



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월07일

(11) 등록번호 10-1600333

(24) 등록일자 2016년02월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/15 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2014-0130161

(22) 출원일자 2014년09월29일

심사청구일자 2014년09월29일

(56) 선행기술조사문헌

KR100940092 B1*

JP2003512442 A*

비특허 1 고려대학교 2010*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

손상옥

서울특별시 종로구 이화장1길 29 (이화동)

이하나

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 신의학관 7층 피부과

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김도현

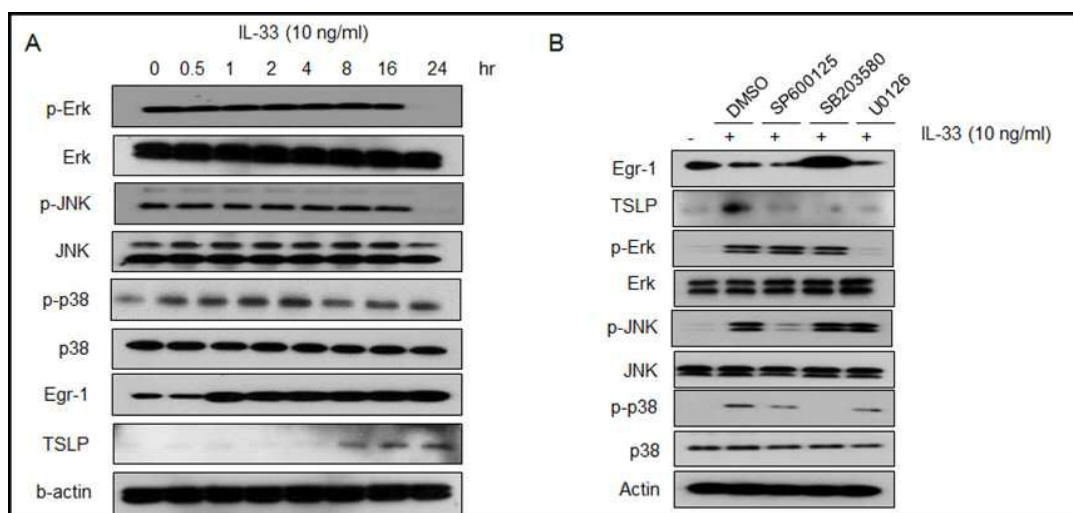
(54) 발명의 명칭 Egr-1 저해를 통한 아토피 피부염 치료제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 아토피 피부염 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 피부세포에 시험 대상물질을 처리한 후, 피부세포에서 Egr-1(Early growth response-1)의 발현 또는 활성 정도를 감소시키는 물질을 유효물질로 선택하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 피부세포에 후보물질을 처리하고 Egr-1의 발현 또는 활성 정도를 확인함으로써, 신속하고 효율적으로 아토피 피부염의 예방 또는 치료 물질을 스크리닝할 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

김진희

서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교

류우인

서울특별시 종로구 통일로16길 8-3, 107동 203호
(무악동, 인왕산I-PARK아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제의 스크리닝 방법:

- (a) Egr-1(Early growth response-1)을 과발현시켜 TSLP 발현이 유도된 피부세포에 아토피 피부염 치료제 후보 물질을 처리하는 단계;
- (b) 후보물질을 처리한 실험군과 대조군의 Egr-1 및 TSLP의 발현 또는 활성 정도를 확인하는 단계; 및
- (c) 상기 대조군에 비해 Egr-1 및 TSLP의 발현 또는 활성 정도를 감소시키는 경우의 후보물질을 아토피 피부염 치료제로 선택하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Egr-1을 과발현하는 피부세포는 (i) 피부세포에 Egr-1 유전자를 도입하거나; (ii) 피부세포에 클로로포름 또는 IL-33을 처리하여 획득되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 3

서열번호 9 또는 10으로 표시되는 Egr-1에 대한 siRNA.

청구항 4

서열번호 9 또는 10으로 표시되는 Egr-1에 대한 siRNA를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 치료제.

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 아토피 피부염 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 피부 세포에 치료제 후보물질을 처리한 후, Egr-1(Early growth response-1)을 감소시키는 후보물질을 치료제로 선택하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

아토피피부염은 심한 가려움증과 전체적인 건조피부를 동반하며 습진 병변이 특정부위에 반복하여 재발하는 만성 염증성 피부질환으로, 유전적인 소인을 나타내고 음식물 알레르기, 알레르기 천식, 알레르기 비염 등 알레르기 질환과 동반하는 알레르기 행진을 하는 특징을 가지고 있다(Akiharu Kubo *et al.*, *J Clin Invest.* 122(2):440-447, 2012; Hywel CW *et al.*, *N Engl J Med*, 352:2314-2324, 2005). 오늘날 아토피 피부염은 도시화 및 산업화가 진행될수록 발생 빈도가 증가하는 것으로 잘 알려져 있으며 최근 우리나라에서도 유병율의 급격한 증가로 사회적 이슈가 되고 있다. 그동안 여러 환경 위해성 물질들이 아토피 피부염을 악화시킬 수 있다는 보고가 있었으나, 분자유전자 수준에서 악화 기전을 규명하는 연구는 미흡한 실정이었다.

