

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0035631

(43) 공개일자 2020년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/165 (2006.01) *A61P 31/06* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/165 (2013.01)*A61P 31/06* (2018.01)

(21) 출원번호 10-2018-0114942

(22) 출원일자 2018년09월27일

심사청구일자 2018년09월27일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

신성재

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물
미생물학교실

강순명

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물
미생물학교실

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재영

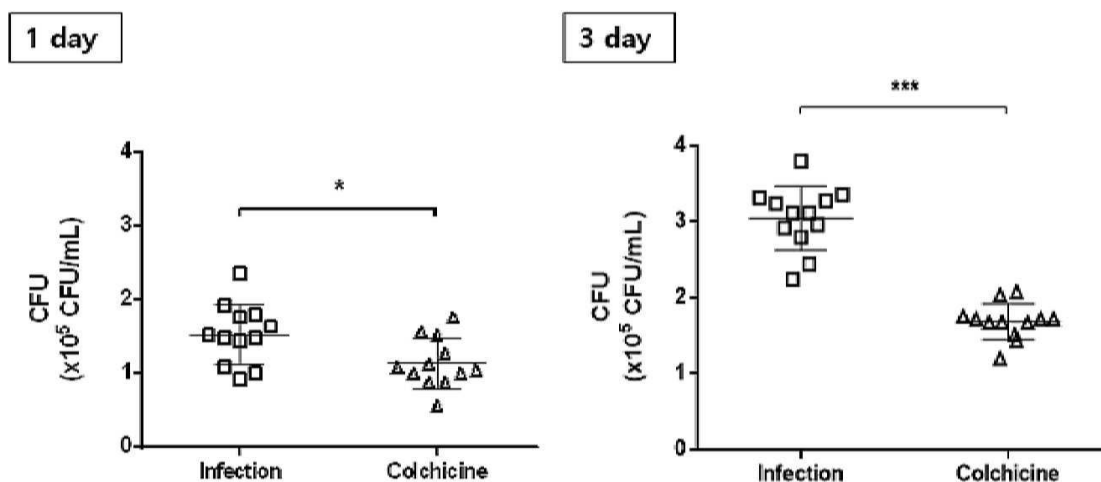
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 결핵의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 콜히친(colchicine)을 유효 성분으로 포함하는 것으로, 결핵균을 사멸시켜 결핵을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

권기웅

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물
미생물학교실

김이한

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물
미생물학교실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2A1A05005263

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업, 중견연구자지원사업, 도약연구_도전

연구과제명 결핵의 질병단계 특이적 핵심병인면역 조절을 통한 면역화학 치료요법 개발

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014K1A3A7A03075054

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 국가간협력기반조성사업, EU 연구개발협력사업, 한-EU 공동연구지원사업

연구과제명 마우스를 이용한 다양한 결핵백신 평가용 모델 개발과 새로운 백신의 효능평가

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.12.01 ~ 2018.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

콜히친(colchicine)을 유효 성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 결핵균을 사멸시키는 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 결핵은 마이코박테리움 투베르쿨로시스(M. tuberculosis), 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 보비스(M. bovis) BCG, 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum), 마이코박테리움 카네티(M. canetti), 마이코박테리움 카프라에(M. caprae), 마이코박테리움 마이크로티(M. microti) 및 K 균주(Mycobacterium tuberculosis K strain)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 균주의 감염에 의해 유발되는 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 잠복 결핵을 예방 또는 치료하는 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 결핵의 재활성화를 억제하는 것인, 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 리팜핀(rifampin), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플로퀴논론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린(Cycloserine), 프로치온 아마이드(Prothionamide), 레보플록사신(Levofloxacin), 목시플록사신(Moxifloxacin), 오픈플록사신(Ofloxacin), 리파부틴(Rifabutin), 카프레오마카프레오마이신(Capeomycin) 및 리네졸리드(Linezolid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 포함하는, 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

콜히친(colchicine)을 유효 성분으로 포함하는 결핵 치료 보조용 약학적 조성물.

청구항 9

콜히친(colchicine)을 유효 성분으로 포함하는 결핵균의 항생제에 대한 감수성 증진용 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 항생제는 리팜핀(rifampin), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플로퀴논론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린(Cycloserine), 프로치온 아마이드(Prothionamide), 레보플록사신(Levofloxacin), 모시플록사신(Moxifloxacin), 오픈록사신(Ofloxacin), 리파부틴(Rifabutin), 카프레오마카프레오마이신(Capeomycin) 및 리네졸리드(Linezolid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 결핵균의 항생제에 대한 감수성 증진용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵균을 사멸시켜 결핵을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵 (TB; Tuberculosis)은 세계보건기구 (WHO; World Health Organization)에서 지정한 인류 건강을 위협하는 3대 감염 질병 중 하나이다. 결핵을 발병시키는 주요 원인균으로는 마이코박테리움 튜버쿨로시스 (MTB; Mycobacterium tuberculosis)가 대표적이고, 전 세계 인구 중 3분의 1정도는 감염된 이력이 있다고 보고되고 있다 (Global TB reports, WHO, 2017). 2017년 세계보건기구에서 작성한 Global TB report에서는 2016년 기준으로 전 세계에서 새롭게 결핵에 걸린 환자는 약 1,040만명으로 추산하고 있으며 기존의 결핵환자 중 140만명은 결핵으로 인한 사망, 그리고 추가적으로 40만명은 인간 면역결핍 바이러스 (HIV; Human Immunodeficiency Virus)와의 동시감염으로 인한 사망이 발생하였다고 보고하고 있다. 그러나 최근 결핵 감염 수는 매년 감소 추세에 이르지만 다제내성 (MDR; Multi-drug resistant) 및 광범위 내성 (XDR; Extensively-drug resistant)을 지닌 결핵균의 증가로 인하여 결핵 치료가 어려워지고 있다. 이로 인해 결핵의 치료 비용도 증가하였고, 치료 효율마저 낮아져 난치성 결핵으로 발전하는 모습을 보여주고 있다.

