



등록특허 10-2677892



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년06월24일

(11) 등록번호 10-2677892

(24) 등록일자 2024년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)

A61K 31/7105 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0005037

(22) 출원일자 2021년01월14일

심사청구일자 2021년01월14일

(65) 공개번호 10-2022-0102743

(43) 공개일자 2022년07월21일

(56) 선행기술조사문헌

Obstetrics & Gynecology. 2002. Vol.99, NO.2,
pp.267-274.*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 14 항

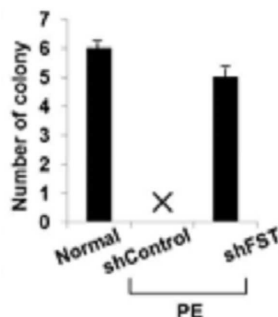
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 자간전증 또는 자간증의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명에 의하는 경우 자간전증 또는 자간증을 간단하고도 신속하면서 정확하게 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 자간전증 또는 자간증을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61P 43/00 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/689 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)
G01N 2800/368 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Endocrinology. 2000. Vol.165, No.1,
pp.157-162.
KR101535737 B1
KR101879497 B1
Clinical Endocrinology. 2015. Vol.83, No.2,
pp.229-235.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| 과제고유번호 | 1345311962 |
| 과제번호 | 2019R1I1A1A01059738 |
| 부처명 | 교육부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 이공학개인지초연구지원사업 |
| 연구과제명 | 양막내 림프관 발생이상에 의한 임신 산모의 임신중독증 발병원리 규명 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 연세대학교 |
| 연구기간 | 2020.03.01 ~ 2021.02.28 |

명세서

청구범위

청구항 1

폴리스타틴(Follistatin, FST)를 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 혈류공급 장애에 의한 자간전증 또는 자간증의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제대혈 혈관 줄기세포에서의 폴리스타틴(Follistatin, FST) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하고, 상기 측정된 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우 자간전증 또는 자간증으로 진단할 수 있는, 자간전증 또는 자간증의 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 폴리스타틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 진단용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 진단용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준은 목적하는 개체에서 분리된 제대혈 혈관 줄기세포에 대하여 측정된 것인, 진단용 조성물.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항의 진단용 조성물을 포함하는 자간전증 또는 자간증의 진단용 키트.

청구항 9

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 제대혈 혈관 줄기세포에서의 폴리스타틴(FST) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 상기 측정된 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 자간전증 또는 자간증이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것

으로 예측하는 자간전증 또는 자간증을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 제대혈 혈관 줄기세포를 포함하는, 정보 제공 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 폴리스타틴 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 제제는 상기 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고핵타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 정보 제공 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 제제는 상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 정보 제공 방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 폴리스타틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 방법은 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)에 의해 수행되는, 정보 제공 방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩에 의하는, 정보 제공 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

분리된 생물학적 시료에서 제대혈 혈관 줄기세포에서의 폴리스타틴(FST) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;

상기 생물학적 시료에 후보 물질을 처리하는 단계; 및

상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하고, 상기 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이, 상기 후보 물질의 처리 전에 비하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 자간전증 또는 자간증의 예방 또는 치료제로 결정하는, 자간전증 또는 자간증의 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 제대혈 혈관 줄기세포를 포함하는, 스크리닝 방법.

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자간전증 또는 자간증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자간전증(pre-eclampsia; PE)이란 임신성 고혈압이 단백뇨와 함께 나타날 때를 말한다. 자간전증의 원인에 대해서는 많은 연구가 이루어지고 있고, 그 원인 또한 무척 다양하다고 알려져 있지만 아직까지 정확한 원인이 밝혀지지 않았다. 일차적으로는 착상 이후 발달단계에서 정상적으로 발생하는 영양막 세포가 모체 내로 잘 침투되지 않아 태반으로의 혈류공급에 장애가 생기게 된다. 이로 인해 산모와 태아의 혈관에 손상이 입어 다양한 증상이 나타나게 된다.

[0003] 자간전증은 임신 20주 이후에 혈압상승, 단백뇨, 그리고 부종 등의 증상이 나타날 때 의심할 수 있다. 고혈압은 자간전증에서 가장 많이 나타나는 증상으로 갑자기 혹은 점차적으로 발생한다. 갑작스러운 체중 증가는 조직내에 수분 축적으로 인하여 발생한다. 이러한 체중 증가는, 보이지 않는 곳에서의 부종으로부터 시작하여 얼굴이나 손가락 부종이 나타나는 것이 특징입니다.

