

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 10월 26일 (26.10.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/144676 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/002953
- (22) 국제출원일: 2011년 4월 22일 (22.04.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울 대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1, 151-742 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **경**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **정두현 (CHUNG, Doo-Hyun)** [KR/KR]; 서울특별시 성북구 정릉동 쌍용아파트 102동 1201호, 136-100 Seoul (KR). **김혜성 (KIM, Hye-Sung)** [KR/KR]; 서울특별시 강북구 삼각산동 미아 래미안 트리베라 106동 1002호, 142-730 Seoul (KR). **김혜영 (KIM, Hye-Young)** [KR/US]; 매사추세츠주 브록클린 비 818, 33 폰드 에비뉴, 02445 Massachusetts (US).
- (74) 대리인: **유미특허법인 (YOU ME PATENT & LAW FIRM)**; 서울특별시 강남구 역삼동 649-10 서림빌딩, 135-080 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

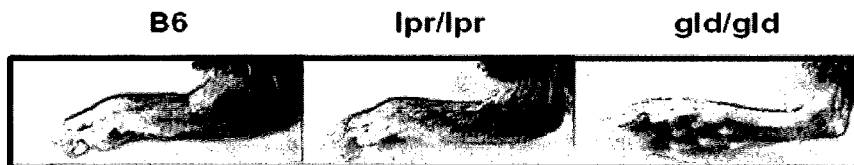
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: CHEMOKINE EXPRESSION REGULATOR

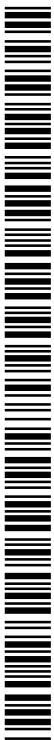
(54) 발명의 명칭 : 케모카인 발현 조절제

【도 2b】



(57) Abstract: Provided is a method for regulating the expression of chemokine materials using Fas ligands. The chemokine materials may be one or more kinds selected from the group consisting of MIP-1, RANTES, and IP-10. Since the chemokine materials participate in an inflammatory response, a technique for regulating the inflammatory response using Fas ligands is also provided.

(57) 요약서: Fas 리간드를 이용하여 케모카인류 물질의 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 상기 케모카인류 물질은 MIP-1, RANTES 및 IP-10 으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 것일 수 있다. 상기 케모카인류 물질은 염증반응에 관여하므로, Fas 리간드를 이용하여 염증 반응을 조절하는 기술도 제공된다.



WO 2012/144676 A1

【명세서】

【발명의 명칭】

케모카인 발현 조절제

5 【기술분야】

Fas 리간드를 이용하여 케모카인류 물질의 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 상기 케모카인류 물질은 MIP-1, RANTES 및 IP-10으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있다. 상기 케모카인류 물질은 염증반응에 관여하므로, Fas 리간드를 이용하여 염증 반응을 조절하는 기술이
10 또한 제공된다.

【배경기술】

Fas 리간드 (FasL, CD95L, CD178, Apo-1)는 제II형 막단백질 (Type II membrane protein)의 하나로서, TNF, CD40L, 4-1BBL 등과 함께 종양괴사인자
15 (Tumor necrosis factor, TNF) 계통에 속하며, 주로 활성화된 T 세포, NK 세포, 종양 세포 및 안구 등과 같은 면역 특권 부위 (immune privileged site)에서 발현된다. Fas 리간드는 동종 삼합체(homotrimer) 구조를 가지며, 그 수용체인 Fas와의 trimerization을 통하여 표적세포를 apoptosis시키는 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다.

20 Fas 리간드는 membrane Fas 리간드와 soluble Fas (sFas) 리간드로 나눌 수 있다. 아포토시스는 세포-세포 접촉으로 유도되기 때문에, Fas와 함께 사멸 유도 신호 복합체 (Death inducing signaling complex, DISC) 이루어 세포를 아포토시스시키는 역할은 막 Fas 리간드가 담당한다. 가용성 Fas 리간드는 세린 매트릭스 메탈로프로테이네이즈-3 또는 -7 (serine matrix metalloproteinase,
25 MMP-3 또는 MMP-7)에 의해 잘려진 막 Fas 리간드의 절단형태이다. 막 Fas 리간드 기능과는 반대로 표적 세포의 아포토시스를 억제하거나 세포 미세환경에 따라서 화학 유인 물질 (chemoattractant)의 기능을 한다고 알려져 있다.

염증질환, 특히 류마티스 관절염 (Rheumatoid arthritis, RA)에서의 Fas
30 리간드의 역할에 대한 보고는 많지 않고, 골관절염 (Osteoarthritis) 환자와 비교했을 때, RA 환자에서 가용성 Fas 리간드의 양이 증가되어 있으며, 이는

활막 섬유모세포 (synovial fibroblast)에서 분비하는 VEGF를 감소시켜 혈관형성(angiogenesis)을 억제하는 역할을 한다는 보고가 유일하다. 또한, 막 Fas 리간드와 관련해서는 CIA(collagen induced arthritis) 모델에서 Fas-Fas 리간드를 통한 아폽토시스는 RA 발병 초기단계에서 자가반응성 세포 (autoreactive cell)들의 생성을 억제하여 RA를 완화시키는 역할을 한다는 보고가 있다.

케모카인이 염증 반응에 중요한 역할을 한다는 것을 고려할 때, Fas 리간드의 케모카인 발현에 있어서의 역할에 대한 연구의 중요성이 커지고 있지만 그 연구 성과는 미미한 실정이다.

10

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

이에, 본 발명자들은 Fas 리간드가 케모카인류 물질의 발현에 있어서 중요한 조절 인자임을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

15

따라서, 본 발명의 일례는 Fas 리간드를 이용하여 케모카인류 물질의 발현을 조절하는 방법을 제공한다.

다른 예는 Fas 리간드를 억제하여 염증반응을 억제하는 방법 및 Fas 리간드 억제제를 유효성분으로 포함하는 염증 반응 억제용 조성물을 제공한다.

20

또 다른 일례는 Fas 리간드를 표적으로 하여 케모카인 발현 조절제 스크리닝 방법을 제공한다.

【기술적 해결방법】

Fas 리간드를 이용하여 케모카인류 물질의 발현을 조절하는 방법이 제공된다. 상기 케모카인류 물질은 MIP-1, RANTES 및 IP-10으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있다. 상기 케모카인류 물질은 염증반응에 관여하므로, Fas 리간드를 이용하여 염증 반응을 조절하는 기술 또한 제공된다.

25

본 발명자들은 Fas 리간드를 염증 세포를 Fas 리간드와 함께 배양하면 케모카인류 물질, 특히 Mip-1 α , RANTES, 및/또는 IP-10의 발현이 증가함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

30

본 발명자들은 또한 K/BxN 세럼 트랜스퍼 모델을 이용하여 류마티스 관절염에서 가용성 Fas (sFas) 리간드의 역할을 시험하여, sFas가 결핍된 lpr 마우스에서는 B6 마우스와 마찬가지로 류마티스 관절염이 유도되지만, sFas 리간드가 결핍된 gld 마우스에서는 류마티스 관절염의 발생이 억제됨을 발견하였다. 이러한 발견은 기존에 알려진 바로는 Fas 리간드가 Fas와의 상호작용에 의한 아포토시스 작용과는 별개로 Fas 리간드가 류마티스 관절염의 발병에 관여한다는 것을 의미하는 것이어서 의미있는 것이라 할 수 있다.

또한, 본 발명자들은 기존에 알려진 바와 같은 Fas 리간드가 Fas와의 상호작용에 의하여 일어나는 아포토시스를 억제할 수 있는 카스파아제 억제제 (caspase inhibitor)를 처리하여도 류마티스 관절염의 발병 정도에는 차이가 없는 것을 확인하였으며, sFas 리간드가 결핍된 gld 마우스에 가용성 Fas 리간드를 주입하였을 때, 류마티스 관절염이 다시 유도되는 것을 관찰하였다. 또한 류마티스 관절염의 발병 단계를 나누어 발병 초기, 중기 및 말기의 각각의 단계에서 Fas 리간드의 활성화를 차단하였을 때, 발병 단계에 관계없이 Fas 리간드의 활성화 차단에 의하여 류마티스 관절염이 억제 및 완화되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 Fas와 Fas 리간드의 상호작용에 의한 아포토시스가 류마티스 관절염 발병 초기 단계에서 자가반응성 세포 (autoreactive cell)들의 생성을 억제하여 류마티스 관절염을 완화시키는 역할을 한다는 기존의 보고와 상반되는 것으로, 본 발명은 Fas 리간드가 Fas와의 상호작용에 의한 아포토시스와 무관하게, Fas 리간드(sFas 리간드)가 독립적으로 관절염, 특히 류마티스 관절염의 유발 인자로서 작용함을 최초로 밝힌 것이다.

이를 종합해보면, sFas 리간드는 Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인류 물질의 발현을 증가시키는 역할을 하며, 이에 의하여 염증 반응에 중요한 인자로서 역할을 하며. 또한 류마티스 관절염의 중요한 발병 원인 중 하나임이 확인되었고, 이를 이용하여 염증, 특히 관절염의 예방뿐만 아니라 치료차원에도 효과적인 표적 분자로서 유용하다.

이러한 발견에 기초하여, 본 발명의 일례는 sFas 리간드를 이용하여 케모카인류 물질, 예컨대, Mip-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , accession number: NP_035467, AAI_11444, CAI25136, ABY66390, EDL15715 등), Mip-1 β (accession number: NP_038680, AAI_19258, AAI_19260, CAI_25137, EDL

15716), RANTES(Chemokine (C-C motif) ligand 5, CCL5, accession number: CAJ18523, AAH33508, AAU43779, EDL 15710 등) 및 IP-10 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 10, CXCL10, accession number: AAH 30067, EDL 05256, NP_067249 등)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인류 물질의 발현을
 5 조절하는 방법을 제공한다. 구체적으로, Fas 리간드를 subject에 투여하거나, Fas 리간드 활성을 증진시켜(예컨대, subject에 Fas 리간드 활성 증진제를 처리), Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인류 물질의 발현을 증가시키는 방법이 제공된다. 또한, Fas 리간드를 억제하여(예컨대, subject에 Fas 리간드 활성 억제제를 처리), Mip-1 α , RANTES,
 10 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인류 물질의 발현을 감소시키는 방법이 제공된다.

또 다른 면에서, sFas 리간드를 유효성분으로 포함하는 케모카인류 물질 조절제가 제공된다. 보다 구체적으로 sFas 리간드 또는 sFas 리간드 활성 증진제를 유효성분으로 포함하는 Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진
 15 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인류 물질의 발현 증진제가 제공된다. 또한, sFas 리간드 억제제를 유효성분으로 포함하는 Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인류 물질의 발현 억제제가 제공된다.

또 다른 면에서, sFas 리간드의 케모카인류 물질 조절을 위한 용도가
 20 제공된다. 보다 구체적으로 sFas 리간드 또는 sFas 리간드 활성화제의 Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인류 물질의 발현 촉진 또는 발현 촉진제 제조에 사용되기 위한 용도가 제공된다. 또한, sFas 리간드 억제제의 Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인류 물질의 발현 억제 또는 발현 억제제 제조에
 25 사용되기 위한 용도가 제공된다.

본 발명에 따른 구체예에 있어서, sFas 리간드 또는 이의 활성 증진제를 subject에 투여하거나, sFas 리간드를 함께 배양하여 케모카인의 발현을 증가시키거나, sFas 리간드 억제제를 subject에 투여하여 케모카인의 발현을 감소시킬 수 있다.

30 또한, sFas 리간드는 그 자체가 케모카인으로서 역할을 하여 직접적으로 염증세포 유입 및/또는 염증 유발 작용을 할 수 있다 (실시예 8 참조).

상기와 같은 케모카인류 물질은 염증 반응에 관여하는 것으로 알려져

있으므로, 본 발명의 또 다른 측면에서는 sFas 리간드를 억제하여 염증 반응을 억제하는 기술이 제공된다. 특히, Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인류 물질과 관련된 염증, 예컨대, 관절염, 특히 류마티스 관절염을 예방, 치료, 완화, 및/또는 경감시키는 기술이 제공될 수 있다.

