

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 11월 7일 (07.11.2024)



(10) 국제공개번호
WO 2024/228570 A1

- (51) 국제특허분류: C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/005979
- (22) 국제출원일: 2024년 5월 3일 (03.05.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2023-0057549 2023년 5월 3일 (03.05.2023) KR
- (71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (UIF (UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION), YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울특별시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 남기택 (NAM, Ki Taek); 10416 경기도 고양시 일산동구 강송로 156, 207동 902호, Gyeonggi-do (KR). 이유라 (LEE, Yura); 02781 서울특별시 성북구 한천로 76길 73, 2동 1402호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 파도특허법인유한회사 (PADO IP LAW PLLC); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로78길 16, 노벨빌딩 9층, Seoul (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.

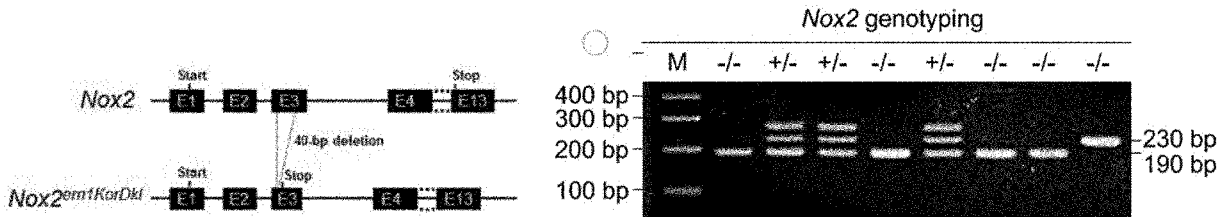
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, 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).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: DISCOVERY OF TARGET FOR INHIBITING FIBROSIS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

(54) 발명의 명칭: 염증성 장 질환에서 섬유화 억제 타겟 발굴



(57) Abstract: The present invention relates to discovery of a target for inhibiting fibrosis in inflammatory bowel disease, and prediction of the progression of fibrosis in inflammatory bowel disease by using same. The present inventors, who are researchers, have found that NOX4 transcripts are detected at low levels in a normal colon, but NOX4 expression is up-regulated in drug-resistant fibrostenosis patients with UC or Crohn's disease (CD) and in a dextran sulfate sodium (DSS)-induced mouse colitis model, and thus it is hypothesized that NOX4 contributes to intestinal fibrosis damage of ulcerative colitis and TGF-β signaling is required to induce fibrosis development. In order to test this hypothesis, the present inventors established Nox4 deficient mice (Nox4^{-/-}) with DSS-induced colitis, and investigated the effect of Nox4 on the response to intestinal injury. This study is expected to be widely used to predict whether fibrosis proceeds in inflammatory bowel diseases and inhibit same.

(57) 요약서: 본 발명은 염증성 장 질환에서 섬유화 억제 타겟 발굴, 및 이를 이용한 염증성 장 질환에서의 섬유화 진행 예측에 관한 것이다. 본 발명자들은 연구자들은 Nox4 전사체는 정상 결장에서 낮은 수준으로 검출되지만, NOX4 발현은 UC 또는 크론병(Crohn's disease; CD)에서 섬유협착증을 갖는 약물 내성 환자 및 덱스트란 황산 나트륨(dextran sulfate sodium; DSS) 유발 쥐 대장염 모델에서 상향 조절된다는 것을 발견하여, NOX4가 궤양성 대장염의 장 섬유화 손상에 기여하고 섬유화 발달을 유도하는데 TGF-β 신호 전달이 필요하다는 가설을 세웠다. 이 가설을 테스트하기 위해 본 발명자들은 DSS 유발 대장염이 있는 NOX4 결핍 마우스(Nox4^{-/-})를 확립하고, Nox4가 장 손상에 대한 반응에 미치는 영향을 조사하였다. 이 연구는 염증성 장 질환에서 섬유화 진행 여부를 예측하고, 이를 억제하는데 크게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

WO 2024/228570 A1

명세서

발명의 명칭: 염증성 장 질환에서 섬유화 억제 타겟 발굴 기술분야

- [1] 본 발명은 염증성 장 질환에서 섬유화 억제 타겟 발굴, 및 이를 이용한 염증성 장 질환에서의 섬유화 진행 예측에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 궤양성 대장염(Ulcerative colitis; UC)은 장기간의 염증성 손상과 대장 점막의 궤양으로 인한 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease; IBD)의 일반적인 형태이다. 공생 박테리아에 의해 유발된 지속적인 염증은 장 상피 장벽에 영향을 미치며 UC 발병의 주요 원인으로 지목된다. 현대화와 서구식 식습관 증가에 따라 UC 환자가 급격히 증가되고 있음에도 불구하고, 현재 치료법은 대부분의 UC 환자에게 효과가 없으며 조직 기능 이상, 섬유화착증, 악성 변형과 같은 부작용과 연관된다. UC와 관련된 발암은 주로 손상된 조직에서 염증을 매개로 과도한 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 생성되는 데서 유래하며, 그에 따른 산화환원 균형의 손상은 유전적 변이와 함께 지질, DNA, 단백질 등 분자 손상에 따른 산화 스트레스를 유발한다. 이는 궁극적으로 결장 세포를 변형시켜 대장암을 유발한다. 이러한 UC 관련 대장암의 예후가 좋지 않다는 점을 고려할 때, 새로운 치료 표적을 식별하는 것이 시급하다.
- [3] 한편, 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH)의 산화효소인 NOX(NADPH oxidase) 계열은 위 장관에서 병원체 제거, 장벽 기능 유지, 및 부상 후 점막 복구 역할을 하는 ROS 생성을 주로 담당한다. 구체적으로 NOX1과 DUOX2는 장 점막 내 ROS의 주요 공급원으로 장 상피에서 풍부하게 발견되며, 이들의 돌연변이는 성인 IBD 위험과 관련이 있다. NOX1은 점액 세포 분화, 이동, 미생물 방어, 및 부상 후 점액 복구 중재를 조절하여 장의 항상성에 기여하고, DUOX2는 병원체 유래 우라실(uracil)에 의해 활성화되어 DUOX 의존성 ROS를 생성하고 장 감염으로 인한 장내 미생물을 제거한다. NOX4는 산소 센서 역할을 하며 분자 산소가 다양한 활성 산소종(ROS)으로 환원되는 것을 촉매하는데, 장기에 따라 기능을 달리한다. NOX4는 요관 폐쇄 및 폐고혈압 발병과 연관되는 것으로 보이며, 질병의 FLT3(fms-like tyrosine kinase 3) 신호 전달과 자극에 대한 세포 반응 활성을 야기한다. 최근의 여러 연구에서는 결장에서 염증 매개 병태생리학을 조절하는 데 NOX4의 역할이 밝혀졌다. NOX4는 H₂O₂를 생성하며 혈관 평활근 세포, 내피 세포, 및 섬유아세포에서 주로 발견된다. 본 발명의 연구자들은 Nox4 전사체는 정상 결장에서 낮은 수준으로 검출되지만, NOX4 발현은 UC 또는 크론병(Crohn's disease; CD)에서 섬유화착증을 갖는 약물 내성 환자와 덱스트란 황산 나트륨(dextran sulfate sodium; DSS) 유발 쥐 대장염 모델에서 상향 조절된다는 것을 발견하였다. 종래 NOX4는

마우스 대장염 모델에서 섬유화 특징의 발달과 연관되지 않았으며, UC에서 섬유증 발생의 기초가 되는 상세한 분자 메커니즘도 밝혀지지 않았다.

- [4] 이러한 배경을 바탕으로 본 발명자들은 NOX4가 궤양성 대장염의 장 섬유화 손상에 기여하고 섬유화 발달을 유도하는데 TGF- β 신호 전달이 필요하다는 가설을 세웠다. 이 가설을 테스트하기 위해 본 발명자들은 DSS 유발 대장염이 있는 NOX4 결핍 마우스(Nox4^{-/-})를 확립하고, Nox4가 장 손상에 대한 반응에 미치는 영향을 조사하였다. 이 연구는 염증성 장 질환에서 섬유화 진행 여부를 예측하고, 이를 억제하는데 크게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명자들은 NOX4가 궤양성 대장염의 장 섬유화 손상에 기여하고 섬유화 발달을 유도하는데 TGF- β 신호 전달이 필요하다는 가설을 세우고, 이 가설을 테스트하기 위해 본 발명자들은 DSS 유발 대장염이 있는 NOX4 결핍 마우스(Nox4^{-/-})를 확립하고, Nox4가 장 손상에 대한 반응에 미치는 영향을 조사하였다.
- [6] 따라서 본 발명의 목적은 궤양성 대장염에서 NOX4가 대장염의 장 섬유화 손상에 기여하고 섬유화 발달을 유도하는데 관여하는 TGF- β 신호 전달의 역할을 규명하는 데 있다.
- [7] 본 발명의 다른 목적은 대장염에서의 섬유화 진행 여부 예측용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 대장염에서의 섬유화 진행 여부 예측용 키트를 제공하는 데 있다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 대장염에서의 섬유화 진행 여부를 예측하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 대장염에서의 섬유화 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 데 있다.
- [11] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. “한 가지 구체예” 또는 “구체예”에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미

한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 “한 가지 구체예에서” 또는 “구체예”의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

- [13] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [14] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [15] 본 발명의 연구는 Nox4가 부족하면 결장에서 TGF- β 신호가 활성화되고, 이어서 중등도의 섬유화 표현형으로 전환되고, 제2형 면역 반응으로 Treg 모집이 이어진다는 증거를 제공한다. 결과적으로, Nox4^{-/-} 마우스는 WT 마우스보다 더 심한 점막 손상, 증가된 면역 반응, 및 DSS 유발 대장염으로 인한 더 심각한 섬유증을 겪어 회복 실패로 인해 생존하지 못하였다. 종래 연구에서는 Nox4가 쥐 대장염 모델에서 섬유화에 역할을 하지 않는다고 보고되었지만, Nox4^{-/-} 마우스에서 2.5% DSS로 유발된 대장염에서 실험 6일 후 Tgfbr1 발현 증가가 관찰되었다 (Redox Biol 2020;37:101752.). 본 연구에서는 2.5% DSS를 14일 동안 투여했는데, 이는 대장에 더 심각한 손상을 유발하였다. 이는 DSS 유발 쥐 대장염 모델 확립에서 DSS 농도 및 투여 기간에 따라 조직 손상의 심각도에 차이가 있음을 보여준다.
- [16] Nox4는 조직 섬유증과 밀접한 관련이 있는 것으로 간주되지만 섬유증 진행에서의 구체적인 역할에 대해서는 논란의 여지가 있었다. Nox4에 의해 유도된 ROS는 세포 사멸과 중간엽 세포 분화 및 활성화를 촉진하여 조직 섬유증을 유발하는 것으로 보인다. Nox4는 쥐의 폐에서 중요한 역할을 하여 근섬유아세포 활성화에 의한 폐포 세포 사멸 및 이후 블레오마이신 유발 섬유증을 유발하고 CCl4 유발 간 손상, 간세포 세포사멸 및 간 섬유증을 악화시키는 것으로 보고되었다 (Nat Med 2009;15:1077-81.). 반대로, 또 다른 연구에서는 Nox4가 세뇨관 세포 사멸과 산화 스트레스를 억제함으로써 만성 신장 손상이 있는 쥐의 신장에서 신장 섬유증을 예방하는 데 기여한다는 것을 보여주었다 (J Am Soc Nephrol 2012;23:1967-76.). 특히 Nox4는 Keap1-Nrf 경로에서 Hif1a 발현과 항산화 분자를 감소시켜 ROS 생성을 억제함으로써 Nox4가 신장에서 항산화 활성을 긍정적으로 조절할 수 있음을 시사한다.
- [17] 마찬가지로, 본 발명의 연구 결과는 Nox4의 손실이 마우스 결장 조직에서 ROS 수준의 결과적 상승으로 산화-환원 신호를 증가시키는 것으로 나타났다. 쥐 결장에서 Nox4의 결실로 인한 ROS의 증가는 ROS를 억제하고 하류 신호 전달을 조절하는 신장에서 이전에 보고된 Nox4의 역할과 유사하다. 이러한 결과는 Nox4가

결장에서 ROS 생성을 억제하고 TGF- β 신호와 그 하류 섬유증 관련 신호, 및 제 2형 면역 관련 신호를 억제한다는 사실과 관련이 있을 것으로 판단된다. Nox4^{-/-} 결장에서 확인된 DEG의 기능 강화 분석 결과에 따르면 콜라겐 관련 신호 전달은 콜라겐 단백질 수준의 변화와 일치하여 상향 조절되었으며 Treg 세포 계통 2형 면역이 활성화되었다. 이러한 데이터는 증가된 ROS가 숙주 방어를 위한 제2형 면역과 같은 TGF- β 매개 면역 반응을 자극하고 면역 관용을 위한 Treg 세포를 유도하여 면역 억제를 활성화한다는 것을 시사한다.

- [18] TGF- β 신호 전달 경로는 콜라겐 합성 및 Treg 세포 계통 결정을 비롯한 조직 생리학과 광범위하게 연관되어 있다. 본 발명에서 연구자들은 Nox4의 손실이 정상 및 염증성 마우스 결장 모두에서 지속적으로 활성화된 TGF- β 에 의해 자극된 T 세포의 하위 집합을 변경한다는 것을 발견하였다. TGF- β 신호전달은 순수 CD4⁺ T 세포로부터 Foxp3⁺ Tregs 및 ROR γ T⁺ Th17 세포의 분화를 직접적으로 유도할 수 있었다. 정상적인 조건(즉, DSS 처리 없이)에서 Nox4^{-/-} 마우스는 Foxp3⁺ Treg 세포의 침윤이 크게 증가하였다. Tregs은 특히 장내 공생 박테리아에 대한 면역 억제에 관여한다. Nox4^{-/-} 결장의 증가된 ROS와 함께 Foxp3⁺ Treg의 침윤은 TGF- β 활성화, 전염증성 사이토카인(Tnf 및 Il1 β) 발현, 및 F4/80⁺ 대식세포 침윤을 유발하였다. 따라서 Treg의 증가는 TGF- β 활성화에 의한 것일 뿐만 아니라 Nox4^{-/-} 마우스 대장의 염증성 면역 반응을 조절하는 방어 메커니즘을 나타내는 것으로 간주된다.
- [19] DSS 유발 염증이 유도된 후 Treg 개체군은 감소하고 ROR γ T⁺ Th17 세포는 확장되었다. 이 결과는 Nox4가 대장염 동안 Treg/Th17 균형을 조절한다는 것을 보여 준다. 추가 연구에 따르면, Th17 세포는 활동성 IBD 환자에서 더 풍부하고, IBD 관련 대장암에서 원인 역할을 하는 것으로 나타났다. 대장암은 일반적으로 전염증성 사이토카인 생성 세포가 촘촘하게 침윤된 모습을 보인다. 종양 침윤 면역 세포 중에서 T 세포는 Th17 유도 사이토카인(IL-17A, IL-12, IL-22), TNF- α , IL-6을 다량 분비하는 기능적 집단으로 전환된다. 이 집단은 STAT3/NF- κ B 활성화를 통해 결장 종양 형성 및 생존을 촉진한다. 본 발명의 연구 결과는 Th17 세포 및 관련 사이토카인이 Nox4^{-/-} 마우스에서 대장암의 생존과 성장을 향상시킬 수 있음을 시사한다.
- [20] 증가된 산화 스트레스는 만성적인 대장염의 발병과 관련되어 왔다. NOX 계열은 장 염증 진행의 주요 원인으로 제안되었다. Nox1과 Duox2는 장 상피에서 발현되며 위장관에서 ROS의 주요 공급원이다. 이들 유전자의 결핍은 대장염의 질병 중증도 증가와 관련이 있다. 섬유아세포와 장세포에서 Nox4의 조건부 결실은 특히 내피 세포에서 더 높은 종양 부담을 초래하며, Nox4의 섬유아세포 특이적 결실은 Nox4 마우스의 상피 세포 특이적 결실보다 종양이 더 빠르게 발달하는 결과를 가져왔다. 본 발명에서 연구자들은 Nox4가 비상피 세포 집단에서 발현된다

는 사실을 발견했는데, 이는 Nox4가 결장 간질 세포에서 ROS 유발 TGF- β 신호 전달을 조절함으로써 결장 손상의 심각도를 결정할 수 있음을 시사한다.

[21] 결론적으로, 본 발명에서 연구자들은 Nox4의 유전적 결실이 더 심각한 섬유성 대장염의 진행과 그에 따른 회복 실패로 이어진다는 것을 규명하였다. Nox4의 손실은 결장 조직의 산화 스트레스를 증가시켰고 이후 표준 TGF- β 신호를 영구적으로 활성화하였다. 또한, TGF- β 매개 T 세포 계통(Treg 및 Th17 세포)의 분화와 증식, 및 대장염에서의 섬유증 진행에 영향을 미쳤다. 쥐 대장염에서 Nox4의 역할에 대한 우리의 연구 결과는 산화환원 신호의 조절이 IBD 환자의 성공적인 치료를 위한 중요한 목표가 될 수 있음을 시사한다.

[22] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 Nox4(NADPH Oxidase 4) 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하고, CD3e(Cluster of Differentiation 3 epsilon), Muc11(Mucin Like 1), Vegf(vascular endothelial growth factor), Ano5(Anoctamin 5), Tnfrsf9(TNF Receptor Superfamily Member 9), Itg2a(Integrin α 2), Nlrp3(NLR family pyrin domain containing 3), Tnfrsf4(TNF Receptor Superfamily Member 4), Fabp7(Fatty Acid Binding Protein 7), CD79b(Cluster of Differentiation 79B), Ptgs2(Prostaglandin-endoperoxide synthase 2), 및 Caprin2(Caprin Family Member 2)로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 대장염에서의 섬유화 진행 여부 예측용 조성물을 제공한다.

[23] 본 발명에 따르면, 상기 대장염은 궤양성 대장염인 것일 수 있다.

[24] 본 발명에 따르면, 상기 생물학적 시료는 조직(tissue), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract), 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)으로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[25] 본 발명에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서 상기 항체는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 바이오마커로 기능하는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리

공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 바이오마커 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에서 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에서 널리 공지된 하이브리도마 방법(*European Journal of Immunology*, 6, 511-519.), 또는 과지 항체 라이브러리 기술(*Mol. Biol.*, 222:58, 1-597, 1991)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다. 본 발명에서 상기 PNA(Peptide Nucleic Acid)는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[*Science* 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다. 본 발명에서 상기 앵타머는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 문헌[*Proc Natl Acad Sci USA*. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.

- [26] 본 발명에 따르면, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에서 상기 프라이머는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다. 본 발명에서 상기 프로브란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생

물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 LNA(Locked nucleic acids)란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다(Gene Therapy (2006) 13, 496.502). LNA 뉴클레오사이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다. 본 발명에서 상기 안티센스는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

- [27] 본 발명에 따른 바이오마커 단백질이나, 이를 코딩하는 유전자의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.
- [28] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Nox4(NADPH Oxidase 4) 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하고, CD3e(Cluster of Differentiation 3 epsilon), Muc11(Mucin Like 1), Vegf(vascular endothelial growth factor), Ano5(Anoctamin 5), Tnfrsf9(TNF Receptor Superfamily Member 9), Itg2a(Integrin α 2), Nlrp3(NLR family pyrin domain containing 3), Tnfrsf4(TNF Receptor Superfamily Member 4), Fabp7(Fatty Acid Binding Protein 7), CD79b(Cluster of Differentiation 79B), Ptgs2(Prostaglandin-endoperoxide synthase 2), 및 Caprin2(Caprin Family Member 2)로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 대장염에서의 섬유화 진행 여부 예측용 조성물을 포함하는, 대장염에서의 섬유화 진행 여부 예측용 키트를 제공한다.
- [29] 본 발명에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것일 수 있다. 또한 상기 본 발명의 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람

직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.

[30] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 대장염 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, (a) Nox4(NADPH Oxidase 4) 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 증가를 확인하는 단계; 및, (b) CD3e(Cluster of Differentiation 3 epsilon), Muc11(Mucin Like 1), Vegf(vascular endothelial growth factor), Ano5(Anoctamin 5), Tnfrsf9(TNF Receptor Superfamily Member 9), Itg2a(Integrin α 2), Nlrp3(NLR family pyrin domain containing 3), Tnfrsf4(TNF Receptor Superfamily Member 4), Fabp7(Fatty Acid Binding Protein 7), CD79b(Cluster of Differentiation 79B), Ptgs2(Prostaglandin-endoperoxide synthase 2), 및 Caprin2(Caprin Family Member 2) 로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 증가를 확인하는 단계;를 포함하는 대장염에서의 섬유화 진행 여부를 예측하는 방법을 제공한다.

[31] 본 발명에 따르면, 상기 대장염은 궤양성 대장염인 것일 수 있다.

