



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0108207
(43) 공개일자 2021년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 57/20 (2006.01) A01N 43/36 (2006.01)

A01N 43/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 57/20 (2013.01)

A01N 43/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0023126

(22) 출원일자 2020년02월25일

심사청구일자 2020년02월25일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김도경

서울특별시 성북구 화랑로 214, 113동 402(석관동, 래미안석관)

김종승

경기도 성남시 분당구 판교역로 145, 202동 204호(백현동, 알파리움2단지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

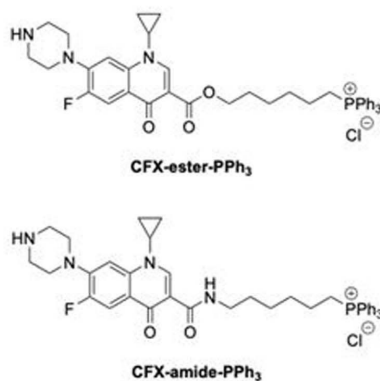
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 항생제 내성 균주에 대해 항균활성을 갖는 항균용 조성물

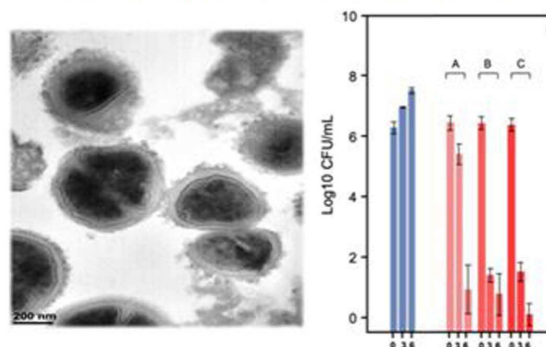
(57) 요약

본 발명은 항생제 내성 균주에 대해 항균활성을 갖는 항균용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 그람 양성균의 다제내성균의 세포막을 표적으로 하는 항균활성을 나타내는 항균성 화합물을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 양전하를 띤 지질친화성 양이온 화합물인 미토콘드리아를 표적하는 트리페닐포스포니움(TPP^+)을 포함하고 있어 박테리아의 세포막 음이온성 지질을 표적하는 것을 특징으로 하며, 그람양성 박테리아 특히 황색포도상구균 및 메타실린 내성 황색포도상구균에 낮은 MIC 값을 나타내고, 약물 유출 유전자의 발현을 감소시킴으로써 세포 내 유입된 항생제의 유출을 억제해 항균 활성을 나타내며, 항생제 및 항염제와 같은 의료 산업 또는 식품첨가제 등에 다양한 생물학적 적용이 가능하다.

대표도 - 도8



Multidrug Resistant Bacteria



(52) CPC특허분류

A01N 43/48 (2013.01)

(72) 발명자

강상립

경기도 용인시 기흥구 신갈로 100, 104동 602호(신갈동, 한신아파트)

선우경

서울특별시 서초구 신반포로 45, 68-501 (반포동, 반포아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345281263
부처명	경희대학교
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기본연구(1년~5년)
연구과제명	알츠하이머병 내 아밀로이드-베타 응집체 분해 기능의 나노입자 개발
기 여 율	70/100
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345295870
부처명	경희대학교
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원(이공계분야)
연구과제명	경희대학교 의과학 연구소
기 여 율	30/100
과제수행기관명	한국연구재단
연구기간	2018.06.01 ~ 2027.02.28

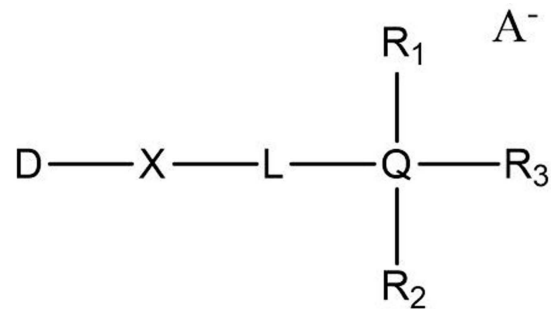
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 항생제 내성 균주에 대한 항균용 조성물:

[화학식 1]



상기 [화학식 1]에서,

D는 플루오로퀴놀론계 항생제로서 X와 연결되고,

X는 O, S 및 NR 중에서 선택되는 어느 하나이며, 상기 R은 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 6 내지 10의 아릴기 및 탄소수 2 내지 10의 헤테로아릴기 중에서 선택되는 어느 하나이고,

L은 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기 및 폴리알킬렌글리콜기 중에서 선택되는 어느 하나이며,

Q는 N, P, As 및 Sb 중에서 선택되는 어느 하나이고,

R1 내지 R3는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 6 내지 10의 아릴기 및 탄소수 2 내지 10의 헤테로아릴기 중에서 선택되는 어느 하나이며,

A⁻는 할로젠, 하이드록실, 카르복실레이트, 설페이트, 설파메이트, 설포네이트, 포스페이트, 포스포네이트, 보로네이트 및 (폴리)에틸렌옥시 중에서 선택되는 어느 하나의 음이온이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 D는 플루메퀸(flumequine), 옥솔린산(oxolinic acid), 로속사신(rosoxacin), 시녹사신(cinoxacin), 날리딕산(nalidixic acid), 피로미드산(piromidic acid), 피페미드산(pipemidic acid), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 플레록사신(fleroxacin), 로메플록사신(lomefloxacin), 나디플록사신(nadifloxacin), 노르플록사신(norfloxacin), 오플록사신(ofloxacin), 페플록사신(pefloxacin), 루플록사신(rufloxacin), 에녹사신(enoxacin), 발로플록사신(balofloxacin), 그레파플록사신(grepafloxacin), 레보플록사신(levofloxacin), 파주플록사신(pazufloxacin), 스파르플록사신(sparfloxacin), 테마플록사신(temafloxacin), 토수플록사신(tosufloxacin), 클리나프록사신(clinafloxacin), 가티플록사신(gatifloxacin), 모시플록사신(moxifloxacin), 시타플록사신(sitafloxacin), 프룰리플록사신(prulifloxacin), 베시플록사신(besifloxacin), 제미플록사신(gemifloxacin), 트로바플록사신(trovafoxacin), 델라플록사신(delafloxacin), 다노플록사신(danofloxacin), 디플록사신(difloxacin), 엔로플록사신(enrofloxacin), 이바플록사신(ibafloxacin), 마보플록사신(marbofloxacin), 오비플록사신(orbifloxacin) 및 사라플록사신(sarafloxacin)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 그람 양성균인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 그람 양성균은 엔트로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*)균 또는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 엔트로코커스 페시움균은 반코마이신 내성 엔트로코커스 페시움균인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

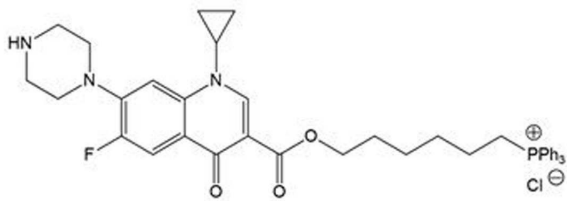
상기 황색포도상구균은 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA) 또는 반코마이신 내성 황색포도상구균(VISA)인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 7

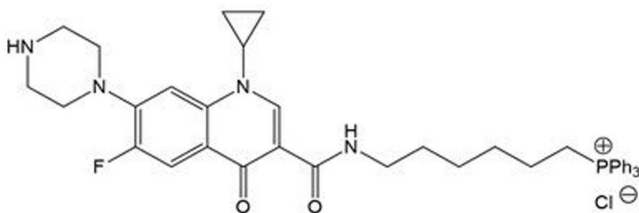
제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]의 화합물은 하기 [화학식 2] 또는 [화학식 3]으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물:

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 그람 양성균의 세포막을 직접적으로 표적하는 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 그람 양성균의 바이오필름 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 조성물은 *norA*, *sepA* 또는 *medA* 유전자의 발현을 감소시킴으로써, 세포 내에 유입된 약물의 유출을 억제하는 것을 특징으로 하는, 항균용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항생제 내성 균주에 대해 항균활성을 갖는 항균용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 그람 양성 다제내성균의 세포막을 표적으로 하여 항균활성을 나타내는 항균성 화합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세균에 의한 감염은 인간의 질병에 있어 가장 흔하고 치명적인 원인 중의 하나이다. 세균 감염에 의한 질병에 있어 항생제의 사용은 불가피하다. 최초 항생제 페니실린(penicillin)의 발견 이후 수많은 종류의 항생제가 개발되어 세균성 감염 질병의 치료를 위해 사용되어 왔다. 그러나 최근 들어 이러한 항생제의 오남용은 항생제에 내성을 가지는 균주들의 출현 및 더 나아가 각종 항생제에 내성을 나타내는 다제내성균(MDR, mult drug resistant bacteria)이 출현함으로써 전 세계적으로 큰 문제로 여겨지고 있다. 이러한 다제내성균의 출현은, 세균성 감염질환에서 사용할 수 있는 항생제의 종류에 제한을 주고, 이에 따라, 질병 치료에 있어 큰 어려움을 줌과 동시에 치료기간의 연장 및 의료비용 상승 등의 부담을 유발시키는 문제점이 있다.

