(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0094563
(43) 공개일자 2015년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5044 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0106848(분할)
(22) 출원일자 2015년07월28일
심사청구일자 2015년07월28일
(62) 원출원 특허 10-2013-0072455
원출원일자 2013년06월24일
심사청구일자 2013년06월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
손상욱
서울특별시 용산구 서빙고로 31, 202동 101호 (한강로3가, 용산시티파크2단지아파트)
김진희
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교 신의학관 7층 피부과
배현철
서울특별시 성북구 안암로 145 고려대학교
(74) 대리인
이처영, 장제환

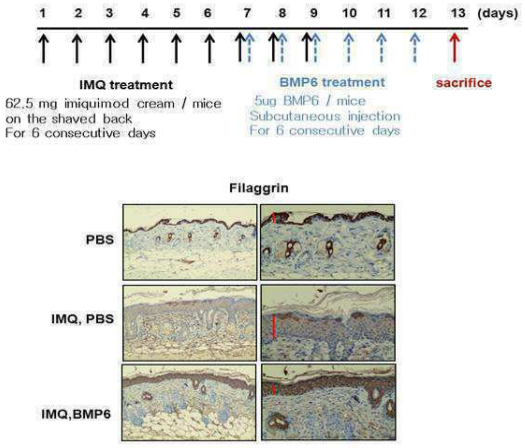
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **BMP6를 함유하는 건선 예방 또는 치료용 조성물 및 BMP6를 함유하는 건선 예방 또는 개선용 건강기능식품**

(57) 요 약

본 발명은 BMP6를 유효성분으로 함유하는 건선 예방 또는 치료용 조성물 및 BMP6를 함유하는 건선 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것으로, 본 발명을 이용하면 각질세포를 표적으로 하여 건선 치료 효율을 상당히 높일 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61K 38/18 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2013.01)
G01N 33/53 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2012R1A1A2044085
부처명 한국연구재단
연구관리전문기관 의무산학협력팀
연구사업명 이공-일반연구자지원사업-기본연구
연구과제명 나노물질의 피부독성에서 활성산소생성 기전 및 HIF-1α 역할 연구
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2014.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 HIF-1(Hypoxia inducible factor-1) 과발현에 의해 유발되는 건선의 치료제를 스크리닝하는 방법:

(a) HIF-1 발현이 증가된 각질세포에 건선치료제 후보물질을 처리하는 단계;

(b) 후보물질을 처리한 실험군과 후보물질을 처리하지 않은 대조군의 BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6) 발현을 측정하여 비교하는 단계; 및

(c) 상기 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 BMP6 발현이 증가되는 경우의 후보물질을 HIF-1 과발현에 의해 유발되는 건선의 치료제로 선정하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 BMP6의 발현은 실시간 PCR 또는 웨스턴블랏을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 실시간 PCR은 서열번호 11과 12로 표시되는 프라이머를 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 BMP6(Bone Morphogenetic Protein 6; 골형성단백질 6)를 함유하는 건선 예방 또는 치료용 조성물 및 BMP6를 함유하는 건선 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 건선(psoriasis)은 만성 재발성 피부 염증 질환으로 은백색의 인설로 덮인 홍반성 구진이 나타난다. 세계 인구의 약 3% (1억2천5백만명)가 건선 환자이며 국내에서도 전 인구의 2% 정도가 해당된다. 건선은 조직학적으로 각질층의 이상 분화를 특징으로 갖는 것으로써, 아직까지 치료가 어려운 대표적 만성 염증성 피부질환의 하나이다. 따라서, 건선 치료제에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있는 상황이다.

[0004] 전통적인 피부질환 치료제로써 가장 널리 사용되고 있는 스테로이드의 경우 당뇨병, 고혈압 등의 부작용을 유발하고, 그 오남용으로 인해 사회적 문제가 되었으며, 최근 개발되고 있는 면역조절제의 경우, 표적이 되는 특정 부분에만 작용하여 안전하게 면역억제 작용을 일으킬 것으로 예상되었던 항체 제제들이 면역장애, 감염, 암 등의 예상치 못한 심각한 부작용을 유발하는 것으로 보고되었다. 따라서, 좀 더 명확한 건선의 발생기전과 새로운 표적인자의 선별이 요구되고 있었다.

[0005] 건선 피부 조직에서 발현이 증가되어 있는 것으로 최근 보고된 HIF-1은 저산소 상태에서 외부의 산소 농도의 변화에 적절하게 반응하기 위해 해당과정, 혈관신생 등을 유도함으로써 세포내 항상성을 유지시켜주는 전사인자이다. 그 중 HIF-1α는 기본 헬릭스-루프-헬릭스-PER-ARNT-SIM (basic helix-loop-helix-PER-ARNT-SIM; bHLH-PAS) 구조의 전사인자로 저산소 상태 또는 유전적 결합에 의한 피부각질세포 내 HIF-1α 발현증가 및 활성증가

는 의존적 신호전달 체계를 활성화시킴으로써 피부각질 세포의 증식을 유도하고 표피 주변의 혈관 생성을 촉진함으로써 건선과 같은 피부질환을 촉진하는 것으로 알려져있다(C. Rosenberger et al, *Journal of Investigative Dermatology*, 127:2445-52, 2007). 또한 실제 건선환자 조직 내에서 HIF-1α의 발현을 면역 조직화학 염색법으로 확인한 결과 정상조직에 비해 발현이 증가되었음이 보고되었다(M. Ioannou et al, *Journal of Cutaneous Pathology*, 36(12):1255-61, 2009). 그러나, HIF-1α의 과발현이 건선의 발생에 어떠한 역할을 하는지 전혀 알려져 있지 않다.

