(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0088404
(43) 공개일자 2025년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 311/30 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 31/352 (2006.01) *A61K 31/407* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 311/30 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2024-0180836
(22) 출원일자 2024년12월06일
심사청구일자 2024년12월06일
(30) 우선권주장
1020230177972 2023년12월08일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정유훈
서울특별시 서초구 반포대로 275, 109동 2503호(반포동, 래미안퍼스티지아파트)
박기호
서울특별시 양천구 목동서로 340, 902동 503호(신정동, 목동신시가지아파트9단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

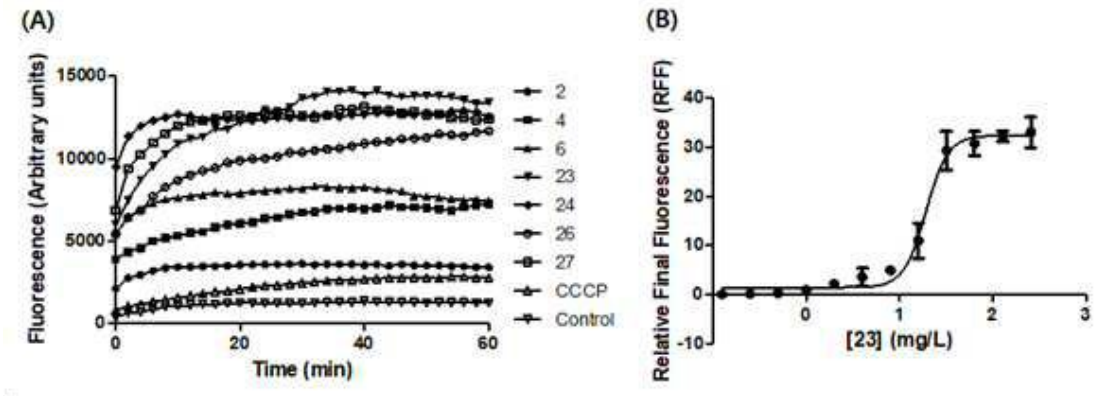
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **3',4'-디플루오로퀘르세틴 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 3',4'-디플루오로퀘르세틴 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 화합물은 3',4'-디플루오로퀘르세틴의 3-O 위치에 다양한 치환기를 도입하여 28종의 신규 화합물을 제조하였으며, 화합물의 약물배출펌프 저해능 개선 활성 및 카바페넴 분해 효소 억제 활성 효과를 확인하고, 기존 카바페넴계 항생제 메로페넴(meropenem; MEM)과 병용하여 카바페넴 내성 장내세균(CRE)에 대한 항생제의 항균 활성이 회복되는 효과를 확인한 바, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2023.05)
A61K 31/407 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자
김미경
경기도 부천시 소사구 범안로 220, 108동 2504호(옥길동, 옥길호반베르디움)
이성연
인천광역시 미추홀구 경인로252번안길 41-3, 102호 (도화동, 드림캐슬)
이태검
경기도 군포시 군포로 109, 112동 602호(대야미동, 군포대야미 이-편한세상)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2460000914
과제번호	KH134968
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	미해결 치료제 도전 기술개발
연구과제명	카바페네메이즈 생산 다제내성 그람 음성균에 대한 항생제 효과를 회복시키는 병용 투여 물질 개발
과제수행기관명	건국대학교 산학협력단
연구기간	2023.04.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R은 $COCH_2C(CH_3)_3$, $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCOOCH(CH_3)_2$, CH_2(4-*t*BuPh), CH_2(4-*i*PrPh), $(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2NH_2$, $(CH_2)_2$(thiophen-2-yl), $(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $(CH_2)_2N(CH_2)_2$, $(CH_2)_2N^+(CH_3)_2CH_2CO_2$, $(CH_2)_2$(4-methylpiperazin-1-yl), $(CH_2)_2N(CH_2)_4NH$, $(CH_2)_2N(CH_2)_4$, $(CH_2)_2N(CH_2)_5$, $(CH2)_2N(CH_2)_4O$, (*S*)-$(CH_2)_2$(1-methylpyrrolidin-2-yl), $(CH_2)_2CF_3$, $(CH_2)_2C(CH_3)_3$, $(CH_2)_2CH(CH_3)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_5$, $CH_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_3CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4O$ 및 $(CH_2)_2CH(CH_2)_4NH$ 중에서 선택되는 하나이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 약물배출펌프를 저해시키는 것인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화합물은 카바페넴 분해 효소 활성을 억제하는 것인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 카바페넴 분해 효소는 KPC-2, OXA-48, VIM-2 또는 NDM-1을 포함하는 것인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R은 $COCH_2C(CH_3)_3$, $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCOOCH(CH_3)_2$, $CH_2(4\text{-}t\text{BuPh})$, $CH_2(4\text{-}i\text{PrPh})$, $(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2NH_2$, $(CH_2)_2$(thiophen-2-yl), $(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $(CH_2)_2N(CH_2)_2$, $(CH_2)_2N^+(CH_3)_2CH_2CO_2$, $(CH_2)_2$(4-methylpiperazin-1-yl), $(CH_2)_2N(CH_2)_4NH$, $(CH_2)_2N(CH_2)_4$, $(CH_2)_2N(CH_2)_5$, $(CH2)_2N(CH_2)_4O$, (*S*)-$(CH_2)_2$(1-methylpyrrolidin-2-yl), $(CH_2)_2CF_3$, $(CH_2)_2C(CH_3)_3$, $(CH_2)_2CH(CH_3)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_5$, $CH_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_3CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4O$ 및 $(CH_2)_2CH(CH_2)_4NH$ 중에서 선택되는 하나이다.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 다제내성 그람음성균은 카바페넴 내성 그람음성균 또는 카바페넴 내성 장내세균(carbapenemase)을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 조성물은 항생제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 화합물은 항생제의 항균 활성을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 항생제는 메로페넴(meropenem)을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 화합물은 항생제와 병용하여 다제내성균을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 11

제5항에 있어서,

상기 화합물은 항생제의 최소 억제 농도를 4배 내지 64배 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 12

제5항에 있어서,

상기 화합물은 박테리아 수를 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 13

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R은 $COCH_2C(CH_3)_3$, $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCOOCH(CH_3)_2$, $CH_2(4\text{-}t\text{BuPh})$, $CH_2(4\text{-}i\text{PrPh})$, $(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2NH_2$, $(CH_2)_2$(thiophen-2-yl), $(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $(CH_2)_2N(CH_2)_2$, $(CH_2)_2N^+(CH_3)_2CH_2CO_2$, $(CH_2)_2$(4-methylpiperazin-1-yl), $(CH_2)_2N(CH_2)_4NH$, $(CH_2)_2N(CH_2)_4$, $(CH_2)_2N(CH_2)_5$, $(CH2)_2N(CH_2)_40$, (*S*)-$(CH_2)_2$(1-methylpyrrolidin-2-yl), $(CH_2)_2CF_3$, $(CH_2)_2C(CH_3)_3$, $(CH_2)_2CH(CH_3)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_5$, $CH_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_3CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_40$ 및 $(CH_2)_2CH(CH_2)_4NH$ 중에서 선택되는 하나이다.

청구항 14

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 베타락탐계 항생제를 혼합하는 단계; 및

혼합물을 다제내성 그람음성균에 처리하는 단계;를 포함하는, 항생제의 항균 활성을 증가시키는 방법.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R은 $COCH_2C(CH_3)_3$, $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCOOCH(CH_3)_2$, $CH_2(4\text{-}t\text{BuPh})$, $CH_2(4\text{-}i\text{PrPh})$, $(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2NH_2$, $(CH_2)_2$(thiophen-2-yl), $(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $(CH_2)_2N(CH_2)_2$, $(CH_2)_2N^+(CH_3)_2CH_2CO_2$, $(CH_2)_2$(4-methylpiperazin-1-yl), $(CH_2)_2N(CH_2)_4NH$, $(CH_2)_2N(CH_2)_4$, $(CH_2)_2N(CH_2)_5$, $(CH2)_2N(CH_2)_40$, (*S*)-$(CH_2)_2$(1-methylpyrrolidin-2-yl), $(CH_2)_2CF_3$, $(CH_2)_2C(CH_3)_3$, $(CH_2)_2CH(CH_3)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_5$, $CH_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_3CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_40$ 및 $(CH_2)_2CH(CH_2)_4NH$ 중에서 선택되는 하나이다.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 3',4'-디플루오로퀘르세틴 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 페니실린(Penicillin)과 스트렙토마이신(streptomycin)이 발견된 이래 약 5천여 종 이상의 항생물질이 발견되었으며, 그 중 50여종의 항생제가 400여종의 제재로 개발되어 감염질환의 주요 치료수단으로 실제 임상에서 사용되고 있다. 항생제는 화학구조에 따라 크게 베타락탐계(â-lactam)와 비베타락탐계로, 그리고 작게는 페니실린계, 세파계, 퀴놀론계, 아미노글리코사이드계 등으로 구분된다. 또한 항생제는 작용기작에 따라 세포벽 합성 저해제, 핵산 합성 저해제, 단백질 합성 저해제 등으로 구분되기도 한다.

[0003] 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.

[0004] 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, 1990년대 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.

[0005] 내성 균주는 1)Antibiotic-degrading nzyme 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.

[0006] 이에 본 발명자들은 3',4'-디플루오로퀘르세틴 유도체의 3-O 위치에 치환기를 도입하여 신규 화합물을 제조하여, 약물배출펌프 및 카바페넴 분해 효소를 억제하고, 카바페넴 내성 장내세균(CRE)에 대한 항생제의 항균 활성이 회복되는 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

[0008] [화학식 1]

[0009] 

[0010] 상기 화학식 1에서,

[0011] R은 $COCH_2C(CH_3)_3$, $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCOOCH(CH_3)_2$, $CH_2(4\text{-}t\text{BuPh})$, $CH_2(4\text{-}i\text{PrPh})$, $(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2NH_2$, $(CH_2)_2$(thiophen-2-yl), $(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $(CH_2)_2N(CH_2)_2$, $(CH_2)_2N^{+}(CH_3)_2CH_2CO_2$, $(CH_2)_2$(4-methylpiperazin-1-yl), $(CH_2)_2N(CH_2)_4NH$, $(CH_2)_2N(CH_2)_4$, $(CH_2)_2N(CH_2)_5$, $(CH2)_2N(CH_2)_4O$, (*S*)-$(CH_2)_2$(1-methylpyrrolidin-2-yl), $(CH_2)_2CF_3$, $(CH_2)_2C(CH_3)_3$, $(CH_2)_2CH(CH_3)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_5$, $CH_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_3CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4O$ 및 $(CH_2)_2CH(CH_2)_4NH$ 중에서 선택되는 하나이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

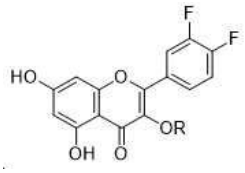
[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 베타락탐계 항생제를 혼합하는 단계; 및 혼합물을 다제내성 그람음성균에 처리하는 단계;를 포함하는 항생제의 항균 활성을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0016] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0017] [화학식 1]

[0018] 

[0019] 상기 화학식 1에서,

[0020] R은 $COCH_2C(CH_3)_3$, $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCOOCH(CH_3)_2$, $CH_2(4\text{-}t\text{BuPh})$, $CH_2(4\text{-}i\text{PrPh})$, $(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2NH_2$, $(CH_2)_2$(thiophen-2-yl), $(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $(CH_2)_2N(CH_2)_2$, $(CH_2)_2N^+(CH_3)_2CH_2CO_2$, $(CH_2)_2$(4-methylpiperazin-1-yl), $(CH_2)_2N(CH_2)_4NH$, $(CH_2)_2N(CH_2)_4$, $(CH_2)_2N(CH_2)_5$, $(CH2)_2N(CH_2)_4O$, (S)-$(CH_2)_2$(1-methylpyrrolidin-2-yl), $(CH_2)_2CF_3$, $(CH_2)_2C(CH_3)_3$, $(CH_2)_2CH(CH_3)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_5$, $CH_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_3CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4O$ 및 $(CH_2)_2CH(CH_2)_4NH$ 중에서 선택되는 하나이다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 베타락탐계 항생제를 혼합하는 단계; 및 혼합물을 다제내성 그람음성균에 처리하는 단계;를 포함하는 항생제의 항균 활성을 증가시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 신규 퀘르세틴 유도체 화합물은 3',4'-디플루오로퀘르세틴의 3-O 위치에 다양한 치환기를 도입하여 28종의 신규 화합물을 제조하였으며, 화합물의 약물배출펌프 및 카바페넴 분해 효소 억제 활성 효과를 확인하고, 기존 카바페넴계 항생제 메로페넴(meropenem; MEM)과 병용하여 카바페넴 내성 장내세균(CRE)에 대한 항생제의 항균 활성이 회복되는 효과를 확인한 바, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 화합물에 따른 EC-001blaNDM에서의 EtBr 형광 세기를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 화합물의 약물배출펌프 억제 활성을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 화합물의 NDM-1 억제 활성을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 화합물의 AcrB, NDM-1 및 KPC-2에 대한 분자 결합 모드를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 화합물 및 항생제 메로페넴 병용에 따른 E. coli-012 및 blaNDM-1에 대한 Time-kill 곡선을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 화합물에 따른 NPN 형광 세기를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 화합물 및 항생제 메로페넴 병용에 따른 E. coli-012 및 blaNDM-1 감염 마우스 모델의 Kaplan-Meier 생존 곡선을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0027] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0028] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0030] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0031] [화학식 1]

