



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0027480
(43) 공개일자 2025년02월26일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 31/713</i> (2006.01)
 <i>A61P 31/06</i> (2006.01) <i>G01N 33/50</i> (2017.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 48/00</i> (2024.01)
 <i>A61K 31/713</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-0043339
 (22) 출원일자 2024년03월29일
 심사청구일자 2024년03월29일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020230106892 2023년08월16일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 송창화
 대전광역시 중구 충무로107번길 100, 107동 1401호 (대흥동, 센트럴자이)</p> <p>김재환
 대전광역시 중구 보문산로 345-27, 501호 (문화동)</p> <p>(74) 대리인
 최규환</p> |
|--|--|

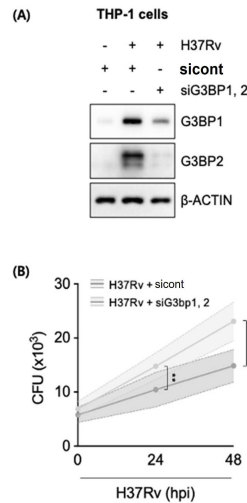
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 스트레스 과립 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 스트레스 과립(stress granule) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 스트레스 과립 형성 억제제인 G3bp1 siRNA; 또는 G3bp1 siRNA 및 G3bp2 siRNA 혼합물;은 결핵균이 감염된 대식세포에서의 결핵균 수를 감소시키고, 특히 G3bp1 siRNA 및 G3bp2 siRNA 혼합 처리군은 이들 단독 처리군에 비해 결핵균 수를 현저히 감소시켰으며, G3bp1 및 G3bp2의 발현을 동시에 감소시킨 동물 모델에 결핵균을 감염시키면, 동물모델의 폐 조직에서 결핵균 수를 감소시키는 효과가 우수하므로, 스트레스 과립(stress granule) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 항결핵제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61P 31/06 (2018.01)

G01N 33/5008 (2013.01)

G01N 2333/4704 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711180931
과제번호	2020R1A2C2005605
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	큰포식세포 대사전사체에 기반한 결핵균 감염제어기전 연구
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

스트레스 과립(stress granule) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 G3bp1(GTPase-Activating Protein-Binding Protein 1)의 발현 또는 활성 억제제인 것을 특징으로 하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 G3bp1의 발현 또는 활성 억제제에 추가로 G3bp2(GTPase-Activating Protein-Binding Protein 2)의 발현 또는 활성 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 G3bp1 단백질에 대한 항체 또는 G3bp1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA) 및 shRNA(short hairpin RNA) 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 G3bp1 단백질에 대한 항체 또는 G3bp1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA) 및 shRNA(short hairpin RNA) 중에서 선택된 어느 하나; 및 G3bp2 단백질에 대한 항체 또는 G3bp2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA) 및 shRNA(short hairpin RNA) 중에서 선택된 어느 하나;인 것을 특징으로 하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 G3bp1 siRNA는 서열번호 1 및 2의 염기서열; 또는 서열번호 5 및 6의 염기서열;로 이루어지고, G3bp2 siRNA는 서열번호 3 및 4의 염기서열; 또는 서열번호 7 및 8의 염기서열;로 이루어진 것을 특징으로 하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 마이코박테리움 튜베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv에 대한 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

스트레스 과립 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

청구항 9

인간을 제외한 동물에게 스트레스 과립 형성 억제제를 투여하여 결핵균의 성장을 억제시키는 방법.

청구항 10

- 1) 대식세포에 결핵균을 감염시키는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 결핵균이 감염된 대식세포에 결핵 치료용 후보 물질을 처리하는 단계;
- 3) 상기 단계 2) 이후에, G3bp1 및 G3bp2 발현 수준을 확인하는 단계; 및

4) 상기 단계 3) 이후에, 상기 단계 2)의 후보 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, G3bp1 및 G3bp2 발현 수준을 더 감소시키는 상기 결핵 치료용 후보 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 시험관 내에서 결핵 치료 물질을 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스트레스 과립 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵(tuberculosis)은 미코박테리움, 특히 결핵균의 감염에 의해 발생하는 전염성 질환으로, 전 세계 인구의 1/3이 결핵균에 감염되어 있는 것으로 추정되며 매년 약 800만 명의 새로운 환자가 발생한다. 대부분의 감염자는 증상이 없으나, 그 중 1/10 정도가 발병하며, 발병 시 적절한 치료를 하지 않으면 그 중 절반 이상이 사망에 이르게 된다.

