



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0164413
(43) 공개일자 2022년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0062069

(22) 출원일자 2022년05월20일

심사청구일자 2022년05월20일

(30) 우선권주장

1020210072162 2021년06월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이영식

서울특별시 종로구 명륜길 15-16, 2층

이도훈

서울특별시 성북구 개운사1길 8, 406호(안암동5가, 보광빌딩)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

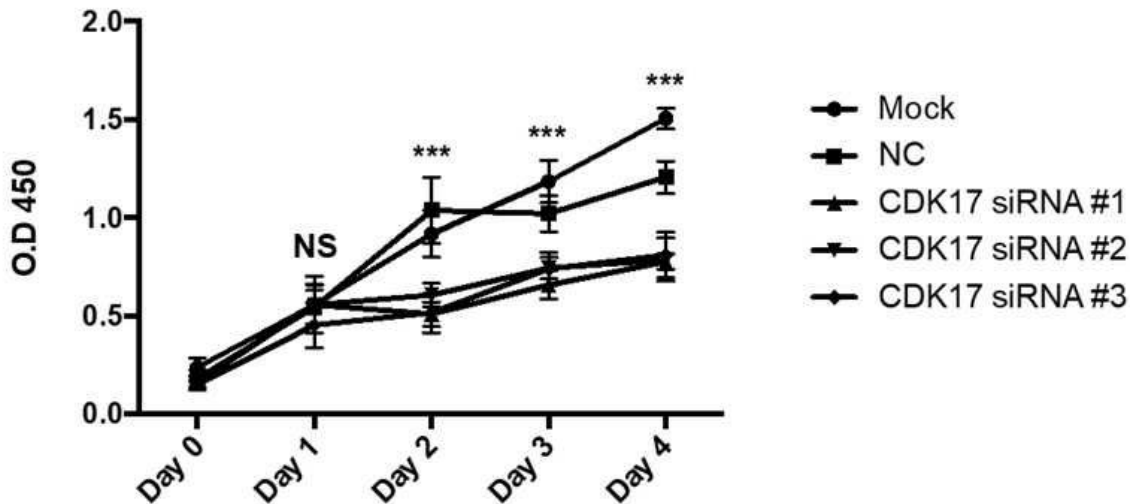
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 CDK 17 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 CDK17(cyclin-dependent kinase 17) 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서 CDK17 발현 또는 활성 억제제가 활성화된 간성상세포(간섬유화 세포모델), TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 신장 세뇨관 상피세포(신장섬유화 세포모델) 그리고 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 폐포상피세포(폐섬유화 세포모델)의 교원질(collagen) 생성, 활성도, 생존력을 현저히 저하시킴을 확인함으로써, 섬유증의 예방 또는 치료 용도로 매우 우수한 효과를 가진다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자

최민석

서울특별시 은평구 진관4로 78-8(진관동, 은평뉴타운상림마을)

홍재상

서울특별시 강서구 곰달래로15가길 25, 303호 (화곡동, 오케이파크빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711131963

과제번호 2021R1A2C1006353

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 (이공)(유형1-1)중견연구

연구과제명 엑소좀 마이크로RNA의 항간섭유화 활성 및 작용기전 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

CDK17(cyclin-dependent kinase 17) 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 섬유증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 CDK17(cyclin-dependent kinase 17) 발현 또는 활성 억제제는 CDK17 리보핵산인 약학적 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 리보핵산은 siRNA인 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 섬유증은 폐, 신장, 간, 심장, 뇌, 혈관, 관절, 장, 피부, 연조직, 골수, 음경, 복막, 근육, 척추, 고환, 난소, 유방, 갑상선, 고막, 췌장, 담낭, 방광 또는 전립선에서 발병한 것인 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

CDK17(cyclin-dependent kinase 17) 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CDK17(cyclin-dependent kinase 17) 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 섬유증은 섬유아세포에 의한 세포외 기질의 비정상적 생성, 축적 및 침착이 일어나는 질환으로, 기관 또는 조직의 섬유화에 의해 발병한다. 섬유증은 장기 손상을 유발하는 매우 치명적인 질환이다. 조직의 섬유화는 간섬유화, 간경화, 만성췌장염, 신부전증, 폐섬유화증(폐경화증) 등의 다양한 질환에서 공통적으로 확인된다.

- [0004] 일례로, 간섬유화(liver fibrosis)는 간 조직의 손상으로 인해 염증반응이 계속 진행됨에 따라 활성화 간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)에서 다량 분비된 교원질(collagen)과 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)이 결합함으로써 나타나는 상처치유의 과정이다. 이러한 간섬유화가 지속적으로 진행되면 간 조직 내 교원질이 다량 침착되고, 재생결절이 교원질로 둘러싸여 비정상적인 구조를 지니게 되는 간 경화(liver cirrhosis)로 발달된다(비특허문헌 1).
- [0005] 다른 일례로, IPF(idiopathic pulmonary fibrosis)는 섬유아세포 축적 및 근섬유아세포 분화와 관련된 재발성 폐포 상피세포 손상의 결과로 나타나며, 폐 실질(lung parenchyma) 조직의 비가역적 파괴와 함께 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 과량 축적을 야기하는 만성, 진행성, 그리고 치사성 질환이다. 그러나 현재까지 섬유증에 대한 효과적인 치료법이 없는 실정이므로(비특허문헌 2-3), 섬유증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 예방제/치료제 개발이 지속적으로 요구되고 있다.
- [0006] RNAi(RNA interference)는 약 22 뉴클레오티드(nucleotide)의 크기를 갖는 단백질 비암호화 리보핵산(non-coding RNA)인 siRNA(small interfering RNA) 또는 마이크로RNA(microRNA, miRNA)에 의해 염기서열 상보적인 mRNA가 분해되거나 단백질로의 번역이 억제됨으로써 해당 표적 유전자의 발현을 조절하는 현상이다. RNAi는 생체의 발생 및 생리, 세포의 분화, 증식 및 사멸, 그리고 유전체의 안정성 등 거의 모든 생물학적 과정에 밀접하게 관련되어 있으며, 또한 바이러스에 대한 저항성 및 다양한 인간 질병과도 밀접하게 연관되어 있다.
- [0007] RNAi는 질병과 연관된 유전자를 조절하는데 사용될 수 있으므로 의학적인 측면에서 중요하며, 특히 RNAi는 적은 양의 siRNA로 특정 유전자에 대해 높은 특이성을 갖고 효과적으로 작용하므로 siRNA 기반 치료 개발이 전세계적으로 진행되고 있다.
- [0008] 따라서 기초분야를 포함한 의약학적 응용분야에서의 무한한 가능성 때문에 RNAi 기술을 이용한 경제적 시장 규모는 계속 증가하고 있는 추세다. Frost&Sullivan 조사에 의하면 RNAi 기술의 세계 시장 규모는 2003년 기준 4800만 달러에서 2010년 기준 3 억 2800만 달러로 엄청난 성장을 이루었다. 또한 BBC 리서치사가 발표한 새로운 보고서는 2013년 36억 달러로 연평균 성장률이 83.4%에 이를 것으로 판단하였다. 뿐만 아니라 Jain PharmaBioTech 조사에 의하면 RNAi 기술에 기반을 둔 신약 개발의 규모가 2004년 기준 5억 달러에서 2010년 기준 10억 달러로 2배의 성장을 보였고, 또 다른 조사에 의하면 RNAi 치료산업의 시장 규모는 2013년 23억 달러에 이를 것으로 예상된 바 있다.
- [0009] 따라서 이러한 연구를 기반으로 섬유화 회복의 검증을 통해 기존의 제한된 치료 방법에 큰 변화를 줄 수 있는 새로운 치료 방법에 대한 필요성이 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: new insights and prospects for therapy, J Gastroenterol Hepatol. 14, 618-633
- (비특허문헌 0002) Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis, Fibrogenesis Tissue Repair, 2012, 5(1): 11
- (비특허문헌 0003) Idiopathic pulmonary fibrosis, N Engl J Med, 2001, 345(7): 517-25

