



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0126428
(43) 공개일자 2021년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/192 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/192 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-0044285
(22) 출원일자 2020년04월10일
심사청구일자 2020년04월10일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
조은경
대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)
김이삭
대전광역시 동구 은어송로 117, 305동 903호(가오동, 은어송마을3단지)
(74) 대리인
김원준

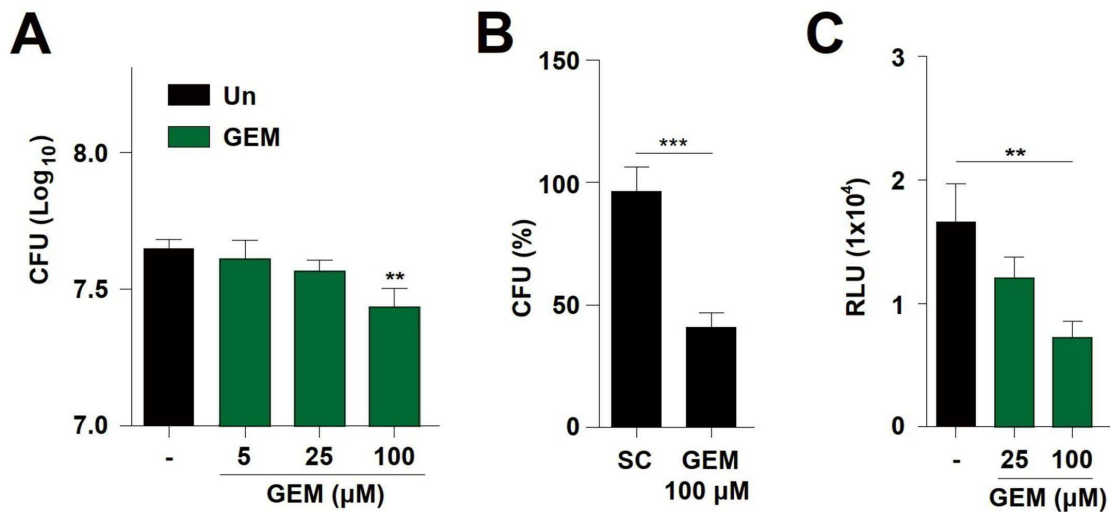
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **젬피프로질을 포함하는 비결핵항산균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 *Mycobacterium abscessus*을 포함하는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 젬피프로질(gemfibrozil)을 유효성분으로 함유하는 비결핵항산균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김진경

대전광역시 서구 복수서로 15, 110동 404호(복수동, 복수센트럴자이)

장지찬

서울특별시 서초구 방배로32길 90, 101동 201호(방배동, 방배 하이빌 5차)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111501
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터사업
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345311927
과제번호	2019R1I1A1A01062086
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	창의도전연구기반지원
연구과제명	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α 에 의해 조절되는 miRNA 발굴 및 기

능 규명을 통한 비결핵 항산균 감염 제어기술 개발

기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

젬피브로질(gemfibrozil)을 유효성분으로 함유하는 비결핵항산균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 비결핵항산균은 미코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 미코박테리움 아비움(*M. avium*) 또는 미코박테리움 압세수스(*M. abscessus*)인 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

비결핵항산균 감염질환은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증, 또는 파종성 질환인 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

젬피브로질(gemfibrozil)을 유효성분으로 함유하는 비결핵항산균 증식 또는 성장 억제용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 *Mycobacterium abscessus*을 포함하는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비결핵항산균(nontuberculous mycobacteria, MTM)은 절대병원성균인 결핵균과 나병균을 포함하는 결핵균군을 제외한 미코박테리움 속 균종으로 물, 토양 등 자연계에 널리 분포하며 호흡기를 통해 감염되는 기회감염성 균이다. 지금까지 약 150여 종의 비결핵항산균이 알려져 있으며 거의 매년 새로운 비결핵항산균이 발견되고 있으나, 인체 질환과 관련된 것은 대략 25종에 이른다. 균종에 따라서 질병을 일으키는 발병력의 차이도 커서 *M. kansasii*, *M. avium*, *M. abscessus* 등은 상대적으로 발병력이 크고, *M. fortuitum*은 상대적으로 발병력이 낮다. 비결핵항산균으로 인한 질환은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증, 파종성 질환 등 4가지 특징적인 임상 증후를 나타내며, 이 중 폐질환이 비결핵항산균으로 인한 질환의 90% 이상을 차지한다.

