(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 7 월 17 일 (17.07.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/109617 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/000361

(22) 국제출원일: 2014 년 1 월 13 일 (13.01.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0003938 2013 년 1 월 14 일 (14.01.2013) KR

(71) 출원인: **가톨릭대학교 산학협력단 (CATHOLIC UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 137-701 서울시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정내, Seoul (KR).

(72) 발명자: **임향숙 (RHIM, Hyang-Shuk)**; 137-798 서울시 서초구 잠원로 217, 1 동 702 호, Seoul (KR). **조미라 (CHO, Mi-La)**; 140-854 서울시 용산구 이촌로 156, 1103 호, Seoul (KR). **문영미 (MUN, Yeong-Mi)**; 157-765 서울시 강서구 공항대로 39 길 74, 504 동 805 호, Seoul (KR). **이선영 (LEE, Seon-Yeong)**; 443-800 경기도 수원시 영통구 권광로 290 번길 34-18, 1016 호, Gyeonggi-do (KR). **이재선 (LEE, Jae-Seon)**; 480-734 경기도 의정부시 회룡로 221, 508 동 1402, Gyeonggi-do (KR). **유준걸 (RYU, Jun-Geol)**; 235-803 강원도 태백시 장수길 47, 1301 호, Gangwon-do (KR). **손혜진 (SON, Hye-Jin)**; 150-833 서울시 영등포구 도신로 15 나길 10, B 동 301 호, Seoul (KR). **허양미 (HER, Yang-Mi)**; 426-768 경기도 안산시 상록구 화랑로 495, 5 동 305 호, Gyeonggi-do (KR). **남민경 (NAM, Min-Kyung)**; 442-865 경기도 수원시 팔달구 덕영대로 757 번길 10, 1 동 105 호, Gyeonggi-do (KR). **신현아 (SHIN, Hyun-Ah)**; 463-835 경기도 성남시 분당구 돌마로 908, 103 동 502 호, Gyeonggi-do (KR). **김재경 (KIM, Jae-Kyung)**; 331-792 충청남도 천안시 서북구 월봉 7 길 77, 206 동 1410 호, Chungcheongnam-do (KR). **서현범 (SEO, Hyeon-Beom)**; 156-832 서울시 동작구 등용로 15, 305 호, Seoul (KR).

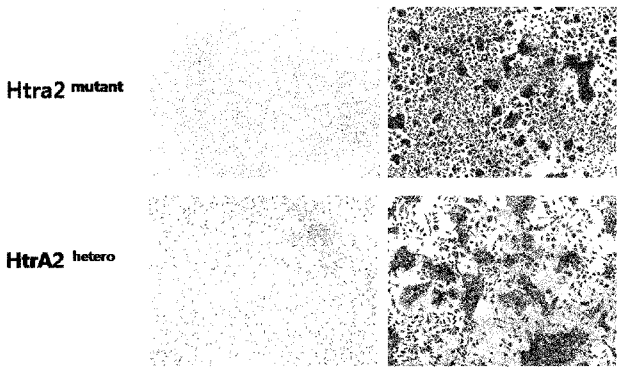
(74) 대리인: **특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP GROUP)**; 137-858 서울시 서초구 강남대로 343, 11 층, Seoul (KR).

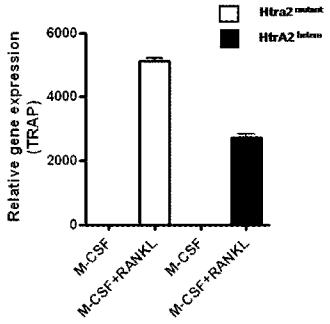
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES, CONTAINING HTRA2 AS ACTIVE INGREDIENT

(54) **발명의 명칭** : HtrA2 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물





(57) **Abstract**: The present invention relates to a composition for preventing or treating autoimmune diseases, containing high temperature requirement protein A2 (HtrA2) as an active ingredient. The HtrA2 according to the present invention reduces the expression of STAT3, which is a Th17 cell transcription factor, inhibits the expression of inflammatory cytokines, and promotes the activity of a regulatory T cell (Treg), thereby regulating an excessive immune response through a mechanism, and thus it is possible to effectively treat autoimmune diseases caused by the abnormal regulation of an inflammatory response and various immune responses.

(57) **요약서**: 본 발명은 HtrA2(High temperature requirement protein A2) 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 HtrA2 단백질은 HtrA2 단백질이 Th17 세포의 전사인자인 STAT3 의 발현을 감소시키고 염증성 사이토카인의 발현을 억제시키며, 조절 T 세포(Regulatory T cell: Treg)의 활성을 촉진시켜 과도한 면역반응을 조절하는 기작을 통해 이루어지므로, 염증반응 및 각종 면역반응의 조절 이상으로 유발되는 자가면역질환을 효과적으로 치료할 수 있는 효과가 있다.

WO 2014/109617 A1

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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: HtrA2 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 HtrA2(High temperature requirement protein A2) 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 면역은 생체 조직으로 침입하거나 주입되는 모든 외부 고분자물질(항원)에 대한 생체의 자기보호 체계의 하나이다. 면역체계의 주요한 구성성분으로 림프구가 있는데, 이는 골수에서 만들어져서 혈액을 따라 림프 조직이나 기관, 주로 림프절.비장.편도 등으로 순환하는 백혈구다. 면역반응에 관여하는 세포로서, B세포는 적절한 항원에 의해 자극되면 빠르게 증식하여, 그 항원을 중화시킬 특별한 항체(면역글로불린)를 만들어내는 클론을 형성하며, B세포가 생성하는 항체는 체액에서 순환하면서 체액성면역을 수행한다. 또한, T세포는 흉선에서 생성되어 림프 조직으로 이동하는데, 항원을 직접 공격하는 세포매개성면역을 담당한다.

[4] 한편, 모든 정상 개체에 있어서 가장 중요한 특성 중의 하나는 자기(self)를 구성하고 있는 항원물질에 대해서는 해롭게 반응하지 않는 반면, 많은 비자기(non-self) 항원에 대해서는 이를 인식하고 반응하여 제거할 수 있는 능력을 가지고 있다는 것이다. 이처럼 자기항원에 대한 생체의 무반응을 면역학적 무반응성(immunologic unresponsiveness) 또는 관용(tolerance)이라 한다.

[5] 이러한 자기관용을 유도하거나 계속 유지하는데 있어서 문제가 생기게 되면 자기항원에 대하여 면역반응이 일어나게 되고, 이로 인하여 자신의 조직을 공격하는 현상이 발생하면서 다발성 경화증(multiple sclerosis), 1형 당뇨병, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염 등의 자가면역질환이 발생하게 되며, 뿐만아니라 이식과 같은 시술 이후 면역거부 반응이 발생하게 된다.

[6] 구체적으로 자가면역질환은 자기 세포에 대한 이상 반응으로 나타나는 질병이므로 치료는 주로 자기면역 기능을 억제하는 약물이 사용되고 있다. 그러나 부작용이 많아 지속적으로 사용하기 곤란하고 재발을 충분히 막지 못하여 완치를 위한 치료에는 한계가 있다. 다발성경화증의 경우 베타인터페론이 사용되고 있으나 부작용이 덜한 대신 치료비가 비싸고 평생동안 주사를 맞아야 하는 불편함이 있고 재발을 막는 효과가 미미 하다. 또한 CD40 리간드에 항체 투여 등으로 세포간의 상호작용을 억제하는 방법이 사용되었으나 그다지 성공적이지 않다. 기타 여러 가지 면역요법들이 있으나

아직 확실한 치료효능을 보이는 방법으로 인정된 사례는 없다.

[7] 따라서 자가면역질환을 효과적으로 치료할 수 있으며 인체에 무해하고 부작용이 없는 치료제에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 이에 본 발명자들은 자가면역질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 새로운 치료방법을 연구하던 중, HtrA2 단백질이 STAT3의 발현을 감소시키고 염증성 사이토카인의 발현을 억제시키며, 조절 T 세포(Regulatory T cell: Treg)의 활성을 촉진시키는 기능을 가지고 있어 자가면역질환을 효과적으로 치료할 수 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[10] 따라서 본 발명의 목적은 HtrA2 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 또한, 본 발명의 다른 목적은 HtrA2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 아울러, 본 발명의 다른 목적은 상기의 조성물을 유효성분으로 포함하는 면역억제제를 제공하는 것이다.

[13]

과제 해결 수단

[14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 HtrA2 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[15] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 HtrA2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[16] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 HtrA2 단백질은 STAT3 발현 및 활성을 감소시키는 것일 수 있다.

[17] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 HtrA2 단백질은 조절 T 세포(Treg)의 활성을 촉진 또는 증가시키고, 혈액 내 총 IgG 및 IgM의 농도를 감소시키는 것일 수 있다.

[18] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 HtrA2 단백질은 염증성 사이토카인인 IL-1b, IL-6 및 IL-17의 발현을 감소 또는 억제시키는 것일 수 있다.

[19] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 HtrA2 단백질은 파골세포의 분화를 억제할 수 있다.

[20] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 소화기 당뇨병, 아토피 피부염, 자가면역성 뇌척수염, 천식 및 크론씨병으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[21] 또한 본 발명은, HtrA2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를

유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[22] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 소화기 당뇨병, 아토피 피부염, 자가면역성 뇌척수염, 천식 및 크론씨병으로 이루어진 군중에서 선택되는 것일 수 있다.

[23] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 것일 수 있다.

[24] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터 내에 포함되어 있는 것일 수 있다.

[25] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 발현 벡터가 플라스미드 또는 바이러스성 벡터인 것일 수 있다.

[26] 나아가 본 발명은 상기의 조성물을 유효성분으로 포함하는 면역억제제를 제공한다.

[27]

[28] 본 발명은 HtrA2 단백질이 STAT3의 발현을 감소시키고 염증성 사이토카인의 발현을 억제시키며, 조절 T 세포(Treg)의 활성을 촉진시키는 기능을 가지고 있어 자가면역질환을 효과적으로 치료할 수 있다는 사실을 확인하였고, 따라서 본 발명은 HtrA2 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[29] 초기 STAT3 관련 인자들이 거론되었을 때, PIAS3 및 SOCS3(suppressor of cytokine signaling 3)는 STAT3의 억제 피드백으로 거론된 바 있고, SOCS 단백질은 JAKs을 억제하여 리간드에 의해 유도되는 반응을 억제하는 활성이 있으며, PIAS 단백질은 STAT3의 인산화를 억제하는 활성이 있는 것으로 알려져 있다(Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. Bioessays 1999;21:4752).