[0032] 

[0033] 상기 화학식 1에서,

[0034] R은 $COCH_2C(CH_3)_3$, $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCOOCH(CH_3)_2$, $CH_2(4\text{-}t\text{BuPh})$, $CH_2(4\text{-}i\text{PrPh})$, $(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2NH_2$, $(CH_2)_2$(thiophen-2-yl), $(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $(CH_2)_2N(CH_2)_2$, $(CH_2)_2N^+(CH_3)_2CH_2CO_2$, $(CH_2)_2$(4-methylpiperazin-1-yl), $(CH_2)_2N(CH_2)_4NH$, $(CH_2)_2N(CH_2)_4$, $(CH_2)_2N(CH_2)_5$, $(CH2)_2N(CH_2)_4O$, (S)-$(CH_2)_2$(1-methylpyrrolidin-2-yl), $(CH_2)_2CF_3$, $(CH_2)_2C(CH_3)_3$, $(CH_2)_2CH(CH_3)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_5$, $CH_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_3CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4O$ 및 $(CH_2)_2CH(CH_2)_4NH$ 중에서 선택되는 하나이다.

[0035] 본 발명에서 “약제학적으로 허용가능한”이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.

[0036] 상기 용어 "약제학적으로 허용가능한 염" 은, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 및 이와 유사한 것 없이 인간 및 하급 동물의 조직과 접촉에 사용되는 것이며 합리적인 장점/단점 비에 비례하는 이들 염을 의미한다. 예를 들어, S. M. Berge et al.는, J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19에 상세하게 약제학적으로 허용가능한 염을 설명하고 있으며, 참조로서 여기 통합되어 있다. 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염은, 적당한 무기 및 유기산 및 염기로부터 유도된 것들을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한, 무독성 산부가염의 예들은, 염산, 브롬화수소산, 인산, 황산 및 과염소산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 말레산, 타르타르산, 시트르산, 숙신산 또는 말론산과 같은 유기산으로 형성되거나, 또는 이온 교환과 같은 당해 기술분야에서 사용된 다른 방법을 사용하여 형성된 아미노기의 염이다. 다른 약제학적으로 허용가능한 염은, 아디페이트, 알지네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠술포네이트, 벤조에이트, 비설페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르술포네이트, 시트레이트, 시클로 펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄술포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페

이트, 글루코네이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 히드로요오다이드, 2-히드록시-에탄술포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메탄술포네이트, 2-나프탈렌술포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올리에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, p-톨루엔술포네이트, 운데카노에이트, 발레르에이트 염, 및 이와 유사한 것을 포함한다.

[0037] 적당한 염기로부터 유도된 염은, 알칼리 금속, 알칼리 토금속, 암모늄 및 $N^+(C_{1-4}알킬)_4$ 염을 포함한다. 대표적 알칼리 또는 알칼리 토금속 염은 소듐, 리튬, 포타슘, 칼슘, 마그네슘, 및 이와 유사한 것을 포함한다. 게다가 약제학적으로 허용가능한 염은, 적당할 때, 무독성 암모늄, 4기 암모늄, 및 할라이드, 히드록시드, 카복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 저급알킬 술포네이트 및 아릴 술포네이트와 같은 상대이온을 사용하여 형성된 아민 양이온을 포함한다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 약물배출펌프를 저해시키는 것일 수 있다.

[0039] 본 발명의 "배출펌프(Efflux pump)"는 세포 내에서 원치 않는 물질을 밖으로 이동시키는 활성 수송체로서, 항생제를 제거하는 박테리아의 중요한 구성 요소이다. 중금속, 유기 오염 물질, 식물에서 생산된 화합물, 쿼럼 감지 신호, 박테리아 대사산물 및 신경전달물질을 이동시킬 수 있다. 유출 시스템은 에너지 의존적 메커니즘(활성 수송)을 통해 특정 유출 펌프를 통해 원치 않는 독성 물질을 펌핑하여 배출한다. 일부 유출 시스템은 약물 특정적이지만 다른 시스템은 작은 다중 약물 내성(SMR) 수송체를 사용하여 여러 약물을 수용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 카바페넴 분해 효소 활성을 억제하는 것일 수 있다.

[0041] 본 발명의 "카바페넴 분해 효소(Carbapenemase)"는 페니실린, 세팔로스포린, 모노박탐 및 카바페넴을 가수분해할 수 있는 베타-락타마제(β-Lactamase)이며, 상기 베타-락타마제(β-Lactamase)는 베타-락탐 항생제에 대한 다중 내성을 제공하는 박테리아에서 생성되는 효소이다. 상기 카바페넴(Carbapenem)은 중증 세균 감염 치료에 가장 일반적으로 사용되는 효과적인 항생제 계열이며, 일반적으로 알려지거나 의심되는 다중 약물 내성(MDR) 세균 감염에 사용된다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 카바페넴 분해 효소는 KPC-2, OXA-48, VIM-2 또는 NDM-1을 포함하는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 "KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2)"는 카바페넴계 항생제에 대한 내성을 가진 폐렴막대균(*Klebsiella pneumoniae*)의 효소이며, 카바페넴 계열의 항생제에 내성을 갖게 하고, 항생제를 분해하여 세균이 생존할 수 있게 한다.

[0044] 본 발명의 "OXA-48 (oxacillin-hydrolyzing β-lactamase-48)"은 카르바페넴계 항생제에 대한 내성을 유발하는 효소로서, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Enterobacter와 같은 병원균에서 발견된다. OXA-48은 카바페넴 계열의 항생제를 분해하여 세균을 억제하지 못하게 만든다.

[0045] 본 발명의 "VIM-2 (Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase-2)"는 메탈로-β-락타마제 계열에 속하는 효소로서, 주로 다제내성균(MDR)에서 발견되며, 카바페넴계 항생제를 포함한 다양한 베타-락탐 계열의 항생제를 분해할 수 있다.

[0046] 본 발명의 "NDM-1 (New Delhi Metallo-β-lactamase-1)"은 메탈로-β-l락타마제 계열에 속하는 효소로서, 베타-락탐계 항생제에 대한 내성을 유발하고, 특히 메로페넴 등의 카바페넴계 항생제에 대한 내성을 부여할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0049] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0050] 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[0051] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 효과를 증가시킬 수 있다.

[0052] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약제학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약제학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약제학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0054] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0056] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 ㎍/ml의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 ㎍/ml 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 ㎍/ml를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 다제내성 그람음성균은 카바페넴 내성 그람음성균 또는 카바페넴 내성 장내세균(carbapenemase)을 포함하는 것일 수 있다.

[0058] 본 발명의 "Carbapenemase"는 카바페넴 계열 항생제(carbapenems)에 내성을 주는 효소로서, 카바페넴계 항생제에는 imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem 등이 포함될 수 있다.

[0059] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 항생제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0060] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 항생제의 항균 활성을 증가시키는 것일 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 항생제는 메로페넴(meropenem)을 포함하는 것일 수 있다.

[0062] 본 발명의 "메로페넴(Meropenem)"은 카바페넴 계열 항생제에 속하는 약물로, 주로 심각한 감염을 치료하는 데 사용된다. 카바페넴 항생제는 다른 항생제에 내성을 보이는 세균을 치료할 수 있는 강력한 효능을 가지고 있어, 특히 병원 내 감염이나 다제내성균(MDR) 감염에서 중요한 역할을 한다.

[0063] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 항생제와 병용하여 다제내성균을 억제하는 것일 수 있다.

[0064] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 항생제의 최소 억제 농도를 4배 내지 64배 감소시키는 것일 수 있다.

[0065] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화합물은 박테리아 수를 감소시키는 것일 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 다제내성 그람음성균 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0068] 본 발명에서 사용되는 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0069] 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 유효성분을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0070] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0071] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 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. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0073] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 베타락탐계 항생제를 혼합하는 단계; 및 혼합물을 다제내성 그람음성균에 처리하는 단계;를 포함하는 항생제의 항균 활성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0075] 뉴델리 메탈로-β-락타마제(NDM) 생성 (blaNDM) 카바페넴 내성 대장균 (E. coli) (EC-001, EC-012, EC-013, EC-014, EC-033, EC-040), NDM 생성 클렙시엘라 폐렴균 (KPC-001, KP-018, KP-020), 클렙시엘라 폐렴균 카바페넴아제(KPC) 생성 (blaKPC) 대장균 (E. coli) (EC-010, EC-022, EC-023), 및 KPC 생성 (blaKPC) 클렙시엘라 폐렴균 (KP-009, KP-022) 균주는 아산병원(서울, 한국)에서 제공받았다.

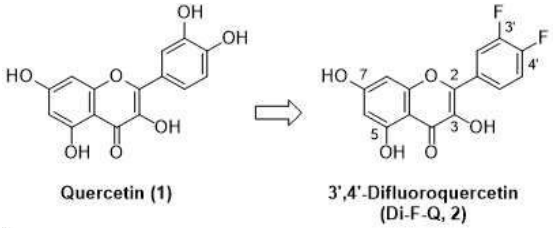
[0076] 모든 동물 실험은 KRIBB의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(approval code: KRIBB-AEC23204)의 승인을 받았다.

[0078] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0080] **<실시예 1> 3-O-알킬화된 3',4'-디플루오로퀘르세틴의 일반적인 합성 방법**

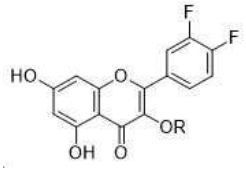
[0081] 본 발명의 3',4'-디플루오로퀘르세틴(화합물 2)은 이전에 공지된 문헌(Cho et al., 2012)을 참조하여, 하기 반응식 A와 같이 퀘르세틴(화합물 1)으로부터 제조하였다.

[0082] [반응식 A]

[0083] 

[0084] 또한, 하기 반응식 1과 같이, 화합물 2의 3-O 위치에 하기 28종의 알킬화제(R)를 도입하기 위하여, 방법 A 또는 방법 B를 이용하여 하기 화학식 1의 화합물 3 내지 31을 합성하였다.

[0085] [화학식 1]

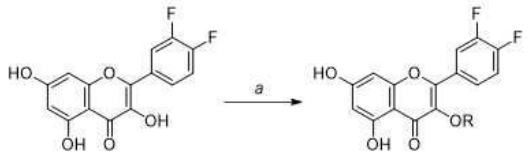


[0086]

[0087] 상기 화학식 1에서,

[0088] R은 $COCH_2C(CH_3)_3$, $CH_2OCOC(CH_3)_3$, $CH_2OCOOCH(CH_3)_2$, $CH_2(4\text{-}t\text{BuPh})$, $CH_2(4\text{-}i\text{PrPh})$, $(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$, $(CH_2)_2O(CH_2)_2NH_2$, $(CH_2)_2$(thiophen-2-yl), $(CH_2)_2N(CH_3)_2$, $(CH_2)_2N(CH_2)_2$, $(CH_2)_2N^+(CH_3)_2CH_2CO_2$, $(CH_2)_2$(4-methylpiperazin-1-yl), $(CH_2)_2N(CH_2)_4NH$, $(CH_2)_2N(CH_2)_4$, $(CH_2)_2N(CH_2)_5$, $(CH2)_2N(CH_2)_40$, (S)-$(CH_2)_2$(1-methylpyrrolidin-2-yl), $(CH_2)_2CF_3$, $(CH_2)_2C(CH_3)_3$, $(CH_2)_2CH(CH_3)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_2$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_5$, $CH_2CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_3CH(CH_2)_4$, $(CH_2)_2CH(CH_2)_40$ 및 $(CH_2)_2CH(CH_2)_4NH$ 중에서 선택되는 하나이다.

