



등록특허 10-2650182



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월21일

(11) 등록번호 10-2650182

(24) 등록일자 2024년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 53/126 (2006.01) A61K 31/191 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01) A61K 31/366 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)

C07D 307/33 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07C 53/126 (2013.01)

A61K 31/191 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7010202

(22) 출원일자(국제) 2018년10월05일

심사청구일자 2021년09월30일

(85) 번역문제출일자 2020년04월08일

(65) 공개번호 10-2020-0060413

(43) 공개일자 2020년05월29일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/077129

(87) 국제공개번호 WO 2019/068862

국제공개일자 2019년04월11일

(30) 우선권주장

17195192.4 2017년10월06일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

EP01764100 A2

(73) 특허권자

게데아 바이오테크 아베

스웨덴, 223 81 룬드, 메디컨 빌리지

(72) 발명자

엘러빅 올프

스웨덴, 246 33 로에데코에편지, 란트배겐 48

스터너 올로브

스웨덴, 212 42 말뫼, 기가탄 24

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 이경철

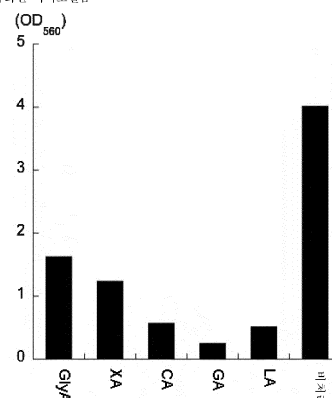
(54) 발명의 명칭 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 글루콘산 유도체

(57) 요약

본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 바이오필름 형성의 방지 및/또는 감소를 위한 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1

정규화된 바이오필름



(52) CPC특허분류

A61K 31/365 (2013.01)

A61K 31/366 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A61P 31/10 (2018.01)

C07D 307/33 (2013.01)

(72) 발명자

스트레벤스 헬레나

스웨덴, 227 36 룬드, 프제리에배겐 15비

매너 소피

스웨덴, 252 51 헬싱보그, 소켄가텐 100

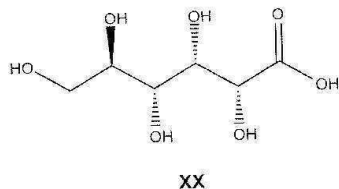
명세서

청구범위

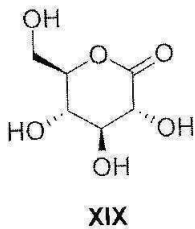
청구항 1

가르드넬라 바기날리스(*Gardnerella vaginalis*) 감염, 모빌룬쿠스 종(*Mobiluncus spp.*) 감염, 우레아플라스마 우레아리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*) 감염, 마이코플라즈마 호미니스(*Mycoplasma hominis*) 감염, 프레보텔라 종(*Prevotella spp.*) 감염, 엔테로코쿠스(*Enterococci*) 감염, 박테로이데스 종(*Bacteroides spp.*) 감염, 펩토스트렙토코쿠스 종(*Peptostreptococcus spp.*) 감염, 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 감염, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 감염, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 감염, 아세티노박터 바우만니이(*Acetivobacter baumannii*) 감염, 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 감염, 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 C 감염, 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 G 감염, 및/또는 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) 감염으로 구성된 군으로부터 선택되는 박테리아성 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 하기 화학식 XX의 화합물, 또는 하기 화학식 XIX 또는 XXI의 그의 락톤을 포함하는, 제약 조성물:

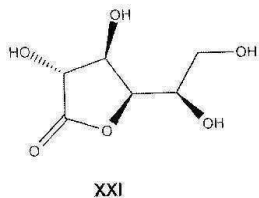
<화학식 XX>



<화학식 XIX>



<화학식 XXI>



청구항 2

제1항에 있어서, 화합물이 화학식 XIX 또는 XX의 화합물인, 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 박테리아성 감염이 비뇨생식계 감염인, 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 박테리아성 감염이 질 감염인, 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 박테리아성 감염이 박테리아성 질증인, 제약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 감염이 하기로 구성된 군으로부터 선택되는, 제약 조성물:

- a. 피부염 및/또는 습진;
- b. 피부염 또는 습진의 2차 감염;
- c. 여드름 또는 여드름모양(acneiform) 병태;
- d. 종기증(furunculosis);
- e. 큰종기증(carbunculosis);
- f. 모낭염;
- g. 농가진(impetigo);
- h. 단독(erysipelas);
- i. 치주염;
- j. 그룹 A 또는 B 스트렙토코쿠스(streptococci) 다내성 박테리아의 콜로니화(colonization)에 대한 2차 감염;
- k. 항문 주위 스트렙토코쿠스성 피부염;
- l. 간찰성 피부염(intertriginous dermatitis);
- m. 손발톱주위염(paronychia);
- n. 피부 상처의 감염;
- o. 내향성 발톱(ingrown toenail) 또는 족부 수포(blisters of the feet)에 대한 2차 감염;
- p. 당뇨병성 족부 상처와 연관된 감염;
- q. 동물 교상 이후에 유발되는 2차 감염;
- r. 곤충 교상, 모기 교상, 진드기 교상, 유주성 홍반(erythema migrans) 또는 피부 양성 림프선증(lymphadenosis benigna cutis) 이후에 유발되는 2차 감염;
- s. 단순 포진(herpes simplex)의 2차 감염;
- t. 대상 포진(herpes zoster) 또는 수두 대상포진(varicella zoster)의 2차 감염;
- u. 안검염(blepharitis);
- v. 결막염;
- w. 질염; 및
- x. 자궁경부염(cervicitis).

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 감염이 포유동물에서의 감염인, 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 포유동물이 인간인, 제약 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 인간이 여성인, 제약 조성물.

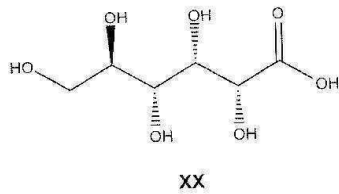
청구항 10

제9항에 있어서, 여성이 임신한 상태인, 제약 조성물.

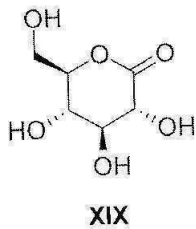
청구항 11

박테리아성 질증의 치료에서 사용하기 위한 하기 화학식 XX의 화합물, 또는 하기 화학식 XIX 또는 XXI의 그의 락톤을 포함하는 제약 조성물:

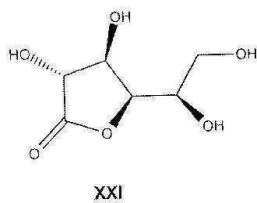
<화학식 XX>



<화학식 XIX>



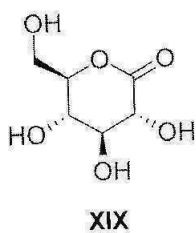
<화학식 XXI>



청구항 12

제1항 내지 제5항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 글루코노-δ-락톤 (하기 화학식 XIX)인, 제약 조성물:

<화학식 XIX>



청구항 13

제1항 내지 제5항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 XX, XIX 또는 XXI의 화합물이 올리고머/중합체를 형성하도록 올리고머화/중합체화되는, 제약 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 올리고머 또는 중합체가 락트산을 추가로 포함하는, 제약 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제5항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제약 조성물이 5 내지 99 wt%의 화학식 XX의 화합물, 또는 그의 락톤을 포함하고/하거나; 제약 조성물이 10 wt% 이하의 물을 포함하는, 제약 조성물.

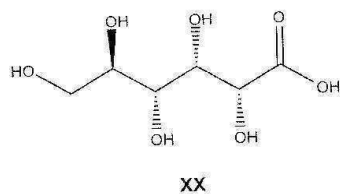
청구항 16

제15항에 있어서, 제약 조성물이 탐폰, 베지토리움(vagitorium), 질 에어로졸, 질 컵(vaginal cup), 질 젤, 질 삽입물, 질 패치, 질내 고리, 질 스폰지, 질 좌제, 질 크림, 질 에멀전, 질 폼, 질 로션, 질 연고, 질 분제, 질 샴푸, 질 액제, 질 스프레이, 질 현탁제, 질 정제, 질 로드(vaginal rod), 질 디스크, 질 장치, 및 이들의 임의의 조합으로 제제화되거나, 또는 제약 조성물이 위생용품 상에 존재하는, 제약 조성물.

청구항 17

조산(preterm birth)을 예방하는 데 사용하기 위한 화학식 XX의 화합물, 또는 그의 락톤을 포함하는 제약 조성물:

<화학식 XX>



청구항 18

제17항에 있어서, 화합물이 질로 투여되는, 제약 조성물.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 기술 분야

[0002] 본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 바이오필름 형성의 방지 및/또는 감소를 위한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 배경

[0004] 항미생물제는 지난 70년 동안 감염성 질환을 앓는 환자를 치료하는 데 사용되어 왔다. 1940년대 이후로, 상기 약물은 감염성 질환으로부터의 질병 및 사망을 크게 감소시켜 왔다. 그러나, 상기 약물은 매우 광범위하게 사용되어 왔고, 오랫동안 항미생물제가 사멸시키도록 디자인된 감염성 유기체는 그에 맞게 적응해왔다. 그 결과, 의약은 실효성이 없어지고 있으며, 감염은 다른 개체들로의 확산의 위험을 증가시키면서, 체내에서 지속되고 있다.

[0005] 항미생물제 저항성은 박테리아, 기생충, 바이러스 및 진균에 의해 유발되는, 점점 더 증가하는 다양한 감염의 효과적인 예방 및 치료를 위협한다. 따라서, 항미생물제 저항성은 모든 정부 부문 및 사회 전반에 걸친 조치를 필요로 하는 세계 공중 보건에 대해 점점 더 심각한 위협이 되고 있다.

[0006] 모든 부류의 미생물이 저항성을 발생시킨다: 진균은 항진균제 저항성을 발생시키고, 바이러스는 항바이러스제 저항성을 발생시키고, 원생동물은 원생동물제 저항성을 발생시키고, 박테리아는 박테리아제 저항성을 발생시킨다.

[0007] 항생제 저항성이 갖는 문제는 일반적인 현상이다. 치료에 대하여 저항성을 띠는 진균성 감염은 새롭게 대두되는 공중 보건 문제가 된다. 전반적으로 항진균제 저항성은 여전히 비교적 드물기는 하지만, 추가 저항성이 발생하지 못하게 막고, 이들 감염의 확산을 막기 위한 더 많은 조치가 취해지지 않는다면, 문제는 계속해서 발전하게 될 가능성이 있다. 비록 대부분의 항진균제 저항성은 칸디다(*Candida*) 종에서 발생하지만, 다른 유형의 진균, 예컨대, 아스퍼질러스(*Aspergillus*)에서의 저항성 또한 새롭게 대두되는 문제이다.

[0008] 진균은, 진균이 감염시키는 인간 숙주와 같은 진핵생물이기 때문에, 항진균성 약물 개발을 위해 사용될 수 있는 뚜렷한 표적은 단지 소수에 불과하다. 그러므로, 항진균제는 대개 몇몇 대사 경로를 표적화하는 약물로 한정된다.

[0009] 항미생물제에 대한 한 표적은 미생물 발생 과정의 생성물인 바이오필름이다. 바이오필름은, 서로 부착되어 있고, 자기 생산 세포의 중합체 매트릭스에 의해 둘러싸인 미생물 세포에 의해 형성된다. 바이오필름 형성은 박테리아 및 진균이 특히, 적대적인 환경에서 그가 사는 환경에 맞게 적응하기 위한 생존 전략법이다. 세포가 성장 모드를 바이오필름으로 전환하였을 때, 세포는 표현형상의 거동은 변화하게 되고, 여기서, 유전자의 큰 스위트(suite)는 차별적으로 조절된다. 바이오필름은 다수의 상이한 유형의 미생물, 예컨대, 박테리아, 원시세균, 원생동물, 진균 및 조류를 함유할 수 있다.

[0010] 바이오필름은 미생물 감염 중 80%와 연관이 있는 것으로 추정되며, 바이오필름에서 미생물의 성장은 그의 항미생물제에 대한 저항성을 증강시킬 수 있다. 추가로, 바이오필름 박테리아는 항생제에 대하여 플랑크톤성 세포보다 최대 1,000배 더 큰 내성 및/또는 저항성을 띤다.

[0011] 대부분의 진균에서, 군사는 영양 성장의 주된 모드이며, 이는 총칭하여 군사체로 불린다. 예를 들어, 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 병독성은 플랑크톤성 세포에서 군사로의 형질변환에 의해 매개된다. 군사 형태, 즉, 사상형 세포는 상피 세포를 파괴하는 세포독성 펩티드 독소인 칸디다리신에 의해 매개되는, 조직을 침투하여 염증을 유도할 수 있는 능력을 갖고 있다 (문헌 [Moyes et. al., Nature, 2016, 532, 64]).

