



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월13일
(11) 등록번호 10-2133290
(24) 등록일자 2020년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/426 (2006.01) A61K 31/496 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/426 (2013.01)
A61K 31/496 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0126626
(22) 출원일자 2018년10월23일
심사청구일자 2018년10월23일
(65) 공개번호 10-2020-0045738
(43) 공개일자 2020년05월06일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130097775 A*
JP2012502962 A
JP2013249284 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
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 8 항

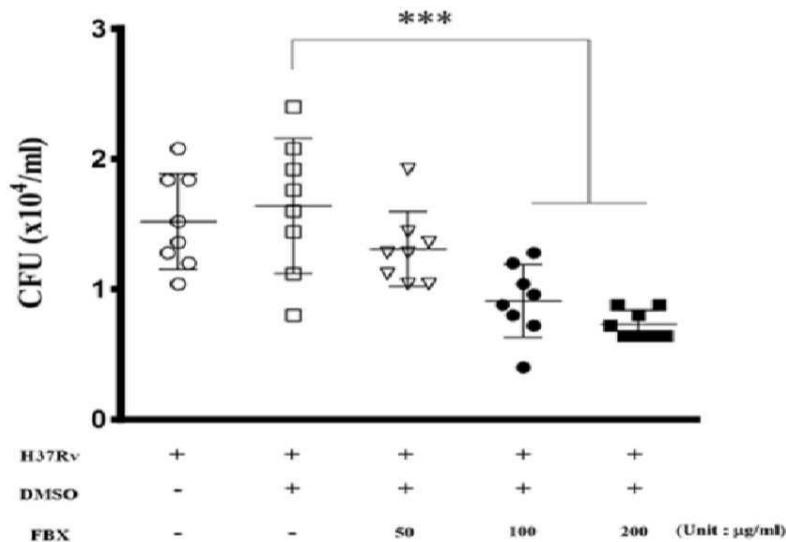
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 **결핵의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

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

대표도 - 도8



- (52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 31/06 (2018.01)

김이한

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물
 미생물학교실

- (72) 발명자
권기웅
 서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원건물
 미생물학교실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2A1A05005263
 부처명 과학기술정보통신부
 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-2017M3A9D5A01052446
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 Korea Mouse Phenotyping Project
 연구과제명 핵심 감염감수성 유전자변형 마우스개발을 통한 미충족 감염질환 해결시스템 구축
 기 여 율 1/2
 주관기관 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2018.02.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

페북소스타트(Febuxostat)를 유효 성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

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

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 결핵은 마이코박테리움 튜버쿨로시스(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 균에서 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 균에서 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), 오플록사신(Ofloxacin), 리파부틴(Rifabutin), 카프레오마카프레오마이신(Capeomycin) 및 리네졸리드(Linezolid)로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상을 더 포함하는, 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

페북소스타트(Febuxostat)를 유효 성분으로 포함하는 항생제에 대한 결핵균의 감수성 증진용 약학적 조성물로, 상기 항생제는 피라진아미드(pyrazinamide)인, 약학적 조성물.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵균의 성장을 억제하여 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), 피라지나미드(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; Lilienkamp 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.

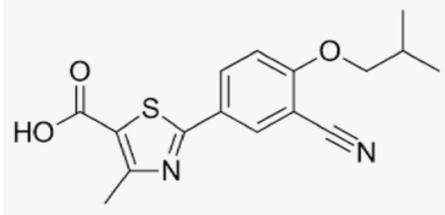
[0006] 본 발명의 다른 목적은 결핵 치료를 보조할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.

[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 페복소스타트(Febuxostat)를 유효 성분으로 포함하는 결핵의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다:

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 본 발명에서 상기 "페복소스타트(Febuxostat)"는 1998년 일본 제약 회사인 테이진(Teijin)에 의해 개발된 약제로, 만성 통풍 및 고요산 혈증을 치료하는데 사용된다. 주로, 상품명인 "Uloric" 또는 "Febuday"이나, 'TMX-67'이라고도 불리기도 한다. 페복소스타트는 크산틴 산화 효소의 비-퓨린-선택성 억제제로, 크산틴 산화제의 활성 자리에 해당하는 몰리브데늄 프테린 센터(molybdenum pterin center)을 경쟁적으로 블러킹하면서 작용한다. 크산틴 산화제는 하이포크산틴(hypoxanthine)과 크산틴이 요산(uric acid)으로 산화되도록 하는 것인데, 페복소스타트는 상기 크산틴 산화 효소를 억제함으로써 요산의 생성을 감소시키는 역할을 한다.

[0012] 본 발명에서 상기 페복소스타트는 결핵균의 성장을 억제하여 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 튜버쿨로시스(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)의 감염에 의해 유발되는 것일 수 있다. 여기서, 상기 한국형 고병원성 결핵균인 K 균주는 베이징 패밀리에 속하는 균주로 표준 균주인 마이코박테리움 튜버쿨로시스 H37Rv(Mycobacterium tuberculosis H37Rv)에 비하여 병원성이 높고 치료 후, 재발율이 높은 것이 특징이다. 우리나라에서 분리되는 결핵균주의 77%는 베이징 패밀리(Beijing family)에 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).

