



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0005978

(43) 공개일자 2016년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0085191

(22) 출원일자 2014년07월08일

심사청구일자 2014년07월08일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

최철희

대구광역시 동구 국제보상로 861, 101동 206호 (신천동, 현대하이페리온아파트)

(74) 대리인

특허법인충정

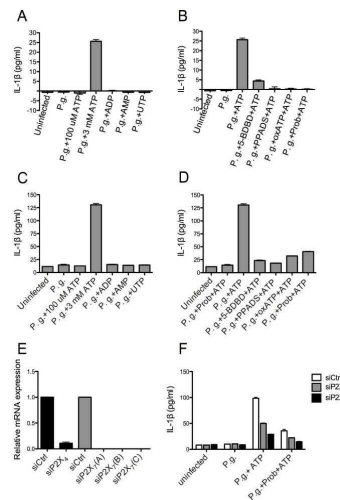
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 P2X₄ 수용체 저해제를 함유하는 치주질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 퓨린수용체 P2X₄의 저해제를 유효성분으로 함유하는 치주질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 치은상피세포에서 치은병원체 감염 시 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1은 복합체를 형성하여 카스파제-1을 활성화시키고 염증성 사이토카인의 분비를 통해 염증 반응을 유발함을 밝혀내었다. 따라서 본 발명은 P2X₄ 수용체 저해제를 이용하여 ROS 생성을 억제하고 염증성 사이토카인의 분비를 억제하며, P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1의 복합체 형성을 저해함으로써 염증반응을 나타내는 치주질환의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



명세서

청구범위

청구항 1

P2X₄ 수용체 저해제를 유효성분으로 함유하는 치주질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 P2X₄ 수용체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 P2X₄ 수용체 저해제는 P2X₄ 수용체의 발현 억제제로서 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 항체로 구성된 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 P2X₄ 수용체 저해제는 P2X₄ 수용체의 길항제인 5-BDBD (P2X₄ receptor antagonist; Tocris Bioscience)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 P2X₄ 수용체 저해제는 치은상피세포(Gingival epithelial cells)에서 활성산소종(ROS)의 생성 및 NLRP3 염증조절복합체의 활성화를 억제함으로써 염증 반응을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 치주질환은 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 타네렐라 포르시티아(*Tannerella forsythia*) 및 악티노바실러스 악티노마이세탐코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)로 구성된 군에서 선택되는 치주병원체의 감염으로 유발되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

- a) 시험관 내에서 치은상피세포(Gingival epithelial cells, GEC)에 ATP를 처리하여 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1의 발현을 유도하는 단계;
- b) 상기 단백질 발현이 유도된 GEC 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
- c) 상기 세포로부터 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1의 복합체 형성을 측정하여 복합체 형성이 저해된 경우에, 상기 후보 물질을 치주질환 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 치주질환 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 c) 단계에서 복합체 형성의 측정은 각 단백질의 항체를 이용한 공동-면역침전(co-immunoprecipitation)을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 P2X₄ 수용체 저해제를 함유하는 치주질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 퓨린 수용체(purinergic receptors) P2X₄의 저해제를 유효성분으로 함유하는 치주질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 선천성 면역은 미생물 감염에 대해 숙주가 사용하는 방어의 최우선이다. 인간 조직에서, 내피세포는 선천성 면역에서 중요한 역할을 한다. 내피세포는 물리적 장벽을 형성할 뿐만 아니라, 톨-유사 수용체(Toll-like receptors, TLR) 및 노드-유사 수용체(Nod-like receptors, NLR)와 같은 패턴-인식 수용체들(pattern-recognition receptors, PRRs)에 의한 미생물의 산물의 인식 후 감염에 반응하여 염증성 사이토카인과 케모카인을 분비할 수 있다 (Hornet MW, et al. 2005 *Journal of endotoxin research* 11: 124-128; Viala J, et al. 2004 *Nature immunology* 5: 1166-1174).

[0003] 전염증성 사이토카인 IL-1 β 및 IL-18은 동맥경화증, 전신 염증성질환, 및 자가면역질환에 관련되어 있다. 그들의 발현과 분비는 병원체-관련 분자패턴(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 및 위험신호에 의해 엄격하게 조절된다 (Gerdes N, et al. 2002 *The Journal of experimental medicine* 195: 245-257; Dinarello CA 2005 *The Journal of experimental medicine* 201: 1355-1359). 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS), 펩티도글리칸(peptidoglycan), 리포테이코산(lipoteichoic acid), 플라젤린(flagellin) 및 미생물의 핵산과 같은 일부 PAMPs는 pro-IL-1 β 와 pro-IL-18 발현, 및 세포내 축적을 유도한다 (Ishii KJ, et al. 2008 *Cell host & microbe* 3: 352-363; Franchi L, et al. 2009 *Nature immunology* 10: 241-247). 그러나 이러한 사이토카인들의 성숙과 분비는 스트레스 받거나 감염된 세포로부터 유래하여 염증조절복합체(inflammasomes)의 활성화를 초래하는, ATP 또는 요산결정(uric acid crystal)과 같은 위험신호를 필요로 한다 (Ciraci C, et al. 2012 *Microbes Infect* 14: 1263-1270).

[0004] 염증조절복합체는 IL-1 β 와 IL-18 성숙에 대해 카스파제-1-활성화 플랫폼으로서 작용하는 큰 다중단백질 복합체이다. 그들은 카스파제-1 보충, 클러스터링 및 자가-활성화에 기여하는 스캐폴드 단백질로서 작용하는, 필수적인 PRR 패밀리의 구성에 의해 분류될 수 있다 (Broz P, et al. 2011 *Immunological reviews* 243: 174-190). 가장 특징적인 면역조절복합체는 NLRP3 면역조절복합체이다. 그것은 ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) 어댑터, 및 카스파제-1을 포함하는 스캐폴드 단백질로서 NLRP3를 포함한다 (Schroder K, et al. 2010 *Cell* 140: 821-832). 세포의 ATP와 같은 위험-관련 분자 패턴(danger-associated molecular patterns, DAMPs)은 ATP-개폐된(gated) P2X₇ 이온 채널을 통해 NLRP3 염증조절복합체를 활성화시킬 수 있다 (Meylan E, et al. 2006 *Nature* 442: 39-44). ATP 자극에 따라, P2X₇ 수용체는 K⁺ 유출(efflux)을 가능케 하는 양이온 채널을 개방하고, 헤미채널(hemichannel) 파넥신-1(pannexin-1)을 보충함으로써 막 상에 큰 포어를 차차 형성하여 NLRP3 염증조절복합체를 활성화시킨다 (Kanneganti TD, et al. 2007 *Immunity* 26: 433-443). P2X₄ 역시 ATP-개폐된 이온 채널이지만, ATP-매개된 카스파제-1 활성화에 관여한다고 보고된 적은 없다.

[0005] 여러 다운스트림 메커니즘이 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성, 리조좀 불안정화, K⁺ 유출 및 세포자살을 포함한, NLRP3 염증조절복합체 활성화를 유도하는 것으로 제안되어 왔다 (Kahlenberg JM, et al. 2004 *American journal of physiology Cell physiology* 286: C1100-1108). 특히, 세포의 ATP 자극은 ROS 생성에 이어 카스파제-1 활성화를 유도하고, P2X₇ 길항제(antagonist)인 oxATP로 처리는 ATP-유도성 ROS 생성을 약화시키는 것으로 나타났다 (Cruz CM, et al. 2007 *The Journal of biological chemistry* 282: 2871-2879). P2X₇ 길항제 뿐만 아니라, 다른 퓨린수용체(purinergic receptors)의 작용제(agonists) 또한 ROS 생성을 촉진함으로써, 다른 퓨린수용체들이 ATP-유도된 ROS 생성에 기여할 수 있음을 설명하고 있다 (Bowler JW, et al. 2003

British journal of pharmacology 140: 567-575). 그러나 지금까지는, 어떠한 퓨린수용체도 P2X₇ 이외에 NLRP3 염증조절복합체의 ATP-유도된 활성화에 관련되어 있음이 알려져 있지 않다.

[0006]

치은상피세포(Gingival epithelial cells, GEC)는 감염에 대한 첫 번째 장벽(barrier)이며 구강 내에서 선천성 면역시스템의 중요한 구성요소이다. 또한 GEC는 감염의 타겟이며, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 타네렐라 포르시티아(*Tannerella forsythia*) 및 악티노바실러스 악티노마이세템코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)와 같은 일반적인 치주병원체(periodontopathogens)에 의해 감염될 수 있다 (Lamont RJ, et al. 2002 *Periodontology* 2000 30: 61-69). 이전에, 본 발명자들은 *P. gingivalis* 감염된 GEC가 pro-IL-1 β 를 과발현하지만, 그러한 사이토카인의 분비가 외인성 ATP로 처리와 같은, 2차 자극을 필요로 하기 때문에, NLRP3 염증조절복합체를 통해 카스파제-1을 활성화시킨다는 것을 제시하였다 (Choi CH, et al. *Cellular microbiology*, 2013, 15(6), 961-976). GEC에서 병원체에 의해 활성화되는 세포 시그널링 작용을 조사하는 것은 치주질환과 관련된 염증성 반응들을 조절하는 잠재적인 후보들을 제공한다. 그러나 GEC가 세균성 감염에 반응하는 분자적 메커니즘은 명확하게 밝혀져야 하는 것으로 남아있다. 따라서 본 발명은 퓨린수용체가 GEC에서 ATP-유도된 ROS 생성 및 염증조절복합체 활성화에 기여하는지를 조사하였고 P2X₄에 대한 예상외의 조절 기능을 밝혀내었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

따라서 본 발명의 목적은, 구강내 염증성 질환인 치주질환의 원인이 되는 활성산소 생성 및 염증조절복합체 활성화를 효과적으로 억제할 수 있는, P2X₄ 수용체 저해제를 유효성분으로 함유하는 치주질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0008]

또한 본 발명의 다른 목적은, 시험관 내에서 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1의 복합체 형성을 저해하는 후보물질을 치주 질환 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 것을 포함하는 치주질환 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 P2X₄ 수용체 저해제를 유효성분으로 함유하는 치주질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010]

본 발명에서, 상기 'P2X₄ 수용체'는 P2X 퓨린수용체의 서브 패밀리로서, 상기 P2X 수용체는 세포의 ATP(adenosine 5'-triphosphate)의 결합에 반응하여 개폐되는 이온 채널의 패밀리들을 의미한다. 상기 ATP 수용체는 이온 채널형 수용체의 P2X 패밀리와 G 단백질 공액형 수용체의 P2Y 패밀리로 크게 나뉘고, 현재까지 각각 7 종류 (P2X₁₋₇), 8 종류 (P2Y_{1,2,4,6,11-14})의 서브 타입이 보고되어 있다 (Buell et al. 1996 *EMBO J.* 15:55-62). P2X 패밀리의 서브 타입인 P2X₄ 수용체 (Genebank No. X87763)는, 중추 신경계 등에서 널리 발현되고 있는 것이 보고되어 있다 (Seguela et al. 1996 *J. Neurosci.* 16:448-455).

