



등록특허 10-2466127



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월11일

(11) 등록번호 10-2466127

(24) 등록일자 2022년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/225 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/225 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0188728

(22) 출원일자 2020년12월31일

심사청구일자 2020년12월31일

(65) 공개번호 10-2022-0096357

(43) 공개일자 2022년07월07일

(56) 선행기술조사문헌

The Journal of Biochemistry, 46, 4, 525-527, 1959.

Trends Biotechnol., 31(3), 177-184, 2013.

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

신성재

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 에비슨의생명연구센터 (ABMRC) #304

김이한

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 에비슨의생명연구센터 (ABMRC) #307

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 이재영

전체 청구항 수 : 총 11 항

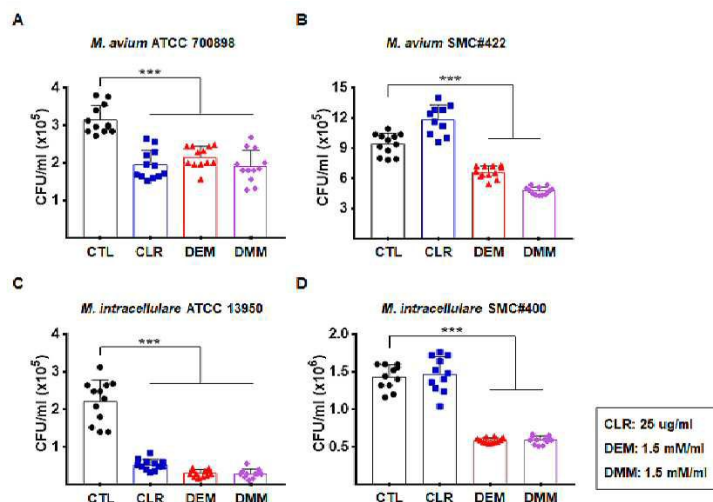
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 약물 내성 비결핵 항산균의 숙주 지향 치료를 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 약물 내성 비결핵 항산균에 대하여 숙주 지향 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 31/04 (2018.01)

(72) 발명자

이주미

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 에비슨의생명연구센터 (ABMRC) #307

박지윤

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 에비슨의생명연구센터 (ABMRC) #307

최상원

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 에비슨의생명연구센터 (ABMRC) #307

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465031457
과제번호	HI20C0017020020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건사업진흥원
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	MAC 폐질환의 치료향상을 위한 항생제 관용 극복기술 검증과 새로운 치료기법의 적용근거 확립
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.04.23 ~ 2020.12.31

명세서

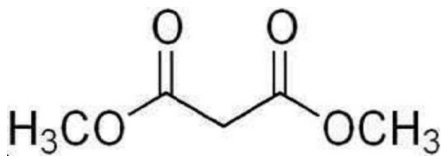
청구범위

청구항 1

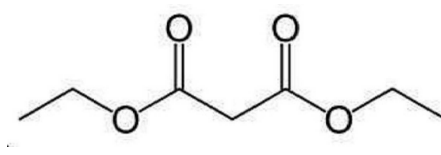
하기 화학식 2 내지 화학식 3으로 표시되는 화합물 중에서 선택되는 어느 하나, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 비결핵 항산균의 약물에 대한 감수성 증진용 약학 조성물로서,

상기 비결핵 항산균은 마크롤리드(macrolide)계 항생제 내성균주인 것인, 약학 조성물:

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*), 마이코박테리움 압세수스 콤플렉스(*Mycobacterium abscessus complex*), 마이코박테리움 플라베센스(*Mycobacterium flavescence*), 마이코박테리움 첼로네(*Mycobacterium chelonae*), 마이코박테리움 셀라툼(*Mycobacterium celatum*), 마이코박테리움 포르투이툼(*Mycobacterium fortuitum*), 마이코박테리움 고르도네(*Mycobacterium gordonae*), 마이코박테리움 가스트리(*Mycobacterium gastri*), 마이코박테리움 헤모필룸(*Mycobacterium haemophilum*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테리움 칸사시이(*Mycobacterium kansasii*), 마이코박테리움 말모엔스(*Mycobacterium malmoense*), 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*), 마이코박테리움 스줄가이(*Mycobacterium szulgai*), 마이코박테리움 테레(*Mycobacterium terrae*), 마이코박테리움 스크로풀라세움(*Mycobacterium scrofulaceum*), 마이코박테리움 울서란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코박테리움 시미애(*Mycobacterium simiae*) 및 마이코박테리움 제노피(*Mycobacterium xenopi*)로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

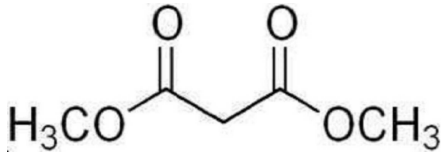
상기 약물은 마크롤리드(macrolide)계 항생제인, 약학 조성물.

청구항 6

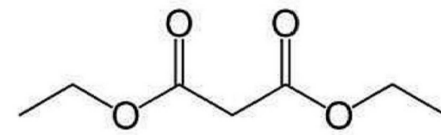
하기 화학식 2 내지 화학식 3으로 표시되는 화합물 중에서 선택되는 어느 하나, 또는 이의 약학적으로 허용 가

능한 염을 유효성분으로 포함하는, 약물 내성 비결핵 항산균의 내성 극복용 약학 조성물로서,
상기 비결핵 항산균은 마크롤리드(macrolide)계 항생제 내성균주인 것인, 약학 조성물:

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 7

삭제

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*), 마이코박테리움 압세수스 콤플렉스(*Mycobacterium abscessus complex*), 마이코박테리움 플라베센스(*Mycobacterium flavescence*), 마이코박테리움 첼로네(*Mycobacterium chelonae*), 마이코박테리움 셀라툼(*Mycobacterium celatum*), 마이코박테리움 포르투이툼(*Mycobacterium fortuitum*), 마이코박테리움 고르도네(*Mycobacterium gordonae*), 마이코박테리움 가스트리(*Mycobacterium gastri*), 마이코박테리움 헤모필룸(*Mycobacterium haemophilum*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테리움 칸사시이(*Mycobacterium kansasii*), 마이코박테리움 말모엔스(*Mycobacterium malmoense*), 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*), 마이코박테리움 스줄가이(*Mycobacterium szulgai*), 마이코박테리움 테레(*Mycobacterium terrae*), 마이코박테리움 스크로풀라세움(*Mycobacterium scrofulaceum*), 마이코박테리움 울서란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코박테리움 시미애(*Mycobacterium simiae*) 및 마이코박테리움 제노피(*Mycobacterium xenopi*)로 구성된 균으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 약물은 마크롤리드(macrolide)계 항생제인, 약학 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 약학 조성물은 1종 이상의 항생제를 더 포함하는, 약학 조성물로서,

상기 항생제는 목시플록사신(moxifloxacin), 리파부틴(rifabutin), 아미카신(amikacin), 클로파지마인(clofazimine), 및 베다퀼린(bedaquiline) 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 약학 조성물.

