



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0082071
(43) 공개일자 2016년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7056 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/216 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0194037

(22) 출원일자 2014년12월30일

심사청구일자 2014년12월30일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

한양대학교 에리카산학협력단

경기도 안산시 상록구 한양대학로 55

(72) 발명자

조은경

대전광역시 유성구 봉명로48, 805동 702호(원신흥동, 신안인스빌아파트)

양철수

경기도 안산시 단원구 광덕2로 74 그린빌 1211동 104호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

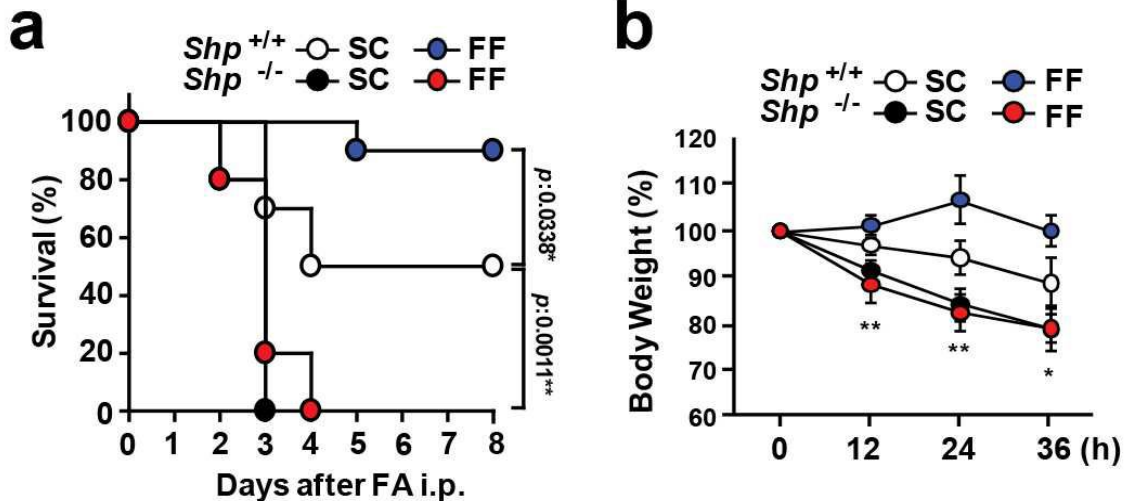
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 SHP를 유효성분으로 하는 신장질환 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신장질환의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고아 핵 수용체의 일종인 SHP를 유효성분으로 포함하는 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김진만

대전광역시 유성구 엑스포로339번길 320 싸이언스 빌 7동 303호

김태성

대전광역시 유성구 어은로 57 한빛아파트 125동 1201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2007-0054932

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업/기초의약학(MRC)

연구과제명 감염 신호에 의한 생체방어 면역조절 기전 분석 및 감염치료 기반기술 개발

기 여 율 4/10

주관기관 충남대학교

연구기간 2007.05.01 ~ 2016.02.29이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0030049

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야 기초연구사업/선도연구센터지원사업 / SRC

연구과제명 감염 및 염증 신호 조절의 후성유전학적 연구를 통한 숙주 방어 기전 분석

기 여 율 2/10

주관기관 한양대학교

연구기간 2011.09.07 ~ 2018.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A100588

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 염증신호 조절을 이용한 당뇨병 전환 제어 타겟 발굴 및 임상 적용

연구과제명 보건의료기술연구개발사업

기 여 율 4/10

주관기관 보건복지부

연구기간 2010.05.01 ~ 2015.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

SHP(Small Heterodimer Partner)를 유효성분으로 포함하는 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 신장질환은 급성 신부전인 것을 특징으로 하는 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 급성 신부전은 급성 세뇨관 괴사에 의한 것을 특징으로 하는 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 신장질환은 신독성에 의해 유발된 것을 특징으로 하는 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 SHP는 체내에서 SHP의 발현을 증가시키는 약물의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 약물은 AICAR(5-amino-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide) 또는 페노피브레이트(fenofibrate) 또는 MSP(재조합 대식세포 자극 단백질)인 것을 특징으로 하는 염증질환 및 자가면역질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 SHP는 SHP를 코딩하는 유전자의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 유전자는 발현백터 내에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

