



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0090113
(43) 공개일자 2018년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/12 (2006.01) A61K 31/4409 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/12 (2013.01)

A61K 31/4409 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0015124

(22) 출원일자 2017년02월02일

심사청구일자 2017년02월02일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

오동찬

서울특별시 강남구 개포로110길 15, 112동 703호
(일원동, 우성7차아파트)

신연혁

서울특별시 강동구 상암로47길 80-8, 201호 (명일동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

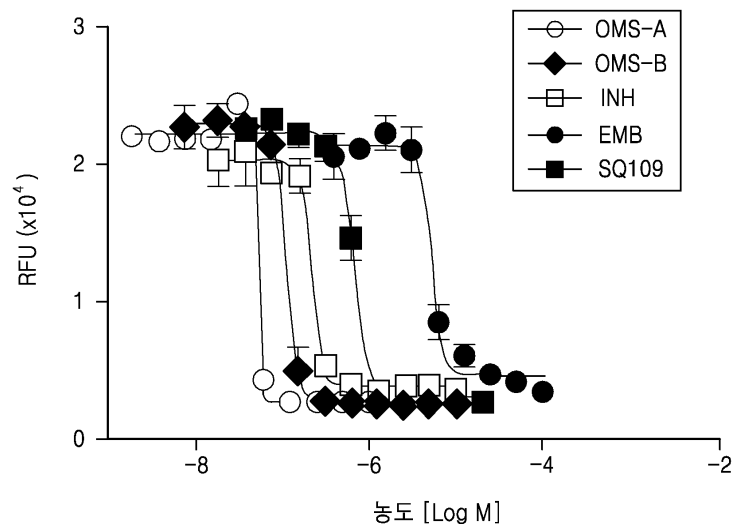
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 사이클릭 펩티드 화합물을 포함한 마이코박테리움 속 세균 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

식 1의 펩티드를 포함하는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 마이코박테리움 속(Mycobacterium sp.) 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 및 이를 이용한 방법을 제공한다. 이에 따르면, 마이코박테리아, 예를 들어 결핵균(Mycobacterium tuberculosis)에 대해 항-결핵균 활성을 갖고, 결핵균에 의해 야기된 염증 반응을 완화할 수 있으므로, 마이코박테리움 속 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
Y10S 514/924 (2013.01)

(72) 발명자

조은경

대전광역시 유성구 봉명로 48, 805동 702호 (원신
홍동, 인스빌리베라)

이혜미

대전광역시 서구 가장로 106, 116동 1501호 (가장
동, 삼성 래미안아파트)

김태성

대전광역시 유성구 송강로 15, 101동 406호 (송강
동, 한솔아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0629-20160003

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 생리활성 연계 천연물 라이브러리 구축 및 lead 천연물 대량 확보

기 여 율 35/100

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0395

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단

연구사업명 감염병위기대응기술개발

연구과제명 자가포식 기반 결핵 방어기전 규명 및 숙주표적 병합치료후보물질 발굴

기 여 율 35/100

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2017.07.01 ~ 2018.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJT200620

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양수산생물 유전체정보 분석 및 활용기반 연구

기 여 율 30/100

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.20 ~ 2022.08.31

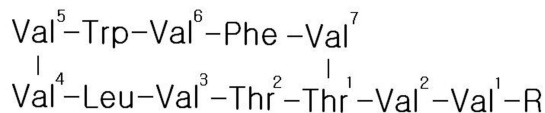
명세서

청구범위

청구항 1

하기 식 1의 펩티드를 포함하는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 마이코박테리움 속(Mycobacterium sp.) 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[식 1]



상기 식에서,

R은 H, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀ 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₂ 내지 C₂₀ 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₂ 내지 C₂₀ 알카닐기, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₂₀ 아릴기, 또는 이들의 조합이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 R은 H 또는 C₁ 내지 C₅ 알킬기인 것인 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 식 1로 표시되는 화합물로부터

Val이 Ala, Leu, Ile, Phe, Trp 또는 Met으로 치환되고;

Thr이 Gly, Ser, Cys, Tyr, Asn 또는 Gln으로 치환되고;

Leu이 Ala, Val, Ile, Phe, Trp 또는 Met으로 치환되고;

Trp이 Ala, Val, Leu, Ile, Phe 또는 Met으로 치환되고; 또는

Phe이 Ala, Val, Leu, Ile, Trp 또는 Met으로 치환된 것인 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 Trp은 4-OCH₃-Trp인 것인 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 Phe은 HO-Phe인 것인 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 식 1 중 Trp, Leu, Val¹, Val⁵, Thr², 또는 이들의 조합의 아미노산에서 펩티드 결합 중 N은 C₁ 내지 C₂₀ 알킬기가 결합된 것인 약학적 조성물.

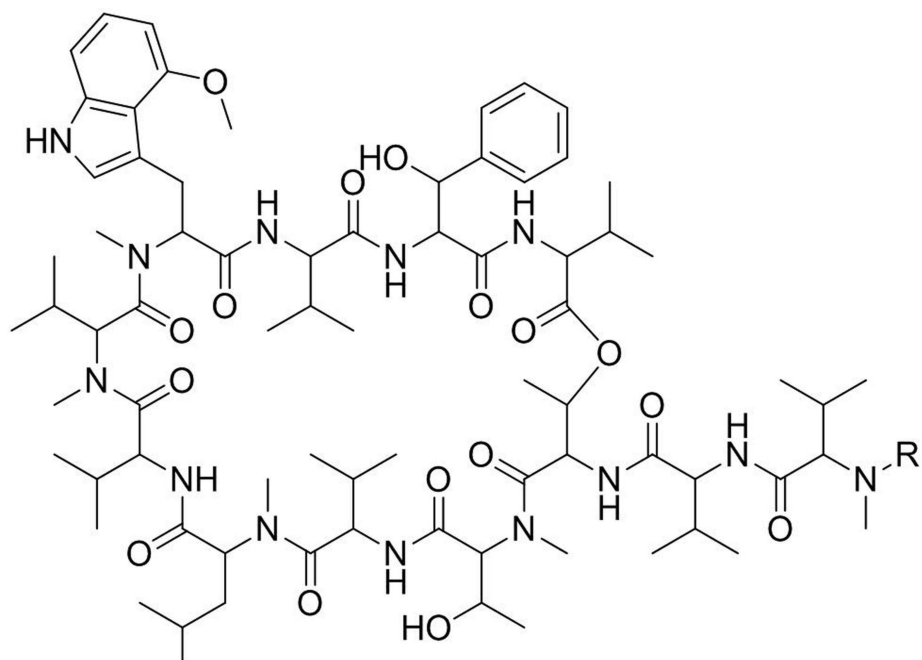
청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 알킬기는 메틸인 것인 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 식 2로 표시되는 것인 약학적 조성물:

[식 2]



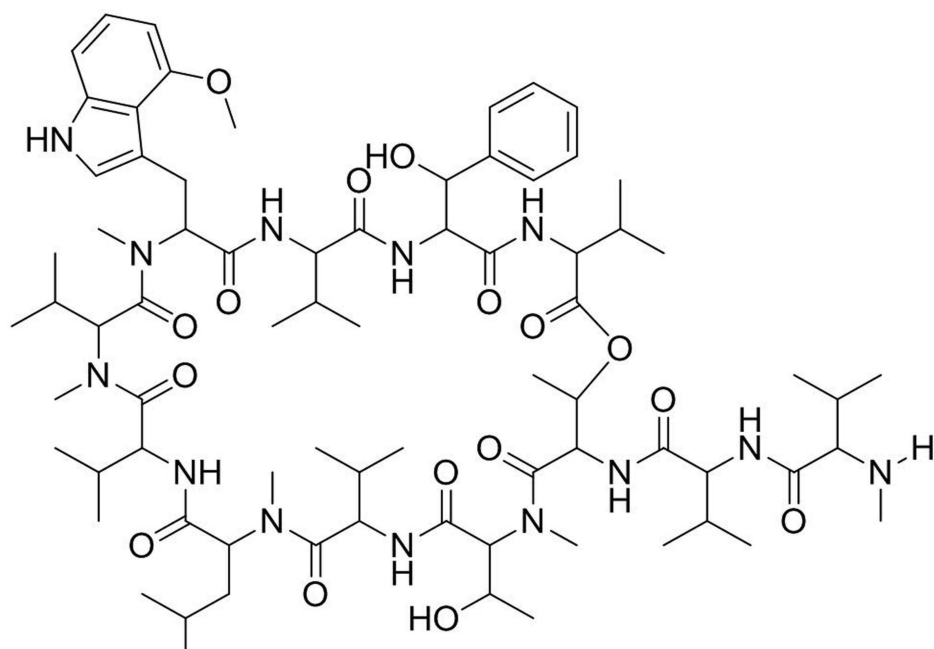
상기 식 2에서,

R은 H, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2 내지 C_{20} 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2 내지 C_{20} 알카닐기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 아릴기, 또는 이들의 조합이다.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 식 3으로 표시되는 것인 약학적 조성물:

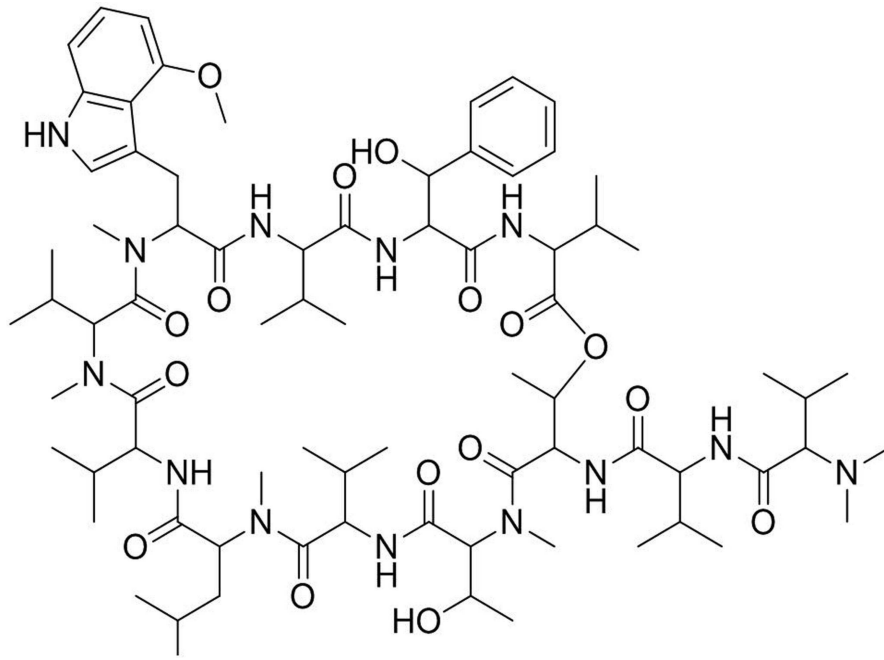
[식 3]



청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 식 4로 표시되는 것인 약학적 조성물.