[32] 본 발명에 따르면, 상기 생물학적 시료는 조직(tissue), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract), 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물

- (bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)으로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [33] 본 발명에 따르면, 상기 방법은 CD3e, Mucl1, Vegf, Ano5, Tnfrsf9, Itg2a, 및 Nlrp3으로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된 경우, 상기 대장염에서 섬유화가 진행될 가능성이 높은 것으로 예측하는 방법이다.
- [34] 본 발명에 따르면, 상기 방법은 상기 Tnfrsf4, Fabp47, CD79b, Ptgs2, 및 Caprin2로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 감소된 경우, 상기 대장염에서 섬유화가 진행될 가능성이 높은 것으로 예측하는 방법이다.
- [35] 이 때, 상기 단백질, 또는 유전자의 발현 증감은 정상 대조군 대비 2배 이상의 발현 증감인 것일 수 있다.
- [36] 본 발명에 따르면, 상기 방법은 Nox4(NADPH Oxidase 4) 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 증가가 TGF- β (Transforming growth factor-beta)에 의해 조절되는 것인 방법이다.
- [37] 본 발명에 따르면, 상기 방법은 (c) F4/80⁺ M1 대식세포, CD127⁺ 림프구 세포, 조절 T세포(Regulatory T cell), 또는 ROR γ T⁺ Th17 세포(T helper 17 cell)의 증가를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 이 때, 상기 F4/80⁺ M1 대식세포, CD127⁺ 림프구 세포, 조절 T세포(Regulatory T cell), 또는 ROR γ T⁺ Th17 세포(T helper 17 cell)가 정상 대조군 대비 증가된 경우 상기 대장염에서 섬유화가 진행될 가능성이 높은 것으로 예측하는 방법이다.
- [38] 또한 본 발명에 따르면, 상기 방법은 (c) CD163⁺ M2 대식세포의 감소를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 이 때 상기 CD163⁺ M2 대식세포가 정상 대조군 대비 감소된 경우 상기 대장염에서 섬유화가 진행될 가능성이 높은 것으로 예측하는 방법이다.
- [39] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Nox4(NADPH Oxidase 4) 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함하고, CD3e(Cluster of Differentiation 3 epsilon), Mucl1(Mucin Like 1), Vegf(vascular endothelial growth factor), Ano5(Anoctamin 5), Tnfrsf9(TNF Receptor Superfamily Member 9), Itg2a(Integrin α 2), 및 Nlrp3(NLR family pyrin domain containing 3)로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 추가로 포함하는, 대장염에서의 섬유화 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [40] 본 발명에 따르면, 상기 대장염은 궤양성 대장염인 것일 수 있다.
- [41] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Nox4(NADPH Oxidase 4) 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함하고, Tnfrsf4(TNF Receptor

Superfamily Member 4), Fabp7(Fatty Acid Binding Protein 7), CD79b(Cluster of Differentiation 79B), Ptgs2(Prostaglandin-endoperoxide synthase 2), 및 Caprin2(Caprin Family Member 2)로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 활성제를 추가로 포함하는, 대장염에서의 섬유화 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

- [42] 본 발명에 따르면, 상기 대장염은 궤양성 대장염인 것일 수 있다.
- [43] 상기 본 발명의 약학조성물들에 있어서, 용어 예방은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [44] 상기 본 발명의 약학조성물들에 있어서, 용어 치료는 본 발명의 상기 유효성분을 이용하여 타겟 질환으로 인해 발생된 증상이 호전되거나, 개체가 이롭게 되는 모든 행위를 의미하며, 임상적 결과를 포함하는 유용한 결과 또는 바람직한 결과를 얻기 위한 시도를 의미한다. 유용한 또는 바람직한 임상적 결과는 검출 가능하거나 가능하지 않더라도, 하나 이상의 증상 또는 상태의 완화 또는 개선, 질병 범위의 축소, 질병 상태의 안정화, 질병 발생의 억제, 질병 확산의 억제, 질병 진행의 지연 또는 늦춤, 질병 발병의 지연 또는 늦춤, 질병 상태의 개선 또는 경감, 및 감퇴 (부분 또는 전체)를 포함할 수 있으며, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, “치료”는 치료의 부재에서 예측되는 것 이상으로 환자의 생존이 연장되는 것을 의미할 수 있다. 또한, “치료”는 질병 진행의 억제, 일시적으로 질병 진행의 늦춤을 의미할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 질병의 진행을 영원히 정지시키는 것과 관련이 있다. 당업자에 의해 이해된 바와 같이, 특정 질병 상태를 향상시키는 동안 치료가 치료된 환자에서 반대의 결과, 즉 치료에 의해 영향을 받는 모든 이점보다 큰 결과를 초래한다면 결과는 유익하지 않거나 바람직하지 않을 수도 있다.
- [45] 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 항암제와 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [46] 상기 본 발명의 약학조성물들에 있어서, 상기 Nox4, CD3e, Mucl1, Vegf, Ano5, Tnfrsf9, Itg2a, 및 Nlrp3으로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질의 발현 억제제는 타겟 단백질에 특이적인 항체, 또는 그 항원 결합 단편을 포함하는 것일 수 있다. 여기서의 단백질 활성 억제란, 단백질에 특이적인 항체 또는 그 항원 결합 단편으로 타겟 단백질의 활성을 억제하는 것을 의미한다. 상기 항체는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 본 발명의 부분 펩티드로는, 최소한

7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 보다 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다. 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄(Light chain) 및 2개의 전체 길이의 중쇄(Heavy chain)를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다. 또는 상기 Nox4, CD3e, Mucl1, Vegf, Ano5, Tnfrsf9, Itg2a, 및 Nlrp3으로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 발현 억제제는 타겟 유전자에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 및 마이크로 RNA로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 짧은 길이의 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)으로서, 생체 내 뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를 달성하기 위해 사용되는 것이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코드된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어 왔다. 올리고뉴클레오타이드가 분해되지 않도록 더욱 안정하고 저항적이 되게 하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형이 당업자에게 알려져 있고 이해된다. 여기서 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고, 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 당분야에 알려진 방법에 의해 변형된다. 이들 변형은 당분야에 알려져 있는 올리고뉴클레오타이드 백본의 변형, 당 모이어티의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 상기 siRNA(small interfering RNA)는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법으로 사용되는 것이다. 본 발명에서 siRNA 분자가 이용되는 경우, 센스 가닥과 안티센스 가닥이 서로 반대쪽에 위치하여 이중쇄를 이루는 구조 또는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 불일치(mismatch)(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 팽창/돌출(bulge)(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNA 간섭(RNA interference, RNAi)

효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다. 상기 siRNA분자는 이에 제한되지는 않으나, 전체 길이가 15 내지 30 염기, 바람직하게는 19 내지 21 염기일 수 있다. 상기 shRNA(short hairpin RNA)은 45 내지 70 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 단일가닥의 RNA로서, 타겟유전자 siRNA 염기서열의 센스가닥과 상보적인 안티센스가닥 사이에 3-10개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후, 플라스미드 벡터에 클로닝하거나 또는 shRNA를 레트로바이러스인 렌티바이러스(lentivirus) 및 아데노 바이러스(adenovirus)에 삽입하여 발현시키면 루프(loop)가 있는 헤어핀 구조의 shRNA가 만들어지고 세포내의 다이서(dicer)에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타낸다. 상기 마이크로 RNA(microRNA)는 발생, 분화, 증식, 보존 및 아포토시스 등 다양한 생물학적 과정을 조절한다. 마이크로 RNA는 일반적으로 타겟 mRNA를 불안정하게 하거나, 번역을 방해함으로써 타겟 mRNA를 코딩하는 유전자의 발현을 조절한다. 상기 안티센스 올리고 뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 마이크로RNA를 지닌 발현 컨스트럭트/벡터에 유용한 조절 서열(예를 들어, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 조직 특이적 프로모터 또는 그의 결합) 역시 당분야에서 공지된 내용으로부터 적절히 선택할 수 있으며, 상기 유전자의 발현 억제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 마이크로RNA 외에도 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질이면 어떤 것이든 가능하다.

- [47] 상기 본 발명의 약학조성물들은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 운활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다. 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 운활제, 습윤제, 향료, 유효제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

이 때, 본 명세서에서 용어 투여는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 의미하고, 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 포함하며, 본 발명의 조성물의 투여경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서 유효량은 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. 성인의 경우, 상기 치료용 약학조성물을 1회 50ml 내지 500ml의 양으로 체내에 투여 가능하며, 화합물일 경우 0.1ng/kg 내지 10mg/kg, 모노클로날 항체일 경우 0.1ng/kg 내지 10mg/kg의 용량으로 투여될 수 있다. 투여간격은 1일 1회 내지 12회일 수 있으며, 1일 12회 투여할 경우에는 2시간마다 1회씩 투여할 수 있다. 또한 본 발명의 약학조성물은 목적하고자 하는 암의 치료를 위해 단독 또는 당업계에 공지된 다른 치료법, 예를 들어 화학요법제, 방사선 및 수술과 같이 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 약학조성물은 면역 반응을 증진하기 위하여 고안된 다른 치료, 예를 들어 당업계에 주지된 것과 같은 어쥬번트 또는 사이토카인(또는 사이토카인을 코딩하는 핵산과 혼합하여 투여될 수 있다. 바이오리스팅(biolistic) 전달 또는 생체 외(ex vivo) 처리와 같은 다른 표준 전달 방법들이 사용될 수도 있다. 생체 외 처리에서 예를 들어 항원제시 세포들(APCs), 수지상세포들, 말초혈액 단핵구 세포들, 또는 골수세포들을 환자 또는 적당한 공여자로부터 얻어서 본 약학조성물로 생체 외에서 활성화된 후 그 환자에게 투여될 수 있다. 또한 이 때 용어 치료적 유효량은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 예방적 유효량을 포함하는 의미이다.

발명의 효과

- [48] 본 발명에서 연구자들은 Nox4의 유전적 결실이 더 심각한 섬유성 대장염의 진행과 그에 따른 회복 실패로 이어진다는 것을 규명하였다. Nox4의 손실은 결장 조직의 산화 스트레스를 증가시켰고 이후 표준 TGF- β 신호를 영구적으로 활성화하였다. 또한, TGF- β 매개 T 세포 계통(Treg 및 Th17 세포)의 분화와 증식, 및 대장염에서의 섬유증 진행에 영향을 미쳤다. 따라서 본 발명은 염증성 장 질환에서 섬유화 진행 여부를 예측하고, 이를 억제하는데 크게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [49] 도 1은 Nox4^{-/-} 마우스의 생성을 나타낸다. 도 1a 및 도 1b는 CRISPR/Cas9 기술을 사용한 Nox2 또는 Nox4 결손의 도식적 표현이다. 생성된 이형접합 및 동형접합 마우스는 특정 Nox2 또는 Nox4 결실 부위를 사용하여 유전자형 PCR을 통해 결정되었다. 도 1c 왼쪽은 치료되지 않은 결장 및 2.5% DSS 처리 결장 색션의 mNox4에 대한 ISH 결과를 나타내며, 도 1c 오른쪽은 치료되지 않은 결장 및 2.5% DSS 처리된 결장 색션의 Nox2에 대한 면역조직화학 결과를 나타낸다. 도 1d는 섬유증 부위를 빨간색으로 보여주는 시리우스-레드 염색 결과이다. 그래프는 이미지 J를 사용한 섬유증 영역의 수치적 측정을 나타낸다. 도 1e 및 도 1f는 DSS 처리되지 않은, 또는 처리된 그룹에서 DCFH-DA 염색을 이용해 평가된 세포내 활성 산소종(ROS)의 수준을 나타낸다. 데이터는 평균±SD로 표시되며, 유의성은 야생형(WT)과 비교하여 *P < 0.5, **P < 0.01 이다.
- [50] 도 2는 Nox4가 텍스트란황산나트륨(DSS)으로 유발된 실험적 대장염에서 보호 기능을 갖는다는 것을 나타낸다. 도 2a는 DSS 유발 쥐 대장염 모델 확립을 위한 실험 계획이다. 도 2b는 매일 측정된 DSS 유발 대장염이 있는 야생형(WT) 및 Nox4^{-/-} 마우스의 체중 감소(n=6)를 나타낸다. 도 2c는 DSS 유발 대장염이 있는 WT 또는 Nox4^{-/-} 마우스의 14일까지의 생존 결과를 나타낸다(n=6). 도 2d는 14일째에 희생된 DSS 유발 대장염이 있는 WT 및 Nox4^{-/-} 마우스의 결장에 대한 육안 관찰 결과를 나타낸다. 결장 길이는 마우스를 안락사시킨 후 평가하였다. 도 2e는 DSS 유발 대장염 WT 및 Nox4^{-/-} 마우스의 결장 조직에 대한 대표적인 헤마톡실린 및 에오신 염색 이미지 결과를 나타낸다. 도 2f는 DSS 유발 대장염 WT 및 Nox4^{-/-} 마우스의 병리학적 평가를 위한 대장염 점수를 나타낸다. 염증 중증도는 염증 정도에 따라 없음(0), 점막 염증(1), 점막하 염증(2), 경벽 염증(3)으로 산정되었다. 도 2g는 매일 측정된 체중 감소, 대변 농도 및 직장 출혈 평가로 구성된 질병 활동 지수를 나타낸다. 데이터는 평균±SD로 표시되며, 유의성은 야생형(WT)과 비교하여 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001 이다.
- [51] 도 3은 Nox4가 장 섬유증 및 면역 매개 조직 재생에 관여함을 나타낸다. 도 3a는 텍스트란 황산나트륨(DSS) 처리된 야생형(WT) 및 Nox4^{-/-} 마우스 결장 색션의 M1 대식세포를 나타내는 F4/80(상단), M2 대식세포를 나타내는 CD164(중간) 및 림프구 세포를 나타내는 CD127(하단)의 면역조직화학(IHC) 염색 결과이다. 도 3b는 증식하는 세포를 나타내는 Ki-67에 대한 면역조직화학(IHC) 염색 결과이다. 2.5% DSS 처리 그룹의 IHC 정량화는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 평가되었으며 결과는 이미지 오른쪽에 막대 그래프로 표시된다. 회색 막대는 WT 그룹(n=3), 빨간색 막대는 Nox4^{-/-} 그룹(n=3)이다. 도 3c는 섬유증 영역을 빨간색으로 보여주는 시리우스 레드 염색(상단) 및 결장 조직의 섬유증을 나타내는 Tenascin-C 항체를 사용한 면역표지(하단) 결과이다. 각 양성 염색 영역은 ImageJ에 의해 측정되었으며 결과는 각 이미지 옆에 막대 그래프로 표시된다. 회색 막대는 WT 그룹(n=3), 빨간색 막대는 Nox4^{-/-} 그룹(n=3)이다. 도 3d는 전염증 관련 유전자 Tnf

및 Il1b의 RT-qPCR 결과이고, 도 3e는 섬유증 관련 유전자 Col1a1, Col3a1 및 Tnc의 RT-qPCR 결과이다. 데이터는 평균±SD로 표시되며, 유의성은 야생형(WT)과 비교하여 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001이다.

[52] 도 4는 야생형(WT) 및 Nox4^{-/-} 마우스 결장의 면역 세포 침윤 결과를 나타낸다. 도 4a는 M1 대식세포를 나타내는 F4/80(상단), M2 대식세포를 나타내는 CD164(중간) 및 림프구 세포를 나타내는 CD127(하단)의 면역조직화학(IHC) 염색 결과이다. 도 4b는 증식하는 세포를 나타내는 Ki-67에 대한 면역조직화학(IHC) 염색 결과이다. DSS 처리되지 않은 그룹의 IHC 정량화는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 평가되었으며 결과는 이미지 오른쪽에 막대 그래프로 표시된다. 회색 막대는 WT 그룹(n=3), 빨간색 막대는 Nox4^{-/-} 그룹(n=3)이다. 도 4c는 섬유증 영역을 빨간색으로 보여주는 시리우스 레드 염색(상단) 및 결장 조직의 섬유증을 나타내는 Tenascin-C항체를 사용한 면역표지(하단) 결과이다. 각 양성 염색 영역은 ImageJ에 의해 측정되었으며 결과는 각 이미지 옆에 막대 그래프로 표시된다. 회색 막대는 WT 그룹(n=3), 빨간색 막대는 Nox4^{-/-} 그룹(n=3)이다. 데이터는 평균±SD로 표시되며, 유의성은 야생형(WT)과 비교하여 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001이다.

[53] 도 5는 Nox4의 손실이 콜라겐 합성 및 조절 T 세포(Treg) 계통의 침윤으로 이어짐을 보여준다. 도 5a는 2.5% DSS 또는 비히클 처리된 야생형(WT)(n=3) 및 Nox4^{-/-}(n=3) 마우스 그룹에서 원위 결장 조직의 대량 RNA 서열 분석을 위한 계획이다. 도 5b는 DSS 미처리 또는 처리된 WT 및 Nox4^{-/-} 그룹의 결장 조직 분자 시그니처에 대한 2차원 및 3차원 주성분 분석(PCA) 플롯이다. 도 5c는 WT 그룹과 비교하여 Nox4^{-/-}의 발현 수준 차이가 2배 이상 차이가 나면서 하향 조절되거나(파란색) 또는 상향 조절되는(빨간색) 유전자의 화산 플롯이다. 도 5d는 Nox4^{-/-} 마우스에서 상향 조절된 DEG의 유전자 온톨로지(GO) 생물학적 과정(BP) 분석 결과이다. 도 5e는 Nox4^{-/-} DEG의 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 분석 결과이다. 상위 14개 경로가 식별되며 색상은 통계적 유의성을 나타낸다. 도 5f는 WT 및 Nox4^{-/-} DEG를 기반으로 CIBERSORT에 의해 평가된 T 세포 하위 집단이다. 도 5g는 WT 및 Nox4^{-/-} 결장 조직의 CIBERSORT 분석 결과이다. 11가지 서로 다른 면역 세포 유형의 상대적 비율은 CIBERSORT를 사용하여 RNA 서열 분석 데이터에서 분리되었다. 도 5h는 WT 또는 Nox4^{-/-} 마우스에서 분리된 원위 결장 조직의 유세포 분석으로, CD4⁺Foxp3⁺ T 세포에 연결된 살아있는 세포의 상대적 수(왼쪽, 히스토그램)와 CD4⁺Foxp3⁺ T 세포의 수(오른쪽, 막대 그래프)를 나타낸다. 도 5i는 WT 또는 Nox4^{-/-} DEG를 기반으로 한 유전자 세트 농축 분석 결과이다. TGF-β 유전자 세트에는 Nox4^{-/-} 마우스 결장에서 상향 조절되는 유전자가 풍부하다.

[54] 도 6은 Nox4가 생체 내 TGF-β 신호 전달의 활성화를 억제함을 보여준다. 도 6a는 일반적인 TGF-β 신호 전달 경로 체계를 나타낸다. 도 6b는 야생형(WT) 또는

Nox4^{-/-} 마우스 결장 조직에서 TGF-β 조절 유전자의 발현에 대한 RT-qPCR 분석 결과이다(여기서 사용된 마우스는 RNA 서열 분석에 사용된 마우스와 다른 개체이다(n=3)). 그래프에서 검은색 검은 DSS 처리되지 않은 WT 마우스를 나타내고, 빨간색 점은 Nox4^{-/-} 마우스를 나타낸다. 도 6c는 효소 결합 면역흡착 분석으로 측정된 WT(검은색) 또는 Nox4^{-/-}(빨간색) 결장 조직 용해물의 활성 TGF-β 수준을 나타낸다. 도 6d는 WT 또는 Nox4^{-/-} 결장 조직 추출물에서 TGF-β 및 TGFβR1 단백질 수준의 면역블로팅 결과이다. β-액틴이 내부 대조군으로 사용되었고, 밴드 크기는 ImageJ에 의해 정량화되었다. 도 6e는 WT 및 Nox4^{-/-} 마우스 결장 조직의 세포질 및 핵산 분획 추출물에서 pSmad2/3, Smad2/3 및 Smad4 단백질 수준의 면역블로팅 결과이다. GAPDH와 HDAC는 각각 세포질과 핵 조절 단백질 대조군으로 사용되었고, 밴드 크기는 ImageJ에 의해 정량화되었다. 도 6f는 WT 또는 Nox4^{-/-} 마우스의 정상 및 염증 결장 절편의 TGF-β 면역형광 염색 결과이고, 도 6g는 TGF-β / CD11c / DAPI의 면역형광 염색 결과이다. 데이터는 평균±SD로 표시되며, 유의성은 야생형(WT)과 비교하여 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001 이다.

- [55] 도 7은 TGF-β 신호 전달 및 그 하류 분자가 텍스트란 황산 나트륨(DSS) 유발 대장염 Nox4^{-/-} 마우스에서 상향 조절됨을 보여준다. 도 7a는 주성분 분석을 위한 로컬 피셔 판별 분석 플롯이다. 2차원 점수는 W/DSS WT(녹색)와 W/DSS Nox4^{-/-}(빨간색) 그룹 간에 쉽게 구별되고, 공유 영역은 95% 신뢰 구간을 나타낸다. 도 7b는 W/DSS WT 또는 W/DSS Nox4^{-/-} 마우스에서 분류된 총 결장 세포를 RNA 서열 분석에 적용한 결과이다. RNA 시퀀싱 데이터의 히트맵은 상향 조절된(보라색) 유전자와 하향 조절된(노란색) 유전자를 보여준다. 도 7c는 W/DSS WT(흰색) 및 W/DSS Nox4^{-/-}(빨간색) 마우스에서 상당히 상향 조절된 유전자를 식별하는 화산 플롯이다. 도 7d와 도 7e는 WT 및 Nox4^{-/-} 마우스 결장 조직의 CIBERSORT 분석을 나타낸다. 11가지 서로 다른 면역 세포 유형(도 7d)과 7가지 T 세포 계통 세포 유형(도 7e)의 상대적 비율은 CIBERSORT를 사용하여 RNA 시퀀싱 데이터에서 분리되었다. 도 7f는 W/DSS WT 및 W/DSS Nox4^{-/-} 그룹에서 차별적으로 발현된 유전자(DEG)에서 상당히 강화된 KEGG 경로를 보여주는 버블 플롯이다. 거품 색상은 p-값을 나타내고 거품 크기는 발현 수준을 나타낸다. 도 7g는 W/DSS Nox4^{-/-} DEG의 TGF-β 관련 유전자 발현에 대한 히트맵이다. 도 7h는 W/DSS WT 또는 W/DSS Nox4^{-/-} 원위 결장 조직 추출물로부터의 TGF-β 및 TGFβR1 단백질 수준의 면역블로팅 결과이다. β-액틴은 내부 대조군으로 사용되었고, 밴드 크기는 ImageJ에 의해 정량화되었다. 도 7i는 W/DSS WT 및 W/DSS Nox4^{-/-} 마우스의 결장 조직으로부터의 CD4⁺ T 세포에 대한 RORγT⁺의 발현을 보여주는 유세포 분석 플롯이다. 막대 그래프는 WT 및 Nox4^{-/-} 마우스의 결장에 있는 CD4⁺ T 세포(오른쪽 상단) 및 CD4⁺RORγT⁺Th17 세포(오른쪽 하단)의 백분율을 나타낸다. 데이터는 평

균±SD로 표시되며, 유의성은 야생형(WT)과 비교하여 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001 이다.

[56] 도 8은 야생형(WT) 및 *Nox4*^{-/-} 마우스 결장의 관련된 생리학적 특징을 보여준다. 도 8a는 W/DSS WT 그룹에서 차별적으로 발현된 유전자(DEG), 도 8b는 W/DSS *Nox4*^{-/-} 그룹에서 차별적으로 발현된 유전자(DEG) 중 상향 조절된 유전자 세트의 유전자 온톨로지(GO) 분석 결과이다. 도 8c는 W/DSS WT 또는 W/DSS *Nox4*^{-/-} 결장 조직 용해물의 활성 TGF-β 수준을 효소 결합 면역흡착법으로 분석한 결과이다. 데이터는 평균±SD로 표시되며, 유의성은 야생형(WT)과 비교하여 *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005, ****P < 0.001 이다.