[0003] 결핵균은 인체 내부로 들어오면서 기존의 인체가 가지고 있는 면역 능력인 내재 면역과 후속으로 생겨나는 적응 면역에 대해 면역적 메커니즘을 변화시키며, 면역 반응으로부터 회피할 수 있는데, 이러한 상황에서 연구자들은 최근 변화되는 면역적인 부분들을 표적으로 하여 면역조절제와 같은 물질로 결핵이라는 질병을 조절하려는 움직임을 보였다 (Andries K, et al. 2005). 기존의 TB에 대하여 WHO에서 사용을 권장하는 항생제의 종류로는 크게 리팜핀(rifampin), 이소니아지드(isoniazid), 피라지나마이드(pyrazinamide) 및 에탐부톨(ethambutol)로서, 이들을 매일 복용하며 2~4개월의 단기간 치료를 행하는 수순을 밟게 된다.

[0004] 하지만 이러한 항생제들 모두 발명된 지 최소 50년 이상 된 약들이고, 따라서 현재 새로운 약의 발전이 다소 지연되고 있다. 더불어 상기 XDR 및 MDR-TB까지 나타나며 점점 더 이러한 약들의 효율도 줄어들고 있어, 연구자들은 고속 대량 스크리닝(High-throughput screening) 기법을 이용하여 다양한 화학 라이브러리(chemical library) 내에서 항미생물적 활성을 보이는 화합물을 찾았고, 약 6,800여 종의 화합물이 확인되었다 (Collins L & Franzblau SG et al. 1997; Mao J, Wang Y et al, 2007; Ananthan S, et al. 2009; Ananthan S, et al. 2009; Pieroni M, et al. 2011; Lilienkampf A, Pieroni M et al, 2012). 따라서 이러한 화합물을 포함시켜 만든 새로운 물질 혹은 화합물을 이용한 기존의 미국 식약안전청 (FDA; Food and Drug Administration)에서 승인을 받은 면역조절제를 이용하여 TB의 치료를 이루기 위해 움직이고 있다 (Onajole OK, et al. 2013; Lun S, et al. 2013).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일 목적은 결핵을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 다양한 용도의 조성물을 제공하고자 한다.

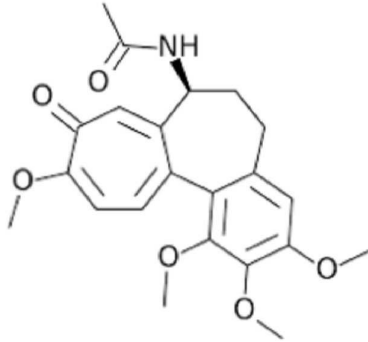
[0006] 본 발명의 다른 목적은 결핵 치료를 보조할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 결핵균에 대한 결핵 치료제의 감수성을 증진시킬 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 콜히친(colchicine)을 유효 성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다:

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 본 발명에서 상기 "콜히친(colchicine)"은 '콜크라이스(Colcrys)' 또는 'MITIGARE™'으로도 불리우며, 화학식은 C₂₂H₂₅NO₆이고 분자량은 399.437이다. 콜히친은 세포 내에서 근육과 골격 역할을 하는 것으로 알려져 있는 단백질인 튜불린(tubulin)에 결합해서 그 기능을 방해하는 것으로 알려져 있다. 이 때문에 세포 분열을 할 때 튜불린이 사용되는 방추사의 기능을 저해해서 염색체가 잘 분리되지 않도록 하는 효과가 있다. 또한 면역 세포인 백혈구 중에서 호중구(neutrophil)의 작용을 방해한다. 호중구는 염증을 일으키는 작용을 하기 때문에, 콜히친은 통풍에 의해 일어나는 염증을 막는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0012] 본 발명에서 상기 콜히친은 결핵균을 사멸시켜 결핵을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0013] 본 발명에서 상기 결핵은 당 분야에 알려진 결핵 유발 균에 의하여 발병하는 결핵을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 마이코박테리움 투베르쿨로시스(M. tuberculosis), 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 보비스(M. bovis) BCG, 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum), 마이코박테리움 카네티(M. canetti), 마이코박테리움 카프라에(M. caprae), 마이코박테리움 마이크로티(M. microti) 및 한국형 고병원성 결핵균인 K 균주(Mycobacterium tuberculosis K strain)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 균주의 감염에 의해 유발되는 것일 수 있다. 여기서, 상기 한국형 고병원성 결핵균인 K 균주는 베이징 패밀리에 속하는 균주로 표준 균주인 마이코박테리움 투베르쿨로시스 H37Rv(Mycobacterium tuberculosis H37Rv)에 비하여 병원성이 높고 치료 후, 재발율이 높은 것이 특징이다. 우리나라에서 분리되는 결핵균주의 77%는 베이징 패밀리에 속하는 것으로 알려져 있고 중고등학교에서 집단으로 발생하는 결핵균들의 제한효소 절편 다형(RFLP; restriction fragment length polymorphism) 프로파일을 조사한 결과 약 18.4%에서 독특한 균주 집단이 발견되어 이를 K-균주로 명명하고 유사한 균주들을 K-패밀리로 명명하였다(Kim SJ, et al. Int. J. Tuberc. Lung Dis.5:824-830, 2001). 본 발명에서 콜히친은 한국형 고병원성 결핵균인 K 균주의 감염에 의해 유발되는 결핵 또한 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0014] 본 발명에 있어, 상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 폐 결핵 또는 신장 결핵일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명에서 상기 콜히친은 결핵균 사멸 효과가 뛰어나, 잠복 결핵 또한 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다. 본 발명에서 상기 "잠복 결핵"이란 비활동성 결핵을 의미하는 것으로, 1차 결핵 감염 이후 휴지기 상태의 결핵을 말하며, 질병 증상의 발현이 없는 결핵균 감염을 의미한다.