[0006] 또한, BMP(bone morphogenetic protein)는 20여 가지의 서브타입이 존재하며, 발생단계 및 성체의 다양한 세포 조직에서 수많은 생물학적 반응을 나타낸다. BMP는 정상피부에서 각질세포의 분화 및 증식을 촉진하고, 흑색종 형성 활성을 조절하며, 모낭 생장 개시를 억제하는 것으로 알려져 있으며, 병변피부에서는 피부손상 후 새로 형성된 각질세포 및 피부 섬유아세포뿐만 아니라 만성상처 조직에서도 BMP6의 발현이 증가되었다는 점이 알려져 있다.

[0007] 게다가, K10 프로모터를 이용하여 BMP6를 과발현시킨 형질전환 쥐에서 건선과 유사한 피부가 관찰되었다는 것이 보고되었다. 이 동물모델의 경우, 본 발명과 달리 BMP6의 과발현은 오히려 표피층의 세포 증식을 억제하고, BMP6의 발현이 약하고 드문드문할 경우 기저표피 각질세포의 증식이 증가된다고 보고하고 있다(Blessing M. et al, *The Journal of Cell Biology*, 135(1):227-39, 1996). 이에 따라, 당해 기술분야에서 건선의 경우 BMP6가 과발현되어 있다는 것이 통상의 지식으로 알려진바, 이와 반대로 BMP6를 처리하여 건선을 예방 또는 치료하는 것에 이를 수 없었다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, BMP6가 HIF-1 과발현시 증가되는 각질세포의 증식을 감소시키는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 BMP6를 함유하는 건선 예방 또는 치료용 조성물 및 BMP6를 함유하는 건선 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 BMP6를 유효성분으로 함유하는 건선 예방 또는 치료용 조성물 및 BMP6를 함유하는 건선 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 BMP6를 유효성분으로 함유하는 조성물을 이용하는 경우 각질세포를 표적으로 함으로써 기존의 면역세포를 표적으로 하는 치료제들에 비하여 건선 치료 효율을 높일 수 있는바, 건선 치료에 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1의 A는 각질세포에 HIF-1을 과발현한 후, CCK-8으로 살아있는 세포의 수를 나타낸 것이고, 도 1의 B는 상기 세포에 칼세인-AM 염색을 통해 형광현미경으로 확인한 살아있는 세포의 이미지이다.

도 2의 A 및 B는 각질세포에 HIF-1을 과발현한 한 후, PI 염색 후 유세포 분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 결과를 나타낸 것이고, 도 2의 C는 실시예 1-2의 웨스턴 블랏으로 확인한 각 세포주기 조절인자의 발현을 나타낸 것이며, 도 2의 D, E, F 및 G는 실시예 1-2의 실시간 PCR법으로 확인한 분화 마커의 발현을 나타낸 것으로, 각각 K5, K10, FLG 및 LOR을 나타낸 것이다.

도 3은 HIF-1의 과발현에 의한 BMP6의 발현 감소를 나타내는 것으로, A는 BMP6 mRNA의 변화를, B는 BMP6 단백질

의 변화를 나타낸 것이다.

도 4의 A는 BMP6 프로모터의 모식도이고, 도 4의 B는 HIF-1의 과발현 후 BMP6 프로모터의 활성도를 나타낸 것이다.

도 5의 A는 각질세포에 BMP6를 처리한 후, CCK-8으로 살아있는 세포의 수를 나타낸 것이고, 도 5의 B는 상기 세포에 칼세인-AM 염색을 통해 형광현미경으로 확인한 살아있는 세포의 이미지이다.

도 6의 A 및 B는 각질세포에 BMP6를 처리한 후, PI 염색 후 유세포 분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 결과를 나타낸 것이고, 도 6의 C는 실시예 2-2의 웨스턴 블랏으로 확인한 각 세포주기 조절인자의 발현을 나타낸 것이며, 도 6의 D, E, F 및 G는 실시예 2-2의 실시간 PCR법으로 확인한 분화 마커의 발현을 나타낸 것으로, 각각 K5, K10, FLG 및 LOR을 나타낸 것이다.

도 7의 A는 HIF-1이 과발현된 각질세포에 BMP6를 처리한 후, CCK-8으로 살아있는 세포의 수를 나타낸 것이고, 도 7의 B는 상기 세포에 칼세인-AM 염색을 통해 형광현미경으로 확인한 살아있는 세포의 이미지이며, 도 7의 C 및 D는 상시 세포에 PI 염색 후 유세포 분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 실시예 3의 마우스 건선 모델에서 BMP6의 처리에 의한 각질세포의 증식 감소 및 필라그린 발현 증가를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0018] 본 발명에서는, HIF-1 과발현에 따른 각질세포 및 S기 각질세포 증식 증가, HIF-1에 의한 BMP6 발현 감소, 및 BMP6 처리에 의한 각질세포 및 S기 각질세포 증식 감소를 분석하였다. 그 결과 BMP6가 HIF-1 과발현시 증가되는 각질세포의 증식을 감소시키는 것을 확인하였다.

