



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0076992  
(43) 공개일자 2020년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/6883* (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*C12Q 1/6883* (2018.05)  
*G01N 33/6893* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0166061  
(22) 출원일자 2018년12월20일  
심사청구일자 2018년12월20일

(71) 출원인  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
유제욱  
서울특별시 마포구 마포대로 33 한화오벨리스크  
APT 2106  
홍수정  
서울특별시 동작구 상도로19길 41-12  
(74) 대리인  
이재영

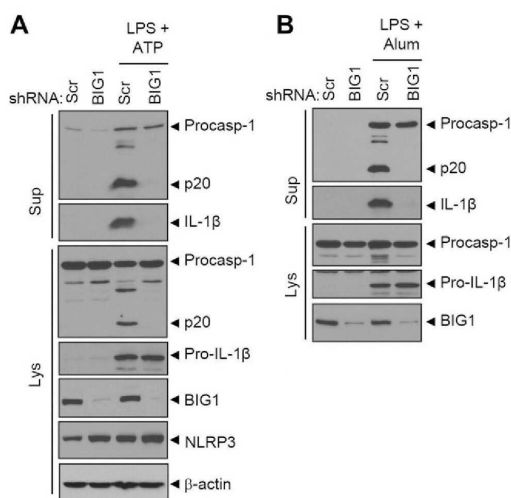
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 염증 억제 물질의 스크리닝 방법

### (57) 요약

본 발명은 (a) BIG1 또는 GBF1을 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 세포 상에서 BIG1 또는 GBF1의 발현을 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해 상기 BIG1 또는 GBF1의 발현을 억제시키는 물질을 염증 억제 물질로 선별하는 단계를 포함하는, 염증 억제 물질 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)  
 C12Q 2600/158 (2013.01)  
 G01N 2333/4706 (2013.01)  
 G01N 2500/00 (2013.01)  
 G01N 2800/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B2007467  
 부처명 과학기술정보통신부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 중견연구자지원사업  
 연구과제명 신호 소기관 트래피킹을 통한 선천면역반응 조절기전  
 기 여 율 1/2  
 주관기관 연세대학교  
 연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3A9B6073856  
 부처명 과학기술정보통신부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 원천기술개발사업  
 연구과제명 PLA2의 NLRP3 inflammasome 활성화 및 lipid mediator 생성을 통한 만성 퇴행성 뇌질환 유  
 도기전 규명  
 기 여 율 2/2  
 주관기관 연세대학교  
 연구기간 2015.12.01 ~ 2016.08.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

BIG1 또는 GBF1 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 물질 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 물질을 포함하는 염증 억제 스크리닝용 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 BIG1 또는 GBF1 유전자는 발현이 억제되는 경우에 염증이 억제되는, 조성물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 BIG1 또는 GBF1 유전자의 발현이 억제되는 경우에 NLRP3 인플라마좀의 활성이 억제되는, 조성물.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 류마티스성 관절염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 및 염증성 척추손상 등을 포함한 많은 만성 신경 염증성 또는 퇴행성 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 것으로 예측하는 것인, 조성물.

#### 청구항 5

(a) BIG1 또는 GBF1을 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 세포 상에서 BIG1 또는 GBF1의 발현을 측정하는 단계; 및

(c) 후보물질 비처리군에 비해 상기 BIG1 또는 GBF1의 발현을 억제시키는 물질을 염증 억제 물질로 선별하는 단계를 포함하는, 염증 억제 물질 스크리닝 방법.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서,

(d) 후보물질이 처리된 세포에서 비처리군과 비교하여, NLRP3 인플라마좀의 활성이 억제되면 염증 억제 물질로 선별하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 염증 억제 물질은 류마티스성 관절염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 및 염증성 척추손상 등을 포함한 많은 만성 신경 염증성 또는 퇴행성 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질인, 방법.

#### 청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 세포는 수지상세포(dendritic cell), 자연살해세포(natural killer cell), T 세포(T cell), B 세포(B cell), 조절 T 세포(regulatory T cell, Treg cell), 자연 살해 T 세포(natural killer T cell), 선천성 림프구 세포(Innate lymphoid cell), 대식세포(macrophage), 과립구(Granulocyte), 키메라 항원 수용체 발현 T 세포(CAR-T: Chimeric antigen receptor-T cell), 림포카 활성 살해세포(LAK: Lymphokine-activated killer

Cell), 사이토카인 유도성 살해세포(CIK: Cytokine Induced Killer Cell), 섬유아세포(fibroblast), 연골세포(chondrocyte), 활액막 세포(synovial cell), 피부각질세포(keratinocyte), 지방세포(adipocyte), 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast) 및 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인, 방법.

## 청구항 9

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항의 염증 억제 스크리닝용 조성물을 포함하는 염증 물질 판별 키트.

## 청구항 10

- (a) 목적하는 시료로부터 BIG1 또는 GBF1의 발현을 측정하는 단계;
- (b) 정상군으로부터 BIG1 또는 GBF1의 발현을 측정하는 단계;
- (c) (a) 단계의 측정값과 (b) 단계의 측정값을 비교하여, (a) 단계의 측정값이 낮은 경우에, 목적하는 시료가 NLRP3 인플라좀이 억제된 것을 판별하는 방법.

## 청구항 11

제 10항에 있어서,

NLRP3 인플라좀이 억제된 경우, 목적하는 시료가 류마티스성 관절염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 및 염증성 척추손상 등을 포함한 많은 만성 신경 염증성 또는 퇴행성 질환의 감수성이 낮은 것으로 판단하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 염증 억제 물질로 선별하는 스크리닝 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 인터루킨 (IL)-1은 류마티스성 관절염 및 알츠하이머병을 포함한 많은 만성 염증성 또는 퇴행성 질환의 진행과 밀접한 관련이 있는 주요 전염증성 사이토카인이다. 골수 세포에서 IL-1 $\beta$ 는 미생물 또는 조직 손상 유발 리간드에 의한 Toll 유사 수용체 (TLRs)의 결합에 의해 불활성 전구체 형태(pro-IL-1 $\beta$ )로 처음 생산된다. 다른 사이토카인과 달리, pro-IL-1 $\beta$ 은 IL-1 $\beta$  유전자에서 소포체(ER)-표적화 리더 서열이 결합되어 있기 때문에 세포질에 존재한다. 대부분의 분비 단백질은 먼저 리더 서열을 통해 ER로 수송된 다음 기존의 ER-골지 분비 경로를 따른다. 따라서, 리더 서열이 없는 IL-1 $\beta$ 가 어떻게 세포질에서 세포외 배지로 방출되는지는 불분명하다.