[0089] [반응식 1]



3	R = $COCH_2C(CH_3)_3$	18	R = $(CH_2)_2N(CH_2)_4$
4	R = $CH_2OCOC(CH_3)_3$	19	R = $(CH_2)_2N(CH_2)_5$
5	R = $CH_2OCOOCH(CH_3)_2$	20	R = $(CH_2)_2N(CH_2)_4O$
6	R = CH_2(4-*t*BuPh)	21	R = (*S*)-$(CH_2)_2$(1-methylpyrrolidin-2-yl)
7	R = CH_2(4-*i*PrPh)	22	R = $(CH_2)_2CF_3$
8	R = $(CH_2)_2OH$	23	R = $(CH_2)_2C(CH_3)_3$
9	R = $(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$	24	R = $(CH_2)_2CH(CH_3)_2$
10	R = $(CH_2)_2O(CH_2)_2O(CH_2)_2OH$	25	R = $(CH_2)_2CH(CH_2)_2$
11	R = $(CH_2)_2O(CH_2)_2NH_2$	26	R = $(CH_2)_2CH(CH_2)_4$
12	R = $(CH_2)_2$(thiophen-2-yl)	27	R = $(CH_2)_2CH(CH_2)_5$
13	R = $(CH_2)_2N(CH_3)_2$	28	R = $CH_2CH(CH_2)_4$
14	R = $(CH_2)_2N(CH_2)_2$	29	R = $(CH_2)_3CH(CH_2)_4$
15	R = $(CH_2)_2N^+(CH_3)_2CH_2CO_2^-$	30	R = $(CH_2)_2CH(CH_2)_4O$
16	R = $(CH_2)_2$(4-methylpiperazin-1-yl)	31	R = $(CH_2)_2CH(CH_2)_4NH$
17	R = $(CH_2)_2N(CH_2)_4NH$		

[0090]

[0091] 1-1. 방법 A

[0092] *N*,*N*-디메틸포름아미드(DMF) 3 mL에 냉각된 3',4'-디플루오로퀘르세틴 100 mg (0.33 mmol, 1.0 당량), 알킬 할라이드(RX, 1.1 당량) 및 K_2CO_3(1.3 당량)를 첨가하고 100 ℃에서 2시간 동안 교반한 후, 실온까지 자연 냉각하고, NH_4Cl 포화 수용액을 처리한 후 에틸아세테이트(EtOAc)로 희석하였다. 유기층은 brine으로 세척하고, $MgSO_4$로 건조한 후 여과 및 감압 농축하여 오일 상의 농축액을 얻었다. 농축액은 유기용매로 세척 또는 분쇄하거나, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 3-O 위치에 알킬 치환기로 치환된 화합물을 수득하였다. 일부 화합물은 보호기 제거 단계를 거친 후 최종 생성물을 수득하였다.

[0094] 1-2. 방법 B

[0095] 테트라하이드로퓨란(THF) 5 mL에 냉각된 3',4'-디플루오로퀘르세틴 100 mg (0.33 mmol), 알코올(1.5 당량), PPh_3(1.5 당량) 및 디이소프로필 아조디카르복실레이트(DIAD, 1.5 당량)를 순차적으로 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 교반한 후, 감압 농축하여 오일 상의 농축액을 얻었다. 농축액은 유기용매로 세척 또는 분쇄하거나, 실

리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 3-O 위치에 알킬 치환기로 치환된 화합물을 수득하였다.

[0097] **<실시예 2> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4-옥소-4H-크로멘-3-일 3,3-디메틸부타노에이트 (화합물 3) 합성**

[0098] DMF 5 mL에 3',4'-디플루오로퀘르세틴(화합물 2) 200 mg (0.65 mmol), tert-뷰틸아세틸클로라이드 0.12 mL (0.85 mmol) 및 K_2CO_3 135 mg (9.8 mmol)를 첨가하고 1시간 동안 교반 후, 반응 혼합물을 NH_4Cl 포화 용액으로 처리하고 에틸아세테이트(EtOAc)로 희석하였다. 유기층을 brine으로 세척하고 $MgSO_4$로 건조한 후 여과 및 감압 농축하여 오일 상의 잔여물을 얻었다. 잔여물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=6:1)로 정제하여 노란색 고체 90 mg (0.23 mmol, 34 % yield)을 수득하였다.

[0099] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 12.08 (s, 1H), 7.73 (ddd, J = 2.2, 7.5, 11.0 Hz, 1H), 7.67-7.64 (m, 1H), 7.32 (ddd, J = 8.5, 8.5, 9.7 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.23 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 2.53 (s, 2H), 1.12 (s, 9H).

[0100] ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 175.6, 170.6, 163.6, 162.1, 156.9, 154.6, 152.3 (dd, J = 12.0, 254.3 Hz), 150.4 (dd, J = 12.0, 249.6 Hz), 131.7, 126.4 (dd, J = 3.5, 6.0 Hz), 125.5 (dd, J = 3.5, 6.0 Hz), 118.2 (d, J = 19.3 Hz), 118.0 (d, J = 16.8 Hz), 105.4, 99.7, 94.5, 47.4, 31.1, 29.6.

[0101] FAB-MS (m/z): found 405.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{21}H_{18}F_2O_6$ 404.1.

[0103] **<실시예 3> ((2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4-옥소-4H-크로멘-3-일)옥시)메틸 피발레이트 (화합물 4) 합성**

[0104] 상기 방법 A에서 알킬화제로 아이오도메틸 피발레이트를 이용하여 반응을 진행하였다. 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=6:1)로 정제 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0105] 수율: 35 %

[0106] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.39 (s, 1H), 8.14 (ddd, J = 2.3, 7.9, 12.2 Hz, 1H), 8.05-8.02 (m, 1H), 7.55 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.4 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.32 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.87 (s, 2H), 0.90 (s, 9H).

[0107] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 178.6, 177.6, 165.6, 163.1, 157.9, 154.1, 152.4 (dd, J = 13.1, 250.8 Hz), 150.7 (dd, J = 13.3, 244.9 Hz), 137.2, 128.5 (dd, J = 3.6, 7.1 Hz), 127.2 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 119.3 (d, J = 19.1 Hz), 118.5 (d, J = 16.9 Hz), 105.8, 99.9, 94.9, 88.0, 39.1, 26.8.

[0108] FAB-MS (m/z): found 421.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{21}H_{18}F_2O_7$ 420.1.

[0110] **<실시예 4> ((2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4-옥소-4H-크로멘-3-일)옥시)메틸 이소프로필 카르보네이트 (화합물 5) 합성**

[0111] 상기 방법 A에서 알킬화제로 클로로메틸 이소프로필 카르보네이트를 이용하여 반응을 진행하였다. 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=6:1)로 정제 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0112] 수율: 37 %

[0113] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.37 (s, 1H), 8.08 (ddd, J = 2.3, 7.9, 12.1 Hz, 1H), 7.99-7.96 (m, 1H), 7.55 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.4 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.32 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.79 (s, 2H), 4.59 (sept, J = 6.3 Hz, 1H), 1.08 (d, J = 6.3 Hz, 6H).

[0114] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 178.4, 165.6, 163.1, 158.0, 154.8, 154.5, 152.4 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 150.6 (dd, J = 12.0, 244.8 Hz), 136.8, 128.5-128.4 (m), 127.2 (dd, J = 3.6, 7.1 Hz), 119.2 (d, J = 19.3 Hz), 118.5 (d, J = 18.0 Hz), 105.9, 99.9, 94.9, 90.6, 73.1, 21.5.

[0115] FAB-MS (m/z): found 423.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{20}H_{16}F_2O_8$ 422.1.

[0117] **<실시예 5> 3-(4-테르트-뷰틸-벤질옥시)-2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 6) 합성**

[0118] 상기 방법 A에서 알킬화제로 4-tert-뷰틸벤질브로마이드를 이용하여 반응을 진행하였다. 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:아세톤=6:1)로 정제 후, 연노란색 고체를 수득하였다.

[0119] 수율: 67 %

[0120] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.66 (s, 1H), 7.90 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.1 Hz, 1H), 7.87-7.84 (m, 1H), 7.44 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.5 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 6.53 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.31 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 1.28 (s, 9H).

[0121] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.6, 165.3, 163.3, 157.9, 154.8, 152.1, 152.1 (dd, J = 13.3, 250.8 Hz), 150.5 (dd, J = 13.3, 244.9 Hz), 138.6, 134.3, 129.8, 128.9 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 126.9-126.8 (m), 125.9, 118.8 (d, J = 20.4 Hz), 118.2 (d, J = 18.0 Hz), 106.1, 99.7, 94.7, 74.9, 35.1, 31.5.

[0122] FAB-MS (m/z): found 453.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{26}H_{22}F_2O_5$ 452.1.

[0124] **<실시예 6> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-(4-이소프로필-벤질옥시)-4H-크로멘-4-온 (화합물 7) 합성**

[0125] 상기 방법 A에서 알킬화제로 4-이소프로필벤질 브로마이드를 이용하여 반응을 진행하였다. 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:아세톤=6:1)로 정제 후, 연노란색 고체를 수득하였다.

[0126] 수율: 60 %

[0127] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.65 (s, 1H), 7.91 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.1 Hz, 1H), 7.87-7.84 (m, 1H), 7.43 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.5 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.52 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 2.87 (sept, J = 7.0 Hz, 1H), 1.20 (d, J = 7.0 Hz, 6H).

[0128] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.6, 165.2, 163.2, 157.9, 154.7, 152.1 (dd, J = 13.1, 250.8 Hz), 150.5 (dd, J = 13.3, 244.8 Hz), 149.9, 138.6, 134.7, 130.1, 128.8 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 127.0, 126.8 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 118.7 (d, J = 20.4), 118.2 (d, J = 18.0 Hz), 106.0, 99.6, 94.7, 74.9, 34.5, 24.2.

[0129] FAB-MS (m/z): found 439.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{25}H_2OF_2O_5$ 438.1.

[0131] **<실시예 7> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-(2-하이드록시에톡시)-4H-크로멘-4-온 (화합물 8) 합성**

[0132] 상기 방법 A에서 알킬화제로 2-브로모에탄올을 이용하여 반응을 진행하였다. 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:아세톤=3:1)로 정제 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0133] 수율: 43 %

[0134] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.49 (s, 1H), 8.29 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.4 Hz, 1H), 8.15-8.12 (m,

1H), 7.52 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.4 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.23 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 3.81 (t, J = 4.6 Hz, 2H).

[0135] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.8, 165.5, 163.1, 157.9, 154.0, 152.3 (dd, J = 13.3, 250.8 Hz), 150.8 (dd, J = 13.3, 244.9 Hz), 139.6, 128.9-128.8 (m), 126.8 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 119.0 (d, J = 20.4 Hz), 118.5 (d, J = 16.8 Hz), 105.9, 99.7, 94.8, 75.5, 61.8.

[0136] FAB-MS (m/z): found 351.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{17}H_{12}F_2O_6$ 350.1.

[0138] **<실시예 8> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]-4H-크로멘-4-온 (화합물 9) 합성**

[0139] 상기 방법 B에서 알킬화제로 디에틸렌글리콜을 이용하여 반응을 진행하였다. 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:아세톤=3:1)로 정제 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0140] 수율: 35 %

[0141] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.45 (s, 1H), 10.98 (s, 1H), 8.25 (ddd, J = 2.2, 8.0, 12.4 Hz, 1H), 8.08-8.05 (m, 1H), 7.63 (ddd, J = 8.7, 8.7, 10.5 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.59 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 4.26-4.25 (m, 2H), 3.63-3.61 (m, 2H), 3.44 (dt, J = 5.2, 5.3 Hz, 2H), 3.34 (t, J = 5.4 Hz, 2H).

[0142] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 178.1, 164.6, 161.2, 156.4, 152.6, 150.8 (dd, J = 14.4, 253.1 Hz), 149.2 (dd, J = 13.3, 243.6 Hz), 137.9, 127.5 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 126.2-126.1 (m), 118.0 (d, J = 21.6 Hz), 117.8 (d, J = 17.9 Hz), 104.4, 98.8, 94.0, 72.2, 71.6, 69.4, 60.1.

[0143] FAB-MS (m/z): found 395.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{19}H_{16}F_2O_7$ 394.1.

[0145] **<실시예 9> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-{2-[2-(2-하이드록시에톡시)에톡시]에톡시}-4H-크로멘-4-온 (화합물 10) 합성**

[0146] 상기 방법 B에서 알킬화제로 트리에틸렌글리콜을 이용하여 반응을 진행하였다. 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:아세톤=1:1)로 정제 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0147] 수율: 38 %

[0148] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.45 (s, 1H), 8.25 (ddd, J = 2.3, 8.0, 12.4 Hz, 1H), 8.06-8.03 (m, 1H), 7.63 (ddd, J = 8.7, 8.7, 10.5 Hz, 1H), 6.50 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.22 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.26-4.25 (m, 2H), 3.63-3.61 (m, 2H), 3.46-3.42 (m, 6H), 3.37 (t, J = 5.3 Hz, 2H).

