

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0121954
(43) 공개일자 2020년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/45 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)
A61K 38/20 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/45 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0044440

(22) 출원일자 2019년04월16일

심사청구일자 2019년04월16일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

천재희

서울특별시 종로구 사직로8길 20, 101동 803호 (내수동, 경희궁 파크텔리스)

김승원

서울특별시 용산구 대사관로30가길 10-7(한남동)

김재현

경기도 고양시 일산서구 대산로 161 문촌마을5단지아파트 508-903

(74) 대리인

이재영

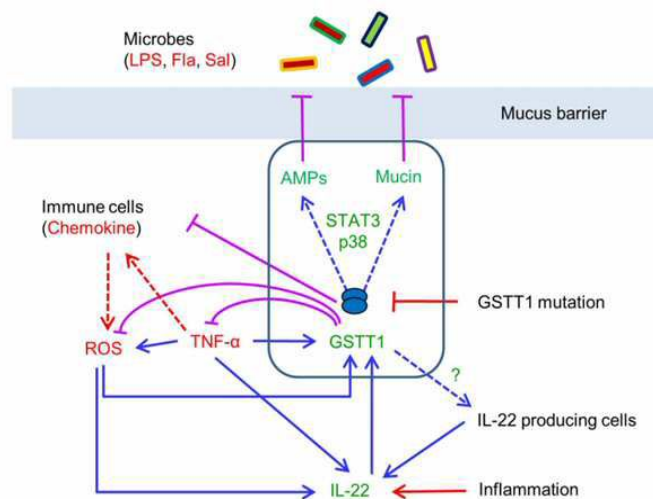
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 GSTT1(glutathione S-transferases theta 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로서, STAT3와 p38/JNK의 인산화를 통해 점막 장벽의 면역반응을 유도함으로써, 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다. 나아가, 상기 세포신호전달을 조절하는 GSTT1 단백질의 이량체가 낮은 수준으로 존재하는지 여부를 측정함으로써 염증성 장질환을 매우 효과적으로 예측할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61K 38/20 (2013.01)
A61P 1/04 (2018.01)
A61P 37/02 (2018.01)
C12N 9/1088 (2013.01)
C12Y 205/01018 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2017R1A1A1A05001011
부처명	한국연구재단
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자지원사업
연구과제명	유전자의 상호작용을 통한 염증성 장질환 모델의 구축 및 기전연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2017.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2017R1A2B4001848
부처명	미래창조과학부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구
연구과제명	장내 미생물 대사체에 의한 항상성 유지 및 미생물 제어를 통한 염증성 장질환의 병
인론 및 새로운 치료표적 연구	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

GSTT1(glutathione S-transferases theta 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 IL-22 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 더 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병(Crohn's disease), 장관형 베체트병, 출혈성 직장 궤양 및 회장낭염(pouchitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 GSTT1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것인, 약학 조성물.

청구항 5

GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 식품 조성물은 IL-22 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 더 포함하는 것인, 식품 조성물.

청구항 7

염증성 장질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및

상기 생물학적 시료에서 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 염증성 장질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 후보물질의 처리 후에 상기 생물학적 시료에서 측정된 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이, 상기 염증성 장질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준에 비하여 증가된 경우, 상기 후보물질을 염증성 장질환의 치료제로 선별하는 단계를 더 포함하는, 염증성 장질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 9

GSTT1(glutathione S-transferases theta 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 술잔세포(Goblet cell)의 증식 또는 분화 촉진용 조성물.

청구항 10

GSTT1 단백질의 이량체가 존재하는 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 염증성 장질환의 진단용 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 단백질의 이량체가 존재하는 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것인, 염증성 장질환의 진단용 조성물.

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 장관형 베체트병, 출혈성 직장 궤양 및 회장낭염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 염증성 장질환의 진단용 조성물.

청구항 13

제 10항 내지 제 12항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 염증성 장질환의 예후 예측용 키트.

청구항 14

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서,

GSTT1 단백질의 이량체가 존재하는 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 염증성 장질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 GSTT1 단백질의 이량체가 존재하는 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우, 상기 목적하는 개체가 염증성 장질환일 것으로 예측하는 것인, 염증성 장질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서,

상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계는 단백질의 비-환원 조건에서 수행되는 것인, 염증성 장질환을 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GSTT1(glutathione S-transferases theta 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease; IBD)은 위장관 내에 만성적인 염증을 유발하는 질환으로서, 그 증상으로는 복통, 발열, 설사, 하혈 등을 수반한다. 대체로, 궤양성 대장염(UC: ulcerative colitis)과 크론병(CD: Crohn's disease)의 2가지 형태로 염증성 장질환이 분류될 수 있다. 궤양성 대장염은 문드러짐이나 궤양을 형성하는 대장의 원인 불명의 확산성 비특이성 염증(diffuse nonspecific inflammation)의 일종으로서, 혈성 설사를 비롯하여 다양한 전신 증상을 수반한다. 또한, 크론병은 구강에서 항문까지 전 소화관을 비연속성으로 점막에서 장관 전 층에 궤양, 섬유화, 협착과 병변이 진전되는 원인불명의 육아종성 염증성 병변으로, 복통, 만성 설사, 발열, 영양장애 등의 전신 증상을 수반한다. 이와 같은 염증성 장질환의 발생율은 종래에는 서양인에게 높다고 알려져 있었으나, 최근 식습관 등 생활 습관의 변화 등으로 인하여 우리나라를 비롯한 아시아권 국가에

서도 환자수가 급증하고 있는 추세이다.

[0003] 현재까지 상기 염증성 장질환의 발생 원인이나 병태생리에 대해서는 아직까지 명확하게 알려진 바 없으나, 유전적 요인, 장내 세균 또는 음식물 등의 환경적인 요인, 및 면역학적 요인 등이 복합적으로 관여할 것으로 추측되고 있다. 이러한 발생 원인 중 하나로서, 장 내에서 발생하는 산화스트레스와 항산화 방어 기작 사이의 불균형을 들 수 있다. 구체적으로, 산화제(Oxidant) 및 자유 라디칼의 생산은 염증 유전자의 발현을 증대하는 신호 기작을 활성화시킬 뿐만 아니라, 세포의 분열, 분화 및 사멸을 조절하는 유전자의 발현을 촉진시킬 수 있다. 그러나, 이러한 산화제 및 자유 라디칼이 과잉으로 생산되는 경우에는 장 상피세포(Intestinal epithelial cells; IEC)에서 염증, 세포 손상 및 세포 사멸이 유도될 수 있을 뿐만 아니라, 점막 장벽의 기능 장애까지 유도됨으로써 위장관 내에 만성적인 염증이 유발될 수 있을 것으로 추측하고 있다.

[0004] 이러한 상황에도 불구하고 염증성 장질환의 경우에는 근본적인 치료법이 확립되어 있지 않아 완전한 치료를 목표로 하는 것이 아닌 증상의 진행을 지연 및 완화시키는데 불과한 실정이다. 나아가 현재 사용되고 있는 치료제인 설파살라진은 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통, 간장해, 백혈구 감소, 이상 적혈구, 단백뇨, 설사 등의 부작용이 존재하며, 프레드니솔론의 경우 위궤양이나 장기 사용에 의한 대퇴 골두 괴사 등의 부작용이 존재하고, 인플릭시맵(Infliximab)는 1998년 미국 FDA로부터 크론병 치료제로 허가를 받은 후 크론병 환자들을 치료하기 위해 사용되었으나, 범혈구 감소, 약물유발 낭창, B형 간염/결핵 재발성 등의 부작용이 존재한다.

[0005] 이에, 부작용이 존재하지 않거나, 적으면서 염증성 장질환의 치료가 가능한 의약품의 개발에 대한 연구가 여전히 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 GSTT1(glutathione S-transferases theta 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효 성분으로 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 염증성 장질환의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 술잔세포(Goblet cell)의 증식 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 GSTT1 단백질의 이량체가 존재하는 수준을 측정하는 체제를 포함하는 염증성 장질환의 진단용 조성물과, 이를 포함하는 키트 및 이를 사용하는 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 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

[0011] 본 발명의 일 구현 예에서는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 상기 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있다.

[0013] 본 발명의 상기 조성물은 GSTT1(glutathione S-transferases theta 1) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 포함한다.

[0014] 본 발명의 상기 GSTT1 단백질은 글루타티온 S- 트랜스퍼라아제(GST) 중 하나로서, GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 투여하는 경우에는 GSTT1 단백질이 존재하는 수준, 바람직하게는 GSTT1 단백질이 이량체로 존재하는 수준을 현저하게 증가시킴으로써 그에 따라 발생하는 STAT3와 p38/JNK의 인산화를 통해 장 점막을 보호하는 기능을 갖는 술잔세포(Goblet cell)의 증식을 촉진하여 점막 장벽의 면역반응을 유도함으로써 염증성 장질환의 치료 효과가 발휘되도록 할 수 있다.

[0015] 본 발명의 상기 조성물은 IL-22 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 더 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 상기 IL-22 단백질은 술잔세포(Goblet cell)의 분화와 창상의 치유를 유도하는 사이토카인이다. 본 발명의 상기 IL-22 단백질이 GSTT1 단백질의 발현을 증가시킴으로써 점막 장벽의 면역반응을 유도하기 때문에,

본 발명의 목적상 IL-22 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자가 더 포함되는 경우에는 상기 조성물을 투여함으로써 예상되는 점막 장벽의 면역반응에 시너지 효과를 유도할 수 있다.

