



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0022193
(43) 공개일자 2020년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/4985 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/4985 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0098033

(22) 출원일자 2018년08월22일

심사청구일자 2018년08월22일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

홍지영

강원도 춘천시 동내면 외솔길19번길 80-7

김영미

강원도 춘천시 국사봉길 7, 104동 301호 (퇴계 우성아파트)

이재준

강원도 춘천시 삭주로 77

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 12 항

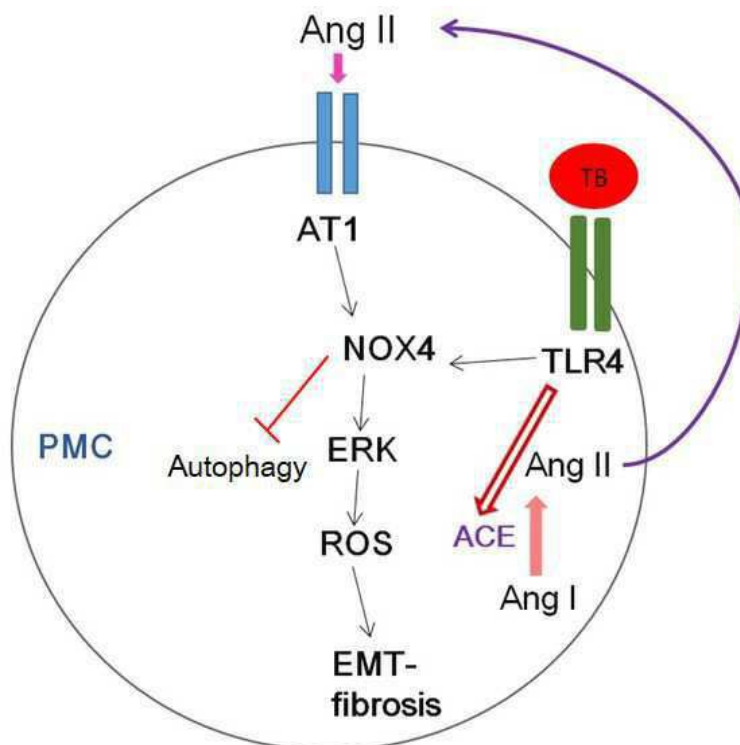
(54) 발명의 명칭 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

결핵성 흉막염은 종종 호흡 부전의 원인이 되는 흉막 섬유증을 일으킨다. NOX (NADPH oxidase) 효소는 폐에서 지혈 및 숙주 방어기능을 제공한다. 그러나 결핵성 흉막염에서 NOX4 신호전달의 역할은 알려져 있지 않다. 본 발명자들은 시험관내 흉막 중피세포 실험 및 BCG 흉막 감염 마우스 모델을 이용하여 결핵성 흉막 섬유화에서 NOX4 신

(뒷면에 계속)

대표도 - 도10



호전달의 역할을 규명하였다. 본 연구 결과는 흉막 중피세포에서 열처리 사멸 결핵균이 NOX4-ROS 생성 및 상피간엽이행을 유도함을 제안한다. TLR4 저해제인 TAK-242와 로자탄은 NOX4-ROS 생성 및 이후 섬유화를 감소시켰다. 배양한 흉막 중피세포에서 SiRNA NOX4 선처리는 열처리 사멸 결핵균 유도 콜라겐-1 합성과 상피간엽이행을 억제하였다. NOX4는 ERK 신호전달 활성화를 통해 열처리 사멸 결핵균-유도 상피간엽이행 및 세포내 활성산소종 생성을 매개한다. BCG 유도 흉막염 모델에서 BCG+SiNOX4 군 (BCG 이후 SiNOX4 IV 후처리)은 BCG+SiCon 군 (BCG 이후 SiCon IV 후처리)과 비교하여 염증성 흉막 세포 모집, 염증성 사이토카인 배출 및 중피세포 섬유화를 감소시켰다.

이러한 결과들은 NOX4-ERK-ROS가 열처리 사멸 결핵균 유도 흉막 섬유증을 TLR4 및 AT1R을 통해 조절함을 말해준다. NOX4는 결핵성 흉막 섬유화에서 새로운 치료 표적이 될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 39/39533 (2013.01)

A61P 11/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017M3A9E8033225

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 임상과학자연구역량강화사업

연구과제명 인공 호흡기 관련 폐렴에 영향을 미치는 마이크로바이옴 요인 발굴 및 타겟 치료 연구

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교

연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1C1B5017879

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 생애초연구

연구과제명 결핵성 흉막염에서 Calpain signaling pathway의 역할 연구: BCG 유도 흉막염 쥐모델을 이용한 in vivo study

기 여 율 1/2

주관기관 한림대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

NOX4 억제제를 포함하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 2

청구항 1에 있어서,

NOX4 억제제는 NOX4에 특이적인 siRNA임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 3

청구항 1에 있어서,

NOX4 억제제는 NOX4에 특이적인 항체임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 4

청구항 2에 있어서,

상기 NOX4에 특이적인 siRNA는 핵산 서열이 서열번호 1임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 5

청구항 2에 있어서,

상기 NOX4에 특이적인 siRNA는 서열번호 4의 핵산서열을 표적으로 하여 생성된 것임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 6

청구항 3에 있어서,

NOX4에 특이적인 항체는 서열번호 2 또는 서열번호 3을 항원결정부위로 하여 생성되는 단일클론항체임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 NOX4 발현 억제제는 NOX4 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 8

청구항 1에 있어서,

NOX4 억제제는 GKT137831, GKT136901, GLX351322, APX-155 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 9

TLR4 억제제를 포함하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 10

청구항 9에 있어서,

TLR4 억제제는 TAK-242, C34 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 11

AT1R 억제제를 포함하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

청구항 12

청구항 11에 있어서,

AT1R 억제제는 타소사르탄(Tasosartan), 트라닐라스트(Tranilast), 아질사르탄(Azilsartan), 로자탄 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵성 흉막 섬유증을 예방 또는 치료할 수 있는 약학 조성물에 관한 것으로서, NOX4 억제제, TLR4 억제제 또는 AT1R 억제제를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵은 세계적으로 아홉 번째 사망 원인이고, 단일 감염체로 인한 사망 원인으로는 최고이다(1). 가장 일반적인 폐외 결핵인 흉막 결핵 (Pleural tuberculosis)은 삼출성 흉막 유출 (exudative pleural effusion) 및 흉막 섬유화를 일으킨다(2). 치료가 성공적으로 완료된 경우에도, 환자의 절반가량에서 흉막 비후 (pleural thickening)가 발생한다(3). 심한 경우에는 비가역적인 흉막 섬유화가 만성 호흡 부전증을 유발하고 삶의 질을 낮출 수 있다(4). 따라서, 결핵성 흉막 섬유증의 발병을 이해하고 새로운 치료 표적을 찾는 것이 필요하다.

[0003] 섬유증은 염증 이후 세포외 기질 (ECM)의 과다한 침착으로 정의된다. 흉막 중피세포 (Pleural mesothelial cell; "PMC")는 흉막섬유증 및 결핵성 흉막염 (TB pleurisy)의 면역반응에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(4). *M.tuberculosis* 또는 BCG에 대한 반응에서 흉막 중피세포에서의 관련 신호전달에 대한 연구 결과를 보고한 것이 있었다(4-6).

[0004] 산화 스트레스는 섬유증에서 중요한 역할을 수행하며 NADPH 옥시데이즈 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, 이하 "NOX"와 혼용함)는 활성산소종의 주요 원천이다(7). NOX4는 특발성 폐섬유증, 블레오마이신 유도 폐손상 및 폐암에서 상향조절되었다(8-11). NOX4가 생성한 활성산소종은 천식에서 기도 평활근의 과다수축 및 과산소증 유도 폐부전 (hyperoxia-induced lung injury)에서 폐포 모세혈관 장벽 기능장애를 매개하는 것으로 제시된 바 있다(12,13).

[0005] 그러나 결핵성 흉막염에서 NOX4의 역할은 연구된 바가 없다. 본 발명자들은 첫째, NOX4 활성화가 결핵 감염 후

콜라겐 합성 및 흉막 중피세포의 증식에서 중요한 역할을 수행하며, 둘째, 결핵 감염 후 NOX4 siRNA를 이용한 NOX4 신호전달 저해가 흉막 섬유화를 감소시킨다는 가설을 세웠다. 본 발명에서는 열로 사멸한 *M. tuberculosis* 처리 후의 흉막 중피세포 모델과 BCG 유도 흉막염 마우스 모델을 이용하였다. 본 발명자들은 NOX4 관련 신호전달 경로 및 그 기저의 기작을 연구하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) WHO: Global tuberculosis report 2017. 2017.
- (비특허문헌 0002) Seibert AF et al., Chest 1991, 99:883-886.
- (비특허문헌 0003) de Pablo A et al., Chest 1997, 112:1293-1297.
- (비특허문헌 0004) Yang J et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2016, 311:L145-153.
- (비특허문헌 0005) Berg JM et al., Toxicol In Vitro 2013, 27:24-33.
- (비특허문헌 0006) Hwanga EH et al., Cytokine 2017, 95:80-87.
- (비특허문헌 0007) Bocchino M et al., PLoS One 2010, 5:e14003.
- (비특허문헌 0008) Hecker L et al., Nat Med 2009, 15:1077-1081.
- (비특허문헌 0009) Crestani B et al., Int J Biochem Cell Biol 2011, 43:1086-1089.
- (비특허문헌 0010) Amara N et al., Thorax 2010, 65:733-738.
- (비특허문헌 0011) Zhang C et al., Oncotarget 2014, 5:4392-4405.
- (비특허문헌 0012) Sutcliffe A et al., Am J Respir Crit Care Med 2012, 185:267-274.
- (비특허문헌 0013) Pendyala S et al., Antioxid Redox Signal 2009, 11:747-764.
- (비특허문헌 0014) Chavez-Galan L et al., Am J Pathol 2016, 186:2364-2377.
- (비특허문헌 0015) Segueni N et al., PLoS One 2015, 10:e0126058.
- (비특허문헌 0016) Ashcroft T et al., J Clin Pathol. 1988;41(4):467-70.
- (비특허문헌 0017) Light RW et al., Ann Intern Med. 1972;77(4):507-13.
- (비특허문헌 0018) Viridis A et al., Int J Hypertens. 2011;2011:916310.
- (비특허문헌 0019) De Batista PR et al., PLoS One. 2014;9(8):e104020.
- (비특허문헌 0020) Nakashima T et al., Hypertens Res. 2015;38(10):649-55.
- (비특허문헌 0021) Bernard K et al., Antioxid Redox Signal 2014, 20:2838-2853.
- (비특허문헌 0022) Brown DI et al., Free Radic Biol Med 2009, 47:1239-1253.
- (비특허문헌 0023) Ogier-Denis E et al., Semin Immunopathol 2008, 30:291-300.
- (비특허문헌 0024) Fu P et al., Am J Respir Cell Mol Biol 2013, 48:477-488.
- (비특허문헌 0025) Uh ST et al., Lung 2013, 191:345-351.
- (비특허문헌 0026) Varagic J et al., J Hypertens 2012, 30:1766-1774.
- (비특허문헌 0027) Colmont CS et al., Nephrol Dial Transplant 2011, 26:4079-4090.
- (비특허문헌 0028) Kato S et al., J Am Soc Nephrol 2004, 15:1289-1299.
- (비특허문헌 0029) Zhang X et al., Inflammation 2017, 40:154-165.

