(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0083861
(43) 공개일자 2013년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0003850
(22) 출원일자 2013년01월14일
심사청구일자 2013년01월14일
(30) 우선권주장
1020120004244 2012년01월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)
(72) 발명자
박용범
서울특별시 서초구 서초3동 1490-36 상지리츠빌 4차 502호
이상원
서울특별시 성동구 옥수동 현대아파트105동 502호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

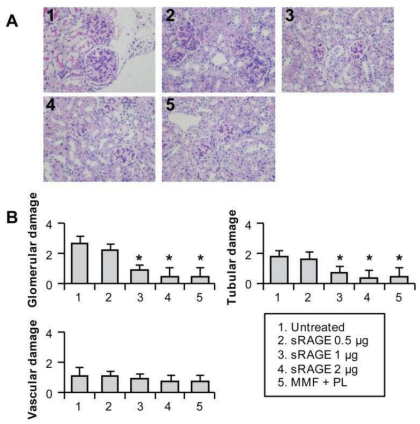
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **용해성 RAGE를 유효성분으로 포함하는 루푸스 신염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 sRAGE를 유효성분으로 포함하는 루푸스 신염(lupus nephritis)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 sRAGE는 면역글로블린 G의 중쇄(Heavy chain) 및 항체의 Fc 부위와 결합되어 있는 융합단백질로 제공되며, 본 발명의 조성물은 단백뇨의 양, 신장 조직 내 면역복합체 침착, 혈청 내 항-dsDNA 항체의 농도를 효과적으로 감소시킴으로써 루푸스 신염에서 우수한 치료효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

최동훈

서울특별시 서초구 잠원동 한신 신반포8차 305동 1201호

박성하

서울특별시 강남구 압구정동 437(28/8) 현대아파트 202-1208

홍성유

서울특별시 동대문구 청량리1동 한신아파트 106동 1504호

특허청구의 범위

청구항 1

최종당화산물 수용체(receptor for advanced glycation end products: RAGE)의 리간드에 결합할 수 있는 서열목록 제 1 서열의 용해성(soluble) RAGE(sRAGE)를 유효성분으로 포함하는 루푸스 신염(lupus nephritis)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 서열목록 제 1 서열의 sRAGE는 RAGE의 리간드와 RAGE 사이의 결합을 방해하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 sRAGE는 면역글로블린 G의 중쇄(Heavy chain) 및 항체의 Fc 부위와 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 항체의 Fc 부위는 인간 면역글로블린 G1의 Fc 부위인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 단백뇨의 양을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 신장 조직 내 면역복합체 침착을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈청 내 항-dsDNA 항체 농도를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 항체는 IgG인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 IgG는 IgG2a, IgG2b 또는 IgG3인 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 용해성 RAGE를 유효성분으로 포함하는 루푸스 신염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최종당화산물(advanced glycation end product, AGE)은 당단백질로 단백질의 자유 아미노 그룹 및 당 간의 비-효소성 반응을 통해 생산된다. AGE는 당뇨병, 노화, 저산소증, 허혈성 빈혈, 만성 신장병 및 염증과 같은 다양한 병리학적 또는 생리학적 환경에서 형성된다. 면역 글로블린의 상과에 속하는 최종당화산물 수용체(Receptor for advanced glycation end products, RAGE)는 다양한 리간드들과 상호작용하며, 내재성 면역 반응을 유도한다. RAGE는 최종당화산물(advanced glycation end product, AGE) 뿐만 아니라 S100/칼그래눌린 패밀리, 암포테린(high-mobility group B1, HMGB1), 괴사된 세포에서 많은 분비되는 핵 단백 등의 내인성 리간드 수용체로 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 체계의 활성화, MAPK 체계의 활성화, NF-κB의 활성에 의해 염증반응이 촉진되고 혈관 평근의 증식을 촉진시키는 것으로 보고되고 있다.

[0003] RAGE는 외재성 병원균과 상호작용하는 TLR(toll like recepter)와 달리 내재성 리간드들과 상호작용하는데, 다양한 내재성 리간드들을 생성하는 만성 염증에 의해 유발되는 다양한 질병의 발병에 관여한다. mRAGE(Membrane-bound form of RAGE)는 세포 외 부위, 소수성 트랜스-멤브레인-스패닝 도메인 및 짧은 세포질 도메인의 세 개 도메인으로 구성되며, 이것은 포스트-RAGE 신호전달에 중요한 역할을 한다. 내재성 리간드에 RAGE가 결합하면 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS), MAPK(mitogen-activated protein kinase), PI3K(phosphoinositide 3-kinase) 및 JAK(janus kinase)/신호 변환기, STAT 경로를 포함하는 다양한 세포 내 신호 케스케이드가 시작된다. 중요하게도 RAGE 신호전달은 NF-κB(nuclear factor kappa B)의 핵 전좌의 진행 속도를 높이고, 조직 염증 및 염증성 세포 결집을 유도하는 TNF-α(tumor necrosis factor-α) 및 인터루킨-6의 발현을 증가시킨다.

[0004] 용해성 RAGE(soluble RAGE, 이하 sRAGE)는 RAGE와 같은 세포 외 부위를 갖는 반면, 트랜스-멤브레인 도메인 및 세포질 도메인은 갖고 있지 않다. sRAGE는 RAGE mRNA의 선택적 스플라이싱(alternative splicing) 또는 멤브레인 부분의 삭제(excision)로 인해 형성된다. sRAGE는 mRAGE에 앞서 세포 외 공간에서 RAGE 리간드에 결합할 수 있고, sRAGE는 mRAGE가 그들의 리간드에 결합하는 정도를 경쟁적으로 억제하여 결과적으로 NF-κB 활성화에 의한 염증반응을 감소시킨다.

[0005] 전신 홍반성 루푸스(Systemic lupus erythematosus, SLE)는 다양한 기관에서 발생하는 자가면역 질환의 하나이다. 루푸스 신염은 전신 홍반성 루푸스와 관련된 사구체신염으로 항-dsDNA 및 보체(complements, C, 주로 C3)를 포함하는 면역 복합체의 침착은 병리 생리학적으로 중요한 역할을 하며, 단백뇨의 양은 말초 사구체 모세혈관 고리의 크기를 반영하고 혈관사이 증식 및 막성 신증(membraneous nephropathy)에 따라 증가되는 경향이 있다. 증식성 사구체 신염(Class Ⅲ 및 Ⅳ)은 루푸스 신염의 가장 심각한 형태이다. 정맥, 구강 프레드니솔론(prednisolone, PL) 플러스, 정맥 시클로포스파미드(cyclophosphamide) 또는 구강 마이코페놀레이트 모페틸(mycophenolate mofetil, MMF)은 현재 증식성 사구체 신염의 표준 치료제로서 이용되고 있다.

[0006] 지금까지 건강한 사람들과 비교하였을 때, 전신 홍반성 루푸스 환자에서 HMGB1 혈청 내 수치가 높다는 것에 대해서 연구가 되었고, 전신 홍반성 푸루스 환자는 2차 괴사를 갖는 사멸성-세포의 식균작용을 악화시킨다는 것이 알려져 있다. HMGB1은 또한 전신 홍반성 루푸스에서 신장 손상 유래 항-dsDNA에 있어 프로-염증 매개체로써 작용한다는 것이 알려져 있다. 최근 RAGE 및 사구체 스트레스 간의 관계가 설명되고 있는데, RAGE가 족세포(podocyte) 및 사구체 상피 세포에 의해 발현된다는 것이 알려졌다. RAGE의 리간드는 족세포 또는 족세포 사멸에 의해 유되는 CCL2 및 ROS의 상향조절을 유도할 수 있다. 또한, RAGE 리간드는 사구체 상피세포 성장을 억제한다. RAGE는 B 세포의 표면에서 발견되며, HMGB1은 활성화된 자가반응성 B 세포에 결합하는 면역자극 복합체의 한 부분이라고 생각되어진다.

[0007] 또한, 최근 NF-κB가 루푸스-프론 마우스에서 혈관사이 증식의 주요 조절자로 재발견되었다. 따라서, sRAGE가 전신 홍반성 루푸스에 특이적인 자가 항체의 생산을 감소시킬 수 있다는 것을 충분히 추측할 수 있고, 더 나아가 sRAGE가 mRAGE와 리간드의 결합을 저해함으로써 그 이후에 NF-κB 전사를 통한 프로-염증 소분자의 생산 가능성을 감소시켜 루푸스 신염을 개선시킬 수 있다는 것을 짐작할 수 있다. 그러나, 비교적 긴 기간 동안 농도-의존적 방식으로 외재성 sRAGE의 효능을 평가한 연구 및 sRAGE와 표준 치료제의 효능을 비교한 연구도 발표되

지 않은 상황이다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 루푸스 신염의 신규한 치료제를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 sRAGE가 루푸스 신염 치료에 효과가 있음을 규명하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 루푸스 신염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 최종당화산물 수용체(receptor for advanced glycation end products: RAGE)의 리간드에 결합할 수 있는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하는 sRAGE를 유효성분으로 포함하는 루푸스 신염(lupus nephritis)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 루푸스 신염의 신규한 치료제를 발굴하고자 예의 연구 노력하였으며 그 결과, 본 발명자들은 sRAGE가 루푸스 신염 치료에 효과가 있음을 규명하였다.

[0014] 본 발명의 sRAGE는 리간드에 결합할 수 있는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는 본 발명의 sRAGE는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 필수적으로 구성되어 있다.

[0015] 본 발명에서 이용되는 sRAGE는 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하지만, sRAGE가 RAGE 리간드에 결합할 수 있는 범위에서, 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열의 변이체(즉, 생물학적 기능 균등물)를 포함할 수 있다는 것은 당업자에게 명확하다.