[0011]

본 발명에 있어서, 상기 P2X₄ 수용체에 대한 유전자 및 단백질 서열 정보는 이미 공지되어 있으며, 인간, 원숭이, 설치류 등을 포함한 포유동물에서 P2X₄ 수용체에 대한 정보는 Genebank에서 쉽게 검색할 수 있다. 예를 들어, 인간에서 유래한 P2X₄ 수용체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열(Genbank Accession No. U83993)을 가질 수 있고, 이를 코딩하는 염기서열은 서열번호 2의 염기서열(Genbank Accession No. GI:4099120)을 가질 수 있다.

[0012]

본 발명에서, 상기 'P2X₄ 수용체의 저해'는 P2X₄ 수용체 유전자의 발현 억제를 통해 이루어질 수 있고, P2X₄ 수용체의 활성 억제를 통해서도 이루어질 수 있으며, 또한 P2X₄ 수용체 작용의 일부 또는 전부를 감쇄시키는 길항제 처리를 통해서도 이루어질 수 있다.

- [0013] 또한, 상기 ‘유전자의 발현’은 인비트로 또는 세포 내에서 유전자가 단백질로 만들어지는 과정의 모든 단계를 포함하는 의미이다. 예를 들어, 유전자에서 mRNA로의 전사, mRNA에서 단백질로의 번역, 및 세포내 또는 세포외 단백질의 활성화 과정 등을 포함한다. 따라서 ‘유전자의 발현 억제제’는 이러한 전사, 번역 및 단백질의 활성화를 억제하는 물질이라면 특별히 그 종류는 제한되지 않는다.
- [0014] 본 발명의 조성물에서, 상기 P2X₄ 수용체 저해제는 P2X₄ 수용체의 발현 억제제로서 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 항체로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [0015] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적 서열 내에서 mRNA와 RNA 간의 올리고머-헤테로이중체를 형성하는 올리고머를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표적 서열에 대해 완전하거나 또는 근사한 서열 상보성을 가지며, mRNA의 번역을 차단하거나 저해하고 스플라이싱 변이체를 생성하는 mRNA의 가공 과정을 변화시켜 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있다.
- [0016] 상기 siRNA는 RNA 간섭 또는 유전자 침묵(gene silencing)을 매개할 수 있는 약 20개의 뉴클레오타이드로 구성된 길이의 이중가닥 RNA를 의미하며, shRNA는 siRNA 표적 서열의 센스 및 안티센스 서열이 5개 내지 9개의 염기로 구성된 루프(loop)를 사이에 두고 위치한 짧은 헤어핀 구조의 RNA를 의미한다. siRNA나 shRNA는 상보적인 서열을 갖는 표적 mRNA에 특이적으로 결합하여 표적 유전자의 mRNA의 절단을 통해 RNA 간섭(RNA interference)을 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [0017] 본 발명에 사용될 수 있는 siRNA를 제조하는 방법은 siRNA를 직접 화학적으로 합성하거나(Sui G et al. 2002 *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5515-5520), 인 비트로 전사를 이용하여 합성하는 방법(Brummelkamp TR et al. 2002 *Science* 296:550-553)이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, shRNA는 siRNA의 고가의 합성 비용, 낮은 형질감염 효율에 따른 RNA 간섭 효과의 짧은 지속시간 등을 극복하기 위해 이용되며, RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아테노바이러스, 렌티바이러스, 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있다. shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 가공 효소(Dicer 또는 RNaseIII)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 표적 유전자의 침묵을 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [0018] 또한 발현 억제제가 siRNA일 경우, siRNA 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현벡터 내에 포함될 수 있다. 상기 “작동 가능하게 연결(operably linked)” 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 발현 조절 서열일 수 있다. 상기 “발현 조절 서열(expression control sequence)”이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.
- [0019] 본 발명의 조성물에서, 상기 P2X₄ 수용체 저해제는 P2X₄ 단백질의 활성을 억제하는 물질일 수도 있으며, 이러한 P2X₄ 단백질의 활성을 억제하는 물질은 P2X₄ 단백질의 활성을 특이적으로 억제하는 단일클론 항체 또는 다중클론 항체일 수 있다.
- [0020] 상기 P2X₄ 단백질의 활성을 억제하는 항체는 P2X₄ 단백질에 특이적으로 결합하여 P2X₄ 단백질의 활성을 효과적으로 억제할 수 있다. P2X₄ 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 당업자에게 알려진 공지의 방법에 의해 제조하거나, 또는 상업적으로 이용가능한 항체를 구입하여 사용할 수 있다. 예를 들어, anti-P2X₄ 항체(APR-002)는 Alomone Labs사로부터 입수하여 사용할 수 있다. 또한, P2X₄ 단백질의 활성을 억제하는 항체는 P2X₄ 단백질에 특이적으로 결합하여 활성을 억제할 수 있는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 갖는 완전한 형태 외에도, 항체의 기능성 단편을 포함한다. 항체의 기능성 단편은 적어도 항원 결합 기능을 보유하는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0021] 본 발명의 조성물에서, 상기 P2X₄ 수용체 저해제는 P2X₄ 수용체 작용의 일부 또는 전부를 감쇄시키는 길항제(antagonists)일 수도 있으며, 이러한 P2X₄ 수용체 길항제는 당업자에게 알려진 공지의 길항제를 이용할 수 있다. 예를 들어, P2X₄ 수용체의 강력한 길항제인 5-BDBD (P2X₄ receptor antagonist)를 Tocris Bioscience사로부터 입수하여 사용할 수 있다.

- [0022] 본 발명의 조성물에서, 상기 $P2X_4$ 수용체 저해제는 치은상피세포(Gingival epithelial cells)에서 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)의 생성 및 NLRP3(nucleotide-binding domain, leucine-rich repeats containing family, pyrin domain-containing-3) 염증조절복합체의 활성화를 억제함으로써 염증 반응을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명의 실시예에 따르면, $P2X_4$ 길항제에 의한 $P2X_4$ 의 저해는 ATP-유도된 ROS 생성을 현저하게 차단하였고 (도 3의 E), RNA 간섭에 의한 $P2X_4$ 의 저해도 ATP-매개된 ROS 생성에서 유의한 감소를 유도하였다 (도 4의 B와 C). 또한 ATP-유도된 ROS 생성이 염증조절복합체 및 카스파제(caspase)-1 활성화와 관련되어 있는데 (Zhou R, et al. 2011 *Nature* 469: 221-225), 본 발명에서는 NLRP3 염증조절복합체 활성화로 유도되는 카스파제-1의 활성화가 $P2X_4$ 결핍된 경우 차단됨을 확인하였으며 (도 5의 A 참조), 이는 $P2X_4$ 저해가 ROS 생성을 감소시켜 염증조절복합체 활성화를 차단할 수 있음을 시사한다 (도 7 참조).
- [0024] 뿐만 아니라, 본 발명에서 $P2X_4$ 의 강력한 길항제인 5-BDBD에 의한 $P2X_4$ 의 저해는, 염증성 사이토카인인 IL-1 β 분비량을 감소시켰으므로 (도 6의 B와 D 참조), 본 발명의 $P2X_4$ 수용체 저해제는 ROS 생성의 억제, 염증조절복합체 활성화의 차단, 및 염증성 사이토카인의 감소를 통해 치주병원체 감염으로 유발되는 염증 반응을 효과적으로 억제할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물에서, 상기 치주질환은 구강 내 감염에 대한 면역 장벽(barrier)인 치은상피세포(GEC)에 치주병원체가 감염되고 감염에 반응하여 염증성 사이토카인과 케모카인이 분비됨으로써 (Hornef MW, et al. 2005 *Journal of endotoxin research* 11: 124-128; Viala J, et al. 2004 *Nature immunology* 5: 1166-1174), 유발되는 구강 내 염증성 질환으로, 바람직하게는 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 타네렐라 포르시티아(*Tannerella forsythia*) 및 악티노바실러스 악티노마이세템코미탄스(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)로 구성된 군에서 선택된 치주병원체의 감염으로 유발될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 $P2X_4$ 수용체 저해제를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 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 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명의 약학 조성물은 치료학적 또는 예방학적 유효량으로 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 질환 종류 및 중증도, 연령, 성별, 체중, 약물에 대한 민감도, 현재 치료법의 종류, 투여방법, 표적 세포 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 단일 또는 다중 투여일 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.
- [0028] 또한 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 약학 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) 시험관 내에서 치은상피세포(Gingival epithelial cells, GEC)에 ATP를 처리하여 $P2X_4$, $P2X_7$ 및 파닉신-1의 발현을 유도하는 단계; b) 상기 단백질 발현이 유도된 GEC 세포에 후보물질을 처리하는 단계; c) 상기 세포로부터 $P2X_4$, $P2X_7$ 및 파닉신-1의 복합체 형성을 측정하여 복합체 형성이 저해된 경우에, 상기 후보물질을 치주질환 예방 또는 치료용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 치주질환 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0030] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 상기 c) 단계에서 복합체 형성의 측정은 각 단백질의 항체를 이용한 공동-면역침전(co-immunoprecipitation)을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 실시예에 따르면, P2X₄와 P2X₇이 막에 관련되어 있고 GEC에서 ATP-매개된 반응의 물리적 복합체로서 기능할 수 있다는 가정을 하였고, 이를 확인하기 위해 공동-면역침전 실험을 수행한 결과, GEC에서 P2X₄와 P2X₇ 사이의 물리적 관련성을 확인하였다. 항-P2X₄ 항체를 이용한 면역침전에서 P2X₇ 및 파넥신-1이 검출됨을 확인하였다 (도 5의 B 참조). 이러한 결과는 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1이 GEC에서 이형복합체(heterocomplex) 형성을 통해 ATP-유도된 ROS 생성에 관여함을 의미한다. 따라서 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1을 발현하는 세포로부터 후보물질을 처리한 후 이들의 복합체 형성의 저해를 확인함으로써 치주질환의 예방 또는 치료에 적용할 수 있는 물질을 효과적으로 선별할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 상기 ‘후보물질’은 P2X₄ 수용체 단백질을 억제할 것으로 기대되는 물질을 의미하여, 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 또는 생물학적 활성물질(예컨대, 단백질, 항체, 펩타이드, DNA, RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, 앵타머, RNA 기반 효소(RNAzyme) 및 DNA 기반 효소(DNAzyme)), 또는 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은 아니다. 또한 상기 후보물질은 2개 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 6개, 10개, 12개, 20개 이하 또는 20개 초과 예컨대 50개 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩타이드일 수 있다. 상기 후보물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 구입 가능하다.
- [0033] 이하, 본 발명에서 P2X₄ 수용체가 치은상피세포에서 P2X₇ 및 파넥신-1과 관련된 역할을 처음으로 밝혀냄으로써 ROS 생성 및 염증조절복합체 활성화에 어떻게 관련되는지를 구체적으로 설명한다.
- [0034] 본 발명의 결과는 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1이 ROS 생성의 원인이 되고 GEC(Gingival epithelial cells)에서 염증조절복합체(inflammasome) 활성화에 관련되어 있음을 보여준다. 이러한 가능성과 일치하게, 이전 연구들은 P2X₄, P2X₇이 골수유래 대식세포(bone marrow derived macrophages, BMDM) 상에 헤테로머 수용체(heteromeric receptors)로 기능할 수 있음을 제시하였다 (Boumechache M, et al. 2009 *The Journal of biological chemistry* 284: 13446-13454). 유사하게, 마우스 대식세포의 ATP-유도된 세포사멸은 P2X₄ 수용체를 필요로 하는 것으로 알려져 있는데, ATP 자극에 따라 Ca²⁺ 유입(influx)을 시작하여 P2X₄ 수용체의 활성화에 의한 포어 형성에 기여하게 된다 (Kawano A, et al. 2012 *Biochemical and biophysical research communications* 419: 374-380). 이러한 결과는 P2X₄, P2X₇ 수용체가 서로에 대한 기능성과 의존성을 시사한다.
- [0035] GEC에서, 본 발명자들은 세포의 뉴클레오타이드-유도된 ROS 생성이 수분 이내로 일어나고 ATP 자극에 특이적임을 발견하였다. 다음으로, 가능성 있는 타겟 수용체들의 발현의 특성을 파악하고 이러한 수용체들에 대한 특이적 저해제가 ROS 생성을 차단할 수 있는지를 시험하였다. P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1의 저해제들은 ATP-의존적 ROS 생성을 현저하게 감소시켰다. 상기 수용체들의 기능성을 좀 더 평가하기 위해, 퓨린 수용체들과 파넥신-1 모두가 일차 또는 불멸화된 GEC에서 효율적인 ATP-유도된 ROS 생성에 필요함을 발견하였다. 본 발명은 P2X₄ 수용체의 결핍이 대식세포주인 RAW264.7 세포에서 ATP-매개된 ROS 생성을 증가시킴을 보고한 (Kawano A, et al. 2012 *Biochemical and biophysical research communications* 419: 374-380), 다른 연구들과 차이가 있다. 상반되는 결과들이 서로 다른 세포주에 의한 것일 수 있지만, 본 발명은 일차 GEC도 사용하여 HIGK 세포처럼 유사한 결과를 확인하였다.
- [0036] NLRP3 염증조절복합체 활성화를 초래하는, DAMPs 또는 PAMPs 중 하나는 ROS 생성을 촉발할 수 있는 것으로 제안되어 왔다 (Schroder K, et al. 2010 *Cell* 140: 821-832). 그러나 ROS의 세포내 기원은 논쟁으로 남아있다. 이전 연구들은 DPI 또는 siRNA에 의한 결핍과 같은 약학적 저해제로 NADPH 산화효소를 저해하는 것은 DAMPs 또는