[0003] VOCs(Volatile Organic Compounds)는 증기압이 높아 대기 중으로 쉽게 증발되는 액체 또는 기체상 유기 화합물로써 대기 중에서 광화학 반응을 일으켜 오존 등 광화학 산화성 물질을 생성시켜 광화학 스모그를 유발하는 발암성 물질이다. 이뿐만 아니라 Th2반응에 따른 초기면역반응에 관여하는 싸이토카인인 IL-33은 최근 아토피 환자의 병변부에서 과발현되어 있다고 알려져 있다. 이에 대한 분자유전자 수준의 악화 기전을 규명하는 연구 또한 미흡한 실정이다. 우리는 VOCs 중 환경 위해성 물질인 클로로포름과 아토피 환자의 병변부에서 과발현되어 있는 싸이토카인인 IL-33이 아토피 피부염에 미치는 영향을 평가하고 관련 신호전달 기전을 규명함으로써 다양한 아토피 유발인자들이 인체 피부 건강에 미치는 영향을 이해하는데 중요한 기초자료를 제시하고자 한다.

[0004] TSLP(thymic stromal lymphopoietin) 유전자는 IL-7와 유사한 새로운 조혈성 사이토카인이다. 인간의 TSLP는 상피세포, 기질세포 및 비만세포에서 만들어지는데, 아토피피부염 환자의 각질형성세포에는 고농도의 TSLP가 존재한다. 비정상적 신호전달의 최상위 단백질이 바로 TSLP 싸이토카인이다. 알러젠이 몸에 침투되면 TSLP 등의 물질이 수지상 세포를 자극하여 반응을 하게 되는데, 이 과정에서 아토피 피부염의 증상이 나타난다. TSLP는 CD11c+ 수지상세포를 자극해서 TARC(thymus and activation-regulated chemokine)와 MDC 생성을 증가시킨다. 이러한 cytokine의 농도는 Th2 반응에 따른 염증반응에 관여하며 만성 염증성 질환 및 자가 면역 질환에 관련이 있음이 알려져 있고 특히 건선 및 아토피 피부염 등과 같은 allergic disease에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0005] Egr-1(Early growth response-1)은 다양한 싸이토카인, 성장인자, 산화지질, 수용체 길항제 II, 저산소증, 과산화수소, 기계적 손상, 방사선에 의해 증가하며 세포의 성장, 분화, 생존, 자멸사와 면역반응에 중요한 전사인자이다. 최근 건선과 같은 피부염증질환에서 Egr-1의 발현이 증가되어 있다는 보고와 함께 담배연기를 통한 피부노화에 Egr-1의 발현이 증가되어 있다는 보고를 통해 Egr-1이 면역세포와 각질형성세포 사이의 상호 신호전달과정에 관여함으로써 피부 질환의 발생에 관여하는 중요한 유전적 요인 중 하나일 것이라는 가능성을 시사하고 있다.

[0006] 그러나 TSLP와 Egr-1 간의 기전 및 Egr-1을 타겟으로 하는 아토피 치료제는 현재까지 개시되지 않고 있는 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 TSLP와 Egr-1의 기전을 규명하고 이를 기반으로 새로운 아토피 피부염 치료제를 스크리닝하는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, Egr-1의 활성화에 의해 TSLP가 활성화되는 기전을 규명함과 아울러, Egr-1을 억제시키는 물질이 아토피 피부염 치료제로 유용하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 Egr-1을 타겟으로 하는 아토피 피부염 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다. 본 발명은 또한 Egr-1에 대한 siRNA 또는 Egr-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 치료제를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, (a) Egr-1(Early growth response-1)을 과발현하는 피부세포에 아토피 피부염 치료제 후보물질을 처리한 다음, 상기 피부세포에서 Egr-1의 발현 또는 활성 정도를 확인하는 단계; 및 (b) 대조군에 비해 상기 Egr-1의 발현 또는 활성 정도를 감소시키는 후보물질을 치료제로 선택하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 서열번호 9 또는 10으로 표시되는 Egr-1에 대한 siRNA를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, Egr-1에 대한 siRNA 또는 Egr-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 유효성분으로 포함하는 아토피 치료제를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 피부 세포에 치료제 후보물질을 처리하고 Egr-1의 발현 또는 활성 정도를 확인함으로써, 신속하고 효율적으로 아토피 피부염 치료제를 스크리닝 할 수 있다. 본 발명은 또한, Egr-1에 대한 siRNA 또는 Egr-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 유효성분으로 포함하는 아토피 치료제를 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 각질세포에 아토피 유발물질을 처리한 후 Egr-1의 발현을 나타낸 결과이다(A: 클로로포름을 처리한 후 웨스턴블랏(Western blot)으로 확인한 각질세포 내 Egr-1 protein 발현; B: IL-33을 처리한 후 웨스턴블랏(Western blot)으로 확인한 각질세포 내 Egr-1 protein 발현).

도 2는 Egr-1의 발현 증가와 TSLP 발현 증가 상호간에 상관관계가 있음을 나타낸 결과이다(A: Egr-1 유전자 과발현 벡터(vector)를 트랜스펙션한 후 각질세포내 TSLP promotor luciferase의 발현 변화; B: Egr-1 유전자 과발현 벡터(vector)를 트랜스펙션 한 후 TSLP 발현 증가를 웨스턴블랏(Western blot)을 통해 확인한 결과(숫자는 대조군에 대한 발현 변화를 수치화한 것이다)).

도 3은 Egr-1 결합 부위에 TSLP가 직접적으로 결합하는 것을 나타낸 결과이다.