이에, 본 발명의 일례는 관절염, 바람직하게는 류마티스 관절염 환자에게 sFas 리간드 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 관절염 예방 및/또는 치료 방법을 제공한다. 상기 관절염 예방 및/또는 치료 방법은 sFas 리간드 억제제를 투여하는 단계 이전에 관절염, 바람직하게는 류마티스 관절염 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

또 다른 예에 있어서, sFas 리간드 억제제를 포함하는 관절염, 바람직하게는 류마티스 관절염의 예방 및/또는 치료용 조성물이 제공된다.

또 다른 예에 있어서, sFas 리간드 억제제의 관절염, 바람직하게는 류마티스 관절염의 예방 및/또는 치료, 또는 예방 및/또는 치료제 제조에 사용되기 위한 용도가 제공된다.

상기한 바와 같이, sFas 리간드는 그 자체가 케모카인으로서 역할을 하므로, 본 발명의 또 다른 예는 가용성 Fas (sFas) 리간드를 유효성분으로 포함하는 염증 유발용 조성물을 제공한다. 또 다른 예는 가용성 Fas (sFas) 리간드의 케모카인으로서의 용도를 제공한다. 또 다른 예는 포유류 또는 포유류에서 분리된 조직 또는 세포에 상기 가용성 Fas 리간드를 투여하거나 또는 접촉시키는 단계를 포함하는 염증 유발 방법을 제공한다. 상기 포유류가 생체로 사용될 경우, 상기 포유류는 인간을 제외한 것으로 해석될 수 있다.

특히, 본 발명에 따른 sFas 리간드의 케모카인 발현 조절 및 관절염 등의 염증 반응 조절 활성은 Fas와의 결합 및 apoptosis와 무관하게 일어나는 것을 특징으로 한다.

이 외에도, 본 발명자들은 sFas 리간드가 pAKT(P31750, NP_033782, AAH 66018, AAI 15584), pSyk (AAA87462, NP_035648, AAH 65121), pERK (NP_033257, NP_001033752, NP_036079, AAH_58258, AAH_06708) 등과 같은 NF-kB 관련 단백질의 발현을 증가시킴도 추가로 확인하였다.

본 발명에서 사용되는 'Fas 리간드'는 특별한 언급이 없는 한 가용성 Fas (sFas) 리간드를 의미하는 것이다. 또한, 본 발명에서의 sFas 리간드는 포유류 유래의 것, 바람직하게는 설치류 또는 인간 유래의 것일 수 있으며,

예컨대, accession number AAA19778 (SEQ ID NO: 1), 또는 AAC50071 (SEQ ID NO: 2)인 것일 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 'sFas 리간드의 활성 증진'은 sFas 리간드의 활성을 증진시키는 것은 물론, sFas 리간드의 발현을 증가시키는 모든 작용을 의미한다. sFas 리간드 활성 증진제는 sFas 리간드를 발현하거나 분비하는 세포의 활성화를 유도하여 sFas 리간드의 활성을 증진시키는 모든 물질로서, 예컨대, 관절염을 유도하는데 사용된 K/BxN serum에 포함되어있는 GPI (Glucose-6-Phosphate Isomerase) 단백질과, 항GPI 항체, 또는 GPI-항GPI 항체 복합체 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

또한, 본 명세서에서 사용되는 'sFas 리간드의 억제'는 Fas 리간드의 활성을 감소시키거나 제거하는 것은 물론, sFas 리간드의 발현억제, 제거 및 불활성화를 포함하여 sFas 리간드의 작용을 감소, 제거, 및/또는 차단하는 모든 작용을 의미한다. 상기 Fas 리간드 억제제는 Fas 리간드의 발현을 감소시키거나, 작용을 감소, 제거, 및/또는 차단하는 모든 물질을 의미하는 것으로, 예컨대, Fas 리간드 블로킹 항체, Fas 리간드 가용화 억제제 (FAS ligand solubilization inhibitor, 예컨대, N1-hydroxyl-3-isobutyl-2-methyl-N4-(2-(methylamino)-2-oxo-1-phenylethyl)succinamide), MMP(matrix metalloprotease)-3 inhibitor (Stromelysin-1 inhibitor; e.g., C₂₇H₄₆N₁₀O₉S, 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있다.

상기 subject는 포유류, 바람직하게는 인간 또는 설치류, 또는 이로부터 분리된 세포 또는 조직일 수 있다. 바람직하게는, 상기 subject는 케모카인, 예컨대, Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발현에 의한 병적 증상, 예컨대 염증을 앓고 있는 환자, 또는 이러한 병적 증상, 예컨대 염증이 유발된 세포, 조직, 또는 체액 등의 생체로부터 분리된 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 상기 염증은 관절염일 수 있고, 상기 염증이 유발된 세포는 관절염 유발 세포, 보다 구체적으로 관절염이 유발된 관절 내에 침윤된 면역세포 및/또는 활막세포, 관절염 환자의 말초 혈액 세포 등일 수 있다.

상기 Fas 리간드 억제제의 투여량은 환자의 상태, 염증 진행 정도 등에 따라서 적절하게 조절 가능하며, 예컨대, 1일 투여량을 유효성분 함량 기준으로 0.1 내지 100 ug/kg(체중), 바람직하게는 1 내지 50 ug/kg(체중)으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

후술하는 실시예에서 보여지는 바와 같이, 본 발명에 따른 염증, 특히

관절염의 예방 및/또는 치료 방법은 발병 예방 효과 및 발병 초기에서의 치료 효과뿐 아니라, 병세가 진행된 중기 및 말기에도 병세 완화 및 치료 효과가 우수하다는 이점을 갖는다.

또 다른 일례에 있어서, Fas 리간드를 표적으로 하는 케모카인 발현 억제제의 스크리닝 방법이 제공된다. 상기 스크리닝 방법은

시료에 후보 물질을 반응시키는 단계; 및
상기 시료의 Fas 리간드 활성을 측정하는 단계
를 포함하고,

상기 후보 물질을 처리한 시료에서의 Fas 리간드의 활성이
제거되거나, 후보 물질을 처리하지 않은 시료에서의 Fas 리간드 활성보다
감소된 경우 상기 후보 물질을 케모카인 발현 억제제로 결정하는 것을
특징으로 하는 것일 수 있다.

상기 케모카인은 Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서
선택된 1종 이상일 수 있다. 상기 케모카인류 물질은 염증 반응에 관여하는
것으로 알려져 있으므로, 상기 스크리닝 방법에 의하여 선별된 케모카인
발현 억제제는 염증, 특히 류마티스 관절염 등의 관절염의 예방제 및/또는
치료제로서 사용 가능하다. 따라서, 상기 스크리닝 방법은 염증 억제제,
및/또는 관절염 (예컨대, 류마티스 관절염) 치료제의 스크리닝 방법일 수
있다.

상기 시료는 동물, 바람직하게는 포유류로부터 얻어진 세포, 조직
또는 기관일 수 있으며, 바람직하게는 면역 특권 부위 (immune privileged
site)를 포함하는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는, T 세포, NK 세포, 종양
세포 또는 안구 등일 수 있다.

상기 Fas 리간드 활성은 통상적 방법으로 측정 가능하며, 이는 이
발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 알 수 있다.
예컨대, 동물에 가용성 FasL를 주입하여 관절염을 유발하였을 때 주입하지
않은 개체와 비교하여 약 1일 내지 20일간, 바람직하게는 약 8일 내지
12일간, 예컨대, 10일간 관절의 두께의 변화를 측정 함으로써 활성화의
정도를 평가할 수 있다. 또는, 예컨대, 관절염유도 후 관절에 침윤된
면역세포들을 얻어 가용성 sFasL와 함께 인큐베이션시킨 그룹과 그렇지 않은
그룹에서, 발현 또는 분비되는 케모카인류를 realtime PCR, Cytoflowmetry,
FACS(fluorescence activated cell sorter), 또는 ELISA로 측정함으로써, 활성
정도를 평가할 수 있다. 예컨대, sFasL를 처리하지 않은 그룹과 처리한

그룹의 케모카인의 발현을 비교하여, 처리한 그룹이 처리하지 않은 그룹보다 케모카인의 발현이 증가 되어있다면, 후보 화합물의 접촉시 후보화합물의 활성정도에 따라 케모카인의 발현이 증가 되어있다고 판단할 수 있다. Realtime PCR은 그룹간 상대 적인 양을 비교하고, ELISA는 절대량을
 5 확인하고, FACS(fluorescence activated cell sorter)는 세포당 활성화 정도를 측정하는데 유리하다.

상기 후보 물질은 합성 또는 천연의 화합물, 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 등을 모두 포함한다.

이와 같이 스크리닝된 케모카인 발현 억제제는 염증, 특히 관절염의
 10 발병 예방 및 발병 초기의 치료 효과뿐 아니라, 병세가 어느 정도 진행된 중기 및 말기에도 우수한 병세 완화 및 치료 효과를 갖는다는 이점이 있다.

본 발명에서 제시된 Fas 리간드를 이용한 케모카인 발현 조절 기술, 이를 이용한 염증, 특히 류마티스 관절염 등의 관절염의 예방 및/또는 치료 기술, 및 이를 이용한 신규한 케모카인 발현 억제제의 탐색 기술은,
 15 관절염의 발생을 효과적으로 예방할 수 있을 뿐 아니라, 병세가 어느 정도 진행된 후에도 우수한 치료 효과를 얻을 수 있게 하여, 관절염으로 고통 받는 많은 환자들을 치료하는데 매우 유용한 기술이다.

【도면의 간단한 설명】

20 도 1a 내지 1c는 Fas 리간드 농도에 따른 케모카인의 발현 정도를 보여주는 것으로, 1a는 MIP-1 α 의 발현 정도, 1b는 RANTES의 발현 정도, 1c는 IP-10의 발현 정도를 보여준다.

도 2a는 실시예 2에 따른 K/BxN 혈청 트랜스퍼에 의하여 관절염이 유발된 3 종류의 마우스 모델에서의 관절의 두께와 임상 지수를 나타낸
 25 것이고,

2b는 상기 3 종류의 마우스의 관절 사진이고,

2c는 상기 3 종류의 마우스에서의 IFN γ , IL-4 및 TGF β 의 발현 정도를 보여주는 것이다.

도 3는 실시예 3에 따라서 z-VAD 처리된 마우스에서의 관절 두께 및
 30 임상 지수를 나타낸 것이다.

도 4a는 실시예 4의 마우스의 관절 두께 및 임상 지수 측정 결과를 보여주는 것이고,

4b는 실시예 5의 마우스의 관절 두께 및 임상 지수 측정 결과를

보여주는 것이고,

4c는 실시예 5의 마우스 관절에서의 $IFN\gamma$, IL-4 및 $TGF\beta$ 의 발현 정도를 보여주는 것이다.

도 5a는 실시예 6의 관절염 초기 마우스의 관절 두께 및 임상 지수 측정 결과를 보여주는 것이고,

5b는 실시예 6의 관절염 중기 마우스의 관절 두께 및 임상 지수 측정 결과를 보여주는 것이고,

5c는 실시예 6의 관절염 말기 마우스의 관절 두께 및 임상 지수 측정 결과를 보여주는 것이고,

10 5d 내지 5f는 각각 실시예 6의 초기, 중기 및 말기 마우스 관절에서의 $IFN\gamma$, IL-4 및 $TGF\beta$ 의 발현 정도를 보여주는 것이다.

도 6은 soluble Fas 리간드의 생체 내 생성을 억제한 경우의 관절 두께 및 임상 지수를 나타낸 것이다.

도 7a는 upper chamber에 염증 세포를 넣고 bottom chamber에 soluble Fas 리간드를 넣고 24시간 후 bottom chamber로 이동한 염증 세포의 수를 나타낸 것이고, 7b는 24시간 후 각각 upper chamber 와 bottom chamber의 세포수를 나타낸 것이다.

【발명의 실시를 위한 형태】

20 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

실시예 1: Fas 리간드의 케모카인 발현 증가 효과 시험

25 정상 마우스인 B6 마우스(오리엔트 바이오)에 K/BxN 마우스(Harvard medical school, Boston, MA 의 Drs.D.Mathis와 C.Benoist에게서 KRN TCR 트랜스제닉 마우스와 NOD 마우스를 제공받아 교배하여 얻음)의 혈청을 주입하여 관절염을 유도하였다. 10일 관찰 후, 관절 내 침윤된 세포와 활막세포를 분리하여 in vitro 에서 가용성 Fas 리간드(accession number
30 AAA19778 (SEQ ID NO: 1), 각각 1 μ g, 5 μ g, 10 μ g (R&D system)) 와 함께 배양하였다. 배양액은 10% Fetal bovine serum(Gibco), 1% penicillin streptomycin(Gibco), DMEM(Dulbeccos's Modified Eagle's Medium)(WelGene)을

이용하였으며, SPL science 에서 제조하는 12 well culture plate 에 well/1ml 의 배양액에, well/10⁶의 세포를 분주하였다.