[30] 또한, HtrA2는 미토콘드리아 serine protease로 Mxi2와 상호작용하는 단백질로 처음 동정되었다. HtrA2는 미토콘드리아 타겟팅 시퀀스(MTS), transmembrane domain(TM), protease domain, PDZ domain으로 구성되어 있으며, 미토콘드리아의 intermembrane space에 존재한다. 박테리아 HtrA는 생리적 온도(37℃)에서는 chaperon으로 작용하고 샤페론(chaperon)이나 프로테아제(protease)로 작용할 가능성이 높다. 최근 UV, 스타우로스포린(staurosporine) 등과 같은 세포사멸 자극이 주어졌을 때, 미토콘드리아로부터 Smac/DIABLO, cytochrome c 등과 함께 HtrA2가 세포질로 방출되어 inhibitor of apoptosis protein(IAP)의 작용을 억제시켜 카파제 3-의존적 세포사멸의 유발을 조절한다는 결과들이 발표되고 있으며 여러 연구를 통해 HtrA2는 세포사멸 경로에서 중추적인 역할을 담당하는 조절인자 중의 하나로 알려지고 있다. 또한 linkage analysis와 돌연변이 스크리닝을 통해 mnd2(motor neuron degeneration 2) 마우스의 HtrA2 유전자에서 serine 276이 cysteine으로 변이되어 있는 것을 확인하였고(서열번호 3 및 서열번호 4 참조),

HtrA2의 serine protease의 기능 상실로 인해 mnd2 마우스는 정상 마우스보다 비장과 흉선의 크기가 작고 몸의 크기가 작으며, 운동성이 저하되고, 평균 수명이 약 40일 정도가 되는 등의 표현형을 나타낸다는 보고가 있다. 이는 HtrA2가 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료에 효과가 있다는 사실을 나타낸다.

[31] 그러나 HtrA2 단백질이 자가면역질환과 관련하여 이들 질환과의 관련성 및 치료 기작에 관한 연구에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

[32] 따라서 본 발명에서는 HtrA2 단백질이 자가면역질환의 예방 또는 치료를 위한 용도로 사용할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다.

[33] 즉, 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예에 의해 확인할 수 있었는데, 본 발명의 한 구현예에 따르면, STAT3을 야생형(wild type)과 HtrA2 변이체 마우스의 비장조직에서 면역형광법(immunofluorescence)으로 염색하여 STAT3 발현량을 측정한 결과 p-STAT3 tyr705와 ser727의 발현이 야생형보다 HtrA2 변이체 마우스의 비장에서 더 많이 발현하는 것을 확인 할 수 있었으며, HtrA2 변이체가 발생하면 STAT3의 발현이 증가 한다는 사실을 알 수 있었다(도 1 참조).

[34] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 야생형과 HtrA2 변이체 마우스 비장에서 T 세포, B 세포, 수지상세포(Dendritic cell)의 마커와 STAT3의 발현을 면역형광염색(immunofluorescence)을 통하여 확인한 결과, 항체 생성에 중요한 여포(follicle) 안쪽에서 T 세포, B 세포, 수지상세포(Dendritic cell)가 밀집 되었으며, STAT3이 과활성화 됨을 확인하였다(도 2 참조).

[35] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, HtrA2 단백질은 h17 세포의 전사인자인 STAT3의 발현을 활성을 감소시키고 조절 T 세포(Treg)의 활성을 촉진시키며, 혈액 내 총 IgG 및 IgM의 농도를 억제하는 역할을 함으로써 면역조절 기능을 하고 있다(도 3a, 도 3b 및 도 4 참조).

[36] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 염증성 사이토카인인 Il-1b, IL-6 및 IL-17를 비장에서 분리한 세포에서 유전자 발현 농도를 realtime-PCR로 확인한 결과 본 발명의 HtrA2 단백질은 염증성 사이토카인인 IL-1b, IL-6 및 IL-17의 발현을 억제함을 알 수 있었다(도 5 및 도 7 참조).

[37] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명자들은 실제로 자가면역질환의 일종인 관절염의 치료에 본 발명의 HtrA2 단백질이 효과가 있는지를 알아보기 위하여 HtrA2 변이체 마우스와 HtrA2 헤테로마우스의 골수에서 파골세포 분화실험을 한 결과, 파골세포 분화에 HtrA2가 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다(도 6 참조).

[38] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명자들은 HtrA2의 기능이 억제되어 있을 경우 관절염 유도에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보기 위하여 HtrA2 변이체 마우스 혹은 변이체 발현 벡터 주입을 통해 관절염을 유도하였을 경우 관절염이 더 심화됨을 확인하였다(도 8 참조).

[39] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명자들은 성숙된 HtrA2와 상호작용하는 것으로 알려져 있는 GRIM19(gene associated with

retinoid-interferon-induced mortality-19)가 HtrA2의 발현에도 관여하는지 확인한 결과, GRIM19 과발현 세포주에서 HtrA2의 mRNA 발현이 현저하게 증가하였고, 또한 GRIM19 과발현 마우스의 비장에서 GRIM19의 과발현과 HtrA2의 발현이 연관있음을 확인하였다(도 9a 및 도 9b 참조).

[40] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, GRIM19와 HtrA2의 상호작용을 확인하기 위하여 GRIM19 과발현 마우스의 비장세포에서 미토콘드리아와 세포질을 단백질로 분리하여 웨스턴 블롯으로 HtrA2가 어느 부위에 더 많이 존재하는지 확인한 결과, HtrA2는 GRIM19가 과발현된 마우스 비장 세포에서 세포질에 더 많이 존재하였으며, 이 결과로 GRIM19 과발현 환경에서 HtrA2가 성숙하여 세포질로 이동하여 기능할 수 있음을 알 수 있었다(도 10 참조).

[41] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, HtrA2에 의한 STAT3 활성 억제 및 분해 효과를 조사한 결과, STAT3 단백질은 HtrA2와 반응한 뒤 잘라져 그 양이 감소하였고, 이로부터 HtrA2는 STAT3을 절단하여 그 양을 감소시키는 효과를 갖고 있음을 알 수 있었다(도 11 참조).

[42] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, HtrA2에 의한 미토콘드리아 활성 조절 효과 조사한 결과, Ndufb5, Cycs, ATP50, COx5a와 같은 미토콘드리아 기능에 관여하는 유전자의 발현이 HtrA2가 없는 세포에서 현저하게 감소되어 있음을 확인하였고, 이로부터 HtrA2는 미토콘드리아 ROS 생성 및 전자전달계 활성을 유발하거나 조절하는 유전자의 발현을 조절할 수 있는 인자임을 알 수 있었다(도 12 참조).

[43] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, HtrA2가 관절염에 어떠한 영향을 미치는지를 제2형 콜라겐을 이용하여 유도한 CIA 마우스 모델에서 확인한 결과, HtrA2 과발현 벡터를 주입한 경우 대조군에 비해 CIA 관절염 지수가 감소하여 HtrA2가 관절염 치료효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다(도 13 참조).

[44] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, HtrA2 과발현을 유도한 류마티스 관절염 모델에서 HtrA2의 관절과 연골 손상을 저해 효과를 조사한 결과, HtrA2 과발현 벡터를 주입한 군의 관절은 대조군과 비교해 덜 파괴되어 있고 염증성 세포들의 침윤도 적었으며 연골의 손상도 적음을 확인하였다(도 14 참조).

[45] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, HtrA2 과발현을 유도한 류마티스 관절염 모델에서 HtrA2의 염증성 사이토카인 발현 억제 효과를 조사한 결과, 관절염이 유도된 대조군에 비해 HtrA2 과발현 벡터를 주입한 경우 염증성 사이토카인들의 발현이 감소하는 것으로 나타났고, 특히 관절 파괴인자인 RANKL(receptor activator of NF-κB ligand) 또한 발현이 더 감소하였으며, 이로부터 HtrA2가 관절염 동물 모델의 관절에서 염증성 세포의 침윤 및 증식을 효과적으로 억제할 수 있다는 사실을 확인하였다(도 15 참조).

[46] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, HtrA2의 발현이 염증성 장질환에 미치는 영향을 확인한 결과, HtrA2 hetero 마우스는 대조군에 비하여 몸무게 변화가 더 컸으며(도 16 참조), 이로부터 HtrA2의 기능 저하가 염증성 장 질환을

더 악화시키는 것으로 보아 HtrA2가 염증성 장질환 치료에 중요한 인자가 될 수 있음을 알 수 있었다.

[47] 또한, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, HtrA2가 암 세포에서 염증성 사이토카인 분비능에 미치는 영향 조사한 결과, HtrA2 과발현된 세포에서는 자극하지 않았을 때뿐만 아니라 ConA로 자극된 뒤에도 TNF-α의 분비가 줄어들었음을 알 수 있었고(도 17 참조), 이로부터 HtrA2가 대장암 세포에서의 염증성 사이토카인 TNF-α 생성을 억제하여 염증 환경을 줄일 수 있음을 확인하였다.

[48] 따라서 이와 같은 공지의 사실과 함께 본 발명의 일 실시예를 통해 확인된 사실에 기초하여, 본 발명의 HtrA2 단백질은 면역질환과 같은 자가면역질환을 치료할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

[49] 본 발명에서 상기 면역질환은 포유류 면역계의 구성성분들이 포유류의 병리상태를 야기하거나, 매개하거나 또는 기타 공헌하는 질환을 의미한다. 또한, 면역 반응의 자극 또는 중단이 그 질병의 진행에 보상적인 효과를 갖는 질환을 모두 포함할 수 있는데, 본 발명에서는 과민성 면역반응으로 인해 야기되는 질환들을 포함할 수 있다. 이러한 면역질환의 예로는 이에 제한되지는 않으나, 자가면역질환을 포함할 수 있다.

[50] 또한, 모든 정상 개체에 있어서 가장 중요한 특성 중의 하나는 자기(self)를 구성하고 있는 항원물질에 대해서는 해롭게 반응하지 않는 반면, 비자기(non-self) 항원들에 대해서는 이를 인식하고 반응하여 제거할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이처럼 자기항원에 대한 생체의 무반응을 면역학적 무반응성(immunologic unresponsiveness) 또는 관용(tolerance)이라고 한다.

[51] 그러나 이러한 자기관용을 유도하거나 계속 유지하는데 있어서 문제가 생기게 되면 자기항원에 대하여 면역반응이 일어나게 되고, 이로 인하여 자신의 조직을 공격하는 현상이 발생하는데 이러한 과정에 의해 발생되는 질환을 자가면역질환이라고 한다.

[52] 본 발명에서 상기 조성물이 적용할 수 있는 상기 자가면역질환으로는 이에 제한되지는 않으나, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 소화기 당뇨병, 아토피 피부염, 자가면역성 뇌척수염, 천식 및 크론씨병으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.

[53] 따라서 본 발명은 HtrA2 단백질을 유효성분으로 함유하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있으며, 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 HtrA2 단백질은 상기 단백질과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질을 포함한다. 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 HtrA2 단백질에는 상기 단백질과 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다.

[54] 상기 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체로서

천연형 HtrA2 단백질과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다. "기능적 유도체"는 상기 HtrA2 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질로서 천연형 HtrA2 단백질과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 것을 의미한다. 바람직하게는, 상기 HtrA2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 가지는 단백질을 말한다.