[0003] 세포질에서, IL-1 $\beta$  변환 효소로 불리는 활성 카스파제-1은 pro-IL-1 $\beta$ 를 성숙한 IL-1 $\beta$  수용체로 절단하고, 활성 IL-1 $\beta$ 는 ER-골지 경로와 독립적인 경로를 통해 분비된다. 분비된 활성 IL-1 $\beta$ 는 표적 세포의 IL-1 $\beta$  수용체에 결합함으로써 전-염증 분자의 발현을 유발한다. 카스파제-1 활성화는 IL-1 $\beta$ 의 활성화 형태로의 절단 뿐만 아니라 분비에도 필요하다고 보고되었고, 최근의 연구에 따르면 활성 카스파제-1은 가스데민 D(gasdermin D)를 분해하여 가스데민 D 포어를 형성하여 IL-1 $\beta$  분비의 도관으로서 역할을 할 수 있다(미국 공개 특허 제 2018-0318414호).

[0004] 뉴클레오타이드가 결합된 올리고머화 도메인과 같은 피린 도메인-함유 3(NLRP3) 수용체 계열은 다양한 확인된 인플라마좀 센서 분자 중 ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain) 및 프로카스파제-1의 결합과 관련된 가장 잘 연구된 분자 중 하나이다. 미생물 감염에서 내인성 대사 산물에 이르기까지 다양한 자극을 제공한다. NLRP3 인플라마좀의 과도한 활성화는 여러 만성 염증 및 대사 장애의 진행과 밀접한 관련이 있다는 새로운 증거가 있다. 그러나 다양한 자극에 의한 NLRP3 인플라마좀의 근원적인 활성화 기전은 여전히 미약하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 BIG1 또는 GBF1을 발현을 억제시켜 NLRP3 인플라마솜의 활성화가 억제되어, 류마티스성 관절염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 및 염증성 척추손상을 포함한 많은 만성 신경 염증성 또는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료할 수 있는 염증 억제제로 결정하는 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0006] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 이하, 본원에 기재된 다양한 구현예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구현예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구현예" 또는 "구현예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구현예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구현예에서" 또는 "구현예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구현예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구현예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

[0008] 본 발명 내 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0009] 본 발명에서 "인플라마솜 활성화 억제"는 목적하는 세포 등의 인플라마솜 활성화의 저하를 야기하는 생체 내 변형을 의미하며, 인플라마솜 생성 억제, 인플라마솜으로 인한 사이토카인 생성 억제 또는 ASC(adaptor protein apoptosis-associated spec-like protein containing a caspase-recruitment domain) 중합체(oligomer) 형성 억제일 수 있다.

[0010] 본 발명에서 인플라마솜(inflammasomes)은 카스파제-1-활성화 복합 단백질 복합체로, 1) 감각 단백질(sensor protein)인 NLRP3(NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3), 2) 연결 단백질(adaptor protein)인 ASC(adaptor protein apoptosis-associated spec-like protein containing a caspase-recruitment domain) 및 3) 이펙터 단백질인 프로카스파제-1(caspase-1)으로 구성된다. 상기한 인플라마솜 구성 성분들은 미생물의 감염이나 조직의 상해가 발생한 경우에 조립되는데, 사이토솔에서 조립에 의해 활성화된 인플라마솜은 카스파제-1을 활성화시켜 인터루킨 (IL)-1 $\beta$  또는 인터루킨-18을 분비하여 숙주의 선천 면역 방어기능을 수행한다 (Schroder K, Tschopp J, Cell 140:821-832(2010); Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunex, Nat Immunol 13:325-332(2012)). 바람직하게는, 상기 인플라마솜은 NLRP3 인플라마솜일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0011] 본 발명에서 NLRP3 인플라마솜은 과도하게 활성 되는 경우에는 인플라마솜 매개 염증성 질환의 발병을 유도 및/또는 촉진할 수 있다(Henao-Mejia J, Elinav Em Thaiss CA, Flavell RA(2014) Inflammasomes and metabolic disease. Annu Rev Physiol 76:57-78; Wen H, TingJP, eil LA 2012) A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases-did Warburg miss inflammation Nat Immunol 13:352-357.). 인플라마솜 매개 염증성 질환이란, 인플라마솜이 비 정상적으로 과도하게 활성화된 경우 발생하는 이상질환으로, 바람직하게는 자가 염증성 질환 또는 신경 염증성 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명에서 자가 염증성 질환은 머클-웰스 증후군(Muckle-Wells syndrome; MWS), LADA (성인형 지연성 자가면역 당뇨병), 가족성 한랭 자가 염증성 증후군 (FCAS), 크리오피린-관련 주기성 증후군 (CAPS), 신생아-발병 다기관 염증성 증후군 (NOMID), 만성 영아 신경 피부 관절 (CINCA) 증후군, 가족성 지중해열 (FMF), 및/또는 전신 발병 소아 특발성 관절염 (SJIA)과 같은 특정 형태의 소아 관절염, 전신 발병 소아 특발성 류마티스 관절염과 같은 특정 형태의 소아 류마티스 관절염, 및/또는 특정 형태의 성인 류마티스 관절염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에서 신경 염증성 질환은 염증 반응에 의해 신경 조직의 손상으로 초래된 질환을 의미하며, 바람직하게는 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 크로이츠펠트야콥병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 미만성 루이소체병, 백색질뇌염, 측두엽간질 및 염증성 척추손상으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이

