



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월10일
(11) 등록번호 10-2132712
(24) 등록일자 2020년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/428 (2006.01) A61K 31/4409 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) A61K 31/4965 (2006.01)
A61K 31/7036 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/428 (2013.01)
A61K 31/4409 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0066327
(22) 출원일자 2017년05월29일
심사청구일자 2018년11월29일
(65) 공개번호 10-2018-0130340
(43) 공개일자 2018년12월07일
(56) 선행기술조사문헌
Frontiers in Immunology, 6, Article 498/1-8,
2015.
Journal of Immunology, 2000, 3506-3518, 2018.

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
김종석
서울특별시 서대문구 연대동문1길 12, 302호 (대신동)
신성재
서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 에비슨생명연구센터 304호 (신촌동)
조상래
서울특별시 양천구 목동동로 430, 608동 406호(목동, 목동신시가지아파트6단지)
(74) 대리인
이재영

전체 청구항 수 : 총 6 항

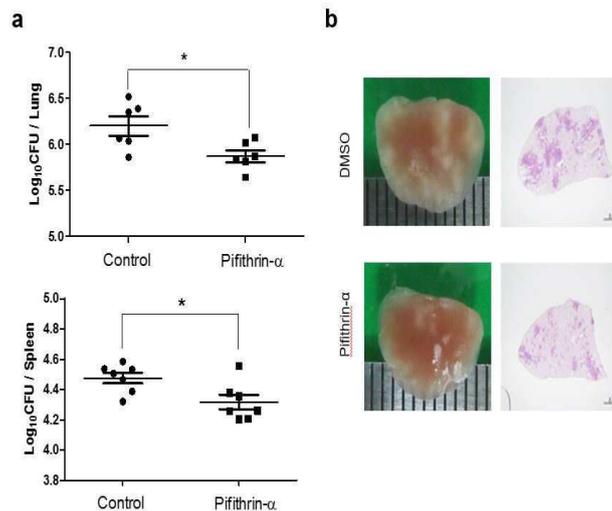
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 결핵 또는 비결핵 항산균 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식을 억제하고, 감염증을 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 p53 억제제(p53 inhibitor) 중에서도 특히 피피트린-알파(pifithrin-α)를 유효 성분으로 포함하는 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식을 억제용 또는 그 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

- A61K 31/496 (2013.01)
- A61K 31/4965 (2013.01)
- A61K 31/7036 (2013.01)
- Y10S 514/924 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A2A1A11053330
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공분야기초연구사업_중견연구자지원사업
 연구과제명 간염줄기세포를 이용한 결핵제어기법 개발과 기작규명
 기여율 1/2
 주관기관 연세대학교
 연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A1A2003795
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공분야기초연구사업_(구)일반연구자지원사업
 연구과제명 숙주 신호전달체계 조절을 통한 결핵균 감염에 대항하는 기작발굴과 검증
 기여율 1/2
 주관기관 연세대학교
 연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

피피트린-알파(pifithrin- α)를 유효 성분으로 포함하는, 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 결핵 또는 비결핵 항산균은 마이코박테리움 압세수스(Mycobacterium abscessus), BCG(Bacillus Calmette-Guerin) 및 결핵균(Mycobacterium tuberculosis)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 비결핵 항산균은 거친 형(rough type) 또는 매끄러운 형(smooth type)의 콜로니(colony)를 보이는 마이코박테리움 압세수스(Mycobacterium abscessus)인, 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식 억제용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 비결핵 항산균은 거친 형(rough type)의 콜로니를 보이는 마이코박테리움 압세수스(Mycobacterium abscessus)인, 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

피피트린-알파(pifithrin- α)를 유효 성분으로 포함하는, 결핵 또는 비결핵 항산균의 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로,

