(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0033863
(43) 공개일자 2025년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 43/30 (2006.01) *A01P 1/00* (2006.01)
C11D 3/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 43/30 (2013.01)
A01P 1/00 (2021.08)
(21) 출원번호 10-2023-0116515
(22) 출원일자 2023년09월01일
심사청구일자 2023년09월01일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김우성
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 약학관 B동 315호
허희영
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 약학관 B동 312호
(74) 대리인
김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 9 항

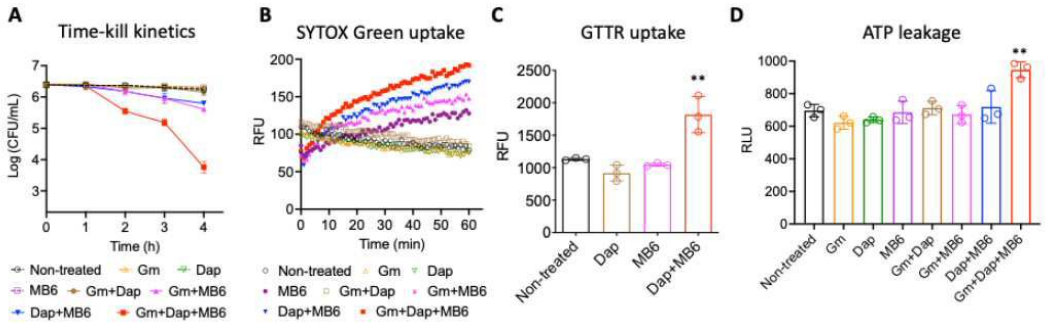
(54) 발명의 명칭 **다제내성 및 지속성 균주에 효과적인 항균 조성물 및 항균보조제**

(57) 요 약

본 발명은 다제내성 및 지속성 균주에 효과적인 항균 조성물 및 항균보조제에 관한 것이다.

본 발명에 따른 화합물은 선택적 막 활성을 가져 다제내성 균주에 대한 항균 활성을 가질 뿐만 아니라, 다제내성 균주 및 지속성 균주에 대한 아미노글리코사이드계 항생제 와 답토마이신의 살균 활성을 향상시켜 강력한 2중 및 3중 시너지 살상 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 항균제 또는 항생 내성 박테리아 지속성 균주와 싸우는 보조제로 기능하여 미래의 치료법을 위한 유망한 길을 제공한다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
C11D 3/2096 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711198661
과제번호 00240870
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 메티실린 내성 황색포도상구균 퍼시스터에 효과적인 다이아릴우레아 항균제 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2023.06.01 ~ 2024.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711197136
과제번호 00228746
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 호흡기 감염 다제내성균 제어 치료제 후보물질 개발
기 여 율 40/100
과제수행기관명 이화여자대학교산학협력단
연구기간 2023.04.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711183409
과제번호 2018R1A5A2025286
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 섬유화질환 제어 연구센터
기 여 율 30/100
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

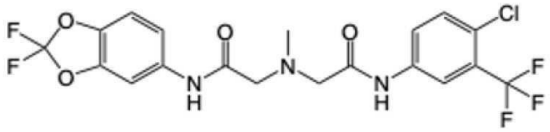
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 항균용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항균제는 다제내성 균주에 대한 항균활성을 갖는 것인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 다제내성 균주는 지속성 균주를 포함하는 것인, 조성물.

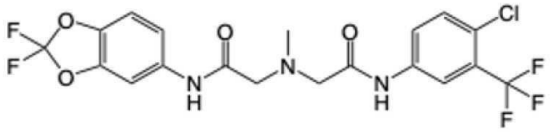
청구항 4

제2항에 있어서, 상기 다제내성 균주는 메티실린 내성 황색포도알균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 반코마이신 내성 장알균(vancomycin-resistant *enterococci*, VRE) 및 반코마이신 내성 황색포도알균(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 항균 보조용 조성물.

[화학식 1]



청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항균 보조제는 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항균제 또는 답토마이신(daptomycin)의 항균활성을 보조하기 위한 것인, 조성물.

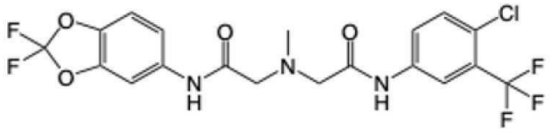
청구항 7

제6항에 있어서, 상기 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항균제는 아미카신(amikacin), 겐타마이신(gentamicin), 카나마이신(kanamycin), 네오마이신(neomycin), 플라조마이신(plazomicin), 스트렙토마이신(streptomycin) 및 토브라마이신(tpbramycin) 중 선택되는 어느 하나인, 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 소독용 제제.

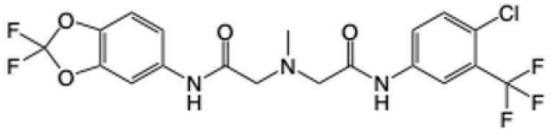
[화학식 1]



청구항 9

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 세정제 조성물.

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다제내성 및 지속성 균주에 효과적인 항균 조성물 및 항균보조제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 박테리아는 유전적 변형 없이 고농도의 항생제에서 생존할 수 있는 현상인, 항생제 내성(antibiotic tolerance)을 가진다. 박테리아가 항생제에 저항하고 항생제 작용 하에서 증식할 수 있도록 유전적으로 획득한 능력을 포함하는 항생제 저항성(antibiotic resistance)과 달리, 항생제 내성(antibiotic tolerance)은 치명적인 농도의 항생제가 존재할 때 유전적 획득이 없이도 박테리아가 생존할 수 있는 일시적 특성이다. 이러한 생존은 박테리아의 대사 활동의 감소 또는 비 성장 휴면 상태로의 진입을 통해 달성된다. 즉, 항생제 저항성(antibiotic resistance) 박테리아는 유전적 변형으로 인해 특정 항생제에 특이적으로 저항할 수 있는 반면, 항생제 내성(antibiotic tolerance) 박테리아는 뚜렷한 작용 메커니즘을 가진 다양한 유형의 항생제에 대한 노출을 견딜 수 있다. 박테리아 지속성 균주(persister)로도 알려진 이러한 항생제 내성 박테리아는 박테리아 응집체가 자가 분비 물질의 보호 매트릭스에 의해 캡슐화될 때, 정지상 및 생물막에서 자주 발견된다. 임상적으로 지속성 균주는 재발성 요로 감염, 낭포성 섬유증 환자의 만성 감염 및 심내막염과 같은 상태에서 볼 수 있듯이 감염의 장기화, 치료 실패 및 항생제 내성 발달에 기여하는 것으로 알려졌다. 현재 박테리아 지속성 균주에 대한 항생제의 제한된 효과는 새로운 치료 전략 개발의 필요성을 시사한다.

[0003] 지속성 균주는 세포벽, 핵산 및 단백질 합성을 표적으로 하는, 각각 고유한 메커니즘을 가진 다양한 유형의 정균(bacteriostatic)제 및 살균(bactericidal)제에 대한 내성(tolerance)을 나타낸다. 따라서 세포벽 또는 핵산 합성 억제제를 사용하면 이러한 지속성 균주의 표적 비활성화로 인해 항생제 내성을 보인다. 반면, 단백질 합성 억제를 통해 살균효과(bactericidal effect)를 보이는 아미노글리코사이드계의 경우, 아미노글리코사이드의 세포 내 진입에 필수적인 양성자 동력(PMF) 감소로 인해 흡수를 방해하여 내성이 달성된다. 흥미롭게도, 박테리아 지속성 균주에서는 여전히 단백질이 합성되기 때문에, 아미노글리코사이드 흡수를 촉진하는 보조제의 사용은 이러한 지속성 균주를 성공적으로 박멸할 수 있다. 예를 들어, 항생제 저항성을 쉽게 획득하는 주요 인간 병원체인 황색포도알균 (*Staphylococcus aureus*)의 지속성 균주에 대하여, 탄수화물 대사산물과 아데노신은 이의 양성자 구동력(PMF)을 증가시켜 아미노글리코시드의 살균 활성을 회복시키는 것으로 보고되었다. 또한, 합성 레티노이드 CD437, 구충제 비티오놀, 생물계면활성제 람노리피드와 같은 막 파괴 항미생물제는 양성자 구동력(PMF) 비의존적 흡수를 촉진함으로써 항생제 내성 황색포도알균 지속성 균주에 대한 아미노글리코사이드의 효능을 향상시키는 것으로 입증되었다.

[0004] 한편, 리포펩티드 항생제인 답토마이신(daptomycin)은 칼슘 이온의 도움으로 막에 기공을 형성하며, 궁극적으로 막 교란 및 후속 박테리아 사멸을 초래한다. 세균막은 대사 또는 성장 상태에 관계없이 생존에 중요하기 때문에 답토마이신은 황색포도알균 지속성 균주에 대해 효과적일 수 있다. 그러나 박테리아의 작은 하위 집단은 여전히 답토마이신에 대한 내성을 나타내고 생존할 수 있다. 더욱이, 답토마이신의 살균 효과는 특정 항생제 내성 황색

포도알균 균주에 의해 형성된 지속성 균주에 대해서는 상당히 감소한다. 답토마이신의 약화된 활성은 D-사이클로세린과 같은 보조제와 결합할 때 증폭될 수 있으며, 이는 막 전하를 변화시키고 결과적으로 답토마이신과 박테리아 막 사이의 친화성을 증가시킨다. 이러한 이전 연구는 막 활성제가 독립형 치료제로 작용하거나 보조제로 기능할 수 있음을 시사한다.

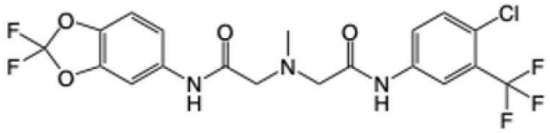
[0005] 본 발명자들은 예의 노력 끝에 포유류 세포막에는 영향을 미치지 않지만, 박테리아 세포막을 우선적으로 방해하는, 막 활성 항균 특성을 나타내는 신규한 메틸아잔디일 비스아세트아마이드 (methylazanediyl bisacetamide) 유도체를 발굴함에 따라 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 항균제 및/또는 항균 보조제를 제공하는 것이다.

[0007] [화학식 1]

[0008] 

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 항균 조성물의 추가적 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

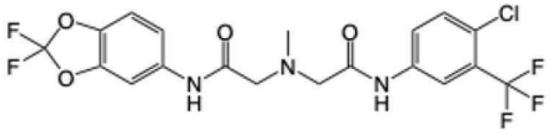
[0010] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속하며, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0011] 또한, 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 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0012] 하기에서는 중복되는 내용의 혼잡을 방지하기 위하여, 중복되는 내용의 기재를 생략하고자 하였다. 즉, 하기의 내용만으로 발명의 내용이 한정되는 것은 아니며, 전체적인 발명의 내용에 따라 발명의 내용이 해석되어야 할 것이다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에서는 Enamine사로부터 구입한 화합물 중 막 활성 항균 특성을 나타내는 화합물을 최종적으로 선정하였다. 이를 '(2-[({[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoyl}methyl)(methyl)amino]-N-(2,2-difluoro-1,3-dioxaindan-5-yl)acetamide)'라 명명하였다. 본 명세서 내 약어로 MB6로도 표현한다. 이의 구체적인 화학구조는 하기 화학식 1에 나타내었다.

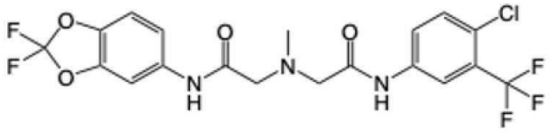
[0014] [화학식 1]

[0015] 

[0016] 한편, 하기에서는 본 발명에 따른 'MB6' 화합물의 적합한 용도를 제공하고자 한다.

[0017] 이에, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

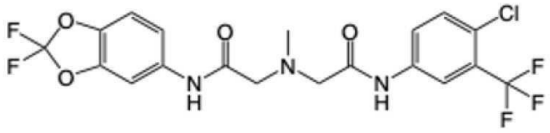
[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020] 구체적으로, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 항균제를 제공한다.

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 이때, 상기 항균제는 다제내성 균주에 대한 항균활성을 갖는 것이다. 또한, 해당 다제내성 균주는 지속성 균주를 포함한다.

[0024] 다제내성 균주로 인한 감염은 항생제 내성을 발전시키고 내성을 나타낼 수 있는 박테리아 가능성으로 인해 지속적으로 상당한 치료적 문제를 유발한다. 이는 유전자 변형과 무관한 생존 메커니즘으로 인한 것으로, 대사 과정이 감소하거나 비활성화되어 박테리아가 항생제를 견딜 수 있게 한다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에서는 본 발명에 따른 화합물은, 다제내성 균주 중 특히 그람 양성 박테리아에 대해서만 항균 활성을 나타내고, 그람 음성균에 대해서는 항균 활성을 나타내지 않음을 확인한 바 있다. 이에, 본 발명의 화합물이 항균활성을 보이는 다제내성 균주는 그람 양성 박테리아를 제한없이 포함한다.

