(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0178338
(43) 공개일자 2024년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 38/12* (2006.01) *A61K 31/438* (2006.01)
*A61P 31/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 38/12* (2013.01)
*A61K 31/438* (2019.05)
(21) 출원번호 10-2023-0080087
(22) 출원일자 2023년06월22일
심사청구일자 2023년06월22일

(71) 출원인
**경상국립대학교산학협력단**
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
**충남대학교산학협력단**
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
**서울대학교산학협력단**
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
**장지찬**
경상남도 진주시 초전남로 30, 101동 502호 (초전동, 초전흥한황토방아파트)
**조은경**
대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호 (문화동, 센트럴파크3단지아파트)
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**특허법인태백**

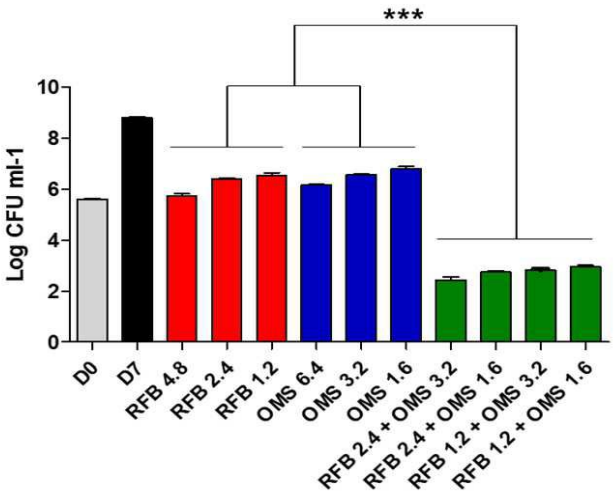
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **오명사마이신 및 리파부틴을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 오명사마이신 및 리파부틴 병용처리 시, 상기 약물 각각을 단독처리했을 때보다 우수한 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) 균주 억제 활성이 나타나는 것을 확인함으로써, 결핵균 또는 비결핵 항상균 감염 질환 예방 또는 치료용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

*대 표 도* - 도4



(52) CPC특허분류
*A61P 31/06* (2018.01)
*A61K 2300/00* (2023.05)
(72) 발명자
**김영재**
대전광역시 서구 청사로 254, 107동 401호 (둔산동, 둥지아파트)
**오동찬**
서울특별시 강남구 개포로110길 15, 112동 703호 (일원동, 일원동우성7차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465040243
과제번호 HI22C1361000123
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 감염병 예방·치료 기술개발사업
연구과제명 후보물질 작용점 규명을 통한 난치결핵 후보물질 도출 및 병용요법 제시
기 여 율 30/100
과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711184866
과제번호 2021R1A4A2001251
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 특이 환경 미생물 유래 생리활성물질 기초연구실
기 여 율 20/100
과제수행기관명 서울대학교 산학협력단
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465039965
과제번호 HI22C1361000223
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 감염병 예방·치료 기술개발사업
연구과제명 거대환 항생물질 유래 난치결핵 치료 후보물질 생산과 체내 동태 및 안전성 평가
기 여 율 20/100
과제수행기관명 서울대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465039621
과제번호 HI22C1361000023
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 감염병 예방·치료 기술개발사업
연구과제명 숙주-병원체 작용점 규명을 통한 신개념 난치성 결핵 치료 후보물질 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 충남대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 오명사마이신 17 내지 67 중량% 및 리파부틴 83 내지 33 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 오명사마이신 및 리파부틴이 0.2 내지 2 : 1의 중량 비율로 포함되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 비결핵 항산균 감염 질환은 결핵, 폐질환, 림프절염, 피부감염증, 연조직감염증, 골감염증 및 파종성 질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

### 청구항 6

오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 동물용 의약품.

