



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0119522
(43) 공개일자 2017년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/05 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/05 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0047659

(22) 출원일자 2016년04월19일

심사청구일자 2017년04월20일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

신동해

서울 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교 종합과학관 C동 408호

서은경

서울 성북구 솔샘로1길 9

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 8 항

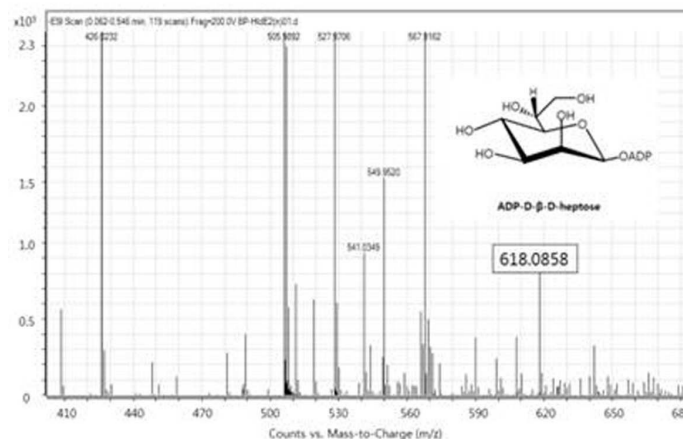
(54) 발명의 명칭 니아졸을 유효성분으로 포함하는 유비저의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 니아졸(niasol)을 유효성분으로 포함하는 유비저(melioidosis)의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 니아졸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 식품 조성물 및 향균용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 니아졸은 유비저균인 버크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*)의 GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose) 생합성을 억제함에 따라 LPS의 구조를 파괴하여 항균 활성을 나타내므로, 상기 균에 의해 발생하는 유비저의 예방 또는 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자

김미선

서울 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교 종합
과학관 C동 408호

박지민

부산 수영구 연수로315번길 16 더샵파크리치 105동
1304호

이다은

서울 서대문구 이화여대길 52 이화여자대학교대학
원기숙사 B108호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A1A05008769

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업 (학술진흥) - 일반연구자지원사업 - 신진연구 (후속연구지원)

연구과제명 구조기반 류비저 특이적 항생제 후보물질 도출

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

니아졸(nyasol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저(melioidosis)의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 니아졸은 유비저균에 대하여 항균 활성을 갖는 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항균 활성은 유비저균의 LPS(lipopolysaccharide)의 합성 저해에 의하여 달성되는 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 LPS의 합성 저해는 헵토스(heptose)의 합성 저해에 의하여 달성되는 것인, 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 헵토스(heptose)의 합성 저해는 GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose)의 합성 저해에 의하여 달성되는 것인, 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose)의 합성 저해는 HddC(D-glycero- β -D-manno-heptose-1-phosphate guanosyltransferase) 효소의 활성 저해에 의하여 달성되는 것인, 약학 조성물.

청구항 7

니아졸(nyasol) 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저(melioidosis)의 개선용 식품 조성물.

청구항 8

니아졸(nyasol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저균에 대한 항균용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 니아졸(nyasol)을 유효성분으로 포함하는 유비저(melioidosis)의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것

[0001]

으로, 구체적으로 니아졸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 식품 조성물 및 항균용 의약외품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 유비저(melioidosis)는 그람 음성 간균인 버크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*)에 의해 발생하는 세균성 감염병으로, 동남아시아, 호주 북부 등 열대 및 아열대 지방에서 주로 발생한다. 감염경로는 오염된 흙 또는 물의 흡입, 경구 섭취, 피부 상처의 노출 등이며, 임상증상은 무증상 감염부터 피부농양, 괴사성 폐렴 등 세균성 패혈증과 관련된 증상이 특징적이다.
- [0004] 적절히 치료되지 못할 경우 치사율이 55%에 이르지만, 동서아시아와 북부 호주에서는 이미 풍토병화되어 태국 북동부에서는 지역사회획득 패혈증의 20%, 치명적인 지역사회획득 폐렴의 40%가 유비저에 의해 발생하고 있다(Wiersinga, W. J. et al., Nature Rev. Microbiol., 2006, 4, 272-282.). 유비저는 국내에는 발병하지 않는 풍토병이지만, 열대지방으로의 여행자나 건설현장 근무자가 증가하면서 유비저에 대한 대비는 매우 시급한 실정이다.
- [0005] 현재 이미페넴(imipenem), 세프트라짐(ceftazidime) 등의 항생제가 유비저의 치료에 사용되고 있으나 약제 내성 및 내성 균주의 출현이 빈번하기 때문에 새로운 항생제 혹은 항생제 보조제 개발 연구가 필수적이다.
- [0007] 한편, 지질다당류(lipopolysaccharide; LPS)는 그람음성균의 외막(outer membratne)의 주요 구성성분으로서 균의 구조적 안정성을 유지하고, 외부물질로부터 막을 보호하는 역할을 한다. 또한, 숙주 세포에 대한 흡착과 면역반응 유도에 관여하고 있다. LPS는 크게 lipid A, 올리고당 핵(core oligosaccharide), 및 O-특이적 다당류(O-antigen polysaccharide chain)로 구성되어있다. 올리고당 핵은 내부핵과 외부핵으로 나뉘는데, 내부핵은 3-디옥시-D-만-옥트-2-올로소닉산(3-deoxy-D-mann-oct-2-ulosonic acid; Kdo)과 L-글리세로-D-만노-헵토스(L-glycero-D-manno-heptose; L-D-heptose) 단위로 구성되어 있으며, 외부핵은 추가적인 당잔기로 구성되어 있다. 이러한 LPS는 균의 생존에 필수적이고, 거의 모든 그람음성균에 보존되어 있으므로(Raetz, C. R. H. et al., Annu. Rev. Biochem., 2002, 71, 635-700), LPS는 항생제 개발의 타겟이 되고 있다.
- [0008] 최근, LPS 내부 핵의 주요 구성성분인 헵토스(heptose)의 합성에 관여하는 유전자들이 밝혀졌다. 이들 유전자의 변이에 따른 헵토스의 생합성 저해는 세균의 감염능력을 상실하게 하고 약물에 대한 민감도를 높여주며, 나아가 사멸을 유도한다는 사실이 보고되었다. 구체적으로, 버크홀데리아 세노세파시아(*Burkholderia cenocepacia*)에서 헵토스 생합성경로에 관여하는 hldA와 hldD 유전자 변이는 균의 항균성 펩타이드에 대한 민감성을 증가시키고, 균의 사멸을 유도함이 밝혀진바 있고(Loutet SA et al., J Bacteriol., 2006, 188: 2073-2080.), 대장균(*Escherichia coli*)에서 HldE 단백질의 변이는 노보비오신(novobiocin)에 대한 민감도를 향상시킨다는 연구결과가 발표된바 있다(McArthur F., J. Bacteriol. 2005, 187, 5292-5300.). 따라서, 헵토스 생합성에 관여하는 단백질들을 저해하는 물질은 새로운 항생제 혹은 항생제보조물질로 개발될 수 있는 가능성이 제시되고 있지만, 유비저의 주요 감염균인 버크홀데리아 슈도말레이의 헵토스 생합성을 저해하는 항생제에 대한 연구는 전무한 실정이다.
- [0010] 버크홀데리아 슈도말레이의 LPS 구성성분인 헵토스는 여러 전구체를 통해 합성되며, 대표적으로 6-디옥시-D-만노-헵토스-1 α -GDP(6-deoxy-D-manno-heptose-1 α -GDP; GDP-6-deoxy-D-heptose) 또는 L-글리세로-D-만노-헵토스-1 β -ADP(L-glycero-D-manno-heptose-1 β -ADP; ADP-L- β -D-heptose)를 그 예로 들 수 있다.
- [0011] 상기 GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose)의 생합성경로에는 일곱 개의 효소가 관여하고 있다. 차례로 트랜스케톨라제(transketolase; TktA), 세도헵툴로스 7-인산 이소머라제(sedoheptulose 7-phosphate isomerase; GmhA), D-글리세로- β -D-만노-헵토스-7-인산 키나제(D-glycero- β -D-manno-heptose-7-phosphate kinase; HddA), D-글리세로-D-만노-헵토스-1,7-비스인산 포스파타제(D-glycero-D-manno-heptose-1,7-bisphosphate phosphatase; GmhB), D-글리세로 β -D-만노-헵토스-1-인산 구아노실트랜스퍼라제(D-glycero- β -D-manno-heptose-1-phosphate guanosyltransferase; HddC), GDP 슈가 에피머라제/디히드라타제(GDP sugar epimerase/dehydratase; WcbK), 캡슐 폴리사카라이드 생합성 단백질(capsular polysaccharide biosynthesis protein; WcbJ)이 관여하고 있음이 밝혀진 상태이다.

