(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0046379
(43) 공개일자 2017년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0146642
(22) 출원일자 2015년10월21일
심사청구일자 2015년10월21일
기술이전 희망 : **기술양도**

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
송창화
대전광역시 동구 한밭대로1237번길 52, 2동 501호 (용전동, 신동아아파트)
한지예
전라북도 전주시 완산구 용리로 178, 303동 301호(삼천동1가, 삼천쌍용아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충정

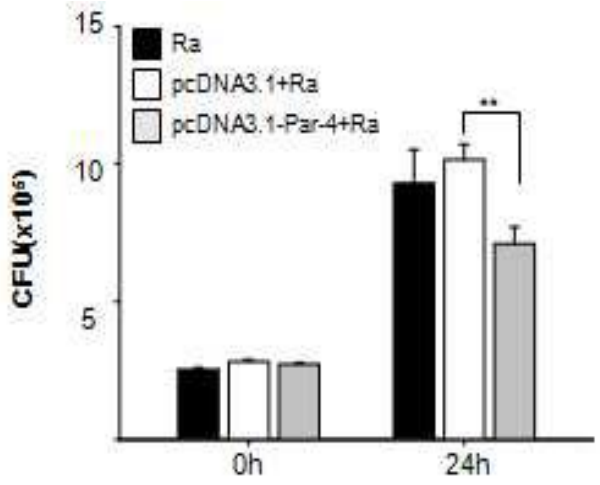
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **Par-4의 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 Par-4 및 GRP78의 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 Par-4(prostate apoptosis response-4) 또는 GRP78(78kDa glucose-regulated protein)의 발현을 증가시키는 경우, 세포 내에 잠복하는 결핵균 증식 제어 효과뿐만 아니라 결핵균을 사멸할 수 있어 결핵 예방 및 치료에 긍정적인 효과를 기대할 수 있다. 또한, 최근 결핵 치료의 어려움 중 하나로 대두되고 있는 다제내성 결핵 (Multi-drug resistant, MDR)과 광범위 약제내성 결핵 (Extensively drug-resistant, XDR)에 대한 치료효과도 기대할 수 있으며, 기존 약제와 함께 사용했을 경우 약물 복용 기간을 단축할 수 있고, 종래에 오랜 시간 약물 복용으로 인한 환자의 고통을 해소할 수 있으며, 환자들의 불규칙적인 약물 복용으로 인한 치료실패 및 재발을 방지할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Q 1/68 (2013.01)
G01N 33/53 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
G01N 2800/26 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)
(72) 발명자
임윤지
대전광역시 서구 용문로 41-22, 304호 (괴정동)
최지애
대전광역시 서구 도솔로511번길 47, 302호(용문동)
이정환
대전광역시 중구 산성로 108-24, 207동 1101호 (문화동, 주공2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A121496
부처명 한국보건산업진흥원
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질병극복
연구과제명 소포체 스트레스 조절에 의한 세포내 결핵균 제어 연구
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교
연구기간 2013.11.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014R1A6A1029617
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원사업
연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교
연구기간 2014.09.01 ~ 2017.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Par-4(prostate apoptosis response-4) 및 GRP78(78kDa glucose-regulated protein)중 어느 하나 이상의 단백질의 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Par-4(prostate apoptosis response-4)의 발현 또는 활성 촉진제는 Par-4를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 GPR78(78kDa glucose-regulated protein)의 발현 또는 활성 촉진제는 GPR78을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

Par-4 또는 GRP78의 발현 또는 활성 촉진제를 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 결핵의 예방 또는 치료방법.

청구항 5

1) 생물학적 시료에 피검물질을 처리하는 단계; 2) 상기 생물학적 시료에서 Par-4 또는 GRP78 유전자의 발현 정도 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및 3) 상기 Par-4 또는 GRP78 유전자의 발현 정도 또는 Par-4 또는 GRP78 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가한 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 결핵의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 1) 단계의 생물학적 시료는 세포, 혈액, 소변, 타액 및 조직으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 시료인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 제2)단계에서 유전자의 발현 정도는 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase ChainReaction), 노던 블롯(Northern blot), cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응 및 인 시투(in situ) 혼성화 반응으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 사용하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 2)단계에서 단백질의 활성 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법을 사용하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Par-4 및 GRP78의 발현 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 결핵은 마이코박테리움 튜베르쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)로 감염되어 유발되는 만성 감염성 질병으로, 개발도상국에서 주요 질병일 뿐 아니라 세계 선진국에서도 그 심각성이 증가하고 있으며, 매년 약 8백만명의 환자가 새로 발병하며 약 3 백만명의 환자가 사망한다. 결핵은 감염되어도 상당한 시간동안 증상이 없을 수 있지만, 이 질병은 가장 통상적으로 폐의 급성 염증으로 나타나서 열 및 비생산적 기침을 초래하며, 이를 치료하지 않으면 통상적으로 심각한 합병증을 초래하고 사망에 이르게 된다.