상의 질병일 수 있고, 더욱 바람직하게는 알츠하이머병일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0014] 상기 알츠하이머병은 미세아교세포(microglia)의 NLRP3 인플라마좀 활성화가 중요한 메커니즘으로 보고되어 있으며, 알츠하이머병의 동물모델에서도 상기 미세아교세포에서 인플라마좀으로 인해 발생하는 사이토카인인 카스파제-1 및 IL-1의 양이 증가된다(Immunol Rev. 2015 May; 265(1):63-74.).
- [0015] 최근 연구에 따르면, MCC950 또는 케톤 메타볼라이트  $\beta$ -하이드록시부티레이트(ketone metabolite  $\beta$ -hydroxybutyrate), 글리벤프라마이드(Glibenclamide)와 같은 NLRP3 인플라마좀 형성을 억제하는 화합물이 자가 염증성 질환인 머클-웰 신드롬 또는 신경 염증성 질환인 알츠하이머 및 CNS 손상 등에서 상기 질환을 경감시키는 과정을 통하여 치료 효과를 발휘한다고 보고되었다(Nature Medicine Volume: 21, Pages:248-255 Year published:(2015) DOI:doi:10.1038/nm.3806, Nature Medicine Volume: 21, Pages:263-269 Year published:(2015) DOI:doi:10.1038/nm.3804). 따라서, 본 발명에 의해 선별된 물질은 NLRP3 인플라마좀 형성을 현저하게 억제함으로써, NLRP3 인플라마좀 연관 질환(NLRP3 inflammasome-mediate inflammatory disease)인 상기 자가 염증성 질환 및 신경 염증성 질환의 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0016] 한편, 본 발명에서, "예방"은 본 발명에 따른 스크리닝 방법으로 선별된 염증 억제 물질을 이용하여 비만 또는 지질 관련 대사성 질환의 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명에서, "치료"는 본 발명에 따른 스크리닝 방법으로 선별된 염증 억제 물질을 이용하여 비만 또는 지질 관련 대사성 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 목적하는 시료는 목적하는 개체에서 분리된 생검, 또는 동물, 바람직하게는 개체로부터 분리된 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 또는 객담 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 환자의 혈액, 혈청 또는 혈장 일 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 혈액, 혈청 또는 혈장으로부터 분리된 단핵구 또는 엑소좀일 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 "BIG1"과 "GBF1"은 ADP-리보실화 인자 구아닌-뉴클레오타이드 교환 인자 (ARFGEF) 계열에 속하는 단백질로, 세포내 소낭 수송에 중요한 역할을 한다. ARFGEF 단백질은 ARF에 결합된 GDP를 GTP로 대체함으로써 ARF의 활성화에 관여한다. 이는 구아닌-뉴클레오타이드 교환 활성을 일으킬 수 있는 Sec7 도메인을 포함한다.
- [0020] 유전체의 증폭은 PCR(Polymerase Chain Reaction)에 의해 수행될 수 있다. PCR은 당업계에서 PCR 반응에 필요한 것으로 공지된 성분들을 포함하는 PCR 반응 혼합액을 이용하거나 상업적으로 이용 가능한 사과를 이용하여 수행될 수 있다. 상기 PCR 반응 혼합액은 사과에서 추출된 유전체 DNA와 본원의 SCAR 프라이머 세트, 적당량의 DNA 증합효소, dNTP, PCR 완충용액 및 물을 포함할 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 또한, mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 또한, 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정 분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명은 BIG1 또는 GBF1 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 물질 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질 수준을 측정하는 물질을 포함하는 염증 억제 스크리닝용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 BIG1 또는 GBF1 유전자는 발현이 억제되는 경우에 염증이 억제된다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 BIG1 또는 GBF1 유전자의 발현이 억제되는 경우에 NLRP3 인플라마좀의 활성이 억제된다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 조성물은 류마티스성 관절염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 및 염증성 척추손상 등을 포함한 많은 만성 신경 염증성 또는 퇴행성 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 것으로 예측하는 것이다.
- [0024] 본 발명은 (a) BIG1 또는 GBF1을 발현하는 세포에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 세포 상에서 BIG1 또는 GBF1의 발현을 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해 상기 BIG1 또는 GBF1의 발현을 억제시키는 물질을 염증 억제 물질로 선별하는 단계를 포함하는, 염증 억제 물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예에서, (d) 후보물질이 처리된 세포에서 비처리군과 비교하여, NLRP3 인플라마좀의 활성이 억제되면 염증 억제 물질로 선별하는 단계를 추가로 포함한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 염증 억제 물



질은 류마티스성 관절염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 및 염증성 척추손상 등을 포함한 많은 만성 신경 염증성 또는 퇴행성 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 세포는 수지상세포(dendritic cell), 자연살해세포(natural killer cell), T 세포(T cell), B 세포 (B cell), 조절 T 세포 (regulatory T cell, Treg cell), 자연 살해 T 세포 (natural killer T cell), 선천성 림프구 세포(Innate lymphoid cell), 대식세포(macrophage), 과립구 (Granulocyte), 키메릭 항원 수용체 발현 T 세포(CAR-T: Chimeric antigen receptor-T cell), 림포카 활성화 살해세포(LAK: Lymphokine-activated killer Cell), 사이토카인 유도성 살해세포(CIK: Cytokine Induced Killer Cell), 섬유아세포(fibroblast), 연골세포(chondrocyte), 활액막 세포(synovial cell), 피부각질세포 (keratinocyte), 지방세포(adipocyte), 조골세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast) 및 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나이다.

[0026] 본 발명은 상기한 염증 억제 스크리닝용 조성물을 포함하는 염증 물질 판별 키트를 제공한다.

