

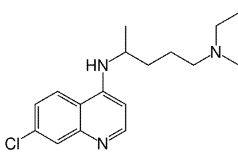
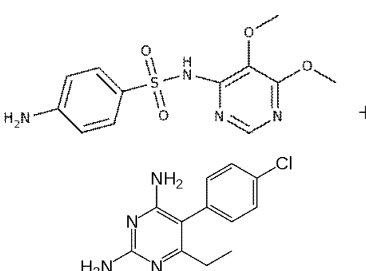
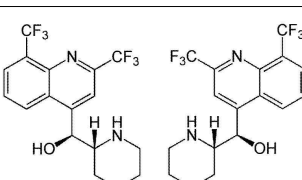
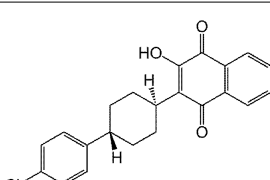
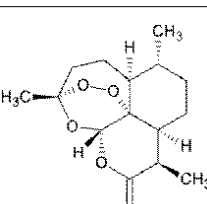
중견연구사업(도약연구) 2013

① 부처사업명(대)	기초연구사업	보안등급(보안, 일반)	일반	
② 사 업 명(중)	중견연구자지원사업	공개가능여부(공개, 비공개)	공개	
③ 세부사업명(소)	도약연구(도전연구)			
④ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초	④-1 실용화 대상여부(실용화, 비실용화)	실용화	
⑤ 과 제 명	국 문	말라리아 칼페인 구조에 근거한 치료후보물질 개발		
	영 문	Development of malaria calpain-based therapeutic agents		
⑥ 주관연구기관	원광대학교			
⑦ 협동연구기관				
⑧ 주관연구책임자	성 명	박 현	직급(직위)	교 수
	소속부서	원광대학교 의과대학	전 공	감염생물학

1. 국내외 관련분야의 환경변화

□ 현재 사용되고 있는 말라리아 약제에 대해 내성이 출현함

- 클로로퀸(Chloroquine)은 1934년에 Hans Andersag와 그의 동료에 의해 처음 발견 된 이후 1947년에 말라리아 치료를 위해 임상에서 사용되었음
- 판시다(Fansidar)는 설파독신(Sulfadoxine)과 피리메스아민(Pyrimethamine)이 혼합된 말라리아 약제로써 클로로퀸(chloroquine) 내성균주 출현 이후 1960년대에 사용된 약물임
- 메플로퀸(Mefloquine)은 1970년에 미국에서 개발된 말라리아 약제로 클로로퀸(Chloroquine) 내성균주에 대해 사용함
- 아토바퀴온(Atovaquone)은 메프론(Mepron)이라는 상업명으로 미국에서 제조되어 2000년대 이후 말라리아 치료를 위해 사용됨
- **아르테미시닌(Artemisinin)은 2006년 세계보건기구(WHO)에 의해 말라리아 치료를 위해 승인되어 사용되고 있는 현재까지는 가장 약효가 좋은 약제이나 2010년 내성 원충이 출현함**

종류	사용시기	구조	작용점
클로로퀸 (Chloroquine)	1940-1950		헤모조인 (hemozoin)의 파괴
판시다 [Fansidar (sulfadoxine+ pyrimethamine)]	1960-1969		엽산 (folic acid)의 합성에 관여하는 효소 저해
메플로퀸 (Mefloquine)	1970-1990		불확실 [헴 (heme) 폴리머레이즈 (polymerase) 저해]
아트바퀴온 (Atvaquone)	2000-2005		말라리아 원충 (parasite)의 전자수송체인 (electron transport chain) 저해
아르테미시닌 (Artemisinin)	2006-2011		말라리아 원충에서 산화환원 항상성 (redox homeostasis) 교란

