



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0104316
(43) 공개일자 2010년09월29일

(51) Int. Cl.

A61K 31/7105 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0022645

(22) 출원일자 2009년03월17일

심사청구일자 2009년03월17일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

유 빈

서울특별시 강남구 개포동 현대1차아파트 105동 303호

김용길

서울특별시 강남구 청담동 현대2차아파트 202동 704호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

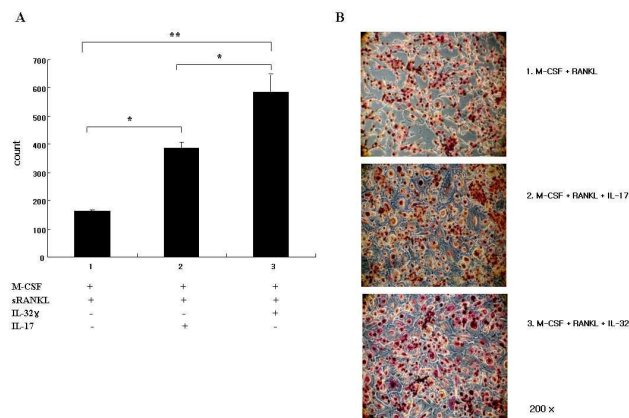
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 인터루킨-32 억제제를 유효성분으로 함유하는 골미란 및 골다공증 치료 및 개선용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 인터루킨-32(IL-32) 억제제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 골미란 및 골다공증 치료 및 개선용 약학조성물에 관한 것으로, IL-32는 단핵세포에서 파골세포로의 분화를 촉진시키며, IL-32 항체, IL-32 안티센스, IL-32 siRNA와 같은 IL-32 억제제는 류마티스 관절염 환자의 골미란 및 골다공증을 치료하거나 개선하는 데에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

이창근

서울특별시 용산구 이촌동 300-163 한강맨션 14동
502호

김수현

서울특별시 노원구 중계2동 509 상아아파트 17동
908호

특허청구의 범위

청구항 1

인터루킨-32 억제제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 골미란 및 골다공증 치료 및 개선용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 인터루킨-32 억제제는 인터루킨-32 자체 억제제; 인터루킨-32의 발현을 억제할 수 있는 siRNA; 인터루킨-32에 특이적으로 결합하는 항체; 및 인터루킨-32에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 골미란 및 골다공증 치료 및 개선용 약학조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 약학조성물은 류마티스 관절염에서 증가되는 골미란 및 골다공증을 치료하거나 개선하는 것을 특징으로 하는 골미란 및 골다공증 치료 및 개선용 약학조성물.

청구항 4

포유동물의 생물학적 샘플에서 인터루킨-32의 발현 프로파일을 검출하는 단계; 및

상기 발현 프로파일을 정상대조군에서 인터루킨-32의 발현 프로파일과 비교하여 포유동물의 골미란 및 골다공증 여부를 판정하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 골미란 및 골다공증의 진단방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 류마티스 관절염을 지닌 포유동물로부터 얻어진 것을 특징으로 하는 골미란 및 골다공증의 진단방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인터루킨-32 억제제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 골미란 및 골다공증 치료 및 개선용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 류마티스관절염(RA)은 유병률 약 1%의 비교적 흔한 질환으로, 활막액의 만성 염증 소견을 특징으로 하며 관절의 변형을 초래함으로써 결국 일상생활의 장애를 유발한다.

[0003] T 세포, B 세포 및 대식세포 등의 수많은 염증 유발 세포들에서 발생하는 TNF- α , IL-1, IL-17 등은 염증성 사이토카인으로서 RA의 병리 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 왔다.

[0004] 최근 RA 활성화에 매개 역할을 하는 이들 염증성 사이토카인들 중 TNF- α , IL-1을 특이적으로 억제하는 생물학적 제제가 개발되어 메토크렉세이트(Methotrexate)를 포함한 전통적인 치료제에 충분한 효과를 보지 못한 환자에게 사용하였을 때 질병 활성도 조절뿐만 아니라 방사선허적으로 골 미란의 진행이 전통적인 치료제와 비교하여 월등히 우수한 것으로 보고되어 점차 사용이 늘고 있다.