PAMPs로 자극된 대식세포에서 카스파제-1 활성화 및 IL-1 β 성숙을 현저하게 감소시킴을 설명하고 있으며, 이는 NADPH 산화효소-유발된 ROS가 염증조절복합체 활성화에서 역할을 함을 의미한다 (Carta S, et al. 2011 *J Biol Chem* 286: 27069-27080). 다음으로, ROS의 다른 세포내 근원인 미토콘드리아 또한 미토콘드리아 DNA의 산화 및 방출을 유도함으로써 DAMPs 또는 PAMPs에 반응하여 NLRP3을 활성화시키는 것으로 보고되었다 (Shimada K, et al. 2012 *Microbes Infect* 14: 1301-1307). GECs에서, 최근 연구는 ATP 자극이 mROS 생성 또한 촉진하는 P2X₇ 라이게이션을 통해 NADPH-유도된 ROS 생성을 유도함을 입증하였다 (Choi CH, et al. 2012 *Cellular Microbiology* 15(6): 961-976). 이러한 결과와 일치하게, 본 발명은 NADPH 산화효소의 저해 역시 oATP-유도된 mROS 생성을 감소시키는 것으로 확인하였다.

[0037]

본 발명은 파넥신-1이 GECs에서 ATP-유도된 NLRP3 활성화에 필수적임을 보여준다. 그러나 최근의 유전학적 증거는 Panx1-결핍된 마우스 유래 대식세포에서 정상적인 NLRP3 염증조절복합체 기능을 나타내었다 (Qu Y, et al. 2011 *J Immunol* 186: 6553-6561). 이러한 모순은 파넥신-1이 서로 다른 세포 타입에서 상이한 역할을 한다는 것으로 추정함으로써 설명될 수 있다. 예를 들어, 신경세포의 경우, 파넥신-1은 파넥신-1 결핍 및 Panx1-결핍된 마우스의 이용을 통해 알려진 것처럼, 염증조절복합체-유도된 세포사멸과 관련되어 있다 (Dvoriantchikova G, et al. 2012 *PLoS ONE* 7: e31991).

[0038]

이전 연구에서 P2X₇을 자극하는 ATP 농도로 GEC의 처리가 염증조절복합체 및 카스파제-1의 활성화를 유도함을 보고된 바 있다 (Yilmaz O, et al. 2010 *Cellular microbiology* 12: 188-198). 그러나 본 발명은 P2X₄ 또는 P2X₇ 중 어느 하나의 결핍이 GEC에서 감소된 카스파제-1 활성화를 유도함을 밝혀내었다. ROS는 P2X₄ 또는 P2X₇ 중 어느 하나가 자극된 경우에 생성되지만, 카스파제-1은 GEC가 P2X₇을 활성화시키는 ATP 농도로 처리된 경우에만 활성화된다. 유사하게, 카스파제-1 활성화를 필요로 하는, *P. gingivalis*-감염된 세포로부터 IL-1 β 분비는 P2X₇을 자극하는 ATP 농도로 감염된 세포의 처리에 의해 유도될 수 있었지만, P2X₄ 또는 P2X₇ 중 어느 하나를 저해하거나 결핍시키는 것은 현저하게 더 낮은 수준의 IL-1 β 분비를 유도하였다.

[0039]

종합하면, 이러한 결과들은 P2X₄ 자극이 카스파제-1의 활성화에 충분치 않을 수 있지만, P2X₄가 P2X₇과 복합체를 형성할 수 있음을 의미하고, 이는 왜 P2X₄ 결핍이 P2X₇-매개된 시그널링의 소실을 유도하는지를 설명할 수 있다. 본 발명은 GEC에서 P2X₄가 P2X₇ 및 파넥신-1과 물리적으로 관련되어 있다는 공동-면역침전에 의해 증명함으로써 이러한 가설을 검증하였다. P2X₄와 P2X₇은 또한 BMDM에서 헤테로머 수용체를 형성하는 것으로 이미 알려져 있다 (Guo C, et al. 2007 *Molecular pharmacology* 72: 1447-1456). 따라서 이러한 결과는 P2X₇ 자극이 카스파제-1 활성화에 필요하지만, P2X₄는 P2X₄/P2X₇/파넥신-1 복합체에서 그것의 존재를 통해, P2X₇의 활성을 조절한다는 것을 의미한다 (도 7 참조).

[0040]

본 발명은 GEC에서 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1을 통한 시그널링이 어떻게 카스파제-1을 활성화시킬 수 있는지에 대한 최초 정보를 제공한다. 상기 동일한 복합체는 *P. gingivalis* 감염에 의해 자극(primed)되어 있던 GEC로부터 IL-1 β 의 분비와 관련되어 있다. 따라서 P2X₇-의존적 ROS 생성 및 카스파제-1 활성화에 대한 유발인자(triggers)를 이해하는 것은 치주 질환, 심혈관계 질환과 같은 *P. gingivalis*와 관련된 질환에 대한 약물 개발과 치료적 접근의 발달에 도움이 될 수 있다.

발명의 효과

[0041]

본 발명에 따르면, 치은상피세포에서 치은병원체 감염 시 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1은 복합체를 형성하여 카스파제-1을 활성화시키고 염증성 사이토카인의 분비를 통해 염증 반응을 유발함을 밝혀내었다. 따라서 본 발명은 P2X₄ 수용체 저해제를 이용하여 ROS 생성을 억제하고 염증성 사이토카인의 분비를 억제하며, P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1의 복합체 형성을 저해함으로써 염증반응을 나타내는 치주질환의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042]

도 1은 GEC에서 ATP에 반응하여 ROS 생성을 확인한 결과이다. (A) 불멸화된 GEC(HIGK)는 3 mM ATP로 1시간 동안 처리되거나 대조군으로 비처리 상태로 두고 DCF (green)로 염색하여 형광현미경으로 ROS를 검출하였다. Hoechst (blue)는 핵을 염색하는데 사용되었다. (B) ROS 생성은 3 mM ATP 자극 후 지시된 시점에서 DCF로 측정되었다. 평균 형광은 이미지 J로 정량화하고 세포의 수에 대하여 정규화 하였다. (C) 서로 다른 뉴클레오타이드에 의해 유도된 ROS 생성의 정량화. GEC들은 1시간 동안 3 mM의 ATP, ADP, AMP 또는 UTP로 처리되거나 비처리로 두고, (B)에서와 같이 이미지 J로 분석하였다. 바(bar)는 세 번의 독립된 실험의 평균 및 표준편차(SD)를 나타낸다.

도 2는 ROS 생성에서 NADPH 산화효소 및 미토콘드리아의 시너지 효과를 나타낸 것이다. (A) HIGK는 50 μ M DPI로 30분간 전처리된 다음 3 mM ATP 자극한 후, DCF (green) 또는 MitoSOX (red)로 염색하여 형광현미경으로 ROS를 검출하였다. (B) 형광은 도 1에서와 같이 세 번의 독립된 실험으로 정량화 하였다.

도 3은 ATP-매개된 ROS 생성에서 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1의 관련성을 나타낸 것이다. (A) 불멸화된 GEC로부터 총 RNA를 추출하여 cDNA로 역전사(RT) 시켰다. cDNA를 사용하여 지시된 유전자들에 특이적인 프라이머로 PCR을 수행하였으며, PCR 산물은 최종적으로 EtBr 염색으로 시각화 하였다. (B) GEC는 100 μ M 또는 3 mM ATP로 1시간 동안 지시된 바와 같이 처리되었으며, ROS 생성은 DCF 염색으로 측정하고 형광현미경으로 시각화 하였다. 표준편차(SD)가 나타난 세 번의 독립된 실험에서 형광의 정량화는 (C)에 나타난다. (DE) ROS 생성은 서로 다른 조건 하에서 자극된 GEC에서 DCF 염색으로 측정되었다. GEC는 비처리로 두거나 20 μ M 니제리신(nigericin) 또는 3 mM ATP로 1시간 동안 자극한 한 다음 형광현미경으로 관찰하였다. 서로 다른 수용체 길항제들에 의해 감소된 ROS 생성은 100 μ M oxATP로 30분간, 1 mM 프로베네시드로 10분간, 또는 50 μ M 5-BDBD 또는 100 μ M PPADS로 15분간 세포를 전처리한 다음, 3 mM ATP로 1시간 동안 자극함으로써 조사되었다.

도 4는 RNA 간섭에 의한 P2X₄ 또는 P2X₇의 결핍에 따른 감소된 ATP-유도된 ROS 생성을 나타낸다. (A) 불멸화된 GEC는 지시된 shRNA-발현하는 플라스미드를 가진 렌티바이러스로 1일 동안 형질도입된 후 퓨로마이신(puromycin)으로 선별되었다. 선별 후, 세포들을 수집하고 총 RNA를 qPCR로 분석하여 녀다운 효율율을 확인하였다. (B) 서로 다른 세포주에서 1시간 동안 3 mM ATP 자극 후 ROS 생성의 DCF 염색. (C)에서 나타난 형광은 도 1에서와 같이 정량화 되었고 비-포유동물 shRNA인 대조군으로 형질도입된, shCtrl로 정규화 하였다.

