(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0041662
(43) 공개일자 2021년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 307/83 (2006.01) *A61K 31/343* (2006.01)
A61L 2/232 (2006.01) *A61L 27/28* (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01) *A61L 31/08* (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
C09D 161/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 307/83 (2013.01)
A61K 31/343 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0123811
(22) 출원일자 2019년10월07일
심사청구일자 2019년10월07일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
동국대학교 산학협력단
서울특별시 중구 필동로1길 30 내 (필동3가,동국대학교)
(72) 발명자
송재준
서울특별시 서초구 신반포로 9, 73동 504호(반포본동, 주공아파트)
최원준
서울특별시 종로구 세검정로7나길 42-4, 나동 102호(신영동, 완성빌라)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 8 항

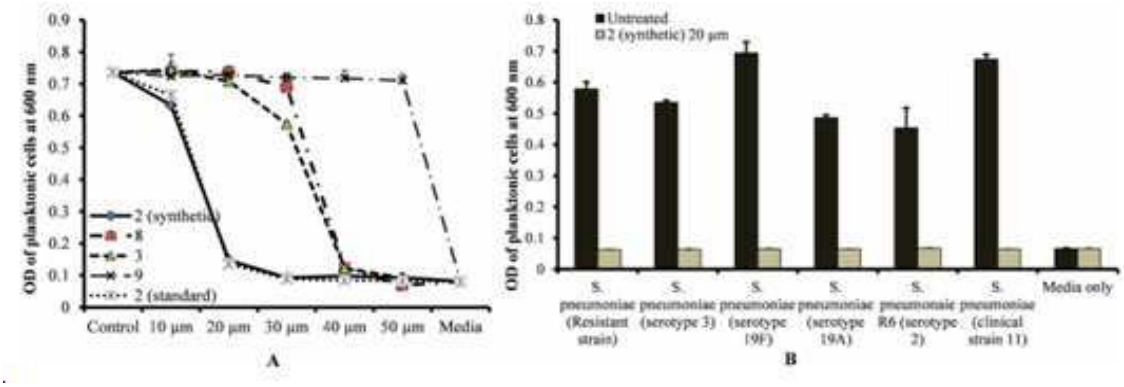
(54) 발명의 명칭 **비니페린 유도체 화합물, 이의 제조 방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 하기 [화학식 1] 내지 [화학식 4]로 표시되는 비니페린 유도체 화합물, 이의 제조 방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료용 조성물, 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항균용 조성물 및 폐렴균성 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물

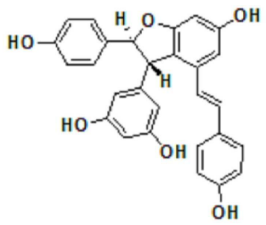
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1

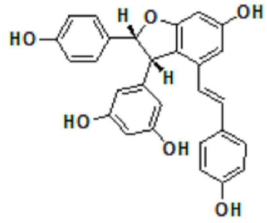


에 관한 것이다.

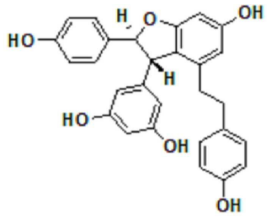
[화학식 1]



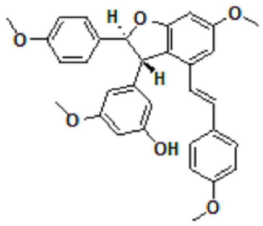
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



본 발명의 약학적 조성물, 항균용 조성물 및 코팅용 조성물은 우수한 항균 효과를 보유하며, 특히, 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항균 및 항생물질 활성 작용효과를 갖는다.

또한, 폐렴균성 바이오필름 형성 억제 및 이미 형성된 바이오필름 제거에 탁월한 효능을 나타내는 바, 바이오필름에 의해서 유발되는 각종 감염증의 예방 또는 치료, 및 각종 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물 등에 형성되는 바이오필름을 억제하기 위한 코팅용 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61L 2/232 (2013.01)
A61L 27/28 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 31/08 (2013.01)
A61L 31/16 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
C09D 161/04 (2013.01)
A61L 2202/21 (2013.01)
A61L 2202/24 (2013.01)

(72) 발명자
무케시, 쿠마르 야다브
서울특별시 구로구 구로동로42길 59-19, 203호(구로동)

카라바사파, 메일러
경기도 고양시 일산동구 동국로 32, 약학관 620호(식사동, 동국대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345296244
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	Nrf2 활성제로서의 감마 뷰티로락톤 계열 천연물 유도체의 합성과 항산화 활성 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	동국대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

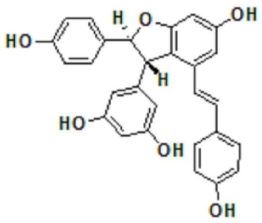
청구항 1

하기 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 및 [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 제조 방법으로서,

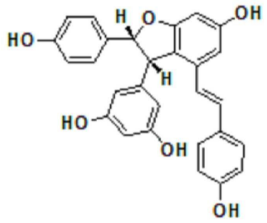
레스베라트롤 용액에 염화 루테늄(III)을 첨가한 후 아세틸화하여 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate)를 수득하는 단계; 및

상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트 혼합 용액에 수산화칼륨(KOH)을 첨가하여 교반하는 단계; 를 포함하는, 제조 방법.

[화학식 1]



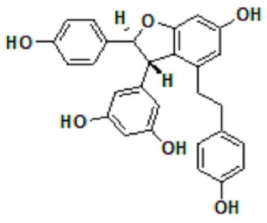
[화학식 2]



청구항 2

팔라듐/탄소(Pd/C) 촉매를 이용하여 제1항에 기재된 방법으로 제조된 (±)-ε-비니페린을 수소화 반응시키는 단계를 포함하는, 하기 [화학식3]으로 표시되는 화합물의 제조 방법.

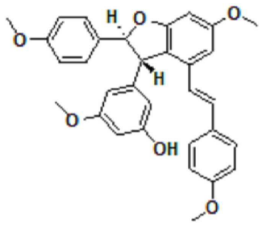
[화학식 3]



청구항 3

제1항에 기재된 방법으로 제조된 (±)-ε-비니페린에 요오드화메틸(MeI) 및 탄산칼륨(K_2CO_3)을 첨가하여 교반하는 단계를 포함하는, 하기의 [화학식4]로 표시되는 화합물의 제조 방법.

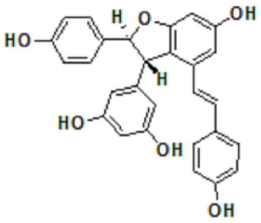
[화학식 4]



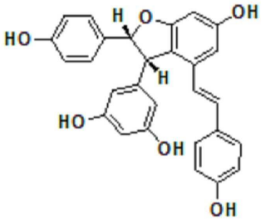
청구항 4

하기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

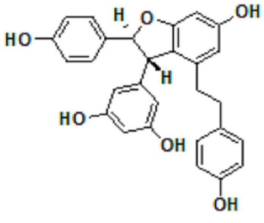
[화학식 1]



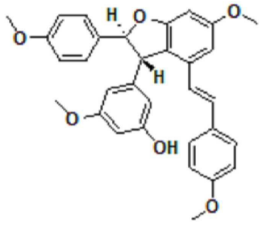
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



청구항 5

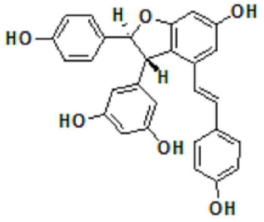
제4항에 있어서,

상기 바이오 필름은 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 의해 형성되는, 약학적 조성물.

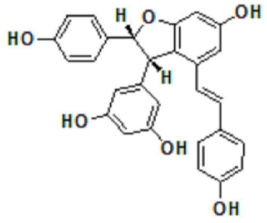
청구항 6

하기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항균용 조성물.

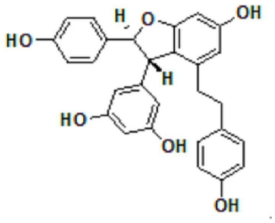
[화학식 1]



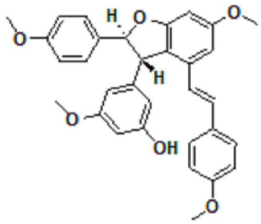
[화학식 2]



[화학식 3]



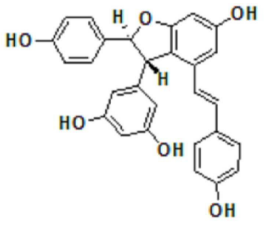
[화학식 4]



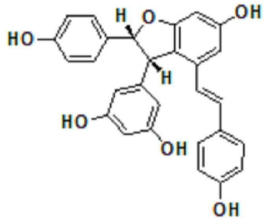
청구항 7

하기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물.

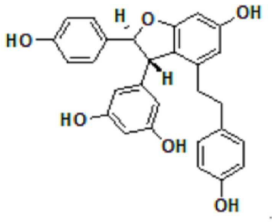
[화학식 1]



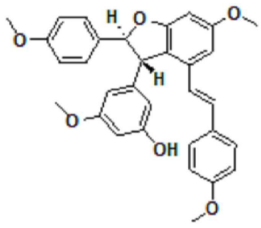
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조성물은 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물에 코팅되는 것인, 코팅용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비니페린 유도체 화합물, 이의 제조 방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료용 조성물, 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항균용 조성물 및 폐렴균성 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 스트렙토코커스 뉴모니아 (Streptococcus pneumoniae, pneumococci)는 어린이 및 노인에게서 폐렴, 뇌수막염,

균혈증 (bacteremia), 및 중이염 (otitis media, OM)을 발병시키는 주된 원인이다 (Ispahani et al., 2004; Kadioglu, 2008). 폐렴균의 군락형성 및 질병은 종종 바이오필름의 형성과 관련이 있다 (Hall-Stoodley L & et al., 2006). 대부분의 박테리아는 일반적으로 물속에서 플랑크톤 형태 (planktonic form) 로 존재하지만, 영양분의 감소나 항생제의 공격 등으로 생존조건이 열악해지는 경우, 고체의 표면에 붙어서 군락을 형성하는 바이오필름의 형태로 표현형이 변화하게 된다. 따라서, 바이오필름은 세균, 효모, 곰팡이 등 미생물이 특정조건에서 인체 (피부, 구강, 치아 등)나 설비 (배관, 저장탱크 등) 등의 표면에 필름처럼 부착되어 있는 미생물의 집합체라 할 수 있으며, 그 자체가 미생물의 서식처로도 제공되어 균의 서식을 가속화하기도 한다. 이러한 바이오필름의 미생물은 산업계 및 의학계 전반에서 심각한 문제를 일으킬 수 있으므로, 이에 대한 연구가 요구되는 상황이다.

