(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월23일
(11) 등록번호 10-2343212
(24) 등록일자 2021년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 38/12* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 38/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7030431
(22) 출원일자(국제) 2014년03월27일
심사청구일자 2019년03월25일
(85) 번역문제출일자 2015년10월21일
(65) 공개번호 10-2015-0134393
(43) 공개일자 2015년12월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/032054
(87) 국제공개번호 WO 2014/160883
국제공개일자 2014년10월02일
(30) 우선권주장
61/805,806 2013년03월27일 미국(US)
61/872,020 2013년08월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Am J Pathol 제180권 636-649면 (2012)*
GASTROENTEROLOGY 제135권, 552-567면 (2008)*
PLoS 제6권, 제1호, e16090 1-16면 (2011)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
세다르스-신나이 메디칼 센터
미합중국 씨에이 90048-1865 로스엔젤레스 8700베버리 불레매드
(72) 발명자
시 데이비드 큐.
미국 캘리포니아 91214 라 크레센타 스카이 뷰 래인 3816
타간 스티븐 알.
미국 캘리포니아 90402 산타 모니카 22nd 스트리트 240
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

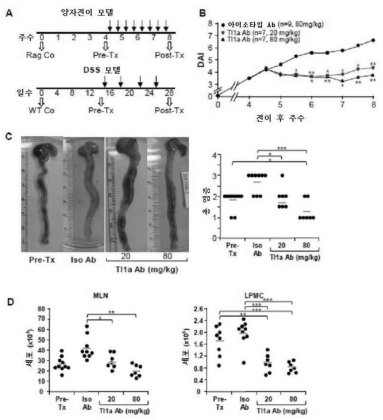
전체 청구항 수 : 총 36 항 심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **TL1A 기능 및 관련된 신호전달 경로의 저해에 의한 섬유증 및 염증의 완화 및 반전**

(57) 요 약

본 발명은 섬유증 및 염증성 장질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 본 발명은 개체에게 치료적으로 유효한 투약량의 TL1A 저해제 및/또는 DR3 저해제를 투여함으로써 장 염증을 치료한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 TL1A-DR3 신호전달 기능을 저해함으로써 개체에서 조직 섬유증을 반전시키는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/53 (2018.05)
C12Q 2600/156 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/065 (2013.01)
(72) 발명자
리 달린
미국 캘리포니아 91789 월넛 카멜백 드라이브 20550
빌스보러 자닌
미국 캘리포니아 93065 시미 밸리 펠번 코트 390

명 세 서

청구범위

청구항 1

인터류킨 31 수용체 A(*IL31RA*)를 포함하는 유전자로부터 발현된 유전자 발현 생성물의 고 수준의 존재를 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 장 질환을 갖는 대상체에서 장 섬유증을 치료하기 위한, TL1A 차단 항체를 포함하는 조성물로서, 상기 유전자 발현 생성물의 고 수준은 정상 개체에서 유전자 발현 생성물의 수준과 비교된 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 1종 이상의 DR3 차단 항체를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 TL1A에 대한 직접 결합에 의해 TL1A 기능을 저해하는데 효과적인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 IL31 항체를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 장 섬유증을 염증 전 수준으로 반전시키는데 효과적인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 장 섬유증은 결장 섬유증인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 장 염증을 저해하는데 효과적인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 섬유아세포 또는 근섬유아세포의 수를 감소시키는데 효과적인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 1차 장 근섬유아세포의 수를 감소시키는데 효과적인 조성물.

청구항 10

분석시 정상 개체에 비하여 대상체로부터 얻은 샘플에서 고 수준의 인터류킨 31 수용체 A(*IL31RA*)가 검출되는 것에 기반하여, *IL31RA*의 고 수준을 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 장 질환을 갖는 대상체에서 장 섬유증을 치료하기 위한, TL1A 차단 항체를 포함하는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 장 섬유증은 소장 및 대장 섬유협착증을 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 섬유아세포 또는 근섬유아세포의 수를 감소시키거나, 대상체에서 장 염증을 저해하거나, 대상체에서 1차 장 근섬유아세포의 수를 감소시키거나, 또는 대상체에서 장 섬유

증을 반전시키는데 효과적인 조성물.

청구항 13

대상체에서 크론병(CD), 염증성 장 질환(IBD), 소장에서의 협착, 장 염증, 장 섬유협착증, 또는 장 섬유증에 대한 감수성의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

대상체로부터의 샘플을 분석함으로써, 정상 개체에 비하여 인터류킨 31 수용체 A(*IL31RA*)를 포함하는 유전자로부터 발현된 유전자 발현 생성물의 고 수준의 존재 또는 부재를 결정하는 단계; 및

정상 개체에 비하여 *IL31RA* 발현의 고 수준의 존재가 결정된 것에 기반하여 CD, IBD, 소장에서의 협착, 장 염증, 장 섬유협착증, 또는 장 섬유증에 대한 감수성의 진단을 위한 정보를 제공하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 장 섬유증은 소장 및 대장 섬유협착증을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

인터류킨 31 수용체 A(*IL31RA*)를 포함하는 유전자로부터 발현된 유전자 발현 생성물의 고 수준의 존재를 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 장 질환을 갖는 대상체에서 장 섬유증을 반전시키기 위한, TL1A 차단 항체를 포함하는 조성물로서, 상기 유전자 발현 생성물의 고 수준은 정상 개체에서 유전자 발현 생성물의 수준과 비교된 것인 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 장 섬유증은 소장 및 대장 섬유협착증을 포함하는 것인 조성물.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 대상체는 인간인 조성물.

청구항 18

인터류킨 31 수용체 A(*IL31RA*)를 포함하는 유전자로부터 발현된 유전자 발현 생성물의 고 수준의 존재를 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 장 질환을 갖는 대상체에서 장 섬유증을 치료하기 위한, TL1A 차단 항체 및 길항물질 항-DR3 항체를 포함하는 조성물로서, 상기 유전자 발현 생성물의 고 수준은 정상 개체에서의 유전자 발현 생성물의 수준과 비교된 것인 조성물.

청구항 19

정상 개체에 비하여 대상체로부터 얻은 샘플에서 고 수준의 인터류킨 31 수용체 A(*IL31RA*)가 검출되는 것에 기반하여, *IL31RA*의 고 수준을 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 장 질환을 갖는 대상체에서 장 섬유증을 반전시키기 위한, TL1A 차단 항체를 포함하는 조성물.

청구항 20

인터류킨 31 수용체 A(*IL31RA*)를 포함하는 유전자로부터 발현된 유전자 발현 생성물의 고 수준의 존재를 갖는 것을 특징으로 하는 염증성 장 질환을 갖는 대상체에서 장 섬유증 염증을 반전시키기 위한, TL1A 차단 항체 및 길항물질 항-DR3 항체를 포함하는 조성물로서, 상기 유전자 발현 생성물의 고 수준은 정상 개체에서 유전자 발현 생성물의 수준과 비교된 것인 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체 또는 길항물질 항-DR3 항체는 TL1A-DR3 신호전달 기능을 저해하는데 효과적인 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 유전자 발현 생성물은 *IL31RA*의 RNA를 포함하는 것인 조성물.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 유전자 발현 생성물은 *IL31RA*에 의해 코딩된 단백질을 포함하는 것인 조성물.

청구항 24

제10항에 있어서, 상기 *IL31RA*는 *IL31RA*의 RNA를 포함하는 것인 조성물.

청구항 25

제10항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 장 염증 또는 장 섬유증을 반전시키는데 효과적인 조성물.

청구항 26

제13항에 있어서, 상기 정보는 대상체가 장 섬유증을 발병할 위험을 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제13항에 있어서, 상기 정보는 장 섬유증을 발병하는 대상체의 감수성을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제13항에 있어서, 상기 대상체로부터의 샘플은 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA)에 의해 분석되는 것인 방법.

청구항 29

제13항에 있어서, 상기 대상체로부터의 샘플은 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 분석되는 것인 방법.

청구항 30

제15항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 장 염증을 반전시키는데 효과적인 조성물.

청구항 31

제15항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 섬유아세포 또는 근섬유아세포의 수를 감소시키는데 효과적인 조성물.

청구항 32

제15항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 1차 장 근섬유아세포의 수를 감소시키는데 효과적인 조성물.

청구항 33

제19항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 장 염증을 반전시키는데 효과적인 조성물.

청구항 34

제19항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 섬유아세포 또는 근섬유아세포의 수를 감소시키는데 효과적인 조성물.

청구항 35

제19항에 있어서, 상기 TL1A 차단 항체는 대상체에서 1차 장 근섬유아세포의 수를 감소시키는데 효과적인 조성물.

청구항 36

제13항의 대상체의 치료를 위한, TL1A 차단 항체를 포함하는 조성물로서, 단 정상 개체에 비하여 대상체로부터의 샘플에서 *IL31RA* 발현의 고 수준의 존재가 결정되는 것인 조성물.

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TL1A 기능 및 섬유증과 관련된 병태의 치료 및 진단을 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 본 명세서의 모든 간행물은 각각 개개의 공개 또는 특허 출원이 참고로서 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시되는 것과 동일한 정도로 참고로서 포함된다. 다음의 설명은 본 발명을 이해하는데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 본 명세서에 제공된 임의의 정보가 선행기술이거나 또는 현재 청구된 발명에 적절하다거나 또는 구체적으로 또는 함축적으로 언급된 임의의 간행물이 선행기술이라는 용인이 아니다.

[0003] 크론병(Crohn's disease: CD)은 병리학적 특징, 예컨대 고르지 않은 전층성 염증 및 섬유 협착증(fibrostenosis)을 지니는 만성 염증성 병태이다. 강력한 항염증적 요법에도 불구하고, 20%까지의 CD 환자는 여전히 수술적 개입을 필요로 하는 구조적 합병증이 생긴다. 섬유증을 조절하는 경로는 염증을 매개하는 것과 별개일 수 있다. TNF 슈퍼패밀리의 구성원인 TL1A는 사멸 도메인 수용체 3(domain receptor 3: DR3)에 결합하고 적응 면역 반응을 조절한다. TL1A는 CD, 장 섬유흡착증 및 수술에 대한 더 큰 필요와 관련될 수 있다. TL1A/DR3 신호전달 경로와 관련된 질환, CD뿐만 아니라 확립된 섬유증의 반전을 위한 치료를 포함하는 관련된 합병증의 치료를 위한 신규하고 효과적인 치료에 대한 필요가 있다.

발명의 내용

[0004] 본 명세서의 다양한 실시형태는 TL1A 기능의 1종 이상의 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계 및 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 섬유증을 치료하는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 TL1A 차단 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 Dr3 차단 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 TL1A에 직접 결합함으로써 TL1A 기능을 저해하는 1종 이상의 화합물을 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 Ifn감마, IL17, Ctgf 및 IL31Ra의 1종 이상의 저해제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 Tgf베타1 및 Igf1의 1종 이상의 저해제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 IL31 신호전달의 1종 이상의 저해제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계는 섬유증의 염증전 수준으로의 반전을 야기한다. 다른 실시형태에서, 섬

유증은 결장 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계는 추가로 대상체에서 장 염증의 저해를 초래한다.

[0005] 다른 실시형태는 IL31Ra 신호전달의 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 및 대상체에게 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, 질환은 TL1A 관련 질환이다. 다른 실시형태에서, 질환은 염증성 장 질환(Inflammatory Bowel Disease: IBD)이다. 다른 실시형태에서, 질환은 소장 및/또는 장 염증에서 발생된 협착과 관련된다. 다른 실시형태에서, 질환은 소장 및 대장 섬유 협착증이다. 다른 실시형태에서, 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 TL1A 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 IL31RA, IFN감마, IL17, Ctgf, TgfB1 및/또는 Igf1 신호전달 중 1종 이상의 저해제를 포함한다.

[0006] 다른 실시형태는 대상체로부터 샘플을 얻는 단계, 정상 개체에 비해 고수준의 IL31Ra 발현의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 샘플을 분석하는 단계 및 정상 개체에 비해 고수준의 IL31 발현의 존재에 기반한 TL1A 관련 질환에 대한 감수성을 진단하는 단계를 포함하는, 대상체에서 TL1A 관련 질환에 대한 감수성을 진단하는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 염증성 장 질환(IBD)이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및/또는 장 염증에서 발생된 협착과 관련된다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및 대장 섬유 협착증이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 IL31RA, IFN감마, IL17, Ctgf, TgfB1 및/또는 Igf1의 정상 개체에 비해 고수준의 발현의 존재를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0007] 다양한 실시형태는 대상체로부터 샘플을 얻는 단계, TL1A 관련 질환과 관련된 1종 이상의 위험 변이체 및/또는 마커의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 샘플을 분석하는 단계 및 TL1A 관련 질환과 관련된 1종 이상의 위험 변이체 및/또는 마커의 존재에 기반하여 TL1A 관련 질환을 진단하는 단계를 포함하는, 대상체에서 TL1A 관련 질환을 진단하는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, 1종 이상의 위험 변이체 및/또는 마커는 고발현의 IL31RA를 포함한다. 다른 실시형태는 고발현의 IFN감마, IL17, Ctgf, TgfB1 및/또는 Igf1을 포함하는 1종 이상의 위험 변이체 및/또는 마커를 포함한다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 염증성 장 질환(IBD)이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및/또는 장 염증에서 발생된 협착과 관련된다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및 대장 섬유 협착증이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 1종 이상의 TL1A 저해제를 투여함으로써 TL1A 관련 질환을 치료하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 TL1A 저해제를 투여함으로써 TL1A 관련 질환을 치료하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 Dr3 저해제를 투여함으로써 TL1A 관련 질환을 치료하는 단계를 추가로 포함한다.

[0008] 다른 실시형태는 TL1A 저해제 및 DR3 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계 및 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 섬유증을 치료하는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, TL1A 저해제는 TL1A 항체이다.

[0009] 다른 실시형태는 TL1A 저해제 및 DR3 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계 및 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 섬유증을 반전시키는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 IFN감마, IL17, Ctgf 및/또는 IL31RA 신호전달 기능의 저해제를 추가로 포함한다.

[0010] 다양한 실시형태는 TL1A 저해제 및/또는 DR3 저해제를 포함하는 조성물, 및 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 염증을 치료하는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 IFN감마, IL17, Ctgf 및/또는 IL31RA 신호전달 기능의 저해제를 추가로 포함한다.

[0011] 다른 실시형태는 Ifnɣ 및 Il-17 발현을 저해시키는 단계, Tgfβ 신호전달을 하향조절하는 단계, 및/또는 섬유아세포/근섬유아세포를 감소시키는 단계, 및 대상체를 치료하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, 질환은 염증성 장질환이다. 다른 실시형태에서, 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 질환은 장 염증이다. 다른 실시형태에서, 질환은 염증성 장질환과 관련된 합병증이다.

[0012] 다른 실시형태는 TL1A, DR3 및 IL31RA 신호전달 기능의 1종 이상의 저해제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 포함한다. 다른 실시형태에서, 1종 이상의 TL1A 저해제는 TL1A 항체이다. 다른 실시형태에서, 1종 이상의 DR3 저해제는 DR3 항체이다.

[0013] 본 명세서의 다양한 실시형태는 TL1A, DR3 및 IL31RA 신호전달 기능의 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 및 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, IBD와 관련된 합병증을 치

료하는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 대상체에게 정맥내로 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 예시적인 실시형태는 언급된 도면에서 도시된다. 본 명세서에 개시된 실시형태 및 도면은 제한이라기보다는 예시적인 것으로 고려되는 것으로 의도된다.

도 1은 본 명세서의 실시형태에 따라, Tl1a Ab가 결장 질환 특징을 감소시켰음을 도시한 도면. (A) 양자전이(adoptive transfer) 모델에 대한 Tl1a Ab 치료 도식; 기준 Rag-/- 대조군 마우스(Rag Co), 기준 야생형 대조군 마우스(WT Co), 처리 전 그룹(Pre-Tx), 아이소형 항체 그룹(Iso Ab), 처리 후 그룹(Post-Tx). (B) DAI를 Iso와 Tl1a Ab 처리군 간에 비교한다. (C) 정량적 염증 스코어(우측 패널)를 지니는 결장(좌측 패널)의 대표적인 전체 외관을 나타낸다. 데이터를 평균 ± SD로서 표현한다. (D) 단핵 세포의 총 수를 MLN 및 LPMC로부터 단리시켰다. 각각의 속이 찬 원은 독립적 마우스를 나타낸다. Tl1a Ab 처리군을 Pre-Tx 및 Iso Ab 그룹과 비교한다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 2는 본 명세서의 실시형태에 따라, Tl1a Ab 처리가 확립된 결장 염증을 반전시켰음을 도시한 도면. (A) 200x 배율에서 대표적인 H&E 염색한 중간-결장 부문. (B) 양자전이 모델에 대한 정량적 조직학 스코어. 적어도 20개의 독립적 장을 스코어링하고, 데이터를 평균 ± SD로서 표현한다. (C) 미엘로퍼옥시다제 활성을 측정하고, 결장 단백질 추출물의 그램(g) 당 활성 단위(u)로서 표현한다. 각각의 속이 찬 원은 독립적 마우스를 나타낸다. Tl1a Ab 처리군을 기준 Rag Co, Pre-Tx 및 Iso Ab 실험군과 비교한다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 3은 본 명세서의 실시형태에 따라, Tl1a Ab가 Th-1 및 -17 면역 반응을 감소시켰음을 도시한 도면. (A) 세포내 Ifnγ 및 Il17 발현에 대해 염색한 개폐 CD4+ 세포의 대표적인 유세포 플롯을 MLN(상부 패널) 및 LPMC(하부 패널)에 대해 나타낸다. CD4+Il17+, CD4+Ifnγ+ 및 CD4+Il17+Ifnγ+ T-세포의 백분율을 MLN (B) 및 LPMC (C)에 대해 정량화하였다. MLN 및 LPMC로부터 단리시킨 단핵 세포를 항-CD3 및 항-CD28로 자극하였고, 분비된 Il17(D) 및 Ifnγ(E)의 수준을 ELISA에 의해 평가하였다. 각각의 채워진 원은 독립적 마우스로부터 얻은 값을 나타낸다. Tl1a Ab 처리군을 Pre-Tx 및 Iso Ab 실험군과 비교한다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 4는 본 명세서의 실시형태에 따른, 양자전이 모델에서 Tl1a Ab 치료를 이용하는 확립된 섬유증의 반전을 도시한 도면. (A) 200x 배율에서 중간-결장 조직 부문에서의 콜라겐 침착의 대표적인 시리우스 레드(Sirius red) 염색. 검정색 화살표는 콜라겐 침착의 두께를 나타낸다. (B) 중간-결장 부문으로부터의 비멘틴(녹색) 및 αSMA(적색)의 대표적인 면역형광 염색을 나타낸다. 오렌지 화살표는 비멘틴과 αSMA를 공동발현시키는 근섬유아세포를 나타낸다. 중간-결장 부문으로부터의 콜라겐 두께의 정량화(C) 및 활성화된 섬유아세포의 백분율(D)을 평균 ± SD로서 나타내고 표현한다. 적어도 20개의 독립적 장을 그룹 당 스코어링하였다. Tl1a Ab 처리군을 기준 Rag Co, Pre-Tx 및 Iso Ab 실험군과 비교한다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 5는 본 명세서의 실시형태에 따라, Dr3 결핍증에 의한 장 섬유아세포의 감소된 증식을 도시한 도면. (A) 마우스 Dr3 내인성 좌위 및 유전자 표적화를 위한 전략의 개략적 표현. (B) 506 bp로 사용되는 표적화된 (Dr3 KO) 밴드 및 353 bp로 사용되는 내인성 Dr3 좌위에 의한 Dr3 유전자형에 대한 대표적인 중합효소 연쇄 반응을 나타낸다. (C) 한배새끼 WT 및 Dr3-/- 결장(좌측 패널)로부터 회수한 장 섬유아세포 및 결장 당 개개의 전체 섬유아세포의 대표적인 6개 사진을 플롯팅한다(우측 패널). (D) WT 및 Dr3-/- 마우스로부터의 증식 섬유아세포(상부 패널) 및 세포자멸사를 겪는 섬유아세포(하부 패널)의 정량화를 나타내는 대표적인 유세포 분석 히스토그램. 감소된 셀트레이스(CellTrace) 보라색 형광 강도는 증식을 나타낸다. 증가된 아넥신 V(Annexin V) 염색은 세포자멸사를 나타낸다. 유사한 결과를 지니는 적어도 6개의 독립적 실험의 대표적인 유세포 분석 히스토그램을 나타낸다. ***p < 0.001.

