

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0037536

(43) 공개일자 2020년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/573 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)

A61K 31/4439 (2006.01) A61P 1/18 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/573 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0116871

(22) 출원일자 2018년10월01일

심사청구일자 2018년10월01일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

홍순선

서울특별시 서대문구 문화촌길 6-24, 102동 1601호 (홍제동, 문화촌현대아파트)

정경희

경기도 부천시 경인로484번길 68-7, 102동 1105호 (괴안동, 신일해피트리아파트)

김주영

인천광역시 미추홀구 매소홀로 143, 2동 308호 (용현동, 윤성아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

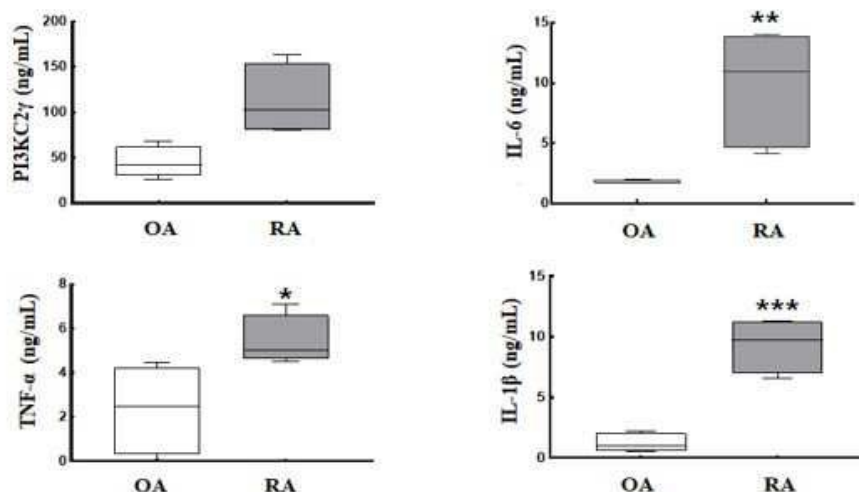
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 PI3KC2 γ 를 표적으로 하는 염증 질환 진단 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 PI3KC2 γ 를 표적으로 하는 염증 질환 진단 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 PI3KC2 γ 저해 활성을 갖는 PBT-6는 염증 유발성 사이토카인 등과 같은 다양한 염증 매개 물질들의 발현 및 활성을 억제시켜 우수한 항염증 효과를 나타냈을 뿐만 아니라, 이에 따른 유효한 치료효과를 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 확인할 수 있었는 바, 기존의 염증성 질환 치료제를 대체할 수 있는 유효 물질로 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/4439 (2013.01)
A61P 1/18 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.05)
A23V 2200/324 (2013.01)
G01N 2333/91215 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/067 (2013.01)
G01N 2800/102 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M3C1A3051476
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니아사업
 연구과제명 세포내 단백질 타겟 항체의 임상적용 기술
 기 여 율 50/100
 주관기관 인하대학교
 연구기간 2018.03.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A5A2009392
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기초의과학연구센터(MRC)사업
 연구과제명 저산소 표적 질환 연구센터
 기 여 율 50/100
 주관기관 인하대학교
 연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

포스포이노시티드 3-키나제-C2 γ (Phosphoinositide 3-Kinase-C2 γ ; PI3KC2 γ)를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

PI3KC2 γ 의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 PI3KC2 γ 의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 PI3KC2 γ 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 PI3KC2 γ 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 염증 질환 진단용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장질환 또는 췌장염인 것을 특징으로 하는 염증 질환 진단용 조성물.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 염증 질환 진단용 키트.

청구항 6

- (1) 환자에서 분리된 시료로부터 PI3KC2 γ 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 PI3KC2 γ 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (2) 상기 PI3KC2 γ 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 PI3KC2 γ 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및
- (3) 상기 PI3KC2 γ 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 PI3KC2 γ 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 염증 질환으로 판단하는 단계를 포함하는 염증 질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장질환 또는 췌장염인 것을 특징으로 하는 염증 질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 PI3KC2 γ 단백질 발현 억제제는 PI3KC2 γ 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 및 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

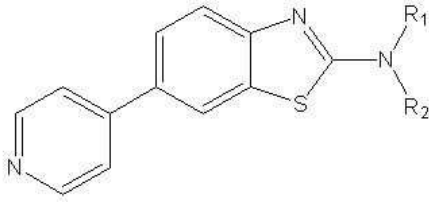
청구항 10

제8항에 있어서, 상기 PI3KC2 γ 단백질 활성 억제제는 PI3KC2 γ 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 1]



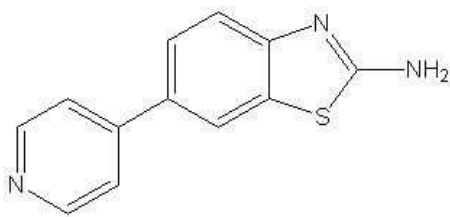
상기 화학식 1에서,

R₁ 및 R₂는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소, (C1~C4)알킬, (C1~C4)알콕시 및 할로겐으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 2]



청구항 13

제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장질환 또는 췌장염인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 14

- (1) 염증 질환 동물 모델에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- (2) 상기 시험물질을 접촉한 염증 질환 동물 모델에서 PI3KC2 γ 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및
- (3) 대조군 시료와 비교하여 상기 PI3KC2 γ 단백질의 발현 또는 활성 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 염증 질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장질환 또는 췌장염인 것을 특징으로 하는 염증 질환 치료제 스크리닝 방법.

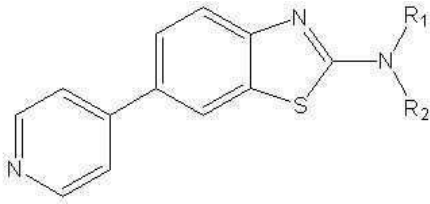
청구항 16

PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



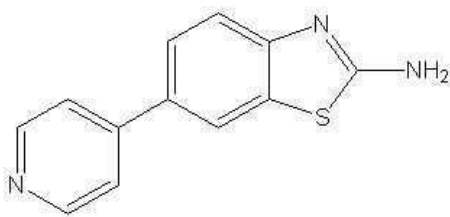
상기 화학식 1에서,

R₁ 및 R₂는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소, (C1~C4)알킬, (C1~C4)알콕시 및 할로겐으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 염증 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 포스포이노시티드 3-키나제-C2 γ (Phosphoinositide 3-Kinase-C2 γ ; PI3KC2 γ)를 표적으로 하는 염증 질환 진단 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 류마티스 관절염은 만성 염증성 자가면역 질환으로 윤활막염과 이의 결과로 발생하는 뼈와 연골의 파괴를 특징으로 한다. 정확한 병인은 밝혀지지 않았으나 유전적 소인과 환경적인 자극이 자가면역 반응을 촉발하여 자가항체 생산을 유발하고 윤활막염이 발생하며, 이 과정에 많은 면역 세포와 시토카인이 서로 유기적 영향 관계를 가지면서 염증 반응을 악화시키며 결과적으로 인접한 연골과 뼈를 파괴하게 된다. 이러한 병인에 착안하여 개발된 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF) 저해제, 인터루킨(IL)-6 차단제 그리고 다양한 면역 세포 저해제와 같은 생물학적 제제의 도입으로 근 20년간 류마티스 관절염에 대한 치료는 획기적인 변화를 맞게 되었다. 기존의 항류마티스 제제에 불충분한 반응을 보이는 환자에게 우수한 임상적 효과를 보였고, 관절 파괴에 대한 뼈와 연골의 보호 효과를 나타내었다. 그러나 이러한 생물학적 제제에도 반응하지 않는 환자가 적지 않게 존재한다는 점, 감염이나 종양 위험성 등의 부작용, 주사를 이용해야 하는 투여 방법의 침습성과 불편성, 높은 약제 가격 등의 문제점을 안고 있다. 이에 비해 소분자 억제제(small molecular inhibitor)는 대부분 세포내 신호 전달 과정이나 케모카인과 수용체의 결합 작용을 억제하는 약물로, 대표적으로 Janus kinase (JAK) 저해제와 spleen tyrosine kinase (Syk) 저해제가 임상 사용의 승인을 받았거나 임상 연구가 거의 종료 단계에 있다. 이 약물들은 메토크세이트의 병합 투여 없이도 생물학적 제제에 버금가는 관절염 조절 효과를 보일 뿐 아니라, 경구 투여가 가능해 투여가 편리하고, 비교적 저렴한 비용으로 이러한 화합물의 생산이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 현재 S1P lyase 저해제인 LX3305와 케모카인 수용체 저해제인 CCX354-C 등의 소분자 억제제가 임상 연구 중에 있으며, 병인에 기초한 연구를 통해 지속적으로 새로운 약물들이 개발되고 있다. 또한, 항염증제로 이용하