청구항 11

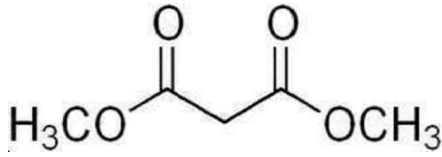
삭제

청구항 12

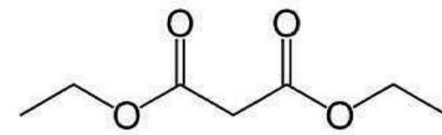
하기 화학식 2 내지 화학식 3으로 표시되는 화합물 중에서 선택되는 어느 하나, 또는 이의 약학적으로 허용 가

능한 염을 유효성분으로 포함하는, 약물 내성 비결핵 항산균 감염의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,
상기 비결핵 항산균은 마크롤리드(macrolide)계 항생제 내성균주인 것인, 약학 조성물;

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 13

삭제

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 비결핵 항산균은 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*), 마이코박테리움 압세수스 콤플렉스(*Mycobacterium abscessus complex*), 마이코박테리움 플라베센스(*Mycobacterium flavescence*), 마이코박테리움 첼로네(*Mycobacterium chelonae*), 마이코박테리움 셀라툼(*Mycobacterium celatum*), 마이코박테리움 포르투이툼(*Mycobacterium fortuitum*), 마이코박테리움 고르도네(*Mycobacterium gordonae*), 마이코박테리움 가스트리(*Mycobacterium gastri*), 마이코박테리움 헤모필룸(*Mycobacterium haemophilum*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테리움 칸사시이(*Mycobacterium kansasii*), 마이코박테리움 말모엔스(*Mycobacterium malmoense*), 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*), 마이코박테리움 스줄가이(*Mycobacterium szulgai*), 마이코박테리움 테레(*Mycobacterium terrae*), 마이코박테리움 스크로폴라세움(*Mycobacterium scrofulaceum*), 마이코박테리움 울서란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코박테리움 시미애(*Mycobacterium simiae*) 및 마이코박테리움 제노피(*Mycobacterium xenopi*)로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 약물은 마크롤리드(macrolide)계 항생제인, 약학 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 약학 조성물은 1종 이상의 항생제를 더 포함하는, 약학 조성물로서,

상기 항생제는 목시플록사신(moxifloxacin), 리파부틴(rifabutin), 아미카신(amikacin), 클로파지마인(clofazimine), 및 베다퀼린(bedaquiline) 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 약학 조성물.

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약물 내성 비결핵 항산균에 대하여 숙주 지향 치료를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이코박테리움 속 균종들은 병원성 정도와 숙주에 감염력에 따라 절대병원성균인 결핵균 및 나병균을 포함하는 결핵균 그룹과, 이를 제외한 기회감염성 균종들인 비결핵 항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)의 두 그룹으로 구분된다.

[0003] 상기 비결핵 항산균은 자연계에 널리 분포하며 균종에 따라 질환을 일으키는 발병력이 다르다. 구체적으로, *M. kansasii*, *M. avium* complex, *M. abscessus* 등은 상대적으로 발병력이 크고, *M. fortuitum*은 상대적으로 발병력이 낮다. 비결핵 항산균으로 인한 질환은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증, 파종성 질환 등 4가지 특징적인 임상 증후를 나타낸다.

[0004] 비결핵 항산균에 의해 유발된 폐질환에 대한 보고는 2000년 이후 증가하고 있으며, 대부분의 선진국에서 *M. avium* complex에 의한 폐질환이 현재 가장 많이 보고되고 있다. 또한 외국에서는 상대적으로 드물지만 국내에서는 두번째로 관찰되는 *M. abscessus*가 원인균으로 보고되고 있다. 특히 한국에서는 *M. avium* complex와 *M. abscessus*(또는 *Mycobacterium abscessus* complex)에 의해 다수의 환자가 발생하는 것으로 보고되고 있다. 상기 비결핵 항산균의 감염에 의해 유발되는 폐 질환은 중년 이상의 비흡연자 여성에서 흔히 발생되며, 기침, 발열, 객혈 및 객담과 같은 증상이 나타난다.

[0005] 비결핵 항산균에 의해 유발된 폐질환 환자의 경우 치료를 위하여, ATS/IDSA와 BTS 지침에 따라 결핵 치료제인 리팜피신(rifampicin; RIF)과, 마크롤리드(macrolide)계열의 클라리트로마이신(clarithromycin; CLR) 또는 아지트로마이신(azithromycin; AZM)에 에탐부톨(ethambutol; EMB)을 병용하여 투여하는 방식으로 치료하고 있다. 그러나, 이와 같은 항생제들의 효과에 대해서는 명확하게 알려진 바가 없으며, 3제 치료에도 마크롤리드(macrolide)에 대해 내성을 획득하는 경우도 빈번하게 나타나고 있다. 하지만 아직까지 마크롤리드를 대체할 항결핵제가 없어 다양한 연구 분야에서 새로운 항생제 개발을 위한 노력이 진행되고 있는 실정이다.

(선행문헌 1) 한국특허등록 제10-2400827호

(선행문헌 2) 한국특허등록 제10-2270382호

(선행문헌 3) 한국특허등록 제10-2276224호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 비결핵 항산균의 약물에 대한 감수성 증진용 조성물을 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 약물 내성 비결핵 항산균의 내성 극복용 조성물을 제공하고자 한다.

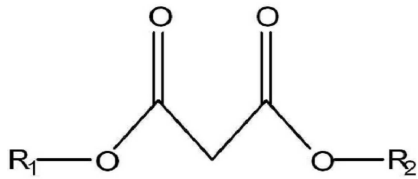
[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 약물 내성 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 비결핵 항산균의 약물에 대한 감수성 증진용 조성물에 관한 것이다:

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 상기 화학식 1에서,

[0014] R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 C1 내지 C9인 알킬기이고, 상기 알킬기는 1종 이상의 C1 내지 C9의 알킬기에 의해 치환되거나 비치환되며, 복수 개의 치환기로 치환되는 경우 이들은 서로 동일하거나 상이할 수 있다.

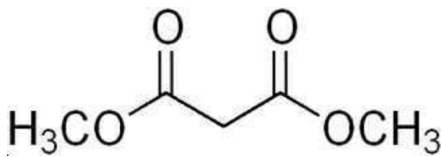
[0015] 본 발명의 상기 "알킬기"는 직쇄 또는 분지쇄일 수 있고, 포화 1가 탄화수소 라디칼을 의미하며, 상기 알킬기는 본 발명에 기재되는 하나 이상의 치환체로 임의로 치환되거나, 치환되지 않을 수 있다. 본 발명의 상기 알킬기는 탄소수는 1 내지 9인 것으로서, 예를 들면 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, t-부틸기, n-부틸기, 이소부틸기, sec-부틸기, 또는 헥실기, 헵틸기 등 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 비제한적 일 예시로, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 1종 이상의 C1 내지 C4의 알킬기에 의해 치환 또는 비치환된 C1 내지 C4인 알킬기일 수 있다.

[0017] 본 발명의 비제한적 일 예시로, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 1종 이상의 메틸기 또는 에틸기에 의해 치환되거나 비치환된 메틸기 또는 에틸기일 수 있다.