[0012] 또한, ADP-L- β -D-헵토스(ADP-L- β -D-heptose)의 생합성 경로에는 여섯 개의 효소가 효소가 관여하고 있다. 차례로 TktA, GmhA, D-글리세로- β -D-만노-헵토스-7-인산 키나제/D-글리세로- β -D-만노-헵토스-1-인산 아데닐트랜스퍼라제(D-glycero- β -D-manno-heptose-7-phosphate kinase; HddA /D-glycero- β -D-manno-heptose-1-phosphate adenylyltransferase; HldE1), GmhB, 시티딜트랜스퍼라제(cytidyltransferase; HldE2), ADP-L-글리세로-D-만노-헵토스 6-에피머라제(ADP-L-glycero-D-manno-heptose 6-epimerase; HldD)가 관여하고 있음이 밝혀진 상태이다. 이들 중에서, TktA, GmhA, GmhB 효소는 상기 GDP-6-디옥시-D-헵토스 생합성경로와 공유하고 있다.

[0014] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 유비저균에 대한 항생제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 니아졸이 헵토스의 전구체인 GDP-6-디옥시-D-헵토스의 합성을 저해함으로써 유비저 발병 원인균으로 알려진 버크홀데리아 슈도말레이의 LPS 구조를 파괴하여 그의 생존을 억제할 수 있음을 확인하였다. 이에 따라, 상기 니아졸은 유비저의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 하나의 목적은 니아졸(nyasol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저(melioidosis)의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 하나의 목적은 니아졸 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저의 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 니아졸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저균에 대한 항균용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 니아졸(nyasol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저(melioidosis)의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명에서 제공하는 니아졸은 HddC(D-glycero- β -D-manno-heptose-1-phosphate guanosyltransferase)의 활성을 억제하는데, 상기 HddC는 GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose) 합성경로에 관여하는 효소로서, 상기 HddC의 활성이 억제되면, 상기 GDP-6-디옥시-D-헵토스의 합성이 억제된다. 또한, 상기 GDP-6-디옥시-D-헵토스는 L-글리세로-D-만노-헵토스를 합성하기 위한 전구체로 사용되는데, 상기 L-글리세로-D-만노-헵토스는 그람음성균의 외막을 구성하는 주요성분인 LPS의 올리고당 핵을 구성하는 주요성분인 것으로 알려져 있다.

[0023] 따라서, 니아졸의 처리에 의해 HddC의 활성이 억제되면 GDP-6-디옥시-D-헵토스의 합성이 억제되고, 상기 GDP-6-디옥시-D-헵토스의 합성이 억제되면 L-글리세로-D-만노-헵토스의 합성이 억제되며, 상기 L-글리세로-D-만노-헵토스의 합성이 억제되면 이를 포함하는 LPS의 올리고당 핵의 생성이 억제되고, 상기 올리고당의 핵의 생성이 억제되면 LPS의 생성이 억제되며, 상기 LPS의 생성이 억제되면 이를 포함하는 그람음성균의 외막의 생성이 억제되어, 결과적으로는 그람음성균의 증식 또는 생존이 저해된다.

[0024] 결국, 니아졸은 그람음성균의 증식 또는 생존을 억제하는 항생제로서의 역할을 수행할 수 있다.

[0025] 실제로, 본 발명자들은 그람음성균의 일종인 버크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*)로부터 유래된 GDP-6-디옥시-D-헵토스의 합성에 관여하는 다양한 효소를 대상으로 니아졸의 효과를 검증한 결과, 니아졸의 처리에 의하여 HddC 효소의 작용이 억제되고, 이로 인하여 GDP-6-디옥시-D-헵토스가 합성되지 않음을 확인하였다.

[0026] 이처럼 버크홀데리아 슈도말레이에 니아졸을 처리하면, GDP-6-디옥시-D-헵토스의 합성이 억제됨을 확인한 결과는 니아졸이 상기 균의 증식 또는 생존을 억제시킬 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있고, 이처럼 니아졸이 상

기 균의 증식 또는 생존을 억제시킬 수 있는 이상, 상기 니아졸은 상기 균의 감염에 의하여 발병되는 질환인 유비저의 발병을 예방하거나 또는 상기 균의 감염으로 인하여 발병된 유비저를 치료하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0027] 따라서, 상기 니아졸은 유비저의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0029] 또한, 상기 니아졸은 유비저균에 대하여 항균 활성을 갖는 것일 수 있다.

[0030] 본 발명에서, 상기 항균 활성은 유비저균의 LPS(lipopolysaccharide)의 합성 저해에 의하여 달성되는 것일 수 있고, 상기 LPS의 합성 저해는 헵토스(heptose)의 합성 저해에 의하여 달성되는 것일 수 있고, 상기 헵토스(heptose)의 합성 저해는 GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose)의 합성 저해에 의하여 달성되는 것일 수 있고, 상기 GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose)의 합성 저해는 HddC(D-glycero- β -D-manno-heptose-1-phosphate guanosyltransferase) 효소의 활성 저해에 의하여 달성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 용어, "니아졸(nyasol)"은 (-)-니아졸 또는 시스-히노키레스inol(cis-hinokiresinol)로 불리는 화합물을 의미한다. 상기 니아졸은 호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory Syncytial Virus: RSV) 감염으로 유발되는 호흡기 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물(한국등록특허 10-0856335) 또는, 피부 미백용 조성물(한국공개특허 2015-0085564)의 유효성분으로 사용될 수 있음이 공지된 바 있지만, 유비저 치료 효과는 지금까지 전혀 알려지지 않았으며, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다.

[0034] 본 발명의 용어, "유비저균"은 유비저를 야기하는 감염균을 의미하며, 슈도모나스 슈도말레이(*Pseudomonas pseudomallei*)를 의미한다. 상기 버크홀데리아 슈도말레이는 그람음성(Gram-negative), 양극성(bipolar), 호기성(aerobic)의 특징을 갖는 운동성의 막대모양 세균이다. 2 내지 5 μ m의 길이, 및 0.4 내지 0.8 μ m의 직경을 가지며, 편모를 이용하여 자체적으로 움직인다. 본 명세서에서 '유비저 감염균' 또는 '유비저균'으로 혼용되어 명명될 수 있다.

[0036] 본 발명의 용어, "유비저(melioidosis)"는 버크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*)에 의해 발생하는 세균성 감염병을 의미한다. 무증상부터 피부농양, 괴사성 폐렴 등 세균성 패혈증과 관련된 임상증상을 나타내며, 치사율이 55%에 달하는 것이 특징이다.

[0038] 본 발명의 용어, "LPS(lipopolysaccharide)"는 그람음성균의 외막(outer membratne)의 주요 구성성분을 의미하며, 균의 구조적 안정성을 유지하고, 외부물질로부터 막을 보호하는 역할을 한다. 상기 LPS의 구조는 도 1에 나타낸 바와 같이, lipid A, 올리고당 핵(core oligosaccharide), 및 O-특이적 다당류(O-antigen polysaccharide chain)로 구성되어있으며, 상기 올리고당 핵은 내부핵과 외부핵으로 나뉘어 있다.

[0039] 본 발명의 용어, "헵토스(heptose)"는 상기 LPS의 내부 핵의 구성성분을 의미한다.

[0040] 본 발명의 용어, "GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose)"는 6-디옥시-D-만노-헵토스-1 α -GDP(6-deoxy-D-manno-heptose-1 α -GDP; GDP-6-deoxy-D-heptose)로도 불리는 상기 헵토스의 전구체를 의미한다.

[0041] 본 발명의 용어, "HddC"는 D-글리세로- β -D-만노-헵토스-1-인산 구아노실트랜스퍼라제(D-glycero- β -D-manno-heptose-1-phosphate guanosyltransferase)를 의미하며, 상기 GDP-6-디옥시-D-헵토스의 합성경로에 관여하는 효소를 의미한다. 상기 HddC 단백질을 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: Accession YP_109389.1, CP029641.1, CRY07523.1 등).

[0043] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용가능한"은 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[0044] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용가능한 염"은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인

염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미한다. 통상적으로 금속염, 유기 염기와 염, 무기 산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.

[0045] 본 발명의 조성물은 니아졸의 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함하고, 가능한 모든 입체이성체도 포함할 수 있다. 또한 상기 니아졸의 용매화물, 수화물 및 입체이성체는 통상적인 방법들을 사용하여 제조될 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다.

[0048] 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 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. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 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 포함되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 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.

