



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0082122
(43) 공개일자 2012년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0003444

(22) 출원일자 2011년01월13일

심사청구일자 2012년01월02일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동,
충남대학교)

(72) 발명자

송창화

대전광역시 동구 한밭대로1237번길 52, 2동 401
호 (용전동, 신동아아파트)

임윤지

경기도 수원시 장안구 정자3동 SK한화아파트 62
6동 1101호

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 1 항

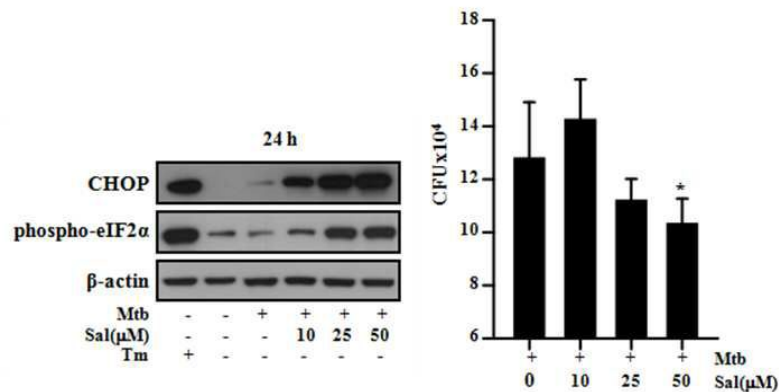
(54) 발명의 명칭 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 C/EBP homologous protein (CHOP)을 유효성분으로 함유하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 의하면 기존 약제에 대해 다약제내성이 있는 결핵균에 대해서도 예방 및 치료효과를 기대할 수 있으며, 세포내에 잠복하고 있는 결핵균의 성장을 억제할 수 있기 때문에 단독으로 사용하거나, 종래 약제와 병용하는 경우 잠복성 결핵균을 제거할 수 있게 된다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

C/EBP homologous protein (CHOP)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵균은 증식속도가 매우 느린 막대 모양의 항산성 간균이다. 공기를 통해 폐에 감염된 결핵균은 대부분은 자연소멸되지만 감염자 중 5~10%는 결핵환자로 발전하게 된다. 세계적으로 인구의 약 1/3(약 19억명)이 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 보균자이며, 매년 약 800~1,000만명의 결핵환자가 발생하고 약 300만명의 결핵환자가 사망하는 것으로 추정된다.

[0003] 결핵으로 인한 사망률은 90년대 이후 다시 증가하고 있는데 이는 다약제내성(multi-drug resistant; MDR) 결핵균에 의한 감염 증가와 HIV/TB 동시감염의 증가가 주원인으로 판단된다. 현재 전 세계적으로 약 5000만명의 다약제내성 결핵 환자가 있지만, 이에 대한 치료효율은 50% 정도 밖에 되지 않는다. 또한, 현재 전 세계적으로 약 600만명의 HIV/TB 동시 감염환자가 있으며 대부분이 결핵으로 사망하는 것으로 추정되고 있다.

[0004] 결핵균은 감염 후 일정 기간 동안 잠복기를 거친 후 발병되거나 또는 잠복기 없이 급성으로 발병하여 폐의 염증과 천식을 동반하는 합병증을 일으켜 감염자를 사망시킨다. 결핵균 단순 보균자의 경우, 자각증상이 없으므로 결핵을 타인에게 쉽게 전염시킬 수 있어 결핵의 예방 및 치료에 큰 어려움이 있는 실정이다.

[0005] 현재 결핵에 대한 예방 및 치료방법으로 화학요법과 백신법(BCG 접종법)이 있다. 화학요법은 약 85% 정도의 결핵 치료율을 나타내는 매우 효과적인 결핵 치료 방법임에도 불구하고, 6개월 이상 지속적인 투여가 필요하고, 상당 한 부작용을 초래하며, 비용이 많이 들 뿐만 아니라 다약제 내성 결핵에 대해서는 효능이 불투명하다는 문제가 있다. 특히 결핵균은 약 10^6 세포분열마다 한 개의 돌연변이주가 출현하기 때문에 최소한 2종 이상, 가능하면 4종 이상의 약제를 병용해야 하는데, 그럼에도 하나의 약제에 대한 내성이 생기는 경우 특별한 대처방법이 없다는 것이 화학요법의 가장 큰 문제점이다.

