



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0089023
(43) 공개일자 2016년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A61K 35/74 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0008227
(22) 출원일자 2015년01월16일
심사청구일자 2015년01월16일

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
최영남
서울 종로구 대학로 101(연건동, 서울대학교 치과대학)
지숙
서울특별시 성북구 인촌로 73 치과 치주과 (안암동5가, 고려대병원)
백금진
서울 종로구 대학로 101(연건동, 서울대학교 치과대학)
(74) 대리인
손민

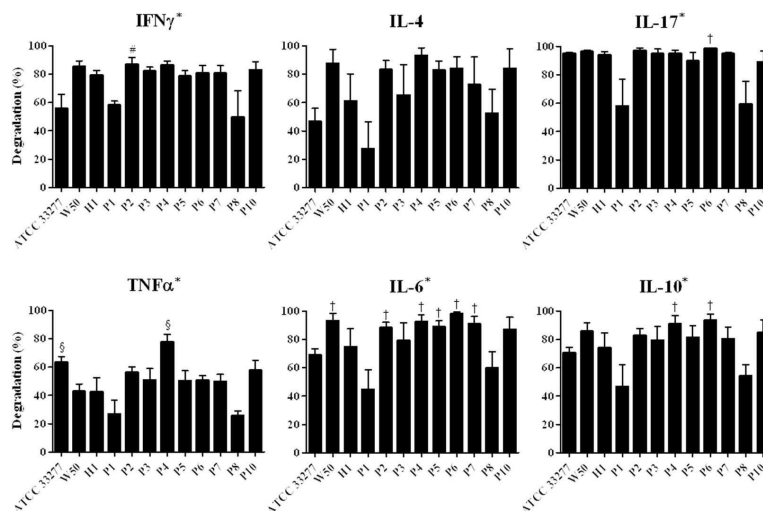
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 생균제로서 사용되는 신규한 포르피로모나스 진지발리스를 포함하는 치주염 예방용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 낮은 수준의 사이토카인 분해활성 및 침습성을 나타내는 신규한 포르피로모나스 진지발리스 균주 및 상기 신규한 포르피로모나스 진지발리스 균주를 생균제로서 포함하는 치주염 예방용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 치주염 예방용 약학 조성물을 이용하면, 치주염의 원인균의 감염 및 증식을 억제하여, 치주염의 발병을 예방할 수 있으므로, 보다 효과적인 치주질환의 예방 또는 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 KRF grant 2014050477
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기초연구사업
 연구과제명 구강 면역기능 장애
 기 여 율 1/1
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2007.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

KCTC12742BP로 기탁된 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1(*Porphyromonas gingivalis* KUMC-P1) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