[0050] 본 발명의 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여에 의해 유비저의 발병을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0051] 본 발명의 용어, "치료"는 본 발명의 조성물의 투여에 의해 유비저의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0053] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 니아졸이 유비저 감염균인 버크홀데리아 슈도말레이에서 발현되는 HddC(D-glycero- β -D-manno-heptose-1-phosphate guanosyltransferase)의 효소활성을 저해하여 GDP-헵토스 생합성이 억제됨을 확인하였다(실시예 4). 이러한 GDP-헵토스 생합성의 저해는 LPS의 구조를 파괴함으로써 버크홀데리아 슈도말레이의 생존 또는 독성을 감소시키는 것이므로, 상기 니아졸이 유비저를 치료하는 항생제 혹은 항생제 보조물질로서 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0055] 다른 하나의 양태는 니아졸(nyasol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저

(melioidosis)의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 유비저의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [0056] 상기 니아졸, 약학적으로 허용가능한 염, 유비저, 예방 및 치료의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0057] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미한다.
- [0058] 본 발명의 용어, "개체"는 유비저가 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적으로 인간을 포함한 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명에서 개체는 인간이 제외될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0060] 구체적으로 본 발명의 조성물은 고형분을 기준으로 1일 0.0001 내지 100 mg/체중 kg으로, 더욱 구체적으로 0.001 내지 100 mg/체중 kg으로 투여할 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0061] 또한, 구체적으로 니아졸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 개체에게 0.01 mM 내지 1000 mM, 더욱 구체적으로 0.1 mM 내지 100 mM 농도 투여될 수 있도록, 본 발명의 조성물을 투여할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 본 발명의 유비저의 예방 또는 치료 방법에서, 상기 조성물을 투여하는 투여 경로 및 투여 방식은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 해당 부위에 상기 조성물을 포함하는 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 그 투여 경로의 비제한적인 예로는, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내 또는 흡입 등을 통하여 투여되는 것을 들 수 있다.
- [0064] 또 다른 하나의 양태는 니아졸(niasol) 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 유비저(melioidosis)의 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0065] 상기 니아졸, 유비저 및 예방에 대한 정의는 전술한 바와 같다.
- [0066] 본 발명의 용어, "생리학적으로 허용가능한 염"은 생리학적으로 허용되고 생물체에 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않으면서, 투여되는 화합물이 목적하는 효과를 발휘할 수 있는 통상적으로 사용되는 것을 의미한다.
- [0067] 본 발명의 용어, "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 유비저가 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0068] 본 발명의 용어 "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0069] 상기 건강기능(성)식품(functional food)은 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 '기능(성)이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조할 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조할 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 유비저의 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

- [0070] 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강 식품, 건강보조식품의 용어는 호용된다.
- [0071] 구체적으로, 상기 건강기능식품은 니아졸 또는 이의 생리화적으로 허용가능한 염을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미한다.
- [0072] 상기 니아졸은 한약재로 사용되어 온 지모(*Anemarrhena asphodeloides*)의 뿌리에 포함된 화합물로서, 생체에 대하여 안전성이 입증된 화합물이다. 따라서, 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없고, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 소비자의 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.
- [0073] 상기 조성물은 생리화적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [0074] 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0075] 또한, 상기 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(돌신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 겔기조제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0076] 상기 니아졸 또는 이의 생리화적으로 허용가능한 염은 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.
- [0078] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0079] 본 발명의 식품 조성물은 소비자의 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 상기 니아졸 또는 이의 생리화적으로 허용가능한 염을 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있다.
- [0081] 또 다른 하나의 양태는 니아졸(nyasol) 또는 이의 약화적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 소비자기능에 대한 향균용 조성물을 제공한다.

- [0083] 상술한 바와 같이, 니아졸을 유비저균에 처리하면, 상기 유비저균에서 발현되는 HddC 효소의 활성을 억제하여, 결과적으로는 상기 균의 증식 또는 생존을 억제할 수 있으므로, 상기 니아졸은 유비저균에 대한 항균용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다. 이때, 상기 니아졸, 약학적으로 허용가능한 염 및 유비저균의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0085] 본 발명의 용어, "항균"은 미생물을 사멸시키거나 성장을 억제하는 것, 또는 독성을 감소시키는 것을 의미한다.
- [0087] 본 발명의 항균용 조성물은 의약외품 형태로 제공될 수 있다.
- [0088] 상기 "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미한다. 구체적인 예로, 피부 외용제, 항균제, 방부제, 살균제, 소독제 또는 세척제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0089] 니아졸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유비저균에 대한 항균을 목적으로 의약외품 조성물에 첨가할 경우, 상기 니아졸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.
- [0090] 상기 피부 외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태로 제조되어 사용될 수 있다.
- [0091] 본 발명의 의약외품 조성물은 유비저의 항균 활성을 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 니아졸 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 의약외품 조성물의 총중량 대비 0.01 내지 100 중량%, 더욱 구체적으로 1 내지 80 중량%로 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0093] 본 발명의 니아졸은 유비저균인 버크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*)의 GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose) 생합성을 억제함에 따라 LPS의 구조를 파괴하여 항균 활성을 나타내므로, 상기 균에 의해 발생하는 유비저의 예방 또는 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0095] 도 1은 그람 음성균의 세포막과 LPS 구조를 보여주는 이미지이다.
- 도 2는 GDP-6-디옥시-D-만노-헵토스(GDP-6-deoxy-D-manno-heptose) 생합성과정을 보여주는 개략도이다.
- 도 3은 ADP-L-β-D-헵토스(ADP-L-β-D-heptose) 생합성과정을 보여주는 개략도이다.
- 도 4는 TktA의 반응 생성물인 세도헵툴로스-7-인산(sedoheptulose-7-phosphate)의 검출 결과를 보여주는 크로마토그램이다.
- 도 5는 HddA의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 α,7-비스인산(D-glycero-D-manno-heptose-1 α,7-bisphosphate)의 검출 결과를 보여주는 크로마토그램이다.
- 도 6은 HddC의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 α-GDP(D-glycero-D-manno-heptose-1 α-GDP)의 검출 결과를 보여주는 크로마토그램이다.

도 7은 WcbK의 반응 생성물인 4-케토-6-디옥시-D-만노-헵토스-1 α -GDP(4-keto-6-deoxy-D-manno-heptose-1 α -GDP)의 검출 결과를 보여주는 크로마토그램이다.

도 8은 HldE1의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 β ,7-비스인산(D-glycero-D-manno-heptose-1 β ,7-bisphosphate)의 검출 결과를 보여주는 크로마토그램이다.

도 9는 HldE2의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 β -ADP(D-glycero-D-manno-heptose-1 β -ADP)의 검출 결과를 보여주는 크로마토그램이다.

도 10은 니아졸의 처리 후, GDP-헵토스 생합성경로의 반응 생성물인 4-케토-6-디옥시-D-만노-헵토스-1 α -GDP(4-keto-6-deoxy-D-manno-heptose-1 α -GDP)의 검출 결과를 보여주는 크로마토그램이다.

도 11은 니아졸의 처리 후, GmhB/HldE2의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 β -ADP(D-glycero-D-manno-heptose-1 β -ADP)의 검출 결과를 보여주는 크로마토그램이다.

도 12는 니아졸의 처리 후, HddC의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 α -GDP(D-glycero-D-manno-heptose-1 α -GDP)의 검출 결과를 보여주는 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0096] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0098] 실시예 1. 효소 단백질 준비

[0100] 유비저균의 LPS 구조를 파괴하는 물질을 이용하여 유비저균에 대한 항생제를 개발하고자 하였다. 헵토스(heptose)는 상기 LPS의 구성성분이며, 헵토스의 전구체로서 GDP-6-디옥시-D-헵토스(GDP-6-deoxy-D-heptose) 또는 ADP-L- β -D-헵토스(ADP-L- β -D-heptose)가 존재하는데, 상기 전구체의 생합성을 저해하여 결과적으로 LPS 구조를 파괴하는 물질을 스크리닝하기 위하여 상기 전구체의 합성에 관여하는 단백질의 활성을 이용하였다. 유비저균은 높은 병원성으로 인하여 배양이 까다롭기 때문에 상기 단백질의 활성을 in vitro 실험을 통해 조사하였다.

[0101] 구체적으로, 도 2에 나타난 바와 같이, GDP-6-디옥시-D-헵토스의 합성에 관여하는 단백질인 버크홀데리아 슈도말레이의 TktA, GmhA, HldE1, HddA, GmhB, HldE2, HddC, HldD, WcbK 단백질을 하기 실시예 1-1 내지 1-3의 방법에 따라 분리 정제하였다. 단, GmhB는 in vitro 실험에서 효소활성이 낮아서, 높은 효소활성을 위해 버크홀데리아 슈도말레이와 매우 높은 서열동등성을 가지는 버크홀데리아 타일랜텐시스(*Burkholderia thailandensis*)의 GmhB를 assay에 사용하였다.

[0103] 실시예 1-1. 유전자 클로닝 과정

[0105] 연결-비의존적 클로닝(Ligation-Independent Cloning, LIC)를 위해 프라이머를 설계하였고, 제노텍사(한국)를 통해 합성하였다. 각 유전자의 증폭을 위해 설계한 상기 프라이머들의 서열은 하기 표 1에 나열하였다.