24시간동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양 후, 원심 분리 방법을 이용하여 세포와 배양액을 분리한 후, 세포에서 RNA 를 추출하였다. RNA
 5 의 추출은 Qiagen 에서 생산하는 RNasy mini prep kit를 이용하여 제공한 순서에 따라 진행하였고, 이 중 3µg의 RNA를 다시 promega에서 생산하는 MMLV reverse transcription kit를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 얻어진 cDNA 에서 Applied Biosystem 에서 제조하는 Realtime PCR ABI 7500를 이용하여 케모카인 Mip-1α, RANTES, 및 IP-10 의 발현을 측정하였다. 케모카인 primer
 10 역시 Applied Biosystem에서 제조하였으며, 케모카인의 발현율은 성격상 외부조건에 잘 변하지 않고 일정 정도의 높은 발현값을 보이는 house keeping gene 의 한 종류인 GAPDH로 표준화 하여 비교하였다.

이와 같이 얻은 결과를 도 1a 내지 1c에 나타내었다. 도 1a 및 1c에서 확인되는 바와 같이, 가용성 Fas 리간드를 처리하지 않은 경우보다
 15 처리한 경우에 3종류의 케모카인의 발현이 모두 증가하였으며, 대체적으로 처리 농도에 비례하여 증가함을 알 수 있다.

실시예 2: 동물 모델에서의 류마티스 관절염 유발 시험 1

항체 유발 관절염 (Antibody-induced arthritis) 모델에서 Fas 리간드의
 20 역할을 알아보기 위하여, Fas 리간드가 결핍된 gld 마우스와 Fas가 결핍된 lpr 마우스, 및 Fas와 Fas 리간드를 모두 갖는 대조군 (정상) B6 마우스에 RA를 유도하였다. 우선, 관절염이 자연스럽게 유발된 K/BxN 마우스 (Harvard medical school, Boston, MA 의 Drs.D.Mathis와 C.Benoist에게서 KRN TCR
 트랜스제닉 마우스와 NOD 마우스를 제공받아 교배하여 얻음)에서 혈액을
 25 얻어 혈청을 채취하였다. 상기한 바와 같은 B6 (오리엔트 바이오), lpr (중앙실험동물) 및 gld 마우스 (중앙실험동물) 에게 상기에서 얻어진 K/BxN 혈청 150µl을 관찰 0일과 2일에 복강 내(i.p)로 주입하였다. 관절의 두께는 칼리퍼 (Manostat, Switzerland)로 측정하였다.

임상지수 (Clinical index)는 다음을 참조하였다:

- 30 0: no joint swelling,
 1: swelling of one finger joint,
 2: mild swelling of wrist or ankle,
 3: severe swelling of wrist or ankle.

상기와 같이 측정된 관절의 두께와 임상지수를 도 2a에 나타내었다. 도 2a에서 확인되는 바와 같이, B6 마우스와 lpr 마우스는 혈청을 주입하고 4일째부터 관절이 부어 오르기 시작하여 8~9일에 가장 높은 지수를 관찰할 수 있었다. 하지만 Fas 리간드가 결핍된 gld 마우스에서는 혈청을 주입하고 10일 지나도 관절이 거의 부어 오르지 않았고, 임상지수 역시 3~4 점에 머물러 있었다. 또한, 시험 마우스의 관절 사진을 도 2b에 나타내었다. 도 2b에서 확인되는 바와 같이, gld 마우스에서 관절이 거의 부어 오르지 않은 것을 관찰할 수 있었다.

K/BxN 혈청 트랜스퍼 모델에서 관절염증을 조절하는데 중요하게 10 관여하고 있는 사이토카인(cytokine)의 발현을 관절 mRNA 에서 확인해 보았다. 혈청 트랜스퍼를 수행하고 10일 관찰 후 마우스를 안락사 시켜 관절을 잘라내었다. RNeasy 키트 (Qiagen)를 이용하여 관절 조직에서 RNA를 분리하고, 모든 과정은 RNeasy 키트 (Qiagen)의 제조사에서 제공된 매뉴얼대로 시행하였다. Reverse Transcription System (Promega Corporation, 15 Madison, Wisconsin)을 이용하여 상기 분리된 RNA 3 μ g으로부터 cDNA를 합성하였다. 각 사이토카인 (IL-4, IFN γ , 및 TGF β)의 발현은 Applied Biosystems 7500 sequence detection system (Perkin-Elmer Biosystems)을 이용하여 측정하였으며 모든 결과는 GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 발현과 비교하여 평균화하였다. 사용된 각각의 프라이머는 다음과 같으며, 20 Applied Biosystem (Foster City, CA) 에서 합성하였다.

TGF- β 1(forward): 5'-GCAACATGTGGAAGCTCTACCAGAA-3',

TGF- β 1(reverse): 5'-GACGTCAAAAGACAGCCACTCA-3',

TGF- β 1

specific

probe:

FAM-ACCTTGGTAACCGGCTGCTGACCC-TAMRA

25 상기에서 얻어진 결과를 도 2c에 나타내었다. 도 2c에서 확인되는 바와 같이, B6, 및 lpr 마우스에서 IL-4와 IFN γ 의 발현이 gld 마우스 보다 증가된 반면, TGF β 의 발현은 gld 마우스에서 증가되어 있었다. 상기 데이터들을 통해서 Fas 리간드가 K/BxN 혈청 트랜스퍼 모델에서 관절 염증을 유도하는데 중요한 역할을 하고 있으며, 이러한 역할은 Fas와는 30 무관하게 독립적인 것임을 확인할 수 있었다.

지금까지 알려진 Fas 리간드의 대표적인 기능은 그것의 수용체인 Fas 와 결합하여 표적세포의 아포토시스를 유도하는 것이다. Fas 리간드가 Fas와의 상호작용에 의한 아포토시스를 통하여 관절 염증에 작용한다면, Fas

가 결핍된 lpr 마우스와 Fas 리간드가 결핍된 gld 마우스는 동일한 관절염 유발 양상을 보여야 할 것이다. 그렇지만, Fig 1a-1c에서 보이는 바와 같이, Fas가 결핍된 lpr마우스와 Fas 리간드가 결핍된 gld 마우스는 관절염의 유도에 있어서 서로다른 양상을 보이는 것으로 나타났다. 이는 Fas
 5 리간드가 Fas와의 결합을 통한 아포토시스의 유도로 관절염의 병인에 기여하는 것이 아니라, 또 다른 기작으로 관여할 가능성이 있음을 제시하는 것이라 할 수 있다.

실시예 3: 동물 모델에서의 류마티스 관절염 유발 시험 2

10 Fas 리간드가 Fas와의 결합에 의한 아포토시스를 통하지 않고 별도의 독립된 기작으로 관절염 유발에 관여함을 보이기 위하여 다음과 같은 시험을 추가로 수행하였다.

상기 실시예 2에서 사용된 것과 같은 B6 마우스에 아포토시스를 억제할 수 있는 카스파아제 억제제 (caspase inhibitor, z-VAD, Calbiochem)를
 15 50ug, 또는 100ug의 양으로 하루 전날 복강으로 처리한 후, K/BxN 혈청을 주입하여 관절염을 유도하였다. 상기 관절염이 유발된 마우스에 대하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 관절의 두께 및 임상 지수를 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

도 3에서 확인되는 바와 같이, z-VAD를 처리한 경우와 처리하지 않은
 20 경우 모두에서 동일한 양상으로 관절염 점수 (관절 두께 및 임상 지수)가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 상기 데이터를 통해서, 아포토시스는 K/BxN 혈청 트랜스퍼를 통한 관절염 유도에 전혀 관여하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

25 실시예 4: 동물 모델에서의 류마티스 관절염 유발 시험 3

Fas 리간드의 역할을 좀 더 확인해 보기 위하여, gld 마우스에 B6, lpr, 및 gld 마우스의 비장세포(splenocyte)를 각각 면역 전달 (adoptive transfer)하여 관절염을 유도하여 시험을 수행하였다.

우선, B6, lpr, 및 gld 마우스를 안락사 하여 비장을 채취한 후에, 1ml
 30 의 적혈구(RBC) 용해 버퍼 (Qiagen)와 함께 균질화 시킨 후 RBC를 제거하고, 림프구를 얻었다. 멸균된 40µm cell strainer (BD bioscience)로 여과한 후, 혈청 트랜스퍼 하루 전날 gld 마우스 한 마리 당 1×10^7 의 비장세포를 멸균된 PBS와 함께 전체 부피 300 µl를 맞추어 혈관 내(i.v) 주입하였다.

이와 같이 비장세포가 트랜스퍼된 마우스 및 대조군으로서 비장세포가 트랜스퍼되지 않은 마우스에 대하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 관절 두께 및 임상 지수를 측정하여 그 결과를 도 4a에 나타내었다. 도 4a에서 확인되는 바와 같이, B6 와 lpr 마우스의 비장세포를 트랜스퍼해준 gld 마우스에서 트랜스퍼하지 않은 gld 마우스와 비교하여 관절 두께 및 임상 지수로 나타나는 관절염 점수가 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 반면에 gld 마우스의 비장세포를 트랜스퍼해 준 gld 마우스는 트랜스퍼하지 않은 gld 마우스와 유사하게 관절염이 거의 유도되지 않은 것으로 나타났다. 상기 데이터를 통해서 Fas가 결핍되었더라도 Fas 리간드가 존재하면 관절염이 유발될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 5: 동물 모델에서의 류마티스 관절염 유발 시험 4

다음으로, gld 마우스에 sFas 리간드 (soluble Fas ligand) 를 주입한 후 K/BxN 혈청을 트랜스퍼하여 관절염이 유발되는지 시험하였다.

마우스 sFas 리간드 (R&D) 2 μ g 또는 10 μ g을 혈청 트랜스퍼 전날에 gld 마우스 복강 내로 주입한 후 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 관절 두께 및 임상 지수를 측정하여 그 결과를 도 4b에 나타내었다. 도 4b에서 확인되는 바와 같이, sFasL를 2 μ g 주입한 경우에는 관절 두께 및 임상 지수의 큰 변화가 없었지만, sFasL 10 μ g을 주입한 경우에는, 야생형 B6 마우스와 비슷한 정도로 관절의 두께와 임상 지수가 증가하였다. 또한 sFasL 10 μ g 주입한 gld 마우스에서의 joint mRNA 상의 IFN γ , IL-4 및 TGF β 의 발현 정도를 측정하여 도 4c에 나타내었다. 도 4c에서 확인되는 바와 같이, sFasL 10 μ g 주입한 gld 마우스에서의 joint mRNA 상의 IFN γ 와 IL-4 의 발현이 증가된 반면, TGF β 의 발현은 감소하였다.

실시예 6: Fas 리간드 억제제를 통한 관절염 치료 시험

이상의 결과들을 통하여 Fas 리간드는 K/BxN 혈청 트랜스퍼 모델에서 관절염을 유발시키는 중요한 병인 중 하나라는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, 반대로 Fas 리간드 활성화의 차단은 관절염의 예방 및 치료에 효과적인 역할을 한다는 가능성을 제시한다. 이러한 가설을 확인하기 위해서, 관절염의 발병 단계를 초기(early), 중기(mediated), 및 말기(late phase)로 나누어서 Fas 리간드의 활성화를 차단하고 관절염의 병세를 관찰하였다.

