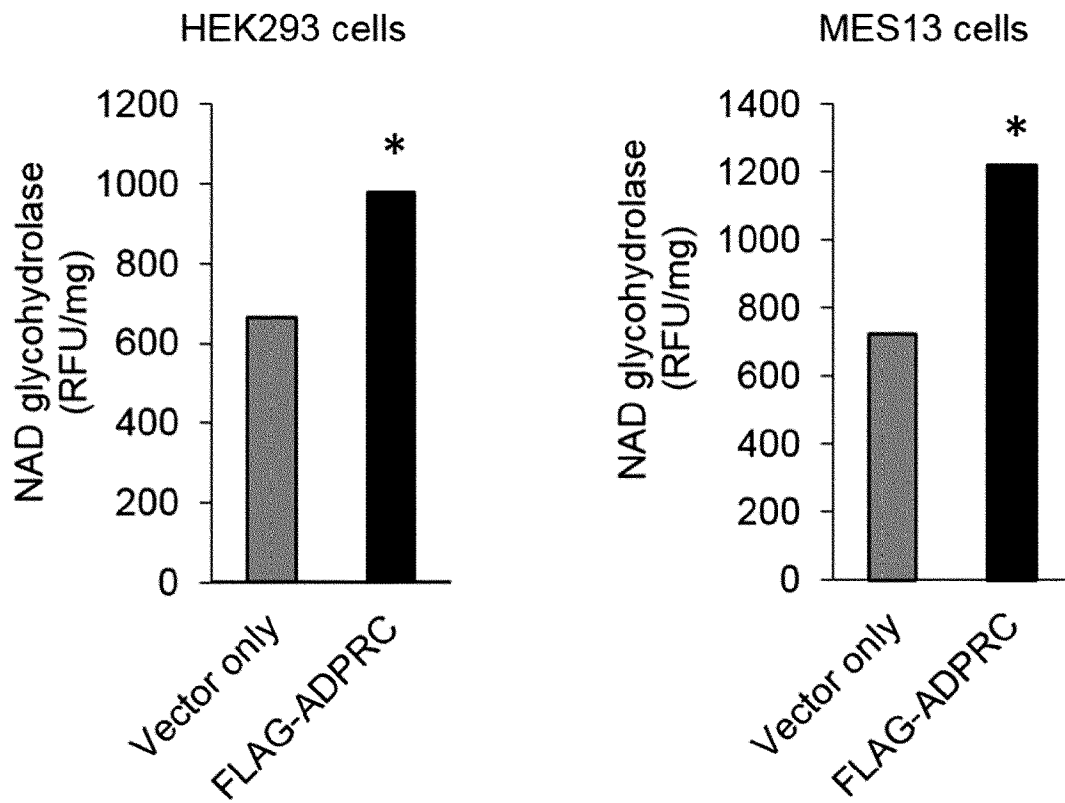
[청구항 25] 하기의 단계를 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법:

1) 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 포함하는 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체를 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계; 및

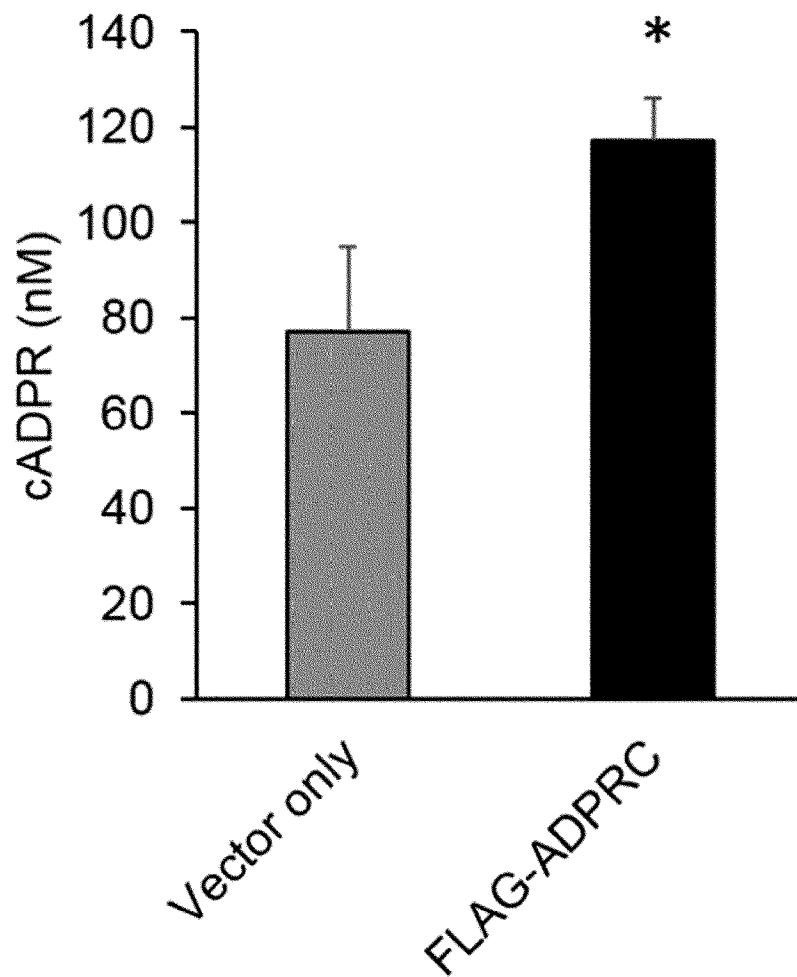
2) 상기 후보물질의 처리에 의해 상기 에이디피-라이보실 사이클라아제 또는 이의 천연적으로 발생된 변이체의 유전자 발현 수준 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

3) 상기 유전자 발현 수준 또는 단백질 수준이 후보물질을 처리하지 않는 대조군과 비교하여 감소한 경우 상기 후보물질을 에이디피-라이보실 사이클라아제 매개 질환의 예방 또는 치료 물질로 선별하는 단계.

