(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0040766
(43) 공개일자 2015년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
G01N 33/563 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0134714
(22) 출원일자 2014년10월07일
심사청구일자 2014년10월07일
(30) 우선권주장
1020130119221 2013년10월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이지희
서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32, 102동 302호 (목동, 이편한세상)
(74) 대리인
안소영

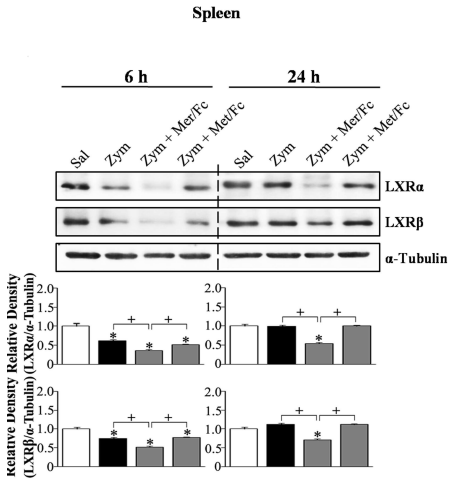
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **항염증 물질을 스크리닝하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 항염증 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하면 다수의 항염증 후보물질 중 Gas 6, Mer 수용체 또는 LXR의 발현 또는 활동도를 증가시키는 물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 기존의 소염제를 대체할 수 있는 약물 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0029353
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업-선도연구센터육성사업-기초의과학분야(MRC)
연구과제명 조직손상방어연구센터 - 내인성 염증 치유 네트워크 규명을 통한 조직손상 개선 연구
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교
연구기간 2011.09.01 ~ 2015.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 염증 유발물질과 Mer 수용체 억제제를 실험동물에게 투여하는 단계;

2) 항염증 후보 물질을 상기 실험동물에게 투여하는 단계; 및 3) 상기 실험동물의 세포에서 LXR 발현 또는 활동도가 감소되는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 항염증 물질의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Mer 수용체 억제제는 Gas 6 저해제 또는 항-Mer 항체(anti-Mer antibody)인, 항염증 물질의 스크리닝 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 Gas 6 저해제는 Mer/Fc인, 항염증 물질의 스크리닝 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포는 복막대식세포, 폐 세포, 또는 비장 세포인, 항염증 물질의 스크리닝 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 3)단계에서 LXR 발현 또는 활동도가 감소되는지 여부는 웨스턴 블롯을 이용하여 확인하는, 항염증 물질의 스크리닝 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 4) 상기 실험동물에서 하기 ⅰ 내지 ⅳ로 이루어진 군으로부터 선택되는 특성들 중 1 이상을 나타내는지 여부를 확인하는 단계를 더 포함하는, 항염증 물질의 스크리닝 방법.

ⅰ. 체액 내 호중구 수의 감소,

ⅱ. 체액 내 총 단백질 양의 감소,

ⅲ. 전염증성 사이토카인 발현 감소,

ⅳ. 항염증성 사이토카인 발현 증가.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 체액은 혈액, 림프액, 기관지폐포 세척액 및 복강 세척액으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항염증 물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항염증 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증반응은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려는 기전이다. 염증반응은 외부 자극으로부터 우리 몸을 보호하는 정상적인 방어기전이나, 그 정도가 심하거나 만성적인 경우 암, 혈관 장애 및 당뇨와 같은 다양한 심각한 질병을 유발할 수 있다.

[0003] 현재까지는 브라디키닌 길항제, COX 억제제 등의 기전으로 작용하는 스테로이드성 소염제 또는 비스테로이드성 소염제(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)가 많이 사용되어 왔다. 그러나 스테로이드성 소염제를 장기간 사용하면 내성, 자성의 웅성화 현상 등 심각한 부작용이 발생하며, 비스테로이드성 소염제를 장기간 복용하게 되면 위장관계의 소화성 궤양출혈로 인한 이차적 빈혈 초래, 혈소판 기능 억제, 분만 유도 억제, 신장에 대한 부작용, 간장 손상, 과민 반응 등의 심각한 부작용을 초래한다. 따라서, 이러한 약물의 부작용을 극복하기 위하여 인체에 부작용이 적고 항염증 효과가 우수한 치료제의 개발에 대한 필요성이 절실히 요구되고 있다.

[0004] 한편 신약 개발은 통상적으로 5000~2만개의 신약 후보물질을 탐색한 후 그 중 250~10개의 물질을 선발하여 비임상 시험을 거치고, 거기서 다시 10개 미만의 물질을 선발하여 1상, 2상, 3상 임상 시험을 거쳐 최종적으로 1개의 물질을 신약으로 개발하여 신약판매허가를 받고 시판하는 과정으로 이루어진다. 이 과정에서 10년 내지 15년의 시간이 소요되고 많은 인력과 비용이 투입된다. 신약 후보물질은 컴퓨터상에서 후보물질의 구조를 확인하여 탐색하기도 하고(in-silico), 세포에 후보물질을 처리하여 효과를 확인하여 탐색하기도 한다(in-vitro). 이러한 후보물질의 스크리닝을 효과적으로 할 수 있다면 막대한 비용과 긴 시간이 소요되는 신약 개발 과정이 보다 수월하게 이루어질 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 항염증 효과를 갖는 물질을 보다 효과적으로 스크리닝하여 항염증 치료제 신약으로 개발할 물질을 발굴하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은

[0007] 1) 염증반응 유발 물질과 Mer 수용체 억제제를 실험동물에게 투여하는 단계;

[0008] 2) 항염증 후보 물질을 상기 실험동물에게 투여하는 단계; 및 3) 상기 실험동물의 세포에서 LXR 발현 또는 활동도가 감소되는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 항염증 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0009] 염증반응 유발 물질은 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떤 물질이라도 될 수 있으며, 보다 바람직하게는 zymosan을 사용할 수 있다. zymosan은 무균성 염증을 유발하는 물질에 해당한다. 또한 실험동물은 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떤 실험동물이라도 가능하고, 예를 들어 마우스, 햄스터, 랫트, 페렛, 기니피그, 토끼, 개, 영장류, 돼지 등이 있으며, 보다 바람직하게는 마우스일 수 있다.

[0010] 상기 1)단계에서 염증반응 유발 물질과 Mer 수용체 억제제는 각 물질의 특성에 맞는 경로로 투여할 수 있으며, 보다 바람직하게는 복강내로 투여할 수 있다.

[0011] 생체내에서 염증반응이 유발되지 않은 상태와 염증반응이 유발된 상태에서 발현 또는 활성화되는 물질들은 서로 다르다. 따라서 항염증 후보 물질을 스크리닝하기 위해서는 일단 염증반응을 유발할 필요가 있다.

[0012] 상기 Mer 수용체 억제제는 Gas 6 저해제 또는 항-Mer 항체(anti-Mer Antibody)가 될 수 있다. Gas 6 저해제는 Mer 수용체의 리간드인 Gas 6의 저해제(inhibitor)로 작용하는 물질로서, 보다 바람직하게는 Mer/Fc일 수 있다. 항-Mer 항체는 Mer 수용체에 결합하여 Mer 수용체와 리간드와의 결합을 차단하는 물질이다. 본 발명자들은 Mer 수용체 활성 억제가 LXR(Liver X Receptor)의 발현 및 활동도를 억제시킴을 확인하였고, 이로부터 Mer 수용체 활성화가 LXR 발현 및 활동도를 증가시킨다는 것을 규명하였다. 이는 LXR에 의하여 Mer 수용체가 조절된다는 종래의 통념과 상반되는 것이다. 염증반응이 있는 경우 Mer 수용체를 통하여 LXR이 활성화되어 염증반응이 억제되는 효과가 일어나는 경로는 항염증 물질의 스크리닝에 매우 중요하다. Mer 수용체의 활성화는 혈소판 응집 및 T 세포의 면역관용 효과와도 관련이 있으므로, Mer 수용체를 발현 또는 활성화시키는 물질이 반드시 효과적인 항염증 물질이라고 할 수는 없다. 또한 LXR은 항염증 효과보다는 지질 대사 및 세포로부터의 콜레스테롤 배출과 더욱 관련되어 있다. 따라서 Mer 수용체 또는 LXR 둘 중 하나만을 확인해서는 항염증 물질을 효과적으로 스크리닝할 수 없다. 또한 Mer->LXR 순서의 경로로 진행되기 때문에 염증유발 물질과 LXR 억제제를 투여한 후 후보물질이 Mer 수용체의 발현 또는 활동도를 유지 또는 증가시키는지 여부를 확인하는 방식으로 스크리닝 방법을 구성할 수도 없다. 따라서 본 발명의 스크리닝 방법에서는 염증 유발 물질을 투여하여 염증 반응을 유발한 상태에서 Mer 수용체 억제제를 투여하여 Mer 수용체의 작용을 억제하였을 때 LXR의 발현 또는 활동도를 증가시키는 물질을 염증을 종결시키는 효과를 갖는 항염증 물질로서 선별할 수 있도록 하였다. 즉, Mer 수용체 억제제를 염증