□ 아르테미시닌 기반 혼합치료 [Artemisinin-based combination therapies (ACTs)] 및 한계

- 아르테미시닌 내성 원충 출현으로 인해 아르테미시닌을 단독 투여하지 않고 이를 기반으로 혼합 투여를 하는 치료를 시행하고 있는 실정임
- 특히, 아르테미시닌 내성 원충이 가장 강하게 출현한 캄보디아-태국 경계지역에서 아르테미시닌을 기반으로 하는 혼합치료제를 주로 사용하고 있음
- 그러나, 혼합치료제로 사용될 시 아르테미시닌 뿐만 아니라 함께 사용한 다른 약(Partner drug) 또한 그들 고유의 기능을 상실할 수 있으므로, 지속적인 혼합치료의 사용에는 한계가 있음. 실제로, 아르테미시닌 기반 혼합치료 후에 말라리아가 재발되는 사례가 지속적으로 보고되고 있음
- 이렇듯 ACT의 한계에 따라 새로운 항말라리아 치료제의 개발이 시급함

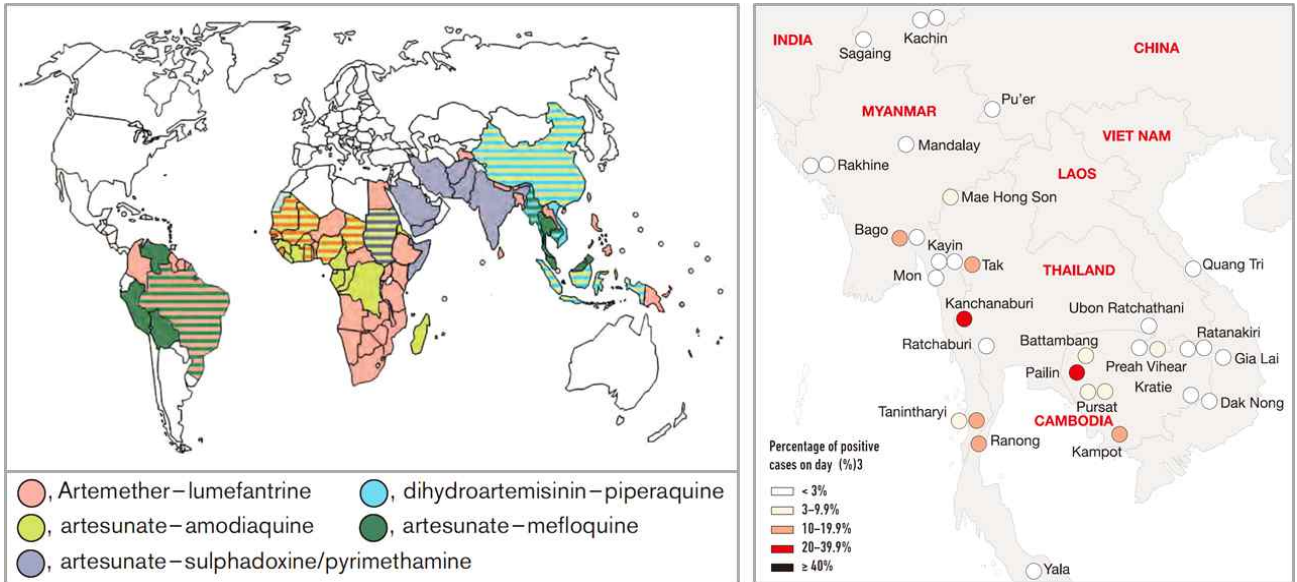


그림 1. 아르테미시닌 기반 혼합치료를 시행하는 나라 분포도(좌) 및 캄보디아-태국 경계지역에서 혼합치료 3일후 측정된 말라리아 원충 감염율 (우) (출처: Current Opinion in Infectious Diseases, 2011/WHO, 2011)

