

(43) 공개일자 2020년05월07일

- (71) 출원인

건국대학교 산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)

- 경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

- 정유훈

- 서욱특

서울특별시 광진구 아차산로 262, A동 3001호(자
양동, 더샵스타시티)

김미경

서울특별시 구로구 구로중앙로 60(구로동, 대림오피스타워)

박기호

서울특별시 동대문구 한천로63길 10, 102동 106호(이문동, 이문e편하세상아파트)

- (74) 대리인

특허법이이룸리온

전체 청구항 수 : 총 11 항

- (54) 발명의 명칭 3',4'-디플루오로케르세틴 및 그 유도체에 의한 항생제 내성 억제 효능

(57) 요약

본 발명은 다제내성균에 대하여 항균 활성을 가지는 3',4'-디플루오로케르세틴 (3',4'-difluoroquercetin) 및 이의 신규 유도체에 관한 것이다. 본 발명의 케르세틴 유도체 화합물은 그람양성 다제내성균에 대하여 유의적인 항균 활성을 나타낼 뿐 아니라, 그람음성 다제내성균에만 강한 항균 활성을 나타내고 그람음성 다제내성균에는 항균활성을 가지지 않거나 낮은 항균활성을 가지는 항생제와 본 발명의 화합물을 혼합 처리하였을 때 유의적인 시너지 효과를 나타내어, 그람양성균 뿐 아니라, 그람음성균과 이들의 항생제 내성균에 대하여 우수한 항균효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 31/04 (2018.01)

C07D 311/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017-A010-0025

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 감염병위기대응기술개발사업

연구과제명 [단독](EZBARO, 2차_2세부)항생제 내성억제를 위한 폴리페놀 기능성 접합체 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

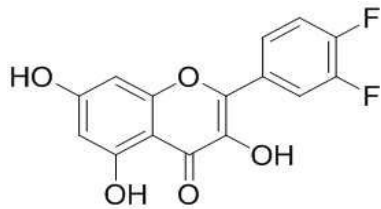
명세서

청구범위

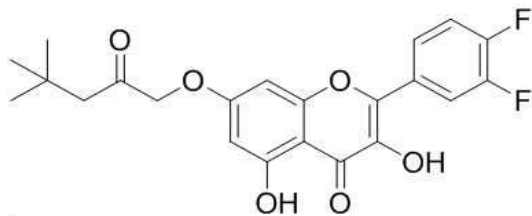
청구항 1

하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물; 또는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는, 항균용 조성물.

[화학식 1]



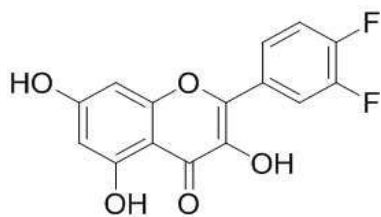
[화학식 2]



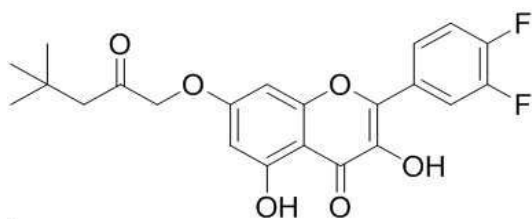
청구항 2

- (a) 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물; 및
- (b) 항생제를 유효성분으로 포함하는, 항균용 조성물.

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화합물은 항생제 내성을 억제하기 위하여 항생제 보조제로 사용되는 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 항생제는 암피실린(Ampicillin), 반코마이신(Vancomycin), 리네졸리드(Linezolid), 에리트로마이신(Erythromycin), 메티실린(Methicillin), 옥사실린(Oxacillin), 세포탁심(Cefotaxime), 리팜피신(Rifampicin), 아미카신(Amikacin), 겐타마이신(Gentamicin), 아미카신(Amikacin), 카나마이신(Kanamycin), 토브라마이신(Tobramycin), 네오마이신(Neomycin), 에르타페넴(Ertapenem), 도리페넴(Doripenem), 이미페넴/실라스타틴(Imipenem/Cilastatin), 메로페넴(Meropenem), 세프트아지딤(Ceftazidime), 세파핼름(Cefepime), 세프트아로린(Ceftaroline), 세프트비프롤(Ceftobiprole), 아즈트레오남(Aztreonam), 피페라실린(Piperacillin), 폴리믹신 B(Polymyxin B), 콜리스틴(Colistin), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 레보플록사신(Levofloxacin), 모시플록사신(Moxifloxacin), 가티플록사신(Gatifloxacin), 티게사이클린(Tigecycline), 이의 배합체 및 이들의 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항균용 조성물은 그람 양성균, 그람 음성균 및 이의 다제내성균주에 대해 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 그람 양성균은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 엔테로코커스속균종 (*Enterococcus* sp.) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 그람 음성균은 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아세네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 및 대장균(*Escherichia coli*)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 다제내성균주는 메티실린감수성황색포도알균(MSSA), 메티실린내성황색포도알균(MRSA), 반코마이신내성황색포도알균(VRSA), 반코마이신중등도내성황색포도알균(VISA), 반코마이신내성장알균(VRE), 반코마이신감수성장알균(VSE), 다제내성녹농균(MRTA), 카베페넴내성 녹농균(CRPA), 카파페넴내성아세토박터바우마니균(CRAB) 카바페넴내성장내세균속균종(CRE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항균용 조성물은 약학적 조성물인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 10

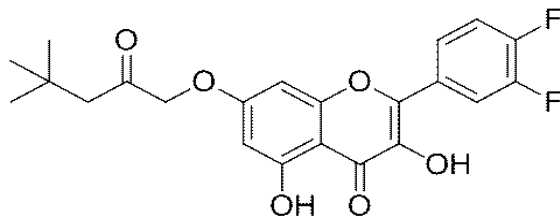
제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 항균용 조성물은 식품 첨가제, 사료 첨가제, 방부용 조성물 및 의약품 조성물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항균용 조성물.

청구항 11

하기 화학식 2로 표시되는 화합물:

[화학식 2]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 3',4'-디플루오로케르세틴 (3',4'-difluoroquercetin) 및 이의 신규한 유도체의 항생제 내성 억제 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 페니실린(Penicillin)과 스트렙토마이신(streptomycin)이 발견된 이래 약 5천여 종 이상의 항생물질이 발견되었으며, 그 중 50여종의 항생제가 400여종의 제제로 개발되어 감염질환의 주요 치료수단으로 실제 임상에서 사용되고 있다. 항생제는 화학구조에 따라 크게 베타락탐계(β -lactam)와 비베타락탐계로, 그리고 작용기는 페니실린계, 세파계, 퀴놀론계, 아미노글리코사이드계 등으로 구분된다. 또한 항생제는 작용기작에 따라 세포벽 합성 저해제, 핵산 합성 저해제, 단백질 합성 저해제 등으로 구분되기도 한다.

[0004] 여러 항생제에 대해 동시 내성을 갖는 다제내성균주(multidrug resistant bacteria)의 출현으로 인해 새로운 항생제 개발에 대한 요구가 크게 증가하고 있으며, 현재의 추세라면 항생제 내성문제가 21세기 의학이 당면할 가장 큰 문제점 중의 하나가 될 것으로 예측된다.

