



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0086746
(43) 공개일자 2024년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)
C07K 14/35 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/164 (2013.01)
A61P 29/00 (2023.02)
(21) 출원번호 10-2022-0162295
(22) 출원일자 2022년11월29일
심사청구일자 2022년11월29일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김동호
대전광역시 중구 과례로 101, 301호(대사동, 더힐 하우스)
우경호
대전광역시 중구 선화로12번길 5, 203호(용두동)
(74) 대리인
최규환

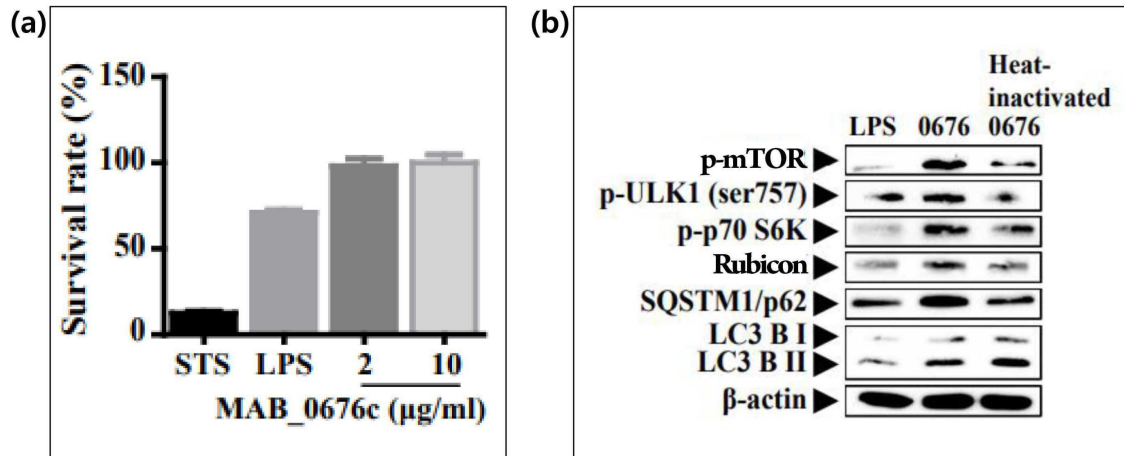
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가포식 활성 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가포식 활성 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내(*in vitro*) 세포의 자가포식(*autophagy*) 활성 조절 방법, 키트 및 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/35 (2013.01)

(72) 발명자

박호성

대전광역시 동구 대전로 872, 308호(삼성동, 맑은
미소아파트)

최철희

대구광역시 수성구 상록로 41, 102동 2103호(범어
동, 범어태왕아너스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465036850
과제번호	HI22C0973000022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병 예방·치료 기술개발사업
연구과제명	비결핵 항산균 감염 치료를 위한 선도 물질 개발 및 최적화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내(*in vitro*) 세포의 자가포식(*autophagy*) 활성 조절 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 MAB_0676c 단백질은 mTOR (mammalian target of rapamycin) 신호전달 경로를 활성화시키고, Rubicon (Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein)의 발현을 증가시켜 자가포식 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 활성 조절 방법.

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 시험관 내(*in vitro*)에서 세포의 자가포식(*autophagy*) 활성 조절용 키트.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내(*in vitro*) 세포의 자가포식(*autophagy*) 활성 조절용 조성물.

청구항 5

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 항염증용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 MAB_0676c 단백질은 면역세포에서 인터루킨-10 (Interleukin-10)의 생산을 증가시키고, 종양괴사인자- α (Tumor Necrosis Factor- α)의 생산을 감소시키는 것을 특징으로 하는 항염증용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가포식(*autophagy*) 활성 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비결핵 항산균(Nontuberculous mycobacteria; NTM)은 폐 질환을 비롯한 다양한 감염증을 야기하며, 과거에는 면역력이 저하된 사람에게서 주로 질병을 일으키는 기회 감염균(opportunistic pathogen)으로 알려져 있었으나 최근에는 정상인에게서도 질병을 유발한다는 보고가 있다. NTM 감염으로 진단되는 사례가 증가하고 있으며, 국내에서 폐질환을 야기하는 주된 원인균은 마이코박테리움 아비움 콤플렉스(*Mycobacterium avium* complex)와 마이코박테리움 압세수스(*M. abscessus*)로 알려져 있다. 높은 항생제 내성과 독성을 가지는 마이코박테리움 압세수스는 항생제만으로는 치료가 어렵기 때문에, 효과적인 마이코박테리움 압세수스 감염 제어를 위해서는 병원성(pathogenicity) 연구가 필요하다.

