



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0075106
(43) 공개일자 2022년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0162746
(22) 출원일자 2020년11월27일
심사청구일자 2020년11월27일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
윤호근
경기도 고양시 일산동구 강송로 33, 103동 2808호(백석동, 일산요진와이시티)
박수연
경기도 성남시 분당구 판교원로 46, 1202동 803호
(74) 대리인
파도특허법인유한회사, 이재영

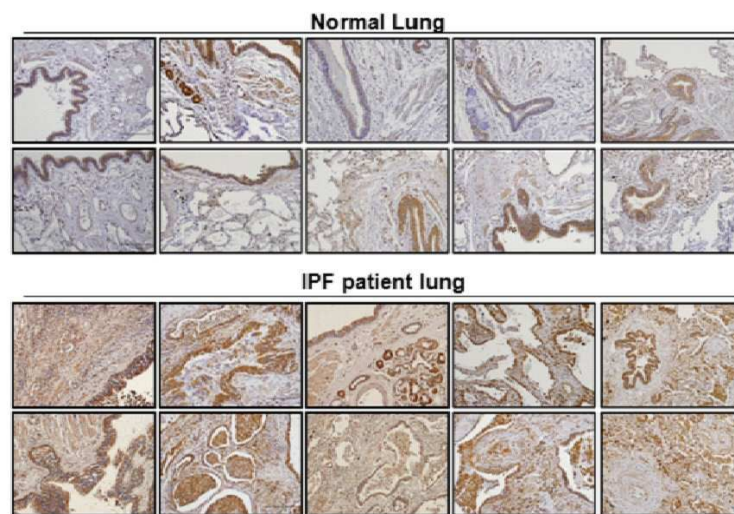
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 섬유증의 진단 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명에 의하는 경우 섬유증의 발병 여부 또는 발병 가능성을 신속하고 정확하게 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 발병한 섬유증을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 43/00 (2018.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/5434 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)
G01N 2800/7052 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108062
과제번호	2020R1A2C3003303
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	섬유화질환의 후성유전학적 제어기전 연구
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108917
과제번호	2018R1A5A2025079
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	만성난치질환 시스템의학 연구센터
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111187
과제번호	2017R1E1A01072732
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	전략공모
연구과제명	세포사멸 유도 단백질 PDCD5에 의한 폐섬유화 전사조절 네트워크 규명
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

프로그래밍된 사멸 단백질 5(Programmed Cell Death 5; PDCD5) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 제제를 포함하는 섬유증의 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PDCD5의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 PDCD5에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고핵타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 애포머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 섬유증의 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PDCD5를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 섬유증의 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 섬유증은 신장, 간, 폐, 심장, 뼈 또는 골수 및 피부로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 기관에 발생된 섬유증인, 섬유증의 진단용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 섬유증의 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트, ELISA 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인, 섬유증의 진단용 키트.

청구항 7

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 프로그램된 사멸 단백질 5(Programmed Cell Death 5; PDCD5) 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 섬유증을 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 PDCD5의 발현 수준을 측정하는 단계는 상기 PDCD5에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고핵타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 애포머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 제제에 의해 수행되는, 정보 제공 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 PDCD5의 발현 수준을 측정하는 단계는 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 10

제7항에 있어서,

상기 PDCD5를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 제제에 의해 수행되는, 정보 제공 방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 PDCD5를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계는 역전사 증합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 증합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 증합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 칩에 의해 수행되는, 정보 제공 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 생물학적 시료에 대하여 측정된 상기 PDCD5 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 섬유증이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함하는, 정보 제공 방법.

청구항 13

제7항에 있어서,

상기 섬유증은 신장, 간, 폐, 심장, 뼈 또는 골수 및 피부로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 기관에 발생된 섬유증인, 정보 제공 방법.

청구항 14

프로그래밍된 사멸 단백질 5(Programmed Cell Death 5; PDCD5)의 활성 억제제 또는 상기 PDCD5를 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 섬유증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 PDCD5의 활성 억제제는 상기 PDCD5에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 PDCD5를 암호화하는 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA), 마이크로 RNA(microRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 섬유증은 신장, 간, 폐, 심장, 뼈 또는 골수 및 피부로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 기관에 발생된 섬유증인, 약학 조성물.

