



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월28일  
(11) 등록번호 10-1435638  
(24) 등록일자 2014년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/34 (2006.01) A61K 31/366 (2006.01)  
A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2010-0134865  
(22) 출원일자 2010년12월24일  
심사청구일자 2011년06월27일  
(65) 공개번호 10-2012-0072931  
(43) 공개일자 2012년07월04일  
(56) 선행기술조사문헌  
Journal of Pharmaceutical Sciences, 16권, 11  
호, 1820-1822페이지\*  
KR1020080055753 A  
KR1020110095486 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
한국생명공학연구원  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
(72) 발명자  
김원곤  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
권윤주  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
손미진  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
(74) 대리인  
손민

전체 청구항 수 : 총 8 항

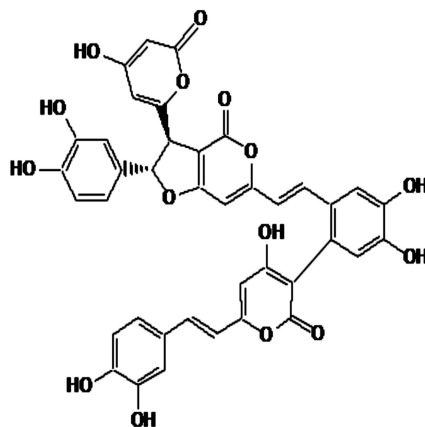
심사관 : 박정민

(54) 발명의 명칭 **에노일 리덕테이즈 저해 및 항균 활성을 갖는 신규한 히스피딘계 화합물**

(57) 요약

본 발명은 화학식 1로 표시되는 신규 히스피딘계 화합물, 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물 및 에노일 리덕테이즈 활성 억제용 조성물 및 페닐러스 린테우스 균주를 이용하여 상기 화합물을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명의 화합물은 Fab I, Fab K 효소의 활성을 강력하게 저해함으로써, 병원성 미생물 및 항생제 내성균에 대하여 강한 항균력을 가지며, 특히 MRSA에 대하여 항균 활성을 나타냄으로써 슈퍼박테리아에 의한 감염성 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090075824

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구지원사업

연구과제명 신규 항결핵 타겟분자 Enoyl-ACP Reductase 저해제 연구

기여율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2009.05.01 ~ 2010.04.30

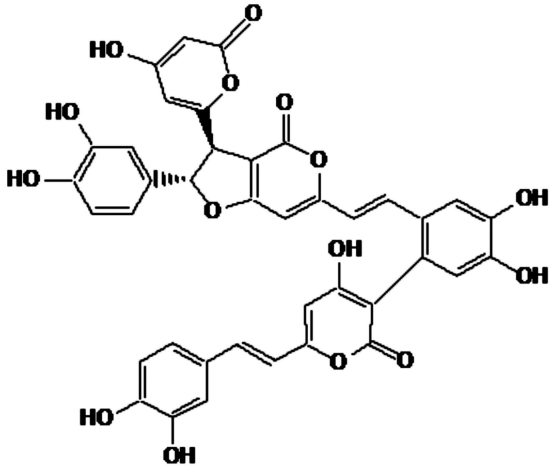
---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항균용 조성물.

[화학식 1]



**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 화합물은 페닐러스 린테우스(*Phellinus linteus*) 08090-29 균주로부터 생산되는 것인 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 스태필로코커스 에피더미스(*Staphylococcus epidermis*), 메티실린-저항성 포도상구균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 퀴놀론-저항성 포도상구균(Quinolone-resistant *Staphylococcus aureus*, QRSA) 및 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)로 이루어지는 균에서 선택된 어느 하나 이상의 균에 대한 항균 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 화합물은 Fab I 또는 Fab K 저해 활성을 갖는 것인 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

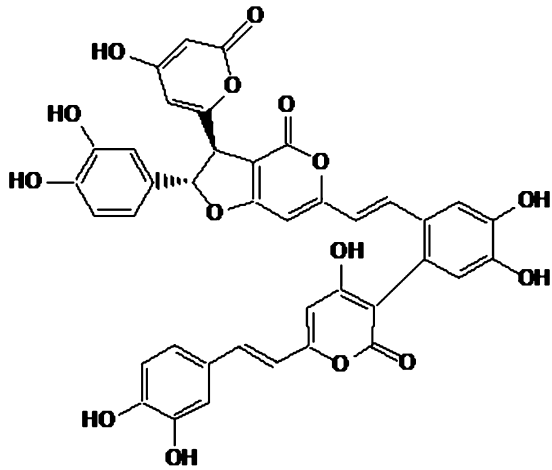
청구항 8

삭제

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균용 의약외품 조성물.