[0003] 선진국의 결핵감염률은 0.1% 이하이고, 질병 발생률이 25% 이하이다. 우리나라는 활동성 폐결핵 유병률(엑스선 촬영에 의한 유병률)이 1965년 5.1%에서 1995년 1.0%로 감소하였으며, 균 양성 유병률은 0.94%에서 0.22%로, 연간 결핵 감염 위험률은 5.3%에서 0.5%로 감소하였다. 인구 10만 명당 사망률은 1991년 10.4%에서 2001년 6.3명으로 감소하였으나, 아직도 결핵은 10대 사망원인 중의 하나이다.

[0004] 6개월 단기 치료요법은 일차 항결핵제인 리팜피신(rifampicin), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진아미드(pyrazinamide) 및 에탐부톨(ethambutol)을 2개월 동안 병용처방하고, 2개월 후 리팜피신(rifampicin), 아이소니아지드(isoniazid) 및 에탐부톨(ethambutol)의 3제를 4개월 동안 처방하는 것이다. 초기 집중치료 2개월 동안 에탐부톨(ethambutol) 대신에 스트렙토마이신(streptomycin)을 사용할 수도 있다. 이 경우 유지치료는 리팜피신(rifampicin) 및 아이소니아지드(isoniazid)를 투여한다.

[0005] 하지만, 이러한 항생제들은 모두 발명된 지 최소 50년 이상된 것이고, 새로운 치료제의 개발도 활발하지 않은 상황이다. 더불어 다약제내성(MDR; Multi-drug resistant) 및 광범위 내성(XDR; Extensively-drug resistant)을 지닌 결핵균까지 나타나고 있어, 종래의 치료제 효율도 점차 감소하는 추세이다. 따라서 새로운 결핵 치료제 또는 기존 결핵 치료제의 감수성을 증진시킬 수 있는 물질에 대한 연구가 요구된다.

[0006] 결핵 치료제 관련 선행기술로는 한국등록특허 제1833048호에 콜리닌을 포함하는 항결핵 약학 조성물 및 이의 제조방법이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0656969호에 산초 조추출물을 유효성분으로 하는 결핵 치료용 약학 조성물 및 건강기능성 식품이 개시되어 있지만, 본 발명의 스트레스 과립 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관해서는 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 스트레스 과립 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고, 결핵균을 감염시킨 대식세포 및 결핵균을 감염시킨 동물모델에서 스트레스 과립 형성 억제제인 G3bp1 siRNA를 단독, 또는 G3bp2 siRNA와 함께 처리한 경우, 결핵균 수가 감소하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 스트레스 과립(stress granule) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 스트레스 과립 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 동물에게 스트레스 과립 형성 억제제를 투여하여 결핵균의 성장을 억제시키는

방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은

[0012] 1) 대식세포에 결핵균을 감염시키는 단계;

[0013] 2) 상기 단계 1)의 결핵균이 감염된 대식세포에 결핵 치료용 후보 물질을 처리하는 단계;

[0014] 3) 상기 단계 2) 이후에, G3bp1 및 G3bp2 발현 수준을 확인하는 단계; 및

[0015] 4) 상기 단계 3) 이후에, 상기 단계 2)의 후보 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, G3bp1 및 G3bp2 발현 수준을 더 감소시키는 상기 결핵 치료용 후보 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 시험관 내에서 결핵 치료 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 스트레스 과립(stress granule) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 스트레스 과립 형성 억제제인 G3bp1 siRNA; 또는 G3bp1 siRNA 및 G3bp2 siRNA 혼합물;은 결핵균이 감염된 대식세포에서의 결핵균 수를 감소시키고, 특히 G3bp1 siRNA 및 G3bp2 siRNA 혼합 처리군은 이들 단독 처리군에 비해 결핵균 수를 현저히 감소시켰으며, G3bp1 및 G3bp2의 발현을 동시에 감소시킨 동물모델에 결핵균을 감염시키면, 동물모델의 폐 조직에서 결핵균 수를 감소시키는 효과가 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 마우스 골수 유래 대식세포에서, siRNA의 처리에 따라 G3bp1 또는 G3bp2 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인한 결과이다.