도 4는 ERK에 의한 Egr-1 활성화와 Egr-1 활성화에 의한 TSLP 활성 증가를 확인한 결과이다(A: 클로로포름 처리 후 TSLP에 의한 MAPK 활성화를 나타낸 결과; B: ERK와 JNK 활성화와 TSLP 발현증가의 관련성을 나타내는 결과).

도 5는 ERK에 의한 Egr-1 활성화와 Egr-1 활성화에 의한 TSLP 활성 증가를 확인한 결과이다(A: IL-33 처리 후 TSLP에 의한 MAPK 활성화를 나타낸 결과; B: ERK와 JNK 활성화와 TSLP 발현증가의 관련성을 나타내는 결과).

도 6은 각질세포에 Egr-1에 대한 siRNA를 트랜스펙션한 다음 클로로포름을 처리하여 TSLP가 감소하였음을 확인한 결과이다(A: TSLP promotor luciferase의 발현 변화를 나타낸 결과 ; B: 웨스턴블랏을 통해 확인한 TSLP 단백질의 발현 변화를 나타낸 결과).

도 7은 각질세포에 Egr-1에 대한 siRNA를 트랜스펙션한 다음 IL-33을 처리하여 TSLP가 감소하였음을 확인한 결과이다(A: TSLP promotor luciferase의 발현 변화를 나타낸 결과; B: 웨스턴블랏을 통해 확인한 TSLP 단백질의 발현 변화를 나타낸 결과(숫자는 대조군에 대한 발현 변화를 수치화한 것이다)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학

[0015] 적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0016] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0017] 본 발명에서 “TSLP(Thymic stromal lymphopoietin)”란 피부세포에서 분비되는 cytokine의 하나로 allergic type 2 immune responses와 밀접한 연관이 있으며 아토피와 천식과 같은 allergic disease에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0018] 본 발명에서 “Egr-1(Early growth response-1)란 다양한 사이토카인, 성장인자, 산화지질, 수용체 길항제 II, 저산소증, 과산화수소, 기계적 손상, 방사선에 의해 증가하며 세포의 성장, 분화, 생존, 자멸사와 면역반응에 중요한 전사인자로 알려져 있다.

[0019] 본 발명에서 “si-RNA(small interfering RNA)”란 서열 특이적으로 효율적인 유전자 발현 억제(gene silencing)를 매개하는 짧은 이중 가닥의 RNA(dsRNA)를 의미한다.

- [0020] 본 발명에서 “MAPK(mitogen-activated protein kinase)”란 분열제활성단백질키나아제로 성장인자 등이 세포막에 위치한 수용체를 활성화하면 이 신호를 세포막으로부터 핵으로 전달함으로써 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달계를 의미한다. 포유동물에서 MAPK는 지금까지 3가지(ERK, JNK/SAPK, p38) 종류 이상이 발견되어 MAPK family를 이루고 있다. MAPK는 MAPKKK→MAPKK→MAPK로 연결된 protein kinase cascade를 통하여 활성화된 후, 여러 가지의 표적 유전자의 발현을 조절함으로써 세포 반응을 유발한다. 성장 인자는 주로 ERK 경로를 활성화하고 자외선 등의 stress, 그리고 TNF 등의 염증성 cytokine은 주로 JNK와 p38의 경로를 활성화한다. 그러나 이 경로들은 완전히 독립된 것이 아니어서, 자극이나 세포의 종류에 따라서 여러 가지의 MAPK가 서로 다른 정도로 활성화되고, 이에 따라 서로 다른 기질을 서로 다른 정도로 인산화함으로써, 다양한 신호에 따르는 세포 반응의 특이성을 나타내는 것으로 추정된다.
- [0021] 본 발명에서 “ERK(extracellular signal-regulated protein kinase)”란 세포외신호조절키나아제로 상기 MAPK 신호전달계의 한 경로이며 주로 세포의 증식, 분화 및 생존 등의 반응을 촉발시키는 성장 인자에 의해 활성화된다.
- [0022] 본 발명에서 “JNK(c-Jun-N-terminal kinase)”란 상기 MAPK 신호전달계의 한 경로로 세포가 환경적인 스트레스에 노출되면 활성화되는 신호 전달 체계이다. JNK의 활성화는 MAPK에 의해 트레오닌과 티로신 잔기가 인산화되는 과정을 통해 조절된다.
- [0023] 본 발명에서 “압타머”란, 높은 친화성으로 타겟물질을 특이적으로 인지할 수 있는 작은 단일가닥 올리고핵산을 말한다.
- [0024] 본 발명에서는, 아토피 피부염 환자들에게서 특징적으로 증가되어 있는 TSLP의 발현에 Egr-1이 중요한 역할을 한다는 새로운 메커니즘을 규명하고, 상기 Egr-1을 억제시킬 경우, TSLP가 감소되어 아토피 치료 효과를 가질 수 있다는 것을 규명하였다.
- [0025] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) Egr-1(Early growth response-1)을 과발현하는 피부세포에 아토피 피부염 치료제 후보물질을 처리한 다음, 상기 피부세포에서 Egr-1의 발현 또는 활성 정도를 확인하는 단계; 및 (b) 대조군에 비해 상기 Egr-1의 발현 또는 활성 정도를 감소시키는 후보물질을 치료제로 선택하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 Egr-1을 과발현하는 피부세포는 (i) 피부세포에 Egr-1 유전자를 도입하거나, (ii) 피부세포에 클로로포름 또는 IL-33을 처리하여 획득되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에서는 Egr-1에 대한 siRNA가 피부세포에서 Egr-1의 발현을 감소시켜 TSLP를 감소시키는 것을 확인하였다.
- [0028] 따라서 본 발명은 다른 관점에서, 서열번호 9 또는 10으로 표시되는 Egr-1에 대한 siRNA에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명에 있어서 'siRNA(small interfering RNA)'란 특정 mRNA의 절단을 통하여 RNA 간섭을 유도할 수 있는 짧은 이중가닥 RNA를 말한다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중가닥 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 쌍을 이루는 염기 길이는 15 내지 30 염기이다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNA 간섭 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활 말단 또는 돌출 말단 모두 가능하다. 접착 말단 구조는 3' 말단 돌출 구조와 5' 말단 돌출 구조 모두 가능하다.
- [0030] 본 발명의 siRNA는 그 활성을 저하시키지 않는 하나 이상의 치환, 삽입, 결실 및 그 조합을 갖는 변형체를 포함한다. 이러한 변형체는 상기한 siRNA의 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 가질 수 있으며, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는다.
- [0031] 본 발명의 siRNA는 직접 화학적으로 합성하거나(Sui G et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2002) 99:5515-5520), 인비트로 전사를 이용하여 합성하는 방법(Brummelkamp TR et al., Science (2002) 296:550-553) 등 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 합성할 수 있다.
- [0032] 한편, Egr-1에 특이적으로 결합하는 항체나 압타머를 투여할 경우, 피부세포에서 Egr-1의 활성을 감소시켜 TSLP의 발현을 감소시키게 되고, 궁극적으로 아토피 치료 효과를 가질 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다 할 것이다.
- [0033] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서 Egr-1에 대한 siRNA 또는 Egr-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머