[57] 도 9는 *Nox4*의 결손이 텍스트란황산나트륨(DSS) 유발 대장염으로 인한 조직 복구를 방해함을 보여준다. 도 9a는 DSS 유발 쥐 대장염의 회복 단계에 대한 실험 계획이다. 도 9b는 매일 측정된 회복 단계 동안의 DSS 유발 대장염이 있는 야생형(WT) 및 *Nox4*^{-/-} 마우스의 체중 변화를 나타낸다(그룹당 n= 5). 도 9c는 WT 및 *Nox4*^{-/-} 마우스에서 DSS 유발 대장염 후 회복 단계 15일 까지의 생존율 결과이다(그룹당 n=5). 도 9d는 WT 및 *Nox4*^{-/-} 마우스에서 DSS 유발 대장염 후 회복 단계 동안 결장 조직의 헤마톡실린 및 에오신 염색 결과이고, 도 9e는 결장 길이 및 질병 활동 지수(DAI) 점수의 정량화 결과이다. DAI의 경우, 염증 정도에 따라 없음(0), 점막 염증(1), 점막하 염증(2), 경벽 염증(3)으로 산정되었다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[58] *Nox4*^{-/-} 마우스에서 관찰된 보다 심각한 염증 및 섬유증에 기여하는 기본 메커니즘을 확인하기 위해 대량 RNA-seq 분석을 수행하였다. 총 5124개의 차별적으로 발현된 유전자(differentially expressed genes; DEG)가 4가지 그룹에서 비교되었다[untreated (W/O) *Nox4*^{-/-} vs. W/O WT, treated (W/) *Nox4*^{-/-} vs. W/ WT, W/ WT vs. W/O WT, and W/ *Nox4*^{-/-} vs. W/O *Nox4*^{-/-}]. 처리된 그룹과 처리되지 않은 그룹을 비교하면 42개의 유전자가 공동 상향 조절되었고 2개의 유전자가 공동 하향 조절되었다. 42개의 공동 조절 유전자에는 T 세포 관련 유전자(CD3e 및 *Tnfrsf9*), 섬유아세포 활성화 인자(*Itg2a* 및 *Vegf*), 염증복합체 센서(*Nlrp3*), TGF-β 표적 유전자(*Ano5* 및 *Muc11*)가 포함되어, WT 마우스의 유전자와 비교할 때 *Nox4*^{-/-}에서 발현 수준이 더 높았다. 치료되지 않은 비교를 위한 *Tnfrsf4*, *Fabp7*, *CD79b* 및 *Ptgs2*와 같은 대장암 바이오마커로 확인된 유전자는 WT 마우스의 유전자와 비교할 때 *Nox4*^{-/-}에서 하향 조절되었다. 이러한 발견은 *Nox4* 결핍이 TGF-β 신호 전달을 억제한다는 것을 시사한다.

발명의 실시를 위한 형태

[59] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따

라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[60] 실시예

[61] [실험방법]

[62] **1. 마우스 및 동물모델 구축**

[63] 모든 동물 실험은 대한민국 연세대학교 동물윤리심의위원회(IACUI 2017-0258)의 승인을 받아 수행되었다. 8주령 C57BL6/J 수컷 마우스를 이용하였으며, 동물은 12시간 명암 주기 하에 특정 병원체가 없는 시설에 수용되었고, 사료로 PicoLab Rodent Diet 20(LabDiet, St. Louis, MO, USA)이 제공되었다.

[64] Nox2-null 마우스(Nox2^{-/-})는 엑손 4를 삭제한 CRISPR/Cas9 기술을 사용하여 확립되었다(도 1a). 또한 DSS 대장염의 섬유증 특징에 대한 Nox 계열 구성원을 발현하는 면역 세포의 영향을 테스트하기 위해 Nox4-null 마우스(Nox4^{-/-})도 확립하였다(도 1b).

[65] 이전 연구에서 Nox4^{-/-} 마우스가 DSS 체제에 의해 손상되기 쉽다고 보고됨에 따라, 본 연구에서는 WT 또는 Nox4^{-/-} 8주령 수컷 마우스에게 섬유성 대장염을 유발하기 위해 식수에 2.5% DSS(MP Biochemicals, Santa Ana, CA, USA)를 첨가하여 14일 동안 투여하였다. 2일마다 새로운 DSS 용액을 준비하였다. 회복 단계의 경우, 마우스에게 식수에 2%(w/v) DSS를 5일 동안 투여한 후 고압멸균된 증류수로 10일의 회복 기간을 두었다. 대조군 마우스에는 고압멸균된 증류수만 제공되었다. 마우스의 일일 체중 변화와 DAI(Disease Activity Index)가 기록되었고, DSS로 유발된 대장염 활동은 체중 감소(0~4), 배변 빈도(0~3) 및 직장 출혈(0~3)에 따라 점수가 산정되었다(Nat Protoc 2017;12:1295-1309).

[66] **2. 병리학적 분석**

[67] 마우스를 희생시키고 차가운 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline; PBS)로 좌심실 관류시켰다. 이후 수득된 결장 조직을 차가운 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 4°C에서 밤새 고정하고, 결장 조직을 "스위스 롤" 형태로 가공하고, 탈수하고, 파라핀 포매하고, 5 μ m 두께로 박절하였다. 절편을 자일렌으로 20분씩 3회, 무수 EtOH로 10분씩 3회, 90% EtOH로 10분씩 2회, 75% EtOH로 10분간 탈파라핀화한 후, 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색하였다. 이후 조직 슬라이드를 탈수시키고 Shandon 합성 마운트 용액(Thermo Scientific)을 사용하여 봉입하였다.

[68] **3. 면역조직화학 염색**

[69] 결장에서 염증 반응이 일어나는 동안 면역 세포 침윤은 대장염 조직에서 전염증성 사이토카인의 증가를 특징으로 한다. DSS로 유도된 WT와 Nox4^{-/-} 마우스의 면역학적 표현형을 평가하기 위해 결장 절편에서 면역 세포 마커의 면역조직화학 염색을 수행하였다. 파라핀 포매된 마우스 결장 절편을 60°C에서 1시간 동안 가열한 후, 실온(22~25°C)에서 냉각하였다. 탈파라핀화 및 조직 재수화

는 [2. 병리학적 분석]에서와 동일한 방법으로 수행하였다. 항원 검색은 Target Retrieval Solution(Dako)을 사용하여 고압에서 15분 동안 수행하고 4°C에서 1시간 동안 냉각하였다. 절편을 3% H₂O₂로 30분 동안 처리하여 내인성 퍼옥시다제를 차단한 후, 무혈청 시약(Dako)으로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후, 절편을 4°C에서 표 1의 1차 항체로 밤새 처리하고, PBS로 세척하고, HRP(horseradish peroxidase) 표지 2차 항체(Dako)로 실온에서 20분간 처리하였다. 타겟의 검색을 위해 Liquid DAB+ 염색을 수행하였으며, Mayer의 헤마톡실린(Dako)으로 대조 염색하였다.

[70]

[표1]

1 st Antibody	Dilution	Vendor	Catalog
Cytochrome B245	1:1000	Bio-Rad	MCA4685
F4/80	1:500	Cell Signaling Technology	70076
CD163	1:1000	Novus	NB110-59935
CD127	1:1000	eBioscience	14-1271-82
Ki-67	1:1000	Abcam	ab16667
TGF-beta	1:100	Genetex	GTX21279
TGFbR1	1:100	R&D System	MAB5871
pSmad2/3	1:1000	Cell Signaling Technology	8828
Smad2/3	1:1000	Cell Signaling Technology	8685
Smad4	1:1000	Cell Signaling Technology	46535
CD11c	1:300	Cell Signaling Technology	97585
Beta-actin	1:5000	Abcam	ab8227
GAPDH	1:5000	Abcam	ab8245
HDAC1	1:1000	Abcam	ab280198
PE anti-mouse CD4	1:100	Biolegend	100408
Pacific blue anti-Foxp3	1:100	Biolegend	126409
Alexa 488 anti-RORgT	1:100	R&D System	IC9125G-025

Cy3 affini-pure Donkey anti-Mouse	1:500	Jackson Immunor esearch	715-165-151
Donkey anti-mouse IgG Alexa 488	1:500	Invitrogen	A-21202

[71] **4. TGF- β 활성 측정**

[72] 활성 TGF- β 의 발현 수준은 제조업체의 지침(Promega, Madison, WI, USA)에 따라 TGF β R1 kinase ELISA system을 사용하여 측정하였다. 활성 TGF β R1을 측정하기 위해 새로 분리된 결장 용해물을 1N HCl로 활성화하였다.

[73] **5. RNA 시퀀싱**

[74] TRIzol 시약(Invitrogen)을 사용하여 조직으로부터 총 RNA를 분리하였다. RNA 품질은 RNA 6000 Nano Chip(Agilent Technologies, Amstelveen, the Holland)을 사용하여 Agilent 2100 bioanalyzer로 평가하였으며, RNA 정량은 ND-2000 분광 광도계(Thermo Inc., Wilmington, DE, USA)로 측정하였다.

[75] 제조업체 지침에 따라 QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit(Lexogen, Inc., Austria)를 사용하여 대조 및 시료 RNA에 대한 전장 라이브러리를 구축하였다. 구체적으로, 각 500ng의 RNA 샘플을 5'-말단에 Illumina 호환 서열을 포함하는 올리고-dT 프라이머와 혼성화하고, 역전사를 수행하였다. RNA 주형이 분리된 후, 5'말단에 Illumina 호환 링커 서열을 포함하는 무작위 프라이머에 의해 두 번째 가닥 합성이 시작된다. 모든 반응 성분을 제거하기 위해 이중 가닥 라이브러리를 자기 비드를 사용하여 정제하였고, 클러스터 생성에 필요한 전체 어댑터 시퀀스를 추가하기 위해 라이브러리를 증폭시켰다. 라이브러리를 PCR 성분으로부터 정제하고, NextSeq 500 플랫폼(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 단일 말단 75bp 시퀀싱으로 High-throughput sequencing을 수행하였다.

[76] QuantSeq 3'mRNA-Seq 리드는 Bowtie2를 사용하여 정렬되었다. Bowtie2 인덱스는 게놈 조립 서열 또는 게놈 및 전사체에 정렬하기 위한 대표적인 전사체 서열로부터 생성되었다. 정렬 파일은 전사체 조립 및 존재비 추정과 DSS 처리되지 않은 WT(W/O WT), DSS 처리되지 않은 Nox4^{-/-}(W/O Nox4^{-/-}), DSS 처리된 WT(W/DSS WT), 및 DSS 처리된 Nox4^{-/-}(W/DSS Nox4^{-/-}) 원위 결장 시료들 사이의 DEG를 검출하는데 사용되었다. 시료들은 bedtools의 적용 범위를 고려하여 고유 및 다중 정렬의 개수를 기반으로 2배 컷오프 값과 P 값을 사용하여 DEG를 정의하였다. 리드 수 데이터는 Bioconductor가 포함된 R 소프트웨어(R Development Core Team, 2016)의 EdgeR 패키지를 사용하여 Quantile Normalization 방법을 기반으로 처리되었고, 기능 조사를 위한 유전자 분류는 DAVID(/david.abcc.ncifcrf.gov/) 및 Medline 데이터베이스(/www.ncbi.nlm.nih.gov/) 검색을 기반으로 하였다. 데이터 마이닝과 그래픽 시각화는 ExDEGA(Ebiogen Inc., Korea)를 이용하여 수행하였다.

[77] **6. RT-qPCR**

[78] 수득된 결장 조직을 4°C의 RNAlater™ 안정화 용액(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc.)에 담그어 밤새 처리하고, 제조사의 지시에 따라 TRIzol 시약(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 총 RNA 추출하였다. Recombinant DNase1(Takara Bio Inc., Shiga, Japan)을 사용하여 오염된 게놈 DNA를 제거하고, Nanodrop 분광광도계(Thermo Fisher Scientific)로 RNA를 정량화하였다. ImProm-IITM 역전사 시스템(Promega)을 사용하여 총 1µg의 주형 RNA를 역전사하였다. qPCR에 사용된 프라이머를 하기 표 2에 기재하였다.

[79] [표2]

Genes	Seq. No.	Sequence	Accession No.
Tnf	서열번호 1	F: GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	NM_013693
	서열번호 2	R: GCCATAGAAGCTGATGAGAGGGAG	
Il1b	서열번호 3	F: TGGACCTTCCAGGATGAGGACA	NM_008361
	서열번호 4	R: GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	
Colla1	서열번호 5	F: CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC	NM_007742
	서열번호 6	R: CAGAAGGACCTTGTTTGCCAGG	
Col3a1	서열번호 7	F: GACCAAAGGTGATGCTGGACA G	NM_009930
	서열번호 8	R: CAAGACCTCGTGCTCCAGTTAG	
Tnc	서열번호 9	F: GAGACCTGACACGGAGTATGAG	NM_011607
	서열번호 10	R: CTCCAAGGTGATGCTGTTGTCTG	
Tgfb1	서열번호 11	F: TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	NM_011577
	서열번호 12	R: CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA	
Tgfbr1	서열번호 13	F: TGCTCCAAACCACAGAGTAGGC	NM_009370
	서열번호 14	R: CCCAGAACACTAAGCCCATTGC	
Tgfbr2	서열번호 15	F: CCTACTCTGTCTGTGGATGACC	NM_009371
	서열번호 16	R: GACATCCGTCTGCTTGAACGAC	

[80] **7. Western Blotting**

[81] 수득된 결장 조직을 RIPA 용액(Sigma Aldrich)으로 처리하고, 정제된 단백질을 8-15% 폴리아크릴아미드 겔에 로딩하고 폴리비닐리덴 플루오라이드 막(Millipore)으로 이전시켰다. 상기 표 1의 1차 항체를 사용하여 단백질 발현을 검출하고, HRP 표지된 2차 항체와 함께 인큐베이션한 후 LAS 화학발광 이미징 시

스탐(Amersham)과 함께 Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate(Thermo Scientific)를 사용하여 특정 단백질의 발현량을 측정하였다.

[82] **8. Flow Cytometry**

[83] 결장에서 CD4+ 및 Foxp3+ Tregs 또는 ROR γ T⁺ Th17 세포를 검출하기 위해 조직으로부터 단일 세포를 분리하였다. 세포는 FACS(fluorescence-activated cell sorting) 버퍼(0.5% fetal bovine serum, 10 mM EDTA, and 0.05% NaN₃ in PBS)로 4°C에서 30분간 처리하여 Fc Block하였다. 이후 세포를 phycoerythrin-conjugated anti-mouse CD4 (Biolegend), Pacific blue-conjugated anti-mouse Foxp3 (Biolegend), 또는 or Alexa 488-conjugated anti-mouse ROR γ T (R&D Systems)와 함께 4°C에서 1 시간 동안 처리하였다. FACS 완충액으로 세척한 후, 정량화를 위해 FACS Aria II 세포 분류기(BD Biosciences)에서 CD4+ 및 Foxp3+ 세포 분획에 대해 게이팅 및 세포 분류를 진행하였다.

[84] **9. 통계 처리**

[85] 데이터는 평균 \pm SD로 표시하였다. 유의미한 차이는 Student's t-test, Mann-Whitney U tests, 또는 Prism9(GraphPad Software, USA)을 사용하여 one-way 분석을 통해 평가하였고, P<0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[86] **[실험결과]**

[87] **1. Nox4는 DSS로 인한 유도 대장염으로부터 조직을 보호한다.**

[88] DSS 유발 대장염에서의 섬유증 발생에서 Nox4의 역할을 연구하기 위해 마우스 조직에서 Nox4 발현을 확인하였다. 정상 대장과 DSS 처리된 염증된 대장 조직에서 면역조직화학을 실시한 결과, 정상 결장에서는 간질 영역에서 Nox4가 검출되었으며(도 1c, 왼쪽 상단), 2.5% DSS를 투여한 대장염 모델에서는 점막 및 점막하 영역에서 Nox4 전사체의 수준이 크게 증가하였다(도 1c, 왼쪽 하단). Nox4의 손실은 대조군(도 1e)과 DSS 유발 대장염 모델(도 1f) 마우스 모두에서 ROS 생성을 증가시켰으며, 이는 Nox4 상승이 질병 진행과 연관될 수 있음을 시사한다. DSS 처리(W/DSS)로 대장염의 염증 단계를 유도한 후(도 2a), Nox4^{-/-} 마우스는 약 20-30%의 신속한 체중 감소(그림 2b) 및 생존율 감소(그림 2c)가 있는 악화된 염증을 보였으며, 야생형 마우스(WT)와 비교하여 대장의 길이가 짧았고, 염증 세포의 침윤, 소낭 소실을 포함하여(도 2e, 도 2f) 말단 결장에서 더 심각한 염증 영역이 있는 것으로 나타났다. W/DSS Nox4^{-/-} 마우스는 W/DSS WT 그룹보다 1일부터 14일까지 더 높은 질병 활동 지수(DAI) 점수를 나타냈다(도 2g). W/DSS Nox4^{-/-} 마우스의 결장은 W/DSS WT 마우스의 결장에서 발견된 것보다 1.5배 더 높은 H₂O₂/ROS 생산을 보여주었다(도 1g). 이러한 결과는 Nox4가 ROS 생성을 억제함으로써 DSS 유발 대장염에 대한 보호 역할을 한다는 것을 나타낸다. Nox2는 주로 면역 세포에서 발현되었다(도 1c, 오른쪽 상단). W/DSS Nox2^{-/-} 마우스는 심각한 대장염을 발병하지 않았으며 체중 변화는 W/DSS WT 마우스에서 발견된 것보다 적게 감소하였다(도 2b). 또한, W/DSS Nox2^{-/-} 마우스는 높은 생존율을 보였으며

(도 2c), WT 마우스와 비교할 때 결장 길이에 큰 변화가 없었다(도 2d). DSS 처리된 W/DSS Nox2^{-/-} 마우스 결장의 조직학적 검사 결과, 길쭉한 선와, 면역 세포 침투, 및 잔세포 손실이 밝혀졌으며(도 1d), 이는 결장의 손상을 의미한다. 그러나 W/DSS WT 및 W/DSS Nox4^{-/-} 마우스(도 2f-g)에 비해 손상 점수가 크게 낮았다. 이러한 결과와 매칭되게 W/DSS Nox2^{-/-} 마우스는 DSS 투여 후 결장에서 섬유증 영역이 발달되지 않았다(도 1e). 결론적으로 Nox2 결핍은 DSS 유발 대장염에서 경미한 염증을 일으키는 반면, W/DSS Nox4 결핍은 DSS 유발 대장염에서 심각한 결장 손상을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 Nox4^{-/-} 마우스의 염증 특성을 추가로 조사하였다.

[89] **2. Nox4 결핍은 DSS 유발 대장염에서 장 섬유증을 증가시킨다.**

[90] 결장 조직의 면역조직화학 염색 결과, Nox4^{-/-} 결장 조직에서 WT 결장과 비교하여 F4/80⁺ M1 대식세포가 증가한 반면(도 3a, 상단), CD163⁺ M2 대식세포는 크게 감소한 것으로 나타났다(도 3b, 중간). CD127⁺ 림프구 세포는 DSS 유발 대장염 Nox4^{-/-} 마우스에서도 증가하였다(도 3a, 하단). Ki-67 면역염색은 DSS 유도 대장염 Nox4^{-/-} 마우스와 비교하여 DSS 유도 대장염 WT 결장에서 현저한 증가를 보여주었다(도 3b). 이 결과는 Nox4^{-/-} 마우스가 대장염으로 인한 손상에 대한 일반적인 복구 반응을 나타내지 않음을 의미한다. 시리우스 레드 염색은 역전사 정량 중합효소 연쇄 반응(RT-qPCR)에 의해 검출된 Col1a1 및 Col3a1(도 3e)과 같은 일반적인 섬유증 마커의 발현 증가와 일치되는 증가된 장 섬유증(도 3c, 상단)을 보여주었다. 교원성 대장염의 특정 진단 마커인 Tenascin-C의 수준은 대장염에 비해 단백질(도 3c, 하단) 및 mRNA(도 3e) 수준 모두에서 대장염 유발 Nox4^{-/-} 결장에서 현저하게 증가하였다. 또한, 염증성 사이토카인 종양 괴사 인자(Tnf) 및 인터루킨-1베타(IL1β)의 mRNA 수준은 대장염 유발 Nox4^{-/-} 마우스에서 대장염 유발 WT 마우스와 비교하여 동일한 시점에서 유의하게 증가하였다(도 3d). 더욱이, 치료되지 않은 조건(DSS 없이)에서 Nox4^{-/-} 마우스는 F4/80⁺ 대식세포 및 Ki-67⁺ 증식 세포의 증가를 보여주었다(도 4a). 섬유증 관련 마커와 염증성 사이토카인 Tnf 및 IL1β의 mRNA 수준도 Nox4^{-/-} 마우스에서 증가하였다(도 3d, 도 3e). 또한, 치료되지 않은 Nox4^{-/-} 마우스의 결장은 WT 결장의 결장에 비해 Tenascin-C 면역염색에 의해 검출된 바와 같이 더 큰 섬유증 영역을 가지고 있었다(도 4b). 이러한 결과는 Nox4^{-/-} 마우스에서 DSS 유도에 대한 보다 심각한 염증 반응이 Nox4 결핍으로 인한 장 염증 및 섬유증의 활성화와 관련이 있음을 시사한다.

[91] **3. 원위 결장 조직의 Nox4 결핍 하에서의 차등 유전자 발현**

[92] Nox4^{-/-} 마우스에서 관찰된 보다 심각한 염증 및 섬유증에 기여하는 기본 메커니즘을 확인하기 위해 대량 RNA-seq 분석을 수행하였다(도 5a). 총 5124개의 차별적으로 발현된 유전자(differentially expressed genes; DEG)가 4가지 그룹에서 비교되었다[untreated (W/O) Nox4^{-/-} vs. W/O WT, treated (W/) Nox4^{-/-} vs. W/

WT, W/ WT vs. W/O WT, and W/ *Nox4*^{-/-} vs. W/O *Nox4*^{-/-}]. 치료된 그룹과 치료되지 않은 그룹을 비교하면 42개의 유전자가 공동 상향 조절되었고 2개의 유전자가 공동 하향 조절되었다(도 5b). 42개의 공동 조절 유전자에는 T 세포 관련 유전자(CD3e 및 *Tnfrsf9*), 섬유아세포 활성화 인자(*Itg2a* 및 *Vegf*), 염증복합체 센서(*Nlrp3*), TGF- β 표적 유전자(*Ano5* 및 *Muc11*)가 포함되어, WT 마우스의 유전자와 비교할 때 *Nox4*^{-/-}에서 발현 수준이 더 높았다. 치료되지 않은 비교를 위한 *Tnfrsf4*, *Fabp7*, *CD79b* 및 *Ptgs2*와 같은 대장암 바이오마커로 확인된 유전자는 WT 마우스의 유전자와 비교할 때 *Nox4*^{-/-}에서 하향 조절되었다(도 5c). 이러한 발견은 *Nox4* 결핍이 TGF- β 신호 전달을 억제한다는 것을 시사한다. *Nox4*^{-/-}에서 발현이 증가된 유전자들의 생물학적 기능을 평가하기 위해 Gene Ontology(GO) 및 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 농축을 포함한 DEG의 기능적 농축 분석이 주석, 시각화 및 통합 검색용 데이터베이스를 이용하여 수행되었다. GO 분석은 *Nox4*^{-/-} 마우스의 대부분의 DEG가 WT 마우스와 비교할 때 콜라겐 관련 반응, TGF- β 자극 및 세포 복구 과정의 연관성이 풍부하다는 것을 나타낸다(도 5d). 또한, KEGG 분석에서는 제2형 면역반응, 콜라겐 과정 및 염증 반응(면역체계 과정, 지질다당류에 대한 반응 및 산화환원 과정)과 관련된 *Nox4*^{-/-} DEG의 높은 발현을 보여주었다(도 5e). 11개의 면역 시그니처 유전자 세트가 있는 CIBERSORT(Cell-type Identification by Estimating Relative Subsets of RNA Transcripts)를 이용한 세포 유형 식별을 사용한 추가 조사에서는 *Nox4*^{-/-} 결장이 WT에 비해 조절 T 세포(Treg)가 우세하게 증가하고 형질 세포가 감소한 것으로 나타났다(도 5f 및 도 5g). 결장 조직의 유세포 분석을 통해 *Nox4*의 손실로 인해 CD4⁺Foxp3⁺Treg가 4배 증가한 것을 확인하였다(도 5h).

