



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0137723
(43) 공개일자 2014년12월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/19 (2006.01) *A61K 31/185* (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0058568

(22) 출원일자 2013년05월23일

심사청구일자 2013년05월23일

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

윤성철

경상남도 진주시 진주대로879번길 19, A동 305호
(주약동, 현대성우트리펠리스)

최문환

경상남도 진주시 가호로 17-10, 103동 905호 (가좌동, 올리움아파트)

(74) 대리인

위병갑

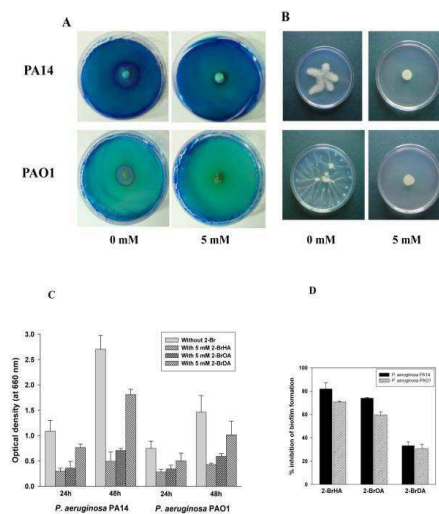
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 2-브로모알칸산을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물

(57) 요약

본 발명은 2-브로모알칸산을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 2-브로모알칸산(2-bromoalkanoic acids)은 낭포성 섬유증 등의 폐질환의 원인이 되는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 강한 저해활성을 나타내어 낭포성 섬유증, 폐혈증, 전신감염 또는 만성기도 감염증의 치료를 위한 항생 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009522

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업 (미래유망 융합기술 파이오니아사업)

연구과제명 생분해성 고분자를 기반으로 한 뇌로의 고효율 약물전달 나노담체 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

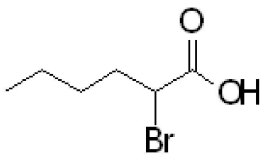
2-브로모알칸산(2-bromoalkanoic acids)을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물.

청구항 2

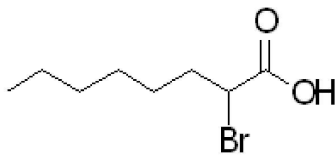
제1항에 있어서,

상기 2-브로모알칸산은 하기 화학식 1로 표시되는 2-브로모헥산(2-bromohexanoic acid), 하기 화학식 2로 표시되는 2-브로모옥탄산(2-bromooctanoic acid) 또는 하기 화학식 3으로 표시되는 2-브로모데칸산(2-bromodecanoic acid)인 것을 특징으로 하는 항생제 조성물;

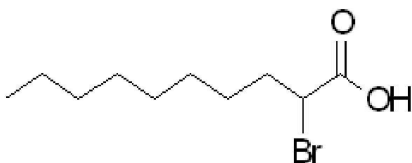
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 3

제1항에 있어서,

상기 항생제 조성물은 항생제 내성을 감소 또는 억제시킴으로써 항균 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 항생제 조성물은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대하여 항균 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항생제 조성물은 PHA(Polyhydroxyalkanoate) 또는 람노리피드 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항생제 조성물은 병원균의 스와밍 운동성을 감소 또는 억제하는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 항생제 조성물은 병원균의 바이오 필름 형성을 감소 또는 억제하는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항생제 조성물은 낭포성 섬유증, 패혈증, 전신감염 또는 만성기도 감염증을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 항생제 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 2-브로모알칸산을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 감염성 병원균인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 면역력이 저하된 환자나 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 환자의 폐에 기생하여 치명적인 증상을 유발한다. 녹농균 감염의 위험성은 이미 오래 전부터 알려졌고 이를 극복하기 위한 항생제 연구도 오래 전부터 진행되어 항생제의 개별적 효능도 임상적으로 연구되었다(G. Doring et al. Eur. Respir. J. 2000, 16, 749). 녹농균 감염의 치료제로 사용되는 항생제는 작용 기작에 따라서 몇 종류로 분류된다. 페니실린이나 세팔로스포린(Cephalosporins) 등은 베타 락탐 계열 항생제로 세균의 세포벽 형성을 저해하며 그 중에서도 세프트아지딴(Ceftazidime)이 녹농균 치료제로 널리 사용된다. 세프트아지딴은 주로 혈관을 통해 주입되며 일일 적정 주사량은 체중의 kg 당 100 ~ 250 mg 이다. 노보바이오신(Novobiocin)이나 퀴놀론(Quinolones) 등은 토포아이스머라아제(topoisomerase)와 반응하여 DNA의 생성을 방해한다. 이들 중 널리 사용되는 시프로플록사신(Ciprofloxacin)은 주로 경구 투여되며 일일 적정 주입량은 체중의 kg 당 30 mg 이다. 그밖에 리팜핀(Rifampin) 등은 DNA로부터 RNA로의 전사를 방해하며, 클로르암페니콜(Chloramphenicol), 테트라사이클린(Tetracycline) 계열의 항생제 들은 세균의 리보솜과 결합하여 단백질 형성을 억제한다. 이들 항생제들은 각각 효능에서도 차이를 나타내지만 낭포성 섬유증 환자와 같은 만성 감염자의 경우에 한 종류의 항생제를 장기간 처방되었을 경우에 항생제에 대한 내성 균주들이 발생된다. 녹농균의 내성은 돌연변이를 통해 발생되거나 다른 개체로부터 항생제 내성 유전자를 전달 받아 항생제 내성 균주로 발전한다.

[0003] 이러한 항생제 내성 균주 발생을 억제하기 위해서 임상적으로는 여러 항생제의 혼합을 통한 복합적 처방이 이용되고 있으나 내성 균주의 발생을 유도하지 않고, 새로운 저해타깃을 갖는 새로운 종류의 신약개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2012-0138769호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 2-브로모알칸산(2-bromoalkanoic acids)을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물을 제공하는

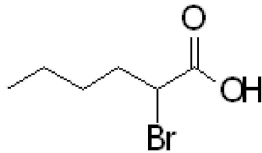
것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 2-브로모알칸산(2-bromoalkanoic acids)을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물을 제공한다.

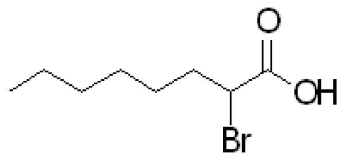
[0007] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 2-브로모알칸산은 하기 화학식 1로 표시되는 2-브로모헥산(2-bromohexanoic acid), 하기 화학식 2로 표시되는 2-브로모옥탄산(2-bromooctanoic acid) 또는 하기 화학식 3으로 표시되는 2-브로모데칸산(2-bromodecanoic acid)일 수 있다.