고 있는 물질로는 비스테로이드계에 이부프로펜, 인도메타신 등이 있고 스테로이드계에는 텍사메타손 등이 있으나, 이들의 부작용으로 인해 그 사용이 제한되고 있어서 새로운 항염증 제제의 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2017-0136281호 (2017.12.11 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 PI3KC2 γ 를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 진단용 바이오마커 조성물, PI3KC2 γ 의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 진단용 조성물, PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물, PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 및 PI3KC2 γ 단백질 발현 수준 측정을 통한 염증 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 PI3KC2 γ 를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0006] 또한, 본 발명은 PI3KC2 γ 의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 PI3KC2 γ 의 발현 수준 측정을 통한 염증 질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 PI3KC2 γ 단백질의 발현 수준 측정을 통한 염증 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 PI3KC2 γ 를 표적으로 하는 염증 질환 진단 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 PI3KC2 γ 저해 활성을 갖는 PBT-6는 염증 유발성 사이토카인 등과 같은 다양한 염증 매개 물질들의 발현 및 활성을 억제시켜 우수한 항염증 효과를 나타냈을 뿐만 아니라, 이에 따른 유효한 치료효과를 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 확인할 수 있었는 바, 기존의 염증성 질환 치료제를 대체할 수 있는 유효 물질로 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 골관절염 환자와 류마티스 관절염 환자의 활막액에서 염증 유발성 사이토 카인 (IL-6, TNF- α , IL-1 β) 및 PI3KC2 γ 의 발현량을 확인한 결과이다.

도 2는 골관절염 환자와 류마티스 관절염 환자의 활막 조직에서 H&E 염색과 PI3KC2 γ 를 IHC로 염색하여 발현량을 확인한 결과이다.

도 3은 건강한 사람과 류마티스 관절염 환자의 PBMC에서 PI3KC2 γ 의 단백질 발현량을 확인한 결과이다.

도 4는 PBT-6의 구조를 나타낸다.

도 5는 PBT-6의 PI3KC2 γ 결합 억제 결과이다.

도 6은 PBT-6의 PI3 키나제 결합 분석 결과이다.

도 7은 류마티스 관절염 세포에서 PBT-6의 세포 사멸을 확인한 결과이다.

도 8은 류마티스 관절염 세포에서 PBT-6에 따른 IL-6의 분비량 변화를 확인한 결과이다.

도 9는 류마티스 관절염 세포에서 PBT-6에 따른 신호 전달물질(PI3KC2 γ , p-AKT2, p-mTOR)의 발현량 변화를 확인한 결과이다.

도 10은 대식세포에서 PBT-6의 세포 사멸을 확인한 결과이다.

도 11은 대식세포에서 PBT-6에 따른 IL-6 및 TNF- α 의 분비량 변화를 확인한 결과이다.

도 12는 대식세포에서 PBT-6에 따른 신호 전달물질(PI3KC2 γ , p-AKT2, p-mTOR)의 발현량 변화를 확인한 결과이다.

도 13은 대식세포에서 PBT-6에 따른 과골세포 분화 억제를 확인한 결과이다.

도 14는 대식세포에서 PBT-6에 따른 과골세포 관련 유전자(NFATc1, RANKL)의 발현량 변화를 확인한 결과이다.

도 15는 대식세포와 류마티스 관절염 세포에서의 세포이동 실험을 보여주는 그림이다.

도 16은 대식세포에서 PBT-6에 따른 세포이동의 변화를 확인한 결과이다.

도 17은 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 PBT-6의 처리에 따른 발바닥의 부종 변화를 보여주는 사진이다.

도 18은 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 PBT-6의 처리에 따른 관절염 진행지수의 변화를 확인한 결과이다.

도 19는 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 PBT-6의 처리에 따른 발바닥 두께의 변화를 확인한 결과이다.

도 20은 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 PBT-6의 처리에 따른 IL-6 및 TNF- α 의 분비량 변화를 확인한 결과이다.

도 21은 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 PBT-6의 처리에 따른 H&E staining과 PI3KC2 γ , p-AKT2를 IHC로 염색하여 발현량을 확인한 결과이다.

도 22는 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 PBT-6의 처리에 따른 병리학적 요인들의 변화를 확인한 결과이다.

도 23은 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 PBT-6의 처리 후 발목과 손가락 관절을 micro-CT로 관찰한 결과이다.

도 24는 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델에서 PBT-6의 처리 후 발목과 손가락 관절의 병적 요인을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이에, 본 발명자들은 PI3K class II γ 가 류마티스 관절염을 가진 환자의 활막액과 활막 조직에서 많이 발현되는 것을 확인하였고, 선택적인 PI3K class II γ 억제제인 PBT-6가 류마티스 관절염 세포인 MH7A cell과 대식세포인 Raw 264.7 cell에서 세포사멸 효과를 가져다 주는 것을 확인하였다. 또한 PBT-6에 의해서 과골세포의 분화가 억제되는 것을 확인하였고, 세포이동을 현저히 감소시키는 것을 보여주었다. 또한 콜라겐 유도 류마티스 관절염 동물모델(CIA mouse)에서 발목의 붓기나 부종, 관절의 뒤틀림 정도가 PBT-6에 의해 현저히 감소 되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0014] 본 발명은 PI3KC2 γ 를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0015] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.

- [0016] 또한, 본 발명은 PI3KC2 γ 의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0017] 상세하게는, 상기 PI3KC2 γ 의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 PI3KC2 γ 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 상기 PI3KC2 γ 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앵타머 또는 화합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 상세하게는, 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장질환 또는 채장염일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 염증 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0020] 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 것은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 PI3KC2 γ 에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0023] 또한 본 발명의 키트는 마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙어서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 "앵타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앵타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오타이드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.
- [0026] 또한, (1) 환자에서 분리된 시료로부터 PI3KC2 γ 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 PI3KC2 γ 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; (2) 상기 PI3KC2 γ 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 PI3KC2 γ 단백질의 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계; 및 (3) 상기 PI3KC2 γ 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 PI3KC2 γ 단백질의 발현 수준이 대조군 시료보다 높을 경우 염증 질환으로 판단하는 단계를 포함하는 염증 질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0027] 상세하게는, 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장질환 또는 채장염일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 상세하게는, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 상세하게는, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

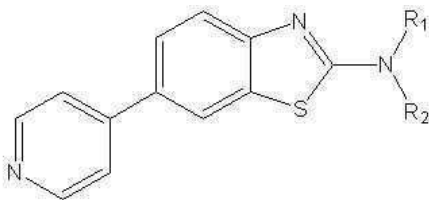
[0030] 본 명세서에서 용어 "환자에서 분리된 시료"란 염증 질환 진단용 바이오 마커인 상기 PI3KC2 γ 유전자 또는 PI3KC2 γ 단백질의 발현 수준에 있어서 대조군과 차이가 나는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨와 같은 시료를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 또한, 본 발명은 PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0032] 상세하게는, 상기 PI3KC2 γ 단백질 발현 억제제는 PI3KC2 γ 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA)일 수 있고, 상기 PI3KC2 γ 단백질 활성 억제제는 PI3KC2 γ 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 또는 천연물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 보다 상세하게는, 상기 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] [화학식 1]



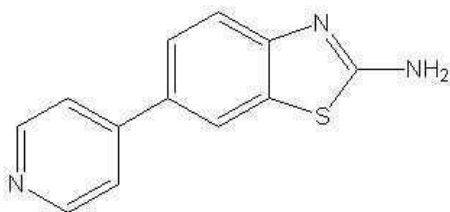
[0035]

[0036] 상기 화학식 1에서,

[0037] R₁ 및 R₂는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소, (C1-C4)알킬, (C1-C4)알콕시 및 할로겐으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0038] 보다 더 상세하게는, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] [화학식 2]



[0040]

[0041] 상세하게는, 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장질환 또는 채장염일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 한편, 본 명세서에서는 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 6-(4-피리디닐)-2-벤조티아졸라민(6-(4-pyridinyl)-2-benzothiazolamine; PBT-6)으로도 명명하였다.

