



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0063188
(43) 공개일자 2023년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/137 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 31/138 (2006.01) A61K 31/155 (2006.01)
A61K 8/41 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/137 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0148172

(22) 출원일자 2021년11월01일

심사청구일자 2021년11월01일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

권용태

서울특별시 종로구 대학로 103 융합관 408호

이윤지

서울특별시 종로구 대학로 103 융합관 408호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영철, 김민정, 김 순 영

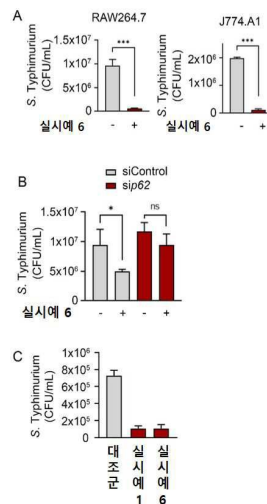
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 항균용 조성물

(57) 요약

본 명세서는 항균용 조성물, 세균 감염성 억제용 조성물, 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료용 조성물, 세균 감염에 의한 염증 예방, 완화 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 p62 단백질에 특이적으로 결합함으로써 p62를 활성화시켜 세균 감염에 의해 억제된 오토파지 활성을 증가시키는 바, 다양한 세균에 대하여 항균 활성을 가지고, 세균의 감염성을 억제할 수 있으며, 세균성 감염병 및 세균 감염에 따른 염증을 예방, 완화 또는 치료할 수 있는 우수한 효과가 있어, 상기 조성물은 치료제, 식품, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 소독제, 화장품 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/138 (2013.01)
A61K 31/155 (2013.01)
A61K 8/411 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61Q 17/005 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

정찬훈

서울특별시 종로구 대학로 103 융합관 408호

조은경

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호

김진경

대전광역시 서구 복수서로 15, 110동 404호

김영재

대전광역시 서구 청사로 254, 107동 401호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711119463
 과제번호 2020R1A5A1019023
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 집단연구지원(R&D)
 연구과제명 세포 분해 생물학 연구단
 기 여 율 1/3
 과제수행기관명 서울대학교
 연구기간 2020.07.01 ~ 2021.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711135259
 과제번호 2020R1A5A1019023
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 집단연구지원(R&D)
 연구과제명 세포 분해 생물학 연구단
 기 여 율 1/3
 과제수행기관명 서울대학교
 연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711130480
 과제번호 2021R1A2B5B03002614
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
 연구과제명 N-데그론 분해 경로의 기능과 기작
 기 여 율 1/3
 과제수행기관명 서울대학교
 연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

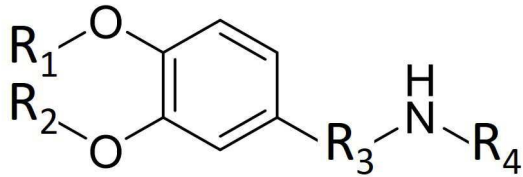
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 항균용 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1 은 $-(CH_2)_{n1}-R_a$ 이고, $n1$ 은 1 또는 2의 정수이고, R_a 는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

R_2 는 $-(CH_2)_{n2}-R_b$ 이고, $n2$ 는 1 내지 3의 정수이고, R_b 는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

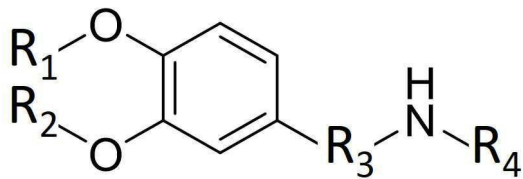
R_3 은 $-CH_2-$, $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 또는 $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-NH-CH_2-CH_2-$ 이고;

R_4 는 $-CH_2-CH_2-OH$, $-C(=NH)-NH_2$, $-CH(CH_3)_2$ 또는 $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-OH$ 이다.

청구항 2

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균 감염성 억제용 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1 은 $-(CH_2)_{n1}-R_a$ 이고, $n1$ 은 1 또는 2의 정수이고, R_a 는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

R_2 는 $-(CH_2)_{n2}-R_b$ 이고, $n2$ 는 1 내지 3의 정수이고, R_b 는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

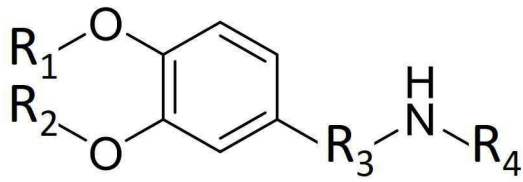
R_3 은 $-CH_2-$, $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 또는 $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-NH-CH_2-CH_2-$ 이고;

R_4 는 $-CH_2-CH_2-OH$, $-C(=NH)-NH_2$, $-CH(CH_3)_2$ 또는 $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-OH$ 이다.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료용 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1 은 $-(CH_2)_{n1}-R_a$ 이고, $n1$ 은 1 또는 2의 정수이고, R_a 는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

R_2 는 $-(CH_2)_{n2}-R_b$ 이고, $n2$ 는 1 내지 3의 정수이고, R_b 는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

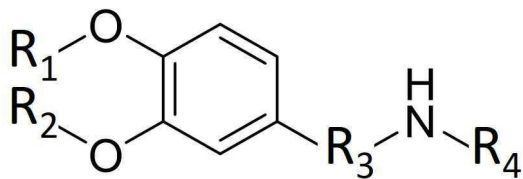
R_3 은 $-CH_2-$, $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 또는 $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-NH-CH_2-CH_2-$ 이고;

R_4 는 $-CH_2-CH_2-OH$, $-C(=NH)-NH_2$, $-CH(CH_3)_2$ 또는 $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-OH$ 이다.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균 감염에 의한 염증 예방, 완화 또는 치료용 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R_1 은 $-(CH_2)_{n1}-R_a$ 이고, $n1$ 은 1 또는 2의 정수이고, R_a 는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

R_2 는 $-(CH_2)_{n2}-R_b$ 이고, $n2$ 는 1 내지 3의 정수이고, R_b 는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

R_3 은 $-CH_2-$, $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-$ 또는 $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-NH-CH_2-CH_2-$ 이고;

R_4 는 $-CH_2-CH_2-OH$, $-C(=NH)-NH_2$, $-CH(CH_3)_2$ 또는 $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-OH$ 이다.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 그람 음성균 또는 그람 양성균에 대하여 항균 활성을 갖는, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 그람 음성균은 살모넬라 종(*Salmonella* species), 예르시니아 종 (*Yersinia* species), 대장균 종 (*Escherichia* species), 클라미디아 종(*Chlamydia* species), 잔토모나스 종(*Xanthomonas* species), 어위니아 종(*Erwinia* species), 슈도모나스 종(*Pseudomonas* species) 및 랄스토니아 종(*Ralstonia* species)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 그람 양성균은 미코박테리움 종(*Mycobacterium* species), 연쇄상구균 종(*Streptococcus* species), 포도상구균 종(*Staphylococcus* species), 장내구균 종(*Enterococcus* species) 및 락토바실러스 종(*Lactobacillus* species)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 항생제 내성을 갖는 세균에 대하여 항균 활성을 갖는, 조성물.

청구항 9

제3항에 있어서,

상기 세균성 감염병은 폐렴, 식중독, 이질, 녹농균 감염, 농가진, 화농성 질환, 급성 피부염, 방광염, 질염, 뇌막염, 장티푸스와 파라티푸스, 파상풍, 라임병, 록키산 홍반열, 콜레라, 한센병, 브루셀라증, 에를리키아병, 큐열, 성홍열, 리스테리아증, 보툴리누스 중독증, 랩토스피라증, 페스트, 발진티푸스, 균혈증 및 심내막염 장염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 약학, 식품 또는 화장품 조성물인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서는 항균용 조성물, 세균 감염성 억제용 조성물, 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료용 조성물, 세균 감염에 의한 염증 예방, 완화 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세균은 미생물의 한 종류로, 핵막이 없는 대부분의 원핵생물이 여기에 속한다. 세균은 일정한 크기로 자라면 둘로 분열되어 각각 독립적으로 성장하는 방식으로 증식되며 환경이 적절하면 매우 빠르게 번식한다. 감염은 세균을 포함한 질병을 일으킬 가능성이 있는 미생물이 사람이나 동식물 등 숙주의 조직 표면에 부착하거나 또는 내부에 침입하여 증식이 일어난 상태를 말한다. 감염은 세균의 증식력과 숙주가 갖는 저항력의 상호 관계에 의해서 일어난다.

[0003] 항균제는 미생물의 생성을 방지하거나 번식을 억제시키는 물질로서, 인체에 침입한 세균에 작용하여 감염 예방, 억제 내지 치료 효과를 나타낸다. 세균의 성장과 번식을 억제하는 항균제를 정균제, 세균을 직접 죽이는 항균제를 살균제로 구분한다. 대부분의 항균제는 세균이 사람의 세포와 다른 부분에 특이적으로 작용하여 효과를 나타내는데 세균의 어느 부분을 저해하는가는 항균제의 종류에 따라 다른데, 작용기전을 기준으로 세포벽 합성 저해제, 세포막 기능 저해제, 단백질 합성 저해제, 핵산 합성 저해제, 엽산 합성 저해제로 나눌 수 있다.

[0004] 한편, 항균제 중에서 특히 미생물에 의해 생산된 2차 대사 산물에서 유래한 경우를 항생제라고 일컫는데, 이는 매우 낮은 농도에서 미생물을 죽이거나 성장을 저해하고, 병원균에 의한 감염증을 치료하는 약물로서 감염 증세에 뛰어난 효능을 보이기 때문에 전 세계적으로 사용되고 있다. 항생제라는 용어는 1940년대 왁스만(Waksman)에 의해 처음 사용되기 시작한 것으로, 초기에는 당시에 주로 사용되던 합성물질 설펜아미드류(sulfonamide)와 페니실린 곰팡이(*Penicillium* sp.)에 의해 생산되는 페니실린(Penicillin)을 구별하기 위해 사용되었다. 그 후 항균활성(antimicrobial activity)을 나타내는 많은 물질들이 발견되고 합성됨에 따라 항생제의 의미를 일의적으로 정의하는 것이 어려워지고 있는데, 현재는 일반적으로 항생제가 낮은 농도에서 효과적으로 항생활성을 갖는 천연, 반합성 또는 합성의 화합물을 의미하는 것으로 받아들여지고 있다.

[0005] 하지만, 항생제의 남용으로 인하여 병원균 스스로 저항할 수 있는 힘을 길러 그 내성이 점차로 강해져 어떤 항생제에도 저항할 수 있게 된 일명 슈퍼박테리아(super bacteria)가 1996년 일본에서 처음 등장함에 따라 항생제

의 효과적인 사용에 문제가 발생하였다. 항생제의 경우 세균을 죽이는 작용으로 인해 세균의 돌연변이를 유도하게 되고, 이러한 돌연변이 형성과정에서 항생제 내성을 유발하는 유전자를 만들게 되어, 약제내성 돌연변이 세균이 만들어질 수 있으며, 이 내성균들은 내성 유전자를 다른 세균들에게 전달시켜 주어 내성균의 확대는 신속하게 이루어질 수 있다. 이러한 슈퍼박테리아는 대표적으로 MRSA(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus)와 더욱 강한 항생제 내성을 가진 VRSA(Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus) 및 VRE(Vancomycin-resistant Enterococci)를 들 수 있고, 항생제 내성 세균의 경우 항생제에 내성을 가지고, 내성은 점차로 강해져 어떤 항생제에도 저항할 수 있게 된다. 이에, 기존에 보고된 항생제에 대한 내성을 갖는 물질 또는 약제의 개발 필요성이 더욱 강조되고 있는 실정이다. 즉, 기존 항균제 내지 항생제를 대체할 수 있는 새로운 작용 메커니즘을 가진 약제의 개발에 관심이 집중되고 있다. 따라서 새로운 활성물질의 개발을 위한 표적 특이적인 탐색방법 및 새로운 자원의 확보가 요구되고 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 새로운 작용 메커니즘을 통해 세균에 대해 항균활성을 가지는 화합물을 연구하던 중, 본 발명에 따른 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물이 새로운 메커니즘으로 다양한 세균에 대해 항균활성을 가짐을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

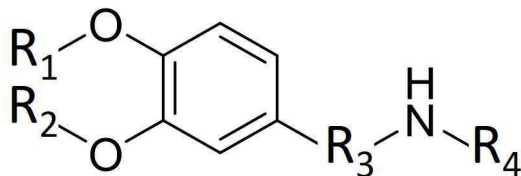
발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 새로운 작용 메커니즘에 의해 항균 활성을 갖는 물질을 개발하기 위한 연구를 수행하였다. 연구 수행 결과, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 가능한 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물이 p62에 결합하여 이를 활성화함으로써 다양한 세균에 대하여 항균 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0009] 따라서, 일 측면에서, 본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 항균용 조성물을 제공하는 것이다:

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 화학식 1에서,

[0013] R₁은 -(CH₂)_{n1}-R_a이고, n₁은 1 또는 2의 정수이고, R_a는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

[0014] R₂는 -(CH₂)_{n2}-R_b이고, n₂는 1 내지 3의 정수이고, R_b는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

[0015] R₃은 -CH₂-, -O-CH₂-CH(OH)-CH₂- 또는 -O-CH₂-CH(OH)-CH₂-NH-CH₂-CH₂-이고;

[0016] R₄는 -CH₂-CH₂-OH, -C(=NH)-NH₂, -CH(CH₃)₂ 또는 -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH이다.

[0017] 다른 측면에서, 본 발명의 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균 감염성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

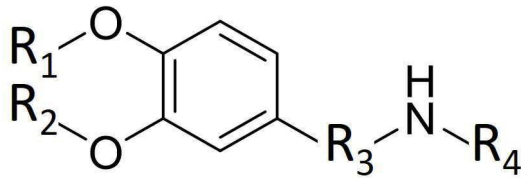
[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명의 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 발명의 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균 감염에 의한 염증 예방, 완화 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 발명의 일 측면은, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 항균용 조성물을 제공한다:

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 상기 화학식 1에서,

[0024] R₁은 -(CH₂)_{n1}-R_a이고, n₁은 1 또는 2의 정수이고, R_a는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

[0025] R₂는 -(CH₂)_{n2}-R_b이고, n₂는 1 내지 3의 정수이고, R_b는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

[0026] R₃은 -CH₂-, -O-CH₂-CH(OH)-CH₂- 또는 -O-CH₂-CH(OH)-CH₂-NH-CH₂-CH₂-이고;

[0027] R₄는 -CH₂-CH₂-OH, -C(=NH)-NH₂, -CH(CH₃)₂ 또는 -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH이다.