[0003] 착생 박테리아는 숙주 표면 및 서로에 대해서 부착되어 외부 기질 (exopolysaccharide, EPS)에 의해서 덮인 다층 구조를 형성하게 된다 (Costerton et al., 1999; Wolcott Rd, 2008). 즉, 바이오필름의 형성은 박테리아가 당단백으로 이루어진 기질을 세포 주위에 3차원적으로 형성하고, 이것이 주위의 고형물에 부착되는 과정을 통하여 이루어지며, 박테리아는 정족수 감지 (quorum sensing, QS)라는 일련의 과정을 통하여 부족한 영양물질을 기질 내에 가두어 두고 외부의 공격 (항생물질, 저산소)으로부터 자신을 보호할 수 있게 된다. 또한, 바이오필름의 형성으로 인해 박테리아의 생존에 필요한 대사율을 낮춤으로써, 소량의 영양물질로도 생존이 가능하게 되어 열악한 환경에서의 생존가능성이 높아지게 된다. 바이오필름은 실제로 자연계에서는 흔히 볼 수 있는 현상으로, 일정한 유속을 가지고 있는 강에서도 바위의 표면에 박테리아들이 바이오필름의 형태로 서식하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 바이오필름 중의 박테리아는 항생제 및 숙주 방어 시스템에 대해서 증진된 내성을 나타내며, 이는 종종 지속적이며 치료가 어려운 감염증으로 이어진다 (Kania et al., 2008; Vlastarakos et al., 2007). 다양한 연구들에 의해서 폐렴균성 바이오필름이 페니실린, 테트라사이클린, 림파피신, 아목실린, 에리쓰로마이신, 클린다마이신 및 레보플록사신에 대해서 현저하게 높은 내성을 갖는다는 사실이 보고된 바 있다 (del Prado et al., 2010; Garcia-Castillo et al., 2007). Marks 등은 (2012), 마우스의 비인두 조직 (nasopharyngeal tissue) 상에 형성된 폐렴균성 바이오필름이 플랑크톤성 바이오필름에 비해서 젠타마이신 및 페니실린 G에 대해서 더욱 내성을 갖는다는 사실을 보고한 바 있다 (Marks et al., 2012). 따라서, 폐렴균성 바이오필름에 대한 항미생물성 화합물을 개발하기 위해서는, 대안적인 항미생물성 표적을 검색해야 하는 시급한 필요성이 존재한다.

[0005] 특히, 인체의 감염성 질환에 있어서 바이오필름은 임상적으로 많은 문제를 일으키게 된다. 예를 들어, 치아의 표면에 바이오필름의 형태로 박테리아가 존재하여 치석을 형성할 경우에는 충치와 치주질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 구강의 건강 요소와 관련하여 가장 커다란 영향을 끼치는 요소는 치아의 부식 또는 충치, 잇몸 질환 혹은 치주질환, 그리고 불쾌한 입냄새의 발생이라고 할 수 있으며, 그 근본 원인은 구강에 서식하는 병원균들에 의해 형성되는 바이오필름이다. 상기 병원균들은 구강 표면에 부착되지 않은 상태에서는 타액 등의 용액 상태로 존재하다가 양치질이나 음료섭취와 함께 쉽게 제거될 수 있어, 구강에 질환을 일으킬 기회가 매우 적다. 그러나, 상기 병원균들은 효과적인 생존을 위하여 구강 표면에 부착되는 성질이 있어, 바이오필름을 형성하게 된다. 일단 바이오필름이 형성되면, 외부의 물리, 화학적 자극에 대한 방어력이 현저하게 커지기 때문에, 일반적인 물리적 방법으로 제거하기 어려울 뿐만 아니라, 독성이 매우 강한 항균제를 사용하거나 많은 양의 항균제를 사용하여야만 일시적으로 제거될 수 있다. 이러한 바이오 필름은 방치될 경우, 더욱 두터워지고 강해져 치석을 형성하여 수많은 세균의 서식처가 되어 각종 구강 질환을 일으키게 된다. 또한, 중심정맥관이나 이식물의 표면에 바이오필름이 존재하는 경우에는 일반적인 항생제로 제거가 되지 않고 바이오필름에서 박테리아가 떨어져 나오면서 주기적인 발열을 보이는 양상의 세균감염을 나타내게 된다. 또한, 기관절개관, 인공와우 이식기 등 이식물이나 의료용 재료의 표면에서도 바이오필름의 형성이 보고되고 있다. 현재까지 바이오필름에 의한 감염의 치료는 감염원이 되는 이식물을 제거하거나, 바이오필름의 서식처를 물리적으로 제거하는 것이 유일한 해결책으로 알려져 있다.

[0006] 한편, 플라보노이드, 페놀산, 리그난, 스틸벤 등의 천연 폴리페놀은 생물학적 활성을 나타내는 넓은 범위에 존재한다 (Lee et al., 2014). 특히, 항산화물질로 잘 알려진 스틸벤은 화학요법에서 항균 및 항생물 작용을 나타내는 혁신적인 천연 물질이다 (shimizu K., 2000). 스틸벤 단량체인 트랜스-레스베라트롤(Trans-resveratrol)의 항균 활성 작용은 기존에 보고된 바 있고, 항균 메커니즘 또한 연구되어 왔다 (Hwang and Lim, 2015). 래디칼 페놀류의 산화 올리고머화에 의해 만들어지는 올리고스틸벤 또한 다양한 항균 활성을 갖는다 (Sotheeswaran and Pasupathy, 1993; Cichewicz and Kouzi, 2002).

[0007] (±)-ε-비니페린은 트랜스-레스베라트롤의 이량체로, 포도과(Vitaceae), 포도속(grapevines, vitis), 및 사초

속(carex) 식물을 포함하는 많은 식물군에 존재한다. (±)-ε-비니페린은 P450 저해효과 및 항산화작용, 간 보호 및 항균 작용을 갖는다고 알려져 있다 (Fiorentino et al., 2008; Santamaria et al., 2012).

[0008] 또한, (±)-ε-비니페린은 식물 카틀레야(C. pumila) 추출물과 작약(lactiflora) 추출물에 존재한다고 알려져 있으며, 녹농균과 대장균과 같은 그람음성균에 대한 항균 활성을 갖는다는 연구가 보고되었다 (Lee et al., 2014). 그러나, (±)-ε-비니페린의 그람 양성균에 대한 바이오필름 형성 억제 및 항생 물질 활성 효과는 아직까지 알려져 있지 않다. 일부 보고서의 ε-비니페린의 합성방법을 보고한 바에 따르면, 메탄올 용액에 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 및 $Ti(NO_3)$을 첨가하여, 레스베라트롤의 산화환원반응을 일으켜 ε-비니페린을 합성하는 방법을 제공하나, 적은 양의 비니페린을 합성하였다 (Yao et al. 2004; Takaya et al., 2005).

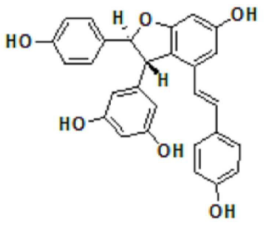
[0009] 이에 본 발명의 발명자는 바이오필름에 의해 유발되는 감염증을 치료하기 위한 물질에 대해 연구하던 중, 하기의 [화학식1] 내지 [화학식4]의 구조를 가지는 비니페린 유도체가 세균의 바이오필름의 형성을 억제시키는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

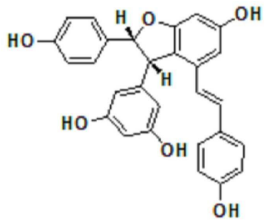
[0010] 본 발명의 목적은, 하기 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 및 [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 제조 방법으로서, 레스베라트롤 용액에 염화 루테늄(III)을 첨가한 후 아세틸화하여 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate)를 수득하는 단계; 및 상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트 혼합 용액에 수산화칼륨(KOH)을 첨가하여 교반하는 단계; 를 포함하는, 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] [화학식 1]



[0012]

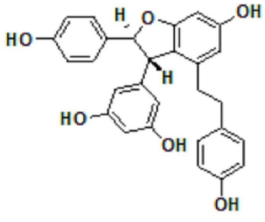
[0013] [화학식 2]



[0014]

[0015] 본 발명의 다른 목적은, 팔라듐/탄소(Pd/C) 촉매를 이용하여 상기 제조 방법으로 제조된 (±)-ε-비니페린을 수소화 반응시키는 단계를 포함하는, 하기 [화학식3]으로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0016] [화학식 3]

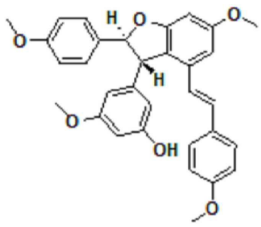


[0017]

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 제조 방법으로 제조된 (±)-ε-비니페린에 요오드화메틸(MeI) 및 탄산칼륨(K_2CO_3)을 첨가하여 교반하는 단계를 포함하는, 하기의 [화학식4]로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공하는 것

이다.

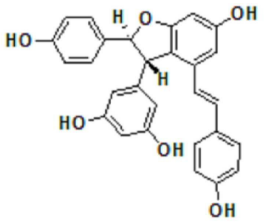
[0019] [화학식 4]



[0020]

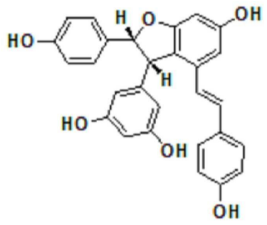
[0021] 본 발명의 또 다른 목적은, 하기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0022] [화학식 1]



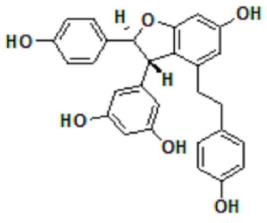
[0023]

[0024] [화학식 2]



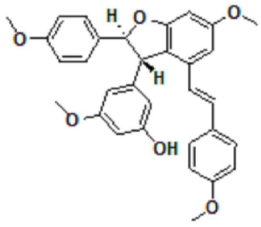
[0025]

[0026] [화학식 3]



[0027]

[0028] [화학식 4]



[0029]

[0030] 본 발명의 또 다른 목적은, [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항균용 조성물을 제공하는 것이다.

[0031] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물을 제공하는 것

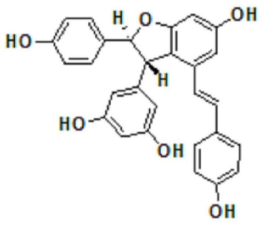
이다.

[0032] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

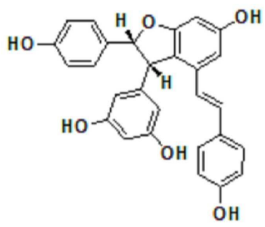
[0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 하기 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 및 [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 제조 방법으로서, 레스베라트롤 용액에 염화 루테늄(III)을 첨가한 후 아세틸화하여 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate)를 수득하는 단계; 및 상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트 혼합 용액에 수산화칼륨(KOH)을 첨가하여 교반하는 단계; 를 포함하는, 제조 방법이 제공된다.

[0034] [화학식 1]



[0035]

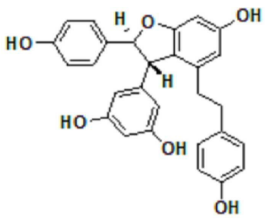
[0036] [화학식 2]



[0037]

[0038] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 제조 방법으로 제조된 팔라듐/탄소(Pd/C) 촉매를 이용하여 (±)-ε-비니페린을 수소화 반응시키는 단계를 포함하는, 하기 [화학식3]으로 표시되는 화합물의 제조 방법이 제공된다.

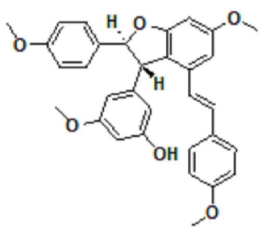
[0039] [화학식 3]



[0040]

[0041] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 제조 방법으로 제조된 (±)-ε-비니페린에 요오드화메틸(MeI) 및 탄산칼륨(K_2CO_3)을 첨가하여 교반하는 단계를 포함하는, 하기의 [화학식4]로 표시되는 화합물의 제조 방법이 제공된다.