- [0017] 본 발명의 상기 GSTT1 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, GSTT1 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 상기 IL-22 단백질은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, IL-22 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 상기 GSTT1 단백질 또는 IL-22 단백질은 공지의 단백질 합성법 또는 형질 전환된 숙주세포를 배양함으로써 제조될 수 있다. 상기 단백질을 형질 전환된 숙주세포를 이용하는 경우, 본 발명의 단백질을 암호화하는 염기 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질 전환체를 제조한 뒤, 당업계에서 공지된 임의의 방법을 적절하게 사용하여 상기 형질 전환체를 배양할 수 있다. 이렇게 배양된 상기 형질 전환체로부터 단백질은 당업계에서 공지된 원심분리, 크로마토그래피, 전기영동 등의 방법을 통해 분리 및 정제함으로써 얻을 수 있다.
- [0020] 본 발명의 상기 아미노산 서열은 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 또는 이들 조합에 의해 용이하게 변형될 수 있다. 따라서, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 높은 상동성을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드, 예를 들면 상동성이 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상인 경우도 항균제 내성이 극복될 수 있는 기능을 유지하는 한 본 발명의 상기 단백질에 모두 포함된다.
- [0021] 본 발명의 상기 상동성이란, 야생형(Wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 아미노산 서열과 상기와 같은 서열 상동성 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 상동성은 두 서열을 육안으로 비교하여 결정할 수도 있으나, 비교대상이 되는 서열을 나란히 배열하여 상동성 정도를 분석해 주는 생물정보 알고리즘(bioinformatic algorithm)을 사용하여 결정할 수 있다. 상기 두 개의 아미노산 서열 사이의 상동성은 백분율로 표시될 수 있다. 유용한 자동화된 알고리즘은 Wisconsin Genetics Software Package(Genetics Computer Group, Madison, W, USA)의 GAP, BESTFIT, FASTA와 TFasta 컴퓨터 소프트웨어 모듈에서 이용가능 하다. 상기 모듈에서 자동화된 배열 알고리즘은 Needleman & Wunsch와 Pearson & Lipman과 Smith & Waterman 서열 배열 알고리즘을 포함한다. 다른 유용한 배열에 대한 알고리즘과 상동성 결정은 FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST와 CLUSTAL W를 포함하는 소프트웨어에서 자동화될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 상기 GSTT1 단백질을 암호화하는 유전자 또는 IL-22 단백질을 암호화하는 유전자 자체로서 포함될 수 있고, 바람직하게는 재조합 발현 벡터에 포함되는 형태로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터는 목적하는 숙주세포에서 목적하는 단백질 또는 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 개시 코돈, 종결 코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(In frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성 프로모터일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터는 프로모터와 본 발명의 상기 GSTT1 유전자를 이루는 염기서열 즉, 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수 있다. 본 발명의 상기 '작동 가능하게 연결(Operably linked)'이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(Functional linkage)되어 있는 상태를 의미다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결되어 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 발현 벡터와의 작동 가능하게 연결되는 것은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등이 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 상기 재조합 발현 벡터의 백본(Backbone)으로 사용할 수 있는 벡터는 본 발명의 상기 단백질을 생산할 수 있는 한 특별히 제한되지는 않으나, 예를 들면, 플라스미드 DNA, 파아지 DNA, 상업적으로 개발된 플라스미드(pGEM[®] T 벡터, pET22b, pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pGEX-4T-1, pET, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt 10, AAAAA λgt 11, λ

ZAP 등), 동물 바이러스 벡터(레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 백신시아 바이러스(Vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(Baculovirus) 등)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병(Crohn's disease), 장관형 베체트병, 출혈성 직장 궤양 및 회장낭염(pouchitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 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.

[0029] 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, 활탁제, 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, 윤활제, 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 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

[0030] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 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, 향 응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 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.

[0032] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 상기 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 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.

[0034] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0035] 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.

[0036] 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 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오

시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 동일 수 있다.

- [0037] 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 등이 더 포함될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 식품 조성물에 포함되는 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 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.
- [0040] 본 발명의 다른 구현 예에서는 염증성 장질환의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 상기 스크리닝하는 방법은 염증성 장질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 목적하는 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 생물학적 시료에서 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0042] 본 발명의 상기 스크리닝하는 방법은 상기 후보물질의 처리 후에 상기 생물학적 시료에서 측정된 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이, 상기 염증성 장질환 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준에 비하여 증가된 경우, 상기 후보물질을 염증성 장질환의 치료제로 선별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 상기 스크리닝하는 방법에서, GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자 및 염증성 장질환에 대한 기제는 상기 약학; 및 식품 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0044] 본 발명의 상기 생물학적 시료는 염증성 장질환 환자이거나, 질환이 의심되는 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) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 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, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 상기 후보물질은 염증성 장질환을 극복하기 위한 활성, 즉 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 염증성 장질환이 존재하지 않는 정상인에서의 발현 수준과 동등, 또는 유사한 정도의 수준으로 증가시킬 수 있는 활성이 존재하는지 여부에 대해 테스트하기 위한 약제를 의미하며, 단백질, 올리고 펩타이드, 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오티드 및 광범위한 화합물 등의 임의의 분자를 포함한다. 이러한 후보물질은 천연물질뿐만 아니라, 합성 물질도 모두 포함하는 것일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 상기 GSTT1 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 생물학적 시료에 포함된 측정의 대상이 되는 단백질의 발현 수준을 확인하기 위한 제제를 의미한다. 구체적으로, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머일 수 있다. 구체적으로, 상기 제제는 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay), ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(Immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(Immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(Immunochromatography), FACS(Fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법에 사용되는 항체 또는 앵타머를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 상기 "항체"는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 분자를 의미한다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을

갖는 것이라면, 항체의 일부인 경우라도 포함될 수 있고, 모든 종류의 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 또한, 인간화 항체 등의 특수 항체가 포함될 수 있고, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 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, Fv 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 상기 "엡타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 엡타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 엡타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 상기 엡타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있다.

[0049] 본 발명의 상기 항체는 *GSTT1* 유전자의 염기 서열, 바람직하게 서열번호 2로 표시되는 염기 서열로 이루어진 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질(항원)을 얻은 뒤에 통상적인 방법에 의해 제작될 수 있고, 상기 엡타머는 각각의 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지된 방법에 따라 쉽게 제작될 수 있다.

[0050] 본 발명의 상기 *GSTT1* 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 생물학적 시료에 포함된 측정의 대상이 되는 유전자의 발현 수준을 확인하기 위하여, 상기 측정 대상이 되는 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 측정하는 방법에 사용될 수 있는 제제를 의미한다. 구체적으로, 상기 제제는 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯 분석(Northern blot assay), DNA 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 측정 대상이 되는 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 쌍 또는 프로브를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명의 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 주형 가닥(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 기능을 하는 짧은 염기 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충 용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.

[0052] 본 발명의 상기 "프로브"는 상기 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하고, 이와 같은 프로브는 특정 mRNA의 존재 유무, 발현되는 수준(발현량)을 확인할 수 있도록 라벨링되어 있을 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명의 상기 프라이머 또는 프로브는 *GSTT1* 유전자의 염기 서열, 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상이 지식을 가진 자가 공지된 방법에 의해 쉽게 제작될 수 있다.

[0055] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 술잔세포(Goblet cell)의 증식 촉진용 조성물을 제공한다.

[0056] 본 발명의 상기 증식 촉진용 조성물은 *GSTT1* 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명의 상기 증식 촉진용 조성물은 IL-22 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자를 더 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 상기 조성물은 STAT3와 p38/JNK의 인산화를 통해 장 점막 보호 기능을 갖는 술잔세포의 증식을 촉진 시킴으로써 점막 장벽의 면역반응을 유도할 수 있고, 이를 통해 궁극적으로 술잔세포의 감소로 인해 유발될 수 있는 질환, 예를 들면 염증성 장질환 등의 예방 또는 치료에 적용할 수 있다.

[0059] 본 발명의 상기 "증식"이란, 세포가 같은 성질을 유지하면서 분열하여 세포의 개수가 증가되는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 증식은 장 점막에 존재하는 술잔세포의 개수가 증가되는 것일 수 있다.

[0060] 본 발명의 상기 증식 촉진용 조성물에서 *GSTT1* 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 염증성 장질환, *GSTT1* 단백질의 이량체, 존재하는 수준을 측정하는 제제에 대한 기재는 상기 약학; 및 식품 조성물 및 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

- [0062] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 염증성 장질환의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0063] 본 발명의 상기 진단용 조성물은 GSTT1 단백질의 이량체가 존재하는 수준을 측정하는 제제를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 상기 GSTT1 단백질의 이량체가 존재하는 수준을 측정하는 제제는 이량체로 존재하는 GSTT1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.
- [0065] 본 발명의 상기 진단용 조성물은 염증성 장질환 환자에서 정상 대조군에 비하여 상기 GSTT1 단백질의 이량체가 낮은 수준으로 존재하는지 여부를 확인함으로써, 염증성 장질환을 진단할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 상기 GSTT1 단백질의 이량체란, 두개의 GSTT1 단백질 단량체에 존재하는 아미노산의 잔기가 결합되어 있는 형태로서, 세포 내 산화자극이 존재하는 경우 상기 GSTT1 단백질은 p38/MAPK 신호전달을 촉진하여 산화 스트레스를 완화시킬 수 있다. 본 발명의 상기 GSTT1 단백질 이량체는 염증성 장질환이 발생되지 않는 정상인에서는 높은 수준으로 존재하여 산화 스트레스에 대한 자극을 완화시키는 반면, 염증성 장질환 환자에서는 *GSTT1* 유전자 돌연변이, 예를 들면 결손 돌연변이가 발생되어 GSTT1 단백질이 이량체를 이루지 못하여 산화 스트레스에 대한 자극을 충분히 완화시키지 못함으로써 증상을 유발 또는 악화시키는 것일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 상기 진단용 조성물에서, GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자 및 염증성 장질환에 대한 기제는 상기 약학; 및 식품 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0068] 본 발명의 상기 "항체"는 이량체로 존재하는 GSTT1 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 분자를 의미하며, 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않지만 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이라면, 항체의 일부인 경우라도 포함될 수 있고, 모든 종류의 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 또한, 인간화 항체 등의 특수 항체가 포함될 수 있고, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 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, Fv 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명의 상기 "앵타머"는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 이량체로 존재하는 GSTT1 단백질에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 상기 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있다.
- [0071] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 본 발명의 상기 조성물을 포함하는 염증성 장질환의 진단용 키트를 제공한다.
- [0072] 본 발명의 상기 키트는 본 발명의 상기 조성물을 사용하여 염증성 장질환이 존재하지 않는 정상 대조군에 비하여 목적하는 개체에서 GSTT1 단백질의 이량체가 낮은 수준으로 존재하는 경우 염증성 장질환으로 예측할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 상기 진단용 키트에서, GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 염증성 장질환, GSTT1 단백질의 이량체, 존재하는 수준을 측정하는 제제에 대한 기제는 상기 약학; 및 식품 조성물 및 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0074] 본 발명의 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(Rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 본 발명의 상기 키트가 단백질의 수준을 측정하기 위한 경우에는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충 용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등이 포함될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 상기 기제는 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지 또는 폴리스티렌 수지로 합성된 96웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 사용될 수 있고, 상기 발색 효소는 퍼옥시다아제(Peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 FITC, RITC 등이 사용될 수 있고, 발색 기질액은 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic

acid); ATBS), o-페닐렌디아민(o-Phenylenediamine; OPD), 테트라메틸 벤지딘(tetramethyl benzidine; TMB)가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0078] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 염증성 장질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0079] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서, GSTT1 단백질의 이량체가 존재하는 수준을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0080] 본 발명의 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 측정된 GSTT1 단백질의 이량체가 존재하는 수준이 정상 대조군에 비하여 낮은 경우, 상기 목적하는 개체가 염증성 장질환일 것으로 예측할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 상기 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료는 정상 또는 질환이 의심되는 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) 및 혈청(serum)을 포함하는 혈액, 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, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0082] 본 발명의 상기 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에서, GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자, 염증성 장질환, GSTT1 단백질의 이량체, 존재하는 수준을 측정하는 제제에 대한 기재는 상기 약학; 및 식품 조성물 및 진단용 조성물에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0083] 본 발명의 상기 단백질이 존재하는 수준을 측정하는 단계는 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 웨스턴 블롯 분석, ELISA, 방사선면역분석, 방사 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학 염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 면역형광법, 면역크로마토그래피법, FACS 및 단백질 칩 분석법으로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나를 통해 수행될 수 있고, 바람직하게는 상기 단계는 비-환원 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0084] 본 발명의 상기 비-환원 조건은 단백질의 이황화 결합 등을 끊어 전기 영동과 같은 분석을 용이하게 해주는 제제, 예를 들면 β-메르캅토에탄올(β-mercaptoethanol) 또는 DTT (dithiothreitol)가 포함되어 있지 않은 조건으로서, 본 발명의 목적상 산화된 AMPK 단백질을 검출하는데 적합한 조건일 수 있다.

