



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월28일
(11) 등록번호 10-2171321
(24) 등록일자 2020년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/381 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61P 31/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/381 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0139927
(22) 출원일자 2018년11월14일
심사청구일자 2018년11월14일
(65) 공개번호 10-2019-0093111
(43) 공개일자 2019년08월08일
(30) 우선권주장
1020180012353 2018년01월31일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
W02011103189 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
최상호
서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 농업생명
과학대학 200동 8108호
정낙신
서울특별시 강남구 언주로 332, 107동 402호 (역
삼동, 역삼푸르지오 아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

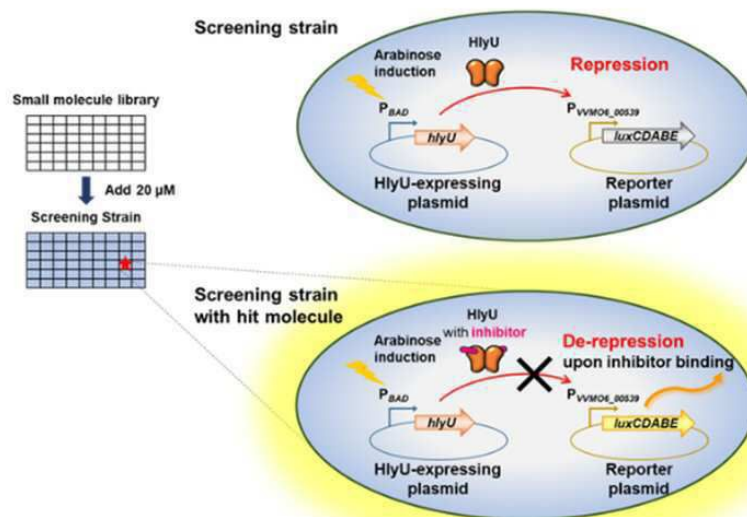
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오균 감염증 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오균 감염 치료 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서 발굴한 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로판-2-아미드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체로 하기 화학식 12의 구조를 갖는 화합물, (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



하기 화학식 13의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 14의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 15의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 16의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 17의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 21의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 22의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 23의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 24의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 25의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 26의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 27의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 28의 구조를 갖는 화합물 및 하기 화학식 29의 구조를 갖는 화합물은, 비브리오팀을 직접 사멸시키는 것이 아닌, RTX 독소 생성을 저해하여 비브리오팀이 병원성을 띠지 못하게 함으로써 비브리오팀 감염증을 억제 (예방 또는 치료)할 수 있다. 따라서, 본 발명은, 균 자체의 사멸을 타겟으로 하여 내성 유발의 문제를 본질적으로 안고 있는 항생제의 대체 방안이 될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 31/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

(72) 발명자

한호재

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 수의과대학 85동 912호

하남철

서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 교수아파트 122i동 304호

김병식

경기도 용인시 처인구 양지면 남평로231번길 75-11, 오크빌 3호

장경구

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 농업생명과학대학 200동 8111호

이지원

서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교 농업생명과학대학 200동 8111호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0635-20180005
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농림축산식품연구센터지원사업
연구과제명	독성인자 발현제어 선도물질 유래 신개념 식품안전소재 도출
기여율	50/100
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2017.09.01 ~ 2020.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0635-20180003
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	전략과제
연구과제명	독성미생물의 숙주환경 인지 신호전달체계의 동정, 특성규명 및 제어기술 연구
기여율	50/100
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2017.11.01 ~ 2022.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

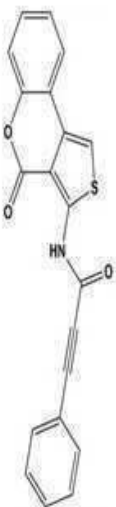
청구항 5

하기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로프-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide)를 포함하며,

상기 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로프-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide)는, 비브리오균의 RTX 독소 (MARTX toxin) 유전자인 *rtxA*, 용혈단백질 (hemolysin) 유전자인 *vvhA*, 포스포리파아제 (phospholipase) 유전자인 *plpA*의 발현을 활성화시키는 전사조절자 (transcriptional regulator) 단백질 HlyU와 공유결합함으로써, HlyU의 작용을 저해하여 비브리오균의 RTX 독소 생성을 저해하는 한편, 비브리오균의 생장은 저해하지 않고,

상기 비브리오균은, 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 볼니피쿠스 (*Vibrio vulnificus*) 및 비브리오 알기놀리티쿠스 (*Vibrio alginolyticus*) 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 11]



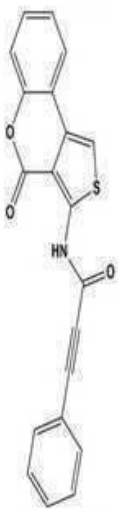
청구항 6

하기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide)를 포함하며,

상기 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide)는, 비브리오균의 RTX 독소 (MARTX toxin) 유전자인 *rtxA*, 용혈단백질 (hemolysin) 유전자인 *vhA*, 포스포리파아제 (phospholipase) 유전자인 *plpA*의 발현을 활성화시키는 전사조절자 (transcriptional regulator) 단백질 HlyU와 공유결합함으로써, HlyU의 작용을 저해하여 비브리오균의 RTX 독소 생성을 저해하는 한편, 비브리오균의 생장은 저해하지 않고,

상기 비브리오균은, 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라해몰리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피쿠스 (*Vibrio vulnificus*) 및 비브리오 알기놀리티쿠스 (*Vibrio alginolyticus*) 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 비브리오균 감염 개선용 식품 조성물.

[화학식 11]



청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 RTX 독소 생성 저해제 및 이를 이용한 비브리오균 감염 치료 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비브리오 (*Vibrio*)는 지금까지 34종이 알려져 있는데, 세포가 길진 않지만 휘어져 있고, 단립하거나 몇 개가 연결되어 나선상이 되는 특징이 있다. 몸의 한쪽 끝에는 1개 또는 여러 개의 편모가 나있고, 이것으로 활발히 수영하여 움직인다. 비브리오는 그람 음성균으로써 야생종은 바다에 널리 분포하며, 담수와 토양에서도 많이 발견된다.

[0004] 비브리오 중에는 사람이나 어패류에서 병원성을 나타내는 것이 있는데, 병원성이 있는 대표 종으로는 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라해몰리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피쿠스

(*Vibrio vulnificus*), 비브리오 알기놀리티쿠스 (*Vibrio alginolyticus*)가 있다.

- [0005] 비브리오 콜레라 (*V. cholerae*)는 전염성 설사로 잘 알려진 '콜레라'를 일으키는 세균이다. 콜레라는 감염되면 쌀뜨물 같은 설사가 설 새 없이 발생하기 때문에 적절한 수액보충을 하지 못하면 탈수로 인한 사망에 이르는 것으로 알려졌다. 국내에서도 제1군 법정 전염병으로 분류할 정도로 높은 전염성을 가진 세균이다.
- [0006] 비브리오 파라해몰리티쿠스 (*V. parahaemolyticus*)는 바닷물에 주로 살기 때문에 해산물을 날 것이나 덜 익힌 상태로 복용하게 되면 감염되는데, 장염을 유발하기 때문에 장염비브리오라고도 불린다.
- [0007] 비브리오 불니피쿠스 (*V. vulnificus*)는 바닷물에 주로 서식하며, 여름철에 대량 증식한다. 각종 만성 질병으로 면역이 저하된 환자들이 덜 익히거나 날 것의 해산물을 섭취하게 되면, 팔이나 다리의 심한 감염과 함께 고열, 혈압 저하 등의 심각한 패혈증을 일으킨다.
- [0008] 비브리오 알기놀리티쿠스 (*V. alginolyticus*)는 복어와 같은 해양생물의 몸에 존재하여 복강 내 독소인 테트로도톡신(tetrodotoxin)을 생산하며, 주로 이엽과 상처 감염을 일으킨다.
- [0009] 한편, 병원성 미생물은 숙주(host)에 독성을 나타내는 여러 독성 인자(virulence factor)의 생성을 통해 숙주 내에서 생존하고 증식하며, 발병 과정 동안 다양한 독성 인자들이 총체적으로 발현되고 작용할 수 있도록 하는 조절 기전을 발달시켜 왔다. 이러한 독성 인자들의 조절 기전은 매우 정교하며, 조절 기전을 저해함으로써 독성 인자의 생성을 억제할 수 있다. 이를 통해 병원성 미생물의 독성을 약화시킬 수 있고, 숙주의 면역 반응에 의해 미생물의 독성을 쉽게 저해할 수 있게 된다.
- [0010] 독성 인자의 생성 기전 저해는 미생물의 생장을 인위적으로 저해하지 않기 때문에 항생제 내성을 유발할 가능성이 매우 낮아, 새로운 병원성 미생물 치료 전략 중 하나로 각광받고 있다. 하지만, 현재까지는 특정 미생물에 한정된 연구만이 활발히 진행되고 있으며, 그 외의 병원성 미생물에 관한 독성 인자 생성 조절 기전의 저해에 관한 연구는 미진한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 제10-0515767호(2005.09.12)에는, 패혈증 비브리오균의 생체 내 독력발현 조절인자 HlyU가 기재되어 있다.
- (특허문헌 0002) 대한민국등록특허 제10-1613347호(2016.04.11)에는, 비브리오 패혈증균 알티엑스에이-1 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체 및 이의 용도가 기재되어 있다.

발명의 내용

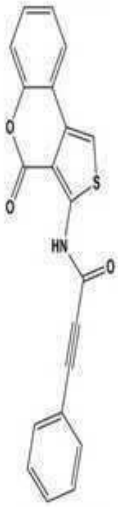
해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 비브리오균 자체를 직접 사멸시키는 것이 아닌, RTX 독소 생성을 저해함으로써 비브리오균이 병원성을 띠지 못하게 하여, 비브리오균이 일으키는 감염 또는 질병을 치료하기 위한 물질을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

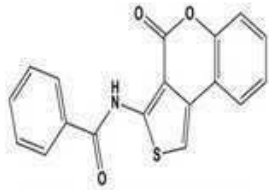
- [0015] 본 발명은 하기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로프-2-이나마이드(N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체를 포함하되, 상기 유도체는 하기 화학식 12의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 13의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 14의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 15의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 16의 구조를 갖는 화합물 및 하기 화학식 17의 구조를 갖는 화합물 중 선택되는 어느 하나를 포함하는 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] [화학식 11]



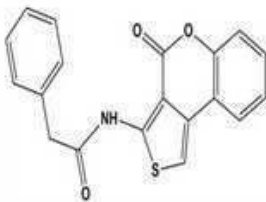
[0017]

[0018] [화학식 12]



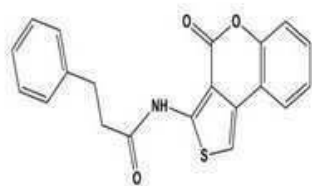
[0019]

[0020] [화학식 13]



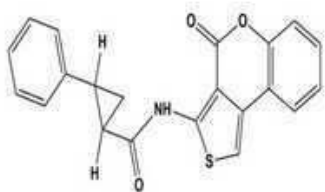
[0021]

[0022] [화학식 14]



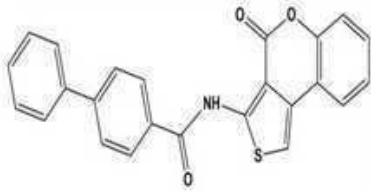
[0023]

[0024] [화학식 15]



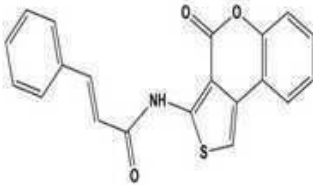
[0025]

[0026] [화학식 16]



[0027]

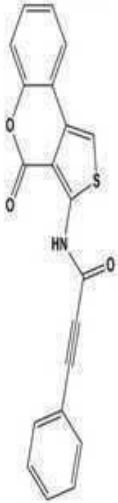
[0028] [화학식 17]



[0029]

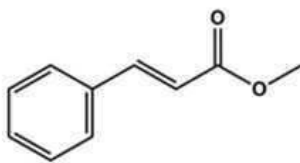
[0030] 또한, 본 발명은 하기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체를 포함하되, 상기 유도체는 하기 화학식 21의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 22의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 23의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 24의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 25의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 26의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 27의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 28의 구조를 갖는 화합물 및 하기 화학식 29의 구조를 갖는 화합물 중 선택되는 어느 하나를 포함하는 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0031] [화학식 11]



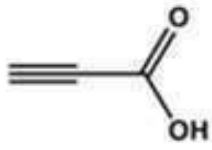
[0032]

[0033] [화학식 21]



[0034]

[0035] [화학식 22]



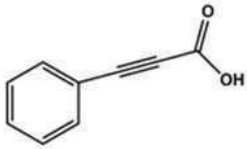
[0036]

[0037] [화학식 23]



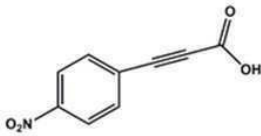
[0038]

[0039] [화학식 24]



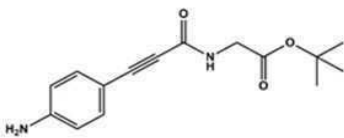
[0040]

[0041] [화학식 25]



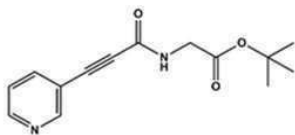
[0042]

[0043] [화학식 26]



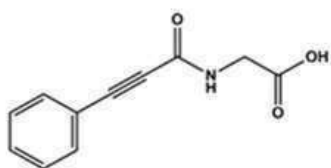
[0044]

[0045] [화학식 27]



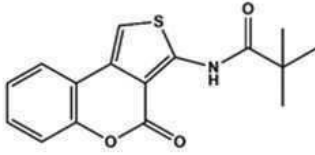
[0046]

[0047] [화학식 28]



[0048]

[0049] [화학식 29]



[0050]

[0052] 본 발명의 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어, 상기 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체는, 바람직하게 비브리오균의 RTX 독소 (MARTX toxin) 유전자인 *rtxA*, 용혈단백질 (hemolysin) 유전자인 *vvhA*, 포스포리파아제 (phospholipase) 유전자인 *plpA*의 발현을 활성화시키는 전사조절자(transcriptional regulator) 단백질 HlyU와 공유결합함으로써, HlyU의 작용을 저해하는 것이 좋다.