[0019] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 BMP6가 HIF-1 과발현시 증가되는 각질세포의 증식을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0020] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, BMP6를 유효성분으로 함유하는 건선 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 BMP6가 HIF-1 과발현시 증가되는 각질세포의 증식을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0022] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 조성물에 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 하며, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.

[0023] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 조성물을 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 하고, 상기 조성물에 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하며, 상기 조성물은 용액, 현탁액, 에멀젼, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0024] 또한, 본 발명은 다른 관점에서 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 건선 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0025] 본 발명의 명세서에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물 뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0026] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여의 경우에는 복강주입, 정맥내 주입, 피하주입, 근육주입 등으로 투여할 수 있다.

[0027] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게

결정할 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 치료 대상의 체중 kg 당 0.0001 내지 100 mg, 바람직하게는 치료 대상의 체중 kg 당 0.01 내지 50 mg의 BMP6를 함유하는 것을 특징으로 한다.

[0029] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위용량의 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 상기의 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 아카시아 고무, 인산칼슘, 젤라틴, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸하이드록시벤조에이트, 활석, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 조성물은 파라옥시안식향산메틸, 솔빈산칼륨 등과 같은 방부제, 안정화제, 매실향, 레몬향 등의 천연향료, 클로로필린 등의 천연색소, 과당, 벌꿀, 설탕 등과 같은 감미료, 염료, 항-산화제 등을 추가로 함유할 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학 조성물의 비경구투여를 위한 제제로는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제 등이 있으며, 비수성용제 또는 현탁제의 제로를 위해 프로필렌글리콜, 올리브오일과 같은 식물성기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으며, 좌제의 기제로 위텝솔, 마크로골, 카카오지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0032] 본 발명의 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6722호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 식품을 의미한다.

[0033] 본 발명의 건강기능식품은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있고, 상기 건강기능식품은 과립제, 정제, 환제, 현탁액, 에멀젼, 시럽제, 껌, 차, 젤리, 각종 음료수, 드링크제, 알코올 음료 등으로 제조될 수 있으며, 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다.

[0034] 본 발명의 건강기능식품은 인체를 비롯한 동물 신체에 투여하기 적합한 임의의 생약 형태, 더욱 구체적으로는 경구 투여에 통상적인 임의의 형태, 예를 들어 식품 또는 사료, 식품 또는 사료의 첨가제 및 보조제, 강화된 식품 또는 사료, 정제, 환제, 과립, 캡슐 및 발포 배합물 등과 같은 고체 형태 또는 용액, 현탁액, 유화액, 음료, 페이스트 등과 같은 액체형태 일 수 있고, 영양제, 비타민, 전해질, 감미제, 착색제, 유기산, 방부제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분들을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0036] [실시예]

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0039] **실시예 1: HIF-1에 의한 BMP6의 조절**

[0040] 1-1 : HIF-1 과발현에 따른 각질세포의 증식 증가

[0041] 각질 세포의 과다 증식이 나타나는지 확인하기 위하여, 각질 세포에 HIF-1을 과발현한 후, 시간별로 각질세포의 증식정도를 CCK-8 (웅비, 한국)으로 확인한 결과, HIF-1이 과발현된 각질세포에서 증식이 증가되는 결과를 확인하였다(도 1의 A). 그 후, 실험 5일째되는 날, 본래 형광을 띄지 않는 소수성 물질로 세포 내로 들어가기 용이한 물질로써, 살아 있는 세 포내로 들어가 세포 내 에스테라제에 의해 칼세인으로 변해 녹색 형광을 띄게 됨으로써 살아 있는 세포를 확인할 수 있는 2uM 칼세인 아세토메틸 에스터(calcein acetoxymethyl ester; calcein-AM; Sigma, 미국)를 이용하여 37℃에서 10분간 염색한 후 형광현미경으로 확인하였다(도 1의 B).

[0043] 1-2 : HIF-1 과발현에 따른 증식 가능한 S기 각질세포의 증가

[0044] 각질 세포의 과다 증식이 세포 주기 변화와 관련성이 있는지 확인하기 위하여, HIF-1을 과발현한 후, 각질세포를 프로피디움 요오드화물 (Propidium iodide; PI) 염색 후 유세포 분석기 분석으로 확인하였다. 구체적으로, 사람 각질세포 (Millipore, 미국)에 리포펙타민 (lipofectamin 2000)을 이용하여, pcDNA3-no insert와 pcDNA-HIF-1a(P402A, P564A)를 형질주입 하고 48시간 후 4℃에서 70% 에탄올에 1시간 동안 고정 후 세척하여, 37℃에서 0.5mg/ml의 RNase(Sigma, 미국) 용액에 1시간 반응시켰다. 그 후 10ug/ml PI 용액을 첨가하여 유세포 분석기(BD, 미국)로 세포주기를 분석하였다. 그 결과, HIF-1이 과발현된 각질세포에서 증식기 세포인 S기 세포들이 증가된 것을 확인하였다(도 2의 A 및 B).

