

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2018년 1월 11일 (11.01.2018)

WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2018/008932 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 35/15 (2014.01)

A61K 31/739 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/007061

(22) 국제출원일:

2017년 7월 4일 (04.07.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0084770 2016년 7월 5일 (05.07.2016) KR

(71) 출원인: 충남대학교산학협력단 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)) [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 송창화 (SONG, Chang-Hwa); 35015 대전시 중구 문화로 266, Daejeon (KR). 임윤지 (LIM, Yun-Ji); 35015 대전시 중구 문화로 266, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인홍정 (HWANG MOK PARK IP GROUP); 06234 서울시 강남구 테헤란로14길 16, 8층 (역삼동, 라인빌딩), Seoul (KR).

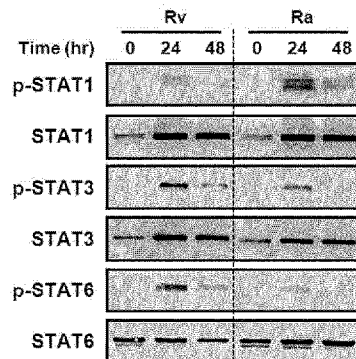
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

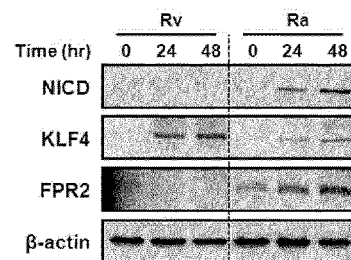
(54) Title: COMPOSITION FOR INHIBITING SURVIVAL OR GROWTH OF TUBERCLE BACILLUS BY ADJUSTING POLARIZATION OF MACROPHAGE, AND METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 대식세포의 극성 조절에 의한 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물 및 이를 이용한 방법

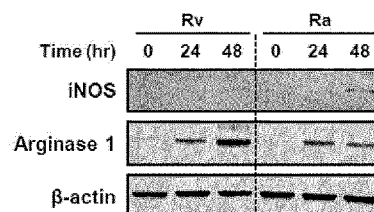
A



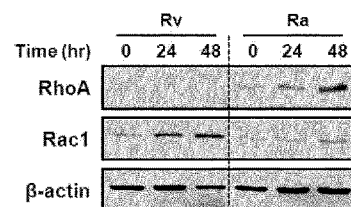
C



B



D



(57) Abstract: The present invention provides a composition for inhibiting the survival or growth of a tubercle bacillus, containing a material which induces the polarization of a macrophage into an M1 macrophage, and a method for inhibiting the survival or growth of the tubercle bacillus by using the composition.

(57) 요약서: 본 발명은 대식세포를 M1 대식세포로 극성을 유도하는 물질을 포함하는 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물, 및 이를 이용한 결핵균의 생존 또는 증식 억제 방법을 제공한다.

[다음 쪽 계속]

WO 2018/008932 A1



LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 대식세포의 극성 조절에 의한 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물 및 이를 이용한 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 결핵균의 생존 또는 증식을 억제하는 방법에 관한 것이며 이를 위한 대식세포(macrophage)의 극성(polarization) 조절 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 결핵은 결핵균 및 다른 마이코박테리움(Mycobacterium)종의 감염에 의해 유발되는 만성 감염성 질병이다. 결핵은 매년 약 8백만명의 신규 감염자가 발생되며 3백만명의 목숨을 앗아가는 개발도상국의 주요 질병이며, 또한 선진국에서도 문제점으로 부각되고 있다. 상당한 기간 동안 감염은 무증상일 수 있으나, 결핵은 가장 공통적인 증상으로서 폐의 급성 염증을 나타내며, 그 결과 발열 및 마른 기침(nonproductive cough)을 유발시킨다. 치료하지 않으면, 일반적으로 심각한 합병증 및 사망을 초래한다.
- [3] 결핵은 장기간에 걸친 항생제 요법을 이용하여 치료될 수 있으나, 이러한 치료법이 결핵의 확산을 막기에는 역부족이다. 감염된 개체들은 증상을 나타내지는 아니하나, 일정 기간 보균상태(contagious)일 수 있다. 게다가 치료 섭생을 엄격하게 따르더라도 환자의 행동을 통제하는 것은 어렵다. 일부 환자들은 치료과정을 끝마치지 못하는데, 이는 효험없는 치료와 약제 내성의 발달을 초래할 수 있다. 치료의 전 과정을 끝마친다 하더라도, 결핵균 감염은 감염된 개체로부터 근절되지 아니하며 여전히 재활성화될 수 있는 잠복성 감염으로 잔존하게 된다.
- [4] 결핵의 확산을 통제하기 위해서는, 상기 질병에 대한 효과적인 예방접종(vaccination) 및 정확한 초기 진단이 가장 중요하다. 현재까지는 생균(live bacteria)을 이용한 예방접종이 보호 면역을 유도하기 위한 가장 효율적인 방법이다. 상기 목적을 위해 이용되는 가장 일반적인 마이코박테리움은 바실러스 칼메트-게링(Bacillus Calmette-Guerin, BCG)인데, *M. bovis*의 비병원성 종이다. 그러나, BCG의 안정성 및 효능은 논쟁의 대상이 되고 있으며, 미국과 같은 일부 국가에서는 상기 제제를 사용한 일반 대중의 예방접종을 실시하지 않고 있다. 따라서, 종래기술에 비해 안정성 및 효능이 우수한 결핵 감염 예방을 위한 기술에 대한 연구가 계속되고 있다.
- [5] 결핵의 진단은 일반적으로 피부 검정법을 이용하여 수행되는데, 상기 검정법은 투베르쿨린 PPD(proteinpurified derivative)에 대한 피내 노출을 포함한다. 항원-특이 T 세포 반응은 주입후 48-72시간 까지 주입 부위에서의 측정가능한 정도 경화(induration)를 초래하는데, 이는 마이코박테리움 항원에 대한 노출을 의미한다. 그러나 상기 검정법은 민감도 및 특이성에서 문제가 있으며, BCG로

예방접종된 개체들은 감염된 개체들과 구별될 수 없다.