[0053] 본 발명의 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어, 상기 비브리오균은, 일 예로 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피쿠스 (*Vibrio vulnificus*) 및 비브리오 알기놀리티쿠스 (*Vibrio alginolyticus*) 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0054] 한편, 본 발명은 상기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체를 포함하되, 상기 유도체는 상기 화학식 12의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 13의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 14의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 15의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 16의 구조를 갖는 화합물 및 상기 화학식 17의 구조를 갖는 화합물 중 선택되는 어느 하나를 포함하는 비브리오균 감염 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0055] 또한, 본 발명은 상기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체를 포함하되, 상기 유도체는 상기 화학식 21의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 22의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 23의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 24의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 25의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 26의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 27의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 28의 구조를 갖는 화합물 및 상기 화학식 29의 구조를 갖는 화합물 중 선택되는 어느 하나를 포함하는 비브리오균 감염 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0056] 본 발명의 비브리오균 감염 개선용 식품 조성물에 있어, 상기 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체는, 바람직하게 비브리오균의 RTX 독소 (MARTX toxin) 유전자인 *rtxA*, 용혈단백질 (hemolysin) 유전자인 *vvhA*, 포스포리파아제 (phospholipase) 유전자인 *plpA*의 발현을 활성화시키는 전사조절자(transcriptional regulator) 단백질 HlyU와 공유결합함으로써, HlyU의 작용을 저해하는 것이 좋다.

[0057] 본 발명의 비브리오균 감염 개선용 식품 조성물에 있어, 상기 비브리오균은, 일 예로 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피쿠스 (*Vibrio vulnificus*) 및 비브리오 알기놀리티쿠스 (*Vibrio alginolyticus*) 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

[0059] 본 발명에서 발굴한 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체로 하기 화학식 12의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 13의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 14의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 15의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 16의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 17의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 21의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 22의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 23의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 24의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 25의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 26의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 27의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 28의 구조를 갖는 화합물 및 하기 화학식 29의 구조를 갖는 화합물은, 비브리오균을 직접 사멸시키는 것이 아닌, RTX 독소 생성을 저해하여 비브리오균이 병원성을 띠지 못하게 함으로써 비브리오 감염증을 억제 (예방 또는 치료)할 수 있다. 따라서, 본 발명은, 균 자체의 사멸을 타겟으로 하여 내성 유발의 문제를 본질적으로 안고 있는 항생제의 대체 방안이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0061]

본 발명의 도면에 표시된 *hlyU* (strain)는 *hlyU* 유전자가 knock-out된 돌연변이 균주를 나타낸다. 또한, 도면에 표시된 CM2660은 본 발명의 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로프-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide)로서, 화학식 11의 구조식을 갖는다.

도 1은 HlyU의 선택적 저해제를 스크리닝하는데 사용된 전략을 나타낸 모식도이다.

도 2는 대장균 스크리닝 균주를 이용하여 1025E12 (하기에서 'CM2660'로 명명함), 1030B04, 1040E12, 855B03, 855D03, 855F03 및 855G03의 HlyU 저해활성을 검증한 결과이다.

도 3은 HlyU에 의해 *lux*의 발현이 억제(repression)되는 *lux* 리포터 플라스미드 (pZW1608)가 삽입된 야생형 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)과, HlyU에 의해 *lux*의 발현이 억제(repression)되는 *lux* 리포터 플라스미드 (pZW1608)가 삽입된 *hlyU* 돌연변이 패혈증 비브리오균을 이용하여 1025E12 (하기에서 'CM2660'로 명명함), 1030B04, 1040E12, 855B03, 855D03, 855F03 및 855G03의 HlyU 저해활성을 검증한 결과이다.

도 4는 HlyU에 의해 *lux*의 발현이 활성화되는 *lux* 리포터 플라스미드 (pKK1305)가 삽입된 야생형 패혈증 비브리오균과, HlyU에 의해 *lux*의 발현이 활성화되는 *lux* 리포터 플라스미드 (pKK1305)가 삽입된 *hlyU* 돌연변이 패혈증 비브리오균을 이용하여 1025E12 (하기에서 'CM2660'로 명명함), 1030B04, 1040E12, 855B03, 855D03, 855F03 및 855G03의 HlyU 저해활성을 검증한 결과이다.

도 5는 화합물 I 군의 화학 구조를 나타낸 것이다.

도 6은 화합물 I 군의 HlyU 활성 억제능을 확인한 결과이다.

도 7은 화합물 II 군의 화학 구조를 나타낸 것이다.

도 8은 화합물 II 군의 HlyU 활성 억제능을 확인한 결과이다.

도 9는 세포 내에서 CM2660 처리에 따른 패혈증 비브리오균의 세포 내 HlyU 단백질량을 확인한 결과이다.

도 10은 패혈증 비브리오균에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 0.5$ 에서의 *rtxA* mRNA의 수준을 확인한 결과이다.

도 11은 패혈증 비브리오균에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 0.5$ 에서의 *vvhA* mRNA의 수준을 확인한 결과이다.

도 12는 패혈증 비브리오균에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 1.0$ 에서의 *pIpA* mRNA의 수준을 확인한 결과이다.

도 13은 패혈증 비브리오균에 CM2660을 농도별로 처리하여 세포 독성 발생 여부를 확인한 결과이다.

도 14는 패혈증 비브리오균에 CM2660을 농도별로 처리하여 적혈구에 대한 용혈 활성을 확인한 결과이다.

도 15는 DMSO, CM2660 및 대조군 화합물 (실시에 1에서 스크리닝했던 8,400여 개의 화합물 중에서 HlyU 저해 활성을 나타내지 않았던 화합물 중 무작위로 선발된 화합물)을 처리한 경우, HlyU의 DNA 결합능력을 확인한 결과이다.

도 16은 CM2660을 농도별로 처리한 경우, HlyU의 DNA 결합능력을 확인한 결과이다.

도 17은 CM2660을 처리한 HlyU (녹색)와 처리하지 않은 자연 상태의 (native) HlyU (magenta, PDB code: 3JTH)의 구조를 비교한 결과이다.

도 18은 CM2660이 처리된 HlyU 구조체의 Cys30 과 Cys96 주변의 전자 밀도 지도를 나타낸 것이다 (1.0 σ로 윤곽이 잡힌 2FoFc 맵은 파란색 메쉬로 표시되고, 3.0 σ로 윤곽이 잡힌 2FoFc 맵은 옥색 메쉬로 표시된다).

도 19는 CM2660을 처리한 HlyU 단백질 샘플을 질량분석법에 의하여 분석한 결과이다.

도 20은 CM2660이 패혈증 비브리오균의 생장에 미치는 영향을 조사한 결과이다.

도 21은 CM2660의 인간상피세포인 INT-407 세포에서의 독성을 조사한 결과이다.

도 22는 마우스에 CM2660을 주사한 후, 패혈증 비브리오균에 의한 생체 내 독성 발현 여부를 관찰한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 23은 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 0.5$ 에서의 *exsA*의 mRNA 수준을 확인한 결과이다.

도 24는 장염 비브리오균에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 0.5$ 에서의 *vp1668*, *vopQ*, *vopS*, *vopR*의 mRNA 수준을 확인한 결과이다.

도 25는 장염 비브리오균에 CM2660을 농도별로 처리하여 세포 독성 발생 여부를 확인한 결과이다.

도 26은 비브리오 알기놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*)에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 0.5$ 에서의 *exsA*, *val1668*, *vopQ*, *vopS*, *vopR*의 mRNA 수준을 확인한 결과이다.

도 27은 비브리오 알기놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*)에 CM2660을 농도별로 처리하여 세포 독성 발생 여부를 확인한 결과이다.

도 28은 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 0.5$ 에서의 *hlyA*, *t1h*의 mRNA 수준을 확인한 결과이다.

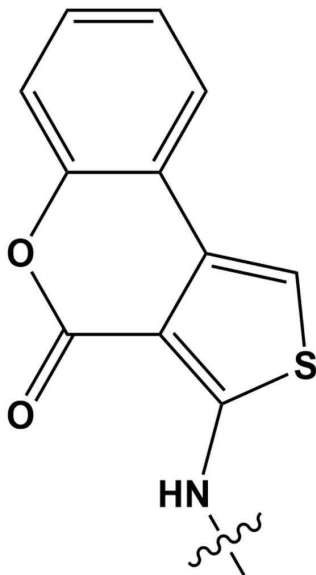
도 29는 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)에 CM2660 20 μM 처리시, 용혈 활성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 본 발명은 하기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로프-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체를 포함하되, 상기 유도체는 하기 화학식 12의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 13의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 14의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 15의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 16의 구조를 갖는 화합물 및 하기 화학식 17의 구조를 갖는 화합물 중 선택되는 어느 하나를 포함하는 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

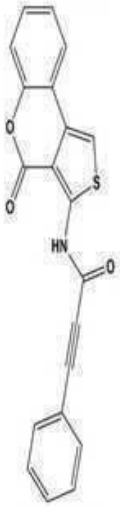
[0063] 본 발명의 화학식 11의 구조를 갖는 화합물 내지 화학식 17의 구조를 갖는 화합물은 하기 화학식 10의 구조를 공통으로 포함하고 있어, 하기에서는 '화합물 I 군'이라 지칭하기로 한다.

[0064] [화학식 10]



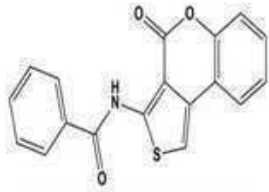
[0065]

[0066] [화학식 11]



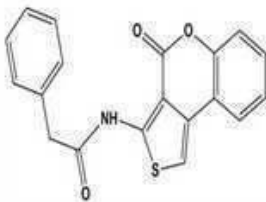
[0067]

[0068] [화학식 12]



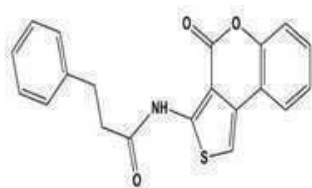
[0069]

[0070] [화학식 13]



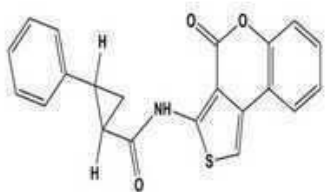
[0071]

[0072] [화학식 14]



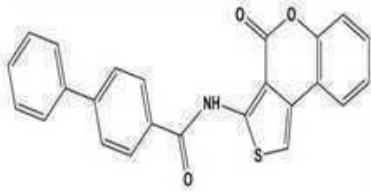
[0073]

[0074] [화학식 15]



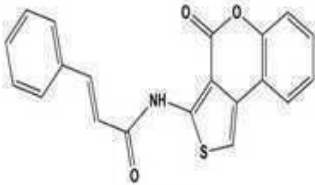
[0075]

[0076] [화학식 16]



[0077]

[0078] [화학식 17]

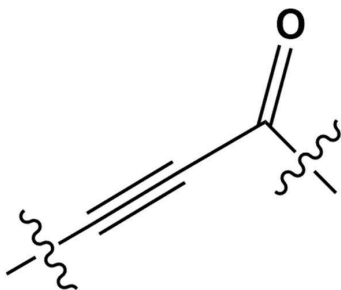


[0079]

[0080] 또한, 본 발명은 하기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체를 포함하되, 상기 유도체는 하기 화학식 21의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 22의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 23의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 24의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 25의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 26의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 27의 구조를 갖는 화합물, 하기 화학식 28의 구조를 갖는 화합물 및 하기 화학식 29의 구조를 갖는 화합물 중 선택되는 어느 하나를 포함하는 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

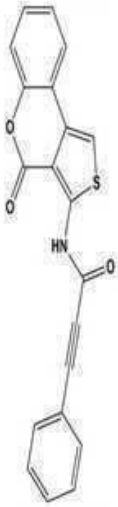
[0081] 본 발명의 화학식 11의 구조를 갖는 화합물, 화학식 21의 구조를 갖는 화합물 내지 화학식 29의 구조를 갖는 화합물은 하기 화학식 20의 구조를 공통으로 포함하고 있어, 하기에서는 '화합물 II군'이라 지칭하기로 한다.