[0005] 또, 최근 다양한 형태의 TNF- α 억제제가 시판 중이며 RA 병리 기전에 주목받은 사이토카인인 IL-15, IL-17 등을 표적으로 하는 치료법이 개발 단계에 있다. 그리고, 골 미란에 중요한 작용을 하는 것으로 알려진 RANKL를 표적으로 하는 데노수마브(Denosumab)가 개발되어 현재 임상 실험 중에 있다.

[0006] 파골 세포는 형태학적으로 다핵의 거대세포로써 3개 이상의 핵을 포함하고 있으며 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase) 염색으로 확인 가능하며 기능적으로 골 흡수에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 단핵세포와 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor)와 함께 있는 상황에서 RANKL를 주게 되면 파골세포로

의 분화가 발생하게 되고 또한 용량에 따른 활성도의 증가도 관찰된 바 있다.

- [0007] Suda 등은 1999년 TNF 수용체 및 리간드 패밀리가 파골세포 분화에 관여함을 보고하였으며, Kotake 등은 2001년 활성화된 T 세포의 직접적인 영향으로 PBMCs로부터 파골세포 분화를 관찰함으로써 RA에서 골 파괴 이전에 T 세포 관여의 가능성을 제기하였다.
- [0008] 이후 RANKL-RANK association 등에 의한 파골세포 분화기전을 확인하게 되었으며 수많은 염증세포 및 사이토카인 환경이 형성되어 있는 RA에서 파골세포의 과 형성 및 과 활동성의 기전이 보고되었고, 또한 NFAT(nuclear factor of activated T cells)c1이 파골세포 분화뿐만 아니라 파골세포 활성화에도 결정적인 역할을 하는 중요한 전사인자인 것으로 알려졌다.
- [0009] RA 환자에서 파골세포의 지속적인 활성화는 궁극적으로 골 미란, 골다공증을 발생시키게 되고 이차적으로 골 변형 및 골절을 초래하므로 이 세포의 활성화에 관여하는 물질의 발견은 RA 치료에 매우 중요한 분야로 부각되었다.
- [0010] 한편, IL-32는 이전에 NK4 전사물로 알려진 물질로써 최근에 서열이 규명되고, T 세포, NK 세포, 상피세포, 단핵세포 등에서 광범위하게 생산되며 주로 전염증성 활성을 지닌 것으로 밝혀져 있다. 현재까지 밝혀진 IL-32의 6개 이성체(isoform)는 α , β , γ , δ , ϵ , 및 ζ 로 알려져 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0011] 이에, 본 발명자는 파골세포 형성에 IL-32가 잠재적인 분자임을 확인하고 또한 기전을 밝힘으로써 향후 IL-32에 대한 항체 및 제조합 단백질의 개발을 통해 직접적으로 IL-32를 억제하거나 혹은 신호 전달 체계를 억제할 수 있는 약제 개발을 통해 골 미란 및 골다공증을 치료하거나 개선하고자 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 인터루킨-32 억제제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 골미란 및 골다공증 치료 및 개선용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 포유동물의 생물학적 샘플에서 인터루킨-32의 발현 프로파일을 검출하고 정상대조군과 비교하여 포유동물의 골미란 및 골다공증 여부를 판정하는 단계를 포함하는 골미란 및 골다공증의 진단방법을 제공하는 데에 있다.

과제 해결수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인터루킨-32(IL-32) 억제제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 골미란 및 골다공증 치료 및 개선용 약학조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 IL-32 억제제로는 IL-32 자체 억제제; IL-32의 발현을 억제할 수 있는 siRNA; IL-32에 특이적으로 결합하는 항체; 및 IL-32에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 하나 이상을 사용한다.
- [0016] 본 발명에서 이용되는 IL-32의 발현을 억제할 수 있는 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이러한 스템-앤드-루프 구조는 인비트로(in vitro) 또는 인비보(in vivo)에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.
- [0017] 본 발명에서 이용되는 IL-32에 특이적으로 결합하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 이러한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6: 511-519, 1976), 제조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, Nature, 352: 624-628, 1991)에 의해 제조될 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 약학조성물은 특히 류마티스 관절염에서 증가되는 골미란 및 골다공증을 치료하거나 개선할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 포유동물의 생물학적 샘플에서 IL-32의 발현 프로파일을 검출하는 단계; 및 상기 발현 프로파일을 정상대조군에서 IL-32의 발현 프로파일과 비교하여 포유동물의 골미란 및 골다공증 여부를 판정하는 단계

를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 골미란 및 골다공증의 진단방법을 제공한다.

