

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0082937
(43) 공개일자 2025년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07F 7/08 (2006.01) A61K 31/695 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07F 7/0812 (2013.01)
A61K 31/695 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0171803

(22) 출원일자 2023년11월30일

심사청구일자 2023년11월30일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김범준

서울특별시 강남구 압구정로 151, 117동 702호 (압구정동, 현대아파트)

서혜준

서울특별시 성북구 동소문로 84, 803호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인더웨이브

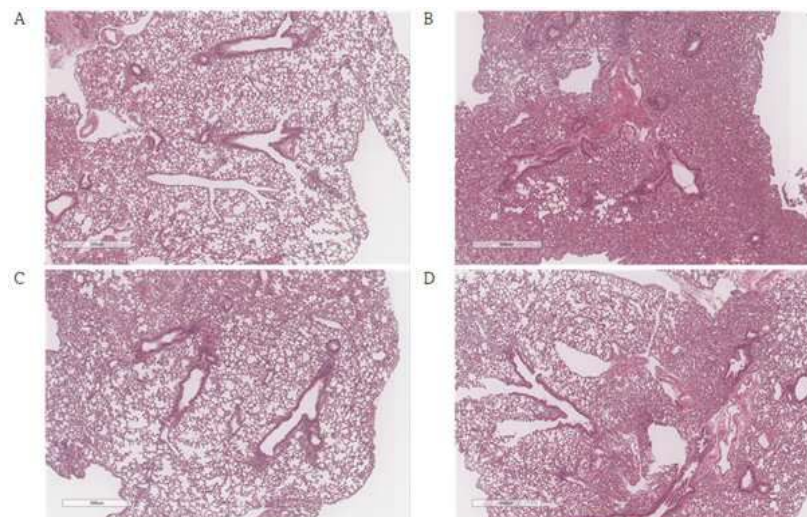
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 플라보노이드 유도체(comp. no. 22099) 및 이를 포함하는 비결핵항산균 감염에 의한 질환 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 플라보노이드 유도체 22099를 포함하는 비결핵항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 일 양상에 따른 플라보노이드 유도체 22099는 마이코박테리움 압세스스(*M. abscessus*) 감염 대식세포에서 mtROS 및 세포 내 균 수를 감소시키며, 직접처리시에도 *M. abscessus*의 성장을 저해한다. 또한, *M. abscessus*의 아종(subspecies)인 *abscessus*, *massiliense*, *bolletii*의 표준 균주, 치료 불응성 환자에서 유래된 *M. abscessus* 및 호흡기 감염 마우스 모델에서도 성장 저해 활성을 가지며, 다른 항생제(클래리스로마이신 및 아미카신)와도 시너지 효과를 나타내므로, 상기 플라보노이드 유도체 22099는 단독으로 또는 병용으로 *M. abscessus* 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도13



(52) CPC특허분류

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 31/04 (2018.01)

(72) 발명자

오재훈

서울특별시 성북구 고려대로7라길 7, 401호 (안암동1가)

김남중

서울특별시 강남구 광평로31길 27, 102동 1303호 (수서동, 삼성아파트)

신정원

전라남도 여수시 종고산길 16 (덕충동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465036871

과제번호 HI22C0312000022

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 감염병 예방·치료 기술개발사업

연구과제명 미토콘드리아 활성화산소 저해를 표적으로 하는 *Mycobacterium abscessus* 감염 치료

제 개발

기 여 율 1/4

과제수행기관명 서울대학교 산학협력단

연구기간 2022.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465039534

과제번호 HI22C0312000023

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 감염병 예방치료기술개발사업

연구과제명 미토콘드리아 활성화산소 저해를 표적으로 하는 *Mycobacterium abscessus* 감염 치료

제 개발

기 여 율 1/4

과제수행기관명 서울대학교 산학협력단

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465037562

과제번호 HI22C0312000122

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 감염병 예방·치료 기술개발사업

연구과제명 미토콘드리아 활성화산소 저해 화합물의 분자설계 및 합성

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경희대학교 산학협력단

연구기간 2022.04.01 ~ 2023.12.31

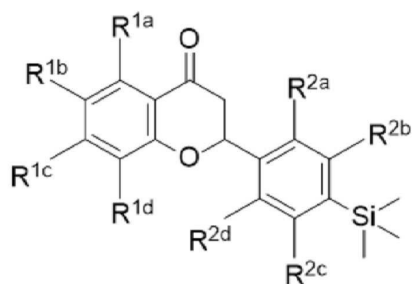
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에 있어서,

R^{1a} 내지 R^{1d} 는 서로 독립적으로 수소, 하이드록시, C_{1-6} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-6} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;

R^{2a} 내지 R^{2d} 는 서로 독립적으로 수소, 하이드록시, C_{1-6} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-6} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이다.)

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 R^{1a} 내지 R^{1d} 는 서로 독립적으로 수소, C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고;

상기 R^{2a} 내지 R^{2d} 는 서로 독립적으로 수소, C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시;인 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 R^{1a} 내지 R^{1d} 는 서로 독립적으로 수소, 또는 C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고;

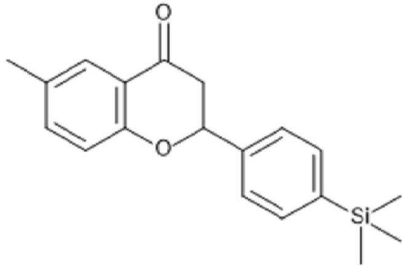
상기 R^{2a} 내지 R^{2d} 는 서로 독립적으로 수소, 또는 C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬;인 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

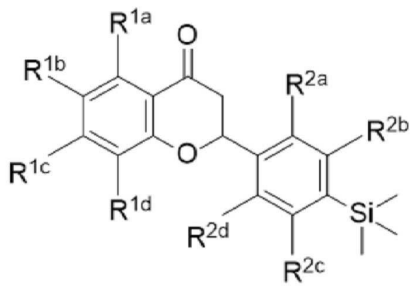
[화학식 2]



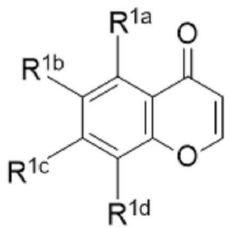
청구항 5

화학식 3으로 표시되는 화합물 및 화학식 4로 표시되는 화합물을 유기용매에서 반응시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

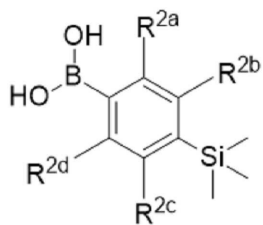
[화학식 1]



[화학식 3]



[화학식 4]



(상기 화학식 3 및 4에 있어서,

R^{1a} 내지 R^{1d} 및 R^{2a} 내지 R^{2d} 는 청구항 1의 화학식 1에서 정의한 바와 같다.)

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 유기용매는 디메틸설폭사이드, 1,4-다이옥산, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤, 아세톤, 아세토니트릴, 디메틸포름아마이드, 엔메틸피롤리돈, 아세트산, 메틸알콜, 에틸알콜, 프로필알콜 및 벤질알콜로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 제조방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 화합물을 제조하는 단계는 촉매로서 팔라듐(II) 트리플루오로아세테이트 및 2,2-비피리딘을 더 첨가하여 반응하는 것인, 제조방법.

청구항 8

청구항 1의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비결핵 항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 비결핵항산균은 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰레어(*Mycobacterium Intracellulare*), 마이코박테리움 앱세수스(*Mycobacterium abscessus*), 마이코박테리움 마실리엔시스(*Mycobacterium massiliense*), 마이코박테리움 볼레티(*Mycobacterium bolletii*), 마이코박테리움 키메라(*Mycobacterium chimaera*), 마이코박테리움 스크로풀라세움(*Mycobacterium Scrofulaceum*), 마이코박테리움 켈로네(*Mycobacterium chelonae*), 마이코박테리움 폴투이텀(*Mycobacterium fortuitum*), 마이코박테리움 페레그리눔(*Mycobacterium peregrinum*), 마이코박테리움 울세란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*), 마이코박테리움 칸사시(*Mycobacterium kansasii*), 마이코박테리움 제네반스(*Mycobacterium Genevans*), 마이코박테리움 시미에(*Mycobacterium simiae*), 마이코박테리움 테레(*Mycobacterium terrae*), 마이코박테리움 논크로모제니쿰(*Mycobacterium nonchromogenicum*), 마이코박테리움 셀라툼(*Mycobacterium celatum*), 마이코박테리움 고르도네(*Mycobacterium gordonae*), 마이코박테리움 스줄가이(*Mycobacterium szulgai*), 마이코박테리움 뮤코제니쿰(*Mycobacterium mucogenicum*) 및 마이코박테리움 아우바그넨스(*Mycobacterium aubagnens*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 비결핵항산균은 마이코박테리움 앱세수스(*Mycobacterium abscessus*)인 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 8에 있어서,

상기 비결핵항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환은 폐질환, 림프절염, 피부질환 및 파종성 질환(disseminated disease)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 폐질환은 폐렴 또는 기관지확장증인 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

청구항 8에 있어서,

항생제를 더 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 14

청구항 1의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비결핵 항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 플라보노이드 유도체(comp. no. 22099) 및 이를 포함하는 비결핵항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 마이코박테리움 앵세수스(*Mycobacterium abscessus*) 감염에 의한 질환 치료에 유용할 수 있다.

