(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월09일
(11) 등록번호 10-1510993
(24) 등록일자 2015년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0073488
(22) 출원일자 2014년06월17일
심사청구일자 2014년06월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020060020139 A

기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
차광호
대전광역시 중구 문화로 266 충남대학교의과대학 감염생물학 교실
이영하
대전광역시 중구 문화로 266 충남대학교의과대학 감염생물학 교실
(74) 대리인
특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 이수정

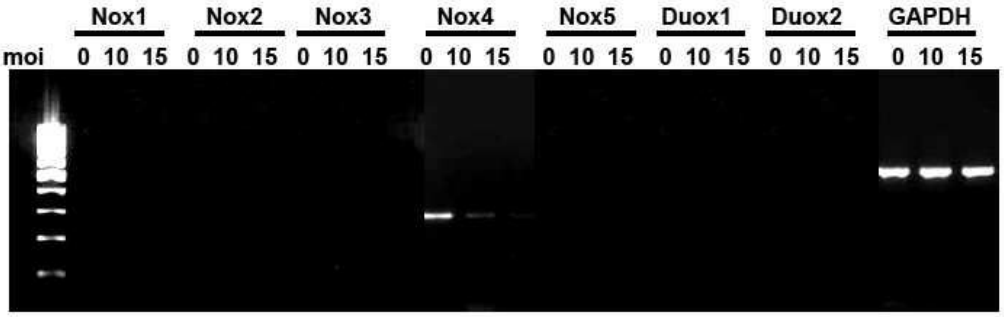
(54) 발명의 명칭 **NOX4를 함유하는 톡소플라즈마증 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 NOX4를 함유하는 톡소플라즈마증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 NOX4 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 톡소플라즈마증(toxoplasmosis) 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 톡소포자충 감염은 숙주세포에서 PI3K/Akt 시그널링 경로의 활성화를 통해 Nox4의 유전자 발현을 감소시키고 세포 내 ROS 수준을 감소시킴으로써 톡소포자충 성장 및 증식에 적합한 세포내 환경을 조성한다. 따라서 톡소포자충 감염 시 Nox4의 발현을 증가시킴으로써 톡소포자충 감염으로 인한 숙주세포 내 ROS 감소를 차단하여 톡소포자충의 복제 및 증식을 억제시킬 수 있다.

대 표 도 - 도11



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2007-0054932
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터 지원 사업 - 기초의약학 (MRC)
연구과제명 감염신호네트워크 응용연구센터(감염신호에 의한 생체 방어 면역조절 기전 분석 및 감염 치료 기반 기술개발)
기 여 율 1/3
주관기관 충남대학교
연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2009-0068747
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구(신진연구)
연구과제명 Huntingtin에 대한 palmitoylation의 역할 규명 및 관련 유전자의 스크리닝을 통한 Huntington's disease 발병 원인 규명
기 여 율 1/3
주관기관 충남대학교
연구기간 2009.05.01 ~ 2010.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011-0023501
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자(기본연구)지원사업
연구과제명 톡소포자충 감염세포내 신호전달체계간의 Network Hierarchy 파악 및 관련 세포반응의 규명
기 여 율 1/3
주관기관 충남대학교
연구기간 2011.09.01 ~ 2012.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

NOX4 (NADPH oxidase 4) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 톡소플라즈마증(toxoplasmosis) 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 NOX4 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 NOX4 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 톡소플라즈마증은 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*) 또는 톡소포자충의 ESP (excretory/secretory proteins)의 감염에 의해 발병되는 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 톡소플라즈마증은 눈 톡소플라즈마증(Ocular toxoplasmosis)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 NOX4는 톡소포자충 감염으로 인한 숙주세포 내 ROS (reactive oxygen species) 감소를 회복시킴으로써 톡소포자충의 복제 및 증식을 억제시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 NOX4를 함유하는 톡소플라즈마증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 NOX4 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 톡소플라즈마증(toxoplasmosis) 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)은 세계적으로 가장 광범위한 인수공통(zoonotic) 병원체 중 하나이다. 타키조이트(tachyzoite)는 면역 및 비-면역 세포를 포함하여, 광범위한 포유동물 숙주세포에 감염시킬 수 있는 독소포자충의 빠르게 분열하는 반수체(haploid) 형태이다 (Hill D, et al., 2002 *Clin Microbiol Infect* 8: 634-640). 숙주세포 내부에서, 기생충들은 엔도좀의 산성화(endosomal acidification) 및 리소좀의 융해(lysosomal fusion)에 저항하는 분화된(specialized) 기생충공포(parasitophorous vacuole, PV) 내에 서식하는데, 이들 기

생충은 PV에서 빠른 세포내 복제를 나타내고, 숙주 세포내 세포 기관(organelles) 및 세포골격(cytoskeleton)을 재분배하며, 숙주세포 유전자 발현을 조절한다 (Coppens I, et al., *Expert Rev Mol Med* 2001: 1-20). 톡소포자충은 생존을 위해 뉴클레오티드 뿐만 아니라 글루코오스, 지질, 아미노산과 같은 대사산물에 대하여 숙주세포와 경쟁하는 절대 세포내 기생충이다 (Black MW, et al., 2000 *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 607-623). 생존을 위한 이 치열한 경쟁을 이기기 위해, 기생충은 숙주 반응들 및 근본적인 신호 전달 캐스케이드들을 왜곡시킬 수 있는 고도로 정교한 능력을 나타낸다. 그러나 그들의 세포내 복제와 관련된 세포 인자들은 잘 밝혀져 있지 않다.

[0003] 최근, 몇몇 보고들은 숙주 PI3K/Akt 시그널링 경로가 톡소포자충 감염에 의해 자극됨을 설명하였다 (Manea A, et al., 2010 *Biochem Biophys Res Commun*. 396: 901-907). PI3K는 어디에서나 발현되는 효소로서 인슐린 의존적 세포성장, 막 수송(membrane trafficking), 및 엔도좀 융해와 같은 다양한 세포내 과정의 조절의 원인이 된다 (Lindmo K, et al., 2006 *J Cell Sci* 119: 605-614). 세린/트레오닌 단백질 키나아제 B (PKB)/Akt는 PI3K의 주요 다운스트림 타겟의 하나이며 세포의 성장 조절에서 중추적인 역할을 한다 (Franke TF, et al., 1995 *Cell* 81: 727-736). Ser473 및 Thr308에서의 인산화는 대사, 성장 및 합성 과정을 증가시키고 세포자살을 억제하는 다중 세포 과정을 조절하는 Akt의 키나아제 활성을 활성화시킨다 (Ehrhardt C, et al., 2009 *Cell Microbiol* 11: 863-871.). PIP3(phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate)가 감염성 타키조이트에 반응하여 숙주세포에 빠르게 축적되기 때문에 PI3K/Akt 시그널링은 숙주세포에 대한 톡소포자충 침입에서 중요한 역할을 하고, 더 중요하게는, PI3K 저해제가 기생충 침입을 부분적으로 감소시킨다 (Wang Y, et al., 2010 *Mol Biochem Parasitol* 173: 142-153). 다른 연구는 톡소포자충 유래 ESP(excretory/secretory proteins)가 숙주세포로의 기생충 침입에 적합한 조건을 만드는데 중요한 역할을 함을 제시하였다 (Son ES, et al., 2001 *Korean J Parasitol* 39:). 눈 톡소플라즈마증(Ocular toxoplasmosis)은 눈 안쪽을 포함하여 톡소포자충 감염에 의해 유발되는 염증 상태이다. 이러한 질환은 면역기능이 정상인 환자에서 가장 일반적인 후부 포도막염(posterior uveitis)이다 (Quan JH, et al., 2013 *Exp Parasitol* 133: 462-471). 눈 톡소프라즈마증은 보통 자가회복성(self-limited) 맥락망막염(retinochoroiditis)으로 이루어져 있지만, 시력저하 합병증(sight-threatening complications)을 유발하는데, 이러한 질환은 포도막염이 있는 환자에서 한쪽 시력상실의 주요한 원인이 된다 (Jabs DA, 1990 *Int Ophthalmol Clin* 30: 264-270). 망막(retina)과 맥락막(choroid)에 대한 손상의 강도는 감염의 심각성 및 관련 염증반응에 달려있다. 톡소포자충-유도된 포도막염의 가장 중증형에서, 외망막층 및 색소상피(pigment epithelium)의 거대 세그먼트(large segments)의 변성이 종종 관찰된다 (McMenamin PG. et al., 1986 *Exp Eye Res* 43: 529-543).

[0004] 망막색소상피(retinal pigment epithelium, RPE)는 망막 광수용체(retinal photoreceptors)와 혈관-풍부 맥락막 사이에 단일-세포층을 형성함으로써, 혈액망막장벽(blood-retinal barrier)을 형성한다. RPE는 출생 후 상대적으로 높은 산소분압 하에서 정상적으로 기능한다. 몇몇 동물모델은 톡소포자충 타키조이트가 맥락막 및 망막순환(choroidal and retinal circulation) 둘 다를 통해 망막에 도달함을 제시하였다. 토끼에서 맥락막상의 공간내로 타키조이트를 주사한 경우, 48시간 내 외망막병변 및 망막색소상피의 국부병소(localized foci)가 관찰되었다 (Tabbara KF, et al., 1974 *Arch Ophthalmol* 92: 244-247). 이러한 결과는 타키조이트가 맥락막에서 망막까지 RPE-Bruchs막 장벽을 통과한다는 것을 의미한다. 톡소플라즈마 맥락망막염의 조직병리학적 조사는 RPE와 망막에서 유리 타키조이드 및 낭종(cysts)의 존재를 나타내었다 (Nicholson DH, et al., 1976 *Arch Ophthalmol* 94: 248-254). RPE가 톡소포자충 생존 및 증식을 위한 이상적인 환경인지는 알려져 있지 않지만, 이러한 보고는 RPE가 톡소포자충에 대한 우선적인 감염 부위 중 하나임을 뒷받침한다. 따라서 본 발명에서는, 눈 톡소플라즈마증에 대한 모델로서 인간 RPE 세포주(ARPE-19)를 사용하여 기생충 침입 및 세포내 복제에 반응한 숙주 방어기작을 연구하였다.

[0005] 대사 반응의 부산물로 발생하는 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 보통 다양한 세포 생리학적 작용에 관여한다. ROS는 Akt, NF-kB 및 MAPK 등을 타겟팅하는, 특정 필수 시그널링 경로를 조절한다 (Mochizuki T, et al. 2006 *Oncogene* 25: 3699-3707). 그러나 ROS는 화학적으로 반응성이 있으므로 고농도로 존재하는 경우 DNA, 지질 및 단백질을 쉽게 손상시킬 수 있다. 따라서 ROS의 높은 수준은 노인성 황반변성(age-related macular degeneration, AMD) 및 포도막염을 포함한 안질환(eye disorder)에 있어서 산화적 손상의 잘 알려진 원인이다 (Gritz DC, et al., 1991 *Curr Eye Res* 10: 927-931). 그와 반대로, 이러한 ROS의 유해한 효과는 면역세포의 선천성 면역 방어 반응의 중요한 구성요소이며 외부 환경으로부터 감염성 병원체에 대항하는데 이용된다. 식세포(phagocytes)에서, 신속한 ROS 생성은 “산화적 폭발(oxidative burst)”로 불리는, 감염에 대한 초기 세포 반응들 중 하나이다. 초과산화물(superoxide, O^{2-}) 또는 그 불균등화 산물인 과산화수소(hydrogen

peroxide, H_2O_2)의 아포플라스트 생성(apoplastic generation)은 *in vitro* 및 *in vivo*에서 톡소포자충에 침입하여 사멸시킬 수 있다 (Aline F, et al., 2002 *Infect Immun* 70: 2368-2374). 다양한 비식세포성 세포들도 다양한 세포외 자극에 반응하여 낮은 수준의 ROS를 생성하는 초과산화물-생성 효소를 가지고 있다 (Lambeth JD, 2004 *Nat Rev Immunol* 4: 181-189). 주목할 만한 것은, RPE 자체 및 그에 인접한 광수용체들은 광에너지를 전기화학적 시그널로 변환하는 광화학적 반응으로 인해, 상당한 ROS을 생성한다 (Kang K H, et al., 2009 *Trends Mol Med* 15: 191-198).

[0006] ROS의 근원은 NADPH 산화효소, 미토콘드리아 전자전달계, 잔틴 산화효소(xanthine oxidase) 및 내피세포 산화질소 합성효소를 포함한다 (Bedard K, et al., 2007 *Physiol Rev* 87: 245-313). 이 효소들이 산화적 부하(oxidative burden)에 원인이 되기는 하지만, NADPH 산화효소가 인간 RPE 세포주에서 ROS 생성의 주된 효소적 근원임을 시사하는 증거가 된다 (Qian J, et al., 2011 *J Cell Biochem* 112: 2480-2489). 최근 연구는 NADPH 의존적 산화 스트레스가 RPE 세포에서 세포자살성 시그널링 경로를 유도하고 NADPH 산화효소가 *in vivo*에서 일부 타입의 망막 변성(retinal degeneration)의 발병에 기작론적으로(mechanistically) 관련되어 있음을 증명하였다 (Chen Y, et al., *J Biol Chem* 287: 5059-5069). NADPH 산화효소 활성은 모든 세포의 혈관벽에서 일어나지만, 이 효소의 서브유닛은 세포-특이적이다. NADPH 산화효소들의 패밀리(Nox/Duox)는 Nox1, Nox2 (gp91phox), Nox3, Nox4 및 Nox5 뿐만 아니라 Duox1 및 Duox2로도 구성된다 (Bedard K, et al., 2007 *Physiol Rev* 87: 245-313).

[0007] 본 발명에서는, 톡소포자충 감염에 의한 숙주세포 PI3K/Akt 경로의 활성화가 이러한 기생충의 복제에 유익하다는 증거를 제공한다. Nox4는 RPE 세포에서 지속적인 ROS의 일차 근원이므로, 톡소포자충에 유리하도록 숙주세포의 산화 면역시스템을 무력하게 하기 위해 톡소포자충이 이용하는 주요 타겟이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 Nox4의 발현 조절이 톡소포자충의 생존 및 증식에 관련되어 있음을 밝혀내고, 이러한 Nox4를 이용하여 톡소포자충 감염으로부터 숙주세포의 면역시스템을 회복 또는 개선시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 톡소포자충의 생존 및 증식 억제를 통해 톡소포자충 감염으로 유발되는 질환의 치료에 효과를 나타내는, NOX4 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 톡소플라즈마증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 NOX4 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 톡소플라즈마증(toxoplasmosis) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 톡소플라즈마증은 톡소포자충(*Toxoplasma gondii*) 또는 톡소포자충의 ESP(excretory/secretory proteins)의 감염에 의해 발병되는 질환일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 톡소플라즈마증은 눈 톡소플라즈마증(Ocular toxoplasmosis)에 대한 좋은 실험적 임상적 모델일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 NOX4는 톡소포자충 감염으로 인한 숙주세포 내 ROS(reactive oxygen species) 감소를 회복시킴으로써 톡소포자충의 복제 및 증식을 억제시킬 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 톡소포자충 감염은 숙주세포에서 PI3K/Akt 시그널링 경로의 활성화를 통해 Nox4의 유전자 발현을 감소시키고 세포 내 ROS 수준을 감소시킴으로써 톡소포자충 성장 및 증식에 적합한 세포내 환경을 조성한

다. 따라서 톡소포자충 감염 시 Nox4의 발현을 증가시킴으로써 톡소포자충 감염으로 인한 숙주세포 내 ROS 감소를 차단하여 톡소포자충의 복제 및 증식을 억제시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] **도 1**은 톡소포자충 및 ESP가 ARPE-19 세포에서 PI3K/Akt 경로를 활성화시킴을 나타내는 결과이다. ARPE-19 세포는 다음 시험에 사용하기 전 1일 동안 혈청 결핍시켰다. (A) 세포들은 24시간 동안 지시된 moi에서 GFP-RH 타키조이트로 감염되었다. 감염 두 시간 후, 세포외 타키조이트들은 PBS로 세척함으로써 즉시 제거한 후 22시간 동안 혈청 배지가 없는 상태에서 배양되었다. (B) 세포들은 0.1 내지 10 mg/ml 범위에 있는 다양한 농도의 GFP-RH 타키조이트로 1시간 동안 자극되었다. (C) ARPE-19 세포들은 24시간 동안 톡소포자충(moi 15)로 감염되었으며 마지막 1시간 동안 LY294002의 농도를 증가시키면서 처리되었다. (D) 세포들은 1시간 동안 보르트만닌으로 전처리된 다음 세척 후, 세포들은 1시간 동안 1 mg/ml ESP로 자극되었다. 전체 세포 용해물은 수집되어 phospho-AKt 및 총 Akt에 대한 일차 항체를 이용한 웨스턴 블롯으로 분석되었다. Akt 인산화 수준은 총 Akt의 양에 대해 정규화한 후 비처리 대조군 세포의 비로서 계산되었다. (E) 세포들은 24시간 동안 15 moi로 감염된 다음 1시간 동안 각각의 저해제로 처리되었다.

