



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0125837
(43) 공개일자 2009년12월07일

(51) Int. Cl.

A61K 31/41 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7022222

(22) 출원일자 2008년03월24일

심사청구일자 2009년10월23일

(85) 번역문제출일자 2009년10월23일

(86) 국제출원번호 PCT/KR2008/001650

(87) 국제공개번호 WO 2008/117971

국제공개일자 2008년10월02일

(30) 우선권주장

60/896,501 2007년03월23일 미국(US)

60/896,502 2007년03월23일 미국(US)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김재홍

경기도 고양시 일산동구 마두동 배마마을 극동삼환 아파트 211-102

조경진

부산광역시 연제구 연산6동 2125-8 4/3 상장빌라 302호

유민혁

서울특별시 성북구 안암동 5-1 고려대학교 생명과학대학

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 25 항

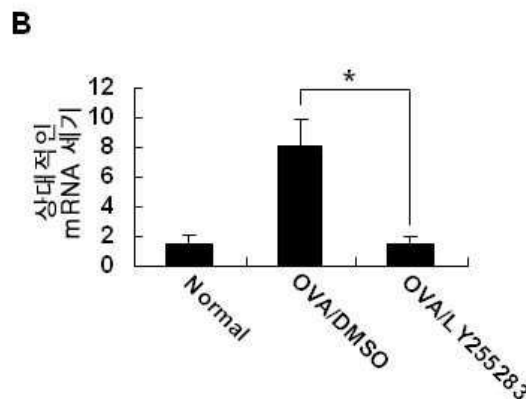
(54) 천식 치료를 위한 류코트리엔 B4 수용체 BLT2의 저해제의 용도

(57) 요약

본 발명은 천식 치료용 류코트리엔 B4 수용체 BLT2의 저해제의 신규한 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 BLT2 저해제를 포함하는 천식 치료용 약학적 조성물 및 BLT2 저해제를 이용한 천식 치료방법에 관한 것이다.

본 발명자들은 류린 모델을 이용하여 천식의 병인에서 BLT2의 역할을 조사하고 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은, BLT2 저해제를 사용함으로써 BLT2가 AHR 및 기도 염증의 발달에 결정적인 역할을 함을 증명하였다. 따라서, 본 발명에 따른 BLT2 저해제는 천식 치료를 위한 치료학적 조성물로서 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2b



특허청구의 범위

청구항 1

천식 치료용 약제의 제조를 위한 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질의 용도.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 물질은 BLT2와 결합하여 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하는 화합물인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 화합물은 LY255283 (1-[5-ethyl-2-hydroxy-4-[[6-methyl-6-(1H-tetrazol-5-yl)heptyl]oxy]phenyl]-ethanone)인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 물질은 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하는 BLT2에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 물질은 BLT2의 발현을 저해하는 안티센스 또는 siRNA 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 서열번호 6의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 siRNA 올리고뉴클레오티드는 서열번호 7의 센스 서열 및 서열번호 8의 안티센스 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 물질은 BLT2의 상류(upstream) 또는 하류(downstream) 신호전달 경로를 저해하는 화합물인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 천식은 BLT2 단백질이 기관지(lung airway)에서 과-발현되는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 BLT2 활성화는 ROS 생성의 증가 후 NF- κ B 활성화에 의해 천식 증상(asthmatic symptom)을 일으키는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 천식의 치료는 기관지에 호산구 침윤(eosinophil infiltration), 기도 염증(airway inflammation) 및 기도 과반응성(airway hyperresponsiveness, AHR)을 감소시킴으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 12

천식 치료용 약제의 제조를 위한 (a) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질과, (b) 다른 항-천식 약품과의 혼합물의 용도.

청구항 13

천식 치료용 약제의 제조를 위한 Rac의 발현 또는 활성을 저해하는 물질의 용도.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 물질은 Rac의 발현을 저해하는 안티센스 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 용도.

청구항 15

활성성분으로서 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질을 포함하는 천식 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

활성성분으로서 Rac의 발현 또는 활성을 저해하는 물질을 포함하는 천식 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질의 치료학적으로 유효한 양을 천식 환자에 투여하는 것을 포함하는 천식 환자의 치료 방법.

청구항 18

Rac의 발현 또는 활성을 저해하는 물질의 치료학적으로 유효한 양을 천식 환자에 투여하는 것을 포함하는 천식 환자의 치료 방법.

청구항 19

하기 단계들을 포함하는 천식 치료용 물질의 스크리닝 방법:

- (a) BLT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석될 상기 물질을 접촉시키는 단계; 및
- (b) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달 수준을 측정하는 단계로서, 상기 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달 수준이 하향-조절될 때, 상기 물질은 천식의 치료 효능을 갖는 것으로 결정하는 단계.

청구항 20

하기 단계들을 포함하는 천식 치료용 물질의 스크리닝 방법:

- (a) Rac 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석될 상기 물질을 접촉시키는 단계; 및
- (b) Rac의 발현 또는 세포내 신호전달 수준을 측정하는 단계로서, 상기 Rac의 발현 또는 활성 수준이 하향-조절될 때, 상기 물질은 천식의 치료 효능을 갖는 것으로 결정하는 단계.

청구항 21

BLT2 유전자의 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 천식 검출용 키트.

청구항 22

제 21항에 있어서, 상기 키트는 서열번호 2 및 3의 염기서열을 갖는 프라이머 쌍을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 23

BLT2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 천식 검출용 키트.

청구항 24

Rac 유전자에 상보적인 염기서열을 갖는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 천식 검출용 키트.

청구항 25

Rac 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 천식 검출용 키트.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 천식 치료를 위한 류코트리엔 B4 수용체(leukotriene B4 receptor) BLT2의 저해제의 신규한 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 BLT2 저해제를 포함하는 천식 치료용 약학적 조성물 및 BLT2 저해제를 이용한 천식 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 류코트리엔 B4(Leukotriene B4, LTB4)는 염증 과정, 면역 반응, 및 감염에 대한 숙주 방어의 주요 매개인자이다 (1-4). 이는 주화성(chemotaxis), 탈과립(degranulation), 리소좀 효소(lysosomal enzymes)의 방출, 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생산을 자극한다 (5-7). 사실상, LTB4는 공지된 가장 강력한 화학유인물질(chemoattractant) 중 하나로서, 주로 과립구(granulocytes) 및 단핵구(monocytes)에 작용한다 (8, 9). 최근에는, 작동자(effector)인 CD4+ 및 CD8+ T 림프구에 대한 화학유인물질인 것으로도 밝혀졌다 (10-15). 또한 혈관내피세포에 세포부착, 및 이동(transmigration)을 촉진하여(8, 16), 염증 초기 반응을 확대한다. LTB4-유도된 백혈구 보충(leukocyte recruitment)이 다양한 병원체에 대한 숙주 방어에서 보호 기능을 하는 것으로 생각되기는 하지만, 천식과 같은 다수의 인간 염증 질환(17-20), 호산구 침윤(eosinophilic infiltration)으로 일어나는 만성 기도 염증의 질환, 점액 과다분비(mucus hypersecretion), 및 기도 과반응성(airway hyperresponsiveness, AHR)에도 관련되어 있다. 따라서 LTB4의 현저히 증가된 수준은 천식을 가진 환자의 기도 및 천식의 실험 모델에서도 발견된다 (20).
- <3> LTB4는 BLT1 및 BLT2로 알려진 특이적 G 단백질-연결 수용체들(G protein-coupled receptors)을 통해 그 생물학적 효과를 나타낸다 (21-24). 현재까지, LTB4 수용체들에 대한 대부분의 연구는 오로지 백혈구에서만 발견되는, 고-친화성 LTB4 수용체, BLT1, 특히 염증반응에서 그것의 역할에 초점이 맞춰져 왔다 (22). 예를 들어, 알레르겐 흡입에 반응하여 기도 안에서 호중구(neutrophils) 및 호산구(eosinophils)의 초기 보충은 BLT1-결합 마우스에서 감소되는데(8, 25), 이는 알레르기성 천식에 있어서 과립구(granulocytes)의 주화성에 대한 BLT1의 역할을 나타낸다. 또한, BLT1은 기관지에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 알레르겐-매개 초기 보충 및 특정 실험 조건하에서 알레르겐-유도 AHR 및 염증의 발달에 필수적이다 (26, 27). BLT1과는 대조적으로, BLT2는 LTB4에 대하여 낮은 친화력으로 폭넓고 다양한 조직들에서 발견되며, 비장(spleen), 백혈구 및 난소(ovary)에서 가장 높은 수준을 나타낸다 (23).
- <4> 본 발명에서, 본 발명자들은 무린 모델(murine model)을 이용하여 천식의 병인(pathogenesis)에서 BLT2의 역할을 조사하였다. 본 발명자들은, 내생적(endogenous) BLT2 발현을 차단하기 위해 안티센스를 사용함으로써, BLT2가 AHR 및 기도 감염의 발달에 결정적인 역할을 함을 증명하였다. 또한, 본 발명자들은 BLT2가 ROS 생성의 증가 후 NF- κ B 활성화에 의해 천식 증상을 일으킨다는 증거를 제시하였다. 더욱이, 임상 천식 샘플의 면역조직화학적 분석은 주로 기도 상피층(epithelial layers) 뿐만 아니라 미세혈관 내피세포(microvascular endothelium)에서도 BLT2 발현의 현저한 증가를 나타내었으며, 이는 천식 무린 모델에서 관찰된 패턴과 유사하였다.
- <5> 본 출원서 전반에 걸쳐, 몇몇 특허 및 공개특허는 참조로서 삽입되어 인용된다. 이러한 특허 및 공개특허의 상세한 설명은 본 출원서에 편입되어 본 발명 및 본 발명이 속하는 기술분야의 수준을 더욱 충분히 설명한다.
- ### 발명의 상세한 설명
- <6> 본 발명의 목적은 천식 치료용 약제의 제조를 위한 BLT2 저해제의 신규한 용도를 제공하는 것이다.
- <7> 또한, 본 발명의 다른 목적은 활성성분으로서 BLT2 저해제를 포함하는 천식 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- <8> 또한, 본 발명의 다른 목적은 환자에 BLT2 저해제를 투여하는 것을 포함하는, 천식 환자의 치료방법을 제공하는 것이다.
- <9> 또한, 본 발명은 BLT2의 발현 또는 신호전달 수준을 감소시키는지를 결정하는 것을 포함하는, 천식 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

- <10> 또한, 본 발명의 다른 목적은 BLT2 유전자를 검출하기 위한 프라이머 또는 프로브 또는 BLT2 단백질을 검출하기 위한 항체를 포함하는, 천식 검출용 키트를 제공하는 것이다.
- <11> 또한, 본 발명의 다른 목적은 천식 치료용 약제의 제조를 위한 Rac 저해제의 신규한 용도를 제공하는 것이다.
- <12> 본 발명의 또 다른 목적 및 이점은 첨부된 특허청구범위 및 도면과 함께 상세한 설명으로부터 명확해질 것이다.
- <13> BLT2는 5-리폭시지나아제 경로(5-lipoxygenase pathway)를 통해 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 생성되는 염증의 강력한 지질 매개인자인, 류코트리엔 B4(leukotriene B4, LTB4)에 대한 저-친화성 수용체이다. LTB4에 대한 고-친화성 수용체인 BLT1과 달리, BLT2에 대한 생리학적 기능, 특히 천식의 병인과 관련하여서는 아직 알려지지 않았다. 본 발명자들은 알레르기성 천식의 무린 모델을 이용하여 난백알부민(ovalbumin)-유도성 기도염증 및 기도 과반응성(airway hyperresponsiveness, AHR)에서 BLT2의 역할을 평가하였다. 기관지에서 BLT2 mRNA 및 그 리간드 LTB4의 수준은 OVA 항원노출(OVA challenge) 후 매우 증가되었고, 안티센스 BLT2 올리고뉴클레오타이드를 이용한 BLT2의 감소조절은 기도염증 및 AHR을 두드러지게 약화시켰으므로, 천식 반응에서 BLT2의 역할을 보여준다. BLT2의 하류 매개인자들을 동정하는 것을 목적으로 하는 추가적 분석은 BLT2 활성화가 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 증가 후 NF- κ B 활성화를 초래함으로써, 기관지에서 호산구 침윤(eosinophil infiltration)과 관련이 있는 것으로 알려진 VCAM-1의 발현을 유도한다는 것을 나타내었다. 본 발명은 BLT2가 'ROS-NF- κ B' -관련 신호전달 경로에 작용하여, 천식의 병인에 중추적 역할을 함을 나타낸다. 끝으로, 임상 환자의 면역조직화학적 분석은 BLT2 발현이, 천식의 무린 모델에서와 같이, 기도 상피층 뿐만 아니라 미세혈관 내피세포에서 높게 나타남을 증명하였다.
- <14> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 천식 치료용 약제의 제조를 위한 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질의 용도를 제공한다. 본 출원서에서, 상기 용어 "BLT2의 발현을 저해한다"는 BLT2의 전사, mRNA 프로세싱, 번역, 전좌(translocation), 및 성숙(maturation) 중 어느 단계를 저해하는 것을 의미하고, 상기 용어 "BLT2의 세포내 신호전달을 저해한다"는 천식을 유도하기 위한 BLT2에 LTB4의 결합, BLT2의 활성화 및 그것의 세포내 신호전달 경로 중 어느 단계를 저해하는 것을 의미한다.
- <15> 인간 BLT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 NCBI(NM_019839)에서 이용가능하고 본 출원서에 서열번호 1로 표시되어 있다. BLT2는 2 종류의 CDS 형태, 장형 CDS(1618-2787) 및 단형 CDS(1711-2787)를 갖는데, 이들 염기 서열은 서열번호 2 및 서열번호 4로 표시되어 있다. 장형 BLT2 단백질의 아미노산 서열은 NCBI(NM_019839)에서 이용가능하고 서열번호 3으로 표시되어 있다. 단형 BLT2 단백질의 아미노산 서열은 NCBI(AB029892)에서 이용가능하고 서열번호 5로 표시되어 있다.
- <16> 바람직한 구현예에서, 상기 물질은 BLT2에 결합하여 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하는 화합물일 수 있다. 상기 화합물은 BLT2 길항제(antagonist)라고 불리기도 하는데, 이는 BLT2에 대한 LTB4의 작용을 상쇄하는 화합물을 의미한다. 상기 화합물은 상업적으로 이용가능한 화학 DB로부터 본 발명의 스크리닝 방법에 따라 스크리닝될 수 있다.
- <17> 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 LY255283 (1-[5-ethyl-2-hydroxy-4-[[6-methyl-6-(1H-tetrazol-5-yl)heptyl]oxy]phenyl]-ethanone)일 수 있다. 도 1a는 LY255283의 화학적 구조를 보여준다. LY255283은 BLT 수용체의 경쟁적인 길항제이다. LY255283은 10 μ M의 농도에서 80%까지 호산구 주화성(eosinophil chemotaxis)을 저해하고 260 nM의 IC50으로 호산구 막에 방사선 표지된 LTB4의 결합을 저해하는 것으로 알려져 있다 [Ann N Y Acad Sci 629 274-287 (1991)]. 또한, LY255283은 신규한 류코트리엔 B4 수용체 길항제로 알려져 있는데, 이는 폐지에서 호중구의 활성을 제한하여 내독소(endotoxin)에 의해 유도되는 급성 폐 손상(acute lung injury)을 방지한다 [Surgery. 1993 Aug;114(2):191-8]. 그러나, LY25583의 항-천식 활성은 본 발명자들에 의해 처음으로 밝혀졌다.
- <18> 바람직한 구현예에서, 상기 물질은 BLT2의 세포내 신호전달을 저해하는 BLT2에 대한 항체일 수 있다. 상기 항체는 LTB4와 경쟁적으로 BLT2에 결합하므로, BLT2의 세포내 신호전달을 저해할 수 있다. 상기 항체는 항원으로서 BLT2 또는 그 단편을 사용하여 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 생산하기 위한 전통적인 방법들에 따라 생산될 수 있다.
- <19> 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 BLT2의 발현을 저해하는 안티센스 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 안티센스 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2에서 설명하는 바와 같이 BLT2 mRNA의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열을 갖는다.

- <20> 본 명세서에 사용된 상기 용어, “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 타겟 mRNA의 염기서열에 상보적이고, 타겟 mRNA에 결합하여 단백질로의 번역을 방해하는, 핵산, 바람직하게는, DNA, RNA 또는 그 유도체(derivatives)를 의미하는 것으로 간주된다. 본 발명의 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 BLT2 mRNA의 번역, 전좌, 성숙 또는 다른 생물학적 기능을 저해할 수 있는, BLT2 mRNA에 상보적으로 결합하는 DNA 또는 RNA 서열을 의미한다. 상기 안티센스 핵산은 길이가 6-100, 바람직하게는 8-60, 더욱 바람직하게는, 10-40 뉴클레오타이드이다.
- <21> 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 더 높은 저해 효능을 위해 염기(base), 당(sugar) 또는 백본(backbone)에서 적어도 하나의 변형(modification)을 포함할 수 있다 (De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55(1995)). 상기 변형된 핵산 백본은 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 포스포트리에스터(phosphotriester), 메틸 포스포네이트(methyl phosphonate), 단사슬 알킬 또는 사이클로알킬 당 사이 결합(short chain alkyl or cycloalkyl intersugar linkages) 또는 단사슬 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 당 사이 결합(short chain heteroatomic or heterocyclic intersugar linkages)을 포함한다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 또한 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moieties)를 포함할 수 있다. 상기 안티센스 핵산은 하나 이상의 변형된 염기들, 예를 들어, 하이포크산틴(hypoxanthine), 6-메틸아데닌(methyladenine), 5-메틸피리미딘(methylpyrimidines)(특히, 5-메틸시토신(methylcytosine)), 5-히드록시메틸시토신(hydroxymethylcytosine, HMC), 글리코실 HMC(glycosyl HMC) 및 젠티오마이오실 HMC(gentobiosyl HMC), 뿐만 아니라 합성 뉴클레오베이스(synthetic nucleobases), 예컨대, 2-아미노아데닌(aminoadenine), 2-(메틸아미노)아데닌((methylamino)adenine), 2-(이미다졸릴알킬)아데닌((imidazolylalkyl)adenine), 2-(아미노알킬아미노)아데닌((aminoalkylamino)adenine) 또는 다른 헤테로치환된 알킬아데노신(other heterosubstituted alkyladenines), 2-티오우라실(thiouracil), 2-티오티민(thiothymine), 5-브로모우라실(bromouracil), 5-히드록시메틸우라실(hydroxymethyluracil), 8-아자구아닌(azaguanine), 7-디아자구아닌(deazaguanine), N⁶(6-아미노헥실)아데닌(N⁶(6-aminohexyl)adenine) 및 2,6-디아미노퓨린(diaminopurine)을 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드의 다른 변형은 올리고뉴클레오타이드의 활성 또는 세포 섭취를 강화시킬 수 있는 올리고뉴클레오타이드의 하나 이상의 모이어티(moieties) 또는 콘주게이트(conjugates)에 화학적으로 결합하는 것을 포함한다. 이러한 모이어티는 콜레스테롤 모이어티(cholesterol moiety), 콜레스테릴 모이어티(cholesteryl moiety)(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6553(1989))와 같은 지질 모이어티, 콜린산(cholic acid)(Manoharan et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 4:1053(1994)), 티오에테르(thioether), 예컨대 헥실-S-트리틸티올(hexyl-S-tritylthiol)(Manoharan et al. Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:306(1992); Manoharan et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 3: 2765(1993)), 티오펜콜레스테롤(thiocholesterol)(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 20:533(1992)), 지방족 사슬(aliphatic chain), 예컨대 도데칸디올(dodecandiol) 또는 운데실 잔기(undecyl residues)(Saison-Behmoaras et al. EMBO J., 10:111(1991); Kabanov et al. FEBS Lett., 259:327(1990); Svinarchuk et al. Biochimie, 75:49(1993)), 인지질(phospholipid), 예컨대 디-헥사데실-락-글리세롤(di-hexadecyl-rac-glycerol) 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-O-헥사데실-락-글리세로-3-H-포스포네이트(triethylammonium 1,2-di-O-hexadecyl-rac-glycero-3-H-phosphonate)(Manoharan et al. Tetrahedron Lett., 36:3651(1995); Shea et al. Nucl. Acids Res., 18:3777(1990)), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬(polyamine or polyethylene glycol chain)(Manoharan et al. Nucleosides & Nucleotides, 14:969(1995)), 또는 아다만탄 아세트산(adamantane acetic acid)(Manoharan et al. Tetrahedron Lett., 36: 3651(1995))를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 올리고뉴클레오타이드는 지방 친화성의 모이어티를 포함하며, 이러한 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 방법들은 본 발명이 속하는 기술분야, 예를 들어, U.S. Pat. Nos. 5,138,045, 5,218,105 및 5,459,255에 알려져 있다. 상기 언급된 변형들은 뉴클레아제(nuclease) 분해에 대해 안정성을 강화시켜 타겟 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 친화도(affinity)를 증가시킨다.
- <22> 상기 안티센스 분자는 시험관내에서 전통적으로 합성되어 세포로 옮겨진다. 또한, 외래 서열로부터 전사에 의해 세포내부적으로 생산된다. 시험관내 합성은 RNA 중합효소 I를 필요로 한다. 안티센스 RNA를 제조하기 위한 시험관내 전사는 반대방향(opposite orientation)에 인식부위(MCS)의 복제지점(origin)을 갖는 벡터를 사용한다. 상기 안티센스 RNA는 바람직하게는 펩티드로의 번역을 저하하기 위한 번역 종결코돈(translation stop codon)을 포함한다.
- <23> 바람직한 구현예에 따르면, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2의 타겟 영역(1738-1752)에 상보적인, 서열번호 6의 염기서열을 가질 수 있다.
- <24> 바람직한 구현예에 따르면, 상기 siRNA 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 2의 타겟 영역(1705-1724)에 상보적인,

서열번호 7의 센스 서열을 가질 수 있다.

- <25> 본 명세서에 사용된 상기 용어 “siRNA”는 RNA 간섭(RNA interference) 또는 유전자 침묵(gene silencing)를 매개하는 핵산 분자를 말한다 (WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 01/29058, WO 99/07409 및 WO 00/44914 참조). 타겟 유전자의 발현을 저해하기 위한 siRNA는 효과적인 유전자 녹-다운 방법 또는 유전자 치료 방법을 제공한다. 식물, 곤충, 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*) 및 기생충에서 처음 사용되었으며 최근에는 포유동물 세포 연구에 사용되고 있다.
- <26> 본 발명의 siRNA 분자는 센스 RNA 가닥(BLT2 mRNA에 대응하는 서열을 갖는) 및 안티센스 RNA 가닥(BLT2 mRNA에 상보적인 서열을 갖는)으로 구성될 수 있으며 2중구조(duplex structure)를 형성한다. 다른 방법으로, 본 발명의 siRNA 분자는 자신의-상보적인 센스 및 안티센스 가닥들을 포함하는 단일가닥 구조를 가질 수 있다.
- <27> 본 발명의 siRNA는 두 가닥이 완전하게 쌍을 이루는 RNA 이중구조에 한정되지 않으며 비-상보적인 염기를 갖는 매치되지 않는 부분 및 상반되는 염기가 없는 융기(bulge)와 같은 쌍을 이루지 않는 부분을 포함할 수 있다. 상기 siRNA의 전체 길이는 10-100 뉴클레오티드, 바람직하게는 15-80 뉴클레오티드, 더욱 바람직하게는 20-70 뉴클레오티드이다.
- <28> 상기 siRNA는 블런트(blunt) 또는 부착 말단(cohesive end)을 포함하는 한 RNAi 효과에 기인하는 BLT2 발현을 침묵(silent)하게 할 수 있게 한다. 상기 부착 말단은 3' 말단 돌출 구조(overhanging structure) 또는 5' 말단 돌출 구조에서 만들어 질 수 있다.
- <29> 상기 siRNA는 자신의-상보적인 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오티드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)을 삽입함으로써 구성될 수 있다. 발현된 siRNA는 분자 간 혼성화(intramolecular hybridization)에 의해 헤어핀 구조(hairpin structure)를 형성하여, 그 결과 스템-앤-루프(stem-and-loop) 구조의 형성한다. 상기 스템-앤-루프 구조는 시험관내 또는 생체내에서 제조되어 RNAi를 매개하는 활성 siRNA 분자를 생성한다.
- <30> 바람직한 구현예에서, 상기 물질은 BLT2의 상류 또는 하류 신호전달 경로를 저해하는 화합물일 수 있다.
- <31> 바람직한 구현예에서, 상기 천식은 BLT2 단백질이 기관지에서 과-발현될 수 있다. 본 발명자들은 BLT2 단백질 및 그 리간드 LTB₄가 OVA 항원노출 후 기관지에서 과-발현되고, 안티센스 BLT2 올리고뉴클레오티드를 이용한 BLT2를 하향조절은 기도 염증 및 AHR을 현저하게 약화시킴을 발견하였다. 따라서, BLT2 과발현의 저해에 기초한 임의의 항-천식 치료 전략은 본 발명으로 포함된다.
- <32> 바람직한 구현예에서, 상기 과-발현, 즉, BLT2의 활성화는 ROS 생성의 증가 후 NF- κ B 활성화에 의해 천식 증상을 일으킬 수 있다. 본 발명자들은 상기 BLT2 활성화가 활성산소종(ROS)의 증가 후 NF- κ B의 활성화를 초래하여, 기관지에서 호산구 침윤과 관련이 있는 것으로 알려진 VCAM-1의 발현을 유도함을 증명하였다.
- <33> 바람직한 구현예에서, 상기 천식의 치료는 기관지에서 호산구 침윤, 기도 염증 및 기도 과반응성(AHR)을 감소시킴으로서 이루어질 수 있다. 따라서, 천식에 대한 치료학적 조성물로서 BLT2 저해제의 임의의 용도는 본 발명으로 포함된다.
- <34> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질과, (b) 천식 치료용 약제의 제조를 위한 다른 항-천식 약품과의 혼합물의 용도를 제공한다.
- <35> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 천식 치료용 약제의 제조를 위한 Rac의 발현 또는 활성을 저해하는 물질의 용도를 제공한다. 본 출원서에서, 상기 용어 “Rac의 발현을 저해한다”는 Rac의 전사, mRNA 프로세싱, 번역, 전좌(translocation), 및 성숙(maturation) 중 어느 단계를 저해하는 것을 의미하고, 상기 용어 “Rac의 활성을 저해한다”는 천식을 유도하기 위한 Rac의 GTPase 활성, 및 그것의 세포내 신호전달 경로 중 어느 단계를 저해하는 것을 의미한다.
- <36> Rho 패밀리 GTPase의 하나인, Rac는 액틴 중합반응, 세포 증식, cPLA2 활성, 및 활성산소종(ROS)의 생성과 같은 다양한 세포 반응을 매개한다. 본 발명자들은 천식용 마우스 모델을 이용하여, 알레르겐-유도성 기관지 염증 및 기도 과반응성(AHR)에서 Rac1의 역할을 확인하였다. 알레르겐 항원노출 후 Rac1 활성은 유의하게 자극되었으며 Rac1에 대한 안티센스 올리고머의 투여는 기관지 염증 및 AHR을 현저하게 감소시켰다. Rac1이 천식성 염증 및 AHR을 매개하는 것에 의한 신호전달 메커니즘을 결정하는 것에 대한 추가 연구에서, 본 발명자들은 Rac1이 VCAM-1과 같은 다양한 염증 유전자의 전사에 결정적으로 연관된 NF- κ B 활성화를 초래한다는 것을 밝혀냈다. 그리고, Rax1은 cPLA2의 활성화를 매개하는 것으로 나타났는데, 이는 아라키돈산(arachidonic acid, AA)에 이어 류코트리엔(leukotrienes, LTs)과 같은 에이코사노이드(eicosanoids)의 방출을 초래하는 막인지질

(membranephospholipids)의 가수분해를 촉진시킨다. 종합하면, 이러한 결과는 Rac1이 기관지 천식의 병인에 결정적으로 관련이 있음을 나타낸다.