[0045] 또한, 어떤 세포 주기 조절인자에 의해 세포주기가 증가 되었는지 확인하기 위하여, 세포주기에 관여하는 이자들의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 구체적으로, 사람 각질세포 (Millipore, 미국)에 리포펙타민 (lipofectamin 2000)을 이용하여, pcDNA3-no insert와 pcDNA-HIF-1a(P402A, P564A)를 형질주입 하고 48시간 후, RIPA버퍼(Elpis, 한국)에 넣어 얼음에 30분간 정치시켰다. 그 후 냉장원심분리기에서 13000rpm으로 30분간 원심분리하고, 상층액만을 취하여 단백질 정량 후, 50㎍의 단백질을 SDS-PAGE 젤에 로딩하였다. 그 후 PVDF에 로딩된 젤을 트랜스퍼한 후 5% BSA로 1시간 동안 블로킹하고, CKD2, CDK4, CDK6 또는 Actin 항체 (Cell Signaling, 미국)를 1:1000으로 희석한 후 인큐베이션하였다. HRP가 부착된 2차 항체 반응과 세척과정을 거친 후 ECL용액을 이용하여 단백질의 밴드를 확인하였다. 그 결과 S기에 발현이 증가 되는 것으로 알려져 있는 CDK2의 발현이 HIF-1 과발현시 2배 이상 증가 되는 것을 확인하였다(도 2의 C). 각질세포의 분화와 증식이 밀접한 연관성을 가지고 조절된다는 것을 알 수 있다.

[0046] 각질세포 분화 인자의 발현이 변화를 일으키는지 확인하기 위하여, 실시간(real time) PCR 실험법으로 각질세포의 정상적인 분화시에 발현이 증가되는 것으로 알려져 있는 케라틴-10(K10), 필라그린(filaggrin; FLG), 로리크린(Loricrin; LOR)과 각질 미분화시에 발현이 증가되는 케라틴-5(K-5)의 발현정도를 확인하였다. 구체적으로, 사람 각질세포 (Millipore, 미국)에 리포펙타민 (lipofectamin 2000)을 이용하여, pcDNA3-no insert와 pcDNA-HIF-1a(P402A, P564A)를 형질주입 하고 48시간 후, TRIzol 시약을 첨가한 뒤 균질기(homogenizer)를 이용하여 잘게 갈아준 뒤 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 역 전사효소(Super-bio, 한국)를 이용하여 각 조직의 cDNA를 제조하는데 이용되었다. 제조된 cDNA를 주형으로 하여, K5 프라이머-F(서열번호 1) 및 K5 프라이머-R(서열번호 2), K10 프라이머-F(서열번호 3) 및 K10 프라이머-R(서열번호 4), FLG 프라이머-F(서열번호 5) 및 FLG 프라이머-R(서열번호 6), LOR 프라이머-F(서열번호 7) 및 LOR 프라이머-R(서열번호 8), GAPDH 프라이머-F(서열번호 9) 및 GAPDH 프라이머-R(서열번호 10)를 이용하여 변성단계(95℃, 30초), 어닐링단계(56℃, 30초) 및 연장단계(72℃, 40초)를 1 싸이클로 하여 35 싸이클을 실시하여 PCR로 증폭하였다. 그 결과 FLG 및 LOR의 발현이 HIF-1 과발현시에 감소하는 것을 알 수 있었다(도 2의 D, E, F 및 G). 이는 각질세포에서 HIF-1 과발현에 따라 각질세포의 이상 분화가 유도될 수 있음을 보여 주는 결과이다.

[0048] 1-3 : 마이크로어레이를 통한 HIF-1의 표적인자 선별

[0049] HIF-1 과발현시 각질세포의 증식뿐만 아니라 분화를 조절하는 기능이 변화된 것은 HIF-1이 분화를 조절하는 인자를 표적인자로 하기 때문이라고 추측할 수 있는바, 분화 조절인자들 중에서 HIF-1의 표적인자를 선별하였다. HIF-1 플라스미드를 형질주입한 각질세포와 no insert 플라스미드를 형질주입한 각질세포에서 RNA를 추출하여 4x44k 어레이칩(Agilent, 한국)을 이용하여 마이크로어레이를 실시하였다. 그 결과, HIF-1을 과발현한 각질세포에서 발현이 대략 반으로 감소되었고, 프로모터 상에 HIF-1 결합자리를 가지고 있으며, 각질세포의 분화에 관여하는 유전자인 BMP6가 표적인자로 선별되었다.

[0051] 1-4 : HIF-1에 의한 BMP6 유전자의 발현감소 확인

[0052] 각질세포에 HIF-1 플라스미드를 형질주입한 후, HIF-1을 과발현한 후 24시간 뒤 실시간 PCR과 웨스턴블랏으로 BMP6의 mRNA와 단백질의 발현이 감소된 것을 확인하였다(도 3). 웨스턴블랏은 BMP6 (R&D, 미국), HIF-1α(BD, 미국) 또는 액틴 항체 (Cell Signaling, 미국)를 1:1000으로 희석한 것을 제외하고는 실시예 1-2과 같다. 또한 실시간 PCR의 경우, BMP6 프라이머-F(서열번호 11) 및 BMP6 프라이머-R(서열번호 12), GAPDH 프라이머-F(서열번호 9) 및 GAPDH 프라이머-R(서열번호 10)를 이용한 것을 제외하고는 실시예 1-2와 같다.

[0054] 1-5 : HIF-1에 의한 BMP6의 조절

[0055] HIF-1 과발현에 의해 감소된 BMP6 분자의 조절가부를 확인하기 위하여, 생물정보공학(bioinformatics) 측면에서, BMP6 유전자의 프로모터에 HIF-1 결합부위가 존재하는지 확인하였다. 매트릭스 검사기(matrix-inspector; Genomatix)를 이용하여 BMP6 프로모터에 결합하는 전사인자를 분석한 결과, BMP6 유전자의 프로모터에 HIF-1 결합부위가 존재하는 것을 확인하였다(도 4의 A).