[0016] 본 발명에서, sRAGE 범위에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 sRAGE와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.

[0017] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 곁사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 곁사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

[0018] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스 (hydropathic idex)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신 (+4.5); 발린 (+4.2); 루이신 (+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스타인 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글라이신 (-0.4); 쓰레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 타이로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5). 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직

하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

[0019] 한편, 유사한 친수성 값 (hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌 (+3.0); 라이신 (+3.0); 아스팔테이트(+3.0± 1); 글루타메이트 (+3.0± 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글라이신 (0); 쓰레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 ± 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루이신 (-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4). 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

[0020] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

[0021] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 sRAGE는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 98%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio. 48:443(1970);* Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 sRAGE는 막관통 영역 또는 세포질 꼬리 부분을 포함하지 않는 RAGE 단백질이다(Park et al., *Nature Med.*, 4:1025-1031(1998). 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 sRAGE는 인간 sRAGE 또는 그의 단편을 포함할 수 있는데, 제1잔기로서 메티오닌이 아닌 글리신을 수반한다(예를 들어, Neeper et al, (1992). 또한, 본 발명에서 사용되는 sRAGE는 신호 서열이 제거된 인간 sRAGE 또는 이러한 아미노산 서열의 일부를 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명의 sRAGE는 RAGE 리간드와 RAGE 사이의 결합을 방해한다. sRAGE는 디코이 수용체(decoy receptor)로 작용하여 혈중에 존재하는 RAGE 리간드들과 결합하여 세포막 RAGE 수용체와 결합하는 작용을 길항하는 역할을 한다. sRAGE는 RAGE mRNA의 선택적 스플라이싱(alternative splicing) 또는 멤브레인 부분의 삭제(excision)로 인해 형성되며 전체 RAGE의 1-2%를 차지한다.

[0024] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물에서 sRAGE는 면역글로블린의 Fc 부위로부터 유래된 폴리펩티드와 융합된 융합 단백질 형태로 제공된다. 융합 단백질에는 RAGE 또는 그의 단편으로부터 유래되지 않은 몇 가지 유형의 펩티드가 포함될 수 있다. 융합 단백질은 면역글로블린으로부터 유래된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 면역글로블린 폴리펩티드가 면역글로블린 중쇄 또는 그의 일부(즉, 단편)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 단편은 면역글로블린의 Fc 부위로부터 유래된 폴리펩티드를 포함할 수 있는데, 이러한 Fc 부위는 중쇄 힌지 폴리펩티드 및 단량체로서의 면역글로블린 중쇄의 CH_2 및 CH_3 도메인을 포함한다.

중쇄(또는 그의 일부)는 다음 공지된 중쇄 이소형 중의 어느 한 가지로부터 유래될 수 있다: IgG(γ), IgM(μ), IgD(δ), IgE(ε), 또는 IgA(α). 또한, 중쇄(또는 그의 일부)는 다음 공지된 중쇄 아유형 중의 어느 한 가지로부터 유래될 수 있다: IgG1(γ1), IgG2(γ2), IgG3(γ3), IgG4(γ4), IgA1(α1), IgA2(α2), 또는 생물학적 활성을 변경시키는 이들 이소형 또는 아유형의 돌연변이물.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 sRAGE는 면역글로블린 중쇄-sRAGE-인간 면역글로블린 G1(IgG1)의 형태를 갖는다. 본 발명의 sRAGE는 Fc 부위가 융합된 융합 단백질 형태로 천연 sRAGE보다 우수한 안정성을 나타낸다.

[0026] 본 명세서의 용어 "루푸스"는 결합 조직을 공경하는 항체가 관여하는 자가면역 질환 또는 장애를 말하며, 루푸스의 주요형태는 전신성 질환, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 예를 들어 피부 SLE 및 아급성 피부 SLE 뿐만 아니라 기타 유형의 루푸스(신염, 신외성, 뇌염, 소아과, 비-신성, 원판상 및 탈모증 등)을 포함한다.

[0027] 본 발명에서의 루푸스 신염(lupus nephritis)이란 전신성 홍반성 루푸스와 관련된 사구체신염으로 루푸스가 심한 경우 잘 동반되는 질환으로 맥관막 및 기저막내의 항원항체 복합체 침착, 혈뇨 및 요독증을 동반하고 수 주내에 사망하는 전격성 경과, 또는 만성진행성 경과를 취하는 것이 특징이다. 루푸스는 자가면역 질환으로 유전적 소인이 있는 환자에서 자외선이나 세균이나 바이러스 감염과 같은 환경적 요인이 작용하는 면역세포들이 과도하게 반응하고 면역 세포들에 만들어진 자가항체가 우리 몸을 적으로 판단하고 우리 몸의 여러 장기들을 공격하여 손상을 주기 때문에 발생하는 질환이다. 혈액 내에 과도하게 존재하는 여러 가지 자가항체나 면역복합체가 신장의 사구체에 침착하고, 염증 세포가 사구체 내로 침투하여 신장의 사구체에 염증과 손상을 유발하는 것을 루프스 신염이라고 말한다. 신장 조직이 파괴되어 소변 검사에서 단백뇨, 혈뇨 같은 이상 소견이 나타나게 된다. 단백뇨가 심해지면서 혈액 내의 단백질이 다량 빠져 나가면 혈액 성분이 조직으로 빠져 나가서 체액의 축적이 생기게 되고, 이로 인해 체중 증가와 부종이 생기며 그 결과 다리, 발목, 손이 부어오르는데 이것이 루푸스 신염을 드러내는 첫 증상이 된다. 루프스 신염 환자의 대부분에서 동맥경화증이 더 잘 발생하며 이로 인해 고혈압, 고지혈증, 고혈당과 같은 증상이 발생한다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 sRAGE를 포함하는 단백뇨의 양을 감소시킨다. 단백뇨는 요단백이라고도 불리며 단백질이 신장에서 걸러지지 않고 소변을 통해 체외로 배출되는 것을 말한다. 정상인의 경우 섭취하는 단백질이 신장에서 대부분 걸러져 150 mg 미만의 단백질이 배설된다. 하루 150 mg 이상의 요단백 배설을 병리적 단백뇨로 지칭하며, 일반적으로 단백뇨라고 부른다.

[0029] 본 발명에 따르면, 루푸스 마우스 모델에 sRAGE를 투여한 후 단백뇨를 측정한 결과, sRAGE를 처리한 경우 대조군과 비교하여 단백뇨의 양이 현저하게 감소하였다(도 1A).

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 sRAGE를 포함하는 조성물은 신장 조직 내 면역복합체의 침착을 감소시킨다. 면역복합체(immune complexes, IC)는 항원 및 항체가 상호 결합된 덩어리를 가리키며, 이러한 면역복합체는 포식세포에 의해 쉽게 제거되는데 다량의 항원이 들어왔거나 항원을 제거하는데 실패하여 지속적으로 항원이 체내에 존재하면서 조직에 침착되면 면역질환을 일으키게 된다. 본 발명에 따르면, NZB/WF1 마우스의 신장을 C3 및 IgG 항체를 이용하여 염색하고 면역형광법으로 분석한 결과, sRAGE를 처리한 경우 대조군과 비교하여 면역복합체의 침착이 현저하게 감소하였다(도 3). 따라서, 면역복합체의 침착을 현저하게 감소시키는 본원발명의 조성물은 루푸스에 있어 뛰어난 치료효과를 갖는다고 할 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 sRAGE를 포함하는 조성물은 혈청 내 항-dsDNA 항체 농도를 감소시킨다. 바람직하게는 항-dsDNA 항체는 IgG이고, 보다 바람직하게는 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3이며, 보다 더 바람직하게는 IgG2a, IgG2b 및 IgG3이다.

[0032] 항-dsDNA 항체는 핵 안에 존재하는 이중나선 DNA에 대한 자가항체로 질병활성이 있는 루푸스(active lupus) 환자의 40-90%가 양성이며, 병인에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있어 루푸스의 진단에 중요한 요인이다. 본 발명에 따르면, NZB/WF1 마우스의 신장에서 항-dsDNA 항체를 확인한 결과, sRAGE(2 μg)를 처리한 경우 대조군과 비교하여 항-dsDNA 항체가 현저하게 감소하였다(도 3). 또한, sRAGE를 처리한 경우 IgG의 아형 가운데 IgG2a, IgG2b 및 IgG3의 혈청 내 농도가 현저하게 감소하였다.

[0033] 항-dsDNA 항체는 루푸스를 확진하는 인자이며, 루푸스 질병이 악화될 경우 증가하는 것으로 항-dsDNA 항체의 혈청 내 농도를 감소시키는 본 발명의 조성물은 루푸스 치료에 뛰어난 효과를 갖는다고 할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학 적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제,

향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19 th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0035] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구 투여 방식으로 적용되며, 가장 바람직하게는 정맥 투여할 수 있다.

[0036] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 ㎎/㎏ 범위 내이다.

[0037] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스 제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 특징 및 이점(advantages)을 요약하면 다음과 같다:

[0039] (a) 본 발명은 sRAGE를 유효성분으로 포함하는 루푸스 신염(lupus nephritis)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0040] (b) 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 단백뇨의 양, 신장 조직 내 면역복합체 침착, 혈청 내 항-dsDNA 항체의 농도를 효과적으로 감소시킴으로써 루푸스 신염에서 우수한 치료효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 MMF + PL 및 농도별로 sRAGE를 NZB/WF1 마우스에 투여한 후, 단백뇨 양을 측정한 결과(A) 및 생존율(B)을 나타낸 그래프이다. 별표(*)는 대조군과 각 처리그룹간의 측정값이 현저한 차이를 갖는다는 것을 나타냄(P<0.05).