도 6은 본 명세서의 실시형태에 따라, 장 섬유아세포가 Dr3을 발현시키고, Tl1a 자극에 반응함을 도시한 도면. (A) Dr3 mRNA는 WT에서 검출되지만 Dr3-/- 섬유아세포에서는 검출되지 않는다(상부). ND = 검출되지 않음. WT 섬유아세포의 면역형광 염색은 적색으로 양성 Dr3 염색을 나타내었다(하부). (B) 1차 장 섬유아세포를 Dr3, αSMA 및 비멘틴으로 염색하였다. αSMA 양성 및 음성 섬유아세포를 나타낸 바와 같이 개폐시키고, Dr3 염색은 αSMA+ WT에서 발견되지만, Dr3-/- 및 αSMA 음성 세포에서 발견되지 않는다. 나타낸 데이터는 유사한 결과를 지니는 적어도 3회의 독립적 실험을 대표한다. (C) Tl1a 자극이 증가함에 따른(0 내지 200ng/㎖) WT 1차 장 섬유아세포에서의 Col1a2 및 Il31Ra mRNA의 발현, 평균 ± SD로서 나타냄. (D) WT 및 Dr3-/- 장에서 Tl1a에 의한 Col1a2 및 Il31Ra mRNA의 상대적 유도, 평균 ± SD로서 나타냄. *p < 0.05.

도 7은 본 명세서의 실시형태에 따라, Tl1a Ab가 만성 DSS 투여에 기인하는 염증질환 활성을 감소시킨다는 것을

도시한 도면. (A) DAI는 아이소타입 Ab(n=14)와 Tl1a Ab(n=9) 처리군 간을 비교한다. (B) 정량적 염증 스코어(우측 패널)를 지니는 결장의 대표적인 전체 외관(좌측 패널)을 나타낸다. 데이터를 평균 +/- SD로서 표현한다. (C) 단핵 세포의 총 수를 MLN 및 LP로부터 단리시켰다. 각각의 속이 찬 기호는 독립적 마우스를 나타낸다. Tl1a Ab 처리군을 Pre-Tx 및 Iso Ab 그룹과 비교한다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

도 8은 본 명세서의 실시형태에 따라, Tl1a Ab가 만성 DSS 모델에서 확립되 결장 염증을 반전시켰음을 도시한 도면. (A) 200x 배율로 대표적인 H&E 염색된 중간-결장 부문을 나타낸다. (B) 적어도 20개의 독립적 중간-결장 장으로부터의 조직학적 염증의 정량화를 스코어링하고, 데이터를 평균 +/- SD로서 표현한다. (C) 미엘로퍼옥시다제 활성을 측정하고, 결장 단백질 추출물의 그램(g) 당 활성 단위(u)로서 표현한다. Tl1a Ab 처리군을 기준 WT Co, Pre-Tx 및 Iso Ab 실험군과 비교한다. 각각의 속이 찬 원은 독립적 결장으로부터의 MPO 활성을 나타낸다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

도 9는 본 명세서의 실시형태에 따라, Tl1a Ab가 만성 DSS 대장염 모델에서 Th-1 및 -17 면역 반응을 감소시켰음을 도시한 도면. (A) 세포내 Ifnɣ 및 Il-17에 대해 염색한 (상부 패널) 및 LPMC(하부 패널)로부터의 개폐 CD4+ 세포의 대표적인 유세포 분석 플롯. CD4+Il17+, CD4+Ifnɣ+ 및 CD4+Il17+Ifnɣ+ T-세포의 백분율을 MLN (B) 및 LPMC (C)에 대해 정량화하였다. MLN 및 LPMC로부터 단리시킨 단핵 세포를 항-CD3ε 및 항-CD28로 자극하고, 분비된 Il17 (D) 및 Ifnɣ (E)의 수준을 ELISA에 의해 평가하였다. 각각의 속이 찬 원은 독립적 마우스로부터 얻은 값을 나타낸다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 10은 본 명세서의 실시형태에 따라, 만성 DSS 대장염 모델에서 Tl1a Ab를 이용한 확립된 섬유증의 반전을 도시한 도면. (A) 200x 배율에서 중간-결장 조직 부문 내 콜라겐 침착의 대표적인 시리우스 레드 염색을 나타낸다. 검정색 화살표는 콜라겐 침착의 두께를 나타낸다. (B) 중간-결장 부문으로부터의 비멘틴(녹색) 및 αSMA(적색)의 대표적인 면역형광 염색을 나타낸다. 오렌지색 화살표는 비멘틴과 αSMA를 공동발현시키는 근섬유아세포를 나탄낸다. 중간-결장 부문으로부터의 콜라겐 두께의 정량화 (C) 및 활성화된 섬유아세포의 백분율 (D)을 나타내고, 평균 ± SD로서 표현한다. 적어도 20개의 독립적 장을 그룹 당 스코어링하였다. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

도 11은 본 명세서의 실시형태에 따라, Tl1a Ab가 Dr3 및 Tl1a의 근섬유아세포 수 및 발현을 감소시켰음을 도시한 도면. 양자전이 모델 (a) 및 만성 DSS 모델 (b)로부터의 중간-결장 부문으로부터 비멘틴(녹색) 및 αSMA(적색)의 대표적인 면역형광 염색을 630x 배율로 나타낸다. 오렌지색 화살표는 비멘틴 및 αSMA를 공동발현시키는 근섬유아세포를 나타낸다. 중간-결장 부문으로부터의 근섬유아세포의 백분율을 정량화하고, 양자전이 모델(a, 우측 패널) 및 만성 DSS 모델(b, 우측 패널)에 대패 평균 ± SD로서 표현한다. 적어도 10개의 독립적 장을 (a) 및 (b)에 대해 그룹 당 스코어링하였다. 중간-결장 부문으로부터의 비멘틴(녹색) 및 Dr3(적색)의 대표적인 면역형광 염색을 양자전이 모델(c) 및 만성 DSS 모델(d)로부터 나타낸다. (c) 및 (d)에 대한 도면 삽입 그림은 200x 배율로 획득한 더 큰 이미지 그림이다. 적어도 8개의 독립적 장을 그룹 당 정량화시키고, 고출력장(high power field: HPF) 당 Dr3+ 세포로서 플롯팅하였다. 결장 Dr3(e) 및 Tl1a(f) mRNA를 정량화시키고, 평균± SD(n=5-14)로서 나타낸다. Tl1a Ab 처리군을 기준 Rag Co, Wt Co, Pre-Tx 및 Iso Ab 실험군과 비교한다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. 구체적으로, 도 11 (c) 및 (d)는 Tl1a Ab 처리군(더 낮은 콜라겐 침착과 괄련됨)에 비해 처리 전 및 아이소타입 항체 그룹(둘 다 더 높은 콜라겐 침착과 관련됨) 내 섬유아세포에 대한 증가된 Dr3 염색을 나타낸다. 추가적으로, 도 11(e) 및 (f)는 RT-PCR 발현에 의해 Tl1a와 Dr3 발현이 둘 다(더 낮은 콜라겐 침착과 관련됨) 아이소타입 그룹에 비해(더 높은 콜라겐 침착과 관련됨) Tl1a Ab 그룹에서 하향조절된다는 것을 나타낸다.

도 12는 본 명세서의 실시형태에 따라, Dr3 결핍증을 지니는 감소된 장 섬유아세포를 도시한 도면. (a) 100x 배율에서 염증의 정량화에 의한 대표적인 H&E 염색 결장을 상부 패널에 나타낸다. HPF 당 섬유아세포의 정량화에 의해 200x 배율에서(삽입그림은 200x 배율에서 더 큰 그림) 대표적인 비멘틴/αSMA 염색 결장을 중간 패널에 나타낸다. 한배새끼 WT 및 Dr3-/- 결장으로부터 회수한 장 섬유아세포 및 결장 당 개개의 전체 섬유아세포의 대표적인 사진을 나타낸다(a, 하부 패널). WT 및 Dr3-/- 마우스로부터의 증식 섬유아세포의 대표적인 유세포 분석 히스토그램 (b) 및 세포자멸사를 겪은 섬유아세포 (c)를 나타낸다. 감소된 셀트레이스 보라색 형광 강도는 증식을 나타낸다. 증가된 아넥신 V 염색은 세포자멸사를 나타낸다. 유사한 결과를 지니는 적어도 6회의 독립적 실험의 대표적인 유세포 분석 히스토그램을 나타낸다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. 구체적으로, 12(a)에 관해, 상부 패널은 야생형과 Dr3KO 결장 사이의 조직학적 염증에서의 차이가 없음을 나타내어 Dr3KO 결장에서 감소된 섬유아세포 수를 야기하는 염증을 겪지 않음을 설명한다. 12(a) 중간은 결장 부문에서 직접 염색에 대한 Dr3 결여 결장에서 비멘틴 양성 세포가 감소됨을 나타내며(도 12a, 중간 패널), 감소된 섬유아세포는 결장으로

부터의 섬유아세포 단리 전에 결장 내에서 이미 존재한다는 것을 나타내는데 중요하다.

도 13은 본 명세서의 실시형태에 따라, 장 섬유아세포가 Dr3을 발현시키고 Tl1a 자극에 반응함을 도시한 도면. (a) 1차 장 섬유아세포를 Dr3, αSMA 및 비멘틴으로 염색하였고, 유세포 분석에 의해 분석하였다. 고, 중간 및 저 αSMA를 발현시키는 섬유아세포를 나타낸 바와 같이 개폐하고, Dr3 염색을 αSMA 고 > 중간 > 저에서 우선적으로 발견한다. 3개의 독립적 실험을 수행하였다. 구체적으로, 도 13(a)는 Dr3 발현과 알파 SMA 발현 사이에 직접적 상관관계가 있다는 것을 나타낸다. 이는 고 알파 SMA 발현(더 활성의 섬유아세포)을 지니는 섬유아세포가 더 높은 (Dr3 발현)을 가지는 것을 나타내는데 중요하며, 이들 더 활성의 섬유아세포는 Tl1a 신호전달에 대해 더 수용적이다. 이 실험을 위해, 본 발명자들은 알파 SMA 상에서 별개로 저, 중간 및 고 발현 근섬유아세포를 개폐하였고, 이어서, 세포 발현 Dr3의 비율을 나타내었다(도 13a). 도면은 Dr3이 αSMA 고 > αSMA 중간 > αSMA 저 섬유아세포에서 발현된다는 것을 도시한다. (b) 데이터는 200x 배율에서 3개의 독립적으로 분류된 αSMA 양성 근섬유아세포를 나타낸다. WT에서 Dr3의 공동 염색이 있었지만, Dr3 결여 αSMA 양성 근섬유아세포에서는 그렇지 않았다. 구체적으로, 도 13(b)는 Tl1a에 대한 수용체인 Dr3이 근섬유아세포에 대해 발현되었음을 직접적으로 나타낸다. 이는 섬유증을 매개하는 근섬유아세포가 Tl1a로부터의 신호전달을 수용할 수 있음을 나타내는데 중요하다. 이 실험을 행하기 위해, 본 발명자들은 항-알파 SMA 및 DR3 항체와 함께 염색한 αSMA 양성 세포에 대해 분류하였다. 이어서, 그들은 Dr3이 αSMA 양성 WT 상에서 발현되지만 면역형광 현미경검사를 이용하는 DR3 KO 근섬유아세포에서는 그렇지 않다는 것을 나타낸다(도 13b). (c) Tl1a 자극(0 내지 200 ng/㎖)을 증가시키고 평균 ± SD로서 나타냄에 따른 WT 1차 장 섬유아세포 내 Col1a2 및 Il31Ra mRNA의 발현을 나타낸다(n=3). (d) WT 및 Dr3-/- 통합에서 Tl1a, Tgfβ/Igf1 및 Tnfα에 의한 Col1a2 및 Il31Ra mRNA의 유도를 나타내고, 평균 ± SD으로서 나타낸다(n=3). *P < 0.05, **P < 0.01. 구체적으로, 도 13(d)는 시험관내 실험을 향상시키기 위한 추가적인 실험을 나타낸다(도 13d). 본 발명자들은 원형 섬유아세포 성장인자로서 Tgfβ 및 Igf1을 사용하였고, WT와 Dr3 결여 1차 장 섬유아세포 사이의 Col1a2 및 Il31Ra 발현의 유도에서 차이가 없음을 나타내었다(도 13d). 그들은 원형의 전염증 자극으로서 Tnfα를 사용하였고, WT와 Dr3 결여 1차 장 섬유아세포를 비교하는 Col1a2 및 Il31Ra의 유도에서 차이가 없음을 나타내었다. 이는 Dr3 결여 1차 장 섬유아세포에 비해 WT에서 Col1a2 및 Il31Ra 발현의 상당한 유도가 있는 Tl1a에 의한 자극과 대조적이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌은 전문이 제시되는 것과 같이 그들 전체가 참고로 포함된다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 문헌[Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 4th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2012); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); 및 Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012)]은 본 출원에서 사용되는 다수의 용어에 대한 일반적 안내를 당업자에게 제공한다. 당업자는 본 발명의 실행에서 사용될 수 있는 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 또는 동일한 다수의 방법 및 물질을 인식할 것이다. 사실, 본 발명은 임의의 방법에 의해 기재된 방법 및 물질로 제한되지 않는다.

[0016] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 장 섬유 협착증은 중증의 크론병의 특징이다. 특정 TNFSF15 변이체를 지니는 환자는 TL1A를 과발현시키고, 소장 내에서 협착을 발생시킬 더 높은 위험을 가진다. 추가적으로 지속적 Tl1a 발현을 지니는 마우스는 대장염성(colitogenic) 병태 하에서 소장 및 대장 섬유 협착증을 야기한다. 본 발명자들은 Tl1a 기능을 중화시키는 것이 확립된 뮤린 대장염 및 결장 섬유증을 반전시킬 수 있는지의 여부를 조사하였다.

[0017] 본 명세서에 추가로 개시된 바와 같이, Tl1a 차단 항체(12F6A) 또는 아이소타입 대조군 Ig가 확립된 만성 뮤린 대장염 및 결장 섬유증을 지니는 마우스에게 투여되었다. Dr3 결핍증(Dr3-/-)을 지니는 마우스가 생성되었다. 1차 뮤린 장 섬유아세포가 단리되었다. 염증 및 섬유증 정도를 비교하기 위해 조직학적 및 면역형광 염색, 유세포 분석, ELISA 및 mRNA 수준이 사용되었다. 세포 증식 및 세포자멸사를 각각 결정하기 위해 셀트레이스 및 아넥신 V 염색이 사용되었다. 본 발명자들은 Tl1a 항체를 이용하는 치료가 뮤린 대장염을 완화시키고 결장 섬유증을 다시 본래의 염증전 수준으로 반전시킨다는 것을 발견하였다. 이는 저하된 Ifnγ, Il17, Ctgf, Il31Ra 발현 및 Tgfβ1 및 Igf1 신호전달의 하향조절에 기인할 수 있었다. 추가적으로, Tl1a 기능을 차단하는 것은 감소된 수의 섬유아세포 및 근섬유아세포를 야기하였다. 1차 장 근섬유아세포는 Dr3을 발현시키며, 콜라겐 및 Il31Ra 발현을 증가시킴으로써 Tl1a 신호전달을 지시하도록 기능적으로 반응할 수 있다. 결론적으로, TL1A 신호전달의 조절은 장 염증과 섬유증을 둘 다 저해한다.

[0018] 일 실시형태에서, 본 발명은 IL31 신호전달의 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계 및 대상체에게 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 질환은 TL1A 관련 질환이다. 다른 실시형태에서, 질환은 염증성 장 질환(IBD)이다. 다른 실시형태에서, 질환은 소장 및/또는 장 염증에서 발생된 협착과 관련된다. 다른 실시형태에서, 질환은 소장 및 대장 섬유 협착증이다. 다른 실시형태에서, 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 TL1A 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 IL31RA, IFN감마, IL17, Ctgf, TgfB1 및/또는 Igf1 신호전달 중 1종 이상의 저해제를 포함한다.

[0019] 다른 실시형태에서, 본 발명은 IL31Ra 신호전달의 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 및 대상체에게 유효량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 질환은 TL1A 관련 질환이다. 다른 실시형태에서, 질환은 염증성 장 질환(IBD)이다. 다른 실시형태에서, 질환은 소장 및/또는 장 염증에서 발생된 협착과 관련된단. 다른 실시형태에서, 질환은 소장 및 대장 섬유 협착증이다. 다른 실시형태에서, 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 TL1A 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 IL31RA, IFN감마, IL17, Ctgf, TgfB1 및/또는 Igf1 신호전달 중 1종 이상의 저해제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계는 대상체에서 섬유아세포 및/또는 근섬유아세포의 수를 감소시킨다.

[0020] 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체로부터 샘플을 얻는 단계, 정상 개체에 비해 고수준의 IL31Ra 발현의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 샘플을 분석하는 단계 및 정상 개체에 비해 고수준의 IL31 발현의 존재에 기반한 TL1A 관련 질환에 대한 감수성을 진단하는 단계를 포함하는, 대상체에서 TL1A 관련 질환에 대한 감수성을 진단하는 방법을 포함한다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 염증성 장 질환(IBD)이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및/또는 장 염증에서 발생된 협착과 관련된다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및 대장 섬유 협착증이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 IL31RA, IFN감마, IL17, Ctgf, TgfB1 및/또는 Igf1의 정상 개체에 비해 고수준의 발현의 존재를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0021] 대상체로부터 샘플을 얻는 단계, 정상 개체에 비해 고수준의 IL31Ra 발현의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 샘플을 분석하는 단계 및 정상 개체에 비해 고수준의 IL31RA 발현의 존재에 기반하여 TL1A 관련 질환의 감수성을 진단하는 단계를 포함하는, 대상체에서 TL1A 관련 질환에 대한 감수성을 진단하는 방법.다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 염증성 장 질환(IBD)이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및/또는 장 염증에서 발생된 협착과 관련된다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및 대장 섬유 협착증이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 콜라겐, IL31RA, IFN감마, IL17, Ctgf, TgfB1 및/또는 Igf1의 정상 개체에 비해 고수준의 발현의 존재를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0022] 다른 실시형태에서, 대상체로부터 샘플을 얻는 단계, TL1A 관련 질환과 관련된 1종 이상의 위험 변이체 및/또는 마커의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 샘플을 분석하는 단계, 및 TL1A 관련 질환과 관련된 1종 이상의 위험 변이체 및/또는 마커의 존재에 기반한 TL1A 관련 질환을 진단하는 단계를 포함하는, 대상체에서 TL1A 관련 질환을 진단하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 1종 이상의 위험 변이체 및/또는 마커는 고발현의 IL31RA를 포함한다. 다른 실시형태에서, 1종 이상의 위험 변이체 및/또는 마커는 고발현의 IFN감마, IL17, Ctgf, TgfB1 및/또는 Igf1를 포함한다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 염증성 장 질환(IBD)이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및/또는 장 염증에서 발생된 협착과 관련된다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 소장 및 대장 섬유 협착증이다. 다른 실시형태에서, TL1A 관련 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 1종 이상의 TL1A 저해제를 투여함으로써 TL1A 관련 질환을 치료하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 TL1A 저해제를 투여함으로써 TL1A 관련 질환을 치료하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 Dr3 저해제를 투여함으로써 TL1A 관련 질환을 치료하는 단계를 추가로 포함한다.

[0023] 본 명세서에서 개시된 바와 같이, 2개의 별도의 만성 대장염 모델에서, T11a Ab는 대장염 질환을 개선시키고 장 섬유증을 반전시켰다는 것이 나타났다. TL1A 신호전달의 조절은 장 염증과 섬유증을 둘 다 처리함으로써 크론병의 자연적 이력을 변용시킬 수 있다. TL1A/DR3 신호전달 경로를 차단하는 것은 확립된 섬유증의 반전을 포함하여 크론병 및 그와 관련된 합병증의 치료를 위한 치료적 접근을 제공한다.

[0024] 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 섬유증을 진단하는 단계, 및 이어서, 치료적으로 유효한 TL1A 항체를 투여하는 것과 같이 TL1A-DR3 신호전달 기능의 1종 이상의 저해제를 투여하는 단계, 또는 DR3 발현을 결실시키

는 단계, 또는 TL1A 발현(TNFSF15의 발현)을 위한 dsRNA 또는 siRNA 암호화 단계에 의해 대상체에서 염증성 장질환(IBD)과 관련된 섬유증을 치료하는 방법을 제공한다. 또는, 다른 실시형태에서, TL1A-DR3의 하류의 하나 이상의 분자를 저해시킴으로써.