표 1

유전자	정방향 프라이머	역방향 프라이머
TktA	5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGACGACTTCGTCTCCCGCC TCC-3' (서열번호 1)	5'- GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTACGCGAGC ACCGCCTTCG-3' (서열번호 2)
GmhA	5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGGAGAATCGCGAATTGACG TACAT-3' (서열번호 3)	5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTACTGCTTCCGAAAA TGGAGTGCT-3' (서열번호 4)
HddA	5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGAATCCGACAATCAT TCGCGC-3' (서열번호 5)	5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTAATTCGCGATT CTCCATGCCTGC-3' (서열번호 6)

GmhB	5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGCCGACCAGTCCCAGCAAA-3' (서열번호 7)	5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTACTCGTGTCTTTGGAAA GGAAATCGA -3' (서열번호 8)
HddC	5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGAGAGAAGCGATCATCTTGGCGG-3' (서열번호 9)	5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTACTTGCAGATTCCGGAAA GCTC-3' (서열번호 10)
WcbK	5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGGCAAAGCGTGTGTTGATTACG-3' (서열번호 11)	5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTATCGGGTCAAGAACTTCT CGCCG-3' (서열번호 12)
H1dE1	5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGTCGCGCAGCAGATCGC-3' (서열번호 13)	5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTAATGAAACAGTTTCGT CGTACTCGACGG-3' (서열번호 14)
H1dE2	5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGCCCGCTTCGTTCAAGC-3' (서열번호 15)	5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTAGCGCGACTGCGCGCG -3' (서열번호 16)
H1dD	5'-GGCGGTGGTGGCGGCATGACCCTCATCGTTACGGCG-3' (서열번호 17)	5'-GTTCTTCTCCTTTGCGCCCCTACAGCTGGCCGAACA GCCAAC-3' (서열번호 18)

[0108] GmhB를 제외한 모든 유전자는 버크홀데리아 슈도말레이의 게놈 DNA 200 ng를 주형으로 사용하였고, GmhB는 버크홀데리아 타일랜텐시스의 게놈 DNA 109 ng를 주형으로 사용하였다. 주형 DNA 1 μ l, 50 μ M 농도의 정방향 및 역방향 프라이머 각각 1 μ l, 2X PrimeSTAR GC 버퍼(타카라) 50 μ l, 2.5 mM dNTP mix(타카라, 일본) 8 μ l, GC 버퍼가 포함된 PrimeSTAR HS DNA 폴리머라제(타카라, 일본) 1 μ l를 포함하는 총 100 μ l의 반응 혼합물을 사용해 증합효소연쇄반응(PCR)을 수행하였다.

[0109] 증합효소연쇄반응은 98℃에서 10초, 68℃에서 1 분/Kb를 한 주기로 하여 30주기 반복한 후, 4℃에서 3분간 방치하였다. 이후, 1.2% 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 증폭된 증합효소연쇄반응의 산물을 확인하였고, 진올사의 Expin™ Gel SV 키트(Gel DNA 추출 키트)를 이용하여 겔로부터 유전자를 분리, 정제하였다.

[0110] 증폭된 유전자의 삽입을 위하여 pET21a 벡터(노바젠, 미국)의 유도체인 LIC 발현 벡터 pB2 벡터를 뉴잉글랜드 바이오랩스(NEB)의 제한효소인 SmaI로 절단한 후, 1mM dATP의 존재하에 T4 DNA 폴리머라제(뉴잉글랜드 바이오랩, 미국)와 함께 37℃에서 30분 배양 후, 70℃에서 20분간 배양하였다. 증폭된 유전자를 벡터에 삽입하기 위하여 pB2 벡터와 동일한 프로토콜로 1 mM dATP 대신 1 mM dTTP를 첨가하여 수행하였다. T4 DNA 폴리머라제의 3'→5' 엑소뉴클라제(exonuclease) 활성으로 특정 dNTP 직전까지 염기가 잘려나가 상보적인 돌출말단(LIC site)이 생성된 증폭된 유전자 50 ng과 pB2 벡터 50 ng을 함께 상온에서 30분간 배양한 후, 이를 대장균(DH5 α)에 열 충격 방법으로 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균(DH5 α)으로부터 얻어진 유전자 재조합 플라스미드들을 인트론사의 DNA spin™ 키트(Plasmid DNA purification kit)를 이용하여 분리 정제한 후, 단백질 발현을 위하여 대장균(BL21(DE3)/pSJS1244)에 형질전환시켰다.

[0112] 실시예 1-2. 단백질 발현 및 세포 파쇄물의 준비 과정

[0114] 상기 실시예 1-1에 따라 형질전환된 재조합 대장균을 150 μ g/ml 엠포실린을 포함한 Luria-Bertani(LB) 아가 플레이트에 접종하여 배양한 후, 몇 개의 콜로니를 선택하여 150 μ g/ml 엠포실린을 포함하는 10 mL의 LB에 접종하여 밤새 배양하였다. 이후, 0.85 mL의 배양액과 0.15 mL의 글리세롤을 섞어서 cell stock을 만들어 -80℃에서 보관하였다. 상기 cell stock을 5 mL의 LB 배지에 접종시켜 밤새 배양한 후, 1000 mL의 새로운 LB 배지에 희석하여 37℃에서 OD600 값이 0.6 내지 0.8이 되었을 때, 1mM IPTG(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)로 클로닝한 단백질의 발현을 유도하였다. TktA, HddC, WcbK 단백질의 발현은 25℃에서 16시간, GmhA, HddA, GmhB 단백질의 발현은 37℃ 3시간 동안 유도하였다. 이후, 4℃에서 6500rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 세포 펠렛을 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1 mM PMSF, 10 mg/ml DNase I으로 이루어진 버퍼 25 mL에 재현탁시켰다. 상기 세포현탁액을 Digital Sonifier 450(Branson Ultrasonics Co., Danbury, Connecticut, USA)을 이용한 초음파 처리를 통해 파쇄한 후, 4℃에서 15000rpm으로 30분간 원심분리시켜 해당 단백질을 포함하는 상등액을 얻었다.

[0116] 실시예 1-3. 단백질 분리 과정

[0118] 모든 단백질의 분리는 AKTA Explorer system(GE Healthcare, 미국)을 사용하여 수행하였다. 먼저, His-trap HP 컬럼(GE Healthcare, 미국)을 사용하여 히스티딘태그(His tag)를 이용한 친화성크로마토그래피(affinity chromatography)를 수행하였고, 아래와 같은 조성으로 이루어진 버퍼를 이용하였다:

[0119] 1. His trap 결합 버퍼: 50 mM pH 8.0 Tris, 0.1M NaCl 및 0.01M Imidazole

[0120] 2. His trap 세척 버퍼: 50 mM pH 8.0 Tris, 0.3M NaCl 및 0.01M Imidazole

[0121] 3. His trap 용출 버퍼: 50 mM pH 8.0 Tris, 0.1M NaCl 및 0.5M Imidazole.

[0122] 이후, HddC 단백질을 제외한 모든 각 단백질을 Hi-Trap Heparin 컬럼(GE healthcare, 미국)을 사용한 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography)로 분리하였고, 각각의 흡착버퍼 및 용출버퍼를 이용하여 분리하였다. 상기 버퍼의 조성과 NaCl을 0 M에서 1 M까지 직선농도구배 처리하였을 때의 각 단백질이 용출된 NaCl의 농도를 하기 표 2에 정리하였다.

표 2

[0123]

단백질	흡착버퍼 조성	용출버퍼 조성	용출 시 NaCl의 농도
TktA	20 mM Tris-HCl pH 8.0	20 mM Tris-HCl pH 8.0 및 1M NaCl	0.3 M
GmhA	20 mM Tris-HCl pH 8.0	20 mM Tris-HCl pH 8.0 및 1M NaCl	0.4 M
HddC	20 mM Tris-HCl pH 8.5	20 mM Tris-HCl pH 8.5 및 1M NaCl	0.4 M
GmhB	20 mM Tris-HCl pH 8.0	20 mM Tris-HCl pH 8.0 및 1M NaCl	0.37 M
WcbK	20 mM Tris-HCl pH 8.5	20 mM Tris-HCl pH 8.5 및 1M NaCl	0.26 M
HldE1	20 mM Tris-HCl pH 7.5	20 mM Tris-HCl pH 7.5 및 1M NaCl	0.3 M
HldE2	20 mM Tris-HCl pH 8.5	20 mM Tris-HCl pH 8.5 및 1M NaCl	0.16 M
HldD	20 mM Tris-HCl pH 8.0	20 mM Tris-HCl pH 8.0 및 1M NaCl	0.44 M

[0125] 한편, HddC 단백질은 Hi-Trap Heparin 컬럼(GE healthcare, 미국)을 사용한 헤파린 크로마토그래피로 분리하였고, 20 mM Tris-HCl pH 8.0를 버퍼로 크로마토그래피를 수행한 결과, 헤파린 컬럼에 붙지 않고 씻겨져 나와 순수한 단백질로 정제되었다. 상기 방법으로 분리된 단백질들은 모두 SDS-PAGE 젤을 이용하여 크기와 순도를 확인하였다.

[0126] 상기 과정을 통해, 유비저균의 LPS의 구성성분인 헵토스의 전구체(GDP-6-디옥시-D-헵토스 또는 ADP-L-β-D-헵토스)를 생합성하는데 관여하는 TktA, GmhA, HldE1, HddA, GmhB, HldE2, HddC, HldD, WcbK 단백질을 모두 준비하였다.

