(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025 년 5 월 8 일 (08.05.2025)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2025/095250 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 38/17 (2006.01) *A23L 33/17* (2016.01)
A61P 17/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/005307

(22) 국제출원일: 2024 년 4 월 19 일 (19.04.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0148524 2023 년 10 월 31 일 (31.10.2023) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (KR).

(72) 발명자: 황은숙 (**HWANG, Eun Sook**); 03760 서울특별시 서대문구 이화여대길 52, C-206 (KR).

(74) 대리인: 리앤목 특허법인 (**Y.P.LEE, MOCK & PARTNERS**); 06292 서울특별시 강남구 언주로 30길 13 대림아크로텔 12층 (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

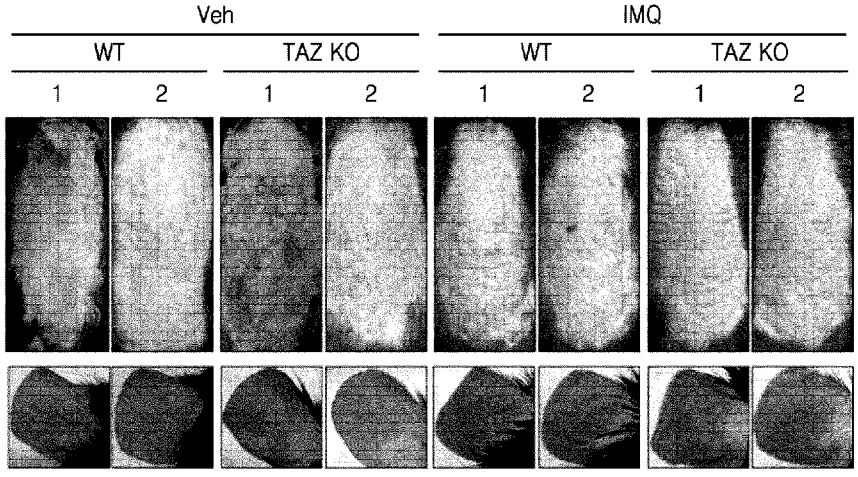
— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING INFLAMMATORY SKIN DISEASES COMPRISING TAZ OR AGONIST THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: TAZ 또는 이의 작용제를 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating inflammatory skin diseases, comprising transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) or an agonist thereof as an active ingredient. The composition of the present invention can efficiently ameliorate skin inflammatory diseases, including psoriasis, by controlling the stability of TCTP, and thus can be widely used in related industrial fields.

(57) 요약서: 본 발명은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 또는 이의 작용제(agonist)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 TCTP의 안정성을 조절함으로써, 건선을 비롯한 피부염증성 질환을 효율적으로 개선할 수 있는 바, 관련 산업분야에서 폭넓게 활용될 수 있다.

WO 2025/095250 A1

명세서

발명의 명칭: TAZ 또는 이의 작용제를 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 출원은 2023년 10월 31일 출원된 대한민국 특허출원 제10-2023-0148524호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

[2] TAZ 또는 이의 작용제를 유효성분으로 포함하는 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[3] 건선(Psoriasis)을 비롯한 염증성 피부질환은 유전적, 환경적, 면역학적인 원인에 의해 발생하고, 피부 가장 바깥에서 보호벽 역할을 하는 각질층에 이상이 생긴 것으로 건조한 기후에서 더욱 심해지는 질환이다. 이들의 주요 증상은 심한 가려움증, 피부건조, 발진, 진물, 부스럼딱지, 비늘 같은 껍질이 있는 피부(인비늘) 등으로 주로 만성 피부염증이 동반된다. 가려움에 의한 환자의 긁는 행동으로 인해서 피부장벽이 붕괴되고 2차 감염을 유발하여 염증이 더욱 악화될 수 있다.

[4] 건선은 단순히 피부에만 영향을 주는 것이 아니라, 광범위한 전신성 염증 면역반응을 수반하고 있어 다양한 장기와 기관에서의 염증 반응을 유발하여 기능에 장해를 일으킬 수 있다. 이러한 건선을 치료하기 위한 위해 수많은 연구 개발이 진행되고 있으나(국내공개특허: 2021-0154983), 이러한 연구는 단순히 피부에 나타나는 건선의 증상에 집중하는 것이 대부분이다. 따라서, 건선의 이러한 광범위한 전신성 염증을 제어할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[5] 일 양상은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 또는 이의 작용제(agonist)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[6] 다른 양상은 하기 단계를 포함하는 염증성 피부질환 치료제의 스크리닝 방법: (a) In vitro 상에서 세포에 후보 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보 물질 처리 후 TCTP의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해 TCTP의 발현 수준을 감소시키는 물질을 염증성 피부질환 치료제로 결정하는 단계를 제공하는 것이다.

[7] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[8] 일 양상은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 또는 이의 작용제(agonist)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부질환 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[9] 상기 본 명세서에서 용어, "TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)"는 14-3-3 단백질과 상호작용하는 세포 단백질로 동정된 바 있으며, WWTR1으로도 명명될 수 있다. TAZ는 또한 근육 세포 내 인슐린수용체 물질(the insulin receptor substrate: IRS)과 근육세포-특이적인 상호작용을 수행하여, 포도당 항상성 조절에 활용될 수 있다. 따라서, 상기 TAZ는 TAZ 유전자에 의해 암호화된 단백질일 수 있다.

[10] 상기 TAZ 단백질을 코딩하는 유전자의 서열은, 사람의 경우 GeneBank Accession No. NM_000116.5, NM_001303465.1, NM_181311.3, NM_181312.3, 또는 NM_181313.3, 마우스의 경우, NM_001173547.2, NM_001242615.2, NM_001242616.2, NM_001290738.1, 또는 NM_181516.6로부터 수득되는 서열일수 있다. 상기 TAZ 단백질의 아미노산 서열은 GeneBank Accession No. NP_001161753, NP_001161753, NP_001335291.1, NP_000107.1, NP_001290394.1, NP_851828.1, NP_851829.1, 또는 NP_851830.1로부터 수득되는 아미노산 서열일 수 있다. 상기 핵산 서열 또는 아미노산 서열과 일부 핵산 서열 또는 아미노산 서열이 일치하지 않더라도, 생물학적으로 동등한 활성을 갖는 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 TAZ의 mRNA 또는 단백질로 간주될 수 있다.

[11] 상기 TAZ는 TAZ 유전자를 의미할 수 있고, 그 외에도 TAZ 유전자가 암호화하는 폴리펩티드를 의미하는 것일 수 있다.

[12] 상기 약학적 조성물은 TAZ 유전자, TAZ 단백질 또는 TAZ 작용제 외에 본 약학적 조성물이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 포함할 수 있다.

[13] 또한, 상기 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 외에 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[14] 예를 들어, 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등을 사용할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다.

[15] 상기 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 에어로졸 제형, 주사용 제형이 있을 수 있다.

[16] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 유효 성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면,

전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에도 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[17] 경구투여를 위한 액상제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[18] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니며, 일 양상에 따른 약학적 조성물은 당해 기술분야의 공지된 방법이라면 제한 없이 사용하여 목적에 맞게 제제화할 수 있다.

[19] 상기 약학적 조성물의 유효 투여량은 환자의 나이, 성별 체중에 따라 달라질 수 있으나 0.0001 내지 100mg/kg으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[20] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있으며, 0.0001 내지 100mg/kg으로 투여할 수 있고, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[21] 다른 양상은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 또는 이의 작용제(agonist)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[22] 일 양상에 따른 염증성 피부질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 있어서, 상기 TAZ 또는 이의 작용제를 건강기능식품의 첨가물로 사용하는 경우 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.

[23] 건강기능식품의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.

[24] 상기 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸콜렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.

[25] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 상기 TAZ 또는 이의 작용제를 첨가하는 경우 섭취에 적절한 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 보다 낮은 수

준으로 첨가할 수 있으며, 또한 본 발명은 천연물로부터의 분획물을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[26] 일 양상에 따른 건강기능식품 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명에 따른 음료 100 mL당 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g일 수 있다.

[27] 상기 외에 일 양상에 따른 염증성 피부질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 수면 개선용 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 대비 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[28] 또 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 피부질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

[29] 상기 개체는 인간을 제외한 포유동물일 수 있고, 바람직하게는 침팬지, 고릴라, 원숭이, 개, 고양이, 소 또는 쥐일 수 있다.

[30] 또 다른 양상은 상기 약학적 조성물의 염증성 피부질환 치료 용도를 제공하는 것이다.

[31] 또 다른 양상은 하기 단계를 포함하는 염증성 피부질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[32] (a) In vitro 상에서 세포에 후보 물질을 처리하는 단계;

[33] (b) 상기 후보 물질 처리 후 TCTP의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[34] (c) 후보물질 비처리군에 비해 TCTP의 발현 수준을 감소시키는 물질을 염증성 피부질환 치료제로 결정하는 단계.

[35] 상기 (b) 단계의 발현 수준은 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학분석법(immunohistochemical analysis), RealTime-PCR, qRT-PCR, 웨스턴 블롯(Western Blotting), 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것이 바람직하나, 당업자에게 알려진 단백질 발현 정도를 측정하는 방법이면 제한없이 사용할 수 있다.

[36] 또한, 상기 (b) 상기 후보 물질 처리 후 TCTP의 발현 수준을 측정하는 단계는 측정하는 타겟 장기가 한정되지 않으나, 비장에서 TCTP의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[37] 본 발명은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 또는 이의 작용제(agonist)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 TCTP의 안정성을 조절함으로써, 건선을 비롯한 피부염증성 질환을 효율적으로 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[38] 도 1은 TAZ 단백질의 구조를 나타낸 도이다.

[39] 도 2는 건선 발생된 피부의 병리학을 나타낸 도이다.

[40] 도 3은 마우스에 건선을 유발시키는 전략 및 이에 따라 건선이 유발된 마우스의 체중 변화를 나타낸 도이다.

[41] 도 4는 건선 유발 실험에 사용된 마우스 그룹의 귀 및 등의 피부의 염증 상태를 확인한 도이다.

[42] 도 5는 건선 유발 실험에 사용된 마우스 그룹의 등 및 귀의 상태를 촬영한 도이다.

[43] 도 6은 건선 유발 실험에 사용된 마우스 그룹의 등 및 귀 피부조직을 H&E (헤마톡실린 및 에오신), Trichrome (콜라겐), 및 Sirius red (콜라겐) 염색한 다음 관찰한 결과이다.

[44] 도 7은 건선 유발 실험에 사용된 마우스 그룹에서 흉선을 채취한 다음 촬영 및 무게 분석, 그리고 유세포 분석을 수행하여 T 세포의 정상적 분화 성숙 특징을 확인한 도이다.

[45] 도 8은 건선 유발 실험에 사용된 마우스 그룹의 비장을 채취하여 촬영하고 비장 및 림프절의 총 세포수 증가를 확인한 도이다.

[46] 도 9는 건선 유발 실험에 사용된 마우스 그룹의 비장 및 림프절을 채취한 다음, CD3으로 염색하고 T 세포의 변화를 유세포 분석을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

[47] 도 10은 건선 유발 실험에 사용된 마우스 그룹의 비장 단백질 및 혈중 단백질을 채취하여 TCTP 단백질의 발현을 확인한 도이다.

[48] 도 11은 건선 유발 실험에 사용된 마우스 그룹의 등 및 귀 피부 조직에서 TCTP 단백질 변화를 확인한도이다.

