



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월06일

(11) 등록번호 10-2496267

(24) 등록일자 2023년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/12 (2006.01) A61K 31/10 (2006.01)

A61K 31/417 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/12 (2013.01)

A61K 31/10 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0015714

(22) 출원일자 2021년02월03일

심사청구일자 2021년02월03일

(65) 공개번호 10-2022-0112123

(43) 공개일자 2022년08월10일

(56) 선행기술조사문헌

World Journal of Clinical Cases, 3(7),
575-598, 2015.

Viruses, 10, 308/1-22, 2018.

Expert Opinion on Therapeutic Patents, 21(5),
657-679, 2011.

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대
학교)

(72) 발명자

윤상선

서울특별시 은평구 백련산로 36, 303동 806호(응
암동, 백련산 힐스테이트 3차)

민경배

서울특별시 서대문구 봉원사길 40, 101호(대신동)

(74) 대리인

특허법인인벤싱크

전체 청구항 수 : 총 13 항

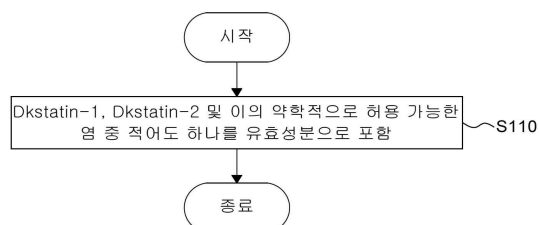
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 항병원성 조성물 및 이를 포함하는 감염성 질병 예방 조성물

(57) 요약

본 명세서에서는 다양한 병원체에 의한 감염성 질병을 예방할 수 있는 항병원성 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 31/417 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 31/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|-------------|--|
| 과제고유번호 | 1711105311 |
| 과제번호 | 2017M3A9F3041233 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 바이오.의료기술개발(R&D) |
| 연구과제명 | 새로운 유전자 스크리닝 시스템을 통한 프로바이오틱스 유전자 기능 연구 |
| 기 여 율 | 1/2 |
| 과제수행기관명 | 연세대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2020.01.01 ~ 2020.12.31 |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|-------------|---|
| 과제고유번호 | 1465030988 |
| 과제번호 | HR14C0006070020 |
| 부처명 | 보건복지부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국보건산업진흥원 |
| 연구사업명 | 연구중심병원육성(R&D) |
| 연구과제명 | 제2유닛 (7세부) 마이크로바이옴 활용 감염 및 면역질환 치료기술 개발 |
| 기 여 율 | 1/2 |
| 과제수행기관명 | 연세대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2020.01.01 ~ 2020.12.31 |

공지예외적용 : 있음

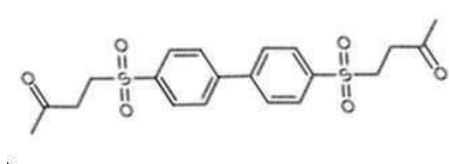
명세서

청구범위

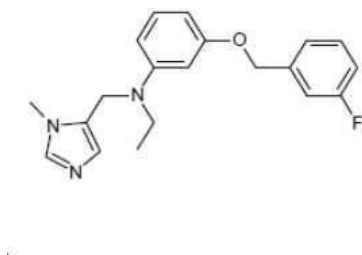
청구항 1

하기 화학식 1 화합물, 화학식 2의 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 적어도 하나를 유효성분으로 포함하는, 결핵, 폐렴, 요로감염, 창상감염, 뇌수막염, 골수염, 상처감염, 내안구염, 안내염, 간농양, 인후염, 설사, 패혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증, 심내막염, 담낭염 및 이하선염 중 적어도 하나에 해당하는 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은,

병원체의 퀸럼 센싱(quorum sensing, QS)에 대한 전사체의 발현을 억제시키는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 쿼럼 센싱에 대한 전사체는,

lasI, lasR, rhII, rhIR, pqsA, pqsB, pqsC, pqsD, pqsE, phnA 및 phnB 중 적어도 하나를 포함하는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은,

병원체의 30s 리보솜 단백질(30s Ribosomal proteins) 및 50s 리보솜 단백질(50s Ribosomal proteins)에 대한 전사체의 발현을 증가시키는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 30s 리보솜 단백질에 대한 전사체는,

rpsU, rpsA, rpsB, rpsP, rpsD, rpsK, rpsM, rpsE, rpsH, rpsN, rpsQ, rpsC, rpsS, rpsJ, rpsG, rpsL, rpsI, rpsT, rpsO, rpsR 및 rpsF 중 적어도 하나를 포함하고,

상기 50s 리보솜 단백질에 대한 전사체는,

rpmA, rpmB, rpmC, rpmD, rpmE, rpmF, rpmG, rplA, rplB, rplC, rplD, rplE, rplF, rplS, rplO, rplP, rplU, rplN, rplW, rplV, rplX 및 prmA 중 적어도 하나를 포함하는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은,

병원체의 병독 인자(virulence factors)에 대한 전사체의 발현을 억제시키는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 병독 인자에 대한 전사체는,

lasA, lasB, rhlA, rhlB, aprA, aprD, aprE, aprF, tadB, tadC, tadD, hcnA, hcnB, hcnC, phzM, phzS, phzH, phzA1, phzB1, phzC1, phzD1, phzE1, phzF1, phzG1, phzA2, phzB2, phzC2, phzD2, phzE2, phzF2, phzG2, pchA, pchB, pchC, pchD, pchE, pchF, pchG 및 pchR 중 적어도 하나를 포함하는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은,

DksA 단백질 및 DksA1을 포함하는 DksA 상동체 단백질과 RNA 중합효소의 결합을 억제하는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은,

병원체의 병원성 병독 인자(pathogenic virulence factor)의 활성 및 생성을 억제하는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 병원성 병독 인자는,

엘라스타제(elastase) 또는 파이오시아닌(pyocyanin)인, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은,

병원체(phthogen)에 대한 항독성(anti-virulence) 또는 항병원성 활성을 갖는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용

약학적 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서,

병원체는,

박테리아, 바이러스, 원생동물, 프라이온, 바이로이드 및 진균 중 적어도 하나이고,

상기 박테리아는,

슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코커스 페루스(*Streptococcus ferus*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 스탕필로코커스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 엔테로코커스 피칼리스(*Enterococcus faecalis*), 바실러스 리체니포미스(*Bacillus licheniformis*), 스탕필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 리스테리아 이노쿠아(*Listeria innocua*), 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 스트렙토코커스 파라상귀니스(*Streptococcus parasanguinis*), 살모넬라 타이피무리움(*Salmonella typhimurium*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*), 스트렙토코커스 상귀니스(*Streptococcus sanguinis*), 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*), 스트렙토코커스 파이오젠(*Streptococcus pyogene*), 스트렙토코커스 미티스(*Streptococcus mitis*), 리스테리아 이바노비(*Listeria Ivanovii* subsp *ivanovii*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 스트렙토코커스 수이스(*Streptococcus suis*), 크로스트리디움 퍼플린젠스(*Clostridium perfringens*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 쉬겔라 보이디(*Shigella boydii*), 쉬겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 쉬겔라 소네이(*Shigella sonnei*), 살모넬라 콜레라에슈이스(*Salmonella choleraesuis* subsp), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 본고리(*Salmonella bongori*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 레프래(*Mycobacterium leprae*), 크로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumonia*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*), 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 보렐리아 속(*Borrelia* sp.), 바르토넬라 속(*Bartonella* sp.), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 및 마이코플라즈마 뉴모니아(*Mycoplasma pneumonia*) 중 적어도 하나를 포함하는, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은,

외용제 또는 분무제인, 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항병원성 조성물 및 이를 포함하는 감염성 질병 예방 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 천식, 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 및 만성폐쇄성폐질환(COPD) 등의 만성 호흡기질환은 질병 부담이 큰 만성질환으로 지속적인 예방 관리 및 치료 가 요구된다. 이러한, 호흡기 질환의 원인으로는 기회 감염성 인체 유해세균으로 알려진 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)이 있다.

[0003] 녹농균은 토양, 수중 등 자연환경 중에 일반적으로 널리 분포되어 있는 그람 음성 간균이며, 난치성 및 치사성 감염증을 일으킨다. 녹농균의 주된 표적은 생체 방어 기능이 쇠약해진 감염성 환자(숙주)이다. 특히, 기관지 상에 존재하는 점액질층(mucus layer)의 미생물 배출 기능이 저하된 호흡기 질환 환자에게 녹농균은 치명적일 수 있다.

[0004] 이러한, 녹농균과 같은 박테리아성 병원체에 의한 감염의 치료에는 일반적으로 항생제가 사용된다. 항생제(antibiotics)는 미생물이 생산하는 대사산물로서, 소량으로 다른 미생물의 발육을 억제하거나 사멸시키고, 병원체에 의한 감염증을 치료하는 약물이며, 감염 증세에 뛰어난 효능을 보이기 때문에 감염 치료에 주로 사용되고 있다.

[0005] 그러나, 항생제의 남용으로 인하여 병원체는 스스로 저항할 수 있는 힘인 내성을 획득할 수 있다. 이러한 내성에 대한 역치는 항생제가 처리될수록 점차 증가할 수 있음에 따라, 결국 병원체는 어떠한 항생제에도 저항할 수 있는 슈퍼박테리아로 변화될 수 있다. 보다 구체적으로, 항생제로부터 생존하기 위하여, 박테리아는 스스로 돌연변이를 유도하여, 항생제 내성을 유발하는 유전자를 만들어 약제내성과 같은 다양한 다제내성에 대한 돌연변이를 포함하는 박테리아로 변화될 수 있다. 더욱이, 내성균들은 내성 유전자를 다른 병원체들에게 전달하여, 다양한 내성균의 확대를 유도할 수 있다.

[0006] 결국, 전술한 녹농균을 포함하는 다양한 박테리아성 병원체는 다제내성을 가질 수 있음에 따라, 완치를 목적으로 갖는 항생제 처방은 효과를 기대하기 어렵다.

[0007] 이에, 약제내성 병원체의 출현을 막기 위하여, 최근에는 생체 내 침투한 병원체가 숙주를 위협하는데 이용하는 독성인자의 발현이나 활성을 억제하여 병원성을 감소시키는 항독성제가 병원체에 의한 감염질환을 치료하는 방법으로 제시되고 있다.

[0008] 이러한, 항독성제에 의하여 독성을 잃은 병원체는 인체의 면역작용에 의해 사멸되어 궁극적으로 치료효과를 기대할 수 있게 된다. 나아가, 항독성제는 실제로 기존에 알려진 항생제와 전혀 다른 기전으로 작용됨에 따라, 보다 넓은 범위의 다양한 병원체에 적용되어 치료제로 사용될 수 있다. 또한, 항독성제는 기존에 사용되고 있는 항생제와 병용투여함으로써, 항생제의 투여용량을 줄이거나 활성을 증가시키는데 이용될 수 있다.

[0009] 그러나, 전술한 바와 같은 항독성제에 대한 연구들이 보고되고 있지만, 실제로 이러한 방법을 이용한 치료제의 개발은 미미한 실정임에 따라, 병원균에 의한 감염성 질환에 치료 효과를 가지며 항생제의 이용을 줄일 수 있는 새로운 치료용 조성물에 대한 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.

[0010] 발명의 배경이 되는 기술은 본 발명에 대한 이해를 보다 용이하게 하기 위해 작성되었다. 발명의 배경이 되는 기술에 기재된 사항들이 선행기술로 존재한다고 인정하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

(특허문헌 1) KR 10-1939726 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 한편, 본 발명의 발명자들은, 다양한 병원체들이 스트레스적 환경에서 특정 인자를 방출함으로써 이를 극복한다는 것을 인지하였다. 보다 구체적으로, 본 발명의 발명자들은 병원체가 스트레스에 노출될 경우, ppGpp와 같은 분자를 발현함으로써, 스트레스에 대한 저항성을 가지고 DksA라는 인자에 의하여 이의 기작이 더욱 활발해질 수

있다는 것을 인지하였다.

[0012] 이에, 본 발명의 발명자들은 DksA라는 인자 및 병원체에 대한 병원성의 연관성에 대하여 더욱 주목하였다.

[0013] 보다 구체적으로, 본 발명의 발명자들은, 전술한 DksA의 인자를 억제할 경우, 병원체의 병원성과 관련된 전사 인자들의 발현이 낮아진다는 것을 발견하였다.

[0014] 그 결과, 본 발명의 발명자들은 전술한 DksA의 인자를 효과적으로 억제할 수 있는 화학적 조성물을 발견하였으며, 이에 따라, 병원체에 의한 감염 치료를 효과적으로 증진시킬 수 있다는 것을 발견하였다.

[0015] 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 다양한 병원체에 의한 감염성 질병을 예방할 수 있는 항병원성 조성물을 제공하는 것이다.

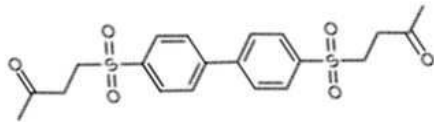
[0016] 나아가, 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는, 병원체의 스트레스에 대한 저항성을 낮추어 항생제에 대한 감수성을 향상시킬 수 있음에 따라, 치료의 효과를 향상시킬 수 있는 항병원성 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

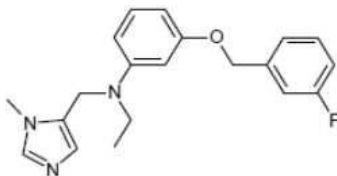
[0018] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1 화합물, 화학식 2의 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 적어도 하나를 유효성분으로 포함하는, 항병원성 조성물을 제공한다.