[0082] [화학식 20]



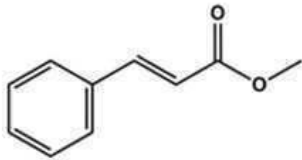
[0083]

[0084] [화학식 11]



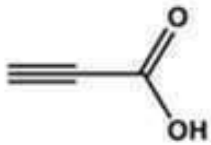
[0085]

[0086] [화학식 21]



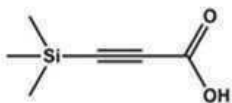
[0087]

[0088] [화학식 22]



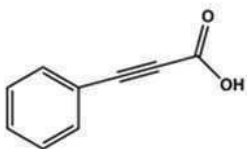
[0089]

[0090] [화학식 23]



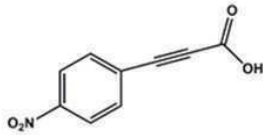
[0091]

[0092] [화학식 24]



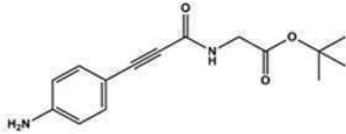
[0093]

[0094] [화학식 25]



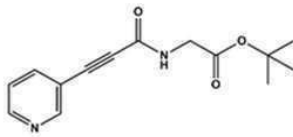
[0095]

[0096] [화학식 26]



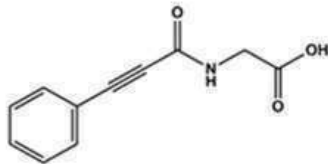
[0097]

[0098] [화학식 27]



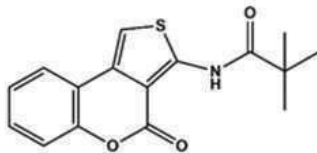
[0099]

[0100] [화학식 28]



[0101]

[0102] [화학식 29]



[0103]

[0104] 상기 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체는, 바람직하게 비브리오균의 RTX 독소 (MARTX toxin) 유전자인 *rtxA*, 용혈단백질 (hemolysin) VvhA 유전자인 *vvhA*, 포스포리파아제 (phospholipase) PlpA 유전자인 *plpA*의 발현을 활성화시키는 전사조절자(transcriptional regulator) 단백질 HlyU와 공유결합함으로써, HlyU 단백질의 작용을 저해하는 것이 좋고, 상기 비브리오균은, 일 예로 비브리오 콜레라 (*Vibrio cholerae*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피쿠스 (*Vibrio vulnificus*) 및 비브리오 알기놀리티쿠스 (*Vibrio alginolyticus*) 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0105] 패혈증 비브리오균 (*V. vulnificus*)은 캡슐다당 (capsular polysaccharide), 리포다당 (lipopolysaccharide), RTX 독소 (RTX toxin, RtxA), 용혈단백질 (hemolysin, VvhA), 포스포리파아제 A₂ (phospholipase A₂, PlpA), 부착 단백질 (adhesin protein) 등과 같은 다양한 독성 인자를 생성하여 질병을 유발하는 것으로 알려졌다. 이들 중, 주요한 독성 인자인 RtxA, VvhA 및 PlpA 각 유전자의 발현은 전사조절자 (transcriptional regulator)인 HlyU에 의해 활성화되는 것으로 알려졌다.

[0106] 본 발명에서는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드 또는 그 유도체가 HlyU 단백질을 저해함을 확인하고, 비브리오 패혈증의 예방 또는 치료용 조성물로 개발하여 제공하는 것이다. 즉, 본 발명에서는, N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프롭-2-이나마이드(CM2660, 화학식 11) 또는 그 유도체 LJ4451(화학식 12), LJ4457(화학식 13), LJ4458(화학식 14), LJ4459(화학식 15), LJ4460(화학식 16), LJ4461(화학식 17), LJ4522(화학식 21), LJ4523(화학식 22), LJ4524(화학식 23), LJ4525(화학식 24), LJ4526

(화학식 25), LJ4531(화학식 26), LJ4532(화학식 27), LJ4533(화학식 28) 및 LJ4534(화학식 29)가 HlyU 단백질과 공유결합함으로써, HlyU 단백질이 독성 관련 표적 DNA에 결합하지 못하도록 하는 RtxA 독소 생성 저해제로써 사용될 수 있음을 확인할 수 있었던 것이다.

- [0107] 본 발명은 비브리오균을 직접 사멸시키는 것이 아닌, 독성인자 발현과 관련되는 HlyU 단백질을 저해함으로써, 비브리오균이 갖는 독성을 낮추거나 제거하여, 비브리오균 감염으로 말미암은 질환을 예방 또는 치료하고자 하는데, 이로 인해 항생제의 사용으로 말미암아 발생하는 내성 등의 문제가 없는 장점이 있다.
- [0108] 한편, 본 발명의 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 벡스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물인 약제는 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 중 선택되는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0109] 한편, 본 발명의 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니먼트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 안연고제(OPHTHALMIC OINTMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 전제(DECOCTIONS), 침제(INFUSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLASMA), 캡슐제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 톨크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴캡슐 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0110] 한편, 본 발명의 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 비브리오균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물은 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.00001 내지 100mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여 가능하다. 그러나 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 따라 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.
- [0112] 한편, 본 발명은 상기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로판-2-아미드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체를 포함하되, 상기 유도체는 상기 화학식 12의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 13의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 14의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 15의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 16의 구조를 갖는 화합물 및 상기 화학식 17의 구조를 갖는 화합물 중 선택되는 어느 하나를 포함하는 비브리오균 감염 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0113] 또한, 본 발명은 상기 화학식 11의 구조를 갖는 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로판-2-아미드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide) 또는 그 유도체를 포함하되, 상기 유도체는 상기 화학식 21의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 22의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 23의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 24의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 25의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 26의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 27의 구조를 갖는 화합물, 상기 화학식 28의 구조를 갖는 화합물 및 상기 화학식 29의 구조를 갖는 화합물 중 선택되는 어느 하나를 포함하는 비브리오균 감염 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0114] 본 발명의 비브리오균 감염증 개선용 식품 조성물에 있어, 상기 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로판-2-아미드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide, CM2660) 또는 그 유도체는 바람직하게 비브리오균 감염증 개선용 식품 조성물 대비 0.00001~50 중량% 포함되는 것이 좋다. 0.00001 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미미하고, 50 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.
- [0115] 본 발명의 비브리오균 감염증 개선용 식품 조성물은 일 예로, 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵

류, 스낵류, 과자류, 사탕, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 유제품류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0117] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예 또는 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0119] [실시예 1: HlyU 저해제의 선별을 위한 고속 대량 탐색 (high throughput screening) 실시]

[0120] 본 실험에서 사용한 박테리아 종과 플라스미드는 표 1에 정리되어 있다.

표 1

균주 또는 플라스미드	상대적 특성 (Relevant characteristics) ^a	참고문헌 또는 소스 (source)
Bacterial strains		
<i>V. vulnificus</i>		
MO6-24/O	Clinical isolate, virulent	본 발명자인 최상호 교수 소속 실험실 보유
ZW141	MO6-24/O with $\Delta hlyU$	참고문헌 1
<i>V. parahaemolyticus</i>		
FORC_008	Clinical isolate, virulent	본 발명자인 최상호 교수 소속 실험실 보유
<i>V. alginolyticus</i>		
ATCC17749	virulent	Korean Collection for Type Cultures
<i>V. cholerae</i>		
E1 Tor N16961	Clinical isolate, virulent	참고문헌 2
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 \Delta lacU169 (\Phi 80 lacZ \Delta M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	본 발명자인 최상호 교수 소속 실험실 보유
Plasmids		
pBBR_lux	Broad host range vector within promoterless <i>luxCDABE</i> ; Cm ^r	참고문헌 3
pZW1608	pBBR_lux with P _{VVM06_00539} , Cm ^r	본 발명
pKK1305	pBBR_lux with P _{rtxA} , Cm ^r	본 발명
pBAD24	Expression vector with the P _{BAD} promoter; Ap ^r	참고문헌 4
pKK1306	pBAD24 with <i>hlyU</i> ; Ap ^r	본 발명
^a Ap ^r , ampicillin-resistant; Cm ^r , chloramphenicol-resistant.		

[0123] 본 발명에서 사용한 대장균 (*Escherichia coli*)은 루리아-베르타니 (Luria-Bertani, LB) 배지에서 37°C로 배양하였으며, 패혈증 비브리오균 (*V. vulnificus*)은 2% NaCl이 첨가된 LB 배지 (LBS)에서 30°C의 온도로 배양하였다. 필요한 경우, 대장균 및 패혈증 비브리오균에 100µg/ml의 암피실린 (ampicillin), 대장균 및 패혈증 비브리오균 각각에 20µg/ml 및 3µg/ml의 클로람페니콜 (chloramphenicol)을 사용하였다.

[0124] 한편, 대장균 리포터 스트레인 구축 및 고속 대량 탐색을 수행하고자, 야생형 *hlyU* 유전자가 아라비노스 (arabinose)에 의해 유도되도록 클로닝된 pKK1306 플라스미드를 구축하였다. 리포터 플라스미드는 HlyU에 의해 발현이 직접 억제 (repression)되는 VVM06_00539 유전자의 프로모터가 바이오루미네센스 오페론 (bioluminescence operon, *lux* operon)의 앞에 클로닝된 pZW1608이다. 이 두 플라스미드를 대장균 DH5 α 에 동시에 트랜스포메이션 (transformation)하여 대장균 리포터 스트레인을 구축하였다 (도 1). 도 1은 HlyU의 선택적 저해제를 스크리닝하는데 사용된 전략을 나타낸 모식도이다. 이 대장균 리포터 스트레인은 아라비노스의 농도가 증가할수록 생체 발광이 줄어드는 것으로 확인되었으며, HlyU 저해제를 탐색하기 위한 리포터 시스템으

로 이용되었다.

[0125] 탐색을 위해 한국화학물은행으로부터 약 8400개의 저분자 화합물을 분양받아 본 실험에서 사용하였다. 16시간 동안 배양한 대장균 리포터 스트레인을 LB 배지에 100배 희석 접종하고, 최종농도 0.0002%가 되도록 아라비노오스를 첨가해주었다. 양성대조군에는 아라비노오스 대신 물을 첨가함으로써 HlyU가 발현되지 않아 리포터 플라스미드의 *lux* 오페론(operon) 발현이 억제되지 않도록 하였다. 37°C에서 배양하여 배양액의 흡광도 (absorbance at 600nm, A_{600})가 0.5에 이르렀을 때, 배양액을 100 μ l씩 96웰 검정 플레이트 (96-well black plate)로 옮겨 담았다. 각 웰에는 최종 농도 20 μ M의 각 화합물들 및 대조군으로 디메틸설폭사이드 (dimethyl sulfoxide, DMSO)를 처리하였다. 이를 37°C에서 배양하면서, 리포터 스트레인의 성장과 생체 발광정도를 'Infinite™ M200 microplate reader (Tecan, Mannedorf, Switzerland)'로 측정하였다. 측정된 발광값을 흡광도로 나누어서 정규화 (normalization)함으로써 RLU (relative luminescence unit)을 계산하였다.

수학적 식 1

[0127] $RLU = \text{luminescence} / \text{absorbance}$

[0129] 대장균 리포터 스트레인을 이용하여 8,400여 개 화합물들의 활성을 탐색한 결과, 몇몇 화합물은 대장균의 성장을 저해하였으며, 다른 몇 개는 세균의 성장에 영향을 미치지 않으면서 생체 발광을 증가시켰다. HlyU의 후보 저해제로는 총 7개의 화합물 (1025E12, 1030B04, 1040E12, 855B03, 855D03, 855F03 및 855G03)들이 스크리닝되었는데, 이들은 대장균 리포터 스트레인의 생체 발광을 유의성 있게 증가시켰다.

[0130] 고속 대량 탐색 실험의 결과를 검증하기 위해 7개의 화합물 (1025E12, 1030B04, 1040E12, 855B03, 855D03, 855F03 및 855G03)들을 새로운 플레이트에 옮기고 대장균 리포터 스트레인을 이용하여 다시 실험하였다. 이 검증 실험에서는 4시간 동안 배양을 하였으며, 매시간 마다 대장균의 성장과 생체 발광 정도를 측정하였다 (도 2). 도 2는 대장균 스크리닝 균주를 이용하여 1025E12 (하기에서 'CM2660'로 명명함), 1030B04, 1040E12, 855B03, 855D03, 855F03 및 855G03의 HlyU 저해활성을 검증한 결과이다.

[0131] 한편, 허위 양성 (false positive) 결과를 제외하기 위해 비브리오 리포터 스트레인을 이용한 검증 실험도 수행하였다. 대장균 리포터 스트레인에 사용되었던 HlyU에 의해 억제되는 리포터 플라스미드 (pZW1608)와 HlyU에 의해 활성화되는 *rtxA* 유전자의 프로모터가 바이오루미네센스 오페론 앞에 클로닝된 플라스미드 (pKK1305)를 각각 지닌 패혈증 비브리오균을 이용하여 화합물의 효과가 오직 대장균에만 국한되는 것이 아님을 확인하고자 하였다.

[0132] 실험을 위해, HlyU에 의해 직접적으로 억제되는 프로모터를 갖는 pZW1608와 활성화되는 프로모터를 갖는 pKK1305 플라스미드를 컨주게이션 (conjugation)을 통해 패혈증 비브리오균의 야생형과 *hlyU* 돌연변이 균주 (*hlyU*가 knock-out 된 균주)에 도입하였다. 구축된 야생형 비브리오 리포터 스트레인에 샘플 화합물들을 처리하고 30°C에서 배양하며, 상기 대장균 스트레인 스크리닝과 같은 방법으로 세포의 성장과 발광 정도를 측정하였다 (도 3, 도 4). 도 3은 HlyU에 의해 *lux*의 발현이 억제(repression)되는 *lux* 리포터 플라스미드 (pZW1608)가 삽입된 야생형 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)과, HlyU에 의해 *lux*의 발현이 억제(repression)되는 *lux* 리포터 플라스미드 (pZW1608)가 삽입된 *hlyU* 돌연변이 패혈증 비브리오균을 이용하여 1025E12 (하기에서 'CM2660'로 명명함), 1030B04, 1040E12, 855B03, 855D03, 855F03 및 855G03의 HlyU 저해활성을 검증한 결과이고 도 4는 HlyU에 의해 *lux*의 발현이 활성화되는 *lux* 리포터 플라스미드 (pKK1305)가 삽입된 야생형 패혈증 비브리오균과, HlyU에 의해 *lux*의 발현이 활성화되는 *lux* 리포터 플라스미드 (pKK1305)가 삽입된 *hlyU* 돌연변이 패혈증 비브리오균을 이용하여 1025E12 (하기에서 'CM2660'로 명명함), 1030B04, 1040E12, 855B03, 855D03, 855F03 및 855G03의 HlyU 저해활성을 검증한 결과이다.