[0027] 본 발명은 (a) 목적하는 시료로부터 BIG1 또는 GBF1의 발현을 측정하는 단계; (b) 정상군으로부터 BIG1 또는 GBF1의 발현을 측정하는 단계; (c) (a) 단계의 측정값과 (b) 단계의 측정값을 비교하여, (a) 단계의 측정값이 낮은 경우에, 목적하는 시료가 NLRP3 인플라좀이 억제된 것을 판별하는 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명의 일 구체예에서, NLRP3 인플라좀이 억제된 경우, 목적하는 시료가 류마티스성 관절염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 및 염증성 척추손상 등을 포함한 많은 만성 신경 염증성 또는 퇴행성 질환의 감수성이 낮은 것으로 판단한다.

### 발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 염증 억제제로 결정하는 스크리닝 방법은 상기 염증 억제제를 처리하여 세포 내에서 BIG1 또는 GBF1을 발현을 억제시켜 NLRP3 인플라마좀의 활성화가 억제되어, 류마티스성 관절염, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 및 염증성 척추손상 등을 포함한 많은 만성 신경 염증성 또는 퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 효과를 발휘할 수 있다.

[0030] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 정상 BMDM(Scr) 또는 BIG1(*Arfgef1*)-특이적 shRNA(BIG1)-발현 BMDM 세포에서 LPS (0.25 $\mu$ g/ml, 3h)로 처리 후 ATP (2mM, 30분, 도 1의 A) 또는 명반 결정 (500 $\mu$ g/ml, 6시간, 도 1의 B) 처리한 후의 면역 불룩한 결과이다.

도 2는 ATP(2mM, 30분) 처리 및 LPS (0.25 $\mu$ g/ml, 3 시간)로 처리한 shScr 또는 shBIG1 BMDM의 배양 상등액 중 IL-1 $\beta$ 를 정량한 그래프이다.

도 3은 ATP(2mM, 30분) 처리 및 LPS (0.25 $\mu$ g/ml, 3 시간)로 처리한 shScr 또는 shBIG1 BMDM로부터의 DSS-가교된 펠렛(DSS-pe1) 또는 세포 용해물 (Lys)에 대해 면역 불룩한 결과이다.

도 4는 정상 BMDM(Scr) 또는 GBF1-특이적 shRNA-발현 BMDM에서 LPS(0.25 $\mu$ g/ml, 3h) 및 ATP (2.5mM, 30분) 처리 및 되거나 처리되지 않은 후의 RT-PCR 분석 결과를 나타낸다.

도 5는 배양 상등액(Sup) 또는 세포 용해물(Lys)로 면역 불룩한 결과이다.

도 6의 A는 처리되지 않은 마우스 BMDM(unt) 또는 BFA (2 $\mu$ g/ml, 1시간 또는 3시간)로 처리된 마우스 BMDM 및 항-GM130 항체(적색)로 염색된 마우스 BMDM의 대표적인 면역 형광 이미지이고, 도 6의 B 및 C는 ATP(2mM, 30분) 처리 및 LPS (0.25 $\mu$ g/ml, 3시간)로 처리한 정상 BMDM (Scr) 또는 shBig1 BMDM(B) 또는 NLRP3-GFP-발현 BMDM (C)의 대표적인 면역 형광 이미지이다. DAPI에 있어서, 핵 신호를 파란색으로 표시되었다. 스케일바, 10  $\mu$ m.

도 7 및 도 8은 BIG1 녹다운이 부분적으로 전염증성 사이토카인의 LPS-유발성 mRNA 생산을 손상시킨다는 것을 나타내는 그래프이다.

도 7은 표시된 항체를 사용하여 세포 용해물의 면역 불룩을 나타낸다. 야생형 BMDM 및 BFA (2 $\mu$ g/ml)의 존재 또는 부재 하에서 LPS (0.5  $\mu$ g/ml, 1h 또는 3h)로 처리하지 않거나(unt) 처리하여 면역불룩을 실시하였다. 정상

BMDM(Scr) 또는 BIG1-녹다운된 BMDM을 LPS (0.5 $\mu$ g/ml, 1, 3 또는 6시간)로 처리하였다.

도 8은 정량적 실시간 PCR에 의해 결정된 세포 용해물 중의 IL-1 $\beta$  또는 IL-6 mRNA 수준을 정량한 그래프이다. \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001. n.s. 유의하지 않다.

도 9는 ATP (2mM, 30분) 처리 및 LPS(0.25 $\mu$ g/ml, 3h)로 처리된 BIG1-녹다운(shBIG1) 마우스 BMDM의 면역 형광 이미지이다. BIG1-매개성 소포 수송의 억제제 ATP 유도성 미토콘드리아 공간 재 배열을 억제하지 않는다는 것을 나타낸다. 항-Tom20 (적색) 및 항- $\alpha$ -튜불린 (녹색) 항체로 염색하였다. 스케일바, 10  $\mu$ m.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

### 실시예

### 마우스

Orient Bio (Seoul, Korea)로부터 C57BL/6 마우스를 수득하였다. Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 *Nlrp3*<sup>-/-</sup> 마우스를 수득하여 연세대학교에서 생육시켰다. 마우스는 특정 병원균이 없는 조건하에 생육시켰으며, 9주에서 12주된 수컷 마우스를 실험에 사용하였다. 동물 실험을 위한 프로토콜은 연세대학교 의과대학병원 윤리위원회의 승인을 받았으며 모든 실험은 기관 윤리위원회의 승인된 지침에 따라 수행하였다.

### 시약 및 항체

LPS, ATP, 브레펠딘 A (BFA; brefeldin A), 니제리신, MCC950 및 폴리 dA:dT는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 시판되는 것을 사용하였다. GolgiPlug는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 입수하였다. Ac-YVAD-클로로메틸케톤은 Bachem (Torrance, CA, USA)에서 입수하였다. 명반 결정은 InvivoGen (San Diego, CA, USA)에서, Ciliobrevin D는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서, 항-마우스 카스파제-1과 항-NLRP3 항체는 AdipoGen (San Diego, CA, USA)에서, 항-마우스 IL-1 $\beta$  항체는 R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)에서, 항-ASC 및 항-포스포-ERK 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, 항-I $\kappa$ B, 항-포스포-I $\kappa$ B 및 항-IL-6 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서, 항-BFA-억제된 구아닌-뉴클레오티드-교환 단백질 1(BIG1; brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1) 항체는 Abcam (Cambridge, MA, USA)에서 PE-접합된 항-TLR4 항체는 BioLegend (San Diego, CA, USA)에서 입수하였다.