[0005] 질병관리본부의 "다제내성균 감염 관리 지침" 상의 의료관련 감염 법정 6종 [반코마이신내성황색포도알균(VRSA; vancomycin-resistant-Staphylococcus aureus), 반코마이신내성장알균(VRE; vancomycin-resistant Enterococci), 메티실린내성황색포도알균(MRSA; methicillin-resistant Staphylococcus aureus), 다제내성녹농균(MRPA; Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa), 다제내성아시네토박터바우마니균(MRAB; Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii), 카바페넴내성장내세균속균종(CRE; Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae) 등]은 대표적 다제내성균이며, 특히 MRSA(methicillin-resistant Staphylococcus aureus)와 VRE(vancomycin-resistant Enterococci)는 가장 심각한 대표적 내성균주이다. *S. aureus*는 폐렴(특히 원내폐렴), 피부 및 연조직 감염, 균혈증 등을 일으키는 그람양성구균으로, 가장 흔한 병원균 중 하나이나, 1990

년대 이래 *S. aureus*의 35-66%가 MRSA로 밝혀지고 있다. 한편, 그람양성구균의 하나인 엔테로코커스(*Enterococcus*)에서 반코마이신(vancomycin) 내성균주가 발견되었으며 미국의 원내 VRE 발생률은 1989년 0.3%에서 1993년 7.9%로 20배 이상 증가하고 있다. 또한 2008년 확인된 뉴델리 메탈로 베타 락타메이즈-1 (NDM-1)의 경우 현존하는 어떤 항생제에도 내성을 보이는 병원 감염성 초강력 슈퍼 박테리아로 판명되었다.

[0006] 내성 균주는 ① Antibiotic-degrading enzyme 및 Antibiotic-altering enzyme에 의해 항생제의 구조를 변화시키거나, ② 항생제 유입 억제/배출펌프를 통한 유출을 활성화함으로써 세포 내 항생제의 농도를 낮추거나, ③ 항생제가 결합하는 표적 단백질을 돌연변이(mutation)를 통해 변화시키는 등의 방법으로 항생제에 대한 내성을 획득하는 것으로 알려져 있다. 세균은 내성 기전들 중 두 가지 이상을 동원하여 효과적으로 항생제에 대항하게 되며, 여러 기전이 동원될수록 내성의 정도는 증가하는 것으로도 알려져 있다. 따라서 내성 균주에 대항하기 위한 항생제는 ① 지금까지 알려지지 않은 새로운 박테리아 표적을 저해하거나, ② 다양한 표적군 저해를 통해, 내성 발생을 회피할 수 있어야 한다.

[0007] 박테리아의 게놈 시퀀스에 근거하여 내성의 기전을 회피할 수 있을 것으로 기대되는 신개념 표적들이 밝혀지고 있기는 하지만, 신규 타겟에 대한 연구는 많은 비용과 노력에 비해 hits 수준의 화합물을 도출하는데 실패하였으며, 더욱 심각한 문제는 지금까지 알려진 내성의 기전을 회피할 수 있는 신규 표적을 찾는다는 해도 결국은 내성 균주가 나타날 것이라는 점인데, 그 예로 2000년대 들어 신규 표적 저해제로 유일하게 승인된 항생제 리네졸리드(linezolid)에 대한 내성이 매우 빠르게 나타남이 확인된 바 있다.

[0008] 따라서 항생제 개발 연구에서 보다 현명하고 효과적인 방법은 신규 항생제의 개발보다는 내성 기전을 저해할 수 있는 물질을 개발하여 기존 항생제와 병용함으로써, 우수한 약효와 안전성을 갖는 기존 항생제의 효용을 증대시키는 연구라고 할 수 있다. 특히, 내성균주 마다 내성의 기전이 상이하고 때로는 둘 이상의 기전이 복합되어 나타나므로, 내성 저해 물질이 다양한 내성 기전을 동시에 저해할 수 있다면 더욱 효과적으로 내성에 대처할 수 있을 것으로 기대된다.

[0009] 폴리페놀은 식물이 초식성 곤충이나 진균류 혹은 박테리아에 대항하기 위해 만들어내는 이차대사산물로서 다양한 항균효과를 보인다. 항생제라는 것이 본래 미생물들이 다른 미생물들의 생존을 막기 위해 만들어낸 물질들이므로, 폴리페놀과 같은 이차대사산물을 기존의 항생제와 병용처방하면 항생제의 약효를 증가시키는 물론, 항생제 복용량을 줄일 수 있어 항생제 부작용을 감소시킬 수 있으리라는 기대 때문에 항생제와 폴리페놀의 병용처방에 대한 많은 연구가 진행되었으며 실제로 상당한 상승효과가 관찰되었다. 특히, 케르세틴(quercetin)은 항생제 내성 기전과 관련된 베타-락타마아제(β -lactamase), 토포아이스오머라아제(topoisomerase), 유출 펌프(efflux pump) 등을 저해하는 활성이 있음이 보고되어 있기 때문에 기존 항생제와의 복합처방에 의해 다양한 내성 균주에 대한 항생제의 약효를 효과적으로 유지시킬 수 있는 새로운 방안으로 기대되고 있다(Planta Med. 2008, 74:840-846; Antimicrob. Agents Chemother. 1997, 41:992-998; Planta Med. 2002, 68:1140-1141).

[0010] 그러나 케르세틴이 항생제와 병용투여에 의해 내성 균주에 대한 상당한 상승작용을 보임에도 불구하고 임상적 가치는 높지 않은데, 그 이유는 케르세틴의 낮은 생체이용률(bioavailability)로 인해 실제 의약품으로 개발될 수 있는 적절한 투약제형 및 투여방법이 확보되지 않기 때문이다. 실제 일반적으로 식이(diet)로부터 사람이 케르세틴을 섭취함으로써 얻을 수 있는 혈중 농도(<1 μ M)는 보통 세포주에서 생리활성을 나타내는 폴리페놀의 농도(10 - 100 μ M) 보다 매우 낮은 것으로 보고 되어 있다(BioFactors, 2000, 12:175-180).

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) KR 10-1325058 B1

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) Cho, S. Y.; Kim, M. K.; Mok, H.; Choo, H.; Chong, Y. Separation of Quercetin's Biological Activity from Its Oxidative Property through Bioisosteric Replacement of the Catecholic Hydroxyl Groups with Fluorine Atoms. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 6499-6506.