[0003] 이러한 결핵균의 중요성이 증가하고 있는데 그 이유는 전 세계적인 HIV 유행병과 여러 종의 약제에 대해 동시에 저항성을 갖는 결핵균주에 감염되는 사례들 때문이다. 최근 5년간 35개국에서의 항생제 내성 결핵균에 대한 조사에 의하면, 한 가지 이상의 약제에 내성을 가지는 경우가 36%에 이르고, 아이소니아지드(isoniazid, INH)와 리팜핀(rifampin, RMP)을 포함한 2가지 이상의 항생제에 내성을 보이는 다제내성 결핵(multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis, MDR-TB)이 약 13%로 심각한 수준에 이르고 있다. 치료경력이 없는 환자에서 조차도 적어도 한 가지 약제에 대한 내성을 보이는 경우도 9.9%에 달하고 있다. 이처럼 결핵, 그 중에서도 약제내성 및 다제내성 결핵은 치료비용의 증가를 불러올 뿐만 아니라 치료 효율도 낮아져 난치성 결핵으로 발전하는 등의 큰 위협을 주고 있다. 기존 결핵치료는 보통 1-2 년의 장기치료를 요하는데 이때 1-2 가지의 항결핵제를 사용하면 빠르게 내성이 생기므로 항결핵제 투여시 3-4 가지 약물을 병용 투여하는 것을 권장하고 있다. 하지만 장기 복용시 간에 무리를 주어 간경화와 황달 등 부작용을 유발한다. 또한 다제내성 결핵의 치료를 위해서는 상대적으로 덜 효과적이며 부작용이 더 많이 유발되고 고가인 2차 항결핵제를 복용해야 하는 문제점들이 있다. 따라서 이러한 다제내성 결핵의 치료 효율을 향상시키고 결핵을 퇴치시키는 전략(elimination strategy)을 위해서는 잠복 결핵까지 치료할 수 있는, 보다 효과적이고 부작용이 적으며 단기간 동안 사용할 수 있는 새로운 약제에 대한 개발이 요구되고 있다. 이처럼 인체에 안전하면서도 보다 효과적이며 신속한 항결핵제의 개발이 절실하게 요구되고 있으나, 현재 개발되고 있는 치료제들은 결핵 치료에 있어서 큰 효과를 나타내고 있지 않는 실정이다.

[0004] 한편, Par-4(prostate apoptosis response-4)은 종양 억제 단백질로써 세포 내 다양한 곳에서 존재하며, C 말단에 루신지퍼 도메인(Leucine Zipper (LZ) domain) 과 SAC 도메인(Selective for apoptosis of cancer cells domain)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 또한, Par-4는 소포체 스트레스(Endoplasmic Reticulum stress, ER stress) 발생 시 증가한 GRP78과 결합 후 세포 밖으로 분비되고, caspase-8을 활성화시켜 세포 자멸사를 유도한다.

[0005] GRP78는 열충격 단백질계 (heat shock protein family)의 단백질 중 하나로서 소포체(Endoplasmic Reticulum)에 존재하며 단백질의 접힘에 관여하며, 소포체에서 접히지 않은 단백질(unfolded protein)과 잘못 접힌 단백질(misfolding protein)이 증가하거나, 세포 내 칼슘이온의 항상성이 붕괴되어 세포에 스트레스가 발생할 경우, GRP78은 증가된다고 알려져 있다.

[0006] 최근 Par-4는 암세포에서 높은 수준으로 발현되어 종양을 제어한다고 보고되고 있으며, Par-4의 발현을 증가시키는 약물은 암세포에서 그 기능이 검증되어 현재 항암제로 이용되고 있고, 특히 유방암과 전립선암과 같은 호르몬에 관련된 암 치료에 다각도로 사용되고 있다. 하지만 Par-4 및 GRP78이 결핵의 예방 및 치료에 관여한다는 사실은 전혀 보고되고 있지 않다.