[0025] 일 실시형태에서, 본 발명은 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 TL1A 저해제 및/또는 DR3 저해제를 포함하는 조성물을 투여함으로써 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 질환은 염증성 장질환이다. 다른 실시형태에서, 질환은 크론병이다. 다른 실시형태에서, 질환은 대장염이다. 다른 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 다른 실시형태에서, TL1A 저해제는 TL1A 항체이다. 다른 실시형태에서, DR3 저해제는 DR3 항체이다.

[0026] 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 TL1A 저해제 및/또는 DR3 저해제를 포함하는 조성물을 투여함으로써 개체에서 섬유증을 반전시키는 방법을 제공한다.

[0027] 다른 실시형태에서, 본 발명은 TL1A-DR3 신호전달 기능의 1종 이상의 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계 및 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 섬유증의 치료 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 TL1A 차단 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 1종 이상의 Dr3 차단 항체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 TL1A에 직접 결합함으로써 TL1A 기능을 저해하는 1종 이상의 화합물을 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 Ifn감마, IL17, Ctgf 및 IL31Ra 중 1종 이상의 저해제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 Tgf베타1 및 Igf1 중 1종 이상의 저해제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 IL31 신호전달의 1종 이상의 저해제를 포함한다. 다른 실시형태에서, 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계는 섬유증의 염증전 수준으로의 반전을 야기한다. 다른 실시형태에서, 섬유증은 결장 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계는 대상체에서 장 염증의 저해를 추가로 초래한다. 다른 실시형태에서, 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계는 대상체에서 섬유아세포 및/또는 근섬유아세포의 수를 감소시킨다. 다른 실시형태에서, 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계는 대상체에서 1차 장 근섬유아세포의 수를 감소시킨다.

[0028] 일 실시형태에서, 본 발명은 TL1A 저해제 및 DR3 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계; 및 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 섬유증을 치료하는 방법을 제공한단. 다른 실시형태에서, TL1A 저해제는 TL1A 항체이다. 다른 실시형태에서, DR3 저해제는 DR3의 발현을 결실시킨다. 다른 실시형태에서, 섬유증은 감소된다. 다른 실시형태에서, 조성물은 TL1A-DR3 신호전달 기능을 저해한다.

[0029] 일 실시형태에서, 본 발명은 TL1A 저해제 및 DR3 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 및 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 섬유증을 반전시키는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 IFN감마, IL17, Tgf베타1, Ctgf 및/또는 IL31RA 신호전달 기능의 저해제를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 TL1A-DR3 신호전달 기능을 저해한다.

[0030] 일 실시형태에서, 본 발명은 TL1A 저해제 및/또는 DR3 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 및 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 염증을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 IFN감마, IL17, Ctgf 및/또는 IL31RA 신호전달 기능의 저해제를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 TL1A-DR3 신호전달 기능을 저해한다.

[0031] 일 실시형태에서, 본 발명은 Ifnɣ 및 Il-17 발현을 저해시키는 단계, Tgfβ 신호전달을 하향조절하는 단계, 및/또는 섬유아세포/근섬유아세포를 감소시키는 단계 및 대상체를 치료하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 질환은 염증성 장질환이다. 다른 실시형태에서, 질환은 섬유증이다. 다른 실시형태에서, 질환은 장 염증이다. 다른 실시형태에서, 질환은 염증성 장질환과 관련된 합병증이다.

[0032] 일 실시형태에서, 본 발명은 TL1A, DR3 및 IL31RA 신호전달 기능의 저해제를 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 및 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, IBD와 관련된 합병증을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 대상체에게 정맥내로 투여된다.

[0033] 일 실시형태에서, 본 발명은 1종 이상의 TL1A 저해제 및/또는 1종 이상의 DR3 저해제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 실시형태에서, 1종 이상의 TL1A 저해제는 TL1A 항체이다. 다른 실시형태에서, 1종 이상의 DR3 저해제는 DR3 항체이다.

[0034] 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에게 치료적으로 유효한 투약량의 TL1A 저해제 및/또는 DR3 저해제를 포함

하는 조성물을 투여함으로써 대상체에서 염증을 저하시키는 방법을 제공한다.

[0035] 다른 실시형태에서, 본 발명은 Ifnɣ 및 Il-17 발현을 저해시키는 단계, Tgfβ 신호전달을 하향조절하는 단계, 및/또는 섬유아세포/근섬유아세포를 감소시키는 단계에 의해 섬유증과 관련된 병태를 저해하는 방법을 제공한다.

[0036] 일 실시형태에서 본 발명은 TL1A, DR3 및 IL31RA 신호전달 기능의 1종 이상의 저해제 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 다른 실시형태에서, 1종 이상의 TL1A 저해제는 TL1A 항체이다. 다른 실시형태에서, 1종 이상의 DR3 저해제는 DR3 항체이다.

[0037] 단백질 마이크로어레이를 포함하는, 폴리펩타이드 또는 다른 마커/생체마커의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 분야에서 용이하기 이용가능한 다수의 기법이 있다. 예를 들어, 이를 위하여 사용될 수 있는 일부 검출 패러다임은 최적의 방법, 전기화학적 방법(전압 전류법 및 전류법 적정(amperometry) 기법), 원자력현미경 및 무선주파수 방법, 예를 들어, 다극 공명 분광법을 포함한다. 광학적 방법의 예시는 현미경 검사에 더하여 공초점과 비-공초점이 둘 다 형광, 발광, 화학발광, 흡광도, 반사율, 투과율 및 복굴절 또는 굴절률의 검출이다(예를 들어, 표면 플라스몬 공명, 타원 편광법, 공명 거울 방법, 격자 결합기 도파관 방법 또는 간섭계법).

[0038] 유사하게, 바이오마크를 단리 및/또는 분별하기 위해 사용될 수 있는 다수의 기법이 있다. 예를 들어, 생체마커는 생체특이적 포획 시약, 예컨대 항체, 앱타머 또는 생체마커를 인식하는 항체 및 그의 변형된 형태를 이용하여 포획될 수 있다. 이 방법은 또한 단백질에 결합되거나 또는 항체에 의해 달리 인식되고, 그 자체가 생체마커일 수 있는 단백질 상호작용자(interactor)의 포획을 야기할 수 있었다. 생체특이적 포획 시약은 또한 고체상에 결합될 수 있다. 이어서, 포획된 단백질은 SELDI 질량분석법에 의해 또는 포획 시약으로부터 단백질을 용리시키고 용리된 단백질을 전통적인 MALDI에 의해 또는 SELDI에 의해 검출함으로써 검출될 수 있다. SELDI의 일례는 "친화도 포획 질량분석법" 또는 "표면 증강 친화도 포획" 또는 "SEAC"로 불리는데, 이는 물질과 분석물 간의 비공유적 친화도 상호작용(흡착)을 통해 분석물을 포획하는 프로브 표면 상의 물질을 갖는 프로브의 사용을 수반한다. 질량 분석법의 일부 예는 비행시간, 자장형(magnetic sector), 사중극자 필터, 이온 트랩, 이온 사이클로트론 공명, 정전기적 섹터 분석기 및 이들의 혼성물이다.

[0039] 대안적으로, 예를 들어, 예컨대 폴리펩타이드의 존재는 전통적인 면역분석 기법을 이용하여 검출될 수 있다. 면역분석은 분석물을 포획하기 위한 생체특이적 포획 시약, 예컨대 항체를 필요로 한다. 분석은 또한 단백질의 변형된 형태와 단백질을 명확하게 구별하도록 설계될 수 있는데, 이는 하나의 항체가 하나 이상의 형태를 포획하고, 제2의 별도로 표지된 항체가 특이적으로 결합하며, 다양한 형태의 별도의 검출을 제공하는 샌드위치 분석을 사용함으로써 행해질 수 있다. 항체는 생체분자를 이용하여 동물을 면역화시킴으로써 생성될 수 있다. 전통적인 면역분석은 또한 ELISA 또는 형광기반 면역분석을 포함하는 샌드위치 면역분석뿐만 아니라 다른 효소 면역분석을 포함할 수 있다.

[0040] 검출 전에, 생체마커는 또한 용액 중의 다른 성분으로부터 또는 검출을 방해할 수 있는 혈액의 다른 성분으로부터 그것을 단리시키기 위해 분획화될 수 있다. 분획화는 다른 혈액 성분으로부터의 혈소판 단리, 혈소판 성분의 하위세포 분획화 및/또는 크로마토그래피, 친화도 정제, 1D 및 2D 맵핑 및 당업자에게 공지된 정제를 위한 다른 방법을 이용하여 혈소판 내에서 발견되는 다른 생체분자로부터의 목적으로 하는 생체마커의 분획화를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 샘플은 바이오칩에 의해 분석된다. 바이오칩은 일반적으로 고체 기질을 포함하며, 일반적으로 포획 시약(또한 흡착제 또는 친화도 시약으로 불림)이 부착된 평면의 표면을 가진다. 빈번하게는, 바이오칩의 표면은 복수의 처리가능한 위치를 포함하며, 이들 각각은 그것에 결합된 포획 시약을 가진다.

[0041] 상기 기재된 다양한 방법 및 기법은 본 발명을 수행하기 위한 다수의 방법을 제공한다. 물론, 기재된 모든 목적 또는 이점이 본 명세서에 기재된 임의의 특정 실시형태에 따라 반드시 달성되지 않을 수도 있다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 예를 들어, 당업자는 상기 방법이 본 명세서에 교시되거나 또는 제시될 수 있는 바와 같은 다른 목적 또는 이점을 반드시 달성하는 일 없이 본 명세서에 교시된 바와 같은 하나의 이점 또는 이점의 그룹을 달성하거나 또는 최적화하는 방식으로 수행될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 다양한 유리한 대안과 불리한 대안이 본 명세서에 언급된다. 일부 바람직한 실시형태는 하나의, 다른 또는 몇몇의 유리한 특징을 구체적으로 포함하는 반면, 다른 실시형태는 하나의, 다른 또는 몇몇 불리한 특징을 구체적으로 제외하는 한편, 또 다른 것들은 하나의, 다른 또는 몇몇 유리한 특징의 포함에 의한 본 발명의 불리한 특징을 구체적으로 완화시키는 것으로 이해되어야 한다.

[0042] 더 나아가, 당업자는 상이한 실시형태로부터의 다양한 특징의 적용 가능성을 인식할 것이다. 유사하게, 상기 논

의한 다양한 구성요소, 특징 및 단계들뿐만 아니라 각각의 이러한 구성요소, 특징 또는 단계에 대한 다른 공지된 동등물은 본 명세서에 기재된 원칙에 따른 방법을 수행하기 위해 당업자에 의해 혼합되고 매칭될 수 있다. 다양한 구성요소, 특징 및 단계들 중에서, 일부는 다양한 실시형태에서 구체적으로 포함될 것이며, 다른 것들은 구체적으로 제외될 것이다.

[0043] 본 발명은 특정 실시형태 및 실시예와 관련하여 개시되었지만, 본 발명의 실시형태가 다른 대안의 실시형태 및/또는 이의 용도 및 변형 및 동등물에 대해 구체적으로 개시된 실시형태 이상으로 연장된다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0044] 다수의 변화 및 대안의 구성요소가 본 발명의 실시형태에서 개시되었다. 또한 추가의 변화 및 대안의 구성요소는 당업자에게 명백할 것이다. 제한 없이 이들 변화 중에서, 이에 의해 진단, 예측 또는 처리될 수 있는 본 발명의 합병증 및 질환 및 다른 임상적 병태에 대한 구성요소 모듈이 선택된다. 본 발명의 다양한 실시형태는 임의의 이들 변화 또는 구성요소를 구체적으로 포함하거나 또는 제외할 것이다.

[0045] 일부 실시형태에서, 본 발명의 특정 실시형태를 기재하고 특허청구하기 위해 사용되는 농도, 반응 조건 등과 같은 성분의 양, 특성을 표현하는 숫자는 일부 예에서 용어 "약"에 의해 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 기재된 설명 및 첨부되는 청구범위에 제시된 수치적 파라미터는 특정 실시형태에 의해 얻어질 것으로 추구되는 목적으로 하는 특성에 따라서 다를 수 있는 근사치이다. 일부 실시형태에서, 수치적 파라미터는 보고된 유의한 숫자의 수에 비추어 그리고 보통의 반올림 기법을 적용함으로써 해석되어야 한다. 본 발명의 넓은 범주의 일부 실시형태를 제시하는 수치적 범위 및 파라미터가 근사치임에도 불구하고, 구체적 예에 제시된 수치적 값은 실행가능할 만큼 정확한 것으로 보고된다. 본 발명의 일부 실시형태에 제시된 수치적 값은 그들 각각의 시험 측정에서 발견된 표준 편차로부터 반드시 초래되는 특정 오차를 포함할 수 있다.

[0046] 일부 실시형태에서, 본 발명의 특정 실시형태와 관련하여(특히 특정 다음의 청구범위와 관련하여) 사용되는 단수의 용어 및 유사한 언급은 단수와 복수를 둘 다 아우르는 것으로 해석될 수 있다. 본 명세서의 값의 범위의 인용은 단지 범위 내에 속하는 각각의 별개 값에 대해 개별적으로 지칭하는 단축 방법으로서 작용하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 달리 표시되지 않는 한, 각각의 개개 값은 본 명세서에 개별적으로 이용된 것과 같이 본 명세서 내로 포함된다. 본 명세서에 기재된 모든 방법은 본 명세서에 달리 표시되거나 또는 내용과 명확하게 다르게 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본 명세서의 특정 실시형태에 대해 제공된 임의의 및 모든 실시예 또는 예시적 언어의 사용은 본 발명을 단지 더 양호하게 설명하기 위한 의도이며, 다르게 청구되는 본 발명의 범주에 대한 제한을 제기하지 않는다. 본 명세서의 어떤 언어도 본 발명의 실행에 필수적인 임의의 비청구 구성요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0047] 본 명세서에 개시된 본 발명의 대안의 구성요소 또는 실시형태의 그룹은 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 각각의 그룹 구성원은 개별적으로 또는 본 명세서에서 발견되는 그룹의 구성원 또는 다른 구성요소와 임의의 조합으로 청구되고 지칭될 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원은 편리함 및/또는 특허성의 이유로 그룹 내에 포함되거나 또는 삭제될 수 있다. 임의의 이러한 포함 또는 삭제가 일어날 때, 본 명세서는 첨부된 청구범위에서 사용되는 모든 마쿠쉬 그룹의 기재된 설명을 충족시키도록 변형된 것과 같은 그룹을 본 명세서에 포함하는 것으로 여겨진다.

[0048] 본 발명의 바람직한 실시형태는 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자에게 공지된 최상의 방식을 포함하여 본 명세서에 기재된다. 해당 바람직한 실시형태에 대한 변형은 앞서 언급한 설명을 읽을 때 당업자에게 명백하게 될 것이다. 당업자는 적절한 경우 이러한 변형을 사용할 수 있으며, 본 발명은 본 명세서에 구체적으로 기재된 것과 다르게 실행될 수 있다는 것이 이해된다. 따라서, 본 발명의 다수의 실시형태는 적용가능한 법에 의해 허용되는 바와 같이 본 명세서에 첨부된 청구범위에 인용된 대상 물질의 모든 변형 및 동등물을 포함한다. 게다가, 이의 모든 가능한 변형에서 상기 기재한 구성요소의 임의의 조합은 본 명세서에서 달리 표시되거나 또는 문맥에 의해 달리 명확하게 모순되지 않는 한, 본 발명에 의해 포함된다.

[0049] 더 나아가, 본 명세서 전체적으로 특허 및 인쇄된 간행물에 대한 수많은 언급이 있었다. 각각의 상기 인용한 참고문헌 및 인쇄된 간행물은 그의 전문이 본 명세서에 개별적으로 참고로 포함된다.

[0050] 마지막으로, 본 명세서에 개시된 본 발명의 실시형태는 본 발명의 원칙을 예시하는 것으로 이해되어야 한다. 사용될 수 있는 다른 변형은 본 발명의 범주 내일 수 있다. 따라서, 예로서, 제한 없이, 본 발명의 대안의 구성이 본 명세서의 교시에 따라 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시형태는 나타내고 기재한 대로 정확하게 제한되지 않는다.

[0051] **실시예**

[0052] 다음의 실시예를 청구된 본 발명을 더 양호하게 설명하기 위해 제공하며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 구체적 물질이 언급되는 정도로, 이는 단지 예시의 목적을 위한 것이며, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 당업자는 본 발명의 능력을 발휘하는 일 없이 그리고 본 발명의 범주로부터 벗어나는 일 없이 동등한 수단 또는 반응물을 개발할 수 있다.

[0053] *실시예 1*

[0054] *만성 대장염의 유도 및 치료*

[0055] C57BL/6J 마우스를 잭슨 래버러토리즈(Jackson Laboratory)로부터 구입하였다. 기재한 바와 같이 만성 덱스트린 황산나트륨(dextran sodium sulfate: DSS) 대장염을 유도하였다.10 양자전이 모델에서, WT 마우스로부터 Rag1-/-까지의 마우스로부터 단리시킨 500,000 CD4+CD45RBhi 나이브 T-세포의 복강내 주사에 의해 대장염을 유도하였다. 햄스터 항-마우스 Tl1a Ab(12F6A, TEVA, 펜실베이니아 노스 웨일즈에 소재)를 Tl1a의 기능을 차단시키고 나서, 20- 또는 80-mg/kg으로 투여하거나 또는 대조군 면역글로불린(Ig)G (미조리주 세인트 루이스에 소재한 레인코 테크놀로지즈(Leinco Technologies))을 80-mg/kg 용량에서 마우스 내로 만성 DSS에 대해 제15일에 시작해서 그리고 양자전이 모델에 대해 제29일에 시작해서 1주당 2회 복강내 주사로 주사하였다(도 1A). 기준 대조군(Rag Co 또는 WT Co)은 나이브 T-세포의 DSS 처리 또는 양자전이 전에 분석한 마우스였다. 처리전(Pre-Tx) 대조군은 만성 DSS 모델에 대해 제14일에 그리고 양자전이 모델에 대해 제28일에 분석한 마우스였다. 처리군은 만성 DSS 모델에 대해 제28일에 그리고 양자전이 모델에 대해 제56일에 분석한 마우스였다(도 1A). 모든 마우스를 세다스-시나이 의료 센터(Cedars-Sinai Medical Center: CSMC)에서 구체적 무병원균 조건 하에 유지하였다. 이 연구를 미국국립보건원의 실험동물에 대한 인도적인 배려와 사용에 대한 표준 지침(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health)에 따라 엄격하게 수행하였다. 동물실험윤리위원회(CSMC Animal Care and Use Committee)(프로토콜 3813)에 의해 동물 연구를 승인하였다.

[0056] *실시예 2*

[0057] *질환 활성 지수, 미엘로퍼옥시다제, 거시적 및 조직학적 분석*

[0058] DSS 모델에 대해 이틀마다 그리고 기재한 바와 같은 양자전이 모델에 대해 1주에 2회 질환 활성 지수(DAI) 스코어를 결정하였다. 제조업자의 프로토콜(펜실베이니아 플리머스 미팅에 소재한 엔조 라이프 사이언스(Enzo Life Sciences))에 따라 미엘로퍼옥시다제 형광 검출 키트를 이용하여 미엘로퍼옥시다제 활성을 평가하였다. 확립된 분류를 이용하여 맹검처리한 염증의 거시적 증거를 스코어링하였다. 조직 샘플을 처리하고 나서, CSMC 조직학-코어(CSMC Histology-Core)에 의해 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. 제조업자의 프로토콜(매릴랜드주 우드스턱에 소재한 IHC 월드(IHC World))에 따라 노바울트라 시리우스 레드 염색 키트(NovaUltra Sirius Red Stain Kit)를 이용하여 시리우스 레드 염색을 수행하였다. 10% 포말린으로 고정시킨 4㎛ 냉동 부문 상에서 면역형광 염색을 수행하고 나서, 1:100 희석으로 α-SMA Ab(앱캠(Abcam)) 및 1:2000 희석으로 α-비멘틴 Ab(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 코반스(Covance))와 함께 당나귀 α-토끼 IgG 및 염소 α-닭 IgY(매사추세츠주 캠브릿지에 소재한 앱캠) 2차 항체로 염색시켰다. 기재한 바와 같이 2명의 훈련된 동물 병리학자(DQS 및 JC) 에 의해 맹검 방식으로 조직학적 스코어를 할당하였다. 마우스마다 장 영역 당 5개 이상의 상이한 장의 관찰을 사용하여 200x 배율에서의 조직학적 스코어 및 콜라겐 침착을 결정하였고, 레이카(Leica) TCS SP 스펙트럼 공초점 현미경을 이용하여 630x 배율에서 섬유아세포/근섬유아세포 수를 계수화하였다.