도 5는 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1을 포함하는 복합체의 붕괴(disruption)에 따른 약화된 ATP-자극된 카스파제 활성화를 나타낸다. (A) 렌티바이러스 입자를 이용하여 P2X₄ 또는 P2X₇이 결핍된 불멸화된 GEC는 100 μ M 또는 3 mM ATP로 3시간 동안 처리되었으며, 상층액은 카스파제-1 활성 측정을 위해 수집되었다. 카스파제-1 활성은 실시에에 개시된 바와 같이 ELISA로 측정되었다. (B) GEC로부터 분리된 총 단백질은 다클론 항-P2X₄ 항체 또는 대조군으로서 비드(Dynabeads)에 의한 면역침전(IP)에 제시되었다. (투입물로서) 침전물 또는 총 단백질 추출물은 SDS-PAGE 상에서 분석되었으며 항-P2X₇ (top), 항-파넥신-1 (middle), 또는 항-P2X₄ (bottom) 항체들로 면역블롯 상에서 분석되었다.

도 6은 P2X₄, P2X₇ 또는 파넥신-1의 저해에 의한 *P. gingivalis*-감염된 세포에서 ATP-유도된 IL-1 β 분비의 차단을 나타낸다. 일차 GEC (C와 D) 및 불멸화된 GEC (A와 B)는 100 moi에서 6시간 동안 *P. gingivalis* (P.g.)가 있거나 없이 감염된 후, 서로 다른 약제로 처리되었다. 감염된 세포들은 100 μ M ATP, 3 mM ATP, 3 mM ADP, 3 mM AMP 또는 3 mM UTP로 1시간 동안 개별적으로 처리되었다 (A와 C). 다른 방법으로, 감염된 세포들은 50 μ M 5-BDBD로 15분간, 100 μ M PPADS로 15분간, 100 μ M oxATP로 30분간, 또는 1 mM 프로베네시드로 10분간 전처리된 후, 3 mM ATP로 1시간 동안 처리되었다 (B와 D). 상층액을 수집하고 ELISA를 이용하여 IL-1 β 를 측정하였다. (E) 일차 GEC는 하루 동안 P2X₄ 또는 P2X₇에 대한 siRNA 서열로 트랜스펙션 한 후 mRNA 수준을 qPCR로 검출하였다. (F) P2X₄ 또는 P2X₇이 결핍된 일차 GEC는 *P. gingivalis* (P.g.)로 감염되었고 (B)에 나타난 바와 같이 프로베네시드 및 3 mM ATP로 처리되었다. 상층액에서 IL-1 β 분비는 ELISA로 분석되었다.

도 7은 세포의 ATP로 자극된 GEC의 ROS 생성 및 염증조절복합체 활성화에서 P2X₄ 및 P2X₇의 역할을 보여주는 모델이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043]

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설

명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1. 세포 및 시약

[0045] 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) ATCC 33277은 효모추출물(1 mg/ml), 헤민(hemin; 5 mg/ml) 및 메나디온(menadione; 1 mg/ml)이 보충된 TSB(trypticase soy broth)에서 37℃, 24시간 동안 혐기적으로(anaerobically) 배양하였으며, 이전에 보고된 바와 같이 감염에 사용되었다 (Choi CH, et al. 2013 *Cellular microbiology*, 15(6), 961-976).

[0046] 불멸화된 인간 치은 각화세포(human immortalized gingival keratinocyte, HIGK) 세포주는 이전에 공지된 바와 같이 얻었다 (Oda D, et al. 1996 *Exp Cell Res* 226: 164-169). 세포들을 혈청-프리 keratinocyte-SFM (Gibco)에서 37℃, 5% CO₂를 포함하는 습도 조절된 인큐베이터에서 배양하였다. 일차 GEC는 이전에 공지된 바와 같이 (Yilmaz O, et al. 2004 *Infection and immunity* 72: 3743-3751), 건강한 치주 조직으로부터 수술(oral surgery) 후 얻었다. 세포들을 혈청-프리 KGM(keratinocyte growth medium)에서 37℃, 5% CO₂에서 단일층으로 배양하였다. 일차 GEC는 75-80%의 컨플루언스(confluence)에서 실험에 사용하였으며 100 MOI(multiplicity of infection)에서 *P. gingivalis*로 감염 전 24시간 또는 48시간 동안 배양하였다 (Choi CH, et al. 2013 *Cellular microbiology*, 15(6), 961-976). ATP, ADP, UTP, oxATP, PPADS 및 프로베네시드(probenecid)는 Sigma-Aldrich로부터 입수하였다. AMP는 Santa Cruz Biotech로부터 입수하였다. 5-BDBD는 Tocris Bioscience로부터 입수하였다. 모든 프라이머들은 Fisher Scientific로부터 구입하였다. P2X₄ (APR-002) 및 P2X₇ (APR-008)에 대한 항체들은 Alomone Labs로부터 입수하였다.

[0047] 실시예 2. RNA 추출, 역전사 PCR 및 정량적 PCR

[0048] 총 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 RNA 추출 키트(RNeasy Mini kit; Qiagen)를 이용하여 10⁶ HIGK 세포로부터 분리하였다. cDNA는 역전사 키트(TagMan Reverse Transcription Reagents kit; Applied Biosystems)를 이용하여 랜덤 헥사머에 의해 2 mg RNA로부터 증폭되었다. PCR에 사용된 프라이머들은 하기 표 1과 같다:

표 1

Primers	Foward (5'→3')	Reverse (5'→3')
P2X ₁	CGCCTTCCTCTCGAGTATGA	AGATAACGCCCACCTTCTTATTACG
P2X ₂	GCCTACGGGATCCGCATT	TGGTGGGAATCAGGCTGAAC
P2X ₃	GCTGGACCATCGGGATCA	GAAAACCCACCCTACAAAGTAGGA
P2X ₄	CCTCTGCTTGCCCAGGTACTC	CCAGGAGATACGTTGTGCTCAA
P2X ₅	CTGCCTGTCGCTGTTCGA	GCAGGCCACCTTCTTGTT
P2X ₆	AGGCCAGTGTGTGGTGTCA	TCTCCACTGGGCACCAACTC
P2X ₇	TCTTCGTGATGACAACTTTCTCAA	GTCTTCGCGGTGGGATACT
pannexin1	GGTGAGACAAGACCCAGAGC	GGCATCGGACCTTACACCTA

[0050] 모든 프라이머에 대한 PCR 사이클링 프로토콜은 94℃에서 5초, 55℃에서 5초, 및 68℃에서 15초였다. 상기 프로토콜은 40 사이클 동안 반복되었으며 초기 94℃에서 5분 효소 활성화 단계와 마지막 72℃에서 10분 신장(extension) 단계를 포함하였다. PCR 산물은 2% 아가로스 겔 상에서 전기영동으로 분리되었으며 에티디움 브로마이드(ethidium bromide) 염색으로 시각화 하였다. 정량적 PCR(quantitative PCR, qPCR)은 최종 용량 25 ml로 Brilliant QPCR Master Mix (Stratagene)를 이용하여 Mx3000P (Stratagene)에서 cDNA 제조물의 1/50로 수행하였다. cDNA는 각각 200 mM의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 정량적 PCR은 95℃에서 10분간 수행된 후, 95℃에서 30초, 55℃에서 1분, 72℃에서 30초로서 40 사이클로 수행되었다. P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1의 발현 수준은 제조사(Stratagene)에서 설명한 바와 같이, 경쟁적 사이클 역치 기법(cycle threshold metho

d)으로 GAPDH로 정규화하였다. P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1을 코딩하는 유전자에 대한 프라이머들은 상술한 바와 같다. GAPDH에 대한 프라이머는 다음과 같다: 5' -TTAAAAGCAGCCCTGGTGAC-3' and 5' -CTCTGCTCCTCTGTTCGAC-3' .

실시예 3. HIGK 세포의 렌티바이러스 감염

P2X₄ (TRCN0000044960 및 TRCN0000044962), P2X₇ (TRCN0000045095 및 TRCN0000045097), 및 파넥신-1 (TRCN0000156046 및 TRCN0000155348)에 대한 shRNA를 안정적으로 발현하는 불멸화된 GEC(HIGK)는 Sigma-Aldrich로부터 구입한 렌티바이러스 입자로 상기 세포들을 형질도입(transduction)함으로써 제조하였다. 형질도입은 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 비타겟 shRNA 대조군 세포들 또한 무관한 서열(irrelevant sequence; SHC002V, Sigma)를 이용하여 제조하였다. 간략히 설명하면, GEC를 형질도입 24시간 전에 70% 컨플루언스로 평균 배양하고, 그에 상응하는 렌티바이러스 형질도입 입자들을 밤새 3 MOI로 추가하였다. 그 다음날 신선한 배지를 추가하고, 안정되게 감염된 세포들을 5 mg/ml 푸로마이신(puromycin; Sigma-Aldrich)을 포함하는 배지를 추가하여 선별하였다.

실시예 4. 일차 GEC에서 siRNA로 일시적 RNA 억제

일차 GEC에서 P2X₄와 P2X₇의 발현은 이전에 기술된 바와 같이 상이한 siRNA로 억제되었다 (Abdul-Sater AA, et al. 2010 *The Journal of biological chemistry* 285: 41637-41645). 상기 siRNA 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

siRNA	Sequence (5'→3')	Product/Manufacture
P2X ₄	GCUUUCACGGGUGUCUGATT	Ambion, LifeCell Technologies, S9957, Cat. #: 4392420
	UGACAGACCCGUUGAAAGCTA	
P2X ₇	ACAAUGUUGAGAAACGGACUCUGAT	27mer siRNA duplexes OriGene Technologies, Cat. #: SR303325

간략히 설명하면, 세포들은 총 용량 100 ml에서 10 nM siRNA(siRNA의 스톱 농도 20 nM)가 혼합된 트랜스펙션 시약(Glycofect Transfection Reagent; Kerafast)을 이용하여 siRNA로 처리하였다. 4시간 후, 새로운 세포-배지를 트랜스펙션 혼합물의 제거 없이 상기 세포에 첨가하고, 세포들을 36시간 동안 배양하였다. 이전에 보고된 바와 같이, qPCR을 수행하여 Nick나운 효율 및 특이성을 확인하였다 (2012 *J Exp Med* 208: 1823-1834).

실시예 5. ROS 측정

ROS 측정은 이전에 기술된 바와 같이, ROS 지시 시약인 CM-H₂-DCFDA DCF 및 MitoSOX (Invitrogen)으로 분석하였다 (Choi CH, et al. 2012 *Cellular Microbiology* 15: 961-976). 간략히 설명하면, 세포들은 PBS에 녹인 2.5 mM DCF 또는 5 mM MitoSOX로 37°C에서 30분간 로딩한 후, PBS로 세척한 다음, 100 μM 또는 3 mM ATP로 37°C에서 1시간 동안 처리하였다. 세포들은 핵을 표시하기 위해 Hoechst33342로 카운터-염색(counter-stained)하였다. 마지막으로, 상기 세포들을 광시야 형광현미경(Leica, Deerfield, IL)으로 관찰하였다.