- [0020] 상기 생물학적 샘플은 류마티스 관절염을 지닌 포유동물로부터 얻어진 것을 사용한다.
- [0021] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0022] IL-32는 최근에 밝혀진 물질로써 염증성 관절조직에서 관찰되고 있으나 류마티스 관절염(RA) 환자에서 골미란 및 관절 변형에 중요한 역할을 하는 파골세포에서의 영향은 전혀 알려지지 않았고, 본 발명에서는 IL-32의 파골세포에 끼치는 영향을 검토하여 완성되었다.
- [0023] 먼저, 파골세포 분리 및 사용을 위하여, 건강한 기증자의 혈액에서 말초혈액단핵세포(PBMC)를 분리 후 단핵세포 분리 키트(Monocyte isolation kit)를 이용하여 단핵세포를 분리하였다. 분리된 CD14+ 단핵세포의 순도가 97% 이상임을 확인하였다.
- [0024] 단핵세포는 M-CSF 및 RANKL와 공동배양 시 파골세포로 분화가 일어나며, 이 과정에 IL-32, TNF- α , IL-17을 첨가 후 분화된 파골세포의 세포수를 카운팅하여 분화능을 비교하였고, Osteologic disk를 사용하여 각각의 사이토카인의 의한 파골세포 활성도를 비교하였다.
- [0025] 먼저, 파골세포 분화시 가장 효과적인 IL-32의 농도는 50 ng/ml로 나타났다. 또, 기존에 파골세포 분화능이 알려진 TNF- α , IL-17보다 IL-32에 의해 보다 뛰어난 파골세포로의 분화가 관찰되었다.
- [0026] IL-32의 파골세포 분화 기전을 확인하기 위해 파골세포 분화에 있어서 중요한 전사인자인 NFATc1의 발현을 RT-PCR 및 리얼타임-PCR로 확인하였으며, FLS에서 RANKL 및 OPG 발현의 변화를 확인하였다. 그 결과, IL-32가 IL-17보다 강력한 파골세포 분화능을 나타내었다. 또, 류마티스 관절염(RA) 환자의 활막세포에서 IL-32 자극에 의한 RANKL의 증가 및 OPG의 감소가 관찰되었다.
- [0027] 따라서, 류마티스 관절염 활막조직에 증가되어 있는 IL-32가 류마티스 관절염 환자의 골미란 및 골다공증 유발에 관여되며, IL-32 억제제의 개발이 류마티스 관절염 환자의 골미란 및 골다공증을 치료하거나 개선할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0030] 상기 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0031] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.
- [0032] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0033] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0034] 상기 약학조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.01 내지 10 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0035] 또한, 이러한 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0036] 상기 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 비강흡입제, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

효 과

[0037] 본 발명의 약학조성물은 IL-32 억제제를 함유함으로써 류마티스 관절염 환자의 골미란 및 골다공증을 치료하거나 개선하는 데에 유용하게 사용될 수 있으며, 또 IL-32의 발현 프로파일을 분석하여 골미란 및 골다공증의 진단에도 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0038] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 하기에 제시한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] <실시예 1> IL-32의 파골세포 분화능 검토

[0040] 1) 단핵세포 및 FLS(fibroblast-like synoviocyte) 분리

[0041] Ficoll/Paque을 이용하여 400g에서 30분 동안 원심분리하여 건강한 기증자 혈액에서 PBMCs 분리한 후, 상업용 단핵세포 분리 키트(Commercial monocyte isolation kit)를 이용하여 제조자의 지침에 따라 negative selection을 통해 CD14+ 단핵세포를 분리하였다.

[0042] 분리된 단핵세포의 순도(purity)를 확인하기 위해 분리된 단핵세포는 항-비오틴 PE(anti-biotin PE)와 CD14-FITC로 FACS(fluorescence-activated cell sorting)를 수행하였다. 그 결과, 도 1과 같이 97% 순도의 단핵세포를 분리하였다.

[0043] 그 후, 분리된 고순도의 단핵세포를 RPMI 1640으로 철저히 세정하고, Lymphoprep으로 혼합하고 α-MEM(10% FBS, 2mM L-글루타민산, 100U/ml 페니실린 및 100μl/ml 스트렙토마이신)으로 24웰 플레이트에서 4X10⁵ 세포/웰로 배양하였다.