[0059] *실시예 3*

[0060] *Dr3-/- 마우스의 생성*

[0061] Dr3+/- 파운더 마우스의 Dr3 표적화 벡터 및 생성의 클로닝을 제노웨이(genOway)(프랑스 리옹에 소재한 제노웨이)와 협력하여 수행하였다. 간단하게, 엑손 1 상류의 1.5kb 및 엑손 8 하류의 3kb를 함유하는 Dr3 내인성 좌위를 C57BL/6J 마우스로부터의 게놈 DNA를 이용하여 PCR 증폭에 의해 생성하였고, pCR4-TOPO 벡터(캘리포니아주 칼스베드에 소재한 인비트로젠) 내로 클로닝시켰다. 후속적으로, Dr3 엑손 2 내지 5에 측접하는 2개의 loxP 부위를 삽입하였다(도 5A). FRT 부위에 측접하는 양의 선택 네오마이신 유전자를 엑손 1과 2 사이의 인트론에 삽입하여 표적화 벡터를 생성하였다(도 5A). 클로닝 과정의 모든 단계를 제한 분석 및 서열화(sequencing)를 통해 입증하였다. Dr3 유전자 표적화 작제물을 선형화시키고, 전기천공법에 의해 C57BL/6J 배경을 지니는 게노웨이 소유의 배아 줄기(embryonic stem: ES) 세포 내로 형질감염시켰다. 상동성 재조합체를 G418에 의해 선택하고 나

서, 사우던 블롯 분석에 의해 확인하였다. 정확한 5' 및 3' 재조합을 지니는 ES 클론을 C57BL/6J 배반포 내로 미량주사하고 나서, 상상임신 C57BL/6J 마우스 내로 도입하였다. 생식계열 돌연변이체 마우스를 얻기 위해 수컷 키메라 새끼를 낳았고, 이어서 네오마이신 카세트를 제거하기 위해 Flpe 결실 마우스 변종을 낳은 다음, loxP 측접 서열을 절단하기 위해 Cre 결실 마우스를 낳고(도 5A), 사우던 블롯에 의해 확인하고 C57BL/6J 유전자 배경에 대해 유지하였다.

[0062] *실시예 4*

[0063] *발현 분석*

[0064] 마이크로어레이 조직 미니 키트(RNeasy Microarray Tissue Mini Kit)(캘리포니아주 발렌시아에 소재한 퀴아젠(Qiagen))를 이용하여 총 RNA를 단리시키고, RT2 HT 제1 가닥을 이용하여 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하였고, 제조업자의 프로토콜 당 RT2 커스텀 섬유증 어레이(Custom Fibrosis Array) CAPM11248(캘리포니아주 발렌시아에 소재한 퀴아젠)를 이용하여 측정하였다. 다중 복합 면역분석, 즉 제조업자의 프로토콜에 따라 마우스 Th1/Th2/Th17/Th22 13plex 키트 플로사이토믹스(FlowCytomix)(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 이바이오사이언스(eBioscience))를 이용하여 사이토카인 농도를 분석하였다. 입증한 Dr3 qPCR 분석 Mm.PT.51.17321439, Il31Ra qPCR 분석 Mm.PT.56a.32787326 및 β-액틴 qPCR 분석 Mm.PT.39a.22214843을 IDT 테크놀로지즈(IDT Technologies)(일리노이주 스코키에 소재)로부터 구입하였다.

[0065] *실시예 5*

[0066] *세포 단리, 배양, 세포내 사이토카인 발현 및 유세포분석*

[0067] 프로프리아층 단핵세포(lamina propria mononuclear cell: LPMC), 장관막림프절(mesenteric lymph node: MLN), 및 비장 세포의 단리 및 배양 및 항-CD28 및 항-CD3ε에 의한 이들의 후속 자극을 수행하였다. 본 발명자들은 LPMC 단리를 위해 전체 결장 및 회장의 원위 10㎝를 사용하였다. 마우스 1차 결장 섬유아세포를 1 mM DTT(캘리포니아주 터스틴에 소재한 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific))와 함께, 37℃, 15분에 인큐베이션시킨 다음, 1 mM DTT을 5 mM EDTA(위스콘신주 메디슨에 소재한 프로메가(Promega))와 함께, 37℃, 30분에 인큐베이션시켰다. 남아있는 결장 조직을 1 x HBSS(뉴저지주 스웨데스보로에 소재한 코닝 셀그로(Corning Cellgro))에 의해 린스하고 나서, 민싱하고, 이어서, 37℃에서 30분 동안 1.5㎎/㎖ 올라게나제 II(뉴저지주 레이크우드에 소재한 워링톤(Worthington)), DMEM(뉴저지주 스웨데스보로에 소재한 코닝 셀그로) 내 0.3㎎/㎖ DNase I 및 3㎎/㎖ 하이알루로니다제(미조리주 세인트 루이스에 소재한 시그마(Sigma))로 분해하였다. 단리시킨 세포를 10% FCS, 페니실린/스트렙토마이신(100 IU/㎖), 훈기존(Fungizone)(0.5㎍/㎖)으로 보충한 DMEM에서 배양시켰다. 1차 장 섬유아세포를 계대 2에서 사용하였다. 세포를 LSR II 유세포 분석기(캘리포니아주 산호세에 소재한 BD 바이오사이언스(BD Biosciences)) 상에서 획득하고 나서, FlowJo 분석 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

[0068] *실시예 6*

[0069] *생체밖 장 섬유아세포 증식 및 세포자멸사 분석*

[0070] 1차 장 섬유아세포를 단리시키고, 제조업자의 지침에 따라 셀트레이스 바이올렛(CellTrace Violet)을 염색하였다. 이어서, 염색한 세포를 10% FCS, 페니실린/스트렙토마이신(100 IU/㎖) 및 훈기존(0.5㎍/㎖)으로 보충한 DMEM에서 100 ng/㎖의 Tl1a와 함께 인큐베이션시켰다. 48시간 후에, 배양시킨 장 섬유아세포를 제조업자의 지침에 따라 아넥신 V 세포자멸사 검출 키트(캘리포니아주 샌디에이고 이바이오사이언스)를 이용하여 염색하였다. 아넥신 V 염색 후에, 섬유아세포를 채취하고 나서, 세척하고, 2% 파라폼알데하이드로 고정시키고 나서, BD LSR II 유세포 분석기를 이용한 유세포 분석을 실시하였고, 플로조(FlowJo) 소프트웨어에 의해 분석하였다.

[0071] *실시예 7*

[0072] *통계학적 분석*

[0073] 데이터를 평균 ± 표준 편차(SD)로서 제시하였다. 두 그룹간의 비교를 범주적 변수에 대해 양방 피셔 정확 검정(two-tailed Fisher's Exact Test) 및 연속적 변수에 대해 스튜던트 t-검정에 의해 수행하였다. 시험 추정의 충족에 따라서 모수 및 비모수 검증을 사용하였다. 3개의 군간의 비교를 일원 ANOVA로 행한 후에, 터키 HSD(Turkey's HSD)를 이용한 쌍별 사후 분석 및 다중 비교를 위한 베렌스-피셔-검정(Behrens-fisher-Test) 보정을 행하였다. $p < 0.05$를 유의한 것으로 고려하였다.

[0074] *실시예 8*

[0075] *Tl1a Ab 투여는 확립된 만성 대장염의 질환 활성 및 총 염증을 감쇠시켰다*

[0076] 만성 뮤린 대장염에서 중화 Tl1a 기능의 효과를 나이브 CD4+CD45RBhi T-세포와 함께 양자전달한 면역결핍 Rag1-/- 마우스에서 Tl1a Ab를 이용하여 평가하였다. 대장염이 확립되었을 때, 20- 및 80-mg/kg에서의 Tl1a Ab 또는 80-mg/kg에서의 아이소타입 대조군 Ab(Iso Ab)를 전달 후 제29일에 시작해서 주 당 2회 투여하였다(도 1A). 6주까지 그리고 8주에 연구의 마지막까지 계속해서, Tl1a Ab로 처리한 마우스의 질환 활성 지수(DAI)는 Iso Ab를 받은 마우스보다 상당히 더 낮았다(도 1B). Iso Ab 그룹에 비해, 총 결장 염증은 용량 둘 다에서 Tl1a Ab를 투여한 마우스에서 상당히 감소되었다(도 1C). 단핵 세포의 수를 장간막림프절(MLN)로부터 회수하였고, 프로프리아층(LP)은 또한 Iso Ab 그룹에 비해 Tl1a Ab 처리에 의해 감소되었다(도 1D). Tl1a 80-mg/kg Ab 처리 마우스에서, 확립된 대장염 및 세포 침윤의 개선은 덜 심한 총 결장 염증 및 Pre-Tx 군보다 상당히 감소된 수의 LP 단핵세포(LPMC)에 의해 입증되었다(도 1C 및 도 1D).

[0077] 만성 DSS 대장염 모델을 이용하여 유사한 결과를 얻었다. 이 모델에서, 대장염이 확립되었을 때 Tl1a Ab(20-mg/kg)를 제15일에 시작해서 1주에 2회 투여하였다(도 1A). Iso Ab 그룹에 비해, 본 발명자들은 더 낮은 DAI(도 7A), 감소된 총 염증(도 7B), 및 MLN 및 LP로부터의 더 소수의 회수된 단핵세포(도 7C)를 관찰하였다. DAI 및 단핵 세포의 감소는 또한 Pre-Tx 그룹보다 더 적었다. 이들 데이터는 Tl1a Ab에 의한 처리가 염증의 감소된 총 지표 및 장 내 염증 세포의 감소된 축적을 야기한다는 것을 나타내었다.

[0078] *실시예 9*

[0079] *Tl1a Ab 투여는 확립된 뮤린 대장염의 조직병리학적 특징을 완화하였다*

[0080] 결장의 조직학적 시험은 양자전이 모델 내 Iso Ab에 비해 Tl1a Ab 요법을 이용하여 감소된 세포 침윤, 뮤신 고갈, 음와농양(crypt abscess) 및 구조적 변화를 특징으로 하는 감소된 염증을 나타내었다(도 2A 및 도 2B). 조직학적 염증의 감소는 또한 4주 Pre-Tx 군에 비해 상당히 감소되었는데(도 2A 및 도 2B), 이는 부분적으로 해결된 염증을 나타내었다. 일치되게, 결장 미엘로퍼옥시다제(MPO) 활성은 Iso Ab 그룹과 비교되는 Tl1a Ab 투여에 의해 그리고 Pre-Tx 그룹과 비교되는 80-mg/kg의 Tl1a Ab에 의해 상당히 감소되었다(도 2C). Tl1a Ab 용량에 의한 결장 MPO 활성의 감소가 Rag 기준 대조군(Rag Co) 그룹과 상당히 다르지 않은 수준으로 감소되었을 때, 대장염의 점막 분해가 시사되었다(도 2C).

[0081] 유사하게, 만성 DSS 모델에서 Iso Ab와 Pre-Tx 그룹 둘 다에 비해 Tl1a Ab에 의해 결장 조직학이 개선되었다(도 8A 및 도 8B). Tl1a Ab 처리에 의한 조직학적 염증에서의 감소가 있다고 해도, 결장 염증은 기준 WT 대조군에 비해 여전히 상당히 더 높다(도 8B). 추가적으로, 결장 MPO 활성은 Iso Ab와 Pre-Tx 그룹 둘 다에 비해 Tl1a Ab 처리에 의해 상당히 더 낮았다(도 8C). 이들 결과는 Tl1a Ab의 투여가 결장 조직병리학의 정상화를 초래한다는 것을 나타낸다.

[0082] *실시예 10*

[0083] *Tl1a Ab는 Th-1 및 -17 면역 반응을 저해하였다*

[0084] 두 대장염 모델에서 감소된 확립 뮤린 대장염의 잠재적 면역 메커니즘을 평가하기 위해, Ifnγ, Il13 및 Il17의 발현을 측정하였다. Tl1a Ab는 양자전이 모델에서 Iso Ab 그룹과 Pre-Tx 그룹 둘 다에 비해 MLN 및 LPMC에서의 CD4+Il17+ T-세포의 빈도를 감소시켰다(도 3A 및 도 3B). 20-mg/kg에서 Tl1a Ab가 Pre-Tx 그룹에 비해 상당한 감소를 야기하지 않은 LPMC를 제외하고, CD4+Ifnγ+ T-세포는 Tl1a Ab 처리 용량 둘 다에 의해 유사하게 감소되었다(도 3A 및 도 3C). 추가적으로, 본 발명자들은 또한 MLN과 LPMC 둘 다에서 Pre-Tx 및 Iso Ab 그룹에 비해 Tl1a Ab 처리에 의해 Ifnγ+ 및 Il17+ 이중 양성 CD4+ T-세포가 상당히 감소된다는 것을 발견하였다(도 3B 및 도 3C, 우측 패널). CD3/CD28로 자극한 MLN 및 LPMC 세포를 이용하여, Iso Ab 및 처리 전 그룹을 받은 마우스에 비해 Tl1a Ab로 처리한 마우스에서 더 낮은 Il17 생성을 알 수 있었다(도 3D). MLN에서를 제외하고, 용량 둘 다에서의 Tl1a Ab 처리는 Iso Ab 및 Pre-Tx 그룹에 비해 더 낮은 Ifnγ 분비를 야기하였다(도 3E). CD4+Il13+ T-세포 및 Il13 생성의 백분율은 그룹 간에 유의하게 상이하지 않았다. 만성 DSS 대장염 모델에서, CD4+Il17+, CD4+Ifnγ+ 및 CD4+Il17+Ifnγ+ T-세포의 감소가 Tl1a Ab 처리에 의한 MLN 및 LPMC에서 유사하게 관찰되었다(도 9A 내지 도 9C). 일치되게, Tl1a Ab 처리는 CD3/CD28을 자극한 단리된 MLN 및 LPMC 세포에서 Il17 및 Ifnγ의 더 낮은 생성을 초래하였다(도 9D 및 도 9E). CD4+Il13+ T-세포 및 Il13 생성의 백분율은 만성 DSS 대장염 모델에서 그룹 간에 상이하지 않았다. 이들 데이터는 Tl1a Ab가 Th-1 및 -17 전염증 면역 반응을 감소시켰다는 것을 시사하였다.

[0085] *실시예 11*

[0086] *Tl1a Ab는 확립된 결장 섬유증을 반전시켰다*

[0087] 구성적 Tl1a 발현을 지니는 마우스는 증가된 장 섬유증이 진행된 것으로 이전에 나타났다. Tl1a 신호전달을 차단하는 것이 결장 섬유증을 감소시킬 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 콜라겐 침착 정도를 측정하기 위한 시리우스 레드 염색을 수행하였다. 본 발명자들은 기준 Rag Co에 비해 Pre-Tx 군에서 나이브 T 세포 전달 후에 제4주까지 콜라겐이 증가되었음을 발견하였다(도 4A 및 도 4C). 콜라겐 침착도는 대조군 Iso Ab를 투여한 마우스에서 제8주까지 더 커졌다. 그러나, Tl1a Ab에 의한 처리는 Iso Ab 또는 Pre-Tx 그룹을 받은 마우스에 비교할 때 콜라겐 침착의 상당한 감소를 야기하였다(도 4A 및 도 4C). 특히, 80mg/kg의 Tl1a 처리를 정상 Rag Co 마우스와 비교할 때 콜라겐 침착은 유의하게 상이하지 않았다(도 4C). 만성 DSS 모델에서, Iso Ab 또는 Pre-Tx 그룹에 비해 Tl1a Ab 처리에 의한 콜라겐 침착의 유의한 감소가 관찰되었다(도 4A 및 도 4C). 추가로, Tl1a 처리는 WT 기준 대조군과 통계적으로 상이하지 않은 수준으로 콜라겐 침착에서의 감소를 야기하였다(도 4A 및 도 4C). 종합하면, 이들 데이터는 Tl1a 신호전달을 차단하는 것이 염증 개시전과 유사한 수준으로 콜라겐 침착을 반전시켰다는 것을 시사하였다.

[0088] *실시예 12*

[0089] *Tl1a-Dr3 신호전달을 차단하는 것은 장 섬유아세포 및 근섬유아세포 수를 감소시켰다*

[0090] Tl1a Ab를 이용한 콜라겐 침착 감소의 메커니즘 연구를 시작하기 위해, 장 섬유아세포 및 근섬유아세포의 빈도를 측정하였다. 장 근섬유아세포는 장 섬유생성(fibrogenesis)에 수반된 세포 집단이다. 비멘틴 양성 세포는 섬유아세포인데, 알파 평활근 액틴(αSMA)의 공동 발현과 관련하여 근섬유아세포를 나타낸다. 데이터는 나이브 T-세포 전달의 4주 후에(Pre-Tx 그룹), 섬유아세포 및 근섬유아세포 수가 증가되었음을 나타내었다(도 4B 및 도 4D). 섬유아세포 및 근섬유아세포의 수는 Iso Ab를 받은 마우스에서 제8주까지 추가로 증가되었다. 그러나, Tl1a Ab에 의한 처리는 정상 Rag Co과 유사한 수준으로 섬유아세포 및 근섬유아세포 수의 감소를 야기하였다(도 4B 및 도 4D). 흥미롭게도, 80-mg/kg의 Tl1a Ab를 나타낸 마우스에서 근섬유아세포의 감소는 Rag Co 마우스와 통계적으로 상이하지 않은 수준으로 감소되었는데(도 4B 및 도 4D), 이는 섬유생성의 반전을 시사한다.

[0091] 만성 DSS 모델에서, 아이소타입 또는 Pre-Tx 그룹에 비교할 때 Ab 처리에 의한 섬유아세포 및 근섬유아세포 수와 유사한 감소를 관찰하였다(보충적 도 4B 및 도 4D). 양자전이 모델과 일치되게, Tl1a Ab 처리에 의해 장 섬유아세포 및 근섬유아세포 수의 감소는 WT 기준 대조군과 통계적으로 상이하지 않은 수준으로 감소되었다(도 10B 및 도 10D).

[0092] 본 발명자들은 장 섬유아세포 및 근섬유아세포 수의 감소가 직접적인 Tl1a-Dr3 신호전달에 기인하는지의 여부를 설명하기 위해 Dr3 결여(Dr3-/-) 마우스를 생성하였다(도 5A 및 도 5B). 야생형 한배새끼 기준(비-대장염) 마우스에 비해 Dr3-/-에서 상당히 더 적은 장 섬유아세포가 있었다(도 5C). 다음에, 본 발명자들은 생체밖 셀트레이스 바이올렛 분석 및 아넥신 V 염색을 수행하여 WT와 Dr3-/- 마우스 간의 장 섬유아세포에서의 차이가 각각 증식 및/또는 세포자멸사에 기인하는지의 여부를 결정하였다. WT과 Dr3-/- 섬유아세포 간의 중복되는 셀트레이스 바이올렛 강도에 의해 분명한 바와 같이 유세포분석은 유사한 증식률을 나타내었다(도 5D, 상부 패널). 야생형과 Dr3-/- 장 섬유아세포 간에 세포자멸사 비율의 차이는 관찰되지 않았다(도 5D, 하부 패널).

[0093] *실시예 13*

[0094] *Tl1a Ab 요법을 이용한 섬유생성의 반전*

[0095] Tl1a Ab를 이용한 확립된 장 섬유증 반전의 분자적 메커니즘을 연구하기 위해, 콜라겐의 발현, 섬유생성 프로그램 매개체(Tgfβ1, Ctgf, Igf1, Pten 및 Il31Ra), 및 세포외 기질(ECM) 리모델링에 수반된 인자(Mmp 및 Timp)를 측정하였다. 양자전이와 만성 DSS 모델(본 명세서의 표 1 및 표 2)에서 더 낮은 수준의 콜라겐 발현을 발견하였다. 양자전이와 만성 DSS 모델 둘 다에서의 Tgfβ1 및 Il31Ra, 및 양자전이 모델에서의 Igf1을 포함하는 전-섬유생성 매개체의 더 낮은 발현과 함께 Tl1a Ab를 이용한 섬유생성 프로그램에서의 정규화를 관찰하였다(표 1 및 표 2). Tgfβ 신호전달의 하류 매개체인 결합 조직 성장인자(Ctgf)의 발현은 양자전이 모델에서의 Pre-Tx 및 Iso Ab 그룹에 비해 Tl1a Ab 투여에 의해 감소되었다. 메탈로프로테아제(Mmp) 및 메탈로프로테아제의 조직 저해제(Timp)의 발현을 측정함으로써 ECM 리모델링을 평가하였다. 아이소타입 Ab 그룹에 비해, ECM 분해에 수반된 유전자의 발현은 양자전이 모델(Mmp2, Mmp3; 표 1)에서 그리고 만성 DSS 모델(Mmp2, Mmp3, Mmp13; 표 2)에서 Tl1a Ab로 처리한 마우스에서 감소되었다. 특히, Timp의 발현은 양자전이 모델에서(Timp2, 표 1) 그리고 만성

DSS 모델에서(Timp1, Timp2; 표 2) Tl1a 처리에 의해 더 낮아졌다. 이들 결과는 콜라겐 합성의 감소를 야기하는 Tl1a Ab에 의한 섬유생성 프로그램에서 감소가 있음을 입증한다. Mmp와 Timp 둘 다의 낮은 발현은 조직 손상을 유도하기 보다는 확립된 ECM 성분의 향상된 제거에 기여할 수 있다. 따라서, Tl1a Ab에 의해 확립된 섬유증의 반전은 감소된 섬유생성 프로그램 및 가능하게는 Mmp와 Timp 둘 다의 감소의 순 결과일 수 있다는 것을 시사한다.