청구항 18

프로그래밍된 사멸 단백질 5(Programmed Cell Death 5; PDCD5)의 활성 억제제 또는 상기 PDCD5를 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 섬유증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 섬유증을 진단할 수 있는 조성물과, 상기 섬유증을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조직은 세포 외 매트릭스에 결합되어 있고, 혈관 네트워크에 의해 둘러싸여 있는 잘 정돈된 세포 군집을 포함한다. 섬유화 또는 섬유증(Fibrosis)은 다양한 조직의 구조 및 기능을 변화시키는 손상(Injury) 또는 염증에 따른 콜라겐 매트릭스의 비정상적인 축적이다. 섬유증의 경우, 그 발생 위치와는 무관하게, 정상 조직을 대체하는 콜라겐 매트릭스와 같은 섬유질 결합 조직의 과도한 축적이 대부분의 병인학적 요인에 해당한다. 신장, 간, 지방, 폐, 심장, 뼈 또는 골수, 및 피부 등에서의 진행성 섬유증은 사망 또는 고통의 주요한 요인이다.

[0003] 상기 섬유증 중에서 특히, 폐에 발생하는 섬유증인 폐섬유증(Pulmonary fibrosis)은 폐 조직의 폐포 벽에 만성 염증 세포들이 침투하면서 조직 섬유화를 유도하여 폐 조직의 심각한 구조적 변이를 일으키는 질환을 말한다. 어떠한 원인에 의해 일단 섬유화가 진행되면 폐 조직이 단단하게 굳고 폐포 벽이 두꺼워져 혈액에 의한 산소 공급량이 줄어들게 되고, 이에 따라 호흡이 어려워지게 된다. 현재 의학으로는 이미 섬유화가 진행된 폐 조직을 완전히 복구할 수 있는 치료 방법이 없어, 섬유화 진행 초기에 발견하거나 또는 폐 이식을 제외하면 대개 증상이 발병되고 3 ~ 5년 이후 환자가 결국 사망에 이르게 된다.

[0004] 진행 초기에 발견된 폐섬유증의 치료 방법으로는 스테로이드(Steroid), 아자티오프린(Azathioprine), 사이클로포스파 마이드(Cyclophosphamide)와 같은 스테로이드계 약물을 이용한 치료 방법, 아세틸시스테인(Acetylcysteine)과 같은 항산화제를 이용한 치료 방법 및 사이토카인(Cytokine), IFN- γ (Interferon- γ)와 같은 성장인자 투여를 통한 치료 방법 등이 있다. 스테로이드계 약물 및 항산화제를 이용한 치료 방법들은 2000년도부터 지속적으로 연구 및 보고된 것은 많으나 아직까지 뚜렷한 약물 효능으로 입증된 것이 없는 상태이며, 장기간 투여 시 전신 부작용을 초래하거나, 내성이 생기는 부작용들을 초래하는 것으로 보고된 바 있다. 성장인자 투여를 통한 치료법은 최근 들어 많은 이목을 받고 있는 치료법으로서 폐섬유증에 중요한 인자로 알려진 TGF- β (Transforming growth factor- β)의 생산을 억제하는 '인터페론'을 이용한 비교적 근본적인 접근 방식의 치료법이다. 이러한 발명의 원인을 분석하여 치료하는 접근 방식 때문에 스테로이드계 약물 및 항산화제를 이용한 치료법에 비해 부작용이 적고, 효능이 우수하여 주사제 또는 에어로졸 방식과 같은 다양한 형태의 치료법들이 보고되어 있다. 하지만 아직까지 폐섬유증의 정확한 발병 원인이 알려져 있지 않기 때문에 인터페론과 같은 단일 성분에 의한 치료 효능은 일시적일 수 있고, 이는 일부 환자들에 대해서만 효능이 나타날 수 있으므로 지속적인 연구 및 임상시험이 필요하다.

