



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0065257
(43) 공개일자 2020년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/04 (2006.01) *A23L 33/195* (2017.01)

A61K 38/16 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/04 (2013.01)

A23L 33/195 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0151545

(22) 출원일자 2018년11월30일

심사청구일자 2018년11월30일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김화중

대전광역시 중구 서문로 96 센트럴파크2단지아파트 208동 2104호

박혜수

대전광역시 중구 문화로22번길 29, 가동 302호 (산성동, 성하빌라)

백용우

대전광역시 서구 구룡산북로 212, 101동 502호 (관저동, 관저5엘에이치천년나무1단지)

(74) 대리인

특허법인 공간

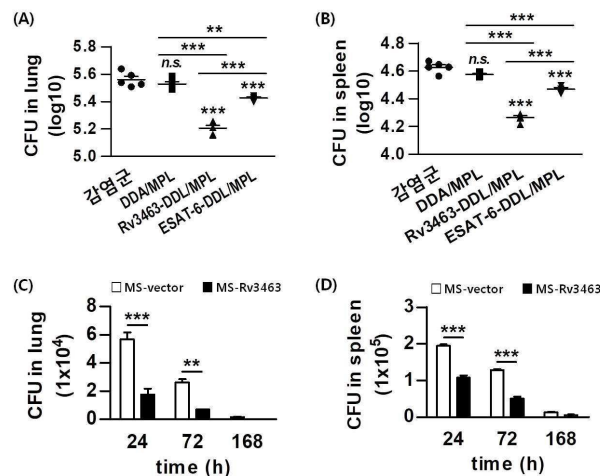
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물

(57) 요약

본 발명은 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 치료용 백신 조성물에 관한 것으로, 결핵균 배양 여과액 단백질로부터 Rv3463이라는 미코박테리아 유래 단백질을 분리하였고, Rv3463 단백질이 대식세포에서의 식포 성숙을 유도하고, PI3K 및 세포 내 칼슘 이온 증가 촉진을 통해 미코박테리아에 대한 우수한 살균 효과를 나타내며, 결핵균 감염 마우스 모델에서 감염된 결핵균을 제거하는 것을 확인하였다. 또한, Rv3463 단백질이 발현되는 미코박테리움 스메그매티스(*M. smegmatis*)를 이용한 경우에도 미코박테리움 스메그매티스가 대식세포 및 감염된 마우스에서 빠르게 제거되는 것을 확인함으로써, 본 발명의 Rv3463 단백질을 이용하여 결핵 예방 또는 치료 효과가 우수한 치료 백신, 치료제 또는 건강기능식품을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 38/164 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1E1A1A02921580

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 다제내성 결핵을 표적으로 하는 치료백신 개발연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2016.12.01 ~ 2019.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Rv3463 단백질은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 Rv3463 단백질은 결핵균을 제거하는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 결핵균 제거는 대식세포에서의 식포(phagosome) 및 리소좀(lysosome)의 융합(phagosome-lysosome fusion) 촉진을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 백신 조성물은 면역증강제를 포함하는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 결핵은 안 결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장 결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장 결핵, 다제내성 결핵, 폐 결핵, 담 결핵, 골 결핵, 인후 결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물.

청구항 7

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 Rv3463 단백질은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 결핵 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서,

상기 Rv3463 단백질은 결핵균을 제거하는 것을 특징으로 하는 결핵 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 결핵균 제거는 대식세포에서의 식포(phagosome) 및 리소좀(lysosome)의 융합(phagosome-lysosome fusion) 촉진을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 결핵 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵(tuberculosis, TB)은 여러 종류의 미코박테리움(*Mycobacterium*)종, 특히 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 감염되어 발병하는 치명적인 전염병이다. 결핵은 인체의 어느 곳에서나 발생할 수 있는 전염성인 동시에 감염성인 급성질환이며 만성질환으로, 85%가 폐에서 발생하는 폐결핵이고 혈류나 임파관을 따라 신체의 어느 기관에나 전파되어 발생할 수 있으며 발생 위치에 따라 병명이 달라진다.

[0003] 결핵의 원인이 되는 결핵균은 호흡기를 통해 감염된다. 전염성 있는 폐결핵 환자가 말을 하거나 기침, 재채기를 할 때, 결핵균이 포함된 미세한 침방울이 배출되는데, 수분은 곧 증발하고 결핵균만 공중에 남아 있다가 주변 사람이 숨을 쉴 때 함께 폐 속으로 들어가면서 감염된다. 결핵균에 감염된 사람 중 10%만이 발병하여 결핵 환자가 되고, 나머지 90%의 감염자는 면역 기전에 의해 발병하지 않는다. 또한, 결핵 환자 중 50%는 결핵균 감염 후 1~2년 내에 발병하고 나머지 50%는 잠복 상태로 있다가 면역력이 떨어지면 발병하게 된다.

[0004] 결핵의 치료는 세균을 죽이기 위한 항생제를 일정한 시간에 정확한 용량을 규칙적으로 복용하는 것이다. 그러나 결핵균이 포함되어 있는 미코박테리아의 세포벽은 구조와 화학적 구성이 특이하여 여러 항생제를 무력화하며, 약의 진입을 방해한다. 또한, 결핵균은 증식 속도가 무척 느리기 때문에 최소 6개월 정도 약을 복용해야 하나, 결핵약을 복용하고 1~2주가 지나면 증상이 완화된거나 나타나지 않아 결핵이 완치된 것으로 임의 판단하여 약 복용을 중단하게 되는 경우에는 죽지 않은 채 존재하던 결핵균이 다시 증식하여 재발하게 될 가능성이 크고, 약에 대한 내성을 가진 결핵균이 나타나 결핵의 치료를 어렵게 할 수 있다.

[0005] 현재 사용되고 있는 유일한 결핵 백신인 BCG(*Bacillus Calmette-Guerin*)는 유아기의 가장 심각한 형태의 결핵은 예외로 하고, 성인 폐결핵을 유효하게 예방할 수 없다. 또한 다양한 새로운 결핵 백신이 개발 중이나 잠재적으로 감염된 개인에게 안전하고 효과적인 백신이 여전히 필요하다. 따라서 결핵균에 대한 면역력을 유도할 수 있는 다양한 미코박테리아 항원의 확인과 정의는 병원체 숙주 상호작용을 좀 더 잘 이해할 수 있게 하며, 효과적인 백신 개발을 용이하게 할 수 있다.

[0006] 현재 임상시험 중인 12종의 결핵 백신은 BCG 대체용과 BCG 부스터용 백신과 치료용 백신으로 구분된다. 이중 8종이 BCG 부스터용으로 결핵균 단백질로 구성된 아단위 백신이다. 타입 1 T 보조(Type 1 T helper, T_H1) 세포의 역할이 항결핵 면역반응에서 필수적이기 때문에 이들 결핵균 단백질로 구성된 아단위 백신 후보는 대부분 T 세포 활성 단백질이며, 현재 백신에 적용된 T 세포 활성 단백질은 소수에 불과하다. 또한 단순히 T 세포 활성 반응을 강하게 유도하더라도 모두 예방 효과를 나타내는 것은 아니기 때문에 예방 및 치료 효과가 우수한 새로운 결핵 백신의 발굴이 시급한 실정이다.

[0007] 또한, 결핵의 효과적인 관리를 위해서는 언제든지 활동성 결핵으로 재활성화 될 수 있는 잠복 결핵 감염자의 관리가 필요하나, 이들을 대상으로 하는 예방 및 치료 백신은 아직까지 개발되지 않았다. 이는 T 세포 활성 단백질로 구성된 아단위 백신은 결핵균을 완전히 제거하는 면역반응(sterilizing immunity)을 유도할 수 없기 때문이다. 따라서 세포 내 결핵균을 직접 타격하거나 세포 내 결핵균 사멸 작용을 활성화시킬 수 있는 단백질은 최적의 결핵 치료 및 예방 백신 후보가 될 수 있다.

[0008] 대식세포(macrophage)는 결핵균을 사멸시키는 효과세포(effector cell)인 동시에 결핵균이 생존하는 장소이기도 하다. 따라서 대식세포의 결핵균 사멸 작용을 활성화시키는 것은 항-결핵 면역반응의 핵심이다. 구체적으로 대식세포는 식세포작용(phagocytosis) 후에, 식세포작용으로 형성된 식포(phagosome)의 성숙 과정, 즉, 식포가 엔도솜(endosome) 및 리소솜(lysosome)과 상호작용하여 파고리소솜(phagolysosome; 식포와 리소솜이 융합되어 만들어진 액포)을 형성하고, 이러한 파고리소솜 형성 과정에서 pH가 점진적으로 감소하여 파고리소솜의 산성화를

통해 결핵균을 분해하고 제거한다(Li, W., et al., 2012; Pauwels, A.M., et al., 2017). 동시에, 감염된 세포에 대한 살균 반응에 중요한 MAPK(Mitogen activated protein kinase) 및 칼슘 관련 신호 전이 기작을 포함하는 일련의 과정이 활성화된다(Li, W. et al., 2014).