[0003] 이러한 내성균들을 극복하기 위해 지금까지 수많은 새로운 항생물질들이 개발되어졌고 지금은 약 160여 종의 항균제들이 임상적으로 사용되고 있다. 현재 국내에 등록된 항생제는 100개가 있지만, 내성균에 효과를 보이는 항생제는 sulphonamides 및 penicillin 계를 시작으로 aminoglycosides, tetracyclines, cephalosporins, macrolides, glycopeptides, quinolones, 와 carbapenems 계의 10여 종에 불과하기 때문에, 다제내성균 감염에 대항하기 위한 항생제 개발의 필요성이 증대되고 있다.

[0004] 2002년 미국 질병통제국(Centers for Disease Control)에서 인간에게 가장 흔하게 감염을 일으키는 원인균인 황색포도상구균의 마지막 치료제라고 하던 반코마이신(vancomycin)에도 심각한 내성을 보이는 황색포도상구균(vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA)이 세계 최초로 보고됨으로써, 다제내성 박테리아의 확산 가능성이 상당히 높아지고 있다. 특히, 1988년 반코마이신 내성 장구균(vancomycin resistant enterococcus, VRE)이 유럽에서 처음으로 발견된 이후 프랑스와 한국에서 반코마이신 내성 황색포도상구균(vancomycin intermediate-resistant *S. aureus*, VISA)이 발생함으로써, 항생제 내성 문제는 범세계적인 문제로 대두되고 있어 새로운 개념의 항생제 개발이 시급히 요구되고 있다.

[0005] 이러한 주요 다제내성균을 극복하기 위해 다양한 항독성, 나노물질 및 약물전달 시스템과 같은 많은 연구들이 이루어지고 있다(대한민국 등록특허 제 10-1599587호). 최근에는 항균성 펩타이드(antibacterial peptides) 및 박테리오파지를 이용한 항균물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히, 항균성 펩타이드를 이용한 항생물질 개발은 펩타이드의 양전하를 띠는 부분이 음전하를 갖는 박테리아의 세포막과 결합하여 세포막의 전위를 변화시키거나, 세포막 자체에 천공(pore)을 형성하여 막투과성(permeability)과 막유동성(fluidity)을 변화시킴으로써 세포를 파괴하는 항균작용 메커니즘에 기인하여 이루어지고 있다. 이렇듯 항생물질을 개발하기 위한 여러 가지 노력들이 이루어지고 있으나, 이러한 방법들은 여전히 임상적으로 사용하기 위한 의약품으로 되기까지는 많은 어려움이 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 기존에 그람 음성 및 그람 양성 박테리아 치료에 사용되는 시프로프록사신에 박테리아의 세포막 음이온성 지질을 표적하기 위한 전략으로 트리페닐포스포늄(TPP⁺)을 -에스터(ester)와 -아마이드(amide) 결합을 통해 시프로프록사신의 카르복실산(carboxylic acid)과 화학적으로 결합된 2종의 시프로프록사신 유도체를 합성하고, 그람 양성 다제내성균에 대한 항균활성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

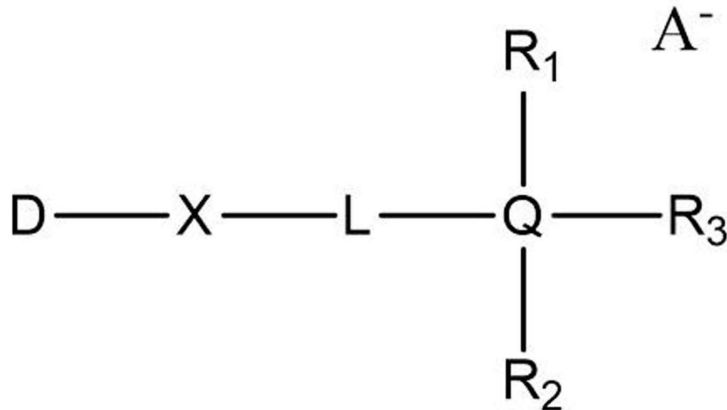
[0007] 이에, 본 발명은 항생제 내성 균주에 대해 항균성을 갖는 화합물을 포함하는 항균용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여,

[0009] 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 항생제 내성 균주에 대한 항균용 조성물을 제공한다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 상기 [화학식 1]의 구조 및 치환기에 대한 설명은 후술하기로 한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 D는 플루메퀸(flumequine), 옥솔린산(oxolinic acid), 로속사신(rosoxacin), 시녹사신(cinoxacin), 날리딕산(nalidixic acid), 피로미드산(piromidic acid), 피페미드산(pipemidic acid), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 플레록사신(fleroxacin), 로메플록사신(lomefloxacin), 나디플록사신(nadifloxacin), 노르플록사신(norfloxacin), 오플록사신(ofloxacin), 페플록사신(pefloxacin), 루플록사신(rufloxacin), 에녹사신(enoxacin), 발로플록사신(balofloxacin), 그레파플록사신(grepafloxacin), 레보플록사신(levofloxacin), 파주플록사신(pazufloxacin), 스파르플록사신(sparfloxacin), 테마플록사신(temafloxacin), 토수플록사신(tosufloxacin), 클리나프록사신(clinafloxacin), 가티플록사신(gatifloxacin), 목시플록사신(moxifloxacin), 시타플록사신(sitafloxacin), 프룰리플록사신(prulifloxacin), 베시플록사신(besifloxacin), 제미플록사신(gemifloxacin), 트로바플록사신(trovafloracin), 델라플록사신(delafloxacin), 다노플록사신(danofloxacin), 디플록사신(difloxacin), 엔로플록사신(enrofloxacin), 이바플록사신(ibafloxacin), 마보플록사신(marbofloxacin), 오비플록사신(orbifloxacin) 및 사라플록사신(sarafloxacin)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 균주는 그람 양성균일 수 있다.

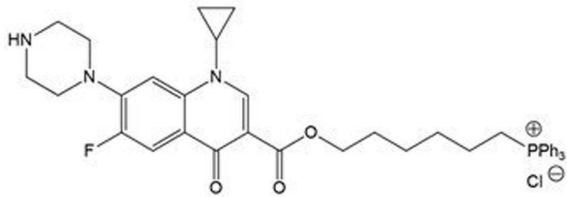
[0015] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 그람 양성균은 엔트로코커스 페시움(Enterococcus faecium)균 또는 황색포도상구균(Staphylococcus aureus)일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 엔트로코커스 페시움균은 반코마이신 내성 엔트로코커스 페시움균(VRE)일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 황색포도상구균은 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA) 또는 반코마이신 내성 황색포도상구균(VISA)일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 [화학식 1]의 화합물은 하기 [화학식 2] 또는 [화학식 3]으로 표시되는 화합물일 수 있다.

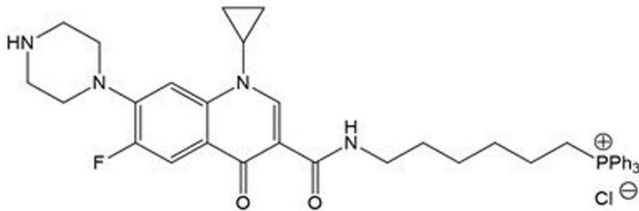
[0019] [화학식 2]



[0020]

[0021]

[0022] [화학식 3]



[0023]

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 그람 양성균의 세포막을 직접적으로 표적할 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 그람 양성균의 바이오필름 형성을 억제할 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 *norA*, *sepA* 또는 *medA* 유전자의 발현을 감소시킴으로써, 세포 내에 유입된 약물의 유출을 억제할 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따른 항균성 화합물을 포함하는 조성물은 양전하를 띤 지질친화성 양이온 화합물이면서 미토콘드리아를 표적하는 트리페닐포스포늄(TPP^+)을 포함하고 있어 박테리아의 세포막 음이온성 지질을 표적하는 것을 특징으로 하며, 그람양성 박테리아 특히 황색포도상구균 및 메타실린 내성 황색포도상구균에 낮은 MIC 값을 나타내고, 약물 유출 유전자의 발현을 감소시킴으로써 세포 내 유입된 항생제의 유출을 억제시켜 항균 활성을 나타내는바, 항생제 및 항염제와 같은 의료산업 또는 식품첨가제 등에 다양한 생물학적 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 다제내성 그람 음성균 및 양성균에 대한 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃의 항균활성을 보기 위한 MIC 결과 그래프를 나타낸 것이다.

도 2는 다제내성 그람 음성균에 대한 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃의 바이오필름 형성 억제 스크리닝 그래프를 나타낸 것이다.

도 3은 다제내성 그람 양성균에 대한 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃의 바이오필름 형성 억제 스크리닝 그래프를 나타낸 것이다.

도 4는 MSSA와 MRSA에 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃를 처리하고, 시간에 따른 항균 효과 양상 그래프를 나타낸 것이다.

도 5는 그람 양성 황색포도상구균 및 메티실린 황색포도상구균의 MIC에서 성장곡선 그래프를 나타낸 것이다.

도 6은 MSSA와 MRSA에 처리된 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃에 대한 형태학적 관찰을 위해 TEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 7은 MSSA와 MRSA에 처리된 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃에 대한 다중유출펌프 관련 유전자의 mRNA 발현양상을 qRT-PCR을 통해 확인한 결과 그래프를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명에 따른 화합물 및 이의 다제내성균에 대한 항균 효과 결과를 요약한 것이다.