[49] 도 12는 대조군(WT), TAZ KO군(TAZ KO) 마우스 그룹의 비장 세포에서 LPS 자극에 따른 TCTP 발현세포를 유세포측정법으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

[50] 도 13은 대조군(WT), TAZ KO군(TAZ KO) 마우스 그룹의 비장 세포에 LPS, CHX 및 MG132를 처리한 다음, 면역블롯을 수행하여 TCTP 발현 변화를 확인한 도이다.

[51] 도 14는 대조군(WT), TAZ KO군(TAZ KO), TAZ를 재도입한 KO (KO/T) MEF 세포를 확보하여면역형광실험,면역블롯, 및 유세포 분석법을 수행하여 TCTP 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[52] 도 15a는 상기 MEF 세포에 CHX를 처리한 다음, TCTP 단백질 변화를 촬영한 도이다.

[53] 도 15b는 상기 MEF 세포에 CHX를 처리한 다음, TCTP 단백질 변화 수준을 정량화한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[54] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[55] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 다른 경우를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 경우 “포함한다(comprise, include)”및/또는 “포함하는(comprising, including)”은 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 하나 이상의 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.

[56]

[57] 실시예

[58] **실시예 1. 실험 및 재료 준비**

[59] 1-1. 항체

[60] 실험에 사용된 항체는 Abcam (Cambridge, MA, USA), Santa Cruz Biotecnology (Dallase, TX, USA), Cell signaling, Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), BioLegend (San Diego, CA, USA) 및 BD Biosciences (NJ, USA)에서 구매하였다. 실험에 사용한 구체적인 항체의 목록은 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

[61] [표1]

Antibody	catalog	company	application	dilution factor/ conc
TAZ	560235	BD Pharmingen	IF	1:100
TCTP	ab37506	Abcam	IB, IF, IHC, FACS	1:500 ~ 1:3000
b-actin	sc-47778	Santa Cruz	IB	1:1000
Alexa Fluor™488, Goat anti-Rat IgG (H+L)	A11006	Invitrogen	IHC	1:500
Alexa Fluor™488,	A11008	Invitrogen	IHC , FACS	1:500

Goat anti-rabbit IgG (H+L)				
Alexa Fluor™647, Goat anti-mouse IgG (H+L)	A21235	Invitrogen	IHC	1:500
APC Rat IgG1, κ Isotype Ctrl	400412	Biolegend	FACS	1:500
APC anti-mouse CD25 Antibody	102012	Biolegend	FACS	1:500
FITC Mouse IgG1, κIsotype Control	550616	BD Pharmingen	FACS	1:500
FITC anti-mouse/human CD45R/B220	103206	Biolegend	FACS	0.5
PE Hamster Anti-Mouse CD3e	553064	BD Pharmingen	FACS	1:500

[62] 1-2. 프라이머

[63] 실험에 사용된 프라이머 서열은 하기 표 2에 나타낸 바와 같다.

[64] [표2]

Primer	Sequence
IL-17a F	GCT CCA GAA GGC CCT CAG A
IL-17a R	AGC TTT CCC TCC GCA TTG A
IL-22 F	TTG AGG TGT CCA ACT TCC AGC A
IL-22 R	AGC CGG ACA TCT GTG TTG TTA
Foxp3 F	GGC CCT TCT CCA GGA CAG A
Foxp3 R	GCT GAT CAT GGC TGG GTT GT
IFNg F	AGC AAC AGC AAG GCG AAA A
IFNg R	CTG GAC CTG TGG GTT GTT GA
RORgt F	ACC TCC ACT GCC AGC TGT GTG CTG TC
RORgt R	TGA CGC GTG CAG GAG TAG G
TCTP F	ACC GAA AGC ACA GTA GTC ACC
TCTP R	AGT CAC ACC ATC TTC ACG G
b-actin F	AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC
b-actin R	CAA TAG TGA TGA CCT GGC CG

[65] 1-3. 실험용 동물

[66] Jackson Laboratory (Minneapolis, MN, US)에서 구입한 WT C57BL/6 마우스와 TAZ 결핍 마우스(KO)는 기존에 알려진 대로 제조되었다. 모든 쥐는 이화여자대학교의 특정 무병원체 동물시설에서 사육 및 관리되었다. 모든 동물은 통제된 조건(온도 22 ± 2 °C, 습도 60 ± 5%, 조명 12시간 명/12시간 암) 하에 사육되었으며, 모든 동물 실험은 이화여자대학교 동물실험실 관리 및 사용위원회 의 승인을 받았다. 지침(IACUC 19-031, 21-072)에 따라 실시되었다.

[67]

[68] 1-4. 이미퀴모드 처리에 의한 건선 유발 마우스의 제조

[69] 마우스 실험은 야생형(WT) 마우스(수컷, 8~12주령, 25~30g) 및 TAZ 결핍(KO) 마우스(수컷, 8~12주령, 20~25g)를 사용하여 실험을 수행했다. 마우스 그룹은 WT, TAZ KO, 이미퀴모드(imiquimod, IMQ)를 처리한 WT(WT + IMQ) 및 이미퀴모드를 처리한 TAZ KO(TAZ KO + IMQ)로 나누어 구성하였다. 이미퀴모드를 처리한 그룹의 경우, 5% IMQ(Aldara 크림) 62.5 mg을 제모된 등 피부와 왼쪽 귀에 처리하였다. 이미퀴모드를 처리하지 않은 그룹의 경우 같은 양의 바셀린을 처리하였다.

[70] 상기 마우스 그룹은 PASI(The Psoriasis Area and Severity Index) 점수 시스템을 사용하여 5일동안 피부의 염증 수준을 평가하였으며, 상기 평가 기준에는 피부 두께, 체중 감소 등도 포함하였다. 치료 전 피부 두께는 다이얼 두께 측정기(Peacock G1-A, Ozaki MFG. Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

[71]

[72] 1-5. 세포 배양

[73] ① 비장세포 배양

[74] 마우스로부터 얻은 비장을 RPMI 1640 배지(Hyclone, Logan, VA, USA)가 담긴 30 mm 배양 접시에 넣었다. 비장용 반투명 슬라이드 유리를 사용하여 조직을 갈아준 다음, 현탁액을 50ml 원뿔형 튜브로 옮겼다. 그리고 현탁액을 1,000rpm에서 3분간 회전시킨 후 RBC 용해 완충액으로 적혈구를 용해했다. 용해된 현탁액을 70um 스트레이너로 여과한 다음, 새로운 50ml 원뿔형 튜브로 옮겨주었다. 10% 열 불활성화 소 태아 혈청(FBS, Gendepot, Katy, TX, USA)이 포함된 충분한 RPMI 1640 배지로 다시 중화한 다음, 재현탁하였다. 얻은 총 비장 세포를 배양 플레이트 웰에 플레이팅(5 x 10^6cells/ml)했다.

[75]

[76] ② 섬유아세포 배양

[77] 마우스 섬유아세포(Mouse Embryonic Fibroblast)를 야생형 및 TAZ 결핍 마우스 배아로부터 분리한 다음, 10% FBS가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Hyclone, Logan, VA, USA)에서 배양했다.

[78]

[79] 1-6. 조직학적 분석

[80] 마우스의 등, 귀 등의 조직을 부인 용액(bouin`s solution)에 3-4시간 고정한 다음, 밤새 4%의 포름알데히드를 포함한 PBS로 고정하였다. 그 다음 파라핀에 매립하였다. 매립된 조직을 슬라이드 유리 위에 자동 회전 마이크로톰을 사용하여 4um 두께의 슬라이스로 절개했다. 피부 절편을 Neo-Clear(Merck Millipore, MA, USA)로 파라핀 제거하고 무수 알코올로 70% 알코올로 재수화시킨 후 증류수로 세척하였다. 세척된 피부 절편은 Hematoxylin과 Eosin(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)으로 염색했다. 콜라겐 염색에는 trichrome 염색 키트(DAKO)와 Sirius red 염색 키트(Abcam)를 사용하였다.

[81]

[82] 1-7. 면역형광 염색

[83] ① 조직 염색

[84] 파라핀 포매된 피부 조직을 코팅된 슬라이드 글라스(Matsunami, Japan) 위에서 4um 두께의 슬라이스로 절단했다. 피부 절편을 파라핀에서 제거한 다음 재수화했다. 항원 검색을 10mM 시트르산나트륨 완충액(pH 6.0)으로 수행하고 PBS 중 1% Triton-X-100으로 투과화시키고 PBST에서 3% BSA로 차단하고 각각 1%로 희석된 TAZ 및 TCTP에 특이적인 1차 항체로 염색했습니다. 4°C에서 하룻밤 동안 PBST의 BSA PBST로 3회 세척한 후 슬라이드를 Alexa 647, 488 염소 항-마우스 및 염소 항-토끼(Invitrogen)와 함께 암실에서 실온조건으로 40분 동안 배양했다. 핵은 DAPI(1ug/ml)로 염색하였다. 이미지는 Aryscan을 사용하여 공초점 현미경 Zeiss LSM880을 분석한 다음, ZEN5 소프트웨어(Zeiss, Oberkochen, Germany)로 처리했다.

[85]

[86] ② MEF 세포 염색

[87] MEF 세포를 0.01% 폴리-L-리신(Sigma-Aldrich)으로 코팅된 커버 슬립이 포함된 24웰 플레이트에서 배양했습니다. 세포를 PBS 중 4% 파라포름알데히드로 20분 동안 고정시키고, PBS 중 0.1% Triton X-100에서 10분 동안 투과화시키고, PBST 중 3% BSA로 30분 동안 차단시켰습니다. 세포를 1차 항체 YAP, TAZ, TCTP와 함께 4°C에서 밤새 배양했습니다. PBST로 3회 세척하고 Alexa 647, 488 2차 항체와 함께 40분 동안 배양했습니다. 그런 다음 핵을 DAPI로 5분 동안 염색하고 형광 장착 매체로 장착했습니다. 이미지는 Aryscan을 사용하여 공초점 현미경 Zeiss LSM880을 분석하고 ZEN5 소프트웨어(Zeiss, Oberkochen, Germany)로 처리했습니다.

[88]

[89] 1-8. 면역블롯 분석

[90] 마우스 조직 또는 배양 세포에서 단백질을 추출하고, 10% 글리세롤, 25mM Tris(pH 7. 5), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% 데옥시콜산나트륨, 0.1% SDS, 50mM NaF, 1mM PMSF, 1mM DTT, 1mM Na_3VO_4, 프로테아제 억제제 칵테일(Roche, BS, SUI) 및 12,000rpm에서 4°C에서 10분 동안 원심분리했다.

[91] 환원 또는 비환원 조건에서 용해물에 SDS-PAGE를 실시하고 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮겼다. 3% BSA와 0.1% tween-20을 TBS로 차단한 후, 멤브레인을 1차 항체와 함께 4°C에서 하룻밤 배양하고 양 고추냉이 과산화효소 결합 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies)와 ECL 웨스턴 블롯팅 시약으로 배양했으며, 결과는 Image J 소프트웨어로 정량 분석하였다.

[92]

[93] 1-9. 유세포 분석

[94] 림프절 및 비장의 단일 세포 현탁액을 PE, FITC 또는 APC와 접합된 항체를 사용하여 염색했다. 고정된 세포는 항-TCTP 및 알렉사 488-항-토끼 IgG(Alexa 488-anti-rabbit IgG) 또는 알렉사 633-항-토끼(Alexa 633-anti-rabbit)를 사용하여 염색했다. 염색된 세포는 유세포 분석기 및 Cell Quest Pro 분석을 사용하여 분석했다. 모든 분석은 10,000개의 살아있는 세포를 게이팅하여 수행했다. 모든 분석의 음성 대조군으로는 FITC, PE 또는 APC Isotype Ctrl을 사용했다.