Fas 리간드 블로킹 항체 (Fas ligand blocking antibody, BD bioscience)를 10 μ g 의 양으로 PBS와 혼합하여 전체 부피를 300 μ l로 맞추어 B6 마우스의 혈관 내(i.v) 주입하였다. 혈청 트랜스퍼 하루 전날부터 혈청 트랜스퍼 9일 후까지 Fas 리간드 블로킹 항체를 처리하여, 관절염 발병 초기 단계에서의 Fas 리간드의 역할을 차단하였다. 상기 동물 모델에 대하여 실시예 2와 동일하게 관절 두께 및 임상 지수를 측정하여 도 5a에 나타내었다. 도 5a에서 볼 수 있듯이, Fas 리간드 블로킹 항체를 처리한 마우스에서 관절염의 발병이 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

또한 관절 염증의 중기라고 여겨지는 혈청 트랜스퍼 5일 후부터 9일까지 Fas 리간드 블로킹 항체를 10 μ g 또는 20 μ g의 양으로 PBS와 혼합하여 전체 부피를 300 μ l로 맞추어 B6 마우스에 혈관내 주입하고, 관절 두께 및 임상 지수를 측정하여 도 5b에 나타내었다. 도 5b에서 확인되는 바와 같이, Fas 리간드 블로킹 항체를 관절염 발병 중기에 처리한 경우에도 관절염이 억제되는 현상을 관찰할 수 있었으며, 이러한 억제 효과는 Fas 리간드 블로킹 항체의 농도가 높아 질수록 더 유의미한 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

마지막으로 관절염 점수 (관절 두께 및 임상 지수)가 가장 높은 시기인 혈청 트랜스퍼 8일 후부터 관찰 11일까지 Fas 리간드 블로킹 항체를 20 μ g 의 양으로 PBS와 혼합하여 전체 부피를 300 μ l로 맞추어 B6 마우스의 혈관 내(i.v) 주입하였다. 상기 마우스에 대하여 실시예 2와 동일한 방법으로 관절 두께 및 임상 지수를 측정하여 그 결과를 도 5c에 나타내었다. 도 5c에서 확인되는 바와 같이, 관절염 발병 초기, 중기와 마찬가지로, 말기에서도 Fas 리간드 블로킹 항체 처리시 관절염이 빠른 속도로 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 상기 혈청 트랜스퍼된 B6 마우스 모델의 Joint mRNA 상에서 사이토카인 (IL-4, IFN γ 및 TGF β)의 발현 정도를 관절염 발병 초기, 중기 및 말기로 각각 측정하여 그 결과를 도 5d 내지 5f에 각각 나타내었다. 도 5d 내지 5f에서 확인되는 바와 같이, 관절염 발병 초기, 중기 및 말기 모두에서 Fas 리간드 블로킹 항체를 주입한 마우스에서 IL-4 와 IFN γ 의 발현이 감소하고, TGF β 의 발현은 증가한 것으로 나타났다.

실시예 7: soluble Fas 리간드의 생성을 억제 했을 때 관절염 유발 실험

실제로 관절염의 유발을 촉진하는 soluble Fas 리간드의 생체 내 생성을 억제하였을 때 관절염의 유발이 억제되는지 시험하였다. 야생형 B6 마우스와 Fas 결핍 lpr 마우스, 그리고 Fas 리간드 결핍 gld 마우스에 첫번째 혈청 트랜스퍼 전날과 그 다음날 매트릭스 메탈로프로테이네이즈-3 억제제 (MMP-3 inhibitor, Calbiochem, Ac-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Asp-NH₂) 100μg 을 복강 내로 주입한 후 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 관절 두께 및 임상 지수를 측정하여 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에서 확인되는 바와 같이 야생형 B6 마우스에 sFas 리간드의 생성을 억제하였을 경우 관절 두께 및 임상 지수가 감소하는 것을 관찰 하였고, lpr 마우스와 gld마우스에서는 이러한 효과를 관찰할 수 없었다. 상기 데이터를 통하여, MMP 억제제의 관절염 치료 효과는 sFas 리간드 생성 억제를 통하여 얻어지며, sFas 리간드의 생성은 관절염의 유발을 촉진하는 중요한 요인임을 확인할 수 있었다.

15 실시예 8: soluble Fas 리간드의 직접적인 케모카인 역할의 확인 시험

위의 데이터 들을 통하여 sFas 리간드의 생성은 케모카인의 발현을 촉진하고, 이는 관절염의 유발하는 역할을 함을 알 수 있었다. 다음으로 sFas 리간드가 단순히 케모카인의 발현 조절제가 아닌 sFas 리간드 자체가 염증세포의 유입을 촉진하는 케모카인으로 작용할 수 있는지 시험해 보았다.

20 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 야생형 B6 마우스에 관절염을 유도한 후 가장 관절 두께 및 임상 지수가 높은 8일째 관절에 유입된 염증 세포를 얻은 후, 80μm transwell plate(BD Falcon)의 upper chamber는 300μl 배양액 (RPMI 1640, 10% Fetal bovine serum, 1% antibiotics) 에 염증 세포를 넣고, bottom chamber는 700μl 배양액에 각각 0ng, 50ng 그리고 100ng의 sFas 리간드를

25 넣어주었다. 24시간 후, sFas 리간드에 따라 upper chamber에서 bottom chamber 로 이동한 세포의 수가 전체 upper chamber에 넣은 수의 얼마의 비율인지를 도7a에 나타내었다. 또한 24시간 후 각각 upper chamber 와 bottom chamber의 세포수를 도 7b에 나타내었다.

도 7a 및 7b에서 알 수 있는 바와 같이, sFas 리간드 농도와 비례하여 upper chamber에 있던 염증 세포 중 bottom chamber 로 이동한 세포 수가 증가하였다. 상기 결과를 토대로 sFas 리간드는 케모카인의 발현을 조절할 뿐만 아니라 sFasL 자체가 케모카인으로 작용함을 확인할 수 있었다.

- 위의 결과들을 종합해 볼 때 Fas 리간드 활성 차단은 케모카인의 발현을 억제하여 염증 반응을 억제하며, 염증, 특히 관절염의 발병 초기뿐만 아니라 발병 후에도 관절염 증세의 억제에 효과적이라는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 이러한 결과들은 관절염을 비롯한 염증의 예방 및 치료법
- 5 개발에 획기적인 정보를 제공할 수 있을 것이다. 더 나아가, sFasL 자체의 케모카인으로서의 새로운 용도를 제공한다.

【청구의 범위】

1. 가용성 Fas (sFas) 리간드 억제제를 유효성분으로 함유하는, Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인 발현 억제용 조성물.
5
2. 제1항에 있어서, 상기 가용성 Fas 리간드 억제제는 Fas 리간드 블로킹 항체, Fas 리간드 가용화 억제제, 및 MMP-3 억제제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것인 조성물.
10
3. 가용성 Fas (sFas) 리간드를 유효성분으로 포함하는 염증 유발용 조성물.
4. 가용성 Fas (sFas) 리간드 억제제를 유효성분으로 함유하는
15 염증 예방 또는 치료용 조성물.
5. 제4항에 있어서, 상기 가용성 Fas 리간드 억제제는 Fas 리간드 블로킹 항체, Fas 리간드 가용화 억제제, 및 MMP-3 억제제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것인 조성물.
20
6. 제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 염증은 관절염인 조성물.
7. 제6항에 있어서, 상기 관절염은 류마티스 관절염인 조성물.
8. 가용성 Fas (sFas) 리간드 억제제의 Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인 발현 억제를 위한
25 용도로 사용하기 위한 용도.
9. 제8항에 있어서, 상기 가용성 Fas 리간드 억제제는 Fas 리간드 블로킹 항체, Fas 리간드 가용화 억제제, 및 MMP-3 억제제로 이루어진
30 군에서 선택된 1종 이상의 것인 용도.
10. 가용성 Fas (sFas) 리간드의 케모카인으로서의 용도.

11. 가용성 Fas (sFas) 리간드 억제제의 염증 예방 또는 치료를 위한 용도.

12. 제11항에 있어서, 상기 가용성 Fas 리간드 억제제는 Fas
5 리간드 블로킹 항체, Fas 리간드 가용화 억제제, 및 MMP-3 억제제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것인 용도.

13. 제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 염증은 관절염인 용도.

10 14. 제13항에 있어서, 상기 관절염은 류마티스 관절염인 용도.

15. 케모카인 발현 감소를 필요로 하는 환자 또는 케모카인이
과다 발현된 세포에 가용성 Fas 리간드 억제제를 투여하는 단계를 포함하는,
Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의
15 케모카인의 발현을 감소시키는 방법.

16. 제15항에 있어서, 상기 가용성 Fas 리간드 억제제는 Fas
리간드 블로킹 항체, Fas 리간드 가용화 억제제, 및 MMP-3 inhibitor로
이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 케모카인의 발현을 감소시키는 방법.

20

17. 포유류 또는 포유류에서 분리된 조직 또는 세포에 상기
가용성 Fas 리간드를 투여하는 단계를 포함하는, 염증 유발 방법.

18. 염증 환자 또는 염증이 유발된 세포에 가용성 Fas 리간드
25 억제제를 투여하는 단계를 포함하는,
염증의 예방 또는 치료 방법.

19. 제18항에 있어서, 상기 가용성 Fas 리간드 억제제 Fas 리간드
블로킹 항체, Fas 리간드 가용화 억제제, 및 MMP-3 inhibitor로 이루어진
30 군에서 선택된 1종 이상인, 염증의 예방 또는 치료 방법.

20. 제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 염증은 관절염인, 염증의
예방 또는 치료 방법.

21. 제20항에 있어서, 상기 관절염은 류마티스 관절염인 염증의 예방 또는 치료 방법.

5 22. 시료에 후보 물질을 반응시키는 단계; 및
상기 시료의 Fas 리간드 활성을 측정하는 단계
를 포함하고,

상기 후보 물질을 처리한 시료에서의 Fas 리간드의 활성이 제거되거나, 후보 물질을 처리하지 않은 시료에서의 Fas 리간드 활성보다 감소된 경우 상기 후보 물질을 Mip-1 α , RANTES, 및 IP-10로 이루어진 군에서
10 선택된 1종 이상의 케모카인 발현 억제제로 결정하는 것을 특징으로 하는,
케모카인 발현 억제제의 스크리닝 방법.

23. 시료에 후보 물질을 반응시키는 단계; 및
상기 시료의 Fas 리간드 활성을 측정하는 단계
15 를 포함하고,

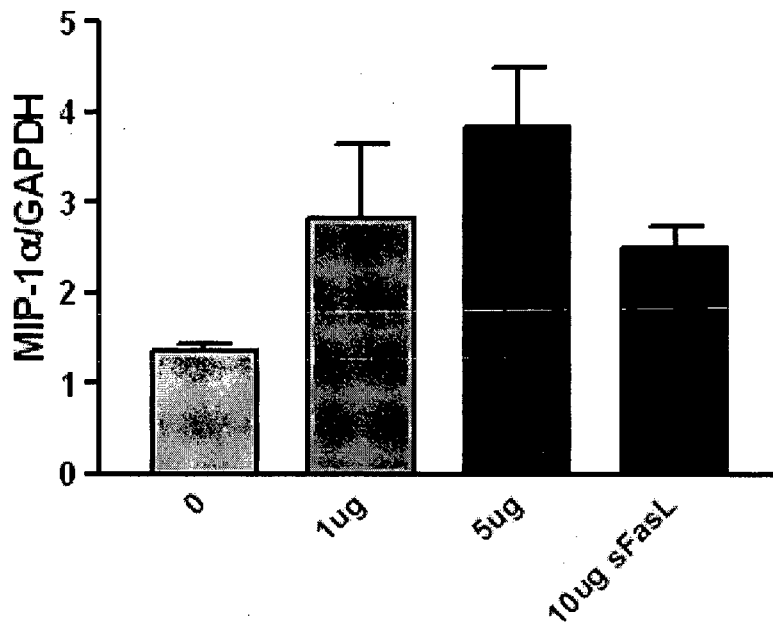
상기 후보 물질을 처리한 시료에서의 Fas 리간드의 활성이 제거되거나, 후보 물질을 처리하지 않은 시료에서의 Fas 리간드 활성보다 감소된 경우 상기 후보 물질을 염증 치료제로 결정하는 것을 특징으로 하는,
염증 치료제의 스크리닝 방법.