[0014] 본 발명에 있어, 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 페복소스타트는 결핵균의 성장 억제 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 페복소스타트는 결핵균 성장 억제 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 휴지기, 비활동성 또는 잠복성 결핵균 감염의 재활성화를 의미한다. 보다 상세하게는, 상기 "결핵의 재활성화"는 투베르쿨린 시험에서 양성인 것으로 판명되거나 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 페복소스타트 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), 카

프레오마카프레오마이신(Capeomycin) 및 리네졸리드(Linezolid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

- [0018] 또한, 본 발명의 페북소스타트는 상기 결핵균의 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 페북소스타트를 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 페북소스타트를 함께 처리함으로써 항-결핵 효과를 더욱 증진시킬 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 페북소스타트를 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 페북소스타트를 처리함으로써 기존의 항생제에 의해 성장이 저해 또는 사멸되지 않거나, 그 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, 윤활제, 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, 유향제, 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 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 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 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할

수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 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 결핵균의 성장을 효과적으로 저해하여 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 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주에 페북소스타트(Febuxostat) 또는 알로푸리놀(Allopurinol)을 처리하여 최소 억제 농도(MIC)를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 실시예 2에서 M. tuberculosis H37Ra ATCC 25177, M. tuberculosis K, M. tuberculosis HN878, M. tuberculosis Erdman, M. tuberculosis CDC1551 균주 및 M. tuberculosis #1, #7, #10, #11, #20, #23 임상 균주에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리하여 최소 억제 농도(MIC)를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 실시예 3에서 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리하여 콜로니 형성 유닛의 변화를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예 3에서 M. tuberculosis H37Ra ATCC 25177 균주에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리하여 콜로니 형성 유닛의 변화를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 실시예 3에서 M. tuberculosis K 균주에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리하여 콜로니 형성 유닛의 변화를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 실시예 3에서 M. tuberculosis HN878 균주에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리하여 콜로니 형성 유닛의 변화를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실시예 3에서 M. tuberculosis CDC1551 균주에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리하여 콜로니 수의 변화를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 실시예 4에서 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주를 감염시킨 큰포식 세포에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리한 뒤 상기 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주의 콜로니 형성 유닛을 측정된 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] 마이코박테리움 튜버큘로시스(M. tuberculosis)의 성장 제어 효과 확인(1)

[0042] 결핵균에 대해 통풍 치료제로 알려진 페북소스타트(Febuxostat)(Sigma Aldrich, USA)가 직접적으로 성장 억제 효과를 보이는 지 확인하기 위하여 미생물의 성장 저해를 확인 할 수 있는 MIC (Minimal Inhibitory Concentration) 실험을 우선적으로 실시하였다. 구체적인 실험 내용은 하기와 같다.

[0043] 1-1. 박테리아 배양법

[0044] M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주를 American Type Culture Collection (ATCC®, USA)에서 구입하여 사용하였다. 먼저 Difco™ Middlebrook 7H9 브로쓰 (BD bioscience, USA)에 0.2 % 글리세롤(glycerol)과 10% (vol/vol)의 올레산-알부민-덱스트로스-카탈라제(oleic acid-albumin-dextrose-catalase) (BD bioscience,

USA)를 첨가한 상태에서 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주를 접종하고, 이를 삼각 플라스크(Erlenmeyer Flask) (Corning, USA)에 넣은 뒤 배양하였다. 플라스크를 37°C, 140 rpm이 유지된 진탕 배양기(shaking incubator)에서 28일간 배양하였고, 단일 세포 서스펜션(single cell suspension)을 진행하였다. 먼저 박테리아가 포함된 7H9 브로쓰를 수거하여 10,000 x g, 20분 동안 원심분리를 실시한 다음 PBS (pH 7.2)로 3번 세척을 진행하였다. 그 후, 침전된 펠렛은 오버헤드 스테러(overhead stirrer) (Wheaton Instrument, USA)를 통하여 1분간 얼음(ice)에서 균질화시켰다. 이후 균질화된 박테리아는 8 µm-포어 사이즈의 필터(Millipore Corp. USA)로 한번 거른 뒤 항산성 염색(acid-fast staining)을 거쳐 최종 확인 후 사용하였다. 모든 배양 과정은 연세대학교 의과대학 소속 에비슨의생명연구센터 내 BSL-3 시설에서 진행되었다.

[0045] 1-2. 최소 억제 농도 분석(Minimal Inhibitory Concentration assay, MIC)

[0046] M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주를 10% (vol/vol) OADC가 함유된 Difco™ Middlebrook 7H9 (BD bioscience, USA) 브로쓰를 통해 균을 1.5×10^6 CFU/ml까지 희석하고 96 웰 세포 배양 플레이트 기준 하나의 웰 당 1.5×10^5 CFU/well을 맞춰주기 위해 100 µl씩 넣었다. Febuxostat를 200 µg/ml 농도를 최고 농도로 하여 1/2씩 희석하여 0.39 µg/ml까지, 약이 들어가지 않은 조건, 0.2% (v/v) DMSO가 들어간 조건으로 설정하고 조건 별로 웰 당 100 µl씩 추가적으로 넣었다. 모든 조건은 3 웰씩 동시 진행되었다. 그리고 나서 37°C, CO₂ 인큐베이터에 14일 간 배양한 뒤 각 웰마다 레조아주린(resazurin)을 처리하여 24시간 뒤 변화를 확인하였다. 이때, 양성 대조군으로는 역시 통풍 치료제로 알려진 알로퓨리놀(Allopurinol)을 사용하였다.