[95]

[96] 1-10. 단백질 안정성 분석

[97] 비장에서 얻은 단일 세포 현탁액을 5 x 세포/ml의 밀도로 6개의 웰에 플레이트했다. 모든 웰에서 지질다당류(LPS, 1 ug/ml)를 24시간 동안 자극한 다음, MG132(20 uM) 및 사이클로헥시미드(CHX, 20 ug/ml)를 수확 6시간 및 4시간 전에 처리했다. 수확한 세포를 RIPA 용해 완충액을 사용하여 용해한 다음, SDS-PAGE를 통해 단백질을 검출했다. 각 밴드의 강도는 Image J 소프트웨어를 통해 b-actin으로 정규화하여 분석했다. MEF 세포에서는 LPS 자극 없이 MG132와 CHX만 처리했다. 폴리-L-라이신으로 코팅된 커버 슬라이드가 포함된 24개의 웰에 MEF 세포를 1 x 10^6cells/ml의 밀도로 시드하고 면역 형광 염색을 통해 단백질을 확인했다.

[98]

[99] **실시예 2. TAZ 유전자 유무에 따른 건선 증상 확인**

[100] 실험은 4 그룹으로 나누어 진행하였다. 야생형(WT) 및 TAZ KO 그룹에 IMQ를 처리 유무를 달리하며 총 4개의 그룹으로 실험군을 준비하였다. 각 그룹은 그룹당 n=5로 3회 반복하여 실험을 수행하였다. IMQ는 5일 동안 지속적으로 처리하였고, 대조군은 바셀린을 동일한 방법으로 처리하였다. IMQ 및 바셀린 모두 처리 전 매일 체중을 측정하였고, Day 0의 수치를 100%로 설정하여 체중변화를 확인하였다(도 3).

[101] PASI(Psoriasis Area Severity Index)를 활용하여 체중, 등 피부 두께 변화, 스케일링(각 4점)을 평가하여 총 12점을 부여하였다. IMQ 비처리 군의 경우, WT와 TAZ 결핍 마우스 사이에 유의한 수준의 차이가 관찰되지 않았다(도 4). 그러나, IMQ로 처리된 마우스 그룹의 경우, WT와 TAZ 결핍 마우스 사이에 현저한 수준의 차이과 확인되었다. 구체적으로, TAZ KO 마우스에 IMQ를 처리했을 때, 체중 변화에 대한 민감도가 높아졌으며 더 심한 건선 유발이 관찰되었다. 또한 시각적으로

등쪽 피부가 1일 차부터 두꺼워졌으며, 3일 차부터는 귀의 극적인 변화도 관찰되었다. 5일 차에 마우스를 관찰했을 때, WT 마우스에 IMQ를 처리한 그룹은 등 피부의 붉은 부위에서는 부분적인 발적과 각질분리가 관찰되었으나(도 5), TAZ KO 마우스에 IMQ를 처리한 그룹은 WT 마우스에 비해 더 많은 각질이 발견되고, 전체 피부의 발적이 증가한 것으로 확인되었다. 귀 분석에서도, TAZ KO 마우스에서 더 큰 발적과 더 뚜렷한 피부 각질분리가 관찰되었다.

[102] 피부의 두께를 확인했을 때에도, IMQ를 처리하지 않은 그룹의 경우, 유의한 수준의 차이가 확인되지 않았으며(도 6), IMQ를 처리한 그룹들의 경우에도 진피층 두께에는 유의미한 차이가 확인되지 않았다. 그러나, IMQ를 처리한 그룹의 경우, TAZ KO 마우스가 WT 마우스에 비하여 표피층의 두께가 전체적으로 두꺼워진 것으로 확인되었다.

[103] 상기와 같은 결과는 TAZ가 결핍된 마우스에서 유발된 건선이 대조군에 비해 현저히 증가하였음을 보여주었다. 이에 따라 TAZ 유전자가 건선의 감수성에 영향을 주는 것으로 보아, 건선발병과정에서 관찰되는 면역 염증 반응에 TAZ 유전자의 효과를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[104]

[105] **실시예 3. TAZ 유전자 유무에 따른 염증 반응 확인**

[106] 우선, 내인성 면역체계(intrinsic immune system)에 차이가 있는지 알아보기 위해 흉선을 채취하여 크기와 무게를 확인하였다. 그 결과, IMQ 비처리 그룹의 경우, 두 그룹 사이에 유의한 수준의 차이가 확인되지 않았다. 따라서 TAZ 결핍은 내인성 면역체계에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. IMQ을 처리했을 때에도, 염증으로 인해 흉선 위축이 발생하는 것은 확인되었으나, 야생형 및 TAZ KO 그룹간의 차이도 확인되지 않았다. 또한 T 세포의 성숙 동안 생성되는 CD4/CD8 double positive 세포와 CD4 T, CD8 T single positive 세포 생성 모두 야생형 및 TAZ KO 그룹 사이에 차이가 나타나지 않았다 (도 7).

[107] 말단에서의 면역반응의 변화를 확인하기 위하여 비장과 림프절을 확인한 결과, IMQ 처리에 의해 비장 비대증이 관찰되었으며, 비장 및 림프절을 구성하는 총 면역세포의 숫자가 증가하였음을 확인하였다. 또한, TAZ KO군의 비장이 일부 커져있었으나 IMQ 처리에 의해 더 현저하게 증가하였고 비장 및 림프절 구성 세포도 유의미하게 증가하였다 (도 8). 림프절과 비장에 존재하는 T 세포를 염색한 결과, 림프절의 T 세포는 IMQ를 처리한 대조군과 TAZ KO군 모두에서 증가하였고 비장의 T 세포의 구성 비율은 IMQ 처리에 의해 감소하였고 대조군과 TAZ KO군 사이에 의미있는 변화는 확인되지 않았다(도 9).

[108]

[109] **실시예 4. TAZ 결핍 마우스에서 TCTP 단백질 수준 확인**

[110] TAZ KO 군에서의 건선 발병 민감성 증가로 인한 염증 악화 기전을 이해하기 위하여 염증성 사이토카인의 발현을 분석하였고, 특히 건선 유발의 주요 인자 TCTP 발현을 관찰하고자 하였다. 각 그룹의 비장에서 TCTP의 단백질 발현 수준

을 b-actin과 비교하여 확인하였다. TCTP는 세포 증식, 세포 사멸, 세포 주기, 세포골격, 단백질 합성, 면역 반응, 악성 형질 전환 및 핵 재프로그래밍을 비롯한 다양한 생리학적 과정에서 필수적인 역할을 한다. 또한, TCTP는 염증 세포가 염증 부위로의 이동하는 것에 영향을 주고, NF-κB를 포함한 신호 전달 경로와 상호작용하여 알레르기 반응의 발달에 참여할 수 있는 바, TAZ 유전자와 TCTP 단백질과의 상호작용을 확인하였다. 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, IMQ를 처리한 그룹에서 TCTP 단백질 수준이 증가하는 것을 확인하였고, 그 중에서도 TAZ KO 그룹의 TCTP의 발현 수준이 현저하게 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한, IMQ를 처리하지 않은 TAZ KO 군에서 대조군에 비하여 내인성 TCTP 발현이 증가하였음을 추가로 확인하였다 (도 10의 A). 게다가 혈청을 확보하여 혈청중 존재하는 TCTP 발현수준을 확인한 결과, TAZ KO 군의 혈청에서 TCTP 발현이 증가하였고, IMQ 처리에 의해 대조군과 TAZ KO 군 모두에서 TCTP 혈청 농도 증가를 웨스턴블롯 및 ELISA 방법으로 확인하였다 (도 10의 B).

[111] 피부에서의 TCTP 발현 확인을 위하여 등 및 귀의 피부에서 면역조직화학(IHC)를 수행하여 TCTP의 단백질 수준을 확인하였다(도 11). 그 결과, TAZ가 결핍된 마우스에서 현저하게 높은 수준의 TCTP 발현을 보이는 형광을 확인할 수 있었다. 또한, 웨스턴블롯 방법을 통해서도 TAZ KO 마우스에서 TCTP의 단백질이 상대적으로 증가함을 확인하였다.

[112]

[113] **실시예 5. TAZ의 TCTP 단백질 안정성 조절능 확인**

[114] 상기 실시예 4에서 확인한 바와 같이, TAZ KO 마우스에 TCTP의 단백질 발현이 증가함을 확인할 수 있었으나, 별도로 mRNA의 수준을 확인했을 때에는 유의한 발현 증가가 확인되지 않았다. 따라서, TAZ 유전자는 TCTP의 발현이 아닌, 안정성을 조절하는 기능을 할거라 판단하여, 사이클로헥시미드(CHX) 및 MG132를 사용한 추가적인 실험을 수행하였다. 구체적으로, LPS 자극 조건에서 CHX를 4시간 동안 도포하고, MG132를 6시간 동안 투여하였다. 그 결과, WT 마우스에서 CHX를 처리했을 때, TCTP 발현이 50% 이상 감소했으며, 이는 MG132 치료 시 원래 상태로 복원됨을 확인하였다(도 12 및 도 13). 그러나, TAZ KO 마우스의 경우, CHX를 처리했을 때, TCTP가 미미한 수준으로 감소되는 것을 확인하였다. 즉, TAZ가 존재하지 않을 경우, TCTP가 충분히 안정화되어 있기 때문에 CHX 처리에 의해 단백질 양이 감소하지 않기에 MG132에 의해서도 크게 영향을 받지 않는 것으로 이해된다.

[115] 상기와 같이 TAZ가 TCTP 단백질 안정성을 조절한다는 결과가 비장세포뿐만 아니라 TCTP가 발현되는 다른 종류의 세포에서도 동일하게 관찰되는지 확인하기 위하여, MEF를 사용한 실험을 진행하였다. MEF 세포는 야생형(WT), TAZ KO, TAZ KO 세포에 TAZ를 재도입하여 TAZ를 과발현 시킨 세포(KO/T)의 3가지를 제조하여 실험을 준비하였다. 우선 상기 세포에 면역형광염색을 수행했을 때, WT에 비하여 TAZ KO에서 TCTP의 발현이 증가했고, TAZ가 재도입된 KO/

T MEF 세포에서는 감소하였다 이러한 경향성은 WB 및 FACS 염색 실험에서도 동일하게 나타나는 것이 확인되었다. 즉, TAZ가 존재하지 않는 경우, TCTP 발현이 증가하였고 TAZ 발현이 재도입되는 경우, TCTP 발현이 감소함을 증명하였다 (도 14).

[116] 또한, 대조군 MEF 세포에서의 TCTP의 발현은 CHX 처리에 의해 급감하는 반면, TAZ가 존재하지 않는 MEF 세포에서는 CHX 영향을 거의 받지않았으며, TAZ 발현이 재도입된 MEF 세포는 대조군 세포와 동일하게 CHX 처리에 의해 TCTP 감소를 보였다 (도 15a 및 도 15b). 따라서, TAZ는 TCTP 단백질 안정성 조절에 중요한 인자임을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 또는 이의 작용제(agonist)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 염증성 피부질환은 건선(psoriasis), 과각화증(hyperkeratosis), 어린선(ichthyosis), 아토피 피부염(atopic dermatitis), 모공성각화증(keratosis pilaris), 광선각화증(actinic keratoses), 지루각화증(seborrheic keratoses), 천포창(pemphigus), 티눈(corns), 사마귀(warts), 및 편평태선(lichen planus)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 약학적 조성물은 TCTP(Translationally controlled tumor protein)의 발현 수준을 감소시키는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 4] 청구항 3에 있어서,
상기 TCTP 발현 수준의 감소는 TCTP의 안정성을 감소시키는 것에 의한 것인, 약학적 조성물.