[0016] 또한, 본 발명에서 상기 콜히친은 결핵균 사멸 효과가 뛰어나, 결핵이 재활성화 되는 것을 예방 또는 억제할 수 있다. 여기서 상기 "결핵의 재활성화"는 2차 결핵과 동일한 의미로 사용될 수 있으며, 1차 결핵 감염 이후 휴지

기, 비활동성 또는 잠복성 결핵균 감염의 재활성화를 의미한다. 보다 상세하게는, 상기 "결핵의 재활성화"는 투베르쿨린 시험에서 양성인 것으로 판명되나 명확한 질병 증상을 지니지 않는 개체에서의 질병 증상의 뒤늦은 발현(manifestation)을 의미한다. 상기 개체는 결핵균에 감염되어 있고, 결핵이 비활동성 또는 잠복 상태가 될 정도로 충분히 치료되어 질병 증상이 이전에 활발히 발현되었거나 되지 않았을 수 있다. 결핵 재활성화를 예방 또는 치료하기 위한 방법은 그러나 질병 증상이 활발히 발현된 개체에서도 개시될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 콜히친 외에, 결핵균 치료에 사용되는 항생제를 제한없이 포함할 수 있다. 여기서 상기 항생제의 종류는 특별히 제한하지는 않지만, 예를 들면, 리팜핀(rifampin), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플로퀴논론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린(Cycloserine), 프로치온 아마이드(Prothionamide), 레보플록사신(Levofloxacin), 목시플록사신(Moxifloxacin), 오픈플록사신(Ofloxacin), 리파부틴(Rifabutin), 카프레오마카프레오마이신(Capeomycin) 및 리네졸리드(Linezolid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 콜히친은 상기 결핵균이 상기 항생제에 대한 감수성 또는 민감성을 증진시켜 결핵균 사멸 효과를 증진시킬 수 있다. 또한 항생제 투여의 중단 시 잔존하는 잠복 결핵의 재활성화를 억제함으로써 잠복 결핵의 재활성화를 효과적으로 억제한다.

[0020] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 콜히친을 유효 성분으로 포함하는 결핵 치료 보조용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에서는 표준 결핵 치료로, 예를 들면 항생제를 이용한 결핵 치료 시 본 발명에 따른 상기 콜히친을 함께 처리함으로써 항-결핵 효과를 더욱 증진시킬 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 콜히친을 유효 성분으로 포함하는 항생제에 대한 결핵균의 감수성 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0024] 본 발명에서 상기 "감수성"은 "민감성"과 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 항생제 사용에 의해 유도되는 항생제에 대한 저항성의 반대 개념으로, 항생제에 의한 치료 효과가 의도하는 대로 발휘될 수 있는 상태를 말한다.

[0025] 본 발명에서는 콜히친을 처리함으로써 기존의 항생제에 의해 사멸되지 않거나, 그 사멸 효과가 미미한 결핵균에 대하여 항생제에 대한 감수성을 증진시켜 항 결핵 효과를 높일 수 있다.

[0027] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 결핵 감염증의 증상을 차단하거나, 감염증 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 결핵 감염증의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 운화제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

- [0031] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장 투여가 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다.
- [0033] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 결핵균을 사멸시켜 결핵을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있으며, 잠복 결핵 또한 예방, 개선 또는 치료할 수 있고, 결핵이 재활성화 되는 것을 예방 또는 억제할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 결핵균의 항생제에 대한 감수성 또는 민감성을 증진시켜 항-결핵 효과를 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 본 발명의 실시예 1에서 큰포식세포에 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주를 감염시킨 뒤 콜히친 또는 에탄올 처리하거나, 무처리 후 배양 1일째, 3일째, 5일째에 회수된 상층액에 대하여 각 처리별 IL-1 β , IL-10 및 IL-6의 발현 수준의 변화를 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 2에서 큰포식세포에 LPS를 처리하여 인플라마좀을 유도한 뒤 콜히친 및/또는 ATP를 처리한 후 IL-1 β 의 발현 수준의 변화를 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예 3에서 큰포식세포에 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주를 감염시킨 뒤 콜히친을 처리하고, 배양 1일째 또는 3일째에 회수된 큰포식세포로부터 결핵균의 CFU를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 3에서 큰포식세포에 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주를 감염시킨 뒤 배양 기간 및 콜히친 처리에 따른 결핵균의 CFU의 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예 4에서 큰포식세포에 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주를 감염시킨 뒤 콜히친을 처리한 후 qRT-PCR을 이용하여 IFN- β mRNA의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예 4에서 큰포식세포에 톨-유사 수용체 9(Toll-like receptor 9)의 아고니스트(agonist)인 CpG-ODN를 형질 주입시킨 뒤, 콜히친을 처리한 후 qRT-PCR을 이용하여 IFN- β mRNA의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명의 실시예 5에서 큰포식세포에 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주를 1 MOI 또는 2 MOI로 감염시킨 뒤 콜히친을 처리한 후 프로스타글랜딘 E2(PGE₂)의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명의 실시예 5에서 큰포식세포에 결핵균 H37Rv CSU 균주를 1 MOI 또는 2 MOI로 감염시킨 뒤 콜히친을 처리한 후 프로스타글랜딘 E2(PGE₂)의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명의 실시예 6에서 큰포식세포에 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주를 감염시킨 뒤 인터페론-감마(IFN-