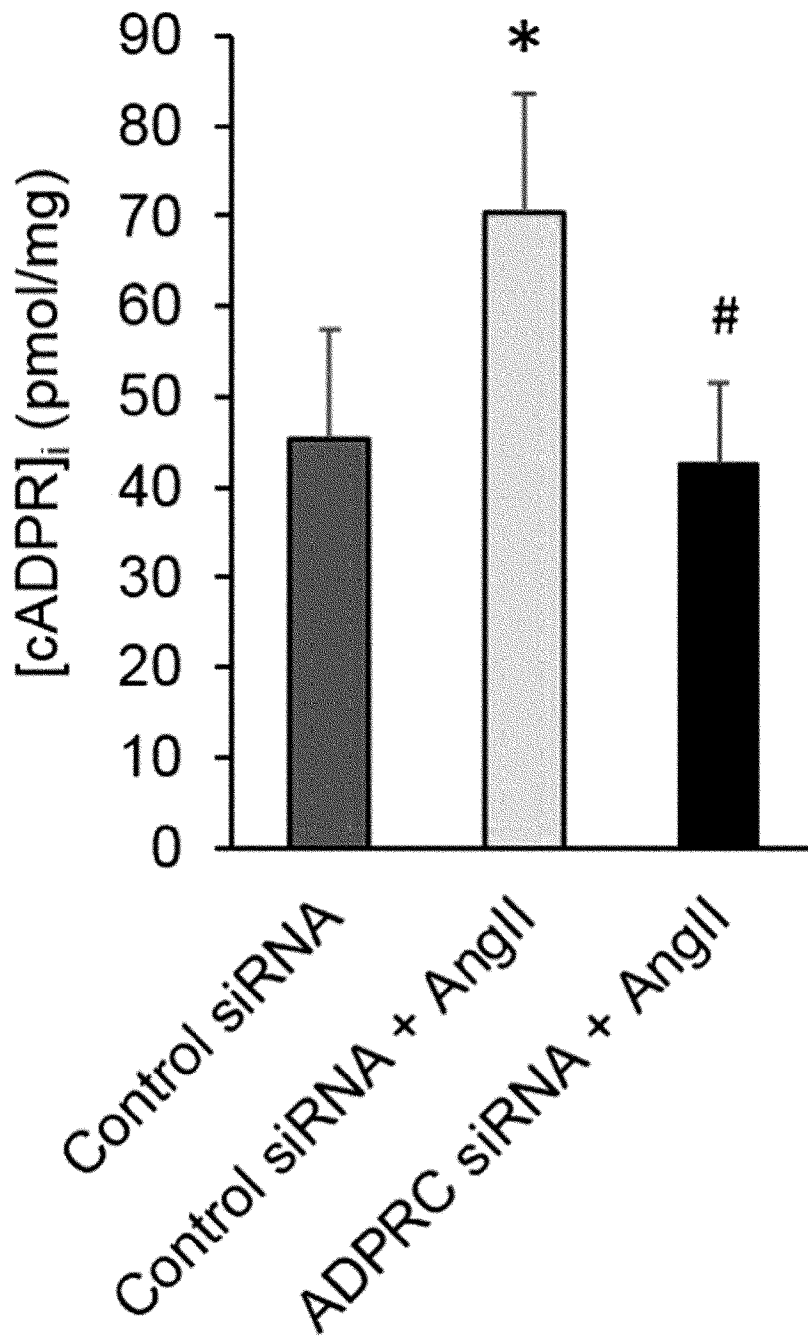
[도1]



[도2]

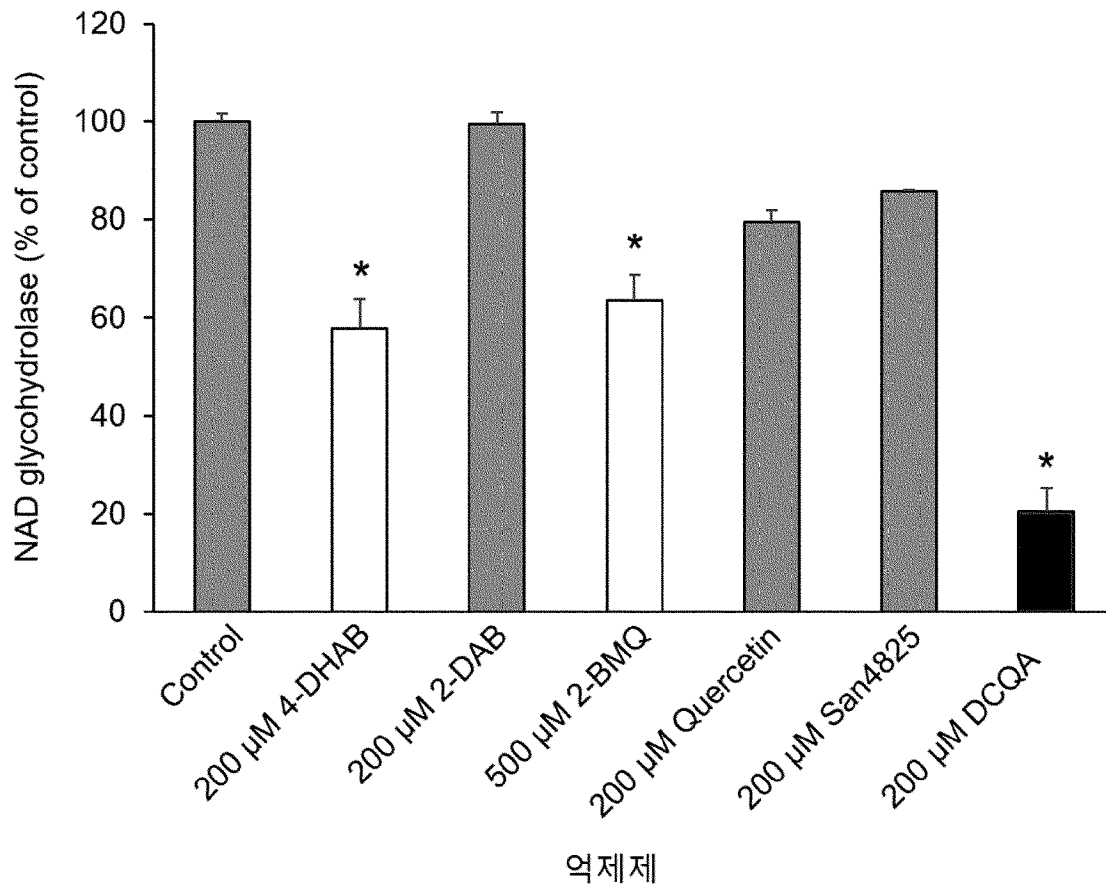


[도3]

