



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0121191
(43) 공개일자 2018년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/4409 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 31/4409 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0055595

(22) 출원일자 2017년04월28일

심사청구일자 2017년04월28일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

송창화

대전광역시 동구 한밭대로1237번길 52, 2동 501

호(용전동, 신동아아파트)

이정환

대전광역시 중구 삼성로 108-24, 207동 1101호(문화동, 주공2차아파트)

(74) 대리인

특허법인충정

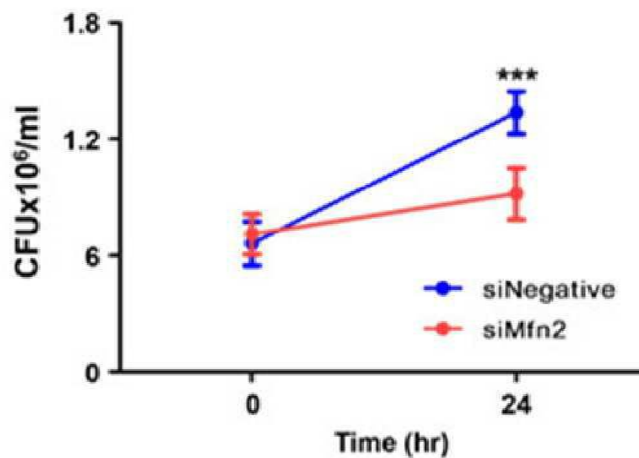
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 대식세포의 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 녹다운을 이용한 결핵균 억제방법

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아 막 단백질 MFN2(mitofusin 2)의 발현을 감소시키는 화합물을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 유효성분인 MFN2의 발현을 감소시키는 화합물은 대식세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도함으로써 결핵균의 증식을 억제하는 효과가 있으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 방법은 결핵의 예방 또는 치료에서 유용하게 사용될 수 있다

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/496 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016008178

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 결핵균 감염특이적 큰포식세포의 샤페론 기능과 네트워크 규명을 통한 결핵균 사멸기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

미토콘드리아 막 단백질 MFN2(mitofusin 2)의 발현을 감소시키는 화합물을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 발현을 감소시키는 화합물은 Negative siRNA, MFN2의 siRNA 및 리포펙타민(Lipofectamine)을 포함하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 Negative siRNA 및 MFN2의 siRNA는 80~120nm이며 리포펙타민은 1~2 μ l임을 특징으로 하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 MFN2의 발현의 감소는 결핵균에 감염된 대식세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도함으로써 결핵균의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 발현을 감소시키는 화합물에 항결핵 약제를 병용하여 사용하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항결핵 약제는 리팜피신(Rifampicin), 아이소니아지드(Isoniazid), 에탐부톨(Ethambutol) 또는 피라진아미드(Pyrazinamide)인 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항에 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, 폐허증, 유방 결핵 또는 척추 결핵인 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전반적으로 면역학 분야에 관한 것이며, 부분적으로 대식세포에서 미토콘드리아 막 단백질 MFN2(mitofusin 2)의 발현을 조절하여 결핵균을 억제시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 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.
- [0003] 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.
- [0004] 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. 결핵의 진단은 일반적으로 피부 검정법을 이용하여 수행되는데, 상기 검정법은 투베르쿨린 PPD(proteinpurified derivative)에 대한 피내 노출을 포함한다. 항원-특이 T 세포 반응은 주입후 48-72시간까지 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.
- [0005] 결핵균은 세포내 기생하는 세균으로 주로 대식세포에 감염된다. 결핵균에 감염된 대식세포는 세포자멸사(Apoptosis)를 통하여 결핵균을 제거한다고 알려져 있고, 특히 미토콘드리아는 세포자멸사와 밀접한 상관관계가 있다. 자극을 받은 미토콘드리아는 여러 작은 조각으로 나뉘게 되는 분열이 일어나는데, 이러한 분열의 증가는 세포자멸사를 유도한다. 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 감소는 분열을 일으키는 원인 중 하나 알려져있다.
- [0006] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 따라서, 결핵균 감염시 대식세포 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 발현 조절은 결핵균 생존 억제에 매우 효과적인 기전으로 작용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2012-0012297호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2012-0090393호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 미토콘드리아 막 단백질 MFN2(mitofusin 2)의 발현을 억제하고 이를 통한 대식세포의 세포자멸사 기전을 활성화시킴으로, 기존 약제와 작용기전이 다르고 부작용이 상대적으로 적은 결핵 예방 및 효율적인 치료 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 전술한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 미토콘드리아 막 단백질 MFN2(mitofusin 2)의 발현을 감소시키는 화합물을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0010] 상기 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 발현을 감소시키는 화합물은 Negative siRNA, MFN2의 siRNA 및 리포펙타민(Lipofectamine)을 포함하며 그 양은 Negative siRNA 및 MFN2의 siRNA는 80~120nM이며 리포펙타민은 1~2 μ l임을 특징으로 한다.