반응이 유발된 실험동물에게 투여하면 그 실험동물의 세포의 LXR 발현 또는 활동도가 감소되어야 하나, 항염증 후보 물질이 Gas 6, Mer 수용체 또는 LXR의 발현 또는 활동도를 증가시키는 작용을 하는 경우 Mer 수용체 억제제의 작용이 극복되어 LXR 발현 또는 활동도 감소 효과가 줄어들거나 나타나지 않는다. 따라서 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하면 Gas 6, Mer 수용체, 또는 LXR 발현 또는 활성화 기전으로 작용하는 항염증 물질을 스크리닝할 수 있다. 이러한 항염증 물질은 각종 부작용이 문제되고 있음에도 불구하고 현재 널리 사용되고 있는 스테로이드성 또는 비스테로이드성 소염제를 대체할 수 있는 약물로 개발될 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 세포는 복막대식세포, 폐 세포 또는 비장 세포가 될 수 있다. 그러나 세포의 종류는 이에 제한되지 않는다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 3)단계에서 LXR 발현 또는 활동도가 감소되는지 여부는 웨스턴 블롯(western blot)을 이용하여 확인할 수 있다. LXR 발현 및 활동도는 실험동물에서 염증반응이 유발된 후 단시간 내에 확인할 수 있다. LXR 발현 감소 여부는 항-LXR 항체를 이용하여 확인할 수 있다. LXR 활동도 감소 여부는 항-ABCA1 항체, 항-ABCG1 항체 또는 항-ApoE 항체를 이용하여 확인할 수 있다. 여기서 ABCA1 및 ApoE는 LXR 활성화에 의해 발현되는 단백질에 해당한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 4) 상기 실험동물에서 하기 i 내지 iv로 이루어진 군으로부터 선택되는 특성들 중 1 이상을 나타내는지 여부를 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0016] i. 체액 내 호중구 수의 감소,

[0017] ii. 체액 내 총 단백질 양의 감소,

[0018] iii. 전염증성 사이토카인 발현 감소,

[0019] iv. 항염증성 사이토카인 발현 증가.

[0020] 여기서 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)이란 염증반응시 발현, 분비되어 염증반응이 일어나는 것을 촉진하는 사이토카인을 의미하며, TNF-α(Tumor Necrosis Factor-α), IL-1β(Interleukin-1β), MIP-2(macrophage inflammatory protein 2) 등이 있다. 항염증성 사이토카인은 염증반응 유발 직후에 급증하는 경향이 있다. 항염증성 사이토카인(anti-inflammatory cytokine)이란 염증반응이 일어나면 서서히 발현, 분비되어 염증반응을 억제하는 작용을 하는 사이토카인을 의미하며, TGF-β(Transforming Growth Factor-β), HGF(Hepatocyte Growth Factor) 등이 있다. 여기서 체액은 혈액, 림프액, 기관지폐포 세척액 또는 복강 세척액일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하면 다수의 후보물질 중 Gas 6, Mer 수용체, 또는 LXR의 발현 또는 활동도를 증가시키는 물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 기존의 항염증 치료제를 대체할 수 있는 약물 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1 및 2는 Mer/Fc 투여가 Mer 수용체의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 확인한 도이다. 도 1은 비장 세포에서 확인한 것이고, 도 2는 폐 세포에서 확인한 것이다.

도 3 내지 5는 Mer/Fc 투여가 복강세척액에서 전염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 확인한 도이다. 도 3은 TNF-α를 확인한 것이고, 도 4는 IL-1β를 확인한 것이고, 도 5는 MIP-2를 확인한 것이다.

도 6 및 7은 Mer/Fc 투여가 복강세척액에서 항염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 확인한 도이다. 도 6은 TGF-β1을 확인한 것이고, 도 7은 HGF를 확인한 것이다.

도 8은 Mer/Fc 투여가 복강세척액에서 호중구 수에 미치는 영향을 확인한 도이다.

도 9는 Mer/Fc 투여가 복강세척액에서 총 단백질 함량에 미치는 영향을 확인한 도이다.

도 10 및 11은 Mer/Fc 투여가 LXRα와 LXRβ 발현에 미치는 영향을 확인한 도이다. 도 10은 비장 세포에서 확인한 것이고, 도 11은 폐 세포에서 확인한 것이다.

도 12 및 13은 Mer/Fc 투여가 LXRα와 LXRβ의 활동도에 미치는 영향을 확인하기 위해 LXRα와 LXRβ의 타겟 유

전자인 ABCA1 발현에 미치는 영향을 측정한 도이다. 도 12는 비장 세포에서 확인한 것이고, 도 13은 폐 세포에서 확인한 것이다.

도 14 및 15는 Mer/Fc 투여가 LXRα와 LXRβ의 활동도에 미치는 영향을 확인하기 위해 LXRα와 LXRβ의 타겟 유전자인 ApoE 발현에 미치는 영향을 측정한 도이다. 도 14는 비장 세포에서 확인한 것이고, 도 15는 폐 세포에서 확인한 것이다.

도 16은 복막 대식세포에서 Mer 수용체의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 확인한 도이다.

도 17은 Mer/Fc 투여가 LXRα와 LXRβ 발현에 미치는 영향을 확인한 도이다.

도 18은 Mer/Fc 투여가 LXRα와 LXRβ의 활동도에 미치는 영향을 확인하기 위해 LXRα와 LXRβ의 타겟 유전자인 ABCA1, ABCG1, 및 ApoE 발현에 미치는 영향을 측정한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0024] **<제조예> Mer/Fc의 투여**

[0025] 무균의 수컷 BALB/C 마우스(Orient Bio, Sungnam, Korea)를 4개의 군으로 나누어 첫 번째 군에는 복강내로(intraperitoneal) 500 μl saline을 투여하고, 두 번째 군에는 1 mg/500 μl zymosan(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)만을 투여하고, 세 번째 군에는 1.5 mg/kg의 Mer/Fc(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 투여하고 1시간 후에 zymosan을 투여하고, 네 번째 군에는 1.5 mg/kg의 Met/Fc(네가티브 대조 단백질,R&D Systems)를 투여하고 1시간 후에 zymosan을 투여하였다. 그 후 각 군의 동물들을 투여 6시간 후 및 24시간 후에 각각 희생시켜 하기의 효과를 확인하였다.

[0026] 결과는 5마리 이상의 마우스의 결과의 means±SEM의 대푯값에 해당한다. 도면의 그래프상에서 *는 saline 투여군과 현저한 차이가 있음을 의미한다($p < 0.05$). +는 zymosan 및 Mer/Fc를 투여한 군과 zymosan 투여군, zymosan 및 Met/Fc를 투여한 군 간에 현저한 차이가 있음을 의미한다($p < 0.05$).

[0027] **<실험예 1> Mer/Fc 투여가 비장 및 폐에서 Mer 수용체의 발현 및 활성화에 미치는 영향 확인**

[0028] 제조예에서 희생시킨 마우스에서 비장 및 폐를 적출하였다. 비장 세포 및 폐 세포를 분리하여, 각 세포에서 항-Mer 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 항-인산화 Mer 항체(phosphor Mer, Fab Gennix Inc., Frisco, TX, USA)를 프로브로 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 웨스턴 블롯 결과는 도 1 및 도 2의 상단에 나타내었다.

