

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0096274 (43) 공개일자 2016년08월16일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/12 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) A61K 31/135 (2006.01)	(71) 출원인 계명대학교 산학협력단 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)	(72) 발명자 서영호 대구광역시 수성구 청수로 257 1304동 1002호 (황금동, 캐슬골드파크3단지) 신광수 대전광역시 유성구 가정로 43 109동 1403호 (신성동, 삼성한울아파트) 김성수 경기도 수원시 권선구 세권로108번길 15 (세류동)
(52) CPC특허분류 A61K 31/12 (2013.01) A23L 1/30 (2013.01)	(21) 출원번호 10-2015-0017430 (22) 출원일자 2015년02월04일 심사청구일자 2015년02월04일	(74) 대리인 특허법인태백

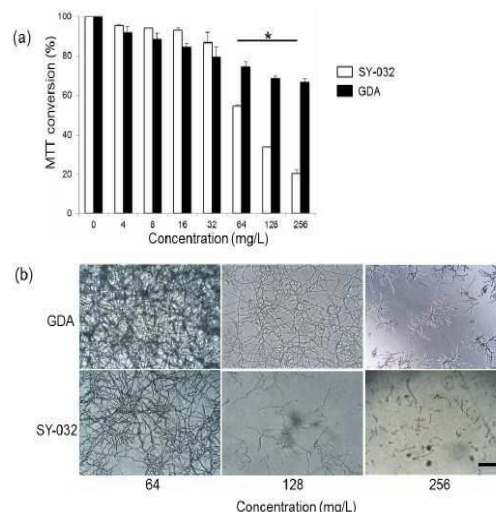
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 2',4'-디하이드록시칼콘 화합물을 유효성분으로 포함하는 항진균용 조성물

(57) 요약

본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항진균용 조성물에 대한 것이다. 또한, 본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 곰팡이성 폐렴(aspergillosis) 예방 또는 치료용 약학조성물에 대한 것이다. 면역력이 저하된 환자에서 아스페질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 의해 야기되는 침습성 곰팡이성 폐렴(aspergillosis)은 감염 및 사망의 주된 원인인데, 아직까지 효과적으로 감염을 치료할 수 있는 약제의 개발 및 사용은 매우 제한적이다. 따라서, 본 발명의 2',4'-디하이드록시칼콘 화합물은 아스페질러스 푸미가투스에 대한 항진균제로 개발되어 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/135 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-011325

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중점연구소지원 (이공계분야)

연구과제명 약물의존장애 핵심 진단기술 개발 및 치료전략 연구(약학연구소)

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항진균용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 열 충격 단백질 90(Heat shock protein 90; Hsp90)에 결합하여 이를 억제하는 것을 특징으로 하는 항진균용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 진균은 아스페질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)인 것을 특징으로 하는 항진균용 조성물.

청구항 4

2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 곰팡이성 폐렴(aspergillosis) 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 곰팡이성 폐렴(aspergillosis) 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물을 유효성분으로 포함하는 항진균용 조성물에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 열 충격 단백질 90(Heat shock protein 90; Hsp90)은 모든 진핵생물에 존재하는 ATP-의존적 분자 샤페론이다. 이는 클라이언트 단백질이 적절한 구조를 유지하는데 필수적인 역할을 한다. Hsp90에 대한 클라이언트 단백질은 트랜스멤브레인 타이로신 키나제(transmembrane tyrosine kinases)[상피성장인자 수용체 및 인간 상피성장인자 수용체 2(epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor 2)], 전사인자[저산소증-유도 전사인자 1 α 및 신호 전달 및 전사활성인자 3 (hypoxia-inducible transcription factor 1 α and signal transducer and activator of transcription 3) 및 불안정성 신호전달 단백질(metastable signaling proteins)[protein kinase B, I κ B kinase 및 Raf-1]을 포함한다. Hsp90은 정상세포에서 다양한 세포 기능을 담당하는데, 악성종양 전이 및 질병 진행에도 연관되어 있다. 따라서, Hsp90은 암, 신경퇴행성 질병 및 병원성 감염(바이러스, 진균 및 박테리아)을 포함하는 많은 질병 치료에 있어서 분자 활성화 표적이 되고 있다.

[0003] 면역력이 저하된 환자에서 아스페질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 의해 야기되는 침습성 곰팡이성 폐렴(aspergillosis)은 감염 및 사망의 주된 원인이다. 조기 진단 및 적절한 치료가 임상 결과를 개선할 수 있다. 아스페질러스 푸미가투스 감염은 트리아졸(triazole), 폴리엔(polyene) 또는 에키노칸딘(echinocandin) 약물로 치료할 수 있지만, 상기 병원균의 치료에 사용할 수 있는 항진균 약물의 수는 제한적이다. 더구나, 약물에 대한 내성이 발생하여 가능 약물의 임상 효과는 떨어지고 있다. 따라서, 생명을 위협하는 진균 감염에 대한 새

