(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0049449
(43) 공개일자 2017년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/54 (2006.01) *A61K 38/20* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/54 (2013.01)
A61K 38/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0141357
(22) 출원일자 2016년10월27일
심사청구일자 2016년10월27일
(30) 우선권주장
1020150149444 2015년10월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
손상욱
서울특별시 용산구 서빙고로 31, 202동 1001호 (한강로3가, 용산 시티파크2단지)
류우인
서울특별시 종로구 통일로18길 9, 107동 203호 (무악동, 인왕산아이파크아파트)
이하나
서울특별시 성북구 안암로9가길 76, 304호 (안암동5가, 안암복합빌딩)
(74) 대리인
특허법인 무한

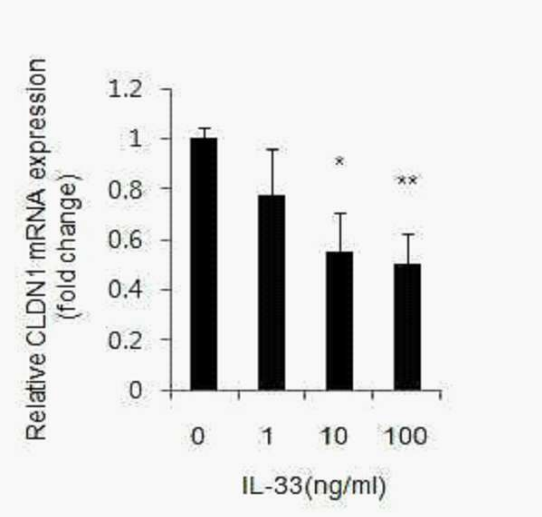
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 아토피성 피부염에서 중요한 인자로 알려진 IL-33에 의해 Claudin-1이 조절되는 분자 기전에 관한 것으로, STAT-3 전사조절인자에 의존적인 Claudin-1의 발현을 이용하여 아토피성 피부염 치료제의 효능을 스크리닝하기 위한 것이다.

대 표 도 - 도1



명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 각질형성세포(keratinocyte)로 이루어진 피부조직 모델에 IL-33(Interleukin 33)을 처리하는 단계;

(b) 상기 피부조직 모델에 아토피성 피부염 치료제 후보물질을 처리하는 단계; 및

(c) 상기 피부조직 모델 중 STAT-3(Signal Transducer and Activator of Transcription 3)의 발현 수준을 확인하는 단계;를 포함하는, 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 IL-33은 상기 STAT-3의 발현을 유도하는, 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 IL-33은 상기 STAT-3의 발현을 유도하여 CLDN-1의 발현을 억제하는, 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

(d) 상기 피부조직 모델 중 CLDN-1(Claudin-1)의 발현 수준을 확인하는 단계;를 더 포함하는, 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 STAT-3는 CLDN-1 프로모터에 특이적으로 결합하는, 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 아토피성 피부염 치료제 후보물질은 상기 STAT-3의 발현을 억제하거나 상기 CLDN-1의 발현을 유도하는, 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 스크리닝 방법을 이용하는, 아토피성 피부염 치료제 선별 키트.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 스크리닝 방법에 따라 선별된 아토피성 피부염 치료제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 아토피 피부염에서 중요한 인자로 알려진 IL-33에 의해 claudin-1이 조절되는 분자 기전을 이용하는 방법에 관한 것이다. 또한, STAT-3 전사조절인자에 의존적인 Claudin-1의 발현 저하를 바탕으로 IL-33에 의한 피부 장벽 기능이 조절됨을 증명하였다. 이는 아토피성 피부염 치료제 개발에 응용될 수 있다.

배 경 기 술

[0003] 아토피성 피부염(Atopic dermatitis, AD) 환자는 보건복지가족부에 따르면 2001년에는 1000명당 12명에 불과했으나 2005년 에는 1000명당 91.4명으로 5년 동안 무려 661% 급증하였다. 또한, 지난 30년간 선진국에서의 유병률(전체 인구 중 감염 환자의 수) 또한 3배까지 증가하였다. 이처럼 환자수가 급증함에 따라 아토피로 인한 사회적 지출도 만만치 않은 실정이다.

[0004] 아토피성 피부염은 만성 염증성 피부 질환으로써 습진성 피부와 지속적인 가려움증을 특징적으로 보이며, 아직까지 그 치료가 어려운 대표적 만성 염증성 피부질환 중의 하나이다. 아토피성 피부염은 Th2 면역반응이 증가되어 비정상적인 epidermis의 증대, 염증관련 세포들의 활성화 등을 동반하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 전통적 피부질환 치료제로 가장 널리 사용되고 있는 스테로이드의 경우 당뇨, 고혈압, 쿠싱 증후군 등의 부작용 등을 유발하고 그 오남용으로 더욱 사회적 문제가 되고 있어 근본적 치료를 통한 보다 효과적이고 안전한 치료제의 개발이 필요하다. 최근 개발되고 있는 면역 조절제에 있어서도 가장 요구되는 특성은 선택성으로써, 표적이 되는 특정 부분에만 작용하여 안전하게 면역억제작용을 일으킬 것으로 기대를 모았던 항체 제제들이 면역장애, 감염, 암 발생 등의 위험성 증가 등으로 예상치 못한 심각한 부작용들을 초래하는 것으로 보고되고 있다.

[0006] 기존의 Th2(T helper 2)에 의한 질환으로 해석되던 아토피성 피부염을 비롯한 다양한 만성 염증성 피부질환 및 아토피성 질환에서 IL-33의 역할이 크게 강조되고 있다. 특히, IL-4, IL-13, TSLP, IL-33 등의 사이토카인(Cytokine)들은 아토피성 피부염 병변에 발현이 증가되어 있다고 알려져 있다. IL-33(Interleukin-33)은 가장 최근에 발견된 IL-1 유사 사이토카인으로써 다양한 자극에 의해 endothelial 세포와 epithelial 세포에서 발현되며, 조직이 손상된 경우 방어기작으로써 분비되고, 즉각적인 선천면역반응과 Th2 면역반응을 활성화시킨다고 알려져 있다. IL-33은 류마티스 관절염, 알러지성 비염, 천식 등 만성 염증성 질환 및 자가면역 질환에 관련성이 알려져 있고, 특히 건선 및 아토피성 피부염 등이 대표적 질환으로써 IL-33 작용 기전 연구에 우수한 질환 모델이 되고 있다. 특히, 아토피성 피부염 환자 병변에서 IL-33과 IL-33의 수용체(receptor)인 ST2의 발현이 증가되어 있으며, 아토피성 피부염의 정도에 따라 혈청(serum) 내 IL-33이 연관성을 갖는다는 보고가 있으나, 정확한 신호전달 기전에 대해서는 알려져 있지 않다.