[청구항 5] 청구항 3에 있어서,
상기 TCTP 발현 수준의 감소는 비장에서 TCTP의 발현 수준이 감소하는 것인, 약학적 조성물.

[청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 염증성 피부질환은 이미퀴모드(Imiquimod)에 의해 유발된 것인, 약학적 조성물.

[청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 염증성 피부질환은 지질다당류(lipopolysaccharide)에 의해 유발된 것인, 약학적 조성물.

[청구항 8] TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 또는 이의 작용제(agonist)를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[청구항 9] 청구항 8에 있어서,
상기 염증성 피부질환은 건선(psoriasis), 과각화증(hyperkeratosis), 어린선(ichthyosis), 아토피 피부염(atopic dermatitis), 모공성각화증(keratosis pilaris), 광선각화증(actinic keratoses), 지루각화증(seborrheic keratoses), 천포창(pemphigus), 티눈(corns), 사마귀(warts), 및 편평태선(lichen planus)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 건강기능식품 조성물.

[청구항 10] 하기 단계를 포함하는 염증성 피부질환 치료제의 스크리닝 방법:
(a) In vitro 상에서 세포에 후보 물질을 처리하는 단계;
(b) 상기 후보 물질 처리 후 TCTP의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

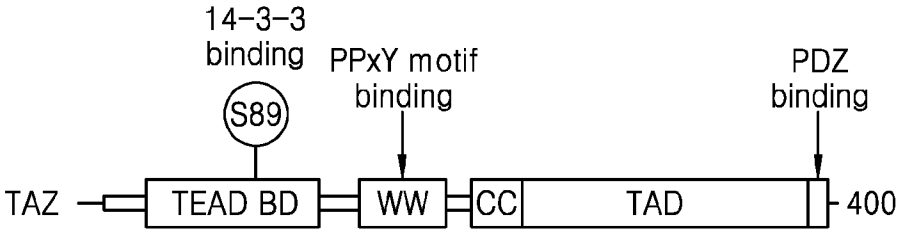
(c) 후보물질 비처리군에 비해 TCTP의 발현 수준을 감소시키는 물질을 염증성 피부질환 치료제로 결정하는 단계.

[청구항 11] 청구항 10에 있어서,
상기 (b) 단계의 발현 수준은 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학분석법(immunohistochemical analysis), RealTime-PCR, qRT-PCR, 웨스턴 블롯(Western Blotting), 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정하는 것인, 염증성 피부질환 치료제의 스크리닝 방법.

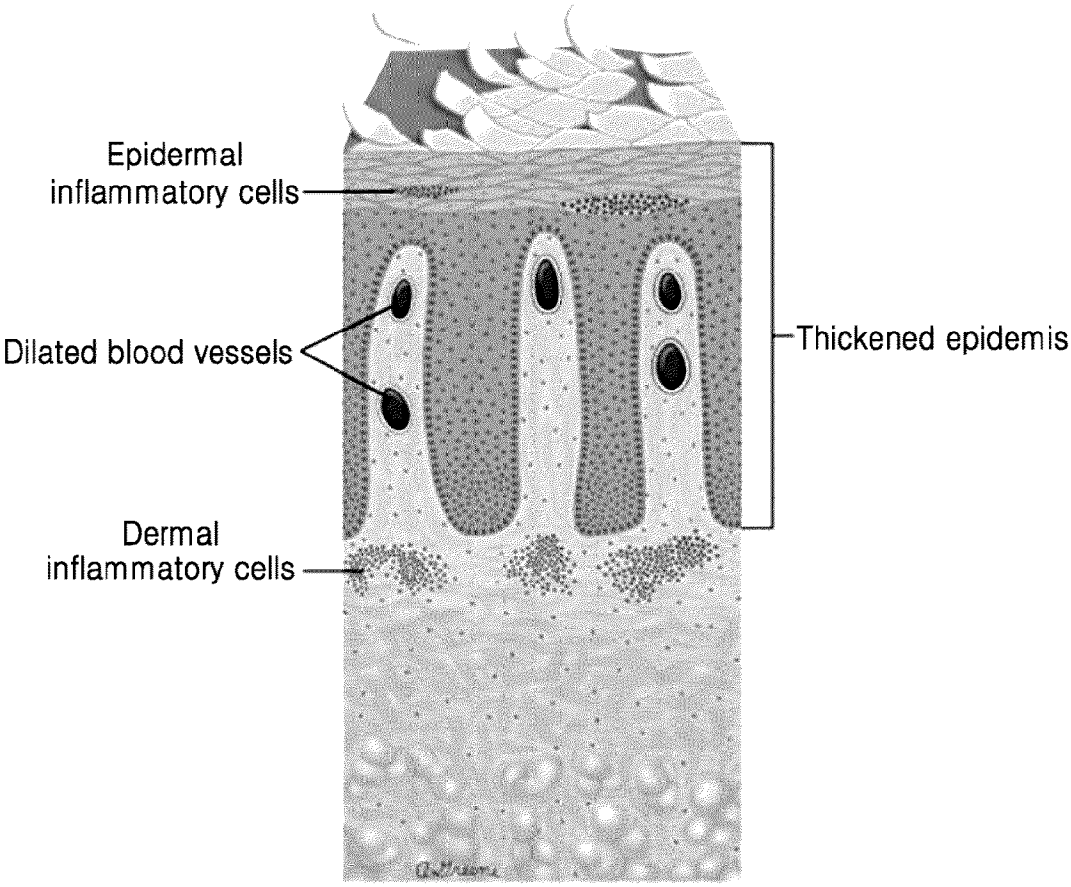
[청구항 12] 청구항 10에 있어서,
상기 (b) 단계의 발현 수준 측정은 비장에서 이루어지는 것인, 염증성 피부질환 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 13] 청구항 10에 있어서,
상기 염증성 피부질환은 건선(psoriasis), 과각화증(hyperkeratosis), 어린선(ichthyosis), 아토피 피부염(atopic dermatitis), 모공성각화증(keratosis pilaris), 광선각화증(actinic keratoses), 지루각화증(seborrheic keratoses), 천포창(pemphigus), 티눈(corns), 사마귀(warts), 및 편평태선(lichen planus)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 염증성 피부질환 치료제의 스크리닝 방법.

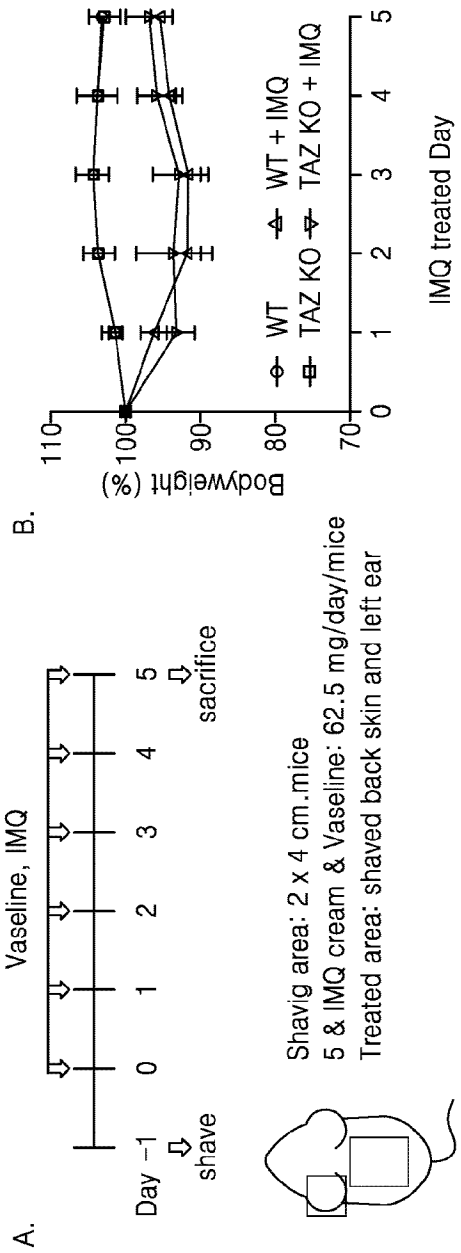
[도1]


14-3-3
binding
S89
PPxY motif
binding
PDZ
binding
TAZ
TEAD BD
WW
CC
TAD
400

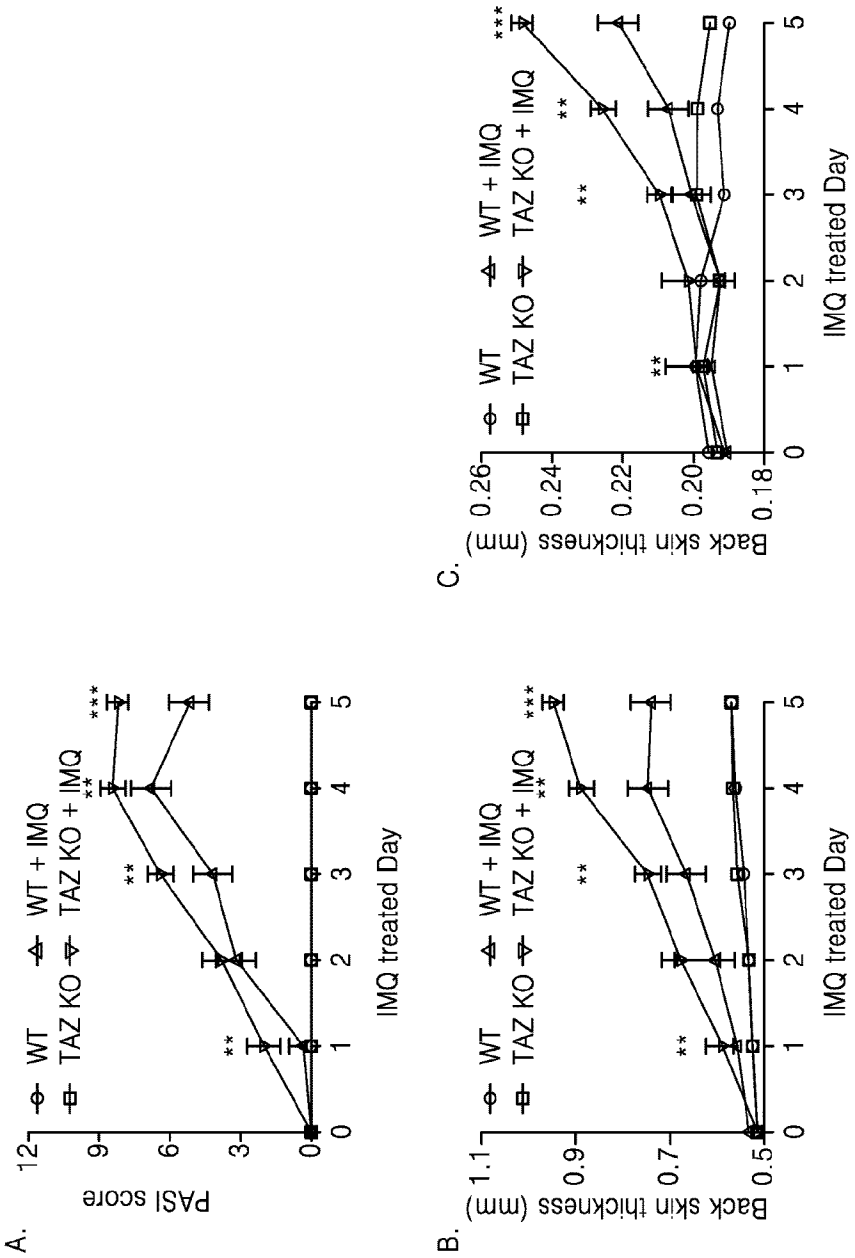
[도2]