[0009] 그러나 결핵균과 같은 병원성 미코박테리아는 엔도솜의 수송, 식포의 산성화 및 리소솜과의 융합과 같은 식포 성숙을 방해하는 전략을 가지고 있으며(Mitchell, G., et al., 2016), PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)/PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate)-의존적 파고리소솜 생물발생(biogenesis)에 중요한 세포질의 칼슘 이온(Ca^{2+})의 증가를 억제한다고 알려져 있다(Korb, V.C., et al., 2016). 또한, SapM, PtpA 및 LAM(lipoarabinomannan)을 비롯한 여러 가지 미코박테리아 인자는 식포의 성숙 과정을 조절한다는 것이 이미 보고되어있다.

[0010] 결핵균의 항원계는 매우 복잡하다. 결핵균의 항원(면역 활성 단백질) 중에는 대식세포에 작용하여 항-염증인자 또는 염증성 사이토카인의 분비를 유도하는 다양한 단백질들이 포함되어 있고, 이들 단백질을 동정하여 특성을 분석하는 연구들이 지속적으로 진행되고 있다(Nair, S., et al., 2009; Choi, H.G., et al., 2016).

[0011] 일반적으로 수지상세포나 대식세포는 항원을 포식하고 T 세포에 항원 펩타이드를 제시하여 T 세포를 활성화시킨다. 이때 결핵균의 면역 활성 단백질은 대식세포나 수지상세포의 T 세포 활성화 능력을 증대시키도록 성숙과 분화를 유도하게 된다. 즉, 결핵균의 면역 활성 단백질에 의해 활성화된 대식세포는 효과적으로 T 세포를 활성화시키고, 활성화된 T 세포는 IFN- γ (interferon- γ)를 분비하여 대식세포의 결핵균에 대한 면역능을 증대시킨다.

[0012] 그러나 아직까지 세포 내 결핵균을 직접 타격하거나 세포 내 결핵균을 직접적으로 사멸시킬 수 있는 기전을 활성화시키는 결핵균 면역 활성 단백질은 아직까지 보고된 바가 없다.

[0013] 본 발명자들은 결핵균 예방 또는 치료법을 개발하기 위해 결핵균 항원(면역 활성 단백질)을 지속적으로 연구해 왔으며, 결핵균 배양 여과액 단백질 항원계로부터 항원 85(Antigen 85, Ag85)와 같은 T 세포 활성 단백질을 비롯한 수지상세포 활성 단백질, 대식세포 활성 단백질 등을 동정하고, 그 특성을 분석하였다. 본 발명자들이 동정한 결핵균의 면역 활성 단백질 중 하나인 Rv3463 단백질이 대식세포에서 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL(interleukin)-12, IL-6와 같은 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 발현을 증가시킨다는 것을 확인하였으나, 결핵균 사멸 및 결핵 치료 효과는 아직까지 확인하지 못하였다.

[0014] 이에, 본 발명자는 Rv3463 단백질을 결핵 면역 치료법에 적용할 수 있는지를 분석하는 과정에서 Rv3463 단백질이 특이하게도 T 세포의 활성화 없이 세포 내 결핵균을 사멸시키는 것을 발견하였고, 이러한 Rv3463 단백질의 결핵균 사멸 기전을 연구한 결과, Rv3463 단백질이 대식세포에서의 식포 성숙을 유도하고, PI3K 및 세포 내 칼슘 이온 증가 촉진을 통해 미코박테리아에 대한 우수한 살균 효과를 나타내며, 결핵균 감염 마우스 모델에서 감염된 결핵균을 제거하는 것을 확인하였다. 또한, Rv3463 단백질이 발현되는 미코박테리움 스메그매티스(*M. smegmatis*)를 이용한 경우에도 미코박테리움 스메그매티스가 대식세포 및 감염된 마우스에서 빠르게 제거되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

[0015] 종래 선행기술로서 한국등록특허 제1893947호에는 결핵균 유래 단백질을 포함하는 결핵 예방 또는 치료용 조성물이 기재되어 있어 본 발명의 구성과 유사하나, 결핵균 유래 단백질로 Rv2882c가 기재되어 있는 바, 본 발명의 Rv3463 단백질과 차이가 있다. 또한, 한국등록특허 제1579861호에는 결핵균 유래 단백질인 Rv3131을 포함하는 결핵 예방용 백신 조성물이 기재되어 있으나, 본 발명의 Rv3463 단백질 및 이의 식포 성숙 촉진을 통한 결핵균 사멸 효과는 전혀 기재 및 암시되어 있지 않다. 국제공개특허 제W02007-108829호에는 결핵균 유전자를 암호화하는 항원성의 폴리펩타이드가 기재되어 있으나, 본 발명의 Rv3463 및 이의 식포 성숙 촉진을 통한 결핵균 사멸 효과는 전혀 기재 및 암시되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0016] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1893947호, Rv2882c 단백질을 포함하는 대식세포의 활성화 조성물, 2018. 08. 27. 등록.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제1579861호, Rv3131 단백질을 포함하는 결핵 예방용 백신 조성물, 2015. 12. 17. 등록.

(특허문헌 0003) 국제공개특허 제W02007-108829호, Tuberculosis nucleic acids, polypeptides and

immunogenic compositions, 2007. 09. 27. 공개.

비특허문헌

- [0017] (비특허문헌 0001) Byun, E.H., et al., Mycobacterium tuberculosis Rv0577, a novel TLR2 agonist, induces maturation of dendritic cells and drives Th1 immune response, FASEB J., 26, 2695-2711, 2012.
- (비특허문헌 0002) Choi, H.G., et al., Mycobacterium tuberculosis Rv2882c Protein Induces Activation of Macrophages through TLR4 and Exhibits Vaccine Potential, PloS one, 11, e0164458, 2016.
- (비특허문헌 0003) Korb, V.C., et al., Mycobacterium tuberculosis: Manipulator of Protective Immunity, International journal of molecular sciences, 17(3), 131, 2016.
- (비특허문헌 0004) Lee, K.I., et al., Mycobacterium avium MAV2054 protein induces macrophage apoptosis by targeting mitochondria and reduces intracellular bacterial growth, Sci. Rep., 6, 37804, 2016.
- (비특허문헌 0005) Li, W., et al., Role of Mucosal Immunity against Mycobacterium tuberculosis Infection, Tuberculosis research and treatment, 2012, 791728, 2012.
- (비특허문헌 0006) Li, W. et al., Mycobacterium tuberculosis Rv3402c enhances mycobacterial survival within macrophages and modulates the host pro-inflammatory cytokines production via NF-kappa B/ERK/p38 signaling, PloS one, 9, e94418, 2014.
- (비특허문헌 0007) Mitchell, G., et al., Strategies Used by Bacterial to Grow in Macrophages, Microbiology spectrum, 4(3), 2016.
- (비특허문헌 0008) Nair, S., et al., The PPE18 of Mycobacterium tuberculosis interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage, Journal of immunology, 183, 6269-6281, 2009.
- (비특허문헌 0009) Pauwels, A.M., et al., Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation, Trends in immunology, 38, 407-422, 2017.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 본 발명의 목적은 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 상기 Rv3463 단백질은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 유래의 단백질일 수 있다.
- [0021] 상기 Rv3463 단백질은 결핵균을 제거할 수 있다.
- [0022] 상기 결핵균 제거는 대식세포에서의 식포(phagosome) 및 리소좀(lysosome)의 융합(phagosome-lysosome fusion) 촉진을 통해 이루어질 수 있다.
- [0023] 상기 백신 조성물은 면역증강제를 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 결핵은 안 결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장 결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장 결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담 결핵, 골 결핵, 인후 결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 개선용