[0007] 사람의 피부에서 표피는 intracellular junction(ICJ) 구조로 결합된 각질형성세포로 둘러싸여, 외부 환경으로부터 내부기관을 보호하고 인체의 항상성을 유지함에 유익한 역할을 수행한다. ICJ의 역할은 다양한 접합구조들로 행해지고 있는 가운데, 이들 중 Tight junction(TJ)은 multi-protein complex로써 표피의 과립층에서 발현되며, 밀접한 세포사이를 밀착시킴으로써 epithelial과 endothelial 방어 기능을 유지시키며, TJ의 장벽기능은 세포간의 permeability와 molecule passage를 평가하는 척도로써 잘 알려져 있다. TJ의 이상은 천식, melanoma 등의 다양한 질병에서도 주요한 기능을 한다는 연구결과들이 보고되고 있다. 또한, 아토피성 피부염 환자에서 Tight junction(TJ) 중 특히 CLDN-23(Claudin-23)과 함께 CLDN-1(Claudin-1)의 기능 저하가 특이적으로 발생한다고 보고되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 아토피성 피부염 치료제의 개발을 위해서는 이의 발병 기전을 보다 명확히 밝힐 필요가 있다. 본 발명의 목적은 이러한 아토피성 피부염의 발병 기전을 보다 명확하게 밝히고, 이를 이용하여 아토피성 피부염을 근본적으로 치료할 수 있는 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 측면은 (a) 각질형성세포(keratinocyte)로 이루어진 피부조직 모델에 IL-33(Interleukin 33)을 처리하는 단계; (b) 상기 피부조직 모델에 아토피성 피부염 치료제 후보물질을 처리하는 단계; 및 (c) 상기 피부조직 모델 중 STAT-3(Signal Transducer and Activator of Transcription 3)의 발현 수준을 확인하는 단계;를 포함하는, 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 IL-33은 상기 STAT-3의 발현을 유도할 수 있다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 IL-33은 상기 STAT-3의 발현을 유도하여 CLDN-1의 발현을 억제할 수 있다.

[0014] 일 실시예에 있어서, (d) 상기 피부조직 모델 중 CLDN-1(Claudin-1)의 발현 수준을 확인하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 STAT-3는 CLDN-1 프로모터에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0016] 일 실시예에 있어서, 상기 아토피성 피부염 치료제 후보물질은 상기 STAT-3의 발현을 억제하거나 상기 CLDN-1의 발현을 촉진할 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 스크리닝 방법을 이용하는, 아토피성 피부염 치료제 선별 키트를 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 스크리닝 방법에 따라 선별된 아토피성 피부염 치료제를 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 피부각질세포에서 IL-33에 의하여 유도된 STAT3 전사인자를 중심으로 하는 CLDN1 발현조절기전을 규명하고, 이와 관련된 치료제의 효능을 스크리닝함으로써 아토피성 피부염과 같은 만성 염증성 질환을 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은, IL-33에 의한 CLDN1의 mRNA 발현 감소를 나타낸 그래프이다.

도 2는, IL-33에 의한 CLDN1의 단백질 발현 감소를 나타낸 것이다.

도 3은, IL-33에 의한 CLDN1의 발현 감소를 형광 현미경을 이용하여 나타낸 것이다.

도 4는, IL-33에 의한 CLDN1의 프로모터 발현을 나타낸 것이다.

도 5는, IL-33에 의한 CLDN1의 발현 감소를 3차원 인공피부 모델을 이용하여 나타낸 것이다.

도 6은, CLDN1의 프로모터의 모식도이다.

도 7은, IL-33에 의한 다양한 전사조절인자 활성을 확인한 것이다.

도 8은, IL-33에 의한 p-STAT3 발현 증가를 나타낸 것이다.

도 9는, p-STAT에 의한 CLDN1 발현 조절을 나타낸 것이다.

도 10은, STAT-3 저해제에 따른 CLDN1 단백질 발현 증가를 나타낸 것이다.

도 11은, STAT-3 siRNA에 따른 CLDN1 단백질 발현 증가를 나타낸 것이다.

도 12는, 쥐 모델을 통한 IL-33의 기능적 변화 확인한 것이다.

도 13은, STAT-3에 의한 CLDN1 전사 활성 저해를 나타낸 것이다.

도 14는, STAT-3이 CLDN1 프로모터에 부착하는 것을 나타낸 것이다.

도 15는, IL-33에 의한 CLDN1 단백질 발현 조절을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0024] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0025] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0026] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0027] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0029] 본 발명의 일 측면에 따른 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법이 (a) 각질형성세포(keratinocyte)로 이루어진 피부조직 모델에 IL-33(Interleukin 33)을 처리하는 단계; (b) 상기 피부조직 모델에 아토피성 피부염 치료제 후보물질을 처리하는 단계; 및 (c) 상기 피부조직 모델 중 STAT-3(Signal Transducer and Activator of Transcription 3)의 발현 수준을 확인하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0030] 대한민국 등록특허공보 제10-1655384호를 참고하면, 상기 피부조직 모델은 인간 피부의 표피를 이루는 주요 세포인 각질형성세포(keratinocyte)를 기체-액체 경계면(air-liquid interphase)에서 분화유도시킴으로써 3차원적으로 인간의 표피를 재구성한 인공 피부 모델(RhE, Reconstituted human skin equivalent model)일 수 있다.

[0031] 이미 EPISKINTM, EpiDermTM, SkinEthicTM 등과 같은 인공피부 모델은 다양한 검증(validation) 연구를 통해 피부자극 대체법으로서의 유용성을 인증받아 OECD 가이드라인(guideline)에도 등재되어 있으므로, 상기 피부조직 모델을 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝에 활용할 수 있다.

[0032] 상기 IL-33은 각질형성세포 내에서 CLDN-1(Claudin-1)의 발현을 억제함으로써 아토피성 피부염을 발병시킬 수 있다. 따라서, 상기 (a) 단계에서는 각질형성세포를 포함하는 피부조직 모델에 IL-33을 처리함으로써 아토피성 피부염이 발병한 인간 피부와 유사한 모델을 제작할 수 있다.

[0033] 다만, 종래의 연구결과는 아토피성 피부염의 발병 기전을 분자 수준에서 명확하게 규명하지 못하였고, 이에 따라 근본적인 치료제의 개발에 한계가 있었다.

[0034] 한편, 본 발명자들은 이러한 종래 연구결과에 비해 보다 명확한 아토피성 피부염 발병 기전을 밝혀내었다. 이에 따르면, 상기 IL-33은 각질형성세포 내 STAT-3(Signal Transducer and Activator of Transcription 3)의 발현을 유도할 수 있다. 이 때, 상기 STAT-3의 발현 유도는 이를 암호화하는 유전자의 발현 유도를 의미할 수도 있다.