로운 치료 전략의 필요성이 대두되고 있다. 항진균 약물의 효율을 개선시키고, 약물에 대한 내성을 극복하기 위해서, 병원성 진균 내 Hsp90은 새로운 항진균제에 대한 가능성 높은 표적으로서 부상하고 있다. 1994년 최초로 천연물 젤다나마이신(geldanamycin; GDA)이 Hsp90 억제제로 밝혀졌다. 그 후로, 가네테스피브(ganetespib) 및 PU3를 포함하는 여러 작은-분자 Hsp90 억제제들이 개발되었는데, 이는 Hsp90-표적 치료가 발전하고 있다는 것을 보여준다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0081690호(2012.07.20 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항진균용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항진균용 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 곰팡이성 폐렴(aspergillosis) 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 곰팡이성 폐렴(aspergillosis) 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone; SY-032)을 유효성분으로 포함하는 항진균용 조성물에 관한 것으로서, 면역력이 저하된 환자에서 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 의해 야기되는 침습성 곰팡이성 폐렴(aspergillosis)은 감염 및 사망의 주된 원인인데, 아직까지 효과적으로 감염을 치료할 수 있는 약제의 개발 및 사용은 매우 제한적이다. 따라서, 본 발명의 2',4'-디하이드록시칼콘 화합물은 아스퍼질러스 푸미가투스에 대한 항진균제로 개발되어 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1(a)는 3-(4,5-디메틸-2-티아졸일)-2,5-디페닐-2H-테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; MTT) 분석을 통해, SY-032 및 젤다나마이신(geldanamycin; GDA)에 대한 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) Af293의 감수성을 측정한 결과이다. 분생자(conidia) 부유물은 최종 농도 0.1 mg/mL의 MTT가 함유된 RPMI 1640에서 희석되었고, 플레이트는 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 포르마잔(formazan) 반응 산물을 추출하였고 측정하였다. (b) 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) Af293의 대표적인 역상 현미경 이미지를 나타낸다. 균사체 성장에 있어 3개의 다른 GDA 및 SY-032 농도(64, 128 및 256 mg/L)에 따른 가시적 차이점은 명백하게 나타났다. 스케일 바는 200 μ m이다.

도 2는 고체 RPMI 1640 media (a) 및 액체 MMG media (b)에서 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) Af293에 대한 SY-032의 시험관 내(*In vitro*) 항진균 활성을 나타낸다. 균사 성장(Hyphal growth) 및 색소 형성은 SY-032 처리 후에 결핍되었다. (c) 분생자 형성(conidiation)-특이 유전자 전사(*abaA*, *brlA* 및 *wetA*)에 대해 실시간 PCR을 통해 정량화한 결과이다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타났다. ** $P < 0.01$.

도 3(a)는 칼시뉴린(calcineurin)(*cnaA*) 및 전사 인자 *crzA*의 전사에 대해 실시간 PCR을 통해 정량화한 결과이다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타났다. ** $P < 0.01$ 및 * $P < 0.05$. 일정 농도의 이트라코나졸(itraconazole) (ITC; 0.2 mg/L; b) 및 카스포펄진(caspofungin) (CSP; 2.0 mg/L; c)으로 조합된 SY-032 (0-256 mg/L)의 다양

한 농도에 대한 시험관 내(*In vitro*) 효과를 나타낸다. 그래프는 평균±SD로 나타냈다. * $P < 0.05$. (d) 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) Af293의 대표적인 역상 현미경 이미지를 나타낸다. 균사체 성장에 있어 3개의 다른 SY-032 농도(32, 64 및 128 mg/L)에 따른 가시적 차이점은 명백하게 나타났다. 스케일 바는 50 μm 이다.

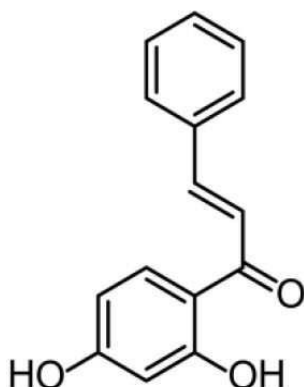
도 4(a)는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 Hsp90 도메인 구조(상단)와 비교한 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)의 Hsp90 도메인 구조(하단)를 나타낸다. 두 개의 Hsp90 단백질은 매우 보존되어 있고, HATPase 및 HSP90 도메인으로 구성되어 있다. 분홍색 부분은 낮은 복잡성 부위이고, 녹색 부분은 이중 나선(coiled coil) 부위를 각각 나타낸다. (b) 두 개의 Hsp90 단백질의 아미노산 서열 비교를 나타낸다. 별표는 SY-032와 상호작용할 것으로 예상되는 아미노산들을 나타낸다.

도 5는 효모 Hsp90에 결합하는 SY-032의 분석결과이다. (a) ligand-13N 및 SY-032와 효모 Hsp90 (PDB code: 2XX5)의 비교 도킹 포즈를 나타낸다. (b) 효모 Hsp90의 ATP-결합 포켓 내 SY-032의 도킹 모델을 나타낸다. 13N 및 SY-032의 탄소 원자는 각각 청록색 및 노란색으로 나타났다. 13N 및 SY-032의 산소, 질소 및 염소 원자는 빨간색, 파란색 및 녹색으로 각각 나타났다. Hsp90의 ATP-결합 사이트의 측쇄(side chains)는 원자 형태에 따라 색칠하였고(탄소, 회색; 산소, 파란색; 질소, 빨간색; 황, 노란색), 잔기 이름을 표시하였다. 수소 결합은 빨간색 점선으로 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명자들은 병원성 진균에 대응하는 용도로서 잠재적 Hsp90 억제제들을 개발할 수 있는 프로그램을 완성하였다. 본 발명자들은 Hsp90 연구를 통해 표적-중점 화합물 라이브러리(target-focused compound libraries)를 개발하게 되었다. 표적-중점 라이브러리를 이용한 스크리닝을 통해, 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 대한 항진균 활성을 나타내는 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone; SY-032)를 찾아내고 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항진균용 조성물을 제공한다.
- [0013] 상세하게는, 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 열 충격 단백질 90(Heat shock protein 90; Hsp90)에 결합하여 이를 억제할 수 있다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 진균은 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명의 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물은 하기 화학식 1로 표시되며, 본 명세서에서는 "SY-032"라고도 명명되어 있다.