[0019] [화학식 1]



[0020]

[0021] [화학식 2]



[0022]

[0023] 본 발명의 특징에 따르면, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은, 병원체의 퀴럼 센싱(quorum sensing, QS)에 대한 전사체의 발현을 억제시킬 수 있으며, 이때, 퀴럼 센싱에 대한 전사체는 lasI, lasR, rhII, rhIR, pqsA, pqsB, pqsC, pqsD, pqsE, phnA 및 phnB 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은, 병원체의 30s 리보솜 단백질 (30s Ribosomal proteins) 및 50s 리보솜 단백질 (50s Ribosomal proteins)에 대한 전사체의 발현을 증가시킬 수 있으며, 이때, 30s 리보솜 단백질에 대한 전사체는 rpsU, rpsA, rpsB, rpsP, rpsD, rpsK, rpsM, rpsE, rpsH, rpsN, rpsQ, rpsC, rpsS, rpsJ, rpsG, rpsL, rpsI, rpsT, rpsO, rpsR 및 rpsF 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 또한 50s 리보솜 단백질에 대한 전사체는 rpmA, rpmB, rpmC, rpmD, rpmE, rpmF, rpmG, rplA, rplB, rplC, rplD, rplE, rplF, rplS, rplO, rplP, rplU, rplN, rplW, rplV, rplX 및 prmA 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은, 병원체의 병독 인자(virulence factors)에 대한 전사체의 발현을 억제시킬 수 있으며, 이때, 병독 인자에 대한 전사체는 lasA, lasB, rhIA, rhIB, aprA, aprD, aprE, aprF, tadB, tadC, tadD, hcnA, hcnB, hcnC, phzM, phzS, phzH, phzA1, phzB1, phzC1, phzD1, phzE1, phzF1, phzG1, phzA2, phzB2, phzC2, phzD2, phzE2, phzF2, phzG2, pchA, pchB, pchC,

pchD, pchE, pchF, pchG 및 pchR 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물은, DksA1 단백질과 RNA 중합효소의 결합 및 병원체의 병원성 병독 인자(pathogenic virulence factor)의 활성을 억제할 수 있다. 이때, 병원성 병독 인자는, 엘라스타제(elastase) 또는 파이오시아닌(pyocyanin)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 즉, 항병원성 조성물에 의하여 감소될 수 있는 다양한 병원성 병독 인자를 모두 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 병원체(phthogen)에 대한 항독성(anti-virulence) 또는 항병원성 활성을 가질 수 있으며, 이때, 병원체는, 박테리아, 바이러스, 원생동물, 프라이온, 바이로이드 및 진균 중 적어도 하나이고, 박테리아는 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코커스 페루스(*Streptococcus ferus*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 스태필로코커스 사프로피티쿠스(*Staphylococcus saprophyticus*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 엔테로코커스 피칼리스(*Enterococcus fecalis*), 바실러스 리체니포미스(*Bacillus licheniformis*), 스태필로코커스 에피데미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheriae*), 크렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 리스테리아 이노쿠아(*Listeria innocua*), 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 스트렙토코커스 파라상귀니스(*Streptococcus parasanguinis*), 살모넬라 타이피리움(*Salmonella typhimurium*), 스트렙토코커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*), 스트렙토코커스 상귀니스(*Streptococcus sanguinis*), 스트렙토코커스 이니아(*Streptococcus iniae*), 스트렙토코커스 파이오젠(*Streptococcus pyogene*), 스트렙토코커스 미티스(*Streptococcus mitis*), 리스테리아 이바노비(*Listeria Ivanovii* subsp *ivanovii*), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 스트렙토코커스 수이스(*Streptococcus suis*), 크로스트리디움 퍼플렌젠스(*Clostridium perfringens*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 쉬겔라 보이디(*Shigella boydii*), 쉬겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*), 쉬겔라 소네이(*Shigella sonnei*), 살모넬라 콜레라에슈이스(*Salmonella choleraesuis* subsp), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 본고리(*Salmonella bongori*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 마이코박테리움 튜버클로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코박테리움 레프래(*Mycobacterium leprae*), 크로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 클라미디아 뉴모니아(*Chlamydia pneumonia*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 콕시엘라 부르네티(*Coxiella burnetii*), 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 보렐리아 속(*Borrelia* sp.), 바르토넬라 속(*Bartonella* sp.), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 및 마이코플라즈마 뉴모니아(*Mycoplasma pneumonia*) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 또 다른 특징에 따르면, 항병원성 조성물은, 항생제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 더 포함할 수 있으며, 이때, 항생제는 메티실린(methicillin), 옥사실린(oxacillin), 노르플록사신(norfloxacin), 반코마이신(vancomycin), 아미카신(Amikacin), 젠타마이신(Gentamicin), 카나마이신(Kanamycin), 네오마이신(Neomycin), 네틸마이신(Netilmicin), 토브라마이신(Tobramycin), 파로모마이신(Paromomycin), 스트렙토마이신(Streptomycin), 스펙티노마이신(Spectinomycin), 겔다나마이신(Geldanamycin), 허비마이신(Herbimycin), 리팍시민(Rifaximin), 로라카르베프(Loracarbef), 어타페넴(Ertapenem), 도리페넴(Doripenem), 이미페넴/실라스타틴(Imipenem/Cilastatin), 메로페넴(Meropenem), 세파드록실(Cefadroxil), 세파졸린(Cefazolin), 세팔로틴(Cefalothin), 세팔렉신(Cefalexin), 세파클로르(Cefaclor), 세파만돌(Cefamandole), 세폭시틴(Cefoxitin), 세프프로질(Cefprozil), 세프로심(Cefuroxime), 세픽심(Cefixime), 세프디니르(Cefdinir), 세프디토렌(Cefditoren), 세포페라존(Cefoperazone), 세포탁심(Cefotaxime), 세포포독심(Cefpodoxime), 세프타지딤(Ceftazidime), 세프티부텐(Ceftibuten), 세프티족심(Ceftizoxime), 세프트리악손(Ceftriaxone), 세페핌(Cefepime), 세프타롤린 포사밀(Ceftaroline fosamil), 세프토비프로롤(Ceftobiprole), 테이코플라닌(Teicoplanin), 텔라반신(Telavancin), 달바반신(Dalbavancin), 오리타반신(Oritavancin), 클린다마이산(Clindamycin), 린코마이신(Lincomycin), 렙토마이신(Daptomycin), 아지트로마이신(Azithromycin), 클레리스로마이신(Clarithromycin), 디리스로마이신(Dirithromycin), 에리스로마이신(Erythromycin), 록시스로마이신(Roxithromycin), 트로린도마이신(Troleandomycin), 테리스로마이신(Telithromycin), 스피라마이신(Spiramycin), 아즈트레오남(Aztreonam), 푸라졸리돈(Furazolidone), 니트로퓨란토인(Nitrofurantoin), 리네졸리드(Linezolid), 포시졸리드(Posizolid), 라데졸리드(Radezolid), 토레졸리드(Torezolid), 아목시실린

(Amoxicillin), 엠피실린(Ampicillin), 아즈로실린(Azlocillin), 카르베니실린(Carbenicillin), 클록사실린(Cloxacin), 디클록사실린(Dicloxacin), 플루클록사실린(Flucloxacillin), 메즈로실린(Mezlocillin), 나프실린(Nafcillin), 페니실린 G(Penicillin G), 페니실린 V (Penicillin V), 피페라실린(Piperacillin), 테모실린(Temocillin), 티카실린(Ticarcillin), 아목시실린/클라불란산(Amoxicillin/clavulanate), 엠피실린/설박탐(Ampicillin/sulbactam), 피페라실린/타조박탐(Piperacillin/tazobactam), 티카실린/클라불란산(Ticarcillin/clavulanate), 바시트라신(Bacitracin), 콜리스틴(Colistin), 폴리믹신 B(Polymyxin B), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 이녹사신(Enoxacin), 가티플록사신(Gatifloxacin), 제미플록사신(Gemifloxacin), 레보플록사신(Levofloxacin), 로메플록사신(Lomefloxacin), 모시플록사신(Moxifloxacin), 날리딕스산(Nalidixic acid), 오픈플록사신(Ofloxacin), 트로바플록사신(Trovafloxacin), 그레파플록사신(Grepafloxacin), 스파플록사신(Sparfloxacin), 테마플록사신(Temafloxacin), 마펜나이드(Mafenide), 설파아세트아미드(Sulfacetamide), 설파다이아진(Sulfadiazine), 실버설파다이아진(Silver sulfadiazine), 설파디메톡신(Sulfadimethoxine), 설파메티졸(Sulfamethizole), 설파메톡사졸(Sulfamethoxazole), 설파닐리마이드(Sulfanilimide), 설파살라진(Sulfasalazine), 설피소자졸(Sulfisoxazole), 트리메소프림-설파메톡사졸(Trimethoprim-Sulfamethoxazole(Cotrimoxazole), TMP-SMX), 설폰아미도 크리소이딘(Sulfonamido chrysoidine), 데메클로사이클린(Demeclocycline), 독시사이클린(Doxycycline), 미노사이클린(Minocycline), 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline), 테트라사이클린(Tetracycline), 클로파지민(Clofazimine), 담손(Dapsone), 카프레오마이신(Capreomycin), 사이클로세린(Cycloserine), 에탐부톨(Ethambutol), 에티오나미드(Ethionamide), 이소니아지드(Isoniazid), 피라진아미드(Pyrazinamide), 리팜피신(Rifampicin), 리파부틴(Rifabutin), 리파펜틴(Rifapentine), 아르스페나민(Arsphenamine), 클로람페니콜(Chloramphenicol), 포스포마이신(Fosfomycin), 푸시딘산(Fusidic acid), 메트로니다졸(Metronidazole), 무피로신(Mupirocin), 플라텐시마이신(Platensimycin), 퀴누프리스틴/달포프리스틴(Quinupristin/Dalfopristin), 치암페니콜(Thiamphenicol), 티지사이클린(Tigecycline), 티니다졸(Tinidazole), 및 트리메소프림(Trimethoprim) 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 1 화합물 또는 화학식 2 화합물에 의하여 약물 감수성이 향상될 수 있는 다양한 항생제를 모두 포함할 수 있다.

- [0029] 전술한 바와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 전술한 항병원성 조성물을 유효성분으로 포함하는, 감염성 질병 예방 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 특징에 따르면, 감염성 질병은, 결핵, 폐렴, 요로감염, 창상감염, 뇌수막염, 골수염, 상처감염, 내안구염, 안내염, 간농양, 인후염, 설사, 패혈증, 축농증, 비염, 중이염, 균혈증, 심내막염, 담낭염 및 이화선염으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 병원체에 의하여 야기될 수 있는 다양한 감염성 질병을 모두 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 특징에 따르면, 감염성 질병 예방 조성물은, 외용제 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 다양한 형태로 개체에 사용될 수 있다.
- [0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명은, 화학식 1 화합물, 화학식 2의 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 적어도 하나를 유효성분으로 포함하는, 항병원성 조성물을 제공할 수 있다.
- [0034] 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은, 병원체의 병원성을 감소시킴으로써, 항생제와 같은 감염 치료의 감수성을 향상시켜 치료 효과를 극대화시킬 수 있으며, 나아가, 개체의 면역 세포에 의한 면역 반응이 보다 효과적으로 작용할 수 있음에 따라, 감염성 질병에 대한 예방 효과를 가질 수 있다.
- [0035] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 병원성을 나타나게 할 수 있는 병독 인자의 발현 및 생산을 차별적으로 억제시킬 수 있는 효과가 있으며, 병원체의 항생제에 대한 감수성을 크게 증가시키고 회피 작용에 대한 기작을 저해시킴에 따라, 항생제의 효과를 더욱 증가시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 감염성 질병 예방 조성물에 대한 효능도를 도시한 것이다.
- 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 감염성 질병 예방 조성물의 구성인 항병원성 조성물의 표적 단백질 DksA 및 DksA1의 기작과 구조를 예시적으로 도시한 것이다.
- 도 2a 내지 2e는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 표적하고자 하는 물질의 선별 근거로서, 병원체 내 DksA1 단백질의 결핍에 의한 결과를 도시한 것이다.
- 도 3a 및 3b는 선별된 표적 DksA1을 억제 및/또는 차단할 수 있는 화합물의 선별 즉, 스크리닝 과정을 예시적으로 도시한 것이다.
- 도 4a 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 스크리닝 과정에서 표적 DksA1의 활성 억제 및/또는 차단한 결과를 도시한 것이다.
- 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 활성 기전을 예시적으로 도시한 것이다.
- 도 5a는 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물에 따른 병원체의 성장율과 항생효과에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 대한 병원체의 병원성 병독 인자(pathogenic virulence factor)에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물 처리에 의한 퀴럼 센싱에서 자가유도물질인 3-oxo-C12-HSL 및 C4-HSL의 생성에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 5d는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물과 함께 자가유도물질을 병용 처리한 결과를 도시한 것이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 의한 병원체의 혐기성 호흡의 저해 결과를 도시한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 의한 병원체의 항생제 감수성(antibiotic susceptibility) 결과를 도시한 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 의한 RNA 중합효소 및 DksA 단백질에 대한 결합 방해 작용에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 의한 유전자 발현 결과를 도시한 것이다.
- 도 10a 및 10b는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물 처리에 의한 병원체의 생체 내 병독성 감소 효과에 대한 결과를 도시한 것이다.
- 도 10c는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물 처리에 의한 생체 내 독성에 대한 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0039] 이하에서는, 설명의 명확함을 위해 본원 명세서 내에서 사용되는 용어를 설명한다.
- [0040] 본 명세서에서 사용되는 용어, "개체"는, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 영향을 미칠 수 있는 대상체를 의미할 수 있으며, "숙주", "대상체" 및 "환자"와 같은 용어와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 용어, "발현"은 특정 유전자에서 의하여 폴리펩타이드가 발현하는 것 또는 생산되는 것을 의미할 수 있다.
- [0042] 분리 및 정제는 폴리펩타이드를 유효성분으로 분리하고 정제하는 것을 의미한다. 예를 들어, 본 발명의 일 실

시에에 따른 폴리펩타이드를 분리 및 정제하는 과정은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 이온교환 크로마토그래피를 이용할 수 있다.

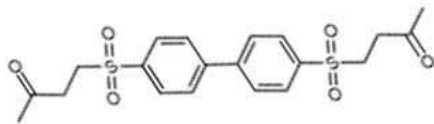
[0043] **항병원성 조성물**

[0044] 이하에서는 도 1a 및 1b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 감염성 질병 예방 조성물에 대하여 설명하도록 한다.

[0045] 먼저, 도 1a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 화학식 1(이하 Dkstatin-1로 명명한다), 화학식 2(이하 Dkstatin-2로 명명한다) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 적어도 하나를 유효성분으로 포함할 수 있다(S110).

[0046] 이때, Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2은 DksA 또는 DksA1 단백질을 표적함에 따라, 본 발명의 발명자에 의하여 명명된 화합물을 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, Dkstatin-1은 하기의 화학식 1로 표시되는 화합물인 4,4'-(4,4'-biphenyldiyl disulfonyl)di(2-butanone)을 의미할 수 있다.

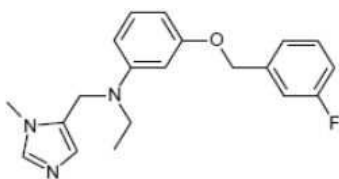
[0047] [화학식 1]



[0048]

[0049] 또한, Dkstatin-2는 하기의 화학식 2로 표시되는 화합물인 N-ethyl-3-[(3-fluorophenyl)methoxy]-N-[(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]aniline을 의미할 수 있다.

[0050] [화학식 2]



[0051]

[0052] 전술한, Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2는 병원체의 스트레스 반응 중 긴축 반응(Stringent response)에 대한 전사 조절원(transcriptional regulator)을 차단함과 동시에, 병원체의 병원성 즉, 숙주에 대한 독성(pathogenic virulence)을 감소시킬 수 있다.