건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

- [0026] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0027] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 또는 치료용 백신 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 Rv3463 단백질은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 유래의 단백질로, 결핵균 배양 여과액 단백질 항원계로부터 동정된 결핵균 면역활성 단백질 중 하나이다.
- [0029] 상기 Rv3463 단백질은 Rv3463 단백질을 암호화하는 유전자가 삽입된 재조합 단백질 발현 벡터를 이용하여 대량 생산한 재조합 Rv3463 단백질일 수 있다. 또한, 상기 Rv3463 단백질은 결핵균 배양 여과액으로부터 분리, 정제할 수 있다.
- [0030] 상기 발현 벡터는 진핵세포용 또는 박테리아용 발현 벡터일 수 있으며, 바람직하게는 박테리아용 발현 벡터일 수 있다.
- [0031] 상기 발현 벡터는 숙주 미생물에 형질 전환시킬 수 있다. 바람직하게는 박테리아균이다.
- [0032] 상기 재조합 Rv3463 단백질은 내독소 제거 과정을 통해 세포 독성을 감소 또는 제거할 수 있다.
- [0033] 상기 Rv3463 단백질은 결핵균을 제거함으로써 결핵을 예방 또는 치료할 수 있다. 상기 결핵균은 세포 내 결핵균으로, 새로 감염된 결핵균뿐만 아니라 이미 감염되어 존재하는 결핵균(잠복 결핵균)일 수 있다.
- [0034] 상기 결핵균 제거는 대식세포에서 이루어질 수 있다. 보다 구체적으로 대식세포는 식세포작용(phagocytosis) 후에 식세포작용을 형성된 식포(phagosome)를 성숙 과정을 통해 결핵균을 제거할 수 있다. 상기 식포 성숙 과정은 식포가 엔도솜(endosome) 및 리소솜(lysosome)과 상호작용하여 파고리소솜(phagolysosome)을 형성하고, 이러한 파고리소솜 형성 과정에서 pH가 점진적으로 감소하여 파고리소솜의 산성화를 유도하여 결핵균을 분해, 제거하는 것이다. 상기 파고리소솜은 식포와 리소솜이 융합되어 만들어진 액포로, 상기 파고리소솜의 형성은 PI3K 신호전이 및 세포 내 칼슘 이온의 증가와 관련되어 있음이 알려져 있다.
- [0035] 상기 Rv3463 단백질은 상기 식포 성숙을 촉진하는 것이다. 바람직하게는 파고리소솜의 형성을 촉진하고, 더 바람직하게는 식포 및 리소솜의 융합을 촉진한다.
- [0036] 상기 Rv3463 단백질은 대식세포의 PI3K 신호 전이 또는 세포 내 칼슘 이온의 증가를 촉진할 수 있다.
- [0037] 상기 결핵은 인체의 어느 곳에서나 발생할 수 있는 전염성인 동시에 감염성 질환으로, 바람직하게는 안 결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장 결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장 결핵, 다제내성 결핵, 폐 결핵, 담 결핵, 골 결핵, 인후 결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 '백신(vaccine)'은 면역체계의 자극을 통해서 항원에 대한 특이적인 반응을 유발하여 다양한 감염성 질병과 암 등을 예방 또는 치료하는 물질을 의미하며, 백신은 크게 예방용 백신(prophylactic vaccine)과 치료용 백신(therapeutic vaccine)으로 구분된다. 상기 예방용 백신은 병원균에 노출되기 전에 미리 접종하여, 이후에 그 병원균이 체내에 침투하더라도 면역체계를 활성화하여 질병을 예방할 수 있게 만들어주는 백신을 말한다. 반면, 치료용 백신은 대부분 예방의 기능도 가지고 있지만, 이미 감염된 환자를 치료할 목적으로 만든 백신을 말한다.
- [0039] 상기 치료용 백신 조성물은 감염된 결핵균의 제거를 통해 결핵 발병을 예방할 수 있다. 또한, 이미 결핵균에 감염되어 있는 결핵 환자의 세포 내 결핵균을 제거하여 결핵을 치료할 수 있다.
- [0040] 상기 백신 조성물은 면역증가제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 면역증가제는 면역 반응의 향상 또는 접종 후 흡수 속도를 촉진하는 화합물 또는 혼합물을 지칭하는 것으로, 임의의 흡수-촉진제를 포함한다. 허용 가능한 면역증가제로는 프로인트 완전 어주버트, 프로인트 불완전 어주버트, 사포닌, 미네랄 젤, 예컨대 수산화알루미늄, 계면활성제, 예컨대 리소레시틴, 플루론폴리올, 다중음이온, 펩타이드, 오일 또는 탄화수소 에멀전, 키흐림펩 헤토시아닌, 디니트로페놀 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 Rv3463 단백질을 포함하는 조성물은 결핵 치료용 약학 조성물일 수 있다.

- [0043] 상기 약학 조성물은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 Rv3463 단백질 및 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 Rv3463 단백질에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0045] 상기 약학 조성물의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0046] 상기 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 점막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0047] 상기 Rv3463 단백질을 포함하는 조성물은 결핵 개선용 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0048] 상기 건강기능식품 조성물은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 Rv3463 단백질 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 건강기능식품 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 Rv3463 단백질을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품류 등이 있다.

발명의 효과

- [0050] 본 발명은 Rv3463 단백질을 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 또는 백신 치료용 조성물에 관한 것으로, 결핵균 배양 여과액 단백질로부터 Rv3463이라는 미코박테리아 유래 단백질을 분리하였고, Rv3463 단백질이 대식세포에서의 식포 성숙을 유도하고, PI3K 및 세포 내 칼슘 이온 증가 촉진을 통해 미코박테리아에 대한 우수한 살균 효과를 나타내며, 결핵균 감염 마우스 모델에서 감염된 결핵균을 제거하는 것을 확인하였다. 또한, Rv3463 단백질이 발현되는 미코박테리움 스메그매티스(*M. smegmatis*)를 이용한 경우에도 미코박테리움 스메그매티스가 대식세포 및 감염된 마우스에서 빠르게 제거되는 것을 확인하였다.
- [0051] 이를 통해, 본 발명의 Rv3463 단백질을 이용하여 결핵 예방 또는 치료 효과가 우수한 백신, 치료제 또는 건강기능식품을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 제조합 균주로부터 발현한 본 발명의 제조합 Rv3463 단백질의 분리 및 정제 여부를 확인한 것으로, 전기영동 한 겔의 염색(A) 및 웨스턴 블롯(B)을 이용해 확인한 결과를 보여주고 있다.
- 도 2는 본 발명의 제조합 Rv3463 단백질의 세포 독성 유발 여부를 확인한 결과를 보여주고 있다.

도 3은 본 발명의 Rv3463 단백질의 결핵균 성장 억제 효과를 확인한 결과로, (A) 및 (B)는 Mtb-RFP로 감염시킨 BMDM에서의 Rv3463 단백질 처리에 따른 Mtb-RFP의 성장 억제를 보여주는 것으로, (A)는 Mtb-RFP의 CFU를, (B)는 Mtb-RFP가 발현하는 RFP의 형광세기 측정을 통해 확인한 결과를 보여주고 있다. (C)는 Rv3463 단백질을 발현하는 미코박테리움 스메그매티스(MS-Rv3463)로 감염시킨 BMDM에서의 Rv3463 단백질 발현에 따른 미코박테리아의 성장 억제를 보여주는 것으로, MS-Rv3463의 CFU를 균의 생존율로 환산한 결과를 보여주고 있다.

도 4는 본 발명의 Rv3463 단백질의 결핵균 제거를 위한 대식세포 내 식포 성숙에의 영향을 확인한 결과로, 식포 성숙에 관련된 초기 엔도솜 마커인 Rab5(A) 및 VPS34, 후기 엔도솜 마커인 Rab7(C), 리소솜 마커인 LAMP1(D)가 결핵균인 Mtb-RFP에서 발현되는 RFP와 동시에 존재(colocalization, 결핵균을 포함하는 엔도솜 또는 리소솜)하는 것을 형광 이미지로 확인하고, 이의 비율을 분석한 결과를 보여주고 있다.

도 5는 본 발명의 Rv3463 단백질의 대식세포 내 자가포식에의 영향을 확인한 결과로, 자가포식 과정에 관련된 LC3 단백질의 발현 정도를 형광 이미지(A) 및 웨스턴 블롯(B)을 통해 확인한 결과를 보여주고 있다.

도 6은 본 발명의 Rv3463 단백질의 식포 성숙에 관련된 PI3K 관련 기전에서의 영향을 확인한 결과로, (A) 및 (B)는 PI3K 억제제 처리에 따른 Rv3463 단백질의 결핵균 제거 효과를 CFU 분석을 통해 확인한 결과를 보여주는 것으로, (A)는 PI3K 억제제로 Ly2940029(Ly)를, (B)는 와트마닌(WM)을 처리한 결과이다. (C) 및 (D)는 PI3K 억제제인 Ly2940029(Ly) 또는 와트마닌(WM) 처리에 따른 결핵균을 포함하는 엔도솜(C) 또는 리소솜(D)을 확인한 결과를 보여주는 것으로, 초기 엔도솜 마커인 VPS34 또는 리소솜 마커인 LAMP1과 Mtb-RFP의 RFP가 동시에 존재하는 것을 형광 이미지로 확인하고, 이의 비율을 분석한 결과를 보여주고 있다.

도 7은 본 발명의 Rv3463 단백질의 결핵균 제거에 관련된 세포 내 Ca^{2+} 증가에 미치는 영향을 확인한 결과로, (A) 및 (B)는 Rv3463 단백질 처리에 따른 세포내 Ca^{2+} 증가 정도를 형광이미지로 확인한 결과를, (C) 및 (D)는 세포 내 Ca^{2+} 유동성을 분석한 결과를 보여주고 있다.