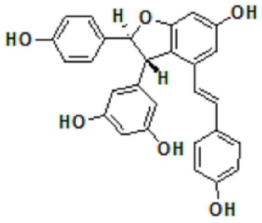
[0042] [화학식 4]



[0043]

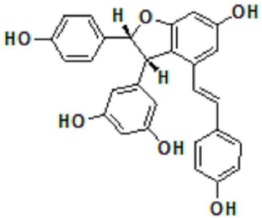
[0045] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 하기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0046] [화학식 1]



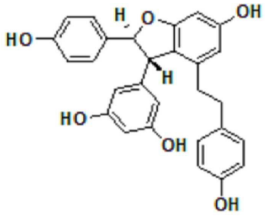
[0047]

[0048] [화학식 2]



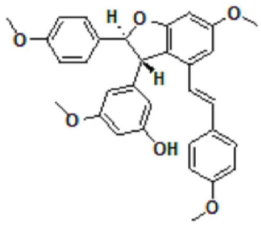
[0049]

[0050] [화학식 3]



[0051]

[0052] [화학식 4]



[0053]

[0054] 일 측에 따르면, 상기 바이오 필름은 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)일 수 있다.

[0055] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항균용 조성물이 제공된다.

[0056] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물이 제공된다.

[0057] 일 측에 따르면, 상기 조성물은 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물에 코팅되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명의 제조 방법을 이용하면, [화학식1] 내지 [화학식4]로 표시되는 비니페린 유도체 화합물을 높은 수율로 합성할 수 있다.

[0059] 본 발명의 비니페린 유도체 화합물은 폐렴균성 바이오필름의 형성을 억제하는 효과가 뛰어나므로, 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 비니페린 유도체 화합물은 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항균효과가 우수하며, 폐렴균성 바이오필름 형성을 억제할 뿐만 아니라 이미 형성된 폐렴균성 바이오필름을 제거할 수 있다.

[0061] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도1은 본 발명의 비니페린 유도체 화합물을 폐렴구균 (S. pneumoniae)에 처리하여 최소억제농도(MIC)를 확인한 것이다. 도1A는 표준 (±)-ε-비니페린 및 [화학식1] 내지 [화학식4]로 표시되는 비니페린을 10㎛내지 50㎛ 농도로 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39 (혈청형2)에 처리하여 최소억제농도(MIC)를 확인한 것이고, 도1B는 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 20㎛ 농도에서 항생제 내성 균주 및 다른 혈청형의 폐렴구균 성장 억제효과를 확인한 것이다.

도2는 0.25×MIC, 0.5×MIC 및 MIC의 비니페린 처리에 따른 이미 형성된 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름 성장 억제 효과를 확인한 것이다. 도2A는 이미 형성된 바이오필름에 0.25×MIC, 0.5×MIC 및 MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 경우의 바이오필름 바이오매스를 크리스탈 바이올렛(CV) 마이크로 플레이트 분석한 값을 나타낸다. 도2B는 이미 형성된 바이오필름에 0.25×MIC, 0.5×MIC 및 MIC의 [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 및 표준 (±)-ε-비니페린을 처리한 경우의 바이오필름 바이오매스를 크리스탈 바이올렛(CV) 마이크로 플레이트 분석한 값을 나타낸다.

도3은 본 발명의 비니페린 유도체 화합물을 이미 형성된 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름에 처리한 경우의 바이오필름 바이오매스를 크리스탈 바이올렛(CV) 마이크로 플레이트 분석한 값을 나타낸다. 도3A는 MIC 및 2×MIC의 [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 및 표준 (±)-ε-비니페린(Standard viniferin)을 처리한 경우의 바이오필름 바이오매스를 크리스탈 바이올렛(CV) 마이크로 플레이트 분석한 값을 나타낸다. 도3B는 MIC 와 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 경우의 바이오필름 cfu 값을 나타낸다. 도3C는 MIC 및 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 경우의 바이오필름 내 생물학적 활성 박테리아를 레사주린(Resazurin) 염색으로 확인한 것이다.

도4는 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름의 형태 변화를 주사전자현미경 분석(SEM)으로 관찰한 것이다. 도4A 및 도4B는 대조군 바이오필름의 이미지이고, 도4C 및 도4D는 비니페린 처리한 바이오필름의 이미지이다. 비니페린을 처리한 바이오필름의 세포는 비뚤어진 형태를 보이거나, 세포막이 손상된 형태를 나타낸다 (화살표 참조).

도5는 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 이미 형성된 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름에 처리하여 LIVE/DEAD 바이오필름 염색 및 공초점현미경(CM) 분석한 값을 나타낸다. DMSO 처리한 대조군 바이오필름은 죽은 세포들로 관찰되었다 (도5A, 5B). 반면, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 바이오필름은 얇고 죽은 세포(적색)이거나 세포막이 손상된 세포(황색)으로 관찰되었다 (도5C, 5D).

도6은 본 발명의 비니페린 유도체 화합물 처리에 따른 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형 균주의 생존능력을 확인한 것이다. 2×MIC의 [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린을 처리한 균주의 생존능력은 0, 6, 12, 24 시간에 따라 cfu 값으로 나타낸다.

도7은 MIC 및 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 또는 에리트로마이신(Erythromycin) 처리에 따른 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형 균주의 세포막 투과성 변화를 크리스탈 바이올렛(CV) 흡수 분석으로 관찰한 값을 나타낸다.

도8은 MIC 및 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린이 처리된 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형 균주에서 방출된 총 단백질, DNA 및 RNA를 정량화 한 값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에

대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

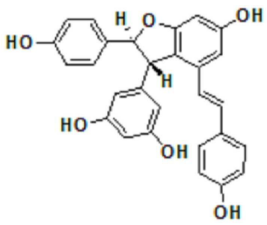
[0064] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0065] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

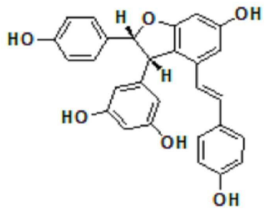
[0066] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0067] 본 발명은, 하기 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 및 [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 제조 방법으로서, 레스베라트롤 용액에 염화 루테늄(III)을 첨가한 후 아세틸화하여 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate)를 수득하는 단계; 및 상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트 혼합 용액에 수산화칼륨(KOH)을 첨가하여 교반하는 단계; 를 포함하는, 제조 방법을 제공한다.

[0068] [화학식 1]

[0069] 

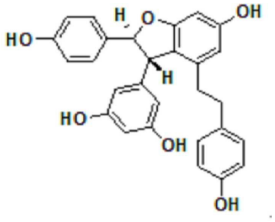
[0070] [화학식 2]

[0071] 

[0072] 본 발명은 염화 루테늄(III) 촉매를 이용하여 상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate)를 수득하고, 여기에 수산화칼륨(KOH)을 첨가하여 아세틸화(Acetylation)함으로써, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 및 [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 화합물을 각각 88%, 75%의 높은 수율로 수득할 수 있고, 고순도로 분리 및 정제할 수 있다.

[0073] 본 발명은, 팔라듐/탄소(Pd/C) 촉매를 이용하여 상기 제조 방법으로 제조된 (±)-ε-비니페린을 수소화 반응시키는 단계를 포함하는, 하기 [화학식3]으로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다.

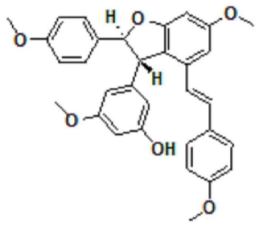
[0074] [화학식 3]



[0075]

[0076] 본 발명은, (±)-ε-비니페린에 요오드화메틸(MeI) 및 탄산칼륨(K_2CO_3)을 첨가하여 교반하는 단계를 포함하는, 하기의 [화학식4]로 표시되는 화합물의 제조 방법을 제공한다.

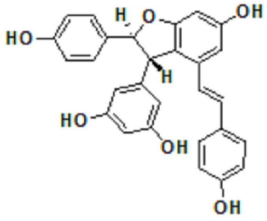
[0077] [화학식 4]



[0078]

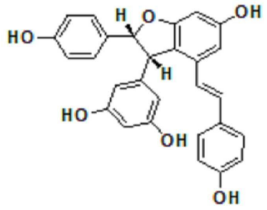
[0079] 또한, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 하기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0080] [화학식 1]



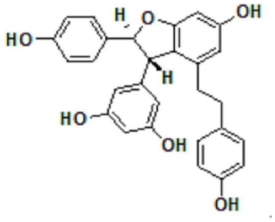
[0081]

[0082] [화학식 2]



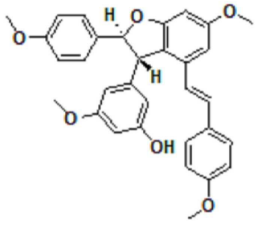
[0083]

[0084] [화학식 3]



[0085]

[0086] [화학식 4]



[0087]

[0088] 여기서, 상기 바이오필름은 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 의해 형성되는 것일 수 있다.

[0089] 상기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 그 형태는 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않은 화합물의 제형을 의미한다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 본 발명의 화합물을 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등의 무기산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산 등의 술폰산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 카프릭산, 이소부탄산, 말론산, 석신산, 프탈산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리실산 등과 같은 유기 카본산과 반응시켜 얻어질 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물을 염기와 반응시켜, 암모니움 염, 나트륨 또는 칼륨염 등의 알칼리 금속염, 칼슘 또는 마그네슘 염 등의 알칼리 토금속염 등의 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸) 메틸아민 등의 유기염기들의 염 및 아르기닌, 리신 등의 아미노산 염을 형성함으로써 얻어질 수도 있다.

[0090] 또한, [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함할 수 있다.

[0091] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항균 활성을 나타내어 폐렴균성 바이오필름의 형성을 억제할 수 있다. 뿐만 아니라, 이미 형성된 바이오필름을 제거할 수 있으므로, 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0092] 본 발명에서, 바이오필름에 의해 유발되는 감염증은 항균효과로 억제될 수 있는 감염증일 수 있으며, 이는 기존의 소독제, 항생제로 치료하던 감염증과 질병 진단시 감염증이 유발될 수 있는 경우를 포함한다. 이러한, 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예로는, 이에 제한되지 않으나, 충치, 치주염, 중이염, 근골계 감염, 괴사성 근막염, 담관계 감염, 골수염, 세균성 전립선염, 자연 판막의 심내막염, 낭포성 섬유증 폐렴, 멜로이도시스(meloidosis), 및 병원내 감염 (nosocomial infection), 예컨대 ICU 폐렴, 요로 카테터 방광염 (urinary catheter cystitis), 복막 투석 (CAPD) 복막염 및 담도 배액관 폐쇄 (biliary stent blockage)를 포함할 수 있다.

[0093] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 [화학식 1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물과 함께 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 혼합물일 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수도 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화 할 수도 있다. 더 나아가, 당분야의 적정한 방법으로, 또는 Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수도 있다.

[0094] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 투여량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위를 다양화할 수 있다.

[0095] 본 발명의 약학적 조성물은 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료 효과를 위하여 단독으로, 또는 기존의 소독제나 항생제, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제와 병용하여 사용될 수도 있다.