- <37> 바람직한 구현예에서, 상기 물질은 Rac의 발현을 저해하는 안티센스 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 안티센스 또는 siRNA 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 13에 개시된 바와 같이 Rac mRNA의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 염기서열을 갖는다. 인간 Rac 유전자의 mRNA 또는 CDS의 서열은 NCBI(gi:156071511)에서 이용가능하고 그 추정 아미노산 서열은 서열번호 14로 표시되어 있다.
- <38> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 활성성분으로서 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질을 포함하는, 천식 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 물질은 화학적 화합물, 펩티드, 항체 단백질, 뉴클레오타이드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 올리고뉴클레오타이드 또는 천연 원료(natural source)의 추출물일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- <39> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 활성성분으로서 Rac의 발현 또는 활성을 저해하는 물질을 포함하는, 천식 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 물질은 화학적 화합물, 펩티드, 항체 단백질, 뉴클레오타이드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 올리고뉴클레오타이드 또는 천연 원료(natural source)의 추출물일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- <40> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달을 저해하는 물질의 치료학적으로 유효한 양을 천식 환자에 투여하는 것을 포함하는, 천식 환자의 치료 방법을 제공한다.
- <41> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Rac의 발현 또는 활성을 저해하는 물질의 치료학적으로 유효한 양을 천식 환자에 투여하는 것을 포함하는, 천식 환자의 치료 방법을 제공한다.
- <42> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 천식 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- <43> (a) BLT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석될 상기 물질을 접촉시키는 단계; 및
- <44> (b) BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달 수준을 측정하는 단계로서, 상기 BLT2의 발현 또는 세포내 신호전달 수준이 하향-조절되면, 상기 물질은 천식의 치료 효능을 갖는 것으로 결정하는 단계.
- <45> 본 발명의 방법에 따르면, 상기 BLT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포는 오리지널 BLT2 유전자를 포함하는 세포를 획득하거나 또는 외래 BLT2 유전자로 세포를 유전자 도입(transfecting)시킴으로서 쉽게 제조될 수 있다. BLT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포는 분석될 물질에 처음으로 접촉된다. 본 발명의 스크리닝 방법에 관련하여 본 명세서에 사용된 상기 용어 “물질”은 BLT 유전자의 발현 수준, BLT2 단백질의 양 또는 BLT2 수용체의 세포내 신호전달 수준에 대한 영향을 분석하기 위해 본 발명의 방법에 테스트되는 물질을 말한다. 상기 물질은 화학적 화합물, 펩티드, 항체 단백질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(작은 간섭 RNA) 또는 천연 원료(natural source)의 추출물을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- <46> 그 후에, 세포에서 BLT2 유전자의 발현 수준, BLT2 단백질의 양 또는 BLT2의 세포내 신호전달 수준이 측정된다. BLT2 유전자의 발현 수준, BLT2 단백질의 양 또는 BLT2의 세포내 신호전달 수준이 하향-조절되는 것으로 측정되면, 상기 물질은 천식 치료를 위한 후보물질로 결정된다.
- <47> BLT2 유전자의 발현 수준의 측정은 본 발명이 속하는 기술분야의 다양한 방법들로 수행될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR (Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블로팅 (Peter B. Kaufma et al., Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 102-108, CRC press), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 (Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 및 원위치 혼성화(in situ hybridization) (Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))가 사용될 수 있다.
- <48> BLT2 유전자의 발현 수준은 RT-PCR로 분석되는데, 총 RNA는 먼저 분석될 물질로 처리된 세포로부터 분리되고 다음으로 첫 번째 cDNA 가닥은 올리고 dT 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 합성된다. 그 후, PCR 증폭은 주형으로 첫 번째 cDNA 가닥 및 BLT2-특이적 프라이머를 이용하여 수행된다. 마지막으로, 상기 PCR 증폭된 산물은

전기영동으로 분석되고 밴드들은 BLT2 유전자의 발현 수준을 평가하기 위해 분석된다.

- <49> BLT2 단백질의 양은 본 발명이 속하는 기술분야에 알려진 다양한 면역분석법으로 측정될 수 있다. 예를 들어, 방사선면역분석법(radioimmunoassay), 방사선면역-침전법(radioimmuno-precipitation), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA(capture-ELISA), 저해제 또는 경쟁 분석법(inhibition or competition assay) 및 샌드위치 분석법(sandwich assay)이 BLT2 단백질의 양을 분석하기 위해 사용된다.
- <50> BLT2 수용체의 세포내 신호전달 수준은 LTB4에 의해 유도된 결과(event)를 모니터링, 예컨대 BLT2-발현 세포 등 (예컨대, BLT 과발현 세포 등)을 이용하여 실시예에서 개시된 바와 같이 세포내 칼슘 농도의 상승을 모니터링함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 상기 물질이 BLT2-발현 세포에서 LTB4에 의한 세포내 칼슘 농도를 감소시키면, BLT2 길항제로서 판단될 수 있다.
- <51> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 천식 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- <52> (a) Rac 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석될 상기 물질을 접촉시키는 단계; 및
- <53> (b) Rac의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계로서, 상기 Rac의 발현 또는 활성 수준이 하향-조절되면, 상기 물질은 천식의 치료 효능을 갖는 것으로 결정하는 단계.
- <54> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 2에 개시된 바와 같이 BLT2 유전자의 염기 서열에 상보적인 염기서열을 갖는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, 천식 검출용 키트를 제공한다. 따라서, BLT2 과발현이 천식 환자의 기관지에서 검출된다는 정보에 기초하여 개발된 임의의 방법론 또는 키트는 본 발명에 포함될 수 있다.
- <55> 본 발명의 키트에 사용된 프로브 또는 프라이머는 BLT2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에 사용된 서열과 관련하여 용어 “상보적인”은 특정 어닐링(annealing) 또는 혼성화(hybridization) 조건 하에서 상기 서열이 BLT2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 특이적으로 어닐링되거나 또는 혼성화되는 범위(extent)에 대하여 상보성(complementarity)을 갖는 서열을 말한다. 이점에 있어서는, 본 명세서에 사용된 용어 “상보적인”은 용어 “완벽하게 상보적인”과는 서로 다른 의미를 갖는다. 본 발명에 사용된 프로브 또는 프라이머는 미스매치(mismatch)들이 BLT2 유전자에 특이적 어닐링 또는 혼성화를 완벽하게 배제하기에 충분하지 않은 한 하나 이상의 미스매치가 있을 수 있다.
- <56> 본 명세서에 사용된 용어 “프로브”는 타겟 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합가능한, 데옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotides) 및 리보뉴클레오티드(ribonucleotides)를 포함하여, 자연 상태 또는 변형된 모노머의 선형 올리고머 또는 연결(linkages)를 의미한다. 상기 프로브는 자연적으로 발생하거나 또는 인공적으로 합성될 수 있다. 상기 프로브는 바람직하게는 단일가닥이다. 바람직하게는, 본 발명에 사용된 프로브는 올리고데옥시리보뉴클레오티드이다. 본 발명의 프로브는 자연적으로 발생하는 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형된 뉴클레오티드, 또는 비-자연발생 뉴클레오티드로 구성될 수 있다. 상기 프라이머 또한 리보뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 프로브는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트(phosphorothioate) DNA, 포스포로디티오에이트(phosphorodithioate) DNA, 포스포라미데이트(phosphoramidate) DNA, 아마이드-결합(amide-linked) DNA, MMI-연결(MMI-linked) DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트(methylphosphonate) DNA와 같은 백본 변형을 갖는 뉴클레오티드, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알킬닐 DNA, 헥소오스(hexose) DNA, 피라노실(pyranosyl) RNA, 및 앤히드로헥시톨(anhydrohexitol) DNA와 같은 당 변형(sugar modifications)을 갖는 뉴클레오티드, 및 C-5 치환된 피리미딘(플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이도(iodo)-, 메틸-, 에틸-, 비닐(vinyl)-, 포르밀(formyl)-, 에티닐(ethynyl)-, 프로피닐(propynyl)-, 알키닐(alkynyl)-, 티아졸릴(thiazolyl)-, 이미다졸릴(imidazolyl)-, 피리딜(pyridyl)-을 포함하는 치환체들), C-7 치환체들을 갖는 7-데아자퓨린(deazapurines)(플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이도(iodo)-, 메틸-, 에틸-, 비닐(vinyl)-, 포르밀(formyl)-, 알키닐(alkynyl)-, 알케닐(alkenyl)-, 티아졸릴(thiazolyl)-, 이미다졸릴(imidazolyl)-, 피리딜(pyridyl)-을 포함하는 치환체들), 이노신(inosine), 및 디아미노퓨린(diaminopurine)와 같은 염기 변형(base modifications)을 갖는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- <57> 본 명세서에 사용된 용어 “프라이머”는 핵산 가닥(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물(primer extension product)의 합성이 일어나는 조건하에 놓여질 때, 다시 말해, 뉴클레오티드 및 DNA 중합효소와 같은 중합반응 시약의 존재하고 적절한 온도 및 pH에 있는 경우, 합성의 개시점으로 작용 가능한, 올리고뉴클레오티드를 의미한다.

- <58> 프라이머의 적절한 길이는 프라이머의 온도, 적용 및 소스를 포함하는 여러 요소들에 따르며, 보통, 15-30 뉴클레오티드 길이이다. 짧은 프라이머는 주형에 안정한 혼성화 2중 구조를 형성하는데 보통 낮은 온도를 필요로 한다.
- <59> 프라이머의 서열은 주형에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없다. 프라이머의 서열은 주형에 혼성화되어 프라이머로 제공되는 동안은 몇몇 오합(mismatches)을 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 프라이머는 주형으로서 BLT2 유전자에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없다; 그들이 합성의 개시점으로 작용하는 BLT2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 특이적으로 어닐링하는 범위(extend)에 대해 상보성을 갖는 것으로 충분하다. 상기 프라이머 디자인은 BLT2 gDNA 또는 cDNA 서열, 바람직하게는 cDNA 서열을 참조하여 전통적으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 프라이머 디자인은 프라이머 디자인용 컴퓨터 프로그램(예컨대, PRIMER 3 program)을 이용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 예시적인 프라이머는 서열번호 9(센스 프라이머) 및 서열번호 10(안티센스 프라이머)으로 표시되어 있다.
- <60> 바람직한 구현예에 따르면, 프로브를 포함하는 친식용 진단 또는 검출 키트는 마이크로어레이, 더욱 바람직하게는 DNA 또는 cDNA 마이크로어레이, 가장 바람직하게는 cDNA 마이크로어레이의 형태이다.
- <61> 마이크로어레이에서, 본 발명의 프로브는 혼성화 가능한 어레이 구성요소로서 제공되어 기판(substrates)에 고정화된다. 바람직한 기판은 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼(wafer), 섬유(fiber), 자성(magnetic) 또는 비자성 비드, 젤, 튜빙(tubing), 플레이트(plate), 거대분자(macromolecule), 미세입자(microparticle) 및 모세관 튜브(capillary tube)와 같은, 적당한 고체 또는 반-고체 지지체(supporters)를 포함한다. 상기 혼성화 가능한 어레이 구성요소들은 배열되어 기판에 고정화된다. 이러한 고정화는 화학적 결합 또는 UV와 같은 공유결합을 통해 일어난다. 본 발명의 구현예에서, 상기 혼성화 가능한 어레이 구성요소들은 에폭시 화합물(epoxi compound) 또는 알데히드기(aldehyde group)를 포함하는 변형된 유리 표면 또는 폴리신(polylysine)-코팅된 표면에 결합된다. 또한, 상기 혼성화 가능한 어레이 구성요소들은 링커(linkers)(예컨대, 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기판에 결합된다.
- <62> 본 발명의 마이크로어레이로 시험될 DNAs는 라벨링되어 마이크로어레이 상에서 어레이 구성요소들과 혼성화될 수 있다. 다양한 혼성화 조건들이 적용가능하고, 혼성화 범위의 검출 및 분석을 위해, 다양한 방법들이 사용된 라벨에 따라 이용가능하다.
- <63> 친식을 진단하기 위한 본 발명의 방법(The present method)은 혼성화에 따라 수행될 수 있다. 이러한 분석을 위해, 상기 BLT2 유전자의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 갖는, 프로브들이 사용된다.
- <64> BLT2 유전자 또는 cDNA, 바람직하게는 cDNA로 혼성화 가능한 프로브를 이용하여, 친식은 혼성화-기반 분석법(hybridization-based assay)에 의해 진단 또는 검출된다. 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 프로브에서 몇몇 변형은 상기 변형이 프로브의 이점(advantages)을 파괴하지 않는 한 일어날 수 있다. 이러한 변형, 즉, 상기 프로브에 연결한 라벨은 신호를 발생하여 혼성화를 검출한다. 적절한 라벨은 플루오로포어(fluorophores)(예컨대, 플루오레세인(fluorescein)), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민(rhodamine), 리사민(lissamine), Cy3 및 Cy5 (Pharmacia), 크로모포어(chromophores), 케미루미네서(chemiluminescers), 자성 입자(magnetic particles), 방사성 동위원소(radioisotopes)(예컨대, P32 및 S35), 질량 라벨(mass labels), 전자 치밀 입자(electron dense particles), 효소들(예컨대, 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase) 및 양고추냉이 페록시다아제(horseradish peroxidase)), 보조인자(cofactors), 효소에 대한 기질(substrates for enzymes), 중금속(예컨대, 금), 및 대응물(partners)에 특이적 결합을 갖는 부착소(haptens), 예컨대, 항체, 스트렙토아비딘, 바이오틴, 다이곡시제닌(digoxigenin) 및 킬레이트기(chelating group)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 라벨링은 닉 트랜슬레이션(nick translation), 랜덤 프라이밍(Multiprime DNA labeling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 키네이션(kination)(Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))과 같은 본 발명이 속하는 다양한 방법에 따라 수행된다. 상기 라벨은 형광(fluorescence), 방사능(radioactivity), 발색 측정(measurement of color development), 질량 측정(mass measurement), X-레이 회절 또는 흡수, 자기장, 효소적 활성, 질량 분석, 결합 친화도(binding affinity), 고주파 혼성화(high frequency hybridization) 또는 나노크리스탈(nanocrystal)에 의해 검출 가능한 신호를 발생한다.
- <65> 분석될 상기 핵산 샘플(바람직하게는 cDNA)은 다양한 생체 시료로부터 얻은 mRNA를 이용하여 제조될 수 있다. 상기 생체 시료는 바람직하게는 기도 상피(airway epithelium) 유래 세포이다. 프로브를 대신하여, cDNA가 혼성화-기반 분석법을 위해 라벨링될 수 있다.

- <66> 프로브는 천식을 검출하기 위해 엄격한(stringent) 조건 하에서 cDNA 분자와 혼성화된다. 적절한 혼성화 조건은 최적화 과정에 의해 관례적으로 결정될 수 있다. 온도, 구성성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 버퍼 구성성분, 및 그들의 pH 및 이온 세기(ionic strength)와 같은 조건은 프로브의 길이와 GC 함량 및 타겟 뉴클레오티드 서열을 포함하여, 다양한 요소에 따라 변경될 수 있다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 매우 엄격한 조건은 65°C에서 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate) 및 1 mM EDTA에서의 혼성화 및 68°C에서 0.1 x SSC (standard saline citrate)/0.1% SDS에서의 세척을 포함한다. 또한, 매우 엄격한 조건은 48°C에서 6 x SSC/0.05% 피로인산나트륨(sodium pyrophosphate)에서의 세척을 포함한다. 약간 엄격한 조건은 예컨대, 42°C에서 0.2 x SSC/0.1% SDS에서의 세척을 포함한다.
- <67> 혼성화 반응에 이어, 혼성화의 발생을 나타내는 혼성화 신호가 다음으로 측정된다. 상기 혼성화 신호는 라벨에 따라 다양한 방법으로 분석될 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소로 라벨링되는 경우에, 혼성화의 발생은 효소에 대한 기질을 혼성화 결과물과 반응시킴으로써 측정될 수 있다. 본 발명에 사용가능한 상기 효소/기질 쌍은 페록시다아제(oxidase)(예컨대, 양고추냉이 페록시다아제)와 클로로나프톨(chloronaphtol)의 쌍, 아미노에틸카바졸(aminoethylcarbazol), 디아미노벤지딘(diaminobenzidine), D-루시페린(luciferin), 루시제닌(lucigenin) (bis-N-methylacridinium nitrate), 레소루핀 벤질 에테르(resorufin benzyl ether), 루미놀(luminol), 앰플렉스 레드 시약(Ampler Red reagent) (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), HYR (p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), ABTS (2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(phenylenediamine, OPD) 또는 나프톨(naphtol)/피로닌(pyronine); 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase)와 브로모클로로인돌릴포스페이트(bromochloroindolylphosphate, (BCIP)의 쌍, 니트로 블루 테트라졸륨(nitro blue tetrazolium, NBT), 나프톨(naphtol)-AS-B1-포스페이트(phosphate) 또는 ECF 기질; 글루코시다아제(glucosidase)와 t-NBT(nitroblue tetrazolium)의 쌍 또는 m-PMS(phenazine methosulfate)를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 프로브가 금 입자로 라벨링되는 경우에, 혼성화의 발생은 질산은(silver nitrate)을 이용하는 은 염색 방법으로 검출될 수 있다.
- <68> 이와 관련하여, 천식을 진단하기 위한 본 발명의 방법은 혼성화로 수행될 수 있는데, 이는 (i) 핵산 샘플을 BLT2 유전자의 뉴클레오티드에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 갖는 프로브에 접촉시키는 단계; 및 (ii) 혼성화의 발생을 검출하는 단계를 포함한다.
- <69> 혼성화로부터의 신호 강도는 천식을 나타낸다. 진단될 샘플로부터 BLT2 cDNA에 대한 혼성화 신호가 정상 샘플보다 더 강하게 측정되는 경우에, 상기 샘플은 천식을 가지는 것으로 결정될 수 있다.
- <70> 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머는 증폭 반응에 사용된다.
- <71> 본 명세서에 사용된 용어 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하기 위한 반응을 말한다. 중합효소 연쇄반응(이하 PCR이라 함) (U.S. Patent Nos. 4,683,195, 4,683,202, and 4,800,159), 역전사-중합효소 연쇄반응(이하 RT-PCR이라 함) (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I. (WO 89/06700) 및 Davey, C. et al. (EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄반응 (ligase chain reaction, LCR)(17, 18), Gap-LCR (WO 90/01069), 수선 연쇄반응(repair chain reaction) (EP 439,182), 전사-매개 증폭(transcription-mediated amplification, TMA)(19) (WO 88/10315), 자기 부양 서열 복제(self sustained sequence replication) (WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 서열의 선택적 증폭 (U.S. Patent No. 6,410,276), 공통 서열 준비된 중합효소 연쇄반응(CP-PCR) (U.S. Patent No. 4,437,975), 무작위 준비된 중합효소 연쇄반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR) (U.S. Patent Nos. 5,413,909 and 5,861,245), 핵산 서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification, NASBA) (U.S. Patent Nos. 5,130,238, 5,409,818, 5,554,517, and 6,063,603), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-매개 등온 증폭(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)을 포함하여, 다수의 증폭 반응들이 본 발명이 속하는 기술분야에 개시되어 있으나, 이에 한정되지 않는다. 사용될 수 있는 다른 증폭 방법들은, U.S. Patent Nos. 5,242,794, 5,494,810, 4,988,617 및 U.S. Ser. No. 09/854,317에 개시되어 있다.
- <72> 가장 바람직한 구현예에 따르면, 상기 증폭 반응은 U.S. Pat. Nos. 4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159에 개시되어 있는 PCR(중합효소 연쇄반응)에 따라 수행될 수 있다.

- <73> PCR은 핵산 증폭을 위한 가장 주된 과정 중 하나이며 다수의 그 변형법 및 적용법이 개발되어 왔다. 예를 들어, PCR 특이성 또는 감수성을 개선하기 위해, 터치다운(touchdown) PCR(24), 숙주 출발(hot start) PCR(25, 26), 이중(nested) PCR(2) 및 부스터(booster) PCR(27)이 전통적인 PCR 과정을 변형하여 개발되어 왔다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 발현차(differential display) PCR (DD-PCR), RACE(rapid amplification of cDNA ends), 다중(multiplex) PCR, 역중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction, IPCR), vectorette PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR) 및 다중(multiplex) PCR이 특정 용도를 위해 개시되어 있다. PCR의 상세한 설명은 McPherson, M.J., and Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에서 찾을 수 있으며, 그 내용은 참조로서 본 명세서에 편입된다.
- <74> 천식을 진단하기 위한 본 발명의 방법이 프라이머를 이용하여 수행하는 경우에, 상기 핵산 증폭은 BLT2 유전자의 발현 수준을 분석하기 위해 실행된다. 본 발명은 BLT2 유전자의 발현 수준을 평가하기 위해 의도된 것이기 때문에, 샘플들에서 BLT2 mRNA의 수준을 분석한다.
- <75> 따라서, 본 발명은 mRNA 또는 cDNA에 어닐링될 주형 및 프라이머와 같이 샘플들에서 mRNA 분자를 이용하여 핵산 증폭을 수행한다.
- <76> mRNA 분자를 얻기 위해, 총 RNA는 샘플로부터 분리된다. 총 RNA의 분리는 다양한 방법으로 수행될 수 있다 (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., Plant Mol. Biol. Rep., 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons(1987); and Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)). 예를 들어, 세포에서 총 RNA는 트리졸(Trizol)을 이용하여 분리될 수 있다. 그 후, cDNA 분자는 분리된 mRNA 분자를 이용하여 합성된 후 증폭된다. 본 발명에 사용된 총 RNA 분자는 인간 샘플에서 분리된 이후로, mRNA 분자는 폴리-A 꼬리(poly-A tails)를 가지며 dT 프라이머와 역전사효소의 사용에 의해 cDNA로 변환되었다 (PNAS USA, 85:8998(1988); Libert F, et al., Science, 244:569(1989); and Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 합성된 cDNA 분자는 이후 증폭 반응에 의해 증폭된다.
- <77> 본 발명에 사용된 프라이머는 주형 상의 영역에서 혼성화되거나 또는 어닐링되어 이중-가닥 구조를 형성한다. Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- <78> 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 방법의 증폭 단계에 사용될 수 있는데, 이는 열에 안정한 DNA 중합효소인 E. coli DNA 중합효소 I의 “Klenow” 단편, 및 박테리오파지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는 상기 중합효소는 썬머스 아쿠아티쿠스(Thermus aquaticus, Taq), 썬머스 썬모필러스(Thermus thermophilus, Tth), 썬머스 필리포르미스(Thermus filiformis), 썬미스 플라부스(Thermis flavus), 썬모코커스 리터랄리스(Thermococcus literalis), 및 피로코커스 푸리오수스(Pyrococcus furiosus, Pfu)를 포함하여, 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 것으로 열에 안정한 DNA 중합효소이다.
- <79> 중합 반응이 시작되면, 반응 용기(reaction vessel)에서 과량으로(in excess) 이러한 반응에 필요한 구성요소를 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응의 구성요소와 관련하여 과량(excess)은 원하는 증폭을 달성하기 위한 능력이 그러한 구성요소의 농도에 의해 실질적으로 제한되지 않을 만큼의 각 구성요소의 양을 말한다. 원하는 증폭의 정도를 유지하기 위해서 반응 혼합물에 Mg^{2+} 와 같은 필요한 양의 보조인자(cofactors)와, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 충분한 양으로 제공하는 것이 바람직하다. 본 발명의 증폭 반응에 사용된 모든 효소들은 동일한 반응 조건 하에서 활성을 띌 수 있다. 실제로, 모든 효소에 존재하는 버퍼는 그들의 최적 반응 조건에 가깝다. 따라서, 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 추가와 같은 임의의 조건의 변화가 없이 단일 반응 부피로 수행될 수 있다.
- <80> 본 발명의 방법에서 어닐링 또는 혼성화는 프라이머와 주형 핵산 사이에 특이적 결합을 허용하는 엄격한 조건 하에서 수행된다. 어닐링에 대한 이러한 엄격한 조건은 서열-의존적이며 환경 변수에 따라 변화될 것이다.
- <81> 상기 증폭된 BLT2 cDNA 분자는 다음으로 BLT2 유전자의 발현 수준을 평가하기 위해 분석된다. 예를 들어, 상기 증폭된 산물은 겔 전기영동으로 분석되고 생성된 밴드들은 BLT2 유전자의 발현 수준을 평가하기 위해 분석된다. 진단될 샘플로부터 BLT2 유전자의 발현 수준이 정상 샘플보다 더 높은 것으로 측정되면, 상기 샘플은 천식을 갖

는 것으로 결정될 수 있다.