[0004] 중증자간전증일 경우는 위의 대표적인 증상들과 함께 신체 다른 기관에서도 다양한 증상을 보입니다. 궤뇨, 두통 혹은 시각장애, 폐부종 혹은 청색증, 심와부 혹은 우측상복부 통증, 간기능 손상, 혈소판 감소증, 태아 발육 지연의 증상이 동반될 수 있다.

[0005] 산전 검사 중 혈압과 소변 검사 시행을 통해 증상이 없는 상태에서 조기에 환자를 발견한다. 혈압과 소변검사에서 혈압이 상승하거나 소변에서 단백 성분이 검출되는 경우에는 정확한 자간전증검사를 시행해야 한다. 산모의 혈압, 소변, 혈액검사를 입원하여 시행하고 초음파를 통해 태아의 상태를 확인해야 한다.

[0006] 자간전증의 증상은 치료를 통해 없어질 수 없고 아이 분만을 통해 질환이 호전된다. 질환이 많이 진행된 경우나 산모가 발작을 일으키는 경우에는 조산 여부와 무관하게 분만을 바로 진행해야 한다. 치료 약물은 경련 발작을 예방하기 위한 약물과 혈압을 조절하기 위한 약물이 사용된다.

[0007] 자간전증(임신중독증)은 전체 산모 사망의 15% 정도의 원인이 되고, 갑작스러운 태아 사망의 원인이 되기도 하는 심각한 질환이다. 또한 아이를 분만하는 것이 원칙적인 치료 방법이므로 조산의 큰 원인이 되고 있고, 이로 인해 여러 가지 신생아 질환의 원인이 된다. 산모가 적절한 치료를 받지 못할 경우 발작 경련을 일으키기도 하고 간 파열, 뇌출혈, 실명과 같은 심각한 합병증들이 발생하기도 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 목적은 자간전증 또는 자간증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 자간전증 또는 자간증을 진단하기 위한 조성물, 이를 포함하는 진단 키트, 이를 이용한 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 자간전증 또는 자간증의 예방 또는 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 폴리스타틴(Follistatin, FST)의 활성 억제제 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 자간전증 또는 자간증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 본 발명에서 상기 “폴리스타틴(Follistatin, FST)”은 액티빈-결합 단백질로 알려져 있으며, FST 유전자에 의해 암호화되는 단백질이다. 폴리스타틴은 고등 동물의 대부분 조직에서 발현되는 자가분비 글리코단백질에 해당한다. 이러한 폴리스타틴의 주된 기능은 TGF-베타 슈퍼 패밀리의 멤버에 결합 및 생중화 작용이다. 본 발명에서 상기 폴리스타틴은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 본 발명에서 상기 폴리스타틴의 활성 억제제는 상기 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명에서 상기 “펩티드 미메틱스(Peptide Mimetics)”는 폴리스타틴을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β -턴 디펩티드 코어(Nagai et al. Tetrahedron Lett 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류, 아제핀, 벤조디아제핀, β -아미노알콜 및 치환 감마 락탐화 등을 사용하여 생성할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 “앵타머(Aptamer)”는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앵타머는 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 앵타머 발굴 기술이 처음 개발된 이후(Ellington, AD and Szostak, JW., Nature 346:818-822, 1990), 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 앵타머들이 계속해서 발굴되었다. 앵타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 “화학 항체”라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 “항체”는 폴리스타틴의 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다. 여기서, 상기 다클론 항체는 폴리스타틴을 동물에 주사하고, 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에서 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 만들어질 수 있다. 또한, 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포주 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다.
- [0018] 또한, 본 발명에서는 상기 폴리스타틴에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')₂ 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리 섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 “안티센스 뉴클레오티드”는 왓슨-클릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다. 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포주흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될

수 있다.