배경 기술

[0002] 비결핵항산균(non-tuberculosis mycobacteria, NTM)이란 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis complex*)과 나병균(*M. leprae*)을 제외한 항산균을 말하며, 동물계 숙주 안에서만 발견되는 결핵균과는 달리 동물계뿐만 아니라 토양이나 수계 등 환경에 정상적으로 존재하며 현재 약 150종 이상이 알려져 있다. NTM에 의한 질환은 임상에 의해 폐질환, 림프절염, 피부질환 및 파종성 질환으로 분류되며, 이 중 폐질환이 90% 이상을 차지하고 있다.

[0003] NTM 폐질환은 전 세계적으로 발생률과 유병률이 증가하는 추세이며, 국내에서도 임상 검체에서 NTM이 분리되는 빈도, 발생률과 유병률 모두 빠른 속도로 증가하고 있다. NTM에 의한 감염 질환은 국가별로 병원체별 발생률의 차이를 보이고 있으며, 미국과 일본에서 NTM 폐질환을 일으키는 가장 흔한 원인균은 마이코박테리움 아비움(*M. avium*)과 마이코박테리움 인트라셀룰레어(*M. intracellulare*)의 혼합체인 마이코박테리움 아비움 복합체(MAC)로 알려져 있다. 국내에서도 MAC에 의한 감염이 가장 흔하며, 국내 NTM 감염 폐질환의 중요한 역학적 특징은 외국에서 상대적으로 드문 원인균인 신속 성장균 특히, 마이코박테리움 앵세수스 복합체(*M. abscessus complex*)가 두 번째로 흔한 원인균이라는 것이다. 마이코박테리움 앵세수스 복합체는 마이코박테리움 앵세수스 아종 앵세수스(*M. abscessus* subsp. *abscessus*), 마이코박테리움 앵세수스 아종 마실리엔시스(*M. abscessus* subsp. *massiliense*) 및 마이코박테리움 앵세수스 아종 볼레티(*M. abscessus* subsp. *bolletii*)의 세 아종(subspecies)으로 구성되며, 높은 항생제 내성으로 인해 주요한 임상적 의의를 갖는다. NTM 중 특히, *M. abscessus*는 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 환자에서 임상적으로 중요한 NTM이다. 낭포성 섬유증 환자에서 *M. abscessus* 감염은 폐 기능의 더 빠른 감소와 상관관계가 있으며, 이후에 폐 이식에 장애가 될 수 있어 임상 결과가 좋지 않거나 증상이 없는 감염이 평생 지속될 수 있다.

[0004] 폐 감염에서 *M. abscessus*는 가장 일반적으로 분리되고 빠르게 성장하는 마이코박테리아인 것에 반해, 평균 치료 성공률이 45.6%에 불과하다는 점은 매우 놀랍다. 현재 이용 가능한 치료법 중 어떤 것도 만성 폐 질환 환자에서 완치되거나 장기간의 가래 전환에 효과가 없는 것으로 나타났다.

[0005] *M. abscessus*는 우리나라에서 발병 빈도수가 크게 증가하고 있으며, β -lactamases, aminoglycoside phosphotransferases 및 aminoglycoside acetyltransferases 등의 내성 유전자를 보유하고 있어 제1세대 항결핵제(isoniazid, rifampin, pyrazinamide 및 ethambutol)에 대해 선천적으로 내성을 지니고 있고, 마이코박테리아 속 중에서도 가장 항생제 내성이 높은 균으로 알려져 있다. 현재, *M. abscessus* 폐 감염에 대한 현재의 치료 권장 사항에는 매크로라이드(macrolides), 리네졸리드(linezolid), 클로파지민(clofazimine) 계열 및 때때로 퀴놀론(quinolone) 유래 약물을 포함하는 1개 또는 2개의 경구 항생제와 2개 이상의 정맥 주사 약물(예: amikacin, tigecycline, imipenem 및 cefoxitin)의 조합 요법이 포함된다. 장기간의 다중항생제 치료는 종종 리네졸리드에 의한 골수 억제, 티게사이클린에 의한 간 독성, β 락탐에 대한 과민증 발병 등과 같은 약물 유발 독성에 의해 제한된다. 엄격한 요법에도 불구하고 치료 실패율은 재발성 또는 만성으로 여전히 높다.

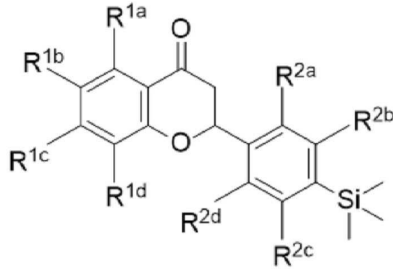
[0006] 이러한 특성과 더불어 장기간의 약물 치료를 요하는 *M. abscessus* 감염은 항생제 단독치료만으로는 한계가 있으며, 결국 수술적 치료에 의존하는 경향이 높기에 이를 보완하기 위한 새로운 약제 개발이 시급한 상황이며, 새로운 치료 접근법을 확인하는 것이 필요하다. 하지만, 다양한 기전에서 *M. abscessus*에 대한 잠재적 활성을 가진 실험적 항생제 및 새로운 치료법에 대한 연구가 급증하고 있으나, *M. abscessus*에 대한 효능에 대해서는 충분히 연구되지 않은 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다:

[0008] [화학식 1]



[0009]

[0010] 다른 양상은 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비결핵항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비결핵항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

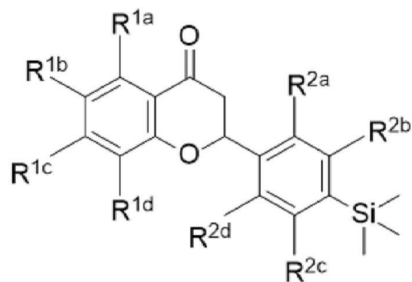
과제의 해결 수단

[0013] 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로써, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미할 수 있다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용될 수 있다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.

[0015] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 상기 화학식 1에 있어서, R^{1a} 내지 R^{1d}는 서로 독립적으로 수소, 하이드록시, C₁₋₆의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C₁₋₆의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고; R^{2a} 내지 R^{2d}는 서로 독립적으로 수소, 하이드록시, C₁₋₆의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C₁₋₆의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이다.

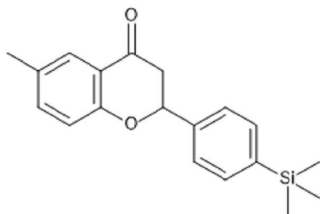
[0019] 구체적으로, 상기 R^{1a} 내지 R^{1d}는 서로 독립적으로 수소, C₁₋₃의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C₁₋₃의 직쇄 또는 측쇄

알콕시이고; 상기 R^{2a} 내지 R^{2d} 는 서로 독립적으로 수소, C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이다.

[0020] 더욱 구체적으로, 상기 R^{1a} 내지 R^{1d} 는 서로 독립적으로 수소, 또는 C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이고; 상기 R^{2a} 내지 R^{2d} 는 서로 독립적으로 수소, 또는 C_{1-3} 의 직쇄 또는 측쇄 알킬이다.

[0021] 일례로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0022] [화학식 2]



[0023]

[0024] 본 명세서에서 용어, “약학적으로 허용가능한”이란 세포나 인간에게 독성이 없으며, 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 의미한다. 본 발명의 유효물질은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다.

[0025]

본 명세서에서 용어, “약학적으로 허용가능한 염”은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 유효물질의 염기 화합물의 이로운 효능을 떨어뜨리지 않는 유효물질의 염기 화합물의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산 또는 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함한다. 예를 들면, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 푸마레이트, 글루세이트, 글루코네이트, 글루큐로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프틸레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으며, 이들 중 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트가 바람직하다.

[0026]

본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 유효물질을 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 있다.

[0027]

또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

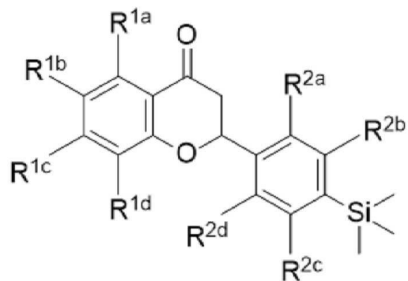
[0028]

나아가, 본 발명은 유효물질 및 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용

매화물, 수화물, 이성질체, 광학 이성질체 등을 모두 포함한다.

[0029] 다른 양상은 화학식 3으로 표시되는 화합물 및 화학식 4로 표시되는 화합물을 유기용매에서 반응시켜, 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

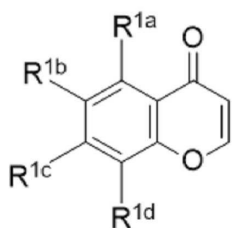
[0030] [화학식 1]



[0031]

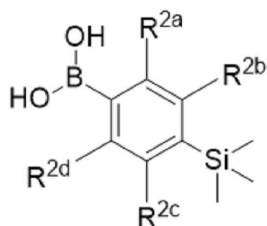
[0032] 상기 화학식 1에 있어서, R^{1a} 내지 R^{1d}는 서로 독립적으로 수소, 하이드록시, C₁₋₆의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C₁₋₆의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이고; R^{2a} 내지 R^{2d}는 서로 독립적으로 수소, 하이드록시, C₁₋₆의 직쇄 또는 측쇄 알킬, 또는 C₁₋₆의 직쇄 또는 측쇄 알콕시이다.

[0033] [화학식 3]



[0034]

[0035] [화학식 4]



[0036]

[0037] (상기 화학식 3 및 4에 있어서,

[0038] R^{1a} 내지 R^{1d} 및 R^{2a} 내지 R^{2d}는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.)

