



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월25일

(11) 등록번호 10-2093409

(24) 등록일자 2020년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/496 (2006.01) A61K 31/4045 (2006.01)

A61K 31/454 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/496 (2013.01)

A61K 31/4045 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0132073

(22) 출원일자 2019년10월23일

심사청구일자 2019년10월23일

(56) 선행기술조사문헌

JP2003512371 A

W02008147864 A2

W02019043064 A1

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김준

서울특별시 강남구 선릉로 222, 106동 901호 (대치동, 대치아이파크아파트)

박영광

인천광역시 연수구 원인제로 315, 105동 810호 (연수동, 주공1단지, 2단지아파트)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 2 항

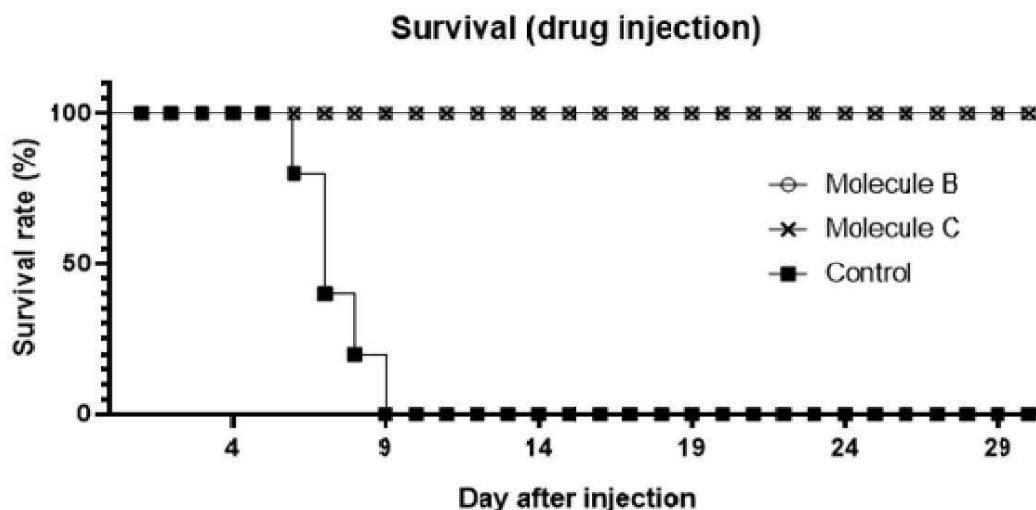
심사관 : 강태현

(54) 발명의 명칭 카바졸 화합물을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물

(57) 요약

본 발명은 카바졸 화합물을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 카바졸 화합물은 칸디다균 뿐만 아니라 효모와 같은 진균에 대해서도 생장 억제하고, 칸디다균의 형태변환을 억제하여 병원성을 무력화시키므로, 칸디다 감염을 치료할 수 있는 항진균용 조성물로 매우 유용하다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 31/454 (2013.01)

A61P 31/10 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711083078

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 전략공모_전략과제

연구과제명 스트레스관련 라이보솜 단백질 이형성, 분해 및 병원성 효모 발병 기작

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

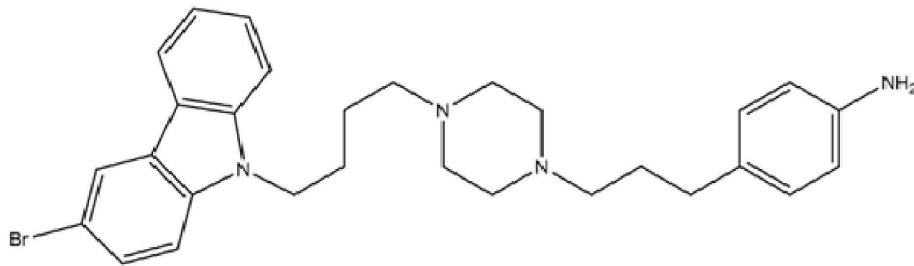
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 카바졸 화합물을 유효성분으로 함유하는 항진균 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 칸디다 속 (*Candida* sp.), 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces* sp.), 카자크스 타니아 속 (*Kazachstania* sp.), 아스퍼질러스 속 (*Aspergillus* sp.), 클라도스포리움 속 (*Cladosporium* sp.), 페니실리움속 (*Penicillium* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나에 대한 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항진균 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 카바졸 화합물을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 캔디다균은 가장 흔한 병원균 중 하나로서 건강한 사람의 점막 감염 (mucosal infection)에서부터 면역력이 약한 사람과 약해진 환자에 심각한 감염 상태인 전신성 감염 (systemic infection)에 이르기까지 다양하고 넓은 감염 범주를 갖는다. 캔디다균은 건강한 인간의 구강, 피부, 질 (vagina), 장 (intestinal tract)등에 기생하며 정상적인 면역체계를 통하여 조절 받고 있으나, 피로의 누적, 잘못된 식생활로 인한 독성물질의 분비, 당뇨병, 영양실조 등에 의한 면역 감소 등으로 인하여 병원증상을 나타내며, 또한 질병 치료를 위한 항생물질, 부신피질 호르몬제, 면역억제제를 장기간 처방받고 있을 때에도 발생할 수가 있다. 특히 이 병원균은 병원에서 일어나는 원내감염의 내인성 요인으로 알려져 있다. 장기 이식으로 인한 면역력 저하 환자를 비롯하여, 항암제 치료를 받고 있는 환자, AIDS 환자들의 경우엔 심각한 생명위협 요인으로 작용한다. 미국의 경우 전체 병원 내 감염 원인 중 캔디다균은 1980년 6%에서 1990년 10.4%까지 계속된 증가추세에 있으며, 최근 들어 가장 흔한 병원 내 감염균으로 인식되고 있다. 또한 1992년부터 1997년까지 미국 질병관리센터 조사기관 (National Nosocomial Infections Surveillance: NNIS)의 최근 결과에 의하면 혈액감염에선 4위를, 요도, 눈, 귀, 코, 목 감염에서는 2위를 기록하고 있다. 현재까지 전 세계적으로 병원 내에서 그 피해가 심각한 수준이며, 해결해야 할 우선 과제로 떠오르고 있다. 지금까지 이러한 캔디다균은 항생제를 통하여 박멸하고자 하였으나, 환자의 경우마다 그 차이가 있으며 또한 같은 항생제이더라도 작용하는 범주나 내용면에서 달라 치료에 어려움을 겪고 있다. 우리나라의 경우에는 원내 감염의 18% 정도를 캔디다균이 차지하고 있으며, 전신성 감염이 이루어졌을 경우 50% 이상의 치사율을 보이고 있다.