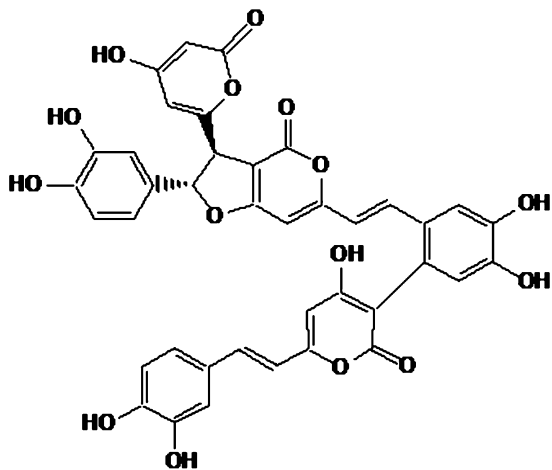
[화학식 1]



청구항 10

- 1) 페닐러스 린테우스(*Phellinus linteus*) 균주 또는 그의 돌연변이주를 배양하는 단계;
- 2) 상기 1) 단계에서 얻어진 균주의 배양액 및 균사체를 유기용매로 추출한 후 에틸아세테이트로 추출하는 단계; 및
- 3) 상기 2) 단계에서 얻어진 에틸아세테이트 추출물에 크로마토그래피를 수행하여 하기 화학식 1의 화합물을 얻는 단계를 포함하는, 화학식 1의 화합물의 제조방법.

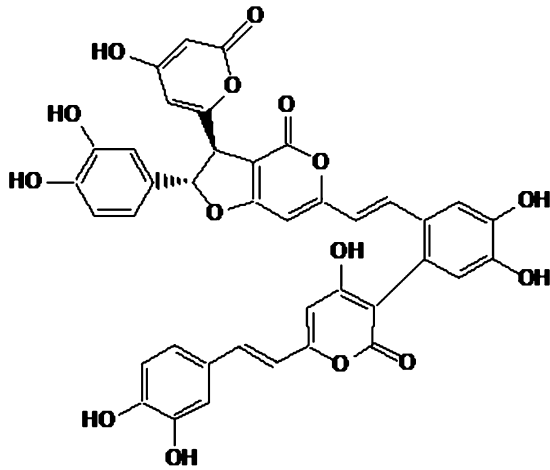
[화학식 1]



청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 화합물.

[화학식 1]



**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 신규 히스피딘계 화합물, 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균용 조성물 및 에노일 리덕테이즈 활성 억제용 조성물 및 페닐러스 린테우스 균주를 이용하여 상기 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 일반적으로 병원성 미생물에 의한 직접 혹은 간접적인 피해는 경제, 환경, 의학적으로 많은 문제를 야기시키고 있다. 식품산업에서 식품 유통 과정 중의 부패로 인한 손실, 농산업에서 농작물에 대한 과량의 화학 살충제의 사용으로 인한 인체의 유해성 및 환경오염, 항생제의 오남용으로 인한 항생제 내성 균주의 출현 등 사회 전반에서 많은 문제들을 야기시키고 있다. 감염병의 치료에 있어 합리적인 항생제 요법은 환자의 예후를 결정하는 중요한 요인임에도 불구하고, 상기와 같은 항생제 내성 균주의 출현으로 인하여 과거와 달리 효과적인 항생제의 선택이 더욱 어려워지고 있다.

[0003] 예를 들어, 인체 감염의 가장 흔한 원인균인 포도상구균의 마지막 치료제라고 하던 반코마이신(vancomycin)에 의해서만 치료가 되는 메치실린 내성 포도상구균(methicillin-resistant S. aureus, MRSA)이 1970년대부터 문제시된 이후, 1988년에는 반코마이신에 내성을 보이는 장구균(vancomycin resistant Enterococcus, VRE)이 유럽에서 처음으로 발견되었고, 1990년 후반에는 일본, 미국, 프랑스, 한국에서 반코마이신에 내성을 보이는 포도상구균(vancomycin intermediate-resistant S. aureus, VISA)이 발생하였다. 나아가 반코마이신(vancomycin)에 대하여 고도의 내성을 보이는 포도상구균(vancomycin-resistant Staphylococcus aureus, VRSA)이 2002년 미국질병통제국(Centers for Disease Control)에서 세계 최초로 보고되면서, 소위 "슈퍼 박테리아"의 확산 가능성이 매우 높아지고 있다. 이에 따라, 항생제 내성 문제가 범세계적인 위기로 떠오르며 새로운 개념의 항생제 개발이 시급히 요구되고 있다.

[0004] 한편, 1990년 중반부터 시작한 병원 미생물 유전체 연구 결과, 새로운 항생제 타겟이 발굴되어 신개념의 항생제 개발 가능성이 열리기 시작하였다. 미생물 유전체 정보를 활용하여 발굴 및 검증된 새로운 항생제 타겟 중 하나인 에노일 리덕테이즈(enoyl-ACP reductase)는 지방산 합성 주기(cycle) 중 연장(elongation) 단계의 마지막을 담당하는, 미생물의 생장에 필수적인 효소로서, 그람 양성균 및 음성균에 모두 존재하며, 인간과 상동성(homology)이 매우 낮기 때문에 새로운 항생제 표적으로 주목받고 있다. 특히, 기존에 그 기전이 밝혀지지 않았던 살균제 트리클로산(triclosan)과 결핵 치료제 이소니아지드(isoniazid)의 작용 표적으로 밝혀짐으로써, 항생제 개발 작용점으로 재확인된 바 있다.

[0005] 에노일 리덕테이즈(enoyl reductase) 효소에는 Fab I, Fab K, Fab L 등 3 가지의 이성구조(isoform)가 존재하는데, 스태필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 대장균(E. coli) 등 대부분의 주요한 병원성 세균에

는 Fab I가 공통적으로 존재하며, 폐렴구균에는 Fab K 만이 존재한다.