[0012] 항미생물제 저항성은 1차 감염 뿐만 아니라, 2차 감염에서도 문제가 된다. 감염 예방 및 치료를 위해 효과적인 항미생물제가 없다면, 의학적 방법, 예컨대, 장기 이식, 암 화학요법, 당뇨병 관리 및 대수술은 매우 높은 위험이 된다. 추가로, 진균성 감염은 면역손상 환자, 예컨대, HIV/AIDS, HIV/AIDS, 결핵증을 앓거나, 화학요법을 받고 있는 환자에서 이환 및 사망의 주된 원인들 중 하나가 되고 있다. 의식 증가 및 치료 전략법의 개선에도 불구하고, 임상 환경에서 사용되는 항진균성 약물에 대한 저항성이 빈번하게 발생하는 것은 진균증 피해 증가의 원인이 된다.

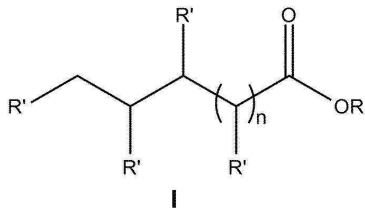
[0013] 따라서, 신규한 항미생물제에 대한 요구가 새롭게 부상하고 있다

발명의 내용

요약

본 발명자들은 바이오필름 형성을 방지 및/또는 감소시키는 방법을 개발하였다. 바이오필름 형성이 감소 또는 방지되면, 개체 미생물 세포는 더 이상 표면에 부착하지 못한다. 그러므로, 추가 감염이 예방되고, 더 이상 바이오필름을 형성하지 않는 미생물 세포는 폐기된다. 본 발명자들은 하기 화학식 I의 화합물, 또는 그의 락톤을 이용하는 치료가 진균 중의 바이오필름의 존재를 감소시키고, 수개의 진균 중에 대해 세포독성 효과를 미친다고 밝혔다:

<화학식 I>



상기 식에서,

R은 -H, -알킬, -C(O)알킬 및 페닐로 구성된 군으로부터 선택되고;

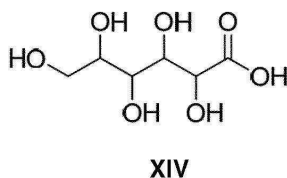
R'은 독립적으로 -OR, -H 및 할로젠으로 구성된 군으로부터 선택되고;

n은 정수 1, 2 또는 3이다.

추가로, 본 발명자들은 화학식 I의 화합물이 항박테리아제로서 유용하다고 밝혔다.

따라서, 한 측면에서, 본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물, 또는 화학식 I의 화합물을 포함하는 제약 조성물로서, 단, 미생물 감염이 진균성 감염일 경우, 이때, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 (XIV)의 화합물, 또는 그의 락톤이 아닌 것을 조건으로 하는 것인, 화학식 I의 화합물, 또는 화학식 I의 화합물을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다:

<화학식 XIV>



한 실시양태에서, 본 발명은 박테리아성 감염 또는 혼합형 진균성 및 박테리아성 감염 치료에서 사용하기 위한 글루코노-δ-락톤에 관한 것이다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 바이오필름 형성을 방지 및/또는 감소시키는 방법에 관한 것이다.

추가 측면에서, 본 발명은 조산(preterm birth) 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1. 상이한 산으로 처리된 칸디다 알비칸스의 정규화된 바이오필름 형성. GlyA = 글리세린산 (pH = 7), XA = 크실론산 (pH = 7), CA = 시트르산 (pH = 4.6), GA = 글루콘산 (pH = 6.5), LA = 락트산 (pH = 4.9). 24 h 후 바이오필름을 측정하였다.

도 2. 증류수 (채워지지 않은 원), pH 4 완충제 (채워진 사각형), pH 5 완충제 (채워지지 않은 사각형), 및 pH 7 완충제 (채워진 원) 중의 글루코노-δ-락톤 (GDA)의 가수분해에서의 광학 회전 변화

도 3. 포스페이트 완충제 (채워지지 않은 원, 점선) 또는 글루코노-δ-락톤 (채워진 사각형, 실선)을 포함하는

pH 2.6-6.6의 최소 배지 중에서의 칸디다 알비칸스의 정규화된 바이오필름 형성. 24 h 후 바이오필름을 측정하고, 크리스털 바이올렛을 이용하여 염색을 수행하였다.

도 4. (a) 락톤화/올리고머화된 GA로 처리된 칸디다 알비칸스의 정규화된 바이오필름 형성. 락톤화/올리고머화된 글루콘산의 펠릿을 37℃에서 pH 3.71의 완충제 용액 (10 mL)에 첨가하였다. 샘플 (4 mL)을 매 시간마다 (상이한 시간 간격으로) 취하고, 새 완충제 용액 (4 mL)을 첨가하였다. 샘플을 바이오필름 배지를 이용하여 50배 희석시키고, 24 h 후, 바이오필름 형성의 양을 측정하였다. **(b)** 락톤화/올리고머화된 GA로 처리된 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*)의 정규화된 바이오필름 형성. 락톤화/올리고머화된 글루콘산의 펠릿을 37℃에서 pH 3.71의 완충제 용액 (10 mL)에 첨가하였다. 샘플 (4 mL)을 매 시간마다 (상이한 시간 간격으로) 취하고, 새 완충제 용액 (4 mL)을 첨가하였다. 샘플을 바이오필름 배지를 이용하여 50배 희석시키고, 24 h 후, 바이오필름 형성의 양을 측정하였다.

도 5. (a) 글루코노- δ -락톤 (GDA)으로 처리된 칸디다 알비칸스의 정규화된 바이오필름 형성. GDA의 펠릿을 37℃에서 pH 3.71의 완충제 용액 (10 mL)에 첨가하였다. 샘플 (4 mL)을 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 24시간 후에 취하고, 새 완충제 용액 (4 mL)을 첨가하였다. 샘플을 바이오필름 배지를 이용하여 50배 희석시키고, 24 h 후, 바이오필름 형성의 양을 측정하였다. **(b)** GDA로 처리된 칸디다 글라브라타의 정규화된 바이오필름 형성. GDA의 펠릿을 37℃에서 pH 3.71의 완충제 용액 (10 mL)에 첨가하였다. 샘플 (4 mL)을 1, 2, 3, 4, 5, 6 및 24시간 후에 취하고, 새 완충제 용액 (4 mL)을 첨가하였다. 샘플을 바이오필름 배지를 이용하여 50배 희석시키고, 24 h 후, 바이오필름 형성의 양을 측정하였다.

도 6. (a) 24 h 동안 상이한 농도의 글루코노- δ -락톤 (GDA)으로의 처리 이후의 C. 알비칸스(*C. albicans*) 및 C. 글라브라타(*C. glabrata*)의 바이오필름의 생존능. XTT를 이용하여 바이오필름 염색을 수행하였다. 485 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 사선 스트라이프는 C. 알비칸스에 대한 데이터를 나타낸다. 채워진 검은색 칼럼은 C. 글라브라타에 대한 데이터를 나타낸다. **(b)** 48 h 동안 상이한 농도의 GDA로의 처리 이후의 C. 알비칸스 및 C. 글라브라타의 바이오필름의 생존능. XTT를 이용하여 바이오필름 염색을 수행하였다. 485 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 사선 스트라이프는 C. 알비칸스에 대한 데이터를 나타낸다. 채워진 검은색 칼럼은 C. 글라브라타에 대한 데이터를 나타낸다.

도 7. 글루코노- δ -락톤 (GDA)이 C. 알비칸스 및 C. 글라브라타의 성숙한 바이오필름에 미치는 효과. (48 h 동안 성장된) 성숙한 바이오필름을 37℃에서 5 h 동안 GDA와 함께 인큐베이션시킨 후, 이어서, 세포를 YPD 플레이트 상에 연속 희석물로 플레이팅하여 세포 생존율을 추정하였다.

도 8. (a) 최소 배지 (pH 7.0) 중의 비처리된 비처리된 C. 알비칸스의 바이오필름 발생에 관한 미세유체공학 연구. 비처리된 세포는 주로 균사를 형성한다. **(b)** 최소 배지 중에서 x50 최종 농도의 글루코노- δ -락톤 (GDA)의 가수분해물 (pH 3.8)로 처리된 C. 알비칸스의 바이오필름 발생에 관한 미세유체공학 연구. GDA 첨가는 C. 알비칸스가 균사 형태가 아니라, 주로 효모 형태로 성장하도록 유발시켰다.

도 9. 상이한 pH (2.6-6.6)를 갖는 배지를 수득하기 위해 포스페이트 완충제 (채워진 사각형), 시트르산 (채워지지 않은 사각형), 락트산 (채워진 삼각형), 글루콘산 (채워진 원) 또는 글루코노- δ -락톤 (채워지지 않은 원)으로 처리된 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) K12의 바이오필름 형성. 바이오필름을 크리스털 바이올렛으로 염색하였다.

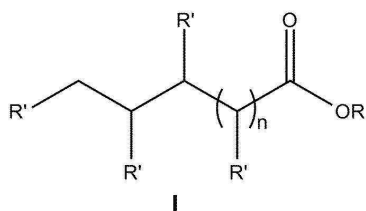
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 상세한 설명

[0031] 화합물

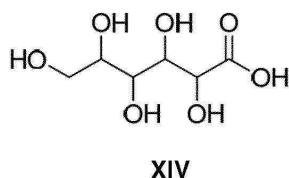
[0032] 한 측면에서, 본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한, 하기 화학식 I의 화합물, 또는 그의 락톤을 포함하는 제약 조성물로서, 단, 미생물 감염이 진균성 감염일 경우, 이때, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 (XIV)의 화합물, 또는 그의 락톤이 아닌 것을 조건으로 하는 것인 제약 조성물에 관한 것이다:

[0033] <화학식 I>



[0034]

[0035] <화학식 XIV>



[0036]

[0037] 상기 식에서,

[0038] R은 -H, -알킬, -C(=O)알킬 및 페닐로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0039] R'은 독립적으로 -OR, -H 및 할로겐으로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0040] n은 정수 1, 2 또는 3이다.

[0041] 한 실시양태에서, 알킬은 C₁ 내지 C₂₀ 지방족 쇠이다. 본원에서 사용되는 바, "지방족 쇠"란, 비-방향족 탄화수소를 지칭한다. 상기 지방족 쇠는 선형, 분지형 및/또는 시클릭일 수 있다. 상기 지방족 쇠는 포화 또는 불포화일 수 있다. 상기 지방족 쇠에서, 하나 이상의 수소는 하나 이상의 벤젠 모이어터를 포함하는, 방향족 모이어터에 의해 치환될 수 있다.

[0042] 한 실시양태에서, 알킬은 C₁ 내지 C₂₀ 지방족 쇠이고, 여기서, 하나 이상의 수소는 임의적으로 -OH, =O, 또는 페닐 대신으로 치환되고, 여기서, 지방족 쇠의 CH₂ 기 중 하나 이상은 임의적으로 O, S, 또는 NH 대신으로 치환된다. 지방족 쇠의 CH₂ 기 중 하나 이상이 O, S, 또는 NH 대신으로 치환되는 것인 알킬의 비-제한적인 예로는 에테르, 티오에테르 및 3급 아민이 있다. 한 실시양태에서, 알킬은 C₁ 내지 C₂₀ 지방족 쇠, 예컨대, C₁ 내지 C₁₅ 지방족 쇠, C₁ 내지 C₁₀ 지방족 쇠, C₁ 내지 C₅ 지방족 쇠, 예컨대, C₅ 내지 C₂₀ 지방족 쇠, 예컨대, C₅ 내지 C₁₅ 지방족 쇠, 예컨대, C₅ 내지 C₁₀ 지방족 쇠, 예컨대, C₁₀ 내지 C₂₀ 지방족 쇠, 예컨대, C₁₀ 내지 C₁₅ 지방족 쇠이다. 바람직한 실시양태에서, 알킬은 메틸, 에틸, 및 프로필로 구성된 군으로부터 선택된다.

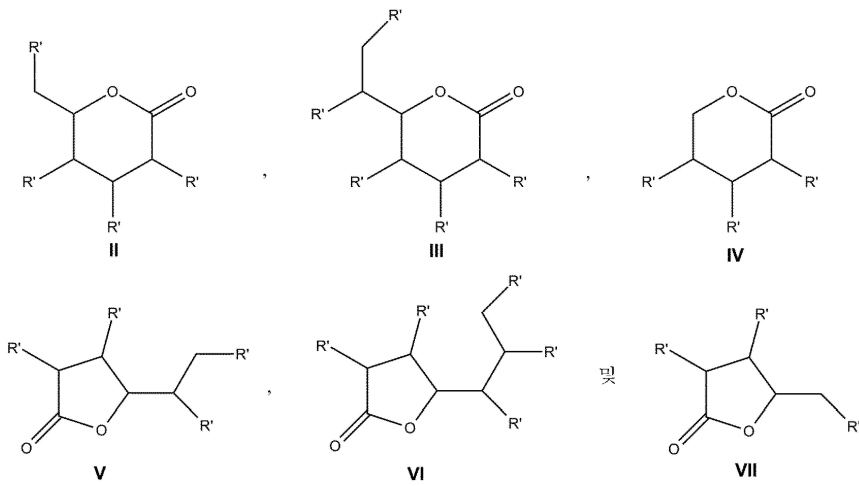
[0043] 한 실시양태에서, R' 중 적어도 하나는 -OR이다. 한 실시양태에서, R' 중 적어도 2개, 예컨대, 적어도 3개, 예컨대, 적어도 4개, 예컨대, 적어도 5개, 예컨대, 적어도 6개는 OR이다. 바람직한 실시양태에서, R'은 -OR이다.