20

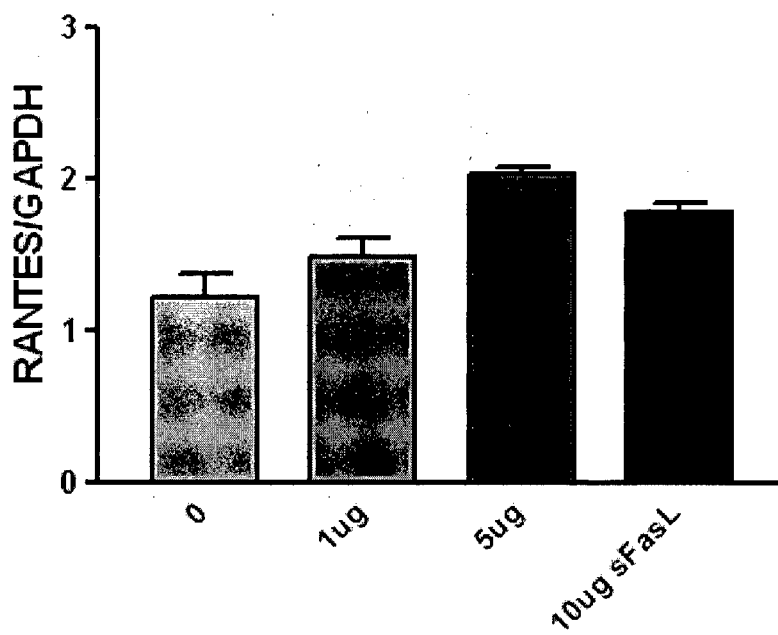
24. 제23항에 있어서, 상기 염증은 관절염인, 염증 치료제의 스크리닝 방법.

【도면】

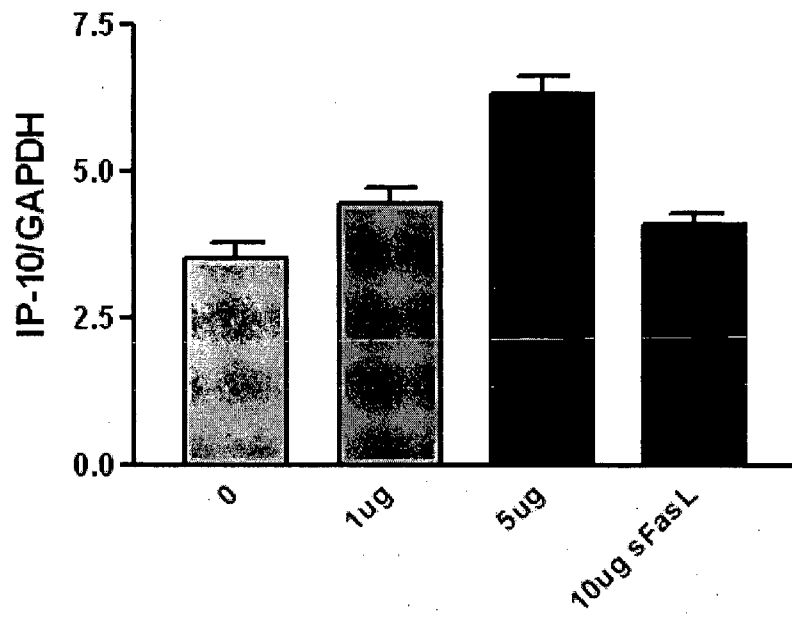
【도 1a】



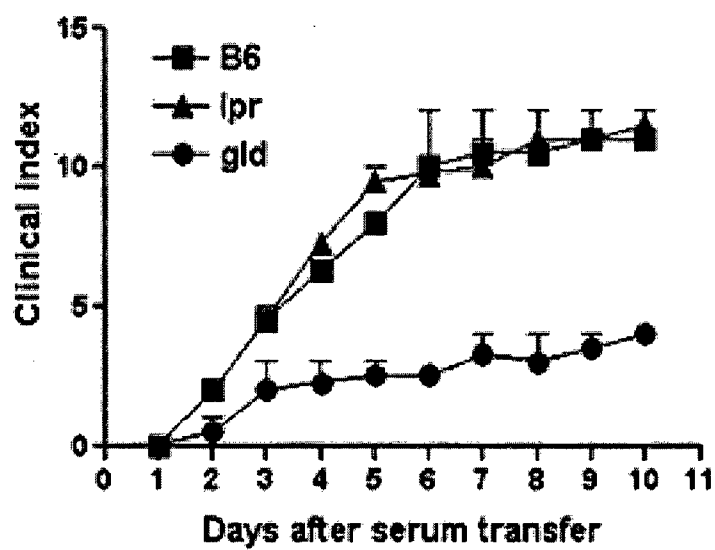
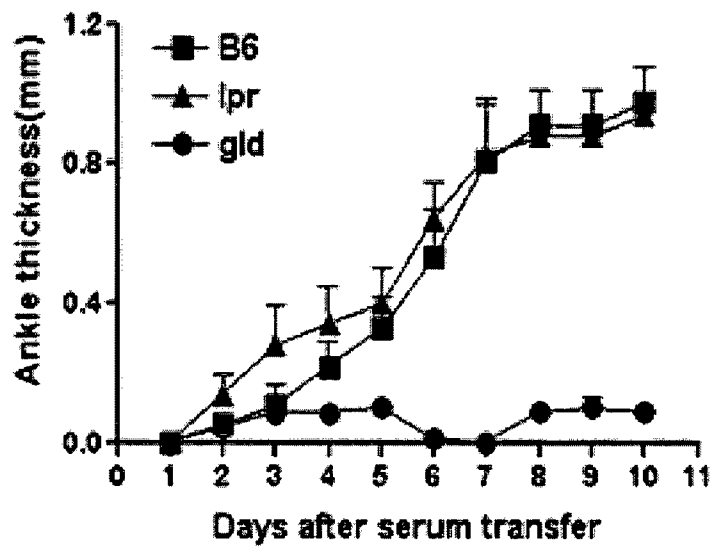
【도 1b】