도 2는 결핵균(H37Rv)이 감염된 마우스 골수 유래 대식세포에서, G3bp1; G3bp2; 또는 G3bp1 및 G3bp2; 억제에 따른 결핵균 감소 효과를 확인한 결과이다. **, ***은 sicont 처리군 대비 siG3bp1; 또는 siG3bp1 및 siG3bp2; 처리군의 결핵균 수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, **은 $p < 0.01$, ***은 $p < 0.001$ 이다. @@@은 siG3bp1 처리군 대비 siG3bp1 및 siG3bp2; 처리군의 결핵균 수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p < 0.001$ 이다. \$\$\$는 siG3bp2 처리군 대비 siG3bp1 및 siG3bp2 처리군의 결핵균 수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p < 0.001$ 이다.

도 3은 결핵균(H37Rv)이 감염된 마우스 골수 유래 대식세포에서, G3bp1 및 G3bp2; 억제에 따른 결핵균 감소 효과를 감염 24시간 및 48시간 후 확인한 결과이다. ***은 sicont 처리군 대비 siG3bp1 및 siG3bp2 처리군의 결핵균 수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p < 0.001$ 이다.

도 4는 결핵균(H37Rv)이 감염된 동물모델의 폐 조직에서, siRNA의 처리에 따른 G3bp1 및 G3bp2 단백질의 발현 감소 효과를 확인하고(A), 이에 따른 결핵균 감소 효과를 확인한 결과이다(B). ***은 sicont군 대비 G3bp1 및 G3bp2 억제군의 결핵균 수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p < 0.001$ 이다.

도 5는 결핵균(H37Rv)이 감염된 인간 유래 대식세포에서, siRNA의 처리에 따른 G3bp1 및 G3bp2 단백질의 발현 감소 효과를 확인하고(A), 이에 따른 결핵균 감소 효과를 확인한 결과이다(B). **, ***은 sicont군 대비 G3bp1 및 G3bp2 억제군의 결핵균 수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, **은 $p < 0.01$, ***은 $p < 0.001$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스트레스 과립(stress granule) 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 G3bp1(GTPase-Activating Protein-Binding Protein 1)의 발현 또는 활성 억제제인 것이 바람직하고, 추가로 G3bp2(GTPase-Activating Protein-Binding Protein 2)의 발현 또는 활성 억제제를 더 포함할 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0020] 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 G3bp1 단백질에 대한 항체 또는 G3bp1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA) 및 shRNA(short hairpin RNA) 중에서 선택된 어느 하나인 것일 수 있고, 추가로 G3bp2 단백질에 대한 항체 또는 G3bp2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA) 및 shRNA(short hairpin RNA) 중에서 선택된 어느 하나인 것을

더 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 일 구현 예에서, G3bp 1 및 2의 발현은 siRNA에 의해 억제되고, siRNA는 하기 표 1 및 표 2에 개시된 바와 같이, G3bp1 siRNA는 서열번호 1 및 2의 염기서열; 또는 서열번호 5 및 6의 염기서열;로 이루어지고, G3bp2 siRNA는 서열번호 3 및 4의 염기서열; 또는 서열번호 7 및 8의 염기서열;로 이루어져 있으나, G3bp1 또는 G3bp2의 발현을 억제하는 서열이라면 어느 것이라도 무방하다.