[0003] 자가포식(*autophagy*)은 세포 내 손상된 소기관 및 병원균 등을 자가포식소체(*autophagosome*)를 통하여 격리한 뒤, 라이소좀(*lysosome*)과의 결합을 통해 분해하는 과정이다. 자가포식은 mTOR (mammalian target of rapamycin 또는 mechanistic target of rapamycin)와 AMPK (AMP-activated protein kinase)에 의해서 조절된다. mTOR에 의하여 ULK (UNC-51-like kinase) 및 p70 S6K가 활성화되면 자가포식은 저해되지만, AMPK에 의하여 신호전달이 활성화가 되면 자가포식이 활성화되는 기전을 가지고 있다. 이외에도 자가포식소체를 생성하는데 관여하는 LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3) 시스템과 Atg (*autophagy*-

related) 시스템이 존재하며, 자가포식소체와 라이소좀 결합에 관여하는 tether protein, SNARE 복합체 등을 통하여 자가포식이 조절된다. Rubicon (Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein)은 Beclin 복합체(complex)와 결합을 통해 자가포식소체와 라이소좀의 결합을 억제함으로써, 자가포식을 억제하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1771851호에는 'AMPK-Skp2-CARM1 경로에 의해 매개되는 자가포식 조절 방법 및 그 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제2302304호에는 '2-푸코실락토오스를 포함하는 자가포식 활성 유도용 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 'MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 자가포식 활성 억제용 조성물'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) 감염 시 숙주세포에서 자가포식을 억제하는 Rubicon 단백질의 발현을 증가시키는 균단백을 발굴하고자 하였다. 이를 위해, 2차원 젤 전기영동(2D electrophoresis)을 통하여 마이코박테리움 압세수스 배양액으로부터 균단백을 분리 및 동정하였고, 상위 5종의 균단백을 대장균 발현 시스템을 이용하여 재조합하였다. 그 후, 재조합 균단백 5종을 마우스 대식세포주에 처리한 결과, MAB_0676c 단백질(서열번호 2)이 mTOR 신호전달 경로를 활성화시키고, Rubicon 단백질의 발현을 증가시키며, IL-10의 생성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통해, MAB_0676c 단백질이 자가포식 억제제 및 면역 억제제로서 기능할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내(*in vitro*) 세포의 자가포식(autophagy) 활성 조절 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 시험관 내에서 세포의 자가포식 활성 조절용 키트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내 세포의 자가포식 활성 조절용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 항염증용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에서는 균단백 MAB_0676c가 자가포식 뿐만 아니라 면역반응의 억제에도 관여함을 확인하였다. 본 발명의 균단백 MAB_0676c는 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) 감염증의 신규한 치료용 타깃이 될 수 있으며, 자가포식과 관련된 질환에도 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1(a)는 *E. coli* 발현 시스템을 통해 정제된 재조합 균단백 MAB_0676c의 처리에 따른 대식세포(Raw 264.7)의 생존율 분석 결과이며, (b)는 MAB_0676c 처리에 따른 대식세포의 자가포식 활성과 관련한 단백질의 발현 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다. STS: sodium tanshinone IIA sulfonate, LPS: lipopolysaccharide.

도 2는 대식세포에서 MAB_0676c 처리에 따른 사이토카인 생성 수준을 ELISA로 분석한 결과이다.