- <82> 이와 관련하여, 천식을 진단하기 위한 본 발명의 방법이 증폭에 의해 수행되는 경우에, (i) BLT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는 프라이머의 사용에 의해 핵산 샘플을 증폭하는 단계; 및 (ii) 상기 증폭된 산물을 분석하여 BLT2 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함한다.
- <83> 바람직한 구현예에서, 상기 키트는 서열번호 9의 정방향 서열 및 서열번호 10의 역방향 서열을 갖는 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 이 프라이머 세트는 장형 및 단형 BLT2 모두를 검출할 수 있다.
- <84> 바람직한 구현예에서, 상기 키트는 서열번호 11의 정방향 서열 및 서열번호 12의 역방향 서열을 갖는 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 이 프라이머 세트는 장형의 BLT2만 검출할 수 있는데 상기 프라이머는 장형 CDS의 앞부분을 인식하기 때문이다.
- <85> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 BLT2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 천식 치료용 키트를 제공한다. 천식용 진단 키트는 BLT2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 도입함으로써 구성될 수 있다.
- <86> 본 발명에 사용된 BLT2 단백질에 대한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날, 바람직하게는 모노클로날일 수 있다. 상기 항체는 융합법(fusion method) (Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA법(recombinant DNA method) (USP 4,816,56) 또는 파지 항체 라이브러리(phage antibody library) (Clackson et al, Nature, 352:624-628(1991) and Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991))와 같은 전통적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 항체 생산을 위한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1988; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY, 1991에 개시되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로서 편입된다. 예를 들어, 모노클로날 항체 생산을 위한 하이브리도마 세포주의 제작은 불멸세포(immortal cell)와 항체를 생산하는 림프구의 융합에 의해 수행된다. 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 기술에 의해 수행될 수 있다. 폴리클로날 항체는 적당한 동물에 BLT2 단백질 항원의 주사, 상기 동물로부터 항체를 포함하는 항혈청의 수집, 및 임의의 공지의 친화도 기술(affinity techniques)로 특이적 항체를 분리함으로써 제조될 수 있다.
- <87> 본 발명의 진단 방법이 BLT2 단백질에 대한 항체를 이용하여 수행되는 경우에, 이는 천식 검출을 위한 전통적인 면역분석 과정에 따라 수행될 것이다.
- <88> 이러한 면역분석은 방사선면역분석(radioimmunoassay), 방사선면역-침전(radioimmuno-precipitation), ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 저해 또는 경쟁 분석법(inhibition or competition assay), 샌드위치 분석법(sandwich assay), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광분석법(immunofluorescence assay) 및 면역친화도 분석법(immunoaffinity assay)을 포함하여, 정량 또는 정성 면역분석 프로토콜에 의해 실행될 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 면역분석 및 면역염색 과정은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1999에서 찾을 수 있으며, 이는 본 명세서에 참조로서 편입된다.
- <89> 예를 들어, 방사선면역분석법에 따르면, 방사성 동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}) 표지된 항체가 BLT2 단백질을 검출하는데 사용될 수 있다.
- <90> 또한, 상기 ELISA 방법에 따르면, 본 발명의 방법의 예는 (i) 분석될 세포 용해물(lysate)로 고체 기판의 표면을 코팅하는 단계; (ii) BLT2 단백질에 대한 1차 항체와 상기 코팅된 세포 용해물을 인큐베이션하는 단계; (iii) 효소와 접합된 2차 항체와 상기 결과물을 인큐베이션하는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- <91> 본 발명에 사용가능한 고체 기판은 카보하이드레이트 폴리머(carbohydrate polymer)(예컨대, 폴리스티렌 및 폴리프로필렌), 글라스, 금속 및 겔, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트(microtiter plates)이다.
- <92> 상기 2차 항체와 접합된 효소는, 예컨대 알칼리 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 루시페라아제, 시토크롬 P450 및 양고추냉이 페록시다아제를 포함하여, 컬러리메트릭(colorimetric), 플루오로메트릭(fluorometric), 루

미네선스(luminescence) 또는 적외선(infra-red) 반응들을 촉진하는 것이다. 알칼리 포스파타아제를 사용하는 경우에는, 브로모클로로인돌릴포스파타아제(BCIP), 니트로 블루 테트라졸륨(NBT) 또는 ECF가 색-발달 반응(color-developing reactions)을 위한 기질로서 사용될 수 있고; 양고추냉이 페록시다아제를 사용하는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시제닌(bis-N-methylacridinium nitrate), 레 소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 애플렉스 레드 시약(10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-phenylenediamine(OPD) 또는 나프톨/피로닌이 기질로서 사용될 수 있으며; 그리고 글루코오스 옥시다아제(glucose oxidase)를 사용하는 경우에는, t-NBT(nitroblue tetrazolium) 또는 m-PMS(phenazine methosulfate)가 기질로서 사용될 수 있다.

- <93> 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방법에 따라 수행되는 경우에는, 본 발명의 구체적인 예는 (i) BLT2 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 포획하여 고체 기관의 표면을 코팅하는 단계; (ii) 분석될 세포 샘플과 포획하는 항체를 인큐베이션하는 단계; (iii) BLT2 단백질에 특이적으로 결합할 수 있고 검출 가능한 신호를 발생하는 라벨과 접합된 검출 항체와 (ii) 단계의 결과물을 인큐베이션 하는 단계; 및 (iv) 상기 검출 항체와 접합된 라벨로부터 발생하는 신호를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- <94> 상기 검출 항체는 검출 가능한 신호를 발생하는 라벨을 갖는다. 상기 라벨은 화학적(예컨대, 바이오틴), 효소적(알칼리 포스파타아제, 양고추냉이 페록시다아제, β -갈락토시다아제 및 시토크롬 P450), 방사능(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광(플루오레세인), 발광(luminescent), 화학발광(chemiluminescent) 및 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 라벨을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 다양한 라벨 및 라벨링 항체에 대한 방법들은 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려져 있다 (Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999).
- <95> 검출 항체와 접합된 라벨로부터 발생하는 신호의 검출은 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 다양한 과정에 의해 수행될 수 있다. 상기 신호의 검출은 정량 또는 정성 방법에서 BLT2 단백질을 분석할 수 있게 한다. 바이오틴 및 루시페라아제가 라벨로서 사용되는 경우에, 상기 신호 검출은 각각 스트렙토아비딘 및 루시페린의 사용에 의해 달성될 수 있다.
- <96> 상기 언급된 면역분석으로부터 발생된 신호 강도들의 측정은 천식을 나타낸다. 진단될 생체 시료에서 BLT2 단백질에 대한 신호가 정상 샘플보다 더 높은 것으로 측정되면, 상기 생체 시료는 천식을 갖는 것으로 결정될 수 있다.
- <97> 본 발명의 키트는 상기 언급된 프라이머, 프로브 또는 항체와 함께 다른 시약을 선택적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 핵산 증폭에 사용될 수 있는 경우에, 이는 버퍼, DNA 중합효소(써머스 아쿠아쿠스(Taq), 써머스 썬모필러스(Tth), 써머스 필리포르미스, 썬미스 플라부스, 썬모코커스 리터랄리스, 및 피로코커스 푸리오수스(Pfu)에서 얻은 열에 안정한 DNA 중합효소), DNA 중합효소 보조인자, 및 테옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트와 같은 PCR 반응을 수행하는데 필요한 시약들을 선택적으로 포함할 수 있다. 상기 키트는, 대체로, 전술한 구성성분들을 개별 패키징(separate packaging)하거나 또는 구획화하여 포함하도록 개조된다.
- <98> 천식을 검출 또는 진단하기 위한 상기 키트는 천식의 발달(development), 악화(aggravation) 및 완화(alleviation)를 결정할 수 있게 한다. 이점에 있어서는, 질병과 관련하여 본 명세서에 사용된 용어 “검출하는 것 또는 진단하는 것”은 질병의 존재 뿐 아니라 질병의 발달, 악화 및 완화의 결정도 의미한다.
- <99> 약학적 제형에 보통 사용되고, 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용가능한 담체는, 락토오스, 텍스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 루버 애러블(rubber arable), 포타슘 포스페이트(potassium phosphate), 알지네이트(arginate), 젤라틴(gelatin), 포타슘 실리케이트(potassium silicate), 마이크로크리 스탈 셀룰로오스(microcrystalline cellulose), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone), 셀룰로오스, 물, 시럽(syrups), 메틸셀룰로오스(methylcellulose), 메틸히드록시 벤조에이트(methylhydroxy benzoate), 프로필히드록시 벤조에이트(propylhydroxy benzoate), 탈크(talc), 마그네슘 스테아레이트(magnesium stearate), 및 미네랄 오일(mineral oils)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 윤활제(lubricant), 습윤제(humectant), 감미제(sweetener), 착향제(flavoring agent), 유화제(emulsifier), 침강방지제(suspending agent), 및 방부제(preservative)를 더 포함할 수 있다. 적절한 약학적으로 허용가능한 담체 및 제형의 상세한 설명은 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에서 찾을 수 있으며, 이는 본 명세서에 참조로서 편입된다.

- <100> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Rac 유전자의 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, 천식 치료용 키트를 제공한다. 따라서, Rac 과발현이 천식 환자의 기관지에서 검출된다는 상기 정보에 기초하여 개발된 임의의 방법론 또는 키트는 본 발명에 포함될 수 있다.
- <101> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Rac 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 천식 검출용 키트를 제공한다. 천식용 진단 키트는 Rac 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 도입함으로써 구성될 수 있다.
- <102> 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구(예컨대, 정맥 주사, 피하주사, 근육주사 및 국부 주사)로 투여될 수 있다.
- <103> 본 명세서에 사용된 용어 “치료학적 유효량”은 치료되는 환자에서 의학적으로 원하는 결과를 일으킬 수 있는 물질의 양을 의미한다. 본 발명의 약학적 조성물의 정확한 투여량은 특정한 제형, 사용방법, 환자의 나이, 체중 및 성별, 식이조절, 투여시간, 환자의 상태, 약제 조합, 질병의 반응 감수성 및 정도에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 에 대한 일일 적정 투여량은 인간 숙주에 대하여 0.001-100 mg/kg(체중) 범위이다.
- <104> 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 알려진 전통적인 기술에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 언급된 바와 같이 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 비히클로 제형화될 수 있어, 최종적으로 단위 용량(unit dosage) 형태를 포함하는 여러 가지 형태를 제공한다. 상기 제형화의 비-제한적인 예들은 용액, 현탁액 또는 에멀전, 추출물, 엘릭시르(elixir), 분말, 그라놀(granule), 정제, 캡슐, 경고제(emplastra), 리니멘트(liniment), 로션 및 연고(ointment)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- <105> 천식은 호산구 침윤, 점액 과다분비 및 AHR에 의한 기도의 만성 염증 질환이다. 천식에서 BLT1의 역할은 많이 연구되어 있지만, BLT2의 역할은 아직 명확하지 않다. 약리학적인 BLT2 길항제 및 내생적인 BLT2 발현을 차단하는 안티센스 뉴클레오티드 서열을 사용함으로써, 본 발명자들은 BLT2가 AHR 및 기도 염증의 발달에 결정적인 역할을 함을 증명하였다. 또한 본 발명자들은 BLT2가 ROS 생성의 증가 후 NF- κ B 활성화에 의해 천식 반응을 매개한다는 증거를 제시하였다. 본 발명자들의 첫 번째 보고서는 BLT2가 알레르기성 자극에 의해 유도되고 BLT2의 차단은 천식 반응을 완화시킨다는 것이다.
- <106> 다수의 앞선 연구는 상기 ‘LTB4-BLT1’ 경로가 염증을 일으킨 조직에 대한 호산구와 같은 과립구(granulocytes)의 초기 화학유인(chemoattraction)에 주요한 역할을 함으로써, 국부 염증 매개인자로서 작용함을 나타내었다 (3, 35). 또한 LTB4-BLT1 경로는 기도 내에서 알레르겐-매개 작동자(effector) CD4+ 및 CD8+ T 림프구를 보충함으로써, 마찬가지로, 면역학적 반응을 조절하는데 중추적인 것으로 생각된다 (10-12, 36). LTB4-BLT1는, 따라서, 과립구 및 작동자 CD4+ 및 CD8+ T 림프구의 보충을 통해 천식의 발달에 기여하는 것으로 여겨진다. BLT1과는 대조적으로, BLT2는 LTB4에 대한 낮은 친화도를 가지며, 그에 대한 생리학적 기능은 아직까지 명백하게 밝혀지지 않았다. 놀랍게도, BLT2는 천식 모델에서 OVA-유도된 알레르기성 폐 염증(pulmonary inflammation) 동안 유의하게 하향조절되었다. 골수성 백혈구(myeloid leukocytes) 및 T 세포의 특이적 클래스에서 주로 발현되는, BLT1과 달리, LTB4가 알레르겐 항원노출(challenge)에 반응하여 풍부하게 생성되는 경우에, BLT2는 기도 상피(airway epithelium) 및 내피(endothelium)의 일부에서 유도된다 (도 1c). OVA를 에어로졸 항원노출 후, 기도 비만세포(mast cells) 및 폐포대식세포(alveolar macrophages)는 활성화된다. 이러한 세포들이 알레르겐 항원노출 후 초기에 기도에서 LTB4의 주요 원인인 것으로 생각된다. LTB4는 호산구, 중산구 및 분화된 T 세포가 발현하는 BLT1을 통해 기도로 그들을 유인하는 것으로 생각되지만, LTB4는 또한 국부적 미세환경(microenvironment)에서 기도 상피에서 유도되는 BLT2와 결합하여 VCAM-1 및 다른 전염증성 단백질(proinflammatory proteins)의 상향조절을 초래하는 세포내 신호전달을 자극할 수도 있다. 상기 유도된 VCAM-1은 번갈아 상피층을 가로질러 기도에 염증성 백혈구를 보내는 것을 강화하여, 기도 염증 및 AHR의 발달에 기여한다. 실제로, 폐포 구획(alveolar compartments)으로 백혈구 이동(emigration)은 천식과 같은 급성 및 만성 염증성 폐 손상의 두드러진 특징이다 (37). 이러한 이동 과정 동안, 기도 상피세포는 아마도 기도에서 백혈구의 체류(retention) 및 활성화뿐만 아니라 그들의 수송(passage)을 조절하는데 중요하다. 아무튼, 천식 반응 동안 ‘LTB4-BLT2’의 분포 및 기능은 유일하고 LTB4-BLT1과 구별될 수 있는 것으로 보인다. BLT2는 명백하게 T 세포 보충에 최소한의 역할만 하는데; 그 결과, 안티센스 BLT2의 투여 후 기도에 T 세포 보충은 고스란히 남아있었으나 (도 8), AHR 및 기도 염증은 약화되었다. 이는 BLT2 저해가 AHR 및 기도 염증을 억제하는 메커니즘이 T 세포 보충과는 관계가 없다는 것을 의미한다. 다른 한편으로는, CD4+ T 세포 및 CD8+ TEFF 세포가 BLT1을 강력하게 발현함에도 불구하고, BLT2의 발현은 CD4+ T 세포 및 CD8+ TEFF 세포에서 검출되지 않았다 (10, 38).
- <107> 본 발명자들은 ROS가 알레르기성 천식에서 AHR 및 기도 염증을 매개하는 LTB4-BLT2 경로의 주요 하류 구성요소

임을 시사하고 있다. 축적된 증거는 그들이 유도하는 ROS 및 산화 스트레스가 기도 염증 및 AHR의 병인(pathogenesis)에 결정적인 역할을 함을 시사하고 있다 (29, 39-41). 더욱이, 다음 단계에서, 천식성의 기도에 보충되는 염증성 세포는 ROS를 생산하는 능력을 가지며, 기도에 침윤하는 호산구 및 다른 백혈구에 의해 방출되는 ROS는 천식에서 관찰되는 조직 손상을 유발한다 (42).

<108> 하지만, 이런 경우에는 본 발명자들은 ROS가 단지 산화 스트레스의 비특이적 병원성 매개인자로 작용하는 것으로 생각지는 않았다. 그 대신에, 본 발명자들은 그들이 천식과 관련한 타겟 유전자의 상향조절을 이끄는 경로에서 특이적인 신호전달 기능을 가진다고 제시하였다. 이러한 생각에 지지하여, 본 발명자들은 이전에 BLT2 활성화가 강화된 ROS 생성을 초래하여, 차례로 특이적인 세포내 신호전달 반응을 매개하는 것을 나타내었다 (7, 37). ROS-매개성 AHR 및 염증의 유도의 분자적 근거는 알려지지 않았지만, 최근 연구는 천식에서 ROS 생성이 산화환원-민감성(redox-sensitive) 전사인자 NF- κ B의 활성화를 초래하여 (32, 43), 대부분의 세포 형태에 존재하고 천식을 포함하는 면역 및 염증 반응에 결정적인 역할을 하는 것을 밝히고 있다 (44). 예를 들어, NF- κ B 활성화는 기관지의 상피에서 천식의 발달 및 유지에 기여하고 (45), BLT2 mRNA가 OVA-유도성 알레르기 반응 시 유도되는 기도 상피세포에서 관찰되고 있다 (46). 이러한 관찰과 일관되게, 본 발명자들은 본 발명에서 NF- κ B 수준이 OVA-유도성 천식을 가진 마우스에서 얻은 폐 조직의 추출물에서 실질적으로 증가되고 BLT2 안티센스에 의해 특이적으로 억제되었음을 확인하였다 (도 6a). 부착 분자(adhesion molecules)(예컨대, VCAM-1)를 포함하여, NF- κ B의 활성화가 다양한 전-염증성 유전자를 유도한다는 것은 알려져 있다 (33, 34). 예상한 대로, VCAM-1의 발현은 알레르겐 항원노출 후 증가되었고, BLT2 안티센스 또는 수용체 길항제(receptor antagonist)는 그 발현을 감소시킨 반면, BLT1 안티센스는 아무런 효과도 없었다 (데이터 미도시).

<109> BLT2-/- 녹다운 마우스는 BLT2 유전자가 BLT1 유전자좌(locus) 내 존재하기 때문에 만들기가 어렵다 (47). 이로 인해 BLT2의 붕괴(disruption)는 BLT1 발현을 방해하고, 그 결과를 해석하는 것을 어렵게 한다. 따라서, 본 발명자들은 최근 BLT2를 과발현하는 유전자 도입 마우스를 제조하여 그들의 BAL 액(BAL fluid)에서 ROS의 증가된 수준을 검출하였다 (Cho et al., unpublished observation). 게다가, 본 발명자들은 OVA 항원노출 전에도, AHR의 현저한 유도를 관찰하였고, 이는 천식의 병인에서 BLT2의 상기 명시된 매개적 역할을 더욱 지지한다 (Cho et al., unpublished observation).

<110> 이것은 천식과 BLT-연결된 신호전달 과정(signaling cascade) 사이에 관련성을 처음으로 밝힌 것이다. 본 발명자들은 LTB4가 BLT1- 및 BLT2-의존성 신호전달 경로 둘 다에 걸쳐 영향을 미치고 이 둘은 알레르기성 천식의 발달 동안 함께 작용할 수 있음을 나타낸다. 상기 BLT2-연결된 경로의 더 나은 이해와 상기 BLT1 및 BLT2 경로 사이에 가능한 교차-조절은 LTB4-매개된 알레르기성 병인에서 그들의 역할을 명확히 설명하는데 도움이 될 것이다. 그뿐 아니라, LTB4-BLT2-ROS 경로가 천식에 관련되어 있다는 본 발명의 발견은 알레르기성 질환에 대한 새로운 진단 툴 및 치료법의 발전에 기초로서 제공될 것이다.

실시예

<123> 본 발명의 구체적이고 바람직한 구현에는 이하 실시예에 보여지는 바와 같이 설명된다. 그러나, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는, 본 발명의 상세한 설명을 고려하여, 본 발명의 요지 및 범위 내에서 변형 및 개량을 할 수 있는 것으로 보아야 한다.

<124> [시약]

<125> 2',7'-디클로로플루오레세인(dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA)은 Molecular Probes (Eugene, OR)로부터 구입하였다. BSA 및 DMSO는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)로부터 입수하였다. 아세틸-메타콜라인 클로라이드(Acetyl-methacholine chloride)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 기타 모든 화학제는 표준 소스로부터 입수하였으며 분자생물학 등급 또는 더 높은 것을 사용하였다. 모든 마우스는 고려대학교 마우스 설비에서 특이적 병원체가 없는 조건 하에서 사육하였으며, 실험은 Animal Research Committee에 의해 인가된 프로토콜의 변수 내에서 수행되었다.

<126> **실시예 1: 마우스의 감작(sensitization) 및 항원노출(challenge)**

<127> 암컷 BALB/c 마우스 및 C57BL/6 마우스(7 주령; 18~20 g)을 Orientbion Inc. (Seoungnam, Korea)로부터 입수하였다. 감작 및 항원노출은 이전에 개시된 방법을 약간 변형하여 수행하였다 (28). 간단히 설명하면, 암컷 C57BL/6 마우스 (7 주령; 18~20 g)는 2.5 mg의 어쥬반트 알루미늄 히드로퍼옥사이드 겔(adjuvant aluminum hydroperoxide gel, alum) (Pierce, Rockford, IL)에 유화시킨 200 μ g 난백알부민(ovalbumin, OVA)을 복강 내로(intraperitoneal; i.p.) 주사하여 면역화하였다. alum (2.5 mg)에 흡착시킨 20 μ g OVA의 두 번째 i.p.

주사는 10일 후 투여하였다. 추가 10일 후, 마우스는 3일간 계속하여 매일 30분간 생리식염수에 1% OVA의 에어로졸(aerosol)에 노출시켰다. 25일째에, 마우스는 10% OVA 에어로졸로 자극함으로써 최종적으로 항원노출(challenged)시켰다. 저해 실험을 위해, 센스 또는 안티센스 BLT2 (1.6 mg/kg)는 상기 10% OVA 항원노출 전 24시간 및 그 다음 1시간에 정맥주사하였다. 상기 마우스는 27일째에 희생하여 천식 표현형을 평가하였다. 안티센스 BLT2 올리고뉴클레오티드 (5'-GCTCAGTAGTGTCTCATTC-3'), 센스 BLT2 올리고뉴클레오티드 (5'-GGAATGAGACACTACTGAGC-3').

<128> 다른 방법으로, BALB/c 마우스는 2.5 mg의 alum (Pierce, Rockford, IL)에 유화된 20 µg OVA의 복강 내 주사로 1일째에 감작(sensitized)되었다. 최초 감작 후 21, 22, 및 23일째에, 상기 마우스는 초음파 분무기(ultrasonic nebulizer)를 이용하여 1% OVA의 에어로졸로 30분간 항원노출시켰다. LY255283 (2.5 mg/kg) 또는 비히클 대조군(vehicle control; DMSO)은 1% OVA 항원노출 전 1시간에 정맥내로 투여하였다. 마우스는 25일째에 희생하여, 천식 표현형을 평가하였다.

<129> **실시예 2: OVA-유도성 천식 마우스 폐에서 BLT2 mRNA의 유도**

<130> 1) LTB4의 정량 (도 1a)

<131> LTB4의 수준은 류코트리엔 B4 효소 면역법(EIA) Biotrak™ system (Amersham Biosciences, UK)으로 정량하였다. 간단히 설명하면, 200 µl BAL 액은 12시간 동안 동결-건조하여 농축하고 분석 버퍼에서 재구성하였다. 상기 분석의 감도는 0.3 pg/well로 6 pg/ml과 동일하다.

<132> 2) 반정량 RT-PCR (도 1b)

<133> 총 RNA는 Easy-blue RNA 추출시약 (Intron, Korea)을 이용하여 폐 샘플에서 추출하였다. 상기 추출된 RNA(1 µg)는 42°C에서 1시간 동안 역전사하고 다음의 프라이머들을 이용하여 PCR로 증폭하였다: 마우스에 대한 BLT2, 5'-CAGCATGTACGCCAGCGTGC-3' (센스) 및 5'-CGATGGCGCTCACCAGACG-3' (안티센스); 및 마우스에 대한 BLT1, 5'-GCATGTCCCTGTCTCTGTTG-3' (센스) 및 5'-CGGGCAAAGGCCTTAGTACG-3' (안티센스). 전사의 반정량적인(semiquantitative) 분석을 위해, 본 발명자들은 먼저 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 선형 증폭(linear amplification)에 의해 최적 PCR 조건을 결정하였다. 그 후에, 28 사이클이 BLT 증폭에 사용되었으며 선형 범위(linear range)에 있는 것으로 확인하였다. 상기 증폭된 PCR 산물은 1.2% 아가로스 겔 상에서 분리하여 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하였다.

<134> 3) 마우스에서 BLT2에 대한 원위치 혼성화(in situ hybridization) (도 1c)

<135> 마우스 BLT2를 코딩하는 cDNA는 상기 마우스 BLT2 프라이머로 PCR하여 증폭하였고 시퀀싱으로 확인하였다. 모든 선형화된 벡터는 T7 중합효소 및 digoxigenin (DIG) RNA labeling mix (Roche, Germany)로 전사시켰다. 포매된(embedded) 마우스 폐 조직을 자일렌(xylene)으로 탈파라핀(deparaffinize)하였고, 이후에 원위치 혼성화를 제조사의 프로토콜에 따라 원위치 혼성화 키트(in situ hybridization detection kit; InnoGenex, CA)를 이용하여 수행하였다.