[0043] 본 발명의 약학 조성물은 화합물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물

로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 조성물은 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1mg/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1mg/kg~10g/kg, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01mg/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명은 (1) 염증 질환 동물 모델에 시험물질을 접촉시키는 단계; (2) 상기 시험물질을 접촉한 염증 질환 동물 모델에서 PI3KC2 γ 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및 (3) 대조군 시료와 비교하여 상기 PI3KC2 γ 단백질의 발현 또는 활성 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 염증 질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

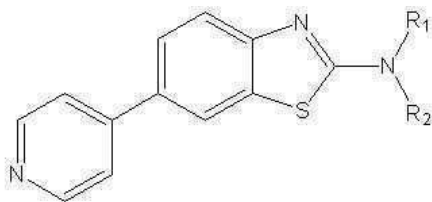
[0046] 상세하게는, 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장질환 또는 채장염일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 또한, 본 발명은 PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 염증 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0049] 상세하게는, 상기 PI3KC2 γ 단백질 발현 또는 활성 억제제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] [화학식 1]



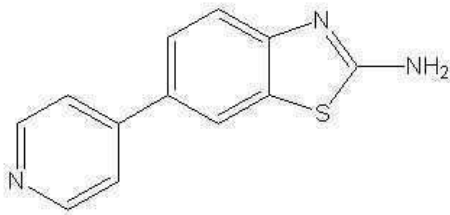
[0051]

[0052] 상기 화학식 1에서,

[0053] R₁ 및 R₂는 각각 같거나 다를 수 있으며, 수소, (C1~C4)알킬, (C1~C4)알콕시 및 할로젠으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나임.

[0054] 보다 더 상세하게는, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] [화학식 2]



[0056]

[0057] 상세하게는, 상기 염증 질환은 류마티스 관절염, 염증성 장질환 또는 채장염일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058]

본 발명의 조성물이 건강기능식품 조성물인 경우, 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0059]

상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0060]

상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0061]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0062]

<실험예>

[0063]

하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0064]

1. 시약 및 항체

[0065]

PI3KC2 γ 에 대한 1차 항체는 Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA)으로부터, p-AKT2 (S474), p-mTOR 및 β -actin은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터, RANKL은 Abcam (Cambridge, MA, UK)으로부터, NFATc1는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, CA, USA)로부터 구입하였다. RANKL 및 M-CSF는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)으로부터 얻었다. 6-(4-피리디닐)-2-벤조티아졸라민(6-(4-pyridinyl)-2-benzothiazolamine; PBT-6)은 성균관대학교 약학대학에서 합성하였다. 1차 단계는 온화한 조건하에서 피리딘(pyridine) 및 아세트산 무수물(acetic anhydride)로 NH₂를 아세틸화시켰다. 2차 단계는 포스핀 리간드, 염기 및 Pd 촉매를 이용하여, Suzuki 반응을 통해 브로모 벤조티아졸(bromo benzothiazol) 및 보로닉산(boronic acid)을 커플링시켰다. 마지막 단계는 이를 NaOH 용액에서 가수분해시켰다. 6-(pyridin-4-yl)benzo[d]thiazol-2-amine: 1H NMR (400 MHz, DMSO): 8.58 (d, J = 6, 2H-Ar), 8.18 (d, J = 1.6, 1H-Ar), 7.70-7.66 (m, 5H), 7.42 (d, J = 8, 1H-Ar).

[0066]

2. 세포 배양

[0067]

MH7A 세포는 Riken cell bank (Tsukuba, Japan)로부터 구입하였고, 10% 열-불활화된 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)이 첨가된 RPMI1640 배지에서 배양하였다. Raw 264.7 세포는 Korean Cell Line Bank로부터 구입하였고, 10% 열-불활화된 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지에서 배양하였다. 세포 배양을 위한 FBS 및 모든 다른 시약은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하였다. 95% air 및 5% CO₂ 조성으로 습도가 조절되는 배양기에서 세포 배양을 37℃로 유지하였다.

[0068] 3. 세포 생존능 측정

[0069] 세포 생존능은 MTT 분석을 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 세포는 96-웰 플레이트에서 8×10^3 cells/well의 밀도로 접종한 후, 밤새도록 배양하였다. 다음 날, 배지를 제거하였고 세포들을 유도체인 TNF- α (50 ng/mL) 또는 LPS (1 μ g/mL) 중 하나와, 다양한 농도의 PBT-6 (0.1-100 μ M)로 처리하였다. 72시간 배양 후, 10% MTT 용액 (2 mg/mL)을 각 웰에 첨가하였고, 세포들을 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 얻어낸 포르마잔 결정은 DMSO (100 μ L/well)에서 5분 동안 일정하게 흔들어 녹였다. 그 후, 플레이트의 흡광도를 540 nm에서 microplate reader로 측정하였다. 각 분석에 대해서 3번 반복하여 측정하였다.

[0070] 4. 웨스턴 블랏팅(Western blotting)

[0071] 프로테아제 및 포스파타아제 억제제가 포함된 용해 완충액에서 용해시키기 전, 세포들을 DPBS로 씻어냈다. 8, 12% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate; SDS)-폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 사용하여, 동등한 양의 단백질을 분리하였고, 폴리비닐리덴 플루오라이드 멤브레인 상으로 옮겼다. Ponceau S staining solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하여, 단백질 이동을 확인하였다. 그 후, 블랏들을 적절한 1차 항체(1:1000)로 면역염색한 후, 겨자무 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)가 접합된 적절한 2차 항체(1:5000)로 반응시켰다. 관심 단백질에 특이적인 1차 항체가 사용되었고, enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, UK)를 통해, X-Ray 필름을 사용하여 검출하였다.

[0072] 5. 효소-결합 면역흡착 분석(Enzyme-linked immunosorbent assay)

[0073] 모든 환자로 부터 동의서를 받았고, 실험 프로토콜은 인하대병원 윤리위원회로부터 승인 받았다(INHAUH IRB 2015-09-016-002). 건강한 지원자(n = 8), 골관절염 환자(n = 9) 및 류마티스 관절염 환자(n = 9)로부터 수집한 말초 혈액 및 윤활액(synovial fluid)을 기록하였고, ELISA 키트는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)으로부터 구입하였으며, 사이토카인 수준은 혈청 또는 윤활액으로부터 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 간단히 설명하면, 각 웰은 0.1 g의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6로 24시간 동안 코팅하였고, 2% BSA가 포함된 PBS로 1시간 동안 상온에서 차단시켰다. 혈청 또는 윤활액을 각 웰에 첨가하였고, 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 0.1% Tween 20이 포함된 PBS로 플레이트를 씻어낸 후, 비오틴화된 항체를 각 웰에 첨가하였고, 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP로 반응시켰다. 세척 완충액으로 플레이트를 씻어낸 후, 3, 3', 5, 5' - 테트라메틸벤지딘(3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine) 용액을 20분 동안 첨가하였다. 1 N 황산(sulfuric acid)을 첨가함으로써 반응을 중단시켰고, 450 nm에서 신호를 측정하였다. 시험관 내(*in vitro*) 사이토카인 분비 분석을 위해, MH7A cells (5×10^4) 또는 Raw 264.7 cells (5×10^6)를 12-웰 플레이트에 접종하였고, 1, 10 μ M의 PBT-6 화합물로 6시간 반응시킨 후, LPS 또는 TNF- α 를 첨가하여 24시간 동안 반응시켰다. 배양 배지를 수확하였고, 사이토카인 측정을 위해 사용하였다.