실시예 6. ELISA를 이용한 카스파제-1 활성화 측정

EC는 100 μM 또는 3 mM ATP로 3시간 동안 처리한 후 상층액을 수집하여 제조사의 설명서에 따라 인간 카스파제-1 면역분석(human caspase-1 immunoassay; R&D)에 사용하였다. 간략히 설명하면, 카스파제-1 ELISA는 각각 포획 및 검출 항체로서 카스파제-1 p20 서브유닛에 대한 단클론 및 다클론 항체들을 사용한다. 100 ml의 상층액을 우선 50 ml의 RD1W 버퍼와 혼합하고 카스파제-1 단클론 항체 코팅된-웰에 1.5 시간동안 로딩하였다. 그 후, 100 ml의 카스파제-1 항형질을 검출 항체로서 사용하였다. 항-토끼 IgG-HRP 컨쥬게이트를 정량을 위해 사용하였다. 활성화된 카스파제-1은 540 nm에서 파장 보정된 450 nm의 플레이트 리더를 이용하여 측정하였다.

[0061]

실시에 7. ELISA에 의한 IL-1 β 분비 측정

[0062]

IL-1 β 의 분비는 공지된 바와 같이, 상업적인 사이토카인 ELISA 키트(BD Biosciences Pharmingen)를 이용하여 측정하였다 (Yilmaz O, et al. 2010 *Cellular microbiology* 12: 188-198).

[0063]

실시에 8. 퓨린수용체들의 공동-면역침전

[0064]

공동-면역침전(co-immunoprecipitation)은 제조사의 설명서에 따라 Dynabeads (Invitrogen)로 수행하였다. 세포들을 추출 버퍼로 용해한 후, 세포 추출물을 P2X₄ 항체와 밤새 사전-커플링된(pre-coupled) 비드(beads)로 4℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 침전물을 추출 버퍼로 세척하고 자석을 이용하여 LWB(Last Washing Buffer)한 후, 2X 샘플 버퍼에 제공하여 99℃에서 10분간 가열하였다. 용출된 단백질들은 이전에 공지된 바와 같이 웨스턴 블롯으로 분석하였다 (Huang PR, et al. 2010 *Biochimica et biophysica acta* 1803: 1164-1174).

[0065]

실험결과 1. ATP는 GEC에서 ROS 생성을 유도한다.

[0066]

ATP에 의한 자극은 폐포 대식세포(alveolar macrophages) 및 일차 GEC에서 생성된 높은 수준의 ROS를 유도한다는 것이 보고되어 있다 (Cruz CM, et al. 2007 *The Journal of biological chemistry* 282: 2871-2879; Choi CH, et al. 2013 *Cellular microbiology*, 15(6), 961-976). GEC에서 ATP-유도된 ROS 생성을 조사하기 위해, 본 발명자들은 안정된 GEC 세포주인, 불멸화된 인간 치은 각화세포주(HIGK)를 사용하였고, 탈아세틸화(deacetylation) 및 산화(oxidation) 시까지 비형광을 유지하는 카복시-H₂DCFDA (DCF)로 염색하였다. 형광현미경 이미지는 3 mM ATP 자극된 HIGK 세포에서 현저한 증가를 나타내었다 (도 1의 A). 형광현미경 테이터의 정량적 분석은 ATP-처리된 세포에서의 형광이 비처리 세포 보다 약 9배 높음을 나타내었다. 또한 세포들은 ATP 자극에 5분 이내로 빠르게 반응하였으며 30분에서 적어도 3시간까지 정상상태(steady state)에 이르렀다 (도 1의 B와 C). ADP, AMP 또는 UTP와 같은 다른 세포의 뉴클레오티드로 처리는 상기 세포에서 현저한 ROS 생성을 유도할 수 없었다 (도 1의 C). 이러한 결과는 다른 뉴클레오티드와 달리, ATP에 의한 자극이 GECs에서 ROS 생성을 유도할 수 있음을 의미한다.

[0067]

실험결과 2. ROS 생성 시 NADPH 산화효소와 미토콘드리아의 시너지 효과

[0068]

염증조절복합체를 활성화시키는 ROS의 2가지 가능한 원인은 이미 공지되어 있다. 하나는 포식실패(frustrated phagocytosis)로 촉발되는, NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 산화효소의 활성화에 기인한 것일 수 있다 (Dostert C, et al. 2008 *Science* 320: 674-677). 다른 하나는 ROS의 주요한 세포내 근원인, 미토콘드리아에 기인한 것일 수 있다 (Zhou R, et al. 2011 *Nature* 469: 221-225). 최근 연구는 NADPH 산화효소와 미토콘드리아 사이에서 크로스토크(cross-talk)의 존재를 밝혀내었다 (Desouki MM, et al. 2005 *Cancer Biology & Therapy* 4: 1367-1373). GECs에서, ATP는 시토졸 ROS 및 mROS 생성 둘 다를 유도한다는 것이 밝혀졌다 (Choi CH et al. *Cellular microbiology*, 2013, 15(6), 961-976). ATP에 의해 ROS를 유도하는 NADPH 산화효소가 GECs에서 mROS 생성을 조절할 수 있는지를 증명하기 위해, 본 발명자들은 카스파제-1 활성화를 차단하는 것으로 이미 알려져 있는 (Cassel SL, et al. 2008 *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9035-9040), DPI(diphenyleneiodonium chloride)로 NADPH 산화효소를 저해한 후 ATP-유도된 mROS 생성을 측정하였다. 도 2의 A와 B에 나타난 바와 같이, DPI는 DCF로 검출된 것처럼, ATP-촉발된 시토졸의 ROS 생성을 강력하게 약화시켰으며, 이는 ATP 처리가 NADPH 산화효소를 통해 ROS를 유도함을 증명하는 것이다. 또한 NADPH 산화효소가 ATP-유도된 mROS 생성을 조절할 수 있는지를 시험하기 위해, MitoSOX를 이용하여 미토콘드리아에서 초과산화물(superoxide)을 검출하였다. 형광 현미경사진의 정량적 분석은, 이전 결과와 일치하게 (Choi CH, et al. 2012 *Cellular Microbiology* 15: 961976), ATP 처리가 mROS 생성을 촉발함을 입증하였다. mROS의 증가는 DPI에 의해 부분적으로 저해될 수 있으며, 이는 NADPH 산화효소가 mROS 생성에서 중요한 역할을 함을 시사한다 (도 2의 A와 B). 종합하면, 이러한 결과는 ATP-유도된 NADPH 활성화가 GECs에서 mROS 생성을 상승적으로 촉진할 수 있음을 의미한다.

[0069]

실험결과 3. ATP-유도된 ROS 생성에 관련되어 있는 퓨린 수용체들

[0070] 세포의 ATP는 대식세포와 뉴런에서 포어-형성하는 헤미-채널(hemi-channel), 파넥신-1과 관련되어 있는, ATP-개폐된 P2X₇ 이온 채널의 라이게이션(ligation)을 통해 ROS 생성을 유도하는 것으로 보고되어 있다 (Silverman WR, et al. 2009 *The Journal of biological chemistry* 284: 18143-18151). GEC에서 ATP-유도된 ROS 생성이 P2X₇을 통해 일어나는지를 조사하기 위해, HIGK 세포에서 퓨린수용체의 유전자 발현 수준을 측정하였다. 본 발명자의 일차 GEC에 관한 이전 연구와 일치하여 (Yilmaz O, et al. 2008 *Cellular microbiology* 10: 863-875), HIGK 세포는 P2X₇을 통해 P2X₄을 발현한다. 또한, HIGK 세포는 파넥신-1을 발현한다 (도 3의 A).

[0071] 다음으로, HIGK 세포에서 P2X- 및 파넥신-1-의존성 반응은 형광현미경으로 측정하였다 (도 3의 B). 이전 결과와 일치하게, 3 mM ATP는 높은 수준으로 ROS 생성을 자극하였고, 이는 ATP가 P2X₇ 라이게이션을 통해 ROS 생성을 매개함을 시사한다 (도 3의 B와 C). P2X₇의 역할은 ATP-유도된 ROS 생성이 P2X₇ 및 파넥신-1 길항제(antagonists)로서 각각 oxATP와 프로베네시드로 전처리에 의해 저해됨을 보여줌으로써 추가적으로 확인되었다 (도 3의 D). 더욱이, 도 3E에 도시된 바와 같이, 선택적인 P2X₇ 길항제인 PPADS로 처리는 ATP-유도된 ROS 생성을 현저하게 차단하였다. 이러한 결과는 P2X₇이 GEC에서 ATP-유도된 ROS 생성에 관련될 수 있음을 시사한다.

[0072] 예상외로, 100 μM ATP로 처리 또한 ROS 생성을 유도해내긴 하지만, 3 mM ATP로 처리한 것 보다는 더 낮은 정도였다 (도 3의 A와 B). P2X₄는 ATP 자극에 대해 P2X₇ 보다 낮은 농도에서, 높은 친화도 반응(affinity responses)을 매개하는 것으로 여겨진다 (Negulyaev YA, et al. 2000 *Neuroscience letters* 279: 165-168). 따라서 이러한 결과는 P2X₄가 ATP-매개된 ROS 생성에 관련되어 있을 수 있음을 시사한다. 이러한 가능성을 시험하기 위해, 강력한 P2X₄ 길항제인 5-BDBD로 세포를 전처리하였다. 도 3의 E에 나타나 바와 같이, 5-BDBD로 전처리하는 ATP-유도된 ROS 생성을 현저하게 차단하였다. 종합하면, 이러한 결과들은 ATP가 GEC에서 P2X₄와 P2X₇ 라이게이션을 통해 ROS 생성을 이끌어낼 수 있음을 의미한다.

[0073] 실험결과 4. ATP-매개된 ROS 생성에서 P2X₇, P2X₄ 및 파넥신-1의 RNA 간섭을 이용한 기능 확인

[0074] 저해제 시험으로 P2X₄가 ATP-유도된 ROS 생성에 관련되어 있음이 제시되었기 때문에, 본 발명자들은 특이적인 shRNA의 렌티바이러스 전달에 의해 안정적으로 P2X₇, P2X₄ 및 파넥신-1을 결핍시킴으로써 이러한 예상외의 결과를 검증하였다. RNA 간섭(RNA interference)에 의한 퓨린수용체의 특이적인 결핍이 공지되어 있으므로 (2012 *J Exp Med* 208:1823-1834), 각 세포주에서 특이적인 결핍 효율은 qPCR로 개별적으로 검증하였다. 도 4A에 나타난 바와 같이, P2X₇, P2X₄ 및 파넥신-1의 mRNA 수준은 대조군 shRNA 바이러스 입자로 형질도입된 세포와 비교하여 적어도 70%까지 감소하였다. 결핍은 특이적이어서, P2X₄ 결핍은 P2X₇ 발현에 영향을 미치지 않았고, 반대로 P2X₇ 결핍도 P2X₄ 발현에 영향을 주지 않았다 (데이터 미도시). 도 3과 일치하게, P2X₇ 또는 파넥신-1의 결핍은 대조군 shRNA로 형질도입된 GEC와 비교하여 ATP 자극 후 ROS 생성의 약화를 초래하였다. RNA 간섭에 의한 P2X₄의 결핍이 P2X₇ 보다 덜 효율적이긴 하지만, P2X₄의 결핍은 ATP-매개된 ROS 생성에서 유의한 감소를 유도하였다 (도 4의 B와 C). 종합하면, 이러한 결과는 P2X₄와 P2X₇ 모두 GEC의 ATP 처리 후 ROS 생성에 기여함을 의미한다.