[0003] 결핵균의 발견을 위한 항산균 도말검사에서 비결핵항산균은 결핵균과 구별되지 않는다. 비결핵항산균 폐질환의 빈도가 상대적으로 높은 국가에서는 항산균 도말 양성 객담의 30~50%까지 비결핵항산균이 분리되고 있으며, 선진국화될수록 비결핵항산균에 의한 감염 비율이 증가하는 것으로 보고되고 있다. 우리나라의 경우 비결핵항산균 질환의 빈도가 낮다고 알려져 있기 때문에 항산균 도말 양성일 경우 대부분 결핵으로 간주하고 항결핵제 치료를 시행하는 것이 일반적이었으나, 국내에서도 항산균 도말 양성 객담의 10% 이상에서 결핵균이 아닌 비결핵항산균이 분리되고 있다. 결핵의 경우 항결핵제의 개발에 따라 90% 이상의 치료율을 나타내며 전 세계적으로 발병율과 사망률이 1990년대 이후 지속적으로 감소하는 데 반하여, 비결핵항산균은 약제내성균의 분리비율이 매우 높고 2년 이상의 장기치료를 요하는 등의 어려움이 있어 2000년 이후 가속적인 증가추세를 나타내고 있다.

[0004] 국내에서 비결핵항산균 폐질환의 원인균으로 가장 흔한 균은 *M. Avium*이다. 특히 외국에서는 상대적으로 드문 신속 성장균인 *M. abscessus*가 국내에서는 두 번째로 흔한 원인균이라는 특징이 있다. *M. abscessus* 폐질환은 중년 이상의 비흡연자 여성에서 흔히 발생한다. 증상은 기침, 발열, 객혈, 객담 등이 흔히 동반된다. 항생제 치료를 받지 않은 환자에서 분리된 *M. abscessus*는 시험관 내 약제 감수성검사에서 클래리스로마이신, 아미카신, 세콕시틴 등에 대하여 감수성을 보이지만, 일반적인 항결핵제에 모두 내성을 나타낸다. 이에 대하여 정주용 항생제를 사용하여야 하며, 균음전에 성공한 이후에도 최소 12개월 이상의 치료기간이 필요하다는 점 등 때문에 *M. abscessus* 폐질환의 치료는 매우 어렵다. 환자들은 질환으로 인한 증상 뿐 아니라 장기간 항생제 투여에 의한 신체적 부담이 추가되어 어려움을 겪게 된다. 더구나 항생제에 내성을 지니게 되면 치료는 더욱 어려워지며 정주용 항생제를 포함한 치료를 하더라도 내과적 치료만으로 완치율이 10% 미만으로 객담 균음전을 이루기는 매우 어려워 병변이 국한된 경우는 폐절제술을 고려해야 하는 어려움이 있다.

[0005] 따라서, 점점 증가하고 있는 비결핵항산균 관련 질환에 대해 결핵의 치료와 구분된 치료법이 요구된다. 본 발명자들은 등록특허 제10-1751930호에서 PPAR alpha 작용제로 알려진 세 가지 화합물이 결핵균 또는 비결핵항산균의 생존을 저해함을 보고하였다. 상기 특허에서 확인할 수 있듯이 상기 화합물은 비결핵항산균보다 결핵균에 더 효과적으로 작용하며, PPAR alpha의 활성화 효과가 높을수록(EC₅₀ 값이 작을수록) 결핵균 또는 비결핵항산균의 생존을 저해 효능이 우수하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1751930호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 항결핵제에 대한 내성이 강하고, 치료가 어려운 비결핵항산균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한 본 발명은 비결핵항산균의 증식 또는 성장 억제용 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 겐피브로질(gemfibrozil)을 유효성분으로 함유하는 비결핵항산균 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010] 겐피브로질은 시험관 내 실험에서 비결핵항산균의 생존율을 크게 낮였으며, 마우스를 대상으로 한 실험에서 각 조직 내 비결핵항산균의 생존율을 낮출 뿐 아니라 폐조직의 병리적인 반응도 완화시킴을 확인하였다. 마우스 대상 실험에서는 정맥주사와 비강내 투여 두 가지 방법에 의한 효과를 확인하였으며, 두 방법 모두 통계적으로 유의하게 조직 내 비결핵항산균의 생존율을 감소시켰으며 특히 비강내 투여 방식에 의한 효과가 우수하여 환자들에게 부담없이 사용될 수 있을 가능성을 제시하였다. 제브라피쉬에 대한 실험에서도 제브라피쉬 내 비결핵항산균의 생존율을 약화시키는 것은 물론, 비결핵항산균에 감염된 제브라피쉬 자체의 생존율 역시 증가시켰으며, 생체 내 비결핵항산균의 분포에도 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