상기 결핵 또는 비결핵 항산균의 감염증은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 및 과중성 질환으로 이루어진 군에서 선택되는, 결핵 또는 비결핵 항산균의 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 결핵 또는 비결핵 항산균은 마이코박테리움 압세수스(Mycobacterium abscessus), BCG(Bacillus Calmette-Guerin) 및 결핵균(Mycobacterium tuberculosis)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 결핵 또는 비결핵 항산균의 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식을 억제하고, 감염증을 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이코박테리움 (Mycobacterium) 속(屬)에는 결핵, 우형결핵 (牛形結核), 나병 (癩病)과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균 종 (species)뿐 아니라, 기회 감염균으로 일컬어지는 균 종, 그리고 자연환경에서 볼 수 있는 사물 (死物) 기생의 균 종 (saprophytic species) 등 현재까지 약 72 종(species)이 알려져 있으며, 그 중 인체 질환과 관련된 것이 25종에 이르는 것으로 알려져 있다. 이러한 마이코박테리움 속은 일반적으로 사용되는 염색약으로는 용이하게 염색되지 않지만 일단 염색되면 알코올이나 염산 등으로 처리시에도 용이하게 탈색되지 않기 때문에 항산균이라고도 불린다.

[0003] 항산균 중 결핵은 우리나라를 포함하여 전세계 인구의 3분의 1 즉, 약 2억명 이상의 결핵균에 잠복 감염되어 있으며, 이들 가운데 5~10%는 평생 동안 활동성 결핵으로 이행될 수 있다. 결핵균은 호흡기를 통하여 감염된 후 사람의 면역상태에 따라 일정기간 동안의 잠복기를 거쳐 활동성 결핵 또는 장기간의 잠복 감염 과정을 거치게 된다.

[0004] 결핵을 제외한 비결핵 항산균 중 마이코박테리움 압세수스(Mycobacterium abscessus)는 우리나라에서 발병 빈도가 크게 증가하고 있으며, 대부분의 항생제에 대한 내성을 가지고 있어 감염질환에 있어 큰 문제로 지적되고 있다. 마이코박테리움 압세수스(M. abscessus)은 결핵균과 마찬가지로 세포 내 기생 세균이나 결핵균과는 다르게 토양, 물 등 자연계에 널리 존재하는 세균으로 항산균 중 유일하게 현재 사용 중인 모든 항결핵제에 내성을 보이고 있다. 과거에는 면역기능이 저하된 사람에게서 질병을 유발시키는 기회감염균으로 인식되었으나, 최근에는 면역기능의 정상 유무에 관계없이 인체에 심각한 질환을 일으키는 진정 병원균(true pathogen)으로 인정되었다. 그 특징으로, M. abscessus ATCC19977T의 게놈 크기는 약 5Mb이며 다른 마이코박테리아(mycobacteria)와는 다르게 특징적인 삽입 서열은 갖고 있지 않지만, 81kb에 달하는 전체 길이의 프로파지(full-length prophage)를 보유하고 있다. 마이코박테리움 압세수스는 고체배지에서 자라는 콜로니 모양에 따라 거친 형(rough type)과 매끄러운 형(smooth type)으로 나눌 수 있으며 일반적으로 거친 형의 균주가 병원성이 높다.

[0005] 이러한 결핵 및 비결핵 항산균 치료는 기본적으로 1차 치료제인 이소니아지드, 리팜피신, 피라진아마이드 및 에탐부톨이 사용된다. 2차 약제로는 아미카신, 카나마이신 및 목시플로사신 등이 사용된다. 이러한 항결핵제들은 개발된 지 수십년이 지났으며 이에 대한 내성균주가 큰 문제로 대두 되고 있다. 약제 내성 결핵은 다제내성 결핵균주(MDR-TB)로 이소니아지드와 리팜피신에 대한 내성을 가진 경우며, 2차 약제까지 내성을 가진 경우 광범위 약제내성(XDR-TB) 균주라 불리운다.