[0096] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학

적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴 구균(Streptococcus pneumoniae)에 대한 항균용 조성물이 제공된다.

[0097] 이하, 상기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 공통된 설명은 생략한다.

[0098] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물이 제공된다.

[0099] 이하 마찬가지로, 상기 [화학식1] 내지 [화학식4] 중 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 폐렴균성 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 공통된 설명은 생략한다.

[0100] 본 발명의 코팅용 조성물은 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물에 코팅되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0101] 상기 의료기기는, 진찰 및 진단용기기 (Consultation & diagnosis equipment), 임상 검사용기기 (Clinical examination equipment), 방사선관련기기 (Radiology equipment), 수술관련기기 및 장비 (Surgical apparatus & equipment), 치료관련기기 (Cure apparatus & equipment), 재활의학 및 물리치료기 (Physiotherapy appartus), 안과관련기기 (Ophthalmic appartus), 치과관련기기 (Dental appartus), 중앙공급실 관련기기 (Central supply equipment), 병원설비 및 응급장비 (Hospital accmmodation & emergency equipment), 한방관련기기 (Oriental medicine & equipment), 제약관련기기 (Pharmaceutical equipment), 비만 및 건강관련기기 (Obesity cure & healthcare equipment), 의료용품, 소모품 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0102] 또한, 의료기기의 표면은 고분자재료 또는 금속재료가 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0103] 상기 고분자재료는 의료활동에 쓰이는 고분자재료 즉, 진단과 치료를 포함한 각종 의료행위에 쓰이는 의료기구나 신체 일부를 대신하기 위해 인공장기로 사용되는 중합체를 말한다. 활용되는 분야로는 수혈용 주머니를 비롯한 수혈용 장비, 주사기, 소프트 콘택트렌즈, 인공신장용 필터, 요도, 심장의 판막, 인공 혈관, 뼈, 피부, 힘줄, 귀, 턱, 안구, 치아 및 치아 충전제 등이 있다. 사용되는 물질로는 폴리염화비닐, 폴리에틸렌, 천연고무, 실리콘고무, 폴리프로필렌, 폴리우레탄 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0104] 상기 금속재료는 스테인리스강, 코발트합금, 타이타늄합금, 금속생체재료, 코발트크롬합금, 탄탈럼, 형상기억합금 (Shape memory alloys) 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0105] 의료용 재료는 그 재질에 따라 금속재료, 무기재료, 고분자재료, 복합재료 등으로 구분된다. 금속재료는 코발트계, 크롬계, 스테인레스스틸계, 터치탄계 및 탈탄계 등으로 구분되며, 무기재료는 생체유리 (bioglass) 및 세라믹계 등이 포함되고, 고분자재료에는 천연 고분자재료, 바이오플라스틱, 합성고분자재료, 합성고무, 합성섬유 등이 포함되며, 의료용 복합재료는 섬유강화플라스틱 (Fiber reinforced plastics)계, 유리섬유, 탄소섬유 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0106] 의료용 이식물 (medical implants)들에는 도뇨관 (catheter)처럼 매우 간단한 것부터 인공장기 (artificial organs)나 감지기 (sensors)처럼 매우 복잡하고 정교한 장치까지 다양한 이식물들이 포함된다. 그러나, 질병의 치료나 생활의 불편함을 해소시켜 주기 위해 환자의 피하에 이식하는 의료용 이식물이 본래의 의도와는 달리 환자의 생명을 위협하는 원인이 되기도 하는데, 이는 의료용 이식물을 환자에게 이식하는 과정에서 심각한 감염이 발생할 수 있기 때문이다. 병원에서 발생한 감염증의 절반 이상이 의료용 장치의 이식과 관련 있으며, 의료용 이식물의 구체적 예로는, 혈관 내 인공 삽입물, 스텐트, 심장 스텐트, 말초 스텐트, 정형외과용 이식물, 뼈 또는 관절 보형물, 인공 심장, 인공 심장 밸브, 피하 및/또는 근육 내 이식물을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

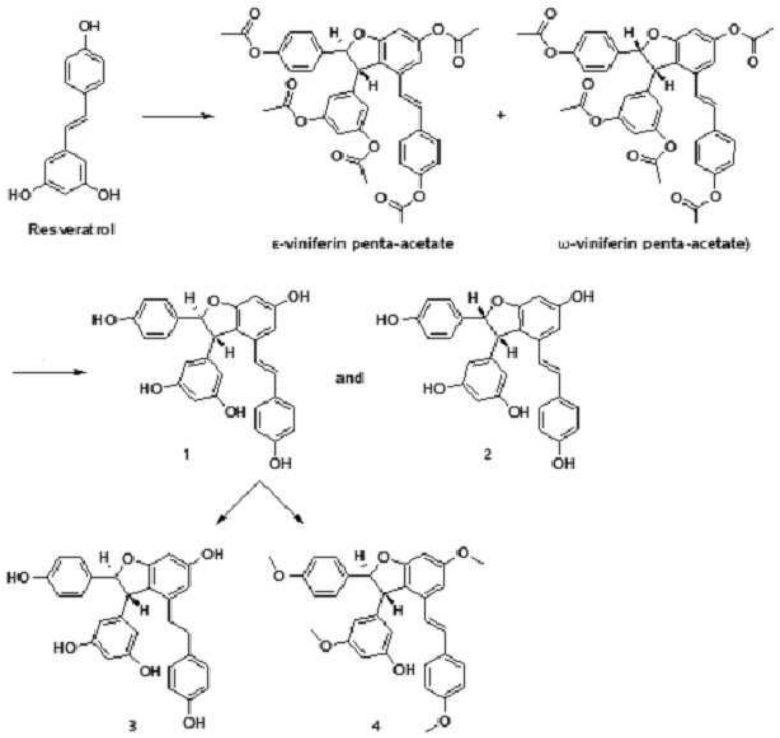
[0107] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0109] **<참고예>**

[0110] **시약 및 재료**

[0111] 본 발명의 출발 물질들 및 용매들을 포함하는 모든 시약들은 구입한 후, 추가 정제없이 사용하였다. 실리카겔 크로마토그래피 및 박막 크로마토그래피(TLC)를 포함하는 Merck 실리카겔 60 F_{254}플레이트를 사용하여 수행하였고, UV(Ultraviolet) 방사를 이용하여 TLC 플레이트를 가시화하였다. Varian 400 (1H에 대하여 400MHz; 13C에 대하여 100MHz) 스펙트로미터 상에서 NMR 스펙트럼이 기록되었다. 1H 및 13C NMR 화학적 이동은 내부기준물질로서 사용된 잔여 용매 피크와 함께 TMS(테트라메틸실란)에 대하여 ppm 단위로 보고하였다. 신호는 m(다중항), s(단일항), d(이중항), t(삼중항), q(사중항), bs(넓은 단일항), bd(넓은 이중항), dd(이중항의 이중항), dt(삼중항의 이중항), 또는 dq(사중항의 이중항)로 보고되었고; 커플링 상수는 헤르츠(Hz) 단위로 보고되었다. 질량 스펙트럼(Mass spectrum)은 고분해능 질량분석법(HRMS, electrospray ionization MS)을 사용하여 사중극자 비행시간형 질량 분석계(Quadrupole time-of-flight mass spectrometer) 상에서 얻었다. 적외선 분광 스펙트럼은 적외선 분광법(IR)을 사용하여 푸리에 변환 적외선 분광 간섭계(Fourier-transform infrared spectroscopy, FT-IR)(NICOLET-Is5) 상에서 얻었다. UV 측정 장치 (254 - 280nm)를 포함하는 Reversed-phase high-pressure liquid chromatography (RP-HPLC, YL9100 HPLC system; Younglin Instruments CO., Ltd., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 최종 생성물의 순도를 분석하였다. RP-HPLC 분석을 위해 0.1% trifluoroacetic acid와 H_2O(A) 및 0.1% trifluoroacetic acid와 아세토나이트릴(acetonitrile)(B) 용매를 사용하였다. HPLC 조건은 Agilent Eclipse Plus C18(4.63x100 5㎛) 컬럼이 장착된 HPLC를 사용하고, 유속은 1.0㎖/min으로 0-12분 동안은 5-55% B버퍼, 12-15분 동안은 55-100% B버퍼, 15-19분 동안은 100% B버퍼, 19-22분 동안은 5-100% B 버퍼, 22-23분 동안은 5% B버퍼의 조건에서 분석하였다. 한편, 초기 반응 화합물인 레스베라트롤 및 염화 루테늄(Ⅲ)은 Sigma Aldrich, TCI, Alfa-Aesar, 및 Combi Blocks에서 구입하였다. 생물학적으로 평가된 모든 화합물의 순도는 95% 이상이었다.

[0113] **실시예1: [화학식1] 내지 [화학식4]로 표시되는 화합물의 제조**

[0114] 

[0116] **실시예 1-1: [화학식1]로 표시되는 (±)-ε 비니페린 화합물의 제조**

[0117] MeOH: 물(10:1, 11mL) 내의 레스베라트롤(Resveratrol) (1.0 g, 4.38 mmol) 용액에 염화 루테늄(Ⅲ) (1.09 g,

5.26 mmol)을 0℃에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 35℃에서 3시간 동안 혼합하고, 메탄올을 제거한 후, 생성된 혼합물을 에틸아세테이트(Ethyl acetate, EtOAc) 200 mL로 희석하고, 유기상을 염수로 세척하고, $MgSO_4$로 건조하고 진공에서 농축시켰다. 이후, 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(염화메틸렌 : 아세톤 = 100% : 0 내지 20%)를 통해 잔사를 정제하여 엡실론-비니페린(ε-viniferin) 및 오메가-비니페린(ω-viniferin) 화합물 340 mg과 레스베라트롤 (350 mg, 1.53 mmol) 을 수득하였다. 엡실론 비니페린(ε-viniferin) 및 오메가 비니페린(ω-viniferin) 화합물을 다이클로로메테인(Dichloromethane, DCM) 20 mL와 다이메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide, DMSO) 1 mL로 용해하였다. 트리에틸아민(Triethyl amine, TMS) (2.8 mL, 17.8 mmol) 과 무수아세트산(Ac_2O) 1.36 mL, 14.4 mmol을 0℃에서 첨가하였고, 실온에서 5시간 동안 혼합하였다. 생성된 혼합물을 염화메틸렌(Methylene chloride) 100 mL로 희석하고, 유기상을 염수 및 $NaHCO_3$로 세척하고, $MgSO_4$로 건조하고 진공에서 농축시켰다. 이후, 실리카겔 상에서 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(EtOAc : 헥산 = 1 : 5 내지 1 : 3)를 통해 잔사를 정제하여 흰색 고체의 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 화합물 18 mg (18%)과 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate) 화합물 75 mg (7.5%) 을 수득하였다.

[0118] 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 화합물: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.3 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 7.18 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 7.1 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 6.99 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 6.94 (s, 1 H), 6.89 (d, J = 16.8 Hz, 1 H), 6.85 (s, 2 H), 6.64 (s, 1 H), 6.55 (d, J = 16 Hz, 1 H), 5.6 (d, J = 6.8 Hz, 1 H), 4.6 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 2.33 (s, 3 H), 2.26 (bs, 9H).