- [0022] 본 발명에서 상기 "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱 (silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 (knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀 (hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스 (dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할 지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자에 특이적으로 작용하여 FST 유전자(예; mRNA 분자)를 절단하여 RNA 간섭 (RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 폴리스타틴을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내 (in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내 (in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트 (cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에서 상기 "리보자임(ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며, FST 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지된 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 예시에서 상기 shRNA는 서열번호 2로 표시되는 센스 서열 및 서열번호 3으로 표시되는 안티센스 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 일 예시에서 상기 shRNA는 서열번호 4로 표시되는 센스 서열 및 서열번호 5로 표시되는 안티센스 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 일 예시에서 상기 shRNA는 서열번호 6으로 표시되는 센스 서열 및 서열번호 7로 표시되는 안티센스 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 일 예시에서 상기 shRNA는 서열번호 8로 표시되는 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 일 예시에서 상기 shRNA는 서열번호 9로 표시되는 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 일 예시에서 상기 shRNA는 서열번호 10으로 표시되는 염기 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에서 상기 "자간전증(pre-eclampsia; PE)"이란 임신성 고혈압이 단백뇨와 함께 나타날 때를 말하고, "자간증(eclampsia)"은 자간전증에 경련이 동반되는 경우를 의미한다.
- [0031] 본 발명에서는 목적하는 개체 유래의 줄기세포, 바람직하게는 제대혈 혈관 줄기세포에서 발현되는 폴리스타틴의 활성을 억제하거나 상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자의 발현을 억제함으로써 자간전증 또는 자간증을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 자간전증 또는 자간증이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 개체를 의미하며, 포유동물 및 비-포유동물을 모두 포함할 수 있다. 여기서, 상기 포유동물의 예로는 인간, 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 종; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 래트, 마우스 또는 기니아 피그 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서 상기 비-포유동물의 예로는 조류 또는 어류 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0035] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 유효제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(Elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0036] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항 응집제, 유효제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0038] 본 발명의 상기 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 상기 유효성분 포함하는 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 상기 유효성분이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 동일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 상기 성분은 독립적 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 폴리스타틴(FST) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는, 자간전증 또는 자간증의 진단용 조성물에 관한 것이다.

- [0047] 본 발명에서 상기 폴리스타틴 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 상기 폴리스타틴에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 바이오마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 바이오마커 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) *European Journal of Immunology* 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628, 1991; Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0049] 본 발명에 상기 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩타이드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". *Science* 254 (5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.
- [0050] 본 발명에서 상기 "앵타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 앵타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., *Nature* 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.
- [0051] 본 발명에서 상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 상기 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다. 프로브의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없으나, 바람직하게는 PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, RNA 또는 DNA일 수 있으며, 가장 바람직하게는 PNA이다. 보다 구체적으로, 상기 프로브는 바이오 물질로서 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로, 예를 들어, 효소, 단백질, 항체, 미생물, 동식물 세포 및 기관, 신경세포, DNA, 및 RNA일 수 있으며, DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 단백질의 예로는 항체, 항원, 효소, 펩타이드 등을 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 상기 "LNA(Locked nucleic acids)"란, 2'-O, 4'-C 메틸렌 브릿지를 포함하는 핵산 아날로그를 의미한다 [J Weiler, J Hunziker and J Hall *Gene Therapy* (2006) 13, 496.502]. LNA 뉴클레오타이드는 DNA와 RNA의 일반적 핵산 염기를 포함하며, Watson-Crick 염기 쌍 규칙에 따라 염기 쌍을 형성할 수 있다. 하지만, 메틸렌 브릿지로 인한 분자의 'locking'으로 인해, LNA는 Watson-Crick 결합에서 이상적 형상을 형성하지 못하게 된다. LNA가 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드에 포함되면, LNA는 보다 빠르게 상보적 뉴클레오타이드 사슬과 쌍

을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.

- [0055] 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오타이드 염기의 서열 및 서브유닛간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 폴리스타틴이나, 이를 암호화하는 유전자의 정보는 알려져 있으므로, 당업자라면 이를 바탕으로 상기 단백질을 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 안티센스 뉴클레오타이드를 용이하게 디자인할 수 있을 것이다.
- [0057] 본 발명에서 상기 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준은 목적하는 개체에서 분리된 생물학적 시료 중 줄기세포, 바람직하게는 제대혈 혈관 줄기세포에 대하여 측정될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 진단용 조성물을 포함하는 자간전증 또는 자간증의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0060] 본 발명에서는 상기 진단용 키트를 이용하여 자간전증 또는 자간증의 발병 여부 또는 발병 가능성을 예측할 수 있고, 더 나아가서는 상기 자간전증 또는 자간증의 경과, 예후 또는 치료 효과에 대하여도 진단할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명의 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다.
- [0063] 예를 들면, 본 발명의 진단용 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 코딩하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0065] 또한, 본 발명의 진단용 키트는 ELISA를 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. ELISA 키트는 상기 단백질에 대해 특이적인 항체를 포함한다. 항체는 마커 단백질에 대한 특이성 및 친화성이 높고 다른 단백질에 대한 교차 반응성이 거의 없는 항체로, 단클론 항체, 다클론 항체 또는 재조합 항체이다. 또한 ELISA 키트는 대조군 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다. 그 외 ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨주게이트됨) 및 그의 기질 또는 항체와 결합할 수 있는 다른 물질 등을 포함할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 폴리스타틴(FST) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 자간전증 또는 자간증을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명의 상기 "목적하는 개체"란 해당 질환의 발병 여부가 불확실한 개체로, 자간전증 또는 자간증이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 개체를 의미한다. 여기서, 상기 개체는 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"는 개체로부터 얻어지거나 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum),

눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 줄기세포일 수 있고, 보다 바람직하게는 제대혈 혈관 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명의 정보 제공 방법에서, 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제 등과 관련된 내용은 상기 진단용 조성물에 기재된 바와 중복되어, 명세서의 과도한 복잡을 피하고자 이하 그 기재를 생략한다.

[0071] 본 발명에서 상기 폴리스타틴 단백질의 발현 수준을 측정 또는 비교 분석 방법으로는 단백질 칩 분석, 면역측정법, 리간드 바인딩 어세이, MALDI-TOF(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, 방사선 면역 분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 보체 고정 분석법, 2차원 전기영동 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(liquid chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), 웨스턴 블랏팅 또는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0072] 본 발명에서 상기 폴리스타틴을 암호화하는 유전자의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명에서 상기 생물학적 시료에 대하여 측정된 상기 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 상기 자간전증 또는 자간증이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0074] 더 나아가, 본 발명에서 상기와 같이 생물학적 시료에 대하여 측정된 상기 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 자간전증 또는 자간증의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 경우, 상기 목적하는 개체에 대하여 그 질환에 대한 약제 투여를 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0076] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 분리된 생물학적 시료에서 폴리스타틴(FST) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;

[0077] 상기 생물학적 시료에 후보 물질을 처리하는 단계; 및

[0078] 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 자간전증 또는 자간증의 예방, 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0079] 본 발명에서 상기 "스크리닝"이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적으로 하는 어떤 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것이다.

[0080] 본 발명에서 상기 분리된 생물학적 시료는 자간전증 또는 자간증이 유발되었거나 유발되지 않은 개체로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있다. 구체적으로, 상기 생물학적 시료는 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 골반 내 유체액(pelvic fluids), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 줄기세포일 수 있고, 보다 바람직하게는 제대혈 혈관 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] 본 발명의 스크리닝하는 방법에서, 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제 또는 방법 등과 관련된 내용은 상기 진단용 조성물 및 정보 제공 방법에 기재된 바와 중복되어, 명세서의 과도한 복잡을 피하고자 이하 그 기재를 생략한다.

[0082] 본 발명에서 상기 후보 물질은 천연 화합물, 합성 화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0083] 본 발명에서 상기 후보 물질의 처리 후 상기 생물학적 시료에서 상기 폴리스타틴 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이, 상기 후보 물질의 처리 전에 비하여 감소된 경우, 상기 후보 물질을 자간전증 또는 자간증의 예방, 개선 또는 치료제로 결정할 수 있다.

발명의 효과

[0084] 본 발명에 의하는 경우 자간전증 또는 자간증을 간단하고도 신속하면서 정확하게 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 자간전증 또는 자간증을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 실시예 1에서 정상 산모 및 자간전증 산모 유래 제대혈에서 분리된 혈관 줄기세포의 시간에 따른 혈관 내피세포로의 분화를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 2는 실시예 1에서 정상 산모 및 자간전증 산모 유래 제대혈에서 분리된 혈관 줄기세포의 시간에 따른 혈관 내피세포로의 평균 분화 일수를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 실시예 2에서 정상 산모 및 자간전증 산모 유래 제대혈에서 분리된 혈관 줄기세포의 시간에 따른 혈관 내피세포로의 분화 콜로니를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 2에서 정상 산모 및 자간전증 산모 유래 제대혈에서 분리된 혈관 줄기세포의 시간에 따른 혈관 내피세포로의 분화 콜로니 수를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 실시예 3에서 정상 산모에 비하여 자간전증 산모 유래 제대혈 혈관 줄기세포의 분화능 감소와 관련된 특이 유전자를 마이크로어레이(microarray)로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 실시예 3에서 정상 산모에 비하여 자간전증 산모 유래 제대혈 혈관 줄기세포에서 폴리스타틴(FST)의 발현 수준을 실시간 qRT-PCR로 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 4에서 정상 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포에 폴리스타틴(FST) 단백질을 농도별로 처리한 뒤 시간에 따른 제대혈 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 분화를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 8은 실시예 4에서 정상 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포에 폴리스타틴(FST) 단백질을 농도별로 처리한 뒤 제대혈 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 평균 분화 일수를 측정하여 그 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 실시예 4에서 정상 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포에 폴리스타틴(FST) 단백질을 농도별로 처리한 뒤 상기 혈관 줄기세포의 시간에 따른 혈관 내피세포로의 분화 콜로니 수를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 실시예 5에서 정상 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포와, 자간전증 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포에 FST 유전자의 발현을 억제시킨 뒤 시간에 따른 제대혈 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 분화를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 11은 실시예 5에서 정상 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포와, 자간전증 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포에 FST 유전자의 발현을 억제시킨 뒤 제대혈 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 평균 분화 일수를 측정하여 그 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 12는 실시예 5에서 정상 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포와, 자간전증 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포에 FST 유전자의 발현을 억제시킨 뒤 제대혈 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 분화 콜로니 수를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 13은 실시예 5에서 정상 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포와, 자간전증 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포