[55] 본 발명에서 상기 '치료'란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 '치료'란 용어는 '치료하는'이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.

[56] 본 발명에 따른 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적조성물은 약학적으로 유효한 양의 HtrA2 단백질을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 자가면역질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[57] 본 발명에 따른 HtrA2 단백질의 약학적으로 유효한 양은 0.5 ~ 100 ㎎/day/체중㎏, 바람직하게는 0.5 ~ 5 ㎎/day/체중㎏이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 자가면역질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[58] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는" 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[59] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[60] 또한, 본 발명에 따른 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물은 자가면역질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[61] 또한, 본 발명은 HtrA2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적조성물을 제공할 수 있다.

[62] 상기 HtrA2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 DNA 서열을 갖는다.

[63] 여기서 상기 폴리뉴클레오티드는 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터 내로 공지의 방법에 의해 도입시킨 후 상기 발현 벡터를 당업계에 공지된 다양한 방법으로 감염(infection) 또는 형질도입(transduction)에 의해 발현형으로 표적 세포 내에 도입시킬 수 있다.

[64] 플라스미드 발현 벡터는 사람에게 사용할 수 있는 FDA의 승인된 유전자 전달방법으로 사람 세포에 직접적으로 플라스미드 DNA를 전달하는 방법이다(Nabel, E. G., et al., Science, 249:1285-1288, 1990). 플라스미드 DNA는 바이러스 벡터와는 달리 균질하게 정제될 수 있는 장점이 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 플라스미드 발현 벡터로는 당업계에 공지된 포유동물 발현 플라스미드를 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 pRK5(유럽특허 제307,247호), pSV16B(국제특허공개 제91/08291호) 및 pVL1392(PharMingen) 등이 대표적이다.

[65] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드 발현 벡터(plasmid expression vector)는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran- mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated trans fection), 전기침공법(electropora tion), 유전자 건(gene gun) 및 세포 내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있다(Wu et al., J. Bio. Chem., 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Bio. Chem., 263:14621-14624, 1988).

[66] 상기 HtrA2를 발현시킬 수 있는 벡터는 공지의 방법에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 국소적으로, 비경구, 경구, 비강, 정맥, 근육 내, 피하 내 또는 다른 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다.

[67] 따라서 본 발명은 HtrA2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약제를 제공할 수 있으며, 나아가 본 발명은 HtrA2 단백질 또는 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 면역억제제를 제공할 수 있다.

[68]

발명의 효과

[69] 본 발명에 따른 HtrA2 단백질은 HtrA2 단백질이 Th17 세포의 전사인자인

STAT3의 발현을 감소시키고 염증성 사이토카인의 발현을 억제시키며, 조절 T 세포(Treg)의 활성을 촉진시켜 과도한 면역반응을 조절하는 기작을 통해 이루어지므로, 염증반응 및 각종 면역반응의 조절 이상으로 유발되는 자가면역질환을 효과적으로 치료할 수 있는 효과가 있다.

[70]

도면의 간단한 설명

[71] 도 1은 STAT3을 야생형과 HtrA2 변이체 마우스의 비장조직에서 면역형광법(immunofluorescence)으로 염색하여 STAT3 발현량을 측정한 결과이다.

[72] 도 2는 야생형과 HtrA2 변이체 마우스 비장에서 T 세포, B 세포, 수지상세포(Dendritic cell)의 마커와 STAT3의 발현을 면역형광염색(immunofluorescence)을 통하여 확인한 결과이다.

[73] 도 3a 및 도 3b는 야생형과 HtrA2 변이체 마우스 비장에서 Treg(CD4+CD25+Foxp3+)의 세포 집단을 유세포기(flow cytometry)를 이용하여 측정한 결과이다.

[74] 도 4는 야생형과 HtrA2 변이체 마우스 비장에서 분리한 세포에서 항체를 생산할 수 있는 형질세포(plasma cell)의 전사인자인 AID와 Blimp-1과 항체의 마커인 IgG와 IgM을 realtime-PCR로 확인한 결과이다.

[75] 도 5는 염증성 사이토카인인 Il-1b와 IL-6를 비장에서 분리한 세포에 유전자 발현 농도를 realtime-PCR로 측정한 결과이다.

[76] 도 6은 HtrA2 변이체 마우스와 HtrA2 헤테로마우스의 골수에서 파골세포 분화를 TRAP staining을 통하여 분석한 결과이다.

[77] 도 7은 HtrA2의 발현변화에 따른 염증성 사이토카인인 IL-17의 발현을 real time PCR로 측정한 결과이다.

[78] 도 8은 HtrA2의 변이체 마우스 혹은 변이체 발현 벡터를 통해 동물모델을 유도한 결과이다.

[79] 도 9a 및 도 9b는 GRIM19 과활성에 의한 HtrA2의 발현 유도 효과를 보여주는 면역형광염색 사진 및 그래프이다.

[80] 도 10은 GRIM19 과발현에 의한 HtrA2의 세포질 이동을 보여주는 그래프이다.

[81] 도 11은 HtrA2에 의한 Stat3 활성 억제 및 분해 효과를 보여주는 전기영동 사진이다.

[82] 도 12는 HtrA2가 미토콘드리아 ROS 생성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

[83] 도 13은 HtrA2를 이용한 류마티스 관절염 억제 효과를 보여주는 그래프이다.

[84] 도 14는 HtrA2 과발현을 유도한 류마티스 관절염 모델에서 HtrA2가 관절과 연골 손상을 저해하는 효과를 보여주는 면역염색 사진이다.

[85] 도 15는 HtrA2 과발현을 유도한 류마티스 관절염 모델에서 HtrA2가 관절에서

염증성 사이토카인의 발현을 억제하는 효과를 보여주는 면역염색 사진이다.

[86] 도 16은 HtrA2가 염증성 장질환에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

[87] 도 17은 HtrA2가 대장암 세포주에서 염증성 사이토카인 분비능에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

[88]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[89] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[90] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[91]

[92] 실시예 1. HtrA2에 의한 STAT3 발현 확인

[93] Th17세포의 전사인자로 알려진 STAT3이 야생형과 HtrA2 변이체 마우스의 비장조직에서 면역형광법(immunofluorescence)으로 염색을 하여 야생형 대비 HtrA2 변이체 마우스에서 STAT3의 발현을 알아보았다. HtrA2 변이체 마우스(Stock number 004608)는 Jaxson lab에서 구입하였으며 mouse chromosome 6에 위치하는 mnd2라는 유전자에 염색체상의 열성적 돌연변이가 생긴 마우스이다.

[94] 그 결과, p-STAT3 tyr705와 ser727의 발현이 야생형보다 HtrA2 변이체 마우스의 비장에서 더 많이 발현하는 것을 확인할 수 있었으며, HtrA2 변이체가 발생하면 Th17 세포의 전사인자인 STAT3의 발현이 증가한다는 사실을 알 수 있었다(도 1).

[95]

[96] 실시예 2. HtrA2에 의한 T세포, B세포, 수지상세포 및 STAT3 발현 확인

[97] 야생형과 HtrA2 변이체 마우스 비장에서 T 세포, B 세포, 수지상세포(Dendritic cell)의 마커와 STAT3의 발현을 관찰을 위해 조직에서 면역형광염색(immunofluorescence)을 통하여 확인하였다.

[98] 그 결과, CD4, B220, CD11C등 여러 면역 세포의 집단이 증가하였으며, STAT3의 발현도 HtrA2 변이체 마우스에서 발현이 증가됨을 확인하였다. 이 결과로 항체 생성에 중요한 여포(follicle) 안쪽에서 T 세포, B 세포, 수지상세포(Dendritic cell)가 밀집되었으며, STAT3이 과활성화됨을 확인하였다(도 2).

[99]

[100] 실시예 3. HtrA2 변이체 마우스의 비장에서의 Foxp3 발현 Treg 세포 분석

[101] 생후 38일 된 야생형과 HtrA2 변이체 마우스의 비장에서 분리한 세포에서 effector T cell 등 활성화된 면역세포(immune cell)들을 억압시킬 수 있는 기능을 가진 Treg(CD4+CD25+Foxp3+)의 세포 집단을 유세포기(flow cytometry)를 사용하여 확인하였다.

[102] 그 결과, Lymphocyte gate는 차이가 없으나 CD4+ 세포 집단에서 HtrA2 변이체 마우스에서 야생형보다 13%정도 높은 것을 확인하였으며 오히려 Treg의 %는 5.74%로 야생형 대비 약 4% 정도가 낮은 것을 알 수 있었다(도 3a 및 도 3b).

[103]

[104] 실시예 4. HtrA2에 의한 항체 생산 능력 분석

[105] 생후 38일 된 야생형과 HtrA2 변이체 마우스의 비장에서 분리한 세포에서 항체를 생산할 수 있는 형질세포(plasma cell)의 전사인자인 AID와 Blimp-1과 항체의 마커인 IgG와 IgM을 realtime-PCR로 확인하였다.

[106] 그 결과, 항체 마커인 IgG와 IgM의 농도가 야생형 대비 HtrA2 변이체 마우스에서 증가하였으며, 항체 생산에 중요한 형질세포(plasma cell)의 전사인자인 AID와 Blimp-1도 야생형 대비 HtrA2 변이체 마우스에서 증가한 것을 알 수 있었다(도 4).

[107]

[108] 실시예 5. HtrA2의 비정상적인 형태에 의한 염증성 사이토카인 발현 측정

[109] 대표적인 염증성 사이토카인으로 알려진 Il-1b와 IL-6를 비장에서 분리한 세포에서 유전자 발현 농도를 realtime-PCR로 확인한 결과 IL-1b와 TNF-α가 HtrA2 변이체 마우스에서 증가하였다. 이 결과로 염증유발에 중요한 IL-1b, TNF-α가 HtrA2의 비정상적인 형태가 염증을 만들 수 있음을 알 수 있었다(도 5).

[110]

[111] 실시예 6. HtrA2에 의한 파골세포 분화 분석

[112] 관절염과 밀접한 관련이 있는 파골세포(osteoclast) 분화에 HtrA2가 관련이 있는지 알아보기 위하여 HtrA2 변이체 마우스와 HtrA2 헤테로마우스의 골수에서 파골세포 분화실험을 하였다.

[113] 그 결과, HtrA2 헤테로마우스보다 HtrA2 변이체 마우스에서 파골세포(osteoclast) 분화가 더 촉진됨을 TRAP staining을 통하여 확인하였고, 파골세포에서 얻은 cDNA로 파골세포 마커인 TRAP을 realtime-PCR로 확인한 결과 HtrA2 헤테로마우스보다 HtrA2 변이체 마우스에서 증가됨을 확인하였으며, 이로부터 파골세포 분화에 HtrA2가 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다(도 6).