[0006] 마이코박테리움 압세수스의 경우 대부분의 항결핵제 및 항생제에 내성을 갖는 것으로 알려져 있으며, 표준 치료 기간이 2년으로 매우 오랜 기간 동안 치료함에도 불구하고 완치율이 낮다. 따라서, 이러한 결핵 및 비결핵 항산균 감염증 치료를 위해서는 균 자체의 성장을 억제하는 새로운 항생제의 개발이 일차적인 목표지만, 최근에는 감염 숙주의 신호 전달 기전 및 면역 조절 등을 조절하여 균의 성장을 억제하고자 하는 숙주 유래 치료 기법(host-directed therapy)의 연구가 활발히 진행되고 있다.

(특허문헌 1) KR10-2016-0139074 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식을 억제하여 그 감염증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 발명자들은 큰포식세포 감염 모델 및 마우스 감염 모델을 통하여 p53 의존적 전사 조절 활성화 및 세포 사멸 블로커(blocker)로 알려진 피피트린-알파(pifithrin- α)의 항-항산균 억제 능력을 최초로 확인하여 본 발명에 이르게 되었다.
- [0009] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, p53 억제제 중에서도 특히 피피트린-알파(pifithrin- α)를 유효 성분으로 포함하는 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, p53 억제제 중에서도 특히 피피트린-알파(pifithrin- α)를 유효 성분으로 포함하는 결핵 또는 비결핵 항산균의 감염증의 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0011] 본 발명에서 상기 피피트린-알파를 이용하면 숙주 유래 치료(host-directed therapy) 방법으로 결핵 또는 비결핵 항산균의 증식을 억제하고 더 나아가 상기 균의 감염증을 치료할 수 있다.
- [0012] 더욱 구체적으로는 본 발명의 피피트린-알파는 마이코박테리움 압세수스(Mycobacterium abscessus), BCG(Bacillus Calmette-Guerin) 및 결핵균(표준 균주, 한국형균주, 다제내성균)에 대한 항-항산균능을 가질 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명에서 상기 피피트린-알파는 매끄러운 형(smooth type)의 콜로니를 보이는 마이코박테리움 압세수스(Mycobacterium abscessus)뿐만 아니라, 거친 형(rough type)의 콜로니를 보이거나 그렇게 보이도록 변형된 마이코박테리움 압세수스(Mycobacterium abscessus) 모두에 있어서 증식 억제 및 감염증 치료 효과를 보이지만, 보다 바람직하게는 특히 거친 형의 콜로니를 보이는 마이코박테리움 압세수스에 대한 증식 억제 효과가 뛰어나다.
- [0014] 또한, 본 발명에서 상기 결핵 또는 비결핵 항산균 감염증은 상기 결핵균 또는 비결핵 항산균의 감염에 의해 나타나는 모든 임상적 증상을 포함하는 것으로, 상기 감염증은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 및 파종성 질환 등을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 감염증의 증상을 차단하거나, 감염증 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 감염증의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 일반적으로 사용되는 결핵 및 비결핵 항산균의 감염증 치료제를 추가로 더 포함할 수 있다. 이의 예로는 이소니아지드, 리팜피신, 피라진아마이드, 에탐부톨, 아미카신, 카나마이신 및 목시플로사신으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 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 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0020] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내,

골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[0022] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/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 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명은 결핵 및 비결핵 항산균의 증식을 억제하고, 더 나아가 그 감염증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1(a)는 큰포식세포에 대한 피피트린-알파의 세포독성을 확인한 그래프를 나타낸 것이다.

도 1(b) 및 도 1(c)는 각각 큰포식세포에 마이코박테리움 압세수스 거친 형(rough type)과 매끄러운 형(smooth type)을 감염시킨 후 피피트린-알파를 5 uM의 양으로 처리하고 3일 뒤 균수를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 2(a) 및 도 2(b)는 각각 큰포식세포에 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis)의 BCG(Bacillus Calmette-Guerin)와 결핵균 표준 균주인 H37Rv 균주를 각각 감염시킨 뒤 피피트린-알파를 5 uM의 양으로 처리하고 3일 후 균수를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 3(a) 및 도 3(b)는 각각 큰포식세포에 한국형 결핵 균주인 Mtbk와 MDR-tb균주를 각각 감염시킨 뒤 피피트린-알파를 5 uM의 양으로 처리하고 3일 후 균수를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 한국형 고병원성 균주인 Mtbk의 마우스 감염 및 피피트린-알파를 이용한 동물 치료 실험에 대한 전체 실험 방법을 나타낸 설계도이다.