- [0011] 이렇게 제공된 화합물을 통하여 MFN2의 발현은 감소되며 이는 결핵균에 감염된 대식세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도함으로써 결핵균의 증식을 억제하게 된다.
- [0012] 또한 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 발현을 감소시키는 화합물에 항결핵 약제를 병용하여 사용하는 것을 포함할 수 있다.
- [0013] 여기에서 사용되는 항결핵 약제는 리팜피신(Rifampicin), 아이소니아지드(Isoniazid), 에탐부톨(Ethambutol), 피라진아미드(Pyrazinamide)으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나일 수 있다.
- [0014] 또한 상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나일 수 있다.

발명의 효과

- [0015] 이상과 같이 본 발명에 의하면 종래 전혀 알려져 있지 않던 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 녹다운에 의한 대식세포의 세포자멸사 유도를 통해 결핵균을 억제하는 효과를 가지고 있다. 또한 본 발명은 결핵균 감염시 대식세포의 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 발현을 감소시킬 수 있는 화합물 자극 요법을 사용한다면 다약제내성이 있는 결핵균에도 더욱 효과적이었다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 마우스 유래 큰포식세포주 Raw264.7 세포에서 MFN2 특이적인 siRNA를 형질전환하여 MFN2 단백질의 발현 감소를 보여주는 Western blot을 통한 전기영동사진이다.
- 도 2는 MFN2에 특이적인 siRNA를 형질전환시킨 큰포식세포주 Raw264.7 세포에 결핵균을 24시간 동안 감염시킨 후, 세포내 결핵균의 생존을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 첨부된 도면은 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0019] 실시예 1 : 큰포식세포 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 발현을 조절하는 단계

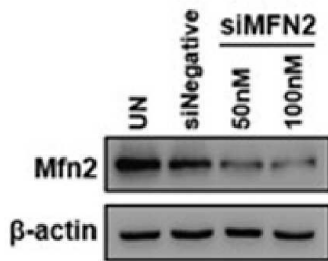
- [0020] 큰포식세포주 Raw264.7 세포에서 미토콘드리아 막 단백질 MFN2의 발현을 억제하기 위하여 각각 100nM의 Negative siRNA와 MFN2의 siRNA를 lipofectamine(1.5ul)을 이용하여 세포내 형질전환 해주었다. 도 1은 형질전환 18시간 후, 세포내 MFN2 단백질 발현정도를 Western blotting 방법으로 확인한 결과, 큰포식세포 내 MFN2 단백질 발현의 감소를 확인할 수 있었다.

[0022] 실시예 2 : MFN2 단백질의 발현 감소가 결핵균 억제에 영향을 미치는 것을 확인하는 단계

- [0023] 도 2는 도 1에서 확인한 MFN2 단백질의 발현을 감소시킨 큰포식세포에 결핵균 H37Rv를 Multiplicity of infection (MOI)=1로 감염시킨 후, 세포내 결핵균 생존비율을 비교한 그래프이다. 결핵균 감염 24시간 이후, 3차 증류수를 사용하여 세포에서 결핵균을 용출시키고 7H10 배지에서 14일간 배양하여 세포내 결핵균 생존율을 확인하였다. 결핵균 감염 시 MFN2 단백질의 발현이 감소된 큰포식세포에서 세포내 결핵균의 생존이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0024] 상기 실시예에서는 큰포식세포에서 MFN2 단백질의 감소가 결핵균의 생존 억제에 효과적인 기전임을 나타낸다. 본 발명은 결핵균뿐만 아니라 다양한 세포내 기생세균의 감염에 관련한 큰포식세포의 병원균 생존 억제 연구에 적용가능하며, MFN2조절 화합물을 통한 치료제 개발에도 광범위하게 활용이 가능할 것으로 사료된다.

도면

도면1



도면2