SHP(Small Heterodimer Partner)를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 신장질환 예방 및 증상 개선용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신장질환의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신장은 노폐물을 배설하고 산염기 및 전해질 대사 등 체내 항상성을 유지하며 여러 가지 호르몬을 생산하고 활성화시키는 내분비 기능을 하는 기관으로, 신장의 기능이 심하게 저하되거나 소실되는 경우 생명의 유지가 어려워진다.

[0003] 신장이 배설, 조절, 대사 및 내분비적 기능을 정상적으로 수행하지 못하고 기능이 저하되거나, 이상이 초래된 상태를 신장질환이라고 한다. 신장질환은 진행상태에 따라 만성 신부전과 급성 신부전으로 나눌 수 있다. 만성 신부전은 3개월 이상 신장이 손상되어 있거나, 신장 기능 감소가 지속적으로 나타나는 것으로 병의 진행이 지속되어 정상 신장에 비해 기능이 15% 이하로 심하게 감소하는 말기 질환이 유발되면 혈액투석이나, 복막투석, 신장이식과 같은 치료를 받지 않으면 정상적인 생활을 할 수 없는 상태가 된다. 우리나라에서는 당뇨병과 고혈압이 주된 발병원인으로 알려져 있다. 급성 신부전은 신장 기능이 수시간에서 수일에 걸쳐 급격하게 저하되는 것으로, 병원에 입원하는 환자의 약 5%, 중환자실에 입원하는 환자의 약 30%에서 관찰된다. 급성 신부전의 원인은 신혈류의 저하가 오래 이어져 세포가 허혈에 빠지는 허혈형과 화학물질이나 치료약물, 부적합 수혈 등의 독성으로 인한 신독성형이 주를 이룬다. 사망률은 원인에 따라 다르지만 수술 후 혹은 외상 후 발생한 급성 신부전의 경우에는 60~70%에 이르는 것으로 보고되고 있다. 생존 환자는 병에 걸리기 전과 비슷한 정도로 신장 기능이 서서히 회복되지만 만성 신기능 저하 상태로 유지되는 경우도 있다.

[0004] 이러한 신장 독성에 따른 질환의 예방 또는 치료를 위한 다수의 합성 제제가 개발되어 있으나, 고가이며 단지 부분증상만을 완화시키는 제한된 효능으로 널리 사용되지 못하고 있다. 또한 인체에 장기간 적용 시 부작용의 발생 가능성 등 안정성에 대한 문제 역시 제기되고 있어 효과적인 신장질환 치료제의 개발은 현재 의학계의 공동 과제이다.