[식 4]



청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 마이코박테리움 속 세균 감염증은 결핵, 한센병, 및 비결핵성 마이코박테리아 (Nontuberculous mycobacteria: NTM) 감염증으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 결핵은 다제 내성(multi drug resistance: MDR) 또는 광범위 약제 내성(Extensive drug resistance: XDR) 결핵인 것인 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 1에 있어서, 상기 마이코박테리움 속 세균 감염증과 연관된 증상은 염증인 것인 약학적 조성물,

청구항 14

청구항 1에 있어서, 상기 마이코박테리움 속 세균은 결핵균(Mycobacterium tuberculosis)인 것인 약학적 조성물.

청구항 15

청구항 1에 있어서, 상기 식 1의 펩티드를 포함하는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 대식세포의 자가소화 작용을 촉진하거나, 염증을 완화하거나, 또는 이들의 조합을 유도하는 것인 약학적 조성물.

청구항 16

청구항 1에 있어서, 항생제를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 항생제는 항-결핵제인 것인 약학적 조성물.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 항-결핵제는 이소니아지드(isoniazid), 리팜피신(rifampicin), 에탐부톨(ethambutol), SQ-109, 피라진아미드(pyrazinamide), 스트렙토마이신(streptomycin), 카나마이신(kanamycin), 카프레오마이신

(capreomycin), 에티오나미드(ethionamide), 프로티온아미드(prothionamide), 엔비오마이신(enviomycin), 파라-아미노살리실산(para-aminosalicylic acid), 시클로세린(cycloserine), 아미카신(amikacin), 레보플록사신(levofloxacin), 모시플록사신(moxifloxacin), 가티플록사신(Gatifloxacin), 오픈플록사신(ofloxacin), 테리지돈(terizidone), 티온아미드(thionamide), 에티온아미드(Ethionamide), 프로티온아미드(protionamide), 클로파지민(clofazimine), 리네졸리드(linezolid), 아목실린(amoxicillin), 클라불라네이트(clavulanate), 티오아세타존(thioacetazone), 이미페넴(imipenem), 실라스타틴(cilastatin), 클라리트로마이신(clarithromycin), 베다퀼린(bedaquiline), 델라마니드(delamanid), 리미페넴(lmipenem), 실라스틴(cilastatin), 메로페넴(Meropenem), 또는 이들의 조합인 것인 약학적 조성물.

청구항 19

청구항 1의 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 마이코박테리움 속 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 방법은 상기 개체에 항생제를 투여하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 사이클릭 펩티드 화합물을 포함한 마이코박테리움 속 세균 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이를 이용한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵(tuberculosis)은 석기 시대인 기원전 7천년 경에도 그 흔적이 발견될 정도로 오랫동안 존재해 온 감염 질환이다. 오래된 질병임에도 불구하고, 전 세계적으로 아직까지도 젊은 연령층의 사망 원인 중 상당수를 차지하고 있다. 결핵을 일으키는 결핵균(Mycobacterium tuberculosis)은 1882년 독일의 세균학자인 로버트 코흐(Robert Koch)에 의해 알려지게 되었다. 결핵균에 감염된다고 해서 모두 결핵이 발병하는 것은 아니며, 체내에 감염되어 있다가 면역력이 낮아졌을 때 발병하게 된다. 현재 전세계 인구의 약 30%가 결핵균에 감염되어 있을 것으로 추측되고 있다. 결핵균은 일반적인 감염성 세균에 비하여 그 증식 속도가 느리지만, 대식세포 내에서도 생존하면서 돌연변이를 일으켜 다양한 약물에 내성을 나타내는 것이 특징이다. 따라서, 결핵 치료 방법으로, 일반적인 단일 약물 처방으로는 치료 효과를 보기 힘들고, 다양한 약제를 혼용하는 요법으로 장기간 치료 치료하는 것이 권장되고 있다.

[0003] 항-결핵제로 이소니아지드, 리팜피신, 에탐부톨, 피라진아미드, 스트렙토마이신, 카나마이신 등 다양한 화합물이 사용되고 있다. 그러나, 이소니아지드는 말초신경염을 야기할 수 있고, 리팜피신은 혈소판 감소, 스트렙토마이신은 평형장애나 난청, 또는 말초신경장애를 유발하고, 에탐부톨은 시력장애의 원인이 될 수 있고, 피라진아미드는 고노산 혈증의 원인이 되기도 한다. 이처럼 항-결핵균 치료제의 종류가 다양하지 않고 각각의 약제들이 지니고 있는 다양한 부작용 증상 때문에 처방 횟수나 용량이 제한적이라는 문제가 있다. 이외에도 항결핵 활성을 갖는 화합물이 개발되고 있다(한국 공개 10-2015-0144812 (2015.12.28)).

[0004] 따라서, 항결핵 활성을 갖고 부작용이 적은 새로운 항결핵제를 선별할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 사이클릭 펩티드 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 마이코박테리움 속(Mycobacterium sp.) 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0006] 사이클릭 펩티드 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 이용하여 마이코박테리움 속 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상에 따르면, 식 1의 펩티드를 포함하는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 마이코박테리움 속 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 다른 양상에 따르면, 상기 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 이용하여 마이코박테리움 속 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 식 1의 펩티드를 포함하는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 마이코박테리아, 예를 들어 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 대해 항-결핵균 활성을 갖고, 결핵균에 의해 야기된 염증 반응을 완화할 수 있으므로, 마이코박테리움 속 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상을 예방 또는 치료하는데 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1a 및 도 1b는 각각 오명사마이신 A(OMS-A) 및 오명사마이신 B(OMS-B)의 구조식이다.

도 2는 화합물의 농도에 따른 항-결핵균 활성을 나타내는 그래프이다(○: OMS-A, ◆: OMS-B, □: 이소니아지드, ●: 에탐부톨, ■: SQ109, RFU: 상대적 형광 강도(relative fluorescence unit)).

도 3a 및 도 3b는 각각 OMS-A 및 OMS-B의 투여시, 배양 시간(일)에 따른 콜로니 형성 단위(colony forming unit: CFU)를 나타내는 그래프이다.

도 4는 OMS-A, OMS-B, 또는 이들의 조합의 농도에 따른 CFU 값을 나타내는 그래프이다.

도 5a 및 도 5b는 각각 OMS-A의 농도에 따른 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*)에 감염된 초파리의 생존율(%) 및 초파리 내에 존재하는 M. 마리눔의 CFU 값을 나타내는 그래프이다.

도 6a는 OMS-A 또는 OMS-B의 존재에 따른 DAPI 및 항-LC3 항체로 염색된 대식세포의 이미지이고, 도 6b는 OMS-A 또는 OMS-B의 존재에 따른 대식세포 당 LC3 반점의 개수를 나타내는 그래프이다.

도 7a는 OMS-A 또는 OMS-B의 존재에 따른 대식세포의 면역 블로팅 이미지이고, 3-메틸아데닌(3-methyladenine: 3-MA) 또는 바필로마이신 A1(Bafilomycin A1: Baf-A)의 사전 처리에 따른 대식세포의 면역 블로팅 이미지이다.

도 8은 OMS-A 또는 OMS-B를 처리한 대식세포를 유세포분석법으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 OMS-A 또는 OMS-B를 처리한 대식세포를 면역형광 염색한 이미지이다.

도 10a 및 도 10b는 각각 LC3에 대하여 획득된 형광 이미지 및 Mtb 파고솜과 LC3의 공통-지역의 비율(%)을 나타내는 그래프이고, 도 10c 및 도 10d는 각각 LAMP2에 대하여 획득된 형광 이미지 및 Mtb 파고솜과 LAMP2의 공통-지역의 비율(%)을 나타내는 그래프이다.

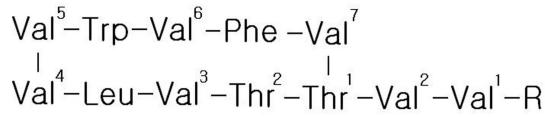
도 11a 및 도 11b는 각각 OMS-A 및 OMS-B에 의한 면역블로팅 이미지이다.

도 12a는 오명사마이신의 양에 따른 결핵균-감염 대식세포에서 분비된 사이토카인의 양을 나타내는 그래프이고, 도 12b는 결핵균-감염 대식세포에서 OMS-A 또는 OMS-B를 처리한 경우, NF-κB의 발현 수준을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 일 양상은 하기 식 1의 펩티드를 포함하는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 마이코박테리움 속(*Mycobacterium* sp.) 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] [식 1]



[0013]

[0014]

상기 식 1에서, Val, Thr, Leu, Trp, 및 Phe은 각각 발린, 트레오닌, 류신, 트립토판, 및 페닐알라닌을 의미한다.

[0015]

상기 식에서, R은 H, 치환 또는 비치환된 C₁ 내지 C₂₀ 알킬기, 치환 또는 비치환된 C₂ 내지 C₂₀ 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C₂ 내지 C₂₀ 알카닐기, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₂₀ 아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 알킬기는 예를 들면, C₁ 내지 C₁₅, C₁ 내지 C₁₀, C₁ 내지 C₅, 또는 C₁ 내지 C₃인 알킬기일 수 있다. 상기 알킬기는 예를 들면, 메틸기일 수 있다. 상기 알케닐기는 예를 들면, C₂ 내지 C₁₅, C₂ 내지 C₁₀, 또는 C₂ 내지 C₅인 알케닐기일 수 있다. 상기 알카닐기는 예를 들면, C₂ 내지 C₁₅, C₂ 내지 C₁₀, 또는 C₂ 내지 C₅인 알카닐기일 수 있다. 상기 아릴기는 예를 들면, C₃ 내지 C₁₅, C₃ 내지 C₁₀, 또는 C₃ 내지 C₅인 아릴기일 수 있다.

[0016]

상기 화합물의 아미노산은 물리화학적 성질이 유사한 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 발린, 류신, 트립토판, 또는 페닐알라닌은 비극성 R기를 갖는 다른 아미노산 또는 이의 유도체로 치환될 수 있다. 예를 들면, 발린은 알라닌(Ala), 류신(Leu), 이소류신(Ile), 페닐알라닌(Phe), 트립토판(Trp) 또는 메티오닌(Met)으로 치환될 수 있다. 예를 들면, 류신은 알라닌(Ala), 발린(Val), 이소류신(Ile), 페닐알라닌(Phe), 트립토판(Trp) 또는 메티오닌(Met)으로 치환될 수 있다. 예를 들면, 트립토판은 알라닌(Ala), 발린(Val), 류신(Leu), 이소류신(Ile), 페닐알라닌(Phe), 또는 메티오닌(Met)으로 치환될 수 있다. 예를 들면, 페닐알라닌은 알라닌(Ala), 발린(Val), 류신(Leu), 이소류신(Ile), 트립토판(Trp) 또는 메티오닌(Met)으로 치환될 수 있다. 트레오닌은 극성 R기를 갖는 다른 아미노산 또는 이의 유도체로 치환될 수 있다. 예를 들면, 트레오닌은 글리신(Gly), 세린(Ser), 시스테인(Cys), 티로신(Tyr), 아스파라긴(Asn) 또는 글루타민(Gln)으로 치환으로 치환될 수 있다.

[0017]

상기 Trp은 R기의 4번째 탄소에 메톡시기가 결합된 것인 4-OCH₃-Trp일 수 있다.

