



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0130706
(43) 공개일자 2016년11월14일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/255</i> (2006.01) <i>A61K 31/16</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/167</i> (2006.01) <i>A61K 31/265</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/505</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/255</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/16</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0048021
 (22) 출원일자 2016년04월20일
 심사청구일자 2016년04월20일
 (30) 우선권주장
 1020150062453 2015년05월04일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 조은경
 대전광역시 유성구 봉명로 48, 805동 702호 (원신
 홍동, 신안인스빌리베라)</p> <p>육재민
 대전광역시 중구 동서대로 1347, 101동 902호 (용
 두동, 늘푸른아파트)</p> <p>(74) 대리인
 김원준</p> |
|--|---|

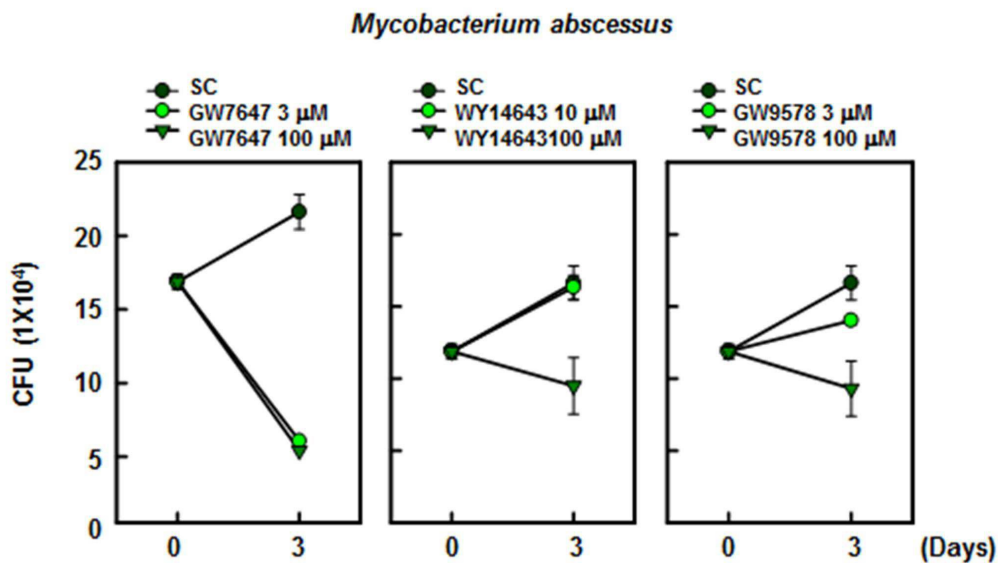
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 결핵균 또는 비결핵항산균의 감염에 의한 질환의 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 PPAR alpha 작용제를 유효성분으로 함유하는 결핵 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/167 (2013.01)

A61K 31/265 (2013.01)

A61K 31/505 (2013.01)

(72) 발명자

김이삭

대전광역시 동구 은어송로 117, 305동 903호 (가오동, 은어송마을3단지아파트)

이혜미

대전광역시 서구 가장로 106, 116-1501

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0395

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 감염병위기대응기술개발

연구과제명 자가포식 기반 결핵 방어기전 규명 및 숙주표적 병합치료 후보물질 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.06.30

명세서

청구범위

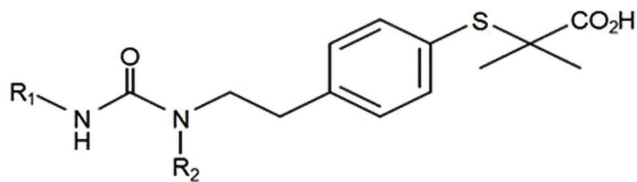
청구항 1

PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor) alpha 작용제(agonist)를 유효성분으로 함유하는 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 PPAR alpha 작용제는 화학식 1의 화합물인 것을 특징으로 하는 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 약학 조성물.



(화학식 1)

이때, R₁은 시클로헥실기, 알킬기나 할로젠이 치환된 시클로헥실기, 페닐기 또는 알킬기나 할로젠이 치환된 페닐기이며, R₂는 C7~C10의 직쇄 또는 분지쇄의 알킬기이다.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

R₁은 시클로헥실 또는 2,4-디플루오로페닐기이며, R₂는 n-헵틸 또는 4-시클로헥실부틸기인 것을 특징으로 하는 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 PPAR alpha 작용제는 4-Chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthioacetic acid(WY14643)인 것을 특징으로 하는 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비결핵항산균은 *Mycobacterium abscessus*인 것을 특징으로 하는 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 질환은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환인 것을 특징으로 하는 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵균 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미코박테리움 속 균종은 병원성 정도에 따라 절대병원성균인 결핵균 및 나병균을 포함하는 결핵균군과 상기 균을 제외한 기회감염성 균종인 비결핵항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)의 두 그룹으로 구분된다.