[93] **4. *Nox4* 결핍은 TGF- β 신호 전달 경로를 활성화한다.**

[94] 유전자 세트 농축 분석을 통해 WT DEG와 비교하여 *Nox4*^{-/-} DEG에 설정된 TGF- β 신호전달 자극 유전자 세트의 상향 조절이 확인되었다(그림 5i). 따라서 결장에서 표준 TGF- β 신호 전달에 대한 *Nox4*의 역할에 더 초점이 맞춰졌다. 일반적인 TGF- β 신호 전달의 활성화에는 TGF β R2에 대한 TGF- β 의 결합이 포함되며, TGF β R2는 TGF β R1을 인산화하여 Smad2/3(pSmad2/3) 및 Smad4의 인산화를 유도하여 궁극적으로 pSmad2/3 및 Smad4의 핵으로의 전위를 촉진한다(도 6a). 확인 결과, 치료되지 않은 WT 결장보다 *Nox4*^{-/-} 결장 조직에서 *Tgfb1*의 더 높은 mRNA 발현을 관찰한 반면, 두 그룹 사이의 *Tgfb2* 및 *Tgfb1*의 mRNA 수준에는 차이가 없었다(도 6b). ELISA(Enzymelinked Immunosorbent Assay)를 통해 WT 결장에 비해 *Nox4*^{-/-} 결장에서 TGF- β 의 활성 형태가 증가한 것으로 나타났다(도 6c). 일관되게, 웨스턴 블롯은 WT 그룹과 비교하여 *Nox4*^{-/-} 결장 조직 용해물에서 TGF- β 및 TGF β R1 단백질 수준이 증가한 것으로 나타났다(도 6d). TGF β R1에 의한 Smad2/3, 총 Smad2/3 및 Smad4의 인산화를 검증하기 위해 각 결장 조직 용해물의 세포질-핵 분획을 평가했는데, 이는 *Nox4*^{-/-} 그룹에서 WT 그룹과 비교하여

세포질 pSmad2/3 및 Smad4의 핵으로의 전위 증가를 보여준다(도 6e). TGF β ⁺ 세포는 Nox4^{-/-} 결장의 상피보다는 고유판(lamina propria)에서 발현되었으며, TGF- β ⁺ 세포의 수가 훨씬 더 많았다(도 6f). 면역형광염색은 결장의 TGF- β ⁺ 세포에서 CD11c⁺ 수지상 세포의 공동 발현을 추가로 보여주었다(도 6g). 전반적으로, 이러한 결과는 Nox4 결핍이 결장에서 TGF- β 활성화를 유도하여 섬유증 유전자 발현 및 Treg를 유도함을 강력히 시사한다.

[95] **5. Nox4 결핍은 TGF- β 경로를 유도하여 장 염증을 촉진함으로써 대장염을 악화시킨다.**

[96] 상기 결과를 바탕으로 DSS로 유발된 대장염 동안 TGF- β 신호가 지속적으로 장 염증에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해 DSS로 처리된 WT 및 Nox4^{-/-} 마우스의 대량 RNA-seq 데이터를 추가로 분석하였다. 주성분 분석에 따르면 W/DSS Nox4^{-/-} 전사체는 W/DSS WT 마우스의 전사체와 명확하게 구별되었다(도 7a). W/DSS WT 마우스와 비교하여 W/DSS Nox4^{-/-} 마우스에서 247개의 상향 조절된 유전자와 179개의 하향 조절된 유전자가 확인되어, 두 그룹 사이에 총 427개의 DEG가 확인되었다(P < 0.05; fold change, >2)(도 7b). 특히, W/DSS Nox4^{-/-} 마우스에서는 TGF- β 경로의 양성 조절자인 Asap3 및 Tgfb1과 같은 TGF- β 관련 유전자의 유의한 발현 수준이 나타났다. Plekha 및 Batf와 같은 염증 매개 Th17 세포 분화 유전자; 콜라겐 합성을 촉진하는 Acta1, Myo6 등 섬유화 관련 유전자도 증가하였다. 반면 W/DSS WT 마우스에서는 Chic1, Ido1 및 Reg3g와 같은 케양성 대장염(UC) 관련 유전자와 Tmco3, Orai2 및 Saa2와 같은 면역 침윤 관련 유전자가 상향 조절되었다(도 7c). CIBERSORT를 사용하여 W/DSS WT 결장에 비해 W/DSS Nox4^{-/-} 결장에서 Th17 세포의 비율이 크게 증가한 것을 확인하였다(도 7d, 도 7e). W/DSS WT 또는 W/DSS Nox4^{-/-} DEG의 GO 분석은 선천성 면역 반응, 생물학적 자극 및 사이토카인과 같은 대장염 매개 기능과 관련된 세포 구성 요소 측면에서 증식, 상처 치유, 및 방어 반응과 같은 조직 복구 기작의 상향 조절된 W/DSS WT DEG의 농축을 보여주었다. 마찬가지로, 상향 조절된 W/DSS WT DEG는 선천성 면역 반응 및 사이토카인 생산과 같은 장 염증과 관련된 소포체 스트레스의 생물학적 과정 및 조직 회복 기작이 활성화되었다. DEG는 칼슘 이온 결합, 펩티다제 활성 및 신호 전달 관련 기능과 같은 염증성 장 질환(IBD) 병태생리학 관련 유전자 세트에 포함된 분자 기능 GO 용어가 풍부하게 포함되었다(도 8a). 그러나 W/DSS Nox4^{-/-} DEG는 다른 기능적 패턴을 보여주었다. GO 세포 구성 요소의 측면에서 DEG에는 세포 사멸, 염증 및 손상과 같은 조직 손상 유전자 세트가 풍부하게 포함되었다. 그 중에서 최고로 풍부한 유전자 세트는 촉매 복합체, 세포골격 부분 및 리보핵산단백질 복합체와 같은 조직 섬유증 관련 유전자 세트로 확인되었다. 분자 기능 용소의 측면에서, 고도로 농축된 DEG는 단백질 결합, 단백질 키나제 활성, 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 활성 및 산화환원효소 활성과 같은 UC 관련 발암 유전자 세트로 확인되었습니다(도 8b). KEGG 경로 분석에 따르면 W/

DSS WT의 DEG는 Toll 유사 수용체 경로, JAK-STAT 경로 및 미토젠 활성화 단백질 키나아제 경로가 풍부한 반면 W/DSS Nox4^{-/-}의 DEG는 TGF-β 경로, 및 T 세포 수용체 및 라파마이신 경로의 유전자 세트가 풍부하였다(도 7f). 추가로 히트 맵을 통해 W/DSS Nox4^{-/-} 그룹의 DEG에서 TGF-β 표적 유전자의 발현 수준이 W/DSS 그룹의 DEG에 비해 유의하게 증가했음을 확인하였다(도 7g).

- [97] 이러한 발견은 TGF-β 신호 및 이와 관련된 섬유화 및 T 세포 신호가 Nox4가 결핍된 마우스 결장에서 지속적으로 증가하여, 보다 심각한 염증의 유지에 기여한다는 것을 시사한다. RNA-seq 분석의 이러한 결과에 맞춰, 웨스턴 블롯팅에서는 W/DSS WT 결장 용해물에 비해 W/DSS Nox4^{-/-} 결장 용해물에서 TGF-β 및 TGFβR1 단백질 수준이 상승한 것으로 나타났다(도 7h). ELISA를 통한 분석에서도 활성 TGF-β 수준이 W/DSS WT 결장보다 W/DSS Nox4^{-/-} 결장에서 2배 증가했음을 확인하였다(도 8c). 유세포 분석 결과에서는 W/DSS WT 결장에서 CD4⁺ T 세포의 증가가 나타났다. 그러나 W/DSS Nox4^{-/-} 결장에서 CD4⁺ 세포의 약 59%가 Th17 세포의 마커인 RORγT⁺를 발현했는데, 이는 W/DSS WT 결장보다 증가된 수치였다(도 7i). 이러한 발견은 Nox4^{-/-} 결장에서 DSS 유발 염증과 Th17 계통 세포 증가의 연관성을 의미한다.

[98] **6. Nox4는 DSS 유발 급성 대장염의 장 회복에 필요하다.**

- [99] 마지막으로 Nox4가 장 염증 회복에 필요한지 여부를 조사하였다(도 9a). W/DSS WT 마우스의 체중은 9일째(DSS 처리 후 2일)에 개선되기 시작한 반면, W/DSS Nox4^{-/-} 마우스의 체중은 2.5% DSS 투여 후 회복 단계에서도 지속적으로 감소했으며 더 빠른 체중 감소가 관찰되었다. 30% 이상의 체중 감소를 경험한 W/DSS Nox4^{-/-} 마우스는 생존하지 못하였다(도 9b). 따라서 W/DSS Nox4^{-/-} 마우스에서 전체 생존 확률이 크게 감소하였다(도 9c). W/DSS Nox4^{-/-} 마우스 중 어느 것도 종말점에서 생존하지 않았기 때문에 조직학적 분석을 위해 10일째에 모든 결장 조직을 수득하였다. 회복 단계에서 W/DSS WT 마우스는 10일차에 상피가 복구되고, 점막이 치유되었으며, 중간 정도의 염증만 나타났다. 반면 W/DSS Nox4^{-/-} 마우스는 여전히 선와 위축과 심각한 면역 세포 침윤, 및 상피 조직구 형성을 보여주었다(도 9d). 대장염의 중증도를 나타내는 지표인 결장 길이의 평균 백분율은 W/DSS WT 결장보다 W/DSS Nox4^{-/-} 결장에서 유의하게 낮았다(도 9e, 왼쪽). 더욱이, W/DSS Nox4^{-/-} 결장 섹션에서 검출된 잔세포(Goblet Cell)의 수가 2배 이상 감소하였다(도 9e, 오른쪽). 종합적으로, 이러한 결과는 Nox4의 손실이 DSS 유발 대장염 후 전반적인 복구 과정을 악화시켜 만성 대장염을 유발하고 전반적인 생존에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

- [100] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

산업상 이용가능성

[101] 본 발명에서 연구자들은 Nox4의 유전적 결실이 더 심각한 섬유성 대장염의 진행과 그에 따른 회복 실패로 이어진다는 것을 규명하였다. Nox4의 손실은 결합 조직의 산화 스트레스를 증가시켰고 이후 표준 TGF- β 신호를 영구적으로 활성화하였다. 또한, TGF- β 매개 T 세포 계통(Treg 및 Th17 세포)의 분화와 증식, 및 대장염에서의 섬유증 진행에 영향을 미쳤다. 따라서 본 발명은 염증성 장 질환에서 섬유화 진행 여부를 예측하고, 이를 억제하는데 크게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

서열목록 Free Text

[102] 서열번호 1: Tnf 프라이머_F
 [103] GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT
 [104] 서열번호 2: Tnf 프라이머_R
 [105] GCCATAGAAGCTGATGAGAGGGAG
 [106] 서열번호 3: Il1b 프라이머_F
 [107] TGGACCTTCCAGGATGAGGACA
 [108] 서열번호 4: Il1b 프라이머_R
 [109] GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG
 [110] 서열번호 5: Colla1 프라이머_F
 [111] CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC
 [112] 서열번호 6: Colla1 프라이머_R
 [113] CAGAAGGACCTTGTTTGCCAGG
 [114] 서열번호 7: Col3a1 프라이머_F
 [115] GACCAAAAGGTGATGCTGGACAG
 [116] 서열번호 8: Col3a1 프라이머_R
 [117] CAAGACCTCGTGCTCCAGTTAG
 [118] 서열번호 9: Tnc 프라이머_F
 [119] GAGACCTGACACGGAGTATGAG
 [120] 서열번호 10: Tnc 프라이머_R
 [121] CTCCAAGGTGATGCTGTTGTCTG
 [122] 서열번호 11: Tgfb1 프라이머_F
 [123] TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT
 [124] 서열번호 12: Tgfb1 프라이머_R
 [125] CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA
 [126] 서열번호 13: Tgfbr1 프라이머_F
 [127] TGCTCAAACCACAGAGTAGGC
 [128] 서열번호 14: Tgfbr1 프라이머_R
 [129] CCCAGAACACTAAGCCCATTGC

- [130] 서열번호 15: Tgfbr2 프라이머_F
[131] CCTACTCTGTCTGTGGATGACC
[132] 서열번호 16: Tgfbr2 프라이머_R
[133] GACATCCGTCTGCTTGAACGAC

청구범위

- [청구항 1] Nox4(NADPH Oxidase 4) 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하고,
 CD3e(Cluster of Differentiation 3 epsilon), Mucl1(Mucin Like 1), Vegf(vascular endothelial growth factor), Ano5(Anoctamin 5), Tnfrsf9(TNF Receptor Superfamily Member 9), Itg2a(Integrin α 2), Nlrp3(NLR family pyrin domain containing 3), Tnfrsf4(TNF Receptor Superfamily Member 4), Fabp7(Fatty Acid Binding Protein 7), CD79b(Cluster of Differentiation 79B), Ptgs2(Prostaglandin-endoperoxide synthase 2), 및 Caprin2(Caprin Family Member 2)로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는, 대장염에서의 섬유화 진행 여부 예측용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
 상기 대장염은 궤양성 대장염인 것인, 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서,
 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 5] 제 1항의 조성물을 포함하는, 대장염에서의 섬유화 진행 여부 예측용 키트.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,
 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인 것인, 키트.
- [청구항 7] 대장염 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서,
 (a) Nox4(NADPH Oxidase 4) 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 증가를 확인하는 단계; 및,
 (b) CD3e(Cluster of Differentiation 3 epsilon), Mucl1(Mucin Like 1), Vegf(vascular endothelial growth factor), Ano5(Anoctamin 5), Tnfrsf9(TNF Receptor Superfamily Member 9), Itg2a(Integrin α 2), Nlrp3(NLR family pyrin domain containing 3), Tnfrsf4(TNF Receptor Superfamily Member 4), Fabp7(Fatty Acid Binding Protein 7), CD79b(Cluster of Differentiation 79B),

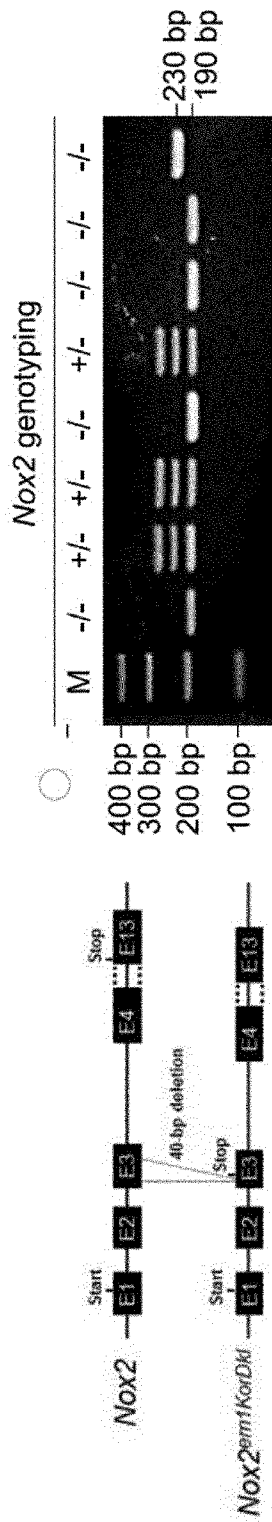
- Ptgs2(Prostaglandin-endoperoxide synthase 2), 및 Caprin2(Caprin Family Member 2)로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 증감을 확인하는 단계;를 포함하는, 대장염에서의 섬유화 진행 여부를 예측하는 방법.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서,
상기 대장염은 궤양성 대장염인 것인, 방법.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 조직(tissue), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract), 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 및 뇌척수액(cerebrospinal fluid)으로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 방법.
- [청구항 10] 제 7항에 있어서,
상기 CD3e, Mucl1, Vegf, Ano5, Tnfrsf9, Itg2a, 및 Nlrp3으로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된 경우, 상기 대장염에서 섬유화가 진행될 가능성이 높은 것으로 예측하는, 방법.
- [청구항 11] 제 7항에 있어서,
상기 Tnfrsf4, Fabp47, CD79b, Ptgs2, 및 Caprin2로 구성된 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 감소된 경우, 상기 대장염에서 섬유화가 진행될 가능성이 높은 것으로 예측하는, 방법.
- [청구항 12] 제 7항에 있어서,
상기 단백질, 또는 유전자의 발현 증감은 정상 대조군 대비 2배 이상의 발현 증감인 것인, 방법.
- [청구항 13] 제 7항에 있어서,
상기 Nox4(NADPH Oxidase 4) 단백질, 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 증가는 TGF- β (Transforming growth factor-beta)에 의해 조절되는 것인, 방법.
- [청구항 14] 제 7항에 있어서,
상기 방법은,

(c) F4/80⁺ M1 대식세포, CD127⁺ 림프구 세포, 조절 T세포(Regulatory T cell), 또는 ROR γ T⁺ Th17 세포(T helper 17 cell)의 증가를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것인, 방법.

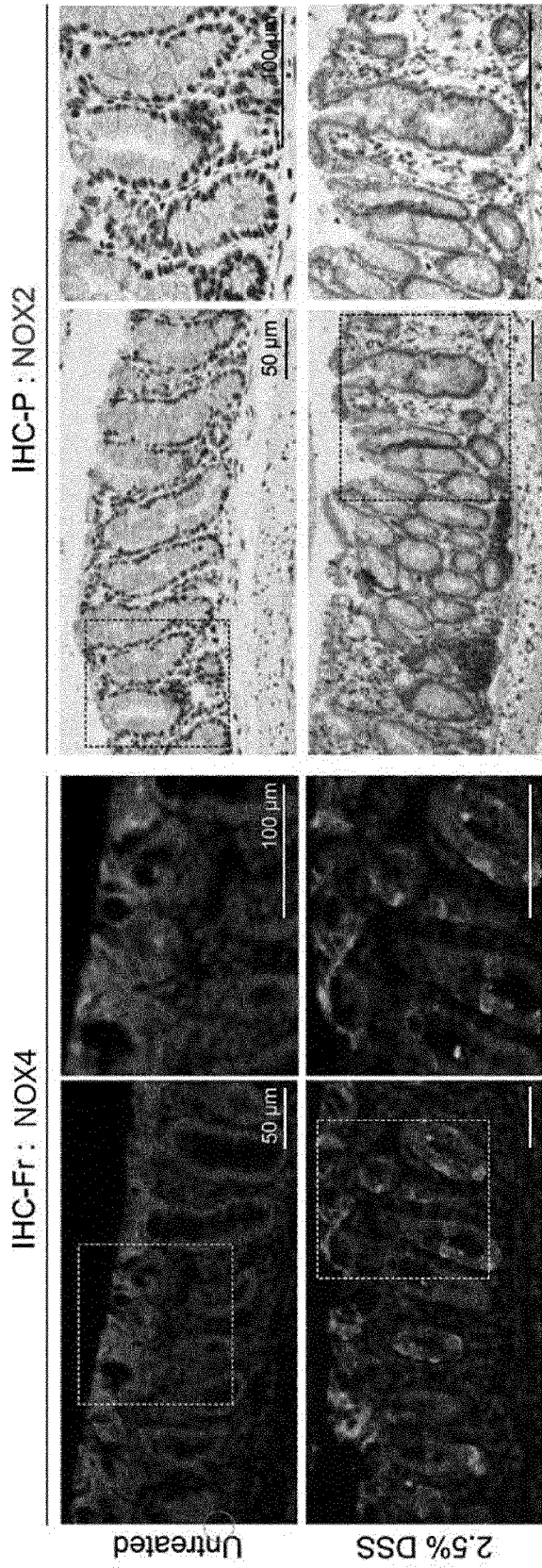
[청구항 15] 제 7항에 있어서,
상기 방법은,

(c) CD163⁺ M2 대식세포의 감소를 확인하는 단계;를 추가로 포함하는 것인, 방법.