γ) 및/또는 콜히친을 처리한 후 배양 1일째 또는 3일째에 회수된 상층액에 대하여 질소 산화물의 분비량을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0039] **실시예**
- [0041] [실시예 1] 결핵균이 감염된 큰포식세포에서의 변화된 사이토카인 측정
- [0042] 결핵균에 대해 콜히친 (Sigma Aldrich, USA)이 기존의 세포 내에서 분비되는 사이토카인 양상과 달라진 것이 있는지 확인하기 위하여, 사이토카인을 측정할 수 있는 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 실험을 우선적으로 실시하였다.
- [0043] 1-1. 세포 배양법
- [0044] 실험에 사용된 큰포식세포는 마우스의 골수세포를 얻어내어 10% FBS (Biowest, France)와 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Biowest, France) 이 포함된 DMEM 고농도 글루코스 배지 (Biowest, France)와 10% L929 세포 상층액을 섞어 만든 배양액에 넣고 90 x 15 mm 페트리접시 (SPL life science, Korea)에 10ml씩 넣은 뒤 온도는 37도, 이산화탄소는 5%로 유지되는 인큐베이터에서 배양을 시작하였다. 3일 후 앞서 언급한 배양액을 추가적으로 10ml씩 페트리접시에 추가하고 다시 인큐베이터에서 배양을 하였다. 총 6일 동안 배양을 실시하였다.
- [0045] 1-2. 결핵균 감염 및 콜히친의 처리
- [0046] 상기 1-1에서 배양된 세포를 상기 배양액에 섞어 48 웰 세포 배양 플레이트(cell culture plate)(SPL life science, Korea)에 각 웰당 1×10^5 세포/웰씩 넣고, 24시간 프리-배양(pre-incubation)을 실시하였다. 이 후 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주 (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 strain)를 이용하여, 큰포식세포에 2MOI로 4시간 감염시킨 뒤 콜히친 (Sigma Aldrich, USA)을 1 ug/mL, 10ug/mL 또는 100ug/mL의 양으로 처리하고 5일 간 배양하되, 1일, 3일 및 5일째에 상층액을 회수하였다. 단, 음성 대조군으로는 무처리 하였고, 양성 대조군으로는 에탄올을 처리하였다.
- [0047] 1-3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- [0048] EIA/RIA 어ッセ이를 위한 96 웰 마이크로플레이트 (Corning, USA)를 이용하여 앞서 1-2에서 회수한 상층액에 대하여 사이토카인 (IL-10 : BD bioscience, USA / IL-6, IL-1β : Invitrogen, USA)에 대한 ELISA 키트를 사용하여, 배양 시기 별 상층액 내 각 사이토카인의 발현 수준을 확인하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0049] 1-4. 결과
- [0050] 도 1에서 보는 바와 같이, IL-1β의 경우 콜히친을 처리한 경우가 무처리한 경우나 에탄올을 처리한 경우 보다 현저히 증가하였고, 특히 콜히친의 처리 농도가 증가할수록 상기 IL-1β의 발현 수준이 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0051] 또한, IL-10의 경우 콜히친을 처리한 경우가 무처리한 경우나 에탄올을 처리한 경우 보다 발현 수준이 감소하였고, 콜히친의 처리 농도가 증가할수록 상기 IL-10의 발현 수준은 더욱 낮아진 것을 확인할 수 있었다.
- [0052] 또한, IL-6의 경우 콜히친을 처리한 경우가 무처리한 경우나 에탄올을 처리한 경우 보다 현저히 증가하였고, 콜히친의 처리 농도가 증가할수록 상기 IL-6의 발현 수준은 더욱 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0054] [실시예 2] 결핵균에 특이적인 작용을 확인하기 위한 사이토카인 측정
- [0055] 기존의 콜히친은 통풍 환자 내 IL-1β의 분비량을 감소시켜 염증을 낮춰주는 역할을 한다고 알려져 있었다. 하지만, 상기 실시예 1에 의하면 이와 반대되는 현상이 관찰되었다. 이에, 결핵균이 감염된 환경에서만 IL-1β의

분비량이 증가하는 효과가 나타나는지 확인하기 위하여, 큰포식세포에 인플라마솜(inflammasome)을 유도시키고 콜히친을 5 ug/mL, 10 ug/mL 또는 20 ug/mL의 농도로 처리하여 IL-1 β 의 분비량을 확인하는 실험을 진행하였다.

[0056] 2-1. 세포 배양법

[0057] 실험에 사용된 큰포식세포는 마우스의 골수세포를 얻어내어 10% FBS (Biowest, France)와 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Biowest, France)이 포함된 DMEM 고농도 글루코스 배지 (Biowest, France)와 10% L929 세포 상층액을 섞어 만든 배양액에 넣고 90 x 15 mm 페트리접시 (SPL life science, Korea)에 10ml씩 넣은 뒤 온도는 37도, 이산화탄소는 5%로 유지되는 인큐베이터에서 배양을 시작하였다. 3일 후 앞서 언급한 배양액을 추가적으로 10ml씩 페트리접시에 추가하고 다시 인큐베이터에서 배양을 하였다. 총 6일 동안 배양을 실시하였다.

[0058] 2-2. 콜히친, LPS 및 ATP의 처리

[0059] 상기 2-1에서 배양된 세포를 상기 배양액에 섞어 48 웰 세포 배양 플레이트(cell culture plate)(SPL life science, Korea)에 각 웰당 1×10^5 세포/웰씩 넣고, 24시간 프리-배양(pre-incubation)을 실시하였다. 이 후 인플라마솜(inflammasome)을 유도하기 위하여 LPS 100 ug/mL로 6시간 자극을 실시하였다. 자극 개시 후 5시간이 되었을 때 콜히친 (Sigma Aldrich, USA)을 5 ug/mL, 10 ug/mL 또는 20 ug/mL의 농도로 처리하고 1시간 동안 자극을 실시하였다. 자극 개시 후 6시간이 경과하였을 때 ATP 5 mM을 처리하고 40분을 배양하였다. 그리고 나서 최종적으로 상층액을 회수하였다.

[0060] 2-3. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

[0061] EIA/RIA 어세이를 위한 96 웰 마이크로플레이트 (Corning, USA)를 이용하여 앞서 2-2에서 회수한 상층액에 대하여 사이토카인 (IL-1 β : Invitrogen, USA)에 대한 ELISA 키트를 사용하여, 상기 상층액 내 각 사이토카인의 발현 수준을 확인해 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0062] 2-4. 결과

[0063] 도 2에서 보는 바와 같이, LPS와 ATP에 의해 인플라마솜을 유도하였을 때 IL-1 β 의 발현 수준이 현저히 증가하였지만, 콜히친을 처리하자 농도 의존적으로 상기 IL-1 β 의 발현 수준이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0065] [실시예 3] 콜히친의 결핵균 제어 효과의 확인

[0066] 상기 실시예 1 및 2에서 확인한 큰포식세포 내 면역적 변화가 결핵균을 제어할 수 있는지 확인하기 위하여 CFU (Colony Forming Unit) 분석을 수행하였다.