[0047] 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주에 대하여 페복소스타트(Febuxostat)를 100 µg/ml 이상의 농도로 처리하자 상기 균주의 성장이 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 알로퓨리놀(Allopurinol)의 경우 모든 농도 조건에서 상기 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주의 성장이 저해되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0049] [실시에 2] 마이코박테리움 튜버쿨로시스(M. tuberculosis)의 성장 제어 효과 확인(2)

[0050] 실시예 1에서 MIC 실험을 통해 페복소스타트(Febuxostat)가 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주의 성장 저해를 일으킨다는 결과를 확인하였다. 이하에서는 상기 페복소스타트(Febuxostat)가 다른 종류의 M. tuberculosis 균주들 또한 성장을 저해하는지 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 실험에 사용된 균주로는 M. tuberculosis H37Ra ATCC 25177, M. tuberculosis K, M. tuberculosis HN878, M. tuberculosis Erdman, M. tuberculosis CDC1551 균주 및 M. tuberculosis #1, #7, #10, #11, #20, #23 임상 균주에 해당한다.

[0051] 2-1. 박테리아 배양법

[0052] M. tuberculosis H37Ra ATCC 25177 균주는 American Type Culture Collection (ATCC®, USA)에서 구입하여 사용하였다. M. tuberculosis K 균주는 결핵 연구원(Korean Institute of Tuberculosis; KIT, Korea)에서 분양받아 사용하였다. M. tuberculosis HN878, M. tuberculosis Erdman, M. tuberculosis CDC1551, M. tuberculosis 임상 균주 #1, #7, #10, #11, #20, #23 균주는 국제 결핵 연구 센터(International Tuberculosis Research Center; ITRC, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 모든 균주는 Difco™ Middlebrook 7H9 브로쓰(BD bioscience, USA)에 0.2 % 글리세롤과 10% (vol/vol)의 올레산-알부민-텍스트로스-카탈라제(BD bioscience, USA)를 첨가한 상태에서 접종하였고, 이를 삼각 플라스크(Corning, USA)에 넣고 배양하였다. 플라스크를 37°C, 140 rpm이 유지된 진탕 배양기에서 28일간 배양시켰고, 단일 세포 서스펜션을 진행하였다. 먼저 박테리아가 포함된 7H9 브로쓰를 수거하여 10,000 x g, 20분 동안 원심분리를 실시한 다음 PBS (pH 7.2)로 3번 세척을 진행하였다. 그리고 나서 침전된 펠렛은 오버헤드 스테러(Wheaton Instrument, USA)를 통하여 1분간 얼음에서 균질화시켰다. 이후 균질화된 박테리아는 8 µm-포어 사이즈의 필터(Millipore Corp. USA)로 한번 거른 뒤 항산성 염색을 거쳐 최종 확인 후 사용하였다. 모든 배양 과정은 연세대학교 의과대학 소속 에비슨의생명연구센터 내 BSL-3 시설에서 진행되었다.

[0053] 2-2. 최소 억제 농도 분석

[0054] 모든 균주를 각각 10% (vol/vol) OADC가 함유된 Difco™ Middlebrook 7H9 (BD bioscience, USA) 브로쓰를 통해 균을 1.5×10^6 CFU/ml까지 희석하고 96 웰 세포 배양 플레이트 기준 하나의 웰 당 1.5×10^5 CFU/well을 맞춰주기 위해 100 µl씩 넣었다. Febuxostat는 200 µg/ml 농도를 최고 농도로 하여 1/2씩 희석하여 25 µg/ml까지, 약이 들어가지 않은 조건, 0.2% (v/v) DMSO가 들어간 조건으로 설정하고 조건 별로 웰 당 100 µl씩 추가적으로 넣

었다. 모든 조건은 2 웰씩 동시 진행되었다. 그리고 나서 37℃, CO₂ 인큐베이터에 14일 간 배양한 뒤 각 웰마다 레조아주린을 처리하여 24시간 뒤 변화를 확인하였다.

표 1

[0055]

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> 균주	MIC 결과 (mg/ml)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv ATCC 27294	100
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	100
<i>M. tuberculosis</i> K	100
<i>M. tuberculosis</i> HN878	50
<i>M. tuberculosis</i> Erdman	50
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551	100
<i>M. tuberculosis</i> #1	50
<i>M. tuberculosis</i> #7	100
<i>M. tuberculosis</i> #10	100
<i>M. tuberculosis</i> #11	100
<i>M. tuberculosis</i> #20	100
<i>M. tuberculosis</i> #23	100

[0056]

그 결과, 상기 표 1 및 도 2에서 보는 바와 같이, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. tuberculosis* K, *M. tuberculosis* HN878, *M. tuberculosis* Erdman, *M. tuberculosis* CDC1551 균주 및 *M. tuberculosis* #1, #7, #10, #11, #20, #23 임상 균주에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리하자 상기 균주 모두에서 성장 저해 효과를 확인할 수 있었다.

[0058]

[실시예 3] 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*M. tuberculosis*)의 성장 제어 효과 확인(3)

[0059]

실시예 1 및 2를 통하여 페북소스타트(Febuxostat)의 여러 *M. tuberculosis* 균주들에 대한 성장 저해능을 앞의 연구를 통해서 확인할 수 있었고, 이러한 페북소스타트(Febuxostat)를 통해 더 오랜기간 동안 *M. tuberculosis* 균주의 성장 저해가 이루어지는지 확인하기 위해 형태학적 분석(phenotypic assay)을 진행하였다. 실험에 사용된 균주는 *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177, *M. tuberculosis* K, *M. tuberculosis* HN878, *M. tuberculosis* CDC1551 균주이다.