[0007] 이에 본 발명의 발명자들은 Par-4(prostate apoptosis response-4) 및 GRP78(78kDa glucose-regulated protein)의 발현을 감소시킨 경우, 대식세포 내에서 결핵균이 증가하고, Par-4의의 발현을 증가시킨 경우, 결핵균이 감소함을 확인하여, 결액의 예방 또는 치료효과가 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 출원번호 10-2004-0074190 결핵 치료용 ＤＮＡ 백신 및 이를 함유하는 약학적 조성물

(특허문헌 0002) 출원번호 10-2008-0092934 결핵의 단계 진단용 마커의 스크리닝 방법 및 발굴된 단백질 항원

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) 1. FEBS Letters 584 (2010) 2445-2454; Endoplasmic reticulum stress response is involved in Mycobacterium tuberculosis protein ESAT-6-mediated apoptosis

(비특허문헌 0002) 2. Cell. 2009 July 23; 138(2): 377-388; A Novel Extrinsic Pathway for Apoptosis by Tumor Suppressor Par-4

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 Par-4(prostate apoptosis response-4) 및 GRP78(78kDa glucose-regulated protein)중 어느 하나 이상의 단백질의 발현 촉진제 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 Par-4(prostate apoptosis response-4) 및 GRP78(78kDa glucose-regulated protein)의 발현 촉진제 또는 활성제를 이용한 결핵의 예방 또는 치료방법을 제공함에 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 Par-4 또는 GRP78 유전자의 발현 정도 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계;를 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0013] Par-4(prostate apoptosis response-4) 및 GRP78(78kDa glucose-regulated protein)중 어느 하나 이상의 단백질의 발현 촉진제 또는 활성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0015] 본 발명에서, Par-4(prostate apoptosis response-4) 및 GRP78(78kDa glucose-regulated protein)중 어느 하나 이상의 단백질의 "발현 촉진제 또는 활성 촉진제"란 Par-4 또는 GRP78에 직접 또는 간접적으로 작용하여 Par-4 또는GRP78의 발현 또는 활성을 개선, 유도, 자극, 증가시키는 물질을 의미한다. 이런 물질은 유기 또는 무기 화합물과 같은 단일 화합물, 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물 및 복수 화합물의 복합체 등을 포함한다. 상기 물질이 상기 Par-4 또는 GRP78의 발현 또는 활성을 촉진시키는 기작은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 물질은 전사, 번역 등의 유전자 발현을 증대시키거나, 비활성형을 활성형으로 전환시키는 기작으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, Par-4 또는 GRP78의 발현 또는 활성을 촉진시키는 물질은 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물이다. 핵산 및 단백질 서열이 이미 공지된 Par-4 또는 GRP78에 대하여 당업자는 촉진제로 작용하는 유기 또는 무기 화합물과 같은 단일 화합물 펩타이드, 단백질, 핵산, 탄수화물 및 지질과 같은 생체 고분자 화합물 및 복수 화합물의 복합체 등을 당 분야의 기술을 이용하여 제조하거나 스크리닝할 수 있다.

[0016] 본 발명의 Par-4 또는 GRP78의 발현 또는 활성 촉진제는 유전자 치료 등에 사용되기 위하여 세포 내에서 Par-4 또는 GRP78을 발현할 수 있는 벡터의 형태로 제공될 수 있다. 이에, 본 발명은 Par-4 또는 GRP78을 코딩하는 핵산, 바람직하게는 이 핵산을 함유하는 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는 결핵의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0017] Par-4 또는 GRP78을 코딩하는 핵산 서열은, 이와 동등한 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 이러한 핵산 분자의 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA) 분자일 수 있다.

[0018] 본 발명의 벡터는, 리포좀, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 바람직한 바이러스 벡터의 예로는 아데노바이러스(adenovirus), 아데노부속바이러스(adeno-associated virus), 레트로바이러스(retrovirus),렌티바이러스(lentivirus), 단순포진바이러스(herpes simplex virus), 알파바이러스(alpha virus) 등이 있다. 본 발명의 재조합 벡터는 Par-4 또는 GRP78을 코딩하는 핵산과 이의 전사 또는 해독을 위한 조절서열을 포함할 수 있다. 특히 중요한 조절서열은 프로모터, 인핸서와 같이 전사 개시를 조절하는 것이다. 또한, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 코작(Kozak), 인핸서, 막 표적화 및 분비를 위한 신호서열, IRES(Internal Ribosome Entry Site) 등으로 이루어진 조절서열을 포함할 수 있다. 이러한 조절서열과 Par-4 또는 GRP78을 코딩하는 핵산은 작동가능하게 연결되어야 할 것이다.