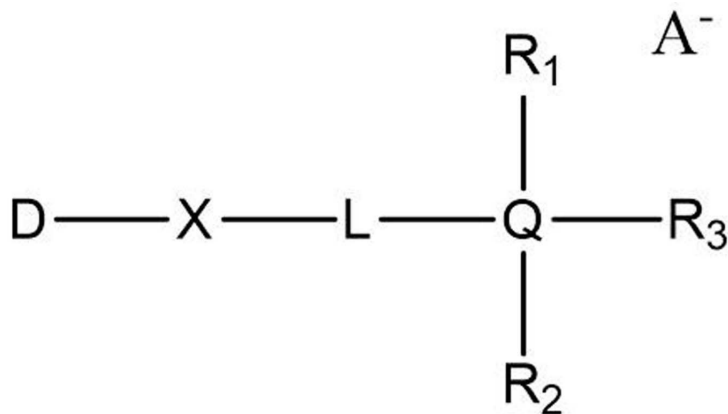
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 한다.

[0030] 본 발명자들은 기존에 그람 음성 및 양성 박테리아 치료에 사용되는 시프로프록사신에 박테리아의 세포막 음이온성 지질을 표적하기 위한 전략으로 트리페닐포스포늄(TPP⁺)을 -에스터(ester)와 -아마이드(amide) 결합을 통해 시프로프록사신의 카르복실산(carboxylic acid)과 화학적으로 결합된 2종의 시프로프록사신 유도체를 합성하고, 다제내성균에 대한 항균활성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0031] 이에, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 항생제 내성 균주에 대한 항균용 조성물을 제공한다.

[0032] [화학식 1]



[0033]

[0034] 상기 [화학식 1]에서,

[0035] 상기 D는 안정성이 높은 플루오로퀴놀론계 항생제 골격으로서 플루메퀸(flumequine), 옥솔린산(oxolinic acid), 로속사신(roxacin), 시녹사신(cinoxacin), 날리딕산(nalidixic acid), 피로미드산(piromidic acid), 피페미드산(pipemidic acid), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 플레록사신(fleroxacin), 로메플록사신(lomefloxacin), 나디플록사신(nadifloxacin), 노르플록사신(norfloxacin), 오플록사신(ofloxacin), 페플록사신(pefloxacin), 루플록사신(rufloxacin), 에녹사신(enoxacin), 발로플록사신(balofloxacin), 그레파플록사신(grepafloxacin), 레보플록사신(levofloxacin), 파zuf플록사신(pazufloxacin), 스파르플록사신(sparfloxacin), 테마플록사신(temafloxacin), 토수플록사신(tosufloxacin), 클리나프록사신(clinafloxacin), 가티플록사신(gatifloxacin), 목시플록사신(moxifloxacin), 시타플록사신(sitafloxacin), 프롤리플록사신(prulifloxacin), 베시플록사신(besifloxacin), 제미플록사신(gemifloxacin), 트로바플록사신(trovafloxacin), 델라플록사신(delaflaxacin), 다노플록사신(danofloxacin), 디플록사신(difloxacin), 엔로플록사신(enrofloxacin), 이바플록사신(ibafloxacin), 마보플록사신(marbofloxacin), 오비플록사신(orbifloxacin) 및 사라플록사신(sarafloxacin) 중에서 선택될 수 있으며, 상기 플루오로퀴놀론계 항생제 골격 말단의 하이드록실기가 상기 X와 연결될 수 있다.

[0036] 상기 X는 O, S 및 NR (상기 R은 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 6 내지 10의 아릴기 및 탄소수 2 내지 10의 헤테로아릴기 중에서 선택되는 어느 하나임) 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 O 또는 NR일 수 있다.

[0037] 이때, X가 아마이드기(NR)인 경우에는 본 발명에 따른 [화학식 1]의 화합물의 체내 안정성은 더욱 우수하다.

[0038] 또한, L은 표적기 그룹과의 연결기로서, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기 및 폴리알킬렌글리콜기 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0039] 또한, Q는 N, P, As 및 Sb 등의 15족 원소 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, R1 내지 R3는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 6 내지 10의 아릴기 및 탄소수 2 내지 10의 헤테로아릴기 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

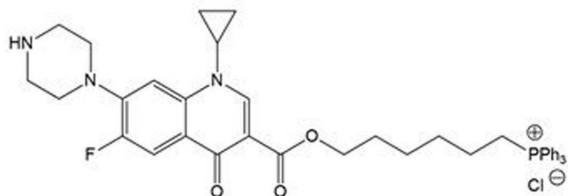
[0040] 또한, A-는 할로젠, 하이드록실, 카르복실레이트, 설페이트, 설파메이트, 설포네이트, 포스페이트, 포스포네이

트, 보로네이트 및 (폴리)에틸렌옥시 중에서 선택되는 어느 하나의 음이온일 수 있다.

[0041] 또한, 상기 할로겐은 플루오르(F), 염소(Cl), 브로민(Br) 및 아이오딘(I) 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

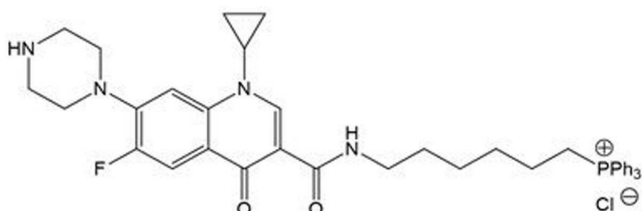
[0042] 본 발명의 일 구현예에 의하여 상기 [화학식 1]의 구체적인 화합물을 예시하면 하기 [화학식 2] 또는 [화학식 3]의 화합물일 수 있으며, 이에 의하여 본 발명에 따른 [화학식 1]의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0043] [화학식 2] - CFX-ester-PPh₃



[0044]

[0046] [화학식 3] - CFX-amide-PPh₃



[0047]

[0048] 본 발명은 일 구현 예에 있어서, 상기 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃은 시프로프록사신을 기반으로 트리페닐포스포니움 구조를 포함하는 것을 특징으로 하며, 상기 트리페닐포스포니움 구조는 양전하를 띤 지질 친화성 양이온 화합물(lipophilic cationic compound)의 성질을 가지고 있으며, 미토콘드리아를 표적할 수 있다.

[0049] 상기 CFX-amide-PPh₃는 CFX-ester-PPh₃에서 결합부위를 에스터가 아닌 아마이드기로 변형시킨 것으로, 체내에서 안정성을 더욱 향상시킬 수 있다.

[0050] 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 항균용 조성물은 그람 양성균에 대한 항균용도를 갖는 조성물일 수 있으며, 상기 그람 양성균은 엔트로코커스 페시움 또는 황색포도상구균일 수 있다.

[0051] 상기 엔트로코커스페시움 또는 황색포도상구균은 다제내성균일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나, 반코마이신 내성 엔트로코커스 페시움(Vancomycin-resistant *E. faecalis* (VRE)), 메티실린 내성 황색포도상구균(Methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA)), 이중내성 VISA(Heteroresistant VISA (hVISA)) 및 반코마이신 내성 황색포도상구균(Vancomycin-intermediate resistance *S. aureus* (VISA))으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 균일 수 있으며, 바람직하게는 반코마이신 내성 엔트로코커스 페시움(VRE), 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA) 또는 반코마이신 내성 황색포도상구균(VISA)일 수 있다.

[0052] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물은 그람 양성균의 바이오필름 형성을 억제하거나 *norA*, *sepA* 또는 *medA* 유전자의 발현을 억제하여 세포 내에 유입된 약물의 유출을 방지하는 것일 수 있으며, 그람 양성균의 세포막을 직접적으로 표적함으로써 항균활성을 나타낼 수 있다.

[0053] 본 발명에서는 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 항균성 화합물이 다제내성균에 대한 항균효과를 나타냄을 구체적으로 확인하였다.

[0054] 본 발명은 실시예를 통해, 상기 CFX-ester-PPh₃ 또는 CFX-amide-PPh₃으로 표시되는 화합물이 미토콘드리아 표적 특성으로 인해 미토콘드리아 유사 세포막을 갖는 박테리아에 대해 항균 활성을 나타낼 것으로 예상하고, 다제내성균 14종을 대상으로 항균 활성 스크리닝을 수행한 결과, CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃이 그람 양성 다제내성균에 대해 낮은 MIC를 갖는 것을 확인하고(실시예 3 참조), CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃ 을 처리하는 경우 다제내성균이 형성하는 바이오필름 형성 억제에 대해 미치는 영향을 조사하였으며, 그 결과 그람양성 다제

내성 균주에서 바이오필름이 상당히 억제되는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0055] 본 발명의 다른 실시예에서는 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃으로 표시되는 화합물을 그람 양성 다제내성균에 처리하였을 때 6시간 이내에 박테리아의 대부분을 사멸시키는 것을 확인하였으며, 특히 CFX-amide-PPh₃으로 표시되는 화합물이 시프로플록사신 및 CFX-ester-PPh₃에 비해 약 2배이상 빠르게 사멸 효과가 나타나는 것을 확인하였으며, CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃으로 표시되는 화합물의 항균활성 메커니즘을 형태학적 측면 및 유전학적 측면에서 조사한 결과, 형태학적인 측면에서 CFX-ester-PPh₃ 또는 CFX-amide-PPh₃의 화합물이 그람 양성 다제내성균의 세포막을 직접적으로 표적함으로써 항균효과를 나타냄을 확인하였고, 유전학적인 측면에서 다중약물유출펌프(multi-drug efflux pump)인 *norA*, *sepA* 또는 *medA* 유전자의 발현을 감소시킴으로써 항생제의 유출을 억제하는 것을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0056] 상기 실시예의 결과로부터 본 발명에 따른 화합물이 양이온 지질친화성 성질에 의해 효과적으로 그람 양성 다제내성균의 세포막을 표적함으로써, 우수한 항균활성을 나타내는 것을 확인하였고, 이를 기반으로 본 발명의 항균성 화합물 또는 상기 화합물을 포함하는 약학 조성물이 기존의 항생제에 비해 효과적으로 다제내성균 제어를 위한 항균 효과를 가질 수 있음을 확인하였다.