[0074] 6. 생체 내(*in vivo*) 콜라겐-유도 관절염 모델

[0075] 모든 동물 실험은 인하대학교 의과대학의 INHA 실험동물윤리위원회(INHA Institutional Animal Care and Use Committee; INHA IACUC)의 가이드라인에 따라 수행되었다(approval ID: INHA 170718-501). 5주령의 비병원성 DBA/1 mice (수컷)을 Orient Bio (Orient Bio, Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 면역화를 위해, 200 μ g 미변성 bovine type II collagen (Chondrex Inc, Redmond, WA, USA)을 동등 부피의 complete Freund's adjuvant (Chondrex)와 상온에서 15분 동안 섞어 완전히 혼합하였다. 6주령 수컷 DBA/1 mice를 100 μ g의 상기 혼합물로 꼬리 기저부에서 피부 내 면역화시켰다. 21일 쯤, 마우스를 200 μ g incomplete Freund's adjuvant (Chondrex)에 녹인 200 μ g bovine type II collagen으로 추가 접종하였다. 추가 접종 14일 후에, CIA가 완전히 확립되었다. 관절염 점수가 4보다 높은 마우스를 선별하여 그룹화하였다. 15마리의 실험 마우스를 3 그룹으로 고르게 나누었다(group 1, 정상 대조군; group 2, vehicle 처리; group 3, 10 mg/kg PBT-6 처리). 정상 대조군을 제외한 모든 마우스는 PBT-6를 하루에 한 번 경구 투여하였다. 1차 면역화 후, 마우스를 40일 동안 일주일에 한 번 관측하였다. 버니어 캘리퍼스(vernier caliper)로 발 두께를 측정하였다. 관절염은 점수화하였고, 발 두께는 2명의 독립된 측정자에 의해 측정되었다. 마우스의 4개 다리 모두 측정하였고, 다음의 등급에 따라 0 내지 4로 점수화하였다. 0, 관절염 증상 없음; 1, 발 또는 발가락 하나에 발적(redness); 2, 발가락 각각에 부기(swelling)를 동반하는 발목 또는 손목의 약한 부기; 3, 발목 또는 손목의 중간 정도의 부기; 4, 발가락을 포함한 전체 발의 심각한 부기. AI = 사지 관절 부기 등급 점수의 총합 (1 등급은 1포인트를 나타내고, 전체는 16포인트).

[0076] 7. 마이크로-CT 이미지화

- [0077] 마우스를 케타민으로 마취시켰고, 희생시켰다. 그 후, 이들의 다리를 잘라내어 4% 포르말린에서 2일 동안 고정시켰다. 실험 마우스로부터 얻어낸 발[발가락 끝에서 끝마디뼈(distal phalanx) 끝까지]을 스캔하였고, 이미지는 13.38 mm의 복셀 크기(13.38 mm)를 가진 micro-CT (Sky Scan 1172; Bruker)로 3차원 구조로 재구성하였다. 0.5 mm 두께의 알루미늄 필터를 가진 X ray 튜브 전압은 59 kV이었고, 전류는 167 mA이었다. 노출 시간은 1160ms이었다. X ray 투사이미지는 180° 각도 회전으로 스캔하여 0.45° 간격에서 얻었다.
- [0078] **8. 주석산염-저항 산성 인산분해효소(Tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP)-양성 염색 분석**
- [0079] Raw 264.7 세포를 100 ng/mL RANKL 및 30 ng/mL M-CSF가 포함되고, 다양한 농도의 PBT-6 (1-10 μ M)가 포함된 분화 배지에서 6일 동안 배양하였다. TRAP staining kit (Sigma Aldrich, OH)를 사용하여, TRAP 발현을 측정하였다. 광학 현미경을 이용하여, 3개 이상의 핵이 포함된 TRAP (+) 다핵 세포를 파골세포로서 계수하였고, Image Pro Plus를 사용하여 데이터를 정량하였다.
- [0080] **9. PI3KC2 γ 키나제 분석**
- [0081] ADP-Glo kinase assay는 Promega (Madison, WI, USA)로부터 구입하였다. 키나제 반응은 다음과 같이 진행하였다. 1.5 mL 마이크로원심분리 튜브에 25 μ M APT, 0.1 mg/mL PI3K 기질, 여러 농도의 PBT-6 (0.1-100 μ M)을 잘 혼합하고, 최종적으로 5 ng/ μ L PI3KC2 γ 효소를 첨가하였다. 30°C에서 40분 동안 반응시킨 후, 10 μ L ADP-Glo™ 시약을 첨가하였다. 30°C에서 40분 동안 반응시킨 후, 키나제 검출 시약 10 μ L를 첨가하였고, 스핀 다운하였다. 최종적으로, 화이트 플레이트로 옮긴 후, 이의 발광도를 측정하였다.
- [0082] **10. 키나제 프로파일링**
- [0083] 10 μ M 농도의 ATP를 사용한 1 μ M 농도에서, Eurofins Kinase Profiler Selectivity Testing Service에서 제공하는 Eurofins (<https://www.eurofinsdiscoveryservices.com/>)를 사용하여, PI3 키나제에 대한 PBT-6의 활성을 스크리닝하였다.
- [0084] **11. 트랜스웰 이동 분석**
- [0085] 지름 6.5 mm 및 기공 크기 8.0 μ m를 갖는 폴리카보네이트 필터(Corning Costar, Cambridge, MA, USA)가 장착된 24-트랜스웰 유닛을 사용하여, 제조사의 지시에 따라 대식세포(macrophages) 이동 분석을 수행하였다. 간단히 설명하면, 배양 배지에 PBT-6를 포함하거나 또는 포함하지 않고, TNF- α -처리된 MH7A 세포를 24-웰 플랫-바텀(flat-bottom) 플레이트에서 배양하였다. 그 후, Raw 264.7 세포를 3시간 동안 굼겼고, 2% FBS DMEM에 녹인 LPS가 포함된 트랜스웰 삽입물의 상단 챔버에 세포를 넣었다. 48시간 후, 이동하지 않은 세포를 제거하기 위해서, 상단 부분에 있는 Raw 264.7 세포를 면봉으로 조심스럽게 제거하였고, 트랜스웰 내 멤브레인의 하단으로 이동한 세포들은 20% 메탄올로 고정시켰고, 0.2% 크리스탈 바이올렛으로 30분 동안 염색시켰다. 각각 독립된 샘플당 5개의 임의적 스팟을 계수함으로써, 이동된 대식세포(macrophages)를 정량하였다.
- [0086] **12. 면역조직화학**
- [0087] CIA 마우스로부터 얻은 관절 조직을 탈석회화시켰고, 10% 완충된 포르말데히드에서 4°C로 밤새도록 고정시켰으며, 파파린에 포매하여 절단하였다. 탈파파린화 후, 8-mm 관절 샘플 절편 상에서 면역염색을 수행하였다. PBS에 녹인 0.2 mg/mL Proteinase K (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA)를 상온에서 15분 동안 반응시켜, 항원 복구(Antigen retrieval)를 수행하였다. PBS로 2번 조심스럽게 씻어낸 후, 증류수에 녹인 0.3% H₂O₂를 사용하여 상온에서 15분 동안 내재성 퍼옥시다아제를 차단시켰다. 조직 절편을 PBS로 씻어냈고, 정상 염소 또는 말 혈청(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 1시간 동안 차단시켰으며, PI3KC2 γ 및 p-AKT2 (S474)에 대한 1차 항체의 1:50 희석액으로 4°C에서 밤새도록 반응시켰다. 그 후, 절편들을 비오틴화된 2차 항체(1:100)로 1시간 동안 반응시켰다. ABC kit (Vector Laboratories)를 사용하여 아비딘-비오틴 퍼옥시다아제(avidin-biotin peroxidase) 복합체 용액으로 절편들을 가시화시켰고, PBS로 씻어냈으며, 디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드(diaminobenzidine tetrahydrochloride; DAB) 기질로 5분 동안 반응시킨 후, 헤마톡실린으로 대비 염색하였다. 각각의 절편에 대해 최소한 3개의 임의로 선택된 영역에서 200 $\times$ 배율로 측정 및 분석하였다.
- [0088] **13. 통계 분석**
- [0089] 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타냈고, ANOVA 및 unpaired Student's t-test로 분석하였다. 0.05 이하의 P-value는 통계적 유의성이 있는 것으로 나타났다. 결과 비교는 Student's t-test를 사용하여 수행하였다.