도 2는 MMF + PL 및 농도별로 sRAGE를 투여한 마우스로부터 신장을 적출한 후 PAS(periodic-acid Schiff) 염색을 수행한 결과(A) 및 이로부터 사구체(glomerular), 관상(tubular) 및 혈관상(vascular) 손상을 포함하는 마우스 신장의 조직학적 이상에 대한 스코어링을 실시한 결과(B)를 나타낸 그래프이다. 별표(*)는 대조군과 각 처리그룹간의 측정값이 현저한 차이를 갖는다는 것을 나타냄(P<0.05).

도 3은 MMF + PL 및 농도별로 sRAGE를 투여한 마우스로부터 수득한 신장조직을 마우스 C3(green) 및 IgG(red) 특이적 항체로 염색하여 면역형광법으로 분석한 결과를 나타낸 그림이다. 검정색 화살표는 사구체 구조를 의미함. 별표(*)는 대조군과 각 처리그룹간의 측정값이 현저한 차이를 갖는다는 것을 나타냄(P<0.05). DIC는 차등간섭대비(differential interference contrast)를 의미함.

도 4는 MMF + PL 및 농도별로 sRAGE를 투여한 마우스의 혈청에서 항-dsDNA 항체 및 IgG 아형의 농도를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 별표(*)는 대조군과 각 처리그룹간의 측정값이 현저한 차이를 갖는다는 것을 나타냄(P<0.05).

도 5는 sRAGE 투여에 따른 T 세포 군집의 변화를 측정한 결과이다.

(a) CD4+IFN-γ+ T 세포, (b) CD4+IL-17A+ T 세포, (c) CD4+IL-4+ T 세포, (d) CD4+FoxP3+ T 세포, (e) 총 CD4+ T 세포.

도 6은 sRAGE 투여에 따른 NF-κB의 핵 내 이동 및 전사 활성을 측정한 결과이다. 별표(*)는 대조군과 각 처리그룹간의 측정값이 현저한 차이를 갖는다는 것을 나타냄(P<0.05).

(a) 공동국소화 결과, (b)-(c) sRAGE 투여 마우스의 신장 조직에 대한 ICAM-1 및 VCAM-1 염색 결과, (d)-(e) sRAGE 투여 마우스의 신장 조직에 대한 면역블롯팅 결과(p65, VCAM-1).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0043] **실시예**

[0044] **재료 및 방법**

[0045] *sRAGE 융합 단백질의 발현 및 정제*

[0046] sRAGE-Fc를 구축하기 위해 리더 시퀀스(유전자 ID: K02149; 단백질: AAA51633), 마우스 IgG H 체인(프라이머 세트: 5′ -ATAGGCTAGCGCCACCATGGGATGG-3′ , 5′ -TGTGTGAGTTTTGTCCGAGTGGACA TCTGT-3′), 마우스 sRAGE의 23-341 아미노산(프라이머 세트: 5′ -GGTCAGAACATCACAGCCCGG ATTG-3′ , 5′ -TGTGTGAGTTTTGTCCCCCATGGTGCAAGA-3′) 및 인간 IgG1 Fc 부위(프라이머 세트: 5′ -GGCTAGCGTACCCAGCCCAGACTC-3′ , 5′ -CCAGCTCGAGCTAT TTACCCGGAGACAG-3′)를 증폭시킨 다음, 오버랩 익스텐션 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 *sfiI*로 절단한 후, pYK602 벡터에 삽입하였다. 마우스 sRAGE-Fc를 HEK293E 세포에서 발현시킨 다음, 단백질 A-세파로오스 컬럼(Amersham Biosciences)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 정제하였다. 정제된 재조합 sRAGE를 PBS로 투석하고 SDS-PAGE에 전기영동한 후, 생물학적 내독소시험 키트(Cape Cod)를 이용하여 내독소 농도를 분석하였다.

[0047] *실험동물 및 투여 방법*

[0048] 모든 실험동물은 연세대학교 동물 관리 규정에 따라 처리하였다. 28 마리 18 주령 자성(female) NZB/WF1 마우스를 구입(SLC, ha mamatsu, 일본)하고 표준 살균 조건하에서 무균 시설 내 개별 케이지에서 사육하였다. 본 발명의 예비 실험에 따르면 실험 기간 동안 아무 것도 처리하지 않은 마우스의 약 25-30%가 사망하였다(20). 아무 것도 처리하지 않는 그룹(untreated group)(그룹 1)에 8 마리를 배정하였고 각 처리 그룹(그룹 2 = 0.5㎍ sRAGE, 그룹 3 = 1㎍ sRAGE, 그룹 4 = 2㎍ sRAGE, 그룹 5 = MMF (33.3 mg/kg) + PL(1.5 mg/kg))에는 5 마리씩 분류하였다. 마우스가 24 주령이 되었을 때, sRAGE, MMF 및 PL 투여를 개시하였다. sRAGE는 복강 내로 일주일에 2회 주사하였고 MMF 및 PL은 31 주령이 될 때까지 매일 구강으로 투여하였다. 미처리 그룹 또는 MMF + PL 처리 그룹에도 동일한 일정으로 PBS를 복강 내로 주사하였다.

[0049] *단백뇨 측정*

[0050] 단백뇨는 각 마우스로부터 수득한 스팟 오줌에서 알부민 시약 시트립(URiSCA; Yongdong Pharmaceutical Co., 한국)을 이용하여 실험 기간 중 일주일에 두 번씩 측정하였다. 단백뇨는 다음과 같이 반-정량적으로 표현하였다: 0 = 없거나 미량, 1+ = 100 mg/dL 이하, 2+ = 300 mg/dL 이하, 3+ = 2,000 mg/dL 이하 및 4+ = 2,000 mg/dL 이상.

[0051] *조직병리학적 평가*

[0052] 마우스가 31 주령이 된 시점에 마취한 후 해부하였다. 신장은 모든 마우스로부터 적출하였으며, 포르말린으로 고정한 후 액체 질소에 보관하였다. 포르말린에 고정된 신장 조직은 파라핀에 삽입한 후 4 마이크로-미터 두께로 절편을 제작하고, 표준 프로토콜에 따라 PAS(Periodic-Acid Schiff) 염색을 수행하였다.

[0053] 사구체(glomerular), 관상(tubular) 및 혈관상(vascular) 손상을 포함하는 마우스 신장의 조직학적 이상에 대한 스코어링은 4-포인트 스케일로 반-정량적으로 수행되었으며, 두 명의 조직학자가 블라인드 테스트하였고, 각 스코어에 대한 평균값을 계산하였다(20). 스코어 0은 변화 없음, 1은 미미한 변화, 2는 중간의 변화, 3은 뚜렷한 변화를 나타낸다. 마우스 당 적어도 50 개의 사구체를 평가하였다.

[0054] *신장의 면역형광 염색*

[0055] 모든 마우스의 신장은 OCT 컴파운드에 삽입한 후 -20° C에서 냉동시켰다. 샘플들은 4 마이크로-미터 두께로 절편을 제작하고, 4% 파라포름알데히드에서 15분간 고정시킨 후 아이스-콜드 PBS(phosphate buffer saline)로 3회 세척하였다. 비특이적인 결합은 1% 노멀 고트 시럼을 포함한 PBST(phosphate buffer saline tween)를 이용하여 30분간 블로킹하였다. 샘플들에 고트 항-마우스 NF-κB (1:100; Abcam)를 처리한 다음, 2차 항체로서 알렉사 형광 488이 라벨링 된 동키 항-고트 IgG(1:200; Invitrogen)를 처리하였다. 핵은 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, 1:1000; Invitrogen)을 이용하여 염색하였다. 그 다음 마운팅 미디엄(Vector laboratories, Southfield, MI)으로 마운팅한 후 레이저 스캐닝 콘포칼 현미경(LSM 710, Carl Zeiss AG, 독일)으로 샘플을 관찰하였다. 두 명의 병리학자가 독립적으로 0부터 4까지 염색 강도 스케일 하에서 IgG 및 C3의 면역형광염색에 대한 강도 및 분포에 대해 반정량적인 스코어를 부여하였다: 0, 염색 안됨; 1, 약한 염색; 2, 중간정도의 염색; 3, 강한 염색. 스코어의 평균값을 측정하였다.

[0056] NF-κB의 핵 이동 정도를 분석하기 위해, 합병된 이미지에서 NF-κB에 의한 상대적 영역(백분율) 및 핵 공동국소화(colocalization) 계수(Ch1-T1)는 LSM ZEN 2009 이미지 분석 프로그램(Carl Zeiss AG)를 이용하여 계산하였다. 핵 및 NF-κB 사이의 공동국소화 계수는 Zeiss 공동국소화 계수 기능 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. 채널 1(Ch1)에서 공동국소화 픽셀(NF-κB)은 총 픽셀(핵)과 비교하여 계산하였다.

[0057] *항-dsDNA 항체 및 면역글로블린 G 아형의 혈청 내 농도 확인*

[0058] 마우스로부터 수득한 혈액 샘플로 부터 혈청을 분리한 후 -80° C에 보관하였다. 마우스 항-dsDNA IgG 농도는 제조사(Alpha diagnostic international, San Antonio, TX)의 지시에 따라 샌드위치 ELISA 방법으로 측정하였다. 측정된 혈청 내 IgG 아형은 IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3였다. 혈청 IgG 아형은 Milliplex MAP 마우스 면역글로블린 아형결정 키트(Millipore, Billerica, MA)를 이용하여 분석하였다.