[0096] *실시예 14*

[0097] *장 섬유아세포는 Dr3을 발현시키고, Tl1a 자극에 반응한다*

[0098] 본 발명자들은 장 섬유아세포는 직접적인 Tl1a 신호전달에 기능적으로 반응할 수 있는지 여부를 조사하였다. Tl1a에 대한 유일한 공지된 수용체인 Dr3의 mRNA 수준을 측정하였고, WT에서 낮은 수준으로 발현되었지만 Dr3 결여 1차 장 섬유아세포에서 그렇지 않은 것을 발견하였다(도 6A, 상부 패널). 일치되게, 면역형광 염색은 Dr3이 WT 1차 장 섬유아세포 상에서 발현된 것을 나타내었다(도 6A, 하부 패널). 유세포 분석을 이용하여, 본 발명자들은 Dr3이 αSMA 발현이 없는 섬유아세포에 비해 αSMA과 공동발현시키는 섬유아세포 상에서 우선적으로 발현된 것을 발견하였다(도 6B). 본 발명자들은 다음에 장 섬유아세포가 Tl1a 자극에 반응할 수 있고 섬유아세포 활성화의 마커로서 콜라겐(Col1a2) 및 Il31 수용체(Il31Ra)를 사용할 수 있는지의 여부를 확인하였다. 본 발명자들은 Tl1a가 생체밖 뮤린 1차 장 섬유아세포에서 Col1a2 및 Il31Ra의 발현을 용량 의존적으로 증가시킬 수 있다는 것을 나타내었다(도 6C). Tl1a 자극의 특이성은 생체밖 Dr3-/- 뮤린 장 섬유아세포에서 Col1a2 및 Il31Ra의 무딘 Tl1a 유도에 의해 입증된다(도 6D). 이들 데이터는 장 섬유아세포가 Dr3를 발현시키고 직접적인 Tl1a 신호전달에 기능적으로 반응할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0099] *실시예 15*

[0100] *섬유증 매개체의 발현 분석을 위한 결과*

표 1

양자전이 대장염 모델에서 섬유증 매개체의 발현 분석

	기준	Pre-Tx	Iso Ab	Tl1a Ab - 80 mg/kg			
	% β-액틴 n=6	% β-액틴 n=6	% β-액틴 n=7	% β-액틴 n=6	p 대		
					Rag	Pre-Tx	Iso Ab
col1a1	0.19 ± 0.12	0.19 ± 0.12	0.21 ± 0.10	0.11 ± 0.03	ns	0.024	0.03
col1a2	0.49 ± 0.29	0.76 ± 0.32	1.23 ± 0.78	0.39 ± 0.12	ns	0.024	0.026
col3a1	12.69 ± 3.61	16.45 ± 3.93	16.08 ± 4.04	9.66 ± 3.44	ns	0.0073	0.014
col4a1	1.54 ± 0.32	1.95 ± 0.32	1.88 ± 0.84	1.19 ± 0.33	ns	0.00055	ns
Tgfβ1	0.16 ± 0.06	0.40 ± 0.16	0.50 ± 0.17	0.25 ± 0.06	0.018	0.046	0.003
Ctgf	0.66 ± 0.13	1.04 ± 0.40	1.04 ± 0.32	0.54 ± 0.08	ns	0.021	0.007
Igf1	0.32 ± 0.06	0.53 ± 0.18	0.73 ± 0.36	0.41 ± 0.15	ns	ns	0.047
Pten	3.80 ± 0.75	2.28 ± 0.53	1.86 ± 0.25	2.03 ± 0.67	0.0015	ns	ns
Il31Ra	0.003 ± 0.001	0.005 ± 0.002	0.007 ± 0.003	0.004 ± 0.001	ns	ns	0.034
Mmp2	0.32 ± 0.072	0.43 ± 0.12	0.44 ± 0.13	0.28 ± 0.07	ns	0.015	0.015
Mmp3	0.046 ± 0.022	1.15 ± 1.15	1.18 ± 0.70	0.34 ± 0.37	0.043	ns	0.036
Mmp13	0.047 ± 0.015	0.20 ± 0.17	0.18 ± 0.08	0.10 ± 0.06	ns	ns	ns
Timp1	0.038 ± 0.014	0.19 ± 0.24	0.18 ± 0.12	0.14 ± 0.07	0.016	ns	ns
Timp2	1.11 ± 0.27	0.86 ± 0.15	0.79 ± 0.12	0.59 ± 0.18	0.001	0.001	0.048

[0101] ns = 유의하지 않음

표 2

DSS 모델에서 섬유증 매개체의 발현 분석

	WT	Pre-Tx Co	아이소타입 Co	Tl1a Ab - 20 mg/kg			
	% β-액틴 n=6	% β-액틴 n=5	% β-액틴 n=5	% β-액틴 n=5	p 대 WT	p 대 Pre-Tx	p 대 아이소타입
col1a1	0.54 ± 0.45	0.55 ± 0.36	0.67 ± 0.45	0.30 ± 0.17	ns	ns	ns
col1a2	0.67 ± 0.26	1.20 ± 0.94	1.19 ± 0.93	0.63 ± 0.31	ns	ns	ns
col3a1	35.79 ± 10.95	38.64 ± 18.02	35.18 ± 9.74	23.28 ± 3.47	0.044	ns	0.036
col4a1	2.60 ± 1.08	2.62 ± 1.37	2.70 ± 0.54	1.83 ± 0.10	ns	ns	0.010
Tgfβ1	0.21 ± .06	0.38 ± 0.15	0.43 ± 0.03	0.22 ± 0.04	ns	0.041	6.943E-05
Ctgf	0.97 ± .27	1.1 ± .32	1.14 ± .36	0.84 ± .21	ns	ns	ns
Igf1	0.48 ± 0.18	0.85 ± 0.63	1.09 ± 0.52	0.65 ± 0.28	ns	ns	ns
Pten	0.004 ± 0.003	0.008 ± 0.004	0.012 ± 0.003	0.008 ± 0.002	ns	ns	ns
Il31Ra	3.13 ± 0.65	2.56 ± 0.61	2.67 ± 0.97	2.69 ± 0.31	0.020	ns	0.046
Mmp2	0.52 ± 016	0.60 ± 0.29	1.21 ± 0.38	0.52 ± 0.25	ns	ns	0.007
Mmp3	0.03 ± 0.015	2.07 ± 3.70	1.91 ± 0.10	0.42 ± 0.27	0.003	ns	1.48E-05
Mmp13	0.05 ± 0.011	0.61 ± 1.07	1.02 ± 0.21	0.21 ± 0.15	0.014	ns	0.0003
Timp1	0.04 ± 0.024	0.32 ± 0.37	0.33 ± 0.06	0.15 ± 0.07	0.003	ns	0.004
Timp2	1.02 ± 0.32	0.88 ± 0.17	1.12 ± 0.11	0.74 ± 0.14	ns	ns	0.005

[0102] ns = 유의하지 않음

[0103] *실시예 16*

[0104] *TL1A-Dr3 신호전달을 차단시키는 것은 장 섬유아세포 및 근섬유아세포의 수를 감소시켰다 - 추가적인 결과*

[0105] 결장 근섬유아세포는 장 섬유생성에 수반된 세포 집단이다. Tl1a Ab에 의한 콜라겐 침착 감소의 세포 메커니즘을 연구하기 위해, 비멘틴의 섬유아세포 발현 및 비멘틴과 알파 평활근 액틴(αSMA)의 근섬유아세포 공동발현을 측정하여 이들 세포 유형의 수를 평가하였다. Pre-Tx와 Iso Ab 그룹 둘 다에서 나이브 T-세포 전달 후에, 결장 섬유아세포 및 근섬유아세포의 수는 증가되었다(도 11a). 그러나, Tl1a Ab에 의한 치료는 정상 Rag Co와 유사한 수준으로 섬유아세포 및 근섬유아세포 수의 감소를 야기하였다(도 11a).

[0106] 만성 DSS 모델에서, Tl1a Ab로 처리한 마우스는 Iso 또는 Pre-Tx 그룹에 비해 결장 섬유아세포 및 근섬유아세포 수의 유사한 감소를 나타내었다(도 11b). 양자전이 모델에서 관찰한 것과 일치되게, Tl1a Ab 처리에 의한 장 섬유아세포 및 근섬유아세포의 수는 WT 기준 대조군과 통계적으로 상이하지 않는 수준으로 감소되었다(도 11b). 만성 DSS 대장염 모델에서 WT Co 그룹에 비해 Tl1a Ab 처리에 의해 여전히 상당히 악화된 대장염이 있기 때문에, 감소된 수의 근섬유아세포 및 섬유아세포는 감소된 염증을 통한 단지 2차 효과보다는 중화 Tl1a의 직접적 결과에 적어도 부분적으로 일치한다.

[0107] 다음에 만성 대장염의 이들 뮤린 모델에서 섬유증 변화와 관련된 Dr3 발현 변화가 있는지의 여부를 평가하였다. 면역형광 염색은 양자전이와 만성 DSS 대장염 모델 둘 다에서의 기준 대조군(Rag Co 및 WT Co)과 Tl1a Ab 처리군 둘 다에 비해 Pre-Tx 및 Iso Ab 그룹에서 증가된 Dr3 발현을 나타내었다(도 11c, d). 현저하게는, Pre-Tx 및 아이소타입 Ab 그룹에서 섬유아세포의 백분율의 Dr3 발현이 있었다(도 11c, d). 실시간 정량적 역 전사효소-PCR 분석은 모델 둘 다에서 Dr3의 발현이 기준 대조군(Rag Co 및 WT Co)과 Tl1a Ab 처리군 둘 다에서의 마우스에 비해 Iso Ab에서 상당히 더 높았다는 것을 나타내었다(도 11e). 추가적으로, Tl1a mRNA 발현은 양자전이와

만성 DSS 대장염 모델 둘 다에서 비염증 대조군(Rag Co 및 WT Co) 및 Tl1a Ab 처리군에 비해 Iso Ab 그룹에서 상당히 증가되었다(도 11f). 이들 결과는 Dr3-Tl1a 발현과 장 섬유증의 증가 사이의 직접적인 관계와 일치된다.

[0108] 장 섬유아세포 및 근섬유아세포 수의 감소가 직접적인 Tl1a-Dr3 신호전달에 기인할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해, Dr3 결여 (Dr3-/-) 마우스를 생성하였다. 8주령까지의 WT 또는 Dr3-/- 마우스에서 자발적 대장염이 없었지만(도 12a, 상부 패널), 비멘틴의 면역형광 염색(도 12a, 중간 패널) 및 결장 당 총 회수된 섬유아세포의 정량화(도 12a, 하부 패널)에 의해 나타내는 바와 같이 WT 한배새끼 마우스에 비해 Dr3-/-에서 상당히 더 적은 장 섬유아세포가 있었다. 비멘틴과 αSMA에 의한 면역형광에 의해(도 12a, 중간 패널) 또는 광현미경검사를 이용할 때(도 12a, 하부 패널) WT과 Dr3-/- 섬유아세포 간의 형태학적 차이는 없었다. 생체밖 셀트레이스 바이올렛 분석 및 아넥신 V 염색을 사용하여 WT과 Dr3-/- 마우스 간의 장 섬유아세포 수의 차이가 각각 증식 및/또는 세포자멸사에 기인하였는지의 여부를 결정하였다. 유세포 분석은 WT와 Dr3-/- 장 섬유아세포 간의 중복 셀트레이스 바이올렛 강도에 의해 증명된 바와 유사한 증식 속도를 나타내었다(도 12b). WT와 Dr3-/- 장 섬유아세포 간의 세포자멸사 속도에서 차이가 관찰되지 않았다(도 12c).

[0109] *실시예 17*

[0110] *장 섬유아세포는 Dr3을 발현시키며 TL1A 자극에 반응한다 - 추가적인 결과*

[0111] 장 섬유아세포가 직접적인 Tl1a 신호전달에 기능적으로 반응하는지의 여부를 결정하기 위해, Dr3의 mRNA 수준을 측정하였고, WT에서 낮은 수준으로 발현되었지만(0.0018±0.001% β-액틴) Dr3 결여 1차 장 섬유아세포에서 검출가능하지 않은 것으로 발견하였다. Dr3이 비멘틴+αSMA- 섬유아세포 또는 비멘틴+αSMA+ 근섬유아세포에서 발현되었는지의 여부를 결정하기 위해 유세포 분석을 수행하였다. 결과는 Dr3이 비멘틴+αSMA- 섬유아세포에 비해 비멘틴+αSMA+ 근섬유아세포 상에서 우선적으로 발현되었는지를 나타내었다. 추가적으로, 근섬유아세포 상에서 αSMA 수준과 Dr3 발현의 직접적인 상관관계가 있었으며; 가장 높은 αSMA 발현을 지니는 근섬유아세포 상에서 더 고비율의 Dr3 발현을 지녔다(도 13a). 추가적으로, αSMA 및 Dr3으로 면역염색한 분류된 αSMA 양성 1차 장 섬유아세포는 WT에서 Dr3의 공동염색을 나타내었지만, Dr3 결여 근섬유아세포에서는 그렇지 않았는데, 이는 Dr3이 αSMA 양성 1차 장 섬유아세포 상에서 발현되었음을 나타낸다(도 13b).

[0112] 장 섬유아세포가 직접적 Tl1a 자극에 반응할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해, 콜라겐(Col1a2, 섬유아세포 기능에 대한 마커) 발현 및 Il31Ra의 변화(Il31Ra는 섬유아세포 상에서 발현됨)를 외인성 Tl1a 단백질의 첨가에 의해 측정하였다. 결과는 생체밖 뮤린 1차 장 섬유아세포에서 Col1a2 및 Il31Ra의 발현에서의 Tl1a 용량-의존적 증가를 나타내었다(도 13c). Tl1a 자극의 특이성을 생체밖 Dr3-/- 뮤린 장 섬유아세포에서 Col1a2 및 Il31Ra의 무딘 Tl1a 유도에 의해 입증하였다(도 13d). 대조적으로, Col1a2 또는 Il31Ra의 차별적인 유도는 공지된 섬유아세포 성장 인자(Tgfβ 및 Igf1) 또는 전염증 자극(Tnfα)를 이용하여 알 수 없었다(도 13d). 이들 데이터는 장 섬유아세포가 Dr3을 발현시켰고, 직접적 Tl1a 신호전달에 기능적으로 반응할 수 있었다는 것을 나타내었다.

[0113] *실시예 18*

[0114] *일반론*

[0115] 장 섬유 협착증은 중증의 크론병의 특징이다. 특정 TNFSF15(TL1A에 대한 유전자명) 변이체를 지니는 환자는 TL1A를 과발현시키며, 소장에서 협착이 발생될 더 높은 위험을 가진다. 추가적으로, 마우스에서 지속된 Tl1a 발현은 대장염 유발 병태 하에서 소장 및 대장 섬유 협착증을 야기한다. 본 발명자들은 확립된 뮤린 결장 섬유증이 Tl1a 항체에 의해 반전될 수 있었는지의 여부를 결정하였다. 중화 Tl1a 항체에 의한 처리는 결합 조직 성장 인자(Ctgf), Il31Ra, 형질전환 성장인자(Tgf) β1 및 인슐린 유사 성장 인자-1(Igf1)의 저하된 발현의 결과로서 결장 섬유증을 본래의 염증전 수준으로 반전시켰다. 추가적으로, 중화 Tl1a 항체 또는 사멸 도메인 수용체 3(Dr3)의 결실에 의해 Tl1a 기능을 차단하는 것은 조직 섬유증을 매개하는 1차 세포 유형인 섬유아세포 및 근섬유아세포의 수를 감소시켰다. 1차 장 근섬유아세포는 Dr3을 발현시키고, 콜라겐 및 Il31Ra 발현을 증가시킴으로써 직접적 Tl1a 신호전달에 기능적으로 반응한다. 이들 데이터는 조직 섬유증에서 TL1A-DR3 신호전달에 대한 직접적 역할 및 TL1A-DR3 신호전달의 조절이 장 섬유증을 조절한다는 것을 입증하였다.

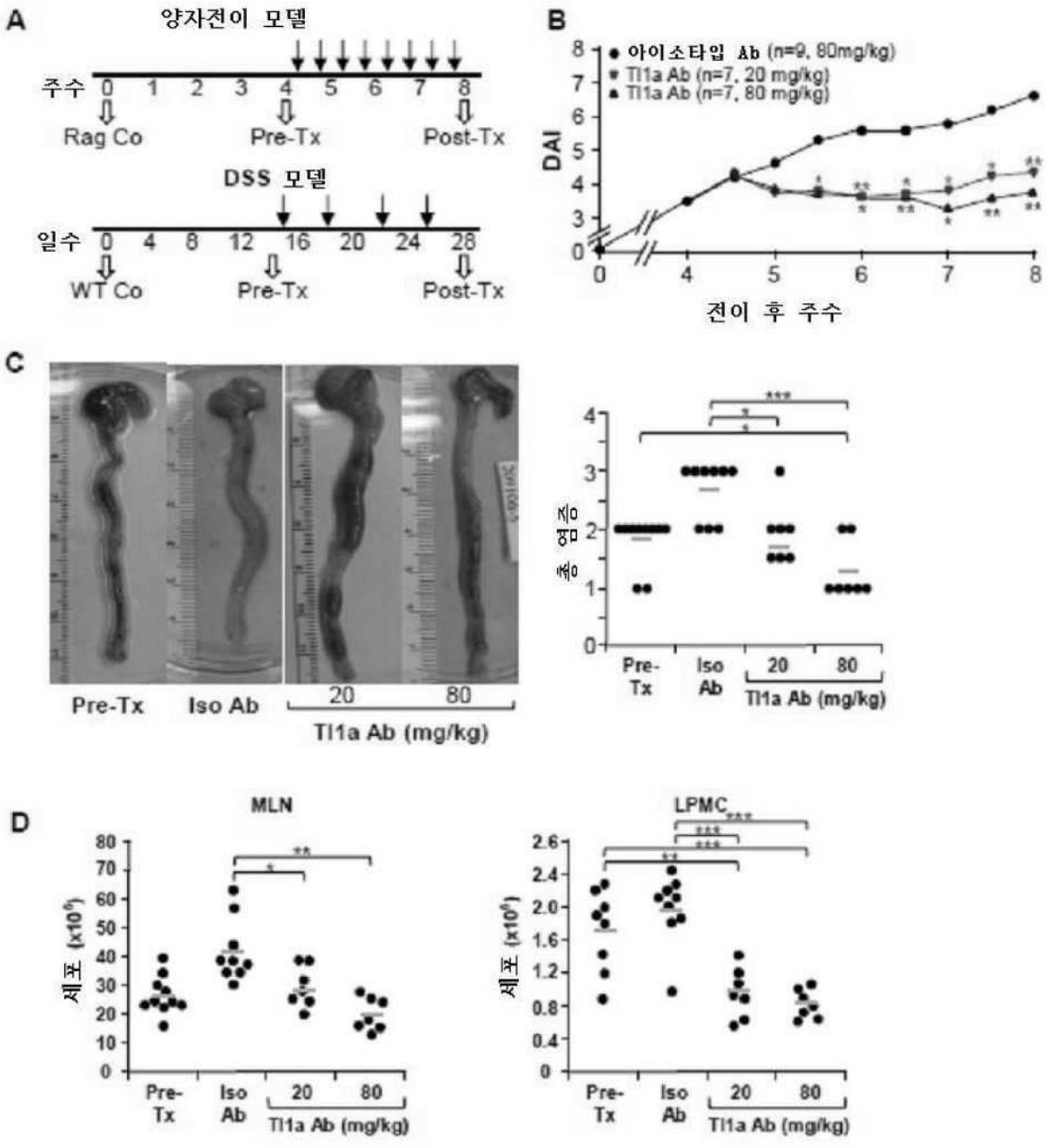
[0116] 본 발명의 다양한 실시형태를 상기 상세한 설명에서 기재하였다. 이들 설명이 상기 실시형태를 직접 기재하지만, 당업자는 본 명세서에 나타내고 기재하는 구체적 실시형태에 대한 변형 및/또는 변화를 인식할 수 있는 것으로 이해된다. 이 설명의 범위 내에 속하는 임의의 이러한 변형 또는 변화가 마찬가지로 본 명세서에 포함되는 것으로 의도된다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에서의 단어 및 어구는 적용가능한 분야(들)의 당업자에 대한 보통의 그리고 익숙한 의미로 제공된다는 것이 본 발명자들의 의도이다.