[0057] 본 발명에 따른 항균용 조성물이 약학 조성물인 경우, 상기 [화학식 1]로 표시되는 항균성 화합물 또는 그 염을 유효성분으로 포함할 수 있으며, 또한 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 유회제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시된 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제, 또는 경구 섭취제 등으로 제제화할 수 있다.

[0058] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 피부, 비강, 기도)에 적용할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 항균용 조성물이 식품 조성물인 경우, 그람 양성균, 바람직하게는 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA) 또는 반코마이신 내성 황색포도상구균(VISA)에 대한 항균 용도로 사용될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food), 식품 첨가제(food additives) 및 사료 등의 모든 형태를 포함하며, 인간 또는 가축을 비롯한 동물을 취식대상으로 한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0061] 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 일반 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과실 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마야말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 옛, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물 유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 상기 [화학식 1]로 표시되는 항균성 화합물 또는 그 염을 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함할 수 있다.

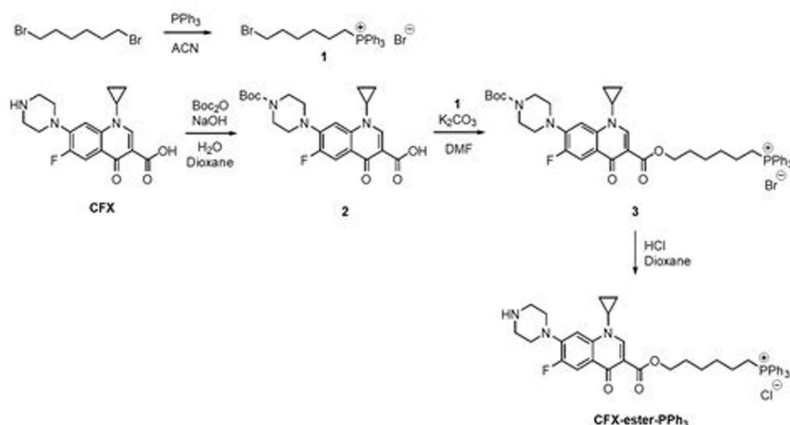
[0063] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을

보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0065] 실시예 1. CFX-ester-PPh₃의 합성

[0066] 하기 [도식 1]의 합성 경로를 통하여 CFX-ester-PPh₃를 합성하였다. 하기 도식 1의 화합물 1 및 2는 종래 알려진 방법에 따라 합성하였다.

[0068] [도식 1]



[0069] (1) 화합물 3의 합성

[0070] 디메틸포름아마이드 용매에 화합물 1 (1 g, 1.975 mmol) 과 화합물 2 (852 mg, 1.975 mmol)를 녹인 뒤 탄산칼륨 (819 mg, 5.925 mmol)을 천천히 가한다. 50 ℃에서 12시간 동안 교반한 뒤 감압하여 용매를 증발시킨다. 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제한 뒤 50 mL 혼합용액 (메탄올/증류수 = 1/9)에 녹이고 NaBF₄를 넣고 1시간 동안 교반하고, 디클로로메탄과 증류수로 추출하고, 이후 메탄올에 녹이고 Dowex® 1X8 chloride를 가한 뒤 6시간 동안 교반하고 필터 후 용매를 증발시킨다.

[0073] (2) CFX-ester-PPh₃의 합성

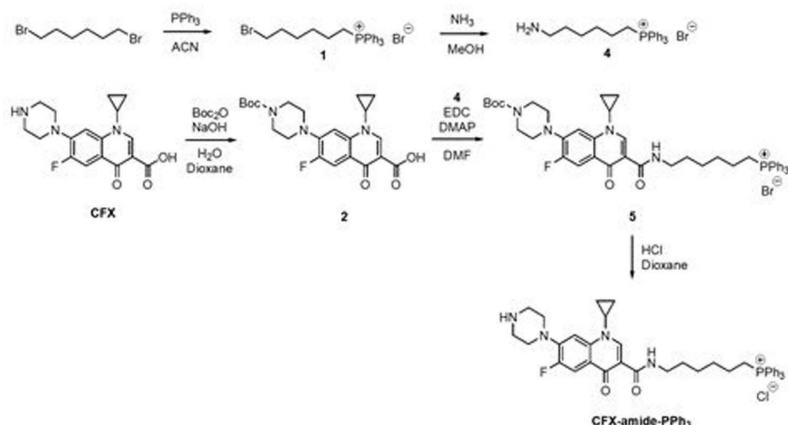
[0074] 18 mL의 혼합용액 (1,4-다이옥세인/디클로로메탄 = 4/1)에 화합물 3을 녹인 뒤 0 ℃에서 4 N HCl in Dioxane 6 mL을 한 방울씩 넣어준다. 상온에서 12 시간 동안 교반한 뒤 감압하여 용매를 증발시켜 CFX-ester-PPh₃를 합성하였다.

[0075] ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8.50 (s, 1H), 7.87-7.70 (m, 15H), 7.66 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 4.29 - 4.23 (m, 2H), 3.69- 3.60 (m, 2H), 3.59-3.53 (m, 1H), 3.50-3.42 (m, 4H), 3.30-3.20 (m, 4H), 1.78-1.65 (m, 6H), 1.61-1.53 (m, 2H), 1.39 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 1.14 - 1.07 (m, 2H) ppm.

[0077] 실시예 2. CFX-amide-PPh₃의 합성

[0078] 하기 [도식 2]의 합성 경로를 통하여 CFX-amide-PPh₃를 합성하였다. 하기 도식 2의 화합물 1 및 2는 종래 알려진 방법에 따라 합성하였다.

[0079] [도식 2]



[0080]

[0081] (1) 화합물 4의 합성

[0082] 화합물 1 (1 g, mmol)을 35 mL의 7 N NH₃ 메탄올 용액에 녹인 후 3일 동안 상온에서 교반한다. 이후 용매를 감압하여 증발시키고 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제한다.

[0083] (2) 화합물 5의 합성

[0084] 디메틸포름아마이드 용매에 화합물 2 (1 g, 2.318 mmol), EDC hydrochloride (667 mg, 3.477 mmol), 1-Hydroxybenzotriazole hydrate (470 mg, 3.477 mmol)을 녹인 후 30분 동안 상온에서 교반한다. DMAP (425 mg, 3.477mmol)과 화합물 4 (1.025 g, 2.318 mmol)을 넣어준 뒤 12시간 동안 교반한 뒤 감압하여 용매를 증발시킨다. 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제한 뒤 50 mL 혼합용액 (메탄올/증류수 = 1/9)에 녹이고 NaBF₄를 넣고 1시간 동안 교반하고 디클로로메탄과 증류수로 추출한 후에 메탄올에 녹이고 Dowex® 1X8 chloride를 가한 뒤 6시간 동안 교반하고 필터 후 용매를 증발시킨다.

[0085] (3) CFX-amide-PPh₃의 합성

[0086] 18 mL의 혼합용액 (1,4-다이옥세인/디클로로메탄 = 4/1)에 화합물 5를 녹인 뒤 0 ℃에서 4N HCl in Dioxane 6mL을 한 방울씩 넣어준다. 상온에서 12시간 동안 교반 한 뒤 감압하여 용매를 증발시켜 CFX-amide-PPh₃를 합성하였다.

[0087] ¹H NMR (MeOD, 500 MHz): δ 8.88 (s, 1H), 7.95 - 7.74 (m, 17H), 7.69 (d, J = 7.2 Hz, 1H) 3.85 - 3.79 (m, 1H), 3.69 - 3.64 (m, 4H), 3.54 - 3.49 (m, 4H), 3.49 - 3.41 (m, 4H), 1.77 - 1.70 (m, 2H), 1.70 - 1.58 (m, 4H), 1.53 - 1.42 (m, 4H) ppm.

[0089] 실시예 3. 시프로프록사신 유도체의 그람염색 및 양성 다제내성균주에 대한 최소억제농도 비교

[0090] 본 발명자들은 상기 실시예 1 및 실시예 2에서 합성된 시프로프록사신 유도체 2종을 대상으로 다제내성균 14종에 대해서 항균활성에 대한 스크리닝을 수행하였다.