### 세포 배양

마우스 일차 골수 파생 대식세포(BMDM; bone marrow-derived macrophages)는 C57BL/6 또는 *Nlrp3*<sup>-/-</sup> 마우스의 대퇴부로부터 채취하였다. 불멸의 NLRP3-GFP-발현성 및 NLRP3-재구성된(N1-8) BMDM은 Dr. E.S.에 의해 제공된 것이었다(Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA). 모든 BMDM은 10% FBS 및 항생제가 첨가된 L929-조건화 DMEM에서 유지시켰다. 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs; peripheral blood mononuclear cell)는 밀도구배 원심분리에 의해 혈액으로부터 분리시켰다. CD14<sup>+</sup> 단핵구는 항 CD14 마이크로비드 (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA)를 사용하여 PBMC에서 양성으로 분리시켰다. 연구 프로토콜은 서울 대학교 병원의 기관 검토위원회 (No.1403-049-564)에 의해 승인된 것이다. *Arfgef1*에 의해 코딩된 BIG1의 녹다운을 위해, 비표적화 또는 *Arfgef1*-특이적 쏿-헤어핀(sh) RNA (Sigma-Aldrich)를 함유한 렌티바이러스 입자를 마우스 BMDM에 감염시키는 데 사용하였다. shRNA를 안정적으로 발현하는 세포를 푸로마이신 선별로 클로닝하였다.

### 면역 블롯 분석



[0046] 세포를 20mM HEPES (pH 7.5), 0.5% Nonidet P-40, 50mM KCl, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA 및 프로테아제 억제제를 함유하는 완충액에서 용해시켰다. 수용성 용해물을 SDS-PAGE로 분석한 후 PVDF 막으로 옮겼다. 일부 실험에서는 세포 배양 상등액을 메탄올/클로로포름에 의해 침전시킨 다음 면역 블롯을 실시하였다.

#### [0048] mRNA의 정량화

[0049] mRNA 생산을 측정하기 위해 TRIzol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 분리하고 PrimeScript RT 마스터 믹스 (Takara, Tokyo, Japan)를 사용하여 역전사시켰다. SYBR Premix Ex Taq (Takara)를 이용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. 프라이머는 다음과 같다: 5'-GCC CAT CCT CTG TGA CTC AT-3' 및 5'-AGG CCA CAG GTA TTT TGT CG-3'(마우스 *II-1β*); 5'-AGT TGC CTT GGG ACT GA-3' 및 5'-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3'(마우스 *II-6*); 5'-CGC GGT TCT ATT TTG TTG GT-3' 및 5'-AGT CGG CAT CGT TTA TGG TC-3'(마우스 *Rn18s*).

#### [0051] 인플라마솜 활성화 분석

[0052] NLRP3 인플라마솜의 활성화를 자극하기 위해 BMDM을 LPS(0.25μg/ml, 3시간)로 처리한 다음, ATP(2mM, 40분) 또는 니제리신(5μM, 40분)으로 처리하였다. 흡색 중 2에서의 결핍(AIM2; absent in melanoma 2) 인플라마솜 활성화를 유도하기 위해 폴리 dA:dT (1μg/ml)를 6시간 동안 BMDM으로 형질감염시켰다. NLR 패밀리를, CARD 도메인 함유 4 (NLRC4; NLR family, CARD domain-containing 4) 인플라마솜 활성화를 유도하기 위해 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1을 사용하여 이전에 설명한 바와 같이 BMDM을 감염시켰다. 인플라마솜의 활성화는 면역블롯에서 배양 상등액으로부터 활성 카스파제-1 p20 및 활성 IL-1β의 존재로 측정하고, Quantikine ELISA 키트(R&D Systems)를 이용한 세포의 IL-1β 정량에 의해 결정하였다.

#### [0054] NLRP3 인플라마솜 조립 분석

[0055] NLRP3의 올리고머화를 측정하기 위해, NLRP3-GFP의 반점 유사 응집체를 NLRP3-GFP-발현 BMDM에서 다초점형광현미경으로 평가하였다. ASC 올리고머화를 결정하기 위해, 디숙신이미딜 수베레이트(DSS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)-매개성 크로스-결합 분석을 수행하였다. ASC와 NLRP3의 분자 상호 작용을 시각화하기 위해, 제조사의 프로토콜에 따라 항-ASC 또는 항-NLRP3 항체를 사용하여 Duolink *in situ* red starter 키트(Sigma-Aldrich)를 사용하여 근접-연결(proximity-ligation) 분석을 수행하였다. Image J 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 상대적 근접 연결 신호(PL 신호/DAPI 신호)를 정량하고 처리되지 않은 대조군과 비교하여 상대적 배수 변화로 계산하였다.

#### [0057] 면역 형광 분석법

[0058] 세포를 12-웰 플레이트에서 커버 슬립 상에서 성장시키고, 적절한 처리 후에 세포를 4% 파라포름알데히드로 30분 동안 고정시키고, 0.2% 트리트론 X-100으로 15분 동안 투과시켰다. 4% BSA로 1시간 블로킹한 후, 세포를 1차 항체와 함께 1시간 동안 배양한 후, PBS로 세척하고 Alexa 488- 또는 FITC-접합 항-마우스 또는 항-토끼 IgG 항체 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)에서 30분간 배양하였다. 다초점형광현미경 (LSM 700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 세포를 관찰하였다.

