(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 48/00

(11) 공개번호 특1998-702268
(43) 공개일자 1998년07월15일

(21) 출원번호 특1997-705665
(22) 출원일자 1997년08월16일
번역문제출일자 1997년08월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US 96/001913 (87) 국제공개번호 WO 96/025178
(86) 국제출원출원일자 1996년02월14일 (87) 국제공개일자 1996년08월22일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다

EA EURASIAN특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈스탄 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄

EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 스웨덴

OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고

국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 체크 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀랜드 영국 그루지야 헝가리 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈스탄 북한 대한민국 카자흐스탄 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽골 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바크 타지키스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투칼 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르

(30) 우선권주장 8/389,887 1995년02월15일 미국(US)
(71) 출원인 더 유니버시티 오브 유타 아룬디프 에스. 프라드한
미국, 유타 84108, 솔트 레이크 시티, 와카라 웨이 421, 슈이트 170
(72) 발명자 보르드 와니 에이
미국, 유타 84124, 솔트 레이크 시티, 아비나들 로드 4464
(74) 대리인 강명구

심사청구 : 없음

(54) 항-형질전이 성장인자-β 유전자 요법

요약

본 발명은 TGF-β-유도된 세포외 매트릭스의 무해한 축적을 특징으로 하는 개체에서 병인을 감소시키는 방법을 제공하는데 이는 개체의 세포 내 TGF-β 특이적 저해물질 또는 이의 활성단편을 인코드하는 핵산을 도입시켜 이루어진다. 한 구체예에서, TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는 핵산은 물질을 발현시키는 세포를 수득하기 위해 생체외에 세포내로 형질감염시키고, 세포는 치료가 필요한 개체에 투여한다. 본 발명의 TGF-β 특이적 저해물질에는 데코린, 비글리칸, 피브로모듈린과 루미칸과 같은 프로테오글리칸의 데코린 족 또는 TGF-β에 대한 특이항체를 포함하나 이에 한정시키지 않는다. 병인은 본 발명에 의해 감소될 수 잇는 병인은 다양한 섬유증 질환이 포함된다.

명세서

기술분야

본 발명은 당뇨병과 소화계 및 신장질환 국립 연구소의 승인 DK43609로 일부 지원을 받았다. 미국정부는 본 발명에 대해 일부권리를 갖는다.

발명의 요약

본 발명은 성장인자의 제어, 특허 성장인자 TGF-β에 의해 영향을 받은 과량의 세포외 매트릭스 생산과 세포성장의 제어에 관계한다.

배경기술

신장, 간, 폐, 심장, 골수 및 피부의 진행성 섬유증은 고통과 죽음의 중요한 원인이 되고 치료비용이 상당히 소요된다. 세포와 사이토킨 생물학의 진보로 조직 섬유증에 대한 분자차원의 사건을 이해하게 되었다. 섬유증의 발생은 독특한 병리학적 과정은 아니며, 정상적인 조직치료와 연관된 동일한 생물학적

사건으로 보는 것이 맹백해졌다.

조직 치유의 중심과정은 손상에 대한 반응으로 사이토킨을 방출한다는 것이다. 형질전환 성장인자 β(TGF-β)는 원형 사이토킨으로 세포 증식을 자극하고, 세포외 매트릭스 물질의 생산을 자극함으로써 조직 치유의 개시와 종료에 있어서 중요한 역할을 하게 된다. 세포외 매트릭스는 피브리노겐, 콜라겐과 프로테오글리칸을 포함한 자가-응집 거대분자의 복합적인 슈퍼 구조로써 표면 수용체에 의해 세포에 부착하게 된다. 인테그린(Integrins)은 특정 매트릭스 성분에 결합하는 것으로 공지된 표면 수용체종이다. 세포 주변 매트릭스는 기존 매트릭스의 분해와 새로운 매트릭스의 합성 및 재구성으로 이루어진 역동적인 과정에 의해 유지된다. TGF-β는 매트릭스 축적의 조절, 새로운 매트릭스의 합성을 촉진시키고 매트릭스 분해를 저해시키는데 연관된 하나의 인자이다.

조직 섬유증은 세포외 매트릭스의 유해한 축적을 특징으로 하는 병적 상태이다. 예로, 신장의 사구체 진행성 질환의 경우에, 세포외 매트릭스가 맥관막에 축적되거나 또는 사구체 기저막을 따라 축적되어 종국에는 질병 말기인 요독증이 된다. 유사하게, 성인 또는 급성 호흡기 곤란 증후군(ARDS)은 폐에 매트릭스의 유해한 축적과 연관되고, 간 경변증은 간의 반흔에 의해 나타나는 매트릭스가 유해하게 축적되는 특징이 있다. 세포외 매트릭스가 유해하게 축적되는 것을 특징으로 하는 또다른 증상이 당뇨병으로 진행성 신장질환의 가장 흔한 원인이 된다.

TGF-β의 무제한 합성은 세포의 매트릭스가 유해하게 축적되게 하는 하나의 원인인데 이는 조직 섬유층으로 발전된다. TGF-β의 작용을 제어하는 방법은 조직 섬유증의 치료와 예방 및 치료비에 상당한 영향을 줄 것이다.

따라서, TGF-β-유도된 세포외 매트릭스의 축적으로 인한 조직 섬유증을 치료하는 새로운 시도가 필하다. 본 발명은 이와 같은 욕구를 충족시키고 관련된 장점을 제공한다.

발명의 요약

본 발명은 개체의 세포내로 TGF-β-특이적 저해물질 또는 활성 단편을 인코드하는 핵산을 도입시켜 조직에서 TGF-β 유도된 세포외 매트릭스의 유해한 축적을 특징으로 하는 개체의 질병을 감소시키는 방법을 제공한다.

한 구체예에서, TGF-β 특이적 저해 물질을 인코드하는 핵산을 골근육에 생체 주입하여 세포로 유도한다. 또다른 구체예에서는, TGF-β특이적 저해 물질을 인코드하는 핵산을 생체외에서 세포내 형질 감염시켜 물질을 발현시키는 세포를 수득하고 세포는 치료가 필요한 개체내로 이식시키거나 또는 접목시킨다.

TGF-β 특이적 저해제를 발현시킬 수 있는 세포에는 골 근육, 간, 신장, 폐 그리고 피부의 것을 포함한다.

본 발명의 특이적 저해재는 데코린, 비글리칸과 피브로모듈린과 루이칸같은 프로테오글리칸의 데코린족, 베타글리칸과 엔도글린과 같은 TGF-β 특이적 수용체 및 TGF-β에 특이적인 항체를 포함한다.

본 발명에 의해 감소시킬 수 있는 질병은 섬유증 질환, 신장 사구체염, ARDS, 간경변, 섬유성암, 폐의 섬유증, 세동맥경화증, 후 심근경색, 심장 섬유증, 맥관형성술후 재협착증, 신장-장 섬유증, 반흔과 당뇨병성 질환을 포함하나 이에 한정시키지 않는다. 본 발명에 의해 치료될 수 있는 조직에는 신장, 간, 폐 또는 피부를 포함한다.

또한 본 발명은 TGF-β 유도성 조직의 유해한 성장을 하고 있는 개체에서 질병을 줄이기 위한 방법을 제공한다. 방법은 개체의 세포내로 TGF-β특이적 저해제 또는 이의 활성단편을 인코드하는 핵산을 도입시키고 이때 특정 물질 또는 이의 활성 단편은 세포에서 발현되어 조직의 유해한 성장을 억제시키게 된다. TGF-β 특이적 저해제의 발현은 생체내에서 물질을 인코드하는 핵산을 직접 주사하거나 생체외에서 세포의 형질감염후에 개체로 형질 전이된 세포를 이식하는 것으로 구성된다.

도면의 간단한 설명

도 1 은 데코린 발현 벡터의 형질감염후에 배양된 쥐 근세포에서 합성되고 방출된 쥐 데코린을 나타내는 자가 방사선 사진이다. 데코린 발현 벡터는 일본의 헤마글루티닌 바이러스(HVJ-리포좀: 라인 1)가 결합된 리포좀 또는 리포펙타민™ (라인 2)에 포함시킨다. 라인 3은 HVJ-리포좀에 포함된 클로람페니콜 아세틸 전이효소 발현벡터로 형질감염을 나타낸다. 데코린의 위치는 좌측에 표시되어 있다. kD: 킬로달톤.

도 2 는 데코린 발현벡터의 근육내 주사 후에 쥐 신장 사구체에서 데코린이 증가되었음을 보여주는 면역형광 사진이다. 데코린에 대한 면역형광 사진은 데코린 발현 벡터(라벨된 데코린) 또는 클로람페니콜 아세틸-전이효소 발현 벡터(라벨된 CAT)의 근육내 주사후 5일 뒤에 죽인 쥐의 신장부분에서 실행하였다.

도 3A 와 3B는 데코린 발현 벡터와 함께 근육내로 주사한 사구체염을 가진 쥐에서 TGF-β의 발현이 감소되었음을 나타낸다. 도 3A 는 쥐 데코린 발현벡터(라인 1) 또는 클로람페니콜 아세틸-전이효소 발현벡터(라인 2)의 주입후 6일 뒤에 죽인 사구체염이 있는 쥐의 신장에서 분리한 사구체 mRNA 의 노던 블랏이다. 2.5kb 표식이 데코린 특정 프로브와 하이브리드 되었음을 나타내고 1.3kb 표식은 글리셀알데히드 포스페이트 디하이드로게나제(GAPDH) 특정 프로브와 하이브리드 되었음을 나타낸다.

도 3B 는 데코린 발현벡터(라벨된 데코린) 또는 클로람페니콜 아세틸 전이효소 발현벡터(라벨된 CAT)의 근육내 주사후 7일 뒤에 죽인 쥐 신장의 사구체에서 TGF-β 면역활성 세포를 요약한 것이다. 값은 평균±표준 편차이다.

도 4A 내지 4F 는 데코린 발현 벡터의 근육내 주사 후에 사구체에서 세포외 매트릭스 성분의 축적이 감소되었음을 나타낸다. 도 4A 와 4B에서는 데코린 발현 벡터(라벨된 데코린 형질감염) 또는 클로람페니콜 아세틸-전이효소 ((CAT) 발현벡터 라벨된 CAT 형질감염)로 주입후 6일 뒤에 쥐 신장에서 주기적인

산-Schiff (PAS) 착색을 나타낸 것이다. 부분에서 어두운 곳은 PAS 착색을 나타낸다.

도 4C 내지 4F에서는 데코린 발현 벡터 또는 CAT 발현벡터로 미리 주사한 정상 쥐와 신장염이 있는 쥐에서 면역활성 EDA+ 피브로넥틴(4.D), 콜라겐타입 I(4.E) 또는 테나친(4.F) 또는 착색의 사구체 세포 발현을 나타내는 것이다. 6일과 15일은 신장을 제거한 질병 유도후 시간을 나타낸다. 값은 평균 ± 표준편차이다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 조직에서 TGF-β에 의해 유도된 세포외 매트릭스의 유해한 축적으로 인한 병인을 감소시키는 방법에 관계한다. 이와 같은 방법에는 개체내 세포에 TGF-β-특이적 저해물질을 인코드하는 핵산을 유입하여 개체에서 활성물질은 발현시키는 것이다. 방법은 다른 기존 투여 방식에 비해 장점을 가지는데 그 이유는 이를 인코드하는 핵산을 발현시키기 위해 내생 세포를 변형시킴으로써 저해물질의 생산이 지속적으로 이루어지기 때문이다.

한 구체예에서, TGF-β 특이적 저해물질인 데코린을 인코드하는 핵산은 발현벡터에서 이용될 수 있다. 데코린 인코드 벡터는 사구체염과 같은 섬유증식성 질환을 가지는 개체에 근육내로 주사한다. 주사부위에 충분한 형질감염 효과를 얻기 위해서는 데코린 인코드된 벡터는 일본 헤마글루티닌 바이러스(HVJ) 리포좀 구조 내로 포획시킨다. 주사 후에, 데코린이 발현되고 순환계로 방출되어 신장에 축적된다. TGF-β 특이적 저해물질로써, 데코린은 질병부위에 TGF-β에 결합하고 세포외 매트릭스의 유해한 축적을 저해한다.

여기에서 사용된 것과 같이, TGF-β 특이적 저해물질은 섬유증식성 질환과 연관하여 TGF-β의 활성을 저해할 수 있는 단백질 또는 이의 활성단면을 말한다.

섬유증식성 질환과 연관된 하나의 TGF-β 활성을 세포외 매트릭스 유도 또는 축적이다. 이와 같은 질병과 연관된 또다른 TGF-β 활성은 세포증식의 유도이다. TGF-β 특이적 저해물질은 이들의 활성을 저해할 수 있다.

데코린은 섬유증 질환과 상태를 치료하는데 사용되는 대표적인 TGF-β-특이적 저해물질이다. TGF-β 특이적 저해물질의 또다른 예로는 비글리칸, 피브로모듈린과 루미칸과 같은 데코린족, 베타글리칸과 엔도글린과 같은 TGF-β 수용체와 이의 용해형 및 활성단편 그리고 TGF-β에 특이적인 항체를 포함하나 이에 국한하지 않는다. TGF-β 특이적 저해 물질에는 특정 TGF-β 특이적 저해제를 인코드하는 핵산을 포함한다. TGF-β 특이적 저해물질이 이와 같은 코딩핵산인 경우 TGF-β 활성은 개체내 세포에서 인코드된 물질이 발현됨으로써 저해될 수 있다.