[0119] 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate) 화합물: ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.27 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 7.12 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 7.0 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 6.96 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 6.94 (d, J = 15.6 Hz, 1 H), 6.92 (d, J = 9.2 Hz, 2 H), 6.7 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 6.68 (d, J = 16.4 Hz, 1 H), 6.63 (t, J = 1.8 Hz, 1 H), 6.37 (d, J = 1.6 Hz, 2 H), 6.0 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 4.82 (d, J = 8.8 Hz, 1 H), 2.35 (s, 3 H), 2.27 (s, 3 H), 2.23 (s, 3 H), 2.18 (s, 6H).

[0120] 상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 50 mg, 0.075 mmol의 혼합용액에 수산화칼륨(KOH) 25 mg, 0.44 mmol을 첨가한 후, 메탄올 6 mL에서 30분동안 실온에서 혼합한 후, 메탄올을 제거하고, 잔사를 에틸아세테이트(EtOAc) 25 mL와 1N HCl 10 mL 로 희석하고, 유기상을 염수로 세척하고, $MgSO_4$로 건조하고 진공에서 농축시켰다. 이후, recrystallization(acetone; methylene chloride)을 통해 잔사를 정제하여 옅은 노란색 고체의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물 30 mg (88%)을 수득하였다: ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 7.14 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 7.04 (d, J = 8 Hz, 2 H), 6.83 (d, J = 16.4 Hz, 1 H), 6.75 J = 8.4 Hz, 2 H), 6.65 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 6.62 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 6.58 (d, J = 16.4 Hz, 1 H), 6.24 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 6.17 (d, J = 2 Hz, 1 H), 6.16 (bs, 2 H), 5.37 (d, J = 6.8 Hz, 1 H), 4.35 (d, J = 6.8 Hz, 1 H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 161.3, 158.3 - 156.9, 145.9, 135.5, 132.4, 128.9, 127.3, 126.7, 122.2, 118.6, 114.9, 106, 102.9, 100.7, 95.4, 93.4, 56.8; IR (cm^{-1}) : 3311, 1590, 1440, 1237, 1148, 998, 824; $C_{28}H_{23}O_6$ [M + H] +에 대한 HRMS (ESI) m/z : 계산치 : 455.1495, 실측치 : 455.1487; 순도 95.4 % (RP-HPLC로 측정, t_R = 11.05 분).

[0122] **실시예 1-2: [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω비니페린 화합물의 제조**

[0123] [화학식 2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 화합물은 상기 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate) 30 mg의 혼합용액에 상기 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε비니페린 화합물의 합성과 동일한 방법을 사용하여 제조하였다. 이에 갈색 고체의 18 mg (75%)을 수득하였다: ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 7.13 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 6.97 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 6.88 (d, J = 16.4 Hz, 1 H), 6.67 J = 8.4 Hz, 2 H), 6.67 (d, J = 16.4Hz, 1H), 6.63 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 6.56 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 6.3 (d, J = 1.2 Hz, 1 H), 5.92 (t, J = 2.4 Hz, 1 H), 5.84 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 5.75 (bs, 2 H), 4.6 (d, J = 8.4 Hz, 1

H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 161.2, 157.9, 157.3, 156.9, 156, 142.3, 135.4, 129.4, 128.9, 128.2, 127.8, 127.3, 122.5, 120.9, 115, 113.8, 107.7, 103.7, 100.2, 95.7, 89.4, 52.1; IR (cm^{-1}) : 3311, 1621, 1512, 1442, 1226, 1120, 992; $C_{28}H_{23}O_6$ [M + H] +에 대한 HRMS (ESI) m/z : 계산치 : 455.1495, 실측치 : 455.1495; 순도 96.2 % (RP-HPLC로 측정, t_R = 11.4 분).

[0125] **실시예 1-3: [화학식3]으로 표시되는 화합물의 제조**

[0126] 상기 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물 22 mg, 0.048 mmol 의 혼합용액에 팔라듐/탄소(Pd/C) 촉매 10%, 4.4 mg을 첨가하였고, 에탄올 1 mL에서 수소화 반응시켰다. 생성된 혼합물을 3시간동안 실온에서 혼합한 후, 셀라이트 패드로 여과한 후 여과한 용액은 진공에서 농축시켰다. 이후 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피(염화메틸렌 : 메틸 알코올(MeOH) = 100% : 0 내지 5%)를 통해 잔사를 정제하여 갈색 고체의 [화학식3]으로 표시되는 화합물 8.4 mg (38%)을 수득하였다: ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 7.03 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 6.74 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 6.69 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 6.57 (d, J = 8 Hz, 2 H), 6.17 (s, 1 H), 6.15 (bs, 2 H), 6.06 (bs, 2 H), 5.23 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 3.95 (d, J = 6.4 Hz, 1 H), 2.47-2.38 (bm, 4 H);); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ (ppm) 160.8, 158.5, 158.1, 157, 154.9, 146.1, 139.9, 132.4, 129, 126.9, 119.2, 114.8, 114.4, 108.1, 106, 100.6, 94.1, 93.4, 56.5, 35.6, 35; IR (cm^{-1}) : 3261, 1616, 1440, 1224, 1117, 1000; $C_{28}H_{23}O_6$ [M + H] +에 대한 HRMS (ESI) m/z : 계산치 : 457.1651, 실측치 : 457.1758; 순도 100 % (RP-HPLC로 측정, t_R = 10.78 분).

[0128] **실시예 1-4: [화학식4]로 표시되는 화합물의 제조**

[0129] 상기 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물 100 mg, 0.22 mmol의 혼합용액에 요오드화메틸(MeI) 31 mg, 2.2 mmol 및 탄산칼륨(K_2CO_3) 92 mg, 0.06 mmol을 첨가하였고, 아세톤 5ml에서 교반하였다. 생성된 혼합물을 65℃로 천천히 가열하고 밤새 온도를 유지하였다. 생성된 혼합물을 셀라이트 패드를 사용하여 여과하였고, 잔사를 에틸아세테이트(EtOAc) 50 mL로 희석하고, 유기상을 염수로 세척하고, $MgSO_4$로 건조하고 진공에서 농축시켰다. 이후, 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피(EtOAc : 헥산 = 1 : 4)를 통해 잔사를 정제하여 흰색 고체의 [화학식4]로 표시되는 화합물 20 mg (17%)을 수득하였다: : ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7.27 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 7.13 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 6.88 (d, J = 16.8 Hz, 1 H), 6.86 (J = 8.8 Hz, 2 H), 6.79 (d, J = 8.8 Hz, 2 H), 6.72 (d, J = 2 Hz, 1 H), 6.61 (d, J = 16.8 Hz, 1 H) 6.46 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 6.36 (bs, 3 H), 5.52 (d, J = 5.6 Hz, 1 H), 4.51 (d, J = 5.6 Hz, 1 H), 3.86 (s, , 3 H), 3.79 (s, 3 H), 3.77 (s, 3 H), 3.73 (bs, 6 H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 161.3-161.1, 159.4, 159.2, 145.6, 135.3, 133.6, 129.8, 129.3, 127.6, 126.9, 123.1, 119.5, 114, 105.8, 102.3, 98.8, 95, 93, 56.9, 55.5-55.2; $C_{33}H_{33}O_6$ [M + H] +에 대한 HRMS (ESI) m/z : 계산치 : 525.2277, 실측치 : 525.2383; 순도 100 % (RP-HPLC로 측정, t_R = 17.7 분).

[0131] **실시예2: (±)-ε-비니페린 및 (±)-(E)-ω-비니페린 화합물의 수율 상승 및 분리, 정제 용이성**

[0132] 본 발명은, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 및 [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 제조 방법으로서, 레스베라트롤 용액에 염화 루테늄(III)을 첨가한 후 아세틸화하여 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate)를 수득하는 단계; 및 상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트 혼합 용액에 수산화칼륨(KOH)을 첨가하여 교반하는 단계; 를 포함하는, 제조 방법을 제공한다.

[0133] 상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate)를 수득하는 단계에서, 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-

acetate) 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate)는 염화 루테늄(III) 촉매를 첨가하여 수득하였다.

[0134] 나아가, 상기 염화 루테늄(III)을 촉매를 첨가한 후 아세틸화하여 수득한 엡실론-비니페린 펜타아세테이트 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트 혼합 용액에 수산화칼륨(KOH)을 첨가하여 아세틸화(Acetylation) 반응으로 혼합 용액을 비극성화하여 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 및 [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 화합물을 합성하였다.

[0135] 상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 및 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate)를 수득하는 단계와 각각의 혼합 용액을 아세틸화(Acetylation) 반응으로 비극성화하는 단계에서, 염화 루테늄(III) 촉매를 이용하고, 수산화칼륨(KOH)을 첨가하여 아세틸화(Acetylation) 반응으로 비극성화하는 과정을 이용하여, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 및 [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 화합물을 높은 수율로 수득할 수 있고, 또한, 고순도로 분리 및 정제할 수 있다.

[0136] [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물은 상기 엡실론-비니페린 펜타아세테이트(ε-viniferin penta-acetate) 50 ㎎, 0.075 mmol의 혼합용액에 수산화칼륨(KOH) 25 ㎎, 0.44 mmol을 첨가하여 아세틸화(Acetylation) 반응으로 비극성화하여 노란색 고체의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물 30㎎(88%)을 수득하였다.

[0137] [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 화합물은 상기 오메가-비니페린 펜타아세테이트(ω-viniferin penta-acetate) 30 ㎎의 혼합용액에 수산화칼륨(KOH)을 첨가하여 아세틸화(Acetylation) 반응으로 비극성화하여 갈색 고체의 [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린 화합물 18 ㎎ (75%)을 수득하였다.

[0139] **실시예 3: 박테리아 균주의 배양**

[0140] Streptococcus pneumoniae (NCTC 7466)는 Health Protection Agency Culture Collection (Salisbury, UK)로부터 획득하였다. S. pneumoniae NCTC 7466은 Avery의 독성이 있는 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형 균주, 혈청형 2번 균주, 캡슐형 균주 (Avery et al., 1944) 를 사용하였다. S. pneumoniae CCARM 4003 항생제 저항성 균주 (Clindamycin> 128, Erythromycin> 512, Tetracycline 16㎍ / ㎖) 는 Culture Collection of Antimicrobial Resistance Microorganisms (CCARM 4003, Seoul, South Korea) 으로부터 획득하였다.

[0141] 또한, 폐렴구균 (S. pneumoniae) 11형 균주(strain 7101975)는 고려대학교 의과대학 병리학교실(Infectious disease center, Korea University college of Medicine, Seoul)에서 획득하였다. 폐렴구균 (S. pneumoniae) 혈청형 3 (ATCC 6303), 19F (ATCC 49619), 19A 및 R6는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 획득하였다 (Yadav et al., 2017). 박테리아는 Shin Yang Chemicals Co., Ltd., Seoul, South Korea에서 획득한 5 % defabricated sheep blood (BAPs)를 보충한 한천 플레이트와 BHI (brain heart infusion) 배지에서 배양하였다.

[0143] **실시예4: [화학식1] 내지 [화학식4]로 표시되는 비니페린 화합물의 최소 억제농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) 측정**

[0144] 실시예 1의 제조 방법으로 합성한 [화학식1] 내지 [화학식4]로 표시되는 비니페린 화합물의 최소 억제 농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)를 측정하였다. MIC는 다음과 같이 수행된 CLSI(임상 및 실험 기준 인스티튜트)의 기준에 의하여 액체배지 미량희석법(broth microdilution method)으로 측정하였다.