[0056] 또한, 각질세포에 pcDNA3-no insert와 pcDNA-HIF-1a(P402A, P564A) 플라스미드와 pGL3-BMP6 프로모터 플라스미드를 함께 형질 주입 후, 루시퍼레이즈(Promega, 미국) 활성도를 측정한 결과, 형질주입한 HIF-1의 양이 많아질수록 BMP6의 프로모터 활성도가 떨어지는 것을 알 수 있었다(도 4의 B). 즉, HIF-1이 BMP6의 전사를 조절하여 발현양을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

[0058] **실시예 2: BMP6 처리에 의한 건선치료**

[0059] 2-1 : BMP6 처리에 의한 각질세포의 세포증식 억제

[0060] BMP6 단백질을 각질세포에 각 농도별로 처리 후 시간경과에 따른 세포의 증식정도를 CCK-8을 이용하여 확인하였다. 그 결과 BMP6 처리에 따라 농도의존적으로 각질세포의 증식이 감소된다는 것을 알 수 있었다(도 5의 A). 또한, 실험 5일째되는 날 칼세인-AM 염색을 통해 형광현미경으로 살아 있는 세포를 확인하였다(도 5의 B).

[0062] 2-2: BMP6 처리에 의한 각질세포의 세포주기 억제

[0063] BMP6 처리에 의한 각질세포의 증식속도 감소가 세포주기 억제와 연관성이 있는지 확인한 결과, HIF-1 과발현시와 반대로, BMP6 처리한 그룹의 S기 세포가 감소한다는 것을 확인하였다(도 6). BMP6 단백질을 18시간 동안 처리한 것을 제외하고는 실시예 1-2와 같은 방법으로 PI 염색, 웨스턴 블랏, 및 실시간 PCR을 수행하였다.

[0065] 2-3: HIF-1에 의해 증가된 각질세포에의 BMP6 처리에 의한 증식 억제

[0066] HIF-1 과발현시 나타나는 각질세포의 증식 증가가 BMP6 발현 저하를 통해 일어나는 현상인지 확인하기 위하여, HIF-1 과발현 각질세포에 BMP6 단백질을 처리하여, HIF-1 과발현시에 증가되었던 각질세포의 증식이 감소되는지 확인하였다. 그 결과 BMP6 처리시 증식 정도가 감소한다는 것을 알 수 있었다(도 7의 A 및 B).

[0067] 또한, BMP6 처리에 의한 HIF-1 과발현 각질세포의 증식 감소가 세포주기 억제와 연관성이 있는지 확인한 결과, BMP6 처리한 그룹의 S기 세포가 감소하는_것을 알 수 있었다(도 7의 C 및 D).

[0069] **실시예 3: BMP6 단백질의 건선 치료 효능 검증 실험**

[0070] BMP6 단백질의 건선 치료 효능을 검증하기 위하여, 이미퀴모드(imiquimod; IMQ)를 마우스 피부에 도포하여 건선을 유발한 동물 모델을 이용하였다. 하루에 62.5mg의 IMQ 크림(sigma, 미국)을 5주령 Balb/c 마우스 등 부위에 9일 동안 도포하여 건선 유사한 피부를 유도하였다. 그 후, IMQ 도포 부위에 5ug의 BMP6 단백질을 IMQ처리 7일째부터 6일 동안 피하주사하였고, 대조군으로 PBS를 IMQ도포 부위에 피하주사하였다.

[0071] 면역 조직 화학 염색법으로 결과를 분석하였다. 구체적으로, 마우스를 희생시켜 피부 조직을 채취하여 4% 포름알데하이드(sigma, 미국)에 고정 후 파라핀에 포매하여 슬라이드를 제작하였다. 조직 슬라이드를 자일렌을 이용한 탈파린화 과정 및 알코올을 이용한 탈수화 과정을 거친 후, 시트레이트 버퍼에 슬라이드를 담구어 전자레인지에서 10분간 돌린 후 실온에서 한 시간 동안 식혀 주었다. 증류수로 세척하여 실온에서 5% 염소 혈청으로 한 시간 동안 반응시킨 후 필라그린 항체를 1:50으로 희석하여 인큐베이션하였다. HRP가 부착된 2차 항체를 반응시킨 후 DAB 키트를 이용하여 발색시켜 조직 내 필라그린의 발현 변화를 확인하였다.

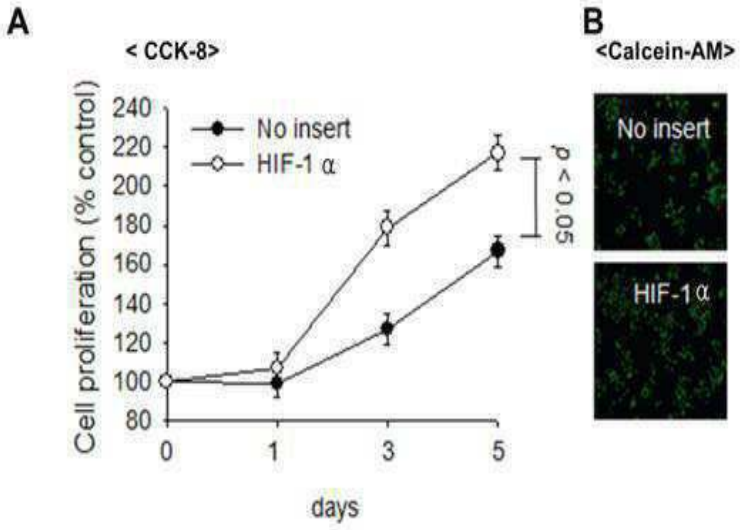
[0072] 그 결과 IMQ 및 PBS가 처리된 그룹이 PBS만 처리된 그룹에 비하여 각질층의 두께가 현저히 증가되어 건선이 유발되었음을 확인할 수 있었다. 또한, IMQ 및 BMP6를 처리한 그룹이 IMQ 및 PBS를 처리한 그룹에 비하여 각질층의 두께가 대략 1/2 정도 감소하였으며, 분화 마지막 단계에서 발현이 될 뿐만 아니라 피부장벽 유지에 있어 중요한 역할을 하는 필라그린의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[0073] 따라서, BMP6를 건선 조직에 처리하면 각질세포의 증식을 억제하여 건선 치료 효능을 보이는 것을 알 수 있었다.