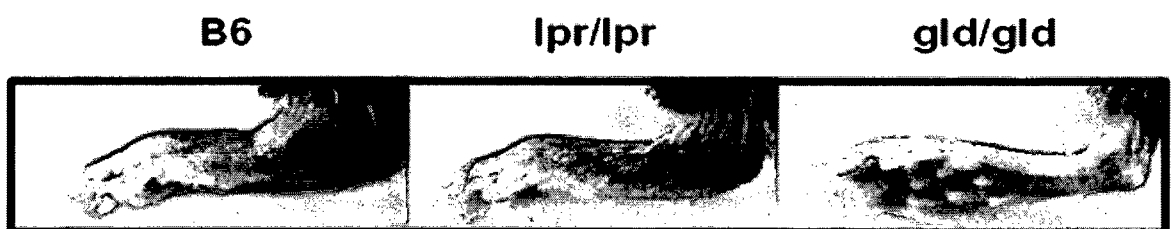
【도 1c】



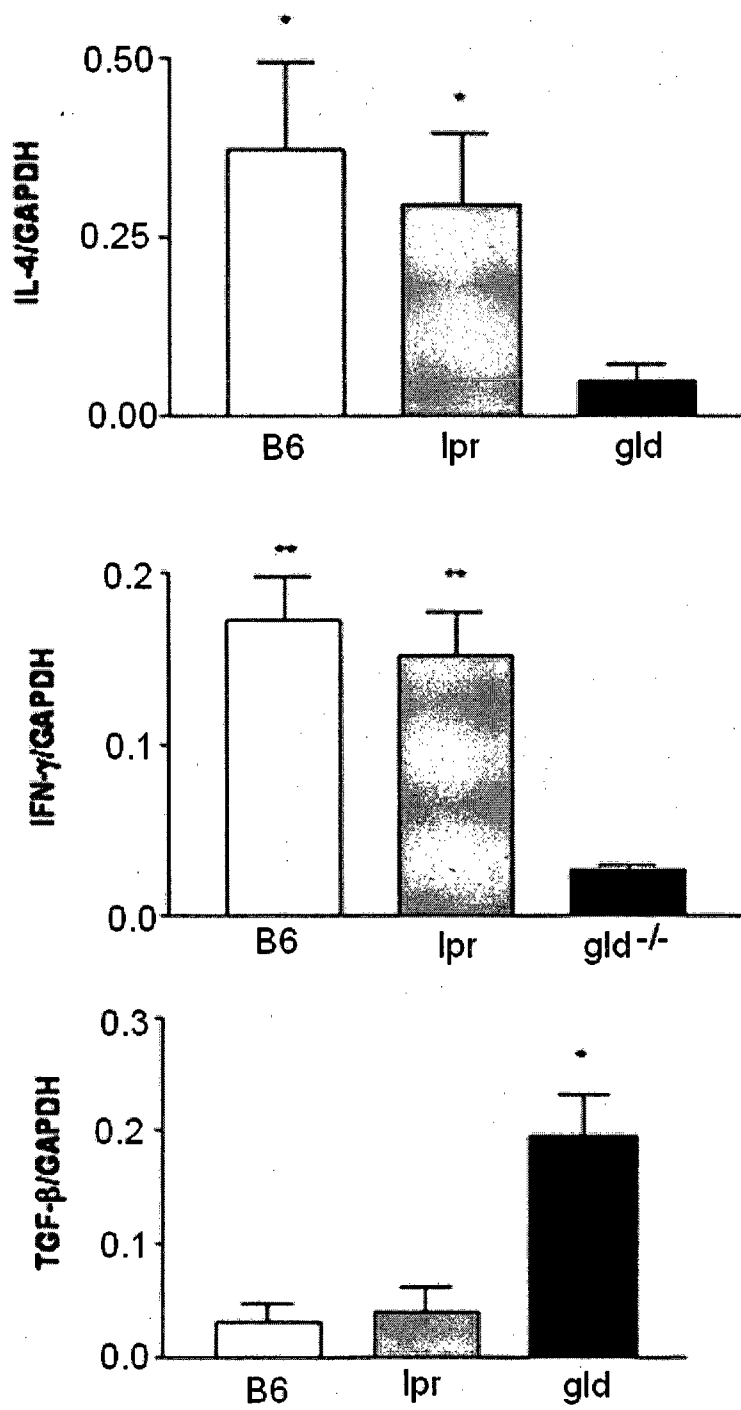
【図 2a】



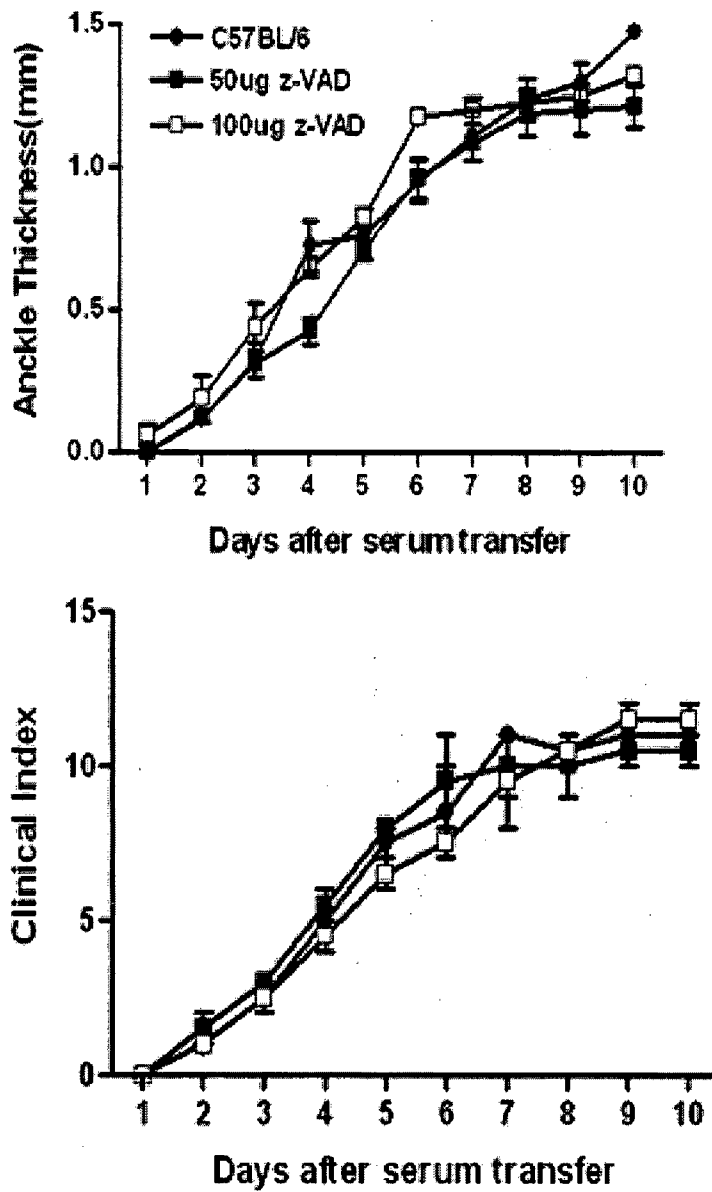
【図 2b】



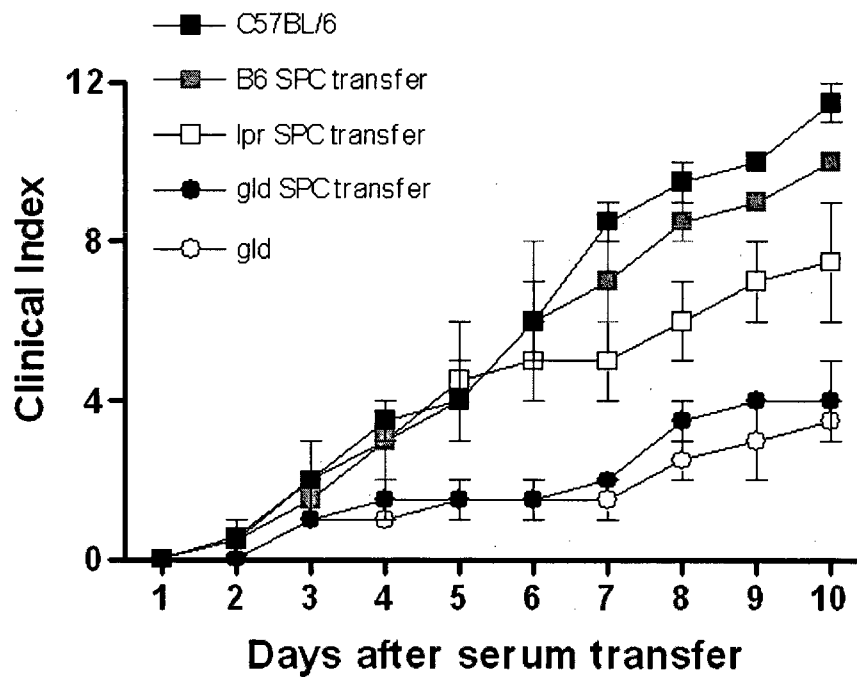
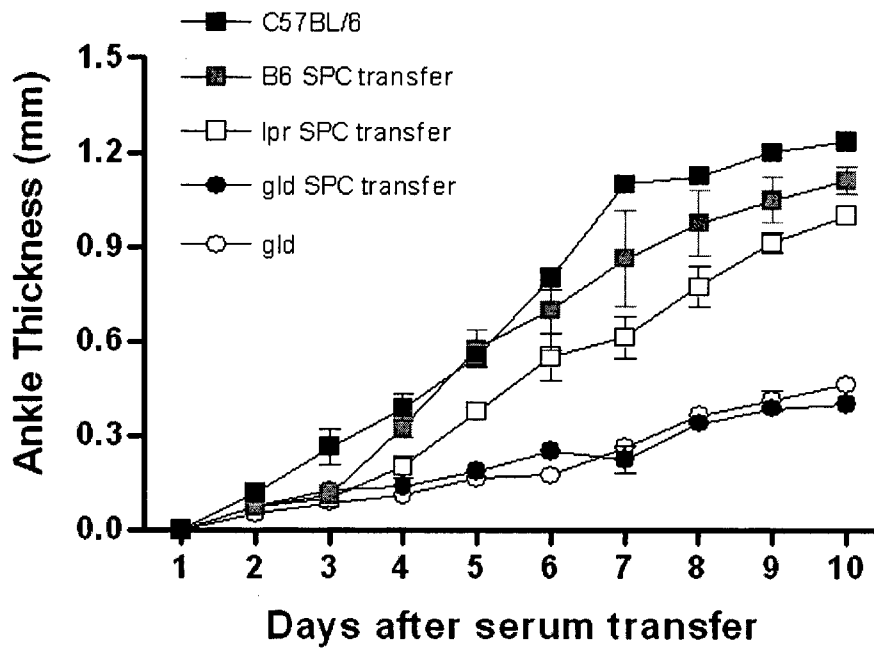
【도 2c】