[0145] 혈액 한천 플레이트(BAP)에서 성장시킨 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형 균주는 로그 상까지 Mueller Hinton(MH) broth에서 배양하였다. 이후, 로그 상 세포를 희석하여 1-5×10^5 cfu/㎖(콜로니-형성 유닛/㎖)의 농도로, 시험 대상 박테리아의 세포 현탁액을 제조하였다. 이후, [화학식1] 내지 [화학식4]로 표시되는 비니페린 화합물을 Mueller Hinton Broth(MHB) 세포 현탁액에 10㎛에서 50 ㎛ 농도로 첨가하였다. [화학식1] 내지 [화학식4]로 표시되는 비니페린 화합물을 포함하는 200 ㎕의 세포 현탁액을 96-웰 플레이트의 각 웰에 주입하였다. 음성 대조군 샘플에는 다이메틸설폭사이드(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)를 처리하고, 플레이트를 37℃에서 18시간 동안 배양하였다. 균주의 성장은 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 600nm에서 흡광도(OD)를 측정함으로써 확인하였다. MIC는 가시적인 균주 성장이 관찰되지 않는 가장 낮은 농도의 비니페린 용액으로 정의하

거나, 균주의 cfu를 결정함으로써 확인하였다. 시험 대상 균주의 세포 현탁액을 시험 대상 항생제의 2배로 희석하고, BAP 한천 플레이트에 도말한 다음 37℃에서 밤새 배양한 후 cfu를 확인하였다. 상기 과정을 동일하게 세번 반복하였고, 실험결과, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물 20㎛ 농도에서 에리트로마이신(Erythromycin) 항생 물질(> 512㎍/㎖)에 내성을 갖는 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형, 11형 및 다른 혈청형(2, 3, 19A, 19F) 균주의 성장을 억제하는 효과를 확인할 수 있었다.

[0146] 도 1A에 나타낸 바와 같이, 폐렴구균 (S. pneumoniae)에 대한 표준 (±)-ε-비니페린 화합물과 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물의 MIC는 20 ㎛에서, [화학식2]로 표시되는 (±)-(E)-ω-비니페린과 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 화합물의 MIC는 40㎛에서 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, [화학식4]로 표시되는 비니페린 화합물의 MIC는 50㎛까지도 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름 성장을 억제하지 못하였다 (도1A 참조). 나아가, 항생 활성 효과가 가장 높은 20㎛ MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리하였을 때 폐렴구균 (S. pneumoniae) 혈청형 2, 3, 19A, 19F 및 임상 균주 11형의 성장을 현저하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (도 1B 참조).

[0147] 반면, 10 ㎛ 0.5 X MIC (Sub-MIC)의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리하였을 때 폐렴구균 (S. pneumoniae) 인 비트로 바이오필름 성장 억제 효과는 낮은 것을 확인할 수 있었다. 20㎛ MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리하였을 때, 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름은 성장하지 않았으나,5 ㎛ 0.25 X MIC (sub-sub-MIC) 또는 10 ㎛ 0.5 X MIC (sub-MIC)에서는 균주의 느린 성장을 확인할 수 있었다(도2A 참조). 또한, 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름 성장은 5 ㎛ 0.25 X MIC (sub-sub-MIC) 또는 10 ㎛ 0.5 X MIC (sub-MIC)의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 폐렴구균 (S. pneumoniae)과 비니페린을 처리하지 않은 대조군 폐렴구균 (S. pneumoniae) 사이에는 15시간 배양 이후 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다 (도2A 참조). 즉, 5 ㎛ 0.25 X MIC (sub-sub-MIC) 또는 10 ㎛ 0.5 X MIC (sub-MIC)에서 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린은 폐렴구균 (S. pneumoniae) 인 비트로 바이오필름 형성 억제 효과는 낮은 것을 확인할 수 있었다 (도2B 참조).

[0149] **실시예5: 비니페린의 기 형성된 폐렴균성 바이오필름 제거 효과**

[0150] [화학식1]로 표시되는 비니페린의 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름 성장에 대한 억제 효과는 통계적 바이오필름 모델(static biofilm models)을 사용하여 측정하였고, 바이오필름 바이오매스는 크리스탈 바이올렛(CV) 마이크로 적정 플레이트 분석에 의해 정량화하였다 (Christensen et al., 1985; Yadav et al., 2017).

[0151] 혈액 한천 플레이트(BAP)에서 성장시킨 폐렴구균 (S. pneumoniae) 균주는 로그 상까지 BHI broth에서 배양하였다. 준비된 살아있는 균주 세포를 1 : 200으로 희석하고, 200㎕의 96-웰 플레이트 또는 1㎖ 24-웰 플레이트에 주입하였다. 비니페린 화합물은 각 웰에 10 내지 50㎛ 농도로 추가하였다. 비니페린 화합물을 첨가하지 않은 대조군에는 0.1 내지 0.5%의 다이메틸설폭사이드(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)를 첨가하였다. 각 플레이트는 37°C에서 18 시간 동안 배양하였다. 배양 이후 배지와 플랑크톤 형태의 바이오필름은 디캔팅(decanting)하였고, 플레이트는 인산완충생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 두 번 세척하였다. 플레이트 바닥에 있는 바이오필름은 50㎕ 0.1% 크리스탈 바이올렛(CV)을 사용하여 15분 동안 남아있게 하였다. 이후, PBS로 두 번 세척하고, 자연건조 후, 크리스탈 바이올렛(CV)은 에탄올로 용해시켰다(96-웰 플레이트는 200㎕ 에탄올, 24-웰 플레이트는 1㎖ 에탄올 사용). 용해된 크리스탈 바이올렛(CV)의 흡수는 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 570 nm에서 측정하였다. 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형 균주가 [화학식1]로 표시되는 비니페린 화합물의 MIC, 0.5 X MIC 및 0.25 X MIC 각각의 조건에서 다르게 성장함을 확인함으로써, 비니페린 화합물의 플랑크톤 형태의 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름 제거 효과를 확인하였다. 이때 균주의 성장은 시간 간격을 두어 600nm에서 흡수율을 측정함으로써 확인하였다.

[0152] 미생물 바이오필름은 제거하기가 어렵고, 기 형성된 바이오필름을 제거하기 위해서는 몇 배 높은 농도의 항생제가 필요하다 (Høet al., 2010; Co et al., 2018). 본 실험에서는 실시예1의 제조 방법으로 합성한 [화학식1] 내지 [화학식4]로 표시되는 비니페린 화합물의 폐렴구균 (S. pneumoniae) 인 비트로 바이오필름 제거 효과에 대한 잠재력을 평가하였다. 폐렴구균 (S. pneumoniae) 인 비트로 바이오필름은 상기 설명한 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름 제거 효과 확인 실험 방법에 따라, 24-웰 플레이트에서 18 시간 동안 성장시켰다. 이

후, 폐렴구균 (S. pneumoniae) 인 비트로 바이오필름에 MIC 및 2XMIC 비니페린 화합물을 6시간 동안 처리하였다. 바이오필름 바이오매스는 크리스탈 바이올렛(CV) 마이크로적정 플레이트 분석을 사용하여 정량화하였고, 살아있는 균주는 cfu 계수에 의해 검출하였다. 한편, Daptomycin, 바이오필름을 제거하는 것으로 알려진 lipopeptide 항생제를 양성 대조군으로 사용하였다.

[0153] 기 형성된 바이오필름 내의 대사 활성 균주는 레사주린 염색을 사용하여 검출하였다. 레사주린(Resazurin)은 청색의 비형광성 염료이며, 대사 활성 세포에 서 레소루핀(Resorufin)이라는 적색의 고 형광성 물질로 환원 반응을 일으킨다. 형광물질 검출로 세포 생존력의 정량적 측정을 하였다. 레사주린 염색은 적은 변형으로 이전 보고된 방법에 따라 수행되었다 (Paytubi et al., 2017). 0.02% (w/v) 레사주린 나트륨 염(Resazurin Sodium Salt) (Sigma, USA) 용액을 멸균 증류수 및 멸균 필터에 준비하였다. 기 형성된 바이오필름은 비니페린을 처리한 24-웰 플레이트에서 멸균 증류수에 용해하고, 이 중 100㎕를 96-웰 플레이트에 옮겼다. 이후, 바이오필름은 레사주린(25㎕, 0.02%)으로 염색하고, 100㎕ BHI broth에서 성장시켰다. 플레이트는 37℃에서 2시간 동안 배양하였고, 형광성은 마이크로 플레이트 판독기(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 excitation 530nm, emission 590nm에서 검출되었다.

[0154] 실험결과, 기 형성된 바이오필름에 비니페린 화합물을 처리하는 경우 바이오필름 바이오매스가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$).

[0155] MIC 및 2×MIC의 [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 화합물 및 표준 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리하였을 때, 기 형성된 바이오필름을 현저하게 제거하는 효과를 확인할 수 있었다 (도 3A 참조). 또한, Deptomycin (양성 대조군)을 처리하였을 때 50 % 이상의 바이오 필름을 제거하는 효과를 확인할 수 있었다. 또한, MIC 및 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 바이오필름 내의 생존하는 균주가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$) (도3B 참조). 이는, 레사주린(Resazurin) 염색을 통해 확인할 수 있었다 (도3C 참조). 즉, 비니페린 화합물이 기 형성된 폐렴균성 바이오필름을 현저하게 제거하는 효과를 갖고, 특히, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리한 경우, 기 형성된 폐렴구균 (S. pneumoniae) 바이오필름 제거 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

[0157] **실시예6: 비니페린 처리에 따른 폐렴균성 바이오필름 형태 변화 관찰**

[0158] **실시예 6-1: 주사전자현미경 분석 (Scanning Elctron Microscope, SEM)**

[0159] 폐렴구균 (S. pneumoniae)은 인 비트로 내 깊은 위치에 견고한 바이오필름을 형성한다 (Moscoso et al., 2006). 주사전자현미경 분석(SEM)을 이용하여 비니페린 처리에 따른 폐렴구균 (S. pneumoniae) 인 비트로 바이오필름의 형태 변화를 관찰하였다. [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리하였을 때 폐렴구균 (S. pneumoniae) 인 비트로 바이오필름을 제거하는 효과가 가장 높은 것을 확인하여 이를 실험에 사용하였다 (실시예6 참조). 폐렴구균 (S. pneumoniae) 인 비트로 바이오필름은24-웰 플레이트에서 18시간 동안 성장시켰고, 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리하였다. 한편, 대조군 바이오필름은 다이메틸석폴사이드(Dimethy Sulfoxide, DMSO)로 처리하였다. 이후, 바이오필름을 2 % 글루타르알데히드와 포름알데히드 용액으로 사전 고정 된 PBS로 세척하고, 오스뮴 산(2 %)으로 2시간 동안 고정시켰다. 이후, 바이오필름은 에탄올 농도 구배를 증가시키고(60 내지95%), t-부틸 알코올 처리로 탈수되었다. 바이오필름 샘플은 동결 건조기에서 건조시키고 백금으로 코팅하였다. 이미지는 field emission-SEM (FE-SEM; Hitachi, S-4700, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

[0160] 실험결과, 대조군에서는 전형적인 세포 외 고분자 물질(EPS) 매트릭스가 균주 표면에 침착되어 손상되지 않은 3차원의 바이오필름을 관찰할 수 있었다. (도4A, 4B 참조). 반면, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리한 바이오필름의 구조는 변형된 것을 확인할 수 있었다 (도4C, 4D 참조). 또한, 비니페린 화합물을 처리한 바이오필름 내의 세포들은 비뚤어진 형태를 보이고, 세포막 또한 변형된 것을 확인할 수 있었다. 용해된 세포에서는 비니페린 화합물이 바이오필름 내의 균주를 효과적으로 제거하지만, 바이오필름 매트릭스를 완벽하게 분해하지는 못하는 것을 확인할 수 있었다 (도4D 화살표 참조). 또한, 대조군 샘플의 바이오필름 내 균주 표면에 존재하는 세포 외 고분자 물질(EPS)은 비니페린 처리한 바이오필름 균주 표면에서는 확인되지 않았다 (도4B 화살표 참조).