[0008] [화학식 1]



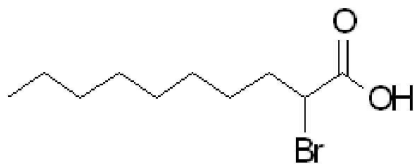
[0009]

[0010] [화학식 2]



[0011]

[0012] [화학식 3]



[0013]

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항생제 조성물은 항생제 내성을 감소 또는 억제시킴으로써 항균 활성을 나타내는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항생제 조성물은 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대하여 항균 활성을 나타내는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항생제 조성물은 PHA(Polyhydroxyalkanoate) 또는 람노리피드(rhamnolipid) 생성을 억제하는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항생제 조성물은 병원균의 스와밍 운동성을 감소 또는 억제하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항생제 조성물은 병원균의 바이오 필름 형성을 감소 또는 억제하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 항생제 조성물은 낭포성 섬유증, 폐혈증, 전신감염 또는 만성기도 감염증을 예방 또는 치료할 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 2-브로모알칸산(2-bromoalkanoic acids)은 낭포성 섬유증 등의 폐질환의 원인이 되는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 강한 저해활성을 나타내어 낭포성 섬유증, 폐혈증, 전신감염 또는 만성기도 감염증의 치료를 위한 항생 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1A, 1B, 1C는 본 발명의 일실시예에 따라서 *P. aeruginosa* PA14 균주에 2-브로모알칸산류(2-BrHA, 2-BrOA)을 처리한 뒤 배양시간에 따른 녹농균(*P. aeruginosa*)의 성장을 측정한 결과이다(A: 대조군, B: 2-BrHA 처리군, C: 2-BrOA 처리군).
- 도 1D, 1E, 1F는 본 발명의 일실시예에 따라서 *P. aeruginosa* PA01 균주에 2-브로모알칸산류(2-BrHA, 2-BrOA)을 처리한 뒤 배양시간에 따른 녹농균(*P. aeruginosa*)의 성장을 측정한 결과이다(D: 대조군, E: 2-BrHA 처리군, F: 2-BrOA 처리군).
- 도 2A는 본 발명의 일실시예에 따라서 3종의 2-브로모알칸산류(2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)을 대상으로 *P. aeruginosa* PA14 와일드 타입과 PA14- $\Delta phaG$ 돌연변이형의 람노리피드와 PHA의 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2B는 본 발명의 일실시예에 따라서 3종의 2-브로모알칸산류(2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)을 대상으로 *P. aeruginosa* PA01 와일드 타입과 PA01- $\Delta rhIA$ 돌연변이형의 람노리피드와 PHA의 생산량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 람노리피드와 PHA 합성 대사과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 4는 *P. aeruginosa* 균의 와일드타입과 돌연변이형에 2-브로모알칸산류(2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)를 처리한 후 PhaG와 RhIA의 발현 정도를 확인한 RT-PCR 결과이다.
- 도 5는 *P. aeruginosa* PA01와 *P. aeruginosa* PA14 두 균주의 와일드타입과 돌연변이형에 2-브로모알칸산류(2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)를 처리한 후 PHA 및 람노리피드의 축적 정도를 나타낸 것이다.
- 도 6A는 *P. aeruginosa*의 PA14와 PA01에 2-BrHA 화합물을 처리한 뒤 람노리피드 존재 유무를 확인한 결과이다.
- 도 6B는 *P. aeruginosa* 균주인 PA01와 PA14에 2-BrHA 화합물을 처리한 뒤 Swarming 운동성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6C는 *P. aeruginosa* 균주인 PA01와 PA14에 2-브로모알칸산류(2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)를 처리한 후 24시간, 48시간 경과 후의 바이오필름 형성 정도를 측정한 결과이다.
- 도 6D는 *P. aeruginosa* 균주인 PA01와 PA14에 2-브로모알칸산류(2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)를 처리한 후 바이오필름 형성정도를 %로 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 2-브로모알칸산(2-bromoalkanoic acids)을 유효성분으로 포함하는 항생제 조성물을 제공한다는 데 그 특징이 있다.
- [0023] 녹농균(*P. aeruginosa*)은 패혈증, 전신감염, 만성기도 감염증 및 췌장포성 섬유증 환자에게 난치성 감염을 일으키는 병원성 세균이다. 특히 수술, 화상, 외상 및 화학요법 치료 등에 의해 저항력이 저하된 환자가 녹농균에 의해서 패혈증에 걸리면 고열, 혈압저하 등의 쇼크를 일으켜 결국 사망에까지 이르게 한다. 더욱이 녹농균 감염 치료는 대부분 항생제에만 의존해 항생제 남용으로 내성 균주가 생겨 기존 상용 항생제에 의한 치료가 점점 어려워지고 있어 치료가 쉽지 않다.
- [0024] 이에 본 발명자들은 녹농균을 효과적으로 치료할 수 있는 항생제에 대해 연구하던 중 본 발명의 2-브로모알칸산이 녹농균(*P. aeruginosa*)의 병원성인자인 람노리피드 및 바이오필름의 형성을 저해하는 활성이 있어 녹농균을 예방하는 데 효과적임을 최초로 규명하였다.
- [0025] 이러한 결과는 본 발명의 일실시예에 의해 확인할 수 있었는데 2 mM 2-브로모알칸산화합물(2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)을 첨가한 70mM 프럭토즈 배지에서의 *P. aeruginosa*의 배양 결과, PA14 및 PA01 균주 모두에서 2-브로모알칸산 화합물을 처리하지 않은 대조군에 비해 PHA 및 람노리피드의 축적이 억제되었으며, 이러한 결과는 알킬기가 가장 짧은 2-BrHA(2-브로모헥산산)에서 그 효과가 가장 좋음을 알 수 있었다(표 1 참조).
- [0026] 다른 일실시예에 따르면, *P. aeruginosa* PA14 와일드 타입과 PA14- $\Delta phaG$ 돌연변이형 균주에서 람노리피드와 PHA의 생산량을 측정한 결과, 와일드타입에 비해 PA14- $\Delta phaG$ 돌연변이형에서 PHA와 람노리피드의 함유량이 더 효과적으로 억제됨을 알 수 있었고, 와일드 타입과 PA14- $\Delta phaG$ 돌연변이형 모두에서 2-BrHA와 2-BrOA에서는 PHA와 람노리피드 생산량이 효과적으로 억제되었으나, 2-BrDA에서는 아무 것도 처리하지 않은 대조군과 비슷한

수치를 보여 PHA와 람노리피드 생성을 거의 억제하지 못함을 알 수 있었다(도 2A 참조).