[0075]

[0076] 실험결과 5. P2X₄/P2X₇/파넥신-1 복합체에 의한 ATP 라이게이션은 GEC에서 염증조절복합체 활성화를 유도한다.

[0077] 이전에 GEC의 ATP 처리가 NLRP3 염증조절복합체 활성화를 유도하는 것이 알려져 있다 (Yilmaz O, et al. 2010 *Cellular microbiology* 12: 188-198). ROS 생성이 염증조절복합체 및 카스파제(caspase)-1 활성화와 관련되어 있기 때문에 (Zhou R, et al. 2011 *Nature* 469: 221-225), 본 발명은 GEC에서 ATP-매개된 카스파제-1 활성화를 P2X₄/P2X₇ 라이게이션을 통해 일어나는지를 평가하였다. ELISA를 이용하여 활성화된 카스파제-1의 분비를 측정하기 위해, 100 μM ATP로 GEC 처리가 ROS 생성을 유도하지만, 카스파제-1 활성화에 충분치 않음을 관찰하였다. 반대로, 3 mM ATP 처리는 대조군 shRNA를 안정적으로 발현하는 GEC에서 높은 수준으로 카스파제-1 활성화를 유도하였다; 그러나 3 mM ATP 처리에 의한 카스파제-1의 활성화는 GEC에서 P2X₄ 또는 P2X₇ 둘 중 하나가 결핍된 경우 차단되었다 (도 5의 A). 따라서 3 mM ATP로 처리는 P2X₄/P2X₇ 복합체를 통해 ROS 생성을 유도하고 NLRP3

염증조절복합체를 활성화 시켰다. 그러나 100 μ M ATP 자극은 P2X₄ 라이게이션을 통해 ROS 생성을 유도하지만 이러한 농도의 ATP로 자극은 염증조절복합체를 활성화시키는데 충분치 않았다.

[0078] ATP-유도된 ROS 생성에서 P2X₄와 P2X₇의 비다중성 역할(non-redundant roles)로부터 본 발명자들은 P2X₄와 P2X₇이 막에 관련되어 있고 GEC에서 ATP-매개된 반응의 물리적 복합체로서 기능할 수 있다는 가정을 하였다. 따라서 공동-면역침전 실험을 수행함으로써 GEC에서 P2X₄와 P2X₇ 사이의 물리적 관련성을 조사하였다. 항-P2X₄ 항체를 이용하여 내인성 P2X₄를 침전시킨 후, 면역침전에서 P2X₇ 및 파넥신-1이 검출됨을 확인하였다 (도 5의 B). 종합하면, 이러한 데이터는 P2X₄, P2X₇ 및 파넥신-1이 GEC에서 이형복합체(heterocomplex)를 형성하고, ATP-유도된 ROS 생성에서 비다중성 역할(non-redundant roles)을 함을 시사한다.

[0079] **실험결과 6. P2X₄/P2X₇/파넥신-1의 ATP 라이게이션은 *P. gingivalis*로 감염된 일차 GEC에서 전염증성 사이토카인 분비의 원인이 된다.**

[0080] 이전에 *P. gingivalis*로 GEC의 감염이 pro-IL-1 β 의 발현 및 감염된 세포 내에 그 축적을 유도함이 보고되어 있다. 그러나 IL-1 β 의 분비가 위험 신호인 ATP와 같은 이차 시그널을 필요로 하고, NLRP3 염증조절복합체 및 카스파제-1을 활성화시키기 위해서는, 성숙한 IL-1 β 가 프로세싱되고 분비되어야 한다 (Yilmaz O, et al. 2010 *Cellular microbiology* 12: 188-198).

[0081] P2X₄가 불멸화된 HIGK 세포에서 ATP-의존적 카스파제-1 활성화를 조절할 수 있다는 예상외의 결과에 따라, 본 발명자들은 유사한 효과가 *P. gingivalis*로 감염 시 불멸화된 (HIGK) 세포 및 일차 GEC에서 관찰될 수 있는지를 조사하였다. 앞선 연구에서와 같이, *P. gingivalis* 단독 감염 또는 100 μ M ATP 처리와 병행한 감염 모두 HIGK 세포에 의한 IL-1 β 를 유도할 수 없었다. 다른 뉴클레오티드가 아닌, 3 mM ATP로 처리된 감염된 세포만 IL-1 β 분비를 촉진시킬 수 있었다 (도 6의 A). 유사하게, 일차 GEC를 이용한 경우, 다른 뉴클레오티드가 아닌, ATP가 감염된 세포에 의한 IL-1 β 의 분비를 촉진시킬 수 있음을 확인하였다 (도 6의 C). 또한 일차 GEC가 HIGK 세포보다 더 높은 수준의 IL-1 β 를 생성하고 분비함을 일관되게 관찰되었다 (도 6).

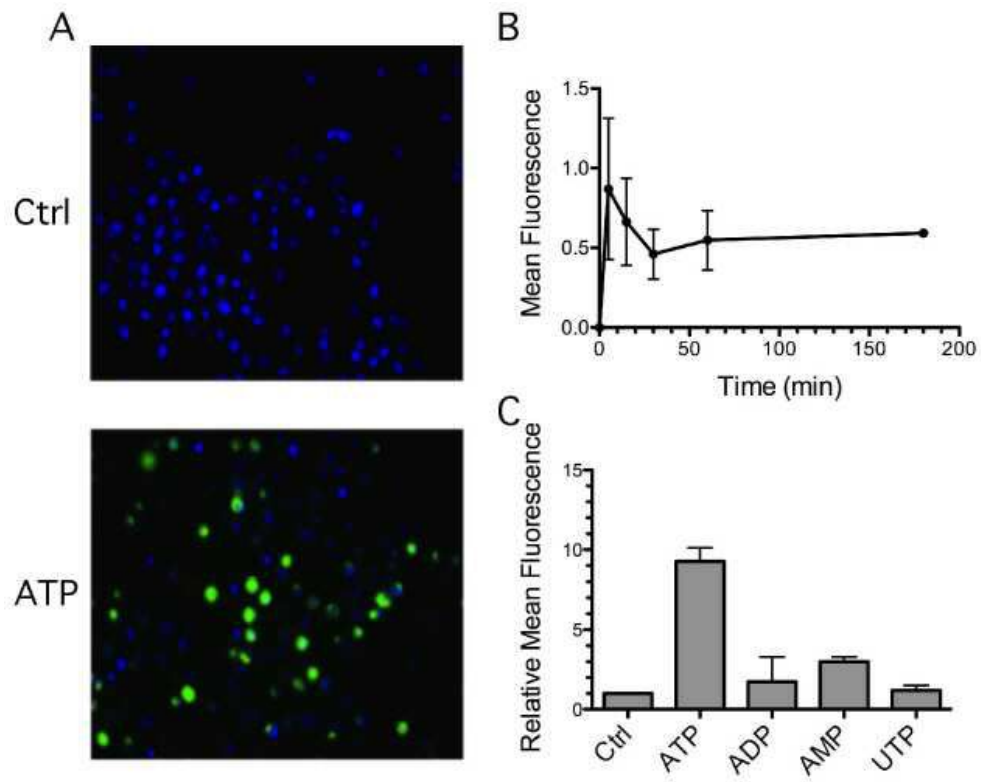
[0082] 또한, P2X₇ 길항제인 PPADS 및 oxATP로 감염된 HIGK 또는 일차 GEC의 전처리는 ATP 의존적 IL-1 β 분비를 차단하였다. 뿐만 아니라, 파넥신-1 저해제인 프로베네시드 또한 IL-1 β 분비를 차단하였다. 마지막으로, 5-BDBD에 의한 P2X₄의 저해는, 상기 세포들이 P2X₇을 통해 시그널링을 자극하는 3 mM ATP로 처리되었음에도, IL-1 β 분비량을 감소시켰다 (도 6의 B와 D).

[0083] IL-1 β 에서 P2X₄와 P2X₇에 대한 역할을 확증하기 위해, siRNA를 이용하여 일차 GEC에서 개별적으로 P2X₄와 P2X₇을 결핍시켰다 (siRNA 처리는 일차 GEC에서 RNA 간섭을 위한 shRNA 전달 보다 더 효과적이다). 도 6의 E는 P2X₄ 또는 P2X₇ mRNA 수준이 일차 GEC에서 80% 이상의 효율로 결핍됨을 나타내었다. 이전의 결과와 유사하게 (Yilmaz O, et al. 2010 *Cellular microbiology* 12: 188-198), *P. gingivalis* 감염 후 3 mM ATP 처리는 대조군 siRNA로 처리되었던 일차 GEC에 의한 IL-1 β 분비를 유도하였다. 그러나 P2X₄ 또는 P2X₇의 결핍은 IL-1 β 분비를 현저하게 감소시켰으며, 이는 ATP-의존적 IL-1 β 분비에서 P2X₄ 및 P2X₇의 비다중성 역할을 재차 나타내었다. ATP 자극 전 프로베네시드 처리는 일차 GEC에 의한 IL-1 β 분비에서 파넥신-1의 역할과 일치하게, 심지어 P2X₄ 및 P2X₇ 녹다운 세포에서 IL-1 β 분비를 나타내었다. 이 모든 결과는 P2X₄/P2X₇/파넥신-1 복합체가 *P. gingivalis*-감염된 세포의 ATP 처리에 반응하여 IL-1 β 분비에 필요함을 의미한다.

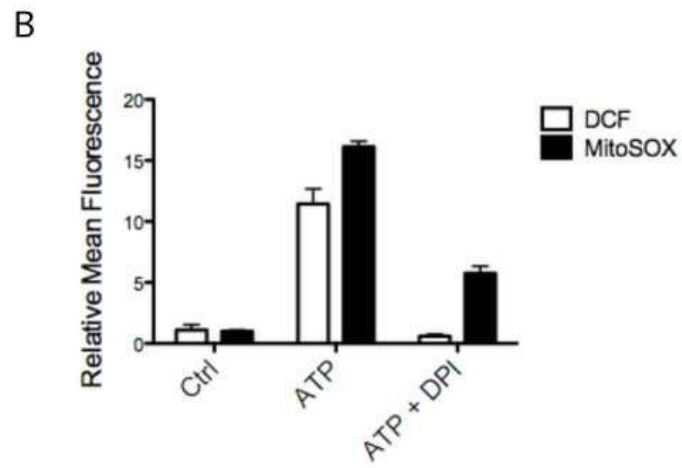
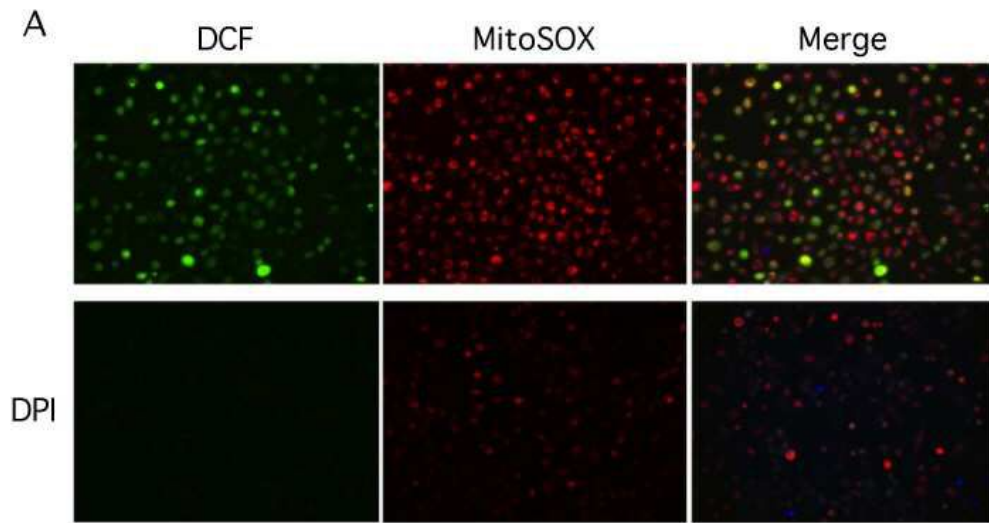
[0084] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