[0026] 일 예로 메티실린 내성 황색포도알균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 반코마이신 내성 장알균(vancomycin-resistant *enterococci*, VRE) 및 반코마이신 내성 황색포도알균(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0027] 메티실린 내성 황색포도알균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)은 메티실린에 내성이 있는 황색포도알균으로, 직·간접 접촉 및 오염된 의료기구, 환경 등을 통해 전파된다. 이는 심내막염, 폐렴, 관절염, 골수염, 연조직감염, 뇌수막염 등을 일으키며 병독성이 강해 중증 감염병을 일으킬 수 있다. MRSA 감염증은 중증 경과를 보이는 경우가 다른 세균 감염증에 비해 흔하기 때문에 치료에 주의를 기울여야 한다.

[0028] 반코마이신 내성 장알균(vancomycin-resistant *enterococci*, VRE)은 장알균 중 반코마이신에 내성인 세균을 지칭하는 용어로, 1986년 처음 보고되었고, MRSA와 함께 병원 감염의 중요한 원인균이다. 이로 인한 요로감염은 발열, 배뇨통, 옆구리 통증 등을 나타내고, 복강내 감염은 발열, 복통, 복부압통으로 나타나며, 균혈증은 발열로 나타난다. 골관절염이 생기면 감염부위의 종창, 발적, 압통 등이 나타난다.

[0029] 반코마이신 내성 황색포도알균(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)은 페니실린과 세파로스포린계 등 여러 항균제에 내성을 나타내고, 비교적 광범위한 항생제로 알려진 반코마이신에 내성을 보인다. 대부분 당뇨나 신장 질환 등 기저질환이 있는 환자, 예전에 MRSA에 감염된 적이 있는 환자, 중심 정맥관 등 몸속에 기구가 삽입된 환자, 반코마이신 투여 환자에게 감염될 위험이 높은 것으로 보고되고 있다. 해당 균주에 감염되면 고열, 오한, 혈압 저하를 일으킬 수 있으며, 화농성 염증, 식중독, 패혈증 등 다양한 감염증을 유발할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 항균 보조용 조성물을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 항균 보조제를 제공한다.

[0032] 이때, 상기 항균 보조제는 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항균제 또는 답토마이신(daptomycin)의 항균활성을 보조하기 위한 용도로 활용할 수 있다.

[0033] 이때, 상기 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항균제는 아미카신(amikacin), 겐타마이신(gentamicin), 카나마이신(kanamycin), 네오마이신(neomycin), 플라조마이신(plazomicin), 스트렙토마이신(streptomycin) 및 토브라마이신(tobramycin) 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 화합물(MB6)은 내성 발달 없이 MRSA에 대해 선택적 막 활성을 나타내

는 강력한 메틸아잔디일 비스아세트아미드(methylazanediyl bisacetamide) 유도체로 확인되었다. 구체적으로, MRSA 지속성 균주에 대한 MB6 화합물의 개별 효과는 제한적이었지만, 항균 흡수를 촉진하여 아미노글리코사이드계 항균제의 살균 활성과 막 활성을 증가시키며, 답토마이신의 살균 활성을 상당히 강화하였다. 결정적으로, MB6 화합물은 아미노글리코사이드계 항균제와 답토마이신을 함께 조합했을 때 MRSA 지속성 균주에 대한 항균효과가 삼중 상승 작용(synergism)을 나타내었다. 이러한 발견은 강력하고 선택적인 막 활성 항균 리드 화합물(lead compound) 및 지속성 균주에 대한 기존 항생제의 효능을 향상시키는 보조제로서 MB6 화합물의 효능을 입증하는 것이다. 이로써, 본 발명의 일 구체예에서 확인한 MB6 화합물의 분자 메커니즘은 현재 항생제 치료의 한계를 극복하기 위한 새로운 치료 전략이 될 수 있다.

[0035] 본 발명에서는 MRSA를 대상으로 본 발명에 따른 화합물의 항균 및 항균보조제로서의 효과를 확인하였으나, 본 발명의 일 구체예에 의하면 본 발명에 따른 화합물의 그람 양성 다제내성균 및 지속성 균주에 대한 항균 활성을 확인한 바, 본 발명에 따른 화합물이 아미노글리코사이드계 항균제의 살균 활성과 막 활성을 증가시키며, 답토마이신의 살균 활성을 상당히 강화하는 측면은, 본 발명에 따른 화합물이 MRSA를 제외한 다른 그람양성 다제내성균 및 지속성 균주에서도 동일 또는 유사한 효과를 보장할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 용어, "항균제"란 본 발명에 따른 화합물 MB6의 투여에 의해 세균의 성장을 억제하거나 죽이는 약물로서, 구체적으로 본 발명에서는 다제내성 및 지속성 균주의 감염을 치료하는 약물을 의미한다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 용어, "항균 보조제"란 본 발명에 따른 화합물이 다른 항균 또는 항생제의 항균 및 살균 활성을 보조하기 위한 약물로, 구체적으로 본 발명에서는 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항균제 또는 답토마이신(daptomycin)의 항균 활성을 보조하기 위한 용도로 활용하기 위한 약물을 의미한다.

[0038] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제는 상기 화합물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 일 예로 본 발명의 항균 보조제는 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항균제 또는 답토마이신(daptomycin) 및 이들 모두와 병용하여 투여될 수 있다.

[0039] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제는 상기 화합물 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제는 필요한 경우, 항산화제, 부형제, 희석제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 계면 활성제, 결합제, 충진제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.

[0042] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제에 있어서, 상기 화합물은 항균제 또는 항균 보조제의 전체의 중량을 기준으로 0.00001중량% 내지 99.99중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 90중량%, 보다 바람직하게는 0.1중량% 내지 70중량%, 더욱 바람직하게는 0.1중량% 내지 50중량%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 항균제 또는 항균 보조제의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.

[0043] 즉, 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제의 약학적 유효량, 유효 투여량은 항균제 또는 항균 보조제의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 항균제 또는 항균 보조제의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제의 일일 투여량은 약 0.01 내지 1,000 mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.

[0044] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수 회에 나누어 투여될 수도 있다. 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제는 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로

최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0045] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제는 다제내성 균주 또는 이의 지속성 균주의 감염증을 예방 또는 치료하기 위하여 추가적으로 호르몬 치료, 약물치료 등의 다양한 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제를 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 목적하는 해당 부위에 상기 항균제 또는 항균 보조제가 도달할 수 있는 한, 특별한 제한 없이 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.

[0047] 상기 항균제 또는 항균 보조제는 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있으며, 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제를 이용한 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 유성 현탁액, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

[0049] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제를 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 락토오스, 사카로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 등과 같은 윤활유; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕해제 등을 사용할 수 있으며, 방향제, 시럽제, 감미제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제의 비경구 투여 방법으로는, 근육 내 투여, 경피 투여, 정맥 내 투여, 복강 내 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제를 이용한 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 크림 등을 들 수 있다.

[0052] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제를 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제를 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제를 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.

[0054] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제를 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.

[0055] 본 발명의 항균제 또는 항균 보조제를 연고, 오일, 크림, 도포용 파우더, 피부 외용제 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.

[0056] 한편, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 소독용 제제를 제공한다.

[0057] 본 발명에 있어서, 상기 소독용 제제는 향료, 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0058] 상기 소독용 제제는 손 또는 보건의료용품 세척용으로 이용이 가능하며, 이외에도 오염으로 인한 세척 또는 소독이 필요한 피부, 의복, 생활용품, 가구, 실내 바닥 등 통상적으로 방역이 필요한 표면에 모두 사용 가능하다.

[0059] 상기 소독용 제제는 오염된 표면에 직접 분사 방식 또는 세척하고자 하는 용품을 담갔다가 꺼내는 침수 방식으로 사용할 수 있으며, 사용 전 세척 및 사용 후 세척 모두 가능하다.

[0060] 상기 보건의료용품은 친수성 및 소수성 물질들로 오염되어 세척이 필요한 것이라면 특별한 제한없이 적용이 가능하며, 수술용 기구, 보건 마스크, 의료용 마스크, 두건, 방호복, 패드, 수건, 천, 의류 등과 같은 보건의료용

품을 예시할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0061] 한편, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 포함하는 세정제 조성물을 제공한다.

[0062] 본 발명의 세정제 조성물은 세정제 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 추가로 더 포함할 수 있으며, 예컨대 안정화제, 용해화제 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0066] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0068] 본 발명의 세정제 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 제형 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비 함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0069] 본 발명에 따른 화합물은 선택적 막 활성을 가져 다제내성 균주에 대한 항균 활성을 가질 뿐만 아니라, 다제내성 균주 및 지속성 균주에 대한 아미노글리코사이드계 항생제 및 답토마이신의 살균 활성을 향상시켜 강력한 3중 시너지 살상 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 항균제 또는 항생 내성 박테리아 지속성 균주와 싸우는 보조제로 기능하여 미래의 치료법을 위한 유망한 길을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 황색포도알균 (*S. aureus*) MW 균주에 항균활성을 갖는 메틸아잔디일 비스아세트아마이드 (methylazanediyl bisacetamide) 유도체를 선별한 결과이다 (A: 6종의 메틸아잔디일 비스아세트아마이드 유도체의 화학구조, B: 메틸아잔디일 비스아세트아미이드 유도체의 *S. aureus* MW2 균주에 대한 항균활성 평가 결과).

도 2는 황색포도알균 (*S. aureus*) MW2 균주에 대한 MB6의 생체 내 활성, 독성 평가 및 살균·정균 활성 평가, 그리고 내성 발현 정도 평가 결과이다 (A: *S. aureus* MW2에 감염된 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)을 대상으로 한 MB6의 생체 내 항균 활성 및 독성 평가 결과, B: *S. aureus* MW2에 대한 MB6의 살균·정균 활성 평가 결과, C: *S. aureus* MW2에 대한 MB6의 내성 발현 정도 평가 결과).

도 3은 MB6의 MRSA 막 무결성 방해 메커니즘을 확인한 결과이다 (A: MB6 처리에 따른 *S. aureus* MW2의 형태 변화를 확인한 투과전자현미경 사진 (우측 하부 모서리 눈금 막대는 1 ㎛를 나타냄), B: 세균막 투과성에 대한 MB6의 효과를 확인하기 위한 SYTOX Green 염색 결과, C: MB6 처리에 따른 ATP 누출 여부를 확인한 결과 (오차막

대는 평균±SD(n=3)을 나타냄), D: MB6 처리에 따른 세포내 ROS 축적 수준 변화를 확인한 결과 (RFU: 상대형광단위, RLU: 상대발광단위)). 패널 B와 D는 시각적 명확성을 위하여 오차막대(SD)가 생략되었음. *** $P < 0.01$.

도 4는 MB6의 MRSA 막 지질 이중층과의 상호작용 메커니즘을 확인한 결과이다 (A: MB6와 7DOPC/3DOPG 지질 이중층의 상호작용에 대한 대표적인 시뮬레이션 구성(초기 부착, 침투, 평형 임베딩 포함)을 나타낸 결과, B: 모의 상호 작용 과정을 통한 MB6와 지질 이중층 사이의 질량 중심(COM) 거리의 대표적인 시간적 변화를 나타낸 결과, C: 이중층의 COM 거리의 함수로서 지질 이중층을 관통하는 MB6의 자유 에너지 프로파일을 나타낸 결과, D 및 E: 포스파티딜글리세롤(PG), 리실 포스파티딜글리세롤(LPG) 또는 카디오리핀(CL)의 존재 하에 MB6 MIC의 변화 (Ciprofloxacin은 대조군)를 체커보드 미세희석 검정을 사용하여 평가한 결과). 패널 B와 C의 검은색 점선은 멤브레인의 표면을 나타냄. **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$.

도 5는 MB6의 세균막 선택적 상호작용을 평가한 결과이다 (A: 인간 적혈구를 대상으로 MB6 처리시 용혈 유발 여부를 평가한 결과, B: HEK-293세포를 대상으로 MB6 및 16-BAC 처리시 ATP 누출 정도를 평가한 결과, C: HepG2 세포를 대상으로 MB6 및 16-BAC 처리시 ATP 누출 정도를 평가한 결과). *P < 0.05, *** P < 0.001.