[0016] [화학식 1]



[0017]

- [0018] 상기 약제학적으로 허용가능한 염으로는 약제학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명의 착온 화합물은 약제학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 곰팡이성 폐렴(aspergillosis) 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 '곰팡이성 폐렴(aspergillosis)'은 아스페르길루스증으로도 알려져 있으며, 아스퍼질러스(*Aspergillus*)에 의해 호흡기가 감염되어 발생하는 질병을 말한다. 침습적인 경우, 감염이 전신적으로 퍼져 혈액공급장애로 인한 조직손상, 혈전형성 등이 생기고 심한 경우 패혈증을 일으킬 수도 있다.
- [0022] 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 제형화하여 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0026] 상기 화합물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 또한, 본 발명은 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone) 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 곰팡이성 폐렴(aspergillosis) 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 건강식품은 유기산, 인산염, 향산화제, 유당 카제인, 텍스트린, 포도당, 설탕 및 솔비톨로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 유기산은 이에 제한되는 것은 아니지만 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산 또는 사과산일 수 있으며, 인산염은 이에 제한되는 것은 아니지

만 인산나트륨, 인산칼륨, 산성피로인산염 또는 폴리인산염(중합인산염)일 수 있으며, 항산화제는 이에 제한되는 것은 아니지만 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산 또는 피틴산 등의 천연 항산화제일 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 건강식품은 상기 유효성분 이외에도 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한 본 발명의 일실시예에 따른 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면, 건강식품의 제형은 이에 제한되는 것은 아니지만 고형, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 액상 또는 음료 형태일 수 있다.

[0031] 또한, 상기 건강식품은 이에 제한되는 것은 아니지만 과자류, 당류, 아이스크림 제품류, 유가공품, 식육제품, 어육제품, 두부류 또는 목류, 식용유지류, 면류, 다류, 음료류, 특수영양식품, 건강보조식품, 조미식품, 얼음, 인삼제품류, 김치절임식품, 건포류, 과일, 야채, 과일 또는 야채의 건조제품, 절단제품, 과일주스, 야채주스, 이들의 혼합주스, 칩류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효유식품, 두류식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 등의 식품의 제조에 사용될 수 있다.

[0032] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0033] < 실험예 >

[0034] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0035] 1. 균주 및 화합물

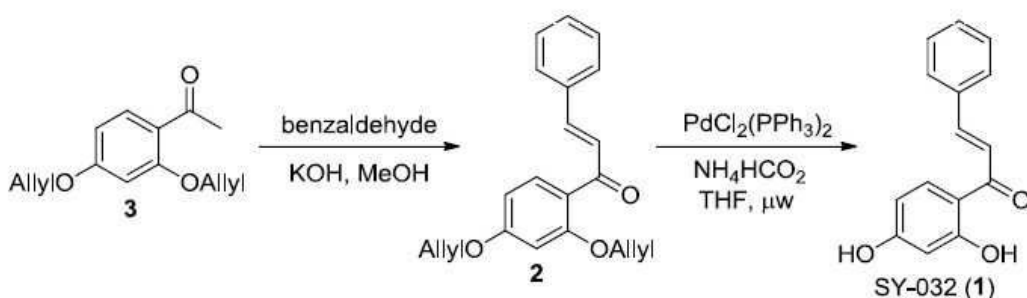
[0036] 항진균제들은 야생형 아스페질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) Af293 (Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, MO, USA)에 대해 측정하였다. 카스포핀진(Caspofungin; CSP), 이트라코나졸(itraconazole; ITC) 및 젤다나마이신(geldanamycin; GDA)은 Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0037] 2. 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone)의 합성

[0038] 2',4'-디하이드록시칼콘(2',4'-dihydroxychalcone; SY-032)은 다음과 같이 합성되었다. 12 mL 메탄올에서 녹인 화합물 3(0.30 g, 1.29 mmol), 벤즈알데하이드(benzaldehyde) (0.14 mL, 1.42 mmol) 및 KOH (0.6 g) 혼합물을 4일 동안 상온에서 혼합하였다. 혼합물은 1 N HCl을 이용하여 pH 6으로 중성화시켰고, 그 후 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층은 포화된 소듐 바이카보네이트(sodium bicarbonate) 용액으로 3번 씻어냈고, 소듐 설페이트(sodium sulfate)로 건조시켰으며, 감압하여 농축시켰고, 73% 수율로 화합물 2를 만들기 위해서 중압 액체크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography; MPLC, Biotage SNAP HP-Sil column)로 정제하였다. Rf = 0.28 (1:9 에틸아세테이트: 헥산). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.56-7.54 (m, 2H), 7.34-7.31 (m, 3H), 6.53 (dd, J = 8.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.06-5.96 (m, 2H), 5.44-5.37 (m, 2H), 5.29-5.22 (m, 2H), 4.55-4.51 (m, 4H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 189.61, 162.78, 159.03, 141.09, 135.01, 132.55, 132.23, 132.02, 129.56, 128.43, 127.91, 126.95, 122.02, 117.71, 117.59, 106.06, 99.81, 68.89, 68.55. ESI MS (m/e) = 321 [M+1]⁺. 화합물 2는 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran) (4 mL)에 녹인 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 디클로라이드[bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride] (13 mg) 및 암모늄 포메이트(ammonium