[0011] 겐피브로질(gemfibrozil)은 고지혈증의 치료에 사용되는 의약품으로 PPAR alpha 작용제로 작용하는 것이 알려져 있기는 하지만, EC₅₀ 값은 59 ± 3.9 μM으로(Med. Chem. Commun., 2015, 6, 1513-1517) 등록특허 제10-1751930호의 화합물의 EC₅₀ 값 0.006~5.0에 비해 매우 크다. 따라서 상기 등록특허를 기반으로 한다면 겐피브로질은 비결핵항산균에 대한 저해 효과를 나타내지 않거나 혹은 효과가 있다고 하더라도 매우 미약할 것으로 예측할 수 있다. 그럼에도 불구하고 겐피브로질은 EC₅₀ 값이 각각 0.05 및 5.0인 GW9578 및 WY14143보다 우수한 효능을 나타내었다. 더구나 상기 화합물들이 아직 시험관 내 실험 또는 동물실험 단계, 혹은 전임상 단계에 머물러 있는 것에 반해, 겐피브로질은 1982년부터 의약품으로 사용되어 지금은 제네릭(generics)으로 사용이 가능한만큼 별도의 안전성 테스트를 거치지 않더라도 적용증만을 달리하여 사용이 가능하다.

- [0012] 상기 비결핵항산균은 미코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 미코박테리움 아비움(*M. avium*) 또는 미코박테리움 압세수스(*M. abscessus*)일 수 있다. 특히 신속 성장균으로 종래 모든 항결핵제에 대해 내성을 갖는 미코박테리움 압세수스일 수 있다.
- [0013] 본 발명에서 비결핵항산균 감염 질환은 비결핵항산균의 감염에 의해 나타나는 모든 임상적 증상을 포함하는 것으로, 상기 질환은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환 등을 포함한다.
- [0014] 켄피브로질은 비결핵항산균의 감염 후 치료적 용도 뿐 아니라, 비결핵항산균의 감염 우려가 높은 군에 예방적 목적으로도 사용될 수 있다. 즉, 켄피브로질은 비결핵항산균의 증식 및 성장을 억제하므로 가족력이 있거나 AIDS 환자와 같이 지속적으로 면역체계 불안정한 환자 등 비결핵항산균 감염 우려가 높은 경우에 예방적 목적으로도 사용될 수 있음은 당연하다.
- [0015] 또한 상기 약학 조성물은 인간 뿐 아니라, 비결핵항산균에 의해 감염되는 다른 동/식물의 질병 치료에도 사용될 수 있다.
- [0016] 켄피브로질은 콜레스테롤을 낮추기 위한 용도로 이미 널리 사용되고 있는 의약품으로 Lopid, Jezil, Geridin, Brozil, Lipiden 등 주로 캡슐의 형태로 여러 가지 상표로 출시되고 있다. 그러나, 제형이 이에 한정되는 것은 아니며 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.
- [0017] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 물활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1kg 당 상기 화합물을 1~100mg 의 양으로 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0018] 본 발명은 또한 켄피브로질을 유효성분으로 함유하는 비결핵항산균 증식 또는 성장 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 비결핵항산균의 감염 전에 자연계에 존재하는 비결핵항산균의 증식 또는 성장을 억제하는 의약외품 조성물로 사용될 수 있다. 본 발명의 의약외품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제 비누, 핸드워시, 가습기 충전제 등을 예로 들 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 이상과 같이 본 발명에 의하면 종래 고지혈증 치료제로 수십년간 사용되며 안전성이 입증된 켄피브로질의 새로운 적용증을 제시하여, 별도의 안전성 시험에 오랜 시간과 비용을 들이지 않고도 비결핵항산균 감염 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 시험관 내에서 켄피브로질이 비결핵항산균의 생존율에 미치는 영향을 보여주는 그래프.
- 도 2는 비결핵항산균 감염 마우스에서 켄피브로질이 각 조직 내 비결핵항산균의 생존율에 미치는 영향을 보여주는 그래프.
- 도 3은 비결핵항산균 감염 폐조직의 병리학적 반응에 대한 켄피브로질의 영향을 보여주는 H&E 염색 이미지.
- 도 4는 비결핵항산균 감염 제브라피쉬에서 비결핵항산균의 산포에 켄피브로질이 미치는 영향을 보여주는 사진.
- 도 5는 비결핵항산균 감염 제브라피쉬의 생존율과 비결핵항산균의 생존율에 켄피브로질이 미치는 영향을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