도 2는 PI3K 저해제들이 ARPE-19 세포에서 톡소포자충 증식을 저해함을 나타내는 결과이다. ARPE-19 세포에서 타키조이트의 증식은 형광현미경으로 측정되었다. 세포들은 PI3K 저해제인, 10 mM LY294002, 200 nM 보르트만닌 (A), 또는 250 nM GDC-0941, 10 nM ZSTK474 (B)로 1시간 동안 전-배양되었다. 세척 후, 세포들은 24시간 동안 5 moi에서 톡소포자충으로 감염되었다. 세포들은 고정되어 F-액틴(빨간색)을 표지하기 위해 텍사스 레드 H-X 팔로이딘으로 염색되었고, 핵은 DAPI(파란색)으로 염색되었다. 공포 당 기생충의 수를 세어 퍼센트로 변환하였다. 스케일 바 = 100 mM.

도 3은 톡소포자충 및 ESP가 PI3K/Akt 시그널링의 활성화를 통해 H_2O_2-유도성 ROS 생성을 저해함을 보여주는 결과이다. 10 mM DHE로 염색되고 서로 다른 조건으로 처리된 세포들의 형광현미경 이미지. ARPE-19 세포들은 23시간 동안 GFP-RH로 감염되거나 (A, B), 또는 ARPE-19 세포들은 1시간 동안 ESP로 자극되었다 (B). 이 세포들은 1시간 동안 저해제가 있거나 없이 100 mM H_2O_2에 노출되었다. 산화 스트레스(H_2O_2) 하에서 ESP 및 PI3K 저해제에 의한 ROS 수준 변화는 유세포 분석에 의해 정량적으로 분석되었다 (C). 스케일 바 = 100 mM.

도 4는 톡소포자충 ESP가 ARPE-19 세포에서 내생성 ROS 수준을 감소시킴을 보여주는 결과이다. (A) 세포들은 ESP로 1시간 동안 자극된 후 PI3K 저해제로 1시간 동안 배양되었다. 세포내 초과산화물은 DHE 염색 후 유세포 분석으로 측정되었다. (B) A에 대응한 DHE-염색된 세포의 개체군의 상대적인 형광강도.

도 5는 톡소포자충 및 ESP가 PI3K/Akt 경로를 통해 숙주 Nox4 발현을 억제함을 보여주는 결과이다. (A) ARPE-19 세포에서 숙주 Nox4 및 $P22^{phox}$ mRNT 수준의 RT-PCR 분석. GAPDH는 내부대조군으로 사용되었다. (B) 세포들은 지시된 시간 동안 1 mg/ml ESP로 자극되었다. Nox4 단백질 수준은 웨스턴 블롯으로 분석되었으며, b-액틴은 로딩 대조군으로 사용되었다. (C) ESP-자극된 세포에서 Nox4의 면역세포화학 분석. ARPE-19 세포들은 5시간 동안 1 mg/ml ESP로 자극되었다. 이어서 세포들은 항-Nox4 항체(green) 및 F-액틴 표지용 텍사스 레드 H-X 팔로이딘(red)으로 염색되었다. 핵은 DAPI(blue)로 염색되었다. 스케일 바 = 100 mM.

도 6은 Nox4 유전자 넉다운이 톡소포자충 증식을 촉진함을 나타낸다. ARPE-19 세포들은 Nox4-특이적 siRNA로 48시간 동안 감염되었다. (A) Nox4 넉다운 효율은 웨스턴 블롯으로 측정되었다. (B) 세포내 ROS 수준은 DHE 염색 후 유세포 분석으로 측정되었다. (C) 대조군 siRNA 또는 특이적인 Nox4 siRNA로 감염된 ARPE-19 세포들은 2시간 동안 톡소포자충으로 감염되었고, 감염 24시간 후 세포내 타키조이트 복제의 형광 그래프를 얻었다.

도 7은 마이코플라즈마 및 엔도톡신의 시험 결과이다. (A) 마이코플라즈마 DNA의 존재를 검출하기 위한 ARPE-19 세포 및 기생충의 PCR 분석. 프라이머 쌍을 양성 주형(positive template)으로 이용한 PCR 산물의 크기는 270 bp이다. (B) LAL 분석으로 검출된 ARPE-19 세포 및 기생충의 엔도톡신 수준.

도 8은 톡소포자충 감염 후 12시간에서 숙주 생존율 및 톡소포자충 복제율에 대한 PI3K 저해제의 효과를 확인한 결과이다. (A) ARPE-19 세포들은 다양한 moi에서 24시간 동안 감염되었으며, 세포 생존율은 MTT 분석으로 분석되었다. (B) 세포들은 1시간 동안 PI3K 저해제인, 10 mM LY294002, 200 nM 보르트만닌, 또는 250 nM GDC-0941, 10 nM ZSTK474 중 하나로 전-배양되었다. 세척 후, 세포들은 12시간 동안 5 moi에서 톡소포자충으로

감염되었다. 공포 당 기생충의 수를 세어 퍼센트로 변환하였다 (doubling time of around 10, 12 h).

도 9는 톡소플라즈마-유도된 PI3K/Akt 활성화에 대한 PI3K-특이적 저해제들의 효과를 나타낸 결과이다. ARPE-19 세포들은 톡소포자충(moi 15)로 감염되었으며 마지막 1시간 동안 GDC-0941 또는 ZSTK474의 농도를 높이면서 처리하였다.

도 10은 톡소포자충에서 높은 ROS가 존재함을 나타낸다. 톡소플라즈마 유도된 ROS 합성 저해는 PI3K 저해제의 처리에 의해 억제되었다. 화살표는 톡소포자충이 DHE(dihydroethidium)로 높게 표지될 수 있음을 나타낸다.

도 11은 톡소포자충 감염된 ARPE-19 세포에서 NADPH 산화효소의 mRNA 발현 패턴을 나타낸다. NADPH 산화효소 이소폼(Nox1~5, Duox1/Duox2)의 몇몇 촉매적 서브유닛에 대하여 선택된 프라이머를 이용한 숙주세포로부터 추출된 총 RNA에 대한 역전사-PCR.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 NOX4 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 톡소플라즈마증(toxoplasmosis) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명에서, 상기 NOX4(NADPH oxidase 4)는 NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)의 산화효소 중 하나로서 NADPH 산화효소들(Nox/Duox)의 패밀리에 속한다. NADPH 산화효소는 포유동물 세포에서 ROS 생성의 주요인자 중 하나로 알려져 있다 (Ehrhardt C, et al., 2009 *Cell Microbiol* 11: 863-871).

[0018] 본 발명의 일실시예에서, 상기 NOX4 단백질은 공지의 단백질로서 그 유래는 특별히 한정되지는 않으나, 바람직하게는 포유동물에서 유래된 것일 수 있다. 예들 들면, 상기 NOX4 단백질은 인간, 원숭이, 및 설치류로 구성된 군으로부터 유래된 것일 수 있다.

[0019] 하나의 예로서, 상기 NOX4 단백질은 인간에서 유래된 서열번호 1(Genbank Accession No. Q9NPH5)의 아미노산 서열을 가질 수 있고, 이를 코딩하는 염기서열은 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 어떠한 염기서열일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 2(Genbank Accession No. NM_016931)의 염기서열이다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 '톡소포자충(*Toxoplasma gondii*)'은 동물세포에 기생하는 기생 생물체로서 전형적인 동물세포보다 작고, 유아 또는 면역체계에 장애가 있는 성인의 중추신경계에 감염되어 톡소플라즈마증을 유발한다. 또한 상기 '톡소플라즈마증(toxoplasmosis)'은 톡소포자충 또는 톡소포자충의 ESP(excretory/secretory proteins)의 감염에 의해 발병되는 질환으로서, 중추신경계 감염으로 인한 정신분열증, 강박장애, 류머티스성 관절염, 뇌종양, 유산, 사산 등을 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 톡소플라즈마증은 눈 톡소플라즈마증(Ocular toxoplasmosis)인 것을 특징으로 한다. 눈 톡소플라즈마증은 눈 안쪽을 포함하여 톡소포자충 감염에 의해 유발되는 염증 상태를 의미하며, 맥락망막염(retinochoroiditis)을 포함하는 질환이다. 이러한 질환은 면역기능이 정상인 환자에서 가장 일반적인 후부 포도막염(posterior uveitis)이며 (Quan JH, et al., 2013 *Exp Parasitol* 133: 462-471), 시력저하 합병증(sight-threatening complications)을 유발하기도 한다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 NOX4는 톡소포자충 감염으로 인한 숙주세포 내 ROS(reactive oxygen species) 감소를 회복시킴으로써 톡소포자충의 복제 및 증식을 억제시키는 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 Nox4의 발현은 숙주세포에서 톡소포자충 감염에 의해 PI3K/Akt 시그널링 경로의 활성화를 통해 억제되는데, 이러한 PI3K 활성화는 숙주세포 내 ROS 수준을 감소시키게 된다 (도 5 참조). 이와 같이, 톡소포자충 감염으로 감소된 ROS 수준으로 인해 숙주세포는 효과적으로 감염 기생충을 공격하기 어려워진다. 본 발명에서는, Nox4 siRNA 트랜스펙션을 이용하여 톡소포자충 증식에서 Nox4의 역할을 평가하였고, 그 결과 대조군과 비교하여 Nox4 발현이 억제된 세포에서 톡소포자충의 증식이 현저하게 촉진된 것을 확인하였다 (도 6의 C 참조). 이러한 결과는 숙주 개체에서 Nox4의 유전자 발현이 억제되면 ROS 생성이 감소되어 톡소포자충 성장 및 증식에 적합한 세포내 환경을 조성됨을 의미한다. 따라서 톡소포자충 감염이 의심되거나 감염이 진행된 개체에 NOX4 단백질을 투여하거나 Nox 유전자의 발현을 증가시킬 경우, 톡소포자충 감염으로 인한 숙주세포 내 ROS 감소를 차단하거나 회복시켜 톡소포자충의 복제 및 증식을 억제시킬 수 있으므로, 톡소플라즈마증의 예방 및 치료 효과를 얻을 수 있다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 NOX4 단백질을 코딩하는 유전자는 분리된 유전자 물질로서 유지될 수 있는 플라스미드

벡터의 형태로 세포내로 도입되거나 또는 염색체 내로 통합될 수 있는 선형 DNA를 세포 내로 도입할 수 있다. DNA가 세포 내로 도입될 경우, 당해 분야에 공지된 바와 같이, 염색체 내로의 DNA 혼입을 촉진시키는 시약을 첨가할 수도 있고, 혼입을 촉진시키는 DNA 서열 또한 조성물 내에 포함될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 상기 NOX4 단백질을 코딩하는 유전자는 발현벡터에 삽입된 형태로 제공될 수 있다.

[0025] 상기 NOX4 단백질을 코딩하는 유전자는 플라스미드 또는 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터 내로 삽입시킨 후, 상기 발현벡터를 감염(infection) 또는 형질도입(transduction) 등의 당업계에 공지된 방법에 의해 발현형으로 표적 세포 내에 도입시켜 유전자 치료에 사용할 수 있다.

[0026] 플라스미드 발현 벡터를 이용한 유전자 전달 방법은 사람 세포에 직접적으로 플라스미드 DNA를 전달하는 방법으로서, FDA로부터 승인받은, 사람에게 사용할 수 있는 방법이다(Nabel, E. G., et al., Science, 249:1285-1288, 1990). 플라스미드 DNA는 바이러스 벡터와는 달리 균질하게 정제될 수 있는 장점이 있다. 본 발명에서 사용할 수 있는 플라스미드 발현 벡터로는 당업계에 공지된 포유동물 발현 플라스미드를 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 pRK5(유럽특허 제307,247호), pSV16B(국제특허공개 제91/08291호) 및 pVL1392(PharMingen) 등이 대표적이다.

[0027] 본 발명에 따른 유전자를 포함하는 플라스미드 발현 벡터(plasmid expression vector)는 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated trans fection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 DNA를 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 숙주세포 내로 도입할 수 있다(Wu et al., J. Bio. Chem., 267:963-967, 1992; Wu and Wu, J. Bio. Chem., 263:14621-14624, 1988).

[0028] 또한 상기 벡터는 NOX4 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 위해 필요한 조절 요소를 포함한다. 이러한 요소는, 예를 들면, 프로모터, 개시 코돈, 정지 코돈 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 당해 분야에 공지된 바와 같이, 이들 요소는 바람직하게는 목적하는 NOX4 단백질을 코딩하는 서열에 작동적으로 연결되며, 조절 요소는 바람직하게는 이들이 투여될 종에서 작동될 수 있도록 선택된다.

[0029] 본 발명에 따른 NOX4 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물은, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 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, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다.

[0030] 또한 본 발명의 약학 조성물은 치료학적 또는 예방학적 유효양으로 투여될 수 있다. 투여량은 환자의 질환 종류 및 중증도, 연령, 성별, 체중, 약물에 대한 민감도, 현재 치료법의 종류, 투여방법, 표적 세포 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한 단일 또는 다중 투여일 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0031] 또한 상기 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 약학 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0032] 이하, 본 발명에 따른 Nox4와 폭소포자충의 성장 및 증식, 그리고 이들 사이의 세포 내 신호전달, 분자적 상호작용에 대해 좀 더 구체적으로 설명한다.

[0033] 톡소포자충 감염된 환자의 망막에서 낭종(cysts)과 타키조이트(tachyzoites)가 발견되는 것은 흔한 일이다. 괴사성 병변(Necrotic lesions)은 종종 신경망막 및 맥락막 구조의 퇴화(맥락망막염)를 수반하여 관찰된다 (Vallochi AL, et al., 2002 *Scand J Immunol* 55: 324-328). 마우스 모델 연구들은 망막 병변이 감염 부위에서 단핵구 세포에 의해 유발되는 염증 반응의 결과로 보고하고 있다. 톡소포자충은 눈 구조, 예들 들어 망막색소상피(retinal pigment epithelium, RPE)에 순조롭게 침투하여 서식하면서 급격한 증상을 나타내지만, 눈은 다양한 메커니즘에 의한 면역-매개된 염증 및 손상으로부터 보호받는 비면역기관(immune privileged organ)으로 알려져 있다 (Streilein JW, et al., 1996 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 413-424). 망막색소상피의 세포는 광수용체 세포로부터 광-유도된 all-*trans*-retina를 11-*cis*-retina로 재활용하여 기능적 광색소(photopigments)를 광수용체로 되돌려 제공하며, 광수용체로부터 산화적으로 손상된 물질을 제거함으로써 망막의 생리기능에서 중요한 역할을 한다 (Kang KH, et al., 2009 *Trends Mol Med* 15: 191-198). 이는 RPE 세포가 근본적으로 산화 스트레스 받기 쉽고 특정 조건 하에서 활성산소종을 생성할 수 있음을 의미한다 (Miceli MV, et al., 1994 *Exp Cell Res* 214: 242-249). 예들 들어, 밝은 빛에 노출은 자유 라디칼을 생성하고 ROS 생성을 증가시킬 수 있으며, 이는 RPE 세포에서 산화 스트레스를 더 유도한다 (Faqhiri Z, et al., 2010 *Exp Eye Res* 90: 718-725). 이러한 사실에 기초하여, 본 발명자들은 톡소포자충이 그러한 가혹한 조건에서 어떻게 생존하고 증식하는지를 밝히고자 노력하였다.