formate) (80 mg)를 첨가하여 마이크로웨이브 방사(microwave irradiation, Biotage Initiator) 하에서 120℃로 30분 동안 혼합하였다. 반응 혼합물은 에틸아세테이트로 회석하였다. 유기층은 물로 씻어냈고, 소듐 설페이트로 건조시켰으며, 감압하여 농축시켰고, 39% 수율로 화합물 1을 만들기 위해서 MPLC로 정제하였다. $R_f = 0.24$ (1:4 에틸아세테이트: 헥산). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 13.41 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.66–7.63 (m, 2H), 7.57 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H), 7.44–7.42 (m, 3H), 6.47 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.45 (s, 1H). ESI MS (m/e) = 241 $[\text{M}+1]^+$ (반응식 1).

[반응식 1]



3. 민감성 분석

항진균 민감성 분석은 이전에 보고된 3-(4,5-디메틸-2-티아졸릴)-2,5-디페닐-2H-테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; MTT) 방법으로 수행하였다. L-글루타민(L-glutamine)을 포함하고 소듐 바이카보네이트(sodium bicarbonate)를 포함하지 않은 RPMI 1640 배지는 165 mM 몰포린프로판설폰산(morpholinepropanesulfonic acid) 완충액 (pH 7.0)으로 완충시켰고, 시험 배지로서 사용하였다. 모든 시험 화합물들은 1.28 g/L 디메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide)에 용해시켰다. 상기 화합물들은 0.06 내지 256 mg/L 범위의 최종 약물 농도를 얻기 위해서 연속적으로 희석되었다. 접종 부유액은 혈구측정 방법에 따라 준비되었고, 1×10^4 내지 5×10^4 conidia/mL 범위의 접종물을 얻기 위해서 0.2 mg MTT/mL가 포함된 RPMI 1640로 희석하였다. 그 후, 최종 MTT 농도는 0.1 mg/mL가 되도록, 동일한 부피(100 μL)의 접종물과 화합물을 마이크로플레이트에 첨가하였다. 상기 플레이트는 37℃에서 48시간 동안 배양되었다. 배양 후, 포르마잔(formazan) 분석 산물을 추출하였고, 광학밀도 540 nm에서 측정하였다. 실험은 독립적으로 3번 반복하여 수행하였고, 각각은 4번 반복하였다.

4. 실시간 역전사(Real-time reverse transcription)-PCR(RT-PCR)

항진균제 및 분생자 형성(conidiation) 사이의 연관성을 조사하기 위해서, 무성 분화(asexual development)를 조절하는 *brlA*, *abaA* 및 *wetA* 유전자의 발현을 측정하였다. 또한, 칼시뉴린(calcineurin) 경로 상의 시험 약물 효과를 측정하기 위해서, *cnaA* 및 *crzA*를 분석하였다. 분생자 부유물(5×10^5 conidia/mL)은 글루코스 최소 배지(glucose minimal medium; MMG)에 접종하였고, 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. RNA 추출, cDNA 합성 및 RT-PCR은 이전에 보고된 대로 수행하였다. 발현 비율은 연장 인자 1 α (elongation factor 1 α ; EF1 α)으로 표준화시켰고, $\Delta\Delta\text{Ct}$ 방법에 따라 계산하였다. 모든 실험은 3번 반복하여 수행하였고, 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(standard deviation; SD)로 표시하였다.

4. 현미경 분석

현미경 사진은 Lumenera Infinity camera가 장착된 Olympus Inverted Microscope IX50을 사용하여 얻었다(Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

[0047] 5. 통계 분석

[0048] 독립된 샘플에 대한 2개의 분리된 세트 비교를 위하여 비대칭 Student's *t*-test를 사용하였다. 0.05보다 낮은 *P* 수치를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 처리군 및 대조군의 MTT 전환율은 *post hoc* Tukey comparison에 따른 ANOVA를 이용하여 비교하였다. *P* 수치가 0.05보다 낮을 때, 편차를 중요하게 고려하였다. 통계 분석은 IBM SPSS statistics 21.0 (IBM, Armonk, New York, USA)으로 수행하였다.