- [0027] 또한, 이러한 결과와 비슷하게 *P. aeruginosa* PA01를 대상으로 동일한 실험을 한 결과 와일드타입보다 PA01- Δ *rhIA* 돌연변이형에서 PHA를 더 많이 억제하였으며, 2mM 2-BrHA에서는 PHA와 람노리피드 생성을 효과적으로 억제 되었음을 알 수 있었다(도 2B 참조).
- [0028] 다른 일실시예에 따르면, *P. aeruginosa* PA01와 *P. aeruginosa* PA14 균주에서, 3가지의 2-브로모알칸산화합물 (2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)의 람노리피드 합성 억제 정도, Swarming 운동성 여부 및 바이오필름 형성 유무를 확인한 결과, 2-브로모알칸산화합물이 상기 녹농균의 병원성인자들을 억제함을 알 수 있었으며, 그 중 알킬기가 가장 짧은 2-BrHA(2-브로모헥산산)에서 가장 그 억제 정도가 좋음을 알 수 있었다(도 6참조).
- [0029] 따라서 본 발명의 2-브로모알칸산(2-bromoalkanoic acids)은 녹농균(*P. aeruginosa*)의 병원성인자인 람노리피드 생산 및 바이오필름 등을 억제하는 활성이 있어 낭포성폐질환 등의 폐질환 치료제의 용도로 사용할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 2-브로모알칸산류 중 알킬기가 제일 짧은 2-BrHA 화합물에서 녹농균의 병원성 인자 억제 효과가 월등히 좋음을 확인하였다는 점에 특징이 있다.
- [0031] 본 발명에서 상기 “녹농균(*P. aeruginosa*)”은 숙주세포 속으로 4개의 독성인자 exoenzyme S(Exo S), exoenzyme T(Exo T), exoenzyme U(Exo U), exoenzyme Y(Exo Y)를 직접 주입하기 위하여 type III secretion system을 이용한다.
- [0032] Exo U와 Exo T를 생산하는 균주들은 보다 느리게 카스파제(cysteiny protease 계열) 의존적 숙주세포 사멸을 유도한다. Exo U는 광범위 특이성을 가지는 포스포리파아제 A2(phospholipase A2)와 유사한 활성을 가지는 강력한 세포용해 독소(cytolytic toxin)이다. Exo S와 Exo T는 N-terminal GTPase-activating protein 활성화와 C-terminal adenosine diphosphate(ADP)-ribosyltransferase 활성을 가지는, 즉 두 가지 기능을 동시에 가지는 단백질들이다. Exo Y는 host factor-dependent adenylate cyclase이다.
- [0033] 또한, 녹농균은 기회병원체(opportunistic pathogen)로서 건강한 사람에게는 거의 감염을 일으키지 않지만, 화상, 투과성 외상, 외과수술 등에 의해 정상적인 조직이 손상되거나, 면역 기능의 저하, 광범위 항생제 치료에 의한 정상적인 미생물 다양성(미생물총 : microbial flora)의 보호기능 상실 등에 의해 질병을 일으킬 수 있다. 감염과정을 보면 피부나 점막 표면에서 집락을 형성한 후 국소부위 침투와 하부 조직의 손상을 통해 혈관까지 침습하게 된다.
- [0034] 녹농균의 백신은 낭포성 섬유증 환자에 녹농균 감염을 예방하기 위한 최초의 그리고 유일한 백신이다. 낭포성 섬유증은 폐에 비정상적인 점액 생산선이 발생하는 유전성 질환으로 두껍고 끈적한 점액이 폐와 췌장을 막아 생명을 위협하는 흉부감염 및 소화장애를 유발한다. 이 질환은 주로 녹농균에 의해 악화되며, 치료가 매우 어렵다. 이 백신으로 면역 주사하면 녹농균의 감염 및 진행성 콜로니 형성을 저해시킴으로써 낭포성 섬유증 환자의 폐를 보호하는 것으로 밝혀졌다. *P. aeruginosa* 백신은 유럽에서 희귀의약품(Orphan Drug)으로 승인된 최초의 백신이다.
- [0035] 본 발명에서 상기 녹농균(*P. aeruginosa*)을 원인으로 생기는 질병으로는 이에 제한되지 않으나 낭포성 섬유증, 패혈증, 전신감염 및 만성기도 감염증으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 상기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 2-브로모알칸산(2-bromoalkanoic acids)화합물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.
- [0037] 본 발명에 따른 화합물은 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것을 사용할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 2-브로모알칸산(2-bromoalkanoic acids) 화합물 또는 그의 염의 약학적으로 유효한 양은 0.5 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 5 mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 낭포성 섬유증, 패혈증, 전신감염 및 만성기도 감염증 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및

치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0039] 또한, 상기에서 “약학적으로 허용되는”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명에 따른 항생제 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 항생제 조성물은 낭포성 섬유증, 패혈증, 전신감염 및 만성기도 감염증 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] <실시예 1>

[0044] 사용 균주

[0045] 본 발명의 실험에 사용한 균주는 녹농균(*P. aeruginosa*)으로, PA14 야생형과 PA14- Δ phaG 돌연변이형은 PA14 NR 세트에서 수득했고, *P. aeruginosa* PA01 야생형과 PA01- Δ rhIA 돌연변이형은 University of Washington Transposon Mutant Collection에서 구입하였다.

[0046] 본 연구에 사용한 배지는 NR(nutrient rich) 배지, LB 배지, 그리고 mineral salt 배지였다. NR 배지(1%(w/v)의 효모추출물, 1.5%(w/v)의 영양액 및 0.4%(w/v)의 황산암모늄)는 균주의 유지와 보관, 그리고 배양을 위해 사용하였으며, 고체배지를 위해 1.5%의 Bacto agar를 첨가하였다. PHA 및 람노리피드의 생합성을 위하여는 M1 mineral salt 배지를 사용하였으며, 각 탄소원과 질소원(황산암모늄)의 농도는 필요에 따라 변화시켰다. 아울러 도입된 재조합 플라스미드의 안정성을 위해 60 μ g/ml의 테트라사이클린, 30 μ g/ml의 젠타마이신을 사용하였다.

[0047] <실시예 2>

[0048] 2-브로모알칸산이 녹농균 성장에 미치는 영향 분석

[0049] 본 발명자들은 녹농균(*P. aeruginosa*)인 PA14와 PA01 균주의 성장에 2-브로모알칸산이 미치는 영향을 알아보기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

[0050] 먼저, PA14와 PA01 균주를 각각 NR배지가 들어 있는 시험관에 접종한 후 30℃에서 180 rpm의 속도로 12 시간 동안 진탕배양하고, 70 mM 프럭토스와 1.0 g의 황산암모늄을 포함하는 M1배지 500 ml이 들어 있는 2 L 플라스크에 2 mM의 2-BrHA과 2-BrOA를 각각 첨가한 후 세포성장이 정지기에 도달할 때까지 배양하였다.

[0051] 배양된 세포는 10,000× g 로 10분 원심분리한 후 메탄올로 세척하고 24시간 동안 진공건조기에서 건조하여 분리하였다. 또한, 대조군으로 상기 2-브로모알칸산류인 2-BrHA, 2-BrOA를 첨가하지 않은 M1배지에서 균체를 배양한 후 시간에 따른 성장정도를 건조 균체 중량을 이용하여 측정하였다. 한편, 배지에 남아 있는 프럭토스와 암모늄 이온의 농도는 각각 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)과 Nessler' reagent 방법으로 측정하였다.

[0052] 그 결과, 2-BrHA, 2-BrOA 화합물을 처리한 군과 아무 것도 처리하지 않은 대조군에서의 건조 균체 중량은 차이가 없는 것으로 관찰되었다(도 1 참조). 따라서, 2-브로모알칸산이 녹농균(*P. aeruginosa*)의 성장에는 아무런 영향을 끼치지 않음을 알 수 있었다.