표 1

[0022] 마우스 G3bp1 및 G3bp2의 siRNA 서열

서열번호	siRNA	서열
1	siG3bp1 sense	5'-GCAGUGGGUGUUUCUUGGA-3'
2	siG3bp1 antisense	5'-UCCAAGAAACACCCACUGC-3'
3	siG3bp2 sense	5'-UCAGUGAAUGUCAUACCAA-3'
4	siG3bp2 antisense	5'-UUGGUAUGACAUCACUGA-3'

표 2

[0024] 인간 G3bp1 및 G3bp2의 siRNA 서열

서열번호	siRNA	서열
5	siG3bp1 sense	5'-ACACCAAGAUUCGCCAUG-3'
6	siG3bp1 antisense	5'-ACAUGGCGAAUCUUGGUGU-3'
7	siG3bp2 sense	5'-GUGUGUACACAUAACCUU-3'
8	siG3bp2 antisense	5'-AAGGUUUAUGUGUACACA-3'

[0026] 본 발명에 따른 siRNA에서, 센스 RNA 가닥 및/또는 안티센스 RNA 가닥은 이의 당 부분, 뉴클레오베이스 부분 또는 인터뉴클레오타이드 구조 내에 최소한 1개의 화학적 변형을 포함하는 것이 가능하다. 이러한 변형은 생체 내에서 뉴클레아제에 의해 siRNA의 파괴를 저해하는 것을 가능하게 할 수 있다. 본 발명에 따른 siRNA의 안정성과 생적합성을 생체 내에서 향상시킬 수 있는 모든 화학적 변형이 본 발명의 범위에 포함된다.

[0027] 본 발명에 따른 siRNA는 "분리된 것"이며, 이는 자연 상태에 있지 않은 것을 의미하지만 인간의 개입과 관련된 모든 수단에 의해 얻어질 수 있는 것을 의미한다. 특히, 본 발명에 따른 siRNA는 화학적 합성, 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의한 요구되는 뉴클레오타이드 서열의 증폭, 또는 제조합 합성에 의해 이미 존재하는 siRNA를 정제함으로써 얻어질 수 있다.

[0028] 또한, 상기 항체는 본 발명의 G3bp1 또는 G3bp2 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것으로, 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다. 상기 다클론 항체는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있으며, 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 만들어질 수 있다. 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다.

[0029] 상기 결핵은 안결핵, 피부결핵, 부신결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선결핵, 후두결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다약제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군으로부터 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 마이코박테리움 튜베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv에 대한 항균 활성을 가지는 특징이 있다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할

수 있다.

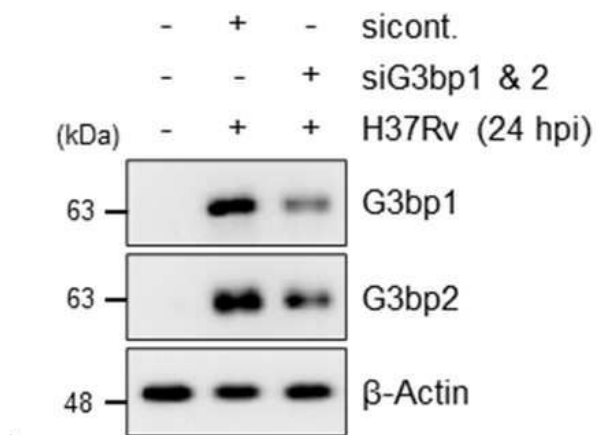
- [0032] 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0034] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0035] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0036] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(Witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 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 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며, 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.
- [0038] 또한, 본 발명은 스트레스 과립 형성 억제제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메칠파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충진제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 수의학적 조성물의 유효한 양은 동물의 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강상태 또는 성별에 따른 본 발명의 유효성분에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 수의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 동물에게 스트레스 과립 형성 억제제를 투여하여 결핵균의 성장을 억제시키는 방법을 제공한다.
- [0043] 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 G3bp1(GTPase-Activating Protein-Binding Protein 1)의 발현 또는 활성 억제제인 것이 바람직하고, 추가로 G3bp2(GTPase-Activating Protein-Binding Protein 2)의 발현 또는 활성 억제제를 더 포함할 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다.