[0053] 예를 들어, 도 1b를 참조하면, 병원체는 영양소 결핍 및 항생제와 같은 다양한 외부 스트레스에서 생존을 촉진하기 위한 반응으로서, 긴축 반응(Stringent response)을 야기할 수 있다. 보다 구체적으로, 도 1b의 (a)를 참조하면, 긴축 반응은 전술한 바와 같이 스트레스 상황에서 일어나는 유전자 발현 조절 반응으로, 영양소(아미노산)가 고갈된 상황에서 tRNA가 증가하며, 증가된 tRNA는 리소좀 A 부위에 결합하여 리소좀이 더 이상 번역을 진행하지 못하고 정체가 된다. 이를 일차 유도 신호로 인지하여 RelA 단백질이 추가로 결합되고, 결합된 RelA 단백질이 SpoT 단백질과 함께 GTP와 ATP를 ppGpp로 전환하여 긴축 반응을 유도한다. 나아가, SpoT 단백질은, GDP와 PPi로 전환하여 긴축 반응을 더욱 유도할 수 있다.

[0054] 이에, 병원체는 이러한 긴축 반응을 통하여, ppGpp를 축적할 수 있으며, ppGpp의 축적은 복제, 전사 및 번역과 같이 에너지 소모 현상에 영향을 미칠 수 있으며, 직접 RNA 중합효소(polymerase)에 결합하여, 유전자의 전사 양상을 바꾸고 단백질 번역기들을 감소시킴으로써 병원체의 생존을 유지할 수 있다. 즉, 전술한 과정의 긴축 반응을 통하여 병원체는 병원성을 증가시키거나, 항생제 내성을 초래할 수 있다.

[0055] 이때, DksA는 ppGpp와 함께 RNA 중합효소에 결합할 수 있는 물질로서, 긴축 반응과 영양소가 고갈된 상황에 알맞은 유전자들을 전사시킨다. 보다 구체적으로, 도 1b의 (b)를 참조하면, DksA는 코일형의 N-말단 도메인(coil N-terminal domain) 및 α -나선 구조를 갖는 Zn^{2+} 결합 모티프(binding motif)로 구성된 C-말단 도메인을 포함

하는 17kDa의 단백질로서, 전술한 도메인들이 연결되어 코일 형태의 틱을 가지고 있다. DksA는 이러한 구조를 통하여, RNA 중합효소 표면의 공극에 결합한 뒤, ppGpp 및 RNA 중합효소의 결합을 유지시킬 수 있다.

[0056] 나아가, DksA는 ppGpp 및 RNA 중합효소의 결합 유지 및 RNA 중합효소와의 결합을 통하여, 엘라스타제(elastase) 및 파이오시아닌(pyocyanin)과 같은 병원성 독성 인자(pathogenic virulence factor)의 활성을 유지하는데 필수적이다.

[0057] 결국, DksA에 의하여, 병원체가 병원성이 유지되고, 항생제에 대한 내성을 획득 여부가 결정될 수 있으며, 나아가, 병원성의 독성 인자의 활성 또한 향상시킬 수 있음에 따라, 이를 저해할 경우, 병원체의 병원성이 감소할 수 있다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물에서의 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2은 이러한 전사 조절원인 DksA를 차단시켜, 다양한 질환을 야기시킬 수 있는 병원체의 병원성을 감소시킬 수 있다.

[0058] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물에서의 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2은 전술한 바와 같이 병원체의 병원성을 감소시킬 수 있음에 따라, 항생제에 대한 병원체의 감수성을 향상시킬 수 있다.

[0059] 이에, 다시 도 1a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 Dkstatin-1, Dkstatin-2 및 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외의 항생제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 더 포함할 수 있으며, 이에 따라, 감염 질환에 대한 치료 효과를 더욱 향상시킬 수 있다. 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 Dkstatin-1, Dkstatin-2 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함함에 따라, 종래의 항생제(항균제) 내성을 갖는 병원체의 치료에 대한 한계를 극복할 수 있다.

[0060] 이때, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물에서 이용될 수 있는 항생제는 메티실린(methicillin), 옥사실린(oxacillin), 노르플록사신(norfloxacin), 반코마이신(vancomycin), 아미카신(Amikacin), 겐타마이신(Gentamicin), 카나마이신(Kanamycin), 네오마이신(Neomycin), 네틸마이신(Netilmicin), 토브라마이신(Tobramycin), 파로모마이신(Paromomycin), 스트렙토마이신(Streptomycin), 스펙티노마이신(Spectinomycin), 겔다나마이신(Geldanamycin), 허비마이신(Herbimycin), 리팍시민(Rifaximin), 로라카르베프(Loracarbef), 어타페넴(Ertapenem), 도리페넴(Doripenem), 이미페넴/실라스타틴(Imipenem/Cilastatin), 메로페넴(Meropenem), 세파록실(Cefadroxil), 세파졸린(Cefazolin), 세팔로틴(Cefalothin), 세팔렉신(Cefalexin), 세파클로르(Cefaclor), 세파만돌(Cefamandole), 세폭시틴(Cefoxitin), 세프프로질(Cefprozil), 세프록심(Cefuroxime), 세픽심(Cefixime), 세프디니르(Cefdinir), 세프티도렌(Cefditoren), 세포페라존(Cefoperazone), 세포탁심(Cefotaxime), 세프로독심(Cefpodoxime), 세프트지딤(Ceftazidime), 세프티부텐(Ceftibuten), 세프티죽심(Ceftizoxime), 세프트리악손(Ceftriaxone), 세페핌(Cefepime), 세프트롤린 포사밀(Ceftaroline fosamil), 세프트로비프로(Ceftobiprole), 테이코플라닌(Teicoplanin), 텔라반신(Telavancin), 달바반신(Dalbavancin), 오리타반신(Oritavancin), 클린다마이산(Clindamycin), 린코마이신(Lincomycin), 뎀토마이신(Daptomycin), 아지트로마이신(Azithromycin), 클라리스로마이신(Clarithromycin), 디리스로마이신(Dirithromycin), 에리스로마이신(Erythromycin), 록시스로마이신(Roxithromycin), 트로린도마이신(Troleandomycin), 테리스로마이신(Telithromycin), 스피라마이신(Spiramycin), 아즈트레오남(Aztreonam), 푸라졸리돈(Furazolidone), 니트로퓨란토인(Nitrofurantoin), 리네졸리드(Linezolid), 포시졸리드(Posizolid), 라데졸리드(Radezolid), 토레졸리드(Torezolid), 아목시실린(Amoxicillin), 엠펜실린(Ampicillin), 아즈로실린(Azlocillin), 카르베니실린(Carbenicillin), 클록사실린(Cloxacillin), 디클록사실린(Dicloxacillin), 플루클록사실린(Flucloxacillin), 메즈로실린(Mezlocillin), 나프실린(Nafcillin), 페니실린 G(Penicillin G), 페니실린 V (Penicillin V), 피페라실린(Piperacillin), 테모실린(Temocillin), 티카실린(Ticarcillin), 아목시실린/클라불란산(Amoxicillin/clavulanate), 엠펜실린/설박탐(Ampicillin/sulbactam), 피페라실린/타조박탐(Piperacillin/tazobactam), 티카실린/클라불란산(Ticarcillin/clavulanate), 바시트라신(Bacitracin), 콜리스틴(Colistin), 폴리믹신 B(Polymyxin B), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 이녹사신(Enoxacin), 가티플록사신(Gatifloxacin), 제미플록사신(Gemifloxacin), 레보플록사신(Levofloxacin), 로메플록사신(Lomefloxacin), 목시플록사신(Moxifloxacin), 날리딕스산(Nalidixic acid), 오픈록사신(Ofloxacin), 트로바플록사신(Trovafloxacin), 그레파플록사신(Grepafloxacin), 스파플록사신(Sparfloxacin), 테마플록사신(Temafloxacin), 마펜나이드(Mafenide), 설파아세트마이드(Sulfacetamide), 설파다이아진(Sulfadiazine), 실버설파다이아진(Silver sulfadiazine), 설파디메톡신(Sulfadimethoxine), 설파메티졸(Sulfamethizole), 설파메톡사졸(Sulfamethoxazole), 설파닐리마이드(Sulfanilimide), 설파살라진(Sulfasalazine), 설피속사졸(Sulfisoxazole), 트리메소프림-설파메톡사졸(Trimethoprim-Sulfamethoxazole(Co-trimoxazole), TMP-SMX), 설펜아미도 크리소이딘(Sulfonamido chrysoidine), 데메클로사이클린(Demeclocycline), 독시사이클린(Doxycycline), 미노사이클린(Minocycline), 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline), 테트라사이클린

(Tetracycline), 클로파지민(Clofazimine), 답손(Dapsone), 카프레오마이신(Capreomycin), 사이클로세린(Cycloserine), 에탐부톨(Ethambutol), 에티오나미드(Ethionamide), 이소니아지드(Isoniazid), 피라진아미드(Pyrazinamide), 리팜피신(Rifampicin), 리파부틴(Rifabutin), 리파펜틴(Rifapentine), 아르스페나민(Arsphenamine), 클로람페니콜(Chloramphenicol), 포스포마이신(Fosfomycin), 푸시딘산(Fusidic acid), 메트로니다졸(Metronidazole), 무피로신(Mupirocin), 플라텐시마이신(Platensimycin), 퀴누프리스틴/달포프리스틴(Quinupristin/Dalfopristin), 치암페니콜(Thiamphenicol), 티지사이클린(Tigecycline), 티니다졸(Tinidazole), 및 트리메소프림(Trimethoprim) 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 병원체의 성장률 저하 및 사멸을 유도할 수 있는 다양한 물질을 모두 포함할 수 있다.

[0061] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 다양한 감염성 질병에 대하여 예방 또는 치료할 수 있다. 이때, 감염성 질병은 결핵, 폐렴, 요로감염, 창상감염, 뇌수막염, 골수염, 상처감염, 내안구염, 안내염, 간농양, 인후염, 설사, 패혈증, 충농증, 비염, 중이염, 균혈증, 심내막염, 담낭염 및 이하선염으로 이루어진 그룹 중 적어도 하나를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 병원체에 의하여 야기될 수 있는 다양한 질병을 모두 포함할 수 있다.

[0062] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 감염성 질병 예방 조성물로서 이용되기 위하여, 이를 제제화 하는 단계를 더 포함할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물을 포함하는 감염성 질병 예방 조성물은 액상용액으로 제제화 되는 경우, 약학적으로 허용 가능한 담체에 의해 희석될 수 있다.

[0063] 보다 구체적으로, 약학적으로 허용 가능한 담체는 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 예를 들어, 액상용액으로 제제화 되는 약학적 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 1% 미만의 디메틸 설폭사이드(DMSO) 및 이들 성분 중 1 성분 이상이 혼합된 혼합물일 수 있다. 또한, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제가 첨가될 수 있다. 더 나아가, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제가 부가적으로 첨가되어 감염성 질병 예방 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화될 수 있다.

[0064] 감염성 질병 예방 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 통해 투여될 수 있고, 질환 부위에의 도포 또는 분무하는 방법으로 투여될 수도 있다. 감염성 질병 예방 조성물은 또한, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여의 비경구로 투여될 수도 있다.

[0065] 감염성 질병 예방 조성물의 적합한 도포, 분무 및 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 대상이 되는 동물 및 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감도와 같은 요인들에 의해 다양할 수 있다. 또한, 숙련된 의사나 수의사는 목적하는 치료에 효과적인 감염성 질병 예방 조성물의 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0066] 감염성 질병 예방 조성물을 유효성분으로 포함하는 경구 투여용 제형은, 정제, 트로키제, 로렌지, 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제일 수 있다. 이때, 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 포함될 수 있으며, 캡슐 제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체가 더 함유될 수 있다.

[0067] 그러나, 감염성 질병 예방 조성물의 가장 바람직한 제형 및 형태는 외용제 또는 분무제의 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 이상의 절차에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물과 이를 포함하는 감염성 질병 예방 조성물은, 병원체의 병원성을 감소시킴으로써, 항생제와 같은 감염 치료의 감수성을 향상시켜 치료 효과를 극대화시킬 수 있으며, 나아가, 개체의 면역 세포에 의한 면역 반응이 보다 효과적으로 작용할 수 있음에 따라, 감염성 질병에 대한 예방 효과를 가질 수 있다.

[0069] **표적 물질 선별**

[0070] 이하에서는, 도 2a 내지 2e를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 표적하고자 하는 물질

의 선별 과정에 대하여 설명하도록 한다.