를 유효성분으로 포함하는 아토피 치료제에 관한 것이다.

- [0034] 본원에서 사용된 용어 "항체"란 경쇄 및 중쇄의 가변영역을 통해 다른 분자(항원)에 결합하는 단백질을 일컫는 것으로, IgG, IgD, IgA 및 IgE 유래를 포함한다. 또한 본원의 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 항체를 일컫는 것이다. 온전한 항체 또는 그 단편을 포함하는 본원의 항체는 단량체의 항원 결합능의 적어도 일부를 포함하는 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 등의 다량체로 존재할 수 있다. 이러한 다량체는 또한 동종다량체, 또는 이종다량체를 포함하는 것이다. 항체 다량체는 다수의 항원 결합 부위를 포함하기 때문에 단량체와 비교하여 항원에 대한 결합능이 우수하다. 항체의 다량체는 또한 다기능성(bifunctional, trifunctional, tetrafunctional) 항체 제작에도 용이하다.
- [0035] 본원에 기재된 Egr-1에 대한 항체는 당업계에서 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).
- [0036] 본원발명에서 Egr-1과 결합하는 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. 또한, 본원에서의 다가 항체의 항원 결합 부위 각각의 항원 결합 친화도가 정량적으로 동일할 필요는 없다. 본원에서의 다량체 항체의 경우에, 기능적 항원 결합 부위의 수는 US 2005/0186208A1의 실시예 2에 기재된 바와 같은 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.
- [0037] 본원에 기재된 Egr-1에 대한 항체는 당업계에 공지된 다양한 분석법에 의해 그의 물리적/화학적 특성 및 생물학적 기능에 대해 특성화될 수 있다. 정제된 Egr-1에 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 제한되지는 않는 일련의 검정에 의해 추가로 특성화될 수 있다.
- [0038] 특정물질과 결합하는 핵산을 선별하는 방법을 셀렉스(SELEX, Systematic Evolution of Ligand by Exponential enrichment)라 하고, 이렇게 선별된 산물인 핵산을 일반적으로 압타머(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. 본 발명의 Egr-1에 특이적으로 결합하는 압타머는 당해 기술 분야에 공지된 기술인 SELEX 표준 방법(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 Egr-1에 대한 압타머를 용이하게 제조할 수 있음은 당업자에게 있어서 자명한 사실이라고 할 것이다.
- [0039] 상기 Egr-1에 특이적으로 결합하는 압타머의 결합 정도를 측정하는 단계는 관련 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 DNA 압타머 결합 측정 기술을 이용하여 수행될 수 있으며, 예컨대, 압타머 말단에 형광 또는 방사성 물질 표지하거나 비오틴을 결합시켜 형광 또는 방사성 세기를 측정하거나, 이미징화하여 관찰하는 방법 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 치료제는 siRNA 또는 Egr-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 약학 조성물로 제공될 수 있으며, 상기 복합체는 질환 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료 기간 등에 따라 적절한 약학적으로 유효한 양으로 약학 조성물에 포함될 수 있다.
- [0041] 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈,

폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0042] 상기 약학 조성물은 충전제, 항응집제, 유허제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 약학 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0044] 실시예 1: 각질세포에서 Egr-1의 발현