[0018]

상기 Phe은 β 탄소에 히드록시기가 결합된 것인 β-OH-Phe일 수 있다.

[0019]

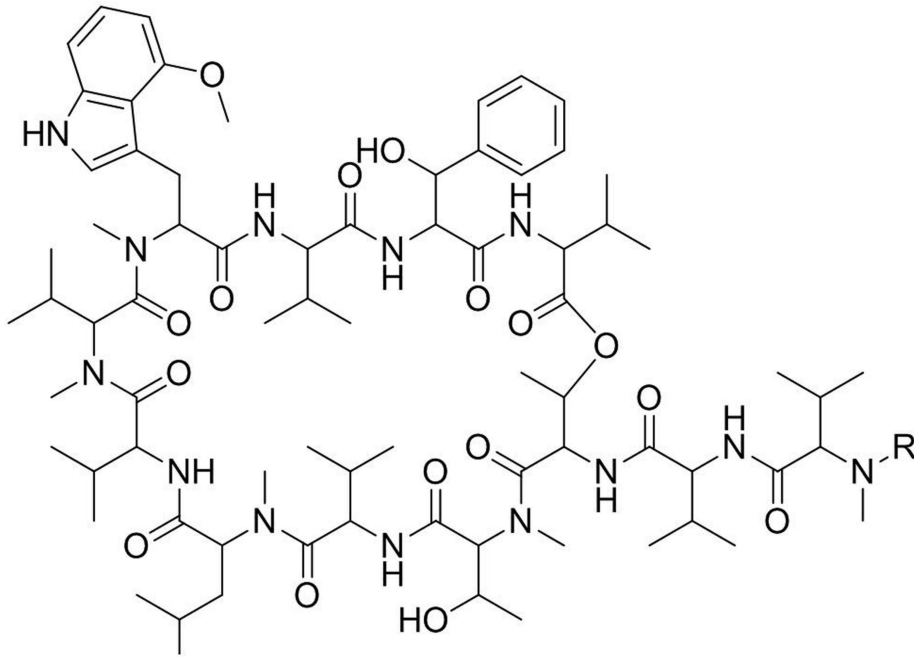
상기 화합물은 아미노산의 아미노기에 C₁ 내지 C₂₀, C₁ 내지 C₁₅, C₁ 내지 C₁₀, C₁ 내지 C₅, 또는 C₁ 내지 C₃의 알킬기가 결합된 것인 화합물일 수 있다. 예를 들면, Trp, Leu, Val¹, Val⁵, Thr², 또는 이들의 조합의 아미노산은 그의 아미노기에 C₁ 내지 C₂₀ 알킬기가 결합된 것인 화합물일 수 있다. 예를 들면, 상기 알킬기는 메틸일 수 있다.

[0020]

상기 화합물은 식 2로 표시되는 것인 화합물일 수 있다.

[0021]

[식 2]



[0022]

[0023]

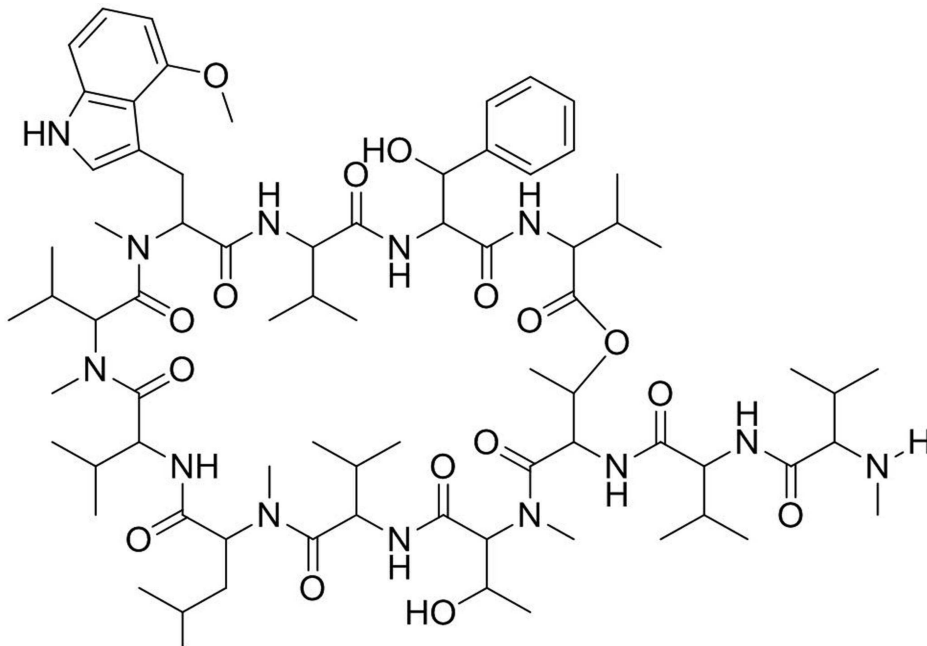
상기 식 2에서, R은 H, 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{20} 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2 내지 C_{20} 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2 내지 C_{20} 알카닐기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 아릴기, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0024]

상기 화합물은 식 3으로 표시되는 것인 화합물일 수 있다.

[0025]

[식 3]



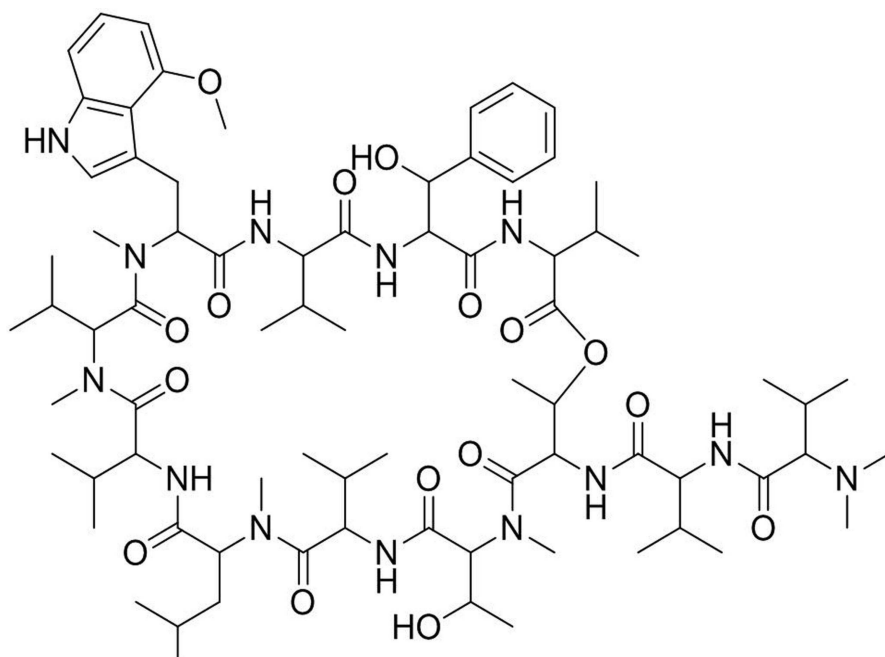
[0026]

[0027]

상기 화합물은 식 4로 표시되는 것인 화합물일 수 있다.

[0028]

[식 4]



[0029]

[0030]

상기 "치환"은 유기 화합물 중의 하나 이상의 수소 원자를 다른 원자단으로 치환하여 유도체를 형성한 경우 수소 원자 대신에 도입되는 것을 말하고, "치환기"는 도입된 원자단을 말한다.

[0031]

치환기는 예를 들면, 할로젠 원자, 할로젠 원자, 할로젠 원자로 치환된 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기(예: CCF_3 , $CHCF_2$, CH_2F , CCl_3 등), C_1 내지 C_{20} 의 알콕시, C_2 내지 C_{20} 의 알콕시알킬, 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미노기, 아미디노기, 히드라진, 히드라존, 카르복실기나 그의 염, 술폰닐기, 술포모일(sulfamoyl)기, 술폰산기나 그의 염, 인산이나 그의 염, 또는 C_1 내지 C_{20} 알킬기, C_2 내지 C_{20} 알케닐기, C_2 내지 C_{20} 알키닐기, C_1 내지 C_{20} 헤테로알킬기, C_6 내지 C_{20} 아릴기, C_6 내지 C_{20} 아릴알킬기, C_6 내지 C_{20} 헤테로아릴기, C_7 내지 C_{20} 헤테로아릴알킬기, C_6 내지 C_{20} 헤테로아릴옥시기, 및 C_6 내지 C_{20} 헤테로아릴옥시알킬기 또는 C_6 내지 C_{20} 헤테로아릴알킬기일 수 있다.

[0032]

용어 "알킬"은 완전 포화된 분지형 또는 비분지형 (또는, 직쇄 또는 선형) 탄화수소를 말한다. 상기 알킬은 C_1 내지 C_{20} , C_1 내지 C_{15} , C_1 내지 C_{10} , 또는 C_1 내지 C_5 인 알킬기일 수 있다. 알킬의 비제한적인 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, sec-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, iso-아밀, n-헥실, 3-메틸헥실, 2,2-디메틸펜틸, 2,3-디메틸펜틸, 또는 n-헵틸 등을 들 수 있다.

[0033]

상기 용어 "알케닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 말한다. 상기 C_2 - C_{20} 의 알케닐기는 예를 들면, C_2 내지 C_{15} , C_2 내지 C_{10} , 또는 C_2 내지 C_5 인 알케닐기일 수 있다. 알케닐기의 비제한적인 예로는 비닐, 알릴, 부테닐, 이소프로페닐, 또는 이소부테닐 등을 들 수 있다.

[0034]

상기 용어 "알키닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 갖는 분지형 또는 비분지형 탄화수소를 말한다. 상기 C_2 - C_{20} 의 알키닐기는 예를 들면, C_2 내지 C_{15} , C_2 내지 C_{10} , 또는 C_2 내지 C_5 인 알키닐기일 수 있다. 알키닐기의 비제한적인 예로는 에티닐, 부티닐, 이소부티닐, 이소프로피닐 등을 들 수 있다.

[0035]

상기 용어 "아릴"은 방향족 고리가 하나 이상의 탄소 고리에 융합된 그룹도 포함한다. 상기 C_6 - C_{30} 의 아릴기는 예를 들면, C_6 내지 C_{15} , 또는 C_6 내지 C_{10} 인 아릴기일 수 있다. 아릴의 비제한적인 예로는, 페닐, 나프틸, 또는 테트라히드로나프틸 등을 들 수 있다.

[0036]

상기 용어 "이성질체(isomer)"는 분자식은 같지만 분자 내에 있는 구성 원자의 연결 방식이나 공간 배열이 동일하지 않은 화합물을 말한다. 이성질체는 예를 들면, 구조 이성질체(structural isomers), 및 입체이성질체(stereoisomer)를 포함한다. 상기 입체이성질체는 부분입체 이성질체(diastereomer) 또는 거울상 이성질체(enantiomer)일 수 있다. 거울상이성질체는 왼손과 오른손의 관계처럼 그 거울상과 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하고, 광학 이성질체(optical isomer)라고도 한다. 거울상 이성질체는 키랄 중심 탄소에 4개 이상의 치환기가

서로 다른 경우 R(Rectus: 시계방향) 및 S(sinister: 반시계 방향)로 구분한다. 부분입체이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하고, 원자의 공간 배열이 달라 생기 시스(cis)-트랜스(trans) 이성질체로 나눌 수 있다.

