



Antifungal Effects of New Synthetic Materials, KAF-200522 and KAF-200522-HCl, on *in vitro* and *in vivo* Models

Ju Young Jung^{1,2}, Kwang-Han Kong^{1,2}, Kyo Hwan Koo², Si-Whan Song², Kap-Ho Kim²,
Zhong Ze Han², Yeo Jin Lee² and Jin Soo Han^{1*}

¹Institute for the 3Rs & Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine,
Konkuk University, Seoul, Korea

²Preclinical Research Center, Chemon Inc., Yongin, Korea

KAF-200522 and its chloride form, KAF-200522-HCl, were invented in Chemon inc. as new triazole antifungal agents with excellent activities *in vivo* and *in vitro* against wide range of fungi. As a result of *in vitro* susceptibility measurements, 80% minimum inhibitory concentrations (MIC₈₀) of both test articles against *Candida albican* sp. and *Aspergillus fumigatus* sp. were below 0.0156 µg/mL, which were over 4,100 times lower than those of fluconazole against fluconazole resistant *C. albican* sp. and *A. fumigatus* sp., and were over 16 times lower than those of amphotericin B against above same fungi. Additionally, against representative dermatophytes, *Trichophyton* sp., the MIC₈₀s of both test articles were below 0.0156 µg/mL which were over 64 times lower than those of fluconazole and amphotericin B. As *in vivo* antifungal activities in *A. fumigatus* sp. infected mouse models, KAF-200522 treatment group at 600 mg/kg showed 80% survival rate which was 2 times higher than that of amphotericin B and showed 13.7 days in the mean survival time (MST) which was about 2.1 times higher than that of amphotericin B. But in KAF-200522-HCl treatment groups, all animals were found dead in contrast to 40% survival rate in amphotericin B treatment group, however dose dependent increases in MST was revealed. In conclusion, antifungal activities of KAF-200522 and its mimics, KAF-200522-HCl *in vitro* and *in vivo* were confirmed in this study, therefore the potentiality of the present compounds to be developed into new antifungal drug was expected.

Key words: Antifungal effects, KAF-200522, KAF-200522-HCl, MIC₈₀

Received 11 November 2010; Revised version received 23 November 2010; Accepted 26 November 2010

진균류는 인체의 면역 기능이 약화되었거나, 항생물질, 호르몬류 또는 항암제등의 과용으로 인하여 항생물질에 대한 내성이 생겼을때 여러가지 진균증을 일으키는데 (Butler, 2004; 2005), *Candida* sp.에 의한 칸디다증, *Aspergillus* sp.에 의한 국균증, *Trichophyton* sp.에 의한 피부 사상균증등이 대표적인 진균증이다(Konishi et al., 1989; Chomnawang et al., 2005). 특히 최근 20년간 인체면역결핍바이러스(Human immunodeficiency virus; HIV) 감염증, 항암화학요법, 골수이식 및 각종 장기이식, 장기적인 스테로이드의 사용 등과 관련된 면역저하 환자들이 늘어나면서 침습적 진균감염이 급속도로 증가하였고

(Andriole, 2000), 사망률은 높은 경우에는 침습적 candidiasis가 50%, 침습적 aspergillosis가 90%에 이른다. 이처럼 진균의 감염이 전신성 감염으로 이어질 경우 사망을 일으키기도 하는 치명적인 질병임에도 불구하고 현재 전신성 진균감염증 치료제로 미국식약청에 등록된 항진균제는 단지 10품목에 불과하다. 이들 약제는 polyene계, pyrimidine계, azole계 등의 3개 계열로 분류된다. Polyene계의 대표적인 진균제 amphotericin B의 경우 효과적인 광범위 항진균제이지만 투여시 발생하는 열, 오한, 오심, 구토 같은 부작용과 신독성 때문에 사용이 제한되는 경우가 많았고 경구용 제제가 없는 단점이 있었다. 1990년대에는 amphotericin B의 지질복합체가 개발되어 부작용을 줄이기는 했으나 치료율은 기대만큼 크게 향상시키지 못했다(Walsh et al., 1998).

Azole계의 대표적인 진균제인 fluconazole의 경우 침습적 aspergillosis나 그외 non-albicans *Candida* 감염에 효과가 없다고 보고하고 있으며(Arathoon EG, 2001), 장시간

*Corresponding author: Jin Soo Han, Institute for the 3Rs & Department of Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
Tel: +82-2-2049-6114
Fax: +82-2-3437-6114
E-mail: labvet@konkuk.ac.kr

치료제로 사용할 경우 약제내성 균주가 발달하는 단점이 있다고 보고하고 있다(Georgopapadakou and Walsh, 1994). 또한 경구용으로 사용되고 있는 itraconazole의 경우 높은 지질친화도 및 물에 대한 용해도가 낮아 체내흡수율이 낮은 단점이 있다고 알려져 있다(Fromtling, 1987).