[0005] 이러한 필요성에 따라 전사작용에 직접적인 역할을 하는 전사인자를 비롯한 수많은 단백질의 기능을 조절하는 기작으로, 단백질을 구성하는 기본단위인 아미노산 중의 라이신(Lysine) 잔기를 조절하여 단백질의 발현 등과 같은 현상에 영향을 미치게 되는 히스톤 단백질의 아세틸화와 같은 단백질의 번역 후 변형과 관련된 성분에 대한 연구가 진행되고 있으나 아직까지 그 효과가 뛰어난 물질에 대한 연구가 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) US 2014-0350304 A

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 일 목적은 섬유증의 진단용 조성물, 이를 포함하는 키트 또는 이를 이용하여 섬유증을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0009] 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

섬유증의 진단

- [0011] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 프로그램된 사멸 단백질 5(Programmed Cell Death 5; PDCD5) 또는 이를 암호화하는 유전자를 포함하는 섬유증의 진단용 바이오마커에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명에서 상기 "프로그램된 사멸 단백질 5(Programmed Cell Death 5; PDCD5)"는 PDCD5 유전자에 의해 코딩되는 단백질로, 중앙 세포에서 세포자멸 유도 자극과 독립적인 세포 자멸 동안 발현되는 단백질에 해당한다. 세포자멸 유도 전에 본 유전자 산물은 핵 및 세포질에 분배되어 있고, 세포 자멸이 유도되면 단백질 수준이 증가하여 세포질로부터 재위치화되어 핵에 축적된다. 본 발명에서 상기 PDCD5는 서열번호 1로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 본 발명에서 상기 "섬유증"은 섬유아세포에 의한 세포 외 기질의 비정상적인 생성, 축적 및 침착이 일어나는 질환으로, 다양한 조직의 구조 및 기능을 변화시킬 수 있는 손상 또는 염증에 의한 콜라겐 매트릭스가 비정상적으로 축적될 수 있는 기관이라면 모든 기관의 섬유증이 포함될 수 있고, 바람직하게는 신장, 간, 폐, 심장, 뼈 또는 골수 및 피부로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 기관에 발생된 섬유증일 수 있고, 보다 바람직하게는 폐 섬유증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, PDCD5 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 체제를 포함하는 섬유증의 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에서 상기 PDCD5의 발현 수준을 측정하는 체제는 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩타이드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 PDCD5 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 상기 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.
- [0018] 본 발명에서 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.

- [0019] 본 발명에서 상기 "애타머"는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자이며, 애타머의 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.
- [0020] 본 발명의 상기 PDCD5 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 및 안티센스 뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0021] 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.
- [0022] 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.
- [0023] 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 뉴클레오사이드는 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 쌍을 이루어 이중 나선의 안정성을 높일 수 있다.
- [0024] 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.
- [0025] 본 발명에 따른 PDCD5 단백질 또는 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.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에 따른 진단용 조성물을 포함하는 질환의 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 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.
- [0029] 본 발명의 상기 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 상기 진단용 키트는 예를 들면, 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 암호화하는 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.

[0031] 본 발명에서 상기 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 기관, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명에서 상기 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.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PDCD5 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 섬유증을 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

[0035] 본 발명의 상기 "목적하는 개체"란 해당 질환의 발병 여부가 불확실한 개체로, 섬유증이 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.

[0036] 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, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 정보 제공 방법에서, PDCD5 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제 등과 관련된 내용은 상기 진단용 조성물에 기재된 바와 중복되어, 명세서의 과도한 복잡을 피하고자 이하 그 기재 생략한다.

[0038] 본 발명에서 상기 PDCD5의 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.

[0039] 본 발명에서 상기 PDCD5를 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.

[0040] 본 발명에서 상기 생물학적 시료에 대하여 측정된 상기 PDCD5 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 섬유증이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0041] 더 나아가, 본 발명에서 상기와 같이 생물학적 시료에 대하여 측정된 상기 PDCD5 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 섬유증의 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 경우, 상기 목적하는 개체에 대하여 그 질환에 대한 약제 투여를 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] **섬유증의 예방, 개선 또는 치료**
- [0044] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, PDCD5의 활성 억제제 또는 상기 PDCD5를 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 섬유증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 본 발명에서 상기 PDCD5의 활성 억제제는 상기 PDCD5 단백질의 활성을 억제하는 기능을 억제할 수 있는 기능이 발휘되는 것이라면 모두 포함될 수 있고, 예를 들면, 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 상기 "펩티드 미메틱스(Peptide Mimetics)"는 PDCD5를 암호화하는 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는 β -턴 디펩티드 코어(Nagai et al. Tetrahedron Lett 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류(Ewenson et al. J Med chem 29:295, 1986; 및 Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce chemical co. Rockland, IL, 1985), 아제핀(Huffman et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 벤조 디아제핀(Freidinger et al. in Peptides; chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), β -아미노알콜(Gordon et al. Biochem Biophys Res commun 126:419 1985) 및 치환 감마 락탐환(Garvey et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 사용하여 생성할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 상기 PDCD5를 암호화하는 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA), 마이크로 RNA(microRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0048] 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(Rothenberg et al., J. Natl. Cancer Inst., 81:1539-1544, 1999). 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포 주입, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.
- [0049] 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 다이서(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 이용할지 여부 및 적절한 상보적인 siRNA 염기 서열은 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 PDCD5를 암호화하는 유전자 유전자에 의해 암호화되는 단백질; 또는 이의 세포 외 도메인을 암호화하는 유전자에 상보적으로 작용하여 mRNA 분자를 절단하여 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 유전자의 발현을 억제할 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 상기 siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 상기 유전자 서열을 이용하여 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(In vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내 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 전달