- [6] 대식세포는 자연면역이나 염증반응에서 중요한 역할을 할 뿐 아니라, 획득면역반응에서도 중요한 역할을 하는데, 그 대표적인 기능이 T cell에 항원을 보여주는 것이다(antigen presentation). 대식세포는 식균작용으로 단백질 항원을 받아들이며, 그들을 작은 펩티드(peptide)로 분해하며(antigen processing), 분해된 펩티드(peptide)를 자신의 MHC와 결합시켜 다시 세포표면에 T cell의 활성화를 촉진할 수 있다. 또한 대식세포는 면역반응의 시작에 필요한 항원을 제시하는 기능 이외에도, 세포매개성 면역반응과 체액성 면역반응에서 면역작용을 나타내는 중요한 작용세포(effector cell)로 활동하기도 한다. T cell에 의해 활성화된 대식세포는 지연성과민반응(delayed type hypersensitivity)에서 항원을 제거하는 기능을 하며, 대식세포는 항체가 결합되어 있는 항원을 식균작용으로 제거하는 기능을 가지고 있다.

- [7] 본 발명의 발명자들은 결핵균이 병원성 인자들을 분비함으로써 대식세포(macrophage)의 M1 극성화를 방해하는 것을 확인하였으며, 이로부터 대식세포의 극성 유도에 따른 결핵균의 생존 또는 증식 억제 효능을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 대식세포의 극성 유도 물질을 사용하여, 기존 약제와 작용기전이 다르고 부작용이 상대적으로 적은 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물 및 이를 이용한 결핵균의 생존 또는 증식 억제 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명의 일 구현 예는 대식세포를 M1 대식세포로 극성을 유도하는 물질을 포함하는, 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물을 제공한다.
- [10] 상기 극성 유도 물질은 지질다당류(Lipopolysaccharide), 인터페론 감마 및 염증성 사이토카인류 예컨대 IL-6, TNF- α 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [11] 상기 조성물은 지질다당류(Lipopolysaccharide) 1~20ng/ml; 및 인터페론 감마 1~20ng/ml를 포함할 수 있다.
- [12] 또한, 상기 조성물은 리팜피신(Rifampicin), 아이소니아지드(Isoniazid), 에탐부톨(Ethambutol), 피라진아미드(Pyrazinamide), 스트렙토마이신(Streptomycin) 또는 그 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항결핵 약제를 더 포함할 수 있다.
- [13] 상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다약제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허중, 유방 결핵 또는 척추 결핵일 수 있다.
- [14] 본 발명의 다른 구현 예는 상기 조성물을 이용하여 대식세포를 M1 대식세포로

- 극성 유도하는 단계를 포함하는 결핵균의 생존 또는 증식 억제 방법을 제공한다.
- [15] 상기 조성물에 의해 대식세포가 M1 대식세포로 극성 유도된 후 결핵균 감염시 상기 대식세포의 세포자멸사(apoptosis)가 유도됨으로써 결핵균의 생존 또는 증식이 억제될 수 있다.

발명의 효과

- [16] 이상과 같이 본 발명에 의하면 종래 전혀 알려져 있지 않던 대식세포(macrophage) 극성(polarization) 유도에 의한 결핵균 억제효과를 증명한 것이므로, 일반적인 결핵균뿐만 아니라 기존 약제에 대해 다약제 내성이 있는 결핵균에 대해서도 예방 및 치료효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 대식세포 내 결핵균 감염 시 대식세포 M1/M2 극성 마커들의 발현을 보여주는 웨스턴 블로팅(Western blotting)에 의한 단백질 발현 전기영동사진.
- [18] 도 2A, 2B는 M1/M2 대식세포에서 결핵균 감염으로 유도된 세포자멸사(Apoptosis)을 나타낸 그림.
- [19] 도 2C는 결핵균을 감염시킨 M1/M2 대식세포에서 Caspase-3, Bax, Bcl-2의 활성을 보여주는 웨스턴 블로팅(Western blotting)에 의한 단백질 발현 전기영동사진.
- [20] 도 2D는 결핵균을 감염시킨 M1/M2 대식세포를 세포질과 미토콘드리아로 분리한 후, 세포 내 시토크롬 C(Cytochrome C)의 이동을 보여주는 웨스턴 블로팅(Western blotting)에 의한 단백질 발현 전기영동사진.
- [21] 도 3A, 3B는 결핵균을 감염시킨 M1/M2 대식세포에서 세포 내 생존한 결핵균 수를 측정한 그래프.
- [22] 도 3C, 3D, 3E, 3F는 형광현미경을 통해 결핵균을 감염시킨 M1/M2 대식세포에서 세포 내 결핵균의 생존을 보여주는 그림.
- [23] 도 4는 결핵균을 감염시킨 M1/M2 대식세포에서 항결핵 약제 병용 시 세포 내 결핵균 수를 측정한 그래프.
- [24] 도 5A는 M1/M2 마우스 모델에서 비강을 통한 결핵균 감염 20일 후, 폐 조직에서 CHOP과 Caspase-3의 활성을 보여주는 웨스턴 블로팅(Western blotting)에 의한 단백질 발현 전기영동사진.
- [25] 도 5B는 결핵균 감염 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직 내에서 생존한 결핵균의 수를 측정한 그래프.
- [26] 도 5C는 결핵균 감염 M1/M2 마우스 모델에서 항결핵 약제와 병용 시 폐 조직 내에서 생존한 결핵균의 수를 측정한 그래프.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 인터페론 감마는 항원을 만나기 전의 대식세포보다 강력한 항원제시 능력을 갖게 한다. 또한 보체를 매개로 하여 탐식능도 키우며 전염증성 사이토카인을 생성하게 한다. 이것을 소위 전형적인 활성화된 대식세포(M1)이라고 한다.