야생형 포르피로모나스 진지발리스 균주인 포르피로모나스 진지발리스 ATCC 33277(*P. gingivalis* ATCC 33277) 균주 및 포르피로모나스 진지발리스 W50(*P. gingivalis* W50) 균주에 비하여 상대적으로 낮은 수준의 사이토카인에 대한 분해활성, 상피세포에 대한 침습성 및 병독력을 나타내는 것인 균주.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 사이토카인은 IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α 및 IFN γ 로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 균주.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 KCTC12742BP로 기탁된 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1 균주를 생균제로서 포함하는 치주염 예방용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 약학 조성물을 치주염의 발병이 우려되는 개체에 투여하면, 상기 개체의 구강내에서 상기 KCTC12742BP로 기탁된 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1 균주가 우점화되고, 이로 인하여 치주염을 발병시킬 수 있는 포르피로모나스 진지발리스 균주의 감염 및 증식을 억제함으로써, 치주염을 예방하는 효과를 나타내는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 생균제로서 사용되는 신규한 포르피로모나스 진지발리스를 포함하는 치주염 예방용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 낮은 수준의 사이토카인 분해활성 및 침습성을 나타내는 신규한 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 균주 및 상기 신규한 포르피로모나스 진지발리스 균주를 생균제로서 포함하는 치주염 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 인간의 구강 내에는 수십억에 달하는 세균이 덩어리를 이룬 채로 서식하여 치태(plaque)를 이루고 있는데, 치태 내의 세균은 음식물로 섭취된 당분을 이용하여 살아간다. 치태는 치아 표면에 주로 생성되어 칫솔질에 의하여 일부 제거되기도 하지만, 치아와 치아 사이나, 치아와 잇몸 사이에 생긴 치태는 칫솔질에 의해서도 제거되지 않고 잔류하며, 이러한 부위에 남아있는 치태는 석회화 물질인 치석으로 변화되면서 구강내 세균을 증식시킨다. 아울러, 이처럼 증식된 세균으로부터 방출된 독성물질은 잇몸같은 치주조직을 손상시켜 염증을 일으키게 되고, 상기 염증이 치조골로 전이되면, 급성 또는 만성적 치주질환(periodontal disease)을 유발시키게 된다.
- [0004] 상기 치주질환은 크게 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 분류되는데, 치은염은 치조골의 파괴없이 치은 출혈과 같이 치은 부위에만 염증이 존재하는 가벼운 치주질환으로서 염증 처치에 의해 잇몸 조직이 정상적인 상태로 환원될 수 있는 치주질환을, 치주염은 치조골 내부로 염증이 파급되어 치아 지지조직이 파괴되는 공격적인 치주질환을 각각 의미한다. 대체로 치주질환의 초기단계인 치은염은 연한 잇몸조직에만 침범한 것으로 이 단계에서는 회복이 가능하지만, 치료받지 않은 채로 있으면 치은염은 치주염을 유발시킬 수 있고, 치주염은 치주질환의 후기단계로서 치아를 지지하는 잇몸, 뼈들이 심하게 손상되는 것으로, 이 단계에서는 특별한 치료가 필요하며, 그렇지 않으면 치아를 손실시키게 된다. 특히, 치주질환이 진행됨에 따라 잇몸과 치조골을 침범하여 충치가 없는 치아라도 치아가 상실될 수 있는데, 18세 이상의 성인 가운데 적어도 절반 이상이 치주질환의 초기 상태에 있으며, 경우에 따라서는 5~6세의 어린이에서도 증상이 발견되기도 하므로, 전체적인 치주질환의 원인을 규명하거나 또는 치은염으로부터 치주염으로의 진행을 완하시켜서 치아의 손실을 방지하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0005] 현재까지의 연구에 따르면, 환경 요인, 진행 중인 여타 질환 및 유전적 요인에 의하여 치주질환이 발병하기도 하지만, 이것보다는 세균에 의한 치주조직의 감염에 의하여 치주질환이 발병되는 경우가 압도적으로 우위를 차지하는 것으로 알려져 있다. 특히, 치은염으로부터 치주염으로의 진행은 특이적인 그람-음성 세균 집합체인 치태에 의한 것으로 알려져 있다. 상기 치태는 구강 내 세균으로부터 분비된 분비물에 의하여 형성되고, 구강내 세균이 그의 내부에 존재하게 되는데, 평균적으로 1mg의 치태내에는 약 10^8 개의 세균이 포함되어 있고, 그중에서 25% 이상이 정상적으로 생존하는 것으로 알려져 있다.
- [0006] 상기 치태가 형성되는 과정을 구체적으로 살펴보면, 구강 내 세균에서 분비되는 점착성 물질이 치아의 표면에 얇은 막을 형성하고, 상기 막에 상기 세균이 부착된 다음, 시간 경과에 따라 세균의 양이 증가하여 상기 세균과 분비물로 구성된 집락인 치태가 형성된다. 특히, 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 균주는 치아와 잇몸사이의 치주낭에 서식하면서 치태의 당과 단백질을 분해하여 생존하면서, 잇몸조직을 구성하는 콜라겐을 분해하는 효소를 분비하여, 잇몸을 약화시킬 수 있는데, 상기 포르피로모나스 진지발리스 균주는 구강의 상피세포에 대한 침습능을 갖고 있어, 상기 상피세포내로 침습하여 치주염을 유발시킬 수 있다고 알려져 있다. 아울러, 이들 세균에 의한 치은염이 적절히 치료되지 않을 경우, 치아 및 치주의 표면이 손상되어 손상부위를 통해 세균이 치은내로 직접 침투하거나 또는 상기 세균으로부터 분비되는 효소(collagenase 등), 내독소, 면역 반응 유발물질 등의 물질이 치은의 상피세포 결합을 이완시키고 상피를 통과해서 치주 결합조직에 도달하여 염증을 일으킴으로써 이들 조직을 약화시킨다.
- [0007] 상술한 치주질환은 치은염으로부터 치주염으로 진행하기 전에 조기에 진단하여 치료할 경우, 가벼운 치료만으로도 구강건강을 회복할 수 있기 때문에, 이를 조기에 진단할 수 있는 방법을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 특허공개 제2007-0001984호에는 박테리아로부터 유래된 arg-진지페인(arg-gingipain)과 같은 박테리아 병독성 생성물의 검출을 위한 제1 검출 검정기 및 환자의 면역계 또는 염증계로부터 유래된 호중구 엘라스타아제의 검출을 위한 제2 검출 검정기를 포함하는 치주질환을 검출하기 위한 시험키트가 개시되어 있고, 특허공개 제2010-0061438호에는 세균의 ITS를 표적으로 하는 올리고뉴클레오타이드, 치주질환 원인 세균 특이적 올리고뉴클레오타이드 및 세균 특이적 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 치주질환 진단용 키트 및 상기 키트를 이용하여 치주질환을 진단하는 방법이 개시되어 있으며, 특허등록 제843443호에는 동물에서 치주질환을 일으키는 신규 박테리아, 상기 박테리아 특이적인 폴리뉴클레오타이드 및 상기 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 폴리펩티드를 포함하는 백신이 개시되어 있고, 특허등록 제1019131호에는 치주질환에 대한 감수성을 나타내는 인터루킨-1 베타(IL-B) 유전자의 상류영역(IL-1B(-3737))과 관련된 다형성을 검출하기 위한 방법 및 제제가 개시되어 있다. 그러나, 상기 진단키트 및 방법은 치은염 또는 치주염이 발병된 후에, 이를 치료하는 방법에 관한 것이기