[0006] 따라서, 새로운 Fab I 저해물질은 기존의 항생제 내성균을 치료할 수 있는 신개념의 치료제로서 유망하다. 또한, 새로운 Fab K 저해물질은 폐렴구균에 대한 치료제로서 유망하다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 미생물, 식물 등 천연물로부터 Fab I, Fab K 저해물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, *Phellinus linteus* 08090-29 균주에서 분리된 신규한 펠린스타틴 화합물이 Fab I 및 Fab K를 강력하게 저해할 뿐만 아니라 내성균에 대한 항균 활성을 갖는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다. 또한, 본 발명자들은 히스피딘 화합물이 Fab I 및 Fab K를 강력하게 저해할 뿐만 아니라 내성균에 대한 항균 활성을 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물, 그의 이성질체, 유도체 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항균용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 에노일 리덕테이즈 활성 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

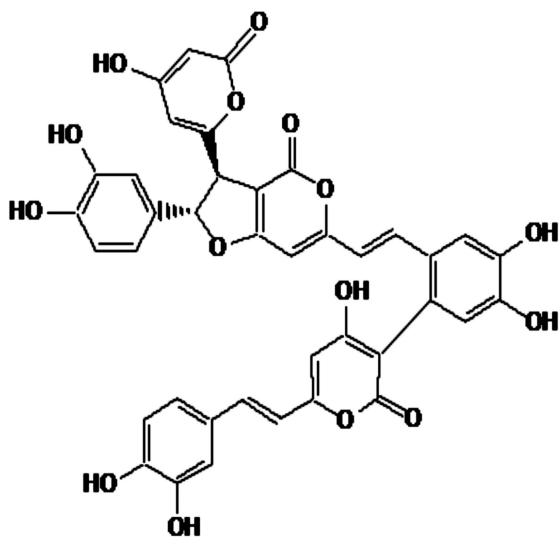
[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

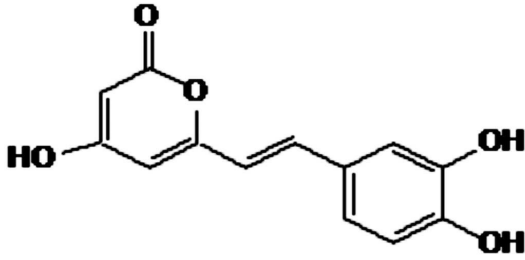
[0013] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 하나의 양태로서 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물, 그의 이성질체, 유도체 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0014] [화학식 1 : 펠린스타틴]



[0015]

[0016] [화학식 2 : 히스피딘]



[0017]

[0018] 본 발명의 화합물은 펠린스타틴 또는 히스피딘 뿐만 아니라, 그의 이성질체, 유도체 또는 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 상기 펠린스타틴은 히스피딘계 화합물로서 본 발명자들에 의해 새롭게 개발되었다.

[0019] 본 발명에서, '이성질체'란 화학식은 같으나 동일하지는 않은 화합물의 관계를 의미하며, 이러한 이성질체의 종류에는 구조 이성질체, 기하 이성질체, 광학 이성질체 및 기하 이성질체가 있다. 입체이성질체란, 동일한 화학적 구성을 갖지만, 공간 중에서 원자 또는 기의 배열의 측면에서 상이한 화합물 의미하고, 광학 이성질체(거울상 이성질체)는 서로 겹치지 않는 거울상을 갖는 한 화합물의 두 입체이성질체를 의미하며, 부분입체이성질체는 둘 이상의 비대칭 중심을 가지고 그것의 분자들이 서로 거울상이 아닌 입체이성질체를 의미한다.

[0020] 본 발명에서, "유도체"는 펠린스타틴 또는 히스피딘 화합물의 구조 일부를 다른 원자나 원자단으로 치환하여 얻어지는 화합물을 의미하며, "약학적으로 허용가능한 염"은 화합물의 상대적으로 무독성인 무기 및 유기산 부가염을 의미한다.

[0021] 본 발명의 화합물은 우수한 Fab I 또는 Fab K 저해 활성을 갖는다. 본 발명에서 용어, "Fab I" 또는 "Fab K"는 에노일 리덕테이즈의 이성구조를 의미하며, 이는 현재 항생제 타겟으로 주목받고 있는 효소로 본 발명의 화합물은 상기 Fab I 또는 Fab K를 효과적으로 저해하여 항균용 물질로 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서는, 예시적으로 주요 병원균인 스태필로코커스 아우레우스의 Fab I 에 대한 펠린스타틴의 효소 저해능을 측정하였고, 측정 결과, 펠린스타틴의 IC<sub>50</sub>은 6 μM로서 Fab I 활성을 강하게 억제시킴을 알 수 있었다. 또한, 폐렴 원인균인 스트렙토코커스 뉴모니애의 Fab K에 대한 펠린스타틴의 IC<sub>50</sub>은 5.8 μM로서 Fab K 활성을 강하게 억제시킴을 확인할 수 있었다(실시예 3 및 표 2).