<136> **실시예 3: 약리학 적 길항제(LY255283)를 이용한 BLT2 신호전달의 차단은 기도 염증을 억제한다.**

<137> 1) 반정량 RT-PCR (도 2a)

<138> 총 RNA는 Easy-blue RNA 추출시약 (Intron, Korea)을 이용하여 폐 샘플에서 추출하였다. 상기 추출된 RNA(1 µg)는 42°C에서 1시간 동안 역전사하고 다음의 프라이머들을 이용하여 PCR로 증폭하였다: 마우스에 대한 BLT2, 5'-CAGCATGTACGCCAGCGTGC-3' (센스) 및 5'-CGATGGCGCTCACCAGACG-3' (안티센스); 및 마우스에 대한 BLT1, 5'-GCATGTCCCTGTCTCTGTTG-3' (센스) 및 5'-CGGGCAAAGGCCTTAGTACG-3' (안티센스). 전사의 반정량적 분석을 위해, 본 발명자들은 먼저 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 선형 증폭(linear amplification)에 의해 최적 PCR 조건을 결정하였다. 그 후에, 28 사이클이 BLT 증폭에 사용되었으며 선형 범위(linear range)에 있는 것으로 확인하였다. 상기 증폭된 PCR 산물은 1.2% 아가로스 겔 상에서 분리하여 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하였다.

<139> 2) 실시간 PCR (도 2b)

<140> 실시간 PCR을 위해, 총 RNA는 Easy-blue RNA 추출시약 (Intron, Korea)을 이용하여 폐 조직으로부터 추출되었으며, 이후에 상기 추출된 RNA를 M-MLV 역전사효소 (Invitrogen, CA)를 이용하여 역전사하였다. 상기 PCR 반응은 이후 제조사의 설명서에 따라 LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Germany)를 이용하여 수행하였

다.

<141> 3) 폐의 BAL 및 조직학적 분석 (도 2c-d)

<142> BAL 액의 염증 세포는 원심분리(1,000 g에서 3분간)에 의해 수집되었으며 PBS에서 한번 세척하였다. 세포들은 헤모사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 카운트하였으며, 생존율은 트립판 블루 배제 방법(trypan blue exclusion)으로 평가하였다. 또한, 사이토스핀(cytospin)은 각 BAL 샘플을 위해 수행되었으며, 그 후 Diff-Quick (Merck, Dorset, U.K.)으로 염색하여, 구별가능한 세포 카운트가 되도록 할 수 있다. 조직학적 분석을 위해, 상기 마우스의 폐는 OVA 항원노출 48시간 후 절개하여 PBS에서 10% 포름알데히드로 고정하고 에탄올-자일렌(ethanol-xylene)으로 탈수하여 파라핀으로 포매하였다. 다중의 파라핀-포매된 6- μ m 절편(sections)은 0.5% 젤라틴-코팅된 슬라이드 상에 위치시키고, 탈파라핀(deparaffinized)하여, 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E)으로 염색하였다. 이미지는 DP71 디지털 카메라 (Olympus, Tokyo, Japan)가 장착된 BX51 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 획득하였다.

<143> **실시예 4: 약리학적 안티센스 BLT2를 이용한 BLT2 신호전달의 차단은 기도 염증을 억제한다.**

<144> 1) 반정량 RT-PCR (도 3a)

<145> 총 RNA는 Easy-blue RNA 추출시약 (Intron, Korea)을 이용하여 폐 샘플에서 추출하였다. 상기 추출된 RNA(1 μ g)는 42°C에서 1시간 동안 역전사하고 다음의 프라이머들을 이용하여 PCR로 증폭하였다: 마우스에 대한 BLT2, 5'-CAGCATGTACGCCAGCGTGC-3' (센스) 및 5'-CGATGGCGCTCACCAGACG-3' (안티센스); 및 마우스에 대한 BLT1, 5'-GCATGTCCCTGTCTCTGTG-3' (센스) 및 5'-CGGGCAAAGGCCTTAGTACG-3' (안티센스). 전사의 반정량적 분석을 위해, 본 발명자들은 먼저 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)의 선형 증폭(linear amplification)에 의해 최적 PCR 조건을 결정하였다. 그 후에, 28 사이클이 BLT 증폭에 사용되었으며 선형 범위(linear range)에 있는 것으로 확인하였다. 상기 증폭된 PCR 산물은 1.2% 아가로스 겔 상에서 분리하여 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하였다.

<146> 2) 실시간 PCR (도 3b)

<147> 실시간 PCR을 위해, 총 RNA는 Easy-blue RNA 추출시약(Intron, Korea)을 이용하여 폐 조직으로부터 추출되었으며, 이후에 상기 추출된 RNA를 M-MLV 역전사효소 (Invitrogen, CA)를 이용하여 역전사하였다. 상기 PCR 반응은 이후 제조사의 설명서에 따라 LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Germany)를 이용하여 수행하였다.

<148> 3) 폐의 BAL 및 조직학적 분석 (도 3c-d)

<149> BAL 액의 염증 세포는 원심분리(1,000 g에서 3분간)에 의해 수집되었으며 PBS에서 한번 세척하였다. 세포들은 헤모사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 카운트하였으며, 생존율은 트립판 블루 배제 방법(trypan blue exclusion)으로 평가하였다. 또한, 사이토스핀(cytospin)은 각 BAL 샘플을 위해 수행되었으며, 그 후 Diff-Quick (Merck, Dorset, U.K.)으로 염색하여, 구별가능한 세포 카운트가 되도록 할 수 있다. 조직학적 분석을 위해, 상기 마우스의 폐는 OVA 항원노출 48시간 후 절개하여 PBS에서 10% 포름알데히드로 고정하고 에탄올-자일렌(ethanol-xylene)으로 탈수하여 파라핀으로 포매하였다. 다중의 파라핀-포매된 6- μ m 절편(sections)은 0.5% 젤라틴-코팅된 슬라이드 상에 위치시키고, 탈파라핀(deparaffinized)하여, 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E)으로 염색하였다. 이미지는 DP71 디지털 카메라(Olympus, Tokyo, Japan)가 장착된 BX51 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 획득하였다.

<150> **실시예 5: 기도 AHR에 대한 BLT2 저해의 효과**

<151> 1) 메타콜린에 반응하는 AHR의 측정 (도 4a-b)

<152> 기도 AHR은 이전에 개시된 바와 같이 (29), 전신 체적변동기록계(whole-body plethysmograph)를 이용하여 최종 OVA 항원노출 24시간 후 제어되지 않고, 의식이 있는 마우스에서 측정되었다. 마우스는 기압식 체적변동기록계 챔버(All Medicus Co., Seoul, Korea)에 위치시키고, 기준선 기록(baseline reading)을 하고 3분 동안 평균을 냈다. 농도를 증가시키면서(6.25 mg/ml ~ 50 mg/ml) 에어로졸된 메카콜린은 주 챔버의 입구를 통해 3분간 분무되었다. 각 분무 후 3분 동안 기록을 하고 평균을 내어, Penh(enhanced pause)을 측정하였다. 신호들을 분석하여 호흡수(respiratory rate), 호흡량(tidal volume), 흡기 시간(inspiratory time, Ti), 호기 시간(expiratory time, Te), 최대 흡기유량(peak inspiratory flow, PIF), 최대 호기유량(peak expiratory flow, PEF) 및 완화 시간(relaxation time, RT)를 포함하는 전신 흐름 변수들(whole body flow parameter)을 산출하였다. 이러한 변수들은 메타콜린에 대한 기도 반응성의 측정에 사용되는 단위 없는 변수(unitless

parameter)인, Penh(enhanced pause)를 계산하는데 사용된다. Penh는 다음의 식에 따라 기관지수축(bronchoconstriction) 시 폐 저항(pulmonary resistance)에서의 변화를 반영한다: $Penh = [(TeRT) \div RT] \times (PEF \div PIF)$. 각 동물에 대한 기준선 Penh 측정은 3분간 평균하여 기록된다. 결과는 기준선 Penh(생리식염수 항원노출 후)을 100%로 나타내는 경우에, 메타콜린의 각 농도로 항원노출 후 Penh의 증가 퍼센트로 나타낸다. Penh 값은 각 분무(nebulization) 후 3분간 평균하여 평가하였다.

<153> 실시예 6: BLT2 저해에 의한 ROS 생성의 약화

<154> 1) BAL 액에서 ROS 수준의 측정 (도 5a)

<155> BAL 액에서 ROS 수준은 이전에 개시된 바와 같이 (30) DCF 형광의 작용으로 측정하였다. 간단히 설명하면, BAL 액의 세포들은 원심분리(1,000 g에서 3분간)에 의해 수집되었으며 상기 펠렛은 PBS로 세척하여 H₂O₂-감수성 플루오로포어(fluorophore) 2',7'-디클로로플루오로세인 디아세테이트(dichlorofluorescein diacetate, DCF-DA, 10 μM) (Molecular Probes, Eugene, OR)로 10분간 인큐베이션하였다. 이는, 흡수 시, 세포내 H₂O₂를 DCF로 형광표지한다. 이어서 세척하고, 상기 세포는 FACS Calibur™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 즉시 관찰하였다. DCF 형광은 488 nm에서 여기되고 유발된 방출은 515 nm 롱-패스 필터로 여과하였다.

<156> 2) LTB₄의 정량 (도 5b)

<157> LTB₄의 수준은 류코트리엔 B₄ 효소 면역 분석(EIA) Biotrak™ system (Amersham Biosciences, UK)로 정량하였다. 간단히 설명하면, 200 μl BAL 액은 12시간 동안 동결건조하여 농축하고 분석 버퍼에 재구성하였다. 상기 분석은 0.31 내지 40 pg/well 범위에 있는 표준 LTB₄로 계산하였다. 96-웰 플레이트에서 BAL 액의 샘플 및 표준 LTB₄를 항혈청(antiserum)으로 2시간 동안 인큐베이션한 다음, 이어서 실온에서 1시간 동안 LTB₄ 페록시다아제로 결합(conjugate)시켰다. 결합하지 않는 리간드를 제거하기 위해, 상기 웰을 흡인하고 버퍼로 4회 세척하였다. 그 후 기질(테트라메틸벤지딘)을 첨가하고 산 용액을 첨가함으로써 반응을 중단시켰으며 분광광도계(spectrophotometer)로 450 nm에서 색을 측정하였다. 상기 분석의 감도는 0.3 pg/well로 6 pg/ml과 동일하다. 그룹 간 차이의 통계학적 유의성은 변화의 분석에 의해 평가되었으며, P < 0.05는 유의한 것으로 간주하였다.

<158> 실시예 7: BLT2 저해에 의한 NF-κB 활성화의 약화

<159> 1) EMSA(Electrophoretic mobility shift assay) (도 6a)

<160> 공통의 NF-κB 결합 모티프(consensus NF-κB binding motif)에 대응하는 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드 및 돌연변이 서열은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA)로부터 구입하였으며 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제(T4 polynucleotide kinase; Roche, Germany)를 이용하여 γ-32P-ATP로 라벨링하였다. 다음으로 표지된 올리고뉴클레오타이드는 제조사의 프로토콜에 따라 ProbeQuart™ G-50 microcolumns (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd., UK) 상에서 유리 γ-32P-ATP로부터 분리하였다. 표지된 올리고뉴클레오타이드, 10 μg의 핵 추출물 및 EMSA 버퍼는 20 μl의 최종 용량으로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였고, 이 후 상기 반응물을 전기영동하였다.

<161> 2) 폐 세포 용해물의 SDS-PAGE 및 면역블롯 분석 (도 6b-e)

<162> 폐 샘플은 총 단백질의 제조를 위해 설명한 바와 같이 제조하였다. 세포 용해물은 13,000 g에서 10분간 원심분리하고 상등액은 10% 아크릴아마이드 겔 상에서 SDS-PAGE를 수행한 다음, Novex wet transfer system(100 V에서 2시간)으로 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막에 옮겼다. 상기 막은 무지방 건조 스킵 밀크(nonfat dry skim milk)가 첨가된 0.05% (v/v) Tween20에 5% (w/v)를 포함하는 TBS(Tris-buffered saline)에서 1시간 동안 차단한 후, 3% (w/v) BSA가 첨가된 0.05% (v/v) Tween 20을 포함하는 TBS에서 1차 항체로 2시간 동안 인큐베이션한 다음, ECL (enhanced chemiluminescence; Amersham Pharmacia Biotech, Ltd., UK)에 의한 발달 전 양고추냉이 페록시다아제(HRP)-결합된 2차 항체로 1시간 동안 인큐베이션하였다.

<163> 실시예 8: 임상의 천식 환자의 샘플에서 BLT2의 증가된 발현

<164> 1) 기관지경검사(bronchoscopy) (도 7a-f)

<165> 기관지 생체검사 표본(specimens)은 4명의 비천식 대조군(normal), 4명의 경증(mild) 기관지 천식 환자 및 5명의 중간정도(moderate) 기관지 천식 환자로부터 얻었다. 상기 환자들은 순천향대학교 병원의 외래 임상환자로부터 모집하였다. 비천식 대조군의 환자들은 기관지-폐 질환의 병력이 없고 예상치 FEV₁ > 80% 및 FEV₁/FVC% >

70%였다. 상기 경증 기관지 천식군은 FEV1 > 70%였고 중간정도 기관지 천식군은 FEV1 < 70%였다. 모든 표본은 포르말린-고정, 파라핀-포매 및 일상적인 조직학적 진단을 수행하였다. 상기 연구는 순천향대학교 병원의 윤리 위원회에서 인가받았으며, 환자들은 고지에 입각한 동의서를 작성하여 제공하였다. 기관지 생체검사 표본에서 BLT2 발현의 패턴은 알칼리 포스파타아제 기질 시스템(alkaline phosphatase substrate system)을 이용하여 면역조직화학적 검출하였다.

실시예 9: BLT2 저해는 기도에서 T 림프구의 보충을 방해하지 않는다.

1) BAL 액에서 세포의 유세포측정 분석 (도 7a-b)

유세포측정 분석을 위해, BAL 액의 세포는 0.01% 아지드화 나트륨(sodium azide) 및 0.1% BSA를 포함하는 50 μ l의 PBS에 현탁하였다. BAL 백혈구는 2.4G2 항-Fc γ III/II 수용체(BD PharMingen)로 30분간 인큐베이션하고 FITC-결합된 항-마우스 TCR, 사슬 (BD PharMingen) 및 PE-cy5 항-마우스 CD8a (BD PharMingen) 또는 PE 래트 항-마우스 CD4 (BD PharMingen)로 4°C에서 30분간 염색하였다. 세포형광측정(cytofluorimetry)은 FACS CaliburTM (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)으로 수행하였으며, 상기 결과는 CellQuest 소프트웨어 (Becton-Dickinson)로 분석하였다.

실시예 10: 안티센스 Rac 올리고뉴클레오티드 실험

올리고뉴클레오티드는, Genotech Co. (Korea)로부터 포스포로티오에이트 백본(phosphorothioate backbone)으로 합성하여 엔도뉴클레아제(endonuclease)에 대한 저항성을 개선하였다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드는 유린 Rac mRNA 서열의 5' 말단과 유사한 17 뉴클레오티드로 구성되는데, 이는 번역 개시부위(initiation site)에 연결된다. 대조군 Rac 올리고뉴클레오티드는 상기 안티센스 올리고뉴클레오티드로 동일한 뉴클레오티드 조성물을 포함한다. 올리고뉴클레오티드(1.25 mg/kg 체중)는 OVA 자극 24 및 4시간 전에 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. 본 연구에 사용된 상기 올리고뉴클레오티드 서열은 다음과 같다: 대조군 Rac: 5'-GATCAGTGCACACAGTG-3' 안티센스 Rac: 5'-CACTTGATGGCCTGCAT-3'.

1) 폐의 BAL 및 조직학적 분석 (도 9a)

BAL 액의 염증 세포는 원심분리(1,000 g에서 3분간)에 의해 수집되었으며 PBS에서 한번 세척하였다. 세포들은 헤모사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 카운트하였으며, 생존율은 트립판 블루 배제 방법(trypsin blue exclusion)으로 평가하였다. 또한, 사이토스핀(cytospin)은 각 BAL 샘플을 위해 수행되었으며, 그 후 Diff-Quick (Merck, Dorset, U.K.)으로 염색하여, 구별가능한 세포 카운트가 되도록 할 수 있다. 조직학적 분석을 위해, 상기 마우스의 폐는 OVA 항원노출 48시간 후 절개하여 PBS에서 10% 포르말린으로 고정하고 에탄올-자일렌(ethanol-xylene)으로 탈수하여 파라핀으로 포매하였다. 다중의 파라핀-포매된 6- μ m 절편(sections)은 0.5% 젤라틴-코팅된 슬라이드 상에 위치시키고, 탈파라핀(deparaffinized)하여, 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H&E)으로 염색하였다. 이미지는 DP71 디지털 카메라 (Olympus, Tokyo, Japan)가 장착된 BX51 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 획득하였다.

2) EMSA(Electrophoretic mobility shift assay) (도 9b)

공통의 NF- κ B 결합 모티프(consensus NF- κ B binding motif)에 대응하는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 및 돌연변이 서열은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA)로부터 구입하였으며 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제(T4 polynucleotide kinase; Roche, Germany)를 이용하여 γ -32P-ATP로 라벨링하였다. 다음으로 표지된 올리고뉴클레오티드는 제조사의 프로토콜에 따라 ProbeQuartTM G-50 microcolumns (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd., UK) 상에서 유리 γ -32P-ATP로부터 분리하였다. 표지된 올리고뉴클레오티드, 10 μ g의 핵 추출물 및 EMSA 버퍼는 20 μ l의 최종 용량으로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였고, 이 후 상기 반응물을 전기영동하였다.

3) 폐 세포 용해물의 SDS-PAGE 및 면역 블롯 분석 (도 9c)

폐 샘플은 총 단백질의 제조를 위해 설명한 바와 같이 제조하였다. 세포 용해물은 13,000 g에서 10분간 원심분리하고 상등액은 10% 아크릴아마이드 겔 상에서 SDS-PAGE를 수행한 다음, Novex wet transfer system(100 V에서 2시간)으로 PVDF(polyvinylidene difluoride) 막에 옮겼다. 상기 막은 무지방 건조 스킴 밀크(nonfat dry skim milk)가 첨가된 0.05% (v/v) Tween20에 5% (w/v)를 포함하는 TBS(Tris-buffered saline)에서 1시간 동안 차단한 후, 3% (w/v) BSA가 첨가된 0.05% (v/v) Tween 20을 포함하는 TBS에서 1차 항체로 2시간 동안 인큐베이션 한 다음, ECL (enhanced chemiluminescence; Amersham Pharmacia Biotech, Ltd., UK)에 의한 발광 전 양고

추냉이 페록시다아제(HRP)-결합된 2차 항체로 1시간 동안 인큐베이션하였다.

<177> **결과 1: OVA-유도성 천식 마우스 폐에서 BLT2 mRNA의 유도**

<178> OVA-유도된 알레르기성 천식에서 BLT2의 역할을 평가하기 위해, 본 발명자들은 BLT2 및 그것의 리간드 LTB4의 수준을 측정하였다. 도 1a에 나타난 바와 같이, BAL 액에서 LTB4 수준은 천식의 무린 모델에서 OVA 항원노출 후 증가하였으며, 항원노출 후 48시간 후 최고치를 나타냈다. 반정량 RT-PCR 분석은 폐에서 BLT2 mRNA의 수준이 OVA 항원노출 후 유의하게 증가한 반면, BLT1 mRNA의 수준은 약간 증가할 뿐임을 보여주었다 (도 1b). 폐에서 BLT2 발현의 분포를 측정하기 위해, 본 발명자들은 다음으로 안티센스 BLT2 프로브로 원위치 혼성화(in situ hybridization)를 수행하였고 내피(endothelium)에서 약간의 유도가 있는 상피(epithelium)에서 BLT2 발현의 상당한 증가를 검출하였다 (도 1c). 따라서 LTB4와 그 수용체 BLT2는 둘다 천식에서 상향조절되는 것으로 나타난다.

<179> **결과 2: 약리학 적 길항제 또는 안티센스 BLT2를 이용한 BLT2 신호전달의 차단은 기도 염증을 억제한다.**

<180> 천식성 기도 염증에서 가능한 매개 역할을 평가하기 위해, 특이적 BLT2 길항제인, LY255283을 1% OVA 항원노출 1시간 전에 정맥주사로 투여하였으며, 그 후 마우스는 항원노출 48시간 후 희생되었다. 반정량 RT-PCR (도 2a) 또는 실시간 PCR 분석 (도 2b)은 폐에서 BLT2 mRNA의 수준이 OVA 항원노출 후 크게 증가하였으며, LY255283의 투여는 BLT2 수준을 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다. 폐의 염증 세포의 침윤의 조직학적 분석은 OVA 항원노출 후 증가된 기도 폐색(obstruction) 및 백혈구 침윤을 보여주었으며 (도 2c & 2d); 다시, LY255283은 그 효과를 감소시켰다 (도 2e). 실험재료 및 방법에 개시된 바와 같이, 기도 염증을 등급매기는 것(grading)을 수반하는, 조직학적 샘플의 정량 분석은 LY255283이 대조군과 비교하여, ~66%까지 염증 스코어를 감소시키는 것으로 나타났다 (도 2f).

<181> 천식의 병인에서 BLT2의 역할을 더 평가하기 위해, 안티센스 BLT2의 효과를 분석하였다. 이 실험에서, 안티센스 BLT2를 10% OVA 항원노출 24시간 및 1시간 전에 정맥주사로 투여하였으며, 마우스는 항원노출 48시간 후 희생되었다. 이어 반정량 RT-PCR 분석은 상기 안티센스 BLT2가 BLT1과는 상관없이 폐에서 BLT2 발현을 감소시키는 것으로 나타났다 (도 3a). 실시간 PCR 분석 또한 유사한 결과를 얻었다 (도 3b). 기도 호산구 축적(eosinophil accumulation)은 천식성 폐 염증의 특징(hallmark)으로, 본 발명자들은 BAL 액에서 호산구의 축적을 검출하였으며, 이는 10% OVA 항원노출 48시간 후 최고치를 나타냈다. 안티센스 BLT2의 투여는 BAL 액에서 호산구 침윤을 ~87%까지 감소시켰으나, 센스 BLT2는 아무런 저해효과도 없었다 (도 3c). 그에 더하여, 조직학적 분석은 OVA 항원노출 후 증가된 기도 폐색 및 백혈구 침윤을 나타냈으며, 이러한 효과는, 역시, 안티센스 BLT2에 의해 감소되었다 (도 3d). 이러한 결과와 일관되게, 안티센스 BLT2의 투여는 대조군과 비교하여, 염증 스코어를 ~67%까지 감소시켰다.

<182> **결과 3: 기도 AHR에 대한 BLT2 저해의 효과**

<183> AHR에 대한 BLT2의 기여를 시험하기 위해, 본 발명자들은 메타콜린(6.25 - 50 mg/ml)에 의해 유도되는 Penh(enhanced pause)의 증가를 측정하였다. 본 발명자들은, OVA-항원노출된 마우스가 흡입된 메타콜린에 대하여 AHR이 현저하게 발전하고, LY255283 또는 안티센스 BLT2가 Penh을 ~70%까지 감소시킨다는 것을 밝혔으며, 이는 BLT2가 AHR 반응에 대하여 어떤 점에서는 결정적인 것임을 시사한다 (도 4).

<184> **결과 4: BLT2 저해에 의한 ROS 생성의 약화**

<185> 'LTB4-BLT2' 과정(cascade)은 증가된 ROS 생성을 초래하는 것으로 이전에 밝혀졌다 (7). 이에 본 발명자들은 OVA 항원노출 후 BAL 액에서 ROS 수준을 측정하였다. 예상대로, BAL 액에서 ROS 수준은 OVA-항원노출된 마우스에서 증가하였다. 특히, 센스 BLT2가 아닌, 안티센스 BLT2의 주사는 ROS 수준을 ~70%까지 유의하게 감소시켰는데 (도 5a), 이는 ROS가 천식 증상을 초래하는 'LTB4-BLT2' 신호전달에서 매개자로서 작용함을 나타낸다. 또한 본 발명자들은 안티센스 BLT2의 투여가 BAL 액에서 LTB4의 수준을 ~72%까지 억제하는 것으로 관찰되었으며 (도 5b), 이는 LTB4와 BLT2 사이에 각각이 서로에게 영향을 미치는 것과 같은, 크로스-토크(cross-talk)가 있음을 나타낸다. 실제로, 크로스-토크의 유사한 사례는 에이코노사이드(eicosanoid) 지질 리간드와 그 수용체 사이에서 이미 개시되어 있다 (30, 31).

<186> **결과 5: BLT2 저해에 의한 NF-κB 활성화의 약화**

<187> ROS는 NF-κB 및 AP-1과 같은 산화환원-민감성 인자에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다 (32). 'LTB4-BLT2'가 생체내에서 천식 증상을 일으키는 하류 신호전달 메커니즘을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 EMSA를

사용하여 OVA-항원노출된 마우스의 폐에서 NF- κ B 활성화를 평가하였다. 본 발명자들은 NF- κ B 공통 서열에 대응하는 32P-표지된 올리고뉴클레오타이드에 결합하는 폐 조직에서 얻은 핵 추출물의 능력에 대하여 테스트하였다. 본 발명자들은 OVA 항원노출이, 안티센스 BLT2의 앞선 투여로 약화되었던, NF- κ B 결합 활성의 증가를 이끌어냄을 확인하였다 (도 6a). 더욱이, 여분의 표지되지 않은 올리고뉴클레오타이드(cold)를 이용한 경쟁 분석(competition assays)은 상기 결합이 특이적임을 확인시켜주었다. NF- κ B는 보통은 I κ B- α 와 복합된 비활성화(inactivated)된 형태로 세포질에 존재한다. 자극이 있는 경우, I κ B- α 는 빠르게 인산화되고 분해되어, NF- κ B가 핵으로 이동하게 한다. NF- κ B 활성화의 징후에 따라, 본 발명자들은 BLT2 저해 후 I κ B- α 의 수준을 분석하였다. 본 발명자들은 OVA 항원노출 후 I κ B- α 의 상당한 분해를 검출하였으나, 안티센스 BLT2 (도 6b) 또는 LY255283은 그러한 분해를 ~50%까지 감소시켰다. NF- κ B의 활성화가 부착 분자들(예컨대, VCAM-1)을 포함하여, 다양한 염증 유전자를 유도한다는 것은 알려져 있다 (33). 따라서 본 발명자들은, NF- κ B에 의해 조절되고 보고에 따르면 호산구 침윤에 관련되어 있는 (34), VCAM-1의 수준에 대한 BLT2 차단 효과도 시험하였다. 도 6c 및 6e에서 나타난 바와 같이, OVA 항원노출은 폐 조직에서 VCAM-1의 유도를 일으켰으며, 안티센스 BLT2 또는 LY255283은 이러한 효과를 ~60%까지 억제하였다.