발명의 내용

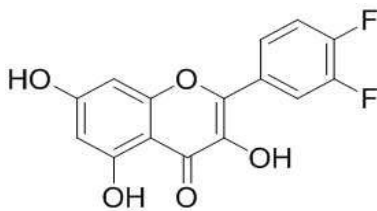
해결하려는 과제

- [0014] 본 발명자들은 본 발명에서 새로 합성한 케르세틴 유도체 및 3',4'-디플루오로케르세틴이 다제내성균에 대한 항균활성을 나타냄과 동시에, 나아가 항생제와 함께 혼합 처리하였을 때 그 다제내성균에 대하여 유의적으로 증가한 수준의 시너지 효과로 항균 활성을 나타내므로, 본 발명의 케르세틴 유도체는 종래 항생제와 복합제로서 항균용 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0015] 이에, 본 발명의 목적은 케르세틴의 불안정성을 개선함으로써 향상된 생체이용률을 가지며, 다제내성균에 대하여 우수한 항균활성을 나타내는 신규한 케르세틴 유도체를 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 케르세틴 유도체를 유효성분으로 하는 항균용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 케르세틴 유도체와 함께 복합제로 투여하여 다제내성균에 대한 우수한 시너지 효과의 항균 활성을 나타내는 항균용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

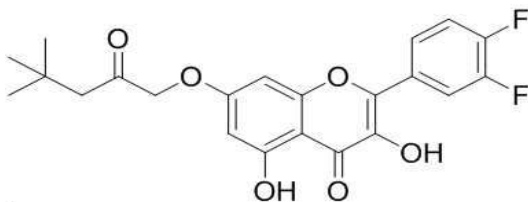
- [0019] 상기 목적을 달성하기 위한 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물; 또는 이의 염을 유효 성분으로 포함하는, 항균용 조성물을 제공한다.

- [0020] [화학식 1]



- [0021]

- [0022] [화학식 2]



- [0023]

- [0024] 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물; 및 (b) 항생제를 유효성분으로 포함하는, 항균용 조성물을 제공한다.

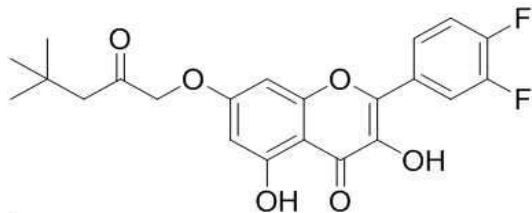
- [0025] 본 발명의 화합물은 항균 용도로 단독으로 사용될 수도 있고, 항생제 내성을 억제하기 위하여 항생제와 함께 사용될 수도 있다.

- [0026] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 항생제는 암피실린(Ampicillin), 반코마이신(Vancomycin), 리네졸리드(Linezolid), 에리트로마이신(Erythromycin), 메티실린(Methicillin), 옥사실린(Oxacillin), 세프트락심(Cefotaxime), 리팜피신(Rifampicin), 아미카신(Amikacin), 겐타마이신(Gentamicin), 아미카신(Amikacin), 카나마이신(Kanamycin), 토브라마이신(Tobramycin), 네오마이신(Neomycin), 에르타페넴(Ertapenem), 도리페넴(Doripenem), 이미페넴/실라스타틴(Imipenem/Cilastatin), 메로페넴(Meropenem), 세프트아지딴(Ceftazidime), 세프피뮴(Cefepime), 세프트로린(Ceftaroline), 세프트로비프로(Ceftobiprole), 아즈트레오남(Aztreonam), 피페라실린(Piperacillin), 폴리믹신 B(Polymyxin B), 콜리스틴(Colistin), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 레보플록사신(Levofloxacin), 모시플록사신(Moxifloxacin), 가티플록사신(Gatifloxacin), 티게사이클린(Tigecycline), 이의 배합체 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [0027] 본 발명의 바람직한 일실시예에서, 상기 항균용 조성물은 그람 양성균, 그람 음성균 및 이의 다제내성균주에 대해 항균 활성을 갖는 것일 수 있다.
- [0028] 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 엔테로코커스속균종 (*Enterococcus* sp.) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0029] 상기 그람 음성균은 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아세네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 및 대장균(*Escherichia coli*)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0030] 상기 다제내성균주는 메티실린감수성황색포도알균(MSSA), 메티실린내성황색포도알균(MRSA), 반코마이신내성황색포도알균(VRSA), 반코마이신중등도내성황색포도알균(VISA), 반코마이신내성장알균(VRE), 반코마이신감수성장알균(VSE), 다제내성녹농균(MRTA), 카베페넴내성 녹농균(CRPA), 카파페넴내성아세트박터바우마니균(CRAB) 카바페넴내성장내세균속균종(CRE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 항균용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물을 유효성분으로 포함하는 식품 첨가제를 제공한다.
- [0033] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 사료 첨가제를 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 방부용 조성물을 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 의약품 조성물을 제공한다.

[0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0037] [화학식 2]



[0038]

도면의 간단한 설명

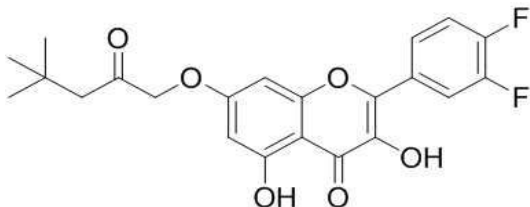
- [0040] 도 1은 본 발명의 3',4'-디플루오로케르세틴 YC-399의 합성과정을 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명에서 새로 합성한 3',4'-디플루오로케르세틴 유도체 YC-400의 합성과정을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 본 발명의 3',4'-디플루오로케르세틴 YC-399의 황색포도알균(*S. aureus*)의 다제내성균에 대한 바이오필름 억제 효과를 나타낸 것으로,
- A는 황색포도알균 균주별 상대적인 바이오필름 생성능력을 나타낸 것이고,
- B는 MRSA(ST-72)에 대한 YC-399의 농도별 바이오필름 억제 효과를 나타낸 것이고,
- C는 MRSA(ST-5)에 대한 YC-399의 농도별 바이오필름 억제 효과를 나타낸 것이고,
- D는 MSSA에 대한 YC-399의 농도별 바이오필름 억제 효과를 나타낸 것이고,
- E는 MRSA(ST-239)에 대한 YC-399의 농도별 바이오필름 억제 효과를 나타낸 것이고,
- F는 hVISA에 대한 YC-399의 농도별 바이오필름 억제 효과를 나타낸 것이고,
- G는 VISA에 대한 YC-399의 농도별 바이오필름 억제 효과를 나타낸 것이고,
- H는 음성 대조군(ATCC 25923 strain MSSA)에 대한 YC-399의 농도별 바이오필름 억제 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0042] 상술한 바와 같이, 항생제에 대하여 내성을 가지는 다제내성균에 대한 항균 활성을 나타내는 항생물질의 개발이 계속 요구되고 있다.

[0043] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 화학식 2로 표시되는 케르세틴 유도체의 제조방법을 제공한다.

[0044] [화학식 2]



[0045]

[0046] 구체적으로, 본 발명은 케르세틴을 출발물질로 하여 등록특허 [10-1325058]을 통해 공지된 케르세틴 유도체, 3',4'-디플루오로케르세틴 (3',4'-difluoroquercetin, YC-399)을 합성하고(도 1), YC-399 화합물을 출발물질로 하여 하기 [도 2]에 나타낸 바와 같이 1-클로로-4,4-디메틸펜탄-2-온과의 치환반응을 통해 새로운 케르세틴 유도체 YC-400 화합물(화학식 2로 표시됨)을 합성하였다.

[0047] 다음으로, 본 발명에서는 상기 케르세틴 유도체 YC-399 및 YC-400의 항균 활성을 그람양성 및 그람음성 다제내성균에서 최소성장 억제농도(Minimal inhibitory concentration: MIC)를 측정함으로써 확인한 결과, 케르세틴 유도체 YC-399 및 YC-400은 모든 그람양성 다제내성균에 대해 높은 항균활성을 가지고, 그람음성 다제내성균에 대해서도 항균활성을 가짐을 확인하였다(표 2, 표 3 및 도 3).