[0005] NROB2로도 불리우는 SHP(small heterodimer partner, Mouse Genome Informatics accession code, 1346344)는 다양한 핵 수용체 중 비전형적인 고아 핵 수용체로 주로 핵 속에서 다수의 전사인자 또는 다른 핵 수용체와 결합하여 전사조절에 관여한다. SHP는 전형적인 DNA-결합 도메인이 없이 추정 상의 리간드 결합 도메인만을 갖는다. 지난 20여년간의 많은 연구들을 통해 고아 핵 수용체 SHP는 생체 내 대사경로 조절에서 여러 가지 유전자의 보조 억제제로서 역할을 한다고 알려져 왔으며, 특히 글루코스, 담즙 및 지방의 대사에 연루된 것이 알려져 있다. 그러나 SHP가 신장 질환의 예방 및 치료에 효과가 있음은 아직 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 새로운 작용기작에 의한 신장질환 예방 및 치료/증상 개선용 조성물을 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 SHP(Small Heterodimer Partner)를 유효성분으로 포함하는 신장질환 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0008] 인위적으로 신장질환을 유발시킨 마우스 모델에서 SHP의 발현 증가는 생존률을 크게 향상시켰으며, 신장질환 유발에 의해 증가하는 사이토카인의 분비를 억제하였다. 또한 신장 조직 변화를 관찰한 결과 SHP 발현 증가는 신장질환 유발에 의해 나타나는 세뇨관 괴사, 세관 상피의 평탄화, 세관 팽창, 세관 원주(cast) 형성, 세관 세포 핵 손실, 세관간질 호중구 침윤과 IL-1 β 의 발현 양성 세포의 수의 증가와 같은 병리적인 현상을 현저하게 완화시켰다.
- [0009] 하기 실시예에서는 SHP 발현을 증가시키는 약물을 사용하였으나, SHP를 녹아웃 시킨 마우스에서는 신장질환에 의한 생존율이나 증상을 개선하지 못하여, 발현이 증가된 SHP가 실질적인 유효성분임을 확인할 수 있었다. 따라서 SHP 그 자체를 처리하는 경우에도 동일한 효과를 얻을 수 있음은 명백하다.
- [0010] 또는 하기 실시예에서와 같이 본 발명에서 SHP는 체내에서 SHP의 발현을 증가시키는 약물의 형태로 제공될 수 있다. AICAR(5-amino-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide)나 페노피브레이트(fenofibrate), MSP(재조합 대식세포 자극 단백질)와 같은 약물은 AMPK(5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase)활성화를 통하여 SHP 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다.
- [0011] 또는 본 발명에서 상기 SHP는 SHP를 코딩하는 유전자의 형태로 제공될 수 있다. 상기 유전자는 DNA, RNA 또는 PNA를 포함한다. 상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로 상기 발현벡터를 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 감염 또는 형질도입하여 발현형으로 표적 세포 내에 도입시킬 수 있다.
- [0012] 상기 약학 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.
- [0013] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.
- [0014] 본 발명은 또한 SHP를 유효성분으로 포함하는 신장질환 예방 및 증상 개선용 건강식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태로 가공될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

발명의 효과

- [0015] 이상과 같이 본 발명의 조성물은 신장질환 모델에서 생존율을 현저하게 증가시키며, 사이토카인의 분비 억제와 병리적인 특징의 감소에 효과적이어서 신장질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 신장질환 유발 마우스의 생존율 및 체중 변화에 대한 페노파이버레이트의 영향을 보여주는 그래프.
 도 2는 신장질환 유발 마우스의 신장 세포분쇄액에서 사이토카인의 발현에 대한 페노파이버레이트의 영향을 보

여주는 그래프.

도 3은 신장질환 유발 마우스 및 페노파이크로이드 처리군 마우스의 신장 조직의 H&E 염색 이미지 및 이로부터 관측되는 histology score를 보여주는 그래프.

도 4는 신장질환 유발 마우스 및 페노파이크로이드 처리군 마우스에서 neutrophil(green)과 IL-1 β (red)의 면역형광조직염색 이미지.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

실시예

실시예 1 : SHP 결손 마우스의 제작

wild type C57BL/6 마우스(SHP^{+/+} 마우스)를 Samtako Bio Korea(경기도, 대한민국)에서 구입하였으며, Dev. Cell 3 721-731(2002)에 기술된 방법에 따라 SHP 유전자의 target deletion이 일어난 마우스(SHP^{-/-} 마우스)를 제작하였다. 마우스는 특정 병원체 부재 상태에서 사육하였다.

실시예 2 : 마우스의 급성 신부전 모델에서의 페노파이크로이드의 효능 평가

1) 급성 신부전의 유발

실시예 1에서 준비한 SHP^{+/+} 마우스와 SHP^{-/-} 마우스를 각각 10마리씩 4개의 군으로 나누었다. 각 마우스에서 대조군은 corn oil 100 μ l씩을, 실험군은 페노파이크로이드 100mg/kg을 7일간 경구투여하였다. 이후, 엽산(FA, folic acid) 250mg/kg을 복강내 주사하여 인위적으로 급성 신부전을 유발하였다.