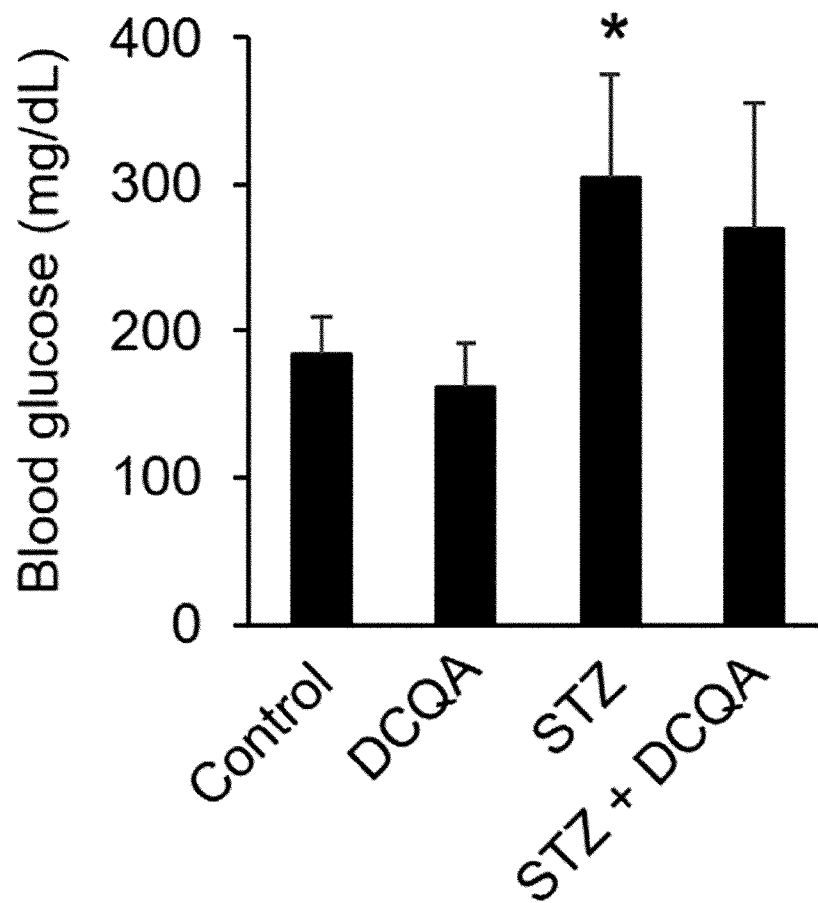


	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
mouse	FKLW.GNCS GLIND	—SYGFEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETYPV	—MMK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	VNIETVFMG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
human	FKLW.GNCS GLIND	—SYGFEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETYPV	—MMK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	VNIETVFMG	NSGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
rat	FKLW.GNCS GLIND	—SYGFEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETYPV	—THK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	QWVEYFGLG	NSGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
rat	FKLW.GNCS GLIND	—TYTGROEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETAPV	—MMK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
pig	FKLW.GNCS GLIND	—TYGKROEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETYPV	—MMK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
rabbit	FKLW.GNCS GLIND	—TYGKROEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETSPG	—TK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
sheep	FKLW.GNCS GLIND	—TYGFEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETYPV	—MMK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	VSIYEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
chicken	FKRW.EMCS GLIND	—TFYGRDEK PCOILKILNRY LG	—FK PKAPE-NESL PSDLAG	—K YNPVLPIVOC	VAKREDEADK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	VRIEKEVEYGO	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KSS				
cattle	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
chimpanzee	FKLW.GNCS GLIND	—TYGFEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETYPV	—MMK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	QWVEYFGLG	NSGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
horse	FKLW.GNCS GLIND	—TYGFEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETYPV	—MMK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
frog	FRWL.GNCS GLIND	—TFGFEK PCOILKILNRY VA	—FK PVPPO-NESL PREMT	—AN YNPVLPIVOC	QKGRDEDIPN	IREKYVYGMG	GFAGEPLHY	P—YYGKLLQ	PEYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIDYHDKORF	QGRFDKIEI	KSS				
goat	FKLW.GNCS GLIND	—TYGFEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETYPV	—MMK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	VSIYEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
turkey	FKRW.GNCS GLIND	—TFYGRDEK PCOILKILNRY LG	—FK PKAPE-NESL PLGLAG	—K YNPVLPIVOC	VAKREDEADK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	RSS				
guinea pig	FKLW.GNCS GLIND	—SYGFEK PCOILKILNRY LG	—FK PKPKP-NESL ETYPV	—MMK YNPVLPIVOC	TKGRDEKDK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KS				
E. garratob	FKLW.GNCS GLIND	—SHNN FQOYLKILNRY YG	—YL P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
S. hamatob	FYPHMGVQPC KENNF	—YORSO PCVIMKILNRY YG	—WL P	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D. spiralis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D. rosalia	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Drosophila	FKPEVTSPST EDSFAPPEL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Zebrafish	FRWL.GNCS GLIND	—TYGFEK PCOILKILNRY VA	—FK PKAPE-NESL PLGLAG	—K YNPVLPIVOC	VAKREDEADK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KSS				
zebrafish	FRWL.GNCS GLIND	—TYGFEK PCOILKILNRY VA	—FK PKAPE-NESL PLGLAG	—K YNPVLPIVOC	VAKREDEADK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV	QFTNLTYDE	IRIEKAYGE	NIGYSEKORF	QGRFDKIEI	KSS				
zebrafish	FRWL.GNCS GLIND	—TYGFEK PCOILKILNRY VA	—FK PKAPE-NESL PLGLAG	—K YNPVLPIVOC	VAKREDEADK	QWVEYFGLG	GYGFPLOYT	P—YYGKLLQ	KPYLOPLAV									