[0039] 상기 유기용매는 디메틸설폭사이드, 1,4-다이옥산, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤, 아세톤, 아세토니트릴, 디메틸포름아마이드, 엔메틸피롤리돈, 아세트산, 메틸알콜, 에틸알콜, 프로필알콜 및 벤질알콜로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0040] 상기 화합물을 제조하는 단계는 촉매로서 팔라듐(II) 트리플루오로아세테이트 및 2,2-비피리딘을 더 첨가하여 반응시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 또 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하

는 비결핵항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0042] 상기 비결핵항산균은 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 인트라셀룰레어(*Mycobacterium Intracellulare*), 마이코박테리움 앱세수스(*Mycobacterium abscessus*), 마이코박테리움 마실리엔시스(*Mycobacterium massiliense*), 마이코박테리움 볼레티(*Mycobacterium bolletii*), 마이코박테리움 키메라(*Mycobacterium chimaera*), 마이코박테리움 스크로풀라세움(*Mycobacterium Scrofulaceum*), 마이코박테리움 켈로네(*Mycobacterium chelonae*), 마이코박테리움 폴투이텀(*Mycobacterium fortuitum*), 마이코박테리움 페레그리눔(*Mycobacterium peregrinum*), 마이코박테리움 울세란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*), 마이코박테리움 칸사시(*Mycobacterium kansasii*), 마이코박테리움 제네반스(*Mycobacterium Genevans*), 마이코박테리움 시미에(*Mycobacterium simiae*), 마이코박테리움 테레(*Mycobacterium terrae*), 마이코박테리움 논크로모제니쿰(*Mycobacterium nonchromogenicum*), 마이코박테리움 셀라툼(*Mycobacterium celatum*), 마이코박테리움 고르도네(*Mycobacterium gordonae*), 마이코박테리움 스줄가이(*Mycobacterium szulgai*), 마이코박테리움 뮤코제니쿰(*Mycobacterium mucogenicum*) 또는 마이코박테리움 아우바그넨스(*Mycobacterium aubagnens*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 일 구체예에 있어서, 상기 비결핵항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환은 폐질환, 림프절염, 피부 질환 및 파종성 질환일 수 있다.
- [0044] 일 구체예에 있어서, 상기 폐질환은 폐렴 또는 기관지확장증 일 수 있다.
- [0045] 본 명세서에서 용어, “예방”은 질환, 장애, 또는 그의 부수적 증상의 발병 또는 재발을 부분적으로 또는 완전히 지연시키거나 방지하거나, 질환 또는 장애의 획득 또는 재획득을 막거나, 질환 또는 장애의 획득의 위험을 감소시키는 것을 총칭한다.
- [0046] 본 명세서에서 용어, “치료”는 질환, 장애, 또는 그의 부수적 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [0047] 본 명세서에서 용어, “치료제” 또는 “약학적 조성물”은 대상체로의 투여 시에 몇몇 유리한 효과를 부여하는 분자 또는 화합물을 지칭한다. 유리한 효과는 진단적 결정을 가능하게 하는 것; 질병, 증상, 장애 또는 병태의 개선; 질병, 증상, 장애 또는 질환의 발병의 감소 또는 예방; 및 일반적으로 질병, 증상, 장애 또는 병태의 대응을 포함한다.
- [0048] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 항생제를 더 포함하는 것일 수 있고, 상기 항생제는 리팜핀(rifampin), 리파펜틴(rifapentine), 이소니아지드(isoniazid), 피라진아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플루오로퀴놀론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린(cycloserine), 프로치온 아마이드(prothionamide 또는 protionamide), 레보플록사신(levofloxacin), 모시플록사신(moxifloxacin), 오픈록사신(ofloxacin), 리파부틴(rifabutin), 카프레오마이신(capeomycin), 아미카신(amikacin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 에티오나마이드(ethionamide), 사이클로세린(cycloserine), 티오아세트존(thioacetazone), 클로파지민(clofazimine), 아목시실린/클라불라네이트(amoxicillin/clavulanate), 다이아미노다이페닐설폰의 유도체(derivative of diaminodiphenyl sulfone), 에리스로마이신(erythromycin), 클라리스로마이신(clarithromycin), 디리스로마이신(dirithromycin), 록시스로마이신(roxithromycin), 아지스로마이신(azithromycin), 조사마이신(josamycin), 미데카마이신(midecamycin), 로키타마이신(rokitamycin), 스피라마이신(spiramycin), 베다퀼린(bedaquiline) 및 리네졸리드(linezolid)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0049] 일 구체예에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양의 생리활성성분을 추가로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 “약학적으로 유효한 양”이란 상기 생리활성성분이 동물 또는 사람에게 투여되어 목적하는 생리학적 또는 약리학적 활성을 나타내기에 충분한 양을 의미한다. 상기 약학적으로 유효한 양은 투여 대상의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0050] 상기 “생리활성성분”은 동물 또는 사람의 체내에서 생리적인 기능을 촉진 또는 억제하여 목적하는 생물학적 또는 약리학적 효과를 유도할 수 있는 물질로서, 동물 또는 사람에게 투여하기 적합한 화학적 또는 생물학적 물질 또는 화합물을 의미하며, (1) 감염 예방과 같은 원하지 않는 생물학적 효과를 예방하여 유기물에 대한 예방

효과를 가지고, (2) 질병으로 생기는 컨디션을 경감시키며, 예를 들어 질병의 결과로 생기는 고통 또는 감염을 완화시키며, (3) 유기물로부터 질병을 완화, 감소 또는 완전히 제거할 수 있는 역할을 수행할 수 있다. 또한, 상기 “생리활성성분”은 “치료제”의 용어와도 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

- [0051] 상기 생리활성성분은 단백질, 항암제, 소염진통제, 항생제, 항균제, 호르몬제, 유전자 및 백신으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 상기 약학적 조성물은 당업계에 공지된 방법으로 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제형화될 수 있고, 이러한 제형은 경구 또는 비경구 투여 제형일 수 있다.
- [0053] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 유효물질에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0054] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁 용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성 용제, 현탁 용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0055] 상기 투여는 당업계에 알려진 방법에 의하여 투여될 수 있다. 투여는 예를 들면, 정맥내, 근육내, 경구, 경피(transdermal), 점막, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal) 또는 피하 투여와 같은 경로로, 임의의 수단에 의하여 개체로 직접적으로 투여될 수 있다. 상기 투여는 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있다.
- [0056] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이를 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0057] 상기 약학적 조성물의 치료적 유효 투여량은 1일 체중 1 kg당 0.01 내지 1000 mg, 예를 들면 0.1 내지 500 mg 또는 0.1 내지 300 mg의 양으로 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 그러나 상기 치료적 유효 투여량 또는 치료적 유효량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있다. 또한, 상기 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.
- [0058] 또 다른 양상은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비결핵항산균 감염증 또는 비결핵항산균 감염에 의한 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0059] 본 명세서에서 용어, "건강기능식품"은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0060] 일 양상에 따른 건강기능식품에 있어서, 본 발명의 조성물을 식품첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.
- [0061] 상기 “식품첨가물”은 외관, 향미, 조직 또는 저장성을 향상시키기 위한 목적으로 보통 적은 양이 식품에 의도적으로 첨가되는 것을 가리키며, 식품의 품질을 개량하여, 보존성 또는 기호성을 향상시킬 뿐 아니라 영양가 및 식품의 실질적인 가치를 증진시킬 목적으로 사용하는 것을 의미한다. 이는, 식품위생법 제2조 제2호에서 정의하고 있는 바와 같이, 식품을 제조가공 또는 보존함에 있어 식품에 첨가, 혼합, 침윤, 기타의 방법으로 사용되는 물질일 수 있다.
- [0062] 건강기능식품의 제형은 산제, 과립제, 환제, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.

[0063] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지류, 빵류, 초코렛류, 캔디류, 스낵류, 과자류, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있고, 통상적인 의미에서의 식품, 건강식품 및 건강기능식품을 모두 포함할 수 있다.

[0064] 일 양상에 따른 건강기능식품에 있어서, 상기 유효물질을 함유하는 건강기능식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효물질의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 및 건강기능식품 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명 유효물질을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 건강기능식품 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명에 따른 음료 100 mL 당 약 0.01~0.04 g, 바람직하게는 약 0.02~0.03 g 일 수 있다.

[0066] 상기 외에 본 발명의 유효물질을 함유하는 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 본 발명의 유효물질을 함유하는 건강기능식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0067] 일 양상에 따른 플라보노이드 유도체 22099는 마이코박테리움 앵세수스(*M. abscessus*) 감염 대식세포에서 증가하는 mtROS 및 세포 내 균 수를 감소시키며, 직접처리시에도 *M. abscessus*의 성장을 저해하고, *M. abscessus*의 아종(subspecies)인 *abscessus*, *massiliense*, *bolletii*의 표준 균주(type strain)뿐만 아니라, 치료 불응성 환자에서 유래된 *M. abscessus* 및 호흡기 감염 마우스 모델에서도 성장 저해 활성을 가진다. 또한, 다른 항생제(클라리스로마이신 및 아미카신)와도 시너지 효과를 나타내므로, 상기 플라보노이드 유도체 22099는 단독으로 또는 병용으로 *M. abscessus* 감염에 의한 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 *in vitro* 상에서 22099의 안전성 및 효과를 확인하기 위한 실험 모식도이다.
 도 2는 치료 불응성 환자 유래 균에 대한 22099의 효능을 확인하기 위한 실험 모식도이다.
 도 3은 *in vivo* 상에서 22099의 효능을 확인하기 위한 실험 모식도이다.
 도 4는 *in vitro* 상에서 mitoSOX™ 및 유세포분석을 통한 22099의 미토콘드리아 활성화산소 저해능을 나타낸 그래프이다.
 도 5는 *in vitro* 상에서 대식세포 J774A.1에 감염된 *M. abscessus* 균주에 대한 22099의 성장 저해능을 나타낸 그래프이다.
 도 6은 *in vitro* 상에서 NRU assay를 통한 대식세포 J774A.1에서의 22099의 세포독성을 나타낸 그래프이다.
 도 7은 *in vitro* 상에서 *M. abscessus* 균주에 직접적으로 22099를 처리하였을 때의 균 성장 저해능을 나타낸 그래프이다.
 도 8은 CFU assay를 통해 치료 불응성 환자 유래 *M. abscessus* 균주 (Clinical Mab_R) 감염 대식세포 모델에서의 22099의 균 성장 저해능을 나타낸 그래프이다.