[0067] 3-1. 세포 배양법

[0068] 실험에 사용된 큰포식세포는 마우스의 골수세포를 얻어내어 10% FBS (Biowest, France)와 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Biowest, France)이 포함된 DMEM 고농도 글루코스 배지 (Biowest, France)와 10% L929 세포 상층액을 섞어 만든 배양액에 넣고 90 x 15 mm 페트리접시 (SPL life science, Korea)에 10ml씩 넣은 뒤 온도는 37도, 이산화탄소는 5%로 유지되는 인큐베이터에서 배양을 시작하였다. 3일 후 앞서 언급한 배양액을 추가적으로 10ml씩 페트리접시에 추가하고 다시 인큐베이터에서 배양을 하였다. 총 6일 동안 배양을 실시하였다.

[0069] 3-2. 결핵균의 감염 및 콜히친의 처리

[0070] 상기 3-1에서 배양된 큰포식세포를 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신과 10% L929 세포 상층액이 함유된 DMEM 고농도 글루코스 배지 (Biowest, France)에 2×10^5 세포/mL의 농도로 맞춰 준비하고, 48 웰 세포 배양 플레이트 (SPL life science, Korea)에 각 웰당 1×10^5 세포/웰씩 넣었다. 이 후, 24시간 동안 인큐베이터에 넣어 안정화 하고, 큰포식세포에 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주 (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 strain)를 2 MOI로 4시간 동안 감염시킨 뒤 콜히친 10 ug/mL을 3일간 처리하였다. 단, 음성 대조군으로는 무처리 하였다.

[0071] 3-3. 7H10 고체배지 준비

[0072] Difco™ Middlebrook 7H10 아가 파우더 (BD bioscience, USA) 9.5g을 1L 삼각 플라스크안에 넣고 증류수 450 mL와 함께 섞은 뒤 고압증기멸균을 121도에서 15분 동안 진행하였다. 고압증기멸균이 완료되면 OADC (BD bioscience, USA) 50 mL를 추가하고 90 x 15 mm 페트리접시 (SPL life science, Korea)에 23 mL씩 담아 하루

건조 후 저장하였다.

[0073] 3-4. 콜로니 형성 유닛(Colony Forming Unit; CFU)의 확인

[0074] 상기 3-2에서 결핵균으로 감염 후 각각 1일 및 3일이 경과하였을 때 증류수로 희석한 0.05% Triton X-100을 감염된 큰포식세포가 있는 웰당 200 μ l씩 처리하였다. 처리 후 10분이 경과한 뒤 세포로부터 용출된 용해물을 1/10 또는 1/100을 희석하고, 7H10 고체배지에 CFU 접종을 실시하였다. 이후 14일 뒤 CFU를 카운팅하여 그 결과를 도 3에 나타내었고, 도 3의 결과를 토대로 배양 후 각 시기별 콜히친 처리에 따른 CFU의 변화를 그래프로 나타내었다.

[0075] 3-5. 결과

[0076] 도 3에서 보는 바와 같이, 결핵균으로 감염 후 1일이 경과하였을 때에는 콜히친을 처리한 경우와 무처리한 경우에서 CFU는 큰 차이가 없었지만, 3일이 경과하였을 때 콜히친을 처리한 경우가 무처리한 경우보다 CFU가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0077] 즉, 도 4에서 보는 바와 같이 감염 후 시간이 경과할수록 CFU가 증가하는 것을 확인할 수 있었는데, 콜히친을 처리한 경우가 무처리한 경우 보다 CFU 증가폭이 현저히 작은 것을 확인할 수 있었다.

[0079] [실시예 4] 감염된 큰포식세포 내 제 1형 인터페론의 전사수준 변화 확인

[0080] 결핵균에 감염된 큰포식세포 내 제 1형 인터페론의 전사수준 변화를 보기 위하여 실시간 중합효소연쇄반응(Quantitative PCR) 기법을 사용하여 확인하였다. 또한 제 1형 인터페론을 올릴 수 있는 톨-유사 수용체 9(Toll-like receptor 9)의 아고니스트(agonist)인 CpG-ODN 역시 형질 주입시켜 결핵균으로의 비감염 상태 세포에서 콜히친의 효과를 재차 확인하였다.

[0081] 4-1. 실험 디자인

[0082] C57BL/6 마우스에서 추출한 골수를 이용해 분화시킨 큰포식세포를 하기 표 1에 나타낸 조건으로 처리하였다.

표 1

구분	처리
1	비-감염(non infection)
2	비-감염(non infection)+CpG+ODN
3	비-감염(non infection)+CpG+ODN+콜히친
4	감염
5	감염+콜히친

[0084] 60mm³ 세포 배양 디쉬(SPL life science, Korea)에 상기 표 1의 처리를 한 큰포식세포 3 x 10⁶ 개를 넣고 1, 4 및 5번 조건은 24시간 동안 안정화를 진행하였다. 2 및 3번 조건의 경우 세포 배양 디쉬에 4시간 배양한 후 형질 주입(transfection) 과정을 6시간 동안 진행한 뒤 12시간 동안 안정화를 진행하였다.

[0085] 4-2. 형질 주입

[0086] 상기 표 1에 나타낸 조건 중 2 및 3번에 대하여 CpG-ODN을 1 μ g/mL의 농도로 세포 내로 넣어주기 위하여 형질 주입을 실시하였다. 실험에 사용된 제품으로는 리포펙타민(Lipofectamine) LTX kit (Invitrogen, USA)을 이용하였다.

[0087] 4-3. 결핵균 감염 및 콜히친의 처리

[0088] 상기 표 1에 나타낸 4 및 5번 조건의 큰포식세포를 대상으로 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주 (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 strain)를 2 MOI로 4시간 감염시킨 뒤 콜히친을 10 μ g/mL의 농도로 6시간 동안 처리하고 세포를 수확하여 실험에 사용하였다. 상기 표 1의 1, 2 및 3번 조건의 경우 4 및 5번의 조건에서 감염이 끝나는 시점을 기준으로 콜히친을 10 μ g/mL의 농도로 6시간 처리한 뒤 세포를 수확하여 실험에 사용하였다.