[0034] 다른 많은 병원체와 같이, 톡소포자충은 숙주세포로부터 리소좀 공격을 회피하기 위해 숙주세포에 침투할 때 막공포(membranous vacuole)를 형성하여 서식한다. 기생충공포 막(parasitophorous vacuolar membrane, PVM) 자체는 물리적 장벽으로서 작동하지만 또한 그들의 생존력을 증가시키기 위해서도 작동하며, 다양한 시그널 관련된 작용(events)이 PVM 주변에서 일어난다. ARF6(ADPribosylation factor-6)은 PI3K를 활성화시키고 PIP(2) 및 PIP(3)를 침투하는 기생충의 공포에 보충하는 것으로 보고되어 있다 (Lee H, et al., 2010 *Int J Biol Macromol* 47: 104-108). 또한 다른 연구에서 톡소포자충 감염으로 인해, 숙주 PI3K/Akt 경로가 활성화되고, 이러한 활성화는 세포자살에 대한 숙주세포 저항성에 필요하며 (Kim L, et al., 2006 *J Cell Sci* 119: 2119-2126), Akt 활성화 역시 숙주 중심체 위치의 조절, 세포소기관 분포 및 이동 반응을 조정하기 위해 톡소포자충에 필요함을 설명하였다 (da Silva CV, et al., 2009 *Biochem Biophys Res Commun* 378: 656661). 이러한 보고들은 톡소포자충이 그 자신에 유용한 작용을 변형하고 이용하기 위해 숙주 PI3k/Akt 경로가 하나의 주요 타겟임을 시사한다.

[0035] 본 발명의 새로운 발견은 PI3K/Akt 시그널링 경로 활성화가 세포내 톡소포자충 증식에 필수적이라는 것이다. 세포내 타키조이트 복제율을 조사하기 위해, 각 PV에서 GFP-표지된 톡소포자충의 복제수를 형광현미경으로 모니터하였다. 이 방법은 다중-감염된 톡소포자충을 제외시키고 각 PV에서 각 톡소포자충의 정확한 수를 세는데도 유용하였다 (톡소포자충의 수를 평가하기 위해 단지 GFP의 강도를 측정하는 FACS 보다 더 유용함). 대부분의 세포내 타키조이트는 감염 24시간 후 2회 분열하여 4개의 개체를 생성한다. LY294002 및 보르트만닌의 전처리에 의한 PI3K/Akt 경로의 저해는 비처리된 대조군과 비교하여 톡소포자충 복제가 감염 24시간 후 1회만 일어나서 하나의 PV에서 2개의 기생충을 생성하는 톡소포자충의 분열을 현저히 감소시켰다. 이러한 데이터는 톡소포자충에 의한 PI3K/Akt 시그널링 경로 활성화가 숙주 선천성면역 방어시스템에 대항하여 그것의 증식에 중요함을 시사한다. GDC-0941은 모든 클래스 1 PI3K 이소폼들(isoforms)을 저해하지만 mTOR를 포함하여 시험된 다른 어떤 지질 또는 단백질 키나아제의 활성을 현저하게 억제하지는 않는다 (Folkes AJ, et al., 2008 *J Med Chem* 51: 5522-5532). ZSTK474는 PI3K의 ATP-경쟁적 저해제로 알려져 있고, ZSTK474의 그 저해 활성은 심지어 이소폼-특이적이다 (Kong D, et al., 2007 *Cancer Sci* 98: 1638-1642). 그와 반대로, 100 mM의 농도에서 조차, ZSTK474는 mTOR 활성을 다소 약하게 저해하였다고 보고되어 있다. mTOR에 대해 비-저해 효과를 갖지만 PI3K 활성에 대해서는 특이적으로 저해하는, GDC-0941 및 ZSTK474의 독특한 특성은 본 발명에서도 확인하였고 (도 1의 E), 이들 PI3K-특이적 저해제를 이용한 실험은 mTOR 경로 보다 오히려 PI3K/Akt 경로가 톡소포자충에 의한 숙주 ROS 및 Nox4 발현의 조절에 중요하다는 본 발명자들의 가설을 더욱 뒷받침한다.

[0036] 다음 단계로서, 감염된 톡소포자충의 성장을 저지할 수 있는, 알려지지 않은 근본적인 숙주 메커니즘에 주목하였다. ROS는 환원된 NADPH 산화효소에 의한 초과산화물(superoxide)의 생성을 통해 박테리아 또는 세포내 기생충과 같은, 병원체에 대한 선천성 면역 반응들에서 중요한 역할을 하는 것으로 오랫동안 알려져 왔다. 이 때문에, 세포내 기생충의 입장에서는, 세포내 ROS를 감소시키는 것, 제거 또는 중독시키는 것이 그들의 생존 및 증식에 절박한 필요 요건이다 (Gritz DC, et al., 1991 *Curr Eye Res* 10: 927-931). 톡소포자충의 증식은 *in vivo* 대식세포에서 산소 라디칼 생성을 감소시킬 수 있다고 보고되어 있지만, 그 작용과 관련된 대부분의 메커

니즘 및 경로는 아직 완전히 이해되지 않고 있다 (Wang Y, et al., 2010 *J Biol Chem* 285: 15611-15618).

[0037] 본 발명은 톡소포자충만이 아니라, ESP 또한 산화 스트레스 자극이 있거나 없는 조건에서 숙주 ROS 수준을 감소시킬 수 있음을 명확하게 설명하고 있다. 놀랍게도, PI3K 저해제의 처리는 톡소포자충 또는 ESP 활성을 현저하게 억제하여 숙주 ROS 수준을 환원시켰다. 이러한 두 결과를 결합시킴으로써, 본 발명자들은 RPE에서 톡소포자충 증식을 위한 숙주세포에서 ROS 수준 감소가 중요하고 이러한 환경적 조절이 숙주 PI3K/Akt 시그널링 경로를 활성화시킴으로써 달성된다는 가설을 이끌어낼 수 있었다.

[0038] 본 발명자들이 톡소포자충-관련 숙주 ROS 조절 연구를 시작한 시점에, 면역세포화학 및 FACS 분석으로부터 얻은 데이터를 결합하고자 하였고 각 실험으로부터 얻은 결과들을 교차-검토하는데 각각 사용하였다. 그러나 톡소포자충 자체가 많은 양의 ROS를 내부에 포함하고 있으므로, 톡소포자충 감염된 세포는 FACS 분석에 적합하지 않았다. 그러한 문제를 우회하기 위해, 살아있는 톡소포자충을 감염시키는 대신, ARPE 세포에 ESP의 처리가 숙주 ROS 수준 조절에 대한 기생충 감염의 작용을 연구하기 위한 매우 유용한 모델 시스템으로서 확립되었다.

[0039] 다음으로, 이러한 모든 데이터는 톡소포자충 유도된 시그널 활성화가 숙주 ARPE 19 세포에서 ROS의 생성을 감소시키기 위한 특이적 타겟을 갖는다는 것을 시사한다. 배경기술에서 설명한 바와 같이, 포유동물 세포들은 진화 과정 동안 발달된 많은 ROS 생성 효소를 가지며 NADPH 산화효소는 RPE 및 다른 포유동물 세포에서 ROS 생성을 위한 주요인자 중 하나로 알려져 있다. NADPH 산화효소들(Nox/Duox)의 패밀리는 Nox1-5 뿐만 아니라 Duox1 및 Duox2로도 구성된다 (Ehrhardt C, et al., 2009 *Cell Microbiol* 11: 863-871). 이러한 후보들 중에서, PI3k/AKT 시그널링 경로에 의해 조절되는 NADPH 산화효소를 확인하기 위해, 먼저 ARPE 19 세포에서 각 효소들의 mRNA 발현 수준을 검토하였다. 놀랍게도, Nox4만 ARPE 19 세포에서 현저히 많은 양의 mRNA 전사체를 갖는 NADPH 산화효소라는 것이 밝혀졌다 (도 11). 대식세포에서 유도성 NADPH 산화효소로 잘 알려진 Nox2를 포함한, 다른 DNADP 산화효소들은 톡소포자충 감염 후 그 자체의 수준에서 조차 어떠한 변화도 나타내지 않았다. 대신에, 톡소포자충 감염은 Nox4 mRNA와 단백질 수준, 및 숙주의 세포내 ROS 수준의 현저한 감소를 유도하였다. 이러한 결과는 Nox4가 숙주 세포내 ROS 수준을 감소시키는데 있어서 톡소포자충에 대한 주요 타겟이며, PI3K/Akt 시그널링 경로가 Nox4 발현의 억제의 원인이 된다는 것을 시사한다. 다른 흥미로운 결과는 $P22^{Phox}$ 전사체가 톡소포자충 감염으로 억제되었다는 것이다. $P22^{Phox}$는 NADPH 산화효소가 완전한 효소적 활성 및 효소 복합체의 안정화를 발현하는데 필요한 구성요소이다. 예들 들어, 식세포(phagocyte)에서 잘 특징되어 있는 다성분 효소인, 촉매 서브유닛 gp61/Nox2 및 $P22^{Phox}$는 플라보시토크롬(flavocytochrome) b558로 불리는 완전한 복합체(integral complex)를 형성한다 (Bedard K, et al., 2007 *Physiol Rev* 87: 245-313). 당연하게도, 일부 병원체들은, 살모넬라 티피뮤리움 (Shrestha SP, et al., 2006 *Int J Parasitol* 36: 433-441.) 및 헬리코박터 파일로리 (Fang FC 2004 *Nat Rev Microbiol* 2: 820-832)에 대한 경우에서와 같이, 파고솜(phagosome)에서 Nox2 조립을 저해하거나, 아나플라즈마 파고사이토필라 (Allen LA, et al., 2005 *J Immunol* 174: 3658-3667) 또는 에르리키아 카페엔시스 (Garcia-Garcia JC, et al., 2009 *Infect Immun* 77: 2385-2391)에 의해 설명된 바와 같이, Nox2 구성요소의 정상상태(steady-state) 수준을 감소시킴으로써 Nox2 반응에 대항하기 위한 발달된 전략을 갖는다.

[0040] 그러나 프롤린-풍부 영역에서 돌연변이된 $P22^{Phox}$의 형태가 Nox1, Nox2 및 Nox3에 대한 ROS 생성을 저해하였으나 Nox4에 대해서는 그렇지 않았다는 보고가 있다 (Bedard K, et al., 2007 *Physiol Rev* 87: 245-313). Nox4가 그것의 활성화를 위해 $P40^{Phox}$, $P47^{Phox}$, $P67^{Phox}$ 또는 Rac와 같은, 다른 구성요소를 필요로 하지 않는다는 다른 보고도 있다 (Lin M, et al., 2007 *Cell Microbiol* 9: 861-868). Nox4가 세포 자극 및 보조인자(cofactors)의 필요없이도 상당한 양의 ROS를 생성한다는 사실을 감안하면, 톡소포자충이 RPE에서 Nox4의 활성을 조절하는 것 보다 오히려 전사 수준에서 끊임없이 활성 Nox4를 제거함으로써 ROS 생성을 억제하기 위한 톡특한 메커니즘을 발전시켜 왔음을 의미한다. 톡소포자충에 의한 $P22^{Phox}$ 전사 수준의 하향조절은 내부에 추적할 수 있는 양 또는 유도성 Nox 효소가 있는 조직에 대한 서브시스템(sub-system)일 것이다. 이러한 논점은 추가 연구가 필요할 것이다. Nox4 siRNA로 Nox4 발현을 억제하는 것은 Nox4 전사의 하향조절이 세포내 ROS 수준을 감소시키는데 충분함을 입증하였고, 그 결과 비처리된 세포 또는 대조군 siRNA 처리된 세포에서의 톡소포자충과 비교하여 Nox4 siRNA 처리된 숙주세포에서 톡소포자충은 더 빠르게 증식하는 것이 관찰되었다.

[0041] 이전 연구는 NF-kB, GATA, AP-1, Ets1, C/EBP 및 STAT1/3과 같은 다중전사인자들이 Nox 발현과 기능의 조절에 조직적으로 관련되어 있음을 설명하고 있다 (Lambeth JD 2004 *Nat Rev Immunol* 4: 181189). 이러한 데이터는 다중전사인자, 보조활성인자(co-activators) 및 보조억제인자(co-repressors) 사이의 협동(cooperation)이 Nox 전사와 기능의 정확한 조절에 필수적임을 시사한다. 그럼에도, Nox 조절의 정확한 메커니즘은 완전히 명확하지

는 않다. Nox4 전사에서 PI3K/Akt 경로의 관련성을 설명하는 본 발명의 데이터는 FoxO(Forkhead Box O) 전사인자들이 Nox4 전사를 조절하는 구성요소의 목록에 추가되어야할 가능성을 포함한다. FoxO 전사인자들은 산화환원 시그널링 및 증식과 세포자살의 조절에 관련되어 있다. 이 전사인자들은 PI3K 시그널링 경로에서 Akt/PKB에 의한 인산화에 따라 저해되어 핵 밖으로 위치이동되는 능력을 공유한다. 본 발명자들의 이전 데이터에 따르면, 톡소포자충 감염은 실제로 세포내 ROS 수준과 상관관계가 있는 FoxO의 인산화 및 핵에서 시토졸로 FoxO의 재위치(relocation)를 유도하였다 (데이터 미도시).

[0042] 결론적으로, 본 발명은 톡소포자충이 숙주 PI3K/Akt 시그널링 경로를 조종하여 세포내 ROS 수준을 감소시키고 증식에 유리한 환경을 조성할 수 있음을 증명한다. 또한 Nox4 siRNA 실험에 따르면, Nox4가 기생충 감명에 대한 숙주세포의 선천성 면역 방어기작에 중요한 구성요소이고 불리한 세포내 ROS 수준을 억제하기 위한 톡소포자충의 주요 타겟임을 시사한다. 톡소포자충 감염된 인간 RPE 세포에서 Nox4의 하향조절은 눈 톡소플라즈마증에서 혈액-망막 장벽 손상 및 병리적 망막의 신규한 메커니즘을 설명할 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **시약 및 항체**

[0045] Akt 및 인산특이적 Akt(Ser473) 항체들은 Cell Signaling Tech., Inc. (Beverly, MA, USA)로부터 입수하였다. 항-Nox4는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 입수하였다. 단클론 항-액틴, HRP-콘쥬게이트된 항-토끼 및 항-마우스 이차 항체들은 Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA)로부터 구입하였다. PI3K 저해제인 LY294002 및 보르트만닌(wortmannin)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 입수하였으며, PI3K-특이적 저해제인 GDC-0941 및 ZSTK474는 Selleck Chemical. Co로부터 구입하였다.

[0046] **실시예 1. 세포 배양**

[0047] 인간 망막색소상피세포인 ARPE-19 (ATCC, Manassas, VA, USA)는 10% 열처리-불활성화된 FBS 및 항생제-항진균제 시약이 첨가된 DMEM과 영양 혼합물 F12의 1:1 혼합물(DMEM/F12)에서 배양하였다 (모두 Life Technologies Corporation, CA, USA로부터 입수). 처리 하루 전, 상기 배양배지를 FBS가 없는 DMEM/F12로 교환하였다.

[0048] **실시예 2. 기생충**

[0049] 형질전환된 녹색형광단백질(GFP-RH)을 발현하는 톡소포자충 RH 균주의 타키조이트(tachyzoites)는 Dr. Yoshifumi Nishikawa (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan)가 제공하였다. ARPE-19 세포를 톡소포자충 GFP-RH 균주로 감염시키고 37℃, 5% CO_2에서 2-3일간 배양하였다. 자발적인 숙주세포 파열(rupture) 후, 기생충 및 숙주세포 데브리스(debris)를 차가운 PBS로 세척하였다. 원심분리 후, 최종 펠렛을 차가운 DMEM/F12로 재현탁하고 재현탁물을 26게이지 바늘 및 5.0 mm 포어 필터(Millipore, Billerica, MA, USA)를 통과하게 하였다.

[0050] **실시예 3. ESP의 제조**

[0051] 분리된 타키조이트(3×10^8)를 0.5 ml HBSS(Hank's balanced salt solution; Gibco BRL, Rockville, MD, USA)에서 약한 교반 상태에서 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 6,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, ESP(excretory/secretory proteins)를 포함하는 상층액을 모았다. 단백질 농도는 표준으로 BSA를 이용하여 브래드포드 분석법으로 측정하였고, 샘플은 사용 시까지 -70℃에서 저장하였다.