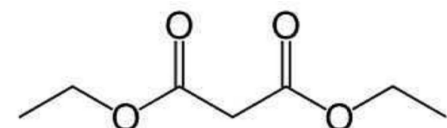
[0018] 본 발명의 비제한적 일 예시로, 상기 화합물은 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0019] [화학식 2]



[0020]

[0021] [화학식 3]



[0022]

[0023] 본 발명에서 상기 약학적으로 허용되는 염은, 의학적 적용에 적합한 것으로 당업자에 의해 일반적으로 간주되는 염(예를 들어 이러한 염이 상기 염으로 치료될 수 있는 대상체에게 유해하지 않기 때문임), 또는 각각의 치료 내에서 허용 가능한 부작용을 야기하는 염이다. 일반적으로, 상기 약학적으로 허용되는 염은 미국 식품 의약국 (FDA), 유럽 의약청(EMA), 또는 일본 후생성의 의약품 의료기기 종합기구(PMDA)와 같은 규제 당국에 의해 허용되는 것으로 간주되는 염이다. 그러나, 본 발명은 원칙적으로, 예를 들어 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체의 제조에서의 중간체, 또는 본 발명에 따른 화합물의 약학적으로 허용되는 염 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체의 제조에서의 중간체로서, 그 자체로는 약학적으로 허용되지 않는 본 발명에 따른 화합물의 염을 또한 포함한다. 상기 염은 수불용성 염을 포함하고, 특히, 수용성 염을 포함한다.

[0024] 각각의 경우에, 당업자는 본 발명에 따른 특정 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체가 염을 형성할 수 있는지 여부, 즉, 상기 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체가, 예를 들어 아미노기, 카르복실산기 등과 같은 전하를 띌 수 있는 기를 가지는지 여부를 쉽게 결정할 수 있다.

[0025] 본 발명의 화합물의 예시적인 염은 산 부가 염 또는 염기와의 염, 특히 약학적으로 허용되는 무기산 및 유기산 부가 염 및 약학에서 통상적으로 사용되는 염기와의 염이며, 이는 수불용성 또는 특히 수용성 산 부가 염이다. 본 발명의 화합물의 치환기에 따라 염기와의 염이 또한 적합할 수 있다. 산 부가 염은, 예를 들어, 본 발명의

화합물의 용액을 염산, 황산, 푸마르산, 말레산, 석신산, 아세트산, 벤조산, 시트르산, 타르타르산, 탄산 또는 인산과 같은 약학적으로 허용되는 산의 용액과 혼합함으로써 형성될 수 있다. 마찬가지로, 약학적으로 허용되는 염기 부가 염은 알칼리 금속염(예를 들어, 나트륨 또는 칼륨 염); 알칼리 토금속 염(예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘 염); 및 적합한 유기 리간드로 형성된 염(예를 들어, 할라이드, 하이드록사이드, 카복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 알킬 설포네이트 및 아릴 설포네이트와 같은 반대 음이온을 사용하여 형성된 암모늄, 4차 암모늄 및 아민 양이온)을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 염의 예시적인 예로는 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아르기네이트, 아스코르베이트, 아스파테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이카르보네이트, 바이설페이트, 바이타르트레이트, 보레이트, 브로마이드, 부티레이트, 칼슘 에테데이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 캄실레이트, 카르보네이트, 클로라이드, 시트레이트, 디글루코네이트, 디하이드로클로라이드, 도데실설페이트, 에테데이트, 에디설페이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 갈락테이트, 갈락투로네이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 헥실레소르시네이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 하이드록시나프토에이트, 요오다이드, 이소부티레이트, 이소티오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트), 메틸설페이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 판토테네이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트/디포스페이트, 프탈레이트, 피크레이트, 피발레이트, 폴리갈락투로네이트, 프로피오네이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 설페이트, 수베레이트, 석시네이트, 탄네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 운테카노에이트, 발레레이트 등이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0026] 본 발명에서 약학적으로 허용되지 않으며, 예를 들어, 산업적 규모로 본 발명에 따른 화합물을 제조하는 동안 공정 생성물로서 수득될 수 있는 염이 또한 본 발명에 포함되고, 요망되는 경우, 이는 당업자에게 알려진 방법에 의해 약학적으로 허용되는 염으로 전환될 수 있다.

[0027] 본 발명의 상기 "비결핵 항산균"이란, 결핵균종(*Mycobacterium tuberculosis* complex)과 나병균(*M. leprae*)를 제외한 다른 모든 마이코박테리아를 지칭하는 것으로서, 예를 들면, 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*), 마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*), 마이코박테리움 압세수스 콤플렉스(*Mycobacterium abscessus* complex), 마이코박테리움 플라베센스(*Mycobacterium flavescence*), 마이코박테리움 첼로네(*Mycobacterium chelonae*), 마이코박테리움 셀라툼(*Mycobacterium celatum*), 마이코박테리움 포르투이툼(*Mycobacterium fortuitum*), 마이코박테리움 고르도네(*Mycobacterium gordonae*), 마이코박테리움 가스트리(*Mycobacterium gastri*), 마이코박테리움 헤모필룸(*Mycobacterium haemophilum*), 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*Mycobacterium intracellulare*), 마이코박테리움 칸사시이(*Mycobacterium kansasii*), 마이코박테리움 말모엔스(*Mycobacterium malmoense*), 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*), 마이코박테리움 스줄가이(*Mycobacterium szulgai*), 마이코박테리움 테레(*Mycobacterium terrae*), 마이코박테리움 스크로풀라세움(*Mycobacterium scrofulaceum*), 마이코박테리움 울서란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코박테리움 시미애(*Mycobacterium simiae*) 및 마이코박테리움 제노피(*Mycobacterium xenopi*)로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 상기 "마이코박테리움 아비움 콤플렉스 (*Mycobacterium avium* complex)"는 비결핵 항산균(nontuberculous mycobacteria; NTM) 감염 폐 질환을 일으키는 가장 흔한 slow-growing 항산균으로, 마이코박테리움 아비움 서브스페시스 아비움(*Mycobacterium avium* subsp. *avium*), 마이코박테리움 아비움 서브스페시스 파라튜버쿨로시스(*Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*), 마이코박테리움 아비움 서브스페시스 호미니수스(*Mycobacterium avium* subsp. *Hominisuis*), 또는 마이코박테리움 인트라셀룰라레(*Mycobacterium intracellulare*)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서 상기 "약물"은 항생제일 수 있고, 예를 들면, 리팜핀(rifampin), 리파펜틴(rifapentine), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플로퀴논론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린(cycloserine), 프로치온 아마이드(prothionamide), 레보플록사신(levofloxacin), 모ξι플록사신(moxifloxacin), 오픈플록사신(Ofloxacin), 리파부틴(rifabutin), 카프레오마이신(capeomycin), 아미카신(amikacin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 프로티오나마이드(protionamide), 에티오나마이드(ethionamide), 사이클로세린(cycloserine), 티오아세트존(thioacetazone), 클로파지마인(clofazimine), 아목실린/클라불라네이트(amoxicillin/clavulanate), 다이아미노다이페닐설폰의 유도체(derivative of dianomidiphenylsulphone), 에리트로마이신(erythromycin), 클라리트