[0090] <실시예 1> RA 환자 유래 윤활액, 윤활막 조직 및 PBMC에서의 PI3KC2 γ 발현 증가

[0091] 우선, 본 발명자들은 윤활액에서의 PI3KC2 γ 및 전-염증성 사이토카인의 발현을 측정하였다. ELISA를 통한 윤활액 분석 결과, PI3KC2 γ , IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 발현은 골관절염(OA)에서의 발현 수준에 비해 류마티스 관절염(RA)에서 더 증가하였다(도 1). 또한, 본 발명자들은 RA 및 OA의 윤활막 조직에서 염증 반응 및 PI3KC2 γ 의 단백질 발현을 측정하였다. RA 환자 윤활막 조직에서, 염증 세포 침습을 동반한 활막 내피 과다 증식(synovial endothelial hyperplasia), 과립 형성, 섬유아세포 및 혈관 증식이 명확하게 관측되었다. 또한, PI3KC2 γ 은 RA 그룹에서 높게 발현되는 것을 면역조직화학 및 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다(도 2). 이외에도, 건강한 대조군의 PBMC에 비해 RA PBMC에서 PI3KC2 γ 의 단백질 수준이 증가되었다(도 3). 상기 결과는 RA 윤활액, 윤활막 조직 및 PBMC에서, 염증 및 PI3KC2 γ 가 증가된다는 것을 뒷받침한다.

[0092] <실시예 2> PI3KC2 γ 의 ATP 결합 사이트에 강한 결합 친화도로 결합하는 PBT-6

[0093] PI3KC2 γ 억제제인 PBT-6의 화학구조는 도 4에 나타났다. 다음으로, PBT-6의 결합 친화도를 측정하기 위하여, 키나제 분석을 수행하였다. 그 결과, PBT-6의 결합 포화 곡선을 분석하였고, K_d 수치는 826 nM이었다(도 5). PBT-6의 보다 자세한 특성을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 Eurofins를 통해 균일 시간 분해 형광(homogeneous time-resolved fluorescence; HTRF) 키나제 분석을 수행하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, PBT-6는 다른 PI3K 이성질체와 다르게 1 μ M 농도에서 PI3KC2 γ 을 완전히 선택적으로 억제시켰다.

[0094] <실시예 3> TNF- α 유도 MH7A 세포에서 세포 생존능, 전염증성 사이토카인 및 PI3K/AKT 활성화를 감소시키는 PI3KC2 γ 억제

[0095] 세포 생존능에 있어 PBT-6의 효과를 시험하기 위해서, 본 발명자들은 류마티스 관절염 활막세포(MH7A)를 이용하여 MTT 분석을 수행하였다. 그 결과, PBT-6는 농도 의존적 방식으로 세포 생존능을 감소시켰다. 특히, 10 μ M 농도로 PBT-6를 처리하면, 세포 성장이 40-50% 감소하였다(도 7). TNF- α 및 IL-6과 같은 전-염증성 사이토카인은 RA의 발병을 촉진시키는 것으로 잘 알려져 있다. PI3KC2 γ 및 염증 간의 관련성을 더 입증하기 위해서, 본 발명자들은 세포 상등액을 사용하여 ELISA로 PBT-6의 효과를 확인하였다. 그 결과, TNF- α 유도 MH7A 세포에서 PBT-6에 의해 IL-6는 약간 감소하였다(도 8). PBT-6가 PI3K/AKT 경로의 활성화를 억제하는지 확인하기 위해서, 본 발명자들은 MH7A 세포에서 PI3K/AKT 신호 경로의 억제를 조사하였다. 그 결과, PBT-6는 AKT2 및 mTOR의 인산화를 상당히 억제하였다(도 9).

[0096] <실시예 4> LPS 유도 Raw 264.7 세포에서 세포 생존능, 전염증성 사이토카인 및 PI3K/AKT 활성화를 감소시키는 PI3KC2 γ 억제

[0097] 대식세포에서도 상기와 유사한 결과를 나타내는지 확인하기 위해서, 본 발명자들은 LPS 유도 Raw 264.7 세포에서 PBT-6의 효과를 확인하였다. 예상대로, PBT-6는 농도 의존적 방식으로 세포 생존능을 감소시켰고(도 10), Raw 264.7 세포에서 PBT-6에 의해 TNF- α 를 크게 감소시켰다(도 11). 게다가, PBT-6는 AKT2 및 mTOR의 인산화를 상당히 억제하였는데(도 12), 이는 PBT-6가 PI3K/AKT/mTOR 신호 전달 체계를 차단함으로써 염증성 사이토카인 발현을 억제한다는 것을 나타낸다.

[0098] <실시예 5> 파골세포형성 및 이동을 감소시키는 PI3KC2 γ 억제

[0099] Raw 264.7 세포는 RANKL-발현 세포로서 알려져 있고, 파골세포 형성 및 기능을 연구하기 위한 파골세포 전구 모델로서 널리 사용되고 있다. 파골세포형성에 있어 PI3KC2 γ 의 역할을 연구하기 위해서, 본 발명자들은 Raw 264.7 세포의 파골세포로의 RANKL-유도 분화에 있어 비-독성 농도 범위에서의 PBT-6 효과를 확인하였다. 파골세포 분화 정도를 측정하기 위해서, 파골세포에서 높게 발현되는 마커 효소인 TRAP 염색을 수행하였다. 3개 이상의 핵을 가진 TRAP-양성 다핵성 세포를 파골세포로 간주하였다. PBT-6는 Raw 264.7 세포의 파골세포 분화를 농도 의존적 방식으로 크게 억제하였다(도 13). NFATc1은 파골세포로의 분화 초기 단계에서 RANKL 촉진에 의해 가장 강력하게 유도되는 전사 인자로 알려져 있는데, 이는 파골세포 분화에 필요한 여러 유전자들의 발현을 조절한다. 도 14에 나타난 바와 같이, RANKL-촉진 Raw 264.7 세포에서, NFATc1 발현에 상당한 증가가 관측되었으나, 1-10 μ M의 PBT-6의 존재 하에서는 NFATc1의 발현이 분명히 억제되었다. 다음으로, 대식세포로부터 활막세포로의 주화성(chemo-attraction)에서의 PBT-6 저항성을 시험하기 위해, 대식세포 이동에 있어서의 PI3KC2 γ 효과를 Transwell 챔버 분석을 통해 측정하였다. 그 결과, LPS-처리 Raw 264.7 세포의 이동은 증가하였으나, 플레이트 하단에 PBT-6가 존재시에는 억제되었다(도 15 및 도 16).