도 5(a)는 마우스에 한국형 고병원성 균주인 Mtbk를 감염시킨 후 피피트린-알파를 주사한 뒤 감염 4주 때 폐와 비장에서의 균수를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 5(b)는 마우스에 한국형 고병원성 균주인 Mtbk를 감염시킨 후 피피트린-알파를 주사한 뒤 감염 4주 때 폐의 병변을 확인한 사진을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 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.

[0028] **실시예**

[0030] 1.1 큰포식세포의 분리 및 유도

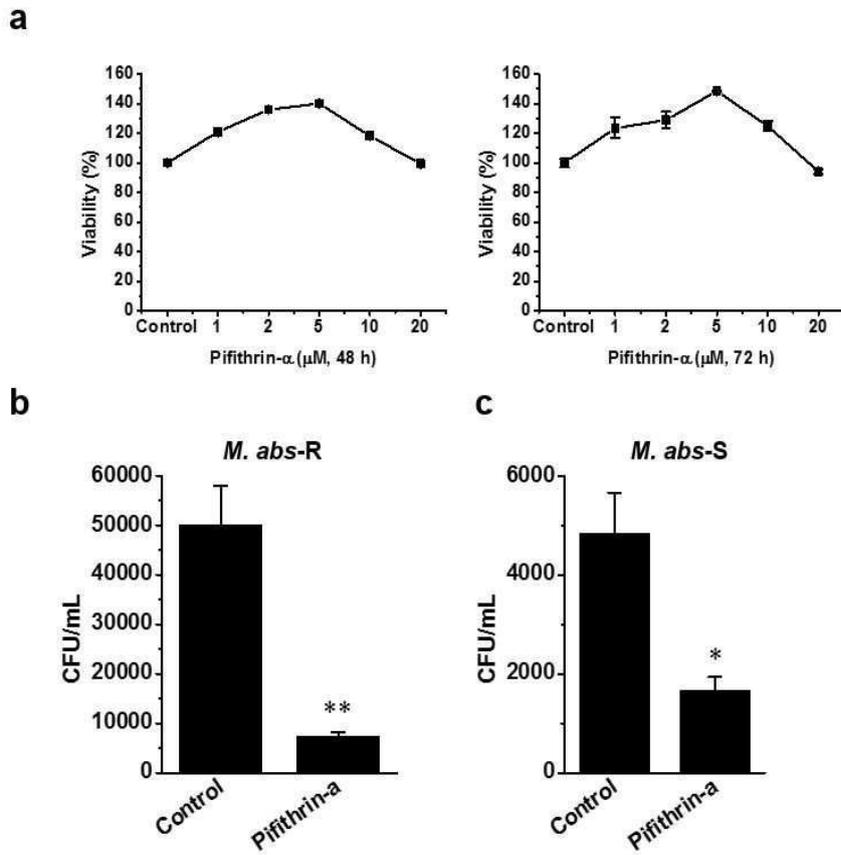
[0031] C57BL/6마우스로부터 골수 채취용 주사를 이용해 대퇴부 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 세척한 후 적혈구를 염화암모늄을 이용하여 제거하였다. 분리한 세포를 100 mm 플레이트에서 DMEM (10% FBS (Fetal bovine serum, 송아지 혈청), 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신, 10 ng/ml M-CSF)을 첨가하여 6일 동안 배양하였다.