[0035] 아토피성 피부염 환자는 정상 대조군에 비해 IL-33을 과발현하고, 이는 결과적으로 STAT-3의 발현 수준 증가를

초래할 수 있다. 이에 따라, 상기 (b) 단계에서 아토피성 피부염 치료제 후보물질을 처리하고, 상기 (c) 단계에서 STAT-3의 발현 수준을 확인하여 상기 (a) 단계의 아토피성 피부염 발병 모델(IL-33 처리 모델)의 수준과 비교함으로써 치료제 후보물질의 효능을 스크리닝할 수 있다.

[0036] 즉, 상기 (a) 단계에서 IL-33을 처리함으로써 STAT-3의 발현 수준이 증가하여 아토피성 피부염을 발병시키므로, 상기 STAT-3의 발현 수준을 감소 내지 억제하는 후보물질은 치료제로서의 효능이 있는 것으로 판정할 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 사용된 용어, "발현 수준 확인"이란 생물학적 시료에서 아토피성 피부염 진단용 마커(단백질) 또는 이를 암호화하는 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정을 의미한다. 상기 발현 수준 확인 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Sulface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 및 ELISA(Enzyme Linked Immunosorbentassay) 등을 예시할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 한편, 치료제의 효능을 보다 정밀하게 스크리닝하기 위해, 상기 아토피성 피부염 치료제의 스크리닝 방법이 (d) 상기 피부조직 모델 중 CLDN-1(Claudin-1)의 발현 수준을 확인하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0039] 상기 STAT-3의 발현이 유도되면, 이는 상기 CLDN-1의 발현을 억제할 수 있다. 상기 CLDN-1은 아토피성 피부염 발병에 보다 직접적으로 관여하는 단백질로, 이의 발현률이 낮으면 아토피성 피부염이 발병하거나 발병 가능성이 높은 것을 의미한다.

[0040] 즉, 상기 (d) 단계에서 CLDN-1의 발현 수준을 확인하고 상기 (c) 단계와 같이 아토피성 피부염 모델(IL-33 처리 모델)의 발현 수준과 비교함으로써, 상기 (c) 단계만을 수행하는 경우에 비해 보다 정밀한 치료제 후보물질의 스크리닝을 구현할 수 있다.

[0041] 상기 STAT-3가 CLDN-1 프로모터의 특정 결합 부위에 특이적으로 결합하는 것에 의해 상기 CLDN-1의 발현을 억제할 수 있다. 상기 CLDN-1 프로모터는 STAT-3, HIF-α, NF-kB, 및 CREB 결합 부위를 내부에 가지며, 상기 STAT-3 결합 부위에 STAT-3 단백질이 결합하면 그 외 전사조절인자의 결합을 억제할 수 있고, 결과적으로 CLDN-1 단백질 내지 이를 암호화하는 유전자의 발현을 억제할 수 있다.

[0042] 상기 아토피성 피부염 치료제 후보물질은 상기 IL-33의 활성을 억제하여 STAT-3 발현을 억제하거나, 상기 STAT-3가 CLDN-1 프로모터에 결합하는 것을 억제함으로써 CLDN-1의 발현을 촉진할 수도 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 이 때, 상기 치료제 후보물질은 IL-33이나 STAT-3에 특이적으로 결합하는 항체(antibody) 또는 앱타머(aptamer)일 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 용어 "항체(antibody)"는 경쇄 및 중쇄의 가변영역을 통해 다른 분자(항원)에 결합하는 단백질을 일컫는 것으로, IgG, IgD, IgA 및 IgE 유래를 포함한다.

[0045] 또한, 상기 항체는 다양한 형태의 구조를 갖는 단클론 항체를 포함하는 것으로, 예를 들면, 두 개의 전장 중쇄 및 두 개의 전장 경쇄를 포함하는 온전한 항체(intact Ab)는 물론 불변영역을 포함하거나 또는 포함하지 않는 이의 단편, 키메라 항체, 인간화항체, 또는 본원에 따른 특징을 갖는 기타 유전공학적으로 변형된 항체일 수 있다.

[0046] 온전한 항체 또는 그 단편을 포함하는 상기 항체는 단량체의 항원 결합능의 적어도 일부를 포함하는 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 등의 다량체로 존재할 수 있다. 이러한 다량체는 또한 동종다량체, 또는 이종다량체를 포함할 수 있다. 항체 다량체는 다수의 항원 결합 부위를 포함하기 때문에 단량체와 비교하여 항원에 대한 결합능이 우수하다. 항체의 다량체는 또한 다기능성(bifunctional, trifunctional, tetrafunctional) 항체 제작에도 용이하다.

[0047] 상기 항체는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다(Scheving, L.A. et al., American Journal of Physiology, 306:G370-81, 2014; Kaufmann, A. et al., J. Cell. Biochem. 114:681-69, 2013; Herndon, CA. et al., Cell Res, 319:718-730, 2013; Lacoste, B. et al., Journal of Neuroinflammation, 10:57,

2013; del Blanco, B. et al., J. Immunol, 188:3278-3293, 2012).

[0048] IL-33 또는 STAT-3에 대한 상기 항체의 결합 친화도는 항원 결합 부위가 유래된 모 항체만큼 강할 필요는 없지만, 항원에 결합하는 능력은 항원에 대한 항체 결합의 평가에 대해 공지된 다양한 방법 중 어느 하나를 이용하여 측정가능해야 한다.

[0049] 또한, 다가 항체의 항원 결합 부위 각각의 항원 결합 친화도가 정량적으로 동일할 필요는 없다. 다량체 항체의 경우, 기능적 항원 결합 부위의 수는 초원심분리 분석을 이용하여 평가할 수 있다. 이러한 분석 방법에 따라, 다량체 항체에 대한 표적 항원의 상이한 비를 조합하고, 기능적 결합 부위의 상이한 수를 추정하여 복합체의 평균 분자량을 계산한다. 이러한 이론적 값을 기능적 결합 부위의 수를 평가하기 위해 수득된 실제 실험값과 비교한다.

[0050] 상기 항체는 당업계에 공지된 다양한 분석법에 의해 그의 물리적/화학적 특성 및 생물학적 기능에 대해 특성화될 수 있다. 정제된 IL-33 또는 STAT-3에 대한 항체는 N-말단 서열분석, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 질량 분광측정법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파파인 소화를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 그 외의 검정에 의해 추가로 특성화될 수 있다.

[0051] 한편, 특정물질과 결합하는 핵산을 선별하는 방법을 셀렉스(SELEX, Systematic Evolution of Ligand by Exponential enrichment)라 하고, 이렇게 선별된 산물인 핵산을 일반적으로 앱타머(aptamer)라고 한다(Craig et al., Science, 249:505-510, 1990). 상기 SELEX법을 통하여 자연 상태에서 핵산과 결합할 수 있는 단백질뿐만 아니라 핵산과 결합하고 있지 않은 단백질을 비롯한 여러 생체분자와도 매우 높은 친화력으로 결합할 수 있는 분자들이 선별되고 있다.