[0133] pZW1608 플라스미드를 지닌 야생형 패혈증 비브리오균에 대조군인 DMSO를 처리하였을 경우에는, DMSO에 의해 HlyU가 저해되지 않아 HlyU에 의해 *lux* 오페론이 억제되어 빛이 증가하지 않고 낮은 레벨로 유지되는 양상을 보인다. 하지만, 저해제 화합물들을 처리하게 되면 HlyU가 저해되어 *lux* 오페론이 활성화되고, 빛이 DMSO 처리에 비해 비교적 높은 레벨로 상승하여 발광된다 (도 3).

[0134] 한편, pKK1305 플라스미드를 지닌 야생형 패혈증 비브리오균에 DMSO를 처리하였을 경우에는 HlyU가 저해되지 않아 HlyU에 의해 *lux* 오페론이 활성화되어 빛이 증가하다가 세포가 성장하면서 점점 감소하는 거꾸로 된 U 모양

의 그래프가 나타났다. 하지만, pKK1305 플라스미드를 지닌 야생형 패혈증 비브리오균에 저해제 화합물들을 처리하였을 경우에는 HlyU가 저해되어, HlyU에 의해 *lux* 오페론이 활성화되지 못해 발광 레벨이 낮아졌다 (도 4).

[0135] 이상의 결과로부터, 본 발명의 화합물들은 대장균 리포터 스트레인뿐만 아니라, 패혈증 비브리오균에서도 HlyU의 활성을 저해하는 저해제임을 확인할 수 있었다.

[0136] 한편, 상기의 화합물 중 가장 효과가 좋은 화합물 1025E12를 HlyU 저해제로 선정하고, CM2660이라 명명하였으며, 하기 실험에서 사용하였다. 화학식 1의 구조를 갖는 CM2660은 본 발명의 N-(4-옥소-4H-티에노[3,4-c]크로멘-3-일)-3-페닐프로프-2-이나마이드 (N-(4-oxo-4H-thieno[3,4-c]chromen-3-yl)-3-phenylprop-2-ynamide)이다.

[0138] **[실시예 2: '화합물 I군'의 효과 확인]**

[0139] CM2660에서 특정 구조가 HlyU 저해에 중요한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 화합물 CM2660과 그 유도체인 '화합물 I군' (도 5)의 HlyU 저해 효과를 확인하였다. 이를 위하여, 실시예 1에서 제작한 pKK1305 플라스미드를 패혈증 비브리오균의 야생형에 컨주게이션(conjugation)시키고, 이렇게 제작한 비브리오 리포터 스트레인 (pKK1305 in wild-type *V. vulnificus*)에 다양한 농도의 유도체 화합물을 처리하였다. 도 5는 화합물 I군의 화학 구조를 나타낸 것이다.

[0140] 이를 30℃에서 배양하면서 리포터 스트레인의 성장과 생체 발광 정도를 실시예 1의 방법과 동일하게 측정하고 RLU를 계산하였다. DMSO를 처리한 대조군의 RLU를 100% HlyU 활성 (activity)으로 나타내었다. 유도체 화합물의 농도에 따른 HlyU 활성을 그래프로 나타내었고, GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA)을 이용하여 EC₅₀ (half maximal effective concentration)을 계산하였다. (도 6, 표 2). 도 6은 화합물 I군의 HlyU 활성 억제능을 확인한 결과이다.

표 2

[0142]

Compound	EC ₅₀ (μM)
CM2660 (화학식 11)	30.94
LJ4450	3.53
LJ4451 (화학식 12)	993
LJ4457 (화학식 13)	1018 × 10 ⁶
LJ4458 (화학식 14)	874.6
LJ4459 (화학식 15)	29.67 × 10 ⁶
LJ4460 (화학식 16)	0.3953 × 10 ⁶
LJ4461 (화학식 17)	73.7 × 10 ⁶

[0144] 실험 결과, CM2660의 스캐폴드 (scaffold)인 LJ4450은 가장 낮은 EC₅₀ 값을 나타내며 가장 큰 HlyU 저해 효과를 보였다. 그러나 LJ4450은 패혈증 비브리오균의 성장을 저해하였는데, 내성 발생의 우려가 있어 추후 진행된 실험에서 제외되었다. CM2660은 30.94 μM의 EC₅₀ 값을 나타내었으며, 다른 유도체 화합물 또한 CM2660보다는 약하지만 HlyU 저해 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 CM2660의 삼중 결합이 HlyU 저해에 중요한 역할을 하기 때문으로 판단된다. 종합적으로, CM2660 및 구조적 유사성을 가지는 유도체 화합물은 HlyU를 저해함으로써 패혈증 비브리오균의 독성인자 발현을 저해할 것으로 예상할 수 있었다.

[0146] **[실시예 3: 화합물 II군의 효과 확인]**

[0147] 한편, CM2660의 삼중 결합이 HlyU 저해에 중요한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 화합물 CM2660의 유도체인 '화합물 II군' (도 7)의 HlyU 저해 효과를 확인하였다. 도 7은 화합물 II군의 화학 구조를 나타낸 것이다.

[0148] 이를 위하여, 실시예 2와 동일한 실험 방법을 통해 EC₅₀ 값을 계산하였다 (도 8, 표 3). 도 7은 화합물 II군의 화학 구조를 나타낸 것이고, 도 8은 화합물 II군의 HlyU 활성 억제능을 확인한 결과이다.

표 3

Compound	EC ₅₀ (μM)
LJ4522 (화학식 21)	1,790
LJ4523 (화학식 22)	6.17 × 10 ⁶
LJ4524 (화학식 23)	1,380
LJ4525 (화학식 24)	1,310
LJ4526 (화학식 25)	140
LJ4527	0.17
LJ4528	0.5
LJ4529	3.26
LJ4530	2.29
LJ4531 (화학식 26)	118
LJ4532 (화학식 27)	52.36
LJ4533 (화학식 28)	1,140
LJ4534 (화학식 29)	71.6
LJ4535	7.31

[0149]

[0150]

[0152]

[0153]

[0155]

[0156]

[0158]

[0159]

실험 결과, LJ4522~LJ4535로 명명된 14개의 유도체 화합물 중, LJ4527, LJ4528, LJ4529, LJ4530, LJ4535의 5개 화합물은 CM2660보다 낮은 EC₅₀ 값을 나타내었다. 그러나 이들 화합물은 모두 패혈증 비브리오균의 성장을 저해하였기 때문에, 추후 연구에서 제외되었다. 종합적으로, CM2660 및 구조적 유사성을 가지는 유도체 화합물은 HlyU를 저해함으로써 패혈증 비브리오균의 독성인자 발현을 저해할 것으로 예상할 수 있었다.

[실험예 1: CM2660 및 그 유도체의 작용기전 구명]

실시에 1 내지 실시예 3에서 선택된 화합물이 비브리오균의 직접적인 사멸 없이, 낮은 항생제 내성 유발 가능성으로 병원성 미생물의 독성을 제어할 수 있음을 입증하기 위하여, 하기 실험에서는 CM2660 및 그 유도체의 작용기전을 구명하고자 한다. 다만, CM2660의 작용기전이 구명되면 그 유도체 LJ4451, LJ4457, LJ4458, LJ4459, LJ4460, LJ4461, LJ4522, LJ4523, LJ4524, LJ4525, LJ4526, LJ4531, LJ4532, LJ4533 및 LJ4534의 작용기전을 유추할 수 있는바, 하기 실험에서는 대표적으로 CM2660만을 사용하여 그 유도체의 효과적 기제를 대신하려 한다.

(1) 화합물 CM2660이 HlyU의 세포 내 농도 감소가 아닌 HlyU의 활성을 직접적으로 저해함을 확인

HlyU 저해제 CM2660이 어떠한 기전으로 HlyU의 활성을 저해하였는지를 확인하기 위해, 패혈증 비브리오균을 30℃에서 배양하고 A₆₀₀ = 0.2에서 다양한 농도의 CM2660을 처리하였다. 대조군으로는 DMSO를 2%로 처리하였다. 이후 HlyU의 세포 내 양이 최대가 되는 시점인 A₆₀₀ = 0.5에서 배양액을 원심분리하여 세포부분 (pellet)만을 회수하였다. 회수한 세포를 화학적으로 용해 (lysis)하여 각 샘플 내 HlyU의 양을 확인하였다 (도 9). 도 9는 세포 내에서 CM2660 처리에 따른 패혈증 비브리오균의 세포 내 HlyU 단백질량을 확인한 결과이다. 실험 농도 범위 내의 CM2660을 처리하였을 때, 각 샘플 내 HlyU의 양은 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 이로부터 CM2660이 HlyU의 세포 내 발현량을 조절하는 것이 아닌 HlyU 활성을 직접적으로 저해함을 알 수 있었다.

(2) 화합물 CM2660이 HlyU에 의해 활성화되는 *rtxA*, *vvhA*, *plpA* 유전자의 발현을 저해함을 확인

HlyU에 의해 활성화되는 패혈증 비브리오균의 독성 유전자인 *rtxA*, *vvhA*, *plpA*의 발현이 CM2660에 의해 어떻게 변화하는지를 조사하였다. 이를 위해 먼저 패혈증 비브리오균을 30℃에서 배양하고, A₆₀₀ = 0.2에서 CM2660을 최종 농도 20 μM로 처리하였다. 대조군으로는 DMSO를 2%로 처리하였다. 이후 각 유전자의 발현이 HlyU에 의해 주로 조절되는 시점 (*rtxA*, *vvhA*의 경우 A₆₀₀ = 0.5, *plpA*의 경우 A₆₀₀ = 1.0)에서 배양액을 샘플링하고 RNA를 정제하여 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응 (quantitative Real-Time (qRT)-PCR)을 수행하였다 (도 10 내지 12). 도 10은 패혈증 비브리오균에 CM2660 20 μM 처리시, A₆₀₀ = 0.5에서의 *rtxA* mRNA의 수준을 확인한 결과이고, 도 11은 패혈증 비브리오균에 CM2660 20 μM 처리시, A₆₀₀ = 0.5에서의 *vvhA* mRNA의 수준을 확인한 결과이며, 도 12는 패혈증 비브리오균에 CM2660 20 μM 처리시, A₆₀₀ = 1.0에서의 *plpA* mRNA의 수준을 확인한 결과이다. 그 결과, HlyU에 의해 활성화되는 패혈증 비브리오균의 독성 유전자 *rtxA*, *vvhA*, *plpA*의 발현이 화합물 CM2660에 의해 유

의성 있게 감소하였음을 확인할 수 있었다.

[0161] (3) 화합물 CM2660이 패혈증 비브리오균의 독성을 시험관에서 (*in vitro*) 약화시킴을 확인

[0162] 화합물 CM2660에 의하여 독성 유전자 *rtxA*, *vvhA*, *plpA*의 발현이 감소한 것이 패혈증 비브리오균의 독성 감소로 까지 이어지는지를 살펴보고자 하였다. 인간상피세포인 INT-407 세포와 적혈구 (human erythrocytes)를 이용하여 CM2660이 패혈증 비브리오균의 독성에 미치는 효과를 알아보았다.

[0163] 30°C에서 $A_{600} = 0.5$ 까지 배양한 패혈증 비브리오균에 여러 농도의 CM2660 또는 DMSO (대조군)를 처리하고, MOI (multiplicity of infection) 10으로 96웰 검정 플레이트에 준비한 INT-407 세포에 2.5 시간 동안 감염시켰다. 이후 96웰 검정 플레이트를 원심분리하여 INT-407 세포와 상등액 (supernatants)을 분리하고 상등액 내 젖산탈수소효소 (lactate dehydrogenase, LDH) 활성을 측정함으로써 독성 발생 여부를 관찰하였다 (도 13). 도 13은 패혈증 비브리오균에 CM2660을 농도별로 처리하여 세포 독성 발생 여부를 확인한 결과이다. CM2660을 처리하였을 시, 농도 의존적으로 패혈증 비브리오균의 독성 발생이 감소하였음을 확인할 수 있었다.

[0164] 한편, CM2660이 패혈증 비브리오균의 적혈구에 대한 용혈 활성 (hemolytic activity)에 미치는 효과를 조사하였다. 이를 위해 패혈증 비브리오균을 30°C에서 배양하고 $A_{600} = 0.2$ 에서 CM2660을 농도별로 처리하였다. 대조군으로는 DMSO를 2%로 처리하고, 각 배양액을 $A_{600} = 1.0$ 까지 배양한 뒤, 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 여과한 상등액을 농축한 후 이를 PBS에 10%로 희석한 적혈구와 섞어 37°C에서 배양하였다. 적혈구에 대한 용혈 활성은 540nm에서 흡광도 (A_{540})를 측정함으로써 정량하였다. 상등액 대신 5% Triton X-100을 처리하여 완전히 용해한 샘플을 양성 대조군 (positive control)으로 삼고, LBS 배지를 사용한 샘플을 음성 대조군 (negative control)으로 삼았다.

[0165] 용혈 활성은 하기 수학적 식 2로 계산하여, 도 14에 퍼센테이지(%)로 나타내었다.

수학적 식 2

$$\frac{\text{샘플흡광도}-\text{음성대조군흡광도}}{\text{양성대조군흡광도}-\text{음성대조군흡광도}}$$

[0168] 도 14는 패혈증 비브리오균에 CM2660을 농도별로 처리하여 적혈구에 대한 용혈 활성을 확인한 결과이다. 독성 저감과 같은 양상으로, CM2660 처리에 의하여 비브리오균의 적혈구에 대한 용혈 활성이 농도 의존적으로 감소하였음을 확인할 수 있었다.

[0169] 이상을 종합하면, 화합물 CM2660이 패혈증 비브리오균의 독성을 시험관에서 농도 의존적으로 약화시킴을 확인할 수 있었다.

[0171] (4) HlyU가 DNA에 결합하는 것을 화합물 CM2660이 억제하는 것을 확인

[0172] CM2660이 HlyU 단백질의 DNA 결합능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여, HlyU가 결합하는 것으로 알려진 *rtxA* 프로모터 부위의 DNA를 이용하여 전기영동 이동성 변화분석 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 실험을 수행하였다.