도 6은 MB6의 MRSA 지속성 균주에 대한 살균 활성을 평가한 결과이다 (A: 각 농도 별 다양한 항생제 및 MB6의 각 MIC 100배 농도의 처리에 따른 MRSA MW2 지속성 균주의 생존율을 확인한 결과, B: MB6 농도 별 처리에 따른 MRSA MW2 지속성 균주에서 SYTOX Green 흡수 결과 (Ex=485 nm, Em=525 nm), C: MB6 및 16-BAC 농도별 처리에 따른 MRSA MW2 지속성 균주의 ATP 누출을 확인한 결과). 오차막대는 평균±SD(n=3)을 나타냄, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

도 7은 MB6의 아미노글리코사이드계 항균제 살균 활성 보조 효능을 평가한 결과이다 (A: 겐타마이신과 MB6의 병용에 따른 MRSA MW2 지속성 균주의 생존율을 확인한 결과, B: 겐타마이신, MB6 및 이들 병용에 따른 바이오필름 내 MRSA MW2 지속성 균주의 생존율을 확인한 결과 (x축의 데이터 포인트는 검출 수준 미만임 ($2X10^2$ CFU/㎖ 또는 디스크당 $2X10^2$ CFU), C: MRSA MW2 지속성 균주에 농도별 MB6 처리에 따른 GTTR 흡수 정도를 확인한 결과 (Ex=589 nm, Em=615 nm), D: 겐타마이신, MB6 및 이들 병용에 따른 MRSA MW2 지속성 균주에 의한 SYTOX Green 흡수 정도를 확인한 결과 (Ex=485 nm, Em=525 nm), E) MB6, 반코마이신(Van) 및 이들 병용에 따른 MRSA MW2 지속성 균주에 의한 SYTOX Green 흡수 정도를 확인한 결과 (좌측패널) 및 MB6, 겐타마이신(Gm) 또는 이들 병용에 따른 MRSA MW2 지속성 균주에서 ATP 누출 정도를 확인한 결과 (우측패널)). 오차막대는 평균±SD(n=3)를 나타냄. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

도 8은 MB6의 답토마이신 항균 활성 보조 효능을 평가한 결과이다 (A: 답토마이신 및 답토마이신, MB6의 병용에 따른 MRSA MW2 지속성 균주의 생존율을 확인한 결과 (x축의 데이터 포인트는 검출 수준 미만임 ($2X10^2$ CFU/㎖ 또는 디스크당 $2X10^2$ CFU), B: 농도별 답토마이신 및 답토마이신, MB6의 병용에 따른 MRSA MW2 지속성 균주에 의한 SYTOX Green 흡수 정도를 확인한 결과 (Ex=485 nm, Em=525 nm), C: 농도별 답토마이신 및 답토마이신, MB6의 병용에 따른 MRSA MW2 지속성 균주에서 ATP 누출 정도를 확인한 결과). 오차막대는 평균±SD(n=3)를 나타냄. ** $P < 0.01$.

도 9는 MB6, 아미노글리코사이드계 항균제 및 답토마이신 삼중 조합에 따른 항균 활성을 평가한 결과이다 (A: 삼중 조합에 따른 MRSA MW2 지속성 균주의 생존율을 확인한 결과, B: 삼중 조합에 따른 MRSA MW2 지속성 균주에 의한 SYTOX Green 흡수 정도를 확인한 결과 (Ex=485 nm, Em=525 nm), C: 삼중 조합에 따른 MRSA MW2 지속성 균주에서 GTTR 흡수 정도를 확인한 결과 (Ex=589 nm, Em=615 nm), D: 삼중 조합에 따른 지속성 균주에서 ATP 누출 정도를 확인한 결과). 오차 막대는 평균±SD(n=3)를 나타냄. ** $P < 0.01$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0072] **재료 및 방법**

[0073] **1. 주요 리소스 및 에이전트**

[0074] 본 실험에 사용된 박테리아 균주, 화학 물질, 염료 및 키트를 포함한 주요 자원 및 제제는 하기 표 1에 상세히 나타내었다.

표 1

[0075]

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Bacterial, nematode strains		
S. aureus MW2	ATCC	BAA-1707
S. aureus ATCC 33591	ATCC	ATCC 33591
S. aureus ATCC 43300	ATCC	ATCC 43300
S. aureus HL16278	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301230
S. aureus HL17064	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301231
S. aureus HL17078	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301232
S. aureus HL18380	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301233
S. aureus HL18807	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301234
S. aureus HL18840	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301235
S. aureus HL18883	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301236
S. aureus HL18888	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301237
S. aureus HL20835	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301238
S. aureus HL21008	Hallym University College of Medicine	BioSample Accession #: SAMN17301239
S. aureus 0215	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0215
S. aureus 0216	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0216
S. aureus 0217	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0217
S. aureus 0218	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0218
S. aureus 0219	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0219
S. aureus 0220	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0220
S. aureus 0221	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0221
S. aureus 0222	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0222
S. aureus 0223	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0223
S. aureus 0224	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0224
S. aureus 0225	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0225
S. aureus 0226	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0226
S. aureus 0227	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0227
S. aureus 0228	CDC & FDA Antibiotic Resistance Isolate Bank	AR Bank # 0228
S. aureus VRS1	(Kos *et al.*, 2012)	BioSample Accession #: SAMN02596782
E. faecium E007	(Garsin *et al.*, 2001)	
K. pneumoniae WGLW2	BEI Resources	HM-751
A. baumannii ATCC 17978	ATCC	ATCC 17978
P. aeruginosa PA14	(Rahme *et al.*, 1995)	BioSample Accession #: SAMN 33794324

E. aerogenes ATCC 13048	ATCC	ATCC 13048
C. elegans AU37	Caenorhabditis Genetics Center	AU37
Cells and cell lines		**Cat#**
Human red blood cell	Innovative Research	IWB3ALS40ML
HEK-293	Korean Cell Line Bank	21573
HepG2	Korean Cell Line Bank	88065
Chemicals and media		**Cat#**
Cation-adjust Mueller-Hinton Broth	BD	212322
Tryptic Soy Broth	BD	211825
Brain heart infusion broth	BD	237500
Agar	Sigma-Aldrich	A1296
HEPES (1M)	Gibco	15630080
FBS	Gibco	16000044
DMEM	Gibco	11965092
DMEM/F-12	Gibco	11320033
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich	D2438
Methanol	Sigma-Aldrich	34860
Vancomycin	Sigma-Aldrich	V2002
Gentamicin	Sigma-Aldrich	G1264
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich	17850
Daptomycin	Tocris	3917
Phosphatidylglycerol	Avanti Polar Lipids	841188P
Cardiolipin	Avanti Polar Lipids	841199P
Lysyl phosphatidylglycerol	Avanti Polar Lipids	840520P
MB1	Enamine	Z46395311
MB2	Enamine	Z46377505
MB3	Enamine	Z46395636
MB4	Enamine	Z46377518
MB5	Enamine	Z46384180
MB6	Enamine	Z46391767
SYTOX Green	Invitrogen	S7020
Benzyl Alcohol	Sigma-Aldrich	305197
Triton X-100	Sigma-Aldrich	93443
Critical Commercial Assays		**Cat#**
RealTime-Glo™ Extracellular ATP Assay	Promega	GA5012
Fluorometric Intracellular ROS kit	Sigma-Aldrich	MAK143

[0076] **2. 박테리아 균주 및 성장 조건**

[0077] 스타필로코커스 아루레우스 (*S. aureus*)는 TSB (tryptic soy broth) 배지에서 배양한 반면 엔테로코커스 패시움 (*Enterococcus faecium*)은 BHI (brain heart infusion) 배지에서 배양하였다. 클렙시엘라 뉴모니애(*Klebsiella pneumoniae*), 아시네토박터 바우마니 (*Acinetobacter baumannii*), 슈도모나스 에어루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 및 엔테로박터 에어로지니스 (*Enterobacter aerogenes*)를 LB (Lennox) 배지에서 배양하였다. 오버나잇 배양을 준비하기 위해 각 박테리아 균주의 단일 콜로니를 5 ㎖의 적절한 액체 배지에 접종하고 200 rpm에서 일정하게 진탕하면서 18~24시간 동안 37℃에서 배양하였다.

[0078] **3. 항균 및 화학 용액의 준비**

[0079] 옥사실린 (oxacillin), 겐타마이신 (gentamicin), 반코마이신 (vancomycin) 및 답토마이신 (daptomycin)을 이중 증류수(ddH_2O)에 용해시켰다. 한편, 시프로플록사신 (ciprofloxaxin)은 0.1N HCl에 용해시켰다. 새로운 종류의 화합물인 MB6 포함 모든 메틸아잔디일 비스아세타마이드 (methylazanediyl bisacetamide) 유도체는

DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시켰다. 모든 항균 용액은 처음에 10 mg/mℓ의 저장 농도를 설정하도록 준비하였다. 다양한 실험적 분석을 위하여, 이러한 원액은 원하는 작동 농도를 얻기 위해 적절한 배지 또는 완충액에서 필요에 따라 추가로 희석하였다.

[0080] **4. 최소 억제 농도(MIC) 결정**

[0081] 항균제 및 메틸아잔디일 비스아세타마이드 유도체의 MIC는 Clinical and Laboratory Standards Institute(Institute, 2012)에서 제공한 지침에 따라 마이크로브로스 희석 방법에 따라 결정되었다. 간략하게, 하룻동안 배양한 박테리아 배양물을 양이온 조정된 CaMH (Mueller-Hinton) 배지를 사용하여 $1X10^6$ CFU/mℓ의 농도로 희석하였다. 그런 다음 테스트 화합물을 CaMH 배지로 2배 연속 희석하여 96-웰 플레이트(Corning Falcon Cat# 353072) 내에서 농도 범위가 128 ㎍/mℓ에서 0.25 ㎍/mℓ에 이르는 결과를 얻었다. 이어서, 희석된 박테리아 샘플 50 ㎕를 다양한 농도로 용해된 테스트 화합물이 있는 50 ㎕의 배지를 포함하는 각 웰에 첨가하였다. 미처리 샘플 (약물 농도 0 ㎍/mℓ)을 음성 대조군으로 사용하였다. 그런 다음 이 플레이트를 37℃에서 밤새 배양한 후 Cytation 5 multi-mode reader (BioTek, USA)를 사용하여 600 nm(OD_{600})에서 광학 밀도를 측정하였다. 박테리아 성장은 OD600 ≥ 0.1에서 정의되었다. 실험은 독립적으로 세 번 반복하였다.

[0082] **5. 예쁜꼬마선충 (*C. elegans*)-MRSA 감염 검정**

[0083] 온도에 민감한 멸균 및 면역 저하된 *C. elegans* AU37[glp-4(bn^2);sek-1(km^4)]는 *Escherichia coli* HB101가 깔린 10 ㎝ 슬로우 킬(SK) 한천 플레이트에서 임신한 성충으로 성장하였다. 알(eggs)을 표백 처리하여 수집하고 M9 완충액으로 3회 세척하였다. M9 완충액에 재현탁된 알을 15℃에서 48시간 동안 부드럽게 흔들어 L1 유충으로 부화시켰다. 약 4,500마리의 L1 유충을 *E. coli* HB101가 깔린 각 SK 플레이트에 분배하고 25℃에서 52시간 동안 배양하여 유충을 불임의 어린 성충으로 성장시켰다. 성충을 수확하여 6회 세척하고 M9 완충액에 1 mℓ당 1,000마리의 농도로 재현탁하였다.

[0084] 바닥이 투명한 검은색 384웰 플레이트(Corning no. 3712)에 원하는 농도의 MB6 또는 반코마이신을 포함하는 20 ㎕ M9 완충액을 넣었다. 그런 다음 Multidrop Combi Reagent Dispenser를 사용하여 15 ㎕의 성충 현탁액을 384-웰 플레이트의 각 웰에 약 15마리의 벌레를 분주하였다. *S. aureus* MW2의 배양물을 M9 완충액 중 20% TSB로 OD_{600} 0.08로 희석하였다. 희석된 배양액 35 ㎕를 384-웰 분석 플레이트에 첨가한 후 가스 투과성 멤브레인(Breathe-Easy; Diversified Biotech, USA)으로 밀봉하였다. 분석 플레이트를 25℃의 가습 챔버에서 5일 동안 배양하였다.

[0085] 배양이 완료되면 405 TS 마이크로플레이트 세척기(BioTek, USA)를 사용하여 M9 완충액으로 9회 세척하여 각 웰의 박테리아 상층액과 생물막을 제거하였다. 포괄적인 제거를 보장하기 위해 MixMate(Eppendorf, Germany)를 사용하여 45초 동안 1,800 rpm에서 세 번째 세척 주기마다 플레이트를 교반하였다. 그런 다음 세척된 성충 중 죽은 성충을 선택적으로 표시하는 얼룩인 0.7 μM SYTOX Orange로 밤새 염색하였다. 각 웰의 성충은 Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader(BioTek, USA)를 사용하여 이미지화하였으며 투과광과 RFP(excitation 531/40 nm, emission 593/40 nm) 형광 이미지를 4X 대물렌즈로 캡처하였다. 감염 분석은 독립적으로 세 번 수행하였다.

[0086] **6. 지수 위상 MRSA 살상 동역학 분석**

[0087] *S. aureus* MW2의 하룻밤 배양물을 250 mℓ 플라스크에서 25 mℓ TBS로 1:10,000으로 희석하였다. 이 희석된 배양물을 0.1의 OD_{600}으로 표시되는 지수기에 도달할 때까지 200 rpm으로 진탕시키면서 37℃에서 인큐베이션하였다. 이러한 기하급수적 단계 배양물을 원하는 농도의 각 특정 항미생물제의 두 배를 포함하는 동일한 부피의 prewarmed TSB와 혼합하였다. 37℃에서 200 rpm으로 진탕한 후 인큐베이션한 후 샘플을 매시간 수집하고 PBS로 한 번 세척하고 PBS로 10배 연속 희석한 뒤 CaMH 한천 플레이트에 점적하였다. 37℃에서 밤새 배양한 후, 살아있는 세포를 콜로니 계수로 정량하였다. 실험은 생물학적 삼중으로 실행되었다.

[0088] **7. 직렬 통과 분석을 통한 저항 선택**

[0089] 저항성 선택은 이전에 확립된 프로토콜을 약간 수정하여 수행된 15일 연속 계대 분석을 통해 수행되었다. 간단히 말해서, 20, 24 및 32 ㎍/mℓ의 초기 농도에서 시작하여 CaMH 배지의 2배 연속 희석을 통해 확장된 범위의 MB6 농도를 제조하였다. 이 프로세스는 96-웰 플레이트의 3개 컬럼에 걸쳐 수행되어 24개의 뚜렷한 농도 구배를 생성한다. 플레이트에는 양성 대조군으로 사용되는 시프로플록사신의 확장된 구배 한 세트와 함께 이 확장된 MB6 구배의 세 세트가 포함되었다.