로마이신(clarithromycin), 디리트로마이신(dirithromycin), 록시트로마이신(roxithromycin), 아지트로마이신(azithromycin), 조사마이신(josamycin), 미데카마이신(midecamycin), 로키타마이신(rokitamycin), 스피라마이신(spiramycin), 베다퀼린(bedaquiline) 또는 리네졸리드(linezolid) 등일 수 있고, 바람직하게는 에리트로마이신(erythromycin), 클라리트로마이신(clarithromycin), 디리트로마이신(dirithromycin), 록시트로마이신(roxithromycin), 아지트로마이신(azithromycin), 조사마이신(josamycin), 미데카마이신(midecamycin), 로키타마이신(rokitamycin) 또는 스피라마이신(spiramycin) 등의 마크롤리드(macrolide)계 항생제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0030] 본 발명에서 상기 "마크롤리드(macrolide)계 항생제"는 호흡기 감염의 대표적인 치료제로 마크로사이클릭 락톤 고리(macrocyclic lactone ring)를 포함하고 있어서 마크롤리드(macrolide) 항생제라고 불리고 있다. 마크롤리드는 그 구조에 따라 14각형(erythromycin, clarithromycin, dirithromycin, roxithromycin), 15각형(azithromycin), 그리고 16각형(josamycin, midecamycin, rokitamycin, spiramycin)으로 분류된다.
- [0031] 본 발명에서 상기 "감수성"은 "민감성"과 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 항생제 사용에 의해 유도되는 항생제에 대한 저항성의 반대 개념으로, 항생제에 의한 치료 효과가 의도하는 대로 발휘될 수 있는 상태를 말한다.
- [0032] 본 발명에서는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 처리함으로써 기존의 항생제에 의해 사멸되지 않거나, 그 사멸 효과가 미미한 비결핵 항산균에 대하여 항생제에 대한 감수성을 증진시켜 비결핵 항산균의 증식을 억제하는 효과를 높일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 약물 내성 비결핵 항산균의 내성 극복용 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명에서 상기 "내성 극복"이란, 특정 약물에 대한 내성을 획득한 비결핵 항산균의 약물에 대한 감수성을 증가시키는 작용을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 특정 약물은 항생제를 의미할 수 있다. 상기 감수성의 증가는 내성이 없는 비결핵 항산균에 대해 증식 억제 등의 효과를 보이는 농도와 비교하여, 내성을 획득한 비결핵 항산균의 증식 억제 등의 효과를 보이는 농도가 동등하거나 그 이상으로 상승시키는 정도에 이르는 것을 의미한다. 상기 내성 극복과 동의어로서 "내성억제", "내성해제" 또는 "저항성 해제" 등이 있다.
- [0036] 본 발명의 내성 극복용 조성물은 1종 이상의 항생제를 더 포함함으로써 내성 극복 효과를 현저히 향상시킬 수 있다. 여기서, 상기 항생제로는 예를 들면, 리팜핀(rifampin), 리파펜틴(rifapentine), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플로퀴논론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린(cycloserine), 프로치온 아마이드(prothionamide), 레보플록사신(levofloxacin), 목시플록사신(moxifloxacin), 오픈록사신(Ofloxacin), 리파부틴(rifabutin), 카프레오마이신(capeomycin), 아미카신(amikacin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 프로티오나마이드(protionamide), 에티오나마이드(ethionamide), 사이클로세린(cycloserine), 티오아세트아존(thioacetazone), 클로파지마인(clofazimine), 아목실린/클라불라네이트(amoxicillin/clavulanate), 다이아미노다이페닐설폰의 유도체(derivative of dianomidiphenylsulphone), 에리트로마이신(erythromycin), 클라리트로마이신(clarithromycin), 디리트로마이신(dirithromycin), 록시트로마이신(roxithromycin), 아지트로마이신(azithromycin), 조사마이신(josamycin), 미데카마이신(midecamycin), 로키타마이신(rokitamycin), 스피라마이신(spiramycin), 베다퀼린(bedaquiline) 또는 리네졸리드(linezolid) 등일 수 있고, 바람직하게는 리팜핀(rifampin), 에탐부톨(ethambutol), 리파펜틴(rifapentine), 리파부틴(rifabutin), 베다퀼린(bedaquiline), 아미카신(amikacin), 목시플록사신(moxifloxacin) 및 클로파지마인(clofazimine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 보다 바람직하게는 리파부틴(rifabutin), 베다퀼린(bedaquiline), 아미카신(amikacin) 및 클로파지마인(clofazimine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 내성 극복용 조성물에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 비결핵 항산균의 종류 및 약물에 관한 정의는 상기 약물에 대한 감수성 증진용 조성물에서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위해 이하 그 기재를 생략한다.
- [0038] 본 발명에서는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 처리함으로써 약물에 대한 감수성을 증가시켜 해당 약물에 대한 내성을 극복할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 약물 내성 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조

성물에 관한 것이다.

- [0041] 본 발명의 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 1종 이상의 항생제를 더 포함함으로써 상기 감염 또는 감염 질환의 예방, 개선 또는 치료 효과를 현저히 향상시킬 수 있다. 여기서, 상기 항생제로는 예를 들면, 리팜핀(rifampin), 리파펜틴(rifapentine), 아이소니아지드(isoniazid), 피라진 아마이드(pyrazinamide), 에탐부톨(ethambutol), 스트렙토마이신(streptomycin), 플루오퀴놀론(fluoroquinolone), 카나마이신(kanamycin), 시클로세린(cycloserine), 프로치온 아마이드(prothionamide), 레보 플록사신(levofloxacin), 모시플록사신(moxifloxacin), 오픈플록사신(Ofloxacin), 리파부틴(rifabutin), 카프레 오마이신(capeomycin), 아미카신(amikacin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 프로티오나마이드(protionamide), 에티오나마이드(ethionamide), 사이클로세린(cycloserine), 티오아세트존(thioacetazone), 클로파지마인(clofazimine), 아목실린/클라불라네이트(amoxicillin/clavulanate), 다이아미노다이페닐설폰의 유도체(derivative of dianomidiphenylsulphone), 에리트로마이신(erythromycin), 클라리트로마이신(clarithromycin), 디리트로마이신(dirithromycin), 록시트로마이신(roxithromycin), 아지트로마이신(azithromycin), 조사마이신(josamycin), 미데카마이신(midecamycin), 로키타마이신(rokitamycin), 스피라마이신(spiramycin), 베다퀼린(bedaquiline) 또는 리네졸리드(linezolid) 등일 수 있고, 바람직하게는 리팜핀(rifampin), 에탐부톨(ethambutol), 리파펜틴(rifapentine), 리파부틴(rifabutin), 베다퀼린(bedaquiline), 아미카신(amikacin), 모시플록사신(moxifloxacin) 및 클로파지마인(clofazimine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 보다 바람직하게는 리파부틴(rifabutin), 베다퀼린(bedaquiline), 아미카신(amikacin) 및 클로파지마인(clofazimine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균에 의한 감염 질환은 상기 비결핵 항산균의 감염에 의해 나타나는 모든 임상적 증상을 포함하는 것으로, 상기 감염 질환은 폐 질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환 등을 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 비결핵 항산균에 의한 감염성 폐 질환은 섬유공동형(fibrocavitary form), 기관지 확장증형(nodular bronchiectatic form), 또는 이들의 조합인 것일 수 있다. 또한, 상기 감염성 폐 질환은 기침, 객담, 혈담, 발열, 호흡곤란, 흉통 또는 이들의 조합을 동반하는 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 상기 "예방"은 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환으로 인해 발생한 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 모두 포함될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 상기 "개선" 및 "치료"는 본 발명의 상기 조성물을 이용하여 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환으로 인해 발생한 증상이 호전되거나 이롭게 되는 행위라면 제한없이 모두 포함될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 내성 극복용 조성물에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 비결핵 항산균의 종류 및 약물에 관한 정의는 상기 약물에 대한 감수성 증진용 조성물에서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위해 이하 그 기재를 생략한다.
- [0047] 본 발명에서는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 처리함으로써 약물에 대한 감수성을 증가시켜 해당 약물에 대한 내성을 극복할 뿐만 아니라, 더 나아가 상기 약물 내성 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.
- [0048] 더 나아가, 본 발명에서 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 숙주의 면역 세포, 특히 큰포식 세포에 작용하여 기존의 TCA 사이클 억제가 아닌 숙주 지향 치료법(Host-directed therapies; HDTs)으로서 사용되어, 단독으로 사용될 경우뿐만 아니라 기존의 치료제와 병용하여 사용하는 경우 치료에 시너지 효과가 발휘되도록 할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 상기 "숙주 지향 치료법"이란, 전통적인 항생제와 같이 병원체에 직접적으로 작용하는 것이 아닌, 병원체에 대하여 숙주-매개 반응을 통해 작용하는 치료법을 의미한다. 이와 같은 숙주 지향 치료법은 병원체가 존재하는 숙주의 환경, 예를 들면 대사반응 등을 변화시킴으로써 병원체가 숙주 내 감염되어 유지되거나, 성장하는데 불리하도록 하는 방법으로서, 면역 반응을 조절하거나, 숙주 세포의 대사반응을 조절하는 등의 작용을 통해 그 기능이 발휘될 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 제공하는 상기 각 용도의 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물로 사용될 수 있으나, 그 형태를 특별히 제한하지 않는다.
- [0052] 본 발명의 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있