이처럼 현재 널리 이용되는 약제들은 효능, 독성, 항진균 스펙트럼 및 약제내성 진균의 출현으로 장기간 사용하는데 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있으며(Tawara *et al.*, 1989 Ruhnke *et al.*, 1996; Shadomy *et al.*, 1997; Tortorano *et al.*, 1998), 이러한 이유들로 전신성 항진균 물질의 연구가 절실히 필요한 실정이다.

본 연구에서는 보다 효율적인 항진균제 개발을 목표로 triazole계 항진균제의 화학구조를 개량하여 넓은 범위의 항진균 활성효과가 있는 물질로 기대되고 있는 시험물질 KAF-200522 및 KAF-200522에 염을 합성한 것으로 생체 내 침투효과를 높일 것으로 기대되는 시험물질 KAF-200522-HCl에 대하여 항진균 효능을 평가하였다.

재료 및 방법

In vitro 항진균 효력시험


시험물질: 시험물질 KAF-200522은 (주)켄온(경기도 용인시) 전임상연구소 주관으로 (사)분자설계연구센터(서울시 서대문구)에서 설계하고 한국화학연구원(충청북도 대전시)에서 합성하여 기존의 triazole계 항진균제의 화학구조를 개량하여 만든 화합물로서 넓은 범위의 항진균 활성효과가 있는 물질로 기대되고 있다. KAF-200522의 합성은 benzoxazole-2-thiol에 oxirane을 p-xylene의 용매로 끓는 점을 130°C로 하여 교반이 잘되게 반응기를 설치하고 반응을 진행시키면 황화수소가스(H_2S)가 발생, 제거되면서 높은 수율의 KAF-200522 화합물을 얻을 수 있다. 또한 KAF-200522-HCl은 KAF-200522에 염화수소(HCl)를 합성한 물질로, KAF-200522의 용해도를 높여 생체 내 침투효과를 높일 것으로 기대되는 물질이다(Table 1).

시험물질 및 양성대조물질의 조제: 시험물질인 KAF-200522 및 KAF-200522-HCl은 적량의 시험물질을 부형제인 dimethyl sulfoxide (DMSO, 10085CH, Sigma-Aldrich Co.)에 용해하여 측정범위 최고농도(16 $\mu g/mL$)의 100배가 되도록 조제하였다. 양성대조물질로는 amphotericine B (117K4016, Sigma-Aldrich Co.), fluconazole (2330003, Daewoong Chemical Co., LTD) 및 terbinafin (Tokyo Chemical Industry)을 사용하였고, 시험물질과 동일한 방법으로 조제하여 사용하였다.

균주 및 배양: 진균주는 *C. albicans* (36082, ATCC), *C. albicans* (MYA-573, ATCC), *C. krusei* (6258, ATCC), *A. fumigatus* (16424, ATCC)를 American Type Culture Collection에서, *Trichophyton rubrum* (60450, KCCM)는 Korean Culture Center of Microorganism에서, *Trichophyton mentagrophytes* (6085, KCTC)는 Korean Collection for Type Cultures에서 시판하는 것을 분양 받아 (주)켄온 전임상연구소에서 계대배양한 것을 시험에 사용하였다. 모든 균주는 Sabouraud's dextrose agar 평판배지에 Cork Borer를 이용하여 일정한 블록을 배지에 뒤집어 30°C에서 약 7-10일간 배양 한 후 사용하였다.

***In vitro* 감수성 시험:** 최소 생육 억제 농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 알아보기 위한 감수성 시험은 broth microdilution method에 따르고, The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)의 보고서 M38-A에(Pfaller *et al.*, 1997) 준하여 실시하였다. Broth의 제조는 멸균된 microtube내에서 RPMI 1640 배양액(Gibco-BRL, Richmond, USA)으로 농도 계열이 최종적으로 0.0313-32 g/mL가 되도록 희석하여 조제하였다. 이때 부형제로 사용된 DMSO의 농도는 최종적으로 2% (V/V)가 되도록 하였다. 배양된 균주의 표면을 백금 및 spatula를 이용하여 표면을 따라 긁어낸 후 긁어낸 균사체를 멸균된 유리 분쇄기(glass tissue grinder)를 이용하여

Table 1. Physical properties of KAF-200522 and the synthesis proof KAF-200522-HCl from KAF-200522

Name	KAF-20522
Formulation	C23H23ClF2N6O2
Molecular weight	488.92
Melting point	129-130°C
Process of KAF-20522-HCl synthesis	