[114]

[115] 실시예 7. HtrA2의 발현변화에 따른 염증성 사이토카인 발현 분석

[116] HtrA2의 발현변화에 따른 염증성 사이토카인인 IL-17의 발현을 확인하기 위하여 본 발명자들은 T cell lymphoma cell line인 LBRM 세포에 HtrA2 과발현 벡터와mock vector를 형질주입한 뒤 TCR자극을 3일 주고 IL-17의 발현을 real time PCR로 측정하였다.

[117] 그 결과, HtrA2가 과발현된 세포에서 IL-17의 발현이 감소하였으며 화학억제제(chemical inhibitor)로 억제했을 경우에는 IL-17이 증가하였으므로 HtrA2가 IL-17발현을 조절함을 알 수 있었다(도 7).

[118]

[119] 실시예 8. HtrA2의 변이체 마우스와 변이체가 관절염에 끼치는 영향 분석

[120] HtrA2의 기능이 억제되었을 때 관절염에 어떠한 결과를 초래하는지 확인하기 위하여 본 발명자들은 HtrA2 변이체 이형 마우스 혹은 변이체 발현 벡터를 주입하여 관절염 지수를 측정하였다.

[121] 그 결과, HtrA2 변이체가 생겨 그 기능을 하지 못하는 마우스에서 CIA 관절염 지수가 증가하여 HtrA2 기능이 억제되었을 경우 관절염 치료효과가 없어지는 것을 확인 할 수 있었다(도 8).

[122]

[123] 실시예 9. GRIM19 과발현에 의한 HtrA2의 발현 유도 효과 조사

[124] GRIM19는 미토콘드리아내에서 complex1에 속하는 단백질로 ROS 생성과 세포의 생존에 관여하는 인자이다. GRIM19는 성숙된 HtrA2와 상호작용하는 것으로 알려져 있는데 GRIM19가 HtrA2의 발현에도 관여하는지 확인해보고자 T 세포주인 LBRM 세포주에 GRIM19와 발현 벡터를 주입하여 만든 GRIM19 과발현 세포주에서 HtrA2의 발현을 확인하였다.

[125] 그 결과, GRIM19 과발현 세포주에서 HtrA2의 mRNA 발현이 현저하게 증가하였으며, GRIM19 과발현 마우스(GRIM19 transgenic mice, GRIM19 Tg)의 비장에서 GRIM19와 HtrA2의 발현을 확인하기 위하여 실시예 1과 동일한 실험 방법으로 비장에서 공초점 현미경으로 GRIM19와 HtrA2 발현 세포를 확인한 결과, GRIM19 과발현 마우스의 비장에서 GRIM19의 과발현과 HtrA2의 발현이 연관이 있음을 확인하였다(도 9a 및 도 9b).

[126]

[127] 실시예 10. GRIM19 과발현에 의한 HtrA2의 세포질 이동

[128] GRIM19와 HtrA2의 상호작용을 확인하기 위하여 GRIM19 과발현 마우스의 비장세포에서 미토콘드리아와 세포질을 단백질로 분리하여 웨스턴 블롯으로 HtrA2가 어느 부위에 더 많이 존재하는지 확인하였다.

[129] 그 결과, HtrA2는 GRIM19가 과발현된 마우스 비장 세포에서 세포질에 더 많이 존재하였으며, 이 결과로 GRIM19 과발현 환경에서 HtrA2가 성숙하여 세포질로 이동하여 기능할 수 있음을 알 수 있었다(도 10).

[130]

[131] 실시예 11. HtrA2에 의한 Stat3 활성 억제 및 분해 효과 조사

[132] STAT3 과발현 E. coli에서 얻은 STAT3 단백질과 HtrA2 과발현 E. coli에서 얻은 HtrA2 단백질을 37℃에서 16시간 반응시킨 뒤 단백질을 전기영동하였고, STAT3의 단백질양을 웨스턴 블롯하였다.

[133] 그 결과, STAT3 단백질은 HtrA2와 반응한 뒤 잘라져 그 양이 감소하였다(도 11). 따라서, HtrA2는 STAT3을 절단하여 그 양을 감소시키는 효과를 갖고 있음을 알 수 있었다.

[134]

[135] 실시예 12. HtrA2에 의한 미토콘드리아 활성 조절 효과 조사

[136] HtrA2+/+ MEF 세포주와 HtrA2-/- 세포주에서 얻은 RNA에서 미토콘드리아 ROS 생성에 관여하는 유전자의 발현을 확인하였다.

[137] 그 결과, Ndufb5, Uqcrb, Cycs, ATP50, COx5a와 같은 미토콘드리아 기능에 관여하는 유전자의 발현이 HtrA2가 없는 세포에서 현저하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 12). 따라서, HtrA2는 미토콘드리아 ROS 생성 및 전자전달계 활성을 유발하거나 조절하는 유전자의 발현을 조절할 수 있는 인자임을 알 수 있었다.

[138]

[139] 실시예 13. HtrA2를 이용하여 류마티스 관절염을 억제하는 효과 조사

[140] HtrA2가 관절염에 어떠한 결과를 초래하는지 확인하기 위하여 본 발명자들은 제2형 콜라겐을 이용하여 유도한 CIA 마우스 모델에 HtrA2 과발현 벡터를 주입하여 관절염 지수를 측정하였다. 이를 위하여 DBA1/J 마우스에 제2형 콜라겐을 진피내(intradermal) 주사하여 관절염을 유도하였으며, 관절염 유도 후 HtrA2 과발현 벡터를 유체역학적 주사(hydrodynamic injection) 방법을 통해 마우스에 주사하였다. 유체역학적 주사는 물리적인 힘을 사용하여 세포막을 통과하여 세포질 내로 도입하는 방법으로 생리식염수에 희석된 벡터를 꼬리 정맥으로 주사하였다.

[141] 그 결과, HtrA2 과발현 벡터를 주입한 경우 대조군에 비해 CIA 관절염 지수가 감소하여 HtrA2가 관절염 치료효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다(도 13).

[142]

[143] 실시예 14. HtrA2 과발현을 유도한 류마티스 관절염 모델에서 관절과 연골 손상을 저해하는 효과 조사

[144] HtrA2 과발현 벡터 주입에 따른 관절염 개선 정도를 분석하기 위하여 관절염 마우스 동물 모델의 관절 조직에 대한 조직학적 검사를 실시하였다. 먼저 HtrA2 과발현 벡터과 대조군을 관절염 유도 후 뒷발을 10% 포르말린으로 고정시키고 뼈에서 석회질을 제거한 뒤 파라핀으로 블록을 제조하였다. 이로부터 관절 절편(7 ㎛)을 준비하고 헤마톡실린(Hematoxylin)과 에오신(Eosin)으로 관절 절편을 염색하였다. 또한, 연골파괴 정도를 확인하기 위하여 톨루이딘 블루(Toluidin blue)와 사프라닌 O (Safranin O) 염색을 하였다.

[145] 그 결과, 실험동물군의 관절내 연골 및 염증도를 관찰한 결과 HtrA2 과발현 벡터를 주입한 군의 관절은 대조군과 비교해 덜 파괴되어 있고 염증성 세포들의 침윤도 적었으며 연골의 손상도 적음을 확인하였다(도 14).

[146]

[147] 실시예 15. HtrA2 과발현을 유도한 류마티스 관절염 모델에서 관절에서 염증성 사이토카인 발현 억제 효과 조사

[148] HtrA2 과발현 벡터 주입에 따른 관절 내 염증성 사이토카인의 발현을 확인하기 위하여 실시예 14와 동일한 방법으로 만든 파라핀 블록을 이용하였으며

염증성사이토카인인 IL-17, IL-1b, TNFa, IL-6의 발현과 관절 파괴인자인 RANKL에 대한 항체를 사용하여 염색하였다.

[149] 그 결과, 관절염이 유도된 대조군에 비해 HtrA2 과발현 벡터를 주입한 경우 염증성 사이토카인들의 발현이 감소하는 것으로 나타났고, 특히 관절 파괴인자인 RANKL 또한 발현이 더 감소하였다(도 15). 따라서, 상기 결과로부터 HtrA2가 관절염 동물 모델의 관절에서 염증성 세포의 침윤 및 증식을 효과적으로 억제할 수 있다는 사실을 확인하였다.

[150]

[151] 실시예 16. HtrA2 억제 시스템을 통한 IBD 염증성 장질환 촉진 현상 조사

[152] C57BL/6 야생형 마우스와 HtrA2 hetero mutant에 2.5% 덱스트란 셀페이트 나트륨(Dextran sulfate sodium, DSS) 물을 5일간 음용하게 하여 염증성 장 질환 유도 동물(IBD)을 유도하였을 때 HtrA2의 기능을 확인하기 위해 실험동물의 무게 변화를 관찰하였다.

[153] 매일 두 군의 동물 모델에 대해 무게를 측정해 본 결과, HtrA2 hetero 마우스는 대조군에 비하여 몸무게 변화가 더 컸다(도 16). 따라서, HtrA2의 기능 저하가 염증성 장 질환을 더 악화시키는 것으로 보아 HtrA2가 염증성 장질환 치료에 중요한 인자가 될 수 있음을 알 수 있었다.

[154]

[155] 실시예 17. HtrA2가 HT-29 대장암 세포주에서 염증성 사이토카인 분비능에 미치는 영향 조사

[156] 대장암 세포주인 HT-29 세포에서 HtrA2가 염증성 사이토카인의 분비를 조절할 수 있는지 확인해 보기 위하여 HtrA2를 삽입한 대장암 세포주와 대조군(mock)에 ConA를 자극한 뒤 3일 후 얻는 세포 배양액에서 염증성 사이토카인인 TNF-α의 양을 ELISA로 확인하였다.

[157] 그 결과, TNF-α의 분비능은 ConA의 자극하에 증가하는데, HtrA2 과발현된 세포에서는 자극하지 않았을 때뿐만 아니라 ConA로 자극된 뒤에도 TNF-α의 분비가 줄어들었음을 알 수 있었다(도 17). 따라서, HtrA2가 대장암 세포에서의 염증성 사이토카인 TNF-α 생성을 억제하여 염증 환경을 줄일 수 있음을 확인하였다.