[0128] 실시예 2. 효소 활성 분석

[0130] 상기 실시예 1을 통해 준비한 GDP-6-디옥시-D-헵토스 또는 ADP-L-β-D-헵토스의 생합성에 관여하는 단백질들이 정상적인 활성을 나타내는지 확인하기 위하여 하기 실시예 2-1 내지 2-2의 과정을 수행하였다.

[0132] 실시예 2-1. GDP-6-디옥시-D-헵토스 생합성경로의 효소 활성 분석

[0134] 액체 크로마토그래피/질량 분석기(LC-MS)를 이용하여 GDP-6-디옥시-D-헵토스 생합성경로에 관여한 효소의 활성을 하기 실시예 2-1-1 내지 2-1-4의 방법에 따라 분석하였다. 액체 크로마토그래피와 질량분석기는 각각 Agilent 1200 HPLC system (Agilent, Santa Clara, CA, USA), Agilent 6220 Accurate-Mass TOF (Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였으며, LC-MS 결과는 Agilent Mass Hunter Data Acquisition software (version B.03.01)로 기록하였고, 결과 분석은 Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis software (version B.03.01)를 사용하였다.

[0136] 실시예 2-1-1. TktA의 활성 분석

[0138] TktA를 cofactor인 5 mM CaCl_2 및 1 mM 티아민 피로인산염(thiamine pyrophosphate)과 결합시켜 최종농도가 2.5 mg/ml이 되도록 준비하였고, 반응 기질인 프럭토스-6-인산(fructose-6-phosphate, F6P)과 리보스-5-인산(ribose-5-phosphate, R5P)을 각각 최종농도 50 mM, 25 mM가 되도록 조절하여 섞어 준 후, pH를 50mM Tris pH 7.5로 조절한 50 μl 의 반응 혼합액을 만들었다(이하, 'TktA 반응혼합액').

[0139] 상기 TktA 반응혼합액을 37°C에서 밤새 반응시킨 후, LC-MS 분석을 위한 검체를 다음과 같은 과정을 통해 제조하였다. 10000rpm으로 25°C에서 10분간 원심분리하여 침전을 제거하고, 20 μl 의 상등액을 취하여 1000배 희석한 후 0.22 μm 시린지 필터(Millipore, 미국)를 이용하여 여과하였다. 검체에 포함되어 있는 반응 생성물들은 액체 크로마토그래피/질량 분석기를 이용하여 분석하였다.

[0140] 그 결과, 도 4에서 볼 수 있듯이, TktA의 반응 생성물인 세도헵툴로스-7-인산(sedoheptulose-7-phosphate)(m.w 290.04, m/z 289.03)의 피크가 검출됨을 확인하였고, 이를 통해 TktA 효소는 정상적인 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0142] 실시예 2-1-2. GmhA 및 HddA의 활성 분석

[0144] GmhA의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-7-인산(D-glycero-D-manno-heptose-7-phosphate)은 반응 기질인 세도헵툴로스-7-인산과 분자량이 동일한 이성질체이므로 mass peak으로는 구분할 수 없어, HddA의 효소활성까지 함께 확인하였다.

[0145] 구체적으로, TktA 반응혼합액에 GmhA와 이의 cofactor인 MgCl_2 및 ZnCl_2 를 최종농도가 각각 0.6 mg/ml, 10 mM, 0.1 mM가 되도록 넣어주었다. 이후, HddA의 활성을 위하여 위의 반응혼합액에 HddA와 cofactor인 MnCl_2 , KCl를 각각 그 최종농도가 1.5 mg/ml와 1 mM, 25 mM이 되도록 넣은 후, 반응기질인 ATP를 최종농도 30 mM이 되도록 추가하였다(이하, 'GmhA/HddA 반응혼합액').

[0146] 상기 GmhA/HddA 반응혼합액을 37°C에서 밤새 반응시킨 후, TktA 반응혼합액과 같은 과정으로 LC-MS를 위한 검체를 만들어 분석하였다.

[0147] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, HddA의 반응생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 α ,7-비스인산(D-glycero-D-manno-heptose-1 α ,7-bisphosphate)(m.w 370.01, m/z 368.99) 피크가 검출됨을 확인하였고, 이를 통해 GmhA 및 HddA 효소는 정상적인 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0149] 실시예 2-1-3. GmhB 및 HddC의 활성 분석

[0151] GmhB의 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 α -인산(D-glycero-D-manno-heptose-1 α -phosphate)은 세도헵툴로스-7-인산과 분자량이 동일하여, HddC까지 추가적으로 처리하여 반응시켰다.

- [0152] GmhA/HddA 반응혼합액에 GmhB와 HddC를 최종농도 0.6 mg/ml과 0.07 mg/ml 되도록 넣고, 반응 기질인 GTP를 최종농도 15 mM이 되도록 첨가하였다(이하, 'GmhB/HddC 반응혼합액').
- [0153] 그 결과, 도 6에서 볼 수 있듯이, 상기 GmhB/HddC 반응혼합액을 37℃에서 밤새 반응시킨 결과, HddC의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 α -GDP(D-glycero-D-manno-heptose-1 α -GDP)(m.w 635.09, m/z 634.08) 피크가 검출됨을 확인하였고, 이를 통해 GmhB 및 HddC 효소는 정상적인 활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0155] **실시예 2-1-4. WcbK의 활성 분석**
- [0157] WcbK의 활성을 확인하기 위하여 GmhB/HddC 반응혼합액에 WcbK를 0.6 mg/ml이 되도록 넣은 후, 37℃에서 밤새 반응시켜 LC-MS 검체를 만들어 분석하였다.
- [0158] 그 결과, 도 7에서 볼 수 있듯이, 그 반응 생성물인 4-케토-6-디옥시-D-만노-헵토스-1 α -GDP(4-keto-6-deoxy-D-manno-heptose-1 α -GDP)(m.w 617.08, m/z 616.07) 피크가 검출됨을 확인하였고, 이를 통해 WcbK 효소는 정상적인 활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0160] **실시예 2-2. ADP-L- β -D-헵토스 생합성경로의 효소 활성 분석**
- [0162] 액체 크로마토그래피/질량 분석기(LC-MS)를 이용하여 ADP-L- β -D-헵토스 생합성경로에 관여한 효소의 활성을 하기 실시예 2-2-1 내지 2-2-2의 방법에 따라 분석하였다.
- [0164] **실시예 2-2-1. TktA, GmhA 및 H1dE1의 활성 분석**
- [0166] 상기 실시예 2-1에 따른 방법으로 TktA의 효소 활성을 확인하였고, GmhA와 H1dE1의 효소활성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 2-1의 GmhA/HddA 반응 혼합액의 조성과 같게 하되 HddA 대신 H1dE1을 최종농도 0.3 mg/ml 이 되도록 첨가하였다(이하, 'GmhA/H1dE1 반응 혼합액').
- [0167] 상기 GmhA/H1dE1 반응 혼합액을 37℃에서 밤새 반응시킨 결과, 도 8에서 볼 수 있듯이, H1dE1의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 β ,7-비스포스페이트(D-glycero-D-manno-heptose-1 β ,7-bisphosphate)(m.w 370.01, m/z 368.99) 피크가 검출됨을 확인하였고, 이를 통해 GmhA 및 H1dE1 효소는 정상적인 활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0169] **실시예 2-2-2. GmhB 및 H1dE2의 활성 분석**
- [0171] GmhB와 H1dE2의 효소활성을 확인하기 위하여, 상기 실시예 2-1의 GmhB/H1dE2 반응 혼합액의 조성과 같게 하되, HddC 대신 H1dE2 를 최종농도 0.3 mg/ml으로 첨가하였다(이하, 'GmhB/H1dE2 반응 혼합액').
- [0172] 상기 GmhB/H1dE2 반응 혼합액을 37℃에서 밤새 반응시킨 결과, 도 9에서 볼 수 있듯이, H1dE2의 반응생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 β -ADP(D-glycero-D-manno-heptose-1 β -ADP)(m.w 619.093, m/z 618.086) 피크가 검출됨을 확인하였고, 이를 통해 GmhB 및 H1dE2 효소는 정상적인 활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [0173] 상기 과정을 통해, GDP-6-디옥시-D-헵토스 또는 ADP-L- β -D-헵토스의 생합성에 관여하는 단백질들이 정상적인 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0175] 실시예 3. 저해제 후보물질 스크리닝 과정

[0177] 헵토스 생합성경로를 타겟으로 하여 결과적으로 LPS 구조를 파괴하는 유비저균의 항생제 후보 물질을 탐색을 위하여 상기 실시예 1 및 2를 통해 준비한 단백질들을 이용하였다.