[0053]

[표 1] *P. aeruginosa* PA14와 PAO1 균주에 람노리피드와 PHA 합성과정에서의 2-BrHA, 2-BrOA 또는 2-BrDA 화합물 첨가 효과 분석

Strain	Co-added compounds (mM)	Culture time (h)	Dry cell weight (g/L)	PHA content (wt %)	PHA monomer-unit composition (mol%) ^a				Rhamnolipid Content (g/L)	Rhamnolipid acyl-group composition (mol%) ^a			
					3HC ^b	3HO	3HD			3HC ^b	3HO	3HDDe	3HDD
PA14	No inhibitor	72	1.45±0.07	2.3±0.5	4.0±0.3	26.1±0.5	69.9±0.8	0.082±0.035	10.0±0.9	87.5±0.7	1.1±0.1	1.4±0.1	
		96	1.67±0.13	12.7±0.7	4.5±0.5	27.2±0.9	68.3±0.4	1.093±0.062	10.2±0.6	87.3±0.4	1.0±0.1	1.5±0.1	
		120	1.83±0.10	15.8±0.5	4.5±0.2	27.3±0.5	68.2±0.7	1.562±0.131	10.5±0.1	86.4±0.3	1.4±0.1	1.7±0.1	
		144	1.86±0.09	15.2±0.4	4.3±0.3	27.6±0.7	68.1±0.4	1.571±0.105	10.4±0.5	86.7±0.2	1.3±0.1	1.6±0.2	
	2 mM 2-BrHA	72	1.38±0.03	0.3±0.1	5.0±0.3	41.7±0.5	53.3±0.2	-	-	-	-	-	-
		96	1.55±0.09	0.9±0.3	5.0±0.5	42.9±0.6	52.1±0.1	0.175±0.053	8.1±0.4	89.4±0.6	1.1±0.1	1.4±0.1	
		120	1.71±0.09	1.7±0.3	5.2±0.5	43.3±0.2	51.5±0.3	0.191±0.031	8.5±0.3	88.4±0.4	1.4±0.1	1.7±0.1	
		144	1.69±0.04	1.6±0.6	5.2±0.2	43.7±0.7	51.1±0.5	0.195±0.105	8.4±0.6	88.5±0.3	1.4±0.1	1.7±0.2	
	2 mM 2-BrOA	72	1.41±0.05	0.5±0.1	5.0±0.3	40.5±0.2	54.5±0.5	-	-	-	-	-	-
		96	1.60±0.11	1.7±0.3	5.1±0.5	42.1±0.6	52.8±0.1	0.332±0.071	8.2±0.4	89.2±0.2	1.1±0.1	1.5±0.1	
		120	1.72±0.15	5.1±0.7	4.9±0.1	42.9±0.6	52.2±0.7	0.498±0.099	8.5±0.2	88.4±0.5	1.4±0.1	1.7±0.2	
		144	1.71±0.10	4.9±0.3	4.8±0.3	43.4±0.3	51.8±0.6	0.505±0.053	8.5±0.5	88.6±0.2	1.3±0.1	1.6±0.2	
	2 mM 2-BrDA	72	1.42±0.10	1.5±0.3	4.0±0.3	24.1±0.5	71.9±0.8	0.077±0.025	9.5±0.5	88.0±0.7	1.1±0.1	1.4±0.1	
		96	1.63±0.11	8.1±0.7	4.1±0.5	26.6±0.9	69.3±0.4	0.991±0.055	9.7±0.6	87.6±0.4	1.2±0.1	1.5±0.1	
		120	1.80±0.06	10.2±0.5	4.3±0.2	27.0±0.5	68.7±0.7	1.568±0.130	10.0±0.1	86.9±0.4	1.4±0.1	1.7±0.2	
		144	1.77±0.13	10.6±0.7	4.3±0.3	27.3±0.7	68.4±0.4	1.563±0.123	10.0±0.3	86.9±0.6	1.4±0.1	1.7±0.2	
PAO1	No inhibitor	72	1.65±0.11	8.8±0.7	5.2±0.3	34.8±0.7	60.0±0.4	0.279±0.063	9.6±0.2	87.6±0.5	1.3±0.1	1.5±0.2	
		96	1.83±0.13	11.9±0.8	5.9±0.2	36.1±0.7	58.0±0.4	1.568±0.101	9.8±0.7	87.2±0.5	1.4±0.1	1.6±0.1	
		120	1.87±0.07	12.5±0.4	6.3±0.2	36.6±0.5	57.1±0.3	1.816±0.079	9.7±0.3	87.2±0.6	1.4±0.1	1.7±0.2	
		144	1.81±0.09	10.9±1.3	6.1±0.5	36.6±0.3	57.3±0.2	1.672±0.099	9.9±0.5	87.0±0.3	1.4±0.1	1.7±0.1	
	2 mM 2-BrHA	72	1.55±0.05	1.3±0.5	5.0±0.1	33.5±0.3	61.5±0.4	0.033±0.012	9.3±0.2	87.9±0.5	1.3±0.1	1.5±0.2	
		96	1.73±0.15	1.5±0.1	5.5±0.3	33.7±0.7	60.8±0.4	0.158±0.035	8.8±0.7	88.2±0.5	1.4±0.1	1.6±0.1	
		120	1.71±0.11	1.4±0.3	6.1±0.2	35.1±0.5	58.8±0.3	0.194±0.029	8.9±0.1	88.0±0.4	1.4±0.1	1.7±0.2	
		144	1.69±0.14	1.1±0.5	6.1±0.5	35.3±0.4	58.6±0.1	0.177±0.053	8.9±0.3	88.0±0.6	1.4±0.1	1.7±0.2	
	2 mM 2-BrOA	72	1.58±0.10	3.5±0.7	5.6±0.5	33.5±0.2	60.9±0.3	0.138±0.065	8.7±0.2	88.5±0.5	1.3±0.1	1.5±0.2	
		96	1.78±0.07	4.2±0.5	5.9±0.3	34.3±0.7	59.8±0.4	0.413±0.112	8.6±0.6	88.4±0.4	1.4±0.1	1.6±0.1	
		120	1.73±0.15	3.8±0.2	6.1±0.3	34.8±0.6	59.1±0.3	0.553±0.091	8.5±0.3	88.5±0.6	1.4±0.1	1.6±0.2	
		144	1.72±0.09	3.3±0.8	6.1±0.5	35.1±0.3	58.9±0.8	0.491±0.035	8.3±0.3	88.6±0.6	1.4±0.1	1.7±0.2	
	2 mM 2-BrDA	72	1.62±0.11	7.1±1.1	5.5±0.3	34.0±0.7	60.5±0.4	0.265±0.081	9.6±0.3	87.6±0.6	1.3±0.1	1.5±0.2	
		96	1.78±0.15	9.3±0.8	5.9±0.2	35.0±0.6	59.1±0.4	1.553±0.115	9.6±0.8	87.4±0.5	1.4±0.1	1.6±0.2	
		120	1.82±0.15	9.5±0.9	6.3±0.2	35.2±0.5	58.5±0.7	1.801±0.079	9.3±0.3	87.7±0.6	1.4±0.1	1.6±0.2	
		144	1.84±0.05	9.1±1.1	6.3±0.5	35.6±0.7	58.1±0.2	1.811±0.063	9.4±0.4	87.6±0.1	1.4±0.1	1.6±0.1	

^a Calculated from the GC data.