- (비특허문헌 0030) Yang J et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 2011, 301:E132-144.
- (비특허문헌 0031) Meng Y et al., Antioxid Redox Signal 2015, 22:241-258.
- (비특허문헌 0032) Bedard K et al., Physiol Rev 2007, 87:245-313.
- (비특허문헌 0033) Aggarwal S et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2016;311(2):L433-52.
- (비특허문헌 0034) Lam A et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2017;313(2):L218-L29.
- (비특허문헌 0035) Gu X et al., Exp Cell Res. 2017;354(2):71-7.
- (비특허문헌 0036) Pan M et al., Am J Respir Cell Mol Biol. 2018.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 결핵성 흉막 섬유증에 대한 효과적인 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 결핵성 흉막염은 종종 호흡 부전의 원인이 되는 흉막 섬유증을 일으킨다. NOX (NADPH oxidase) 효소는 폐에서 지혈 및 숙주 방어기능을 제공한다. 그러나 결핵성 흉막염에서 NOX4 신호전달의 역할은 알려져 있지 않다. 본 발명자들은 시험관내 흉막 중피세포 실험 및 BCG 흉막 감염 마우스 모델을 이용하여 결핵성 흉막 섬유화에서 NOX4 신호전달의 역할을 규명하였다. 본 연구 결과는 흉막 중피세포에서 열처리 사멸 결핵균이 NOX4-ROS 생성 및 상피간엽이행을 유도함을 제안한다. TLR4 저해제인 TAK-242와 로자탄은 NOX4-ROS 생성 및 이후 섬유화를 감소시켰다. 배양한 흉막 중피세포에서 SiRNA NOX4 선처리는 열처리 사멸 결핵균 유도 콜라겐-1 합성과 상피간엽이행을 억제하였다. NOX4는 ERK 신호전달 활성화를 통해 열처리 사멸 결핵균-유도 상피간엽이행 및 세포내 활성 산소종 생성을 매개한다. BCG 유도 흉막염 모델에서 BCG+SiNOX4 군 (BCG 이후 SiNOX4 IV 후처리)은 BCG+SiCon 군 (BCG 이후 SiCon IV 후처리)과 비교하여 염증성 흉막 세포 모집, 염증성 사이토카인 배출 및 중피세포 섬유화를 감소시켰다.
- [0011] 이러한 결과들은 NOX4-ERK-ROS가 열처리 사멸 결핵균 유도 흉막 섬유증을 TLR4 및 AT1R을 통해 조절함을 말해준다. NOX4는 결핵성 흉막 섬유증에서 새로운 치료 표적이 될 수 있다.
- [0013] NOX 효소들은 활성산소종 생성에서 중요한 역할을 수행한다(21). NOX는 신호 전달, 혈관신행 및 면역반응에 관여한다(22,23). 종래 연구들에서는 NOX 효소가 몇몇 폐질환의 발병에 관여함을 평가한 바 있다(8-13,21,24).
- [0014] 천식에서, NOX2는 천식의 염증 반응을 조절하고 NOX4는 기도 평활근 과수축을 조정한다(12). Amara 등은 특발성 폐섬유증에서 NOX4가 TGF- β 유도 섬유아세포의 근섬유아세포로의 분화를 매개함을 밝혔다(10). 몇몇 연구에서는 특발성 폐섬유증에서 NOX4가 Smad 2/3 인산화, JNK 및 P38MAP 카이네이즈 같은 다중 신호 경로를 활성화함으로써 근섬유아세포 분화에 기여한다고 보고한 바 있다(9). Fu 등은 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 폐 감염에서 NOX2 및 NOX4가 폐의 염증과 세포자기사멸 및 투과성을 조절함에 있어서 현저한 역할을 수행함을 밝혔다(24).
- [0015] 본 발명에서는 결핵성 흉막염에 관련된 섬유증 기저에 있는 기작을 연구하였다. 본 발명자들은 최초로 NOX4가 결핵성 흉막 섬유증에서 중요한 역할을 함을 밝혔다. 시험관 내 데이터는 열처리 사멸 결핵균이 흉막 중피세포에서 NOX4 활성화와 EMT를 유도하고, NOX4 저해가 열처리 사멸 결핵균 유도 콜라겐 합성 및 섬유화를 억제함을 보여준다. 본 발명자들은 열처리 사멸 결핵균이 NOX4 신호전달을 활성화함으로써 사람과 마우스 흉막 중피세포에서 ERK 발현을 상향조절함을 밝혔다. 이뿐만 아니라, 본 발명은 NOX4 활성화 및 이어서 촉발되는 ERK/ROS/EMT 신호전달경로 활성화가 ACE-Ang II 시스템- TLR 4 활성화의 결과임을 밝혔다.
- [0016] ACE 및 Ang II는 심혈관 섬유증 및 흉막 섬유증과 같은 섬유화 질환에서 조직 리모델링에 관여한다(25,26). Yang 등은 Ang II type I 수용체가 흉막 중피세포에서 TPE 유도 콜라겐 합성에 참여한다고 보고한 바 있다(4).

중막 세포는 내독소 및 결핵균 감염에 대한 반응으로 다양한 Toll-유사 수용체를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(6,27,28).

- [0017] 로자탄 및 TAK-242를 이용한 ATR 및 TLR4의 차단은 열처리 사멸 결핵균 유도 NOX4 발현 및 연이어 ERK-ROS 신호 전달을 억제한다. 이러한 결과는 선행 연구들과 일치한다. Zhang 등은 MAPK 경로를 통한 Ang 자극에 대한 반응에서 NOXs가 시간-의존적 반응을 두 번 수행함을 밝혔다(29). 안지오텐신은 NOX 매개 손상의 활성화를 통하여 폐 섬유화에서 결정적인 역할을 수행한다(30,31). NOX4는 LPS, 인슐린 및 안지오텐신 II 같은 다른 자극 하의 TLR4 신호전달 캐스케이드에서 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(32). Nakashima 등은 TLR4가 혈관 리모델링에서 NOX4를 활성화함으로써 Ang II 유도 활성산소종 수준을 조절하는데 결정적인 역할을 수행한다고 보고한 바 있다(20). 흥미롭게도, 본 발명의 결과는 결핵성 흉막염 세포 모델에서 TLR4와 AT1R 사이의 교란에 관한 증거들을 제시한다. 열처리 사멸 결핵균 처리 전 TLR4 수용체를 차단하면 AT1R의 리간드인 Ang II를 생성하는 효소인 ACE가 감소하였다.
- [0018] BCG로 유도되는 쥐의 흉막염은 결핵성 섬유증에서 NOX4 신호전달의 역할을 확인해주며, 이는 시험관 내 흉막 중피세포 실험과 일치한다. SiRNA NOX4 후처리는 내장쪽 흉막의 과증식을 억제하고, 빈 폐포 공간 및 BCG 주입으로 일어나는 높은 폐세포 침윤을 감소시켰다. 본 발명자들은 다른 동물 연구에서 보고한 바와 같이 BCG 유도 흉막염 세포 모집 및 감염된 식세포를 시험하였다. 흉막 세포에 사이토스핀을 처리하면 BCG 주사 후 SiNOX4 처리는 식세포 생성 및 바실러스 균을 제거하는 능력을 저해하지 않았다. BCG 유도성 흉막염 동안 NOX4 수용체 신호 전달을 저해하면 흉막 감염 및 BCG 세균 부하가 감소하였다.
- [0019] BCG 노출 후 NOX4 발현을 억제하면 ERK-ROS 신호전달 발현이 하향 조절되며, 이는 시험관 내 흉막 중피세포 실험과 유사한 결과이다. 또한, 이 결과는 NOX4 신호전달이 BCG 유발성 흉막염 모델에서 손상된 자가포식에 관련함을 제시한다. 자가포식은 기능장애 세포 소기관들을 분해함으로써 소기관의 질을 제한한다(33). 몇몇 선행 연구에서는 결핵 감염에서 자가포식의 임상적 관련성 및 블레오마이신- 및 담배-관련 폐 섬유증에서 자가포식의 보호적 역할을 평가하였다(31,34-36). 블레오마이신- 및 담배-관련 폐 섬유증에 대한 NOX4-유도 활성산소종 억제를 통한 Ang의 보호적 효과(1-7)는 로자탄 및 TAK-242가 결핵성 흉막염에서 NOX-ROS 신호전달에 의해 일어나는 자가포식을 증진한다는 본 발명자들의 결과(31-36)와 일치한다. 결핵성 흉막염에서 자가포식 억제에 대한 NOX4의 가능한 기작을 탐구하는 것은 강력한 치료 표적을 찾기 위해 필요하다.
- [0020] 도 10은 NOX4가 결핵성 흉막염에 기여하는 몇몇 가능한 신호전달 경로를 나타낸다. 마이코박테리아는 TLR4와 AT1R의 반응을 통하여 NOX4 발현을 자극하며, 이것은 ERK-ROS-콜라겐 생산을 현저하게 유도하며, 자가포식 흐름을 악화하였다 (도 10).
- [0021] 인간을 대상으로 한 실험에서, 결핵성 흉막염에 걸린 성인은 부폐렴성 흉막염에 걸린 성인 또는 여출과 비교하였을 때 흉막 삼출액 내의 NOX4 농도가 높았다. 이 결과는 마우스 실험 결과와 비슷하며, BCG에 노출하면 NOX4 농도가 상승하고 연이어 섬유증이 유발됨을 보여주었다.
- [0022] 결론적으로 본 발명자들은 NOX4 신호전달이 결핵성 흉막 섬유증에 관여하며, 이것이 ERK-ROS 신호전달 및 EMT 경로를 조절함을 밝혔다. 마우스 실험에서, SiRNA NOX4 처방으로 NOX4 발현을 저해하면 흉막 섬유증이 감소하였다. 따라서, NOX4 저해제는 흉막 섬유증 치료제로 이용할 수 있다.
- [0024] 본 발명은 NOX4 발현 또는 활성 억제제를 포함하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 NOX4 발현 억제제가 NOX4 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 NOX4에 대한 siRNA의 센스 서열이 서열번호 1번 (UCA GAC AAA UGU AGA CAC U)임을 특징으로 한다. 또한, 본 발명은 상기 NOX4에 대한 siRNA가 서열번호 4번의 서열 (AAACCGGCAGGAGUUUACCCAG)을 표적으로 하여 생성되는 것임을 특징으로 한다. NOX4에 대한 siRNA는 NOX4 유전자 서열을 바탕으로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 제조할 수 있으며, 가능한 siRNA의 수는 제한이 없으며, 위 siRNA는 예시적인 기재일 뿐이다. 또한, NOX4 유전자에 대한 siRNA가 NOX4 유전자와 결합하여 NOX4의 발현을 저해할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝혀둔다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 NOX4 단백질 활성 억제제가 NOX4 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물을 제

공한다.