[0044] 한 실시양태에서, R' 중 적어도 하나는 -OH이다. 또 다른 실시양태에서, R' 중 1개 이하는 -H이고, 예컨대, R' 중 2개 이하는 -H이다. 바람직한 실시양태에서, R은 -H이다.

[0045] 한 실시양태에서, -OR은 아세테이트 또는 락테이트이다.

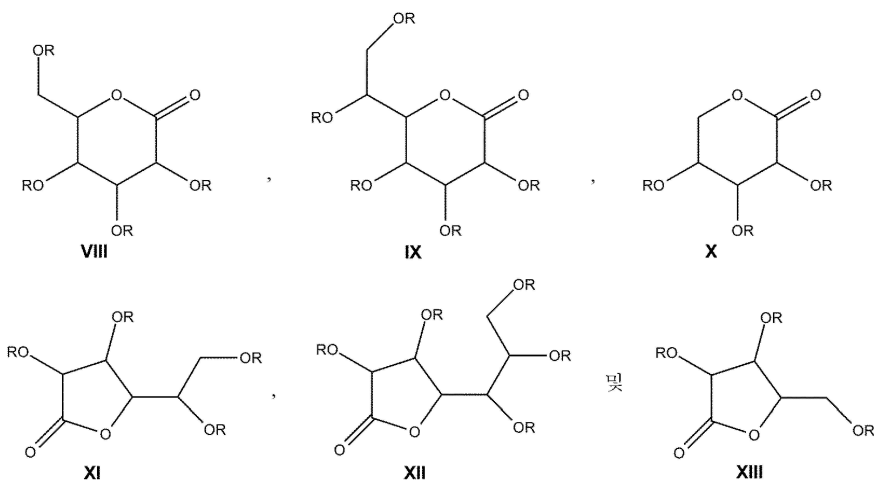
[0046] 수용액 중에서, 화학식 I에 따른 화합물은 상응하는 락톤, 예컨대, δ-락톤 및 γ-락톤과 평형상태에 있을 수 있다. 한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 그의 락톤이다. 상기 락톤은 바람직하게 δ-락톤 또는 γ-락톤일 수 있다.

[0047] 한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은



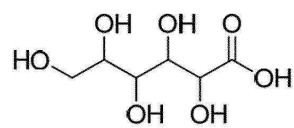
[0048] 다. 로 구성된 군으로부터 선택된

[0049] 또 다른 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은



[0050] 으로 구성된 군으로부터 선택된다.

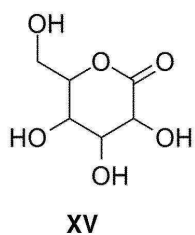
[0051] 바람직한 실시양태에서, n은 2이다.



[0052] 한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 이다.

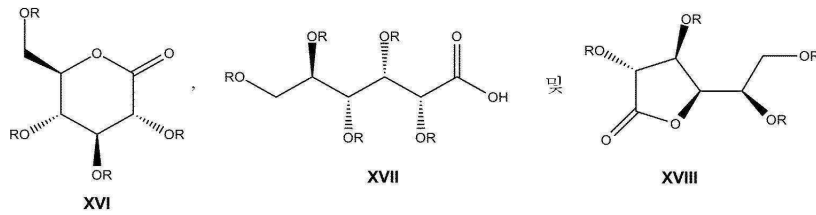
[0053] 한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 XV의 화합물이다:

[0054] <화학식 XV>



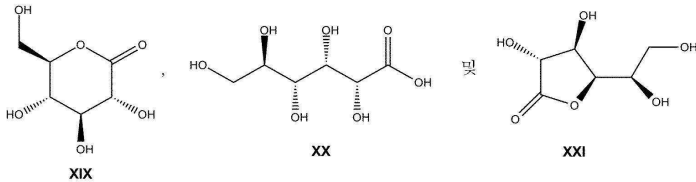
[0055] .

[0056] 한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은



[0057] 로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0058] 한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은

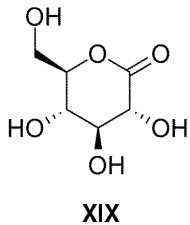


[0059] 로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0060] 한 실시양태에서, 화합물 XIX, XX 및 XXI은 수용액 중에서 평형이다.

[0061] 바람직한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 글루코노-δ-락톤 (GDA, 하기 화학식 XIX)이다:

[0062] <화학식 XIX>



[0063]

[0064] 또 다른 실시양태에서, 화합물은 글루코노-δ-락톤 (화학식 XIX)이 아니다. 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물로서, 단, 화학식 I의 화합물은 글루코노-δ-락톤 (화학식 XIX)이 아닌 것을 조건으로 하는 것인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

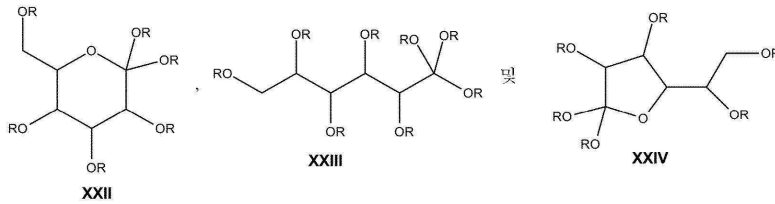
[0065] 한 실시양태에서, 본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물로서, 단, 화학식 I의 화합물이 화학식 XIX의 화합물일 경우, 이때, 미생물 감염은 진균성 감염이 아닌 것을 조건으로 하는 것인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

[0066] 한 실시양태에서, 본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물로서, 단, 화학식 I의 화합물이 화학식 XIX의 화합물일 경우, 이때, 미생물 감염은 비노생식계 진균성 감염이 아닌 것을 조건으로 하는 것인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

[0067] 한 실시양태에서, 본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물로서, 단, 화학식 I의 화합물이 화학식 XIX의 화합물일 경우, 이때, 미생물 감염은 외음부질 칸디다증(vulvovaginal candidosis)이 아닌 것을 조건으로 하는 것인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

[0068] 한 실시양태에서, 본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물로서, 단, 미생물 감염이 비노생식계 진균성 감염일 경우, 이때, 화학식 I의 화합물은 화학식 XIV의 화합물이 아닌 것을 조건으로 하는 것인 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

[0069] 한 실시양태에서, 화합물은 화학식 I의 화합물의 아세탈이다. 한 실시양태에서, 화합물의 옥소 기는 상응하는 아세탈이고, 즉, 화학식 I의 화합물은

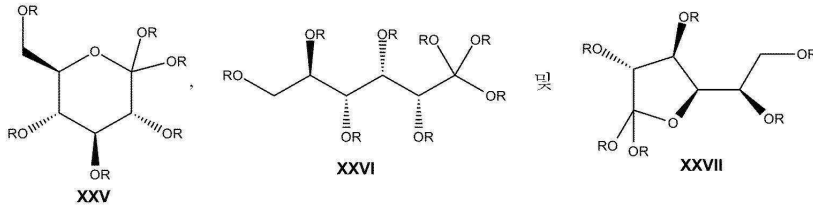


[0070]

로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0071]

한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은



로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0072]

중합체/올리고머

[0073]

한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 올리고머화되어 올리고머를 형성한다. 또 다른 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 중합화되어 중합체를 형성한다.

[0074]

한 실시양태에서, 올리고머 또는 중합체는 1개의 화학식 I의 화합물을 포함하고, 즉, 1개의 화학식 I의 화합물이 단량체인 것인 동중-올리고머/중합체이다. 또 다른 실시양태에서, 올리고머 또는 중합체는 혼합된 올리고머/중합체, 즉, 이종-올리고머/중합체이다. 한 실시양태에서, 올리고머는 적어도 2개의 상이한 화학식 I의 화합물을 포함한다.

[0075]

한 실시양태에서, 올리고머 또는 중합체는 락트산을 추가로 포함하고, 즉, 락트산 올리고머/중합체이다.

[0076]

한 실시양태에서, 2개의 화학식 I의 화합물은 연결되어 이량체를 형성한다. 한 실시양태에서, 이량체는 2개의 화학식 XIV의 화합물을 포함한다. 한 실시양태에서, 이량체는 2개의 상이한 화학식 I의 화합물을 포함한다.

[0077]

감염

[0078]

한 측면에서, 본 발명은 미생물 감염의 치료 및/또는 예방에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물, 또는 화학식 I의 화합물을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 박테리아성 감염 또는 혼합형 진균성 및 박테리아성 감염 치료에서 사용하기 위한 글루코노-δ-락톤에 관한 것이다.

[0079]

한 실시양태에서, 미생물 감염은 비조생식계 감염이다. 한 실시양태에서, 미생물 감염은 질 감염이다.

[0080]

한 실시양태에서, 감염은 포유동물에서의 감염이고, 즉, 상기 치료를 필요로 하는 대상체는 포유동물이다. 바람직하게, 포유동물은 인간이다. 한 실시양태에서, 인간은 여성이다. 상기 여성은 임신부일 수 있다.

[0081]

한 실시양태에서, 감염은 피부염 및/또는 습진이다. 상기 피부염 및/또는 습진은 지루성 피부염(Seborrhoeic dermatitis)일 수 있다. 감염은 또한 상기 피부염 또는 습진의 2차 감염일 수 있다.

[0082]

본원에서 사용되는 바, "2차 감염"이라는 용어는 근본 원인의 후유증 또는 합병증을 지칭한다. 상기 근본 원인은 1차 감염일 수 있다.

[0083]

한 실시양태에서, 감염은 모든 중증도의 여드름, 또는 여드름모양(acneiform) 병태, 예컨대, 주사(rosacea), 입 주위(perioral) 또는 눈 주위(periorbital) 피부염이다.

[0084]

한 실시양태에서, 감염은 종기증(furunculosis), 큰종기증(carbunculosis) 또는 모낭염이다.

[0085]

한 실시양태에서, 감염은 구순염(cheilitis)이다. 상기 구순염은 구각 구순염(angular cheilitis)일 수 있다.

[0086]

한 실시양태에서, 감염은 안면, 두피, 몸통 및/또는 서해부의 감염이다. 감염은 상기 부위 중의 감염된 피부 상처의 감염일 수 있다. 감염은 또한 신체 피부 주름에 위치할 수 있다.

[0087]

한 실시양태에서 감염은 농가진(impetigo) 또는 단독(erysipelas)이다.

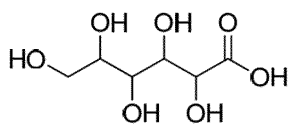
[0088]

한 실시양태에서, 감염은 족부 감염이다. 상기 족부 감염은 당뇨병성 족부 상처와 연관된 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 족부 감염은 내향성 발톱(ingrown toenail) 또는 족부 수포(blisters of the feet)에 대해 속발

성이다.

- [0089] 한 실시양태에서, 감염은 동물 교상 이후에 유발되는 2차 감염이다. 상기 동물은 곤충일 수 있다. 한 실시양태에서, 감염은 곤충 교상, 모기 교상, 진드기 교상, 유주성 홍반(erythema migrans) 또는 피부 양성 림프선증(lymphadenosis benigna cutis) 이후에 유발되는 2차 감염이다.
- [0090] 한 실시양태에서, 감염은 피부, 구강, 또는 성기 단순 포진(herpes simplex)의 2차 감염, 또는 대상 포진(herpes zoster) 또는 수두 대상포진(varicella zoster)의 2차 감염이다.
- [0091] 한 실시양태에서, 감염은 피부 손상, 예컨대, 화상 또는 자상의 2차 감염이다.
- [0092] 한 실시양태에서, 감염은 진균성, 박테리아성, 또는 혼합형 안감염이다.
- [0093] 한 실시양태에서, 감염은 결막염이다.
- [0094] 한 실시양태에서, 감염은 질염 또는 자궁경부염(cervicitis)이다.
- [0095] 한 실시양태에서, 감염은 트리코모나스 바기날리스(*Trichomonas vaginalis*)에 의해 유발된 것이다. 한 실시양태에서, 감염은 트리코모나스증(trichomoniasis)이다.
- [0096] 한 실시양태에서, 미생물 감염은 진균성 감염, 박테리아성 감염 및 혼합형 진균성 및 박테리아성 감염으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0097] **박테리아성 감염**
- [0098] 일부 실시양태에서, 미생물 감염은 박테리아성 감염이다. 한 실시양태에서, 미생물 감염은 혼합형 진균성 및 박테리아성 감염이다.
- [0099] 한 실시양태에서, 박테리아성 감염은 치주염이다.
- [0100] 한 실시양태에서, 박테리아성 감염은 박테리아성 질증(vaginosis)이다.
- [0101] 한 실시양태에서, 박테리아성 감염은 가드너렐라 바기날리스(*Gardnerella vaginalis*) 감염, 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*) 감염, 나이세리아 고노레아에(*Neisseria gonorrhoeae*) 감염, 트레포네마 팔리둠(시필리스)(*Treponema pallidum*(syphilis)) 감염, 아토포비움 바지나에(*Atopobium vaginae*) 감염, 프레보텔라 종(*Prevotella spp.*) 감염, 모빌룬쿠스 종(*Mobiluncus spp.*) 감염, 펩토스트렙토코쿠스 종(*Peptostreptococcus spp.*) 감염, 포르피로모나스 종(*Porphyromonas spp.*) 감염, 마이코플라스마 호미니(*Mycoplasma hominis*) 감염, 박테로이데스 종(*Bacteroides spp.*) 감염, 우레아플라스마 우레아리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*) 감염, 스트렙토코쿠스 종(*Streptococcus spp.*) 감염, 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*) 감염, 엔테로코쿠스(*Enterococci*) 감염, 스태필로코쿠스 종(*Staphylococcus spp.*) 감염, 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*) 감염, 에스케리키아 콜라이 감염, 클렙시엘라(*Klebsiella*) 감염, 스태필로코쿠스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*) 감염, 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 감염, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 감염, 아세티노박터 바우만니(*Acetobacter baumannii*) 감염, 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) 감염, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에(*Streptococcus agalactiae*) 감염, 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 C 및 G 감염 및/또는 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 감염으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0102] 한 실시양태에서, 감염은 그룹 A 또는 그룹 B 스트렙토코쿠스 또는 다내성 박테리아의 구강, 비강 또는 항문 성기 콜로니화(colonization)에 대해 속발성이다.
- [0103] 한 실시양태에서, 감염은 항문 주위 스트렙토코쿠스성 피부염이다.
- [0104] **혼합형 진균성 및 박테리아성 감염**
- [0105] 한 실시양태에서, 상기 미생물 감염은 혼합형 진균성 및 박테리아성 감염이다. 상기 혼합형 진균성 및 박테리아성 감염의 박테리아 성분은 본원에서 정의된 박테리아성 감염과 동일할 수 있다. 상기 혼합형 진균성 및 박테리아성 감염의 진균 성분은 본원에서 정의된 진균성 감염과 동일할 수 있다. 한 실시양태에서, 혼합형 진균성 및 박테리아성 감염의 상기 진균 성분은 칸디다증이다.
- [0106] 상기 혼합형 진균성 및 박테리아성 감염은 간찰성 피부염(intertriginous dermatitis) 또는 손발톱주위염(paronychia)일 수 있다.