2. 연구개발의 필요성

- 말라리아는 결핵 및 AIDS와 더불어 세계보건기구(WHO)에서 정한 가장 치사율이 높은 3대 감염성 질환임
 - 말라리아는 AIDS, 결핵과 더불어 WHO에서 정한 세계적으로 치사율이 가장 높은 3대 감염성 질환의 하나임
 - 전 세계 인구의 약 40%인 25억 명이 말라리아 위험지역에 살고 있으며, 연간 200만~300만 명이 말라리아에 의해 사망함 (15초당 1명 사망)
 - 말라리아의 지속적 확산과 약제 내성 균주의 출현으로 새로운 구조의 항말라리아 약제 개발이 요구됨
- 말라리아는 매년 우리나라에도 약 3천명, 북한(접경지역)에 약 30 만명의 환자가 발생하여 국내에서도 점차 위험도가 높아지는 감염성 질환임
 - 환경 파괴와 기후 온난화로 많은 온대지역 선진 국가에서 말라리아의 재출현이 꾸준히 보고되고 있음
 - 삼일열 말라리아는 과거 수세기 동안 우리나라에 존재하던 대표적 토착성 전염병임
 - 우리나라는 정부와 WHO의 노력으로 1979년 말라리아 청정지역으로 선포되었으나, 1993년 휴전선과 인근한 경기 북부 지방과 강원 북서부를 중심으로 말라리아가 재출현함(북한에서 유입된 것으로 추정)
 - 우리나라 말라리아 환자 수는 2000년을 고점으로 감소추세에 있으나 감염위험지역이 점차 확대되고 있음(현재 21개의 위험지역)

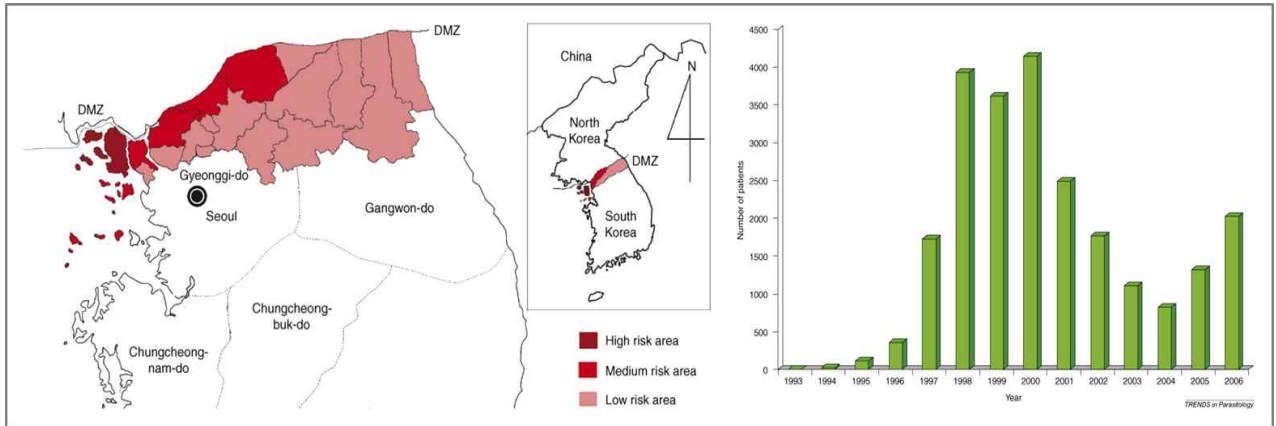


그림 31. 우리나라 말라리아 위험지역 및 말라리아 발생현황
(출처: Shin EH et al., Trends in Parasitology, 2008)

- 말라리아 재출현, 토착화와 북한으로부터의 지속적 유입 등 국내 상황과 OECD 가입국의 일원인 대한민국의 위상을 고려해 볼 때 세계적인 3대 감염 질환의 하나인 말라리아 퇴치를 위해 말라리아 기초/응용연구의 지원이 절실히 요구됨