여기에서 사용된 것과 같이, 데코린은 Kirusius and Ruoslahti (Pro. Natl. Acad. Sci. (USA) 83:7683-7688(1986)에서 정의한 구조적 특징을 가지는 프로테오글리칸을 말한다. Krusius 와 Ruoslahti 에서 제시한 아미노산 서열을 가지는 사람 섬유아 데코린은 TGF-β의 활성을 저해시킬 수 있는 것과 같은 분자의 기능적 특징을 보유한 고유 조성물과 이의 수정 조성물 모두를 의미한다. 부착된 글리코사미노글리칸이 없는 데코린 폴리펩티드인 데코린 핵 단백질 또한 여기에서 정의된 것과 같이 데코린 의미에 포함된다. 데코린은 효소처리, 돌연변이 또는 핵 단백질에 글리코사미노글리칸을 결합시킬 수 있는 재조합 데코린을 세포에서 생산시키는 것과 같은 다른 수단에 의해 글리코사미노글리칸을 떼어낼 수도 있다. 전술한 것과 같이, 데코린과 데코린 핵 단백질 모두 TGF-β 특이적 저해물질의 예이다.

데코린의 기능적 등가체에는 TGF-β 의 활성을 저해시키는 능력을 가지는 데코린의 기능상 특징을 유지하는 데코린 변형체를 포함한다. 수정체에는 데코린 핵 단백질의 TGF-β 특이적 저해 활성을 간섭하지 않는 하나 이상의 아미노산을 치환 또는 첨가하는 것을 포함한다. 또한, 데코린의 기능적 등가체에는 비글리칸, 피브로모듈린과 루미칸과 같은 프로테오글리칸의 데코린 족을 포함하는데 이는 데코린과 구조적 그리고 기능적 관계를 공유한다(Funderburgh et al., J. Biol. Chem. 268:11874-11880 (1993), Takahashi et al., J. Histochem. Cytochem. 41:1447-1457 (1993), Yamaguchi et al., Nature 346:281-284 (1990) and Blochberger et al, J. Biol. Chem. 267:20613-20619 (1992), each of which are incorporated herein by reference).

여기에서 사용된 것과 같이, 활성 단편은 이 부분이 이에 상응하는 총 길이 단백질의 TGF-β 활성 특징을 가진다는 조건하에 전체 길이 TGF-β 특이적 저해제의 일부를 의미한다. 따라서, 활성 단편은 조직에서 세포외 매트릭스의 유도성 또는 유해성 축적을 저해할 수 있다. 데코린 또는 세포에 TGF-β 의 결합을 저해시킬 수 있는 데코린의 활성 단편은 공지되어 있다(WO 93/20202). 예로써, 시스테인 잔기 26에서 티로신까지의 돌연변이를 포함하는 데코린의 아미노 단부 45 잔기를 포함한 융합 단백질을 TGF-β 활성을 저해할 수 있다(WO 93/20202). 데코린 또는 다른 TGF-β 특이적 저해제의 다른 활성 단편은 공지되어 있거나 또는 본 기술에 숙지된 기술을 가진 자에 의해 결정될 수 있다.

본 발명은 세포외 매트릭스의 유해한 축적을 특징으로 하는 병인학을 감소시키는데 이용될 수 있다. 콜라겐, 피브로넥틴과 다른 매트릭스 성분들을 포함한 세포외 매트릭스의 유해성 축적에 의한 질병은 많다. 이와 같은 질병에는, 사구체염, 성인 또는 급성 호흡기 기능이상 증후군(ARDS), 당뇨성 신장 질환, 간의 섬유성 질환, 폐와 심근경색후 섬유증과 같은 당뇨병 유관 질병 등을 포함한다. 피브로이드, 피브로마, 피브로아데노마와 피브로살코마를 포함하는 유방, 자궁 또는 췌장과 같은 기관의 섬유성 암과 섬유 경화증 등을 포함한다.

또한, 콜라겐, 피브로넥틴과 다른 매트릭스 성분이 증가된 것과 연관있는 세포외 매트릭스의 유해한 축적과 연관 있는 다양한 질병이 있다. 이와 같은 질병에는 심근경색, 심장 섬유증, 맥관형성술후 재협착증 그리고 신장-장 섬유증, 켈로이드 반흔과 손상, 화상 또는 외과술에 의한 반흔을 포함한다.

여기에서 사용된 것과 같이, 병인의 감소는 질병과 연관된 적어도 하나의 특징을 감소시킨다는 의미이다. 예로써 사구체염은 세포외 매트릭스의 증가로 인한 섬유증과 같은 병인 또는 과세포충실성으로 인해 신장 기능을 상실하게 된다. 본 발명의 사구체염 치료 후에 경변증의 감소는 여기에서 정의한 것과

같은 병인이 감소된 것이다. 본 발명이 병인을 감소시키는데 이용되기 때문에 따라서 본 발명은 질병의 치료에 유용하다.

세포외 매트릭스의 유해한 축적이 있는 것과 같은 여기에서 상술한 질병과 질환은 섬유증 질환으로 공지된 일반적인 범주내에 포함될 수 있는 유사한 병인이다. TGF-β가 사람 질병의 동물 모델과 사람 질환에서 이와 같은 질병과 질환에 중요한 원인이 된다(Border and Ruoslahti, J. Clin. Invest. 90:1-7 (1992) and Border and Noble, New Engl. J. Med. 331:1286-1292 (1994), both of which are incorporated herein by reference). TGF-β는 콜라겐, 피브로넥틴 그리고 다른 매트릭스 성분의 생산을 촉진시키고 조직에서 간염 세포의 증식을 촉진시킴으로써 이와 같은 질병을 중재할 수 있다. 간염 세포의 증식은 실질 세포를 제거하는 세포를 확장시킴으로써 기관의 기능을 파괴하여 생성된 세포외 매트릭스의 유해한 축적이 이루어지게 된다.

본 발명의 방법은 개체에서 TGF-β 특이적 저해물질을 발현시킴으로써 개체에서 이와 같은 질병을 치료하거나 예방하는데 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 이와 같은 질병을 치료하는데 약물로써 유용하다. 본 발명이 TGF-β 특이적 저해물질에 의해 TGF-β 를 저해시킴으로써 세포외 매트릭스의 유해한 축적을 저해하는 방법에 관계하기는 하나, 이와 같은 물질이 작용하는 메카니즘은 중요하지 않다. 예로써 TGF-β 특이적 저해성물질은 TGF-β 에 결합하여 이의 수용체 결합을 방해함으로써 TGF-β 를 발해하거나 또는 TGF-β 의 합성 또는 분비를 저해함으로써 또는 표적 세포로부터 TGF-β 를 격리시킴으로써 간접적으로 TGF-β 의 활성을 저해한다. 또한, 여기에 제시된 병은 단순히 대표적인 것이고 본 기술에 숙지된 지식을 가진 자는 본 발명이 세포외 매트릭스의 유해한 축적과 연관된 임의 질병에 유용한 것임을 인지할 것이다.

TGF-β 는 조직 손상 후에 치료와 재생을 정상적으로 조절하는 다기능성 사이토킨이다. 보통의 조직 치료동안에, TGF-β 생산이 증가되어 치료과정을 촉진시키고, 완료되었을 때 TGF-β 발현이 감소된다. TGF-β 발현이 정상적인 조직 치유후에도 감소되지 않은 경우에는 섬유증이 발생된다. 따라서 반복된 조직손상 또는 TGF-β 조절에 이상이 있는 경우에 지속적으로 TGF-β 가 생산되고 이는 세포외 매트릭스의 유해한 축적이 되어 조직 섬유증이 된다(Border and Noble, *supra*).

TGF-β 는 391 아미노산 전구체 분자로 합성되어 단백질 분해되면 펩티드 단편과 112개 아미노산 소단위가 형성된다. 활성 TGF-β 는 두 개의 112개 아미노산 소단위가 이황화결합에 의해 연결된 것으로 이루어진 25KD 이량체 단백질이다. TGF-β 는 비활성형 또는 잠복기형으로 분비되어 생물학적 효과를 발휘하기 전에 활성화가 필요하다. TGF-β 의 잠복기형은 TGF-β 이량체와 전구체 TGF-β 의 절단 단편(잠복기 연관 펩티드로 공지됨) 사이에 형성된 고분자량 복합체이다. 잠복기 TGF-β 는 세포 표면과 세포외 매트릭스에 저장되어 알려지지 않은 기작에 의해 활성 TGF-β 로 전이된다.

본 설명에 의해 지연되기를 원치는 않지만, 콜라겐, 피브로넥틴과 다른 매트릭스 단백질의 생산을 자극하기 위한 TGF-β 의 능력은 특이적 세포 표면 수용체의 결합을 통하여 중재된다. TGF-β는 수용체 I, II, III로 일컫는 세 개 막 단백질에 결합되는데 이는 실제 모든 세포에 존재한다. 타입 I과 II 수용체에는 세포 내 시그날과 상호작용하는 막통과 세린-트레오닌 카이나제 도메인을 포함한다. 베타글리칸으로 공지된 타입 III 수용체는 타입 I과 II 수용체에 의해 TGF-β를 인지할 수 있는 막-고정된 프로테오글리칸이다. 세포외 매트릭스 성분에 합성과 침착에서 TGF-β의 효과는 타입 I 수용체에 의해 중재되고 세포 증식에서 효과는 타입 II 수용체에 의해 중재된다.

세포증식에서 TGF-β의 효과는 복합적인데 유용한 발생은 간질-유도된 세포의 증식이 TGF-β에 의해 일반적으로 자극되고 반면에 상피세포는 이들의 성장에 의해 저해된다. TGF-β는 또한 간질-유도된 세포에서 세포외 매트릭스 생산을 촉진시킨다(Okuda et al., J. Clin. Invest. 86:453-462 (1990), which is incorporated herein by reference) and this also can be inhibited with decorin (Border et al., *supra*). 몇가지 형태의 암세포와 종양은 종양 성장에 대해 TGF-β 활성에 따라 달라진다. 예로써, 이에 상응하는 사람 종양의 특징을 충실히 반복하는 쥐 중피 종양(Fitzpatrick, et al., Growth Factors 11:29 (1994)), 섬유육종(Spearman et al., Gene 149:25 (1994)) 그리고 차이니즈 헴스터 오버리 세포(Yamaguchi and Ruoslahti, Nature 336:244-246 (1988))를 포함한다. 이와 같은 모델에서 종양성장은 안티센스 올리고뉴클레오티드로 TGF-β 활성을 억제함으로써 상승된 TGF-β와 연관이 있는 것으로 보인다.

본 발명의 TGF-β 특이적인 저해 물질은 동물 모델에서 TGF-β에 의해 유도된 급성 맥관막 증식성 사구체염의 발생을 성공적으로 저해시키는데 이용되었다(실시예 1과 4). 항-흉선 세포의 정맥 내 주사에 의해 신장염이 있는 쥐의 사구체는 TGF-β mRNA과 TGF-β 단백질의 합성이 증가되었고 상당히 많은 피브로넥틴과 프로테오글리칸(Okuda et al)을 분비하였다. 쥐 신장염 모델은 사람 사구체염과 사구체경변증과 연관이 있으며 사람 맥관막 증식성 사구체염에 특히 연관되어 있는데 이유는 이들 사람 질병의 특징이 상당히 재현되기 때문이다(Yamamoto and Wilson, Kidney Int. 32:514-525 (1987); Bagchus et al., Lab Invest. 55:680-687 (1986) and Border, Kidney Int. 34:419-434 (1988)). 세포외 매트릭스 성분의 생산 억제와 사구체염을 가진 쥐의 사구체에서 맥관막 매트릭스의 유해한 축적의 저해는 TGF-β에 특이적인 중화항체를 정맥내 투여함으로써 이루어진다(Border et al., Nature 346:371-374 (1990), which is incorporated herein by reference). 또는 정제된 데코린을 투여할 수도 있다(실시예 1 Border et al. Nature 360:361-364 (1992)).

사구체 경화증은 일차적으로 사구체신염, 당뇨성 신장병과 낭창 신장염을 포함한 다양한 질병에서 신장기능을 점진적으로 상실하게 하는 최종적인 공통 과정이다. 이와 같은 질병은 부분적으로 TGF-β에 의해 중재되는 세포외 매트릭스의 확장과 맥관막 세포 증식과 연관된 통상적인 병인을 가진다. 여기에서 언급한 것과 같이, 개체내의 세포에 TGF-β 저해성 물질을 인코드하는 핵산의 유전자 전달은 TGF-β-유도성 맥관막 세포증식을 저해하고 신장에서 세포외 매트릭스의 유해한 축적을 저해함으로써 사구체경화증과 연관이 있는 병인을 감소시키는데 이용될 수 있다.

여기에서 사용된 것과 같이, 본 발명의 상술한 방법의 타당성은 항흉선 항혈청에 의해 유도된 사구체신염의 급성 맥관막 증식성 모델에서 설명된다. 예로써 쥐에게 데코린이 인코드된 핵산을 골 근육에 주사

하였다. 골근육은 매우 도관화되어 근육 세포에 의해 발현되는 데코린은 혈류로 들어가고 신체의 다른 부분으로 전이되어 세포외 매트릭스와 연합하게 되고 TGF-β 활성을 저해한다.