[0052] **실시예 4. 마이코플라즈마 및 엔도톡신 검출 분석**

[0053] 서로 다른 샘플에서 마이코플라즈마(mycoplasma) 및 엔도톡신(endotoxin)을 분석하기 위해, 상업적 EZ-PCR 마이

코플라즈마 테스트 키트(Biological Industries, Beit Haemek, Israel) 및 정량적 색소생성법(Pierce LAL; Limulus amebocyte lysate) 색소생산성 엔도톡신 정량화키트(Thermo Scientific Co, PO)를 이용하였다. LAL(Limulus amebocyte lysate)는 엔도톡신이 있는 상태에서 활성화되는 효소적 시스템을 포함한다. 이러한 분석의 하한(lower limit)은 0.1 EU/ml이다. 세포 또는 기생충 배양시스템에서 마이코플라즈마 또는 엔도톡신의 오염은 검출되지 않았다 (도 7).

[0054] **실시예 5. 면역블롯**

[0055] ARPE-19 세포를 6웰 플레이트에 성장시키고 밤새 혈청 결핍(serum starved)하여 혈청인자로부터 임의의 자극을 제거하였다. 세포를 지시된 바와 같이 타키조이트로 감염시키거나 ESP로 처리하였다. 세포를 차가운 PBS로 세척한 후, 단백질을 PRO-PREP 단백질 추출용액 (iNtRON Biotechnology, Korea)으로 추출한 다음, 20분간 아이스 상에서 반응시킨데 이어, 13,000 rpm으로 4℃에서 5분간 원심분리 하였다. 각 샘플로부터 얻은 동량의 단백질을 12% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 전기영동으로 분리하였다. 그런 다음, 단백질들을 PVDF(polyvinylidene fluoride) 막에 옮겼다. 막을 0.1% Tween 20 (TBST)이 포함된 5% 탈지유로 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. TBST에서 한번 세척한 후, 막을 5% BSA가 첨가된 TBST로 희석된 일차항체로 실온에서 2시간 또는 4℃에서 밤새 반응시켰다. TBST로 3번 세척한 후, 막을 HRP-콘쥬게이트된 이차항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA)로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBST로 3번 세척한 후, 단백질 밴드들을 제조사의 설명서에 따라 ECL 화학발광 키트(Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)로 가시화하였다. 상기 밴드들을 이미지 농도계(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 스캔하고 정량하였다.

[0056] **실시예 6. 독소포자충의 증식**

[0057] ARPE-19 세포는 톡소포자충 MOI(multiplicity of infection) 5로 감염하기 전에 글라스 커버슬립을 포함하는 24웰 플레이트에 배양하고 혈청-결핍(serum-starved)시켰다. 세포의 일부 셋은 PI3Kinase 저해제로 1시간 동안 전처리한 다음, 톡소포자충으로 감염 전 PBS로 3회 헹구어 내었다. 톡소포자충 복제 시점을 “일치시키기” 위해, 톡소포자충 감염을 위한 매우 좁은 창(narrow window)을 디자인하였다 (2시간 감염 후 톡소포자충이 없거나 감염되지 않게 씻어냄). “감염된” 톡소포자충 단독의 증식율이 측정되기 때문에, 이러한 과정으로, 톡소포자충이 없거나 감염되지 않은 분비성 ESP로 인한 부작용을 제거할 수도 있게 하였고, 잠재적인 침투율 차이는 무시될 수 있다.

[0058] 배양 24시간 후, 커버슬립을 PBS로 세척한 다음, 4% 포름알데히드로 고정하였다. 세포를 텍사스 레드 H-X 팔로이딘(Texas Red H-X phalloidin; Life Technologies Corporation, CA, USA)으로 염색하여 F-액틴을 표지하였고 DAPI(Vector Laboratories, USA)가 포함된 봉입배지(mounting medium)를 이용하여 슬라이드 상에 고정시켰다. 다음으로 세포를 형광현미경 또는 공초점현미경을 이용하여 이미지화하였다. 100 내지 200개의 PV(parasitophorous vacuole)는 각 제조물에서 랜덤하게 선택되었고 기생충 복제는 PV당 타키조이드의 수를 세어 확인하였다. 상기 결과의 통계분석을 위해 세 번의 독립된 실험을 수행하였다.

[0059] **실시예 7. 형광현미경**

[0060] ARPE-19 세포를 글라스 커버슬립을 포함하는 24웰 플레이트에서 밤새 배양한 후, GFP-RH 타키조이트로 23시간 또는 ESP로 1시간 동안 감염시켰다. 다음으로 세포를 100 mM H_2O_2 (Sigma Chemical Co)에 1시간 동안 노출시켰다. HBSS로 세척한 후, 세포를 10 mM ROS-감수성 염료인 DHE(dihydroethidium; Life Technologies Corporation)으로 암실에서 37℃, 30분간 반응시켰다. 염색된 세포를 형광현미경(Olympus BX-51)을 이용하여 이미지화하였다. DHE 염색된 모든 이미지는 동일한 노출 시간을 이용하여 촬영하였다.

[0061] **실시예 8. 유세포 분석**

[0062] 세포를 6웰 디쉬에서 배양하고 실험 디자인에 따라 ESP로 처리하였다. 배양된 세포들은 10 mM DHE로 염색하고 HBSS로 세척하였다. 세포들을 트립신 처리하고 원심분리 하였다. 그 후 세포들을 HBSS에 재현탁하고 FACS (BD Biosciences, San Diego, CA) 상에서 분석하였다.

[0063] **실시예 9. RT-PCR에 의한 NADPH 산화효소 발현 분석**

[0064] 트리졸 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 자극된 세포로부터 총 RNA를 제조하고, RNA를 역전사 키트(ReverTra Ace RT kit; Toyobo, Osaka, Japan)를 이용하여 역전사 시켰다. 모든 PCR 반응은 MyCycler (Bio-Rad)로 25 사이클 수행하였다. RT-PCR을 위한 Nox1-4 및 p22phox 프라이머 서열은 공지되어 있다 (Piccoli C, et al., 2005 *J Biol Chem* 280: 26467-26476). Nox5 RT-PCR 프라이머 서열도 공지되어 있다 (Chou CC, et al., 2008 *Nano Lett* 8: 437-445). 다른 프라이머 서열들(5'-3')은 다음과 같다: Duox1 정방향, ATCAATCGGAACTCAAGTGTCTC; Duox1 역방향, AACCAACACATGGTCCTCTCG; Duox2 정방향, GCTACCATGTTCTTTCCGACG; 및 Duox2 역방향, GAGTGCGAGGAGCCATAGAT. 증폭된 산물은 2% 아가로스 겔에서 전기영동하고 에티디움 브로마이드로 시각화하였다. 각 mRNA에 대한 밴드의 상대적인 강도는 내부대조군의 오토라디오그램(autoradiogram) 밴드의 강도에 비례한다. mRNA의 정량은 이미지 농도계(Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 이용하여 수행하였다.

[0065] **실시예 10. siRNA 트랜스펙션**

[0066] Nox4에 대한 두 개의 서로 다른 이중구조 서열(duplex sequences)은 Weyemi 등에 의해 보고된 것으로 사용하였다 (Weyemi U, et al., 2012 *Oncogene* 31: 1117-1129). 세포들은 제조사의 프로토콜에 따라 LipofectamineTM RNAiMAX (Life Technologies Corporation)을 이용하여, 인간 Nox4에 대한 특이적 siRNA 이중구조로 트랜스펙션 시켰다.

[0067] 간략히 설명하면, 세포들은 6웰 플레이트에 씨딩하여, 24시간 동안 (70% confluence) 성장시킨 후, 6-24 nM Nox4-특이적 siRA 또는 음성대조군 siRNA (Santa Cruz, CA)로 48시간 동안 트랜스펙션 시켰다. 다음으로, 세포를 톡소포자충으로 24시간 동안 감염시킨 후, 톡소포자충 증식을 평가하였다. 넉다운 효율은 RT-PCR 및 웨스턴 블롯으로 측정하였다.

[0068] **통계분석**

[0069] 데이터는 GraphPad Prism 데이터 분석 프로그램을 이용하여 분석하였다. 두 그룹 사이의 통계적 유의성의 비교를 위해, 독립된 샘플 Student's *t*-test가 사용되었다. 다중 비교를 위해, one-way ANOVA에 이어 Tukey의 방법에 따라 그룹 평균의 *post hoc* 비교가 사용되었다. P 값 < 0.05는 유의한 것으로 간주하였다.

[0070] **실험결과 1. 톡소포자충 감염 및 ESP 처리에 의한 숙주 PI3/Akt의 활성화**

[0071] 세포내 기생충인 톡소포자충(*T. gondii*)은 숙주세포에 의해 제공되는 성장환경에 의존한다. 세린/트레오닌 키나아제 Akt는 세포의 성장조절에 중추적인 역할을 하며, 그 활성은 PDK1에 의한 Thr308에서의 인지질 결합 및 활성화 인산화 또는 Ser473에서의 카르복시 말단(carboxy terminus) 내 인산화에 의해 조절된다 (James SR, et al. 1996 *Biochem J* 315: 709-713). 톡소포자충의 증식의 원인이 되는 숙주세포의 세포내 시그널링 메커니즘을 규명하기 위해, 본 발명자들은 톡소포자충 감염이 인산특이적 Ser473 Akt 항체로 면역블롯 분석을 이용하여 ARPE-19 세포에서 Akt 인산화를 유도하는지를 확인하였다. 더불어, Akt 시그널링에 대한 톡소포자충 ESP의 효과를 함께 조사하였다. ESP는 숙주세포에서 기생충의 침입을 위한 적합한 환경을 제공하기 위해 필수적인 기능을 한다 (Son ES, et al., 2001 *Korean J Parasitol* 39: 49-56).

[0072] 기초적인 Akt 활성을 최소화하기 위해, 이들 실험은 혈청-결핍(serum-starved) 세포에서 수행하였다. 톡소포자충 감염 24시간 또는 ESP 자극 1시간 후, 세포들을 면역블롯 분석을 위해 수집하여 숙주 Akt 활성화를 측정하였다. 농도 분석에 의해 측정된 바와 같이, 감염되지 않거나 자극되지 않은 샘플과 비교하여 감염 및 자극된 샘플에서 인산화 Akt 및 총 Akt의 강도 사이의 비율은 도 1a와 1b에 나타내었다. Akt의 인산화는 톡소포자충으로 24시간 동안 감염된 세포에서 일어났고, 숙주 Akt 활성은 감염된 세포 당 톡소포자충의 수에 따라 현저하게 증가하였다. 또한 ESP는 투여량-의존적 방식으로 Akt 인산화를 증가시켰으며, 이러한 결과는 톡소포자충 감염 실험과 일치한다. 숙주세포 생존력은 MTT 분석으로 시험하였으며 ARPE-19의 생존력은 24시간 동안 톡소포자충 감염 (moi 15)에 의해 뚜렷하게 감소하지는 않았다 (도 8의 A).

[0073] 톡소포자충 감염이 숙주 ARPE-19 세포에서 Akt 인산화를 초래함에 따라, Akt 시그널링의 업스트림 구성요소

(upstream component)에 대한 톡소포자충 감염 또는 ESP 처리의 효과를 분석하였다. 보르트만닌(wortmannin)과 LY294002는 Akt의 업스트림 활성인자(activator)인 PI3K에 대한 저해제로 잘 알려져 있다. 본 발명자들은 숙주 세포 PI3K 활성화를 차단하는 것이 톡소포자충-유도된 Akt 인산화의 저해를 초래하는지를 조사하였다. ARPE-19 세포를 톡소포자충으로 24시간 동안 감염시키고 마지막 1시간 동안 LY294002로 처리하였다. 실제로, LY294002 농도에서 순차적인 증가는 톡소포자충 감염-유도된 Akt 인산화의 저해를 초래하였다 (도 1c). 유사한 방식으로, 보르트만닌으로 전처리는 톡소포자충 ESP 처리에 의해 유도된 Akt 인산화를 차단하였다 (도 1d). 보르트만닌 및 LY294002가 PI3K에 대한 저해제로 잘 알려져 있지만, PI3K에 비특이적이며 mTOR 경로를 저해할 수 있다는 것 또한 알려져 있다. PI3K/Akt 경로가 실제로 톡소포자충 유도된 작용에 관련되어 있는지를 검증하기 위해, GDC-0941 및 ZSTK474를 톡소포자충 유도된 숙주세포 반응에 대한 그들의 효과에 대해 시험하였고, GDC-0941 및 ZSTK474는 투여량-의존적 방식으로 톡소포자충에 의한 Akt 인산화를 성공적으로 저해하였지만 (도 9), mTOR의 조절 하에 있는 S6 인산화는 아무런 영향이 없었다 (도 1e). 이러한 결과는 톡소포자충 및 ESP가 PI3K-의존적 방식으로 숙주 Akt를 활성화시킨다는 것을 의미한다.

[0074] **실험결과 2. 숙주의 톡소포자충 증식에서 Akt/PKB 시그널링의 역할**

[0075] 몇몇 독립된 일련의 증거는 톡소포자충 감염이 세포를 세포자살 유도성 자극에 저항하게 한다는 것을 시사한다 (Kim L, et al., 2006 *J Cell Sci* 119: 2119-2126). 이러한 효과는 숙주세포에서 톡소포자충 생존 및 증식에 좋은 영향을 주는 것으로 추정된다. 키나아제들을 활성화시킴으로써 인산화한 후, Akt는 대사, 성장 및 합성 과정을 증가시키고 세포자살을 억제하는 다중 세포 타겟에 영향을 준다 (Ehrhardt C, et al., 2009 *Cell Microbiol* 11: 863-871). 세포내 기생충인 톡소포자충은 숙주에 의해 제공되는 성장 환경을 필요로 한다. 그 결과, 본 발명자들은 ARPE-19 세포에서 톡소포자충 증식에 대한 PI3K 저해제의 효과를 조사하였다. LY294002 및 보르트만닌에 의한 톡소포자충 성장과 증식의 통계적으로 현저한 저해가 확인되었다 (도 2). 1시간 동안 PI3K 저해제로 전-처리된 다음, 5 moi의 톡소포자충으로 감염되었던, ARPE-19 세포에서 타키조이트의 수를 감염 24시간 후 카운트하였다. 저해제 전처리가 없는 경우, 대부분의 타키조이트는 2회 분열하여 PV 당 4마리 기생충을 생성하였다. 또한 PI3K-특이적 저해제인 GDC-0941 및 ZSTK474는 PI3K/Akt 경로의 저해가 톡소포자충 분열 속도를 감소시키는 톡소포자충 증식에 대한 LY294002 및 보르트만닌과 유사한 효과를 나타내었으며, 대부분의 PV들은 1-2마리의 톡소포자충만 포함하였다. 또한 서로 다른 시점(12시간)에서 증식 속도 관찰은 PI3K 저해제가 비처리군에 비해 톡소포자충의 증식을 지연시키는 것으로 나타났다 (도 8의 B). 이러한 결과는 톡소포자충-유도된 PI3K/Akt 시그널링이 숙주세포에서 톡소포자충 증식에 중요하다는 것을 의미한다.

[0076] 마지막으로, 마이코플라즈마 및 엔도톡신이 PI3K 시그널링 및 ROS에 대한 반응에 영향을 줄 수 있기 때문에, 본 발명자들은 배양 배지, 세포, 기생충 및 ESP에서 마이코플라즈마 및 엔도톡신의 수준을 정량하였다. 그 결과는 도 7에 나타내었으며, 실험 과정에서 오염은 없었다.