[0049] 6. 도메인 구조 분석 및 도킹(docking) 연구

[0050] Hsp90의 도메인 구조는 도메인 분석 사이트 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>)를 이용하여 분석하였고, 단백질 정렬은 EMBOSS needle (version 6.6.0) (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)를 이용하여 수행하였다. SY-032와 효모 Hsp90 (PDB code: 2XX5)와의 인 실리코 도킹(*In silico* docking)은 Molecular Graphics Laboratory at Scripps Research Institute에서 다운로드 받은 AutoDock4.2 program을 이용하여 완성하였다. AutoDock4.2 program은 유전자 알고리즘의 Lamarckian version을 활용하여 알려지거나 예측된 결합 사이트 내부 리간드의 포즈(poses)를 만들어내기 위한 유전자 알고리즘을 사용하기 때문에 선택되었는데, *in situ* 최적화 후 분자들에 의해 적용되는 구조 내 변화는 결과물에 대한 다음 포즈로서 사용되었다. 도킹 실험에 있어서, Gasteiger charges는 AutoDock suite의 툴(tools)을 사용하여 SY-032와 함께 HSP90 도메인 N-말단의 X-ray 구조 상에서 확인하였다. 50_50_50 포인트 및 0.375Å 간격으로 정의되는 Hsp90 도메인 N-말단 상의 중간에 위치한 그리드 박스(grid box)를 리간드 도킹 실험을 위해 선택하였다. 도킹 파라미터는 세팅된 개체군 크기 150, 세대수 27,000, 평가수 25,000,000로 구성되어 있는 반면, 각 도킹 반응 과정에서 그룹화에 대한 제곱평균제곱근(root-mean-square) 허용치는 1Å로 컷오프(cutoff)되고, 도킹 수 반응은 100으로 세팅되어 있다. 효모 Hsp90와 SY-032의 도킹 모델을 그렸고, 모델의 렌더링(rendering)은 PyMol (DeLano Scientific)을 사용하여 만들었다.

[0051] <실시에 1> 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 대한 SY-032의 항진균 활성

[0052] SY-032의 항진균 활성을 시험하였고, 최소억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)를 측정하였다. 도 1a에서 나타난 바와 같이, 잘 알려진 Hsp90 억제제인 GDA보다 SY-032가 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에 대하여 더 효과적이었다. GDA와 비교시, SY-032 농도 ≥ 64 mg/L에서 MTT 전환율에 상당한 감소를 보였다. SY-032의 MIC₅₀ (성장의 50%를 억제하는 MIC)은 64 mg/L 내지 128 mg/L 사이였다. GDA의 MIC₅₀은 256 mg/L 보다 높았다(도 1a). 또한, SY-032의 억제 효과는 역상 현미경을 이용하여 시험하였다. 64, 128 및 256 mg/L에서 SY-032 및 GDA 사이의 균사체 밀도 및 성장률에 있어 가시적 차이가 명확하게 관찰되었다(도 1b). SY-032 (256 mg/L)의 처리는 균사체 성장을 심하게 감소시켰다.

[0053] <실시에 2> 영양생장(vegetative growth) 및 적정 분생자 형성(conidiation)을 억제하는 SY-032

[0054] 시험 화합물 처리에 의해, RPMI 1640 아가 배지에서 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)의 방사형 성장(Radial growth)은 억제되었다. SY-032 (8 mg/L)는 대조군과 비교시 상대적 방사형 성장을 20% 감소시켰다. 또한, 처리된 콜로니들은 녹색 색소 형성이 결핍되었는데, 이는 분생자(conidia)를 거의 형성하지 않는다는 것을 나타낸다(도 2a). 이러한 현상은 액체배양에서도 명확하게 관찰되었다. 도 2b에서 나타난 바와 같이, SY-032와 함께 배양 후 녹색 색소 형성은 완전히 결핍되었다. 약물 처리로 인해 분생자 형성이 강하게 억제되었으므로, 본 발명자들은 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 종에서 무성 분화(asexual development)(분생자 형성)를 조절하는 전사 인자를 코딩하는 유전자들인 *abaA*, *brlA* 및 *wetA*의 발현을 정량화하였다. 대조군과 비교시, SY-032 처리에 의해 3개 유전자의 발현이 모두 상당히 감소하였다(약 3 내지 5 배)(도 2c).

[0055] <실시에 3> SY-032에 의해 억제되는 칼시뉴린(calcineurin) 경로

[0056] 칼시뉴린(calcineurin) 신호 전달 경로는 적정 균사 성장에 필요하고, 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)에서 세포벽 스트레스에 반응하여 활성화된다. 칼시뉴린(calcineurin) 신호 전달에 있어 SY-032의 효과를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 두 개의 주요 신호전달 구성요소인 *cnaA* 및 *crzA*의 발현을 정량화하였다.

cnaA 발현은 SY-032에 의해 대략 1.5배 정도 감소한 반면, 징크 핑거 전사 인자인 *crzA* (*cnaA*의 하류)의 발현은 SY-032 하에서 상당히 감소하였다(도 3a). 억제 정도는 *cnaA* 보다 *crzA*가 더 컸다. 효모에서 CrzA는 아졸(azole) 및 에키노칸딘(echinocandin) 내성에 부분적인 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 본 발명자들은 ITC (azole, 0.2 mg/L) 및 CSP (echinocandin, 2.0 mg/L)와의 조합에 있어서의 SY-032 효과를 시험하였다. ITC 단독으로는 최소 억제 활성을 나타냈다. 하지만, ITC 및 SY-032(64 mg/L 이상)와의 조합에서는 억제 활성이 상당히 향상되었다(도 3b). 더구나, CSP 및 증가된 농도의 SY-032 조합에서는 아스페질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)를 계속적으로 억제하였고, 256 mg/L의 농도에서는 성장을 완전히 억제하였다(도 3c). 또한, SY-032와의 조합에 있어서 항진균제 ITC 및 CSP의 억제 효과에 대해 광학 현미경을 이용하여 시험하였다. 균사체 성장은 조합 처리에 의해 상당히 감소하였다. 또한 놀랍게도 SY-032를 ITC와 함께 조합하여 사용하였을 때, 발아율도 감소하였다(도 3d).