^b 3HC, 3-hydroxyhexanoic acid; 3HO, 3-hydroxyoctanoic acid; 3HD, 3-hydroxydecanoic acid; 3HDDe, 3-hydroxy-cis-5-dodecenoic acid; 3HDD, 3-hydroxydodecanoic acid.

^c Not detected by GC analysis.

[0054]

<실시예 3>

[0055]

2-브로모알칸산에 의한 람노리피드와 PHA의 생산 억제 효과 분석

[0056]

녹농균(*P. aeruginosa*)은 당류와 함께 배양하였을 때 PhaG와 RhIA를 이용하여 PHA와 람노리피드를 합성하는 것으로 알려져 있다. 이 경우, 2-BrOA는 프럭토스를 이용하여 배양하였을 때 PHA의 축적을 저해하는 것으로 알려져 있는데 본 발명자들은 2-BrOA와 동종 화합물인 2-BrHA와 2-BrDA가 2-BrOA와 유사하게 PHA와 람노리피드 생산을 억제할 수 있는지를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 준비하였다.

[0057]

[0058]

<3-1> 람노리피드 분석(Rhamnolipid assay)

[0059]

2-브로모알칸산에 의한 람노리피드의 생산 변화를 분석하기 위하여 본 발명자들은 0.2% 프럭토스, 2 mM MgSO₄, 0.0005% 메틸렌블루, 0.02% 세틸트리메틸암모늄 브로마이드가 첨가된 M9 salts 배지에 2 mM 2-브로모알칸산을 첨가하였다. 한편, 상기 배지에 질소원으로 글루타메이트(glutamate)를 0.05%의 농도가 되도록 첨가한 후, 1.8% 한천을 첨가하여 람노리피드 고체배지를 만들었다. LB 고체배지에서 자란 각각의 콜로니를 이쑤시개를 이용하여 람노리피드 고체배지에 접종시켰으며, 30℃에서 24 시간 동안 배양한 후 다시 실온에서 최소 48 시간 이상 콜로니 주위에 파란색의 테두리가 형성될 때 까지 배양하였다.

[0060] <3-2> 오르시놀 분석(Orcinol assay)

[0061] 오르시놀 분석은 M1 mineral-salt 배지에서 배양되는 동안 분비되는 람노리피드의 양을 측정하기 위한 분석방법으로, 오르시놀 분석을 위하여 M1 배양액을 원심분리하여 분리한 상층액 300 μ l를 600 μ l 디메틸에테르로 2번 추출하였고, 에테르 분획물을 모으고 건조하여 증발시킨 후 100 μ l 증류수를 첨가하였다. 각 샘플 100 μ l에 100 μ l의 1.71% 오르시놀 용액 및 800 μ l의 60%(v/v) 황산용액을 첨가한 후 80℃에서 30분간 가열하였다. 이후, 각 샘플을 15 분 동안 차갑게 한 뒤 421 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 람노리피드의 농도는 0에서 50 mg/ml 사이의 람노스 표준용액 곡선으로부터 계산된 값으로 나타냈으며, 람노리피드의 알킬기는 가스크로마토그래피로 측정하였다. 각각의 배양액을 원심분리하여 회수한 상층액을 동결 건조한 후 클로로포름으로 추출하여 모았으며, 필터링 된 클로로포름 추출물은 회전 증발기(Eyela N-1000, Japan)를 사용하여 농축하였다. 클로로포름의 추출물 일부는 하기 실시예 3-3에 기재된 것과 같이 메탄올분해 반응 후 GC 분석을 실시하였다.

[0062] <3-3> 세포 내 PHA 정량 분석

[0063] 세포내 PHA의 양을 분석하기 위하여, 상기 건조된 세포 20 mg을 1 ml 클로로포름, 0.85 ml 메탄올, 0.15 ml 농축된 황산 혼합액과 반응시키고, 100℃에서 3시간 동안 배양하였다. 반응물을 포함하는 유기층을 분리한 후 여기에 MgSO₄를 첨가하여 남아있는 물을 완전히 제거한 후, 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 각각의 피크는 정량 NMR 분석에 의해 결정된, 이미 알려진 조성인 정제 PHA의 황산메탄을 분해에 의해 얻어진 표준 3-히드록시-메틸에스터를 이용하여 표준화하였다. 가스 크로마토그램은 HP-5 컬럼과 불꽃이온화검출기가 장착된 Hewlett Packard 5890A 가스 크로마토그래피를 이용하여 얻을 수 있었다. 컬럼은 80-250℃ 범위에서 10℃/min으로 가열하였다.

[0064] 상기와 같은 실험 결과, 람노리피드와 PHA의 생산은 세포가 성장함에 따라 증가하였으며, 람노리피드 생산은 질소원이 거의 고갈되고 PHA가 축적되는 동안 일어나는 것으로 확인되었다(도 1A, 도 1D 참조). 한편, PHA는 탄소원이 거의 고갈되는 마지막 정지기에서 최대 축적량을 보임을 알 수 있었다. 탄소원이 전부 사용된 이후, PHA 합성은 감소되었으나 람노리피드의 합성은 계속됨이 확인되었다(도 1A, 1D 참조). 이러한 결과는 탄소원이 고갈된 상황에서 세포내에 존재하는 PHA 분해효소(PhaZ)에 의해 PHA가 람노리피드로 전환되기 때문인 것으로 판단된다.

[0065] 한편, 2 mM 2-브로모알칸산화합물(2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)을 첨가한 70 mM 프럭토즈 배지에서의 *P. aeruginosa* PA14 균주의 PHA와 람노리피드 생산량을 확인한 결과, PA14 균주에 아무 것도 처리하지 않은 군에서는 PHA와 람노리피드가 각각 최대생산량인 16 wt%, 1.56 g/l을 보였으며, 2-BrHA 화합물을 처리하였을 때는 각각 1.7 wt%, 0.19 g/l로 줄어들었고, 2-BrOA 화합물을 처리하였을 때는 각각 5.1 wt%, 0.50 g/l로, 2-BrDA 화합물을 처리하였을 때는 각각 10.2 wt%, 1.56 g/l로 줄어들었음을 알 수 있었다(표 1 및 도 1B, 1C 참조).