- [0044] 상기 스트레스 과립 형성 억제제는 G3bp1 단백질에 대한 항체 또는 G3bp1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA) 및 shRNA(short hairpin RNA) 중에서 선택된 어느 하나인 것일 수 있고, 추가로 G3bp2 단백질에 대한 항체 또는 G3bp2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, siRNA(short interfering RNA) 및 shRNA(short hairpin RNA) 중에서 선택된 어느 하나인 것을 더 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 또한, 본 발명은
- [0046] 1) 대식세포에 결핵균을 감염시키는 단계;
- [0047] 2) 상기 단계 1)의 결핵균이 감염된 대식세포에 결핵 치료용 후보 물질을 처리하는 단계;
- [0048] 3) 상기 단계 2) 이후에, G3bp1 및 G3bp2 발현 수준을 확인하는 단계; 및
- [0049] 4) 상기 단계 3) 이후에, 상기 단계 2)의 후보 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여, G3bp1 및 G3bp2 발현 수준을 더 감소시키는 상기 결핵 치료용 후보 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 시험관 내에서 결핵 치료 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0050] 상기 단계 3)의 G3bp1 및 G3bp2 발현 수준은 G3bp1 및 G3bp2 단백질을 또는 mRNA를 정량적으로 검출하여 확인할 수 있다.
- [0051] 상기 단백질 정량 검출은 웨스턴 블롯, ELISA, 방사선면역분석법, 방사면역확산법, 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 통한 것이 바람직하지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0052] 상기 mRNA 정량 검출은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법(RNase protection assay), 노던블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 중에서 선택된 방법을 통한 것이 바람직하지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0054] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [0056] **실시예 1. 마우스 골수 유래 대식세포에서, G3bp1 또는 G3bp2 발현 억제 효과 확인**
- [0057] G3bp1 또는 G3bp2의 발현을 억제하기 위해, 상기 표 1에 개시된 서열번호로 이루어진 G3bp1 및 G3bp2의 siRNA를 바이오니아(bioneer)사로부터 구매하였다.
- [0058] 마우스 골수 유래 대식세포(bone marrow-derived macrophage)에서, siRNA에 의한 G3bp1 또는 G3bp2 단백질의 녹다운 여부를 확인하기 위하여, 이들을 마우스 골수 유래 대식세포에 형질주입(siRNA 200nM+리포펙타민 1.5 μ l)하고, 4시간 이후 배지를 교환하였다. 배지 교환 후, 48시간 동안 단백질 녹다운을 진행한 후, 세포수를 카운팅하여 MOI=1이 되도록 병원성 결핵균 H37Rv를 감염시켰다. 3시간 후, 배지를 교환하여 감염되지 않은 결핵균을 제거하고, 이로부터 24시간 동안 배양한 후, 세포를 용해하여 총 단백질을 분리한 후, 세포 내 G3bp1 또는 G3bp2 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블랏으로 확인하였다.
- [0059] 그 결과 도 1에 개시한 바와 같이, 상기 표 1에 개시된 서열번호로 이루어진 siRNA의 처리에 의해 G3bp1 또는 G3bp2 단백질 발현이 억제된 것을 확인하였다.
- [0061] **실시예 2. 결핵균이 감염된 대식세포에서, G3bp1 및/또는 G3bp2 발현 억제에 의한 결핵균 감소 효과**
- [0062] 6주령 C57BL/6 암컷 마우스의 골수에서 추출한 대식세포(BMDM)에 1.5 μ l 리포펙타민을 이용하여 200nM siG3bp1; 200nM siG3bp2; 또는 100nM siG3bp1 및 100nM siG3bp2 혼합물;을 형질주입하고, 4시간 후, 배지를 교환하였다. 그 후, 48시간 동안 단백질 발현을 억제한 다음 세포수를 카운팅하여 MOI=1이 되도록 병원성 결핵균 H37Rv를 감염시켰다. 3시간 후, 배지를 교환하여 감염되지 않은 결핵균을 제거하고, 이로부터 48시간 동안 배양한 후, 세포 내 살아남은 결핵균 수를 확인하였다.