- [0107] 진균성 감염
- [0108] 일부 실시양태에서, 미생물 감염은 진균성 감염이다. 한 실시양태에서, 미생물 감염은 혼합형 박테리아성 및 진균성 감염이다. 한 실시양태에서, 상기 진균성 감염은 진균증(mycosis)이다. 상기 진균증은 피부사상균증(Dermatophytosis), 칸디다증, 콕시디오이테스 진균증(Coccidioidomycosis), 히스토플라스마증(Histoplasmosis), 블라스토마이세스증(Blastomycosis), 파라콕시디오이테스 진균증(Paracoccidioidomycosis), 스포로트릭스증(Sporotrichosis), 색소진균증(Chromomycosis) 및 갈색진균성 농양(phaeomycotic abscess), 아스페질러스증(Aspergillosis), 크립토크쿠스증증(*Cryptococcosis*), 털곰팡이증(Zygomycosis), 및 진균증(Mycetoma)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0109] 바람직한 실시양태에서, 진균증은 칸디다증이다. 상기 칸디다증은 외음부 및 질의 칸디다증; 피부 및 손톱의 칸디다증; 비뇨생식계 및 위장관 부위의 칸디다증; 칸디다성 구내염(Candidal stomatitis); 유방 및 유두의 칸디다; 폐 칸디다증(Pulmonary candidiasis); 칸디다성 수막염(Candidal meningitis); 칸디다성 심내막염(Candidal endocarditis); 및 칸디다성 패혈증(Candidal sepsis)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0110] 한 실시양태에서, 진균증은 피부사상균증이다. 상기 피부사상균증은 손발톱 백선증(Tinea unguium); 발톱 조각 진균증(toenail onychomycosis); 서혜부 백선증(Tinea inguinalis), 족부 백선증(Tinea pedis); 수부 백선증(Tinea manuum); 백선성 모창(Tinea barbae), 석면 백선증(Tinea amiantacea); 두부 백선증(Tinea capitis); 체부 백선증(Tinea corporis); 와상 백선증(Tinea imbricata); 및 살백선증(Tinea cruris)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다..
- [0111] 한 실시양태에서, 진균성 감염은 칸디다 종 감염, 예컨대, 칸디다 알비칸스 감염, 칸디다 크루세이(*Candida krusei*) 감염, 칸디다 글라브라타 감염, 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 감염; 트리코피톤(*Trichophyton*) 종 감염, 예컨대, 트리코피톤 베루코숨(*Trichophyton verrucosum*) 감염, 트리코피톤 루브룸(*Trichophyton rubrum*) 감염, 트리코피톤 비올라세움(*Trichophyton violaceum*) 감염, 트리코피톤 톤수란스(*Trichophyton tonsurans*) 감염; 및 마이크로스포룸 종(*Microsporum*) 감염, 예컨대, 마이크로스포룸 캐니스(*Microsporum canis*) 감염; 아스페질러스 감염 및 말라세지아(*Malassezia*) 감염으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0112] 한 실시양태에서, 감염은 사카로마이세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)에 의해 유발된다.
- [0113] 한 실시양태에서, 진균증은 어루러기(Pityriasis versicolor)이다.
- [0114] 한 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 화학식 XIX의 화합물이 아니고, 진균성 감염은 비뇨생식계 진균성 감염이 아니다.
- [0115] 또 다른 실시양태에서, 화학식 I의 화합물은 화학식 XIX의 화합물이 아니고, 진균성 감염은 외음부질 칸디다증이 아니다.
- [0116] 추가의 또 다른 실시양태에서, 진균성 감염은 비뇨생식계 진균성 감염이 아니고, 화학식 I의 화합물은



- [0117] XIV 이 아니다.

[0118] 바이러스 감염

- [0119] 한 실시양태에서, 미생물 감염은 바이러스 감염이다. 한 실시양태에서, 바이러스 감염은 HIV이다.

[0120] 제제

- [0121] 일부 실시양태에서, 본 발명은 미생물 감염 치료에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 정제, 구강 붕해 정제 (또는 구강 용해 정제 (ODT)), 로젠지(lozenge), 검, 츄잉 검, 크림, 로션, 젤, 에멀전, 액제, 폼(foam), 연고, 스프레이, 현탁 구강세정제, 구강용 린스, 오랄 린스, 구강용 패쓰, 네일 폴리시(nail polish), 진피용 패치 또는 샴푸로 제제화된다. 한 실시양태에서, 상기 액제는 붕대, 드레싱 및/또는 압박붕대에서 사용하기 위한 것으로 조정된다.

- [0122] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 적어도 5 wt%, 예컨대, 적어도 10 wt%, 예컨대, 적어도 15 wt%, 예컨대, 적어도 20 wt%, 예컨대, 적어도 25 wt%, 예컨대, 적어도 30 wt%, 예컨대, 적어도 40 wt%, 예컨대, 적어도 50 wt%, 예컨대, 적어도 60 wt%의 화학식 (I)의 화합물을 포함한다.
- [0123] 한 실시양태에서, 상기 항들 중 어느 한 항에 따라 사용하기 위한 용도의 제약 조성물로서, 여기서, 제약 조성물은 99 wt% 이하, 예컨대, 95 wt% 이하, 예컨대, 90 wt% 이하, 예컨대, 85 wt% 이하, 예컨대, 80 wt% 이하, 예컨대, 75 wt% 이하의 화학식 (I)의 화합물을 포함한다.
- [0124] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 5 내지 99 wt%, 예컨대, 10 내지 95 wt%, 예컨대, 15 내지 95 wt%, 예컨대, 20 내지 90 wt%, 예컨대, 40 내지 95 wt%, 예컨대, 40 내지 95 wt%, 예컨대, 50 내지 95 wt%의 화학식 (I)의 화합물을 포함한다.
- [0125] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 10 wt% 이하의 물, 예컨대, 5 wt% 이하의 물을 포함한다.
- [0126] 본원에서 사용되는 바, "항미생물제"란, 미생물, 예컨대, 당업계에 공지되어 있는 (예시적인 미생물로는 미생물, 예컨대, 박테리아, 진균, 바이러스 및 다른 병원체)의 성장을 감소 또는 제거 또는 억제시킬 수 있는 작용제를 지칭한다. 유사하게, "항진균제"라는 용어는 진균의 성장을 감소 또는 제거 또는 억제시킬 수 있는 작용제를 지칭하고, "항박테리아제"라는 용어는 박테리아의 성장을 감소 또는 제거 또는 억제시킬 수 있는 작용제를 지칭한다.
- [0127] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 하나 이상의 항진균제를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 미생물 감염 치료를 필요로 하는 개체에게 화학식 I의 화합물 및 항미생물제를 공동 투여하는 단계를 포함하는, 하나 이상의 미생물 감염을 치료하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 항미생물제는 항진균제 또는 항박테리아제이다. 상기 항진균제는 미코나졸, 테르코나졸, 이소코나졸, 펜티코나졸, 플루코나졸, 니스타틴, 케토코나졸, 클로트리마졸, 부토코나졸, 에코나졸, 티오코나졸, 이트라코나졸, 5-플루오라실 및 메트로니다졸로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0128] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 하나 이상의 항박테리아제를 추가로 포함한다. 항생제는 박테리아성 감염의 치료 및 예방에서 사용되는 항미생물제의 한 유형이다. 상기 항박테리아제는 클린다마이신, 테트라사이클린, 아목시실린, 암피실린, 에리트로마이신, 독시사이클린, 루메플록사신(lumefloxacin), 노르플록사신, 아플록삼(afloxam), 시프로플록사신, 아지트로마이신, 및 세플록신(cefloxacin)으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0129] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 스테로이드를 추가로 포함한다. 상기 스테로이드는 코르티손일 수 있다.
- [0130] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 탐폰, 베지토리움(vagitorium), 질 에어로졸, 질 컵(vaginal cup), 질 젤, 질 삽입물, 질 패치, 질내 고리, 질 스폰지, 질 좌제, 질 크림, 질 에멀전, 질 폼, 질 로션, 질 연고, 질 분제, 질 샴푸, 질 액제, 질 스프레이, 질 현탁제, 질 정제, 질 로드(vaginal rod), 질 디스크, 질 장치, 및 그의 임의 조합으로 제제화되거나, 또는 여기서, 제약 조성물은 위생용품, 예컨대, 탐폰, 위생 냅킨, 요실금용 패드 또는 기저귀, 또는 팬티 라이너 상에 존재한다.
- [0131] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 적어도 1일 1회, 예컨대, 적어도 1일 2회, 예컨대, 적어도 1일 3회 투여용으로 조정된다.
- [0132] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 매 2일마다 1회 이하로, 예컨대, 매 3일마다 1회 이하로, 예컨대, 주 1회 이하로 투여하기 위한 것으로 조정된다.
- [0133] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 6일 이하의 기간 동안 투여하기 위한 것으로 조정된다.
- [0134] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 적어도 1주 동안, 예컨대, 적어도 2주 동안, 예컨대, 적어도 3주 동안, 예컨대, 적어도 4주 동안 투여하기 위한 것으로 조정된다.
- [0135] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 적어도 1주 동안 적어도 1일 1회 투여하기 위한 것으로 조정된다.
- [0136] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 투여 후 장기간에 걸쳐, 예컨대, 적어도 4시간에 걸쳐, 예컨대, 적어도 6시간에 걸쳐, 예컨대, 적어도 24시간에 걸쳐 화학식 I에 따른 화합물을 방출하도록 제제화된다.
- [0137] *바이오필름 형성의 방지 및/또는 감소를 위한 방법*
- [0138] 한 측면에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 바이오필름 형성의 방지 및/또는 감소를 위한 방법에 관한 것이다. 본원에서 사용되는 바, "바이오필름"이라는 용어는, 미생물 세포가 서로 및/또는

표면에 부착되어 있는 미생물의 응집체를 지칭한다. 이들 부착성 세포는 대개, 상기 세포에 의해 생산된, 예컨대, 세포의 DNA, 단백질, 및 다당류를 포함하는, 세포의 중합체 물질로 이루어진 매트릭스로 덮여 있다. 바이오필름에서 미생물 세포 성장은 대개 동일한 유기체의 플랑크톤성 세포와는 생리학적으로 상이하다.

[0139] 상기 바이오필름은 임의의 살아있는 또는 살아있지 않은 표면 상에서 형성될 수 있다. 한 실시양태에서, 바이오필름은 포유동물 내의 또는 그 위의 바이오필름이다.

[0140] 한 실시양태에서, 바이오필름은 임플란트 또는 임플란트 또는 보철물의 바이오필름이다. 본원에서 사용되는 바, "임플란트 또는 보철물"이라는 용어는 신체 일부를 대신하는 인공 대체재, 및 기능, 미용 또는 치료 목적으로 조직 내로 삽입되는 물질을 지칭한다. 임플란트 또는 보철물은 의수 및 의족인 경우에서와 같이 기능 목적, 또는 의안인 경우에서와 같이 미용 목적인 것일 수 있다. 외과 수술에 의해 체내로 삽입되거나, 또는 이식된 임플란트는 모두 치료적으로 사용되는 경향이 있다.