[0059] *면역조직화학염색*

[0060] 면역조직화학 분석은 벡타스타인 ABC 키트(Vector)를 이용하여 수행하였다. 조직에 마우스 ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1) 및 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)(1:100; Abcam)에 대한 고트 항체를 처리하고 4℃에서 하룻밤 동안 배양한 다음, 비오티닐화된 2차 항체를 처리하고 스트렙타비딘-퍼록시다아제 복합체를 1시간 동안 처리하였다. 최종적으로 아미노에틸카르바졸(Dako)을 이용하여 발색을 유도하였다. 섹션은 헤마톡실린으로 대비염색하였고 올림푸스 현미경 사진기로 촬영하였다. 사구체 및 세관에 있어서 ICAM-1 또는 VCAM-1 염색의 강도 및 분포에 대한 반정량적인 스코어는 다음에 따라 부여하였다: 0, 보통 또는 일반적인 약한 염색; 1, 중심, 약하게 증가함; 2, 중심, 중간정도로 증가함; 및 3, 확산, 눈에 띄게 증가한 염색 정도. 스코어링은 블라인드 방식으로 두 명의 병리학자들에 의해 독립적으로 수행되었으며, 각 스코어의 평균이 계산되었다.

[0061]

[0062] *FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 분석*

[0063] 비장은 모든 실험동물로부터 수득하였다. 면역세포는 기계적 파쇄를 통해 수득하고, 혈청을 포함하는 RPMI 배지(Invitrogen)에 모은 후, 각 실험군으로 풀링하였다. CD4+ T 세포는 항-CD4-FITC(eBiosciences)로 염색하였다. 세포 표면 염색에 대한 유세포분석은 FACS LSR II(BD Biosciences)로 실시하였다. 데이터 분석은 FlowJo 소프트웨어(Tree Star, Inc.)를 이용하여 수행하였다. 세포 내 사이토카인의 발현은 75 ng/ml PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)(Sigma Aldrich) 및 750 ng/ml 이오노마이신(SigmaAldrich)을 5시간 동안 처리하고, 골지 플러그/브레팔딘 A(BD Biosciences)를 처리하여 유도하였다. 세포 내 사이토카인은 eBiosciences부터 구입한 항체(IFN-γ PerCP, IL-17A APC 및 IL-4 PE)를 이용하여 검출하였다. 세포 내 유세포분석 염색은 제조사의 프로토콜에 따라 BD GolgiPlug™ (BD Biosciences)로 BD Cytofix/Cytoperm™ 고정/투과 수용액 키트를 이용하여 수행하였다. T 세포는 CD4 T 세포 분리 키트 II(Miltenyi Biotec)를 이용하여 분리하였다. 조절 T 세포(Tregs)는 항-CD4-FITC 및 항-CD25-PercP를 이용하여 염색하였다. 세포를 고정시키고, FoxP3(forkhead box P3) 염색 버퍼를 이용하여 투과시킨 다음 Foxp3-PE(eBioscience)로 염색하였다. 세포를 FACS LSR II 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다(Tree Star, Inc.).

[0064]

[0065] *웨스턴 블롯*

[0066] 1시간 동안 쥐 족세포(Murine podocytes)에 10 μg/ml의 sRAGE를 전처리 한 다음, 1 μg/ml의 HMGB1을 처리하고 p65 및 VCAM 항체를 각각 이용하여 면역블롯팅을 수행하였다. 면역침강물은 4-20% 트리스-글라이신-PAG 겔(koma biotech)에 전기영동 한 다음, iBlot(Invitrogen)을 이용하여 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 멤브레인을 5% BSA를 포함하는 세척 버퍼에 2시간 동안 배양하여 비특이적인 단백질의 결합을 막았다. 1차 항체 NF-κB p65(1: 1000, Cell signaling, Technology), VCAM-1(1:2000), TBP(1:5000), β-액틴(1:5000, Sigma-Aldrich)을 5% BSA를 포함하는 세척 버퍼에 희석한 다음, 멤브레인에 처리하여 3시간 동안 상온에서 배양하였다. 멤브레인을 세척한 후, HRP-결합 2차 항체 토끼 IgG(1:5,000), 마우스 IgG(1:2,000, KPL)를 5% BSA를 포함하는 세척 버퍼에 희석한 다음, 멤브레인에 처리하여 45분 동안 상온에서 배양하였다. 면역반응 밴드는 ECL 시스템을 이용하여 측정하였다(GE healthcare).

[0067]

[0068] *세포독성 평가*

[0069] 미처리 그룹, MMF + PL 처리 그룹 및 1 또는 2 μg sRAGE 처리 그룹의 마우스로부터 샘플을 수득하고 골수, 간 및 신장에서 sRAGE에 대한 독성을 평가하였다.

[0070] *통계학적 분석*

[0071] 모든 통계학적 분석은 SPSS 패키지(Windows, version 15, SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하여 수행하였다. 대표값은 각 그룹에서 각 마우스로부터 수득한 값을 의미하며, 처리 그룹에서의 모든 값들은 미처리 그룹과 비교하였다. 모든 결과 및 측정값은 ± 표준편차로 표현하였다. 생존율에 대한 Kaplan-Meier 플롯은 로그-랭크 테스트에 의해 분석되었다. 두 그룹간 단백뇨, 조직학적 손상 스코어 및 항체의 혈청 내 농도에 대한 통계학적 비교는 Mann-Whitney U 테스트에 의해 평가되었다. 미처리 그룹과 각 처리 그룹들 간의 비교 시, 통계학적 유의성(P 값 < 0.05)을 갖는 각 처리 그룹의 평균값은 별표(*)로 표시하였다.

[0072] **실험 결과**

[0073] *루푸스 마우스 모델의 단백뇨 및 생존율*

[0074] 표준 치료방법인 MMF 및 PL과 sRAGE의 효과를 비교하기 위하여, 루푸스 마우스 모델의 단백뇨 양을 측정하였고 그들의 생존율을 분석하였다. 24 주령 대부분의 마우스는 단백뇨 값이 2+ 이상을 나타냈다. 단백뇨의 양은 시간에 따라 점차 증가하였고, 대조군(untreated mice)의 경우 단백뇨 값이 약 3 정도인 반면 sRAGE를 0.5 μg 처리한 그룹은 단백뇨 값이 2.5를 나타냈다. sRAGE를 1 μg 처리한 그룹은 초기 단백뇨 양과 비교하였을 때, 31 주령 시기에 단백뇨의 양이 다소 감소하였다(24%). 반면, sRAGE(2 μg) 또는 MMF + PL 처리 시에 단백뇨의 양이 무처리 그룹과 비교하여 현저하게 감소하였다(각각 75%, 62%). 더욱이 sRAGE(2 μg)의 효과는 27주령에 나타났으며, 이것은 MMF + PL의 효과에 비해 일찍 나타난 것이다(도 1A). 실험기간 중 미처리 그룹에서 2마리의 마우스가 사망하였으나, 다른 그룹의 모든 마우스는 생존하였다(도 1B). 이러한 결과들을 볼 때, sRAGE(2 μg)는 루푸스 마우스 모델에서 신염의 정도를 완화시킬 수 있다. 더 나아가 sRAGE의 효능은 표준 치료제인 MMF + PL과 유사하거나 뛰어나다고 할 수 있다.

[0075] *신장의 조직학적 손상*

[0076] 미처리그룹 마우스에서 심각한 사구체신염 및 관 손상은 자주 관찰되었으나, 혈관벽 비대(thickning) 또는 모세혈관 혈전증과 같은 혈관 변화는 나타나지 않았다. 반면, 사구체 및 관의 가벼운 변화 또는 정상적인 구조는 sRAGE(1 또는 2 μg) 또는 MMF + PL 처리그룹 마우스의 신장 조직에서 발견되었다(도 2A). 조직학 실험 결과, 1 또는 2 μg의 sRAGE 또는 MMF + PL 처리 시 사구체 손상 스코어는 대조군과 비교하여 각각 65%, 81% 또는 81%, 관 손상은 각각 61%, 78% 또는 72%로 현저하게 감소하였다(도 2B). 그러나, 1 또는 2 μg의 sRAGE 또는 MMF + PL 처리는 혈관 손상 스코어에 큰 영향을 미치지 않았다.

[0077] 아무것도 처리하지 않은 마우스에서 사구체 세포 증식이 증가된 것이 관찰된 반면, sRAGE(1, 2 μg) 및 MMF + PL을 처리한 마우스에서는 비교적 낮은 세포 증식 또는 정상 구조가 관찰되었다. 조직학적 평가에서 sRAGE(1, 2 μg) 및 MMF + PL은 관상 손상 스코어 뿐 만 아니라 사구체 손상 스코어를 현저하게 감소시키는 것으로 나타났다(도 2). 그러나, 모든 실험 그룹에 있어서 혈관 손상 스코어는 현저한 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과들을 볼 때, sRAGE(1, 2 μg)의 치료 효과는 루프스 신염에서 MMF의 효과와 유사하다고 할 수 있다.

[0078] *신장에서 면역 복합체 침착*

[0079] 면역 복합체의 침착 정도를 평가하기 위해, NZB/WF1 마우스로부터 수득한 신장을 마우스 C3(녹색) 및 IgG(적색) 특이적 항체로 염색하여 면역형광법으로 분석하였다. 미처리 그룹의 사구체에서 C3 및 IgG가 다량 침착되어 있음이 관찰되었는데 모세혈관고리(capillary loops) 뿐만 아니라 사구체간질에서 면역복합체가 존재하는 패턴을 나타냈다. 또한, 형광이 동시에 발광하여 노랑-오렌지색을 나타내는 것으로 볼 때 면역복합체에서 IgG 및 C3가 함께 존재한다고 예측된다. 0.5 μg의 sRAGE를 처리한 마우스의 신장 조직 절편에서는 미처리 그룹과 유사한 형광 강도가 남아 있었으나, 1 μg의 sRAGE를 처리한 마우스에서는 감소하기 시작하였다. sRAGE(2 μg) 또는 MMF + PL을 처리한 경우, 미처리 그룹과 비교하였을 때 면역복합체의 침착이 현저하게 감소하였다(도 3). 이러한 결과들은 sRAGE가 사구체 면역복합체, IgG 및 C3의 사구체 침착을 저하시킴으로써 루푸스 마우스 모델의 신염을 약화시킨다는 것을 나타낸다.