[0006] BCG는 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*)라는 세균의 병독성을 약화시킨 약독화 생백신으로 전세계적으로 가장 많이 사용되고 있다. 그러나 BCG는 어린이에게는 효과적이지만 성인에게는 치료 효능이 거의 없으며, 특히 잠복해 있는 결핵균에 대해서 거의 효과가 없는 것으로 알려져 있다.

[0007] 따라서 기존 약제와 작용기전이 다르고 부작용이 상대적으로 적은 새로운 항결핵제의 개발이 매우 시급한 과제이다. 더 나아가 언제든지 재활성화될 수 있는 잠복결핵에 효과가 있는 결핵 예방 및 치료용 약제를 개발하는 것은 매우 중요한 일이다.

[0008] 본 발명자들은 결핵균 감염과 apoptosis(세포자사멸)과의 관련성을 연구하는 과정에서, 소포체 스트레스(endoplasmic reticulum stress; ER 스트레스)에 관여하는 신호경로가 결핵균 감염시 관여하며 ER 스트레스 경로조절을 통해 세포내 결핵균 사멸을 조절할 수 있으며, apoptosis에 관여하는 특정 단백질이 세포에 잠복

하고 있는 결핵균의 증식을 억제하는 현상을 발견하고 이를 예의 분석/검토함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) H.-H. Choi et al. FEBS Letters 584 (2010) 2445~2454

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 기존 약제와 작용기전이 다르고 부작용이 상대적으로 적은 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 C/EBP homologous protein (CHOP)을 유효성분으로 함유하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0012] C/EBP homologous protein (Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD153으로도 알려짐, 이하 "CHOP"이라 함)은 다른 C/EBP 계열 단백질과 이종결합(heterodimer)하여 표적유전자의 전사를 억제 또는 활성화시키는 전사인자(transcription factor)의 일종이다.

[0013] 대표적인 CHOP의 분자량은 약 27kD이며, 192개의 아미노산으로 구성되어 있고(서열번호 1), 이것의 cDNA는 579개의 염기로 이루어져 있다(서열번호 2).

[0014] <서열번호 1> C/EBP homologous protein (CHOP)

[0015] 1 melvpatphy padvlfqtdp taemaaeslp fsfgtlsswe leawyedlqe vlssdenggt

[0016] 61 yvsppgnee eskifttldp aslawlteee pepaevtsts qspshpdssq sslaqeeeee

[0017] 121 dqgrtrkrkq sghsparagk qrmkekeqen erkvaqlae nerlkqeier ltreveatrr

[0018] 181 alidrmvnlh qa

[0019] <서열번호 2> C/EBP homologous protein (CHOP) gene

[0020] 1 atggagcttg ttccagccac tcccattat cctgcagatg tgcttttcca gactgatcca

[0021] 61 actgcagaga tggcagctga gtcattgcct ttctccttcg ggacactgtc cagctgggag

[0022] 121 ctggaagcct ggtatgagga cctgcaagag gtctgtctt cagatgaaaa tgggggtacc

[0023] 181 tatgtttcac ctcttgaaa tgaagaggaa gaatcaaaaa tcttcaccac tcttgaccct

[0024] 241 gcttctctgg cttggctgac tgaggaggag ccagaaccag cagaggtcac aagcacctcc

[0025] 301 cagagccctc actctccaga ttccagtcag agtccctgg ctcaggagga agaggaggaa

[0026] 361 gaccaaggga gaaccaggaa acggaaacag agtgggtcatt cccagcccg ggctggaaag

[0027] 421 cagcgcatga aggagaaaga acaggagaat gaaaggaaa tggcacagct agctgaagag

[0028] 481 aatgaacggc tcaagcagga aatcgagcgc ctgaccaggg aagtagaggc gactcgccga

[0029] 541 gctctgattg accgaatggt gaatctgcac caagcatga

발명의 효과

[0030] 이상과 같이 본 발명에 의하면 종래 전혀 알려져 있지 않던 CHOP의 기능을 활용한 것이므로, 기존 약제에 대해 다약제내성이 있는 결핵균에 대해서도 예방 및 치료효과를 기대할 수 있다.