2) 체중 및 생존률 비교

1)에 의해 급성 신부전을 유발시킨 마우스에 대해 엽산의 주사 후 시간의 경과에 따른 생존률과 체중의 변화를 측정하고 그 결과를 도 1의 a와 b에 각각 도시하였다.

도 1의 a에서 엽산의 주사 후 SHP^{+/+} 마우스의 대조군에서는 엽산 주사 후 50%의 마우스가 폐사하였으나, 페노파이크로이드를 처리한 군에서는 1마리의 마우스만이 폐사하여 대조군에 비해 생존률이 크게 향상되었다. b의 체중 측정결과 또한 생존률에 대한 경향과 유사하여 대조군에서는 엽산의 주사에 의해 체중이 점차 감소하였으나, 페노파이크로이드 처리군에서는 체중의 변화가 유의적이지 않았다. 반면 SHP^{-/-} 마우스에서는 대조군에서 엽산의 주사에 의한 사망률이 현저히 가속화되어 3일 내에 모든 마우스가 폐사하였으며, 페노파이크로이드의 처리가 사망률을 완화시키지는 못하였다. 체중의 변화 역시 생존율에 대한 결과와 일치하였다.

상기 결과로부터 페노파이크로이드의 처리에 의한 SHP 발현의 증가에 의해 급성 신부전 유발 마우스의 생존률이 향상되었음을 알 수 있다.

3) 신장 세포분쇄액 중 사이토카인 비교

1)과 동일한 방법에 의해 엽산을 주사한 마우스를 엽산 주사로부터 36시간 쯤 이산화탄소를 사용하여 안락사시킨 후 신장을 적출하였다. 적출된 신장을 호모게나이저로 파쇄하여 얻은 세포분쇄액(kidney homogenate)으로부터 면역블랏팅에 의해 IL-1 β p17, 카스파제-1 p10을 분석하여 도 2의 a에 도시하였으며, 효소면역검사법(ELISA)에 의해 IL-1 β 및 IL-18을 분석하여 도 2의 b에 도시하였다.

[0030] 도 2의 a는 대조군에 비해 SHP^{-/-} 마우스에서 IL-1 β 의 성숙과 카스파제-1의 활성화가 증가하였음을 보여주며, SHP^{+/+} 마우스에서는 페노파이버레이트의 처리에 의해 IL-1 β 의 성숙과 카스파제-1의 활성화가 저해됨을 나타낸다. 도 2의 b는 페노파이버레이트를 처리한 SHP^{+/+} 마우스에서 IL-1 β 와 IL-18의 발현이 크게 감소하였음을 나타낸다. 그러나 SHP^{-/-} 마우스에서는 페노파이버레이트의 처리가 IL-1 β 의 성숙, 카스파제-1의 활성화이나 IL-1 β 와 IL-18의 발현을 크게 개선하지는 못하였다.

[0031] 이는 급성 신부전 유발 마우스에서 페노파이버레이트 처리에 의한 IL-1 β 의 성숙과 카스파제-1의 활성화 역시 SHP 발현의 증가에 기인함을 나타낸다.

[0032] 4) 조직 관측

[0033] 1)과 동일한 방법에 의해 엽산을 주사한 마우스를 엽산 주사로부터 36시간 췌 이산화탄소를 사용하여 안락사시킨 후 신장을 적출하였다. Cell 153, 348-361(2013) 및 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 13374-9, (2012)에 기재된 방법에 따라 한쪽 신장은 포르말린으로 고정하여 H&E 염색하고, 다른 한쪽은 1% 파라포름알데히드로 고정하여 면역형광염색하였다. H&E 염색을 위해서는 포르말린으로 고정한 신장 조직을 파라핀에 임베딩하여 7 μ m 두께의 절편을 생성하였으며, 면역형광염색을 위해서는 3 μ m 두께의 절편을 생성하여 neutrophils과 IL-1 β 특이적인 항체로 염색하였다.