- [0037] 상기 용어 "유도체(derivative)"는 상기 화합물의 구조 일부를 다른 원자나 원자단으로 치환하여 얻어지는 화합물을 말한다.
- [0038] 용어 "용매화물(solvate)"는 유기 또는 무기 용매에 용매화된 화합물을 말한다. 상기 용매화물은 예를 들어, 수화물이다.
- [0039] 상기 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 화합물의 무기 및 유기산 부가염을 말한다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 염일 수 있다. 상기 무기산염은 염산염, 브롬산염, 인산염, 황산염, 또는 이황산염일 수 있다. 상기 유기산염은 포름산염, 초산염, 아세트산염, 프로피온산염, 젖산염, 옥살산염, 주석산염, 말산염, 말레인산염, 구연산염, 푸마르산염, 베실산염, 캄실산염, 에디실염, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산염, 벤조산염, 글루콘산염, 메탄술폰산염, 글리콜산염, 숙신산염, 4-톨루엔술폰산염, 갈락투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산, 또는 아스파르트산염일 수 있다. 상기 금속염은 칼슘염, 나트륨염, 마그네슘염, 스트론튬염, 또는 칼륨염일 수 있다.
- [0040] 상기 마이코박테리움 속 세균 감염증은 결핵, 한센병, 및 비결핵성 마이코박테리아(Nontuberculous mycobacteria: NTM) 감염증으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 결핵은 다제 내성(multi drug resistance: MDR) 또는 광범위 약제 내성(Extensive drug resistance: XDR) 결핵일 수 있다. 상기 다제 내성 결핵은 이소니아지드(isoniazid)와 리팜피신(rifampicin)을 인체에 투여해도 결핵균이 사멸하지 않는 결핵일 수 있다. 광범위 약제 내성 결핵은 이소니아지드와 리팜피신 뿐만 아니라 퀴놀론 계통과 주사제에 동시에 내성을 가지는 결핵일 수 있다.
- [0041] 상기 마이코박테리움 속 세균 감염증과 연관된 증상은 기침, 가슴 통증, 발열, 오한, 식욕감소, 체중감소, 염증, 또는 이들의 조합일 수 있다. 예를 들어, 마이코박테리움 속 세균 감염증과 연관된 증상은 마이코박테리움 속 세균에 의해 유도된 염증일 수 있다.
- [0042] 상기 마이코박테리움 속 세균은 방선균류(Actinobacteria)의 코리네박테리움(Corynebacterineae)에 속하는 세균이다. 마이코박테리움 속 세균은 항산성(acid-fast)을 가질 수 있다. 상기 마이코박테리움 속 세균은 예를 들어 결핵균(Mycobacterium tuberculosis), 마이코박테리움 보비스(M. bovis), 마이코박테리움 아프리카눔(M. africanum), 마이코박테리움 마이크로티(M. microti), 및 마이코박테리움 레프라에(M. leprae)이다.
- [0043] 상기 식 1의 펩티드를 포함하는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 대식세포의 자가소화 작용을 촉진하거나, 염증을 완화하거나, 또는 이들의 조합을 유도할 수 있다.
- [0044] 상기 조성물은 항생제를 더 포함할 수 있다. 상기 항생제는 항-결핵제(antituberculous drug)일 수 있다. 상기 항-결핵제는 예를 들어 이소니아지드(isoniazid), 리팜피신(rifampicin), 에탐부톨(ethambutol), SQ-109, 피라진아미드(pyrazinamide), 스트렙토마이신(streptomycin), 카나마이신(kanamycin), 카프레오마이신(capreomycin), 에티오나미드(ethionamide), 프로티오나미드(prothionamide), 엔비오마이신(enviomycin), 파라-아미노살리실산(para-aminosalicylic acid), 시클로세린(cycloserine), 아미카신(amikacin), 레보플록사신(levofloxacin), 모ξι플록사신(moxifloxacin), 가티플록사신(Gatifloxacin), 오픈플록사신(ofloxacin), 테리지돈(terizidone), 티오나미드(thionamide), 에티오나미드(Ethionamide), 프로티오나미드(protionamide), 클로파지민(clofazimine), 리네졸리드(linezolid), 아목실린(amoxicillin), 클라불라네이트(clavulanate), 티오아세트아존(thioacetazone), 이미페넴(imipenem), 실라스타틴(cilastatin), 클라리트로마이신(clarithromycin), 베다퀼린(bedaquiline), 델라마니드(delamanid), 리미페넴(lmipenem), 실라스틴(cilastatin), 메로페넴(Meropenem), 또는 이들의 조합이다. 상기 식 1의 펩티드를 포함하는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염과 상기 항생제는 단일 또는 별개의 조성물일 수 있다.
- [0045] 상기 용어 "예방"은 조성물의 투여에 의해 질병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 상기 용어 "치료"는 조성물의 투여에 의해 질병의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0046] 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 담체, 부형제 및 희석제는 예를 들면, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐

피콜리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유를 포함할 수 있다.

[0047] 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0048] 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구 투여를 위한 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제일 수 있다. 상기 고형 제제는 부형제를 더 포함할 수 있다. 부형제는 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 또는 젤라틴일 수 있다. 또한, 상기 고형 제제는 마그네슘 스테아레이트, 또는 탈크와 같은 윤활제를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 또는 시럽제일 수 있다. 상기 액상 제제는 물, 또는 리퀴드 파라핀을 포함할 수 있다. 상기 액상 제제는 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 또는 보존제를 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 또는 및 좌제일 수 있다. 비수성용제 또는 현탁제는 식물성 기름 또는 에스테르를 포함할 수 있다. 식물성 기름은 예를 들면, 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 또는 올리브 오일일 수 있다. 에스테르는 예를 들면 에틸올레이트일 수 있다. 좌제의 기제는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 또는 글리세로젤라틴일 수 있다.

[0049] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 상기 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 예를 들면, 약 0.0001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 또는 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 24회, 2일 내지 1주에 1 내지 7회, 또는 1개월 내지 12개월에 1 내지 24회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 약학적 조성물에서 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 용매화물, 또는 약학적으로 허용가능한 염은 전체 조성물 총 중량에 대하여 약 0.0001 중량% 내지 약 10 중량%, 또는 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%로 포함될 수 있다.

[0050] 투여 방법은 경구, 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 예를 들어, 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 또는 피내 경로일 수 있다. 상기 조성물은 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 함께 투여될 수 있다.

[0051] 다른 양상은 일 양상에 따른 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 마이크로박테리움 속 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0052] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 마이크로박테리움 속 세균 감염증 또는 이와 연관된 증상을 앓고 있거나, 앓을 가능성이 큰 개체일 수 있다.

[0053] 상기 방법은 상기 개체에 항생제를 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 항생제는 식 1의 펩티드를 포함하는 화합물, 이의 이성질체, 유도체, 또는 약학적으로 허용가능한 염과 동시, 개별, 또는 순차로 상기 개체에 투여될 수 있다.

[0054] 투여 방법은 경구, 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 예를 들어, 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 또는 피내 경로일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 함께 투여될 수 있다.

[0055] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.

[0056] 본 명세서에서 "포함"이라는 용어는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 추가 또는/및 개제할 수 있음을 나타내도록 사용된다.

- [0057] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] **실시예 1. 오명사마이신의 항-결핵균 활성의 확인**
- [0059] **1. 스트렙토마이세스 속 SNJ042 균주의 배양**
- [0060] 해양 유래 세균 스트렙토마이세스 속 SNJ042 균주를 준비하였다(한국 특허 등록번호 10-1522625(2015.05.18)).
- [0061] 스트렙토마이세스 속 SNJ042 균주를 YEME 고체 배지(물 1L 당 맥아 추출물 10 g, 효모 추출물 4 g, 글루코스 2 g, 인공 바다 소금 34 g, 한천 18 g)에 접종하고 30℃에서 약 14일 동안 1차 배양하였다.
- [0062] 그 후, 균주가 생산한 포자를 125 mL의 YEME 액체 배지(물 1L 당 맥아 추출물 10 g, 효모 추출물 4 g, 글루코스 4 g, 인공 바다 소금 34 g)에 접종하고, 약 2일 동안 약 28℃의 온도에서 약 180 rpm의 속도로 진탕하면서 배양하였다. 14 mL의 액체 배양액을 1 L의 A1+C 액체 배지(물 1L 당 녹말 10 g, 효소 추출물 4 g, 펩톤 2 g, 탄산칼슘 1 g, 인공 바다 소금 34 g)에 접종하고, 약 6 내지 7일 동안 약 28℃의 온도에서 약 180 rpm의 속도로 진탕하면서 배양하였다.
- [0063] 1 L 액체 배지의 총 108개에 상기 균주를 접종하여, 총 108 L의 배지에 스트렙토마이세스 속 SNJ042 균주를 배양하였다.
- [0064] **2. 오명사마이신의 분리**
- [0065] 분별 깔대기에 1.에 기재된 바와 같이 배양한 SNJ042 균주 배양액 1 L와 1.5 L의 에틸아세테이트를 주입하였다. 깔대기의 입구를 봉한 뒤, 약 2분 동안 격렬하게 용액을 혼합한 후 약 1 분 동안 방치하는 과정을 2회 반복하고, 3분 동안 방치하였다. 그 후, 물 층을 제거하고, 에틸아세테이트 층을 수득하였다. 수득된 에틸아세테이트 층에 100 g의 무수 소듐 술페이트(anhydrous sodium sulfate)를 가하여 수분을 제거한 후, 에틸아세테이트 층을 거름종이에 여과하였다. 여과된 용액을 감압하여 에틸아세테이트를 증발시키고 용액을 농축시켰다. 이 과정을 반복하여, 총 108 L의 배양액에서 12 g의 조 추출물(crude extract)을 수득하였다.
- [0066] 조추출물을 2회에 걸쳐 역상 크로마토그래피(Sepak® C₁₈ 20 g, reversed-phase)를 이용하여 5개의 분획으로 나누었다. 분획을 위해 물과 메탄올을 용매로 사용하였고, 각 200 mL의 20%(v/v), 40%(v/v), 60%(v/v), 80%(v/v), 및 100%(v/v)의 메탄올/물 용액을 사용하였다. 20%(v/v)의 메탄올/물 용액을 사용하여 분획을 시작하였고, 이후 메탄올의 농도를 높이면서(20%(v/v) 메탄올/물 → 100%(v/v) 메탄올) 분획을 진행하였다. 100%(v/v) 메탄올을 이용한 분획이 끝난 후, 각 200 mL의 5개의 분획물을 20 µL씩 LC/MS 분석용 바이알에 옮겨 담아 LC/MS를 이용하여 분석하였다. 사용된 컬럼은 역상 HPLC 컬럼(reversed-phase HPLC 컬럼, Phenomenex, C₁₈ (2), 100 X 4.6 mm)이고, 농도구배 용매 조건(20분간 10%(v/v) 내지 100%(v/v)의 아세토나이트릴/물)에서 분석하였다. 머무름 시간(retention time: *t_R*)과 자외선 스펙트럼, 질량 스펙트럼을 통해서, 분획 4(80%(v/v) 메탄올/물)와 분획 5(100%(v/v) 메탄올/물)에 표적 물질인 오명사마이신(Ohmyungsamycin: OMS)-A와 OMS-B가 포함되어 있음을 확인하였다.
- [0067] 분획 4와 5를 감압농축기로 농축한 뒤 100%(v/v) 메탄올에 용해시키고, 농도구배 용매 조건(20분간 40%(v/v) 내지 56%(v/v)의 아세토나이트릴/물, 이후 60%(v/v) 아세토나이트릴/물)을 이용하여 역상 HPLC 컬럼(Kromacil, C₁₈ (2), 250 X 10 mm)으로 분리하였다. OMS-A와 OMS-B 화합물은 위 분리 조건에서 HPLC 주입 후 각각 약 32분 및 34분 후에 용출되었다. 수득된 OMS-A와 OMS-B는 전술한 바와 같이 LC/MS를 이용하여 순도를 확인하였다. 최종적으로 순수한 70 mg의 OMS-A 및 20 mg의 OMS-B를 분리하였다.
- [0068] **3. 결핵균에 대한 오명사마이신의 최소 저해 농도의 측정**
- [0069] OMS-A와 OMS-B가 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*: Mtb)을 저해하는지 여부를 확인하기 위해, OMS-A와 OMS-B의 최소 저해 농도(minimum inhibitory concentration: MIC)를 측정하였다.
- [0070] OMS-A와 OMS-B의 MIC 측정을 위하여, 레사주린-기반 마이크로타이터 플레이트 분석법(resazurin-based microtiter plate assay: REMA)을 수행하였다. Mtb H37Rv 균주(University of Arizona)를 준비하고, 준비된 Mtb H37Rv 균주는 OD₆₀₀ 값이 0.005가 되도록 희석 배양을 통해 준비하였다. 96-웰 플레이트의 각 웰에 100 µL의 Mtb H37Rv 균주 배양액을 접종하였다.