[158]

[159] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] HtrA2 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 HtrA2 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 HtrA2 단백질은 STAT3 발현 및 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 HtrA2 단백질은 조절 T 세포(Treg)의 활성을 촉진 또는 증가시키고, 혈액 내 총 IgG 및 IgM의 농도를 감소시키는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 HtrA2 단백질은 IL-1b, IL-6, IL-17 및 TNF-α로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 사이토카인의 발현을 감소 또는 억제시키는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 HtrA2 단백질은 파골세포의 분화를 억제하는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 HtrA2 단백질은 GRIM19에 의해 발현 및 활성이 증가되는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 HtrA2 단백질은 관절 파괴 인자인 RANKL(receptor activator of NF-κB ligand)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 9] 청구항 1에 있어서,
상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 소화기 당뇨병, 아토피 피부염, 자가면역성 뇌척수염, 천식 및 크론씨병으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 10] HtrA2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 11] 청구항 10에 있어서,
상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 소화기 당뇨병, 아토피 피부염, 자가면역성 뇌척수염, 천식 및 크론씨병으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

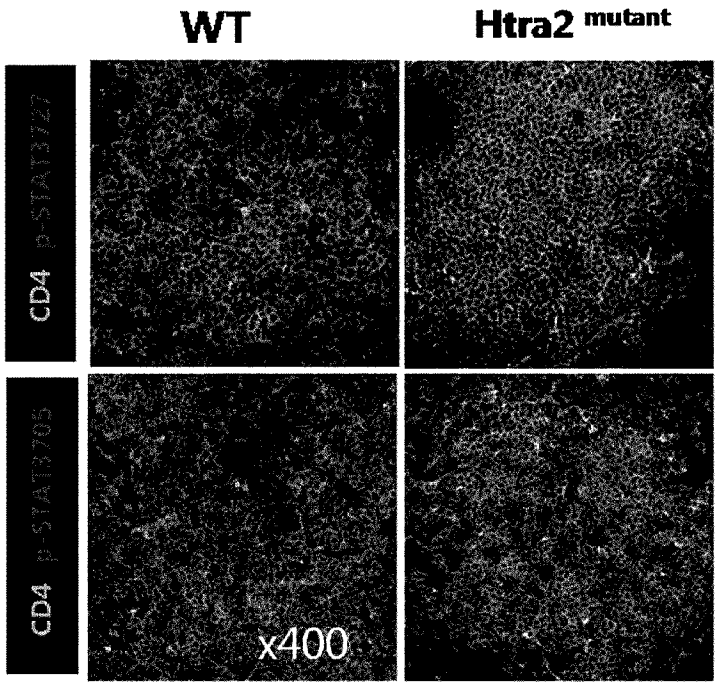
[청구항 12] 청구항 10에 있어서,
상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 13] 청구항 10에 있어서,
상기 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터 내에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

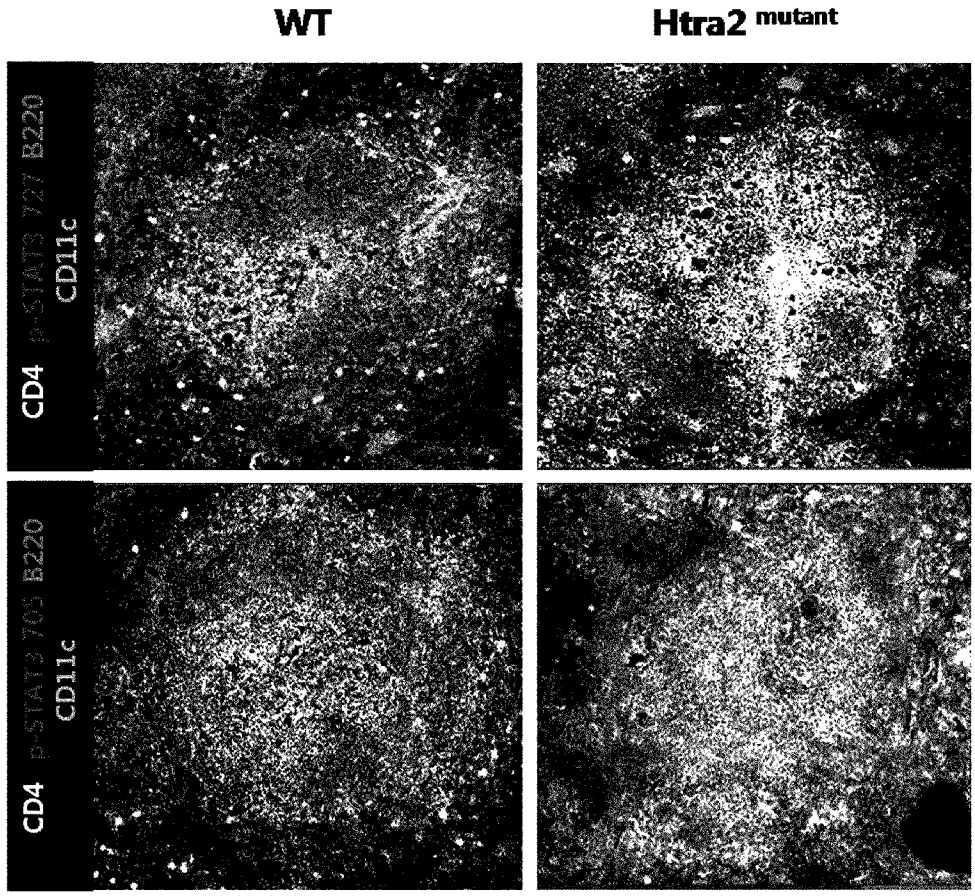
[청구항 14] 청구항 13에 있어서,
상기 발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 15] 청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 따른 조성물을 유효성분으로 포함하는 면역억제제.

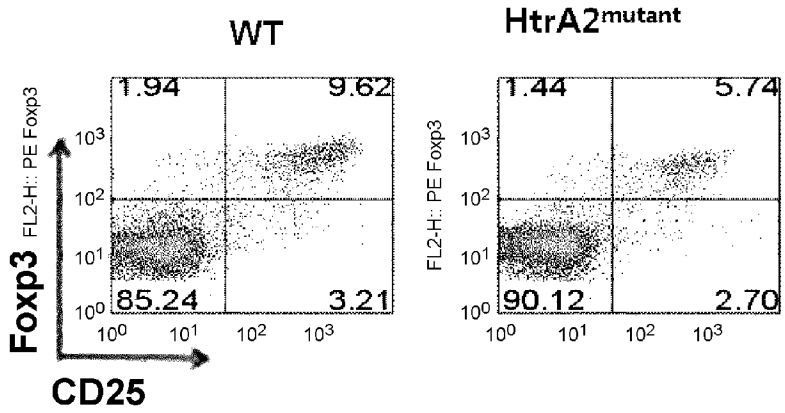
[Fig. 1]


WT
Htra2 mutant
CD4 p-STAT3 727
CD4 p-STAT3 705
x400

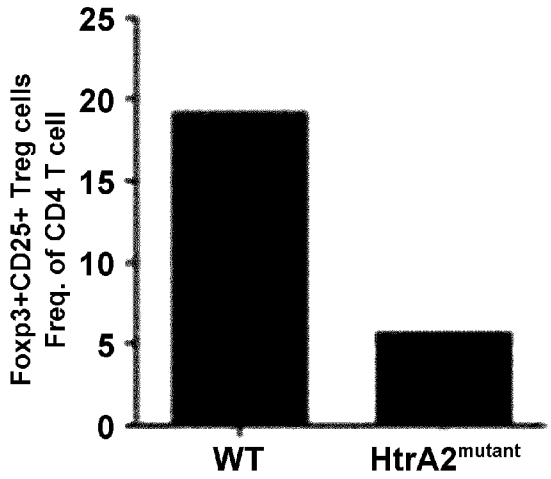
[Fig. 2]


WT
Htra2 mutant
CD4 p-STAT3 727 B220
CD11c
CD4 p-STAT3 705 B220
CD11c

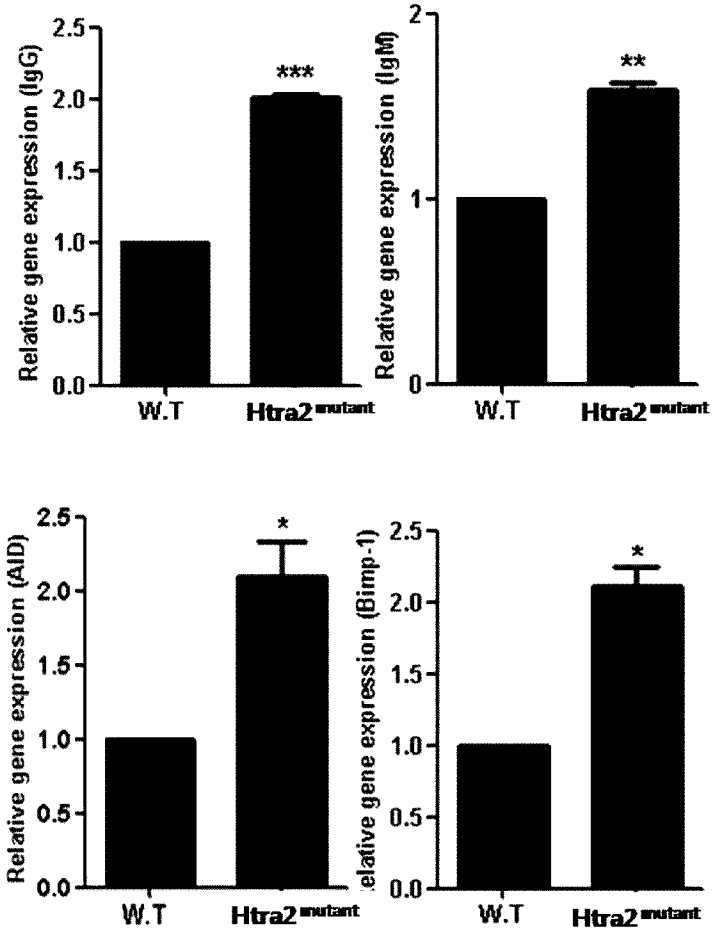
[Fig. 3a]


WT
HtrA2mutant
1.94
9.62
85.24
3.21
1.44
5.74
90.12
2.70
Foxp3 FL2-H:: PE Foxp3
CD25
FL2-H:: PE Foxp3

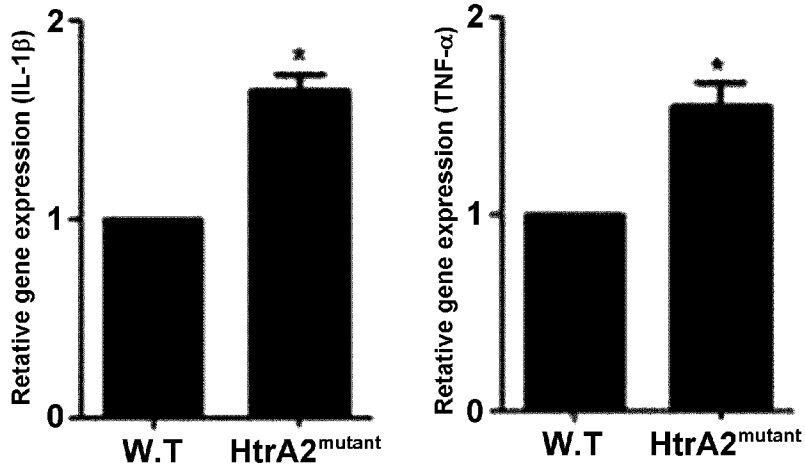
[Fig. 3b]