[0023] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 예시적으로 주요 병원균인 스태필로코커스 아우레우스의 Fab I에 대한 히스피딘의 효소 저해능을 측정하였고, 측정 결과, 히스피딘의 IC<sub>50</sub>은 12.6 μM로서 Fab I 활성을 강하게 억제시킴을 알 수 있었다. 또한, 폐렴 원인균인 스트렙토코커스 뉴모니애의 Fab K에 대한 히스피딘의 IC<sub>50</sub>은 6.4 μM로서 Fab K 활성을 강하게 억제시킴을 확인할 수 있었다(실시예 3 및 표 2). 이와 같은 결과는, 본 발명의 화합물이 항균용 조성물로 사용될 수 있음을 뒷받침하는 것이다.

[0024] 본 발명의 화합물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 합성할 수 있으며, 균주로부터 생산되는 천연 화합물로서 수득할 수도 있다. 본 발명의 화합물은 바람직하게는 페닐러스 린테우스(Phellinus linteus) 균주로부터 생산할 수 있으며, 보다 바람직하게는 페닐러스 린테우스(Phellinus linteus) 08090-29 균주로부터 생산할 수 있다. 본 발명에서 용어, "페닐러스 린테우스"는 상황버섯 균주를 의미하며, 상기 상황버섯 균주로부터 본 발명자들에 의해 화학식 1의 펠린스타틴을 최초로 분리하였으며, 화학식 2의 히스피딘이 항균 효과를 가지고 있음을 최초로 규명하였다.

[0025] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 본 발명의 항균용 조성물을 병원성 미생물 또는 내성균에 의한 감염성 질환이 발병한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 병원성 미생물 또는 내성균에 의한 감염성 질환의 치료방법을 제공한다.

[0026] 본 발명에서 용어, "치료"란 약학 조성물의 투여에 의해 병원성 미생물 또는 내성균에 의한 감염성 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미하며, 본 발명에서 용어, "개체"란 병원성 미생물 또는 내성균에 의한 감염성 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 항균

용 조성물을 개체에 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.

- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 병원성 미생물은 동식물의 생체에 침입하여 기생하면서 병을 일으키거나 피해를 주는 모든 미생물로서, 그람 양성균 및 그람 음성균의 세균, 효모 및 진균을 포함하고, 바람직하게는 스태필로코커스 아우레우스, 스태필로코커스 에피더미스, 바실러스 서브틸리스, 스트렙토코커스 뉴모니아 또는 칸디다 알비칸스 일 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 내성균은 임의의 질환 및 이의 합병증, 또는 임의의 박테리아성 장애 및 이의 합병증을 치료 또는 예방하기 위하여 약물을 지속적으로 사용한 결과, 해당 세균이 항생제에 대한 저항성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 항생제의 예로는 세팔로스포린, 퀴놀론 및 플루오로퀴놀론, 페니실린, 베타 락타마제 억제제, 카르베페넴, 모노박탐, 마크롤리드 및 린코사민, 글리코펩티드, 리팜핀, 옥사졸리디논, 테트라사이클린, 아미노글리코시드, 스트렙토그라민 및 숄폰아미드 등이 있으며, 항생제 내성균은 상기 열거된 항생제를 처리하는 경우에도 저항성을 나타내어 개체에서 지속적으로 질환이 유지되며, 바람직하게는 MRSA(methicillin-resistant Staphylococcus aureus) 또는 QRSA(Quinolone-resistant Staphylococcus aureus)일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에서는, 예시적으로 스태필로코커스 아우레우스, MRSA 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 대한 펠린스타틴의 항균활성을 측정하였고, 측정결과 펠린스타틴의 각 균에 대한 MIC는 모두 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 강력한 항균활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(실시예 4 및 표 3).
- [0030] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는, 예시적으로 스태필로코커스 아우레우스, MRSA 및 스트렙토코커스 뉴모니아에 대한 히스피딘의 항균활성을 측정하였고, 측정결과 히스피딘의 각 균에 대한 MIC는 모두 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 강력한 항균활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(실시예 4 및 표 3). 따라서, 본 발명의 항균용 조성물은 병원성 미생물 또는 내성균에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 항균용 조성물은 본 발명의 화합물뿐만 아니라, 병원성 세균에 대한 항균활성을 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관, 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 항균용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 화학식 1의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0035] 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 병원성 세균 및 내성균에 대한 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료,