- [0028] 또한, 본 발명은 상기 NOX4 단백질에 결합하는 항체가 인간 NOX4 단백질 중 서열번호 2 또는 서열번호 3 중 어느 하나를 항원결정부위로 하여 생산된 것, 바람직하게는 단일클론항체임을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0029] 서열번호 2는 L ILLPMCRTLL AYLRGSQKVP SRRTRRLLDK SRTFHITCGV TICIFSGVHV이며, 서열번호 3은 YMLLTlHVSG GLLKYQTNLD THPPGCISLN RTSSQNISLP EYFSEHFHEP FPEGFSKPAE FTQHKFVKIC MEEPRFQANF PQTWLWISGP LCLYCAERLY RYIRSNKPV T IISVISHPSD VMEIRMVKEN FKARPGQYIT LHCPSVSALE NHPFTLT MCP TETKATFGVH LKIVGDWTER FRDLLLPSS QDSEILPFIQ SRNYPKDDWK PYKLRLLYFI WVCR이다.
- [0030] 또한, 본 발명은 NOX4 억제제가 GKT137831, GKT136901, GLX351322, APX-155 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 NOX4 발현 억제제가 NOX4 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 인간 NOX4 유전자 서열은 NM_001291926.1, NM_001291927.1, NM_001291929.1, NM_001300995.1 및 NM_016931.4이다. 이와 같은 인간 NOX4 유전자 서열을 바탕으로 NOX4 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드 서열을 합성하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 적절한 소프트웨어 등을 이용하여 쉽게 수행할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 TLR4 억제제를 포함하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0033] 상기 TLR4 억제제는 TAK-242, C34 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 AT1R 억제제를 포함하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0035] 상기 AT1R 억제제는 타소사르탄(Tasosartan), 트라닐라스트(Tranilast), 아질사르탄(Azilsartan), 로자탄 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [0037] 본 발명의 NOX4 발현 또는 활성 억제제, TLR4 억제제 또는 AT1R 억제제를 유효성분으로 함유하는 결핵성 흉막 섬유증 예방 또는 치료용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50 중량%로 포함한다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 상기 NOX4 발현 또는 활성 억제제, TLR4 억제제 또는 AT1R 억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은 임상 투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라 주사 가능한 용액의 조성을 위해 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 사용되는 유효성분의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 일 회 내지 수 회 나누어 투여될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 방사선 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법 등과 병용하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0043] NOX4는 ERK 신호전달 활성화를 통해 열처리 사멸 결핵균-유도 상피간엽이행 및 세포내 활성산소종 생성을 매개하며, BCG 유도 흉막염 모델에서 BCG+SiNOX4 군 (BCG 이후 SiNOX4 IV 후처리)은 BCG+SiCon 군 (BCG 이후 SiCon IV 후처리)과 비교하여 염증성 흉막 세포 모집, 염증성 사이토카인 배출 및 중피세포 섬유화를 감소시켰다. 이러한 결과들은 NOX4-ERK-ROS가 열처리 사멸 결핵균 유도 흉막 섬유증을 TLR4 및 AT1R을 통해 조절함을 말해준다. NOX4는 결핵성 흉막 섬유증의 새로운 치료 표적이 될 수 있다.
- [0044] 따라서, NOX4 유전자의 발현이나 단백질 활성을 억제하면 결핵성 흉막 섬유증을 예방 또는 치료할 수 있으며, TLR4 억제제 및/또는 AT1R 억제제를 사용하는 경우에도 결핵성 흉막 섬유증을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 열처리 사멸 결핵균이 흉막 중피 세포에서 콜라겐-1 합성과 NOX4-ROS 발현을 유도하는 것을 보여준다. (a)는 NOX4, ERK 및 Snail 단백질의 웨스턴블랏 분석 결과이고, (b)는 RT-PCR에 의한 콜라겐-1 mRNA 농도를 나타낸다. (c)는 DCF-DA 처리한 세포의 대표적인 현미경 사진이다. * <0.01 은 열처리 사멸 결핵균 처리 후 0시간과 비교하여 유의한 데이터이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. NOX: NADPH 옥시다제, ROS: 활성산소종.
- 도 2는 NOX4가 열처리 사멸 결핵균에 의해 유도된 콜라겐-1 합성 및 EMT를 매개함을 나타낸다. 흉막 중피 세포를 NOX4를 표적으로 하는 siRNA (SiNOX4)로 트랜스펙션시켰다. 24시간 후, 열처리 사멸 결핵균 (10ng/ml)으로 1 시간 동안 처리하거나 처리하지 않은 세포를 준비하였다. (a)는 NOX4, ERK 및 Snail 단백질을 웨스턴블랏 분석한 결과이다. (b)는 RT-PCR에 의한 콜라겐-1 mRNA 농도를 나타낸다. (c)는 DCF-DA 처리한 세포의 대표적인 현미경 사진이다. * <0.01 은 열처리 사멸 결핵균 처리하지 않은 siCTRL과 비교한 값이다, # <0.01 은 열처리 사멸 결핵균 처리한 siCTRL과 비교한 값이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.
- 도 3은 NOX4가 ERK 신호전달 활성화를 통해 열처리 사멸 결핵균-유도 EMT 및 세포 내 활성산소종 생산을 매개함을 나타낸다. 흉막 중피세포는 ERK 억제제 (PD98059)의 존재 또는 부재 하에서 열처리 사멸 결핵균으로 처리하였다 (a)는 NOX4, ERK를 웨스턴블랏 분석한 결과이고, (b)는 DCF-DA 처리한 세포의 대표적인 현미경 사진이다. * <0.01 은 열처리 사멸 결핵균 처리하지 않은 모조군 (mock)과 비교한 것이다. # <0.01 은 열처리 사멸 결핵균 처리한 모조군 (mock)과 비교한 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.
- 도 4는 TLR4 억제 및 AT1 억제가 열처리 사멸 결핵균-유도된 NOX-ROS 생산 및 콜라겐 합성을 감소시킴을 나타낸다. (a) NOX4, ERK를 웨스턴블랏 분석하였다. (b) RT-PCR에 의한 콜라겐-1 mRNA 농도를 나타낸다. (c) DCF-DA 처리한 세포의 대표적인 현미경 사진이다. 로사탄 (Losartan): AT1 수용체 길항제; TAK242 : TLR4 수용체 길항제
- 도 5는 TLR4가 열처리 사멸 결핵균 처리로 ACE 발현을 상향 조절함을 나타낸다. RT-PCR에 의한 ACE mRNA 농도를 나타낸다.
- 도 6은 BCG-유도 흉막 섬유증에서 NOX4 수치 증가를 확인한 것이다. 마우스 모델에서 SiNOX4 후처리는 BCG에 의해 유도된 내장쪽 흉막 과형성, 육아종 및 세기관지염을 억제한다. (a) NOX4를 웨스턴블랏 분석한 결과 및 RT-PCR에 의한 콜라겐-1 mRNA 농도를 나타낸다. (b) 네 개의 군 (PBS + SiCon 군, BCG + SiCon 군, PBS + SiNOX4 군 및 BCG + SiNOX4 군)에서 14일째 폐를 현미경으로 관찰한 것이다. (c) 마우스 폐의 흉막 절편을 Elastic van Gieson으로 면역염색하였다. (d) 마우스 폐에서 NOX4를 면역염색하였다. (e) 폐 섬유증 및 자유 폐포 공간을 정량하였다.
- 도 7은 BCG로 유도한 흉막염 마우스 모델에서 NOX4와 메소텔린 침착이 활성화됨을 나타낸다. NOX4와 메소텔린 (PMCs의 마커들임)은 면역형광 염색법으로 염색하였다. A1-D1: DAPI 염색. A2-D2: 메소텔린에 대한 면역형광염색 (녹색). A3-D3: NOX4에 대한 면역형광염색 (적색). A4-D4: 면역형광염색과 DAPI 염색을 겹친 것, 노란색은 메소텔린과 NOX4가 같은 위치에 있는 것을 보여준다.
- 도 8은 흉강에서 BCG에 의한 흉막염과 세포 축적을 나타낸다. (a) 4개의 군 (PBS + SiCon 군, BCG + SiCon 군, PBS + SiNOX4 군 및 BCG + SiNOX4 군)에서 흉강 내 총 세포 수를 나타낸다. (b) 김자액으로 염색된 사이토스핀의 현미경 사진이다. (c) 흉수에서 사이토카인 수치 (Interferon- γ , IL-2, TNF- α , MCP-1 및 IL-6)를 평가하였

다.

도 9는 BCG 감염 및 siRNA NOX4 후처리한 다음 마우스 폐 용균액에서 NOX4, Erk 및 Snail 단백질의 발현을 나타낸다.

도 10은 흉막 중피세포에서 열처리 사멸 결핵균으로 유도된 흉막 섬유화와 관련된 신호 전달 경로의 개략도이다.

도 11은 TLR4 저해 및 AT1 저해가 HKMT 처리에 의해 손상된 자가포식을 개선함을 보여준다. LC3II 및 P62를 웨스턴블랏 분석하였다.

도 12는 결핵성 흉막염, 악성 흉막 삼출 및 여출에서 NOX4 수치를 나타낸다. NOX4를 웨스턴블랏 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0049] 동물

[0050] 야생형 C58BL/6 마우스는 두얼 바이오텍 (서울, 한국)에서 구입하였다. 3-4주령 마우스를 일차 세포배양을 수행하는데 이용하였다. 체중 20~24g의 8-10 주령 마우스를 BCG 유발 흉막염 모델로 이용하였다. 모든 동물 실험은 한림대학교의 동물 관리 및 사용위원회의 승인을 받았다.

[0052] 흉막 중피세포 (PMC)의 일차 배양

[0053] 종래 문헌에 기술된 바와 같이 3-4주령 쥐의 횡격막과 심장 및 폐의 외부 표면으로부터 중피 세포를 분리하였다 (6). 횡격막 및 부속 기관의 조각을 0.25 % 트립신-EDTA 용액에 1시간 동안 두었다. 손상되지 않은 조직 및 파편을 제거한 후, 세포 현탁액을 1,500rpm에서 5분간 원심분리하였다. 펠릿을 FBS, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 배지에서 37℃로 밤새 배양하였다. 다음날, 부착 세포를 수집하고 추가로 4일 동안 배양하였다. 중피 세포의 특징을 확인하였고, 2 계대의 중피 세포가 이 실험에 사용되었다.

[0055] 박테리아 및 중피세포 실험 준비

[0056] 열처리 사멸 결핵균 (Heat killed mycobacterium tuberculosis; HKMT)은 InvivoGen (San Diego, USA)에서 구입하였다. Human Met 5A는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 구입하여 제조자의 지시에 따라 배양하였다. Met 5A 세포 및 마우스 흉막 중피세포 세포를 지시된 기간 동안 억제제가 있거나 없는 상태에서 열처리 사멸 결핵균으로 처리하였다. siRNA NOX4는 Abcam (Cambridge, UK)으로부터 구입하였다. MEK 억제제 (PD98059, 10 μM), 로자탄 (losartan) (AT1R 길항제) 및 TAK-242 (TLR4 억제제)는 R&D 시스템에서 구입하였다. 열처리 사멸 결핵균에 노출된 흉막 중피세포의 총 활성산소종은 DCFDA 형광법으로 측정하였다. 내인성 NOX4 발현을 억제하기 위해 NOX4 유전자의 표적 부위 (59-AAACCGGCAGGAGUUACCCAG-39)에 대하여 설계된 NOX4에 특이적인 siRNA (Xeragon-Qiagen, Valencia, California, USA)를 실험에 이용하였다. 스크램블된 siRNA (인간 계놈과 비상동성; 59-AACCAGCAAGGUGUAUCGCCAC-39)(서열번호 5)를 대조군으로 사용하였다.

[0058] BCG 유발 흉막염

[0059] *M.bovis* BCG는 Dr.Cho (연세대학교 의과대학 미생물학교실)로부터 입수하였다. 마이코박테리아 투베르쿨로시스는 이전에 보고된 바와 같이 100ul의 생리 식염수에 10⁶ CFU₅의 BCG 파스퇴르를 복강 내 주입하여 생성되었다. 마우스를 일주일에 두 번 관찰하고 BCG 주사 후 15일째에 희생시켰다. 대조군에게는 BCG 대신 멸균된 PBS 100ul을 주입하였다.

[0060] 24마리의 마우스를 PBS + SiCon 군 (PBS 처리 후 대조군 siRNA (이하 "SiCon"과 혼용함)로 처리한 군), BCG + SiCon 군 (BCG 처리 후 SiCon 처리한 군), PBS + SiNOX4 군 (PBS 처리 후 siRNA NOX4 처리한 군) 및 BCG +

SiNOX4 군 (BCG 처리 후 SiRNA NOX4 처리한 군)으로 무작위로 4개 군으로 나누었다.

[0061] PBS 또는 BCG를 주사한 날로부터 일주일에서 두 번 NOX4 SiRNA 또는 대조군 SiRNA를 마우스에 정맥주사 하였다. 15일째, 모든 마우스를 희생시키고 폐 조직 및 흉막 삼출액을 수집하였다.

[0063] **흉막 세포 및 흉막 삼출액 준비**

[0064] 감염되지 않은 마우스 및 감염된 마우스의 흉강은 2mmol/L EDTA-PBS 1ml로 세척하였다. 흉막 삼출액을 원심분리 (4℃, 1500g, 10분)하고, 상등액은 사이토카인, 케모카인 및 CFU 평가에 사용하였다. 세포 펠렛을 100ul PBS에서 재현탁하고 세포분석에 사용하였다. 혈액소계로 총 세포 수를 세고 Diff Quick 염색으로 세포원심분리기에서 세포를 평가하였다.