[0060]

3-1. 박테리아 배양법

[0061]

M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294, *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 균주는 American Type Culture Collection (ATCC®, USA)에서 구입하여 사용하였다. *M. tuberculosis* K 균주는 결핵 연구원(KIT, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. *M. tuberculosis* HN878, *M. tuberculosis* CDC1551 균주는 국제 결핵 연구 센터(ITRC, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 모든 균주는 Difco™ Middlebrook 7H9 브로쓰 (BD bioscience, USA)에 0.2 % 글리세롤과 10% (vol/vol)의 올레산-알부민-텍스트로스-카탈라제(BD bioscience, USA)를 첨가한 상태에서 접종하였고, 이를 삼각 플라스크 (Corning, USA)에 넣고서 배양하였다. 플라스크는 37℃, 140 rpm이 유지된 진탕 배양기에서 28일간 배양시켰고, 단일 세포 서스펜션을 진행하였다. 먼저 박테리아가 포함된 7H9 브로쓰를 수거하여 10,000 x g, 20분 동안 원심 분리를 실시한 다음 PBS (pH 7.2)로 3번 세척을 진행하였다. 그리고 나서 침전된 펠렛은 오버헤드 스테리 (Wheaton Instrument, USA) 를 통하여 1분간 얼음에서 균질화시켰다. 이후 균질화된 박테리아는 8 um-포어 사이즈의 필터(Millipore Corp. USA)로 한번 거른 뒤 항산성 염색을 거쳐 최종 확인 후 사용하였다. 모든 배양 과정은 연세대학교 의과대학 소속 에비슨의생명연구센터 내 BSL-3 시설에서 진행되었다.

[0062]

3-2. 7H10 아가 배지의 제작

[0063]

Difco™ Middlebrook 7H10 아가 배지 파우더 9.5g과 3차 증류수 450 ml을 균일하게 섞고 고압증기멸균기를 통해 121℃, 15분간 멸균을 실시하였다. 이 후 0.2 % (vol/vol) DMSO 및 Febuxostat을 각 실험 조건 (400 ug/ml, 200 ug/ml, 100 ug/ml, 50 ug/ml) 농도에 따라 멸균된 7H10 아가 배지에 넣고 10 % (vol/vol) OADC도 넣어 균일하게 잘 섞어준 뒤 배지를 만들었다.

[0064]

3-3. 박테리아 접종 및 콜로니 형성 유닛(colony forming unit; CFU) 확인

[0065]

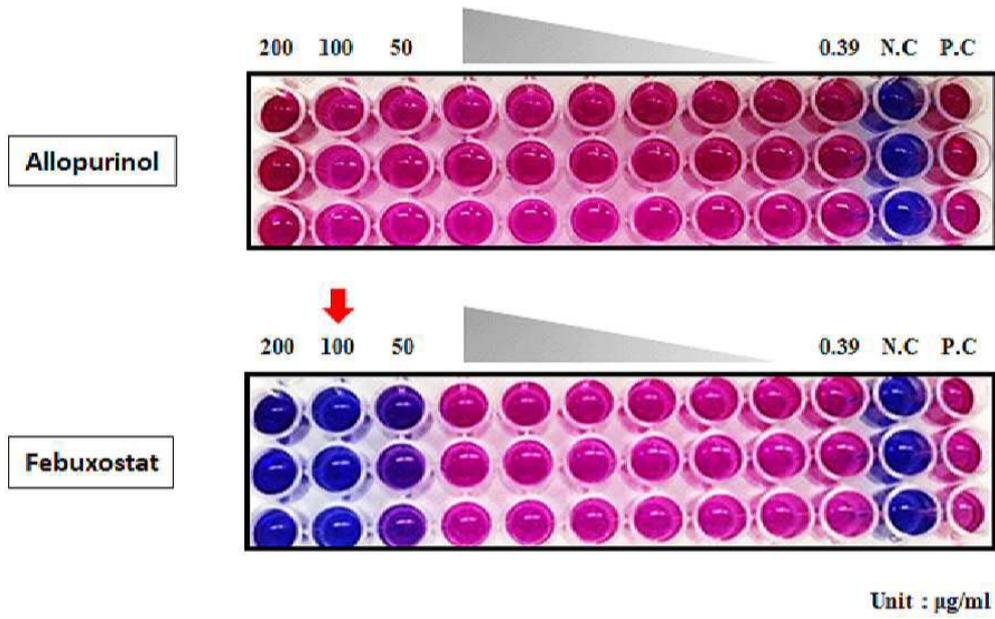
각각의 균주들을 PBS (pH7.2)를 사용하여 1 x 10⁴ CFU, 1 x 10⁵ CFU로 희석한 뒤 이를 미리 제작한 Febuxostat

및 DMSO가 포함된 배지에 접종하였다. 접종 된 플레이트는 37°C가 유지되는 인큐베이터에서 배양하며 접종 2주 후부터 8주까지 콜로니를 측정하였다.