[0004] 캔디다 알비칸스 (*Candida albicans*)는 1950년대에 이르러 과학적 학술적 연구의 접근이 이루어지면서 많은 결과들을 알아낸 가장 대표적인 캔디다 종이다. 두 가지 형태의 곰팡이균 (dimorphic fungus)으로서 대부분의 시간을 단일 타원형의 효모 세포로 존재하며 이분법을 통하여 성장한다. 그러나 적정 조건 즉, 체내온도, pH, serum을 구비하였을 경우, 필라멘트성 분지 (filamentous branching)인 균사 (hyphae)를 형성한다. 아직까지 이러한 형태변화가 병원성으로의 전환과 관계가 아직 확실한 것은 아니지만, 병원성을 나타내는 환자에서 분리한 경우 대부분이 균사 (hyphae)를 형성하고 있으며, 또한 균사를 형성하지 못하게 한 유전자 돌연변이 쥐를 사용한 실험에서 캔디다증으로 발병되지 않은 결과 등을 미루어 형태변화와 병원성 획득에는 일련의 상관관계가 존재한다고 생각된다. 따라서 많은 과학자들이 그러한 캔디다균의 형태변화와 관련된 유전자의 기능분석에 많은 연구를 진행하고 있으며 많은 결과들을 밝혀냈다.

[0005] 이러한 캔디다 질병의 치료를 위하여 암포테리신 B (amphotericin B), 플루코나졸 (fluconazole)과 같은 많은 항생제/항진균제 (antifungal drug)가 개발되어 사용되고 있으며 그 효능을 입증하고 있다. 그러나 환자에서 플루코나졸에 대한 강력한 저항성이 새로운 문제로 대두되고 있다. 따라서 플루코나졸에 대한 저항성을 피할 수 있는 새로운 약물의 개발이 절실히 요구된다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 기존의 캔디다 치료제에 비해 안전하고 효과도 우수한 항진균 치료제를 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 카바졸을 포함하는 화합물이 캔디다균 뿐만 아니라 효모와 같은 다른 진균에 대해서도 우수한 항진균 효과를 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) 1. Daniel Poulain (2015) *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis, *Critical Reviews in Microbiology*, 41:2, 208-217, DOI: 10.3109/1040841X.2013.813904
- (비특허문헌 0002) 2. De Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. (2004). Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 17:729-59
- (비특허문헌 0003) 3. E.D. Olthof, R. Nijland, A.F. Gulich, G.J.A. Wanten, Microbiocidal effects of various taurolidine containing catheter lock solutions, *Clinical Nutrition*, Volume 34, Issue 2, 2015, Pages 309-314, ISSN 0261-5614
- (비특허문헌 0004) 4. Rajendra Prasad, Remya Nair, Atanu Banerjee, Multidrug transporters of *Candida* species in clinical azole resistance, *Fungal Genetics and Biology*, Volume 132, 2019, 103252, ISSN 1087-1845,

발명의 내용

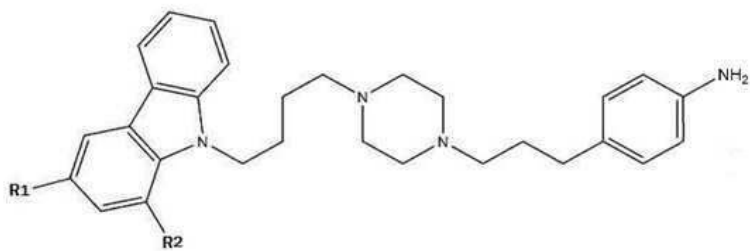
해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 캔디다균 뿐만 아니라 효모와 같은 진균에 대해서도 성장 억제 및 병원성 상쇄 효과를 가지는 새로운 카바졸 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 항진균 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1 내지 8로 구성된 군에서 선택되는 카바졸 화합물을 유효성분으로 함유하는 항진균용 조성물을 제공한다.

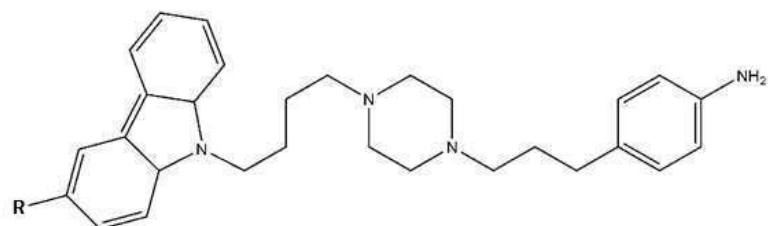
[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 상기 식에서, R1 및 R2는 H 또는 Br이다.

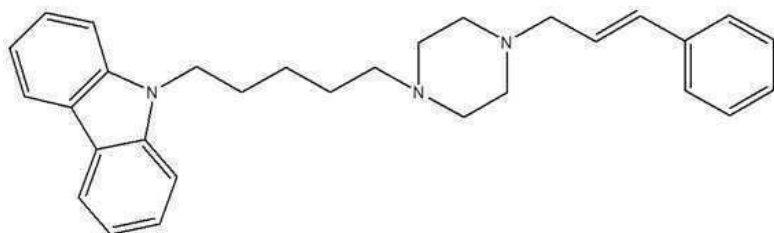
[0015] [화학식 2]



[0016]

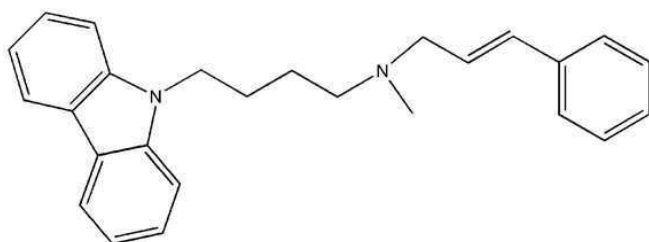
[0017] 상기 식에서, R은 H 또는 NO₂이다.