- [0071] 피검 화합물로서 2.에 기재된 바와 같이 준비된 OMS-A와 OMS-B를 사용하였다. 양성 대조군으로서 결핵 치료제로 사용되는 항생제인 이소니아지드(isoniazid: INH)(Sigma)와 에탐부톨(ethambutol: EMB)(Sigma), 및 결핵 치료제로 개발중인 SQ109(Sigma)(Stehr et al., *Curr. Top. Med. Chem.*, 2014, vol.14, p.110-129)를 사용하였다. 상기 화합물들을 2배 연속 희석법으로 희석하였다. 준비된 화합물 및 40 μ l의 0.025%(w/v)의 레사주린(Sigma) 용액을 각 웰에 가하고, 각 플레이트를 약 37℃에서 약 5일 동안 배양하였다.
- [0072] 배양을 시작한 후 1일에, Synergy H1 micro plate reader(BioTek)를 사용하여 레사주린의 대사물질인 레소루핀(resorufin)의 양을 측정하였다. GraphPad Prism 5.0 소프트웨어를 사용하여 측정된 레소루핀의 양으로부터 MIC₅₀(세균 성장 50% 최소 저해 농도)을 측정하였다. 화합물의 농도에 따른 측정된 형광 강도(relative fluorescence unit: RFU)를 도 2에 나타내었다.
- [0073] 도 2에 나타난 바와 같이, OMS-A와 OMS-B 화합물은 이소니아지드, 에탐부톨, 및 SQ109에 비해 항-결핵균 활성이 우수하고, OMS-A 및 OMS-B 화합물의 MIC₅₀은 각각 57 nM 및 117 nM였다.
- [0074] **4. 결핵균에 감염된 대식세포에 대한 오명사마이신의 항균 활성**
- [0075] 야생형 마우스 (Samtako Bio Korea)로부터 수집한 골수 유래 대식세포(Bone-marrow-derived macrophage: BMDM)를 플레이트에서 배양하였다. 배양된 대식세포에 10 감염다중도(multiplicity of infection: MOI)의 Mtb H37Rv 균주를 가하고, 약 37℃의 온도 및 5% CO₂의 조건 하에서 약 4 시간 동안 배양하였다.
- [0076] 결핵균에 감염된 대식세포에 1 μ M 또는 10 μ M의 OMS-A, 1 μ M 또는 10 μ M의 OMS-B, 또는 이들의 조합을 각각 가하고, 약 37℃의 온도 및 5% CO₂의 조건 하에서 약 3일 동안 배양하였다. 음성 대조군으로 OMS-A 및 OMS-B를 가지 않은 용매 대조군(solvent control: SC)를 사용하였고, 비교군으로 0.5 μ g/ml의 이소니아지드(INH)(Sigma)를 사용하였다. 배양된 대식세포의 콜로니 형성 단위(colony forming unit: CFU)를 측정하였다. OMS-A 및 OMS-B의 투여시, 배양 시간(일)에 따른 CFU를 각각 도 3a 및 도 3b에 나타내었다. 또한, OMS-A 및 OMS-B의 조합을 투여하고 3일 동안 배양한 후, 투여된 화합물의 농도에 따른 CFU를 도 4에 나타내었다(***: p<0.001).
- [0077] 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, OMS-A 및 OMS-B 각각은 이소니아지드와 유사한 값의 CFU를 갖고, 농도-의존적으로 감소하였다. 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, OMS-A 및 OMS-B를 함께 처리한 경우 각각 처리한 경우에 비해 낮은 CFU 값을 가졌다. 따라서, OMS-A 및 OMS-B는 결핵균에 감염된 대식세포에 대해서도 항균 활성을 갖는다는 것을 확인하였다.
- [0078] **5. 생체 내에서 오명사마이신의 항균 활성**
- [0079] 생체 내에서(in vivo) 오명사마이신이 항균 활성을 갖는지 여부를 확인하기 위하여, 마이코박테리움 마리눔-초파리(*Mycobacterium marinum*-*Drosophila melanogaster*) 감염 시스템을 이용하였다(Dionne et al., *Infect Immun.*, 2003, vol.71, p.3540-3550).
- [0080] 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)를 CO₂ 가스로 흡입 마취한 후, 500 cfu로 조정된 *M. marinum*을 주사하여 감염시켰다. 이후, 노랑초파리를 1 μ M 또는 10 μ M의 OMS-A가 포함된 배양 배지에서 배양하였다. 3일마다 새로운 배양 배지에 옮겨주고, 약 30일 동안 노랑초파리의 수를 측정하여 생존율을 산출하였다. 양성 대조군으로 *M. marinum*에 감염되지 않은 초파리에 인산염 완충 용액(phosphate-buffered saline: PBS)를 가하였고, 음성 대조군으로 *M. marinum*에 감염된 초파리를 사용하였다. 또한, 비교군에서, *M. marinum*에 감염된 초파리에 1 μ g/ml의 항생제인 아미카신(amikacin: AMK)(Sigma)을 가하였다. 산출된 초파리의 생존율(%)을 도 5a에 나타내었다(Mm: *M. marinum*에 감염된 초파리). 도 5a에 나타난 바와 같이, OMS-A는 아미카신과 마찬가지로 *M. marinum*에 감염된 초파리의 생존율을 증가시켰다.
- [0081] 보다 정확한 결과를 위하여, 노랑초파리를 마취하여 새로운 튜브에 옮긴 후 균질기를 사용하여 큐티클 층만 남을 때까지 균질화하였다. 이후, 초파리 내에 존재하는 *M. marinum*을 추출하여, 4.에 기재된 바와 같이 CFU 값을 측정하였다. OMS-A의 농도에 따른 초파리 내에 존재하는 *M. marinum*의 CFU 값을 도 5b에 나타내었다(***: p<0.001). 도 5b에 나타난 바와 같이, OMS-A를 처리한 경우, 초파리 내의 *M. marinum*의 CFU 값이 음성 대조군인 용매 대조군(SC)에 비해 농도-의존적으로 감소하였다.
- [0082] 따라서, OMS-A는 시험관 내에서뿐만 아니라 생체 내에서도 항균 활성을 갖는다는 것을 확인하였다.

[0083] 6. 대식세포의 자가소화작용의 활성화에 대한 오명사마이신의 효과

[0084] OMS-A 및 OMS-B가 대식세포의 자가소화작용 활성화에 관여하는지 여부를 확인하였다.

[0085] 대식세포의 자가소화작용(autophagy) 측정에 주로 사용되는 LC3 반점(puncta) 형성 및 지질화 분석법을 수행하였다(Eisuke and Noboru, *Autophagy*, 2010, vol.6, p.764-776). 4.에 기재된 바와 같이 준비된 골수 유래 대식세포(Bone-marrow-derived macrophage: BMDM)에 10 μ M의 OMS-A 또는 10 μ M의 OMS-B를 가하고, 약 24 시간 동안 배양하였다. 음성 대조군으로 PBS를 사용하였다. 그 후, 대식세포를 DAPI(4',6-디아미디노-2-페닐인돌)(Sigma) 및 항-LC3 항체(Cell signaling)로 염색하고, 대식세포 당 LC3 반점의 개수를 측정하였다. 염색된 대식세포의 이미지를 도 6a에 나타내고(UN: 미처리), OMS-A 또는 OMS-B에 따른 대식세포 당 LC3 반점의 개수도 도 6b에 나타내었다(**: $p < 0.01$). 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이, OMS-A 및 OMS-B의 처리시 LC3 반점이 많이 형성되었다.

[0086] 또한, 대식세포에 1 μ M, 5 μ M, 및 10 μ M의 OMS-A 또는 OMS-B를 가하고, 약 24 시간 동안 배양한 후 대식세포의 세포 용해물을 수득하였다. 수득된 세포 용해물은 항-LC3 항체(Cell signaling), 및 항- β -액틴 항체(Santa Cruz)를 사용하여 면역블로팅을 수행하였고, 그 결과를 도 7a에 나타내었다(U: 미처리). 또한, 자가소화작용 억제제로서 10 μ M의 3-메틸아데닌(3-methyladenine: 3-MA) 또는 100 nM의 H^+ -ATPase 억제제로서 바필로마이신 A1(Bafilomycin A1: Baf-A)을 대식세포에 사전 처리한 경우, 대식세포의 면역블로팅 이미지를 도 7b에 나타내었다(U: 미처리, SC: 용매 대조군). 도 7a에 나타난 바와 같이, OMS-A와 OMS-B를 처리한 경우, LC3의 세포질 형태인 LC3-I에 비해 LC2-포스포타이딜에탄올아민 접합체인 LC3-II의 양이 증가하였다. 또한, 도 7b에 나타난 바와 같이, 3-MA를 사전 처리한 경우, OMS-A 또는 OMS-B를 각각 처리한 경우에 비해 LC3-II의 양이 감소하였다. Baf-A를 사전 처리한 경우, OMS-A 또는 OMS-B를 각각 처리한 경우에 비해 LC3-II의 양이 증가하였다.