약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

- [0036]
- [0037] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 에노일 리덕테이즈 활성 억제용 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 에노일 리덕테이즈(enoyl-ACP reductase)는 박테리아의 지방산 생합성의 각 주기에 포함된 네 개 반응의 마지막 단계에서 에노일-아실(enoyl-acyl) 담체 단백질 (ACP) 환원 효소로 기능하는 것으로 여겨지는 박테리아성 효소를 의미한다.
- [0039] 상기 효소는 박테리아 및 식물에 널리 분포된 것으로, 박테리아 생체막을 구성하는 지질을 합성하는데 필요한 단백질 효소로서, Fab I, Fab K, Fab L의 3가지의 아이소폼(isoform)이 존재하며, 이 중, Fab I는 스타필로코커스 아우레우스, 메티실린-저항성 포도상구균 및 퀴놀론-저항성 포도상구균 등의 병원성 세균에 공통적으로 존재하며, Fab K는 주로 폐렴 균주에 존재하는 것으로 알려져 있다.
- [0040] 바람직하게는, 상기 에노일 리덕테이즈는 Fab I 또는 Fab K 일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물이 Fab I 및 Fab K에 대한 저해 활성이 있음을 확인하였다(실시예 3 및 표 2).
- [0041] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균용 의약외품 조성물을 제공한다. 즉, 본 발명은 병원성 미생물 또는 내성균에 의한 감염성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0042] 본 발명의 의약외품 조성물은 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0043] 상기 의약외품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제 일 수 있다.
- [0044] 또 하나의 양태로서, 1) 페닐러스 린테우스 균주 또는 그의 돌연변이주를 배양하는 단계; 2) 상기 1) 단계에서 얻어진 균주의 배양액 및 균사체를 유기용매로 추출한 후 에틸아세테이트로 추출하는 단계; 및 3) 상기 2) 단계에서 얻어진 에틸아세테이트 추출물에 크로마토그래피를 수행하여 본 발명의 화합물을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0045] 상기 1) 단계에서는 페닐러스 린테우스 균주는 물론, 상기 균주에서 유래하는 돌연변이주(자연돌연변이 또는 인공돌연변이주), 형질접합체 또는 유전공학적인 방법에 의해 새롭게 만들어진 균주도 포함할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 페닐러스 린테우스 균주는 바람직하게는 페닐러스 린테우스 08090-29 균주일 수 있다.
- [0047] 상기 페닐러스 린테우스 균주 또는 그의 돌연변이주의 배양은 통상의 미생물이 사용할 수 있는 영양원을 함유하는 배지에서 배양한다. 영양원으로는 종래 곰팡이의 배양에 이용되고 있는 공지의 영양원을 사용한다. 예를 들어, 탄소원으로는 글루코오스, 물엿, 텍스트린, 전분, 당밀, 동물유, 식물유 등을 사용할 수 있으며, 질소원으로는 밀기울, 대두박, 소맥, 맥아, 면실박, 어박, 콘스톱리커, 육즙, 효모 추출물, 황산암모니움, 질산소다, 요소 등을 사용할 수 있다. 필요에 따라, 식염, 칼륨, 마그네슘, 코발트, 염소, 인산, 황산 및 기타 이온생성을 촉진하는 무기염류를 첨가하면 매우 효과적이다. 배양방법으로는 호기적 조건에서는 진탕배양 혹은 정치배양이 가능하다.
- [0048] 배양온도는 상기의 각 조건들에서 배양할 경우 조건에 따라 약간씩 상이하기는 하나, 보통 20~37℃에서 배양하는 것이 적당하며, 대부분의 경우에는 26~30℃에서 배양한다. 또한, 배양기간은 진탕배양, 정치배양의 경우 모두 통상 7일 내지 10일간 배양할 때 본 발명의 펠린스타틴 화합물의 생산이 최고에 달하였다.
- [0049] 상기 2) 단계는 페닐러스 린테우스 균주 또는 그의 돌연변이주의 배양액 및 균사체를 추출하는 단계로, 펠린스타틴 화합물은 균주의 배양액뿐만 아니라 균사체 부분에도 존재한다. 따라서, 균주의 배양액 및 균사체에 아세톤 등의 유기용매를 가하여 배양액 및 균사체로부터 유효성분을 추출한 후 감압하에 아세톤을 증발시키고, 에틸

아세테이트로 용매 추출한 후, 에틸아세테이트 용매층을 감압농축하여 에틸아세테이트를 제거한다.

[0050] 상기 3) 단계는 본 발명의 화합물을 분리하는 단계로, 화합물의 정제 및 분리는 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법이 제한 없이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 배지의 종류, 배양 조건, 추출 정제 방법 등을 변화시켜, 수득량 및 수득률을 조절할 수 있음은 자명하다. 본 발명의 일 실시예에서는, 예시적으로 이하의 방법으로 에틸아세테이트 추출물에 크로마토그래피를 수행하여 본 발명의 화합물 제조하였다.

[0051] 상기 2)단계에서 얻은 에틸아세테이트 농축액을 클로로포름:메탄올을 20:1 내지 1:1로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하고, 이렇게 얻어진 활성분획을 감압농축하여 오일성 조유효성분을 얻은 뒤, 메탄올을 용매로 하여 세파덱스 ODS 컬럼 크로마토그래피에서 정제하였다. 최종적으로 활성분획을 메탄올:물 = 60:40인 용매 조건에서 ODS TLC를 실시하였고, 재차 0.1% TFA 함유한 아세토나이트릴:물 = 30:70인 조건에서 ODS TLC를 실시하여 2개의 순수한 화합물, 펠린스타틴과 히스피딘을 얻었다(실시예 2).

[0052] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 펠린스타틴 화합물을 제공한다.

[0053] 상기 펠린스타틴(Phellinstatin)은 페닐러스 린테우스 08090-29 균주를 배양하여 수득한 신규 화합물로서, 노란색 분말로 획득하였으며, C<sub>39</sub>H<sub>27</sub>O<sub>15</sub>의 분자식, 734의 분자량을 갖는 화합물이다.

**발명의 효과**

[0054] 본 발명의 화합물은 Fab I, Fab K 효소의 활성을 강력하게 저해함으로써, 병원성 미생물 및 항생제 내성균에 대하여 강한 항균력을 가지며, 특히 MRSA에 대하여 강력한 항균 활성을 나타냄으로써, 슈퍼박테리아에 의한 감염성 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0055] 도 1은 본 발명에 따른 펠린스타틴의 화학구조식을 보인 도면이다.