[0066] 또한, 2 mM 2-브로모알칸산화합물(2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA)을 첨가한 70 mM 프럭토즈 배지에서의 *P. aeruginosa* PA01 균주의 PHA와 람노리피드의 생산량을 확인한 결과, PA01 균주에 아무 것도 처리하지 않은 군에서는 PHA와 람노리피드가 각각 최대생산량인 13 wt%, 1.82 g/l을 보였으며, 2-BrHA 화합물을 처리하였을 때는 각각 1.4 wt%, 0.19 g/l로 감소하였고, 2-BrOA 화합물을 처리하였을 때는 각각 3.8 wt%, 0.55 g/l로 감소하였으며, 2-BrDA 화합물을 처리하였을 때는 각각 9.5 wt%, 1.80 g/l로 감소하였음을 알 수 있었다(표 1 및 도 1E, 1F 참조).

[0067] 한편, PA14 균주에서 2-브로모알칸산이 PHA와 람노리피드 생산을 저해하는 %를 계산해본 결과, 알킬기의 사슬 길이가 가장 짧은 BrHA가 가장 강한 저해 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 즉, PHA 생산에 있어서, 2-BrHA는 89.3%의 저해 효과가, 2-BrOA는 67.8% 저해 효과가, 2-BrDA는 35.5% 저해 효과가 나타났으며, 람노리피드 생산에 있어서, 2-BrHA는 87.8%, 2-BrOA는 68.2%, 2-BrDA 0.3% 저해 효과가 있는 것으로 확인되었다(도 2A). 또한, PA01 균주에서도 유사한 양상의 저해 효과가 있는 것으로 확인되었다(도 2B).

- [0068] RhIA와 PhaG 효소는 지방산합성경로에서 각각 람노리피드와 PHA 합성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 2-브로모알칸산이 람노리피드와 PHA를 생산을 저해하는 기전을 확인하기 위하여 *rhIA*와 *phaG*의 트랜스포존 돌연변이 균주를 사용하여 실험을 진행하였다. PA14 균주에서의 *rhIA* 돌연변이는 지나치게 과도한 람노리피드 발현을 나타내어 본 실험에서 배제하고, PA01 균주에서 제작한 PA01- $\Delta rhIA$ 돌연변이형을 사용하였다. 한편, *phaG* 돌연변이는 PA14균주에서 제작한 PA14- $\Delta phaG$ 돌연변이형 균주를 사용하였다.
- [0069] PA01- $\Delta rhIA$ 돌연변이형 균주는 야생형에 비하여 PHA 생산이 148% 증가한 것으로 나타났는데(도 2 참조), 이러한 결과는 RhIA와 PhaG가 동일한 지방산 전구체를 사용하는 경쟁 관계에 있기 때문인 것으로 판단된다. 그러나, 2 mM의 2-BrHA 또는 2-BrOA를 처리한 경우에는 각각 PHA 축적량이 야생형에 비하여 6.9%, 9.46%까지 현저하게 감소하는 것으로 나타났다(도 2B 참조).
- [0070] 한편, PA14- $\Delta phaG$ 돌연변이형 균주에서는 람노리피드 합성이 야생형에 비하여 76.1%인 것으로 나타났고, 2 mM 2-BrHA 또는 2-BrOA를 첨가하였을 때, 람노리피드는 각각 야생형에 비하여 3.1%, 7.5%인 것으로 나타났다(도 2A 참조).
- [0071] 이러한 2-BrHA 또는 2-BrOA에 의한 람노리피드와 PHA 합성의 강력한 억제 효과는 지방산합성경로로부터 PHA와 람노리피드 합성으로 연결되는 두 가지 효소(PhaG, RhIA)를 이중으로 타겟팅함으로써 이루어지는 것으로 판단된다(도 3 참조).
- [0072] <실시예 4>
- [0073] 2-브로모알칸산에 의한 PhaG 및 RhIA의 억제활성 분석
- [0074] 본 발명자들은 2-브로모알칸산에 의한 PHA 및 람노리피드 생산 저해 효과가 이들 생합성 경로에 관여하는 효소인 PhaG 및 RhIA의 발현을 억제하는 효과에 기인하는지 확인해 보고자, 야생형 및 돌연변이형 균주에 2-브로모알칸산을 처리한 후 RT-PCR을 수행하였다.
- [0075] RNA의 발현을 보기 위하여 세포들은 2 또는 5 mM 2-브로모알칸산을 첨가하거나 첨가하지 않은 70 mM 프럭토스가 함유된 M1 배지에서 30℃의 온도에서 72시간 성장시켰다. 상기 세포들을 모아, 제조업체의 프로토콜에 따라 RNeasy 미니키트를 사용하여 RNA를 분리하였으며, *phaG*와 *rhIA* 유전자의 발현을 보기 위하여 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 Roto-Greene SYBR Green RT-PCR 키트를 이용하여 원스텝 RT-PCR을 실시하였다.
- [0076] 그 결과, PA01 야생형과 돌연변이형에서 2-브로모알칸산을 처리하더라도 *phaG*와 *rhIA* 유전자의 발현에는 아무런 영향이 없는 것으로 나타났다(도 4A, 도 4B). 따라서, 본 발명자들은 2-브로모알칸산은 PhaG와 RhIA 효소 자체를 저해함으로써 PHA와 람노리피드의 생산을 저해하는 것으로 판단하였다.
- [0077] 2-브로모알칸산은 PhaG와 RhIA 효소를 이중으로 타겟팅하는 것으로 판단되는바, 본 발명자들은 이를 더 명확히 하고자 2-브로모알칸산이 PHA 및 람노리피드를 저해하는 억제 효과를 비교 분석하였다.
- [0078] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이 2-BrHA와 2-BrOA는 PHA와 람노리피드 합성을 모두 저해하였으며, 각각 90%, 70% 저해 활성을 나타내어 유사한 정도의 억제 효과를 나타내었으나, 2-BrDA는 PHA 합성에서 약 25~35%의 억제 효과를 나타내었고 람노리피드 합성에서는 거의 억제효과를 나타내지 않는 것으로 나타났다. 이와 같이, 2-BrDA를 처리함에 있어서 상대적으로 PHA와 람노리피드 합성 억제 효과가 다른 양상을 나타내는 것은 지방산생합성 경로의 상위 단계에 있는 특정 유전자만이 2-브로모알칸산의 유일한 타겟은 아니라는 것으로 판단된다. 즉, 본 발명에 따른 2-브로모알칸산은 PhaG 및 RhIA 각각의 작용을 이중으로 저해하는 효과를 가지고 있는 것으로 예상할 수 있었다.
- [0079] <실시예 5>

2-브로모알칸산에 의한 람노리피드 생산억제 활성과 스와밍 운동성 억제 활성 분석**<5-1> 2-브로모알칸산에 의한 람노리피드 생산억제 활성**

녹농균(*P. aeruginosa*)은 일반적으로 람노즈에 지질이 결합된 람노리피드라는 생계면활성제를 생산한다. 본 발명자들은 2-브로모알칸산 처리에 따른 람노리피드 생산 억제활성을 알아보기 위하여 람노리피드 분석을 실시하였다.