[0086] [서열목록]

[0087] 서열번호 1: GSTT1 아미노산 서열

[0088] MVLELYLDLLSQPCRAIYIFAKKNNIPFQMHTVELRKGEHLSDAFARVNPMPKRVPMMDGGFTLCESVAILLYLAKHYKVPDHWYPQDLQARARVDEYLAWQHTGLRRSCLRALWHKVMFPVFLGEQIPPETLAATLAELDNVLQVLEDKFLQDKDFLVGPHISLADLVAITELMHPVGGGCPVFEGHPRLAAWYQREAAVVGKDLFREAEVILKVKDCPPADLI IKQKLMPRVLAMIQ

[0090] 서열번호 2: GSTT1 유전자 서열

[0091] ATGGTTCTGGAGCTGTACCTGGATCTGCTGTCGAGCCCTGTCGCGCCATTTATATCTTCGCCAAGAAGAACAATATCCCGTTCCAGATGCACACGGTGGAGCTGCGCAAGGGTGAGCACCTCAGCGATGCGTTTGCCCGGGTGAACCCCATGAAGAGGGTACCAGCCATGATGGATGGTGGCTTCACCTGTGTGAGAGTGTGGCTATCTTGCTCTACCTGGCACACAAGTATAAGGTTCTGACCACTGGTACCCCAAGACCTGCAGGCTCGTGCTCGTGTAGACGAGTACCTGGCATGGCAGCATACGGGCTTCGGAGAAGCTGCCTCAGGGCCCTGTGGCATAAGGTGATGTTCCCTGTTTTCTTGGTGAGCAAATACCTCCTGAAACACTGGCAGCCACGTTGGCAGAAGTGGATGTTAACCTACAGGTGCTTGAAGACAAGTTCTCCAGGACAAAGACTTCTTGTGGGCCCCACATCTCCCTGGCCGACTTGGTGGCCATCACAGAGCTGATGCATCTGTAGGTGGTGGCTGCCAGTCTTTGAAGGGCATCCAGGCTGGTGCATGGTACCAGCGAGTGAGGCAGCTGTGGGGAAGGACCTCTCCGGGAAGCCCATGAAGTCATCTGAAGGTGAAGGACTGTCCCTGCTGACCTCATATAAGCAGAAGCTGATGCCAGAGTGCTGGCAATG

ATCCAG

- [0093] 서열번호 3: IL-22 아미노산 서열
- [0094] 1 maalqksvss flmgtlatsc llllallvqg gaaapisshc rldksnfqpp yitnrtfmla
- [0095] 61 keasladnnt dvrligeklf hgvsmsercy lmkqvlntfl eevlfpqsdr fqpymqevvp
- [0096] 121 flarlslrsls tchiegddlh iqrvnqklkd tvkklgesge ikaigeldll fmslrnaci
- [0098] 서열번호 4: IL-22 유전자 서열
- [0099] 1 acaagcagaa tcttcagaac aggttctcct tccccagtca ccagttgctc gagttagaat
- [0100] 61 tgcttgcaat ggccgccctg cagaaatctg tgagctcttt ccttatgggg accctggcca
- [0101] 121 ccagctgcct ccttctcttg gccctcttgg tacagggagg agcagctgcg cccatcagct
- [0102] 181 cccactgcag gcttgacaag tccaacttcc agcagcccta taccaccaac cgcaccttca
- [0103] 241 tgctggctaa ggaggctagc ttggctgata acaacacaga cgttcgtctc attggggaga
- [0104] 301 aactgttcca cggagtcagt atgagtgagc gctgctatct gatgaagcag gtgctgaact
- [0105] 361 tcaccttga agaagtgtg ttccttcaat ctgataagtt ccagccttat atgcaggagg
- [0106] 421 tggtgccctt cctggccagg ctgagcaaca ggctaagcac atgtcatatt gaaggatgag
- [0107] 481 acctgcatat ccagaggaat gtgcaaaagc tgaaggacac agtgaaaaag ctggagagaga
- [0108] 541 gtggagagat caaagcaatt ggagaactgg atttgctgtt tatgtctctg agaaatgcct
- [0109] 601 gcatttgacc agagcaaaagc tgaaaaatga ataactaacc ccctttccct gctagaaata
- [0110] 661 acaattagat gcccacaaagc gatttttttt aacacaaagg aagatgggaa gccaaactcc
- [0111] 721 atcatgatgg gtggattcca aatgaacccc tgcgttagtt acaaggaaa ccaatgccac
- [0112] 781 ttttgtttat aagaccagaa ggtagacttt ctaagcatag atatttattg ataacatttc
- [0113] 841 attgtaactg gtgttctata cacagaaaac aatttttttt ttaaataatt gtctttttcc
- [0114] 901 ataaaaaaga ttactttcca ttccttttagg ggaaaaaacc cctaaatagc ttcattgttc
- [0115] 961 cataatcagt acttttatatt tataaatgta ttattattta ttataagact gcattttatt
- [0116] 1021 tataatcattt tattaatatg gattttattt tagaaacatc attcgatatt gctacttgag
- [0117] 1081 tgtaaggcta atattgatat ttatgacaat aattatagag ctataacatg tttatttgac
- [0118] 1141 ctcaataaac acttgatgat cctaa
- [0120] 서열번호 5: *GSTT1* forward primer(human)
- [0121] TCTTTTGCATAGAGACCATGACCAG
- [0123] 서열번호 6: *GSTT1* reverse primer(human)
- [0124] CTCCTACTCCAGTAACTCCCGACT
- [0126] 서열번호 7: β -actin forward primer(human)

- [0127] CTCTTCCAGCCTTCCTTCCTG
- [0129] 서열번호 8: *β-actin* reverse primer(human)
- [0130] CAGCACTGTGTTGGCGTACAG
- [0132] 서열번호 9: *GSTT1* forward primer(mouse)
- [0133] GTAGGTAAACATCCAGTTCTGC
- [0135] 서열번호 10: *GSTT1* reverse primer(mouse)
- [0136] GGCACATGGCAGCATACGG
- [0138] 서열번호 11: *β-actin* forward primer(mouse)
- [0139] AGTGTGACGTTGACATCCGT
- [0141] 서열번호 12: *β-actin* reverse primer(mouse)
- [0142] TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA
- [0144] 서열번호 13: *IL-22* forward primer(mouse)
- [0145] GGCCAGCCTTGCAGATAACA
- [0147] 서열번호 14: *IL-22* reverse primer(mouse)
- [0148] GCTGATGTGACAGGAGCTGA
- [0150] 서열번호 15: *Muc2* forward primer(mouse)
- [0151] GGTCCAGGGTCTGGATCACA
- [0153] 서열번호 16: *Muc2* reverse primer(mouse)
- [0154] GCTCAGCTCACTGCCATCTG
- [0156] 서열번호 17: *Muc2* forward primer(human)
- [0157] AGGATGACACCATCTACCTCACC
- [0159] 서열번호 18: *Muc2* reverse primer(human)
- [0160] GGTGTAGGCATCGCTCTTCTC
- [0162] 서열번호 19: *CAMP* forward primer(human)

[0163] GCACGCTGACCACTACC

[0165] 서열번호 20: *CAMP* reverse primer(human)

[0166] CGGGCTATTCCTGTCCAC

발명의 효과

[0167] 본 발명에 따른 조성물은 STAT3와 p38/JNK의 인산화를 통해 술잔세포의 증식을 촉진하여 장 점막 장벽의 면역반응을 유도함으로써, 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

[0168] 나아가, 상기 세포신호전달을 조절하는 GSTT1 단백질의 이량체가 낮은 수준으로 존재하는지 여부를 측정함으로써 염증성 장질환을 매우 효과적으로 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0169] 도 1의 A는 본 발명의 일 실시예에 따른 면역조직화학 염색을 수행한 결과이며, 도 1의 B 및 C는 본 발명의 실시예에 따른 *GSTT1* 유전자의 발현 수준을 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 GSTT1 단백질에 특이적인 항체 또는 IgG가 주입된 대장염 동물 모델에서 술잔세포(goblet cell)를 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 3의 A 내지 D는 본 발명의 일 실시예에 따른 *GSTT1* 유전자가 직장 주입을 통해 형질 전환된 마우스에서, 체중 변화(도 3의 A), 질병 활성 점수(Disease activity index; DAI)(도 3의 B), 장의 길이 변화(도 3의 C) 및 술잔세포(도 3의 D)를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4의 A 내지 E는 본 발명의 일 실시예에 따른 *GSTT1* 유전자가 복강 주입을 통해 형질 전환된 마우스에서, 체중 변화(도 4의 A), 질병 활성 점수(도 4의 B), 생존율(도 4의 C), 장의 길이 변화(도 4의 D) 및 술잔세포(도 4의 E)를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5의 A 내지 C는 본 발명의 일 실시예에 따른 *GSTT1* 유전자 및 *IL-22* 유전자의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이고, 체중 변화(도 5의 D), 질병 활성 점수(도 5의 E), 장의 길이 변화(도 5의 F) 및 술잔 세포(도 5의 G)를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6의 A는 본 발명의 일 실시예에 따른 GSTT1 단백질의 발현 수준을 면역조직화학(immunohistochemistry)을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이고, 도 6의 B 및 C는 *GSTT1* 유전자의 발현 수준을 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이며, 도 6의 D는 *GSTT1* 유전자에 특이적인 siRNA 처리 후, 웨스턴 블롯 분석을 통해 GSTT1 단백질의 발현 수준을 확인한 결과이고, 도 6의 E 내지 H는 GSTT1 단백질의 발현이 억제된 세포에서 유전자들의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7의 A 및 B는 GSTT1 단백질의 단량체 및 이량체의 발현 수준을 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하고, 전체 GSTT1에 따른 이량체 GSTT1 단백질의 발현 수준을 비율로 나타낸 것이다.

도 8의 A 및 B는 GSTT1 단백질 단량체 및 이량체의 발현 수준을 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하고, 전체 GSTT1에 따른 이량체 GSTT1 단백질의 발현 수준을 비율로 나타낸 것이며, 도 8의 C는 GSTT1 단백질과 관련된 세포신호전달 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 GSTT1 단백질의 작용 기작을 모식도로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0170] 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 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0172] 실시예

[0174] [준비예 1] 세포주 배양 및 형질 전환

[0175] 열을 이용하여 불활성화된 10%의 우태아혈청 및 1%의 항생제가 포함된 RPMI 배지에서 HT-29 세포주(Korea Cell Line Bank, 한국)를 5%의 CO₂, 37℃의 조건에서 배양하였다. 리포펙타민 2000(Life Technologies, 미국)을 이용하여 상기 세포주에 GSTT1 유전자(서열번호 2)에 상보적으로 결합하는 siRNA 또는 비-표적화 대조군(non-targeting control; AccuTarget, Bioneer, 한국)을 형질 전환하였다.