[0033] 1.2 마이코박테리아 배양

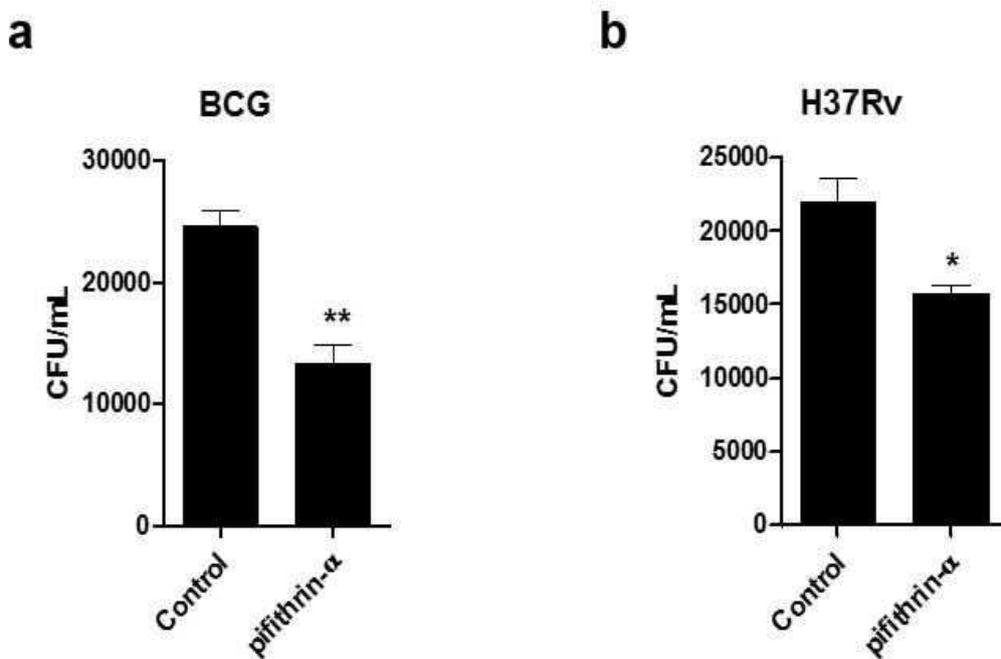
- [0034] 마이코박테리움 압세수스, 표준 결핵 균주 (*M. abscessus* ATCC19977T)는 미국 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)로부터 분양 받은 후, 7H9 브로스(Difco Laboratories, Detroit, MI) 배지에 10%(vol/vol) 올레산-알부민-텍스트로스-카탈라제 (OADC, Becton Dickinson, Spark, MD)에 37°C를 유지하며 7 일 동안 배양하였다. 이때, 마이코박테리움 압세수스는 매끄러운 형태의 콜로니를 보인다. 이 균을 거친 형태로 바꿔 주기 위해, C57BL/6J 마우스에 감염시킨 후, 마크로라이드계의 항생제를 처리하였다. 그 다음 마우스 폐로부터 거친 형태로 변형(*switching*)된 형태의 마이코박테리움 압세수스를 획득하여 VNTR 기법을 통해 \circ 유전자형 (*genotype*)의 변화를 확인하였다. 이를 OADC를 포함한 7H9 브로스에 배양한 후 10,000 xg로 20 분 원심분리하고 PBS로 3차례 세척하였다. 원심한 펠렛을 균질기로 1분 동안 간 후 8 μ m 포어 사이즈 필터에 통과시켜 단일 세포(*single cell*)을 만들었다. 이를 -80°C에 저장한 후 감염 직 후에 녹여서 사용하였다.
- [0035] 한편, *M. bovis* BCG, H37Rv, MtbK 및 MDR-tb 균주는 미국 ATCC 및 한국 국제 결핵 연구소로부터 분양받은 후 7H9-OADC 브로스에서 15일간 배양하였다. 그 다음 배양된 균주들을 수집한 후, 6mm 글래스 비드로 드립게 불텍싱하면서 파쇄하였다. 세포 응집물이 가라앉은 다음, 상청액을 수거하고 각각 나누어 -70°C에 보관하였다. 이를 해동한 후, 살아있는 결핵균을 Middlebrook 7H11 아가(Difco, Detroit, MI, USA)에서 단계적 희석 평판 배양하고 카운팅하였다. 마우스에게 결핵균을 접종하기 위해, 상기 결핵균 현탁액을 음파조(*sonic bath*)에서 가볍게 음파처리하고, pH7.2의 PBS(*phosphate buffered saline*)로 희석시켜 원하는 수의 균을 수득하였다.
- [0037] 1.3. 항산균 동물감염 모델
- [0038] 실험 동물로 생후 5 내지 6주된 특이적 병원체가 없는 C57BL/6(Japan SLC, Inc, Shizuoka)를 연세대학교 의학 연구센터 내의 BL-3 바이오해저드 애니멀 룸의 제한 공간에서 사육하였다. 마우스에게는 멸균된 판매용 마우스 먹이와 물을 임의적으로 제공하였다. 동물 결핵 감염은 MtbK 균주를 Glas-Col inhalation device (Terre Haute, IN)를 이용하여 마우스당 200 내지 250개의 결핵균이 들어가도록 흡입시켜 감염시켰다.