[0087] 한편, 대식세포에 10 μ M의 OMS-A 또는 OMS-B를 가하고 약 24 시간 동안 배양하였다. 그 후, 항-LC3B 항체(Cell signaling)를 사용하여 유세포분석법으로 대식세포의 평균 형광 강도(mean fluorescence intensity: MFI)를 측정하였다. OMS-A 및 OMS-B에 따른 평균 형광 강도를 도 8에 나타내었다(*: $p < 0.01$). 도 8에 나타난 바와 같이, OMS-A와 OMS-B를 처리한 대식세포에서 LC3B의 발현 수준이 증가하는 것을 확인하였다.

[0088] 따라서, OMS-A 및 OMS-B는 자가소화작용을 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[0089] 아울러, 대식세포에 mCherry-증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein: EGFP)-LC3B를 발현시키는 레트로바이러스 벡터를 형질감염시켰다. 형질감염된 대식세포에 10 μ M의 OMS-A 또는 OMS-B를 가하고 약 24 시간 동안 배양하였다. 형질감염된 대식세포의 형광 이미지를 수득하고, 그 이미지를 도 9에 나타내었다(UN: 미처리, N: 핵). 도 9에 나타난 바와 같이, 대식세포의 리소솜(lysosome)에 전달된 mCherry-EGFP-LC3B의 형광 강도를 측정하였을 때, 붉은 반점의 수가 증가하였다. 따라서, OMS-A 및 OMS-B는 자가소화작용뿐만 아니라 자가소화작용의 흐름(autophagic flux)도 강화시키는 것을 확인하였다.

[0090] 7. 결핵균 유도 대식세포의 염증 반응에 대한 오명사마이신의 효과

[0091] OMS-A 및 OMS-B가 결핵균(Mtb)이 야기하는 파고리소솜(phagolysosome)의 성숙을 억제할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 4.에 기재된 바와 같이 대식세포를 준비하였다.

[0092] 준비된 대식세포에 증강된 적색 형광 단백질(enhanced red fluorescent protein: ERFP)-Mtb(University of Gyeongsang)로 형질감염시킨 후, 대식세포에 10 μ M의 OMS-A 또는 OMS-B를 가하였다. 대식세포를 약 24 시간 동안 배양한 후, 항-LC3 항체(MBL), 항-리소솜-연관 막 단백질(lysosome-associated membrane protein 2: LAMP2) 항체(Santa Cruz), 및 DAPI를 사용하여 대식세포의 형광 이미지를 수득하였다. 수득된 형광 이미지로부터 Mtb 파고솜과 LC3 또는 LAMP2의 공통-지역(co-localization)의 비율(%)을 산출하였다. LC3에 대하여 수득된 형광 이미지 및 Mtb 파고솜과 LC3의 공통-지역의 비율을 나타내는 그래프를 각각 도 10a 및 도 10b에 나타내었고, LAMP2에 대하여 수득된 형광 이미지 및 Mtb 파고솜과 LAMP2의 공통-지역의 비율을 나타내는 그래프를 각각 도 10c 및 도 10d에 나타내었다(**: $p < 0.01$).

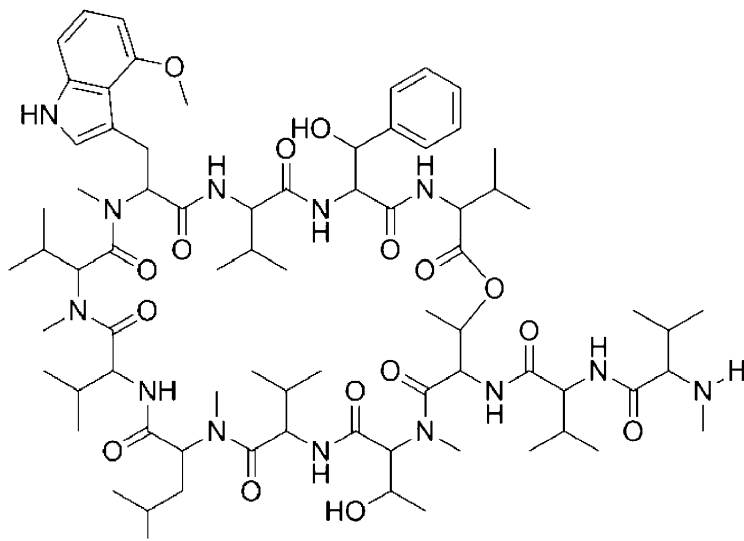
[0093] 도 10a 내지 도 10d에 나타난 바와 같이, OMS-A와 OMS-B를 처리한 경우, 자가소화작용 지표인 LC3와 Mtb 파고솜의 공통-지역화 및 LAMP2와 Mtb 파고솜의 공통-지역화가 증가하였다. 따라서, OMS-A 및 OMS-B는 대식세포 내 Mtb 파고솜의 성숙을 유도하는 것을 확인하였다.

[0094] 8. 대식세포 내의 Mtb 파고솜 성숙과 항균 반응에 필요한 AMPK 경로에서 오명사마이신의 효과

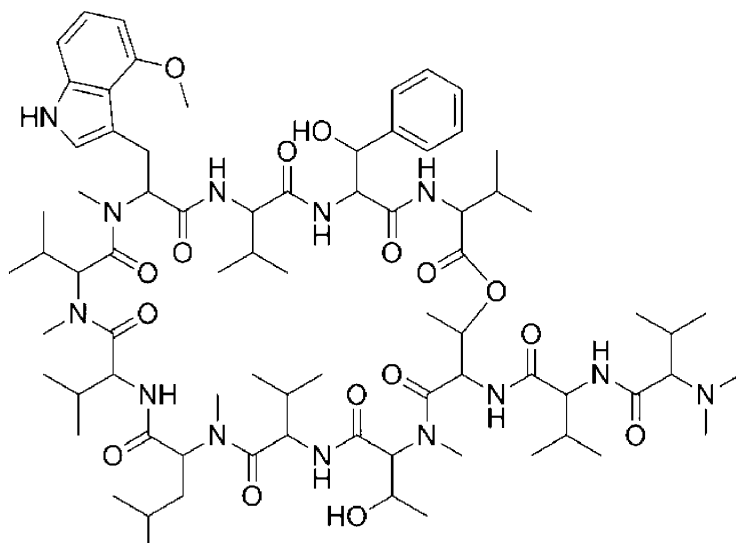
- [0095] AMP-활성화 단백질 키나제(AMP-activated protein kinase: AMPK)의 활성화가 대식세포 내의 Mtb 파고솜 성숙과 항균 반응을 유도한다는 것이 알려져 있으므로, OMS-A와 OMS-B가 AMPK 신호전달 경로의 활성화를 유도하는지 여부를 확인하였다.
- [0096] 4.에 기재된 바와 같이 결핵균-감염 대식세포에 OMS-A와 OMS-B를 가하고, 약 18 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포로부터 세포 용해액을 수득하고, 항-p-AMPK 촉매성 α -서브유닛 (AMPK- α) Thr172 (T172) 항체(Cell signaling), 항-p-아세틸-CoA 카르복실라제(acetyl-CoA carboxylase: ACC) 항체(Cell signaling), 및 항- β 액틴 항체(Cell signaling)를 사용하여 면역블로팅을 수행하였다. OMS-A 및 OMS-B에 의한 면역블로팅 이미지를 각각 도 11a 및 도 11b에 나타내었다.
- [0097] 도 11a 및 도 11b에 나타난 바와 같이, OMS-A와 OMS-B가 AMPK α 의 Thr172와 아세틸-CoA 카르복실라제의 Ser78 (S79)에서 시간-의존적으로 인산화반응을 유도하였다. 구체적으로, 대식세포에 OMS-A 또는 OMS-B를 처리한 경우 약 1 시간 이내에 빠르게 AMPK 인산화반응이 증가하였고, 이후 점차 감소하다가 약 18 시간 경에 인산화 반응이 유도된다는 것을 확인하였다.
- [0098] **9. 오명사마이신의 결핵균-유도 염증 반응의 완화 효과**
- [0099] 4.에 기재된 바와 같이, 결핵균-감염 대식세포에 1 μ M, 5 μ M, 또는 10 μ M의 OMS-A와 OMS-B를 가하고, 약 24 시간 동안 배양하였다.
- [0100] 배양된 대식세포를 수득하고, 대식세포에서 분비된 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor: TNF)- α , 인터루킨(interleukin: IL)-6, IL-1 β 및 IL-12 p40의 양을 ELISA 키트(BD)를 사용하여 측정하였다.
- [0101] 오명사마이신의 양에 따른 결핵균-감염 대식세포에서 분비된 사이토카인의 양을 도 12a에 나타내었다(U: 미처리, SC: 용매 대조군, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$). 도 12a에 나타난 바와 같이, 결핵균-감염 대식세포에 OMS-A 또는 OMS-B를 처리한 경우, 항-염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 및 IL-12 p40의 양이 농도-의존적으로 감소하였다.
- [0102] 또한, NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell)-루시퍼라제 리포터 유전자를 포함하는 벡터(Genetransfer Vector Core)를 대식세포에 형질감염시키고, 결핵균을 감염시켰다. 이후, 1 μ M, 5 μ M, 또는 10 μ M의 OMS-A와 OMS-B를 가한 후 약 6 시간 동안 배양하였다. 그 후, 대식세포로부터 세포 용해물을 수득하고, 세포 용해물의 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 측정된 루시퍼라제 활성을 도 12b에 나타내었다(U: 미처리, SC: 용매 대조군, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$). 도 12b에 나타난 바와 같이, 결핵균-감염 대식세포에 OMS-A 또는 OMS-B를 처리한 경우, 루시퍼라제의 활성이 농도-의존적으로 감소하여, 염증 유발 인자인 NF- κ B의 발현이 저해되었다.
- [0103] 따라서, OMS-A 및 OMS-B는 결핵균-감염 대식세포의 염증 반응을 완화할 수 있음을 확인하였다.