[0028] 본 발명의 다른 측면은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균 감염성 억제용 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균 감염에 의한 염증 예방, 완화 또는 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 일 측면에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 p62 단백질에 특이적으로 결합함으로써 p62를 활성화시켜 세균 감염에 의해 억제된 오토파지 활성을 증가시키는 바, 다양한 세균에 대하여 항균 활성을 가지고, 세균의 감염성을 억제할 수 있으며, 세균성 감염병 및 세균 감염에 따른 염증을 예방, 완화 또는 치료할 수 있는 우수한 효과가 있어, 상기 조성물은 치료제, 식품, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 소독제, 화장품 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 Raw264.7 대식세포 및 HeLa 세포를 장티푸스균(*Salmonella* Typhimurium)으로 감염시켰을 때의 p62 및 LC3 발현량 변화, 오토파지 관련 유전자의 발현량 변화, 오토파지 유전자 발현 억제 시의 장티푸스균(*S. Typhimurium*)의 감염성 변화를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 HeLa 세포를 대장균(*E. coli*) 포함 장티푸스균(*S. Typhimurium*)으로 감염시켰을 때, p62, NBR1, 유티누린, NDP52, TAX1BP1 단백질의 변화, p62 발현 억제 시의 장티푸스균(*S. Typhimurium*)의 감염성 변화를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물을 대식세포 RAW264.7 및 HeLa 세포에 처리 시의 LC3 및 p62 발현 변화를 면역블롯팅으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물을 장티푸스균(*S. Typhimurium*)에 감염된 J774.A1 및 RAW264.7 대식세포에 처리 시의 감염성 변화를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물을 장티푸스균(*S. Typhimurium*)에 감염된 HeLa 세포 및 Raw 264.7 세포에 처리 시의 LC3 발현량 변화, p62의 모집 유도 여부, 박테리오파지 유도 여부 및 장티푸스균(*S. Typhimurium*)에 감염된 마우스에 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물 투여 시 감염에 의해 유발되는 염증의 완

화 여부를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 측면에 따른 화합물을 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 감염된 마우스에 처리 시 콜로니 형성 분석 결과, 공동화 분석 및 LC3B 발현량 분석 결과, 투과 저자 현미경 촬영 사진, Atg7 녹아웃 마우스에서의 콜로니 형성 분석 결과, 단기 감염 모델에서의 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 측면에 따른 화합물을 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 감염된 마우스에 처리 시 폐 조직 콜로니 형성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 8a 및 8b는 본 발명의 일 측면에 따른 화합물을 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*)에 감염된 Raw264.7 및 J774A.1 대식세포에 처리 시 콜로니 형성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 9a 내지 9c는 본 발명의 일 측면에 따른 화합물을 장티푸스균(*Salmonella Typhimurium*)에 감염된 Raw264.7 및 J774A.1 대식세포에 처리 시 콜로니 형성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일 측면에 따른 화합물을 항생제 내성(multidrug-resistant, MDR)을 가진 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 감염된 마우스에 처리 시 콜로니 형성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 일 측면에 따른 화합물을 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 감염된 복막 대식세포(PM) 및 골수 유래 대식세포(BMDM)에 처리 시 IL6, IL1 β , Cxc15 및 TNF- α 의 발현량과 마우스에 처리시 TNF- α 발현량 분석 결과를 나타낸 도이다.

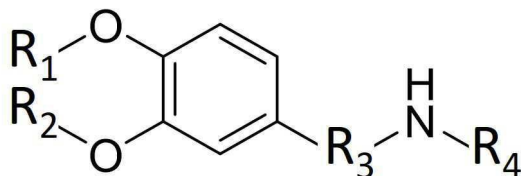
도 12a 및 12b는 본 발명의 일 측면에 따른 화합물을 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 감염된 마우스에 처리 시 폐 조직의 염증 상태를 H&E 염색하여 촬영한 사진(도 12a) 및 염증 조직의 면적을 비교한 그래프(도 12b)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 항균용 조성물을 제공한다.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R₁은 -(CH₂)_{n1}-R_a이고, n₁은 1 또는 2의 정수이고, R_a는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

R₂는 -(CH₂)_{n2}-R_b이고, n₂는 1 내지 3의 정수이고, R_b는 비치환 또는 플루오로로 치환된 페닐이고;

R₃은 -CH₂-, -O-CH₂-CH(OH)-CH₂- 또는 -O-CH₂-CH(OH)-CH₂-NH-CH₂-CH₂-이고;

R₄는 -CH₂-CH₂-OH, -C(=NH)-NH₂, -CH(CH₃)₂ 또는 -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-OH이다.

본 발명의 일 측면에서, 상기 화합물은 하기 1 내지 6의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다:

1) 2-((3,4-디페네톡시벤질)아미노)에탄-1-올,

2) (R)-1-(3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페녹시)-3-((2-히드록시에틸)아미노)프로판-2-올,

3) (R)-1-(2-((3-(3,4-비스(벤질옥시)페녹시)-2-히드록시프로필)아미노)에틸)구아니딘,

- [0048] 4) (R)-1-(4-(벤질옥시)-3-페네투시페녹시)-3-(이소프로필아미노)프로판-2-올,
- [0049] 5) (R)-1-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로폭시)페녹시)-3-(이소프로필아미노)프로판-2-올, 및
- [0050] 6) 2-(2-((3,4-비스(벤질옥시)벤질)아미노)에톡시)에탄-1-올.
- [0051] 본 발명의 일 측면에서, "염"은 "약학적으로 허용 가능한 염"일 수 있고, "약학적으로 허용 가능"이란 통상의 의약적 복용량(medicinal dosage)으로 이용할 때 상당한 독성 효과를 피함으로써, 동물, 더 구체적으로는 인간에게 사용할 수 있다는 정부 또는 이에 준하는 규제 기관의 승인을 받을 수 있거나 승인 받거나, 또는 약전에 열거되거나 기타 일반적인 약전에 기재된 것으로 인지되는 것을 의미한다.
- [0052] 본 발명의 일 측면에서, "약학적으로 허용 가능한 염"은 약학적으로 허용 가능하고 모 화합물(parent compound)의 바람직한 약리 활성을 갖는 본 발명의 일측면에 따른 염을 의미한다. 상기 염은 (1) 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등과 같은 무기산으로 형성되거나; 또는 아세트산, 프로파이온산, 핵사노산, 시클로헥테인프로피온산, 글라이콜산, 피루브산, 락트산, 말론산, 숙신산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-히드록시벤조일)벤조산, 신남산, 만델산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 1,2-에테인-디설폰산, 2-히드록시에테인설폰산, 벤젠설폰산, 4-클로로벤젠설폰산, 2-나프탈렌설폰산, 4-톨루엔설폰산, 캄페르설폰산, 4-메틸바이시클로 [2,2,2]-oct-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵톤산, 3-페닐프로파이온산, 트리메틸아세트산, tert-부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 글루탐산, 히드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 뮤콘산과 같은 유기산으로 형성되는 산 부가염(acid addition salt); 또는 (2) 모 화합물에 존재하는 산성 프로톤이 치환될 때 형성되는 염을 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일 측면에서, "입체 이성질체"는 특히 광학 이성질체(optical isomers)(예를 들면, 본래 순수한 거울상 이성질체(essentially pure enantiomers), 본래 순수한 부분 입체 이성질체(essentially pure diastereomers) 또는 이들의 혼합물)뿐만 아니라, 형태 이성질체(conformation isomers)(즉, 하나 이상의 화학 결합의 그 각도만 다른 이성질체) 또는 기하 이성질체(geometric isomers)(예컨대, 시스-트랜스 이성질체)를 포함한다.
- [0054] 본 발명의 일 측면에서, "본래 순수(essentially pure)"란, 예컨대 거울상 이성질체 또는 부분 이성질체와 관련하여 사용한 경우, 거울상 이성질체 또는 부분 이성질체를 예로 들 수 있는 구체적인 화합물이 약 90% 이상, 구체적으로 약 95% 이상, 보다 구체적으로 약 97% 이상 또는 약 98% 이상, 보다 더 구체적으로 약 99% 이상, 보다 더욱 더 구체적으로 약 99.5% 이상(w/w) 존재하는 것을 의미한다.
- [0055] 본 발명의 일 측면에서, "수화물(hydrate)"은 물이 결합되어 있는 화합물을 의미하며, 물과 화합물 사이에 화학적인 결합력이 없는 내포 화합물을 포함하는 광범위한 개념이다.
- [0056] 본 발명의 일 측면에서, "용매화물"은 용질의 분자나 이온과 용매의 분자나 이온 사이에 생긴 고차의 화합물을 의미한다.
- [0057] 본 발명의 일 측면에서, 상기 조성물은 p62 활성화에 의해 항균 활성을 갖는 것일 수 있고, 또는 p62 활성화 및 박테리오파지 유도에 의해 항균 활성을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 p62에 결합하여 p62의 활성을 증가시킴으로써 항균 활성을 갖는 것일 수 있고, 보다 구체적으로 상기 조성물은 p62에 결합하여 p62의 활성을 증가시킴으로써 박테리오파지를 유도하여 항균 활성을 갖는 것일 수 있으며, 보다 더 구체적으로 상기 조성물은 p62에 결합하여 p62의 활성을 증가시킴으로써 선택적 오토파지를 통해 분해성 플렉스를 향상시켜 박테리오파지를 유도하여 항균 활성을 갖는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 세균 감염에 의해 LC3의 발현 및 이의 지질화(LC3-II)가 감염되어 오토파지 활성이 감소하고(실험예 1) p62 발현 억제 시 세균의 감염성에 큰 영향을 끼치는바(실험예 2), 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 p62에 결합하는 p62 활성화제로서, 상기 p62를 활성화 시킴과 동시에 선택적 오토파지를 통해 분해성 플렉스를 향상시키고(실험예 3), 세균의 감염성을 억제하며(실험예 4), 박테리오파지를 유도하고 세균 감염에 의한 염증을 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다(실험예 5).
- [0058] 본 발명의 일 측면에서, 상기 조성물은 세균의 종류에 있어서 비특이적으로 항균 활성을 갖는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 조성물은 그람 음성균 또는 그람 양성균에 대하여 항균 활성을 갖는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 그람 음성균은 살모넬라 종(*Salmonella* species), 예르시니아 종(*Yersinia* species), 대장균 종(*Escherichia* species), 클라미디아 종(*Chlamydia* species), 잔토모나스 종(*Xanthomonas* species), 어위니아 종(*Erwinia* species), 슈도모나스 종(*Pseudomonas* species) 및 랄스토니아 종(*Ralstonia* species)으로 이루어

진 균으로부터 선택된 하나 이상일 수 있고, 보다 더 구체적으로, 장티푸스균(*Salmonella Typhimurium*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 예르시니아 슈도튜버쿨러시스(*Yersinia pseudotuberculosis*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 대장균(*Escherichia coli*), 클라미디아 종(*Chlamydia species*), 잔토모나스 캄페스트리스(*Xanthomonas campestris*), 슈도모나스 시링가에(*Pseudomonas syringae*) 및 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상일 수 있고, 보다 더욱더 구체적으로, 상기 조성물은 장티푸스균(*Salmonella Typhimurium*)에 대해 항균 활성을 갖는 것일 수 있다. 또는 보다 구체적으로, 상기 그람 양성균은 미코박테리움 종(*Mycobacterium species*), 연쇄상구균 종(*Streptococcus species*), 포도상구균 종(*Staphylococcus species*), 장내구균 종(*Enterococcus species*) 및 락토바실러스 종(*Lactobacillus species*)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상일 수 있고, 보다 더 구체적으로, 상기 조성물은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 및 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상에 대해 항균 활성을 갖는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 장티푸스균(*Salmonella Typhimurium*), 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 또는 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*)에 감염된 세포 또는 마우스에 처리 시 세포 또는 마우스에서 번식한 세균이 생성한 콜로니 개수가 대조군에 비하여 감소하는바, 그람 음성균 또는 그람 양성균에 대해 우수한 항균 효과가 있음을 알 수 있었다(실험예 6).

[0059] 본 발명의 일 측면에서, 상기 조성물은 감염된 세균의 증식 또는 성장을 음성 대조군에 비하여 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상 또는 90% 이상 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0060] 본 발명의 일 측면에서, 상기 조성물은 항생제 내성을 갖는 세균에 대하여 항균 활성을 갖는 것일 수 있다. 상기 항생제는 이소니아지드(Isoniazid, INH), 리파펜틴(Rifapentin, RFP), 스트렙토마이신(Streptomycin, SM), 에탐부톨(Ethambutol, EMB), 프로티온아미드(Prothionamide, PTH), 사이클로세린(Cycloserine, CS), 오픈록사신(Ofloxacin, OFX), 피라진아미드(Pyrazinamide, PZA), 리파부틴(Rifabutin, RBT), 모시플록사신(Moxifloxacin, MXF) 및 레보플록사신(Levofloxacin, LEV)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 상기 조성물은 새로운 작용 메커니즘, 구체적으로 p62 활성화에 따른 박테리오파지 유도에 의한 항균 활성을 가져, 기존의 항생제에 의해 내성을 갖게 된 세균에 대해서도 항균 활성을 가지며, 상기 세균이 저항성을 갖는 항생제의 종류는 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 조성물은 항생제 내성을 갖는 세균 감염 시, 상기 세균의 증식 또는 성장을 음성 대조군에 비하여 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상 또는 90% 이상 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 항생제 내성을 가진 결핵균에 감염된 마우스에 본 발명의 일 측면에 따른 화합물을 투여 시에도 마우스 폐에서 생성된 결핵균의 콜로니 개수가 대조군에 비해 감소하였는바(실험예 7), 항생제 내성을 갖는 세균에 대해서도 우수한 항균 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0061] 본 발명의 일 측면에서, 상기 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물은 조성물 총 부피 기준으로 0.001 내지 1000 μM 인 것일 수 있다.

[0062] 본 발명의 일 측면에서, 상기 조성물의 투여량은 0.01 내지 5000 mg/kg/일일 수 있다.

[0064] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균 감염성 억제용 조성물을 제공한다. 상기 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물, 수화물, 항균 활성, 세균, 항생제 내성, 농도, 투여량 등에 대한 설명은 상술한 바와 같다.

[0065] 본 발명의 일 측면에서, "감염성"은 병원체가 숙주의 조직 속에 또는 표면에 정착하는 능력 또는 숙주의 조직에 감염을 일으킬 수 있는 성질 또는 능력을 말하며, 본 발명의 일 측면에 따른 세균 감염성은 병원체가 세균일 경우의 감염성을 의미하며, 세균 감염성은 세균에 감염된 세포 또는 개체에서 콜로니 형성 정도를 측정(CFU 분석)하여 판단할 수 있다. 상기 조성물은 상기 조성물 처리 전 또는 무처리군에 비하여 세균의 감염성을 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상 또는 90% 이상 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 세균 감염성 억제는 p62 활성화에 의한 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 장티푸스균에 감염된 HeLa, J774.A1 및 RAW264.7 대식세포에 본 발명의 일 측면에 따른 조성물을 처리 시 세균의 수가 감소하여 감염성이 억제되었으며, p62 억제 시 세균 감염성 억제 효과는 나타나지 않았는바, 본 발명의 일 측면

에 따른 조성물은 p62 활성화를 통해 세균 감염성을 억제하는 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다(실험예 4).