[0045] Egr-1이 면역세포와 각질형성세포 사이의 상호 신호전달과정에 관여하는 전사인자로서 피부 질환의 발생에 관여하는 중요한 유전적 요인 중 하나임을 확인하기 위하여 Egr-1의 발현을 웨스턴블랏(Western blot)으로 확인하였다. 사람 각질세포주(CLS; Cell Lines Service, Eppelheim, 독일)를 0% FBS DMEM 배지에 24시간 배양한 다음 추가로 18시간을 0.5% DMEM 배지에 배양하였다. TSLP 유도 인자로서 클로로포름과 IL-33을 처리한 다음, RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치시킨 다음, 냉장원심분리기에서 13000rpm의 속도로 30분간 원심분리한 후, 상층액만을 취하여 단백질을 정량 후 50 µg의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 겔을 트랜스퍼한 후 5% BSA로 1시간 동안 블로킹한 후 Egr-1(Santa Cruz, CA)을 1:1000으로 희석하여 인큐베이션 하였다. HRP가 부착된 2차 항체 반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액(West-Q Chemiluminescent Substrate Kit, Plus - GenDEPOT)을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다.

[0046] 그 결과, 사람 각질세포주 (HaCaT cell line)에 클로로포름과 IL-33을 처리한 경우 모두에서 Egr-1 단백질의 발현이 각각 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다(도 1A, 도 1B).

[0047]

[0048] 실시예 2: Egr-1이 TSLP 전사단계에서부터 영향을 미치는지 여부 확인

[0049] Egr-1의 과발현이 TSLP 전사조절 부위인 promoter 수준에서는 어떠한 영향을 미치는지 확인하는 실험을 진행하였다. Egr-1에 의한 TSLP의 발현 변화를 확인하기 위하여 TSLP promoter luciferase(pGL3.0 luciferase reporter vector(Promega, Madison, WI) 내에 제한효소(Kpn, Hind)를 이용하여 TSLP promoter를 삽입시킨 다음 bacteria culture를 통하여 대량 생산하여, HaCaT cells에 trasfection 시킴)를 이용하여 TSLP의 발현 증가가 실제 TSLP의 전사조절 부위인 promoter에 의하여 발현되는 것인지를 확인하였다. 사람 각질세포주(HaCaT cell line)를 12well에서 antibiotics-free media(10% fetal bovine serum(HyClone)를 첨가한 Dulbeccos modified Eagles medium)에서 24시간 배양한 다음 클로닝된 promoter를 LF2000과 함께 15분간 배양한 후 media에 떨어뜨린 다음 24시간이 경과하면 세포를 24well로 옮겼다. 상기 각질세포주에 Egr-1 과발현 벡터(vector)를 transfection 한 후, 0.5% FBS 배지에서 12시간동안 배양하였다. 8시간 후에 각각의 well에서 세포를 취하여 reporter assay buffer로 lysis한 다음 일정량의 lysate에 luciferin을 첨가하였다. 형광은 berthold MPL1 luminometer에서 측정하였다. 그 결과, 사람 각질세포주(HaCaT cell line)에 Egr-1을 과발현 시킨 경우 전사레벨에서부터 TSLP의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 2A).

[0050] 한편, 각질세포에 Egr-1 유전자 과발현 벡터(vector)를 transfection하였다. 상기 벡터는 인간 게놈 DNA를 서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시킨 다음, 증폭된 DNA절편을 TA클로닝 벡터(Real Biotech Corp, Taipei, Taiwan)에 ligation 한 후, 클로닝된 시퀀스(sequence)를 서열분석법으로 검증하여 플라스미드를 구축한 다음, Escherichia coli DH5-(Real Biotech Corp)로 형질전환시켜 얻은 DNA 추출물을 제한 효소(KpnI, XbaI)를 이용하여 pcDNA3 발현 벡터에 클로닝하는 과정을 통해 제조하였다. 상기 벡터를 transfection한 다음, 단백질을 추출하여 웨스턴 블랏법으로 단백질 레벨에서의 TSLP의 발현양 변화를 관찰하였다. 상기 방법에 얻어진 Egr-1 유전자 과발현 벡터(vector)가 transfection된 세포를 취하여 RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에서 30분간 정치시킨 후 냉장원심분리기에서 13000rpm의 속도로 30분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 단백질을 정량 후 50 µg의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 겔을 트랜스퍼한 후 5% BSA로 1시간 동안 블로킹한 다음 Egr-1(Santa Cruz, CA)을 1:1000으로 희석한 후 인큐베이션 하였다. HRP가 부착된 2차 항체 반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다. 그 결과, 사람 각질세포주(HaCaT cell line)에 Egr-1을 과발현시킨 경우, 전사레벨에서부터 TSLP 단백질의 발현

이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도2B).

표 1

[0051]

서열번호	염기서열
1	forward: 5' - GACACCAGCTCTCCAGCCT-3'
2	reverse: 5' -CCTTCTTTCCCTTTCCT-3'

[0052]

실시예 3: Egr-1과 TSLP의 결합여부 확인

[0053]

Egr-1과 TSLP promoter의 직접적인 바인딩 여부를 확인하기 위하여 ChIP(Chromatin immunoprecipitation) assay를 수행하였다. 사람 각질세포주(HaCaT cell line)에 IL-33을 처리한 후 세포를 1% 포름알데하이드(formaldehyde)로 10분간 고정시킨 다음, 글리신(Glycine)을 첨가하여 cross-linking을 절단시키고 단백질을 가수분해 효소(protease)를 첨가한 lysis buffer에서 세포를 용해시켰다. 원심분리하여 핵만 분리해 낸 후 nuclear lysis buffer로 다시 용해시켰다. Lysate를 초음파처리(sonication)한 후 연어의 정자(salmon sperm) DNA 및 magnetic bead로 pre-clearing한 다음, 전사인자에 대한 항체 및 magnetic bead로 면역침강을 실시하였다(immunoprecipitation). RNase와 5M 염화나트륨(NaCl)을 처리한 다음, 에탄올(EtOH)을 처리하여 추출한 DNA 전사인자의 결합부위 전후로 TSLP primer를 제작한 다음, 표 2의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. Positive control로 Egr-1의 발현시 유도되는 단백질인 VEGF를 사용하였다.