도면

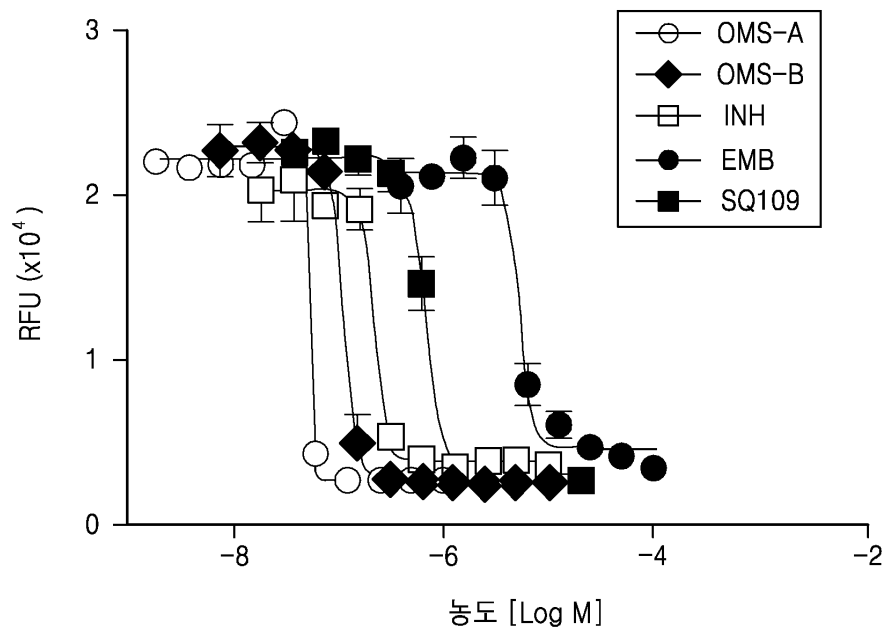
도면1a



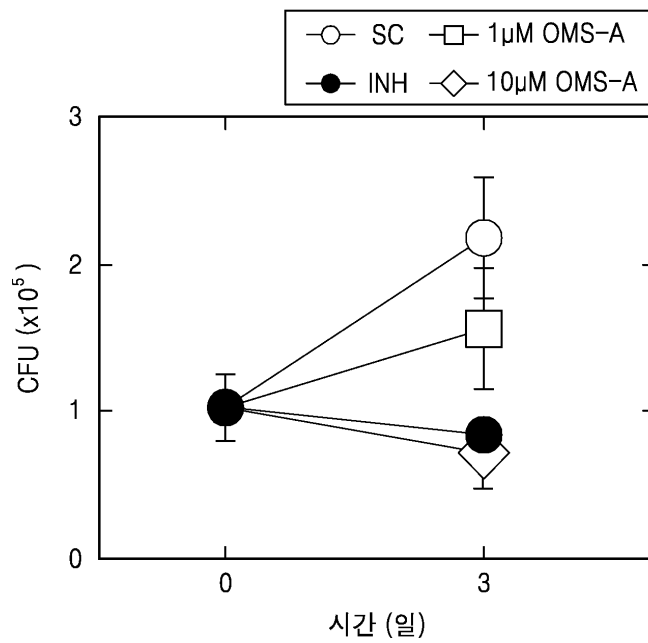
도면1b



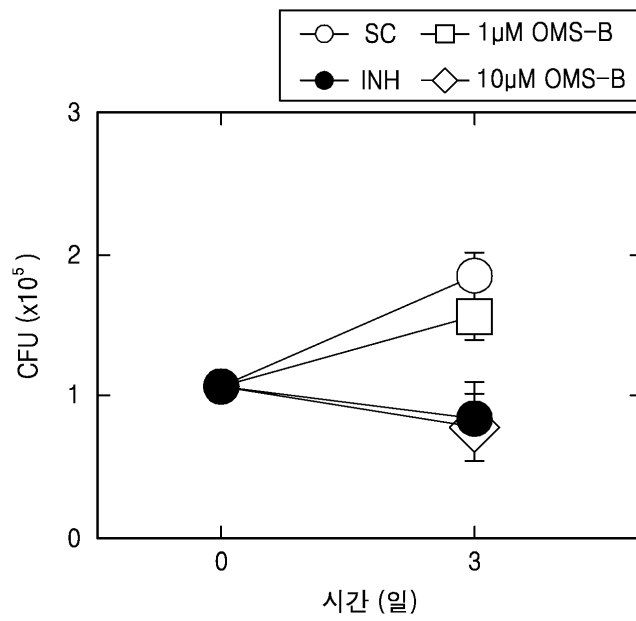
도면2



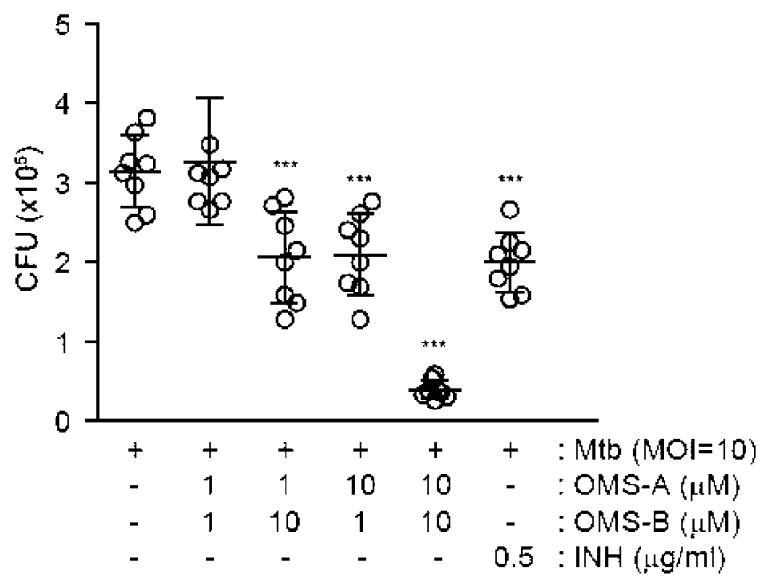
도면3a



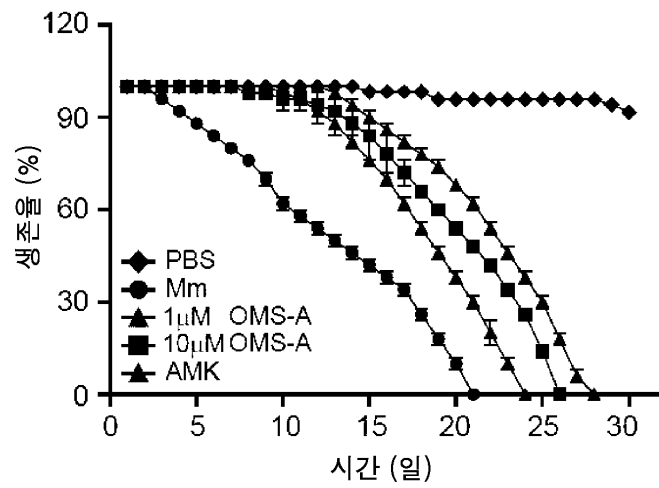
도면3b



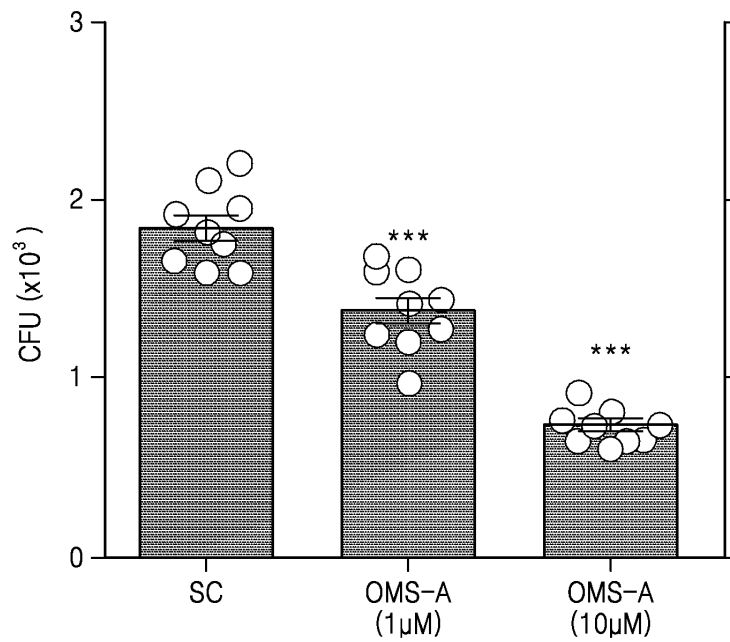
도면4



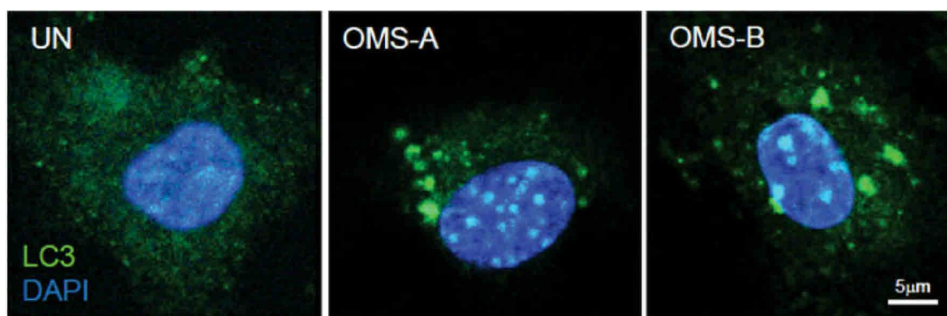
도면5a



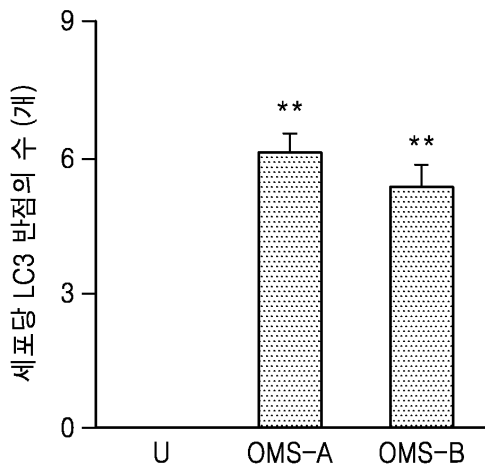
도면5b



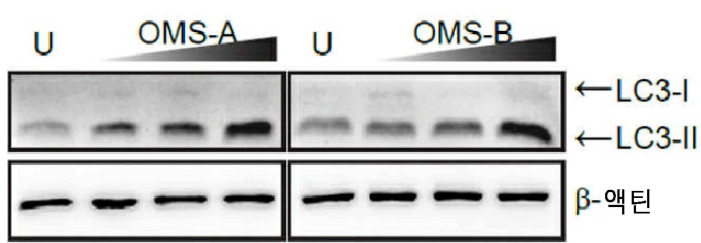
도면6a



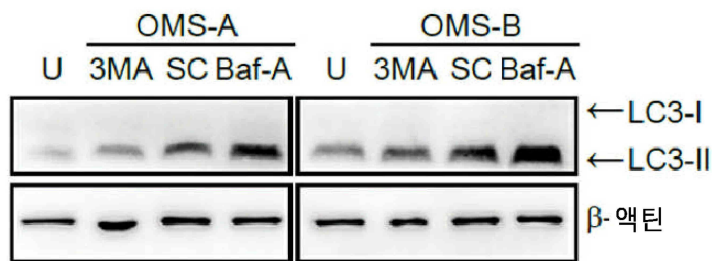