[0089] 4-4. 정량적 PCR (qPCR)

[0090] IFN- β mRNA의 발현 수준을 확인하기 위하여 StepOnePlus (Applied Biosystems, USA) 장비를 이용해 정량적

PCR을 수행하였다. 이때 사용된 프라이머의 정보는 하기 표 2와 같다. 각 처리에 따른 IFN- β mRNA의 발현 수준의 변화를 도 5 및 6에 나타내었다.

표 2

[0091]	프라이머	서열
	정방향	5'- GAT GAC GGA GAA GAT GCA GAA G-3' (22mer)
	역방향	5'- ACC CAG TGC TGG AGA AAT TG-3' (20mer)

[0092] 도 5에서 보는 바와 같이, 콜히친을 처리한 경우가 무처리하여 결핵균 감염만 이루어진 경우보다 제 1형 인터페론인 IFN- β mRNA의 발현 수준이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0093] 도 6에서 보는 바와 같이, CpG-ODN을 형질 주입시킨 경우 IFN- β mRNA의 발현 수준이 현저히 증가하였지만, 콜히친을 처리한 경우 증가된 IFN- β mRNA의 발현 수준이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0095] [실시예 5] 제 1형 인터페론의 양상 변화로 인한 프로스타글랜딘 E2(Prostaglandin E2)의 분비량 확인

[0096] 상기 실시예 4에서 보는 바와 같이 콜히친을 처리한 경우 결핵균으로 감염된 경우보다 제 1형 인터페론의 발현이 감소하였고, 실시예 3에서의 사이토카인 변화 양상에서도 결핵균 방어에 도움이 되는 IL-1 β 의 발현 수준이 증가하였는데, IL-1 β 가 제 1형 인터페론의 발현을 막을 때 이용되는 프로스타글랜딘 E2(prostaglandin E2; PGE₂)(Mayer-Barber, K.D. et al, Nature 2013)의 발현 수준 또한 변화가 일어나는지 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0097] 5-1. 실험 디자인

[0098] 분화시킨 마우스의 골수 유래 큰포식세포를 48 웰 세포 배양 플레이트 (SPL life science, Korea)에 각 웰당 1 x 10⁵ 개의 세포를 넣었다. 그리고 24시간 동안 인큐베이터에 넣어 안정화 하고 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주와 결핵균 H37Rv CSU 균주를 각각 1 또는 2 MOI로 4시간 감염 시킨 뒤, 콜히친(Sigma Aldrich, USA)을 처리하여 3 일 후에 상층액을 회수하였다.

[0099] 5-2. 프로스타글랜딘 E2 검출

[0100] 프로스타글랜딘 E2 검출 키트(R&D systems, USA)를 사용하여 각 처리별 프로스타글랜딘 E2의 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 7 및 8에 나타내었다.

[0101] 5-3. 결과

[0102] 도 7에서 보는 바와 같이, 큰포식세포에 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주를 감염시켰을 때 PGE₂ 발현 수준이 증가하였는데, 상기 결핵균을 감염시킨 후 콜히친을 처리한 경우 PGE₂ 발현 수준이 월등히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0103] 또한 도 8에서 보는 바와 같이, 큰포식세포에 결핵균 H37Rv CSU 균주를 감염시켰을 때 PGE₂ 발현 수준이 증가하였는데, 상기 결핵균을 감염시킨 후 콜히친을 처리한 경우 PGE₂ 발현 수준이 역시 월등히 증가하는 양상을 보였다.

[0105] [실시예 6] 콜히친으로 인한 질소 산화물(Nitric Oxide)의 분비 부스팅(boosting) 효과 확인

[0106] 상기 실시예 4에서 CFU의 변화폭을 보았을 때 콜히친을 처리한 경우가 무처리한 경우보다 상기 CFU의 증가폭이 작은 양상을 확인할 수 있었다. 이는 곧 콜히친을 처리한 경우 결핵균이 원만히 자라지 못하는 것을 의미하는 결과이다. 일반적으로 질소 산화물(Nitric Oxide)은 결핵균의 성장을 제한한다고 알려진 인자에 해당한다. 상기 질소 산화물은 IFN- γ 를 통해 큰포식세포 내 iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase)를 활성화 시켜 분비되는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 이하의 실험에서는 콜히친 처리 시 큰포식세포 내 질소 산화물의 발현 수준의 변화를 분석하였다.

[0107] 6-1. 세포의 배양 및 결핵균 감염

[0108] 실험 진행은 이전에 분화한 마우스 골수 유래 큰포식세포를 48 웰 세포 배양 플레이트 (SPL life science, Korea)에 각 웰당 1×10^5 개의 세포를 넣었다. 그리고 24시간 동안 인큐베이터에 넣어 안정화시킨 뒤 결핵균 H37Rv ATCC 27294 균주를 2 MOI로 4시간 감염 시켰다.