[0018] [화학식 3]



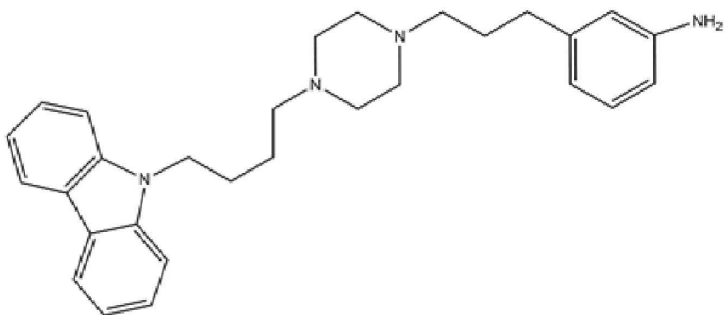
[0019]

[0020] [화학식 4]



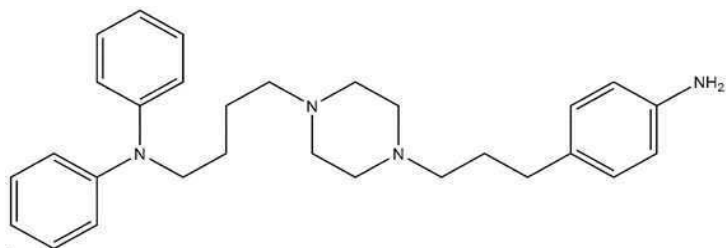
[0021]

[0022] [화학식 5]



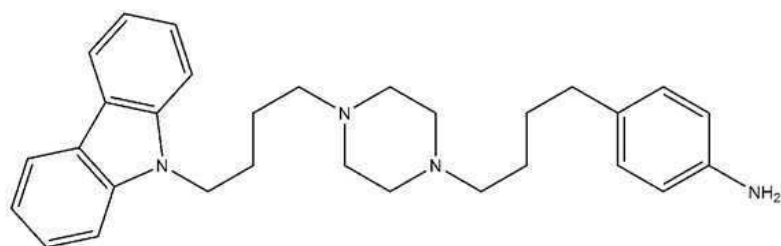
[0023]

[0024] [화학식 6]



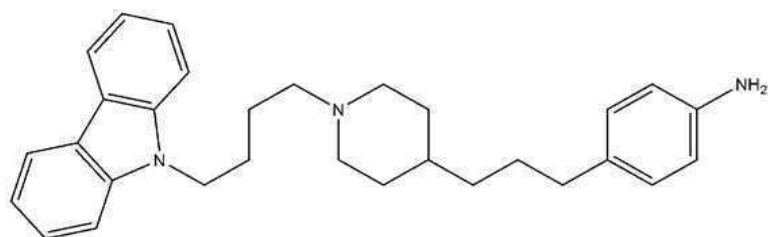
[0025]

[0026] [화학식 7]



[0027]

[0028] [화학식 8]



[0029]

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 카바졸 화합물은 칸디다균 뿐만 아니라 효모와 같은 진균에 대해서도 생장 억제하고, 칸디다균의 형태변환을 억제하여 병원성을 무력화시키므로, 칸디다 감염을 치료할 수 있는 항진균용 조성물로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 카바졸 화합물의 칸디다균 흡광도를 측정한 결과를 나타낸 것으로, 도 1a는 Molecule A, B, C, D, E의 결과, 도 1b는 Molecule F, G, H, I, J의 *Candida albicans*에 대한 MIC 테스트 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 카바졸 화합물 B 및 C의 *S. cerevisiae*에 대한 MIC 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 카바졸 화합물 B 및 C의 *A. fumigatus*에 대한 MIC 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 카바졸 화합물 B 및 C의 포유동물 세포 (HeLa 세포)에 대한 세포독성을 확인한 것이다.

도 5는 꼬리정맥주사를 통해 처리된 카바졸 화합물 B 및 C의 칸디다증 마우스모델에 대한 생존율 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 음용수에 희석된 카바졸 화합물 B 및 C의 칸디다증 마우스모델에 대한 생존율 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 꼬리정맥주사를 통해 처리된 카바졸 화합물 B 및 C의 칸디다증 마우스모델 신장에서 칸디다 감염 정도를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

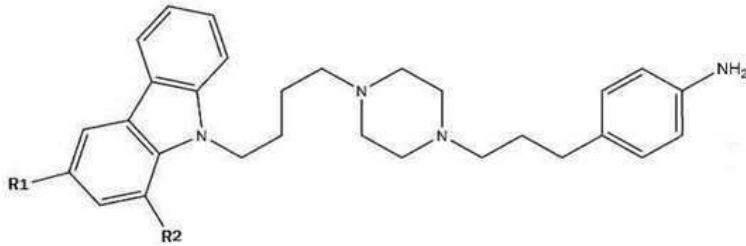
[0034] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서

사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0036] 본 발명에서는 캔디다균에 작용하여 생장을 억제하고, 병원성을 무력화시킬 수 있는 다양한 구조의 카바졸 화합물을 이용하여 캔디다균 및 여러 진균들의 성장 억제, 및 캔디다 감염 마우스에서 치료 효과를 확인하였다. 아울러, 본 발명의 카바졸 화합물은 포유동물 세포에서 안전하면서도 우수한 항진균 효과를 나타낸다.

[0037] 따라서, 본 발명은 일관점에서, 하기 화학식 1 내지 8로 구성된 군에서 선택되는 카바졸 화합물을 유효성분으로 함유하는 항진균용 조성물에 관한 것이다.