에 FST 유전자의 발현을 억제시킨 뒤 FST mRNA의 발현 수준을 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0086] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0088] **실시예**
- [0090] [실시예 1] 자간전증 산모 유래 제대혈 혈관 줄기세포의 분화 속도 감소 확인
- [0091] 정상(NL) 및 자간전증 (PE) 산모 유래 제대혈에서 분리된 혈관 줄기세포의 시간에 따른 혈관 내피세포로의 분화를 현미경으로 관찰하여 그 결과를 도 1에 나타내었고, 평균 분화일을 비교하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0092] 도 1 및 2에서 보는 바와 같이, 정상 산모에 비해 자간전증 산모 유래의 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 분화 속도가 느린 것을 확인할 수 있었다.
- [0094] [실시예 2] 자간전증 산모 유래 제대혈 혈관 줄기세포의 분화 콜로니 크기 및 수 감소 확인
- [0095] 정상(NL) 및 자간전증 (PE) 산모 유래 제대혈에서 분리된 혈관 줄기세포의 시간에 따른 혈관 내피세포로의 분화 콜로니를 현미경으로 관찰하여 그 결과를 도 3에 나타내었고, 시간에 따른 콜로니 수를 측정하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0096] 도 3 및 4에서 보는 바와 같이, 정상 산모에 비해 자간전증 산모 유래의 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 분화 콜로니 크기가 작고 콜로니 수가 적은 것을 확인할 수 있었다.
- [0098] [실시예 3] 자간전증 산모 유래 제대혈 혈관 줄기세포에서 폴리스타틴(FST) 유전자의 과발현 확인
- [0099] 정상 산모에 비하여 자간전증 산모 유래 제대혈 혈관 줄기세포의 분화능 감소와 관련된 특이 유전자를 확인하기 위하여 마이크로어레이(microarray) 유전자 분석을 수행하여 그 결과를 도 5에 나타내었고, 실시간 qRT-PCR (quantitative Reverse transcript -polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 정상(NL) 및 자간전증 (PE) 산모 유래 제대혈에서 분리된 혈관 줄기세포에서 폴리스타틴(FST)의 발현 수준을 확인하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0100] 도 5 및 6에서 보는 바와 같이, 정상 산모에 비하여 자간전증 산모 유래의 혈관 줄기세포에서 폴리스타틴의 발현 수준이 현저하게 증가되어 있음을 확인하였다.
- [0102] [실시예 4] 정상 산모의 제대혈 혈관 줄기세포에 FST(follistatin) 단백질을 통한 분화능 감소 확인
- [0103] 폴리스타틴(FST)에 의한 제대혈 혈관 줄기세포의 분화능 조절을 확인하기 위하여, 정상 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포에 폴리스타틴(FST) 단백질을 농도별(10, 50, 100 ng/ml)로 처리한 후 시간에 따른 제대혈 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 분화를 현미경으로 관찰하여 그 결과를 도 7에 나타내었고, 평균 분화일을 측정하여 그 결과를 도 8에 나타내었으며, 혈관 내피세포로의 분화 콜로니 수를 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0104] 도 7 내지 9에서 보는 바와 같이, 대조군 (Control)에서는 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 정상적 분화 속도 및 콜로니 수를 보인 반면, 폴리스타틴(FST)이 처리된 군에서는 분화가 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.
- [0106] [실시예 5] 자간전증 산모의 제대혈 혈관 줄기세포에 폴리스타틴(FST) 발현 억제를 통한 분화능 회복 확인
- [0107] 정상(NL) 및 자간전증 (PE) 산모 유래 제대혈에서 분리된 혈관 줄기세포에, 하기 표 1로 표시되는 서로 상이한 3종의 shRNA 플라스미드를 포함하는 렌티바이러스 (shFST)를 이용하여 FST 유전자의 발현을 억제시킨 뒤 시간에 따른 제대혈 혈관 줄기세포의 혈관 내피세포로의 분화를 현미경으로 관찰하여 그 결과를 도 10에 나타내었고, 평균 분화일을 측정하여 그 결과를 도 11에 나타내었으며, 혈관 내피세포로의 분화 콜로니 수를 측정하여 그 결과를 도 12에 나타내었고, FST mRNA의 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 13에 나타내었다.