[0044] FLS는 무릎 관절성형술시에 RA 환자의 활막조직으로부터 분리하였다. 즉, 활막조직을 잘게 썰고 DMEM(10% FBS 및 항생제 함유)에 용해된 1mg/ml 콜라게네이즈로 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 세포 현탁물을 70μm 나이론 세포 여과기에서 여과하여 얻은 상등액을 DMEM으로 다시 세정하고 400g에서 10분 동안 원심분리하였다. 얻어진 세포를 3-6계대 서브배양하여 이후 모든 실험을 위한 FLS로 사용하였다.

[0045] 2) 파골세포 분화에 대한 IL-32의 농도별 효과 검토

[0046] 제조함 인간 IL-32 γ (rhIL-32 γ)를 김수현 연구팀(건국대학)으로부터 제공받아 실험하였다. 파골세포 발생에 있어서 IL-32 γ의 적절한 용량을 결정하기 위하여, 분리된 단핵세포(1X10⁵ 세포/웰)를 10 ng/ml M-CSF 및 20 ng/ml 용해성 RANKL(sRANKL)로 처리된 96웰 플레이트를 이용하여 다양한 용량의 rhIL-32 γ (0, 25, 50 및 100 ng/ml)로 처리하여 2주 동안 배양하였다. rhIL-32 γ, M-CSF 및 sRANKL을 3일마다 교체하며, 2주 공배양 후, 세포를 상업용 키트를 이용하여 TRAP 염색을 수행하였다. 3개 핵 이상을 함유한 TRAP-양성 다핵의 거대세포를 파골세포로 규정하고 광학현미경으로 카운팅 하였다(OCs: osteoclast count).

[0047] 그 결과, 도 2와 같이 50ng/ml의 IL-32로 처리한 경우 가장 높은 파골세포 분화능을 나타내었다. 이후 실험에서는 50ng/ml의 IL-32로 처리하여 수행하였다.

[0048] <실시예 2> IL-32의 파골세포 활성화에 미치는 영향 검토

[0049] 1) 파골세포 분화능 효과 검토

[0050] 50 ng/ml rhIL-32 γ, TNF- α (20 ng/ml) 및 20 ng/ml rhIL-17 간의 파골세포 형성 효과를 비교하기 위하여, 상기 사이토카인들을 단핵세포 배양계에서 2주 동안 처리하였고, 기타 앞선 실시예와 동일하게 처리하였다.

[0051] 파골세포 분화 과정에 IL-32, TNF- α, IL-17을 각각 첨가하여 2주 배양하고, 광학 현미경으로 TRAP 염색 양성 파골세포 개수를 확인하여 각각의 분화능을 비교하였다(OCs: osteoclast count). 그 결과, 도 3과 같이 IL-32는 IL-17보다 뛰어난 파골세포 분화능을 나타내었다.