[0090] 이후, CaMH에서 $1X10^6$ CFU/㎖의 밀도로 50 ㎕의 *S. aureus* MW2세포를 MB6 또는 시프로플록사신의 확장 구배 50 ㎕가 이미 포함된 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 그런 다음 분석 플레이트를 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 600 nm에서의 광학 밀도는 Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader(BioTek, USA)를 사용하여 측정하였으며 박테리아 성장은 OD_{600} ≥ 0.1에서 정의되었다. 가장 높은 항균 농도에서 성장한 샘플을 CaMH로 1,000배 희석하고, 새로운 확장된 구배 플레이트로 옮겼다. 샘플의 나머지는 최종 글리세롤 농도가 16%가 되도록 글리세롤과 혼합한 후 -80℃에서 보관하였다.

[0091] **8. 투과 전자 현미경**

[0092] MRSA MW2의 오버나잇 배양물을 신선한 TSB에서 1:10,000으로 희석하고 0.1의 OD_{600}으로 표시되는 지수기에 도달할 때까지 37℃, 200 rpm에서 배양하였다. 이 지수기 세포를 200 rpm에서 진탕하면서 37℃에서 2시간 동안 20 ㎍/㎖(5X MIC) MB6 또는 0.1% DMSO(대조군)로 처리하였다. 처리된 세균 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 2.5% 글루타르알데히드를 포함하는 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4) 1 ㎖에 2시간 동안 고정시켰다. 이후 고정된 균체를 0.1M 인산완충액으로 3회 세척한 후 다시 0.1M 인산완충액(pH 7.4)에 1% 사산화오스뮴 (osmium tetroxide)으로 1시간 동안 고정한 후 2회 더 세척하였다. 고정된 세포는 각 농도에서 10분 동안 다양한 농도의 에탄올 (50, 60, 70, 80, 90, 95, 100%)에서 탈수되었으며 마지막 2회는 100% 에탄올에서 탈수되었다. 이어서 프로필렌 옥사이드에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 Epon-812에폭시 수지에 끼워넣었다. 다이아몬드 나이프가 장착된 Leica EM UC7 ultramicrotome을 사용하여 약 60~70 nm 두께의 초박 절편을 준비하였다. 섹션은 우라닐 아세테이트 (uranyl acetate)와 리드 시트레이트 (lead citrate)로 염색하였다. 샘플은 80kV의 가속 전압에서 작동하는 Hitachi H-7650 투과 전자 현미경(Tokyo, Japan)을 사용하여 이화 의학 연구소에서 검사되었다. 얻은 이미지는 10개 이상의 개별 박테리아 세포에서 관찰된 박테리아 미세구조를 나타낸다.

[0093] **9. 막 투과성 평가**

[0094] MRSA의 막 투과성은 이전에 약술한 절차에 따라 막 불투과성 DNA 결합 염료인 SYTOX Green을 사용하여 평가하였다. MRSA 지수상 또는 지속성 균주를 PBS로 3회 세척한 다음 OD_{600}을 0.4로 조정하였다. 그 다음, SYTOX Green을 세척된 세포에 최종 농도 5 μM로 첨가하였다. 샘플을 실온의 암실에서 30분 동안 배양하였다. 그런 다음 각 샘플의 50 ㎕ 분취량을 표시된 농도의 화합물을 포함하는 검은색 96-웰 플레이트의 각 웰에 분주하였다. 형광 측정은 각각 485 nm 및 525 nm의 여기 및 방출 파장으로 설정된 Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader(BioTek, USA)를 사용하여 실온에서 수행하였다. 실험은 세 번 수행하였다.

[0095] **10. 세포 내 반응성 산소종(ROS) 수준 평가**

[0096] *S. aureus* MW2에서 MB6에 의한 세포내 ROS의 유도는 제조업체의 지침에 따라 Fluorometric Intracellular ROS kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 평가되었다. 박테리아는 CaMH 배지에서 약 1.0의 OD_{600}에 도달하도록 배양되었다. 이어서, 10 ㎕의 형광 염료 용액을 다양한 농도의 MB6 10 ㎕가 이미 들어 있는 검은색의 평평하고 바닥이 투명한 384-웰 플레이트(Corning Cat no. 3764)의 각 웰에 분주하였다. 플레이트를 암실에서 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후 Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader(BioTek, USA)를 사용하여 여기(excitation) 및 방출(emission) 파장을 각각 490 nm 및 520 nm로 설정하여 6시간 동안 형광 강도를 모니터링하였다. 이 분석은 3회 수행되었다.

[0097] **11. 박테리아 세포에서 ATP 누출 평가**

[0098] 지수기 및 지속성 *S. aureus* MW2 세포 모두로부터의 세포외 ATP 방출은 RealTime-Glo™ Extracellular ATP Assay (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 측정되었다. 4X ATP 분석 키트 시약 혼합물을 제조업체의 지침에 따라 준비하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 다음 PBS에 재현탁하여 OD_{600}이 0.4가 되도록 조정하였다. 이 세포 현탁액의 50 ㎕ 분취량을 원하는 최종 농도의 2배인 50 ㎕의 항균제로 미리 채워진 검은색의 바닥이 투명한 96웰 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 그런 다음 플레이트를 1시간 동안 흔들지 않고 빛이 차단된 37℃에서 배양하였다. 이후 33.4 ㎕의 4X ATP 분석 키트 시약 혼합물을 각 웰에 첨가하고 Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader(BioTek, USA)를 사용하여 발광을 정량화하였다. 모든 실험은 세 번 수행하였다.

[0099] **12. 모든 원자 분자 역학 시뮬레이션**

[0100] MB6와 GROMACS에 기반한 시뮬레이션된 박테리아 원형질막 사이의 상호작용을 조사하기 위해 MD 시뮬레이션을 수

행하였다. GROMOS54a7 force field와 호환되는 MB6의 토폴로지(topologies) 및 매개변수는 Automated Topology Builder(ATB)를 사용하여 계산하였으며 다음을 수행할 수 있다. molid: 1223233을 사용하여 웹 사이트(https://atb.uq.edu.au/)에서 자유롭게 액세스할 수 있다. *S. aureus*의 원형질막은 연구에 널리 사용되는 Berger's lipid force field 와 함께 88개의 DOPC 및 40개의 DOPG 지질 (~7:3 비율)을 포함하는 혼합 지질 이중층으로 모델링되었다. 시뮬레이션 설정은 SPC/E water model과 fast smooth particle-mesh Ewald 방법을 사용하여 장거리 정전기 상호 작용을 계산하였다. 시스템 중립성을 유지하기 위해 40개의 나트륨 이온이 포함되었다. 우리 시스템의 초기 크기는 5.96X5.96X12.3 nm이며 모든 방향에서 주기적인 경계 조건을 갖는다. 시간 단계(time step)는 2 fs이고 NPT 앙상블(1atm, 300K)이 채택되었다. 용매화된 지질 시스템의 500 ns로 초기 평형화 후, MB6를 막 위의 수상으로 도입한 후 추가로 100 ns로 재평형화하였다. MB6 방출(releasing)과 동시에 이 시스템은 100 ps마다 MB6와 지질 이중층 사이의 질량 중심(COM) 거리를 기록하는 또 다른 500 ns 동안 시뮬레이션되었다. 또한, 조정된 MD, umbrella sampling 및 WHAM (weighted histogram analysis method)를 사용하여 MB6의 막으로의 침투와 관련된 자유 에너지 프로필을 도출하기 위한 시뮬레이션을 추가로 수행하였다. 열 에너지 kBT는 에너지 단위로 사용되었다. umbrella sampling에서 42개의 창 각각은 25 ns(너비: 0.1 nm) 동안 시뮬레이션되었으며, 처음 5 ns는 WHAM 분석에서 폐기되었다.

[0101] **13. 인지질 결합 분석**

[0102] MB6의 결합 친화력은 checkerboard microdilution assay에서 도출된 MIC 값의 변화를 기반으로 평가되었다. 포스파티딜글리세롤(PG), lysyl-PG 및 카디오리핀(cardiolipin)을 포함하는 인지질을 메탄올에 용해시켜 10 mg/mℓ 농도의 원액을 준비하였다. 96-웰 플레이트에서 MB6 및 각 인지질 모두에 대해 다양한 농도를 준비하였다. MB6의 경우 x축을 따라 128 ㎍/mℓ부터 시작하여 최종 농도의 4배 희석 농도를 준비하였다. 유사하게 인지질 또한 최종 농도의 4배 희석 농도를 준비하여 y축을 따라 256 ㎍/mℓ부터 시작하여 준비하였다.

[0103] 50 ㎕의 MB6 및 인지질 혼합물을 포함하는 각 웰에 1×10^6 CFU/mℓ의 박테리아 현탁액 50 ㎕를 첨가하여 최종 부피 100 ㎕를 제조하였다. DNA 합성을 저해하며 항균효과를 나타내는 것으로 알려진 시프로플록사신을 음성 대조군으로 사용하였다. 37℃에서 밤새 배양한 후 Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader(BioTek, USA)를 사용하여 OD_{600}을 측정하였다. 박테리아 성장은 $OD_{600} \geq 0.1$에서 정의되었다. 실험은 독립적으로 세 번 반복되었다.

[0104] **14. 용혈 분석**

[0105] 25% 농도의 세척된 인간 적혈구(RBC)는 Innovative Research(미국 미주리주 Novi)에서 구입하였다. RBC는 PBS를 사용하여 4%의 농도로 추가로 희석하였다. 이어서, 희석된 RBC 100 ㎕를 96-웰 플레이트에 PBS로 2배 연속 희석된 MB6 100 ㎕, PBS 100 ㎕(음성 대조군) 또는 2% Triton X-100(양성 대조군)을 첨가하였다. 96-웰 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 500Xg에서 5분 동안 원심분리하였다. 상등액 100 ㎕를 조심스럽게 새 96-웰 플레이트에 옮기고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음 공식을 사용하여 용혈을 백분율로 정량화하였다: (화합물 처리 시료의 A540-0.1% PBS 처리 시료의 A540)/(1% Triton X-100 처리 시료의 A540-0.1% DMSO 처리 시료의 A540)×100. 다른 배치의 인간 적혈구를 사용하여 실험을 독립적으로 3회 반복하였다.

[0106] **15. 포유류 세포에서 ATP 누출 평가**

[0107] 불멸화 인간 배아 신장 세포주 HEK-293 및 인간 간암 세포주 HepG2로부터의 ATP 누출은 MB6 처리에 대한 반응으로 RealTime-GloTM Extracellular ATP Assay(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 평가되었다. HEK-293 세포는 15 mM HEPES가 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco)에서 배양되었고 HepG2 세포는 DMEM/F-12(Gibco)에서 배양되었다. 두 배지 모두 10% FBS 및 페니실린-스트렙토마이신(100 units/mℓ)으로 보충되었고, 세포는 37℃의 가습된 5% CO_2 인큐베이터에서 배양되었다. 배양액이 70-80% 컨플루언스(confluence)에 도달하면, 세포를 해당 배양 배지의 웰당 100 ㎕ 부피를 포함하는 조직 배양 처리된 96-웰 플레이트로 옮겼다. ATP 누출 평가를 위해 세포를 PBS로 1회 세척한 후 혈청 및 항생제가 없는 해당 배양 배지로 다시 세척하였다. 이어서, 세포를 무혈청 무항생제 배양 배지에서 다양한 농도의 MB6 또는 16-BAC 100 ㎕에 1시간 동안 노출시켰다. 후처리 후, 각 웰에 33.4 ㎕의 4X 시약 혼합물을 첨가하고, Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader(BioTek, USA)를 사용하여 생성된 발광을 정량화하였다. 모든 실험은 세 번 수행되었다.

[0108] **16. MRSA MW2 지속성 균주의 준비**

[0109] MRSA MW2 지속성 균주는 확립된 비산염 처리 방법에 따라 생성되었다. 이 접근법은 비산염을 사용하여 세포 내

ATP 합성을 억제함으로써 *S. aureus* 지속성 균주의 형성을 촉진한다. 초기에, *S. aureus* MW2의 오버나잇 배양물을 250 ㎖ 플라스크에서 25 ㎖ TBS로 1:10,000이 되도록 희석하였다. 그런 다음 희석된 배양액을 0.4의 OD_{600}으로 표시되는 지수기에 도달할 때까지 200 rpm에서 진탕하면서 37℃에서 배양하였다. 제이비산나트륨 7수화물(Sodium arsenate dibasic heptahydrate, Sigma cat no. A6756)을 배양액에 첨가하여 최종 농도가 5mM이 되도록 한 다음, 37℃에서 200 rpm으로 진탕시키면서 30분간 더 배양하였다. 그 후, 비산염 처리된 MRSA 세포를 PBS로 3회 세척하고 PBS로 재현탁하여 OD_{600}이 0.1가 되도록 하였다. MRSA 지속 세포의 성공적인 분리는 반코마이신, 겐타마이신 및 시프로플록사신의 100X MIC로 4시간 처리 후 세포 생존력을 유지함으로써 검증되었다.