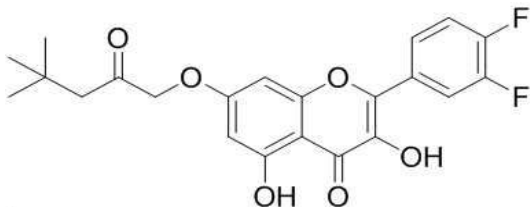
[0048] 이에, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물; 또는 그의 염을 유효 성분으로 포함하는, 항균용 조성물을 제공한다.

[0049] [화학식 1]



[0050]

[0051] [화학식 2]



[0052]

[0053] 본 발명의 용어 “약학적으로 허용가능한 염”은 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1 또는 2로 표시되는 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0054] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을

사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[0056] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 상기 화학식 1 또는 2의 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식 1 또는 2의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0058] 본 발명의 상기 화학식 1 또는 2의 화합물의 약학적으로 허용가능한 염으로는 약학적으로 허용가능한 염으로서, 상기 화학식 1 또는 2의 화합물과 동등한 항균 활성을 나타내는 상기 화학식 1 또는 2의 화합물의 염이면 제한 없이 모두 사용 가능하다.

[0060] 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물; 및 (b) 항생제를 유효성분으로 포함하는, 항균용 조성물을 제공한다.

[0061] 본 발명의 일실시예에서는, 케르세틴 유도체에 의한 약제내성 억제 효능을 약제내성 균주에서 기존 항생제의 활성이 케르세틴 유도체에 의해 회복되는 정도를 확인함으로써 평가하였다. 그 결과, 본 발명의 YC-399(화학식 1) 또는 YC-400(화학식 2) 화합물은 기존의 항생제와 함께 혼합 처리하였을 때 그람양성균, 그람음성균 및 이의 항생제 내성 균주에 대하여 유의적인 상승적 항균 효과를 나타내는 것을 확인하였다(표 4 내지 7). 이에, 본 발명의 YC-399 또는 YC-400 화합물은 항생제 내성을 억제하기 위한 항생제 보조제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 “항생제”는 다제내성균에 대하여 낮은 항균활성을 가지거나 항균활성이 없는 것으로 당업계에 알려진 것이라면 어떤 것을 사용하여도 무방하다. 구체적으로, 본 발명의 항생제는 암피실린(Ampicillin), 반코마이신(Vancomycin), 리네졸리드(Linezolid), 에리트로마이신(Erythromycin), 메티실린(Methicillin), 옥사실린(Oxacillin), 세프트락심(Cefotaxime), 리팜피신(Rifampicin), 아미카신(Amikacin), 겐타마이신(Gentamicin), 아미카신(Amikacin), 카나마이신(Kanamycin), 토브라마이신(Tobramycin), 네오마이신(Neomycin), 에르타페넴(Ertapenem), 도리페넴(Doripenem), 이미페넴/실라스타틴(Imipenem/Cilastatin), 메로페넴(Meropenem), 세프트라지딴(Ceftazidime), 세프피뎀(Cefepime), 세프트로린(Ceftaroline), 세프트로비프로(Ceftobiprole), 아즈트레오남(Aztreonam), 피페라실린(Piperacillin), 폴리믹신 B(Polymyxin B), 콜리스틴(Colistin), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 레보플록사신(Levofloxacin), 목시플록사신(Moxifloxacin), 가티플록사신(Gatifloxacin), 티게사이클린(Tigecycline), 이의 배합체 및 이들의 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0063] 본 발명의 화합물은 그람 양성균, 그람 음성균 및 이의 다제내성균주에 대해 항균 활성을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0064] 구체적으로, 상기 그람 양성균은 스태필로코커스 속(*Staphylococcus* species), 리스테리아 속(*Listeria* species), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* species), 코리네박테리움 속(*Corynebacterium* species), 락토바실러스 속(*Lactobacillus* species), 클로스트리듐 속(*Clostridium* species), 엔테로코커스 속(*Enterococcus* species), 에리시펠로트릭스 속(*Erysipelothrix* species) 및 바실러스 속(*Bacillus* species)을 포함하는 그람 양성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 양성균인 것이 바람직하며, 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 및 엔테로코커스속군종(*Enterococcus* species)인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0065] 상기 그람 음성균은 대장균 속(*Escherichia*), 슈도모나스 속(*Pseudomonas*), 살모넬라 속(*Salmonella*), 렙토스

피라 속(*Leptospira*), 리케치아 속(*Rickettsia*)을 포함하는 그람 음성균으로 당업계에 공지된 모든 그람 음성균인 것이 바람직하며, 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 아세네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*) 또는 대장균(*Escherichia coli*) 중 어느 하나인 것이 보다 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0066] 상기 다제내성균주는 메티실린감수성황색포도알균(MSSA), 메티실린내성황색포도알균(MRSA), 반코마이신내성황색포도알균(VRSA), 반코마이신중등도내성황색포도알균(VISA), 반코마이신내성장알균(VRE), 반코마이신감수성장알균(VSE), 다제내성녹농균(MRTA), 카베페넴내성 녹농균(CRPA), 카파페넴내성아세네토박터바우마니균(CRAB) 카바페넴내성장내세균속균종(CRE) 중 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0068] 또 다른 측면에서, 본 발명의 YC-399(화학식 1) 또는 YC-400(화학식 2) 화합물은 그 자체로도 다제내성균에 우수한 항균 활성을 나타내고, 기존의 항생제와 함께 혼합 처리하였을 때 그람양성균, 그람음성균 및 이의 항생제 내성 균주에 대하여 유의적인 상승적 항균 효과를 나타내므로, 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 화합물과 항생제의 복합제는 항균용 약학 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0069] 본 발명의 항균용 약학적 조성물은 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(Nasal), 흡입, 안구 및 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있다. 본 발명의 항균용 약학적 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0070] 즉, 본 발명의 항균용 약학적 조성물은 실제로 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(Witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0071] 또한, 본 발명의 항균용 약학적 조성물은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(Carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(Ascorbic acid) 또는 글루타치온(Glutathione)과 같은 항산화제(Antioxidants), 킬레이트화제(Chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(Stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[0072] 본 발명의 항균용 약학적 조성물의 유효용량은 0.01 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 10 mg/kg이며, 하루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.

[0073] 본 발명의 약학적 조성물에서 본 발명의 화합물, 또는 화합물과 항생제의 복합제의 총 유효량은 볼루스(Bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 주입(Infusion) 등에 의해 단일 투여량(Single does)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(Multiple does)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(Fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강 상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

[0074] 본 발명의 항균 보조제는 항생제 투여시, 항생제와 함께, 항생제 처리전, 항생제 처리 후 투여할 수 있으며, 항생제의 항균활성을 증진시키기 위한 보조제로서 사용될 수 있다. 상기 보조제는 항생제와 항균활성에 대하여 상승적 효과를 가지는 것이 바람직하며, 그람 양성균, 그람 음성균 및 항생제 내성 균주에 대하여 항생제의 항균활성을 증가시키는 것이 바람직하다.

[0076] 또 다른 측면에서, 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는, 식품 첨가제를 제공한다.

[0077] 또한, 본 발명은 (a) 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물; 및 (b) 항생제를 유효성분으로 포함하는, 식품 첨가제를 제공한다.