적량의 멸균생리식염수를 넣어 분쇄한 후 멸균된 거즈를 이용하여 분리하였다. 분생자를 포함한 균액은 약 1×10^8 conidia/mL 이상으로 준비하여 냉장보관 하였다. 준비된 균주를 0.85% 멸균생리식염수에 530 nm에서 투과도가 68-70%가 되도록 멸균생리식염수로 보정한 후 RPMI 1640 배양액으로 1:50으로 희석하여 균의 수가 0.4×10^4 - 5×10^4 CFU/mL가 되도록 하여 접종 균액을 준비하였다. 멸균된 96-well microplate에 시험물질과 양성대조물질의 농도별 희석액을 각각 0.1 mL씩, 부형제를 0.1 mL 분주하고, 해당 균액을 0.1 mL씩 분주한 후 alamarblue (Trek Diagnostic Systems, Inc) 를 25 μ L씩 처리하였다(시험물질 최종농도: 0.0156-16 g/mL, DMSO 농도: 1%). 그 후 35°C에서 5-7일간 정치 배양하였다.

결과의 표시 및 판정 기준: 결과는 MIC가 부형제대조군에 비해 80% 억제되는 농도로 표시하였다(MIC₈₀). 5일 이상 경과 후 해당 농도에서의 균의 생육 유무를 육안적 검사와 함께 흡광광도계(SPECTRAMax Plus 384, molecular Devices co.)로 흡광도를 측정하였다.

In vivo 항진균 효력시험

실험동물 및 사육환경: 실험동물은 약 5주령의 특정병원균 부재(SPF) 수컷 HRsdKoat:ICR(CD-1[®]) 마우스로 동물은 코아텍(경기도 평택시)으로부터 입수하여 이후 7일간 (주)캠온 전임상연구소에서 순화 후 약 6주령 된 건강한 동물을 실험에 사용하였다.

본 시험은 온도 23±3°C, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10-20회/hr, 조명 12 hrs/cycle, 조도 150-300 Lux조건하에 (주)캠온 전임상연구소내의 실험동물사육실에서 수행하였다. 동물은 스테인레스제 망 사육상자(W165×L240×H145 mm)에 사육하였고, 사육상자는 시험번호 및 동물번호를 기입한 라벨지를 부착하여 식별하였다. 사료는 방사선 조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(Harlan Co. Ltd., USA. Teklad Certified Global 18% Protein Rodent Diet, 2918C)를 폴라스인터내셔널로부터 공급받아 사용하였고, 물은 지하수를 자외선 살균기 및 미세여과장치로 소독한 후 물병을 이용하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

동물실험윤리규정의 준수: 본 시험은 동물보호법(제정 1991년 05월 31일 법률 제 4379호, 일부 개정 2008년 02월 29일 법률 제 8852호)에 근거한 (주)캠온 전임상연구소의 동물윤리위원회에 의해 승인되었다.

실험동물의 면역저하: 시험물질 및 균 감염 3일전에 cyclophosphamide · H₂O (CPA, 097K1311, Sigma-Aldrich Co.)를 200 mg/10 mL/kg으로 실험동물에 단회 복강투여하여 면역저하를 유도하였다.

균 배양 및 접종: 진균주는 *A. fumigatus* (16424, ATCC)를 American Type Culture Collection에서 분양 받아 26°C Malt agar에 7-10일간 충분히 배양 후 0.85% 멸균생리식염수(with 0.2% tween80)로 포자현탁액을 계수(균수: 5×10^5 CFU/mL)하여 조제한 후 각 마우스의 미정맥을 통하여 0.2 mL/head씩 시험물질 투여개시일에 단회투여하였다.

시험군의 구성 및 투여용량의 설정: KAF-200522를 이용한 항진균 효력시험의 경우 멸균생리식염주사액을 부형제로 하여 양성대조물질 amphotericin B (126K4032, Sigma-Aldrich Co.)를 3 mg/kg/day로 투여하는 양성대조군과 polyethylene glycol 400 (PEG 400, 036K0046, Sima-Aldrich Co.)을 부형제로 하여 KAF-200522를 100 mg/kg/day로 투여하는 고용량투여군을 군당 각 10마리씩 두었으며, 공비를 약 2로 하여 아래로 50, 25 및 10 mg/kg/day를 투여하는 3개의 시험물질 투여군과, PEG 400만을 투여하는 부형제대조군을 군당 각 7마리씩 두었다.

시험물질 KAF-200522-HCl을 이용한 항진균 효력시험의 경우 멸균생리식염주사액을 부형제로 하여 amphotericin B를 3 mg/kg/day로 투여하는 양성대조군으로 수컷 10마리를 두었으며, 0.5% methylcellulose (MC, 811×1513, Kanto Chemical Co.)를 부형제로 하여 KAF-200522-HCl을 10 mg/kg/day로 투여하는 고용량군과 공비를 5로 하여 아래로 2 및 0.4 mg/kg/day를 투여하는 2개의 시험군을 두었으며, 0.5% MC만을 투여하는 부형제대조군을 군당 각 6마리씩 두었다.