[0080] *항-dsDNA 항체 및 IgG 아형의 혈청 내 농도*

[0081] 2 μg sRAGE 또는 MMF + PL 처리는 미처리그룹과 비교하여 항-dsDNA의 혈청 내 농도를 각각 33% 또는 24%로 현저하게 감소시킨다. MMF + PL와 비교하여 2 μg sRAGE는 혈청 내 항-dsDNA 농도를 보다 더 감소시켰으나, 둘 간의 차이는 현저하지 않았다(도 4A). sRAGE 또는 MMF + PL, 둘 다 IgG1 농도에 영향을 미치지 않았으나, 2 μg sRAGE 또는 MMF + PL는 혈청 내 IgG2a, IgG2b 및 IgG3 농도를 현저하게 감소시켰다. 또한, IgG2a 및 IgG3의 혈청 내 농도는 1 μg sRAGE에 의해 감소하였으며, IgG3 농도는 0.5 μg sRAGE에 의해 감소하였다(도 4B). 이러한 결과는 sRAGE가 IgG2a, IgG2b 및 IgG3 뿐만 아니라 항-dsDNA 생산을 감소시킬 수 있으며, 신장에서 면역복합체 침착의 감소 및 NZB/WF1 마우스에서 신염을 약화시키는데 기여한다는 것을 의미한다.

[0082] sRAGE(2 μg) 및 MMF + PL은 통계학적 유의성을 나타내면서 효과적으로 혈청 내 항-dsDNA 항체의 농도를 감소시킨다. 모든 치료제들은 IgG1의 농도에 영향을 끼치지 못했으나 sRAGE(2 μg) 및 MMF + PL은 IgG2a, IgG2b 및 IgG3의 혈청 내 농도를 현저하게 감소시켰다. 1 μg의 sRAGE 또한 미처리 그룹과 비교하였을 때, IgG2a의 혈청 내 농도를 감소시켰다(도 4).

[0083] *T 세포 군집에 대한 sRAGE의 효과*

[0084] 1 또는 2 μg sRAGE 처리는 대조군과 비교하여 CD4+IFN-γ+ T 세포 또는 CD4+IL-17A+ T 세포의 숫자를 현저히 감소시켰다(도 5A, B). 1 또는 2 μg sRAGE 처리 그룹에서 CD4+IL-4+ T 세포의 숫자는 감소하는 경향이 있었으나, MMF + PL 처리 그룹과 큰 차이를 나타내지는 않았다(도 5C). 더욱이, 1 또는 2 μg sRAGE 처리는 대조군 또는 MMF + PL 그룹과 비교하여 CD4+FoxP3+ T 세포의 숫자를 현저히 증가시켰다(도 5D). CD4+ T 세포의 총 숫자에 대한 sRAGE의 효과를 분석한 결과, MMF + PL 뿐만 아니라 1 또는 2 μg sRAGE 처리는 CD4+ T 세포의 총 숫자를 현저히 감소시켰다(도 5E). 통계학적 분석 결과는 표 1과 같다.

표 1

[0085] 총 CD4+ T 세포 숫자 및 T 세포 서브 군집에 대한 통계학적 분석

-	Untreated	MMF + PL	sRAGE 1μg	sRAGE 2μg
Th1	12.1 ± 1.2	8.6 ± 1.0 (*P*=0.006)	8.5 ± 1.0 (*P*=0.006)	7.4 ± 0.5 (*P*=0.006)
Th17	8.5 ± 0.6	3.9 ± 0.3 (*P*=0.004)	4.6 ± 0.4 (*P*=0.006)	3.5 ± 0.3 (*P*=0.006)
Th2	3.1 ± 0.2	2.8 ± 0.1 (*P*=0.078)	2.8 ± 0.2 (*P*=0.028)	2.8 ± 0.2 (*P*=0.045)
Treg	4.7 ± 0.4	5.0 ± 0.3 (*P*=0.172)	6.1 ± 0.6 (*P*=0.006)	6.5 ± 0.3 (*P*=0.006)
CD4+	48.3 ± 3.6	39.5 ± 1.4 (*P*=0.004)	39.0 ± 1.8 (*P*=0.006)	33.7 ± 1.9 (*P*=0.006)

[0086] *신장세포에서 NF-κB의 핵 내 이동*

[0087] sRAGE(1 또는 2 μg) 또는 MMF + PL 처리는 대조군과 비교하여 공동국소화 영역(colocalization area)을 각각 71%, 96% 또는 99%, Ch1-T1을 각각 78%, 96% 또는 99%로 현저하게 감소시켰다(도 6A). 공동국소화 평가는 신장 구조를 보존하는 장점 및 실시간 기능 이해를 가져온다. sRAGE(1 또는 2 μg) 처리는 루푸스 마우스의 신장조직에서 NF-κB의 핵 내 이동을 방해함으로써 신염을 약화시킨다.

[0088]

[0089] *NF-κB에 의해 조절되는 하부 유전자들의 발현*

[0090] 대조군 마우스 및 0.5 μg의 sRAGE를 투여한 마우스의 신장 조직에서 NF-κB에 의해 조절되는 하부 유전자 및 염증 증폭 매개자로 잘 알려진 ICAM-1 및 VACM-1이 강하게 염색되었다(22). 반면, sRAGE(1 또는 2 μg) 또는 MMF + PL를 처리한 마우스의 신장 조직에서는 ICAM-1의 염색 강도가 각각 69%, 94% 또는 94%, VACM-1의 염색강도가 각각 69%, 90% 또는 84%로 현저하게 감소하였다(도 6B, C). 또한, 면역블롯팅 결과, HMGB1은 처리 후 15분까지 p65 발현을 증가시켰고, 이어 VCAM-1 발현을 증가시켰다. HMGB1 처리에 앞서 sRAGE를 전처리한 경우, HMGB1-유도 p65 및 VCAM-1의 발현은 현저하게 억제되었다(도 6D, E). 이러한 결과는 sRAGE NF-κB의 핵 내 이동을 중단시키고, NF-κB의 전사활성을 억제시킨다는 것을 나타낸다.

[0091]

[0092] *sRAGE의 세포독성*

[0093] 모든 실험그룹에서 백혈구세포 또는 혈소판 개수, 헤모글로빈 수치 또는 간 및 신장 기능은 큰 차이를 나타내지 않았다. 대조군에서는 다른 실험그룹과 비교하여 낮은 혈소판 개수 및 높은 혈중요소질소 농도를 나타냈다(표 2). 상대적인 혈소판 감소 및 증가된 혈중요소질소는 루푸스 신염과 관련되어 있다.

표 2

[0094]

-	미처리	MMF + PL	1 μg sRAGE	2 μg sRAGE
백혈구세포 (/mm^3)	7248.5 ± 1102.1	7345.2 ± 1204.2	7922.9 ± 979.0	7834.3 ± 1088.0
헤모글로빈 (g/dL)	15.2 ± 0.9	16.9 ± 1.0	17.1 ± 0.8	16.2 ± 1.1
혈소판 (×1000/mm^3)	422.9 ± 73.7	650.1 ± 65.2*	624.4 ± 49.3*	611.2 ± 78.2*
혈중요소질소 (mg/dL)	39.1 ± 8.3	20.1 ± 3.2*	20.2 ± 3.8*	21.9 ± 5.6*
크레아티닌 (mg/dL)	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
아스파르트산 카르바밀전달효소(IU/L)	192.5 ± 25.0	189.0 ± 22.4	179.3 ± 32.6	190.7 ± 12.4
알라닌 전달효소 (IU/L)	55.3 ± 10.4	55.5 ± 8.8	58.8 ± 6.1	54.2 ± 12.8

[0095] 측정값은 ± 표준편차로 나타냄. 별표(*)는 대조군과 각 처리그룹간의 측정값이 현저한 차이를 갖는다는 것을 나타냄($P<0.05$).

[0096] **논의**

[0097] 본 발명자들은 sRAGE가 루푸스 마우스 모델에서 심각한 신염을 약화시킨다는 것을 본 발명에서 최초로 규명하였다. 특히, NZB/WF1 마우스에 2 μg sRAGE를 처리한 경우, 단백뇨 및 조직학적 신장 손상을 현저하게 개선되었으며, 사구체 면역복합체 침착량 및 루푸스 신염-관련 자가항체의 혈청 농도가 감소되었고, NF-κB의 핵 내 이동 및 NF-κB의 하부 유전자의 발현이 감소되었다. 더욱이, 1 또는 2 μg sRAGE는 MMF + PL 보다 빠른 치료학적 효과를 나타냈다.

[0098] 항-dsDNA는 루푸스 신념 발생에서 가장 중요한 자가항체이며, 이것은 신장 손상에 연관된 유전자의 발현을 조절할 수 있다(12, 17).

[0099] 본 발명에서 sRAGE는 Treg 세포 숫자를 증가시키고, Th1, Th17 및 Th2 세포 숫자를 감소시킴으로써 T 세포 군집

을 현저하게 변화시켰다. 미처리 그룹과 비교하여 sRAGE 처리 그룹에서 Th1, Th17 및 Th2 세포 숫자는 현저히 감소하고, Treg 세포 숫자는 증가하였는데 결과적으로 루푸스 마우스에서 루푸스 신염을 약화시켰다. 또한, sRAGE는 총 CD4+ T 세포의 숫자를 현저하게 감소시켰는데, 이러한 sRAGE가 총 CD4+ T 세포 숫자를 감소시키고, 루푸스 신염 개선에 유리한 방향으로 T 세포 하위집합 극성을 변화시킨다고 생각된다.