[0117] 출원 시 출원인에게 공지되어 있는 본 발명의 다양한 실시형태의 앞서 언급한 설명이 제시되며, 예시 및 설명의 목적을 위해 의도된다. 본 설명은 철저한 것으로 또는 개시된 실시형태로 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않으며, 다수의 변형 및 변화가 상기 교시에 비추어 가능하다. 기재된 실시형태는 본 발명의 원칙 및 그의 실행적 적용을 설명하기 위한 작용을 하며 다양한 실시형태에서 그리고 고려되는 특정 용도에 적합한 다양한 변형에 의해 당업자가 본 발명을 이용하는 것을 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 본 발명을 수행하기 위해 개시된 특정 실시형태로 제한되지 않는 것으로 의도된다.

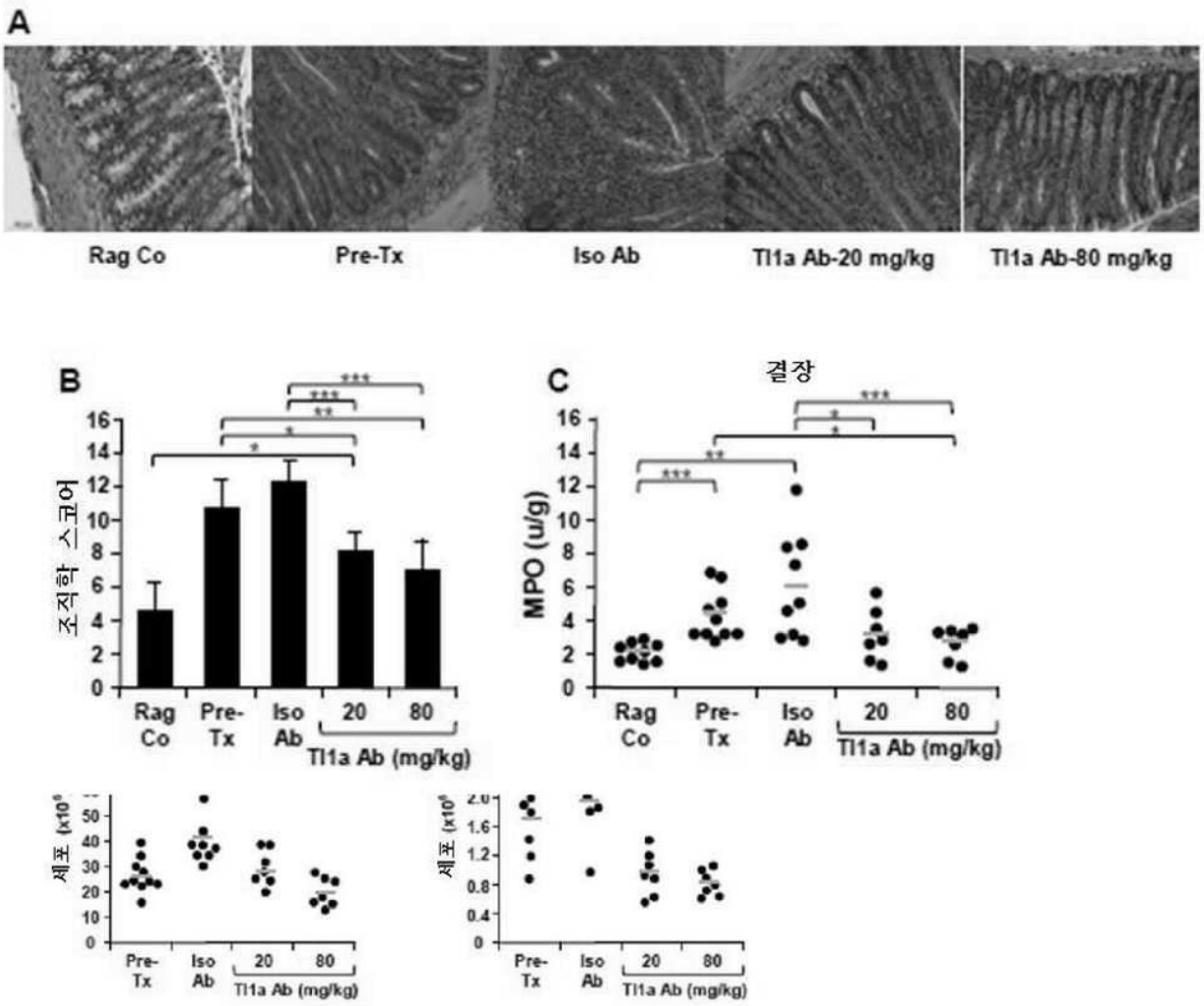
[0118] 본 발명의 특정 실시형태를 나타내고 기재하였지만, 본 명세서의 교시에 기반하여 변화 및 변형이 본 발명 및 그의 더 넓은 양태로부터 벗어나는 일 없이 당업자에게 명확하게 될 것이며, 따라서, 첨부되는 청구범위는 본 발명의 진정한 정신과 범주 내에 있는 것과 같이 그들의 범주 내에서 모든 이러한 변화 및 변형을 포함할 것이다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용되는 용어는 일반적으로 "개방적" 용어로서 의도되는 것으로 이해될 것이다(예를 들어, 용어 "포함하는"은 "포함하지만, 제한되지 않는"으로서 해석되어야 하며, 용어 "갖는"은 "적어도 갖는"으로서 해석되어야 하며, 용어 "포함하다"는 "포함하지만 제한되지 않는" 등으로서 해석되어야 한다).

도면

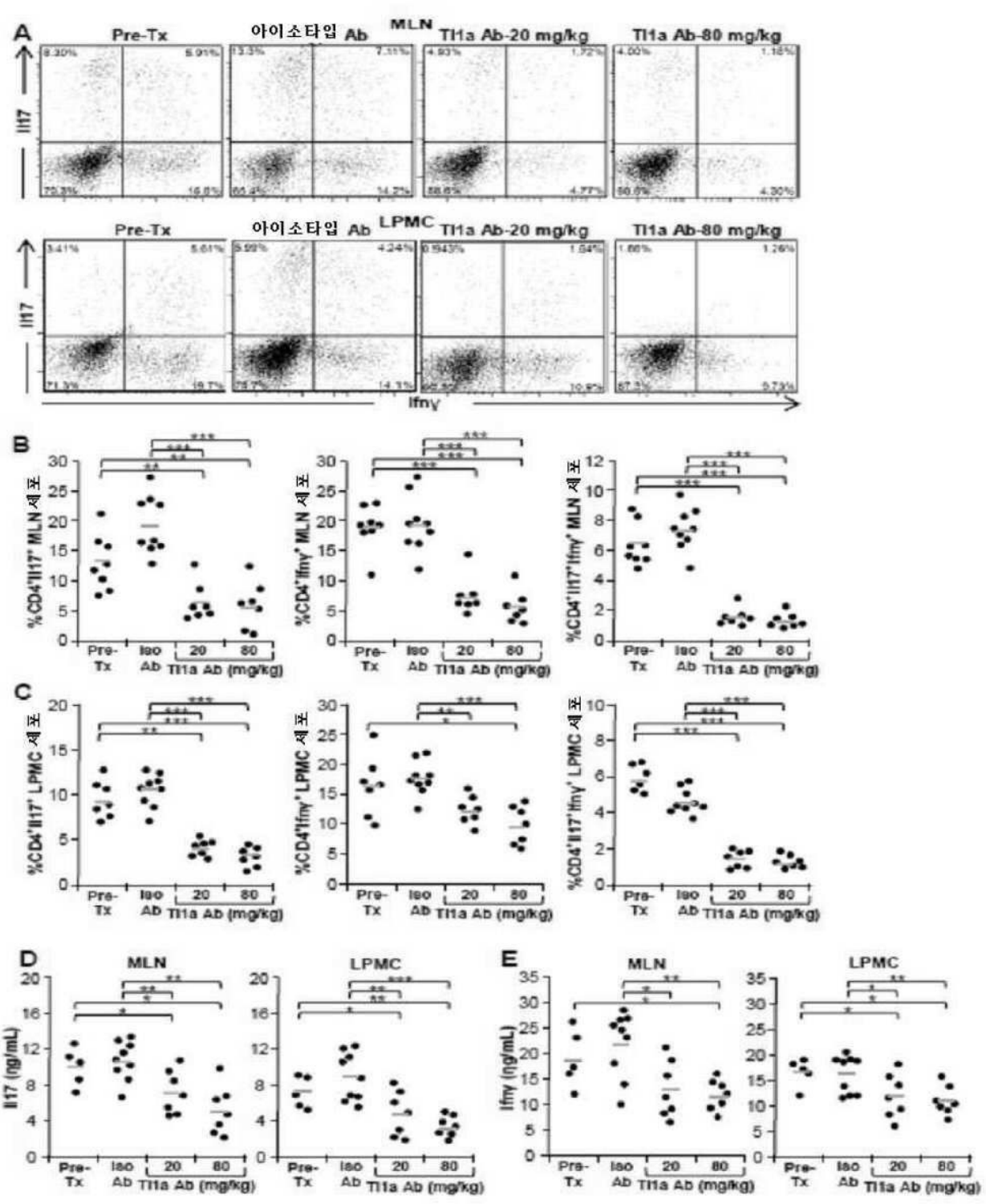
도면1


A
양자전이 모델
주수 0 1 2 3 4 5 6 7 8
Rag Co
Pre-Tx
Post-Tx
DSS 모델
일수 0 4 8 12 16 20 24 28
WT Co
Pre-Tx
Post-Tx
B
아이소타입 Ab (n=9, 80mg/kg)
Tl1a Ab (n=7, 20 mg/kg)
Tl1a Ab (n=7, 80 mg/kg)
DAI
전이 후 주수
C
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)
총 염증
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)
D
MLN
세포 (x10⁶)
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)
LPMC
세포 (x10⁶)
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)

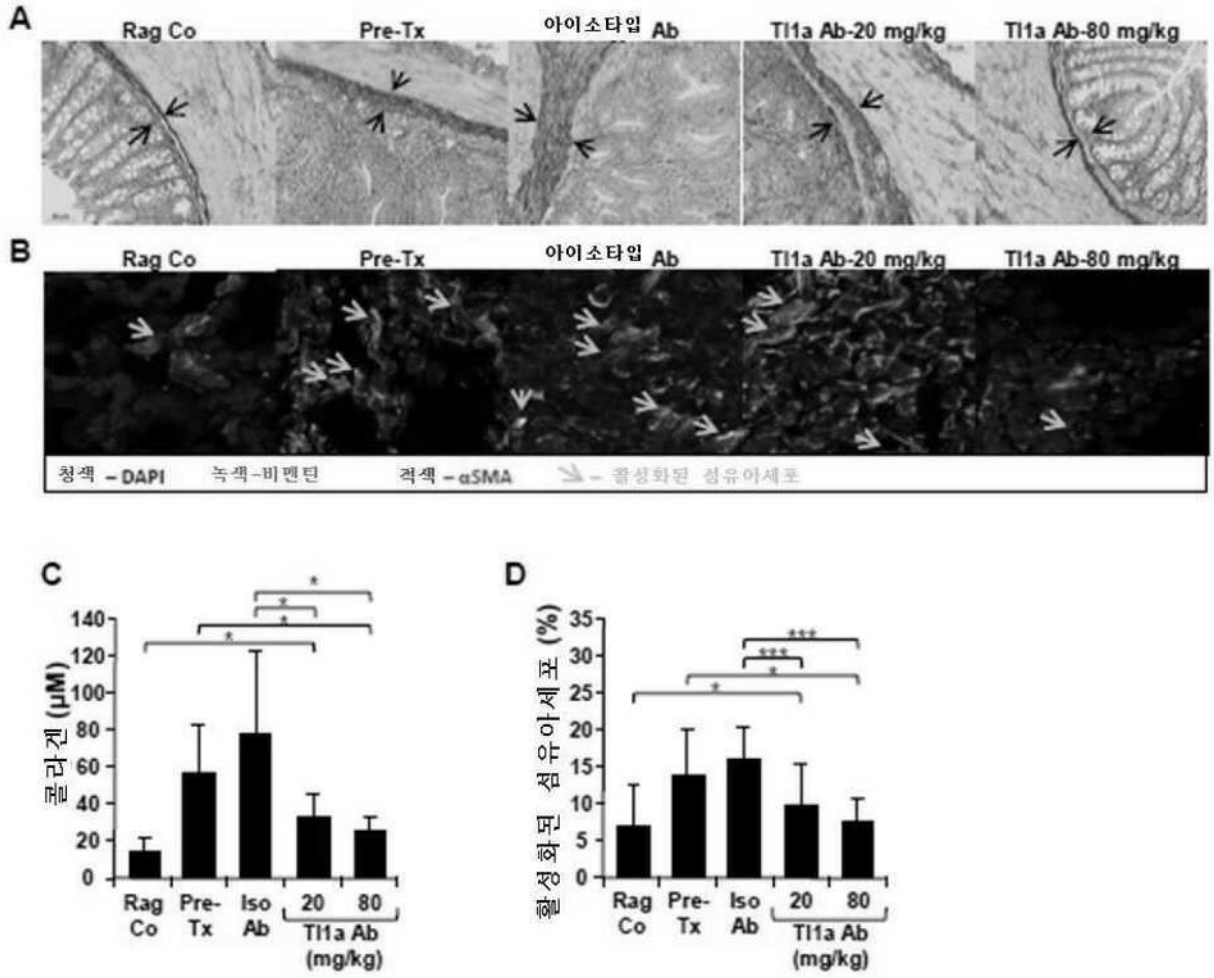
도면2


A
Rag Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab-20 mg/kg
Tl1a Ab-80 mg/kg
B
조직학 스코어
Rag Co
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)
C
결장
MPO (u/g)
Rag Co
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)
세포 (x10⁶
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)
세포 (x10⁶
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)

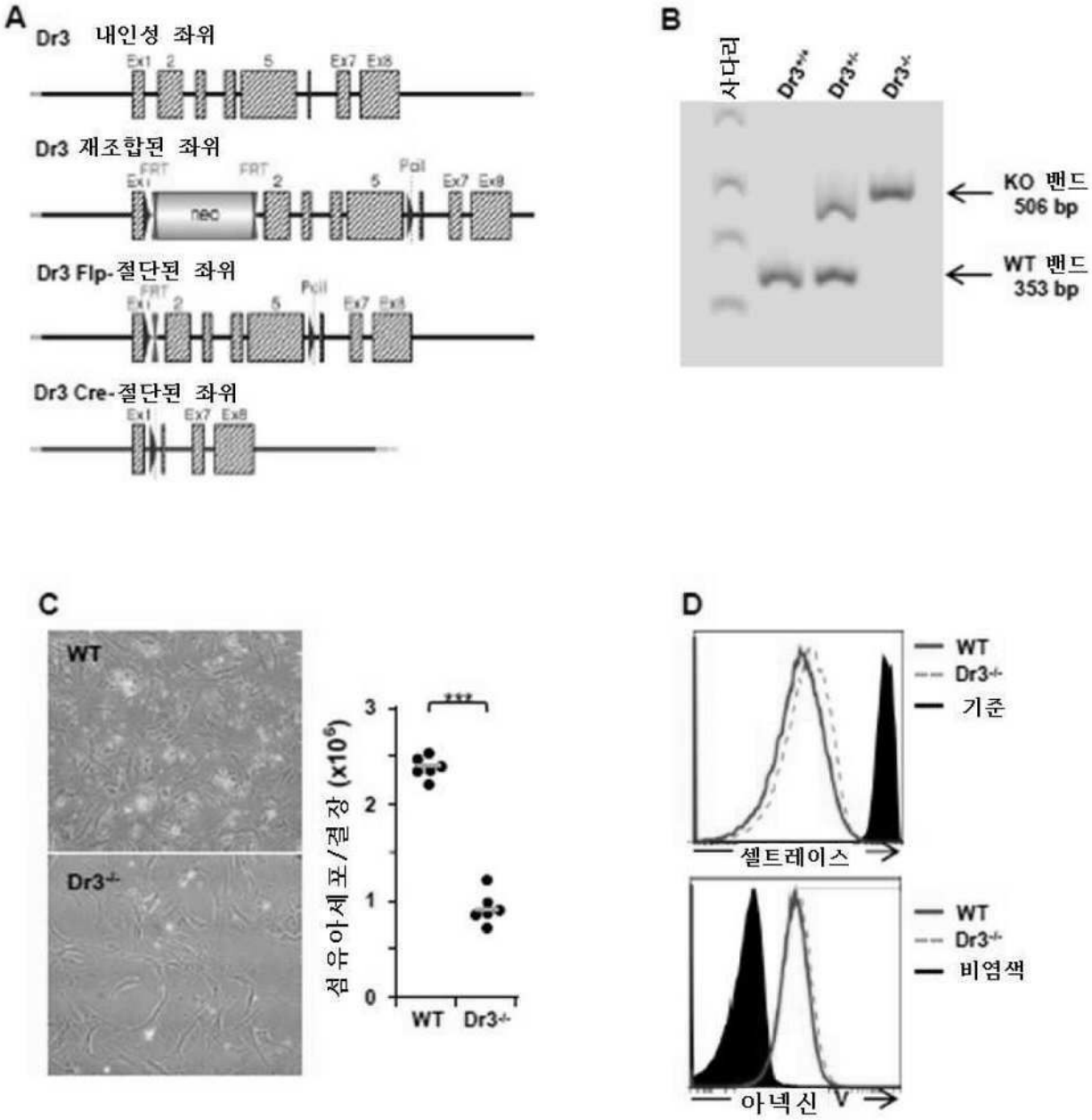
도면3


A
Pre-Tx
아이소타입 Ab
MLN
Tl1a Ab-20 mg/kg
Tl1a Ab-80 mg/kg
Il17
Pre-Tx
아이소타입 Ab
LPMC
Tl1a Ab-20 mg/kg
Tl1a Ab-80 mg/kg
Il17
Ifnγ
B
%CD4+Il17+ MLN 세포
%CD4+Ifnγ+ MLN 세포
%CD4+Il17+Ifnγ+ MLN 세포
C
%CD4+Il17+ LPMC 세포
%CD4+Ifnγ+ LPMC 세포
%CD4+Il17+Ifnγ+ LPMC 세포
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)
D
MLN
LPMC
Il17 (ng/mL)
E
MLN
LPMC
Ifnγ (ng/mL)