도 8은 본 발명의 Rv3463 단백질의 결핵균 또는 미코박테리아 감염 마우스 모델에서의 균 제거 효과를 확인한 결과로, (A) 및 (B)는 결핵균 감염 마우스 모델에서의 Rv3463 단백질 처리에 따른 폐(A) 및 비장(B)에서의 결핵균 제거 효과를, (C) 및 (D)는 Rv3463 단백질을 발현하는 미코박테리움 스메그매티스 감염 마우스 모델에서 Rv3463 단백질 발현에 따른 폐(C) 및 비장(D)에서의 미코박테리아 제거 효과를 확인한 결과를 보여주고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0054] <실시예 1. 동물 세포, 결핵균 균주 및 동물 준비>

[0055] 실시예 1-1. 골수 유래 대식 세포(bone marrow-derived macrophage, BMDM) 준비

[0056] 대퇴골과 골반으로부터 얻은 BMDM은 10% FBS(fetal bovine serum), 50ng/ml M-CSF(macrophage colony stimulating factor)(R&D System, 미국) 및 1% 항생제(Welgene, 대한민국)가 포함되어 있는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 이용해 5% CO₂, 37°C 조건의 세포 배양기에서 배양하였다.

[0057] 실시예 1-2. 결핵균 균주 준비

[0058] 결핵균 H37Rv(Mtb H37Rv, ATCC 27294), H37Ra(Mtb H37Ra, ATCC 25177) 및 미코박테리움 스메그매티스(*M. smegmatis*)는 0.5% 글리세롤, 0.05% 트윈-80, 10% 올레인산, 알부민, 텍스트로스 및 카타라아제(catalase)가 포함되어 있는 7H9 배지를 이용해 배양하였다.

[0059] 빨간 형광 단백질(Red fluorescent protein, RFP)이 발현되는 H37Rv 결핵균(Mtb-RFP) 균주를 제조하기 위해, pRSET-RFP1 플라스미드 DNA를 주형으로 하고, 정방향 프라이머(ATGGATCCTATGGCTCTCCGAG) 및 역방향(TTGAATTCTTAGCGCCGCTCGAG) 프라이머를 이용해 RFP 유전자를 증폭하였다. 증폭한 RFP 유전자와 벡터인 pMV261 DNA를 BamH I과 EcoR I 제한 효소를 처리하여 절단한 다음, T4 리가아제(ligase)를 이용해 pMV261 벡터에 RFP 유전자를 삽입하여 pMV261-RFP 유전자를 제조하였다. 제조한 pMV261-RFP 유전자를 상기 결핵균 균주인 Mtb

H37Rv에 형질전환 시키고, 가나마이신(kanamycin) 저항성 및 RFP 발현 여부를 통해 RFP가 발현되는 결핵균인 Mtb-RFP를 선별하였다.

[0060] Lee, K.I., et al., Sci. Rep., 6, 37804, 2016.에 공지되어 있는 방법을 이용하여 Rv3463 단백질이 발현되는 미코박테리움 스메그매티스 균주(MS-Rv3463)를 제조하였다.

[0061] **실시예 1-3. 동물 준비**

[0062] 특정 병원균에 감염되지 않은 5~6주령, 암컷 C57BL/6 마우스를 충남대학교 의과대학의 생물학적 위험 동물 실험실에서 사육하였다. 사육 조건은 12시간 낮/12시간 밤의 조건하에 살균된 일반적인 식이를 공급하였다. 마우스는 매일 모니터링 하였고, 실험하는 동안 어떤 마우스도 임상증상이나 질병이 나타나지 않았다.

[0063] **<실시예 2. 재조합 Rv3463 단백질 생산>**

[0064] **실시예 2-1. 재조합 Rv3463 발현 벡터 제조 및 균주 확보**

[0065] 재조합 Rv3463 단백질 생산을 위해 결핵균 H37Rv(Mtb H37Rv, ATCC 27294)의 게놈 DNA(genomic DNA, gDNA)를 주형으로 하고, 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 Rv3463 유전자를 PCR로 증폭하였다. 이때, 대조군으로 이용한 결핵균 항원 인자인 ESAT6 및 Ag85 유전자도 함께 PCR로 증폭하였다. 증폭된 각각의 유전자의 PCR 산물 및 Hig-태그가 있는 발현 벡터인 pET22b(+)를 하기 표 1의 제한효소로 처리하여 절단하고, T4 리가아제 효소를 이용해 절단한 각각의 유전자를 pET22b(+) 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하였다. 제조한 재조합 벡터는 BL21 대장균에 형질전환(transformation)하여 재조합 Rv3463 발현 균주를 확보하였다.

표 1

목적유전자	프라이머 종류	프라이머 염기서열	제한효소
Rv3463	Forward	5' -CATATGACCAATTGTGCCGCCGCAAA-3'	Nde I, Hind III
	Reverse	5' -AAGCTTAGTCAGTCGGAGCGGCTTCGC-3'	
ESAT6	Forward	5' -AAGCTTATGACAGAGCAGCAGTGAAT-3'	Hind III, Xho I
	Reverse	5' -CTCGAGTGCGAACATCCAGTGACGTT-3'	
Ag85	Forward	5' -GAATTCGATGACAGACGTGAGCCGAAAG-3'	EcoR I, Hind III
	Reverse	5' -AAGCTTGCCGGCGCCTAACGAACCTCTG-3'	

[0067] **실시예 2-2. 재조합 Rv3463 단백질 생산**

[0068] 상기 실시예 2-1에서 확보한 재조합 Rv3463 발현 균주를 이용하여 Byun, E.H., et al., FASEB J., 26, 2695-2711, 2012.에 공지되어 있는 재조합 단백질 발현 및 정제 방법을 통해 재조합 Rv3463 단백질을 발현, 정제하였다.

[0069] 정제된 재조합 Rv3463 단백질로부터 내독소(endotoxin) 오염을 제거하기 위해 정제된 재조합 Rv3463 단백질을 4℃에서 6시간 동안 폴리미신 B-아가로스(polymyxin B-agarose)와 반응시킨 후, 재조합 단백질 내 잔류 LPS(lipopolysaccharide)의 양을 제조사의 지침에 따라 LAL 테스트 키트(Lonza, 스위스)를 사용하여 분석하였다. 내독소가 제거된 재조합 Rv3463 단백질의 순도는 전기영동한 겔의 코마지 블루(coomassie blue, CB) 염색 및 항-His 항체를 이용한 웨스턴 블롯(Western blot, WB)을 통해 확인하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0070] 도 1에서 보듯이, 겔의 코마지 블루 염색(A) 및 웨스턴 블롯(B) 결과 모두에서 29kDa의 재조합 Rv3463 단백질 밴드를 관찰하였다.

[0071] 이를 통해, 본 발명의 재조합 Rv3463 단백질이 분리, 정제되었음을 알 수 있었다.

[0072] **<실시예 3. 재조합 Rv3463 단백질의 세포 독성 확인>**

[0073] 상기 실시예 2-2의 재조합 Rv3463 단백질의 세포 독성 여부를 확인하였다.

[0074] 상기 실시예 1-1의 BMDM을 웰 당 5×10^5 개가 되도록 플레이트에 분주한 후 하룻밤 동안 배양하였다. 이후, 상기 실시예 2-2의 재조합 Rv3463 단백질을 1, 3, 5 μ g/ml이 되도록 처리하였고, 비교군으로 LPS 및 STS(staurosporine)를 각각 100ng/ml이 되도록 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이때, 아무것도 처리하지 않은 세포를 정상군으로 이용하였다. 24시간 후에 세포를 모아 PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고, 형광

물질인 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 붙어 있는 아넥신 V(FITC-Annexin V)와 PI(propidium iodide)를 15분간 처리하여 염색한 후, 유세포 분석기(FACScanto flow cytometer, BD Biosciences)를 이용해 사멸된 BMDM을 확인하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0075] 도 2에서 보듯이, 세포 사멸 유도 물질인 STS를 처리한 경우에는 아넥신 V 및 PI의 형광이 증가된 BMDM(사멸된 BMDM)의 수가 증가하는 반면에, 재조합 Rv3463 단백질을 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리한 경우는 사멸된 BMDM 수가 정상군과 유사하거나 낮은 것을 확인하였다.

[0076] 이를 통해, 본 발명의 분리, 정제된 재조합 Rv3463 단백질은 세포 독성을 일으킬 수 있는 내독소가 제거되었으며, 재조합 Rv3463 단백질이 세포 독성을 나타내지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[0077] <실시예 4. Rv3463 단백질의 결핵균 성장 억제 효과 확인>

[0078] 실시예 4-1. 결핵균 감염 세포에서의 결핵균 성장 억제 효과 확인

[0079] 상기 실시예 1-1의 BMDM을 웰 당 1×10^5 개가 되도록 플레이트에 분주하여 배양한 후, 상기 실시예 1-2의 RFP를 발현하는 Mtb-RFP를 1 MOI(multiplicity of infection)의 농도로 4시간 동안 처리하여 감염시켰다. 이후, 감염되지 않고 BMDM의 외부에 남아있는 결핵균을 제거하기 위해 항균제인 아미카신(amikacin)을 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 첨가하여 2시간 동안 처리하고, PBS로 세척하였다. 세척한 BMDM에 상기 실시예 2-2의 재조합 Rv3463 단백질을 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 이때, Mtb-RFP를 처리하지 않은 BMDM을 비감염군으로, Mtb-RFP 감염 후 배지를 처리한 BMDM을 감염군으로, $100\text{ng}/\text{ml}$ LPS, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ Ag85, $2\mu\text{g}/\text{ml}$ ESAT-6을 처리한 BMDM을 비교군으로 이용하였다. 배양 기간 동안 0, 24, 28, 72시간 별로 각각의 BMDM을 모아 증류수에 30분 동안 처리하여 BMDM을 용해(lysis)시켜 용해물을 확보하였다. 확보한 용해물을 연속적으로 희석한 다음 7H10 고체 배지에 도말하고 37°C 에서 배양하였다. 배양 후 고체 배지에 생성된 콜로니 수(colony forming unit, CFU)를 분석하였다. 또한 72시간 동안 배양한 BMDM을 유세포 분석기를 이용해 Mtb-RFP에서 발현되는 RFP의 형광 세기를 측정하여 Mtb-RFP의 성장 정도를 분석하였고, 그 결과를 도 3(A) 및 3(B)에 나타내었다.