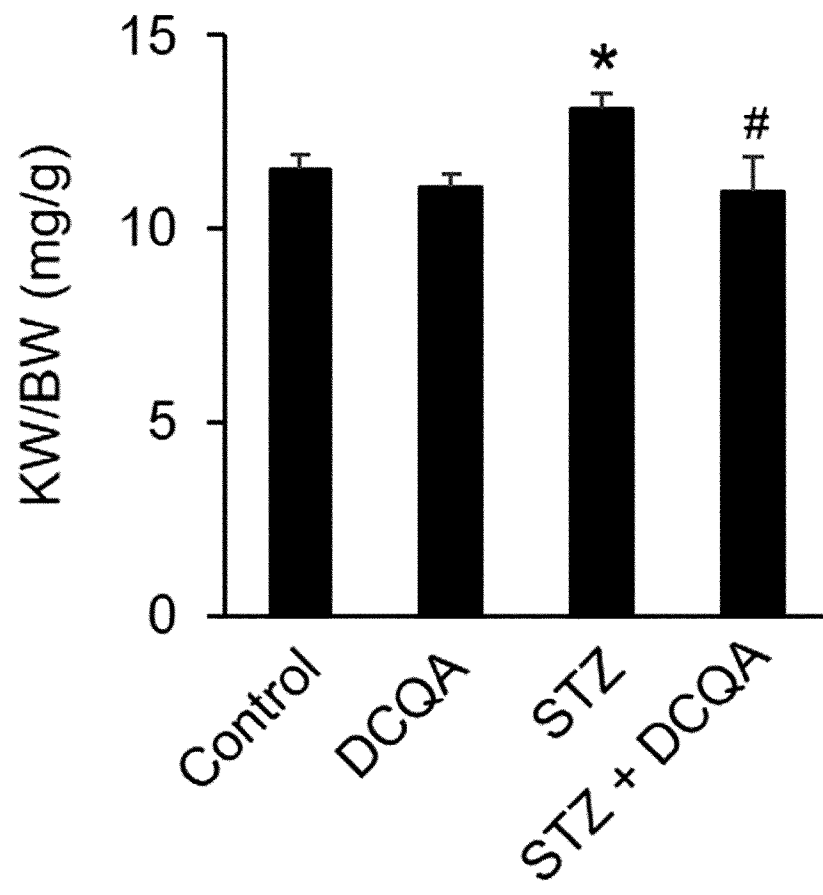
[도5]



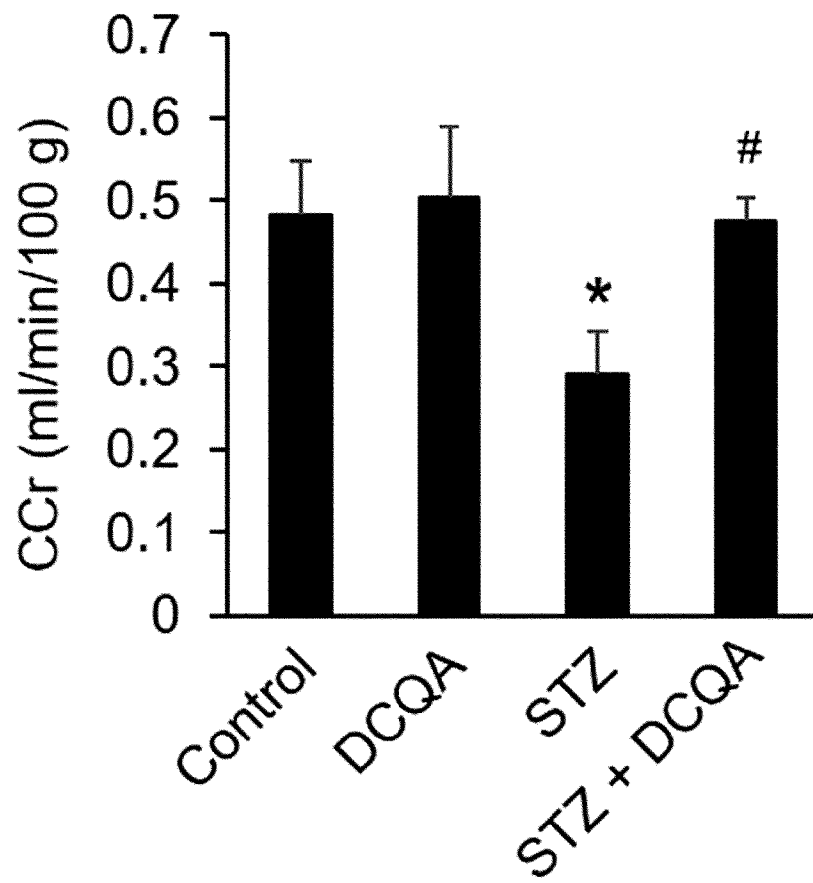
[도6a]



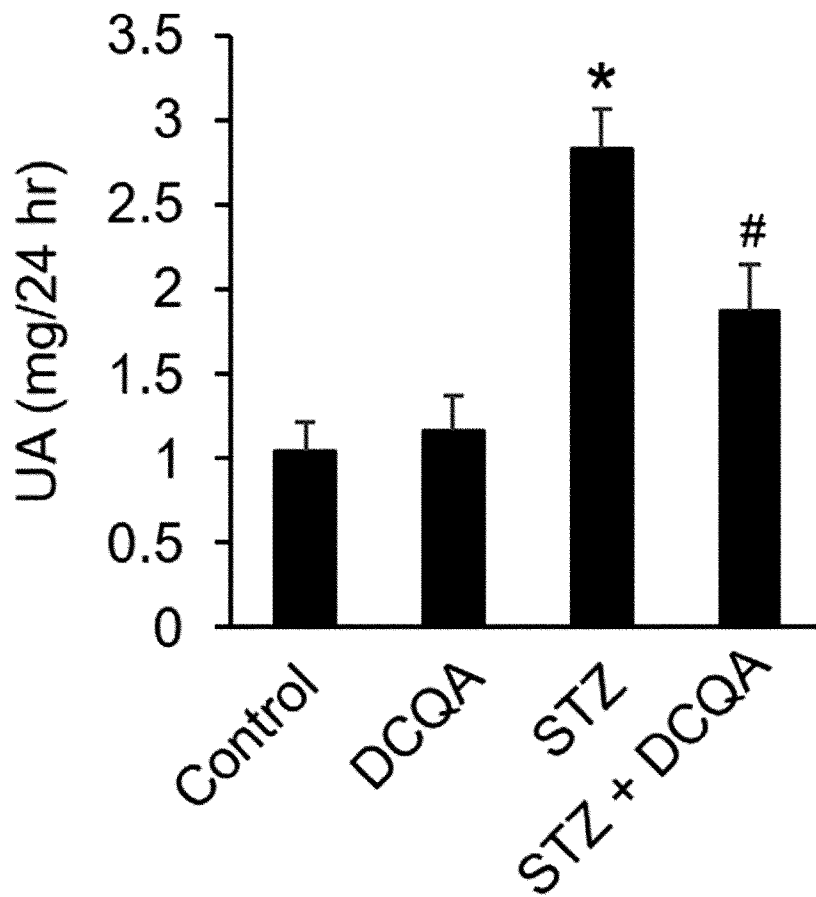
[도6b]