때문에, 상기 치은염 또는 치주염의 발병을 예방하는 것이 보다 바람직한 것으로 예상되고 있으나, 아직까지는 이러한 치주질환의 발병을 예방할 수 있는 방법이 개발되지 않고 있는 실정이다.

[0009] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 치주질환의 발병을 예방할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 치주질환을 유발시키는 포르피로모나스 진지발리스 균주 중에서 상대적으로 낮은 수준의 사이토카인 분해활성 및 상피세포 침습능을 나타내는 신규한 균주를 발굴하였으며, 상기 발굴된 신규한 균주를 생균제로 사용할 경우, 병독력이 강하여 치주염을 유발할 수 있는 포르피로모나스 진지발리스 균주의 감염 및 증식을 억제함으로써 치주염을 예방할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 낮은 수준의 사이토카인 분해활성 및 침습성을 나타내는 신규한 포르피로모나스 진지발리스 균주를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규한 포르피로모나스 진지발리스 균주를 생균제로서 포함하는 치주염 예방용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 치주질환의 발병을 예방할 수 있는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 생균제에 주목하게 되었다. 즉, 치주염을 유발하는 주요 원인균의 하나인 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 집락형성 및 증식을 억제할 수 있다면 치주염의 발병을 예방할 수 있는데, 이를 위한 방법으로는 유사하지만 병독력이 낮은 균주를 생균제의 형태로 사전 접종하여 이를 구강내에서 우점화시킴으로서, 이후에 감염될 수 있는 강한 병독력을 갖는 포르피로모나스 진지발리스의 감염 및 증식을 억제하는 방안이 주목하였다. 이에, 상기 생균제로 사용할 수 있는 병독력이 낮은 균주를 발굴하고자 치주염 환자의 치태시료로부터 다양한 종류의 포르피로모나스 진지발리스 균주를 수득하고, 이들 균주를 대상으로 사이토카인 분해활성 및 상피세포에 대한 침습능을 시험한 결과, 한종의 균주(KUMC-P1)가 모든 종류의 사이토카인에 대한 분해활성이 다른 포르피로모나스 진지발리스 균주 보다도 상대적으로 낮은 수준을 나타낼 뿐만 아니라, 상피세포에 대한 침습능도 낮은 수준을 나타냄을 확인하였다.

[0015] 이에, 본 발명자들은 상기 균주를 "포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1(*Porphyromonas gingivalis* KUMC-P1)"이라 명명하고, 이를 2015년 1월 13일자로 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture)에 수탁번호 KCTC12742BP로 기탁하였다. 상기 기탁된 균주는 종래의 다른 포르피로모나스 진지발리스 균주보다도 낮은 수준의 사이토카인 분해활성 및 침습능을 나타내므로, 치주염의 예방용 생균제 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있을 것으로 분석되었다.

[0017] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 낮은 수준의 사이토카인 분해활성 및 침습성을 나타내는 신규한 포르피로모나스 진지발리스 균주인 KCTC12742BP로 기탁된 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1(*Porphyromonas gingivalis* KUMC-P1)을 제공한다.

[0019] 본 발명의 용어 "포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)"란, 치아와 잇몸사이의 치주낭에 서식하면서 치태의 당과 단백질을 분해하여 생존하면서, 잇몸조직을 구성하는 콜라겐을 분해하는 효소를 분비하여, 잇몸을 약화시킬 수 있는 균주를 의미한다. 상기 포르피로모나스 진지발리스 균주는 구강의 상피세포에 대한 침습능을 갖고 있어, 상기 상피세포내로 침습하여 치주염을 유발시킬 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 포르피로모나스 진지발리스는 치주염을 유발시키는 원인균으로 해석될 수 있고, 본 발명에서 제공하는 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1에 의하여 집락형성 및 증식이 억제될 경우, 이로 인한 치

주염의 발병이 예방될 수 있다.