[0080] 도 3(A)의 Mtb-RFP의 CFU 분석 결과에서 보듯이, Mtb-RFP 감염 후 배지만 처리한 경우(결핵균 감염)에는 배양 시간에 따라 CFU가 증가하는 반면에, 재조합 Rv3463 단백질, Ag85와 ESAT-6를 처리한 경우에는 배양 24시간까지는 CFU가 증가하다가 24시간 이후부터는 감소하는 것을 확인하였다. 특히나, 재조합 Rv3463 단백질을 처리한 경우에는 CFU가 Ag85 및 ESAT-6를 처리한 경우보다 더 많이 감소하는 것을 확인하였다.

[0081] 또한, 도 3(B)의 유세포 분석기를 이용하여 Mtb-RFP의 RFP 형광 세기를 측정한 결과에서 보듯이, Mtb-RFP 감염 후 배지만 처리한 경우(결핵균 감염)와 비교하여 재조합 Rv3463 단백질을 처리한 경우에 RFP 형광 세기가 가장 많이 감소한 것을 확인하였다.

[0082] 이를 통해, 본 발명의 Rv3463 단백질이 결핵균에 감염된 세포에서 결핵균의 성장을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

[0083] 실시예 4-2. Rv3463 단백질 발현 미코박테리아의 성장 억제 효과 확인

[0084] 상기 실시예 1-1의 BMDM을 웰 당 1×10^5 개가 되도록 플레이트에 분주하여 배양한 후, 상기 실시예 1-2의 Rv3463을 발현하는 미코박테리움 스메그매티스균(MS-Rv3463)을 10 MOI의 농도로 4시간 동안 처리하여 감염시켰다. 이때, Rv3463 유전자가 삽입되지 않은 벡터를 포함하고 있는 미코박테리움 스메그매티스 균(MS-vector)을 대조군으로 처리하였다. 이후, 감염되지 않고 BMDM 외부에 남아있는 균을 제거하기 위해 겐타마이신(gentamicin)을 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 넣고 2시간 동안 처리하고, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 겐타마이신이 포함된 10% FBS를 24시간 마다 추가하면서 72시간 동안 배양하였다. 배양기간 동안 0, 24, 28, 72시간 별로 각각의 BMDM을 모은 다음, 모은 BMDM 세포를 이용하여 상기 실시예 4-1의 균의 CFU 분석 방법과 동일하게 진행하여 배양시간에 따른 미코박테리움 스메그매티스균 수를 분석하였다. 0시간의 미코박테리움 스메그매티스 균수를 100% 생존율로 하고, 배양 시간별 미코박테리움 스메그매티스 균수를 생존율로 환산하였고, 그 결과를 도 3(C)에 나타내었다.

[0085] 도 3(C)에서 보듯이, MS-Rv3463의 경우, MS-vector와 비교하여 배양 시간에 따른 미코박테리움 스메그매티스균의 생존율이 더 많이 감소된 것을 확인하였고, 72시간에서는 미코박테리움 스메그매티스균이 완전히 제거된 것을 확인하였다.

[0086] 상기 실시예 4-1 및 4-2의 결과를 통해, 본 발명의 Rv3463 단백질이 결핵균에 감염된 세포에서 결핵균의 성장을 억제하고, 결핵균을 사멸시킨다는 것을 알 수 있었다.

[0087] <실시예 5. Rv3463 단백질의 대식세포에서의 식포 성숙에의 영향 확인>

[0088] 대식세포에서의 식포 성숙은 박테리아 제거를 위한 가장 중요한 기작 중 하나이다. 따라서 본 발명의 Rv3463 단백질이 결핵균이 감염되는 동안에 식포 성숙 과정에서 나타나는 파고리소좀 형성에 영향을 주는지 확인하였다.

[0089] 상기 실시예 1-1의 BMDM를 커버슬라이드를 넣은 12웰 플레이트에 웰 당 2×10^5 개가 되도록 분주하여 배양한 후, 상기 실시예 1-2의 Mtb-RFP를 1 MOI의 농도로 4시간 동안 처리하여 감염시켰다. 이후, PBS로 세포를 세척한 후, 상기 실시예 2-2의 재조합 Rv3463 단백질을 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 이때, Mtb-RFP를 처리하지 않은 BMDM을 비감염군으로, Mtb-RFP만을 처리한 BMDM을 감염군으로, $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ESAT-6를 처리한 BMDM을 비교군으로 하였다. 배양 후에 4% 파라포름알데히드를 처리하여 세포를 고정시키고, Mtb-RFP가 포함된 엔도솜 또는 리소솜을 확인하기 위해, 초기 엔도솜 마커인 Rab5와 VPS34, 후기 엔도솜 마커인 Rab7 및 리소솜 마커인 LAMP1을 인식하는 항체를 처리한 후, Alexa 488이 결합된 항-토끼 IgG(Alexa 488-anti-rabbit IgG) 또는 항-쥐 IgG(Alexa 488-anti-rat IgG)를 넣어 면역 염색하였다. 항체 처리가 끝나고 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)를 처리하여 핵을 염색하였다. 염색이 완료된 세포는 공초점 현미경(confocal microscope)을 이용하여 각각의 형광 이미지를 촬영하였다. 형광 이미지에서 엔도솜 또는 리소솜에 Mtb-RFP가 포함되어 각각의 마커와 RFP가 동시에 존재(colocalization)하는 비율을 분석하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0090] 도 4에서 보듯이, 재조합 Rv3463 단백질을 처리한 경우에는 Mtb-RFP와 초기 엔도솜 마커인 Rab5(A) 및 VPS34(B), 후기 엔도솜 마커인 Rab7(C), 리소솜 마커인 LAMP1(D)이 동시에 존재하는 비율이 비교군으로 처리한 ESAT-6를 처리한 경우에 비해 현저히 증가한 것을 확인하였다.

[0091] 추가적으로, 감염된 세포가 리소솜을 이용하여 세포 내 병원균을 분해시키는 과정인 자가포식(autophagy)은 결핵균 제거를 위한 중요한 목표이다. 따라서 본 발명의 Rv3463 단백질이 자가포식체(autophagosome) 축적을 유도하는지 확인하기 위해 면역형광염색을 이용해 대식세포 내의 자가포식체 축적과 관련되어 있는 내인성 미세소관 관련 단백질 경쇄 3(microtubule-associated protein light-chain 3, LC3)의 발현을 형광 이미지 및 웨스턴 블롯을 통해 확인하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0092] 도 5에 보듯이, 형광 이미지 결과(A) 및 웨스턴 블롯 결과(B) 모두에서 자가포식 유도체인 라파마이신(rapamycin)을 처리한 경우(Rapa)에는 자가포식이 유도되어 내인성 LC3의 발현이 증가하였다. 또한, 결핵균만을 처리한 경우(Mtb)에도 내인성 LC3의 발현이 증가하였으나, 결핵균 처리 후에 Rv3463 단백질을 처리한 경우(Mtb+Rv3463)에는 Rv3463 처리에 따른 내인성 LC3의 발현이 증가하지 않았다.

[0093] 이를 통해, 본 발명의 Rv3463의 결핵균 제거는 대식세포에서의 강력한 식포 성숙(식포-리소솜 융합을 통한 파고리소솜 형성) 촉진 효과를 통해 이루어짐을 알 수 있었다.

[0094] <실시예 6. Rv3463 단백질의 식포 성숙 촉진 기전 확인>

[0095] 결핵균은 PI3K-의존적 파고리소솜 생물발생(biogenesis)에 중요한 세포 내(세포질)의 칼슘 이온 증가를 억제한다고 알려져 있다. 따라서 본 발명의 Rv3463 단백질의 PI3K-의존적 파고리소솜 생물발생, 즉 식포 성숙 기전에서의 영향을 확인하였다.