[0052] 상기 IL-33 또는 STAT-3에 특이적으로 결합하는 앱타머는 당해 기술 분야에 공지된 기술인 SELEX 표준방법(Bock LC et al., Nature, 355:564-6, 1992)에 의해 제조될 수 있다(Mannironi et al., Biochemistry 36:9726, 1997; Ellington and Szostak et al., Nature, 346:818, 1990; Tuerk and Gold, et al., Science 249:505, WO 00/20040, WO 99/54506, WO 99/27133, WO 97/42317). 따라서 실시예에 기재되지 않아도 공지기술을 이용하여 IL-33 또는 STAT-3에 대한 앱타머는 당업자가 용이하게 제조할 수 있다.

[0053] 상기 앱타머의 결합 정도를 측정하는 단계는 관련 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 DNA 앱타머 결합 측정 기술을 이용하여 수행될 수 있으며, 예를 들어, 앱타머 말단에 형광 또는 방사성 물질을 표지하거나 비오틴을 결합시켜 형광 또는 방사성 세기를 측정하거나, 이미지화하여 관찰하는 방법 등을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 한편, 본 발명의 다른 일 측면은 상기 스크리닝 방법을 이용하는, 아토피성 피부염 치료제 선별 키트를 제공한다. 상기 선별 키트는 상기 STAT-3 및/또는 CLDN-1의 발현 수준을 정량할 수 있는 수단을 포함할 수 있고, 이는 면역염색 등과 같은 공지의 수단일 수 있다. 구체적인 스크리닝, 선별 기전에 관해서는 전술한 것과 같다.

[0055] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 스크리닝 방법에 따라 선별된 아토피성 피부염 치료제를 제공한다. 상기 아토피성 피부염 치료제는 전술한 아토피성 피부염 치료제 후보물질 중 STAT-3을 억제 효능 또는 CLDN-1의 발현 유도 효능이 우수한 물질일 수 있다.

[0056] 특히, 상기 아토피성 피부염 치료제는 CLDN-1 프로모터에 특이적으로 결합하여 CLDN-1의 발현을 억제하는 다른 조절 인자들의 활성을 억제함으로써 상기 CLDN-1의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 기전에 관해서는 전술한 것과 같다.

[0058] 이하, 본 발명의 실시예에 관하여 더욱 상세히 설명하기로 한다.

[0060] **[실시예 1] IL-33에 의해 CLDN1의 발현 감소 확인**

[0061] NHEKs를 Ca^{2+} 처리한 후 48시간 배양한 뒤 IL-33을 처리한 후 목표하는 시간까지 배양하였다. TRIzol Reagent를 이용하여 RNA를 추출하였다. RNA lug을 이용해 cDNA를 합성하였고, 다음 primer를 이용해 real-time PCR을 수행하였다. real-time PCR은 CFX Manager™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0062] CLDN1 : sense 5-GCT TCT CTC TGC CTT CTG GG-3′ ; antisense 5-TCA CAC GTA GTC TTT CCC GC-3β-actin :

sense 5-ACA GGA AGT CCC TTG CCA TC-3; antisense 5-AGG GAG ACC AAA AGC CTT CA-3. IL-33에 의한 다양한 밀착 연접 단백질(Tight juction protein)의 발현을 평가한 결과, CLDN1 발현의 감소를 확인하였고, 이러한 결과를 토대로 IL-33을 0, 1, 10, 100ng/ml의 농도로 처리한 결과 IL-33 농도 의존적으로 CLDN1의 mRNA 발현이 감소됨을 확인하였다(도 1).

[0064] IL-33이 처리된 NHEKs를 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1% NP40, 0.5% sodium deoxychlolate, 10 mM glycerophosphate, 0.1 mM orthovanadate, protease inhibitor가 포함된 lysis buffer로 30분간 lysis시킨 후 13000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. BCA method를 이용해 단백질 정량을 시행하였다. 단백질을 10~15% SDS-PAGE로 분리한 후 wet blotting 방법으로 Polyvinylidene difluoride membrane으로 이동시켰다. 5% skim milk로 blocking 시킨 membrane에 CLDN1, β-actin 등 다양한 target antibody로 확인하였다. NHEKs를 Ca^{2+} 처리된 fasting 배지에서 48시간 배양 후 IL-33 0, 1, 10,100ng/ml의 농도로 처리한 결과, 농도 의존적으로 CLDN1의 protein 발현이 감소됨을 확인하였다(그림2.A). 또한, IL-33을 처리한 후 16-24시간이 지났을 때 CLDN1의 protein 발현이 최대 감소되는 것을 확인하였다(도 2.B).

[0066] **[실시예 2] IL-33에 의한 CLDN1 발현 감소의 확인을 위한** Immunofluorescence 분석

[0067] NHEKs에 IL-33을 처리하고 CLDN1 항체를 이용하여 염색한 후, fluorophore-conjugated 2차 항체 및 DAPI를 이용해 면역형광염색을 수행하였으며, 이후에 형광현미경을 이용하여 결과를 분석하였다.

[0068] NHEKs를 Ca^{2+} 처리된 fasting 배지에서 48시간 배양한 후 IL-33을 0, 1, 10,100ng/ml의 농도로 처리하였다. 이후 면역염색을 실시한 후 형광현미경을 이용하여 분석한 결과, 100ng/ml 농도의 IL-33을 처리하였을 때 CLDN1의 발현이 감소됨을 확인하였다(도 3). 이러한 결과들은 상기 western blot 결과들과 동일함을 알 수 있다.

[0070] **[실시예 3] IL-33에 의한 CLDN1 promoter luciferase 활성 조절**

[0071] IL-33에 의한 CLDN1 발현 감소를 확인하기 위해 CLDN1의 promoter를 클로닝한 후 실험에 사용하였다. NHEKs에 클로닝한 CLDN1 promoter 500ng을 형질도입한 후 IL-33을 처리한 결과, IL-33에 의해 CLDN1의 luciferase 활성이 감소됨을 확인하였다(도 4). 이러한 결과들은 IL-33에 의한 CLDN1의 전사 수준의 조절을 의미한다.

[0073] **[실시예 4] 3D skin model에서 IL-33에 의한 CLDN1의 발현 감소 확인 분석**

[0074] NHEKs로 이루어진 3차원 인공피부모델(human skin equivalent model)에 IL-33을 처리한 후, 24시간 후에 4% paraformaldehyde으로 고정시키고 파라핀에 넣어 블록을 만든 뒤 CLDN1 항체를 이용하여 조직화학염색과 면역형광염색 실험 수행 후, 광학현미경과 Confocal microscopy를 이용하여 분석한 결과, CLDN1이 IL-33에 의해 발현이 감소됨을 확인하였다(도 5 A, B).