[0149] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 178.1, 164.6, 161.2, 156.4, 152.5, 150.7 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 149.2 (dd, J = 13.1, 244.8 Hz), 137.9, 127.6-127.5 (m), 126.1 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 118.0 (d, J = 20.4 Hz), 117.8 (d, J = 18.0 Hz), 104.4, 98.8, 94.0, 72.4, 71.5, 69.7, 69.7, 69.4, 60.2.

[0150] FAB-MS (m/z): found 439.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{21}H_{20}F_2O_8$ 438.1.

[0152] **<실시예 10> 3-[2-(2-아미노에톡시)에톡시]-2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 11) 합성**

[0153] 10-1. 벤질 (2-(2-아이오도에톡시)에틸)카르바메이트 합성

[0154] THF 25 mL에 냉각 디글라이콜아민 1 mL (8.97 mmol), 트리에틸아민(TEA) 1.25 mL (8.97 mmol) 및 벤질 클로로

포르메이트 1.4 mL (9.87 mmol)를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 교반 후, NH_4Cl 포화 수용액을 처리하여 반응을 종결하였다. 유기층을 brine으로 세척 및 $MgSO_4$로 건조시키고 여과 및 감압 농축하여 농축액을 얻은 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH_2Cl_2:EtOAc=1:1)로 정제하여, 무색 오일 상의 Cbz-보호된 디글라이콜아민 1.53 g을 수득하였다.

[0155] CH_2Cl_2 20 mL에 Cbz-보호된 디글라이콜아민 1.53 g을 용해시키고, TEA 0.98 mL (1.1 당량) 및 메탄설포닐클로라이드(MsCl) 0.55 mL를 첨가하고 30분 동안 교반 후, NH_4Cl 포화 수용액을 처리하여 반응을 종결하였다. 유기층을 brine으로 세척 및 $MgSO_4$로 건조시키고 여과 및 감압 농축하여 농축액을 얻었다. 농축액을 아세톤 20 mL에 용해시키고, NaI 1.11 g를 첨가한 후 2시간 30분 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, EtOAc로 희석하고, $Na_2S_2O_3$ 포화 수용액 및 brine으로 세척 및 $MgSO_4$로 건조시킨 후 여과 및 감압 농축하였다. 잔여물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=4:1)로 정제하여 알킬 할라이드인 벤질 (2-(2-아이오도에톡시)에틸)카르바메이트 1.18 g을 수득하였다.

[0157] 10-2. 화합물 11 합성

[0158] 상기 방법 A에서 알킬화제로 벤질 (2-(2-아이오도에톡시)에틸)카르바메이트를 이용하여 반응을 진행하였다. Cbz 보호기를 제거하기 위하여, 벤질 (2-(2-아이오도에톡시)에틸)카르바메이트 43 mg (0.09 mmol) 및 10% Pd/C 4 mg 퇴적물을 CH_2Cl_2 3 mL 및 메탄올 3 mL 1:1 부피비 혼합 용매에 첨가하고, H_2(balloon) 하에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물은 짧은 셀라이트 패드를 통해 여과하고, 감압 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피(CH_2Cl_2:MeOH:NH_4OH(aq.)=90:10:1)로 정제하여, 노란색 고체를 수득하였다.

[0159] 수율: 47 % (16 mg, 0.04 mmol).

[0160] ^1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4): δ 8.14 (ddd, J = 2.3, 7.9, 12.3 Hz, 1H), 7.97-7.94 (m, 1H), 7.44 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.3 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.09 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.17-4.15 (m, 2H), 3.78-3.76 (m, 2H), 3.67-3.65 (m, 2H), 3.05-3.03 (m, 2H).

[0161] ^{13}C NMR (125 MHz, 메탄올-d4): δ 179.6, 168.5, 163.0, 158.6, 154.6, 153.0 (dd, J = 13.3, 250.8 Hz), 151.3 (dd, J = 13.1, 244.8 Hz), 139.5, 129.0 (dd, J = 3.6, 6.0 Hz), 126.8 (dd, J = 3.6, 7.1 Hz), 119.2 (d, J = 20.4 Hz), 118.8 (d, J = 18.0 Hz), 105.5, 100.8, 95.4, 73.1, 71.2, 68.3, 40.7.

[0162] FAB-MS (m/z): found 394.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{19}H_{17}F_2NO_6$ 393.1.

[0164] **<실시예 11> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-[2-(티오펜-2-일)에톡시]-4H-크로멘-4-온 (화합물 12) 합성**

[0165] CH_2Cl_2에 2-(티오펜-2-일)에탄올, TEA (1.1 당량) 및 MsCl (1.1 당량)을 첨가하고 1시간 동안 교반 후, NH_4Cl 포화 수용액을 처리하여 반응을 종결하였다. 유기층을 brine으로 세척 및 $MgSO_4$로 건조시키고 여과 및 감압 농축하여 2-(티오펜-2-일)에틸 메탄술포네이트를 수득하였다.

[0166] 상기 방법 A에서 알킬화제로 2-(티오펜-2-일)에틸 메탄술포네이트를 이용하여 반응을 진행하였다. 컬럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=6:1)로 정제 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0167] 수율: 47 %

[0168] ^1H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.58 (s, 1H), 7.97 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.1 Hz, 1H), 7.90-7.86 (m, 1H), 7.39 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.5 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 1.5, 4.8 Hz, 1H), 6.94-6.91 (m, 2H), 6.53 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.28 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.40 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.27 (t, J = 6.6 Hz, 2H).

[0169] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.5, 165.2, 163.2, 157.8, 154.0, 152.1 (dd, J = 13.3, 250.8 Hz),

150.6 (dd, J = 12.0, 244.8 Hz), 141.3, 139.3, 128.8-128.7 (m), 127.7, 126.8 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 126.5, 124.7, 118.6 (d, J = 19.1 Hz), 118.4 (d, J = 18.0 Hz), 106.0, 99.7, 94.7, 73.8, 31.2.

[0170] FAB-MS (m/z): found 417.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{21}H_{14}F_2O_5S$ 416.1.

[0172] **<실시예 12> 2-(3,4-디플루오로페닐)-3-[2-(디메틸아미노)에톡시]-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 13) 합성**

[0173] 상기 방법 B에서 알킬화제로 *N,N*-디메틸에탄올아민을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 아세톤으로 세척 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0174] 수율: 26 %

[0175] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.29 (s, 1H), 8.11 (ddd, J = 2.1, 7.8, 11.7 Hz, 1H), 7.98-7.95 (m, 1H), 7.66 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.2 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.28 (t, J = 4.7 Hz, 2H), 3.46 (t, J = 4.9 Hz, 2H), 2.89 (s, 6H).

[0176] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 177.7, 165.0, 161.1, 156.6, 153.6, 151.0 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 149.4 (dd, J = 13.1, 244.8 Hz), 137.3, 127.1 (dd, J = 3.6, 7.1 Hz), 126.3 (dd, J = 3.6, 7.1 Hz), 118.3 (d, J = 16.8 Hz), 117.9 (d, J = 19.1 Hz), 104.4, 99.2, 94.3, 66.4, 55.9, 42.6.

[0177] FAB-MS (m/z): found 378.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{19}H_{17}F_2NO_5$ 377.1.

[0179] **<실시예 13> 3-[2-(아지리딘-1-일)에톡시]-2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 14) 합성**

[0180] 상기 방법 B에서 알킬화제로 1-(2-하이드록시에틸)에틸렌이미드를 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 아세톤으로 세척 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0181] 수율: 28 %

[0182] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.31 (s, 1H), 8.13 (ddd, J = 2.2, 7.9, 11.9 Hz, 1H), 7.99-7.96 (m, 1H), 7.65 (ddd, J = 8.7, 8.7, 10.4 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.23 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.93 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.36 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.28 (t, J = 5.2 Hz, 2H).

[0183] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 177.8, 165.0, 161.1, 156.6, 153.4, 151.0 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 149.4 (dd, J = 13.3, 244.8 Hz), 137.5, 127.2 (dd, J = 3.6, 7.1 Hz), 126.3-126.3 (m), 118.2 (d, J = 16.8 Hz), 117.9 (d, J = 19.1 Hz), 104.3, 99.1, 94.2, 68.3, 48.3, 46.8, 40.3.

[0184] FAB-MS (m/z): found 376.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{19}H_{15}F_2NO_5$ 375.1.

[0186] **<실시예 14> 2-((2-((2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4-옥소-4H-크로멘-3-일)옥시)에틸)디메틸암모늄)아세테이트 (화합물 15) 합성**

[0187] 14-1. 1단계

[0188] DMF 10 mL에 화합물 2 310 mg (1.00 mmol), 2-chloro-N,N-dimethylethylamine hydrochloride (1.1 당량) 및 K_2CO_3 (2.5 당량)를 첨가하고 90 ℃에서 2시간 동안 교반하였다. 실온까지 냉각한 후, NH_4Cl 포화 수용액을 처리하고 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 brine으로 세척 및 $MgSO_4$로 건조시키고 여과 및 감압 농축하였다. 컬럼 크로마토그래피(CH_2Cl_2:MeOH=30 내지 10:1)로 정제하여 노란색 고체를 수득하였다.

[0189] 수율: 65 %

[0190] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 12.46 (s, 1H), 8.19 (ddd, J = 2.3, 7.8, 12.0 Hz, 1H), 7.98-7.95 (m, 1H), 7.31-7.26 (m, 1H), 6.64 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 4.18 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 3.50 (s, 3H), 2.67 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 2.30 (s, 6H).

[0192] 14-2. 2단계

[0193] DMF 5 mL에 상기 노란색 고체 250 mg (0.59 mmol) 및 tert-뷰틸브로모아세테이트 0.26 mL (1.78 mmol)을 첨가하고 실온에서 12시간 동안 교반하고,생성물을 여과 및 EtOAc로 세척하여 연갈색 고체의 암모늄 브로마이드 염을 수득하였다.

[0194] 수율: 77 %

[0195] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.18 (s, 1H), 8.14 (ddd, J = 2.2, 7.9, 11.9 Hz, 1H), 7.98-7.95 (m, 1H), 7.70 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.4 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 5.35 (s, 2H), 4.59 (s, 2H), 4.43-4.41 (m, 2H), 4.04-4.02 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.36 (s, 6H), 1.38 (s, 9H).

[0197] 14-3. 3단계

[0198] 상기 연갈색 고체 100 mg (0.16 mmol)를 0.5 M 염산 MeOH 용액 5 mL로 처리하고 70 ℃에서 24시간 동안 교반하였다. 실온까지 냉각하고 감압 농축하고, $NaHCO_3$ 포화 수용액으로 중화시킨 후, C18 반응상에서 역상 크로마토그래피로 정제하여 노란색 고체를 수득하였다.

[0199] 수율: 30 %

[0200] ^{1}H NMR (500 MHz, 메탄올-d4): δ 7.93 (ddd, J = 2.2, 7.8, 11.8 Hz, 1H), 7.91-7.87 (m, 1H), 7.44 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.3 Hz, 1H), 6.08 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.95 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.33-4.32 (m, 2H), 4.24 (s, 2H), 4.12-4.11 (m, 2H), 3.49 (s, 6H).

[0201] ^{13}C NMR (125 MHz, 메탄올-d4): δ 178.9, 177.5, 169.3, 162.6, 159.3, 153.4, 152.7 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 151.4 (dd, J = 13.3, 246.0 Hz), 138.0, 129.3 (dd, J = 3.5, 6.0 Hz), 126.7-126.6 (m), 118.9 (d, J = 18.0 Hz), 118.4 (d, J = 19.3 Hz), 104.2, 102.6, 97.8, 67.0, 66.0, 64.0, 53.1.

[0202] FAB-MS (m/z): found 436.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{21}H_{19}F_2NO_7$ 435.1.

[0204] **<실시예 15> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-[2-(4-메틸피페라진-1-일)에톡시]-4H-크로멘-4-온 (화합물 16) 합성**

[0205] 상기 방법 B에서 알킬화제로 4-메틸피페라진-1-에탄올을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 에틸아세테이트로 분쇄 후, 흰색 고체를 수득하였다.

[0206] 수율: 54 %

[0207] ^{1}H NMR (500 MHz, D2O): δ 7.66-7.60 (m, 2H), 7.29 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.0 Hz, 1H), 6.03 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.00 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 3.79 (br s, 8H), 3.64 (t, J = 4.5 Hz, 2H), 3.10 (s, 3H).