[0003] 결핵균은 감염 후 일정 기간 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 있는 실정이다.

[0004] 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 들 뿐만 아니라 다약제 내성 결핵에 대해서는 효능이 불투명하다는 문제가 있다. 특히 결핵균은 약 10⁶ 세포분열마다 한 개의 돌연변이주가 출현하기 때문에 최소한 2종 이상, 가능하면 4종 이상의 약제를 병용해야 하는데, 그럼에도 하나의 약제에 대한 내성이 생기는 경우 특별한 대처방법이 없다는 것이 화학요법의 가장 큰 문제점이다. 실제로 결핵으로 인한 사망률은 90년대 이후 다시 증가하고 있는데 이는 다약제내성(multi-drug resistant; MDR) 결핵균에 의한 감염 증가와 HIV/TB 동시감염의 증가가 주원인으로 판단된다. 현재 전세계적으로 약 5000만명의 다약제내성 결핵 환자가 있지만, 이에 대한 치료효율은 50% 정도 밖에 되지 않는다. 또한, 현재 전세계적으로 약 600만명의 HIV/TB 동시 감염환자가 있으며 대부분이 결핵으로 사망하는 것으로 추정되고 있다(비특허문헌 1).

[0005] 따라서 기존 약제와 작용기전이 다르고 부작용이 상대적으로 적은 새로운 항결핵제의 개발이 매우 시급한 과제이다.

[0006] 대부분의 NTM은 자연계에 널리 분포하며 균종에 따라 질환을 일으키는 발병력이 달라, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. abscessus* 등은 상대적으로 발병력이 크고, *M. fortuitum*은 상대적으로 발병력이 낮다. NTM으로 인한 질환은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증, 파종성 질환 등 4가지 특징적인 임상 증후를 나타내며, 이 중 폐질환이 NTM으로 인한 질환의 90% 이상을 차지한다. 국내에서도 최근 임상 검체에서 NTM이 분리되는 빈도와 NTM 폐질환으로 진단, 치료받는 환자들이 증가하는 추세이다.

[0007] 결핵균의 발견을 위한 항산균 도말검사서 NTM은 결핵균과 구별되지 않는다. NTM 폐질환의 빈도가 상대적으로 높은 국가에서는 항산균 도말 양성 객담의 30~50%까지 비결핵 항산균이 분리되고 있으며, 선진국화될수록 비결핵 항산균에 의한 감염 비율이 증가하는 것으로 보고되고 있다. 우리나라의 경우 비결핵 항산균 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 NTM이 분리되고 있으며 점차 그 비율이 높아지는 추세이다.

[0008] NTM 폐질환에 대한 보고는 2000년 이후 증가하고 있으며, 국내에서 NTM 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, 세팍시틴 등에 대하여 감수성을 보이지만, 일반적인 항결핵제에 모두 내성을 나타낸다(비특허문헌 2). 이에 대하여 정주용 항생제를 사용하여야 하며, 장기간의 치료기간이 필요하다는 점 등 때문에 *M. abscessus* 폐질환의 치료는 매우 어렵다. 또한 정주용 항생제를 포함한 치료를 하더라도 내과적 치료만으로 객담 균음전을 이루기는 매우 어려워 병변이 국한된 경우는 폐절제술을 고려해야 하는 어려움이 있다.

[0009] 따라서, 점점 증가하고 있는 NTM 관련 질환에 대한 치료법이 요구된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) WHO Report 2011. Global Tuberculosis Control, World Health Organization. 2011.

(비특허문헌 0002) 대한임상미생물학회지 제7권 제1호 2004 84.

발명의 내용

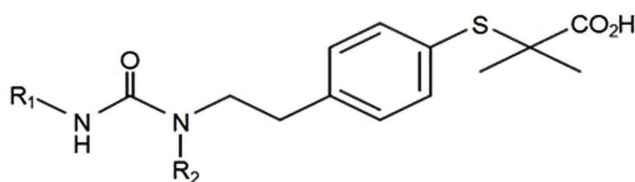
해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 일반적인 항결핵제에 대한 내성이 강하고 치료가 어려운 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환의 치료를 위한 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor) alpha 작용제(agonist)를 유효성분으로 함유하는 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서 PPAR alpha 작용제라 함은 hPPAR alpha의 50% 활성화를 10^{-5} M 이하의 농도로 달성하는 화합물을 의미한다.