### 청구항 7

오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료 방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 결핵균은 감염 후 일정기간 동안 잠복기를 거친 후 발병되거나 또는 잠복기 없이 급성으로 발병하여 폐의 염증과 천식을 동반하는 합병증을 일으켜 감염자를 사망시킨다. 결핵균 단순 보균자의 경우, 자각증상이 없으므로 결핵을 타인에게 쉽게 전염시킬 수 있어 결핵의 예방 및 치료에 큰 어려움이 있다. 현재 결핵에 대한 치료방법으로 화학요법(항결핵제)이 있다. 초기 결핵치료를 위한 1차 항결핵제는 약제의 병합요법(isoniazid, rifampin, pyrazinamide 및 ethambutol)으로 약 85% 정도의 결핵 치료율을 나타내는 매우 효과적인 결핵 치료 방법임에도 불구하고, 최소 6개월 이상 지속적인 투여가 필요하고, 상당한 부작용을 초래하며, 비용이 많이 들뿐만 아니라, 다약제 내성 결핵에 대해서는 효능이 불투명하다는 문제가 있다.

[0003] 비결핵 항산균은 자연환경에 흔히 존재하는 비병원성 세균으로 알려져 있다. 그러나 후천성면역결핍증 환자에서 기회 감염균으로 확인되면서 그 중요성이 부각되기 시작하였고, 최근에는 면역기능이 정상인 환자에서도 감염을

일으킬 수 있음이 밝혀졌다. 전국적인 실태조사에 의하면 비결핵 항산균증은 1990년대 이후 지속적으로 증가하고 있는 추세이다. 결핵 및 비결핵은 공통적으로 피로감, 기침, 가래, 흉통 등의 증상을 보이는데, 이는 결핵 및 비결핵 환자에서만 볼 수 있는 특이한 증상이 아니다. 더욱이, 비결핵 항산균은 기존의 항결핵제에 대하여 높은 내성을 보이기 때문에, 장기간 약제 병용요법으로 치료하여야 한다. 따라서, 지속적으로 증가 추세에 있는 비결핵 항산균 감염 질환에 대한 효과적인 치료제가 요구되고 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-2107659호(2020.04.28. 등록)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 동물용 의약품을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 동물용 의약품을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin) 병용처리 시, 상기 약물 각각을 단독처리했을 때보다 우수한 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*) 균주 억제 활성이 나타나는 것을 확인함으로써, 결핵균 또는 비결핵 항상균 감염 질환 예방 또는 치료용 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 오명사마이신(Ohmyungsamycin)의 화학 구조를 나타낸다.

도 2는 리파부틴(Rifabutin)의 화학 구조를 나타낸다.

도 3은 오명사마이신 및 리파부틴 병용처리를 통한 *M. abscessus* 균주 억제 활성을 checkerboard assay를 통해 분석한 결과이다.

도 4는 오명사마이신 및 리파부틴 병용처리를 통한 *M. abscessus* 생균수 변화를 분석한 결과이다.

도 5는 *M. abscessus* 균주 감염 마우스 모델 대식세포에서 오명사마이신 및 리파부틴 병용처리를 통한 생균수 변화를 분석한 결과이다.

도 6은 *M. abscessus* 균주 감염 제브라피쉬 모델에서 약물 병용처리를 통한 생균수 변화를 분석한 결과이다. 구체적으로, 도 6A는 상기 생균수 변화를 현미경으로 관찰한 결과이고, 도 6B는 상기 생균수 변화 분석 결과를 나타낸 그래프이며, 도 6C는 *M. abscessus* 균주 감염 제브라피쉬의 생존력 변화 분석 결과를 나타낸 Kaplan-Meier

생존곡선 그래프이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 본 발명은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 조성물은 오명사마이신 17 내지 67 중량% 및 리파부틴 83 내지 33 중량%를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 상기 조성물은 오명사마이신 및 리파부틴이 0.2 내지 2 : 1의 중량 비율로 포함된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*)일 수 있다.

[0019] 상기 비결핵 항산균 감염 질환은 결핵, 폐질환, 림프절염, 피부감염증, 연조직감염증, 골감염증 및 파종성 질환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0021] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0023] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 피부 외용제 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

[0026] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

[0027] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내

또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 유효성분으로 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료용 동물용 의약품을 제공한다.