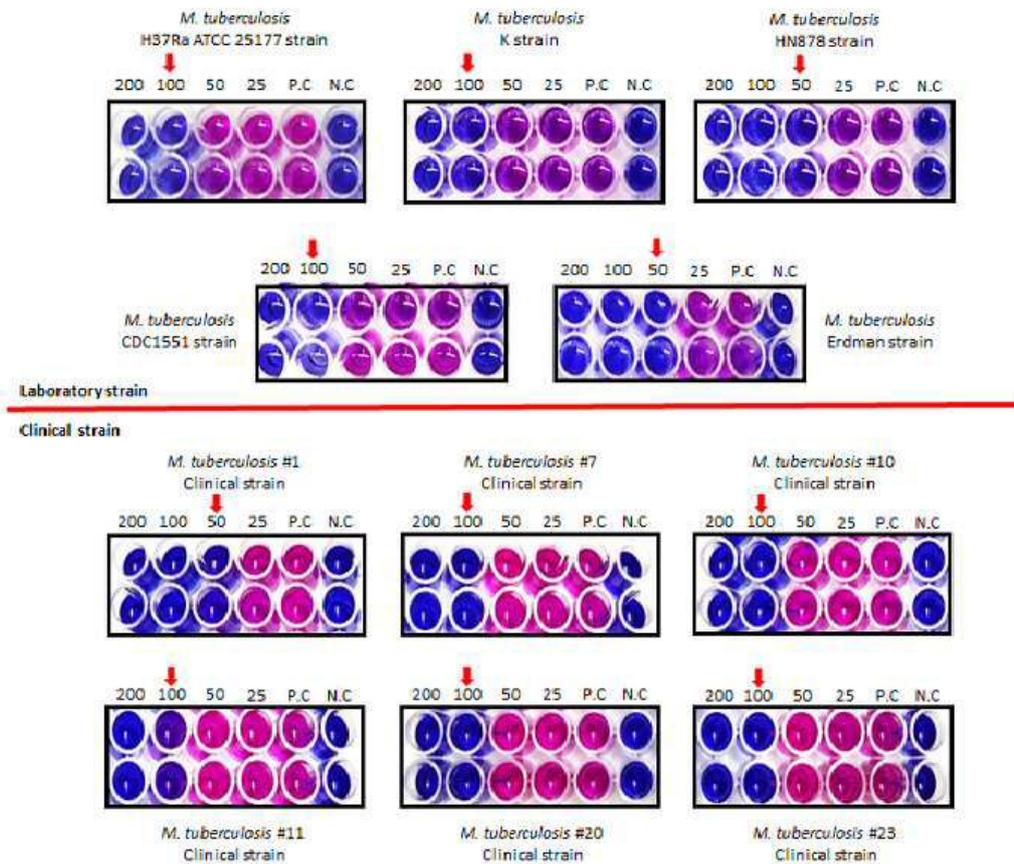
- [0066] 도 3 내지 7에서 보는 바와 같이, M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294, M. tuberculosis H37Ra ATCC 25177, M. tuberculosis K, M. tuberculosis HN878, M. tuberculosis CDC1551 균주에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리하자 8주가 경과하여도 더 이상 균주의 성장이 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- [0068] [실시예 4] 마이코박테리움 튜버큘로시스(M. tuberculosis)의 성장 제어 효과 확인(4)
- [0069] 실시예 1 및 2의 MIC 실험과 실시예 3의 형태학적 분석 실험을 통해 페북소스타트(Febuxostat)가 M. tuberculosis에 대해 직접적으로 성장 저해를 할 수 있는 능력이 확인되었다. 상기 페북소스타트를 통해 이미 감염된 환자의 치료에 적용하려면 우선적으로 세포 내 결핵균 제어 역시 이루어 지는지 확인을 해야 한다. 따라서 쥐의 골수유래 큰포식 세포 내 M. tuberculosis를 감염시키고 이에 대해 균의 성장을 억제할 수 있는지 확인하기 위해 ICG 분석을 진행하였다. 실험에 사용된 균주는 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주이다.
- [0070] 4-1. 세포 배양법
- [0071] 실험에 사용된 큰포식 세포는 마우스의 골수세포를 얻어내어 10% FBS (Biowest, France)와 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Biowest, France)이 포함된 DMEM High Glucose (Biowest, France) 배지와 10% L929 세포 상층액을 섞어 만든 배양액에 넣고 90 x 15 mm 페트리접시 (SPL life science, Korea)에 10ml씩 넣은 뒤 온도는 37°C, 이산화탄소는 5%로 유지되는 배양기에서 배양을 시작하였다. 3일 후 앞서 언급한 배양액을 추가적으로 10ml씩 페트리접시에 추가하고 다시 배양기에서 배양을 하였다. 총 6일 동안 배양을 실시하였다.
- [0072] 4-2. M. tuberculosis 감염 및 Febuxostat 처리
- [0073] 배양한 큰포식 세포는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 그리고 10% L929 세포 상층액이 함유된 DMEM 고농도 글루코스 배지에 2×10^5 cell/ml의 농도로 맞춰 준비하고, 48 웰 세포 배양 플레이트 (SPL life science, Korea)에 웰 당 1×10^5 개의 세포를 넣었다. 그리고 24시간 동안 인큐베이터에 넣어 안정화 하고, 1 MOI로 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주를 큰포식 세포에 4시간 감염시킨 뒤 Febuxostat을 72시간 동안 처리하였다.
- [0074] 4-3. 7H10 아가 배지의 제작
- [0075] Difco™ Middlebrook 7H10 아가 배지 (BD bioscience, USA) 파우더 9.5g을 1L 삼각 플라스크안에 넣고 증류수 450 mL와 함께 섞은 뒤 고압증기멸균을 121°C에서 15분 동안 진행하였다. 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.
- [0076] 4-4. 박테리아 접종 및 콜로니 형성 유닛(CFU) 확인
- [0077] 3일이 지나고 감염된 큰포식 세포가 있는 웰들을 PBS로 세척을 실시하였다. 증류수로 희석한 0.05% Triton X-100을 웰당 200ul씩 처리하여 10분 뒤 세포를 모두 깨어 나온 용해물을 가지고 PBS (pH 7.2)를 사용하여 10배, 100배 희석한 샘플을 만들었다. 그리고 이를 가지고 미리 만들어 놓은 7H10 아가 배지에 접종을 실시하였다. 접종 후 2주 뒤 CFU를 계수 하였다.
- [0078] 그 결과, 도 8에서 보는 바와 같이 M. tuberculosis H37Rv ATCC 27294 균주가 감염된 큰포식 세포에 페북소스타트(Febuxostat)를 처리하자 큰포식 세포 내 M. tuberculosis 균주의 성장이 현저히 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