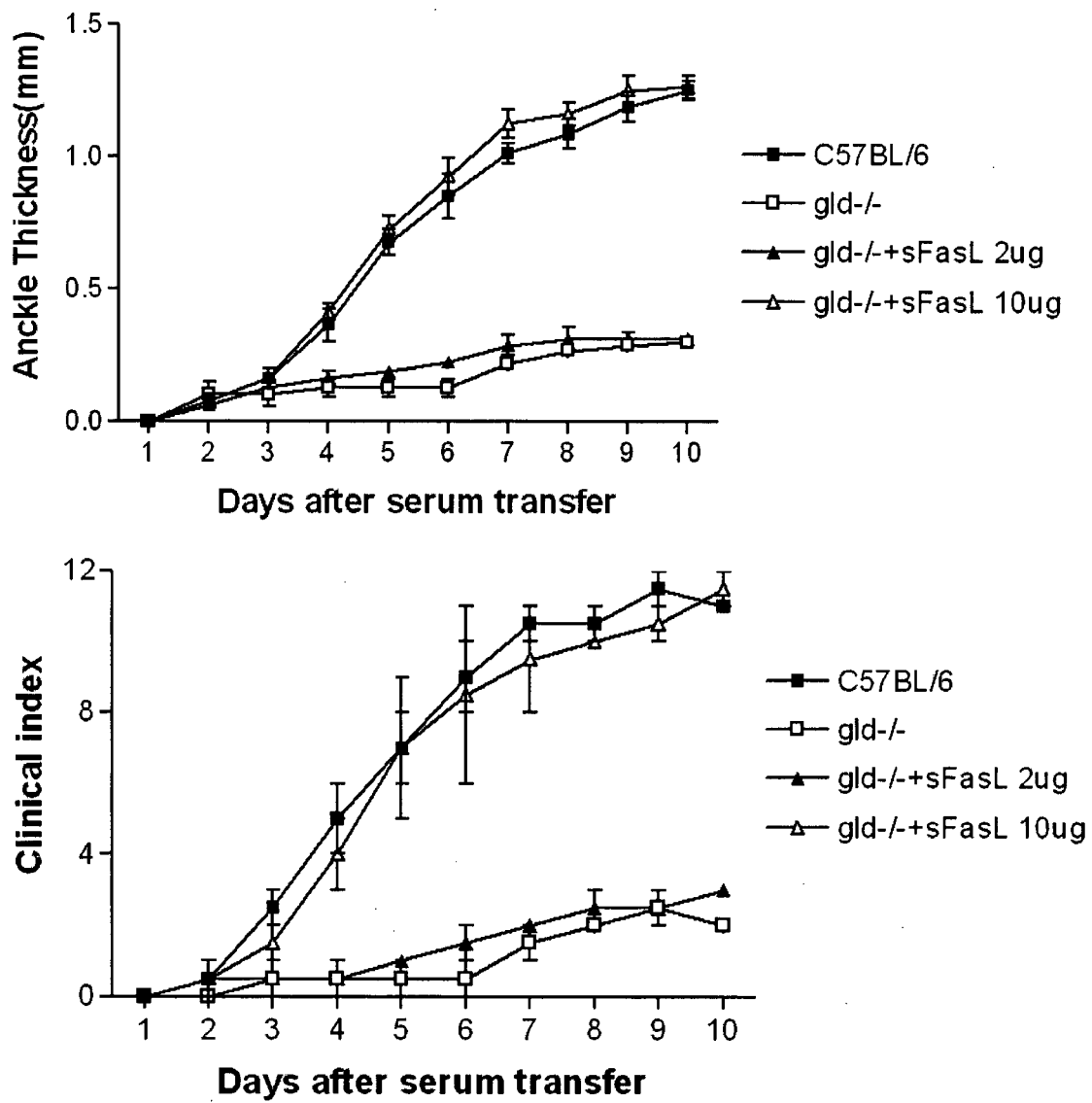
【図 3】



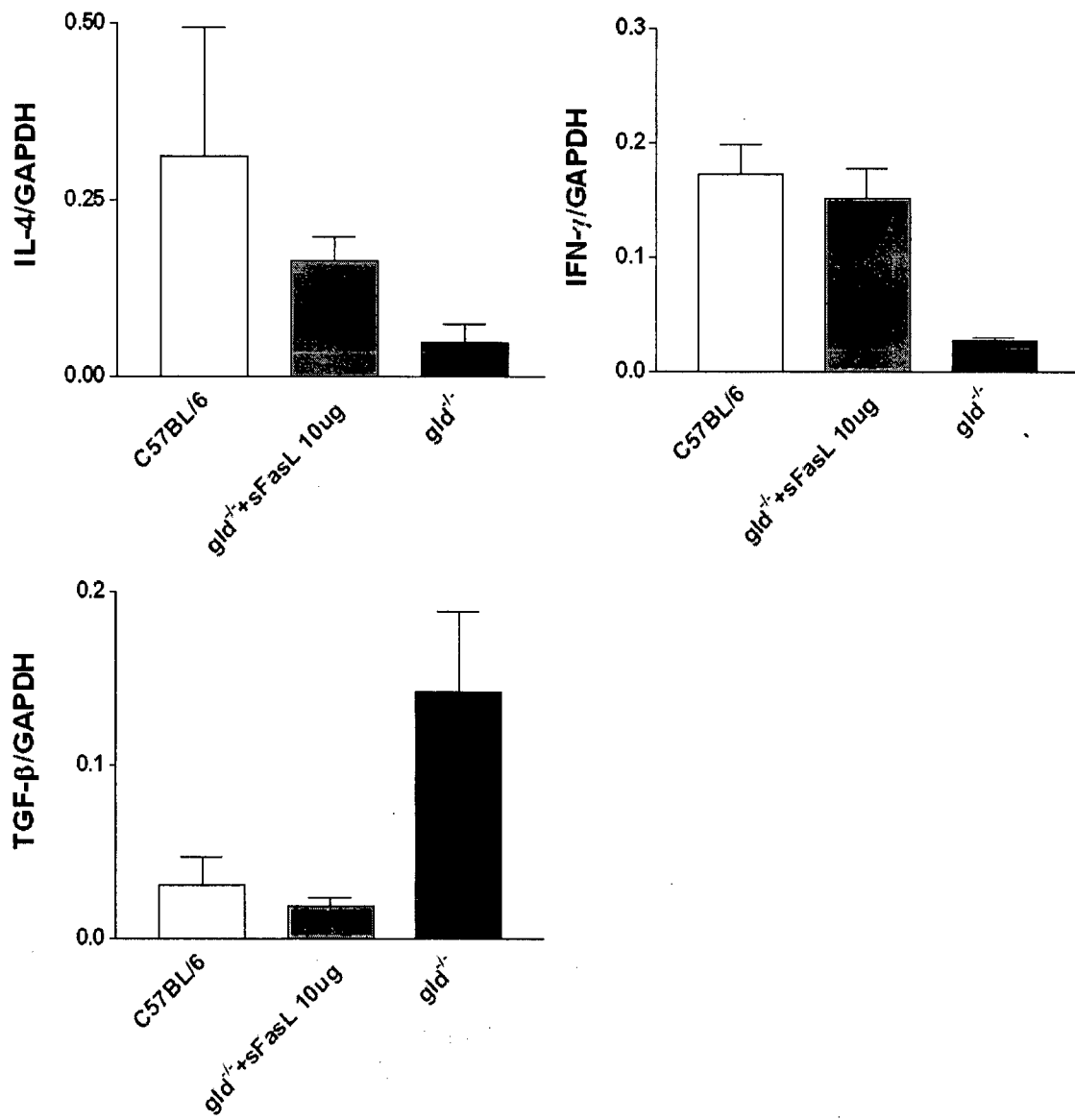
【도 4a】



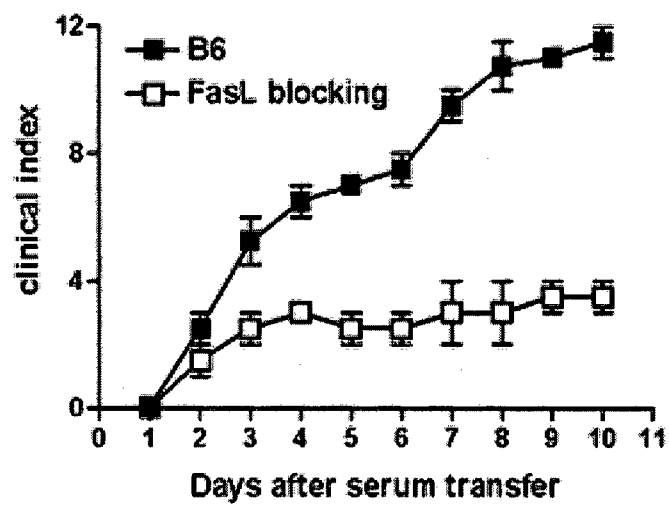
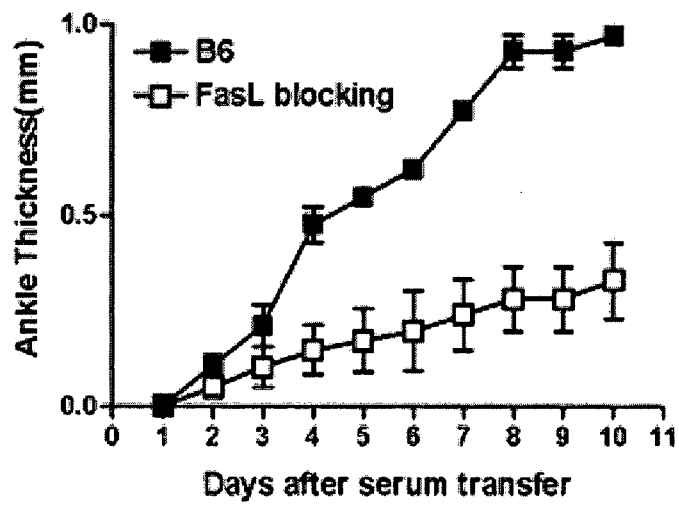
【도 4b】



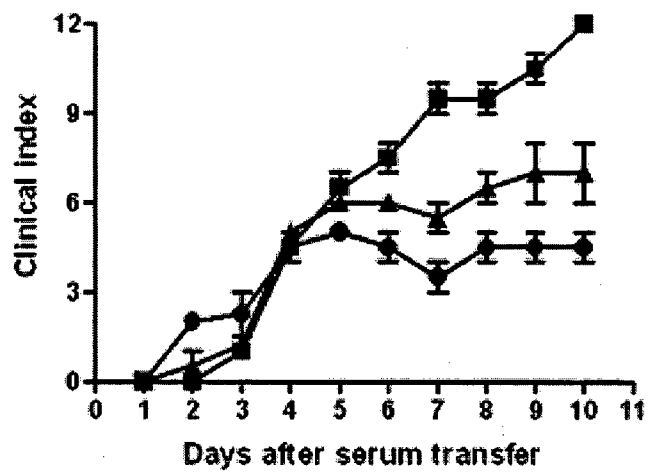
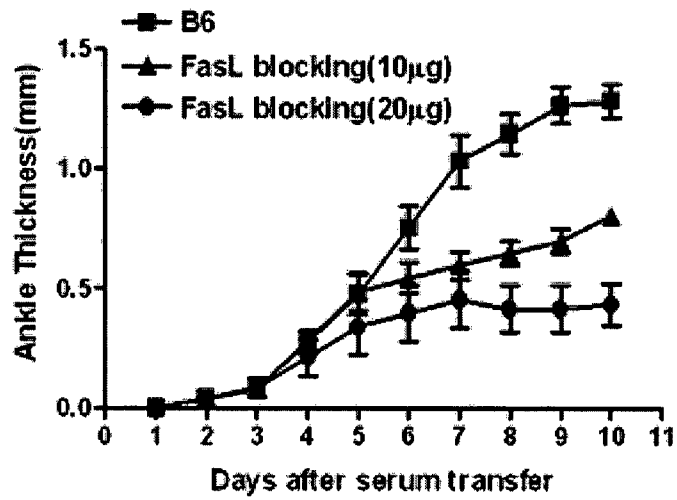
【도 4c】



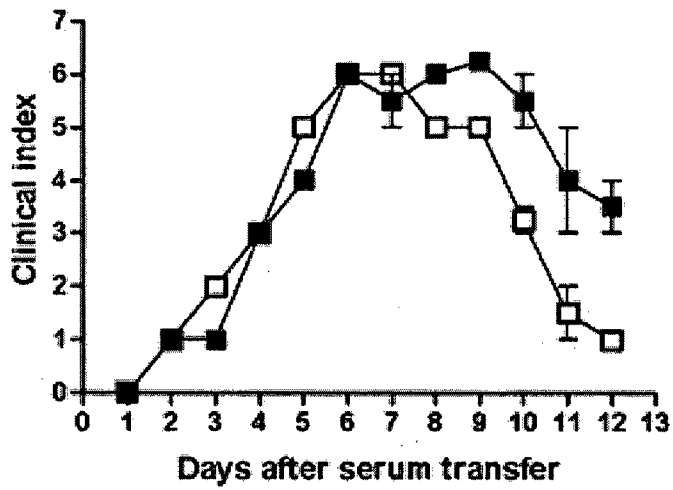
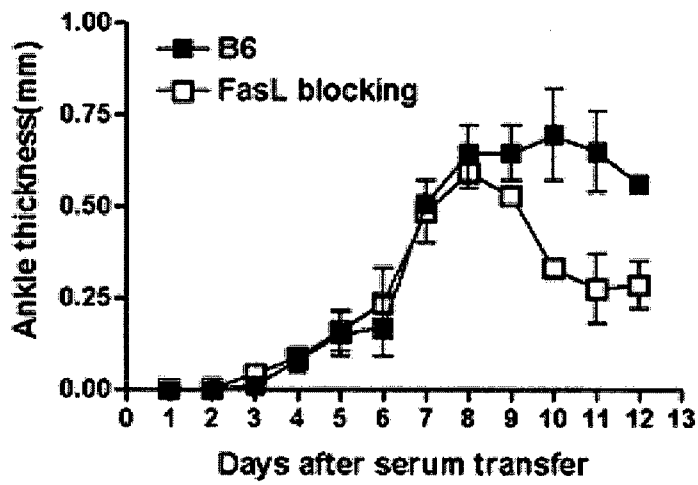
【図 5a】



【도 5b】

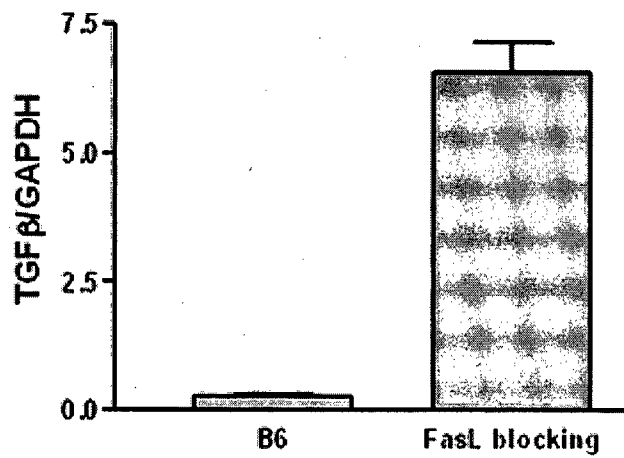
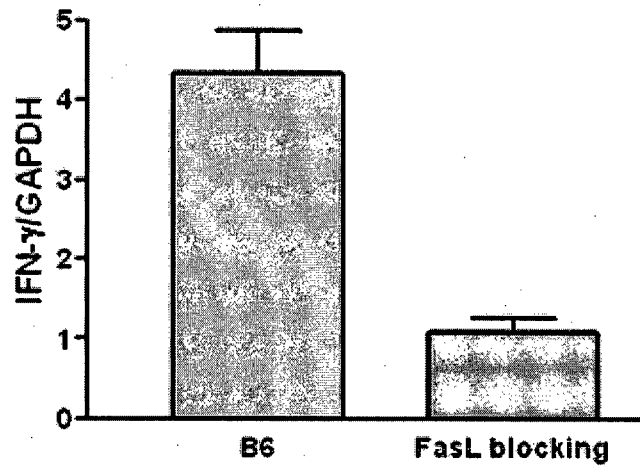
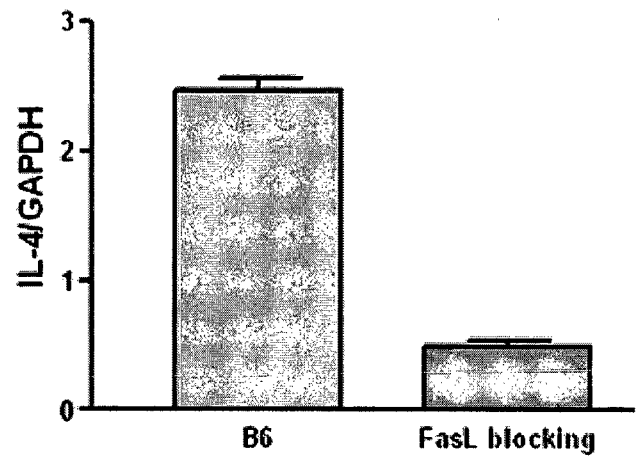