여기에서 사용된 것과 같이, TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는 핵산은 TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는 cDNA 또는 게놈 DNA 또는 RNA 를 의미한다. 데코린 cDNA는 TGF-β 저해성물질을 인코드하는 핵산의 예이다.

생체에 외생 유전자를 발현시키는 방법은 유전자 전달에 의해 이루어진다. 유전자 전달은 생체에서 TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는 핵산을 직접 주사하거나 또는 물질을 발현시키는 세포를 수득하기 위해 세포외에서 세포를 형질감염시키고 그 다음 치료될 개체에 이를 이식하여 이루어진다.

여기에서 사용된 것과 같이, TGF-β 특이적 저해 물질을 발현하는 세포는 물질을 생산하고 분비할 수 있는 세포를 의미하는 것으로 세포에 제공된 핵산에 인코드된 것이다. TGF-β 저해성 물질을 인코드하는 핵산 서열은 발현 벡터내에 클론될 수 있고 벡터는 물질을 인코드하는 서열이 발현 제어 요소와 선택적으로 연결될 수 있다. 구성 프로모터와 선택적으로 연결된 사람 데코린 뉴클레오티드 서열을 포함하는 pAct 핵산 발현 벡터는 TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는 핵산의 특정 실시예이다. 발현 제어 요소는 본 기술 분야에 공지된 것이고 여기에는 프로모터, 인헨서 그리고 적절한 시작과 종료 코돈을 포함한다.

또한 데코린 유전자 전달 방법은 다른 TGF-β 특이적 저해 물질의 유전자 전달에 유용하다. 본 발명의 다양한 물질을 인코드하는 cDNA 서열 또는 게놈 서열은 TGF-F 특이적 저해 물질을 인코드하는데 유용하다. 이와 같은 서열은 공지되어 있고 공적으로도 DNA data 뱅크에서 이용할 수 있으며, 유전자는 PCR에 의해 클론되거나 또는 화학적으로 합성될 수 있다. 본 기술에 공지된 cDNA 서열은 피브로모듈린(Antonsson et al. Biochem. Biophys. Acta. 1174:204-206 (1993)), 비글리칸 (Fisher et al., J. Biol. Chem. 264:4571-4576 (1989)), 루미칸(Blochberger et al., *supra*, 1992), 베타글리칸(Fukushima et al., J. Biol. Chem. 268:22710-22715 (1993) and Lopez-Casillas et al., Cell 67:785-795 (1991)) 그리고 엔도글린(St-Jacques et al., Endocrinology 134:2645-2657 (1994))을 포함한다.

여기에서 사용된 것과 같이, 항체에는 TGF-β와 같은 면역원에 특이적으로 결합할 수 있는 Fab, $F(ab^{1})_2$, Fv와 Fd 단면과 같은 단편 또는 전체 크기의 항체분자를 포함한다. 자연 발생 항체와 결합 활성을 가지는 항체 단편 및 비-자연적으로 발생하는 항체 또한 여기에서 말하는 것과 같은 항체이다. 이와 같은 비-자연적 발생 항체는 고형상 펩티드 합성을 이용하여 만들거나 또는 Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989)에서 상술된 것과 같은 가변 중사슬과 가변 경사슬로 구성된 복합 라이브러리를 스크린하여 수득할 수 있다.

TGF-β의 활성을 중화시킬 수 있는 TGF-β에 특이적인 단클론 항체는 Harlow 와 Lane, Antibodies: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988), which is incorporated herein by reference)에서 상술한 것과 같은 하이브리도마 발생과 같은 공지의 방법을 이용하여 면역화시킨 설치류 또는 다른 동물에서 만들 수 있다. TGF-β 또는 이의 단편은 이뮤노겐으로 이용할 수 있고 이는 천연원 또는 재조합으로 생산하거나 또는 화학적으로 합성할 수 있다. TGF-β 특이적 저해물질과 같은 기능을 하는 단클론 항체를 생산하는 하이브리도마를 확인하는 방법은 예로써 HepG2 세포 또는 정제된 데코린과 같은 표적과 방사능라벨된 TGF-β 사이에 결합을 저해하는 물질을 감지하는 검사를 이용한다.

TGF-β에 특이적인 단클론 항체의 경사슬과 중사슬을 인코드하는 cDNA 서열은 항체를 분비하는 하이브리도마 세포로부터 이와 같은 서열을 클로닝함으로써 수득될 수 있다. 항체 유전자 클로닝 방법은 공지되어 있다(Borrebaeck, Antibody Engineering: A Practical Guide (W.H. Freeman and Co., New York, 1991).

TGF-β의 활성을 저해할 수 있는 인체에서 만들어진 항체는 TGF-β에 특이적인 설치류 또는 다른 동물 항체로 부터 유도된 상보적인 결정 부위(CDRs)를 인코드하는 뉴클레오티드 서열을 사람 이뮤노글로블린 분자의 경사슬과 중사슬의 가변부위로부터 유도된 뉴클레오티드 구조 서열에 접합시켜 생산한다. 사람 이뮤노글로블린 가변부분 구조와 일정부분 뉴클레오티드 서열은 본 기술에 공지되어 있다. 사람 이뮤노글로블린 서열을 인코드하는 cDNA는 공공기관에서 이용할 수 있는 유전자 뱅크에서 이용하거나 또는 공공기관의 세포 뱅크에서 이용할 수 있는 사람 임파세포주로부터 클론할 수 있다(American Type Culture Collection, Rockville MD). CDR 이식에 의한 항체를 사람에서 만드는 방법은 공지된 기술이다(Borrebaeck, *supra*, 1991: Reichmann et al., Nature 332:233 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:10029 (1989), each of which are incorporated herein by reference). 또한 설치류 또는 다른 동물 항체에 특이성과 고유 결합 친화성을 유지하는 분자 모델링과 돌연 변이 접근 방식을 이용하는 방법도 공지되어 있다(Borrebaeck et al., *supra*, 1991).

여기에서 상술하는 것과 같은 유전자 전이에 의한 TGF-β 특이적 저해 물질의 발현을 수득하는데 유용한 유전자 전이 방법과 다양한 발현벡터는 공지되어 있다(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989); Kriegler M. Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (W. H. Freeman and Co. New York NY, 1990) and Wu, Meth. in Enzymol, (Academic Press, New York, 1993). 벡터 또는 방법의 선택은 병인을 감소시키기 위해 조직에서 요구하는 물질의 양과 특정 TGF-β 특이적 저해물질과 같은 몇가지 인자에 따라 달라진다. 예로써, 세포에서 특정 TGF-β 특이적 저해물질의 발현 수준은 세포특징, 물질을 인코드하는 핵산서열에 선택적으로 연결된 조절 부분 뿐만 아니라 물질 자체에 따라 달라진다. 또한 조직에서 생체 내 수득될 수 있는 TGF-β 특이적 저해 물질의 발현 수준은 다른 인자뿐만 아니라 생체 내 생산 부위 및 물질의 약리학적 성질에 따라 달라질 수 있다.

본 발명에 상술된 방법은 실험자가 원하는 조직에서 TGF-β 특이적 저해물질의 발현이 필요 수준으로 되기 위해서 형질감염될 세포형, 벡터, 조절 부위와 같은 인자와 유전자 전달방법을 복합시켜 선택하는데 유용하다. 여기에서 상술된 시험관 형질감염 방법은 특정세포에 의한 발현시 TGF-β 특이적 저해물질의

특징, 벡터, 조절요소를 평가하기 위한 능력을 제공한다. 예로써, 실시예 2 에 상술된 벡터에서 병아리 β-악틴 구성 프로모터에 선택적으로 연결된 데코린 인코드 유전자를 가지는 pAct-Dec 벡터는 생체 내 골 근육에 유전자 전달을 시도하기 전에 배양된 근육세포의 시험관 형질감염에 의해 우선 테스트된다(실시예 2).

여기에서 상술된 결과는 골 근육 세포가 혈류로 들어가서 근육에서 떨어진 부위의 병인을 감소시킬 수 있는 TGF-β-특이적 저해 물질의 발현을 이루는데 편리하고 유용한 부위이다. 본 발명에 적합한 유전자 전달방법은 근세포이외의 다른 세포에 관계한다. 이와 같은 세포에는 예로써 특정기관의 상피세포를 포함한다. 고농도 TGF-β 특이적 저해물질은 특정조직에서 조직 내 또는 부근에 위치한 세포형에 물질을 인코드하는 핵산을 주입하여 이루어진다. 선택적인 세포형 발현이 가능한 조직 특이적 발현 제어 요소는 공지되어 있고 이에는 근세포에 발현을 제한하는 근육 크레아틴 카이나제 인헨서 또는 B 임파 세포에 발현을 제한하는 이뮤노글로블린 인헨서를 포함한다.

생체 내 주사부위에서 세포내에 TGF-β 특이적인 저해 물질을 인코드하는 핵산을 도입하는 데에는 다양한 방법이 이용될 수 있다. 예로써 핵산을 단독으로 주입하거나 또는 리포좀내에 넣거나 또는 헤마글루티민 센다이 바이러스와 복합된 리포좀에 넣거나 또는 바이러스 벡터에 넣는다. 한 구체예에서, 핵산은 pAct 벡터내에 클론시키고 벡터는 주사 전에 리포좀 HVJ 구조에 넣는다.

핵산 분자 단독 또는 양이온성 리포좀에 포획된 핵산의 직접 주사는 생체내에 비-분할 또는 분할 세포내로 TGF-β 저해성 물질을 인코드하는 핵산의 안정적인 유전자 전달에 이용될 수도 있다(Ulmer et al., Science 259:1745-1748 (1993). 또한 핵산은 입자 충격 방법을 이용하여 생체내에 다양한 조직에 옮길 수 있다(Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2726-2730 (1991), which is incorporated herein by reference).

세포 융합을 촉진시키기 위해 센다이 바이러스가 결합된 리포좀내로 핵산을 넣는 것은 본 발명의 핵산의 유전자 전이에 이용된다. 특히, 일본 헤마토글루티닌 바이러스는 생체외 그리고 생체내에서 세포를 형질감염시킴으로써 TGF-β 특이적 저해물질의 성공적인 발현을 이루는데 효과적인 수단을 제공하는 센다이 바이러스(Z 균주)이다(실시예 2 와 3). HVJ-리포좀 방법을 이용한 유전자 전달의 효과는 Lipofectamin™(실시예 2 와 3)에 의해 생성된 리포좀보다 상당히 효과가 크다.

바이러스 벡터는 생체 내 또는 시험관에서 특정 세포형에 TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는 핵산의 유전자 전달에 유용하다. 바이러스는 특정 세포형에 감염되어 증식할 수 있는 특별한 감염성 물질이다. 특정 세포형을 감염시키는 이와 같은 특이성은 생체에서 선택된 세포에 TGF-β 특이적 저해물질을 제공하는데 상당히 적합하다. 바이러스 벡터의 선택성은 표적이 있는 세포형에 따라 달라질 수 있다.

특정 바이러스 벡터는 특정 세포형에 표적을 할 수 있는 것으로 공지되어 있다. 이와 같은 벡터에는 신경세포를 표적으로 하는 허피스 심플렉스 바이러스(Battleman et al., J. Neurosci. 13:941-951 (1993), 조혈세포를 표적으로 하는 면역결핍 바이러스(Carroll et al., J. Cell. Biochem. 17E:241 (1993), 일반적인 또는 조직-특이적인 프로모터를 가지는 재조합 아데노 연합된 바이러스 벡터를 포함한다. 재조합 아데노-연합된 바이러스 벡터는 재조합 바이러스가 정지가 비-증식 세포의 크로마틴내로 안전하게 침투할 수 있는 추가 장점을 가진다(Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996 (1988) which is incorporated herein by reference).

바이러스 벡터는 벡터내에 조직-특이적 프로모터 또는 인헨서를 결합시킴으로써 인코드된 TGF-β 특이적 저해물질을 발현시키는 세포를 추가 제어하기 위해 만들 수 있다(Dai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895 (1992), which is incorporated herein by reference). 구성 프로모터의 제어하에 TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는 핵산 서열을 가질 수도 있다. 여기에서 상술하고 있는 pAct-Dec 벡터는 본 발명에서 유용한 구성 발현 벡터의 예가 된다(실시예 2).

레트로바이러스 벡터는 여기에서 상술된 유전자 전달 방법에 적합하다.

p38 이와 같은 벡터는 단순히 감염 초기 과정을 겪은 비-감염성 입자 또는 감염성 입자로써 기능을 하도록 만들고 있다. 전술한 경우에, 바이러스 게놈을 수정하여 신규 바이러스 단백질과 RNA를 합성하기 위한 필요 유전자, 조절 서열 및 패키지 시그날을 유지하게 된다. 그러나 이들 바이러스의 발암 성질을 제공하는 유전자는 파괴되거나 제거한다. 바이러스 단백질을 합성한 후에, 숙주 세포는 새로운 바이러스 입자에 RNA를 넣고 추가 감염과정을 실시한다. 또한 바이러스 게놈은 소요의 재조합 유전자를 인코드하고 발현하도록 만든다.