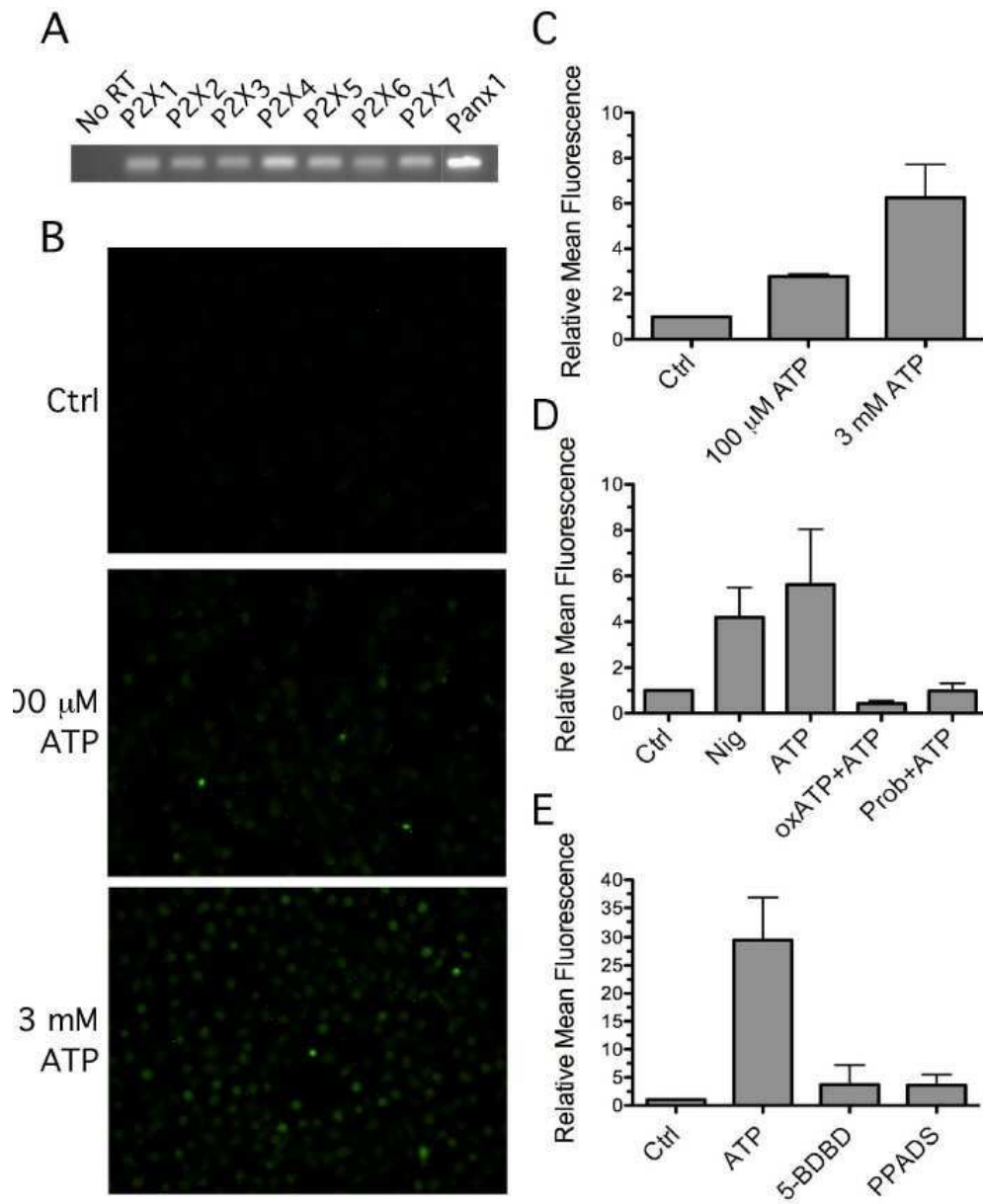
도면1



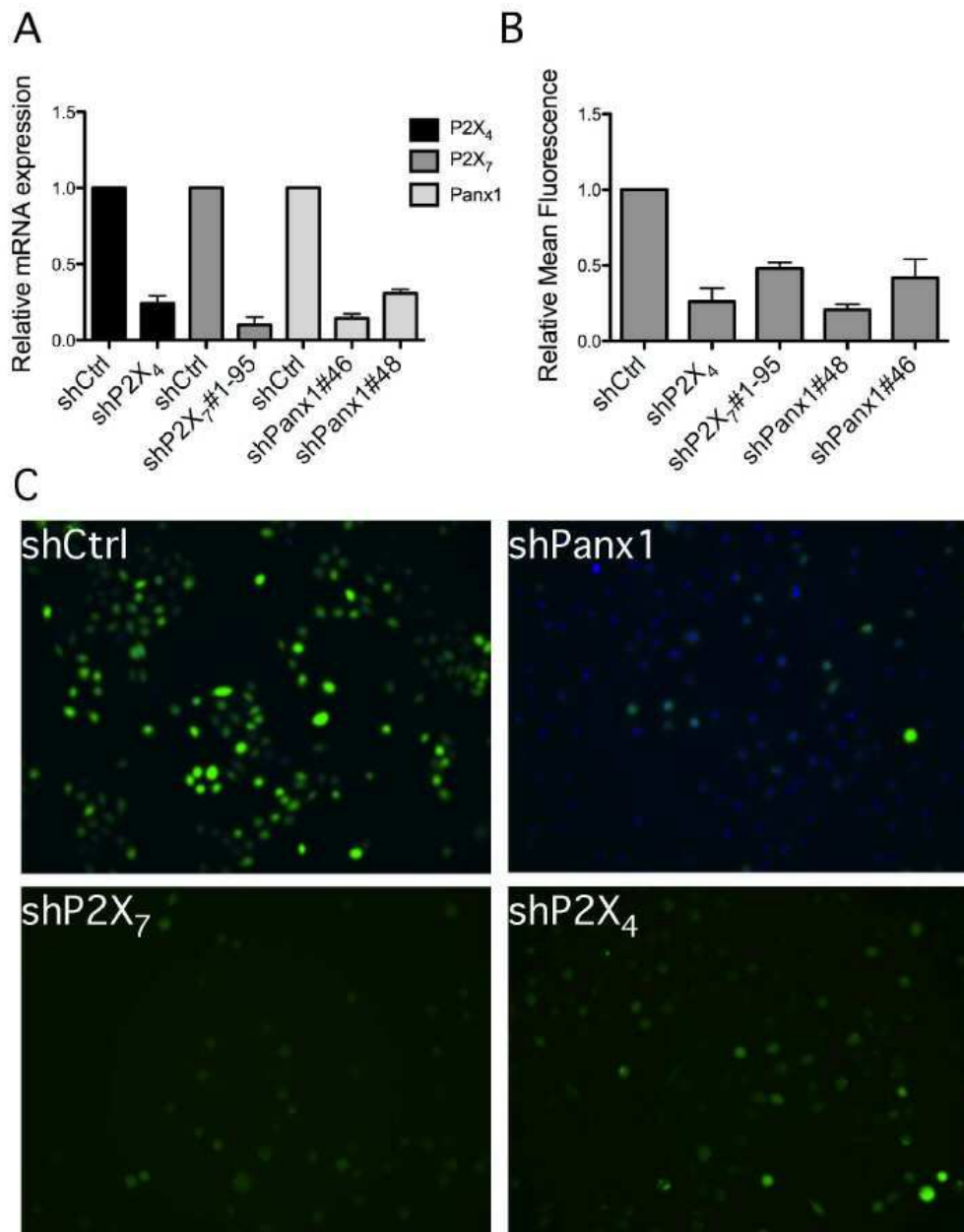
도면2



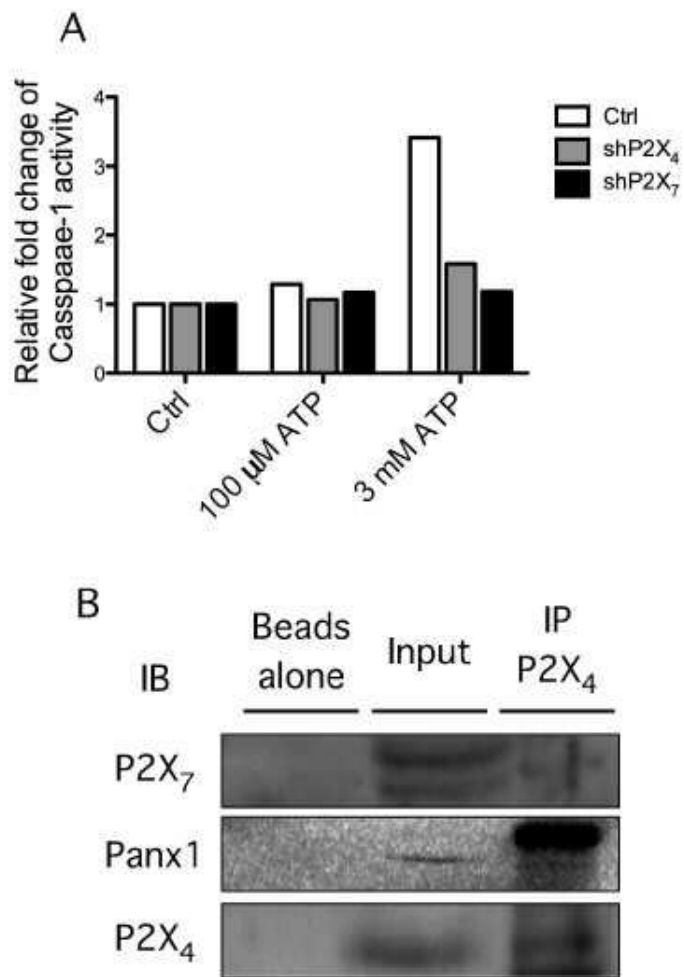
도면3



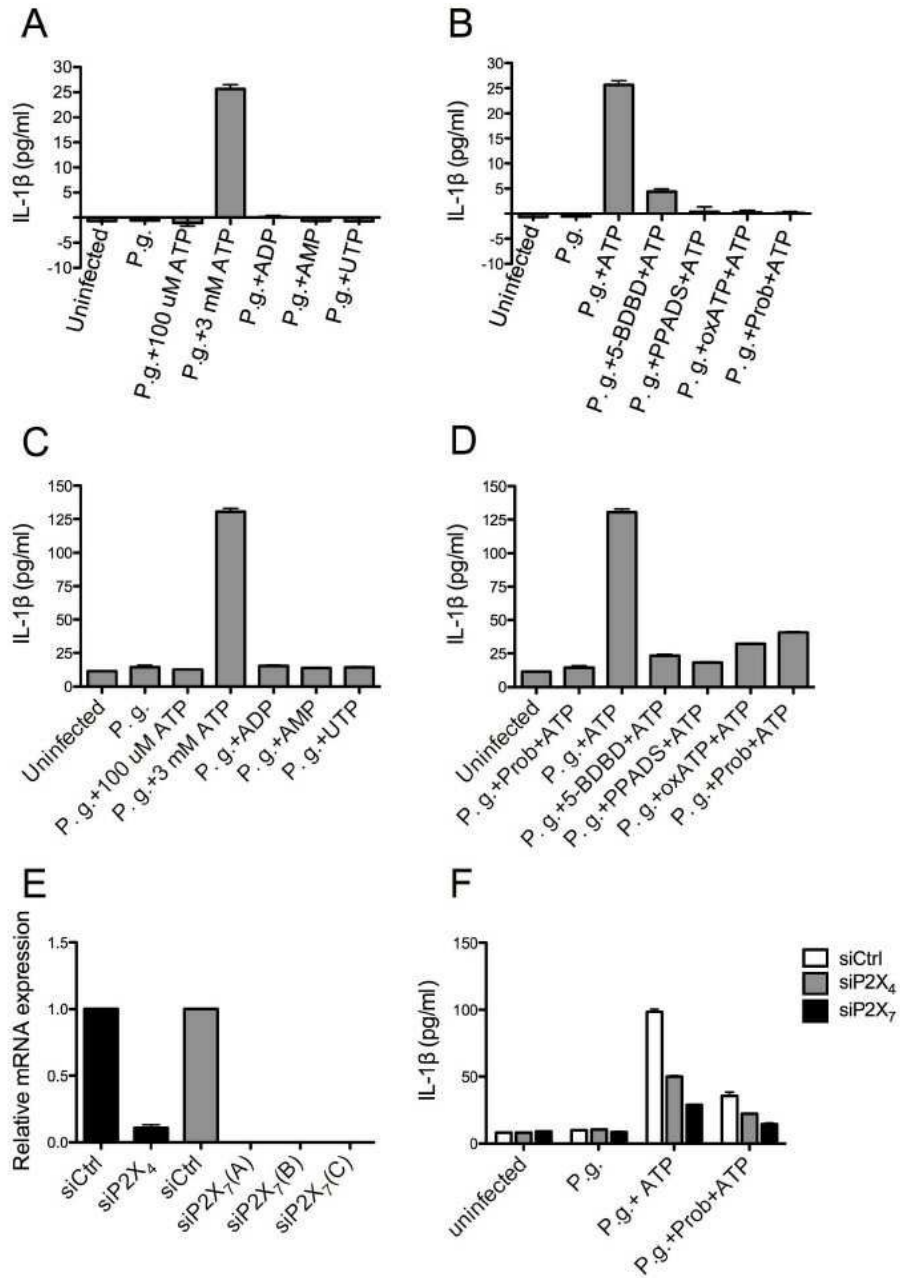
도면4



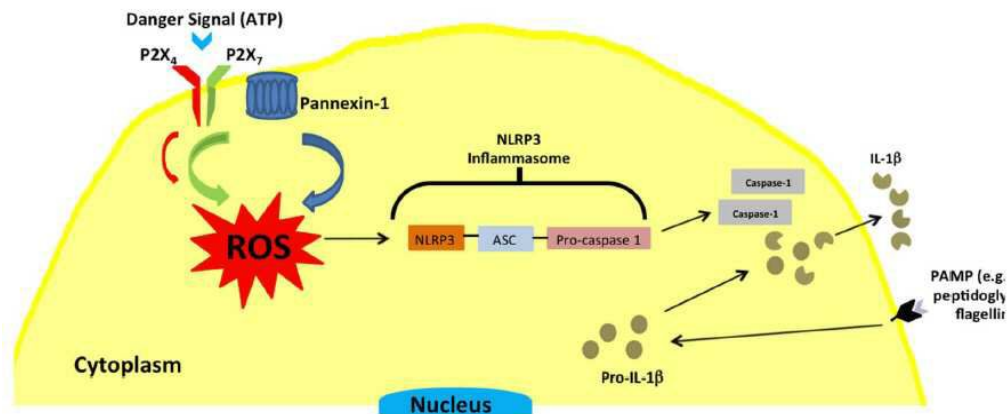
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Compositions for prevention or treatment of periodontal disease
comprising P2X₄ receptor inhibitors

<130> NP14-1160

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 388

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Ala Gly Cys Cys Ala Ala Leu Ala Ala Phe Leu Phe Glu Tyr Asp

1 5 10 15

Thr Pro Arg Ile Val Leu Ile Arg Ser Arg Lys Val Gly Leu Met Asn

20 25 30

Arg Ala Val Gln Leu Leu Ile Leu Ala Tyr Val Ile Gly Trp Val Phe

35 40 45

Val Trp Glu Lys Gly Tyr Gln Glu Thr Asp Ser Val Val Ser Ser Val

50 55 60

Thr Thr Lys Val Lys Gly Val Ala Val Thr Asn Thr Ser Lys Leu Gly

65 70 75 80

Phe Arg Ile Trp Asp Val Ala Asp Tyr Val Ile Pro Ala Gln Glu Glu

85	90	95
Asn Ser Leu Phe Val Met Thr Asn Val Ile Leu Thr Met Asn Gln Thr		
100	105	110
Gln Gly Leu Cys Pro Glu Ile Pro Asp Ala Thr Thr Val Cys Lys Ser		
115	120	125
Asp Ala Ser Cys Thr Ala Gly Ser Ala Gly Thr His Ser Asn Gly Val		
130	135	140
Ser Thr Gly Arg Cys Val Ala Phe Asn Gly Ser Val Lys Thr Cys Glu		
145	150	155
160		
Val Ala Ala Trp Cys Pro Val Glu Asp Asp Thr His Val Pro Gln Pro		
165	170	175
Ala Phe Leu Lys Ala Ala Glu Asn Phe Thr Leu Leu Val Lys Asn Asn		
180	185	190
Ile Trp Tyr Pro Lys Phe Asn Phe Ser Lys Arg Asn Ile Leu Pro Asn		
195	200	205
Ile Thr Thr Thr Tyr Leu Lys Ser Cys Ile Tyr Asp Ala Lys Thr Asp		
210	215	220
Pro Phe Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Lys Ile Val Glu Asn Ala Gly		
225	230	235
240		
His Ser Phe Gln Asp Met Ala Val Glu Gly Gly Ile Met Gly Ile Gln		
245	250	255
Val Asn Trp Asp Cys Asn Leu Asp Arg Ala Ala Ser Leu Cys Leu Pro		
260	265	270
Arg Tyr Ser Phe Arg Arg Leu Asp Thr Arg Asp Val Glu His Asn Val		
275	280	285
Ser Pro Gly Tyr Asn Phe Arg Phe Ala Lys Tyr Tyr Arg Asp Leu Ala		
290	295	300
Gly Asn Glu Gln Arg Thr Leu Ile Lys Ala Tyr Gly Ile Arg Phe Asp		
305	310	315
320		
Ile Ile Val Phe Gly Lys Ala Gly Lys Phe Asp Ile Ile Pro Thr Met		
325	330	335

Ile Asn Ile Gly Ser Gly Leu Ala Leu Leu Gly Met Ala Thr Val Leu

340

345

350