도 9는 치료 불응성 환자 유래 *M. abscessus* 균주 (Clinical Mab_R/ Clinical Mab_S)를 이용하여 22099와 클레리스로마이신 및 아미카신과의 시너지 효과를 나타낸 것이다; (a)는 Clinical Mab_R 균주에 클레리스로마이신과 22099를 함께 직접처리한 결과를 나타낸 것이다; (b)는 Clinical Mab_R 균주에 감염된 대식세포 모델에 클레리스로마이신과 22099를 함께 처리한 결과를 나타낸 것이다; (c)는 Clinical Mab_R 균주에 감염된 대식세포 모델에 아미카신과 22099를 함께 처리한 결과를 나타낸 것이다; (d)는 Clinical Mab_S 균주에 클레리스로마이신과 22099를 함께 직접처리한 결과를 나타낸 것이다; (e)는 Clinical Mab_S 균주에 감염된 대식세포 모델에 클레리스로마이신과 22099를 함께 처리한 결과를 나타낸 것이다; (f)는 Clinical Mab_S 균주에 아미카신과 22099를 함께 직접처리한 결과를 나타낸 것이다; (g)는 Clinical Mab_S 균주에 감염된 대식세포 모델에 아미카신과 22099를 함께 처리한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 *in vivo* 상에서의 22099의 효능을 확인하기 위해 *M. abscessus* 균주 감염 동물모델에서의 후보 치료제 평가 스케줄을 나타낸 것이다.

도 11은 각 실험군별(대조군 및 22099) 마우스의 *M. abscessus* 균주 감염일 (Day 0) 대비 몸무게 변화율을 나타낸 그래프이다.

도 12는 각 실험군별(대조군 및 22099) 마우스의 폐 조직 내 *M. abscessus* 균주의 CFU 비교 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 각 실험군별 H&E 염색을 통한 마우스의 폐 조직 내 염증 정도를 비교한 사진이다(A: No infection군, B: PBS 투여군, C: 22099 투여군, D: 아미카신 투여군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

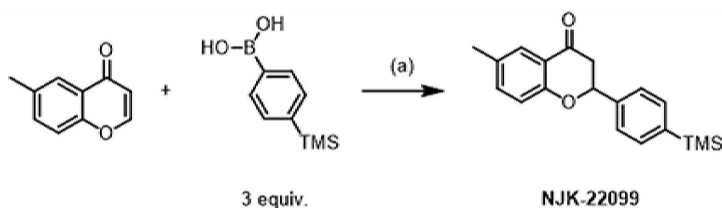
이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다. 실시예들은 다양한 변환을 가할 수 있는 바, 실시예들은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 다양한 형태로 구현될 수 있다.

실시예 1. 6-메틸-2-(4-(트리메틸실릴)페닐)크로만-4-온의 합성(이하, '22099'라 칭함)

NJK-22099 화합물(22099)을 합성하였다. 구체적으로, 6-메틸-4-크로몬(TCI M2764, 50 mg, 0.31 mmol), 팔라듐(II) 트리플루오로아세테이트(Strem chemicals, INC. 46-0280.1, 15 mg, 0.046 mmol), 2,2-비피리딘(TCI B2496, 14.5 mg, 0.093 mmol), 4-(트리메틸실릴)페닐보론산(TCI T2664, 181.7 mg, 0.936 mmol)을 10 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 무수 디메틸 설펍사이드(Sigma-Aldrich 276855-100ML)와 1,4-다이옥산(Alfa Aesar 043821.K2)을 부피비 1:4 비율로 녹인 다음, 트리플루오로 아세트산(Sigma-Aldrich T6508-100ML, 0.0234 mL, 0.31 mmol)을 첨가하고, O₂로 치환 후 100°C Oil bath에서 교반시키고 박층 크로마토그래피(Merck 1.05715.0001)로 반응 양상을 확인하였다. 반응이 끝나면 상온에서 식힌 후 에틸 아세테이트와 물로 추출하고, 유기층을 황산나트륨으로 탈수시켜 얻어낸 크루드 생성물을 플래시 컬럼 크로마토그래피(silica gel 60, 230-400 mesh, 메틸렌 클로라이드/n-헥산)로 정제하여 연한 노랑 고체의 22099(61 mg, 63%)를 얻어냈다.

상기 반응을 하기의 반응식 1에 나타내었다.

[반응식 1]



Reaction condition*: Pd(TFA)₂(15 mol%), bpy(30 mol%), DMSO/dioxane(1:4, 0.6 M), TFA(1 equiv.), O₂, 100 °C(reflux)

[0077] ^1H NMR Spectrum (500 MHz, Chloroform-d) δ 7.73 (m, 1H), 7.62-7.57 (m, 2H), 7.49-7.44 (m, 2H), 7.32 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.44 (dd, J = 13.3, 2.9 Hz, 1H), 3.08 (dd, J = 16.9, 13.3 Hz, 1H), 2.87 (dd, J = 16.9, 2.9 Hz, 1H), 2.33 (s, 3H), 0.28 (s, 9H).

[0078] 합성된 22099의 물리적 특성을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Property	22099
MW ^a	310.468
Type	Flavanone
DonorHB ^b	0
AccpetHB ^b	2.75
PSA	35.577
tPSA ^a	26.3
CLogP ^a	6.554

[0080] ^aCalculated by ChemDraw Professional 19.1

[0081] ^bThe values were predicted by using QikProp in Maestro 13.1 (Schrodinger, LLC, NY, USA)

[0083] 참조예 1. 통계분석

[0084] 실험 결과의 통계적 유의성은 일원분산분석 (One-way ANOVA) 후 신뢰구간 95%를 기준으로 Tukey 사후검정을 통해 분석되었다.

[0086] 실험예 1. *In vitro* 상에서의 22099의 효능 확인

[0087] 실험예 1-1. 미토콘드리아 활성화 산소(mtROS) 저해능 확인

[0088] 각 웰 당 5×10^5 의 대식세포주 J774A.1(한국세포주은행)이 들어가도록 준비한 24웰 플레이트에 opti-MEM (Minimal Essential Medium, Gibco™ 31985062) 배양액으로 1시간 동안 37℃에서 배양 후 20 μM 22099를 2% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco™ 16000044) RPMI(Welgene LM011-01)에 첨가한 배양액으로 교체하여 37℃에서 하루동안 배양하였다. HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco™ 14025092) 버퍼로 세척 후, 10 MOI(multiplicity of infection)의 *M. abscessus* 아종 *massiliense* strain Asan 50594(아산병원 환자 유래)균을 현탁한 10% FBS RPMI를 처리 후 2시간 동안 37℃에서 배양하여 감염시켰다. HBSS 버퍼로 세척 후, 50 $\mu\text{g/mL}$ 아미카신(amikacin, Sigma PHR1654-1G), 2% FBS가 첨가된 RPMI에서 37℃로 1시간 배양하여 세포 외부의 *M. abscessus*를 제거하였다. 세척 후 2% FBS RPMI에 각 농도의 화합물 또는 mito-TEMPO(미토콘드리아 표적 항산화제, Sigma SML0737-5MG)를 처리 후 37℃에서 하루동안 배양하였다.

[0089] mtROS 염색을 위해 세포 배양액을 제거하고, 세척한 다음 HBSS 버퍼에 mitoSOX™(Invitrogen™ M360085)를 5 μM 농도로 희석하여 37℃에서 10분간 처리하였다. 이후 HBSS 버퍼로 세척한 다음, 세포를 수득하여 BD사의 Fortessa X-20 기기를 이용하여 유세포 분석을 진행하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0090] 도 4는 mitoSOX™ 및 유세포분석을 통한 22099의 미토콘드리아 활성화산소 저해능을 확인한 그래프이다.

[0091] 도 4에 나타난 바와 같이, 유세포 분석을 통해 감염군(Infection only)에서 미토콘드리아 활성화산소가 음성 대조군(No infection)에 비해 증가하며, 이러한 미토콘드리아 활성화산소의 증가는 22099 처리를 통해 유의미한 수준으로 저해됨을 확인하였다.