투여방법: 시험물질 및 부형제의 투여경로는 임상 예정 경로인 경구투여를 선택하였으며 투여방법은 한 손으로 동물의 경배부를 잡아 고정하고, 다른 한 손으로 경구투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여하였다. 양성대조물질인 amphotericin B는 26게이지 주사침을 이용하여 복강 내에 투여하였다. 최초의 시험물질 및 양성대조물질투여는 진균 접종 2시간 후에 실시하였다(day 0). 생존을 관찰을 위한 시험물질 및 부형제의 투여는 감염 2시간 후를 1회로 하여 1일 1회씩 5일간(day 0-4) 실시하였고, KAF-200522시험의 경우, 고용량군인 100 mg/kg/day 투여군만 1일 2회 투여하였으며, 양성대조물질은 공히 1일 1회 5일간 복강투여하였다

일반증상 관찰: 모든 동물에 관하여 순화기간, 투여직후(day 0) 및 투여 후 14일(day 14)간 사망여부, 증상의 종류, 발현일 및 증상의 정도를 매일 관찰하여 기록하였다.

통계학적 분석: 부형제대조군, 시험물질투여군 및 양성대조물질투여군에 대해 Kaplan-Meier 생존분석을 실시하

Table 2. *In vitro* activities of KAF-200522, KAF-200522-HCl and other antifungal agents against strains causing experimental systemic infections

Test item	MIC ₈₀ (μg/mL) ^{a)}			
	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>	<i>A. fumigatus</i>
	ATCC-36082	ATCCMYA-573	ATCC-6258	ATCC-28301
KAF-200522	≤0.0156	≤0.0156	0.125	≤0.0156
KAF-200522-HCl	≤0.0156	≤0.0156	0.25	≤0.0156
Amphotericin B	0.125	0.25	0.5	0.25
Fluconazole	0.125	128	32	64

^{a)}MIC₈₀s were determined by the broth microdilution method with RPMI 1640 medium, the inoculum size was 1×10⁸ conidia/mL, and incubation was at 35°C for 5-7 days.

여 생존율을 곡선으로 나타내고, 각 군의 평균생존일수는 Log-rank test로 검정하였다. 체중에 대한 분석은 따로 실시하지 않았다, 모든 통계학적인 분석은 통계 패키지인 SPSS 10.1 K를 이용하였으며, 유의성은 $P < 0.05$ 이하에서 인정하였다.

결 과

In vitro 항진균 효력시험

먼저 시험의 신뢰성을 확인하기 위한 대표균주인, *C. krusei* (ATCC 6258)에서 양성대조물질 처리시 적정수준의 MIC₈₀ (amphotericin B: 0.5 μg/mL, NCCLS guideline: 0.5-2.0 μg/mL 및 fluconazole: 32 μg/mL, NCCLS guideline: 16-64 μg/mL)이 관찰되어 NCCLS guideline을 만족하였기에 시험의 신뢰성을 확보하였음을 알 수 있었다. KAF-200522와 KAF-200522-HCl은 *C. albicans* (36082, ATCC), *C. albicans* (MYA-573, ATCC) 및 *A. fumigatus*에 대하여 MIC₈₀이 ≤0.0156 μg/mL를 보였고, *C. krusei*에는 KAF-200522는 0.125 μg/mL, KAF-200522-HCl은 0.25 μg/mL이 확인되었다. 이는 KAF-200522과 KAF-200522-HCl이 양성대조물질 중의 하나인 amphotericin B와 비교하여 *C. albicans* (36082, ATCC)에는 약 8배 이상, *C. albicans* (MYA-573, ATCC)와 *A. fumigatus*에는 약 16배 이상, *C. krusei*에는 KAF-200522이 4배, KAF-200522-HCl이 2배 낮은 것을 알 수 있었다. 또한 KAF-200522과 KAF-200522-HCl은 fluconazole과 비교하여 *C. albicans* (36082, ATCC)에는 약 8배 이상, *C. albicans* (MYA-573, ATCC)와 약 8,200배 이상, *A. fumigatus*에는 약 4,100배 이상, *C. krusei*에는 KAF-200522이 256배, KAF-200522-HCl이 128배 낮은 것을 확인하였다(Table 2).