비-감염성 바이러스 벡터의 경우에, 헬퍼 바이러스 게놈은 바이러스 구조 단백질을 인코드하는데 필수적인 구조유전자를 제공하도록 요구하고 있다. 그러나 헬퍼 바이러스는 바이러스 입자내로 헬퍼 바이러스를 넣기 위해 요구되는 바이러스 패키지 시그날을 파괴하도록 돌연변이 시켰다. 따라서, 소요의 유전자와 기능성 패키지 시그날을 포함하나 바이러스 구조 유전자는 부족한 재조합 바이러스 벡터를 바이러스 입자에 결합시켰다. 이와 같은 신규 바이러스는 비록 표적 세포를 감염시킬 수는 있으나 바이러스 구조 유전자가 제공되지 않기 때문에 추가 감염성 바이러스가 생산되지는 않는다. 바이러스 벡터를 이용하고 만드는 방법에 대해서는 공지된바 있다(Miller and Rosman, Biotechniques 7:980-990 (1992) and Davison and Elliot, Molecular Virology: A Practical Approach (IRL Press, New York, 1993), both of which are incorporated herein by reference).

TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는 발현 벡터를 생산하는 데에는 다양한 벡터와 프로모터를 이용할 수 있다. 중요한 특징으로는 프로모터는 발현을 위해 바람직한 세포형에서 기능을 하며 벡터는 개체에 치료요법적 효과를 가지는데 충분한 시간동안 유지될 수 있다.

수용체-중재된 DNA 수송 방식은 또한 조직-특이적 리간드 또는 연결 분자를 통해 핵산 분자와 비-공유적으로 복합된 항체를 이용하여 조직-특이적 방식으로 세포내에 TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는 핵산 분자를 수송하는데 사용된다(Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154 (1992); Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987), each of which is incorporated herein by reference).

개체에서 TGF-β 특이적 저해물질의 발현을 얻기 위한 유전자 전이는 자생 세포의 생체외 형질감염에 의해 실행될 수도 있다. 이와 같은 생체외 형질감염에 적합한 세포에는 혈액세포를 포함하는데 이들 세포는 공지의 방식에 의해 개체에 조작과 재접근이 용이하기에 포함될 수 있다. 대립유전자 세포와 같은 비-자생세포는 치료될 개체와 조직적합성 항원을 공유하는 경우에 이용될 수 있다.

생채외 형질감염에 의한 TGF-β 특이적 저해물질의 유전자 전달은 세포의 안전한 집단이 이물질을 발현하는 것에 대해 선택되기 때문에 상당 수준의 발현을 수득하는데 이익이 된다. 또한 발현수준은 적절한 조건하에 벡터내로 약물 선택 표식을 결합시킴으로써 증가될 수 있고 이는 코딩된 서열이 증식되게 된다. 이와 같은 선택 표식에는 디하이드로폴레이트 환원효소 또는 글루타민 합성효소 유전자를 포함한다. 포유류에서 유전자 선택과 증식 방법은 본 기술분야에 공지된 것이다(Sambrook et al. *supra*). TGF-β 특이적 저해물질의 다량 발현을 이루기 위한 또다른 접근 방식은 상이한 약물 저항 유전자를 가지는 벡터를 이용하여 다중 형질 감염과 선택과정을 실행한다.

생체외 세포형질감염을 통한 유전자 전달은 인산 칼슘 침전법, 디에티아미노에틸 덱스트란, 일렉트로포레이션, 리포펙션 또는 바이러스 감염을 포함한 다양한 방법에 의해 실행된다. 이와 같은 방법은 본 기술분야에 공지되어 있다(Sambrook et al., *supra* and Wu, *supra*, 1993). 일단 세포가 형질감염되면, 그 다음 치료될 개체내로 이를 이식한다. 체내에 일단 들어온 세포는 TGF-β 특이적 저해물질을 생산하게 되고 이는 순환계로 들어가서 질병부위에 TGF-β의 활성을 막는다.

형질감염시 생체내와 생체외 사이에 선택은 특정 TGF-β 특이적 저해물질의 발현을 수득하는데 이용되는 벡터의 선택에 영향을 준다. 예로써, TGF-β에 대한 중화 항체의 유전자 전달은 단일 사슬 항체 디자인이 이용되지 않는 한 항체의 중사슬과 경사슬 모두의 발현을 별도로 할 것을 요구한다. 생체외 형질감염은 유전자 전달 방법으로 선택되고 게놈 서열은 TGF-β 특이적 저해물질을 인코드하는데 선택되며 항체의 각 사슬은 상이한 벡터에 의해 인코드될 수 있다. 이와 같은 경우에, 완전한 항체의 발현은 두 개 벡터의 별도 연속 형질감염 또는 벡터와 이중 약물 선택으로 동시 형질감염에 의해 이루어진다.

단일 벡터 디자인에 의해 생체내에서 인코드 핵산을 직접 주입하여 프로테오글리칸의 데코린 족 구성원의 유전자 전달이 이루어진다. 항체의 중사슬과 경사슬 모두 동일 벡터에 인코드된 단일 벡터(이는 이중 사슬 벡터로 공지됨)가 생체외 또는 생체내에서 유전자 전달에 의한 항체를 발현하는데 이용될 수도 있다. 항체 발현에 적합한 이중 사슬 발현 벡터는 본 기술에 공지되어 있다(Borrebaeck, *supra* 1991 and Phelps, et al. J. Immunol. 145:1200-1204 (1990), both of which are incorporated herein by reference). 또는 생체 내 핵산의 직접 주사에 의해 항체의 유전자 전달은 두 개 발현 벡터의 혼합물을 유입시켜 이루어지는데 이때 각 발현 벡터는 항체의 이뮤노글로블린 중사슬 또는 경사슬을 인코드한다.

섬유성 질환을 가진 다양한 동물 모델이 본 기술에 공지되어 있고 여기에서 사용된 것과 같이 TGF-β 특이적 저해 물질을 이용하여 유전자 전달 효과를 테스트하는데 이용될 수 있다. 여기에는 맥관막 증식성 사구체 신염을 가지는 급성 쥐 항-흉선 혈청 모델(실시예 3 과 4) 그리고 항흉선 혈청의 반복 주사에 의해 생성된 만성 사구체 질환(Yamamoto et al) 등을 포함한다. 만성 모델은 뇨단백질, 혈액 뇨 질소 그리고 세포외 매트릭스가 증가된 것을 특징으로 하는 진행성 사구체 질환을 만든다. 만성 사구체 신염 질병 모델은 급성 모델과 구별되는 것이 세포외 매트릭스 축적을 특징으로 하는 진행성 관상 간질 질환을 가진다는 것이다.

또한 신장염은 앙지오텐신 II 의 만성 투여에 의해 동물에서 유도될 수 있다(Miller, et al., Amer. J. Physiol. (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 30:F549-F465 (1991)). 이와 같은 모델에서 0.01N 아세트산에 100ng 앙지오텐신 II/min(Alza Corp. Palo Alto CA)을 수송하는 펌프를 쥐의 목에 외과적으로 이식하여 앙지오텐신 II를 수송하고 기준 집단 쥐에는 0.01N 아세트산을 포함하는 동일 펌프를 이식하였다. 처리 1시간 뒤에 앙지오텐신 처리된 쥐 사구체에서는 특이적으로 TGF-β과 콜라겐 타입 I mRNA 발현이 증가되었으며 세포외 매트릭스의 축적도 증가되었다. 이와 같은 매트릭스의 축적은 정제된 사람 데코린의 정맥 투여에 의해 억제될 수 있다.

사람 당뇨병성 신장염에 대한 스트렙토조토신 쥐 모델은 TGF-β 특이적 저해 물질을 이용한 유전자 전달 효과를 테스트하는데 이용된다. 당뇨병은 Velasquez et al., FASEB 4:2850 (1990), Mauer et al., Diabetes 25:850 (1976) and U.S. Application Serial No. 07/885,674에 상술된 것과 같이 시트레이트 완충액에 6.5㎎/100g 체중으로 스트렙토조토신(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)의 1회 정맥투여에 의해 150g 수컷 스프라구-도우리 쥐에서 유도될 수 있다.

다음의 실시예는 설명을 위한 것이며 본 발명을 이에 한정하고자 함이 아니다.

실시예 1

정제된 데코린의 정맥투여

본 실시예는 사구체신염 실험 모델에서 세포외 매트릭스의 유해한 축적을 감소시키기 위해 정제된 데코린을 이용하는 방법을 제공한다. 사구체에 있는 피브로넥틴의 양은 정량하여 사구체신염에서 매트릭스 침착을 차단하는 데코린의 능력을 평가한다.

A. 데코린의 정제

데코린의 발현.

데코린은 다음과 같이 데코린-발현 CHO 세포를 이용하여 생산된다. Krusius 와 Ruoslahti에서 상술한 것과 같은 1.8kb 전체 길이 데코린 cDNA는 데코린 발현 벡터의 작제에 이용될 수 있다. 데코린 코어 단백질의 발현을 위해 cDNA는 돌연변이시켜 세린을 코드하는 4번째 코돈 TCT를 트레오닌을 코드하는 ACT 또는 알라닌을 코드하는 GCT로 변이시킨다. 이는 Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985)) 의 방법에 따라 부위-특이적 돌연변이에 의해 제조될 수 있다. DNA 서열화 작업에 의해 적절한 돌연변이의 존재를 확인한다.

포유류 발현 벡터 pSV2-데코린과 pSV2-데코린/CP-thr4 핵단백질은 데코린 cDNA 또는 돌연변이된 데코린 cDNA을 pSV2의 3.4kb Hind III-Bam HI 단편에 연결시킴으로써 작제할 수 있다(Mulligan and Berg, Science 209:1423 (1980)).

디하이드로폴레이트 환원효소(dhfr)-네가티브 CHO 세포(CHO-DG44)는 인산 칼슘 침전방법에 의해 pSV2-데코린 또는 pSV2-데코린/CP와 pSV2dhfr과 함께 공동 형질감염될 수 있다. pSV2-데코린에 의해 형질감염된 CHO-DG44 세포는 ATCC에 기탁되어 있다(ATCC No CRL 10332). 형질감염된 세포는 9% 투석된 태아 송아지 혈청, 2mM 글루타민, 100units/ml 페니실린과 100㎍/ml 스트렙토마이신이 보충된 뉴클레오시드 마이너스 알파-수정된 최소 필수 배지(α-MEM)(GIBCO, Long Island)에서 배양시켰다. 형질감염된 세포에서 발생된 콜리니는 클로닝 실린더를 이용하여 찍어내고 계대하여 $^{35}SO_4$-라벨된 배양물 상층액에서 면역침전에 의해 데코린 발현에 대해 점검한다. 실제 데코린을 발현시키는 클론은 점차적으로 메토트렉세이트(MTX)의 농도를 최대 0.64μM(Kaufman and Sharp, J. Mo. Biol. 159:601 (1982))까지 유전자 증폭을 시킨다. 모든 증폭된 세포주는 제한 희석 또는 단일 MTX 저항성 콜로니를 선택함으로써 클론될 수 있다. 이와 같이 정립된 세포주의 원액 배양물은 MTX-함유 배지에 유지시킨다. 단백질 생산에 사용하기 전에, 세포는 원액 배양물로부터 MTX-마이너스 배지에 계대시키고 가능한 MTX 효과를 제거하기 위해 이와 같은 배지에 적어도 1회 계대한다.

또는 데코린의 대량 생산은 마이크로캐리어 비드에 부착된 CHO 세포를 이용하여 실행하였다. 데코린-발현 CHO 세포는 전술한 것과 같이 마이크로캐리어 비드에 부착시키고 현탁액에 배양시켰다. 데코린-발현 세포의 종균이 일단 만들어지면, 발효 반응 용기에 접종하고, 소요의 세포 밀도가 될 때까지 발효의 성장 상태를 지속한다. 이때, 새로운 배지를 반응 용기로 서서히 주입하고 조건화 배지는 매일 반응용기 용적의 약 80-85% 수준으로 수득한다. 데코린 생산 세포의 유실을 막기 위해 살수액으로부터 세포를 포함하는 마이크로캐리어를 분리하는데 주의한다. 수득 배지는 여과하기 전에 24시간동안 4℃에서 배양시켜 세포 찌꺼기가 가라앉게 한다.

데코린은 마이크로캐리어 배양물에서 생산된 CHO 세포 배양 배지 40L에서 정제하였다. 벤자아미딘과 Na_4EDTA 용액을 첨가하여 배지에서 최종 농도에 1X가 되도록 첨가한다(100X 용액은 100mM 벤자아미딘과 500mM Na_4EDTA이다). 배지는 Whatman #1 필터종이로 여과시키고 NaCl 농도는 0.4 NaCl로 조정한다.

데코린의 정제

에탄올을 제거하기 위해 10컬럼 용적의 탈이온 수가 있는 유리로 만든 디스크 글라스 펀넬에서 300ml 수지(Q-Sepharose fast flow gel; Pharmacia, Piscataway NJ)로 세척하여 Q-세파로즈 컬럼을 준비한다. Q-세파로즈는 기체를 제거하고 유동 어뎁터가 있는 10㎝×30㎝ 컬럼에 둔다(Watson/Marlow Peristaltic Pump with 9.6mm ID tubing). 기포 트랩과 펌프는 컬럼에 연결하여 두고 10컬럼 용적 완충액 A (25mM 트리스, pH 7.8, 0.4M NaCl)로 200ml/min 유속으로 균등화시킨다. 280nm에서 UV 흡수, 1.0AUFS(Absorbance units, full scale)를 결정하고 감지기는 완충액 A 를 이용하는 경우 0으로 조절한다.