[0013] 상기 PPAR alpha 작용제로는 하기 화학식 1의 화합물을 예로 들 수 있다.



[화학식 1]

[0014] 이때, R₁은 시클로헥실기, 알킬기나 할로젠이 치환된 시클로헥실기, 페닐기 또는 알킬기나 할로젠이 치환된 페닐기이며, R₂는 C7~C10의 직쇄 또는 분지쇄의 알킬기이다. 상기 화학식 1에 해당하는 여러 화합물들은 PPAR alpha 작용제의 효능이 있음이 보고된 바 있다(WO00/23407). 특히 상기 R₁은 시클로헥실 또는 2,4-디플루오로페닐기이며(GW7647), R₂는 n-헵틸 또는 4-시클로헥실부틸기(GW9578)일 수 있다.

[0016] 또는 상기 PPAR alpha 작용제는 4-Chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthioacetic acid(WY14643)일 수 있다.

[0017] 하기 실시예에 기재한 바와 같이 결핵균 또는 비결핵항산균에 감염된 대식세포에 대하여 PPAR alpha 작용제의 항균활성을 측정한 결과, 약물의 첨가 3일 후 결핵균 또는 비결핵항산균의 생존율이 현저하게 감소하여 항균력이 있음을 확인할 수 있었다. PPAR alpha 작용제들은 비결핵항산균에 비해 결핵균에서 더 낮은 농도에서 약효를 나타내어 결핵균에 더 효과적으로 작용하는 것을 시사하였다. 또한, 결핵균 또는 비결핵항산균의 생존율에 대한 PPAR alpha 작용제의 효능은 PPAR alpha 활성화 효과와 밀접한 연관성을 나타내었다. 하기 표 1은 실시예에

사용된 PPAR alpha 작용제의 EC₅₀값이다(Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 11 (2001) 1225-1227).

표 1

화합물	EC ₅₀ for PPAR alpha activation (μM)
GW7647	0.006
GW9578	0.05
WY14643	5.0

[0018]

[0019]

하기 실시예에서 확인할 수 있듯이 PPAR alpha 활성화에 대한 EC₅₀ 값이 가장 작은 (즉, PPAR alpha 작용제로서 가장 효과가 높은) GW 7647이 가장 낮은 농도에서도 결핵균 및 비결핵항산균의 생존율에 영향을 미쳤으며, EC₅₀ 값이 상대적으로 큰 WY14643의 경우 세가지 화합물 중 가장 높은 처리 농도를 요하였다.

[0020]

상기 비결핵항산균은 *Mycobacterium abscessus*일 수 있다.

[0021]

본 발명에서 비결핵균 또는 결핵항산균 감염 질환은 결핵균 또는 비결핵항산균의 감염에 의해 나타나는 모든 임상적 증상을 포함하는 것으로, 상기 질환은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환 등을 포함한다.

[0022]

본 발명에 의한 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환 치료용 조성물은 약제학적 분야에서 공지된 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.

[0023]

본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다. 일반적으로는 성인에게 1일에 체중 1kg 당 상기 화합물을 0.1~100mg의 양으로 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0024]

이상과 같이 본 발명의 조성물은 세포 내에서 결핵균 또는 비결핵항산균의 생존율을 현저하게 감소시켜 치료가 곤란할 뿐 아니라 발생 빈도가 증가하고 있는 결핵균 또는 비결핵항산균 감염 질환에 대한 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 본 발명의 일실시예에 사용된 화합물의 구조식.

도 2는 비결핵항산균의 세포 내 생존율에 대한 본 발명의 조성물의 항균 효능을 보여주는 그래프.