표 2

[0054]

서열번호	유전자	염기서열
3	TSLP	forward: 5'-TTCTCCGAGCGATGACTCCTA-3'
4	TSLP	reverse: 5'-GGCCCTCTCTACCCAGGTC-3'
5	TSLP	forward: 5'-CCAAGGACCAGAGCGATG-3'
6	TSLP	reverse: 5'-CCTCTCTCTCTTTCCCTTCC-3'
7	VEGF	forward: 5'-GAGAGAGACGGGTCAGAGAGAG-3'
8	VEGF	reverse: 5'-CAGCGCGACTGGTCAGCTG-3'

[0055]

그 결과, Egr-1 binding like sequence를 지니는 TSLP의 -1133 ~ -983 sequence 특이적인 primer를 이용한 PCR에 의해 Egr-1과 TSLP가 직접적인 바인딩을 이루는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0056]

상기 결과로부터 Egr-1과 TSLP의 직접적인 바인딩이 아토피와 같은 피부염증 질환의 신호기작에 중요한 기전임을 확인할 수 있었다.

[0057]

실시예 4: Egr-1과 관련된 아토피 유전자의 확인

[0058]

Egr-1 발현에 의하여 특이적으로 발현하는 target 유전자를 발굴하기 위하여 사람 각질세포주(HaCaT cell line)에서 Egr-1 유전자 과발현 벡터(vector)를 이용하여 Egr-1 분자의 발현을 증가시킨 다음, RNA를 분리시킬 수 있는 trizol을 이용하여 추출한 RNA를 micro-array 기법을 이용하여 분석하였다.

[0059]

실험결과, Egr-1의 발현을 증가시킨 경우 총 1931개의 유전자가 통계적으로 유의미한 수준으로 차이가 있음을 확인하였다. Egr-1 의존적인 발현 양상을 보이는 아토피피부염과 관련한 유전자들을 [표 3]에 나타냈다. 상기 결과를 통해 Egr-1이 아토피 피부염과 관련한 중요한 인자 중 하나임을 확인할 수 있었다.

[0060]

표 3

[0061]

Description	Gene Symbol	Genebank Accession	overexpression-Egr-1 intensity
Interferon, gamma-inducible protein 16	IFI16	NM_005531	2.11256

Caspase1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	CASP1	NM_001223	3.07203
interleukin 10 receptor, beta	IL10RB	NM_000628	1.90667
interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	NM_001560	1.5878
cathepsin Z	CTSZ	NM_001336	11.9228
cathepsin L2	CTSL2	NM_001333	1.92309
cathepsin B	CTSB	NM_001908	1.53292

[0062] 실시예 1 내지 4의 결과는 MAPK 의존적인 Egr-1 발현이 TSLP 과발현을 유도한다는 가정을 뒷받침하는 것으로 분석되며, 이는 Egr-1의 저해를 통한 아토피 치료제 스크리닝을 위한 단서로 작용한다는 것을 의미한다.

[0063]

[0064] 실시예 5: ERK에 의한 Egr-1 활성화와 Egr-1 활성화 의존적인 TSLP의 발현 증가

[0065] Egr-1의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있는 MAPK들의 활성도를 확인하고 각각의 저해제를 처리하여 어떤 MAPK 의존적으로 TSLP의 발현이 증가되는지를 확인해 보았다.

[0066] 사람 각질세포주(HaCaT cell line)를 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 후 클로로포름과 IL-33을 배양액에 처리한 다음, RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣고 얼음에 30분간 정치시킨 후 냉장원심분리기에서 13000rpm의 속도로 30분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 50 µg의 단백질을 정량하여 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 겔을 트랜스퍼한 후 5% BSA로 1시간 동안 블로킹한 다음, TSLP(abcam, USA), p-ERK, ERK, pp38, p38, pJNK, JNK(cell signaling, USA) 그리고 Actin 항체(santa cruz, USA)를 1:1000으로 희석하여 인큐베이션하였다. HRP가 부착된 2차 항체 반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다.

[0067] 그 결과, 클로로포름 처리시에 ERK와 JNK활성화 형태인 pERK와 pJNK의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 4A). 또한 IL-33 처리시에는 ERK와 JNK, p38 활성화 형태인 pERK와 pJNK, p-p38발현이 증가 되는 것을 확인할 수 있었다(도 5A).