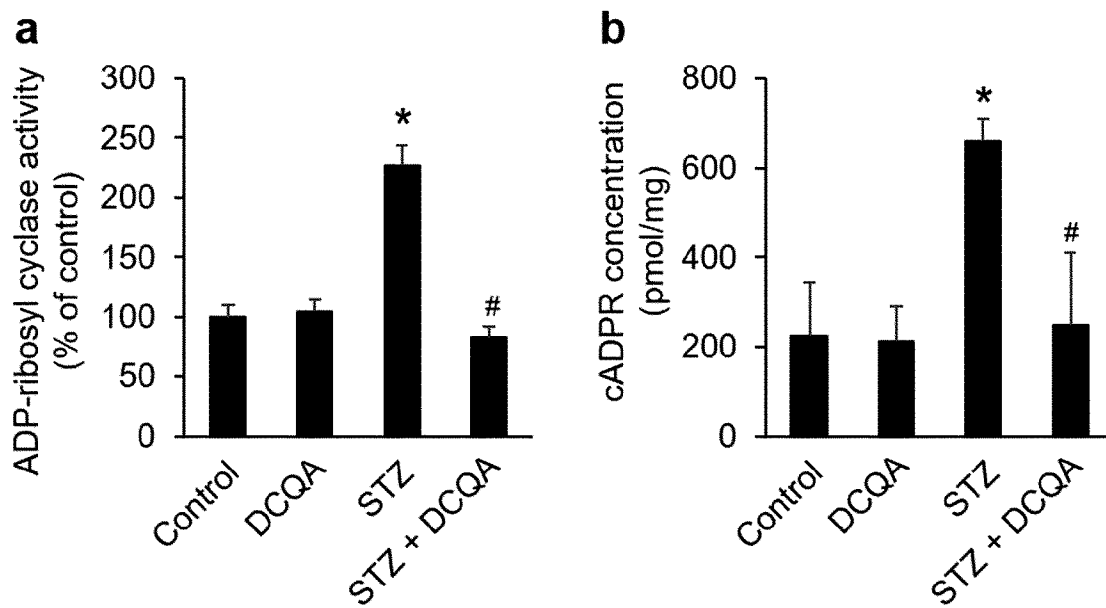
[도6c]



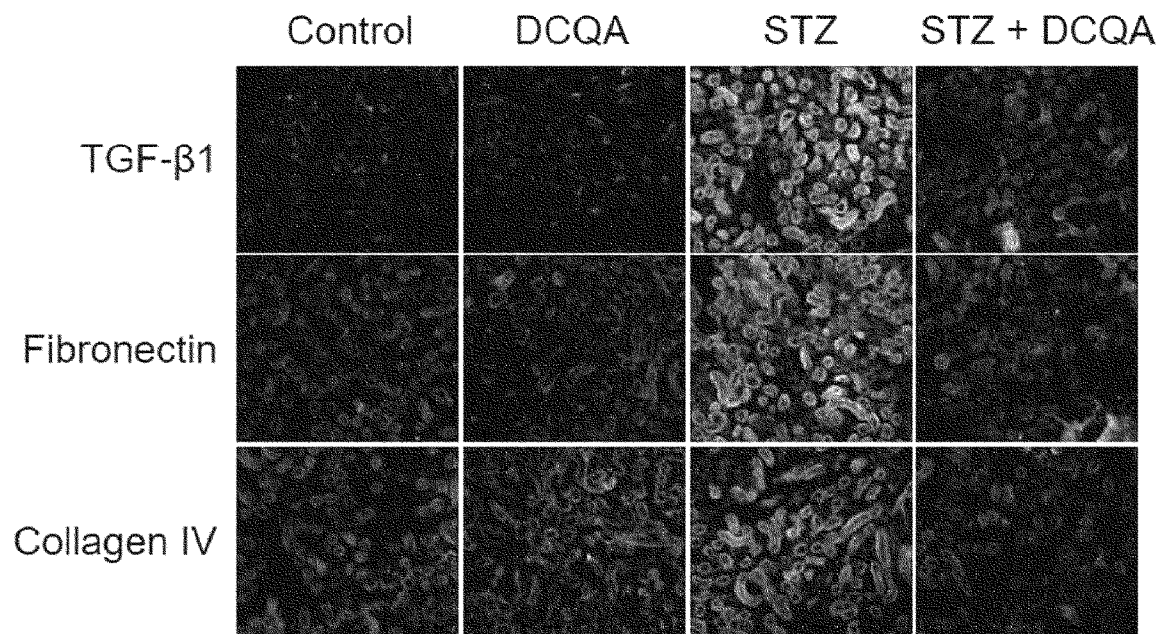
[도6d]



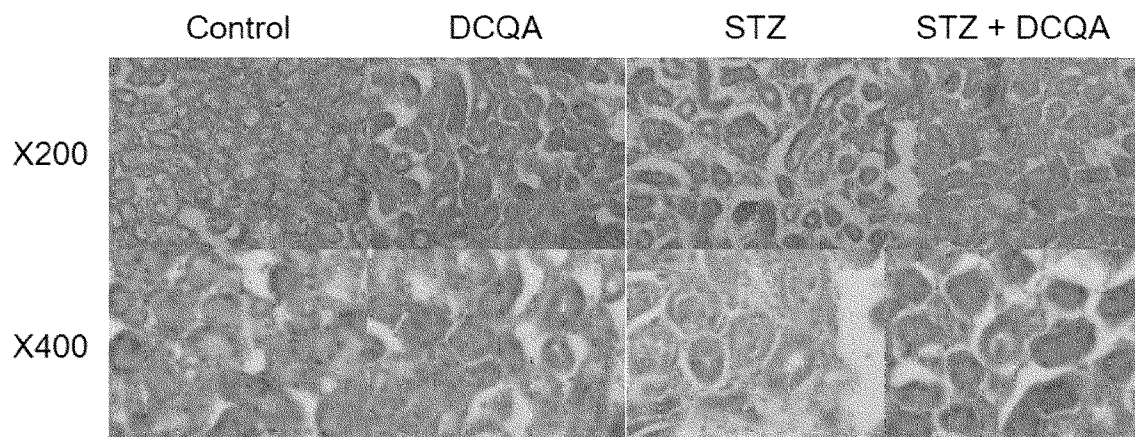
[도7]