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이에, 본 발명자들은 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, CDK17의 새로운 역할 및 CDK17 발현 또는 활성 억제제를 이용한 섬유증 예방 및 치료 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 CDK17 발현 또는 활성 억제제를 포함하는, 섬유증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

- [0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 CDK17 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 섬유증의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 CDK17 발현 또는 활성 억제제를 포함하는, 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0017] 한편, 본 발명의 실시 형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 실시 형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0019] 본 발명은 CDK17(cyclin-dependent kinase 17) 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 섬유증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명에서 용어 "CDK17(cyclin-dependent kinase 17)"은 단백질 코딩 유전자로 CDK17과 관련된 질병으로는 후방 무정형 각막 이영양증(posterior amorphous corneal dystrophy)가 있다. 이 유전자와 관련된 유전자 온톨로지(GO) 주석에는 트랜스퍼라제 활성, 인 함유 그룹 전달 및 단백질 티로신 키나제 활성이 포함된다. 또한 히스톤 H1 단백질에 대한 세린/트레오닌 키나제 활성을 갖는다.
- [0021] 본 발명에서 용어 "CDK17 발현 또는 활성 억제제"는 세포 내에서 CDK17 유전자의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질을 의미하는 것으로서, 구체적으로는 CDK17 유전자에 직접적으로 작용하거나 또는 CDK17 유전자의 상위 조절자에 간접적으로 작용하여 CDK17 유전자의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나, 발현된 CDK17 유전자의 분해를 증가시키거나, 그 활성을 방해함으로써, CDK17 유전자의 발현 수준 또는 그 활성을 감소시키는 물질을 의미한다. 구체적으로, CDK17 발현 또는 활성 억제제는 CDK17 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA), 마이크로RNA(microRNA, miRNA) 등의 리보핵산 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에서 용어 "리보핵산"은 small RNA를 포함할 수 있으며, 본원에서 "small RNA"란, 단백질로 번역되지 않으며 상보적 결합을 통해 특정 mRNA의 분해를 촉진하거나 번역을 효과적으로 억제하는, 보통 염기 서열의 길이가 200개 이하의 짧은 길이의 RNA이다. Small RNA는 siRNAs(small interfering RNAs), miRNAs(microRNAs), piRNAs(Piwi-associated RNAs), long non-coding RNAs 등을 포함한다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "siRNA(small interfering RNA)"는 특정 mRNA의 절단(cleavage) 및 분해(degradation)를 통해 RNAi(RNA interference)를 유도할 수 있는 21 내지 23개의 뉴클레오티드로 구성된 단백질 비암호화 RNA를 의미한다. siRNA는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 갖는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 갖는 안티센스 RNA 가닥을 포함한다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있으므로, 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법 등에 사용된다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "shRNA(short hairpin RNA)"는 단일가닥 RNA로서 수소결합에 의해 이중가닥 부분을 형성하는 줄기(stem) 부분과 고리 형태를 띠는 루프(loop) 부분으로 구분되며, Dicer 등의 단백질에 의해 프로세싱(processing)되어 siRNA로 변환되고 siRNA와 동일한 기능을 수행할 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "miRNA(microRNA)"는 표적 mRNA의 분해를 촉진시키거나 또는 이들의 번역을 억제시킴으로써 염기서열 상보적인 유전자의 발현을 전사 후에 조절하는 21 내지 23개의 뉴클레오티드로 구성된 단백질 비암호화 RNA를 말한다.
- [0026] 본 발명에서 용어, "리보자임(ribozyme)"은 특정 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 표적 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하

는 영역과 표적 mRNA를 절단하는 영역으로 구성된다.

- [0027] 본 발명에서 용어, "섬유증"은 장기 또는 조직에서 과량의 섬유성 결합 부위가 형성되는 것을 의미한다. 이는 장기 또는 조직에서 정상적 구성요소로서의 섬유성 부위와는 구별될 수 있다. 섬유아세포에 의한 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐(collagen) 등의 세포외 기질(extracellular matrix)의 과량 축적으로 인해, 섬유증은 중국적으로 장기 손상을 일으키는 치명적인 질병으로 이해될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 상기 섬유증은 폐, 신장, 간, 심장, 뇌, 혈관, 관절, 장, 피부, 연조직, 골수, 음경, 복막, 근육, 척추, 고환, 난소, 유방, 갑상선, 고막, 췌장, 담낭, 방광 또는 전립선 등 모든 조직에서 나타나는 섬유화 관련 질환을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 섬유증은 신체 각 조직에서 발생하는 섬유화에 의해 야기되는 질환, 예컨대 이상 창상 치유, 간 섬유증, 연결 섬유증, 크론병(장의 섬유증), 췌장 및 폐의 낭포성 섬유증, 특히 아이들에서 근육간 주사의 합병증으로서 발생할 수 있는 주사 섬유증, 심내막심근 섬유증 또는 심장 섬유증, 이식편대숙주병(Graft-Versus-Host Disease, GVHD)에 의한 섬유증, 비장의 섬유증, 망막 섬유증을 포함한 눈의 섬유증, 수술 또는 주사 섬유증의 섬유화 합병증, 사구체 신염, 간질 섬유증, 켈로이드 및 비대성 반흔(피부의 섬유증), 황반 변성, 중격동 섬유증(중격동의 연조직 섬유증), 국소피부경화증(morphea), 다초점 섬유소증, 골수 섬유증, 신장성 전신 섬유증(피부의 섬유증), 결절성 표피 섬유증(예를 들면, 양성 섬유성 조직구종, 흉막 섬유증), 수술(예를 들면, 수술 이식)의 결과로서의 섬유증, 증식성 섬유증, 파이프자루 섬유증(pipestem fibrosis), 후섬유소 섬유증, 진행성 다발 섬유증(폐의 섬유증 유형, 석탄 노동자 진폐증의 합병증), 오래된 심근 경색(심장의 섬유증), 췌장 섬유증, 진행성 다발 섬유증, 방사선 섬유증, 신장 섬유증, 만성 신장 질환 관련 또는 이를 유발하는 신장 섬유증, 후복막 섬유증(후복막의 연조직의 섬유증), 수술 후 반흔화, 경피증/전신 경화증(피부의 섬유증), 상피세포증, 자궁섬유증, 또는 바이러스성 간염 유도 섬유증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명에서 용어 "간섬유증(liver fibrosis)"은 간 조직의 손상으로 인해 염증반응이 계속 진행됨에 따라 활성화된 간성상세포(hepatic stellate cell)에서 다량 분비된 교원질(collagen)과 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)이 결합함으로써 나타나는 상처치유의 과정을 지칭한다. 간섬유화가 지속적으로 진행되면 간 조직 내 교원질이 다량 침착되고, 재생결절이 교원질로 둘러싸여 비정상적인 구조를 지니게 되는 간경화로 발달할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 용어, "예방"이란 본 발명의 조성물을 투여하여 목적하는 증상 또는 질병이 발생하지 않도록 하거나, 이의 발생 또는 발현을 늦추는 모든 행위를 의미한다.
- [0031] 본 발명에서 용어, "치료"란 본 발명의 조성물을 투여하여 목적하는 증상 또는 질병을 호전시키거나 사라지게 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0032] 한편, 본 발명의 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 이를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용 가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있으며, 투여의 용이성과 투여량의 균일화를 위해 단위 투여 형태로 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥 내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다. 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형으로는, 예를 들어 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제로 제제화할 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마