을 통한 발현법 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0051] 본 발명에서 상기 "마이크로 RNA(microRNA)"는 발생, 분화, 증식, 보존 및 아폽토시스 등 다양한 생물학적 과정을 조절한다. 마이크로 RNA는 일반적으로 타겟 mRNA를 불안정하게 하거나, 번역을 방해함으로써 타겟 mRNA를 암호화하는 유전자의 발현을 조절한다.
- [0052] 본 발명에서 상기 "리보자임(ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며 PDCD5을 암호화하는 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지의 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.
- [0053] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학 조성물을 이용하여 질환 증상을 차단하거나, 질환 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서, "치료" 및 "개선"은 본 발명의 약학 조성물을 조사하여 질환 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 상기 섬유증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있으나, 구체적인 사용 형태는 특별히 제한하지 않는다.
- [0056] 본 발명에서 상기 약학 조성물은 다른 섬유증의 예방, 개선 또는 치료제와도 추가로 병용 투여될 수 있고, 이를 통해서 섬유증의 예방, 개선 또는 치료 효과를 더욱 증강시킬 수 있다.
- [0057] 본 발명에서 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.
- [0058] 본 발명에서 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 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 제형할 수 있다.
- [0059] 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, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 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 투여가 바람직하다.
- [0061] 본 발명에서, "비경구"는 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.
- [0062] 본 발명에서 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 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 제형될 수 있다.

- [0063] 본 발명에서 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없는 식물추출물로 구성된 것이므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 활성 억제제 또는 발현 억제제가 상기 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있다.
- [0065] 여기서, 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 함유하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 즉, 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 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등을 들 수 있다.
- [0066] 그 외 본 발명의 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 함유할 수 있다.
- [0067] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

- [0068] 본 발명에 의하는 경우 섬유증의 발병 여부 또는 발병 가능성을 신속하고 정확하게 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 발병한 섬유증을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0069] 도 1은 실시예 1에서 특발성 폐섬유증(Idiopathic Pulmonary Fibrosis; IPF) 환자 및 정상인의 폐 조직에 대하여 항-PDCD5 항체를 이용하여 면역 염색한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 2는 실시예 1에서 특발성 폐섬유증(IPF) 환자 및 정상인의 폐 조직에 대하여 항-PDCD5 항체를 이용하여 면역 염색한 뒤 염색 강도를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 3은 실시예 2에서 특발성 폐섬유증(IPF) 환자 및 정상인의 폐 조직에 대하여 RNA 시퀀싱 결과 PDCD5 유전자의 발현 수준을 측정한 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 4는 실시예 3에서 블레오마이신을 주입하여 섬유증을 유도한 마우스 모델에서 항-PDCD5 항체를 이용하여 면역 염색 및 MTS를 수행한 사진과, 염색 후 총 면적 대비 DAB(3,3'-diaminobenzidine) 염색 및 MTS 염색된 비율을 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 5는 실시예 4에서 독시사이클린을 주입하여 섬유증을 유도한 TGF- β_1 과발현 마우스 모델(Ccsp-rtTA-tTS-TGF β_1)에서 항-PDCD5 항체를 이용하여 면역 염색 및 MTS를 수행한 사진과, 염색 후 총 면적 대비 DAB(3,3'-diaminobenzidine) 염색 및 MTS 염색된 비율을 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 6은 실시예 5에서 폐에서 PDCD5를 녹아웃 시킨 뒤 블레오마이신을 주입한 후 MTS 염색한 사진과, 염색 후 총 면적 대비 MTS 염색된 비율을 측정하고 조직 내 콜라겐의 양을 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 7은 실시예 6에서 폐 상피세포 및 폐 섬유아세포를 공배양 시 TGF- β_1 , 항-PDCD5 항체 또는 항-CTGF 항체를 처리한 뒤 폐 섬유아세포의 수를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0070] 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.