□ 말라리아는 개발도상국 질환으로 제약 회사의 경제적 이익이 보장되지 않아 관련 연구개발이 미흡

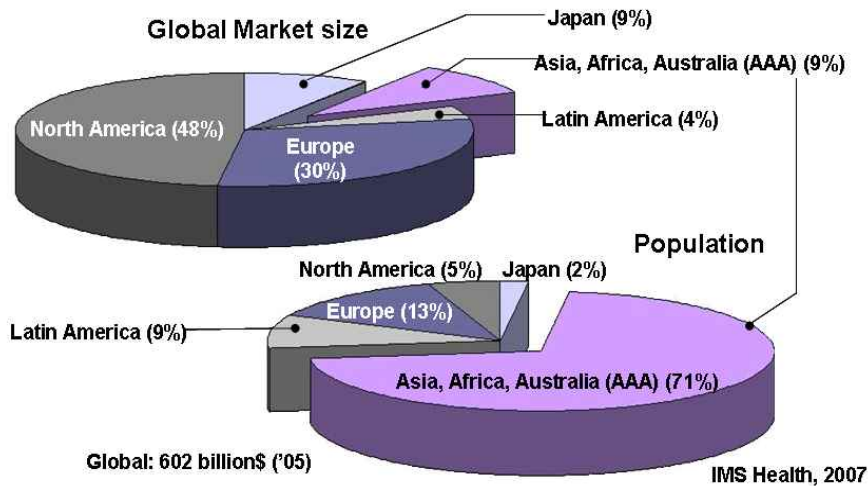


그림 32. 전 세계 의약품시장 및 인구분포

- 개발도상국의 인구는 전체인구에 약 71%이나 세계 의약품시장의 9%만을 점유하고 있음
- 말라리아, AIDS 그리고 결핵 등 3대 감염 질환의 경우, 세계무역기구(WTO)는 TRIPS 「무역관련 지적재산권에 관한 협정(Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights)」의 예외를 인정하여 개발도상국이 싼 가격의 항말라리아 카피약을 수입할 수 있도록 허가함
- 반면, 선진국 의약품 제조회사는 고혈압약, 발모제, 성기능개선제, 다이어트 약품 등에 막대한 연구 개발 투자에 집중하고 있으며, 경제적 이익이 보장되지 않는 말라리아 등의 개발도상국의 질병에는 연구 개발 투자가 이루어지지 않고 있음
- 이 질병의 심각성을 고려할 때, 국가 차원에서 연구 개발지원 한다는 발상의 전환이 필요함

□ 말라리아 치료제 개발에 있어 새로운 타겟이 필요한 이유

- 현재 항말라리아 약제에 대한 표적으로 적혈구의 hemoglobin 분해에 관여하는 단백분해효소가 주목 받아 왔으며, 그 예로 플라스메핀(Plasmeprin)과 팔시페인(Falcipain) 등을 들 수 있음
 - Rosenthal(California University, USA) 그룹의 falcipain 억제제 개발: cysteine protease인 falcipain 표적 연구에서 peptidyl fluoromethyl ketone, vinyl sulfone, aldehyde 등의 falcipain 저해제들이 in vitro와 in vivo에서 항말라리아 효과를 보임을 확인(Int. J. Parasitol. 2004;34:1489-1499)
 - Goldberg(Washington University, USA) 그룹의 plasmeprin 억제제 개발: plasmeprin의 대표적인 저해제인 Pepstatin A와 cysteine protease 저해제인 E64의 항말라리아 효과를 증명하였음(Bioorg. Med. Chem. 1999;7:633-638; J. Biol. Chem. 2005;280:1432-1437)
- 그러나 **plasmeprin과 falcipain 저해제는 이들 단백분해효소의 기작을 완벽하게 저해하지 못했음**
 - Falcipain에 대한 억제제 상위 조절 단계인 plasmeprin의 효소 활성을 완전히 억제하지는 못함
 - Aspartate protease 저해제 pepstatin A는 plasmeprin 활성화를 위한 선행기작을 억제하지 못했음(J. Biol. Chem. 2005;280:1432-1437)
- 따라서 이들 단백분해효소 이외에 **말라리아 원충에 특이적인 새로운 타겟의 발굴이 시급한 실정임**