[0076] **[실시예 5] IL-33에 의해 유도된 STAT-3에 의한 CLDN1 분자의 조절 가능성** 확인

[0077] Genomatix의 matrix-inspector를 이용하여 CLDN1 promoter에 결합하는 전사인자를 분석하였다(도 6).

[0078] IL-33에 의해 유도된 STAT-3에 의해 CLDN1 분자의 조절가능성을 확인하기 위하여 bioinformatics를 이용한 CLDN1 유전자의 promoter에 STAT-3 결합부위 (5'-TTC(N)2-4GAA-3', 5'-TT(N)4-6AA-3')가 존재하는지 확인하였다.

[0079] CLDN1 promoter에 STAT-3 결합자리가 각각 4군데 존재하고 있음을 확인하였으며 이러한 결과는 IL-33에 의해 유도된 STAT-3의 발현증가는 CLDN1의 발현을 감소시킬 수 있는 가능성을 제시한다.

[0080] 최근 연구에 따르면 아토피 피부염의 중요인자인 TSLP에 의해 STAT-3의 발현이 증가되어있고, 그로 인해 피부장벽의 주요 구조물인 Fiaggrin이 감소되어 있음이 보고되고 있지만, 이러한 STAT-3의 증가에 의한 아토피 피부염에서의 Tight Junction의 발현과 기능이 보고된 바가 없다. 따라서 본 발명은 STAT-3에 의한 CLDN1의 조절기전

을 규명하고자 한다.

[0081] 아토피에서 CLDN1의 발현 조절 기전을 규명하기 위해서 promoter부위를 분석하고 가상조절기전을 확립하였다(도 6).

[0083] **[실시예 6] IL-33에 의한 STAT-3 전사조절인자의 발현 확인**

[0084] NHEKs를 Ca^{2+}처리한 후 48시간 배양한 다음, 100ng/ml의 농도로 IL-33을 처리한 결과 phosphorylated STAT-3의 발현이 증가됨을 확인하였다. 또한 분석 프로그램을 통해 CLDN1 promoter에 결합할 것으로 예상되었던 다른 CREB, IkBα, Hif-1α와 같은 전사인자들은 크게 발현이 유도되지 않는 것을 확인하였다. 이를 통해 IL-33에 의한 STAT-3 활성화가 CLDN1 발현 감소에 영향을 주는 조절인자로서의 가능성을 제시한다(도 7).

[0085] NHEKs를 배양 후 IL-33 0, 1, 10,100ng/ml의 농도로 처리한 결과, p-STAT3의 protein 발현이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다. 또한, IL-33을 처리한 후 8시간이후 p-STAT3의 protein 발현이 증가되는 것을 확인하였다(도 8).

[0087] **[실시예 7] IL-33에 의한 STAT-3 의존적 CLDN1 발현 조절**

[0088] NHEKs를 Ca^{2+} 처리 후 48시간 배양한 다음, Constitutively activated STAT3를 형질도입시킨 조건에서 CLDN1의 luciferase 활성 감소를 확인하였으며, 또한 Western blot을 통해 CLDN1의 protein 발현이 STAT-3 의존적임을 확인하였다(도 9).

[0089] IL-33에 의한 CLDN1 의 감소에 STAT-3 의존성을 확인하기 위하여, NHEKs를 Ca^{2+} 처리 후 48시간 배양한 뒤, STAT-3 inhibitor를 처리하여 확인한 결과, CLDN1의 현저한 증가를 Western blot과 Immunofluorescence를 통해 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 IL-33에 의한 CLDN1 분자의 발현 감소가 STAT-3 의존적일 가능성을 제시한다(도 10).

[0090] 또한, IL-33에 의한 CLDN1 의 감소에 STAT-3 의존성을 확인하기 위하여, NHEKs를 Ca^{2+} 처리 후 48시간 배양 한 뒤, STAT-3 siRNA를 처리하여 확인한 결과, IL-33을 처리하였을 때 CLDN1의 발현이 감소되지만 STAT-3 siRNA와 병영 처리 시 CLDN1의 발현이 복원됨을 Westen blot을 통해 확인할 수 있다(도 11).

[0092] **[실시예 8] *In vivo*에서 IL-33 에 의한 피부 기능적 변화 분석**

[0093] IL-33에 의한 피부의 기능적 변화를 분석하기 위해 8주령 BALB/C mouse를 오리엔트바이오로부터 구입함. BALB/C의 복부 피하조직에 IL-33 500ng을 주입하고, 대조군 마우스에는 PBS를 1주일 동안 주입 후에 피부조직의 경피수분손실 Transepidermal water loss (TEWL)과 epidermis의 두께를 측정하였다. TEWL 측정시 온도 23, 습도 49%로 일정하게 측정되었다. IL-33을 주입한 mouse 실험군에서 경피수분손실이 증가한 것으로 확인되었으며, 이러한 결과는 IL-33에 의한 CLDN1 발현 감소가 피부장벽 기능의 소실과 연관되어 있을 것으로 판단된다.

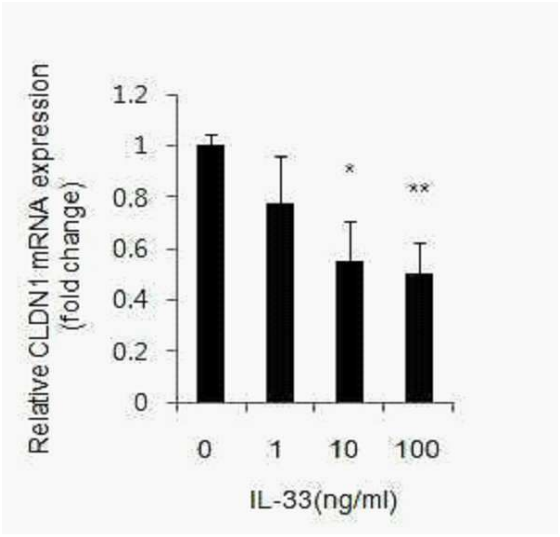
[0094] 또한, mouse의 피부조직을 생검 후에 4% paraformaldehyde으로 고정시키고 파라핀에 넣어 블록을 만든 후 조직화학염색 실험을 수행한 후 분석한 결과, IL-33을 주입하였을 때 AD에서의 대표적 피부양상인 표피과다형성(epidermal hyperplasia)를 확인할 수 있었다(도 12).