Foxp3+CD25+ Treg cells
Freq. of CD4 T cell
25
20
15
10
5
0
WT
HtrA2mutant

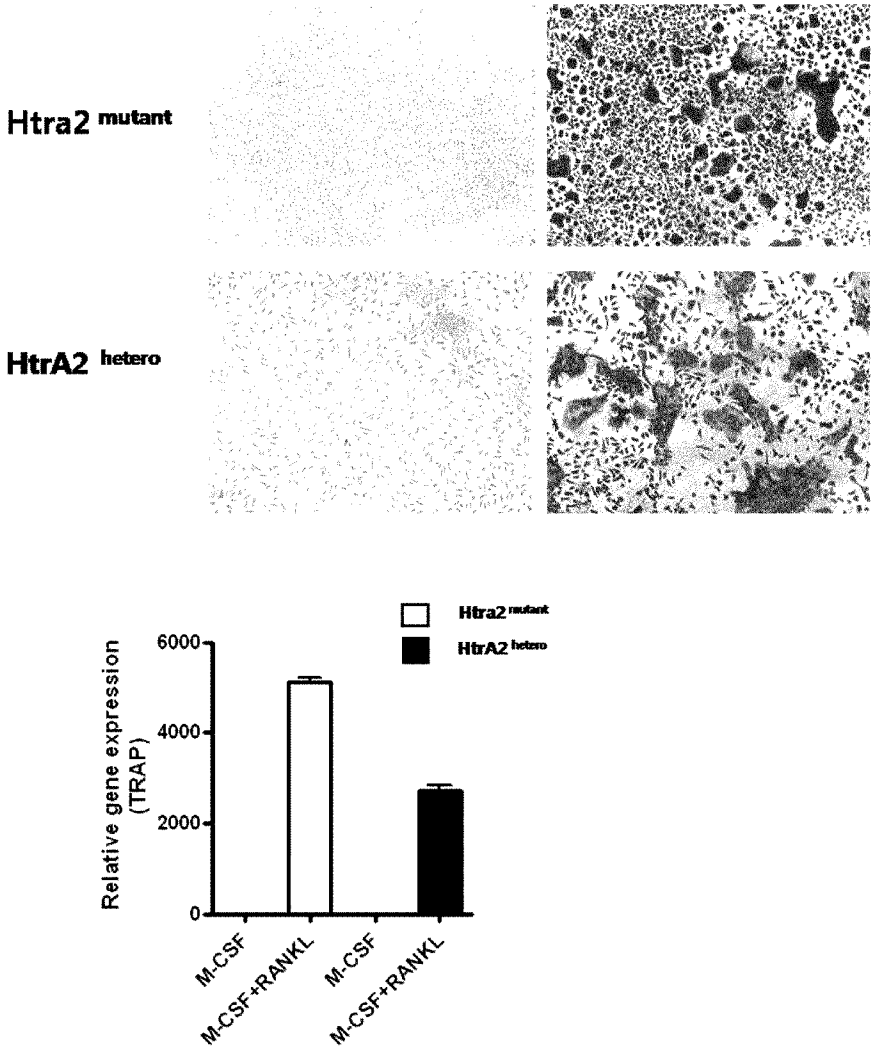
[Fig. 4]


Relative gene expression (IgG)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
W.T
Htra2 mutant
Relative gene expression (IgM)
2
1
0
**
W.T
Htra2 mutant
Relative gene expression (AID)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
W.T
Htra2 mutant
Relative gene expression (Bimp-1)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
W.T
Htra2 mutant

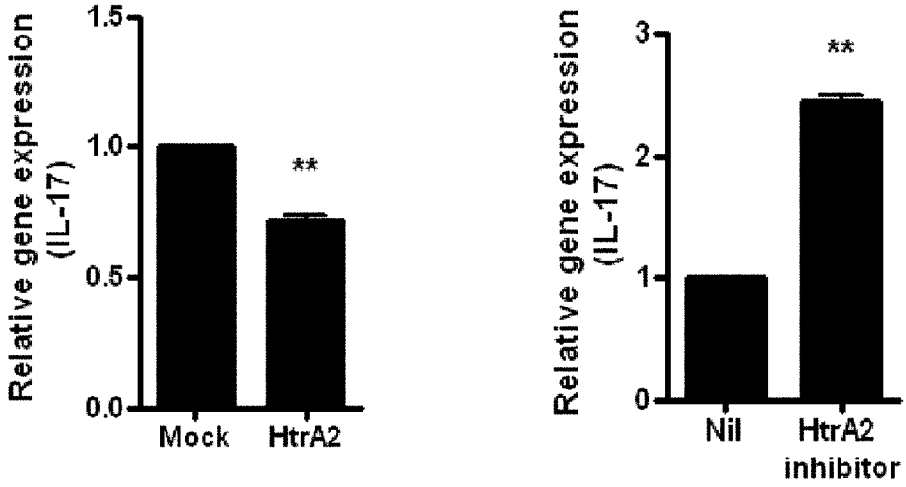
[Fig. 5]


Retative gene expression (IL-1β)
2
1
0
*
W.T
HtrA2mutant
Retative gene expression (TNF-α)
2
1
0
*
W.T
HtrA2mutant

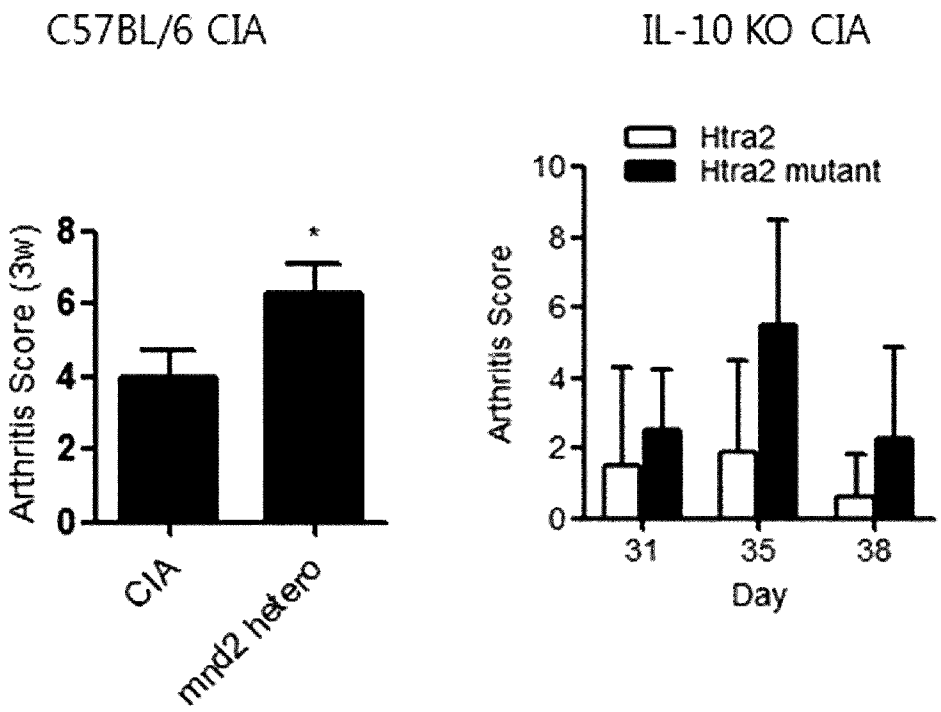
[Fig. 6]


Htra2 mutant
HtrA2 hetero
Htra2 mutant
HtrA2 hetero
Relative gene expression (TRAP)
6000
4000
2000
0
M-CSF
M-CSF+RANKL
M-CSF
M-CSF+RANKL

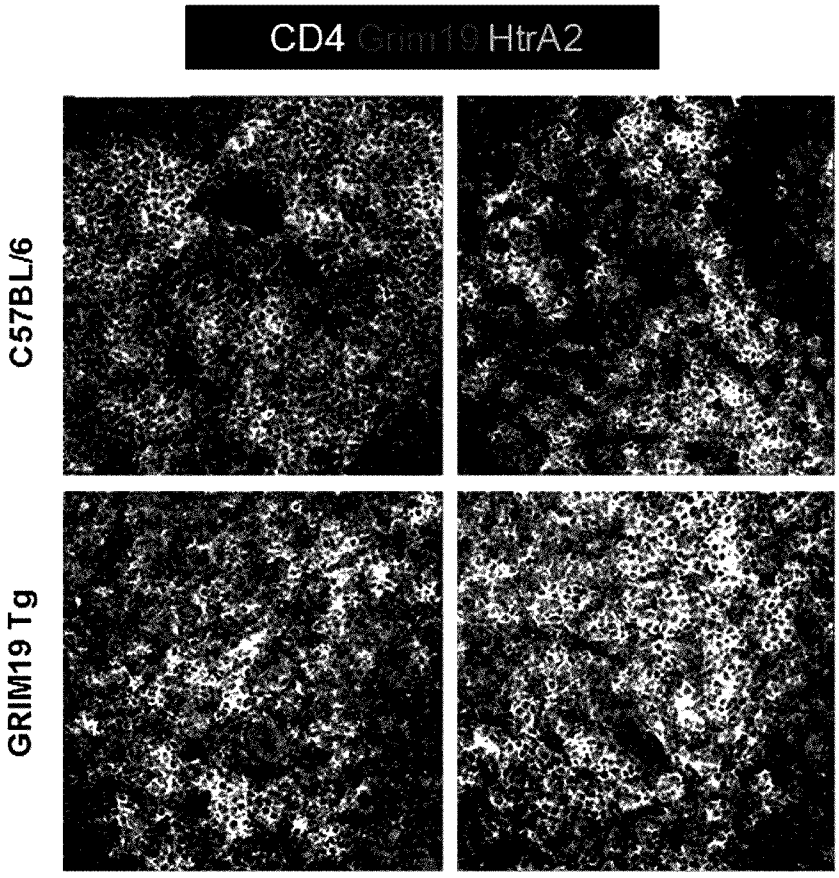
[Fig. 7]


Relative gene expression (IL-17)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Mock
HtrA2
Relative gene expression (IL-17)
3
2
1
0
**
Nil
HtrA2 inhibitor

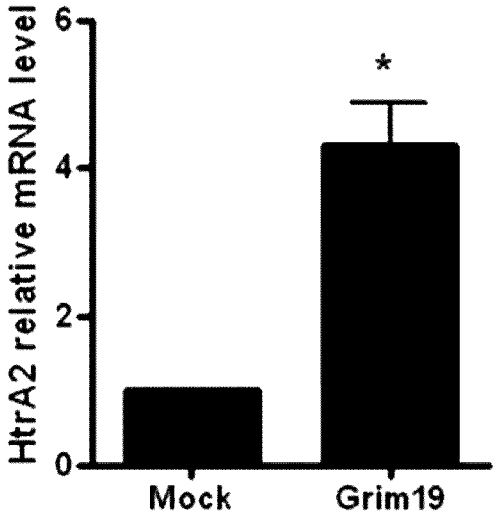
[Fig. 8]


C57BL/6 CIA
IL-10 KO CIA
Arthritis Score (3w)
8
6
4
2
0
*
CIA
mnd2 hetero
Htra2
Htra2 mutant
Arthritis Score
10
8
6
4
2
0
31
35
38
Day