도 3은 결핵균의 세포 내 생존율에 대한 본 발명의 조성물의 항균 효능을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [0027] **[실시예]**
- [0028] **실시예 1 : 대식세포 수집 및 배양**
- [0029] 8주령의 야생형 C57BL/6 마우스의 골수로부터 대식세포(macrophage)를 수집하였다. 수집한 골수세포는 배양액 [DMEM(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) with 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL), sodium pyruvate, nonessential amino acids, penicillin G (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 mg/ml)]에 1×10^5 /ml의 농도로 부유시켜 37℃, 5% CO₂ 조건에서 10-cm petri dish에 부착시켰다. 2시간 후에 세포를 수집하고 원심분리하였다. 세포 배지에 대식세포 집락 인자(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)를 25 ng/ml의 농도로 첨가하여 배양액에 3~4일 동안 대식세포로 분화하여 실험에 사용하였다. 분화한 대식세포가 아닌 림프구들은 기계적인 파괴로 제거하였다.
- [0030] **실시예 2 : 비결핵항산균에 대한 약물의 효과 평가**
- [0031] **1) 비결핵항산균 감염 및 약물의 처리**
- [0032] *Mycobacterium abscessus*(ATCC 19977)는 American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 분주받았으며, 37℃, 10%OADC(oleic acid, albumin, dextrose, catalase; Becton Dickinson)와 0.05% Tween 80(Sigma-Aldrich)가 보충된 Middlebrook 7H10 agar 배지(Difco)에서 배양하였다. *Mycobacterium abscessus*를 원심분리하고 0.2% glycerol, 0.05% Tween 80과 10% OADC가 보충된 액상의 Middlebrook 7H9 배지에 재현탁한 후 후기 성장기(late log phase)까지 회전병 배양하였다. 배양액은 크라이오바이알(cryovial)에 1mL씩 분주하고, -70℃에 저장하며 사용하였다. 사용전 바이알을 녹인 후 Middlebrook 7H9 배지에 살아있는 집락형성단위(cfu)를 측정하였다.
- [0033] 실시예 1에서 준비한 마우스 대식세포 배지 내에 상기 비결핵항산균인 *Mycobacterium abscessus*를 배양 세포 1개당 감염된 균의 개체 평균수(multiplicity of infection, MOI)가 10이 되도록 첨가하여 4시간 동안 감염시켰다. 이후 세포 외부에 존재하는 균들을 제거하기 위해서 PBS로 3번 washing을 수행한 뒤에, GW7647(Sigma, G6793), GW9578(Cayman Chemical, 10011211) 또는 WY14643(Sigma, C7081)을 3~100 μM의 농도가 되도록 처리하였다. 각 화합물의 구조는 도 1에 도시하였다. 대조군으로 용매제인 0.1% DMSO를 사용하였다.
- [0034] **2) 비결핵항산균 생존율에 대한 약물의 영향 분석**
- [0035] 1)에 의해 약물을 처리한 비결핵항산균 감염 대식세포에 대해 약물 처리 3일 후 대식세포의 배양액을 제거한 후 멸균 증류수를 가하여 대식세포를 터트렸다. 대식세포 내에 존재하는 비결핵항산균을 동정하기 위하여 7H10 배지를 사용하였고, 37℃ incubator에서 14일 정도 배양한 후 집락형성단위(CFU)를 측정하여 세포내 균 생존율(intracellular survival, ICS)을 확인하고 그 결과를 도 2에 도시하였다. 도 2에서 SC는 대조군을 나타낸다.
- [0036] 도 2에서 확인할 수 있듯이 비결핵항산균의 세포 내 생존율은 약물 첨가 3일 후부터 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0037] **실시예 3 : 결핵균에 대한 약물의 효과 평가**
- [0038] **1) 결핵균 감염 및 약물의 처리**
- [0039] 감염균으로 비결핵항산균 대신 병원성 결핵균인 *Mycobacterium tuberculosis*(*M. tuberculosis*)를 사용한 것을

제외하고는 실시예 2의 1)과 동일한 방법에 의해 대식세포에 결핵균을 감염시켰다. 이후 역시 동일한 방법에 의해 GW7647(Sigma, G6793) 또는 WY14643(Sigma, C7081)을 각각 2~20 μ M 또는 10~50 μ M의 농도가 되도록 처리하였다.