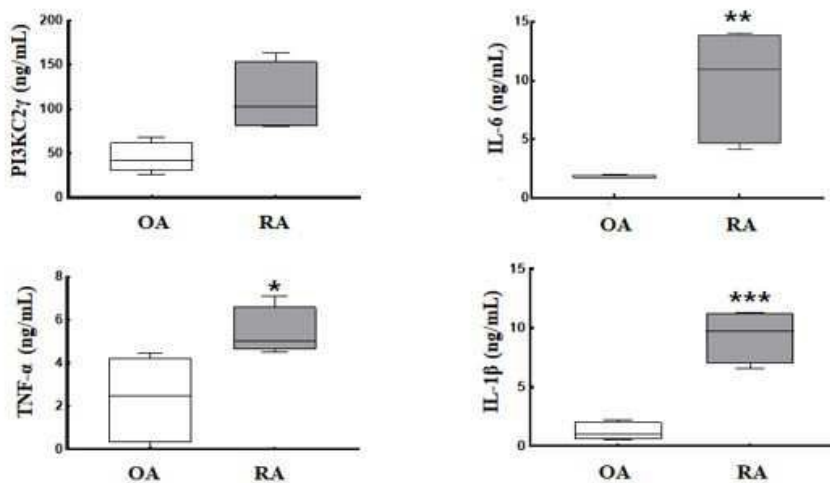
[0100] <실시예 6> 콜라겐 유도 류마티스 관절염(CIA) 마우스에서 관절염 심각도를 약화시키는 PBT-6 투여

[0101] 시험관 내(*in vitro*) 실험 결과를 고려하여, RA에서의 활막 염증 및 관절 손상에 대한, PBT-6의 생체 내(*in vivo*) PI3KC2 γ 억제 효과를 CIA 마우스에서 평가하였다. 비히클(vehicle)-처리군(0.5% 메틸 셀룰로오스 경구 투여)과 비교하여, PBT-6-처리군(10 mg/kg PBT-6 경구 투여)은 발바닥 두께 및 평균 관절염 점수를 포함하는 관절염 심각도를 상당히 약화시켰다(도 17 내지 도 19). 또한, 혈청 내 TNF- α 수준은 비히클(vehicle)-처리군에 비해 PBT-6-처리군에서 상당히 낮아졌으나, 혈청 내 IL-6 수준은 약간 감소하였다(도 20). 비히클(vehicle)-처리된 CIA 마우스 유래 발 관절 절편의 조직병리학적 측정 및 면역조직화학 분석 결과, 염증 세포 침습, 석회화된 연골 및 뼈로의 판누스(pannus) 침윤에 따른 활막 과형성이 나타났다. 상기 절편들은 PI3KC2 γ 및 p-AKT2에 대한 집중적인 염색이 나타났는데, 이는 관절 주위에 염증 세포가 존재한다는 것을 뒷받침한다(도 21). PBT-6 투여는 염증 세포 침습 및 뼈 손상 범위를 감소시켰을 뿐만 아니라, PI3KC2 γ 및 p-AKT2의 발현도 감소시켰다. 일관성 있게, 활막 염증, 연골 손상 및 뼈 손상을 나타내는 조직학적 점수도 CIA 마우스에서 PBT-6에 의해 상당히 감소되었다(도 22). 실험 과정에서 비히클(vehicle)-처리군 및 PBT-6-처리군 사이의 몸무게는 거의 차이가 없었다. 또한, PBT-6-처리군에서 제거된 비장 및 간에서는 비히클(vehicle)-처리군에 비해 유의성 있는 조직병리학적 변화를 확인할 수 없었다. 상기 결과는 CIA 마우스에서의 PBT-6 처리에 대한 안전성을 뒷받침한다. 다음으로, 뒷발에 대한 micro-CT scan의 3차원 재구성 결과, CIA 마우스에서 전형적인 변화를 나타냈는데, 이는 관절 손상, 관절 변위 및 비정상적인 뼈 증식 결과이다. 하지만, PBT-6 처리는 뼈 손상을 완화시켰고, 뼈 부피, 골밀도 및 골주 두께를 상당히 증가시켰다(도 23 및 도 24).

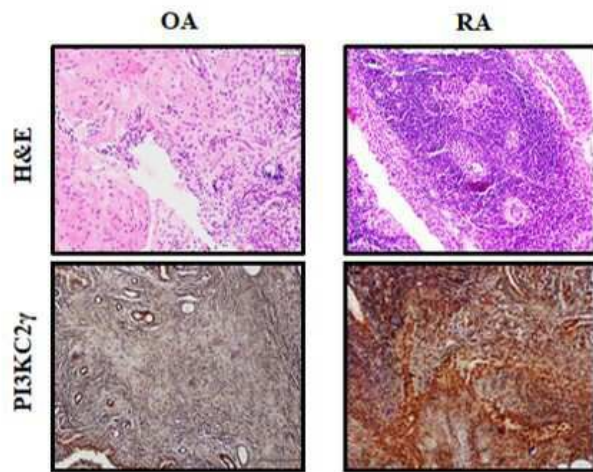
[0102] 이상으로 본 발명을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