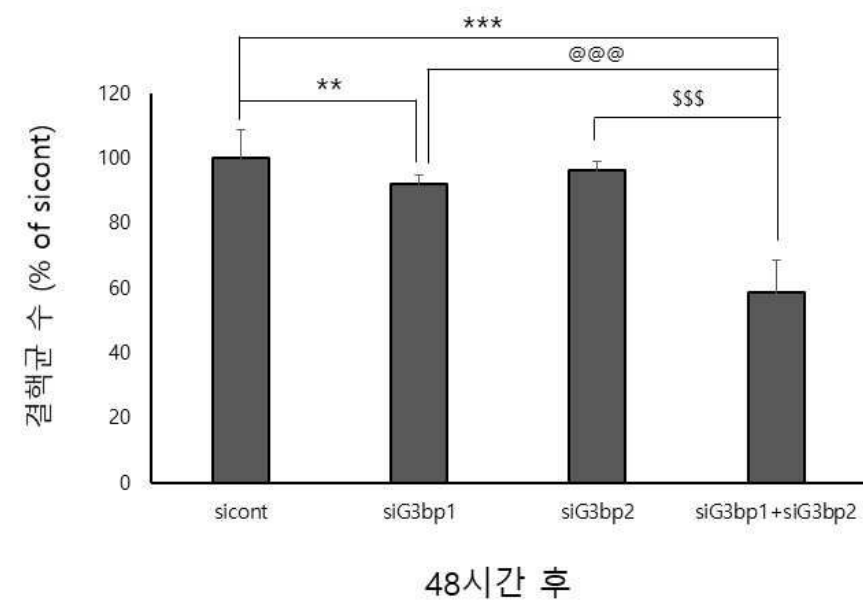
- [0063] 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 G3bp2의 발현 억제제는 대조군(sicont)에 비해 결핵균 수가 억제되지 않았으나, G3bp1의 발현 억제는 대조군에 비해 결핵균 수가 억제된 것을 확인하였다. 또한, G3bp1 및 G3bp2를 동시에 억제한 경우, 이들을 단독으로 억제한 것에 비해 살아있는 결핵균의 수가 현저하게 감소한 것을 확인하였다.
- [0065] **실시예 3. 결핵균이 감염된 대식세포에서, 감염 후 시간의 경과에 따른 G3bp1 및 G3bp2 발현 억제에 의한 결핵균 감소 효과**
- [0066] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 실험을 진행하되, 배지를 교환하여 감염되지 않은 결핵균을 제거하고, 24시간 또는 48시간 동안 배양한 후, 세포 내 살아남은 결핵균 수를 확인하였다.
- [0067] 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 G3bp1 및 G3bp2를 동시에 억제한 경우, 24시간 및 48시간 모두에서 살아남은 결핵균의 수가 현저히 감소하였고, 특히 대조군과 비교하여 48시간 이후 결핵균의 수 감소 효과가 더욱 우수하였다.
- [0069] **실시예 4. 결핵균이 감염된 동물모델의 폐에서, G3bp1 및 G3bp2 발현 억제에 의한 결핵균 감소 효과**
- [0070] 10주령 C57BL/6 암컷 마우스에 인비보펙타민(invivofectamine)을 이용하여 G3bp1과 G3bp2의 발현을 동시에 억제하였다. 인비보펙타민 100 μ l에 siG3bp1(1.2mg/mL) 및 siG3bp2(1.2mg/mL) 혼합물을 142 μ l 혼합하고, PBS로 6배 희석한 후, 1.8mg/kg의 농도로 마우스에 정맥 주사하였다. 이후, 2일째 결핵균 H37Rv(1×10^8 개)를 기도를 통해 감염시켰다. 결핵균 감염 7일 후, 추가로 0.6mg/kg의 농도로 상기 PBS에 희석된 siRNA 및 인비보펙타민 혼합물을 정맥주사 하였다. 7일 후, 마우스의 폐를 용해 버퍼(lysis buffer)로 녹여 총 단백질을 분리한 후, 폐 조직 내 G3bp1, G3bp2의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 또한 폐 전체를 PBS에 넣고 갈아서 마우스 폐에서 생존한 결핵균의 수를 확인하였다.