으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0053] 본 발명의 상기 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화되어 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등이 사용될 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등이 혼합되어 사용될 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 상기 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필 하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로는 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 상기 "비경구"란, 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다.
- [0057] 본 발명의 상기 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여 시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형화될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 상기 조성물의 유효성분이 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등일 수 있다.
- [0061] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등이 더 포함될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 상기 식품 조성물에 포함되는 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0063] 본 발명에서 제공하는 화합물은 비결핵 항산균의 약물, 특히는 항생제에 대한 감수성을 증진시켜 약물 내성을

극복할 수 있을 뿐만 아니라, 더 나아가서는 숙주 세포, 특히는 큰포식 세포에 감염된, 약물에 대한 내성을 가진 비결핵 항산균의 성장 또는 증식을 효과적으로 억제하여 상기 비결핵 항산균에 의한 감염 또는 감염 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명에서 제공하는 화합물을 기존의 항생제와 병용하여 사용하는 경우 약물 내성 극복 효과나 숙주 세포에 감염된 약물 내성 비결핵 항산균의 성장 또는 증식 억제 효율을 현저히 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 본 발명의 실시예 1에서 마크롤리드 내성 유전자 변이 부위를 지닌 비결핵 항산균 6종의 임상 균주가 마크롤리드에 직접적으로 내성을 보이는 균임을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 이때 대조균으로 MAC 표준 균주인 M. 아비움 ATCC 700898과 M. 인트라셀룰라레 ATCC 13950이 사용되었다.

도 2는 본 발명의 실시예 2에서 큰포식 세포에서 디메틸 말로네이트(Dimethyl malonate; DMM) 또는 디에틸 말로네이트(Diethyl malonate; DEM)를 3일간 처리하였을 때 세포 내 마크롤리드 내성 비결핵 항산균의 성장 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다. 이때 대조균으로서 마크롤리드 감수성 균주인 MAC 표준 균주 (M. 아비움 ATCC 700898과 M. 인트라셀룰라레 ATCC 13950)가 사용되었다.

도 3은 본 발명의 실시예 3에서 큰포식 세포에 비결핵 항산균 치료제로 권장하는 약물 중 3종의 M. 아비움 마크롤리드 내성 균주에 효과적인 약물을 선정하기 위해 리팜핀 (RIF), 에탐부톨(EMB), 리파펜틴 (RFP), 리파부틴 (RFB), 베다퀼린 (BDQ), 아미카신 (AMK), 목시플록사신(MXF), 클로파지마인 (CFZ), 클로파지마인과 아미카신 (CFZ+AMK)을 3일간 처리하였고, 이 때 세포내 마크롤리드 내성 비결핵 항산균의 성장 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다. 이때 대조균으로서 마크롤리드 감수성 균주인 M. 아비움 ATCC 700898이 사용되었다.

도 4는 본 발명의 실시예 3에서 큰포식 세포에서 비결핵 항산균 치료제로 권장하는 약물 중 2종의 M. 인트라셀룰라레 마크롤리드 내성 균주에 DMM과의 병용 투여에서 효과적인 약물을 선정하기 위해 리팜핀 (RIF), 에탐부톨 (EMB), 리파펜틴 (RFP), 리파부틴(RFB), 베다퀼린 (BDQ), 아미카신 (AMK), 목시플록사신(MXF), 클로파지마인 (CFZ), 클로파지마인과 아미카신(CFZ+AMK)을 3일간 처리한 뒤 세포 내 마크롤리드 내성 비결핵 항산균의 성장 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다. 이때 대조균으로서 마크롤리드 감수성 균주인 M. 인트라셀룰라레 ATCC 13950가 사용되었다.

도 5는 본 발명의 실시예 4에서 큰포식 세포에 3종의 M. 아비움 마크롤리드 내성 균주를 감염 후, 실시예 3에서 마크롤리드 내성 비결핵 항산균의 효과적인 성장 억제를 보인 약제 (RFB, BDQ, MXF, CFZ, AMK+CFZ)에 DMM을 병용하여 3일간 처리하였고, 세포 내 마크롤리드 내성 비결핵 항산균의 성장 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다. 이때 대조균으로서 마크롤리드 감수성 균주인 M. 아비움 ATCC 700898이 사용되었다.

도 6는 본 발명의 실시예 4에서 큰포식 세포에 3종의 M. 인트라셀룰라레 마크롤리드 내성 균주를 감염 후, 실시예 3에서 마크롤리드 내성 비결핵항산균의 효과적인 성장 억제를 보인 약제 (RFB, BDQ, MXF, CFZ, AMK+CFZ)에 DMM을 병용하여 3일간 처리하였고, 세포 내 마크롤리드 내성 비결핵 항산균의 성장 억제 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다. 이때 대조균으로서 마크롤리드 감수성 균주인 M. 인트라셀룰라레 ATCC 13950가 사용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0068] 실시예

[0070] [준비예 1] 임상 균주의 배양 방법

[0071] 하기 표 1에서 보는 바와 같이 마크롤리드에 대한 내성 유전자를 획득한 임상 균주 6종을 서울 삼성 병원으로부터 제공받아 이하의 실험을 진행하였다. 이때 대조균으로는 표준균주 M. 아비움 ATCC 700898과 M. 인트라셀룰라레 ATCC 13950를 사용하였다. 약제 감수성 시험 진행 전 표준 균주 및 임상 마크롤리드 내성 균주를 배양하기 위한 액체 배지는 10% OADC를 포함하는 middlebrook 7H9 배지를 사용하였으며, 배지에 균주 접종 후 진탕(shaking)하면서 37 °C 조건에서 배양하였다. 비결핵 항산균의 배양은 600nm에서 흡광도가 0.3 ~ 0.5에 도달할 때까지 배양하였고, 약제 감수성 시험은 600nm에서의 흡광도 0.01 (약 5×10^5 CFU/ml)로 희석하여 사용하였다.