[0208] ^{13}C NMR (125 MHz, D2O): δ 177.7, 163.5, 159.8, 156.1, 154.1, 151.8 (dd, J = 12.0, 253.1 Hz), 149.8 (dd, J = 13.1, 244.8 Hz), 136.8, 125.8 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 125.7-125.6 (m), 118.1 (d, J = 18.0 Hz), 117.2 (d, J = 20.5 Hz), 104.3, 99.1, 94.5, 66.2, 56.7, 50.5, 49.5, 42.9.

[0209] FAB-MS (m/z): found 433.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{22}H_{22}F_2N_2O_5$ 432.1.

[0211] **<실시예 16> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-[2-(피페라진-1-일) 에톡시]-4H-크로멘-4-온 (화합물 17) 합성**

[0212] 상기 방법 B에서 알킬화제로 1-피페라진에탄올을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 에틸아세테이트로 분쇄 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0213] 수율: 46 %

[0214] ^{1}H NMR (500 MHz, D2O): δ 7.77 (ddd, J = 2.0, 7.7, 11.5 Hz, 1H), 7.73-7.71 (m, 1H), 7.37-7.32 (m, 1H), 6.23 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.12 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.14 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.80-3.74 (m, 4H), 3.73-3.69 (m, 4H), 3.61 (t, J = 4.6 Hz, 2H).

[0215] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 177.7, 165.0, 161.1, 156.6, 153.5, 151.0 (dd, J = 13.3, 250.8 Hz), 149.5 (dd, J = 13.3, 244.8 Hz), 137.4, 127.1-127.1 (m), 126.4-126.4 (m), 118.3 (d, J = 16.8 Hz), 117.9 (d, J = 19.1 Hz), 104.3, 99.2, 94.3, 66.3, 55.3, 48.3, 48.3.

[0216] FAB-MS (m/z): found 419.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{21}H_{20}F_2N_2O_5$ 418.1.

[0218] **<실시예 17> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-[2-(피롤리딘-1-일) 에톡시]-4H-크로멘-4-온 (화합물 18) 합성**

[0219] 상기 방법 A에서 알킬화제로 1-(2-클로로에틸)피롤리딘 염산염을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 에탄올로 분쇄 후, 연노란색 고체를 수득하였다.

[0220] 수율: 32 %

[0221] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.32 (s, 1H), 11.18 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 8.13 (ddd, J = 2.2, 7.9, 11.8 Hz, 1H), 7.98-7.96 (m, 1H), 7.67 (ddd, J = 8.7, 8.7, 10.4 Hz, 1H), 6.56 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.27 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.67 (br s, 2H), 3.56-3.50 (m, 2H), 3.11 (br s, 2H), 2.01 (br s, 2H), 1.93 (br s, 2H).

[0222] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 177.7, 164.9, 161.1, 156.6, 153.6, 151.0 (dd, J = 12.0, 249.5 Hz), 149.4 (dd, J = 12.0, 244.8 Hz), 137.3, 127.7-127.7 (m), 126.3-126.3 (m), 118.3 (d, J = 18.0 Hz), 117.9 (d, J = 19.3 Hz), 104.4, 99.1, 94.3, 67.4, 53.5, 53.3, 22.6.

[0223] FAB-MS (m/z): found 404.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{21}H_{19}F_2NO_5$ 403.1.

[0225] **<실시예 18> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-[2-(피페리딘-1-일) 에톡시]-4H-크로멘-4-온 (화합물 19) 합성**

[0226] 상기 방법 A에서 알킬화제로 1-(2-클로로에틸)피페리딘 염산염을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 에탄올로 분쇄 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0227] 수율: 34 %

[0228] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.29 (s, 1H), 11.25 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 8.11 (ddd, J = 2.2, 7.8, 11.8 Hz, 1H), 7.97-7.94 (m, 1H), 7.67 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.5 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.31 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.33 (t, J = 4.7 Hz, 2H), 3.57-3.51 (m, 2H), 3.45-3.41 (m, 2H), 3.02-2.95 (m, 2H), 1.83-1.75 (m, 4H), 1.73-1.69 (m, 1H), 1.42-1.32 (m, 1H).

[0229] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 178.1, 165.0, 161.2, 156.4, 152.3, 150.0 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 149.2 (dd, J = 13.3, 244.8 Hz), 138.0, 127.7-127.7 (m), 126.0-126.0 (m), 118.1 (d, J = 19.3 Hz), 117.9 (d, J = 16.9 Hz), 104.3, 99.0, 94.0, 68.6, 57.7, 53.8, 34.0, 24.9.

[0230] FAB-MS (m/z): found 418.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{22}H_{21}F_2NO_5$ 417.1.

[0232] **<실시예 19> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-(2-모르폴리노에톡시)-4H-크로멘-4-온 (화합물 20) 합성**

[0233] 상기 방법 B에서 알킬화제로 4-(2-하이드록시에틸)모르폴린을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 에틸아세테이트로 분쇄 후, 흰색 고체를 수득하였다.

[0234] 수율: 60 %

[0235] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.26 (s, 1H), 11.25 (s, 1H), 11.15 (s, 1H), 8.11 (ddd, J = 2.2, 7.8, 11.8 Hz, 1H), 7.98-7.95 (m, 1H), 7.65 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.4 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.30 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.35 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 4.00-3.98 (m, 2H), 3.87-3.83 (m, 2H), 3.58-3.52 (m, 4H), 3.24-3.19 (m, 2H).

[0236] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 177.7, 165.0, 161.1, 156.5, 153.6, 151.0 (dd, J = 13.1, 250.8 Hz), 149.4 (dd, J = 13.3, 246.0 Hz), 137.3, 127.1-127.1 (m), 126.4-126.3 (m), 118.2 (d, J = 16.8 Hz), 117.9 (d, J = 19.1 Hz), 104.3, 99.1, 94.3, 66.0, 63.2, 55.4, 51.3.

[0237] FAB-MS (m/z): found 420.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{21}H_{19}F_2NO_6$ 419.1.

[0239] **<실시예 20> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-[2-(1-메틸피롤리딘-2-일) 에톡시]-4H-크로멘-4-온 (화합물 21) 합성**

[0240] 상기 방법 B에서 알킬화제로 2-(2-하이드록시에틸)-1-메틸피롤리딘을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 에틸아세테이트로 분쇄 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0241] 수율: 35 %

[0242] ^{1}H NMR (500 MHz, 메탄올-d4): δ 8.04 (ddd, J = 2.2, 7.7, 11.8 Hz, 1H), 7.99-7.95 (m, 1H), 7.51 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.2 Hz, 1H), 6.48 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.26 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 4.07 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.87 (ddd, J = 5.5, 7.7, 11.7 Hz, 1H), 3.74-3.68 (m, 1H), 3.28-3.22 (m, 1H), 3.06 (s, 3H), 2.45-2.38 (m, 1H), 2.26 (td, J = 5.2, 5.5 Hz, 2H), 2.23-2.16 (m, 2H), 2.03-1.95 (m, 1H).

[0243] ^{13}C NMR (125 MHz, 메탄올-d4): δ 180.1, 167.0, 163.0, 158.7, 155.8, 153.3 (dd, J = 13.1, 252.0 Hz), 151.6 (dd, J = 12.0, 242.4 Hz), 139.4, 128.6-128.6 (m), 127.1-127.0 (m), 119.2 (d, J = 18.0 Hz), 118.9 (d, J = 20.4 Hz), 105.8, 100.4, 95.3, 70.6, 69.0, 57.5, 40.2, 30.4, 29.7, 22.3.

[0244] FAB-MS (m/z): found 418.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{22}H_{21}F_2NO_5$ 417.1.

[0246] **<실시예 21> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-(3,3,3-트리플루오로프로폭시)-4H-크로멘-4-온 (화합물 22) 합성**

[0247] 상기 방법 A에서 알킬화제로 1,1,1-트리플루오로-3-아이오도프로판을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=4:1)로 정제한 후, 연노란색 고체를 수득하였다.

[0248] 수율: 50 %

[0249] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.48 (s, 1H), 8.07 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.1 Hz, 1H), 8.01-7.98 (m, 1H), 7.54 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.4 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.39 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.78 (qt, J = 4.9, 6.3 Hz, 2H).

[0250] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.3, 165.4, 161.2, 157.9, 154.3, 152.3 (dd, J = 13.3, 250.9 Hz), 150.7 (dd, J = 13.1, 245.9 Hz), 139.0, 128.7-128.6 (m), 127.5 (q, J = 273.6 Hz), 126.9 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 118.8 (d, J = 19.1 Hz), 118.6 (d, J = 18.0 Hz), 106.0, 99.8, 94.8, 66.2 (q, J = 3.8 Hz), 35.0 (q, J = 22.8 Hz).

[0251] FAB-MS (m/z): found 403.3 $[M+H]^{+}$, calcd for $C_{18}H_{11}F_5O_5$ 402.1.

[0253] **<실시예 22> 2-(3,4-디플루오로페닐)-3-(3,3-디메틸부톡시)-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 23) 합성**

[0254] 상기 방법 A에서 알킬화제로 1,1,1-트리플루오로-3-아이오도프로판을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=6:1)로 정제한 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0255] 수율: 67 %

[0256] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.48 (s, 1H), 8.07 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.1 Hz, 1H), 8.01-7.98 (m, 1H), 7.54 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.4 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.39 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.78 (qt, J = 4.9, 6.3 Hz, 2H).

[0257] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.3, 165.4, 161.2, 157.9, 154.3, 152.3 (dd, J = 13.3, 250.9 Hz), 150.7 (dd, J = 13.1, 245.9 Hz), 139.0, 128.7-128.6 (m), 127.5 (q, J = 273.6 Hz), 126.9 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 118.8 (d, J = 19.1 Hz), 118.6 (d, J = 18.0 Hz), 106.0, 99.8, 94.8, 66.2 (q, J = 3.8 Hz), 35.0 (q, J = 22.8 Hz).

[0258] FAB-MS (m/z): found 403.3 $[M+H]^{+}$, calcd for $C_{18}H_{11}F_5O_5$ 402.1.

[0260] **<실시예 23> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-(3-메틸부톡시)-4H-크로멘-4-온 (화합물 24) 합성**

[0261] 상기 방법 A에서 알킬화제로 1-브로모-3-메틸부탄을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=6:1)로 정제한 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0262] 수율: 70 %

[0263] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.63 (s, 1H), 8.11 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.2 Hz, 1H), 8.04-8.01 (m, 1H), 7.56 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.5 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.29 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.15 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.79 (t sept, J = 6.6, 6.7 Hz, 1H), 1.61 (dt, J = 6.7, 6.8 Hz, 2H), 0.91 (d, J = 6.7 Hz, 6H).

[0264] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.6, 165.2, 163.2, 157.8, 154.0, 152.2 (dd, J = 13.1, 250.8 Hz), 150.7 (dd, J = 13.3, 244.8 Hz), 139.7, 129.0-128.9 (m), 126.7-126.7 (m), 118.6 (d, J = 19.1 Hz), 118.5 (d, J = 15.6 Hz), 106.1, 99.6, 94.7, 71.9, 39.6, 25.5, 22.7.

[0265] FAB-MS (m/z): found 377.4 $[M+H]^{+}$, calcd for $C_{20}H_{18}F_2O_5$ 376.1.

[0267] **<실시예 24> 3-(2-사이클로프로필에톡시)-2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 25) 합성**

[0268] CH_2Cl_2에 2-사이클로프로필에탄올 냉각 용액, TEA (1.1 당량) 및 MsCl (1.1 당량)을 첨가하고 1시간 동안 교반

후, NH_4Cl 포화 수용액을 처리하여 반응을 종결하였다. 유기층을 brine으로 세척 및 $MgSO_4$로 건조시키고 여과 및 감압 농축하여 2-사이클로프로필에틸 메탄설포네이트를 수득하였다.

[0269] 상기 방법 A에서 알킬화제로 2-사이클로프로필에틸 메탄설포네이트를 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(Hexanes:아세톤=6:1)로 정제한 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0270] 수율: 51 %

[0271] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.61 (s, 1H), 8.13 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.2 Hz, 1H), 8.06-8.03 (m, 1H), 7.54 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.4 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.18 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.63 (td, J = 6.7, 6.8 Hz, 2H), 0.85-0.77 (m, 1H), 0.46-0.42 (m, 2H), 0.10-0.07 (m, 2H).