[0031] 또한 본 발명에 의하면 세포내에 잠복하고 있는 결핵균의 성장을 억제할 수 있기 때문에 단독으로 사용하거나, 종래 약제와 병용하는 경우 잠복성 결핵균을 제거할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1a, 1b는 Mtb의 성분이 ER 스트레스-매개 apoptosis를 유도하며, 관련 단백질의 발현도 Mtb의 성분 농도에 따라 CHOP가 비례적으로 발현되는 것을 보여주는 RT-PCR 결과 및 western blotting에 의한 단백질 발현 전기영동사진.

도 2는 Mtb 항원 또는 Mtb에 의해 시간에 따라 CHOP가 비례적으로 발현되는 것을 보여주는 RT-PCR 결과 및 western blotting에 의한 단백질 발현 전기영동사진.

도 3는 CHOP 발현이 억제되면 대식세포내 결핵균의 수가 의미있게 증가하는 것을 보여주는 western blotting에 의한 단백질 발현 전기영동사진 및 그래프.

도 4는 CHOP 발현의 증가에 따라 대식세포내 결핵균 사멸효과가 있는 것을 보여주는 western blotting에 의한 단백질 발현 전기영동사진 및 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] apoptosis(세포자사멸)은 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 방식의 한 형태로 세포의 괴사나 병적인 죽음인 네크로시스와는 구별된다. apoptosis는 발생 과정에서 몸의 형태를 형성하고, 성체에서는 정상적인 세포를 갱신하거나 이상이 생긴 세포를 제거하는 역할을 한다. 이러한 apoptosis는 결핵균(이하 "Mtb"라 함)를 포함하는 세포내 병원균에 대한 숙주의 방어기작 중 하나로서, 세포내 물질의 배출이나 감염의 확산을 방지하는 기능을 한다.

[0034] 본 발명자들의 연구에 의하면, Mtb의 성분이 ER 스트레스-매개 apoptosis를 초래하는 것으로 확인되었다.(도 1 참조, 도에서 β -actin은 내부컨트롤, 이하 동일)

[0035] 즉, 결핵균 분비항원인 ESAT-6로 사람 상피세포(epithelial cell) line A549세포를 자극하면 ER 스트레스에 관여하는 것으로 알려진 XBP-1 전사인자의 spliced form 증가, 78-kDa glucose-regulated protein (이하 "GRP78"이라 함)과 CHOP mRNA의 증가가 관찰되었다(도 1a). 이때 ESAT-6 항원에 의한 apoptosis 관련 단백질인 ER 스트레스 매개 CHOP단백질의 발현은 항원의 농도에 의존적으로 증가하였(도 1b). 나아가 결핵균 H37Rv (Mtb)으로 감염된 mouse 대식세포주인 Raw264.7세포에서도 ER 스트레스 관련 분자들인 XBP-1의 splicing 증가 및 CHOP, GRP78/BiP 전사의 증가가 유도되었으며(도 2a), 실제 관련 단백질의 발현도 증가되었다(도 2b).

[0036] 이러한 사실들은 Mtb의 세포내 감염과 성장(증식)에 대응하여 CHOP가 비례적으로 발현되는 것을 의미한다.

[0037] 이상 본 발명자들의 선행연구에 따르면, 결핵균에 감염되면, ER 스트레스에 관여하는 CHOP가 다량 발현되어 감염된 세포의 apoptosis를 유도하는 것이 확인되었다. 본 발명은, 이에 추가하여 CHOP이 세포에 잠복하고 있는 결핵균의 증식을 억제하는 현상에 기초하여 완성된 것이다.