[0078] 본 발명의 화합물, 또는 화합물 및 항생제 복합제를 식품 첨가물로 사용하는 경우, 상기 화합물, 또는 화합물

및 항균제 복합제를 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 화합물, 또는 화합물 및 항균제 복합제는 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안정성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

- [0079] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0081] 또 다른 측면에서, 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물을 유효 성분으로 포함하는, 사료 첨가제를 제공한다.
- [0082] 또한, 본 발명은 (a) 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물; 및 (b) 항생제를 유효성분으로 포함하는, 사료 첨가제를 제공한다.
- [0083] 본 발명의 화합물, 또는 화합물 및 항균제 복합제를 포함하는 사료 조성물은 기존의 항생제를 대체하고 유해한 식품 병원성균의 성장을 억제하여 동물체의 건강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과가 있다. 본 발명의 사료 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일리지 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0084] 상기 발효사료는 본 발명의 화합물, 또는 화합물 및 항균제 복합제 이외의 여러 가지 미생물군 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 화합물 및 항균제 복합제를 혼합하여 제조할 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일리지는 청예사료를 미생물로 발효시킴으로써 제조할 수 있다. 습식발효사료는 음식물 쓰레기 등과 같은 유기물을 수집 및 운반하여 살균과정과 수분조절을 위한 부형제를 일정비율로 혼합한 후, 발효에 적당한 온도에서 24시간 이상 발효하여, 수분함량이 약 70%로 포함되도록 조절하여 제조할 수 있다. 발효건조사료는 습식발효사료를 건조과정을 추가로 거쳐 수분함량이 30% 내지 40% 정도 함유되도록 조절하여 제조할 수 있다.
- [0086] 또 다른 측면에서, 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물을 유효 성분으로 포함하는, 방부용 조성물을 제공한다.
- [0087] 또한, 본 발명은 발명은 (a) 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물; 및 (b) 항생제를 유효성분으로 포함하는, 방부용 조성물을 제공한다
- [0088] 상기 방부 조성물에는 식품의 방부제, 화장품 보존제 또는 의약품 보존제 등이 있다. 상기 식품의 방부제, 화장품 보존제 및 의약품 보존제는 의약품의 변질, 부패, 변색 및 화학변화를 방지하기 위해 사용되는 첨가물로서 살균제, 산화방지제가 이에 포함되며 세균, 곰팡이, 효모 등 미생물의 증식을 억제하여 식품 및 의약품에서 부패미생물의 발육저지 또는 살균작용을 하는 등의 기능성 항생제도 포함된다. 이러한 방부 조성물의 이상적인 조건으로는 독성이 없어야 하며, 미량으로도 효과가 있어야 한다.
- [0090] 아울러, 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물을 유효 성분으로 포함하는, 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.
- [0091] 또한, 본 발명은 (a) 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물; 및 (b) 항생제를 유효성분으로 포함하는, 항균용 의약외품 조성물을 제공한다
- [0092] 본 발명의 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 본 발명의 화합물, 또는 화합물 및 항생제 복합제를 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0093] 본 발명의 의약외품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세

제비누, 핸드워시, 가습기 증진제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 증진제일 수 있다.

[0095] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0097] [제조예 1]

[0098] 3',4'-디플루오로케르세틴 YC-399의 제조

[0099] [도 1]은 본 발명에서 사용한 3',4'-디플루오로케르세틴(YC-399)의 제조 방법을 그림으로 나타낸 것으로, 한국 등록특허 제10-1325058호에 기재된 방법으로 케르세틴(1)으로부터 3', 4'-디플로로케르세틴(6)을 제조하였다.

[0101] [실시예 1]

[0102] 3',4'-디플루오로케르세틴 유도체 YC-400의 합성

[0103] [도 2]는 본 발명의 3',3'-디플로오로케르세틴 유도체 YC-400의 제조 방법을 상기에서 제조된 3',4'-디플루오로케르세틴(YC-399)으로부터 그림으로 나타낸 것이다.

[0104] 구체적으로, 제조예 1과 같이 제조한 3',4'-디플루오로케르세틴 (YC-399) 500 mg (1.6 mmol)을 아세톤 (30 mL)에 녹인 용액에 탄산칼륨(338 mg, 2.4 mmol)과 1-클로로-4,4-디메틸펜탄-2-온(363 mg, 2.4 mmol)을 첨가하고, 반응 용액을 상온에서 12 시간 동안 교반하였다. 반응물에서 고체를 걸러내고 남은 용액을 감압증류하고, 이 때 얻어진 잔류물을 실리카겔 판크로마토그래피(헥산:에틸아세테이트 = 3:1)로 정제하여 목적하는 화합물 3',4'-디플루오로케르세틴 유도체 YC-400을 65%의 수율로 얻었다: ^1H NMR (400 MHz) δ (Acetone- d_6) 8.21-8.12 (m, 2H), 7.53 (dd, J = 18.9, 8.8 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 4.90 (s, 2H), 2.54 (s, 2H), 1.07 (s, 9H).

[0106] [실시예 2]

[0107] 케르세틴 유도체의 항균 활성 확인

[0108] <2-1> 케르세틴 유도체 YC-399 및 YC-400의 다제내성균에 대한 항균 활성 확인

[0109] 본 발명의 케르세틴 유도체가 나타내는 항균 활성을 확인하기 위하여, 그람음성균 및 그람양성균의 다제내성균에 대해 본 발명의 케르세틴 유도체 YC-399 및 YC-400이 나타내는 항균 활성을 측정하였다. 상기 항균활성은 영양분이 충분한 배지에서 균체가 분열되지 않는 최소성장 억제농도(Minimal inhibitory concentration: MIC)를 측정하였다.

[0110] 최소성장 억제농도는 미국 임상 실험실 표준 지침(Clinical Laboratory Standard Institute [CLSI] M7-A10)에 따라 broth microdilution method로 시행하였다. 하기 [표 1]에 기재된 균주는 최소성장 억제농도 실험에 사용된 균주로 한국미생물보존센터(KCCM), 항생제내성균주은행(CCARM)에서 분양 또는 구입 한 균주와 환자에서 분리된 임상 균주를 사용하였다. 구체적으로, 세균수가 mL 당 5×10^5 colony-forming units(CFUs)가 되도록, CAMHB(Cationic Adjusted Muller Hinton Broth)배지로 희석하고 200 μL 씩 96-웰 마이크로 적정 플레이트(Microtiter plate)에 분주한 후, CAMHB 배지로 희석한 케르세틴 유도체 용액을 각 웰에 200 μL 씩 첨가하였다. 플레이트를 대기과 같은 공기 조건(ambient air)으로 $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도로 균종에 따라 16-24시간 배양한 후 케르세틴 유도체의 MIC의 육안으로 결정하였다. MIC값이 해당농도를 초과하여 나올 경우에는 해당 농도 다음 농도로 MIC를 가정하여 이후 실험을 진행하였다(MIC >256인 경우는 MIC 512로 간주하였다).