[0029] 도 1은 Mer/Fc 투여가 비장에서 Mer 수용체의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 도 1의 상단의 웨스턴 블롯 결과 중 위쪽의 도에서, 각 물질의 투여에 의해 Mer의 발현이 영향을 거의 받지 않으며, 이는 시간이 경과하여도 변하지 않음을 알 수 있다. 그러나 중간의 도에서 zymosan 투여에 의하여 Mer의 활성화가 크게 증가하여 인산화된 Mer가 크게 증가하며, 이러한 효과는 Mer/Fc의 투여에 의해 상쇄됨을 확인할 수 있다. 또한 이러한 효과는 6시간 경과 후에 확인한 경우(좌측)보다 24시간 후에 확인한 경우(우측)에 더욱 뚜렷하게 나타났다.

[0030] 도 1의 하단은 상단의 웨스턴 블롯 결과를 tubulin으로 정규화하여 나타낸 그래프이다. 막대들은 좌측부터 각각 saline, zymosan, zymosan과 Mer/Fc를 함께 투여한 경우, zymosan과 Met/Fc를 함께 투여한 경우를 의미한다. 이 경우에도 도 1의 상단의 웨스턴 블롯에서와 마찬가지의 효과를 확인할 수 있었다.

[0031] 도 2는 Mer/Fc 투여가 폐에서 Mer 수용체의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 도 2의 상단은 웨스턴 블롯 결과이고, 도 2의 하단은 상단의 웨스턴 블롯 결과를 tubulin으로 정규화하여 나타낸 그래프이다. 막대들은 좌측부터 각각 saline, zymosan, zymosan과 Mer/Fc를 함께 투여한 경우, zymosan과 Met/Fc를 함께 투여한 경우를 의미한다. 폐에서도 비장과 마찬가지로, zymosan 투여에 의해 Mer의 활성화가 크게 증가되어 인산화된 Mer의 함량이 크게 증가하고, 이러한 효과는 Mer/Fc의 투여에 의해 상쇄되고, 이러한 효과는 6시간 경과 후에 확인한 경우(좌측)보다 24시간 후에 확인한 경우(우측)에 더욱 뚜렷하게 나타남을 알 수 있다.

[0032] 또한 제조예에서 희생시킨 마우스에서 복막 대식세포를 분리하였다. 분리된 세포에서 항-Mer 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 항-인산화 Mer 항체(phosphor Mer, Fab Gennix Inc., Frisco, TX,

USA)를 프로브로 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0033] 도 16은 복막 대식세포에서 Mer/Fc 투여가 폐에서 Mer 수용체의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 복막 대식세포에서도 비장 및 폐와 마찬가지로, Mer의 발현에는 영향이 거의 없었지만, zymosan 투여에 의해 Mer의 활성화가 크게 증가되어 인산화된 Mer의 함량이 크게 증가하고, 이러한 효과는 Mer/Fc의 투여에 의해 상쇄되고, 이러한 효과는 6시간 경과 후에 확인한 경우(좌측)보다 24시간 후에 확인한 경우(우측)에 더욱 뚜렷하게 나타남을 알 수 있다.

[0034] 상기 결과로부터 정상적인 상태에서는 염증반응이 일어나면 Mer 수용체에 의하여 염증반응을 내인적으로 스스로 억제하여 염증치유가 일어나게 되나, Mer/Fc가 Mer 수용체의 활성화를 억제하며, Mer/Fc의 Mer 수용체에 대한 효과는 염증반응이 유발된 직후보다 시간이 경과한 경우에 더 두드러지게 나타남을 알 수 있다.

[0035] **<실험예 2> Mer/Fc 투여가 복강세척액(peritoneal lavage fluid)에서 전염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향 확인**

[0036] 제조예에서 희생시킨 마우스에서 saline을 주사기를 통해 관류시켜 복강세척액(2.4 ml/마우스)을 채취하였다. ELISA를 이용하여 하기의 전염증성 사이토카인 및 항염증성 사이토카인의 발현을 확인하였다.

[0037] TNF-α, IL-1β, MIP-2는 각각 염증반응시 분비되어 염증반응이 일어나는 것을 촉진하는 전염증성 사이토카인에 해당한다. 반면 TGF-β, HGF는 각각 염증반응시 분비되어 염증반응이 일어나는 것을 억제하는 항염증성 사이토카인에 해당한다.

[0038] 도 3은 Mer/Fc 투여가 복강 세척액에서 TNF-α의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 6시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의하여 TNF-α의 발현이 증가하며, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 TNF-α의 발현이 더욱 증가하였다. 24시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의한 TNF-α 발현 증가 효과가 거의 사라졌고, Mer/Fc를 함께 투여한 경우에도 TNF-α 발현에 거의 차이가 없었다. 그러나 식염수(saline)와 함께 Mer/Fc 또는 Met/Fc를 투여하였을 경우에는 6시간 후에 확인하였을 때와 24시간 후에 확인하였을 때 모두 TNF-α 발현이 매우 낮게 나타났다.

[0039] 도 4는 Mer/Fc 투여가 복강 세척액에서 IL-1β의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 6시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의하여 IL-1β의 발현이 증가하며, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 IL-1β의 발현이 더욱 증가하였다. 24시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의한 IL-1β 발현 증가 효과가 거의 사라졌고, Mer/Fc를 함께 투여한 경우에도 IL-1β 발현에 거의 차이가 없었다. 그러나 식염수(saline)와 함께 Mer/Fc 또는 Met/Fc를 투여하였을 경우에는 6시간 후에 확인하였을 때와 24시간 후에 확인하였을 때 모두 IL-1β의 발현이 매우 낮게 나타났다.

[0040] 도 5는 Mer/Fc 투여가 복강 세척액에서 MIP-2의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 6시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의하여 MIP-2의 발현이 증가하며, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 MIP-2의 발현이 더욱 증가하였다. 24시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의한 MIP-2 발현 증가 효과가 거의 사라졌고, Mer/Fc를 함께 투여한 경우에도 MIP-2 발현에 거의 차이가 없었다. 그러나 식염수(saline)와 함께 Mer/Fc 또는 Met/Fc를 투여하였을 경우에는 6시간 후에 확인하였을 때와 24시간 후에 확인하였을 때 모두 MIP-2의 발현이 매우 낮게 나타났다.

[0041] 상기 결과로부터 염증반응이 유발된 직후에 전염증성 사이토카인의 발현이 급격히 증가하며, Mer 수용체 억제제가 전염증성 사이토카인의 발현을 더욱 증가시켜 염증반응을 악화시킴을 알 수 있다.

[0042] 도 6은 Mer/Fc 투여가 복강 세척액에서 TGF-β1의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 6시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의하여 TGF-β1의 발현이 증가하며, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 TGF-β1의 발현 증가 효과가 의미있게 상쇄되었다. 24시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의한 TGF-β1 발현이 6시간 후에 확인하였을 때보다 더욱 증가하였고, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 TGF-β의 발현 증가 효과가 역시 의미있게 상쇄되었다. 그러나 식염수(saline)와 함께 Mer/Fc 또는 Met/Fc를 투여하였을 경우에는 6시간 후에 확인하였을 때와 24시간 후에 확인하였을 때 모두 TGF-β1의 발현이 매우 낮게 나타났다.

[0043] 도 7은 Mer/Fc 투여가 복강 세척액에서 HGF의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 6시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의하여 HGF의 발현이 증가하며, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 HGF의 발현 증가 효과가 의미있게 상쇄되었다. 24시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의한 HGF 발현이 6시간 후에 확인하였을 때보다 더욱 증가하였고, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 HGF의 발현 증가 효과가 의미있게 상쇄되었다. 그러나 식염수(saline)

와 함께 Mer/Fc 또는 Met/Fc를 투여하였을 경우에는 6시간 후에 확인하였을 때와 24시간 후에 확인하였을 때 모두 HGF의 발현이 낮게 나타났다.