[0096] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

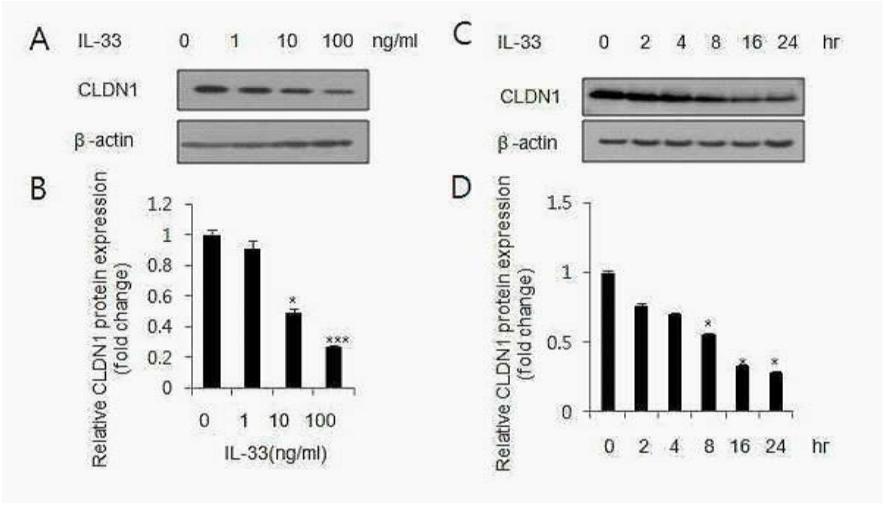
[0097] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

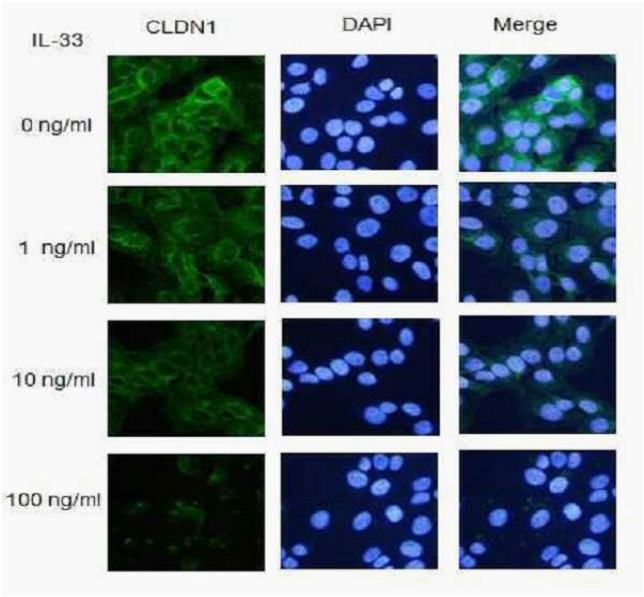
도면1


Relative CLDN1 mRNA expression
(fold change)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
**
0
1
10
100
IL-33(ng/ml)

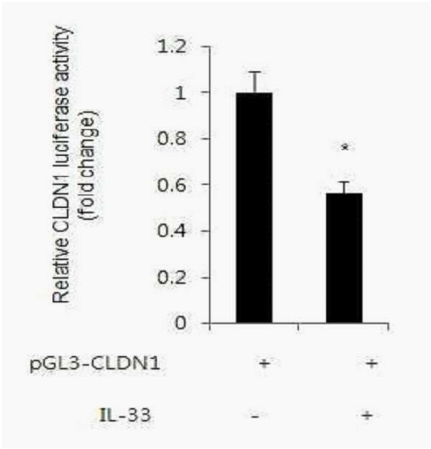
도면2


A
IL-33
0
1
10
100
ng/ml
CLDN1
β-actin
B
Relative CLDN1 protein expression
(fold change)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
***
0
1
10
100
IL-33(ng/ml)
C
IL-33
0
2
4
8
16
24
hr
CLDN1
β-actin
D
Relative CLDN1 protein expression
(fold change)
1.5
1
0.5
0
*
*
*
0
2
4
8
16
24
hr

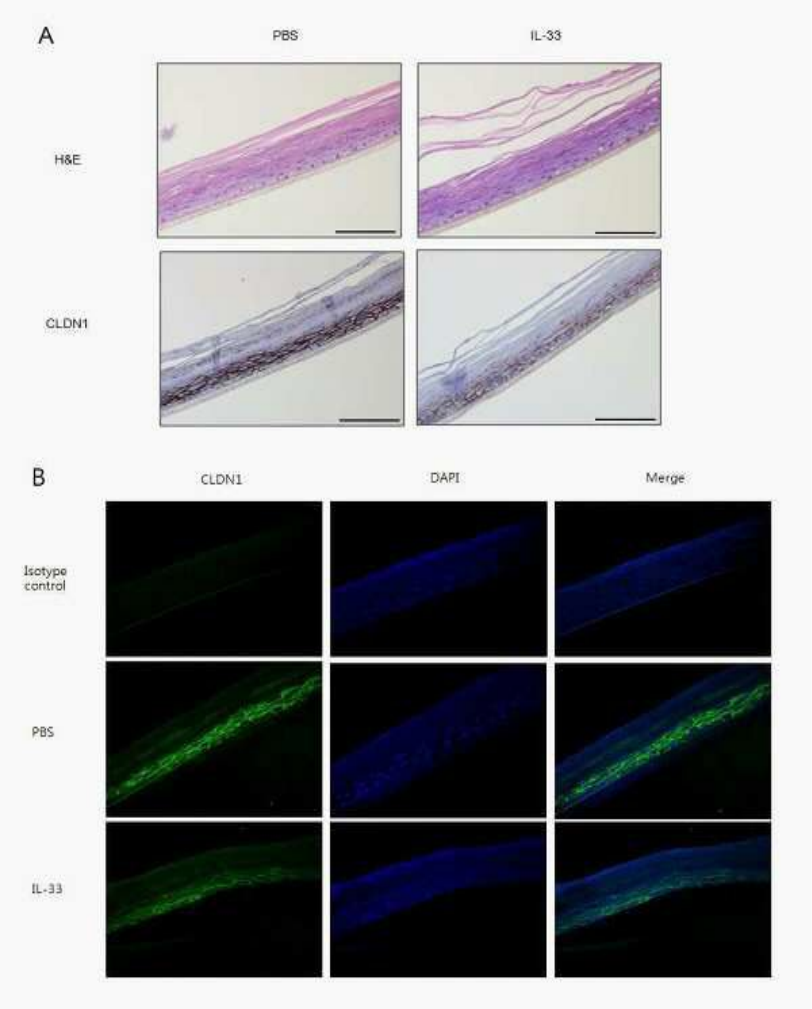
도면3


IL-33
CLDN1
DAPI
Merge
0 ng/ml
1 ng/ml
10 ng/ml
100 ng/ml

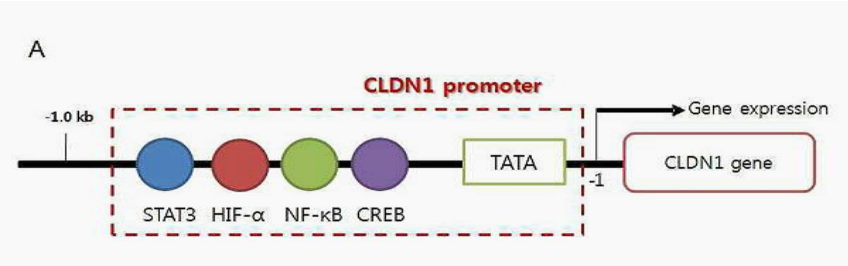
도면4


Relative CLDN1 luciferase activity
(fold change)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
pGL3-CLDN1
+
+
IL-33
-
+