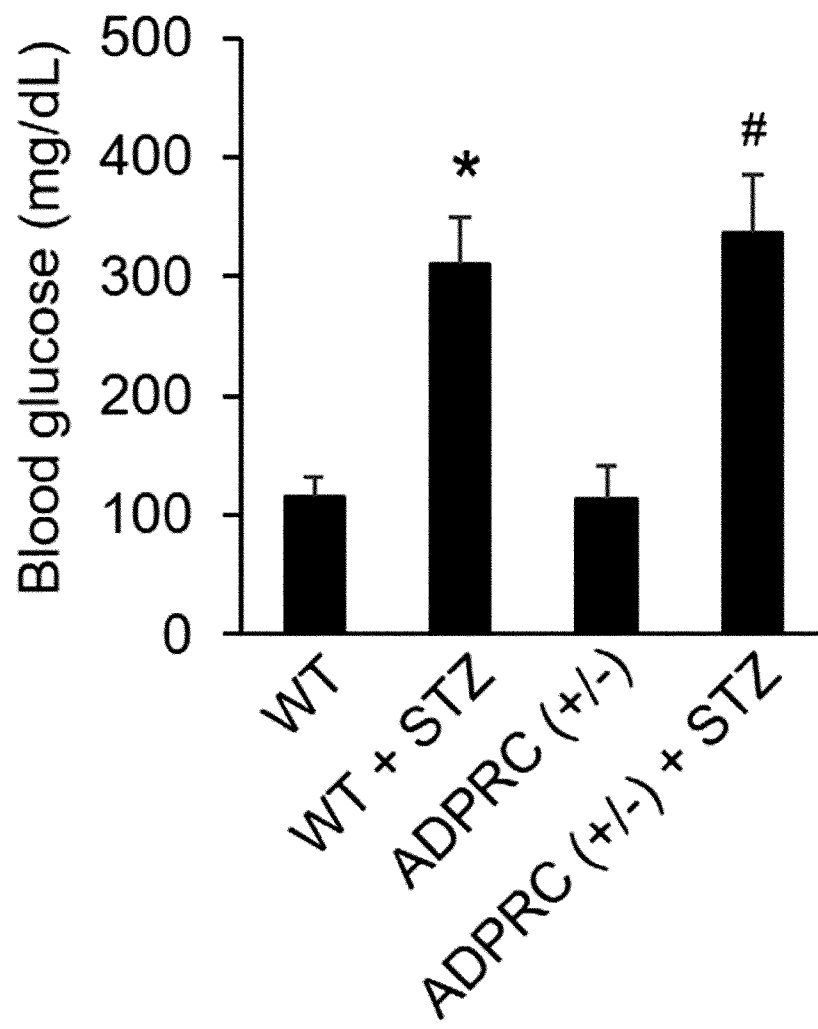
[도8]



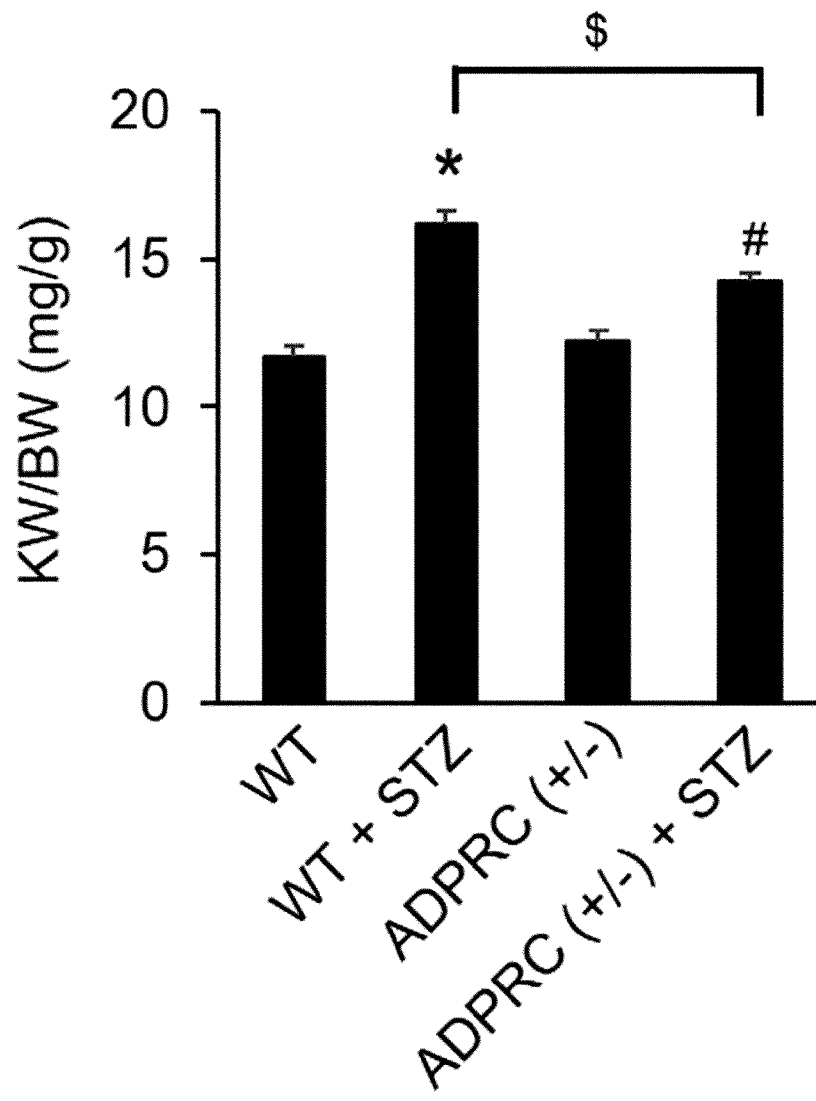
[도9]