- [0071] 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 마우스 폐 조직 내 G3bp1 및 G3bp2의 단백질 발현이 효과적으로 억제되었고, G3bp1 및 G3bp2를 동시에 억제한 경우, G3bp1 및 G3bp2의 발현이 억제되지 않은 대조군에 비해 살아있는 결핵균의 수가 현저하게 감소하였다.
- [0073] **실시예 5. 결핵균이 감염된 인간 유래 대식세포에서, G3bp1 및 G3bp2 발현 억제에 의한 결핵균 감소 효과**
- [0074] 인간 유래 대식세포에서 G3bp1 또는 G3bp2의 발현을 억제하기 위해, 상기 표 2에 개시된 서열번호로 이루어진 G3bp1 및 G3bp2의 siRNA를 바이오니아(bioneer)사로부터 구매하였다.
- [0075] siRNA에 의한 G3bp1 또는 G3bp2 단백질의 녹다운 여부를 확인하기 위하여, 인간 유래 대식세포주인 THP-1 세포를 12웰 플레이트에 웰당 100×10^4 개로 분주한 다음, 안정화시킨 후, 150nM의 PMA(Phorbol myristate acetate)를 72시간 동안 처리하여 대식세포로 분화시켰다. 그 후 상기 표 2에 개시된 siRNA 200nM을 실시예 1과 동일한 방법으로 형질주입하고, 48시간 동안 단백질 녹다운을 진행한 후, 세포수를 카운팅하여 MOI=1이 되도록 병원성 결핵균 H37Rv를 감염시켰다. 3시간 뒤 배지를 교체하여 감염되지 않은 결핵균을 제거한 다음 24 및 48시간 동안 배양하여 THP-1 내에 살아있는 결핵균의 수를 측정하였다. 또한, 세포를 용해하여 총 단백질을 분리한 후, 세포 내 G3bp1 또는 G3bp2 단백질의 발현 정도를 웨스턴 블랏으로 확인하였다.
- [0076] 그 결과, 도 5에 개시된 바와 같이 본 발명의 상기 표 2에 개시된 siG3bp1 및 siG3bp2는 세포 내 G3bp1 및 G3bp2의 단백질 발현을 현저히 감소시켰다.
- [0077] 또한, siG3bp1 및 siG3bp2를 동시에 처리한 경우, 대조군(sicont)에 비해 결핵균 감소 효과가 현저한 것을 확인하였다.