도 3(a)는 MAB_0676c를 처리한 대식세포에서 IL-10 신호전달 경로 물질인 STAT3의 발현 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과이고, (b)는 IL-10 신호전달 경로의 차단을 통한 자가포식 활성과 관련한 단백질의 발현 변화를 분석한 웨스턴 블랏 결과이다. CTS (cryptotanshinone) 및 S31 (S3I-201): JAK2/STAT3 신호전달 경로의 억제제.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 세

포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내(*in vitro*) 세포의 자가포식(*autophagy*) 활성 조절 방법을 제공한다.

- [0013] 본 발명에 따른 자가포식 활성 조절 방법에 있어서, 상기 MAB_0676c는 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) ATCC 19977 (Sequence ID: CU458896.1)의 locus CAM60773에 존재하는 단백질로, HIT-like (histidine triad) protein으로 알려져 있지만, 아직까지 그 기능은 뚜렷하게 밝혀진 것이 없다.
- [0014] 본 발명에 따른 MAB_0676c 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 본 발명에 있어서, 용어 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 시험관 내(*in vitro*) 세포의 자가포식 활성 조절을 의미한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 MAB_0676c 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 상기 MAB_0676c 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 겹)를 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 용어 "자가포식"은 리소좀을 사용하여 필요없거나 또는 이상기능을 나타내는 세포 내 소기관의 분해에 관여하는 기본적인 이화작용(*catabolism*) 기작을 의미한다. 영양결핍과 같은 특수한 상황에서는 세포 내 소기관을 파괴하여 세포 내 에너지 수준을 유지함으로써 세포 생존성을 향상시키는 효과를 나타낼 수 있다. 상기 자가포식은 진화적으로 보존적인 과정으로, 모든 진핵세포에서 나타난다. 상기 자가포식은 크게 3단계로 진행된다. 1단계는 자가포식이 유도되는 단계로, 영양 또는 성장인자의 결핍, 또는 저산소 조건에서 mTOR이 불활성화되고 ATG1 (autophagy related 1)이 활성화되어 자가포식이 유도된다. 2단계는 자식포(*autophagosome*)가 형성되는 단계로, 세포질성 LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3 α)-I이 절단되고 지질화되어 LC3-II로 전환되게 되고 자식포 막에 존재하게 된다. 상기 LC3-II는 자식포 마커로 알려져 있다. 3단계는 상기 자식포와 리소좀의 융합(*fusion*) 단계로, 상기 리소좀에 의해 세포내 소기관이 분해된다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 시험관 내(*in vitro*) 세포의 자가포식 활성 조절 방법은, 바람직하게는 상기 MAB_0676c 단백질이 mTOR 신호전달 경로를 활성화시키고, Rubicon (Run domain Beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein)의 발현을 증가시켜 자가포식 활성을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명에 사용되는 단백질은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 특히 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들면 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 원핵 또는 진핵세포 세포 예를 들면 세균, 곤충세포 또는 포유류 세포에 전달하여 과발현시킨 후 정제하여 사용할 수 있다. 또한, 상기 단백질은 검출의 편의를 위해 다양한 표지물질, 예를 들면 비오틴, 형광물질, 방사선 동위원소 등과 같은 것으로 공지된 방법 또는 시중의 단백질 표지 키트를 사용하여 표지될 수 있으며, 표지된 물질에 적합한 검출기기를 사용하여 검출될 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 바람직하게는 면역세포일 수 있고, 더욱 바람직하게는 대식세포(*macrophage*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 시험관 내(*in vitro*)에서 세포의 자가포식(*autophagy*) 활성 조절용 키트를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 자가포식 활성 조절용 키트는, mTOR 신호전달 경로를 활성화시키고, Rubicon의 발현을 증가시켜 자가포식 활성을 억제하는 활성을 가진 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하고 있으므로, 시험관 내에서 세포의 자가포식 활성을 억제할 수 있다.
- [0022] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 세포에 처리하는 단계를 포함하는 시험관 내(*in vitro*) 세포의 자가포식(*autophagy*) 활성 조절용 조성물을 제공한다. 본 발명의 자가포식 활성 조절용 조성물은 mTOR 신호전달 경로를 활성화시키고, Rubicon의 발현을 증가시켜 자가포식 활성을 억제하는 활성을 가진 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하고 있으므로, 시험관 내에서 세포의 자가포식 활성을 억제할

수 있다.