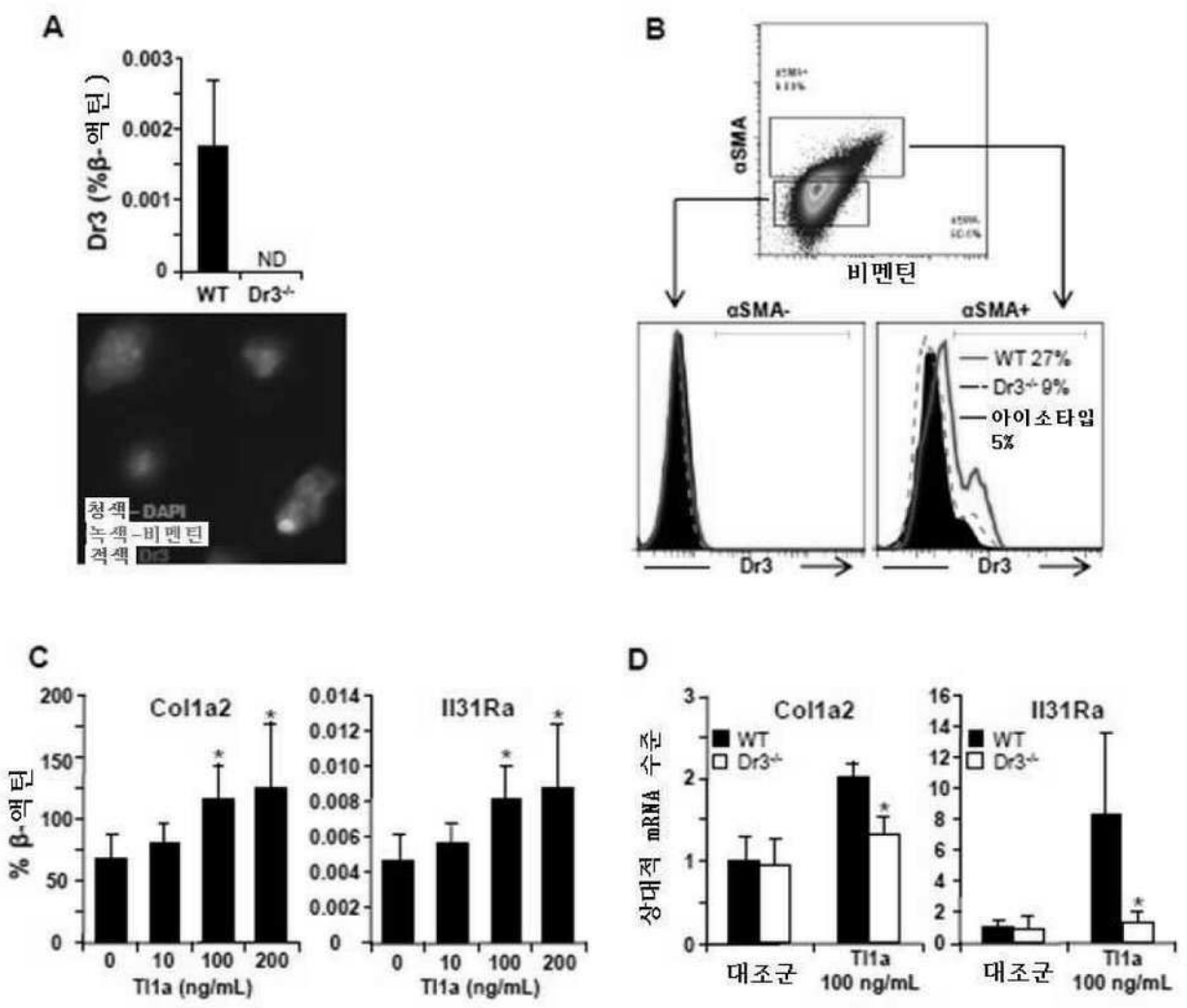
도면4


A
Rag Co
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab-20 mg/kg
Tl1a Ab-80 mg/kg
B
Rag Co
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab-20 mg/kg
Tl1a Ab-80 mg/kg
청색 – DAPI
녹색 – 비멘틴
적색 – αSMA
– 활성화된 섬유아세포
C
콜라겐 (μM)
Rag Co
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)
D
활성화된 섬유아세포 (%)
Rag Co
Pre-Tx
Iso Ab
20
80
Tl1a Ab (mg/kg)

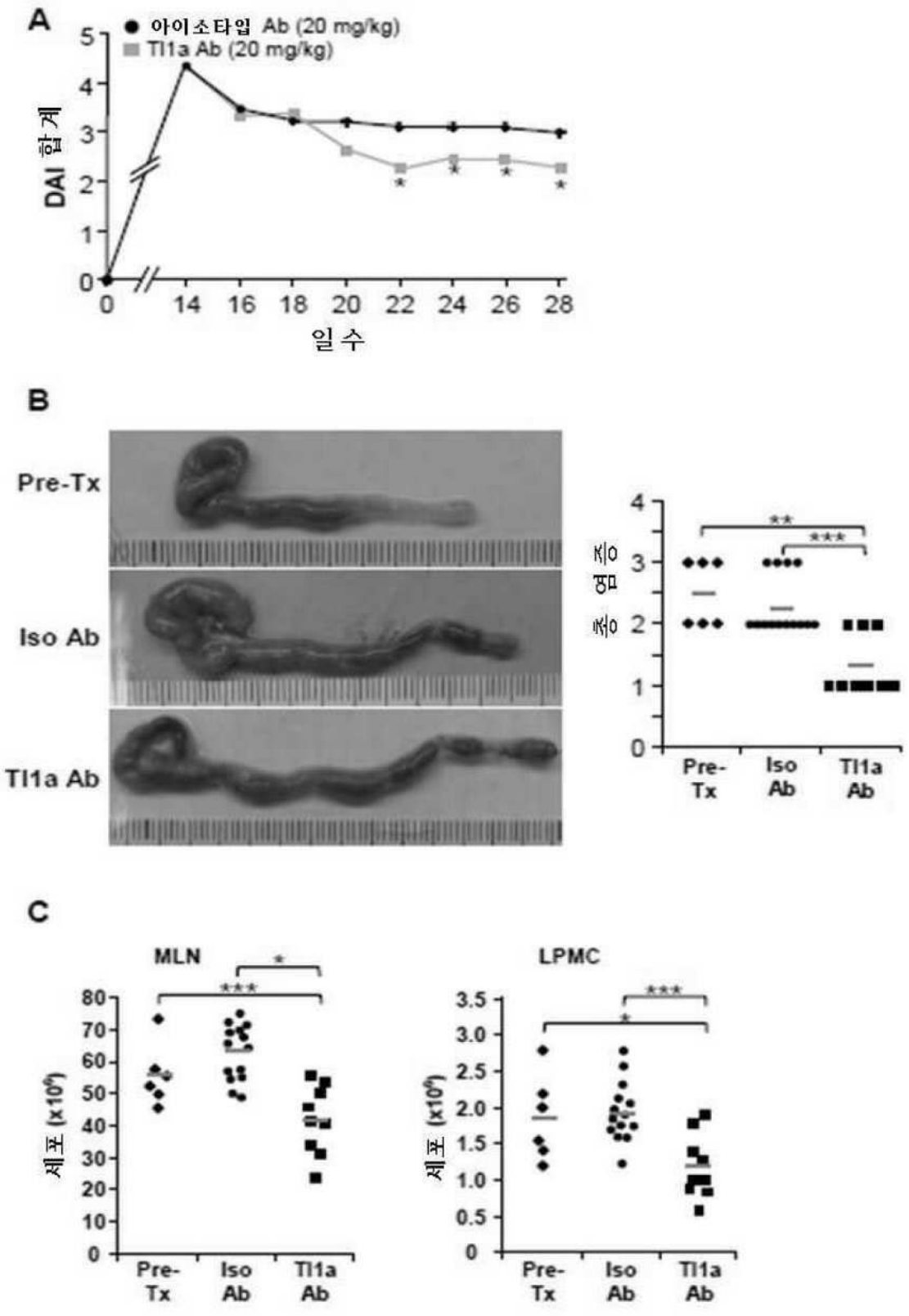
도면5


A
Dr3 내인성 좌위
Ex1 2 5 Ex7 Ex8
Dr3 재조합된 좌위
FRT Ex1 FRT 2 5 PstI Ex7 Ex8
neo
Dr3 Flp-절단된 좌위
FRT Ex1 FRT 2 5 PstI Ex7 Ex8
Dr3 Cre-절단된 좌위
Ex1 Ex7 Ex8
B
사다리
Dr3+/+
Dr3+/-
Dr3-/-
KO 밴드
506 bp
WT 밴드
353 bp
C
WT
Dr3-/-
***
섬유아세포/결장 (x10^6)
3
2
1
0
WT
Dr3-/-
D
WT
Dr3-/-
기준
셀트레이스
WT
Dr3-/-
비염색
아넥신 V

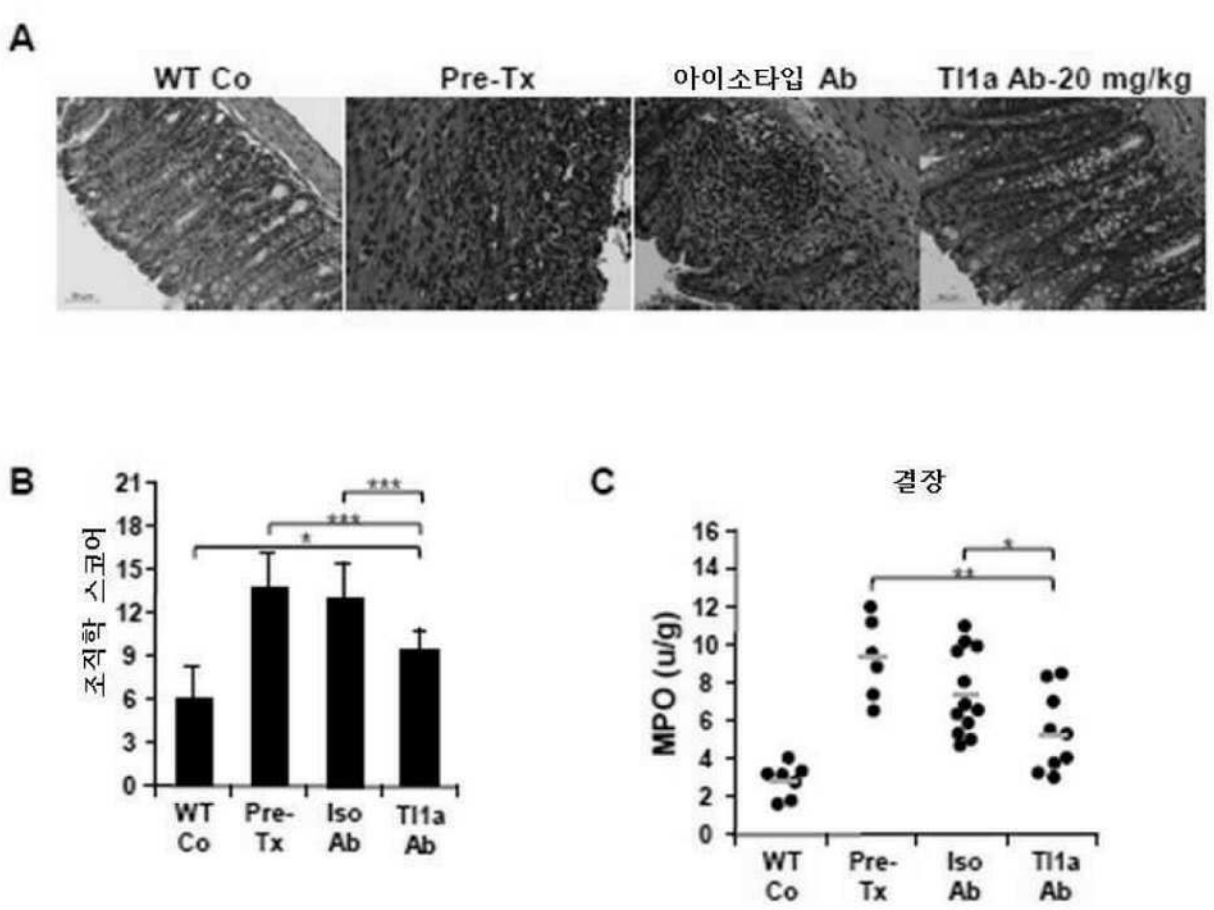
도면6


A
Dr3 (%β-액틴)
0.003
0.002
0.001
0
ND
WT
Dr3-/-
청색 - DAPI
녹색 - 비멘틴
적색 Dr3
B
αSMA
비멘틴
αSMA-
αSMA+
WT 27%
Dr3-/- 9%
아이소타입 5%
Dr3
Dr3
C
% β-액틴
Col1a2
Il31Ra
0
10
100
200
Tl1a (ng/mL)
D
상대적 mRNA 수준
Col1a2
Il31Ra
WT
Dr3-/-
대조군
Tl1a 100 ng/mL

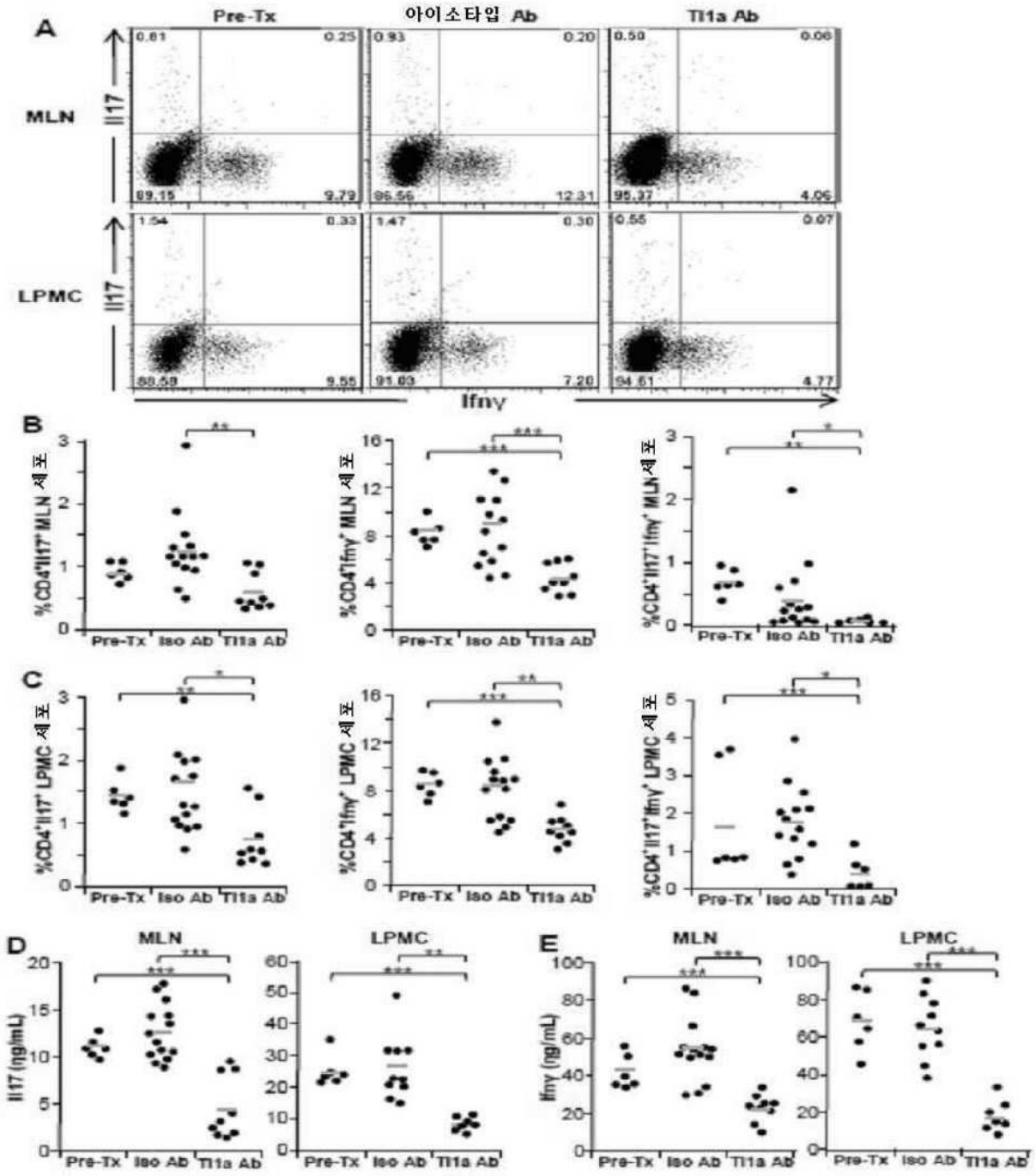
도면7


A
아이소타입 Ab (20 mg/kg)
TI1a Ab (20 mg/kg)
DAI 합계
일 수
B
Pre-Tx
Iso Ab
TI1a Ab
염증 점수
Pre-Tx
Iso Ab
TI1a Ab
C
MLN
LPMC
세포 (x10⁶)
Pre-Tx
Iso Ab
TI1a Ab

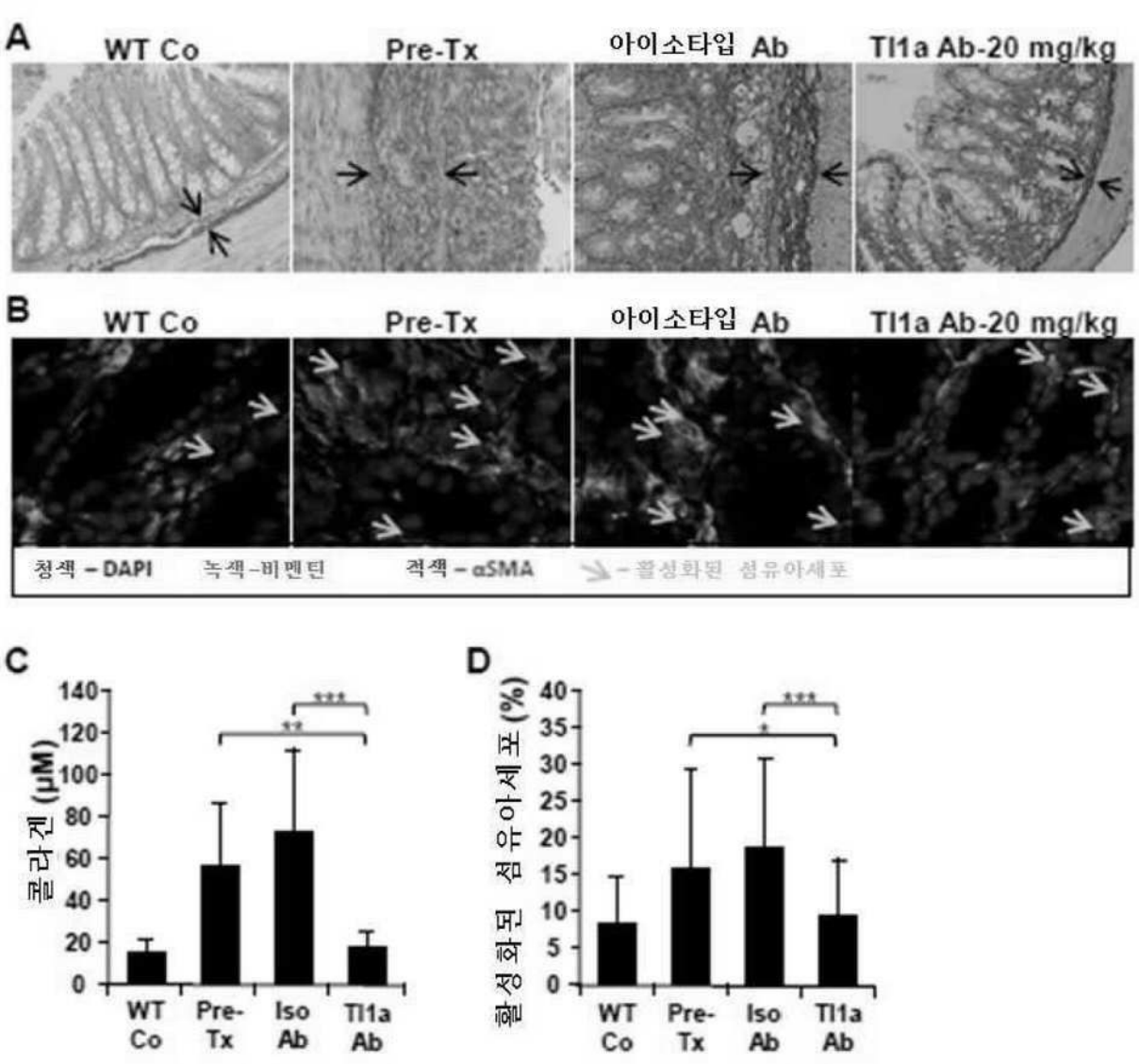
도면8


A
WT Co
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab-20 mg/kg
B
조직학 스코어
21
18
15
12
9
6
3
0
***
***
*
WT Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
C
결장
MPO (u/g)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
**
WT Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab