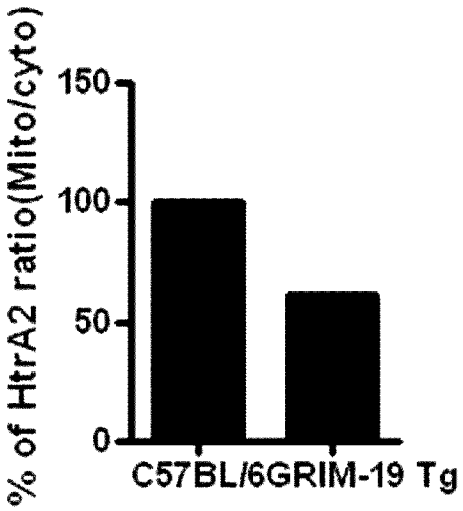
[Fig. 9a]


CD4 Grim19 HtrA2
C57BL/6
GRIM19 Tg

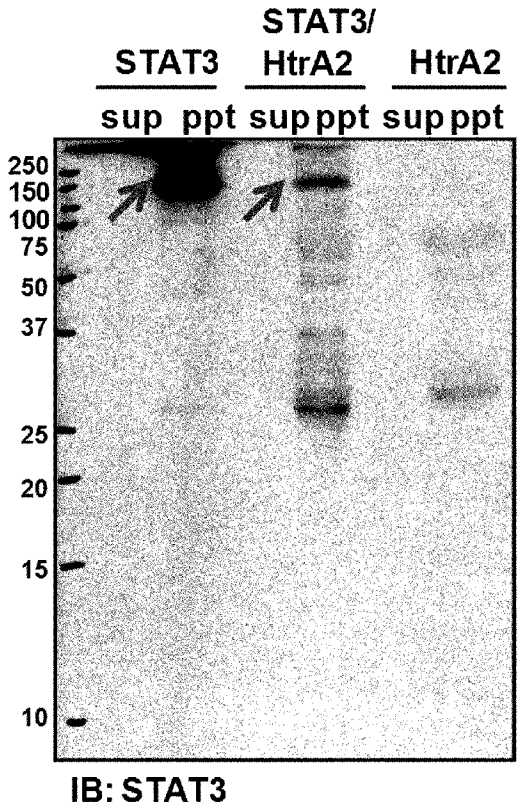
[Fig. 9b]


HtrA2 relative mRNA level
6
4
2
0
*
Mock
Grim19

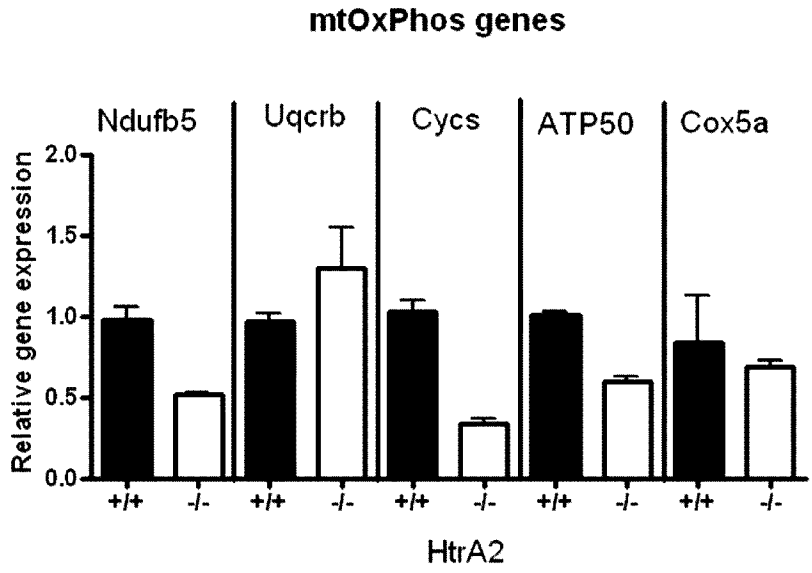
[Fig. 10]


% of HtrA2 ratio(Mito/cyto)
150
100
50
0
C57BL/6GRIM-19 Tg

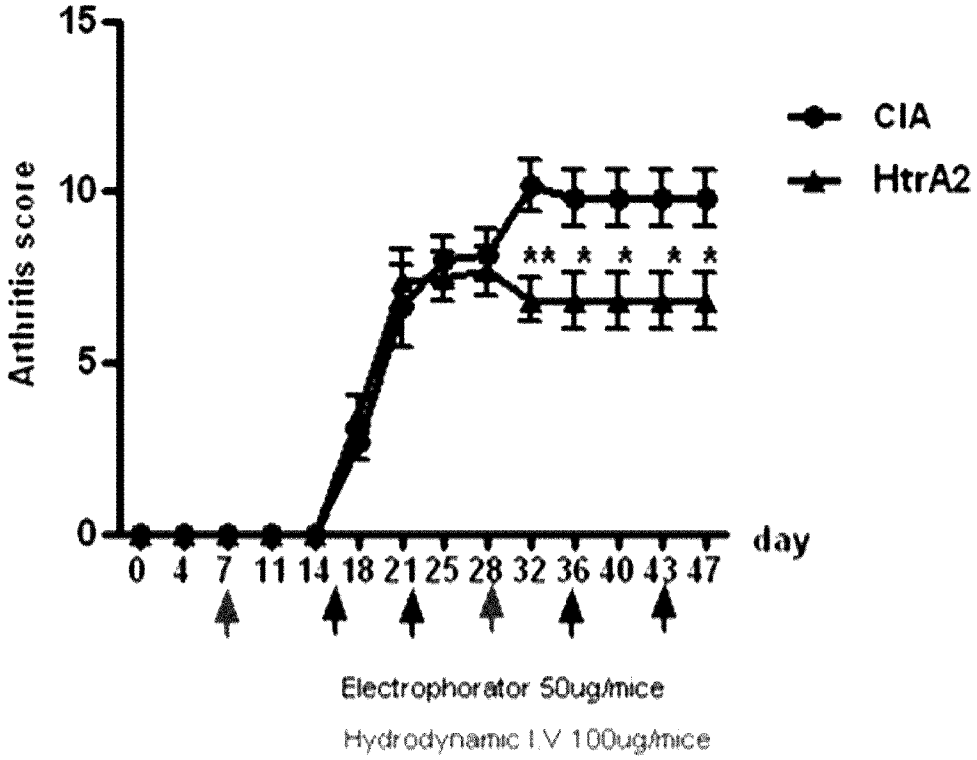
[Fig. 11]


STAT3
STAT3/
HtrA2
HtrA2
sup ppt sup ppt sup ppt
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
IB: STAT3

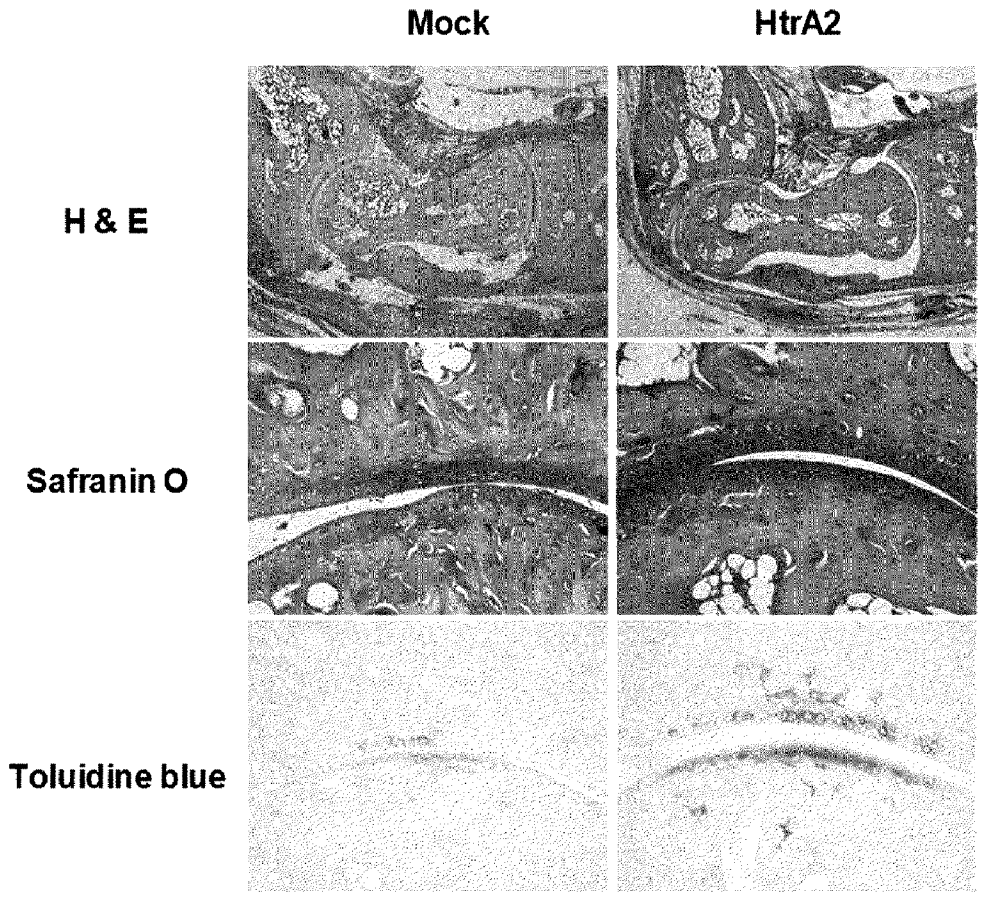
[Fig. 12]


mtOxPhos genes
Ndufb5
Uqcrb
Cycs
ATP50
Cox5a
Relative gene expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
+/+ -/- +/+ -/- +/+ -/- +/+ -/- +/+ -/-
HtrA2