도면

도면1

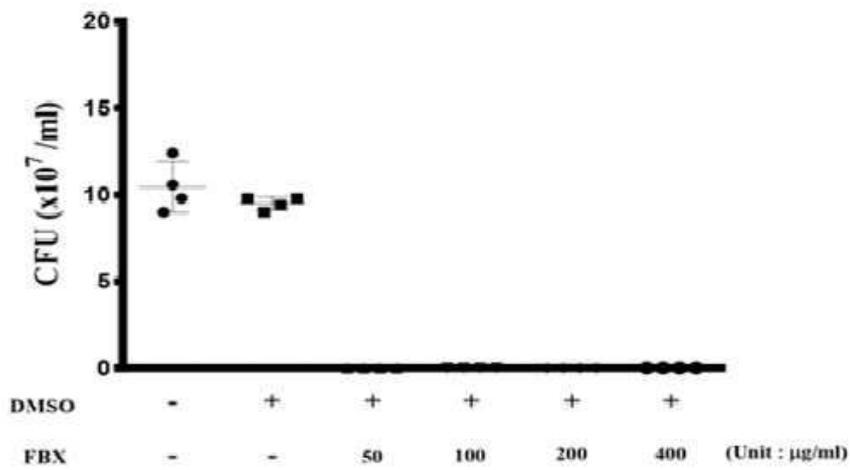
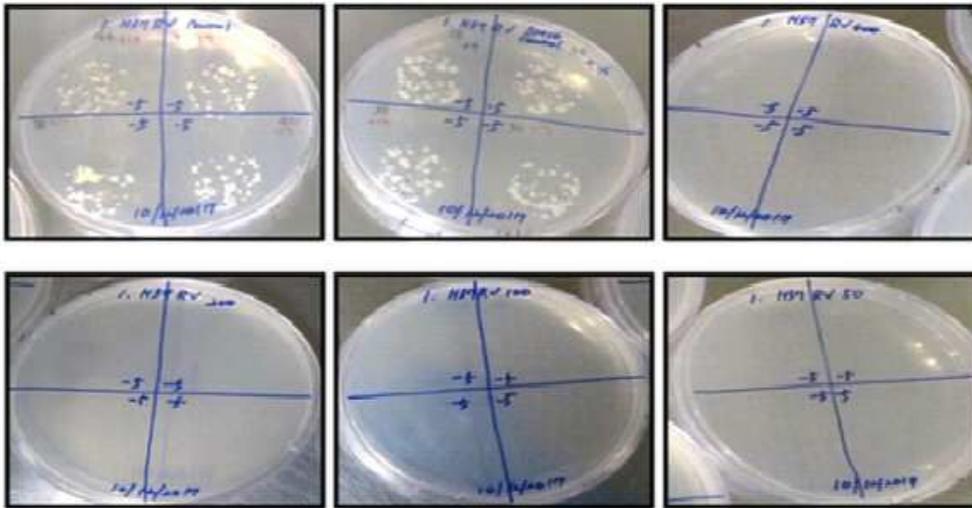


도면2



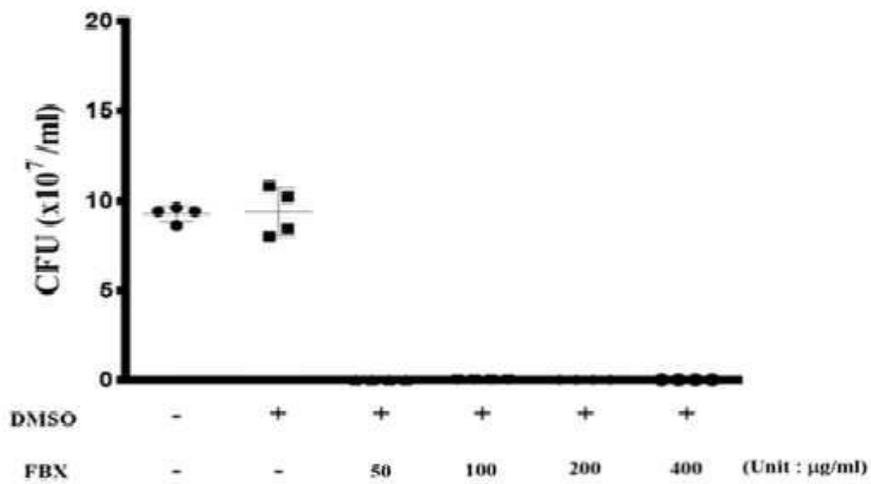
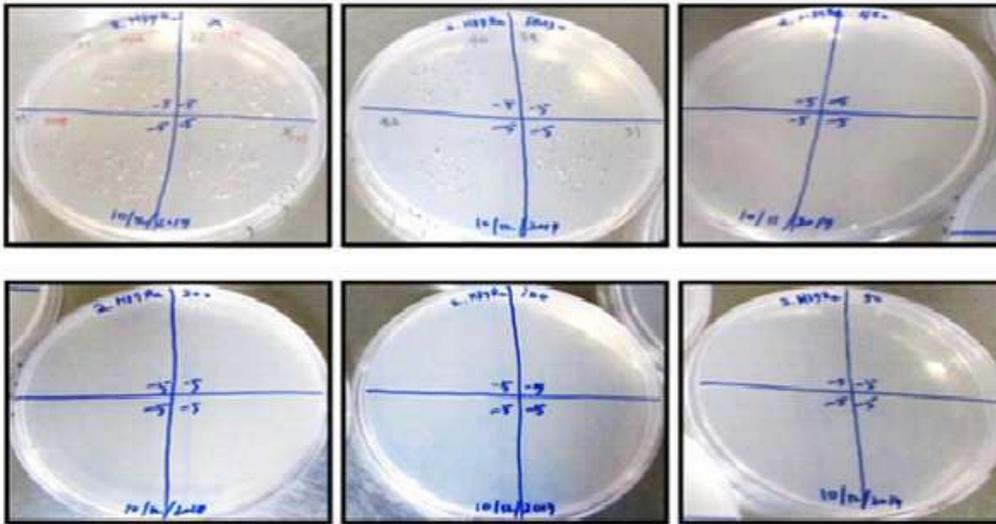
도면3