[0057]

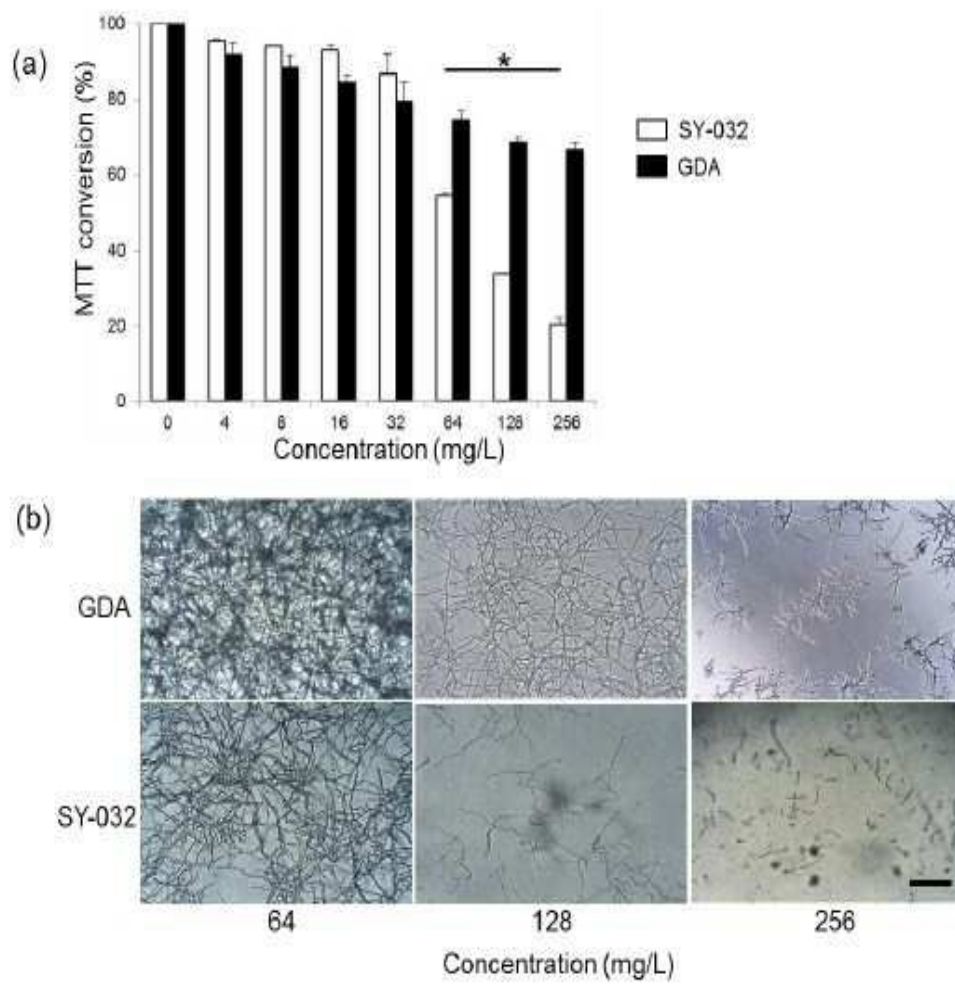
<실시예 4> Hsp90의 ATPase 도메인과 결합하는 SY-032

[0058]