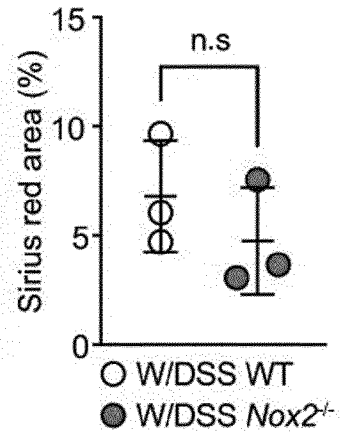
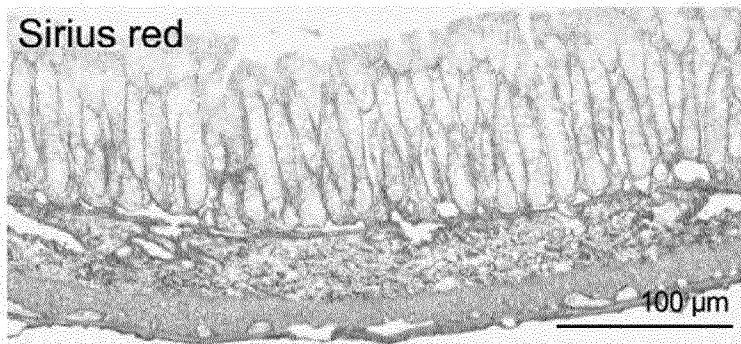
[Figure 1a]



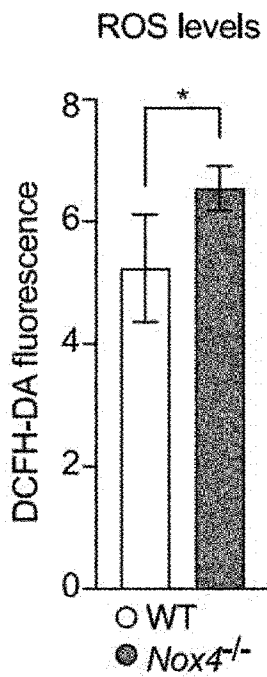
[도 1c]



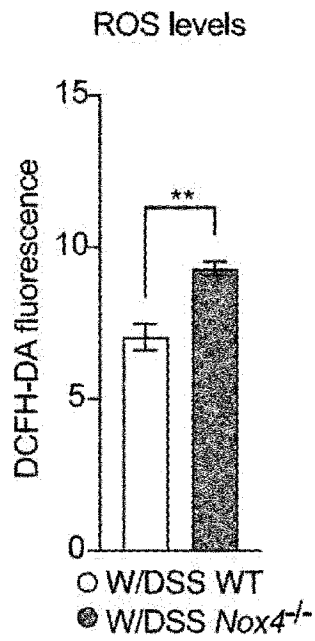
[도 1d]

Nox2^{-/-} mice with 2.5% DSS challenge

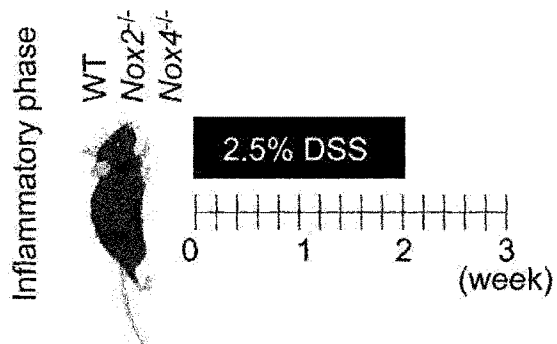
[도 1e]



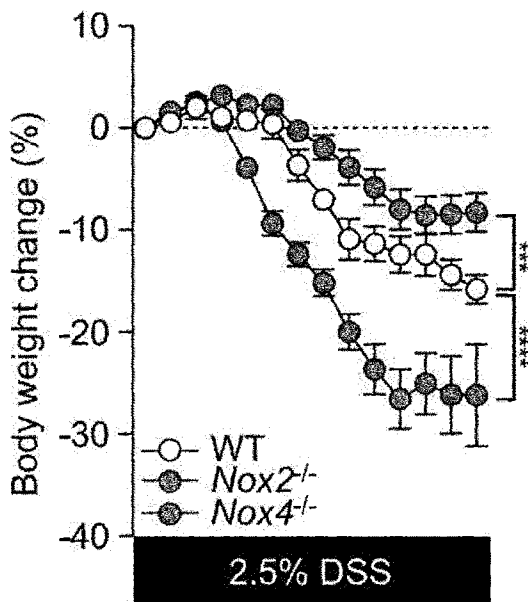
[도1f]



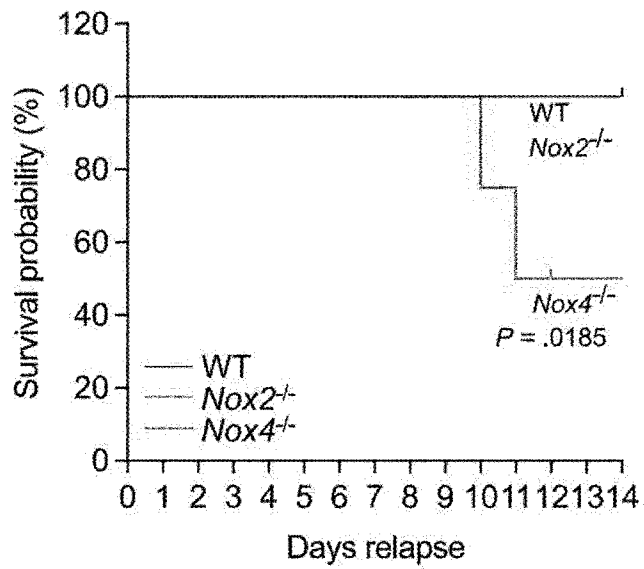
[도2a]



[도2b]

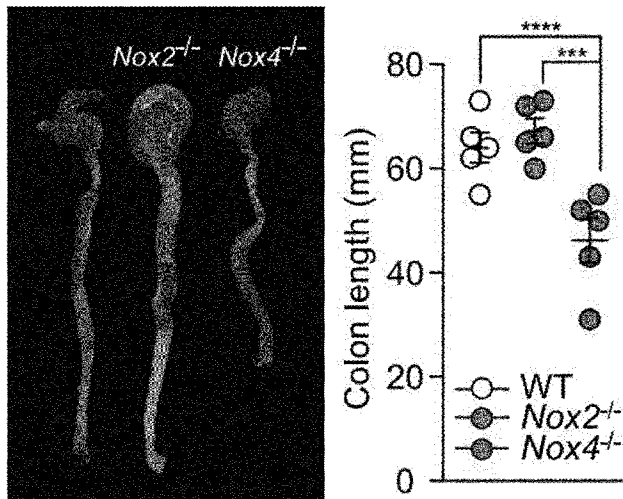


[도2c]

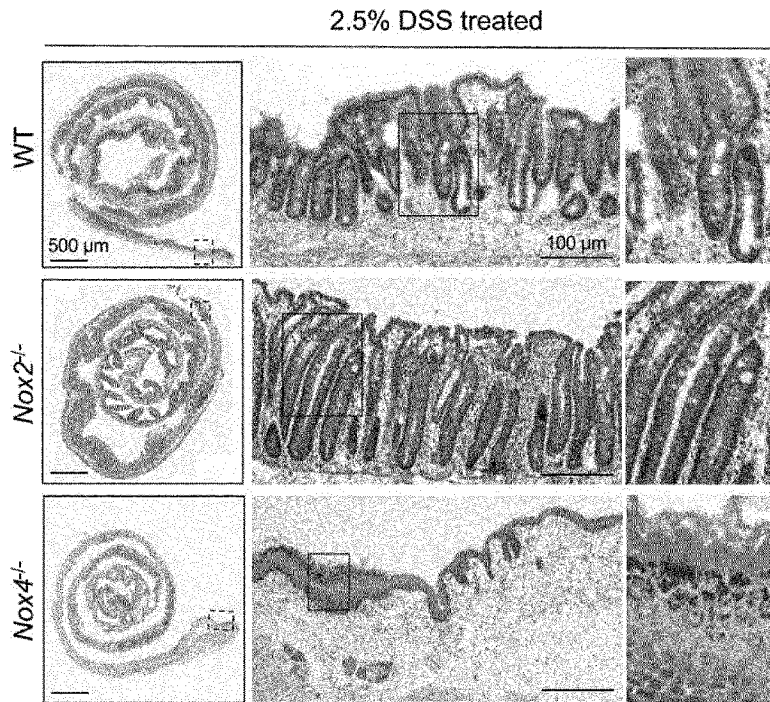


[도2d]

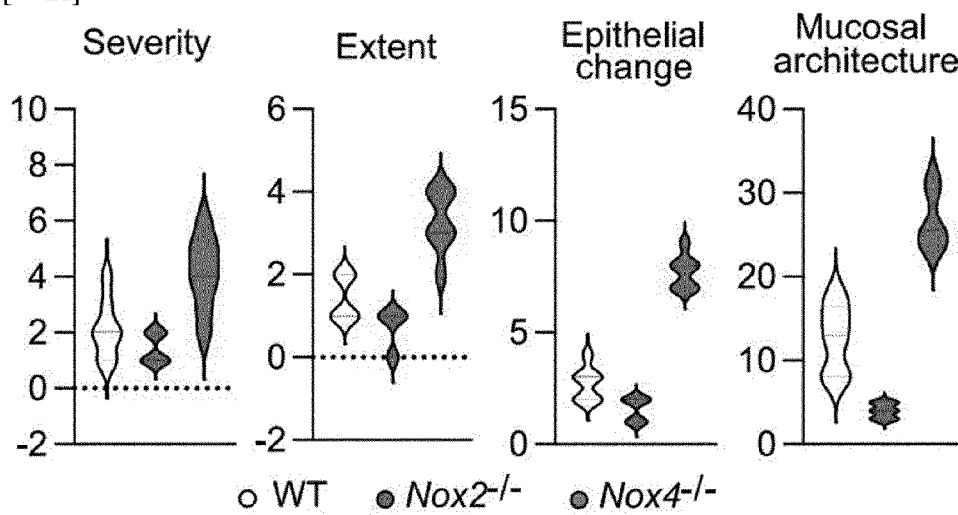
Macroscopic observation



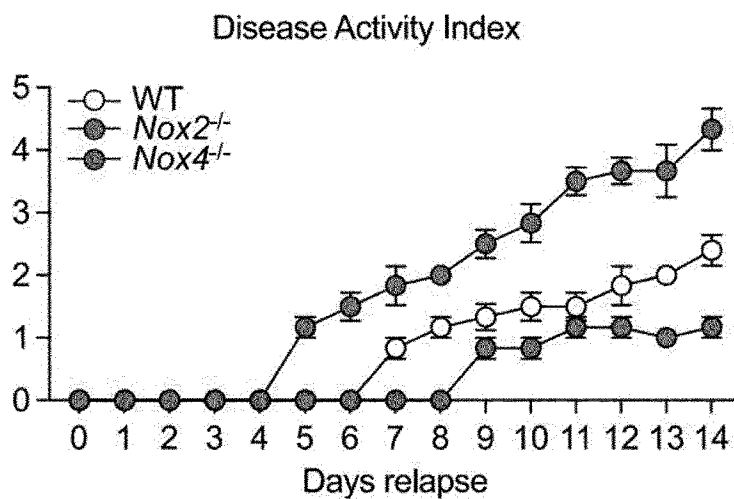
[도2e]



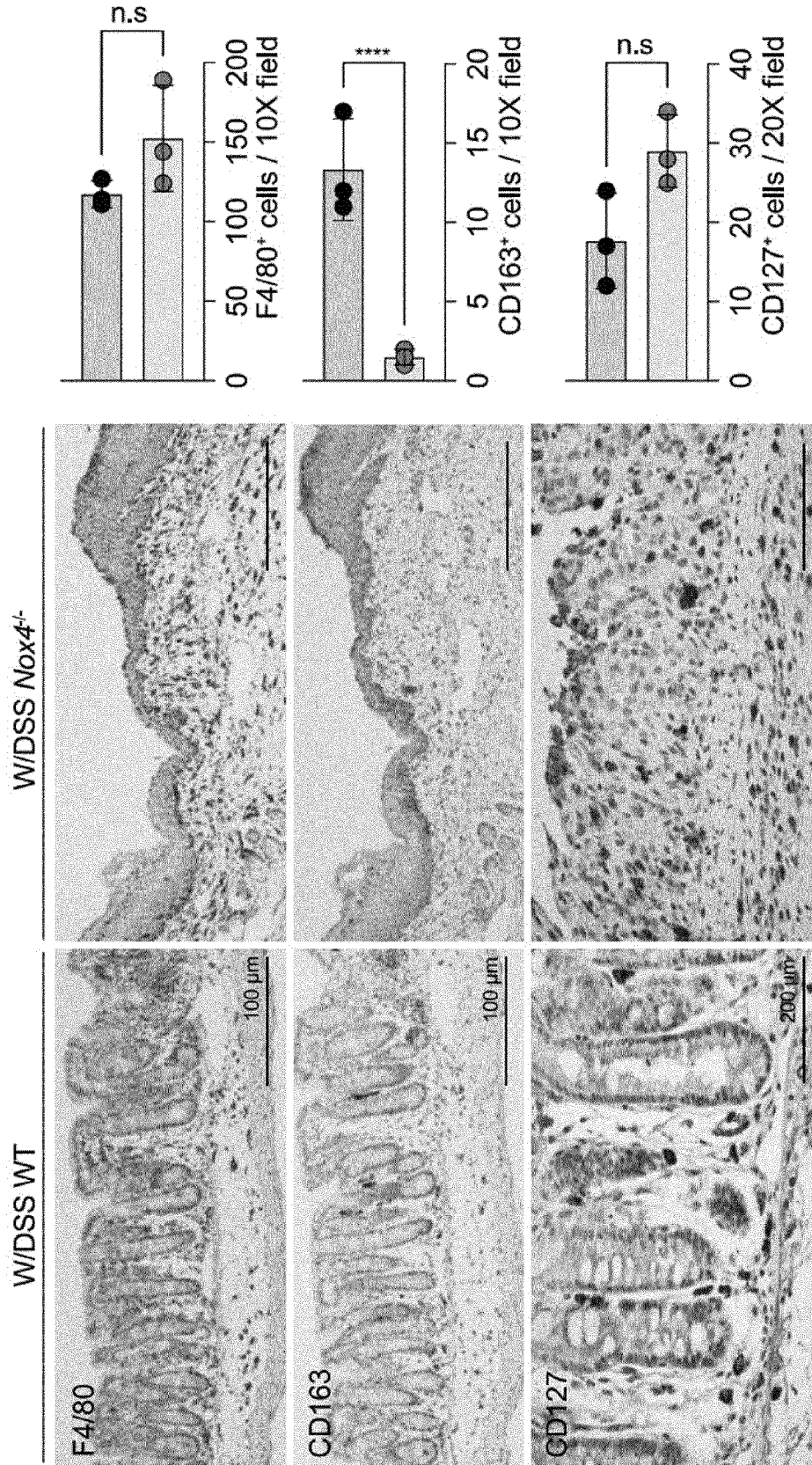
[도2f]



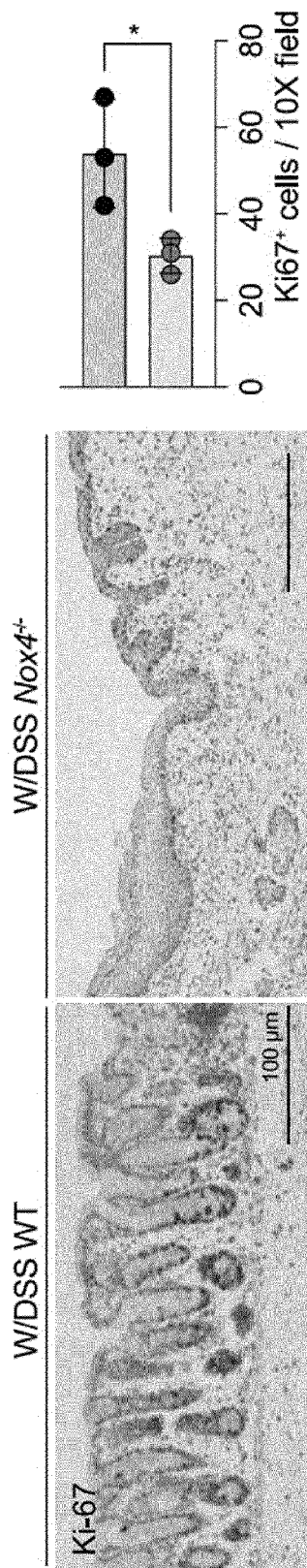
[도2g]



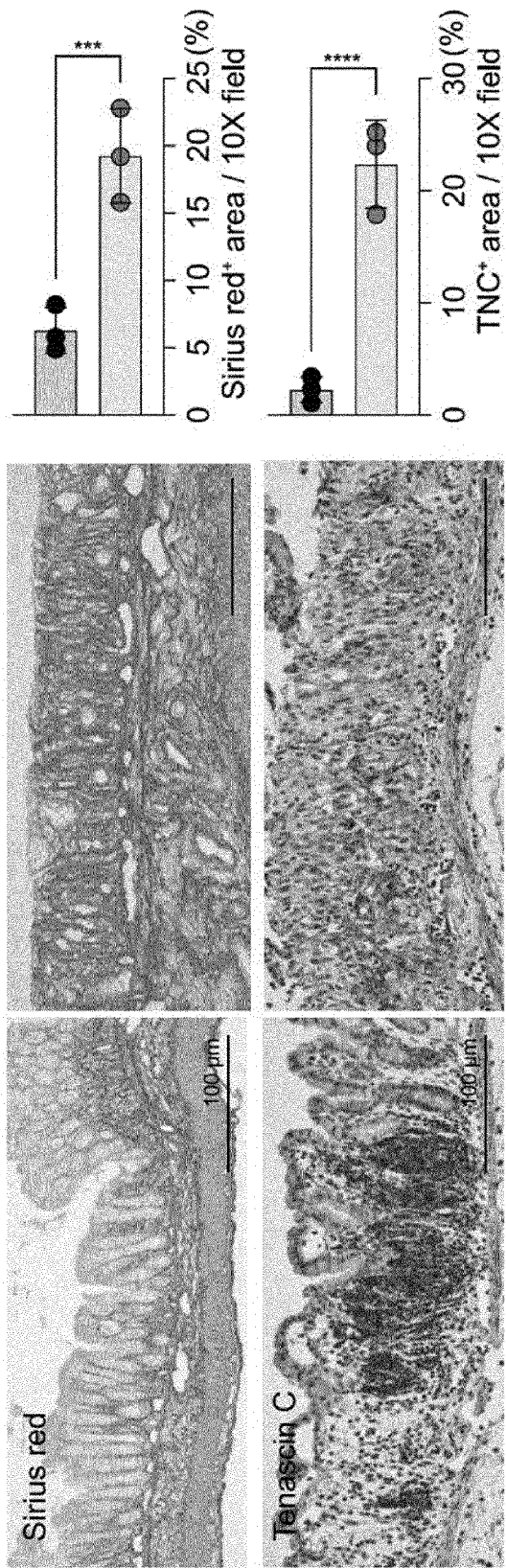
[도3a]



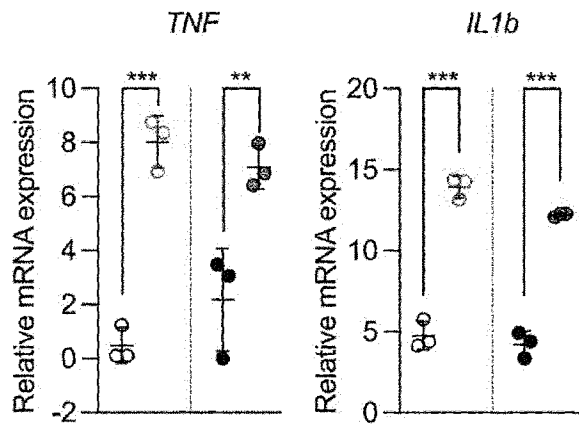
[도3b]



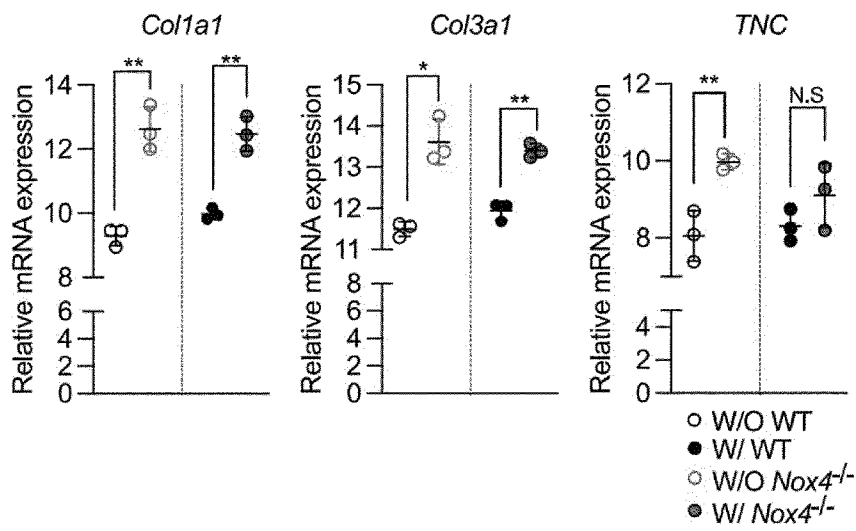
[도3c]



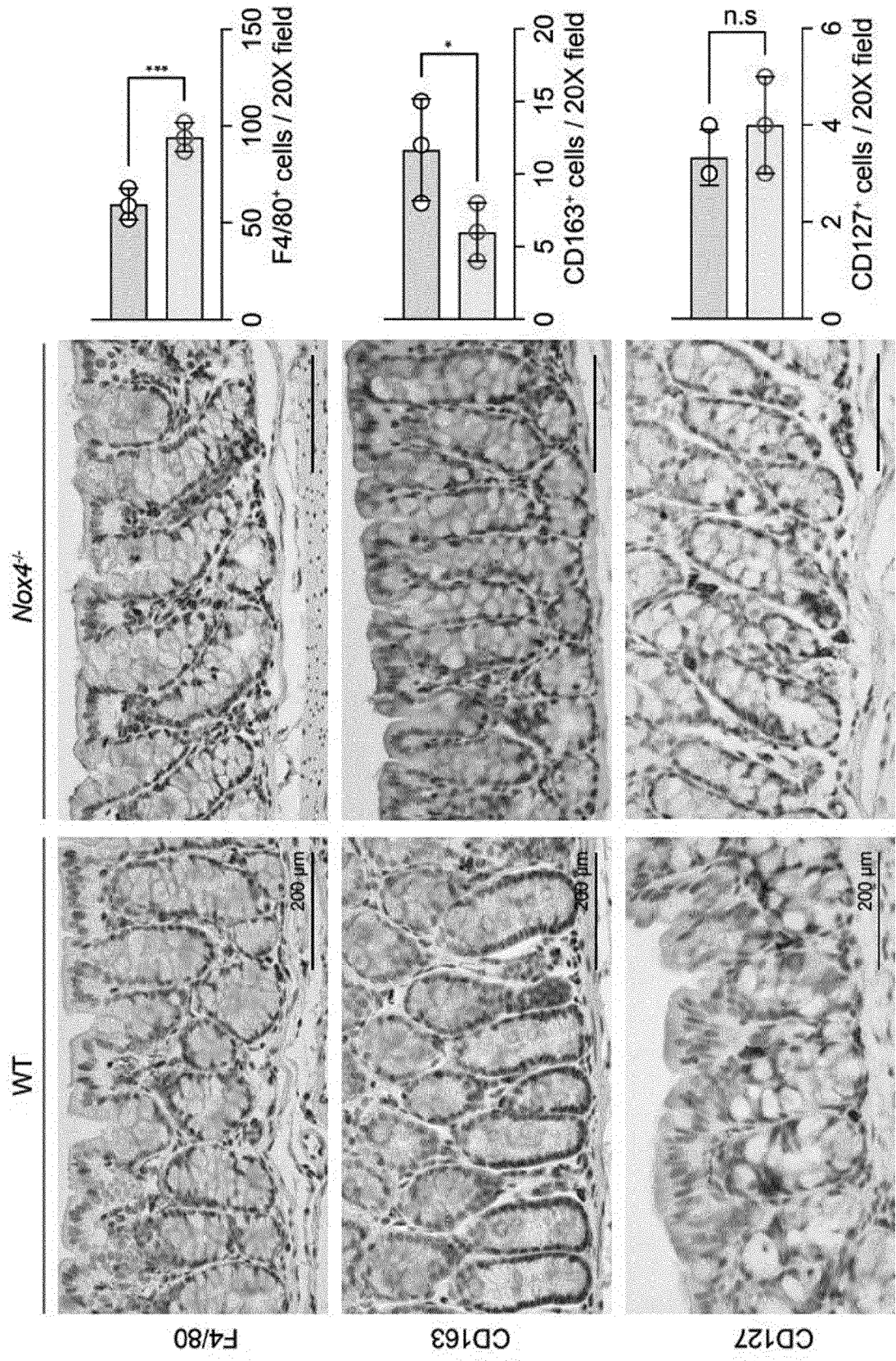
[도3d]