[0023] 자가포식 조절에 이상이 있는 경우, 변성 단백질의 축적이 초래되어 신경변성질환이 발생하는 것으로 알려져 있으며(Komatsu et al., (2006), Nature, 441:880-884), 자가포식은 암세포에서 활성화(Ding et al., (2009), Mol. Cancer Ther., 8(7):2036-2045)되며, 자가포식 억제제가 항암 치료제로서 작용하는 것으로 알려져 있다(Maiuri et al., (2007) Nat. Rev. Cell Biol. 8:741-752). 또한 암 및 신경변성질환에 추가하여 자가포식은 간 질환, 심장 질환, 근육 질환 및 체장 질환과 연관된 것으로 알려져 있다(Levine and Kroemer, (2008), Cell, 132:27-42; Fortunato and Kroemer, (2009), Autophagy, 5(6):850-853). 따라서 본 명세서에 개시된 자가포식 활성 조절 방법 및 자가포식 활성 조절용 조성물은 자가포식 조절 이상으로 인한 다양한 질환의 치료 또는 예방에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 MAB_0676c 단백질을 유효성분으로 포함하는 항염증용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 MAB_0676c 단백질은 면역세포에서 항염증성(anti-inflammatory) 사이토카인인 인터루킨-10 (Interleukin-10)의 생산을 증가시키고, 전염증성(pro-inflammatory) 사이토카인인 종양괴사인자- α (Tumor Necrosis Factor- α)의 생산을 감소시킬 수 있으므로, 항염증용 약학 조성물의 유효성분으로 작용할 수 있다.

[0027] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 재료 및 방법

[0030] 1. 유전자 클로닝 및 단백질의 발현 및 정제

[0031] PCR 주형으로 사용하기 위한 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) ATCC 19977 균주의 게놈 DNA는 제조사의 프로토콜에 따라 Purehelix™ Genomic DNA Prep 키트(Nanohelix, GSBA-100)를 사용하여 추출하였다. pET22b(Merck Millipore, 69744) 플라스미드는 대장균 BL21(Real Biotec Corporation, RH217)에서 재조합 단백질의 발현을 위한 벡터로 사용되었다. 대상 유전자는 EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Takara Bio, RR310A)와 프라이머 세트를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 유전자는 제한효소 BamHI-HF® 및 HindIII-HF® (New England Biolabs, R3136T 및 R3104T)로 처리한 후 pET22b에 라이게이션하여 C-말단에 His-tag을 가진 표적 단백질 발현 플라스미드를 제작하였다. 모든 컨스트럭트는 시퀀싱(MAGROGEN)에 의해 검증되었다. 형질전환은 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었다. 재조합 플라스미드를 보유하고 있는 대장균 BL21 세포는 암피실린(LPS Solution, AMP25 25g)이 함유된 LB 배지(LPS Solution, LB-05)에서 OD₆₀₀ 값이 약 0.6에 도달할 때까지 37℃에서 배양하였다. 재조합 단백질의 생성은 1 mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; LPS Solution, IPTG025)를 첨가하여 유도하고 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. 배양된 세균을 수확하고, 용해 버퍼(20 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 8.0)로 세척한 후, 얼음 위에서 초음파 처리로 파쇄하였다. 재조합 단백질은 nickel-nitrilotriacetic acid (Invitrogen, R901-15) gravity-flow 크로마토그래피에 의해 정제되었다. 정제된 단백질은 PBS(LPS Solution, CBP007A)에서 투석하여 0.22 μ m 주사기 필터(GVS, FJ25ASCCA002DL01)를 통해 여과한 후 -80℃에서 보관하였다.