[0072] 실시예

[0074] [실시예 1] 섬유증 환자 조직에서 PDCD5 발현 수준의 확인(1)

[0075] 특발성 폐섬유증(Idiopathic Pulmonary Fibrosis; IPF) 환자 및 정상인 각각으로부터 얻은 폐 조직을 10% 포르말린으로 고정시키고, 파라핀에 포매하여 7 μ m 두께의 절편을 슬라이드에 부착하였다. 그런 다음, 자일렌을 이용하여 상기 절편을 탈파라핀화 한 뒤에 고농도에서 저농도 순으로 에탄올을 처리하고, PDCD5(Programmed Cell Death 5)에 특이적인 항체를 이용하여 면역염색을 수행하고 광학 현미경을 이용하여 각 단백질들의 발현 수준을 측정하여, 그 결과를 도 1 및 2에 나타내었다.

[0076] 도 1 및 2에서 보는 바와 같이, 정상인으로부터 얻은 폐 조직에 비하여, 특발성 폐섬유증 환자의 폐 조직에서 PDCD5의 발현 수준이 현저히 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0078] [실시예 2] 섬유증 환자 조직에서 PDCD5 발현 수준의 확인(2)

[0079] 미국 국립생물공학정보센터 (NCBI)의 Gene Expression Omnibus(GEO)에 공개된 특발성 폐섬유증 환자 84명 및 정상인 각각으로부터 얻은 폐 조직에 대하여 수행한 RNA 시퀀싱 데이터에서 분석하였다 (GSE124685). RNA-서열 분석 방법은 Illumina사의 TruSeq RNA Sample Prep kit v2를 이용하여 mRNA 라이브러리를 생성하고, HiSeq 2500 플랫폼을 통해 세포주 당 100bp의 최소 4천만개의 paired-end read를 서열 분석하였다. 상기 서열 분석된 read는 TopHat-Cufflinks [Trapnell et al. 2012 PMID 22383036] 파이프라인을 이용하여 인간 레퍼런스 게놈에 정렬하고, 정규화된 (normalization) 값인 FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped)을 계산하여 분석하였다. 상기 분석을 통해 상기 조직의 PDCD5 전사체에 대한 정규화된 발현량을 계산하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0080] 도 3에서 보는 바와 같이, 정상인에 비하여 특발성 폐섬유증 환자의 폐 조직에서 PDCD5의 발현 수준이 현저히 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0082] [실시예 3] 섬유증 유도 마우스 모델의 폐 조직에서 PDCD5 발현 수준의 확인(1)

[0083] 7주령의 20 ~ 25 g의 무균 수컷 C57BL/6 마우스(Orient Bio, 한국)에 블레오마이신(Bleomycin; BLM)이 포함된 용액을 수술을 통하여 기관지 내로 주입시키는 방식으로 투여하였다(40 μ l에 4 mg/kg·체중). 4주 동안 상기 마우스를 사육한 뒤 폐 조직을 적출하여, PDCD5에 특이적인 항체를 이용하여 면역염색을 수행하고, 폐 조직이 부착된 슬라이드를 마손 트리크롬(Masson's Trichrome; MTS)으로 염색하여 섬유화를 확인하고, 이를 바탕으로 총 면적 대비 DAB(3,3'-diaminobenzidine) 염색 및 MTS 염색된 비율을 측정하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0084] 도 4에서 보는 바와 같이, MTS 염색 결과 블레오마이신(BLM)의 과발현으로 인해 섬유증이 유도된 폐섬유증 동물 모델의 폐 조직에서 섬유화가 일어난 것을 확인하였고, 이렇게 섬유증이 유도된 폐 조직에서 PDCD5의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0086] [실시예 4] 섬유증 유도 마우스 모델의 폐 조직에서 PDCD5 발현 수준의 확인(2)