[0141] 상기 임플란트 또는 보철물은 카테터(catheter), 말초 정맥 카테터, 중추 정맥 카테터, 심장 판막, 심실 보조 장치, 관상동맥 스텐트(stent), 신경외과용 심실 셉트(shunt), 이식형 신경 자극기, 인공관절, 골절 고정용 장치, 팽창형 음경 임플란트, 유방 임플란트, 인공 와우, 안구내 렌즈, 치과용 임플란트, 후두절제술용 임플란트, 기관절개술용 임플란트, 인공 후두(voice prosthesis), 턱 가동성을 위한 임플란트, 고막절개술용 임플란트, 및 치아 임플란트로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0142] *조산 예방에서 사용하기 위한 방법*

[0143] 한 실시양태에서, 미생물 감염은 박테리아성 외음부질환(vulvovaginitis)이다. 자궁경부 숙화 또는 자궁경부 무력증일 경우, 상기 감염은 자궁으로 이동하여 용모양막염, 및 이어서, 조산을 유발할 수 있다. 심지어 현증 용모양막염의 부재하에서도 프로스타글란딘 생산을 통한 과도한 염증, 예컨대, 질염 또는 자궁경부염이 조기 수축 및 조산을 유발할 수 있다는 것을 입증하는 증거가 있다. 이어서, 조산 신생아는 미숙아에서의 신생아 면역 결핍에 기인하여 안면 침습성 박테리아성 감염; 폐렴, 수막염 또는 패혈증에 직면하게 될 수 있다. 특히, 그룹 A 및 B 스트렙토코쿠스 및 다내성 박테리아는 상기 미숙아에서 중증의 출산 전후 감염 및 새로 출산한 여성에서 산후의 자궁내막염을 유발할 수 있고, 신생아 및 산모의 심각한 이환 및 사망, 둘 모두의 원인이 될 수 있다.

[0144] 또 다른 실시양태에서, 미생물 감염은 외음부질 칸디다증이다. 조산 신생아는, 특히 신생아 집중 치료실에서 박테리아성 감염보다 더 높은 이환 및 사망을 유발하는 가장 중증인 중증 병원내 감염 중 하나인 침습성 칸디다 감염에 직면하게 될 수 있다.

[0145] 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 조산 예방에서 사용하기 위한 화합식 I의 화합물에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 상기 화합물은 질로 투여된다. 화합물은 탐폰, 베지토리움, 질 에어로졸, 질 캡, 질 젤, 질 삽입물, 질 패치, 질내 고리, 질 스폰지, 질 좌제, 질 크림, 질 에멀전, 질 폼, 질 로션, 질 연고, 질 분제, 질 샴푸, 질 액제, 질 스프레이, 질 현탁제, 질 정제, 질 로드, 질 디스크, 질 장치, 및 그의 임의 조합으로 제제화되거나, 또는 여기서, 화합물은 위생용품, 예컨대, 탐폰, 위생 냅킨, 요실금용 패드 또는 기저귀, 또는 팬티 라이너 상에 존재한다.

[0146] **실시예**

[0147] *실시예 1: 상이한 히드록실화된 카르복실산의 효과*

[0148] 바이오필름 형성 검정

[0149] 효모 균주 (하기 표 1)를 37°C에서 완전 배지 YPD (0.5% 효모 추출물, 1% 펩톤, 2% 글루코스) 또는 0.5% 황산암모늄, 0.2% 글루코스 및 100 mM L-프롤린으로 보충된, YNB로 구성된 최소 배지 (아미노산 및 황산암모늄이 없는 효모 질소 염기, 포미디움(FORMEDIUM)TM, CYN0505) 중에서 성장시켰다. 필요한 경우, 2% 아가를 사용하여 배지를 응고시켰다. 액체 최소 배지 (0.5% 황산암모늄, 0.2% 글루코스 및 100 mM L-프롤린으로 보충된 YNB (아미노산 및 황산암모늄이 없는 효모 질소 염기, 포미디움TM, CYN0505))는 바이오필름 검정을 위해 사용하였다 (바이오필름 배지).

[0150] pH가 바이오필름에 미치는 영향에 관한 실험에서 (하기 실시예 2), 최종 농도 0.25 M의 인산 칼륨 완충제를 사용하거나, 또는 시트르산, 락트산, 및 글루콘산을 바이오필름 배지에 첨가함으로써, (pH 2.6 내지 6.6인) pH 값을 수득하였다.

표 1

본 연구에서 사용된 효모 균주

| 원래 명칭 | 실험실 균주 명칭 | 설명 | 참고문헌 |
|---------------------|-----------------|---|--|
| 칸디다 알비칸스 SC5314 | Y775 | 야생형, 전신 감염의 마우스 모델에서 병독성, 서열분석된 균주 | [A. M. Gillum, et al. Mol. Gen. Genet. 1984, 198, 179-182] |
| 칸디다 글라브라타 CBS138 | Y1092 | 야생형, 인간 배설물로부터 분리된 표준 균주(type strain), 서열분석된 균주 | [B. Dujon, et al. Nature, 2004, 430, 35-44] |

[0151]

[0152]

바이오필름을 문헌 [K. Scherz et al., G3 (Bethesda), 2014, 4, 1671-1680. I. Serrano-Fujarte et al. Biomed Res Int. 2015;2015:783639]에 기술된 바와 같이, 단, 일부를 변형하여 액체 배양물 중에서 측정하였다. 바이오필름 검정에 앞서, 정지상까지 (OD_{600} 11-17)² 24시간 동안 액체 YPD 배지 중에서 효모 배양물을 성장시킨 후, 이어서, 세포를 원심분리 (1,699 g)에 의해 펠릿화하고, 멸균수로 세척하고, 시험 바이오필름 배지 (0.5% 황산암모늄, 0.2% 글루코스 및 100 mM L-프롤린 (pH 7.0)으로 보충된 YNB (아미노산 및 황산암모늄이 없는 효모 질소 염기))에 최종 농도 0.2 OD_{600} /ml로 추가로 접종하고, 37℃ 서모스탯에서 72시간 동안 웰 둥근바닥 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트 (시그마 알드리치(Sigma Aldrich), 코닝(Corning)[®] 코스타(Costar)[®] 배양 플레이트, CLS3596-50EA)에서 인큐베이션시켰다. 정의된 시점에 크리스털 바이올렛 (HT901-8FOZ; 시그마 알드리치)을 최종 농도 0.05%로 배지에 첨가하고, 추가로, 총 바이오매스를 측정하였다. 세포 염색 24시간 후, 플레이트 웰을 200 μ l의 물로 4회 세척하여 플랑크톤성 세포를 제거한 후, 이어서, 바이오필름을 건조시키고, 200 μ l의 96% 에탄올 중에 용해시켰다. 플루오스타 옵티마(FLUOstar OPTIMA) 플레이트 판독기, BMG 랩테크(BMG LABTECH)를 사용하여 OD_{560} 에서 총 바이오매스 및 크리스털 바이올렛 바이오필름 염색 측정을 수행하였다. 크리스털 바이올렛 바이오필름 측정값을 총 바이오매스에 대해 정규화하였다 (OD_{560} 바이오필름/ OD_{560} 총 바이오매스).

[0153]

상이한 히드록실화된 카르복실산의 효과

[0154]

저농도의 상이한 히드록실화된 카르복실산의 효과를 비교하기 위해, 비완충처리 조건하에 0.06 wt%의 글리세린산, 크실론산, 시트르산, 글루콘산, 및 락트산 첨가 후 24 h째에 바이오필름 형성을 측정하였다. 데이터는 하기 표 2 및 도 1에 제시되어 있다.

표 2

저농도 (0.06%)의 히드록실화된 카르복실산이 칸디다 알비칸스의 바이오필름 형성에 미치는 효과. 24 h 후, 바이오필름을 측정하였다.

| | 생성된 pH | 정규화된 바이오필름 (대조군 대비 비율(%)) |
|--------------|--------|------------------------------|
| 글리세린산 (GlyA) | 7.0 | 40 |
| 크실론산(XA) | 7.0 | 31 |
| 시트르산 (CA) | 4.6 | 14 |
| 글루콘산 (GA) | 6.5 | 6 |
| 락트산 (LA) | 4.9 | 13 |

[0155]

[0156]

표 2로부터 알 수 있는 바와 같이, 글루콘산이 가장 효율적인 화합물이고, 그 다음은 락트산 및 시트르산 순이었다. 락트산을 글루콘산으로 대체한 결과, >50% 더 적은 바이오필름 형성이 이루어졌다 (대조군 대비 6% 대 13%). 바이오필름 형성은 낮은 pH에 대해 민감성이 매우 높고, 락트산 및 시트르산과 비교하여, 글루콘산은 단지 중간 정도의 pH 강하를 유도한다는 점을 고려해 볼 때, 이는 놀라운 결과이다.

[0157]

실시예 2: 상이한 pH에서의 칸디다 알비칸스의 바이오필름 형성

[0158]

바이오필름 형성을 방지하는 데 있어서 글루콘산의 효과를 추가로 평가하기 위해, 글루콘산, 락트산 및 시트르산에 대해 상이한 pH에서의 바이오필름 형성을 (실시예 1에 기술된 바와 같이) 측정하였다.

[0159]

하기 표 3으로부터 알 수 있는 바와 같이, 글루콘산은 칸디다 알비칸스의 바이오필름 형성에 대해 강력한 효과를 보인 반면, 락트산 및 시트르산으로부터의 효과는 훨씬 덜 현저하다. 추가로, 글루콘산은 최대 대략 적어도 6인 pH 값에서도 또한 강력한 효과를 보인 반면, 락트산 및 시트르산의 경우에 관찰된 효과는 이미 pH 5에서 감소하기 시작한다. 추가로, 글루콘산은 pH 2.6에서 바이오필름 형성을 완전히 상실시킨다. 데이터는 하기 표 3에 요약되어 있다.

표 3

글루콘산, 락트산 또는 시트르산 첨가 (24 h 처리)에 의한 칸디다 알비칸스의 바이오필름 형성

| | 글루콘산 | 락트산 | 시트르산 | 완충제 |
|---|------|-----|------|------|
| pH 6.1에서의 정규화된 바이오필름 (OD ₅₆₀) | 0.17 | 3.1 | 4.6 | 3.2 |
| pH 2.6에서의 정규화된 바이오필름 (OD ₅₆₀) | 0 | 1.6 | 0.34 | 0.25 |

[0160]

[0161]

실시예 3: 상이한 pH에서의 칸디다 글라브라타의 바이오필름 형성

[0162]

칸디다 알비칸스와 비교하였을 때, 칸디다 글라브라타 처리가 훨씬 더 복잡하다. 그러나, 더욱 긴 장시간, 즉, 72 h 글루콘산으로 처리함으로써 뚜렷한 효과가 수득된다 (하기 표 4).

표 4

글루콘산, 락트산 또는 시트르산 첨가 (72 h 처리)에 의한 칸디다 글라브라타의 바이오필름 형성

| | 글루콘산 | 락트산 | 시트르산 | 완충제 |
|---|------|-----|------|-----|
| pH 6.1에서의 정규화된 바이오필름 (OD ₅₆₀) | 1.6 | 2.8 | 2.9 | 4.7 |
| pH 2.6에서의 정규화된 바이오필름 (OD ₅₆₀) | 0.07 | 0.9 | 1.0 | 4.8 |

[0163]

[0164]

상기 결과에 기초하여, 칸디다에 의한 바이오필름 형성을 표적화하는 데 있어서 락트산 및 시트르산과 비교하였을 때, 글루콘산이 우수한 효과를 갖는다는 결론을 얻었다. 락트산 및 시트르산에 대해 관찰된 효과와 달리, 글루콘산에 대해 관찰된 효과는 단순한 pH 관련 효과가 아니다. 상기 효과는 심지어 pH 6에서도 존재한다.

[0165]

따라서, 바이오필름 형성 감소로 나타나는 바와 같이, 글루콘산이 항진균성 화합물로서 유용하다는 결론을 얻게 된다. 상기 화합물은 생리학상 및 제약상 허용된다. 따라서, 글루콘산은 외음부질 칸디다증 치료에서 사용하기 위한 제약 제제를 제공하는 데 유용하다.

[0166]

실시예 4: 글루콘산 유도체의 제조

[0167]

글루콘산의 락톤화/올리고머화:

[0168]

글루콘산 (GA) (H₂O 중 50 wt%, 4 g)을 개방형 바이알에 붓고, 120°C로 가열하였다. 24 h 후, 혼합물은 실온으로 냉각된 반면, 응고되었다.

[0169]

글루콘산 (GA) 수용액의 조성을 분석하기 위해, GA (H₂O 중 50 wt%)를 DMSO-*d*⁶ 중에 용해시키고, ¹H- 및 ¹³C-NMR에 의해 분석하였다. 락톤화/올리고머화된 글루콘산 (상기 참조)을 DMSO-*d*⁶ 중에 용해시키고, ¹H- 및 ¹³C-NMR에 의해 분석하였고, 하기 표 5를 참조한다.