[0044] 상기 결과로부터 정상적인 상태에서는 염증반응이 일어나는 동안 체내에서 항염증성 사이토카인의 발현이 서서히 증가되어 염증작용을 내인적으로 스스로 억제하여 염증치유 단계로 넘어가나, Mer 수용체 억제제가 항염증성 사이토카인의 발현을 억제하여 이러한 내인적 염증 치유작용을 지연시킨다는 것을 알 수 있다. 또한 이러한 Mer 수용체 억제제의 효과는 염증반응이 일어나는 경우에 항염증성 사이토카인의 수준에 영향을 미치고, 염증반응이 일어나지 않는 경우에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

[0045] **<실험예 3> Mer/Fc 투여가 복강세척액에서 호중구 수(neutrophil number) 및 총 단백질 함량(total protein)에 미치는 영향 확인**

[0046] 제조예에서 희생시킨 마우스로부터 복강세척액을 채취하였다. 복강세척액 내의 호중구 수는 세포 크기를 분석할 수 있는 Coulter 전기 세포계수기 (an electronic Coulter counter fitted with a cell-sizing analyzer counter fitted with a cell-sizing analyzer; Coulter Model ZBI with a channelizer 256; Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 계수하였고, 총 단백질 함량은 혈청 알부민을 기준으로 농도를 측정하였다.

[0047] 도 8은 Mer/Fc 투여가 복강 세척액에서 호중구의 수에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 6시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의하여 호중구의 수가 증가하며, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 호중구의 수가 더욱 증가되었다. 24시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의한 호중구 수 증가 효과는 6시간 후에 확인하였을 때보다 다소 약화되었으며, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 호중구 수는 zymosan만 투여한 경우보다 증가되었다. 그러나 식염수(saline)와 함께 Mer/Fc 또는 Met/Fc를 투여하였을 경우에는 6시간 후에 확인하였을 때와 24시간 후에 확인하였을 때 모두 호중구 수가 매우 낮게 나타났다.

[0048] 도 9는 Mer/Fc 투여가 복강 세척액에서 총 단백질 양에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 염증반응이 일어나면 조직의 투과도가 증가되기 때문에 대체로 총 단백질 양도 증가하는 경향이 있다. 6시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의하여 총 단백질 양이 증가하며, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 총 단백질 양이 더욱 증가되었다. 24시간 후에 확인하였을 때, zymosan 투여에 의한 총 단백질 양 증가 효과가 saline을 투여한 경우보다 조금 더 높은 수준이었고, Mer/Fc를 함께 투여한 경우에는 총 단백질 양이 좀 더 증가되었다. 그러나 식염수(saline)와 함께 Mer/Fc 또는 Met/Fc를 투여하였을 경우에는 6시간 후에 확인하였을 때와 24시간 후에 확인하였을 때 모두 총 단백질 양이 매우 낮게 나타났다.

[0049] 상기 결과로부터 염증반응이 유발되면 체액 내 호중구 수 및 단백질 양이 증가하며, Mer 수용체 억제제가 염증반응을 악화시켜 이러한 현상을 심화시킨다는 것을 알 수 있다. 또한 이러한 Mer 수용체 억제제의 효과는 염증반응이 일어나는 경우에 호중구 수 및 총 단백질 양에 영향을 미치고, 염증반응이 일어나지 않는 경우에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

[0050] **<실험예 4> Mer/Fc 투여가 비장 및 폐에서 LXRα와 LXRβ, ABCA1 및 ApoE 발현에 미치는 영향 확인**

[0051] 제조예에서 희생시킨 마우스에서 비장 및 폐를 적출하였다. 비장 세포 및 폐조직의 균등액(homogenates)에서, 항-LXRα 항체(Abcam, Cambridge, UK), 항-LXRβ 항체 (Santa Cruz Biotechnology), 항-ABCA1 항체(Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), 항-ApoE 항체(Abcam)를 프로브로 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 웨스턴 블롯 결과는 각 도의 상단에 나타내었다.

[0052] 도 10은 Mer/Fc 투여가 비장에서 LXRα 및 LXRβ의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 도 10의 상단의 웨스턴 블롯 결과 중 위쪽의 도에서, zymosan 투여 6 시간 경과후 LXRα 및 LXRβ의 발현이 감소하며, Mer/Fc를 함께 투여한 경우 LXRα 및 LXRβ의 발현이 더욱 감소되었다. 24시간 경과 후에는 zymosan만 투여한 경우에는 saline을 투여한 경우와 LXRα 및 LXRβ의 발현이 거의 차이가 나지 않았고 zymosan과 Mer/Fc를 함께 투여한 경우에는 LXRα 및 LXRβ의 발현이 현저히 감소되었다.

[0053] 도 10의 하단은 상단의 웨스턴 블롯 결과를 tubulin으로 정규화하여 나타낸 그래프이다. 막대들은 좌측부터 각각 saline, zymosan, zymosan과 Mer/Fc를 함께 투여한 경우, zymosan과 Met/Fc를 함께 투여한 경우를 의미한다. 이 경우에도 도 10의 상단의 웨스턴 블롯에서와 마찬가지의 효과를 확인할 수 있었다.

[0054] 도 11은 Mer/Fc 투여가 폐에서 LXRα 및 LXRβ의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 도 11의 상단은 웨스턴 블롯 결과이고, 도 11의 하단은 상단의 웨스턴 블롯 결과를 tubulin으로 정규화하여 나타낸 그래프이다. 막대들은 좌측부터 각각 saline, zymosan, zymosan과 Mer/Fc를 함께 투여한 경우, zymosan과 Met/Fc를 함께 투여한

경우를 의미한다. 폐에서도 비장과 마찬가지로, zymosan 투여에 의해 LXRα 및 LXRβ의 발현이 감소되고, 이러한 감소는 Mer/Fc 투여시 더욱 두드러졌다. 24시간 후에 관찰했을 때에는 6시간 후에 관찰했을 때와 달리 LXRα 및 LXRβ의 발현 감소 효과가 거의 사라지고, zymosan과 Mer/Fc를 함께 투여한 경우에 LXRα 및 LXRβ의 발현이 역시 감소되었다.

[0055] 또한 제조예에서 희생시킨 마우스에서 복막 대식세포를 분리하였다. 분리된 세포의 균등액(homogenates)에서, 항-LXRα 항체(Abcam, Cambridge, UK), 항-LXRβ 항체 (Santa Cruz Biotechnology), 항-ABCA1 항체(Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), 항-ABCG1 항체(Santa Cruz Biotechnology), 항-ApoE 항체(Abcam)를 프로브로 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0056] 도 17은 Mer/Fc 투여가 복막 대식세포에서 LXRα 및 LXRβ의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 도 17의 상단은 웨스턴 블롯 결과이고, 도 17의 하단은 상기 결과를 tubulin으로 정규화하여 나타낸 그래프이다. 도 17에서 복막 대식세포에서도 비장 및 폐에서와 마찬가지로 zymosan 투여에 의해 LXRα 및 LXRβ의 발현이 감소되고, 이러한 감소는 Mer/Fc 투여시 더욱 두드러졌다. 24시간 후에 관찰했을 때에는 6시간 후에 관찰했을 때와 달리 LXRα 및 LXRβ의 발현 감소 효과가 거의 사라지고, zymosan과 Mer/Fc를 함께 투여한 경우에 LXRα 및 LXRβ의 발현이 역시 감소되었다.

[0057] 상기 결과로부터 정상적인 상태에서는 염증반응이 유발된 직후 LXR의 발현이 급격히 억제되었다가 시간이 경과하면서 회복되나, Mer 수용체 억제제가 LXR의 발현을 더욱 억제함을 알 수 있다.

[0058] Mer 수용체 억제제가 LXRα와 LXRβ의 활동도에 미치는 영향을 확인하기 위해 LXRα와 LXRβ의 타겟 유전자인 ABCA1 및 ApoE의 발현을 확인하였다.

[0059] 도 12는 Mer/Fc 투여가 비장에서 ABCA1의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 도 12의 상단의 웨스턴 블롯 결과 중 위쪽의 도에서, zymosan 투여 6시간 후에 ABCA1의 발현이 감소하였으며, 24시간 후에는 saline 대조군과 비교시 현저히 증가하였다. Mer/Fc를 함께 투여한 경우 6시간, 24시간 경과후 ABCA1 발현이 zymosan 투여군과 비교시 감소되었다. 이러한 효과는 6시간 경과 후에 미약하게 나타났으며, 24시간 경과 후에는 더욱 두드러지게 나타났다.