[0162] **실시예 6-2: LIVE/DEAD 바이오필름 염색 및 공초점 현미경 분석 (Confocal Microscope, CM)**

[0163] 다음으로, LIVE/DEAD 바이오필름 염색과 공초점 현미경 분석(Confocal Microscope, CM)을 이용하여 기 형성된 폐렴구균 (S. pneumoniae) 인 비트로 바이오필름의 구조와 비니페린 화합물을 처리하였을 때 바이오필름의 생존력을 관찰하였다. 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형 바이오필름은 마이크로디스크에서 18시간 동안 성장시켰고, 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물을 6시간 동안 처리하였다. 바이오필름은 LIVE/DEAD 바이오필름 생존 Kit (Invitrogen, California, USA)로 제조업체가 설명하는 절차에 따라 염색되었다. 대조군 바이오필름은 비슷한 양의 다이메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)로 처리하였다. 세척 후, 염색된 바이오필름은 플루오레신(녹색) 및 텍사스레드(적색) 밴드 패스 필터 세트를 사용하여, Nikon A1 공초점 현미경 (Nikon Instruments Inc., NY, USA) 하에서 관찰하였다.

[0164] LIVE/DEAD 바이오필름 생존 Kit는 SYTO® 9 녹색 형광 핵산 염료와 적색 형광 핵산 염료, 프로피듐 아이오다이드 혼합물을 사용하였다. 살아있는 세포막을 갖는 균주는 녹색으로 염색되고, 손상된 세포막은 적색으로 염색된다. LIVE/DEAD 바이오필름 염색으로 DMSO 처리한 대조군 바이오필름은 죽은 세포들로 관찰되었다 (도5A, 5B 참조). 반면, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리한 바이오필름은 얇고 죽은 세포(적색)이거나 세포막이 손상된 세포(황색)으로 관찰되었다 (도5C, 5D 참조). 즉, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물이 바이오필름 내의 폐렴구균 (S. pneumoniae)을 사멸시키는 효과를 확인할 수 있었다.

[0166] **실시예 7: 비니페린의 폐렴균성 바이오필름 제거 효과**

[0167] 폐렴구균 (S. pneumoniae)에 대한 비니페린의 살균 또는 정균 효과를 확인하기 위해, 박테리아 사멸 실험을 수행하였다. 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형 균주의 세포 현탁액을 BHI broth에서 초기 로그 상까지 성장시켰고, 2×MIC의 [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 화합물 및 표준 (±)-ε-비니페린 화합물을 분취액에 처리하였다. 세포들을 37 ℃에서 더 성장시켰고, 생존 박테리아는 하기 설명하는 바와 같이 cfu 카운트에 의해 상이한 시점 (0, 6, 12 및 24 시간)에서 검출되었다. 대조군 샘플은 다이메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)로 처리하였다.

[0168] 박테리아 사멸 시간 측정 실험은 비니페린의 억제 효과가 살균 또는 정균 활성을 나타내는지 확인하기 위해 수행되었다. 비니페린을 처리하지 않은 대조군 박테리아 성장은 6시간에서 증가하였으나, 12시간 및 24시간에서 감소하였다 (도6 참조). 그러나, 비니페린을 처리한 샘플의 생존 박테리아는 6시간 배양 이후 감소하였다. [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 화합물을 처리한 폐렴구균 (S. pneumoniae)은 6, 12, 24시간에서 생존함을 확인할 수 있었다 (도6 참조). 0 시간 시점에서 비니페린을 처리하지 않은 대조군 샘플과 [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 화합물을 처리한 샘플의 cfu 카운트는 대략적으로 유사하였다 (4×10^7 cfu/㎖). 6시간이 경과한 시점에, 비니페린을 처리하지 않은 대조군 샘플의 cfu는 4.30×10^8 cfu/㎖까지 증가하였고, 12시간 및 24시간 경과한 시점에는, 4.20×10^7 cfu/㎖ 및 3.0×10^5 cfu/㎖로 감소하였다. 반면, [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 화합물을 처리한 폐렴구균 (S. pneumoniae)의 cfu는 시간 의존도에 따라 감소하였다. [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 화합물 및 표준 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리하고 6시간 경과 후, 폐렴구균 (S. pneumoniae)의 cfu 카운트는 각각 8.3×10^6 cfu/㎖, 1.6×10^7 cfu/㎖, 9.0×10^6 cfu/㎖, 및 8.0×10^6 cfu/㎖로 감소하였다. [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 화합물 및 및 표준 (±)-ε-비니페린 화합물의 처리시간이 증가함에 따라, 폐렴구균 (S. pneumoniae)의 생존력은 더욱 감소하였다. 12시간이 경과한 시점에서 1.6×10^6 cfu/㎖, 5.4×10^6 cfu/㎖, 5.0×10^6 cfu/㎖, 및 5.4×10^6 cfu/㎖로, 24시간이 경과한 시점에서 5.0×10^4 cfu/㎖, 4.1×10^5 cfu/㎖, 3.0×10^5 cfu/㎖, 및 5.5×10^4 cfu/㎖로 감소하였다 (도6 참조). [화학식1] 내지 [화학식3]으로 표시되는 비니페린 화합물 및 및 표준 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리한 샘플의 생존 폐렴구균 (S. pneumoniae)은 12시간이 경과한 시점에서 87 -96%, 24시간이 경과한 시점에서 98 -99% 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 모든 화합물들을 실험한 결과, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 및 표준 (±)-ε-비니페린 화합물을 처리하였을 때 가장 큰 폐렴구균 (S. pneumoniae) 사멸효과를 나타냄을 확인할 수 있었다 (2.8 $\log_{10}$).

[0170] **실시예 8: 비니페린 처리에 따른 박테리아 세포막 투과성 변화 관찰**

[0171] 비니페린 처리에 따른 박테리아 세포막 투과성의 변화는 크리스탈 바이올렛(CV) 흡수 분석 (Devi et al., 2010)을 이용하여 관찰하였다. 폐렴구균 (S. pneumoniae) D39형 균주는 BHI broth에서 초기 로그 상까지 성장하였다. 4500 × g, 4 ℃에서 5 분간 원심 분리하여 세포를 펠렛화 하였다. 박테리아 세포를 PBS로 세척하고, MIC 및 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린 화합물 및 에리트로마이신(Erythromycin)을 37 ℃에서 3시간 동안 처리하였다. 한편, 에리트로마이신(Erythromycin)은 박테리아 세포막 투과성에 영향을 미치지 않아, 대조군으로 사용되었다. 음성 대조군 샘플은 다이메틸설폭사이드 (Dimethyl Sulfoxide, DMSO)로 처리하였다. 배양 후 세포는 9300 × g, 5 분간 원심 분리하여 획득하고, 10㎕/㎖ 크리스탈 바이올렛(CV) 용액 (0.01 %)에 현탁시켰다. 세포 현탁액을 10 분간 배양하고 13,400 × g, 15분간 원심분리 하였다. 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 상층액의 흡광도(Optical Density, OD)는 590 nm에서 검출되었다. 표준 용액의 OD 값은 100%로 간주되었고, CV 흡수율은 하기 공식에 따라 계산되었다.

[0172] (OD value of the sample / OD value of the crystal violet solution) × 100

[0173] 실험결과, 비니페린을 처리하지 않은 대조군 박테리아와 비교하여 비니페린을 처리한 박테리아에서 높은 크리스탈 바이올렛(CV) 흡수율을 확인할 수 있었다. 대조군 박테리아의 CV 흡수율은 대략 40 %인 반면, MIC 및 2 × MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 박테리아의 CV 흡수율은 각각61%, 74%의 값을 나타냈다 (도7 참조). 비니페린을 처리한 박테리아의 증가한 CV 흡수율을 확인함으로써 박테리아 세포막의 투과성이 변화됨을 관찰할 수 있었다 (도7 참조).

[0175] **실시예9: 비니페린 처리에 따른 박테리아의 표면 손상 관찰**

[0176] 비니페린 처리에 따른 폐렴구균 (S. pneumoniae) 세포막의 무결성은 세포막을 원심분리한 상층액의 총 단백질 방출량을 측정함으로써 확인하였다. 상층액의 단백질 농도는 Pierce bicinchoninic acid(BCA) 단백질 분석 키트 (Thermo Scientific, MA, USA)를 사용하여 확인하였다. 폐렴구균 (S. pneumoniae)을 로그 상까지 성장시키고 원심 분리에 의해 펠렛화하고, PBS에 현탁시켰다. 이후, 세포 현탁액 (약 10^7/㎖)에 MIC 및 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리하고, 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 이후, 세포들을 펠렛화하고, 상층액은 0.2㎛ 주사기 필터를 사용하여 여과하였다. cell free supernatant(CFS)에 200㎕ 용액 A 및 용액 B (키트에서 제공됨) 각각을 30분 동안 처리하고, 562nm의 흡광도(OD)를 측정하여 상층액의 총 단백질 방출량을 확인할 수 있었다.

[0177] 또한, 비니페린 처리에 따른 폐렴구균 (S. pneumoniae) 세포막의 무결성은 DNA 및 RNA와 같은 세포질 성분의 방출량을 측정함으로써 확인하였다 (Bouyahya et al., 2019). 폐렴구균 (S. pneumoniae)은 BHI broth에서 중간 로그 상까지 성장시키고 원심 분리에 의해 펠렛화하고, PBS에 현탁시켰다. 이후, MIC 및 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리하고, 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 세포는 10,000 × g, 5분간 원심분리로 펠렛화하고, 상층액은 0.2㎛ 주사기 필터를 사용하여 여과하였다. 260nm의 흡광도(OD)를 측정함으로써 상층액의 DNA 및 RNA 방출량을 확인할 수 있었다.

[0178] 단백질을 정량화 한 결과, 비니페린을 처리하지 않은 대조군 박테리아와 비교하여, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 박테리아에서 총 단백질 방출량이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다 ($p<0.05$). MIC및 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 박테리아에서 총 단백질 방출량은 각각 43% 및 59%까지 증가하였다 ($p<0.05$) (도8A 참조).