<188> **결과 6: 임상 천식 환자의 샘플에서 BLT2의 증가된 발현**

<189> 다음으로 본 발명자들은 면역조직화학적 분석을 이용하여 BLT2 수준이 인간 천식 환자에서도 증가되는지를 확인하였다. 기관지 생체검사 표본은 비천식 대조군(n=4) 및 경증(n=4) 또는 중간정도(n=5) 기관지 천식 환자로부터 입수하였다. 천식의 무린 모델에서 얻은 결과에 따르면 (도 1c), 본 발명자들은 BLT2 발현이 모든 경증 및 중간정도 기관지 천식 표본에서 현저하게 증가되는 것으로 확인하였다. 천식 환자의 기관지 표본들(D-F)은 매우 증가된 BLT2의 발현을 보이는 반면, 건강한 대조군(A-C)의 표본들은 그렇지 않았으며 (도 7), 이는 천식의 임상 병인에서 BLT2의 잠재적인 역할을 시사한다. BLT2 발현은 환자 폐 샘플에서 기도 상피층 및 미세혈관 내피에서 주로 증가되는데, 이는 천식의 무린 모델에서 관찰된 패턴과 유사하다.

<190> **결과 7: BLT2 저해는 기도에서 T 림프구의 보충을 방해하지 않는다.**

<191> BLT1은 알레르기성 폐 염증의 모델에서 기도 내 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 초기 보충을 초래하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 LTB4-BLT1 경로가 초기 면역 시스템 활성화 및 작동자(effector) T 세포 보충의 연결에 관련이 있음을 나타낸다 (11). 본 발명자들은 BLT2가 기도에서 T 세포 수송(T cell trafficking)에 유사한 역할을 하는지 의문을 가졌다. 본 발명자들은 현저히 많은 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 OVA 항원노출 12시간 후 BAL 액에 보충되는 것을 확인하였다. 중요하게도, 안티센스 BLT2는 기도 내 T 세포 수송에 대한 아무런 저해효과가 없는 반면, 안티센스 BLT1의 주사는 이러한 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 보충을 각각 ~93% 및 ~95%까지 감소시켰다. 이는 천식 반응 동안 'LTB4-BLT2'에 의해 매개된 작용이 'LTB4-BLT1'에 의해 매개된 것과 완전히 별개임을 의미한다.

<192> **결과 8: 안티센스 Rac는 기도 염증을 저해한다.**

<193> OVA-유도된 알레르기성 염증 반응에서 Rac의 관련성을 확인하기 위해, 본 발명자들은 폐 용해물에서 OVA 자극에 의한 Rac의 활성화를 조사하였다. Rac가 활성화될 때 시토솔(cytosol)에서 막으로 이동한다는 것은 잘 알려져 있다. 따라서, 본 발명자들은 OVA 항원노출된 마우스의 폐 조직로부터 막 단백질을 준비하여 Rac 활성화의 마커로서 막 분획(membrane fraction)에서 Rac의 양을 비교하였다. Rac는 초기 시점(1 내지 3시간)에 OVA 자극에 의해 활성화되어 자극 6시간 후 정상으로 돌아온다 (도 10a).

<194> Rac에 대한 특이적 저해제가 없기 때문에, 본 발명자들은 무린 Rac mRNA 서열의 5' 말단과 유사한 안티센스 Rac 올리고뉴클레오타이드를 디자인하였고, 이는 번역 개시부위를 연결하여 Rac 내생적 발현을 저해한다. 내생적 Rac의 발현에 대한 안티센스 Rac 올리고뉴클레오타이드의 효과를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 마우스의 꼬리 정맥에 상기 올리고뉴클레오타이드를 주사하고 12시간 후 희생시켰다. 예상한 대로, 안티센스 Rac 올리고뉴클레오타이드는 Rac의 내생적 발현을 저해하였으나, 대조군 올리고뉴클레오타이드는 마우스의 폐 조직에서 Rac의 발현에 현저한 영향을 주지는 못하였다 (도 10b).

<195> 천식성 기도 염증에서 Rac의 잠재적 매개 역할을 평가하기 위하여, 특이적 Rac 안티센스를 10% OVA 항원노출 24시간 및 1시간 전에 정맥내로 주사하였으며, 그 후 마우스를 항원노출 48시간 후에 희생시켰다. 폐에서 염증 세포의 침윤의 조직학적 분석은 OVA 항원노출 후 증가된 기도 폐색 및 백혈구 침윤을 나타내었다 (도 9a); 다시, Rac 안티센스는 그 효과를 감소시켰다.

<196> 본 발명자들은 NF- κ B 공통 서열에 대응하는 32P-표지된 올리고뉴클레오타이드에 결합하는 폐 조직에서 얻은 핵 추출물의 능력에 대하여 테스트하였다. 본 발명자들은 OVA 항원노출이, 안티센스 Rac의 앞선 투여로

약화되었던, NF- κ B 결합 활성의 증가를 이끌어냄을 확인하였다 (도 9b). 더욱이, 여분의 표지되지 않은 올리고뉴클레오티드(cold)를 이용한 경쟁 분석(competition assays)은 상기 결합이 특이적임을 확인시켜주었다.

<197> 부착 분자(adhesion molecules)(예컨대, VCAM-1)를 포함하여, NF- κ B의 활성화가 다양한 염증성 유전자를 유도한다는 것은 알려져 있다 (33). 따라서 본 발명자들은, NF- κ B에 의해 조절되고 보고에 따르면 호산구 침윤에 관련되어 있는 (34), VCAM-1의 수준에 대한 Rac 차단 효과도 시험하였다. 도 8c에서 나타난 바와 같이, OVA 항원노출은 폐 조직에서 VCAM-1의 유도를 일으켰으며, 안티센스 Rac는 이러한 효과를 억제하였다 (도 9c).

<198> **결과 9: BLT2 안티센스 올리고뉴클레오티드 발현은 BLT2 발현에 영향을 미친다.**

<199> 억제된 BLT2 발현 수준은 RT-PCR로 측정하였다. Rat2-BLT2 안정한 세포는 6웰 플레이트 상에 플레이트 당 5×10^4 세포의 밀도로 평판 배양하였다. 24시간 후, 세포는 BLT2 특이적 안티센스 및 센스 올리고뉴클레오티드 플라스미드로 리포펙타민 시약(Lipofectamin reagent)과 함께 순간적으로 트랜스펙션 시킨 후 추가 24시간 동안 10% FBS가 보충된 신선한 DMEM에서 배양하였다. 추가 배양 후, 트랜스펙션된 세포는 BLT2 전사체 분석을 위해 회수하였다. 총 RNA는 역-전사하였고 역-전사했고 PCR 증폭은 BLT2 정방향 프라이머: 5' tctcatcgggcatcacaggt 3' 및 reverse primer: 5' ccaagctccacaccagaag 3'으로 수행하였다. 트랜스펙션 되지 않은 Rat2-BLT2 안정한 세포 cDNA는 음성대조군(negative control)으로서 사용되었으며 GAPDH는 내부대조군(internal control)으로 나타내었다. 도 9는 RT-PCR에 의해 BLT2 발현 수준에 대한 BLT2 안티센스 올리고뉴클레오티드의 억제효과를 나타낸다. 상기 결과는 BLT2 mRNA의 수준이 안티센스 올리고뉴클레오티드에 의해 감소되었으나, BLT2 mRNA의 수준은 센스 올리고뉴클레오티드에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

<200> **결과 10: BLT2 억제에 대한 BLT2 siRNA 억제 효과**

<201> BLT2 억제에 대한 BLT2 siRNA 억제 효과는 노던 블로팅에 의해 확인하였다. CHO-BLT2 안정한 세포는 60 mm 디쉬에서 1×10^5 cells/plate의 밀도로 평판 배양하였다. 24시간 후, 세포를 BLT2 특이적 siRNA로 순간적으로 트랜스펙션 시키고, NM_019839; 5' GAAGGATGTCGGTCTGCTA 3'에 있는 1705-1724 bp에 올리고펙타민 시약으로 타겟팅한 후 추가 24시간 동안 10% FBS가 보충된 신선한 RPMI 1640에서 배양되었다. 추가 배양 후, 총 RNA는 [32P]-dCTP 표지된 BLT2 프로브로 노던 블롯(Northern blot)을 수행하였다. 스크램블(scramble) RNA 및 코딩되지 않은 서열 BLT2 siRNA는 음성대조군으로 사용하였다. 110 bp PCR 단편은 다음의 두 프라이머를 사용하여 pcDNA3.1-BLT2 클론으로 증폭하였다, 정방향 프라이머: 5' cttctcatcgggcatcacag 3' 및 역방향 프라이머: 5' atccttctgaggcctacaggt 3'. 이러한 프로브는 BLT2 코딩 영역에 주로 위치하였다. 총 RNA는 TRIzol 시약으로 추출한 후 아가로스 겔을 포함하는 MOPS에서 2시간 동안 10 마이크로그램의 총 RNA를 로딩하였다. 이 단계 후, 총 RNA를 20 x SSC 버퍼로 밤새 Hybond N+ 막에 옮겼다. 상기 막은 68°C에서 18시간 동안 혼성화 버퍼에서 [32P]-dCTP 표지된 BLT2 프로브로 혼성화하였다. 그런 다음, 68°C에서 1시간 동안 0.1 x SSC (0.1% SDS)에서 세척하고 방사능사진촬영(autoradiography)을 수행하였다. 도 10은 노던 블롯에 의해 BLT2 발현 수준에 대한 BLT2 siRNA의 억제효과를 나타낸다. 상기 결과는 BLT2 mRNA의 수준이 BLT2 siRNA(코딩 서열)에 의해 감소되었으나, BLT2 mRNA의 수준은 BLT2 siRNA(코딩되지 않은 서열)에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

<202> 상술한 바와 같이, 본 발명자들은 무린 모델을 이용하여 천식의 병인에서 BLT2의 역할을 조사하였으며 안티센스 올리고뉴클레오티드와 같은, BLT2 저해제를 사용함으로써 AHR 및 기도 염증의 발달에 결정적인 역할을 한다는 것을 증명하였다. 따라서, 본 발명에 따른 BLT2 저해제는 천식을 치료하기 위한 치료학적 조성물로서 효과적으로 사용될 수 있다.

<203> 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 앞에서 언급한 상세한 설명에 개시되어 있는 개념 및 구체적인 구현예들이 본 발명의 동일한 목적을 수행하기 위하여 다른 구현예를 변형 또는 디자인하는데 기초로서 쉽게 사용될 수 있는 것으로 인정할 것이다. 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 또한 이러한 동등한 구현예들이 첨부된 특허청구범위에 개시된 본 발명의 요지 및 범위에서 벗어나지 않는 것으로 인정할 것이다.

<204> [References]

- <205> 1. Lewis RA., Austen KF, Soberman RJ (1990) *N Engl J Med* 323:645-655.
- <206> 2. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA., Rouzer CA, Serhan CN (1987) *Science* 237:1171-1176.
- <207> 3. Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T (2001) *Arch Biochem Biophys* 385:231-241.
- <208> 4. Serhan CN (1996) *Nature* 384:23-24.

- <209> 5. Gaudreault E, Thompson C, Stankova J, Rola-Pleszczynski M (2005) *J Immunol* 174:3617-3625.
- <210> 6. Lindsay MA, Perkins RS, Barnes PJ, Giembycz MA (1998) *J Immunol* 160:4526-4534.
- <211> 7. Woo CH, You HJ, Cho SH, Eom YW, Chun JS, Yoo YJ, Kim JH (2002) *J Biol Chem* 277:8572-8578.
- <212> 8. Tager AM, Dufour JH, Goodarzi K, Bercury SD, von Andrian UH, Luster AD (2000) *J Exp Med* 192:439-446.
- <213> 9. Silbaugh SA, Stengel PW, Williams GD, Herron DK, Gallagher P, Baker SR (1987) *Am Rev Respir Dis* 136:930-934.
- <214> 10. Goodarzi K, Goodarzi M, Tager AM, Luster AD, von Andrian UH (2003) *Nat Immunol* 4:965-973.
- <215> 11. Tager AM, Bromley SK, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, Carafone AD, Gerszten RE, Luster AD (2003) *Nat Immunol* 4:982-990.
- <216> 12. Ott VL, Cambier JC, Kappler J, Marrack P, Swanson BJ (2003) *Nat Immunol* 4:974-981.
- <217> 13. Gelfand EW, Dakhama A (2006) *J Allergy Clin Immunol* 117:577-582.
- <218> 14. Taube C, Miyahara N, Ott V, Swanson B, Takeda K, Loader J, Shultz LD, Tager AM, Luster AD, Dakhama A, *et al* (2006) *J Immunol* 176:3157-3164.
- <219> 15. Islam SA, Thomas SY, Hess C, Medoff BD, Means TK, Brander C, Lilly CM, Tager AM, Luster AD (2006) *Blood* 107:444-453.
- <220> 16. Steiner D R, Gonzalez NC, Wood JG (2001) *J Appl Physiol* 91:1160-1167.
- <221> 17. Turner CR, Breslow R, Conklyn MJ, Andresen CJ, Patterson DK, Lopez-Anaya A, Owens B, Lee P, Watson JW, Showell HJ (1996) *J Clin Invest* 97:381-367.
- <222> 18. Montuschi P, Barnes PJ (2002) *J Allergy Clin Immunol* 109:615-620.
- <223> 19. Shindo K, Koide K, Fukumura M (1997) *Thorax* 52:1024-1029.
- <224> 20. Henderson WR, Jr, Lewis DB, Albert RK, Zhang Y, Lamm WJ, Chiang G K, Jones F, Eriksen P, Tien YT, Jonas M, *et al* (1996) *J Exp Med* 184:1483-1494.
- <225> 21. Kamohara M, Takasaki J, Matsumoto M, Saito T, Ohishi T, Ishii H, Furuichi K (2000) *J Biol Chem* 275:27000-27004.
- <226> 22. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa, Shimizu T (1997) *Nature* 387:620-624.
- <227> 23. Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T, Shimizu T (2000) *J Exp Med* 192:421-432.
- <228> 24. Qiu H, Johansson AS, Sjostrom M, Wan M, Schroder O, Palmblad J, Haeggstrom JZ (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6913-6918.
- <229> 25. Terawaki K, Yokomizo T, Nagase T, Toda A, Taniguchi M, Hashizume K, Yagi T, Shimizu T (2005) *J Immunol* 175:4217-4225.
- <230> 26. Miyahara N, Takeda K, Miyahara S, Taube C, Joetham A, Koya T, Matsubara S, Dakhama A, Tager AM, Luster AD, *et al* (2005) *J Immunol* 174:4979-4984.
- <231> 27. Miyahara N, Takeda K, Miyahara S, Matsubara S, Koya T, Joetham A, Krishnan E, Dakhama A, Haribabu B, Gelfand EW (2005) *Am J Respir Crit Care Med* 172:161-167.
- <232> 28. Kanehiro A, Ikemura T, Makela MJ, Lahn M, Joetham A, Dakhama A, Gelfand EW (2001) *Am J Respir Crit Care Med* 163:173-184.
- <233> 29. Cho SH, You HJ, Woo CH, Yoo YJ, Kim JH (2004) *J Immunol* 173:624-631.
- <234> 30. Lee YC, Lee KS, Park SJ, Park HS, Lim JS, Park KH, Im MJ, Choi IW, Lee HK, Kim UH (2004) *Faseb J* 18:1917-1919.

- <235> 31. Dohadwala M, Batra RK, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett SM (2002) *J Biol Chem* 277:50828-50833.
- <236> 32. Yoo MH, Song H, Woo CH, Kim H, Kim JH (2004) *Oncogene* 23:9259-9268.
- <237> 33. Henderson WR, Jr Chi EY, Teo JL, Nguyen C, Kahn M (2002) *J Immunol* 169:5294-5299.
- <238> 34. Wilson SJ, Wallin A, Della-Cioppa G, Sandstrom T, Holgate ST (2001) *Am J Respir Crit Care Med* 164:1047-1052.
- <239> 35. Huang WW, Garcia-Zepeda EA, Sauty A, Oettgen HC, Rothenberg ME, Luster AD (1998) *J Exp Med* 188:1063-1074.
- <240> 36. Miyahara N, Miyahara S, Takeda K, Gelfand EW (2006) *Allergol Int* 55:91-97.
- <241> 37. Woo CH, Lim JH, Kim JH (2005) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L307-L316.
- <242> 38. Luster AD, Tager AM (2004) *Nat Rev Immunol* 4:711-724.
- <243> 39. Boldogh I, Bacsı A, Choudhury BK, Dharajiya N, Alam R, Hazra TK, Mitra S, Goldblum RM, Sur S (2005) *J Clin Invest* 115:2169-2179.
- <244> 40. Cortijo J, Marti-Cabrera M, de la Asuncion JG, Pallardo FV, Esteras A, Bruseghini L, Vina J, Morcillo E J (1999) *Free Radic Biol Med* 27:392-400.
- <245> 41. MacNee W (2001) *Eur J Pharmacol* 429:195-207.
- <246> 42. Dworski R (2000) *Thorax* 55 Suppl 2:S51-S53.
- <247> 43. Lee SH, Seo MJ, Choi SM, Sohn YS, Kang KK, Ahn BO, Kwon JW, Yoo M (2005) *Arch Pharm Res* 28:1350-1357.
- <248> 44. Barnes PJ, Karin M (1997) *N Engl J Med* 336:1066-1071.
- <249> 45. Hamilton LM, Davies DE, Wilson SJ, Kimber I, Dearman RJ, Holgate ST (2001) *Monaldi Arch Chest Dis* 56:48-54.
- <250> 46. Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, Barnes PJ, Chung KF (1998) *Am J Respir Crit Care Med* 158:1585-1592.
- <251> 47. Shao WH, Del Prete A, Bock CB, Haribabu B (2006) *J Immunol* 176:6254-6261.

산업상 이용 가능성

- <252> 본 발명은 천식 치료용 류코트리엔 B4 수용체 BLT2의 저해제의 신규한 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 BLT2 저해제를 포함하는 천식 치료용 약학적 조성물 및 BLT2 저해제를 이용한 천식 치료방법에 관한 것이다.
- <253> 본 발명자들은 류린 모델을 이용하여 천식의 병인에서 BLT2의 역할을 조사하고 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 같은, BLT2 저해제를 사용함으로써 BLT2가 AHR 및 기도 염증의 발달에 결정적인 역할을 함을 증명하였다. 따라서, 본 발명에 따른 BLT2 저해제는 천식 치료를 위한 치료학적 조성물로서 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <111> 본 발명의 상기 목적 및 이점은 첨부된 도면을 참고하여 그것의 상세하고 바람직한 구현예에서 설명하는 것에 의해 더욱 명확해질 것이다:
- <112> 도 1은 OVA-유도성 류린 천식 모델에서 BLT2 mRNA의 증가된 발현을 나타낸다. A, BAL 액에서 LTB4의 수준은 OVA 항원노출 후 지시된 시간에서 ELISA를 이용하여 측정된다. B, BLT1 및 BLT2의 반정량 RT-PCR 분석. 폐에서 BLT2 mRNA의 수준은 대조군(정상), OVA 항원노출 전(자극 전) 및 OVA-항원노출된 마우스에서 측정되었다. GAPDH는 정량 대조군으로 사용되었다. C, 기관지에서 BLT2 mRNA의 원위치 혼성화. 정상(i, ii) 및 OVA-유도된 천식성 마우스 기관지(iii, iv)에서 BLT2 mRNA의 분포를 나타낸다 (화살표). 데이터는 평균±SEM (각 그룹에서 n = 4)이다.

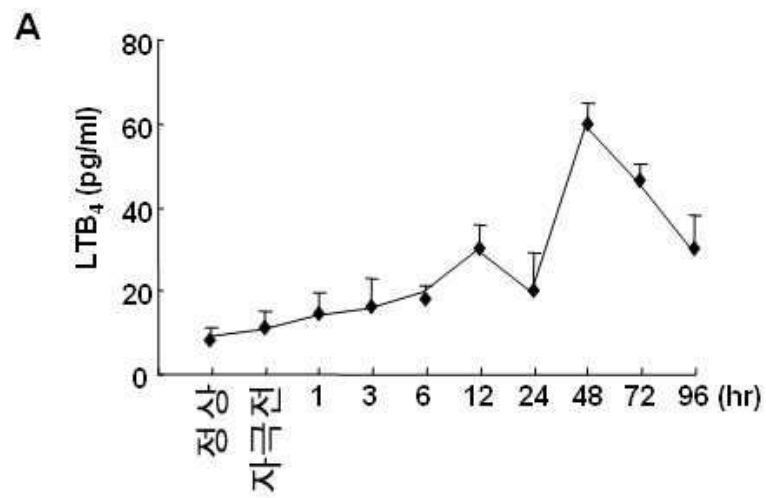
배율, 100 (i, ii) 또는 200 (iii, iv).

- <113> 도 2는 LY255283이 천식에서 기도 염증을 완화시키는 것을 나타낸다. 1% OVA 항원노출 1시간 전에 LY255283 (2.5 mg/kg) 또는 비히클(DMSO)을 BALB/c 마우스에 정맥내로 주사하였다. 그 다음에 상기 마우스를 25일째에 희생시켜 천식 표현형을 평가하였다. A, 폐 조직에서 BLT2 mRNA의 반정량 RT-PCR 분석. B, 실시간 PCR을 이용한 BLT2 mRNA 수준의 정량 분석. C-E, 마지막 1% OVA 항원노출 48시간 후 OVA-항원노출된 마우스에서 기관지의 조직학적 분석. 폐는 절개하여, 고정하고 H&E로 염색하였다. 마우스는 PBS(정상, C), DMSO 전처리와 함께 OVA(OVA/DMSO, D) 또는 LY255283 (2.5 mg/ml) 전처리와 함께 OVA(OVA/LY255283, E)로 감작/항원노출 하였다. 스케일 바, 50 μ m. F, 조직학적 스코어. 데이터는 평균 $\pm$ SEM (각 그룹에서 n = 5)이다. *P < 0.05 vs. OVA/DMSO.
- <114> 도 3은 안티센스 BLT2가 천식에서 기도 염증을 완화시킴을 나타낸다. A, 10% OVA 항원노출 24시간 및 1시간 전에 센스(ss) BLT2 (1.6 mg/kg), 안티센스(as) BLT2 (1.6 mg/kg) 또는 버퍼(생리식염수)로 전처리된 정상 및 OVA-항원노출된 마우스(C57BL/6)를 마지막 OVA 항원노출 2일 후 희생시켰고, 그들의 폐를 반정량 RT-PCR 분석을 이용하여 BLT1, BLT2 및 대조군 GAPDH mRNAs에 대해 분석하였다. B, 실시간 PCR을 이용하여 BLT2 mRNA 수준의 반정량 분석. C, BAL에 호산구의 침윤. BAL 액의 호산구(화살표)는 사이토스핀(cytospin)을 이용하여 얻었으며 Diff-Quick로 염색하였다. 스케일 바, 50 μ m. D, OVA 항원노출 48시간 후 OVA-항원노출 마우스에서 기관지의 조직학적 분석. 폐는 절개하여, 고정하고 H&E로 염색하였다. 이 실험을 위해, 마우스는 OVA 항원노출 전에 센스 BLT2 (1.6 mg/kg), 안티센스 BLT2 (1.6 mg/kg) 또는 버퍼(생리식염수)로 전처리하였다. 스케일 바, 50 μ m. 데이터는 평균 $\pm$ SEM (각 그룹에서 n = 5)이다. *P < 0.05 vs. OVA/ssBLT2; ** P < 0.01 vs. OVA/ssBLT2; ***P < 0.001 vs. OVA/ssBLT2.
- <115> 도 4는 AHR에 대한 BLT2 저해의 효과를 나타낸다. A-B, OVA-항원노출된 마우스에서 AHR에 대한 LY255283 (A) 또는 안티센스 BLT2 (B)의 효과. AHR은 마지막 1% OVA 항원노출 24시간 후 측정되었으며, 이 후에 마우스를 챔버에 넣고 3분간 투여량을 증가시킨 메타콜린 (6.25 mg/ml ~ 50 mg/ml)으로 분무하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM (각 그룹에서 n = 5)이다. A에서 *P < 0.05 vs. OVA/DMSO 또는 B에서 OVA/ssBLT2.
- <116> 도 5는 안티센스 BLT2가 ROS 생성을 약화시키는 것을 나타낸다. A, BAL 액은 10% OVA 항원노출 48시간 후 수집되었다. 정상 및 OVA-항원노출된 마우스는 10% 자극 24시간 및 1시간 전에 센스 BLT2 (1.6 mg/kg), 안티센스 BLT2 (1.6 mg/kg) 또는 버퍼(생리식염수)로 전처리한 후 마지막 OVA 항원노출 48시간 후 희생시켰다. 상기 BAL 액에 존재하는 세포를 세척한 후 즉시 FACSC aliburTM를 이용하여 관찰하였다. B, 특이적 ELISA를 이용한 BAL 액에서 LTB4 수준의 측정. 정상 및 OVA-항원노출된 마우스는 10% 자극 24시간 및 1시간 전에 센스 BLT2 (1.6 mg/kg), 안티센스 BLT2 (1.6 mg/kg) 또는 버퍼(생리식염수)로 전처리한 후 마지막 OVA 항원노출 48시간 후 희생시켰다. 이후 BAL 액을 LTB4 분석을 위해 수집하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM (각 그룹에서 n = 5). *P < 0.05 vs. OVA/ssBLT2; **P < 0.01 vs. OVA/ssBLT2.
- <117> 도 6은 BLT2 저해가 NF- κ B 활성화 및 VCAM-1 발현을 약화시킨다는 것을 나타낸다. A, OVA-항원노출 후 NF- κ B 활성화의 EMSA 분석. 정상 및 OVA-항원노출된 마우스는 자극 24시간 및 1시간 전에 센스 BLT2 (1.6 mg/kg), 안티센스 BLT2 (1.6 mg/kg) 또는 버퍼(생리식염수)로 전처리한 후 마지막 OVA 항원노출 2일 후 희생시켰다. 다음으로 핵 추출물을 폐로부터 제조하고 표지된 NF- κ B-결합 올리고뉴클레오타이드로 인큐베이션하였다. B-C, 폐 조직 추출물은 정상 마우스, OVA-항원노출된 마우스 (OVA/생리식염수), 센스 BLT2 (1.6 mg/kg) 또는 안티센스 BLT2 (1.6 mg/kg)가 투여된 OVA-항원노출된 마우스로부터 제조되었다. 그 후 동일한 양의 단백질을 I κ -B α (B) 및 VCAM-1 (C)에 대한 항체로 면역블로팅하여 분석하였다. 튜불린(tubulin)은 로딩대조군으로 사용되었다. D-E, 정상 및 OVA-항원노출된 마우스를 1% OVA 항원노출 1시간 전에 DMSO 또는 LY255283 (2.5 mg/kg)로 전처리한 후 마지막 OVA 항원노출 48시간 후 희생시켰다. 이후 폐 조직 추출물을 웨스턴 블로팅을 위해 준비하였다. 제시된 I κ B- α (D) 및 VCAM-1 (E)의 상관 수준은 밀도법(densitometry)을 이용하여 얻었다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM (각 그룹에서 n = 5)이다.
- <118> 도 7은 기관지 생체검사 표본에서 BLT2의 증가된 발현을 나타낸다. 생체검사 표본은 건강한 대상 (A-C) 및 경증 (D-E) 또는 중간정도(F) 기관지성 천식 환자로부터 얻었으며, 그 후 점막의 절편(sections)에서 BLT2의 발현 패턴을 면역조직화화적으로 가시화하였다. 양성신호(positive signals)는 스트렙토아비딘-알칼리 포스파타아제 시스템을 이용하여 레드(red) 색상을 나타냈으며, 세포들은 헤마톡실린을 이용하여 카운터-염색(counter-stained)하였다. 상기 이미지들은 유사한 실험 결과를 나타낸다 (건강한 대조군 및 경증 기관지 천식 환자에 대하여 N=4; 중간정도 기관지 천식 환자에 대하여 n=5). 스케일 바, 50 μ m. *P < 0.05 vs. 정상.