- [0022] 본 발명의 용어 "치주염(periodontitis)"이란, 치조골 내부로 염증이 파급되어 치아 지지조직이 파괴되는 공격적인 치주질환을 의미한다. 상기 치주염은 치은부위에 염증이 발생하는 치은염 증상이 악화되어 유발되는데, 치아를 지지하는 잇몸, 뼈들이 심하게 손상되는 증상이 유발된다. 이러한 치주염은 대체로 그람-음성 세균 집합체(치태)에 의해 유발되는 것으로 알려져 있는데, 상기 치태에 포함된 주요 원인균으로는 포르피로모나스 진지발리스 균주가 알려져 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 치주염은 본 발명에서 제공하는 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1를 생균제로 접종함에 의하여 예방될 수 있는 질환인 것으로 해석될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 치주염 환자로부터 치태시료를 수득하고, 이를 배양하여 각각의 포르피로모나스 진지발리스 균주를 수득한 다음, 이들의 사이토카인 분해활성을 측정한 결과, 균주별로 서로 다른 양상의 사이토카인 분해활성을 나타내고, 특히 KUMC-P1 및 KUMC-P8 균주는 모든 종류의 사이토카인에 대한 낮은 수준의 분해활성을 나타냄을 확인하였으며(도 1a 및 1b), 상기 각각의 포르피로모나스 진지발리스 균주의 상피세포에 대한 침습능을 비교한 결과 KUMC-P3 균주가 가장 낮은 수준의 침습능을 나타내고, 상기 KUMC-P1 균주 역시 비교적 낮은 수준의 침습능을 나타냄을 확인하였다(도 2). 끝으로, 이러한 포르피로모나스 진지발리스 균주의 침습능이 치주낭 깊이 및 치조골 손실수준과 상관관계를 나타내는지 분석한 결과, 포르피로모나스 진지발리스 균주의 침습능이 치주낭 깊이, 치조골 손실수준 및 5mm 이상의 치주낭 깊이를 갖는 부위의 비율과 강한 상관관계를 나타냄을 확인하였다(도 3).
- [0027] 따라서, 상기 KUMC-P1 균주는 공지된 야생형 포르피로모나스 진지발리스 균주인 포르피로모나스 진지발리스 ATCC 33277(*P. gingivalis* ATCC 33277) 균주 및 포르피로모나스 진지발리스 W50(*P. gingivalis* W50) 균주에 비하여 상대적으로 낮은 수준의 사이토카인 분해활성과 상피세포에 대한 침습능을 나타내므로, 상기 KUMC-P1를 생균제로 사용하여 치주염의 발병이 우려되는 환자의 구강에 접종하여 우점화시키면, 낮은 수준의 사이토카인 분해활성과 상피세포에 대한 침습능으로 인하여 치주염을 발병시키지 않으면서도, 치주염을 발병시킬 수 있는 강한 병독력을 나타내는 포르피로모나스 진지발리스 균주의 감염 및 증식을 억제할 수 있으므로, 치주염을 예방하는 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [0029] 이에, 본 발명자들은 상기 KUMC-P1 균주를 "포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1(*Porphyromonas gingivalis* KUMC-P1)"이라 명명하고, 이를 2015년 1월 13일자로 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture)에 수탁번호 KCTC12742BP로 기탁하였다.
- [0031] 본 발명은 다른 하나의 양태로서, 상기 KCTC12742BP로 기탁된 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1 균주를 생균제로서 포함하는 치주염 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [0033] 상술한 바와 같이, 상기 KUMC-P1 균주는 낮은 수준의 사이토카인 분해활성과 상피세포에 대한 침습능을 나타내므로, 상기 KUMC-P1를 생균제로 사용하여 치주염의 발병이 우려되는 환자의 구강에 접종하여 우점화시키면, 낮은 수준의 사이토카인 분해활성과 상피세포에 대한 침습능으로 인하여 치주염을 발병시키지 않으면서도, 치주염을 발병시킬 수 있는 강한 병독력을 나타내는 포르피로모나스 진지발리스 균주의 감염 및 증식을 억제할 수 있으므로, 치주염을 예방하는 약학 조성물에 생균제로서 포함될 수 있다.
- [0034] 한편, 상기 KUMC-P1 균주를 치주염이 발병된 환자에 경구투여함으로써 치주염의 치료를 보조할 수 있다. 예를 들어, 치주염이 발병된 환자의 구강을 세척하여 원인균을 모두 제거한 다음, 상기 KUMC-P1 균주를 접종시키면, 치주염을 유발하는 균주의 유입을 억제하여, 치주질환의 치료효과를 배가시킬 수 있다.