본 발명의 *P. aeruginosa*의 PA14와 PAO1에서 검출되는 람노리피드 농도는 plate assay에서 콜로니 주위의 파란색 테두리 유무로 가시화할 수 있는데, 2-브로모알칸산을 처리하지 않은 배지에서는 PA14 및 PAO1 균주가 생장하면서 파란색 테두리를 생성시키면서 람노리피드를 분비하는 것을 확인할 수 있었으나, 5 mM 2-BrHA 또는 2-BrOA를 함께 처리한 배지에서는 람노리피드 분비를 관찰할 수 없었다(도 6A).

따라서 본 발명의 2-브로모알칸산 화합물은 람노리피드를 억제할 수 있는 활성이 있음을 알 수 있었다.

<5-2> 2-브로모알칸산에 의한 스와밍 운동성 억제 활성 분석

녹농균(*P. aeruginosa*)은 '스와밍(swarming)'이라고 불리는 조직화된 다세포성 이동이 가능한데, 이러한 스와밍은 편모 뿐만 아니라 타입IV 필리의 도움을 받는 것으로 알려져 있다. 나아가 람노리피드는 그 전구체인 HAA(C10-C10)와 함께 효율적인 콜로니화를 위해 필요한 표면 상태를 유도하기 위한 표면 장력을 감소시킴으로써 스와밍 운동성에 관여하고, 따라서 *rhlA* 돌연변이는 이러한 스와밍 운동성이 결여되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명자들은 2-브로모알칸산에 의한 스와밍(Swarming) 운동성을 알아보기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

스와밍 운동성 측정용 평판배지는 M9 salt 배지에 1 mM $MgSO_4$, 0.2% 글루코스를 넣고, 0.05% 글루타메이트를 질소원으로 보충하고, 필요한 경우 5 mM 2-브로모-화합물을 첨가하였으며, 0.6% 한천으로 굳힌 배지를 이용하였다. 밤새 LB 배지에서 배양한 균주 2 μ l를 상기 스와밍 운동성 측정용 평판배지의 중앙에 접종하고, 37°C에서 16시간 배양한 뒤 추가로 30°C에서 48시간 배양하였다.

그 결과, 예상한 것과 같이 2-브로모알칸산은 녹농균의 스와밍 운동성을 저해하는 것으로 나타났고(도 6B), 이는 람노리피드 생산 억제 활성에 기인하는 것으로 판단되었다.

<실시예 6>**2-브로모알칸산에 의한 바이오필름 형성 억제 활성 분석**

한편, 녹농균은 단백질, 핵산, 엑소폴리사카라이드, DNA 등으로 구성된 세포외 기질에 둘러싸인 세포의 응집체인 바이오 필름을 형성하는 것으로 알려져 있다.

본 발명자들은 본 발명의 2-BrHA 화합물이 녹농균의 상기와 같은 바이오 필름 형성을 억제할 수 있는지 알아보기 위하여 하기의 방법으로 실험하였다.

먼저, 바이오필름 형성은 O' Toole and Kolter의 실험방법을 일부 수정하여 실시하였다. 균주를 70 mM 프럭토스를 첨가한 4 ml의 M1 배지에서 배양하였으며, 필요에 따라 5 mM 2-브로모-화합물 첨가하여 유리시험관에서 30°C 온도로 24 ~ 48시간동안 교반이 없이 반응시켰다. 바이오 필름 형성은 공기와 접촉하는 배양배지의 표면을 육안 관찰을 통해 측정하였는데, 세포와 기질 층에 의해 배양배지의 표면이 덮여 있는 경우 바이오필름으로 간주하였다. 상기 시험관은 증류수로 세척하고, 0.1% 크리스탈 바이올렛 용액으로 염색하였다. 이후 각 튜브에 4.5ml의 95% 에탄올을 추가한 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 바이오필름을 정량적으로 분석하였다.

흥미롭게도, 2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA 화합물을 처리한 경우 람노리피드가 생성되기 이전부터 바이오필름의 형성이 억제되는 것으로 확인되었다(도 6C, 6D). 한편, 바이오필름 형성의 차이는 알킬기 길이에 따라 차이가 있으며, 5mM 2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA를 처리한 배지에서 48시간 배양한 PA14의 경우 2-브로모알칸산을 처리하지 않은 경우에 비하여 바이오필름은 각각 18%, 26%, 67%로 감소되는 것으로 확인되었다. 또한, 5mM 2-BrHA, 2-BrOA, 2-BrDA를 처리한 배지에서 48시간 배양한 PAO1의 경우 2-브로모알칸산을 처리하지 않은 경우에 비하여 바

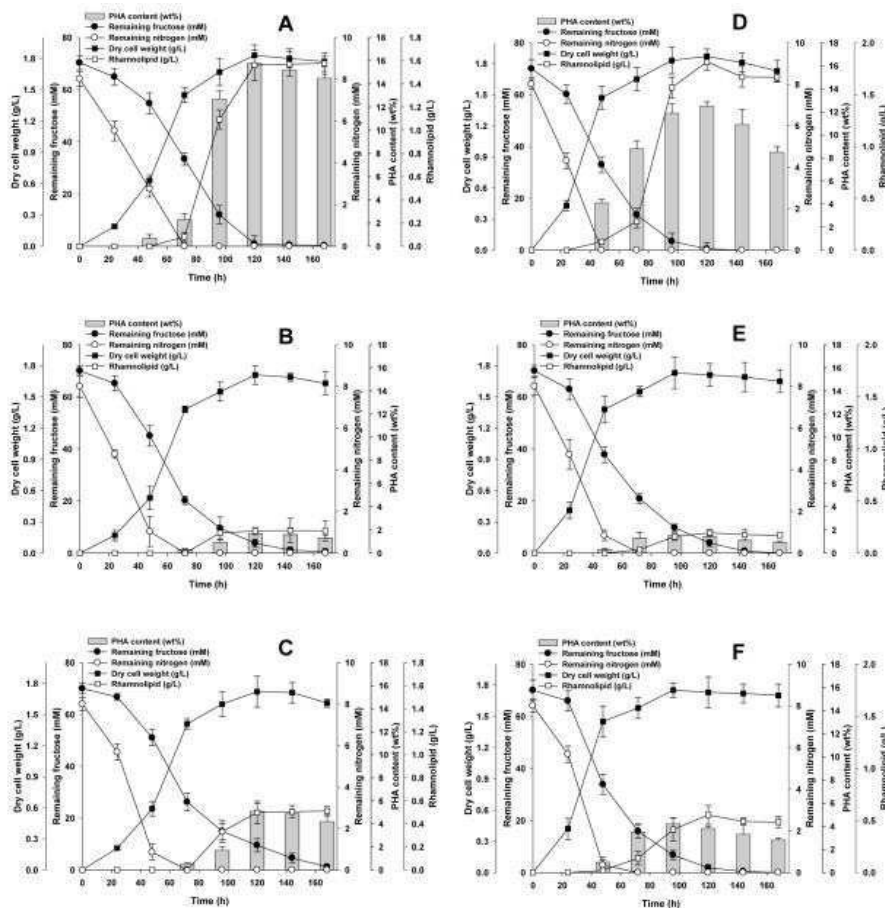
이오필름은 각각 29%, 40%, 69%로 감소되는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과를 통해, 본 발명자들은 알킬 길이가 가장 짧은 2-BrHA에서 바이오필름 억제정도가 가장 큼을 알 수 있었다(도 6D 참조).