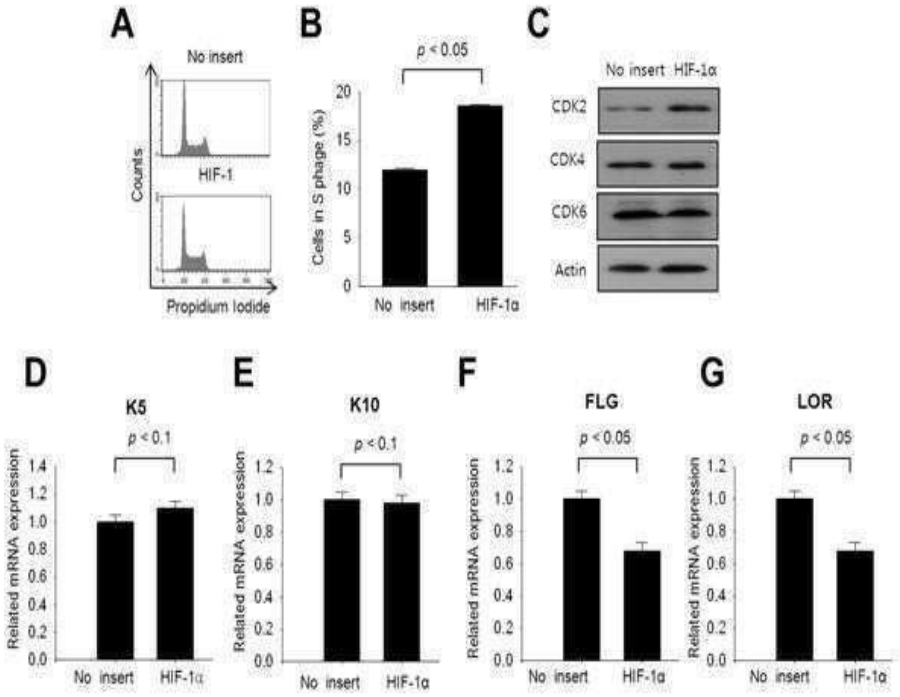
[0075] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

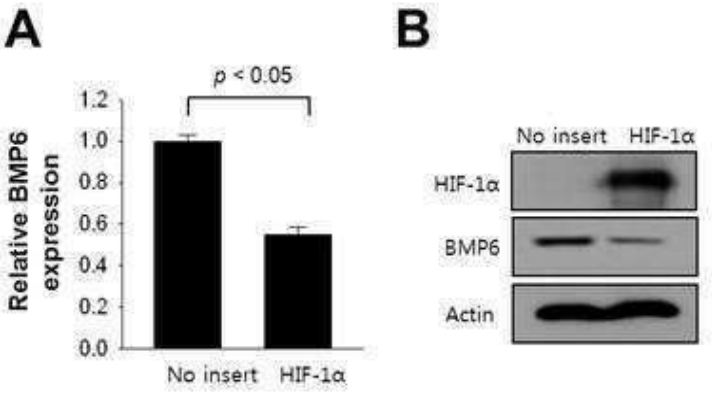
도면1



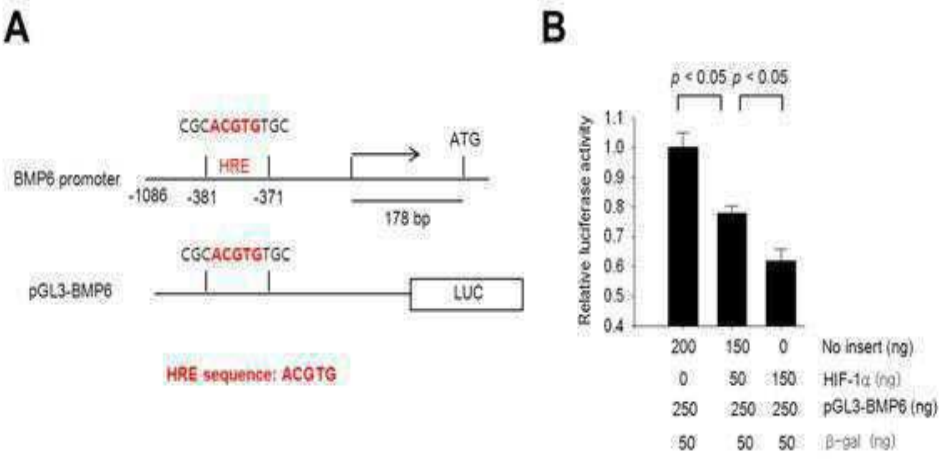
도면2


A
No insert
HIF-1
Counts
Propidium Iodide
B
p < 0.05
Cells in S phage (%)
No insert
HIF-1α
C
No insert HIF-1α
CDK2
CDK4
CDK6
Actin
D
K5
p < 0.1
Related mRNA expression
E
K10
p < 0.1
F
FLG
p < 0.05
G
LOR
p < 0.05