- [0036] 본 발명의 용어 "예방"이란 상기 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1 균주의 투여로 인하여 치주염의 발병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0038] 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0040] 한편, 본 발명의 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 흡입제, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화하여 사용될 수 있다. 제제화할 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 상기 프로바이오틱스에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 약학 조성물에 포함된 상기 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1 균주의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서 일회 접종량을 기준으로 1×10^6 내지 1×10^8 의 세포수를 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적인 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 근위축증 치료용 제제와 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [0046] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 일회 접종시 1×10^6 내지 1×10^8 의 세포수의 포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1 균주를 접종하도록 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 약학 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 치주염의 발병이 우려되는 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치주염의 예방방법을 제공한다.

[0050] 본 발명의 용어 "개체"란 치주염이 발병될 가능성이 있는 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물, 양식어류 등을 제한 없이 포함할 수 있으나, 상기 질환이 발병된 개체 중에서 인간을 제외한다.

[0051] 본 발명의 치주염 예방용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 구강에서 발병되는 치주염의 특성상 구강내 경구 투여 될 수 있다.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 치주염 예방용 약학 조성물을 이용하면, 치주염의 원인균의 감염 및 증식을 억제하여, 치주염의 발병을 예방할 수 있으므로, 보다 효과적인 치주질환의 예방 또는 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0055] 도 1a는 다양한 사이토카인(IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α 및 IFN γ)에 대한 각각의 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)의 분해활성을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1b는 IL-1 α 재조합 단백질에 대한 각각의 포르피로모나스 진지발리스의 분해활성을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 10종의 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주(KUMC-H1, KUMC-P1 내지 KUMC-P8 및 KUMC-P10) 및 대조군 포르피로모나스 진지발리스 균주(*P. gingivalis* ATCC 33277 균주 및 *P. gingivalis* W50 균주)의 침습능을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 치주낭 깊이(A), 치조골 손실수준(B) 및 5mm 이상의 치주낭 깊이를 갖는 부위의 비율(C)과 포르피로모나스 진지발리스 침습능의 상관관계를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 실시예 1: 치주염 원인균의 동정

[0061] 1명의 정상인(H1)과 9명의 치주염 환자(P1 내지 P8 및 P10)로부터 치은하 치태(subgingival plaque) 시료를 각각 수득하였다. 상기 수득한 각 시료를 헤민(hemin)과 메나디온(menadione)이 포함된 양혈액 아가배지(sheep blood agar)에 도말하고, 혐기조건(10% CO₂, 5% H₂ 및 85% N₂)에서 배양하였다. 배양이 종료된 후, 검은색 콜로니를 선별하고, 선별된 콜로니로부터 수득한 균주를 5 μ g/ml 헤민과 5 μ g/ml 메나디온이 포함된 뇌-심장추출 액상배지(brain heart infusion broth, BD Diagnostic Systems)에 접종한 다음, 혐기조건하에 배양하였다. 상기 배양물로부터 게놈 DNA를 수득하고, 이에 포함된 16S rRNA를 코딩하는 유전자를 증폭시킨 다음, 상기 증폭된 유전자를 이용하여 상기 균주를 동정한 결과, 상기 각 치태 시료로부터 수득한 균주는 모두 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)에 속하는 균주임을 확인하였고, 상기 1명의 정상인(H1)과 9명의 치주염 환자(P1 내지 P8 및 P10)로부터 유래된 각각의 균주를 KUMC-H1, KUMC-P1 내지 KUMC-P8 및 KUMC-P10라 명명하였다.

[0063] 실시예 2: 사이토카인 분해 활성

[0065] Th1, Th2, Th17 및 Tregs와 같은 Th(CD4⁺ T-helper) 세포는 면역반응을 조절하는데 중요한 역할을 수행하므로,

상기 실시예 1에서 수득한 10종의 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주가 각각 어떠한 사이토카인을 분해하여 면역반응을 조절하는지 확인하고자 Th1 사이토카인인 IFN γ , Th2 사이토카인인 IL-4, Th17 사이토카인인 IL-17, 염증성 사이토카인인 TNF α , 염증성 사이토카인인 IL-6 및 항-염증성 사이토카인인 IL-10을 대상으로 사이토카인 분해활성을 측정하고자 하였다.