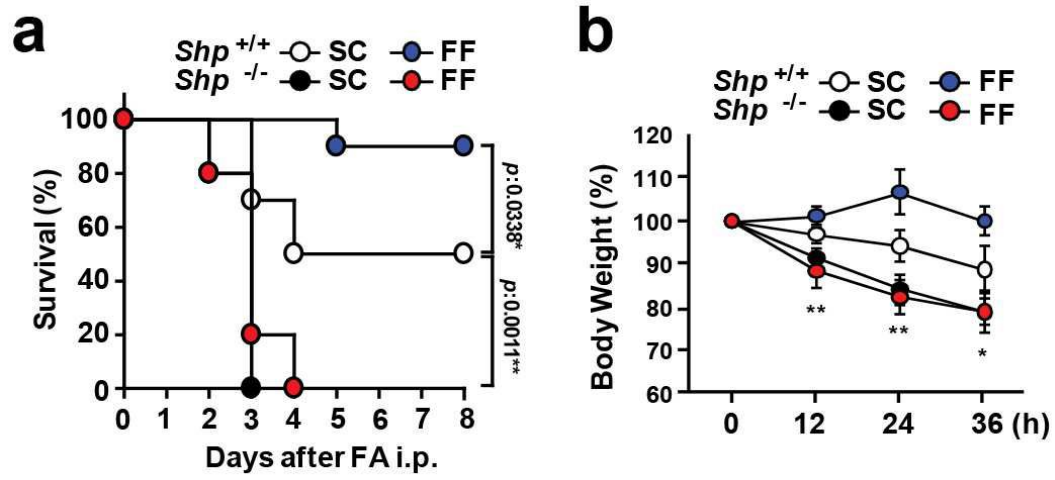
[0034] 도 3은 H&E 염색된 이미지로 상기 이미지로부터 세뇨관간질성 손상(tubulointerstitial damage) 정도에 의해 평가된 ANT histology score를 함께 도시하였다. 세뇨관간질성 손상은 다음의 표준적인 변수를 기준으로 평가하였다: 각 corticomedullary high-powered field내에 세관(tubules)의 비율이 0-25%=1; 5-50% = 2; 50-75% = 3; 75-100% = 4 (최소 10개의 무작위적으로 선택된 비교자 영역에 대해 신장병학자들이 맹검법에 의해 평가함). H&E 염색 이미지에서 Vehicle은 정상대조군이며, Folic acid는 엽산에 의해 급성 신부전을 유발시킨 군이고, FF+Folic acid는 페노파이버레이트 처리 후 급성 신부전을 유발한 군이다. Vehicle에 비해 급성 신부전 유발군에서는 세뇨관 괴사, 세관 상피의 평탄화, 세관 팽창, 세관 원주(cast) 형성, 세관 세포 핵 손실 등의 증거를 포함하는 병리적인 특징의 발생이 증가하였으며, SHP^{+/+} 마우스에 비하여 SHP^{-/-} 마우스에서 증가 정도가 더욱 현저하였다. 또한 페노파이버레이트를 처리한 SHP^{+/+} 마우스는 병리적인 현상이 크게 감소하였으나, SHP^{-/-} 마우스에서는 큰 차이를 나타내지 않았다.

[0035] 도 4는 각각 neutrophil(green)과 IL-1 β (red)의 면역형광조직염색 이미지로 각 군의 마우스 신장의 신수질/신피질 경계에서 간질 호중구 침윤과 IL-1 β 양성 세포를 각각 점선으로 표시하였다. 대조군에 비해 급성 신부전 유발군에서는 세뇨관간질 호중구 침윤과 IL-1 β 의 발현이 크게 증가하였다. SHP^{+/+} 마우스의 페노파이버레이트 처리군에서는 세뇨관간질 호중구 침윤과 IL-1 β 의 발현이 크게 감소하여 대조군과 유사한 양상을 나타내었으나, SHP^{-/-} 마우스에서는 페노파이버레이트 처리의 효과가 없었다.