또한 추가시험으로 KAF-20052를 이용한 *T. mentagrophytes*와 *T. rubrum* 항진균 효력시험의 신뢰성을 확보하기 위한 양성대조물질의 적정수준의 MIC₈₀로 amphotericin B는 각 1과 0.5 μg/mL (historical data: 0.125-1 μg/mL), fluconazole은 두 균주 모두 2 μg/mL (historical data: 2-4 μg/mL), terbinafin는 두 균주 모두 ≤0.0078 μg/

Table 3. *In vitro* activities of KAF-200522 and other antifungal agents against dermatophytes

Test article	MIC ₈₀ (μg/mL)	
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
	KCTC 6085	KCCM 60450
KAF-200522	≤0.0156	≤0.0156
Amphotericin B	1	0.5
Fluconazole	2	2
Terbinafin	≤0.0078	≤0.0078

a) MIC₈₀s were determined by the broth microdilution method with RPMI 1640 medium, the inoculum size was 1×10⁸ conidia/mL, and incubation was at 35°C for 5-7 days.

mL (historical data: ≤0.0078-0.0313 μg/mL)로 나왔기에 신뢰성있는 시험으로 확인되었다. KAF-200522는 *T. mentagrophytes*과 *T. rubrum*에서 MIC₈₀이 각 0.0156 μg/mL 이하로 관찰되었고, 이는 *T. mentagrophytes*균에서 amphotericin B와는 약 64배 이상, fluconazole과는 약 128배 이상 낮은 결과를, *T. rubrum*균에서는 amphotericin B와는 약 32배 이상, fluconazole과는 약 128배 이상 낮은 결과를 나타냈었으나, terbinafin과 비교하여 두 균주 모두에서 약 2배 높은 것으로 확인되었다(Table 3).

In vivo 항진균 효력시험

일반증상: *A. fumigatus* 균 감염에 의한 일반증상으로는 선화(회전), 연변, 설사, 피모거침, 하복부의 오염 등을 포함하여 야위, 쇠약, 빈사 및 사망이 관찰되었다.

사망동물, 생존률 및 평균생존일수: KAF-200522의 항진균 효력시험에서 부형제대조군은 감염 후 4, 6, 및 9 일째 사망동물이 관찰되었고, 총 7마리 중 2마리가 생존하였으나 체중변화에서의 이상이 관찰되지 않아 균 감염 여부가 제대로 이루어지지 않은 것으로 판단하여 결과처리에서 제외하였다(체중 data 미첨부). 10 mg/kg/day 투여군은 감염 후 5, 6, 8일 및 12일째에 사망동물이 관찰되었고 7마리 전례 사망하였다. 25 mg/kg/day 투여군은 감

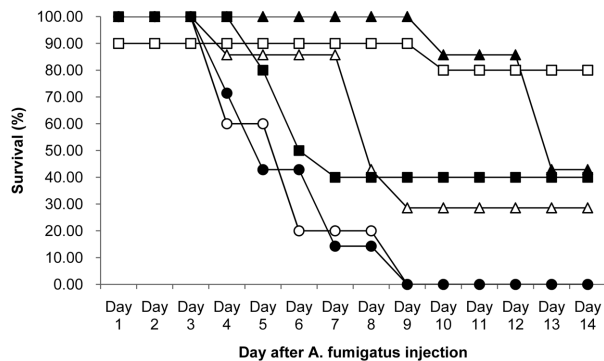


Figure 1. Survival curves for mice infected with *A. fumigatus* strain (16424, ATCC) and treated with various doses of KAF-200522 for 5 consecutive days by oral administration route. ○, Vehicle (PEG 400) treated control; ●, KAF-200522 at 10 mg/kg; △, KAF-200522 at 25 mg/kg; ▲, KAF-200522 at 50 mg/kg; □, KAF-200522 at 100 mg/kg, ■, amphotericin B given by i.p at 3 mg/kg.

염 후 4, 8, 및 9일째 사망동물이 관찰되었고 총 7마리 중 2마리가 생존하였다. 50 mg/kg/day 투여군은 감염 후 10일 및 13일째 사망동물이 관찰되었고 총 7마리 중 3마리가 생존하였다. 100 mg/kg/day 투여군은 감염 후 1일 및 10일째 사망동물이 관찰되었고, 총 10마리 중 8마리가 생존하였다. 양성대조물질군인 amphotericin B 투여군은 감염 후 4, 5, 및 6일째 사망동물이 관찰되었고 총 10마리 중 4마리가 생존하였다.

평균생존일수는 부형제대조군에서 5.8일이었고, 10, 25, 50 및 100 mg/kg/day 투여군은 각 6.3, 9.3, 13.0일 및 13.7일로 나타났고, 50 mg/kg/day 투여군과 100 mg/kg/day 투여군은 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를($P<0.001$, $P<0.01$) 나타내었다. 양성대조물질투여군은 6.5일로 나타났(Figure 1, Table 4).