도면

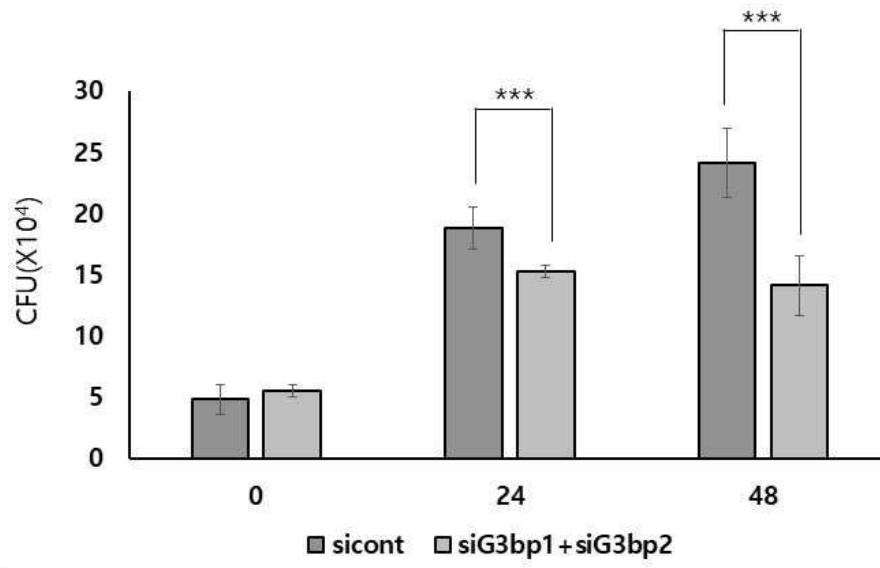
도면1



도면2

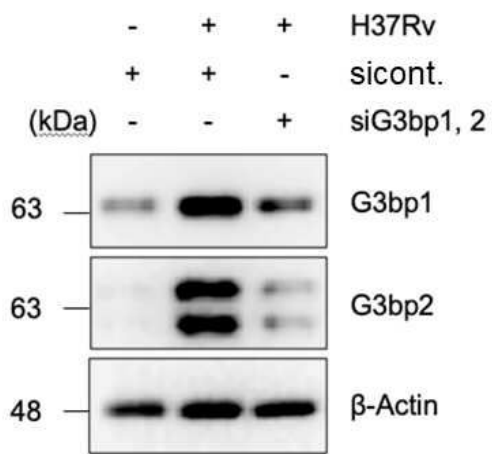


도면3

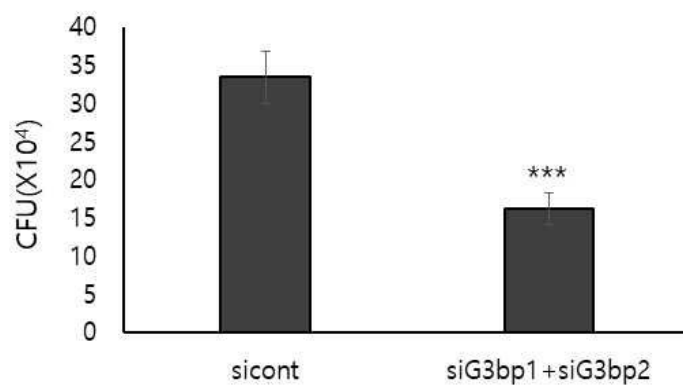


도면4

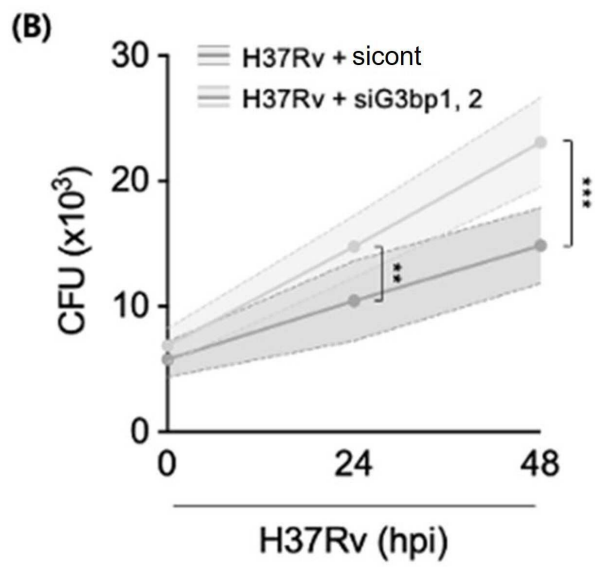
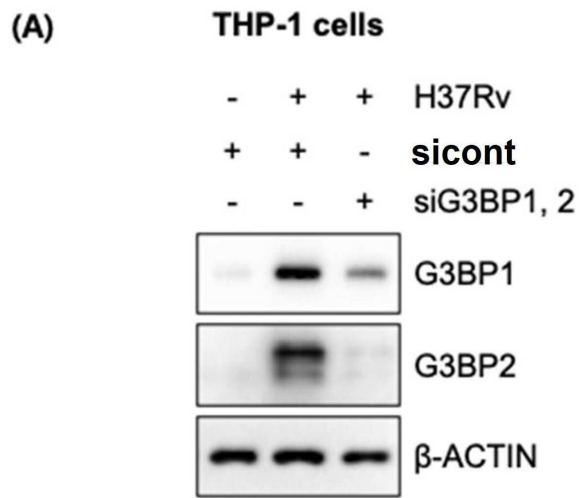
(A)



(B)



도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.