[0173] *rtxA* 유전자의 프로모터 부위를 ³²P-라벨 프라이머 PrtXA-R (5'-ACTAGTTATTTTTTGGATCCTGGCCTAC-3')와 라벨이 되지 않은 프라이머 PrtXA-F (5'-GAGCTCGAATCAAATAAAATGGC-3')를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이 DNA 탐침 (probe)을 50nM 또는 100nM의 HlyU, 100 μM의 CM2660 또는 DMSO와 반응 버퍼 (10mM Tris-Cl, 50mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.75mM DTT 와 5% 글리세롤, 0.1μg poly(dI-dC)) 내에서 25°C로 30분간 반응시켰다.

[0174] DNA-HlyU 복합체는 폴리아크릴아마이드 겔 (polyacrylamide gel)에 전기영동 (electrophoresis)하고, Typhoon FLA7000을 통해 포스포이미징 (phosphoimaging)하여 밴드 위치를 확인하였다 (도 15, 도 16). 도 15는 DMSO, CM2660 및 대조군 화합물 (실시에 1에서 스크리닝했던 8,400여 개의 화합물 중에서 HlyU 저해 활성을 나타내지 않았던 화합물 중 무작위로 선발된 화합물)을 처리한 경우, HlyU의 DNA 결합능력을 확인한 결과이며, 도 16은 CM2660을 농도별로 처리한 경우, HlyU의 DNA 결합능력을 확인한 결과이다. DMSO나, 대조군이 처리된 경우에는 HlyU의 DNA 결합능력이 변화하지 않았으나, CM2660을 처리한 경우는 그 결합력이 크게 감소하였음을 확인할 수

있었다. 이 감소는 CM2660의 농도가 증가할수록 더욱 크게 나타났다.

[0176] **(5) 화합물 CM2660의 HlyU 저해 기전 조사**

[0177] 더 정확한 CM2660의 HlyU 억제기전을 파악하기 위해, CM2660을 처리한 HlyU 단백질의 결정 구조를 X선 결정학 (X-ray crystallography)을 통해 구명하고, CM2660을 처리하지 않았을 때의 결정 구조와 비교하였다 (도 17, 도 18). 도 17은 CM2660을 처리한 HlyU (녹색)와 처리하지 않은 자연 상태의 (native) HlyU (magenta, PDB code: 3JTH)의 구조를 비교한 결과이고, 도 18은 CM2660이 처리된 HlyU 구조체의 Cys30 과 Cys96 주변의 전자 밀도 지도를 나타낸 것이다 (1.0σ로 윤곽이 잡힌 2FoFc 맵은 파란색 메쉬로 표시되고, 3.0σ로 윤곽이 잡힌 2FoFc 맵은 옥색 메쉬로 표시된다).

[0178] 이를 좀 더 자세히 파악하고자 질량분석법 (mass spectrometry)을 이용하여 CM2660을 처리한 HlyU 단백질 샘플을 분석한 결과, HlyU 단백질의 시스테인 (cysteine) 30번 잔기가 CM2660의 일부 단편 (fragment)에 의해 공유 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한, CM2660 단편의 분자량이 질량분석 결과 CM2660을 처리한 HlyU 단백질의 증가한 분자량과 일치하였다 (도 19). 도 19는 CM2660을 처리한 HlyU 단백질 샘플을 질량분석법에 의하여 분석한 결과이다.

[0179] 이러한 결과를 종합하였을 때, CM2660은 HlyU의 시스테인 30번 잔기와 공유결합을 이루어 HlyU 단백질의 구조 변화를 매개하고, 이로 인해 HlyU의 DNA 결합능력이 감소했을 것이라 추론할 수 있었다.

[0181] **(6) 화합물 CM2660이 패혈증 비브리오균의 성장에 미치는 영향 조사**

[0182] CM2660이 패혈증 비브리오균의 성장을 저해한다면, 성장을 직접적으로 저해하는 일반적인 항생제의 경우처럼 내성을 유발할 가능성이 있다. 따라서 다양한 농도의 CM2660을 처리하고 패혈증 비브리오균의 성장을 관찰하였다 (도 20). 도 20은 CM2660이 패혈증 비브리오균의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과이다.

[0183] 20~500 μM의 CM2660 처리는 패혈증 비브리오균의 시험관 내 성장에 유의성 있는 영향을 미치지 않았다.

[0184] 이와 같은 결과는 본 발명의 CM2660이 패혈증 비브리오균의 성장을 저해하지 않으면서 독성을 약화시킴을 의미한다. 또한, 이는 CM2660이 병원성 미생물을 사멸시킴으로써 해당 병원성 인자를 숙주로부터 제거하고자 하는 일반적인 항생제와 다른 기전으로 병원성 미생물을 제어함을 의미한다. 즉, 낮은 항생제 내성 유발 가능성으로 병원성 미생물의 독성을 제어할 수 있음을 보여주는 것이고, 내성을 가지고 있는 병원성 미생물에 대해서도 본 발명의 방법을 통해 제어가 가능함을 보여주는 것이다.

[0186] **(7) 화합물 CM2660의 세포 독성 조사**

[0187] CM2660의 시험관 내 세포 독성을 조사하기 위하여, 인간상피세포 INT-407 세포에 MOI 10의 패혈증 비브리오균 (대조군), 1~500 μM의 CM2660 또는 DMSO를 처리하고, 3시간 후 LDH release 에세이 (assay)를 통해 세포 독성을 측정하였다 (도 21). 도 21은 CM2660의 인간상피세포인 INT-407 세포에서의 독성을 조사한 결과이다. 5% Triton-X 100의 처리에 의해 나타나는 세포 독성을 100%로 하여, 세포 독성(Cytotoxicity, %)을 계산하였다. CM2660은 모든 농도 구간 (1~500 μM)에서 INT-407 세포에 대한 세포 독성이 용매 DMSO의 세포독성과 유사하게 거의 없는 수준으로 나타났다. 이로부터 화합물 CM2660의 세포 독성은 없는 것으로 판단되었다.

[0189] **(8) 화합물 CM2660이 패혈증 비브리오균의 독성을 생체 내 (in vivo)에서 약화시킴을 확인**

[0190] 7주령 ICR 암컷 마우스를 사용하여 CM2660이 생체 내에서도 패혈증 비브리오균의 독성을 약화시키는지 알아보기 위하여, 30℃에서 $A_{600} = 0.5$ 까지 배양한 패혈증 비브리오균을 준비하였다. 이를 DMSO (10%) 또는 CM2660 (1.4mg/kg of mouse body weight)과 혼합하여 아이소플루레인 (isoflurane)으로 마취시킨 마우스의 등에 피하 주사하였다. 이와 더불어 CM2660의 생체 내 독성을 알아보기 위하여 CM2660만을 단독으로 피하주사하였다 (도 22). 도 22는 마우스에 CM2660을 주사한 후, 패혈증 비브리오균에 의한 생체 내 독성 발현 여부를 관찰한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0191] CM2660이 처리된 패혈증 비브리오균에 감염된 마우스는 대조군 (DMSO)에 비해 유의미하게 높아진 생존율을 보였다. 이는 CM2660이 생체 내에서도 패혈증 비브리오균의 독성을 약화시켰음을 나타낸다. 또한, CM2660만을 단독으로 피하주사한 마우스가 모두 생존했다는 사실로부터 CM2660이 생체 내 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

[0193] **[실험예 2: 화합물 CM2660이 다른 비브리오균의 독성을 약화시킴을 확인]**

- [0194] 패혈증 비브리오균 이외에도, 비브리오균 (*Vibrio species*) 중에는 사람이나 어패류에서 병원성을 나타내는 비브리오 파라해몰리티쿠스 (*V. parahaemolyticus*), 비브리오콜레라 (*V. cholerae*), 비브리오 알기놀리티쿠스 (*V. alginolyticus*) 등이 있다. 이 비브리오균들 또한 HlyU 단백질질을 가지고 있기 때문에, CM2660이 다른 비브리오균의 HlyU를 저해함으로써 독성을 약화시키는지 조사하였다.
- [0196] (1) 화합물 CM2660이 장염 비브리오균에 미치는 영향 조사
- [0197] 장염 비브리오균인, 비브리오 파라해몰리티쿠스(*V. parahaemolyticus*)에서, HlyU는 세포 독성을 유발하는 Type III secretion system-1 (T3SS-1)의 주요 전사 조절자(master transcriptional regulator) ExsA의 유전자 발현을 활성화시키는 것으로 알려졌다. CM2660이 비브리오 파라해몰리티쿠스의 HlyU를 저해함으로써 *exsA* 유전자 발현을 감소시키는지 확인하기 위해, 실험에 1의 (2)와 같은 방법을 사용하여 비브리오 파라해몰리티쿠스의 독성 유전자 발현을 조사하였다.
- [0198] 비브리오 파라해몰리티쿠스의 T3SS-1 유전자 발현을 유도하기 위해, 비브리오 파라해몰리티쿠스를 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 배양하였다. $A_{600} = 0.2$ 에서 CM2660을 최종 농도 20 μM 로 처리하고, 대조군으로는 DMSO를 2%로 처리하였다. 3시간 뒤, 배양액을 샘플링하고 RNA를 정제하여 qRT-PCR을 수행하였다 (도 23). 실험 결과, HlyU에 의해 활성화되는 비브리오 파라해몰리티쿠스의 독성 유전자 *exsA*의 발현이 매우 유의미하게 감소한 것을 알 수 있었다. 도 23은 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 0.5$ 에서의 *exsA*의 mRNA 수준을 확인한 결과이다.
- [0199] 한편, ExsA는 비브리오 파라해몰리티쿠스의 T3SS-1 유전자 발현을 활성화시키기 때문에, *exsA*의 발현 감소가 T3SS-1 유전자 발현의 감소로 이어지는지 확인하고자, 동일한 샘플을 사용하여 T3SS-1 유전자 발현을 확인하였다 (도 24). 실험 결과, 비브리오 파라해몰리티쿠스의 T3SS-1 유전자들인 *vp1668*, *vopQ*, *vopS*, *vopR*의 발현이 CM2660을 처리하였을 때 모두 유의미하게 큰 폭으로 감소하였다. 도 24는 장염 비브리오균에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 0.5$ 에서의 *vp1668*, *vopQ*, *vopS*, *vopR*의 mRNA 수준을 확인한 결과이다.
- [0200] 나아가, 도 25에서는 실험에 1의 (3) 방법을 사용하여 이러한 T3SS-1 유전자들의 발현 감소가 비브리오 파라해몰리티쿠스의 세포 독성 감소로 이어짐을 확인하였다. 도 25는 장염 비브리오균에 CM2660을 농도별로 처리하여 세포 독성 발생 여부를 확인한 결과이다.
- [0202] (2) 화합물 CM2660이 비브리오 알기놀리티쿠스에 미치는 영향 조사
- [0203] 비브리오 알기놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*) 또한 비브리오 파라해몰리티쿠스와 유사하게 T3SS를 가지고 있으며 세포 독성을 나타내는 병원성 비브리오균이다. 비브리오 알기놀리티쿠스에서의 CM2660의 독성 저해 효과를 확인하고자, 비브리오 알기놀리티쿠스를 1% NaCl을 첨가한 TSB(tryptic soy broth) 배지에서 배양하였다. $A_{600} = 0.2$ 에서 CM2660을 최종 농도 20 μM 로 처리하고, 대조군으로는 DMSO를 2%로 처리한 후, $A_{600} = 0.5$ 에서 배양액을 샘플링하고, 위와 동일한 방식으로 비브리오 알기놀리티쿠스의 T3SS 독성 유전자 발현을 조사하였다 (도 26).
- [0204] 실험 결과, CM2660은 비브리오 알기놀리티쿠스의 *exsA* 및 T3SS 유전자인 *val1668*, *vopQ*, *vopS*, *vopR* 발현을 유의미하게 감소시켰다. 도 26은 비브리오 알기놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*)에 CM2660 20 μM 처리시, $A_{600} = 0.5$ 에서의 *exsA*, *val1668*, *vopQ*, *vopS*, *vopR*의 mRNA 수준을 확인한 결과이다.
- [0205] 또한, CM2660 농도 의존적으로 비브리오 알기놀리티쿠스의 세포 독성이 감소하는 것을 확인하였다 (도 27). 도 27은 비브리오 알기놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*)에 CM2660을 농도별로 처리하여 세포 독성 발생 여부를 확인한 결과이다.
- [0207] (3) 화합물 CM2660이 비브리오 콜레라에 미치는 영향 조사
- [0208] 비브리오 콜레라에서, HlyU는 용혈단백질 HlyA의 발현을 직접적으로 활성화시킨다고 알려졌다. 비브리오 콜레라에 대한 CM2660의 효과를 확인하기 위해, LB 배지, 37°C에서 비브리오 콜레라를 배양하였다. $A_{600} = 0.2$ 에서 CM2660을 최종 농도 20 μM 로 처리하고, 대조군으로는 DMSO를 2%로 처리하였다. $A_{600} = 0.5$ 에서 배양액을 샘플링하고 RNA를 정제하여 qRT-PCR을 수행한 결과, CM2660은 비브리오 콜레라의 용혈단백질 유전자 *hlyA*의 발현을 유의미하게 감소시켰다. 또한, *hlyA* 유전자와 반대 방향에 위치하여 전사되는 다른 용혈단백질 *t1h* 유전자의 발현 또한 유의미하게 감소하였다 (도 28). 도 28은 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)에 CM2660 20 μM 처리시, A_{600}

= 0.5에서의 *hlyA*, *t1h*의 mRNA 수준을 확인한 결과이다.