[0111] 그 결과, 하기 [표 1]에 나타낸 바와 같이, 케르세틴 유도체 YC-399 및 YC-400은 모든 그람양성 다제내성균에 대해 높은 항균활성을 가짐을 확인하였다. 특히 YC-399는 YC-400에 비해 그람양성 다제내성균 중 *S.aureus*, *Enterococcus* species 및 그 내성균에 대해 우수한 항균활성을 나타냄을 알 수 있었다. 이들 화합물은 모든 그람양성 다제내성균에 선택적으로 매우 높은 항균활성을 가짐을 확인하였고, 그람음성 다제내성균에는 상대적으

로 낮은 항균 활성을 가짐을 확인하였다(표 1).

[표 1]

다제내성균에 대한 케르세틴 유도체의 항균 활성

구분	균종	다제내성균 (strain [ST type])	최소생장억제농도 MIC (mg/L)	
			YC-399	YC-400
그람양성균	스타필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	MSSA (ATCC 29213)	8	128
		MRSA (AMC-SA 5016 [ST5])	16	128
		ST72 MRSA (AMC-SA 5013 [ST72])	16	128
		ST239 MRSA (AMC-SA 3416 [ST239])	8	64
		hVISA (ATCC 700698, μ 3)	16	128
		VISA (ATCC 700699, μ 50)	16	128
	엔테로코커스 속 (<i>Enterococcus</i> species)	VSE (ATCC 29212)	32	64
		VRE (CCARM 5024)	16	8
그람음성균	슈도모나스 에루지노사 (<i>P. aeruginosa</i>)	CSPA (ATCC 27853)	≥ 128	≥ 128
		CRPA (CCARM 2321)	≥ 128	≥ 128
	아세네토박터 바우마니 (<i>A. baumannii</i>)	CSAB (ATCC 19606)	≥ 128	≥ 128
		CRAB (AMC-AB 643)	≥ 128	≥ 128
	클렙시엘라 뉴모니아 (<i>K. pneumonia</i>)	WT (ATCC 13883)	≥ 128	≥ 128
		KPC type CRE (ATCC 13883)	≥ 128	≥ 128
	대장균 (<i>E. coli</i>)	WT (ATCC 25922)	≥ 128	≥ 128
		NDM-1 type CRE (AMC-EC 22365)	≥ 128	≥ 128

<2-2> 다제내성균에 대한 기존 항생제의 항균 활성 확인

본 발명의 화합물의 항균 활성을 기존 항생제와 비교하기 위하여, 동일한 다제내성균에 대하여 항생제가 나타내는 MIC 농도를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법으로 대상 균주를 준비하고, 항생제인 암피실린(Ampicillin, AMP), 세프트라지딴(Ceftazidime, CAZ), 세파핼(Cefepime, FEP), 반코마이신(Vancomycin, VAN), 메로페넴(Meropenem, MERO)을 각각 처리하여 항생제의 MIC를 확인하였다.

그 결과, 기존 항생제는 알려진 바와 같이 다제내성균에 대해서는 낮은 항균활성을 나타냄을 확인하였다(표 2 및 표 3).

[표 2]

[0121] 기존 항생제의 그람양성 내성균에서의 항균 활성

균종	다제내성균 (strain [ST type])	최소생장억제농도 MIC (mg/L)			
		AMP	CAZ	FEP	VAN
스타필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	MSSA (ATCC 29213)	0.5	16	2	0.5
	MRSA (AMC-SA 5016 [ST5])	32	>256	>256	0.5
	ST72 MRSA (AMC-SA 5013 [ST72])	8	256	64	0.5
	ST239 MRSA (AMC-SA 3416 [ST239])	64	8	2	0.5
	hVISA (ATCC 700698, μ 3)	32	>256	>256	1
	VISA (ATCC 700699, μ 50)	8	256	256	4
엔테로코커스 속 (<i>Enterococcus species</i>)	VSE (ATCC 29212)	0.5	256	32	2
	VRE (CCARM 5024)	256	>256	>256	>256

[0122]

[표 3]

[0124] 기존 항생제의 그람음성 내성균에서의 항균 활성

균종	다제내성균 (strain [ST type])	최소생장억제농도 MIC (mg/L)		
		CAZ	FEP	MERO
슈도모나스 에루지노사 (<i>P. aeruginosa</i>)	CSPA (ATCC 27853)	1	1	0.5
	CRPA (CCARM 2321)	16	64	16
아세네토박터 바우마니 (<i>A. baumannii</i>)	CSAB (ATCC 19606)	8	8	1
	CRAB (AMC-AB 643)	256	64	64
클렙시엘라 뉴모니에 (<i>K. pneumoniae</i>)	WT (ATCC 13883)	0.5	0.03	0.03
	KPC type CRE (ATCC 13883)	256	256	256
대장균 (<i>E. coli</i>)	WT (ATCC 25922)	0.06	0.016	0.016
	NDM-1 type CRE (AMC-EC 22365)	>256	8	4

[0125]

[0126] [실시예 3]

[0127] 그람양성 다제내성균에 케르세틴 유도체 및 항생제 혼합 처리시 시너지 효과의 확인

[0128] 본 발명의 화합물은 그람양성 다제내성균에 대하여 높은 항균 활성을 나타내는 것을 확인하여, 그람음성 다제내성균에 강한 항균활성을 내고 그람양성 다제내성균에는 유의적인 항균활성을 가지지 않는 항생제를 본 발명의 화합물과 혼합 처리하였을 때 유의적인 시너지 활성을 나타내는지 확인하였다. 96 well 플레이트에서 checkerboard synergy test를 시행하였으며, YC-399와 YC-400 및 항균제의 최소 억제 농도(MIC)는 broth microdilution 방법을 사용하였다. 다양한 농도의 항균제 및 YC-399, YC-400을 조합하여, YC-399, YC-400의 병합에 의한 기존 항균제의 최소 억제 농도 변화를 평가하였다.

[0129] 구체적으로, 상기 [표 1]에 기재된 각각의 균주를 준비하여 세균수가 ml 당 5×10^5 colony-forming units (CFUs)가 되도록 CAMBH배지로 희석하고 200 μ l씩 96-웰 마이크로적정 플레이트(Microtiter plate)에 분주한 후, CAMBH 배지로 MIC 값부터 희석한 화합물 함유 용액 (단계적으로 희석된 용액)을 각 웰에 100 μ l씩 첨가하였다. 그 후 항생제 용액을 CAMBH 배지에 희석하여 각 웰에 100 μ l씩 첨가하고 상반된 조건으로도 동일하게 실시

하여 각 혼합액의 MIC 값을 결정하였다.

[0131] 그 결과, 하기 [표 4] 및 [표 5]에서 나타낸 바와 같이, 기존의 항생제인 암피실린(AMP), 세프트리지딤(CAZ), 세파킴(FEP) 또는 반코마이신(Vancomycin, VAN)을 본 발명의 화합물인 YC-399 또는 YC-400과 함께 투여한 항균 활성의 시너지 효과를 확인하였다. 본 발명의 화합물을 1/2 MIC가로 처리하였을 때 MRSA, VISA, VISA, VSE, VRE에 대해 세프트리지딤의 MIC가 4-64배 낮아지는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명의 화합물을 1/2 MIC가로 처리하였을 때 MRSA, VISA, VSE에 대해 세파킴의 MIC이 4-128배 낮아졌으며, 본 발명의 화합물을 1/2 MIC가로 처리하였을 때 VSE, VRE, MRSA, VISA에 대해 반코마이신의 MIC이 4배 낮아지는 것을 확인하였다.