- [0040] 2. 큰포식세포에서 마이코박테리움 압세수스 감염 후 피피트린-알파(*pifithrin- α*) 처리에 따른 균수 변화 측정
- [0041] 마이코박테리움 압세수스에 대한 피피트린-알파의 항균능력을 확인하기 위하여, 먼저 큰포식세포의 생존에 영향이 없는 농도를 결정하였다. 이때, 세포 생존능 어췌이(*viability assay*)는 CCK-8을 이용하였다. 피피트린-알파를 20 μ M까지 처리한 경우에도 48시간까지 아무런 독성이 없었다. 하지만, 20 μ M 피피트린-알파를 72시간 처리한 경우 약간 세포 독성이 있었다(도 1(a)). 이에, 본 특허에서는 5 μ M의 피피트린-알파를 적합 농도로 정하였고 이후 실험을 진행하였다. 마이코박테리움 압세수스 거친 형과 매끄러운 형을 각각 큰포식세포에 MOI(*multiplicity of infection*)=0.5 로 감염시켰다. 그 다음, 피피트린-알파를 5 μ M 처리 후 72 시간 동안 방치하였다. 그 결과, 피피트린-알파는 큰포식세포 내 마이코박테리움 압세수스 거친 형과 매끄러운 형의 성장률을 크게 억제시켰다(도 1(b) 및 도 1(c)).
- [0043] 3. 큰포식세포에서 결핵균 감염 후 피피트린-알파 처리에 따른 균수 변화 측정
- [0044] 결핵균 감염에 대한 피피트린-알파의 항균능력을 확인하기 위해 *M. bovis* BCG와 H37Rv 표준 균주를 이용하였다. 즉, *M. bovis* BCG와 H37Rv를 각각 큰포식세포에 MOI(*multiplicity of infection*)=0.5 로 감염시켰다. 그 다음, 피피트린-알파를 5 μ M의 양으로 처리한 후 72 시간 동안 방치하였다. 그 결과, 피피트린-알파는 큰포식세포 내 *M. bovis* BCG와 H37Rv의 성장률을 크게 억제시켰다(도 2(a) 및 도 2(b)).
- [0045] 마찬가지로, 피피트린-알파는 한국형 고병원성 MtbK와 이소니아지드, 리팜피신에 내성을 가진 MDR 균주에서도 효능을 보였다(도 3(a) 및 도 3(b)).
- [0047] 4. 마우스 결핵 감염 모델을 이용한 in vivo에서 피피트린-알파의 항결핵능 확인
- [0048] 마우스 결핵 감염 모델에서도 피피트린-알파의 항결핵능이 있는지 확인하기 위해 C57BL/6 마우스에 한국형고병원성 MtbK 균주를 마우스 당 300 개씩 감염시켰다. 이때, 결핵균 감염은 공기중 감염법을 사용하였다. 결핵균을 감염시킨 후 피피트린-알파를 2.2mg/kg로 주당 2회 3주간 마우스 꼬리 정맥에 주사하였다(도 4). 감염 후 4주에 마우스의 폐와 비장에서 균수를 측정하였다. 그 결과, 폐와 비장에서 피피트린- α 를 주입한 실험군에서 모두 결핵균이 감소됨을 확인하였다. 뿐만 아니라 폐의 조직병리학적, 육안적 염증 정도도 크게 감소함을 확인할 수 있었다(도 5(a) 및 도 5(b)).