- [28] 보조 T림프구는 분비하는 사이토카인에 따라 크게 두 가지 다른 형태로 분류하는데 Th1과 Th2 세포로 분류할 수 있다. 이중 IL-4와 같은 Th2 세포에 의해 주로 분비되는 사이토카인은 대식세포를 인터페론 감마에 의해 유도되는 활성화와 대조적인 상태, 예를 들면 주조직적합성항원 class 의 발현을 증가시킨다. 이런 상태의 대식세포를 일컬어 대체 활성화 대식세포(M2)라고 한다.
- [29] 전술한 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 구현 예는 대식세포를 M1 대식세포로 극성을 유도하는 물질을 포함하는, 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물을 제공한다.
- [30] 상기 극성 유도 물질은 지질다당류(Lipopolysaccharide), 인터페론 감마 및 염증성 사이토카인류 예컨대 IL-6, TNF- α 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [31] 구체적으로, 상기 조성물은 지질다당류(Lipopolysaccharide) 1~20ng/ml; 및 인터페론감마 1~20ng/ml를 포함할 수 있다.
- [32] 또한, 상기 조성물은 리팜피신(Rifampicin), 아이소니아지드(Isoniazid), 에탐부톨(Ethambutol), 피라진아미드(Pyrazinamide), 또는 그 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항결핵 약제를 더 포함할 수 있다.
- [33] 상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다약제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 또는 척추 결핵일 수 있다.
- [34] 본 발명의 다른 구현 예는 상기 조성물을 이용하여 대식세포를 M1 대식세포로 극성 유도하는 단계를 포함하는 결핵균의 생존 또는 증식 억제 방법을 제공한다.
- [35] 상기 방법은 결핵균 감염 전 후 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [36] 상기 조성물에 의해 대식세포가 M1 대식세포로 극성 유도된 후 결핵균 감염시 상기 대식세포의 세포자멸사(apoptosis)가 유도됨으로써 결핵균의 생존 또는 증식이 억제될 수 있다.
- [37] 이하 본 발명에 따른 대식세포의 극성(Macrophage polarization)을 이용한 세포 내 결핵균의 생존 및 증식 억제방법의 바람직한 실시예를 첨부한 도면을 참조로 하여 상세히 설명한다. 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위하여 제공되는 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [38] 실시예 1
- [39] 대식세포(macrophage)의 극성이 결핵균 생존 억제에 미치는 영향을 알아보기 위한 in vitro 실험
- [40] 1. 결핵균 감염시 대식세포의 극성이 어떠한 역할을 하는지 확인하는 단계

- [41] 결핵균의 감염 시 대식세포의 극성이 어떠한 역할을 하는지 분석하기 위하여 결핵균을 감염으로 유도되는 대식세포 극성을 확인하였다. 즉, 마우스 유래 대식세포인 Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) 세포를 사용하여, 병원성 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv)과 비병원성 결핵균(*M. tuberculosis* H37Ra)을 세포당 균 수 1의 비율로 감염시킨 후, 시간에 따른 극성 마커들의 발현 정도를 확인하였다.
- [42] 도면에서 1A는 결핵균이 감염된 대식세포에서 M1 대식세포 극성을 나타내는 마커인 phospho-STAT1(p-STAT1)과, M2 대식세포 극성을 나타내는 마커인 phospho-STAT3(p-STAT3), phospho-STAT6(p-STAT6)의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블로팅 방법으로 확인한 결과이다. 병원성 결핵균이 감염된 대식세포에서는 배양시간이 지남에 따라 M2 대식세포 극성을 나타내는 phospho-STAT3와 phospho-STAT6의 발현이 증가하는 것을 보여준다. 반면, 비병원성 결핵균이 감염된 대식세포에서는 M1 대식세포 극성을 나타내는 phospho-STAT1의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. (도에서 STAT1, STAT3, STAT6는 내부컨트롤, 이하 동일)
- [43] 도 1B, 1C, 1D는 H37Rv 또는 H37Ra이 감염된 대식세포에서 M1 대식세포 극성을 나타내는 iNOS, NICD, FPR2, RhoA와, M2 대식세포 극성을 나타내는 Arginase 1, KLF4, Rac1의 단백질 발현 정도를 western blot 방법으로 확인한 결과이다. 병원성 결핵균이 감염된 대식세포에서는 배양시간이 지남에 따라 M2 대식세포 극성을 나타내는 Arginase 1, KLF4, Rac1의 발현이 증가하는 것을 보여준다. 반면, 비병원성 결핵균이 감염된 대식세포에서는 M1 대식세포 극성을 나타내는 iNOS, NICD, FPR2, RhoA의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. (도에서 β -actin은 내부컨트롤, 이하 동일)
- [44] 또한 도 1에 표시된 Rv와 Ra는 H37Rv(병원성 결핵균) 또는 H37Ra(비병원성 결핵균)으로 대식세포에 감염시킨 실험입니다. 결핵균의 병원성에 따라 대식세포의 극성이 달라짐을 의미합니다.
- [45] **2. 마우스 유래 대식세포를 M1/M2 극성화하는 단계**
- [46] 마우스 유래 대식세포에 지질다당류(Lipopolysaccharide)(10ng/ml)와 인터페론 감마(IFN γ)(10ng/ml)로 24시간 동안 자극시켜 M1 대식세포를, IL-4(10ng/ml)와 IL-13(10ng/ml)을 24시간 동안 자극시켜 M2 대식세포를 준비하였다.
- [47] **3. 결핵균을 상기 대식세포에 감염시킨 후 세포자멸사의 유도를 확인하는 단계**
- [48] 도 2A는 결핵균을 감염시킨 M1/M2 대식세포에 Annexin-V/PI 염색한 후, FACS를 이용하여 세포자멸사를 확인하였다. 도 2B는 Annexin-V+/PI- 세포의 비율을 그래프로 나타낸 그림이다. 결핵균 감염 시 M2 대식세포 보다 M1 대식세포에서 현저히 높은 비율로 세포자멸사가 유도되는 것을 알 수 있었다. 도 2C는 결핵균 감염된 M1/M2 대식세포에서 Caspase-3, Bax, Bcl-2를 이용하여 세포자멸사의 유도를 확인하였다. 위의 결과와 마찬가지로, M1 대식세포에서 Caspase-3와 Bax의 발현이 증가되어있는 반면에, Bcl-2의 발현은

감소되어있었다.

[49] 4. 결핵균을 상기 대식세포에 감염시킨 후 시토크롬 C의 세포 내 이동을 확인하는 단계

[50] 도 3D는 결핵균 감염된 M1/M2 대식세포를 세포질과 마이토콘드리아로 분리한 후, 시토크롬 C의 세포 내 이동을 확인한 결과이다. 결핵균 감염 시 M1 대식세포에서 마이토콘드리아에서 세포질로 시토크롬 C 이동이 증가하는 것을 확인하였다. (도에서 α -tubulin은 세포질 콘트롤, COX IV는 마이토콘드리아 콘트롤)

[51] 본 발명자들의 선행발표에 따르면, 대식세포 내 결핵균에 의해 유도되는 세포자멸사는 세포 내 결핵균 생존 억제에 중요한 메커니즘으로 보고한 바 있다. 따라서 상기 실험결과로부터 결핵균 감염 시 M1 대식세포가 세포자멸사를 유도하여 결핵균 증식억제에 더욱 효과적임을 알 수 있다.