[0030] 상기 동물용 의약품은 사료에 포함됨으로써 포유류, 가금 및 어류를 포함하는 다수의 동물 식이에 적용할 수 있고, 상기 포유류는 돼지, 소, 말, 양, 염소, 실험용 설치 동물, 실험용 설치 동물 및 애완 동물(예: 개, 고양이)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 상기 가금류는 닭, 칠면조, 오리, 거위, 꿩, 및 메추라기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 상기 어류는 송어, 미꾸라지, 광어 및 우럭으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 또한, 본 발명은 오명사마이신(Ohmyungsamycin) 및 리파부틴(Rifabutin)을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 결핵균 또는 비결핵 항산균 감염 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0036] **[실험예 1] 균주 및 배양**

[0037] 마이코박테리움 압세수스(*M. abscessus* CIP 104536T S 및 R morphotype; 이하 *M. abscessus*라 함) 균주는 Laurent Kremer(CNRS, IRIM, Universite' de Montpellier, Montpellier, France)로부터 제공받았다. *M. abscessus* 균주는 10% 알부민-덱스트로스-카탈레이스(albumin-dextrose-catalase; 이하 ADC라 함)가 첨가된 Middlebrook 7H9 broth 및 10% 올레익산-ADC(oleic acid-ADC; 이하 OADC라 함)가 첨가된 Middlebrook 7H10 플레이트에서 37℃로 배양하였다.

[0039] **[실험예 2] 억제 농도($IC_{50}$) 분석**

[0040] *M. abscessus* 균주 50%의 생장을 억제할 수 있는 억제 농도($IC_{50}$)를 확인하기 위해, REMA(Resazurin microtiter assay)를 통해 오명사마이신(Ohmyungsamycin; 이하 OMS라 함) 및 리파부틴(Rifabutin; RFB라 함) 각각의 $IC_{50}$를 분석하였다. Cation-adjusted Mueller-Hinton(CAMH)(Sigma, St. Louis, MO, United States)에 염화칼슘(calcium chloride) 20mg/L 및 염화마그네슘(magnesium chloride) 10mg/L를 첨가하여 배지를 준비하였다. 96 웰 플레이트 첫번째 열(column)에는 98㎕의 준비된 배지를 분주하고 나머지 전체 웰에는 50㎕의 배지를 분주하였다. 약물(OMS 및 RFB) 2㎕를 첫 번째 웰에 분주하여 100㎕로 맞춘 후 연속 2배수 희석법을 통하여 농도 구배를 형성시켰다. 지수기 성장하고 있는 *M. abscessus* 균주를 최종 탁도 0.0025($OD_{600}$)가 되도록 준비하고, 희석된 96 웰 플레이트에 50㎕씩 분주한 후 $CO_2$ 배양기로 37℃에서 5일간 배양하였다. 5일째 되는 날 레사주린(resazurin)[0.025% (wt/vol) to 1/10 of well volume]을 모든 웰에 분주하여 1일 추가 배양한 후, spectraMax ® M3 MultiMode Microplate Reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 세균 생존 유무를 형광량 변화로 측정하였고, GraphPad Prism software(version 6.05; San Diego, CA, United States)를 통하여 $IC_{50}$ 값을 계산하였다.

[0042] **[실험예 3] 약물 병용처리를 통한 *M. abscessus* 균주 억제 활성 분석**

[0043] OMS 및 RFB 병용처리를 통한 *M. abscessus* 균주 억제 활성을 확인하기 위해, 상기 실험예 2에서 확인한 $IC_{50}$ 값을 기반으로 checkerboard assay를 수행하였다. 96 웰 플레이트의 열(column)에 OMS를 농도별로 위치시키고 OMS의 $IC_{50}$ 값(6.4㎛M)이 열의 중앙에 위치하게 배치하여 0~50.1㎛M까지의 농도구배가 형성되도록 하였다. 또한, 96 웰 플레이트의 행(row)에 RFB를 농도별로 위치시키고 RFB의 $IC_{50}$ 값(4.8㎛M)이 행의 중앙에 위치하게 배치하여 0~38.4㎛M까지의 농도구배가 형성되도록 하였다. 이렇게 두 약물이 교차로 만날 수 있도록 구조를 형성한 후, *M. abscessus* 균주를 분주하고, $CO_2$ 배양기로 37℃에서 5일간 배양하였다. 5일째 되는 날 레사주린(resazurin)[0.025%(wt/vol) to 1/10 of well volume]을 모든 웰에 분주하여 1일 추가 배양한 후, spectraMax ® M3 MultiMode Microplate Reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 세균 생존 유무를 형광량 변화로 측정하고, GraphPad Prism software(version 6.05; San Diego, CA, United States)를 통하여 $IC_{50}$ 값을 계산하였다. 시너지를 규정할 수 있는 공식인 하기 수학식 1을 사용하여 FIC(fractional inhibitory index) index를 계산하였다. ΣFIC는 RFB FIC 및 OMS FIC의 합으로, ΣFIC≤0.5이면 시너지 효과라고 규명하였다. 또한, checkerboard는 균주 접종하고, 약물 처리한 7일 후 7H9 OADC agar 플레이트로 옮겨서 CFU를 통한 생균수를 측정하였다. 단독 처리군보다 병용처리군에서 ≥3 log10 이상의 생균수 감소가 나타낼 때 살균 효과(bactericidal activity)가 나타난다고 정의하였다.