스네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유를 포함할 수 있으며, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 함유할 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 비경구 투여용 제형으로는, 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태, 좌제 주입방식 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있다. 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 좌제로 주입하기 위해서는, 코코아버터 또는 다른 글리세라이드 등 통상의 좌약 베이스를 포함하는 좌약 또는 재료 관장제와 같은 직장투여용 조성물로 제제화할 수 있다. 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[0036] 상기 조성물은 100 $\mu\text{g/kg}$ 내지 500 $\mu\text{g/kg}$ 의 용량으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 이미 알려진 섬유증 치료제와 다른 시간에 또는 동시에 병용하여 투여될 수 있고, 또는 이미 알려진 공지의 섬유증 치료 방법이 함께 적용될 수 있다. 또한 상기 조성물은 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0037] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0038] 상기 약학적 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학적 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0039] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 혈관 투과성 증가를 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0040] 본 발명의 용어 "개체"는 대상체를 의미하며, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 관련 질환을 가진 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 동물, 바람직하게는 포유동물 또는 인간을 포함한다.

[0041] 따라서, 본 발명은 CDK17 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 섬유증 예방 또는 치료 방법을 포함한다.

[0042] 본 발명의 예방 또는 치료 방법은 본 발명의 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 상기 치료적 유효량은 섬유화 억제 효과를 증진시키는 양을 의미한다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 일이다. 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 및 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 약학적 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다. 또한, 경우에 따라, 본 발명의 조성물과 함께 공지의 관련 질환 치료제를 병용 투여하여 관련 질환의 치료 효과를 증대시킬 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 CDK17 발현 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 섬유증 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0044] 본 발명의 건강기능식품은, CDK17 발현 또는 활성 억제제를 포함하되, 적절한 식품보조첨가제가 포함될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는

여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 관련 질환 예방 또는 치료 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명에 따른 CDK17 발현 또는 활성 억제제는 전체 조성물 중 1 ~ 10 중량%, 바람직하게는 5 ~ 10 중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

[0047] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0048] 본 발명의 건강식품 조성물은 통상의 식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

발명의 효과

[0050] CDK17 유전자 녹다운(knockdown)에 의해 활성화된 인간 간성상세포(간섬유화 세포모델), TGF- β (Transforming growth factor beta)를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 인간 신장 세뇨관 상피세포(신장섬유화 세포모델) 그리고 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 인간 폐포상피세포(폐섬유화 세포모델)의 활성화 및 생존력을 현저히 감소시키며, 또한 활성화된 인간 간성상세포, TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 인간 신장 세뇨관 상피세포 그리고 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 인간 폐포상피세포의 교원질(collagen) 생성을 현저히 억제함으로써 CDK17 유전자 녹다운(knockdown)에 의한 섬유화 치료 효능을 확인하였다.

[0051] 이로써, 본 발명을 통해 CDK17 발현 또는 활성 억제제가 섬유증 예방 또는 치료 용도로서의 활용가능성을 제시하였다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 활성화된 인간 간성상세포(hTERT-HSC)에서 CDK17 siRNA의 녹다운 효율을 RT-qPCR을 통해 나타낸 것이다. 도 2는 hTERT-HSC에서 CDK17 siRNA에 의한 교원질을 생성하는 hCOL1A1 mRNA 레벨 감소를 RT-qPCR을 통해 나타낸 것이다.

도 3은 hTERT-HSC에서 CDK17 siRNA에 의한 알파-SMA 단백질 레벨 감소를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이다.

도 4는 CDK17 siRNA 처리에 따른 hTERT-HSC 생존력 감소를 plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 한 것이다.

도 5는 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 인간 신장 세뇨관 상피세포(HK-2 cell)에서 CDK17 siRNA의 녹다운 효율을 RT-qPCR을 통해 나타낸 것이다.

도 6은 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell에서 CDK17 siRNA에 의한 교원질을 생성하는 hCOL1A1 mRNA 레벨 감소를 RT-qPCR을 통해 나타낸 것이다.

도 7은 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell에서 CDK17 siRNA에 의한 알파-SMA 단백질 레벨 감소를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이다.

도 8은 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell의 CDK17 siRNA 처리에 따른 생존력 감소를 plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 것이다.

도 9는 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 인간 폐포상피세포(A549 cell)에서 CDK17 siRNA의 녹다운 효율을 RT-qPCR을 통해 나타낸 것이다.

도 10은 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell에서 CDK17 siRNA에 의한 교원질을 생성하는 hCOL1A1 mRNA 레벨 감소를 RT-qPCR을 통해 나타낸 것이다.

도 11은 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell에서 CDK17 siRNA에 의한 알파-SMA 단백질 레벨 감소를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이다.