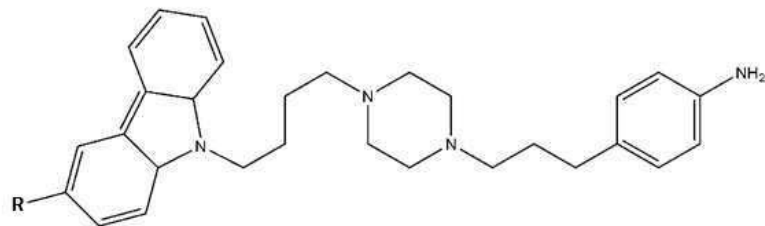
[0038] [화학식 1]



[0039]

[0040] 상기 식에서, R1 및 R2는 H 또는 Br이다.

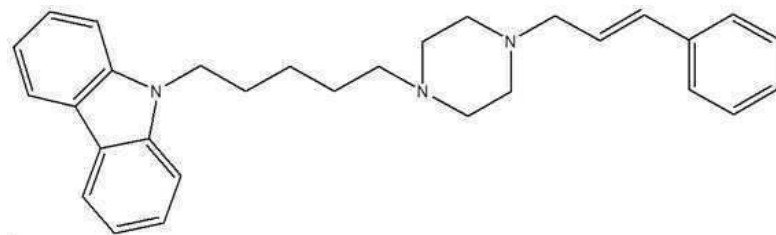
[0041] [화학식 2]



[0042]

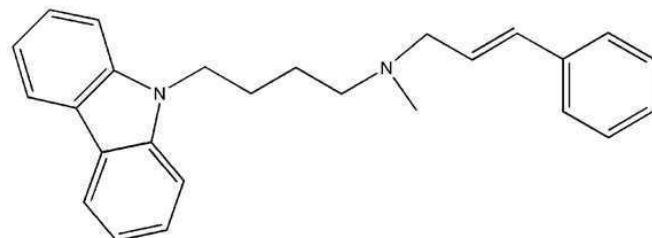
[0043] 상기 식에서, R은 H 또는 NO₂이다.

[0044] [화학식 3]



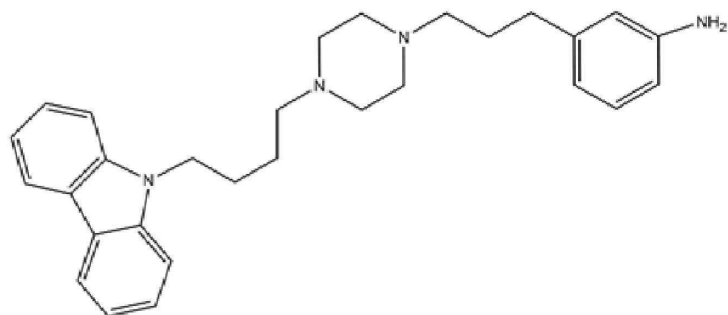
[0045]

[0046] [화학식 4]



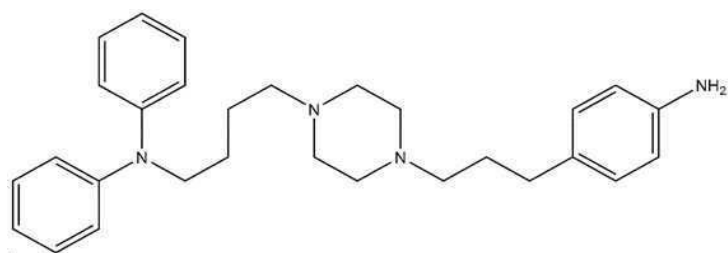
[0047]

[0048] [화학식 5]



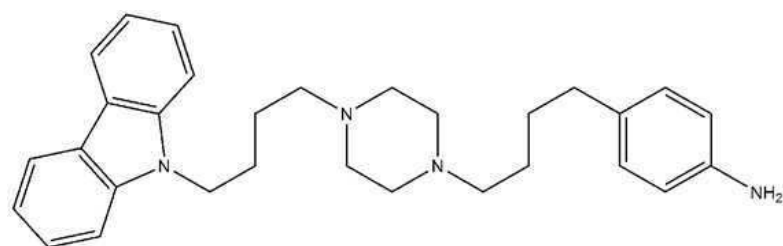
[0049]

[0050] [화학식 6]



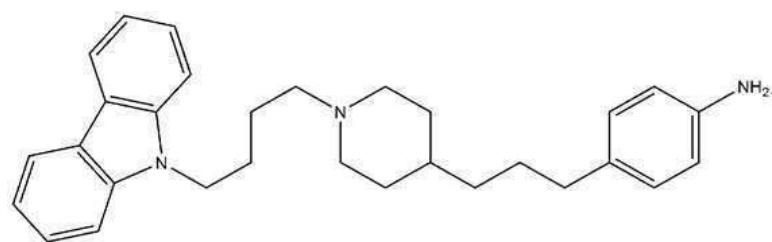
[0051]

[0052] [화학식 7]



[0053]

[0054] [화학식 8]



[0055]

[0056] 본 발명의 카바졸 화합물은 특별한 언급이 없는 한 상기 화합물의 염 및 이의 광학 이성질체를 모두 포함한다.

[0057] 상기 카바졸 화합물이 염의 형태로 사용하는 경우, 유효 성분인 카바졸 화합물에 관하여 존재하는 염 중에서 각각의 용도에 적합하거나 허용되는 염을 선택하면 양호하며, 바람직하기로 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다.

[0058] 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 푸마르산, 글루코산, 메탈설폰산, 아세트산, 글리콜산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 메탈설폰산 또는 염산을 사용할 수 있다.

[0059] 상기 화학식 1에서 R1이 Br이고, R2가 H인 것은 본 발명의 실시예에서 Molecule B로 나타낼 수 있다. 또한, 화학식 1에서 R1이 H이고, R2가 Br인 것은 본 발명의 실시예에서 Molecule J로 나타낼 수 있다.

[0060] 상기 화학식 2에서 R이 H인 것은 본 발명의 실시예에서 Molecule C로 나타낼 수 있다. 또한, 상기 화학식 2에서 R이 NO₂인 것은 본 발명의 실시예에서 Molecule G로 나타낼 수 있다.