[0177] [준비예 2] 마우스 사육 조건 및 대장염 동물 모델 제작

[0178] 병원체가 없는 12:12 암주기의 환경에서 야생형 C57BL/6 마우스(OrientBio, 한국)를 사육하였다. 필터를 이용하여 멸균된 2.5%(W/V)의 DSS(Dextran Sulfate Sodium Salt, MW. 36,00050,000; MP Biomedicals, 미국)가 포함된 음용수를 8주된 마우스에 7일 동안 공급한 뒤, 이어서 2일 동안 멸균된 음용수만을 공급함으로써 상기 마우스에 대장염을 유도하여 대장염 동물 모델을 제작하였다.

[0180] [준비예 3] 마우스에 유전자 전달

[0181] 하기 표 1에 기재된 벡터를 상기 준비예 2의 대장염 동물 모델 또는 야생형 마우스의 직장(100 μ l의 PBS 중 30 μ g) 또는 복강(1ml의 PBS 중 100 μ g)에 2회(1일 및 5일) 주입하였다. 이때, 상기 벡터와 형질 전환 물질 PEI(Polyetherimide)를 1:1(w : v, μ g DNA : μ l PEI)의 비율로 혼합된 혼합용액을 사용하여, 유전자 전달의 효율을 높였다. 또한, 상기 혼합 용액의 직장 또는 복강 주입 시에 이소퓨렌(Isofurane; Ifrane liquid, MNS 한국)을 이용하여 상기 대장염 동물 모델 및 야생형 마우스를 마취하였다. 이때, 상기 혼합용액이 대장염 동물 모델 및 야생형 마우스의 몸에 골고루 분포될 수 있도록 하기 위하여, 20초 동안 상기 대장염 동물 모델 및 마우스를 거꾸로 매달았다. 이러한 과정을 통해 최종적으로 하기 표 1에서와 같이 총 8가지의 경우의 수에 해당하는 마우스를 제작하였다.

표 1

[0183]

주입 방식	벡터	DSS 처리	표시
직장	pCMV-GSTT1-GFP	-	DSS(-)-rectal:pGSTT1(+) 마우스
		+	DSS(+)-rectal:pGSTT1(+) 마우스
	pEGFP-N1	-	DSS(-)-rectal:pGSTT1(-) 마우스
		+	DSS(+)-rectal:pGSTT1(-) 마우스
복강	pCMV-GSTT1-GFP	-	DSS(-)-ip:pGSTT1(+) 마우스
		+	DSS(+)-ip:pGSTT1(+) 마우스
	pEGFP-N1	-	DSS(-)-ip:pGSTT1(-) 마우스
		+	DSS(+)-ip:pGSTT1(-) 마우스

pCMV-GSTT1-GFP: GFP가 태그된 쥐의 GSTT1 유전자가 포함된 CMV 벡터(OriGene, 미국)

pEGFP-N1: pCMV-(AC)-EGFP-N1, EGFP가 포함된 CMV 벡터(AddGene, 미국)

[0185] [실시예 1] GSTT1 단백질 및 유전자의 발현 수준 확인

[0186] 면역조직화학(Immunohistochemistry) 염색과 정량적 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 이용하여, 염증성 장질환 환자(크론병(CD); 장관형 베체트병(intestinal Behcet's disease; intBD)) 또는 정상인(CTL)의 장으로부터 분리된 조직에서 GSTT1 단백질 및 GSTT1 유전자의 발현 수준을 확인하였다. 또한, 상기 준비예 2의 대장염 동물 모델 및 야생형 마우스의 장으로부터 분리된 조직에서 GSTT1 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[0187] 면역조직화학 염색을 위해 포르말린으로 고정된 파라핀 포매 조직 절편을 탈파라핀화 한 뒤, 증류수로 세척하고 10 mM, pH 6.0의 구연산(Citrate) 완충액에 넣고 10분 동안 가열하여 항원이 노출될 수 있도록 하였다. 그런 다

음, 상기 항원이 노출된 절편을 증류수로 세척하고, 3%의 과산화수소에 넣어 5분 동안 반응시켰다. 이후, 0.1% 트윈-20(TBS-T)가 포함된 Tris 완충 식염수로 세척하고 GSTT1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체(Santa Cruz, 미국)와 밤새도록 반응시켰다. 세척 후, 절편을 바이오틴 - 접합 된 IgG (1 : 500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)와 함께 배양 한 뒤, 발색을 위한 벤지딘 기질을 갖는 Vecta-Elite streptavidin-peroxidase kit (Vector Laboratories)의 시약을 처리 하였다. 대조를 위하여 희석된 헤마톡실린으로 상기 절편을 염색하고, 광학 현미경 (Olympus BX41, Olympus Optical, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 단백질의 발현을 정량화하기 위해, 무작위로 선택된 필드를 100 배율로 각 샘플에 대해 조사하고 0 내지 3의 점수를 매겨, 그 결과를 도 1의 A에 나타내었다.

[0188] qRT-PCR을 위해, cDNA 합성 키트(High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, 미국)를 이용하여, 각 조직으로부터 RibospinTM (GeneA11, 한국)을 통해 추출된 전체 RNA의 1 ~ 4 μ g를 제조사가 제공하는 방법에 따라 cDNA를 합성하였다. 제조된 cDNA는 SYBR 그린 마스터 믹스(SYBR Green master mix, Applied Biosystems) 및 하기 표 2의 프라이머 쌍 (각 프라이머 200 nmol, 최종 농도)과 3 중으로 혼합한 뒤, tepOne Plus 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems)에서 45-60 사이클(95 °C 30 초, 56-61 °C 30 초, 72 °C 40 초) 동안 증폭시켰다. 그런 다음, 각 프라이머에 따른 증폭된 값을 GAPDH 또는 β -actin의 발현양에 따른 상대적 발현 수준으로 정량화하여, 도 1의 B 및 C에 나타내었다.

표 2

종	유전자	서열번호	구분	서열(5'-3')
인간	GSTT1	5	F	TCCTTTCATAGAGACCATGACCAG
		6	R	CTCCCTACTCCAGTAACCTCCCGACT
	β -actin	7	F	CTCTCCAGCCTTCCTTCCTG
		8	R	CAGCACTGTGTTGGCGTACAG
마우스	GSTT1	9	F	GTAGGTAAACATCCAGTTCTGC
		10	R	GGCACATGGCAGCATAACGG
	β -actin	11	F	AGTGTGACGTTGACATCCGT
		12	R	TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA

[0192] 도 1의 A에서 보는 바와 같이, 정상인(CTL)에 비하여 크론병 및 베체트병에 해당하는 염증성 장질환 환자의 장 조직에서 GSTT1 단백질의 발현이 현저하게 감소되어 있었다.

[0193] 도 1의 B 및 C에서 보는 바와 같이, 정상인(CTL)에 비하여 염증성 장질환 환자의 장 조직에서 GSTT1 유전자의 발현이 2배 이상 감소되었으며, DSS에 의해 대장염이 유도된 동물 모델의 장 조직에서 역시 GSTT1 유전자의 발현이 정상에 비하여 감소되어 있었다.

[0194] 상기 결과를 통해, 염증성 장질환에서 GSTT1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 감소되어 있음을 알 수 있다.

[실시예 2] 술잔세포(goblet cell) 확인

[0197] 상기 준비예 2의 대장염 동물 모델에 2회(7일째 또는 11일째) GSTT1 단백질에 특이적인 항체(α -GSTT1) 또는 IgG를 복강내 주사한 뒤, PAS(periodic acid-Schiff)를 사용하여 상기 대장염 동물 모델로부터 분리된 대장 조직의 장샘(cypt)에 존재하는 술잔세포를 염색한 뒤, 현미경으로 관찰하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0198] 도 2에서 보는 바와 같이, IgG가 투여된 경우와 비교하여, 대장염 동물 모델에 α -GSTT1가 투여되었을 때에 술잔세포가 감소되는 것을 확인하였다.

[0199] 상기 결과를 통해, 대장염이 발생되었을 때 GSTT1 단백질이 존재하는 수준이 감소되는 경우 술잔세포가 감소되는 것을 알 수 있다.

[0201] [실시예 3] *GSTT1* 유전자 전달을 통한 대장염 완화 효과 확인

[0202] 상기 준비예 3의 마우스들에서 체중 변화, 질병 활성 점수(Disease activity index; DAI), 장의 길이 변화 및 술잔세포를 확인하여, 도 3(직장에 *GSTT1* 유전자 주입) 및 도 4(복강에 *GSTT1* 유전자 주입)에 나타내었다. 여기서, 상기 동물 모델의 체중을 9일 동안 매일 측정하여 체중 변화를 측정하였고, 상기 실시예 2에 기재된 방식과 동일하게 술잔세포를 염색하였다. 또한, 체중감소, 대변의 일관성 및 출혈 여부에 해당하는 3가지의 요인에 대하여 0 내지 4점으로 점수화 하고 합산하는 과정을 통해 상기 질병 활성 점수를 계산하였다. 또한, 상기 동물 모델의 장을 적출하고, 그 길이를 측정하였다.

[0203] 도 3의 A 에서 보는 바와 같이, DSS(+)-rectal:*GSTT1*(-) 마우스 (도 2의 A, DSS+pCTL)의 체중이 약 40% 감소되었다. 그러나, DSS(+)-rectal:*GSTT1*(+) 마우스 마우스(도 3의 A, DSS+*GSTT1*) 의 경우에는 8일 또는 7일째 되는 날부터 체중의 감소가 회복되는 양상을 나타내었다.

[0204] 도 3의 B에서 보는 바와 같이, DSS(+)-rectal:*GSTT1*(-) 마우스(도 3의 B, DSS+pCTL)의 경우, 질병 활성 점수가 시간이 지남에 따라 계속적으로 증가되어, 8일째 12점을 나타내었다. 반면, DSS(+)-rectal:*GSTT1*(+) 마우스(도 3의 B, DSS+*GSTT1*)의 경우에는 약 5점 또는 약 7점으로 질병 활성 점수가 감소되었다.

[0205] 도 3의 C에서 보는 바와 같이, DSS(+)-rectal:*GSTT1*(-) 마우스의 장 길이는 DSS(-)-rectal:p*GSTT1*(-) 마우스에 비하여 2 cm 감소되었으나, *GSTT1* 단백질이 형질전환된 DSS(+)-rectal:*GSTT1*(+) 마우스에서 장 길이 감소가 회복되었다.

[0206] 도 3의 D에서 보는 바와 같이, DSS(-)-rectal:*GSTT1*(-) 마우스(도 3의 D, water+pCTL)와 비교하여, DSS(-)-rectal:p*GSTT1*(+) 마우스(도 3의 D, Water+p*Gstt1*)에서 술잔세포의 수가 현저하게 증가되었다.