도 12는 TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell의 CDK17 siRNA 처리에 따른 생존력 감소를 plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라, 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0056] 실시예 1: CDK17 유전자 녹다운(knockdown)에 의한 간섬유화 치료 효능 확인

[0057] ‘활성화된 간성상세포’는 간섬유화에 핵심적이기 때문에 이를 바탕으로 간섬유증을 치료하기 위한 주요 전략으로 1) ‘활성화된 간성상세포’의 생존력 감소 2) ‘활성화된 간성상세포’의 증식 감소 3) ‘활성화된 간성상세포’의 활성화도 저하 또는 ‘휴지기 간성상세포’로의 전환 4) ‘활성화된 간성상세포’의 교원질(collagen) 생성 억제가 있으며, 이러한 측면에서 CDK17 유전자와 ‘활성화된 간성상세포’인 hTERT-HSC의 생존력 및 증식과의 연관 가능성을 바탕으로, 간섬유증을 치료하기 위한 전략으로 CDK17 유전자에 대한 녹다운(knockdown)이 hTERT-HSC의 생존력, 활성화도, 교원질 생성에 영향을 미치는지를 확인하였다. 이를 위해 서로 다른 염기서열을 갖는 3개의 CDK17 siRNA를 사용하여 실험을 진행하였다.

[0058] 1) CDK17 siRNA 제작

[0059] 인간 CDK17 유전자[GenBank accession number: NM_001170464.4]에 대한 서로 다른 3개의 siRNA들을 BIONEER로부터 구입하였고, 각 CDK17 siRNA의 염기서열은 아래와 같다.

[0060] Human CDK17 siRNA #1: GUCCUCUUCACAGUGGAGU(sense, SEQ ID NO: 1) ACUCCACUGUGAAGAGGAC(antisense, SEQ ID NO: 2)

[0061] Human CDK17 siRNA #2: CUAACAAACUGCUGUUCUU(sense, SEQ ID NO: 3)

[0062] AAGAACAGCAGUUUGUUAG(antisense, SEQ ID NO: 4)

[0063] Human CDK17 siRNA #3: CAGUACACAGGAUCUUUCA(sense, SEQ ID NO: 5) UGAAAGAUCUGUGUACUG(antisense, SEQ ID NO: 6)

[0064] 2) CDK17 siRNA의 CDK17 유전자 녹다운 효율 확인

[0065] 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각의 녹다운 효율을 확인하기 위해 hTERT-HSC를 24-well plate에 2.0×10^4 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(Negative control, NC) 또는 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 2일 동안 배양한 후 RT-qPCR을 통해 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각이 CDK17 mRNA level을 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(도 1). 따라서 서로 다른 3개의

CDK17 siRNA 각각이 CDK17 유전자의 발현을 유의성을 갖고 효과적으로 감소시킴을 확인하였다.

[0066] 3) CDK17 siRNA에 의한 CDK17 유전자 녹다운 후 hCOL1A1 발현 확인

[0067] hTERT-HSC를 24-well plate에 2.0×10^4 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 서로 다른 3개의 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 2일 동안 배양한 후 RT-qPCR을 통해 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각이 교원질을 생성하는 hCOL1A1(human alpha-1 type I collagen) mRNA level을 유의성을 갖고 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(도 2). 이는 CDK17 유전자의 녹다운이 ‘활성화된 간성상세포’의 교원질(collagen) 생성을 현저히 억제함으로써 간섬유증을 치료할 수 있음을 제시하는 결과이다.

[0068] 4) CDK17 siRNA에 의한 CDK17 유전자 녹다운 후 알파-SMA 발현 확인

[0069] 간섬유증 치료를 위해 ‘활성화된 간성상세포’의 활성을 억제하는 것이 중요하다. hTERT-HSC를 24-well plate에 2.0×10^4 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 서로 다른 3개의 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 2일 동안 배양한 후 hTERT-HSC의 활성화 정도를 나타내는 알파-SMA에 대한 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.

[0070] 그 결과, Mock 및 음성대조군 siRNA에 비해 각 CDK17 siRNA 처리 시 hTERT-HSC에서 활성화도의 마커인 알파-SMA 단백질 level이 유의성을 갖고 현저히 줄어드는 것을 확인하였다(도 3). 따라서 CDK17 유전자의 녹다운이 ‘활성화된 간성상세포’의 활성도를 현저히 저하시킴으로써 간섬유증을 치료할 수 있음을 제시하였다.

[0071] 5) CDK17 siRNA에 의한 CDK17 유전자 녹다운 후 hTERT-HSC의 생존력 변화 확인

[0072] 다음으로 CDK17 유전자에 대한 녹다운이 ‘활성화된 간성상세포’의 생존력에 영향을 미치는지 조사하기 위해 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA를 각각 hTERT-HSC에 처리해 생존력의 변화를 확인하였다. 이를 위해 hTERT-HSC를 96-well plate에 3.0×10^3 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 이후 5일 동안 정해진 시간에 EZ-Cytox 시약 10 μ l를 넣고 1시간 동안 배양한 후 plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

[0073] 그 결과, Mock 및 NC에 비해서 3개의 서로 다른 CDK17 siRNA를 각각 처리시 모두 유의성을 갖고 hTERT-HSC의 생존력이 감소되는 것을 확인하였다(도 4). 이는 CDK17 유전자의 녹다운이 ‘활성화된 간성상세포’의 생존력을 현저히 저하시킴으로써 간섬유증을 치료할 수 있음을 제시하는 결과이다.

[0075] **실시예 2: CDK17 유전자 녹다운(knockdown)에 의한 신장섬유화 치료 효능 확인**

[0076] 신장섬유화는 대부분의 만성 신장질환에서 기본적으로 발견되는 현상으로 상피세포가 중간엽 세포로의 전이(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)에 의해 근섬유아세포(myofibroblast)로 변환되어 세포외 기질이 조직에 축적되어 발생하는 것으로 알려져 있으며, TGF- β (Transforming growth factor beta)가 주요 인자로 알려져 있음. 이를 바탕으로 신장섬유증을 치료하기 위한 주요 전략으로 1) ‘TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 인간 신장 세뇨관 상피세포(HK-2 cell)’의 생존력 감소 2) ‘TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell’의 증식 감소 3) ‘TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell’의 활성화도 저하 4) ‘TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell’의 교원질(collagen) 생성 억제가 있으며, 이러한 측면에서 CDK17 유전자와 ‘TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell’의 생존력 및 증식과의 연관 가능성을 바탕으로, 신장섬유증을 치료하기 위한 전략으로 CDK17 유전자에 대한 녹다운(knockdown)이 ‘TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell’의 생존력, 활성화도, 교원질 생성에 영향을 미치는지를 확인하였다. 이를 위해 서로 다른 염기서열을 갖는 3개의 CDK17 siRNA를 사용하여 실험을 진행하였다.

[0077] 1) CDK17 siRNA 제작

[0078] 인간 CDK17 유전자[GenBank accession number: NM_001170464.4]에 대한 서로 다른 3개의 siRNA들을 BIONEER로부터 구입하였고, 각 CDK17 siRNA의 염기서열은 아래와 같다.