[0093] 실험예 1-2. *M. abscessus*에 대한 22099의 효능 및 안전성 확인

[0094] 대식세포주인 J774A.1을 이용하여 *M. abscessus*-마크로파지 감염 모델로 화합물 간접처리 방식의 실험을 진행하였다. 구체적으로, 각 웰에 1×10^5 의 J774A.1을 LumiNunc™ 96웰 플레이트(Thermo 437796)에 시딩(seeding)하여 하룻밤 배양하고 Opti-MEM에서 1시간 세포 기아상태(starvation)로 만든 다음, 22099 및 클래리스로마이신(CLR, 양성대조군)을 2% FBS RPMI-1640에 농도별로 희석하여 J774A.1에 하룻밤동안 전처리하였다. 화합물이 든 배양액을 제거한 뒤 Mab_luxG13(luminescence를 자체적으로 발현하는 *M. abscessus* 임상균주, 아산병원 환자 유래)을 J774A.1에 10 MOI로 2시간동안 감염시켰다. 감염시킨 Mab_luxG13을 제거하고 PBS로 세척해준 후 10 μ M의 아미카신이 포함된 RPMI-1640에서 약 2시간동안 배양하여 세포안으로 들어가지 못한 Mab_luxG13을 불활성화시켰다. 아미카신이 든 배양액을 제거하고 22099 및 클래리스로마이신을 농도별로 희석시킨 2% FBS RPMI-1640에서 배양하고 24시간 뒤에 Tecan F200 Microplate Reader를 통해 luminescence를 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0095] 도 5에 나타난 바와 같이, luminescence를 이용하여 대식세포 내에 존재하는 *M. abscessus*의 양을 측정한 결과 음성 대조군인 DMSO에 비해 22099의 처리시 *M. abscessus*의 성장이 저해되는 경향성을 보였고, 특히, 고농도로 처리할수록 더욱 많은 저해가 일어났으며, 농도에 따른 저해가 이루어지는 양상을 확인하였다.

[0097] 실험예 1-3. 22099의 세포 독성 확인

[0098] 1×10^5 의 J774A.1을 96웰 플레이트에 시딩하여 하룻밤 배양 후, Opti-MEM에서 1시간 세포 기아상태로 만든 다음, 22099를 2% FBS RPMI-1640에 농도별로 희석하여 J774A.1에 14시간동안 처리하였다. 화합물 제거 후, 전날 RPMI-1640에 희석하여 37℃에서 배양한 40 μ g/ml의 Neutral red 용액(Sigma N4638-1G)을 70 μ m 체에 걸러 결정(crystal)을 제거한 뒤 J774A.1에 2시간동안 처리하였다. Neutral red 용액을 제거하고 destain 용액(50% 에탄올, 49% 증류수, 1% 아세트산) 150 μ l를 처리하여 10분간 흔들고(shaking), 세포안의 neutral red를 용출시킨 다음, Tecan F200 Microplate Reader를 통해 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0099] 도 6은 NRU assay(Neutral Red Uptake assay)를 통한 J774A.1에서의 22099의 세포독성을 확인한 그래프이다.

[0100] 도 6에 나타난 바와 같이, 22099의 농도별(5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) 처리군 모두 음성대조군(DMSO)과 유사했으며, 유의미한 수준의 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다.

[0102] 실험예 1-4. 22099의 *M. abscessus* 직접 처리시 효과

[0103] 100 μ g/ml의 카나마이신(Kanamycin, Sigma K1876-25G)을 포함한 7H9 액체배지(BD Difco™ 271310)에서 배양한 Mab_luxG13을 7H9 액체배지에 OD_{600nm}=0.2가 되도록 희석하여 LumiNunc™ 96웰 플레이트에 100 μ l를 넣어준 후 22099 및 클래리스로마이신(CLR, 양성대조군)을 농도별로 7H9 액체배지에 희석하여 100 μ l를 추가로 넣어 Tecan F200 Microplate Reader를 이용해 24시간 뒤 luminescence를 측정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0104] 도 7은 *M. abscessus*에 직접적으로 22099를 처리하였을 때의 저해능을 확인한 그래프이다.

[0105] 도 7에 나타난 바와 같이, 음성대조군인 DMSO에 비해 고농도에 더욱 많은 저해가 보이는 농도 의존적 저해 패턴은 대식세포 내의 *M. abscessus* 뿐만 아니라 균에 직접 22099를 처리하였을 때에도 나타남을 확인하였다.

[0107] 실험예 2. 치료 불응성 환자 유래 *M. abscessus*에 대한 22099의 효능 확인

[0108] 실험예 2-1. 대식세포 감염 모델에서의 22099의 효능 확인

[0109] 치료 불응성 *M. abscessus* 폐질환 환자의 균주를 이용하여 대식세포에 감염시킨 뒤 22099에 대한 효능을 확인하였다. 구체적으로, 전달받은 환자 유래 균주들 중 표면이 거친(Rough) 콜로니 형태를 보이는 *M. abscessus*(Clinical Mab_R)를 대상으로 효능 평가를 용이하게 하게 위해 균 자체적으로 luminescence를 발현하도록 제작한 Clinical Mab_R_luxG13을 이용하였다.

[0110] 1×10^5 의 J774A.1을 LumiNunc™ 96웰 플레이트의 각 웰에 시딩하여 하루 동안 배양하고 Opti-MEM에서 1시간 세포

기아상태로 만들었다. 화합물을 2% FBS RPMI-1640에 농도별로 희석하여 J774A.1에 하룻밤 처리하였다. 화합물이 포함된 배양액을 제거한 뒤 감염균을 J774A.1에 10 MOI로 2시간동안 감염시킨 후, 균이 포함된 배양액을 제거하고 PBS로 세척해준 후 10 μ M의 아미카신이 포함된 10% FBS RPMI-1640에서 약 2시간동안 배양하여 세포안으로 들어가지 못한 박테리아를 불활성화시켰다. 아미카신이 든 배양액을 제거하고 화합물을 농도별로 희석시킨 2% FBS RPMI-1640에서 48시간동안 배양한 다음, PBS로 세척한 뒤 1% Triton X-100이 포함된 PBS를 넣어 J774A.1을 용해(lysis)시켰다. 용해시킨 용액을 PBS로 연속 희석하여 7H10 고체배지(BD Difco™ 262710)에 20 μ l씩 떨어뜨려 37°C에서 콜로니가 형성될 때까지 배양 후 생긴 콜로니를 계수하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0111] 도 8은 CFU assay를 통해 수행한 환자 유래 *M. abscessus* 균주(Clinical Mab_R)에 대한 22099의 유효성을 평가한 그래프이다.

[0112] 도 8에 나타난 바와 같이, 대식세포 내의 치료 불응성 환자로부터 유래된 Clinical Mab_R_luxG13에 대해 22099를 10 μ M, 20 μ M로 처리시 음성대조군인 DMSO 대비 효과적으로 저해시킬 수 있음을 CFU assay를 통해 확인하였다.

[0114] 실험예 2-2. 기존 항생제와의 시너지 효능 확인

[0115] 기존 *M. abscessus* 치료에 사용되고 있는 항생제 클래리스로마이신(clarithromycin, Sigma PHR1038-500MG)과 아미카신에 대해 22099와 함께 사용했을 때 시너지 효과가 있는지 확인을 위해 직접처리 및 대식세포 감염 모델에서 실험을 수행하였다.

[0116] 구체적으로, 직접처리 실험의 경우 배양한 임상 균주를 OD=0.02가 되도록 7H9 액체배지에 희석하여 LumiNunc™ 96웰 플레이트에 100 μ l씩 넣어주고 22099와 항생제를 농도별로 7H9 액체배지에 희석하였다. 항생제는 플레이트의 위에서부터 아랫방향으로 농도가 낮은 것부터 50 μ l씩, 22099는 왼쪽에서부터 오른쪽 방향으로 농도가 낮은 것부터 50 μ l씩 처리하여 checkerboard assay를 수행하였다. 처리를 마친 후 Tecan F200 Microplate Reader를 통해 시간별로 luminescence를 측정하였다.

[0117] 대식세포 감염 모델 실험의 경우 각 웰에 1×10^5 의 J774A.1을 LumiNunc™ 96웰 플레이트에 시딩하여 12~16시간동안 배양하고 임상 균주를 J774A.1에 10 MOI로 2시간동안 감염시켰다. 감염을 위한 균이 함유된 배양액을 제거하고 PBS로 세척해준 후 10 μ M의 아미카신이 포함된 RPMI-1640에서 약 2시간동안 배양하여 세포 안으로 들어가지 못한 균을 불활성화시켰다. 아미카신이 든 배양액을 제거하고 22099와 항생제를 농도별로 희석시킨 2% FBS RPMI-1640를 마찬가지로 항생제는 플레이트의 위에서부터 아랫방향으로 농도가 낮은 것부터 100 μ l씩, 22099는 왼쪽에서부터 오른쪽 방향으로 농도가 낮은 것부터 100 μ l씩 처리하여 checkerboard assay를 수행하였다. 처리를 마친 후 Tecan F200 Microplate Reader를 통해 시간별로 luminescence를 측정하였다.

[0118] 시너지 효과의 분석은 웹기반 분석도구인 SynergyFinder Plus (https://tangsoftwarelab.shinyapps.io/synergyfinder/_w_0138f0d0/#!/)를 이용해 분석하였으며 ZIP, Bliss, Loewe 및 HSA 총 4가지 계산방식을 통해 시너지 스코어가 5 이상인 경우 시너지가 효과가 있다고 간주하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0119] 도 9는 치료 불응성 환자 유래 임상 균주에 대한 22099의 클래리스로마이신 및 아미카신과의 시너지 효과를 나타낸 그래프이다.