- [0061] 또한, 상기 화학식 3은 본 발명의 실시예에서 Molecule A, 화학식 4는 Molecule D, 화학식 5는 Molecule E, 화학식 6은 Molecule F, 화학식 7은 Molecule H, 화학식 8은 Molecule I로 나타낼 수 있다.
- [0062] 상기 화학식 1 내지 8의 화합물은 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18: 4670-4674, 2008의 방법에 따라 제조하였다.
- [0064] 본 발명의 카바졸 화합물은 칸디다균 및 여러 진균에 대하여 우수한 항진균 활성을 나타낸다. 이러한 칸디다 감염 치료 효과는 칸디다균의 병원성 인자 중 하나인 군사체로의 형태변화를 억제하는 카바졸의 효과에 의한 것이다.
- [0065] 본 발명의 일 실시예에서는, 칸디다균에 대한 MIC가 Molecule B는 8 μ g/ml, Molecule C는 16 μ g/ml로 우수한 항진균 활성을 가진다.
- [0066] 본 발명의 다른 실시예에서는, 버딩이스트 효모(*S. cerevisiae*) 및 *A. fumigatus*에 대한 MIC가 Molecule B는 4 μ g/ml, Molecule C 역시 4 μ g/ml로 우수한 항진균 효과를 가지며, *A. fumigatus*에 대한 MIC는 Molecule B 및 C 모두 64 μ g/ml로 동일하였다.
- [0067] 본 발명의 진균은 칸디다 속 (*Candida* sp.), 사카로마이세스 속 (*Saccharomyces* sp.), 카자크스타니아 속 (*Kazachstania* sp.), 아스퍼질러스 속 (*Aspergillus* sp.), 클라도스포리움 속 (*Cladosporium* sp.), 페니실리움 속 (*Penicillium* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 이와 같이 본 발명에 따른 카바졸 화합물은 각종 병원성 미생물에 대한 항진균 활성이 우수하고, 독성이 없으며 미량으로도 효과가 우수하여 각종 항진균제, 약제학적 조성, 식품 보존 첨가제, 화장품 첨가제, 항진균용 건축 자재, 농약, 생활용품 첨가제 등으로 사용이 가능하다.
- [0070] 본 발명은 상기 항진균 활성을 가지는 카바졸 화합물을 유효성분으로 함유하여 항진균제 또는 약제학적 조성 물질로 사용함에 따라 각종 병원성 미생물의 활성을 저해하거나 군사체 형성을 저지한다.
- [0071] 항진균제 조성물은 카바졸 화합물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0072] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0073] 본 발명에 의한 조성물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하고 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용할 수 있으며, 제제화할 경우에는 일반적으로 사용되는 항진균제, 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 상기 항진균제로는 케토코나졸, 이트라코나졸, 플루코나졸, 미코나졸, 클로트리마졸, 펜티코나졸, 에코나졸, 비포나졸, 옥시코나졸, 클로코나졸, 물시클레이트, 암포테리신 B, 플루사이토신, 그리세오폴빈, 터비나핀, 니스타틴, 톨나프테이트, 나프티핀, 할로프로진 및 사이클로피록스, 트리클로산, 노프로락신, 시프로락신 및 염으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 화합물이 사용될 수 있다.
- [0074] 경구투여를 위한 고형제제는 본 발명에 의한 하나 이상의 이미다졸 유도체에 적어도 하나의 부형제, 예를 들면, 진분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 혼합하여 제조할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등의 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 포함되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- [0075] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다.
- [0076] 상기 비수성용제 또는 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에

틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있으며, 상기 좌제의 기재로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등을 사용할 수 있다.

[0077] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 또한, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0078] 또한, 본 발명의 카바졸 화합물은 식품 보존 첨가제로서 사용하여 식품을 장기간 보존할 수 있다. 상기 식품은 식품가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 건강보조식품, 조미식품, 제빵 및 제과류, 유가공품, 절임 식품, 발효 식품 또는 음료 등을 포함하며, 상기 사료는 가축 사료를 포함하여 그 용도에 제한되지 아니하고, 고체 또는 액체일 수 있다.

[0079] 그리고 상기 항진균 활성을 가지는 퀴놀린을 화합물은 화장품 첨가제로 사용되어 손 또는 발의 청결유지를 위한 화장료 조성물 제조에 이용할 수 있다. 일례로, 비누(고형비누, 액체비누, 포상비누, 바디비누, 핸드비누 등), 클렌징 거품, 샴푸(두발용 샴푸, 드라이샴푸 등) 등을 들 수 있다. 이들 중에서도 비누가 바람직하고, 특히 액체비누, 바디비누 등의 제형으로 사용될 수 있다.

[0080] 이외에도, 본 발명의 퀴놀린을 화합물은 항진균용 건축자재, 농약, 생활용품 첨가제 등으로 다양하게 사용이 가능하며, 그 분야에서 사용하는 공지된 항진균제와 혼합하여 사용할 수 있다. 일례로, 농약 관련 항진균제는 예를 들어 농약 사전[참조: Pesticide Manual, 12th ed, British Crop Protection Council, 2000]에 기재되어 있다.

[0081] 진술한 바의 용도를 위해 본 발명의 카바졸 화합물은 각 용도에 유효한 효과를 나타낼 수 있도록 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량%, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량% 포함될 수 있다.

[0083] [실시예]

[0084] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0086] 실시예 1: 진균 성장 억제 효과

[0087] 1-1: 캔디다 성장 억제

[0088] 캔디다의 생장 억제 효과는 항진균제 감수성 검사법의 표준법으로 알려진 CLSI M27법을 이용해 확인을 하였다. CLSI M27-A2의 지침에 따라 액체배지 미량희석법으로 시행하였다. 사용 배지는 L-글루타민 (L-glutamine)이 첨가된 RPMI-1640 배지 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA)인 RPMI-MOPS 10.4g을 증류수 900 mL에 녹인 후, 여기에 0.165 M MOPS (3-N-morpholinopropanesulfonic acid) 완충액 34.53g을 녹여 최종 양이 1,000 mL가 되도록 한 다음 pH를 7.0으로 맞추었다. 이후 0.2 μ m 필터를 이용해 filtration을 하여 배지를 제조하였다.

[0089] 카바졸 화합물은 3차 증류수 또는 DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma)용액을 이용하여 20 mg/mL의 농도로 용해시켰다. 이 항진균제는 64 μ g/mL 농도에서부터 연속 배수 희석하여 0.125 μ g/mL사이의 최종농도가 되도록 하였다.