[0272] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.6, 165.2, 163.2, 157.8, 153.9, 152.2 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 150.7 (dd, J = 13.1, 244.8 Hz), 139.7, 129.0-128.9 (m), 126.7 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 118.7 (d, J = 20.5 Hz), 118.5 (d, J = 16.8 Hz), 106.1, 99.6, 94.7, 73.5, 35.6, 8.4, 4.7.

[0273] FAB-MS (m/z): found 375.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{20}H_{16}F_2O_5$ 374.1.

[0275] **<실시예 25> 3-(2-사이클로펜틸에톡시)-2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 26) 합성**

[0276] 상기 방법 B에서 알킬화제로 2-사이클로펜틸에탄올을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=6:1)로 정제한 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0277] 수율: 70 %

[0278] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 12.52 (s, 1H), 7.97 (ddd, J = 2.2, 7.7, 11.7 Hz, 1H), 7.90-7.86 (m, 1H), 7.29 (ddd, J = 8.6, 8.6, 9.6 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.34 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.00 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.84 (t qu, J = 7.5, 8.3 Hz, 1H), 1.73 (td, J = 7.0, 7.1 Hz, 2H), 1.73-1.67 (m, 2H), 1.61-1.53 (m, 2H), 1.52-1.43 (m, 2H), 1.08-1.01 (m, 2H).

[0279] ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 179.1, 163.2, 162.2, 157.0, 154.0, 151.9 (dd, J = 13.1, 254.4 Hz), 150.2 (dd, J = 13.3, 248.4 Hz), 139.1, 127.5-127.4 (m), 125.5 (dd, J = 3.6, 6.0 Hz), 118.1 (d, J = 20.5 Hz), 117.7 (d, J = 16.9 Hz), 105.9, 99.6, 94.3, 73.2, 36.6, 36.2, 32.7, 25.1.

[0280] FAB-MS (m/z) found 403.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{22}H_{20}F_2O_5$ 402.1.

[0282] **<실시예 26> 3-(2-사이클로헥실에톡시)-2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 27) 합성**

[0283] 상기 방법 B에서 알킬화제로 2-사이클로헥실에탄올을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=10:1)로 정제한 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0284] 수율: 66 %

[0285] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 12.56 (s, 1H), 7.97 (ddd, J = 2.2, 7.7, 11.6 Hz, 1H), 7.89-7.85 (m, 1H), 7.30 (ddd, J = 8.6, 8.6, 9.7 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.31 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.06 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.68-1.61 (m, 5H), 1.59 (dt, J = 6.8, 6.8 Hz, 2H), 1.42-1.34 (m, 1H), 1.21-1.07 (m, 3H), 0.90-0.83 (m, 2H).

[0286] ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 179.1, 162.8, 162.4, 156.9, 153.8, 151.8 (dd, J = 13.1, 254.4 Hz), 150.2

(dd, J = 13.3, 247.3 Hz), 139.1, 127.6-127.5 (m), 125.5 (dd, J = 3.6, 6.0 Hz), 118.2 (d, J = 19.1 Hz), 117.6 (d, J = 18.0 Hz), 106.1, 99.5, 94.2, 71.6, 37.5, 34.4, 33.3, 26.6, 26.3.

[0287] FAB-MS (m/z) found 417.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{23}H_{22}F_2O_5$ 416.1.

[0289] **<실시예 27> 3-(사이클로펜틸메톡시)-2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 28) 합성**

[0290] 상기 방법 B에서 알킬화제로 사이클로펜틸메탄올을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(Hexanes:아세톤=6:1)로 정제한 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0291] 수율: 34 %

[0292] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.61 (s, 1H), 8.09 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.2 Hz, 1H), 8.02-7.99 (m, 1H), 7.54 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.5 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.98 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.30 (t qu, J = 7.5, 7.6 Hz, 1H), 1.77-1.70 (m, 2H), 1.61-1.51 (m, 4H), 1.36-1.29 (m, 2H).

[0293] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.6, 165.2, 163.2, 157.8, 153.9, 152.2 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 150.7 (dd, J = 12.0, 244.8 Hz), 139.6, 129.0-128.9 (m), 126.8 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 118.8 (d, J = 20.4 Hz), 118.5 (d, J = 18.0 Hz), 106.1, 99.6, 94.7, 77.5, 40.6, 30.0, 26.1.

[0294] FAB-MS (m/z) found 389.3 $[M + H]^+$, calcd for $C_{21}H_{18}F_2O_5$ 388.1.

[0296] **<실시예 28> 3-(3-사이클로펜틸프로폭시)-2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-4H-크로멘-4-온 (화합물 29) 합성**

[0297] 상기 방법 B에서 알킬화제로 3-사이클로펜틸-1-프로판올을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(Hexanes:EtOAc=4:1)로 정제한 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0298] 수율: 55 %

[0299] ^{1}H NMR (500 MHz, 아세톤-d6): δ 12.61 (s, 1H), 8.10 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.2 Hz, 1H), 8.02-7.99 (m, 1H), 7.54 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.4 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.12 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.78-1.68 (m, 5H), 1.62-1.55 (m, 2H), 1.53-1.45 (m, 2H), 1.40-1.36 (m, 2H), 1.09-1.02 (m, 2H).

[0300] ^{13}C NMR (125 MHz, 아세톤-d6): δ 179.6, 165.2, 163.2, 157.8, 154.0, 152.2 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 150.7 (dd, J = 13.3, 244.9 Hz), 139.6, 129.0 (dd, J = 3.5, 6.0 Hz), 126.8 (dd, J = 3.6, 6.0 Hz), 118.8 (d, J = 20.4 Hz), 118.5 (d, J = 16.9 Hz), 106.1, 99.6, 94.7, 73.8, 40.6, 33.2, 33.1, 29.9, 25.7.

[0301] FAB-MS (m/z): found 417.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{23}H_{22}F_2O_5$ 416.1.

[0303] **<실시예 29> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-[2-(테트라하이드로-2H-피란-4-일)에톡시]-4H-크로멘-4-온 (화합물 30) 합성**

[0304] 상기 방법 B에서 알킬화제로 2-(테트라하이드로-2H-피란-4-일)에탄올을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(Hexanes:아세톤=3:1)로 정제한 후, 연노란색 고체를 수득하였다.

[0305] 수율: 56 %

[0306] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.46 (s, 1H), 8.04 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.0 Hz, 1H), 7.89-7.86 (m, 1H), 7.66 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.6 Hz, 1H), 6.45 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.21 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.03 (t, J

= 6.0 Hz, 2H), 3.80-3.77 (m, 2H), 3.16 (dt, J = 2.0, 11.9 Hz, 2H), 1.61-1.50 (m, 1H), 1.53 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 1.49-1.46 (m, 2H), 1.13-1.05 (m, 2H).

[0307] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 178.1, 164.6, 161.3, 156.5, 153.1, 150.7 (dd, J = 12.0, 249.5 Hz), 149.2 (dd, J = 13.1, 244.8 Hz), 138.0, 127.6 (dd, J = 3.6, 7.3 Hz), 126.1-126.0 (m), 118.0 (d, J = 18.0 Hz), 117.8 (d, J = 19.3 Hz), 104.5, 98.8, 94.0, 69.6, 67.0, 36.3, 32.4, 31.1.

[0308] FAB-MS (m/z): found 419.3 $[M+H]^+$, calcd for $C_{22}H_{20}F_2O_6$ 418.1.

[0310] **<실시예 30> 2-(3,4-디플루오로페닐)-5,7-디하이드록시-3-[2-(피페리딘-4-일)에톡시]-4H-크로멘-4-온 (화합물 31) 합성**

[0311] 상기 방법 B에서 알킬화제로 1-Boc-4-(2-하이드록시에틸)피페리딘을 이용하여 반응을 진행하였다. 농축액을 diethylether(Et2O)로 세척한 후, 노란색 고체를 수득하였다.

[0312] 수율: 51 %

[0313] ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6): δ 12.46 (s, 1H), 11.13 (s, 1H), 8.90-8.88 (m, 1H), 8.68-8.62 (m, 1H), 8.07 (ddd, J = 2.2, 7.9, 12.0 Hz, 1H), 7.92-7.89 (m, 1H), 7.68 (ddd, J = 8.6, 8.6, 10.5 Hz, 1H), 6.52 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.26 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 4.03 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.23-3.21 (m, 2H), 2.79-2.72 (m, 2H), 1.79-1.76 (m, 2H), 1.73-1.66 (m, 1H), 1.58 (td, J = 6.3, 6.5 Hz, 2H), 1.34-1.26 (m, 2H).

[0314] ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 178.0, 164.7, 161.2, 156.5, 153.0, 150.7 (dd, J = 12.0, 250.8 Hz), 149.2 (dd, J = 13.3, 244.8 Hz), 138.0, 127.6-127.5 (m), 126.1-126.0 (m), 118.1 (d, J = 18.0 Hz), 117.7 (d, J = 19.1 Hz), 104.4, 98.9, 94.1, 69.7, 43.0, 35.5, 30.0, 28.1.

[0315] FAB-MS (m/z): found 418.4 $[M+H]^+$, calcd for $C_{22}H_{21}F_2NO_5$ 417.1.

[0317] **<실시예 31> 에티듐 브로마이드(Ethidium bromide; EtBr) 배출 활성**

[0318] 31-1. 약물배출펌프 억제에 의한 EtBr 축적 증가 활성

[0319] 에티듐 브로마이드(EtBr)은 배출에 취약한 형광 탐침으로, 박테리아 세포 내에 축적되어 세포질 성분과 결합하여 형광을 발산한다. 14종의 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) 임상균주를 대상으로, 화합물 3 내지 31, 대조군(화합물 2) 및 양성대조군인 카르보닐 사이안화물 3-클로로페닐하이드라존(CCCP)을 이용하여 약물 배출 펌프에 의해 배출된 EtBr 축적 정도를 측정하였다.

[0320] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 화합물이 처리되지 않은 음성대조군에서는 약물배출펌프에 의한 EtBr의 신속한 배출로 인하여 형광이 관찰되지 않았으나, 화합물 4, 6, 23, 24, 26 및 27에서 EtBr 축적에 의한 형광이 증가하였으며, 특히 화합물 23의 농도가 증가할수록 EtBr 축적에 의한 형광이 증가(EC_{50}=1.2 mg/L)하는 것을 확인하였다.

[0322] 31-2. EtBr 축적 억제 활성

[0323] EtBr의 축적은 세포 내로의 유입과 배출 사이의 균형을 반영하므로, EtBr을 박테리아 세포에 적재한 후, 0.25-32 mg/L 농도의 화합물 23에 대한 형광 세기를 모니터링하여 배출 펌프 활성 억제 정도를 측정하였다.

[0324] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, DMSO를 처리한 대조군 EC-001blaNDM 균주 및 화합물 23을 0.25, 0.5, 1 및 2 mg/L 농도로 처리한 CRE 균주에서는 EtBr 형광이 시간에 따라 감소했으나, 화합물 23을 4 mg/L 이상의 농도로 처리한 CRE 균주에서는 형광이 일정(EC_{50}=2.7 mg/L)하게 나타나는 것을 확인하였다.

[0326] **<실시예 32> 카바페넴 분해 효소(Carbapenemase) 억제 활성**

[0327] 32-1. metallo-β-lactamase(MBL) 다중 타겟 형광 검출

[0328] 카바페넴 분해 효소인 KPC-2 (calss A; LifeSpan Biosciences, Inc. (LSBio; 제품 코드 LS-G26598)), OXA-48 (class C, residues 23265; Bioneer, Inc. (서울, 한국)), VIM-2 (residues 27266; Bioneer, Inc. (서울, 한국)) 및 NDM-1 (class B; RayBiotech, Inc. (제품 코드 230-00554))는 상업적으로 구입하거나, 기존에 공지된 발현 및 정제법을 준용하여 수득하였으며, 형광 기질로서 니트로세핀 또는 이미페넴을 이용하여 카바페넴 분해 효소 KPC-2, OXA-48, VIM-2 및 NDM-1의 활성을 모니터링하였다.

[0329] 구체적으로, 0.1 내지 70 μM 농도의 화합물 3 내지 31의 PBS 용액 100 μL 및 희석된 효소 저장액 100 μL를 혼합하고, 96웰 플레이트에 최종 농도 2%의 DMSO를 포함한 혼합물을 처리한 후 37 ℃에서 20분 동안 배양하였다. 각 웰 플레이트에 형광 기질로서 KPC-2, OXA-48 및 VIM-2에 대한 니트로세핀 70 μM, 및 NDM-1에 대한 이미페넴 100 μM을 처리하고, Cytation 5 이미징 멀티모드 리더기(BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA)를 이용하여 파장 486 nm (니트로세핀) 또는 300 nm (이미페넴)에서 15분 동안 기질 분해를 모니터링하였다. 억제제가 없는 상태의 분해율(100%)과 비교하여, 각 농도에서의 효소 억제 비율을 산출하였으며, 시그모이드 용량-반응 곡선으로부터 화합물 3 내지 31의 IC_{50} 값을 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Boston, USA)를 이용하여 도출하였다.