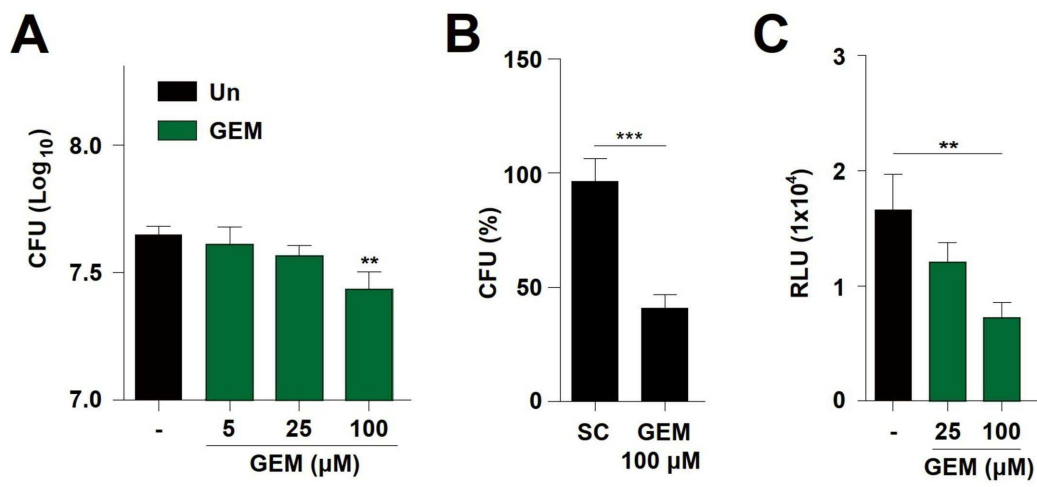
- [0022] [실시예]