[0209] 한편, 상기와 같은 용혈단백질 유전자의 발현 감소가 비브리오 콜레라의 용혈 활성 감소로 이어지는지 확인하고자, 실험에 1의 (3)과 동일하게 비브리오 콜레라의 상등액을 샘플링하였다. DMSO를 처리했을 때의 비브리오 콜레라의 상등액을 말 혈액 아가(horse blood agar) 배지에 도팅(dotting)하고 37°C에서 24시간 배양한 결과, 말 혈액의 용혈에 의해 만들어진 환(clear zone)이 관찰되었다. 그러나 CM2660을 처리한 경우에는 환이 잘 나타나지 않아, CM2660에 의해 비브리오 콜레라의 용혈 활성이 감소했음을 알 수 있었다 (도 29). 도 29는 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)에 CM2660 20 μM 처리시, 용혈 활성을 확인한 결과이다.

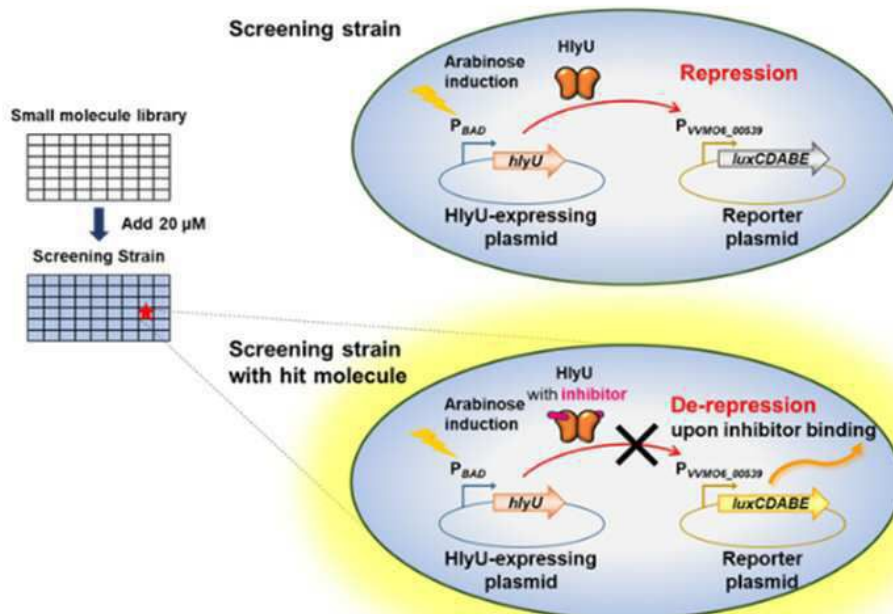
[0211] 상기 결과를 모두 종합하면, CM2660은 패혈증 비브리오균뿐 아니라 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 비브리오 알기놀리티쿠스, 비브리오 콜레라의 독성을 효과적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0214] [참고문헌]

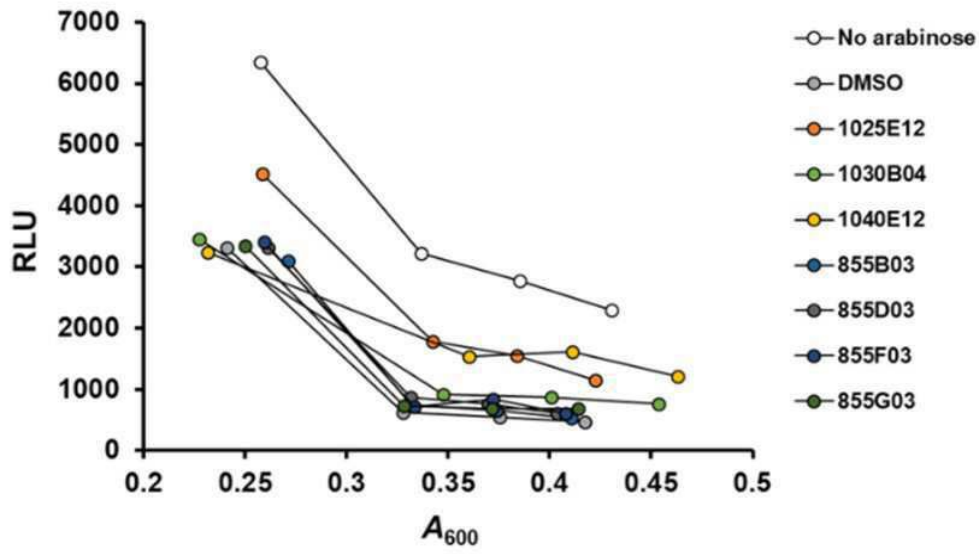
- [0215] 1. Jang, K. K., Lee, Z. W., Kim, B., Jung, Y. H., Han, H. J., Kim, M. H., Kim, B. S., and Choi, S. H. 2017. Identification and characterization of *Vibrio vulnificus plpA* encoding a phospholipase A₂ essential for pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 292:17129-17143.
- [0216] 2. Fullner, K. J., and Mekalanos, J. J. 1999. Genetic characterization for a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 67:1393-1404.
- [0217] 3. Lenz, D. H., Mok, K. C., Lilley, B. N., Kulkarni, R. V., Wingreen, N. S., and Bassler, B. L. 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell.* 118:69-82.
- [0218] 4. Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J., and Beckwith, J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J. Bacteriol.* 177:4121-4130.