KAF-200522-HCl의 항진균 효력시험에서 부형제대조군은 감염 후 5, 6, 및 7일째 사망동물이 관찰되었고 6마리 전례 사망하였다. 0.4 mg/kg/day 투여군에서는 감염 후 4, 5, 6, 및 7일째 사망동물이 관찰되었고 6마리 전례 사망하였다. 2 mg/kg/day 투여군에서는 감염 후 5, 6, 8, 및 12일째 사망동물이 관찰되었고 6마리 전례 사망하였다. 10 mg/kg/day 투여군에서는 감염 후 6, 7, 8, 11, 및 12

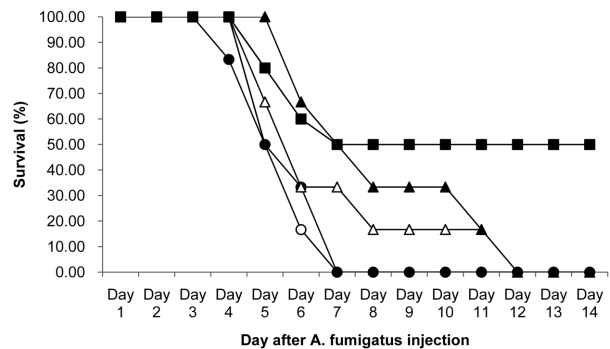


Figure 2. Survival curves for mice infected with *A. fumigatus* strain (16424, ATCC) and treated with various doses of KAF-200522-HCl for 5 consecutive days by oral administration route. ○, Vehicle (0.5% MC) treated control; ●, KAF-200522-HCl at 0.4 mg/kg; △, KAF-200522-HCl at 2 mg/kg; ▲, KAF-200522-HCl at 10 mg/kg; ■, amphotericin B given by i.p at 3 mg/kg.

일째 사망동물이 관찰되었고 6마리 전례 사망하였다. 양성대조물질군인 amphotericin B 투여군은 감염 후 5, 6, 및 7일째 사망동물이 관찰되었고 총 10마리 중 5마리가 생존하였다.

평균생존일수는 부형제대조군에서 4.7일이었고, 0.4, 2 및 10 mg/kg/day 투여군은 각 4.7, 6.0, 7.3 및 9.4일로 나타났고, 10 mg/kg/day 투여군은 부형제대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를($P<0.05$) 나타내었다. 양성대조물질투여군은 9.4일로 나타났고, 부형제대조군에 비해 유의한 증가를($P<0.05$) 나타내었다(Figure 2, Table 4).

고 찰

대부분 시장에서 통용되는 항진균제들은 좁은 스펙트럼, 부작용, 약제내성, 낮은 침투성 등의 한계성을 나타내고 있다. 1970년대부터 개발이 되어온 azole계의 항진균제들 중 가장 시장성이 큰 fluconazole은 *C. albicans* 돌연변이체 균주와 *A. fumigatus*에 대하여 내성을 갖고 있고(Cornely OA et al., 2003), 최근 allylamine계에 속하는 terbinafine이 등장하였으나 오심, 설사, 복통 등 여러 가지 부작용이 보고 되고 있다(Gupta AK et al., 1994).

Table 4. Mean survival times (MST) of *A. fumigatus* -infected ICR mice for 14 days after 5 days repeated oral administrations of KAF-200522 and KAF-200522-HCl

Test article (mg/kg)	Vehicle (PEG400)		KAF-200522			Amphotericin B
	0	10	25	50	100	3
MST (days)±S.E.M	5.8±0.92	6.3±1.06	9.3±1.36	13.0±0.53 ^{##}	13.7±0.00 [*]	6.5±0.70
Test article (mg/kg)	Vehicle (0.5 % MC)		KAF-200522-HCl			Amphotericin B
	0	0.4	2	10	3	
MST (days)±S.E.M	4.7±0.82	4.7±1.21	6.0±2.68	7.3±2.58 [*]	9.4±4.88 [*]	

[#] $P<0.01$ vs. PEG 400 treated group, ^{##} $P<0.001$ vs. PEG 400 treated group, ^{*} $P<0.05$ vs. 0.5 % MC treated group (The MST data were analyzed by Kaplan-Meier test).

이에 본 연구는 표재성 및 전신성 진균 감염 균주들에 광범위한 스펙트럼을 갖고 부작용 및 내성이 적은 항진균제 개발에 목적을 두었다.

KAF-200522는 한국화학연구원과 (주)캠온 전임상연구소에서 개발한 triazole계 항진균 활성 후보물질로서, azole계가 갖는 인체 독성을 경감시키기 위해 기존에 보고된 문헌을 토대로 하여 fluconazole 내성 균주에 강력한 활성을 확보하고 독성이 적은 항진균제를 만들고자 하는 목적으로 개발하였다.

KAF-200522는 본 연구소에서 실시한 랫드에서의 단회 경구투여 독성실험, 마우스에서의 2주 반복경구투여 독성실험 및 기니아피그를 이용한 국소독성실험에서 저독성 물질로 판명되었고, 안전성 약리시험 중 중추신경 및 심혈관계 영향 시험에서 특이한 이상이 관찰되지 않았다 (data not shown). 그러나 비글견을 이용한 약물동태 시험에서 KAF-200522의 경구투여에 따른 생체이용률이 낮은 것으로 나타났고, 이를 개선하기 위하여 KAF-200522에 염산염을 추가하여 생체이용률을 높인 KAF-200522-HCl을 추가 개발하여 수행하였다.