[0110] **17. MRSA 생물막 지속 살상 분석**

[0111] *S. aureus* MW2 오버나잇 배양물을 0.2% 글루코스 및 3% NaCl이 보충된 TSB에서 1:200으로 희석하였다. 24-웰 플레이트의 각 웰에는 13 ㎜ 혼합 셀룰로오스 에스테르 막(GSWP01300; EMD Millipore, USA)이 구비되어 있고 여기에 희석된 배양액 1 ㎖이 첨가되었다. 그런 다음 이 샘플을 37℃에서 정적으로 배양하였다. 24시간 후 형성된 생물막을 1 ㎖ PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 지시된 농도의 항생제를 포함하는 PBS 1 ㎖를 각 웰에 주입하고 플레이트를 37℃에서 추가로 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 멤브레인을 다시 1 ㎖ PBS로 3회 세척하고 1 ㎖ PBS로 채워진 1.5 ㎖ 마이크로원심분리기 튜브로 옮겼다. 그 후, 샘플을 Bronson 초음파 수조에서 10분 동안 초음파 처리하였다. 이 초음파 처리된 샘플을 PBS를 사용하여 10배씩 연속 희석하고 CaMH 한천 플레이트에 스폿 도금하였다. 플레이트를 37℃에서 배양한 후 생존 세포의 수를 추정하기 위해 콜로니를 계수하였다.

[0112] **18. 겐타마이신-텍사스 레드 흡수 분석**

[0113] Texas Red와 접합된 겐타마이신의 흡수는 약간의 수정이 있는 확립된 방법에 따라 분석되었다. AAT Bioquest(Cat no. 24300, Pleasanton, CA, USA)에서 구입한 GTTR(Gentamicin-Texas Red) 결합체를 DMSO에 용해하여 5 ㎎/㎖ 스톡 용액을 제조하였다. 표시된 농도의 화합물과 함께 16 ㎍/㎖ GTTR을 MRSA 지속성 균주에 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 약물 처리된 지속 세포를 PBS로 3회 세척하였다. 이 세척된 세포 100 ㎕를 바닥이 투명한 블록 9웰 플레이트로 옮겼다. 형광 강도는 589 ㎚의 여기(excitation) 파장과 615 ㎚의 방출(emission) 파장을 갖는 Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader(BioTek, USA)를 사용하여 평가되었다. 실험은 생물학적으로 세번 수행되었다.

[0114] **실시예 1. 다제내성 균주에 항균활성을 갖는 메틸아잔디일 비스아세트아마이드 (methylazanediyl bisacetamide) 유도체의 선별**

[0115] **1. ESKAPE 균주에 대한 항균활성 평가**

[0116] 우선, 다제내성 균주에 항균활성을 갖는 메틸아잔디일 비스아세트아마이드 (methylazanediyl bisacetamide) 유도체를 선별하기 위하여, 6종류 (Z46395311, Z46377505, Z46395636, Z46377518, Z46384180 및 Z46391767(순서대로 MB1 내지 MB6로도 명명함))의 메틸아잔디일 비스아세트아마이드 유도체를 이용하여, MRSA 균주인 *S. aureus* MW2에 대한 항균활성을 평가하였다.

[0117] 도 1에 나타낸 바와 같이, 스크링된 6개의 화합물 중 Z46391767 (2-[({[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoyl}methyl)(methyl)amino]-N-(2,2-difluoro-1,3-dioxaindan-5-yl)acetamide)만이 *S. aureus* MW2에 대한 항균활성을 갖는 유일한 화합물로 확인되었다. 이에, 해당 화합물을 'MB6'라 명명하고 이어지는 실험을 진행하였다.

[0118] 항균 활성을 추가로 특성화하기 위하여, ESKAPE 균주로 통칭되는 6가지 주요 박테리아 병원체에 대한 MB6의 항균활성을 평가하였고, 그 결과를 하기 표 2 (단위는 ㎍/㎖, 생략)에 나타내었다. ESKAPE 균주는 일반적으로 병원 감염과 관련이 있고 항균 내성 발생 경향이 높은 것으로 보고되고 있다.

표 2

[0119]

Strains	MB6	Vancomycin	Gentamicin	Ciprofloxacin
S. aureus MW2	4	1	>64	>64
E. faecium E007	4	1	>64	64
K. pneumoniae WGLW2	>64	>64	1	0.031
A. baumannii ATCC 17978	>64	>64	1	0.25
P. aeruginosa PA14	>64	>64	2	0.063

E. aerogenes ATCC 13048	>64	>64	2	0.031

[0120] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, MB6는 스테필로코커스 아우레우스 (*S. aureus*) MW2 및 엔테로코커스 패시움 (*Enterococcus faecium*) E007과 같은 그람 양성 박테리아에 대해 4 ㎍/㎖의 최소 억제 농도(MIC)를 나타내었다. 그러나 MB6는 클렙시엘라 뉴모니애 (*Klebsiella pneumoniae*) WGLW2, 아시네토박터 바오마니 (*Acinetobacter baumannii*) ATCC17978, 슈도모나스 애루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) PA14 및 엔테로박터 애로기네스 (*Enterobacter aerogenes*) ATCC13048을 포함한 그람 음성균에 대해서는 항균 활성을 나타내지 않았다.

[0121] **2. 다제내성 황색포도알균(*S. aureus* strain)에 대한 항균활성 평가**

[0122] 본 실험에서는 MRSA 임상 분리균 (MRSA clinical isolates), FDA-CDC 항균제 내성 은행의 반코마이신 중급 황색포도알균 (vancomycin-intermediate *S. aureus*), 반코마이신 내성 황색포도알균 VRS1 (vancomycin-resistant *S. aureus* strain VRS1)을 포함한 다양한 다제내성 황색포도알균(*S. aureus*)에 대한 항균 효능을 평가하여, 그 결과를 하기 표 3(단위는 ㎍/㎖, 생략)에 나타내었다.

표 3

[0123]

S. aureus strains	MB6	Oxa	Van	Dap	Gm	Cipro
ATCC 33591	4	>64	1	1	4	0.5
ATCC 43300	4	16	2	1	>64	0.5
HLSA 16278	4	>64	1	2	0.5	1
HLSA 17064	4	>64	1	2	>64	64
HLSA 17078	4	64	1	2	64	16
HLSA 18380	4	>64	1	2	0.5	16
HLSA 18807	4	>64	1	2	0.5	64
HLSA 18840	4	>64	1	2	>64	32
HLSA 18883	4	>64	1	2	>64	>64
HLSA 18888	4	>64	1	2	0.5	>64
HLSA 20835	4	>64	1	2	0.5	32
HLSA 21008	4	>64	1	1	0.5	0.125
VISA 0215	4	32	4	4	0.5	>64
VISA 0216	4	8	8	2	0.25	16
VISA 0217	4	8	4	4	1	32
VISA 0218	4	64	4	8	1	16
VISA 0219	4	>64	4	4	>64	16
VISA 0220	4	8	4	2	0.25	16
VISA 0221	4	8	4	8	>64	16
VISA 0222	4	0.25	4	2	1	0.25
VISA 0223	4	64	4	4	1	0.5
VISA 0224	4	>64	4	4	0.25	32
VISA 0225	4	16	4	16	0.5	32
VISA 0226	4	8	4	8	0.25	0.5
VISA 0227	4	1	4	4	0.5	64
VISA 0228	4	16	4	4	1	>64
VRS1	4	>64	>64	2	64	64

[0124] 표 3에 나타난 바와 같이, MB6는 모든 다제내성 황색포도알균 테스트 균주에 대해 4 ㎍/㎖의 MIC 값을 일관되게 보여주었다. 이러한 결과는 MB6가 다제내성 황색포도알균에 대한 항균 효능을 갖는 독특한 메틸아잔디일 비스아세트아미드 유도체임을 입증한다.

[0125] **3. 예쁜꼬마선충 (*Caenorhabditis elegans*)에 대한 감염 분석**

[0126] 시험관 내에서 항균 활성을 확인한 화합물 중 제한된 생체 내 유효성 또는 독성을 나타내는 화합물이 종종 존재하므로, 본 실험에서는 예쁜꼬마선충 (*C. elegans*) 감염 분석을 사용하여 MB6의 생체 내 항균 활성 및 독성을 동시에 평가하고자 하였다. 예쁜꼬마선충은 박테리아 감염 및 독성 시험 연구에 적합한 전체 동물 모델이다. 도

2 A에 나타난 바와 같이, MB6는 5 ㎍/㎖의 중간 유효 농도(EC50)에서 MRSA에 감염된 예쁜꼬마선충을 치료할 수 있었고, 64㎍/㎖의 높은 농도에서도 독성이 관찰되지 않았다. 상기 표 2와 도 2 A에서의 MRSA MW2에 대한 EC50과 MIC 값 사이의 일치는 예쁜꼬마선충의 MRSA 감염 치료에 있어서 MB6가 항균 작용에 기인함을 나타낸다.

[0127] **4. 다제내성균에 대한 MB6의 살균·정균 활성 평가**

[0128] 본 실험에서는 MB6에 살균 또는 정균 특성이 있는지를 조사하였다. 도 2 B에 나타난 바와 같이, MB6는 살균효과를 보인다고 알려져있는 반코마이신의 MIC 값 1 ㎍/㎖에 비해 MIC 값이 4 ㎍/㎖로 더 높음에도 불구하고, 우수한 살균력을 나타내었다. 10 ㎍/㎖의 MB6은 4시간 동안 기하급수적 *S. aureus* MW2의 생존력을 4-log로 현저하게 감소시켰다. 반면, 반코마이신은 같은 농도에서도 10^7 CFU/㎖에서 1-log만 감소하였다.

[0129] 또한, 본 실험에서는 박테리아를 15일 동안 MB6에 대해 하위 MIC 수준에 노출시켜 *S. aureus* MW2의 내성 발현 잠재력을 평가하였다. MRSA 내성을 생성하는 것으로 알려진 시프로플록사신(ciprofloxacin)을 양성 대조군으로 이용하였다. 도 2 C에 나타난 바와 같이, 이 기간 동안 *S. aureus* MW2가 시프로플록사신에 노출되면 시프로플록사신에 대해 6배 높은 MIC를 보이며 저항성을 나타내는 *S. aureus* MW2 돌연변이가 출현하였다. 반면, MB6 처리는 저항성 돌연변이의 생성을 초래하지 않았다. 이러한 결과는 MB6가 저항성 발달 가능성이 낮은 속살제(fast-killing agent)임을 나타낸다.

[0130] **실시예 2. MB6의 항균활성 메커니즘 확인**

[0131] **1. MRSA의 막 무결성을 방해**

[0132] *S. aureus* MW2의 형태에 대한 MB6의 영향을 투과전자현미경을 통해 조사하였다. 도 3 A에 나타난 바와 같이, S. aureus MW2 세포는 20 ㎍/㎖(5X MIC) MB6에 1시간 노출된 후, 세포막에 세포내 메소좀 유사 구조와 표면 함몰을 나타내었다. 이는 MB6가 세균막을 표적으로 삼을 수 있음을 나타낸다.

[0133] 또한, 세균막에 대한 MB6의 효과를 조사하기 위해 막 불투과성 DNA 결합 염료인 SYTOX Green을 사용하여 MB6가 막 무결성에 미치는 영향을 평가하였다. 도 3 B에 나타난 바와 같이, MB6의 처리는 MIC와 같거나 그 이상에서 SYTOX Green 형광을 빠르게 증가시켰다. 이는 MB6이 박테리아 투과성을 손상시킴을 시사한다. 이에, 빠른 살상 속도, 낮은 저항 발달 가능성 및 SYTOX Green 막 투과성의 빠른 유도를 고려하여 MB6가 막 파괴제로 작용할 수 있다는 가설을 세웠다.

[0134] 막 파괴자는 세포 내 ATP의 누출을 일으킬 수 있기 때문에, MB6 처리로 인해 *S. aureus* MW2 세포 내부에서 ATP 누출이 발생하는지를 확인하기 위해 루시페린-루시퍼라제 생물발광 분석을 사용하였다.

[0135] 도 3 C에 나타난 바와 같이, 4 ㎍/㎖(1X MIC) 이상의 농도의 MB6으로 처리된 *S. aureus* MW2 세포에서 현저한 발광 증가가 관찰되었다. 이는 MB6가 막 파괴를 유도하여 결과적으로 세포 내 ATP의 누출을 초래함을 나타낸다.

[0136] 한편, 이전 연구에서는 막 파괴가 활성 산소 종(ROS)의 세포 내 축적을 유발할 수 있음을 입증한바, 이에 대해 평가하였다. 도 3 D에 나타난 바와 같이, 4㎍/㎖ 이상의 MB6로 처리된 *S. aureus* MW2 세포에서 세포내 ROS 수준의 급증을 관찰하였다.

[0137] 종합적으로, 이러한 발견은 MB6가 *S. aureus* MW2 세포의 사멸을 유도하는 막 파괴제로 작용함을 시사한다.