- [0023] 실시예 1 : 비결핵항산균에 대한 쥬피프로질의 시험관 내 효능 검증
- [0024] 1) 대식세포의 수집 및 배양
- [0025] 마우스 골수유래 대식세포(BMDMs)
- [0026] 8주령의 야생형 C57BL/6 마우스의 골수로부터 대식세포(macrophage)를 수집하고 10% fetal bovine serum (Lonza), penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin (100 μ g/ml)를 포함하는 DMEM(Lonza) 배지에서 배양하였다. 배지에 대식세포 집락 인자(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF, R&D Systems)를 25 ng/ml의 농도로 첨가하여 3~5일간 분화하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 가습 조건에서 배양하였다. 동안 대식세포로 분화하여 실험에 사용하였다. 분화된 대식세포가 아닌 림프구들은 기계적인 파괴로 제거하였다.
- [0027] 인간 단핵구유래 대식세포(MDMs)
- [0028] 인간 단핵구 유래 대식세포는 정상인의 정맥혈을 제공받아 밀도구배 원심분리로 말초혈관 단핵세포를 수집하고, *Cell Host Microbe* 2009, 6, 231-243에 기재된 방법에 따라 말초혈액 단핵구를 4 ng/ml 인간 대식세포 집락인자(h-CSF, Sigma-Aldrich, M6518)의 존재 하에 4일간 배양하여 제조하였다.
- [0029] 2) 비결핵항산균 감염 및 약물의 처리
- [0030] *Mycobacterium abscessus*(Mabc, ATCC 19977)은 0.2% 글리세롤, 0.05% Tween 80(Sigma-Aldrich) 및 albumin-dextrose catalase가 보충된 Middlebrook 7H9 broth(Difco, 271310)를 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 박테리아 배양물을 500 $\times$ g에서 20분간 원심분리하여 수거하고, 펠렛을 상기 배양 배지에 재현탁한 후, 중기 대수기(mid-logarithmic phase)까지 배양하였다. 배양액은 크라이오바이알(cryovial)에 1mL씩 분주하고, -80 $^{\circ}$ C에 저장하며 사용하였다. 사용전 바이알을 녹인 후 Middlebrook 7H9 배지에 살아있는 집락형성단위(cfu)를 측정하였다.
- [0031] 1)에서 준비한 마우스 BMDMs 또는 인간 MDMs 배지 내에 상기 비결핵항산균인 *Mycobacterium abscessus*를 배양 세포 1개당 감염된 균의 개체 평균수(multiplicity of infection, MOI)가 5가 되도록 2시간 동안 처리한 후, 세포 외부에 존재하는 균들을 제거하기 위해서 PBS로 3번 세척하였다. 이후 새로운 배지로 교체하고 쥬피프로질을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹이고 0.1% 메틸 셀룰로오스(Sigma-Aldrich, M7-027)로 희석하여 0, 5, 25 또는 100 μ M 농도로 처리하고 3일간 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.
- [0032] 배양 후 세포내 박테리아를 방출시키기 위하여 증류수로 대식세포를 터트리고, PBS로 10배 희석하였다. 7H10 아가 플레이트에 분주하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 3~4일 정도 배양하고 집락형성단위(CFU)를 측정하여 세포 내 균 생존율을 확인하고 그 결과를 도 1의 A와 B에 각각 도시하였다.
- [0033] 도 1에서 쥬피프로질은 대식세포에서 비결핵항산균인 Mab의 성장을 농도의존적으로 저해하며, 특히 인간 단핵구 유래 대식세포에서는 100 μ M 농도 처리 시 생장이 50%이상 저해되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0034] 비결핵항산균에 대한 쥬피프로질의 영향을 또 다른 방법으로 측정하기 위하여, pMV306hsp+LuxG13(Addgene, plasmid #26161)를 전기천공에 의해 컴피턴트 Mab 세포에 도입하였다. 형질도입된 세포를 50 μ g/ml 가나마이신이 함유된 7H10 아가 배지에 도말하고 항생제 내성을 가진 콜로니를 선별하여 Mab-LuxG13 균주를 제작하였다. 상기와 동일한 방법에 의해 마우스 BMDMs 세포에 Mab-LuxG13 균주를 감염시킨 후 쥬피프로질에 의한 영향을 평가하였다. Mab-LuxG13의 발광신호를 luminescence microplate reader로 10초간 측정하고, 상대적인 광도(RLU, relative light unit)로 나타내어 도 1의 C에 도시하였다. 도 1의 C는 쥬피프로질에 의해 Mab의 생존율이 농도 의존적으로 크게 감소하는 것을 보여준다.
- [0035] 실시예 2 : 비결핵항산균 감염 마우스에서의 쥬피프로질의 효능 검증
- [0036] 8~12주령의 C57BL/6 마우스(Samtako Bio Korea)는 특정 무병소 조건(specific pathogen-free condition)에서 12시간 명암 사이클 하에 유지하였다. 하기 모든 동물실험은 충남대학교 의과대학 동물실험윤리위원회에 의해 감독 및 승인되었다.
- [0037] C57BL/6 마우스에 Mab 1×10^7 CFU를 정맥주사하거나, Mab 3×10^6 CFU를 비강내 투여하여 감염시켰다. 감염 3일 후부터 7일까지 하루 한번 쥬피프로질 15 mg/kg을 0.1% 메틸셀룰로오스에 용해시켜서 경구투여 하였다. 대조군으로는 쥬피프로질 대신 0.1% 메틸셀룰로오스 용액을 투여하였다. 각 군의 개체수는 5마리씩으로 하였다.