[0120] 도 9에 나타난 바와 같이, 기존에 이용되고 있는 항생제인 클래리스로마이신 및 아미카신과의 시너지 효과를 다양한 임상 균주에 직접 처리하거나 대식세포에 감염시켜 확인해 보았을 때 Clinical Mab_R의 경우 직접처리시 클래리스로마이신과 시너지효과가 확인되었으며, 대식세포 감염모델에서는 클래리스로마이신 및 아미카신과의 시너지효과를 확인하였고(도 9a, b 및 c), 표면이 매끄러운(Smooth) 콜로니 형태를 보이는 *M. abscessus* 인 Clinical Mab_S에 대해서는 직접처리시와 대식세포 감염모델에서 클래리스로마이신 및 아미카신과의 시너지 효과를 확인하였다(도 9d, e, f 및 g).

[0122] 실험예 3. In vivo 상에서의 22099 효능 확인

[0123] 마우스(OrientBio, BALB/c 암컷, 7주령)에서 치료 불응성 폐질환 환자 유래 *M. abscessus* 호흡기 감염에 대한 치료능을 확인하였다. 구체적으로, 마우스가 가진 면역세포에 의한 균의 제거를 저해함으로써 *M. abscessus*의

감염률을 높이기 위해 사이클로포스파마이드(Cyclophosphamide, Sigma PHR1401-1G)를 처리해 만든 호중구 감소증(neutropenic) 모델 마우스에 감염을 진행하였다. BALB/c 암컷 마우스에 사이클로포스파마이드(150 mg/kg)를 IP route(복강내 투여)로 감염 4일 전, 1일 전에 투여하여 호중구 감소증 마우스를 유도하였다. 위 평가에서 이용한 치료 불응성 폐질환 환자에서 유래한 *M. abscessus* (Clinical Mab_R)를 배양하여 마우스에 1×10^6 CFU (Colony Forming Unit)를 IN route(비강내 투여)로 호흡기 감염을 유도하였다. PBS 투여군을 음성 대조군으로, 아미카신 투여군을 양성 대조군으로 두며 22099 투여군의 효능을 확인하기 위해 20 mg/kg의 22099를 감염 하루 뒤부터 감염 13일 차까지 매일 IP route로 투여하였으며, 그 과정을 도 10에 나타내었다.

[0124] 감염 14일 차에 마우스 희생이 이루어질 때까지 매일 마우스의 체중을 측정하여 변화 양상을 확인하였다. 마우스 희생 시 채혈 및 폐 조직을 적출한 후, 폐 조직 중 일부는 10% 포르말린에 고정하고, 나머지 폐 조직을 PBS(Phosphate buffered saline)에 균질화 후 폐 내의 CFU를 7H10 고체배지에서 측정하였다. 10% 포르말린에 고정된 폐 조직은 파라핀에 포매하여 Hematoxylin-Eosin (H&E 염색)을 진행하고, 투여한 후보 치료제로 인한 폐 조직 내의 염증 반응 완화 정도 비교 등 조직병리학적으로 분석하여 22099의 효능을 평가하였다. 그 결과를 도 11 내지 도 13에 나타내었다.

[0125] 도 11은 감염이 이루어진 날인 Day 0에 대비하여 14일간 측정된 체중의 비율을 나타낸 그래프이다.

[0126] 도 11에 나타난 바와 같이, 사이클로포스파마이드 처리만 이루어지고 아무것도 감염되지 않은 No infection 군은 Day 14일에 체중이 111% 증가한 모습을 보였지만, Clinical Mab_R 감염이 이루어지고 PBS만이 투여된 PBS군에서는 108% 증가한 모습을 보여 체중 증가율이 소폭 감소한 모습을 보였다. 아미카신 투여군(AMI)은 PBS군과 비슷한 몸무게 변화율을 보였고, 22099 투여군(22099 IP)은 No infection군과 비슷한 양상을 보이다가 Day 11부터 소폭 하락하여 PBS군과 비슷한 양상을 보였다.

[0127] 도 12는 약물 투여로 인한 폐 조직 내의 Clinical Mab_R의 양을 나타낸 그래프이다.

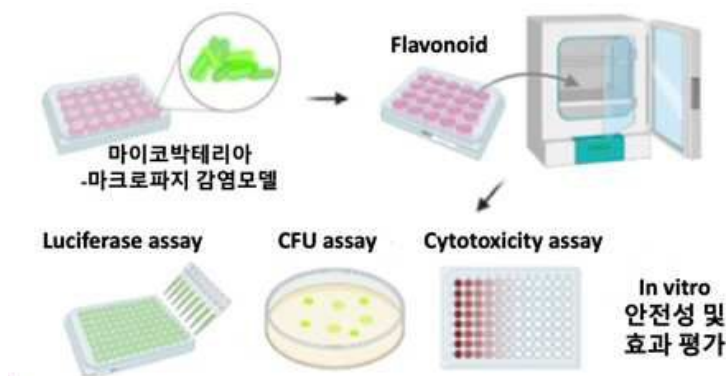
[0128] 도 12에 나타난 바와 같이, CFU assay를 진행한 결과에서 모든 약물 투여군(22099, 아미카신)이 PBS군보다 통계학적으로 유의미하게 CFU가 감소함을 보였으며, 기존 치료에서 사용되고 있는 아미카신군이 PBS군에 비해 85.5% 감소하였고, 22099가 47.1% 감소하였음을 확인하였다.

[0129] 도 13은 조직학적 분석을 위해 감염된 마우스의 고정된 폐 조직을 H&E 염색한 뒤 폐 세포 사이의 간격 및 밀집도 등으로 폐 조직의 염증 정도를 확인한 사진이다.

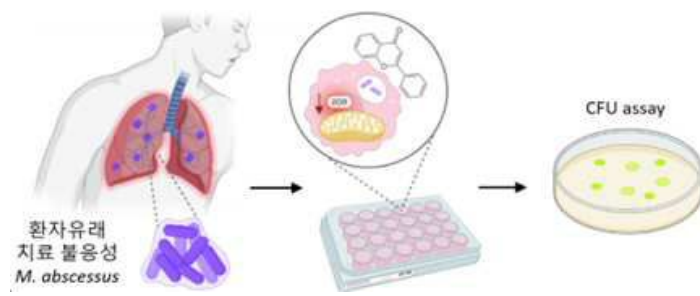
[0130] 도 13에 나타난 바와 같이, 감염이 이루어진 마우스(B: PBS 투여군)의 폐 조직은 폐 세포 사이의 간격이 좁아지고 붉게 염색되는 부분이 많아진 것을 보아 폐 조직 내 염증이 높아진 것을 알 수 있었으며, 이러한 폐 조직 내 염증이 22099를 투여한 군에서 크게 호전됨을 확인하였다.