[52] 실시예 2

[53] 대식세포 극성 조절 물질과 항결핵 약제 병용에 의한 경우

[54] 1. 결핵균 감염시 대식세포의 극성이 어떠한 역할을 하는지 분석하기 위한 실험.

[55] 결핵균 감염시 대식세포의 극성이 얼마나 역할을 하는지 분석하기 위하여 M1/M2 대식세포 내의 결핵균의 수를 측정하였다.

[56] 도 3A, 3B는 M1/M2 대식세포에 병원성 결핵균, 비병원성 결핵균을 각각 감염 3시간 후, 시간 후, 세포 외 결핵균을 세척하고 완전배지조건 하에서 24, 48시간 동안 배양한 결과를 나타낸 그래프이다. 세포 내 생존하고 있는 결핵균의 수를 확인하기 위해 7H10 agar배지에서 세포를 14~21일 동안 배양하여 전체 생균 수를 산출하였다. 도 3C, 3E는 감염 48시간 후, M1/M2 대식세포 내 생존하는 결핵균을 형광현미경으로 나타낸 그림이며, 이를 도 3D, 3F에서 그래프로 나타내었다. 결핵균 감염 시 M2 대식세포 보다 M1 대식세포에서 결핵균의 제거가 효과적으로 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

[57] 2. 대식세포 극성 조절 물질과 항결핵 약제 병용에 의한 결핵균 생존 억제 효과에 대한 확인을 위한 실험

[58] 도 4는 대식세포에 결핵균 감염 3시간 후, 세포 외 결핵균을 세척하고 항결핵 약제(Rifampicin:RIF, Ethambutol:EMB, Isoniazid:INH, Pyrazinamide:PZA) 처리 또는 항결핵 약제와 M1/M2 대식세포 극성 유도 물질(LPS+IFN γ 또는 IL-4+IL-13)을 함께 처리하고 24, 48시간 동안 배양한 다음 세포 내 결핵균의 수를 측정하였다. 실험 결과, 항결핵 약제 단독 처리 시 결핵균의 군수가 감소하였으며, 특히 M1으로 극성을 유도한 세포에서 결핵균의 생존이 더욱 효율적으로 억제되는 것을 확인하였다. 반면, 항결핵 약제 처리에도 불구하고 M2 대식세포에서는 결핵균 생존 억제가 효과적으로 이뤄지지 않은 것을 보였다.

[59] 그러므로 상기 M1대식세포의 실험결과와 이미 공지된 사실인 항결핵 약제의 결핵균 생존 억제의 사실을 바탕으로 항결핵 약제와 함께 대식세포 극성을

조절해주면 결핵균 사멸에 더욱 효과적일 것이라 판단하였고, 이와 같은 가설이 검증되었다.

[60] 실시예 3

[61] 대식세포의 극성이 결핵균 생존 억제에 미치는 영향을 알아보기 위한 *in vivo* 실험(마우스 모델 대상)

[62] 1. 마우스 유래 대식세포를 M1/M2 극성화하는 단계.

[63] 마우스 유래 대식세포에 지질다당류(Lipopolysaccharide)(10ng/ml)와 인터페론 감마(IFN γ)(10ng/ml)로 24시간 동안 자극시켜 M1 대식세포를, IL-4(10ng/ml)와 IL-13(10ng/ml)을 24시간 동안 자극시켜 M2 대식세포를 준비하였다.

[64] 2. 상기 대식세포를 결핵균에 감염시킨 후 대식세포의 극성이 결핵균 생존 억제에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험.

[65] 도 5A는 M1/M2 마우스 모델을 결핵균으로 비강 감염시키고, 감염 20일 후 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직에서 CHOP과 Caspase-3 단백질 발현 정도를 웨스턴 블로팅 방법으로 확인한 결과이다. M2 마우스 모델보다 M1 마우스 모델의 폐 조직에서 세포자멸사 활성이 현저히 높은 것을 관찰할 수 있었다. 도 5B는 결핵균 감염 3, 7, 20일 후 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직 내에서 생존한 결핵균의 수를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 도 5B는 M1/M2 마우스 모델에 결핵균 감염시킨 후, 음수(1.5ml/10g 마우스 체중)를 통해 항결핵 약제 10 mg/kg (RIF, EMB, INH, PZA mixture)를 섭취시켜주었다. 결핵균 감염 3일 후 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직 내에서 생존한 결핵균의 수를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. 항결핵 약제 섭취 시에도 마우스 모델보다 M2 마우스 모델의 폐 내에서 결핵균의 생존이 유리한 것을 확인할 수 있었다. *in vitro*. 결과와 마찬가지로, *in vivo*. 실험에서도 결핵균 감염 시 M1 마우스 모델에서 세포자멸사를 유도하여 결핵균 증식억제에 더욱 효과적일 것으로 사료된다.

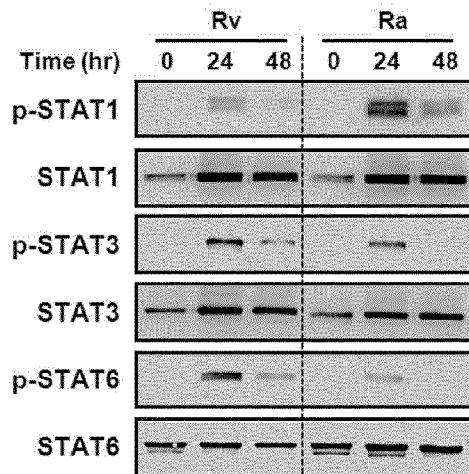
[66] 상기 실시예에서는 결핵균의 병원성에 따라 대식세포의 극성이 조절되며, 결핵균 감염 시 M1으로 극성화시킨 대식세포가 세포자멸사를 이용한 세포 내 결핵균의 성장을 억제하는 능력이 현저히 높은 것을 확인하였다. 반면, M2 대식세포는 세포 내 결핵균의 생존에 유리한 환경이므로, 병원성이 강한 결핵균일수록 M2 대식세포로 극성을 유도한다. 본 결과는 대식세포의 극성을 조절함으로써 세포 내 결핵균 생존 제어가 가능하다는 것을 나타내는 증거이다.