[0077] **실험결과 3. 숙주 PI3K/Akt 시그널링 경로의 톡소포자충-유도된 활성화는 산화 스트레스 하에서 ARPE-19 세포의 세포내 ROS 수준을 감소시킨다.**

[0078] 숙주세포는 감염 기생충을 공격하기 위한 다양한 위협요인(threats)을 생성하는데, ROS의 생성은 침입자를 죽이기 위한 매우 효과적인 방법 중 하나이다 (Aline F, et al., 2002 *Infect Immun* 70: 2368-2374). PI3K/Akt 경로는 세포 생존 시그널링과 관련되어 있고 톡소포자충 증식에 중요하기 때문에, 본 발명자들은 ARPE-19 세포에서 H_2O_2 산화 스트레스에 대항하여 톡소포자충에 의해 유도되는 숙주 PI3K/Akt 시그널링의 효과를 조사하였다. ARPE-19 세포를 100 mM H_2O_2로 자극한 다음 시토졸의 초과산화물 지표인 세포-투과성 형광염료 DHE로 표지하였다. ROS의 세포내 수준은 형광현미경으로 분석하였다. H_2O_2 처리만 받은 양성대조군은 높은 DHE 형광 시그널을 나타내었다. 그러나 톡소포자충 감염 또는 ESP 처리는 H_2O_2 처리가 있는 경우에서도 숙주 시토졸의 ROS를 현저히 감소시켰다 (도 3a, 3b). 흥미롭게도, PI3K 저해제인 보르트만닌, LY294002, GDC-0941 또는 ZSTK474로 추가 처리는 톡소포자충 감염 또는 ESP 처리에 의해 유도된 ROS 수준의 감소를 차단하였다 (도 3a, 3b).

[0079] 또한 유세포 분석을 수행하여 H_2O_2 처리 후 숙주 세포내 ROS 수준에 대한 ESP 및 PI3K 저해제의 효과를 정량적으로 분석하였다 (도 3c). 톡소포자충 감염된 세포를 이용한 유세포 분석은, 톡소포자충 자체가 DHE로 강력하게 표지될 수 있는 것으로 알려져 있고 FACS로 DHE 표지된-숙주세포 세포질의 형광 강도를 표시하는 것을 방해하였

기 때문에, 제외되었다 (도 3 및 도 10). 이러한 결과는 톡소포자충에 의한 숙주 Akt/PKB 시그널링의 활성화가 ROS-의존성 숙주 방어시스템을 차단함으로써 감염된 톡소포자충을 위한 보호 기능을 제공한다는 것을 의미한다.

[0080] **실험결과 4. 숙주 PI3K/Akt 시그널링 경로의 톡소포자충 ESP-유도된 활성화는 ARPE-19 세포의 기초적인 세포내 ROS 수준을 감소시켰다.**

[0081] 다음으로, ESP가 낮은 수준에서도 숙주세포(H_2O_2 비처리)의 기초적인 ROS 수준(basal ROS level)을 감소시킬 수 있는지를 시험하였다. ARPE-19 세포에서 산화 스트레스가 mTOR 시그널링 경로를 활성화시킬 수 있음이 보고되어 있기 때문에 (Perkins ES, 1973, *Br J Ophthalmol* 57: 1-17), 본 발명자들은 H_2O_2의 부작용 가능성이 최소화된 조건 하에서 ESP의 ROS 감소 활성을 시험하고자 하였다. 유세포 분석은 1 mg/ml ESP 처리 5시간 후 ROS 수준에서 대략 50% 감소를 나타내었다 (도 4). 이러한 결과는 숙주 세포내 ROS가 톡소포자충 감염 후 현저하게 감소된다는, 형광 현미경 분석과 일치하였다 (도 3b).

[0082] 다음으로, PI3K 저해제가 ARPE-19 세포에서 톡소포자충 ESP 처리에 의한 ROS 감소를 차단하는지를 시험하였다. 이전 결과에서 예상한 대로, 5시간 처리 후 톡소포자충 ESP에 의해 유도된 ROS의 감소는 LY294002, 보르트만닌, GDS-0941 또는 ZSTK474와 함께 배양 시 거의 완벽하게 회복되었다 (도 4). 종합하면, 이러한 결과는 톡소포자충으로 감염은 숙주 PI3K/Akt 시그널링을 자극하여 ROS 생성을 억제하고 이러한 과정은 감염된 톡소포자충의 생존 및 증식에서 중요한 역할을 함을 시시한다.

[0083] **실험결과 5. 톡소포자충은 Nox4를 타겟팅하여 PI3K/Akt 시그널링의 활성화를 통해 숙주 ROS 수준을 감소시킨다.**

[0084] 톡소포자충 감염이 PI3K/Akt 시그널링을 활성화시키고 세포내 ROS 수준이 스트레스 없는 조건 및 산화 위험(oxidative challenge) 모두에서 현저히 감소되었기 때문에, 본 발명자들은 PI3K/Akt 시그널링의 조절 하에 있는 ROS 생성인자(generator)를 확인하였다. 본 발명은 숙주세포에서 톡소포자충 복제를 억제할 수 있는, ROS를 생성하는 주요 산화효소의 존재를 시사한다. 이러한 아이디어를 검토하기 위해, ROS-생성하는 NADPH 산화효소들의 Nox/Duox 패밀리의 mRNA 수준을 ARPE-19 세포에서 RT-PCR로 측정하였다. Nox4는 ARPE-19 세포에서 풍부하게 발현되는 반면, 다른 Nox 및 Duox 산화효소들의 발현 수준은 검출되지 않았다 (도 11). 흥미롭게도, Nox4 및 그 기능적 파트너인 $p22^{phox}$의 발현은 moi-의존적 방식으로 톡소포자충 감염으로 억제되었다. 또한 PI3K 저해제 처리 실험은 Nox4 유전자 발현이 PI3K/Akt 시그널링 경로에 의해 조절됨을 나타내었다 (도 5a). Nox4 단백질 수준이 그 mRNA 수준의 감소와 일치하여 감소되었는지를 확인하기 위해, 항-Nox4-특이 항체를 이용하여 면역형광 및 면역블롯 분석을 수행하였다. 실제로, Nox4 단백질 수준은 5시간 동안 톡소포자충 ESP 처리 후 현저히 감소하였다 (도 5b, 5c). 이러한 결과는 톡소포자충이 ARPE-19 세포에서 PI3K/Akt 시그널링 경로를 통해 숙주 Nox4 유전자 발현을 특이적으로 억제한다는 것을 증명하였다.

[0085] **실험결과 6. Nox4 발현은 톡소포자충 세포내 복제에 중요하다.**

[0086] ARPE-19 세포에서 Nox4 발현을 억제하기 위한 특이적 siRNA 듀플렉스(duplexes)를 이용한 실험을 수행하여 Nox4-의존적 ROS의 생성이 톡소포자충의 세포내 복제에 중요한 지를 확인하였다. 후보 siRNA 분자들의 시리즈를 ARPE-19 세포에 48시간 동안 트랜스펙션 시키고, Nox4 단백질 수준을 Nox4에 대한 토끼 항체를 이용한 면역블롯으로 측정하였다 (도 6a). siRNA2 및 siRNA3 (24 nM) 모두 Nox4 단백질 발현에서 75-85% 감소를 일관되게 유도하였으므로, 이들 siRNA를 다음의 실험에 사용하기 위해 선택하였다. ARPE-19 세포에서 세포내 ROS 수준은 Nox4 siRNA로 트랜스펙션 시킨 후 40% 이상까지 현저히 감소되었으며, 이는 Nox4가 ARPE-19 세포에서 ROS의 생성에 중요한 역할을 함을 증명한다 (도 6b).

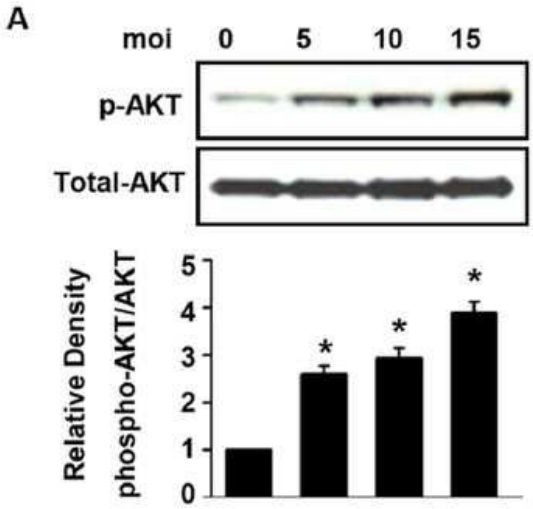
[0087] 톡소포자충 증식에서 Nox4의 역할을 확인하기 위해, Nox4 siRNA로 트랜스펙션 후 48시간 배양한 ARPE-19 세포를 톡소포자충으로 다시 24시간 동안 감염시켜, 톡소포자충의 증식을 형광현미경 하에서 평가하였다 (도 6c). 트랜스펙션되지 않은 세포 및 대조군 siRNA 처리된 세포에서, 8개의 타키조이트를 갖는 PVs는 총 PV 개체수의 대략 40%이다; 그러나 Nox4 siRNA-트랜스펙션 세포에서, 8개의 타키조이트가 포함된 PVs의 50% 이상, 심지어 16개의 타키조이트를 갖는 PVs(대략 10%)도 감염 24시간 후 관찰되었으며, 이는 이들 세포에서 톡소포자충의 증식이 촉진된 것을 증명한다.

[0088] 이러한 결과는 톡소포자충으로 감염이 숙주세포에서 Nox4의 유전자 발현을 억제하여 ROS 생성을 감소시키고 톡소포자충 성장 및 증식을 위한 세포내 환경을 조성하는 것임을 의미한다.

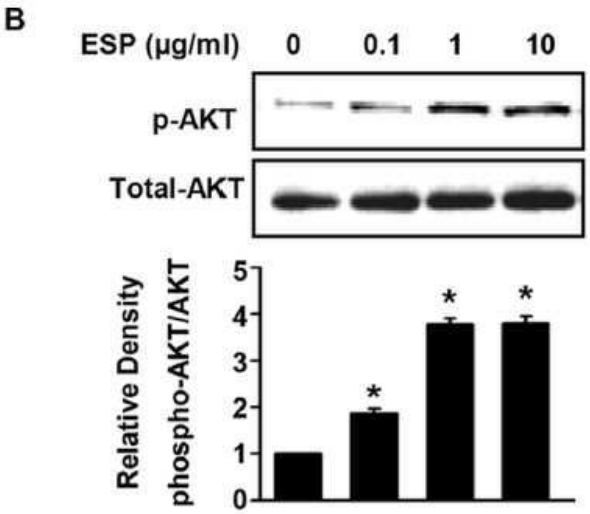
[0089] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

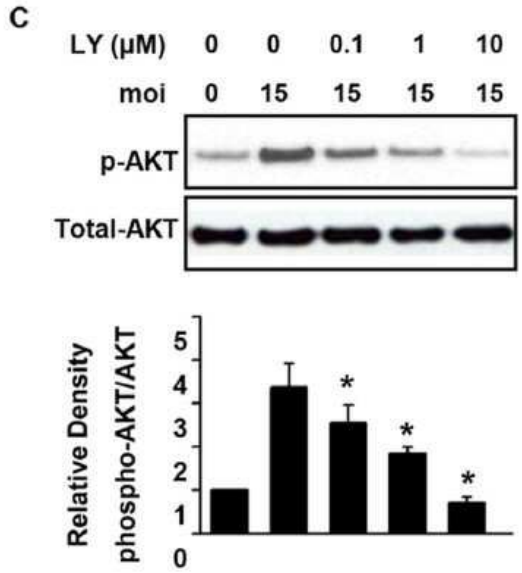
도면1a



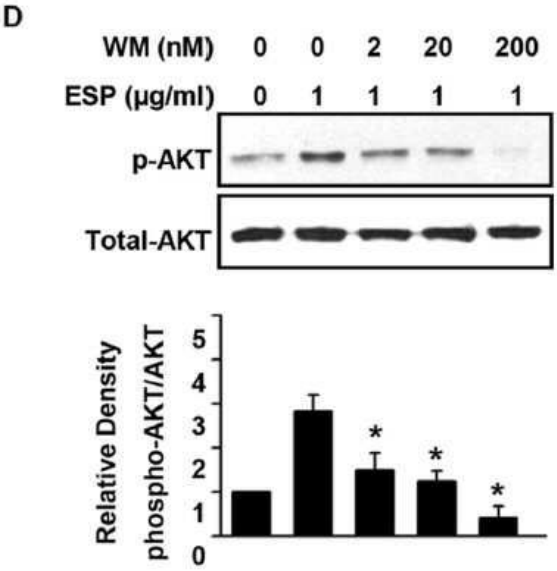
도면1b



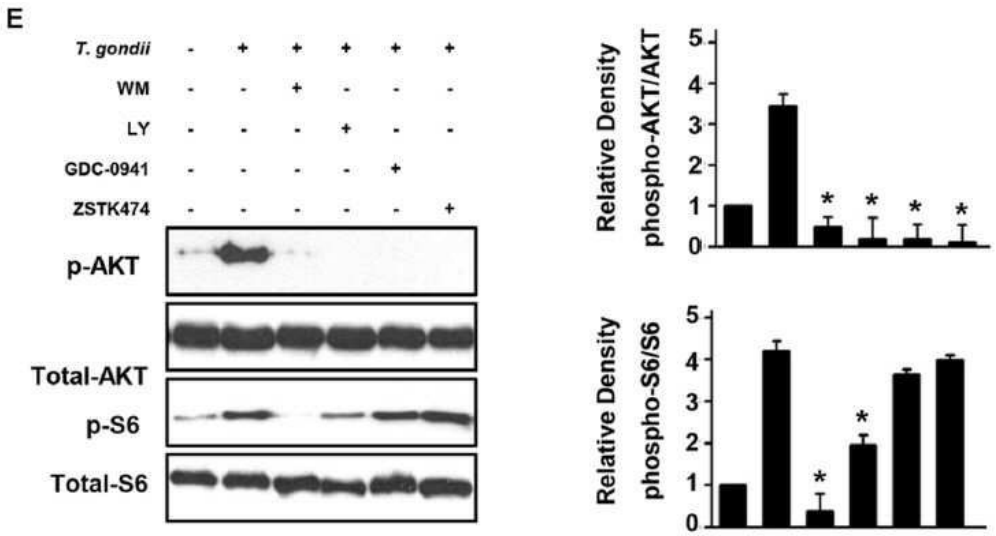
도면1c


C
LY (μM) 0 0 0.1 1 10
moi 0 15 15 15 15
p-AKT
Total-AKT
Relative Density
phospho-AKT/AKT
0
1
2
3
4
5
*
*
*

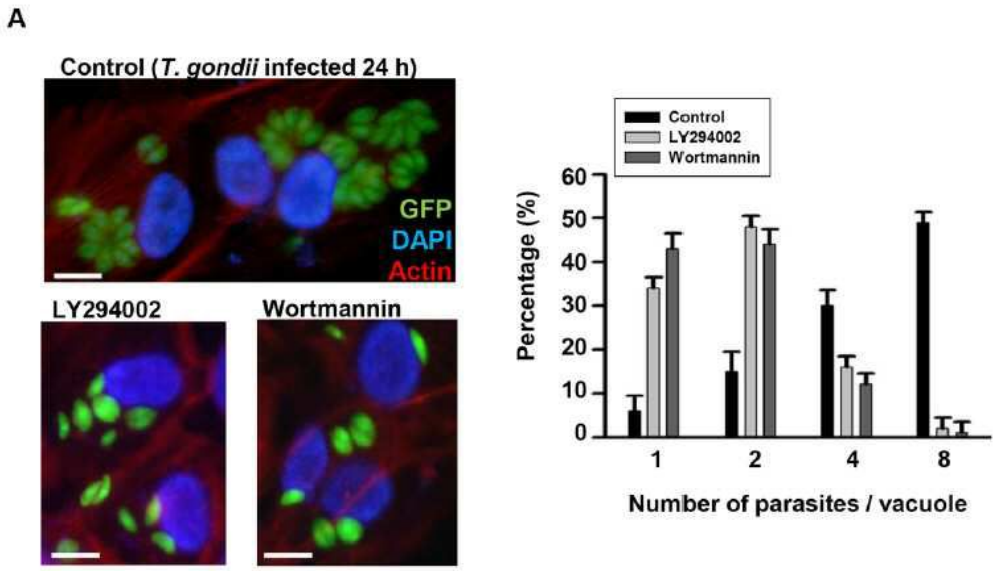
도면1d


D
WM (nM) 0 0 2 20 200
ESP (μg/ml) 0 1 1 1 1
p-AKT
Total-AKT
Relative Density
phospho-AKT/AKT
0
1
2
3
4
5
*
*
*