표 1

[0108]

| 구분 | | 서열 정보 |
|-------------|--------------------------|---|
| sc-39762-VA | 헤어핀 | GATCCGTACCAAGGCAGATGTAAATTCAAGAGATTACATCTGCCCTTGGTACTTTTT (서열번호 8) |
| | 대응 siRNA 센스(sc-39762A) | GUACCAAGGCAGAUGUAAAtt (서열번호 2) |
| | 대응 siRNA 안티센스(sc-39762A) | UUUACAUCUGCCUUGGUACtt (서열번호 3) |
| sc-39762-VB | 헤어핀 | GATCCGGGCAGATCTATTGGATTATTCAAGAGATAATCCAATAGATCTGCCCTTTTT (서열번호 9) |
| | 대응 siRNA 센스(sc-39762B) | GGGCAGAUUAUUGGAUUAAtt (서열번호 4) |
| | 대응 siRNA 안티센스(sc-39762B) | UAAUCCAAUAGAUCUGCCctt (서열번호 5) |
| sc-39762-VC | 헤어핀 | GATCCGTGTGCTACTGGAAGTAAATTCAAGAGATTACTTCCAGTAGCACACTTTTT (서열번호 10) |
| | 대응 siRNA 센스(sc-39762C) | GUGUGCUACUGGAAGUAAAtt (서열번호 6) |
| | 대응 siRNA 안티센스(sc-39762C) | UUUACUCCAGUAGCACActt (서열번호 7) |

[0110]

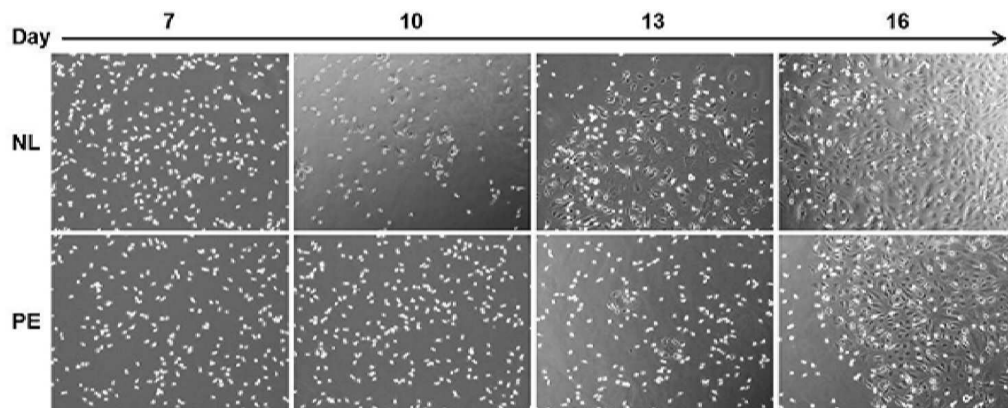
도 10 내지 13에서 보는 바와 같이, 정상 산모에 비하여 자간전증 산모 유래 제대혈 혈관 줄기세포는 분화가 이루어지지 않은 반면, 자간전증 산모 유래의 제대혈 혈관 줄기세포에서 FST 유전자의 발현을 억제시킨 결과 정상 산모의 제대혈 혈관 줄기세포와 유사하게 분화 속도가 촉진되었고 콜로니 수 또한 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0112]

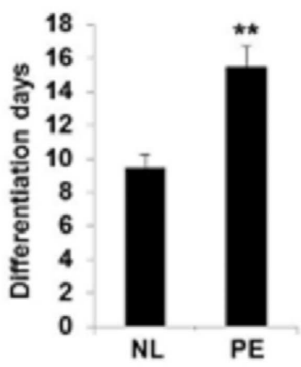
이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