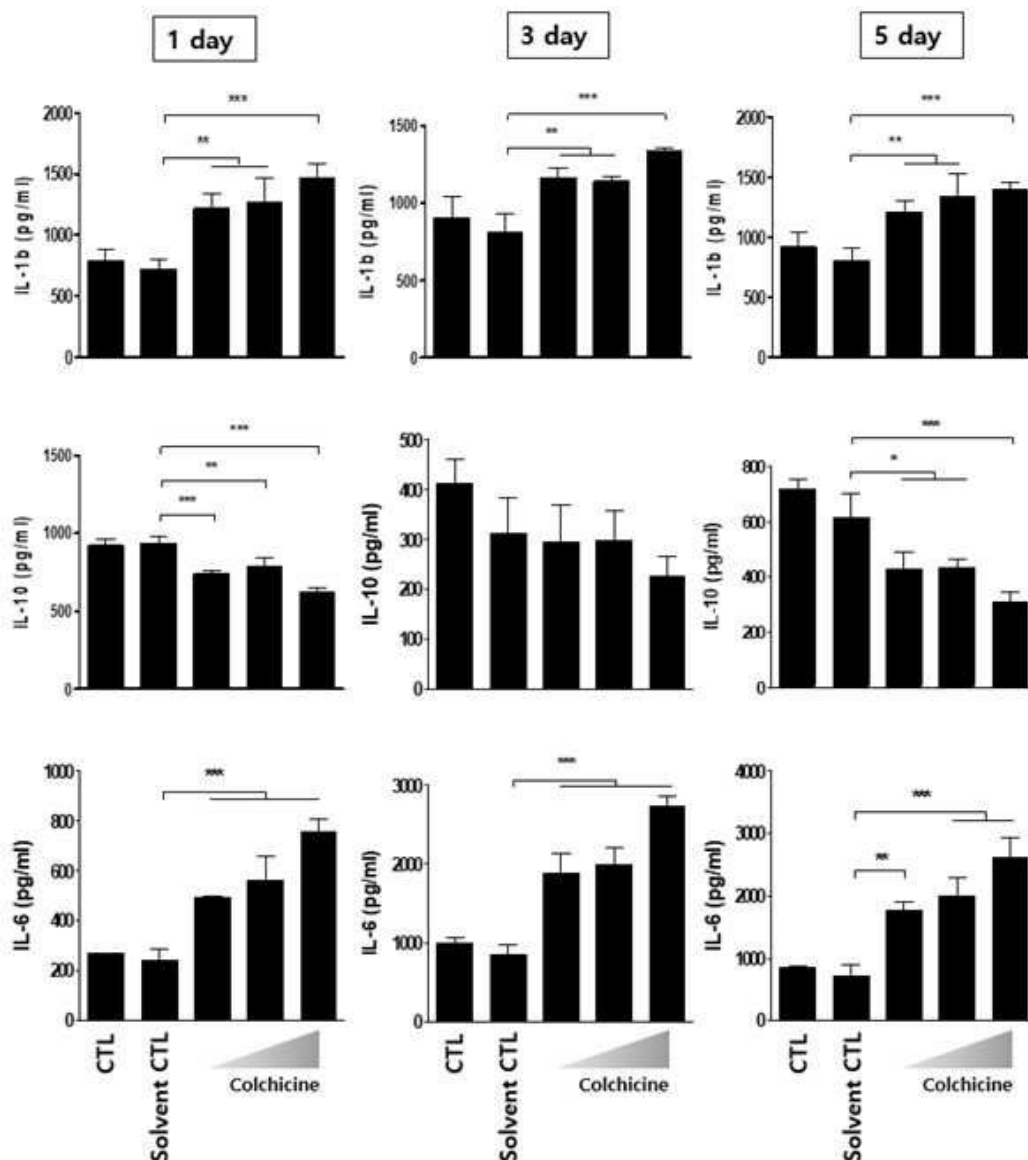
[0109] 6-2. 인터페론 및 콜히친의 처리

[0110] IFN- γ 10 ng/mL 과 함께 콜히친 (Sigma Aldrich, USA)을 1 ug/mL, 10 ug/mL 또는 100 ug/mL의 농도로 각각 처리하여 1일째 또는 3일째에 상층액을 회수한 뒤 NO 검출 키트(iNtRON, Korea)를 이용하여 각 처리 별 질소 산화물의 발현 수준을 측정해 그 결과를 도 9에 나타내었다.

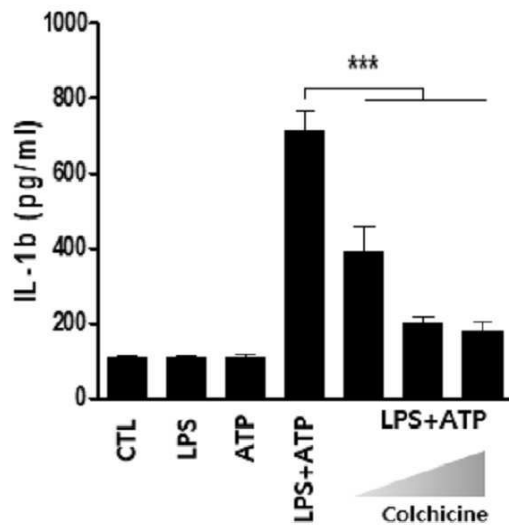
[0111] 도 9에서 보는 바와 같이, 큰포식세포에 결핵균이 감염되었을 때 질소 산화물이 극히 소량으로 분비되었는데, IFN- γ 를 처리하자 상기 질소 산화물의 분비량이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그런데 상기 IFN- γ 와 콜히친을 함께 처리한 경우 IFN- γ 만 처리한 경우보다 질소 산화물의 분비량이 1일째 및 3일째 모두에서 분비량이 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