도면1e

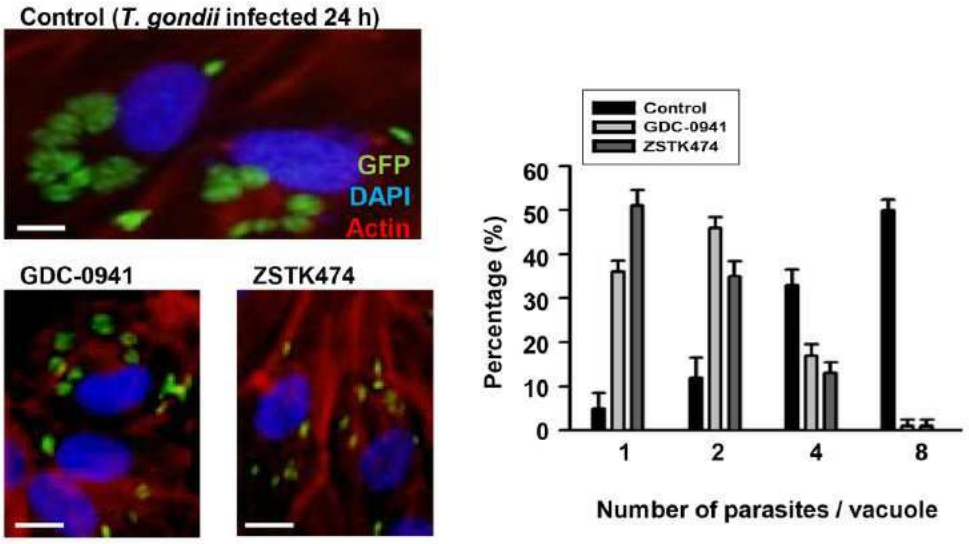

E
T. gondii
WM
LY
GDC-0941
ZSTK474
p-AKT
Total-AKT
p-S6
Total-S6
Relative Density
phospho-AKT/AKT
Relative Density
phospho-S6/S6

도면2a

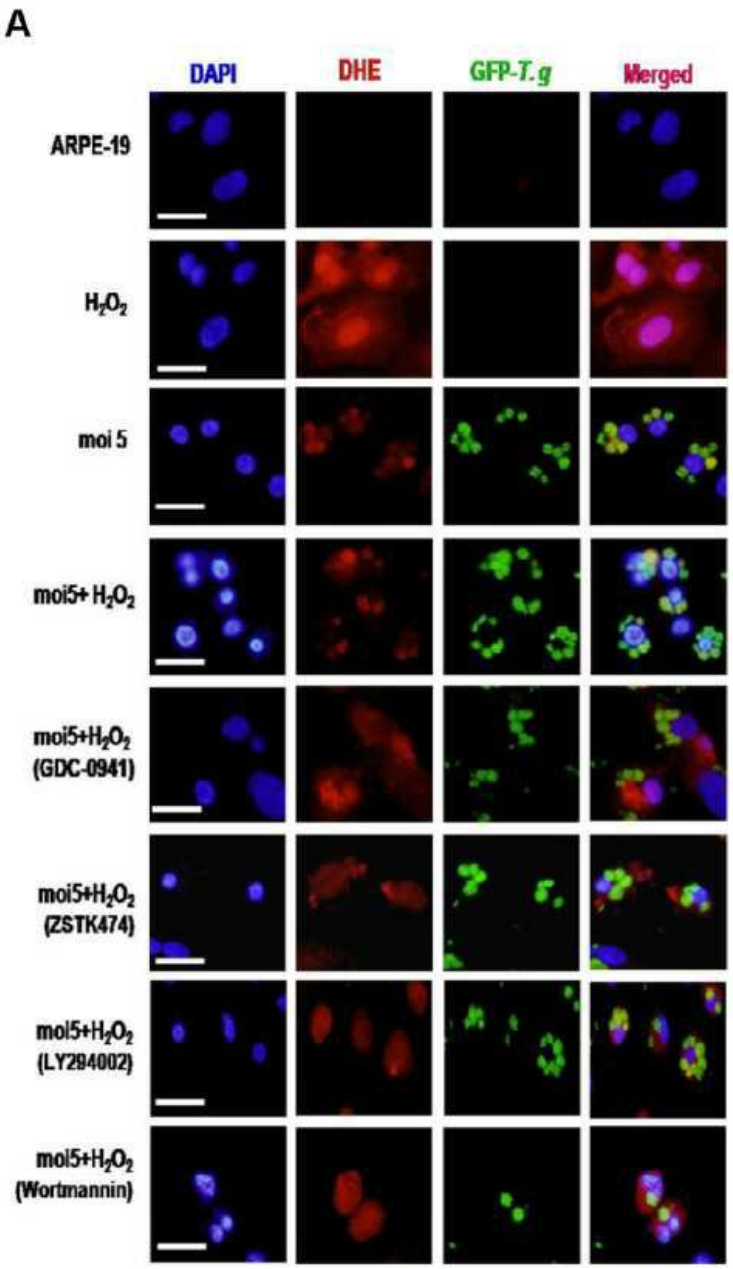

A
Control (T. gondii infected 24 h)
GFP
DAPI
Actin
LY294002
Wortmannin
Control
LY294002
Wortmannin
Percentage (%)
Number of parasites / vacuole

도면2b

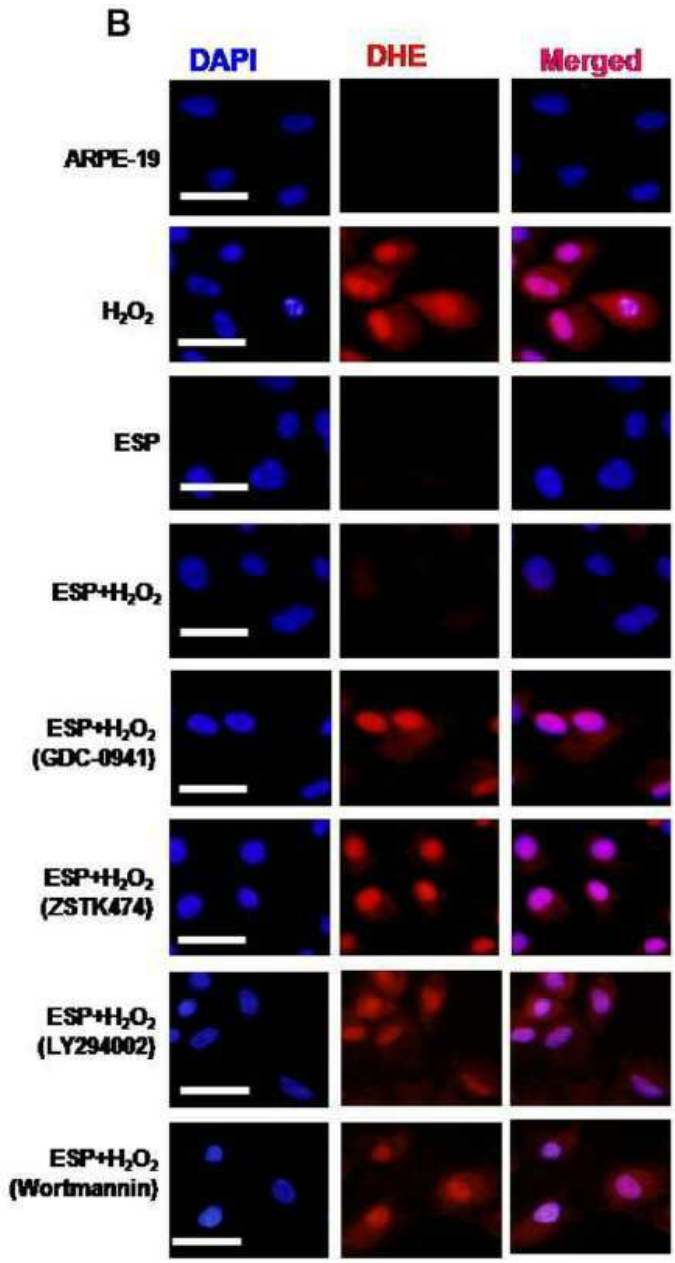
B


Control (T. gondii infected 24 h)
GFP
DAPI
Actin
GDC-0941
ZSTK474
Control
GDC-0941
ZSTK474
Percentage (%)
60
50
40
30
20
10
0
1
2
4
8
Number of parasites / vacuole

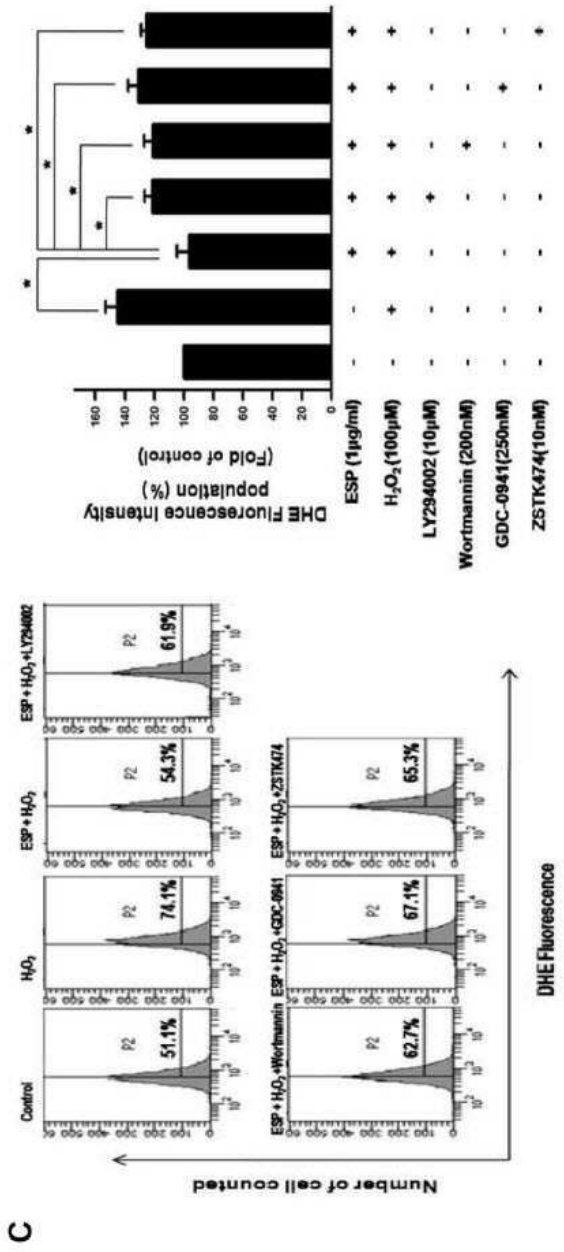
도면3a


A
DAPI
DHE
GFP-T.g
Merged
ARPE-19
H2O2
moi 5
moi5+ H2O2
moi5+H2O2 (GDC-0941)
moi5+H2O2 (ZSTK474)
moi5+H2O2 (LY294002)
moi5+H2O2 (Wortmannin)

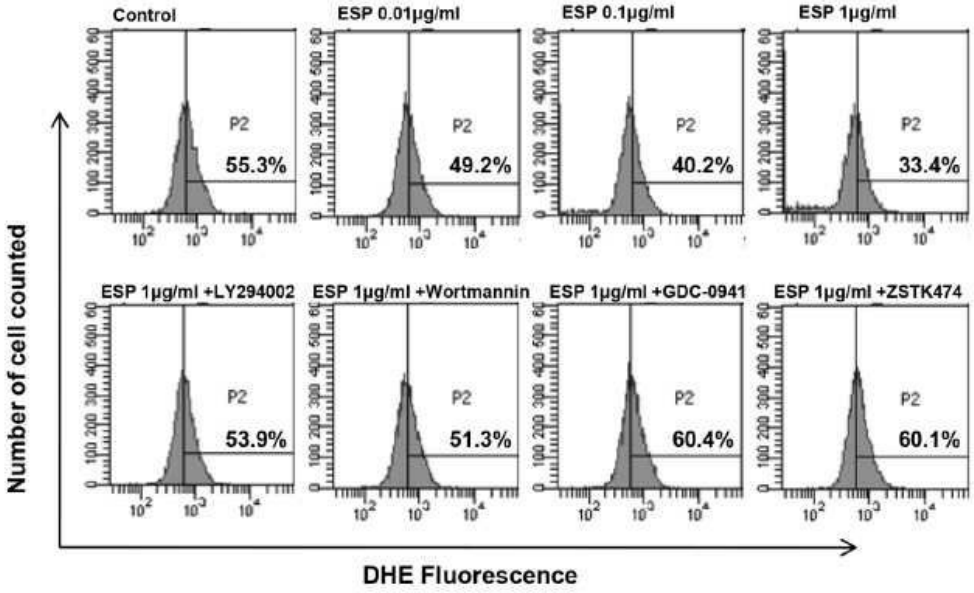
도면3b

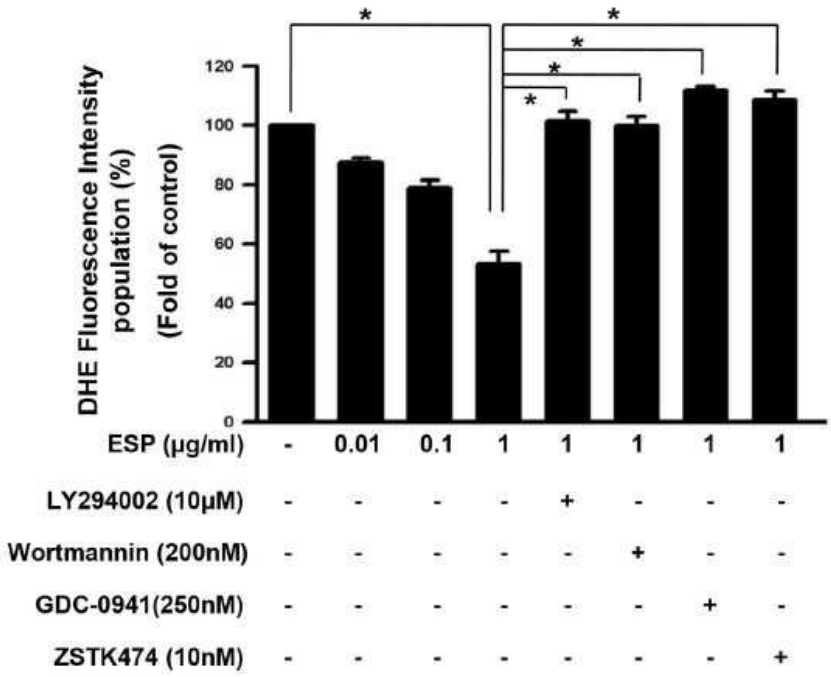

B
DAPI
DHE
Merged
ARPE-19
H_2O_2
ESP
ESP+H_2O_2
ESP+H_2O_2 (GDC-0941)
ESP+H_2O_2 (ZSTK474)
ESP+H_2O_2 (LY294002)
ESP+H_2O_2 (Wortmannin)