[0096] 실시예 6-1. PI3K 관련 기전에서의 영향 확인

[0097] 상기 실시예 1-1의 BMDM를 웰 당 1×10^5 개가 되도록 플레이트에 분주하여 배양한 후, PI3K 억제제인 LY2940029(Ly) $20 \mu\text{M}$ 또는 와트마닌(Wortmannin, WM) 200nM 을 1시간 동안 전처리 하였다. 이후, 상기 실시예 1-2의 Mtb H37Rv 또는 Mtb-RFP를 1 MOI의 농도로 4시간 동안 처리하여 감염시키고, 감염되지 않고 BMDM 외부에 남아있는 결핵균을 제거하기 위해 항균제인 아미카신을 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 넣고 2시간 동안 처리한 후, PBS로 세척하였다. 세척한 BMDM에 상기 실시예 2-2의 재조합 Rv3463 단백질을 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도가 되도록 처리하고 72시간 동안 배양하였다.

[0098] 상기 실시예 1-2의 Mtb H37Rv를 감염시킨 BMDM은 0, 72시간 별로 모은 다음, 모은 BMDM를 이용해 실시예 4-1의 균의 CFU 분석 방법과 동일하게 진행하여 Mtb H37Rv의 CFU를 분석하였고, 그 결과를 도 6(A) 및 6(B)에 나타내었다.

[0099] 도 6(A) 및 6(B)에서 보듯이, Mtb H37Rv 감염 후 재조합 Rv3463 단백질을 처리한 경우(Mtb+Rv3463)에는 CFU가 현저히 감소한 반면에, PI3K 억제제인 Ly294002(Ly)(A) 및 와트마닌(WM)(B)을 전처리하고 Mtb H37Rv 감염 및

제조합 Rv3463 단백질을 처리한 경우(Ly+Mtb+Rv3463 또는 WM+Mtb+Rv3463)에는 CFU가 Mtb H37Rv만 처리한 경우(Mtb)와 유사하게 나타나는 것을 확인하였다.

[0100] Mtb-RFP를 감염시킨 BMDM은 Mtb-RFP가 포함된 엔도솜 또는 리소솜을 확인하기 위해 상기 실시예 5와 같이 초기 엔도솜 마커인 VPS34와 리소솜 마커인 LAMP1의 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행하여 공초점 현미경을 통해 세포 이미지를 관찰하였고, 그 결과를 도 6(C) 및 6(D)에 나타내었다.

[0101] 도 6(C) 및 6(D)에서 보듯이, Mtb-RFP 감염 후 제조합 Rv3463 단백질을 처리한 경우(Mtb+Rv3463)에는 Mtb-RFP와 초기 엔도솜 마커인 VPS34(C) 및 리소솜 마커인 LAMP1(D)이 동시에 존재하는 비율이 증가한 반면에, PI3K 억제제인 Ly294002(Ly) 및 와트마닌(WM)을 전처리하고 Mtb-RFP 감염 및 제조합 Rv3463 단백질을 처리한 경우(Ly+Mtb+Rv3463 또는 WM+Mtb+Rv3463)에는 Mtb-RFP와 VPS3 또는 LAMP1이 동시에 존재하는 비율이 감소되는 것을 확인하였다.

[0102] 이를 통해, 본 발명의 Rv3463 단백질의 결핵균 성장 억제 및 제거 효과는 PI3K에 의존적임을 알 수 있었다.

[0103] 실시예 6-2. 세포내 칼슘 이온(Ca^{2+}) 농도에의 영향 확인

[0104] 파고리소솜의 형성에 있어서 세포 내 Ca^{2+} 이 중요하게 작용한다는 것이 보고되었다. 미코박테리아의 감염 후 세포 내 Ca^{2+} 의 증가는 미코박테리아성 식포에 대한 Rab5(초기 엔도솜 마커)의 모집을 촉진하고, 그 결과 식포에 PI3K VPS34(초기 엔도솜 마커)를 모집하여 식포 막으로의 PI3P의 생산을 증가시킨다. 이에, 본 발명의 Rv3463 단백질이 세포 내의 Ca^{2+} 을 증가시켜 결핵균의 살균 효과를 나타내는지 확인하였다.

[0105] 상기 실시예 1-1의 BMDM를 커버슬라이드를 넣은 플레이트에 웰 당 5×10^5 개가 되도록 분주하여 배양하고, Ca^{2+} 지시약인 Fluo-4AM(이미지 분석용) 또는 Fluo-2AM(유동성 분석용)을 $10 \mu M$ 이 되도록 처리하고 30분간 반응시켰다. 이후, 세포 내의 Ca^{2+} 의 증가를 억제하여 식포 성숙을 억제한다고 알려진 미코박테리아 인자인 리포마라비노만난(lipoarabinomannan, LAM)($20 \mu g/ml$), 상기 실시예 2-2의 제조합 Rv3463 단백질($5 \mu g/ml$) 또는 LAM 및 제조합 Rv3463 단백질 혼합물을 처리하여 3분 또는 30분간 배양하고, HBSS(Hank's balanced salt solution)으로 세척하였다. BMDM에 상기 실시예 1-2의 Mtb H37Rv를 1 MOI의 농도로 2시간 동안 처리하여 감염시키고, PBS로 세척한 후, 상기 실시예 2-2의 제조합 Rv3463 단백질($5 \mu g/ml$) 또는 이오노마이신(ionomycin, 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가제)($500nM$)을 처리하였다. 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Leica TCS SP8)을 이용해 BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 의 형광 이미지를 촬영하였고, Ca^{2+} 의 유동성(flux) 분석은 칼슘과 결합되지 않은 Fluo-2AM은 380nm에서 여기(excite)되고, 칼슘과 결합된 Fluo-2AM은 380nm에서 여기되는 특성을 기반으로 하여 니콘사의 Nikon Eclipse Microscope를 이용하여 5초 간격으로 30분 동안 분석하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0106] 도 7(A)에서 보듯이, Mtb H37Rv만 감염시킨 경우(Mtb)에는 BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 가 거의 관찰되지 않는 반면에, Mtb H37Rv 감염 후 제조합 Rv3463 단백질을 처리한 경우(Mtb+Rv3463)에는 BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 가 현저히 증가하는 것을 확인하였으며, 나아가, 제조합 Rv3463 단백질 처리 후 1분 동안 Ca^{2+} 의 양이 급격히 증가하다가 이후에 서서히 감소되는 것을 확인하였다.

[0107] 또한, 7(B)에서 보듯이, 제조합 Rv3463 단백질 또는 제조합 Rv3463 및 LAM 혼합물을 3분간 전처리하고 Mtb H37Rv를 감염시킨 경우(Rv3463 또는 Rv3463+LAM)에는 LAM을 단독으로 전처리한 경우(LAM)와 비교하여 BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 가 증가하였고, 제조합 Rv3463 단백질을 처리하기 전 또는 후에 LAM을 처리한 경우(LAM→Rv3463 또는 Rv3463→LAM)에는 LAM을 처리더라도 제조합 Rv3463 단백질 처리에 의한 BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 증가 효과는 전혀 억제되지 않는 것을 확인하였다.

[0108] 또한, 도 7(C) 및 7(D)의 BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 의 유동성 분석 결과에서 보듯이, (C)의 LAM을 전처리한 후 세포 내 Ca^{2+} 를 증가시킨다고 알려진 이오노마이신을 처리한 경우(LAM→ionomycin)에는 이오노마이신을 처리하더라도 LAM에 의해 BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 증가 억제가 지속적으로 유지되어 BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 가 낮게 나타나는 반면에 LAM과 제조합 Rv3463 단백질을 동시에 전처리하고 이오노마이신을 처리한 경우(LAM+Rv3463→ionomycin)에는

BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 가 증가하는 것을 확인하였다. 나아가 (D)의 LAM을 전처리한 후 재조합 Rv3463 단백질을 처리한 경우(LAM→Rv3463)에도 재조합 Rv3463을 처리한 후에 BMDM의 세포 내 Ca^{2+} 가 증가하는 것을 확인하였다.

[0109] 이를 통해, 본 발명의 Rv3463 단백질이 대식세포의 세포 내 Ca^{2+} 를 증가시켜 파고리소좀의 형성을 촉진시킴으로써 결핵균에 대한 우수한 살균 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[0110] <실시예 7. 결핵균 감염 모델에서의 Rv3463 단백질의 결핵 치료 효과 확인>

[0111] 상기 실시예 1-3의 C57BL/6 마우스에 상기 실시예 1-2의 결핵균인 Mtb H37Ra를 마우스 마리 당 1×10^6 CFU씩 기관 내 점적을 통해 주입하여 감염시켰다. 감염 10일 후에, 면역증강제(adjuvant)인 모노포스포릴 리피드-A(monophosphoryl lipid-A, MPL)(1회 주입 시 $5\mu\text{g}$)를 포함하는 디메틸디옥타데실암모늄(dimethyldioctadecylammonium, DDA) 리포솜(DDA/MPL)을 사용하여 상기 실시예 2-2의 재조합 Rv3463 단백질과 비교균인 ESAT6 단백질을 $25\mu\text{g}$ 씩을 10일 간격으로 3회 주입하여 면역화 시켰다. 최종 면역화 2주 후에 마우스를 희생시켰다.