도면

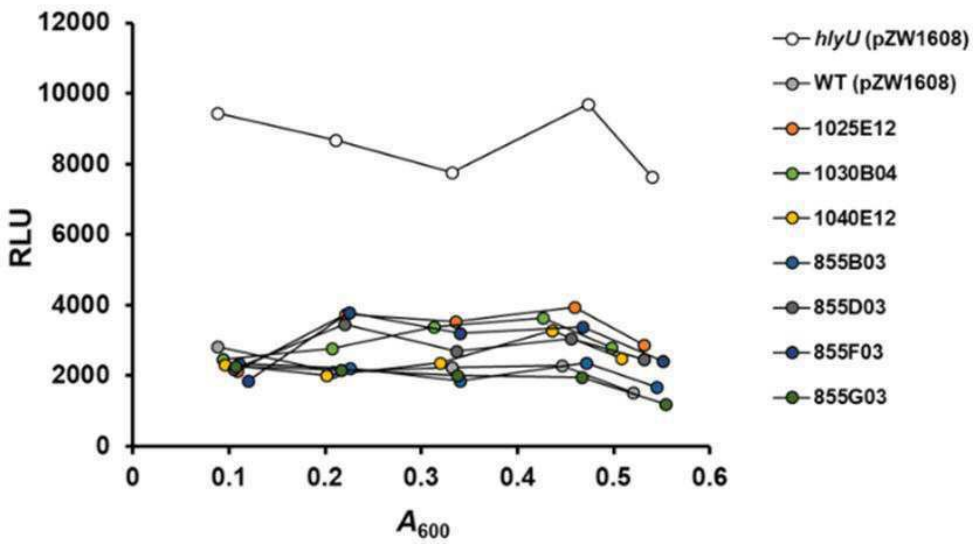
도면1



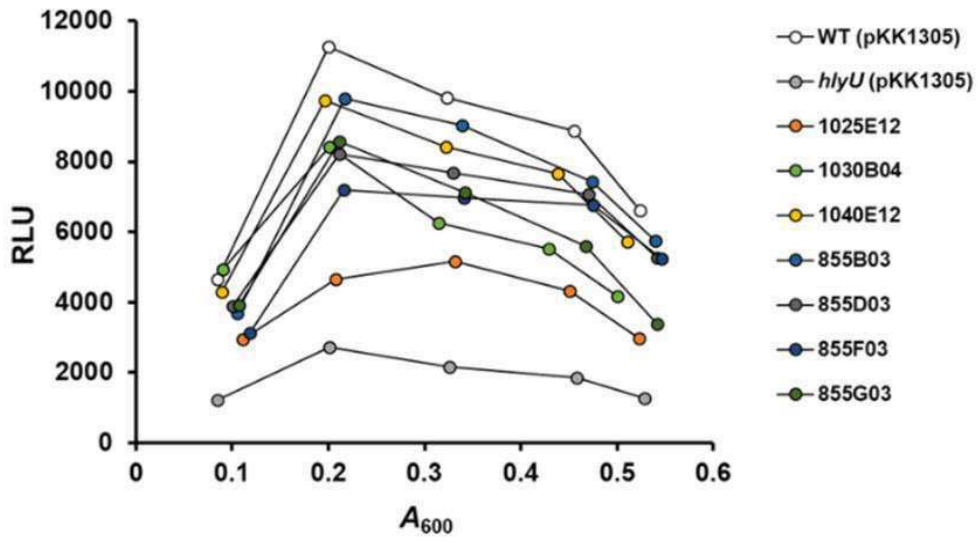
도면2



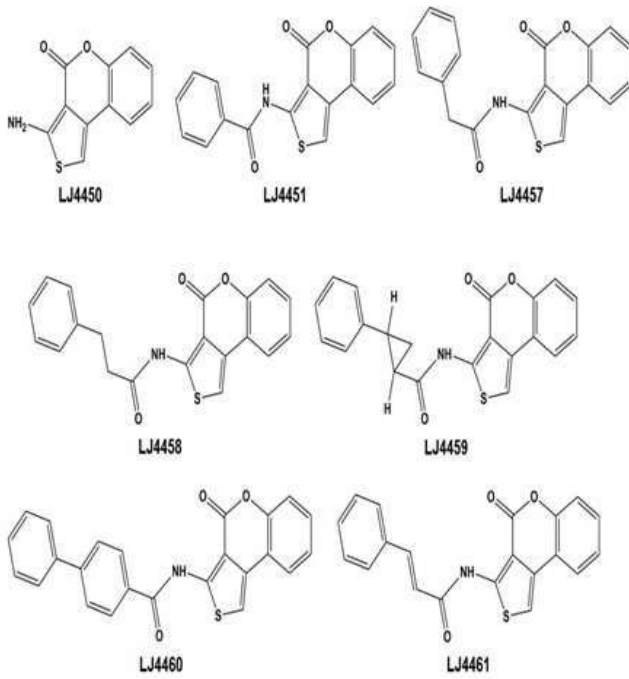
도면3



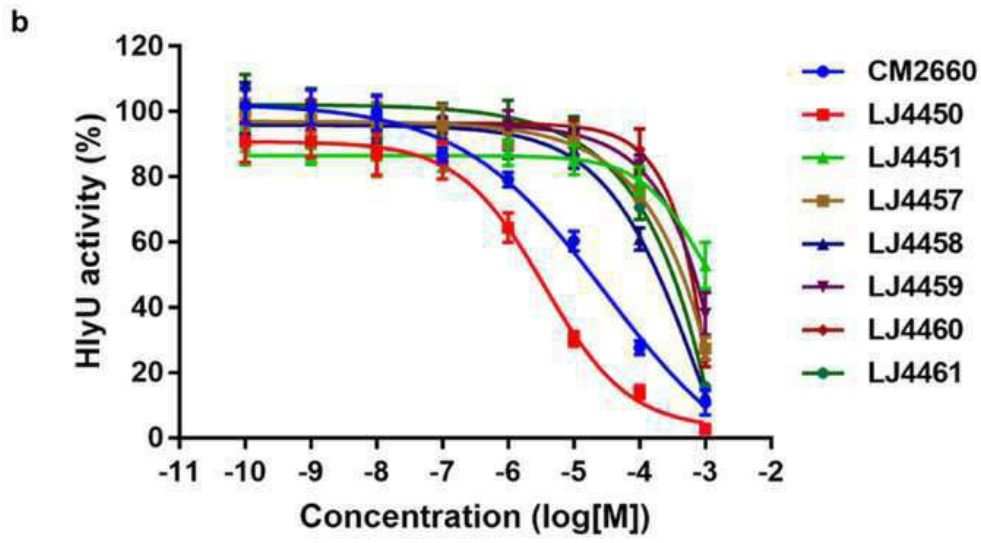
도면4



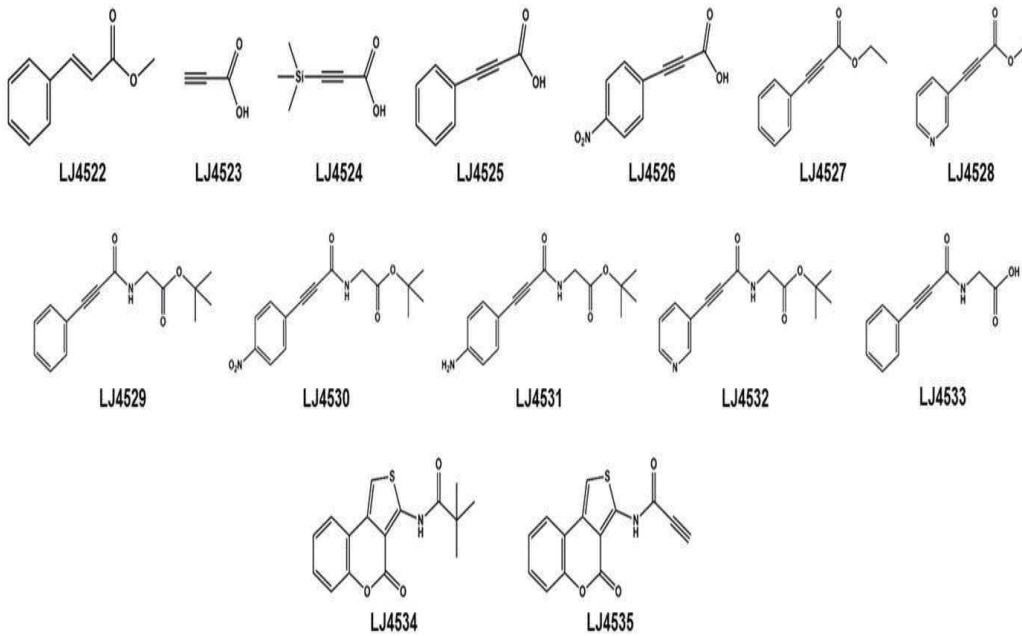
도면5



도면6

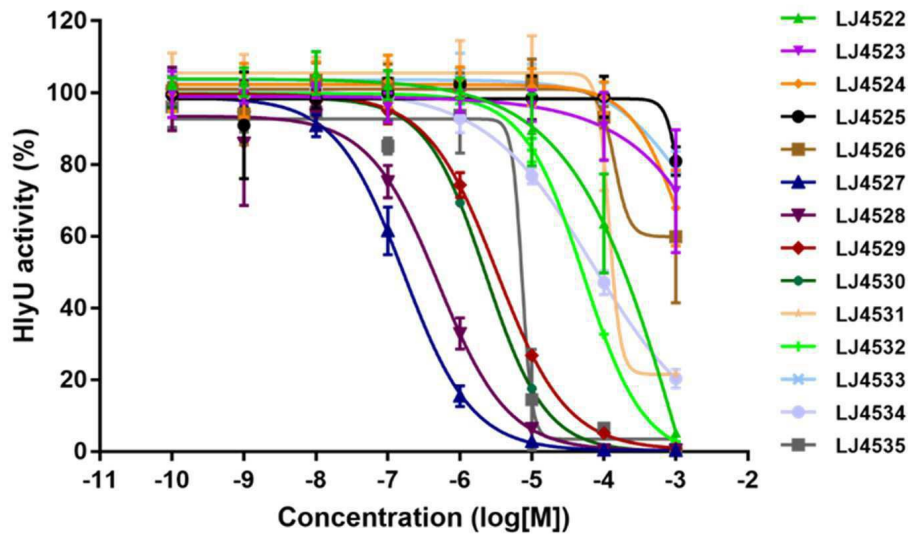


도면7

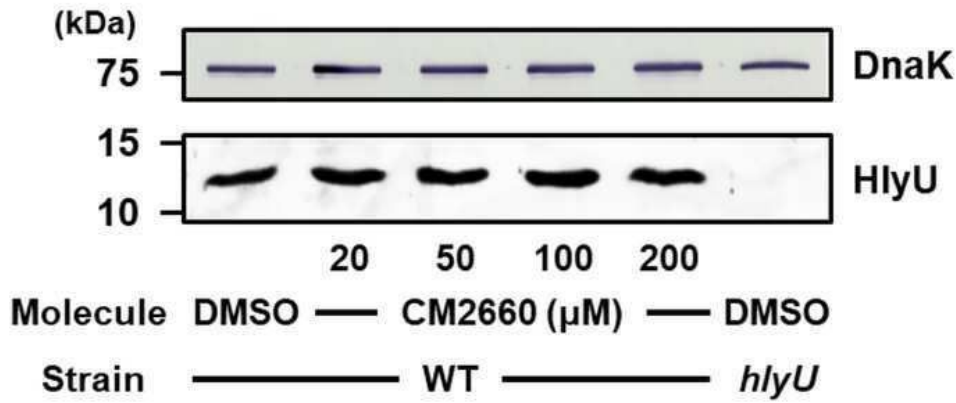


도면8

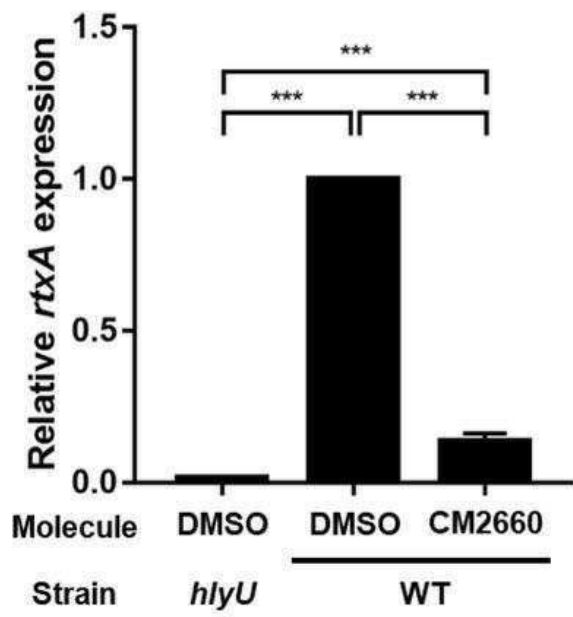
b



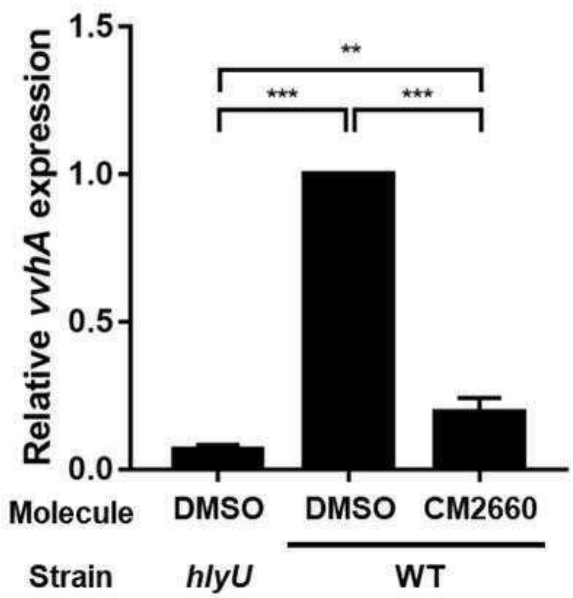
도면9



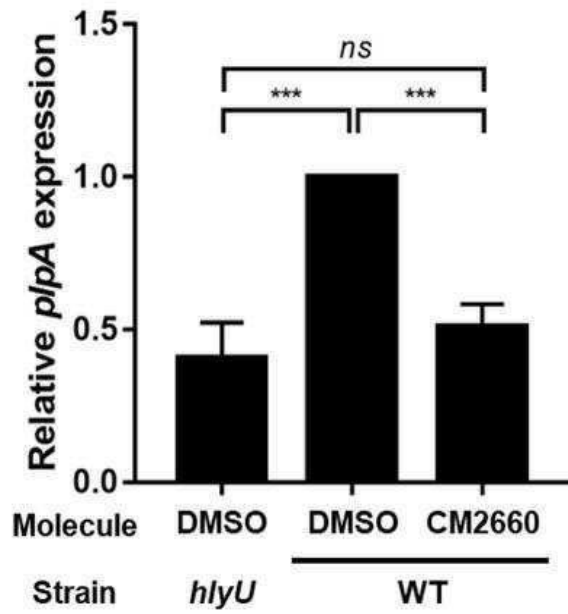
도면10



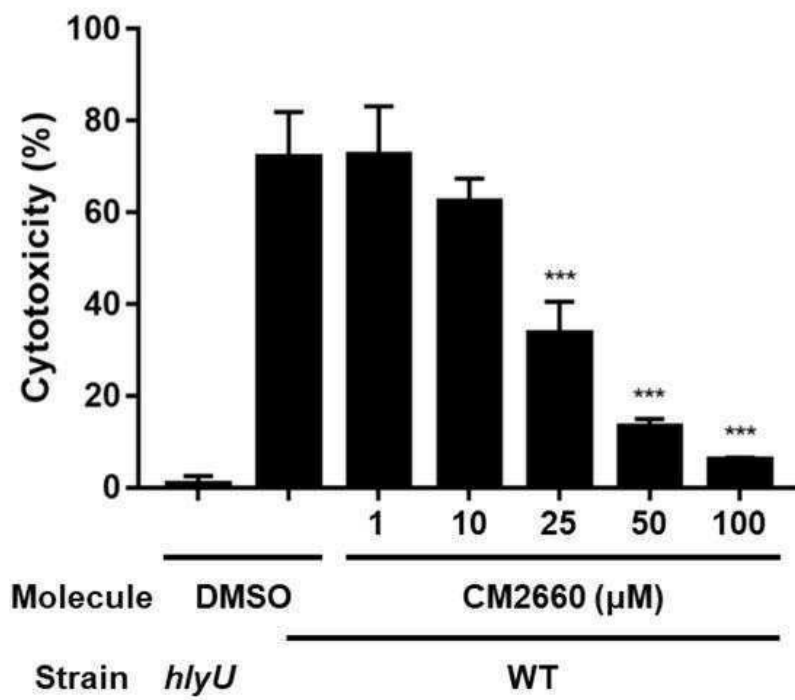
도면11



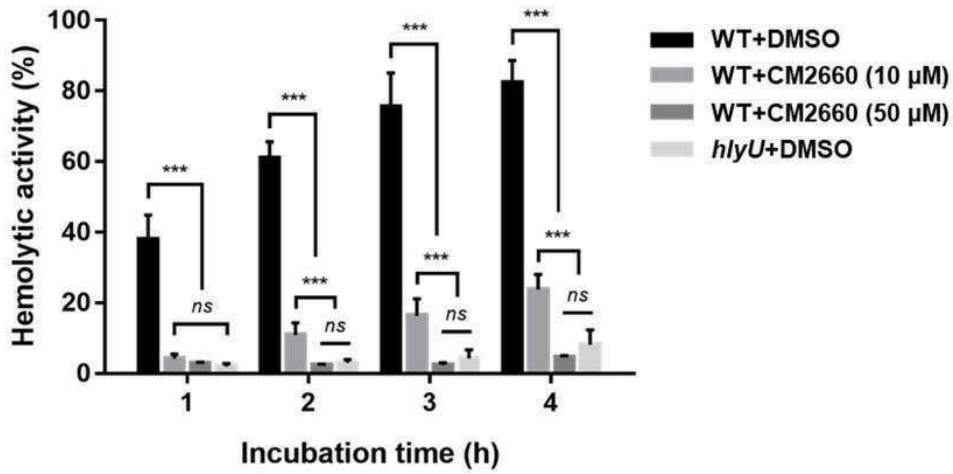
도면12



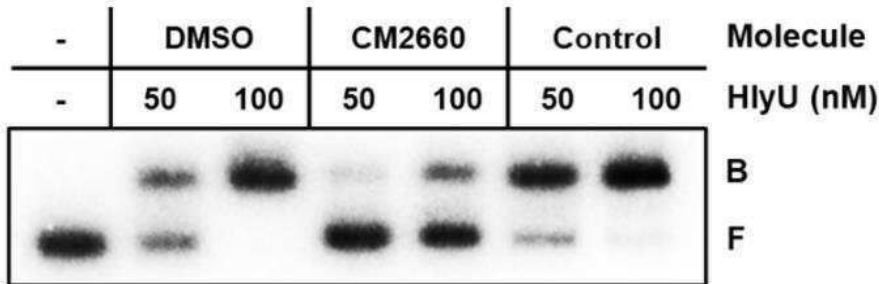
도면13