[0019] 여기서, 이용된 용어 '작동가능하게 연결된'이란 핵산 서열간의 결합이 기능적으로 연관되어 있는 것을 의미한다. 임의의 핵산서열이 작동가능하게 연결된 경우는 임의의 핵산서열이 다른 핵산서열과 기능적으로 관련성을 가지도록 위치해 있는 경우이다. 본 발명에 있어서, 임의의 전사 조절서열이 Par-4 또는 GRP7을 코딩하는 핵산분자의 전사에 영향을 미치는 경우, 상기 전사 조절서열이 상기 핵산분자와 작동가능하게 연결되어 있다고 말한다. 본 발명에서, 치료는 결핵을 억제, 예방하거나, 결핵과 관련된 증상을 감소, 경감, 역전시키고 결핵의 진행을 억제하는 것을 포함한다.

[0020] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트,프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 약제학적 조성물은 유전자 요법에서 통상적으로 이용되는 경로를 통해 투여될 수 있으며, 비경구 투여가 바람직하고, 예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있다.

[0022] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 한 양태로서, 본 발명의 약제학적 조성물을 1 X 10^{8} 내지 1 X 10^{11} pfu의 재조합 아데노바이러스를 정맥으로 1 내지 2회 투여할 수 있다.

[0023] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또 는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 약제학적 조성물은 실온에서의 안정성을 증가시키고, 값비싼 저온 저장의 필요성을 줄이며, 저장 수명(shelf-life)을 연장하기 위해 동결건조시킬 수 있다. 동결건조 공정은 동결, 일차 건조 및 이차 건조의 연속 단계로 이루어질 수 있다. 조성물을 동결시킨 후의 이차 건조 공정은 압력을 강하하고 수증기의 승화를 위해 가열하는 것이다. 이차 건조 단계는 건조물로부터 흡수된 잔여 수분을 증발시키는 것이다.

[0025] 또한, 본 발명은 Par-4 또는 GRP78의 발현 촉진제 또는 활성 촉진제를 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 결핵의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 결핵의 예방 또는 치료방법은 본 발명의 Par-4 또는 GRP78 유전자의 발현 촉진제 또는 활성 촉진제를 유효량으로 개체에 투여하는 것을 포함한다. 특정 개체에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 개체의 연령, 체중, 일반건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명의 목적에 적합한 조성물의 유효량은 전술한 사항을 고려하여 결정하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 개체는 임의의 포유동물에 적용가능하며, 상기 포유동물은 인간 및 영장류뿐만 아니라, 소, 돼지, 양, 말, 개 및 고양이 등의 가축을 포함한다.

[0027] 또한, 본 발명은 1) 생물학적 시료에 피검물질을 처리하는 단계; 2) 상기 생물학적 시료에서 Par-4 또는 GRP78 유전자의 발현 정도 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 활성 정도를 측정하는 단계; 및 3) 상기 Par-4 또는 GRP78 유전자의 발현 정도 또는 Par-4 또는 GRP78 단백질의 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가한 피검물질을 선별하는 단계;를 포함하는, 결핵의 예방 또는 치료용 후보 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0028] 상기 방법에 있어서, 1) 단계의 생물학적 시료는 개체의 혈액, 소변, 타액 및 조직 등을 포함하며, 바람직하게는 세포주이다. 상기 세포주는 모든 세포주를 모두 포함하며, 바람직하게는 인간의 면역세포, 더욱 바람직하게는 대식세포이다. 상기 방법에 있어서, 2)단계에서 유전자의 발현 정도는 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase ChainReaction), 노던 블롯(Northern blot), cDNA 마이크로어레이 혼성화 반응, 및 인 시투(in

situ) 혼성화 반응등의 방법을 통해 측정할 수 있으며, 당업자에게 알려진 유전자의 양을 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있고, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 상기 방법에 있어서, 2)단계에서 단백질의 활성 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS) 등의 방법을 통해 측정할 수 있으며, 당업자에게 알려진 단백질의 양을 측정하는 모든 방법을 사용할 수 있고, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 Par-4(prostate apoptosis response-4) 또는 GRP78(78kDa glucose-regulated protein)의 발현 또는 활성을 증가시키는 경우, 세포 내에 잠복하는 결핵균 증식 제어 효과뿐만 아니라 결핵균을 사멸할 수 있어 결핵 예방 및 치료에 긍정적인 효과를 기대할 수 있다. 또한, 최근 결핵 치료의 어려움 중 하나로 대두되고 있는 다제내성 결핵 (Multi-drug resistant, MDR)과 광범위 약제내성 결핵 (Extensively drug-resistant, XDR)에 대한 치료효과도 기대할 수 있으며, 기존 약제와 함께 사용했을 경우 약물 복용 기간을 단축할 수 있고, 종래에 오랜 시간 약물 복용으로 인한 환자의 고통을 해소 할 수 있으며, 환자들의 불규칙적인 약물 복용으로 인한 치료실패 및 재발을 방지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 비병원성 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra)의 대식세포 감염 시 Par-4와 GRP78의 발현 정도를 나타낸 도이다(단백질 수준; westernblot)