[0207] 도 4의 A, B 및 E에서 보는 바와 같이, *GSTT1* 유전자가 복강을 통해 주입된 경우, 직장에 주입된 경우와 마찬가지로 *GSTT1* 유전자 주입에 의해 체중의 감소가 회복되고(도 4의 A), 질병 활성 점수가 증가되었으며(도 4의 B), 장의 길이 감소의 회복 (도 4의 D) 및 술잔세포의 수가 증가되었다(도 4의 E). 나아가, 도 4의 D에서 보는 바와 같이, DSS(+)-ip:*GSTT1*(-) 마우스(DSS+pCTL) 의 경우 7일부터 그 생존율이 20%로 감소하였으나, DSS(+)-ip:*GSTT1*(+) 마우스(DSS+p*GSTT1*)의 경우에는 그 생존율이 DSS에 의해 대장염이 유도되지 않은 마우스와 유사한 정도의 생존율을 보였다.

[0208] 상기 결과를 통해, 술잔세포에서 분비되는 점액에 의하여 장 상피 장벽이 유지될 수 있기 때문에, 대장의 장샘에서 발현되는 *GSTT1* 단백질은 술잔세포의 증식을 현저하게 증가시켜, 병원체에 대한 첫번째 방어 기작으로 장 상피 반응을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0210] [실시예 4] *GSTT1* 단백질과 IL-22와의 관계 확인

[0211] 상기 준비예 3의 직장으로 유전자를 주입한 마우스들에서 분리된 장 상피 림프구(intestinal epithelial lymphocyte; IEL) 및 점막 고유층 림프구(lamina propria lymphocyte; LPL); 또는 조직으로부터 분리된 mRNA에서 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 *GSTT1* 유전자 및 *IL-22* 유전자의 발현 수준을 확인하여, 그 결과를 도 5의 A 내지 C에 나타내었다.

[0212] 또한, 준비예 3의 DSS(+)-rectal:*GSTT1*(+) 마우스 및 DSS(+)-rectal:*GSTT1*(-) 마우스에 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 IL-22 단백질에 특이적인 항체(α -IL-22)를 복강내로 주사한 뒤, 상기 실시예 3에서와 동일한 방법으로 체중 변화, 질병 활성 점수, 장 길이 변화 및 술잔세포를 확인하여, 그 결과를 도 5의 D 내지 G에 나타내었다. 여기서 *IL-22* 유전자 및 *Muc2* 유전자의 발현 수준은 하기 표 3의 프라이머 서열을 이용하여 측정하였다.

표 3

[0214]

유전자	서열번호	구분	서열(5'-3')
<i>IL-22</i>	13	F	GGCCAGCCTGCAGATAACA
	14	R	GCTGATGTGACAGGAGCTGA
<i>Muc2</i>	15	F	GGTCCAGGGTCTGGATCACA
	16	R	GCTCAGCTCACTGCCATCTG

[0216] 도 5의 A 및 B에서 보는 바와 같이, DSS(-)-rectal:GSTT1(-) 마우스(pCTL)와 비교하여, DSS(-)-rectal:GSTT1(+) 마우스(pGstt1)으로부터 분리된 장 상피 림프구 및 점막 고유층 림프구(A)와 장 조직으로부터 분리된 mRNA(B)에서 *GSTT1* 유전자 및 *IL-22* 유전자의 발현 수준이 현저하게 증가되었다.

[0217] 또한, 도 5의 C에서 보는 바와 같이, DSS(+)-rectal:GSTT1(-) 마우스(pCTL)와 비교하여, DSS(+)-rectal:GSTT1(+) 마우스(pGstt1)에서 *Muc2* 유전자 및 *IL-22* 유전자의 발현 수준이 현저하게 증가되었다.

[0218] 도 5의 D 내지 G에서 보는 바와 같이, DSS(+)-rectal:GSTT1(+) 마우스에 α -IL-22가 투여되는 경우 pCMV-GSTT1-GFP 벡터가 형질 전환됨으로써 발생하는 체중 감소 억제, 질병 활성 점수 감소 및 술잔세포 수가 증가되는 효과가 발휘되지 않았다.

[0219] 상기 결과를 통해, GSTT1 단백질에 의한 염증성 장질환의 억제 효과는 IL-22 단백질과 관련된 세포신호전달에 의해 유도되는 것임을 알 수 있다.

[0221] [실시예 5] GSTT1 단백질과 장 상피 면역 반응 간의 관계 확인

[0222] 상기 준비예 1의 HT-29 세포주 또는 형질 전환된 HT-29 세포주의 배양 배지를 1 μ g/mL의 LPS(Lipopolysaccharide), 500 nM의 H_2O_2 , 100 g/mL의 재조합 인간 IL-22, 40 ng/mL의 TNF- α , 플라젤린(flagellin; fla) 또는 살모넬라 트리뮤리움(*Salmonella typhimurium*; Sal)이 포함된 RPMI 배지로 교체하고 4 시간 또는 24시간 동안 배양하였다. 여기서, 대조군(Vehicle)에는 상기 세포주에 아무것도 처리하지 않았다. pH 7.4, 4%의 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 용액을 이용하여 24시간 동안 배양된 상기 세포를 고정시키고, PBS로 상기 고정된 세포를 세척하였다. 그런 다음, 5% 또는 1% BSA가 포함된 0.1% 트리톤 X-100(Triton X-100)을 이용하여 상기 세포를 차단하고, α -GSTT1를 넣은 뒤에 충분히 배양하였다. 이후 형광이 결합된 2차 항체와 함께 추가 배양하는 과정을 통해 세포 내 존재하는 GSTT1 단백질을 시각화 하여 광학 현미경(Olympus BX41, Olympus Optical, 일본)을 통해 관찰하고, 그 결과를 도 6의 A에 나타내었다. 이때, DAPI를 이용하여 세포 핵을 염색하였다.

[0223] 또한, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 상기 4시간 동안 배양된 세포주에서 *GSTT1*, *CAMP*, 및 *MUC2* 유전자의 발현 수준을 확인하여 그 결과를 도 6의 B 내지 H에 나타내었다. 상기 인간 *Muc2* 유전자, *CAMP* 유전자 및 *TNF- α* 유전자의 발현 수준은 아래 표 4의 프라이머 서열을 이용하여 측정하였다. 여기서, *TNF- α* 유전자의 경우 바이오니아(한국)에서 상업적으로 제작되어 제공되는 프라이머를 이용하여 측정하였다. 이때, 형질전환된 HT-29 세포주의 형질 전환 확인을 위하여 통상의 방법에 의해 웨스턴 블롯 분석을 수행하여, 그 결과를 도 6의 D에 나타내었다.

표 4

유전자	서열번호	구분	서열(5'-3')
<i>Muc2</i>	17	F	AGGATGACACCATCTACCTCACC
	18	R	GGTGTAGGCATCGCTCTTCTC
<i>CAMP</i>	19	F	GCACGCTGACCACTACC
	20	R	CGGGCTATTCCCTGTCCAC

[0227] 도 6의 A에서 보는 바와 같이, LPS가 처리되지 않은 경우와 비교하여, LPS가 처리된 HT-29 세포주에서 GSTT1 단백질의 발현 수준이 현저하게 감소되었다.

[0228] 도 6의 B 및 C에서 보는 바와 같이, 대조군(Veh)에 비하여, HT-29 세포주에 LPS, 플라젤린(Fla) 및 살모넬라 트리뮤리움(Sal)을 처리한 경우 *GSTT1* 및 *CAMP* 유전자의 발현 수준이 감소된 반면, H_2O_2 , IL-22 및 TNF- α 를 처리하였을 때에는 *GSTT1* 및 *CAMP* 유전자의 발현 수준이 증가되었다.

- [0229] 도 6의 D에서 보는 바와 같이, 형질전환된 HT-29 세포주의 경우 2시간 이후부터 GSTT1 단백질의 발현 수준이 현저하게 감소되었다.
- [0230] 도 6의 E 내지 H에서 보는 바와 같이, 비-표적화 대조군이 형질 전환된 경우(SCR)와 비교하여, GSTT1 유전자에 특이적인 siRNA가 형질 전환된 HT-29 세포주에 H₂O₂가 처리되었을 때, *TNF-α* 유전자의 발현 수준은 증가된 반면, GSTT1 유전자에 특이적인 siRNA가 형질 전환된 HT-29 세포주에 H₂O₂ 또는 IL-22가 처리되었을 때 오히려 *MUC2* 유전자의 발현 수준이 감소되었다.
- [0231] 상기 결과를 통해, GSTT1 단백질 및 이를 암호화하는 유전자는 점액 또는 항균 펩타이드와 관련성이 있으며, *GSTT1* 유전자의 결함에 의해 병원균 감염 및 선천성 면역 반응이 손상될 수 있음을 알 수 있다.

[0233] **[실시예 6] 염증성 장질환 환자에서 GSTT1 단백질 확인**

- [0234] 아래 표 5의 대조군; IBD 환자; Int BD^{TT}; 및 Int BD^{null} 환자의 조직으로부터 단백질 및 인산화 분해효소 억제제가 포함되어 있는 Pierce RIPA 완충액(Cat # 89900, Thermo Fisher Scientific, 미국)을 이용하여 단백질을 분리하였다. 아래 표 5의 대조군, IBD 환자, Int BD^{TT} 환자 및 Int BD^{null} 환자의 전체 혈액 세포를 채취하였다. 상기 전체 혈액 세포 또는 분리된 단백질을 58 °C에서 10분 동안 가열한 뒤 원심분리하고, SDS-폴리아크릴아미드 겔에 30 ~ 100 μg 단백질을 넣고 전기영동하였다. 그런 다음, 상기 겔을 PVDF 막으로 옮기고 1차 항체(GSTT1 단백질 및 β-actin 단백질에 특이적인 항체)와 반응시킨 뒤 2차 항체와 반응시킨 뒤 시각화 및 정량화하여, 그 결과를 도 7의 A 및 B에 나타내었다. 여기서, 상기 단백질의 비환원조건을 유지하기 위하여 β-머캅토에탄올(β-mercaptoethanol; Sigma-Aldrich, MO, 미국)을 모든 준비 용액에서 제외하였다.

표 5

구분	염증성 장질환	유전자 변이
대조군	없음	없음
IBD	있음	없음; 및/또는 <i>GSTT1</i> 유전자 결손 돌연변이
Int BD ^{TT}	있음	없음
Int BD ^{null}	있음	<i>GSTT1</i> 유전자 결손 돌연변이

- [0238] 도 7의 A에서 보는 바와 같이, 대조군에 비하여 염증성 장질환(IBD) 환자에서 GSTT1 단백질의 이량체가 낮은 수준으로 존재하였다.
- [0239] 도 7의 A 및 B에서 보는 바와 같이, 조직 및 전체 혈액 세포 모두에서, 염증성 장질환 환자 중에서 *GSTT1* 유전자 결손 돌연변이가 없는 경우(BD^{TT})에 비하여, *GSTT1* 유전자의 결손 돌연변이가 존재하는 경우(Int BD^{null})에서 GSTT1 단백질의 이량체가 낮은 수준으로 존재하였다.
- [0240] 상기 결과를 통해 *GSTT1* 유전자 돌연변이, 특히 결손 돌연변이는 GSTT1 단백질이 이량체가 형성되지 못하도록 하는 것을 알 수 있으며, GSTT1 단백질의 이량체가 정상 대조군에 비하여 낮은 수준으로 존재하는 경우 염증성 장질환을 예측할 수 있음을 알 수 있다.