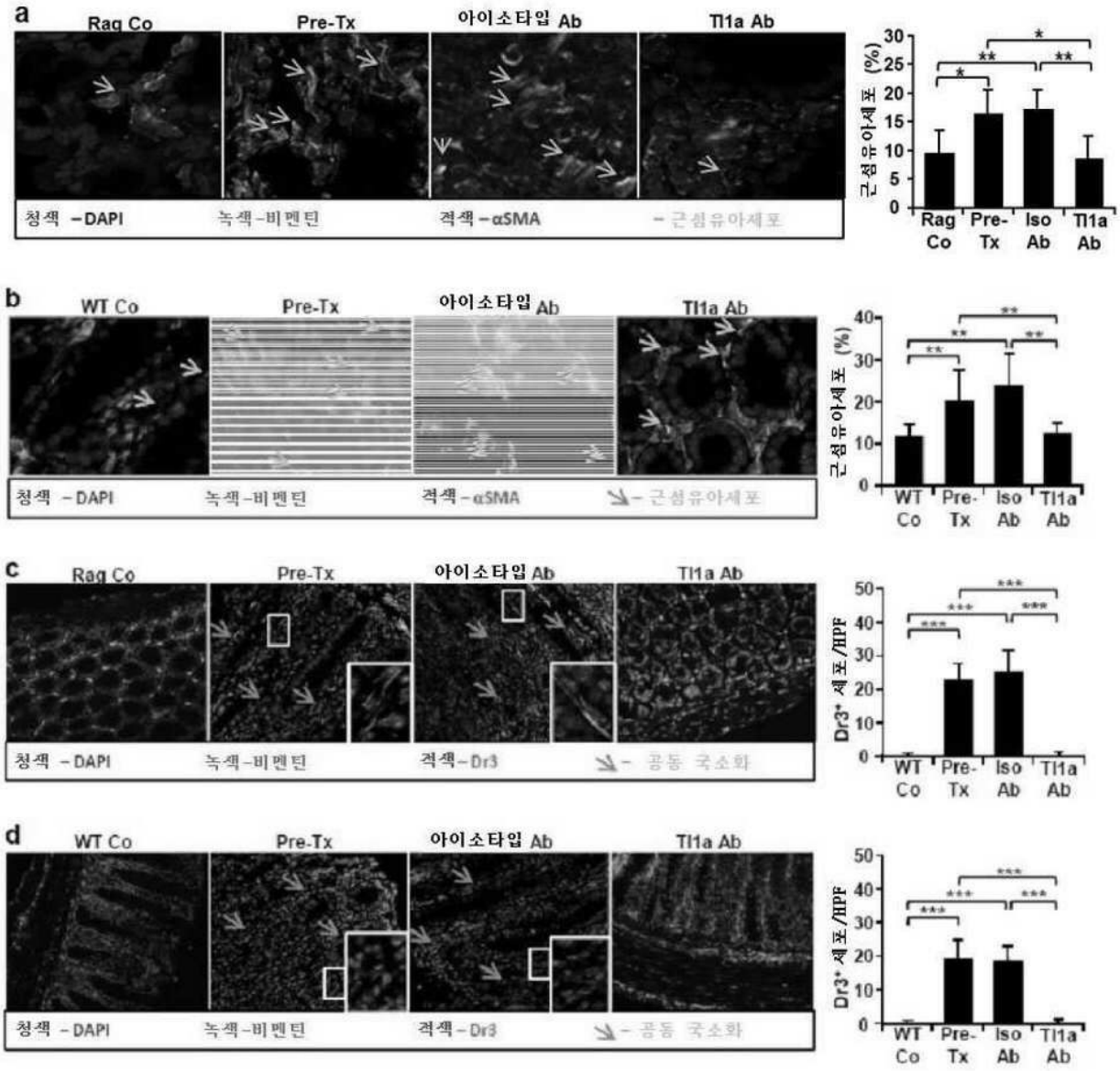
도면9


A
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab
MLN
LPMC
Il17
Ifnγ
0.61
0.25
89.15
9.79
0.93
0.20
86.56
12.31
0.59
0.06
95.37
4.06
1.54
0.33
88.59
9.55
1.47
0.30
91.03
7.20
0.55
0.07
94.61
4.77
B
%CD4+Il17+ MLN 세포
%CD4+Ifnγ+ MLN 세포
%CD4+Il17+Ifnγ+ MLN 세포
C
%CD4+Il17+ LPMC 세포
%CD4+Ifnγ+ LPMC 세포
%CD4+Il17+Ifnγ+ LPMC 세포
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
D
MLN
LPMC
Il17 (ng/mL)
E
Ifnγ (ng/mL)

도면10

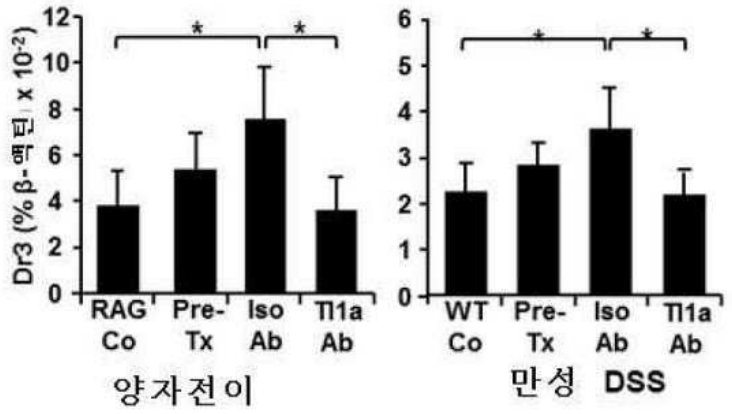

A
WT Co
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab-20 mg/kg
B
WT Co
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab-20 mg/kg
청색 – DAPI
녹색 – 비멘틴
적색 – αSMA
– 활성화된 섬유아세포
C
콜라겐 (μM)
140
120
100
80
60
40
20
0
***
**
WT Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
D
활성화된 섬유아세포 (%)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
***
*
WT Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab

도면11ad

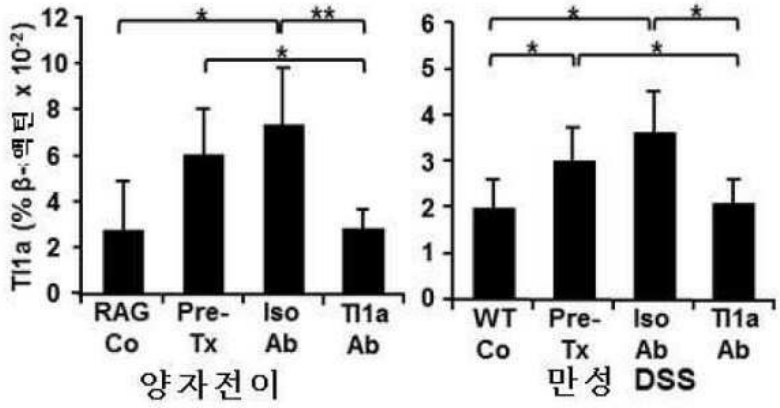

a
Rag Co
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab
청색 – DAPI
녹색 – 비멘틴
적색 – αSMA
– 근섬유아세포
근섬유아세포 (%)
Rag Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
b
WT Co
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab
청색 – DAPI
녹색 – 비멘틴
적색 – αSMA
– 근섬유아세포
근섬유아세포 (%)
WT Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
c
Rag Co
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab
청색 – DAPI
녹색 – 비멘틴
적색 – Dr3
– 공동 국소화
Dr3+ 세포/HPF
WT Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
d
WT Co
Pre-Tx
아이소타입 Ab
Tl1a Ab
청색 – DAPI
녹색 – 비멘틴
적색 – Dr3
– 공동 국소화
Dr3+ 세포/HPF
WT Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab

도면11ef

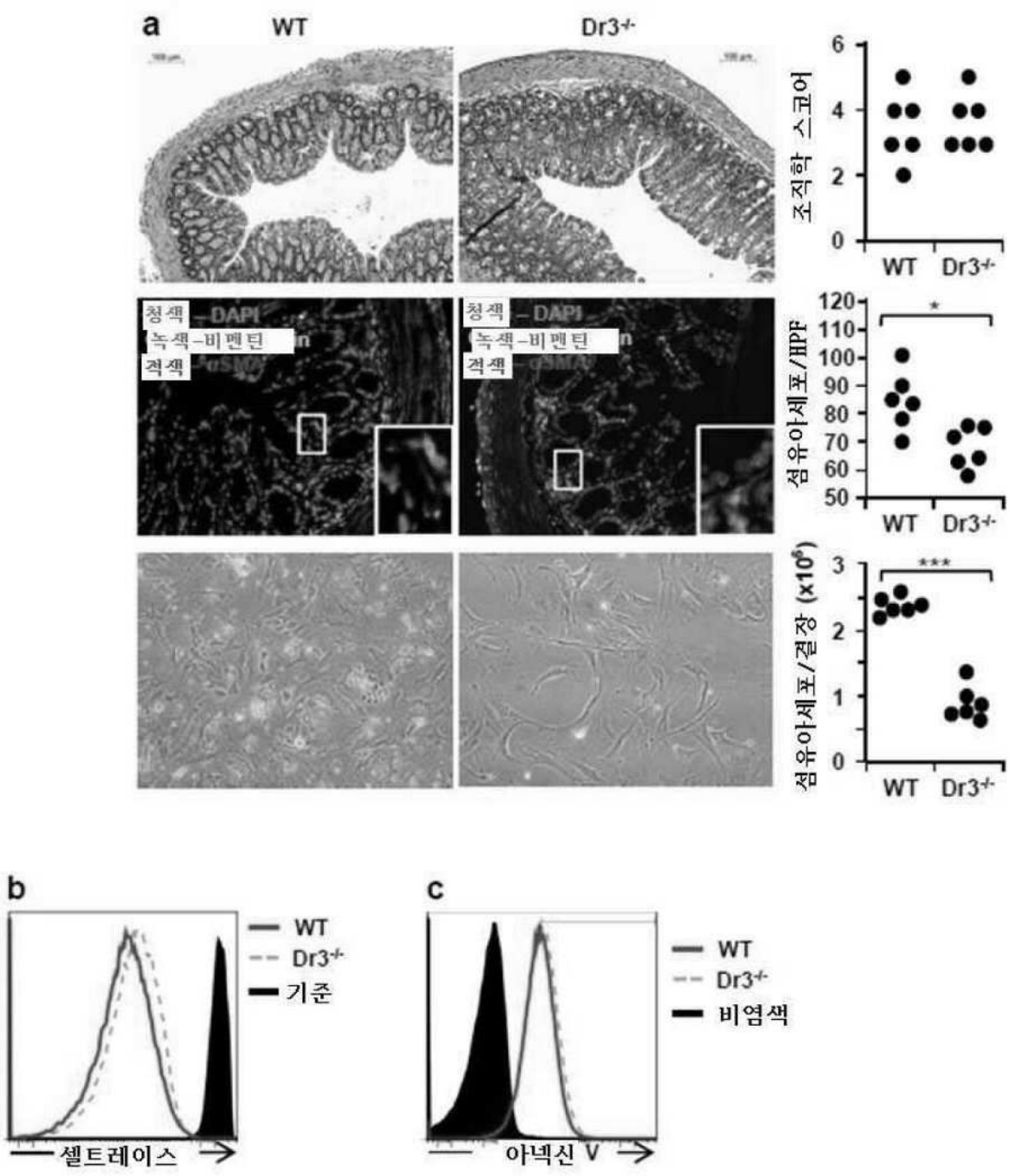
e


Dr3 (% β-액틴 x 10-2)
RAG Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
양자전이
WT Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
만성 DSS

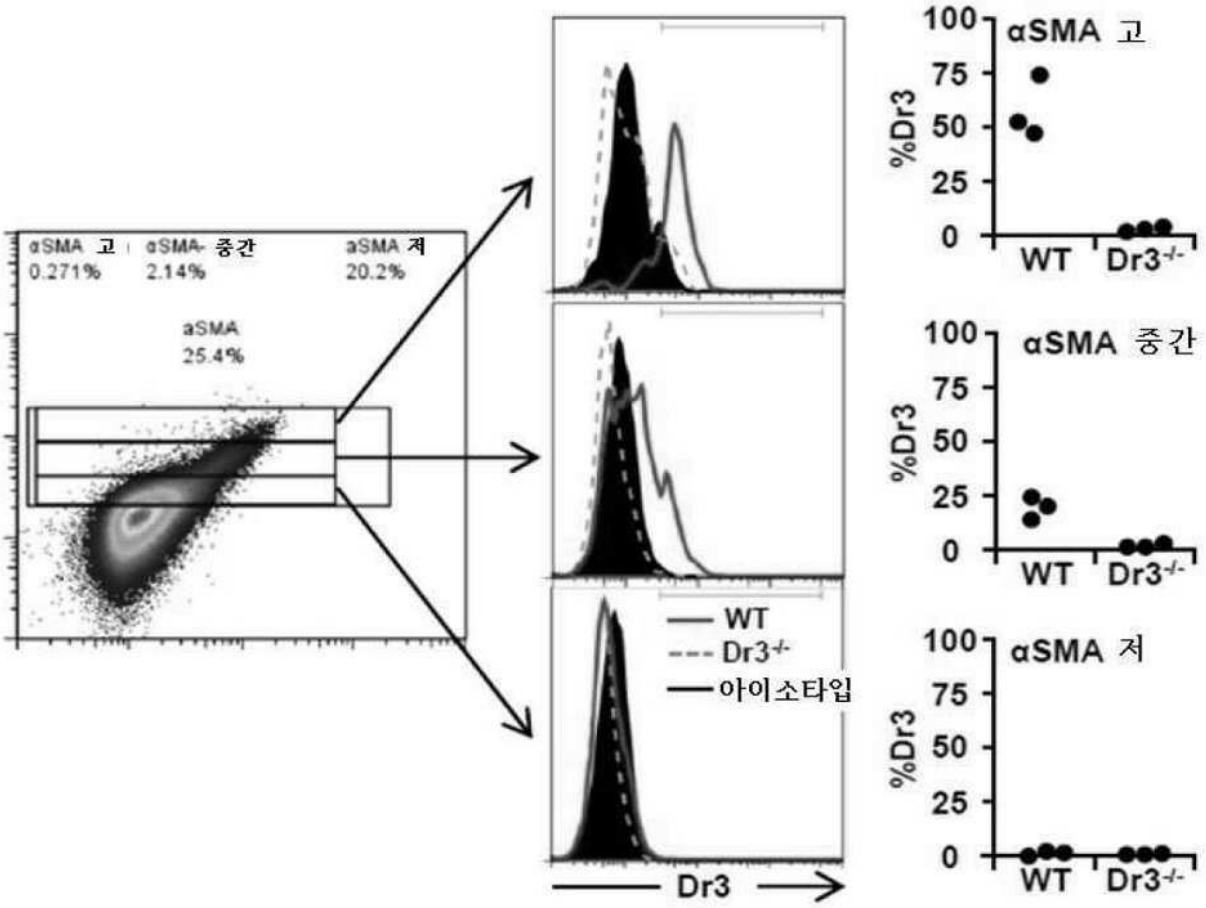
f


Tl1a (% β-액틴 x 10-2)
RAG Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
양자전이
WT Co
Pre-Tx
Iso Ab
Tl1a Ab
만성 DSS

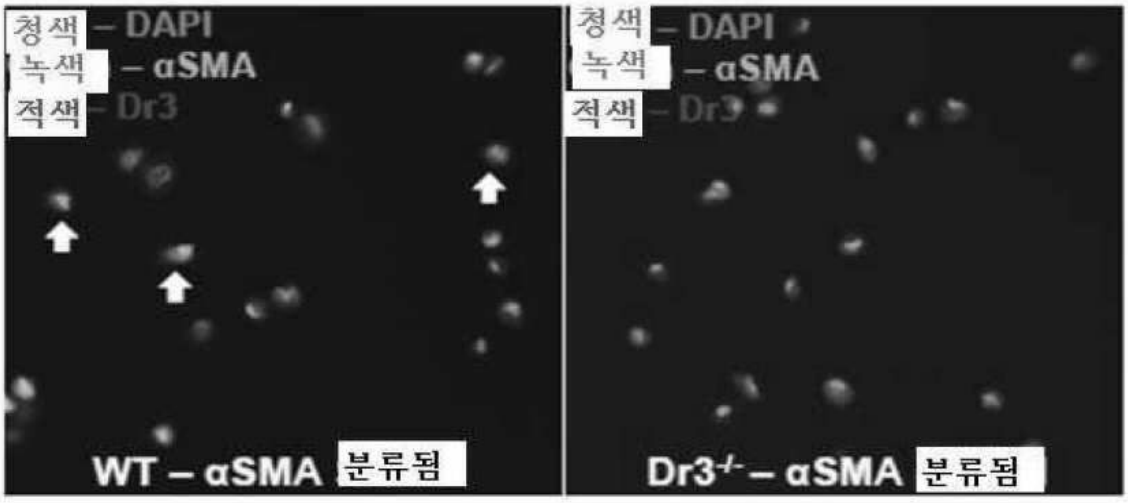
도면12


a
WT
Dr3-/-
청색 – DAPI
녹색 – 비멘틴
적색
조직학 스코어
섬유아세포/HPF
섬유아세포/결장 (x10⁶)
WT
Dr3-/-
b
WT
Dr3-/-
기준
셀트레이스
c
WT
Dr3-/-
비염색
아넥신 V

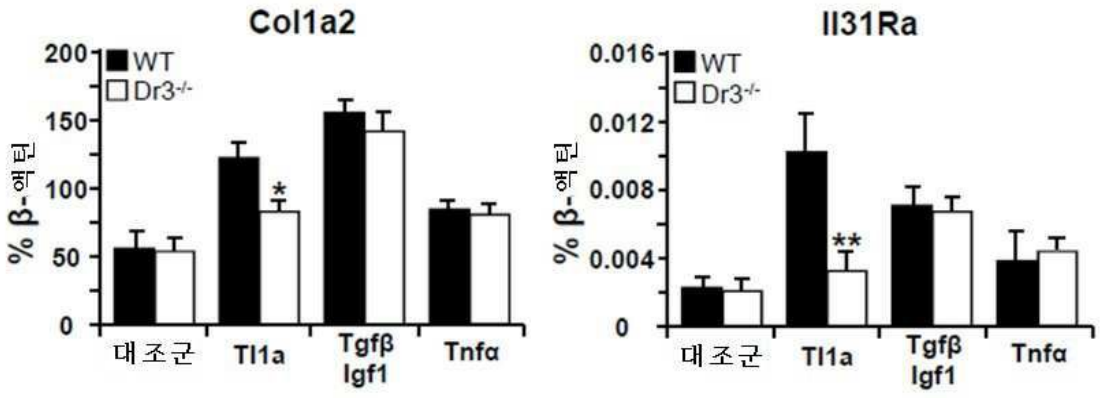
도면13a


αSMA 고
0.271%
αSMA 중간
2.14%
αSMA 저
20.2%
αSMA
25.4%
WT
Dr3-/-
아이소타입
Dr3
%Dr3
100
75
50
25
0
WT
Dr3-/-
αSMA 고
αSMA 중간
αSMA 저

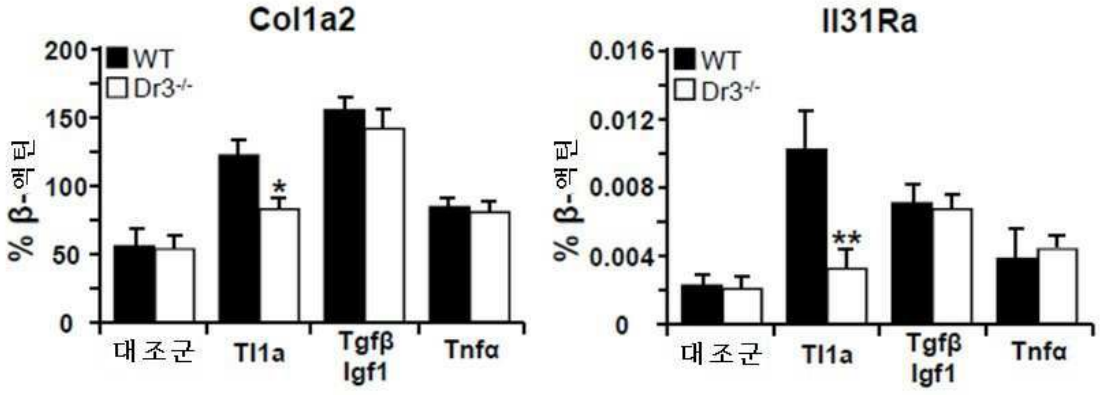
도면13b


청색 – DAPI
녹색 – αSMA
적색 – Dr3
WT – αSMA 분류됨
Dr3-/- – αSMA 분류됨

도면13c


Col1a2
WT
Dr3-/-
% β-액틴
200
150
100
50
0
*
대조군
Tl1a
Tgfβ
Igf1
Tnfα
Il31Ra
0.016
0.012
0.008
0.004
0
**

도면13d


Col1a2
WT
Dr3-/-
% β-액틴
200
150
100
50
0
*
대조군
Tl1a
Tgfβ
Igf1
Tnfα
Il31Ra
0.016
0.012
0.008
0.004
0
**