[0178] 구체적으로, GDP-6-디옥시-D-헵토스 또는 ADP-L-β-D-헵토스의 생합성에 관여하는 단백질의 효소활성을 이용한 스크리닝을 방법을 개발하였다. 먼저, 헵토스 생합성 과정에 필요한 모든 효소들과 cofactor들을 혼합한 혼합액을 하기 표 3에 정리한 조성으로 대량 제조하였다. 이를 50 μl씩 분주한 후, 약 100여 개의 천연 화합물 후보물질을 최종농도 1 mM이 되도록 넣고, 5분간 상온에서 방치하였다. 상기 후보물질과 효소 및 cofactor를 포함하는 혼합액에 하기 표 3에 기재된 바에 따른 반응 기질을 넣고 37℃에서 밤새 반응시킴으로써 헵토스 생합성반응을 유도하였다.

표 3

	GDP-heptose pathway	최종농도	ADP-heptose pathway	최종농도
효소와 cofactor 혼합액	Tris pH7.5	50mM	Tris pH7.5	50mM
	TktA	0.25mg/ml	TktA	0.25mg/ml
	MgCl ₂	10mM	MgCl ₂	10mM
	ZnCl ₂	0.1mM	ZnCl ₂	0.1mM
	GmhA	1.2mg/ml	GmhA	0.6mg/ml
	MnCl ₂	1mM	MnCl ₂	1mM
	KCl	25mM	KCl	25mM
	HddA	1.5mg/ml	HldE	0.3mg/ml
	GmhB	0.6mg/ml	GmhB	0.6mg/ml
	HddC	0.07mg/ml	HldE2	0.3mg/ml
	WcbK	0.6mg/ml		
반응 기질	R5P(1M)	25mM	R5P(1M)	25mM
	F6P(1M)	50mM	F6P(1M)	50mM
	ATP(500mM)	30mM	ATP(500mM)	30mM
	GTP(100mM)	15mM		

[0179]

[0180] 이후, 최종생성물인 GDP-6-디옥시-D-헵토스 또는 ADP-L-β-D-헵토스의 검출여부를 분석함으로써 후보물질의 헵토스 생합성 과정 저해 여부를 확인하였으며, 검출 결과는 하기 표 4에 정리하였다.

표 4

	Code	최종산물 검출 여부
1	EAB009E-1-51-K2	검출
2	EAB009E-1-51-K4	검출
3	EAB009E-1-53-K2	검출
4	EA198C-3-79-K4	검출
5	EA198C-3-79-K7	검출
6	EA205HC-11-1-K11	검출
7	EA205HC-11-1-K14	검출
8	EA221H-9-26-K1	검출
9	EA239E-6-110-K2	검출
10	EA239E-6-99-K5	검출
11	EAB239MH-13-5-K1	검출
12	EA243E-10-19-K1	검출
13	EA244C-11-14-K1	검출
14	EA244C-11-14-K2	검출
15	EA245E-8-80-K1	검출
16	EA248Ac-15-2-K1	검출
17	EA248Ac-15-2-K2	검출
18	EA250H-22-25-6-1	검출
19	EA250H-22-13-9	검출
20	EA266E-18-12-9	검출
21	EA270B-20-35-K21	검출
22	EA270E-20-17-K1	미검출
23	EA270E-20-20-K4	검출
24	EA271B-24-9-K1	검출
25	EA271E-24-7-K5	검출
26	EA275B-23-11-K4	검출
27	EA275B-23-12-K5	검출
28	EA275B-23-16-K5	검출
29	EA275B-23-17-K7	검출
30	EA275B-23-33-K3	검출
31	EAB275B-23-42-K7	검출
32	EA289E-27-55-K1	검출
33	EA289E-27-66-K7	검출
34	EA289E-27-57-K3	검출
35	EA299E-31-6-K8	검출
36	EA299E-31-6-K12	검출
37	EA299E-31-9-K3	검출
38	EA299E-31-9-K5	검출
39	EA299E-31-10-K3	검출
40	EA299E-31-30-K3	검출
41	EA310E-18-40-K9	검출
42	EA310E-18-41-K6	검출
43	EA310E-18-41-K14	검출
44	EA312E-32-20-K2	검출
45	EA312E-32-21-K4	검출
46	IQEE1	검출
47	IQEE2	검출
48	IQBT3	검출
49	QQAe	검출
50	QQKe2	검출
51	QQAI2	검출
52	QQAI3	검출
53	EC11	검출
54	EC12	검출
55	EC13	검출
56	EC14	검출

[0181]

[0182]

그 결과, 상기 표 4에서 볼 수 있듯이, 코드명 EA270E-20-17-K1의 화합물, 즉 니아졸(nyasol)이 GDP-헵토스 생합성과정을 저해함을 확인하였다. 아울러, 도 10에서 볼 수 있듯이, 상기 EA270E-20-17-K1을 처리하면 4-케토-6-디옥시-D-만노-헵토스-1 α -GDP(m.w 617.08, m/z 616.07)가 검출되지 않음을 확인함으로써, GDP-헵토스 생합성과정을 강하게 저해함을 확인하였다. 이를 통해, 상기 니아졸은 유비저균의 LPS 구조를 파괴할 수 있음을 알 수 있었다.

[0184]

실시예 4. 니아졸(nyasol)의 작용 기작 확인

[0186]

실시예 4-1. 니아졸의 분리 방법

[0188]

상기 실시예 3을 통해 GDP-헵토스 생합성과정을 저해함으로써 유비저균에 대한 항생제로 사용될 수 있는 물질임이 확인된 니아졸은 다음과 같은 방법으로 준비하였다.

[0189]

구체적으로, 상기 니아졸은 지모(*Anemarrhena asphodeloides* Bunge) 추출물로부터 분리 및 정제하여

준비하였다. 건조된 지모의 추출 및 용매분획 과정을 통해 수득한 에틸 아세테이트 용매 추출물로부터 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용하여 수득하였다.

[0190] 먼저, 옴니 허브 닛컴(한국)에서 구입한 건조 지모 생약 20 kg을 환류 냉각 장치를 이용하여 100% 메탄올 20 ℓ에 넣고 24시간 동안 추출하였다. 상기 과정을 3회 이상 반복하여 얻은 상층액을 감압 농축하여 지모 조추출물 4kg을 수득하였다. 상기 지모 조추출물을 증류수 1 ℓ에 현탁시킨 후, 헥산 1 ℓ를 첨가하여 용해한 다음 헥산층을 분리하여 진공 건조하였다. 상기 과정을 10회 반복하여 헥산 분획물을 수득하였다. 남은 수층에 에틸아세테이트 1 ℓ를 첨가하여 에틸아세테이트층을 분리하여 진공 건조하였다. 상기 과정을 10회 반복 수행하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하였다. 수득한 에틸아세테이트 분획물은 75g이었다. 에틸아세테이트 분획물을 헥산: 에틸아세테이트 혼합용매 (50:1 → 1:1, v/v)로 용출하는 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 25개의 분획(F1 ~ F25)을 수득하였다. 수득된 분획 중 8번 분획(F8, 10g)을 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 클로로포름: 메탄올 혼합용매 (100:1 → 10:1)를 이동상으로 사용하여 실시하였고, 5개의 소분획(F8-1 ~ F8-5)을 수득하였다. 수득한 3번째 분획(F8-3, 10g)을 다시 클로로포름: 메탄올 혼합용매 (100:1 → 10:1)로 용출하는 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하고, 5개의 소분획(F8-3-1 ~ F8-3-5)을 수득한 후, 수득한 3번째 분획(F8-3-3)을 헥산: 에틸아세테이트 혼합용매 (50:1 → 10:1 v/v)를 이동상으로 사용하는 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 니아졸(2.0g)을 분리하였다.

[0191] 이후, 분광학적 자료(IR, Mass, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 비선광도)를 분석하였고, 수득된 화합물의 구조를 확인함으로써 분리한 화합물은 니아졸임을 알 수 있었다. 상기 분광학적 결과는 아래에 정리하였다.

[0192] $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_2$. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -75.3^\circ$ (c 0.5, MeOH)

[0193] IR $_{\text{max}}$ 3369, 1609, 1511, 1460, 1033, 918 cm^{-1}

[0194] UV $_{\text{max}}$ (log ϵ) 207 nm (4.47), 257 nm (4.09)

[0195] ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.18 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2' and H-6'), 7.11 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-2'' and H-6''), 6.80 (2H, d, $J=8.8$ Hz, H-3' and H-5'), 6.78 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H-3'' and H-5''), 6.53(1H, d, $J=11.2$ Hz, H-1), 6.05 (1H, ddd, $J=16.8, 11.2, 6.4$ Hz, H-4), 5.70(1H, t, $J=11.6, 10$ Hz, H-2), 5.13-5.18 (2H, m, H-5), 4.51(1H, dd, $J=6, 10$ Hz, H-3);

[0196] ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 128.8 (C-1), 131.9 (C-2), 47.0 (C-3), 140.9 (C-4), 115.2(C-5), 130.1 (C-1'), 130.2(C-2' and 6'), 115.3 (C-3' and 5'), 154.7 (C-4'), 135.8 (C-1''), 129.1 (C-2'' and 6''), 115.6 (C-3'' and 5''), 154.2 (C-4'')

[0197] LREIMS m/z (% rel. int.) 252 ($[\text{M}]^+$, 100), 237 (25), 158 (54), 145 (50), 131 (22), 107 (58).