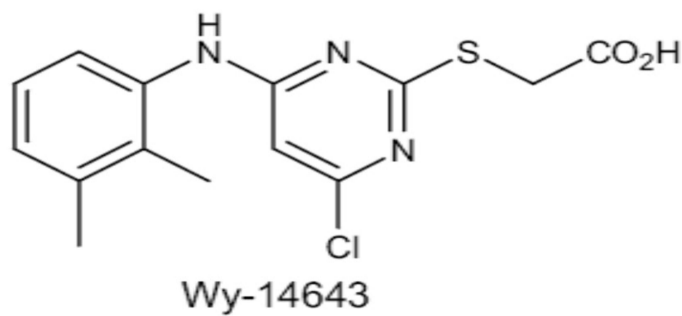
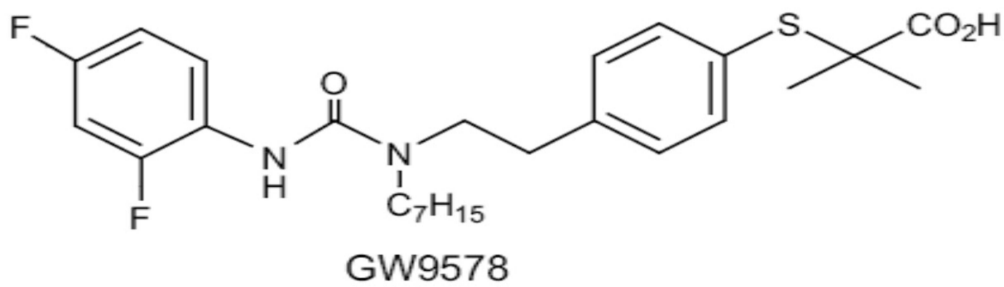
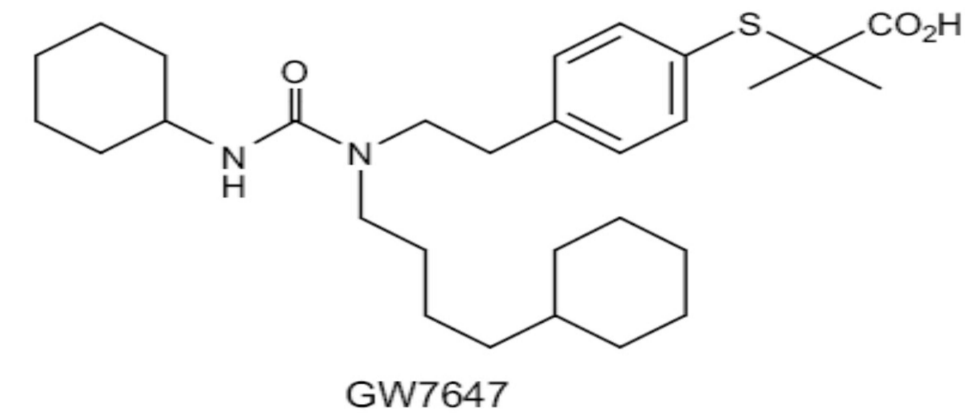
[0040] 2) 결핵균 생존율에 대한 약물의 영향 분석

[0041] 1)에 의해 약물을 처리한 결핵균 감염 대식세포에 대해 실시예 2의 2)와 동일한 방법에 의해 결핵균 생존율에 대한 약물의 영향을 평가하고 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3에서 SC는 대조군을 나타낸다.

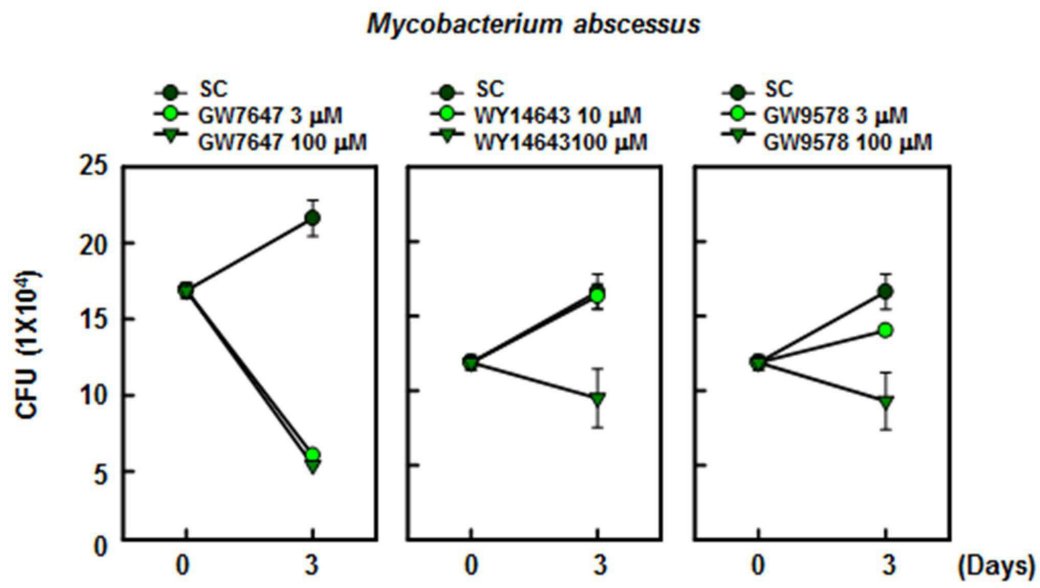
[0042] 도 3에서 확인할 수 있듯이 결핵균의 세포 내 생존율은 약물 첨가 3일 후부터 유의하게 감소하였으며, 비결핵항산균보다 약물에 민감하게 반응하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

도면1



도면2



도면3