- [0071] 먼저, 도 2a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 표적하고자 하는 DksA에 따른 전사체 비교 히트맵이 도시된다. 이때, 병원체로 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)이 이용되었으며, 녹농균에서 DksA1 및/또는 DksA2의 유전자를 녹아웃시킨 뒤, 이에 대한 전사체 분석(Transcriptome analysis)을 수행하여, DksA1에 의한 효과를 확인하였다. 나아가, DksA1은 도 1b의 (b)에서 도시된 형태의 DksA 단백질을 의미하며, DksA2은 DksA1의 Zn²⁺ 결합 모티프가 삭제된 형태를 갖는 DksA 단백질로서, DksA1의 부분적인 기능을 수행할 수 있다. 나아가, 전사체 분석에 대한 결과값은 평균(대조군)과의 거리를 판단하는 지표인 z-스코어(score)로 나타내었으며, 스코어의 범위는 -1.5 내지 1.5까지 색상 코드 색인으로 표시하였다.
- [0072] 보다 구체적으로, DksA2가 녹아웃된 녹농균(Δ dksA1)은 전사체 발현이 대조군인 녹농균(PA01)과 유사한 것으로 나타난다.
- [0073] 이에 반해, DksA1이 녹아웃된 녹농균(Δ dksA1 및 Δ A1 Δ A2)은 RNA 결합 단백질인 리보솜 단백질(ribosomal proteins, 30S, 16S&23S 및 50S), 병원성 발현 기전인 퀴럼 센싱(Quorum sensing), 생리활성 물질인 폴리아민 대사(Polyamine metabolism), 탈질산화(Denitrification), 세균막 형성에 기여하는 편모 합성(Flagella synthesis) 및 선모 합성(Pilus synthesis)과 관련된 전사체 발현 양상이 대조군인 녹농균(PA01)과 전혀 다른 것으로 나타난다.
- [0074] 특히, DksA1이 녹아웃이 될 경우, 병원체에서 병독 인자들의 발현, 생물막 형성, 운동성, 항생제 내성 등과 같은 병원성 발현에 매우 중요한 조절 기전으로 알려진 퀴럼 센싱과 관련된 전사체인 lasI, lasR, rhlI, rhlR, pqsB, pqsC, pqsD, pqsE, phnA, phnB, mvfR, lasB, lasA, rhlA, pchR, pchA, pchB, pchC, pchD, pchE, pchG, phzA1, phzB2, aprA, aprD, aprE, aprF, xcpZ, xcpY, xcpX, xcpW, xcpV, xcpU, xcpT, xcpS, xcpR, xcpP 및 xcpQ에 대한 발현이 매우 낮아지는 것으로 나타난다. 즉, DksA1 발현을 차단함으로써, 퀴럼 센싱과 관련된 전사 인자들의 발현이 낮아짐에 따라, 병원체의 병원성이 낮아질 수 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0075] 나아가, 도 2b의 (a)를 참조하면, DksA1에 따른, 배양 상층액(supernatants)의 시각적 비교 결과가 도시되며, 전술한 바와 같이, DksA2가 녹아웃된 녹농균(Δ dksA1)은 녹농균(PA01)과 유사한 염료(pigment)의 발현을 보이는 것으로 나타나며, DksA1이 녹아웃된 녹농균(Δ dksA1 및 Δ A1 Δ A2)의 배양 상층액의 염료 발현은 유사하며, 이들 모두 녹농균(PA01)보다 옅은 염료의 색상을 나타내는 것으로 나타난다. 즉, DksA1이 녹아웃된 녹농균(Δ dksA1 및 Δ A1 Δ A2)의 배양 상층액은 세포의 밀도가 녹농균(PA01) 및 DksA2가 녹아웃된 녹농균(Δ dksA1)의 상층액보다 세포로부터 분비된 물질의 밀도가 낮다는 것을 의미할 수 있다.
- [0076] 또한, 도 2b의 (b)를 참조하면, DksA1이 녹아웃된 녹농균(Δ dksA1 및 Δ A1 Δ A2)은 병원성 병독 인자인 엘라스타제(elastase) 활성도 및 파이오시아닌(pyocyanin) 발현(생산)량이 녹농균(PA01)보다 낮은 것으로 나타나며, 도 2b의 (c)를 참조하면, 엘라스타제(elastase)의 발현량 또한, 녹농균(PA01)보다 낮은 것으로 나타난다. 즉, DksA1 단백질의 발현을 차단할 경우, 병독 인자의 활성 및 발현량을 감소시킬 수 있음에 따라, 병원체의 병원성을 감소시킬 수 있음을 의미할 수 있다.
- [0077] 이에, 도 2c를 참조하면, 녹농균(PA01)을 접종한 개체(마우스)의 경우, 12시간 이내로 전부 사망하는 것으로 나타나나, DksA1이 녹아웃된 녹농균(Δ dksA1 및 Δ A1 Δ A2)을 접종한 개체의 경우, 전술한 녹농균 접종 개체보다 긴 생존율(survival)을 갖는 것으로 나타난다.
- [0078] 나아가, 도 2d를 참조하면, DksA1에 따른 퀴럼 센싱과 관련된 자가유도물질에 대한 결과가 도시된다. 이때, 퀴럼 센싱은 병원체의 환경적 변화에 반응하여, 집단으로 병원체의 행동 양식을 변화시키는 일종의 세포간의 의사소통 체계임에 따라, 세포 외 신호 전달 물질인 자가유도물질(autoinducer)을 생성할 수 있다. 나아가, 퀴럼 센싱에 의하여 조절되는 행동 양식으로는 발광, 독성물질 분비(병독성), 생물막(바이오필름) 형성 등을 포함할 수 있다. 한편, 자가유도물질은 아실호모세린 락톤(acyl-homoserine lactones, AHLs)이거나, S-아데노실메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM)로부터 만들어진 분자이며, 세포막을 자유롭게 통과할 수 있다. 이러한, 자가유도물질은 퀴럼 센싱 수용체와 결합하여, DNA 결합 전사 활성제로 작용될 수 있다. 예를 들어, 녹농균은 PQS(*Pseudomonas* Quinolone signal), 3-oxo-C12-HSL(N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone) 및 C4-HSL(N-butanoyl-L-homoserine lactone) 기반의 퀴럼 센싱을 포함할 수 있으며, 이들은 lasI 및 rhlI 유전자에 의하여 합성되며, lasR 복합체를 형성하여 많은 유전자들의 발현을 향상시킬 수 있다. 이에, 녹농균은 퀴럼 센싱에 의한 신호 전달이 활성화되어, 전술한 발광, 독성물질 분비(병독성), 생물막(바이오필름) 형성 등과 관련된 타깃 유전자들의 발현을 활성화시킬 수 있다. 이에, 자가유도물질인 PQS(*Pseudomonas* Quinolone signal), 3-oxo-

C12-HSL(N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone) 및 C4-HSL(N-butanoyl-L-homoserine lactone)을 확인함으로써, 병원체의 병원성에 대한 활성을 예측할 수 있다.

[0079] 도 2d의 (a)를 참조하면, DksA1이 녹아웃된 녹농균($\Delta dksA1$)은 녹농균(PA01)보다 자가유도물질인 3-oxo-C12-HSL(N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone) 및 C4-HSL(N-butanoyl-L-homoserine lactone)의 발현이 유의하게 감소되어 있는 것으로 나타난다($p < 0.05$).

[0080] 나아가, 도 2d의 (b)를 참조하면, 녹농균의 퀴럼 센싱(자가유도물질) 신호 분자에 대한 크로마토그래피에 대한 결과가 도시된다. DksA2가 녹아웃된 녹농균($\Delta dksA2$) 및 녹농균(PA01)의 경우, PQS가 발현된 것으로 나타나나, DksA1이 녹아웃된 녹농균($\Delta dksA1$)의 경우, PQS가 발현되지 않은 것으로 나타난다.

[0081] 즉, DksA1 단백질의 발현을 차단할 경우, 병원체의 생존에 기여할 수 있는 퀴럼 센싱에 대한 신호를 차단함으로써, 병원체의 병원성뿐만 아니라 병원체의 다양한 생존과 관련된 기전을 감소시킬 수 있음을 의미할 수 있다.

[0082] 이에, 도 2e를 참조하면, DksA1이 녹아웃된 녹농균($\Delta dksA1$ 및 $\Delta A1\Delta A2$)을 혐기성 조건에서 배양할 경우, 질산염(NO_3 , nitrate) 및 아질산염(NO_2 , nitrite)이 첨가된 혐기성 조건에서 DksA2가 녹아웃된 녹농균($\Delta dksA2$) 및 녹농균(PA01)보다 성장률이 크게 감소되어 있는 것으로 나타난다. 즉, 녹농균의 혐기성 호흡은 탈질화반응에 기초함에 따라, 질산염(NO_3 , nitrate) 및 아질산염(NO_2 , nitrite)이 첨가된 조건에서 녹농균은 성장 및 생존을 유지할 수 있으며, 나아가, 혐기성 호흡에 관여하는 유전자 전사는 DksA1의 활성이 필요하다. 결국, DksA1의 발현을 차단함으로써, 병원체의 혐기성 호흡 기반 성장에 미치는 영향을 확인할 수 있으며, DksA1의 발현을 차단할 경우, 전술한 조건하에서 병원체의 성장 및 생존이 감소될 수 있음을 의미할 수 있다.

[0083] 이상의 과정에 따라, DksA1 단백질은 병원체의 성장, 생존 및 병원성을 감소시킬 수 있으며, 항생제에 대한 감수성을 향상시킬 수 있는 바람직한 항독성제로서의 표적일 수 있다.

[0084] 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 화합물 스크리닝

[0085] 이하에서는, 도 3a 및 3b를 참조하여, 전술한 과정에 의하여 선별된 표적 DksA1을 억제 및/또는 차단할 수 있는 화합물의 선별 즉, 스크리닝 과정에 대하여 설명하도록 한다.

[0086] 도 3a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 화합물 스크리닝에 대한 절차가 예시적으로 도시된다.

[0087] 먼저, 도 3a의 (a)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 표적하고자 하는 DksA1의 표현형이 도시된다. DksA1에 따른 표현형은, DksA1이 산화 환원 균형을 조절할 수 있다. 그러나, 이러한 DksA1이 돌연변이(변형) 또는 파괴가 이루어지면, 순환 물질인 니코틴아미드 아데닌 다이뉴클레오타이드(NAD)의 환원 형태(NADH)와 산화 형태(NAD^+)의 균형이 붕괴되며, 이는 NADH 탈수소효소(NADH dehydrogenase)에 의존한다. 나아가, NADH 탈수소효소에 의한 NADH양에 대한 균형조절은 노란색의 테트라졸리움염(tetrazolium salt)을 보라색의 포마잔(formazan) 결정체의 생성으로 유추될 수 있음에 따라, 시각적(표현형)으로 이를 확인할 수 있다. 이에, NADH 탈수소효소를 통하여, DksA1에 따른 표현형을 간접적으로 관찰할 수 있다.

[0088] DksA1이 녹아웃된 녹농균($\Delta dksA1$)에 대한 배양 배지 경우, 녹농균(PA01)에 대한 배양 배지보다 옅은 보라색을 띄는 것으로 나타난다. 즉, DksA1에 의하여 병원체의 에너지 생산을 위한 산화-환원 반응의 균형이 붕괴되었음을 의미할 수 있으며, DksA1에 따른 표현형을 확인하기 위한 물질로서 포마잔이 선정되었다.

[0089] 이에, 도 3a의 (b)를 참조하면, 먼저, DksA1이 녹아웃된 녹농균($\Delta dksA1$) 및 녹농균(PA01)에 대한 배양 배지의 OD600값을 1.0으로 조정된 뒤, 이의 배양액을 한국화학은행으로부터 제공받은 6,969개의 화합물(μM)과 NADH 형성을 표현할 수 있는 티아졸릴 블루 테트라졸륨 브로마이드(thiazolyl blue tetrazolium bromide, 0.5mg/ml)가 분주되어 있는 웰플레이트에 접종시킨 뒤, 이를 37 °C에서 약 60분 내지 120분 동안 배양하였다(first step). 그 다음, 이의 배양액을 DMSO에 용해시킨 뒤, 이에 대한 포마잔의 생산량을 550nm 파장에서 측정하였으며, 이에 따라, 첫번째 단계(first step)의 결과로서, 6,969개의 화합물 중, 포마잔의 생산을 차별적으로 적게 나타내도록 유도한 178개의 화합물이 선정되었으며, 이 중 25개는 통계적으로 유의한 차이를 갖는 것으로 나타났다($P < 0.05$).

[0090] 그 다음, 전술한 첫번째 단계에서 선별된 화합물 중 상위의 50개의 화합물을 선별한 뒤, 이에 대한 rpsB 발현 및 엘라스타제의 활성을 더 측정하여, 최종 화합물을 선택하였다(second step). 이때, 도 3b를 참조하면, rpsB 발현 및 엘라스타제의 활성의 측정은 각각 약 4시간 및 8시간의 배양 뒤 수행되었으며, rpsB는 30s 리보솜 단백

질을 암호화하는 유전자로서, DksA1이 돌연변이(변형) 또는 삭제될 경우, 생장을 최소화하는 긴축 반응과는 대조적으로 리보솜 단백질에 의한 단백질 합성이 활발해질 수 있다. 이에, rpsB는 dksA1이 돌연변이(변형) 또는 삭제될 경우, 이의 발현 수준이 향상될 수 있다.

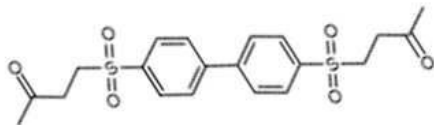
[0091] 보다 구체적으로, 도 3b의 (a)를 참조하면, 4시간째에는 55B05, 02G09, 86B09 및 45G08 화합물을 처리한 녹농균 모두, DksA1이 녹아옴된 녹농균(Δ dksA1)과 유사한 rpsB 발현 및 엘라스타제의 활성을 갖는 것으로 나타나며, 녹농균(PA01)과 비교하였을 경우, 유의하게 차별적으로 향상된 rpsB 발현 및 저하된 엘라스타제의 활성을 갖는 것으로 나타난다($P < 0.05$).

[0092] 그러나, 도 3b의 (b)를 참조하면, 8시간째에는, 02G09 및 45G08 화합물을 처리한 녹농균이 대조군인 녹농균(PA01)과 유사한 수준의 병독 인자인 엘라스타제에 대한 활성을 갖는 것으로 나타난다. 이에 반면에, 55B05 및 86B09 화합물을 처리한 녹농균은 녹농균(PA01)보다 유의하게 낮은 수준의 엘라스타제에 대한 활성을 가지며, 02G09 및 45G08 화합물을 처리한 녹농균보다 높은 수준의 rpsB 발현을 갖는 것으로 나타난다($P < 0.05$).

[0093] 이에, 55B05 및 86B09 화합물이 rpsB 발현 및 엘라스타제의 활성에 대한 조절에 있어 보다 오랜 시간의 지속효과를 가짐에 따라, 선별된 표적 DksA1을 억제 및/또는 차단할 수 있는 화합물로서, 55B05 및 86B09 화합물이 선발되었다.

[0094] 보다 구체적으로, 전술한 55B05 및 86B09 화합물은 DksA과 그의 상동체 DksA1을 표적함에 따라, 본 발명의 발명자들에 의하여 각각 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2로 명명되었으며, Dkstatin-1은 하기의 화학식 1로 표시되는 화합물인 4,4'-(4,4'-biphenyldiyl disulfonyl)di(2-butanone)을 의미할 수 있다.

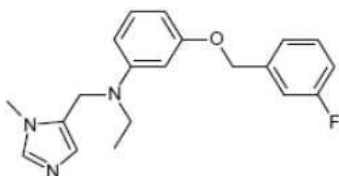
[0095] [화학식 1]



[0096]

[0097] 또한, Dkstatin-2는 하기의 화학식 2로 표시되는 화합물인 N-ethyl-3-[(3-fluorophenyl)methoxy]-N-[(1-methyl-1H-imidazol-5-yl)methyl]aniline을 의미할 수 있다.

[0098] [화학식 2]



[0099]

[0100] 이에, Dkstatin-1(55B05) 또는 Dkstatin-2(86B09)는 병원체의 스트레스 반응 중 긴축 반응(Stringent response)에 대한 전사 조절원(transcriptional regulator)인 DksA1을 차단 즉, DksA1 및 RNA 중합효소와의 결합을 차단시킴으로써, ppGpp 및 RNA 중합효소와의 결합 또한 유지력이 상실되어, ppGpp의 축적에 의한 항생제 내성 및 병원체의 병원성을 감소시킬 수 있다.

[0101] **본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 항병원성 효과 확인**

[0102] 이하에서는, 도 4a 내지 10b를 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물에 의한 표적 단백질 DksA1의 억제와 항병원성 효과에 대하여 설명하도록 한다.

[0103] 도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 스크리닝 과정에서 표적 표적 DksA1의 활성 억제 및/또는 차단한 결과를 도시한 것이다. 이때, 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물 즉, Dkstatin-1(DKST-1+) 또는 Dkstatin-2(DKST-2+)는 각각 녹농균에 150 μ M씩 처리되었다.