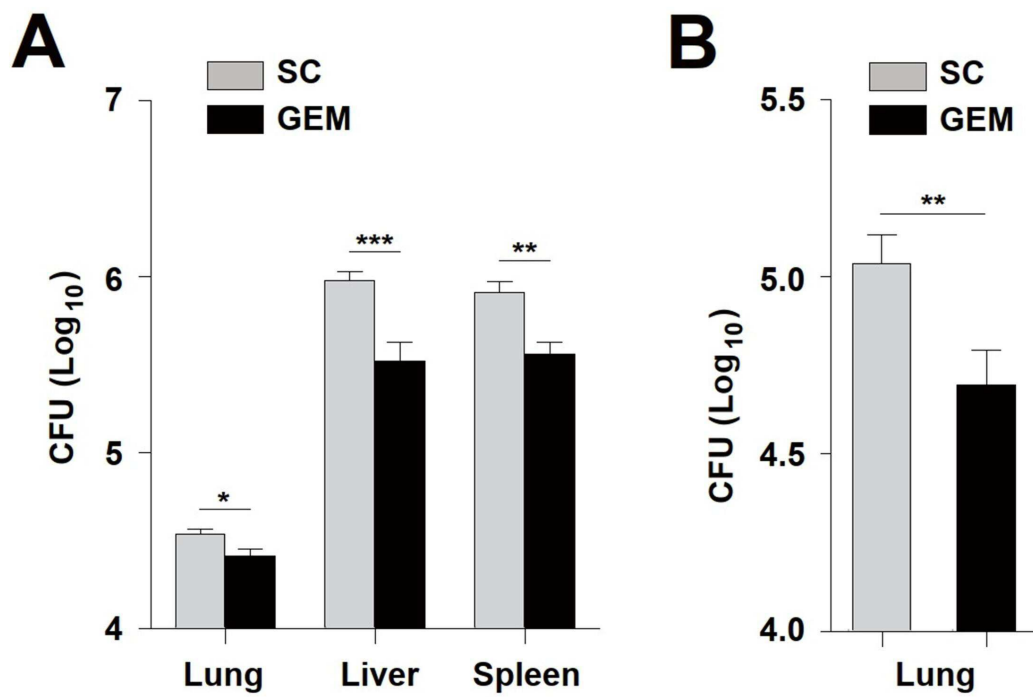
- [0038] Mabc 감염으로부터 7일 후에 마우스를 희생시킨 후 간, 비장 및 폐 조직을 채취하고 homogenizer를 이용하여 곱게 갈았다. 이후 실시예 1에 기재된 대식세포에서의 세포내 생존율 측정방법과 동일한 방법에 의해 각 조직에서의 Mabc의 생존율을 측정하였다. 도 2의 A와 B는 각각 정맥주사 및 비강내 투여 시의 상기 실험 결과를 보여주는 그래프로(각 군당 n=5), in-vitro 실험과 마찬가지로, in-vivo 실험에서도 켈피브로질에 의해 비결핵항산균인 Mabc의 생존율이 현저하게 감소함을 보여주었다.
- [0039] 켈피브로질이 Mabc의 감염에 의한 면역병리적 반응에 미치는 역할을 확인하기 위하여, 상기 실험과정에서 채취한 폐를 10% 포르말린에 고정하고 파라핀 왁스에 임베딩하였다. 이후 4 μ m 두께로 파라핀 절편을 제조하여 H&E 염색한 후, Aperio digital pathology slide scanner(Leica, Germany)로 관측하고 Aperio ScanScope[®] CS System을 사용하여 이미지를 얻었다. 도 3의 A는 그 결과를 보여주는 이미지로 스케일바는 300 μ m를 나타낸다. 켈피브로질 처리군은 대조군에 비해 병리학적 반응(pathological response)과 육아종 장애(granulomatous lesion)가 완화된 것을 보여준다. 이는 단순히 Mabc 균의 생존율 뿐 아니라 장기 조직에서의 병리학적 반응 역시 켈피브로질에 의해 감소됨을 의미한다.
- [0040] **실시예 3 : 비결핵항산균 감염 제브라피쉬 배아에서의 켈피브로질의 효능 검증**
- [0041] 난막을 제거하고(dechorionate) 마취한 30~48 hpf(hours post-fertilization)의 제브라피쉬 배아에 Nanoject III Programmable Nanoliter Injector(Drummond Scientific, Broomall, PA, USA)를 사용하여 형광을 나타내는 mWasabi를 발현하는 Mabc 균주(CIP 104,536) 약 400 CFU를 미정맥(caudal vein)에 주사하였다. 96-웰 플레이트에 감염된 배아(2 embryos/well)와 1 g/L 메틸렌블루를 함유하는 blue fish water를 분주하고, 켈피브로질 또는 클레리트로마이신(clarithromycin)을 5, 10 또는 20 μ M 농도로 처리하였다(각 군당 n=20). 대조군에는 약물 대신 DMSO만 처리하였으며, 약물을 포함한 물을 매일 교체하면서 28.5 $^{\circ}$ C에서 사육하였다. 도 4는 감염 5일 후 제브라피쉬에서 Mabc 균의 산포를 보여주는 사진으로, 대조군의 제브라피쉬에서는 뇌에서 주로 mWasabi의 형광이 발현되었다. 이에 반해, 켈피브로질을 처리한 제브라피쉬는 형광이 크게 감소하였다. 구체적으로 5 μ M의 켈피브로질 처리 시 뇌에서의 mWasabi의 발현이 크게 감소하였으며, 20 μ M 처리 후에는 제브라피쉬의 난황에서만 소량의 mWasabi가 관측되었다. 양성대조군인 클레리트로마이신 역시 제브라피쉬에서 형광이 감소함을 확인할 수 있다.
- [0042] 약물의 효과는 배아 내 박테리아 양(bacterial burden)과 배아의 생존율로 확인하였다. 이를 위하여 13일 동안 죽은 배아(심박이 없는)의 수를 기록하여 생존율을 측정하고, 도 5의 A와 B에 도시하였다.
- [0043] 배아 내 Mabc의 정량을 위해서 감염 5일 후 세 개의 배아를 수집하여 2% Triton X-100/PBST 용액에서 각각 균질화(homogenize)하였다. 균질액을 PBST로 10배씩 순차 희석하여 50 μ g/ml 가나마이신과 BBL MGIT PANTA(polymyxin B, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim 및 azlocillin; Becton Dickinson, NJ, USA)를 함유하는 7H10 아가 플레이트에 도말하고 3~5일간 배양하였다. Mabc에 의한 mWasabi 단백질의 발현량을 형광 광학기가 장착된 SterEO Lumar V12 stereomicroscope(Zeiss)로 관측하고 그 결과를 도 5의 C에 나타내었다.
- [0044] 도 5에서 켈피브로질은 비결핵항산균인 Mabc 감염 제브라피쉬의 생존율을 증가시키고, 제브라피쉬 내 균주의 성장을 억제하여 비결핵항산균 감염질환의 치료에 유효함을 확인할 수 있다.