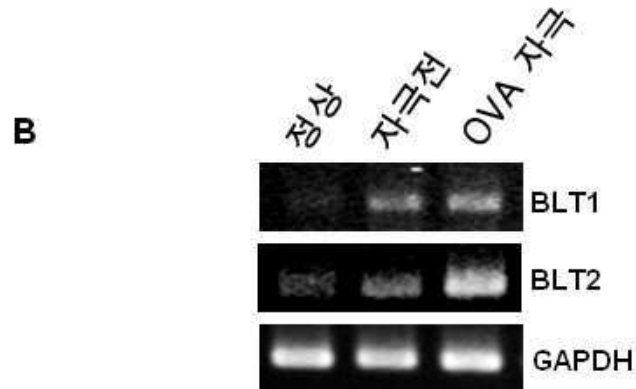
- <119> 도 8은 기도 내 T 림프구의 보충을 나타낸다. 에어로졸 OVA 항원노출 12시간 후 마우스의 BAL 액에서 CD4+ (A) 및 CD8+ (B) T 세포의 보충. BAL 액을 10% OVA 항원노출 12시간 후 수집하고 PBS로 세척하였다. 제공된 백혈구를 항-FcR γ 항체로 블로킹한 후 FITC-결합된 항-마우스 TCR 사슬 및 PE-cy5 항-마우스 CD8a 또는 PE 래트 항-마우스 CD4로 염색하였다. 그 후 샘플들을 유세포 분석법에 의해 분석하여 T 림프구 보충을 평가하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM (각 그룹에서 n = 6)이다. *P < 0.05 vs. OVA/asBLT2.
- <120> 도 9는 폐 염증 및 NF- κ B 활성화에 대한 안티센스 Rac 올리고뉴클레오타이드 처리의 효과를 나타낸다. (A) OVA 자극으로 유발되는 기관지 내 호산구 침윤의 과정에서 Rac의 관련성을 확인하기 위해, 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (체중당 1.25 mg/kg)를 자극 24 시간 및 4시간 전에 마우스의 꼬리 정맥으로 주사하였다. OVA 자극 48시간 후, 마우스를 희생시켜 BAL dor 및 폐 조직을 얻었다. BAL 액의 세포를 슬라이드 글라스에 바르고 제조사의 권고에 따라 헤마컬러(Hemacolour)로 염색하였다. 폐 조직은 정상, 버퍼, 대조군 Rac 올리고뉴클레오타이드 (대조군 Rac) 또는 안티센스 Rac 올리고뉴클레오타이드 (asRac) 처리된 마우스로부터 얻었다. 폐 조직을 10% 포르말린으로 고정시키고, 탈수하여 파라핀에 포매시켰다. 상기 조직을 6 μ m 절편으로 자르고 헤마톡실린 & 에오신으로 염색하였다. (B) OVA 자극이 NF- κ B 활성을 유도하고 유도된 NF- κ B가 Rac에 의해 매개되는지를 확인하기 위하여, 안티센스 Rac 올리고뉴클레오타이드 처리된 마우스를 이용하여 EMSA(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하였다. 핵 추출물을 상기 폐 조직으로부터 깨끗이 분리하고 실온에서 NF- κ B 결합 공동 또는 돌연변이 서열을 포함하는 32P-표지된 이중가닥 올리고뉴클레오타이드로 인큐베이션하였다. DNA-단백질 복합체를 비변성 조건 (nondenaturing condition) 하에서 6% 아크릴아마이드 겔에서 전기영동함으로서 분리하고, 방사능사진촬영을 수행하였다. (C) 유조직(parenchyma) 내 혈관(blood vessel)으로부터 호산구 내피세포이동(eosinophil transendothelial migration)의 과정에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있는, VCAM-1의 발현 수준을 확인하기 위해, 전세포 용해물(whole cell lysate)을 폐 조직으로부터 얻어 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- <121> 도 10은 OVA 자극에 의한 폐 조직에서 Rac의 활성화 및 안티센스 Rac 올리고뉴클레오타이드 처리에 의한 내생적 Rac 발현의 저해를 나타낸다. 폐 샘플을 마이크로페슬(micropestle)로 균질화하고 PBS로 두 번 세척하였다. (A) 막 단백질 준비를 위해, 세포들을 버퍼 A에 현탁시키고 21-G 주사기를 통과시켜 세포들을 파열시켰다. 초원심분리 후, 뭉쳐진 막 분획(pelleted membrane fraction)의 단백질 샘플은 1% 트리톤 X-100을 포함하는 버퍼 A로 녹였다. (B) 전세포 용해물 준비를 위해, 대조군 Rac 올리고뉴클레오타이드 또는 안티센스 Rac 올리고뉴클레오타이드가 주사된 마우스의 폐 조직에서 얻은 세포를 용해버퍼(lysis buffer)에 현탁시키고 20분간 인큐베이션하였다. 샘플의 원심분리 후, 단백질 정량을 브래드포드 시약을 이용하여 시행하였으며 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- <122> 도 11a는 RT-PCR에 의한 BLT2 발현 수준에 대한 BLT2 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 억제 효과를 나타낸다. 도 11b는 노던 블롯에 의한 BLT2 발현 수준에 대한 BLT2 siRNA의 억제 효과를 나타낸다.

도면

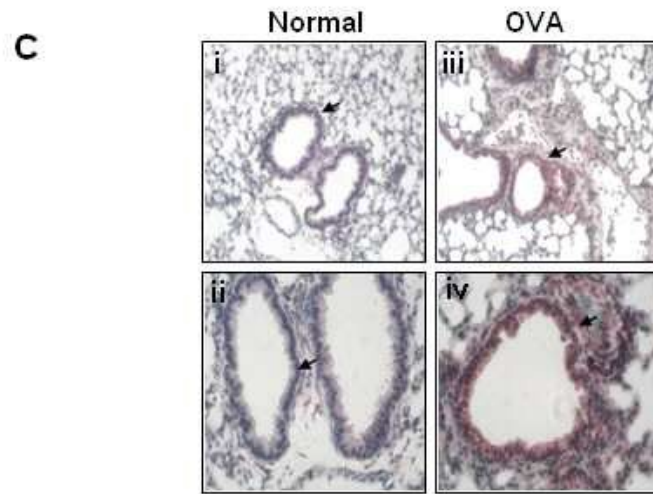
도면1a



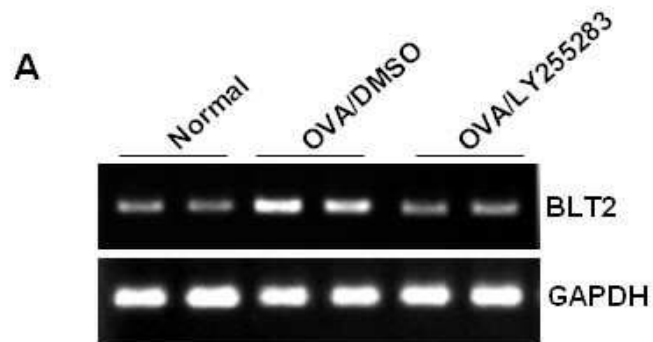
도면1b



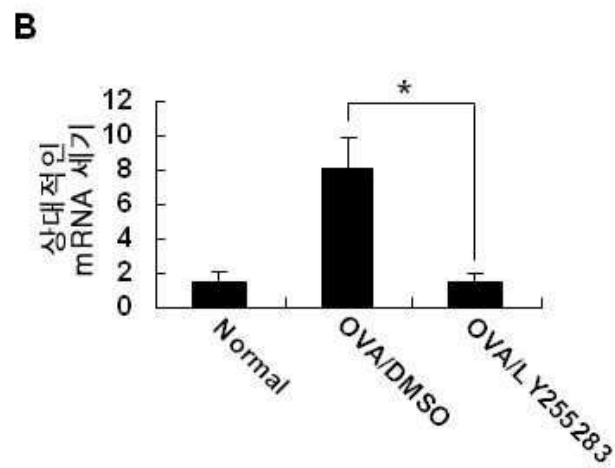
도면1c



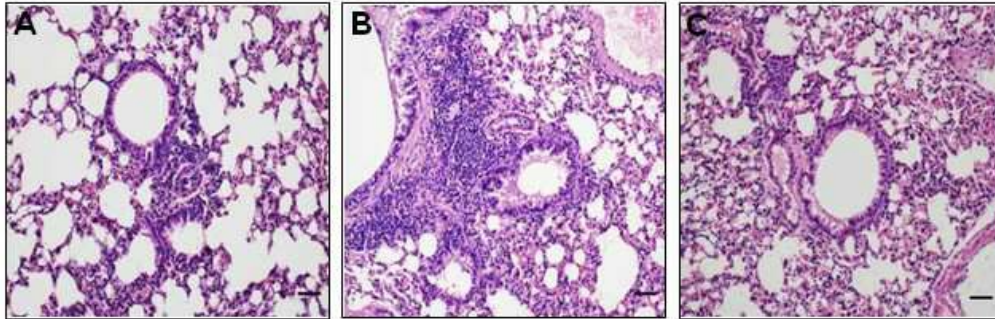
도면2a



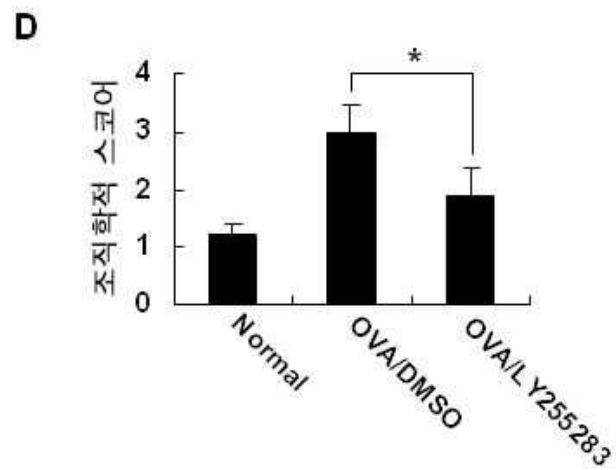
도면2b



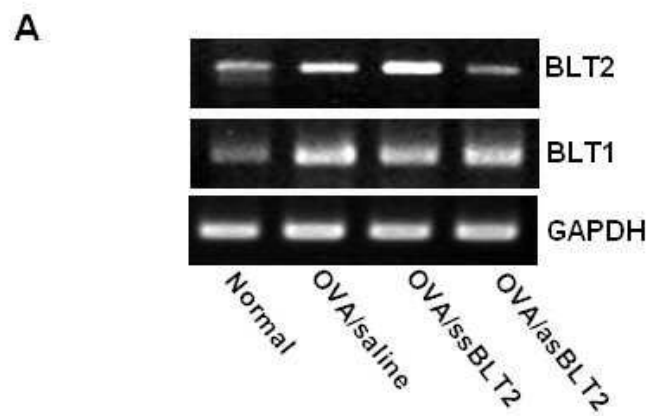
도면2c



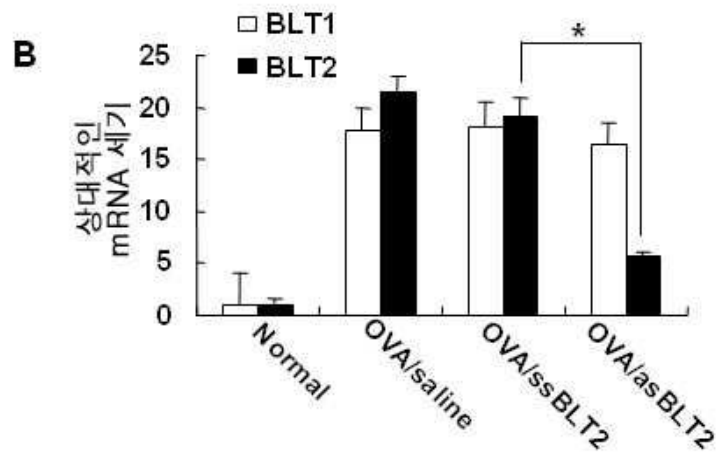
도면2d



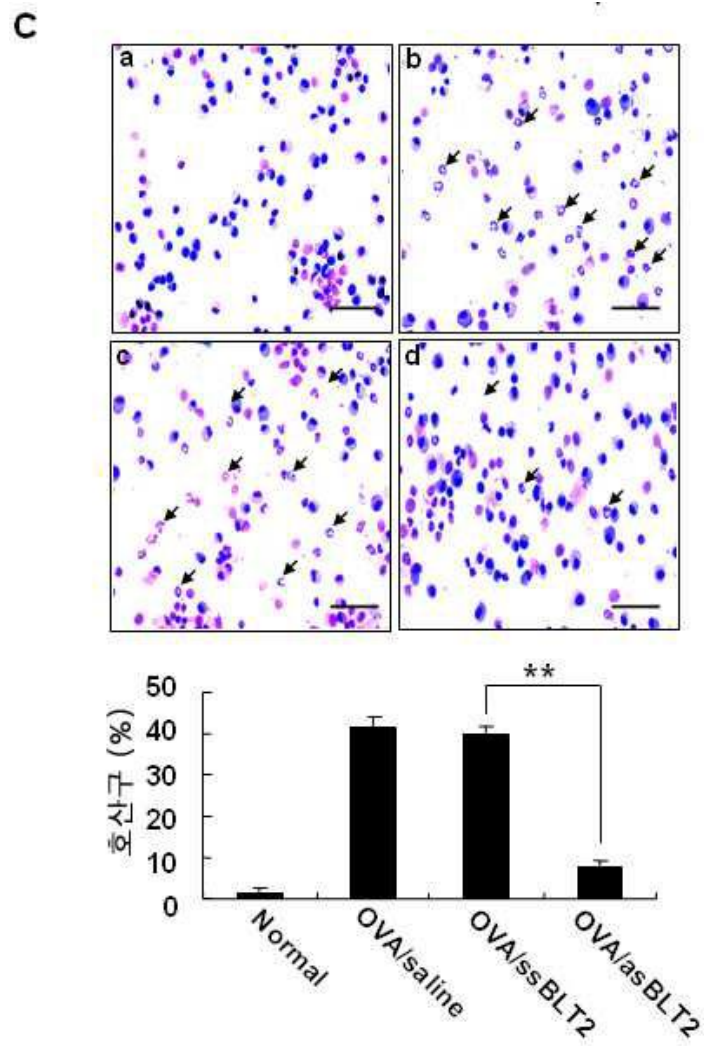
도면3a



도면3b

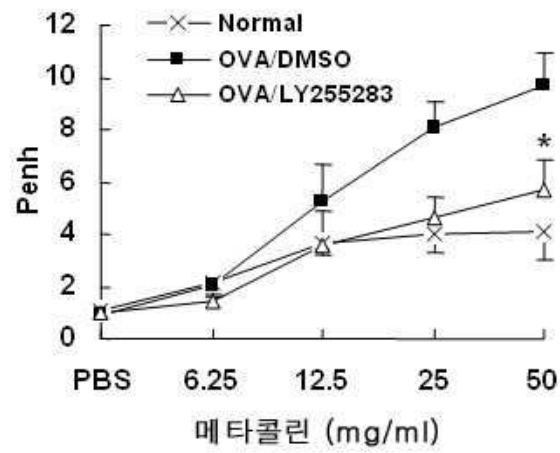


도면3c



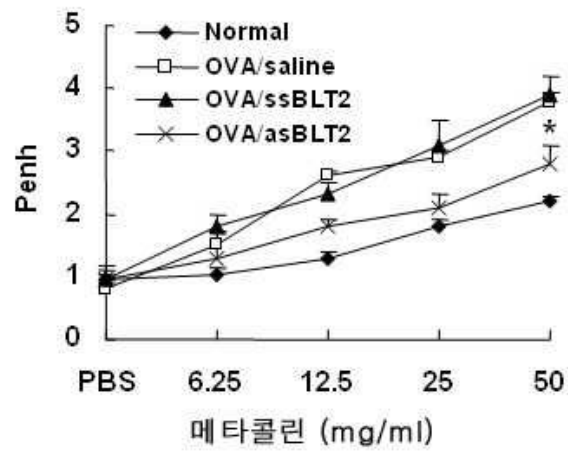
도면4a

A



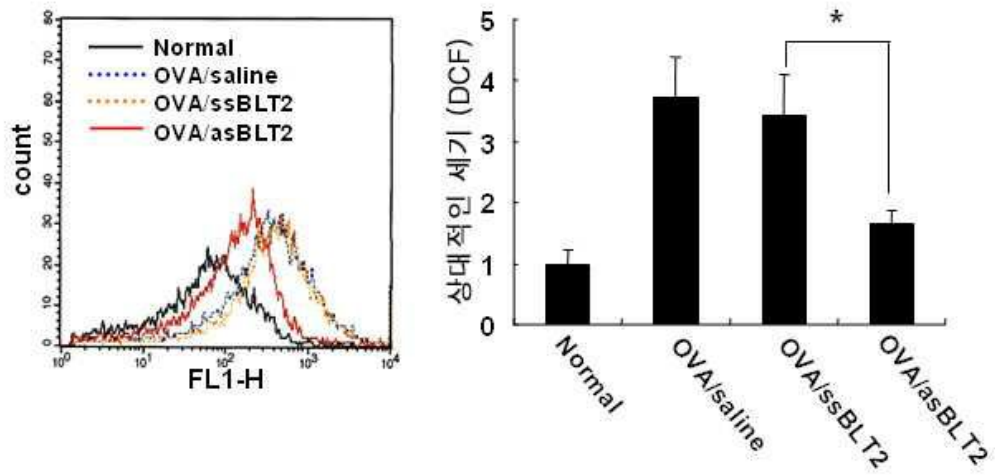
도면4b

B



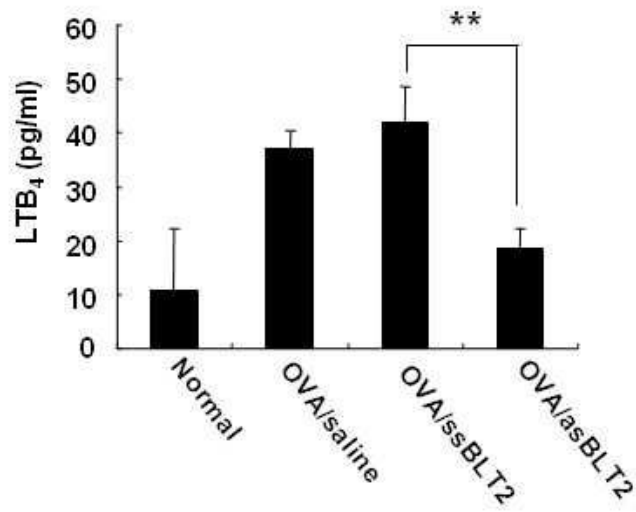
도면5a

A

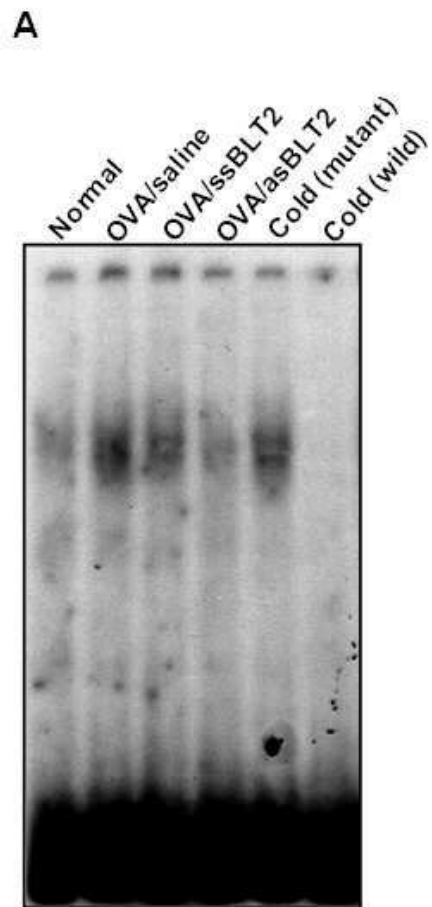


도면5b

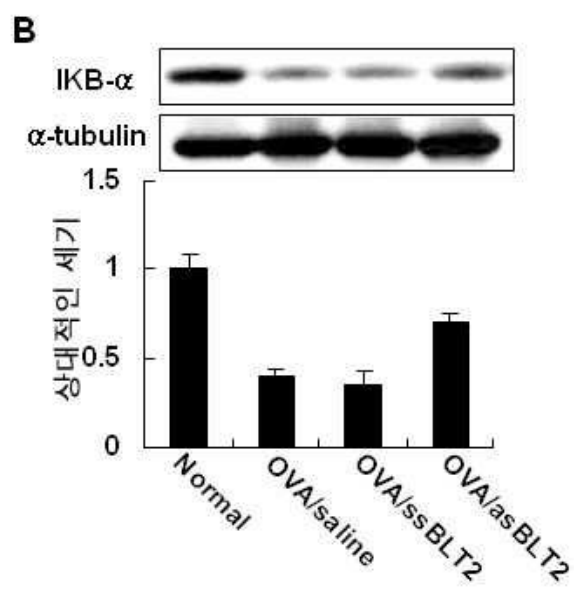
B



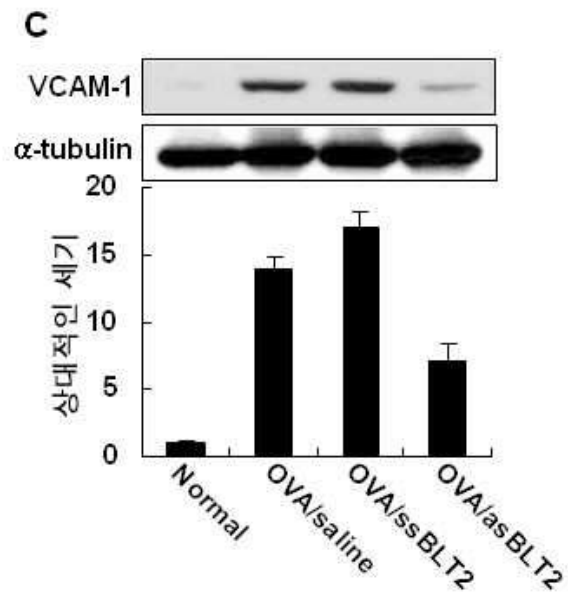
도면6a



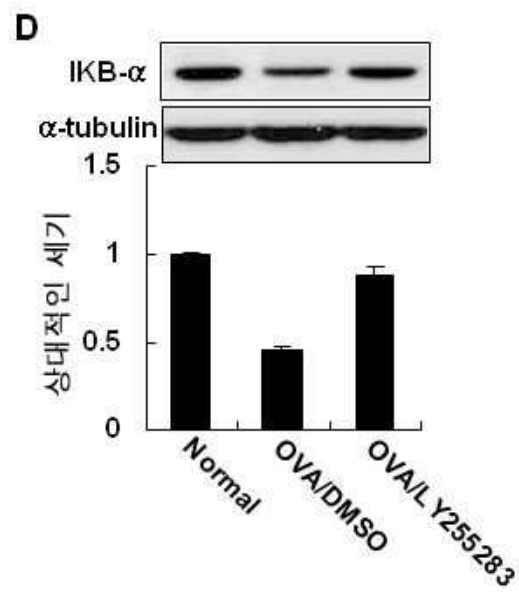
도면6b



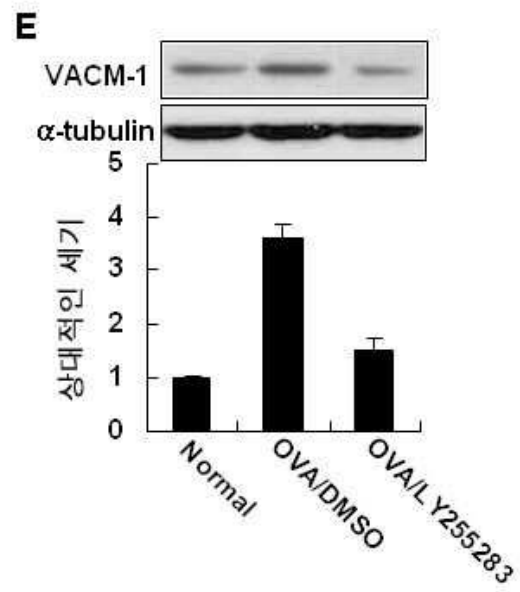
도면6c



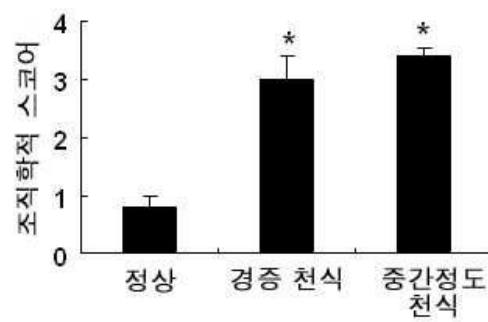
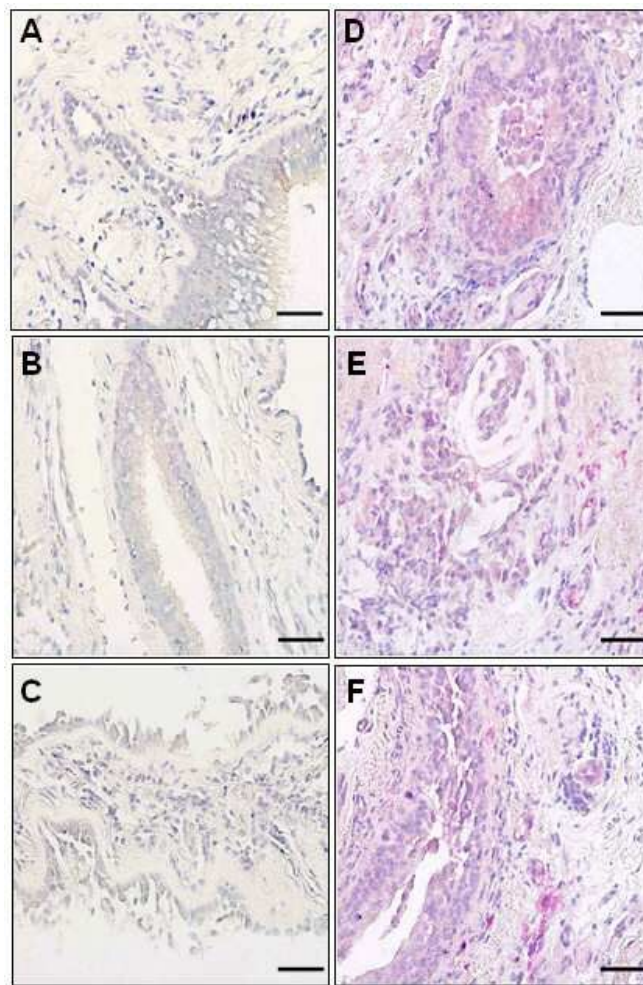
도면6d