[0104] 먼저, 도 4a의 (a)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 화합물인 Dkstatin-1(DKST-1+)

또는 Dkstatin-2(DKST-2+)을 처리한 녹농균은 모두 표준 녹농균(PA01)보다 유의하게 낮은 포마잔 형성(Formazan biosynthesis) 수준을 보이는 것으로 나타난다($p < 0.05$). 특히, Dkstatin-1(DKST-1+) 처리에 의한 녹농균의 포마잔 형성 수준은 DksA1 유전자를 녹아웃 시킨 녹농균보다 유의하게 낮은 것으로 나타난다($p < 0.05$). 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 화합물인 Dkstatin-1(DKST-1+) 또는 Dkstatin-2(DKST-2+)이 유전자 녹아웃 방법과 마찬가지로 DksA1 단백질을 차단하여, 이에 따른 병원체의 병원성을 낮출 수 있다는 것을 의미할 수 있다. 나아가, Dkstatin-1(DKST-1+)에서 두드러진 포마잔 형성 감소가 나타남에 따라, Dkstatin-1(DKST-1+)이 DksA1의 활성화에 보다 특이적이며, 이를 선택적으로 억제할 수 있음을 의미할 수 있다.

[0105] 나아가, 도 4a의 (b)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 화합물인 Dkstatin-1(DKST-1+) 또는 Dkstatin-2(DKST-2+)을 처리한 녹농균은 30s 리보솜 단백질을 암호화하는 rpsB의 발현이 모두 녹농균(PA01)보다 유의하게 높은 것으로 나타나며($p < 0.05$), DksA1 유전자를 녹아웃 시킨 녹농균과는 통계적인 차이 없이 유사한 수준인 것으로 나타난다. 즉, DksA1 단백질이 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 화합물인 Dkstatin-1(DKST-1+) 또는 Dkstatin-2(DKST-2+)에 의하여 발현 및/또는 RNA 중합효소와의 복합체 형성이 저해되었음을 의미할 수 있다.

[0106] 결국, 도 4b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 활성 기전에 대한 예시도가 도시되며, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2는, DksA1 단백질이 RNA 중합효소와의 결합을 차단하고, 전술한 차단에 의하여, ppGpp 및 RNA 중합효소의 결합이 불안정함에 따라, 이를 통한 긴축 반응 기작이 감소되어, 결국, 긴축 반응에 의한 병독 반응 즉, 병원성이 감소될 수 있다.

[0107] 도 5a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물에 따른 병원체의 성장율에 대한 결과가 도시된다. 이때, 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2는 150 μ M씩 처리되었다.

[0108] 녹농균(PA01), DksA1 유전자가 녹아웃된 녹농균(Δ dksA1) 및 Dkstatin-1을 처리한 녹농균(Dkstain-1)은 모두 유사한 성장율을 가지는 것으로 나타나며, Dkstatin-2를 처리한 녹농균(Dkstain-2)의 성장율이 전술한 녹농균들의 성장율보다 조금 높은 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2는 병원체의 성장 및 생존력에 하향 조절을 하지 않는 것으로 나타나며, 이는 표적 단백질 이외의 세포에 대하여 영향을 미치지 않음을 의미할 수 있다. 결국, 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2는 차단하고자 하는 표적 단백질에만 특이성을 가지는 것으로 나타난다.

[0109] 도 5b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 대한 병원체의 병원성 병독 인자(pathogenic virulence factor)에 대한 결과가 도시된다. 이때, 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2는 5ml의 녹농균의 배양액에 150 μ M씩 처리한 후, 이를 약 4 내지 8시간 동안 37 °C에서 배양한 뒤, 녹농균의 대표적인 병원성 병독 인자인 엘라스타제(elastase)의 활성화도 및 파이오시아닌(pyocyanin)의 생산량을 측정하였다.

[0110] 먼저, 도 5b의 (a)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물 처리에 대한 녹농균의 배양 상층액의 시각적 비교 결과가 도시된다. 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2가 처리되어 같이 배양된 녹농균의 배양 상층액의 경우, 녹농균만을 배양한 배양 상층액(PA01)보다 염료 발현이 옅으며, 투명도가 증가한 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물에 의하여 세포 및 세포로부터 분비된 물질의 밀도가 감소될 수 있음을 의미할 수 있다.

[0111] 보다 구체적으로, 도 5b의 (b)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물 처리에 대한 병원성 병독 인자인 엘라스타제(elastase) 활성화도 및 파이오시아닌(pyocyanin) 발현(생산)량에 대한 결과가 도시된다. 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2가 처리된 녹농균(DKST-1+PA01 및 DKST-2+PA01)은 모두 표준 녹농균(PA01)보다 엘라스타제의 활성이 유의하게 감소된 것으로 나타난다($P < 0.05$).

[0112] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2가 처리된 녹농균(DKST-1+PA01 및 DKST-2+PA01)은 모두 녹농균(PA01)보다 파이오시아닌 발현(생산)량이 유의하게 감소되어 있으며, 이는 DksA에 대한 발현을 유전적으로 녹아웃시킨 녹농균의 수준과 유사한 것으로 나타난다.

[0113] 결국, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 병원성을 나타내게 할 수 있는 병독 인자의 발현 및 생산을 차별적으로 억제시킬 수 있는 효과가 있다.

[0114] 도 5c를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물 처리에 대한 퀴럼 센싱에서 자가유도물질인 3-

oxo-C12-HSL 및 C4-HSL에 대한 결과가 도시된다. 이때, 자가유도물질의 종류인 HSL을 측정하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물을 처리하여 같이 배양된 녹농균의 배양 상층액에 약산성화된 에틸 아세테이트(Acidified ethyl acetate)를 처리하여, HSL를 추출하였다. 추출된 HSL 중 3-oxo-C12-HSL는 리포터 균주(reporter strain)의 배양액에 첨가한 다음, 베타갈락토시다아제(β -galactosidase activity)의 활성을 측정한 뒤, 이를 밀리(miller) 단위로 환산하여 산출하였다. 나아가, 추출된 HSL 중 C4-HSL는 CV026(*Chromobacterium violaceum*026) 균주의 비올라세인(violacein)의 생산을 통하여 측정하였다.

[0115] 보다 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2가 처리된 녹농균(DKST-1+PA01 및 DKST-2+PA01)은 모두 녹농균(PA01)보다 생성된 3-oxo-C12-HSL의 수준이 유의하게 낮은 것으로 나타난다($P<0.05$).

[0116] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2가 처리된 녹농균(DKST-1+PA01 및 DKST-2+PA01)은 모두 녹농균(PA01)보다 생성(발현)된 C4-HSL의 수준이 유의하게 낮은 것으로 나타나며($P<0.05$), 이때, DKST-1+PA01 및 DKST-2+PA01 각각의 C4-HSL의 수준은 대조군의 53% 와 63%인 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리로 인하여, 병원체의 발광, 독성물질 분비(병독성), 생물막(바이오필름) 형성에 관여하는 신호 전달 시스템인 퀴럼 센싱의 자가유도물질이 감소될 수 있으며, 이에 따라, 병원체의 전술한 신호 전달과 관련된 활성이 감소되어 병원성이 감소될 수 있다. 나아가, 병원체의 의사 소통 수단인 퀴럼 센싱의 활성이 감소됨에 따라, 병원체의 생존 및 증식을 또한 감소될 수 있다.

[0117] 한편, 전술한 퀴럼 센싱의 자가유도물질과 관련하여, 도 5d를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물과 함께 자가유도물질을 병용 처리한 결과가 도시된다. 이때, 병용 처리에 따른 효과를 관찰하기 위하여, 녹농균(PA01) 및 DksA1 유전자가 녹아아웃된 녹농균(Δ dksA1)을 본 발명의 일 실시예에 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2를 각각 150 μ M씩 처리하여 약 2 시간 정도 배양한 뒤, 자가유도물질인 3-oxo-C12-HSL(C12) 및 C4-HSL(C4)를 각각 200 μ M씩 처리하여 배양한 뒤, 시간대 별로 엘라스타제의 활성을 측정하였다.

[0118] 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 처리된 녹농균(DKST-1 및 DKST-2)의 경우, 엘라스타제의 활성이 약 0.45 내지 0.5의 수준인 것으로 나타난다. 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물과 함께 자가유도물질이 병용 처리된 녹농균의 경우(DKST-1+C4/C12 및 DKST-2+C4/C12) 엘라스타제의 활성이 0.9 내지 1.0 까지 회복되는 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물에 의하여 퀴럼 센싱 중 LasI-R 및 RhII-R가 저해되어 있어, 이와 관련된 신호 물질인 자가유도물질을 처리한 경우, 전술한 퀴럼 센싱 손상이 보완될 수 있다는 것을 의미할 수 있다. 결국, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물에 의한 병원체의 병원성 즉, 병독 인자의 감소는 퀴럼 센싱에 대한 자가유도물질이 감소되었음에 따라, 발생한 것으로 나타난다.

[0119] 도 6을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 대한 병원체의 혐기성 호흡의 결과가 도시된다. 먼저, 도 6의 (a)를 참조하면, 25mM의 질산염(NO_3 , nitrate)에서 혐기성으로 배양된 녹농균(PA01)의 경우, 24시간 이내에 1.6의 평균 OD600에 도달하는 것으로 나타난다. 그러나, 유전자 녹아아웃 및 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 의하여 DksA1에 대한 활성이 억제 및 차단된 경우, 1.18 내지 1.24로 표준 녹농균(PA01) 보다 OD600 값이 정제되어 있는 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 의하여 병원체의 혐기성 호흡 성장이 저해될 수 있다는 것을 의미할 수 있다.

[0120] 도 7을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 의한 병원체의 항생제 감수성(antibiotic susceptibility) 결과가 도시된다. 이때, 병원체의 항생제 감수성을 확인하기 위하여, 항생제 내성을 용이하게 획득하는 균으로 알려진 녹농균의 배양액에 1 내지 25 μ g/ml의 겐타마이신(gentamicin, GM), 이미페넴(imipenem, IMP), 스트렙토마이신(streptomycin, SM), 테트라사이클린(tetracycline, TC), 카나마이신(kanamycin, KM) 및 토브라마이신(tobramycin, TB) 항생제를 첨가한 뒤, 150 μ M의 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2를 2ml의 LB 배지에 희석하여 분주한 뒤, 37° C에서 6시간 동안 배양하였다. 그 다음, 배양된 샘플을 PBS에 10배씩 순차 희석한 뒤, 한천 플레이트(agar plate)에 스팟팅하여 배양하고 이를 계수하여 비교하였다.

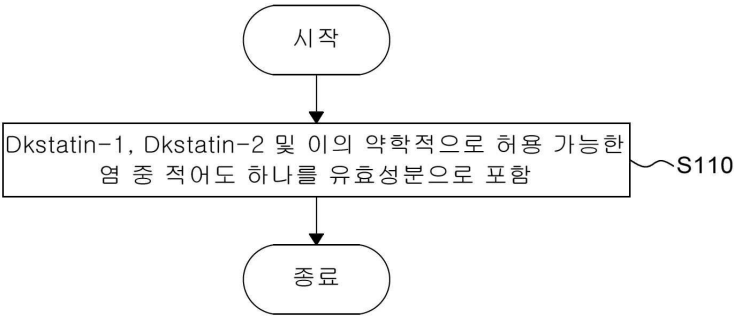
[0121] 보다 구체적으로, 도 7의 (a)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2은 2.5 μ g/ml의 이미페넴(IMP)에서 CFU에 대한 변화가 없는 것으로 나타난다. 즉, 이미페넴에 대한 감수성을 증가시키지 못하였다.

- [0122] 그러나, 도 7의 (b) 내지 (f)를 참조하면, 전술한 이미페넴을 제외한 젠타마이신(GM), 테트라사이클린(TC), 카나마이신(KM), 스트렙토마이신(SM) 및 토브라마이신(TB)에서는 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2의 처리에 따라, 생존 및 증식한 세포 수가 약 10배 이상 감소된 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2에 의하여, 젠타마이신(GM), 테트라사이클린(TC), 카나마이신(KM), 스트렙토마이신(SM) 및 토브라마이신(TB)의 항생제에 대한 감수성이 증가된 것으로 나타난다.
- [0123] 나아가, 전술한 항생제들은 단백질 합성 기작을 억제하는 항생제이다. 이에, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2은 단백질 생합성을 특이적으로 표적하는 항생제에 대한 감수성을 특이적으로 증가시킬 수 있다는 것을 의미할 수 있다.
- [0124] 결국, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 병원체의 항생제에 대한 감수성을 크게 증가시켜, 항생제의 효과를 더욱 증가시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0125] 도 8을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 대한 RNA 중합효소 및 DksA1 단백질에 대한 결합 방해 작용에 대한 결과가 도시된다. 이때, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 DksA1 활성 미치는 영향을 확인하기 위하여, DksA1 유전자의 3' 말단에 3XFLAG 태그를 코딩하는 서열이 융합된 녹농균을 구축한 뒤, 이를 이용하였다. 나아가, 세포 내 분획을 위하여, 항-FLAG 항체 및 항-RpoB 항체를 이용하여 웨스턴블롯을 수행하였다.
- [0126] 보다 구체적으로, 도 8의 (a)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물에 대한 처리 여부와 상관없이 모두 동일한 밴드가 나타났다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 병원체의 DksA1 생산에 전혀 영향을 미치지 않는다는 것을 의미할 수 있다.
- [0127] 이에, 도 8의 (b)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2의 처리군이 밴드 강도가 현저하게 감소된 것으로 나타난다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물이 DksA1 및 RNA 중합효소의 결합을 방해함에 따라, 번역 후에 억제제로서 작용한다는 것을 의미할 수 있다.
- [0128] 도 9를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 대한 유전자 발현 결과가 도시된다.
- [0129] 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2은 50S 및 30S 리보솜 단백질, 전자수송(electron transport) 및 ATP 합성과 관련된 유전자 전사체의 발현을 증가시키는 것으로 나타난다.
- [0130] 나아가, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2은 퀴럼센싱, 독성 인자에 대한 유전자 전사체 및 탈질화(denitrification)과 관련된 유전자 전사체의 발현을 감소시키는 것으로 나타난다.
- [0131] 이때, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2에 의하여 감소된 퀴럼센싱에 대한 유전자 전사체는 lasI, lasR, rhII, rhIR, pqsA, pqsB, pqsC, pqsD, pqsE, phnA 및 phnB 을 포함한 것으로 나타나며, 독성 인자(병독 인자)에 대한 유전자 전사체는 lasA, lasB, rhIA, rhIB, aprA, aprD, aprE, aprF, tadB, tadC, tadD, hcnA, hcnB, hcnC, phzM, phzS, phzH, phzA1, phzB1, phzC1, phzD1, phzE1, phzF1, phzG1, phzA2, phzB2, phzC2, phzD2, phzE2, phzF2, phzG2, pchA, pchB, pchC, pchD, pchE, pchF, pchG 및 pchR를 포함하는 것으로 나타난다.
- [0132] 결국, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2은 전술한 바와 같이 병원체의 건축 반응과 관련된 인자들의 발현을 감소시킬 수 있음에 따라, 병원체의 병원성을 효과적으로 감소시킬 수 있으며, 나아가, 항생제 내성과 같은 회피 작용을 저해할 수 있다.
- [0133] 도 10a 내지 10c를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물에 대한 생체 내 독성 분석 결과가 도시된다.
- [0134] 먼저, 도 10a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물의 처리에 대한 마우스의 생존율 결과가 도시된다. 이때, 병원체로서 약 10^6 cfu/ml의 녹농균과 150 μ M의 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2를 총 6마리의 마우스 비강을 통해 접종한 뒤, 이의 생존율을 관찰하였다.
- [0135] 녹농균(PA01+DMSO)만을 접종한 개체의 경우, 36시간 이내에 모두 사망한 것으로 나타나나, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2가 처리된 개체의 경우, 48시간 이후까지 50 % 이상의 생존율을 갖는 것으로 나타난다.