[0060] 도 12의 하단은 상단의 웨스턴 블롯 결과를 tubulin으로 정규화하여 나타낸 그래프이다. 막대들은 좌측부터 각각 saline, zymosan, zymosan과 Mer/Fc를 함께 투여한 경우, zymosan과 Met/Fc를 함께 투여한 경우를 의미한다. 이 경우에도 도 12의 상단의 웨스턴 블롯에서와 마찬가지의 효과를 확인할 수 있었다.

[0061] 도 13은 Mer/Fc 투여가 폐에서 ABCA1의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 도 13의 상단의 웨스턴 블롯 결과 중 위쪽의 도에서, zymosan 투여 6시간 후에 ABCA1의 발현이 감소하였으며, 24시간 후에는 saline 대조군과 비교시 현저히 증가하였다. Mer/Fc를 함께 투여한 경우 6시간, 24시간 경과후 ABCA1 발현이 zymosna 투여군과 비교시 감소되었다. 이러한 효과는 6시간 경과 후에 미약하게 나타났으며, 24시간 경과 후에는 더욱 두드러지게 나타났다.

[0062] 도 13의 하단은 상단의 웨스턴 블롯 결과를 tubulin으로 정규화하여 나타낸 그래프이다. 막대들은 좌측부터 각각 saline, zymosan, zymosan과 Mer/Fc를 함께 투여한 경우, zymosan과 Met/Fc를 함께 투여한 경우를 의미한다. 이 경우에도 도 13의 상단의 웨스턴 블롯에서와 마찬가지의 효과를 확인할 수 있었다.

[0063] 도 14는 Mer/Fc 투여가 비장에서 ApoE에 미치는 영향을 나타낸 것이다. zymosan 투여 6시간 후에 관찰했을 때는 ApoE의 발현이 조금 감소하였으나, 24시간 후에 관찰했을 때는 zymosan을 투여한 경우 ApoE가 증가했으며, 이러한 효과는 Mer/Fc 투여에 의해 일부 상쇄되었다.

[0064] 도 15는 Mer/Fc 투여가 폐에서 ApoE의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것이다. zymosan 투여 6시간 후에 관찰했을 때는 ApoE의 발현이 조금 감소하였으나, 24시간 후에 관찰했을 때는 zymosan을 투여한 경우 ApoE 발현이 현저히 증가했으며, 이러한 효과는 Mer/Fc 투여에 의해 일부 상쇄되었다.

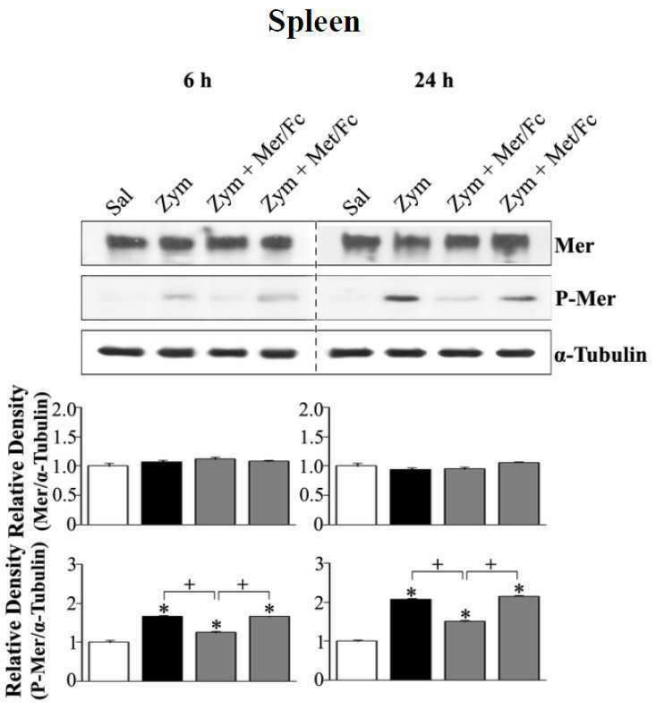
[0065] 또한 복막 대식세포에서 Mer 수용체 억제제가 LXRα와 LXRβ의 활동도에 미치는 영향을 확인하기 위해 LXRα와 LXRβ의 타겟 유전자인 ABCA1, ABCG1 및 ApoE의 발현을 확인하였다. 결과는 도 18에 나타내었다. 도 18에서, ABCA1의 발현은 zymosan 투여 6시간 후에 조금 감소하였으나 24시간 후에 관찰했을 경우에는 현저히 증가하였으며, 이러한 효과는 Mer/Fc 투여에 의해 대부분 상쇄되었다. 또한 ABCG1의 발현은 zymosan 투여 6시간 후에는 별다른 차이를 보이지 않았으나 24시간 후에는 크게 증가하였으며, 이러한 효과는 Mer/Fc 투여에 의해 대부분 상쇄되었다. 또한 ApoE의 발현은 zymosan 투여 6시간 후에 조금 감소하였으나 24시간 후에 관찰했을 경우에는 현

저히 증가하였으며, 이러한 효과는 Mer/Fc 투여에 의해 대부분 상쇄되었다.

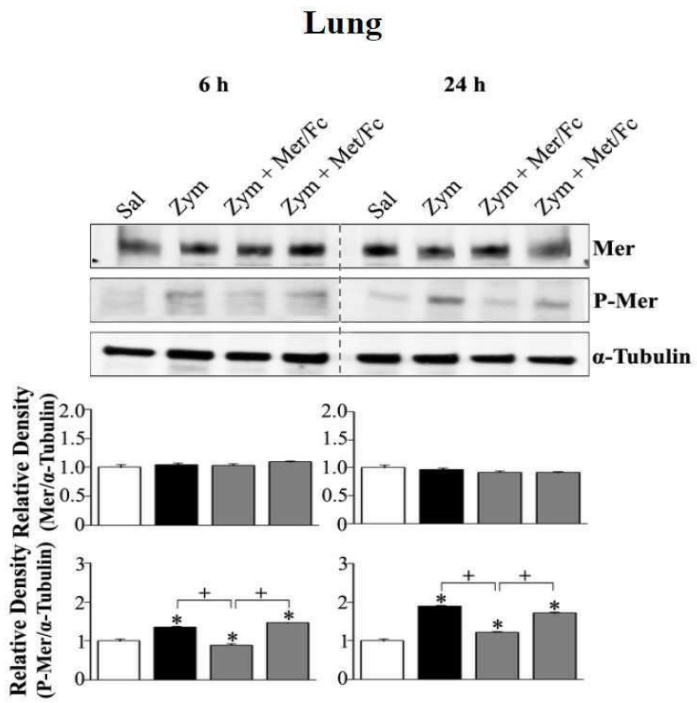
[0066] 상기 결과로부터 정상적으로는 염증반응이 유발되면 LXR 활동도가 감소되었다가 시간이 경과하면서 증가되나, Mer 수용체 억제제가 LXR의 활동도 증가를 억제함을 알 수 있다.