[0199] 실시예 4-2. 니아졸의 타겟 단백질 확인

[0201] GDP-헵토스 생합성 과정에서 니아졸(코드명: EA270E-20-17-K1)이 작용하는 타겟 단백질을 발굴하기 위하여, 상기 실시예 2의 TktA, GmhA/HddA, GmhB/HddC, WcbK 반응혼합액에 각각 니아졸 1 mM을 첨가하여 효소활성을 확인하였다.

[0202] 그 결과, 도 11에서 볼 수 있듯이, ADP-헵토스 생합성경로인 GmhB/HddE2 반응혼합액에서 상기 효소의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 β -ADP(m.w 619.093, m/z 618.086) 피크가 검출되는 것을 확인하였다.

[0203] 아울러, 도 12에서 볼 수 있듯이, GDP-헵토스 생합성경로인 GmhB/HddC 반응혼합액에서 상기 효소의 반응 생성물인 D-글리세로-D-만노-헵토스-1 α -GDP(m.w 635.09, m/z 634.08)의 피크가 검출되지 않음을 확인하였다.

[0204] 상기 결과를 통해, 니아졸이 작용하는 타겟 단백질은 HddC이며, 버크홀데리아 슈도말레이의 HddC 효소 활성을 저해하여 GDP-헵토스 생합성 과정을 저해함을 확인하였다. 이러한 GDP-헵토스 생합성 과정의 저해는 LPS의 구조 파괴를 야기함에 따라, 니아졸은 버크홀데리아 슈도말레이의 생존 또는 독성을 감소시켜 유비저를 치료하는 항

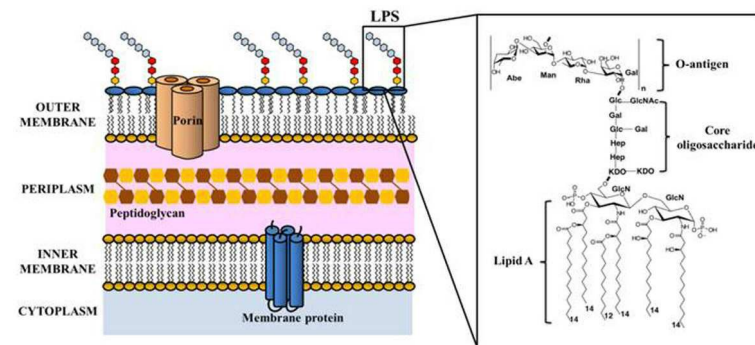
생체 혹은 항생제 보조물질로서 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0206]

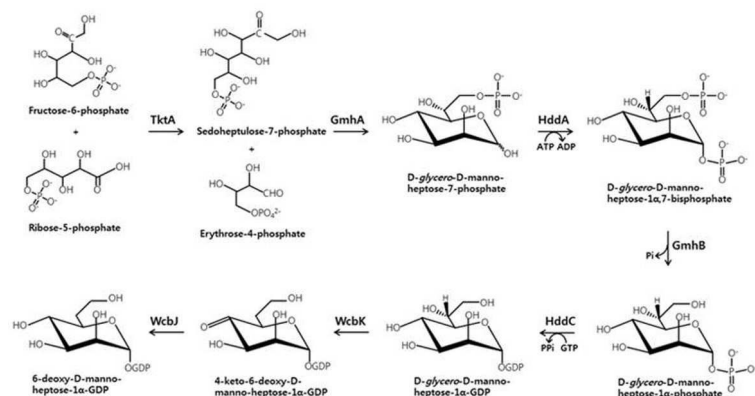
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