[0100] 본 발명에서 sRAGE는 NF-κB의 핵 내 이동을 억제시키고, NZB/WF1 마우스의 신장 조직에서 ICAM-1 및 VCAM1의 발현을 감소시켰다. 쥐 족세포(Murine podocytes)를 이용한 인 비트로 실험 결과, sRAGE는 HMGB1-유도 p65 발현을 현저히 억제시키고, VCAM-1 하부 유전자의 발현의 감소를 유도하였다. 본 발명자들은 sRAGE가 RAGE가 리간드에 결합하는 것을 방해하고, NF-κB의 전사 활성을 억제시킴으로써 루푸스 신염을 약화시킬 수 있다고 판단하였다.

[0101] 본 발명에 따르면, sRAGE는 MMF + PL과 비교하여 루푸스 마우스 모델에서 신염을 현저히 개선시킨다. NZB/WF1 마우스에서 sRAGE는 단백뇨 및 조직학적 신장 손상을 개선시키고, 사구체 면역복합체 침착 및 루푸스 신염 관련 자가항체의 혈청 농도를 감소시키며, 신장 조직에서 NF-κB의 핵 내 이동을 방해하여 결과적으로 ICAM-1 및 VAM-1 발현을 감소시킨다. 이러한 결과는 sRAGE가 병리생학적으로 루푸스 신염에 있어서 항면역 효과를 가지며, 루푸스 신염에 대한 새로운 치료제로서 역할을 할 수 있다는 것을 의미한다.

[0102] **참고문헌**

[0103] 1. Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. *Glycobiology* 15:16R-28R(2005).

[0104] 2. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. *Circulation* 114:597-605(2006).

[0105] 3. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, et al. *J Mol Med (Berl)* 83:876-86(2005).

[0106] 4. Park S, Yoon SJ, Tae HJ, Shim CY. *Front Biosci* 16:486-97(2011).

[0107] 5. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. *Annu Rev Immunol* 28:367-88(2010).

[0108] 6. SZ, Ikonen TP, Ferreira-da-Silva F, Saraiva MJ, Svergun D, Damas AM. *J Biol Chem* 286:37525-34(2011).

[0109] 7. Jin Q, Chen H, Luo A, Ding F, Liu Z. *PLoS One* 6:e19375(2011).

[0110] 8. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, et al. *Scand J Immunol* 61:1-9(2005).

[0111] 9. Hou CH, Fong YC, Tang CH. *J Cell Physiol* 226:2006-15(2011).

[0112] 10. Bagavant H, Fu SM. *Curr Opin Rheumatol* 21:489-94(2009).

[0113] 11. Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M, Gaxatte C, Hudson BI, Lambert M. *Rheumatology (Oxford)* 48:1190-6(2009).

[0114] 12. Gordon C, Jayne D, Pusey C, Adu D, Amoura Z, Aringer M, et al. *Lupus* 18:257-63(2009).

[0115] 13. Wang Y, Hu Q, Madri JA, Rollins SA, Chodera A, Matis LA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8563-8(1996).

[0116] 14. Tesar V, Hruskova Z. *Nat Rev Nephrol* 7:96-109(2011).

[0117] 15. Bertsias G, Ioannidis JP, Boletis J, Bombardieri S, Cervera R, Dostal C, et al. *Ann Rheum Dis* 67:195-205(2008).

[0118] 16. Abdulahad DA, Westra J, Bijzet J, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. *Arthritis Res Ther* 13:R71(2011).

[0119] 17. Qing X, Pitashny M, Thomas DB, Barrat FJ, Hogarth MP, Putterman C. *Immunol Lett* 121:61-73(2008).

[0120] 18. D'Agati V, Schmidt AM. *Nat Rev Nephrol* 6:352-60(2010).

[0121] 19. Clynes R, Herold K, Schmidt AM. *Crit Care* 11:183(2007).

[0122] 20. Lee SW, Kim BS. *Clin Exp Rheumatol* 28:393-6(2010).

[0123] 21. Neubert K, Meister S, Moser K, Weisel F, Maseda D, Amann K, et al. *Nat Med* 14:748-55(2008).

[0124] 22. Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, et al. *Circulation* 105:816-22(2002).

[0125] 23. Biscetti F, Straface G, De Cristofaro R, Lancellotti S, Rizzo P, Arena V, et al. *Diabetes* 59:1496-505(2010).

[0126] 24. Su Z, Sun C, Zhou C, Liu Y, Zhu H, Sandoghchian S, et al. *Eur J Immunol* 41:3586-95(2011).

[0127] 25. Schierbeck H, LundbP, Palmblad K, Klevenvall L, Erlandsson-Harris H, Andersson U, et al. *Mol Med* 17:1039-44(2011).

[0128] 26. Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, et al. *Atherosclerosis* 185:70-7(2006).

[0129] 27. Urbonaviciute V, Voll RE. *J Intern Med* 270:309-18(2011).

[0130] 28. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. *Nat Immunol*. 8:487-96(2007).

[0131] 29. Avalos AM, Kiefer K, Tian J, Christensen S, Shlomchik M, Coyle AJ, et al. *Autoimmunity* 43:103-10(2010).

[0132] 30. Ehlers M, Fukuyama H, McGaha TL, Aderem A, Ravetch JV. *J Exp Med* 203:553-61(2006).

[0133] 31. PostE, Meyer A, Cardillo F, de Alencar R, Pessina D, Nihei J, et al. *Immunology* 125:184-96(2008).

[0134] 32. Liu Z, Bethunaickan R, Huang W, Ramanujam M, Madaio MP, Davidson A. *J Immunol* 187:1506-13(2011).

[0135] 33. Sthoeger ZM, Zinger H, Mozes E. Beneficial effects of the anti-oestrogen tamoxifen on systemic lupus erythematosus of (NZBxNZW)F1 female mice are associated with specific reduction of IgG3 autoantibodies. Ann Rheum Dis 2003;62:341-6.

[0136] 34. Zhu XM, Yao YM, Liang HP, Xu CT, Dong N, Yu Y, et al. High mobility group box-1 protein regulate immunosuppression of regulatory T cells through toll-like receptor 4. Cytokine 2011;54:296-304.

[0137] 35. Zhang Y, Yao YM, Huang LF, Dong N, Yu Y, Sheng ZY. The potential effect and mechanism of high-mobility group box 1 protein on regulatory T cell-mediated immunosuppression. J Interferon Cytokine Res 2011;31:249-57.

[0138] 36. Shi Y, Sandoghchian Shotorbani S, Su Z, Liu Y, Tong J, Zheng D, et al. *Clin Dev Immunol 2012*:295081(2012).

[0139] 37. Xing Q, Wang B, Su H, Cui J, Li J. *Rheumatol Int 2011* [Epub ahead of print].

[0140] 38. Tucci M, Stucci S, Strippoli S, Silvestris F. *J Biomed Biotechnol 2010* 457146(2010).

[0141] 39. Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. Th subset balance in lupus nephritis. J Biomed Biotechnol 2011;2011:980286.

[0142] 40. Tsukinoki T, Sugiyama H, Sunami R, Kobayashi M, Onoda T, Maeshima Y, et al. *Clin Exp Nephrol* 8:196-205(2004).

[0143] 41. Zheng L, Sinniah R, Hsu SI. *Virchows Arch* 448:172-83(2006).

[0144] 42. Kalergis AM, Iruretagoyena MI, Barrientos MJ, GonzPA, Herrada AA, Leiva ED, et al. *Immunology* 128(1 Suppl):e306-14(2009).

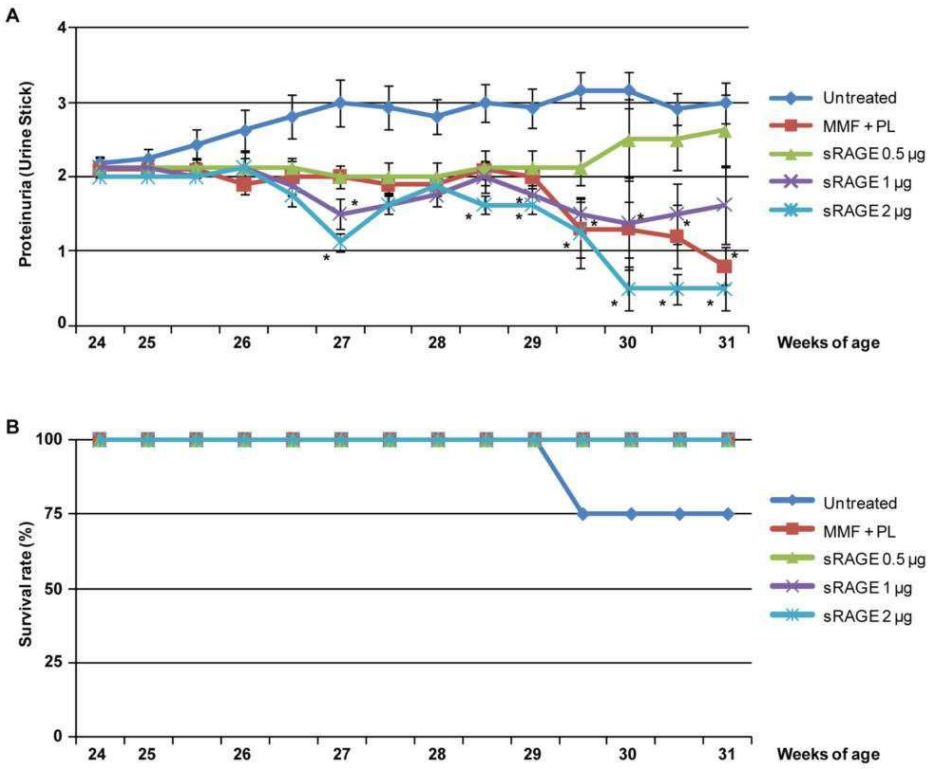
[0145] 43. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2:875-94(2006).