도면

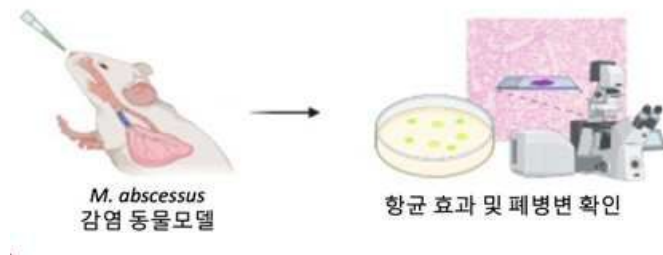
도면1



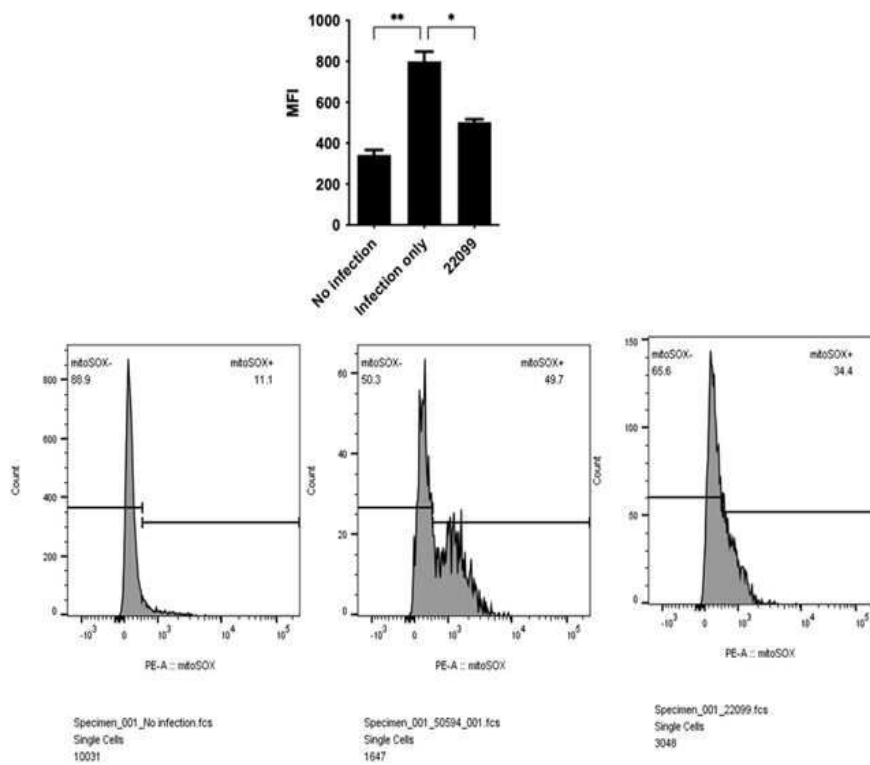
도면2



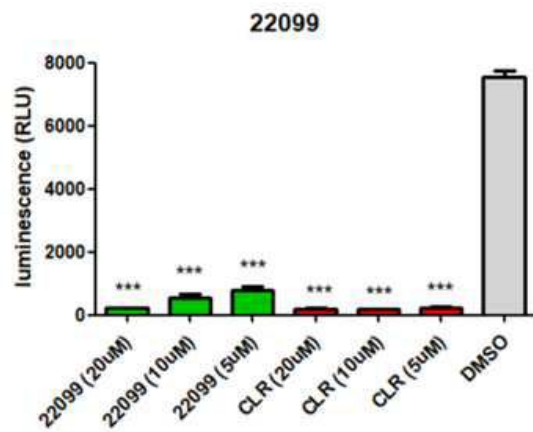
도면3



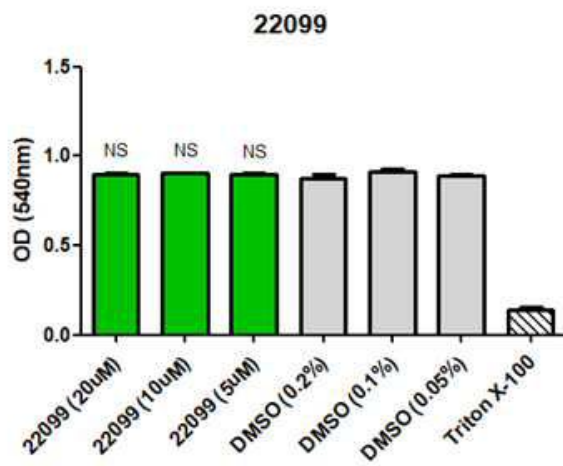
도면4



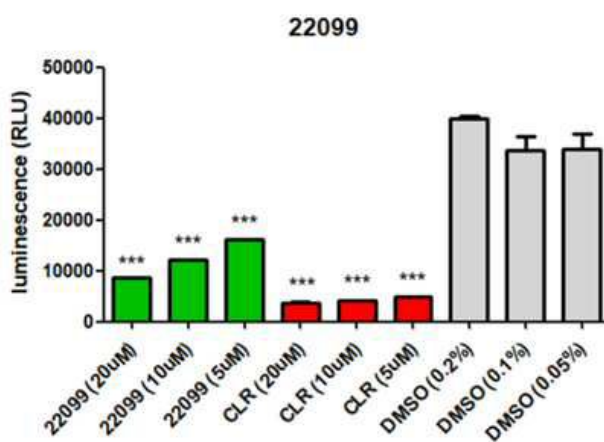
도면5



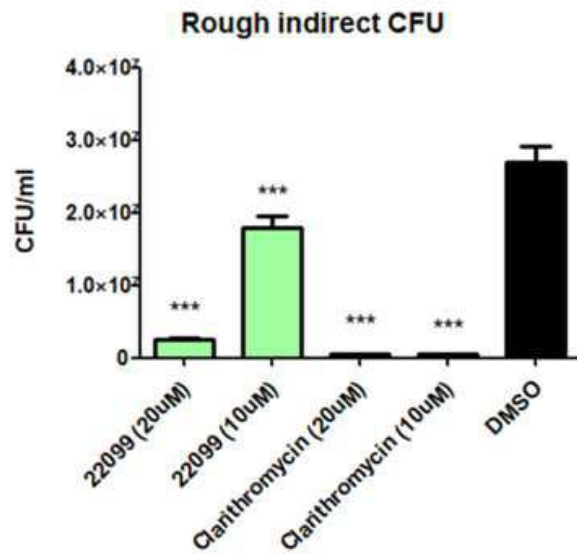
도면6



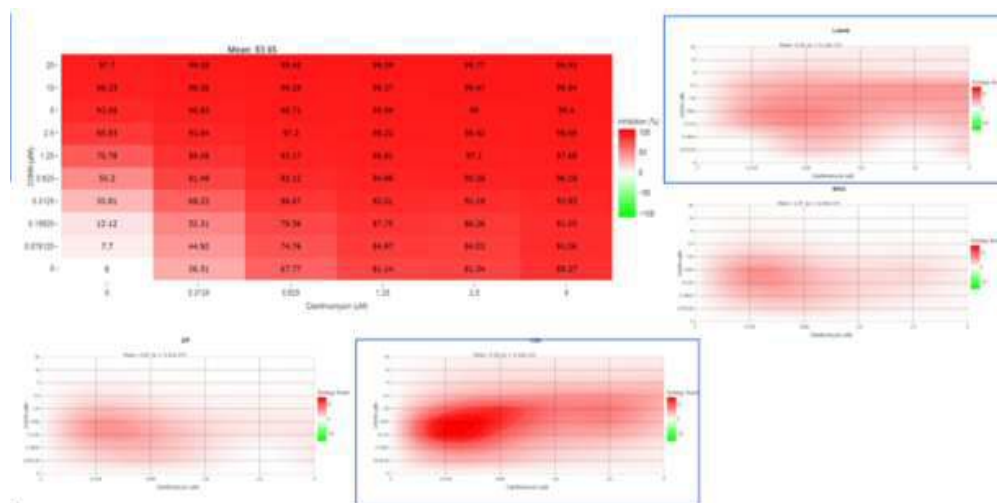
도면7



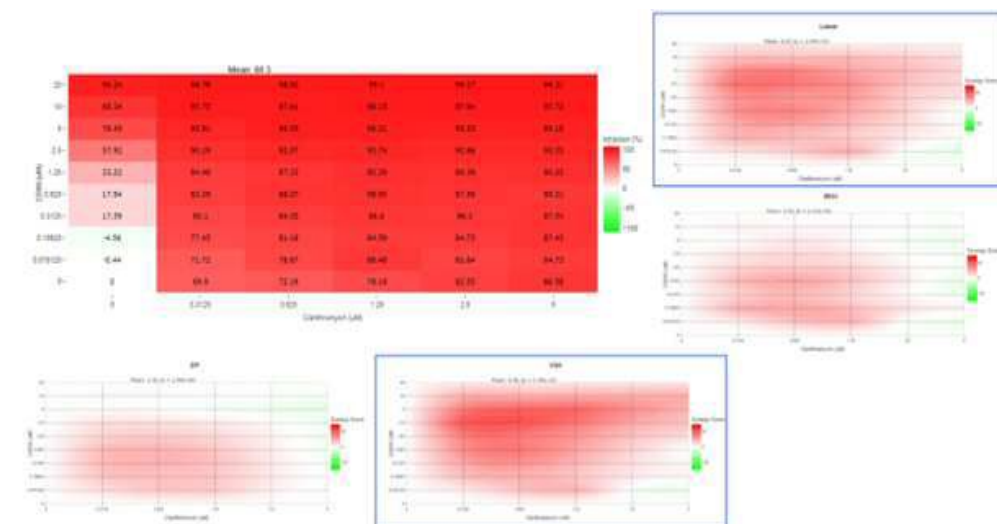
도면8