[0067] 구체적으로, 사이토카인 혼합물(IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α 및 IFN γ)을 포함하는 각질세포 성장배지(keratinocyte growth medium, KGM)를 수득하고, 이를 24웰 플레이트의 각 웰에 분주하였다. 이어, 상기 실시예 1에서 수득한 10종의 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주(KUMC-H1, KUMC-P1 내지 KUMC-P8 및 KUMC-P10) 및 대조군 포르피로모나스 진지발리스 균주(*P. gingivalis* ATCC 33277 균주 및 *P. gingivalis* W50 균주)를 상기 각 웰에 웰당 1×10^7 세포수의 농도로 접종하고, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 배양물을 원심분리하여 배양상등액을 수득하고, 상기 수득한 배양상등액에 남아있는 사이토카인의 농도를 ELISA 키트를 사용하여 측정한 다음, 상기 균주를 접종하지 않고 배양한 대조군의 배지에 포함된 사이토카인의 농도와 비교하였다(도 1a).

[0068] 도 1a는 다양한 사이토카인(IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α 및 IFN γ)에 대한 각각의 포르피로모나스 진지발리스의 분해활성을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1a에서 보듯이, 균주에 따라서 사이토카인을 분해하는 활성이 변화됨을 확인하였다. 대조군으로 사용된 균주에서는 *P. gingivalis* W50 균주가 *P. gingivalis* ATCC 33277 균주에 비하여, 4개의 사이토카인(IL-4, IL-6, IL-10 및 IFN γ)에 대한 분해활성이 낮은 수준을 나타내었고, 임상분리주에서는 KUMC-P1 및 KUMC-P8 균주가 모든 종류의 사이토카인에 대하여 낮은 분해활성을 나타내고, KUMC-P8 균주 보다는 KUMC-P1 균주가 상대적으로 낮은 분해활성을 나타냄을 확인하였다. 또한, TNF α 는 모든 종류의 균주가 낮은 수준의 분해활성을 나타냄을 확인하였는데, 이는 포르피로모나스 진지발리스 균주가 염증성 사이토카인에 대한 낮은 수준의 분해활성을 나타냄을 시사하였다.

[0070] 이에, 또 다른 염증성 사이토카인인 IL-1 α 재조합 단백질에 대한 분해활성을 동일한 방법으로 측정하였다(도 1b).

[0071] 도 1b는 IL-1 α 재조합 단백질에 대한 각각의 포르피로모나스 진지발리스의 분해활성을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1b에서 보듯이, 모든 균주가 IL-1 α 재조합 단백질에 대하여 극히 낮은 분해활성을 나타냄을 확인하였다.

[0073] 따라서, 사이토카인의 분해능은 균주별로 차이가 있고, 염증성 사이토카인인 TNF α 및 IL-1 α 는 모든 종류의 포르피로모나스 진지발리스 균주에 의한 분해에 대하여 낮은 민감성을 나타내며, 임상분리주인 KUMC-P1 균주는 모든 종류의 사이토카인에 대하여 상대적으로 가장 낮은 수준의 분해활성을 나타냄을 알 수 있었으므로, 상기 KUMC-P1 균주는 높은 병독력을 나타내는 포르피로모나스 진지발리스 균주에 의한 치주염의 발병을 예방할 수 있는 생균제로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0075] 실시예 3: 침습능 분석

[0077] 상기 실시예 1에서 수득한 10종의 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주는 구강내 상피세포에 감염되어 치주염을 유발하는 것으로 알려져 있으므로, 상기 각 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주의 침습능을 비교하고자 유세포 침습 분석을 수행하였다.

[0078] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 수득한 10종의 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주(KUMC-H1, KUMC-P1 내지 KUMC-P8 및 KUMC-P10) 및 대조군 포르피로모나스 진지발리스 균주(*P. gingivalis* ATCC 33277 균주 및 *P. gingivalis* W50 균주)의 표면에 CFSE(5-(and 6-) carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester)를 표지하여 각각의 표지된 균주를 수득하고, 상기 수득한 각각의 표지된 균주를 항생제가 없는 각질세포 성장배지에서 배양된 상피세포의 일종인 HOK-16B 세포에 1000 MOI의 농도로 가하여 4시간 감염시켰다. 상기 감염된 HOK-16B 세포를 PBS로 세척하고, 트립신-EDTA를 처리하여 세포를 분리하였다. 상기 분리된 세포에 0.4% 트립판 블루를

처리하여 세포막에 결합된 표지된 균주의 형광신호를 말소시키고, 이를 대상으로 유세포 분석을 수행하여, 상기 감염된 HOK-16B 세포로부터 평균 형광강도(mean fluorescence intensity, MFI)를 측정하였다. 이때, 대조군으로는 3.7% 포르말린으로 고정된 HOK-16B 세포에 상기 CFSE-표지된 각 균주를 접종한 것을 사용하였다. 상기 측정된 MFI 값을 이용하여 침습지수를 다음과 같이 산출하고, 상기 산출된 침습지수를 침습능으로 간주하여 상호 비교하였다(도 2).