도면6e

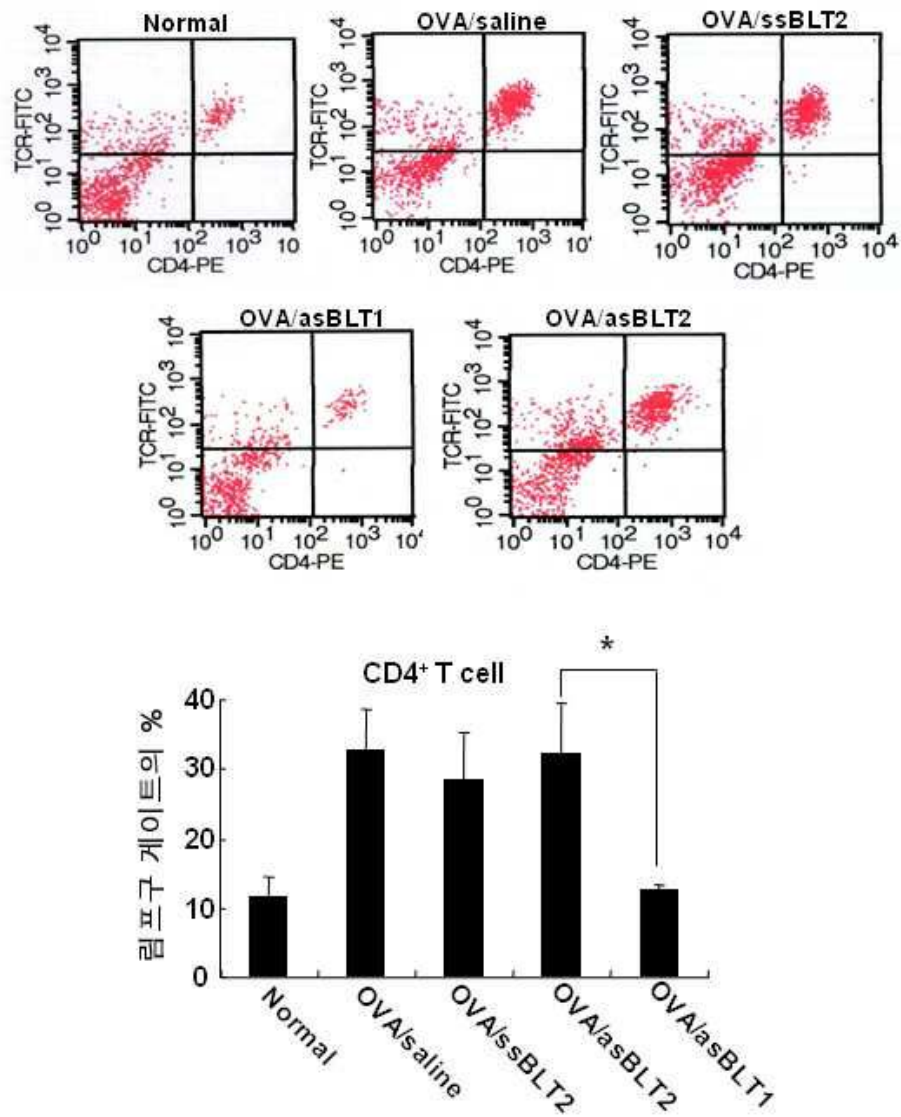


도면7



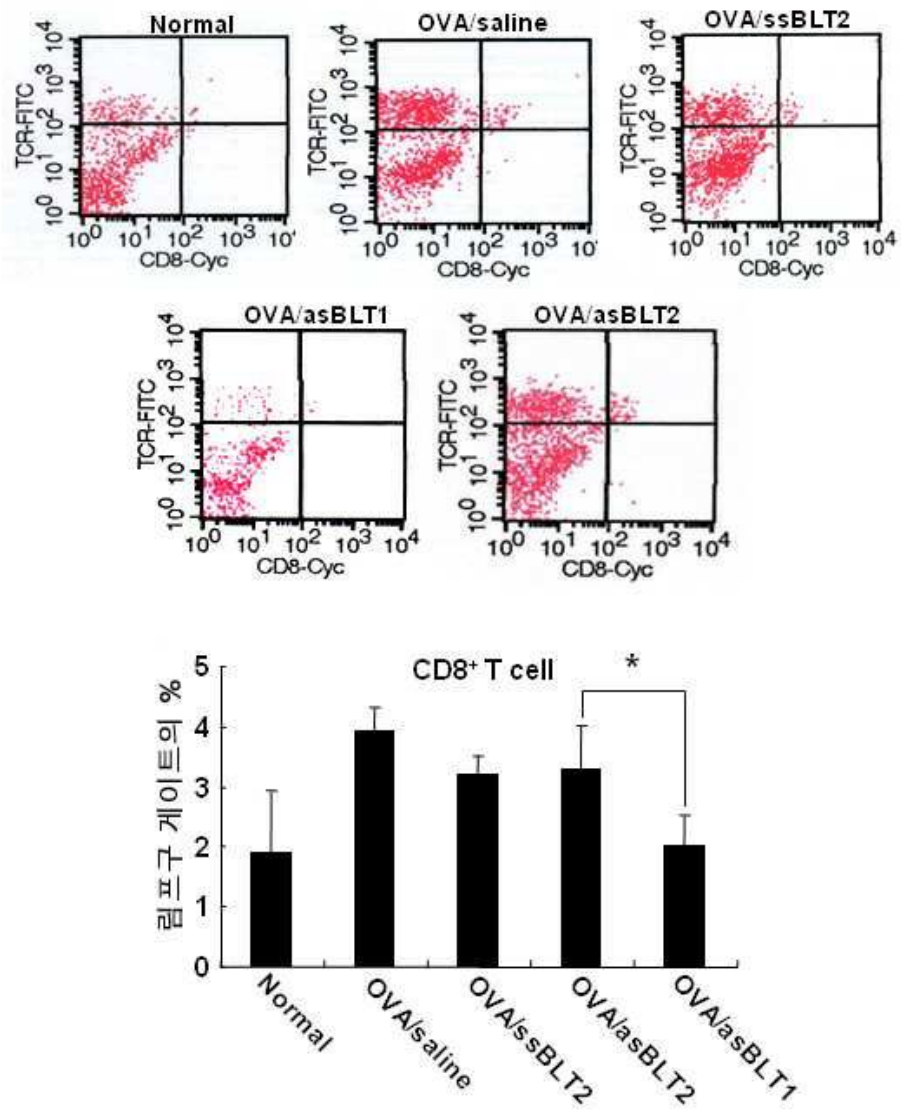
도면8a

A



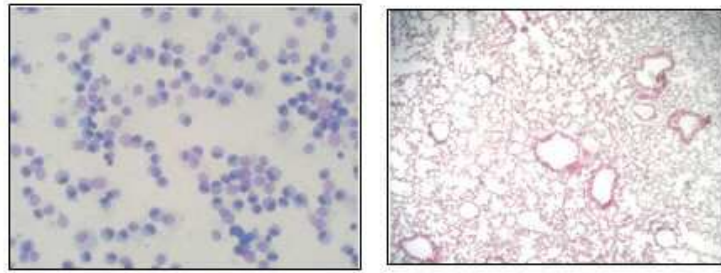
도면8b

B

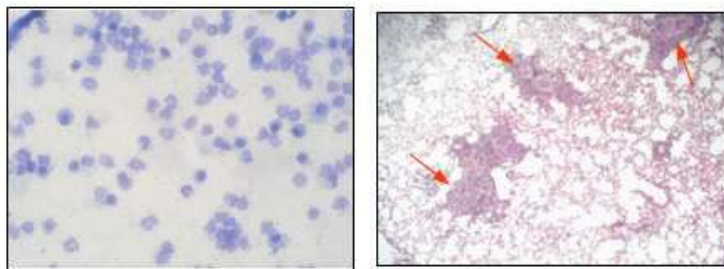


도면9a

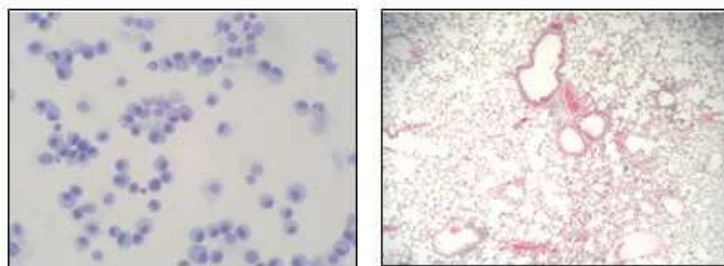
생리식염수 자극



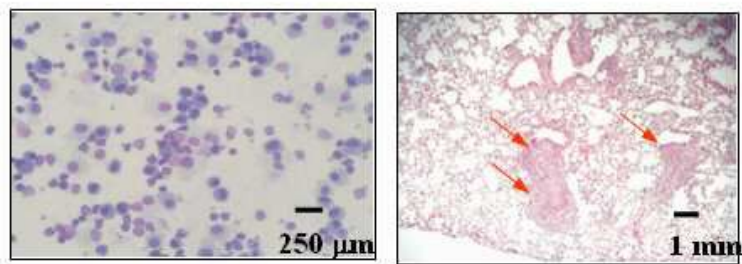
OVA, 생리식염수



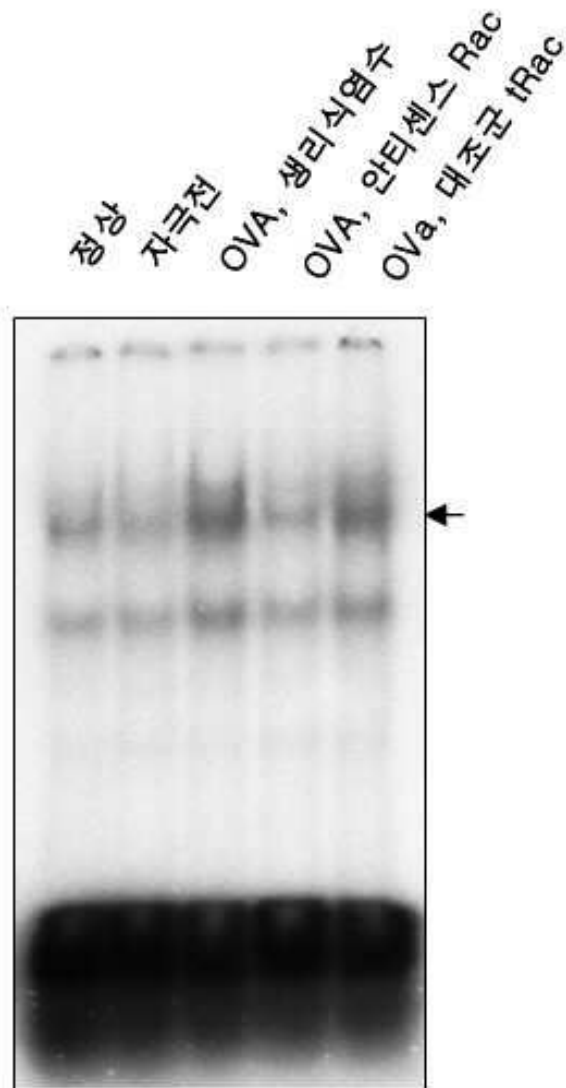
OVA, 안티센스 Rac (1.25 mg/kg)



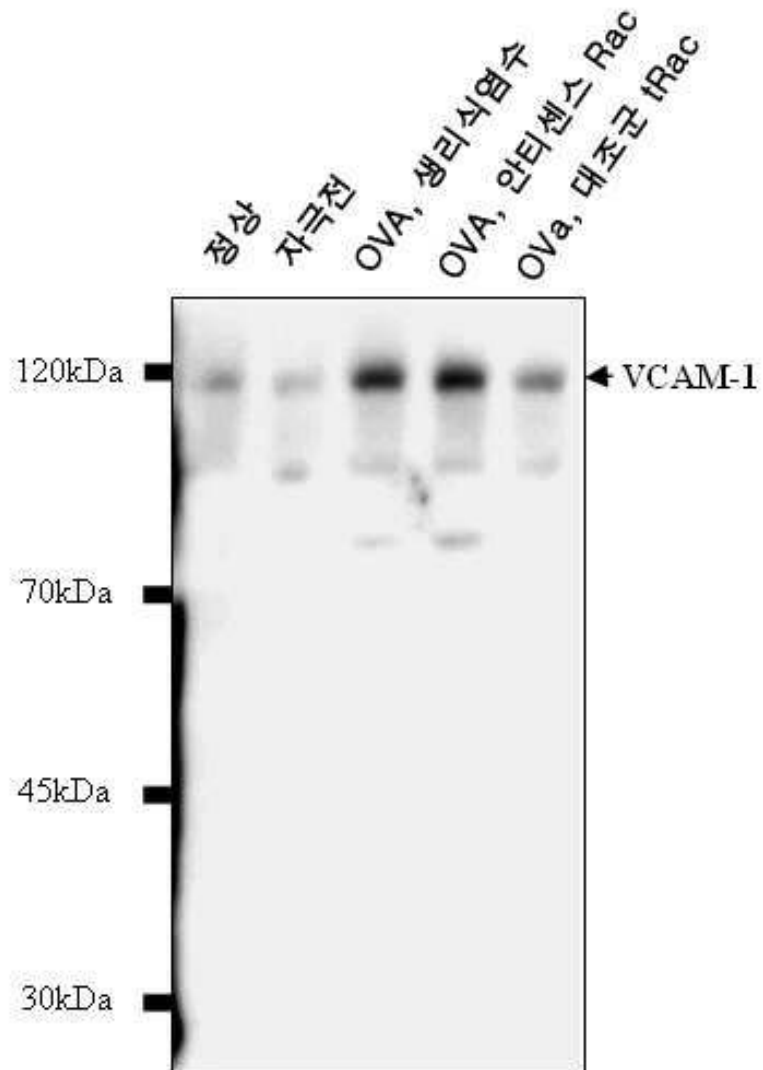
OVA, 센스 Rac (1.25 mg/kg)



도면9b

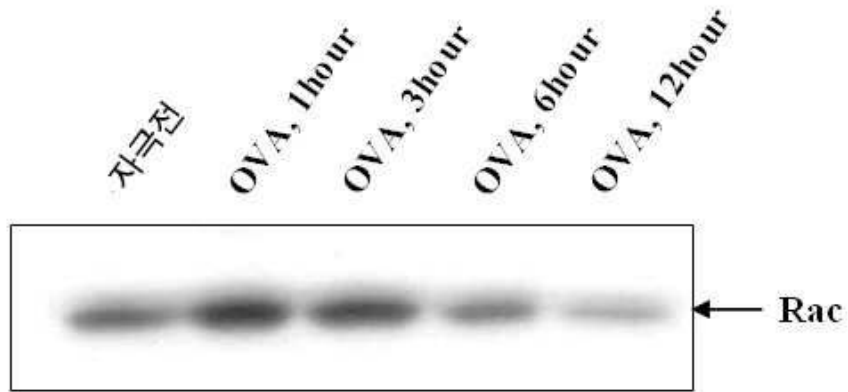


도면9c



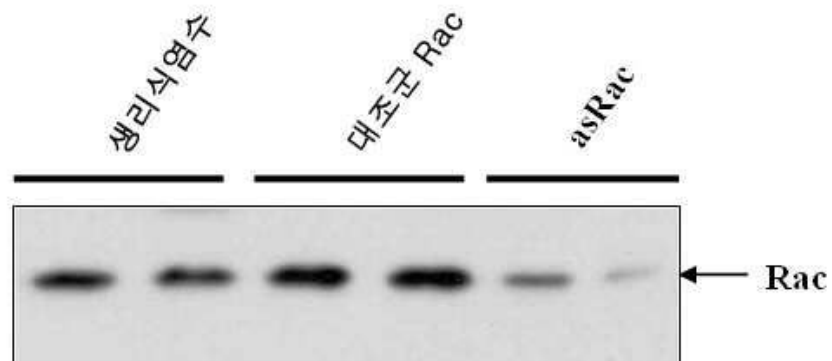
도면10a

A

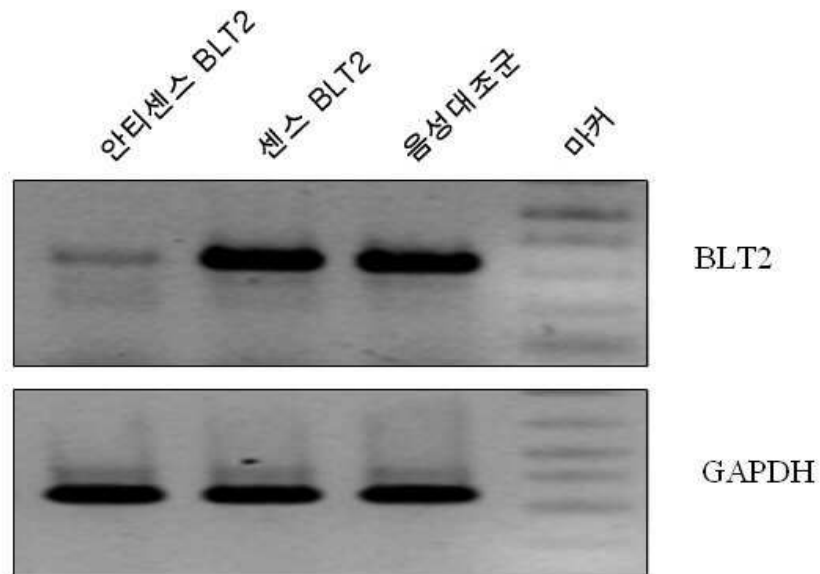


도면10b

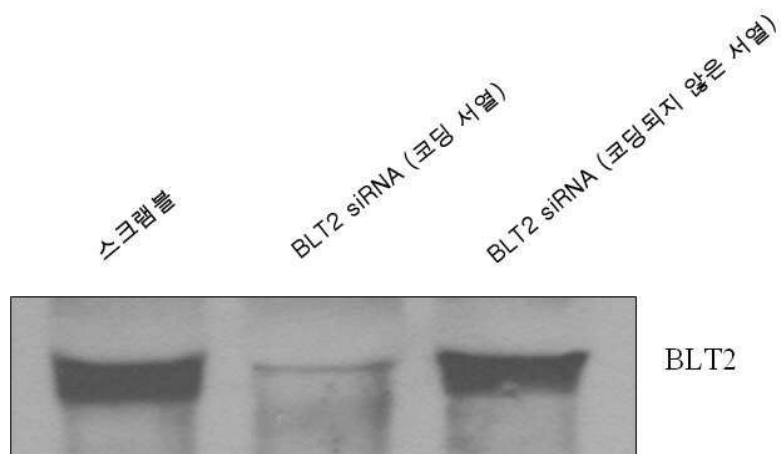
B



도면11a



도면11b



서열 목록

- <110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
- <120> USE OF INHIBITORS OF LEUKOTRIENE B4 RECEPTOR BLT2 FOR TREATING ASTHMA
- <160> 14
- <170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 2798
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 1
 aaactggccc tggccctgaa ccaataacct tgaacctcg taaactccat accctgaccc 60

 ccttgttttg gatataccca ggtagaacia ctctctctca ctgtctgttg tgaggatacg 120

 ctgtagccca ctcatatagt acattctcct aataaatgct ttggactgat caccctgcca 180

 gtcttttgc ttgggcaatc tatacttttc tcagaggttc ccaaggccta ctgaaggagc 240

 ttaacatact cttaatggct ttctctctc ttgttttacc ttatgccctc acttctgag 300

 ttaacctccc aaatacagga tcacctgtac ccaagccctt agctcaagaa tacaggatca 360

 cctgtaccca agcccttagc tcaagctctg ctttggaaga acccaacta agacagtgt 420

 cctgggtgcc tcccaagca acctcaagtt ctggctgtta cttgagcaga ggcctttctt 480

 ttcccttccc ccagctctat ccactgtcca ggccccctc aaatctctc atttccaagt 540

 ttgtctgac tttccaaga ggagagggtc gcttcttagt atgtccctac tcactcttc 600

 ctttctgtc ttgtatctg gtgcagcctg gtaatggggc ctcttcatgg ttgtgtgtca 660

 tgactcccta accattatgc ctccatgcat ccctgttcc tcttgaacc tagcaccatg 720

 cttacatgg aaaagctgtc attgacagcc cgtgagagc cctgagggtg gactgactgg 780

 ggagggcct gaggcaagag gtgggaggag gtaggaggcc aggggctcag ccgaccagg 840

 agactggaaa caggcaagga taaggcaggt gggggactga gttgtttggg tcacctctgc 900

 aggccagaga gaccaggcaa catacacact gcagaagggt ggctgggagg attggggcca 960

gagctggggg agggatgaga acagaagcag gaccaggatt cagcagagtc ctcctatitc	1020
cttcaccac cagggaaict tactgccccca cttcagcttg tgctgtttcc tggcaaggca	1080
ggctctcaca tgcttgacg cctgggtgcg ttggtgatgg gaaggagcag ggtgaggag	1140
gggccccagg agaggcccag gatgagcctc atcttgctcc tccccattct tgtcttacc	1200
tctgcaaatg tgataggcac aggacaggag taggcacctc gcctactgct gcttaacctt	1260
tcagcttctc caggccccca atcctgcttg ctcccagctt ggtaagtaga tctgtgcacg	1320
tccctttaca ccccaccatc cagttttgcc cagatgtgct agaatggggc tggacaaaga	1380
aggaggggcc agactagagg agtgggtgta gagatagtga cagcctgggg tgaggacttt	1440
atgcctgttt accactgagc tctgggaagg aggccaggag tggggcaggt caactgactg	1500
ggagcagggg atctgggttc caagaaggag ttgtgtttga ggtgggtct gggctcctgt	1560
ggaagtcagg actcccaggc agaaaagagg caggctgcag ggaagtaagg aggaggcatg	1620
gcaccttctc atcgggcac acaggtgggg ttttgcccca cccctgaacg ccctctgtgg	1680
cgctttccac ccacctgtag gcccagaagg atgtcggtct gctaccgtcc cccagggaac	1740
gagacactgc tgagctggaa gacttcgagg gccacaggca cagccttcct gctgctggcg	1800
gcgctgctgg ggctgcctgg caacggcttc gtggtgtgga gcttggcggg ctggcgccct	1860
gcacgggggc gaccgctggc ggccacgctt gtgctgcacc tggcgtggc cgacggcgcg	1920
gtgctgctgc tcacgccgt ctttgtggcc ttctgacct ggacggcctg gccgctgggc	1980
caggcgggct gcaaggcggg gtactactgt tgcgcgtca gcatgtacgc cagcgtgctg	2040
ctcaccggcc tgctcagct gcagcgtgc ctgcagtea cccgccccct cctggcgct	2100
cggctgcga gcccgccct ggcccgccgc ctgctgctgg cggctggtt ggccgcccgt	2160

ttgctcgccg tcccggccgc cgtctaccgc cacctgtgga gggaccgcgt atgccagctg 2220

tgccaccctg cgcgggtcca cgccgccgcc cacctgagcc tggagactct gaccgtttc 2280

gtgcttcctt tcgggctgat gctcggctgc tacagcgtga cgctggcacg gctgcggggc 2340

gcccgtggg gctccgggcg gcacggggcg cgggtgggcc ggctggtag cgccatcgtg 2400

cttgccttcg gcttgcctcg gggccctac cagcagtcg accttctgca ggcggtcgca 2460

gcgctggctc caccggaagg ggccttggcg aagctgggcg gagccggcca ggcggcgca 2520

gcgggaacta cggccttggc cttcttcagt tctagcgtca acccggtagt ctacgtcttc 2580

accgctggag atctgctgcc ccgggcaggt ccccgtttcc tcacgcggt cttcgaaggc 2640

tctggggagg cccgaggggg cggccgctct aggaaggga ccatggagct ccgaactacc 2700

cctcagctga aagtggtagg gcagggccgc ggcaatggag acccgggggg tgggatggag 2760

aaggacggtc cggaatggga cttttgacag cagaccct 2798

<210> 2
 <211> 1170
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1167)