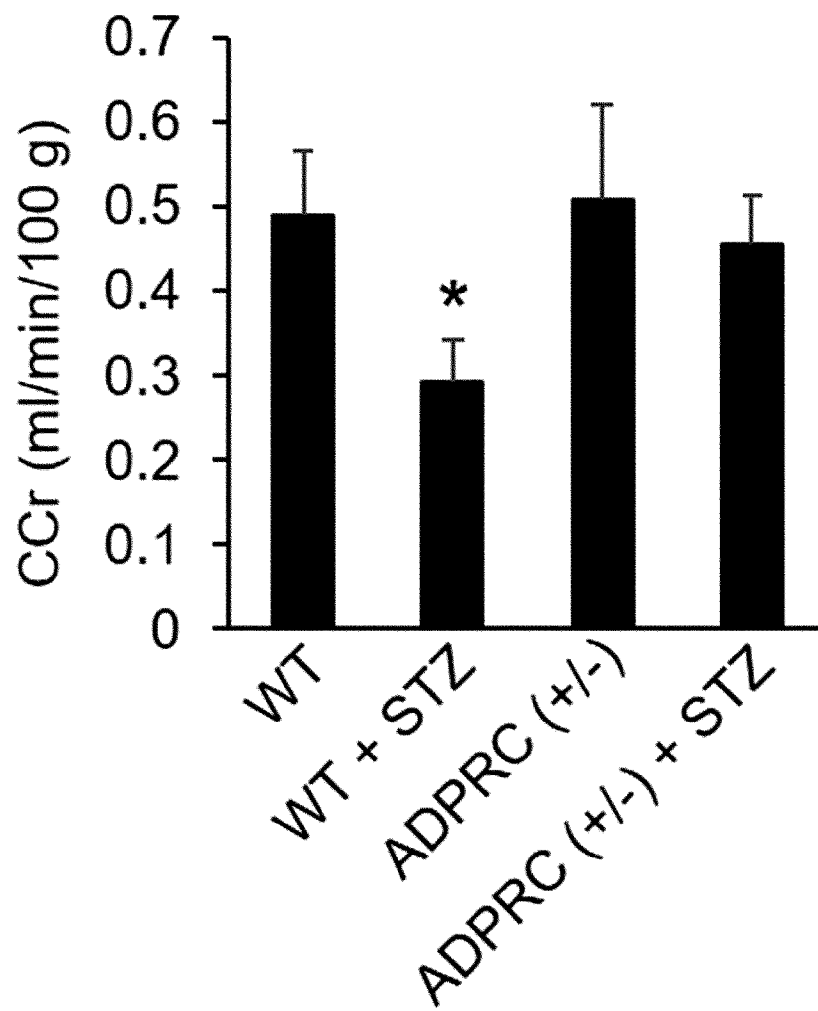
[도 10a]



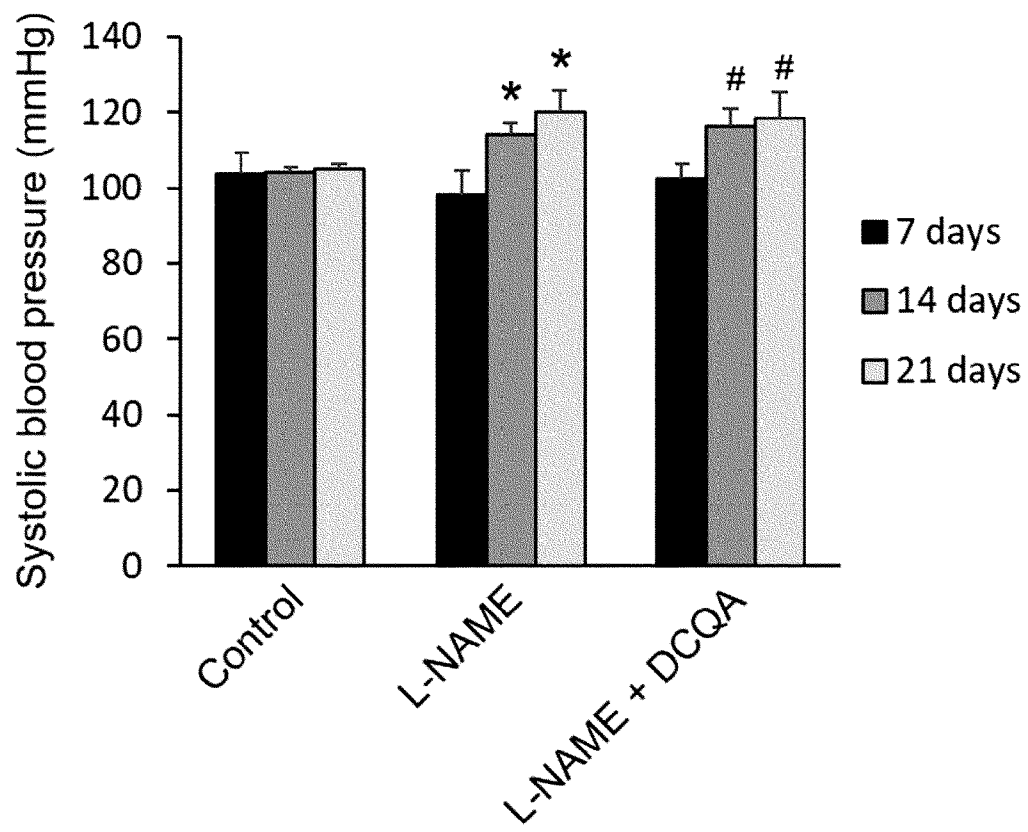
[도 10b]