[0080] 침습지수 = (감염된 HOK-16B 세포의 MFI - 음성대조군의 MFI)/CFSE-표지된 균주의 MFI X 100

[0082] 도 2는 10종의 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주(KUMC-H1, KUMC-P1 내지 KUMC-P8 및 KUMC-P10) 및 대조군 포르피로모나스 진지발리스 균주(*P. gingivalis* ATCC 33277 균주 및 *P. gingivalis* W50 균주)의 침습능을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 대조군 포르피로모나스 진지발리스 균주와 일부의 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주(KUMC-H1 및 KUMC-P1 내지 KUMC-P6)는 매우 낮은 수준의 침습능을 나타낸 반면, 일부의 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주(KUMC-P7, KUMC-P8 및 KUMC-P10)는 매우 높은 수준의 침습능을 나타냄을 확인하였다. 낮은 침습능을 나타내는 포르피로모나스 진지발리스 임상분리주 중에서도 KUMC-P3가 가장 낮은 침습능을 나타내었고, 상기 실시예 2에서 낮은 사이토카인 분해활성을 나타낸 것으로 확인된 KUMC-P1 균주 역시 낮은 침습능을 나타냄을 확인하였다.

[0083] 따라서, 상기 KUMC-P1 균주는 낮은 수준의 사이토카인 분해활성을 나타낼 뿐만 아니라, 낮은 수준의 침습능을 나타내므로, 높은 병독력을 나타내는 포르피로모나스 진지발리스 균주에 의한 치주염의 발병을 예방할 수 있는 생균제로 사용될 수 있음을 다시 한번 알 수 있었다.

[0085] 실시예 4: 임상자료와 침습능의 상관관계 분석

[0087] 치주염의 진단에 사용되는 임상자료인 치주낭 깊이(probing pocket depth, PD), 치조골 손실수준(bone loss) 및 5mm 이상의 치주낭 깊이를 갖는 부위의 비율(Sites with PD > 5mm)이 포르피로모나스 진지발리스에 의한 침습능과 연관되는지를 통계적으로 분석하였다(도 3). 이때, 치주낭 깊이는 각 환자별로 6개의 치아로부터 측정된 치주낭 깊이의 평균값으로 산출하고, 치조골 손실수준은 치근의 길이에 대한 시멘트-사기질 연결부(cement-enamel junction)로부터 치조제(alveolar crest)까지의 길이의 비율로 산출하였다.

[0088] 도 3은 치주낭 깊이(A), 치조골 손실수준(B) 및 5mm 이상의 치주낭 깊이를 갖는 부위의 비율(C)과 포르피로모나스 진지발리스 침습능의 상관관계를 나타내는 그래프이다. 도 3에서 보듯이, 치주낭 깊이, 치조골 손실수준 및 5mm 이상의 치주낭 깊이를 갖는 부위의 비율은 포르피로모나스 진지발리스 침습능과 강한 상관관계를 나타냄을 확인하였다.

[0089] 따라서, 포르피로모나스 진지발리스의 감염에 의하여 치주낭 깊이가 증가하고, 치조골 손실수준이 증가하며, 5mm 이상의 치주낭 깊이를 갖는 부위의 비율이 증가함을 알 수 있었다.

[0090] 상기 실시예 2 내지 4의 결과를 종합하면, 치주염을 유발하는 균주로 알려진 포르피로모나스 진지발리스의 감염에 의하여 포르피로모나스 진지발리스의 감염에 의하여 치주낭 깊이가 증가하고, 치조골 손실수준이 증가하며, 5mm 이상의 치주낭 깊이를 갖는 부위의 비율이 증가하므로, 이러한 포르피로모나스 진지발리스의 감염을 방지할 경우, 치주염의 발병을 예방할 수 있을 것으로 분석되었다. 이처럼, 포르피로모나스 진지발리스의 감염을 방지하여 치주염의 발병을 예방하는 방법의 하나로써, 병독력이 약한 포르피로모나스 진지발리스 균주를 생균제로서 사전 접종하여 우점화시킴으로써, 병독력이 강한 포르피로모나스 진지발리스의 증식을 억제하는 방법을 사용할 수 있다. 이러한 치주염 예방방법에 적합한 균주로서, 낮은 수준의 사이토카인 분해활성을 나타내면서도 낮은 침습능을 나타내는 KUMC-P1 균주가 사용될 수 있는데, 상기 균주의 6S rRNA를 분석한 결과, 지금까지 알려지지 않았던 새로운 아종임을 확인하였다.