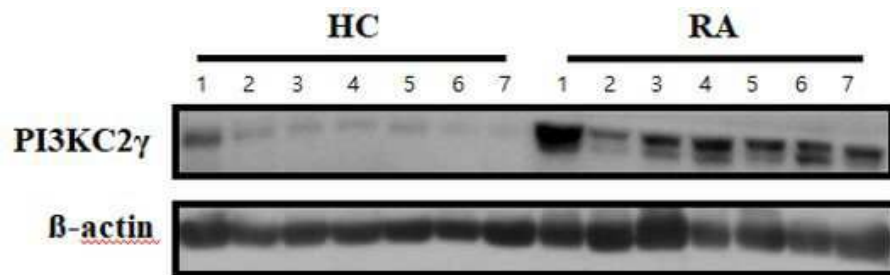
도면1



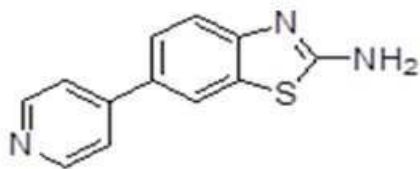
도면2



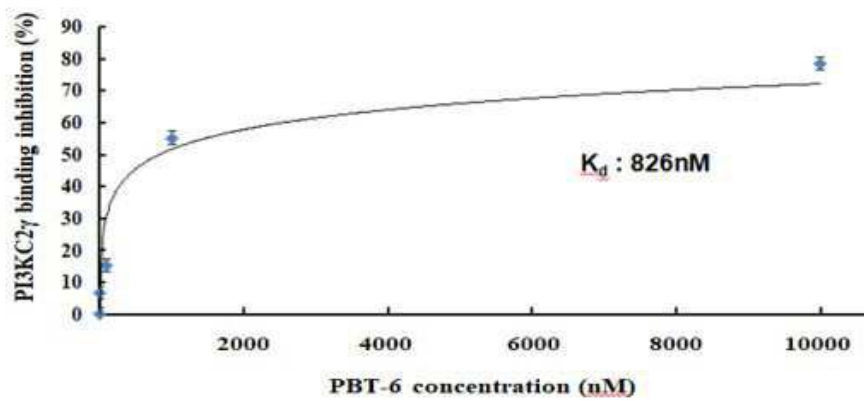
도면3



도면4



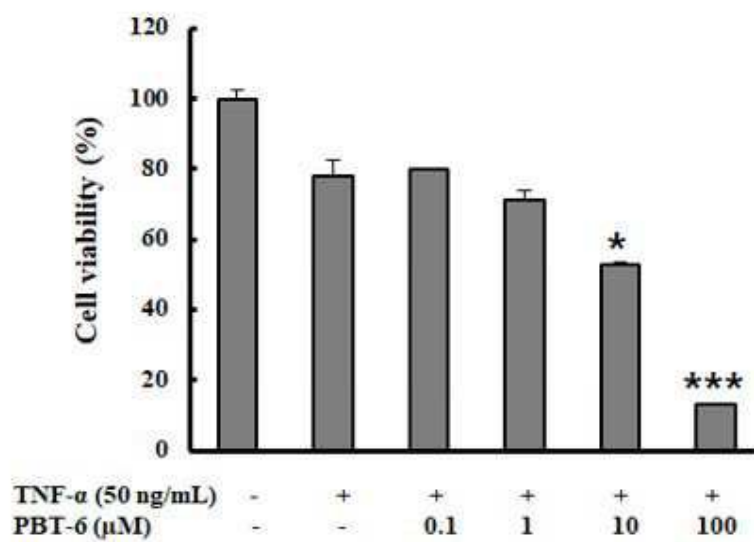
도면5



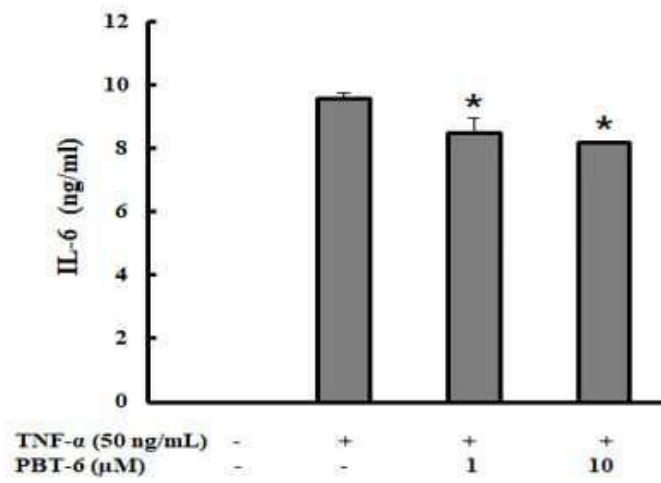
도면6

Kinase name	Percent of Control
PI3 Kinase (p110 α (E542K)/p85 α)	87
PI3 Kinase (p110 α (H1047R)/p85 α)	87
PI3 Kinase (p110 α (E545K)/p85 α)	89
PI3 Kinase (p110 α /p85 α)	95
PI3 Kinase (p110 α /p65 α)	91
PI3 Kinase (p110 β /p85 α)	89
PI3 Kinase (p110 δ /p85 α)	96
PI3 Kinase (p120 γ)	66
PI3KC2 α	102
PI3KC2 γ	0

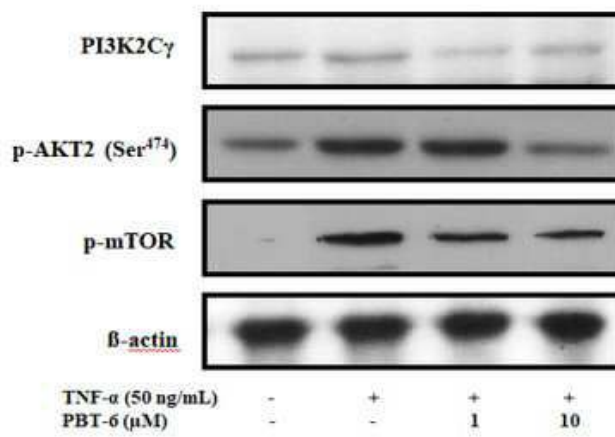
도면7



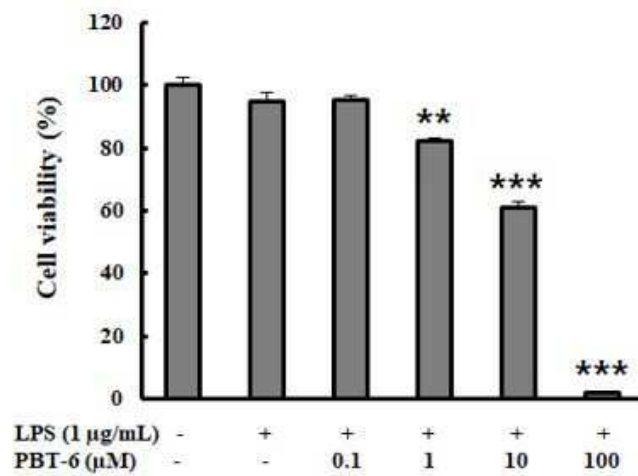
도면8



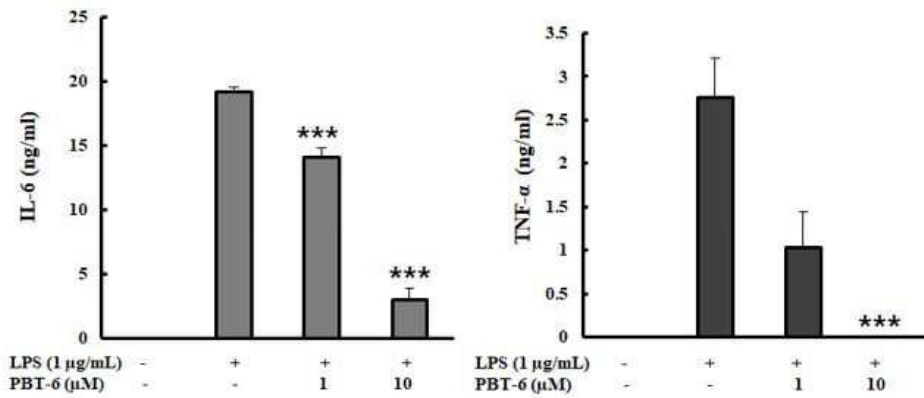
도면9



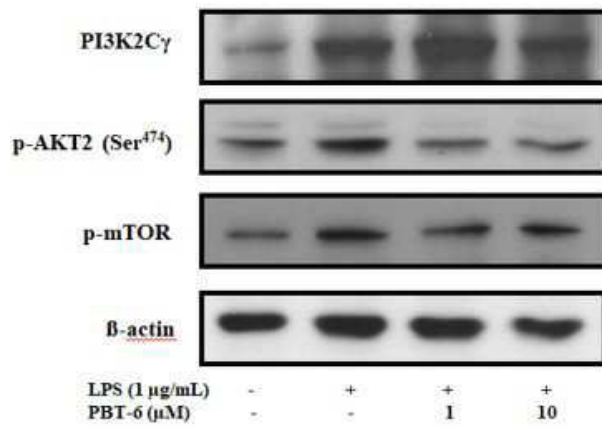
도면10



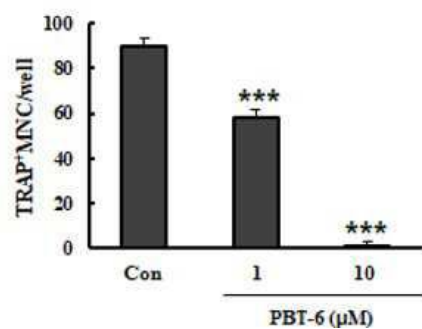
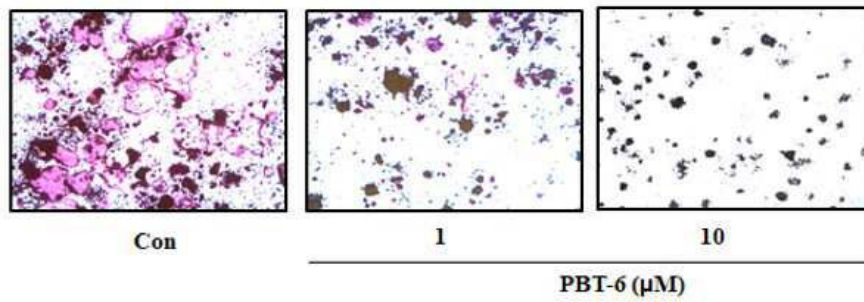
도면11