- [0067] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 화합물, 염, 입체 이성질체, 용매화물, 수화물, 항균 활성, 세균, 농도, 투여량 등에 대한 설명은 상술한 바와 같다.
- [0068] 본 발명의 일 측면에서, 상기 세균성 감염병은 세균 감염에 의해 발병하는 질병을 의미하며, 구체적으로 상기 세균성 감염병은 폐렴, 식중독, 이질, 녹농균 감염, 농가진, 화농성 질환, 급성 피부염, 방광염, 질염, 뇌막염, 장티푸스와 파라티푸스, 과상풍, 라임병, 록키산 홍반열, 콜레라, 한센병, 브루셀라증, 에를리키아병, 큐열, 성홍열, 리스테리아증, 보툴리누스 중독증, 렙토스피라증, 페스트, 발진티푸스, 균혈증 및 심내막염 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 세균성 감염병은 그람 음성균 또는 그람 양성균 감염에 의해 발병하는 질병일 수 있으며, 그람 음성균 및 그람 양성균에 대한 설명은 상술한 바와 같다. 나아가, 상기 세균성 감염병은 항생제 내성에 의해 발병하는 질병일 수 있고, 항생제 내성에 대한 설명은 상술한 바와 같다.
- [0070] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는, 세균 감염에 의한 염증의 예방, 완화 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 화합물, 염, 입체 이성질체, 용매화물, 수화물, 항균 활성, 세균, 항생제 내성, 농도, 투여량 등에 대한 설명은 상술한 바와 같다.
- [0071] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 장티푸스균 또는 결핵균에 감염된 마우스 또는 세포에 본 발명의 일 측면에 따른 조성물을 처리 시, 이의 감염에 의해 과발현되는 전염증성 사이토카인 및 케모카인의 발현량이 감소하고 유발되는 염증이 감소되는바, 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 세균 감염에 의한 염증을 예방, 완화 또는 치료하는 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다(실험예 5-3 및 8).
- [0073] 또 다른 측면에서, 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 약학, 식품 또는 화장품 조성물일 수 있다.
- [0074] 일 실시예로서, 상기 식품 조성물은 건강기능식품 조성물을 포함하며, 상기 건강기능식품 조성물은 세균성 감염병의 개선, 완화 또는 예방용일 수 있다. 구체적으로, 상기 세균성 감염병은 폐렴, 식중독, 이질, 녹농균 감염, 농가진, 화농성 질환, 급성 피부염, 방광염, 질염, 뇌막염, 장티푸스와 파라티푸스, 과상풍, 라임병, 록키산 홍반열, 콜레라, 한센병, 브루셀라증, 에를리키아병, 큐열, 성홍열, 리스테리아증, 보툴리누스 중독증, 렙토스피라증, 페스트, 발진티푸스, 균혈증 및 심내막염 감염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 또는, 상기 건강기능식품 조성물은 세균 감염에 의한 염증의 개선, 완화 또는 예방용일 수 있다.
- [0075] 상기 건강식품기능 조성물은 다양한 형태의 식품 첨가제 또는 기능성 식품을 포함한다. 상기 조성물을 포함하는 침출차, 액상차, 음료, 발효유, 치즈, 요구르트, 주스, 생균제제 및 건강보조식품 등으로 가공될 수 있으며, 그 외 다양한 식품 첨가제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0076] 일 실시예로서, 상기 화장품 조성물은 국소 적용에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 용액, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 고체, 젤, 분말, 페이스트, 포말(foam) 또는 에어로졸 조성물의 제형으로 제공될 수 있다. 이러한 제형의 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0077] 일 실시예로서, 상기 화장품 조성물은 상기한 물질 이외에 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 화장품 조성물은 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당 및 스펅고 지질로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함할 수 있다. 또한 상기 화장품 조성물은 일 실시예로서, 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화방지제, pH 조정제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한(制汗)제를 포함할 수 있다. 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01 내지 5 중량%, 구체적으로 0.01 내지 3 중량%일 수 있다.
- [0078] 일 실시예로서 상기 약학적 조성물은 세균 감염병의 예방, 완화 또는 치료용일 수 있다. 구체적으로, 상기 세균

성 감염병은 폐렴, 식중독, 이질, 녹농균 감염, 농가진, 화농성 질환, 급성 피부염, 방광염, 질염, 뇌막염, 장티푸스와 파라티푸스, 파상풍, 라임병, 록키산 홍반열, 콜레라, 한센병, 브루셀라증, 에를리키아병, 큐열, 성홍열, 리스테리아증, 보툴리누스 중독증, 렙토스피라증, 페스트, 발진티푸스, 균혈증 및 심내막염 장염으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 또는, 상기 약학적 조성물은 세균 감염에 의한 염증의 예방, 완화 또는 치료용일 수 있다.

[0079] 또한, 일 실시예로서 상기 약학적 조성물은 국소 적용에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 경구, 경피(trandermally), 정맥, 근육, 피하주사에 의해 투여될 수 있다. 일 실시예로서 상기 약학적 조성물은 주사제, 피부 외용 용액제, 현탁제, 유액제, 겔, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 제형은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 용이하게 제조될 수 있으며, 계면 활성제, 부형제, 수화제, 유화 촉진제, 현탁제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제, 착색제, 향신료, 안정화제, 방부제, 보존제 또는 기타 상용하는 보조제를 적당히 사용할 수 있다.

[0080] 본 발명의 일 실시예에 따른 약학적 조성물의 유효 성분은 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다.

[0082] 본 발명은 다른 관점에서, 세균 감염성의 억제가 필요한 개체에 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 세균 감염성 억제 방법에 관한 것일 수 있다. 본 발명의 일 관점에 있어서, 상기 방법의 투여는 본 명세서에 기재된 투여 방법 및 투여 용량에 따라 수행될 수 있다.

[0083] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균성 감염병, 예로 폐렴, 식중독, 이질, 녹농균 감염, 농가진, 화농성 질환, 급성 피부염, 방광염, 질염, 뇌막염, 장티푸스와 파라티푸스, 파상풍, 라임병, 록키산 홍반열, 콜레라, 한센병, 브루셀라증, 에를리키아병, 큐열, 성홍열, 리스테리아증, 보툴리누스 중독증, 렙토스피라증, 페스트, 발진티푸스, 균혈증, 심내막염 장염 등의 예방, 완화 또는 치료가 필요한 개체에 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료 방법에 관한 것일 수 있다. 본 발명의 일 관점에 있어서, 상기 방법의 투여는 본 명세서에 기재된 투여 방법 및 투여 용량에 따라 수행될 수 있다.

[0084] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균 감염에 의한 염증의 예방, 완화 또는 치료가 필요한 개체에 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 세균 감염에 의한 염증의 예방, 완화 또는 치료 방법에 관한 것일 수 있다. 본 발명의 일 관점에 있어서, 상기 방법의 투여는 본 명세서에 기재된 투여 방법 및 투여 용량에 따라 수행될 수 있다.

[0085] 본 발명은 또 다른 관점에서, 항균용 약학적 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.

[0086] 본 발명은 또 다른 관점에서, 항균용 식품 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.

[0087] 본 발명은 또 다른 관점에서, 항균용 화장품 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.

[0088] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균 감염성 억제용 약학적 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.

[0089] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균 감염성 억제용 식품 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.

[0090] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균 감염성 억제용 화장품 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.

[0091] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료용 약학적 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.

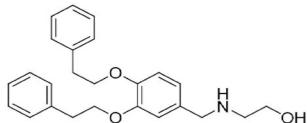
[0092] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균성 감염병의 개선, 완화 또는 예방용 식품 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.

- [0093] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균성 감염병의 개선, 완화 또는 예방용 화장료 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.
- [0094] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균 감염에 의한 염증의 예방, 완화 또는 치료용 약학적 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.
- [0095] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균 감염에 의한 염증의 개선, 완화 또는 예방용 식품 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.
- [0096] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균 감염에 의한 염증의 개선, 완화 또는 예방용 화장료 조성물을 제조하기 위한 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물의 용도에 관한 것일 수 있다.
- [0097] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 향균 용도에 관한 것일 수 있다.
- [0098] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 세균 감염성 억제 용도에 관한 것일 수 있다.
- [0099] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료 용도에 관한 것일 수 있다.
- [0100] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 세균 감염에 의한 염증 예방, 완화 또는 치료 용도에 관한 것일 수 있다.
- [0101] 본 발명은 또 다른 관점에서, 향균 용도의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것일 수 있다.
- [0102] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균 감염성 억제 용도의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것일 수 있다.
- [0103] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균성 감염병의 예방, 완화 또는 치료 용도의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것일 수 있다.
- [0104] 본 발명은 또 다른 관점에서, 세균 감염에 의한 염증 예방, 완화 또는 치료 용도의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염, 입체 이성질체, 용매화물 또는 수화물을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것일 수 있다.
- [0105] 이하, 실시예, 제조예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예, 제조예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0107] [제조예] 화합물의 제조

- [0109] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물인 실시예 1 내지 6을 하기 방법으로 각각 제조하였다.

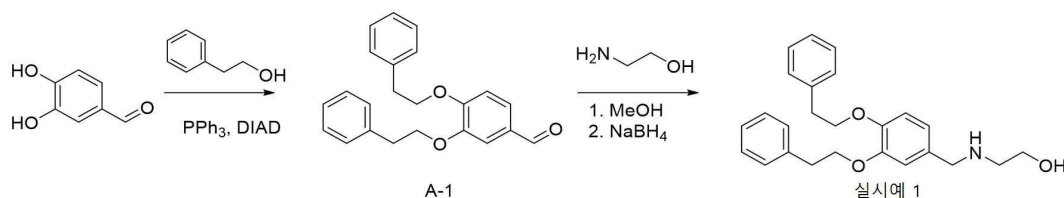
표 1

실시예	화학식명	구조식
실시예 1	2-((3,4-디페넨톡시벤질)아미노)에탄-1-올	

실시예 2	(R)-1-(3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페녹시)-3-((2-히드록시에틸)아미노)프로판-2-올	
실시예 3	(R)-1-(2-((3-(3,4-비스(벤질옥시)페녹시)-2-히드록시프로필)아미노)에틸)구아니딘	
실시예 4	(R)-1-(4-(벤질옥시)-3-페네톡시페녹시)-3-(이소프로필아미노)프로판-2-올	
실시예 5	(R)-1-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로폭시)페녹시)-3-(이소프로필아미노)프로판-2-올	
실시예 6	2-(2-((3,4-비스(벤질옥시)벤질)아미노)에톡시)에탄-1-올	

[0112] 실시예 1. 2-((3,4-디페네톡시벤질)아미노)에탄-1-올의 제조

[0114] [반응식 1]



[0115]

[0116] 단계 1) 3,4-디페네톡시벤즈알데하이드 (A-1)의 합성

[0117] 3,4-다이하이드록시벤즈알데하이드(20.0 g, 140 mmol)을 무수 THF(200 mL)에 용해 후, 2-페닐에탄올(40.7 g, 330 mmol), 트리페닐포스핀 (PPh₃, 102 g, 390 mmol) 및 디이소프로필 아조디카르복실레이트(DIAD, 79.0 g, 390 mmol)를 0 °C에서 반응물에 천천히 첨가한 후, 65 °C에서 12 시간 동안 교반한다. 반응이 종료되면, 반응물을 실온으로 냉각한 다음, 정제수(100 mL)를 넣고 에틸아세테이트(EA, 100 mL)로 3회 추출한 후, 분리된 유기층을 포화 염화나트륨 수용액(50 mL)으로 다시 한번 씻어준다. 이어서 유기층에 무수 황산나트륨(Na₂SO₄)을 넣고 교반한 후, 감압 여과한다. 여과한 용액을 농축한 후, 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하여 노란색 오일형태의 3,4-디페네톡시벤즈알데하이드(A-1, 46.0 g, 수율 : 92 %)를 얻었다.

[0118] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 9.81 (s, 1H), 7.53 (d, 1H), 7.51-7.17 (m, 12H), 4.29-4.20 (m, 4H), 3.09-3.04 (m, 4H).

[0119] 단계 2) 2-((3,4-디페네톡시벤질아미노)에탄-1-올 (실시예 1)의 합성

[0120] 3,4-디페네톡시벤즈알데하이드 (A-1, 20.0 g, 57.8 mmol)을 메탄올(200 mL)에 용해 후, 2-아미노에탄올(3.90 g, 63.9 mmol)을 넣고 65 °C에서 2시간 동안 교반한다. 이어서 반응물을 실온으로 냉각하여 수소화붕소나트륨(NaBH₄, 2.40 g, 36.9 mmol)을 첨가한 후, 50 °C에서 12 시간 동안 교반 한다. 반응이 종료되면, 반응물을 실온으로 냉각한 다음, 정제수를 넣고 에틸아세테이트(EA, 100 mL)로 3회 추출한 후, 분리된 유기층을 포화 염화나

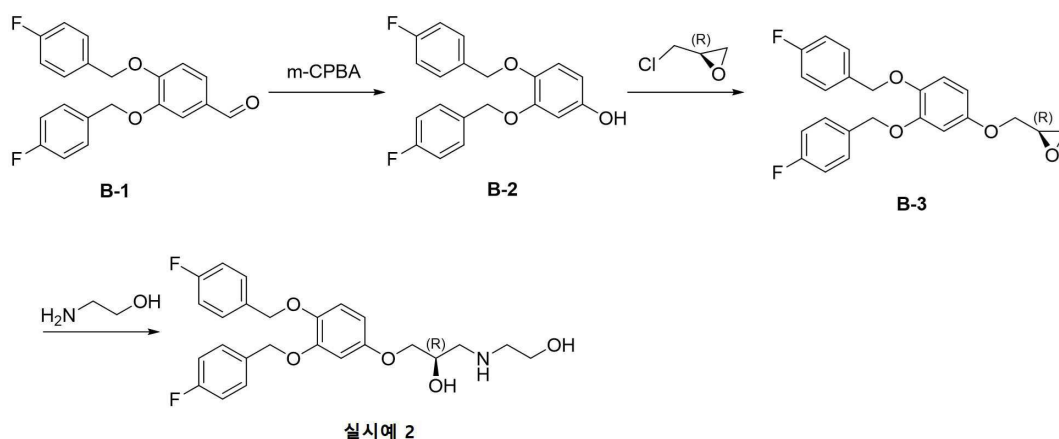
트럼 수용액으로 다시 한번 씻어준다. 이어서 유기층에 무수 황산나트륨(Na_2SO_4)을 넣고 교반한 후, 감압 여과한다. 여과한 용액을 농축한 후, 컬럼 크로마토그래피(DCM/MeOH = 20:1)로 정제하여 노란색 고체 상태의 2-((3,4-디페네토시벤질)아미노)에탄-1-올 (실시예 1, 17.0 g, 수율 : 75 %)를 얻었다.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 7.21-7.35 (m, 10 H), 6.78-6.95 (m, 3 H), 4.43-4.43 (br, 1 H), 4.09-4.14 (m, 4 H), 3.61 (s, 2 H), 3.44-3.47 (m, 2 H), 2.99-3.04 (m, 4 H), 2.53-2.56 (m, 2 H);

LC-MS Calcd.: 391, MS Found: 392 [MS+1].

실시예 2. (R)-1-(3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페녹시)-3-((2-히드록시에틸)아미노)프로판-2-올의 제조

[반응식 2]



단계 1) 3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페놀(B-2)의 합성

다이클로로메탄(15 ml)을 3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)벤즈알데하이드(B-1, 1.00 g, 3.0 mmol, 1 당량)에 넣어 용해한 후, mCPBA(0.78 g, 4.5 mmol, 1.5당량)를 반응물에 넣고 실온에서 4시간 교반하였다. 반응물에 에틸아세테이트를 넣어 희석한 후, 탄산나트륨 포화 수용액을 넣고 씻어준 후, 유기층을 분액하였다. 유기층을 염화나트륨 수용액으로 씻어준 후, 무수황산나트륨으로 탈수하여 감압여과하였다. 여과된 용액을 농축한 후, 다시 메탄올(10ml)에 용해한 후, 6N NaOH를 넣고 30분간 실온에서 교반하였다. 반응물에 4N HCl 용액을 넣은 후, 30 분간 더 교반하였다. 반응물에 에틸아세테이트(50ml)를 넣어 희석한 후, 소금물로 씻어내고 이어서 무수황산나트륨을 넣어 탈수 및 감압여과하였다. 여과된 용액을 농축한 후, 컬럼크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트비율= 7/3)로 정제하여 흰색 고체의 3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페놀(B-2, 0.87g, 수율 90 %)을 얻었다.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) 7.49-7.42 (m, 4H), 7.24-7.15 (m, 4H), 6.82 (d, 1H), 6.49 (s, 1H), 6.27-3.25 (m, 1H), 5.04 (s, 2H), 4.95 (s, 2H).