청구범위

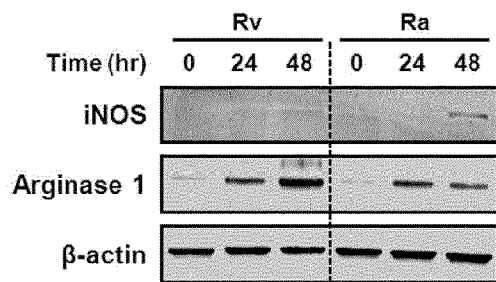
- [청구항 1] 대식세포를 M1 대식세포로 극성을 유도하는 물질을 포함하는, 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 극성 유도 물질은 지질다당류(Lipopolysaccharide), 인터페론 감마, IL-6 및 TNF- α 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는, 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
지질다당류(Lipopolysaccharide) 1~20ng/ml; 및 인터페론 감마 1~20ng/ml를 포함하는, 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
리팜피신(Rifampicin), 아이소니아지드(Isoniazid), 에탐부톨(Ethambutol), 피라진아미드(Pyrazinamide), 또는 그 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 항결핵 약제를 더 포함하는 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다약제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허중, 유방 결핵 또는 척추 결핵인 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 적어도 어느 한 항의 결핵균의 생존 또는 증식 억제용 조성물을 이용하여 대식세포를 M1 대식세포로 극성 유도하는 단계를 포함하는, 결핵균의 생존 또는 증식 억제 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 조성물에 의해 대식세포가 M1 대식세포로 극성 유도된 후 결핵균 감염시 상기 대식세포의 세포자멸사(apoptosis)가 유도됨으로써 결핵균의 생존 또는 증식이 억제되는, 결핵균의 생존 또는 증식 억제 방법.

[도1]

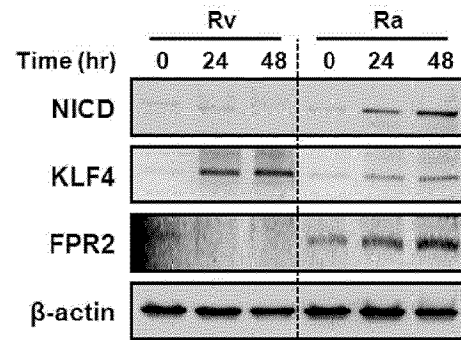
A



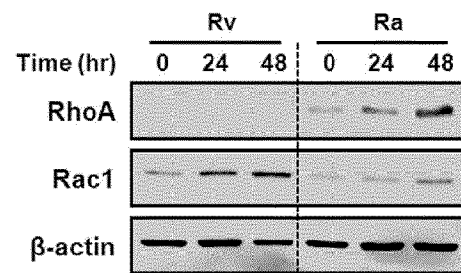
B



C

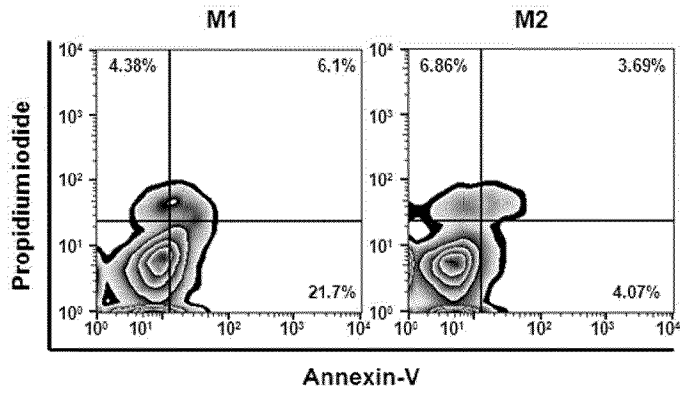


D

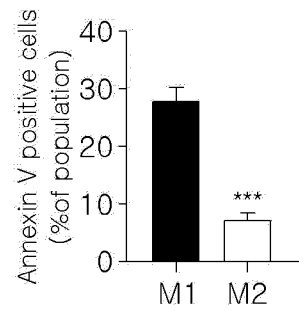


[도2]