[0112] 또한, 상기 실시예 1-2의 Rv3463 단백질이 발현되는 미코박테리움 스메그매티스균(MS-Rv3463)을 마우스 마리당 1×10^6 CFU씩 상기 실시예 1-3의 C57BL/6 마우스에 1, 3, 7일째에 꼬리 정맥을 통해 주사하여 감염시켰다. 감염 후 1, 3, 7일 차에 마우스를 희생시켰다.

[0113] 상기 희생시킨 마우스의 폐와 비장에 존재하는 균을 측정하기 위해, 각 조직을 PBS에 넣고 균질화하여 균질액을 확보하였다. 확보한 균질액을 상기 실시예 4-1의 균의 CFU 분석 방법과 동일하게 진행하여 Mtb H37Ra 또는 MS-Rv3463의 CFU를 분석하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 이때, Mtb H37Ra를 감염시킨 마우스의 균질액은 7H10 고체 배지에, MS-Rv3463을 감염시킨 마우스의 균질액은 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 가나마이신이 포함되어 있는 7H10 배지에 도말하였다.

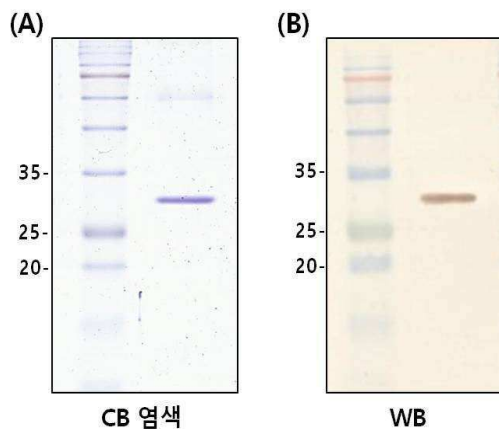
[0114] 도 8(A) 및 8(B)에서 보듯이, Mtb-H37Ra 감염 후 재조합 Rv3463 단백질을 주입한 결과, 폐(A) 및 비장(B) 모두에서 Mtb-H37Ra의 수가 현저히 감소되는 것을 확인하였다.

[0115] 또한, 도 8(C) 및 8(D)에서 보듯이, MS-Rv3463의 경우, Rv3463 단백질이 발현되지 않은 MS-vector와 비교하여 폐(C) 및 비장(D)에서 미코박테리움 스메그매티스균 수가 현저히 감소되는 것을 확인하였다.

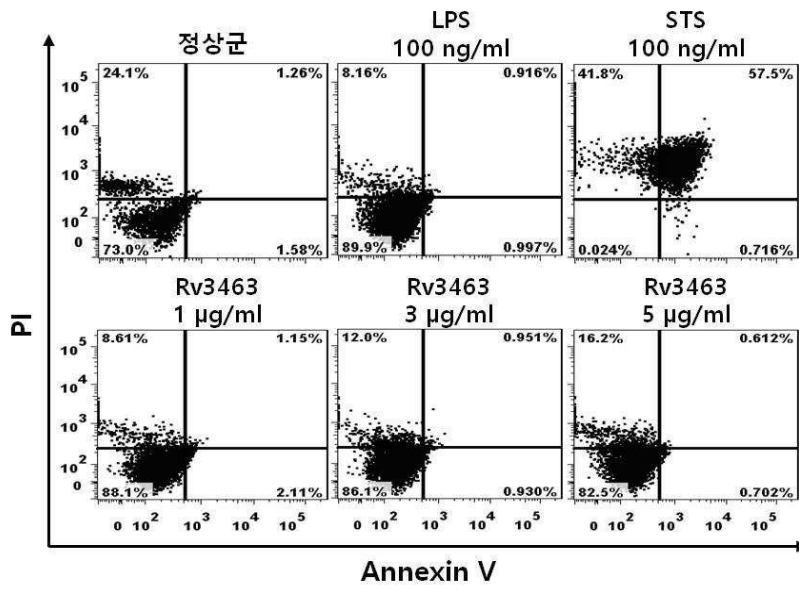
[0116] 이를 통해, 본 발명의 Rv3463 단백질이 인체 내 감염된 결핵균을 사멸시킴으로써 결핵을 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