(A) *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 strain



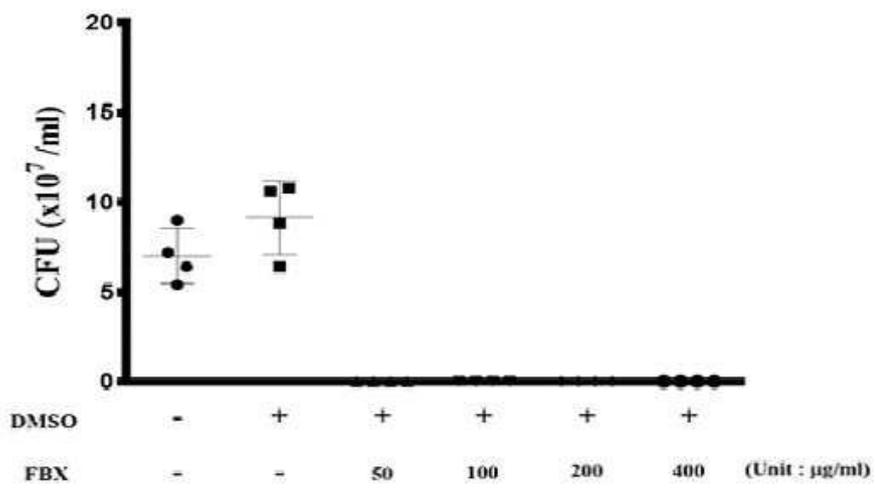
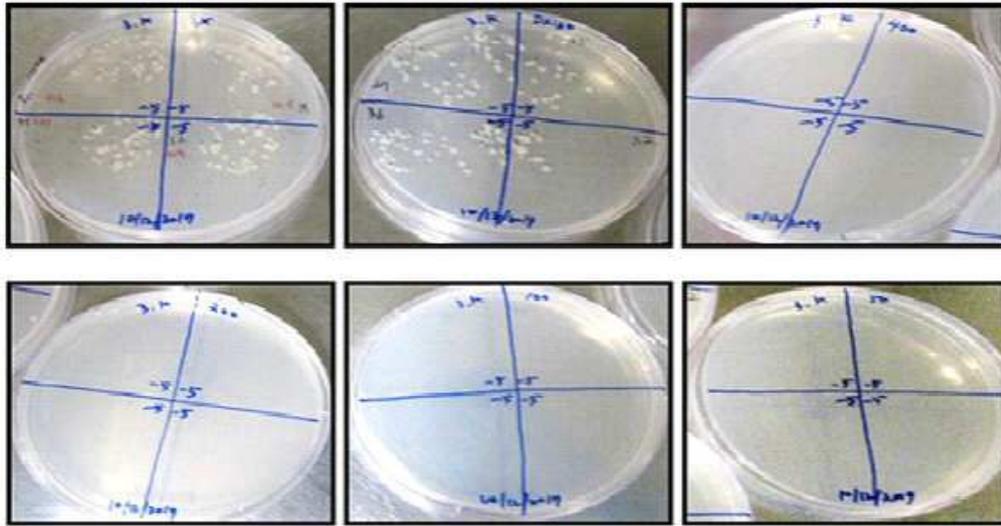
도면4