[0033] 2. 면역블롯팅

[0034] 세포를 수거하고, 프로테아제 억제제 칵테일(Thermo Fisher Scientific, 78430)이 함유된 RIPA 버퍼(Thermo Fisher Scientific, 89900)를 사용하여 30분간 얼음 위에서 용해시켰다. 세포 용해물을 원심분리한 후 상등액을 취하였고, 단백질은 Bradford 검정(Bio-Rad, 5000006)을 이용하여 정량하였다. 동량의 단백질을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 로딩 및 분리한 후 PVDF 멤브레인(Merck Millipore, IPVH00010)에 트랜스퍼 하였다. 그 후 멤브레인을 EZblock Chemi(ATTO, AE-1475)로 블로킹한 후 4℃에서 1차 항체로 밤새 배양하였다. 웨스턴 블랏에 사용된 1차 항체는 LC3 A/B (Cell Signaling Technology, 4108S), phospho-ULK1 (Cell Signaling Technology, 6888S), Rubicon (Thermo Fisher Scientific, PA5-38017),

SQSTM1/p62 (Cell Signaling Technology, 5114S), SOCS3 (abcam, ab16030), STAT3 (Cell Signaling Technology, 9139S), phospho-STAT3 (Cell Signaling Technology, 9145S), phospho-mTOR (Cell Signaling Technology, 5536S) 및 β -Actin (Cell Signaling Technology, 4970S)이다. 1차 항체 반응 후, 멤브레인을 세척하고, HRP가 결합된 2차 항체(Sigma-Aldrich, 401215 및 401353)로 1시간 동안 반응시켰다. 단백질을 WesternBright[®] ECL(advansta, K-12045-D20)을 사용하여 검출하였으며, ChemiDoc XRS+ 시스템(Bio-Rad, 1708265)을 사용하여 시각화되었다.

3. Sandwich ELISA

무세포 상등액을 수집하여 효소결합면역흡착측정법(ELISA)으로 사이토카인 농도를 측정할 때까지 -80°C 에서 냉동 보관하였다. IL-10(Invitrogen, 88-7105-88), TNF- α (Invitrogen, 88-7324-88), IL-6(Invitrogen, 88-7064-88) 및 IL-12p70(Invitrogen, 88-7121-88)용 ELISA 검사 키트는 제조사의 프로토콜에 따라 사용되었다. 간단하게, ImmunoPlate (SPL Life Science, 32296)는 각 사이토카인에 대한 포획 항체가 포함된 코팅 완충액 $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ 로 4°C 에서 밤새 코팅되었다. 모든 세척 단계는 0.05% Tween 20(Bio-rad, 1706531)을 함유하는 PBS로 수행하였다. 상기 플레이트들은 $250\ \mu\text{l}/\text{well}$ 의 ELISA/ELISPOT Diluent로 상온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 세척 후 시료 $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ 을 최소 1:20으로 희석하여 4°C 에서 밤새 배양하였다. 플레이트를 세척한 후, 각 사이토카인에 특이적인 검출 항체 $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ 를 첨가하여 약한 흔들림 하에서 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 각 웰을 세척한 뒤, $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ 의 스트렙타비딘-HRP 또는 아비딘-HRP로 상온에서 30분간 반응시켰다. 플레이트 세척 후, 각 웰에 $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ 의 TMB 기질을 첨가하고 배양하였다. 2 M 황산(Sigma-Aldrich, 339741-500ML) $100\ \mu\text{l}/\text{well}$ 을 첨가하여 발색을 중단시키고, 450 nm와 570 nm로 설정된 SpectraMax ABS 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices)로 흡광도를 측정하였다.

실시예 1. 재조합 MAB_0676c 균단백의 정제, 세포독성 및 자가포식 활성 영향 분석

재조합 MAB_0676c 균단백을 정제한 후 아가로스 겔에 로딩한 결과 예측된 13 kDa 크기에서 밴드가 확인되었다(데이터 미제시). 상기 정제된 재조합 MAB_0676c의 세포독성을 확인하기 위해, Raw 264.7에 2 또는 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MAB_0676c를 처리하고 24시간 동안 배양하여 세포 생존율을 분석하였으며, STS와 LPS를 각각 $100\ \text{nM}$ 및 $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 실험군을 양성 대조군으로 사용하였다. 세포 생존율은 무처리 대조군의 세포 생존율과 비교하여 나타내었다. 세포독성 분석 결과, STS와 LPS 처리군에서는 세포 생존율이 감소하였지만, MAB_0676c가 처리된 실험군에서는 세포 생존율이 감소하지 않아 본 발명의 재조합 MAB_0676c가 세포독성이 없음을 알 수 있었다(도 1a). 이후, 모든 실험에서 MAB_0676c를 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하여 세포사멸에 의한 자가포식 억제가 아님을 전제로 하였다.