표 1

번호	균주	유전자	돌연변이 뉴클레오타이드
1	<i>M. avium</i> SMC#397	23s rRNA	A2059 → C
2	<i>M. avium</i> SMC#422	23s rRNA	A2059 → G
3	<i>M. avium</i> SMC#1216	23s rRNA	A2058 → C
4	<i>M. avium</i> ATCC 700898*	23s rRNA	표준 균주 (대조군)
5	<i>M. intracellulare</i> SMC#400	23s rRNA	A2058 → C
6	<i>M. intracellulare</i> SMC#414	23s rRNA	A2059 → G
7	<i>M. intracellulare</i> SMC#418	23s rRNA	A2058 → G
8	<i>M. intracellulare</i> ATCC 13950*	23s rRNA	표준 균주 (대조군)

[0072]

[0074]

[준비에 2] 골수 유래 큰포식세포(Macrophage)로의 분화

[0075]

마우스의 골수로부터 골수 세포를 분리한 뒤, 10% 우태아혈청(Biowest, 프랑스)과 1% 페니실린/스트렙토마이신(Biowest, 프랑스)이 포함된 글루코스 함량이 높은 DMEM(Biowest, 프랑스) 배양 배지에, 10%의 L929 세포주 배양액을 넣어 분화 배지를 제조하였다. 이후, 10 ml의 상기 분화 배지를 90 X 15 mm 페트리접시(SPL life science, 한국)에 넣고, 5% CO₂ 및 37 °C의 조건의 인큐베이터에서 3일 동안 배양하였다. 10 ml의 상기 분화 배지를 추가로 상기 페트리접시에 넣은 뒤 6 또는 7일 동안 더 배양하는 과정을 통해 큰포식 세포를 얻었다. 이렇게 얻어진 큰포식 세포를 이하의 실험에서 사용할 때에는, 트립신-EDTA(Biowest, 프랑스)를 이용하여 상기 큰포식 세포를 분리한 뒤, 48웰 세포 배양 플레이트의 각 웰에 1.5×10^5 세포의 수로 분주하고, 24시간 동안 배양하는 과정을 통해 플레이트에 상기 큰포식 세포가 충분히 부착될 수 있도록 하였다.

[0077]

[준비에 3] 균주 배양을 위한 7H10 고체 배지의 준비

[0078]

1 L 크기의 삼각 플라스크 안에 9.5 g의 Difco™ Middlebrook 7H10 아가(BD bioscience, 미국) 가루를 넣고, 증류수 450 mL을 넣은 뒤에 충분히 섞어 주었다. 이후, 121 °C의 고압증기멸균기를 이용하여 15분 동안 멸균하고, 60 °C가 될 때까지 충분히 식힌 뒤, 50 mL OADC (Oleic Acid + Albumin + Dextrose + Catalase; BD bioscience, 미국)를 추가하고 23 mL씩 90 X 15 mm 페트리접시 (SPL life science, 한국)에 부은 뒤에, 상온에서 하루 동안 방치하여 충분히 굳힌 뒤 추후 실험에 사용될 때까지 냉장보관 하였다.

[0080]

[실시에 1] 약제 감수성 시험을 통한 비결핵 항산균의 마크롤리드 내성 확인

[0081]

상기 준비예 1에 따라 준비된 임상 균주들이 마크롤리드계 항생제에 내성을 갖는 지를 확인하기 위하여, CLSI (Clinical and laboratory standards institute) 가이드라인과 액체배지 발색법(Resazurin microtiter assay: REMA)을 토대로 마크롤리드계 항생제를 처리하고 액체희석법을 수행하였다. 구체적으로는, 비결핵 항산균의 항생제 감수성 검사는 7H9 액체 배지를 사용하여 액체희석법으로 수행하였고, 이때 상기 항생제로는 마크롤리드계 항생제인 클라리트로마이신(clarithromycin; CLR)을 사용하여 0.125 내지 64 ug/ml 농도 범위대로 실험하였다. 클라리트로마이신을 2x로 제조하여 96웰 플레이트에 각 웰 당 100 uL씩 분주하였고, 600nm에서의 흡광도 0.01 (약 5×10^5 CFU/ml)로 희석한 균주들을 각 웰 당 100 uL씩 추가 접종하여 37 °C 조건에서 일주일간 배양하였다. 이때, 음성 대조군으로 비결핵 항산균과 약물 모두 접종되지 않은 배지만 배양된 그룹 (Negative Control group; N), 양성 대조군으로 비결핵 항산균만 배양된 그룹(Postive Control group; P), 약물 대조군으로 비결핵 항산균에 클라리스로마이신이 투여된 그룹(Drug-Treat group)을 함께 배양하였다. 배양 일주일 후 발색 용액 (0.02% resazurin solution) 22 uL를 각 웰에 첨가하고 37 °C 조건에서 24시간 동안 재배양 하였다. 24시간 후 클라리트로마이신의 항균 활성을 음성 대조군, 양성 대조군 및 약물 대조군과 비교하여 그 결과를 도 1의 A 및 B에 나타내었다.

[0082]

도 1의 A 및 B에서 보는 바와 같이, 상기 임상 균주 6종을 마크롤리드 감수성인 표준 균주 *M. 아비움* ATCC 700898 (*Mycobacterium avium hominissuis* ATCC 700898)과 *M. 인트라셀룰라레* ATCC 13950 (*Mycobacterium intracellulare* ATCC 13950)과 동시에 감수성 검사를 수행하여 상대적으로 내성 여부를 판단하였는데, 상기 임상 균주 6종 모두 마크롤리드계 항생제에 대하여 내성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

[0084]