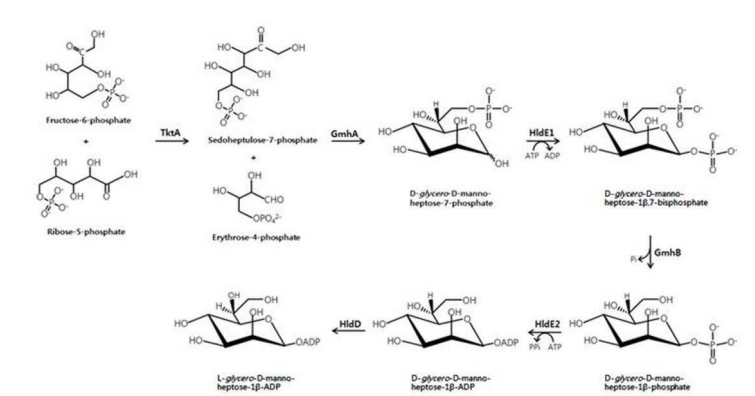
도면1



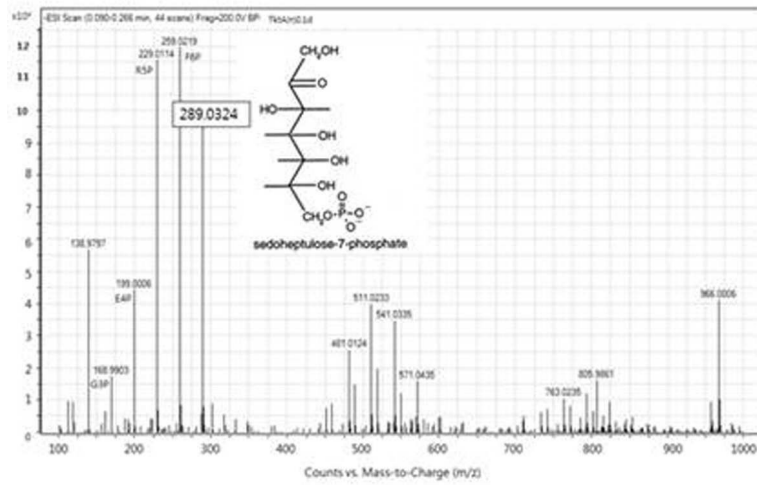
도면2



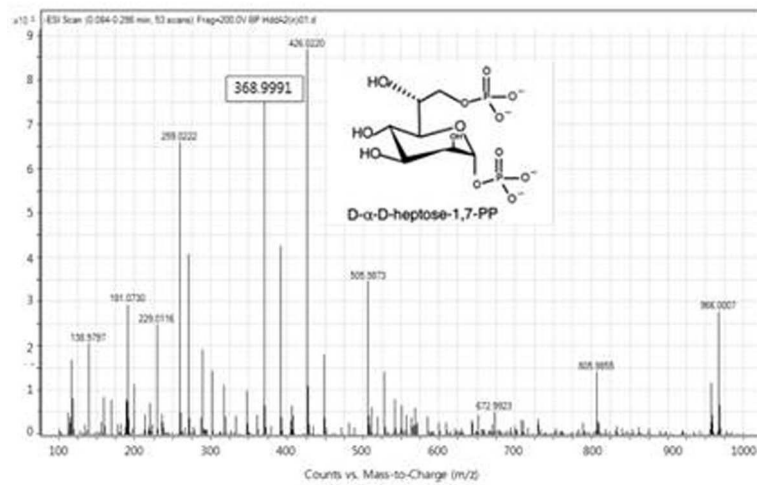
도면3



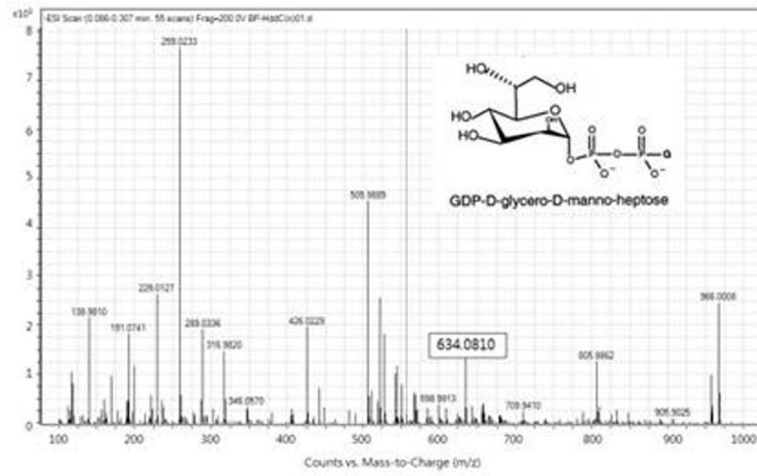
도면4



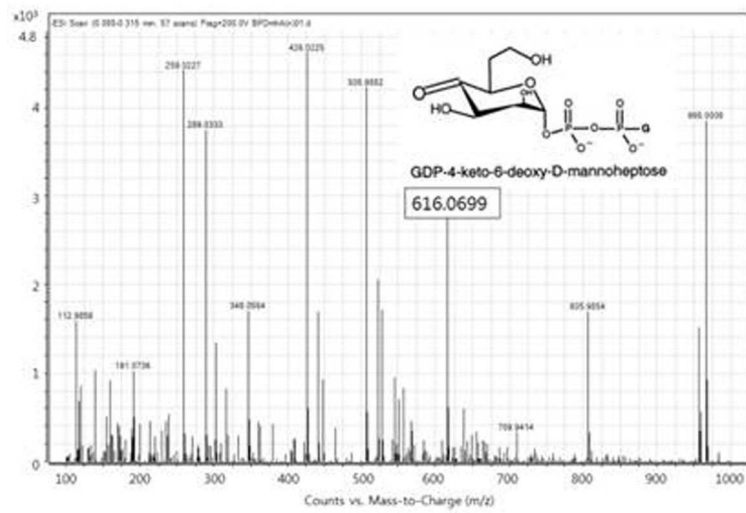
도면5



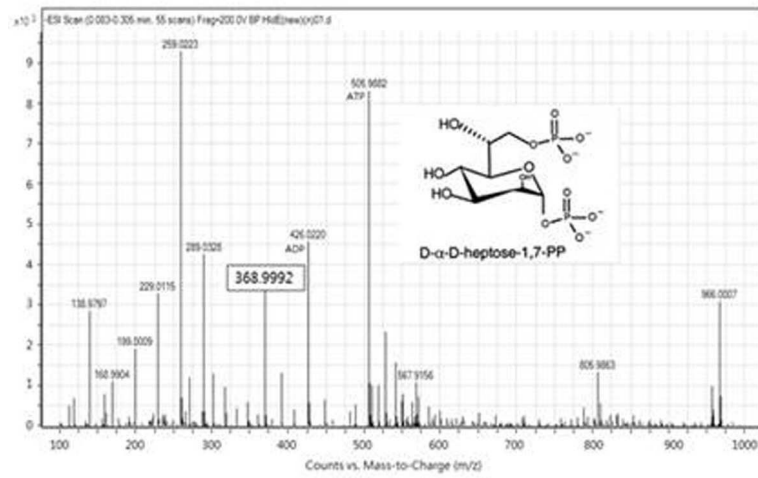
도면6



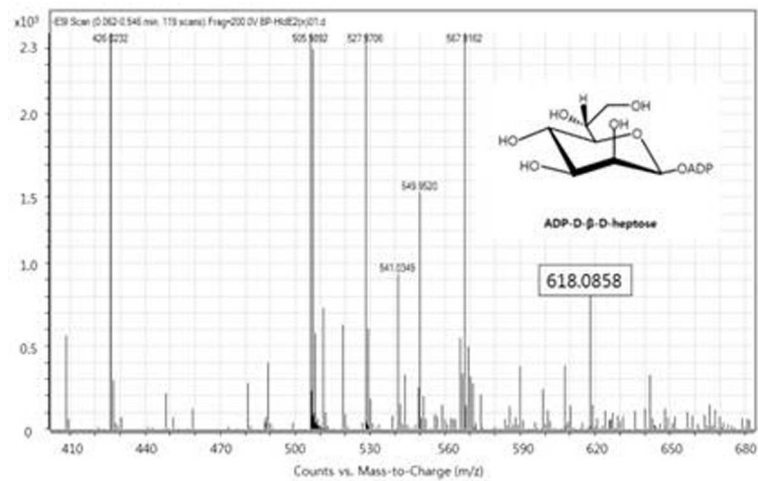
도면7



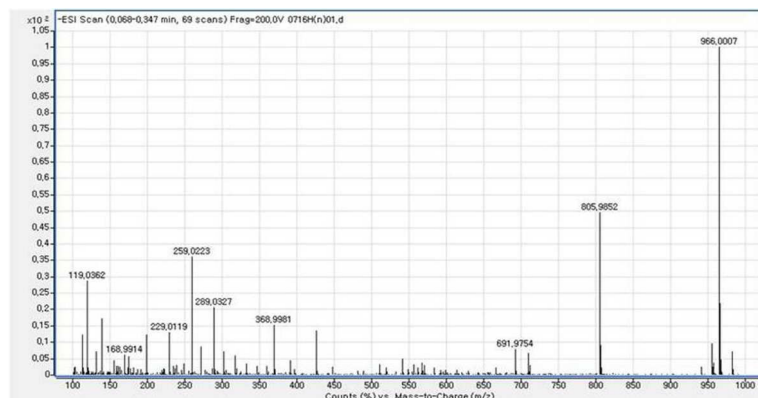
도면8



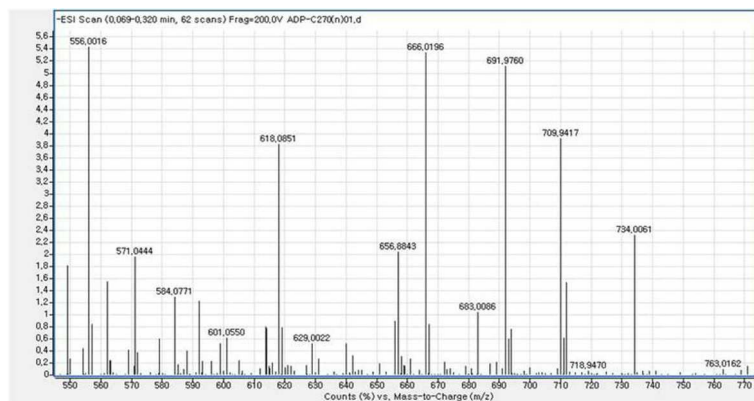
도면9



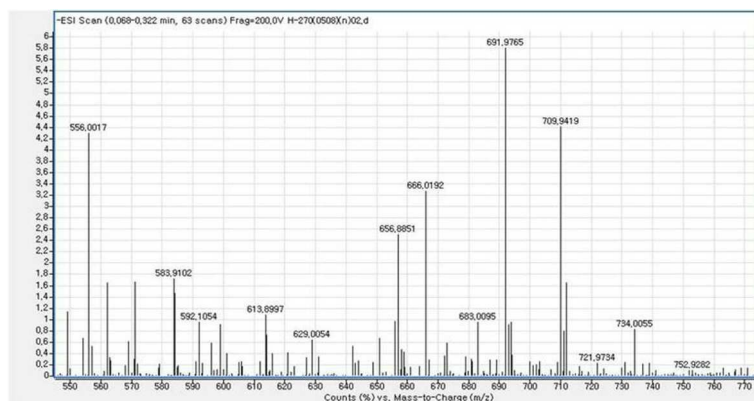
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
 - <120> A composition for preventing or treating melioidosis comprising
nyasol
 - <130> KPA160021-KR
 - <160> 18
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 39
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Forward primer for TktA
 - <400> 1
- ggcggtggtg gcggcatgac gacttcgtct cccgcctcc
- <210> 2
 - <211> 39

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for TktA

<400> 2
 gtctctctcc ttgcgcccc tacgcgagca ccgccttcg 39
 <210> 3
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for GmhA
 <400> 3
 ggcggtggtg gcggcatgga gaatcgcgaa ttgacgtaca t 41
 <210> 4
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for GmhA
 <400> 4
 gtctctctcc ttgcgcccc tactgcttcc cgaaaatgga gtgct 45
 <210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for HddA
 <400> 5
 ggcggtggtg gcggcatgaa tccgacaatc attcgcgc 38
 <210> 6
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for HddA
 <400> 6
 gtctctctcc ttgcgcccc taattcgca ttctccatgc ctgc 44

<210> 7

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for GmhB

<400>

> 7

ggcgggtggtg gcggcatgcc gaccagtccc agcaaa 36

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for GmhB

<400> 8

gtttctctcc ttgcgcccc tactcgtgtt ctttgaaag gaaatcga 48

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for HddC

<400> 9

ggcgggtggtg gcggcatgag agaagcgatc atcttgcccg 40

<210> 10

<

211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for HddC

<400> 10

gtttctctcc ttgcgcccc tacttcgaga ttccgaaag etc 43

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for WcbK

<400> 11
ggcgggtggtg gcggcatggc aaagcgtgtt ttgattacgg 40

<210> 12
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer for WcbK

<400> 12
gtttcttctcc ttgcgcccc tatcgggtca agaacttctc gccg 44

<210> 13
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer for HldE1

<400> 13
ggcgggtggtg gcggcatgtc gcgcgagcag atcgc 35

<210> 14
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer for HldE1

<400> 14
gtttcttctcc ttgcgcccc taatgaaaca gttcgtcgta ctcgacgg 48

<210>
> 15
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer for HldE2

<400> 15
ggcgggtggtg gcggcatgcc cgcttcgttc gaacg 35

<210> 16
<211> 37
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for HldE2

<400> 16

gttctttctcc ttgcgcccc tagcgcgact gcgcgcg

37

<210> 17

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for HldD

<400> 17

ggcgggtggtg gcggcatgac cctcatcggtt accggcg

37

<210> 18

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for HldD

<400> 18

gttctttctcc ttgcgcccc tacagctggc cgaacagcca ac

42