[0079] Human CDK17 siRNA #1: GUCCUCUACAGUGGAGU(sense, SEQ ID NO: 1) ACUCCACUGUGAAGAGGAC(antisense, SEQ ID NO: 2)

- [0080] Human CDK17 siRNA #2: CUAACAAACUGCUGUUCUU(sense, SEQ ID NO: 3)
- [0081] AAGAACAGCAGUUUGUAG(antisense, SEQ ID NO: 4)
- [0082] Human CDK17 siRNA #3: CAGUACACAGGAUCUUUCA(sense, SEQ ID NO: 5) UGAAAGAUCUGUGUACUG(antisense, SEQ ID NO: 6)
- [0083] 2) CDK17 siRNA의 CDK17 유전자 녹다운 효율 확인
- [0084] 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각의 녹다운 효율을 확인하기 위해 HK-2 cell을 24-well plate에 4.0×10^4 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 TGF- β 를 최종 농도가 10 ng/ml이 되도록 처리하고, 동시에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 2일 동안 배양한 후 RT-qPCR을 통해 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각이 CDK17 mRNA level을 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(도 5). 따라서 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각이 CDK17 유전자의 발현을 유의성을 갖고 효과적으로 감소시킴을 확인하였다.
- [0085] 3) CDK17 siRNA에 의한 CDK17 유전자 녹다운 후 hCOL1A1 발현 확인
- [0086] HK-2 cell을 24-well plate에 4.0×10^4 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 TGF- β 를 최종 농도가 10 ng/ml이 되도록 처리하고, 동시에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 서로 다른 3개의 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 2일 동안 배양한 후 RT-qPCR을 통해 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각이 교원질을 생성하는 hCOL1A1(human alpha-1 type I collagen) mRNA level을 유의성을 갖고 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(도 6). 이는 CDK17 유전자의 녹다운이 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'의 교원질(collagen) 생성을 현저히 억제함으로써 신장섬유증을 치료할 수 있음을 제시하는 결과이다.
- [0087] 4) CDK17 siRNA에 의한 CDK17 유전자 녹다운 후 알파-SMA 발현 확인
- [0088] 신장섬유증 치료를 위해 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'의 활성을 억제하는 것이 중요하다. HK-2 cell을 24-well plate에 4.0×10^4 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 TGF- β 를 최종 농도가 10 ng/ml이 되도록 처리하고, 동시에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 서로 다른 3개의 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 2일 동안 배양한 후 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'의 활성화 정도를 나타내는 알파-SMA에 대한 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.
- [0089] 그 결과, Mock 및 음성대조군 siRNA에 비해 각 CDK17 siRNA 처리 시 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'에서 활성화도의 마커인 알파-SMA 단백질 level이 유의성을 갖고 현저히 줄어드는 것을 확인하였다(도 7). 따라서 CDK17 유전자의 녹다운이 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'의 활성도를 현저히 저하시킴으로써 신장섬유증을 치료할 수 있음을 제시하였다.
- [0090] 5) CDK17 siRNA에 의한 CDK17 유전자 녹다운 후 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'의 생존력 변화 확인
- [0091] 다음으로 CDK17 유전자에 대한 녹다운이 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'의 생존력에 영향을 미치는지 조사하기 위해 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA를 각각 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'에 처리해 생존력의 변화를 확인하였다. 이를 위해 HK-2 cell을 96-well plate에 5.0×10^3 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 TGF- β 를 최종 농도가 10 ng/ml이 되도록 처리하고, 동시에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 이후 5일 동안 정해진 시간에 EZ-Cytox 시약 10 μ l를 넣고 1시간 동안 배양한 후 plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.
- [0092] 그 결과, Mock 및 NC에 비해서 3개의 서로 다른 CDK17 siRNA를 각각 처리시 모두 유의성을 갖고 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'의 생존력이 감소되는 것을 확인하였다(도 8). 이는 CDK17 유전자의 녹다운이 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 HK-2 cell'의 생존력을 현저히 저하시킴으로써 신장섬유증을 치료할 수 있음을 제시하는 결과이다.

[0094] 실시예 3: CDK17 유전자 녹다운(knockdown)에 의한 폐섬유화 치료 효능 확인

[0095] 폐섬유화는 대부분의 만성 폐질환에서 기본적으로 발견되는 현상으로 상피세포가 중간엽 세포로의 전이(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)에 의해 근섬유아세포(myofibroblast)로 변환되어 세포의 기질이 조직에 축적되어 발생하는 것으로 알려져 있으며, Transforming growth factor beta(TGF- β)가 주요 인자로 알려져 있음. 이를 바탕으로 폐섬유증을 치료하기 위한 주요 전략으로 1) 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 인간 폐포상피세포(A549 cell)'의 생존력 감소 2) 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 증식 감소 3) 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 활성화 저하 4) 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 교원질(collagen) 생성 억제가 있으며, 이러한 측면에서 CDK17 유전자와 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 생존력 및 증식과의 연관 가능성을 바탕으로, 폐섬유증을 치료하기 위한 전략으로 CDK17 유전자에 대한 녹다운(knockdown)이 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 생존력, 활성화도, 교원질 생성에 영향을 미치는지를 확인하였다. 이를 위해 서로 다른 염기서열을 갖는 3개의 CDK17 siRNA를 사용하여 실험을 진행하였다.

[0096] 1) CDK17 siRNA 제작

[0097] 인간 CDK17 유전자[GenBank accession number: NM_001170464.4]에 대한 서로 다른 3개의 siRNA들을 BIONEER로부터 구입하였고, 각 CDK17 siRNA의 염기서열은 아래와 같다.

[0098] Human CDK17 siRNA #1: GUCCUCUACAGUGGAGU(sense, SEQ ID NO: 1) ACUCCACUGAAGAGGAC(antisense, SEQ ID NO: 2)

[0099] Human CDK17 siRNA #2: CUAACAAACUGCUGUUCUU(sense, SEQ ID NO: 3) AAGAACAGCAGUUUGUUAG(antisense, SEQ ID NO: 4)

[0100] Human CDK17 siRNA #3: CAGUACACAGGAUCUUUCA(sense, SEQ ID NO: 5) UGAAAGAUCUGUGUACUG(antisense, SEQ ID NO: 6)

[0101] 2) CDK17 siRNA의 CDK17 유전자 녹다운 효율 확인

[0102] 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각의 녹다운 효율을 확인하기 위해 A549 cell을 24-well plate에 4.0×10^4 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 TGF- β 를 최종 농도가 10 ng/ml이 되도록 처리하고, 동시에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 2일 동안 배양한 후 RT-qPCR을 통해 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각이 CDK17 mRNA level을 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(도 9). 따라서 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각이 CDK17 유전자의 발현을 유의성을 갖고 효과적으로 감소시킴을 확인하였다.

[0103] 3) CDK17 siRNA에 의한 CDK17 유전자 녹다운 후 hCOL1A1 발현 확인

[0104] A549 cell을 24-well plate에 4.0×10^4 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 TGF- β 를 최종 농도가 10 ng/ml이 되도록 처리하고, 동시에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 서로 다른 3개의 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 2일 동안 배양한 후 RT-qPCR을 통해 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA 각각이 교원질을 생성하는 hCOL1A1(human alpha-1 type I collagen) mRNA level을 유의성을 갖고 효과적으로 감소시킴을 확인하였다(도 10). 이는 CDK17 유전자의 녹다운이 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 교원질(collagen) 생성을 현저히 억제함으로써 폐섬유증을 치료할 수 있음을 제시하는 결과이다.