단계 2) (R)-2-((3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페녹시)메틸)옥시란 (B-3)의 합성

3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페놀(B-2, 306mg, 1.0 mmol)을 에탄올(10ml)에 희석한 후, KOH 수용액(KOH 66mg, 1.2 mmol, 1 ml)과 (R)-2-(클로로메틸)옥시란(410ul, 5.0 mmol)을 차례로 첨가하였다. 반응물을 실온에서 5시간 교반한 후, 유기용매를 감압하여 제거하였다. 농축된 반응물을 다시 에틸아세테이트로 희석한 후, 물로 씻어주고 이어서 소금물로 씻어준 후, 추출한 유기층을 무수황산나트륨으로 탈수한 후, 감압여과하였다. 여과된 유기층을 농축해서 컬럼크로마토그래피로 정제하여 흰색 고체의 (R)-2-((3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페녹시)메틸)옥시란 (B-3, 297mg, 수율82%)를 얻었다.

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ (ppm) 7.51-7.43 (m, 4H), 7.25-7.17 (m, 4H), 6.94 (d, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.47-6.44 (m, 1H), 5.11 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.26-4.23 (m, 1H), 3.78-3.73 (m, 1H), 3.31-3.28 (m, 1H), 2.84-2.82(m, 1H), 2.70-2.67 (m, 1H).

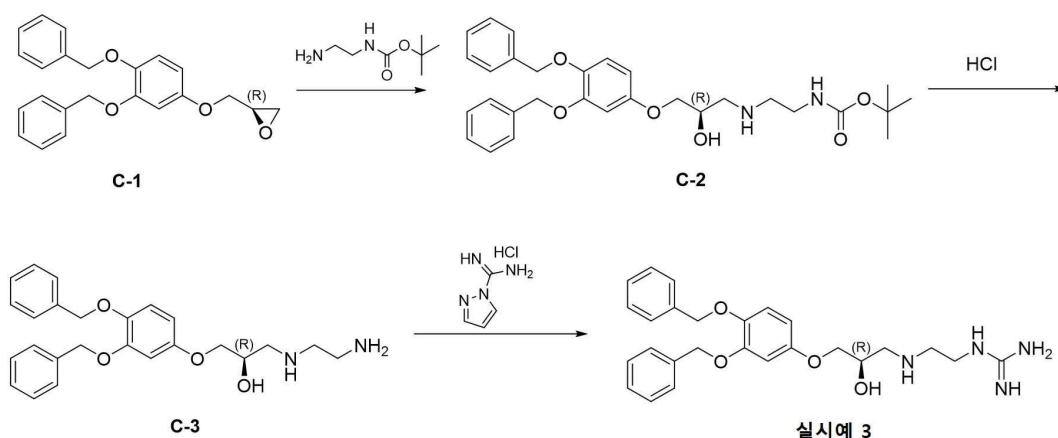
[0134] 단계 3) (R)-1-(3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페녹시)-3-((2-히드록시에틸)아미노)프로판-2-올 (실시예 2)의 합성

[0135] (R)-2-((3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페녹시)메틸)옥시란(**B-3**, 9 mg, 25 nmol)을 무수 에탄올(1ml)에 희석한 후, 2-아미노에탄-1-올(7.6 μ L, 125nmol)을 첨가하고 4시간동안 실온에서 교반하였다. TLC로 반응 확인한 후, 반응 용매를 감압 농축하고, 농축된 반응물에 물을 넣고 다이클로로메탄(3Y 5 mL)으로 추출하였다. 추출한 유기층을 무수 황산나트륨으로 탈수한 후, 감압 여과하였다. 여과된 유기층을 농축해서 컬럼 크로마토그래피(다이클로로메탄:메탄올=19:1)로 정제하여 (R)-1-(3,4-비스((4-플루오로벤질)옥시)페녹시)-3-((2-히드록시에틸)아미노)프로판-2-올 (실시예 2, 9.0 mg, 수율 85%)을 얻었다.

[0136] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 7.40-7.33 (m, 4H), 7.07-7.00 (m, 4H), 6.84 (d, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.41-6.38 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 5.00 (s, 2H), 4.06 (br s, 1H), 3.91 (m, 2H), 3.69 (m, 2H), 2.89-2.76 (m, 4H); LC-MS Calcd.: 459.4, MS Found: 460.9 [MS+1].

[0138] 실시예 3. (R)-1-(2-((3-(3,4-비스(벤질옥시)페녹시)-2-히드록시프로필)아미노)에틸)구아니딘의 제조

[반응식 3]



[0141]

[0142] 단계 1) tert-부틸(R)-2-((3-(3,4-비스(벤질옥시)페녹시)-2-하이드록시프로필)아미노)에틸)카마메이트 (C-2)의 합성

[0143] (R)-2-((3,4-비스(벤질옥시)페녹시)메틸)옥시란(**C-1**, 500 mg, 1.38 mmol)을 메탄올(10 mL)에 용해한 후, tert-부틸 2-아미노에틸카마메이트(442 mg, 2.76 mmol)를 넣고 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10시간 교반하였다. 반응이 종료되면 반응 용매를 감압 농축하였다.

[0144] 단계 2) (R)-1-((2-아미노에틸)아미노)-3-(3,4-비스(벤질옥시)페녹시)프로판-2-올 (C-3)의 합성

[0145] tert-부틸 (R)-2-((3-(3,4-비스(벤질옥시)페녹시)-2-하이드록시프로필)아미노)에틸)카마메이트(**C-2**, 600 mg, 1.15 mmol)을 메탄올(3ml)에 용해한 후 메탄올/염산(3N, 2 ml)을 첨가한 후, 실온에서 4시간 교반하였다. 반응이 종료되면 반응물을 감압 농축한 후(흰색 고체, **C-3**)정제 없이 다음 단계의 출발 물질로 사용하였다.

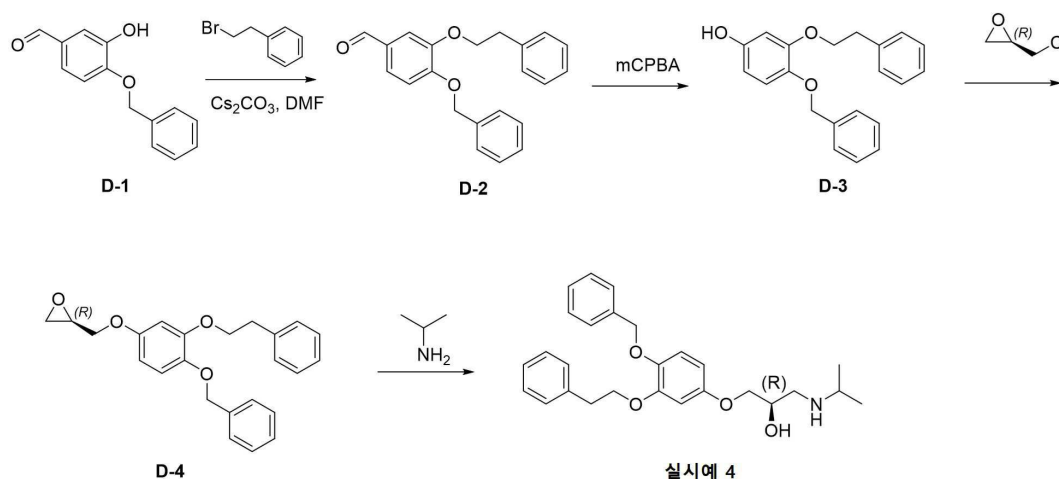
[0146] 단계 3) (R)-1-(2-((3-(3,4-비스(벤질옥시)페녹시)-2-하이드록시프로필)아미노)에틸)구아니딘 (실시예 3)의 합성

[0147] (R)-1-((2-아미노에틸)아미노)-3-(3,4-비스(벤질옥시)페녹시)프로판-2-올(C-3, 400 g, 0.95 mmol)을 DMF(3 mL)에 용해한 후, 1H-피라졸-1-카복스아미딘 염산염 (553 mg, 3.8 mmol)과 다이이소프로필에틸아민(0.3 g, 2.4 mmol)를 추가로 첨가하였다. 반응물을 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 교반한 후, 감압 농축해서 고분해능 액체 크로마토그래피로 정제해서 흰색 고체의 (R)-1-(2-((3-(3,4-비스(벤질옥시)페녹시)-2-하이드록시프로필)아미노)에틸)구아니딘(실시예 3, 22 mg)을 합성하였다

[0148] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- D_2O) δ (ppm) 7.43-7.36 (m, 10H), 6.97 (d, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.46 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 4.18-4.08 (m, 3H), 3.89 (m, 2H), 3.48 (m, 2H), 3.21-3.06 (m, 4H). LC-MS Calcd.: 464.5, MS Found: 465.0 [MS+1].

[0150] 실시예 4. (R)-1-(4-(벤질옥시)-3-페네톡시페녹시)-3-(이소프로필아미노)프로판-2-올의 제조

[0152] [반응식 4]



[0153] 단계 1) 4-(벤질옥시)-3-페네톡시벤즈알데하이드 (D-2)의 합성

[0154] 단계 1) 4-(벤질옥시)-3-페네톡시벤즈알데하이드 (D-2)의 합성

[0155] 4-(벤질옥시)-3-하이드록시벤즈알데하이드 (D-1, 1.0 g, 4.39 mmol, 1.0 당량)와 (2-브로모에틸)벤젠 (0.97 g, 5.26 mmol, 1.2 당량)을 DMF (10 mL)에 용해한 후, 탄산세슘 (Cs_2CO_3 , 4.3 g, 13.2 mmol, 3 당량)을 넣고 80 $^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 교반 한다. 반응액을 실온으로 냉각 한 후, 물을 넣고 EA로 추출했다. 분획된 유기층을 염화나트륨 수용액으로 씻어준 후, 무수 황산나트륨으로 탈수하여 감압 여과하였다. 여과된 용액을 농축한 후, 컬럼 크로마토그래피 (헥산/에틸아세테이트 비율 =20 :1 ~10:1)로 정제하여 4-(벤질옥시)-3-페네톡시벤즈알데하이드 (D-2, 0.37 g, 25.3 % 수율)를 얻었다.

[0156] ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 9.83 (s, 1H), 7.46-7.25 (m, 12H), 7.02 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 4.31 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.18 (t, J = 6.8 Hz, 2H).

[0157] 단계 2) 4-(벤질옥시)-3-페네톡시페놀 (D-3)의 합성

[0158] 4-(벤질옥시)-3-페네톡시벤즈알데하이드 (D-2, 332 mg, 1.0 mmol)을 다이클로로메탄에 용해한 후, m-클로로퍼벤조산(mCPBA, 260 mg, 1.5 mmol)을 첨가한 후, 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응물에 과량의 에틸 아세테이트를 넣은 후, 포화 탄산나트륨 수용액을 넣고 씻어준 후, 유기층을 분액하였다. 유기층을 염화나트륨 수용액으로 씻어준 후, 무수 황산나트륨으로 탈수하여 감압 여과하였다. 여과된 용액을 농축한 후, 다시 메탄올(10 ml)에 용해한 후, 6N NaOH를 넣고 30분간 실온에서 교반하였다. 반응물에 4N HCl 용액을 넣은 후, 30분간 더 교반하였다. 반응물에 에틸 아세테이트(50 ml)를 넣어 희석한 후, 소금물로 씻어내고 이어서 무수 황산나트륨을 넣어 탈수 및 감압 여과하였다. 여과된 용액을 농축한 후, 컬럼 크로마토그래피 (헥산/에틸아세테이트비율= 7/3)로 정제하여 4-(벤질옥시)-3-페네톡시페놀 (D-3, 310mg, 수율 90%)를 얻었다.

[0159] ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm): 7.23-7.42(m, 10H), 6.77(d, 1H, J=9.0 Hz), 6.46(d, 1H), 6.28(dd, 1H, J=3.0 and 9.0 Hz), 4.98(s, 2H), 4.58(s, 1H), 4.20(t, 2H, J=6 Hz), 3.14(t, 2H, J=6 Hz).

[0160] 단계 3) (R)-2-((4-(벤질옥시)-3-페네톡시페녹시)메틸)옥시란 (D-4)의 합성

[0161] 4-(벤질옥시)-3-페네톡시페놀 (D-3, 320 mg, 1.0 mmol)을 에탄올(5 ml)에 희석한 후, KOH 수용액(KOH 66 mg, 1.2 mmol, 1 ml)과 (R)-2-(클로로메틸)옥시란(410 μl , 5.0 mmol)을 차례로 첨가하였다. 반응물을 실온에서 5시

간 교반한 후, 유기용매를 감압하여 제거하였다. 농축된 반응물을 다시 에틸 아세테이트로 희석한 후, 물로 씻어주고 이어서 소금물로 씻어준 후, 추출한 유기층을 무수 황산나트륨으로 탈수한 후, 감압 여과하였다. 여과된 유기층을 농축해서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 순수한 (R)-2-((4-(벤질옥시)-3-페네투시페녹시)메틸)옥시란 (D-4, 308mg, 수율 82%)를 얻었다.

[0162] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.44-7.47(m, 2H), 7.26-7.39(m, 5H), 7.19-7.22(m, 3H), 6.84(d, 1H, $J=6.0$ Hz), 6.54(d, 1H, $J=3.0$ Hz), 6.36(dd, 1H), 5.07(s, 2H), 4.15(dd, 1H), 4.00(t, 2H, $J=6.0$ Hz), 2.84(t, 2H, $J=9.0$ Hz), 2.73 (dd, 1H), 2.10-2.19 (m, 2H); ESIMS m/z : 363.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0163] 단계 4) (R)-1-(4-(벤질옥시)-3-페네투시페녹시)-3-(이소프로필아미노)프로판-2-올 (실시예 4)의 합성

[0164] (R)-2-((4-(벤질옥시)-3-페네투시페녹시)메틸)옥시란 (D-4, 9.4 mg, 25 nmol)을 무수 에탄올(1ml)에 희석한 후, 이소프로필아민(10 μL , 125 nmol)을 첨가하고 4시간 동안 실온에서 교반하였다. TLC로 반응 확인한 후, 반응 용매를 감압 농축하고, 농축된 반응물에 물을 넣고 다이클로로메탄(3Y 5 mL)으로 추출하였다. 추출한 유기층을 무수 황산나트륨으로 탈수한 후, 감압 여과하였다. 여과된 유기층을 농축해서 컬럼 크로마토그래피(다이클로로메탄:메탄올=19:1)로 정제하여 (R)-1-(4-(벤질옥시)-3-페네투시페녹시)-3-(이소프로필아미노)프로판-2-올 (실시예 4, 9.3 mg, 수율 86%)을 얻었다.