- [0052] 2) 파골세포 활성화도 효과 검토(Osteologic disk 실험)
- [0053] 골 재흡수 분석계를 이용하여 파골세포 분화의 기능적 증거를 검토하였다. M-CSF(10 ng/ml) 및 sRANKL(20 ng/ml)의 자극 하에서 분리된 단핵세포(4×10^5 세포/웰)를 히드록시아파타이트로 코팅된 24웰 Osteologic disks® 상에서 IL-32 γ (50 ng/ml) 또는 IL-17(20 ng/ml)로 2주 동안 배양하였다.
- [0054] 2주 배양 후, 세포를 제거하고 재흡수 막공을 공초점 현미경을 이용하여 조사하였다. 이미지 분석 시스템을 이용하여 각 Osteologic disks®에 재흡수된 평균 퍼센트 면적을 측정하였다.
- [0055] 그 결과, 도 4와 같이 IL-32는 IL-17보다 뛰어난 파골세포 활성도를 나타내었다.
- [0056] <실시예 3> 파골세포에 대한 IL-32 유도성 NFATc1 mRNA 발현 수준 검토
- [0057] sRANKL 및 M-CSF의 존재 하에서, 분리된 단핵세포(1×10^5 세포/웰)를 IL-32 γ (50 ng/ml) 또는 IL-17(20 ng/ml)로 처리하거나 처리하지 않고 2주 동안 96웰 플레이트에서 배양하였다. 2주 배양 후, 각 웰 당 1ml 트리졸 시약을 첨가하여 세포를 용출하고 총 RNA를 제조자의 지침에 따라 준비하였다.
- [0058] 제1가닥 cDNA를 제조자의 지침에 따라 1 μl M-MLV 역전사효소(200U), 5 μl의 5X RT 완충액(25mM Tris-HCl, 375mM KCl, 15mM MgCl₂ 및 50mM DTT), 5 μl의 2.5mM dNTP 혼합물, 0.5 μl의 RNase 저해제를 이용하여 37℃에서 1시간 동안 배양하여 합성하였다.
- [0059] NFATc1(Hs00542678_m1) 및 유전자 발현에 대한 내부 대조군인 GAPDH의 검출을 위해 TaqMan® 프라이머 및 탐침을 이용하였다. 리얼타임-PCR은 Taqman Universal PCR Master Mix 및 Assays-on-Demand 유전자 발현 프라이머 및 탐침에 의해 ABI PRISM 7000 서열 검출계에서 수행되었다.
- [0060] 증폭 반응은 12.5 μl의 Taqman Universal PCR Master Mix, 1.25 μl의 프라이머 및 탐침, 5 μl의 cDNA 및 6.25 μl의 증류수를 함유한 최종 부피 25 μl로 수행되었다. 열사이클링 조건은 50℃에서 2분, 95℃에서 10분, (95℃에서 15분 및 60℃에서 1분)의 45주기로 수행되었다. 각 프라이머 세트(13)에 대한 증폭 차이를 산출하기 위하여 상대적 표준곡선법을 이용하였다. 상대적 NFATc1 발현 값은 각 값을 GAPDH에 대해 산출된 값으로 나누어 구하였다.
- [0061] 단핵세포를 M-CSF, sRANKL로 배양하여 전파골세포 형성 단계에 IL-32, IL-17을 각각 첨가하여 2주 배양하였다. Real-time PCR을 이용하여 NFATc1 mRNA 발현을 비교하였다.
- [0062] 그 결과, 도 5에 도시된 바와 같이 IL-32는 IL-17과 유사하거나 조금 높은 NFATc1 mRNA 발현을 나타내었다.
- [0063] <실시예 4> FLS에 대한 IL-32 유도성 RANKL 및 OPG mRNA 발현 수준 검토
- [0064] 분리된 FLS(5×10^4 세포/웰)를 24웰 플레이트에서 IL-32 γ (50 ng/ml) 또는 IL-17(20 ng/ml)로 처리하거나 처리하지 않고 3주 동안 24웰 플레이트에서 배양하였다. 3주 배양 후, 실시예 3과 동일한 방법으로 세포를 용출하고 총 RNA를 준비하였다.
- [0065] RANKL의 검출용 프라이머는 서열번호 1 및 서열번호 2를, OPG의 검출용 프라이머는 서열번호 3 및 서열번호 4를, GAPDH의 검출용 프라이머는 서열번호 5 및 서열번호 6을 사용하였다. RANKL 및 OPG mRNA의 발현을 평가하기 위하여, 사이클-의존성 PCR 반응을 수행하여 각 유전자에 대한 증폭곡선을 만들었다. 증폭 반응은 94℃에서 5분 동안 초기 변성, 선택된 주기의 94℃에서 30초 동안 변성(RANKL은 30주기, OPG는 26주기 및 GAPDH는 24주기), 각각 30초 동안 RANKL에 대해 53℃에서 어닐링, OPG에 대해 62℃에서 어닐링, GAPDH에 대해 55℃에서 어닐링, 72℃에서 5분 동안 연장 및 72℃에서 5분 동안 최종 연장으로 이루어졌다.
- [0066] PCR 산물을 1.5% 아가로오스겔에 전기영동시키고 에티디움 브로마이드로 염색하였다. 리얼타임-PCR은 실시예 4와 동일하게 수행하였다. RANKL(Hs00243519_m1), OPG(Hs00171068_m1) 및 GAPDH의 검출을 위해 TaqMan® 프라이머 및 탐침을 이용하였다. 상대적 RANKL 및 OPG 발현 값은 각 값을 GAPDH에 대해 산출된 값으로 나누어 구하였다.
- [0067] RA 환자의 활액막(synovium)에서 채취한 3-6 세대 활막세포에 IL-32, IL-17을 각각 첨가하여 3주 배양하였다. RT-PCR 및 real-time PCR을 이용하여 RANKL, OPG mRNA 발현을 비교하였다.

[0068] 그 결과, 도 6에 도시된 바와 같이 IL-32는 IL-17보다 높은 RANKL mRNA 발현 및 낮은 OPG mRNA 발현을 나타내었다.