[0066] **폐 조직 수확 및 조직 검사**

[0067] 폐의 혈관을 세척한 후 오른쪽 폐를 분리하고 분자 분석을 위해 -80℃에 보관하였다. 왼쪽 폐를 절제하고 10% 포르말데히드를 포함하는 PBS에 하룻밤 고정시키고 5μm 두께로 파라핀에 묻었다. 좌측 폐 절편을 H&E로 염색하고 광학 현미경으로 평가하였다. 조직학적 점수와 빈 폐포 공간은 종래 연구방법에 따라 분석하였다(15,16).

[0069] **면역조직화학 및 면역형광염색**

[0070] 폐 절편을 항-NOX4 항체를 사용하여 면역조직화학 염색하였다. 흉막 절편은 Elastica van Gieson (Millipore Corporation, Germany)으로 염색하였다. 폐 슬라이드를 NOX4와 메소텔린 (흉막 중피세포에 대한 특이 마커)에 대해 이중 표지하고 DAPI를 사용하여 역염색하였다. 형광 현미경 (올림푸스 FV500, 올림푸스, 도쿄, 일본)을 사용하여 슬라이드를 시험하였다. 노란색은 NOX4와 메소텔린이 같은 위치에 있음을 나타낸다.

[0072] **효소면역측정법 (ELISA)**

[0073] 마우스의 흉막 삼출액 및 혈장에서의 인터페론- γ , IL-2 TNF- α , MCP (monocyte chemotactic protein)-1 및 IL-6은 효소 결합 면역 흡착 분석법 (Cusabio, Wuhan, China)을 사용하여 정량분석하였다.

[0075] **웨스턴블롯 분석**

[0076] 웨스턴블롯 분석을 이용하여 세포 내 단백질 수준을 측정하였다. 인간 / 마우스 흉막 중피세포, 균질화한 마우스 폐 및 인간 흉수를 시료로 사용하였다. 세포 용균액을 변성시키고 SDS-PAGE 젤상에서 전기영동하였다. 분리된 단백질을 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane; Amersham, UK)으로 전기이동시켰다. 지시된 바와 같이 일차 항체로 면역 블롯팅하였다. 일차 항체는 NOX4 (희석 1:1,000), Snail (희석 1:1,000), 인산화된 Erk (희석 1:1,000), TLR4 (희석 1:1,000) 및 액틴 (희석 1:1,000)에 대한 일차 항체들이다. 멤브레인을 항-마우스 IgG HRP-결합 이차 항체와 함께 배양하고 super-signal West Pico 화학발광탐지 키트 (Pierce)를 사용하여 탐지하였다.

[0078] **인간 흉막액 수집**

[0079] 2014년 1월부터 2016년 6월까지 춘천성심병원에서 후향적 연구가 수행되었다. 병원 연구윤리위원회에서 연구에 대한 동의를 받았다 (기관 검토위원회 번호: 2012-27). 결핵성 흉막염 환자 10명과 여출 (transudate) 환자 10명이 분석에 포함되었다. 결핵성 흉막염은 *M. tuberculosis*에 대하여 양성을 나타내는 흉막액의 존재 또는 흉막 생검에 의해 결핵균 감염이 조직학적으로 확인되는 것으로 정의된다. 여출성 흉수 (transudate pleural effusion)는 라이트의 기준 (Light's criteria)에 따라 정의된다(17). NOX4 단백질의 발현은 웨스턴블롯팅으로 측정하였다.

- [0081] **통계 분석**
- [0082] 통계 분석은 Prism 5.1 (Graphpad 소프트웨어, La Jolla, CA USA)을 사용하여 수행하였다. 군별 비교는 Mann-Whitney U test를 사용하여 수행하였다. 데이터는 중간 값 (사분위 범위; interquartile range)으로 나타내었다.
- [0084] **결과 1: 열처리 사멸 결핵균은 인간 및 마우스 흉막 중피세포에서 NOX4 생산을 상향 조절한다.**
- [0085] 본 발명자들은 열처리 사멸 결핵균에 노출되었을 때 인간 및 마우스 흉막 중피세포에서 NOX4 생산의 변화를 살펴보았다.
- [0086] 도 1과 같이 3-6 시간 동안 열처리 사멸 결핵균 (10ng/ml)을 첨가하면 중피 세포에서 NOX4 생산이 촉진되었다. 열처리 사멸 결핵균은 ERK 1/2 단백질의 인산화를 현저히 유도하였다. 또한, EMT 유도제인 Snail 및 콜라겐의 발현이 증가하였다. 흉막 중피세포에서 DCF 표지된 활성산소종은 열처리 사멸 결핵균 군에서 현저히 상승하였다.
- [0088] **결과 2: SiRNA NOX4는 NOX4/ERK/ROS 신호 전달 경로를 통해 열처리 사멸 결핵균 유도 콜라겐 및 EMT 합성을 방지한다.**
- [0089] EMT와 콜라겐 합성에서 NOX4의 역할을 알아보기 위해, 본 발명자는 NOX4에 대한 특이적 SiRNA를 사용하였다. 도 2와 같이, SiRNA NOX4 처리는 열처리 사멸 결핵균에 의한 콜라겐 합성 증가를 방지하고 인산화된 ERK와 Snail의 발현을 감소시켰다. 또한, 세포 내 DCF 표지 활성산소종의 강도는 열처리 사멸 결핵균 군보다 SiRNA NOX4+열처리 사멸 결핵균 군에서 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 열처리 사멸 결핵균이 NOX4-ERK-활성산소종 신호 전달을 활성화함으로써 콜라겐 합성을 유도함을 말해준다.
- [0090] 열처리 사멸 결핵균 자극 흉막 중피세포에서 신호 전달을 매개하는 NOX4 발현을 확인하기 위해 MEK 억제제 (PD98059, 10 μ M)로 전처리하여 신호 전달 경로를 조사하였다. 콜라겐 합성과 Snail의 발현은 MEK 억제제로 전처리함으로써 현저하게 약화되었다. 세포 내 활성산소종 수준에 대한 MEK 억제제에 의한 유사한 억제 효과를 도 3b에 나타내었다. 이러한 결과는 인간 및 마우스 흉막 중피세포에서 열처리 사멸 결핵균이 NOX4 의존적 ERK-활성산소종 경로를 유도함을 말해준다.
- [0092] **결과 3: ANG II 타입 I 수용체 및 TLR4는 열처리 사멸 결핵균 유도된 NOX4-ROS 신호 전달 및 콜라겐 합성에 관여한다.**
- [0093] Ang II의 수용체에 대한 결합은 세포 내 자유 라디칼 생성 및 조직 손상과 관련이 있다(18). 몇몇 연구는 NOX4가 TLR4 신호 전달 하류 연속단계 (downstream cascade)에 결정적인 역할을 한다고 제안한다(19,20). 본 발명자들은 열처리 사멸 결핵균 처리 후 NOX4 매개 콜라겐 합성에서 Ang II 타입 I 수용체 (AT1R) 및 TLR4의 역할을 살펴보았다. 본 발명자는 로자탄 (AT1R 길항제)과 TAK-242 (TLR4 억제제)가 흉막 중피세포에서 열처리 사멸 결핵균에 의해 유도되는 NOX4와 콜라겐 합성 증대를 방지한다는 것을 발견하였다 (도 4). 로자탄과 TAK-242는 모두 흉막 중피세포에서 열처리 사멸 결핵균에 의한 DCF-표지 활성산소종을 감소시켰다. 이러한 결과들은 열처리 사멸 결핵균 처리 후 NOX4에 의해 유도되는 콜라겐 합성과 활성산소종 생성이 AT1R과 TLR4에 의한 것임을 말해준다. 또한, 로자탄과 TAK-242 처리는 열처리 사멸 결핵균 처리 후 LC3II (자가포식소체 형성 마커)의 감소 및 P62 (sequestosome-1)의 증가를 되돌렸다 (도 11 참조).
- [0095] **결과 4: 흉막 중피세포에서 AT1 수용체와 TLR4 사이의 혼선은 열처리 사멸 결핵균에 의해 유도된 활성산소종 생성에 기여한다.**
- [0096] 안지오텐신 전환 효소 (Angiotensin converting enzyme; ACE)는 ANG I을 절단하여 ANG II로 만든다. ANG II는 AT1R에 대한 리간드이다. 본 발명자는 AT1R과 TLR4 사이의 잠재적 상호작용이 존재하는지를 조사하였다. TAK-242는 열처리 사멸 결핵균-유도된 ACE mRNA 발현을 감소시켰다. TLR4는 ACE 수준을 상향조절함으로써 ANG II 매개 활성산소종 생산을 증대시키는 것으로 나타났다 (도 5). 종합하면, 이러한 결과들은 열처리 사멸 결핵균에

노출된 흉막 중피세포에서 AT1R과 TLR4 사이의 기능적 상호 작용을 뒷받침한다.

[0098] **결과 5: BCG-유도 흉막염은 폐 NOX4의 발현을 증가시킨다.**

[0099] 생체 내 실험에서 BCG 유발 흉막염 마우스 모델을 만들었다 (총 네 개의 군: PBS + SiCon 군, BCG + SiCon 군, PBS + SiNOX4 군 및 BCG + SiNOX4 군). 폐 조직에서 NOX4 단백질의 발현 및 콜라겐 합성은 PBS 처리와 비교할 때 BCG 주입 후 증가하였다 (NOX4: 5배, P 값= 0.003)(도 6a). BCG 감염 14일 후, BCG + SiCon 군의 모든 마우스는 흉막 과형성 및 콜라겐 침착물이 증가한 육아종을 나타내었다 (도 6b). PBS + SiCon 군의 폐 조직의 NOX4에 대한 면역염색은 기관지 상피세포에서 약하게 탐지될 정도의 발현을 보여주었다. 반면, BCG + SiCon 군은 두꺼워진 격막을 갖는 염증 부위 주위에서 NOX4가 현저히 증가하였음을 보여주었다 (도 6c). 또한, BCG + SiCon 군의 흉막 절편에서 콜라겐 축적이 있었다 (도 6d).

[0101] **결과 6: NOX4 길항작용은 BCG 유발성 흉막염에서 조직 변화를 감소시킨다.**

[0102] BCG + SiNOX4 군은 BCG + SiCon 군과 비교하여 흉막 과형성 및 폐세포 침윤을 감소시키는 것으로 나타났다 (도 6b). BCG + SiNOX4 군은 BCG + SiCon 군과 비교하여 폐 조직에서 NOX4 발현을 감소시켰고 콜라겐 축적이 적었다 (도 6c, 6d). BCG + SiNOX4 처리한 마우스 폐를 조직 검사한 결과는 BCG + SiCon 처리군과 비교하여 낮은 폐 섬유화 등급 (BCG+SiNOX4: 2.5 ± 0.8 , BCG+SiCon: 6.7 ± 1.0 , $P=0.0023$) 및 높은 자유 폐포 공간 (BCG+SiNOX4: 88.3 ± 4.1 , BCG+SiCon: 22.5 ± 16.0 , $P=0.0024$)을 나타냈다 (도 6e). 조직학적 결과뿐만 아니라, RT-PCR에 의한 콜라겐 mRNA 수준도 BCG + SiCon 군보다 BCG + SiNOX4 군에서 감소하였다.

[0104] **결과 7: BCG 유발성 흉막염 중피에서의 NOX4 활성화**

[0105] 메소텔린으로 폐를 면역염색하면 중피 세포를 탐지할 수 있다. 도 7과 같이, 마우스의 폐 절편은 매우 높은 수준의 NOX4를 함유하는데, 이것은 BCG + SiCon 군에서 메소텔린과 같은 위치에 있다. NOX4 신호전달을 SiNOX4 후 처리로 저해하면 폐 조직에서 BCG 유도 메소텔린 발현이 차단되었다. 이 결과는 BCG 유발성 흉막염에 걸린 마우스의 흉막 중피세포에서 NOX4가 증가함을 가리키며, 이는 세포 실험과 일치한다.