[0087] 7주령의 20 ~ 25 g의 무균 수컷 C57BL/6 마우스(Orient Bio, 한국)에 독시사이클린이 포함된 용액(2% sucrose 가 포함된 0.5mg/ml의 독시사이클린)을 급수한 뒤, 4주 동안 상기 마우스를 사육하여 TGF- β_1 과발현 마우스 (Ccsp-rtTA-tTS-TGF β_1)로, 즉 독시사이클린(Doxycycline)에 의해 폐에 특이적으로 섬유화가 유도된 마우스 모델을 제작하였다. 이후 상기 마우스의 폐 조직을 적출하여, PDCD5에 특이적인 항체를 이용하여 면역염색을 수행하고, 폐 조직이 부착된 슬라이드를 마손 트리크롬(MTS)으로 염색하여 섬유화를 확인하고, 이를 바탕으로 총 면적 대비 DAB(3,3'-diaminobenzidine) 염색 및 MTS 염색된 비율을 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0088] 도 5에서 보는 바와 같이, MTS 염색 결과 블레오마이신(BLM)의 과발현으로 인해 섬유증이 유도된 폐섬유증 동물 모델의 폐 조직에서 섬유화가 일어난 것을 확인하였고, 이렇게 섬유증이 유도된 폐 조직에서 PDCD5의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0090] [실시예 5] PDCD5 녹아웃 마우스 모델에 섬유증 유도 여부 확인

[0091] 7주령의 20 ~ 25 g의 무균 수컷 C57BL/6 마우스(Orient Bio, 한국)의 폐에서 PDCD5를 녹아웃 시킨 후 블레오마이신(Bleomycin; BLM)이 포함된 용액을 수술을 통하여 기관지 내로 주입시키는 방식으로 투여하였다(40 μ l에 4 mg/kg · 체중). 4주 동안 상기 마우스를 사육한 뒤 폐 조직을 적출하여, PDCD5에 특이적인 항체를 이용하여 면역염색을 수행하고, 폐 조직이 부착된 슬라이드를 마손 트리크롬(Masson's Trichrome; MTS)으로 염색하여 섬유화를 확인하고, 이를 바탕으로 총 면적 대비 MTS 염색된 비율을 측정하고 조직 내 콜라겐의 양을 측정하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0092] 도 6에서 보는 바와 같이, PDCD5가 발현되는 마우스에 블레오마이신을 주입한 경우에 비하여, 폐에서 PDCD5를 녹아웃 시킨 뒤 블레오마이신을 주입한 경우는 섬유화 정도가 현저히 감소하였고 미미한 수준으로 섬유화가 유도된 것을 확인할 수 있었다.

[0094] [실시예 6] PDCD5 발현 억제로 인한 섬유증 치료 효과 확인

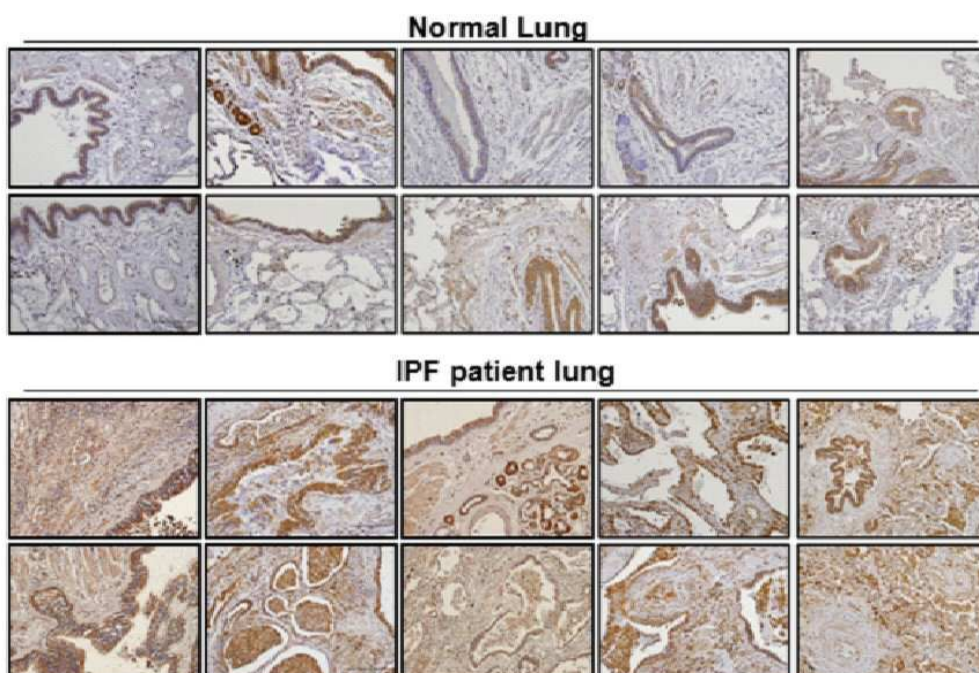
[0095] 폐 상피세포와 폐 섬유아세포를 공배양하고 TGF- β_1 을 첨가하여 섬유증을 유도하였다. 이때, 항-PDCD5 항체(R&D systems, MAB7325) 또는 양성 대조군으로 항-CTGF 항체(Santacruz Biotechnology, sc-365970)를 처리한 뒤 폐 섬유아세포의 수를 측정하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0096] 도 7에서 보는 바와 같이, 폐 상피세포와 폐 섬유아세포의 공배양 시 TGF- β_1 을 첨가하자 폐 섬유아세포의 수가 증가되었으나, 항-PDCD5 항체를 처리하자 TGF- β_1 무처리군과 유사한 수준으로 상기 폐 섬유아세포의 수가 감소한 것을 확인할 수 있었다.