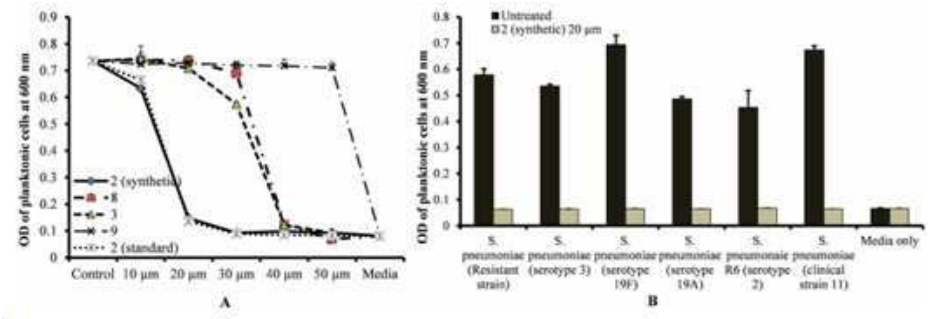
[0179] 또한, DNA 정량화 한 결과에서도 비니페린을 처리하지 않은 대조군 박테리아와 비교하여, [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 박테리아에서 DNA 및 RNA 방출량이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다 ($p<0.05$). MIC및 2×MIC의 [화학식1]로 표시되는 (±)-ε-비니페린을 처리한 박테리아에서 DNA 및 RNA 방출량은 각각 46% 및 64%까지 증가하였다 ($p<0.05$) (도8B 참조).

[0180] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

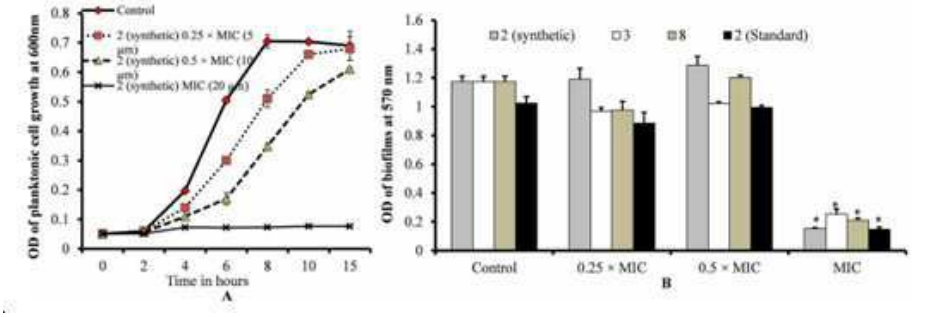
[0181] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

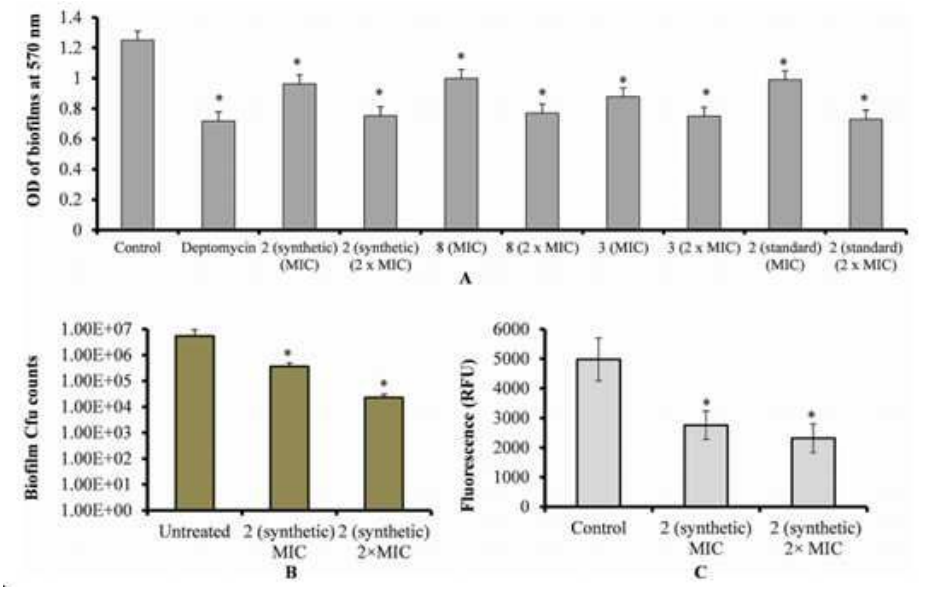
도면1



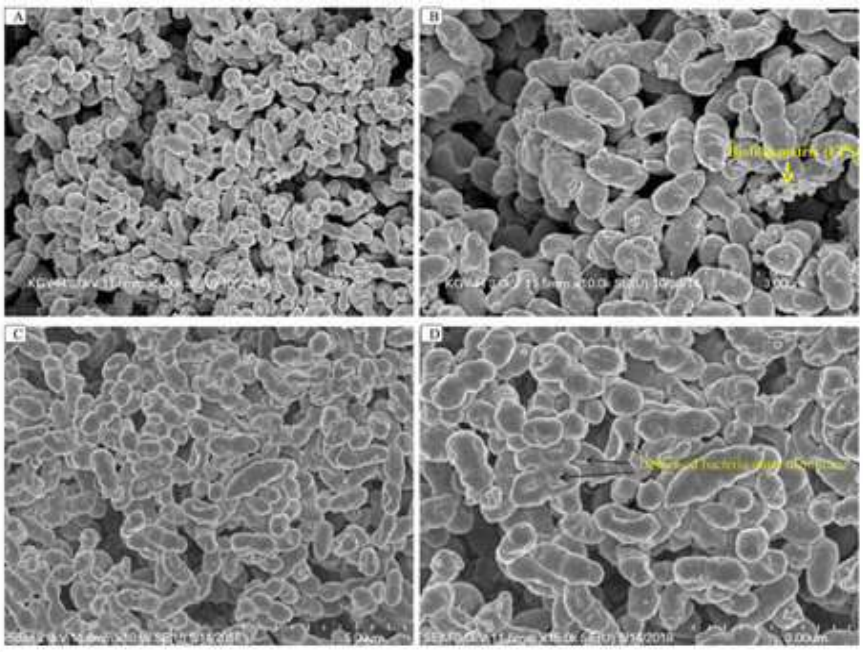
도면2



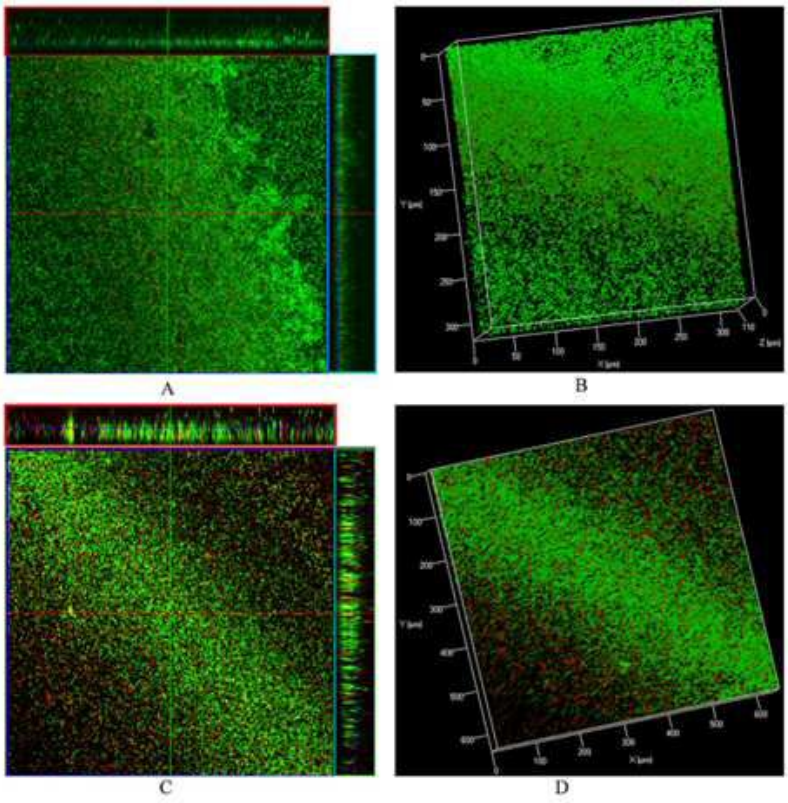
도면3



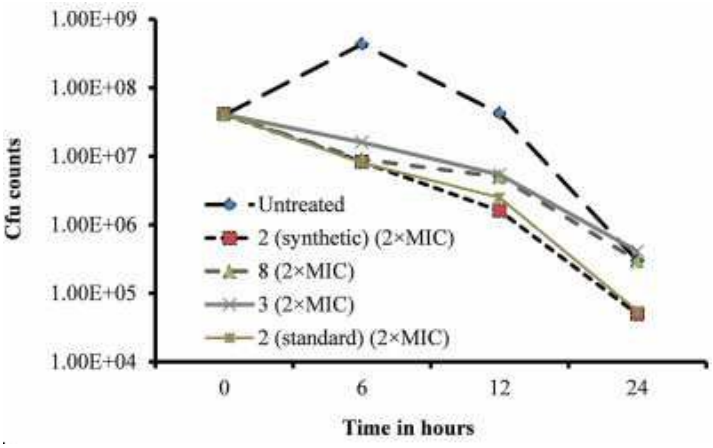
도면4



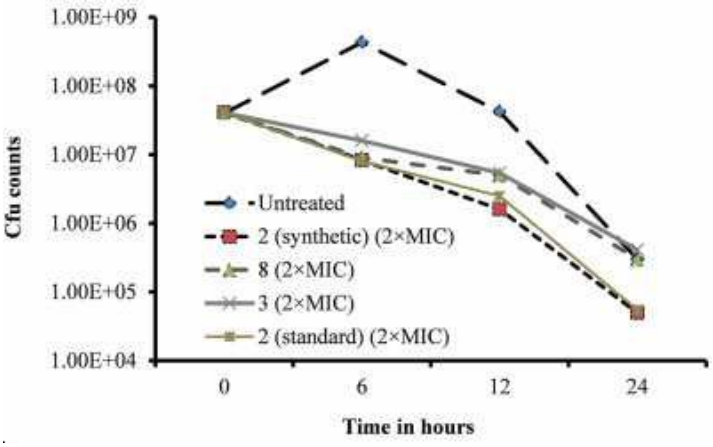
도면5



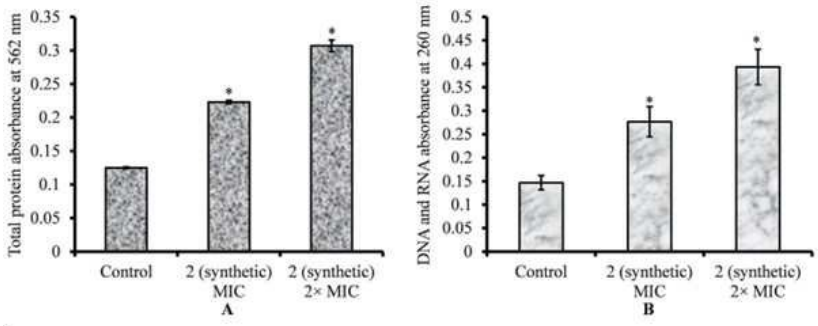
도면6


1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
Cfu counts
Untreated
2 (synthetic) (2×MIC)
8 (2×MIC)
3 (2×MIC)
2 (standard) (2×MIC)
0
6
12
24
Time in hours

도면7


1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
Cfu counts
Untreated
2 (synthetic) (2×MIC)
8 (2×MIC)
3 (2×MIC)
2 (standard) (2×MIC)
0
6
12
24
Time in hours

도면8


Total protein absorbance at 562 nm
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Control
2 (synthetic) MIC
2 (synthetic) 2× MIC
A
DNA and RNA absorbance at 260 nm
0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Control
2 (synthetic) MIC
2 (synthetic) 2× MIC
B