[0069] <실시예 5> IL-32에 의한 파골세포 분화의 RANK-RANKL 경로 관련성 검토

[0070] 앞선 실시예와 동일하게 파골세포 분화능을 검토하되, sRANKL을 첨가하거나 첨가하지 않은 경우로 나누어 검토한 결과, 도 7과 같이 IL-17에 의한 파골세포 분화에는 sRANKL이 관여하지만, IL-32에 의한 파골세포 분화에는 sRANKL이 관여하지 않았다.

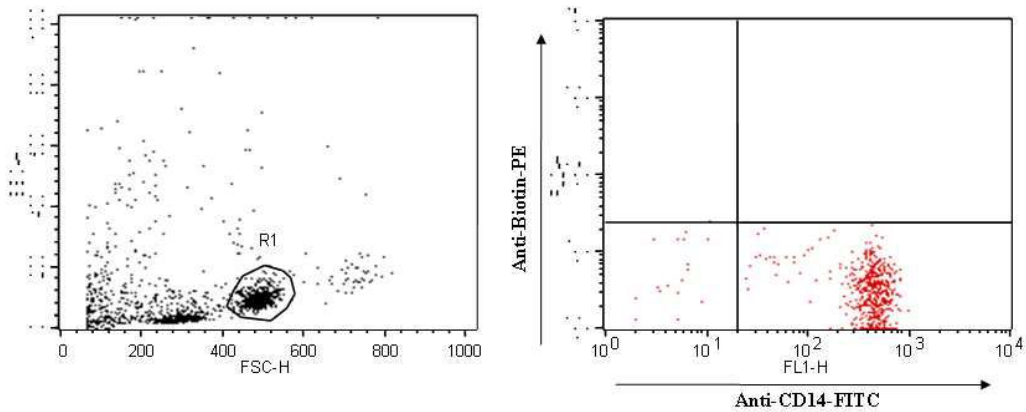
[0071] 따라서, IL-32에 의한 파골세포 분화는 RANK-RANKL 경로와는 무관하게 독립적으로 진행됨을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

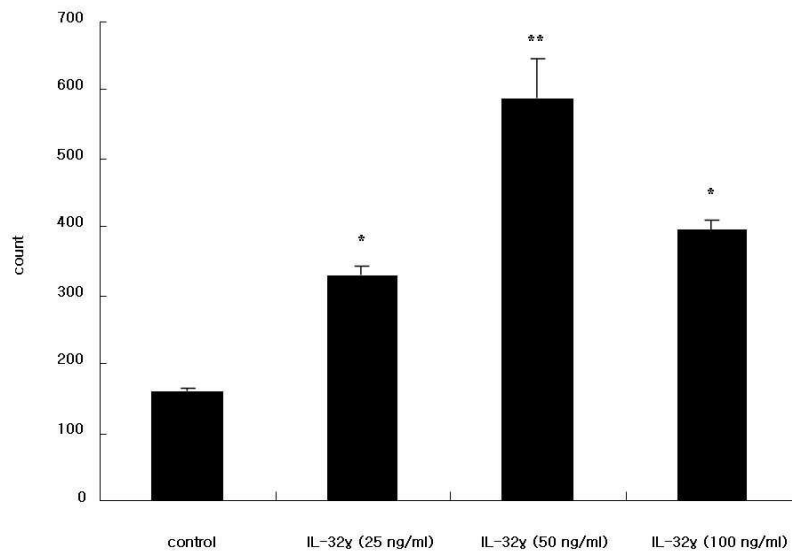
- [0072] 도 1은 분리된 단핵세포의 순도를 나타낸 것이고,
 [0073] 도 2는 파골세포 분화에 대한 IL-32의 농도별 효과를 검토한 것이고,
 [0074] 도 3은 IL-32의 파골세포 분화능을 나타낸 것이고,
 [0075] 도 4는 IL-32의 파골세포 활성도를 나타낸 것이고,
 [0076] 도 5는 NFATc1 mRNA 발현 수준에 대한 IL-32의 효과를 나타낸 것이고,
 [0077] 도 6은 RANKL 및 OPG mRNA 발현 수준에 대한 IL-32의 효과를 나타낸 것이고,
 [0078] 도 7은 IL-32의 RANK-RANKL 경로 관련성을 검토한 것이다.