[0091] 구체적으로, 다제내성균에 대한 항균활성 스크리닝을 위해 CLSI(clinical and laboratory standard institute, 2016) 지침에 따른 감수성 시험법을 수행하였고, 이에 따라 세균의 성장을 억제할 수 있는 최소한의 항생제 농도, 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 조사하였다. 감수성 시험법에 따른 MIC를 조사하기 위해 액체 배지 미량희석법(broth microdilution)을 사용하였다. 배지는 CAMHB (Cation-Adjust Muller Hilton broth)로써, 1L의 멸균증류수에 22g의 CAMHB 파우더를 녹여 제조 후, 121 ℃ 15lb psi의 압력에서 15분 동안 고압에서 고압 멸균하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 6종의 표준균주는 ATCC(american type culture collection), CCARM(culture collection of antibiotics resistant microbes)로부터 분양 받았고, 8종의 내성균주는 아산 병원(AMC, Asan Medical Center)으로부터 분양받았으며, 균주의 리스트는 하기 [표 1]에 나타내었다.

표 1

[0092]

Species	Strains	Antibiotic resistance
Gram negative bacteria		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC [®] 25922	Carbapenem-susceptible <i>E. coli</i>
	AMCEC 22365	Carbapenem-resistant <i>E. coli</i> (NDM-1 type)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC [®] 13883	Carbapenem-susceptible <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	AMCKP 24272	Carbapenem-resistant <i>K. pneumoniae</i> (KPC type)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC [®] 27853	Carbapenem-susceptible <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CSPA)
	CCARM 2321	Carbapenem-resistant <i>P. aeruginosa</i> (CRPA)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC [®] 19606	Carbapenem-susceptible <i>Acinetobacter baumannii</i> (CSAB)
	AMCAB 643	Carbapenem-resistant <i>A. baumannii</i> (CRAB)
Gram positive bacteria		
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC [®] 29212	Vancomycin-susceptible <i>E. faecium</i> (VSE)
	CCARM 5024	Vancomycin-resistant <i>E. faecium</i> (VRE)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC [®] 29213	Methicillin-susceptible <i>S. aureus</i> (MSSA)
	AMCSA 5016	MRSA (ST5)
	ATCC [®] 700698 (Mu3)	Heteroresistant VISA (hVISA)
	ATCC [®] 700698 (Mu50)	Vancomycin-intermediate resistance <i>S. aureus</i> (VISA)

[0093]

상기 [표 1]에 나타난 균 배양액을 준비하기 위해 14종의 다제내성균은 혈액천배지(Blood agar plate)에서 24 시간 37 °C 조건에서 배양하였고, 하룻밤 배양한 시험균주 16종은 각 세균의 집락을 위해 0.5 McFarland 표준탁도의 부유액을 만들었다. 다음으로 각 화합물은 CAMHB 배지를 사용하여 희석하였으며, 시프로프록사신은 최고 농도 512 µg/mL 및 시프로프록사신 유도체 2종 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃은 최고 농도 179.05 µg/mL 부터 점차 2-fold로 단계 희석하여 96well microplate(round bottom)에 분주하였다. 이후, 화합물이 있는 96 well microplate에 0.5 McFarland 표준 탁도로 준비된 균 액을 1/10 희석하여 10 µL씩 접종하였다(*E. coli* 기준 약 5 × 10⁵ CFU/mL). 접종 후, 항온 배양기를 이용하여 37 °C 조건에서 20시간 배양하고, 육안으로 관찰하여 증식을 억제시킨 화합물의 최소농도를 MIC로 관독하고, 그 결과를 [표 2] 및 도 1에 나타내었다.

표 2

[0094]

Type or strain	CLSI breakpoint to CFX susceptibility ($\mu\text{g/mL}$)	QC range for CFX MIC test	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
			CFX	CFX-ester- PPh ₃	CFX-amide- PPh ₃
Gram-negative					
Carbapenem-susceptible <i>E. coli</i>	≤1	0.004-0.015	0.004	5.56	5.56
Carbapenem-resistant <i>E. coli</i> (NDM-1 type)	≤1	-	16	>178.05	89.02
Carbapenem-susceptible <i>K. pneumoniae</i>	≤1	-	0.031	22.25	44.51
Carbapenem-resistant <i>K. pneumoniae</i> (KPC type)	≤1	-	32	>178.05	178.05
Carbapenem-susceptible <i>P. aeruginosa</i> (CSPA)	≤1	-	0.25-0.125	89.02	89.02
Carbapenem-resistant <i>P. aeruginosa</i> (CRPA)	≤1	0.25-2.0	32	>178.05	178.05
Carbapenem-susceptible <i>A. baumannii</i> (CSAB)	≤1		0.5	89.02	89.02
Carbapenem-resistant <i>A. baumannii</i> (CRAB)	≤1		64	89.02	89.02
Gram-positive					

Vancomycin-susceptible <i>E. faecium</i> (VSE)	≤1	0.25-2.0	1.0-0.5	178.05	44.51
Vancomycin-resistant <i>E. faecalis</i> (VRE)	≤1	-	256	89.02	22.25
Methicillin-susceptible <i>S. aureus</i> (MSSA)	≤1	0.12-0.5	0.5	22.25	2.78
MRSA (ST5 5016)	≤1		128	11.12	2.78
Heteroresistant VISA (hVISA)	≤1		64	11.12	11.12
Vancomycin-intermediate resistance <i>S. aureus</i> (VISA)	≤1		64	44.51	11.12

[0095] [표 2] 및 도 1에 나타난 바와 같이 시프로프록사신 유도체 2종은 그람 음성 다제내성균에서는 항균활성이 없으나, 그람 양성 다제내성균에서는 유의적으로 우수한 효과를 보였다.

[0096] 다시 말해, 그람 음성 감수성 균주(표준균주; *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*)에 대해서는 비교적 낮은 MIC값을 보였으나, 다제내성 그람 음성 균주에 대해서는 높은 MIC값을 보여 항균활성을 보이지 않은 반면, VRE, MRSA, VISA의 그람 양성 다제내성균에 대해서는 시프로프록사신에 비하여 매우 낮은 MIC값을 보여 유의적인 항균활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0098] 실시예 4. 시프로프록사신 유도체의 그람음성 및 양성 다제내성균주에 대한 바이오필름 억제 비교 테스트

[0099] 본 발명자들은 상기 실시예 1 및 실시예 2에서 합성된 시프로프록사신 유도체 2종을 대상으로 14종에 대해서 바이오필름 형성 억제효과를 보기 위해 크리스탈 바이올렛 염색법을 수행하였다.

[0100] 실험에 사용된 6종의 표준균주는 ATCC(american type culture collection), CCARM(culture collection of antibiotics resistant microbes)로부터 분양받았고, 8종의 내성균주는 아산 병원(AMC, Asan Medical Center)으로부터 분양받았으며, 균주 리스트는 상기 [표 1]에 나타내었다.

[0101] 구체적으로, 14종의 균주를 TSB(Tryptic soy broth)에서 37℃ 조건에서 24시간 배양 후, 하룻밤 배양한 배양액을 신선한 TSB에 0.5 McFarland 표준탁도의 부유액을 제조하였다. 다음으로 각 화합물은 0.1% 글루코오스를 함유한 TSB 배지를 사용하여 희석하였으며, 시프로프록사신은 최고 농도 256 µg/mL 및 시프로프록사신 유도체 2종은 최고 농도 512 µg/mL부터 점차 2-fold로 단계 희석하여 96well microplate에 분주하였다. 이후, 화합물이 있는 96 well microplate에 0.5 McFarland 표준탁도로 준비된 균액을 1/10 희석하여 10 µL씩 접종하였다(*E. coli* 기준 약 5×10^5 CFU/mL). 접종 후, 항온 배양기를 이용하여 37 °C 조건에서 20시간 배양 후, 배양액 및 플랑크토닉 세균을 제거하여 96 well microplates는 완충식염수(PBS, phosphate-buffered saline, pH7.4)로 조심스럽게 3회 세척하고, 50℃ 건조기에서 약 2시간 동안 완전히 건조시켰다. 건조된 96 well microplate는 1.0% 염색약(crystal violet)을 200 µL를 첨가하여 10분동안 실온에서 염색시킨 후, 멸균 증류수를 이용하여 조심스럽게 세척하였다. 염색된 바이오 필름 매스를 정량화하기 위해, 200 µL의 33% 희석 아세트산(AcOH)을 각 well에 첨가하고 20분 동안 진탕 배양하였다. 바이오필름 매스는 Spark사에서 제공하는 Tecan Microplate Reader기를 이용하여, 흡광도 600 nm에서 측정되었다. 바이오필름 형성 억제효율은 하기 [계산식]의 식으로 계산하였고, 그 결과를 표 2, 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0103] [계산식]

[0104]
$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{Positive-control}} - \text{OD}_{\text{Experimental}}}{\text{OD}_{\text{Positive-control}}}$$