[0165] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ (ppm) 7.38-7.19 (m, 10H), 6.90 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.40 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.20 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.88-3.78 (m, 3H), 3.04 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.73-2.65 (m, 2H), 2.56-2.50 (m, 1H), 0.99 (dd, $J = 1.2, 6.0$ Hz, 6H); LC-MS Calcd.: 435.5, MS Found: 436.2 $[\text{MS}+1]$.

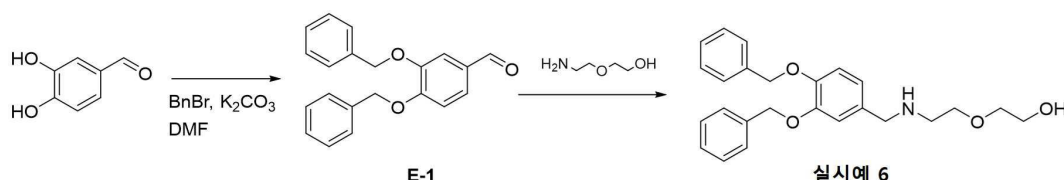
[0167] 실시예 5. (R)-1-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로폭시)페녹시)-3-(이소프로필아미노)프로판-2-올의 제조

[0169] 실시예 4의 제조 방법 중, 단계 1에서 반응 물질을 (2-브로모에틸)벤젠 대신 (3-브로모프로필)벤젠을 사용하여 실시예 4의 제조 방법과 동일한 과정으로 흰색 고체인 (R)-1-(4-(벤질옥시)-3-(3-페닐프로폭시)페녹시)-3-(이소프로필아미노)프로판-2-올 (실시예 5)을 제조하였다.

[0170] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.47-7.19 (m, 10H), 6.84 (d, 1H), 6.52 (d, 1H), 6.36 (dd, 1H), 5.07 (s, 2H), 3.98-4.05 (m, 3H), 3.91 (d, 2H), 2.71-2.89 (m, 6H), 2.33 (br s, 2H), 2.15 (td, 1H), 1.13 (d, 6H); LC-MS Calcd.: 449.5, MS Found: 451.2 $[\text{MS}+2]$.

[0172] 실시예 6. 2-(2-((3,4-비스(벤질옥시)벤질)아미노)에톡시)에탄-1-올의 제조

[0174] [반응식 5]



[0175] 단계 1) 3,4-비스(벤질옥시)벤즈알데하이드(E-1)의 합성

[0177] 3,4-다이하이드록시벤즈알데하이드(0.50 g, 3.62 mmol)을 무수 DMF(5 mL)에 용해 후, K_2CO_3 (1.50 g, 10.86 mmol)를 넣고, 이어서 벤질 브로마이드(0.92 mL, 7.96 mmol)를 반응물에 천천히 첨가하고 60 $^\circ\text{C}$ 에서 4시간 교반하였다. 반응이 종료되면, 반응물을 실온으로 냉각한 다음, 정제수에 희석하여 다이에틸에테르(50 mL)로 2회 추출하였다. 유기층을 정제수(50 mL)로 2회 씻어준 후, 포화 염화나트륨 수용액(50 mL)으로 다시 한번

씻어주었다. 이어서 유기층에 무수 황산나트륨을 넣고 교반한 후, 감압 여과하였다. 여과한 용액을 농축한 후, 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하여 3,4-비스(벤질옥시)벤즈알데하이드(**E-1**, 1.04 g, 수율 90 %)를 얻었다.

[0178] ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9.81 (s, 1 H), 7.49–7.31 (m, 12 H), 7.04 (d, J = 8.3 Hz, 1 H), 5.27 (s, 2 H), 5.22 (s, 2H); ESIMS m/z: 319.33 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0179] 단계 2) 2-(2-((3,4-비스(벤질옥시)벤질)아미노)에톡시)에탄-1-올 (실시예 6)의 합성

[0180] 3,4-비스(벤질옥시)벤즈알데하이드 (**E-1**, 33 mg, 0.1 mmol)을 무수 에탄올(5 mL)에 용해한 후, 2-(2-아미노에톡시)에탄-1-올 (50 μL , 0.5 mmol)을 넣고 4 시간동안 환류 교반하였다. 실온으로 냉각한 후, TLC로 이민이 생성된 것을 확인한 다음, NaBH_4 (7.6 mg, 0.2 mmol)을 넣고, 추가로 4시간 더 교반하였다. 반응 용매를 감압하여 농축한 후, 물을 넣고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 분리된 유기 층을 소금물로 한번 더 씻어준 후, 분액하여 무수 황산나트륨으로 탈수 후 여과해서 여액을 감압 농축하였다. 농축된 혼합물을 컬럼 크로마토그래피를 통해 정제하여 흰색 고체의 2-(2-((3,4-비스(벤질옥시)벤질)아미노)에톡시)에탄-1-올 (실시예 6, 수율 78%)을 얻었다.

[0181] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.48 (d, 2H), 7.27–7.41 (m, 9H), 6.99–7.02 (m, 1H), 6.84 (d, 1H), 5.25 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 4.06(s, 2H), 3.65–3.70 (m, 4H), 3.46–3.48 (m, 2H), 2.87 (t, 2H); Mass Calcd.:407.5; MS Found: 408.9 $[\text{MS}+1]$.

[0183] [실험예 1] 박테리아 감염의 p62 및 LC3 발현량에 대한 영향 확인

[0185] 박테리아 감염 시 p62와 LC3등 오토파지 관련 유전자들의 발현량에 어떠한 영향을 끼치는지를 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0187] [실험예 1-1] p62 및 LC3 발현량 억제 여부 확인

[0188] 먼저 J774A.1 대식세포(Korean Cell Line Bank)를 10% FBS 및 100 units/mL 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI(Rosewell Park Memorial Institute)에서 배양하고, HeLa 세포를 10% FBS 및 100 units /mL 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco, 10566016)에서 배양하였다. 모든 세포주는 MycoAlert 검출 키트(Lonza, LT07-118)를 사용하여 마이코플라스마 시험에서 음성인 것으로 측정되었으며, 모든 배양 플레이트 및 세포주는 가습된 인큐베이터에서 37 °C 및 5% CO_2 로 유지되었다.

[0189] 대식세포 J774A.1 및 HeLa 세포를 그람-음성균인 장티푸스균(*Salmonella Typhimurium*)으로 감염시키고 LC3의 발현을 면역블롯팅을 통해 모니터링하였다. 마우스 모노클로날 항-p62 (Abcam, ab56416, 1: 100,000)를 면역블롯팅에 사용하였고, 토끼 폴리클로날 항-LC3 (Sigma, L7543, 1:40,000)을 면역블롯팅에 사용하였으며, 2차 항체로 항 - 토끼 IgG - HRP (Cell Signaling, 7074, 1:10,000), 및 항-마우스 IgG-HRP(Cell Signalling, 7076, 1:1000)을 사용하였으며, 도 1A는 J774A.1 세포에 *S. Typhimurium* 감염(MOI 10) 시 면역블롯팅 결과를 나타낸다.

[0190] 감염 다중도(multiplicity, MOI)에 따른 발현량을 비교한 결과, 도 1B (J774A.1 세포) 및 1C (HeLa 세포)에 나타난 바와 같이, *S. Typhimurium* 감염에 의해 p62의 발현량은 증가하는 반면, LC3의 발현량이 감소하고 이의 활성화된 형태인 LC3-II로의 지질화가 감소하였으며, 특히 감염 다중도가 증가할수록 LC3-I 및 LC3-II의 발현량이 감소함을 확인하였다.

[0192] [실험예 1-2] 리소좀 활성 억제제 및 LPS 처리 시의 영향 확인

[0193] 상기 실험예 1-1의 J774A.1 세포에 리소좀 V-ATPase의 억제제인 바필로마이신 A1 (100 nM)을 4 시간 동안처리하고, 상기 실험예 1-1과 동일한 방법으로 면역블롯팅을 수행하였다. 그러나, 리소좀 V-ATPase 억제제를 처리하여도 LC3-I 및 LC-II의 발현 억제 정도는 차이가 없었다(도 1E).

- [0194] 또한, J774A.1 및 HeLa 세포가 병원체 침입에 반응하여 자가포식을 유도하는 능력이 결여될 가능성을 배제하기 위해, 상기 실험에 1-1의 J774A.1 및 HeLa 세포에 병원체-연관 분자 패턴 (PAMP)으로서 그람-음성 박테리아의 외막의 성분인 리포폴리사카라이드 (LPS)(100 ng/mL)를 6 시간동안 처리하고, 상기 실험에 1-1과 동일한 방법으로 면역블롯팅을 수행하였다. 그 결과, 살아있는 박테리아와는 대조적으로, LPS는 LC3의 합성(LC3-I)뿐만 아니라, 이의 지질화(LC3-II)를 강하게 유도함을 확인하였다(도 1F).
- [0196] **[실험예 1-3] ATG9B, WIPI1, TMEM74, ULK2 및 DRAM1의 발현에의 영향 확인**
- [0197] *S. Typhimurium*(MOI 10)에 반응하는 선천성 면역계로서 상기 실험에 1-1의 HeLa 세포에 *S. Typhimurium*(MOI 10)를 감염시킨 뒤 정량적 실시간 PCR (RT-qPCR)을 통해 오토파지 관련 유전자로 알려진 ATG9B, WIPI1, TMEM74, ULK2 및 DRAM1 등의 mRNA 발현량을 측정하였다.
- [0198] 그 결과, 상기 5종의 유전자들의 발현량이 증가하였으며 (도 1H), HeLa 세포와 MEF 세포 모두에서 약 30%의 박테리아가 LC3-양성 오토파지 막과 관련이 있는 것으로 나타났다 (도 1I).
- [0200] **[실험예 1-4] ATG5 및 LC3B 유전자 발현 억제 시 박테리아 감염성 변화 확인**
- [0201] siRNA를 이용하여 ATG5 및 LC3B 유전자 발현을 억제 시의 *S. Typhimurium*의 감염성 변화를 측정하였다.
- [0202] 구체적으로, J774A.1 및 HeLa 세포에 하기 서열을 갖는 ATG5 siRNA 및 LC3B siRNA(Map11c3b siRNA)(Life Technologies)를 40 nM의 최종 농도에서 Lipofectamine RNAiMAX 시약 (Invitrogen, 13778150)#4392420, ID #23628)을 사용하여 제조 프로토콜에 따라 트랜스펙션하였다.
- [0203] ATG5 siRNA: 5'-CAGUAUCAGACACGAUCAU-3'(센스)(서열번호 1) 및 5'-AUGAUCGUGUCUGAUCUG-3'(안티센스)(서열번호 2)
- [0204] LC3B siRNA: 5'-CCAAGAUCCAGUGAUUUAUUU-3'(센스)(서열번호 3) 및 5'-AUAACACUGGAUCUUGGUUCU-3'(안티센스)(서열번호 4)
- [0205] siRNA 사일런싱 후 약 48시간 후에, 면역블롯팅 및 면역세포화학적 분석을 위해 세포를 수확하고, 콜로니 형성 정도를 다음과 같은 방법으로 측정하였다. *S. Typhimurium*의 단일 콜로니를 진탕 인큐베이터에서 37° C에서 밤새 성장시키고, 2차 배양물 (5% 접종물)을 미세호기성 조건에서 3시간 동안 성장시키고, HeLa 또는 J774A.1 세포주를 MOI 10에서 30분 동안 감염시켰다. 감염된 세포를 Dulbecco's Phosphate Buffered Salin(DPBS; Thermo Fisher Scientific, 14040133)으로 세척하고, 세포를 100 µg/ml 젠타마이신(Gentamycin)을 함유하는 배지 (Thermo Fisher Scientific, 15710064)로 1시간 동안 처리하여 세포외 박테리아를 측정하였다. 배지를 10 µg/ml 젠타마이신을 포함하는 새로운 배지로 교환하였다. 그런 다음 상기 세포를 용해 완충액 (0.1% Triton X-100, 1X 포스페이트 완충 염수 (PBS; Welgene, LB 204-01))을 사용하여 용해시켰다. 세포내 *S. Typhimurium* 함유 용해물을 연속적으로 희석하고 Luria broth (LB) 한천 플레이트 상에 펼쳤다. 37 °C에서 밤새 인큐베이션한 후, CFU를 측정하였다.
- [0206] 그 결과, siRNA를 사용하여 오토파지 활성화와 관련된 ATG5 및 LC3B 유전자를 결실 시켰을 때 J774A.1 및 HeLa 세포에서 *S. Typhimurium*의 감염성이 촉진되었다(도 1J).
- [0207] 이를 통해 *S. Typhimurium*에 감염된 숙주 세포는 상당한 자가포식 활성을 유지한다는 것을 알 수 있었다.
- [0209] **[실험예 2] p62 단백질 발현과 박테리아의 감염성의 관계 확인**
- [0211] 상기 실험예 1을 통해, 박테리아 감염 시 LC3의 발현량이 감소되지만 숙주 세포 자체는 자가포식 활성을 유지함을 확인하였다. 이에, p62 단백질의 발현이 박테리아 감염성과 관련이 있는지 확인하기 위하여 다음과 같은 방법으로 면역세포화학(immunocytochemistry)을 수행하였다.
- [0212] 구체적으로, 오토클레이브된 22mm² 커버슬립을 24웰 플레이트에 배치하고, 상기 실험예 1과 같은 종류의 HeLa

세포를 2.5×10^5 세포/웰로 시딩하고 밤새 배양하였다. 상기 세포를 MOI 10으로 *S. Typhimurium* S14028로 감염시키고, 세포를 실온에서 15분 동안 PBS 중의 4% PFA 중에 고정시켰다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 차단 용액(PBS 중 5% 소 혈청 알부민 및 0.3% 트리톤 X-100)에서 1시간 동안 배양하였다. 샘플을 4 °C에서 밤새 상기 실험에 1과 같은 종류의 1차 항체와 함께 배양하고, 2차 항체를 실온에서 배양하였다. 2차 항체를 PBS로 세척한 후, 샘플을 장착 용액으로 커버라이드 상에 장착하였다. 공초점 이미지를 Zeiss C-Apochromat 60x (1.2 NA) 및 40x (1.2NA) 물 침지 렌즈가 장착된 Zeiss LSM 700 레이저 스캐닝 공초점 현미경으로 취하고, ZEN (블랙 에디션) 2012 SP5 소프트웨어 (Zeiss)를 사용하여 분석하였다. ZEN 소프트웨어를 사용하여, 전체 세포 두께를 커버하는 이미지들의 z-스택들이 획득되고 최대 투영되었다. 이미지 처리 및 주석처리는 어도비 포토샵(Adobe Photoshop), 어도비 일러스트레이터(Adobe Illustrator) 및 피지(Fiji) 소프트웨어로 수행되었으며, 그 결과는 도 2A 내지 2D와 같다.