표 5

¹H- 및 ¹³C-NMR에 의해 분석된, GA, 락톤화 및 올리고머화된 GA의 조성.

| 화합물 | DMSO- <i>d</i> ⁶ (¹ H 및 ¹³ C) |
|-----------------|---|
| GA [526-95-4] | 70% 글루콘산 15% 글루코노-δ-락톤 15% γ-글루코노락톤 |
| 락톤화 및 올리고머화된 GA | 10% 글루콘산 25% δ-글루코노락톤 50% γ-글루코노락톤 15% 올리고머화된 물질 |

[0170]

[0171]

GA는 장기간 탈수시 상이한 락톤 뿐만 아니라, 올리고머화된 물질의 복합 혼합물을 형성한다는 결론을 얻었다.

[0172]

실시예 5: 글루코노-δ-락톤 (GDA)의 가수분해

- [0173] 수용액 중에서, 글루코노- δ -락톤 (GDA)은 글루콘산 (GA, CAS 526-95-4)과 평형상태에 있다. GDA (200 mg)를 37°C에서 증류된 H₂O (20 mL), pH 4 완충제, pH 5 완충제, 또는 pH 7 완충제에 첨가하였다. 시간 경과에 따라 광학 회전 및 pH를 측정하였다. 광학 회전, 37°C에서 측정, 소듐 D 라인, C=10 mg/mL, 경로 길이=10 cm. GDA의 광학 회전은 대략 6° 이다. 글루콘산의 광학 회전은 대략 5° 이다 (문헌 [D. T. Sawyer, J. B. Bagger, J. Am. Chem. Soc., 1959, 81, 5302-5306]).
- [0174] 상기 실험은 GDA가 GDA 및 GA의 혼합물로 서서히 가수분해된다는 것을 나타낸다 (도 2). 평형은 pH-의존적이며, 관련 농도의 GDA가 모든 완충처리된 조건에 존재한다.
- [0175] 실시예 6 - 글루콘산 (GA)을 이용한 생체내 조건의 모델에서의 바이오필름 형성
- [0176] 락톤화/올리고머화된 글루콘산의 펠릿 (1.3 g, 이중 샘플)을 37°C에서 pH 3.71의 완충제 용액 (0.5 M KH₂PO₄/오르토 인산, 10 mL)에 첨가하였다. 샘플 (4 mL)을 매 시간마다 (1, 2, 3, 4, 5, 6 및 24 h) 취하고, 새 완충제 용액 (4 mL)을 첨가하였다. 상기 기술된 바와 같이, 샘플을 바이오필름 배지 (상기 참조)를 이용하여 50배 희석시키고, 24 h 후, 바이오필름 형성의 양을 측정하였다. 도 4a로부터 알 수 있는 바와 같이, 유리된 GA가 칸디다 알비칸스에서 바이오필름 형성의 양을 유의적으로 감소시킨다. 추가로, 펠릿의 가수분해는 겔보기상 적어도 최대 6시간, 가능하게는 훨씬 더 오랜 기간 동안 방지 효과를 제공하는 데 충분할 정도로 느리다. 상기 효과는 칸디다 글라브라타 (도 4b)를 사용한 경우보다 덜 현저하다. 본 데이터는 하기 표 6에 요약되어 있다.

표 6

생체내 조건의 모델에서의, 락톤화/올리고머화된 GA로 처리된 칸디다 알비칸스 및 칸디다 글라브라타의 바이오필름 형성. 샘플을 1 h 후 취하고, 바이오필름 배지를 이용하여 50배 희석시키고, 24 h 후, 바이오필름 형성의 양을 측정하였다.

| 정규화된 바이오필름 (대조군 대비 비율(%)), 1 h | |
|--------------------------------|-----|
| 칸디다 알비칸스 | 6.5 |
| 칸디다 글라브라타 | 42 |

- [0177]
- [0178] 실시예 7 - 글루코노- δ -락톤을 이용한 생체내 조건의 모델에서의 바이오필름 형성
- [0179] 글루코노- δ -락톤 (GDA)의 펠릿 (2.5 g, 이중 샘플)을 37°C에서 pH 3.71의 완충제 용액 (0.5 M KH₂PO₄/오르토 인산, 10 mL)에 첨가하였다. 샘플 (4 mL)을 고정된 시점에 (1, 2, 3, 4, 5, 6 및 24 h) 취하고, 새 완충제 용액 (4 mL)을 첨가하였다. 상기 기술된 바와 같이, 샘플을 바이오필름 배지 (상기 참조)를 이용하여 50배 희석시키고, 24 h 후, 바이오필름 형성의 양을 측정하였다. 도 5a로부터 알 수 있는 바와 같이, 유리된 GDA가 C. 알비칸스에서 바이오필름 형성의 양을 유의적으로 감소시킨다. 추가로, 펠릿의 가수분해는 겔보기상 적어도 최대 24시간, 가능하게는 훨씬 더 오랜 기간 동안 방지 효과를 제공하는 데 충분할 정도로 느리다. 상기 효과는 C. 글라브라타 (도 5b)를 사용한 경우보다 덜 현저하다.

표 7

생체내 조건의 모델에서의, GDA로 처리된 C. 알비칸스 및 C. 글라브라타의 바이오필름 형성. 샘플을 1 h 후 취하고, 바이오필름 검정 배지를 이용하여 50배 희석시키고, 24 h 후, 바이오필름 형성의 양을 측정하였다.

| | 정규화된 바이오필름 (대조군 대비 비율(%)), 1 h |
|-----------|--------------------------------|
| 칸디다 알비칸스 | 8.3 |
| 칸디다 글라브라타 | 71 |

[0180]

- [0181] 본 결과에서는 C. 알비칸스 및 C. 글라브라타, 둘 모두의 바이오필름 형성이 GDA의 존재하에서 감소된 것으로 나타났다. 바이오필름 형성 감소 이외에도, GDA는 C. 알비칸스 및 C. 글라브라타의 성숙한 바이오필름의 생존능에 영향을 줄 수 있다.
- [0182] 실시예 8: 글루코노- δ -락톤으로 처리된 C. 알비칸스 및 C. 글라브라타의 성숙한 바이오필름의 생존능
- [0183] 상이한 농도의 글루코노- δ -락톤 (GDA)으로 상이한 기간 처리 이후의 C. 알비칸스 및 C. 글라브라타의 바이오필름의 생존능을 세포를 XTT로 염색함으로써 평가하였다. XTT는 세포 생존능, 및 세포독성의 정량화를 위한 비색 검정법이다. 상기 검정법은 오직 생존가능한 세포에서만 발생하는 전환인 테트라졸륨 염 XTT의 절단에 기초한다. 성숙한 바이오필름을 24 h 동안 GDA에 노출시켰다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척한 후, XTT 반응 혼합물을 첨가하였다. 30 min 후, 485 nm에서 광학 밀도를 측정하였다.
- [0184] XTT 검정 결과, 24 h 인큐베이션 후에는 이미 C. 글라브라타의 경우, 생존능은 강력하게 감소된 것으로 나타났다 (도 6a). 그 효과는 C. 알비칸스의 경우, 덜 현저하였지만, 48 h 후에는 명확하게 관찰되었다 (도 6b)
- [0185] 추가로, (YNB, 0.2% 글루코스, 100 mM 프롤린에서 48 h 동안 성장된) C. 알비칸스 및 C. 글라브라타의 성숙한 바이오필름을 상이한 농도 (0.05 - 0.5 g/ml)의 GDA와 함께 37°C에서 인큐베이션시켰다. 상기 목적을 위해, 바이오필름 배지 (YNB, 0.2% 글루코스, 100 mM 프롤린)를 제거하고, 0.05, 0.1, 0.2 및 0.5 g/ml 농도로 물 중에 용해된 GDA를 첨가하였다. 5 h 또는 73 h 동안 GDA와 함께 인큐베이션시킨 후, 5 μ l의 세포를 아가 배지 YPD 상에 연속 희석률로 (1:10 내지 1:1,000) 플레이팅하여 세포 생존율을 추정하였다. 플레이팅된 세포를 37°C에서 24 h 동안 인큐베이션시키고, 시각적으로 분석하였다. 물로 처리된 성숙한 바이오필름으로부터의 세포를 대조군으로 사용하였다. GDA가 특히 고농도에서 C. 알비칸스 및 C. 글라브라타의 세포 생존능을 감소시키는 것으로 나타났다. 0.2 및 0.5 g/ml 농도일 때, 5 h 인큐베이션 후, C. 알비칸스 및 C. 글라브라타, 둘 모두의 경우, 세포 생존능은 약 100배만큼 감소되었다. 73 h 인큐베이션 후, 0.5 g/ml의 GDA의 경우에는 C. 알비칸스의 세포 생존능이 약 1,000배만큼 감소되었다 (데이터는 제시되지 않음). C. 글라브라타가 GDA에 대하여 민감성이 더 높은 것으로 입증되었다 (도 7).
- [0186] 실시예 9: 바이오필름 발생에 관한 미세유체공학 연구
- [0187] C. 알비칸스 세포 형태를 모니터링하기 위해, 본 발명자들은 현미경검사 및 미세유체공학 또한 사용하여 바이오필름 발생에 관해 연구하였다. 효모 세포를 접종시킨 후, 바이오필름 배지 (100 mM 프롤린 및 0.2% 글루코스로 보충된 YNB, pH 7.0) 중에서 인큐베이션 처음 1시간 이내에 군사가 형성되기 시작하였다. 도 8a는 5 h 후의 비처리된 세포를 보여주는 것이다. 글루코노- δ -락톤의 펠릿 (2.5 g)을 37°C에서 pH 3.71의 완충제 용액 (0.5 M KH_2PO_4 /오르토 인산, 10 mL)에 첨가하였다. 샘플을 1 h 후에 취하고, 바이오필름 배지를 이용하여 50배 희석시키고, C. 알비칸스에 첨가하였다. 5 h 후, 처리된 세포는 대부분 플랑크톤성 세포였다.
- [0188] 실시예 10: 글루코노- δ -락톤의 존재하에서의 상이한 칸디다 종의 생존능
- [0189] 연구된 다른 칸디다 종 또한 글루코노- δ -락톤 (GDA)에 대해 민감성이었다 (즉, XTT 검정법을 이용한 세포 생존능 측정, 실시예 8 참조). 그러나, 이들은 상이한 수준의 민감성을 보였다. 칸디다 알비칸스 SC5314는 가장 낮은 감수성을 보였고, 칸디다 크루세이 실리콘 분리주 A4-1은 가장 높은 감수성을 보였다. 칼코플루오르 화이트(calcofluor white)를 포함하는 배지 상에서 GDA에 노출된 세포의 생존능은 삼투 안정제 (0.5 M 슈크로스)로 보충된 것과 비교하고, 상기 배지 상의 비처리된 세포와 비교된 것과 비교하였을 때 더 낮았기 때문에, GDA-독성은 세포벽 손상을 통해 매개된다. 표 3에는 GDA에 의해 나타난 정성적 효과가 요약되어 있다.

표 8

GDA에 대한 상이한 칸디다 종의 민감도

| 균주 | GDA에 대한 민감도, 24 h 노출, 플레이트 |
|------------------------|----------------------------|
| C. 알비칸스 SC5314 | + |
| C. 글라브라타 CBS138 | +++++ |
| C. 트로피칼리스 실리콘 분리주 U3-3 | +++++++ |
| C. 크루세이 실리콘 분리주 U3-5 | ++ |
| C. 트로피칼리스 실리콘 분리주 A6-1 | +++ |
| C. 크루세이 실리콘 분리주 U2-12 | +++++++ |
| C. 크루세이 실리콘 분리주 A5-2 | ++ |
| C. 크루세이 실리콘 분리주 A4-1 | +++++++ |

[0190]

[0191] 결론적으로, (i) GDA는 C. 알비칸스 및 C. 글라브라타에 의해 형성된 성숙한 바이오필름을 파괴시킬 수 있고, (ii) GDA에의 노출시, C. 알비칸스는 효모 형태로 형질변환되는 반면, C. 글라브라타의 생존능은 감소되고, (iii) 효과는 다른 균주, 즉, C. 트로피칼리스(*C. tropicalis*) 및 C. 크루세이(*C. krusei*)에 대해 더욱 명확하다.

[0192] 실시예 11: 글루콘산 (GA)과 락트산 (LA)의 코올리고머화

[0193] LA: GA (4:1 몰비)

[0194] DL-락트산 (563 mg, 6.26 mmol) 및 D-글루콘산 (물 중 50%, 0.50 mL, 1.57 mmol)을 시험관에서 혼합하고, 130 °C로 가열하였다. 4 h 후, 온도를 140°C로 승온시켰다. 총 27 h 후, 반응 혼합물이 rt에 도달하도록 하였다. 냉각시, 반응 혼합물은 응고하였다.

[0195] LA: GA (8:1 몰비)

[0196] DL-락트산 (569 mg, 6.32 mmol) 및 D-글루콘산 (물 중 50%, 0.25 mL, 0.78 mmol)을 시험관에서 혼합하고, 130 °C로 가열하였다. 4 h 후, 온도를 140°C로 승온시켰다. 총 27 h 후, 반응 혼합물이 rt에 도달하도록 하였다. 냉각시, 반응 혼합물은 응고하였다.