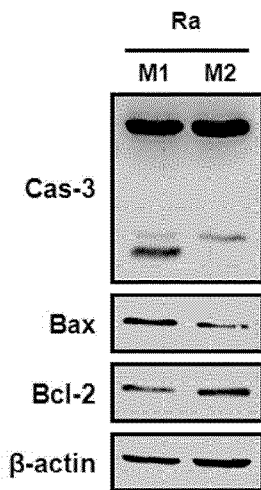
A



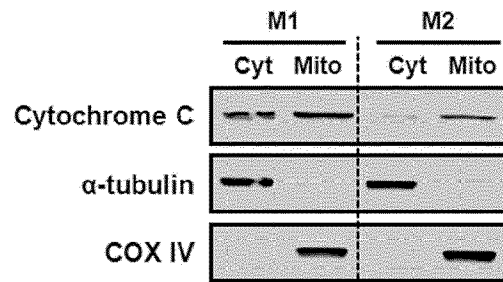
B



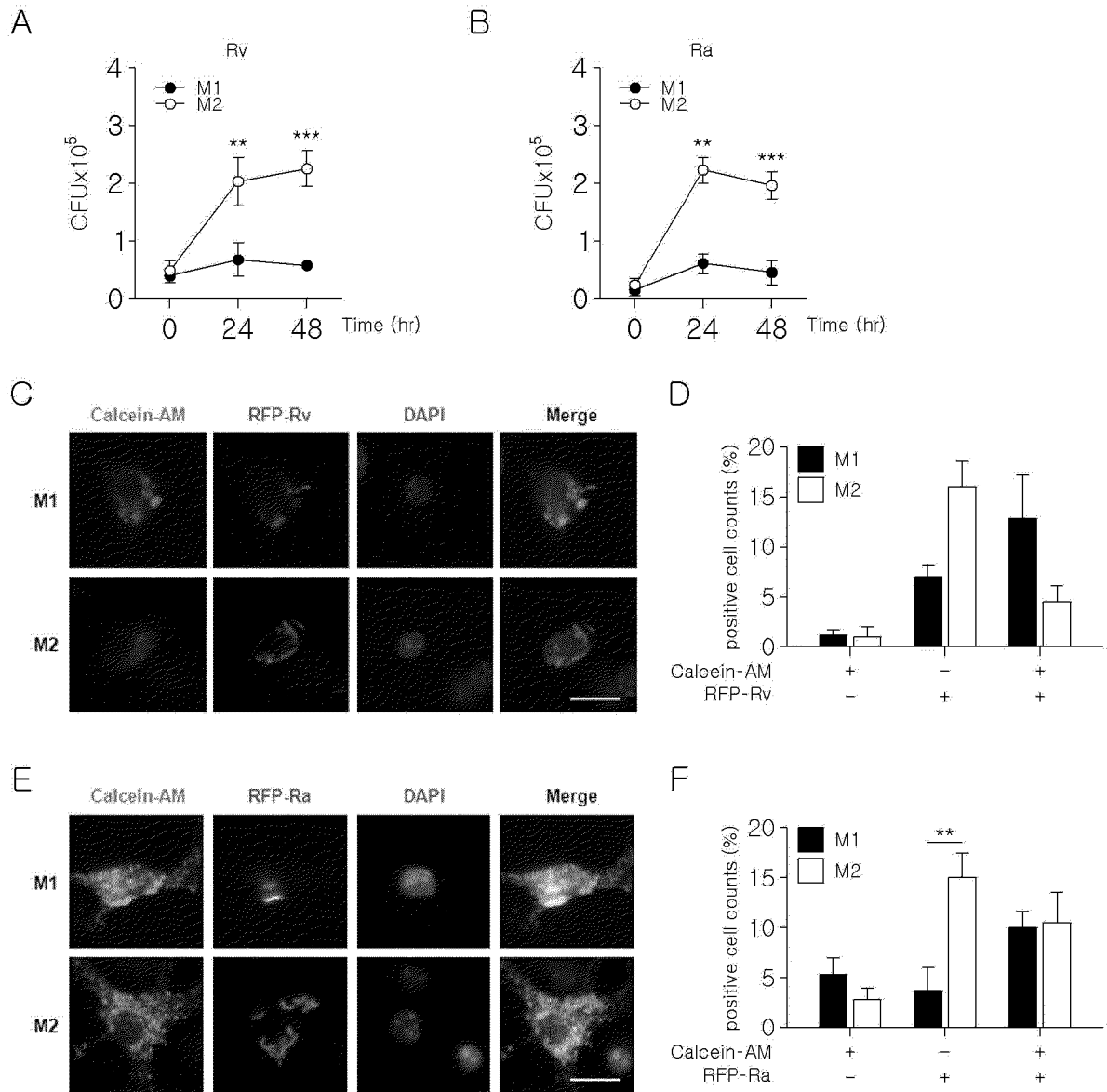
C



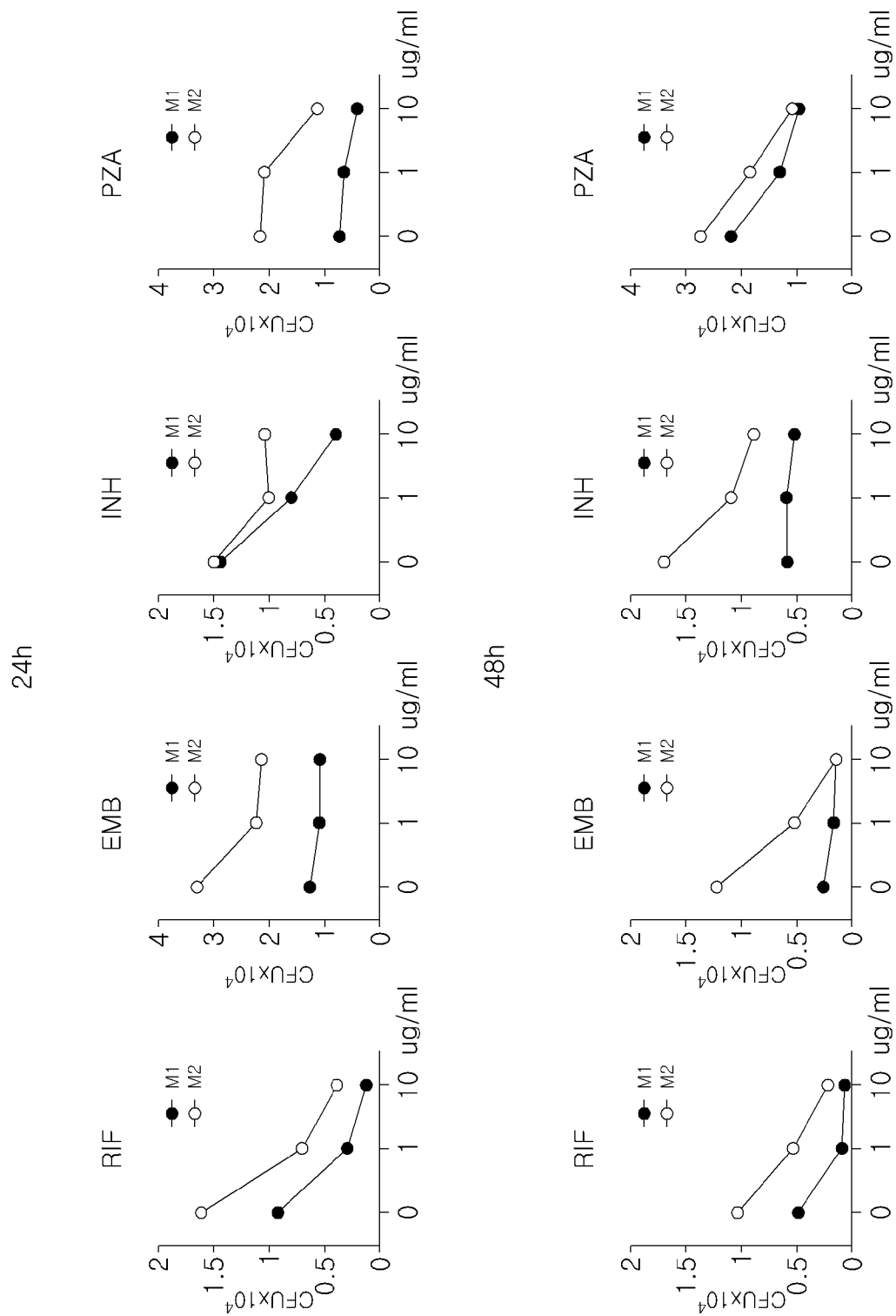
D



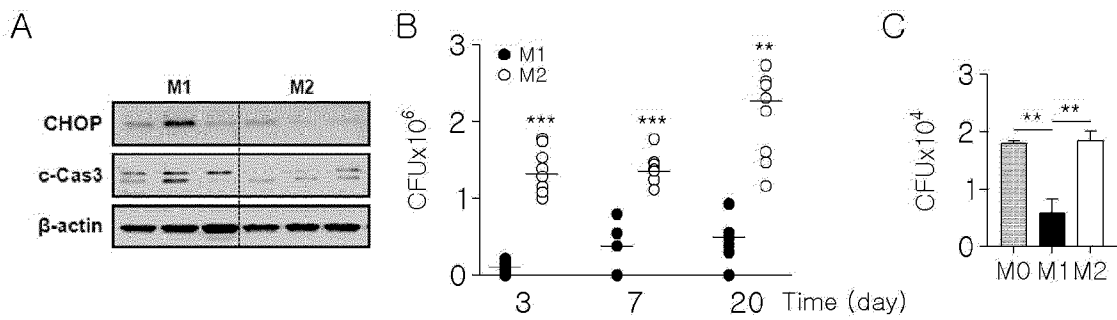
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/007061**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 35/15(2014.01)i, A61K 31/739(2006.01)i, A61K 38/21(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 35/15; A61K 31/60; A61K 31/19; A61K 38/19; A61K 38/21; A61K 31/739; A61K 39/00; A61K 45/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: macrophage, polarity, M1, inducement, tubercle bacillus, inhibition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUANG, Z. et al., "Mycobacterium Tuberculosis-induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas in Vitro", PLOS ONE, vol. 10, no. e0129744, pages 1-16 (19 June 2015) See abstract; page 12; figure 5.	1-7
X	MARINO, S. et al., "Macrophage Polarization Drives Granuloma Outcome during Mycobacterium Tuberculosis Infection", Infection and Immunity, vol. 83, no. 1, pages 324-338 (January 2015) See abstract; page 325.	1-7
A	Park, Jae Seok et al., "The Effect of Interferon-γ on the Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis and Activation of Human Pulmonary Alveolar Macrophage", Tuberculosis and Respiratory Disease, vol. 45, no. 1, pages 36-44 (February 1998) See abstract.	1-7
A	US 2006-0257359 A1 (FRANCOIS, C. et al.) 16 November 2006 See claims 1, 5, 16 and 17.	1-7
A	US 8895536 B2 (BANNISTER, R. M. et al.) 25 November 2014 See claims 1, 5, 6, 22 and 23.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 AUGUST 2017 (30.08.2017)