표 3

Type or strain	Biofilm formation of Inhibition (Inhibition rate %)		
	CFX	CFX-ester -PPh ₃	CFX-amide -PPh ₃
Gram negative bacteria			
<i>E. coli</i>	<0.5 (96.49%)	32 (76.0%)	8 (85.4%)
Carbapenem-resistant <i>E. coli</i> (CRE NDM-1 type)	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-
Carbapenem-resistant <i>K. pneumoniae</i> (CRE KPC type)	128 (74.8%)	>512 (28.5%)	256 (51.2%)
Carbapenem-susceptible <i>P. aeruginosa</i> (CSPA)	2 (73.2%)	64 (50.1%)	256 (54.0%)
Carbapenem-resistant <i>P. aeruginosa</i> (CRPA)	<0.5 (80.3%)	64 (74.4%)	32 (56.5%)
Carbapenem-susceptible <i>A. baumannii</i> (CSAB)	256 (66.0%)	>512 (48.2%)	256 (53.4%)
Carbapenem-resistant <i>A. baumannii</i> (CRAB, A643)	-	-	-
Gram positive bacteria			
Vancomycin-susceptible <i>E. faecium</i> (VSE)	<0.5 (65.0%)	64 (60.0%)	64 (91.5%)
Vancomycin-resistant <i>E. faecalis</i> (VRE)	-	-	-
Methicillin-susceptible <i>S. aureus</i> (MSSA)	<0.5 (89.49%)	16 (50.5%)	4 (73.5%)
MRSA (ST5 5016)	64 (60.8%)	8 (52.5%)	4 (76.4%)
Heterogeneous VISA (hVISA, Mu3)	-	-	-
Vancomycin-intermediate resistance <i>S. aureus</i> (VISA)	-	-	-

- 는 바이오필름을 형성하지 않는 것을 의미한다. 상기 [표 3]과 도 2에서 나타낸 것과 같이, 그람 음성 다제내성균의 경우에는 시프로프록사신 유도체(CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃)가 시프로프록사신에 비하여 바이오필름 형성 억제 효과가 우수하지 않았다.

반면에, 그람 양성 다제내성균의 경우, 특히 MRSA의 경우, [표 3]과 도 3에서 나타낸 것과 같이, 시프로프록사신은 높은 약물농도 64 μ g/mL에서 약 60.8%의 생물막 형성 억제 활성을 확인하였으나, 시프로프록사신의 유도체(CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃)는 이보다 훨씬 낮은 농도에서도 동등 또는 유의적으로 우수한 바이오필름 형성 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

상기 결과를 토대로, MIC 및 바이오필름 형성 억제 테스트를 통해, 상기 시프로프록사신 유도체(CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃) 그람 양성 항생제 내성균에서 뛰어난 항균효과를 확인하였고, 이러한 결과를 토대로 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃의 항생제 작용 메커니즘(Mode of action)을 규명하기 위해 *S. aureus*와 MRSA를 이용하여 하기 실험을 추가로 수행하였다.

실시예 5. 시프로프록사신 유도체의 그람양성균에 대한 기작 확인

본 발명자들은 상기 MIC결과와 바이오필름 형성 억제효율 결과를 바탕으로, 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃의 항균작용에 대한 메커니즘을 확인하기 위해 시프로프록사신에 대한 저항성을 갖는 반면, 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃에 대해서는 높은 항균 효과가 관찰된 Methicillin sensitive *S. aureus*와 내성균주 MRSA ST5 5016을 선정하고 본 균주를 대상으로 하기 실시 예를 통해 유도체의 메커니즘을 확인하였다.

5-1. 타임 킬 곡선(Time-kill curve) 실험

선정된 Methicillin sensitive *S. aureus*(MSSA)와 MRSA ST5 5016에 대해, 시간에 따른 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃의 효과를 확인하기 위해 Time-kill curve assay를 수행하였다.

구체적으로, 선정 균주 MSSA와 MRSA ST5 5016를 MHB 배지에서 37 °C 조건에서 24시간 배양한 뒤, 신선한 MHB 배

지에 배양액을 1/10 비율로 집중한 뒤, 37 °C 조건에서 OD₆₀₀에서 0.5~0.7(약 10⁶ CFU/mL)에 이를 때까지 진탕 배양하였다. 약 10⁶ CFU/mL의 균주 배양액에, 시프로프록사신 및 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃을 하기 [표 4] 나타낸 바와 같이 0.5x MIC, 1.0x MIC, 2.0x MIC를 처리한 뒤, 37 °C 조건에서 진탕 배양하였다.

표 4

	MSSA			MRSA ST5 5016		
	CFX	CFX-ester-PPh ₃	CFX-amide-PPh ₃	CFX	CFX-ester-PPh ₃	CFX-amide-PPh ₃
0.5x MIC	0.25	11.12	1.39	64	5.56	1.39
1.0x MIC	0.5	22.25	2.78	128	11.12	2.78
2.0x MIC	1.0	44.51	5.56	256	22.25	5.56

배양 후, 0, 3, 6시간에서 배양액 10 μL를 취해서 LB 평판배지에 도말하고 24시간 동안 37 °C 조건에서 배양하여, 생성된 집락의 수를 계수하였으며, 각 배지의 집락의 수의 계산은 3번 실시하여 집락의 수의 평균값을 구하였다. 계수된 집락은 CFU/mL로 환산하여 그래프로 나타내었다.

그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 MSSA(a)와 MRSA(b)에서 negative control인 화합물을 처리하지 않은 조건에서는 시간이 경과함에 따라, 균수가 점점 증가하는 것을 확인하였다. MSSA(a)와 MRSA(b) 모두에서 가장 높은 항균활성을 보이는 것은 CFX-amide-PPh₃이었다. CFX-amide-PPh₃의 경우, 모든 농도에서 MSSA(a)와 MRSA(b)를 3시간 이내에 성장을 억제시켰고, 6시간 이내에 거의 사멸한 것을 확인하였다. CFX-ester-PPh₃의 경우, MRSA(b)에서는 CFX-amide-PPh₃과 유사하게 6시간 이내에 거의 사멸하는 것을 확인하였으나, MSSA(a)에서는 1.0x MIC와 2.0x MIC에서 6시간 이내에 약 50%의 성장을 억제시키는 것을 확인하였다. 반면에, 기존의 항생제 시프로프록사신을 처리하였을 때, MSSA(a)는 모든 농도에서 6시간 이내에 성장을 억제하는 것을 관찰하였으며, MRSA(b)의 경우 0.5x MIC와 1.0x MIC에서는 3시간 이내에는 일정하게 균수가 유지되었는데, 2.0x MIC에서는 MRSA의 경우 대부분 6시간 이내에 사멸되는 것을 확인하였다.

즉, 이러한 결과를 토대로 시프로프록사신의 유도체 CFX-amide-PPh₃은 0.5x MIC에서 6시간 이내에 성장 저해 효능을 보이는 높은 항균효과를 갖는 것을 확인하였다.

또한, MSSA와 MRSA에 시프로프록사신 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃의 MIC 값을 처리한 뒤, 0, 3, 6, 9, 12, 24시간에 걸쳐 OD를 측정함으로써, 균주에 대한 성장 곡선을 획득하였고, 그 결과 도 5에 나타낸 바와 같이 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃을 처리하지 않은 컨트롤 그룹의 MSSA와 MRSA는 배양 후 3시간 이후 대수성장기에 접어드는 것을 관찰하였다. 반면에, CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃을 처리한 그룹에서는 각각의 MIC 값에서 3시간 이내에 성장이 저해되는 것을 관찰하였다.

5-2. 투과전자현미경(TEM)을 통한 형태학적 관찰

상기 시프로프록사신 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃의 항균작용 메커니즘을 확인하기 위해, CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃ 처리 후 MRSA ST5 5016의 형태학적 변화를 투과전자현미경(TEM, transmission electron microscopy)을 이용해 이미징하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

구체적으로, TEM을 관찰하기 위해, MRSA ST5 5016은 MHB 배지에서 대수성장기까지 배양한 후, 1:10의 비율로 선정한 MHB 배지에 희석 집중하였다. 그리고 시프로프록사신과 그 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃를 0.5x MIC 농도로 처리하여 6시간 동안 배양한 후, 원심분리를 통해 세균을 수득하였다. 상층액이 제거된 세균 펠렛은 PBS로 3회 세척 후, 4 °C에서 Karnovsky's 고정액을 이용해 24시간 동안 고정하였다. 그 후, PBS로 다시 3회 세척하고 다시 2% 오스뮴 테트라옥사이드(OsO₄, osmium tetroxide) 1시간동안 고정시킨 다음, 에탄올(EtOH)로 탈수시킨 후 100% 프로필렌옥사이드(propylene oxide)로 치환하고, 프로필렌옥사이드:Spurr's 레진의 1:1비율로

60 °C에서 하루 동안 중합시켰다. 고체화된 조직을 1 μm 초박 절편을 만들어 3% 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 염색해 TEM으로 관찰하였다.

[0126] TEM을 통해 시프로프록사신 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃를 처리한 MRSA를 관찰한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 약물을 처리하지 않은 군에 비해 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃를 처리하였을 때 현저한 형태학적 변화를 관찰하였다. 약물을 처리하지 않은 컨트롤 그룹의 MRSA에서는 온전한 격막과 박테리아의 매끄러운 표면 특징을 갖은 코커스(coccus)형태를 확인하였다. 그러나 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃를 처리함에 따라 불규칙하고 거친 표면의 상당한 막 변형을 관찰하였다. 특히, CFX-amide-PPh₃를 처리한 MRSA는 심각한 막의 손상으로 인해 세포막이 붕괴되는 현상을 확인하였으며, 이로 인해 세포질 내 contents가 일부 밖으로 유출되는 현상을 관찰하였다.