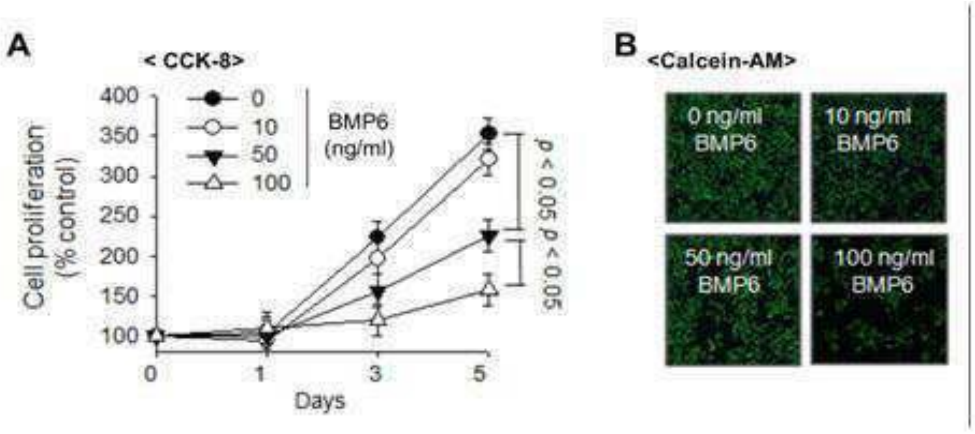
도면3


A
p < 0.05
Relative BMP6 expression
No insert
HIF-1α
B
No insert HIF-1α
HIF-1α
BMP6
Actin

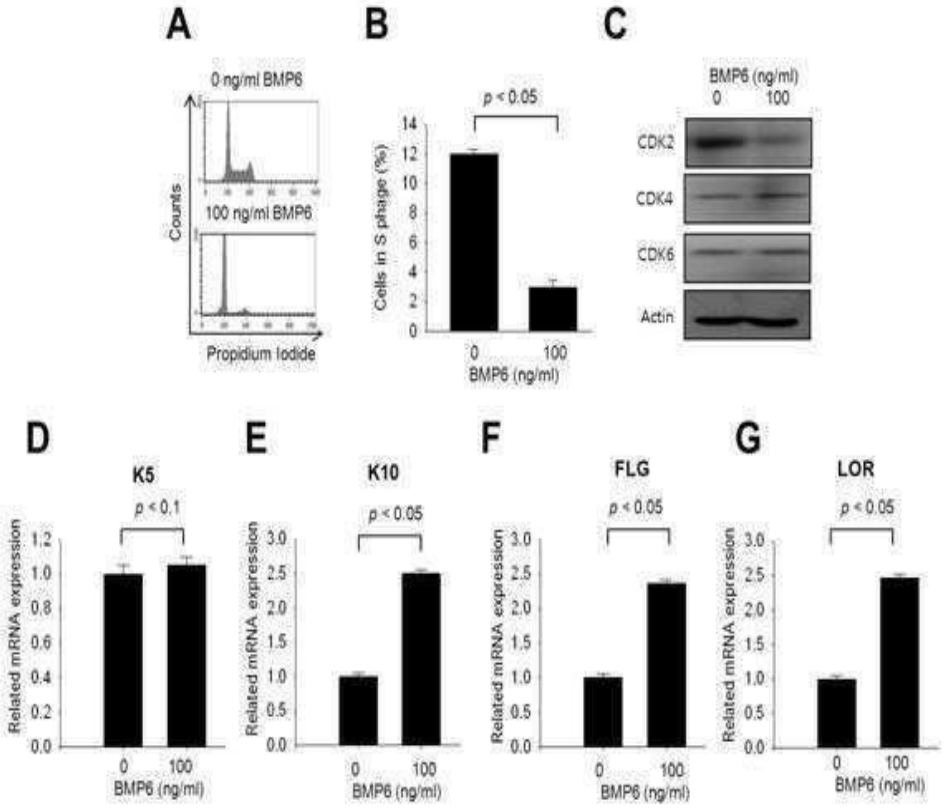
도면4


A
CGCACGTGTGC
ATG
HRE
BMP6 promoter
-1086
-381
-371
178 bp
CGCACGTGTGC
pGL3-BMP6
LUC
HRE sequence: ACGTG
B
p < 0.05 p < 0.05
Relative luciferase activity
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
200 150 0 No insert (ng)
0 50 150 HIF-1α (ng)
250 250 250 pGL3-BMP6 (ng)
50 50 50 β-gal (ng)