[0107] **결과 8: NOX4 길항 작용은 BCG 유발성 흉막염의 폐포 공간에서 세포 축적과 염증성 사이토카인 분비를 감소시킨다.**

[0108] BCG 유발성 흉막염에서 siRNA NOX4 후처리의 효과를 시험하기 위하여 세포 모집과 사이토카인 축적을 측정하였다.

[0109] 감염 후 15일째에 총 흉막 세포 수 (PBS+SiCon: $40.5 \pm 11.6 \times 10^4$ /ml, BCG+SiCon: $465.0 \pm 331.1 \times 10^4$ /ml, $P=0.006$) (도 7a). BCG + SiNOX4 군의 총 흉막세포 수는 BCG + SiCon 군보다 유의하게 낮았다 (BCG+SiNOX4: $113.4 \pm 51.2 \times 10^4$ /ml, $P=0.017$). 본 발명자들은 BCG + SiCon 군에서만 흉막액에서 세균 부하 (bacterial load)를 관찰하였고 (도 7b), BCG + SiNOX4 군에서 비장의 CFU 양이 BCG + SiCon 군보다 비교적 낮았다 (BCG+SiNOX4: 275 ± 603 , BCG+SiCon: 3433 ± 627 , $P=0.014$)(도 7c). 흉막 세포를 현미경 분석한 결과, BCG + SiNOX4 군과 BCG + SiCon 군 모두에서 다핵성 거대 대식세포가 존재함을 확인하였다 (도 7d). 흉막 삼출액의 사이토카인 (IL-6, TNF α , IFN γ MCP-1, IL-2) 농도는 BCG + SiCon 처리군에서 PBS + SiCon 군보다 현저히 높았고, 이러한 결과는 앞선 연구 결과들과 일치한다. BCG + SiCon 군과 비교하여 BCG + SiNOX4 군의 흉막 삼출액에서는 사이토카인의 발현이 감소하였다 (도 7e). 이러한 결과들은 NOX4 길항작용이 흉막 염증 및 흉막 감염의 기본적인 제어를 유도한다는 것을 나타낸다.

[0111] **결과 9: BCG는 NOX4 신호 전달을 통해 ERK 및 콜라겐 발현을 상향 조절한다.**

[0112] 본 발명자들은 인간 및 마우스 세포 실험에서 NOX4-ERK-활성산소종 신호전달이 결핵 유발 EMT 과정에 관여한다는 것을 밝혔다. 본 발명자들은 마우스 모델에서 일관된 결과를 발견하였다. 도 9와 같이, PBS + SiCon군과 비

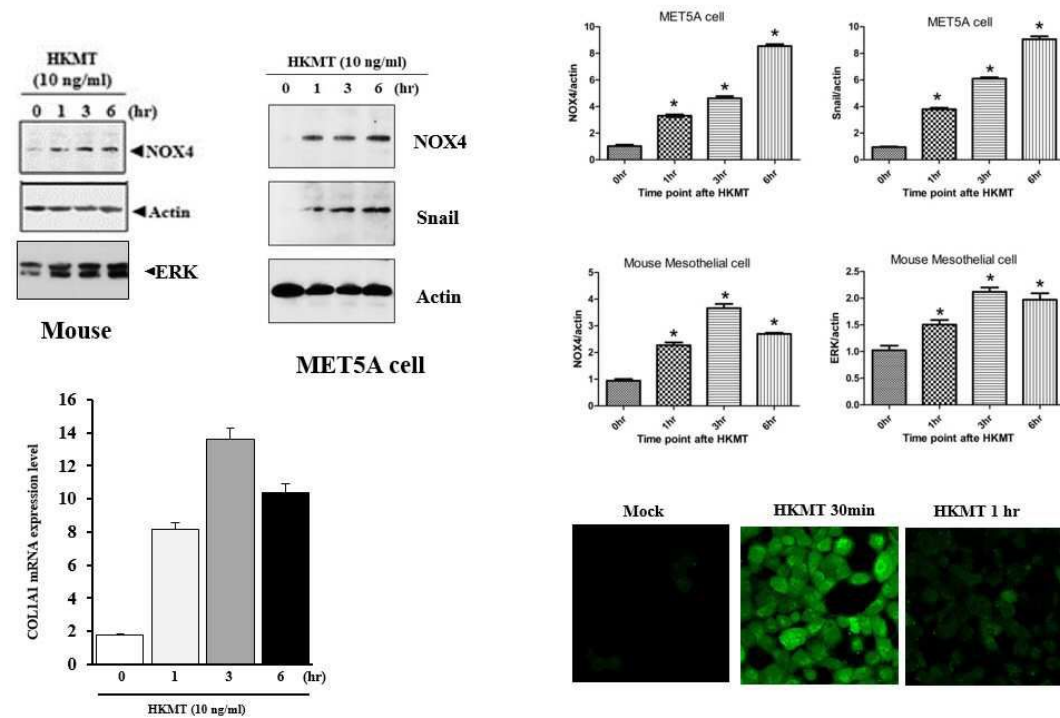
교하여 BCG + SiCon 군에서는 ERK 인산화 및 Snail 발현이 현저히 증가하였다 (ERK 인산화: 2배, $P=0.024$, Snail: 2배, $P=0.024$). BCG + SiNOX4 군에서는 ERK 인산화와 Snail의 발현이 감소하였다 (ERK 인산화, $P=0.004$, Snail: $P=0.007$). PBS + SiCon군과 비교하여 BCG + SiCon 군에서는 폐 조직에서 LC3II 발현이 감소하고 P62 발현이 증가하였다. SiNOX4 후처리는 LC3II의 하향조절 및 P62의 상향조절을 차단하였다. 이러한 결과들은 BCG에 의해 유도된 NOX4 발현이 자가포식 신호전달을 조절함을 설명한다.

[0114] **결과 10: 결핵성 흉막염 환자의 인간 흉막 삼출액에서 NOX4의 발현이 증가한다.**

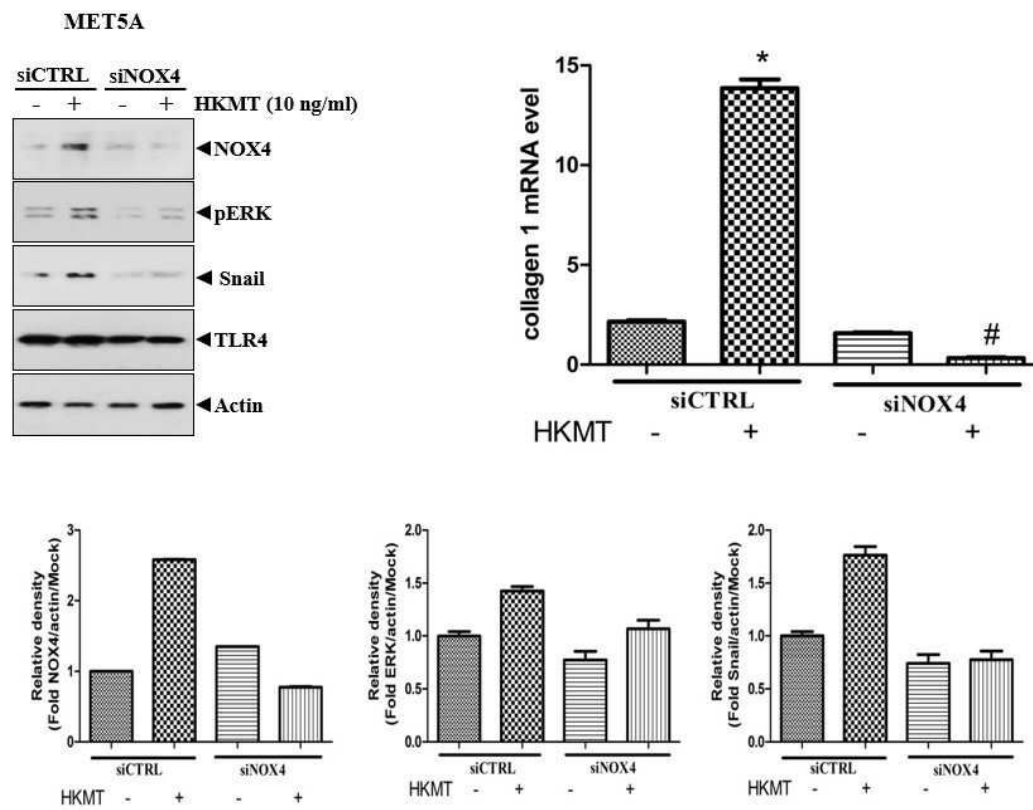
[0115] 인간 성인의 흉막 삼출액에서 NOX4 단백질 발현을 측정하였다 (도 12). 웨스턴 블랏으로 분석한 결과, 비결핵성 흉막염 환자와 비교하여 결핵성 흉막염이 있는 성인에서 NOX4 수치가 현저히 상승하였다. NOX4의 발현은 결핵성 흉막 삼출에서 여출 (transudate)보다 5배 증가하였다 (도 12).