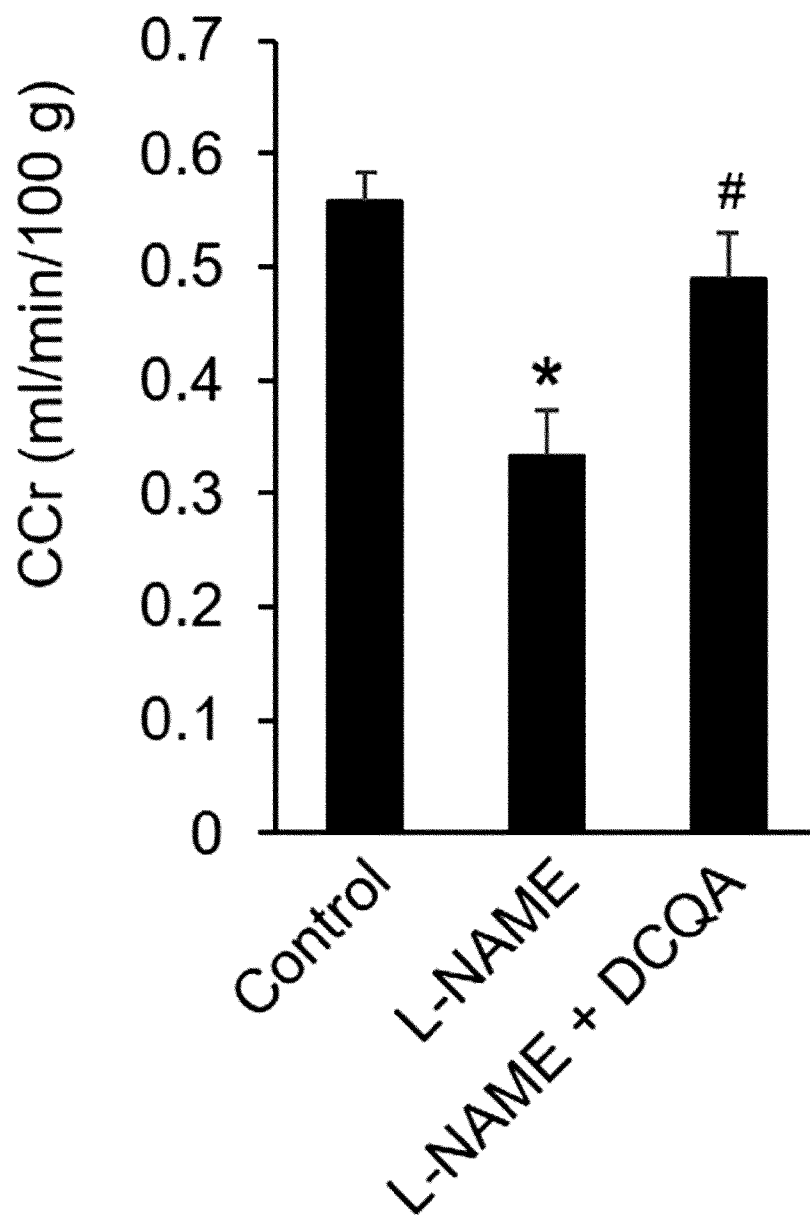
[도 10c]



[도 11a]



[도11b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/008283

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/10(2006.01)i; C12Q 1/6883(2018.01)i; A61P 13/12(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)

C12N 9/10; C07C 245/06; C07C 245/08; C12Q 1/6883; A61P 13/12

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: 에이디피-라이보실 사이클라아제(ADP-ribosyl cyclase, ADPRC), 변이체(variant), 벡터(vector), 숙주세포(host cell), 억제(suppress), 측정(measurement), 치료(treatment), 진단(diagnosis), 스크리닝(screening)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	전북대학교. ADP-ribosyl cyclase를 표적으로 하는 신장질환 치료를 위한 저분자 화합물 선도 물질 개발. 정부과제 최종보고서. 2011, pp. 1-42, non-official translation (JEONBUK NATIONAL UNIVERSITY. Development of a Low-Molecular Compound Leading Substance For the Treatment of Kidney Disease Targeting ADP-Ribosyl Cyclase. Government Project Final Report). See pages 21-24, 26, 30 and 33-35, and figures 9-11, 18 and 23-25.	1-25
Y	NCBI. Genbank : AAH27319.1 (15 July 2006). See entire document.	1-25
A	전북대학교. 조직-특이적 칼슘 신호 차단제 기술 개발. 정부과제 최종 보고서. 2012, pp. 1-111, non-official translation (JEONBUK NATIONAL UNIVERSITY. Development of Tissue-Specific Calcium Signal Blocker Technology. Government Project Final Report). See entire document.	1-25
A	KIM, S. Y. et al. Role of kidney ADP-ribosyl cyclase in diabetic nephropathy. American Journal of Physiology Renal Physiology. 2009, vol. 296, pp. F291-F297. See entire document.	1-25
A	KR 10-2008-0061431 A (INDUSTRIAL COOPERATION FOUNDATION JEONBUK NATIONAL UNIVERSITY) 03 July 2008. See entire document.	1-25



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

“T” 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

15 October 2020

Date of mailing of the international search report

15 October 2020

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea
35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/008283

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/008283

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2008-0061431	A	03 July 2008	EP	2102149	B1	02 September 2015
				EP	2102149	A1	23 September 2009
				KR	10-0879253	B1	16 January 2009
				US	2011-0281826	A1	17 November 2011
				US	2010-0069619	A1	18 March 2010
				US	8314082	B2	20 November 2012
				WO	2008-082169	A1	10 July 2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 9/10(2006.01)i, C12Q 1/6883(2018.01)i, A61P 13/12(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 9/10; C07C 245/06; C07C 245/08; C12Q 1/6883; A61P 13/12

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:에이디피-라이보실 사이클라아제(ADP-ribosyl cyclase, ADPRC), 변이체(variant), 벡터(vector), 숙주세포(host cell), 억제(suppress), 측정(measurement), 치료(treatment), 진단(diagnosis), 스크리닝(screening)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	전북대학교, “ADP-ribosyl cyclase를 표적으로 하는 신장질환 치료를 위한 저분자 화합물 선도물질 개발”, 정부과제 최종보고서, 2011, 페이지 1-42 페이지 21-24, 26, 30, 33-35, 그림 9-11, 18, 23-25	1-25
Y	NCBI, Genbank : AAH27319.1 (2006.07.15) 전체 문헌	1-25
A	전북대학교, “조직-특이적 칼슘 신호 차단제 기술 개발”, 정부과제 최종보고서, 2012, 페이지 1-111 전체 문헌	1-25
A	KIM, S. Y. 등, “Role of kidney ADP-ribosyl cyclase in diabetic nephropathy”, American Journal of Physiology Renal Physiology, 2009, 제296권, 페이지 F291-F297 전체 문헌	1-25
A	KR 10-2008-0061431 A (전북대학교 산학협력단) 2008.07.03 전체 문헌	1-25

☐ 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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“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

2020년 10월 15일 (15.10.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 10월 15일 (15.10.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



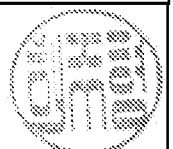
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2008-0061431 A

2008/07/03

EP 2102149 A1

2009/09/23

EP 2102149 B1

2015/09/02

KR 10-0879253 B1

2009/01/16

US 2010-0069619 A1

2010/03/18

US 2011-0281826 A1

2011/11/17

US 8314082 B2

2012/11/20

WO 2008-082169 A1

2008/07/10