Epidermal
inflammatory cells
Dilated blood vessels
Dermal
inflammatory cells
Thickened epidemis

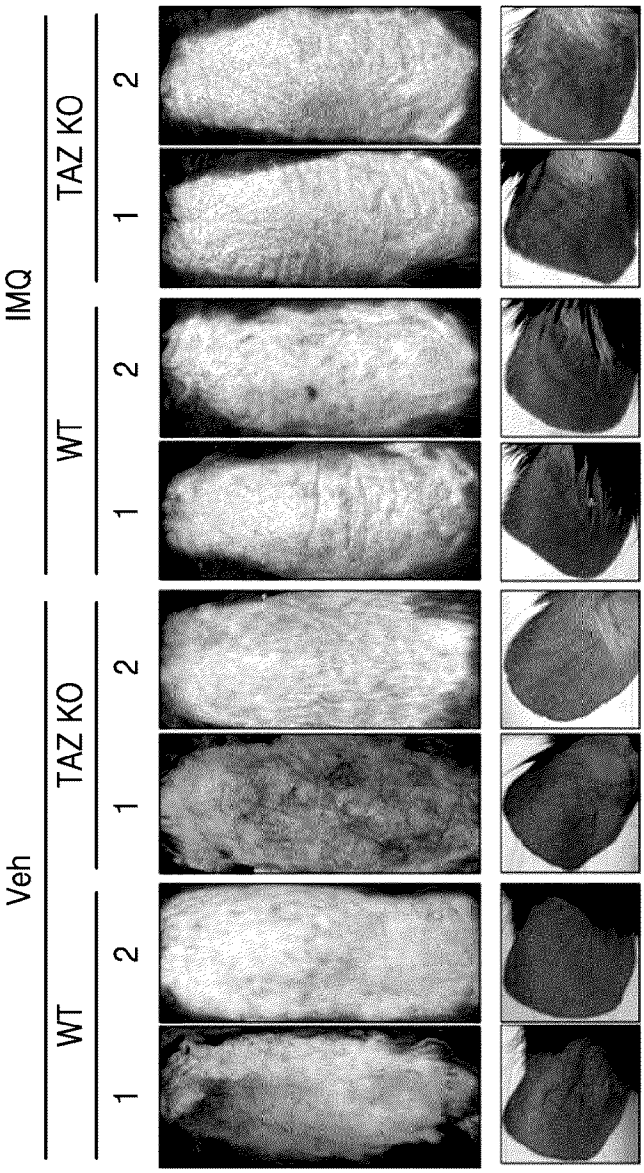
[도3]


A.
Vaseline, IMQ
Day −1
shave
0
1
2
3
4
5
sacrifice
Shavig area: 2 x 4 cm.mice
5 & IMQ cream & Vaseline: 62.5 mg/day/mice
Treated area: shaved back skin and left ear
B.
Bodyweight (%)
110
100
90
80
70
WT
TAZ KO
WT + IMQ
TAZ KO + IMQ
0
1
2
3
4
5
IMQ treated Day

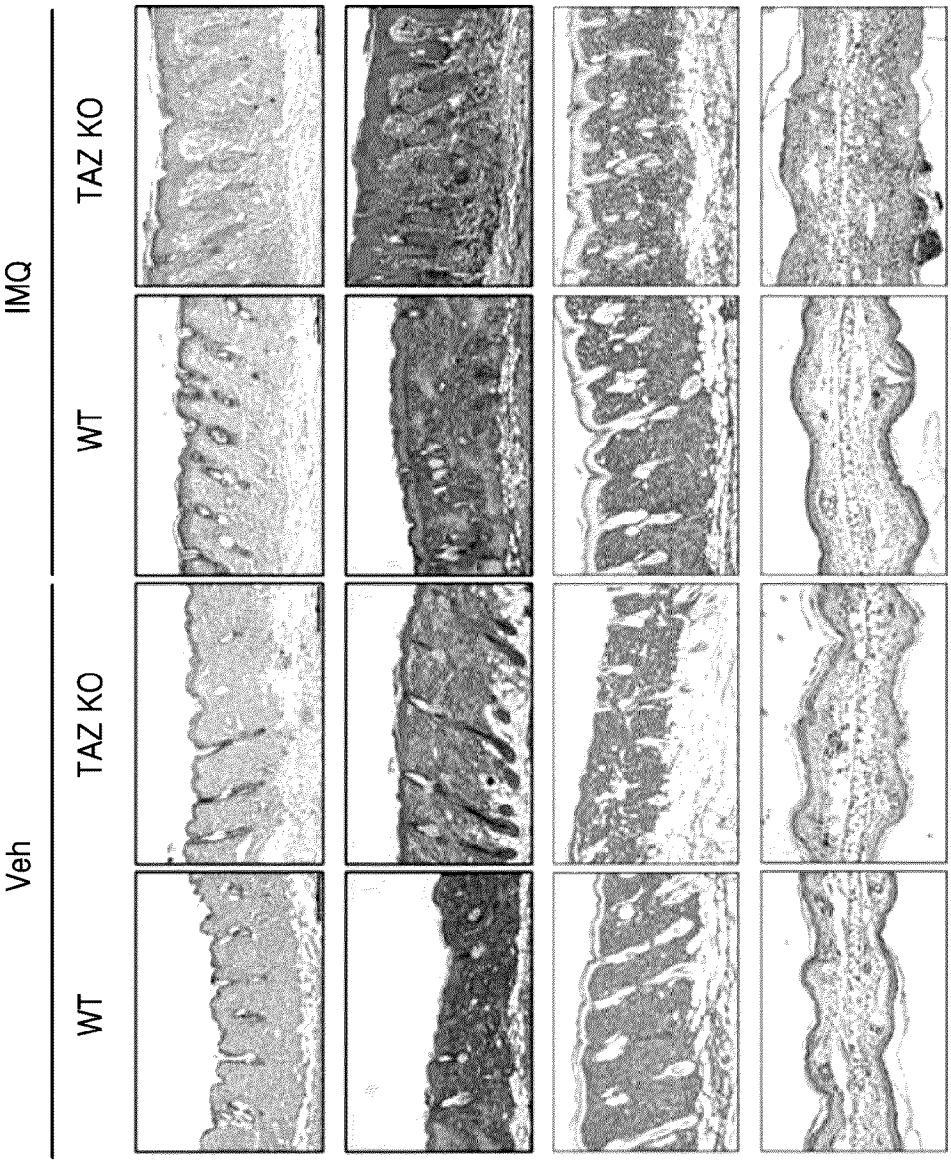
[도4]


A.
PASI score
12
9
6
3
0
0
1
2
3
4
5
IMQ treated Day
WT
TAZ KO
WT + IMQ
TAZ KO + IMQ
**
***
B.
Back skin thickness (mm)
1.1
0.9
0.7
0.5
C.
Back skin thickness (mm)
0.26
0.24
0.22
0.20
0.18

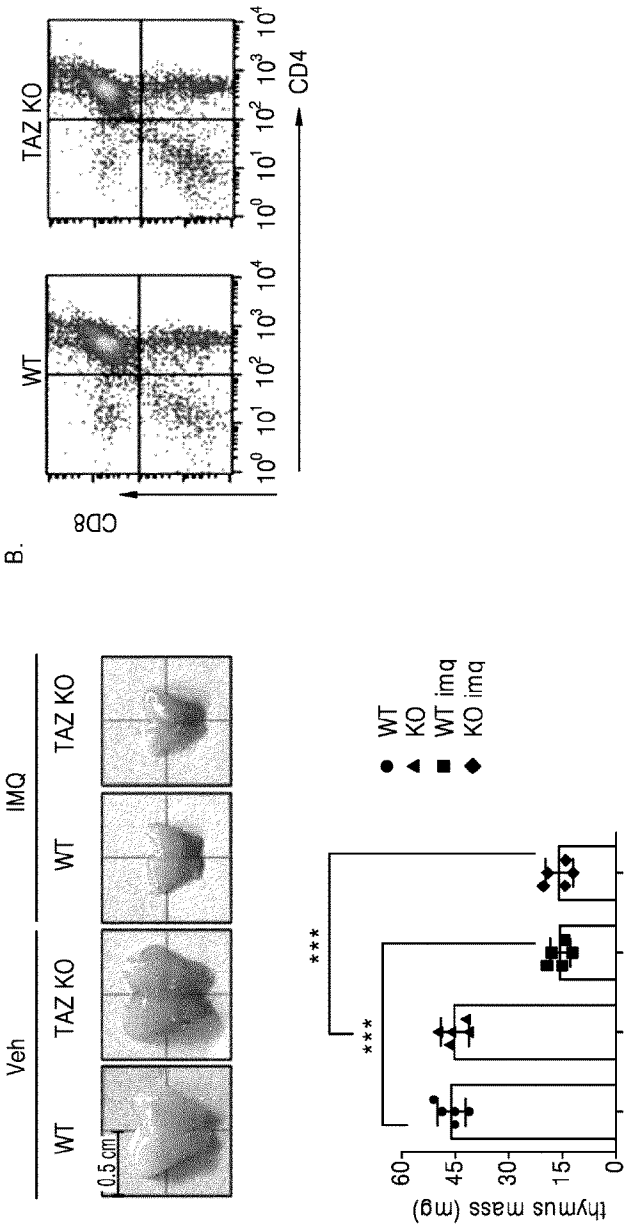
[도5]