도면

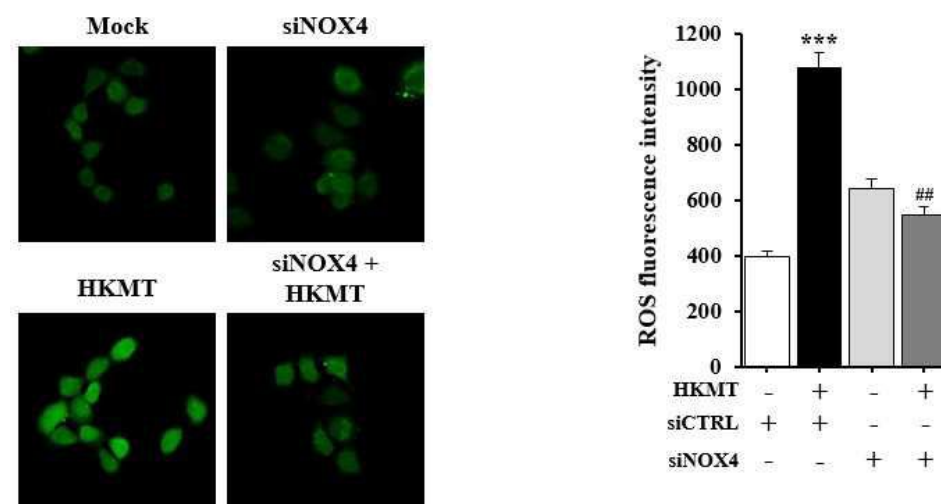
도면1



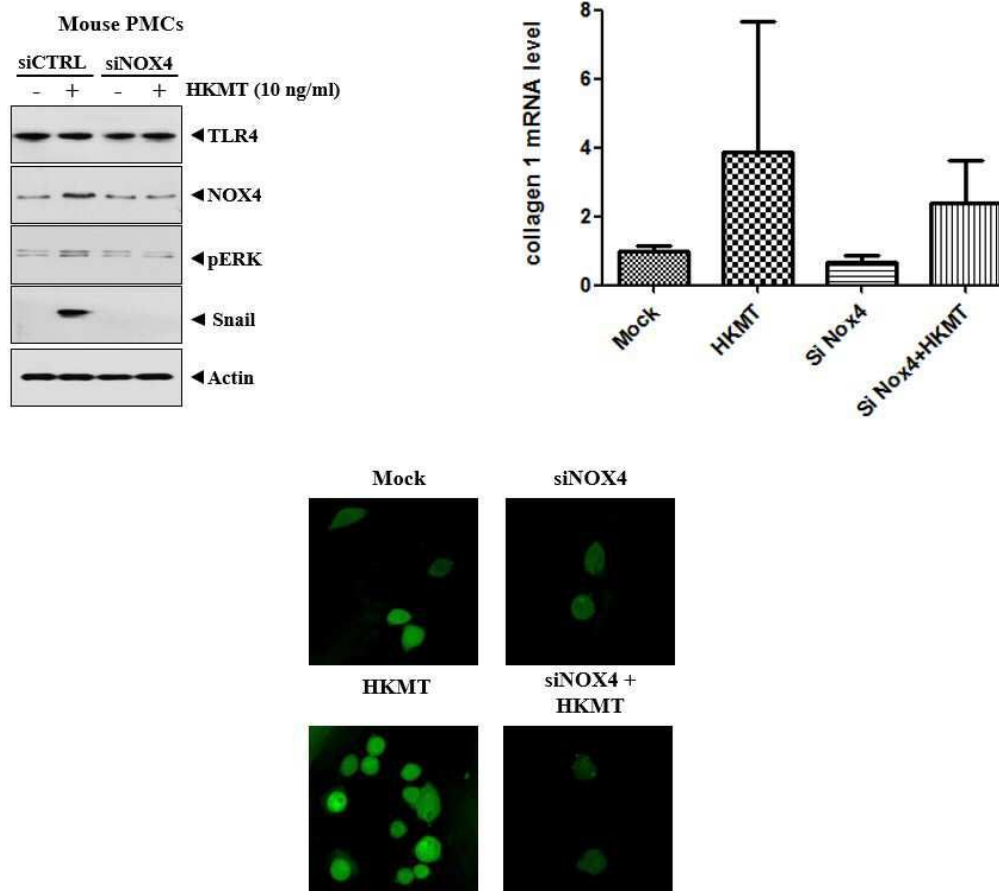
도면2a



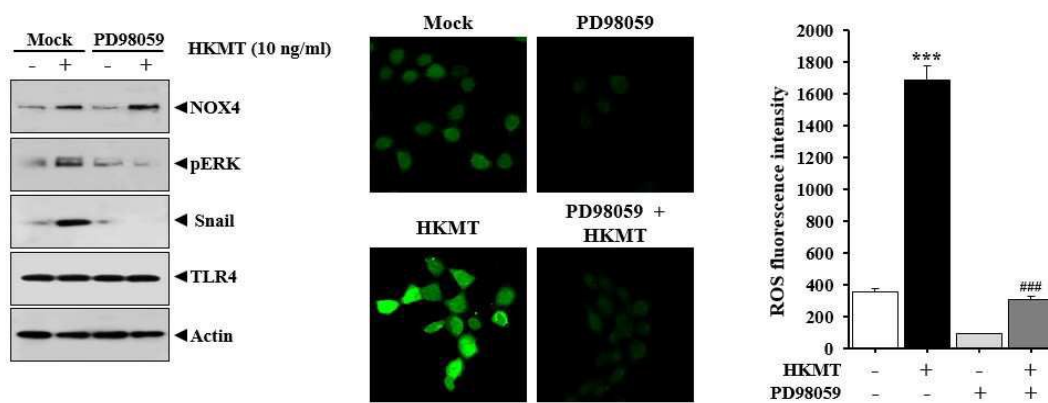
도면2b



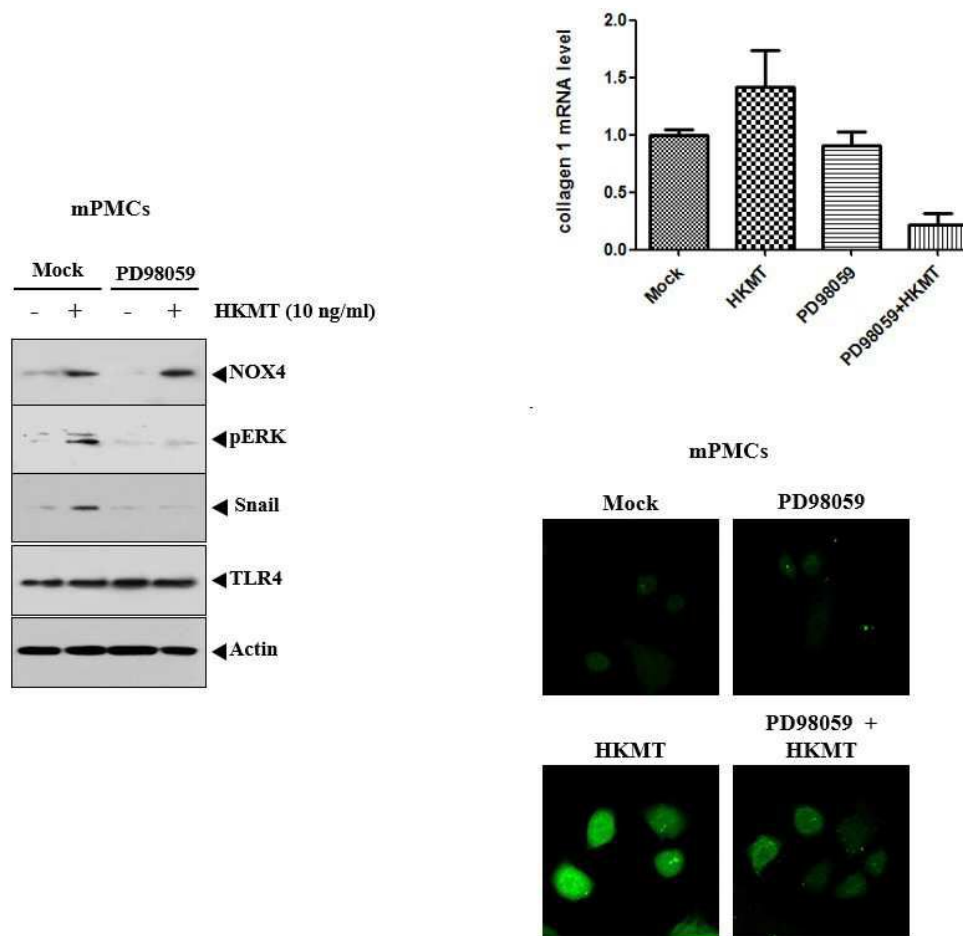
도면2c



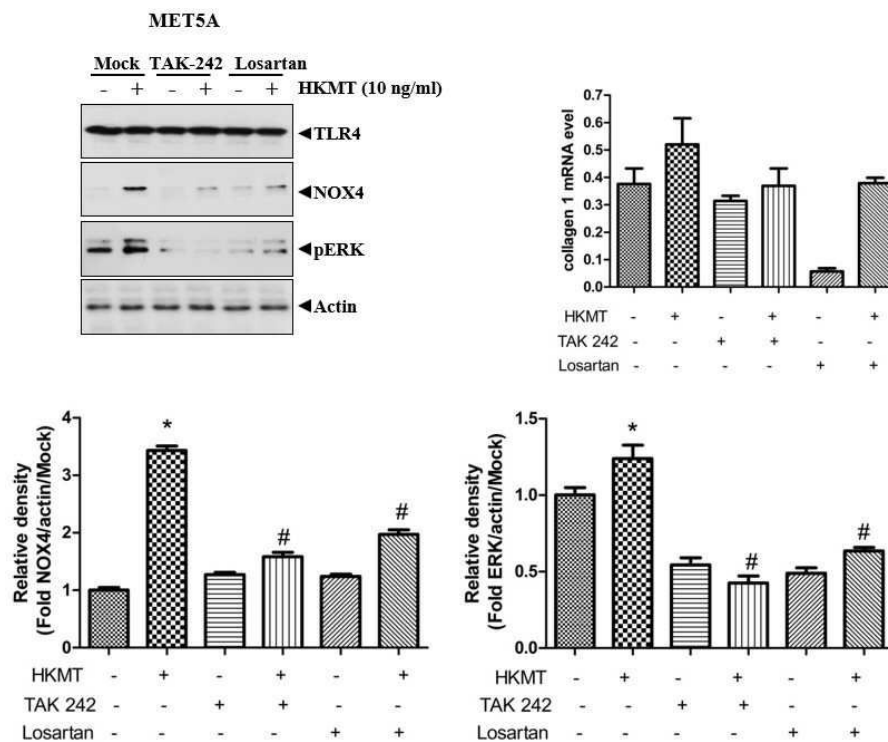
도면3a



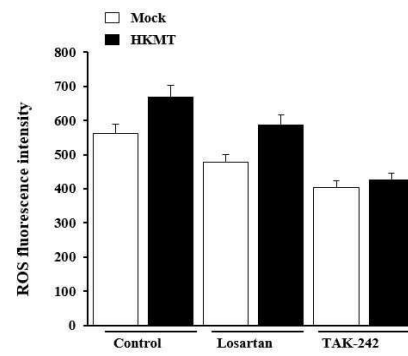
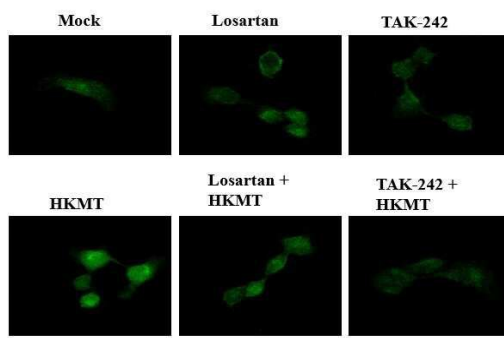
도면3b



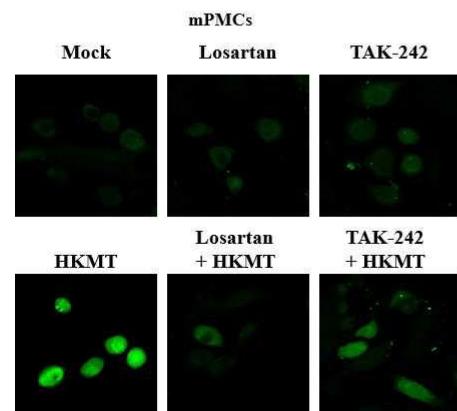
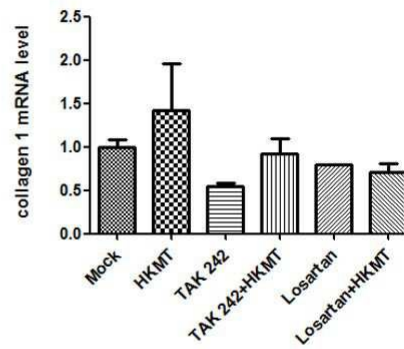
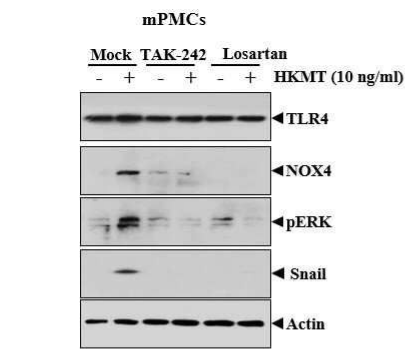
도면4a