세포 배양배지는 유속 200ml/min에서 컬럼에 넣고 이를 통과한 액을 모은다. 컬럼은 완충액 A(1L)로 세척한다. 컬럼은 완충액 B((1.5L) 25mM 트리스, pH 7.8, 1M NaCl)로 용출시키고 1분 부분을 모은다. 용출된 피크를 모아서, 용적을 기록하고(통상 1~1.5L) 280nm와 260nm에서 흡수도를 결정한다. 나중에 읽은 것은 Q-세파로즈 컬럼에서 공동 용출된 핵산을 감지하는데 이용된다(모아진 용적에 동일). 2M 구아니디움-HCl (GuHCl)을 첨가하고 샘플은 옥틸-세파로즈 컬럼에 얹는다.

옥틸-세파로즈 컬럼은 EtOH를 제거하기 위해 소결 유리 펀넬에서 10 컬럼 용적 탈이온수로 60ml 옥틸-세파로즈 겔(Pharmacia)을 세척하여 준비한다. 겔은 기체를 빼고 두 개 유동 어뎁터가 있는 2.6㎝×30㎝ 물 재킷이 있는 컬럼에 두고 그 위치에서 겔을 압축시키고 유지시킨다. 컬럼은 냉장 순환기에 의해 25℃로 유지시킨다. UV 모니터(280nm)를 연결하고 완충액 C ((10컬럼 용적 또는 600ml) 0.1 NaOAc, pH 6.3, 1M GuHCl; 0.2μM 아세테이트 여과물로 여과하고 기체를 뺀다)로 0을 맞춘다.

Q-세파로즈 컬럼에서 수득된 부분은 유속 3ml/min에서 옥틸-세파로즈 컬럼에 얹고 샘플은 2min/부분(6ml/튜브)에서 수득한다. 컬럼은 완충액 C 로 세척하고, 기저선을 만든 다음 완충액 D (0.1M NaOAc, pH 6.3, 2M GuHCl; 0.2μM 아세테이트 필터로 여과)을 이용하여 동일한 기저선을 만든다.

데코린은 3ml/min 유속에서 완충액 E ((200ml) 0.1M NaOAc, pH 6.3, 3M GuHCl)을 이용하여 용출한다. 용출 프로파일은 O.D. 280 흡수도의 대부분이 데코린에 의한 것이며 핵산에 의한 것이 아니라는 것을 보여주기 위해 280nm와 260nm에서 흡수도를 결정함으로써 부분에서 실행한다. 그 다음 컬럼은 확인 안된 200kDa 단백질과 일부 히스톤 단백질을 제거하기 위해 완충액 F ((150ml) 0.1M NaOAc, pH 6.3, 4M GuHCl, 0.2μM 아세테이트 필터에 의해 여과, 기체 제거)으로 용출한다. 컬럼은 완충액 G ((150ml) 0.1M NaOAc, pH 6.3, 8M GuHCl; 0.2μM 아세테이트 필터로 여과하고, 기체를 제거함)로 세척하여 숙주 세포 오염 단백질을 제거한다.

데코린을 포함하는 3M GuHCl 부분은 50mM $NaPO_4$, pH 7.4를 포함하는 용액으로 1:10으로 희석한다. Q-세파로즈 컬럼(Pharmacia)은 완충액, 50mM $NaPO_4$(pH 7.4), 0.4M NaCl 으로 균등화시키고 희석된 데코린 용액은 컬럼에 3ml/min 속도로 펌프한다(Minipuls 2 peristaltic pump with 1.52 ID PVC manifold tubing; Gilson; Middleton WI). 컬럼을 동일 완충액을 5배 컬럼 용적으로 세척하고 그 다음 데코린은 추가 완충액, 50mM $NaPO_4$(pH 7.4)/1.0M NaCl로 용출시킨다. 용출물은 농축하고/한외여과에 의해 여과시킨다(Amicon Inc., Beverly, MA).

데코린에 대한 검사

전술한 재조합과 정제 과정에 의해 생성된 사람 재조합 데코린은 직접적인 데코린 ELISA를 이용하여 감지하고 정량화한다. 이뮬론-2 편평한 바닥 플레이트는 데코린 표준 희석물과 미지 샘플로 코트한다.

희석은 보론실리케이트 튜브에서 0.1M HCO_3 ((500mls) 1.38g Na_2SO_3; 3.11g $NaHCO_3$; ddH_2O로 용적을 맞추고, pH는 9.6으로 점검하고; 용액은 여과, 멸균하고 4℃에서 저장한다), pH 9.6으로 이루어지고 각 세트는 희석 후에 바로 플레이트한다. 데코린 표준 세트 농도는 19ng/ml에서 시작하여 연속하여 1:1.5로 희석하여 1.7ng/ml로 농도를 낮춘다. 미지 데코린 농도를 가지는 샘플은 희석하여 정제된 데코린에 대한 표준 곡선 하에 있게 하고 희석 범위는 1×10^5 내지 16×10^5 이 된다. 사용된 용적은 100㎕/웰이다. 플레이트는 4℃ 12시간 동안 배양시키고 봉한다.

피복 용액을 한 번 뿌리고 웰당 200㎕ 1X PBS + 1% BSA((100mls) 90ml ddH_2O; 10ml 10X PBS((1L), 80g NaCl; 2g KCl; 6.1g Na_2HPO_4; 2g KH_2PO_4; ddH_2O로 용적을 맞춘다); 1g 소혈청 알부민; 용액은 검사일에 새로 만든다)를 첨가하고 0.5-1.0 시간동안 37℃에서 배양시킨다. 그 다음 웰은 1X PBS + 0.1% 트윈-20으로 3회 세척한다.

토끼 항-데코린 혈청 (1:1000의 항-PG40(WO 91/10727에서, La Jolla Cancer Research Foundation)을 100㎍/웰로 첨가하였다. 항체는 1X PBS + 0.1% BSA + 0.1% 트윈 20 ((100mls) 90ml ddH_2O; 10ml 10X PBS; 0.1g 소혈청 알부민; 0.1ml 트윈 20; 용액은 검사일날 다시 만든다)으로 희석하고 60분간 37℃에서 배양시킨다. 웰은 1X PBS + 0.1% 트윈 20(1L) 900ml ddH_2O; 100ml 10X PBS; 1ml 트윈-20; 용액은 검사일에 새로 만든다)로 3회 세척한다.

1X PBS + 0.1% BSA + 0.1% 트윈-20으로 1:3000으로 희석된 쥐 αRb-말 양고추 냉이 과산화효소 100㎍/웰을 첨가하고 60분간 37℃에서 배양하였다. 그다음 웰은 1X PBS + 0.1% 트윈-20으로 5회 세척한다. 새로 만든 O-페닐렌디아민 디하이드로 클로라이드(OPD) 용액 200㎕/웰 (25mls 0.1M 시트레이트 인산 완충액 ((500mls) 5g 시트르산; 7g Na_2PO_4 (무수); 용적은 ddH_2O 로 맞추고 pH는 5.0에서 점검하고; 여과하고, 멸균하고 4℃에서 저장한다); 10mg OPD 정제(Sigma); 6㎕ 30% H_2O_2)를 첨가하고 15분간 암실 실온에서 배양시킨다. 웰당 7.8 H_2SO_4 (55mls 36M H_2SO_4; 200mls 증류수) 50㎕를 첨가하여 반응을 종료시킨다. 데이타는 OD 490에서 읽고 데이타의 선형 픽트를 이용하여 분석한다. 곡선의 최대점은 검사가 상부 밖(top out)에서 시작한 경우 제거한다.

재조합과 정제 과정에 의해 준비된 데코린 샘플의 세 개 부분에는 데코린 0.82mg/ml, 1.23mg/ml 그리고 1.43mg/ml을 포함한다.

B. TGF-β 특이적 저해 물질의 활성을 결정하는 결합 검사

HepG2 세포에 ^{125}I-TGF-β 결합

약 2.5×10^4 HepG2 세포 (ATCC #HB8025)는 실온에서 2시간동안 재조합 사람 데코린(DC-12) 또는 PT-71 (말토즈 결합 단백질) 존재하에 250pM ^{125}I-TGF-β와 함께 배양한다. 세포는 분당 결합수(cpm)를 결정하기 전에 4회 세척 완충액(128mM NaCl, 5mM KCl, 5mM Mg_2SO_4, 1.2mM $CaCl_2$, 50mM HEPES, pH 7.5)으로 세척한다.

표 1 에서는 HepG2 세포에 TGF-β 결합을 저해하는 데코린(DC-12)에 대한 데이타를 제공한다. 변화 %는 배지의 cpm(네가티브 컨트롤)과 비교할 때 테스트 샘플의 평균 cpm과의 차이를 나타낸다. α-TGF-β항체는 TGF-β 수용체를 가지는 세포에 라벨된 TGF-β의 결합을 저해하여 포지티브 컨트롤로써 작용한다.

고정된 데코린에 ^{125}I-TGF-β 결합

96-웰 Linbro 미량적정 플레이트에는 50㎕/웰에서 0.5㎍/ml 재조합 데코린으로 피복한다. 플레이트는 37℃ 배양기에서 12시간 둔 다음 웰당 200㎕ PBS(0.15M NaCl)로 3회 세척하여 결합 안된 데코린을 제거한다.

[표 1a]

HEPG2 세포에 ^{125}I-TGF-β 결합

처리	농도	결합된 CPM	평균	변화 %
배지*	---	13,899**		
		13,898		
		12,529		
		11,764		
		12,694		
		12,448	12,872 ± 856	---
TGF-β1	2.5×10E-8M	3,092		
		2,543		
		2,800	2,812 ± 275	-78
Anti-TGF-β1 (RD)	2.5×10E-7M	6,191		
		4,848		
		3,839	4,959 ± 1,180	-61

[표 1b]

Decorin (DC-12)	2.5×10E-6M	2,745		
		2,844		
		1,945	2,511 ± 493	-80
	2.5×10E-7M	4,258		
		5,914		
		4,052	4,741 ± 1,021	-63
	2.5×10E-8M	13,596		
		12,798		
		11,599	12,664 ± 1,005	-2
PT-71	2.5×10E-6M	11,859		
		13,129		
		12,348	12,449 ± 636	-3
	2.5×10E-7M	11,259		
		11,022		
		9,343	10,541 ± 1,045	-18
	2.5×10E-8M	10,886		
		10,778		
		10,104	10,589 ± 424	-18

[표 1c]

* 부합류 배양물로부터 수득한 25,000 HepG2 세포는 250pM ^{125}I-TGF-β1과 TGF-β, 항 TGF-β, 데코린 또는 데코린 단편으로 실온에서 2시간동안 배양하였다.

** 결합 안된 ^{125}I-TGF-β1은 세포를 4x 세척함으로써 결합된 것으로부터 분리할 수 있다.

^{125}I라벨된 TGF-β(400pM, New England Nuclear, Bolton-Hunter Labeled)은 실온에서 1시간 45분간 200㎕ PBS/0.05% 트윈-20에서 경쟁물질 유무에 관계없이 선배양하였다. 경쟁물질에는 재조합 사람 데코린 DC-12와 데코린 단편, 네가티브 콘트롤로써 PT-71을 포함한다.

선배양된 TGF-β 혼합물 50㎕/웰 또는 컨트롤을 첨가하고 0℃에서 12시간 배양시켰다. 배양 후에 자유 TGF-β 상층액 50㎕을 라벨된 튜브에 옮긴다. 플레이트는 PBS에서 0.05% 트윈-20(200㎕/웰)으로 3회 세척한다. 환원된 샘플 완충액(2X Laemmli 샘플 완충액)을 100㎕/웰에 추가하고 30분간 37℃에서 배양시

켰다. 가겹게 용액에 펄스를 걸고, 결합된 ^{125}I-TGF-β 100㎕를 각 웰로부터 제거하고 감마 카운터에서 헤아리기 위해 튜브로 옮긴다. 50㎕ 자유 TGF-β샘플은 결합된 것과 자유로운 것에 대한 비율을 구하기 위해 100㎕ 결합된 TGF-β 샘플에 대해 나란히 헤아린다. 표 1 에 나타낸 결과에서 TGF-β1, 항-TGF-β1 또는 데코린은 HepG2 세포에서 이의 수용체에 방사능라벨된 TGF-β의 결합을 저해하는 것을 볼 수 있다.

C. 조직 착색

Binding Site, Inc. (San Diego, CA)에서 형광 이소티오시아네이트-결합된 양 항-사람 피브로넥틴을 구입하였다. 피브로넥틴에 대한 면역형광 착색은 각 동물에서 준비된 코드 부분에서 무작위로 선택된 20개 사구체에서 0 내지 4단계(0=착색 없음, 4=최대 강한 착색)를 이용하여 조직의 기원에 대한 사전 정보없이 기록한다. 집단사이에 차이는 Okuda et al., (*supra*)에서 상술한 테스트에 의해 분석할 수 있다.

사구체는 EDA+ 피브로넥틴과 테나신을 감지하는 항체로 착색하고; 이들 매트릭스 성분은 TGF-β에 의해 상대적으로 특이하게 유도된다. 엑스트라 도메인 A(EDA+)을 포함하는 사람 피브로넥틴에 대해서 준비된 쥐 단클론 항체는 Dr. L. Zardi, Instituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Italy의 방법에 따라 만들 수 있다. 토끼 항-사람 테나신은 Telios Pharmaceuticals, Inc. (La Jolla, CA)에서 구하였다. 제2 항체로써 형광 이소티오시아네이트-공액된 쥐 F(ab^{1})$_2$ 항-쥐 IgG 와 원숭이 F(ab^{1})2 항-토끼 IgG가 이용되었다(Jackson Immunoresearch Lab, West Grove, PA). EDA+ 피브로넥틴과 테나신 착색에 대한 통계적 분석 방법과 매트릭스 기록 기술은 전술한 피브로넥틴의 경우와 동일하다.