In vitro 시험 결과, KAF-200522와 KAF-200522-HCl은 *C. albicans* 중 fluconazole에 내성을 갖는 변형 균주인 ATCC 36082와 ATCC MYA-573에서 (Calvet and Yeaman, 1997) MIC₈₀가 0.0156 µg/mL 이하로 amphotericin B의 약 8배 이상의 항진균 효과를 보였다. 또한 이는 fluconazole과 비교하여 *C. albicans* (ATCC MYA-573) 균주에서 약 8,200배 이상의 민감도를 보인 것을 보아 fluconazole 내성 균주에서 본 시험물질이 우수한 항진균 활성을 가짐을 알 수 있었다. 또한 *A. fumigatus* 균에 대해서도 0.0156 µg/mL 이하의 MIC₈₀가 도출되었고, 이는 fluconazole의 약 4,100배 이상이며, amphotericin B의 약 16배 이상이었다. 대부분의 침습적 진균 감염은 *Candida* 나 *Aspergillus* 균들에 의해 발생한다. 따라서 본 시험물질이 침습적 감염에 대한 항진균 효과를 가짐을 알 수 있었다. 그리고 표재성 감염을 일으키는 대표적인 균주인 *Trichophyton* 속의 진균 중 *T. mentagrophytes*와 *T. rubrum* 이용한 배양 실험에서도 본 시험물질들은 MIC₈₀가 0.0156 µg/mL 이하로 관찰되었고, 이는 fluconazole에 비하여 약 128배 이상이었으며 amphotericin B에 비하여 약 32배 이상이었으므로, 본 시험물질이 표재성 감염균에서도 항진균 활성을 가져 넓은 스펙트럼을 나타내는 것으로 판단하였다. 그러나 terbinafin과 비교하여 MIC₈₀이 더 높았으므로 더 우수한 항진균 활성을 기대하기는 어려운 것으로 사료되었다. 이상의 결과로 볼 때 KAF-200522와 KAF-200522-HCl을 이용한 *in vitro* 실험은 대표적인 전신성 감염균 주들인 *C. albicans*, *C. krusei*, *A. fumigatus*와 표재성 감염균 주들인 *T. rubrum* 및 *T. mentagrophytes*에서 현재 가장 널리 임상에서 사용되고 있는 fluconazole

(Grant and Clissold, 1990)과 비교하여 우수한 항진균 활성 효과를 나타내었고, fluconazole에 내성을 갖는 균주인 *A. fumigatus*를 사용한 *in vivo* 실험에서 amphotericin B와 비교하여 우수한 항진균 효력이 있는 것으로 사료되었다.

위의 *in vitro* 실험에서 KAF-200522의 *A. fumigatus*에 대한 MIC₈₀이 amphotericin B보다 낮았음에도 불구하고 본 연구소에서 진행한 마우스에서의 KAF-200522 단회투여 생체이용률 분석시험에서 본 시험물질의 약물노출정도가 매우 낮은 것으로 관찰되었기 때문에 (data not shown), 마우스의 *A. fumigatus* 감염모델 실험에서 KAF-200522 투여군의 고용량으로서 양성대조물질인 amphotericin B의 3 mg/kg/day와 비교하여 약 33배에 많은 100 mg/kg/day를 설정하였다 그 결과 amphotericin B의 투여는 40% 생존율과 6.5일의 평균생존일수를 나타낸 반면, KAF-200522는 100 mg/kg/day 투여군에서 80% 생존율과 13.7일의 평균생존일수를 용량상관성 있게 나타내었는데, 일반증상에서 KAF-200522 투여군이 비정상적인 변화를 보이지 않았던 것과 본 연구소가 사전에 진행하였던 단회, 반복 독성시험에서 KAF-200522의 100 mg/kg의 독성학적 안전성을 고려할 때, 장기간 반복 투여 효력시험 및 독성시험을 추가로 진행한다면 시장에서의 효용성을 기대할 수 있을 것으로 사료되었다. KAF-200522-HCl은 용해도 증가에 기인하여 생체이용률의 증대가 예상되었으므로 KAF-200522의 투여량설정을 참고하여 최고투여량을 10 mg/kg/day로 설정하였다. 실험결과, KAF-200522의 100 mg/kg/day 투여군의 80% 생존율과 13.7일의 평균생존일수와 비교하여 KAF-200522-HCl 10 mg/kg/day 투여군은 전례 사망하였고 7.3일의 평균생존일수를 보였는데 이는 10배 낮은 투여량을 극복할만한 생체이용률의 증대가 나타나지 않는 것으로 사료되었다. 그리고 비록 amphotericin B 투여군의 생존율이 50%이었고 평균생존일수가 9.4일인 것에 비하여 KAF-200522-HCl 투여군의 항진균 활성 효과가 크지는 않았으나, 용량상관적인 항진균 효과가 관찰되었다.