[0213] 도 2A에 나타난 바와 같이, p62, NBR1, 옵티누린(Optineurin) 및 NDP52가 다양한 정도로 박테리아 막과 그리고 별개의 시공간적 패턴과 연관되어 있음을 알 수 있었다 (도 2A 및 2C). 또한, 상기 실험에 1-4와 같은 방법으로 siRNA를 이용하여 p62의 발현 억제 시, 상기 p62, NBR1, 옵티누린(Optineurin), TAX1BP1, 및 NDP52의 유전자 중에서, p62의 녹다운이 *S. Typhimurium*의 감염성에 크게 영향을 미침을 확인하였다(도 2B). 일관되게, p62의 수준은 TAX1BP1, NDP52 및 옵티누린(Optineurin)과 비교할 때, 박테리아 감염 시 신뢰성 있게 증가하였다 (도 2C 및 2D).

[0214] 이를 통해, p62가 항균 물질의 잠재적인 표적임을 알 수 있었다.

[실험예 3] 화합물의 LC3 및 p62 발현에 대한 효과 확인

[0218] 상기 제조예에서 제조한 실시예 1 및 4 내지 6의 화합물을 처리 시 LC3 및 p62 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0219] 먼저, 대식세포 HeLa 세포에 상기 실시예 1 및 4 내지 6의 화합물을 각각 처리하고, 상기 실험에 1과 같은 방법으로 면역블롯팅과 면역세포화학을 수행하였으며, 그 결과는 도 3A 내지 3C와 같다(도 3B에서 2205는 실시예 1의 화합물을 나타낸다).

[0220] 도 3A 내지 3C에 나타난 바와 같이, 실시예 6의 화합물 처리 시, LC3의 합성 및 이의 지질화가 증가되었으며, 이들 대부분은 p62-양성인 세포질 위치와 공동화(colocalize)되었고(도 3A), 이는 실시예 1의 화합물 처리 시에도 마찬가지였다(도 3B). 또한, 실시예 4 내지 6의 화합물은 p62 및 LC3(LC3-I)의 발현을 증가시키고, LC3의 지질화(LC3-II)를 유도하는 효과를 나타내었다(도 3C).

[0221] 이를 통해, 본 발명의 일 측면에 따른 화합물, 구체적으로 실시예 1 및 4 내지 6의 화합물이 p62를 활성화시키고 선택적 오토파지를 통해 분해성 플렉스를 향상시킴을 알 수 있었다.

[실험예 4] 화합물의 세포내 박테리아의 감염성 억제 효과 확인

[0225] 상기 제조예에서 제조한 실시예 1 및 6의 화합물을 처리 시 박테리아의 감염성을 억제하는 효과가 있는지를 확인하기 위해 상기 실험에 1과 동일한 방법으로 콜로니 형성 단위 (CFU) 분석을 수행하였다.

[0226] *S. Typhimurium* (MOI 10)에 감염된 J774.A1 및 RAW264.7 대식세포에 실시예 1 및 6의 화합물 각각을 10 μ M에서 6시간 동안 처리한 결과, 박테리아의 수는 약 10배 감소하였다(도 4A 및 4C). 또한, 상기 실험에 1과 같은 방법으로 siRNA를 이용하여 HeLa 세포에 p62 발현을 억제하였을 때, 실시예 6의 화합물의 항균 효과는 더이상 관찰되지 않았다(도 4B). 이들 결과는 실시예 1 및 6의 화합물이 p62를 조절하여 *S. Typhimurium*의 감염성을 억제한다는 것을 입증한다.

[0227] 이를 통해, 본 발명의 일 측면에 따른 화합물, 구체적으로 실시예 1 및 6의 화합물은 p62의 특이적인 화학적 활성에 의해 박테리아의 감염성을 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

[0229] [실험예 5] 박테리아 감염된 세포에서 화합물의 LC3의 발현 촉진 및 박테리오파지 유도 확인

[0231] [실험예 5-1] LC3의 발현 촉진 및 p62의 모집 유도 효과 확인

[0232] 상기 실험예 1에서 *S. Typhimurium* 감염 시 LC3의 발현이 억제됨을 확인하였는바, 상기 제조예에서 제조된 실시예 1 및 6의 화합물이 박테리아 감염에 의해 억제된 LC3의 발현이 다시 증가될 수 있는지를 확인하기 위해 하기 와 같은 실험을 수행하였다.

[0233] 상기 실험예 1과 같은 방법으로 HeLa 세포 및 Raw 264.7 세포에 *S. Typhimurium*를 감염시키고, 실시예 6의 화합물을 각각 처리하였으며, 그 결과 실시예 6의 화합물은 LC3의 합성 및 이의 지질화를 정상 수준으로 회복시켰다 (도 5A). 이를 통해, 실시예 6의 화합물이 *S. Typhimurium*에 감염된 세포에서 LC3의 합성 및 이의 지질화를 촉진할 수 있음을 확인하였다.

[0234] 다음으로, 공동국소화 검정을 사용하여 실시예 6의 화합물이 *S. Typhimurium*으로의 p62의 모집(recruitment)을 유도하는지 여부를 확인하기 위해, 실험예 1과 같은 방법으로 면역염색 분석을 수행하였다. 그 결과, DAPI-양성 *S. Typhimurium*에 의한 p62의 공동화(colocalization)가 세포가 실시예 6의 화합물로 처리될 때 현저하게 증가됨을 확인하였다 (도 5B). 또한, 대부분의 p62-양성인 박테리아는 LC3-양성이었다 (도 5C).

[0236] [실험예 5-2] 박테리오파지 유도 확인

[0237] 실시예 6의 화합물이 박테리아의 표적화를 향상시키는지를 확인하기 위해 투과 전자 현미경으로 관찰하였다. 구체적으로, RAW264.7 세포를 *S. Typhimurium*으로 30분 동안 감염시킨 후, 5 μ M의 실시예 6의 화합물로 4시간 동안 배양하였다. 세포를 배양 접시에서 긁어내고 3000 xg에서 5분 동안 원심분리하여 펠렛화하였다. 펠렛을 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 0.1M 포스페이트 (7.4PH) 중 2.5% 글루타르알데히드에 재현탁시켰다. 이어서, 50 nm 절편을 절단하고, 각각 Reichert Ultracut S Ultramote (Leica Microsystems) 및 FEI Vitrobot Mark IV (Thermo Scientific)를 사용하여 우라닐 아세테이트 및 납 시트레이트로 염색하였다. 세포 절편을 Seoul National University Hospital Biomedical Research Institute에서 JEOL JEM-1400 시리즈 120kV 투과 전자 현미경을 사용하여 조사하여, 투과 전자 현미경(TEM) 이미지를 획득하였다. 그 결과, 박테리아의 상당히 증가된 부분이 실시예 6의 화합물로 처리된 세포에서 자가포식소체내에 격리되었다 (도 5D). 이를 통해, 실시예 6의 화합물이 *S. Typhimurium*의 박테리오파지를 유도함을 알 수 있었다.

[0239] [실험예 5-3] 마우스에 감염된 박테리아의 개수 변화 및 염증완화 효과 확인

[0240] 박테리오파지에서 실시예 1 및 6의 화합물의 효능을 입증하기 위해, C57BL6 수컷 마우스를 *S. Typhimurium* (마우스 당 10^6)으로 경구 감염시킨 후, 6일 동안 1일 1회 20 mg/kg의 실시예 1 및 6의 화합물을 각각 복강내 주사하였다. 7일째에, 간 및 비장을 수확하고, 이들의 추출물을 CFU 분석에 사용하였다. 비히클-처리된 군과 비교할 때, 실시예 1의 화합물을 주사한 마우스는 박테리아 수가 대략 100배 감소하였다 (도 5E). 실시예 6의 화합물을 주사한 마우스에서도 박테리아 감염의 유사한 억제가 관찰되었다(도 5E). 간으로부터 H&E-염색된 파라핀 절편의 조직학적 검사를 위해, 상기 마우스의 간 및 폐 조직을 10% 포르말린에 고정시키고 파라핀 왁스에 매립하였다. 조직을 4 μ m 두께로 절단하고, 파라핀-매립된 슬라이드를 Neo-Clear로 각각 10분 동안 2회 새로 처리한 후, EtOH (100%, 90%, 80%, 및 70%; 각각 6분) 및 물에서 20분 동안 점진적으로 재수화시켰다. 이어서, 조직을 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. H&E-염색된 절편을 Aperio 디지털 병리학 슬라이드 스캐너(Leica)로 스캐닝하고 Aperio ScanScope[®] CS System을 사용하여 영상화하였다.

[0241] 그 결과, 대조군 마우스에서 *S. Typhimurium* 감염에 의한 염증-관련 손상 조직을 발견하였다. 이러한 손상은 실시예 1의 화합물을 주사한 마우스에서 거의 관찰되지 않았다(도 5F). 이를 통해, 실시예 1 및 6의 화합물이 *S. Typhimurium*의 감염성을 억제하고 박테리아 감염에 의해 유발되는 염증을 감소시킴을 알 수 있었다.

[0243] [실험예 6] 항균 효능 확인

[0245] 상기 제조예에서 제조된 실시예 1 내지 6의 화합물의 항균 효능을 확인하기 위해 하기와 같은 콜로니 형성 측정 실험을 수행하였다.

[0247] [실험예 6-1] 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)에 대한 항균 효능

[0249] A. 배양세포에서 콜로니 형성 분석(CFU 측정)

[0250] 상기 제조예에서 제조된 실시예 1 내지 3의 화합물이 그람-양성균인 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)에 대해 항균 활성을 갖는지 여부를 조사하기 위해, 골수 유래 대식세포(BMDM)에 결핵균(MOI 5)을 감염시킨 후, 상기 제조예에서 제조된 실시예 1 및 3의 화합물을 1, 5, 10 μ M 농도로 처리하고 박테리아 콜로니 형성을 측정하였다(도 6A). CFU 분석 결과, 실시예 1 및 3의 화합물을 5-10 μ M 농도로 처리 시 결핵균(Mtb)의 성장 속도가 극적으로 억제되었다(도 6A).

[0251] B. 공동화(co-localization) 분석 및 LC3B 발현량 분석

[0252] 도 6B 및 6D에 나타난 바와 같이, 결핵균(Mtb)-감염된 BMDM의 실시예 1 또는 3의 화합물을 처리하지 않은 대조군(Control)에 비해, Mtb 파고솜과 오토파고솜 사이의 공동화(co-localization)(도 6B) 및 Mtb 파고솜과 리소솜 사이의 공동화(도 6D)가 유의하게 증가하였다. 이는 본 발명의 일 측면에 따른 화합물, 구체적으로 실시예 1 및 3의 화합물이 감염 동안 결핵균(Mtb)의 파고솜 성숙을 활성화시킴을 시사한다. 또한, LC3B의 발현량은 실시예 1의 화합물 처리에 의해 결핵균(Mtb)-감염된 BMDM에서 유의하게 상향조절되었다(도 6C).

[0253] C. 투과 전자 현미경(TEM) 촬영

[0254] 실험예 5-2와 동일한 방법으로 투과 전자 현미경(TEM)으로 실시예 1의 화합물이 처리된 결핵균(Mtb)-감염된 BMDM을 촬영한 결과, 결핵균(Mtb)는 주로 포식체 구조 내에서 검출되었지만, 실시예 1의 화합물이 처리된 BMDM에서(도 6E의 Mtb+2205), Mtb의 상당 부분은 오토파고솜 또는 오토파고리소솜인 것으로 보이는 형태학적으로 불균질한 이중막 소포에 의해 격리되었다(도 6E).

[0255] D. *Atg7* 녹아웃 마우스 세포에서의 분석

[0256] 결핵균(Mtb) 감염에 대하여 본 발명의 일 측면에 따른 화합물, 구체적으로 실시예 1의 화합물 처리 시 항균 반응이 활성화되는 데에 오토파지가 어떠한 역할을 하는지 확인하기 위해, 오토파지 활성화와 관련된 유전자 *Atg7*를 녹아웃시킨 마우스를 이용하여 실험을 수행하였다. 구체적으로, *Atg7*^{f1/f1} (*Atg7* WT) 마우스 및 *Atg7*^{f1/f1} LysM-Cre⁺ (*Atg7* cKO) 마우스로부터 얻은 BMDM을 결핵균(Mtb)으로 감염시키고, 실시예 1의 화합물을 72시간 동안 처리한 뒤, CFU 분석을 수행하였다. *Atg7* WT BMDM에서 세포내 결핵균(Mtb) 성장 억제에 대한 실시예 1의 화합물의 효과와 비교하면, 실시예 1의 화합물을 동일하게 처리 할 때 *Atg7* cKO에서 세포내 결핵균(Mtb)의 성장 속도가 보다 덜 억제됨을 확인하였다(도 6F). 이러한 결과는, 본 발명의 일 측면에 따른 화합물, 구체적으로 실시예 1의 화합물에 의해 유도된 박테리오파지가 결핵균(Mtb) 감염에 대한 항균 반응에 요구됨을 강하게 시사한다.

[0257] E. 숙주 항균성 방어 촉진 효과 분석

[0258] 본 발명의 일 측면에 따른 화합물, 구체적으로 실시예 1의 화합물의 투여가 마우스에서 결핵균(Mtb) 감염 동안 숙주 항균성 방어(host antimicrobial defense)를 촉진시키는지를 확인하기 위해 결핵균(Mtb)에 의한 단기 감염 모델을 사용하였다[Kim TS, Jin YB, Kim YS, et al. SIRT3 promotes antimycobacterial defenses by coordinating mitochondrial and autophagic functions. Autophagy 2019; 15:1356-75]다. 이 때, 마우스를 고-투여량 접종원 (~5 x 10⁴ CFU)으로 감염시킨 후, 3일에 20 mg/kg의 실시예 1의 화합물을 복강내 주사하였다(총 3회 주사)(도 6H). 폐 추출물의 CFU 분석 결과, 실시예 1의 화합물이 처리된 마우스는 박테리아 수가 상당히 감소되었음을 확인하였다(도 6H). 조직병리학적 분석 결과도 마찬가지로, 실시예 1의 화합물을 처리한 마우스의 폐에서 염증이 유의하게 감소함을 확인하였다(도 6I).

[0259] 8주령 C57BL/6 마우스에 5×10^4 CFU로 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)을 비강을 통해 감염시킨 후, 실시예 2의 화합물을 주 3회 20 mg/kg 복강내 투여하였다. 처리 및 투여 종료 후 마우스의 폐에서 발견된 박테리아 콜로니 형성을 측정하고, 그 결과를 도 6G 및 7에 나타내었다. 이 때, 실시예 2의 화합물에 대한 대조군으로는 실시예 2의 화합물 대신 비히클(vehicle)을 투여한 군을 사용하였다. 실시예 2의 화합물을 처리한 경우 C57BL/6 마우스 폐에서 생성된 결핵균의 콜로니 개수가 대조군에 비해 감소하였다(도 6G, 도 7).

[0260] 이를 통해, 본 발명의 일 측면에 따른 화합물, 구체적으로 실시예 1과 2의 화합물이 생체 내에서 폐에 박테리아 부하 및 폐 염증을 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0262] [실험예 6-2] 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*)에 대한 항균 효능

[0263] Raw264.7 대식세포주와 J774A.1 대식세포주 각각을 5% 이산화탄소가 유지되는 배양기내에서 10% FBS와 1% 스트렙토마이신/페니실린을 함유한 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다. 상기 제조예에서 제조된 실시예 6의 화합물의 항균 효능을 측정하기 위하여, 12웰 플레이트에 각 세포를 분주하였다. 세포가 플레이트의 표면에 완전히 부착 되도록 24시간이 추가적인 배양을 하였다. 이후, 2시간 동안 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*)을 MOI 10으로 각 세포주에 30분 동안 감염시킨 후, 실시예 6의 화합물을 5시간 동안 2μM 처리한 후 세포를 취합하였다. 취합된 세포로부터 세포 내 번식한 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*)을 추출하기 위해 각 샘플에 0.1% triton-x-100/PBS 용액을 처리하였고, 추출된 균들을 LB 한천 콜로니(agar colony)에 16시간 동안 배양하였다. 배양 후 생성된 콜로니 개수를 측정하고, 그 결과를 도 8a 및 8b에 나타내었다.