[0146] 44. Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, et al. *Circulation*, 106:2827-35(2002).

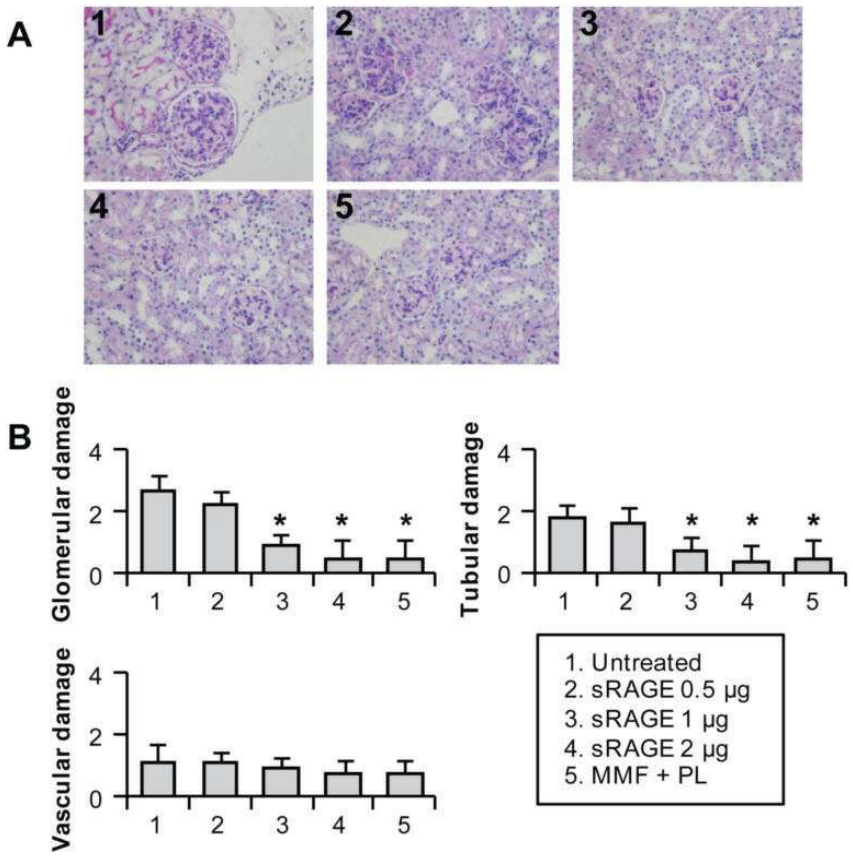
[0147] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

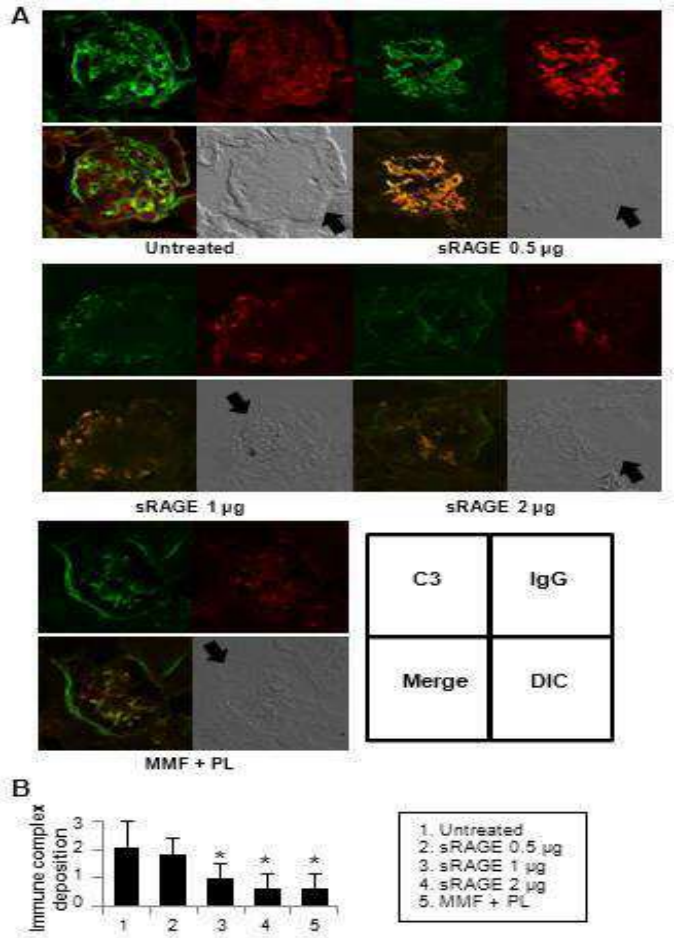
도면1



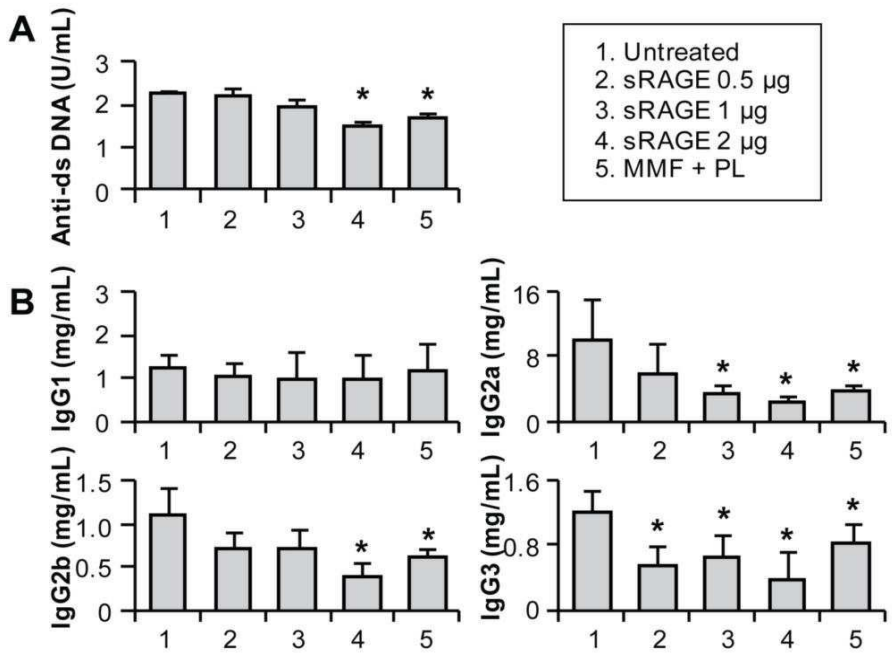
도면2


A
1
2
3
4
5
B
Glomerular damage
Tubular damage
Vascular damage
0
2
4
1
2
3
4
5
*
1. Untreated
2. sRAGE 0.5 μg
3. sRAGE 1 μg
4. sRAGE 2 μg
5. MMF + PL

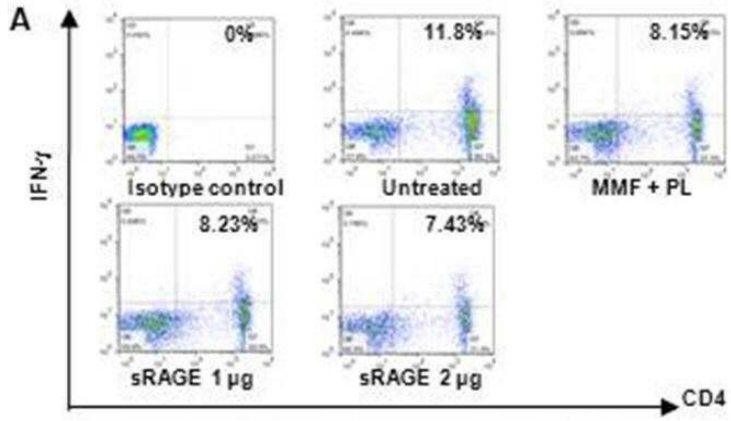
도면3


A
Untreated
sRAGE 0.5 μg
sRAGE 1 μg
sRAGE 2 μg
MMF + PL
C3
IgG
Merge
DIC
B
Immune complex deposition
1. Untreated
2. sRAGE 0.5 μg
3. sRAGE 1 μg
4. sRAGE 2 μg
5. MMF + PL

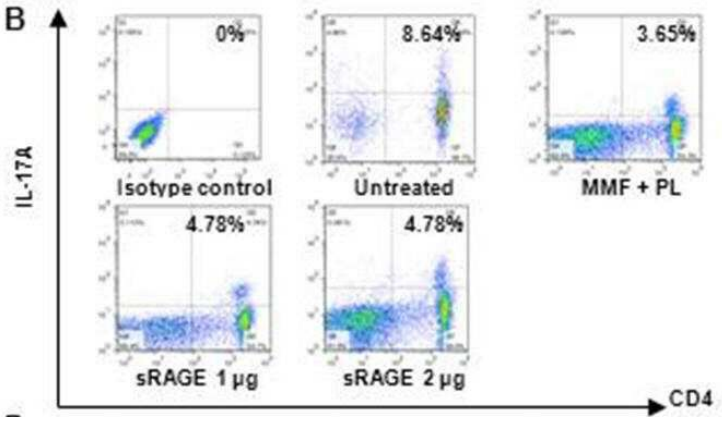
도면4


A
Anti-ds DNA (U/mL)
1. Untreated
2. sRAGE 0.5 μg
3. sRAGE 1 μg
4. sRAGE 2 μg
5. MMF + PL
B
IgG1 (mg/mL)
IgG2a (mg/mL)
IgG2b (mg/mL)
IgG3 (mg/mL)