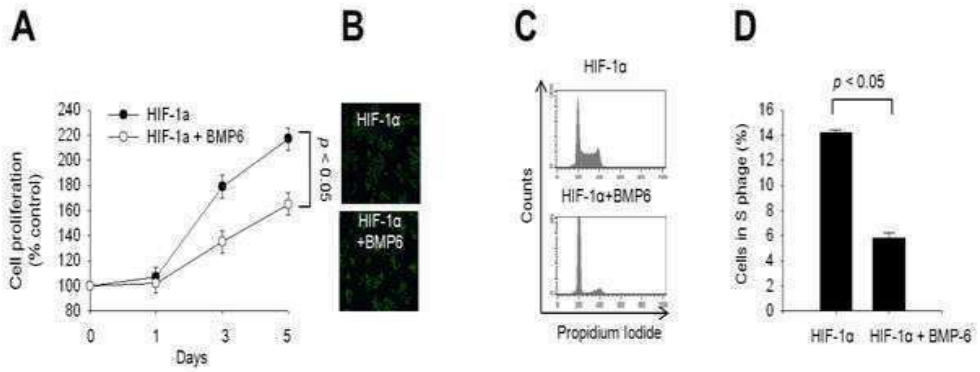
도면5


A
< CCK-8>
Cell proliferation (% control)
400
350
300
250
200
150
100
0
1
3
5
Days
0
10
50
100
BMP6 (ng/ml)
p < 0.05 p < 0.05
B
<Calcein-AM>
0 ng/ml BMP6
10 ng/ml BMP6
50 ng/ml BMP6
100 ng/ml BMP6

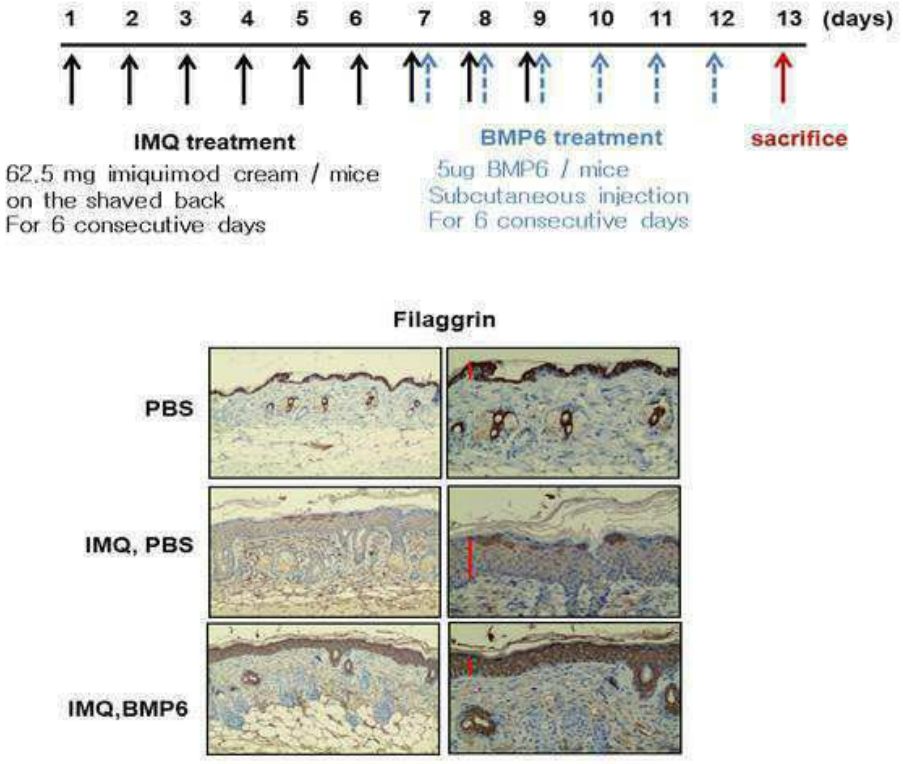
도면6


A
0 ng/ml BMP6
100 ng/ml BMP6
Counts
Propidium Iodide
B
p < 0.05
Cells in S phage (%)
BMP6 (ng/ml)
C
BMP6 (ng/ml)
CDK2
CDK4
CDK6
Actin
D
K5
p < 0.1
Related mRNA expression
E
K10
p < 0.05
F
FLG
p < 0.05
G
LOR
p < 0.05

도면7


A
HIF-1a
HIF-1a + BMP6
Cell proliferation (% control)
Days
p < 0.05
B
HIF-1α
HIF-1α +BMP6
C
HIF-1α
HIF-1α+BMP6
Counts
Propidium Iodide
D
p < 0.05
Cells in S phage (%)
HIF-1α
HIF-1α + BMP-6

도면8



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Compositions Containing BMP6 for Preventing or Treating Psoriasis and Health Foods Containing BMP6 for Preventing or Improving Psoriasis

<130> P15-B235

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> K5 primer F

<400> 1

tctcgccagt caagtgtgtc 20

<210> 2

<211> 20

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> K5 primer R

<400> 2

atagccaccc actccacaag 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> K10 primer F

<400> 3

tcgctactgt gtgcagctct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> K10 primer R

<400> 4

cggaacttcc ctctccttct 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLG primer F

<400> 5

ggtctggacg ttcagggtct 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FLG primer R

<400> 6

ggatgtggtg tggctgtgat 20

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOR primer F

<400> 7

gggcaccgat gggcttag 18

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LOR primer R

<400> 8

ggtaggttaa gacatgaagg attt 24

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH primer F

<400> 9

ccatgttcgt catgggtgt 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH primer R

<400> 10

ccaggggtgc taagcagtt 19

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BMP6 primer F

<400> 11

gaagatctat tcccgggtct tg 22

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BMP6 primer R

<400> 12

cccaagcttc accaccagca cagc 24