#### [0060] 세포 내 칼륨의 정량법

[0061] 세포내 칼륨의 수준을 측정하기 위해 OPTIMA 8300 ICP 분광기 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 유도 결합 플라즈마-광학 방출 분광법(inductively coupled plasma-optical emission spectrometry)을 수행하였다. 세포를 10% HNO<sub>3</sub>로 용해시키고 세포내 칼륨 수준을 측정하였다.

#### [0063] TLR4 내재화 분석

- [0064] 적절한 처리 후, 세포를 5% FBS를 함유하는 PBS로 세척하고, 실온에서 30분 동안 항-TLR4-PE 항체( $0.1\mu\text{g/ml}$ )와 함께 인큐베이션한 다음, 유동세포계측법 (FACSverse, BD Biosciences)으로 분석하였다.
- [0066] **통계 분석**
- [0067] 모든 값은 개별 시료의 평균±표준 오차 (SE)로 표시하였다. 데이터는 일방 분산 분석 (ANOVA), Dunnett 또는 Bonferroni post-hoc 테스트, 또는 Bonferroni post-hoc 테스트와 함께 양방향 ANOVA를 사용하여 정상 그룹 및 BIG1-녹다운된 그룹을 비교하여 분석하였다. 통계적으로 유의 수준은  $p \leq 0.05$ 로 설정하였다. GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하여 분석하였다.
- [0069] **BIG1 또는 GBF1 결핍은 NLRP3 인플라마솜의 활성화를 억제한다.**
- [0070] BFA(brefeldin A) 처리는 대식세포에서 NLRP3 인플라마솜 조립 및 활성화를 명백하게 감소시켰다. BFA는 *Arfgef1*에 의해 암호화된 BIG1(brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1)과 같은 ARFGEF(ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factors)를 비활성화시킴으로써 골지막으로부터 소포 형성을 억제하였다. 본 발명자들은 손상된 BIG1 발현이 NLRP3 인플라마솜 활성화에 영향을 미치는지 조사하였다. *Arfgef1*-표적화된 shRNA를 발현하는 렌티바이러스(lentiviral) 입자를 감염시켜 BIG1-녹다운된 BMDM(bone marrow-derived macrophages)를 생성하였다. 이들 BMDM는 LPS/ATP로 자극 후 배양 상등액 상에서 대조군으로 정상 BMDM에 비해 활성 카스파제-1 및 IL-1 $\beta$  수준이 현저히 감소한 것을 확인하였다 (도 1의 A 및 도 2). 일관되게, LPS/명반-자극된 카스파제-1 및 IL-1 $\beta$ 의 활성화는 BIG1-녹다운된 BMDM에서 명백하게 억제된 것을 확인하였다 (도 1의 B). 또한, BIG1의 결핍으로 인해, LPS/ATP 자극에 의해 유발된 ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain) 올리고머화가 현저히 억제되는 것을 확인하였다 (도 3). 이러한 결과는 BFA-민감성 BIG1이 LPS 및 NLRP3 작용제에 의한 처리에 반응하여 BMDM에서 NLRP3 인플라마솜 경로의 활성화에 기여할 수 있음을 나타낸다.
- [0071] ARFGEF BIG1은 트랜스-골지 영역에서 작용하기 때문에, 본 발명자들은 NLRP3 인플라마솜 신호 전달 상에서 시스-골지-위치된 ARFGEF GBF1(Golgi-specific BFA-resistance guanine nucleotide exchange factor 1)의 영향을 추가로 실험하였다. shRNA 전달에 의해 GBF1-녹다운된 BMDM을 생성하였다 (도 4). GBF1-녹다운된 BMDM은 LPS/ATP 자극에 의해 상당히 손상된 카스파제-1 활성화 및 손상된 IL-1 $\beta$  분비를 확인하였다 (도 5). GBF1-매개성 소포체(ER)-골지 소포 수송이 NLRP3 인플라마솜의 활성화에 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.
- [0073] **BFA는 처리하지만, BIG1은 결핍시켰을 경우, 골지 조직화를 파괴한다.**
- [0074] 장기간 BFA를 처리하면 골지 구조를 파괴하기 때문에, 본 발명자들은 BFA-처리된 대식세포 또는 BIG1-녹다운된 대식세포에서 NLRP3 인플라마솜 신호 전달 장애가 골지 구조를 손상시키는지 여부에 대한 실험을 실시하였다. BFA 처리가 시간 의존적으로 골지 조직화에 손상을 일으킴을 확인하였다 (도 6의 A). 한편, BIG1-녹다운된 BMDM에서는 정상상태에서 온전한 골지 구조를 확인하였다 (도 6의 B). 적어도 BIG1-녹다운된 대식세포의 경우에 골지 파괴는 주로 약화된 NLRP3 인플라마솜의 활성화에 의한 것이 아님을 확인하였다. 골지 주위에 NLRP3 얼룩 같은 응집체가 형성되는지 여부를 확인하였다. 한편, LPS/ATP 자극에 의해 형성된 NLRP3 응집체는 골지체와 함께 국소화되지 않으며 (도 6의 C), 골지체가 NLRP3 인플라마솜의 조립을 위한 플랫폼으로 작용하지 않을 수 있음을 시사하였다.
- [0076] **소포 수송의 억제는 LPS-촉진된 I $\kappa$ B 인산화 및 후속 전사를 손상시킨다.**
- [0077] 일반적으로 NLRP3 인플라마솜 활성화는 두 가지 신호에 의해 달성될 수 있다. 프라이밍을 위한 신호 1 및 활성화를 위한 신호 2이다. BFA 처리 또는 BIG1 녹다운-매개성 NLRP3 인플라마솜 활성화의 억제와 관련하여, 신호 1 및 신호 2로 유도된 사건에서 BFA의 잠재적 역할을 평가하였다. 본 발명자들은 먼저 pro-IL-1 $\beta$ 를 포함한 인플라마솜 성분의 전사에 대한 주요 프라이밍인 NF- $\kappa$ B 경로의 신호 1-관련된 LPS-유도성 활성화를 확인하였다. BPS 처리가 LPS 자극 1시간 후 I $\kappa$ B 인산화를 변화시키지 못했지만 LPS 처리 3시간 후 I $\kappa$ B 인산화를 억제한 반면, LPS는 BMDM에서 I $\kappa$ B의 강력한 인산화를 발생시켰다 (도 7의 A). 마찬가지로, BIG1 결핍은 LPS 처리 후 3

시간에서 I $\kappa$ B 인산화를 약간 손상시켰지만 1시간 시점에서는 그렇지 않았다 (도 7의 B).