도면

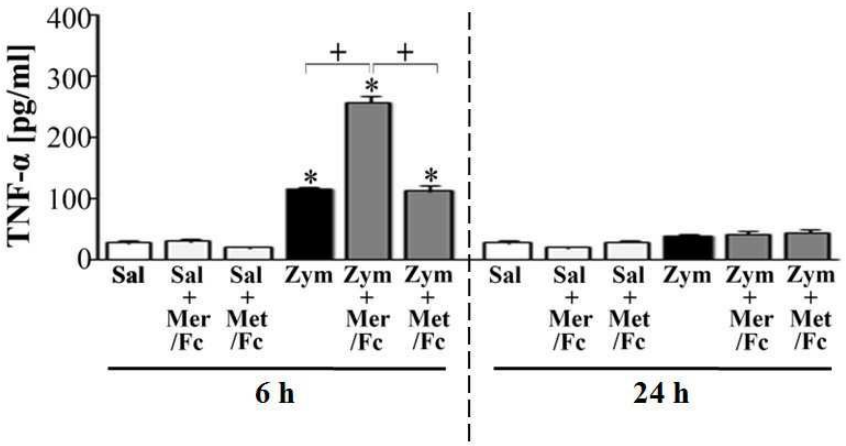
도면1



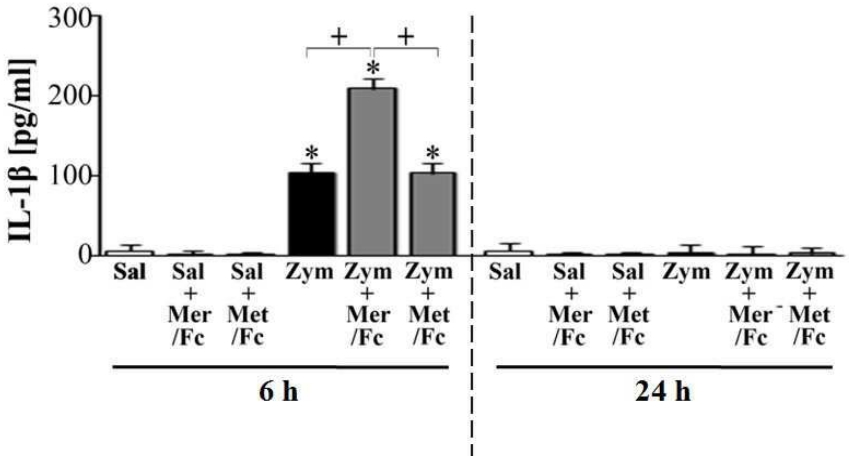
도면2


Lung
6 h
24 h
Sal
Zym
Zym + Mer/Fc
Zym + Met/Fc
Mer
P-Mer
α-Tubulin
Relative Density (Mer/α-Tubulin)
Relative Density (P-Mer/α-Tubulin)

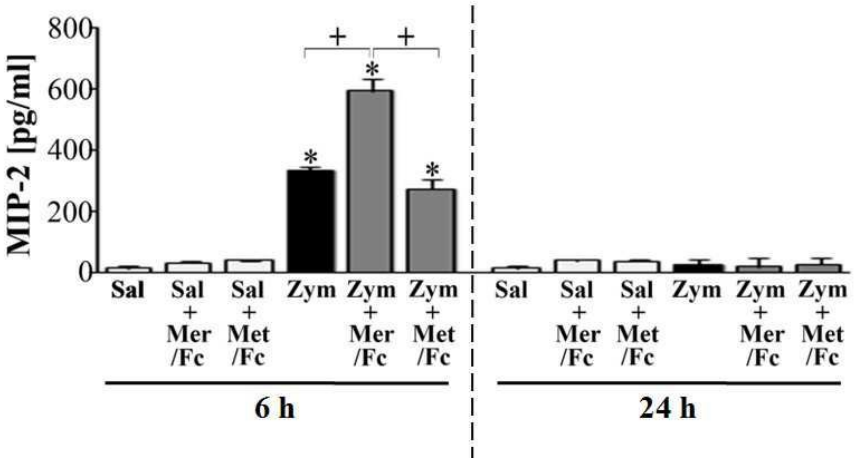
도면3


TNF-α [pg/ml]
400
300
200
100
0
Sal
Sal + Mer /Fc
Sal + Met /Fc
Zym
Zym + Mer /Fc
Zym + Met /Fc
6 h
24 h

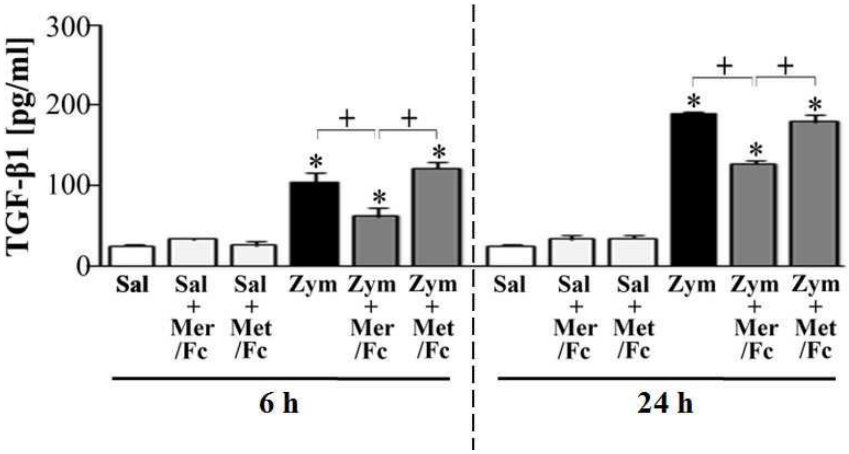
도면4


IL-1β [pg/ml]
300
200
100
0
Sal
Sal + Mer /Fc
Sal + Met /Fc
Zym
Zym + Mer /Fc
Zym + Met /Fc
6 h
24 h

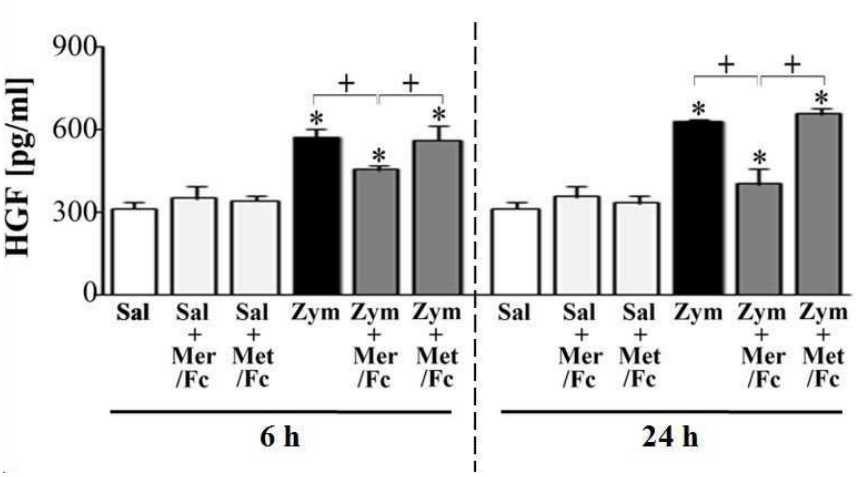
도면5


MIP-2 [pg/ml]
800
600
400
200
0
Sal
Sal + Mer /Fc
Sal + Met /Fc
Zym
Zym + Mer /Fc
Zym + Met /Fc
6 h
24 h

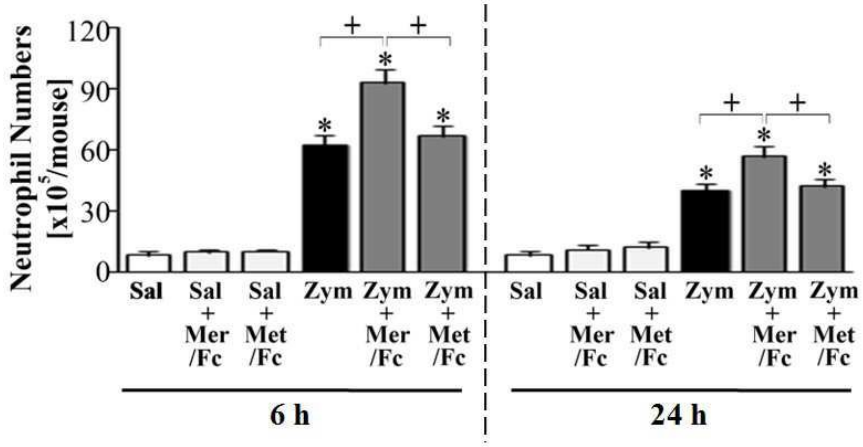
도면6


TGF-β1 [pg/ml]
300
200
100
0
Sal
Sal + Mer /Fc
Sal + Met /Fc
Zym
Zym + Mer /Fc
Zym + Met /Fc
6 h
24 h