도면

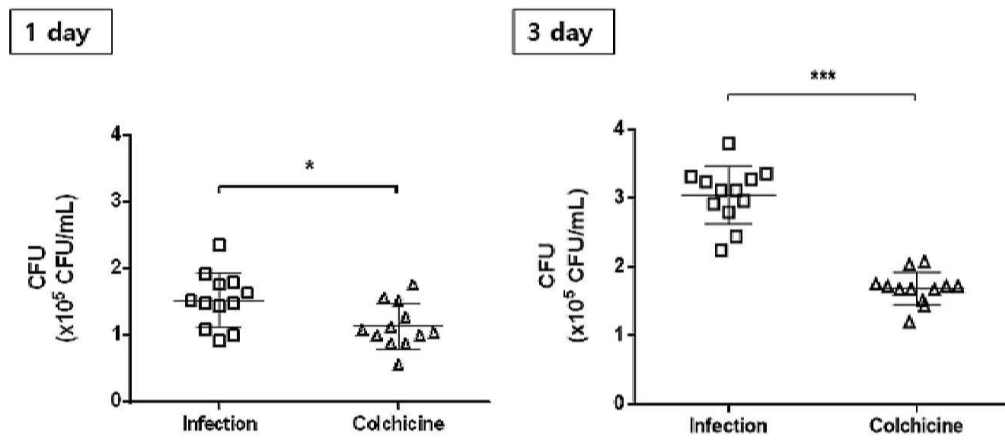
도면1



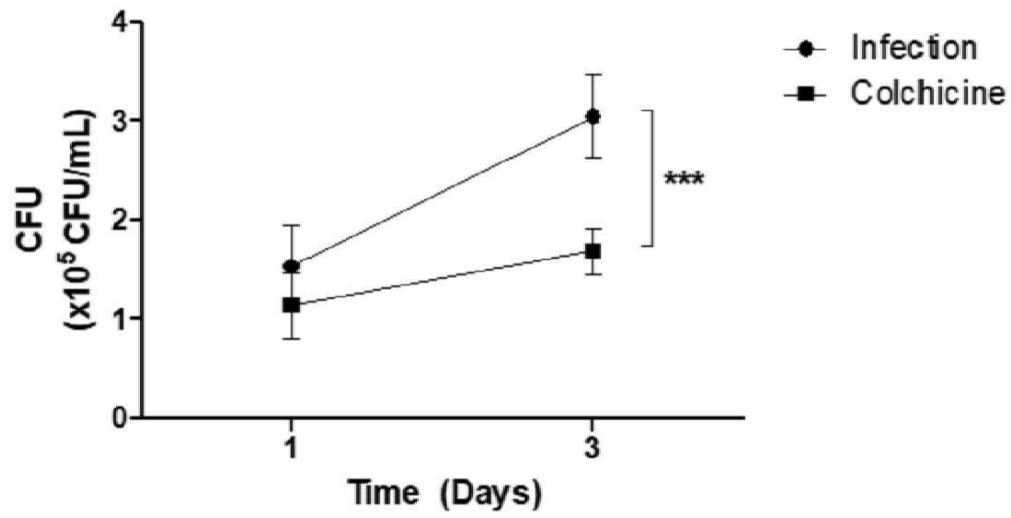
도면2



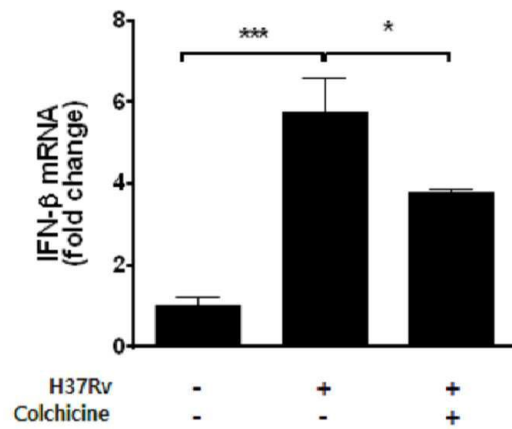
도면3



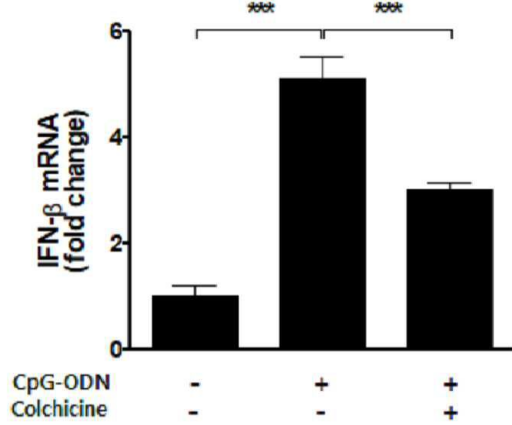
도면4



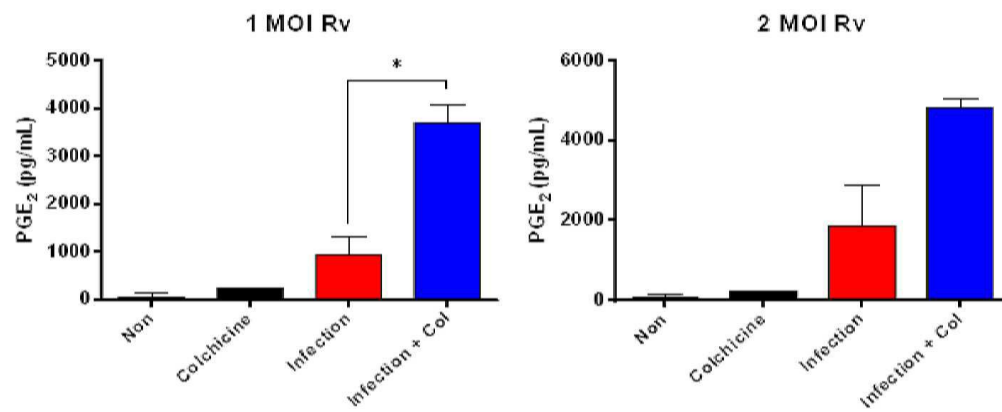
도면5



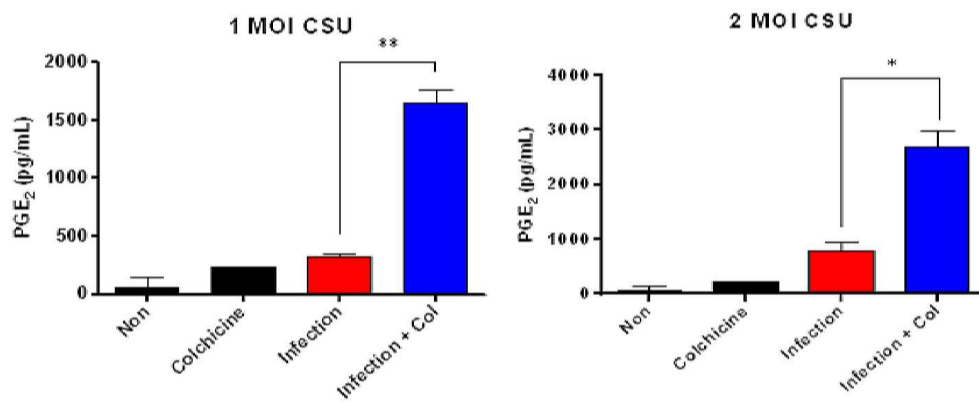
도면6



도면7



도면8



도면9