도 2는 비병원성 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra)의 대식세포 감염 시, Par-4와 GRP78의 발현정도를 나타낸 도이다(RNA 수준; RT-PCR(Reverse transcription Polymerase Chain Reaction).

도 3은 대식세포 내 결핵균 세포당 균 수 비율의 증가에 따라 Par-4와 GRP78의 발현정도를 나타낸 도이다.

도 4는 Par-4 및 GRP78의 발현을 감소시킨 경우, 대식세포 내에서 결핵균의 수를 확인한 도이다.

도 5는 Par-4를 과발현시킨 대식세포에서 결핵균의 수를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 상세히 설명한다. 하기의 실시예는 본 발명의 하나의 예시일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 범위가 제한되지 않는다.

[0034] **[실시예 1] 대식세포에 결핵균 감염 후, Par-4 및 GRP78 발현의 변화 확인**

[0035] 결핵균의 세포 내 감염시 Par-4 및 GRP78의 발현 여부와 기능을 확인하게 위하여, 마우스 유래 대식세포주인 Raw264.7 세포에 비병원성 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra)을 감염시킨 후 Par-4와 GRP78의 발현 정도와 세포당 균 수 비율과 시간에 따른 Par-4 및 GRP78의 발현 정도를 측정하였다. 대식세포에 세포 당 균 수 5의 비율로 결핵균 감염 시 배양시간에 따른 Par-4와 GRP78의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블롯팅(Western blot) 기법으로 확인한 결과를 도 1(도에서 β-actin은 내부컨트롤임)에 나타었고, 결핵균 감염 시 Par-4 및 GRP78의 유전자 발현을 RT-PCR 방법으로 확인한 결과를 도 2에 나타내었고, 세포당 균 수 1, 5, 10의 비율로 결핵균 감염 시 Par-4와 GRP78의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블롯 기술을 이용하여 확인한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0036] 도 1에 나타난 바와 같이, 배양 24시간에서만 Par-4가 발현되고, 48시간에서는 다시 감소되며, GRP78은 배양시간이 길어짐에 따라 그 발현도 증가함을 확인하였다.

[0037] 도 2에 나타난 바와 같이, Par-4 mRNA의 발현은 감염 0.5시간에 크게 증가한 후, 점점 감소가 되며, GRP78의 mRNA 발현은 시간에 비례하여 증가한 것을 확인하였다.

[0038] 도 3에 나타난 바와 같이, 세포당 균 수가 증가할수록 Par-4와 GRP78의 발현도 증가함을 확인하였다.

[0039] 상기의 결과는 대식세포 내 결핵균 감염 시 세포는 결핵균에 대항하기 위하여 하나의 방법으로 Par-4와 GRP78의 발현을 증가시키는 것을 보여준다.

[0041] **[실시예 2] Par-4 및 GRP78 발현 감소를 통한 결핵균 생장 효과 확인**

[0042] 결핵균의 세포 내 감염 시 Par-4 및 GRP78의 발현이 결핵균의 생장에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, Par-4 및 GRP78 발현이 감소한 경우, 대식세포 내 결핵균 수를 측정하였다.

[0043] 보다 구체적으로, Par-4 siRNA, GRP78 siRNA, 음성 대조군 siRNA를 농도150nM로 GenMute를 이용하여 대식세포에 형질도입(transfection)을 실시하였고, 37° C, 5% 농도의 CO_2 하의 배양기에서 5시간 동안 배양하였다. 그 후 대식세포를 5% 우태아혈청이 포함되고 항생제는 포함되지 않는 완전배지에서 24시간 배양하였고, 3시간 동안 결핵균을 감염시킨 후, 세포 외 결핵균 세척을 진행하였다. 이 후, 완전 배지상태에서 24시간동안 배양하였다. 형질도입한 세포에 결핵균을 감염 0 내지 24시간 경과 후, 대식세포 내 생존하는 결핵균 수를 측정한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0044] 도 4에 나타난 바와, 음성 대조군과 비교 시 Par-4의 발현 감소로 인해 세포 내 결핵균 수가 유의하게 증가하며, GRP78의 발현이 감소한 경우, 세포 내 결핵균 수의 증가함을 확인하였다.