□ 새로운 타겟으로서의 말라리아 칼페인

- 본 연구진의 선행 연구에서, **말라리아 칼페인이 말라리아 원충의 전 감염 시기에 걸쳐 발현되고, ALLN과 ALLM 등의 칼페인 저해제들이 plasmeprin processing 기작을 억제할 뿐 아니라 실제로 항말라리아 효과를 나타냄**을 확인함
- 일반적인 칼페인은 Ca^{2+} 결합에 의해 효소 활성이 조절됨: Ca^{2+} 결합에 의해 Catalytic subdomain IIa와 IIb가 구조적으로 가까워져 dimer의 형태를 이루게 되고, 그 때 각각의 subdomain에 존재하는 핵심 아미노산(Cysteine, Histidine, Asparagine)이 catalytic triad를 형성하면서 활성을 가짐
- 그러나 **말라리아 원충의 칼페인은 Ca^{2+} 결합 부위를 가지지 않으므로 원충 특이적인 활성 모드를 통해 효소 활성이 조절될 것으로** 생각됨
- 본 연구진의 선행 연구 결과에 따르면,
 - 말라리아 원충의 칼페인은 오직 Catalytic subdomain IIa만으로 효소 활성을 가짐
 - 말라리아 원충의 칼페인은 일반적인 칼페인과 달리 Catalytic subdomain IIa에 효소 활성에 필요한 핵심 아미노산을 모두 가지고 있음
 - Molecular modeling 결과, Catalytic subdomain IIa만으로도 성공적으로 active site를 형성하고, 형성된 active site의 양상은 일반적인 칼페인이 활성 상태의 active site와 매우 유사함
 - 핵심 아미노산을 돌연변이 시켰을 때 칼페인의 효소 활성을 100% 잃어버림
 - 따라서 말라리아 원충의 칼페인은 일반적인 칼페인과 달리 **monomer의 형태로 활성을 가질 것으로 보임**
 - Monomer의 형태는 저해제가 결합하는 모드를 더 정확하게 분석할 수 있으므로 보다 선택적인 저해제를 비교적 쉽게 합성할 수 있게 해줌
- 결론적으로 말라리아 원충의 칼페인은 사람의 칼페인과 매우 달라, **사람의 칼페인에는 반응하지 않으면서 말라리아 원충의 칼페인에만 선택적이고 특이적으로 반응하는 제해제, 즉 치료제 개발에 매우 적합함**

□ 본 연구진에 의해 말라리아 칼페인 저해 후보물질이 이미 확보됨

- 본 연구진은 기존 칼페인 저해제 개발의 동향과 문제점을 파악하여 생체 내 높은 반응성은 개선하고 칼페인과의 선택성을 증가시킨 ALLN 유도체들을 합성하고 in vitro 및 in vivo 약효평가를 수행하였음
- 그 결과, 낮은 농도에서도 독성이나 부작용(체중 감소 등) 없이 **항말라리아 효과가 좋은 후보물질 3종을** 발굴할 수 있었음
- 본 연구진에 의해 최초로 밝혀진 말라리아 칼페인과 ALLN의 docking mode를 기반으로 발굴된 3종의 후보물질을 더 최적화할 수 있음
- Pharmacophore 분석을 통해 virtual screening이 가능하고 이를 통해 새로운 말라리아 칼페인 저해 후보물질의 추가발굴도 가능함