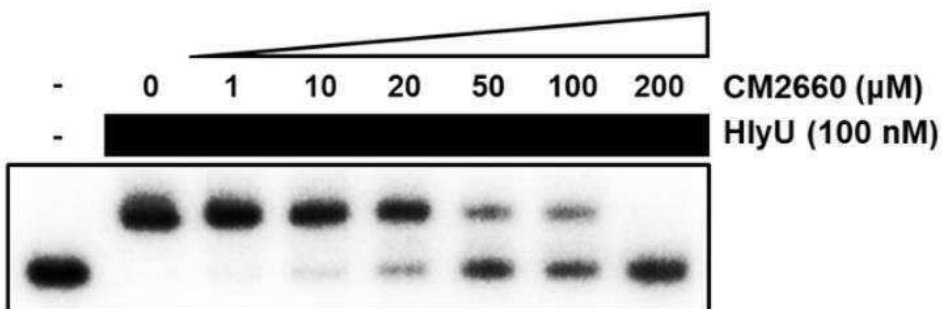
도면14



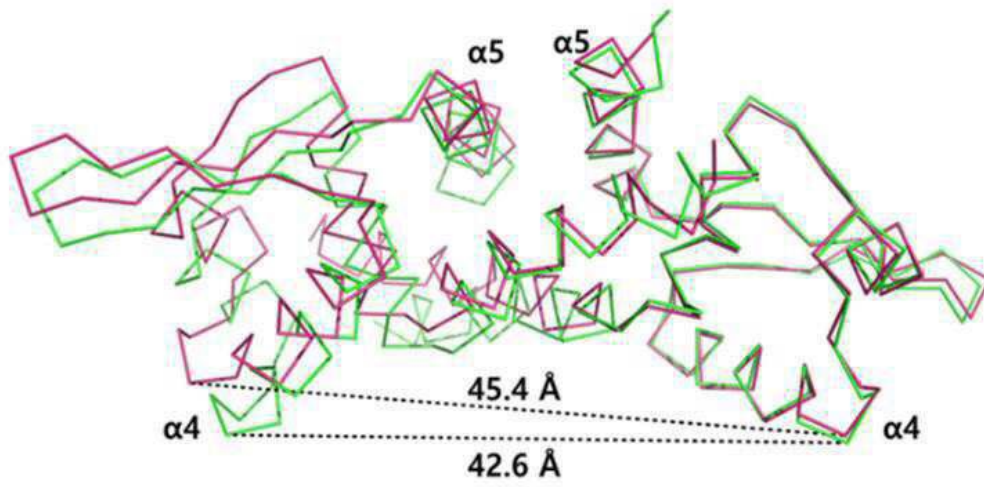
도면15



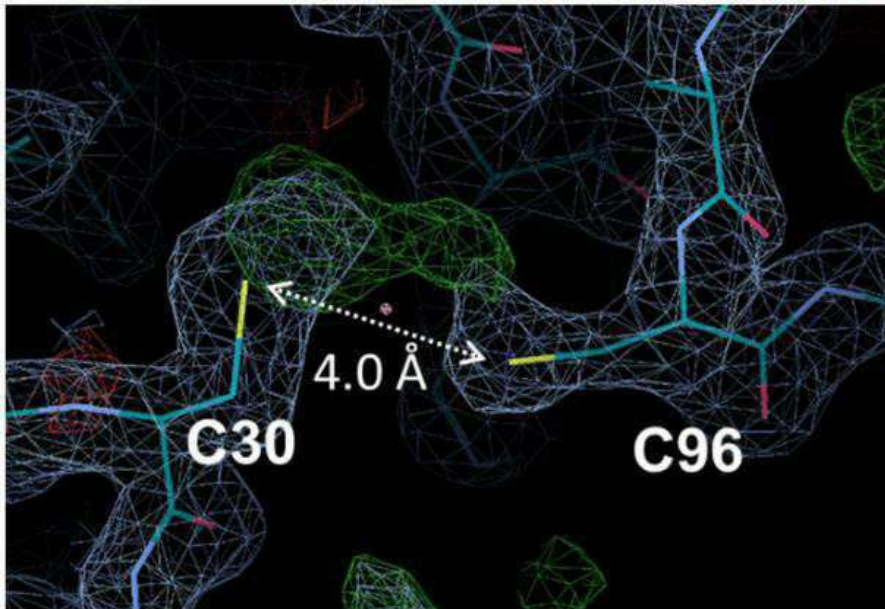
도면16



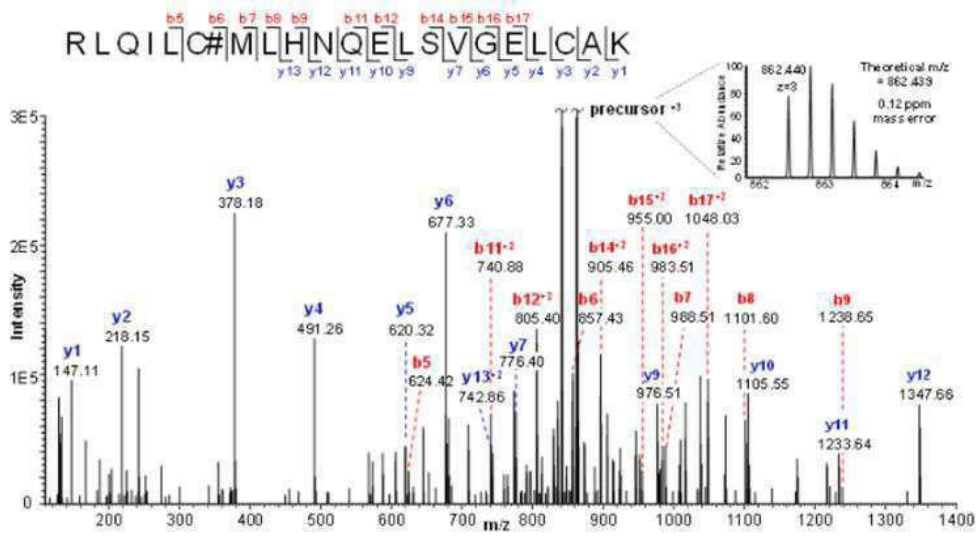
도면17



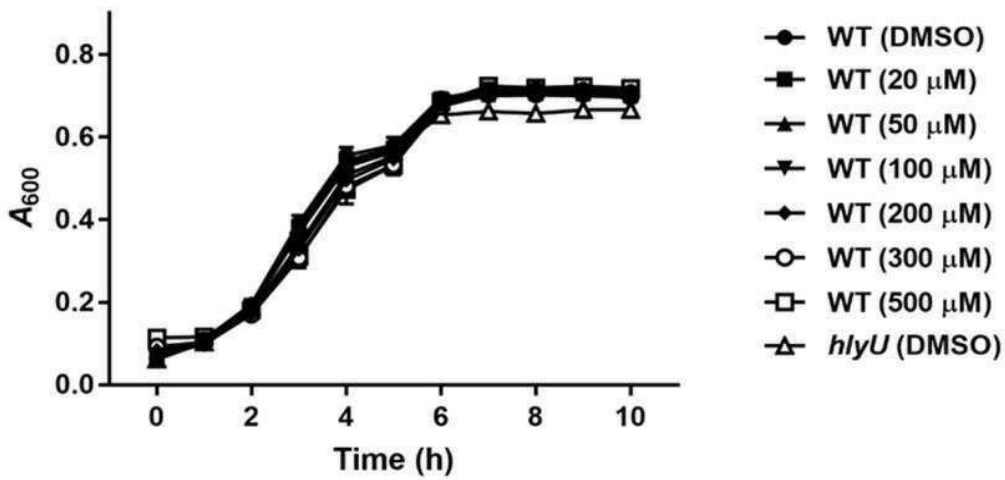
도면18



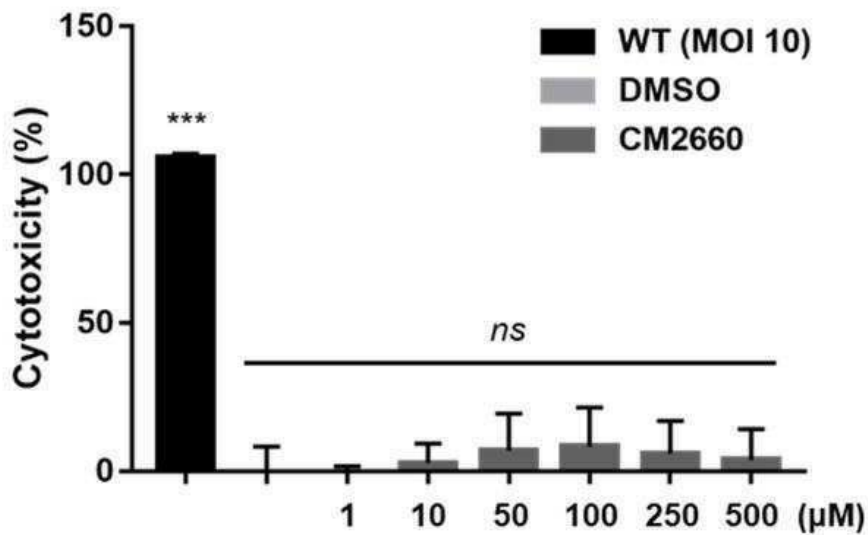
도면19



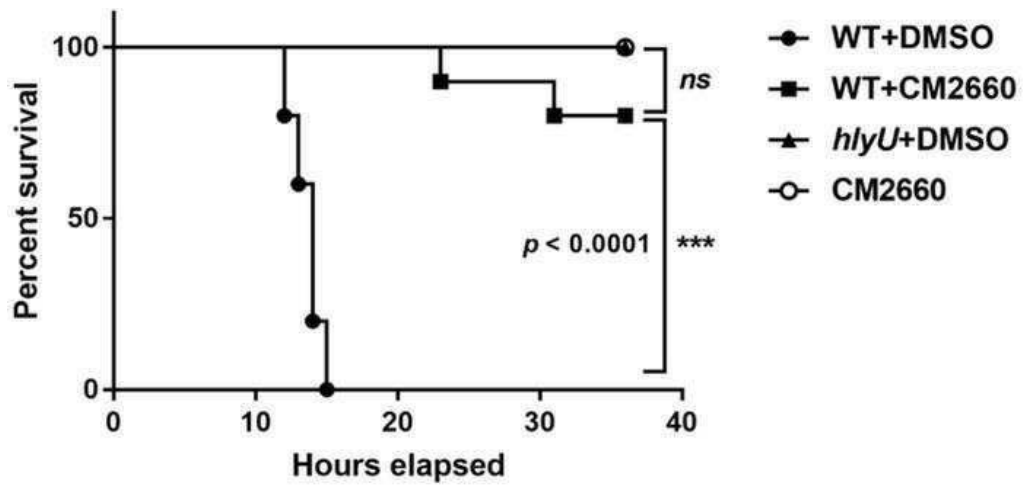
도면20



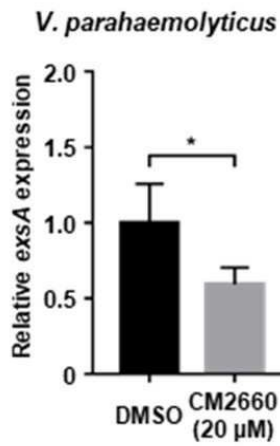
도면21



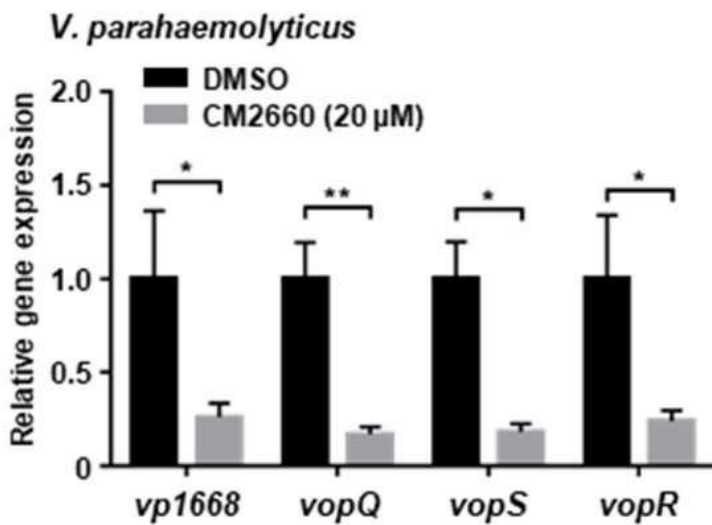
도면22



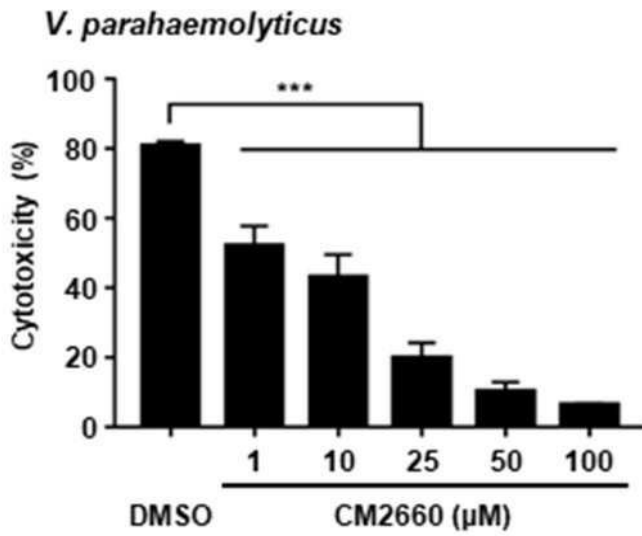
도면23



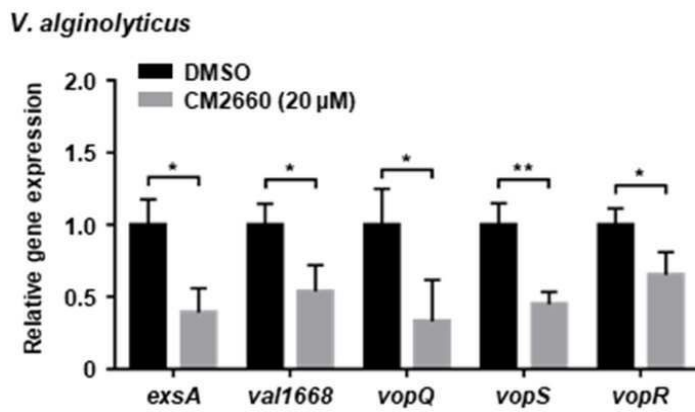
도면24



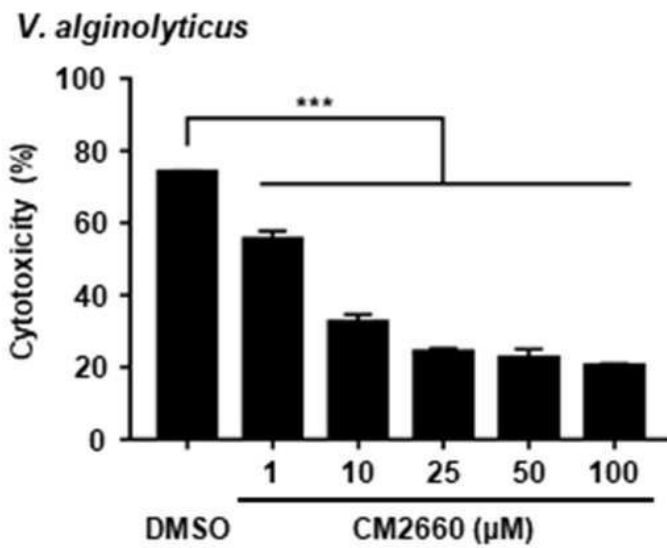
도면25



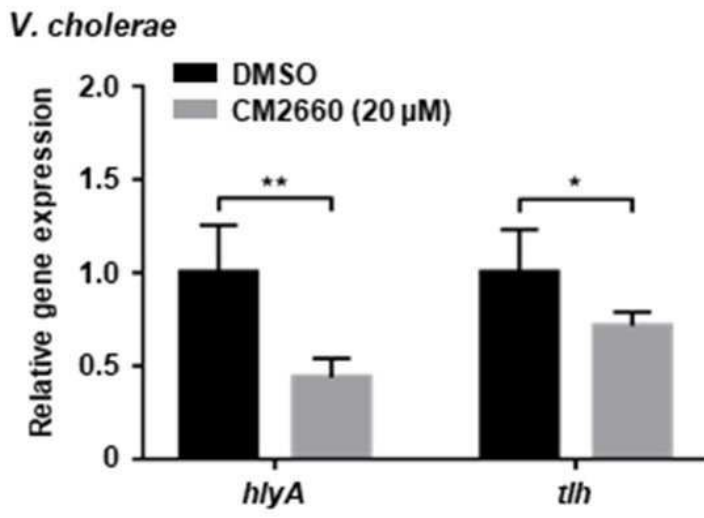
도면26



도면27



도면28



도면29