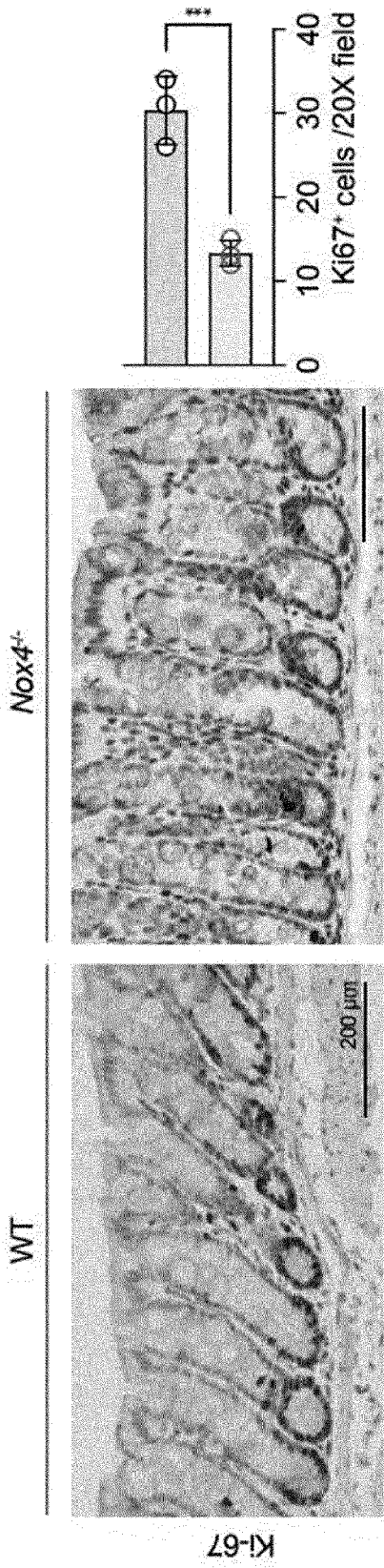
[도3e]



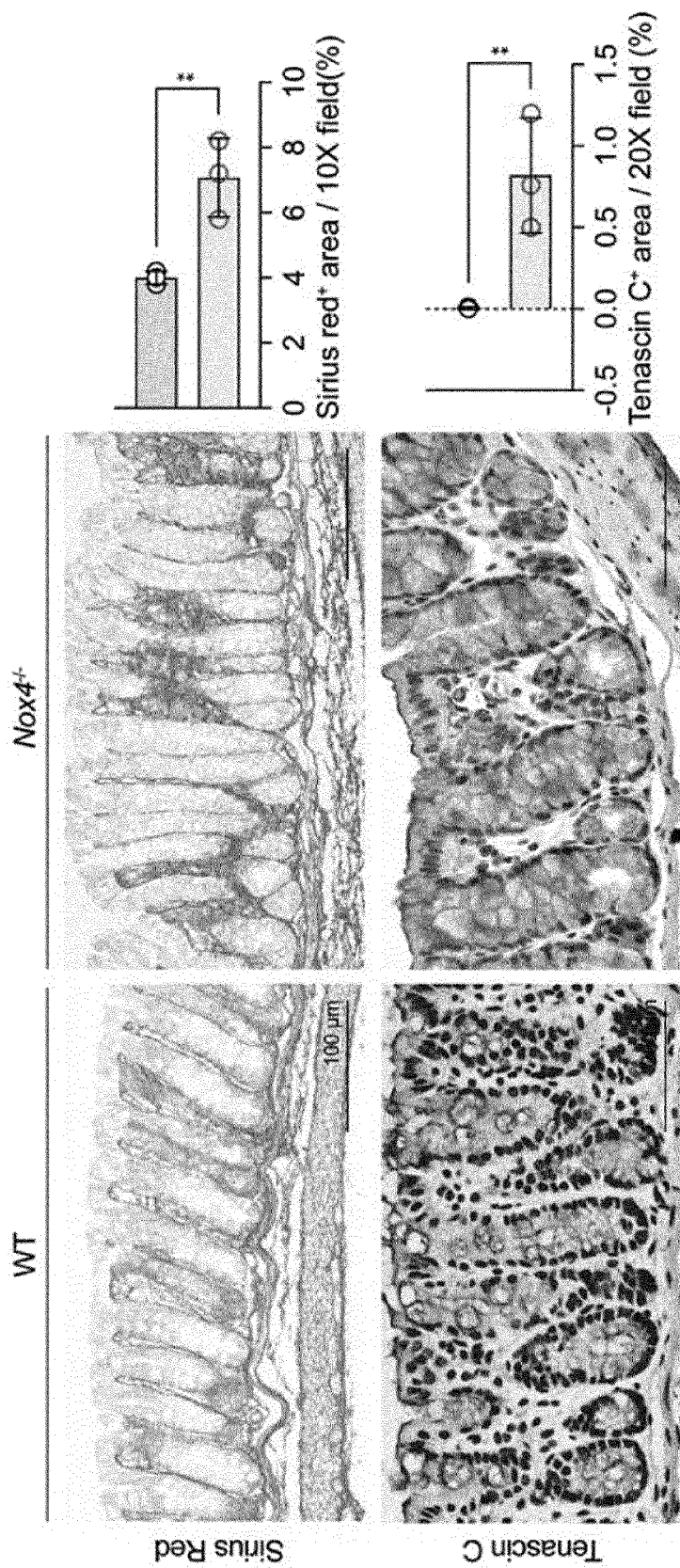
[도4a]



[도4b]



[도4c]



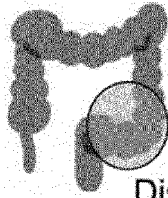
[도5a]

Bulk RNA seq analysis



Vehicle WT, n=3
 Nox4^{-/-}, n=3

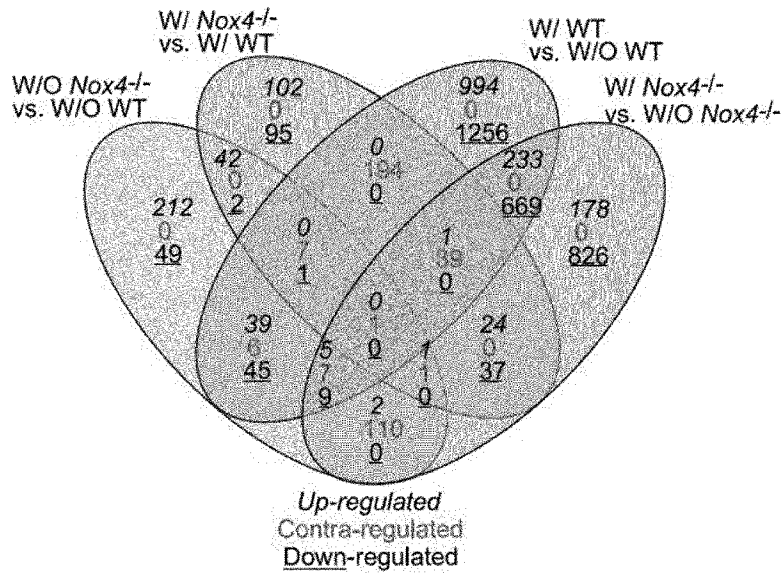
2.5% DSS
 WT, n=3
 Nox4^{-/-}, n=3



Distal colon

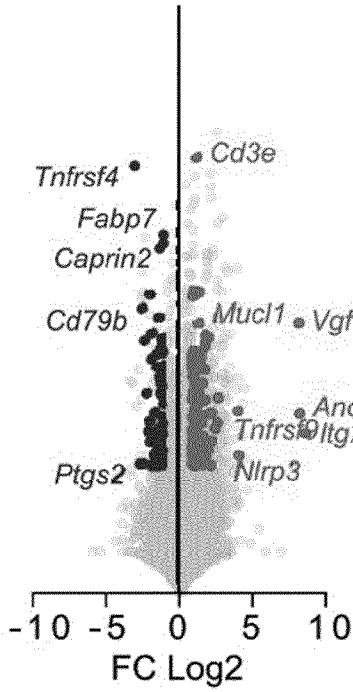
[도5b]

Bulk RNA seq DEGs



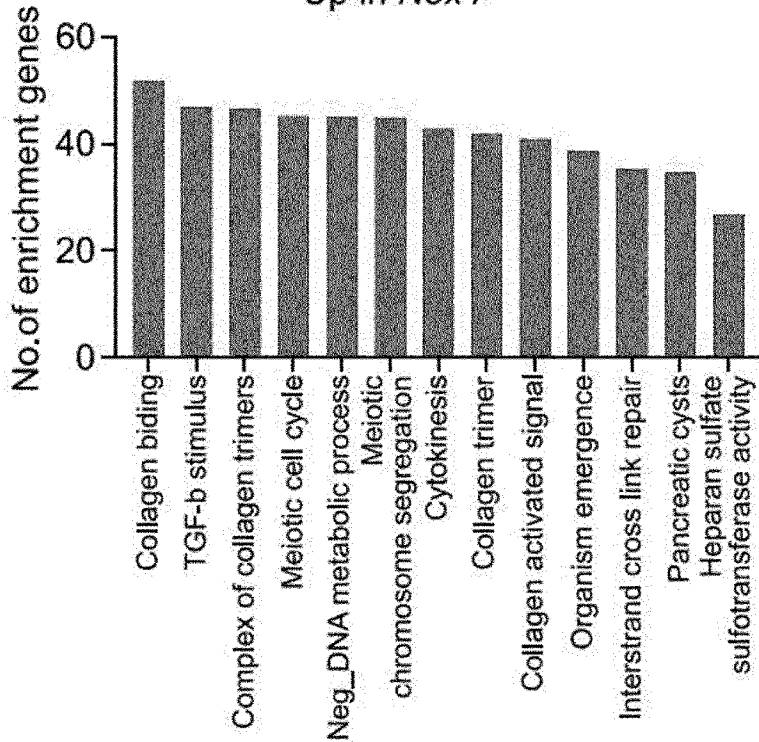
[도5c]

Down in *Nox4*^{-/-} Up in *Nox4*^{-/-}

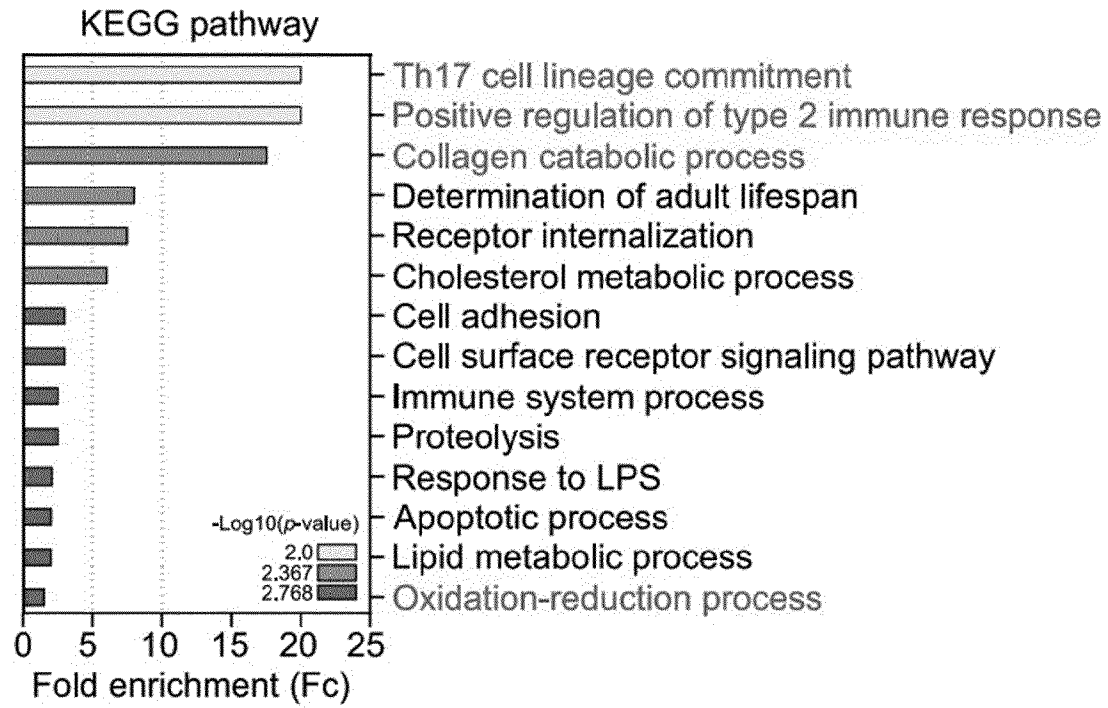


[도5d]

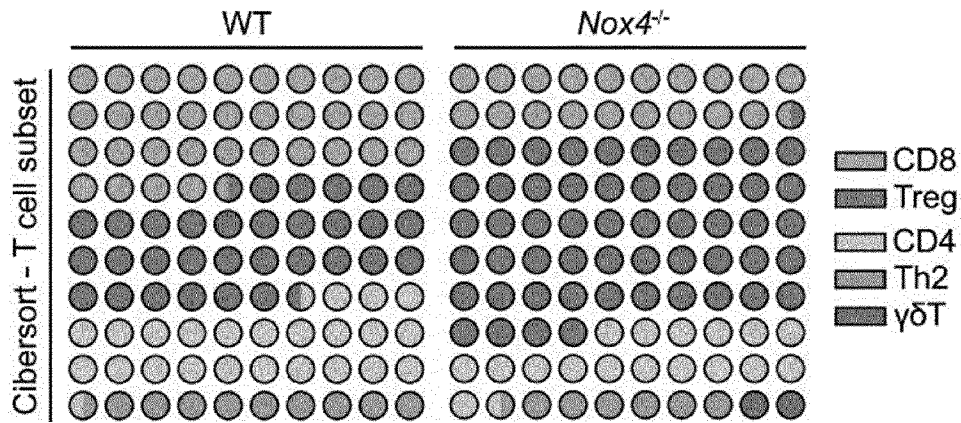
Up in *Nox4*^{-/-}



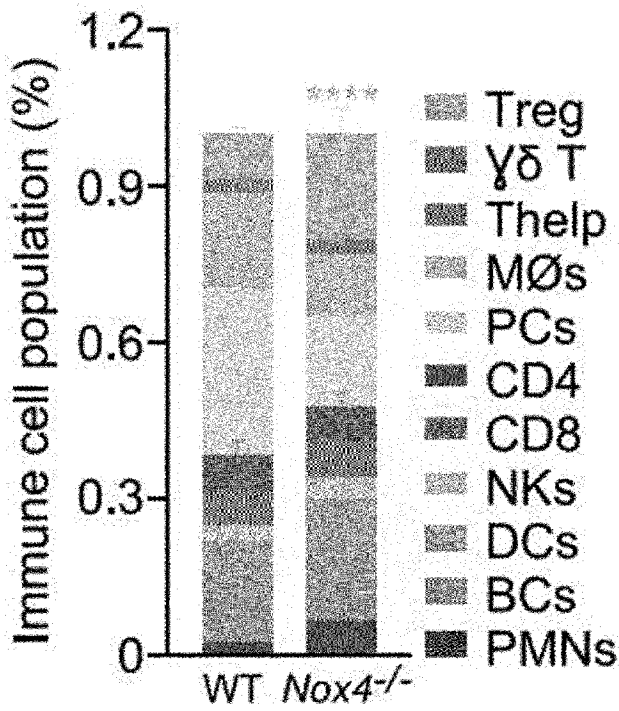
[도5e]



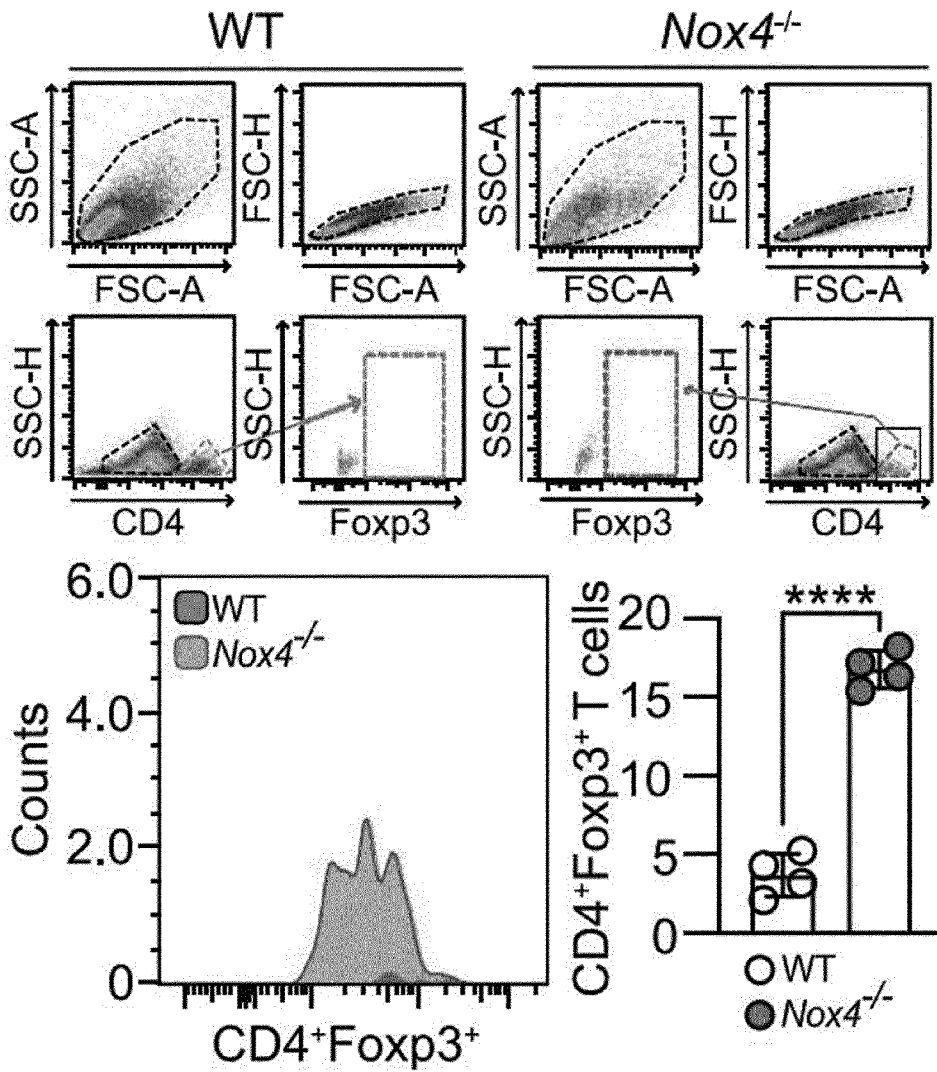
[도5f]



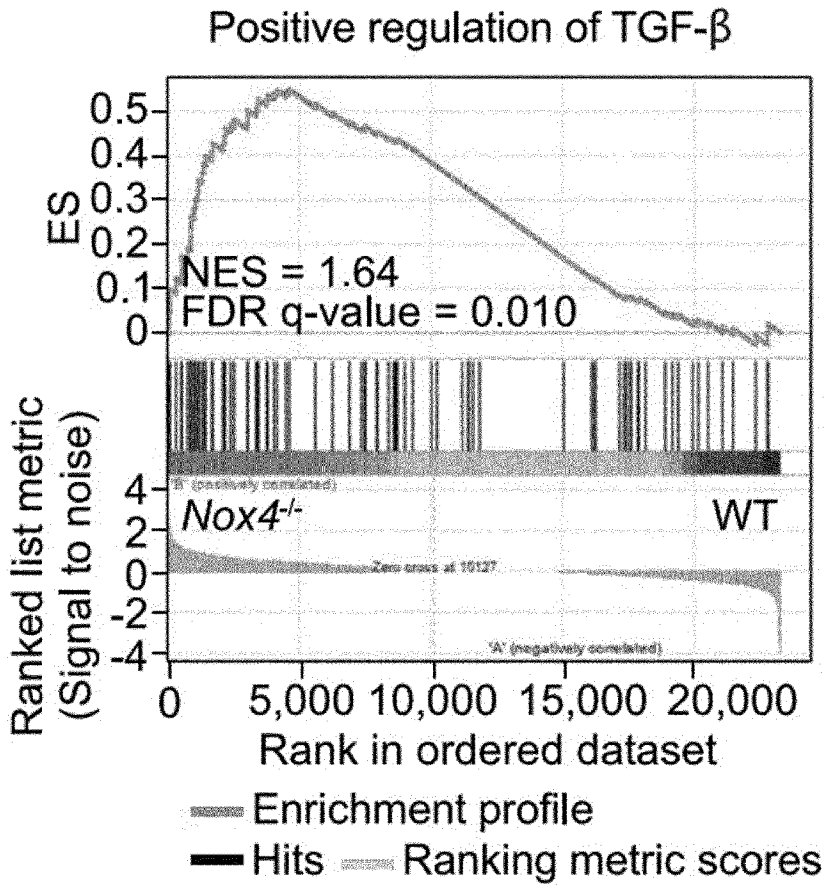
[도5g]



[도5h]

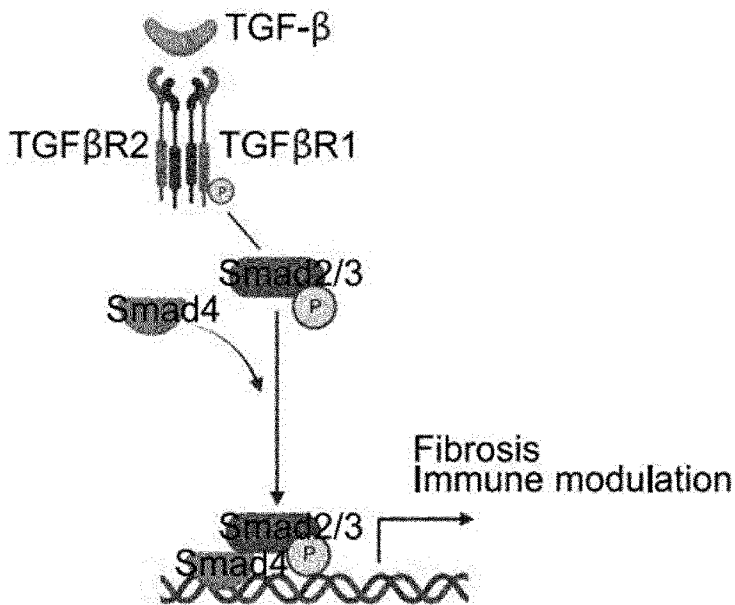


[도5i]

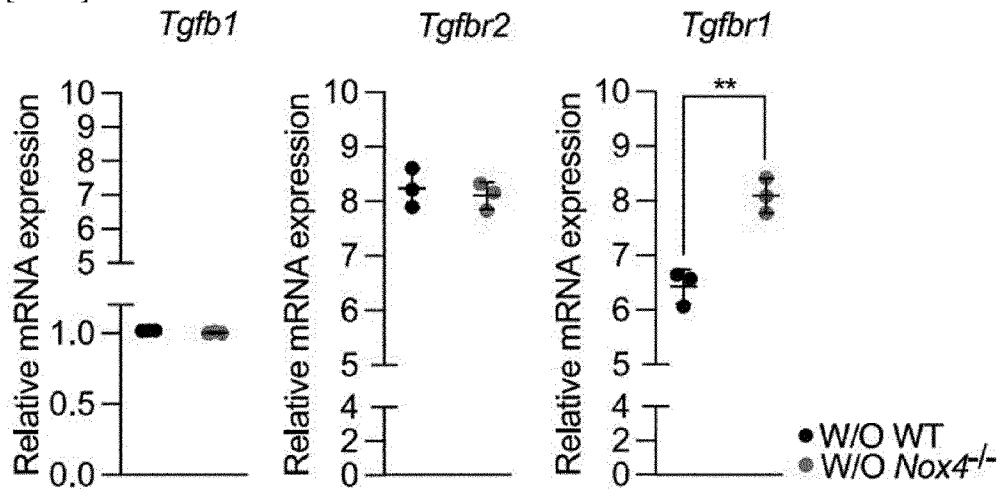


[도6a]