[0242] **[실시예 7] GSTT1 단백질과 관련된 세포신호전달 확인**

- [0243] 상기 준비예 1의 HT-29 세포주 및 형질 전환된 HT-29 세포주에 IL-22 단백질을 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 처리한 뒤, 단백질의 발현 수준을 상기 실시예 6과 동일한 방법으로 확인하여, 그 결과를 도 8의 A 내지 C에 나타내었다.
- [0244] 도 8의 A 및 B에서 보는 바와 같이, HT-29 세포주(CTL)에 비하여 GSTT1 단백질의 발현이 억제되어 있는 경우

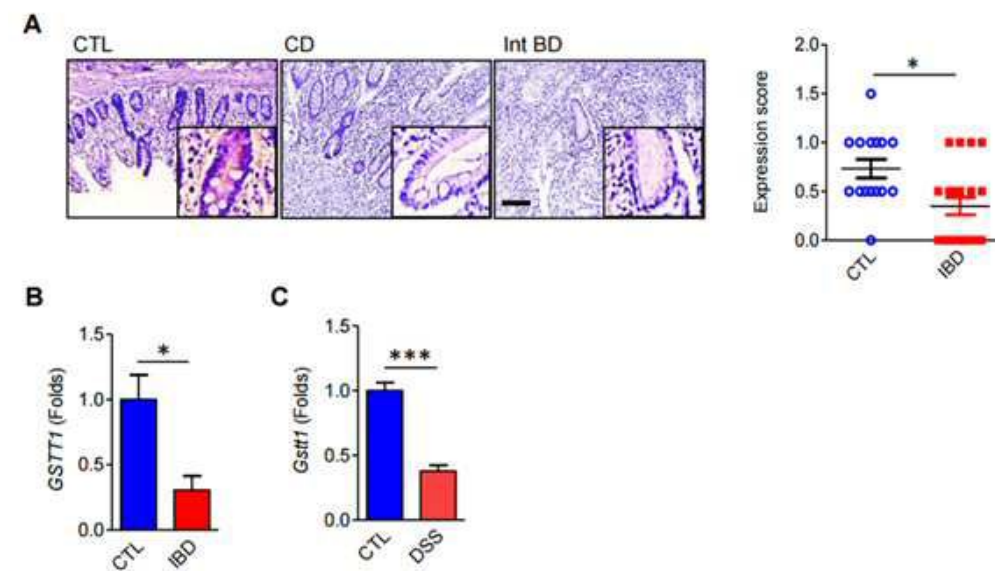
(MT), 전체 GSTT1 단백질의 발현 수준에 비하여 GSTT1 단백질의 이량체가 낮은 수준으로 존재하였고, p38/MAPK와 인산화된 JNK(phosphor JNK), ERK(phosphor ERK) 및 STAT(phosphor STAT3) 단백질의 발현 수준도 감소되었다.

[0245] 상기 결과를 통해 염증성 장질환의 경우, GSTT1 단백질의 이량체가 낮은 수준으로 존재하여, STAT3와 p38/JNK의 인산화가 정상적인 수준으로 일어나지 않음으로써 점막 장벽의 면역반응이 정상적으로 유도되지 않음을 알 수 있다. 따라서, 도 9에서 보는 바와 같이, IL-22 단백질 및 GSTT1 단백질 중 어느 하나 이상을 처리하는 경우 p38 및 STAT3 세포신호전달에 의해 점막 면역반응이 유도되는 것을 알 수 있다.

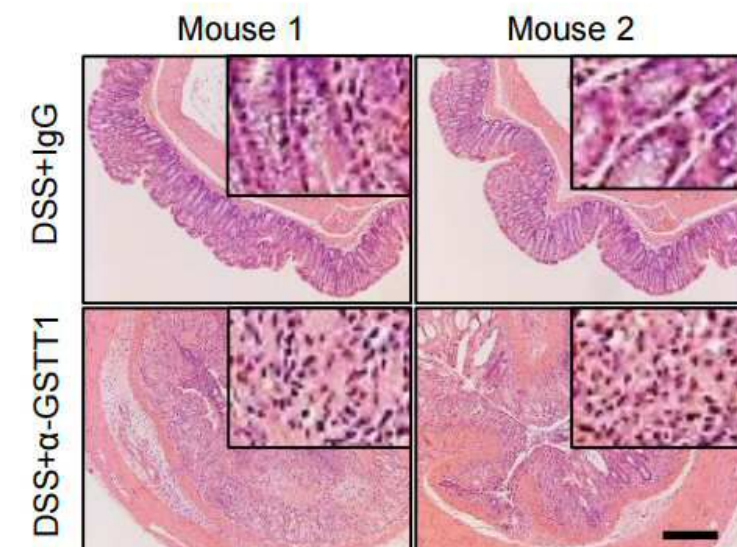
[0246] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