도 2는 본 발명에 따른 히스피딘의 화학구조식을 보인 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0056] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

**[0057] <실시예 1> Phellinus linteus 08090-29 균주의 배양**

[0058] 농촌진흥청 국립농업과학원으로부터 분양받은 Phellinus linteus 08090-29 균주를 배양하기 위하여 종 배지로는 2% 글루코오즈, 0.5% 폴리펩톤(polypeptone), 0.2% 효모추출액(yeast extract), 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 함유한 배지를 멸균 전에 pH를 5.6 내지 5.8로 조절한 후 사용하였다. 상기 종배지 20 ml가 담긴 100 ml 용량의 삼각 플라스크를 121℃에서 20분간 멸균한 후 Phellinus linteus 08090-29 균주의 사면배양 시험관으로부터 1 백금을 접종하여 28℃에서 3 일간 진탕배양 한 후, 이것을 1차 종배양액으로 사용하였다. 그런 다음에 2% 글루코오즈, 0.5% 폴리펩톤, 0.2% 효모추출액, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O를 함유한 멸균된 배지가 들어 있는 500 ml 용량의 삼각플라스크 (48 개)에 종배양액을 접종하여 28℃에서 7 내지 10 일간 진탕 배양하였다.

**[0059] <실시예 2> 본 발명의 화합물의 분리 및 정제**

[0060] 상기의 실시예 1에서 배양한 배양액 및 균사체의 아세톤 추출액을 에틸아세테이트로 3번 용매 추출하였다. 이와 같이 하여 얻어진 유효성분을 함유하고 있는 에틸아세테이트 용매층을 감압농축하여 에틸아세테이트를 제거한 후 클로로포름:메탄올을 20:1 - 1:1인 용매를 사용한 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 이와

같이 하여 얻어진 활성분획을 감압농축하여 오일성 조유효성분을 얻은뒤, 메탄올을 용매로하여 세파텍스 ODS 컬럼 크로마토그래피에서 정제하였다. 최종적으로 활성분획을 메탄올:물 = 60:40인 용매조건에서 ODS TLC 실시하였고, 재차 0.1% TFA 함유한 아세토나이트릴(acetonitrile):물 = 30:70인 조건에서 ODS TLC를 실시하여 펠린스타틴과 히스피딘을 얻었다.

- [0061] 상기 Phellinus linteus 08090-29 균주로부터 분리한 펠린스타틴 및 히스피딘의 이화학적 특성은 다음과 같다.
- [0062]
- [0063] **화합물 1 : 펠린스타틴**
- [0064] 1) 물질의 색상 : 노란색 분말;
- [0065] 2) 분자량 : 734;
- [0066] 3) 고분해능 ESI-MS:
- [0067] 실험치  $m/z$  733.1196 (M-H)<sup>-</sup> (C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>), 계산치 733.1199;
- [0068] 4) 분자식 : C<sub>39</sub>H<sub>27</sub>O<sub>15</sub>;
- [0069] 5) 자외선흡수스펙트럼 [UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε)]:202 (4.37), 284 (3.62), 372 (3.73)nm;
- [0070] 6) IR 스펙트럼: 3432, 2924, 1635, 1500, 1251 cm<sup>-1</sup>;
- [0071] 7) 편광도: [α]<sub>D</sub>=5.7° (c0.14, MeOH);
- [0072] 8) 핵자기 공명 (NMR) 데이터 : 메탄올(CD<sub>3</sub>OD-d<sub>4</sub>)을 용매로 하는 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 데이터는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