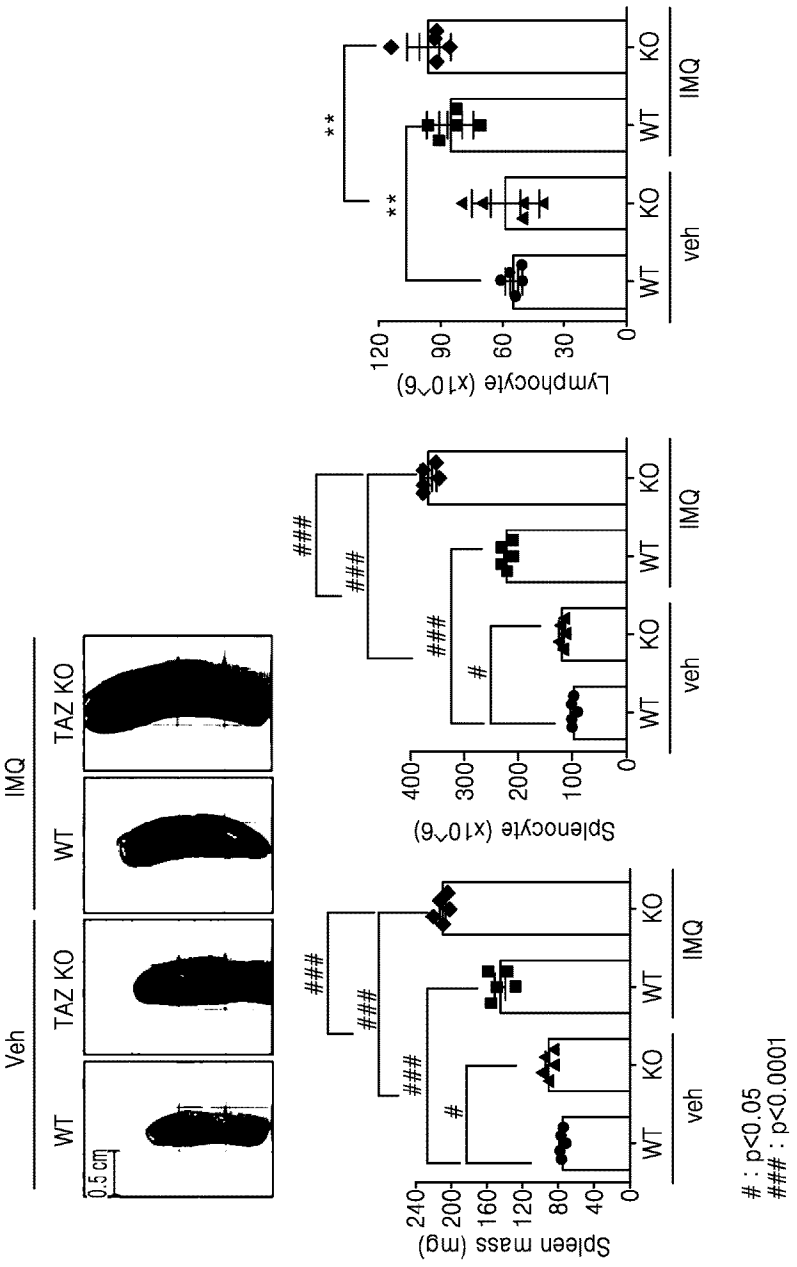
[도6]



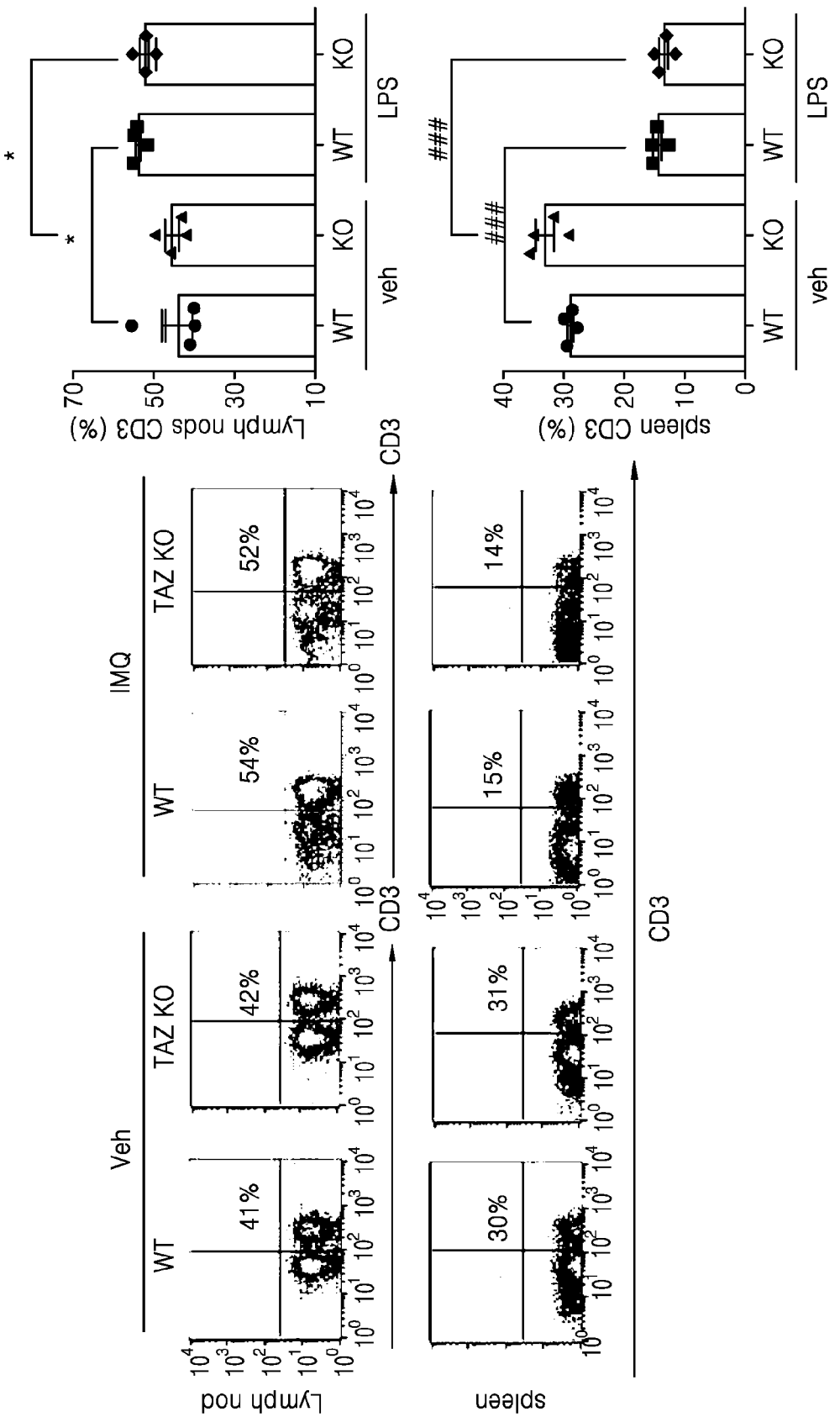
[도7]


B.
CD8
CD4
WT
TAZ KO
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
A.
Veh
IMQ
WT
TAZ KO
WT
TAZ KO
0.5 cm
WT
KO
WT imq
KO imq
***
***
thymus mass (mg)
0
15
30
45
60

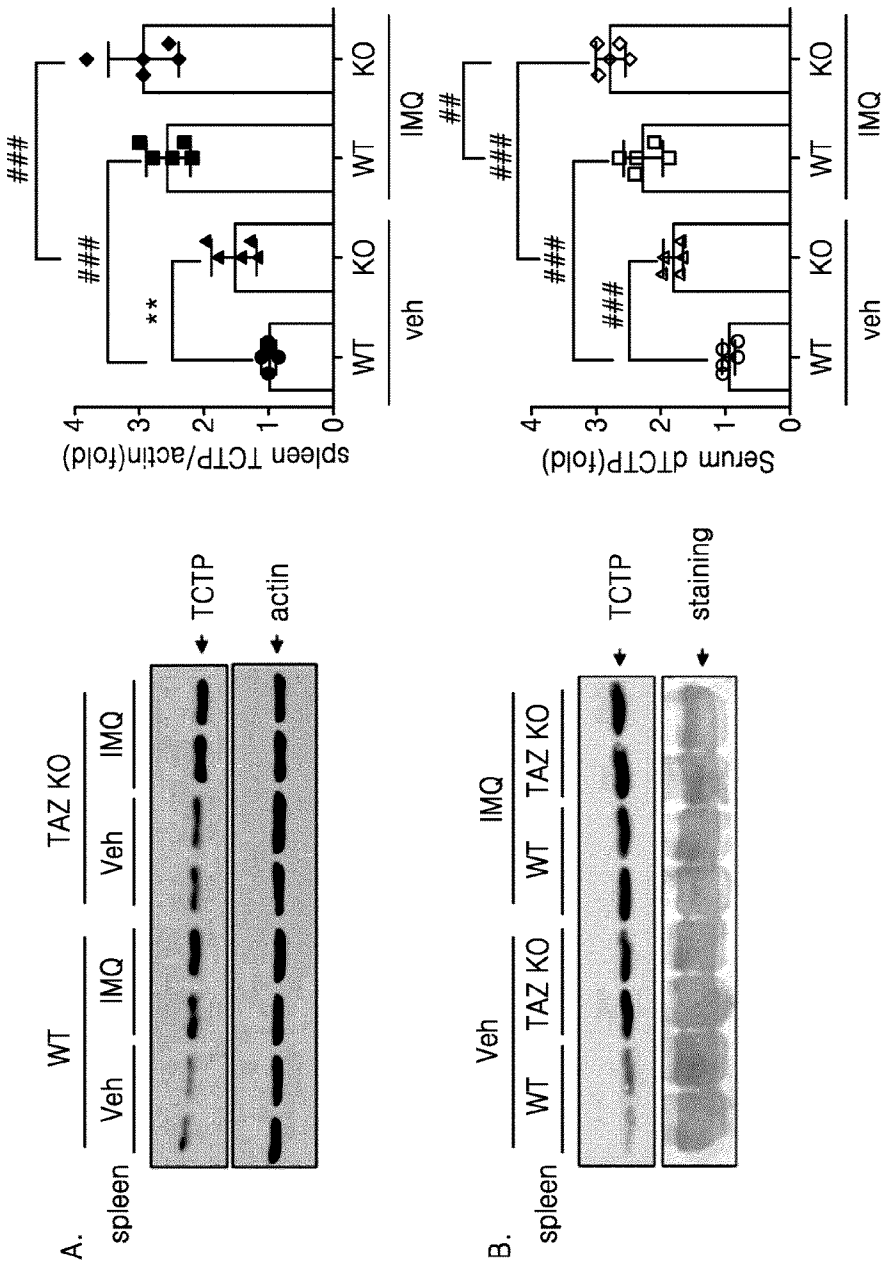
[도8]


Veh
IMQ
WT
TAZ KO
WT
TAZ KO
0.5 cm
Spleen mass (mg)
Splenocyte (x10^6)
Lymphocyte (x10^6)
WT
KO
WT
KO
veh
IMQ
: p<0.05
: p<0.0001