[0264] 도 8a 및 도 8b에 나타난 바와 같이, 실시예 6의 화합물을 처리한 경우 Raw264.7 및 J774A.1 세포주 내에서 번식한 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*)이 생성한 콜로니 개수가 각각 대조군의 약 30%, 10% 수준으로 감소함을 확인하였다.

[0266] [실험예 6-3] 장티푸스균(*Salmonella Typhimurium*)에 대한 항균 효능

[0267] 상기 실험예 1-2와 동일한 방법으로, Raw264.7 대식세포주 및 J774A.1 대식세포주 각각을 배양하고, 화농연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*) 대신 장티푸스균(*Salmonella Typhimurium*)을 감염시키고, 도 9a 내지 9c와 같이 실시예 1 내지 5의 화합물(실시예 2는 도 9a의 21)을 각각 처리하여 콜로니 개수를 측정하였다.

[0268] 그 결과, 도 9a 내지 9c에 나타난 바와 같이, 실시예 1 내지 5의 화합물을 처리한 경우 Raw264.7 및 J774A.1 세포주 내에서 번식한 장티푸스균(*Salmonella Typhimurium*)이 생성한 콜로니 개수가 대조군에 비하여 감소하였으며, 특히 실시예 1의 화합물은 대조군의 20% 수준으로 감소하고, 실시예 4 및 5의 화합물 역시 측정된 콜로니 개수가 거의 없을 만큼 큰 폭으로 감소함을 확인하였다.

[0269] 이를 통해, 본 발명의 일 측면에 따른 화합물은 박테리오파지 효능을 나타내어 세균의 종류에 관계없이 우수한 항균 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0271] [실험예 7] 항생제 내성을 갖는 박테리아에 대한 항균 효능 확인

[0273] 상기 실험예 1을 통해 본 발명의 일 측면에 따른 화합물이 우수한 항균 효과가 있음을 확인하였는바, 항생제 내성을 갖는 박테리아에 대해서도 항균 효능을 갖는지를 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0274] 상기 실험예 1-1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 5×10^3 CFU로 항생제 내성(multidrug-resistant, MDR)을 가진 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)을 감염시키고, 실시예 2의 화합물을 투여하였으며, 마우스 폐에서 발견된 박테리아 콜로니 형성을 측정하고, 그 결과를 도 10에 나타내었다. 이 때, 대조군에는 실시예 2의 화합물 대신 비히클(vehicle)을 투여하였다.

[0275] 도 10에 나타난 바와 같이, 실시예 2의 화합물을 처리한 경우 마우스 폐에서 생성된 항생제 내성을 가진 결핵균 콜로니 개수가 대조군에 비해 약 100배 이상 감소함을 확인하였다.

[0276] 이를 통해, 본 발명의 일 측면에 따른 화합물은 항생제 내성을 갖는 박테리아에 대해서도 우수한 항균 효과가

있음을 알 수 있었다.

[실험예 8] 박테리아 감염에 의한 염증 완화 효능 확인

박테리아 감염에 대한 숙주의 방어는 선천 및 적응 면역 세포에 의해 유도된 염증 반응의 조정된 반응에 의존하는 것으로 알려져 있다[Mayer-Barber KD, Barber DL. Innate and Adaptive Cellular Immune Responses to Mycobacterium tuberculosis Infection. Cold Spring Harb Perspect Med 2015; 5; Yoshikai Y. Immunological protection against mycobacterium tuberculosis infection. Crit Rev Immunol 2006; 26:515-26.]. 상기 실험예 1-1에서 본 발명의 일 측면에 따른 화합물이 p62를 활성화시켜 장티푸스균(*S. Typhimurium*) 또는 결핵균(*Mtb*)에 감염된 마우스에서 조직 병리를 감소시키고 숙주 면역 반응을 증진시키는 것을 확인하였는바, 세균성 감염 질환과 관련된 만성 염증을 예방, 완화 또는 치료하기 위한 조성물의 유효성분으로 본 발명의 일 측면에 따른 화합물의 유의한 효과를 평가하고자 하기와 같은 실험을 수행하였다.

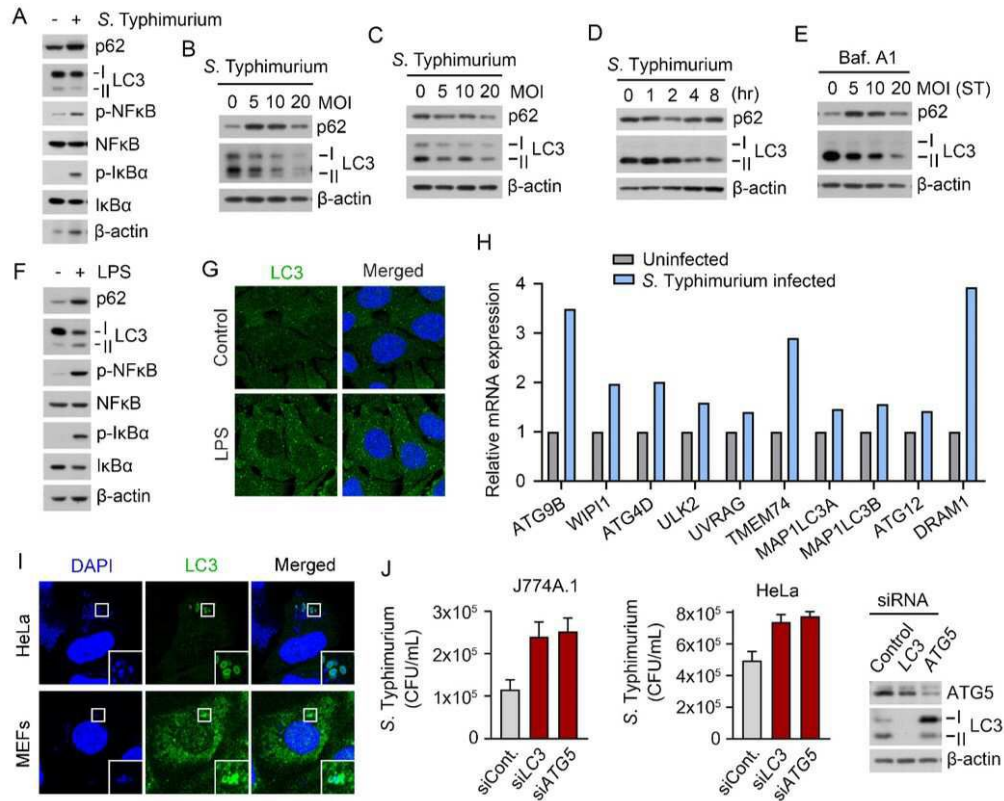
먼저, 상기 실험예 1-1과 동일한 방법으로, 복막 대식세포(peritoneal macrophage, PM) 및 골수 유래 대식세포(BMDM) 둘 모두를 결핵균(*MtB*)으로 감염시키고, 실시예 1의 화합물($10 \mu\text{M}$)을 처리하였다. RT-PCT 분석 결과, 결핵균(*Mtb*) 감염에 의해 과발현된 전염증성 사이토카인(IL6 및 IL1 β) 및 케모카인(Cxc15)은 실시예 1의 화합물 처리에 의해 효율적으로 억제되었다 (도 11A 참조). 또한, 실시예 1과 6의 화합물은 BMDM에서도 결핵균(*Mt b*)에 의한 IL6, IL1 β 및 Cxc15의 과발현을 억제하였다 (도 11B와 11C). 더욱이, 실시예 1의 화합물은 C57BL/6 마우스 내에서 결핵균(*Mtb*) 감염에 의해 과발현된 TNF- α mRNA 수준을 유의하게 억제하였다 (도 11D).

또한, 실험예 1-1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, 5×10^4 CFU로 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)을 감염시키고, 실시예 2의 화합물을 투여한 다음, 투여 종료 후 마우스의 폐 조직의 염증 상태를 측정하기 위해 H&E 염색법을 실행하였으며, 그 결과는 도 12a 및 12b와 같다. 도 12a 및 12b에 나타난 바와 같이, 실시예 2의 화합물이 결핵균 감염으로 야기된 C57BL/6 마우스 폐 조직의 염증을 감소시킨 것을 확인할 수 있었다. 특히, 대조군(vehicle 투여군)과 실시예 2의 화합물 투여군 간의 염증 조직의 면적을 최소 4마리의 마우스로 형성된 실험군에서 얻은 평균값을 내어 비교한 결과, 실시예 2의 화합물을 처리한 경우 염증 면적이 대조군의 약 50% 정도로 감소하였다.

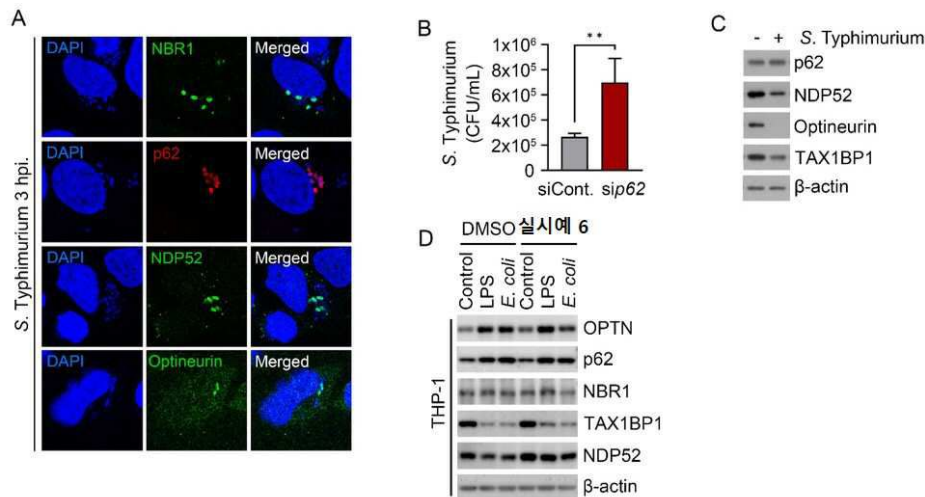
이를 통해, 본 발명의 일 측면에 따른 화합물은 p62 활성화를 통해 박테리아 감염 동안 염증 매개자의 발현을 억제함으로써, 박테리아 감염에 의한 염증을 예방, 완화 또는 치료하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