본 발명자는 자가포식 활성화에 미치는 MAB_0676c의 영향을 확인하기 위해, 대식세포에 MAB_0676c를 처리하고 자가포식과 관련된 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 실험군은 $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS와 $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MAB_0676c 및 동량의 열로 변성시킨(heat-inactivated) MAB_0676c를 각각 처리하고 24시간 배양한 후 단백질 발현 변화를 관찰하였다. 그 결과, $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MAB_0676c 처리군에서 자가포식 억제 기전인 mTOR 신호전달 단백질(p-mTOR, p-ULK과 p-p70 S6K)들과 Rubicon 단백질의 발현이 증가하였으며, 자가포식 마커인 p62와 LC3 II의 발현 또한 증가되어 있음을 확인할 수 있었다(도 1b). 이러한 발현 변화는 열로 변성시킨 MAB_0676c와 LPS를 처리한 대식세포에서는 관측되지 않아, MAB_0676c 균단백이 자가포식을 억제한다는 것을 확인할 수 있다.

실시예 2. 재조합 MAB_0676c의 사이토카인 생성 유도능 분석

본 발명자는 재조합 MAB_0676c 균단백이 대식세포에서 사이토카인 생성에 미치는 영향을 분석하기 위해, 무처리 대조군, $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 LPS, 1, 5 또는 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MAB_0676c를 대식세포에 처리하고 24시간 뒤 배양액을 회수하여 샌드위치 ELISA 방법을 통해 IL-6, TNF- α , IL-10 및 IL-12p70의 생성량을 분석하였다. IL-6, TNF- α 및 IL-12p70은 전염증성 사이토카인이며, IL-10은 항염증성 사이토카인이다.

ELISA 분석 결과, 재조합 MAB_0676c는 대식세포에서 전염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-12p70의 생성을 농도 의존적으로 감소시키며, 항염증성 사이토카인인 IL-10의 생성은 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(도 2). 상기 결과는 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) 감염 시 MAB_0676c 균단백에 의

해 IL-10의 생성이 증가되는 것임을 보여주었다.

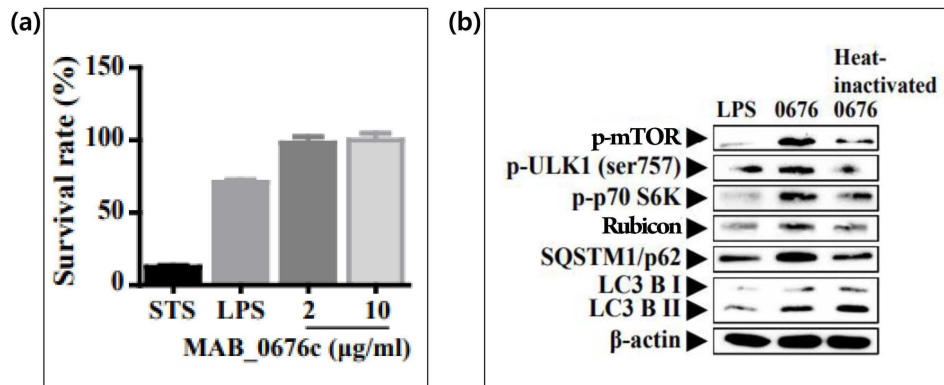
[0047] 실시예 3. STAT3 신호전달 경로를 통한 MAB_0676c의 자가포식 억제

[0048] IL-10 신호전달과 자가포식 활성화의 연관성을 검증하기 위해, 본 발명자는 IL-10 수용체-차단 항체, CTS (cryptotashinone) 및 S31-201 (이하, S31)과 같은 STAT3의 억제제를 사용하였다. 대식세포를 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IL-10 수용체-차단 항체, 20 μM 의 CTS 또는 75 μM 의 S31로 30분 동안 전처리한 후, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 MAB_0676c를 처리하고 24시간 동안 배양한 후, STAT3 경로 및 자가포식 활성화 관련 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