도면

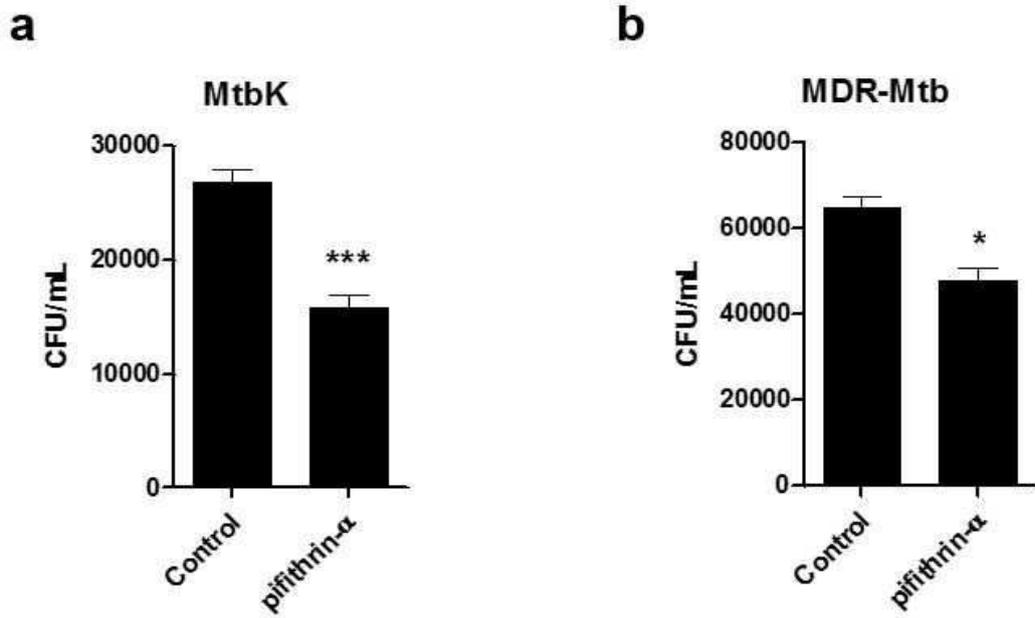
도면1



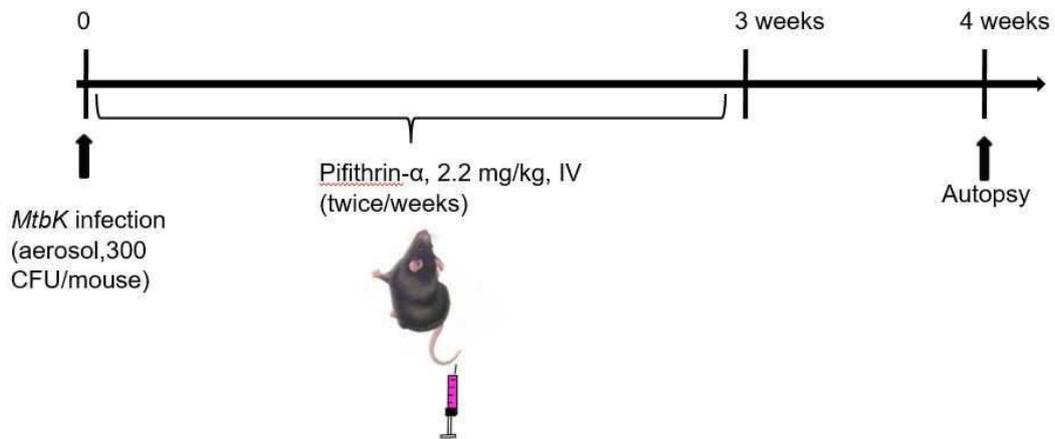
도면2



도면3



도면4



도면5