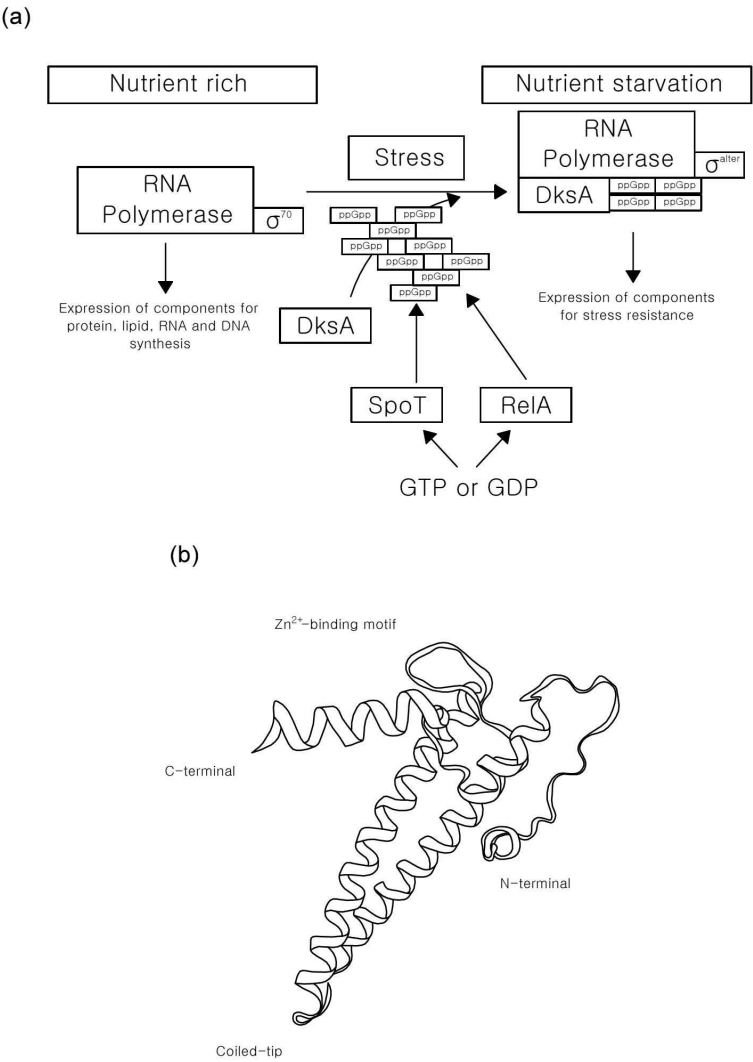
- [0136] 특히, Dkstatin-1가 처리된 개체의 경우, 70 % 이상의 생존율을 가지며, 가장 효과적으로 개체의 생존율을 향상시키는 것으로 나타난다.
- [0137] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 녹농균에 대한 병원성을 감소시킴에 따라, 개체의 면역 반응의 효과를 향상시킬 수 있으며, 이에 따라, 개체의 생존율을 증가시킬 수 있다.
- [0138] 나아가, 도 10b를 참조하면, 전술한 도 10a의 실험 과정에서 녹농균 접종 후, 각 균주의 생존율에 대한 결과가 도시된다. 이때, 균주의 생존율은 녹농균 접종 12시간 후, 개체의 기관지 폐조직을 적출하여 균질화(homogenization) 한 후, PBS에 10배씩 단계별로 희석하여 폐조직내 균주의 수를 측정하였다.
- [0139] 녹농균 접종 12시간 후, 폐포 내의 녹농균의 수는 Dkstatin-1을 접종한 개체(DKST-1+PA01)가 4.7×10^4 cfu/ml로 가장 크게 감소한 것으로 나타나며, Dkstatin-2을 접종한 개체(DKST-2+PA01)의 경우, 대조군(DMSO+PA01)과 유사한 박테리아 수를 갖는 것으로 나타난다.
- [0140] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물 중 Dkstatin-1이 녹농균에 대한 병원성 및 증식률을 차별적으로 감소시킴에 따라, 개체의 면역 반응이 보다 효과적일 수 있다.
- [0141] 나아가, 도 10c를 참조하면, 전술한 도 10a의 실험 과정에서 녹농균 접종 후, 개체의 폐 조직에 대한 현미경 염색 결과가 도시된다.
- [0142] 먼저, 도 10c의 (b) 및 (c)를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2는 도 10c의 (a)와 유사한 염색 결과를 나타내며, 접종 시 폐 조직에 대한 손상을 유발하지 않는 것으로 나타난다.
- [0143] 한편, 도 10c의 (d)를 참조하면, 녹농균을 감염시킬 경우, 조직 침윤을 나타내며, 많은 염증이 유발되어, 폐 조직이 손상된 것으로 나타난다.
- [0144] 그러나, 도 10c의 (e) 및 (f)를 참조하면, 녹농균 및 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물인 Dkstatin-1 또는 Dkstatin-2을 처리한 경우, 전술한 도 10c의 (d)보다 조직 침윤이 감소되어, 폐 조직에 대한 손상이 완화된 것으로 나타난다.
- [0145] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 녹농균에 대한 병원성을 감소시킴에 따라, 개체의 면역 반응을 향상시키고, 더욱이, 개체의 재생능력 또한 향상시킬 수 있다.
- [0146] 이상의 결과에 따라, 본 발명의 일 실시예에 따른 항병원성 조성물은 병원균에 대한 독성 즉, 병원성을 감소시켜, 이에 대한 질병을 예방 및 치료할 수 있으며, 나아가, 개체 자체의 면역 반응을 보다 효과적으로 증진시킬 수 있다.
- [0147] 본 발명의 여러 실시예들의 각각 특징들이 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하며, 당업자가 충분히 이해할 수 있듯이 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 실시예들이 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시 가능할 수도 있다.
- [0148] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 더욱 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 반드시 이러한 실시예로 국한되는 것은 아니고, 본 발명의 기술사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양하게 변형 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