[0138] **2. MRSA의 막 지질 이중층과 상호작용**

[0139] 본 실험에서는 *S. aureus*의 음전하를 띠는 지질 이중층을 모방한 DOPC (dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)과 DOPG (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3phospho-(1'-rac-glycerol))의 비율이 7:3으로 구성된 세균막 지질 이중층 모델을 기반으로 한 전원자 분자 역학 (all-atom molecular dynamics, MD) 시뮬레이션을 사용하여 분자 수준에서 막 파괴 메커니즘을 조사하였다.

[0140] 도 4 A에 나타난 바와 같이, MD 시뮬레이션은 중앙 아세트아미드 및 말단 플루오로, 클로로기를 포함하는 극성 영역이 극성 상호작용을 통해 지질의 친수성 헤드와 결합하여 MB6가 처음에 지질막 표면에 모집됨을 확인하였다. 약 100 나노초(nanoseconds)의 지속적인 부착 후 MB6는 막 내부로 침투하여 지질 이중층에 두 개의 비극성 벤젠 고리가 수직으로 매립된 접힌 분자 구성을 나타내며 지질 꼬리와의 소수성 상호 작용을 최적화한다. 이때, 도 4 A에서 MB6 및 나트륨 이온은 큰 구체로 표시하였고, 인지질은 사슬로 표시하였다. MB6, 인지질 및 나트륨 이온의 원자는 수소(흰색), 산소(빨간색), 질소(파란색), 염소(녹색), 불소(황갈색), 탄소(청록색), 인(주황색), 나트륨 (분홍색)으로 표시하였다. 명확성을 위해 물 분자는 표시하지 않았다.

[0141] 도 4 B에 나타난 바와 같이, 이 임베디드 구성은 MB6와 지질 이중층 사이의 질량 중심(COM) 거리의 시간적 변화에서 알 수 있듯이 시뮬레이션의 나머지 시간 동안 안정적으로 유지된다.

[0142] 또한, 도 4 C에 나타난 바와 같이, 엄브렐러 샘플링 방법을 사용한 잠재적 평균 힘 계산은 지질 이중층에 MB6를 삽입하는 것이 에너지적으로 유리하다는 사실을 입증했으며, 약 20kBT의 전달 에너지를 나타냈다.

[0143] 한편, MB6와 *S. aureus*의 지질 이중층 사이의 상호 작용을 이해하기 위하여, *S. aureus* 막의 주요 인지질 성분인, PG (phosphatidyl-glycerol), LPG (lysyl-phosphatidylglycerol) 및 CL (cardiolipin)과 MB6의 친화성을 조사하였다. 이론적 근거는 MB6가 이러한 인지질 중 하나에 대해 특정 친화력을 나타내는 경우, 해당 인지질의 외부 보충이 MB6의 항균 활성을 약화시켜야 한다. 음성 대조군으로는 막 지질 이중층을 통과하는 것으로 알려진 시프로플록사신을 선택하였다. 인지질 농도 범위는 0 ~ 64 ㎍/㎖이다.

[0144] 도 4 D 및 E에 나타난 바와 같이, 예상대로 시프로플록사신의 항균 효능은 테스트된 인지질의 존재에 의해 영향을 받지 않았다. 대조적으로, MB6의 MIC는 다양한 농도의 CL (cardiolipin)과 PG (phosphatidyl-glycerol)가 존재할 때 크게 증가하였다. 특히 CL (cardiolipin) 농도가 8 ㎍/㎖ 및 32 ㎍/㎖인 경우 MB6의 MIC는 각각 2 및 4배 증가하였다. 마찬가지로 PG (phosphatidyl-glycerol) 농도가 16 ㎍/㎖ 및 64 ㎍/㎖인 경우에도 MB6의 MIC가 각각 2 및 4배 증가하였다. 그러나 64 ㎍/㎖의 고농도 LPG (lysyl-phosphatidylglycerol)는 MB6의 MIC를 약 2배 증가시키는데 그쳤다.

[0145] 이러한 결과는 MB6가 LPG (lysyl-phosphatidylglycerol)보다 CL (cardiolipin)과 PG (phosphatidyl-glycerol)에 대한 뚜렷한 선호도를 가지고 있음을 시사한다. 이러한 결과를 종합하면, MB6의 황색포도알균에 대한 항균 활성은 특정 인지질, 특히 CL (cardiolipin)과 PG (phosphatidyl-glycerol)에 대한 선택적 친화성에서 비롯된 것으로 추정할 수 있다. MB6는 막 지질 이중층에 결합하여 막의 강성을 파괴하고 세포 내 ROS 축적을 증폭시켜 궁극적으로 박테리아 세포 사멸을 유도하는 것이다.

[0146] **실시예 3. MB6의 세균막 상호작용 평가**

[0147] 막 표적 항균제 개발에서 종종 직면하는 중요한 과제인 박테리아 막 및 포유류 막과 무차별적으로 상호 작용하는 경향을 고려하여, 본 실험에서는 MB6와 다양한 유형의 포유류 세포막의 상호 작용을 조사하였다.

[0148] 도 5 A에 나타난 바와 같이, 인간 적혈구에 대한 MB6의 영향을 테스트한 결과, 64 ㎍/㎖ MB6 처리농도까지 용혈이 관찰되지 않았다.

[0149] 이에, 인간 배아 신장 세포주 HEK-293과 인간 간종 HepG2에서 MB6에 의한 ATP 누출을 평가하여 이 결과를 추가로 검증하고자 하였다.

[0150] 도 5 B 및 C에 나타난 바와 같이, 양이온성 세제인 벤질디메틸헥사데실암모늄염화물(16-BAC)은 각각 8 ㎍/㎖ 및 16 ㎍/㎖ 이상의 농도에서 HEK-293(도 4 B) 및 HepG2(도 4 C)에서 ATP 누출을 유도한 반면, 이들 세포를 MB6를 64 ㎍/㎖ 농도까지 처리했을 때는 유의한 ATP 누출이 관찰되지 않았다.

[0151] 이러한 종합적인 관찰은 MB6가 포유류 세포막에 비해 박테리아 세포막에 대해 뚜렷한 선택성을 가지고 있음을 나타낸다. 이러한 관찰은 앞서 언급한 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)-MRSA 감염 분석에서 독성이 검출되지 않은 것과 일치하는 결과이다.

[0152] **실시예 4. MB6의 MRSA 지속성 균주에 대한 살균 활성 평가**

[0153] 일부 막 파괴 항균제는 박테리아 잔류균을 효과적으로 제거하지만, 모든 막 파괴 항균제가 이러한 능력을 입증한 것은 아니다. 따라서, 본 실험에서는 MRSA 지속성 균주 (persisters)에 대한 MB6의 살균 활성을 평가하고자 하였다.

[0154] 이를 위하여, 지수상 *S. aureus* MW2 균주에 ATP 합성을 차단하는 것으로 알려진 5mM 비산염으로 30분 동안 처리하여 지속성 균주를 생성하였다. MRSA의 생성은 각각 다른 작용 방식을 사용하는 반코마이신, 겐타마이신 및 시프로플록사신의 100배 MIC에 대한 높은 내성을 통해 생존이 지속되는 것으로 확인되었습니다.

[0155] 도 2 B에서 확인한 바와 같은 성장하는 MRSA 세포에 대한 살균 효과와 달리, 도 6 A에 나타난 바와 같이 MB6는 MRSA 지속성 균주에 대해 제한적인 효과를 보였다. 즉, 64 ㎍/㎖ 농도의 MB6에 4시간 노출한 결과 MRSA 지속성 균주가 약 80% 사멸되었다.

[0156] 한편, 지속성 균주에 대한 MB6의 살균력이 감소한 이유를 명확하게 하기 위하여, MRSA 지속성 균주의 세포막을

파괴하는 MB6의 능력을 평가하였다.

[0157] 도 6 B에 나타난 바와 같이, 지속성 균주가 눈에 띄게 감소했지만, 상기 MB6는 성장하는 MRSA 세포에 대해 필요한 농도보다 4배 높은 16㎍/㎖ 이상의 농도에서 MRSA 지속성 균주의 세포막을 빠르게 투과하는 능력을 여전히 유지하였다.

[0158] 그 후, 도 6 C에 나타난 바와 같이, 양성 대조군으로 16-BAC를 처리하여 비산염으로 유도된 지속성 균주가 여전히 검출 가능한 양의 세포 내 ATP를 함유하고 있음을 확인하였다. MRSA 군주에서 막 투과성을 유도하는 MB6의 능력과는 대조적으로, 최대 32㎍/㎖까지 MB6로 처리한 경우에도 MRSA 지속성 균주에서 ATP 누출이 관찰되지 않았다.

[0159] 이러한 결과는 MB6가 SYTOX Green 투과성을 허용할 만큼 MRSA 지속성 균주에 충분한 막 손상을 입히지만, 이 정도의 손상으로는 ATP 누출을 유발하지 않으므로 MRSA 지속성 균주를 죽이기에는 부족하다 점을 시사한다.

[0160] **실시예 5. MB6의 항균 보조제로서의 활성 평가**

[0161] **1. 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항균제의 살균 활성 강화능 평가**

[0162] 상기 실시예 4에서 확인한 결과에 의하면, MB6는 MRSA 지속성 균주에 대한 항균 활성이 제한적이지만, 이 세포의 막 투과성을 향상시키는 것으로 나타났다. 따라서, 본 실험에서는 MB6가 아미노글리코사이드계의 MRSA 지속성 균주에 대한 세포 흡수를 증가시킬 수 있다는 가설을 세우고, 이를 확인하였다.

[0163] 도 7 A에 나타난 바와 같이, 아미노글리코사이드계 항생제인 겐타마이신과 MB6를 병용한 결과 용량 의존적으로 MRSA가 박멸되는 것으로 나타났다. 놀랍게도 4㎍/㎖의 겐타마이신과 8㎍/㎖ MB6의 조합은 4시간이라는 짧은 시간 내에 약 5×10^{6} CFU/㎖의 MRSA 지속성균을 완전히 박멸하였다.

[0164] 또한, MB6가 바이오필름 내에 잔류하는 MRSA에 대한 겐타마이신의 효능을 유사하게 향상시킬 수 있는지를 조사하였다.

[0165] 도 7 B에 나타난 바와 같이, 바이오필름 내에 안전하게 박혀 있는 이 지속성 세포는 20㎍/㎖ 겐타마이신 또는 64㎍/㎖ MB6에 대해 어느 정도 내성을 보였다. 반면, 20 ㎍/㎖ 겐타마이신과 32 ㎍/㎖ 또는 64 ㎍/㎖ MB6의 조합은 바이오필름 생존율을 각각 약 2 로그 및 3 로그 감소시켰다.

[0166] 이에, MB6와 겐타마이신 간의 시너지 메커니즘을 탐구하였다. 처음에는 MB6가 겐타마이신의 MRSA 지속성 균주으로의 흡수를 향상시킬 수 있는지를 평가하였다. 이를 위해 GTTR (Taxas Red-conjugated gentamicin)을 사용하였다.

[0167] 도 7 C에 나타난 바와 같이, GTTR의 지속 세포로의 흡수는 특히 8㎍/㎖에서 32㎍/㎖까지 MB6 처리 용량에 따라 크게 증가하는 것으로 나타났다.

[0168] 또한, 겐타마이신이 MB6의 막 활성을 증강시킬 수 있는지도 조사하였다.

[0169] 도 7 D에 나타난 바와 같이, 겐타마이신은 32㎍/㎖ 농도까지 MRSA 지속성 균주 세포의 막을 투과하지 못했지만 (좌측패널), 8㎍/㎖ MB6에 4㎍/㎖ 겐타마이신을 추가하면 이 세포의 막 투과성이 상당히 향상되었다 (우측패널).

[0170] 한편, 도 7 E에 나타난 바와 같이, 반코마이신이 MB6의 MRSA 지속성 균주의 투과 능력을 촉진하지 않았다는 점은 주목할 만하며 (좌측패널), 이는 MB6의 막 활성을 증가시키는 것이 겐타마이신의 고유한 특성이라는 것을 암시한다. 겐타마이신에 의해 유도된 MB6의 막 활성 증가에도 불구하고, 두 약물의 병용 치료는 MRSA 지속성 균주에서 ATP 누출을 유발하지 않았다 (우측패널).

[0171] 이러한 결과는 병용 치료에 의해 유도된 막 손상 정도 증가보다는 겐타마이신의 흡수 증가가 MB6와 겐타마이신 간의 시너지 살균 효과를 이끌어내는 핵심 요소일 수 있음을 의미한다.

[0172] 따라서, 상기 결과를 종합해 볼 때, MB6와 겐타마이신의 총체적인 항-지속성 균주 활성은 겐타마이신이 MB6의 막 활성을 강화하고 MB6는 겐타마이신의 흡수를 촉진하는 등 개별 작용의 상호 강화에서 비롯된 것일 수 있음을 시사하는 것이다.

[0173] **2. 답토마이신의 항균활성 강화능 평가**

[0174] 본 실험에서는 MB6가 답토마이신과 시너지 효과를 발휘하여 MRSA 지속성균에 항균 효과를 보이는지를 조사하였

다.