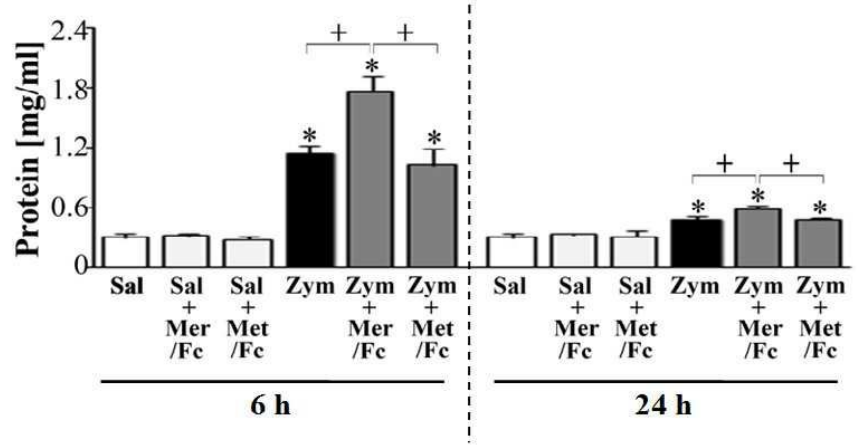
도면7


HGF [pg/ml]
900
600
300
0
Sal
Sal + Mer /Fc
Sal + Met /Fc
Zym
Zym + Mer /Fc
Zym + Met /Fc
6 h
24 h

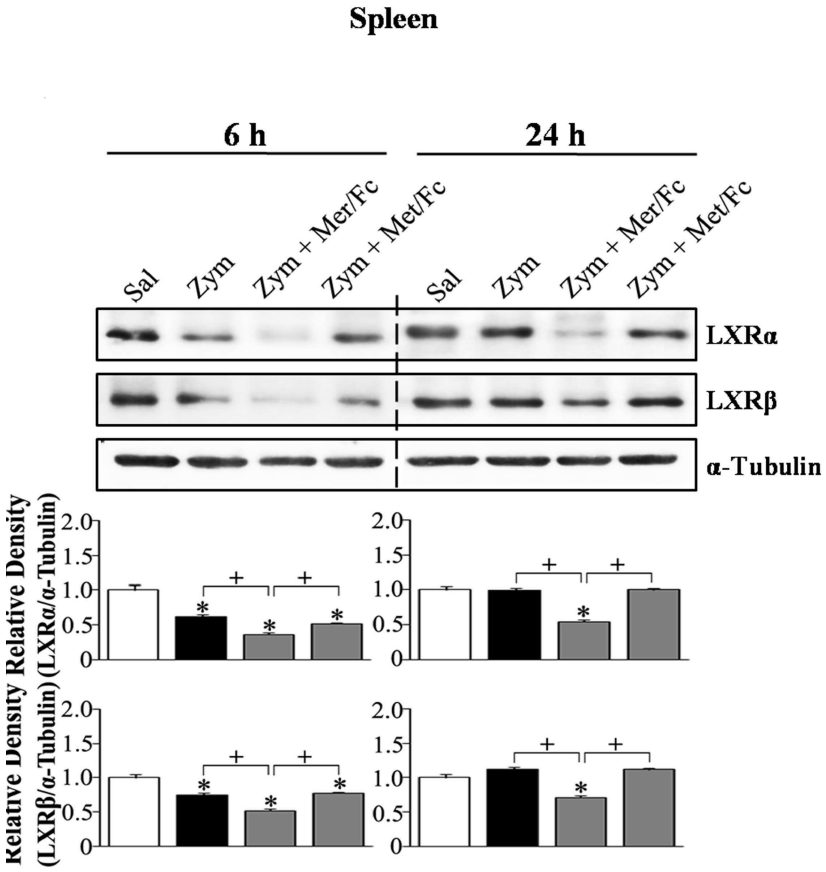
도면8


Neutrophil Numbers [x10^5/mouse]
120
90
60
30
0
Sal
Sal + Mer /Fc
Sal + Met /Fc
Zym
Zym + Mer /Fc
Zym + Met /Fc
6 h
24 h

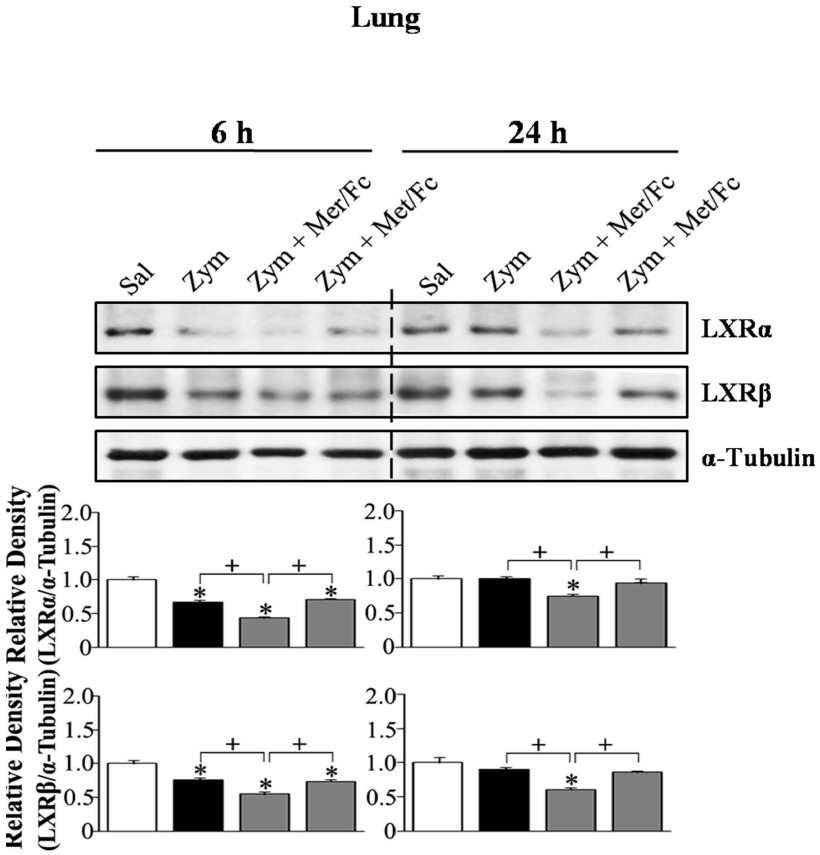
도면9


Protein [mg/ml]
2.4
1.8
1.2
0.6
0
Sal
Sal + Mer /Fc
Sal + Met /Fc
Zym
Zym + Mer /Fc
Zym + Met /Fc
6 h
24 h

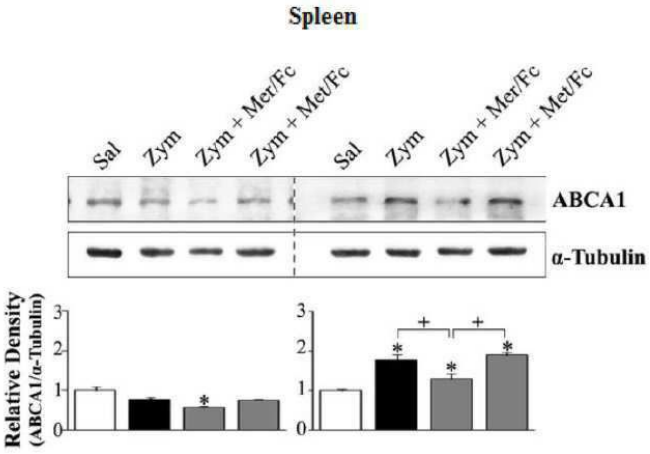
도면10


Spleen
6 h
24 h
Sal
Zym
Zym + Mer/Fc
Zym + Met/Fc
LXRα
LXRβ
α-Tubulin
Relative Density (LXRα/α-Tubulin)
Relative Density (LXRβ/α-Tubulin)
2.0
1.5
1.0
0.5
0
+
*

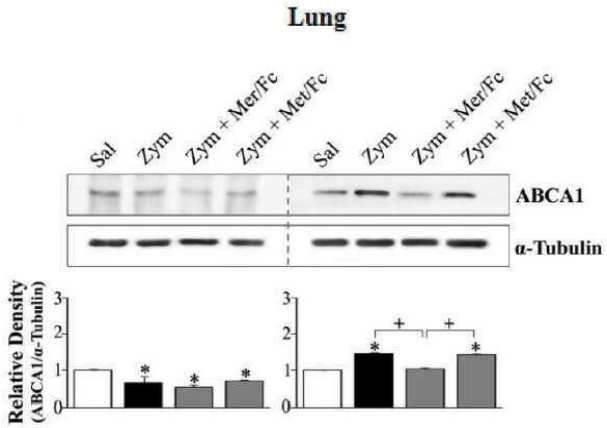
도면11


Lung
6 h
24 h
Sal
Zym
Zym + Mer/Fc
Zym + Met/Fc
LXRα
LXRβ
α-Tubulin
Relative Density
(LXRβ/α-Tubulin) (LXRα/α-Tubulin)