도면3c

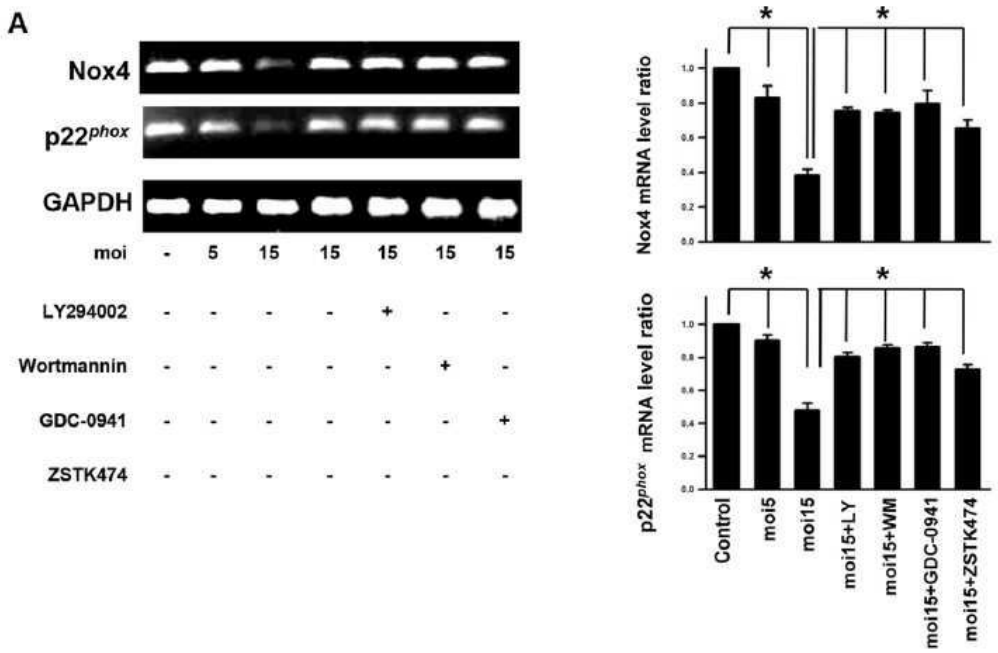

C
Control
H2O2
ESP + H2O2 + Wortmannin
ESP + H2O2 + GDC-0941
ESP + H2O2 + ZSTK474
ESP + H2O2
ESP + H2O2 + LY294002
P2
51.1%
74.1%
62.7%
67.1%
65.3%
54.3%
61.9%
Number of cell counted
DHE Fluorescence
DHE Fluorescence Intensity
population (%)
(Fold of control)
ESP (1μg/ml)
H2O2(100μM)
LY294002 (10μM)
Wortmannin (200nM)
GDC-0941(250nM)
ZSTK474(10nM)

도면4

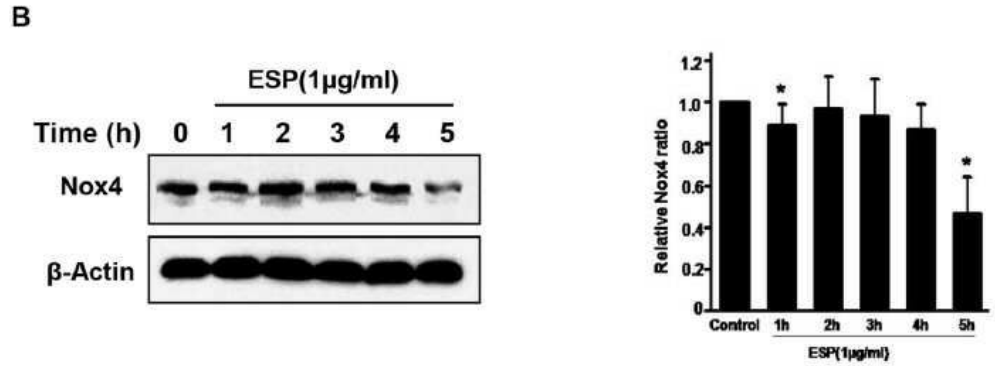

Control
ESP 0.01μg/ml
ESP 0.1μg/ml
ESP 1μg/ml
P2
55.3%
49.2%
40.2%
33.4%
ESP 1μg/ml +LY294002
ESP 1μg/ml +Wortmannin
ESP 1μg/ml +GDC-0941
ESP 1μg/ml +ZSTK474
53.9%
51.3%
60.4%
60.1%
Number of cell counted
DHE Fluorescence


DHE Fluorescence Intensity
population (%)
(Fold of control)
120
100
80
60
40
20
0
ESP (μg/ml) - 0.01 0.1 1 1 1 1 1
LY294002 (10μM) - - - - + - - -
Wortmannin (200nM) - - - - - + - -
GDC-0941(250nM) - - - - - - + -
ZSTK474 (10nM) - - - - - - - +

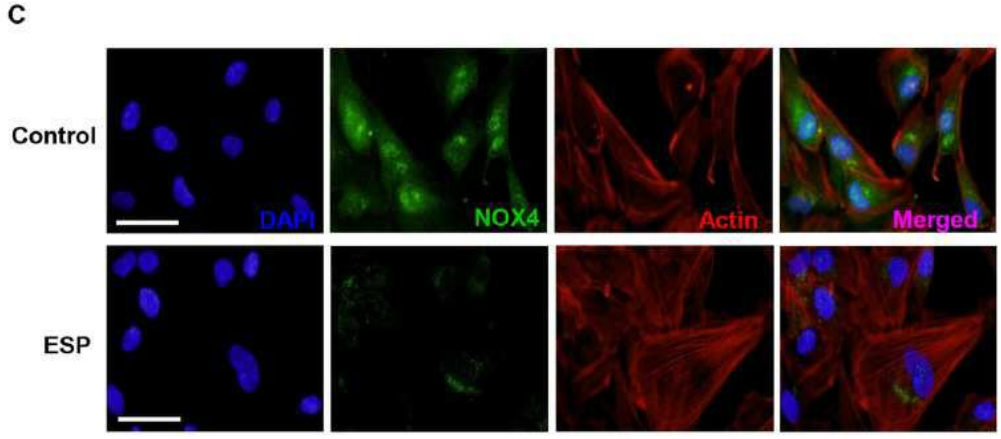
도면5a



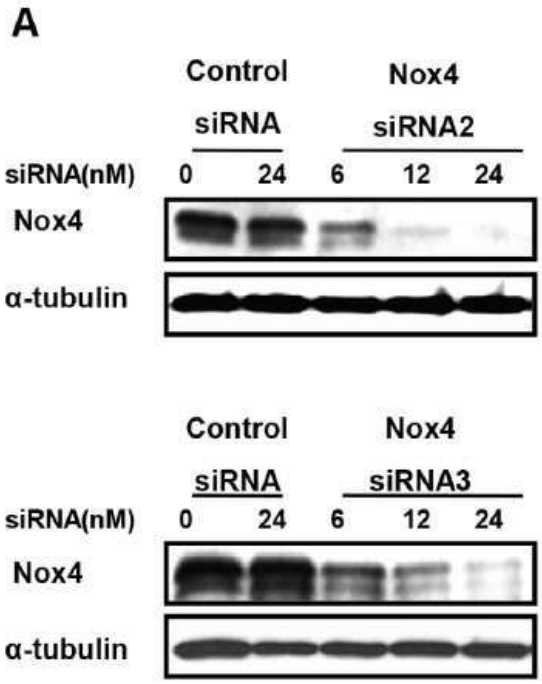
도면5b



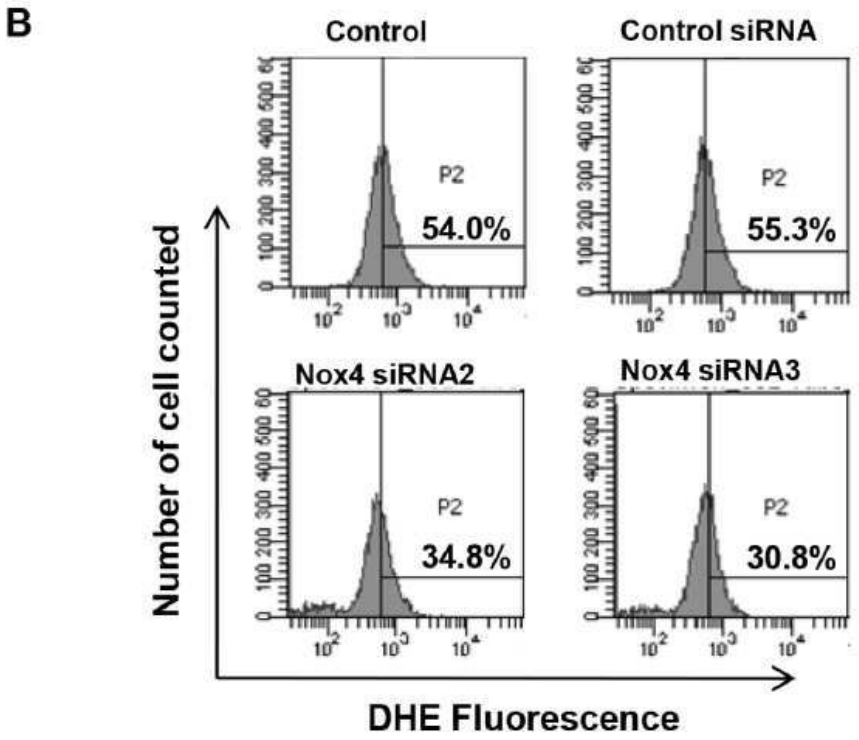
도면5c



도면6a

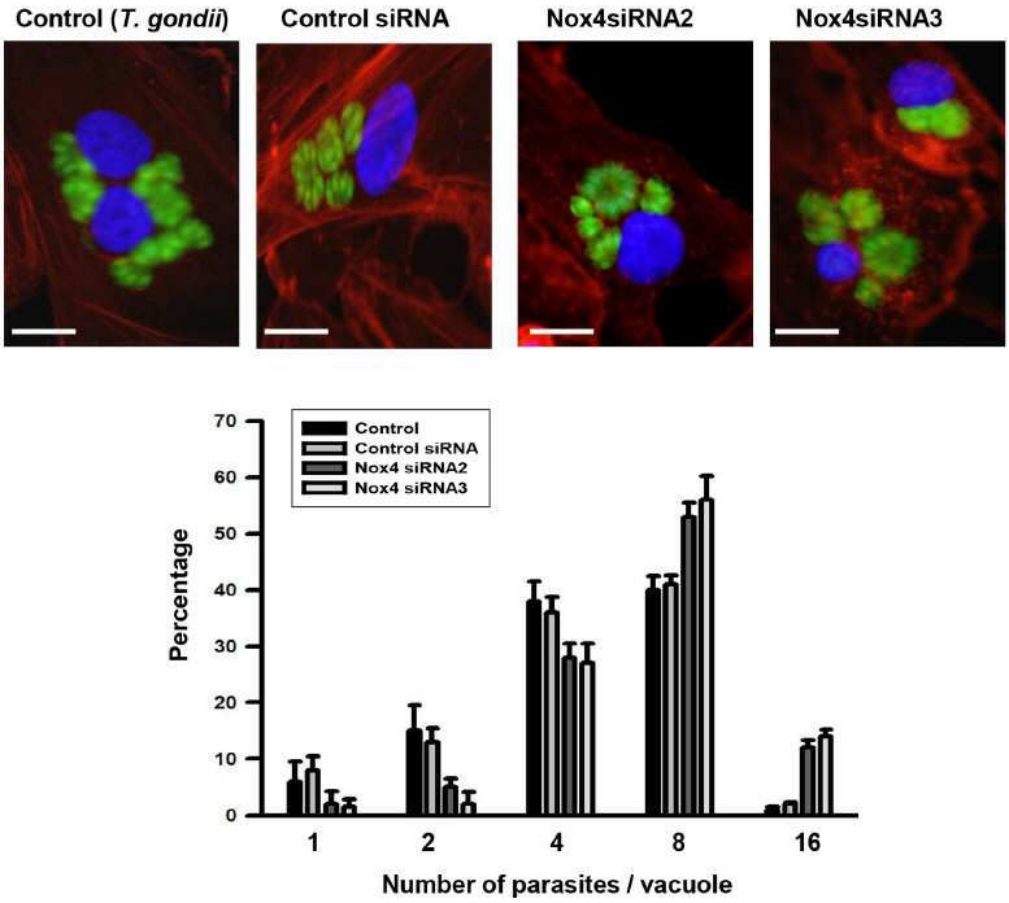

A
Control
siRNA
Nox4
siRNA2
siRNA(nM)
0
24
6
12
24
Nox4
α-tubulin
Control
siRNA
Nox4
siRNA3
siRNA(nM)
0
24
6
12
24
Nox4
α-tubulin

도면6b


B
Control
Control siRNA
Nox4 siRNA2
Nox4 siRNA3
P2
54.0%
55.3%
34.8%
30.8%
Number of cell counted
DHE Fluorescence

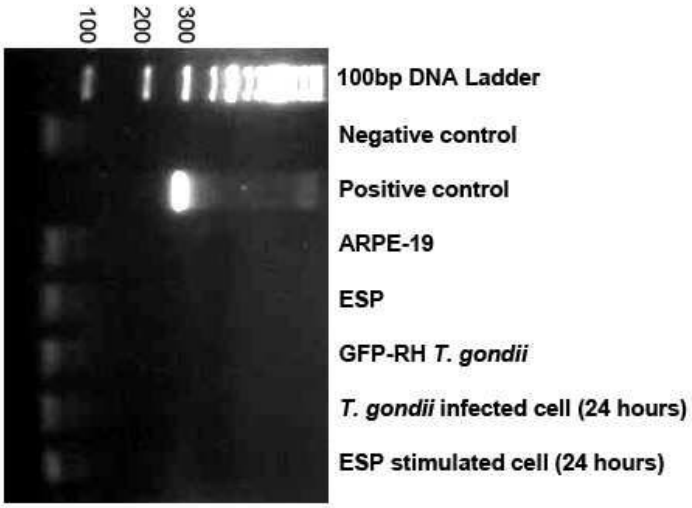
도면6c

C


Control (T. gondii)
Control siRNA
Nox4siRNA2
Nox4siRNA3
Control
Control siRNA
Nox4 siRNA2
Nox4 siRNA3
Percentage
0
10
20
30
40
50
60
70
1
2
4
8
16
Number of parasites / vacuole

도면7

A



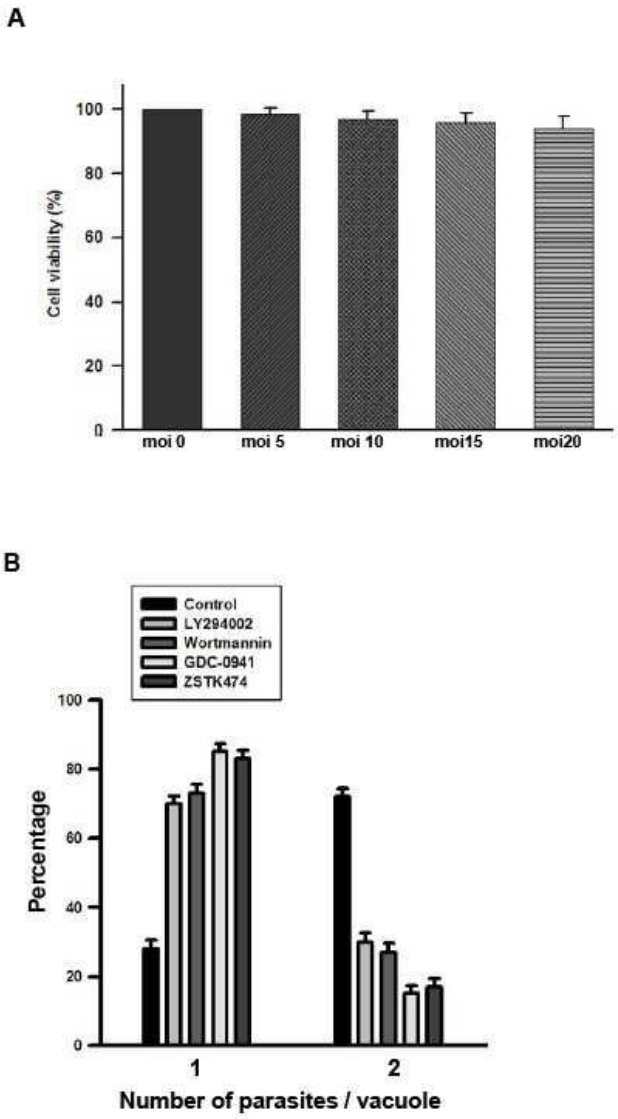
B

Examination of Endotoxin activity

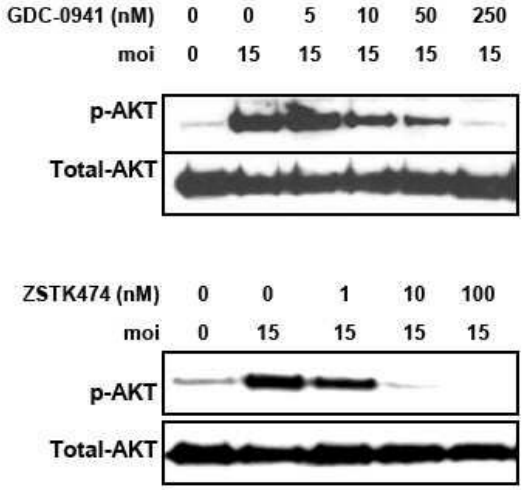
Sample name	Endotoxin activity[a] (EU/ml)
ARPE-19	<0.1
ESP	<0.1
GFP-RH *T. gondii*	<0.1
T. Gondii infected cell (24 hours)	<0.1
ESP stimulated cell (24 hours)	<0.1