도면

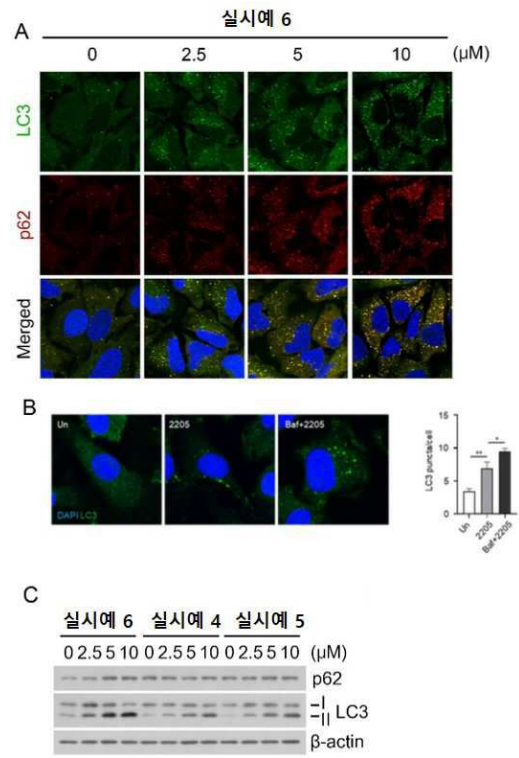
도면1



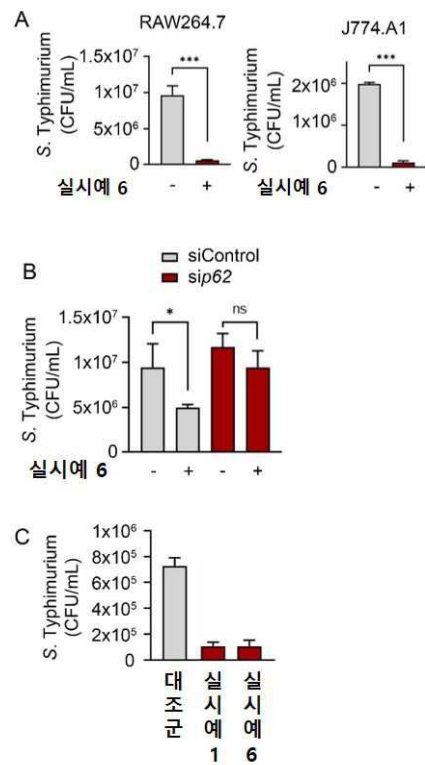
도면2



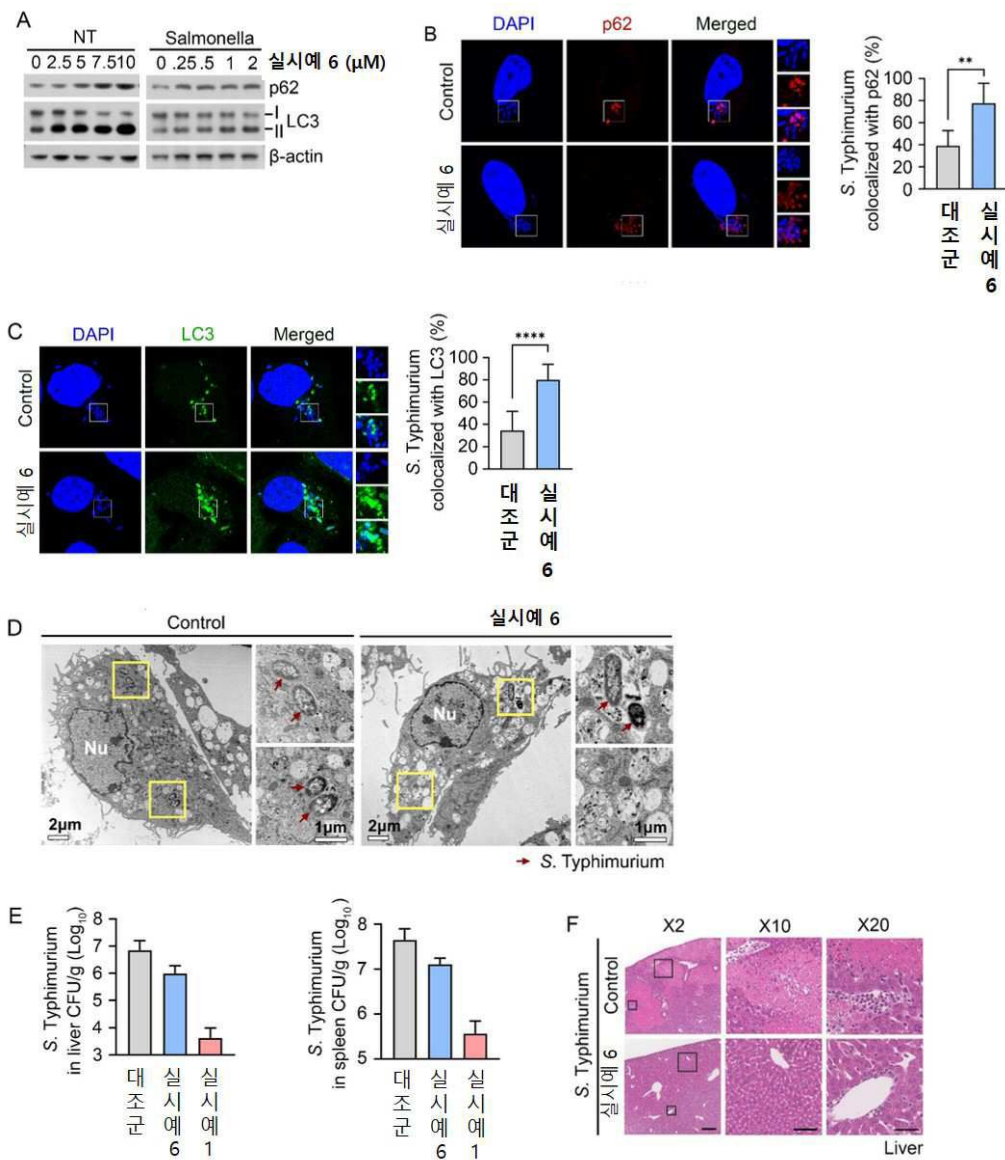
도면3



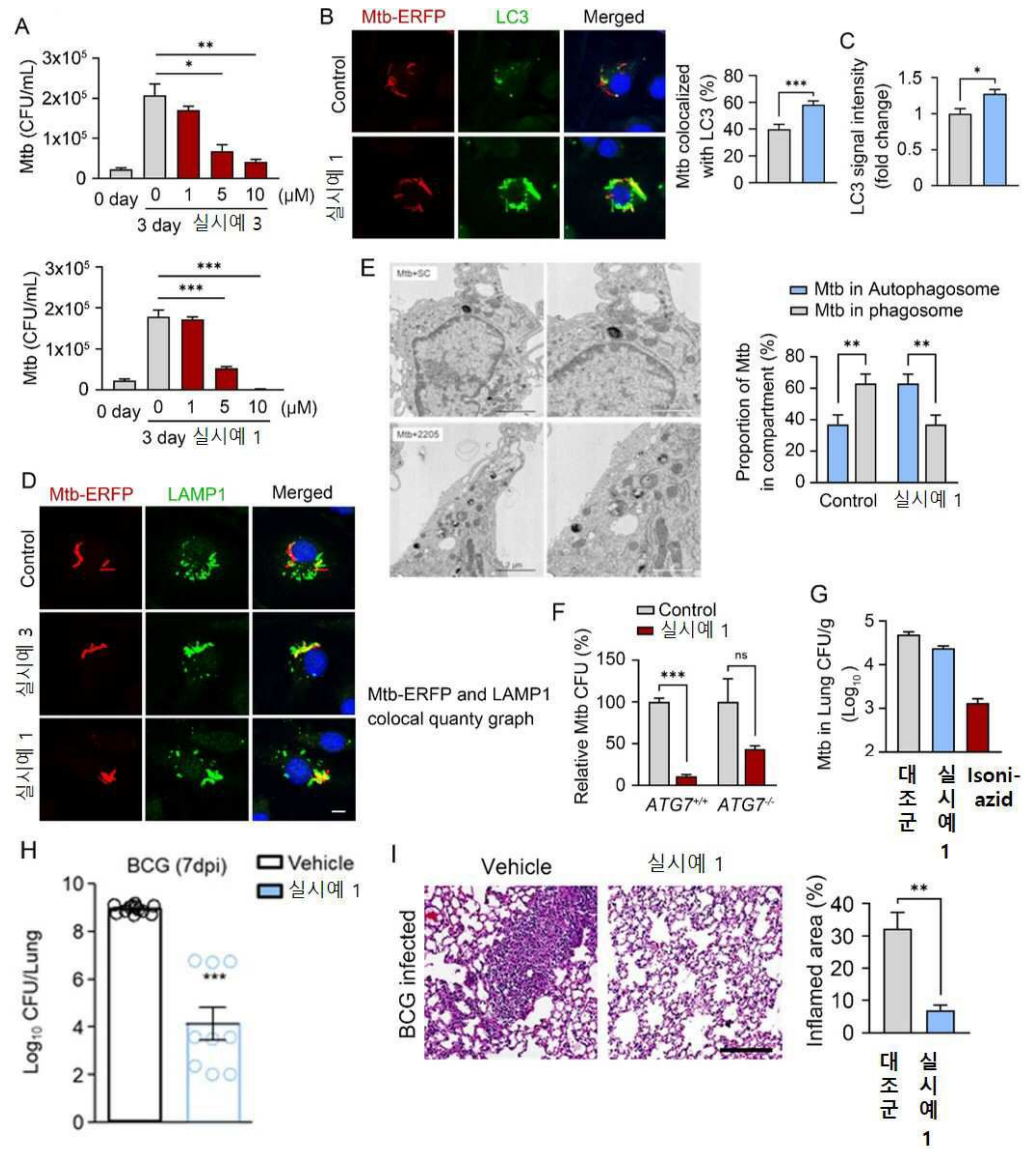
도면4



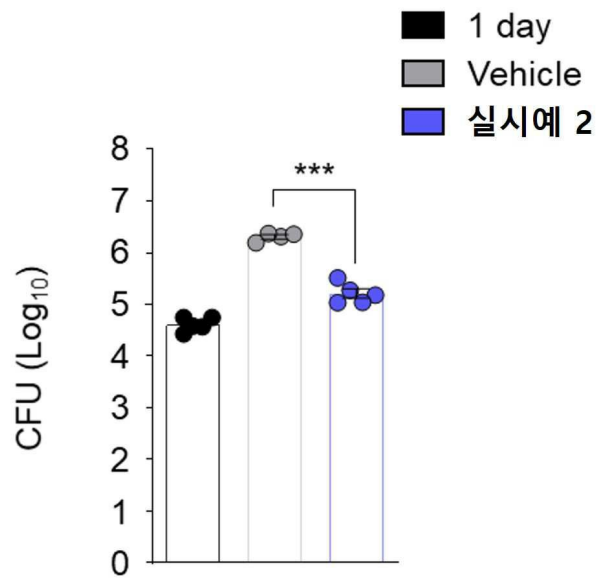
도면5



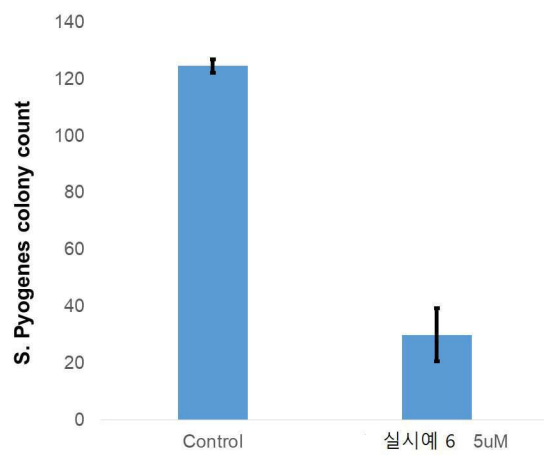
도면6



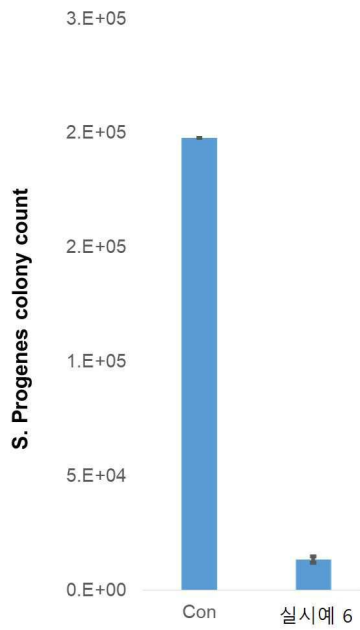
도면7



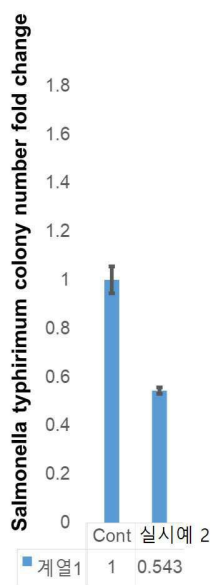
도면8a



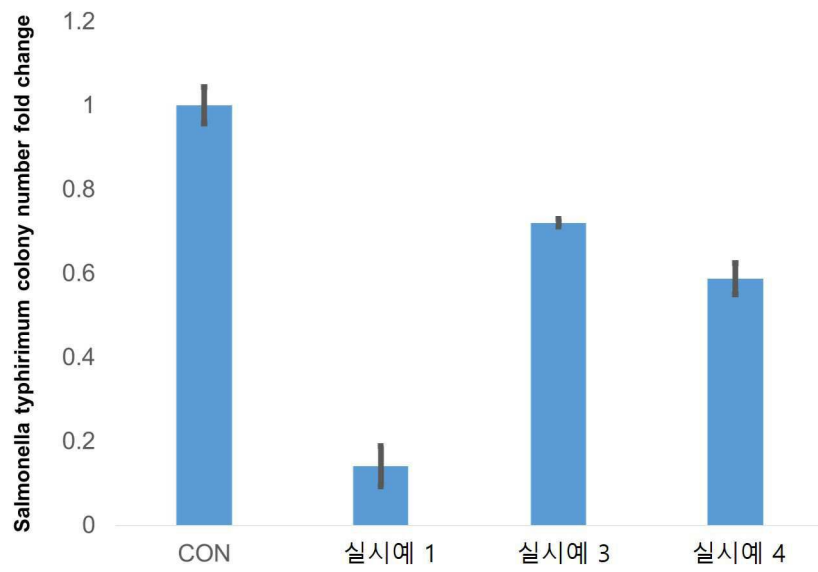
도면8



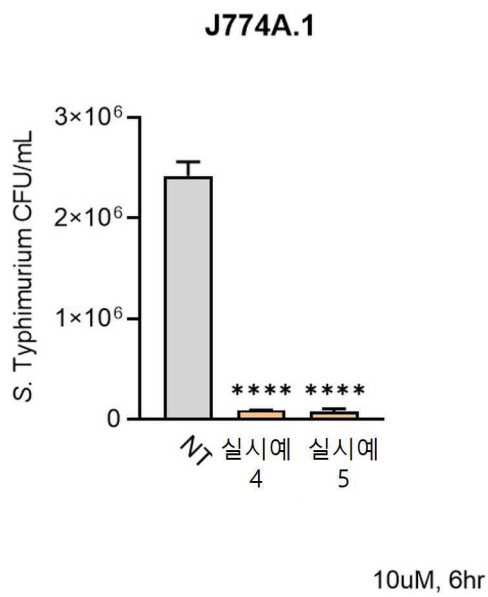
도면9a



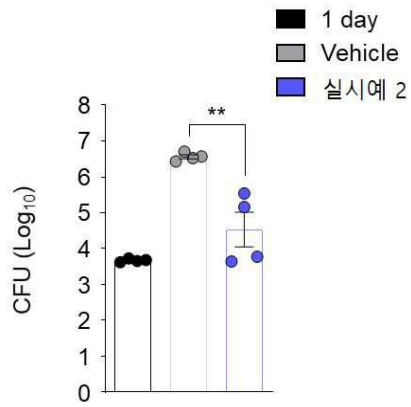
도면9b



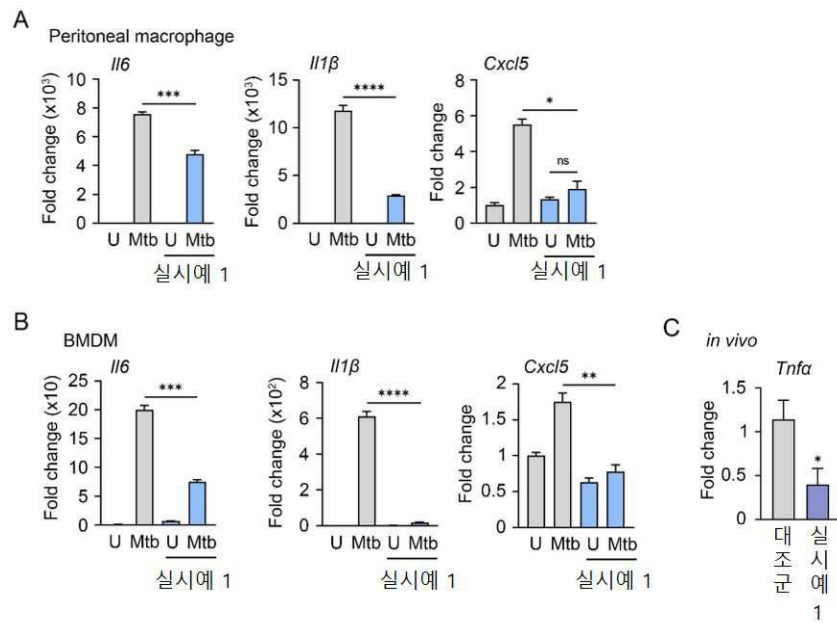
도면9c



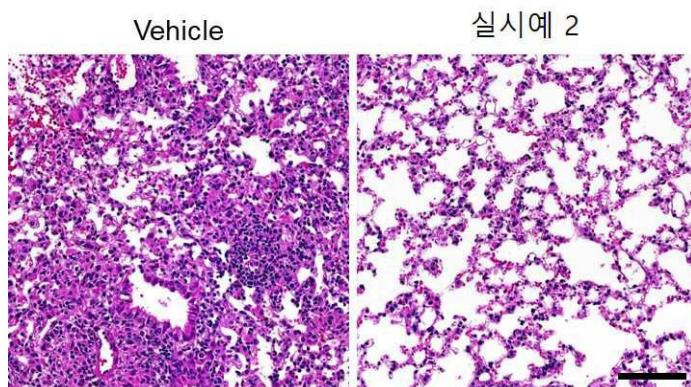
도면10



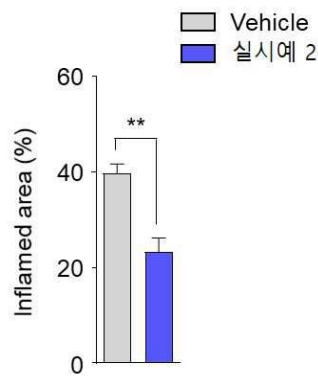
도면11



도면12a



도면12b



서열 목록

<110>	Seoul National University R&DB Foundation	
	The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)	
<120>	Anti-bacterial composition	
<130>	21p258ind	
<160>	4	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ATG5 siRNA sense	
<400>	1	
	caguaucaga cacgaucau	19
<210>	2	
<211>	18	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><		
223>	ATG5 siRNA antisense	
<400>	2	
	augaucgugu cugaucug	18
<210>	3	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> LC3B siRNA sense

<400> 3

ccaagaucca gugauuuuuu u

21

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC3B siRNA antisense

<400> 4

auaaucaucug gaucuugguu cu

22