Date of mailing of the international search report

30 AUGUST 2017 (30.08.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/007061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2006-0257359 A1	16/11/2006	US 2012-0225114 A1	06/09/2012
		US 2015-0150945 A1	04/06/2015
US 8895536 B2	25/11/2014	AU 2011-322255 A1	03/05/2012
		AU 2012-213217 A1	09/08/2012
		AU 2012-213218 A1	09/08/2012
		AU 2012-213218 B2	12/01/2017
		AU 2014-204734 A1	17/07/2014
		AU 2014-204734 B2	11/08/2016
		AU 2014-204735 A1	17/07/2014
		AU 2014-204735 B2	11/08/2016
		AU 2014-204737 A1	17/07/2014
		AU 2014-204737 B2	11/08/2016
		AU 2014-204739 A1	17/07/2014
		AU 2014-204739 B2	11/08/2016
		AU 2014-211715 A1	07/08/2014
		AU 2014-211715 B2	25/08/2016
		CA 2826452 A1	09/08/2012
		CA 2826452 C	22/11/2016
		CA 2897874 A1	17/07/2014
		CA 2897878 A1	17/07/2014
		CA 2897884 A1	17/07/2014
		CA 2898000 A1	17/07/2014
		CA 2898017 A1	07/08/2014
		EP 2925367 A1	07/10/2015
		EP 2943183 A1	18/11/2015
		EP 2943222 A1	18/11/2015
		EP 2943223 A1	18/11/2015
		EP 2950821 A1	09/12/2015
		EP 3127556 A1	08/02/2017
		GB 2487808 A	08/08/2012
		IL 239920 A	31/08/2015
		IL 239921 A	31/08/2015
		IL 239922 A	31/08/2015
		IL 239923 A	31/08/2015
		IL 239924 A	31/08/2015
		JP 2016-128482 A	14/07/2016
		JP 2016-504401 A	12/02/2016
		JP 2016-504403 A	12/02/2016
		JP 2016-506941 A	07/03/2016
		JP 2016-508155 A	17/03/2016
		KR 10-2015-0125647 A	09/11/2015
		KR 10-2015-0125648 A	09/11/2015
		KR 10-2015-0125649 A	09/11/2015
		KR 10-2015-0129664 A	20/11/2015
		KR 10-2015-0129665 A	20/11/2015
		US 2012-0270845 A1	25/10/2012
		US 2012-0270899 A1	25/10/2012
		US 2014-0128354 A1	08/05/2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/007061