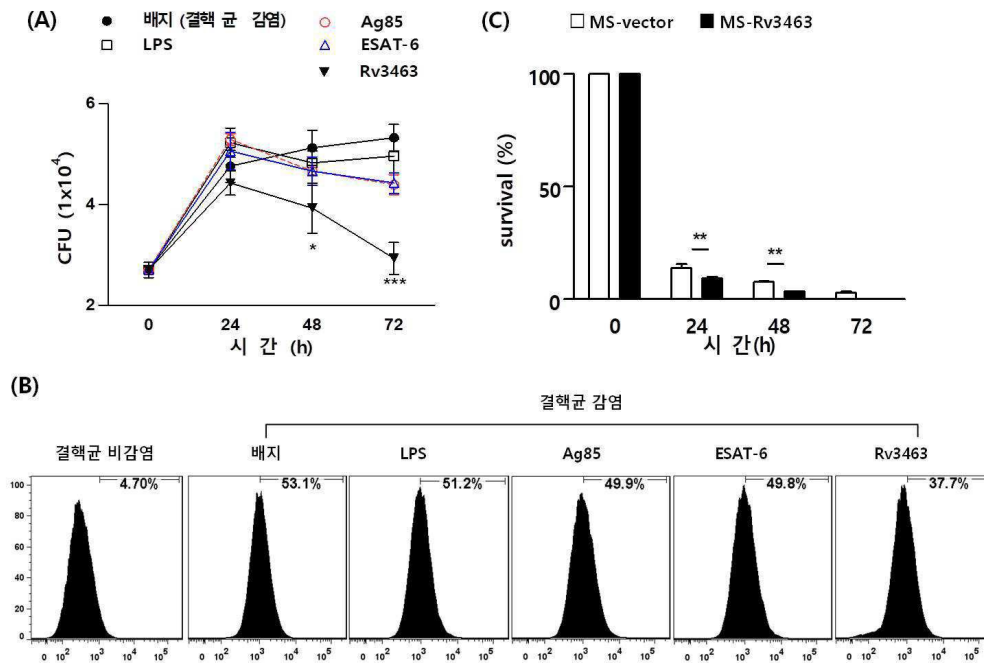
도면1



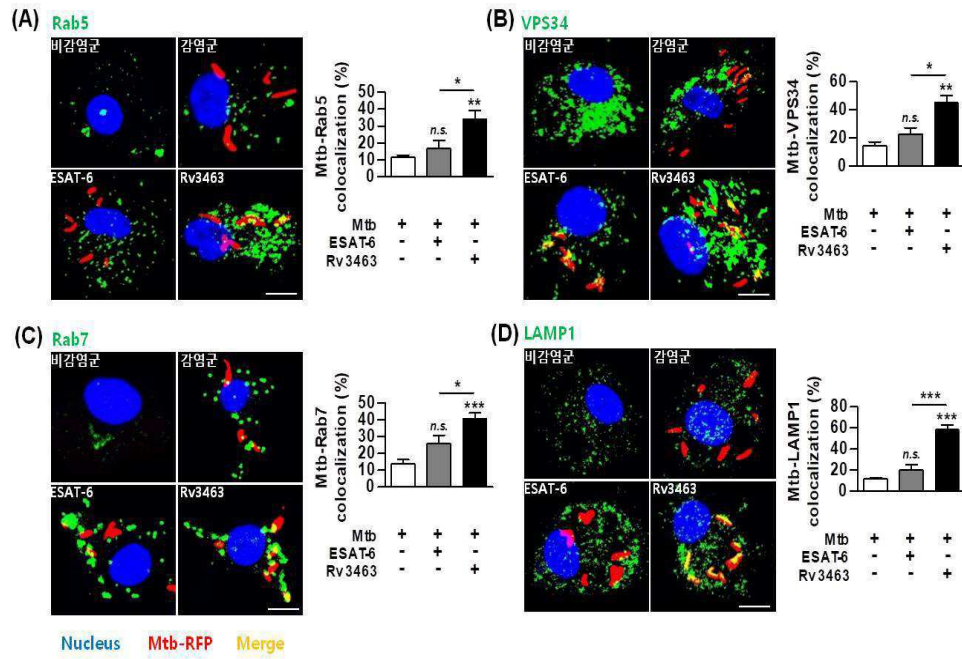
도면2



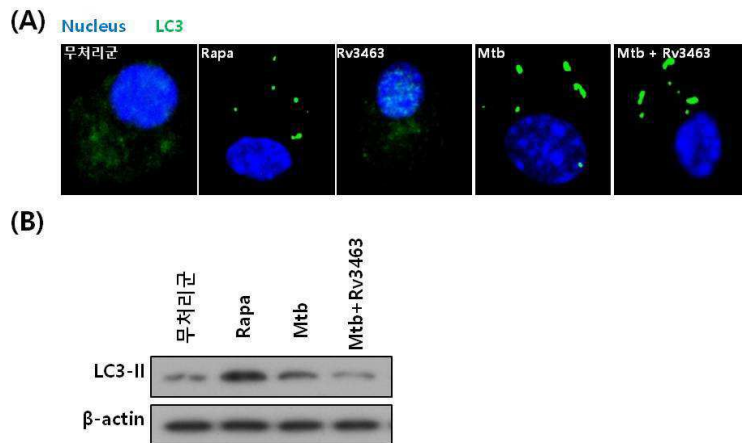
도면3



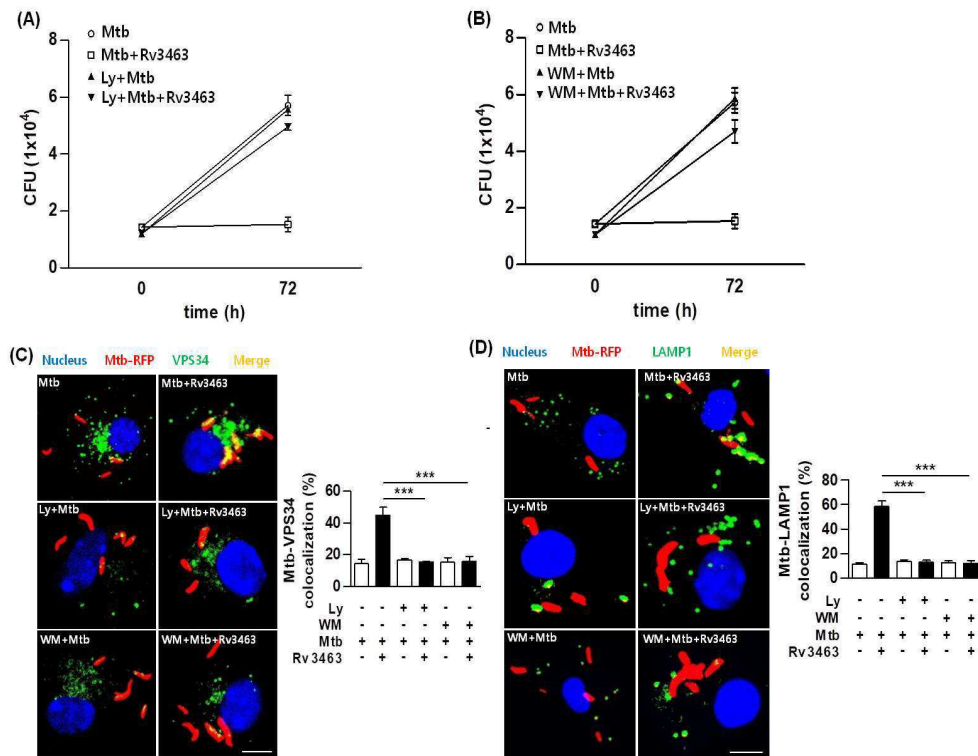
도면4



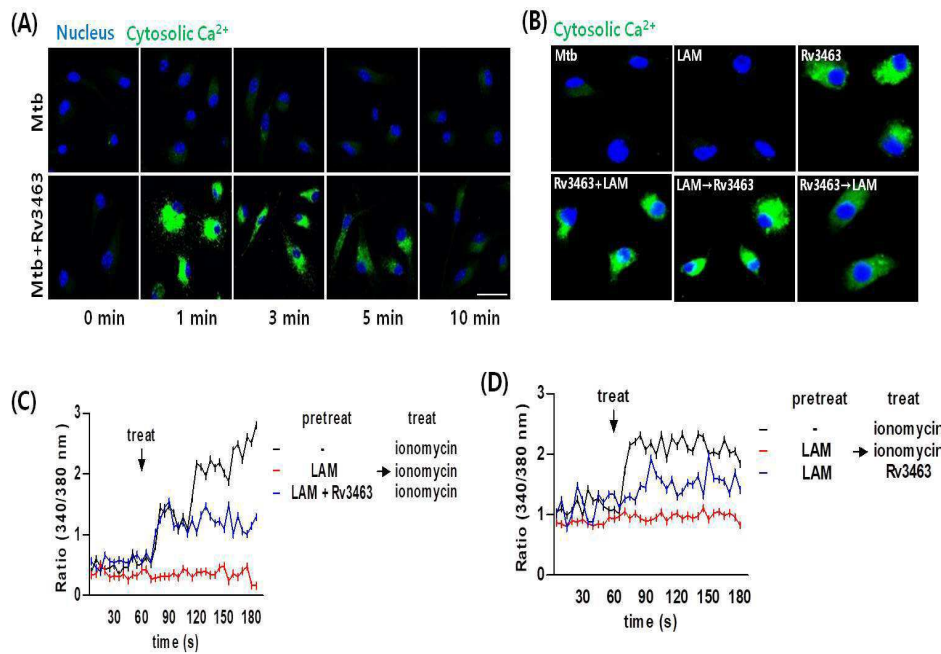
도면5



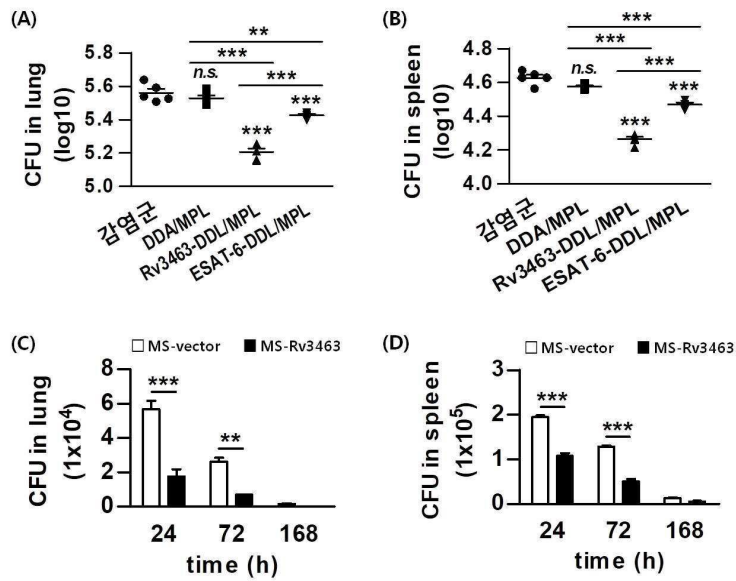
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University

<120> Vaccine composition for prevention or treatment of tuberculosis containing Rv3463 protein

<130> 1

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 285

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M. tuberculosis Rv3463

<400> 1

Met Thr Asn Cys Ala Ala Gly Lys Pro Ser Ser Gly Pro Asn Leu Gly

1 5 10 15

Arg Phe Gly Ser Phe Gly Arg Gly Val Thr Pro Gln Gln Ala Thr Glu

20 25 30

Ile Glu Ala Leu Gly Tyr Gly Ala Val Trp Val Gly Gly Ser Pro Pro

35 40 45

Ala Ala Leu Ser Trp Val Glu Pro Ile Leu Gln Ala Thr Thr Thr Leu
50 55 60

Cys Val Ala Thr Gly Ile Val Asn Ile Trp Ser Ala Pro Ala Gln Arg
65 70 75 80

Val Ala Glu Ser Phe His Arg Ile Glu Ala Ala Tyr Pro Gly Arg Phe
85 90 95

Leu Leu Gly Ile Gly Val Gly His Ala Glu Met Ile Ser Glu Tyr Arg
100 105 110

Lys Pro Tyr Asn Ala Leu Val Glu Tyr Leu Asp Arg Leu Asp Asp Tyr
115 120 125

Gly Val Pro Ala Asn Arg Arg Val Val Ala Ala Leu Gly Pro Arg Val
130 135 140

Leu Gly Leu Ser Ala Arg Arg Ser Ala Gly Ala His Pro Tyr Leu Thr
145 150 155 160

Thr Pro Glu His Thr Ala Arg Ala Arg Glu Leu Ile Gly Pro Ser Ala
165 170 175

Phe Leu Ala Pro Glu His Lys Val Val Leu Thr Thr Asp Ser Ala Arg
180 185 190

Ala Arg Thr Val Gly Arg Gln Ala Leu Asp Met Tyr Phe Asn Leu Ala
195 200 205

Asn Tyr Arg Asn Asn Trp Lys Arg Leu Gly Phe Thr Asp Asp Glu Val
210 215 220

Ser Arg Pro Gly Ser Asp Arg Leu Val Asp Ala Val Val Ala Tyr Gly
225 230 235 240

Thr Pro Asp Ala Ile Ala Ala Arg Leu Asn Glu His Leu Leu Ala Gly
245 250 255

Ala Asp His Val Pro Ile Gln Val Leu Thr Glu Asp Asp Asn Leu Val
260 265 270

Ser Ala Leu Thr Glu Leu Ala Lys Pro Leu Arg Leu Thr
275 280 285