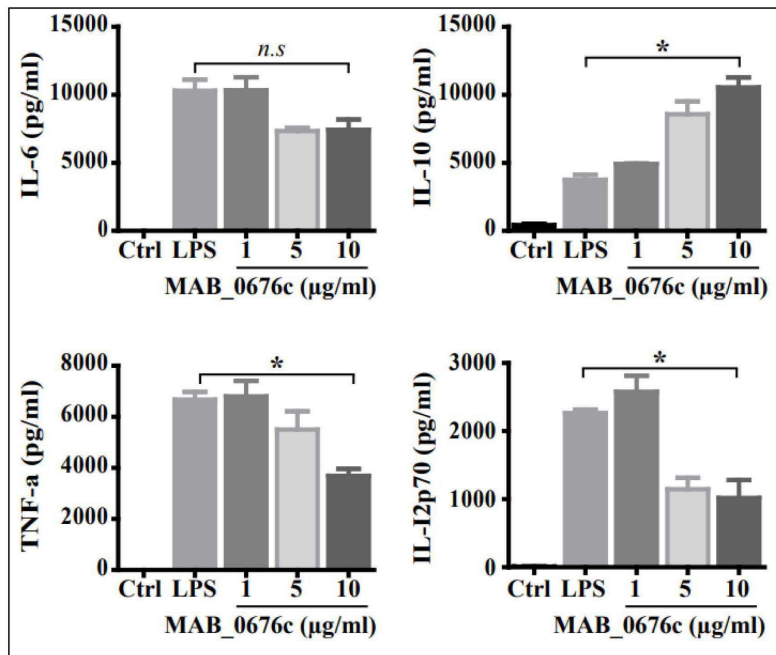
[0049] 그 결과, MAB_0676c를 24시간 동안 처리하였을 때, 대식세포에서 IL-10 신호전달 경로인 p-STAT3의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었고(도 3a 첫 번째 라인), 이는 MAB_0676c에 의해 IL-10이 증가된다는 것을 뒷받침하였다. 또한, IL-10 수용체 차단 항체, CTS 또는 S31가 존재하는 상태에서는 MAB_0676c에 의해 증가되었던 자가포식 억제 신호전달 물질인 p-mTOR 및 Rubicon의 발현이 감소되었다. 또한, IL-10 신호의 차단이 p-mTOR 및 Rubicon 뿐만 아니라 p-ULK 및 p-p70 S6K의 발현을 방해하였다. LC3 B II의 축적은 IL-10 수용체 차단 항체가 존재하는 상태에서 사라졌다. 이와 같은 결과는 MAB_0676c의 자가포식 활성화 억제 효과가 IL-10 신호전달 경로의 활성화에 의해 발생함을 시사하였다.

도면

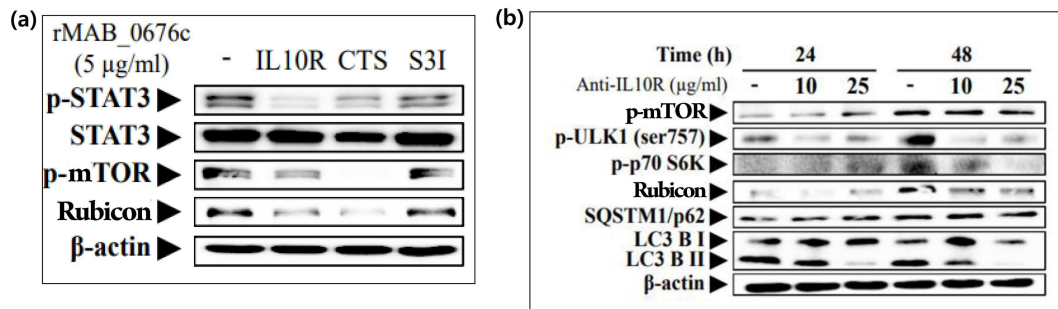
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.