[0105] 4) CDK17 siRNA에 의한 CDK17 유전자 녹다운 후 알파-SMA 발현 확인

[0106] 폐섬유증 치료를 위해 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 활성을 억제하는 것이 중요하다. A549 cell을 24-well plate에 4.0×10^4 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 TGF- β 를 최종 농도가 10 ng/ml이 되도록 처리하고, 동시에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 서로 다른 3개의 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 2일 동안 배양한 후 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 활성화 정도를 나타내는 알파-SMA에 대한 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.

[0107] 그 결과, Mock 및 음성대조군 siRNA에 비해 각 CDK17 siRNA 처리 시 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'에서 활성화도의 마커인 알파-SMA 단백질 level이 유의성을 갖고 현저히 줄어드는 것을 확인하였다(도 11). 따라서 CDK17 유전자의 녹다운이 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 활성도를 현저히

저하시킴으로써 폐섬유증을 치료할 수 있음을 제시하였다.

[0108] 5) CDK17 siRNA에 의한 CDK17 유전자 녹다운 후 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 생존력 변화 확인

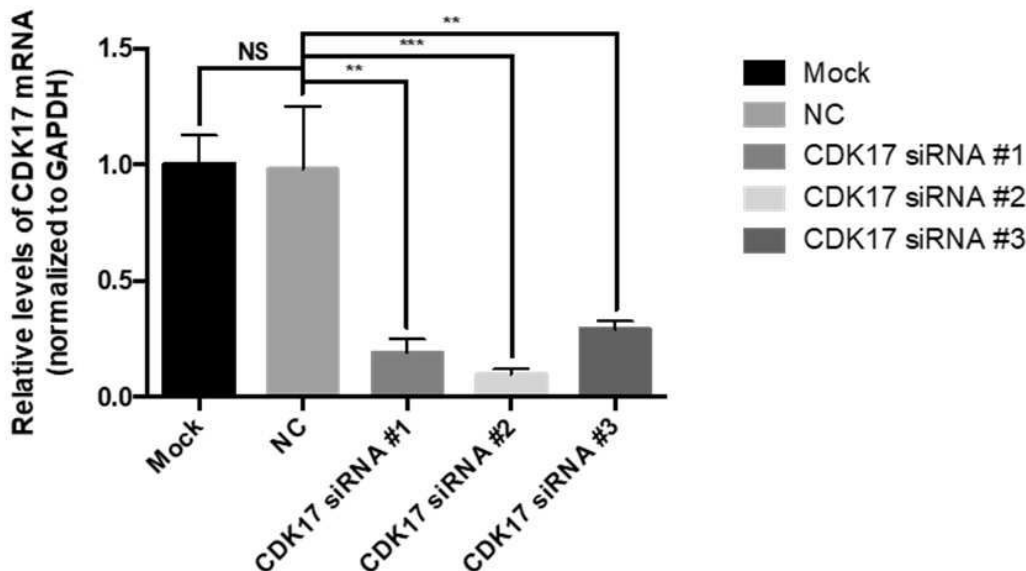
[0109] 다음으로 CDK17 유전자에 대한 녹다운이 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 생존력에 영향을 미치는지 조사하기 위해 서로 다른 3개의 CDK17 siRNA를 각각 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'에 처리해 생존력의 변화를 확인하였다. 이를 위해 A549 cell을 96-well plate에 5.0×10^3 cells/well로 seeding 한 후 24시간 후에 TGF- β 를 최종 농도가 10 ng/ml이 되도록 처리하고, 동시에 Mock 처리, 음성대조군 siRNA(NC) 또는 각 CDK17 siRNA를 최종 농도가 100 nM이 되도록 transfection하였다. 이후 5일 동안 정해진 시간에 EZ-Cytox 시약 10 μ l를 넣고 1시간 동안 배양한 후 plate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

[0110] 그 결과, Mock 및 NC에 비해서 3개의 서로 다른 CDK17 siRNA를 각각 처리시 모두 유의성을 갖고 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 생존력이 감소되는 것을 확인하였다(도 12). 이는 CDK17 유전자의 녹다운이 'TGF- β 를 처리하여 섬유화 반응을 유발한 A549 cell'의 생존력을 현저히 저하시킴으로써 폐섬유증을 치료할 수 있음을 제시하는 결과이다.

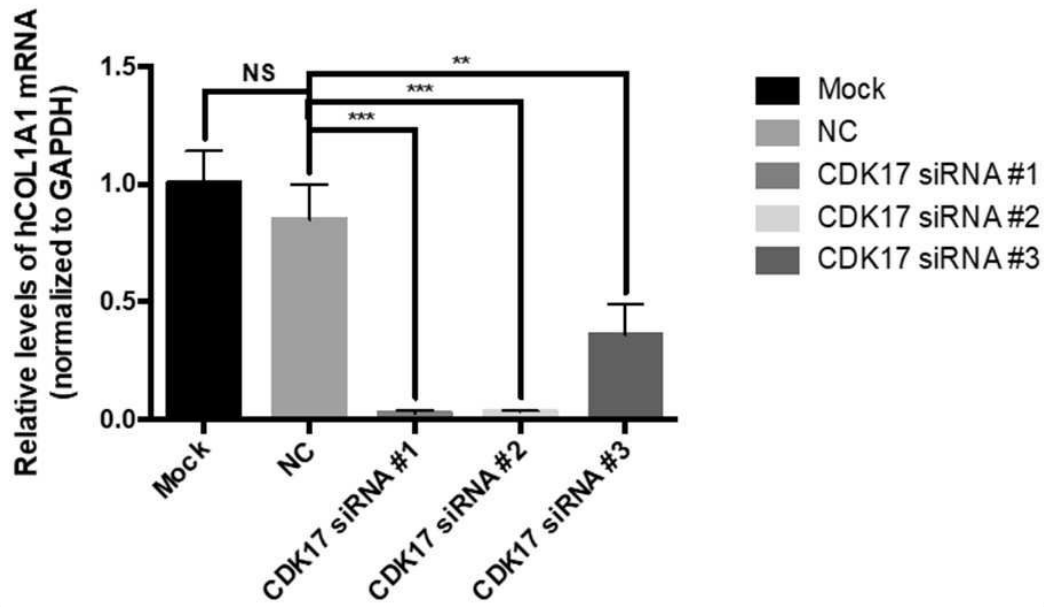
[0112] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