<400> 2
 atg gca cct tct cat cgg gca tca cag gtg ggg ttt tgc ccc acc cct 48
 Met Ala Pro Ser His Arg Ala Ser Gln Val Gly Phe Cys Pro Thr Pro
 1 5 10 15

gaa cgc cct ctg tgg cgc ctt cca ccc acc tgt agg ccc aga agg atg 96
 Glu Arg Pro Leu Trp Arg Leu Pro Pro Thr Cys Arg Pro Arg Arg Met
 20 25 30

tcg gtc tgc tac cgt ccc cca ggg aac gag aca ctg ctg agc tgg aag Ser Val Cys Tyr Arg Pro Pro Gly Asn Glu Thr Leu Leu Ser Trp Lys 35 40 45	144
act tcg cgg gcc aca ggc aca gcc ttc ctg ctg ctg gcg gcg ctg ctg Thr Ser Arg Ala Thr Gly Thr Ala Phe Leu Leu Ala Ala Leu Leu 50 55 60	192
ggg ctg cct ggc aac ggc ttc gtg gtg tgg agc ttg gcg ggc tgg cgg Gly Leu Pro Gly Asn Gly Phe Val Val Trp Ser Leu Ala Gly Trp Arg 65 70 75 80	240
cct gca cgg ggg cga ccg ctg gcg gcc acg ctt gtg ctg cac ctg gcg Pro Ala Arg Gly Arg Pro Leu Ala Ala Thr Leu Val Leu His Leu Ala 85 90 95	288
ctg gcc gac ggc gcg gtg ctg ctg ctc acg ccg ctc ttt gtg gcc ttc Leu Ala Asp Gly Ala Val Leu Leu Leu Thr Pro Leu Phe Val Ala Phe 100 105 110	336
ctg acc cgg cag gcc tgg ccg ctg ggc cag gcg ggc tgc aag gcg gtg Leu Thr Arg Gln Ala Trp Pro Leu Gly Gln Ala Gly Cys Lys Ala Val 115 120 125	384
tac tac gtg tgc gcg ctc agc atg tac gcc agc gtg ctg ctc acc ggc Tyr Tyr Val Cys Ala Leu Ser Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Thr Gly 130 135 140	432
ctg ctc agc ctg cag cgc tgc ctc gca gtc acc cgc ccc ttc ctg gcg Leu Leu Ser Leu Gln Arg Cys Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Leu Ala 145 150 155 160	480
cct cgg ctg cgc agc ccg gcc ctg gcc cgc cgc ctg ctg ctg gcg gtc Pro Arg Leu Arg Ser Pro Ala Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Ala Val 165 170 175	528
tgg ctg gcc gcc ctg ttg ctc gcc gtc ccg gcc gcc gtc tac cgc cac Trp Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Val Tyr Arg His 180 185 190	576
ctg tgg agg gac cgc gta tgc cag ctg tgc cac ccg tcg ccg gtc cac Leu Trp Arg Asp Arg Val Cys Gln Leu Cys His Pro Ser Pro Val His 195 200 205	624
gcc gcc gcc cac ctg agc ctg gag act ctg acc gct ttc gtg ctt cct	672

Ala Ala Ala His Leu Ser Leu Glu Thr Leu Thr Ala Phe Val Leu Pro	
210 215 220	
ttc ggg ctg atg ctc ggc tgc tac agc gtg acg ctg gca cgg ctg cgg	720
Phe Gly Leu Met Leu Gly Cys Tyr Ser Val Thr Leu Ala Arg Leu Arg	
225 230 235 240	
ggc gcc cgc tgg ggc tcc ggg cgg cac ggg gcg cgg gtg ggc cgg ctg	768
Gly Ala Arg Trp Gly Ser Gly Arg His Gly Ala Arg Val Gly Arg Leu	
245 250 255	
gtg agc gcc atc gtg ctt gcc ttc ggc ttg ctc tgg gcc ccc tac cac	816
Val Ser Ala Ile Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Trp Ala Pro Tyr His	
260 265 270	
gca gtc aac ctt ctg cag gcg gtc gca gcg ctg gct cca ccg gaa ggg	864
Ala Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Ala Ala Leu Ala Pro Pro Glu Gly	
275 280 285	
gcc ttg gcg aag ctg ggc gga gcc ggc cag gcg gcg cga gcg gga act	912
Ala Leu Ala Lys Leu Gly Gly Ala Gly Gln Ala Ala Arg Ala Gly Thr	
290 295 300	
acg gcc ttg gcc ttc ttc agt tct agc gtc aac ccg gtg ctc tac gtc	960
Thr Ala Leu Ala Phe Phe Ser Ser Ser Val Asn Pro Val Leu Tyr Val	
305 310 315 320	
ttc acc gct gga gat ctg ctg ccc cgg gca ggt ccc cgt ttc ctc acg	1008
Phe Thr Ala Gly Asp Leu Leu Pro Arg Ala Gly Pro Arg Phe Leu Thr	
325 330 335	
cgg ctc ttc gaa ggc tct ggg gag gcc cga ggg ggc ggc cgc tct agg	1056
Arg Leu Phe Glu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Gly Gly Gly Arg Ser Arg	
340 345 350	
gaa ggg acc atg gag ctc cga act acc cct cag ctg aaa gtg gtg ggg	1104
Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Thr Thr Pro Gln Leu Lys Val Val Gly	
355 360 365	
cag ggc cgc ggc aat gga gac ccg ggg ggt ggg atg gag aag gac ggt	1152
Gln Gly Arg Gly Asn Gly Asp Pro Gly Gly Gly Met Glu Lys Asp Gly	
370 375 380	
ccg gaa tgg gac ctt tga 1170	
Pro Glu Trp Asp Leu	

385

<210> 3

<211> 389

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Met Ala Pro Ser His Arg Ala Ser Gln Val Gly Phe Cys Pro Thr Pro
1 5 10 15

Glu Arg Pro Leu Trp Arg Leu Pro Pro Thr Cys Arg Pro Arg Arg Met
20 25 30

Ser Val Cys Tyr Arg Pro Pro Gly Asn Glu Thr Leu Leu Ser Trp Lys
35 40 45

Thr Ser Arg Ala Thr Gly Thr Ala Phe Leu Leu Leu Ala Ala Leu Leu
50 55 60

Gly Leu Pro Gly Asn Gly Phe Val Val Trp Ser Leu Ala Gly Trp Arg
65 70 75 80

Pro Ala Arg Gly Arg Pro Leu Ala Ala Thr Leu Val Leu His Leu Ala
85 90 95

Leu Ala Asp Gly Ala Val Leu Leu Leu Thr Pro Leu Phe Val Ala Phe
100 105 110

Leu Thr Arg Gln Ala Trp Pro Leu Gly Gln Ala Gly Cys Lys Ala Val
115 120 125

Tyr Tyr Val Cys Ala Leu Ser Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Thr Gly
130 135 140

Leu Leu Ser Leu Gln Arg Cys Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Leu Ala
145 150 155 160

Pro Arg Leu Arg Ser Pro Ala Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Ala Val
165 170 175

Trp Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Val Tyr Arg His
180 185 190

Leu Trp Arg Asp Arg Val Cys Gln Leu Cys His Pro Ser Pro Val His
195 200 205

Ala Ala Ala His Leu Ser Leu Glu Thr Leu Thr Ala Phe Val Leu Pro
210 215 220

Phe Gly Leu Met Leu Gly Cys Tyr Ser Val Thr Leu Ala Arg Leu Arg
225 230 235 240

Gly Ala Arg Trp Gly Ser Gly Arg His Gly Ala Arg Val Gly Arg Leu
245 250 255

Val Ser Ala Ile Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Trp Ala Pro Tyr His
260 265 270

Ala Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Ala Ala Leu Ala Pro Pro Glu Gly
275 280 285

Ala Leu Ala Lys Leu Gly Gly Ala Gly Gln Ala Ala Arg Ala Gly Thr
290 295 300

Thr Ala Leu Ala Phe Phe Ser Ser Ser Val Asn Pro Val Leu Tyr Val
305 310 315 320

Phe Thr Ala Gly Asp Leu Leu Pro Arg Ala Gly Pro Arg Phe Leu Thr
325 330 335

Arg Leu Phe Glu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Gly Gly Gly Arg Ser Arg
340 345 350

Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Thr Thr Pro Gln Leu Lys Val Val Gly
355 360 365

Gln Gly Arg Gly Asn Gly Asp Pro Gly Gly Gly Met Glu Lys Asp Gly
370 375 380

Pro Glu Trp Asp Leu
385

<210> 4
<211> 1077
<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1074)

<400> 4

atg tgc gtc tgc tac cgt ccc cca ggg aac gag aca ctg ctg agc tgg	48
Met Ser Val Cys Tyr Arg Pro Pro Gly Asn Glu Thr Leu Leu Ser Trp	
1 5 10 15	

aag act tgc cgg gcc aca ggc aca gcc ttc ctg ctg ctg gcg gcg ctg	96
Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gly Thr Ala Phe Leu Leu Leu Ala Ala Leu	
20 25 30	

ctg ggg ctg cct ggc aac ggc ttc gtg gtg tgg agc ttg gcg ggc tgg	144
Leu Gly Leu Pro Gly Asn Gly Phe Val Val Trp Ser Leu Ala Gly Trp	
35 40 45	

cgg cct gca cgg ggg cga ccg ctg gcg gcc acg ctt gtg ctg cac ctg	192
Arg Pro Ala Arg Gly Arg Pro Leu Ala Ala Thr Leu Val Leu His Leu	
50 55 60	

gcg ctg gcc gac ggc gcg gtg ctg ctg ctc acg ccg ctc ttt gtg gcc	240
Ala Leu Ala Asp Gly Ala Val Leu Leu Leu Thr Pro Leu Phe Val Ala	
65 70 75 80	

ttc ctg acc cgg cag gcc tgg ccg ctg ggc cag gcg ggc tgc aag gcg	288
Phe Leu Thr Arg Gln Ala Trp Pro Leu Gly Gln Ala Gly Cys Lys Ala	
85 90 95	

gtg tac tac gtg tgc gcg ctc agc atg tac gcc agc gtg ctg ctc acc	336
Val Tyr Tyr Val Cys Ala Leu Ser Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Thr	
100 105 110	

ggc ctg ctc agc ctg cag cgc tgc ctc gca gtc acc cgc ccc ttc ctg	384
Gly Leu Leu Ser Leu Gln Arg Cys Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Leu	
115 120 125	

gcg cct cgg ctg cgc agc ccg gcc ctg gcc cgc cgc ctg ctg ctg gcg	432
Ala Pro Arg Leu Arg Ser Pro Ala Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Ala	
130 135 140	

gtc tgg ctg gcc gcc ctg ttg ctc gcc gtc ccg gcc gcc gtc tac cgc	480
Val Trp Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Val Tyr Arg	

145	150	155	160	
cac ctg tgg agg gac cgc gta tgc cag ctg tgc cac ccg tcg ccg gtc				528
His Leu Trp Arg Asp Arg Val Cys Gln Leu Cys His Pro Ser Pro Val				
	165	170	175	
cac gcc gcc gcc cac ctg agc ctg gag act ctg acc gct ttc gtg ctt				576
His Ala Ala Ala His Leu Ser Leu Glu Thr Leu Thr Ala Phe Val Leu				
	180	185	190	
cct ttc ggg ctg atg ctc ggc tgc tac agc gtg acg ctg gca ccg ctg				624
Pro Phe Gly Leu Met Leu Gly Cys Tyr Ser Val Thr Leu Ala Arg Leu				
	195	200	205	
cgg ggc gcc cgc tgg ggc tcc ggg cgg cac ggg gcg ccg gtg ggc cgg				672
Arg Gly Ala Arg Trp Gly Ser Gly Arg His Gly Ala Arg Val Gly Arg				
	210	215	220	
ctg gtg agc gcc atc gtg ctt gcc ttc ggc ttg ctc tgg gcc ccc tac				720
Leu Val Ser Ala Ile Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Trp Ala Pro Tyr				
225	230	235	240	
cac gca gtc aac ctt ctg cag gcg gtc gca gcg ctg gct cca ccg gaa				768
His Ala Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Ala Ala Leu Ala Pro Pro Glu				
	245	250	255	
ggg gcc ttg gcg aag ctg ggc gga gcc ggc cag gcg gcg cga gcg gga				816
Gly Ala Leu Ala Lys Leu Gly Gly Ala Gly Gln Ala Ala Arg Ala Gly				
	260	265	270	
act acg gcc ttg gcc ttc ttc agt tct agc gtc aac ccg gtg ctc tac				864
Thr Thr Ala Leu Ala Phe Phe Ser Ser Ser Val Asn Pro Val Leu Tyr				
	275	280	285	
gtc ttc acc gct gga gat ctg ctg ccc cgg gca ggt ccc cgt ttc ctc				912
Val Phe Thr Ala Gly Asp Leu Leu Pro Arg Ala Gly Pro Arg Phe Leu				
	290	295	300	
acg cgg ctc ttc gaa ggc tct ggg gag gcc cga ggg ggc ggc cgc tct				960
Thr Arg Leu Phe Glu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Gly Gly Gly Arg Ser				
305	310	315	320	
agg gaa ggg acc atg gag ctc cga act acc cct cag ctg aaa gtg gtg				1008
Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Thr Thr Pro Gln Leu Lys Val Val				

325

330

335

ggg cag ggc cgc ggc aat gga gac ccg ggg ggt ggg atg gag aag gac 1056
Gly Gln Gly Arg Gly Asn Gly Asp Pro Gly Gly Gly Met Glu Lys Asp
340 345 350

ggt ccg gaa tgg gac ctt tga 1077
Gly Pro Glu Trp Asp Leu
355

<210> 5
<211> 358
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 5
Met Ser Val Cys Tyr Arg Pro Pro Gly Asn Glu Thr Leu Leu Ser Trp
1 5 10 15

Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gly Thr Ala Phe Leu Leu Leu Ala Ala Leu
20 25 30

Leu Gly Leu Pro Gly Asn Gly Phe Val Val Trp Ser Leu Ala Gly Trp
35 40 45

Arg Pro Ala Arg Gly Arg Pro Leu Ala Ala Thr Leu Val Leu His Leu
50 55 60

Ala Leu Ala Asp Gly Ala Val Leu Leu Leu Thr Pro Leu Phe Val Ala
65 70 75 80

Phe Leu Thr Arg Gln Ala Trp Pro Leu Gly Gln Ala Gly Cys Lys Ala
85 90 95

Val Tyr Tyr Val Cys Ala Leu Ser Met Tyr Ala Ser Val Leu Leu Thr
100 105 110

Gly Leu Leu Ser Leu Gln Arg Cys Leu Ala Val Thr Arg Pro Phe Leu
115 120 125

Ala Pro Arg Leu Arg Ser Pro Ala Leu Ala Arg Arg Leu Leu Leu Ala
130 135 140

Val Trp Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Val Pro Ala Ala Val Tyr Arg
145 150 155 160

His Leu Trp Arg Asp Arg Val Cys Gln Leu Cys His Pro Ser Pro Val
165 170 175

His Ala Ala Ala His Leu Ser Leu Glu Thr Leu Thr Ala Phe Val Leu
180 185 190

Pro Phe Gly Leu Met Leu Gly Cys Tyr Ser Val Thr Leu Ala Arg Leu
195 200 205

Arg Gly Ala Arg Trp Gly Ser Gly Arg His Gly Ala Arg Val Gly Arg
210 215 220

Leu Val Ser Ala Ile Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Trp Ala Pro Tyr
225 230 235 240

His Ala Val Asn Leu Leu Gln Ala Val Ala Ala Leu Ala Pro Pro Glu
245 250 255

Gly Ala Leu Ala Lys Leu Gly Gly Ala Gly Gln Ala Ala Arg Ala Gly
260 265 270

Thr Thr Ala Leu Ala Phe Phe Ser Ser Ser Val Asn Pro Val Leu Tyr
275 280 285

Val Phe Thr Ala Gly Asp Leu Leu Pro Arg Ala Gly Pro Arg Phe Leu
290 295 300

Thr Arg Leu Phe Glu Gly Ser Gly Glu Ala Arg Gly Gly Gly Arg Ser
305 310 315 320

Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Thr Thr Pro Gln Leu Lys Val Val
325 330 335

Gly Gln Gly Arg Gly Asn Gly Asp Pro Gly Gly Gly Met Glu Lys Asp
340 345 350

Gly Pro Glu Trp Asp Leu
355

<210> 6
<211> 15

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hBLT2 anti-sense sequence

<400> 6
cagcagtgtc tcgtt 15

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hBLT2 siRNA sense sequence

<400> 7
gaaggauguc ggucugcuau u 21

<210> 8
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> hBLT2 siRNA antisense sequence

<400> 8
uagcagaccg acauccuucu u 21

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for hBLT2

<400> 9
agcctggaga ctctgaccgc ttctg 25

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for hBLT2

<400> 10
gacgtagagc accgggttga cgcta 25

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for re-hBLT2

<400> 11
tctcatcgagg catcacaggt 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for re-hBLT2

<400> 12
ccaagctcca caccacgaag 20

<210> 13
<211> 2398
<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (242)..(874)

<400> 13

gggaggccgg atgtgagtgg agcgccatt tcctgtttct ctgcagtttt cctcagcttt 60

gggtggtggc cgctgccggg catcggttc cagtccgaggc agggcgaggc ggcgtggaca 120

gcggccccgg caccagcgc cccgccgcc gcaagccgcg cgccgtccg ccgcgccccg 180

agccccgcg ttcctatctc agcgccctgc cgccgccgcc gcggcccagc gagcgccct 240

g atg cag gcc atc aag tgt gtg gtg gtg gga gac gga gct gta 283
Met Gln Ala Ile Lys Cys Val Val Val Gly Asp Gly Ala Val
1 5 10

ggt aaa act tgc cta ctg atc agt tac aca acc aat gca ttt cct gga 331
Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Thr Asn Ala Phe Pro Gly
15 20 25 30

gaa tat atc cct act gtc ttt gac aat tat tct gcc aat gtt atg gta 379
Glu Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Tyr Ser Ala Asn Val Met Val
35 40 45

gat gga aaa ccg gtg aat ctg ggc tta tgg gat aca gct gga caa gaa 427
Asp Gly Lys Pro Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
50 55 60

gat tat gac aga tta cgc ccc cta tcc tat ccg caa aca gtt gga gaa 475
Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Gln Thr Val Gly Glu
65 70 75

acg tac ggt aag gat ata acc tcc cgg ggc aaa gac aag ccg att gcc 523
Thr Tyr Gly Lys Asp Ile Thr Ser Arg Gly Lys Asp Lys Pro Ile Ala
80 85 90

gat gtg ttc tta att tgc ttt tcc ctt gtg agt cct gca tca ttt gaa 571
Asp Val Phe Leu Ile Cys Phe Ser Leu Val Ser Pro Ala Ser Phe Glu
95 100 105 110

aat gtc cgt gca aag tgg tat cct gag gtg cgg cac cac tgt ccc aac Asn Val Arg Ala Lys Trp Tyr Pro Glu Val Arg His His Cys Pro Asn 115 120 125	619
act ccc atc atc cta gtg gga act aaa ctt gat ctt agg gat gat aaa Thr Pro Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys 130 135 140	667
gac acg atc gag aaa ctg aag gag aag aag ctg act ccc atc acc tat Asp Thr Ile Glu Lys Leu Lys Glu Lys Lys Leu Thr Pro Ile Thr Tyr 145 150 155	715
ccg cag ggt cta gcc atg gct aag gag att ggt gct gta aaa tac ctg Pro Gln Gly Leu Ala Met Ala Lys Glu Ile Gly Ala Val Lys Tyr Leu 160 165 170	763
gag tgc tcg gcg ctc aca cag cga ggc ctc aag aca gtg ttt gac gaa Glu Cys Ser Ala Leu Thr Gln Arg Gly Leu Lys Thr Val Phe Asp Glu 175 180 185 190	811
gcg atc cga gca gtc ctc tgc ccg cct ccc gtg aag aag agg aag aga Ala Ile Arg Ala Val Leu Cys Pro Pro Pro Val Lys Lys Arg Lys Arg 195 200 205	859
aaa tgc ctg ctg ttg taaatg tctcagcccc tcgttcttgg tctgttcct Lys Cys Leu Leu Leu 210	910
tggaaccttt gtacgctttg ctcaaaaaaa aacaaaaaaa aaaaacaaaa aaaaaaaca	970
acggtggagc cticgcactc aatgccaact ttttgttaca gattaatttt tccataaaac	1030
cattttttga accaatcagt aattttaagg ttttgtttgt tctaaatgta agagttcaga	1090
ctcacattct attaaaattt agccctaaaa tgacaagcct tcttaaagcc ttatttttca	1150
aaagcgcccc cccattctt gticagatta agagttgcc aataaccttc tgaactacac	1210
tgcattgttg tgccgagaac accgagcact gaactttgca aagaccttcg tctttgagaa	1270
gacggtagct tctgcagtta ggaggtgcag acacttgctc tctatgtag ttctcagatg	1330

cgtaaagcag aacagcctcc cgaatgaagc gttgccattg aactcaccag tgagttagca 1390

gcacgtgttc ccgacataac attgtactgt aatggagtga gcgtagcagc tcagctcttt 1450

ggatcagtct ttgtgatttc atagcgagtt tctgaccag cttttgcgga gatattgaac 1510

agaactgcta tticctctaa tgaagaattc tgtttagctg tgggtgtgcc ggggtgggtg 1570

tgtgtgatca aaggacaaag acagtatttt gacaaaatac gaagtgagga ttacactac 1630

attgtacaag gaatgaaagt gtcacgggta aaaactctaa aaggtaatt tctgtcaat 1690

gcagtagatg atgaaagaaa ggttggtatt atcaggaaat gttttcttaa gcttttcctt 1750

tctcttacac ctgccatgcc tccccaaatt gggcatttaa ttcacttta aactggttgt 1810

tctgttagtc gctaacttag taagtgttt tcttatagaa ccccttctga ctgagcaata 1870

tgctccttg tattataaaa tctttctgat aatgcattag aaggtttttt tgtcgattag 1930

taaaagtgt ttccatgtta ctttattcag agctaataag tgctttcctt agttttctag 1990

taactagggtg taaaaatcat gtgttcgagc tttatagttt ttaaaatatt ttagataatt 2050

cttaaaactat gaaccttctt aacatcacig tcttgccaga ttaccgacac tgtcacttga 2110

ccaatactga ccctctttac ctgcccacg cggacacacg cctcctgtag tcgctttgcc 2170

tattgatgtt cctttgggtc tgtgagggtc tgtaactgt gctagtgtg acgatgttct 2230

gtacaactta actcactggc gagaatacag cgtgggaccc ttcagccact acaacagaat 2290

tttttaaatt gacagttgca gaattgtgga gtgtttttac attgatcttt tgctaatagca 2350

attagcatta tgttttgcat gtatgactta ataaatcctt gaatcata 2398

<210> 14
<211> 211
<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 14

Met Gln Ala Ile Lys Cys Val Val Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys
1 5 10 15

Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Thr Asn Ala Phe Pro Gly Glu Tyr
20 25 30

Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Tyr Ser Ala Asn Val Met Val Asp Gly
35 40 45

Lys Pro Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr
50 55 60

Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Gln Thr Val Gly Glu Thr Tyr
65 70 75 80

Gly Lys Asp Ile Thr Ser Arg Gly Lys Asp Lys Pro Ile Ala Asp Val
85 90 95

Phe Leu Ile Cys Phe Ser Leu Val Ser Pro Ala Ser Phe Glu Asn Val
100 105 110

Arg Ala Lys Trp Tyr Pro Glu Val Arg His His Cys Pro Asn Thr Pro
115 120 125

Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Asp Thr
130 135 140

Ile Glu Lys Leu Lys Glu Lys Lys Leu Thr Pro Ile Thr Tyr Pro Gln
145 150 155 160

Gly Leu Ala Met Ala Lys Glu Ile Gly Ala Val Lys Tyr Leu Glu Cys
165 170 175

Ser Ala Leu Thr Gln Arg Gly Leu Lys Thr Val Phe Asp Glu Ala Ile
180 185 190

Arg Ala Val Leu Cys Pro Pro Pro Val Lys Lys Arg Lys Arg Lys Cys
195 200 205

Leu Leu Leu
210