(B) *M. tuberculosis* H37Ra ATCC 25177 strain



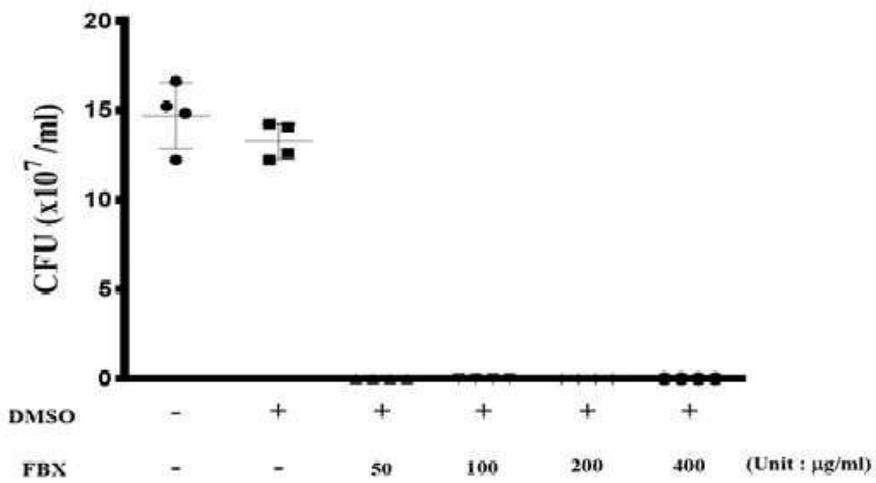
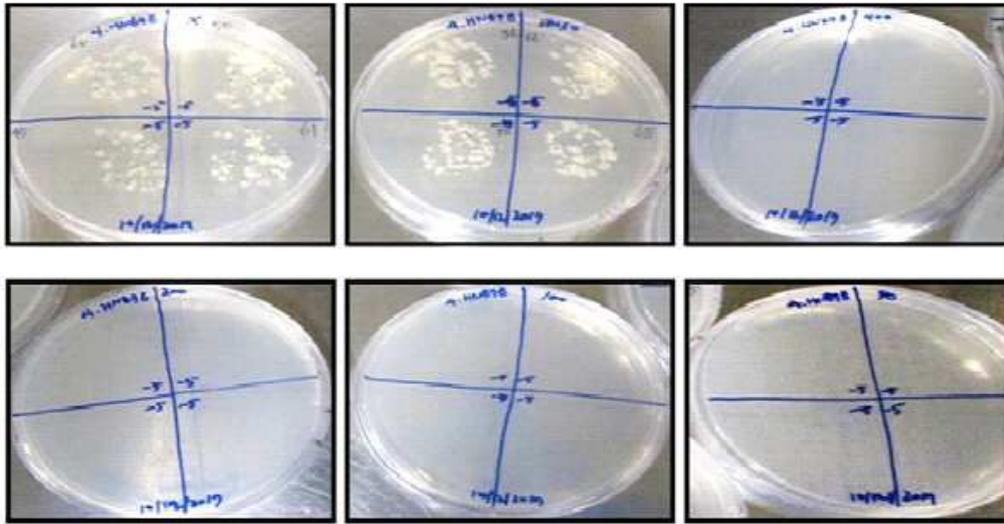
도면5

(C) *M. tuberculosis* K strain



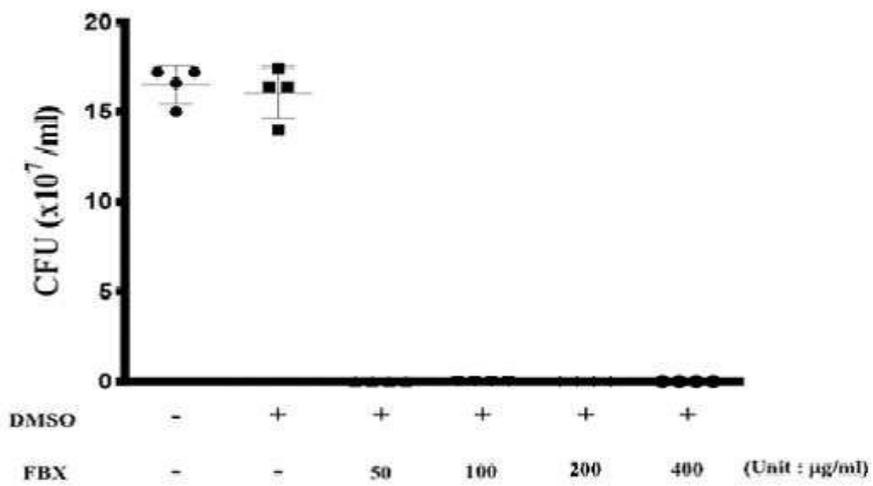
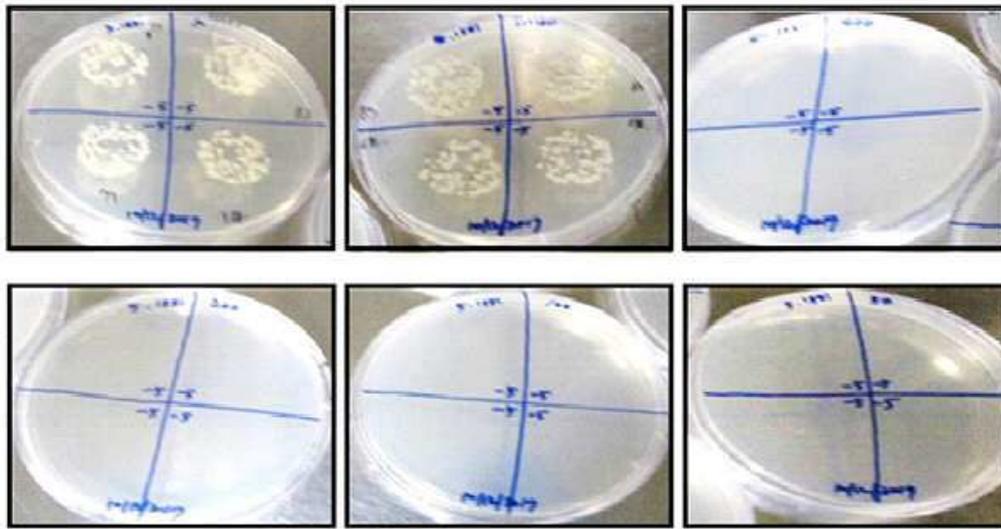
도면6

(D) *M. tuberculosis* HN878 strain



도면7

(E) *M. tuberculosis* CDC1551 strain



도면8