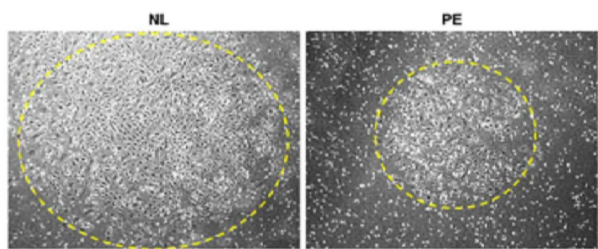
도면1



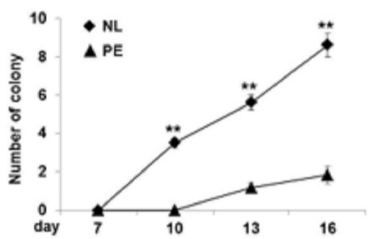
도면2



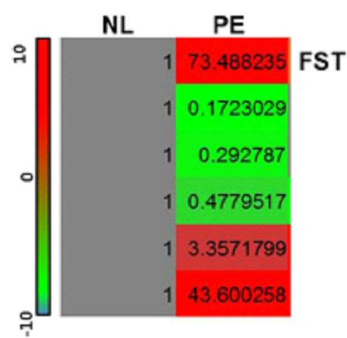
도면3



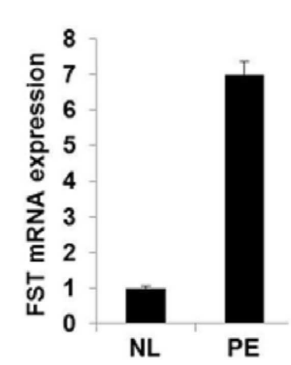
도면4



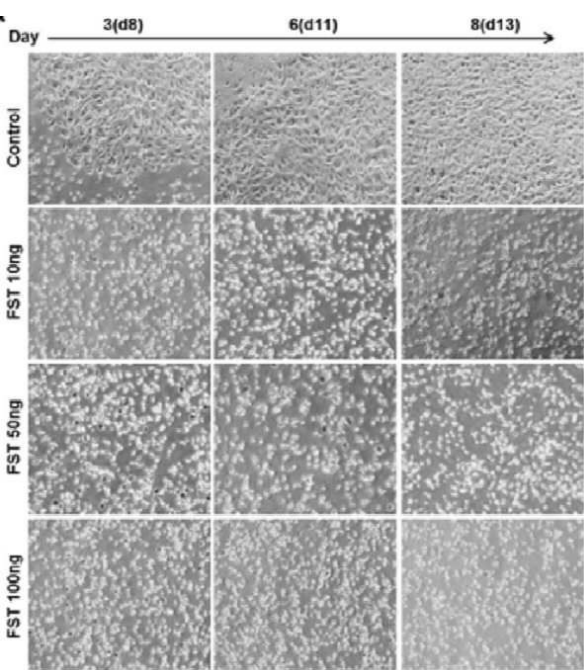
도면5



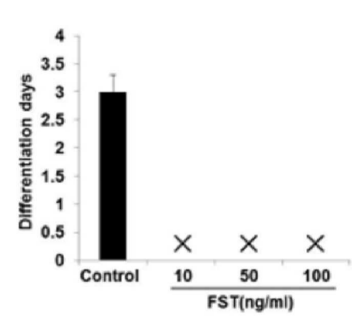
도면6



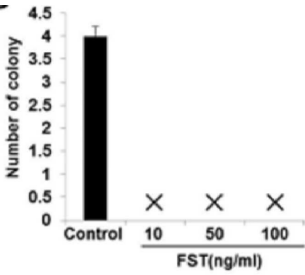
도면7



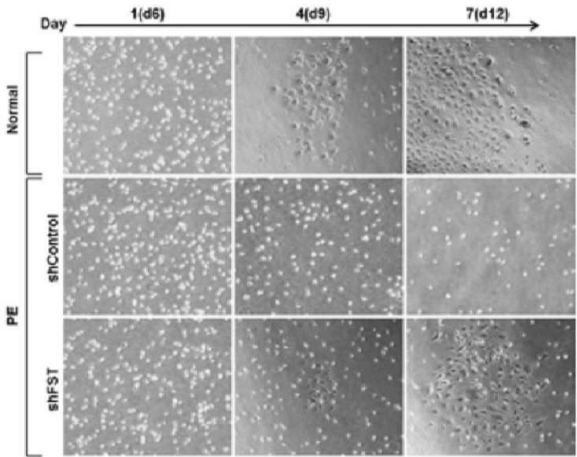
도면8



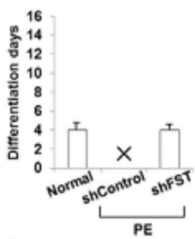
도면9



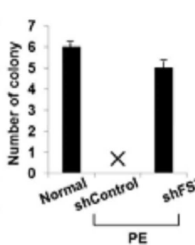
도면10



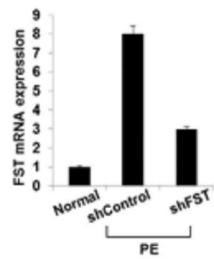
도면11



도면12



도면13



서열목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
 <120> Composition for preventing or treating pre-eclampsia or eclampsia
 <130> PDPB204404
 <160> 10
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Val Arg Ala Arg His Gln Pro Gly Gly Leu Cys Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Gln Phe Met Glu Asp Arg Ser Ala Gln Ala Gly Asn Cys
 20 25 30

Trp Leu Arg Gln Ala Lys Asn Gly Arg Cys Gln Val Leu Tyr Lys Thr
 35 40 45

Glu Leu Ser Lys Glu Glu Cys Cys Ser Thr Gly Arg Leu Ser Thr Ser
 50 55 60

Trp Thr Glu Glu Asp Val Asn Asp Asn Thr Leu Phe Lys Trp Met Ile
 65 70 75 80

Phe Asn Gly Gly Ala Pro Asn Cys Ile Pro Cys Lys Glu Thr Cys Glu
 85 90 95

Asn Val Asp Cys Gly Pro Gly Lys Lys Cys Arg Met Asn Lys Lys Asn

100 105 110

Lys Pro Arg Cys Val Cys Ala Pro Asp Cys Ser Asn Ile Thr Trp Lys

115 120 125
 Gly Pro Val Cys Gly Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Arg Asn Glu Cys Ala
 130 135 140
 Leu Leu Lys Ala Arg Cys Lys Glu Gln Pro Glu Leu Glu Val Gln Tyr
 145 150 155 160
 Gln Gly Arg Cys Lys Lys Thr Cys Arg Asp Val Phe Cys Pro Gly Ser
 165 170 175

 Ser Thr Cys Val Val Asp Gln Thr Asn Asn Ala Tyr Cys Val Thr Cys
 180 185 190
 Asn Arg Ile Cys Pro Glu Pro Ala Ser Ser Glu Gln Tyr Leu Cys Gly