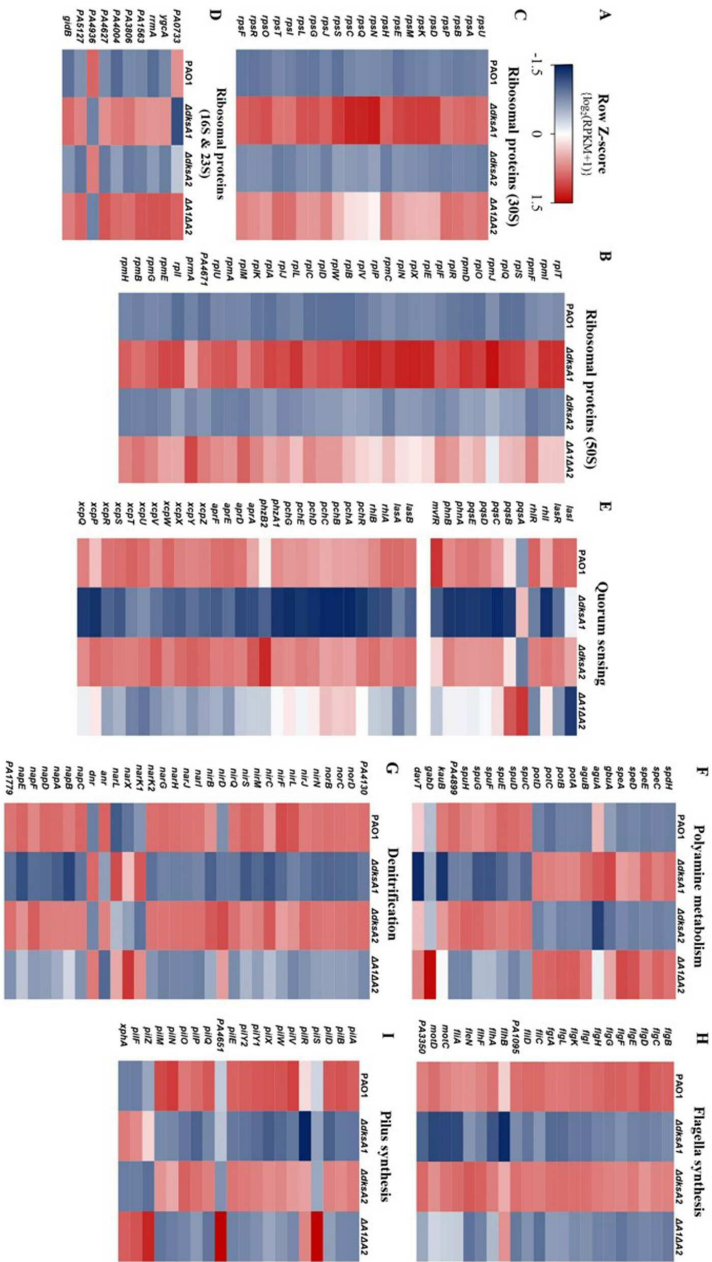
도면1a



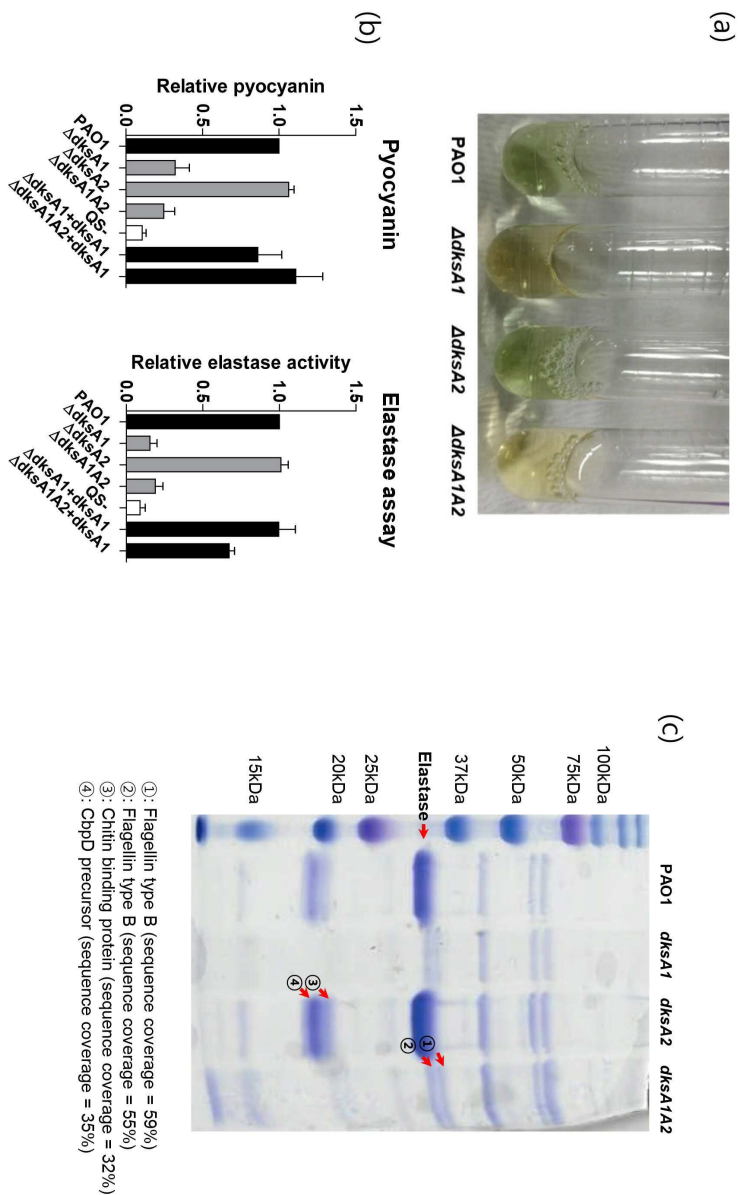
도면1b



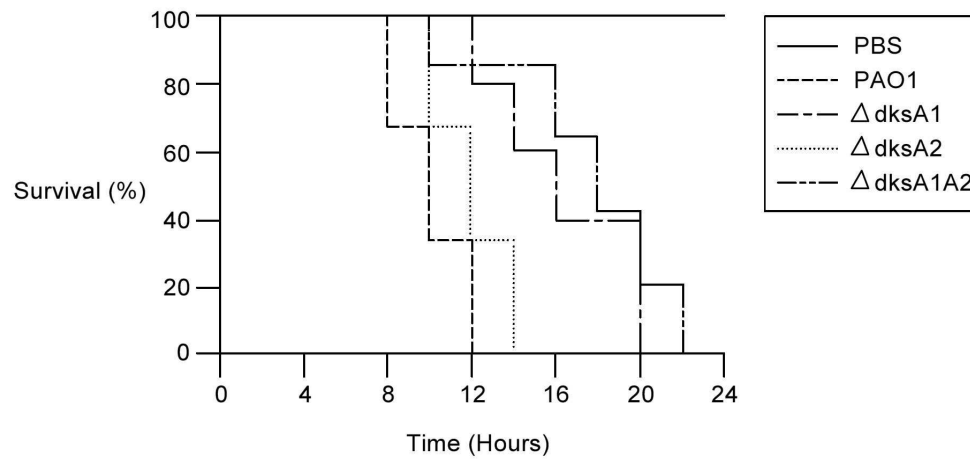
도면2a



도면2b

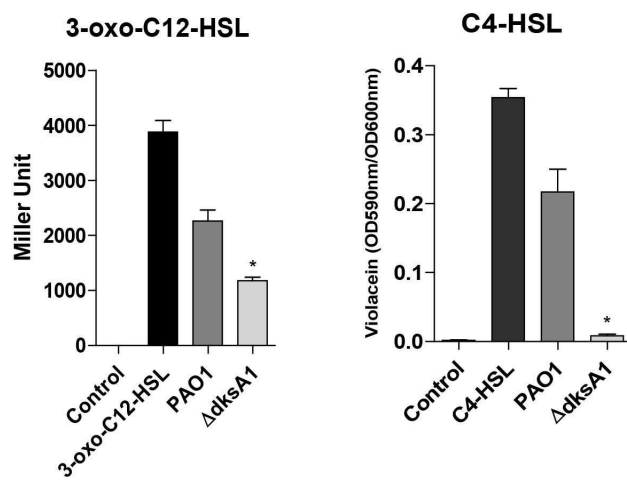


도면2c

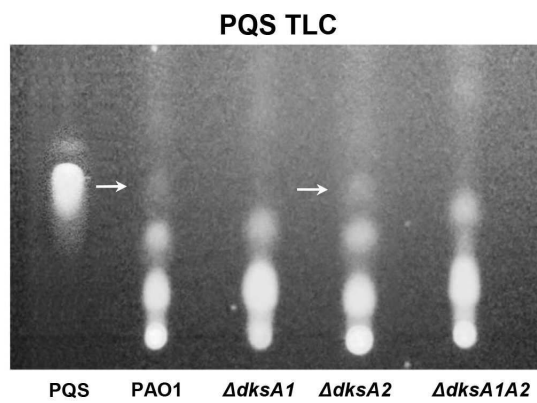


도면2d

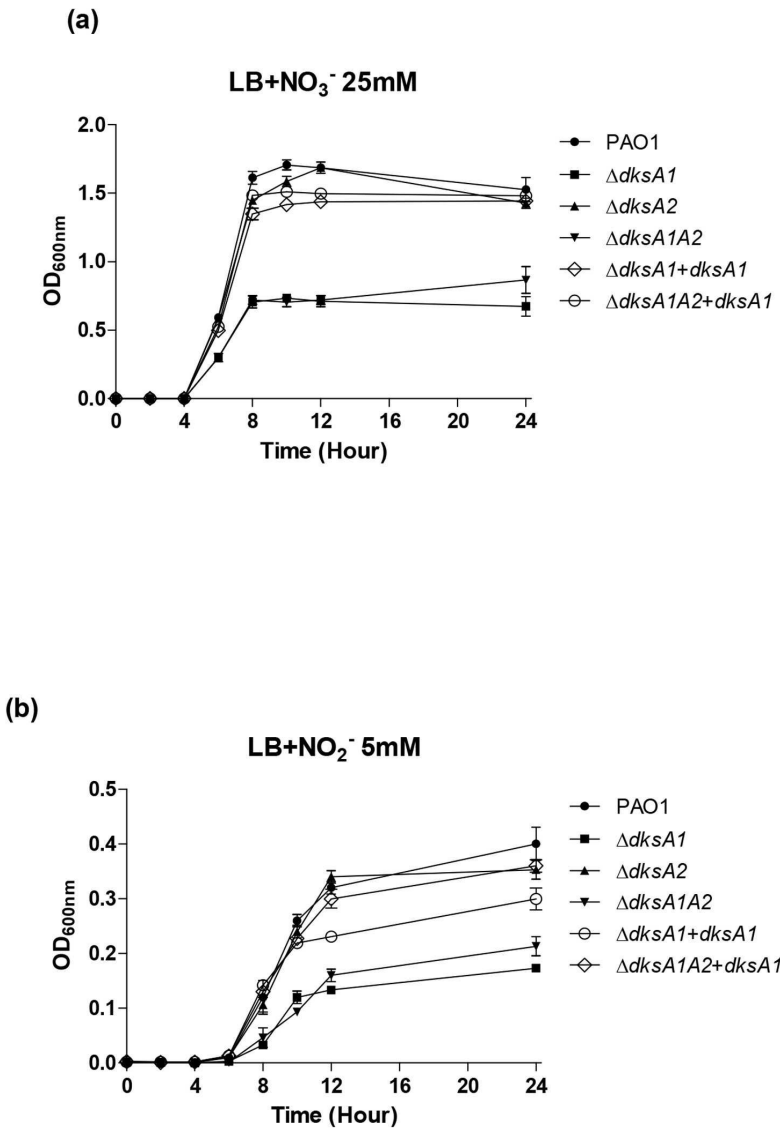
(a)



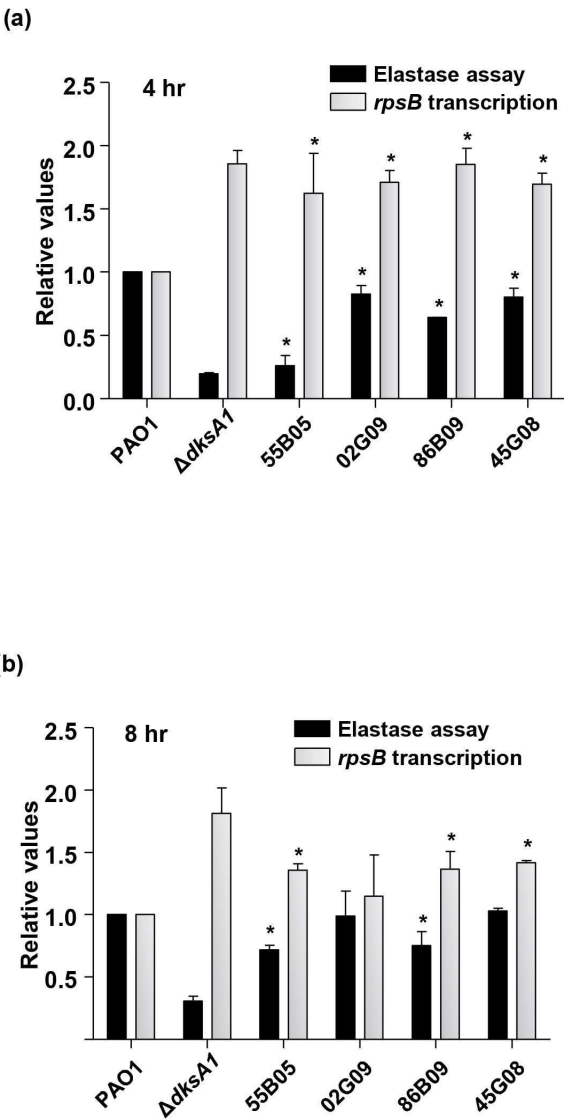
(b)



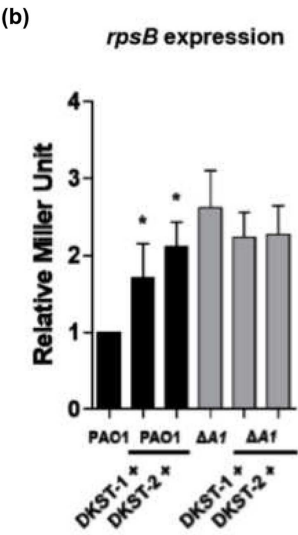
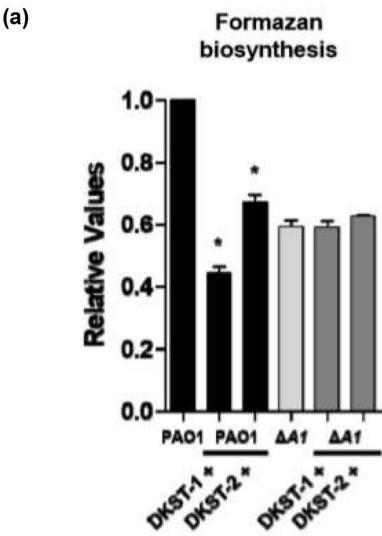
도면2e