【도 5c】



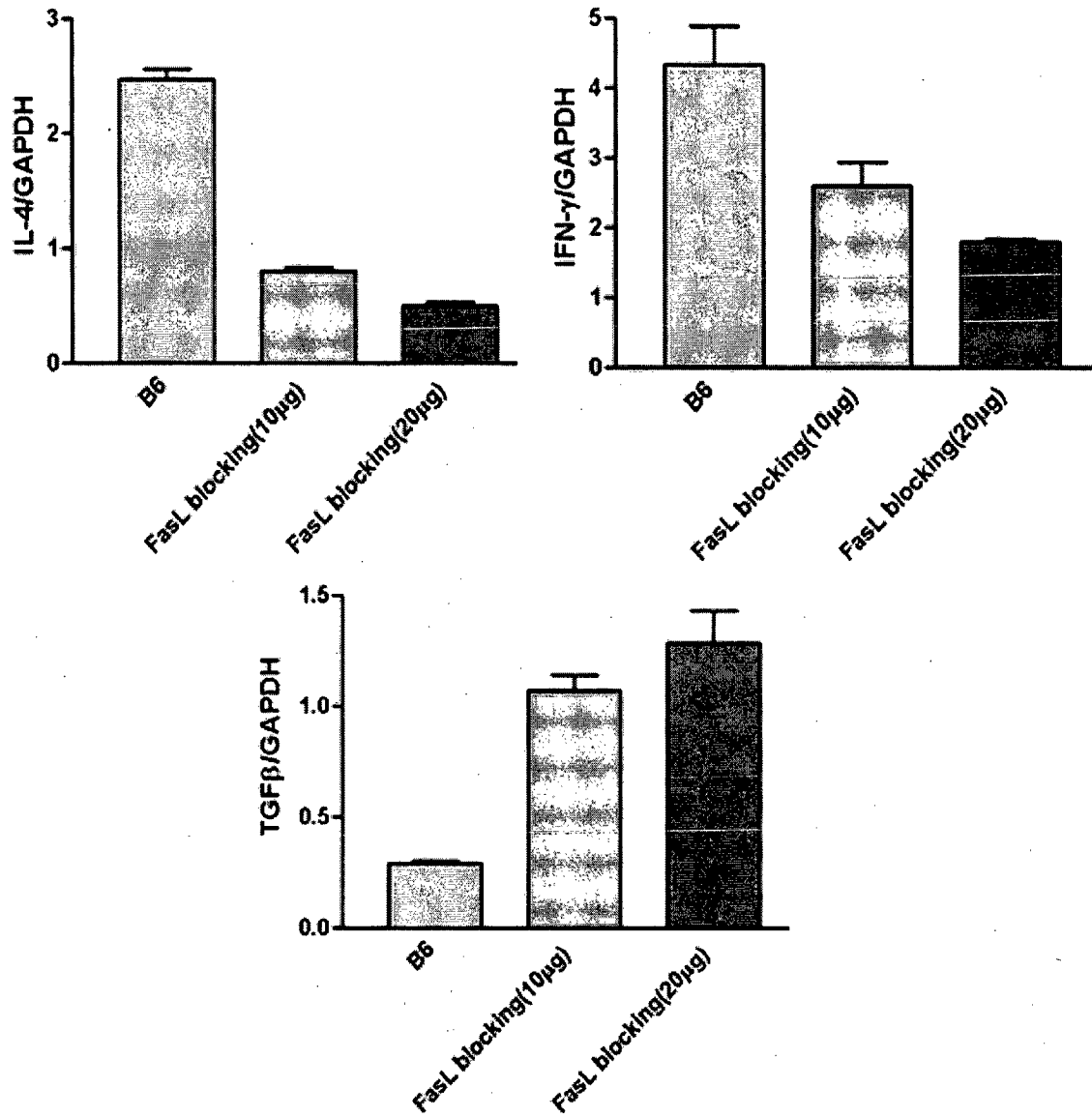
【도 5d】

Early



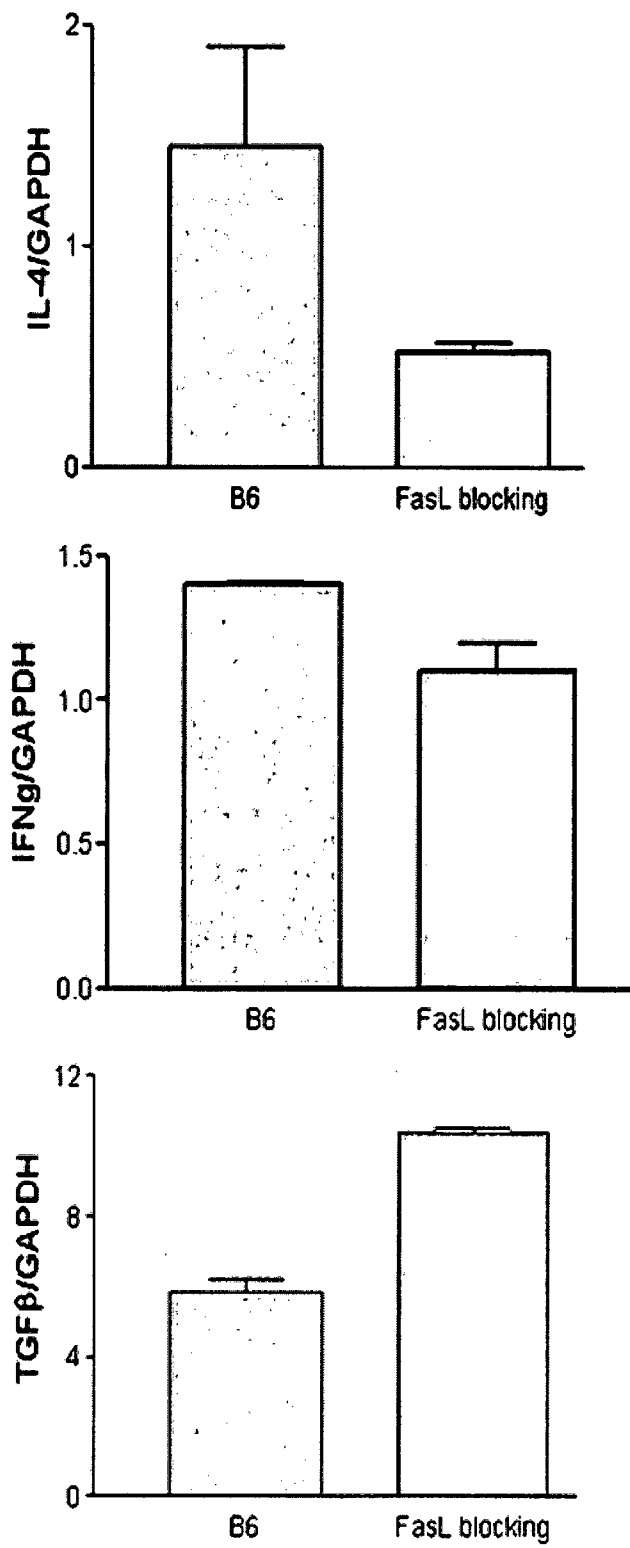
【図 5e】

Mediated

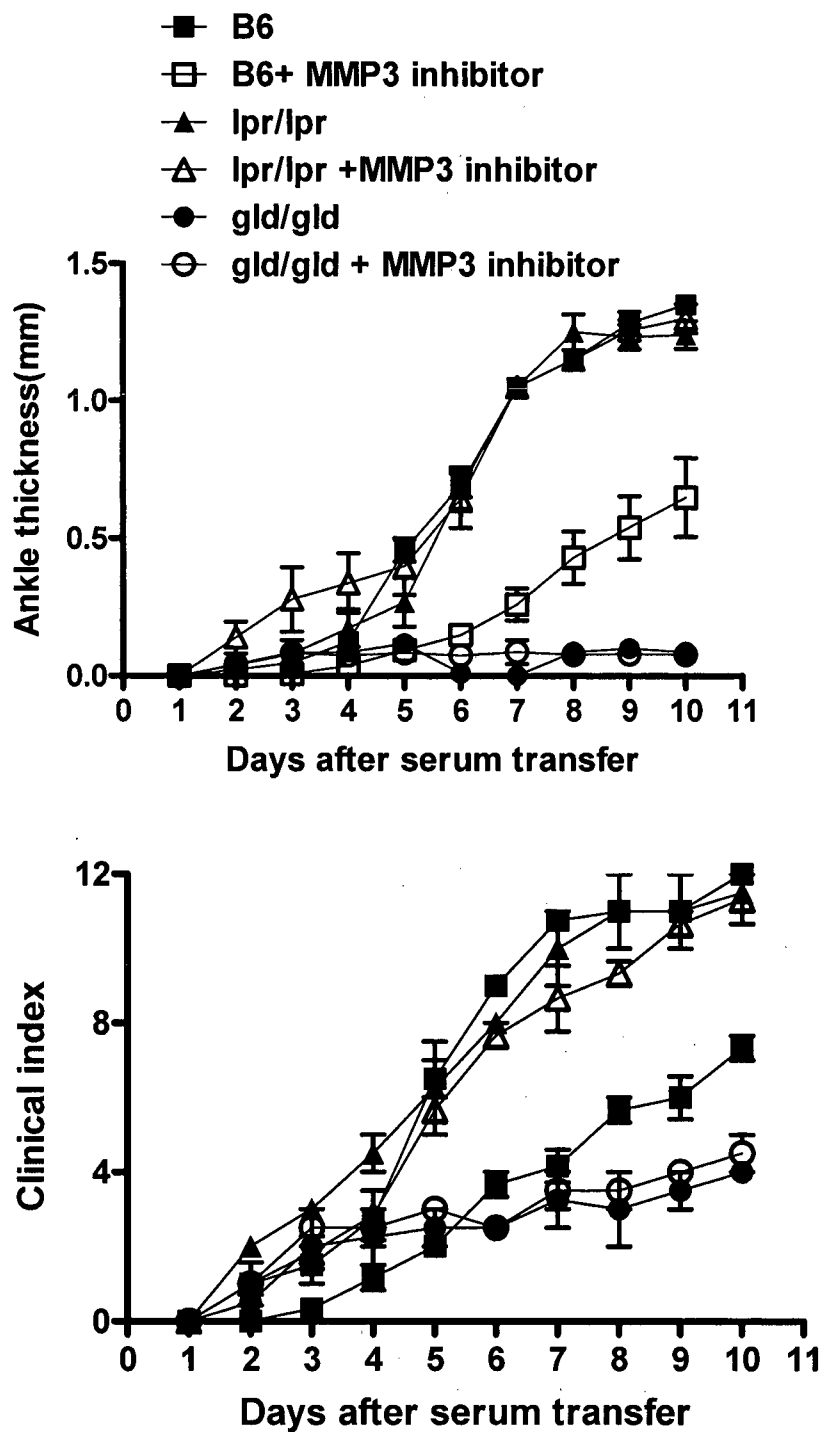


[도 5f]

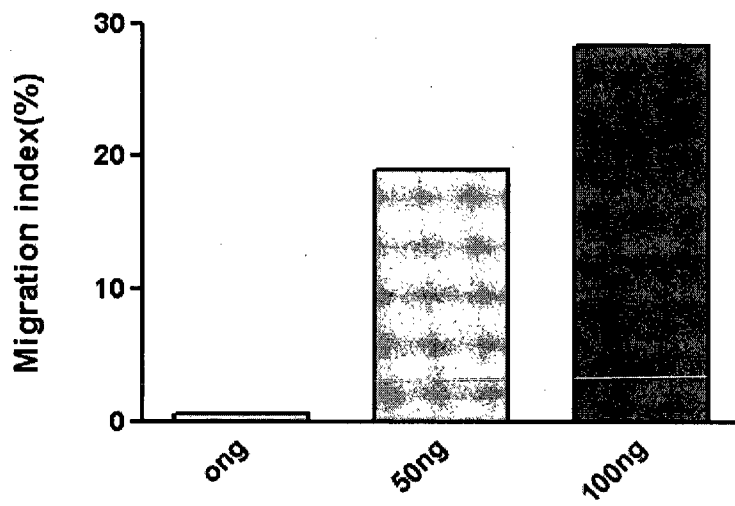
Late phase



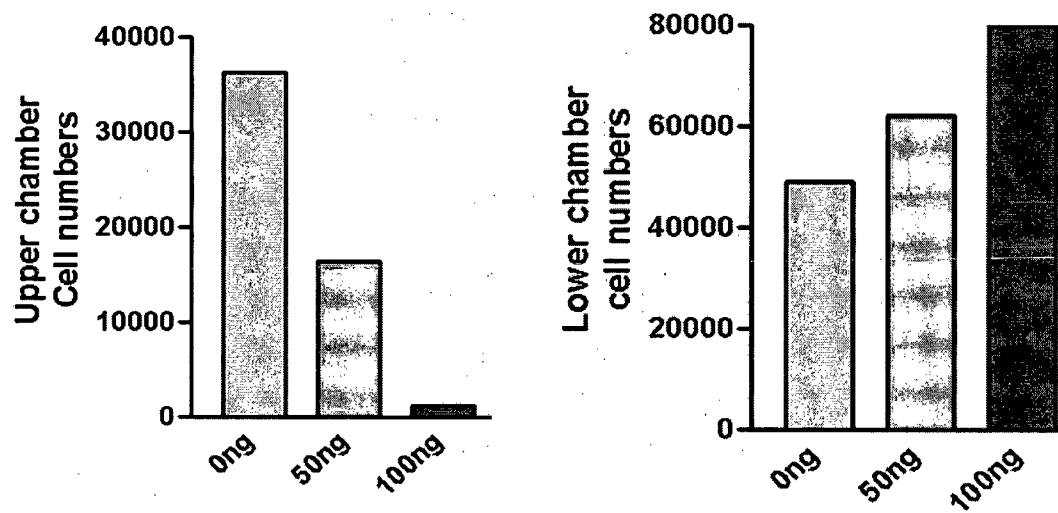
【도 6】



【Fig 7a】



【Fig 7b】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/002953**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 39/395(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 19/02(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)

A61K 39/395

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: , ,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 286: G285-G293 (Feb 2004) See all document	1-14,22-24
A	J Clin Invest 116(10):2748–2756 (02 October 2006) See all document	1-14,22-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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

"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

"I" 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

11 JANUARY 2012 (11.12.2012)

Date of mailing of the international search report

17 JANUARY 2012 (17.12.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/002953

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **15-21**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The claim pertains to methods for treatment of the human body as well as diagnostic methods, and thus a written opinion has not been established. (Rule 43bis.1(b), Rule 67.1(iv)PCT).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/002953

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 39/395(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, A61P 19/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 39/395 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: , ,		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 286: G285-G293 (Feb 2004) see all document	1-14,22-24
A	J Clin Invest 116(10):2748–2756 (2. Oct 2006) see all document	1-14,22-24
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 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 2012년 01월 11일 (11.01.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 01월 17일 (17.01.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 임혜준 전화번호 82-42-481-8395 

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 15-21
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
인체의 진단 및 치료방법에 해당하여 견해서의 작성이 요구되지 않습니다. (Rule 43bis.1(b), Rule 67.1(iv) PCT).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음