도면

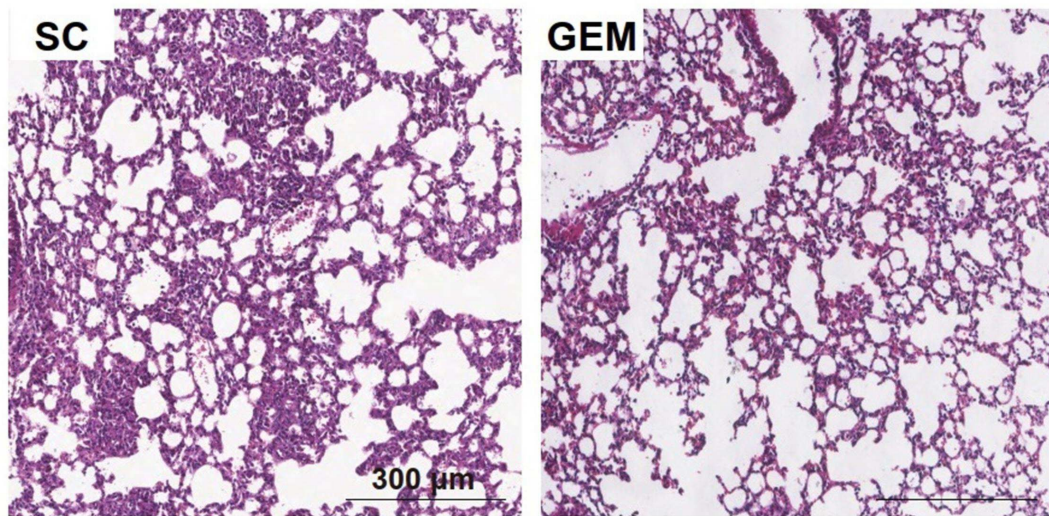
도면1



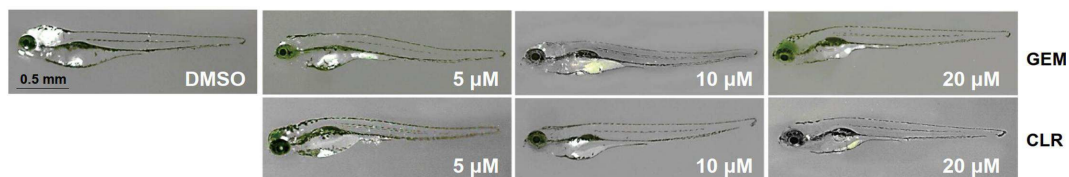
도면2



도면3



도면4



도면5