[0068] 다음으로 MAPK 활성화에 의존하여 TSLP의 발현 증가 현상이 나타나는지를 확인하기 위하여 신호전달체계에 관한 단백질 각각의 저해제를 처리한 후 Egr-1을 처리하고 TSLP 단백질 발현 변화를 웨스턴블랏으로 확인하였다. 사람 각질세포주 (HaCaT cell line)를 실시예 1과 동일한 방법으로 배양한 후 3시간동안 ERK 저해제(U0126, 5M, calbiochem, USA), p38 저해제(SB203580, 5M, calbiochem, USA) 그리고 JNK 저해제(SP600125, 1M, calbiochem, USA)를 처리한 다음, 100ng/ml의 TSLP를 16시간동안 배양액에 처리하였다. DMSO는 대조군으로 사용하였다. 상기 세포를 RIPA 버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치시킨 후 냉장원심분리기에서 13000rpm의 속도로 30분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 50 µg의 단백질을 정량하여 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 겔을 트랜스퍼한 후 5% BSA로 1시간 동안 블로킹한 후 TSLP(abcam, USA), p-ERK, ERK, pp38, p38, pJNK, JNK(cell signaling, USA) 및 Actin 항체(santa cruz, USA)를 1:1000으로 희석한 후 인큐베이션하였다. HRP가 부착된 2차 항체 반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다.

[0069] 그 결과, 클로로포름 처리 후 각 저해제들을 처리하여 정상적으로 ERK, p38, JNK의 활성이 저해되었으며 EKR과 JNK저해제에 의해 Egr-1에 의한 TSLP의 발현 증가 현상이 없어지는 것을 확인할 수 있었다(도 4B). 또한 IL-33 처리 후 각 저해제들을 처리하여 정상적으로 ERK, p38, JNK의 활성이 저해되었으며 EKR과 JNK, p38저해제에 의해 Egr-1에 의한 TSLP의 발현 증가 현상이 없어지는 것을 확인할 수 있었다(도 5B). 따라서 TSLP의 발현 저하 현상이 Egr-1의 억제를 통해 이루어지는 것임을 확인할 수 있었다.

[0070]

[0071] 실시예 6: Egr-1에 대한 siRNA에 따른 TSLP 발현의 감소

[0072] Egr-1의 negative effect를 확인하기 위해 Egr-1에 대한 siRNA를 통하여 Egr-1 발현을 저해시킨 다음 TSLP 발현 변화를 확인하였다. 사람 각질세포주 (HaCaT cell line)를 실시예 2와 동일한 방법으로 배양한 후, Egr-1에 대한 siRNA를 transfection한 다음 0.5% FBS 배지에서 12시간동안 배양한 다음 클로로포름과 IL-33을 처리하였다. 8시간 후에 각각의 well에서 세포를 취하여 reporter assay buffer로 용해시킨 다음 일정량의 lysate에 luciferin을 첨가하였고 berthold MPL1 luminometer에서 형광을 측정하였다. 실험결과 Egr-1에 대한 siRNA가 TSP를 저해함을 확인할 수 있었다(도 6A, 도 7A).

[0073]

상기 방법에 의해 얻어진 siRNA가 transfection된 세포를 취하여 RIPA버퍼(Elpis, Korea)에 넣어 얼음에 30분간 정치시킨 후 냉장원심분리기에서 13000rpm의 속도로 30분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 단백질 정량 후 50 µg의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 겔을 트랜스퍼한 후 5% BSA로 1시간 동안 블로킹한 다음, Egr-1(Santa Cruz, CA)을 1:1000으로 희석한 후 인큐베이션 하였다. HRP가 부착된 2차 항체 반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다. 실험결과 Egr-1에 대한 siRNA가 TSPL를 저해함을 확인할 수 있었다(도 6B, 도 7B).

[0074]

실시에 6의 결과로부터 하기 [표 4]에 기재된 바와 같이, 서열번호 9 또는 10으로 표시되는 Egr-1에 대한 siRNA가 Egr-1를 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다. 이는 Egr-1에 대한 siRNA 또는 Egr-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 압타머를 유효성분으로 포함하는 아토피 치료제의 합리적인 근거를 제공한다.

[0075]

표 4

[0076]

서열	유전자	염기서열
9	Egr-1	5' -GGUACUACCUCUUAUCCA-3'
10	Egr-1	5' -UGGAUAAGAGGUAGUAACC-3'

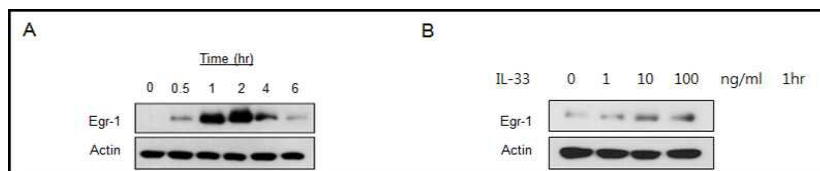
[0077]

이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

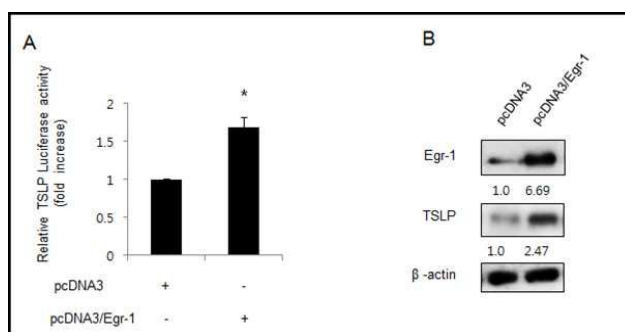
[0078]