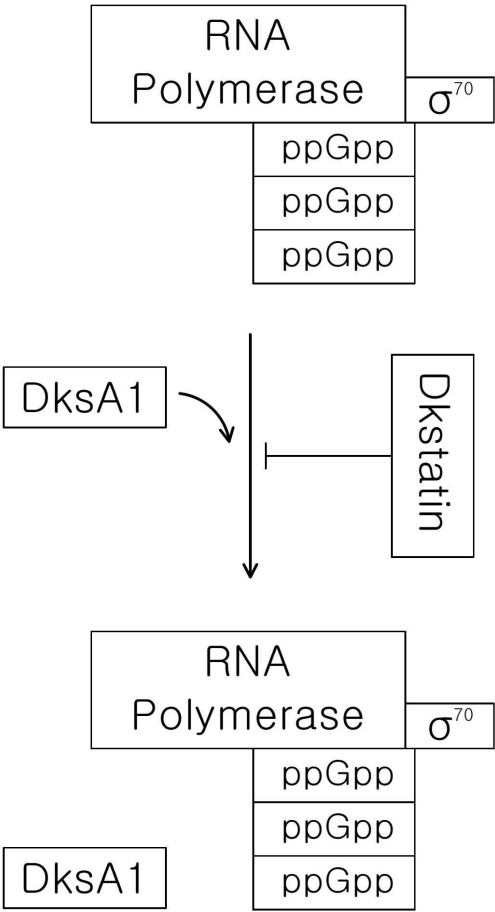
도면3b



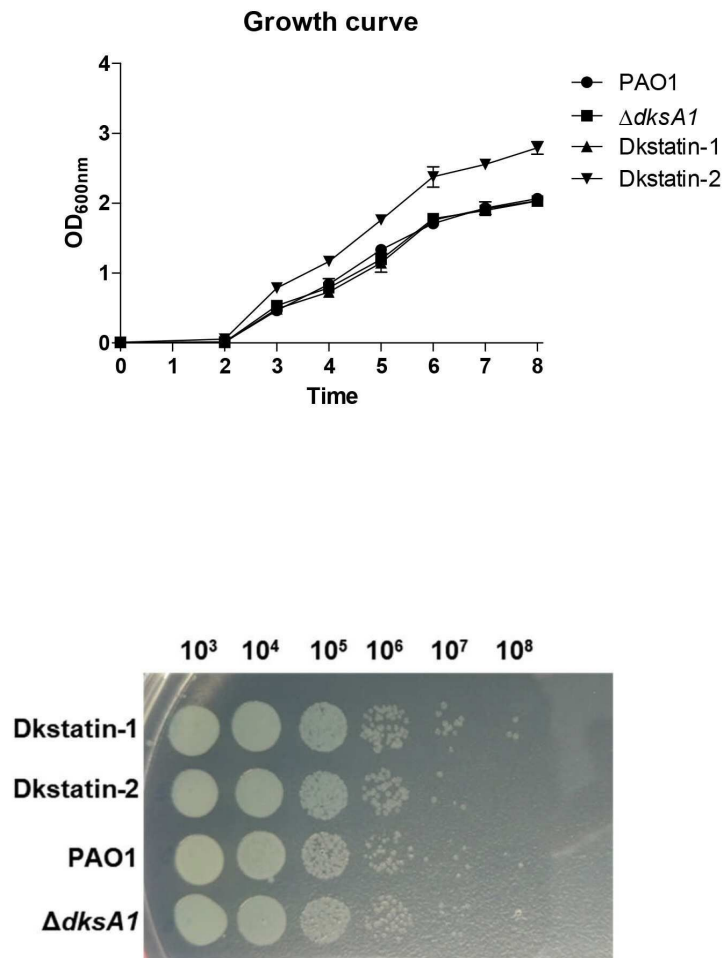
도면4a



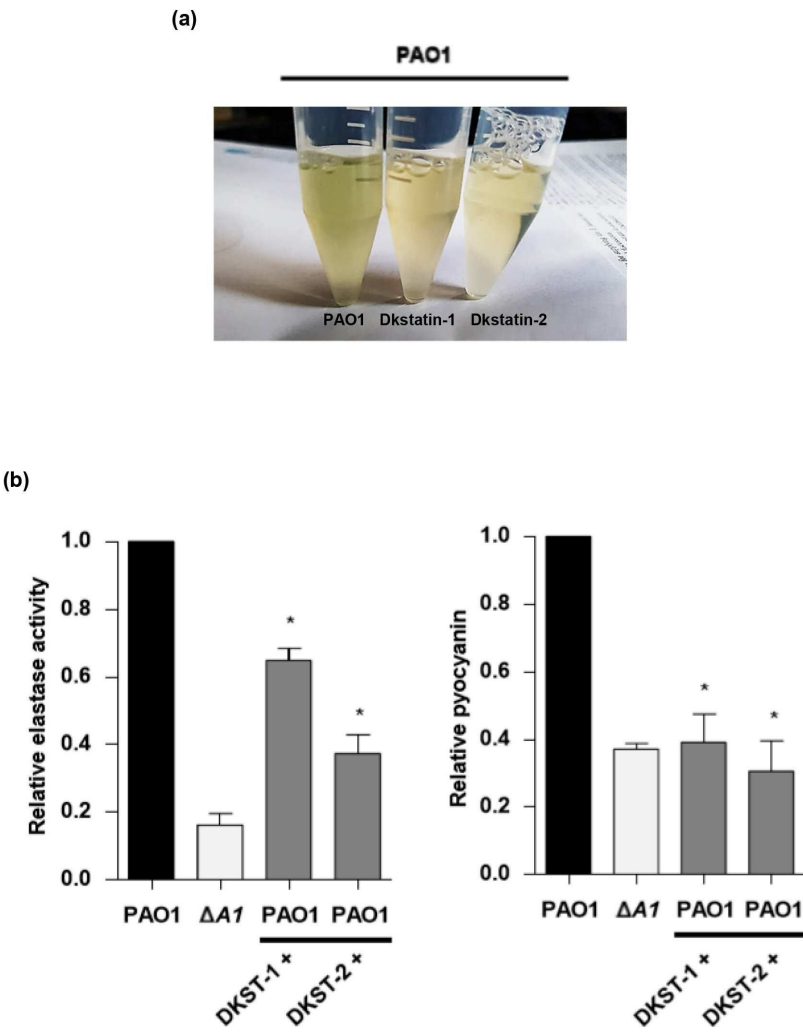
도면4b



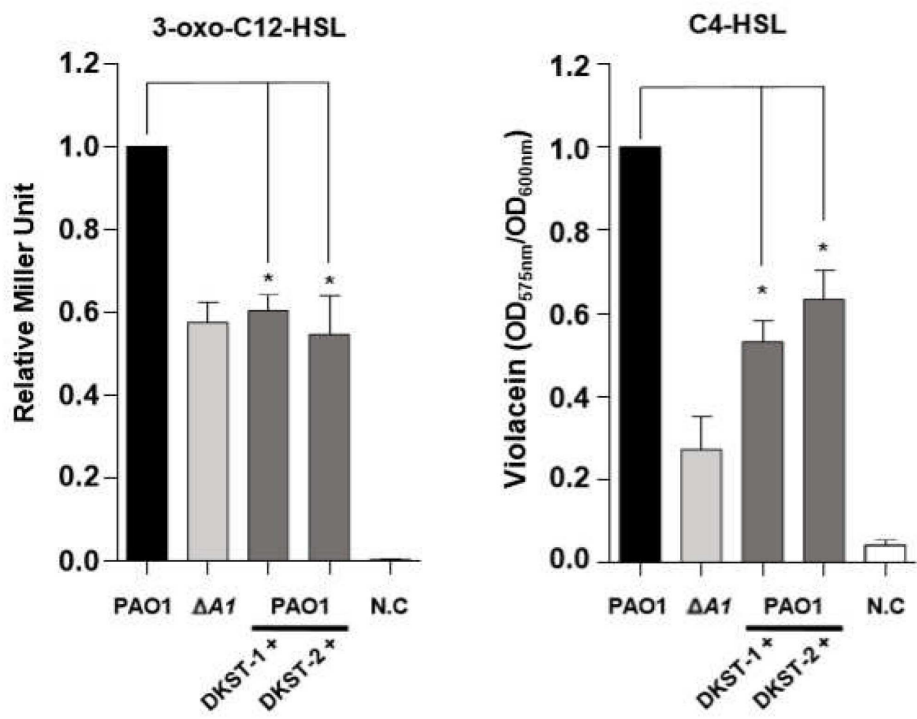
도면5a



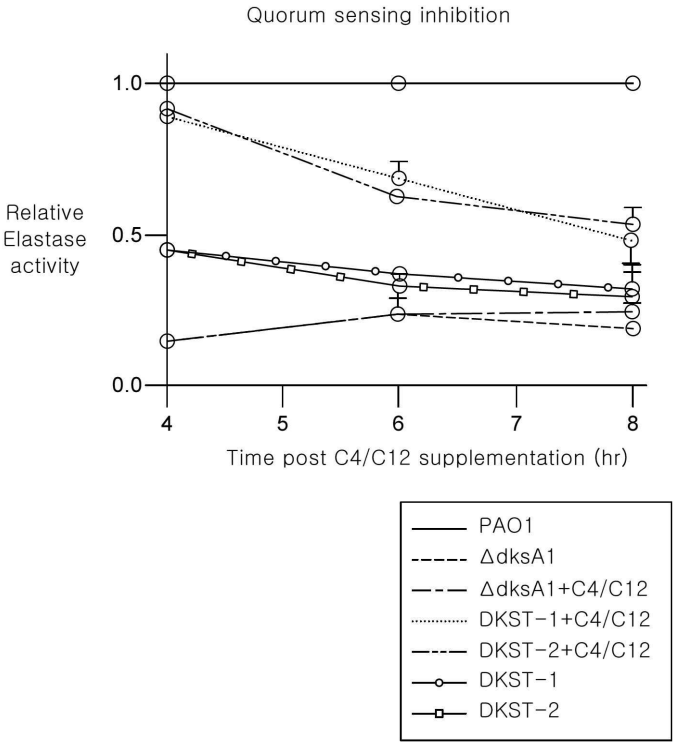
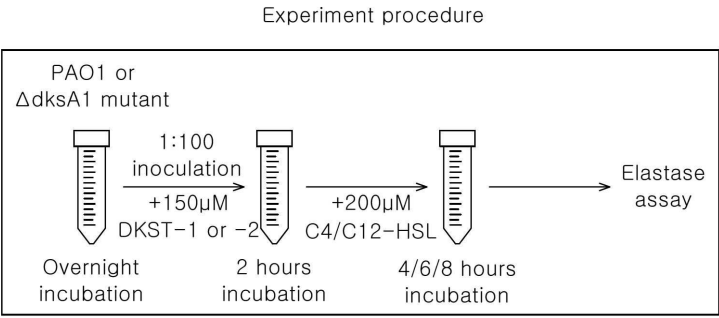
도면5b



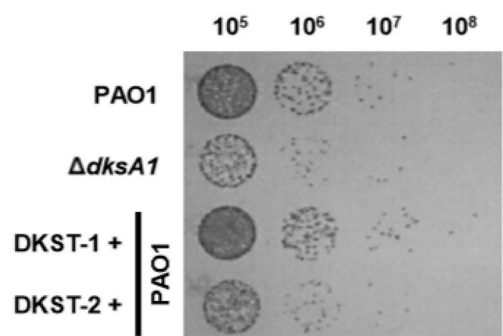
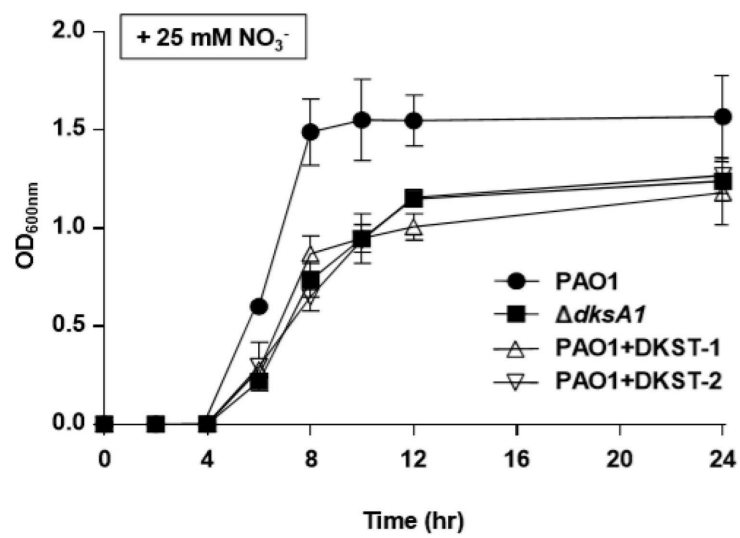
도면5c



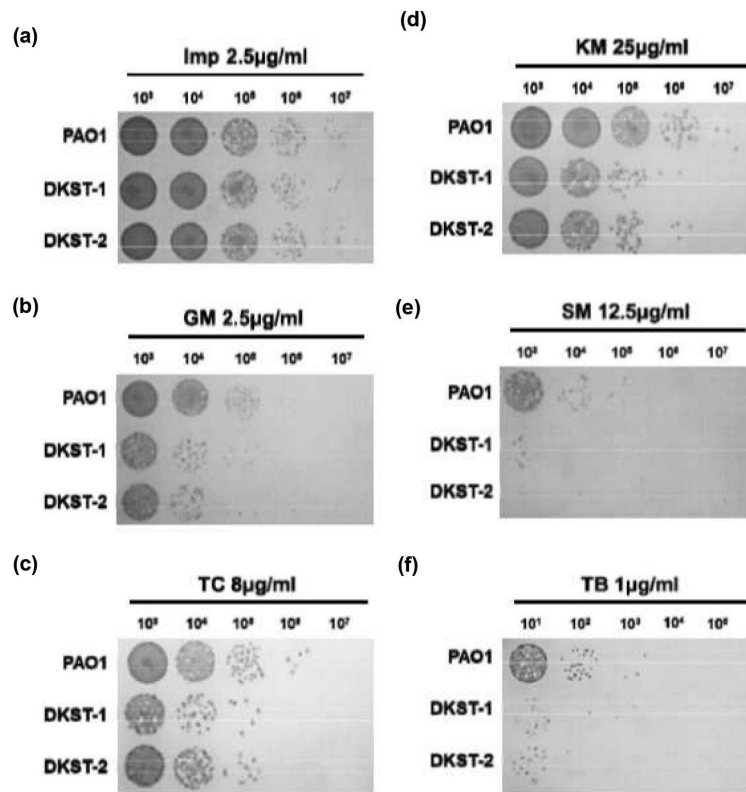
도면5d



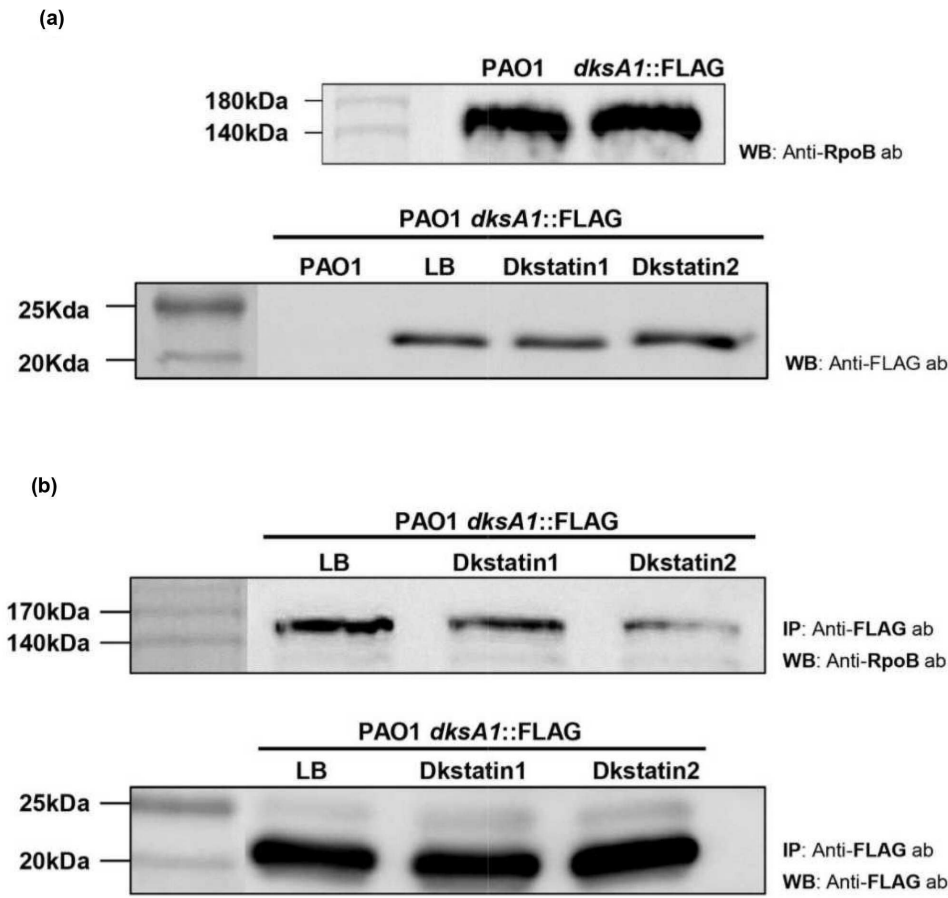
도면6

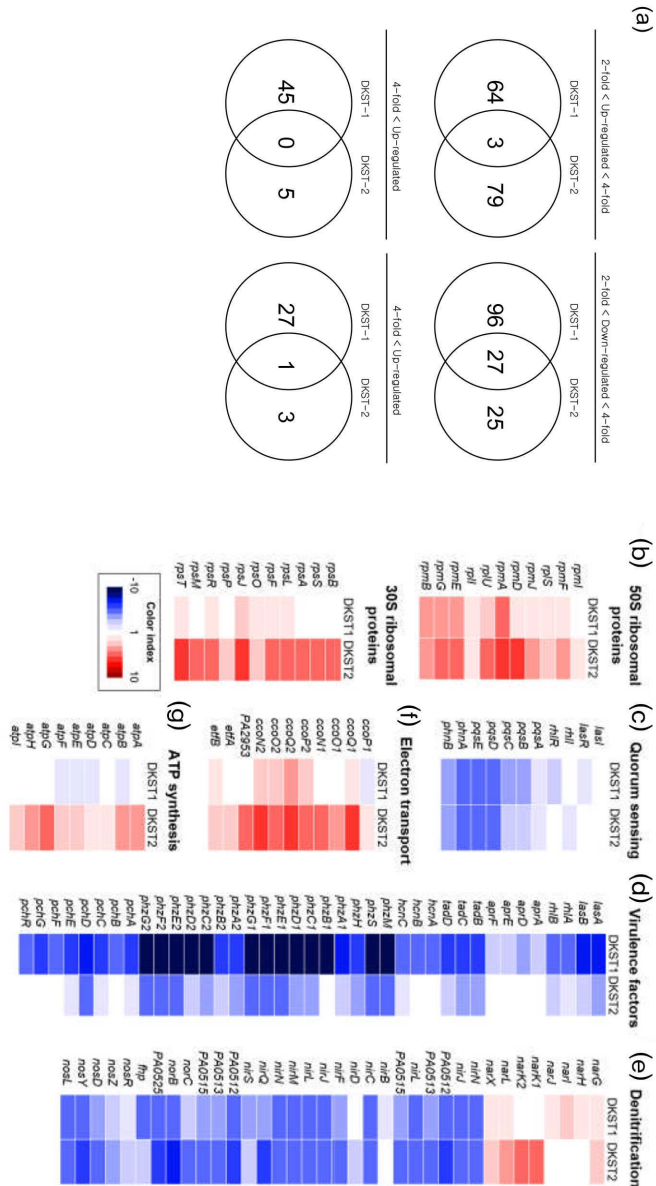


도면7

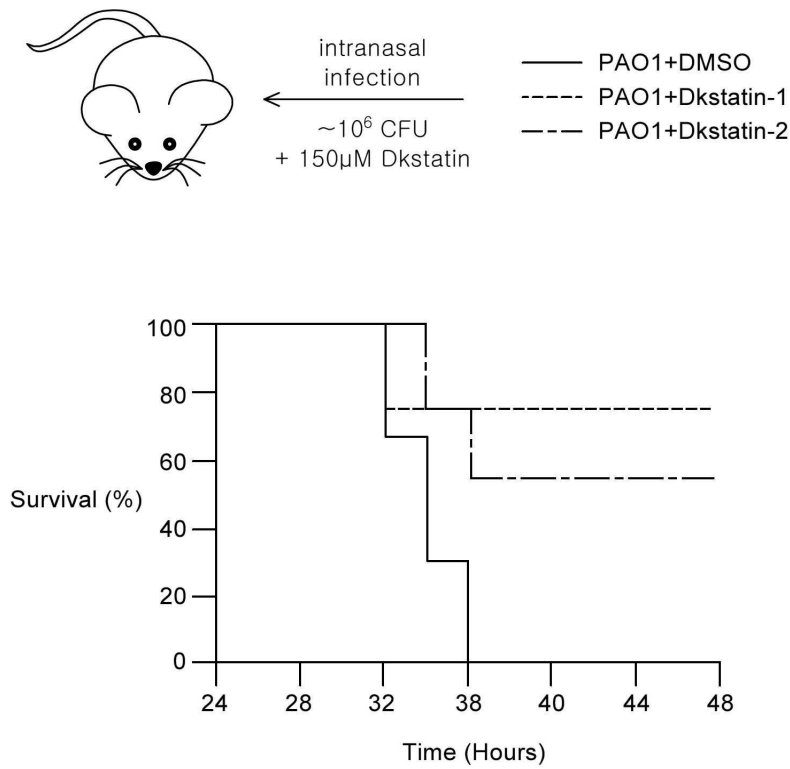


도면8

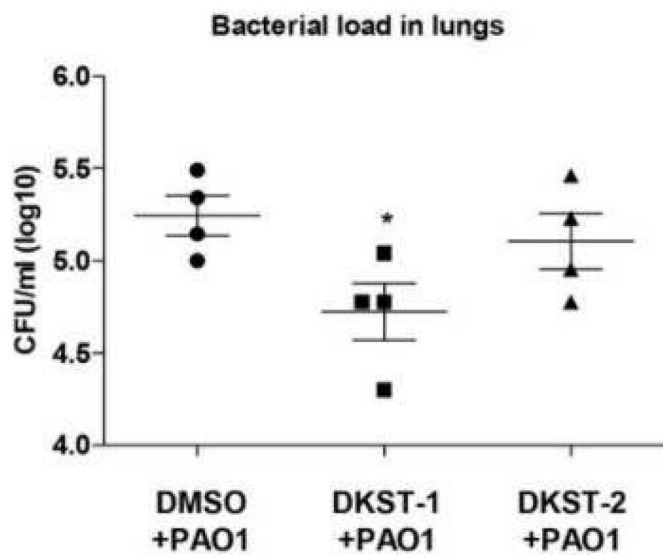




도면10a



도면10b



도면10c