[0095] 녹농균의 바이오 필름은 녹농균에 항생제 내성을 부여하는 것으로 알려져 있는바, 본 발명에 따른 2-브로모알칸산은 녹농균의 바이오필름 형성을 저해하여 녹농균의 항생제로 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

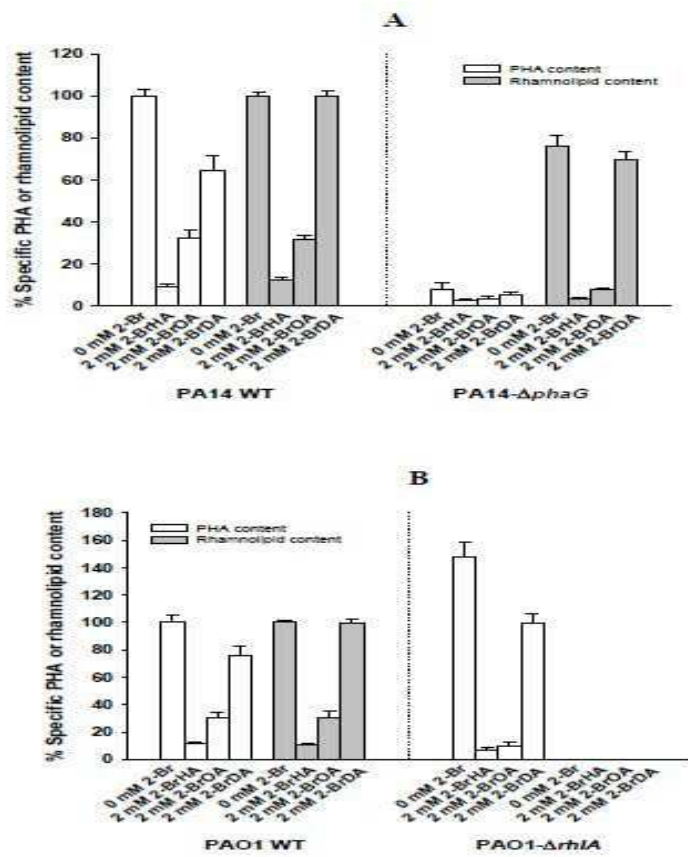
[0096] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

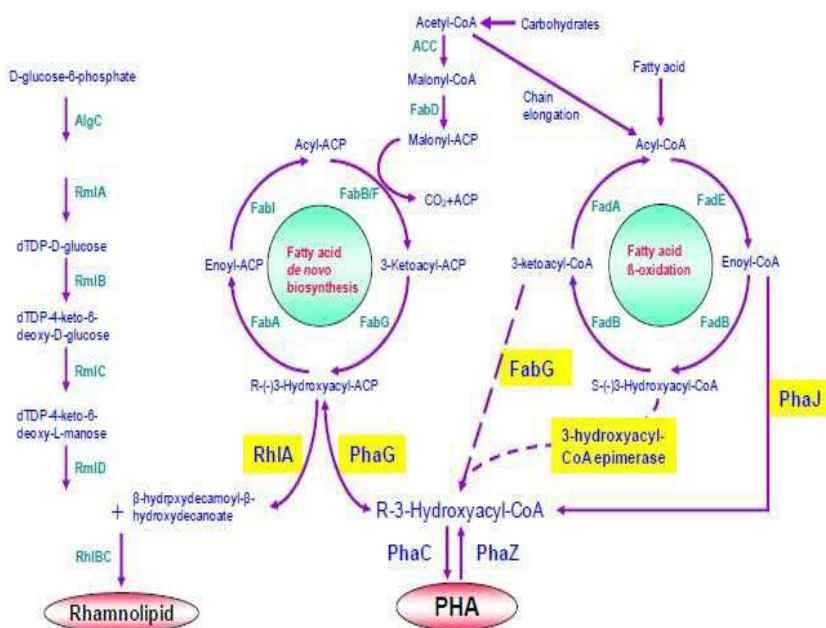
도면1



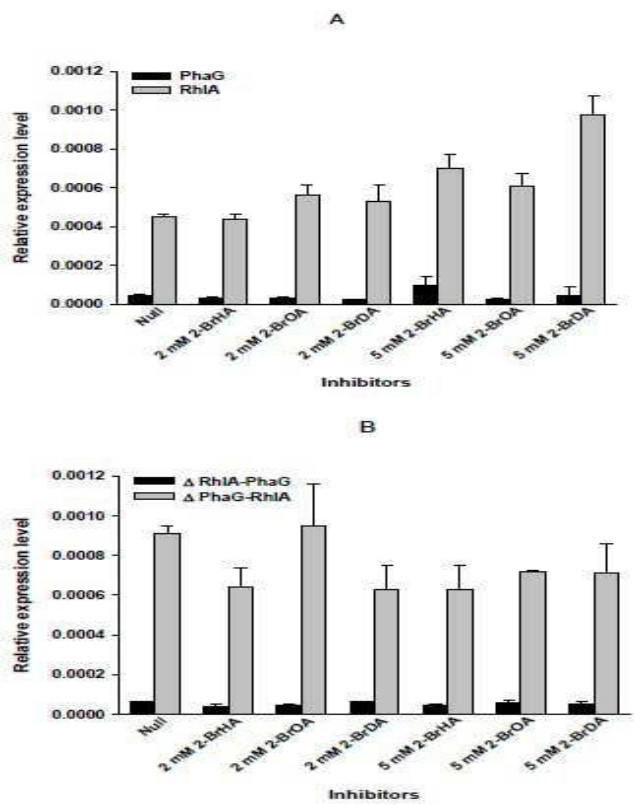
도면2



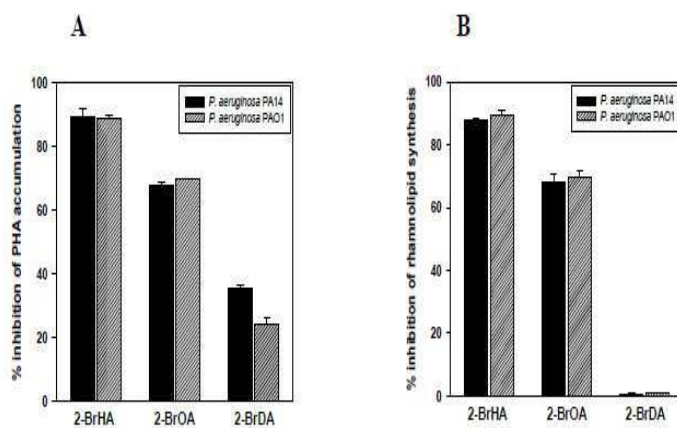
도면3



도면4



도면5



도면6