[0046] **[실시예 3] Par-4 이 과발현된 대식세포에서 결핵균 수의 감소 확인**

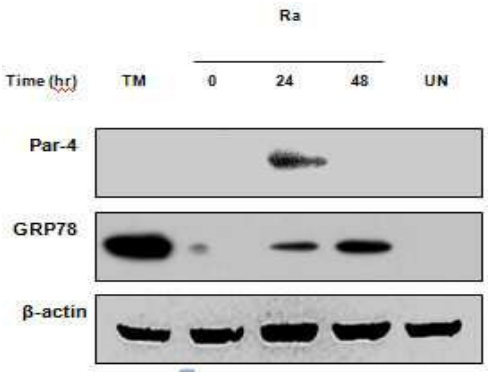
[0047] 결핵균의 세포 내 감염 시 Par-4의 발현의 증가가 결핵균의 생장에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, Par-4를 과발현시킨 대식세포 내 결핵균 수를 측정하였다.

[0048] 보다 구체적으로, Par-4 및 GRP78의 과발현(overexpression)은 음성대조군 pcDNA3.1 및 pcDNA3.1-Par-4를 1μg/ml의 농도로 리포펙타민 3000(Lipofectamin 3000)을 이용하여 Raw 264.7 세포에 형질도입하였다. 이 후, 37° C, 5% 농도의 CO_2하의 배양기에서 5시간 동안 배양하였고, 대식세포를 5% 우태아 혈청이 포함되고 항생제는 포함되지 않는 완전배지에서 24시간 배양하였다. 이 후, 3시간 동안 결핵균을 감염시키고, 세포 외 결핵균 세척을 진행하였다. 그 다음, 완전 배지상태에서 24시간동안 배양하였다. Par-4를 과발현시킨 대식세포에 결핵균을 감염 시킨 후, 0 내지 24시간이 경과한 상태에서 세포 내에 생존하는 결핵균 수를 측정한 결과를 도 5에 나타내었다.

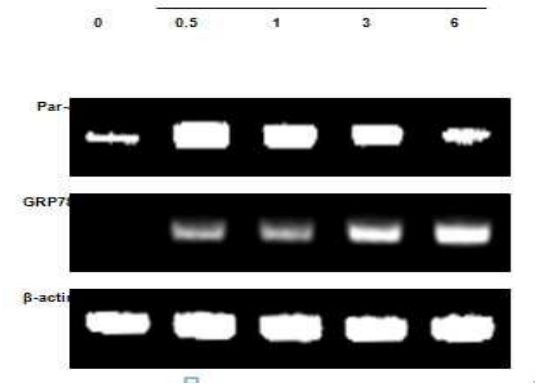
[0049] 도 5에 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하였을 때, Par-4의 발현을 증가시켰을 경우 세포 내 결핵균 수가 유의하게 감소되는 것을 확인하였다. 따라서, Par-4을 과발현 시킨 경우, 결핵을 예방 또는 치료할 수 있다는 점을 알 수 있다.

도면

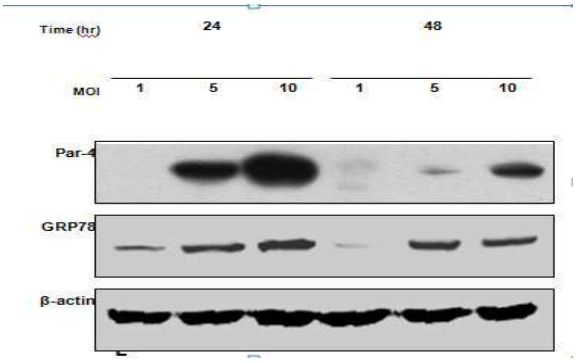
도면1



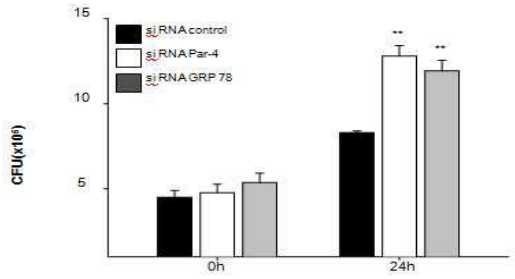
도면2



도면3



도면4



도면5