[0175] 도 8 A에 나타난 바와 같이, 100 ㎍/㎖(100X MIC) 농도의 답토마이신만 단독으로 사용하면 지속 생존력이 약 1 로그 감소하는데 그쳤지만, 8 ㎍/㎖ MB6와 병용하면 그 효과가 크게 증가하였다. 특히, 8 ㎍/㎖ MB6와 함께 사용하면 4 ㎍/㎖ 및 8 ㎍/㎖의 답토마이신은 각각 4시간 및 2시간 이내에 약 $5X10^6$ CFU/㎖의 MRSA 잔존균을 완전히 박멸하였다.

[0176] 한편, MRSA에 대한 이러한 시너지 효과가 지속되는 메커니즘을 탐구하였다. 즉, MB6와 답토마이신의 살균 활성이 모두 막 활성에서 비롯된다는 점을 감안하여 MB6가 지속성 균주에 대한 답토마이신의 막 파괴 활성을 강화할 수 있는지를 평가하였다.

[0177] 도 8 B 및 C에 나타난 바와 같이, 답토마이신 단독으로는 MRSA 지속성 균주에서 SYTOX 그린 막 투과성 또는 ATP 누출을 유도하지 못했다(좌측패널). 반면, 8 ㎍/㎖ MB6와 병용했을 때 답토마이신은 용량 의존적으로 빠른 막 투과화를 유도하였으며, 용량 의존적인 방식으로 MRSA 지속성 세포에서 ATP 누출을 촉진하였다 (우측패널).

[0178] 이러한 결과는 MB6와 답토마이신 간의 시너지 항-MRSA 지속성 균주에 관한 활성이 막 파괴 활성을 상호 강화하는데서 비롯된 것임을 시사한다.

[0179] **3. MB6, 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항균제 및 답토마이신의 삼중 조합 평가**

[0180] MB6와 답토마이신의 조합이 MRSA 지속성 세포의 막 투과성을 향상시킨다는 결과를 바탕으로, 이 조합이 겐타마이신 흡수를 촉진하여 MRSA 지속성 균주에 대한 세 배의 시너지 효과를 낼 수 있을 것이라는 가설을 세웠다. 이를 테스트하기 위하여 MB6, 답토마이신, 겐타마이신의 이중 또는 삼중 조합에 각각 2X MIC로 MRSA 지속성 균주를 노출시켰다.

[0181] 도 9 A에 나타난 바와 같이, MB6, 답토마이신 또는 겐타마이신을 2X MIC로 단독 처리하거나 2X MIC 답토마이신과 2X MIC 겐타마이신의 이중 조합으로 처리한 경우 모두 MRSA 지속성 균주의 생존력에 유의미한 영향을 미치지 않았다. 한편, 상기에서 관찰된 시너지 효과와 일관되게, 2X MIC MB6와 2X MIC 답토마이신 또는 2X MIC 겐타마이신을 병용한 결과 생존율이 0.6~0.8 로그 감소하였다. 놀랍게도 MB6, 답토마이신, 겐타마이신을 각각 2X MIC로 3중 조합한 경우 MRSA 지속 생존율이 3배 감소하였다.

[0182] 또한, 이 3중 시너지 효과를 뒷받침하는 메커니즘을 밝히고자 하였다.

[0183] 도 9 B에 나타난 바와 같이, 예상대로 2X MIC MB6, 답토마이신, 겐타마이신의 3중 조합은 2X MIC의 2중 조합에 비해 MRSA 지속성 균주에서 SYTOX Green 막 투과성을 현저하게 증가시켰다.

[0184] 또한, 도 9 C에 나타난 바와 같이, 2X MIC MB6와 2X MIC 답토마이신을 병용 치료한 결과, 2X MIC MB6 또는 2X MIC 답토마이신 단독 치료 시에는 관찰되지 않았던 GTTR의 지속균으로의 흡수가 현저히 증가하였다.

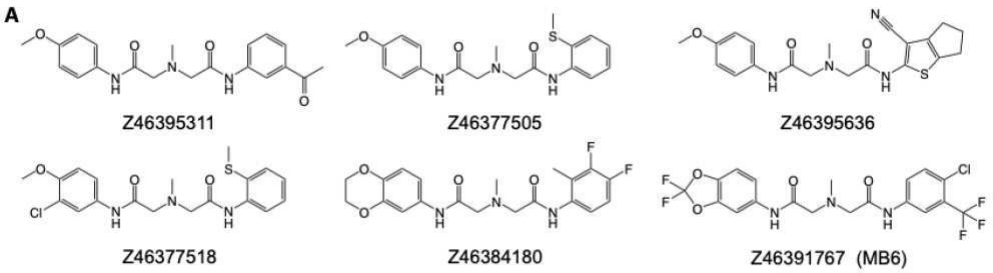
[0185] 흥미롭게도 도 9 D에 나타난 바와 같이, MB6, 답토마이신, 겐타마이신을 각각 2X MIC에서 3중 조합한 결과, 2X MIC에서 단일 또는 이중 조합에서는 볼 수 없는 현상으로 MRSA 지속 세포에서 현저한 세포 내 ATP 누출이 발생하였다).

[0186] 이러한 결과는 MB6, 답토마이신 및 겐타마이신이 시너지 효과를 발휘하여 MRSA 지속막을 파괴함에 따라, 겐타마이신 흡수를 촉진하고 세포 내 ATP 누출을 촉발할 수 있음을 시사한다.