[실시에 2] 큰포식세포 활성화에 의한 마크롤리드 내성 비결핵 항산균의 성장 억제 효과 확인

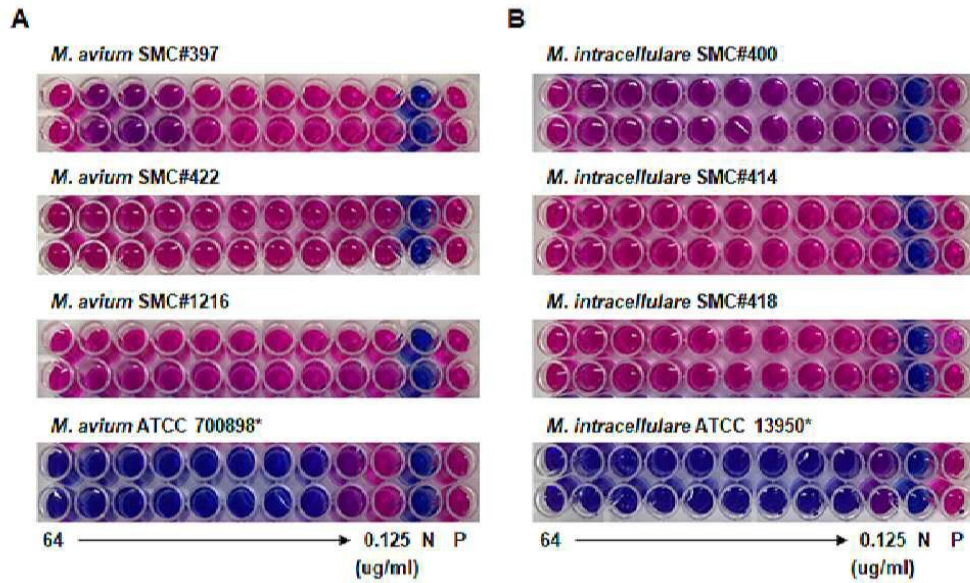
- [0085] 상기 준비예 2에서 48웰 플레이트에 부착된 큰포식 세포의 각 웰에 1:3의 MOI(Multiplicity of infection)로 M. 아비움 ATCC 700898, 마크롤리드 내성 M. 아비움 SMC#422, M. 인트라셀룰라레 ATCC 13950, 마크롤리드 내성 M. 인트라셀룰라레 SMC#400을 각각 넣고 4시간 동안 배양한 뒤 상기 균주가 포함된 배양액을 제거하였다. 그런 다음, 1.5 mM/ml의 디메틸 말로네이트(dimethyl malonate, 이하, 'DMM'이라 함; Sigma-Aldrich, 미국) 또는 1.5 mM/ml의 디에틸 말로네이트(diethyl malonate, 이하, 'DEM'이라 함; Sigma-Aldrich, 미국)가 포함된 상기 플레이트의 상기 준비예 2의 분화 배지를 각각의 웰에 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 여기서, 내성 균주임을 검증하기 위해 25 ug/ml의 클라리트로마이신(CLR)이 포함된 분화 배지를 사용하였고, 대조군으로는 상기 DMM 또는 DEM이 포함되지 않은 분화 배지만을 사용하였다. 배양이 완료된 후, 상기 플레이트의 각 웰을 1X PBS(phosphate buffered saline)를 이용하여 씻어준 뒤, 0.05% 트리톤 X-100을 상기 각 웰에 200 μ l씩 넣고 10 분 동안 배양하여 상기 큰포식 세포의 막을 충분히 용해시켰다. 이후, 큰포식 세포로부터 방출된 용해물을 1/100 또는 1/1000의 배율로 희석하고, 상기 희석된 용해물을 상기 준비예 2의 7H10 고체 배지의 페트리접시에 50 μ l씩 분주한 뒤 미생물 인큐베이터에서 10일 동안 배양하였다. 배양이 완료된 뒤, 페트리접시에 발생된 박테리아 개수(CFU)를 측정하여, 그 결과를 도 2의 A, B, C 및 D에 나타내었다.
- [0086] 도 2의 A, B, C 및 D에서 보는 바와 같이, 비결핵 항산균에 의해 감염된 큰포식 세포에 1.5 mM의 DMM 또는 DEM을 처리하였을 때, 대조군(CTL)과 비교하여 큰포식 세포 내 모든 비결핵 항산균의 성장이 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 2의 B와 D에서 보는 바와 같이, 마크롤리드계 항생제 내성 균주에 감염된 큰포식 세포에 클라리트로마이신(CLR)을 처리하였을 때, 대조군(CTL)과 동일하게 박테리아가 성장하였는 바, M. 아비움 SMC#422와 M. 인트라셀룰라레 SMC#400가 마크롤리드계 항생제에 대한 내성 균주임을 다시금 확인할 수 있었다.
- [0087] 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 DMM 및 DEM은 큰포식 세포에 감염된 마크롤리드계 항생제 감수성 비결핵 항산균뿐만 아니라, 마크롤리드계 항생제에 대한 내성을 갖는 비결핵 항산균의 성장 및 증식 또한 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [0089] [실시예 3] 기존의 항생제 투여에 따른 비결핵 항산균의 성장 억제 효과 확인
- [0090] 기존의 항생제 처리에 따른 마크롤리드계 항생제 내성 비결핵 항산균의 성장 억제 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2과 동일한 방법으로 마크롤리드 내성 MAC 임상 균주가 감염된 큰포식 세포에 10 ug/ml의 리팜핀(rifampin; RIF), 100 ug/ml의 에탐부톨(ethambutol; EMB), 10 ug/ml의 리파펜틴(rifapentine; RFP), 10 ug/ml의 리파부틴(rifabutin; RFB), 12.5 ug/ml의 베다퀼린(bedaquiline; BDQ), 100 ug/ml의 아미카신(amikacin; AMK), 100 ug/ml의 목시플록사신(moxifloxacin; MXF), 10ug/ml의 클로파지마인(clofazimine; CFZ), 10 ug/ml의 클로파지마인(CFZ)과 100 ug/ml의 아미카신(AMK)의 조합으로 각각 처리한 뒤, 3일 동안 배양하고 페트리접시에 발생된 박테리아 개수(CFU)를 측정하여, 그 결과를 도 3과 4에 나타내었다.
- [0091] 도 3과 4에서 보는 바와 같이, 9가지 약제 중 리파부틴(RFB), 베다퀼린(BDQ), 목시플록사신(MXF), 클로파지마인(CFZ), 클로파지마인(CFZ)과 아미카신(AMK)의 조합 약제가 큰포식 세포에 처리되었을 때, 대조군(CTL)과 비교하여 큰포식 세포 내 7종의 마크롤리드계 항생제 내성 또는 감수성 비결핵 항산균의 성장이 모두 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0092] 상기 결과를 통해 본 발명에 따라 리파부틴(RFB), 베다퀼린(BDQ), 목시플록사신(MXF), 클로파지마인(CFZ), 클로파지마인(CFZ)과 아미카신(AMK)의 조합 약제는 큰포식 세포에 감염된 마크롤리드계 항생제 내성 비결핵 항산균의 성장 및 증식을 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0094] [실시예 4] 병용 처리에 따른 비결핵 항산균의 성장 억제 효과 확인
- [0095] DMM과 기존의 항생제와의 병용 투여에 따른 비결핵 항산균의 성장 억제의 시너지 효과를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2과 동일한 방법으로 마크롤리드 내성 MAC 임상 균주가 감염된 큰포식 세포에 10 ug/ml의 리파부틴(RFB), 12.5 ug/ml의 베다퀼린(BDQ), 100 ug/ml의 아미카신(AMK), 100 ug/ml의 목시플록사신(MXF), 10ug/ml의 클로파지마인(CFZ), 10 ug/ml의 클로파지마인(CFZ)과 100 ug/ml의 아미카신(AMK)의 조합의 약제를 단독으로, 또는 1.5 mM/ml의 DMM과 병용하여 처리한 뒤, 3일 동안 배양하고 페트리접시에 발생된 박테리아 개수(CFU)를 측정하여, 그 결과를 도 5과 6에 나타내었다.
- [0096] 도 5와 6에서 보는 바와 같이, DMM을 리파부틴(RFB), 베다퀼린(BDQ), 클로파지마인(CFZ), 클로파지마인(CFZ)과 아미카신(AMK)의 조합 약제와 병용 처리 시 상기 약물들을 각각 단독으로 처리한 경우와 비교하였을 때, 큰포식 세포 내 마크롤리드계 항생제 내성 비결핵 항산균의 성장 억제에 시너지 효과가 발휘되는 것을 확인할 수 있었다.