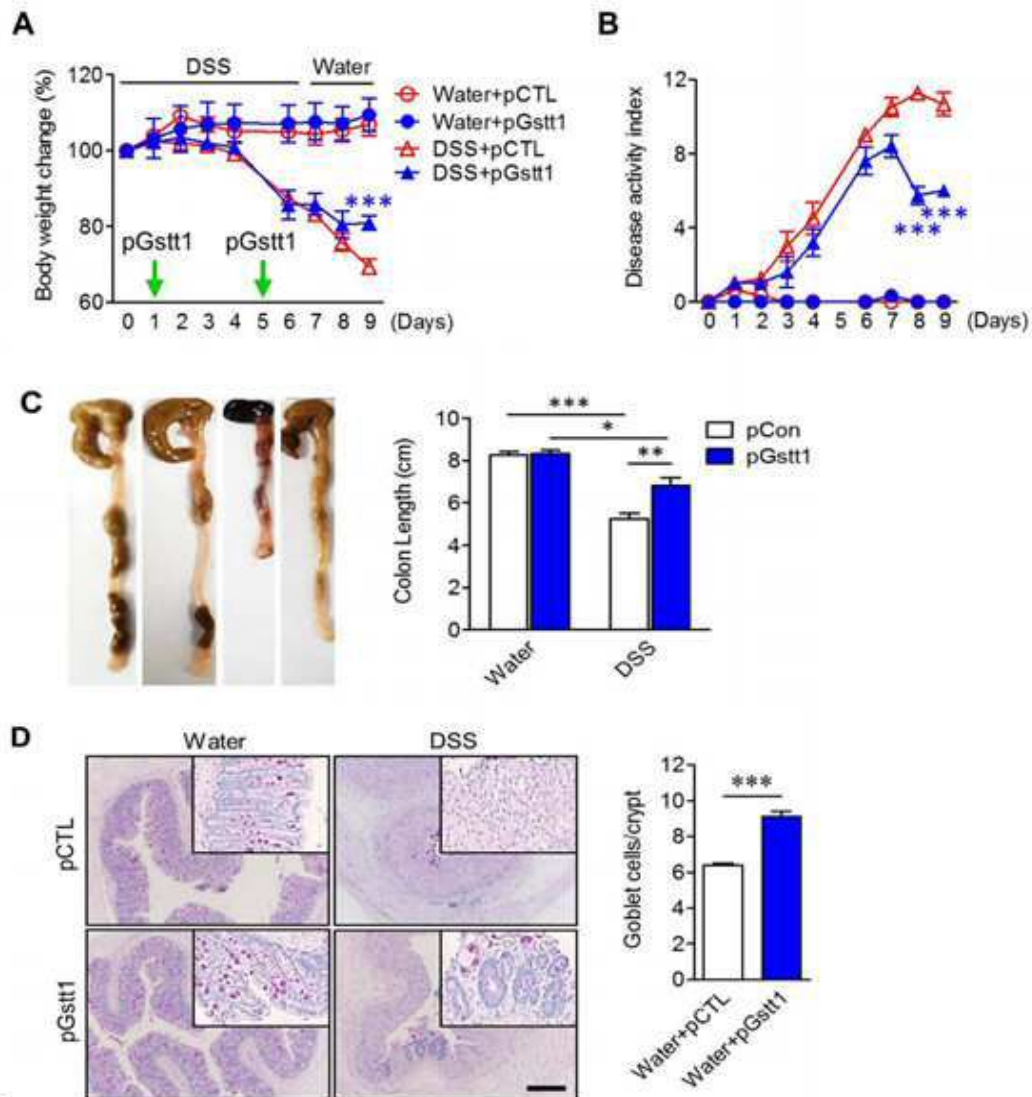
도면1



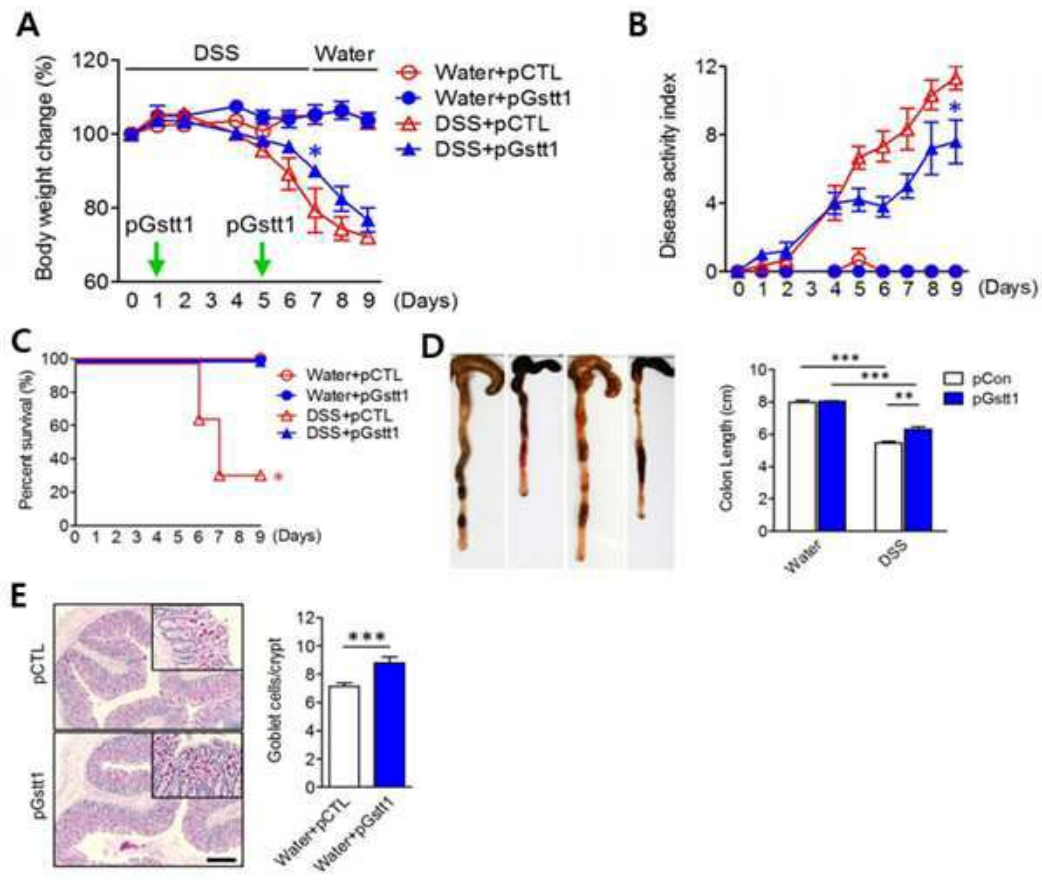
도면2



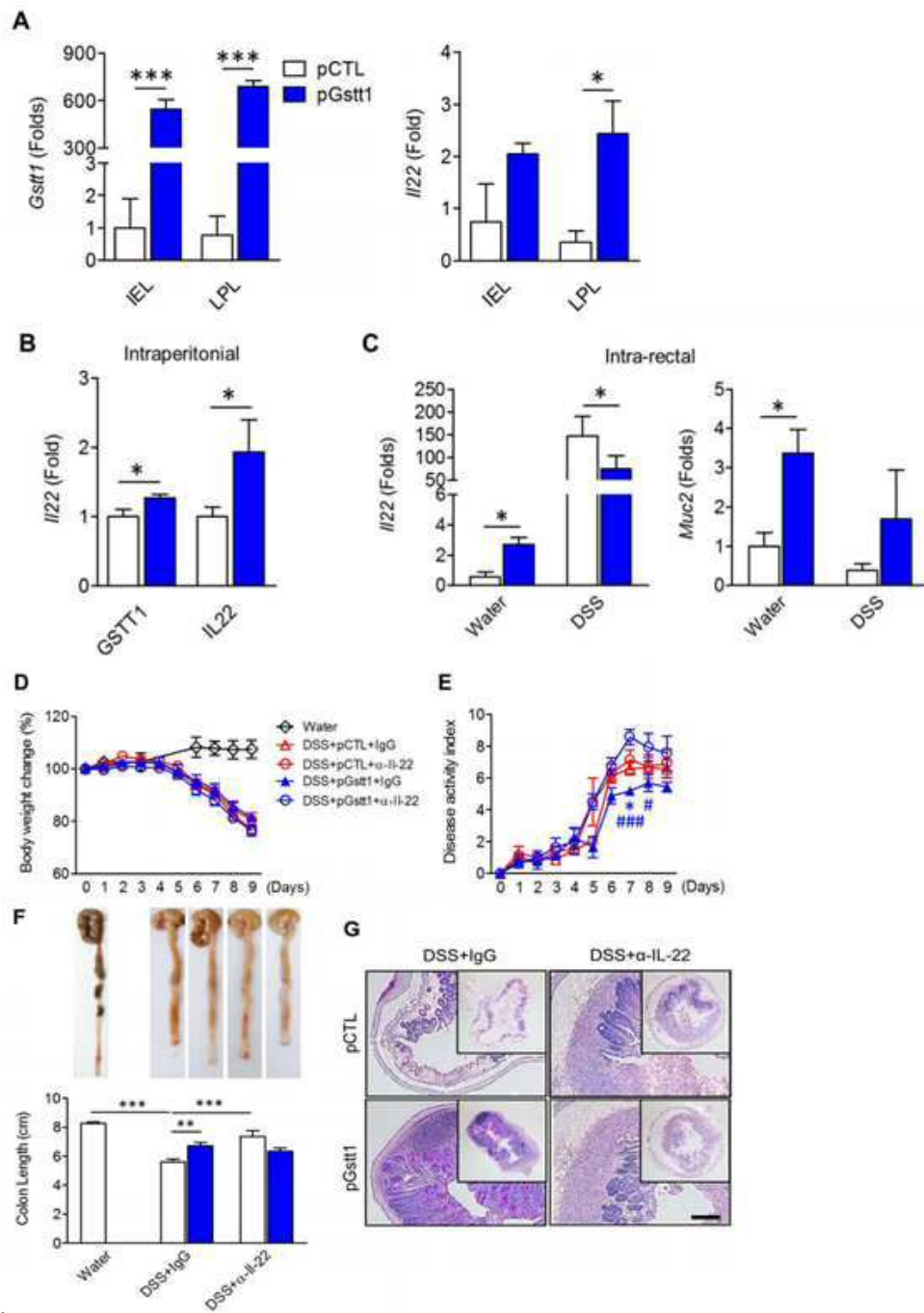
도면3



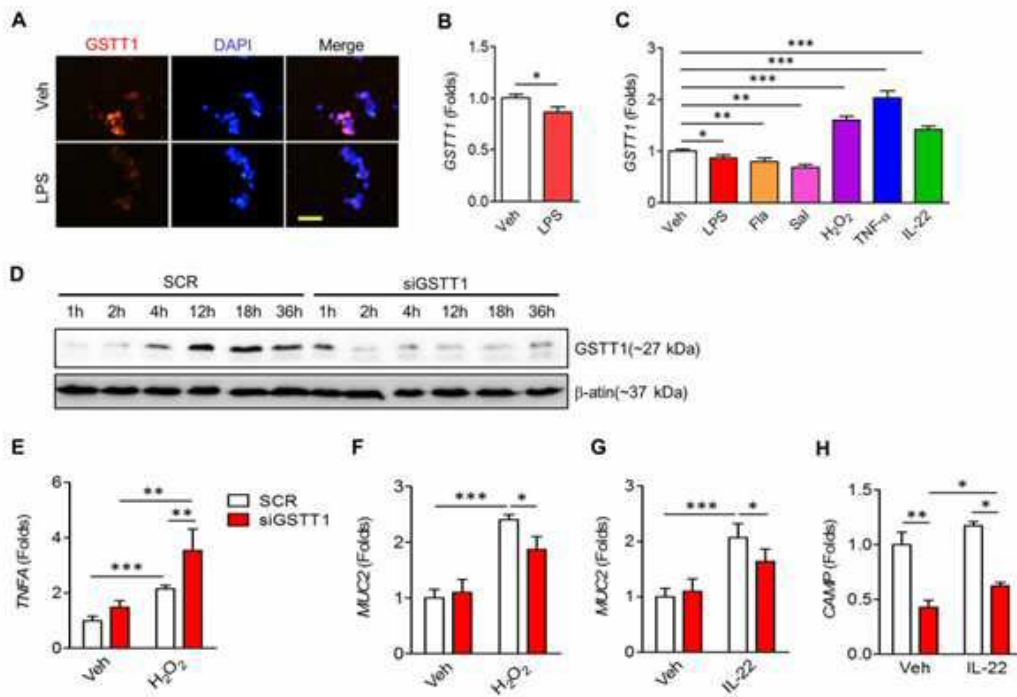
도면4



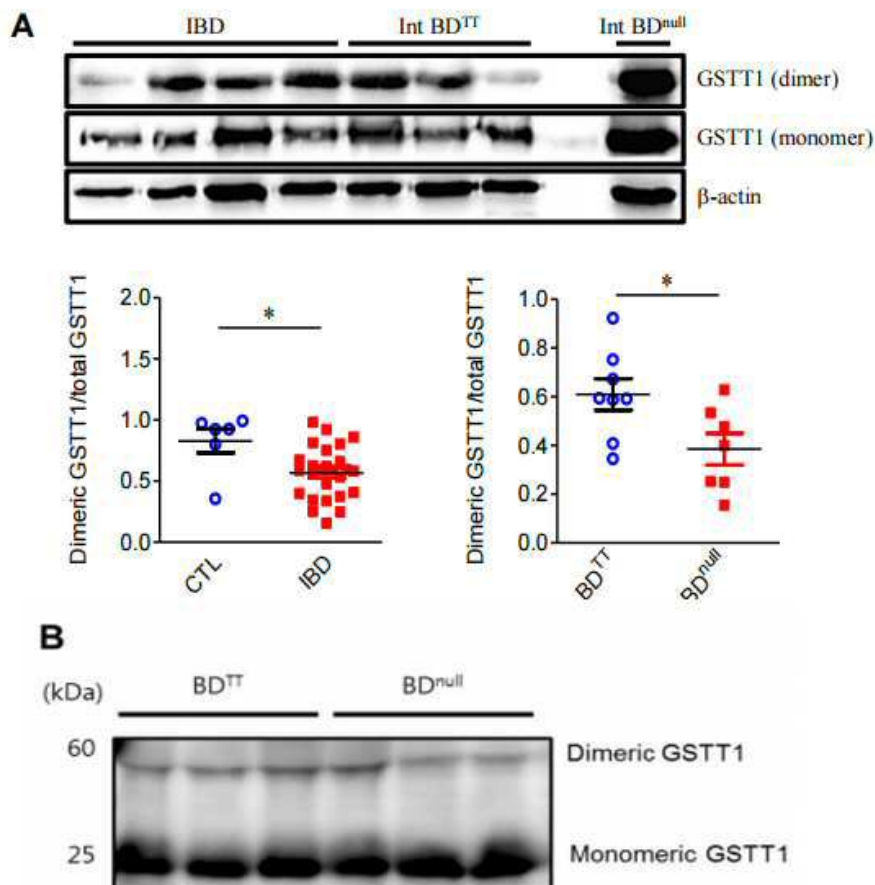
도면5



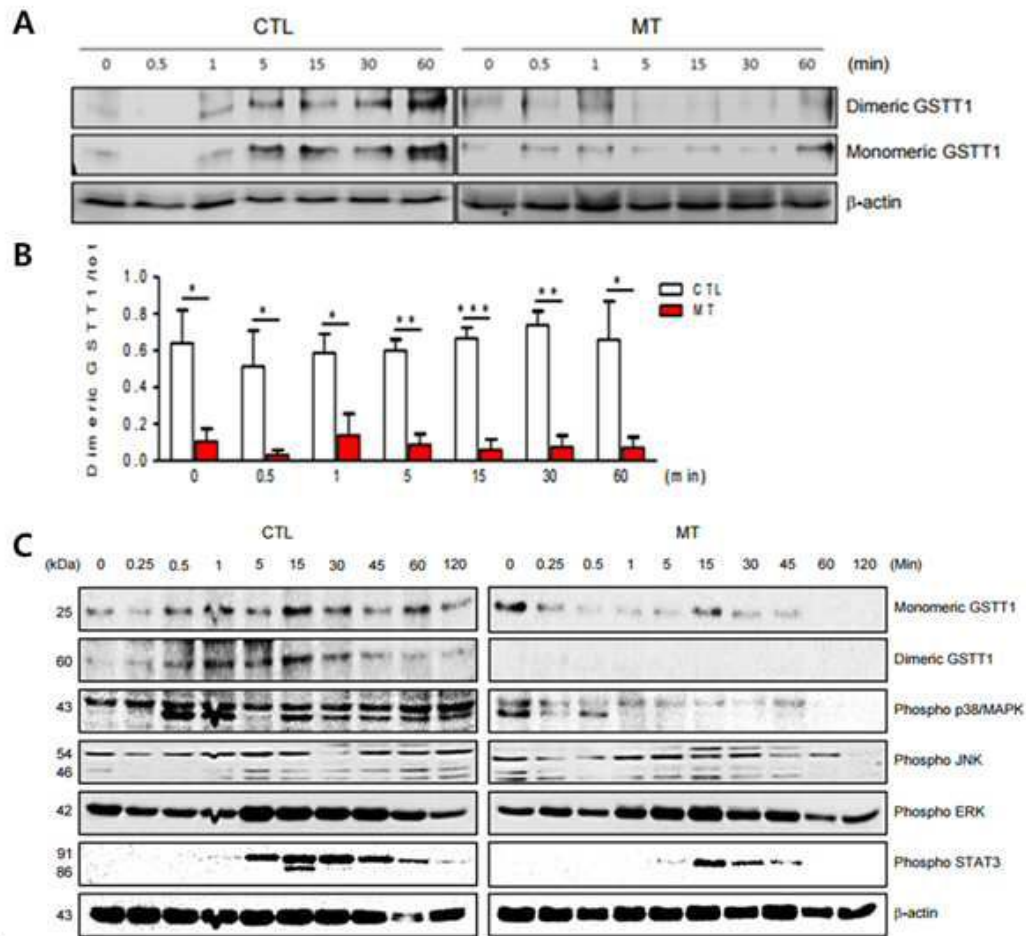
도면6



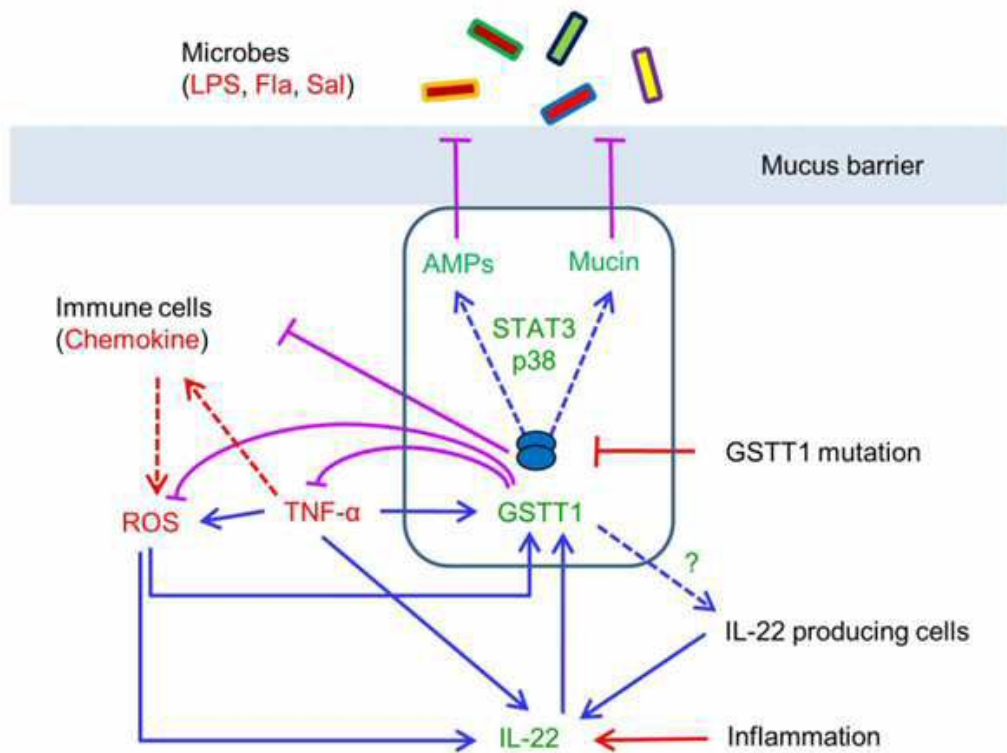
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A composition comprising GSTT1 protein or encoding gene thereof
- <130> PDPB192087
- <160> 20
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 240
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Val Leu Glu Leu Tyr Leu Asp Leu Leu Ser Gln Pro Cys Arg Ala

1 5 10 15

Ile Tyr Ile Phe Ala Lys Lys Asn Asn Ile Pro Phe Gln Met His Thr

20 25 30

Val Glu Leu Arg Lys Gly Glu His Leu Ser Asp Ala Phe Ala Arg Val

35 40 45
 Asn Pro Met Lys Arg Val Pro Ala Met Met Asp Gly Gly Phe Thr Leu
 50 55 60
 Cys Glu Ser Val Ala Ile Leu Leu Tyr Leu Ala His Lys Tyr Lys Val
 65 70 75 80
 Pro Asp His Trp Tyr Pro Gln Asp Leu Gln Ala Arg Ala Arg Val Asp
 85 90 95
 Glu Tyr Leu Ala Trp Gln His Thr Gly Leu Arg Arg Ser Cys Leu Arg

100 105 110
 Ala Leu Trp His Lys Val Met Phe Pro Val Phe Leu Gly Glu Gln Ile
 115 120 125
 Pro Pro Glu Thr Leu Ala Ala Thr Leu Ala Glu Leu Asp Val Asn Leu
 130 135 140
 Gln Val Leu Glu Asp Lys Phe Leu Gln Asp Lys Asp Phe Leu Val Gly
 145 150 155 160
 Pro His Ile Ser Leu Ala Asp Leu Val Ala Ile Thr Glu Leu Met His
 165 170 175

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

<210> 2

<211> 720

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggttctgg agctgtacct ggatctgctg tcgcagccct gtcgcgcat ttatatcttc 60

gccaagaaga acaatatccc gttccagatg cacacggtgg agctgcgcaa gggtgagcac 120

ctcagcgatg cgtttgcccg ggtgaacccc atgaagaggg taccagccat gatggatggt 180
 ggcttcaccc tgtgtgagag tgtggctatc ttgctctacc tggcacacaa gtataaggtt 240
 cctgaccact ggtaccccca agacctgcag gctcgtgctc gtgtagacga gtacctggca 300
 tggcagcata cgggccttcg gagaagctgc ctcagggccc tgtggcataa ggtgatgttc 360

cctgttttcc ttggtgagca aatacctcct gaaacactgg cagccacgtt ggcagaactg 420
 gatgttaacc tacaggtgct tgaagacaag ttcctccagg acaaagactt ccttgttggg 480
 cccacatctt ccttgccga cttggtggcc atcacagagc tgatgcatcc ttaggtggt 540
 ggctgcccag tctttgaagg gcatcccagg ctggtgcat ggtaccagcg agtggaggca 600
 gctgtgggga aggacctctt ccggaagcc catgaagtca tcctgaaggt gaaggactgt 660
 cccctgctg acctcatcat aaagcagaag ctgatgcca gagtgtggc aatgatccag 720
 720

<210> 3
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu
 1 5 10 15
 Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala
 20 25 30
 Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln
 35 40 45
 Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser
 50 55 60
 Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe
 65 70 75 80
 His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
 85 90 95
 Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln
 100 105 110
 Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg

115	120	125	
Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn			
130	135	140	
Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu			
145	150	155	160
Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn			
165	170	175	
Ala Cys Ile			
<210>	4		
<211>	1165		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	4		
acaagcagaa tcttcagaac aggttctcct tccccagtca ccagttgctc gagttagaat			60