표 1

[0330] Inhibitory activity (IC_{50}, mg/L) of the title compounds against various carbapenemases

Cmpd	Carbapenemases				Cmpd	Carbapenemases			
	KPC-2	OXA-48	VIM-2	NDM-1		KPC-2	OXA-48	VIM-2	NDM-1
2	>50	>100	>100	>50	17	>50	>100	>100	>50
3	22.2	21.2	20.3	24.6	18	>50	>100	>100	>50
4	33.2	28.7	19.3	15.7	19	>50	>100	>100	>50
5	>50	42.7	>100	>50	20	>50	>100	>100	>50
6	>50	37.8	>100	14.1	21	>50	>100	>100	>50
7	21.5	6.0	6.0	16.7	22	>50	39.8	>100	>50
8	>50	>100	>100	>50	23	17.3	13.5	11.9	11.4
9	>50	>100	>100	>50	24	39.4	19.1	42.1	>50
10	>50	>100	>100	>50	25	22.8	11.4	13.9	22.7
11	>50	>100	>100	>50	26	11.5	8.0	9.0	15.9
12	>50	>100	>100	>50	27	11.3	5.5	4.4	10.1
13	>50	>100	>100	>50	28	40.8	9.2	7.8	21.8
14	>50	>100	>100	>50	29	28.3	5.5	5.1	26.7
15	>50	>100	>100	>50	30	>50	35.9	>100	>50
16	>50	>100	>100	>50	31	>50	>100	>100	>50

[0331] 그 결과, 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 화합물 3, 4, 7, 23 및 25 내지 29에서 KPC, OXA-48, VIM-2 및 NDM-1 모두에 대하여 카바페넴 분해 효소의 억제 활성을 나타냈으며, 화합물 5, 6 및 24에서도 일부 억제 활성을 나타낸 것을 확인하였다. 한편, 질소나 산소가 포함된 치환기를 가진 화합물 8-22, 30 및 31에서는 카바페넴 분해 효소 억제 활성이 나타나지 않은 바, 표적 효소에서 높은 친수성을 가진 결합 부위가 존재하는 것을 확인할 수 있다.

[0333] 32-2. NDM-1 억제 활성

[0334] NDM-1의 Zn^{2+} 결합 부위는 트립토판(Trp93)을 포함한 소수성 잔기로 둘러싸여 있으며, 이는 내재 형광을 발산한다. 트립토판 형광은 Trp93이 소수성 활성 부위 잔기와 상호작용하는 데 의존하므로, 억제제가 결합하여 활성 부위에서 일어나는 구조적 변화는 트립토판의 형광을 감소시킨다.

[0335] 구체적으로, 2 μM 농도의 NDM-1 HEPES 용액(50 mM, pH 7.5) 100 μL에 0, 1, 5, 10, 20 및 50 μM 농도의 화합물 23 또는 화합물 27을 각각 처리하고 37 ℃에서 20분 동안 배양하였다. 형광 방출 스펙트럼은 Cytation 5 이미징 멀티모드 리더기(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 파장 300 내지 400 nm

(Em: 280 nm)에서 트립토판의 형광 변화를 측정하였다.

[0336] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 화합물 23 또는 27의 농도를 10 μM 이상 처리하였을 때 형광 세기가 감소하였으며, 농도가 증가할수록 형광 세기가 감소하는 것을 확인하였다. 따라서, 화합물 23 및 27은 카바페넴 분해 효소 NDM-1의 활성 부위에 결합하는 것을 확인할 수 있다.

[0338] **<실시예 33> 분자 도킹 연구**

[0339] 본 발명의 화합물 23을 이용하여, 카바페넴 분해 효소에 결합하는 특징적인 결합 모드를 분석하기 위하여 분자 도킹 연구를 실시하였다.

[0340] 구체적으로, AcrB, NDM-1, 및 KPC-2의 3차원 구조는 각각 단백질 데이터 뱅크(PDB ID: 3W9H, 6V1M, 6V1J)에서 얻었으며(Nakashima et al. 2013; Hecker et al. 2013), Vega ZZ를 사용하여 모델링하였다(Pedretti et al. 2021). UCSF Chimera의 AutoDock Vina 모듈(Pettersen et al. 2004)을 이용하여, 화합물 23을 대장균의 3부 구성 배출 펌프인 AcrB 단백질 및 β-락타마제(NDM-1 및 KPC-2)에 도킹하였다. 그리드 간격은 목표 단백질에 대하여 1.0 A로 설정하고, 그리드 맵의 크기는 AcrB (X 37.15, Y 38.96, Z 37.70), NDM-1 (X 32.91, Y 15.25, Z 14.44), 및 KPC-2 (X 18.97, Y 36.13, Z 19.33)로 설정하였다. 그리드 박스의 중심은 AcrB (X 53.94, Y 27.06, Z 45.70), NDM-1 (X 16.76, Y 12.66, Z 3.87), 및 KPC-2 (X 22.25, Y 15.37, Z 8.33)로 설정하였다. 라마르키안 유전자 알고리즘(Lamarckian genetic algorithm)의 기본 매개변수를 이용하여 도킹을 수행하였고, ChimeraX의 인터랙티브 ViewDockX 도구를 이용하여 리간드 및 목표 단백질 간의 결합 모드를 분석하였다.

[0341] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, AcrB 구조의 경우, 화합물 23은 페닐알라닌 소수성 트랩에 의해 인식되었고, 아로마틱 고리는 Phe178, Phe610 및 Phe628과 밀접하게 접촉하여 피리도피리미딘 유도체의 결합 모드와 일치하였으며, 화합물 23의 말단 tert-butyl 그룹은 Phe178, Val612, Phe615, Gln176로 둘러싸인 채널과 같은 구조로 도킹되는 것을 확인하였다.

[0342] 또한, NDM-1 및 KPC-2의 경우, 화합물 23의 4-CO 및 5-OH 그룹에 의하여 NDM-1의 결합 부위에서 QPX7728과 동일한 방식으로 결합하였으며, 화합물 23의 B-링(3,4-디플루오로페닐) 및 3-O 치환기는 NDM-1에 대하여 His250 및 Lys211, KPC-2에 대하여 Trp105 및 Thr216과 추가적인 소수성 결합을 형성한 것을 확인하였다.

[0344] **<실시예 34> 항균 활성 분석**

[0345] 34-1. 카바페넴계 항생제 메로페넴(meropenem; MEM) 항균 활성 증강

[0346] 본 발명의 화합물 23, 27 및 대조군으로서 화합물 2, 25의 항생제 활성은 브로스 미세희석 체커보드 시너지 분석법을 이용하여 평가하였으며, 상기 각 화합물을 카바페넴계 항생제 MEM과 병용하여, NDM-1 또는 KPC 생성 카바페넴 내성 대장균(*E. coli*) 및 클렙시엘라 폐렴균(*K. pneumoniae*) 균주의 최소 억제 농도(MIC)를 측정하였다.

[0347] 구체적으로, 96웰 마이크로플레이트에 CAMHB 100 μL로 준비된 박테리아 접종액(5×10^5 CFU/mL)에 화합물 3 내지 31 및 MEM의 농도를 각각 0.06 내지 512 μg/mL로 처리하여 37 ℃에서 18 내지 24시간 배양한 후, 최소 억제 농도(MIC)를 육안으로 확인하였다. MICMEM (화합물과 조합 시), MICMEM (MEM 단독) + MICtitle compounds (MEM과 조합 시), 또는 MIC(title compound 단독)의 분석은 분수 억제 농도 지수(FICI)를 이용하였으며, FICI 값에 따라 조합의 시너지적(FICIF ≤ 0.5), 가산적(0.5 < FICI ≤ 1.0), 무관심적(1.0 < FICI ≤ 4.0), 또는 길항적(FICI > 4.0)으로 표시하였다.

표 2

Antibiotic-potentiating activity of single-target inhibitors (**2** and **25**) and multitarget MDR inhibitors (**23** and **27**) against 14 carbapenemase-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* clinical isolates.

Strain no.	MEM (MIC)[a]	MEM+ARMA (Antimicrobial resistance modulating agents)							
		Single-target inhibitors				Multitarget inhibitors			
		MEM+2		MEM+25		MEM+23		MEM+27	
		MIC	FICI[b]	MIC	FICI	MIC[c]	FICI	MIC	FICI
EC-001, bla_{NDM}	16	–[d]	1.00 (I)	–	1.00 (I)	4 (32)	0.31 (S)	4 (8)	0.36 (S)
EC-012, bla_{NDM}	128	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	32 (32)	0.31 (S)	16 (32)	0.25 (S)
EC-013, bla_{NDM}	32	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	8 (32)	0.31 (S)	8 (32)	0.31 (S)
EC-014, bla_{NDM}	32	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	8 (32)	0.31 (S)	8 (32)	0.31 (S)
EC-033, bla_{NDM}	64	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	32 (16)	0.53 (A)	32 (2)	0.50 (A)
EC-040, bla_{NDM}	256	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	64 (32)	0.31 (S)	64 (16)	0.28 (S)
KP-001, bla_{NDM}	16	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	8 (4)	0.51 (A)
KP-018, bla_{NDM}	256	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)
KP-020, bla_{NDM}	128	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	32 (32)	0.31 (S)	16 (16)	0.16 (S)
EC-010, bla_{KPC}	16	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	4 (32)	0.31 (S)	4 (32)	0.31 (S)
EC-022, bla_{KPC}	16	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	8 (16)	0.53 (A)	4 (32)	0.31 (S)
EC-023, bla_{KPC}	16	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	4 (32)	0.31 (S)	4 (32)	0.31 (S)
KP-009, bla_{KPC}	256	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)
KP-022, bla_{KPC}	64	–	1.00 (I)	–	1.00 (I)	32 (16)	0.53 (A)	32 (2)	0.50 (A)

[a]Minimum Inhibitory Concentration (mg/L); [b]Fractional Inhibitory Concentration Index = $MIC_{MEM(combination)}/MIC_{MEM(alone)} + MIC_{ARMA(combination)}/MIC_{ARMA(alone)}$, where $MIC_{ARMA(alone)} > 512$ mg/L. (A) additive, (S) synergy, (I) indifference; [c]Numbers in parentheses indicate amounts of ARMAs (mg/L) required to reduce MIC of MEM upon combination; [d]No decrease in MEM MIC was observed even at concentrations of ARMA higher than 256 mg/L.

[0348]

[0349] 그 결과, 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 14종의 임상균주(strain)는 모두 MEM에 대하여 강한 내성을 나타내었고, 단일 타겟 억제제 화합물 2 또는 화합물 25는 MEM의 항생제 활성을 회복시키지 못했으나, 다중 타겟 억제제 화합물 23 또는 화합물 27은 MEM의 항균 내성을 회복시켰으며, 각각 14개의 균주 중 8-9개에서 MEM의 최소 억제 농도를 4배 내지 64배 감소시키는 것을 확인하였다.

[0351] 34-2. 살균 활성

[0352] MEM 128 mg/L 및 화합물 23 32 mg/L를 단독 사용 또는 병용하여, E. coli-012 및 blaNDM-1에 대하여 24시간 배양 기간 동안 time-kill 곡선 실험을 진행하였다.

[0353] 구체적으로, EC-012blaNDM의 박테리아 현탁액(106 CFU/mL)은 지수 성장이 진행 중인 세포에서 준비하였다. 박테리아 현탁액을 원추형 튜브에 넣고, 메로페넴(MEM), 화합물 23, 또는 MEM 및 화합물 23의 혼합물을 처리하여 37 ℃에서 배양하였다. 0, 1, 2, 4, 8 및 24시간 경과 후에 각각 50 μL 취하여 0.85% NaCl 용액에서 연속 희석한 후 BAP에 배양하여 박테리아를 계산하였다.

[0354] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 1/8 MIC 또는 1/4 MIC 단독으로 사용할 경우, 초기 박테리아 수가 감소한 후 8시간 후 다시 증가하였으나, 1/8 MIC 또는 1/4 MIC를 화합물 23과 병용할 경우, *E. coli*-012 및 blaNDM-1에 대하여 24시간 동안 3 log10 CFU 이상 감소하는 것을 확인하였다.