[0044] **[수학식 1]**

[0045] $$FIC(X + Y) = [MIC\ of\ compound\ X\ in\ combination\ with\ Y] / [MIC\ of\ X\ alone]$$

[0047] **[실험예 4] *M. abscessus* 균주 감염 마우스 모델 대식세포에서 약물 병용처리를 통한 생균수 변화 분석**

[0048] *M. abscessus* 균주 감염 마우스 모델에서 OMS 및 RFB 병용처리를 통한 생균수 변화를 확인하기 위해, 6주령 C57BL/6 마우스의 골수로부터 골수유래 대식세포(Bone Marrow-derived Macrophage; 이하 BMDM이라 함)를 분리하여 5일 동안 M-CSF(macrophage colony-stimulating factor)가 함유된 배지에서 분화하였다. 사용된 배지는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)이며, 10% heat-inactivated FBS(fetal bovine serum, Lonza), 50U/ml 페니실린(penicillin) 및 50㎛g/ml 스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가하였다. 최종 BMDM 밀도는 1 x $10^5$ ~ 3 x $10^5$/well(48 웰 플레이트)로 하였다. BMDM은 *M. abscessus* 균주에 MOI(multiplicity of infection) 1로 감염시켰다. 감염 후 PBS로 세척하고 젠타마이신(gentamicin, Sigma-Aldrich) 50g/ml이 포함된 DMEM을 분주하였다. 그 후 OMS 및 RFB를 처리하고, 상기 약물 처리 후 2일 동안 배양하였다. 2일 후 상층액을 제거하고 멸균증류수를 37℃에서 30분 동안 처리하여 세포를 파괴시킨 후, 연속희석법을 통하여 희석하였고 7H10 agar 플레이트에서 3일 동안 배양한 후(37℃) CFU를 통한 생균수를 측정하였다.

[0050] **[실험예 5] *M. abscessus* 균주 감염 제브라피쉬 모델에서 약물 병용처리를 통한 생균수 변화 분석**

[0051] 제브라피쉬 실험은 경상국립대학교 윤리 규정을 준수하였다(Animal Research Ethics Committee of Gyeongsang National University, 프로젝트 식별코드 : GNU-190325-E0014, 승인날짜: 2019년 3월 15일). 녹색 형광을 나타내는 mWasabi *M. abscessus* CIP 104536T R morphotype 균주를 페놀 레드(phenol red) 0.085%로 희석하여 100CFU/nl로 맞췄다. 4nL를 사용한 400CFU *M. abscessus* 균주는 Tritech Research Digital microINJECTOR(Tritech research, model MINJ-D)를 사용하여 제브라피쉬의 미정맥을 통하여 전신 감염을 시행하였다. 감염 후 배아는 새로운 페트리접시 96 웰 플레이트로 옮기고 28.5℃에서 5일 동안 매일 정해진 농도의 RFB 및 OMS를 처리하여 배양하였다. DMSO 처리군을 대조군으로 설정하였다. 생존 기간(수명연장) 확인을 위해, 13일 동안 매일 약물을 처리했고, 매일 육안으로 사멸한 제브라피쉬를 확인하였다. 약물 처리 후 제브라피쉬 내 총 생존 균수를 확인하기 위해, 약물처리한 제브라피쉬를 handheld homogenizer(D1000; Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA)를 사용하여 분쇄하고, PBS로 희석 후 100㎛L를 7H10 agar 플레이트에 10배수 희석법을 사용하여 도말하였다. 도말 5일 후 CFU를 관찰하여 살아있는 *M. abscessus* 균주 양을 카운팅하였다. 또한, 약물처리 후 제브라피쉬에 살아있는 생균을 확인하기 위해, ImageXpress® Pico Automated Cell Imaging System을 사용하여 mWasabi 녹색 형광을 측정하였다.