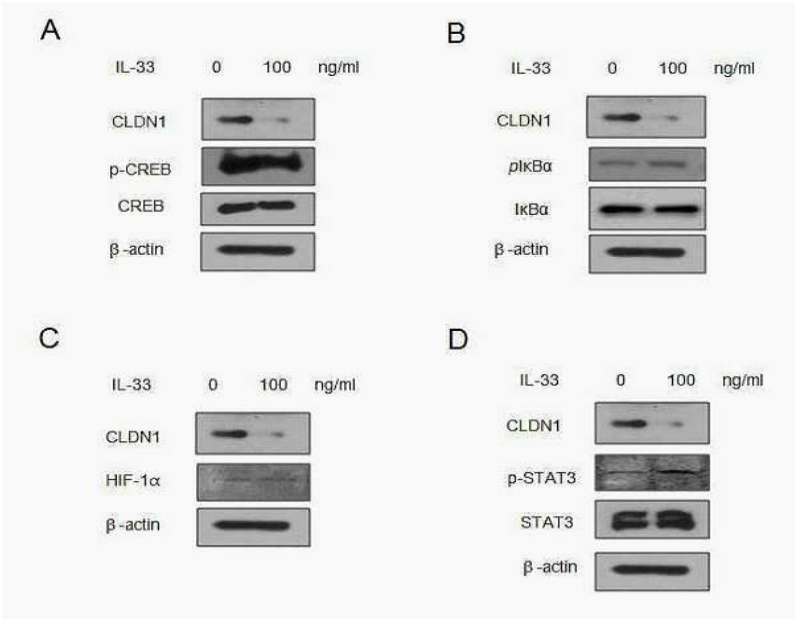
도면5


A
PBS
IL-33
H&E
CLDN1
B
CLDN1
DAPI
Merge
Isotype control
PBS
IL-33

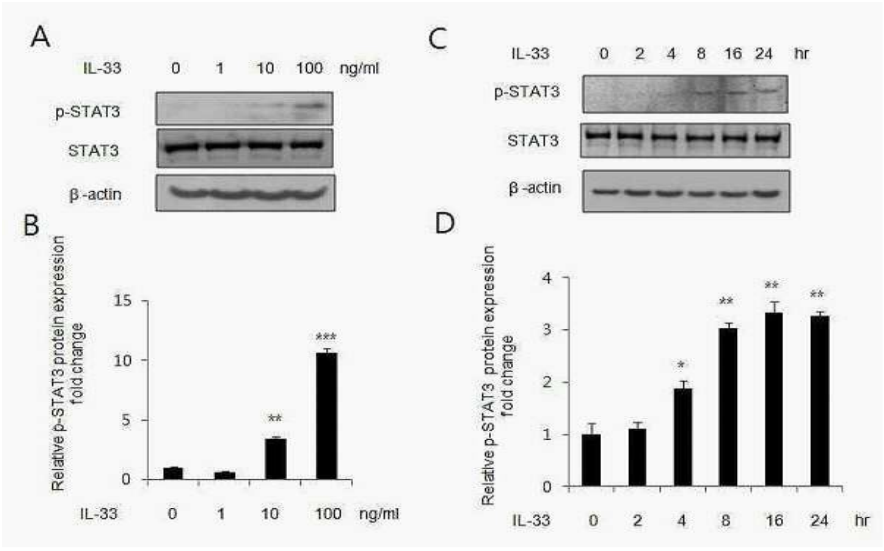
도면6


A
CLDN1 promoter
-1.0 kb
Gene expression
TATA
-1
CLDN1 gene
STAT3
HIF-α
NF-κB
CREB

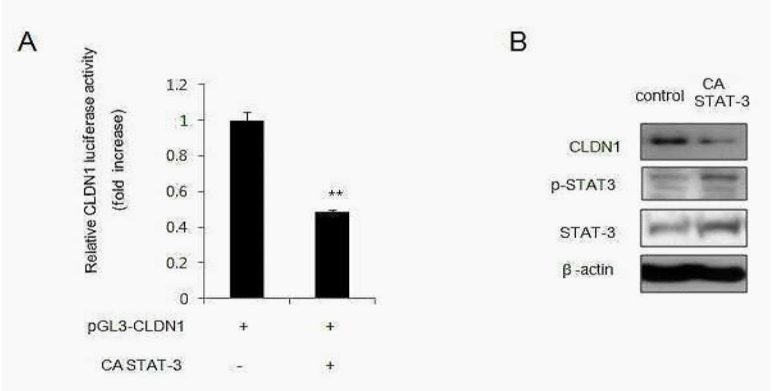
도면7


A
IL-33 0 100 ng/ml
CLDN1
p-CREB
CREB
β-actin
B
IL-33 0 100 ng/ml
CLDN1
pIκBα
IκBα
β-actin
C
IL-33 0 100 ng/ml
CLDN1
HIF-1α
β-actin
D
IL-33 0 100 ng/ml
CLDN1
p-STAT3
STAT3
β-actin

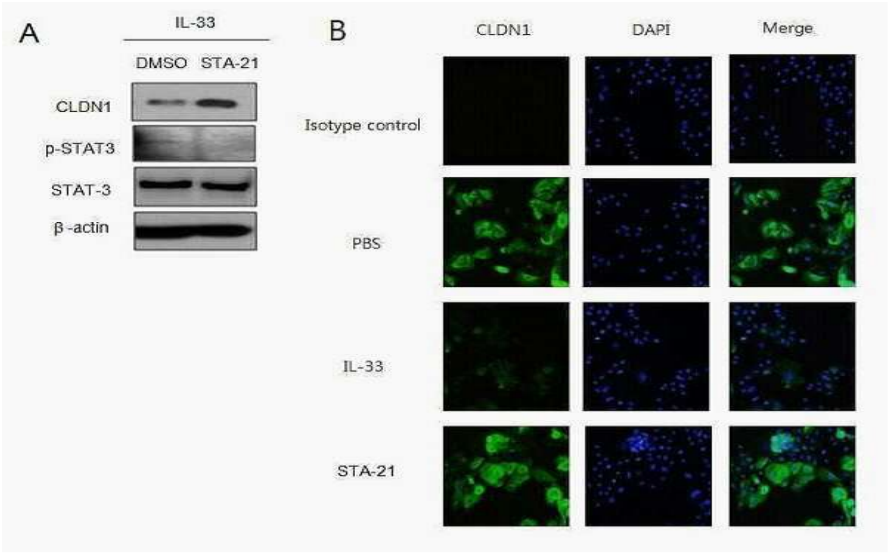
도면8


A
IL-33 0 1 10 100 ng/ml
p-STAT3
STAT3
β-actin
B
Relative p-STAT3 protein expression fold change
IL-33 0 1 10 100 ng/ml
C
IL-33 0 2 4 8 16 24 hr
p-STAT3
STAT3
β-actin
D
Relative p-STAT3 protein expression fold change
IL-33 0 2 4 8 16 24 hr