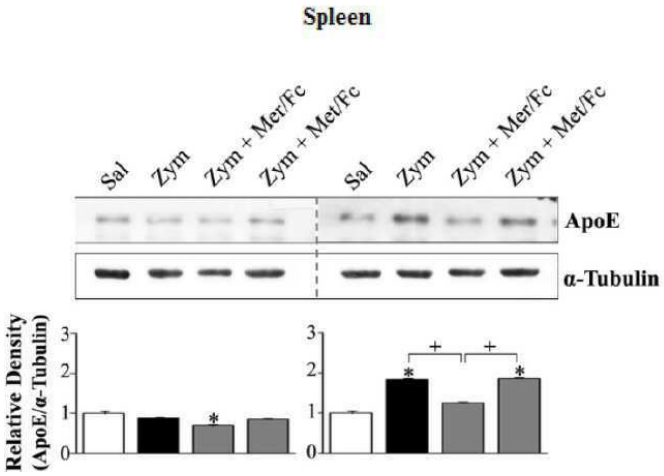
도면12


Spleen
Sal
Zym
Zym + Mer/Fc
Zym + Met/Fc
ABCA1
α-Tubulin
Relative Density
(ABCA1/α-Tubulin)

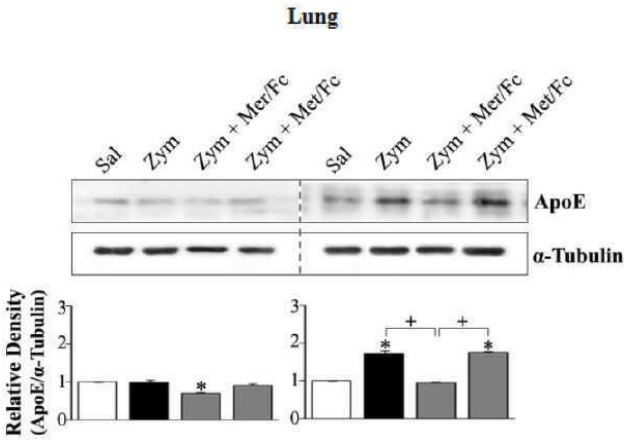
도면13



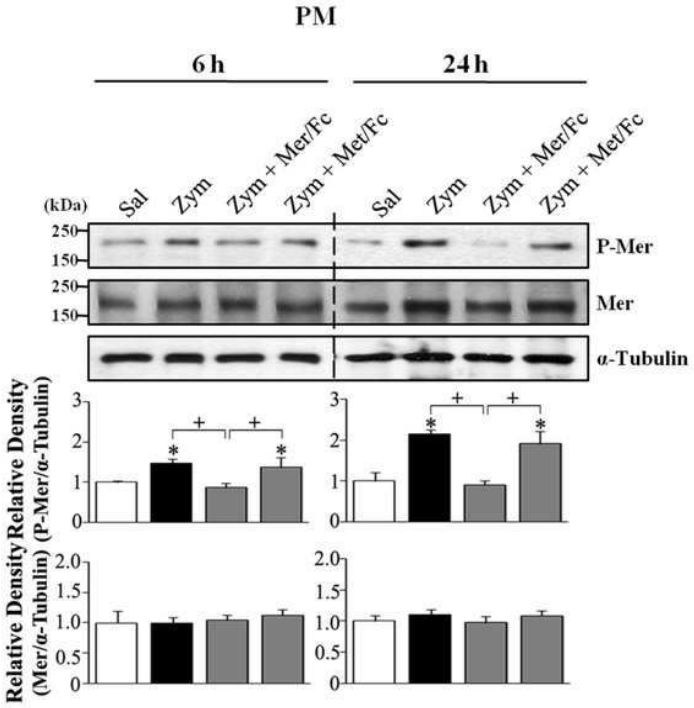
도면14



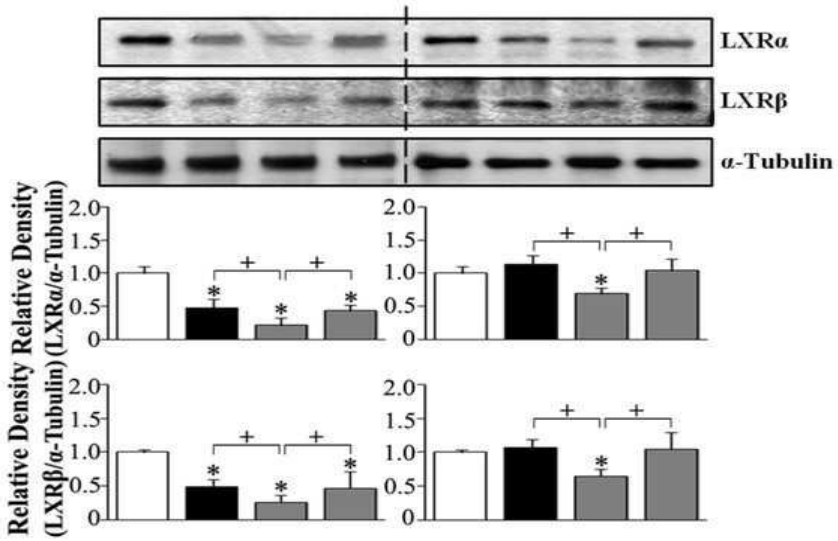
도면15



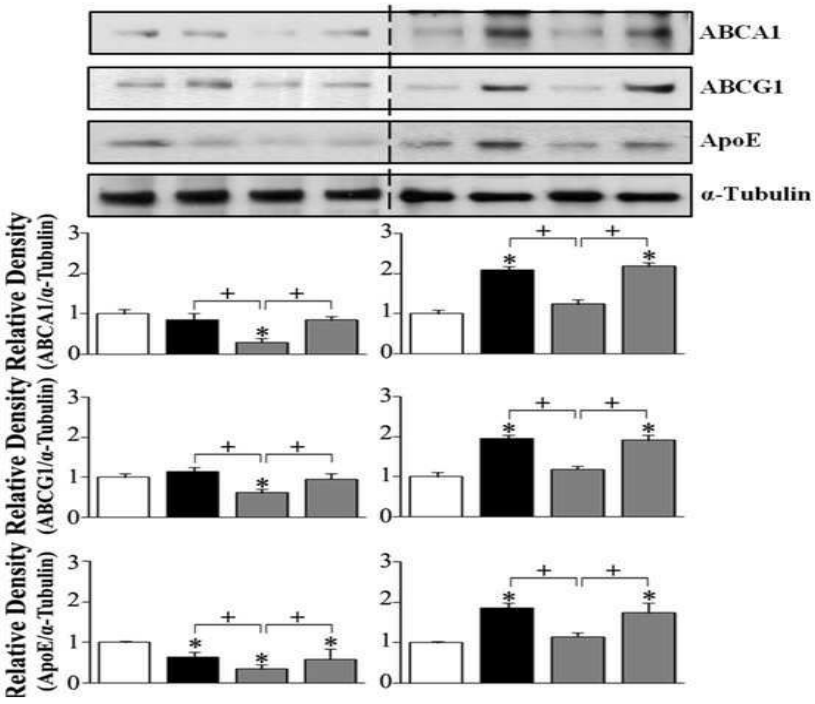
도면16


PM
6 h
24 h
(kDa)
Sal
Zym
Zym + Mer/Fc
Zym + Met/Fc
Sal
Zym
Zym + Mer/Fc
Zym + Met/Fc
250
150
P-Mer
250
150
Mer
α-Tubulin
Relative Density (P-Mer/α-Tubulin)
Relative Density (Mer/α-Tubulin)

도면17


LXRα
LXRβ
α-Tubulin
Relative Density (LXRα/α-Tubulin)
Relative Density (LXRβ/α-Tubulin)

도면18


ABCA1
ABCG1
ApoE
α-Tubulin
Relative Density (ApoE/α-Tubulin)
Relative Density (ABCG1/α-Tubulin)
Relative Density (ABCA1/α-Tubulin)