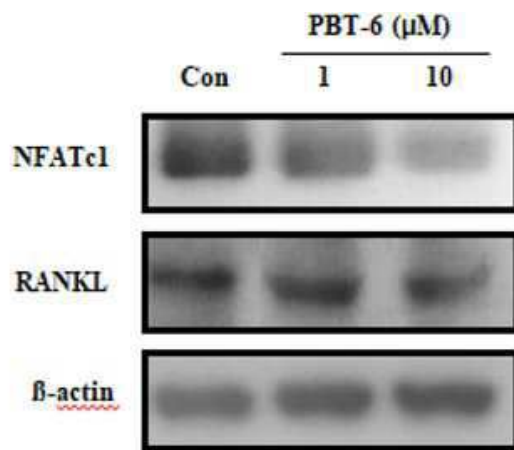
도면12



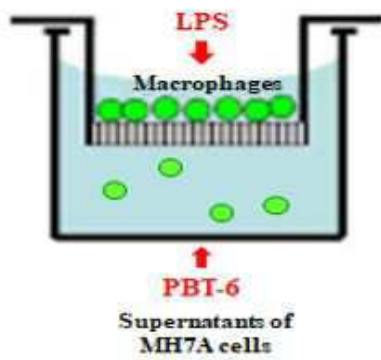
도면13



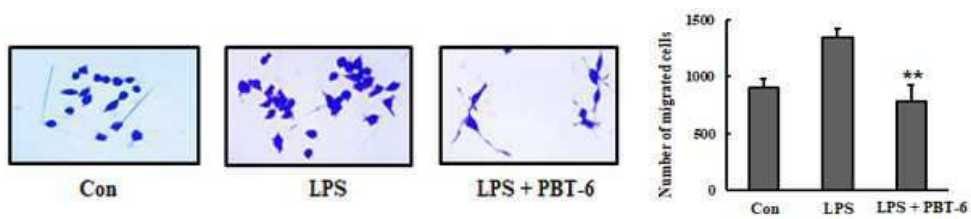
도면14



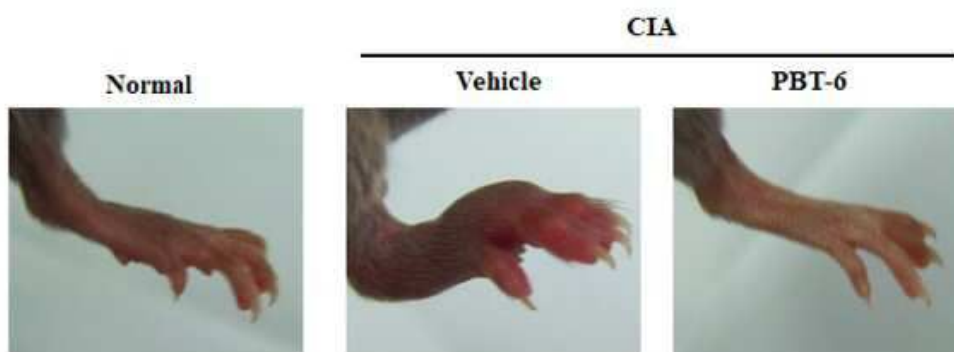
도면15



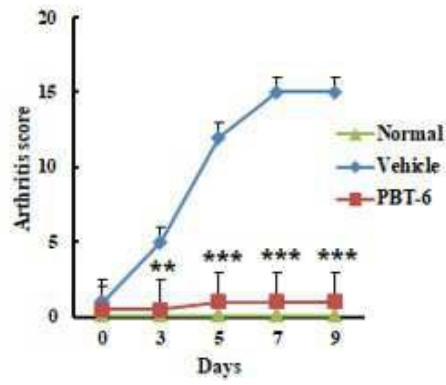
도면16



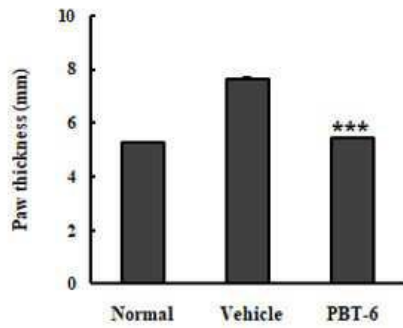
도면17



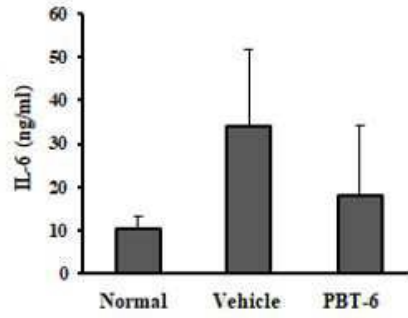
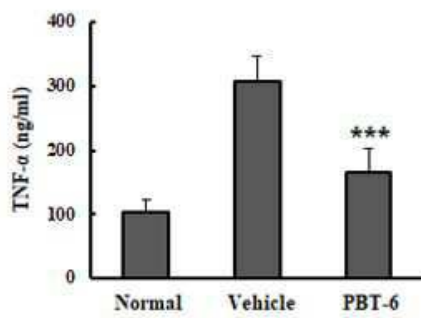
도면18



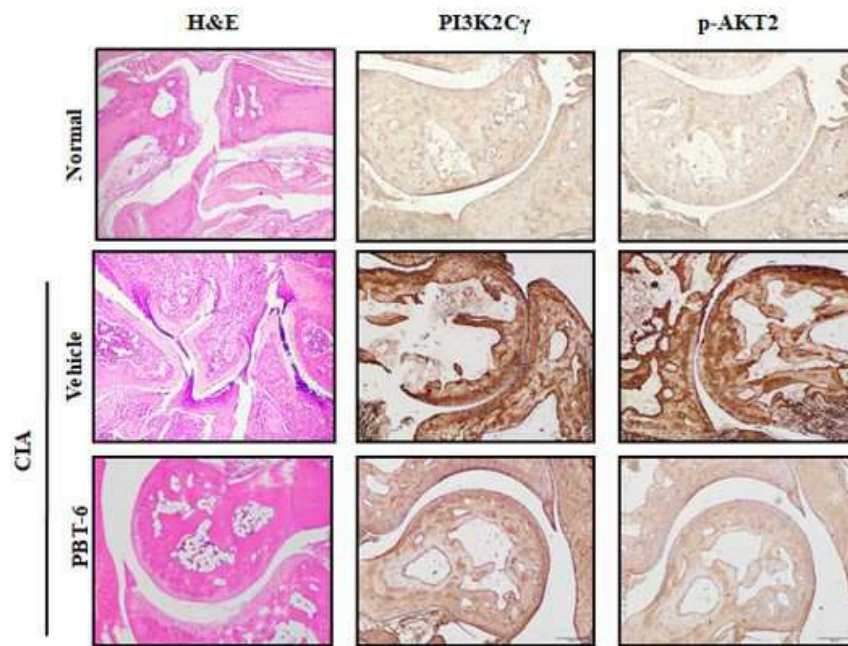
도면19



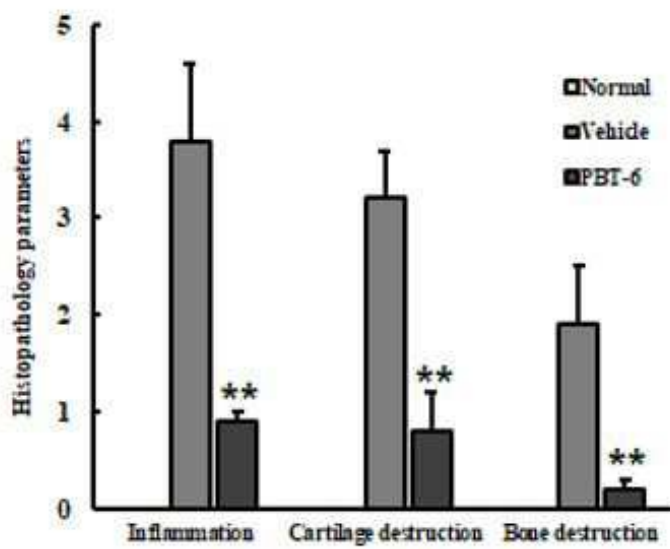
도면20



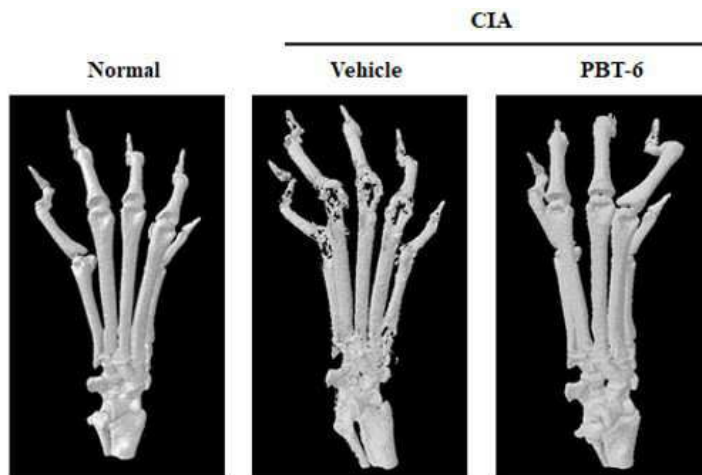
도면21



도면22



도면23



도면24