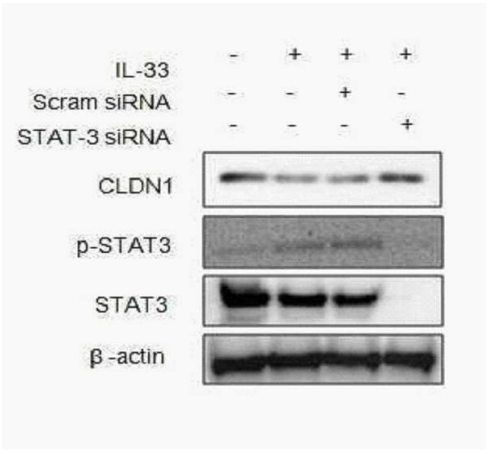
도면9


A
Relative CLDN1 luciferase activity (fold increase)
pGL3-CLDN1 + +
CA STAT-3 - +
B
control
CA STAT-3
CLDN1
p-STAT3
STAT-3
β-actin

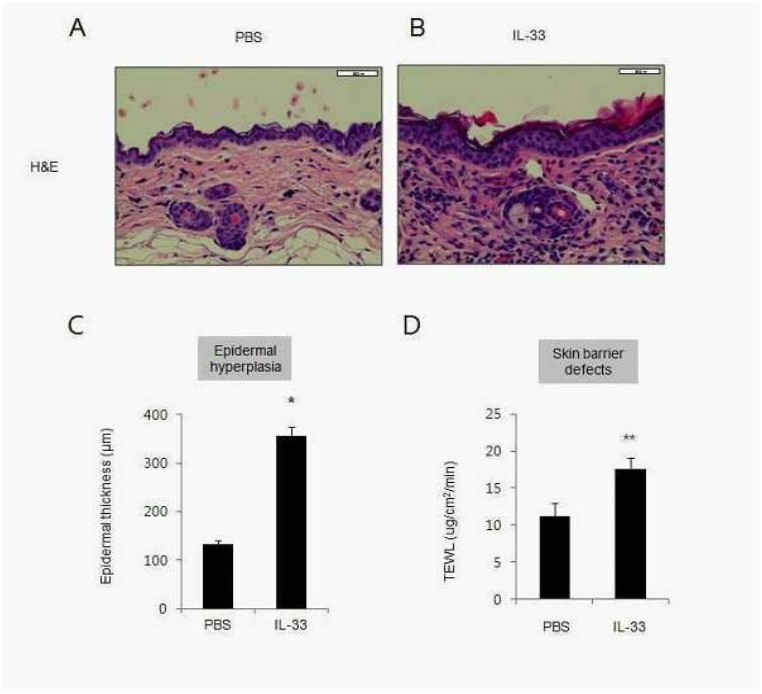
도면10


A
IL-33
DMSO
STA-21
CLDN1
p-STAT3
STAT-3
β-actin
B
CLDN1
DAPI
Merge
Isotype control
PBS
IL-33
STA-21

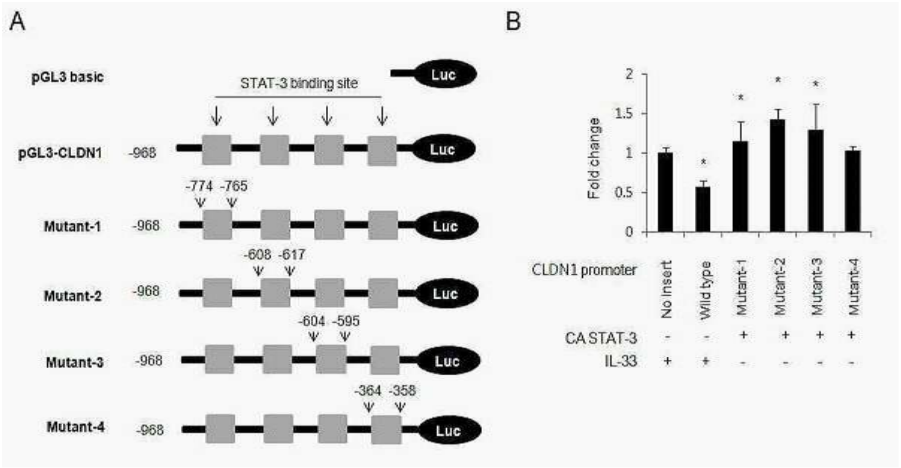
도면11


IL-33
Scram siRNA
STAT-3 siRNA
CLDN1
p-STAT3
STAT3
β-actin

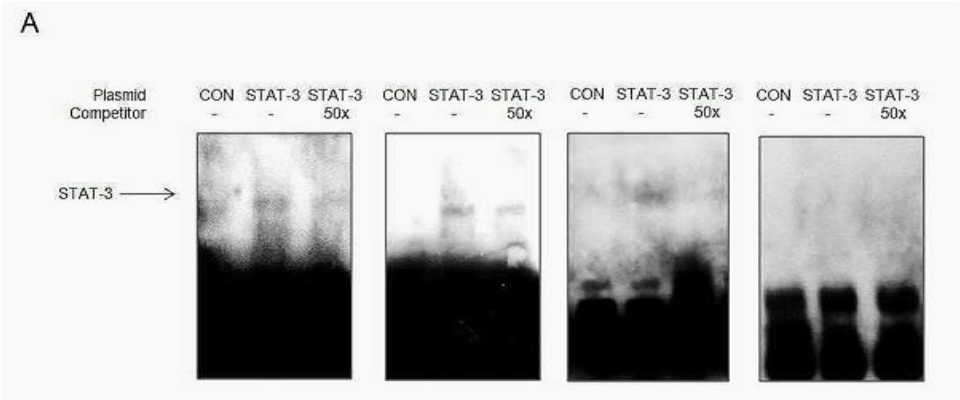
도면12



도면13



도면14



도면15