[0038] 전술한 바와 같이, 본 발명은 C/EBP homologous protein (CHOP)을 유효성분으로 함유하는 결핵 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물에서 유효성분인 CHOP의 함량과, 조성물 처방용량은 치료하고자 하는 포유동물의 연령, 체중 및 의학적 증상과, 투여방법에 좌우된다. 적정 함량과 적정 용량은 당업자에 의해 용이하게 결정될

것이다.

[0040] 본 발명에 의한 조성물은 생리 식염수 또는 포스페이트 완충 식염수 또는 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 같은 에탄올 폴리를 같이 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 운반체(vehicle)와 함께 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 리포솜, 생분해성 중합체, 예를 들면 폴리-락타이드, 폴리-글리콜라이드 및 폴리-락타이드-코-글리콜라이드, 또는 ISCOMS(면역자극 복합체) 중으로 혼입될 수 있고, 보충성 활성성분이 추가될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등의 통상적인 방식 또는 비강흡입방식에 따라 행해질 수 있다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 단백질을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알 또는 스프레이의 단위 투여형으로 제제할 수 있다.

[0042] 본 발명에 의한 조성물 중 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 상기 단백질을 0.1?0.2mg의 양으로 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며 바람직하기로는 0.02?0.1 mg이다.

[0043] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 첨부된 도면은 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0044] 실시예

[0045] 실시예 1 : CHOP의 발현이 세포내 결핵균의 증가에 미치는 영향 1

[0046] 세포내 결핵균의 사멸에 ER 스트레스 매개 세포사멸기전이 어떻게 관여하는지를 분석하기 위하여 siCHOP을 사용하여 CHOP발현을 억제시킨 대식세포로부터 결핵균의 수를 측정하였다. 즉, 대식세포주 Raw264.7세포를 사용하여 CHOP의 발현을 억제시킨 후 세포 하나당 한 개의 결핵균이 감염되는 비율로 감염시킨 후 세포내에서 생존하는 결핵균의 수를 비교하였다.

[0047] 서열번호 3, 4인 프라이머쌍 또는 서열번호 5, 6인 프라이머쌍을 이용하여 CHOP의 발현을 억제하기 위한 두 종의 siCHOP를 제작하였다(표 1). 음성대조군(siControl)으로는 사람의 유전자에 영향을 줄 수 없는 구조로 개발되어 상업적으로 판매되고 있는 siRNA(Bioneer, 한국)를 사용하였다. 하기 표 1의 서열에서 대문자는 RNA를, 소문자는 DNA를 나타낸다.

표 1

서열번호 3	sense 5'-GGUCUCAGCUUGUAUAUAGtt-3'
서열번호 4	antisense 5'-CUAUUAACAAGCUGAGACctt-3'
서열번호 5	sense 5'-GCUCUGAUUGACCGAAUGGtt-3'
서열번호 6	antisense 5'-CCAUUCGGUCAAUUCAGAGCtc-3'

[0049] 이들 siRNA를 200nM로 농도를 조절하고 세포내로 운반시키기 위해 Lipofectamine을 사용하여 transfection을 실시하였다. 5시간 후 Raw264.7세포를 새로운 배지로 세척하고 다시 항생제가 없는 10% 우태아혈청이 포함된 완전배지상태에서 결핵균 감염을 실시하였다. 결핵균으로는 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv를 사용하였으며 세포 하나당 결핵균 하나 정도의 비율로 2시간 동안 감염시켰다. 2시간 경과 후 세포의 결핵균을 세척하고 완전배지조건 하에서 48시간 동안 배양하였다. 48시간 경과후 세포안에 생존하고 있는 결핵균의 수를 7H10 agar배지에서 배양하여 전체 생균수를 산출하고 그 결과를 도 3에 도시하였다. 실험결과 두 종의

siCHOP가 동일한 양상을 보였기에 도면에는 서열번호 3, 4인 프라이머쌍으로 제작한 siCHOP를 적용한 결과만 도시하였다.