[0053] **[실시예 1] 약물 병용처리를 통한 *M. abscessus* 균주 억제 활성 분석**

[0054] 상기 실험예 3에 따라, 약물 병용처리를 통한 *M. abscessus* 균주 억제 활성을 분석한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 병용처리를 통한 OMS 및 RFB의 FIC 값이 0.4로 나타나, 상기 두 약물의 시너지 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 구체적으로, OMS 3.2μM($IC_{50}$의 1/2 농도) 및 RFB 2.4μM($IC_{50}$의 1/2 농도) 각각은 모두 핑크색으로 *M. abscessus* 균주 억제 활성이 나타나지 않은 반면, OMS 3.2μM 이하 및 RFB 2.4μM 이하 병용처리군은 모두 파란색으로 상기 균주 억제 활성이 나타나는 것을 확인하였다. 이는 상기 두 약물 병용처리를 통한 시너지 효과가 나타나는 것을 의미한다.

[0055] 또한, 약물 병용처리를 통한 생균수 변화를 분석한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, OMS 3.2μM($IC_{50}$의 1/2 농도) 및 RFB 2.4μM($IC_{50}$의 1/2 농도) 병용처리군에서 아무것도 처리하지 않은 D7(실험 7일 후) 대조군에 비해 *M. abscessus* 생균수가 약 6.4 log10 CFU/mL 감소하는 것을 확인하였다. 이는 앞서 정의한 살균 효과의 기준인 3.3 log10 CFU/mL보다 높은 값이므로, 상기 두 약물의 병용처리를 통한 살균 효과가 나타나는 것을 의미한다.

[0057] **[실시예 2] *M. abscessus* 균주 감염 마우스 모델 대식세포에서 약물 병용처리를 통한 생균수 변화 분석**

[0058] 상기 실험예 4에 따라, *M. abscessus* 균주 감염 마우스 모델 대식세포에서 약물 병용처리를 통한 생균수 변화를 분석한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, OMS 단독처리군은 아무것도 처리하지 않은 대조군과 유사하게 CFU 감소가 나타나지 않았고, RFB 단독처리군은 1.5μM에서 *M. abscessus* 균주의 생장이 $1.6 \times 10^6$ 억제되는 것을 확인하였다. 또한, OMS(3μM) 및 RFB(1.5μM) 병용처리군에서 균주 생장이 $2.9 \times 10^6$ 감소하는 것을 확인하였다. 이는 세포 내 *M. abscessus* 균주 감염 상태에서도 상기 두 약물의 병용처리를 통한 시너지 효과가 나타나는 것을 의미한다.

[0060] **[실시예 3] *M. abscessus* 균주 감염 제브라피쉬 모델에서 약물 병용처리를 통한 생균수 변화 분석**

[0061] 상기 실험예 5에 따라, *M. abscessus* 균주 감염 제브라피쉬 모델에서 약물 병용처리를 통한 생균수 변화를 분석한 결과, 도 6A에 나타난 바와 같이, DMSO 처리군(대조군)에서는 머리 및 난황 부근에서 형광이 나타났고, OMS 및 RFB 각각의 단독처리군에서는 대조군보다 소량의 형광이 나타났으며, 병용처리군에서는 제브라피쉬 내부에서 형광이 거의 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이는 상기 약물의 단독 처리보다 병용처리가 더 우수한 동물 내 상기 균주 사멸력을 나타내는 것을 의미한다.