[0128] 5-3. 유전학적 측면에서 메커니즘 분석을 위한 qRT-PCR

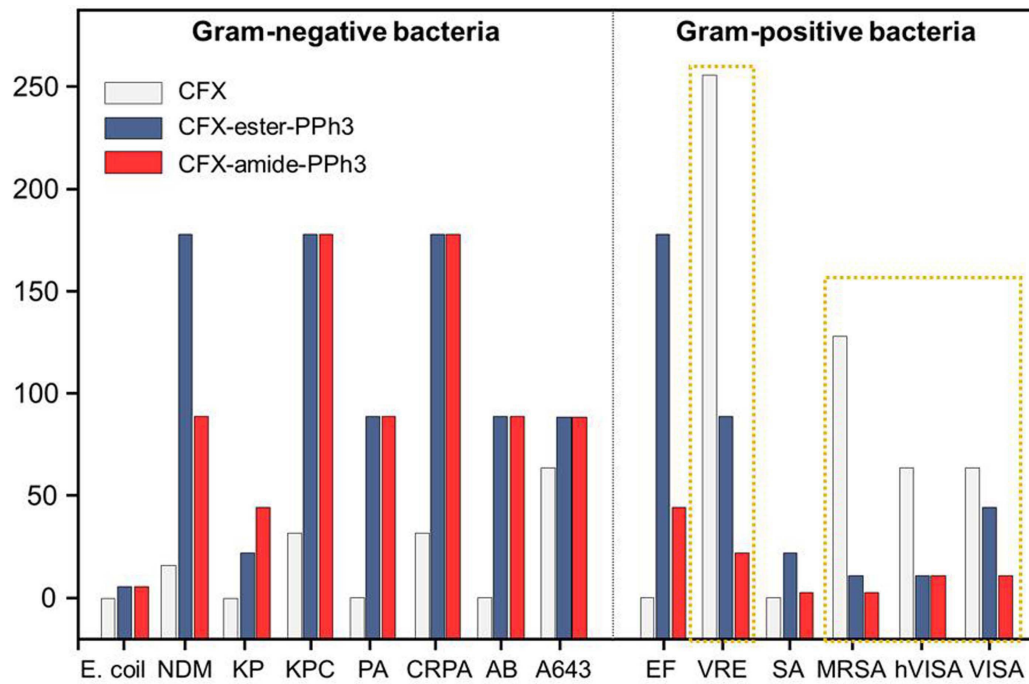
[0129] 상기 시프로프록사신 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃의 항균작용 메커니즘을 유전학적인 측면에서 분석하기 위해 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)을 수행하였다. 일반적으로 항생제에서는 다중약물 유출펌프를 통해 세포 안으로 들어온 항생제가 다시 세포 밖으로 유출되어 다중약물 유출펌프는 양성자원동력(PMF, proton motive force)에 의존하는 특성을 나타내는바, 본 발명자들은 이러한 사실에 근거하여 시프로프록사신 유도체 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃은 PMF를 감소시킴으로써, 약물의 유출을 억제할 것이라고 예상하여, PMF 관련 다중약물 유출 펌프인 *norA*, *sepA* 및 *medA* 유전자의 발현양상을 qRT-PCR을 통해 확인하였다.

[0130] qRT-PCR을 수행하기 위해, 상기 기술된 [실시예 5-2]와 같이 약물을 처리하여 균주를 배양하였고, 배양 후, 균주를 모두 수득하여 qRT-PCR을 하기 위해 RNA를 추출하였다. 총 RNA 추출은 easy-Blue RNA extraction kit을 사용하였고, kit에서 제공된 방법에 따라 수행하였다. 총 RNA 추출 후, High-capacity cDNA reverse transcription kit를 사용하여 MSSA와 MRSA에서 추출된 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. cDNA를 template로 하여 *norA*, *sepA*, *medA* 유전자의 발현양상을 보기 위해 qRT-PCR을 수행하였다. 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이, *norA* 유전자의 발현이 시프로프록사신을 처리하였을 때는 상당히 발현이 증가하였으나, 시프로프록사신 유도체인 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃를 처리한 군에서는 *norA*의 mRNA 발현이 MSSA와 MRSA 모두에서 유의적으로 감소하는 경향을 확인하였다. MRSA에서는 *sepA*와 *medA* 유전자의 발현양상은 *norA* 유전자와 유사한 패턴으로써 CFX-ester-PPh₃ 및 CFX-amide-PPh₃를 처리하였을 때, 시프로프록사신을 처리한 그룹보다 mRNA 발현이 감소하는 경향을 보였다. 반면에, MSSA에서는 *sepA*와 *medA* 유전자가 발현하지 않는 것을 확인하였다.

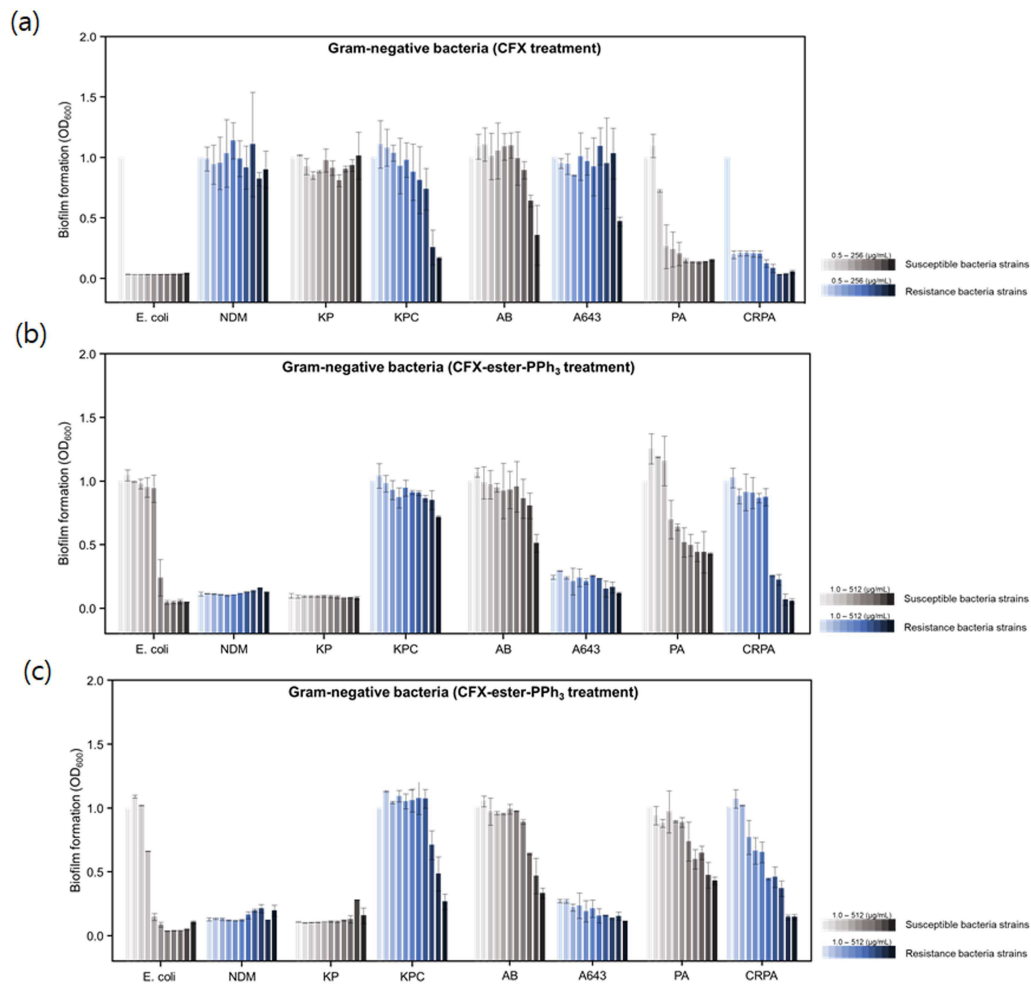
[0132] 기술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것은 아니다.