D. 데코린으로 사구체신염이 있는 쥐의 치료

사구체신염은 Okuda, et al., (*supra*)에서 상술한 것과 같이 항-흉선세포 혈청의 정맥 주사에 의해 Spraque-Dawley 쥐(나이; 4~6주)에서 유도하였다. 정상적인 컨트롤로써 나이가 맞는 쥐를 이용하였다. PBS 0.5ml 에 재조합 사람 데코린 또는 소 데코린 0.45mg의 1회 정맥 주사로 1시간 뒤 처리를 개시하고 컨트롤로는 0.5ml PBS만을 이용한다(쥐는 주사를 놓기 위해 묶어두나 마취는 시키지 않는다). 데코린 또는 PBS의 1회 매일 주사를 하여 처리는 다음과 같이 계속한다: 데코린은 2일간 집단 1 에 투여하고, 집단 2 에는 4일간, 집단 3 에는 6일간 투여한다. 집단 4 에서 6일간 PBS만을 주사한다. 집단 1 과 2 에서 데코린 처리를 지속하지 않는 경우에, PBS로 대체하여 모든 동물이 6일간 매일 주사를 맞도록 한다. 모든 처치는 7일째에 종료하고 24h 뇨를 수거하고 동물을 죽인 후에 신장을 제거한다.

전술한 과정에 따라 다음과 같이 컨트롤 물질을 테스트하기 위해 실험을 실행하였다: 8마리 쥐에 항흉선세포 혈청을 주사하고; 각 2마리씩 1 군으로 하는 군을 나누고; PBS 단독 또는 어그레칸, 오브알부민, 소혈청 알부민을 포함하는 PBS 0.5ml 로 6일간 매일 주사한다. 어그레칸과 데코린의 탄수화물 함량을 결정하고, PBS에서 어그레칸은 데코린과 동일한 탄수화물 농도에서 주사한다. 추가 4마리 쥐에는 항흉선세포 혈청 대신에 PBS를 1회 주사하여 보통 컨트롤로 이용한다. 모든 동물은 전술한 것과 같이 소변을 받아둔후 죽이고 뇨 단백질과 크리아티닌은 Okuda et al에서 상술한 것과 같이 측정한다.

모든 기술에서 신장은 냉각 PBS로 관류시키고 절단해낸다. 신장 조직은 Okuda에서 상술한 것과 같이 광현미경과 면역 현광현미경 관찰을 위해 준비한다.

결과에 따르면 4일 또는 6일간 매일 재조합 데코린 또는 소의 데코린을 주사한 경우에 정상 쥐에서 볼 수 있는 것과는 별반 차이가 없는 수준으로 피브로넥틴 침착을 억제한다는 것을 볼 수 있다. 컨트롤 주사는 완충액 단독, 상이한 프로테오글리칸과 두 개 단백질로 구성된다. 카트릿지 프로테오글리칸, 아그레칸은 데코린의 글리코사미노글리칸에 대해 컨트롤하기 위한 음전하 분자로 이용되고; 아그레칸은 Yamaguchi et al., *supra*, 1990에서 상술한 것과 같이 TGF-β를 저해하지 않는다. 오브알부민을 두 개 단백질이 거의 동일한 분자 크기를 가지기 때문에 데코린의 핵 단백질에 대해 컨트롤로 작용한다. 혈청 알부민은 무관한 단백질 컨트롤로 이용된다. 프로테오글리칸과 단백질 컨트롤은 완충액만 단독으로 주사된 사구체신염이 있는 쥐에서는 구별할 수 없다. 질병진행에서 초기에 2회 데코린의 제공으로 피브로넥틴 축적에 영향을 끼치지는 못했다.

EDA+ 피브로넥틴과 테나신은 정상적인 쥐에서 잔류양으로만 감지할 수 있다. 그러나, 전체 피브로넥틴의 경우와 마찬가지로, 4회 또는 6회 데코린 주사는 TGF-β 활성에 의한 이들 두 개 표식의 침착을 상당히 감소시켜 준다. 동일 신장의 주기적인 산-Schiff의 조직학적 착색부분의 분석에서 사구체 세포외 매트릭스에서 증가를 예방하고 질병이 발생되는 관련 사구체 확대를 예방하는데 데코린의 필적할만한 효과를 보여준다.

4일 또는 6일 동안 제공된 데코린 또한 단백뇨의 발생을 억제시킨다. 크레아티닌의 뇨농도에 대한 뇨단백농도는 단백뇨를 측정하는데 사용되는데 그 이유는 이와 같은 방법이 Ginsberg et al., *supra*.에서 상술하는 것과 같이 단백질 분비치에 대한 노의 양의 차이에 영향을 최소화시켜주기 때문이다. 정상, 질병 컨트롤, 낮은 약량 데코린(2회 주사) 그리고 높은 약량 데코린 처리된 쥐(4회와 6회 주사)에 대한 평균값은 각각 0.7, 15.2, 14.8 그리고 2.4(질병 컨트롤과 비교하였을 때 다량 데코린에 대해 p0.01)이다.

이와 같은 결과에서 신장염이 있는 쥐에서 손상된 사구체에 세포외 매트릭스의 침착을 저해하는데 있어 정맥내 데코린 투여에 대한 극적인 효과를 나타낸다. 이미 언급한 것과 같이, 사구체신염에서 세포외 매트릭스의 축적은 TGF-β(Okuda et al., *supra*, Border et al., *supra*, 1990)의 과다생산에 의한 것임을 나타내었다. 이와 같은 모델에서 매트릭스 축적은 데코린의 주사에 의해 예방되는데 이는 TGF-β를 억제하는데 있어 데코린의 생체 내 활성을 설명하고 있다.

실시예 2

배양된 근세포에서 데코린의 발현

본 실시예는 생체 내 근육세포에서 데코린의 발현을 평가하는 방법을 제공한다.

쥐 데코린 발현 벡터, pAct-Dec 는 벡터 pGEM4-RNDCN(Aundi and Dreher et al. Eur. J. Cell. Biol. 59:314-321 (1992) and Dreher et al. Eur. J. Cell. Biol. 53:296-304 (1990))로부터 쥐 데코린 cDNA의 완전한 부분을 포함하는 EcoRI 단편을 발현 벡터 pAct-CAGGS내로 (Niwa et al. Gene 108:193-199 (1991)) 클로닝시킴으로써 작제된다. 데코린 cDNA가 클로람페니콜 아세틸-전이효소(CAT)를 인코드하는 박테리아 유전자로 대체된 것만을 제외하고는 pAct-Dec와 동일한 벡터인 발현벡터 pAct-CAT를 전술한 것과 같이 작제하였다(Kaneda et al. Science 243:375-378 (1989) and Isaka et al. J. Clin. Invest. 92:2597-2601 (1993)).

C2Cl2 배양된 쥐근세포(American Type Cell Culture Collection, Rockville MD)를 6개 웰 배양 플레이트에서 웰당 1×10^{6} 세포로 접종하고 10% 태아 송아지 혈청(배양 배지)을 포함하는 듈베코 최소 필수 배지에서 준합류(합류의 70-80% 수준)수준으로 생장시킨다. 세포는 pAct-Dec 또는 일본 헤마토글루티닌 바이러스(HVJ)-리포좀 방법에 의해 pAct-CAT(Kato et al. J. Biol. Chem. 266:3361-3364, (1991))에 의해 형질감염시키거나 또는 전술한 것과 같이 (Takeshita et al. J. Clin. Invest. 93:652-652 (1993)) Lipofectamine™으로 리포펙틴(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)에 의해 형질감염시킨다.

HVJ는 막융합을 촉진시키는 센다이 바이러스이다. HVJ의 기능을 이용하는 방법은 수용세포와 리포좀 융합을 촉진시키는데 사용된다. HVJ-리포좀은 테트라하이드로퓨란과 0.01m K_2PO_4, pH 6.8 (9:1, v/v)에서 순수한 소 뇌 포스파티딜세린(나트륨염; Avanti Polar Lipids Inc)을 크로마토그래피에 의해 용해시킴으로써 생성된다. 포스파티딜콜린과 콜레스테롤(Sigma, St. Louis MO)은 모두 테트라하이드로 퓨란에 용해시킨다. 포스파티딜세린, 포스파티딜콜린과 콜레스테롤은 1:4.8:2의 중량비로 혼합한다. 지질 혼합물(10mg)은 회전 기화기에서 유기 용매를 제거함으로써 플라스크의 측면에 침착되고 잔류는 질소 기체하에 -20℃에 저장한다.

HVJ (Z 균주)는 수정관의 융모 요막에서 증식된다(Nakanishi et al., Exp. Cell Res. 159:399-409 (1991)). HVJ는 27,000×g 에서 40분간 원심분리에 의해 수득하고 BSS(-)로 현탁한다. HVJ 현탁액은 BSS(-)에서 60, 40 그리고 30%당(1:1:8, v/v)으로 구성된 불연속 농도에 깐다. 농도는 4℃에서 4시간동안 60,000×g 에서 원심분리하고 HVJ는 4℃에서 저장한다.

HVJ는 사용하기 바로 3분전에 UV 방사 11 $J.m^{-2}\cdot S^{-1}$에 의해 비활성화시킨다. HVJ의 헤마글루티닌 활성은 전술한 것과 같이 결정하였다(Salk et al., J. Immunol. 69:87-97 (1944)). HVJ 현탁액 1 A_{540} 에는 1mg/ml 단백질을 포함하고 이는 15,000 헤마글루티닌 단위(HAU)/ml와 등가이다.

리포좀 현탁액 (0.5ml, 지질 10mg을 포함)을 4ml BSS(-)에 HVJ(64,000 HAU)와 혼합한다. 혼합물을 4℃에서 30분간 배양하고 그 다음 약간의 교반과 함께 2시간동안 37℃에서 배양한다. 다핵세포 형성을 막기 위해 자유 HVJ는 슈크로즈 밀도차 원심분리에 의해 HVJ-리포좀에서 제거한다. 현탁액은 불연속 슈크로즈 농도차(60% 슈크로즈 1ml, 40% 슈크로즈 1ml, 30% 슈크로즈 8ml/BSS(-))에 얹고 4℃, 60,000×g에서 정확히 3.5시간 동안 스윙-부켓 로터에서 원심분리시킨다. 각 원심분리 튜브 상부에서 4ml을 모은다.

형질감염 7일째에, 세포는 균형된 염용액(BSS(-): 140mM NaCl, 5.4mM KCl, 10mM 트리스-HCl, pH 7.6)으로 3회 세척하고 5분간 4℃에서 1ml HVJ-리포좀 용액(기질 2.5mg과 10㎍ 포획된 DNA)로 배양시킨 다음 30분간 37℃에서 배양시킨다. 세포는 BSS(-)로 세척하고 새로운 배양 배지를 공급하고 추가 37℃에서 배양시킨다.

리포펙틴의 경우에, 500㎕ Optimen™ 무혈청 배지(BRL Life Technologies, Gaithersburg MD)에 용해된 50㎍ 플라스미드 DNA는 미리 250㎕ 물에 용해시킨 Lipofectamine™(BRL Life Technologies) 250㎕에 추가시킨다. 혼합물은 실온에서 30분간 배양시키고 2ml 무혈청배지에 근세포를 포함하는 세포배양웰에 점진적으로 첨가시킨다. 세포는 DNA를 취할 수 있도록 37℃에서 2시간동안 배양시켰다. 배양후에 배지를 제거하고 세포는 BSS(-)에 세척시키고 새로운 배양 배지를 첨가하고 세포는 37℃에서 추가 배양시킨다.

HVJ와 리포펙틴 방법에서 배양배지는 형질감염후에 대체시키고 그다음 주당 2회씩 대체한다. 세포는 웰에서 제거하고 주간단위로 두 개의 새로운 웰에 세포를 분포시켜 계대한다.

형질감염된 세포는 형질감염후 3, 7 그리고 14일에 생합성으로 라벨시킨다. 세포는 멸균 인산완충염(PBS: 0.14M NaCl, 2mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 1.8mM KH_2PO_4, pH 7.4)로 3회 세척하고 메티오닌, 시스테인, 글루타민 및 태아 송아지 혈청이 없는 배양배지를 첨가한다. 세포는 37℃에서 2시간동안 배양시킨다. 배지를 세포에서 빼내고 100μCi/ml ^{35}S-설페이트(New England Nuclear, Boston MA)를 포함하는 새로운 배양 배지로 대체시키고 세포는 37℃에서 18시간 배양시키고 배양배지를 제거한다.

방사능 라벨된 프로테오글리칸을 포함하는 배양배지는 전술한 것과 같이 비-환원조건하에서 4-12% 아크릴아미드 겔에서 SDS-PAGE 에 의해 분석하였다(Okuda et al. J. Clin. Invest. 86:453-462 (1992)). SDS-PAGE 후에, 겔을 건조시키고 표준방법을 사용하여 X-선 필름에 노출시킨다(Harlow and Lane, *supra*, 1988). 농도계(LKB instruments Bromma, Sweden)를 이용하면 형질감염된 세포에 의한 데코린 생산의 상대적인 측정치를 수득하기 위해 자가방사 노출을 스캔한다.