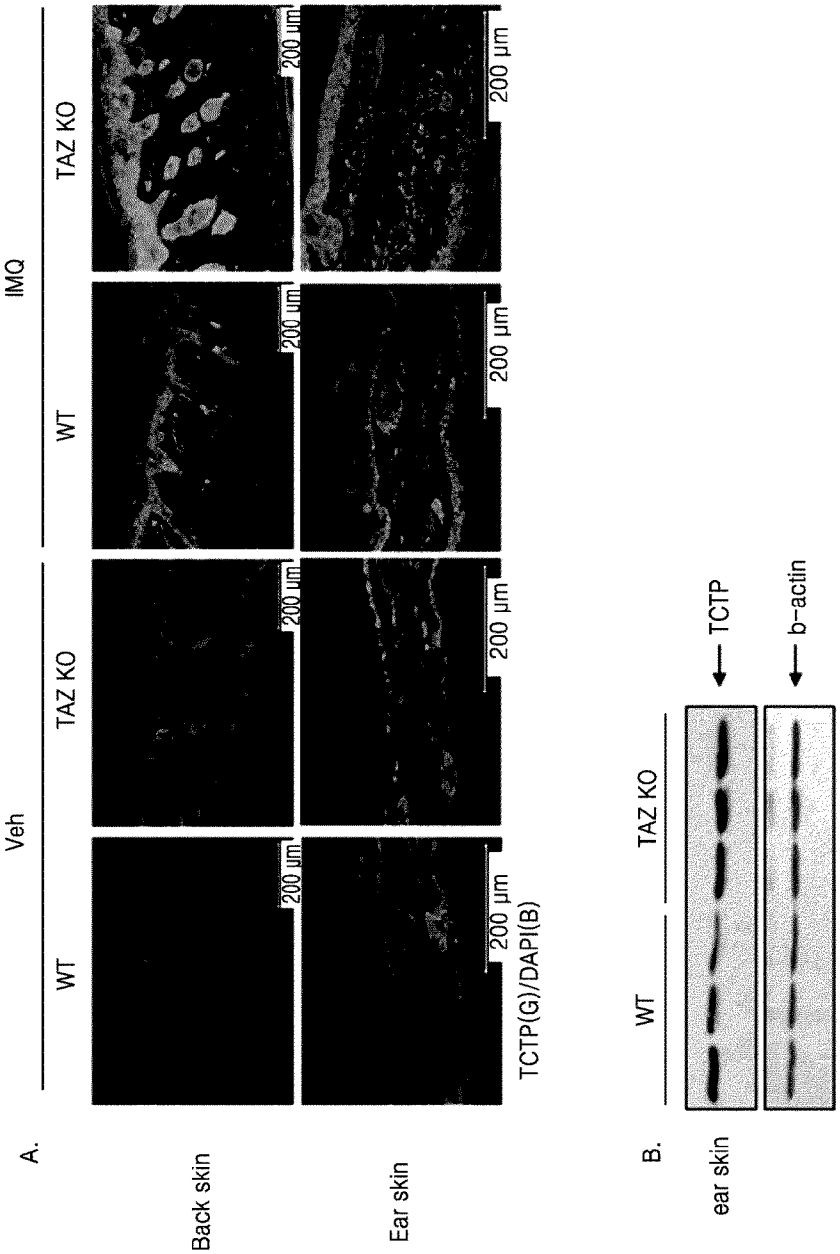
[도9]


Lymph nods CD3 (%)
spleen CD3 (%)
WT
KO
WT
KO
veh
LPS
*
*
###
###
Veh
IMQ
WT
TAZ KO
WT
TAZ KO
Lymph nod
spleen
CD3
CD3
41%
42%
54%
52%
30%
31%
15%
14%

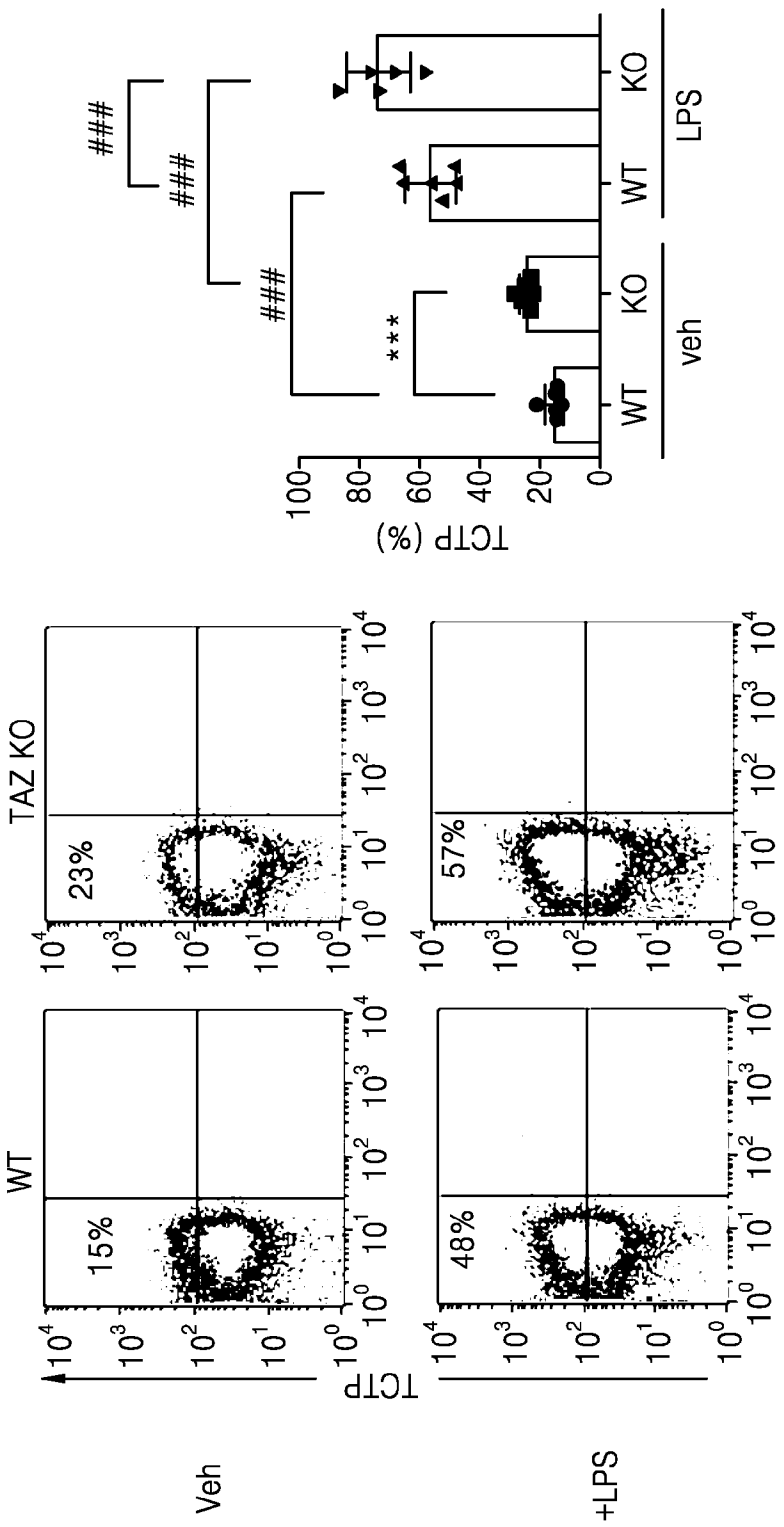
[도10]


spleen TCTP/actin(fold)
Serum dTCTP(fold)
WT
KO
veh
IMQ
**
###
##
A.
B.
spleen
Veh
TAZ KO
TCTP
actin
staining

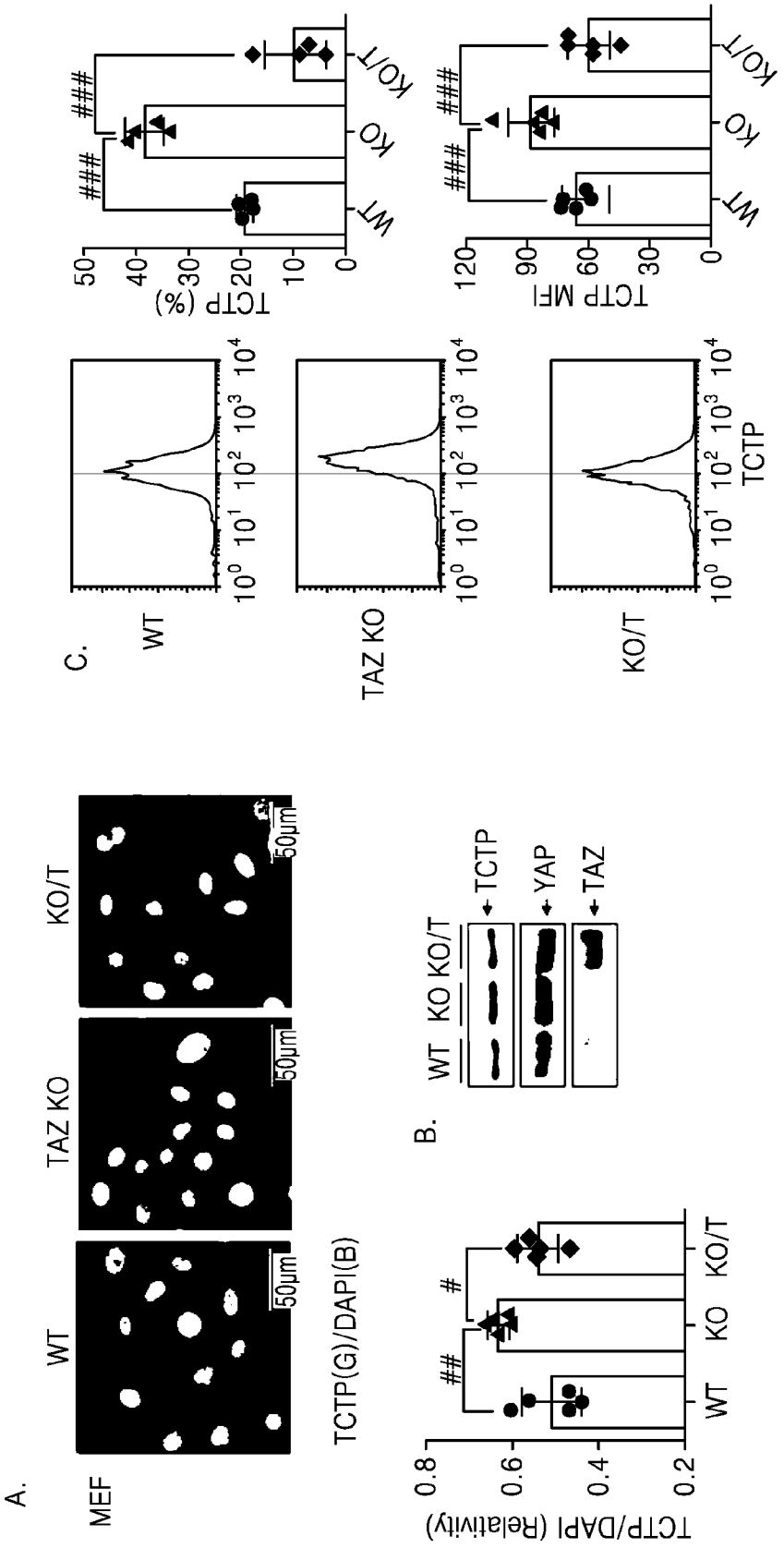
[도11]


A.
Veh
IMQ
WT
TAZ KO
WT
TAZ KO
200 μm
Back skin
Ear skin
TCTP(G)/DAPI(B)
B.
WT
TAZ KO
TCTP
b-actin
ear skin

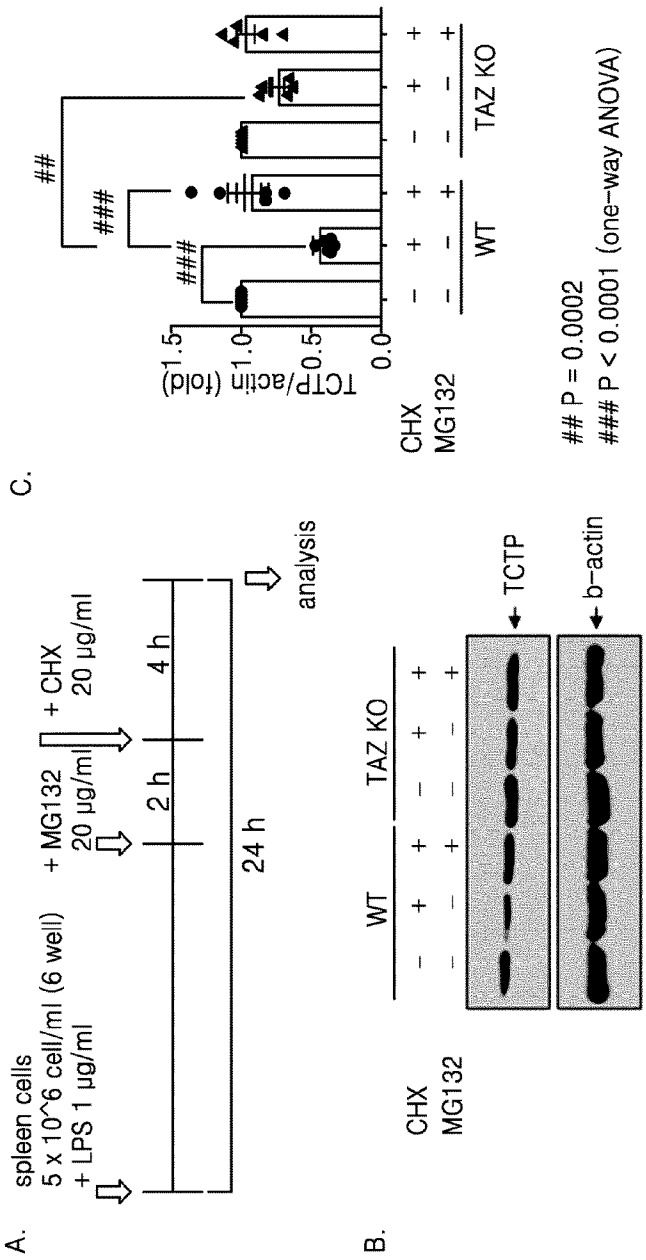
[도12]