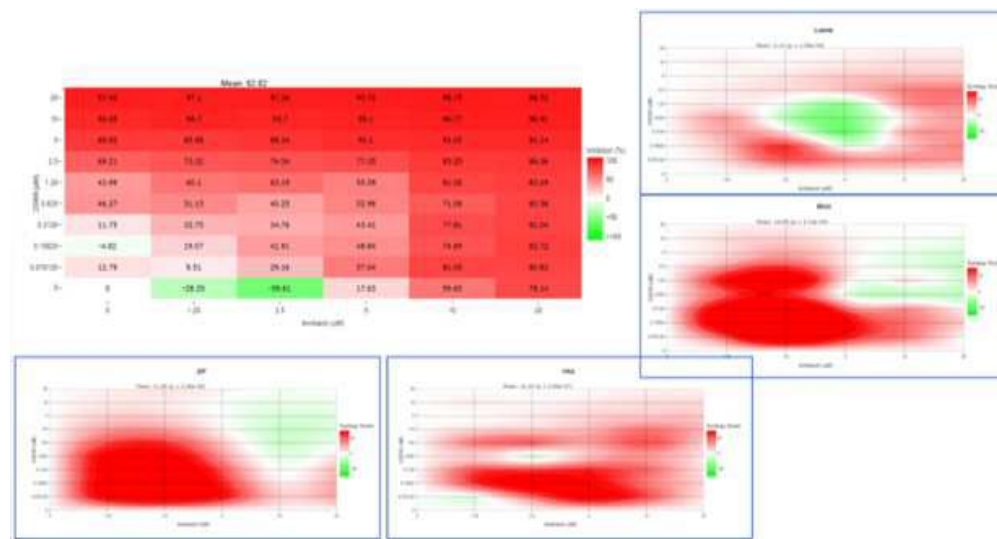
도면9a



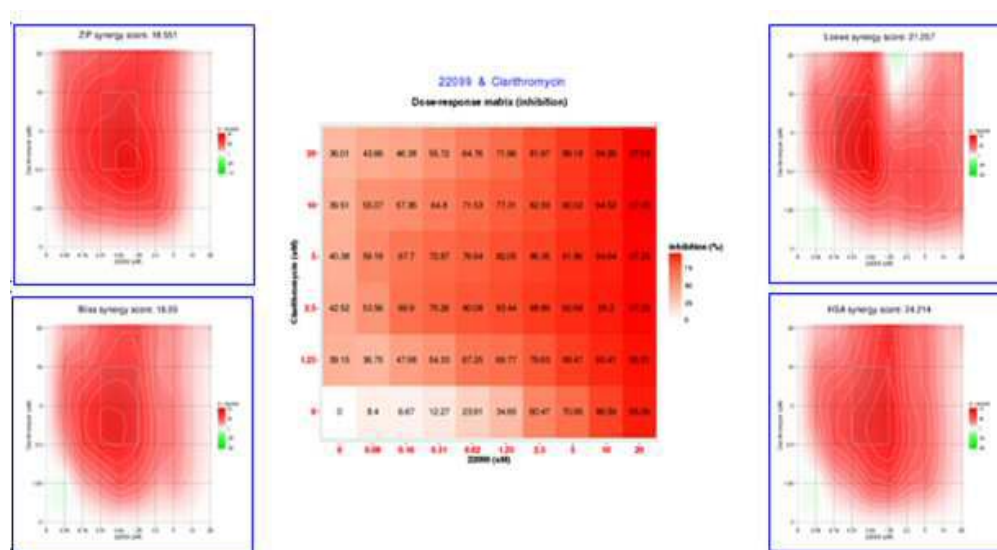
도면9b



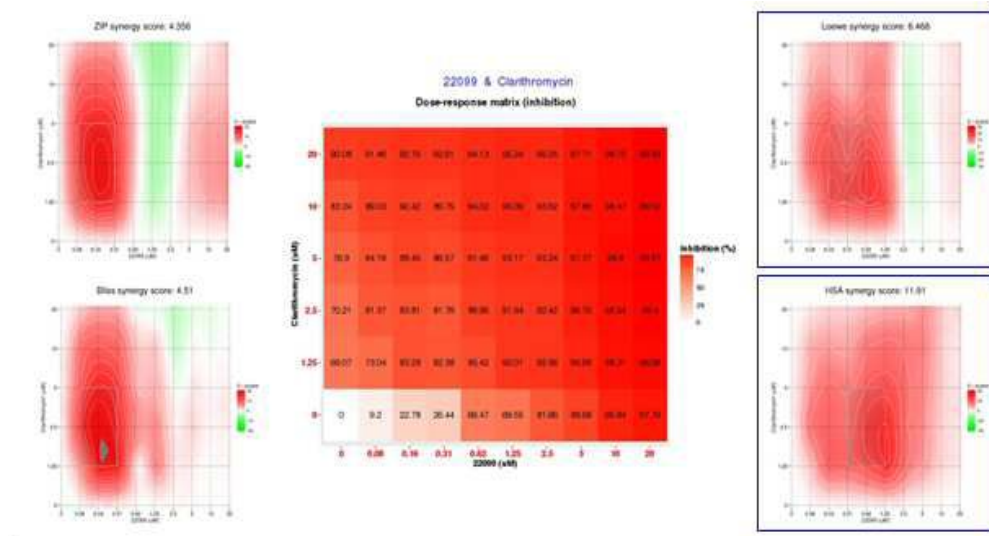
도면9c



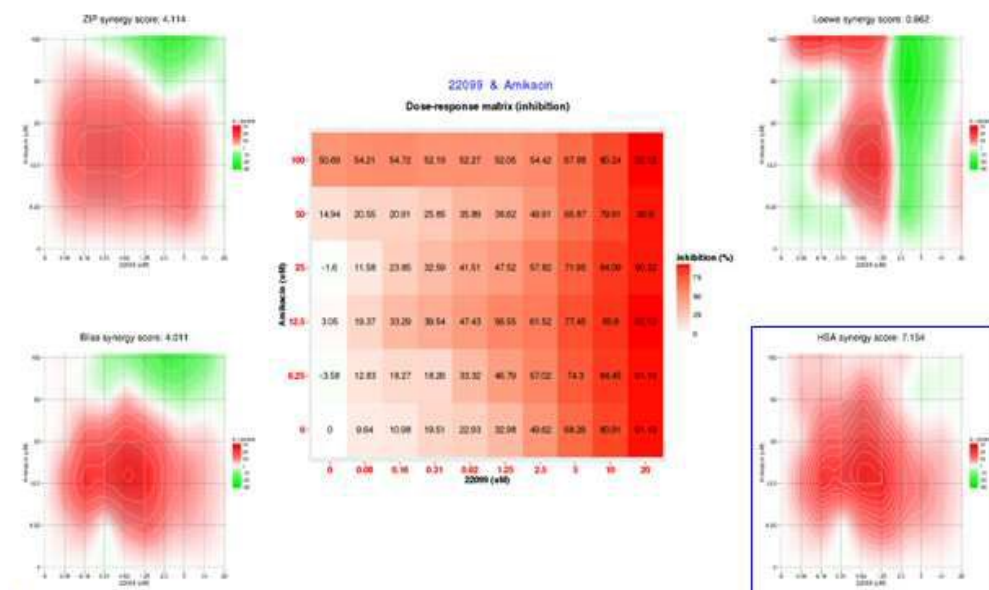
도면9d



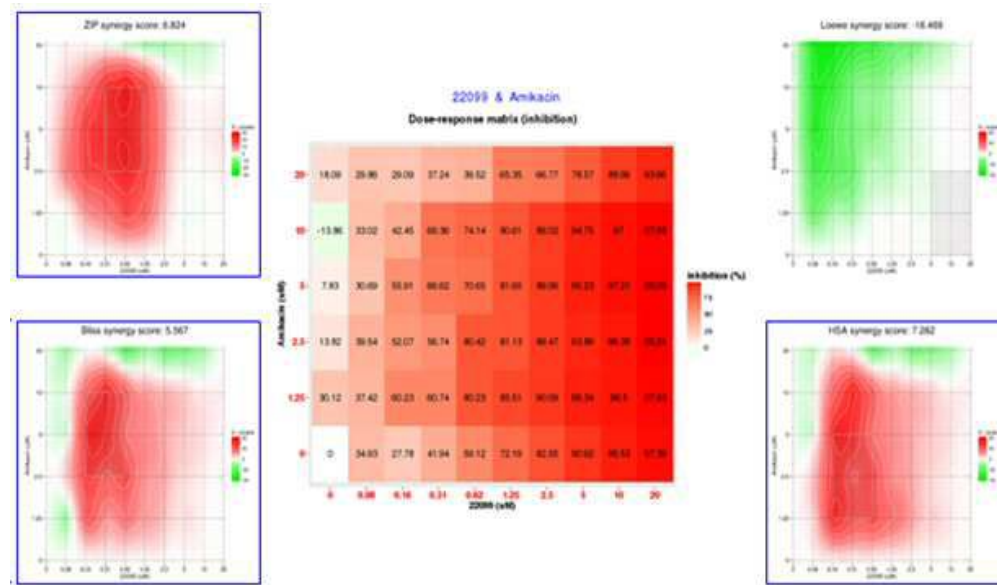
도면9e



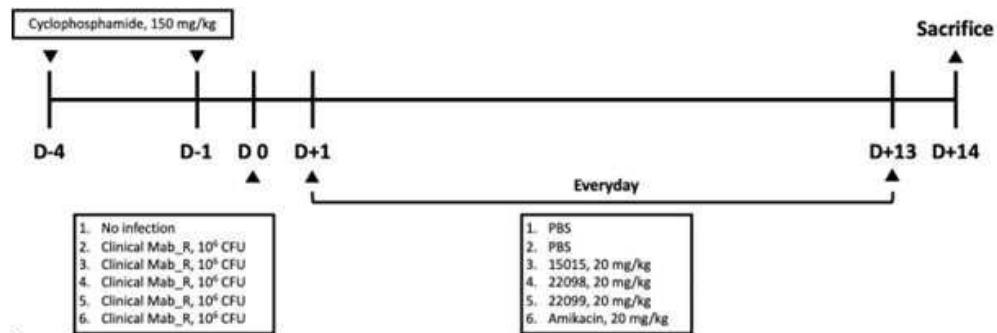
도면9f



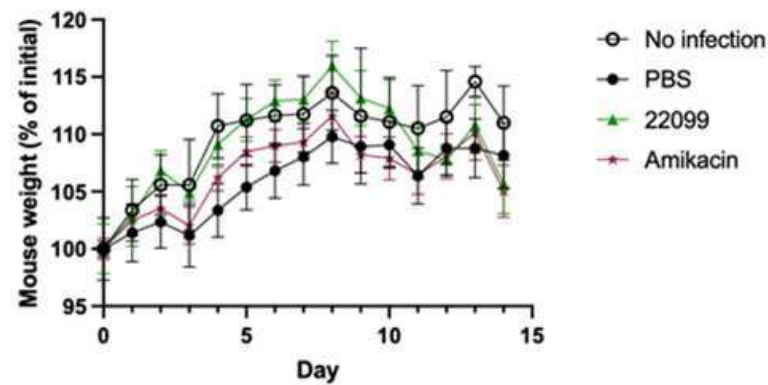
도면9g



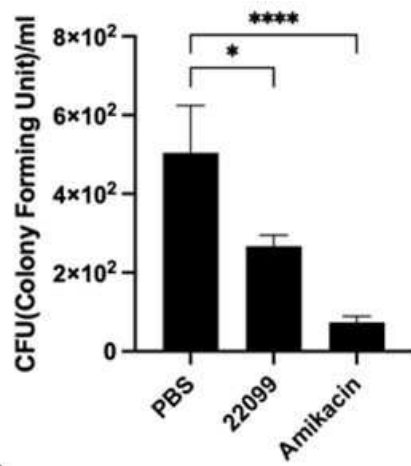
도면10



도면11



도면12



도면13