종합적으로 *in vitro* 상에서 본 시험물질이 전신성 감염균주 뿐만 아니라 표재성 감염균주에 민감한 MIC와 넓은 스펙트럼을 가진 물질임을 예상할 수 있었다. 그리고 *in vivo* 연구에서도 대표적인 전신성 감염균주인 *A. fumigatus*균에서 본 시험물질의 경구투여에 의한 항진균 활성효과를 확인시켜주어 본 시험물질을 신규 차세대 저독성 항진균제로 개발할 가능성이 높다고 사료되었다. 그러나 KAF-200522의 *in vivo*상에서의 넓은 스펙트럼을 확인하기 위해서는 *Candida* 나 *Trichophyton* 속 균주들에 대한 추가 동물실험이 요구되었다. 또한 기존의 azole계 항진균제들의 간 독성과 같은 임상에서의 부작용이나 짧은 반감기 및 내성발현의 문제점들을 본 시험물질에서 스

크리닝 하기 위해서는 실험동물에서의 추가 약물동태 실험이나 장기 반복독성시험 및 임상 병리와 조직병리학적 검사가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 실험은 지식경제부의 중기거점개발사업의 일환으로 수행되었기에(과제번호: 10027892) 감사드립니다.

참고문헌

- Andriole, V.T. (2000) Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *J Antimicrob Chemother.* 44, 151-162.
- Arathoon, E.G. (2001) Clinical efficacy of echinocandin antifungals. *Curr Opin Infect Dis.* 14, 685-691.
- Butler, M.S. (2004) The role of natural product chemistry on drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67, 2131-2153.
- Butler, M.S. (2005) Natural products to drugs: natural product derived compounds on clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 22, 162-195.
- Calvet, H.M., Yeaman, M.R., Filler, S.G. (1997) Reversible fluconazole resistance in *Candida albicans*: a potential *in vitro* model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 535-539.
- Chomnawang, W.T., Surassmo, S., Nukoolkarn, V.S., Gritasnapan, W. (2005) Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 101, 330-333.
- Cornely, O.A., Ullmann, A.J., Carthaus, M. (2003) Evidencebased assessment of primary antifungal prophylaxis in patients with hematologic malignancies. *Blood.* 101, 3365-3372.
- Fromtling, R.A. (1997) Recent trends in the discovery, development and evaluation of antifungal agents. *J. R. Prous Science Publisher.* pp 223.
- Georgopapadakou, N.H., Walsh, T.J. (1994) Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science.* 264, 371-373.
- Grant, S.M., Clissold, S.P. (1990) Fluconazole. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial and systemic mycoses. *Drugs.* 39(6), 877-916.
- Gupta, A.K., Sauder, D.N., Shear, N.H. (1992) Antifungal agents: An overview. Part II. *J am Acad Dermatol.* 206, 2-7.
- Konishi, M., Nishio, M., Saitoh, K., Miyaki, T., Oki, T., Kawaguchi, H. (1989) Cispentacin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation, physico-chemical properties and structure. *J. Antibiotics.* 42, 1749-1755.
- Pfaller, M.A., Bartlett, M.S., Espinel-Ingroff, A. (1997) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi Proposed standard. *NCCLS.* 18(13), 1-21.
- Ruhnke, M., Schmidt-Westhausen, A., Engelmann, E., Trautmann. (1996) Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for *Candida albicans* isolates and correlation with response to fluconazole therapy. *J. Clin. Microbiol.* 3208-3211.
- Shadomy, S., Shadomy, H.J., Wagmer, G.E. (1997) Antifungal compounds, In Siegel, M. R. and Hughl, D. S. (eds.), *Dekker.* pp 437.
- Tawara, S., Matsumoto, S., Hirose, T., Matsumoto, Y., Nakamoto, S., Mitsuno, M. (1989) *In vitro* antifungal synergism between pyrrolnitrin and clotrimazole. *Med. Mycol.* 202-210.
- Tortorano, A.M., Viviani, M.A., Barchiesi, F., Arzeni, D., Rigoni, A.L., Cogliati, M. (1989) Comparison of three methods for testing azole susceptibilities of *Candida albicans* strains isolated sequentially from oral cavities of AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 1578-1583.
- Walsh, T.J., Hiemenz, J.W., Seibel, N.L. (1989) Amphotericin B lipid complex for invasive fungal infections: analysis of safety and efficacy in 556 cases. *Clin Infect Dis.* 26, 1383-1396.