tgtctgcaat ggccgccttg cagaaatctg tgagctcttt ccttatgggg accctggcca			120
ccagctgcct ccttctcttg gccctcttgg tacagggagg agcagctgcg cccatcagct			180
cccactgcag gcttgacaag tccaacttcc agcagcccta tatcaccaac cgcaccttca			240
tgctggctaa ggaggctagc ttggctgata acaacacaga cgttcgtctc attggggaga			300
aactgttcca cggagtcagt atgagtgagc gctgctatct gatgaagcag gtgctgaact			360
tcacccttga agaagtgtct ttccttcaat ctgataggtt ccagccttat atgcaggagg			420
tggtgccctt cctggccagg ctcagcaaca ggctaagcac atgtcatatt gaaggtgatg			480
acctgcatac ccagaggaat gtgcaaaagc tgaaggacac agtgaaaaag cttggagaga			540
gtggagagat caaagcaatt ggagaactgg atttgctgtt tatgtctctg agaaatgcct			600
gcatttgacc agagcaaagc tgaaaaatga ataactaacc ccctttccct gctagaaata			660
acaattagat gcccctaaagc gatTTTTTTT aaccctaaagg aagatgggaa gccctaaactcc			720
atcatgatgg gtggattcca aatgaacccc tgcgttagtt acaaaggaaa ccaatgccac			780
TTTTgtttat aagaccagaa ggtagacttt ctaagcatag atattttattg ataacatttc			840
attgtaactg gtgttctata cacagaaaac aatttatTTT ttaaataatt gtctttttcc			900
ataaaaaaga ttactttcca ttcttttagg ggaaaaaac cctaaatagc ttcatgtttc			960
cataatcagt acttttatatt tataaatgta ttattattta ttataagact gcattttatt			1020

tatatcattt tattaatatg gatttattta tagaaacatc attcgatatt gctacttgag	1080
tgtaaggcta atattgatat ttatgacaat aattatagag ctataacatg tttatttgac	1140
ctcaataaac acttggatat cctaa	1165
<210> 5	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GSTT1 forward primer(human)	
<	
400> 5	
tcttttgcat agagaccatg accag	25
<210> 6	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GSTT1 reverse primer(human)	
<400> 6	
ctccctactc cagtaactcc cgact	25
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> beta actin forward primer(human)	
<400> 7	
ctcttccagc cttccttct g	21
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> beta actin reverse primer(human)	
<400> 8	
cagcactgtg ttggcgtaca g	21
<210> 9	
<211> 22	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GSTT1 forward primer(mouse)	
<400>	9	
	gtaggttaac atccagttct gc	22
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GSTT1 reverse primer(mouse)	
<400>	10	
	ggcacatggc agcatacgg	19
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta actin forward primer(mouse)	
<400>	11	
	agtgtgacgt tgacatccgt	20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta actin reverse primer(mouse)	
<400>	12	
	tgctaggagc cagagcagta	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-22 forward primer(mouse)	
<400>	13	
	ggccagcctt gcagataaca	20

<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-22 reverse primer(mouse)	
<400>	14	
	gctgatgtga caggagctga	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Muc2 forward primer(mouse)	
<400>	15	
	ggtccagggt ctggatcaca	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Muc2 reverse primer(mouse)	
<400>	16	
	gctcagctca ctgccatctg	20
<210>	17	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Muc2 forward primer(human)	
<400>	17	
	aggatgacac catctacctc acc	23
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Muc2 reverse primer(human)	

<400>	18	
ggtgtaggca tcgctcttct c		21
<210>	19	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CAMP forward primer(human)	
<400>	19	
gcacgctgac accactacc		19
<210>	20	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CAMP reverse primer(human)	
<400>	20	
cgggctattc cctgtccac		19