 195 200 205
 Asn Asp Gly Val Thr Tyr Ser Ser Ala Cys His Leu Arg Lys Ala Thr
 210 215 220
 Cys Leu Leu Gly Arg Ser Ile Gly Leu Ala Tyr Glu Gly Lys Cys Ile
 225 230 235 240
 Lys Ala Lys Ser Cys Glu Asp Ile Gln Cys Thr Gly Gly Lys Lys Cys

 245 250 255
 Leu Trp Asp Phe Lys Val Gly Arg Gly Arg Cys Ser Leu Cys Asp Glu
 260 265 270
 Leu Cys Pro Asp Ser Lys Ser Asp Glu Pro Val Cys Ala Ser Asp Asn
 275 280 285
 Ala Thr Tyr Ala Ser Glu Cys Ala Met Lys Glu Ala Ala Cys Ser Ser
 290 295 300
 Gly Val Leu Leu Glu Val Lys His Ser Gly Ser Cys Asn Ser Ile Ser
 305 310 315 320

 Glu Asp Thr Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Gln Asp Tyr Ser Phe
 325 330 335
 Pro Ile Ser Ser Ile Leu Glu Trp
 340

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FST shRNA

<400> 2

guaccaaggc agaaguaaat t 21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FST shRNA

<400> 3

uuuacaucug ccuugguact t 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FST shRNA

<400> 4

gggcagaucu auuggauuat t 21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FST shRNA

<400> 5

uaauccaaua gaucugccct t 21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FST shRNA

<400> 6

gugugcuacu ggaaguaaat t 21

<210> 7

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FST shRNA
 <400> 7
 uuacuucca guagcacact t 21
 <210> 8
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FST shRNA
 <400> 8
 gatccgtacc aaggcagatg taaattcaag agatttacat ctgccttggc acttttt 57
 <210> 9
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FST shRNA
 <400> 9
 gatccgggca gatctattgg attattcaag agataatcca atagatctgc ccttttt 57
 <210> 10
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FST shRNA
 <400> 10
 gatccgtgtg ctactggaag taaattcaag agatttactt ccagtagcac acttttt 57