[0050] 도면에서 (A)는 결핵균 감염시 발현되는 소포체 스트레스 관련 인자들의 발현도를 RT-PCR방법으로 확인한 결과로서 결핵균 감염된 Raw264.7세포에서 배양시간에 따라 점점 소포체 스트레스 인자들의 발현이 증가하고 있는 것을 보여준다. (B)는 결핵균으로 감염된 Raw264.7세포로부터 소포체 스트레스 인자들의 단백질 발현이 점차 증가하고 있는 것을 보여주는 그림으로 결핵균 감염이 mRNA 뿐만 아니라 단백질의 발현에도 영향을 미친다는 것을 보여준다.

[0051] 도 3에 도시되어 있듯이, CHOP발현이 억제되면 대식세포내 결핵균의 수가 의미있게 증가하는 것을 알 수 있다. 이는 CHOP이 더 많이 발현될수록 세포내 결핵균이 더 많이 사멸함을 보여주는 간접증거이다.

[0052] 실시예 2 : CHOP의 발현이 세포내 결핵균의 증가에 미치는 영향 2

[0053] 세포내 결핵균의 사멸에 ER 스트레스 매개 세포사멸기전이 어떻게 관여하는지를 분석하기 위하여 CHOP의 발현이 증가될 때 세포내 결핵균의 수를 측정하였다.

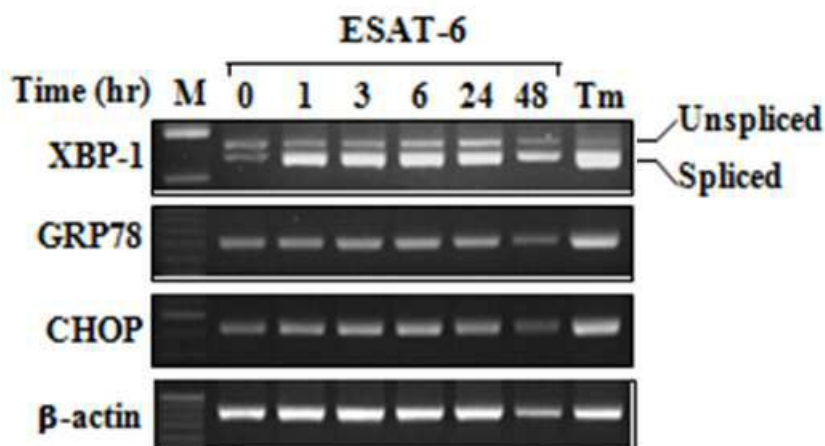
[0054] 즉 Raw264.7세포를 10~50 μ M의 salubrinal로 30분간 전처리한 후 처리 농도를 유지시키는 조건에서 실시예 1에서처럼 결핵균을 감염시키고 배양한 후 결핵균 생존수를 측정하였다(도 4).

[0055] 도면에서 eIF2- α 의 인산화를 증가시키는 salubrinal의 처리에 의해 CHOP발현이 증가하며, 증가된 CHOP의 발현이 Raw264.7세포내 결핵균의 수 감소에 기여하며, 그 효과가 농도에 비례하여 유의함을 보여준다.

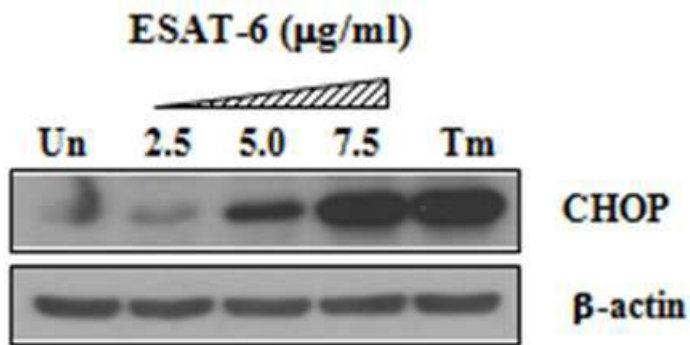
[0056] 상기 실시예에서는 세포내에서 CHOP의 발현정도 즉, 세포내 CHOP의 농도를 제어함으로써 CHOP이 세포내 결핵균을 사멸시킬 수 있음을 보였다. 따라서 CHOP을 유효성분으로 함유하는 본 발명에 의한 조성물을 결핵균 감염세포에 처리하는 경우 즉, 본 발명에 의한 조성물을 결핵균 보균자 내지 결핵환자에게 처치하는 경우에도 세포내 결핵균을 사멸시킬 수 있음을 알 수 있다.