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2014-0155485 A1	05/06/2014
		US 2014-0162987 A1	12/06/2014
		US 2014-0162988 A1	12/06/2014
		US 2015-0051235 A1	19/02/2015
		US 2015-0051281 A1	19/02/2015
		US 2015-0051287 A1	19/02/2015
		US 2015-0342880 A1	03/12/2015
		US 2016-0101077 A1	14/04/2016
		US 2016-0101180 A1	14/04/2016
		US 2016-0158361 A1	09/06/2016
		US 2016-0199327 A1	14/07/2016
		US 2016-0271087 A1	22/09/2016
		US 2016-0271088 A1	22/09/2016
		US 2016-0303060 A1	20/10/2016
		US 2016-0317482 A1	03/11/2016
		US 2016-0331706 A1	17/11/2016
		US 2017-0027895 A1	02/02/2017
		US 2017-0043016 A1	16/02/2017
		US 8895537 B2	25/11/2014
		US 9265742 B2	23/02/2016
		US 9271950 B2	01/03/2016
		US 9308213 B2	12/04/2016
		US 9326958 B2	03/05/2016
		US 9381180 B2	05/07/2016
		US 9427422 B2	30/08/2016
		US 9504664 B2	29/11/2016
		US 9693980 B2	04/07/2017
		WO 2012-056251 A1	03/05/2012
		WO 2012-104654 A1	09/08/2012
		WO 2014-108569 A1	17/07/2014
		WO 2014-108572 A1	17/07/2014
		WO 2014-108573 A1	17/07/2014
		WO 2014-108574 A1	17/07/2014
		WO 2014-117999 A1	07/08/2014
		WO 2017-025517 A1	16/02/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 35/15(2014.01)i, A61K 31/739(2006.01)i, A61K 38/21(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i, A61K 45/06(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 35/15; A61K 31/60; A61K 31/19; A61K 38/19; A61K 38/21; A61K 31/739; A61K 39/00; A61K 45/06

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 대식세포, 극성, M1, 유도, 결핵균, 억제

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	HUANG, Z. 등, 'Mycobacterium tuberculosis-induced polarization of human macrophage orchestrates the formation and development of tuberculous granulomas in vitro', PLOS ONE, 10권, 문헌번호 e0129744, 페이지 1-16 (2015.06.19) 초록; 페이지 12; 도면 5 참조.	1-7
X	MARINO, S. 등, 'Macrophage polarization drives granuloma outcome during Mycobacterium tuberculosis infection', Infection and Immunity, 83권, 1호, 페이지 324-338 (2015.01) 초록; 페이지 325 참조.	1-7
A	박재석 등, 'Interferon- γ 가 사람 폐포대식세포의 결핵균 탐색과 활성화에 미치는 영향', 결핵 및 호흡기질환, 45권, 1호, 페이지 36-44 (1998.02) 초록 참조.	1-7
A	US 2006-0257359 A1 (FRANCOIS, C. 등) 2006.11.16 청구항 1, 5, 16 및 17 참조.	1-7
A	US 8895536 B2 (BANNISTER, R. M. 등) 2014.11.25 청구항 1, 5, 6, 22 및 23 참조.	1-7

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 08월 30일 (30.08.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 08월 30일 (30.08.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



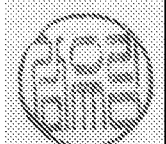
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2006-0257359 A1	2006/11/16	US 2012-0225114 A1 US 2015-0150945 A1	2012/09/06 2015/06/04
US 8895536 B2	2014/11/25	AU 2011-322255 A1 AU 2012-213217 A1 AU 2012-213218 A1 AU 2012-213218 B2 AU 2014-204734 A1 AU 2014-204734 B2 AU 2014-204735 A1 AU 2014-204735 B2 AU 2014-204737 A1 AU 2014-204737 B2 AU 2014-204739 A1 AU 2014-204739 B2 AU 2014-211715 A1 AU 2014-211715 B2 CA 2826452 A1 CA 2826452 C CA 2897874 A1 CA 2897878 A1 CA 2897884 A1 CA 2898000 A1 CA 2898017 A1 EP 2925367 A1 EP 2943183 A1 EP 2943222 A1 EP 2943223 A1 EP 2950821 A1 EP 3127556 A1 GB 2487808 A IL 239920 A IL 239921 A IL 239922 A IL 239923 A IL 239924 A JP 2016-128482 A JP 2016-504401 A JP 2016-504403 A JP 2016-506941 A JP 2016-508155 A KR 10-2015-0125647 A KR 10-2015-0125648 A KR 10-2015-0125649 A KR 10-2015-0129664 A KR 10-2015-0129665 A US 2012-0270845 A1 US 2012-0270899 A1 US 2014-0128354 A1	2012/05/03 2012/08/09 2012/08/09 2017/01/12 2014/07/17 2016/08/11 2014/07/17 2016/08/11 2014/07/17 2016/08/11 2014/07/17 2016/08/11 2014/07/17 2016/08/11 2014/08/07 2016/08/25 2012/08/09 2016/11/22 2014/07/17 2014/07/17 2014/07/17 2014/07/17 2014/08/07 2015/10/07 2015/11/18 2015/11/18 2015/11/18 2015/12/09 2017/02/08 2012/08/08 2015/08/31 2015/08/31 2015/08/31 2015/08/31 2015/08/31 2016/07/14 2016/02/12 2016/02/12 2016/03/07 2016/03/17 2015/11/09 2015/11/09 2015/11/09 2015/11/20 2015/11/20 2012/10/25 2012/10/25 2014/05/08

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2014-0155485 A1	2014/06/05
US 2014-0162987 A1	2014/06/12
US 2014-0162988 A1	2014/06/12
US 2015-0051235 A1	2015/02/19
US 2015-0051281 A1	2015/02/19
US 2015-0051287 A1	2015/02/19
US 2015-0342880 A1	2015/12/03
US 2016-0101077 A1	2016/04/14
US 2016-0101180 A1	2016/04/14
US 2016-0158361 A1	2016/06/09
US 2016-0199327 A1	2016/07/14
US 2016-0271087 A1	2016/09/22
US 2016-0271088 A1	2016/09/22
US 2016-0303060 A1	2016/10/20
US 2016-0317482 A1	2016/11/03
US 2016-0331706 A1	2016/11/17
US 2017-0027895 A1	2017/02/02
US 2017-0043016 A1	2017/02/16
US 8895537 B2	2014/11/25
US 9265742 B2	2016/02/23
US 9271950 B2	2016/03/01
US 9308213 B2	2016/04/12
US 9326958 B2	2016/05/03
US 9381180 B2	2016/07/05
US 9427422 B2	2016/08/30
US 9504664 B2	2016/11/29
US 9693980 B2	2017/07/04
WO 2012-056251 A1	2012/05/03
WO 2012-104654 A1	2012/08/09
WO 2014-108569 A1	2014/07/17
WO 2014-108572 A1	2014/07/17
WO 2014-108573 A1	2014/07/17
WO 2014-108574 A1	2014/07/17
WO 2014-117999 A1	2014/08/07
WO 2017-025517 A1	2017/02/16