HVJ-리포좀 방법에 의한 pAct-Dec로 형질감염된 근세포는 Lipofectamine™과 연관된 pAct-Dec로 형질감염된 근세포와 비교하면 배양배지(120KD 표식 참조)에 9배이상 데코린을 분비하였다. 또한, HVJ-리포좀에서 pAct-CAT로 형질감염된후 데코린 발현은 pAct-Dec와 Lipofectamine™을 이용하여 발현된 데코린 수준과 유사한 양이 된다(도 1). 결과를 보면 Lipofectamine™에 의한 리포펙틴보다는 HVJ-리포좀 방법으로 실행하였을 때 pAct-Dec의 형질감염이 더욱 효과가 있음을 알 수 있다(도 1).

실시예 3

골 근육에 형질감염에 의한 생체 내 데코린의 발현

본 실시예는 데코린 발현 벡터의 근육 내 주사 후에 생체에서 데코린 발현 효과를 평가하는 방법을 제공한다.

생체 내 형질감염에서, 8ml BSS(-)를 2ml HVJ-리포좀 용액(5mg 지질과 2㎍ 포획된 DNA)에 추가하고 용액은 10분간 15,000rpm에서 원심분리한다. 펠렛화된 리포좀은 1mM $CaCl_2$를 포함하는 0.4ml BSS(-)로 재현탁시켜 농축시켰다. 플라스미드 DNA를 포함하는 농축된 HVJ 리포좀 약 0.2ml을 메톡시플로란으로 마취시킨 150g 수컷 Sprague-Dawley 쥐의 둔부 근육의 4곳에 27 가우지 바늘을 통하여 주사한다. 각 근육에는 0.1ml씩 2회 주사를 한다. 주사후 3, 5, 7, 10, 14일째에 쥐를 죽이고 신장, 간, 폐 조직을 떼어낸다. 조직은 냉각 이소펜탄에 신속히 얼리고 항냉기를 이용하여 5 미크론으로 절단한다. 조직부분은 10분간 아세톤에 고정시키고 사람 데코린을 감지하기 위해 주요 토끼 항체를 첨가한다(Mann et al. J. Biol. Chem. 265:5317-5323 (1990)). 주요 토끼 항체의 결합은 토끼 IgG에 특이적인 플로레신 이소티오시아네이트 당나귀 항체로 착색하여 감지한다(Jackson Labs, West Grove PA).

pAct-Dec 처리된 쥐에서는 평가된 모든 시간대에서 pAct-CAT 기준 벡터로 처리된 쥐와 비교할 때 신장, 간, 폐에서 데코린 착색이 증가되었다(주사후 5일째인 도 2 참조). pAct-Dec 처리된 동물에서는 면역활성 데코린의 발현은 정제된 데코린이 정맥내로 투여하였을 때 수득된 결과와 전반적으로 유사하다(Border et al. *supra*, 1992). 결과에서 골 근육에 데코린 발현 벡터를 주입하면 데코린이 발현되어 혈류로 들어가서 신장, 폐, 간과 같은 기관에 근접하게 된다. 데코린 형질감염된 쥐의 혈액에서 발현된 데코린 수준은 데코린 ELISA에 의해 감지된 것보다는 낮은데 이는 데코린이 혈류로 들어가서 다양한 조직에 축적되기 위해서 높은 혈정 농도를 요구하지는 않는다는 것이다.

실시예 4

실험 동물 모델에서 신장염발생에 대한 생체 내 데코린 유전자 전달 효과

본 실시에는 TGF-β-유도에 의해 비정상적으로 세포외 매트릭스 성분이 축적되는 것과 관련된 섬유증이 있는 동물모델에서 병인발생에 대한 데코린 발현 벡터의 투여효과를 평가하는 방법을 제공한다.

A. TGF-β mRNA와 단백질 발현에 대한 효과

각 4마리 쥐가 1군을 이루는 2군을 실시예 3 에서 상술하는 것과 같이 pAct-Dec 또는 pAct-CAT로 정맥투여하여 형질감염시킨다. 다음날, 쥐에 전술한 것과 같이 신장염을 발생시키기 위해 양-항-쥐 흉선세포 혈청 0.25ml 로 정맥투여한다(Okuda et al., *supra*, and Application WO 91/04748). 질병 유도후 6일째에 쥐를 마취시키고 신장은 살수하고 떼어내어 사구체를 분리하고 각 집단에서 그를 모은다. tRNA를 사구체로부터 취하고 노든 블랏팅을 전술한 것과 같이 실행한다(Okuda et al. *supra*, and Yamamoto et al. Kidney Int. 45:916-927 (1994)). TGF-β1에 대한 프로브는 쥐 TGF-β1 cDNA 로부터 280bp Pvu II 단편을 Hinc II 절단된 pBluescript SKII+(Strategene, San Diego CA)에 서브클로닝하여 만든다(Derynck et al., J. Biol. Chem. 261:4377-4379 (1986). 쥐 GAPDH cDNA는 전술한 것과 같이 수득할 수 있다(Fort et al., Nucl. Acid Res. 13:1431-1443 91985)). 레이져 밀도계(LKB)로 표준 밀도스케닝에 의해 2.5kb와 1.3kb에 각 자가방사된 데코린 mRNA와 GAPDH mRNA의 밀도를 결정한다. GAPDH 밴드 밀도는 전술한 것과 같이 RNA 로딩에 대한 컨트롤로 이용한다(Yamamoto et al., *supra*).

실시예 3 에서 상술한 것과 같이 질병유도후 6일째에 취한 쥐 신장 냉동부분을 면역형광 마이크로스코피를 실행하였다. TGF-β 면역활성 세포는 사람 TGF-β1에 대한 토끼 다클론 항체로 착색함으로써 확인할 수 있다(King Brewing Co., Ltd, Kakagawa, Japan). 플로레신 이소티오시아네이트-공액된 당나귀 $F(ab^{1})^{2}$ 항-토끼 IgG는 제 2 항체를 이용하였다(Jackson Immunoresearch Labs). 사구체 TGF-β1 포지티브 세포는 전술한 것과 같이 무작위로 선택된 30개 사구체를 헤아려 계산한다(Okuda et al. *supra*, and Yamamoto et al. *supra*).

질병유도후 6일째에 pAct-Dec 형질감염된 쥐에서 사구체 TGF-β1 mRNA는 pAct-CAT 컨트롤 벡터로 형질감염된 질병 유도된 동물의 사구체에서 이의 37%가 억제되었다(도 3A). 사구체 TGF-β1 포지티브 세포는 pAct-CAT 컨트롤 벡터의 것과 비교할 때 pAct-Dec 형질감염된 신장염 쥐에서 상당히 감소되었다(2.5±1.6 vows. 7.0±2.7; Decorin vows. CAT, p0.01; 도 3B).

B. 세포외 매트릭스 성분의 축적과 신장 기능에 효과

전술한 것과 같이 pAct-Dec와 pAct-CAT로 생체 내 쥐 골 근육의 형질감염과 질병유도에 대해 상술하였다. 각 조건에서 4마리 쥐를 질병유도후 6일 또는 14일에 희생시킨다. 본 질병 모델에서 TGF-β1 mRNA 발현이 6일째 절정을 이루고 매트릭스 성분 축적은 컨트롤 수준으로 복귀되기전 14일째 절정을 이루기 때문에 이와 같은 시간대가 선택되었다. 6일째에는 질병을 유도하지 않고 PBS의 1회 주사만을 제공받은 컨트롤 집단도 포함한다.

포르말린 고정되고 냉동 신장 조직 부분은 전술한 것과 같이 면역활성 콜라겐 타입 I과 II의 주기적인 산-Schiff 착색과 확인처리를 거치게 된다(Okuda et al. *supra*, and Yamamoto et al. *supra*). 전술한 것과 같이 조직부분은 아세톤에 고정시키고 콜라겐 타입 I과 III, 피브로넥틴 EDA+와 테나신의 존재하에 착색한다. 쥐 콜라겐 타입 I과 III에 특이적인 1차 다클론성 토끼 항체(신장은 Dr. A. Ohshima, Wakayama Medical College에 의해 제공됨)는 전술한 것과 같이 만든다(Takahara et al., Lab. Invest. 59:509 (1988)). 테나신에 대한 다클론성 토끼 항체는 상업적으로 수득하거나(Gibco/BRL), 피브로넥틴 EDA+(Accurate Chemical Scientific Corp., Westbury NY)에 특이적인 쥐 단클론 항체는 전술한 것과 같이 만들 수 있다(Balza et al., FEBS Letters 228:42-44 (1988)). 2차 항체는 쥐와 토끼에 대해 형광라벨된 쥐 $F(ab^{1})^{2}$ 항-쥐 IgG(Jackson Immunoresearch Labs.)이다.

총 세포외 매트릭스 프로테오글리칸과 개별 세포외 매트릭스 성분에 대한 PAS 착색은 전술한 것과 같이 (Yamamoto et al., *supra* 1994) 0 내지 4단계로 샘플당 30개 무작위 사구체를 헤아려 평가한다.

질병 유도후 6일째에 데코린 형질감염된 신장 조직부분의 PAS 착색에서 CAT 형질감염된 쥐의 것과 비교할 때 총 세포외 매트릭스 프로테오글리칸의 축적이 감소된 것을 나타내었다(도 4A 와 4B). 개별 세포외 매트릭스 포지티브 세포와 PAS 포지티브 세포의 정량화에서는 컨트롤 CAT 형질감염된 쥐에 대해 질병유도후에 양쪽 시간대에서 EDA+ 피브로넥틴, 테나신과 콜라겐 I과 III에 대한 세포외 매트릭스의 축적이 상당히 감소되었다(p0.01; decorin vows. CAT transfected; 도 4, collagen III data not shown). 데코린 형질감염된 쥐에서 질병유도후 14일째에 감지가능한 PAS, EDA+ 피브로넥틴, 테나신 포지티브 세포기록은 정상적인 PBS 주사된 쥐와는 큰 차이가 없었으나 CAT 형질감염된 동물에서 침착은 상당히 상승된 상태로 유지되었다(p0.01). 이와 같은 결과에서 실제 급성 신장염을 발생시키는 쥐의 골근육에 데코린 발현 벡터의 투여는 신장의 섬유증을 유도하게 되는 세포외 매트릭스 성분의 축적을 감소시킨다.

사구체신염이 임상적으로 상당히 심각하다는 것을 나타내는 단백뇨는 6일째(mg/day, mean±SD; decorin vows. CAT) (17.3±5.5 vows. 118±52.4, p0.01)와 14일째(21.9±7.7 vows. 89.5±19.6, p0.01) 상당히 감소되었다. 1~3일에 이와 같은 모델에서 발생된 단백뇨는 사구체 맥관막 세포의 일부 용혈이 일어나는 항-흉선 세포 혈청 주사 때문이다. 초기 단백뇨는 질병유도 24시간전(83.1±27.6 vows. 102.2±23.1. N.S.) 또는 24시간후(데이타를 나타내지 않음) 데코린 형질감염이 증가되지 않았다. 이와 같은 결과에서는 형질감염이 사구체에 면역학적 손상을 주지 않으나 TGF-β1 과다생산에 의해 유도된 세포외 매트릭스의 유해한 축적을 예방하는 것을 알 수 있다.

본 발명은 전술한 구체예를 참고로 하여 상술하였으나 본 발명의 범위에 벗어나지 않고 다양한 수정이 가능하다. 따라서 본 발명은 다음의 청구범위에만 한정시킨다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

TGF-β 특이적 저해 물질 또는 이의 활성단편을 인코드하는 핵산의 용도에 있어서, 개체의 조직에서 TGF-β에 의해 유도된 세포외 매트릭스의 치료를 위한 제약학적 조성물을 만드는데 사용되며, 개체내로 핵산을 포함하는 물질을 투여하면 개체내에서 세포에 의해 활성물질 또는 이의 단편이 발현되고 조직에서 세포외 매트릭스의 축적을 억제하는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 2

제 1 항에 있어서, TGF-β-특이적 저해물질은 데코린, 비글리칸, 피브로모듈린, 루미칸, 베타글리칸과 엔도글린에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 3

제 1 항에 있어서, TGF-β 특이적 저해물질은 TGF-β에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 세포는 골 근육 세포, 신장 세포, 폐세포, 간세포와 피부세포에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 질병은 사구체신염, ARDS, 간경변증, 섬유성암, 폐섬유증, 심근경색, 심장섬유증, 맥관형성술후 재협착증, 신장-장 섬유증, 반흔과 당뇨병-연관된 병인에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 조직은 신장, 간, 폐와 피부에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 7

데코린 또는 이의 활성단편을 인코드하는 핵산의 용도에 있어서, 개체에서 사구체신염의 치료를 위한 제약학적 조성물을 만드는데 사용되며, 개체내로 핵산을 포함하는 물질을 투여하면 개체 신장에서 세포에 의해 데코린 또는 이의 단편이 발현되고 사구체신염을 억제하는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 8

데코린 또는 이의 단편을 발현시킬 수 있는 세포의 용도에 있어서 사구체신염을 치료하는 제약학적 조성물을 만드는데 이용되고, 이때 데코린 또는 이의 활성단편을 발현시킬 수 있는 세포를 수득하기 위해 생체외에서 데코린 또는 이의 활성단편을 인코드하는 핵산을 세포내에 도입시키고, 이 세포를 개체에 도입시켜 발현시켜 신장에서 데코린 또는 이의 활성단편을 축적시켜 사구체신염을 억제하는 것을 특징으로 하는 세포의 용도.