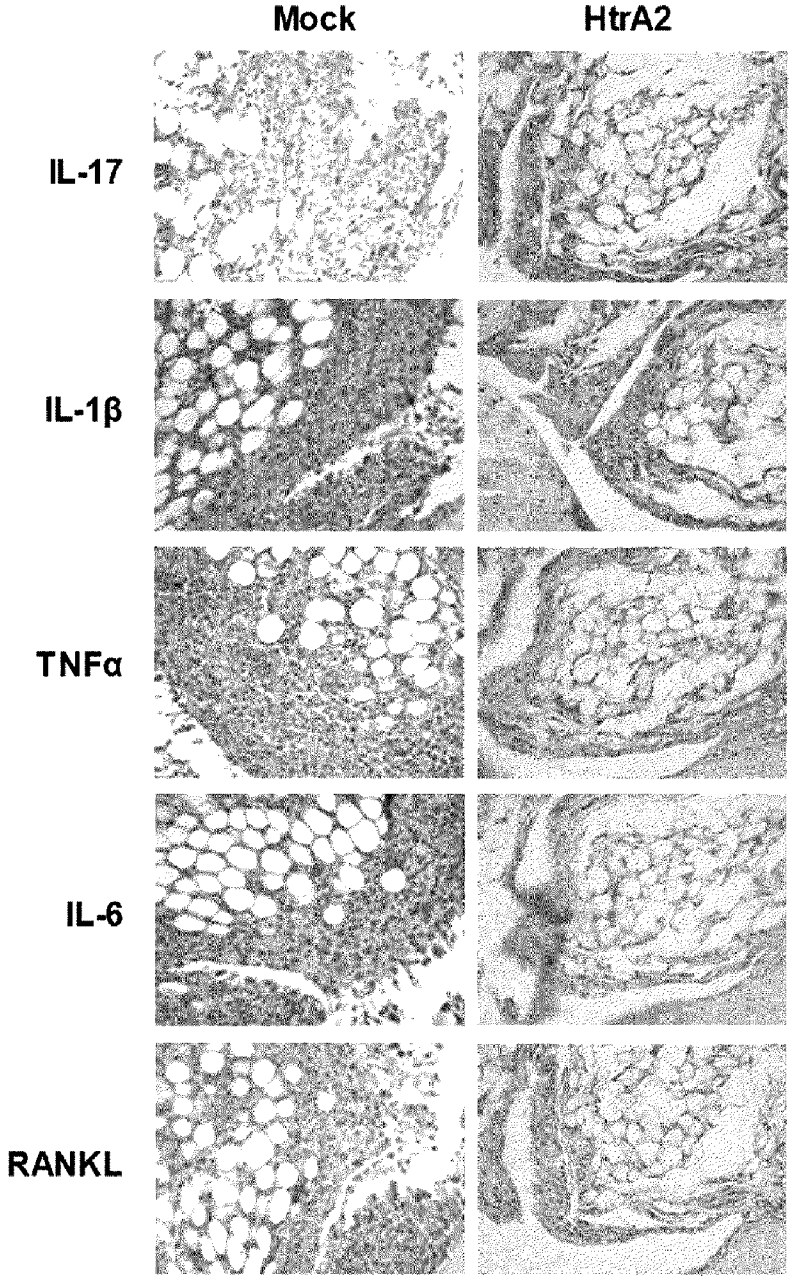
[Fig. 13]


15
10
5
0
Arthritis score
CIA
HtrA2
** * * * *
0 4 7 11 14 18 21 25 28 32 36 40 43 47
day
Electrophorator 50ug/mice
Hydrodynamic I.V 100ug/mice

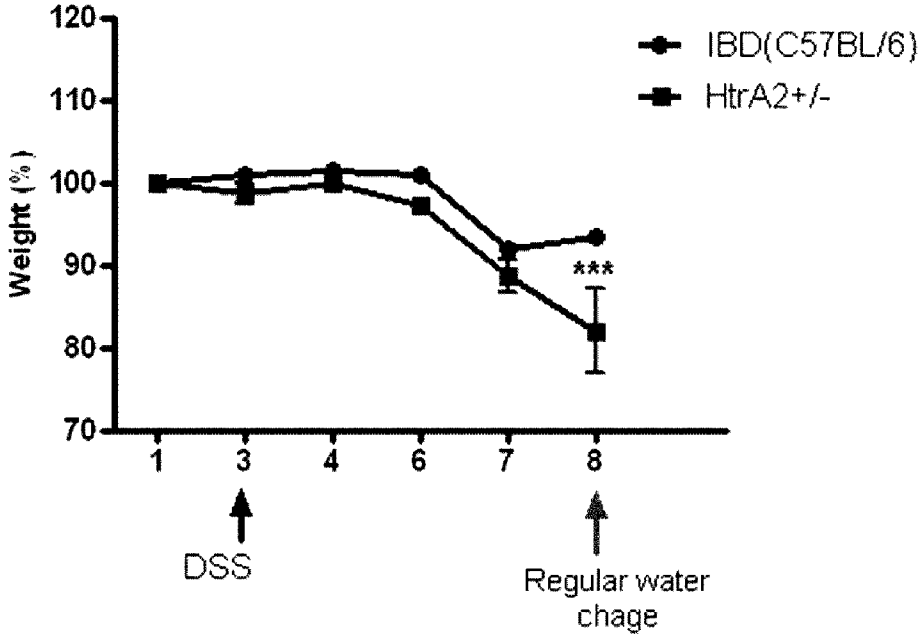
[Fig. 14]


Mock
HtrA2
H & E
Safranin O
Toluidine blue

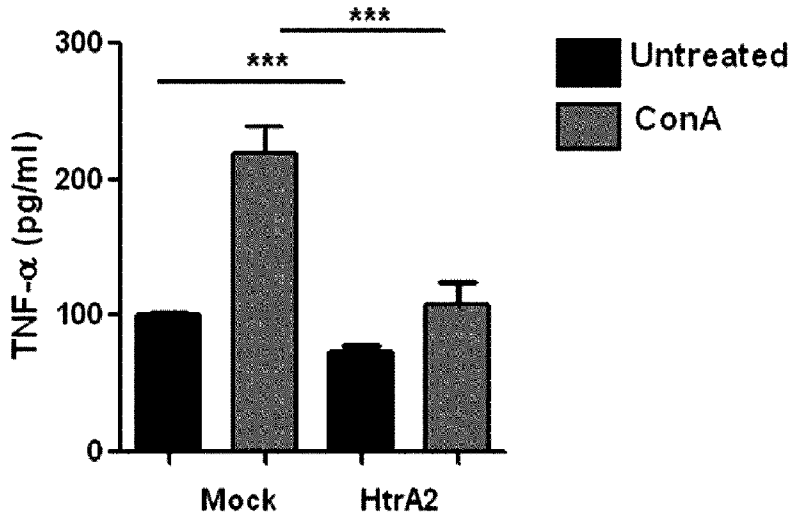
[Fig. 15]



[Fig. 16]


120
110
100
90
80
70
Weight (%)
IBD(C57BL/6)
HtrA2+/-
***
1
3
4
6
7
8
DSS
Regular water chage

[Fig. 17]


300
200
100
0
TNF-α (pg/ml)
***
***
Untreated
ConA
Mock
HtrA2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/000361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 37/00(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 38/17; G01N 33/48; C07K 14/705; G01N 33/53; C12N 9/50; C12Q 1/68; C12P 21/06; A61K 38/16; A61P 37/00

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: HtrA2, autoimmune, autoimmune

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00-70033 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP et al.) 23 November 2000 See abstract, figures 1-2, 11-12	1-15
A	US 2007-0031872 A1 (KRUEGER, R. et al.) 08 February 2007 See abstract, the claims	1-15
A	BHUIYAN, M. S. et al., "Mitochondrial Serine Protease HtrA2/Omi as a Potential Therapeutic Target", CURRENT DRUG TARGETS, 2009, vol. 10, pages 372-383. See pages 378-381	1-15
A	ZURAWA-JANICKA, D. et al., "HtrA Proteins as Targets in Therapy of Cancer and Other Diseases", EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, 2010, vol. 14 (7), pages 665-679 See page 671	1-15
A	US 7947436 B2 (SOOKNANAN, R. R. et al.) 24 May 2011 See columns 4-8, table 2	1-15

☐ 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
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 APRIL 2014 (28.04.2014)	**28 APRIL 2014 (28.04.2014)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/000361

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 00-70033 A1	23/11/2000	NONE	
US 2007-0031872 A1	08/02/2007	DE102004004924 A1	18/08/2005
		DE102004004924 B4	26/04/2007
		EP 1709202 A1	11/10/2006
		WO 2005-071107 A1	04/08/2005
US 7947436 B2	24/05/2011	AU 2005-316169 A1	22/06/2006
		AU 2005-316169 B2	17/11/2011
		CA 2590751 A1	22/06/2006
		EP 1831370 A1	12/09/2007
		EP 1831370 A4	12/08/2009
		EP 2275547 A2	19/01/2011
		EP 2275547 A3	04/05/2011
		EP 2275547 B1	05/03/2014
		JP 2008-522632 T	03/07/2008
		JP 2008-522632A	03/07/2008
		US 2009-0004206 A1	01/01/2009
		US 2011-293604 A1	01/12/2011
		US 2012-308561 A1	06/12/2012
		US 8444975 B2	21/05/2013
		WO 2006-063462 A1	22/06/2006
		WO 2006-063462 A9	26/07/2007

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/000361

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/17; G01N 33/48; C07K 14/705; G01N 33/53; C12N 9/50; C12Q 1/68; C12P 21/06; A61K 38/16; A61P 37/00

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: HtrA2, 자가면역, autoimmune

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 00-70033 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION 외 1명) 2000.11.23 요약, 1-2면, 11-12면 참조	1-15
A	US 2007-0031872 A1 (KRUEGER, R. 외 1명) 2007.02.08 요약, 청구범위 참조	1-15
A	BHUIYAN, M. S. 외 1인, `Mitochondrial Serine Protease HtrA2/Omi as a Potential Therapeutic Target`, CURRENT DRUG TARGETS, 2009, Vol.10, pages 372-383 378-381 면 참조.	1-15
A	ZURAWA-JANICKA, D. 외 2인, `HtrA Proteins as Targets in Therapy of Cancer and Other Diseases`, EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC TARGETS, 2010, Vol. 14(7), pages 665-679 671 면 참조	1-15
A	US 7947436 B2 (SOOKNANAN, R. R. 외 2명) 2011.05.24 컬럼 4-8, 표2 참조	1-15

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2014년 04월 28일 (28.04.2014)	2014년 04월 28일 (28.04.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
이수정
전화번호 +82-42-481-8158

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/000361

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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록
   - ☐ 서면
   - ☒ 전자적 형태

   b. 제출시기
   - ☒ 출원시 국제출원에 포함
   - ☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
   - ☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/000361

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 00-70033 A1	2000/11/23	없음	
US 2007-0031872 A1	2007/02/08	DE102004004924 A1	2005/08/18
		DE102004004924 B4	2007/04/26
		EP 1709202 A1	2006/10/11
		WO 2005-071107 A1	2005/08/04
US 7947436 B2	2011/05/24	AU 2005-316169 A1	2006/06/22
		AU 2005-316169 B2	2011/11/17
		CA 2590751 A1	2006/06/22
		EP 1831370 A1	2007/09/12
		EP 1831370 A4	2009/08/12
		EP 2275547 A2	2011/01/19
		EP 2275547 A3	2011/05/04
		EP 2275547 B1	2014/03/05
		JP 2008-522632 T	2008/07/03
		JP 2008-522632A	2008/07/03
		US 2009-0004206 A1	2009/01/01
		US 2011-293604 A1	2011/12/01
		US 2012-308561 A1	2012/12/06
		US 8444975 B2	2013/05/21
		WO 2006-063462 A1	2006/06/22
		WO 2006-063462 A9	2007/07/26