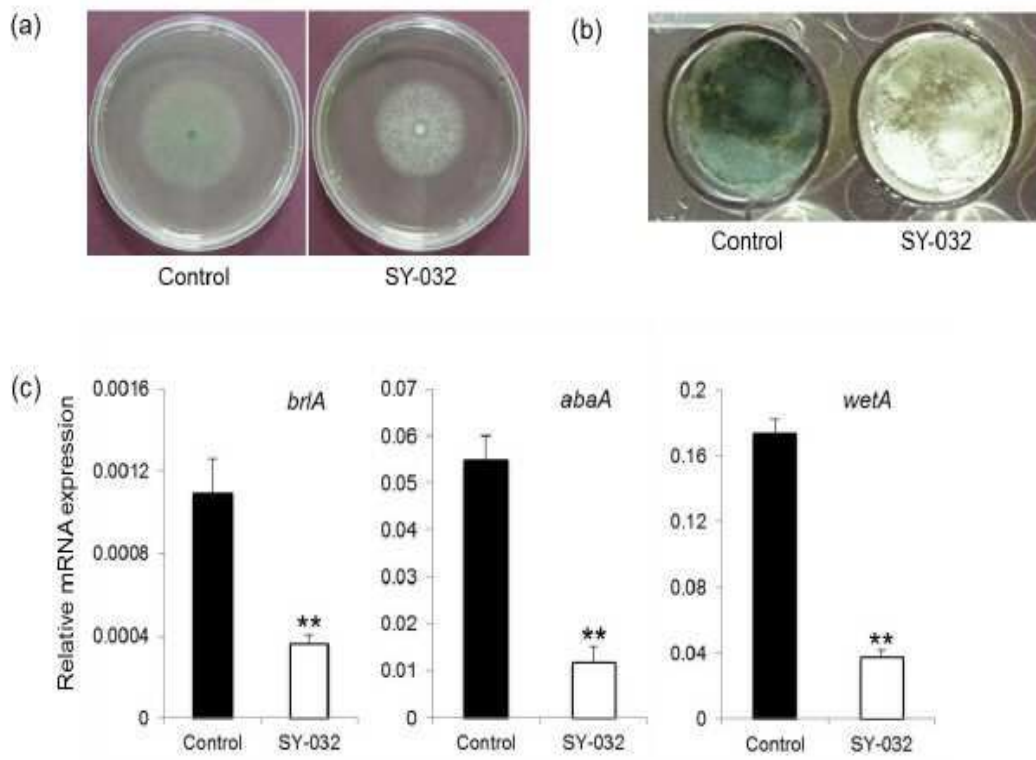
아스페질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) Hsp90 (AFUA_5G04170)는 706개의 아미노산 잔기들로 이루어져 있고, C-말단 HATPase c 도메인 (AA 28-177) 및 HSP90 도메인 (AA 183-706)을 포함한다. 아스페질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) 및 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래 Hsp90 단백질은 상당히 보존되어 있는데(도 4a), 75.3%의 동일성 및 85.8%의 유사성을 나타내며, SY-032와 상호작용할 것으로 예상되는 아미노산은 완전히 일치한다(도 4b). Hsp90의 ATP-결합 사이트에서 SY-032와의 결합 모드를 나타내기 위해서, 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)의 Hsp90 크리스탈 구조(PDB code: 2XX5), 이의 미변성 리간드 13N 및 SY-032를 이용하여 도킹 연구를 수행하였다. AutoDock4.2 program을 이용하여, SY-032는 Hsp90 N 말단 도메인의 3D 좌표와 도킹시켰다. SY-032 및 Hsp90의 ATP 결합 사이트 내 13N의 비교 결과, SY-032는 Hsp90 미변성 리간드 13N과 유사한 방법으로 Hsp90에 결합하는 것으로 나타났다(도 5). SY-032의 레조시놀(resorcinol) 고리 및 페닐 고리는 Hsp90의 ATP-결합 사이트 내 13N의 레조시놀(resorcinol) 고리 및 페닐 고리와 중첩되었는데, SY-032의 에논(enone) 부위는 13N의 매크로락탐(macrolactam) 고리 유래 다른 구조에 적용되었다. 특히, SY-032의 레조시놀(resorcinol) 고리의 2개 하이드록실기 및 카보닐 산소 원자는 포켓의 친수성 부위 내 Asp79, Asn37 및 보존된 물 분자와 수소 결합을 형성한다. 한편, SY-032의 페닐 고리는 Met84, Leu89, Phe124, Val136 및 Trp148 아미노산 잔기들에 의해 형성된 소수성 부위에 적용되었고, Met84, Leu89, Phe124, Val136 및 Trp148 잔기로 닫힌 친유성 접점(close lipophilic contacts)을 만들었다(도 5). 종합하면, 효모 Hsp90에 대한 SY-032의 결합에 SY-032의 레조시놀(resorcinol) 고리, 카보닐 산소 원자 및 페닐 고리에 대한 수소-결합 및 소수성 상호작용이 기여하였고, Lamarckian genetic algorithm을 이용하여 측정된 결합 에너지(ΔG_b) 및 억제 상수(K_i)는 각각 -7.65 kcal/mol 및 2.46 μM 이었다.