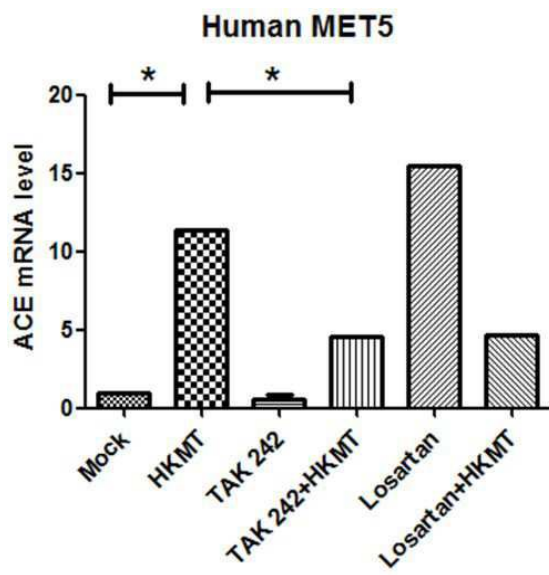
도면4b



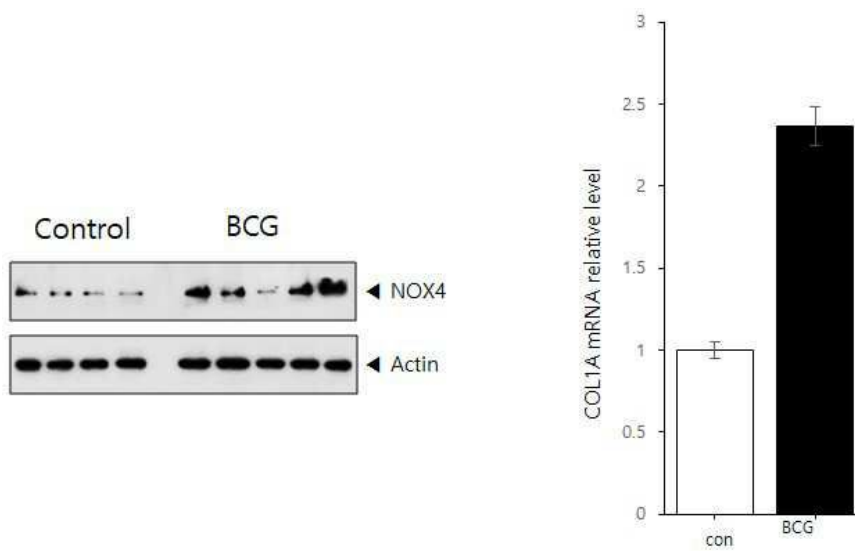
도면4c



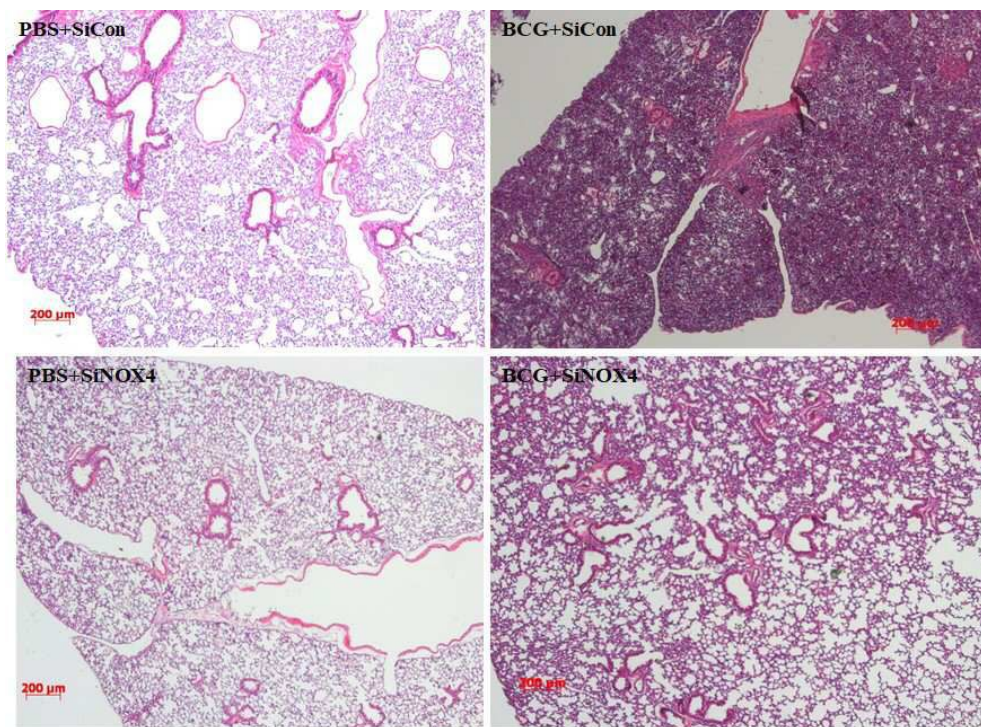
도면5



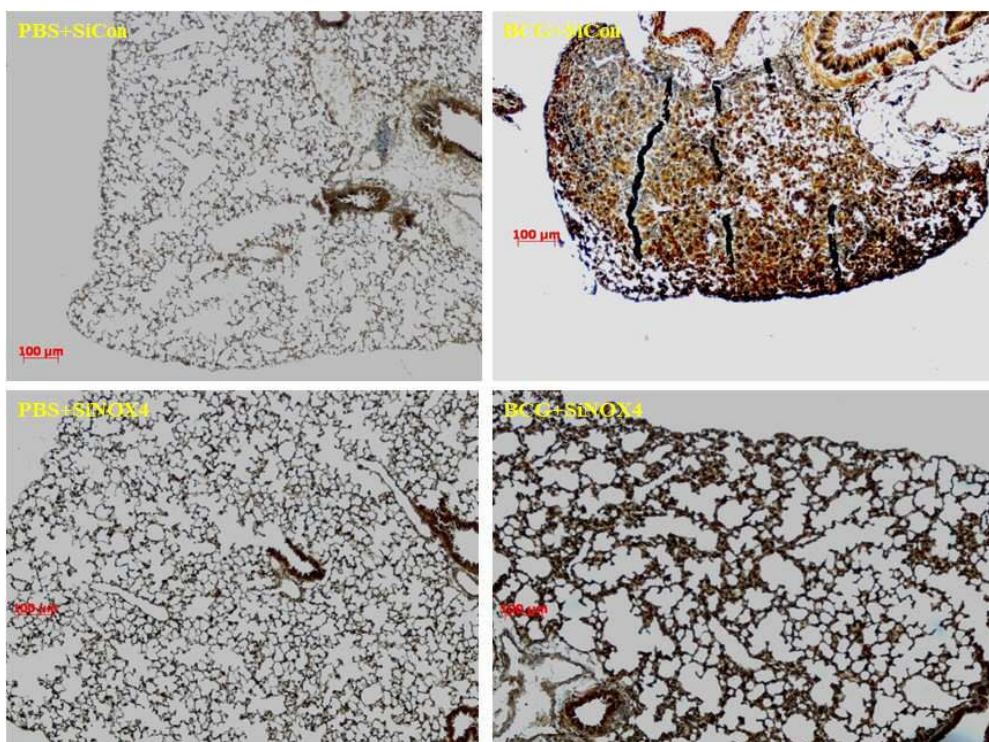
도면6a



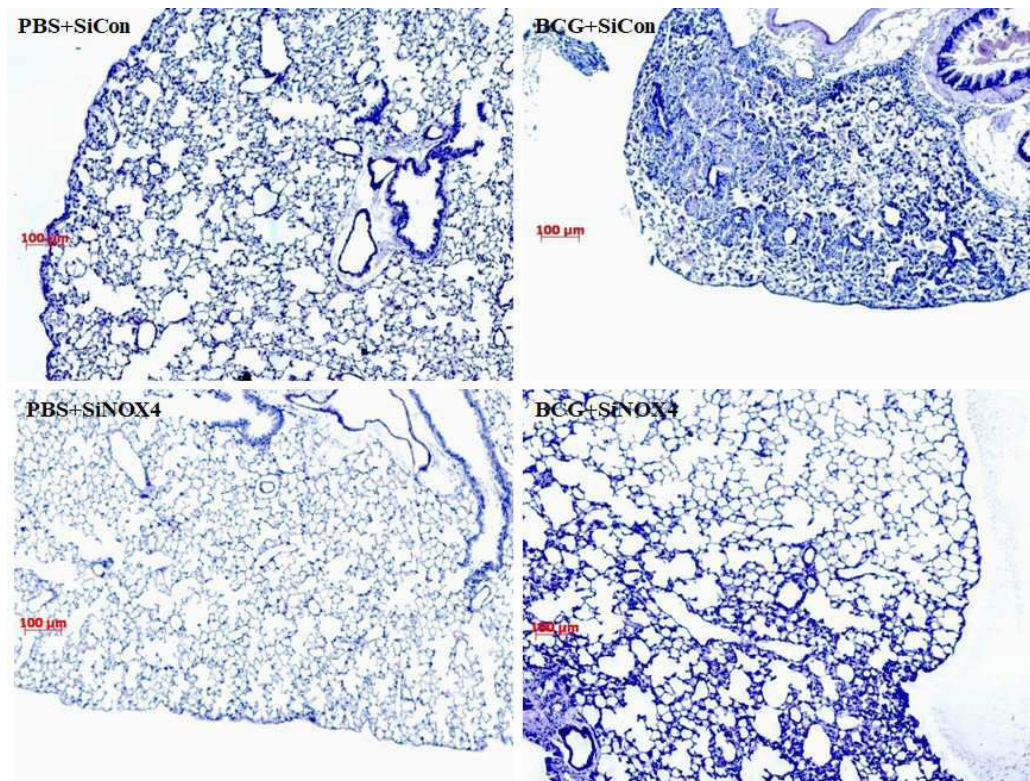
도면6b



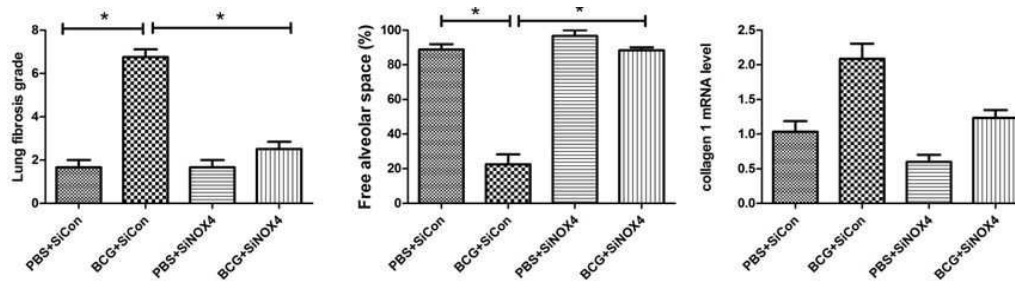
도면6c



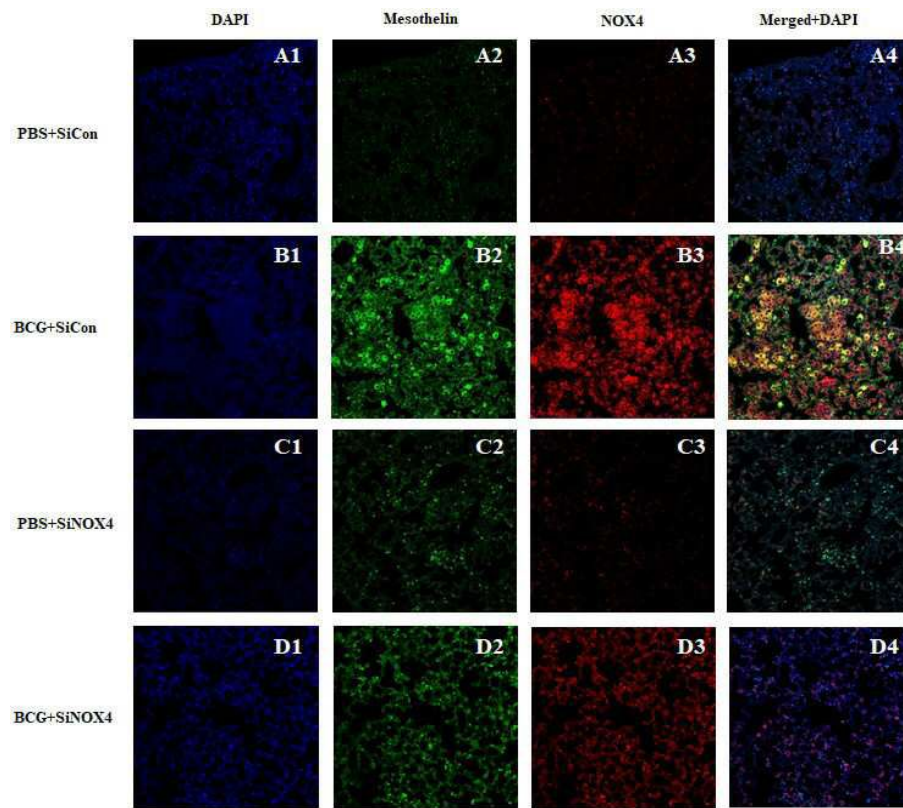
도면6d



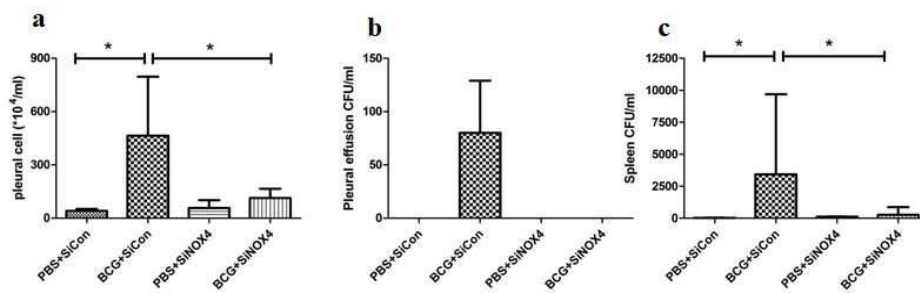
도면6e



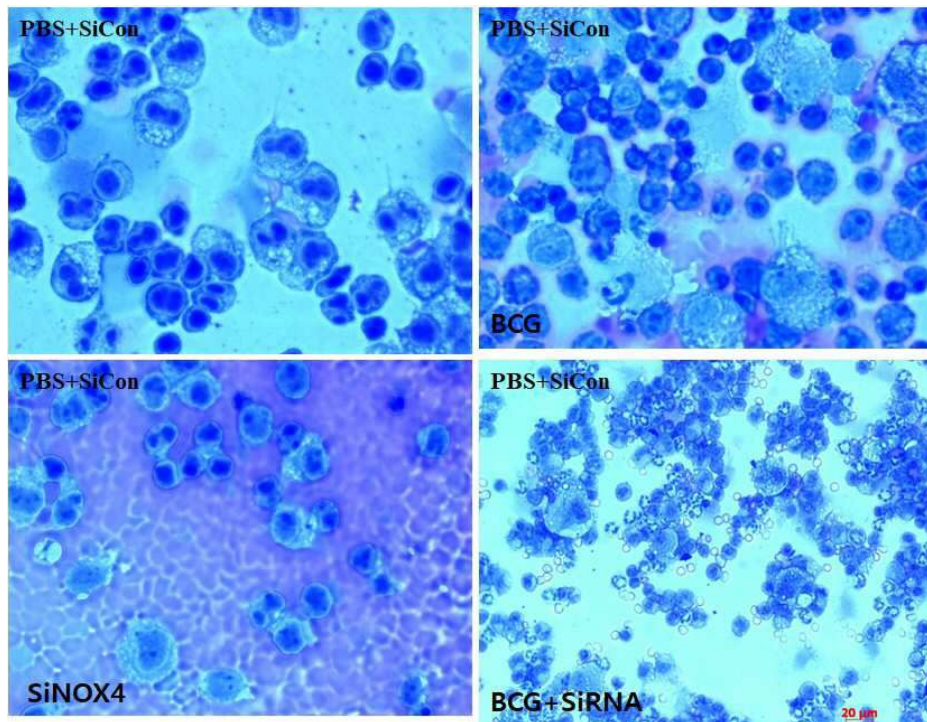
도면7



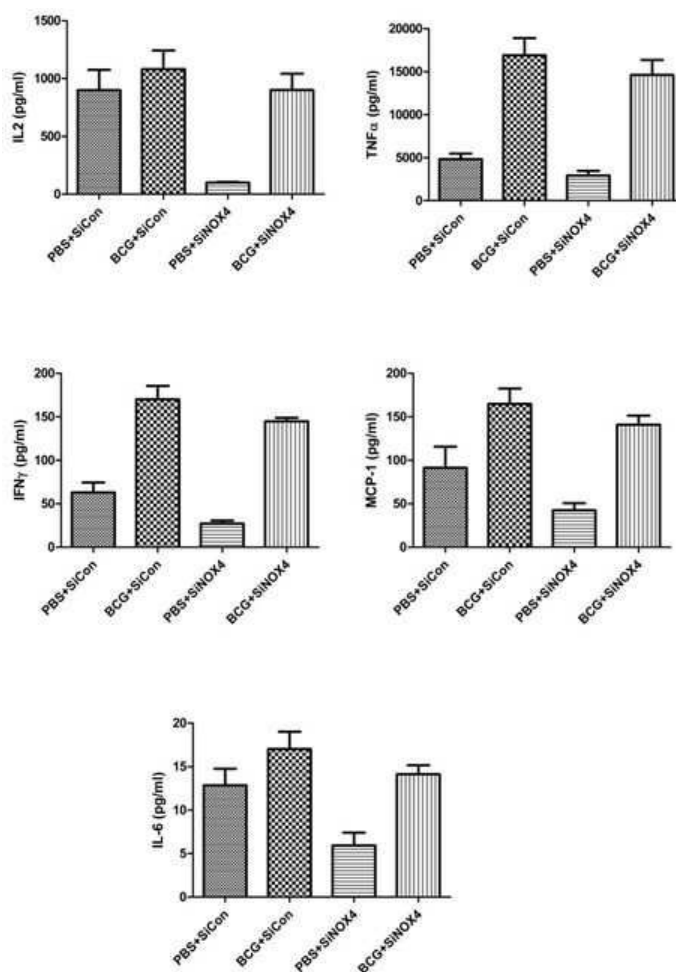
도면8a



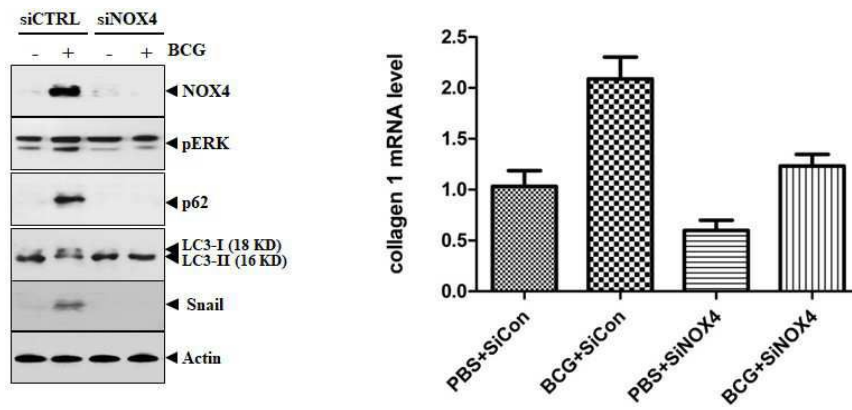
도면8b



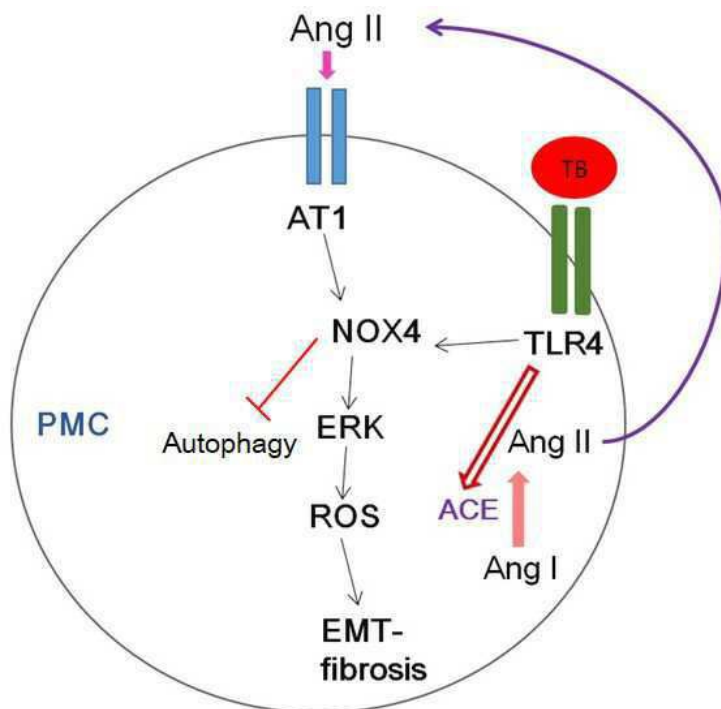
도면8c



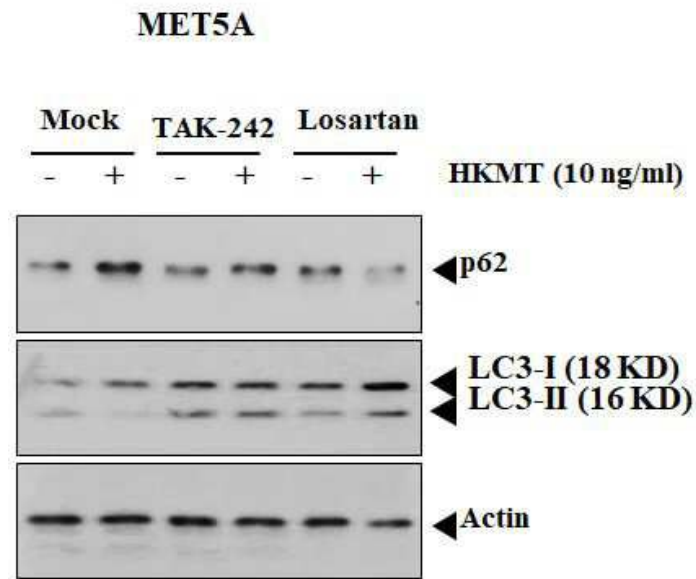
도면9



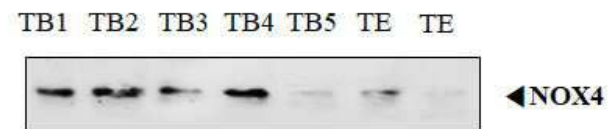
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating tuberculous pleural fibrosis
- <130> HallymU-JYHong-PleuralFibrosis
- <160> 5
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> siRNA for mouse NOX4
- <400> 1
- ucagacaaaau guagacacu
- <210> 2
- <211> 51
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Epitope for mouse NOX4 Antibody formation

<400> 2

Leu Ile Leu Leu Pro Met Cys Arg Thr Leu Leu Ala Tyr Leu Arg Gly

1 5 10 15

Ser Gln Lys Val Pro Ser Arg Arg Thr Arg Arg Leu Leu Asp Lys Ser

20 25 30

Arg Thr Phe His Ile Thr Cys Gly Val Thr Ile Cys Ile Phe Ser Gly

35 40 45

Val His Val

50

<210> 3

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Epitope for mouse NOX4 Antibody formation