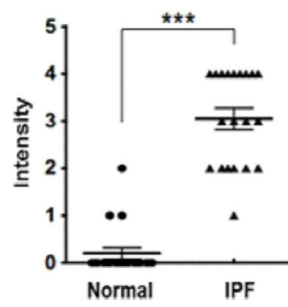
[0098] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

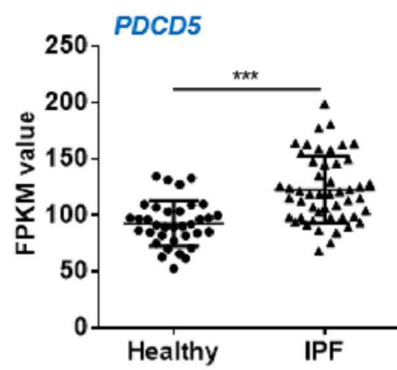
도면1



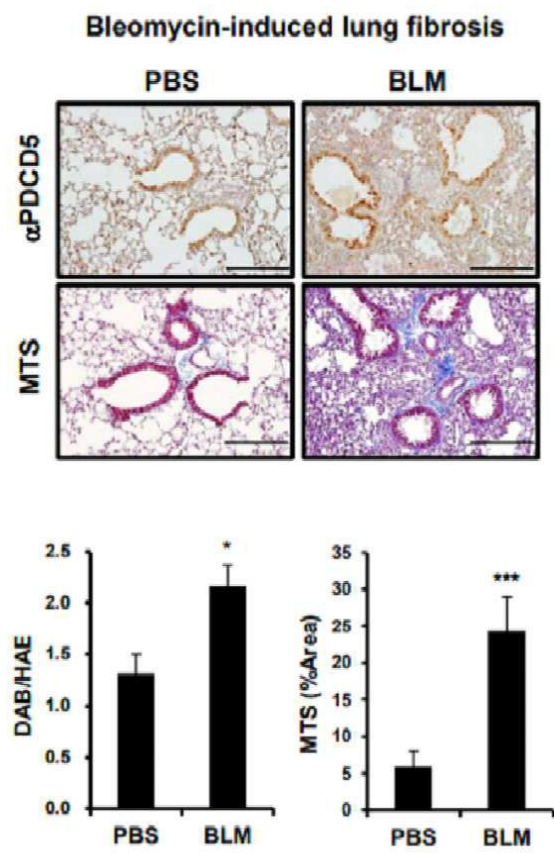
도면2



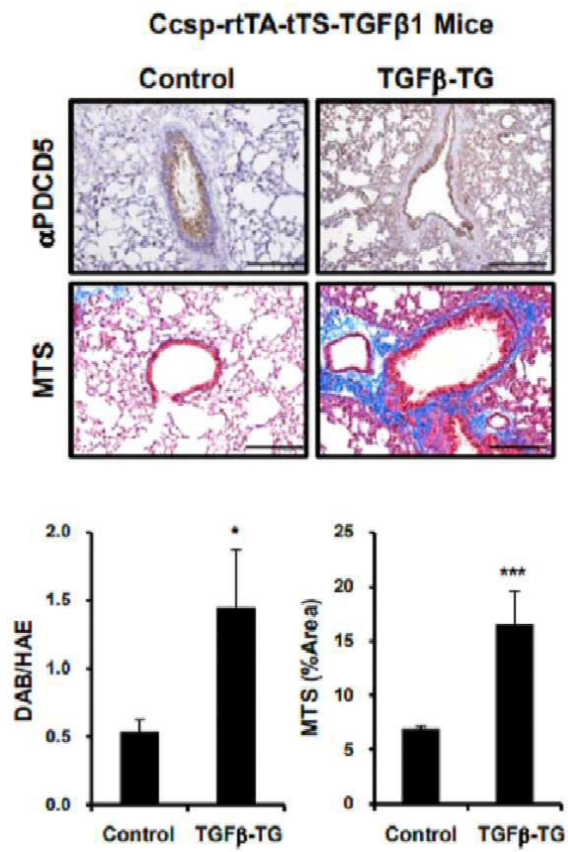
도면3



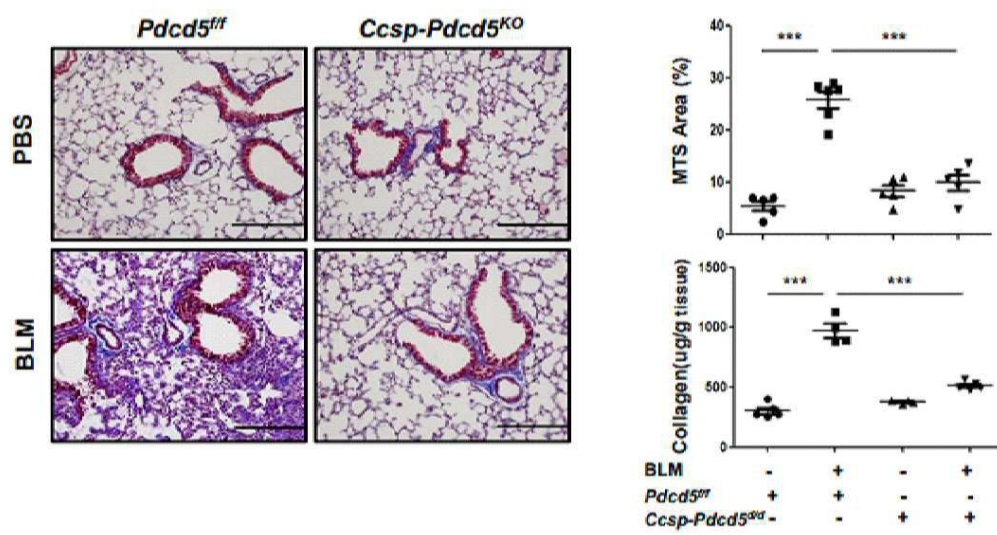
도면4



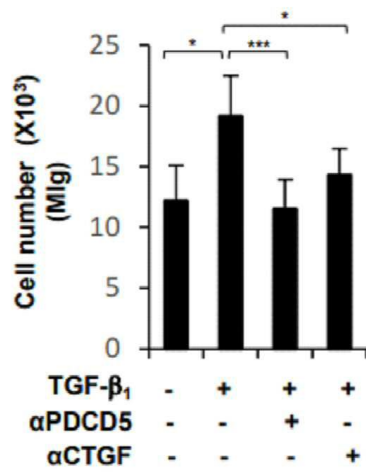
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> A composition for diagnosing or treating fibrosis

<130> PDPB204282

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Asp Glu Glu Leu Glu Ala Leu Arg Arg Gln Arg Leu Ala Glu

1 5 10 15

Leu Gln Ala Lys His Gly Asp Pro Gly Asp Ala Ala Gln Gln Glu Ala

20 25 30

Lys His Arg Glu Ala Glu Met Arg Asn Ser Ile Leu Ala Gln Val Leu

35 40 45

Asp Gln Ser Ala Arg Ala Arg Leu Ser Asn Leu Ala Leu Val Lys Pro

50 55 60

Glu Lys Thr Lys Ala Val Glu Asn Tyr Leu Ile Gln Met Ala Arg Tyr

65 70 75 80

Gly Gln Leu Ser Glu Lys Val Ser Glu Gln Gly Leu Ile Glu Ile Leu

85 90 95

Lys Lys Val Ser Gln Gln Thr Lys Lys Thr Thr Thr Val Lys Phe Asn

100

105

110

Arg Arg Lys Val Met Asp Ser Asp Glu Asp Asp Asp Tyr

115

120

125