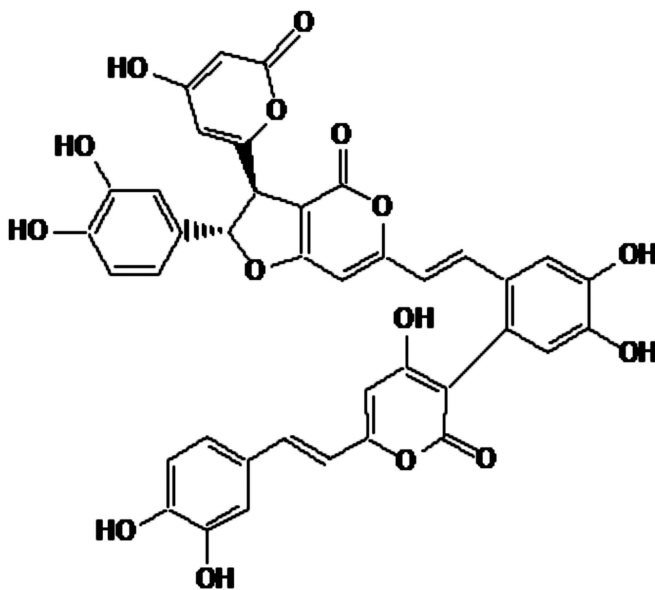
| Position | $\delta_H(J, Hz)$ | $\delta_C$ | HMBC                     | Position | $\delta_H(J, Hz)$     | $\delta_C$ | HMBC                   |
|----------|-------------------|------------|--------------------------|----------|-----------------------|------------|------------------------|
| 2        |                   | 1626C      |                          | 9        |                       | 131.4C     |                        |
| 3        |                   | 999C       |                          | 10       | 676(1H, d, 20)        | 1136CH     | C8, G12, G14           |
| 4        |                   | 1741C      |                          | 11'      |                       | 1465C      |                        |
| 5        | 641(1H, s)        | 963CH      | C2, C4, C6, C7           | 12       |                       | 147.2C     |                        |
| 6        |                   | 1656C      |                          | 13       | 679(1H, d, 8.5)       | 1165CH     | C9, G11'               |
| 7        | 668(1H, d, 160)   | 1176CH     | C6, C9                   | 14       | 672(1H, d, 8.5, 20)   | 1192CH     | C10, G12               |
| 8        | 732(1H, d, 160)   | 1367CH     | C6, C9, G10, G14         | 2'       |                       | 1669C      |                        |
| 9        |                   | 1280C      |                          | 3'       |                       | 108.2C     |                        |
| 10       | 7.26(1H, s)       | 1128CH     | C8, G11, G14             | 4'       |                       | 168.8C     |                        |
| 11       |                   | 1470C      |                          | 5'       | 6.25(1H, s)           | 101.4CH    | C3', C4', C6'          |
| 12       |                   | 1487C      |                          | 6'       |                       | 160.6C     |                        |
| 13       | 670(1H, s)        | 1192CH     | C9, G11, G3'             | 7'       | 6.68(1H, d, 160)      | 1168CH     | C5', C6', C9'          |
| 14       |                   | 1265C      |                          | 8'       | 7.35(1H, d, 160)      | 137.4CH    | C6', C9', G10', G14'   |
| 2        |                   | 1678C      |                          | 9'       |                       | 128.8C     |                        |
| 3        | Quartet           | 904CH      |                          | 10'      | 7.04(1H, d, 1.5)      | 1144CH     | C8', G11'', G12', G14' |
| 4        |                   | 1728C      |                          | 11''     |                       | 147.0CH    |                        |
| 5        | 604(1H, s)        | 1080CH     | C3, C4, C6, C7           | 12'      |                       | 148.6C     |                        |
| 6        |                   | 1637C      |                          | 13'      | 6.77(1H, d, 8.5)      | 1165C      | C9', G11''             |
| 7        | 4.28(1H, d, 6.5)  | 533CH      | C3, C4, C5, C6, C8, C9   | 14'      | 6.96(1H, d, 8.5, 1.5) | 121.9CH    | C8', G10', 12'         |
| 8        | 5.76(1H, d, 6.5)  | 927CH      | C4, C6, C7, C9, G10, G14 |          |                       |            |                        |

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were measured at 500 MHz and 125 MHz, respectively, in CD<sub>3</sub>OD.

The assignments were aided by <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMQC, and HMBC.

[0073]

[0074] 9) 화학구조식



[0075]

[0076] **화합물 : 히스피딘**

[0077] 1) 물질의 성상 : 노란색 분말;

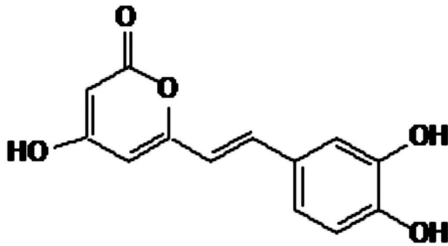
[0078] 2) 분자량 : 246;

[0079] 3) 분자식 : C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>;

[0080] 4) 핵자기 공명 (NMR) 흡수스펙트럼 : 메탄올(CD<sub>3</sub>OD-d<sub>4</sub>)을 용매로 하는 <sup>1</sup>H 데이터는 다음과 같다.

[0081] 6.11(1H, s, H-5), 6.58 (1H, d, 15.9, H-7), 7.31 9H, d, 15.9, H-8), 7.03 (1H, d, 2.1, H-10), 6.78 (1H, d, 8.1, H-14), 6.94 (1H, dd, 8.1, 1.8, H-13)

[0082] 5) 화학구조식



[0083]

[0084] <실시예 3> 펠린스타틴과 히스피딘 화합물의 Fab I 및 Fab K 저해 활성

[0085] 본 발명에 따른 화합물의 Fab I 저해 활성을 확인하기 위하여, 하기와 같은 효소 역가 측정 실험을 수행하였다.

[0086] 효소 역가 측정을 위해서 Ward 등의 방법[참조: Biochemistry 38, 12514(1999)]을 변형하여 이용하였다. 유전자 재조합 기술에 의해 제조된 황색포도상구균(Staphylococcus aureus) 유래의 Fab I를 사용하였다. 역가 측정은 50 mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.5) 중에서 수행하였으며, 기질로는 트랜스-2-옥테노일 N-아세틸시스테인 티오에스터(trans-2-octenoyl N-acetylcysteamine thioester) 400 μM, NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide) 200 μM을 사용하였고, Fab I를 150 nM 사용하였다. 효소를 첨가하고 상온에서 60분간 반응시킨 후 UV-분광계(spectrometer)를 이용하여 340 nm에서 NADPH의 흡광도 감소를 측정하였다. 상기 실시예 2에서 제조한 펠린스타틴 및 히스피딘을 디메틸설폭사이드(DMSO) 용매에 용해시켜 전체 반응액의 2% 이내로 첨가하여 효소 저해능을 평가하였다. 효소 저해능은 시험 화합물이 없는 상태에서의 NADH 소실 정도에 대한 시험 화합물 존재하에서의 NADH 소실 정도를 백분율로 표시하며, 50%의 효소 활성을 저해하는 각 시험 화합물의 농도를 IC<sub>50</sub>으로 결정하였다. 결과는 표 2에 나타내었다.