[0197] LA: GA (16:1 몰비)

[0198] DL-락트산 (565 mg, 6.28 mmol) 및 D-글루콘산 (물 중 50%, 0.35 mL, 0.39 mmol)을 시험관에서 혼합하고, 130 °C로 가열하였다. 4 h 후, 온도를 140°C로 승온시켰다. 총 27 h 후, 반응 혼합물이 rt에 도달하도록 하였다. 냉각시, 반응 혼합물은 응고하였다.

[0199] LA: GA (10:1 몰비, 직접 혼합)

[0200] DL-락트산 (1 g, 11 mmol) 및 D-글루콘산 (물 중 50%, 0.35 mL, 0.78 mmol)을 시험관에서 혼합하고, 진공하에서 130°C로 가열하였다. 총 22 h 후, 반응 혼합물이 rt에 도달하도록 하였다. 냉각시, 반응 혼합물은 거의 완전히 고체가 되었다.

[0201] LA: GA (10:1 몰비, 5 h 동안 미리 가열)

[0202] DL-락트산 (1 g, 11 mmol)을 진공하에 130°C에서 미리 가열하였다. 5 h 후, D-글루콘산 (물 중 50%, 0.35 mL, 1.1 mmol)을 첨가하였다. 진공하에 130°C에서 추가로 16 h 후, 반응 혼합물이 rt에 도달하도록 하였다. 냉각시, 반응 혼합물은 응고하였다.

[0203] GA 중 1 wt% CA

[0204] D-글루콘산 (물 중 50%, 4 g) 및 시트르산 일수화물 (20 mg, 1 wt.%)을 시험관에서 혼합하고, 120°C로 가열하였다. 총 15 h 후, 반응 혼합물이 rt에 도달하도록 하였다. 냉각시, 반응 혼합물은 응고되지 않았다.

- [0205] **GA 중 5 wt% CA**
- [0206] D-글루콘산 (물 중 50%, 4 g) 및 시트르산 일수화물 (105 mg, 5 wt.%)을 시험관에서 혼합하고, 120℃로 가열하였다. 총 15 h 후, 반응 혼합물이 rt에 도달하도록 하였다. 냉각시, 반응 혼합물은 응고되지 않았다.
- [0207] **GA 중 10 wt% CA**
- [0208] D-글루콘산 (물 중 50%, 4 g) 및 시트르산 일수화물 (222 mg, 10 wt.%)을 시험관에서 혼합하고, 120℃로 가열하였다. 총 15 h 후, 반응 혼합물이 rt에 도달하도록 하였다. 냉각시, 반응 혼합물은 응고되지 않았다.
- [0209] 상기 결과로부터, 본 발명자들은, 둘 모두 액체인 순수한 글루콘산 또는 락트산과 달리, 글루콘산이 락트산과 올리고머화되어 고체를 형성할 수 있다는 것을 보여주고 있다.
- [0210] *실시예 12: 글루코노-δ-락톤 및 당산이 E. 콜라이(E. coli)에 미치는 효과*
- [0211] 성장 조건
- [0212] 바이오필름 연구를 위해 박테리아 균주 에스케리키아 콜라이 K12를 사용하였다. 상기 균주를 37℃에서 LB 배지 상에서 유지시켰다. 상이한 pH (2.6-6.6)를 갖는 배지를 수득하기 위해 포스페이트 완충제, 시트르산, 락트산, 글루콘산 또는 글루코노-δ-락톤을 함유하는, 합성 배지 M9 (x1 M9 최소 염 (시그마(Sigma) M6030), 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 및 0.2% 글루코스) 중에서 바이오필름을 연구하였다.
- [0213] **바이오필름**
- [0214] E. 콜라이 K12의 밤샘 배양물 (OD₆₀₀ ~5.0)을 멸균수로 세척하고, 상이한 pH의 상이한 화합물을 포함하는 M9 배지 중에 최종 농도 0.2 OD/ml로 접종하였다. 96-웰 평평한 바닥의 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트 (시그마 알드리치, 코닝® 코스타® 배양 플레이트, CLS3596-50EA)에서 바이오필름 발생을 연구하였다. 바이오필름을 크리스털 바이올렛으로 염색하였다.
- [0215] 바이오필름 실험 (24-48시간) 동안, 박테리아 균주는 오직 pH 6.1 및 pH 6.6의 포스페이트 완충제로 보충된 M9 배지 중에서만 그의 바이오매스 (2-3배)를 증가시켰다 (도 9). 바이오매스는 다른 배지 중에서 더 낮았고, 본 발명자들은 배지의 pH가 강하됨에 따라, 박테리아 바이오매스가 감소하는 것을 관찰하게 되었다. 산 (시트르산, 락트산, 글루콘산), 및 글루코노-δ-락톤은 성장에 대해 억제 효과를 주었다. 성장 억제 이외에도, 배지의 pH 강하는 바이오필름 형성을 감소시켰다. 글루콘산으로 보충된 배지 중에서 가장 낮은 양의 바이오필름이 관찰되었다. 바이오필름 억제에 있어서 두 번째로 가장 효과적인 것은 락트산이고, 그 다음은 글루코노-δ-락톤이었다. 포스페이트 배지와 비교하였을 때, 글루콘산 배지 상의 바이오필름은 pH 2.6에서는 38배 더 낮고, pH 3.0에서는 15배 더 낮았다. pH 6.6에서, 글루콘산 및 락트산은 바이오필름을 ~2배 하락시켰다. pH 2.6에서 글루코노-δ-락톤은 바이오필름 형성을 24h째에는 14.2배, 및 48h째에는 그에 맞춰 30배 감소시켰다.
- [0216] 배지의 pH 강하는 E. 콜라이 바이오필름 발생에 대하여, 가능하게는 살균 효과와 연관이 있는 듯한 분명한 효과를 주었다 (더 낮은 바이오필름에는 더 낮은 바이오매스가 동반되었다).
- [0217] *실시예 13: 가르트네렐라 바기날리스, 락토바실러스 크리스파투스(Lactobacillus crispatus), 및 락토바실러스 이너스(Lactobacillus iners)에 대한 글루코노-δ-락톤의 MIC 시험*
- [0218] 균주
- [0219] 가르트네렐라 바기날리스 CCUG 3717
- [0220] 락토바실러스 크리스파투스 CCUG 44128
- [0221] 락토바실러스 이너스 CCUG 44025
- [0222] 접종물 제조
- [0223] 가르트네렐라 바기날리스, 락토바실러스 이너스, 및 락토바실러스 크리스파투스를 CCUG (예테보리 대학교의 배양 수집소(Culture Collection of University of Gothenburg))에 의해 회수하였다. 5% CO₂, 36℃에서 G. 바기날리스를 위해 초콜릿-GL 플레이트 상에서, 및 락토바실러스 종(Lactobacillus spp.)을 위해 M.R.S. 아가 플레이트 상에서 계대배양 플레이트를 제조하였다. 접종물은 계대배양 플레이트로부터 제조하였다. 콜로니를 5 ml 시험 배지를 포함하는 배양 튜브에 접종하고, 직경이 3 mm인 약 10개의 유리 비드와 함께 2 min 동안 와동시켰

다. 용액의 혼탁도가 OD₄₇₅ 0.4-0.5가 될 때까지, 콜로니를 채취하였다. 세포가 분산되어 있음을 확인하기 위해 위상차를 이용하여 x40로 광학 현미경검사로 박테리아 용액을 체크하였다. 각 박테리아 현탁액을 그의 시험 배지 중에 1:100으로 희석하여 1-3 x 10⁶ CFU/ml가 되도록 만들었다. 접종물을 제조하는 동안 미생물 용액을 20℃에서 보관하였다.

[0224] 미량희석액 제조 및 MIC 시험

[0225] 멸균 H₂O 중 1 g/ml로 시험 물질 용액을 무균 방식으로 제조하였다. 웰의 제1행을 100 µl 물질로 충전시킨 후, 8 단계로 수직으로 2배 희석을 수행하였다. 하기 대조군을 포함하였다: i) 각 균주에 대한 성장 대조군 (+ctrl) = 항미생물제 (AM)를 포함하지 않는 시험 배지 중의 각 미생물, ii) 비 성장 대조군 (-ctrl) = 시험 배지 및 시험된 최고 농도의 물질 (이는 물질 단독인 것은 시험 배지의 색상을 변색시키지 않는다는 것을 확인하기 위한 것이다), iii) 각 균주에 대한 겐타마이신 대조군.

[0226] 이어서, 100 µl 미생물을 첨가하고, 플레이트를 500 rpm으로 30초 동안 부드럽게 진탕시킨 후, 5% CO₂로 설정된 CO₂ 인큐베이터 중 35℃ 및 90% RH에서 인큐베이션시켰다. 48 및 72시간 인큐베이션 후, OD를 측정하고, 육안으로 사정하였다. 모든 희석액에 대한 pH 또한 측정하였다 (n=1, pH = 6.8-7.1).

[0227] MIC 미량희석액 검정을 삼중으로 수행하여 5% CO₂에서의 48시간 인큐베이션 후, *G. 바기날리스* (*G. vaginalis*) (CAMHB) 및 *L. 크리스파투스* (*L. crispatus*) (이소S-M.R.S.(IsoS-M.R.S.)), 및 120시간 후 혐기 조건하에서 배양된 *L. 이너스* (*L. iners*)에 대한 GDA의 MIC 값을 사정하였다 (표 7).

표 9

G. 바기날리스 (CAMHB), *L. 크리스파투스* (이소S-M.R.S.), 및 *L. 이너스* (CAMHB)에 대한 GDA의 최소 억제 농도 (MIC)

| 균주 | CCUG 식별 | MIC (g/ml) |
|------------------|------------|------------|
| <i>G. 바기날리스</i> | CCUG 3717 | 0.001 |
| <i>L. 크리스파투스</i> | CCUG 44128 | 0.0078 |
| <i>L. 이너스</i> | CCUG 44025 | 0.0078 |

[0228]

[0229] 가르드넬라 바기날리스에 대한 GDA의 최소 억제 농도 (MIC) 값이 락토바실러스 이너스 및 락토바실러스 크리스파투스에 대한 GDA의 MIC 값보다 훨씬 더 낮다. 따라서, GDA는 양성 락토바실러스 이너스 및 락토바실러스 크리스파투스에 대해서보다 가르드넬라 바기날리스에 대해서 더 효율적이다.

[0230] 실시예 14: 에스케리키아 콜라이, 스타필로코쿠스 에피더미디스, 스타필로코쿠스 아우레우스, 슈도모나스 아에루기노사, 아세티노박터 바우만니이, 스트렙토코쿠스 피오게네스, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에, 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 C 및 G 및 포르피로모나스 긴기발리스에 대한 GDA의 MIC 시험.

[0231] 균주

[0232] 호기성 미생물:

[0233] 에스케리키아 콜라이 CCUG 3274/ATCC 10536

[0234] 스타필로코쿠스 에피더미디스 CCUG 23118

[0235] 스타필로코쿠스 아우레우스 CCUG 15915/ATCC 29213

[0236] 슈도모나스 아에루기노사 (PA01) CCUG 56489 / ATCC 15692

[0237] 아세티노박터 바우만니이 CCUG 57035

[0238] 배양이 까다로운(fastidious) 호기성 미생물:

- [0239] 스트렙토코쿠스 피오케네스 CCUG 47803/ATCC 700294
- [0240] 스트렙토코쿠스 아갈락티아에 CCUG 29376
- [0241] 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 C 스트렙토코쿠스 디스갈락티아에 ss 에퀴시밀리스(*Streptococcus dysgalactiae ss equisimilis*) CCUG 4211
- [0242] 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 G 스트렙토코쿠스 디스갈락티아에 ss 에퀴시밀리스 CCUG 7975
- [0243] 혐기성 미생물:
- [0244] 포르피로모나스 긴기발리스 CCUG 25893 / ATCC 33277
- [0245] 접종물 제조
- [0246] 모든 균주는 마이크로뱅크로부터 회수하였고, 스트리크(streak) 및 계대배양 플레이트를 제조하였다. TSA 플레이트 상에서 호기성 미생물, 말 혈액 플레이트 상에서 배양이 까다로운 호기성 미생물 및 FAA 플레이트 상에서 혐기성 미생물. 연구 전 기간 동안, 호기성 미생물은 호기성 조건하에서, 배양이 까다로운 것은 5% CO₂에서, 및 혐기성 미생물은 엄격한 혐기성 조건하에 37℃에서 배양하였다. 호기성 미생물 및 배양이 까다로운 호기성 미생물에 대한 18 내지 24시간 아가 플레이트로부터 선택된 백금이량의(loopful) 콜로니를 직경이 3 mm인 10개의 유리 비드를 함유하는 10 ml 튜브 내의 5 ml 중에 현탁시켰다.
- [0247] 혐기성 미생물은 컨셉트 400(Concept 400) 중에 현탁시켰고, 희석제는 헤민 (5 µg/ml), 비타민 K1 (1 µg/ml), 용해된 말 혈액 (5%)으로 보충된 환원된 브루셀라(*Brucella*) 브로쓰였다. 이어서, 세포 현탁액을 1분 동안 왕성하게 와동시켜 혼합한 현탁액을 수득하였다. 호기성 미생물 및 배양이 까다로운 호기성 미생물의 각 현탁액을 분광광도계를 이용하여, 대부분의 종과 대략 1-3 x 10⁸ CFU/ml로 상관관계가 있는 475 nm에서의 OD 0.28이 되도록 조정하였다. 혐기성 미생물의 경우, 배양 배지 중의 혈액 사용으로 인해 OD 측정이 어려운 것으로 밝혀졌다. 그러므로, 이를 0.5 Mc 파랜드(Farland) 표준과 동일하도록 현탁시키고, 접종물의 세포 밀도는 플레이트 계수에 의해 체크하였다. 호기성 미생물 및 배양이 까다로운 호기성 미생물을 염수 중에서 10배 추가로 희석시켜 접종물 농도가 1.5-3.0 X 10⁷ CFU/ml가 되도록 만들었다. 혐기성 미생물은 희석시키지 않고, 그 자체로 바로 사용하였다. 상이한 호기성 박테리아 및 배양이 까다로운 호기성 박테리아 현탁액을 96 웰 플레이트의 각 웰로 옮겨 놓았다. *A. 바우만니*(*A. baumannii*), *E. 콜라이*, 및 *P. 아에루기노사*(*P. aeruginosa*)를 1행에 배치하고, 스타필로코쿠스 종(*Staphylococci spp.*)은 제2행에 배치하고, 배양이 까다로운 호기성 미생물은 플레이트의 제3행에 배치하였다. 혐기성 미생물은 25 ml 다채널 피펫 저장소로부터 옮겨 놓았다.
- [0248] 미량희석액 제조 및 MIC 시험
- [0249] 미량희석액 제조 및 MIC 시험은 실시예 13에서와 같이 수행하였다. MIC 미량희석액 검정을 삼중으로 수행하여 글루코노-δ-락톤 (GDA)의 MIC 값을 사정하였다 (하기 표 10).