<400> 3

Tyr Met Leu Leu Thr Leu His Val Ser Gly Gly Leu Leu Lys Tyr Gln

1 5 10 15

Thr Asn Leu Asp Thr His Pro Pro Gly Cys Ile Ser Leu Asn Arg Thr

20 25 30

Ser Ser Gln Asn Ile Ser Leu Pro Glu Tyr Phe Ser Glu His Phe His

35 40 45

Glu Pro Phe Pro Glu Gly Phe Ser Lys Pro Ala Glu Phe Thr Gln His

50 55 60

Lys Phe Val Lys Ile Cys Met Glu Glu Pro Arg Phe Gln Ala Asn Phe

65 70 75 80

Pro Gln Thr Trp Leu Trp Ile Ser Gly Pro Leu Cys Leu Tyr Cys Ala

85 90 95

Glu Arg Leu Tyr Arg Tyr Ile Arg Ser Asn Lys Pro Val Thr Ile Ile

100 105 110

Ser Val Ile Ser His Pro Ser Asp Val Met Glu Ile Arg Met Val Lys

115 120 125

Glu Asn Phe Lys Ala Arg Pro Gly Gln Tyr Ile Thr Leu His Cys Pro

130 135 140

Ser Val Ser Ala Leu Glu Asn His Pro Phe Thr Leu Thr Met Cys Pro

145 150 155 160

Thr Glu Thr Lys Ala Thr Phe Gly Val His Leu Lys Ile Val Gly Asp

165 170 175

Trp Thr Glu Arg Phe Arg Asp Leu Leu Leu Pro Pro Ser Ser Gln Asp

180 185 190

Ser Glu Ile Leu Pro Phe Ile Gln Ser Arg Asn Tyr Pro Lys Asp Asp

195 200 205

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

210 215 220

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Target sequence for human NOX4 SiRNA

<400> 4

ctgttggtgga cccaattca 19

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse control SiRNA

<400> 5

aaccagcaag guguaucgcc ac 22