3. 연구결과의 활용방안 및 기대성과

□ 연구개발결과의 활용방안

- 본 연구를 통해 전임상 후보물질 확보 시 향후 해외 WHO의 MMV(Medicines for Malaria Venture) 펀드와 빌게이츠 펀드 지원을 통하여 신약개발이 가능함
- 말라리아 약제개발 시 배양기간이 오래 걸려 신속한 스크리닝이 이루어지지 않았던 기존의 연구와는 다르게 단백질해효소를 이용한 고효율 스크리닝 시스템의 제공은 난치성감염질환의 후보물질 발굴에 박차를 가할 수 있음
- 개발된 후보물질을 활용하여 말라리아에 대한 약제 개발을 가속화할 수 있으며 in vitro 및 in vivo 표적단백질에 관한 연구는 말라리아 약재내성균주의 출현에 대비한 신속한 대처를 제공해 줄 것임
- 기술 이전 및 기술문제 해결
 - in vitro 및 in vivo 약제 스크리닝 시스템과 최적화된 약제 후보군은 산·학·연에 이전함
 - 본 연구실의 구축된 기반 기술과 시설을 활용하여 국내 산업체 및 연구기관과 계약을 체결하여 개발 중인 기술에 대한 지원을 할 것임

□ 연구개발결과의 기대성과

- **학문적 측면**
 - 항말라리아 약제 개발에 있어 새로운 표적 단백질에 관한 연구는 본 연구팀이 전 세계적으로 선도적 역할을 하고 있음: 세계 최초로 활성형 칼페인 재조합 단백질을 발굴하고 연구함
 - 말라리아 내에서의 칼페인의 역할 규명 및 약재내성실험동물을 이용한 칼페인과 약제 내성과의 연관성 규명에 대한 연구가 가능함
 - 말라리아 감염에 있어서 칼페인 단백질의 역할 규명 연구는 다른 표적 단백질 발굴 및 숙주와의 상호작용 이해를 통해 신약후보물질의 도출을 가능하게 함
 - α, β -unsaturated carbonyl 시스템을 응용한 약물의 디자인으로 말라리아 칼페인에 대한 선택적 억제제의 최초 개발이 기대됨
 - 칼페인의 입체 구조 규명으로 향후 구조 기반 저해제 개발이 이루어지면 관련 분야의 선도적 입지 확보가 가능함
- **인력양성 측면**
 - 박사후연구원, 석·박사 학위생, 연구원 등 관련 분야 전문 인력 양성에 기여함
 - ▷ 외부 전문가 세미나를 개최하여 본 연구와 관련된 연구 동향 및 기술을 습득하게 함
 - ▷ 국내·외 전문연구기관에서 주최하는 관련 기술 세미나 및 워크숍에 참석하게 함
 - ▷ 선도적 기술의 보유로 인한 제약회사, 생물학관련 업체로의 취업을 유도함
 - ▷ 산업체 담당자 및 연구원에게 새로운 기술 지도를 전수함으로써 전문 인력으로 양성함
- **기술적·경제적·산업적 측면**
 - 세계 최초의 효소활성형 재조합 칼페인 단백질 확보로 항말라리아제 개발에의 원천기술 확보가 가능할 것으로 예상됨
 - ▷ 선택적 칼페인 억제제 디자인의 원천 기술 확보 가능
 - ▷ 칼페인의 구조 결정으로 최적의 약물 디자인 가능
 - ▷ 활성형 칼페인 단백질을 이용한 고효율 스크리닝 시스템의 원천 기술 확보 가능
 - 현재 세계 100대 신약의 연평균 매출액은 1조원이며, 순수익은 3,000억원 수준임. 또한 신약 개발에 성공하면 통상 15년간에 걸친 특허 유효 기간 동안 독점권을 행사할 수 있음. 경쟁력 있는 후보물질의 조기 도출은 신약개발의 효율을 극대화 할 수 있음
 - 본 과제와 같이, 이미 선진제약사에서 타겟으로 하고 있는 질환군보다 독창적이며 그 시장의 성장 잠재력이 큰 질환군을 선별하여 신약을 개발한다면 개발의 효율성과 독점성을 극대화 할 수 있음
 - 공공적 성격이 강한 연구지원 사업이지만 향후 환자 발생 추이를 고려할 때 현재 전체 시장의 규모는 4조 5천억임. 그러나 기후의 온난화로 연평균 16 °C 이상 되는 위험지역이 현재 40%에서 향후 70%로 확대될 것이므로 시장규모의 증가가 예상됨