[0078] 우리는 LPS 프라이밍 후 pro-IL-1 $\beta$ 와 IL-6를 포함하여 NF- $\kappa$ B 표적 유전자의 mRNA 수준을 측정하였다. BIG1-녹다운된 대식세포에서는 LPS 프라이밍 후 3시간 또는 6시간 후에 IL-1 $\beta$  및 IL-6 mRNA의 수준이 상당히 감소함을 보여주었다 (도 8의 A 및 B).

[0079] LPS는 TLR4 내재화(internalization)를 유도하여 하류의 세포내 신호 전달 경로를 조절할 수 있다. 따라서 BIG1의 억제제 TLR4의 내재화를 차단하여 신호 전달이 악화되는지 여부를 조사하였다. 결과적으로, LPS 프라이밍은 시간-의존적 TLR4 내재화를 초래하였고, 이는 TLR4가 LPS 참여 시엔 내포작용됨을 나타낸다. 그러나 BIG1의 억제제 처리는 LPS-유도성 TLR4 내재화에 영향을 미치지 않았다. 이러한 관찰은 골지체 주위의 소포 수송이 NF- $\kappa$ B 매개 경로를 포함하는 LPS-유도성 프라이밍 사건에 관련될 수 있지만 TLR4 내재화는 포함하지 않을 수 있음을 나타낸다.

[0081] **소포 수송의 억제는 ATP 유도 미토콘드리아 공간 배열을 억제하지 않는다.**

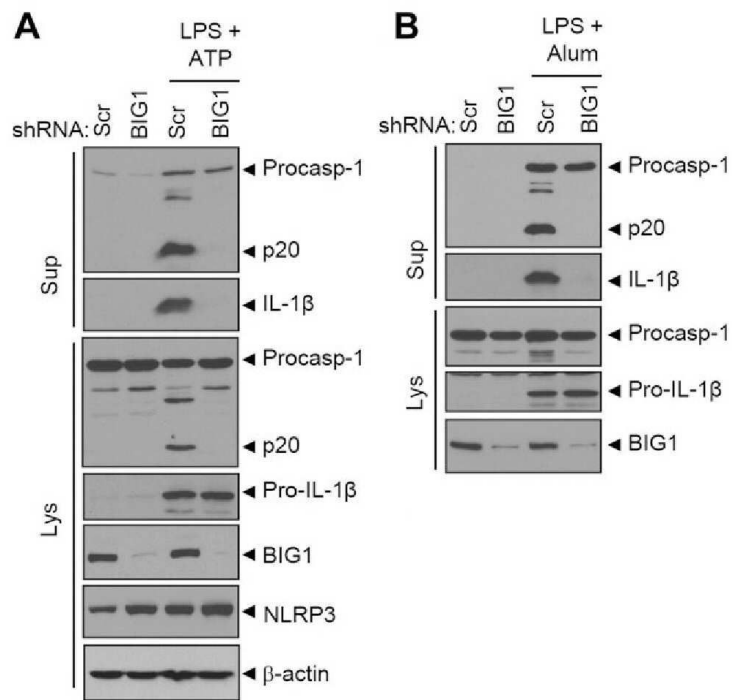
[0082] 최근의 연구에 따르면 ER로의 미토콘드리아 수송에 의해 형성되어, 미토콘드리아와 관련된 ER 막은 NLRP3 인플라마좀의 조립을 위한 플랫폼으로 결정적인 역할을 한다. 따라서, 본 발명자들은 NLRP3 활성화 조건 하에서 손상된 골지 소포 수송이 BMDM에서 미토콘드리아의 공간적 재배치에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. LPS/ATP 자극은 *Nlrp3*-결핍된 대식세포에서조차 핵 주위로 명확한 미토콘드리아 재배치 움직임을 일으켰다. ATP 처리만으로 이 미토콘드리아 재배치 움직임을 촉진시키기에 충분하였다. 미토콘드리아의 재배치는 디네인 억제제 실리오브레빈 D(ciliobrevin D) 처리에 의해 차단되어, ATP 자극으로 미토콘드리아가 미세 소관을 따라 역행으로 이동하는 것으로 나타났다. 한편, BFA 처리는 LPS/ATP 자극 후에 핵 영역으로의 미토콘드리아 움직임에 아무런 영향을 미치지 않았다. 이 발견과 일치하여, ATP-촉진 미토콘드리아 공간 조직은 또한 BIG1-녹다운형 BMDM에서 명백하였다 (도 9). 이러한 결과는 BIG1이 녹다운되는 결과로 인해 손상된 골지 소포 수송이 ATP 유도 미토콘드리아 움직임에 영향을 미치지 않았음을 나타낸다.

[0083] 상기 결과를 통하여, BIG1 또는 GBF1을 억제하는 물질을 처리하면 BIG1 또는 GBF1 결핍에 의해 ER-골지 소포 수송이 억제되며, 대식세포에서 자가 염증성 질환 또는 신경 염증성 질환을 유도하는 NLRP3 인플라마좀 활성을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있다.