[0132] 예를 들어, 화합물 YC-399 MIC의 1/2 농도인 8 mg/L로 화합물을 항생제와 혼합하여 VSE에 처리하였을 때, YC-399를 세프트리지딤 또는 세파킴과 혼합한 경우에서 세프트리지딤 및 세파킴의 MIC 값이 각각 8 및 1 mg/L (각각 항생제 MIC의 1/32, 1/32)임을 확인하였다(표 4).

[0133] [표 4]

[0134] 그람양성 다제내성균에 본 발명의 YC-399 화합물 처리 시 항생제의 항균 활성

균종	다제내성균 (strain [ST type])	YC-399 농도 (mg/L)	최소생장억제농도 MIC (mg/L)				
			YC-399	AMP	CAZ	FEP	VAN
스타필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	MRSA (AMC-SA 5016 [ST5])	Single	16 ^a	32	>256	>256	0.5
		2 (1/8)	-	32	>256	>256	0.5
		4 (1/4)	-	32	>256	>256	0.5
		8 (1/2)	-	32	16	64	0.5
	ST72 MRSA (AMC-SA 5013 [ST72])	Single	16 ^a	8	256	64	0.5
		2 (1/8)	-	8	256	64	0.5
		4 (1/4)	-	8	256	16	0.5
		8 (1/2)	-	8	32	8	0.5
	hVISA (ATCC 700698, μ 3)	Single	16 ^a	32	>256	>256	1
		2 (1/8)	-	32	>256	>256	1
		4 (1/4)	-	32	>256	>256	1
		8 (1/2)	-	16	32	>256	0.5
	VISA (ATCC 700699, μ 50)	Single	16 ^a	8	256	256	4
		2 (1/8)	-	8	256	256	4
		4 (1/4)	-	8	256	256	4
		8 (1/2)	-	8	64	4	4
엔테로코쿠스 속 (<i>Enterococcus</i> species)	VSE (ATCC 29212)	Single	32 ^a	0.5	256	32	2
		4 (1/8)	-	0.5	256	32	2
		8 (1/4)	-	0.5	256	32	2
		16 (1/2)	-	0.06	8	1	0.5
	VRE (CCARM 5024)	Single	16 ^a	256	>256	>256	>256
		2 (1/8)	-	256	>256	>256	>256
		4 (1/4)	-	256	>256	>256	>256
		8 (1/2)	-	16	8	>256	128

^aMIC concentrations of YC-399

[0135]

[0136] [표 5]

[0137] 그람양성 다제내성균에 본 발명의 YC-400 화합물 처리 시 항생제의 항균 활성

균종	다제내성균 (strain [ST type])	YC-400 농도 (mg/L)	최소생장억제농도 MIC (mg/L)				
			YC-400	AMP ^a	CAZ ^b	FEP ^c	VAN ^d
스타필로코커스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	MSSA (ATCC 29213)	Single	128 ^a	0.5	16	4	0.5
		16 (1/8)		0.5	8	4	0.5
		32 (1/4)	—	0.5	8	4	0.5
		64 (1/2)	—	0.125	4	2	0.5
	ST72 MRSA (AMC-SA 5013 [ST72])	Single	128 ^a	8	256	64	0.5
		16 (1/8)	—	8	256	64	0.5
		32 (1/4)	—	8	128	8	0.5
		64 (1/2)	—	8	16	4	0.125
	ST239 MRSA (AMC-SA 3416 [ST239])	Single	64 ^a	64	8	4	0.5
		8 (1/8)	—	64	8	4	0.5
		16 (1/4)	—	64	4	2	0.5
		32 (1/2)	—	4	0.5	0.125	0.25
	hVISA (ATCC 700698, μ 3)	Single	128 ^a	32	>256	>256	1
		16 (1/8)	—	32	>256	>256	1
		32 (1/4)	—	32	>256	>256	1
		64 (1/2)	—	32	>256	64	0.5
	VISA (ATCC 700699, μ 50)	Single	128 ^a	8	256	256	4
		16 (1/8)	—	8	128	256	4
		32 (1/4)	—	8	128	256	2
		64 (1/2)	—	4	16	16	1

[0138] ^aMIC concentrations of YC-400

[0140] [실시예 4]

[0141] 그람음성 다제내성균에 케르세틴 유도체 및 항생제 혼합 처리시 시너지 효과의 확인

[0142] 그람음성 다제내성균에 비교적 강한 항균활성을 나타내는 항생제를 본 발명의 화합물과 혼합 처리하였을 때 유의적인 시너지 활성을 나타내는지 확인하였다. 실시예 3과 동일한 방법으로 96 well 플레이트에서 checkerboard synergy test를 시행하였으며, YC-399와 YC-400 및 항생제의 최소 억제 농도(MIC)는 broth microdilution 방법을 사용하였다. 다양한 농도의 항생제 및 YC-399, YC-400을 조합하여, YC-399, YC-400의 병합에 의한 기존 항생제의 최소 억제 농도 변화를 평가하였다.

[0143] 그 결과, [표 6] 및 [표 7]에 나타난 바와 같이, 기존의 항생제인 세프트라지딴(CAZ), 또는 세파킴(FEP)을 본 발명의 화합물인 YC-399 또는 YC-400과 함께 투여한 항균 활성의 시너지 효과를 확인한 결과, 본 발명의 화합물을 1/2 MIC가로 처리하였을 때 CRPA 및 CRAB에 대해 기존 항생제의 MIC가 4-8배 낮아지는 것을 확인하였다.

[0144] [표 6]

[0145] 그람음성 다제내성균에 본 발명의 YC-399 화합물 처리 시 항생제의 항균 활성

균종	다제내성균 (strain)	YC-399 농도 (mg/L)	최소생장억제농도 MIC (mg/L) ^b		
			YC-399	CAZ	FEP
<i>P. aeruginosa</i>	CRPA	Single	≥128 ^a	16	64
		8 (1/16)	—	16	32
		16 (1/8)	—	16	32
		32 (1/4)	—	4	32
		64 (1/2)		2	32
<i>A. baumannii</i>	CSAB	Single	≥128 ^a	8	8
		8 (1/16)		8	4
		16 (1/8)		4	4
		32 (1/4)		4	2
		64 (1/2)		2	2
	CRAB	Single	≥128 ^a	256	64
		8 (1/16)		64	64
		16 (1/8)		64	32
		32 (1/4)		64	32
		64 (1/2)		64	16

[0146]

[0147] [표 7]

[0148] 그람음성 다제내성균에 본 발명의 YC-400 화합물 처리 시 항생제의 항균 활성

균종	다제내성균 (strain)	YC-400 농도 (mg/L)	최소생장억제농도 MIC (mg/L) ^b		
			YC-400	CAZ	FEP
<i>P. aeruginosa</i>	CRPA	Single	≥128 ^a	16	64
		8 (1/16)	—	16	32
		16 (1/8)	—	16	32
		32 (1/4)	—	4	32
		64 (1/2)		2	32
<i>A. baumannii</i>	CRAB	Single	≥128 ^a	256	64
		8 (1/16)		128	64
		16 (1/8)		128	32
		32 (1/4)		128	32
		64 (1/2)		128	16