TCTP (%)
100
80
60
40
20
0
WT
KO
WT
KO
veh
LPS
***
###
###
###
TAZ KO
WT
23%
15%
57%
48%
TCTP
Veh
+LPS

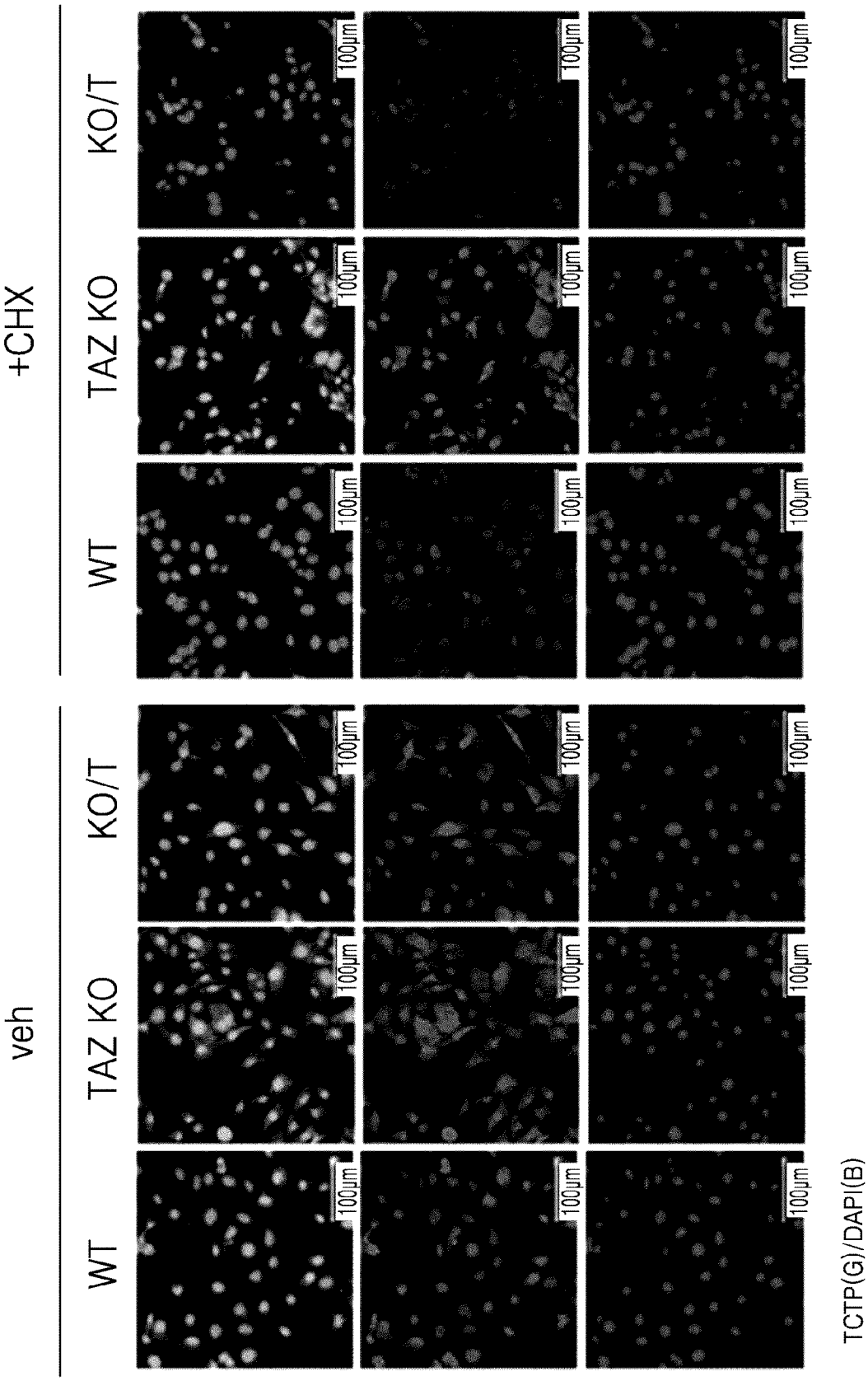
[도13]


A.
MEF
WT
TAZ KO
KO/T
50μm
TCTP(G)/DAPI(B)
TCTP/DAPI (Relativity)
0.8
0.6
0.4
0.2
##
#
WT
KO
KO/T
B.
WT KO KO/T
TCTP
YAP
TAZ
C.
WT
TAZ KO
KO/T
TCTP
TCTP (%)
TCTP MFI
###
WT
KO
KO/T

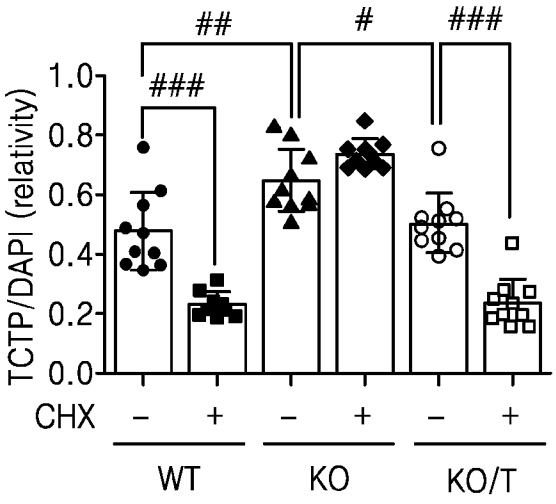
[도14]


A.
spleen cells
5 x 10^6 cell/ml (6 well)
+ LPS 1 μg/ml
+ MG132
20 μg/ml
+ CHX
20 μg/ml
2 h
4 h
24 h
analysis
B.
WT
TAZ KO
CHX
MG132
TCTP
b-actin
C.
TCTP/actin (fold)
0.0
0.5
1.0
1.5
##
###
###
CHX
MG132
WT
TAZ KO
P = 0.0002
P < 0.0001 (one-way ANOVA)

[도15a]



[도15b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/005307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i; **A61P 17/00**(2006.01)i; **A61P 29/00**(2006.01)i; **A23L 33/17**(2016.01)i; **G01N 33/68**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/17(2006.01); A01K 67/027(2006.01); A61K 38/16(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C12N 5/10(2006.01); G01N 33/53(2006.01); G01N 33/68(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), 염증성 피부 질환 (inflammatory skin diseases), TCTP(Translationally controlled tumor protein), 스크리닝(screening)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, K. M. et al. Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif stimulates epidermal regeneration via induction of amphiregulin expression after ultraviolet damage. Biochemical and biophysical research communications. 2020, vol. 524, pp. 242-248. See abstract; and pages 242 and 246.	1-9
Y	KR 10-2023-0009563 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 17 January 2023 (2023-01-17) See abstract; claims 1 and 8; and paragraph [0030].	10-13
Y	KR 10-2015-0144297 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 24 December 2015 (2015-12-24) See paragraphs [0005] and [0040].	10-13
A	KR 10-2012-0080407 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY et al.) 17 July 2012 (2012-07-17) See entire document.	1-13

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 July 2024	**22 July 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2009-0036818 A (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, HALLYM UNIVERSITY) 15 April 2009 (2009-04-15) See entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/005307

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2023-0009563 A	17 January 2023	KR 10-2665156 B1	17 May 2024
KR 10-2015-0144297 A	24 December 2015	EP 3156063 A1	19 April 2017
		EP 3156063 B1	25 December 2019
		JP 2017-519825 A	20 July 2017
		JP 6643329 B2	12 February 2020
		KR 10-1804285 B1	04 December 2017
		KR 10-1843051 B1	28 March 2018
		US 10703812 B2	07 July 2020
		US 11518805 B2	06 December 2022
		US 2017-0158761 A1	08 June 2017
		US 2020-0255513 A1	13 August 2020
		WO 2015-194831 A1	23 December 2015
KR 10-2012-0080407 A	17 July 2012	KR 10-1399121 B1	27 May 2014
KR 10-2009-0036818 A	15 April 2009	KR 10-0940092 B1	02 February 2010

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/005307

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/17(2006.01)i; **A61P 17/00**(2006.01)i; **A61P 29/00**(2006.01)i; **A23L 33/17**(2016.01)i; **G01N 33/68**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/17(2006.01); A01K 67/027(2006.01); A61K 38/16(2006.01); A61K 39/395(2006.01); C12N 5/10(2006.01); G01N 33/53(2006.01); G01N 33/68(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), 염증성 피부 질환(inflammatory skin diseases), TCTP(Translationally controlled tumor protein), 스크리닝(screening)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, K. M. et al., 'Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif stimulates epidermal regeneration via induction of amphiregulin expression after ultraviolet damage', Biochemical and biophysical research communications, 2020, 제524권, 페이지 242-248 초록; 페이지 242, 246	1-9
Y	KR 10-2023-0009563 A (연세대학교 산학협력단) 2023.01.17 요약; 청구항 1, 8; 단락 [0030]	10-13
Y	KR 10-2015-0144297 A (이화여자대학교 산학협력단) 2015.12.24 단락 [0005], [0040]	10-13
A	KR 10-2012-0080407 A (한국생명공학연구원 등) 2012.07.17 전체 문헌	1-13
A	KR 10-2009-0036818 A (한림대학교 산학협력단) 2009.04.15 전체 문헌	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년07월22일(22.07.2024)	**2024년07월22일(22.07.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/005307

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2023-0009563 A	2023/01/17	KR 10-2665156 B1	2024/05/17
KR 10-2015-0144297 A	2015/12/24	EP 3156063 A1	2017/04/19
		EP 3156063 B1	2019/12/25
		JP 2017-519825 A	2017/07/20
		JP 6643329 B2	2020/02/12
		KR 10-1804285 B1	2017/12/04
		KR 10-1843051 B1	2018/03/28
		US 10703812 B2	2020/07/07
		US 11518805 B2	2022/12/06
		US 2017-0158761 A1	2017/06/08
		US 2020-0255513 A1	2020/08/13
		WO 2015-194831 A1	2015/12/23
KR 10-2012-0080407 A	2012/07/17	KR 10-1399121 B1	2014/05/27
KR 10-2009-0036818 A	2009/04/15	KR 10-0940092 B1	2010/02/02