[a] The lower limit of sensitivity of this assay is 0.1 EU/ml

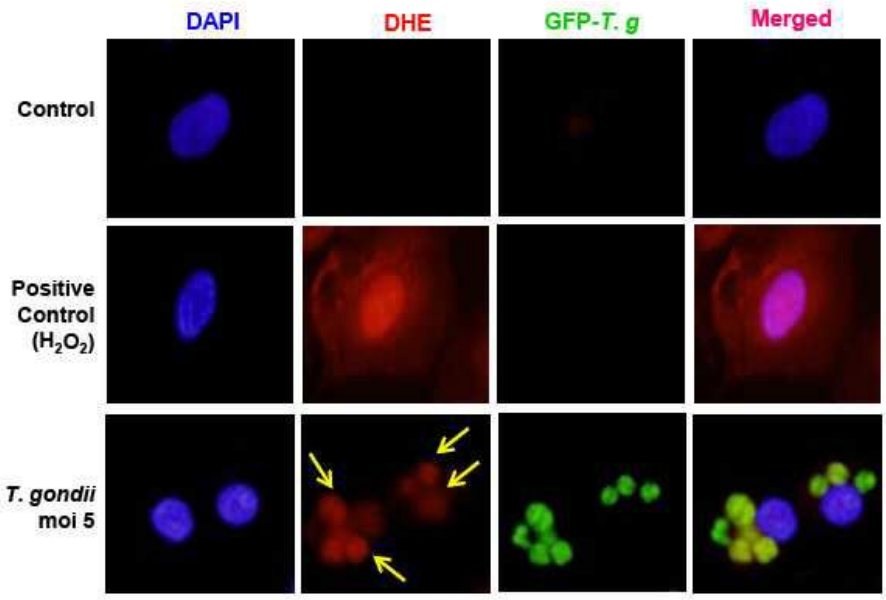
도면8


A
Cell viability (%)
100
80
60
40
20
0
moi 0
moi 5
moi 10
moi15
moi20
B
Control
LY294002
Wortmannin
GDC-0941
ZSTK474
Percentage
100
80
60
40
20
0
1
2
Number of parasites / vacuole

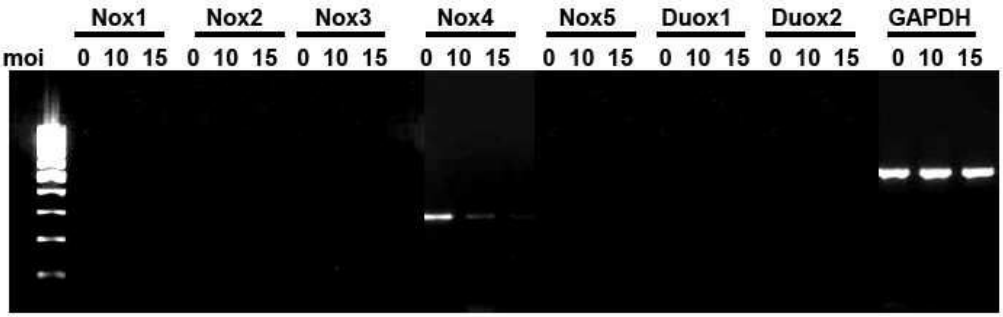
도면9



도면10



도면11



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Compositions for prevention or treatment of toxoplasmosis comprising NOX4

<130> NP14-1138

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 578

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Ala Val Ser Trp Arg Ser Trp Leu Ala Asn Glu Gly Val Lys His
1 5 10 15

Leu Cys Leu Phe Ile Trp Leu Ser Met Asn Val Leu Leu Phe Trp Lys
20 25 30

Thr Phe Leu Leu Tyr Asn Gln Gly Pro Glu Tyr His Tyr Leu His Gln
35 40 45

Met Leu Gly Leu Gly Leu Cys Leu Ser Arg Ala Ser Ala Ser Val Leu
50 55 60

Asn Leu Asn Cys Ser Leu Ile Leu Leu Pro Met Cys Arg Thr Leu Leu
65 70 75 80

Ala Tyr Leu Arg Gly Ser Gln Lys Val Pro Ser Arg Arg Thr Arg Arg
85 90 95

Leu Leu Asp Lys Ser Arg Thr Phe His Ile Thr Cys Gly Val Thr Ile
100 105 110

Cys Ile Phe Ser Gly Val His Val Ala Ala His Leu Val Asn Ala Leu
115 120 125

Asn Phe Ser Val Asn Tyr Ser Glu Asp Phe Val Glu Leu Asn Ala Ala
130 135 140

Arg Tyr Arg Asp Glu Asp Pro Arg Lys Leu Leu Phe Thr Thr Val Pro
145 150 155 160

```
Gly Leu Thr Gly Val Cys Met Val Val Val Leu Phe Leu Met Ile Thr

                165                 170                 175
Ala Ser Thr Tyr Ala Ile Arg Val Ser Asn Tyr Asp Ile Phe Trp Tyr
            180                 185                 190
Thr His Asn Leu Phe Phe Val Phe Tyr Met Leu Leu Thr Leu His Val
        195                 200                 205
Ser Gly Gly Leu Leu Lys Tyr Gln Thr Asn Leu Asp Thr His Pro Pro
    210                 215                 220
Gly Cys Ile Ser Leu Asn Arg Thr Ser Ser Gln Asn Ile Ser Leu Pro
225                 230                 235                 240

Glu Tyr Phe Ser Glu His Phe His Glu Pro Phe Pro Glu Gly Phe Ser
                245                 250                 255
Lys Pro Ala Glu Phe Thr Gln His Lys Phe Val Lys Ile Cys Met Glu
            260                 265                 270
Glu Pro Arg Phe Gln Ala Asn Phe Pro Gln Thr Trp Leu Trp Ile Ser
        275                 280                 285
Gly Pro Leu Cys Leu Tyr Cys Ala Glu Arg Leu Tyr Arg Tyr Ile Arg
    290                 295                 300
Ser Asn Lys Pro Val Thr Ile Ile Ser Val Met Ser His Pro Ser Asp

305                 310                 315                 320
Val Met Glu Ile Arg Met Val Lys Glu Asn Phe Lys Ala Arg Pro Gly
                325                 330                 335
Gln Tyr Ile Thr Leu His Cys Pro Ser Val Ser Ala Leu Glu Asn His
            340                 345                 350
Pro Phe Thr Leu Thr Met Cys Pro Thr Glu Thr Lys Ala Thr Phe Gly
        355                 360                 365
Val His Leu Lys Ile Val Gly Asp Trp Thr Glu Arg Phe Arg Asp Leu
    370                 375                 380

Leu Leu Pro Pro Ser Ser Gln Asp Ser Glu Ile Leu Pro Phe Ile Gln
385                 390                 395                 400
Ser Arg Asn Tyr Pro Lys Leu Tyr Ile Asp Gly Pro Phe Gly Ser Pro
```

405 410 415

Phe Glu Glu Ser Leu Asn Tyr Glu Val Ser Leu Cys Val Ala Gly Gly

420 425 430

Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Ile Leu Asn Thr Leu Leu Asp Asp

435 440 445

Trp Lys Pro Tyr Lys Leu Arg Arg Leu Tyr Phe Ile Trp Val Cys Arg

450 455 460

Asp Ile Gln Ser Phe Arg Trp Phe Ala Asp Leu Leu Cys Met Leu His

465 470 475 480

Asn Lys Phe Trp Gln Glu Asn Arg Pro Asp Tyr Val Asn Ile Gln Leu

485 490 495

Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ile Gln Lys Ile Ile Gly Glu Lys Tyr

500 505 510

His Ala Leu Asn Ser Arg Leu Phe Ile Gly Arg Pro Arg Trp Lys Leu

515 520 525

Leu Phe Asp Glu Ile Ala Lys Tyr Asn Arg Gly Lys Thr Val Gly Val

530 535 540

Phe Cys Cys Gly Pro Asn Ser Leu Ser Lys Thr Leu His Lys Leu Ser

545 550 555 560

Asn Gln Asn Asn Ser Tyr Gly Thr Arg Phe Glu Tyr Asn Lys Glu Ser

565 570 575

Phe Ser

<210> 2

<211> 4459

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 2

cctagacaaa ggggccggcg cggcggagca gactggtgca gcctgggccg cgcgctcaga 60

gcgctgggcg tctgggcagc tgagtgggca gagctgaccc ggtgcgggtg ggagtcaggg 120

cgcccggaaa acccggctct gggtagcaga ccccgcccgg gctggctcgg cgccgggcct 180

tcgggcttcc actcagtctt tgaccctcgg tcctcgctca gcggcccggc aggccgcaca 240

actgtaaccg ctgccccggc cgccgcccgc tccttctcgg tccggcgggc acagagcgca 300

gcgcggcggg gccggcggca tggctgtgtc ctggaggagc tggctcgcca acgaaggggt 360

taaacacctc tgcctgttca tctggctctc catgaatgtc ctgcttttct ggaaaacctt 420

cttgctgtat aaccaagggc cagagtatca ctacctccac cagatgttgg ggctaggatt 480

gtgtctaagc agagcctcag catctgttct taacctcaac tgcagcctta tccttttacc 540

catgtgccga acactcttgg cttacctccg aggatcacag aaggttccaa gcaggagaac 600

caggagattg ttggataaaa gcagaacatt ccatattacc tgtggtgtta ctatctgtat 660

tttctcaggc gtgcatgtgg ctgcccatct ggtgaatgcc ctcaacttct cagtgaatta 720

cagtgaagac tttgttgaac tgaatgcagc aagataccga gatgaggatc ctagaaaact 780

tctcttcaca actgttcctg gcctgacagg ggtctgcatg gtggtggtgc tattcctcat 840

gatcacagcc tctacatatg caataagagt ttctaactat gatatcttct ggtatactca 900

taacctcttc tttgtcttct acatgctgct gacgttgcat gtttcaggag ggctgctgaa 960

gtatcaaact aatttagata cccaccctcc cggctgcatc agtcttaacc gaaccagctc 1020

tcagaatatt tccttaccag agtatttctc agaacatttt catgaacctt tccctgaagg 1080

attttcaaaa ccggcagagt ttacccagca caaatttgtg aagatttgta tggaagagcc 1140

cagattccaa gctaattttc cacagacttg gctttggatt tctggacctt tgtgcctgta 1200

ctgtgccgaa agactttaca ggtatatccg gagcaataag ccagtcacca tcatttcggt 1260

cataagtcat ccctcagatg tcatggaaat ccgaatggtc aaagaaaatt ttaaagcaag 1320

acctggtcag tatattactc tacattgtcc cagtgtatct gcattagaaa atcatccatt 1380

taccctcaca atgtgtccaa ctgaaaccaa agcaacattt ggggttcatc ttaaaatagt 1440

aggagactgg acagaacgat ttcgagattt actactgcct ccatctagtc aagactccga 1500

aattctgccc ttcattcaat ctagaaatta tcccaagctg tatattgatg gtccttttgg 1560

aagtccattt gaggaatcac tgaactatga ggtcagcctc tgcgtggctg gaggcattgg 1620

agtaactcca tttgcatcaa tactcaacac cctgttggat gactggaaac catacaagct 1680

tagaagacta tactttattt gggtatgcag agatatccag tccttccgtt ggtttgcaga 1740

tttactctgt atgttgcata acaagttttg gcaagagaac agacctgact atgtcaacat 1800

ccagctgtac ctcagtcaaa cagatgggat acagaagata attggagaaa aatatcatgc 1860

actgaattca agactgttta taggacgtcc tcggtggaaa cttttgtttg atgaaatagc 1920

aaaatataac agaggaaaaa cagttggtgt tttctgttgt ggacccaatt cactatccaa 1980

gactcttcat aaactgagta accagaacaa ctcatatggg acaagatttg aatacaataa 2040

agagtctttc agctgaaaac ttttgccatg aagcaggact ctaaagaagg aatgagtgca 2100

atttctaaga ctttgaaact cagcggaatc aatcagctgt gttatgccaa agaatagtaa 2160

ggttttctta tttatgatta tttaaaatgg aaatgtgaga atgtggcaag atgaccgtca 2220
cattacatgt ttaatctgga aaccaaagag accctgaaga atatttgatg tgatgattca 2280
cttttcagtt ctcaaattaa aagaaaactg ttagatgcac actgttgatt ttcatggtgg 2340
attcaagaac tccctagtga ggagctgaac ttgctcaatc taaggctgat tgtcgtgttc 2400
ctctttaaat tgtttttggt tgaacaaatg caagattgaa caaaattaaa aattcattga 2460
agctgaaatt ccattttctg tgttgtgtat aaacagagta gctttaattt gcaagcactc 2520
caggcaaata tattagatgt ttgaaaacac agcacaagac tctgtattga tacgggtact 2580

ttgtgtcaat atctaatcgt ctccactact tatgctaata cctctatttg atatctgaag 2640
actatatgct aactgaacct tcctcaaatg ttgttatagt atctattttt atatattttt 2700
ttctttttat tcctctctct agggaaatat gccttccctt agcatgcatt agacataatg 2760
atttaatagg tccctttcat cttcatttaa atctatcact attgcatggt aatgaaaata 2820
ttcctactat aaattataaa gggatatata tatatggata tatatatgta tatacacata 2880
tatatataca cacacacaca catatatata tatatatata tatatacaca tatactaata 2940
acttttccct tttttcagca tttttgtctc tattattatt attgtttttt tcccaggtag 3000

ggtttgtctt aggctgtagc ctctaaggat agttagttaa tttgcacttt gagaccaaag 3060
gacatcatgt gtgtcagtag ggactgaata taagatttat ctcctttgcc acacattggt 3120
ttatgatgga gacattgaaa gtctagtcat attcctgaac agtaaaacct gtattttacc 3180
ttttaagtaa gaggaaatat gatattctta ttcaaactta agtttagaat ccagaatatt 3240
actgtcgcac tttttggtat cctgagtttc catagggaac tattgggttt aaagtcaccg 3300
ttggaactac actgtgtgat cttataaact tatgttccct ggctatcata ttcttggctc 3360
agaacaatat ttcccattac tatcttaaga attaaggcat tcatggctca cgcctgtaat 3420

cccggcactt tgggaggcca aggcaggtgg atcacgaggt cagagttcaa gaccagcctg 3480
accaagttgg tgaaacccca tcgctactaa aaatacaaat attaggcggg tgtggtggcg 3540
ggtgcctata atcccaacta ctcgggagac tgaggcaaag aatcgcttga acccggtggg 3600
cggaggttgc agtgagccaa gattgcacca ctgcactcca gcctgggtga cagagcaaga 3660
ttccatctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaat taaagcattc atacagttta 3720
gtgattttgt ttagtagtcg gctatcaatt gctatcaaat ataacactgc tgaaatcagc 3780
agtgtgactt accttgccat tgttaaaatg ttacataaaa cataacatga tagatgctaa 3840

ggccttttt tgctataatt caccaatagc aatcaagcat gctaacccat actgaatgat 3900

atttacttgt agatatttct tcctttcctt gaaattctcc tttctatgga aagaagatga 3960

acccaaaaaa gtgataggaa atgtggaatg ctcatgcaga tttagctctg aaggcatatt 4020

taataactag tatgtcttga caacagtctt tagattaaaa agaattttca tggaaacatt 4080

taacagaaag aactagtaaa aagacacttt gagttagtcc aggcttaatg tgcaatactg 4140

actctatact gatcataatt tatttatgcg atcatattaa tagacctaat ttcattaaaa 4200

caggtagaag atttttcaaa agaaagatga tgtttcaaag ctggtctgcc attctagatg 4260

agcctccttg cttatttaag ttccagtagg tgttcaaatg ttaaatgtta aacataggtc 4320

atctttgctt ctgcagggct tcatcttgca tgtttaagag aactttgttt tattttgagg 4380

gattatttct ctggggatca ttcttataat acaagcctta aatcactaat tttagtagca 4440

ataaatgtta aaattgaaa 4459