도면6b



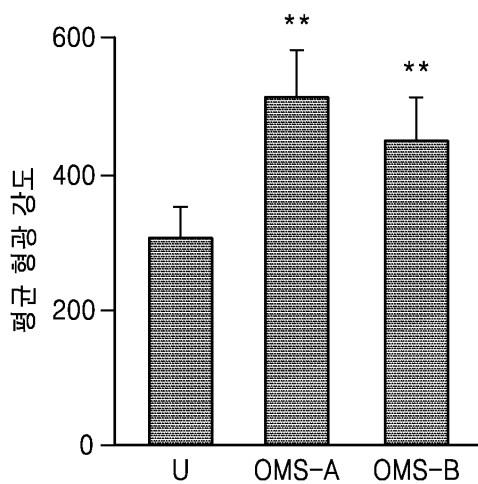
도면7a



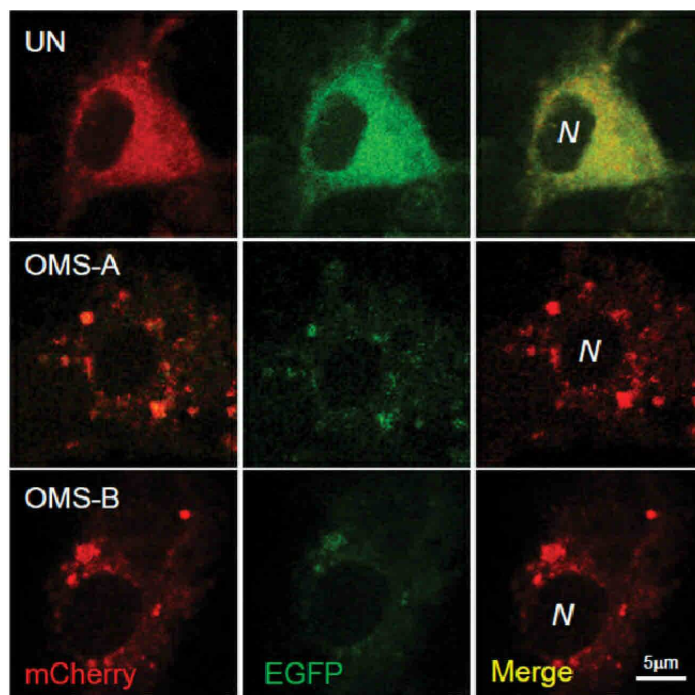
도면7b



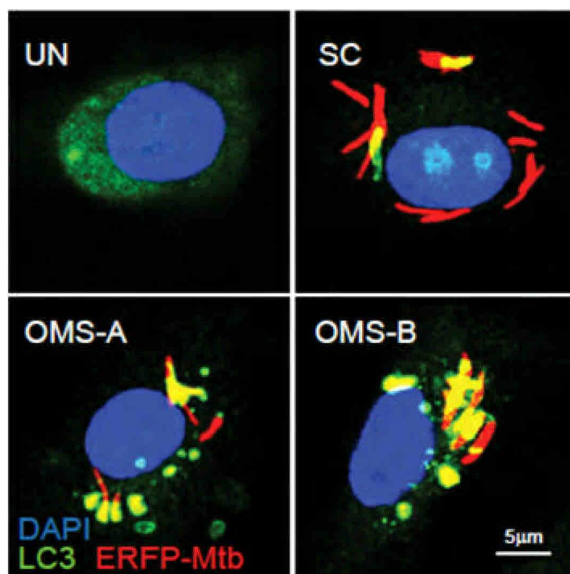
도면8



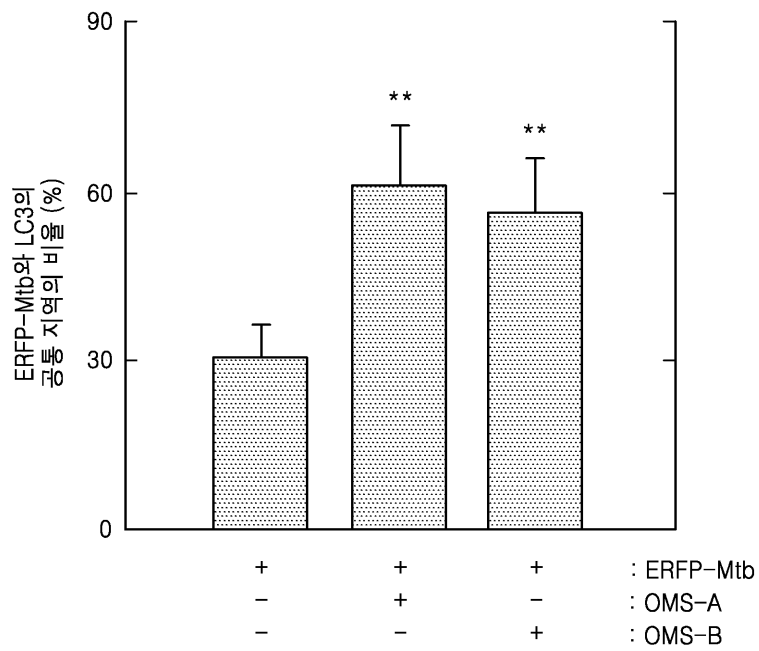
도면9



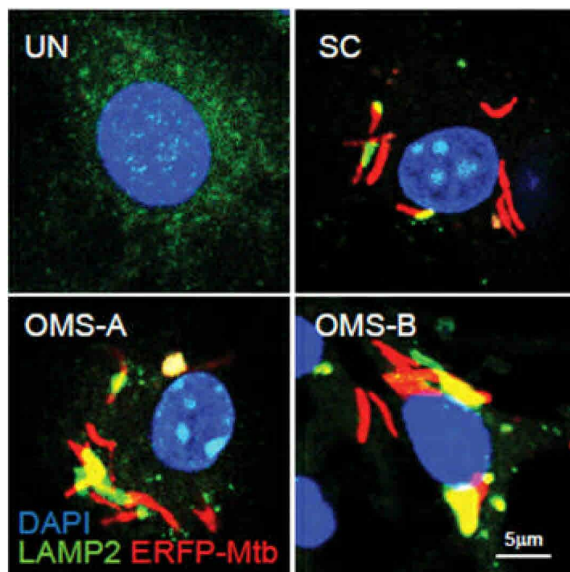
도면10a



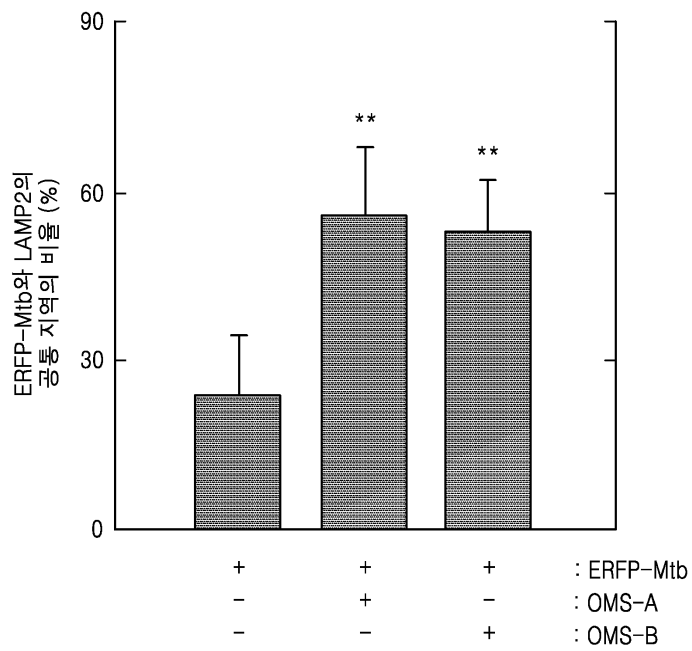
도면10b



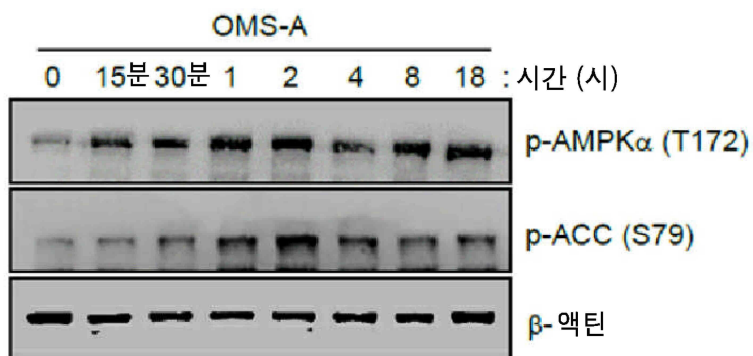
도면10c



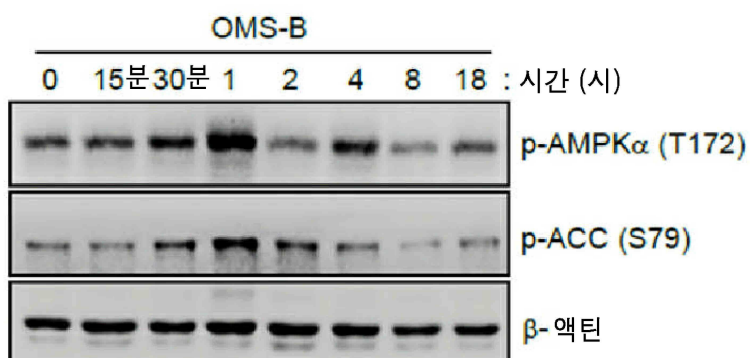
도면10d



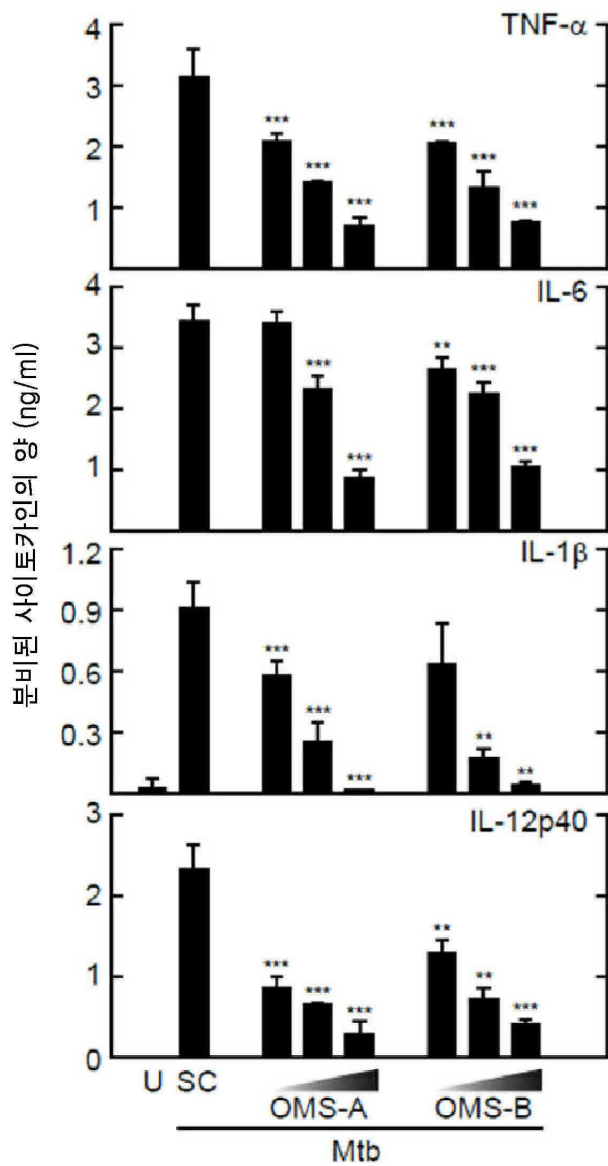
도면11a



도면11b



도면12a



도면12b