도면

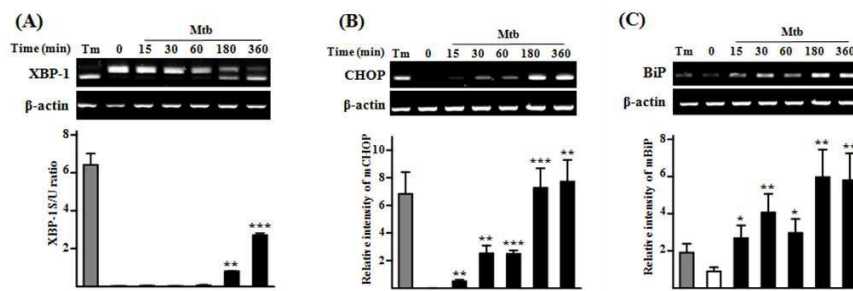
도면1a



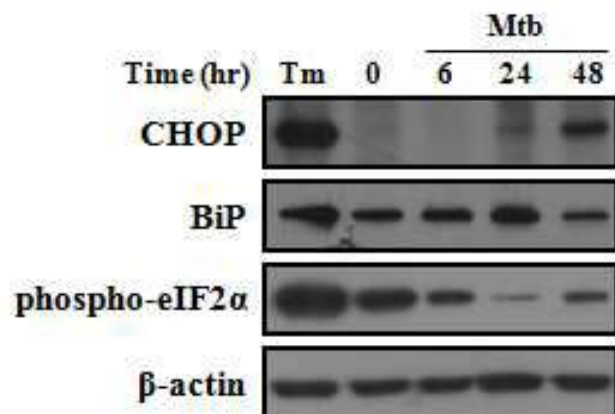
도면1b



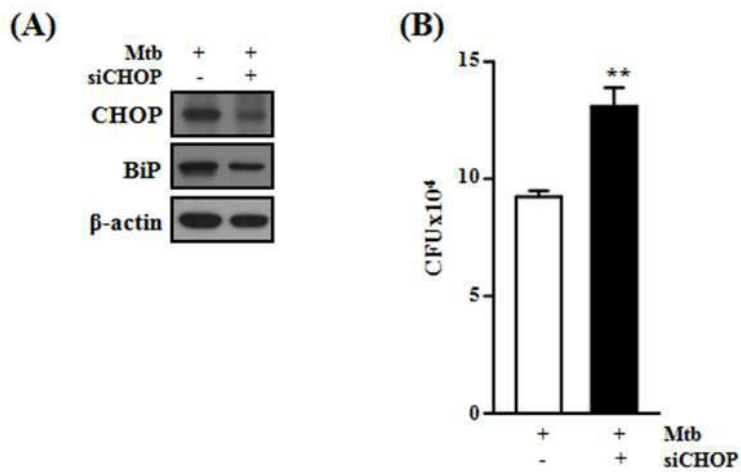
도면2a



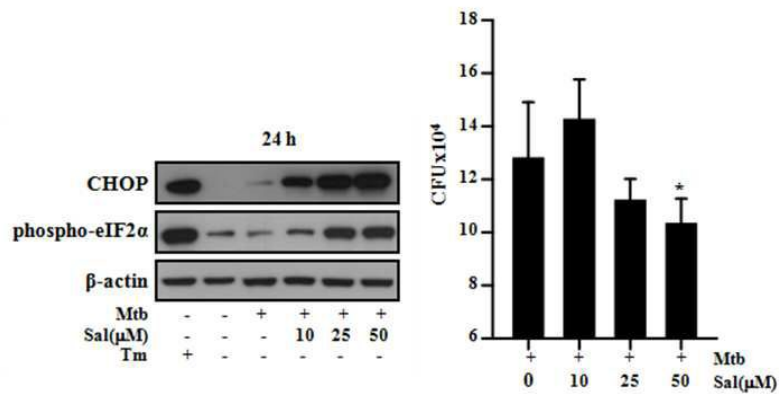
도면2b



도면3



도면4



서열 목록

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

<120> Composition for prevention-and-treatment of tuberculosis

<130> P0111-005

<160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Leu Val Pro Ala Thr Pro His Tyr Pro Ala Asp Val Leu Phe

1 5 10 15

Gln Thr Asp Pro Thr Ala Glu Met Ala Ala Glu Ser Leu Pro Phe Ser

	20	25	30	
Phe Gly Thr Leu Ser Ser Trp Glu Leu Glu Ala Trp Tyr Glu Asp Leu				
	35	40	45	
Gln Glu Val Leu Ser Ser Asp Glu Asn Gly Gly Thr Tyr Val Ser Pro				
	50	55	60	
Pro Gly Asn Glu Glu Glu Glu Ser Lys Ile Phe Thr Thr Leu Asp Pro				
	65	70	75	80
Ala Ser Leu Ala Trp Leu Thr Glu Glu Glu Pro Glu Pro Ala Glu Val				
	85	90	95	
Thr Ser Thr Ser Gln Ser Pro His Ser Pro Asp Ser Ser Gln Ser Ser				
	100	105	110	
Leu Ala Gln Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gln Gly Arg Thr Arg Lys Arg				
	115	120	125	
Lys Gln Ser Gly His Ser Pro Ala Arg Ala Gly Lys Gln Arg Met Lys				
	130	135	140	
Glu Lys Glu Gln Glu Asn Glu Arg Lys Val Ala Gln Leu Ala Glu Glu				
	145	150	155	160
Asn Glu Arg Leu Lys Gln Glu Ile Glu Arg Leu Thr Arg Glu Val Glu				
	165	170	175	
Ala Thr Arg Arg Ala Leu Ile Asp Arg Met Val Asn Leu His Gln Ala				