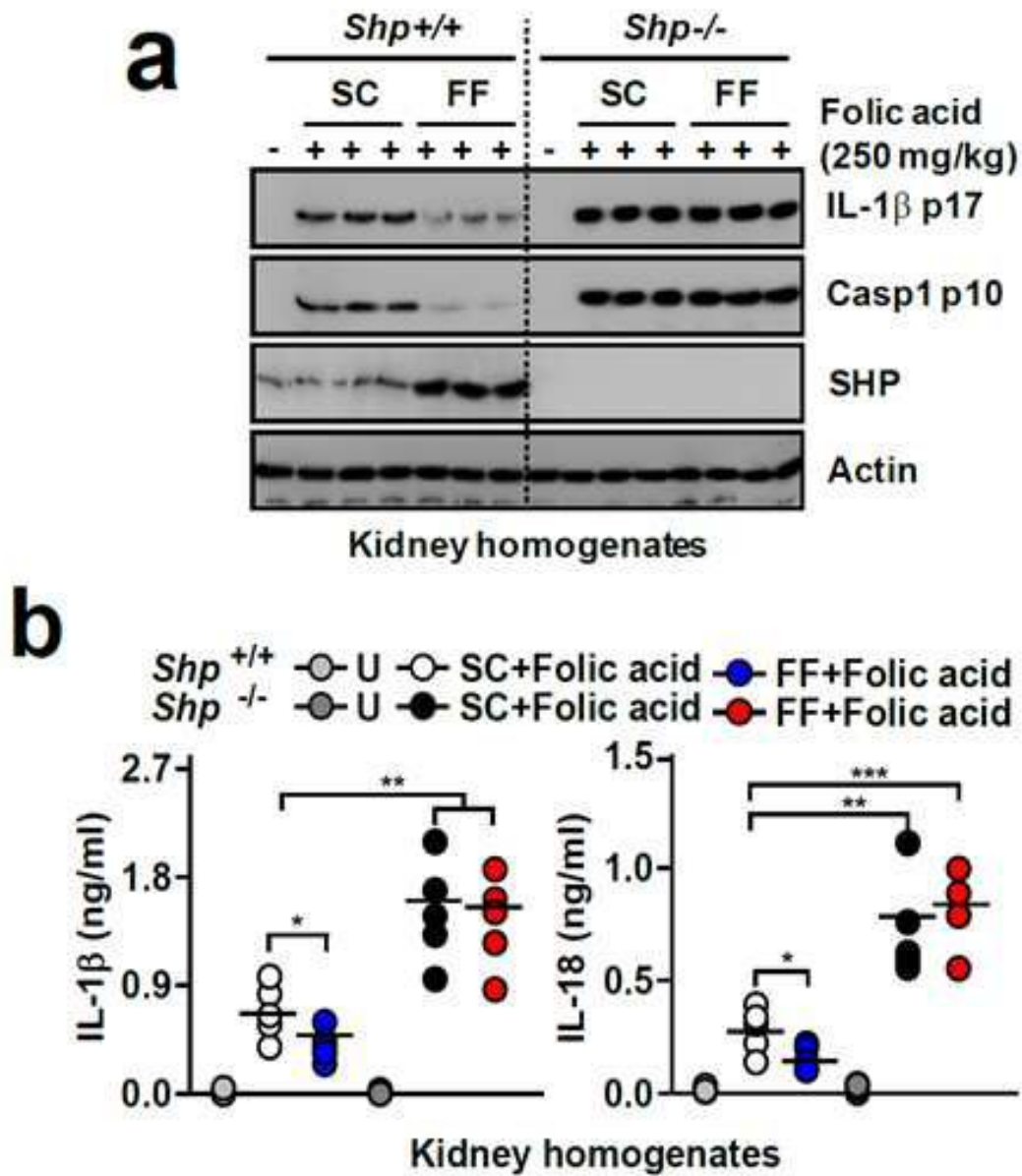
[0036] 이러한 결과들은 SHP 발현의 증가가 급성 신부전에 의한 호중구 침윤과 IL-1 β 발현을 효과적으로 억제함을 나타낸다.