[0149]

[0151] [실시예 5]

[0152] 황색포도알균에 대한 YC-399의 정적 바이오필름 억제 효과 확인

[0153] 대부분의 박테리아는 일반적으로 물속에서 플랑크톤 형태 (planktonic form)로 존재하지만, 영양분의 감소나 항생제의 공격 등으로 생존조건이 열악해지는 경우, 고체의 표면에 붙어서 군락을 형성하는 바이오필름의 형태로 표현형이 변화하게 된다. 바이오필름 중의 박테리아는 항생제 및 숙주 방어 시스템에 대해서 증진된 내성을 나타내며, 이는 종종 지속적이며 치료가 어려운 감염증으로 이어진다 (Kania *et al.* ., 2008; Vlastarakos *et al.* ., 2007). 다양한 연구들에 의해서 폐렴균성 바이오필름이 페니실린, 테트라사이클린, 림파피신, 아목실린, 에리트로마이신, 클린다마이신 및 레보플록사신에 대해서 현저하게 높은 내성을 갖는다는 사실이 보고된 바 있다 (del Prado *et al.* ., 2010; Garcia-Castillo *et al.* ., 2007). Marks 등은 (2012), 마우스의 비인두 조직 (nasopharyngeal tissue) 상에 형성된 폐렴균성 바이오필름이 플랑크톤성 바이오필름에 비해서 젠타마이신 및 페니실린 G에 대해서 더욱 내성을 갖는다는 사실을 보고한 바 있다 (Marks *et al.* ., 2012). 이에, YC-399의 황색포도알균(*S.aureus*) 내성균에 대한 바이오필름 억제 효과를 확인하기 위하여 96-well 플레이트 (Corning, no. 3595)에서 정적 바이오필름 형성 실험을 시행하였다. 세균은 0.5 X, tryptic soy broth (Becton Dickinson and Co.)에 접종 후 1% glucose를 첨가하였다. 200 uL의 접종액을 YC-399(0, 1, 5, 10, 25, and 50 mg/L)와 함께 각 well 접종하였고, well은 5 X 10⁶ 개의 세균에 해당한다. 플레이트를 37℃ 20시간 배양 시행 후 PBS buffer을 사용하여 부착되지 않은 세균을 씻어 낸다. 부착된 세균은 100% 에탄올로 15분간 고정된 후에

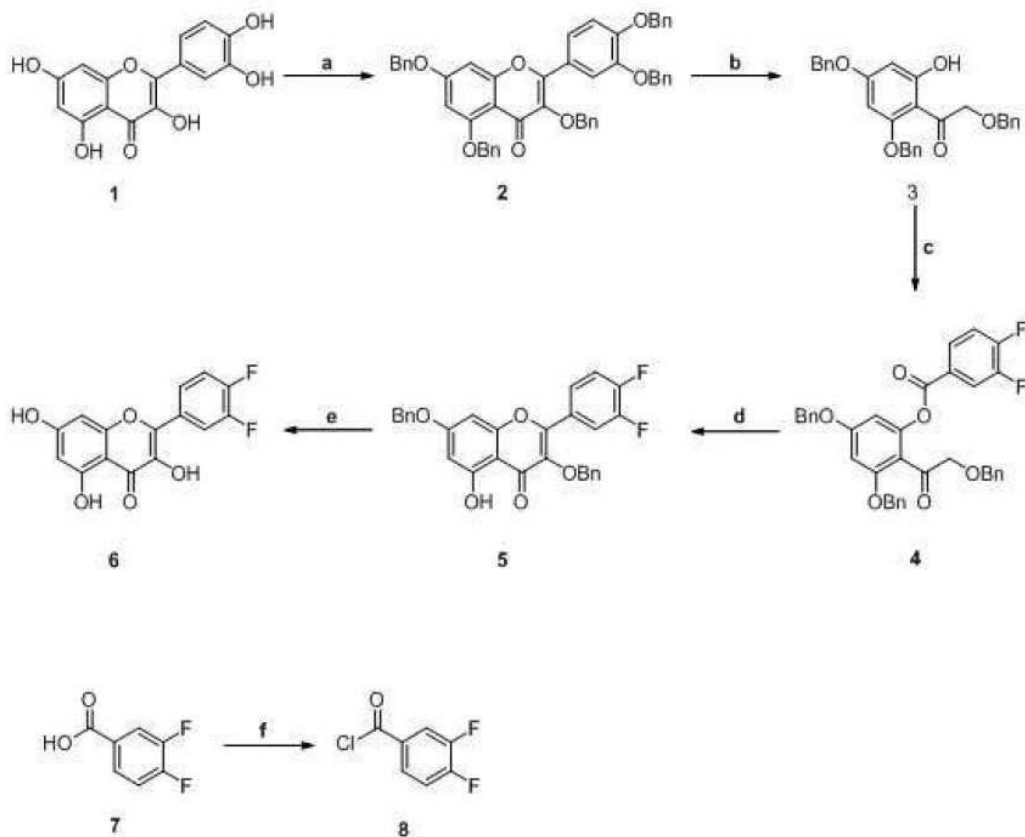
0.1% 크리스탈 바이올렛 용액으로 10분간 염색한다. 이후 플레이트를 deionized water (dH₂O)로 세척 후, 각 well을 분광 광도계를 이용하여 OD₆₀₀에서 측정하였다.

[0154] 도 7은 본 발명의 YC-399 화합물의 스트렙토코커스 아우레우스 내성균성 인 비트로 바이오필름 성장에 미치는 효과를 나타낸 것으로서, 600 nm(OD₆₀₀)에서 광학 밀도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0155] 이를 통해, 5 mg/L의 YC-399를 처리한 균에서부터 바이오필름의 성장이 감소한다는 것을 확인할 수 있다. YC-399는 MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*)에 대하여 최소억제농도 이하의 농도에서 바이오필름 억제 효과를 가지고 있으므로 다제내성균 감염 극복을 위한 효과적인 항균제 또는 항균제 보조 약제로 사용될 것으로 보인다.

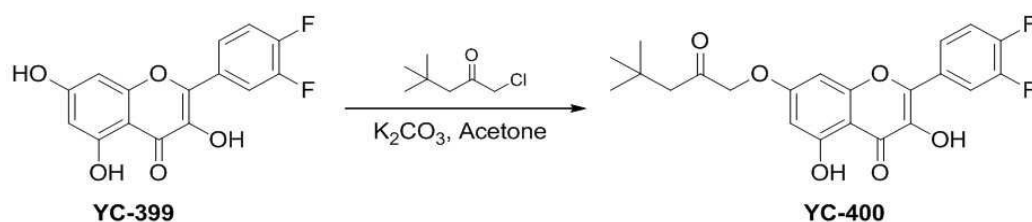
도면

도면1



Reagents and conditions: a) BnBr, K₂CO₃, DMF, 80 °C; (b) 18N KOH, diethylene glycol, 120 °C; (c) 8, TEA, CH₂Cl₂; (d) K₂CO₃, TBAB, Toluene, 90 °C; (e) Pd/C, H₂, CH₂Cl₂, MeOH; (f) Oxalyl chloride, DMAP, CH₂Cl₂, reflux

도면2



도면3