도면

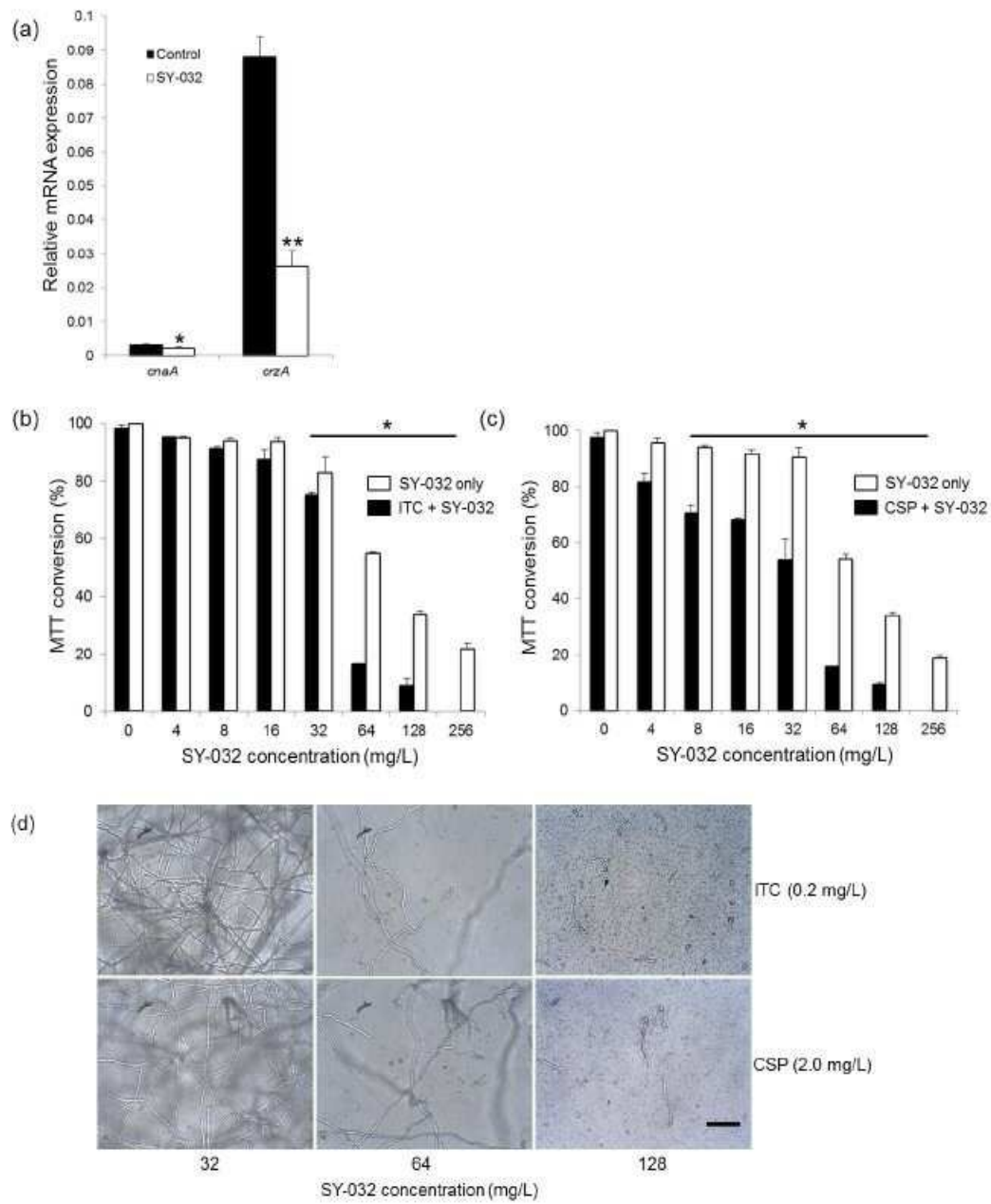
도면1



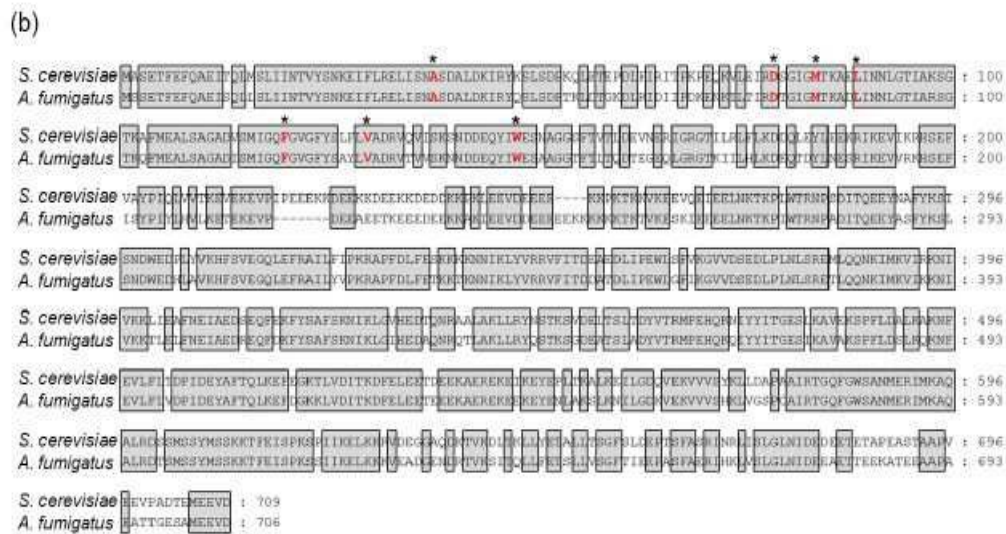
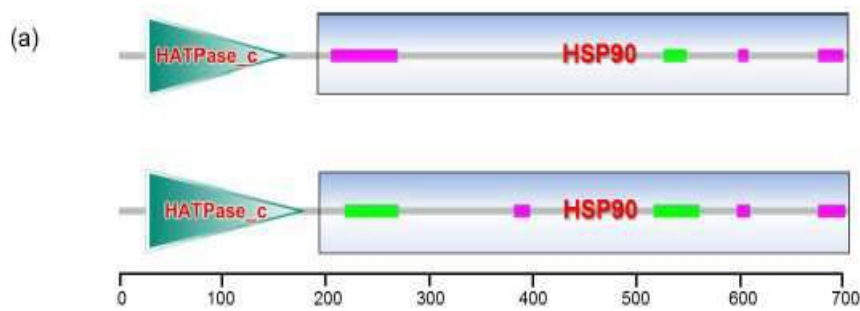
도면2



도면3



도면4



도면5