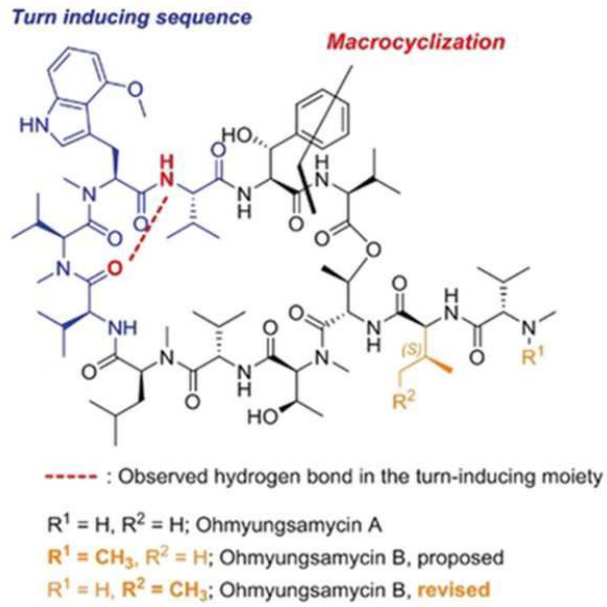
[0062] 또한, 상기 약물을 처리 후 제브라피쉬 내 생균수를 분석한 결과, 도 6B에 나타난 바와 같이, OMS(6.3μM) 및 RFB(6.3μM) 병용처리 시, 대조군과 비교하여 약 3.7 log10 CFU/mL의 총 생균수가 감소하는 것을 확인하였다.

[0063] 또한, Kaplan-Meier 생존곡선을 통해 상기 균주에 감염된 제브라피쉬의 생존력 변화를 비교 및 분석한 결과, 도 6C에 나타난 바와 같이, 대조군은 감염 후 약 13일 후에 모든 감염된 제브라피쉬가 사멸한 반면, OMS(6.3μM) 및 RFB(6.3μM) 병용처리군은 감염 후 13일 후 감염된 제브라피쉬의 약 80%가 생존한 것을 확인하였다.

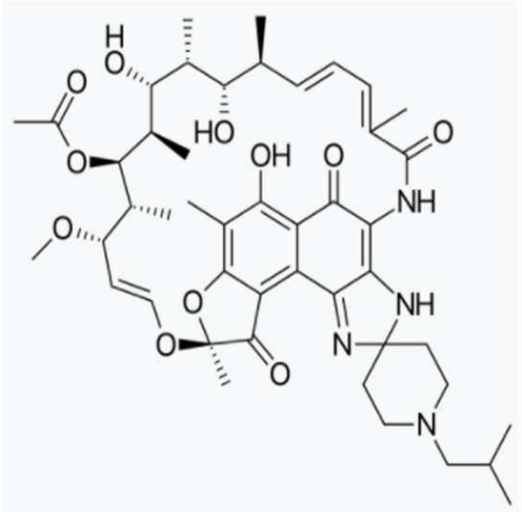
[0065] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

## 도면

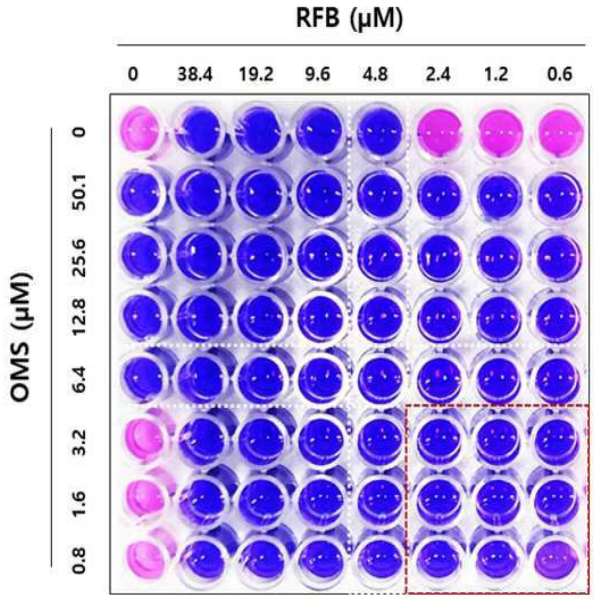
### 도면1


Turn inducing sequence
Macrocyclization
----- : Observed hydrogen bond in the turn-inducing moiety
R1 = H, R2 = H; Ohmyungsamycin A
R1 = CH3, R2 = H; Ohmyungsamycin B, proposed
R1 = H, R2 = CH3; Ohmyungsamycin B, revised