[0098]

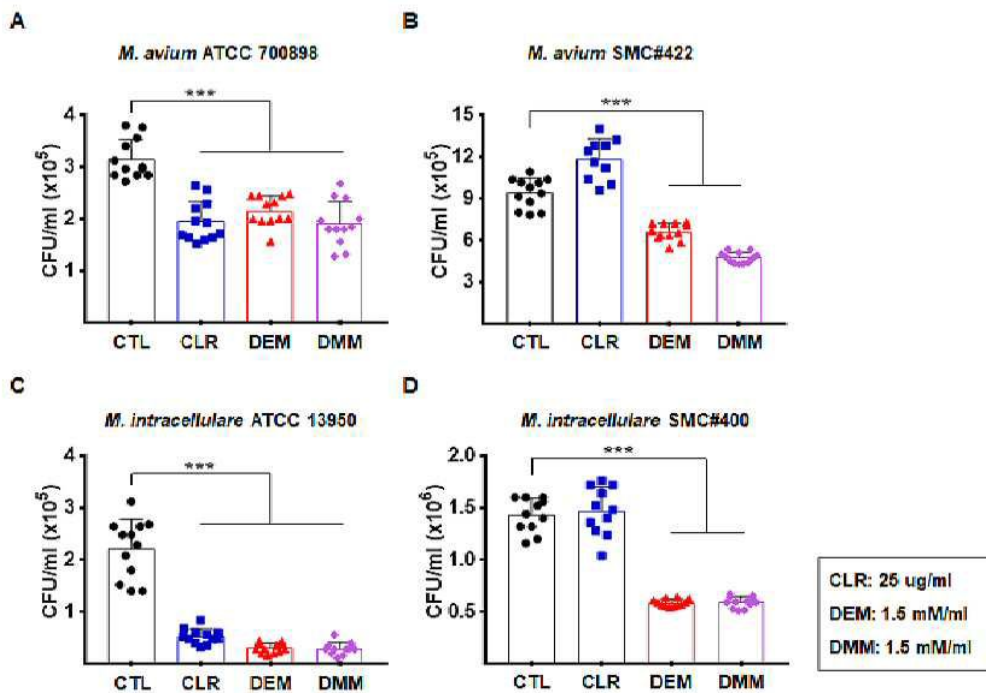
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

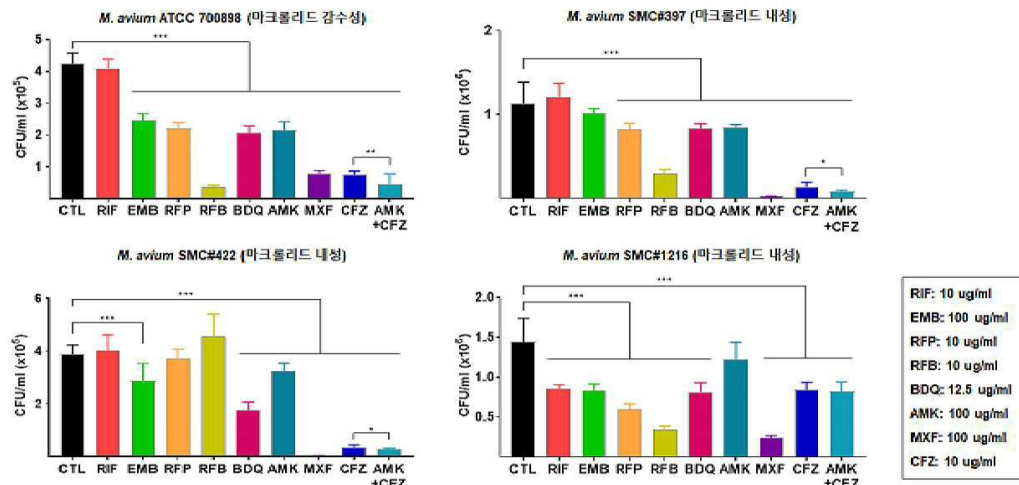
도면1



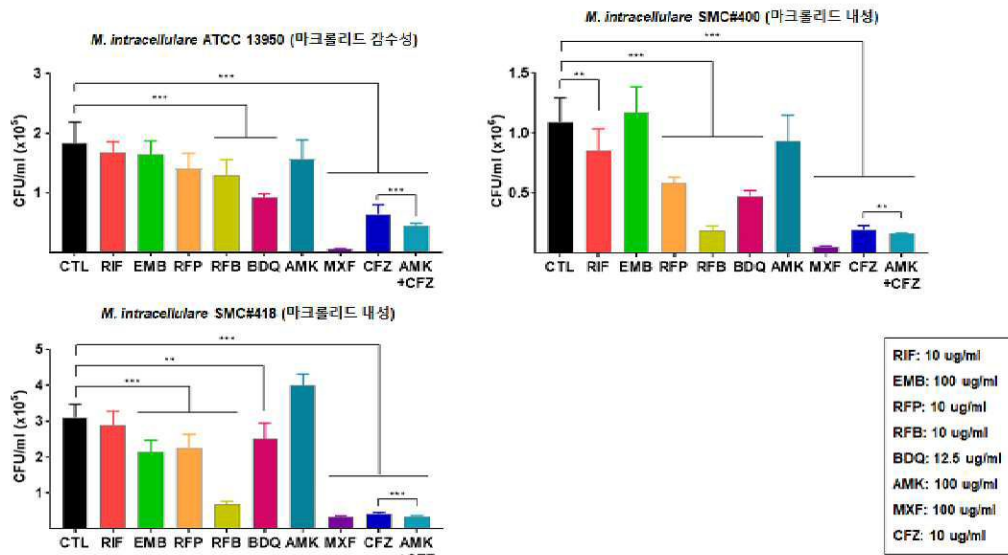
도면2



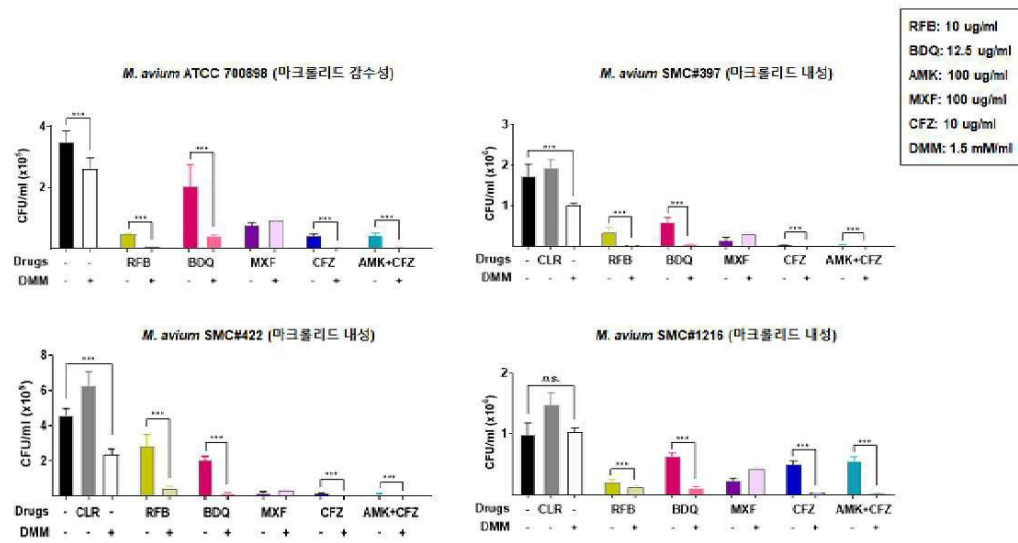
도면3



도면4



도면5



도면6