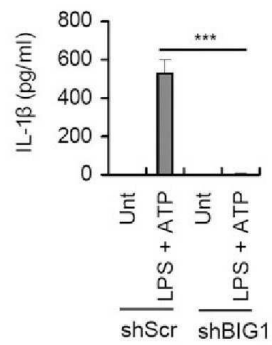
[0084] 이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

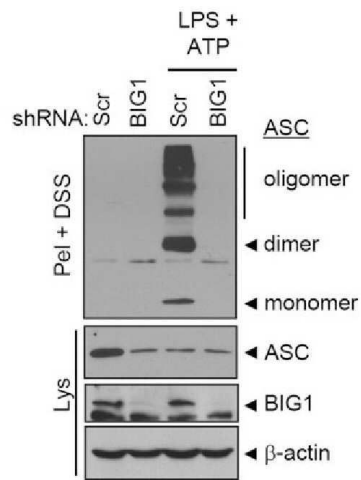
도면1



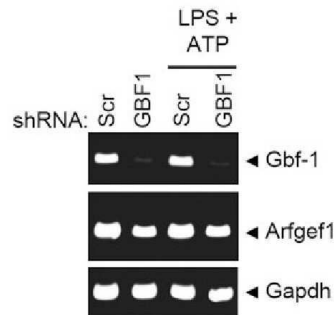
도면2



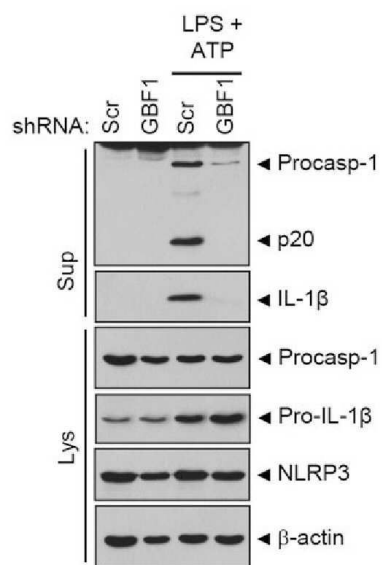
도면3



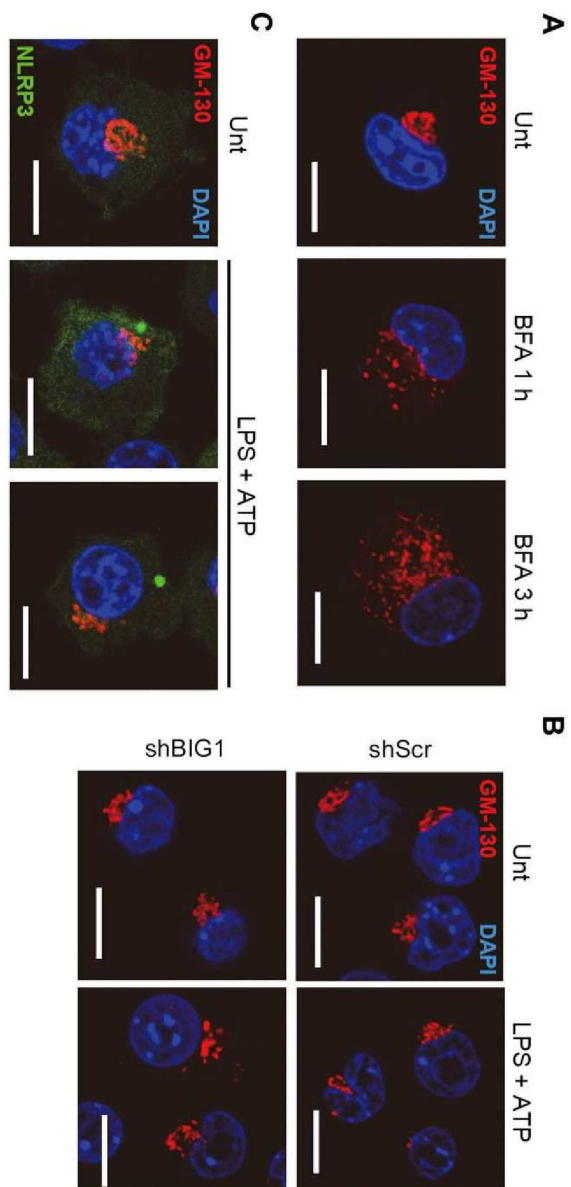
도면4



도면5

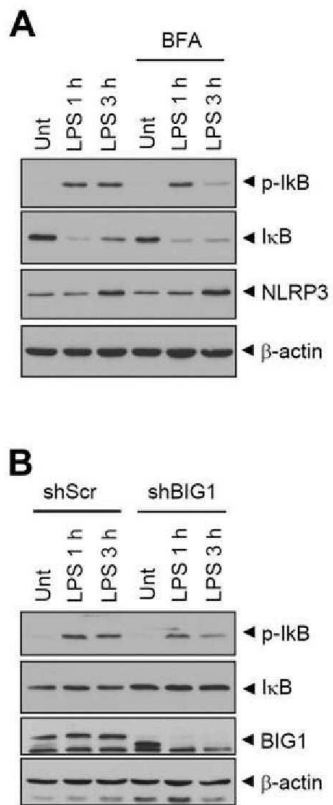


도면6

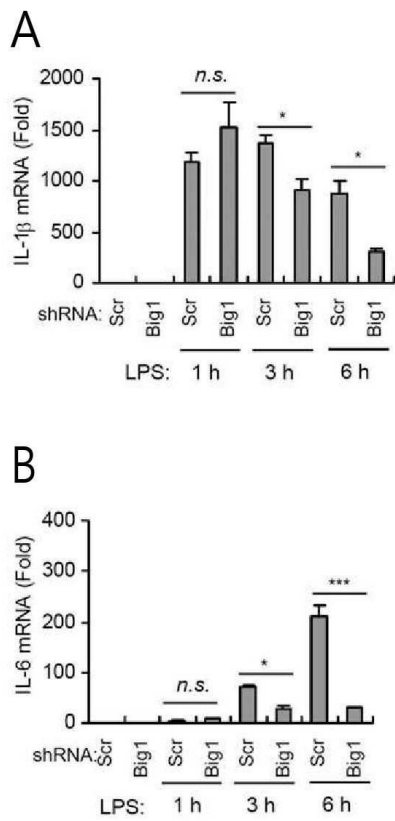




도면7



도면8



도면9