Cys Asp Ile Ile Val Leu Tyr Cys Met Lys Lys Arg Leu Tyr Tyr Arg

355

360

365

Glu Lys Lys Tyr Lys Tyr Val Glu Asp Tyr Glu Gln Gly Leu Ala Ser

370

375

380

Glu Leu Asp Gln

385

<210> 2

<211> 1740

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 2

ccgcaaagtg ctgggatgac aggtgtgagc caccgcccc ggccccctcgc ccgccttttg 60
aaggagcctt tcgtcctcaa gggagaggcc actccccccc cgcgagttcc atgcccccta 120
gagggtcatc gttcccagc gggaggtggc gccctcccc gggccccggg ccccgaccgc 180
ccgtgctgcc tccttcggg ccatcatccg cgatgacggc gccgccagca ggccaggcgg 240
actgggcggg gctccgagcg gggactggga cccagaccga ctaggggact gggagcgggc 300
ggcgcgccca tggcgggctg ctgcgccgcg ctggcggcct tcctgttcga gtacgacacg 360

ccgcgcatcg tgctcatccg cagccgcaaa gtggggctca tgaaccgcgc cgtgcaactg 420
ctcatcctgg cctacgtcat cgggtgggtg tttgtgtggg aaaagggcta ccaggaaact 480
gactccgtgg tcagctccgt tacgaccaag gtcaaggcgc tggctgtgac caacacttct 540
aaacttggat tccgcatctg ggatgtggcg gattatgtga taccagctca ggaggaaaac 600
tcctcttcg tcatgaccaa cgtgacctc accatgaacc agacacaggg cctgtgcccc 660
gagattccag atgcgaccac tgtgtgtaaa tcagatgcc a gctgtactgc cggtctgcc 720
ggcaccaca gcaacggagt ctcaacaggc aggtgcgtag ctttcaacgg gtctgtcaag 780

acgtgtgarg tggcggcctg gtgcccggtg gaggatgaca cacacgtgcc acaacctgct 840
tttttaaagg ctgcagaaaa cttcactctt ttggttaaga acaacatctg gtatcccaaa 900
tttaatttca gcaagaggaa tacccttccc aacatcacca ctacttacct caagtcgtgc 960
atttatgatg ctaaaacaga tccttctgc cccatattcc gtcttggcaa aatagtggag 1020
aacgcaggac acagtttcca ggacatggcc gtggaggag gcatcatggg catccaggtc 1080
aactgggact gcaacctgga cagagccgcc tcctctgct tgeccaggta ctcttccgc 1140

cgcttcgata cacgggacgt tgagcacaac gtatctcttg gctacaattt caggtttgcc	1200
aagtactaca gagacctggc tggcaacgag cagcgcacgc tcatcaaggc ctatggcatc	1260
cgcttcgaca tcatttgttt tgggaaggca gggaaatttg acatcatccc cactatgac	1320
aacatcggt ctggcctggc actgctaggc atggcgaccg tgctgtgtga catcatagtc	1380
ctctactgca tgaagaaaag actctactat cgggagaaga aatataaata tgtggaagat	1440
tacgagcagg gtcttgctag tgagctggac cagtgaggcc tacccacac ctgggtcttc	1500
cacagcccca tcaaagaaca gagaggagga ggaggagaa atggccacca catcaccca	1560
gagaaatttc tggaatctga ttgagtctcc actccacaag cactcagggt tccccagcag	1620
ctctgtgtg ttgtgtgcag gatctgtttg cccactcggc ccaggaggtc agcagtctgt	1680
tcttggtgg gtcaactctg cttttccgc aacctgggtg tgcggggga gcgtggccc	1740
	1740