[0090] 캔디다 균주는 Yeast extract peptone dextrose (YPED)에서 30 $^{\circ}$ C로 16시간 배양 후 1.0 탁도 (분광광도계 600 nm)로 맞추어 균농도가 약 2.0×10^7 CFU/mL가 되도록 하였다. 이 균액을 3차 증류수로 세척을 한 후 다시 RPMI-MOPS 배지를 이용하여 희석하였고, 96-well 마이크로플레이트 1번에서 10번 well까지 각각 100 μ L (최종 균농도, 2.0×10^4 CFU/mL)씩을 분주하였다. 11번 well은 성장 대조 well로서 균액 100 μ L를, 12번 well은 배지의 대조 well로서 RPMI-MOPS 배지 100 μ L만을 분주하였다. 균 접종이 끝난 마이크로플레이트는 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다.

[0091] 결과 판정은 검사자에 의한 오차를 방지하기 위하여 마이크로플레이트 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하여 데이터를 산출하였다. 표 1에는 카바졸을 포함한 합성물의 캔디다균 흡광도 측정 결과를 나타냈다.

표 1

	64ug/ml	32ug/ml	16ug/ml	8ug/ml	4ug/ml	2ug/ml	1ug/ml	0.5ug/ml	0.25ug/ml	0.125ug/ml	0ug/ml	RPMI media
Molecule B	0.043	0.047	0.042	0.041	0.137	0.143	0.224	0.198	0.199	0.209	0.216	0.039
	0.044	0.045	0.042	0.041	0.132	0.143	0.228	0.199	0.201	0.229	0.209	0.038
	0.036	0.04	0.036	0.034	0.135	0.152	0.208	0.218	0.212	0.206	0.197	0.038
Molecule C	0.04	0.039	0.04	0.136	0.24	0.198	0.193	0.25	0.193	0.156	0.207	0.036
	0.039	0.039	0.038	0.124	0.195	0.188	0.194	0.199	0.162	0.17	0.206	0.049
	0.044	0.043	0.044	0.122	0.194	0.19	0.196	0.182	0.189	0.168	0.195	0.04

테이터에서 배지 대조well을 기준으로 증식이 억제된 농도를 MIC (minimum inhibitory concentration)로 정하였고 그 결과를 표 2와 도 1에 나타냈다.

표 2

Molecule	MIC
Molecule A	32ug/ml
Molecule B	8ug/ml
Molecule C	16ug/ml
Molecule D	16ug/ml
Molecule E	32ug/ml
Molecule F	32ug/ml
Molecule G	16ug/ml
Molecule H	32ug/ml
Molecule I	32ug/ml
Molecule J	32ug/ml

그 결과, 캔디다균에 대하여 MIC는 Molecule B 8ug/ml, Molecule C 16ug/ml의 값을 나타냈다 (도 1). 즉, 캔디다균의 성장 억제 효과를 확인 할 수 있었다.

1-2: *S. cerevisiae* 및 *A. fumigatus*의 성장 억제

상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 버딩이스트 효모(*S. cerevisiae*) 및 *A. fumigatus*에 대한 MIC 테스트를 실시하였다.

그 결과, 화합물 Molecule B 및 Molecule C의 효모에 대한 MIC는 동일하게 4ug/ml으로 캔디다균에 대한 MIC보다 낮은 수치를 나타냈다 (도 2). 또한, 아스페르길루스증을 일으키는 *A. fumigatus*에 대한 MIC 측정에서도 64ug/ml의 동일한 농도에서 성장을 억제함을 알 수 있었다 (도 3).

따라서, 두 화합물 모두 캔디다균에만 국한되지 않고 다른 진균류에도 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

실시예 2: 세포독성 확인

인체자궁암 세포주 HeLa를 이용하여 카바졸 화합물의 포유동물세포에 대한 세포독성을 확인하였다.

96-well 마이크로 플레이트에 각 웰 당 세포가 1.0×10^4 개가 되도록 접종하고, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 37°C의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 그 다음 배지를 제거하고 PBS로 1회 세척한 뒤, DMEM 배지에 64ug/ml부터 1ug/ml까지의 농도로 합성물을 희석하여 처리하였다. 합성물 처리 16시간 이후 MTS를 이용하여 세포독성을 측정하였다.

그 결과, Molecule C는 32ug/ml의 농도까지 포유동물세포에 독성을 나타내지 않았고, Molecule B는 16ug/ml의

농도까지 포유동물세포에 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (도 4). 또한, 이 농도는 칸디다균의 성장 억제 효과를 갖는 동시에 포유동물세포에 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 포유동물 세포에는 무해한 동시에 칸디다균의 성장을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0107] 실시예 3: 칸디다증 마우스모델의 생존율 측정

[0108] 칸디다 감염을 위해 야생형 (wild type)의 균주인 SC5314를 사용하였으며, 마우스는 Balb/C 암컷 6주령을 사용하였다. 한 그룹에 5마리씩 두 그룹으로 나눠 생존율을 모니터링 하였다.

[0110] 3-1: 꼬리정맥주사를 통한 칸디다감염 마우스

[0111] 5.0×10^5 개의 칸디다균을 PBS 200 μ l에 희석하여 꼬리정맥주사를 통해 감염시켰다. 감염 후 1일째부터 대조군은 PBS 200 μ l를 꼬리정맥주사를 이용해 접종하고, 실험군은 무게를 측정하여 Molecule B는 8mg/kg으로 처리를 하기 위해 농도에 맞도록 100 μ l의 PBS에 희석하였으며, Molecule C는 16mg/kg으로 처리를 하기 위해 100 μ l의 PBS에 희석한 다음 꼬리정맥주사로 접종하였다.

[0112] 그 결과, 카바졸 화합물을 주사하지 않은 그룹은 9일째 0%의 생존율을 보였으며, 나머지 두 합성물 주사를 받은 마우스들은 30일 이상 생존하였다 (도 5).