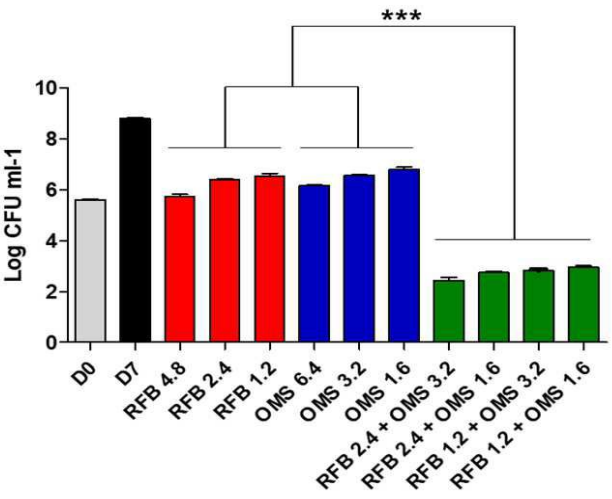
### 도면2



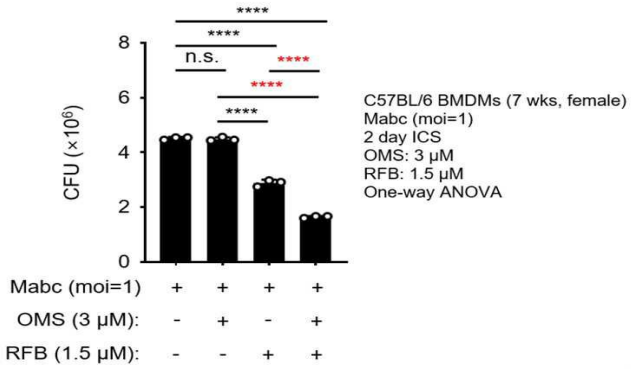
도면3


RFB (μM)
0
38.4
19.2
9.6
4.8
2.4
1.2
0.6
OMS (μM)
0
50.1
25.6
12.8
6.4
3.2
1.6
0.8

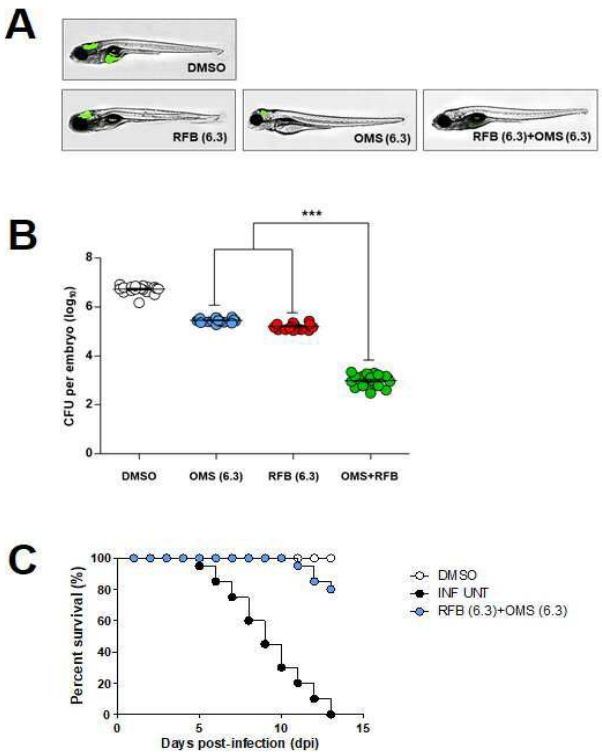
도면4


***
Log CFU ml-1
10
8
6
4
2
0
D0
D7
RFB 4.8
RFB 2.4
RFB 1.2
OMS 6.4
OMS 3.2
OMS 1.6
RFB 2.4 + OMS 3.2
RFB 2.4 + OMS 1.6
RFB 1.2 + OMS 3.2
RFB 1.2 + OMS 1.6

도면5


****
****
n.s.
****
****
****
CFU (×10⁶)
8
6
4
2
0
C57BL/6 BMDMs (7 wks, female)
Mabc (moi=1)
2 day ICS
OMS: 3 μM
RFB: 1.5 μM
One-way ANOVA
Mabc (moi=1) + + + +
OMS (3 μM): - + - +
RFB (1.5 μM): - - + +

도면6


A
DMSO
RFB (6.3)
OMS (6.3)
RFB (6.3)+OMS (6.3)
B
***
CFU per embryo (log10)
8
6
4
2
0
DMSO
OMS (6.3)
RFB (6.3)
OMS+RFB
C
Percent survival (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
Days post-infection (dpi)
DMSO
INF UNT
RFB (6.3)+OMS (6.3)