	180	185	190	
<210>	2			
<211>	579			
<212>	DNA			
<213>	Homo sapiens			
<400>	2			
atggagcttg ttccagccac tccccattat cctgcagatg tgctttttcca gactgatcca				60
actgcagaga tggcagctga gtcattgcct ttttccttcg ggacactgtc cagctgggag				120
ctggaagcct ggtatgagga cctgcaagag gtctgtcttt cagatgaaaa tgggggtacc				180
tatgtttcac ctcttggaat tgaagaggaa gaatcaaaaa tcttcaccac tcttgaccct				240
gcttctctgg cttggctgac tgaggaggag ccagaaccag cagaggtcac aagcacctcc				300

cagagccctc actctccaga ttccagtcag agctccctgg ctcaggagga agaggaggaa 360
gaccaaggga gaaccaggaa acggaacag agtggtcatt cccagcccg ggctggaaag 420
cagcgcatga aggagaaaga acaggagaat gaaaggaaag tggcacagct agctgaagag 480
aatgaacggc tcaagcagga aatcgagcgc ctgaccaggg aagtagaggc gactcgccga 540
gctctgattg accgaatggt gaatctgcac caagcatga 579

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<220><223> RNA from 1 to 19, DNA from 20 to 21

<400> 3

ggucucagcu uguauauagt t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<220><223> RNA from 1 to 19, DNA from 20 to 21

<400> 4

cuauauacaa gcugagacct t 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> primer

<220><223> RNA from 1 to 19, DNA from 20 to 21

<400> 5

gcucugauug accgaauagt t 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<220><223> RNA from 1 to 19, DNA from 20 to 21

<400> 6

ccaauucgguc aaucagagct c

21