도면

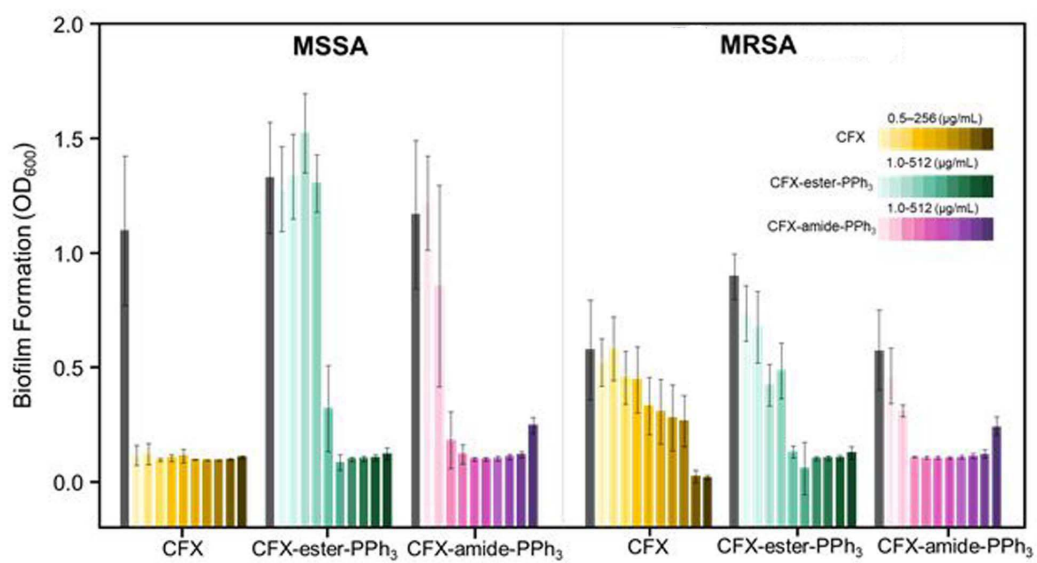
도면1



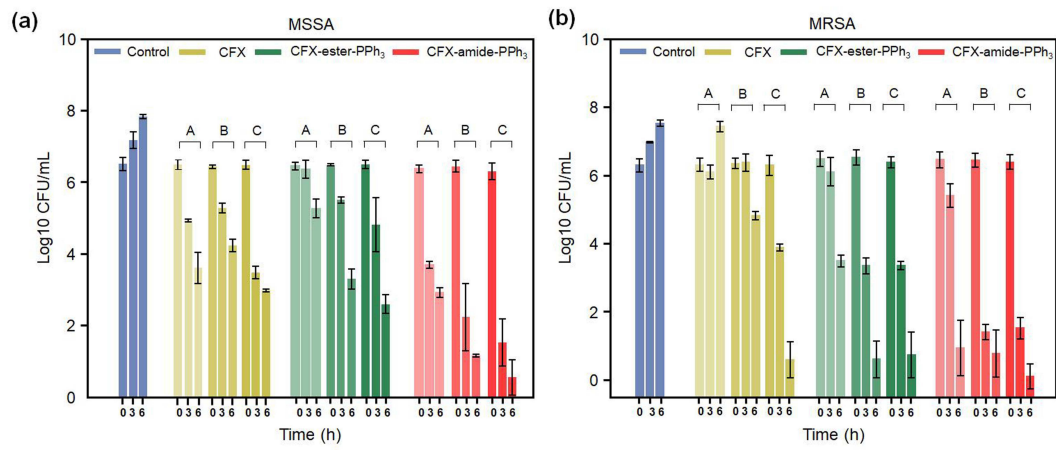
도면2



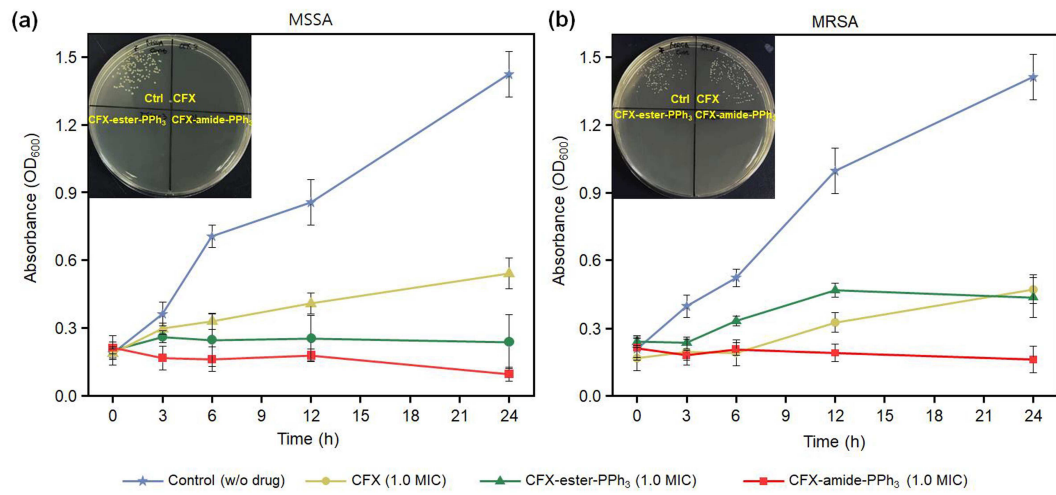
도면3



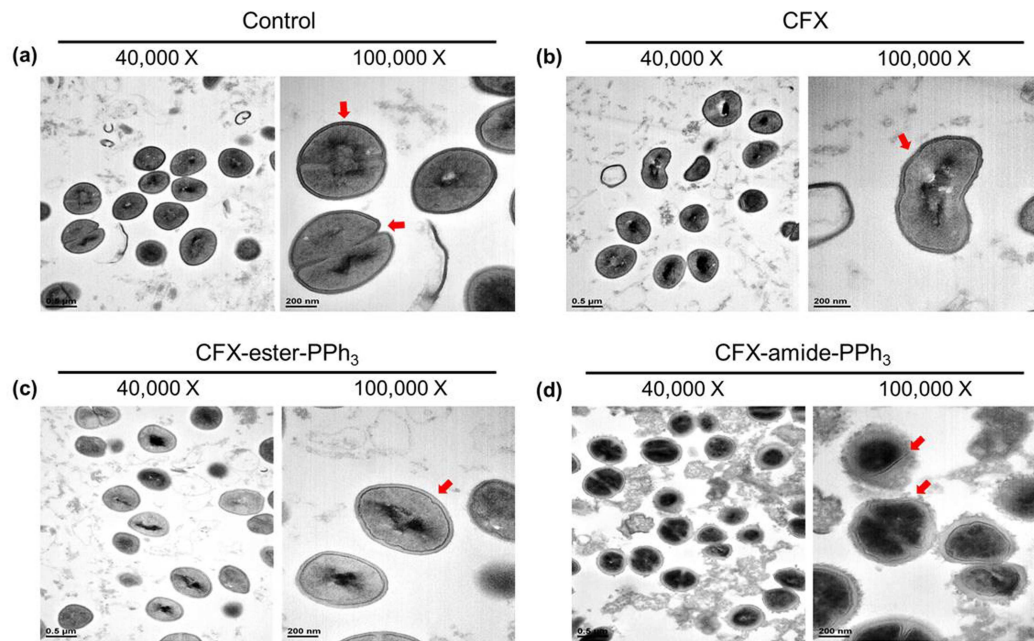
도면4



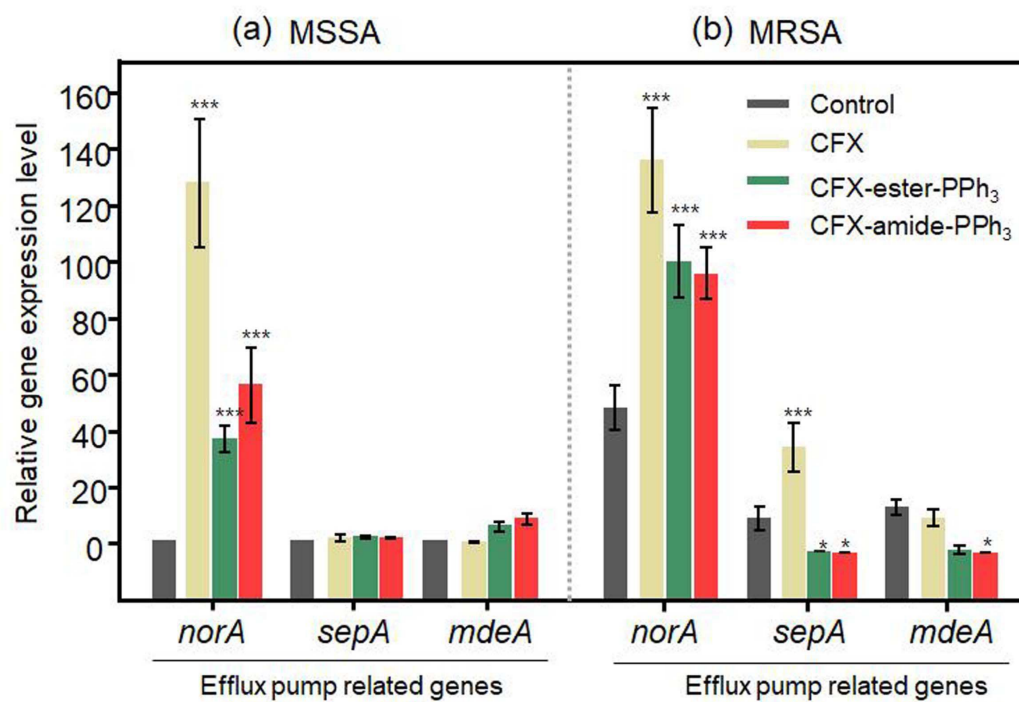
도면5



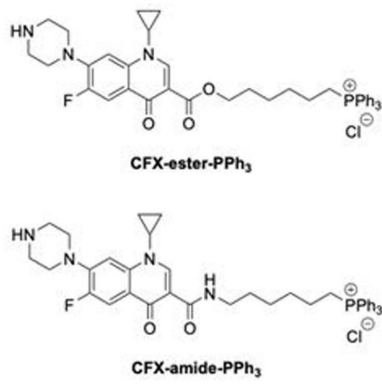
도면6



도면7



도면8



Multidrug Resistant Bacteria