도면

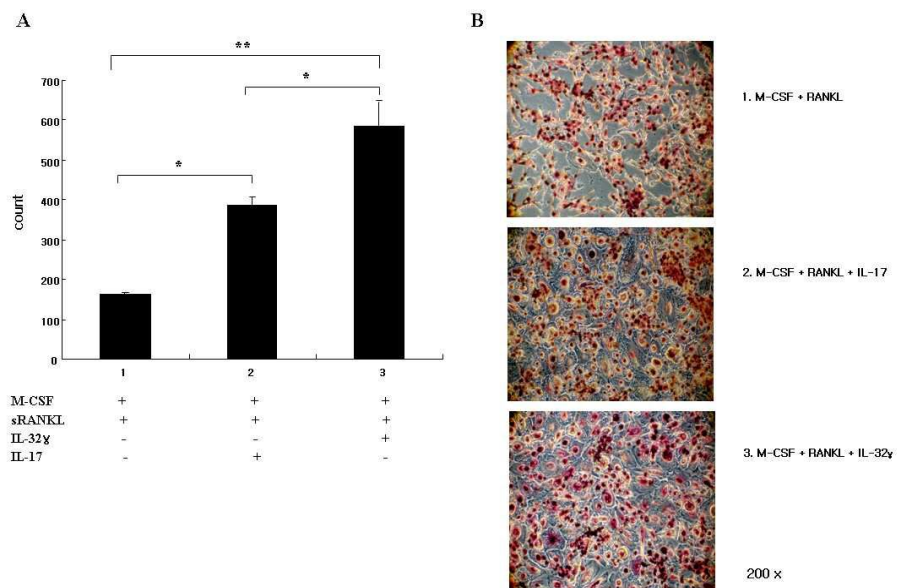
도면1



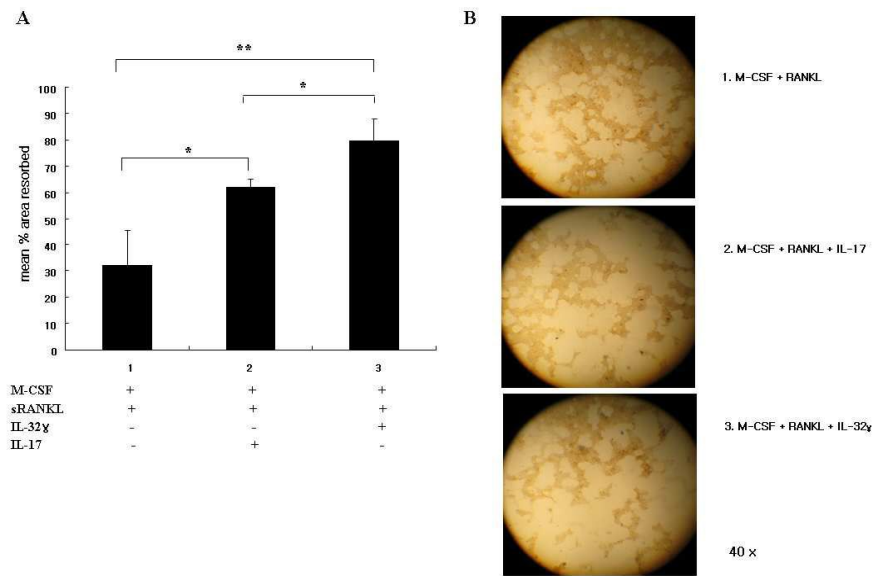
도면2



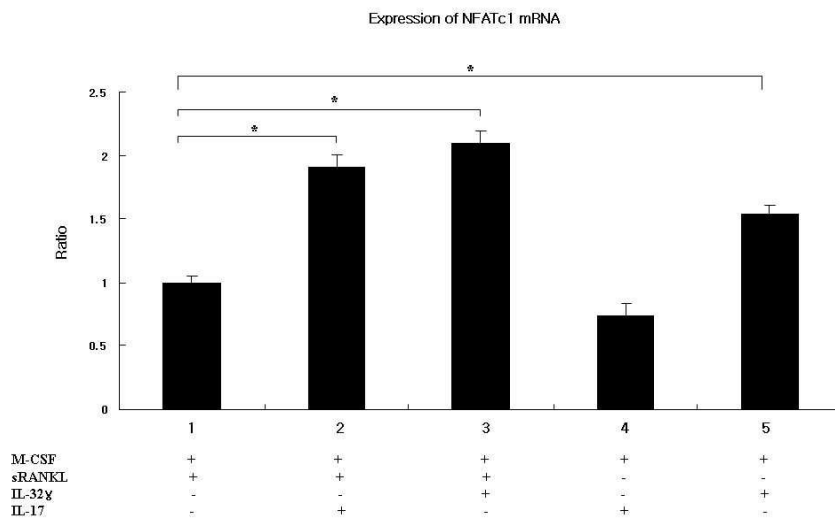
도면3



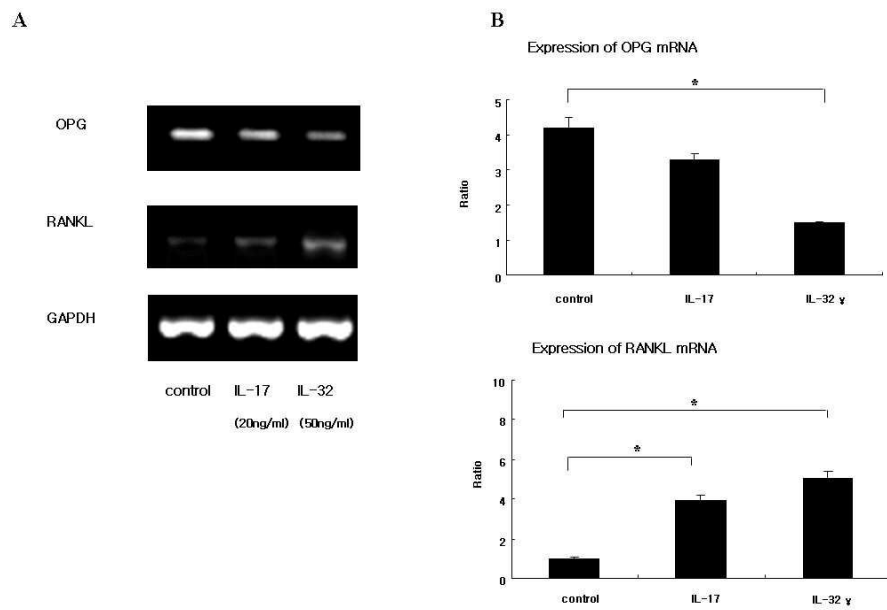
도면4



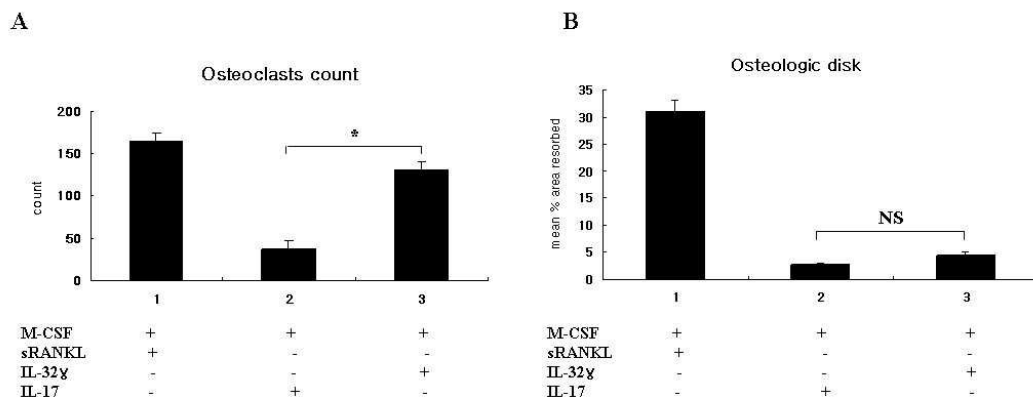
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION
 <120> Pharmaceutical composition for treating and preventing bony erosion and osteoporosis comprising interleukin-32 inhibitor

<130> dp-2009-0023

<160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sense primer for RANKL

<400> 1
 gccagtgga gatgttag 18

<210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Antisense for RANKL

<400> 2
 ttagctgcaa gttttccc 18

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sense primer for OPG

<400> 3
 tgctgttcct acaaagtta cc 22

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense primer for OPG

<400> 4

ctttgagtgc tttagtgcgt g

21

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sense primer for GAPDH

<400> 5

accacagtcc atgcatcac

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Antisense primer for GAPDH

<400> 6

tccaccaccc tgttgctgta

20