도면

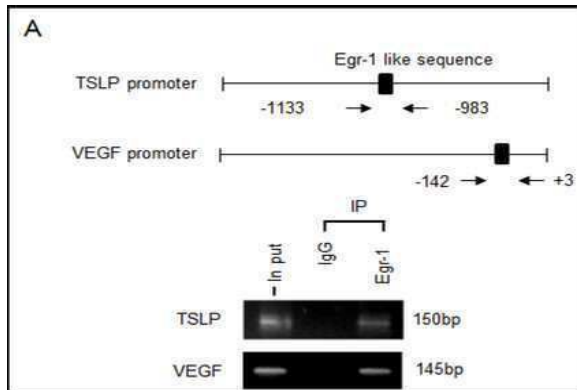
도면1



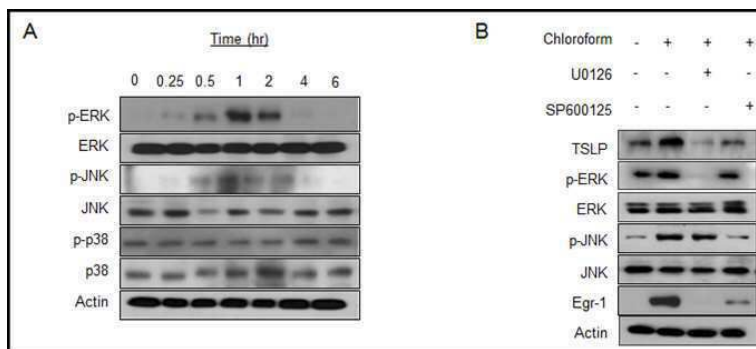
도면2



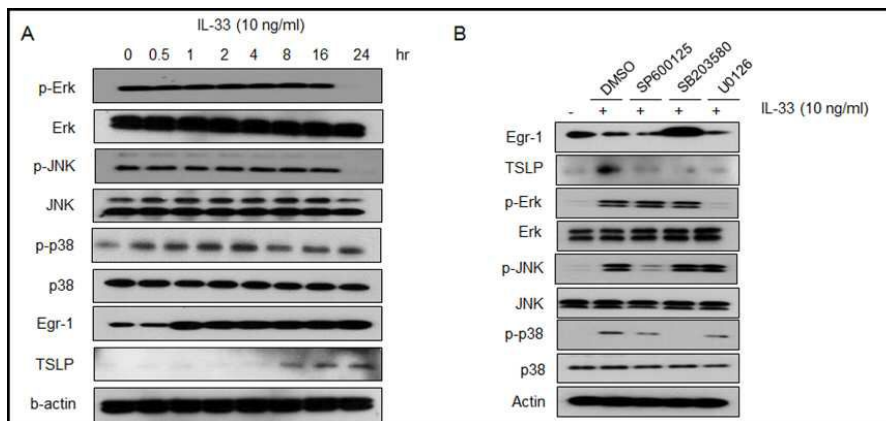
도면3



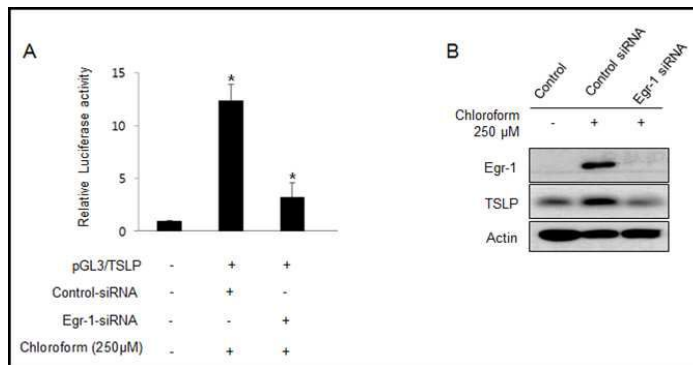
도면4



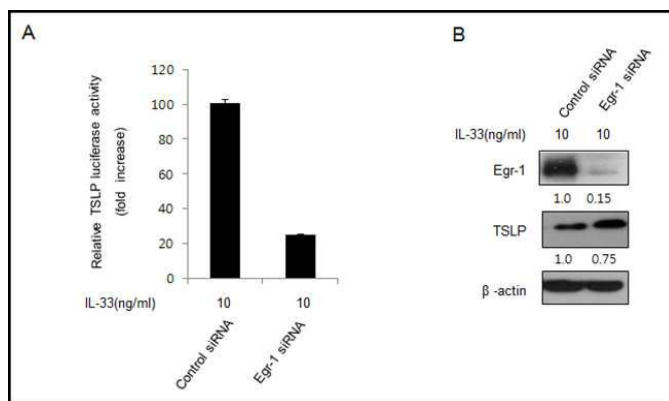
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Korea University Research And Business Foundation
- <120> Method of Screening Therapeutic Agent of Atopic Dermatitis by Egr-1 Downregulation
- <130> P14-B155
- <160> 10
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Primer
- <400> 1
- gacaccagct ctccagcct
- <210> 2
- <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400>
 > 2
 cctttctttc ccctttccct 20
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 3
 ttctccgagc gatgactcct a 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 4
 ggccctctct acaccaggt c 21
 <210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 5
 ccaaggacca gagcgatg 18
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 6
 cctctctctc tctttccctt cc 22

<210>	7	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	7	
	gagagagacg gggtcagaga gag	23
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	8	
	cagcgcgact ggtcagctg	19
<210>	9	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	9	
	gguuacuacc ucuaacca	19
<210>	10	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	siRNA	
<400>	10	
	uggauaagag guaguaacc	19