[0091] 이에, 본 발명자들은 상기 균주를 "포르피로모나스 진지발리스 KUMC-P1(*Porphyromonas gingivalis* KUMC-P1)"이라 명명하고, 이를 2015년 1월 13일자로 한국생명공학연구원 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture)에 수탁번호 KCTC12742BP로 기탁하였다.

[0092]

상기 기탁된 균주는 종래의 다른 포르피로모나스 진지발리스 균주보다도 낮은 수준의 사이토카인 분해활성 및 침습능을 나타내므로, 치주염의 예방용 생균제 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있을 것이다.

수탁번호

[0093]

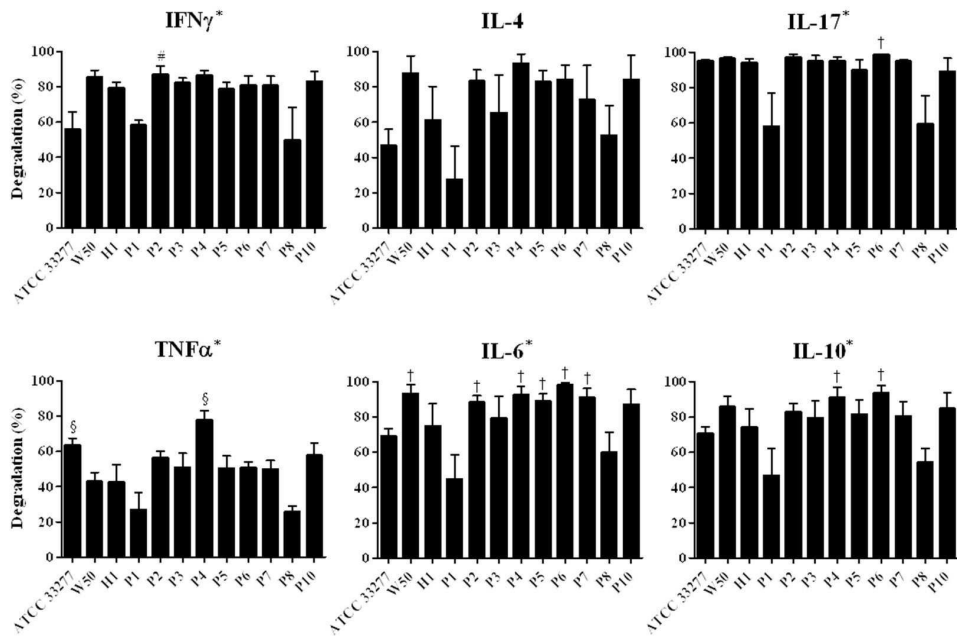
기탁기관명 : 미생물자원센터

수탁번호 : KCTC12742BP

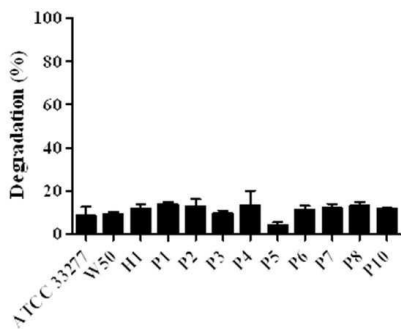
수탁일자 : 20150113

도면

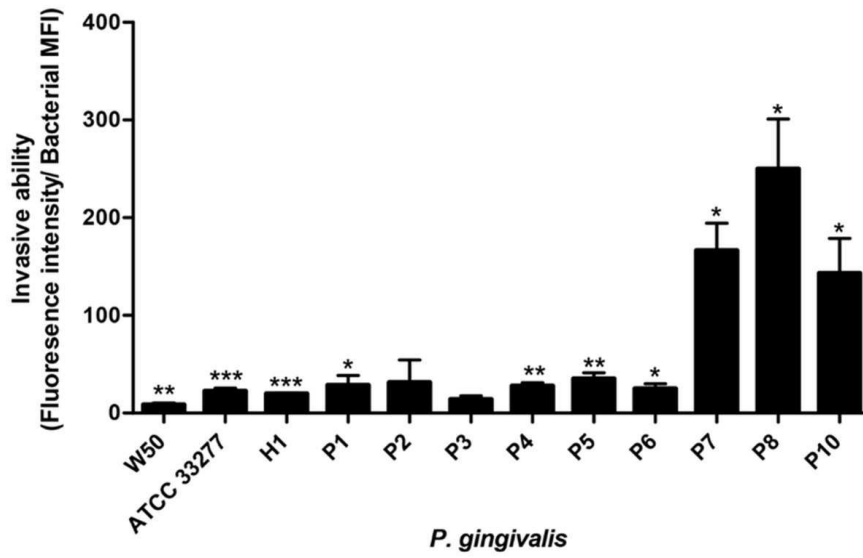
도면1a



도면1b



도면2



도면3