도면

도면1

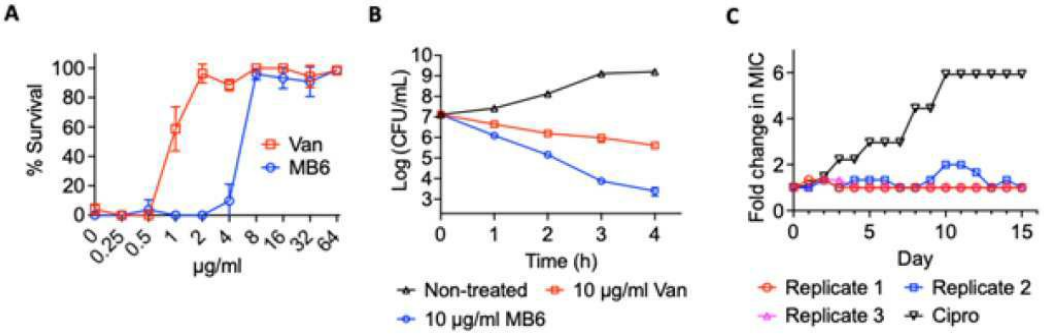
A



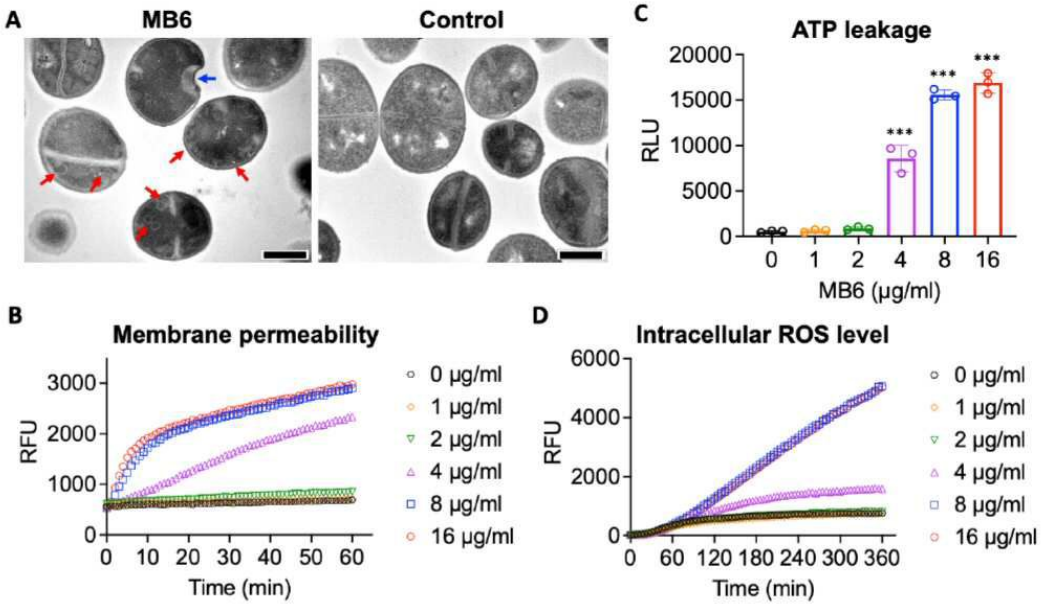
B

Strains	MB1	MB2	MB3	MB4	MB5	MB6
S. aureus MW2	>64	>64	>64	>64	>64	4

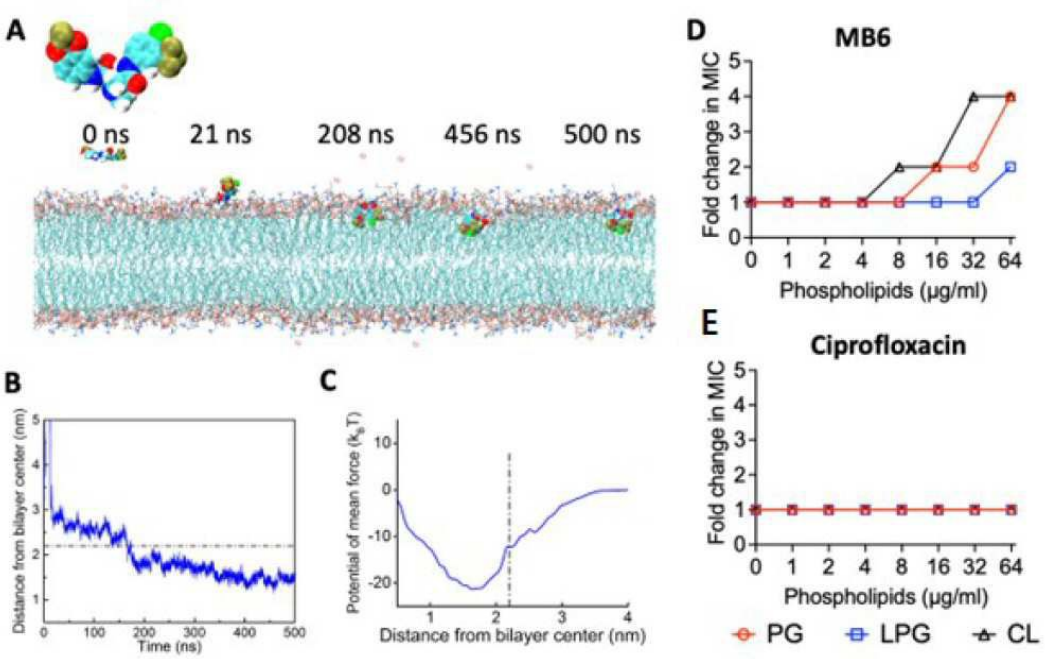
도면2



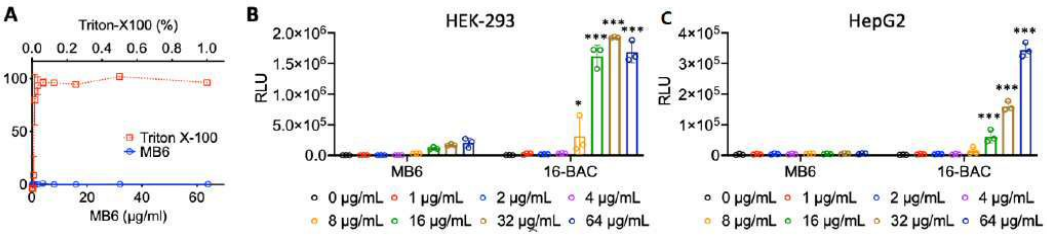
도면3



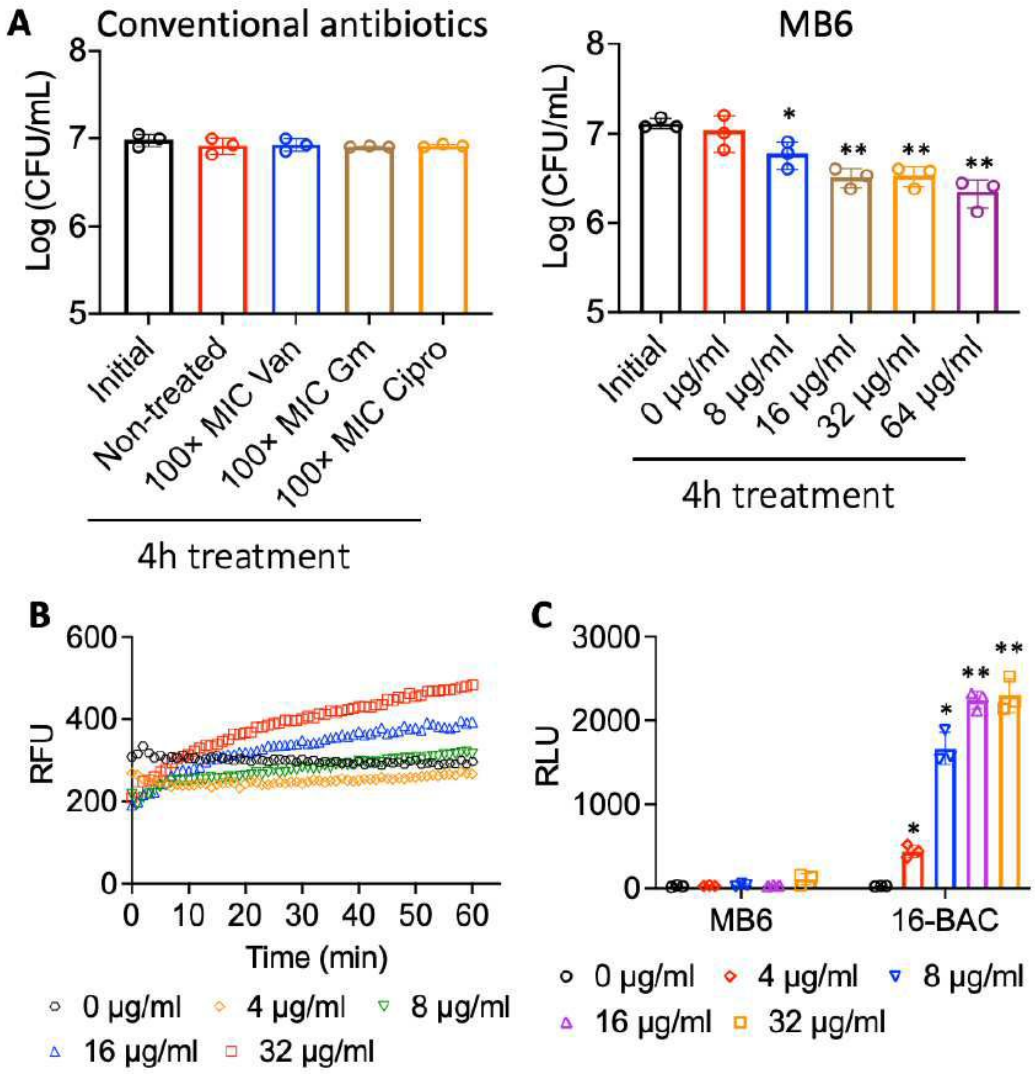
도면4


A
0 ns
21 ns
208 ns
456 ns
500 ns
B
Distance from bilayer center (nm)
Time (ns)
C
Potential of mean force (k_BT)
Distance from bilayer center (nm)
D
MB6
Fold change in MIC
Phospholipids (μg/ml)
E
Ciprofloxacin
Fold change in MIC
Phospholipids (μg/ml)
PG
LPG
CL

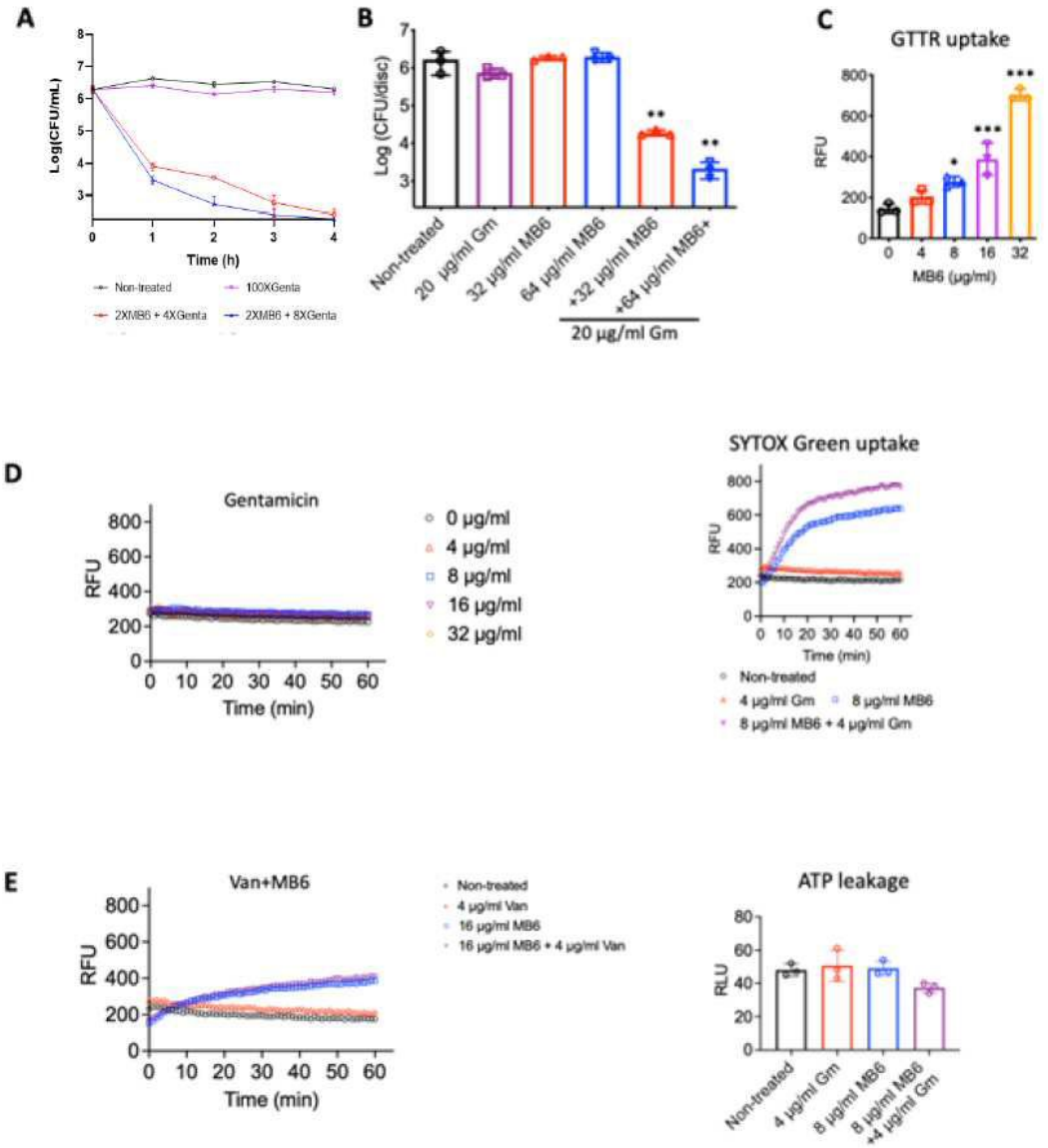
도면5


A
Triton-X100 (%)
Triton X-100
MB6
MB6 (μg/ml)
B
HEK-293
RLU
MB6
16-BAC
0 μg/mL
1 μg/mL
2 μg/mL
4 μg/mL
8 μg/mL
16 μg/mL
32 μg/mL
64 μg/mL
C
HepG2
RLU
MB6
16-BAC

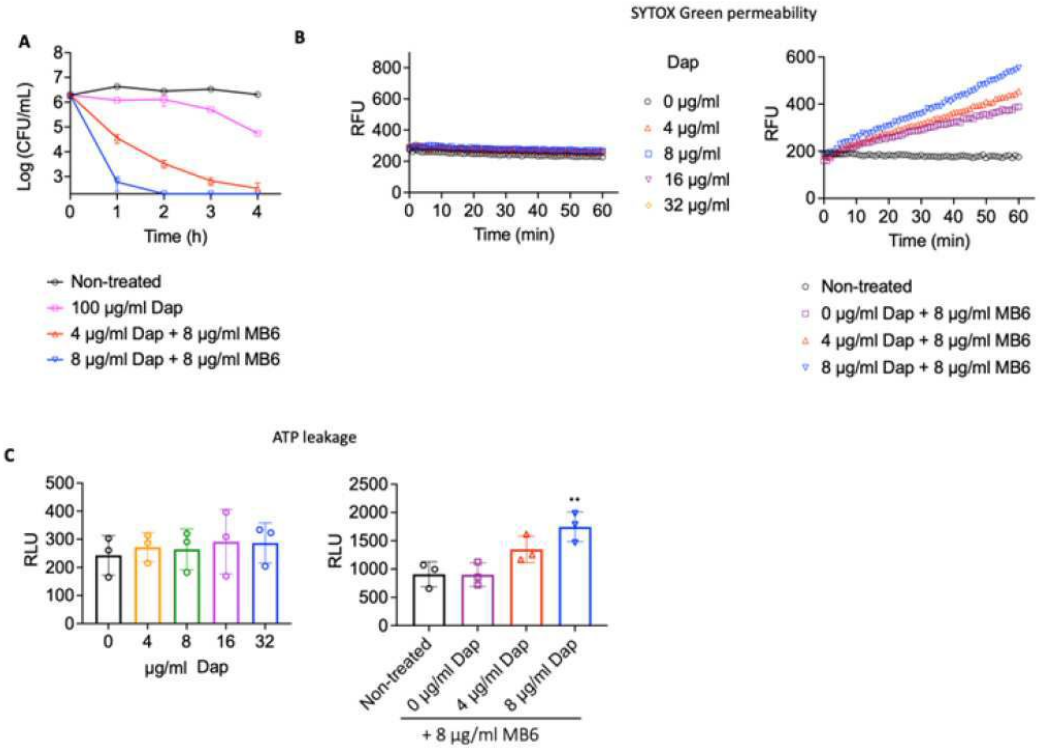
도면6


A
Conventional antibiotics
Log (CFU/mL)
8
7
6
5
Initial
Non-treated
100× MIC Van
100× MIC Gm
100× MIC Cipro
4h treatment
MB6
Log (CFU/mL)
*
**
**
**
Initial
0 μg/ml
8 μg/ml
16 μg/ml
32 μg/ml
64 μg/ml
4h treatment
B
RFU
600
400
200
0
0 10 20 30 40 50 60
Time (min)
0 μg/ml
4 μg/ml
8 μg/ml
16 μg/ml
32 μg/ml
C
RLU
3000
2000
1000
0
*
*
**
**
MB6
16-BAC
0 μg/ml
4 μg/ml
8 μg/ml
16 μg/ml
32 μg/ml

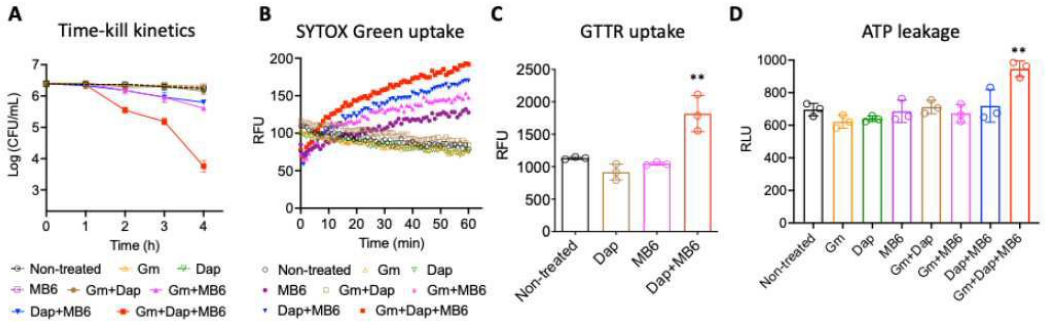
도면7


A
Log(CFU/mL)
Time (h)
Non-treated
100XGenta
2XMB6 + 4XGenta
2XMB6 + 8XGenta
B
Log (CFU/disc)
Non-treated
20 μg/ml Gm
32 μg/ml MB6
64 μg/ml MB6
+32 μg/ml MB6
+64 μg/ml MB6+
20 μg/ml Gm
C
GTTR uptake
RFU
MB6 (μg/ml)
D
Gentamicin
RFU
Time (min)
0 μg/ml
4 μg/ml
8 μg/ml
16 μg/ml
32 μg/ml
SYTOX Green uptake
RFU
Time (min)
Non-treated
4 μg/ml Gm
8 μg/ml MB6
8 μg/ml MB6 + 4 μg/ml Gm
E
Van+MB6
RFU
Time (min)
Non-treated
4 μg/ml Van
16 μg/ml MB6
16 μg/ml MB6 + 4 μg/ml Van
ATP leakage
RLU
Non-treated
4 μg/ml Gm
8 μg/ml MB6
8 μg/ml MB6 +4 μg/ml Gm

도면8


A
Log (CFU/mL)
Time (h)
Non-treated
100 μg/ml Dap
4 μg/ml Dap + 8 μg/ml MB6
8 μg/ml Dap + 8 μg/ml MB6
B
RFU
Time (min)
Dap
0 μg/ml
4 μg/ml
8 μg/ml
16 μg/ml
32 μg/ml
SYTOX Green permeability
RFU
Time (min)
Non-treated
0 μg/ml Dap + 8 μg/ml MB6
4 μg/ml Dap + 8 μg/ml MB6
8 μg/ml Dap + 8 μg/ml MB6
C
ATP leakage
RLU
μg/ml Dap
RLU
Non-treated
0 μg/ml Dap
4 μg/ml Dap
8 μg/ml Dap
+ 8 μg/ml MB6

도면9


A
Time-kill kinetics
Log (CFU/mL)
Time (h)
Non-treated
Gm
Dap
MB6
Gm+Dap
Gm+MB6
Dap+MB6
Gm+Dap+MB6
B
SYTOX Green uptake
RFU
Time (min)
Non-treated
Gm
Dap
MB6
Gm+Dap
Gm+MB6
Dap+MB6
Gm+Dap+MB6
C
GTTR uptake
RFU
Non-treated
Dap
MB6
Dap+MB6
D
ATP leakage
RLU
Non-treated
Gm
Dap
MB6
Gm+Dap
Gm+MB6
Dap+MB6
Gm+Dap+MB6