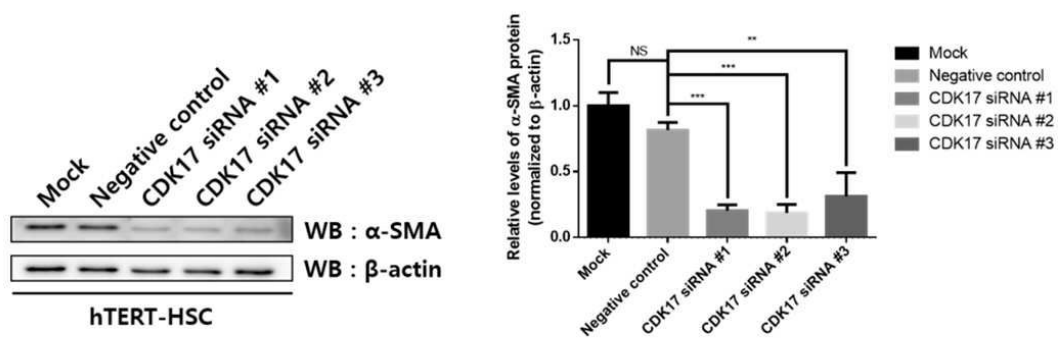
도면1



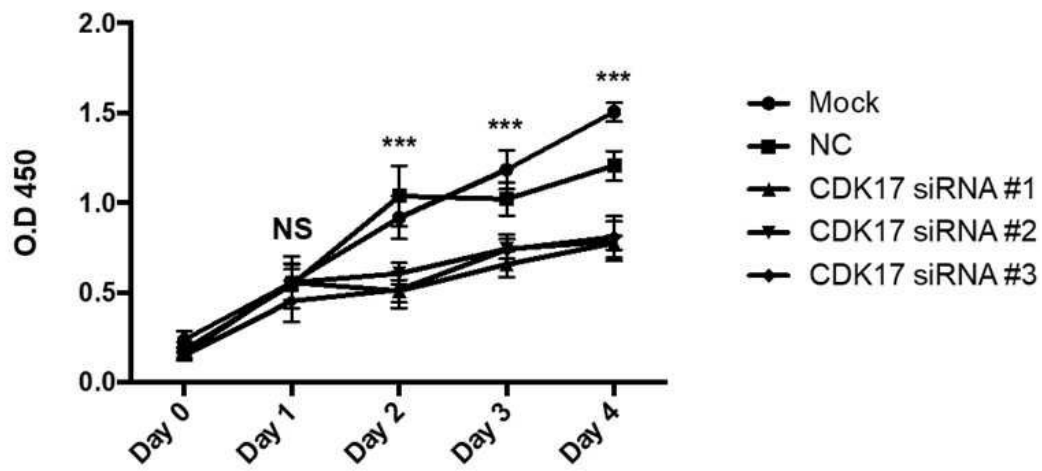
도면2



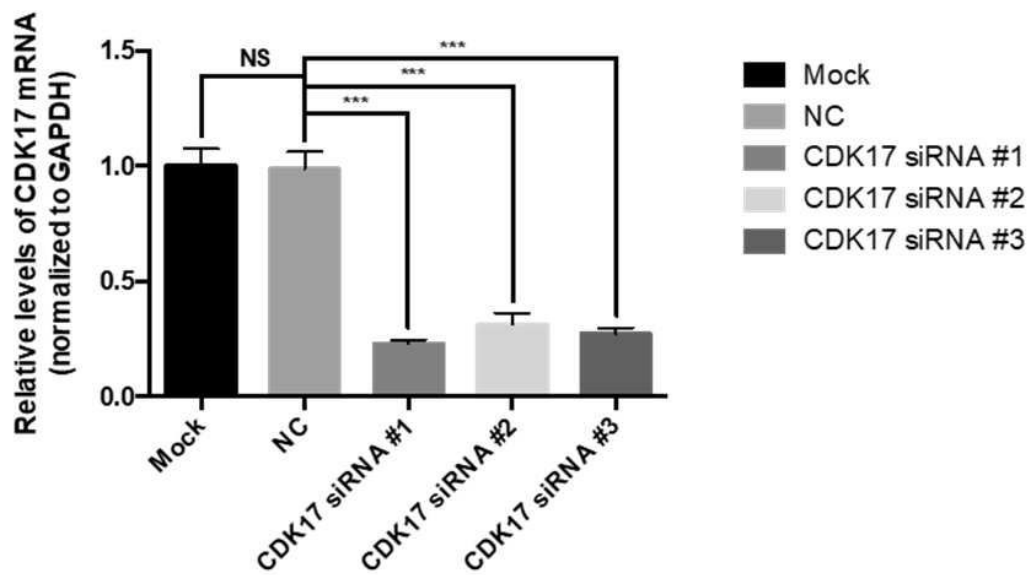
도면3



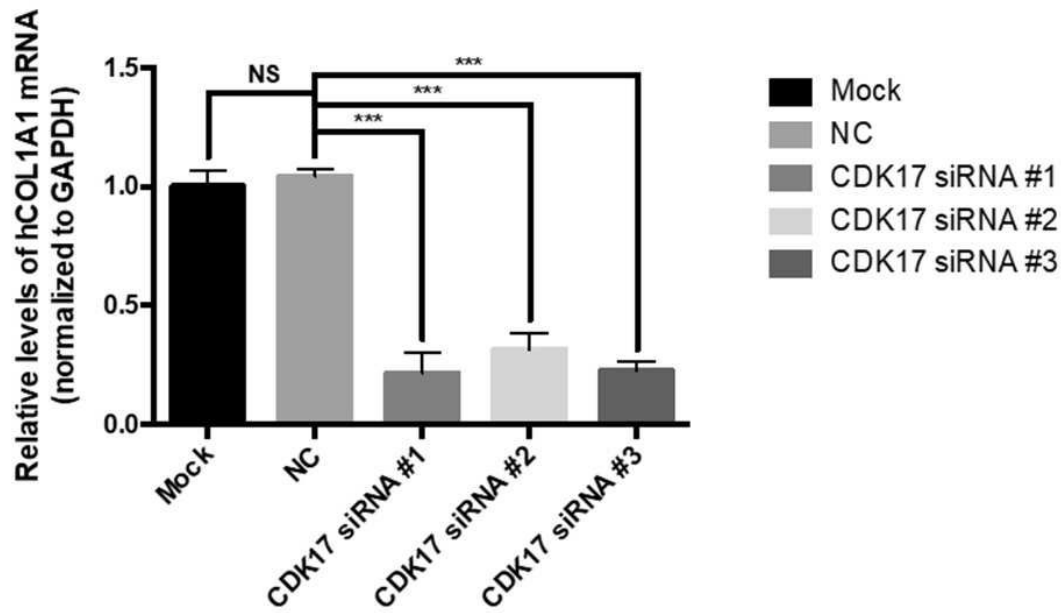
도면4



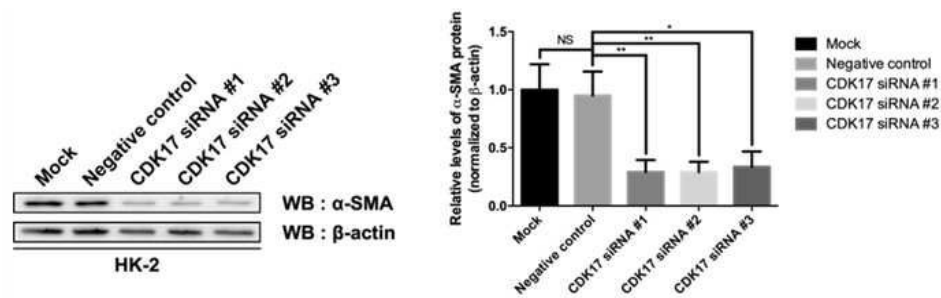
도면5



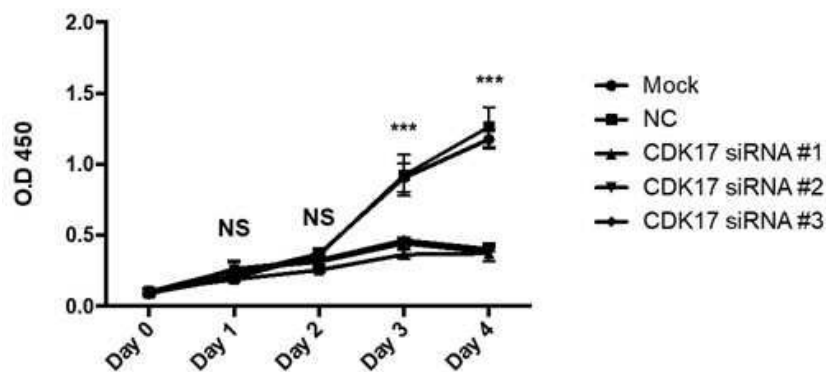
도면6



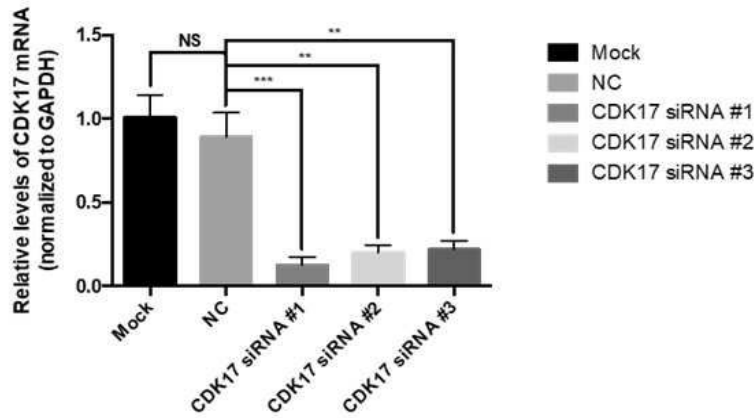
도면7



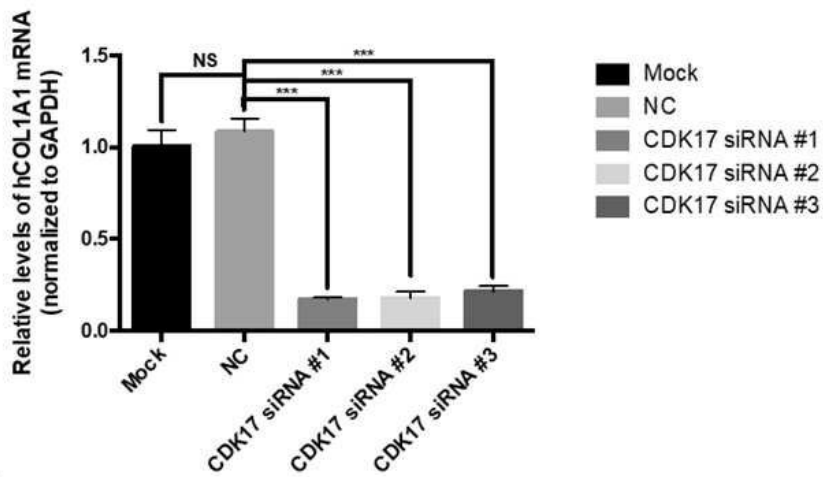
도면8



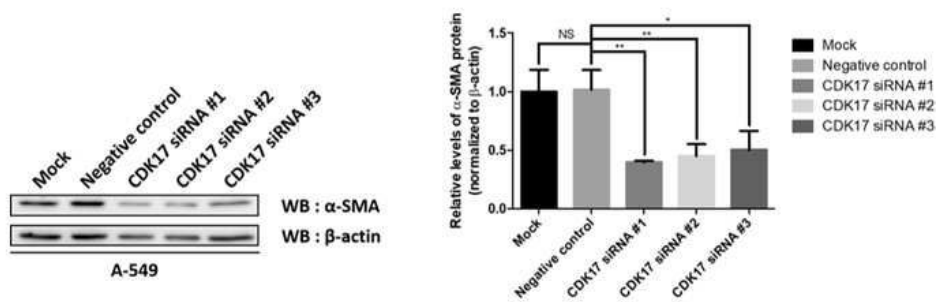
도면9



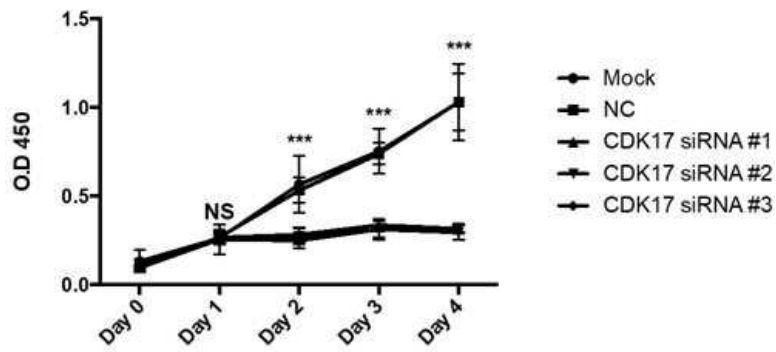
도면10



도면11



도면12



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Composition for preventing or treating fibrosis comprising an inhibitor of CDK17 expression or activity

<130> P22U13C0280

<150> KR 10-2021-0072162

<151> 2021-06-03

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CDK17 siRNA #1 sense

<400> 1

guccucuca caguggagu

19

<210

> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human CDK17 siRNA #1 antisense

<400> 2

acuccacugu gaagaggac

19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CDK17 siRNA #2 sense
 <400> 3
 cuaacaaacu gcuguucuu 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CDK17 siRNA #2 antisense

 <400> 4
 aagaacagca guuuguuag 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CDK17 siRNA #3 sense
 <400> 5
 caguacacag gaucuuuca 19
 <210> 6
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CDK17 siRNA #3 antisense
 <400> 6
 ugaaagaucc uguguacug 19