[0114] 3-2: 음용수를 통한 칸디다감염 마우스

[0115] 음용수 실험의 대조군은 상기 실시예 3-1의 꼬리정맥주사를 통한 칸디다균 감염 이후 매일 일반 음용수를 제공하였으며, 실험군은 16 μ g/ml 농도로 Molecule B가 처리된 음용수 및 32 μ g/ml 농도로 Molecule C가 처리된 음용수를 제작하여 매일 제공하였다. 매일 반복하며 2주간 생존율을 비교하였다.

[0116] 그 결과, 일반적인 음용수를 마신 칸디다 감염 마우스는 9일 이내 0%의 생존율을 보였지만 Molecule B와 Molecule C를 물에 희석하여 음용하게 한 마우스들은 생존율 80%를 나타냈다 (도 6). 즉, 본 발명의 화합물이 칸디다 감염치료에 대한 효과를 갖는 것을 알 수 있었다.

[0118] 3-3: 칸디다 감염 마우스의 신장감염 정도 확인

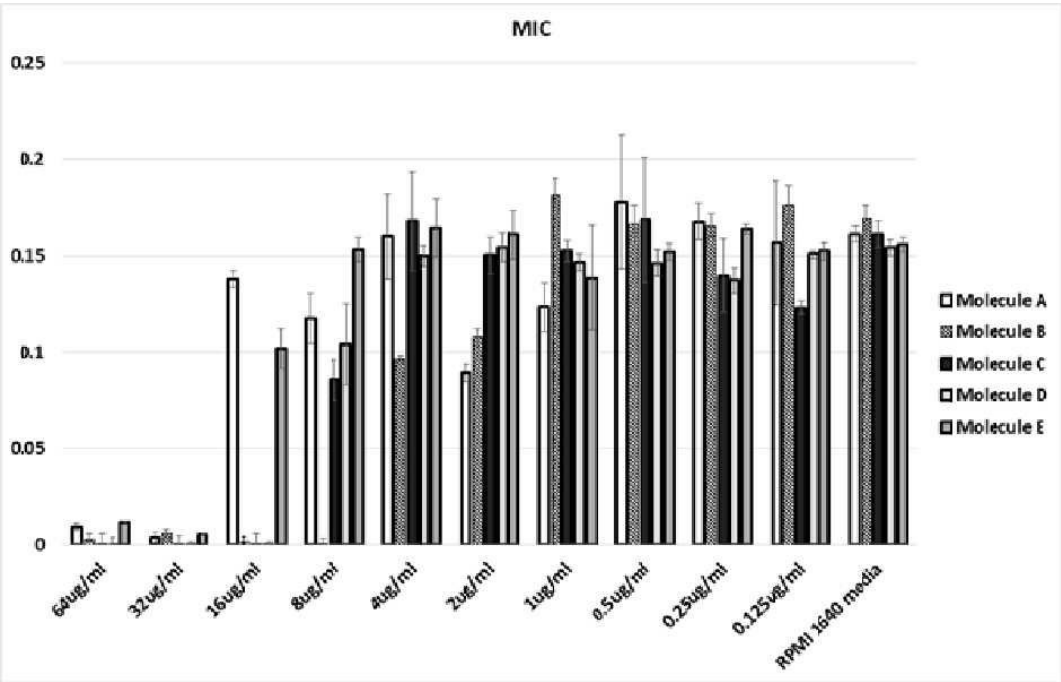
[0119] 실시예 3-1의 꼬리정맥주사를 통한 칸디다균 감염 이후, 인도적 안락사 기준으로 음식을 취식하지 못하거나 물을 마실 수 없는 상태, 호흡에 이상이 보일 때, 털에 윤기가 없고 뻣뻣함이 느껴지는 상태를 보일 때, 움직임이 저하되었을 때, 급한 자세나 몸의 떨림을 보일 때, CO₂를 이용한 안락사를 수행하고, 이들의 신장을 채취해 감염 정도를 비교하였다.

[0120] 대조군 마우스와 두 실험군 마우스의 신장을 모두 취해 감염정도를 살펴본 결과, Molecule B와 Molecule C를 처리한 그룹의 마우스는 대조군 마우스의 신장감염 상태와 비교하여 매우 낮은 감염정도를 나타냈다 (도 7). 즉, 본 발명의 카바졸 화합물이 칸디다 감염 치료에 대한 큰 효과를 보인다는 사실을 알 수 있다.

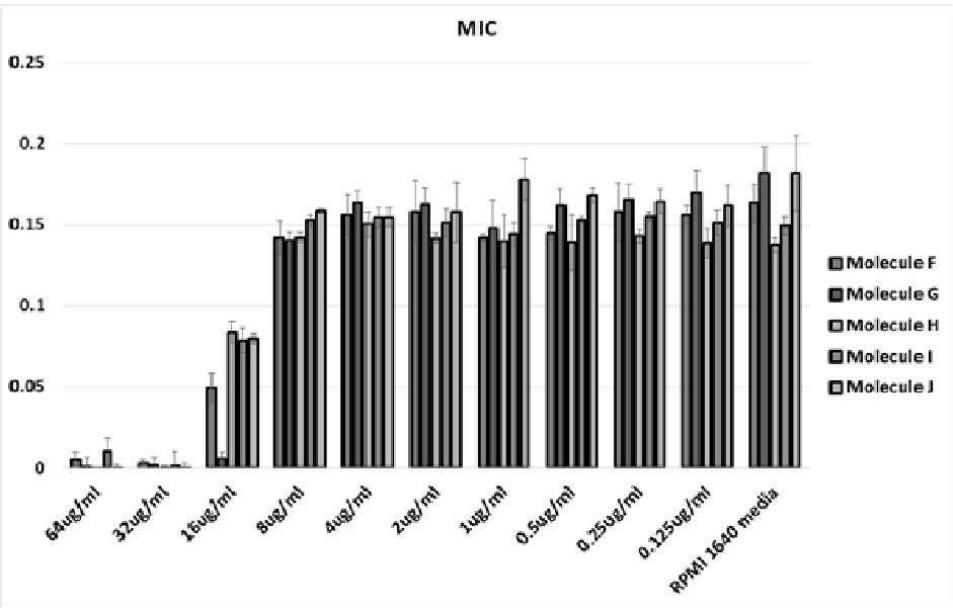
[0122] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