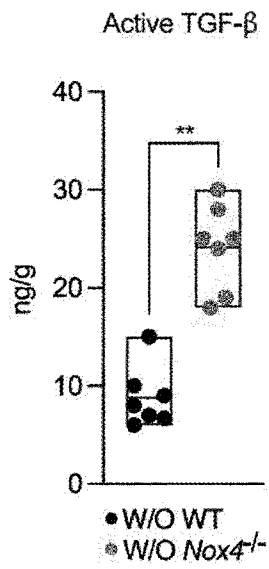
Canonical TGF- β signaling pathway



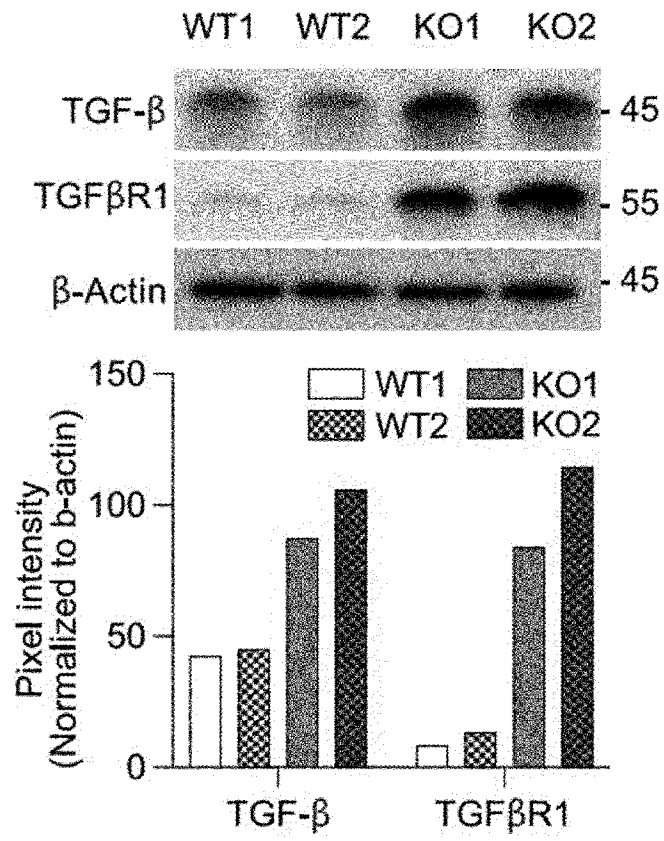
[도6b]



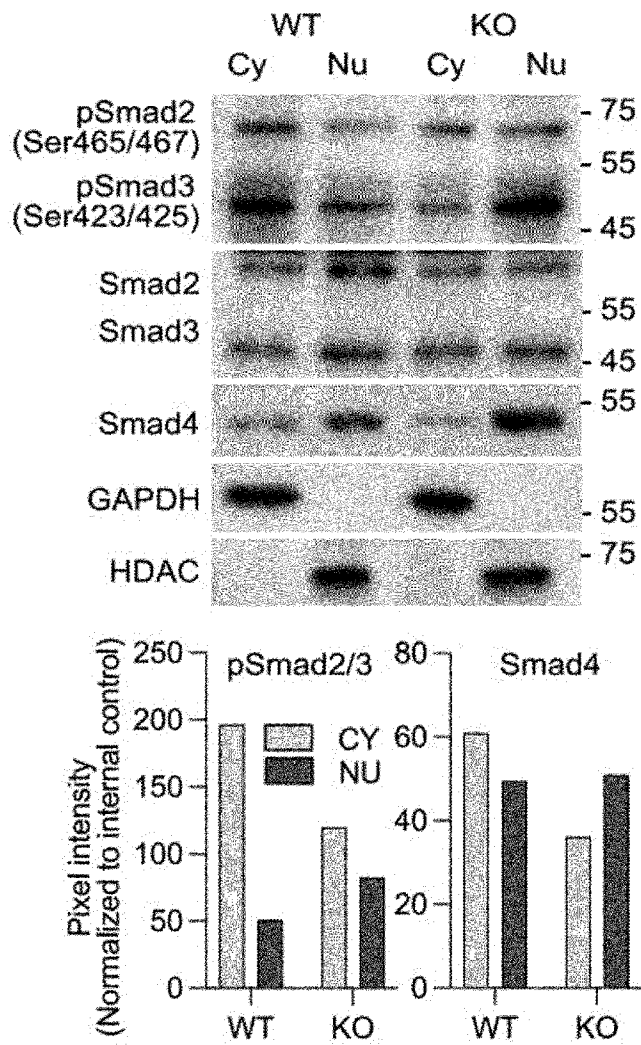
[도6c]



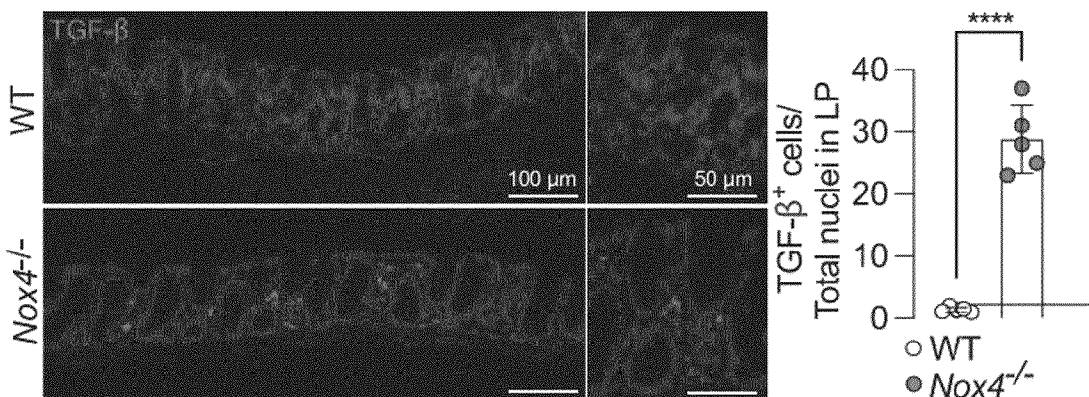
[D6d]



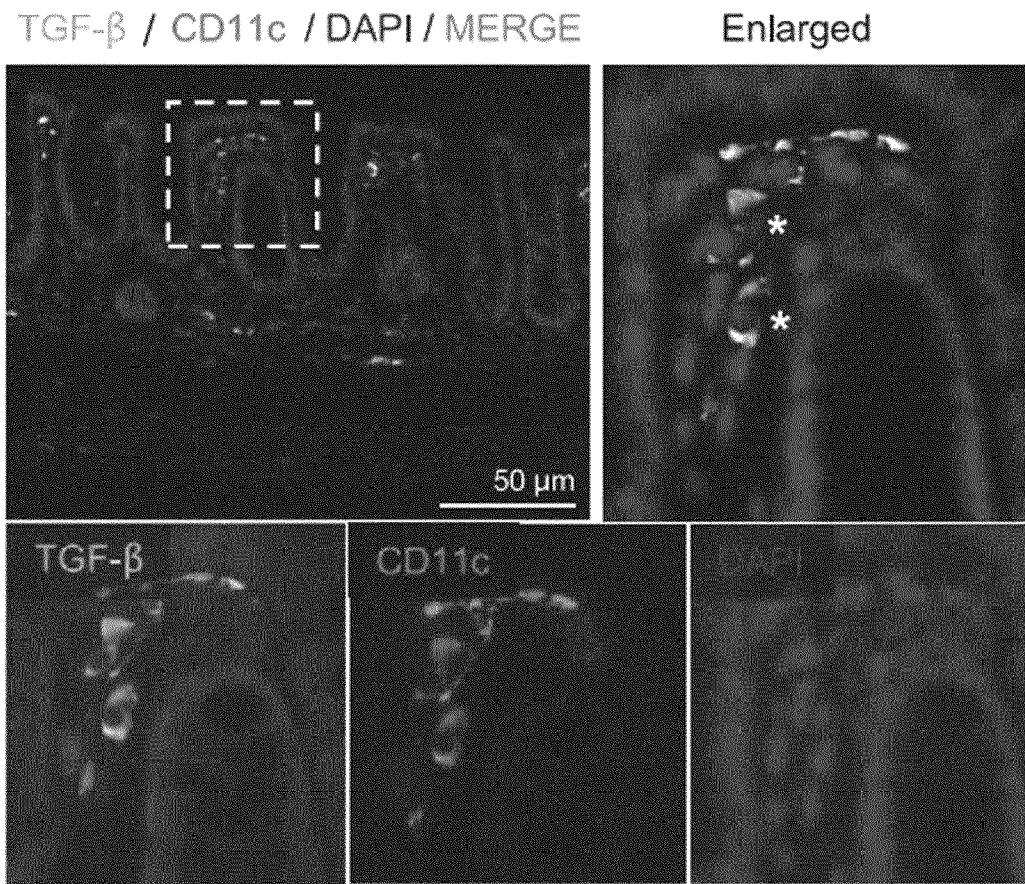
[도6e]



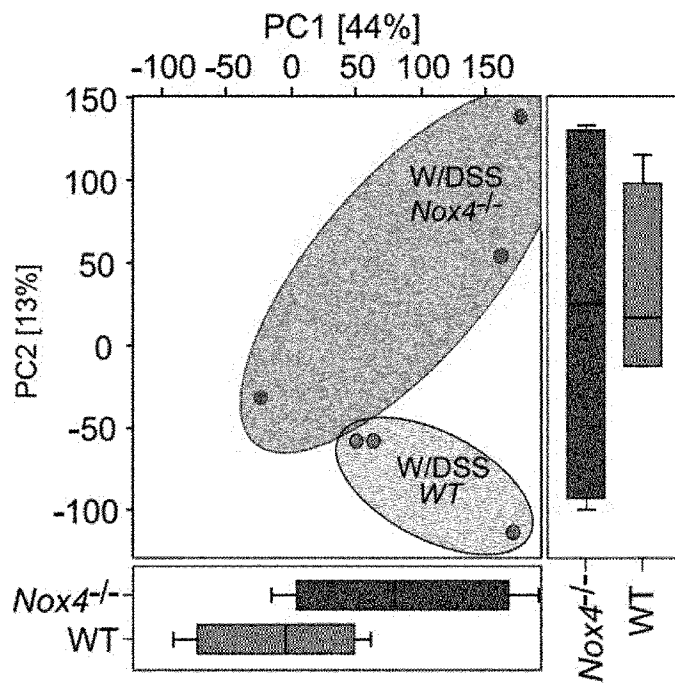
[도6f]



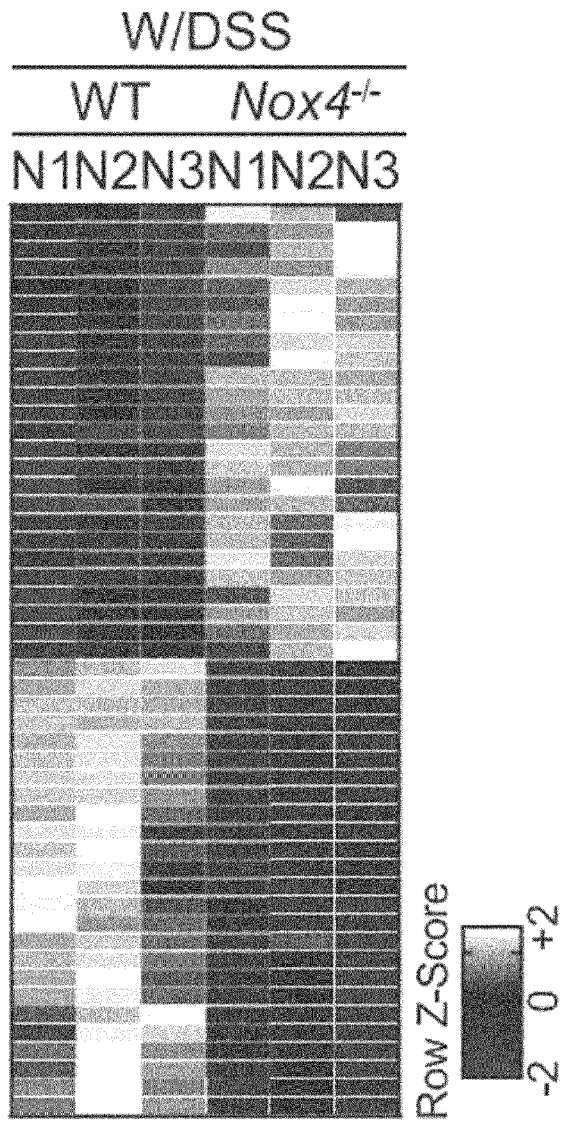
[도6g]



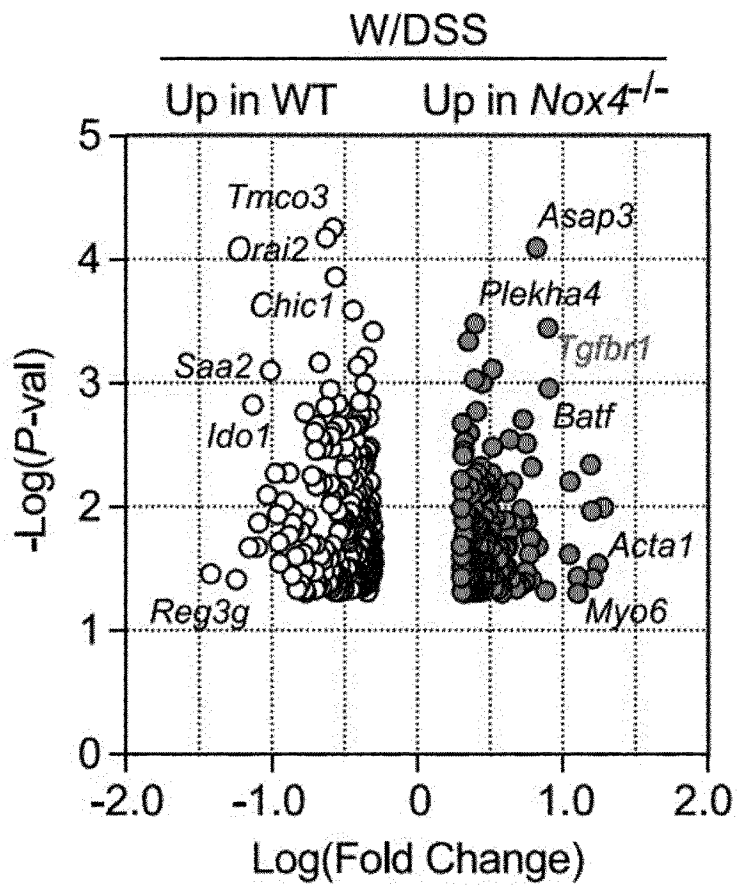
[도7a]



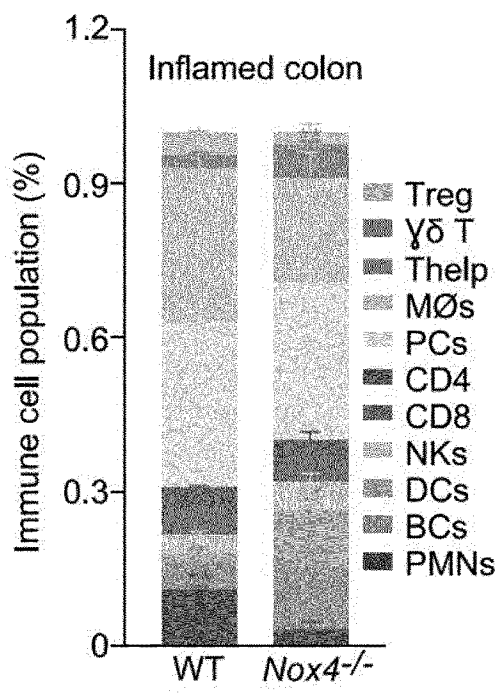
[도7b]



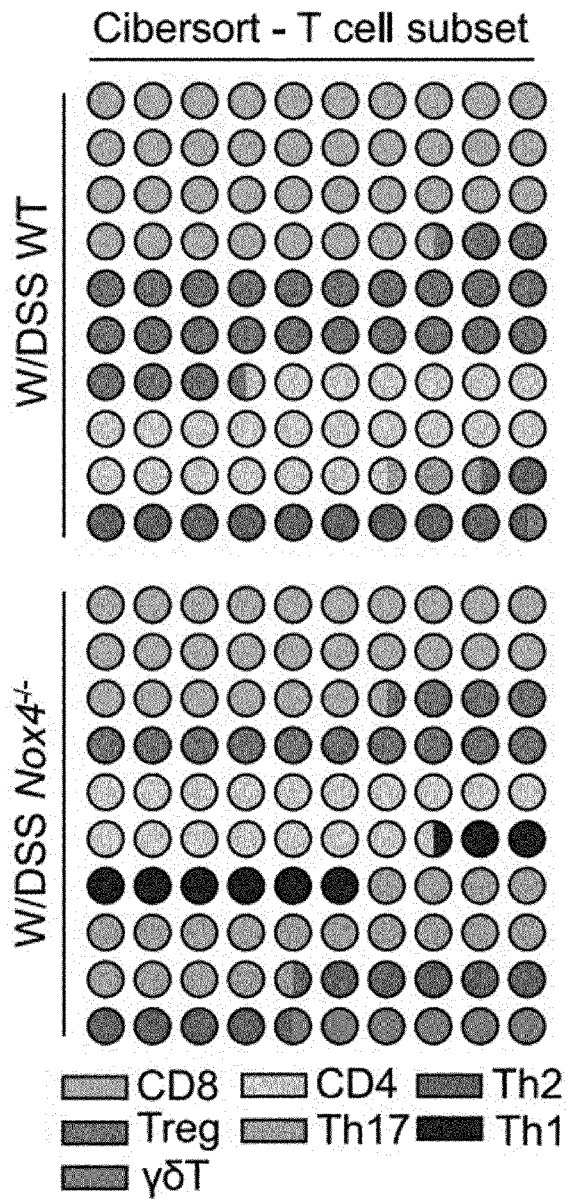
[도7c]



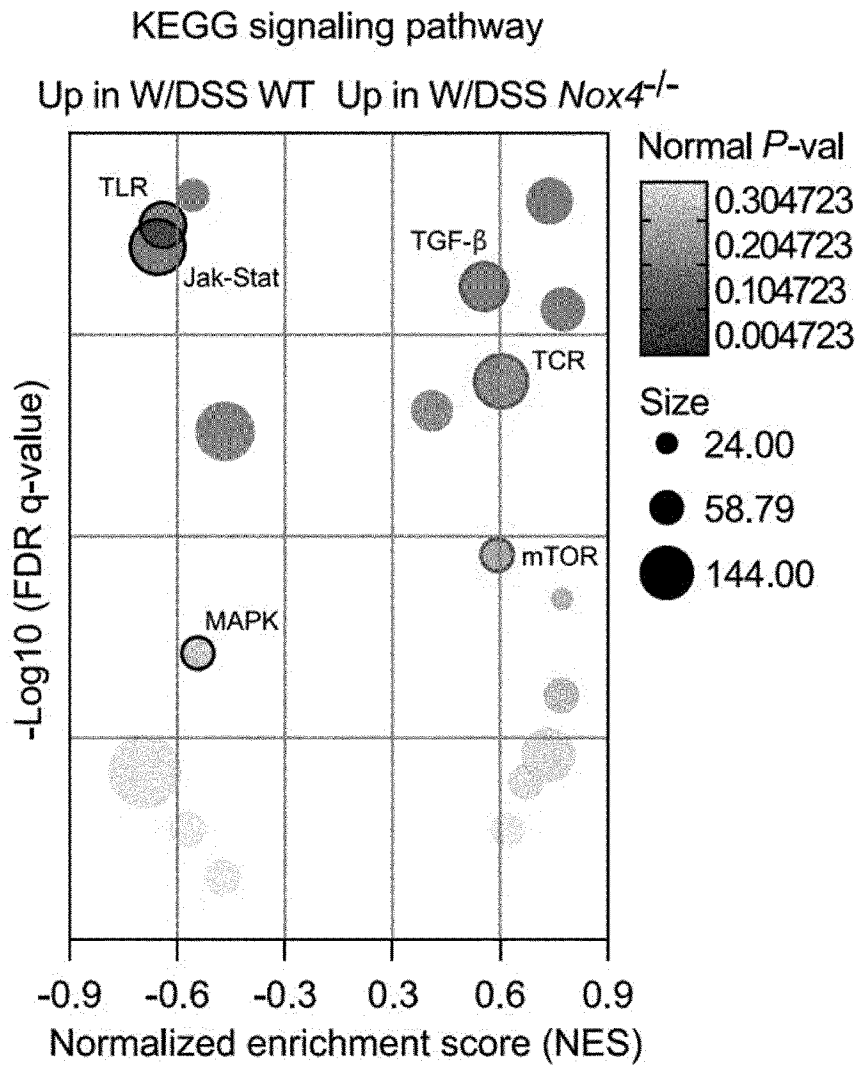
[도7d]



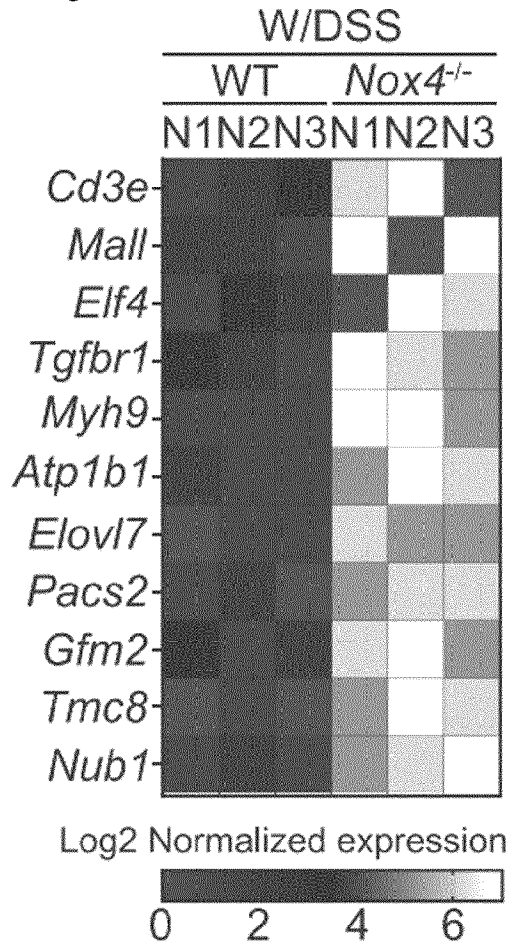
[도7e]