청구항 9

TGF-β 특이적 저해 물질 또는 이의 활성단편을 인코드하는 핵산의 용도에 있어서, 개체의 조직에서 TGF-β에 의해 유도된 세포 성장의 치료를 위한 제약학적 조성물을 만드는데 사용되며, 개체내로 핵산을 포함하는 물질을 투여하면 개체내에서 세포에 의해 활성물질 또는 이의 단편이 발현되고 조직에서 비정상적인 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 10

제 9 항에 있어서, TGF-β-특이적 저해물질은 데코린, 비글리칸, 피브로모듈린, 루미칸, 베타글리칸과

엔도글린에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 11

제 9 항에 있어서, TGF-β 특이적 저해물질은 TGF-β에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 12

제 9 항에 있어서, 세포는 골 근육 세포, 신장 세포, 폐세포, 간세포와 피부세포에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 13

제 9 항에 있어서, 조직은 신장, 간, 폐와 피부에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 14

TGF-β-특이적 저해물질 또는 이의 단편을 발현시킬 수 있는 세포의 용도에 있어서 개체 조직에서 세포외 매트릭스의 TGF-β 유도성 축적을 치료하는 제약학적 조성물을 만드는데 이용되고, 이때 활성물질 또는 이의 활성단편을 발현시킬 수 있는 세포를 수득하기 위해 생체외에서 데코린 또는 이의 활성단편을 인코드하는 핵산을 세포내에 도입시키고, 이 세포를 포함하는 제약학적 조성물을 개체에 도입시켜 발현시켜 조직에서 세포외 매트릭스 축적을 억제하는 것을 특징으로 하는 세포의 용도.

청구항 15

제 14 항에 있어서, TGF-β-특이적 저해물질은 데코린, 비글리칸, 피브로모듈린, 루미칸, 베타글리칸과 엔도글린에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 16

제 14 항에 있어서, TGF-β 특이적 저해물질은 TGF-β에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 17

제 14 항에 있어서, 세포는 골 근육 세포, 신장 세포, 폐세포, 간세포와 피부세포에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 18

제 14 항에 있어서, 질병은 사구체신염, ARDS, 간경변증, 섬유성암, 폐섬유증, 심근경색, 심장섬유증, 맥관형성술후 재협착증, 신장-장 섬유증, 반흔과 당뇨병-연관된 병인에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 19

제 14 항에 있어서, 조직은 신장, 간, 폐와 피부에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 20

TGF-β-특이적 저해물질 또는 이의 단편을 발현시킬 수 있는 세포의 용도에 있어서 개체의 조직에서 TGF-β-유도된 유해성 성장을 치료하는 제약학적 조성물을 만드는데 이용되고, 이때 활성물질 또는 이의 활성단편을 발현시킬 수 있는 세포를 수득하기 위해 생체외에서 활성물질 또는 이의 활성단편을 인코드하는 핵산을 세포내에 도입시키고, 이 세포를 포함하는 제약학적 물질을 개체에 도입시켜 발현시켜 조직의 유해한 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 세포의 용도.

청구항 21

제 20 항에 있어서, TGF-β-특이적 저해물질은 데코린, 비글리칸, 피브로모듈린, 루미칸, 베타글리칸과 엔도글린에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 22

제 20 항에 있어서, TGF-β 특이적 저해물질은 TGF-β에 대한 항체인 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 23

제 20 항에 있어서, 세포는 골 근육 세포, 신장 세포, 폐세포, 간세포와 피부세포에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 24

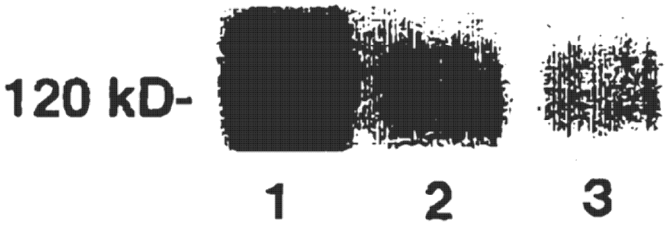
제 20 항에 있어서, 질병은 사구체신염, ARDS, 간경변증, 섬유성암, 폐섬유증, 심근경색, 심장섬유증, 맥관형성술후 재협착증, 신장-장 섬유증, 반흔과 당뇨병-연관된 병인에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

청구항 25

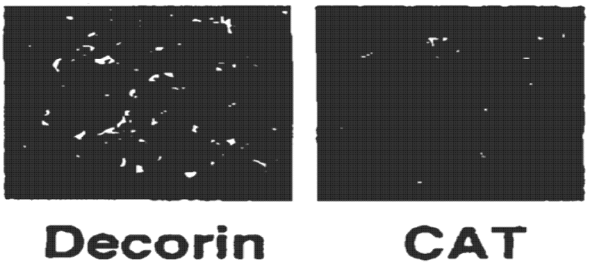
제 20 항에 있어서, 조직은 신장, 간, 폐와 피부에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산의 용도.

도면

도면1



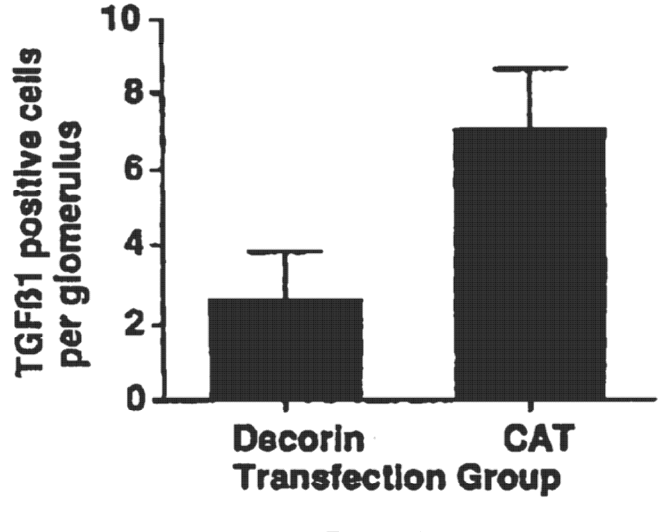
도면2



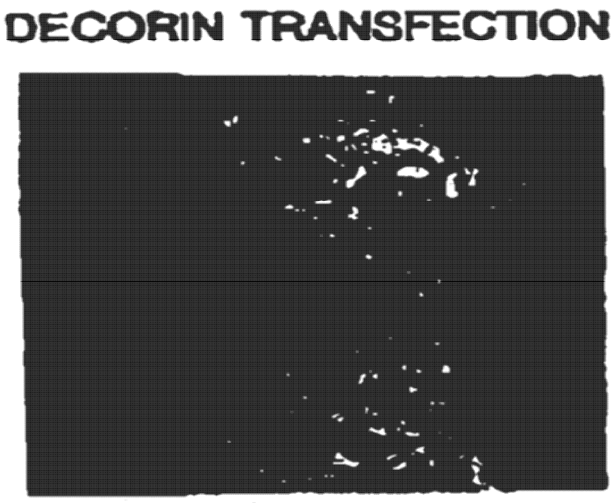
도면3A



도면3B


TGFß1 positive cells per glomerulus
10
8
6
4
2
0
Decorin
CAT
Transfection Group

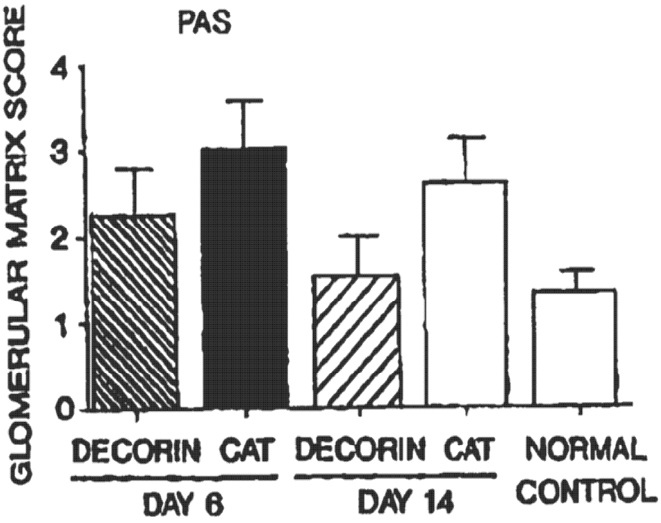
도면4A


DECORIN TRANSFECTION

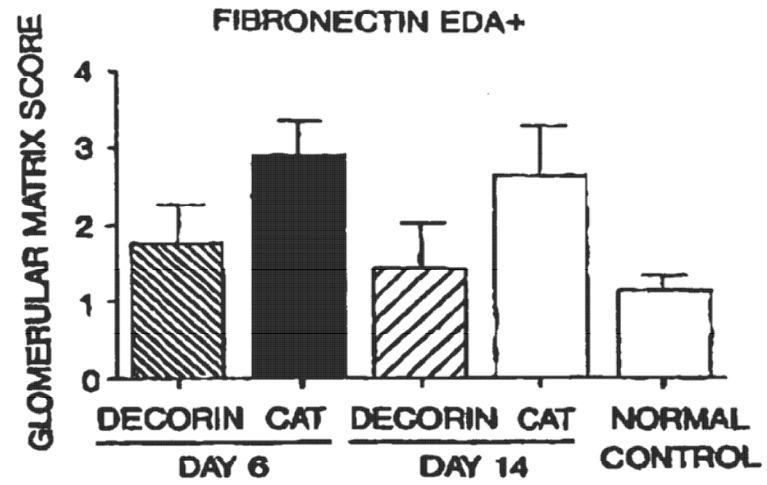
도면4B


CAT TRANSFECTION

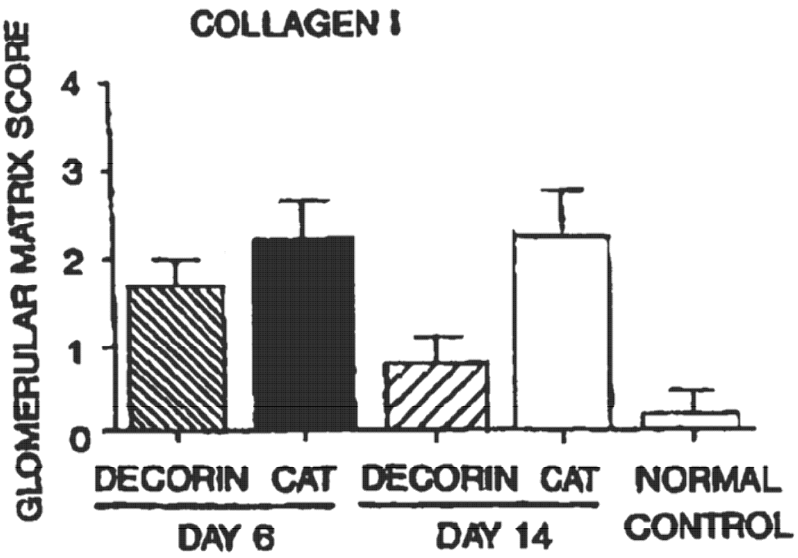
도면4C


PAS
GLOMERULAR MATRIX SCORE
4
3
2
1
0
DECORIN
CAT
DECORIN
CAT
NORMAL
CONTROL
DAY 6
DAY 14

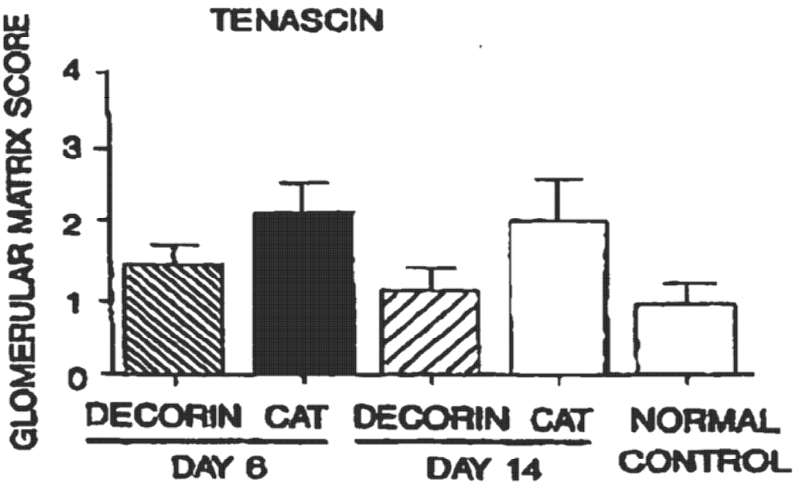
도면4D


FIBRONECTIN EDA+
GLOMERULAR MATRIX SCORE
0
1
2
3
4
DECORIN CAT
DECORIN CAT
NORMAL
CONTROL
DAY 6
DAY 14

도면4E


COLLAGEN I
GLOMERULAR MATRIX SCORE
0
1
2
3
4
DECORIN CAT
DECORIN CAT
NORMAL
CONTROL
DAY 6
DAY 14

도면4F


TENASCIN
GLOMERULAR MATRIX SCORE
4
3
2
1
0
DECORIN
CAT
DECORIN
CAT
NORMAL
CONTROL
DAY 8
DAY 14