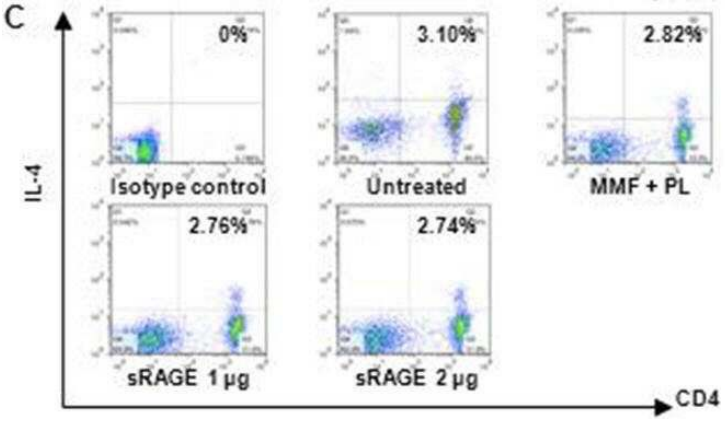
도면5a



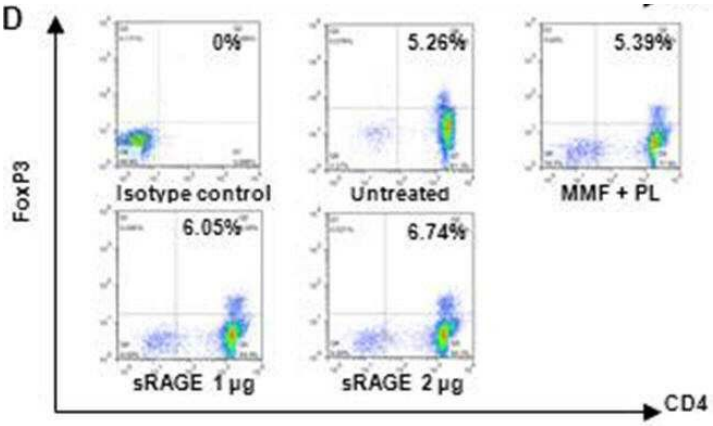
도면5b



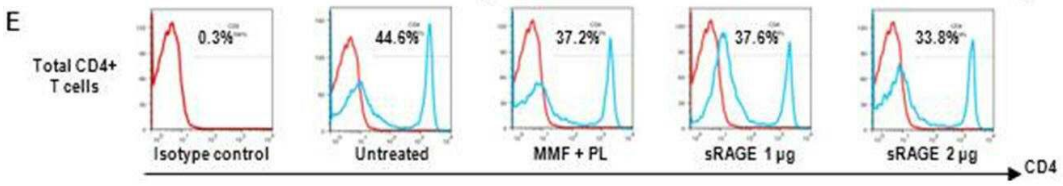
도면5c



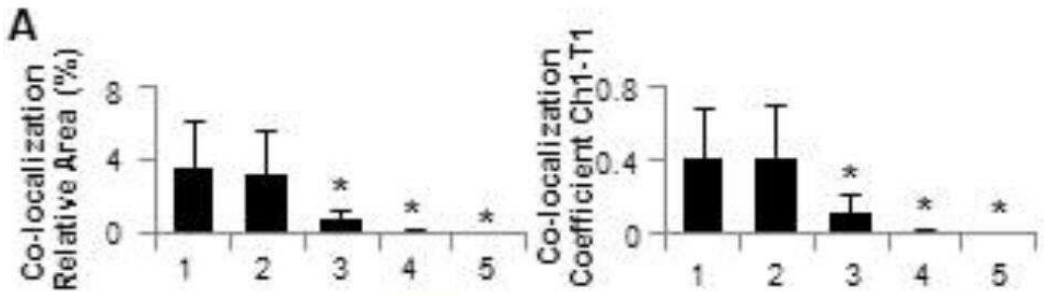
도면5d



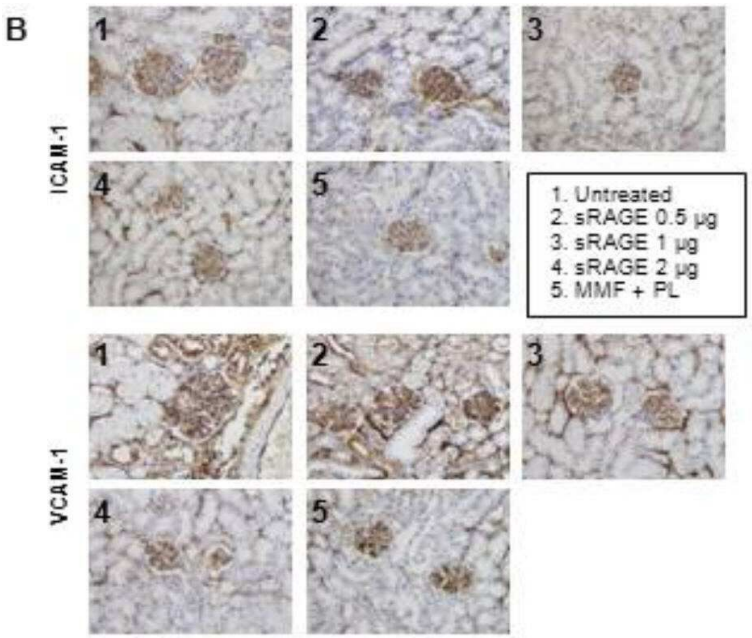
도면5e



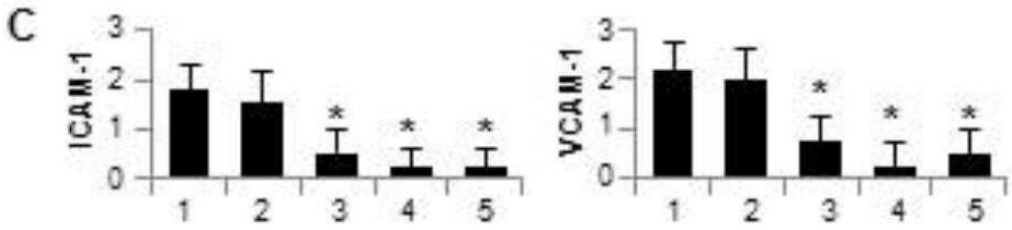
도면6a



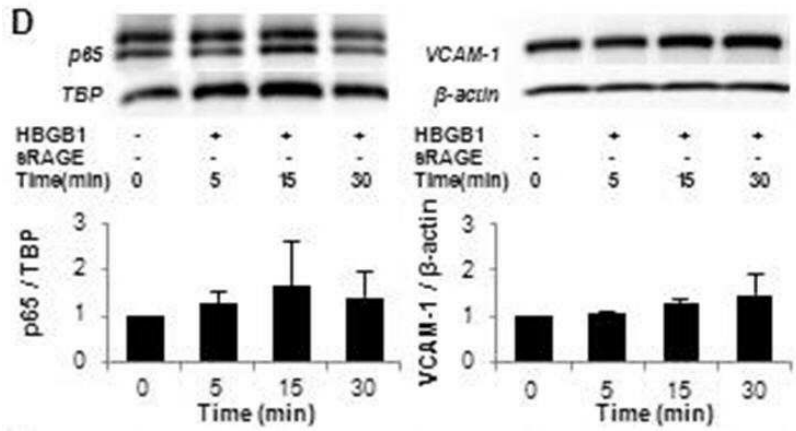
도면6b



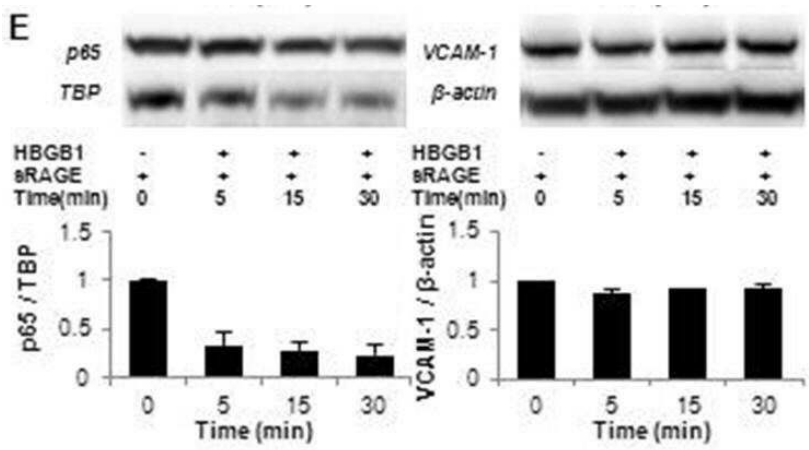
도면6c



도면6d



도면6e



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, Yonsei University

<120> Pharmaceutical Compositions for Preventing and Treating Lupus Nephritis Comprising Soluble RAGE as Active Ingredient

<130> PN110576P

<150> KR KR10-2012-0004244

<151> 2012-01-13

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 347

<212> PRT

<213> soluble RAGE Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu
1 5 10 15

Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu
20 25 30

Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg
35 40 45

Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu
50 55 60

Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro
65 70 75 80

Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile

85 90 95

Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn

100 105 110

Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp

115 120 125

Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys

130 135 140

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp

145 150 155 160

Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln

165 170 175

Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu

180 185 190

Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys

195 200 205

Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro

210 215 220

Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu

225 230 235 240

Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr

245 250 255

Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met

260 265 270

Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu

275 280 285

Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr

290 295 300

His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile

305 310 315 320

Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Glu Gly Phe Asp Lys

325 330 335

Val Arg Glu Ala Glu Asp Ser Pro Gln His Met

340 345