[0356] 34-3. 항생제 시너지 효과의 메커니즘 분석

[0357] 항생제 및 항생제 강화제가 시너지 효과를 보이는 경우는 외막 투과성 증가로 인한 오프타겟 효과가 원인으로 지목된다(Opperman and Nguyen, 2015). 다중 타겟 억제제인 화합물 23의 외막 투과성 증가 효과를 확인하기 위하여, 화합물 23 또는 양성 대조군인 폴리믹신 B(polymyxin B)을 2, 4, 8, 16, 32 또는 64 μg/L로 처리한 후, NDM-1을 생성하는 CRE 균주인 EC-012 및 blaNDM에서 N-페닐-1-나프틸아민(NPN)의 형광 세기를 측정하였다. NPN이 주변 세포질로 흡수되어 NPN 형광이 증가하면 외막 투과성이 있음을 나타낸다.

[0358] 구체적으로, EC-012blaNDM 균주는 CAMHB에서 배양하고 세척하여 버퍼 용액(5 mM HEPES, 5 mM 포도당, pH 7.4)

으로 재현탁한 후, 96웰 마이크로플레이트의 HEPES 152 μL에 박테리아 현탁액 107 CFU/mL를 분주하고, NPN(50 μM HEPES에서) 40 μL 및 화합물 23을 2, 4, 8, 16, 32 또는 64 μg/mL로 처리하였다. Cytation 5 이미징 멀티모드 리더기(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용하여 파장 420 nm (Em: 350 nm)에서 형광을 측정하였다.

[0359] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 화합물 23은 대조군과 비교하여 NPN 형광 세기의 변화가 나타나지 않았으며, 외막 투과제를 사용한 polymyxin B로 처리한 박테리아 세포에서는 형광이 유의미하게 증가하였다.

[0360] 따라서, 다중 타겟 억제제 화합물 23 및 항생제의 시너지 효과는 외막 투과성 증가와 관련된 오프타겟 효과가 아닌 것을 확인할 수 있다.

[0362] **<실시예 35> in vivo 항균 활성 분석**

[0363] 본 발명의 화합물 23 및 MEM을 병용하여, NDM을 생성하는 *E. coli*-033 및 blaNDM에 감염된 마우스의 항균 활성 효능을 평가하였다. 동물 실험은 KRIBB의 기관 동물 관리 및 사용 위원회(approval code: KRIBB-AEC23204)의 승인을 받았다.

[0364] 구체적으로, 6주령의 암컷 C57BL/6J 마우스(체중 20-22 g)는 4.0×10^7 CFU/마우스의 *E. coli*-033, blaNDM 균주 및 5% 돼지 뮤신을 혼합하여 감염시키고, 1시간 후 MEM(25 mg/kg/day) 및 화합물 23 (10 mg/kg/day, 20 mg/kg/day, 40 mg/kg/day)으로 5일 동안 치료하였으며, 각 치료군에는 4마리씩 배치하였다.

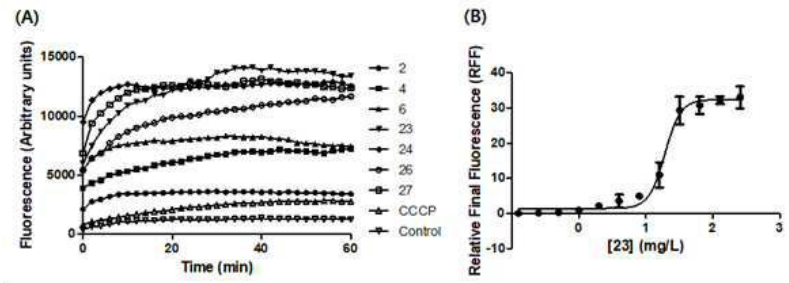
[0365] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 대조군인 항생제 비치료 또는 MEM 단독 사용한 마우스는 2일 내에 모두 사망했으나, 화합물 23 (10 mg/kg 및 40 mg/kg) 및 MEM을 병용하여 치료한 마우스는 5일 후 25%가 생존하는 것을 확인하였다.

[0367] 따라서, 본 발명의 퀘르세틴 유도체 화합물은 3',4'-디플루오로퀘르세틴의 3-O 위치에 다양한 치환기를 도입하여 28종의 신규 화합물을 제조하였으며, 화합물의 약물배출펌프 저해능 개선 활성 및 카바페넴 분해 효소 억제 활성 효과를 확인하고, 기존 카바페넴계 항생제 메로페넴(meropenem; MEM)과 병용하여 카바페넴 내성 장내세균(CRE)에 대한 항생제의 항균 활성이 회복되는 효과를 확인하였다.

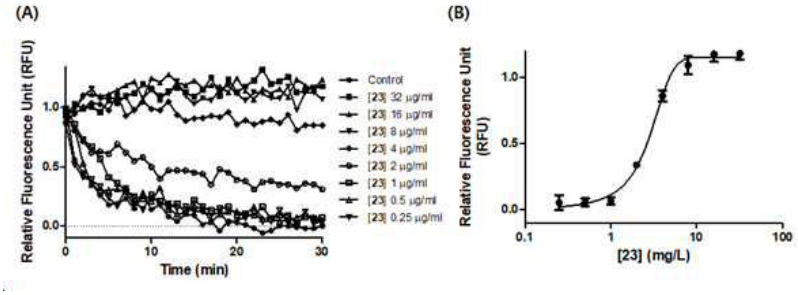
[0369] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

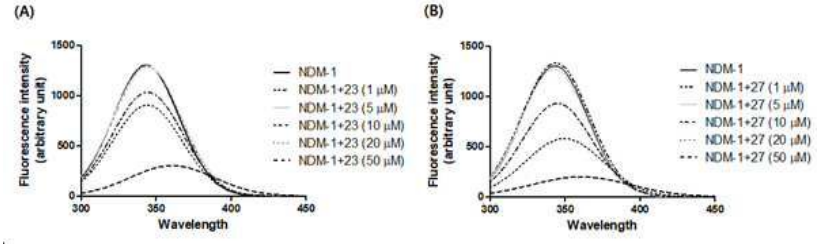
도면1



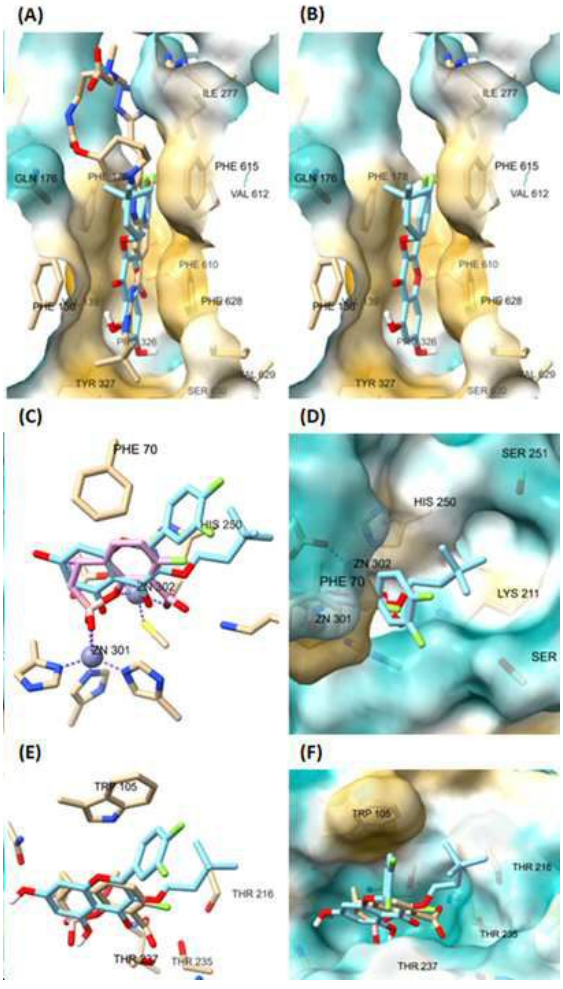
도면2


(A)
Relative Fluorescence Unit (RFU)
Time (min)
Control
[23] 32 μg/ml
[23] 16 μg/ml
[23] 8 μg/ml
[23] 4 μg/ml
[23] 2 μg/ml
[23] 1 μg/ml
[23] 0.5 μg/ml
[23] 0.25 μg/ml
(B)
Relative Fluorescence Unit (RFU)
[23] (mg/L)

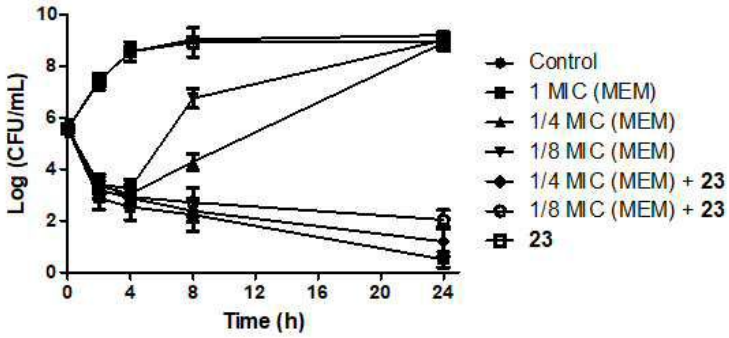
도면3


(A)
Fluorescence intensity (arbitrary unit)
Wavelength
NDM-1
NDM-1+23 (1 μM)
NDM-1+23 (5 μM)
NDM-1+23 (10 μM)
NDM-1+23 (20 μM)
NDM-1+23 (50 μM)
(B)
Fluorescence intensity (arbitrary unit)
Wavelength
NDM-1
NDM-1+27 (1 μM)
NDM-1+27 (5 μM)
NDM-1+27 (10 μM)
NDM-1+27 (20 μM)
NDM-1+27 (50 μM)

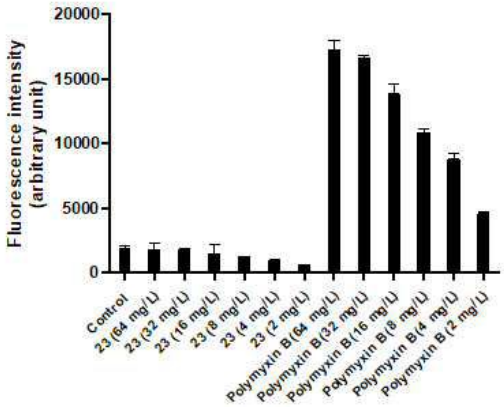
도면4


(A)
ILE 277
PHE 615
VAL 612
GLN 176
PHE 610
PHE 628
TYR 327
(B)
ILE 277
PHE 615
VAL 612
GLN 176
PHE 610
PHE 628
TYR 327
(C)
PHE 70
HIS 250
ZN 302
ZN 301
(D)
SER 251
HIS 250
ZN 302
PHE 70
LYS 211
ZN 301
SER
(E)
TRP 105
THR 216
THR 235
(F)
TRP 105
THR 216
THR 235
THR 237

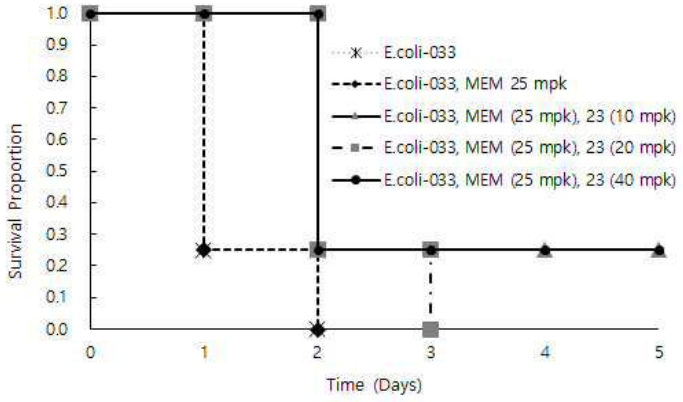
도면5


Log (CFU/mL)
Time (h)
Control
1 MIC (MEM)
1/4 MIC (MEM)
1/8 MIC (MEM)
1/4 MIC (MEM) + 23
1/8 MIC (MEM) + 23
23

도면6


Fluorescence intensity (arbitrary unit)
Control
23 (64 mg/L)
23 (32 mg/L)
23 (16 mg/L)
23 (8 mg/L)
23 (4 mg/L)
23 (2 mg/L)
Polymyxin B(64 mg/L)
Polymyxin B(32 mg/L)
Polymyxin B(16 mg/L)
Polymyxin B(8 mg/L)
Polymyxin B(4 mg/L)
Polymyxin B(2 mg/L)

도면7


Survival Proportion
Time (Days)
E.coli-033
E.coli-033, MEM 25 mpk
E.coli-033, MEM (25 mpk), 23 (10 mpk)
E.coli-033, MEM (25 mpk), 23 (20 mpk)
E.coli-033, MEM (25 mpk), 23 (40 mpk)