도면

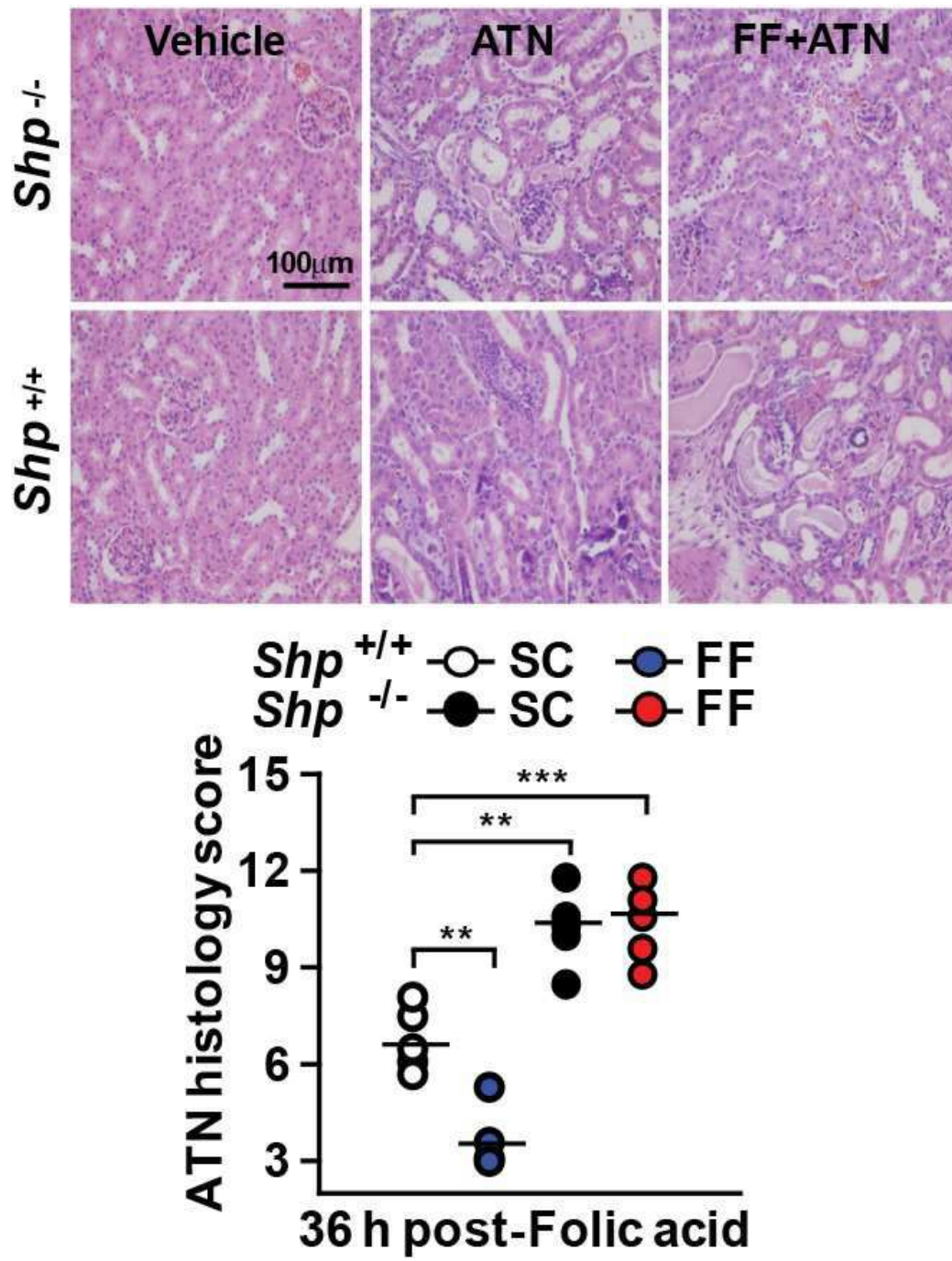
도면1



도면2



도면3



도면4