[0087] 또한, Fab K 역가 측정을 위해서 Zheng 등의 방법[참조: J. Antibiotics 59(12): 808-812, 2006]을 이용하였다. 유전자 재조합 기술에 의해 제조된 폐렴구균 유래의 Fab K 효소를 사용하였다. 역가 측정은 50 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.5) 중에서 수행하였으며, 기질로는 트랜스-2-옥테노일 N-아세틸시스테인 티오에스터 50 μM, NADH 200 μM을 사용하였고, Fab K를 150 nM 사용하였다. 효소를 첨가하고 상온에서 60분간 반응시킨 후 UV-분광계(spectrometer)를 이용하여 340 nm에서 NADH의 흡광도 감소를 측정하였다. 결과는 표 2에 나타내었다.

[0088]

표 2

| 화합물   | IC <sub>50</sub> (μM) |                     |
|-------|-----------------------|---------------------|
|       | S. aureus Fab I       | S. pneumoniae Fab K |
| 펠린스타틴 | 6                     | 5.8                 |
| 히스피딘  | 12.6                  | 6.4                 |

[0090] 표 2에 나타난 바와 같이, 펠린스타틴 및 히스피딘 화합물의 Fab I에 대한 IC<sub>50</sub>은 각각 6 μM 및 12.6 μM로서 우수한 Fab I 저해 활성을 나타내었다. 또한, 펠린스타틴 및 히스피딘 화합물의 Fab K에 대한 IC<sub>50</sub>은 각각

5.8  $\mu\text{M}$  및 6.4  $\mu\text{M}$ 로서 우수한 Fab K 저해 활성을 나타내었다.

[0091] <실시예 4> 펠린스타틴과 히스피딘 화합물의 항균 활성

[0092] 본 발명에 따른 펠린스타틴 및 히스피딘 화합물의 항균 활성을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0093] 시험균주는 MHB(Mueller Hinton broth)에서 배양하였으며, 액체 배지 희석법(broth microdilution)으로 항균 활성을 측정하였다. 하룻밤 배양한 시험균을 2 x 100,000/ml가 되도록 희석한 후, 96 웰 플레이트에 각 웰(well) 당 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음, 화합물을 최고 128  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도부터 점차 2-fold 희석하여 처리하였다. 화합물은 DMSO(dimethylsulfoxide)에 희석하였으며, DMSO의 농도는 1/100로 맞추어서 실험을 실시하였다. 20시간 동안 배양한 후, 650 nm에서 OD 값을 측정하여 세균의 생육을 조사하였다. 세균의 생육을 완전히 저해한 화합물의 최소농도를 MIC로 결정하고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

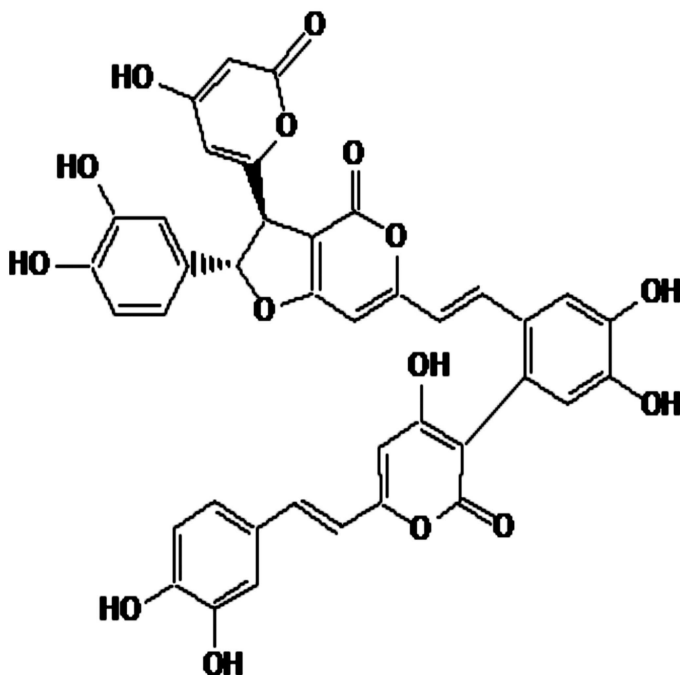
표 3

| 화합물   | MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) |      |               |
|-------|--------------------------|------|---------------|
|       | S. aureus                | MRSA | S. pneumoniae |
| 펠린스타틴 | 128                      | 128  | 128           |
| 히스피딘  | 64                       | 64   | 64            |

[0095] 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 펠린스타틴 화합물은 주요 병원균인 스태필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 항생제 내성균인 MRSA(methicillin-resistant Staphylococcus aureus) 및 스트렙토코커스 뉴모니애(Streptococcus pneumoniae)에 대하여 우수한 항균 활성을 나타내었다(128  $\mu\text{g/ml}$  MIC). 또한, 본 발명의 히스피딘 화합물 역시 스태필로코커스 아우레우스, 항생제 내성균인 MRSA 및 스트렙토코커스 뉴모니애에 대하여 우수한 항균 활성을 나타내었다(64  $\mu\text{g/ml}$  MIC).

도면

도면1



도면2