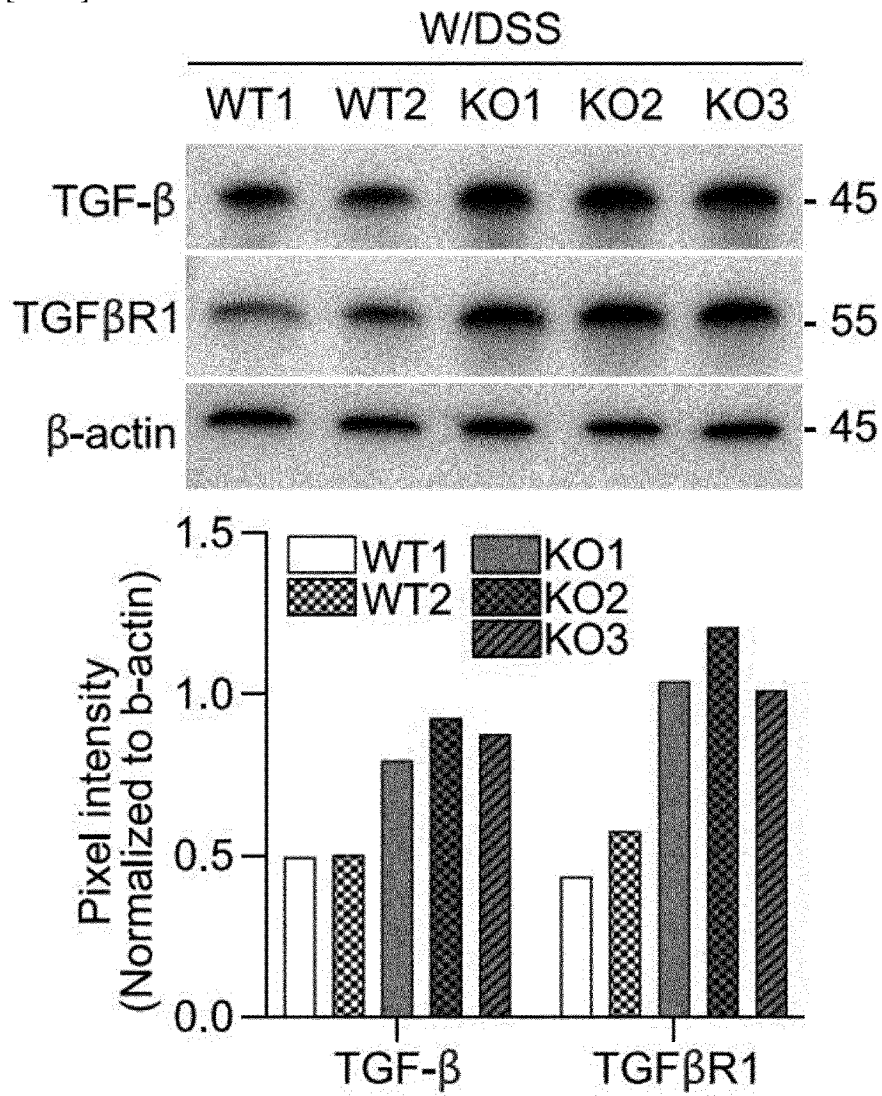
[도7f]



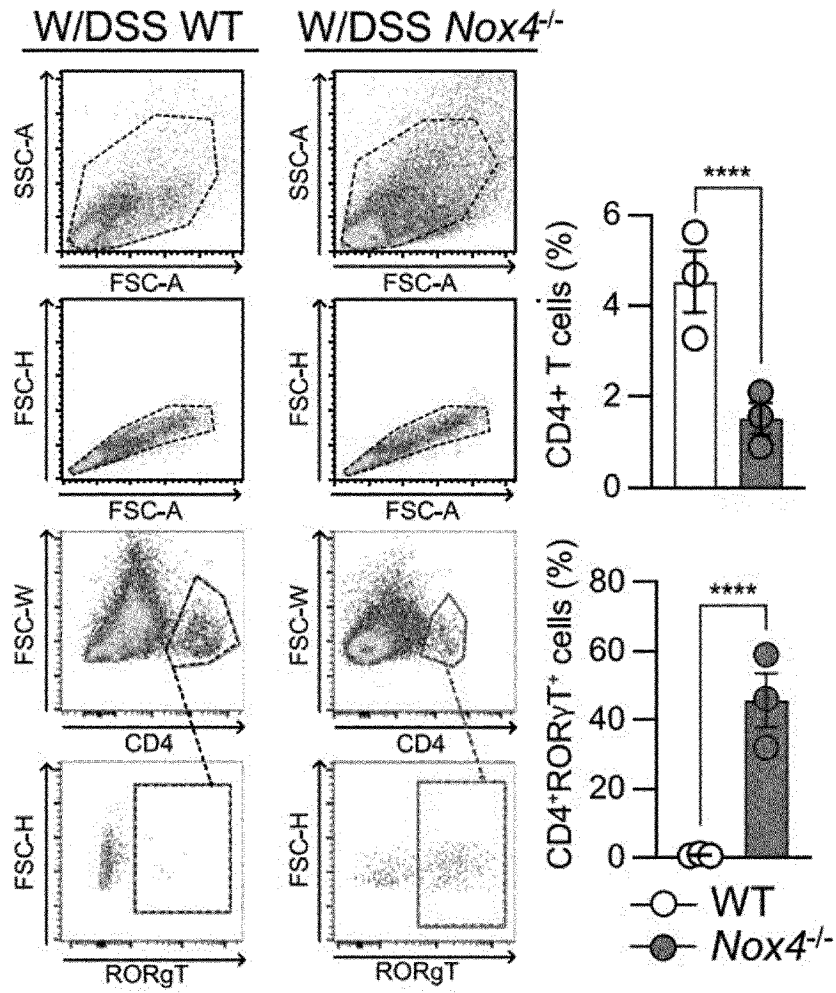
[도7g]



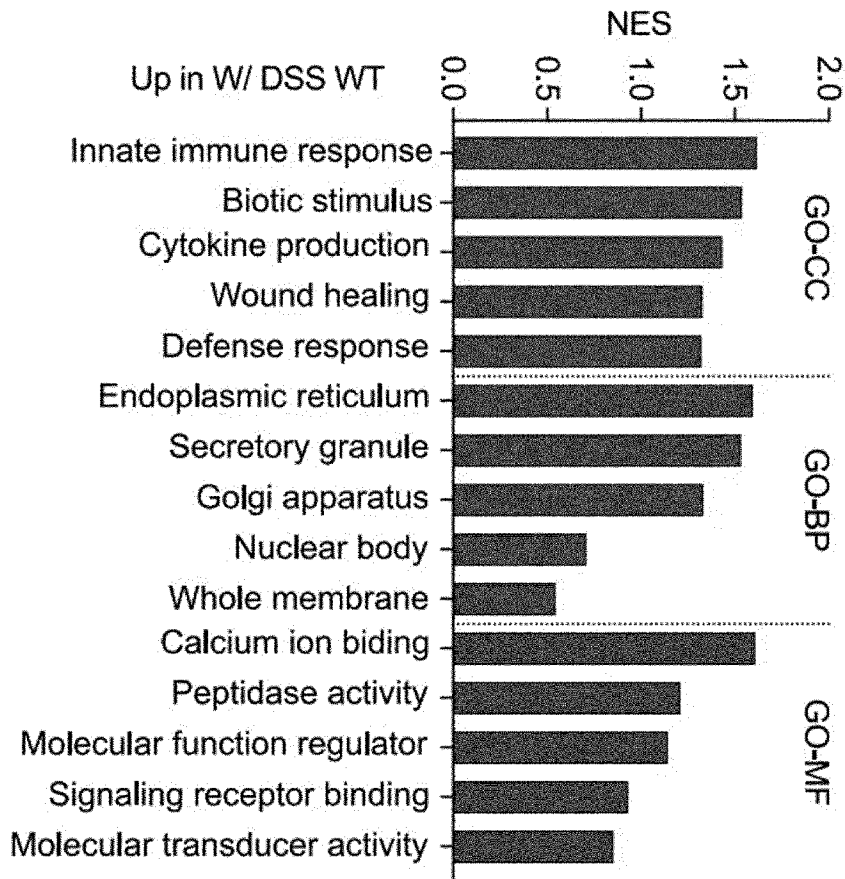
[D7h]



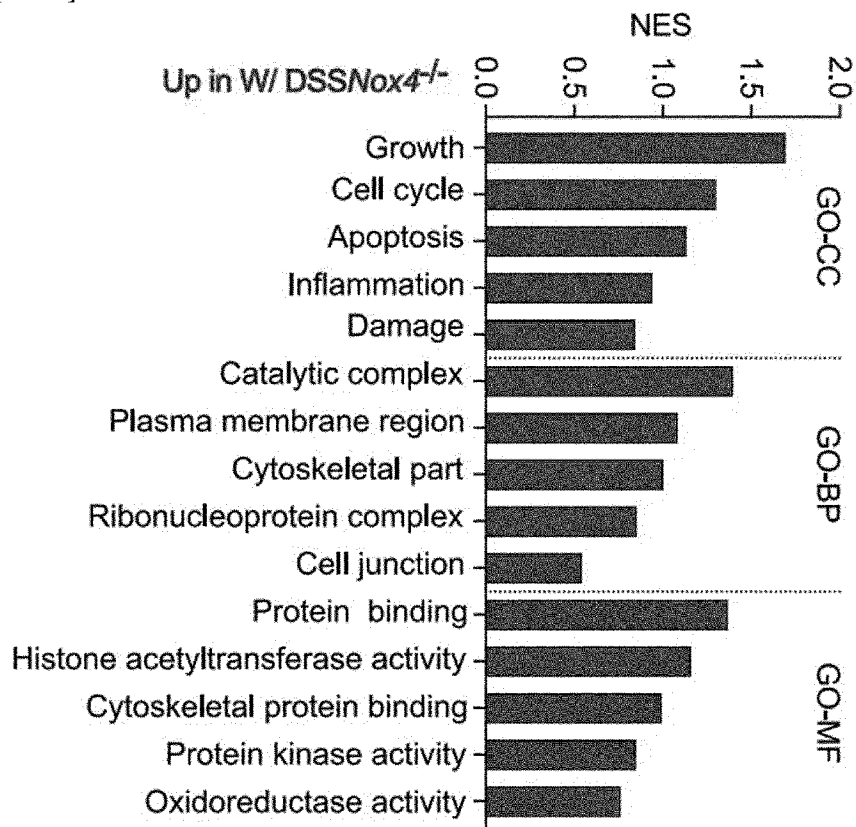
[도7i]



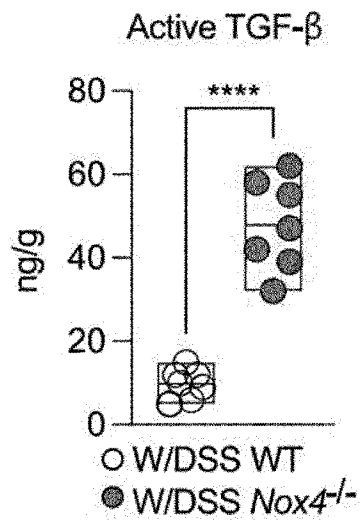
[도8a]



[도8b]

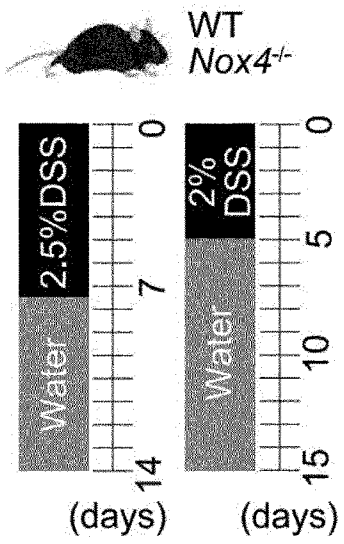


[도8c]

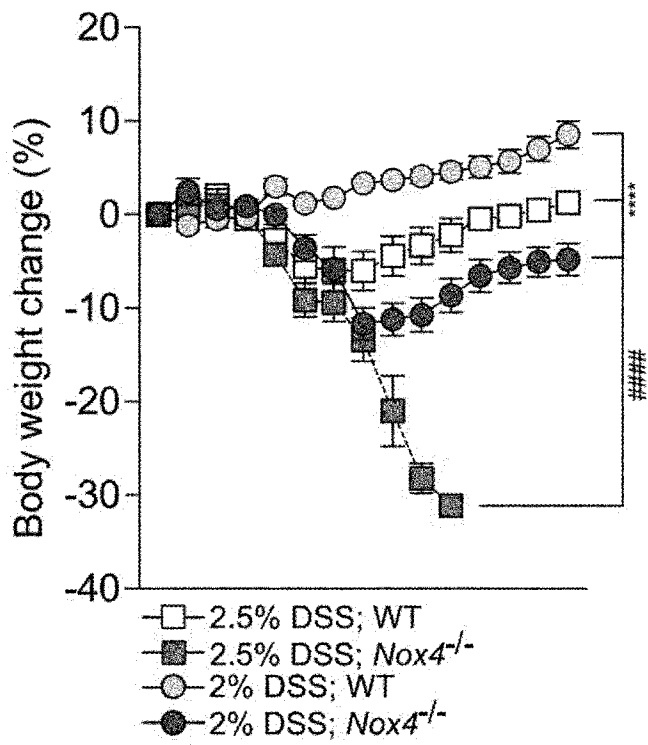


[도9a]

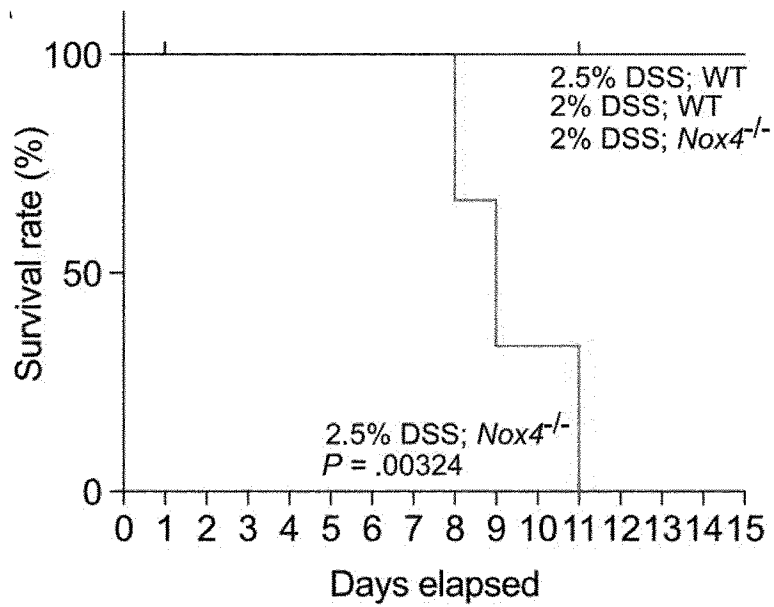
Recovery phase



[도9b]

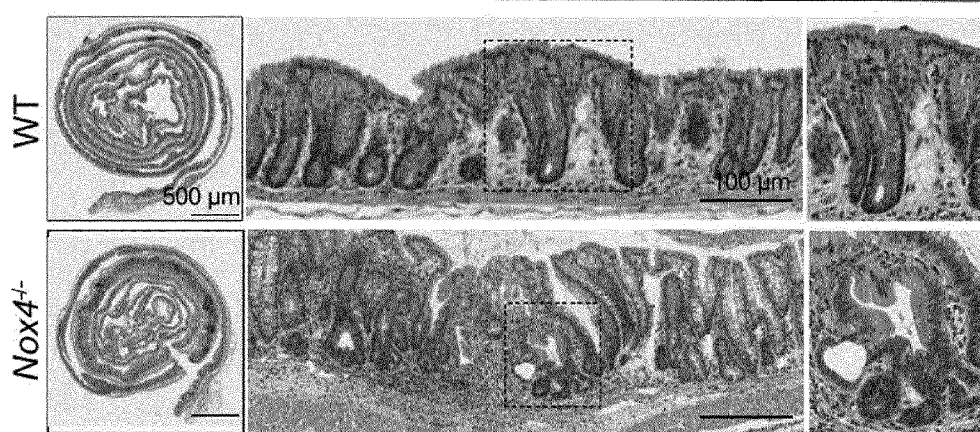


[도9c]

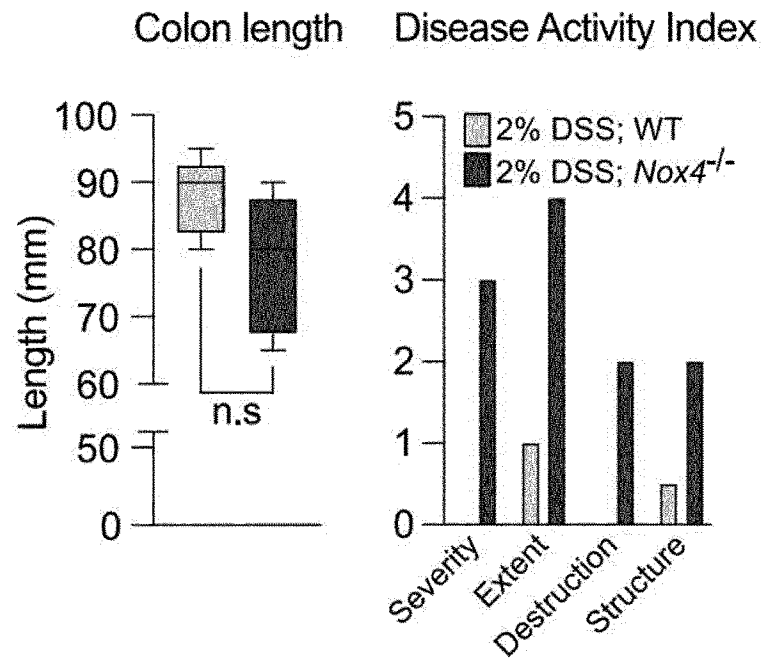


[도9d]

Recovery phase (2% DSS administration)



[도9e]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6883(2018.01)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) C12Q 1/6883(2018.01); A61K 31/713(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 9/00(2006.01); C07K 16/24(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: Nox4(NADPH oxidase 4), CD3e, Muc11, Vegf, Ano5, Tnfrsf9, Itg2a, Nlrp3, Tnfrsf4, Fabp7, CD79b, Ptgs2, Caprin2, 단백질(protein), 유전자(gene), 발현(expression), 수준(level), 측정(measurement), 대장염(colitis), 섬유화(fibrosis)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STENKE, E. et al. NADPH oxidase 4 is protective and not fibrogenic in intestinal inflammation. Redox Biology. 2020, vol. 37, thesis no. : 101752 (pp. 1-10). See abstract; and page 3, left column, last paragraph - right column, first paragraph and page 6, left column, first paragraph.	1-15
A	WO 2019-018571 A1 (WASHINGTON UNIVERSITY et al.) 24 January 2019 (2019-01-24) See entire document.	1-15
A	US 2012-0141461 A1 (THANNICKAL, V. J. et al.) 07 June 2012 (2012-06-07) See entire document.	1-15
A	HAN, C. et al. NOX4 promotes mucosal barrier injury in inflammatory bowel disease by mediating macrophages M1 polarization through ROS. International Immunopharmacology. 2022 (published online : 20 December 2021), vol. 104, thesis no. : 108361 (pp. 1-9). See entire document.	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 27 August 2024		Date of mailing of the international search report 28 August 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005979

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JARMAN, E. R. et al. An inhibitor of NADPH oxidase-4 attenuates established pulmonary fibrosis in a rodent disease model. American Journal of Respiratory cell and Molecular Biology. 2014, vol. 50, no. 1, pp. 158-169. See entire document.	1-15
PX	LEE, Y. et al. Role of Nox4 in mitigating inflammation and fibrosis in dextran sulfate sodium-induced colitis. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology. 18 May 2023, vol. 16, pp. 411-429. See entire document.	1,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/005979

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/KR2024/005979

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019-018571	A1	24 January 2019	CN	111212851	A	29 May 2020
				EP	3655433	A1	27 May 2020
				US	2020-0165677	A1	28 May 2020
				US	2023-0313305	A1	05 October 2023
<hr/>							
US	2012-0141461	A1	07 June 2012	WO	2011-009119	A2	20 January 2011
<hr/>							

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6883(2018.01); A61K 31/713(2006.01); A61K 39/395(2006.01); A61P 9/00(2006.01); C07K 16/24(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: Nox4(NADPH oxidase 4), CD3e, Muc11, Vegf, Ano5, Tnfrsf9, Itg2a, Nlrp3, Tnfrsf4, Fabp7, CD79b, Ptgs2, Caprin2, 단백질(protein), 유전자(gene), 발현(expression), 수준(level), 측정(measurement), 대장염(colitis), 섬유화(fibrosis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	STENKE, E. 등, "NADPH oxidase 4 is protective and not fibrogenic in intestinal inflammation", Redox Biology, 2020, 제37권, 논문번호 : 101752(페이지 1-10) 초록; 페이지 3, 왼쪽 컬럼, 마지막 단락 - 오른쪽 컬럼, 첫 번째 단락; 페이지 6, 왼쪽 컬럼, 첫 번째 단락	1-15
A	WO 2019-018571 A1 (WASHINGTON UNIVERSITY 등) 2019.01.24 전체 문헌	1-15
A	US 2012-0141461 A1 (THANNICKAL, V. J. 등) 2012.06.07 전체 문헌	1-15
A	HAN, C. 등, "NOX4 promotes mucosal barrier injury in inflammatory bowel disease by mediating macrophage M1 polarization through ROS", International Immunopharmacology, 2022(온라인 공개 : 2021.12.20), 제104권, 논문번호 : 108361(페이지 1-9) 전체 문헌	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 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 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2024년08월27일 (27.08.2024)	2024년08월28일 (28.08.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JARMAN, E. R. 등, "An inhibitor of NADPH oxidase-4 attenuates established pulmonary fibrosis in a rodent disease model", American Journal of Respiratory cell and Molecular Biology, 2014, 제50권, 제 1호, 페이지 158-169 전체 문헌	1-15
PX	LEE Y. 등, "Role of Nox4 in mitigating inflammation and fibrosis in dextran sulfate sodium-induced colitis", Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 2023.05.18, 제16권, 페이지 411-429 전체 문헌	1,7

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2019-018571 A1	2019/01/24	CN 111212851 A	2020/05/29
		EP 3655433 A1	2020/05/27
		US 2020-0165677 A1	2020/05/28
		US 2023-0313305 A1	2023/10/05
US 2012-0141461 A1	2012/06/07	WO 2011-009119 A2	2011/01/20