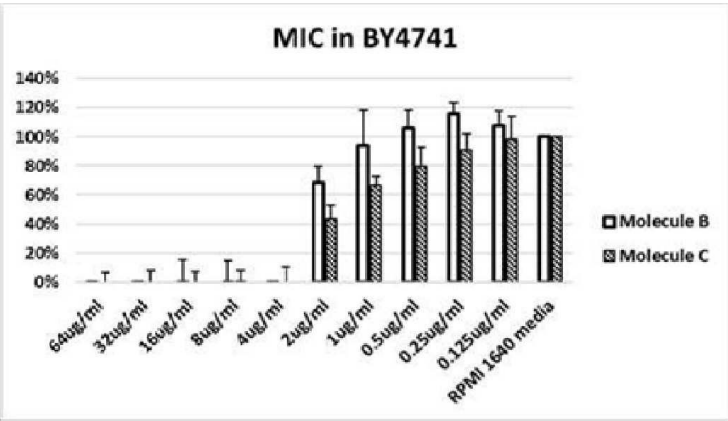
도면1a



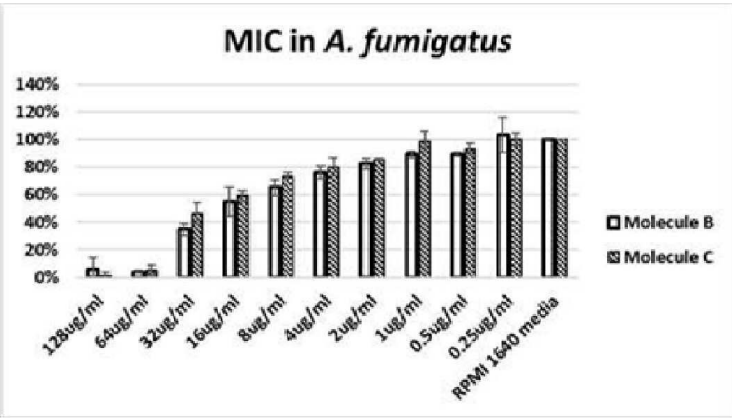
도면1b



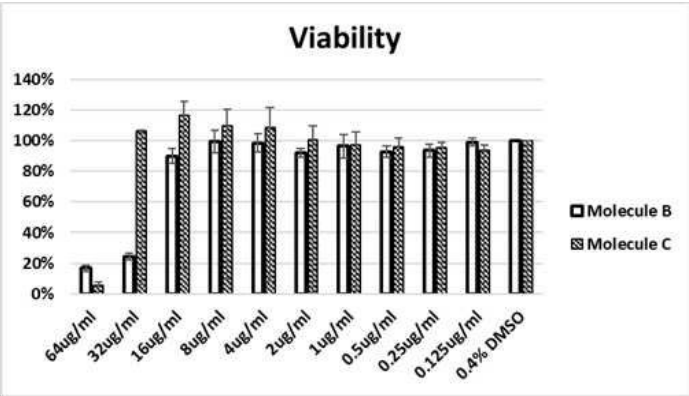
도면2



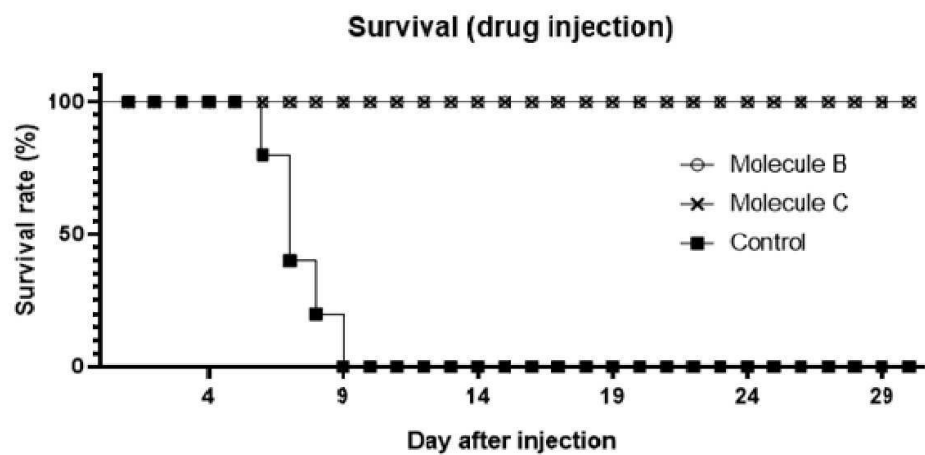
도면3



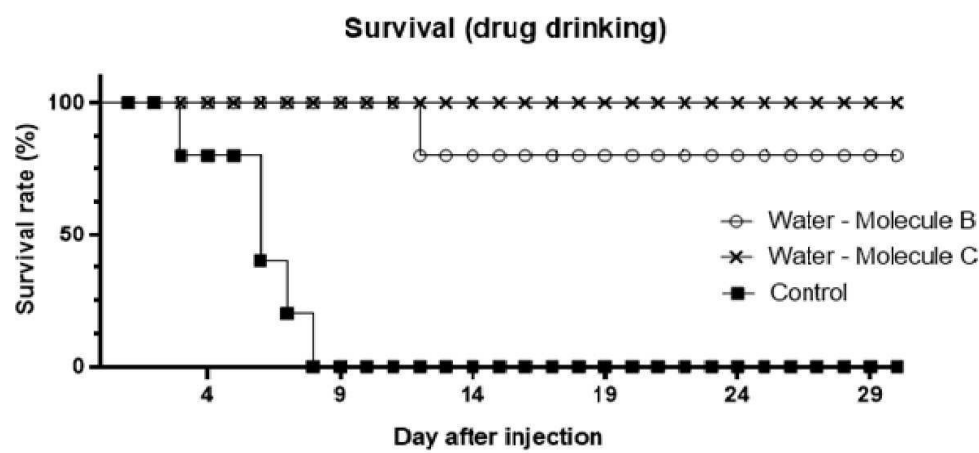
도면4



도면5



도면6



도면7