표 10

에스케리키아 콜라이, 스타필로코쿠스 에피더미디스, 스타필로코쿠스 아우레우스, 슈도모나스 아에루기노사, 아시네토박터 바우만니이, 스트렙토코쿠스 피오게네스, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에, 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 C 및 G 및 포르피로모나스 긴기발리스에 대한 GDA의 최소 억제 농도 (MIC)

| 균주 | CCUG 식별 | MIC (g/ml) |
|---------------------------|------------|------------|
| A. 바우만니이 | CCUG 57035 | 0.0031 |
| E. 콜라이 | CCUG 3274 | 0.0063 |
| P. 아에루기노사 | CCUG 56489 | 0.0031 |
| S. 아우레우스 | CCUG 15915 | 0.0063 |
| S. 에피더미디스 | CCUG 23118 | 0.0031 |
| S. 아갈락티아에 | CCUG 29376 | 0.0031 |
| 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 C | CCUG 4211 | 0.0016 |
| 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 G | CCUG7975 | 0.0031 |
| S. 피오게네스 | CCUG 47803 | 0.0031 |
| P. 긴기발리스 | CCUG 25893 | 0.0031 |

[0250]

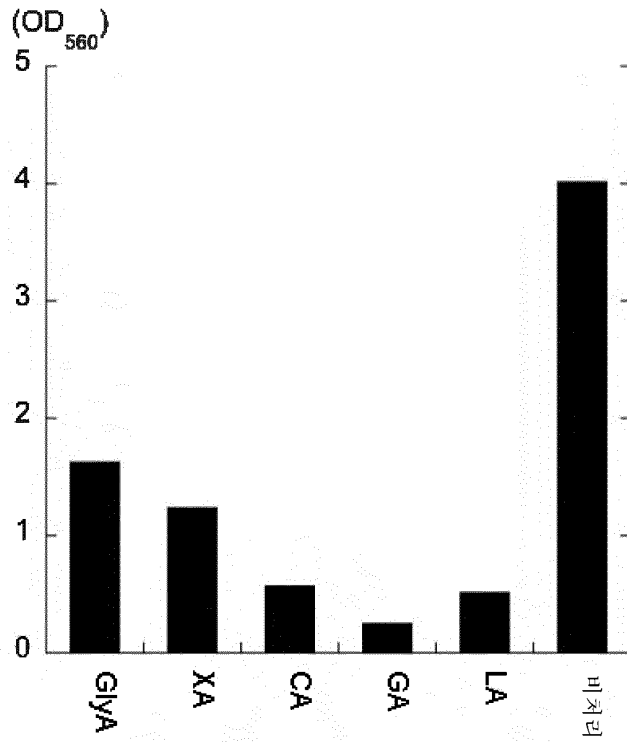
[0251]

에스케리키아 콜라이, 스타필로코쿠스 에피더미디스, 스타필로코쿠스 아우레우스, 슈도모나스 아에루기노사, 아세티노박터 바우만니이, 스트렙토코쿠스 피오게네스, 스트렙토코쿠스 아갈락티아에, 베타-용혈성 스트렙토코쿠스 그룹 C 및 G 및 포르피로모나스 긴기발리스에 대한 GDA의 최소 억제 농도 (MIC) 값이 일반적으로 락토바실러스 이너스 및 락토바실러스 크리스파투스에 대한 GDA의 MIC 값보다 낮다 (실시예 13). 따라서, GDA는 양성 락토바실러스 이너스 및 락토바실러스 크리스파투스에 대해서보다 상기 병원체들에 대해서 더 효율적이다.

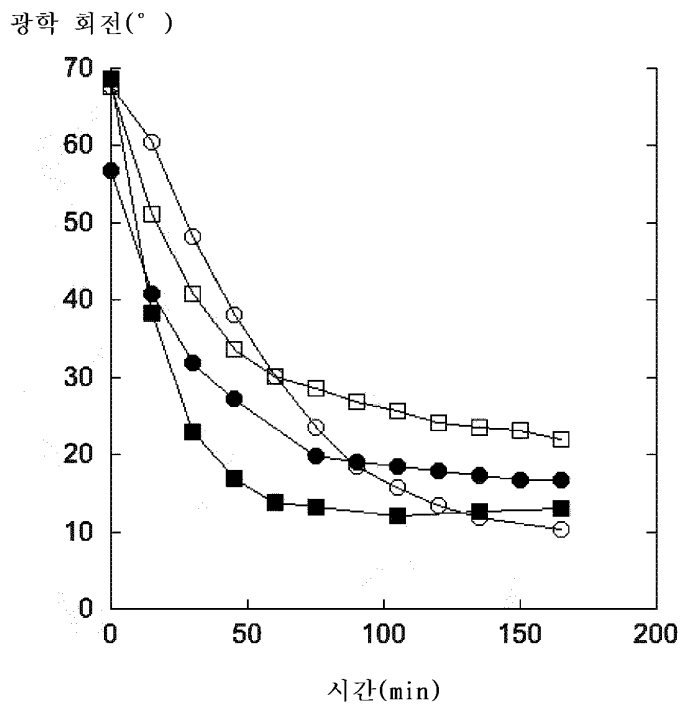
도면

도면1

정규화된 바이오필름

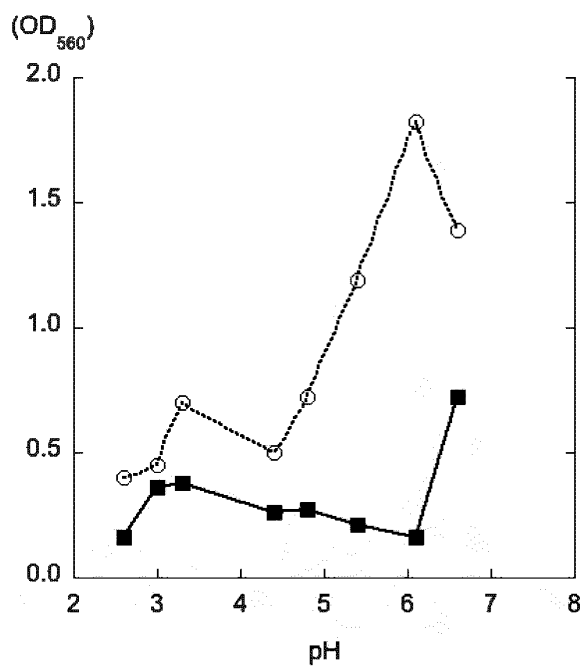


도면2



도면3

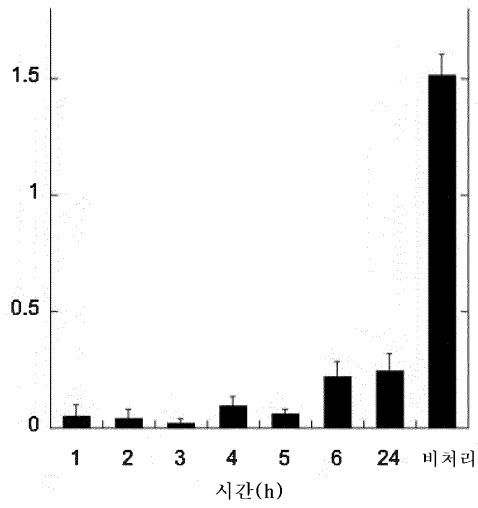
정규화된 바이오필름



도면4

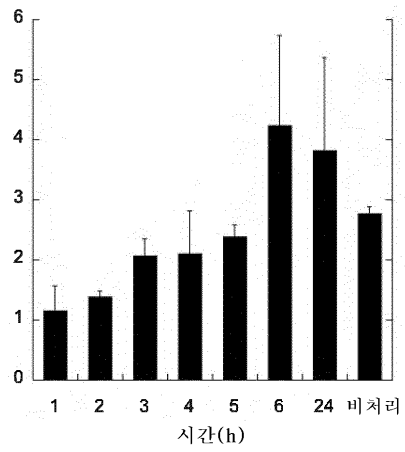
a

정규화된 바이오필름
(OD₅₆₀)



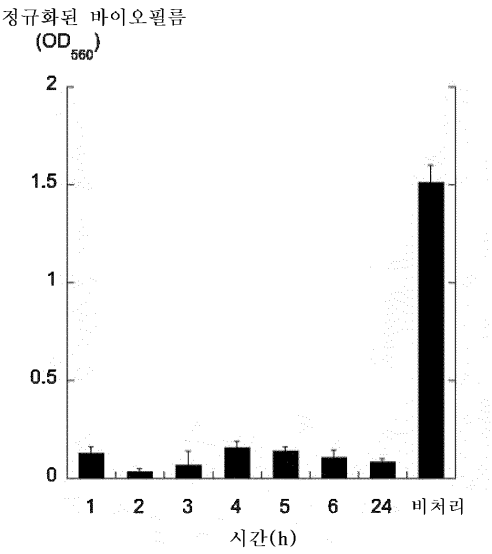
b

정규화된 바이오필름
(OD₅₆₀)

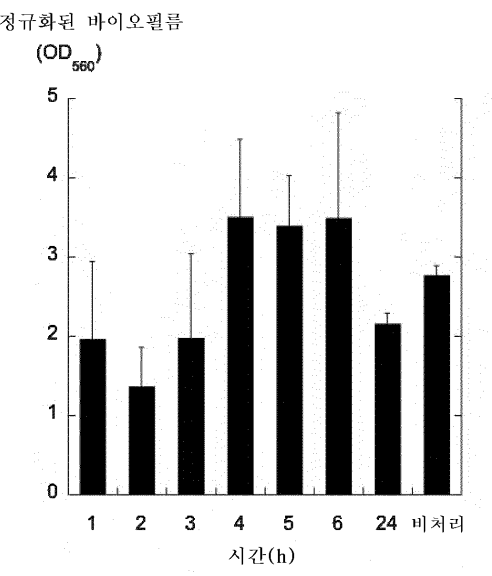


도면5

a

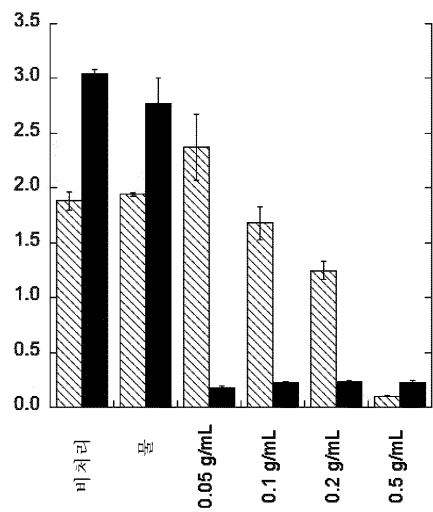


b

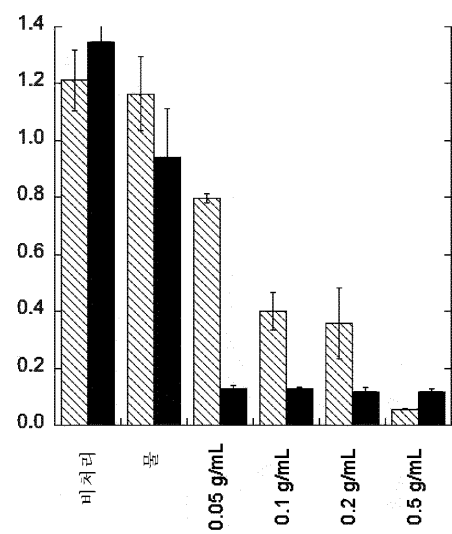


도면6

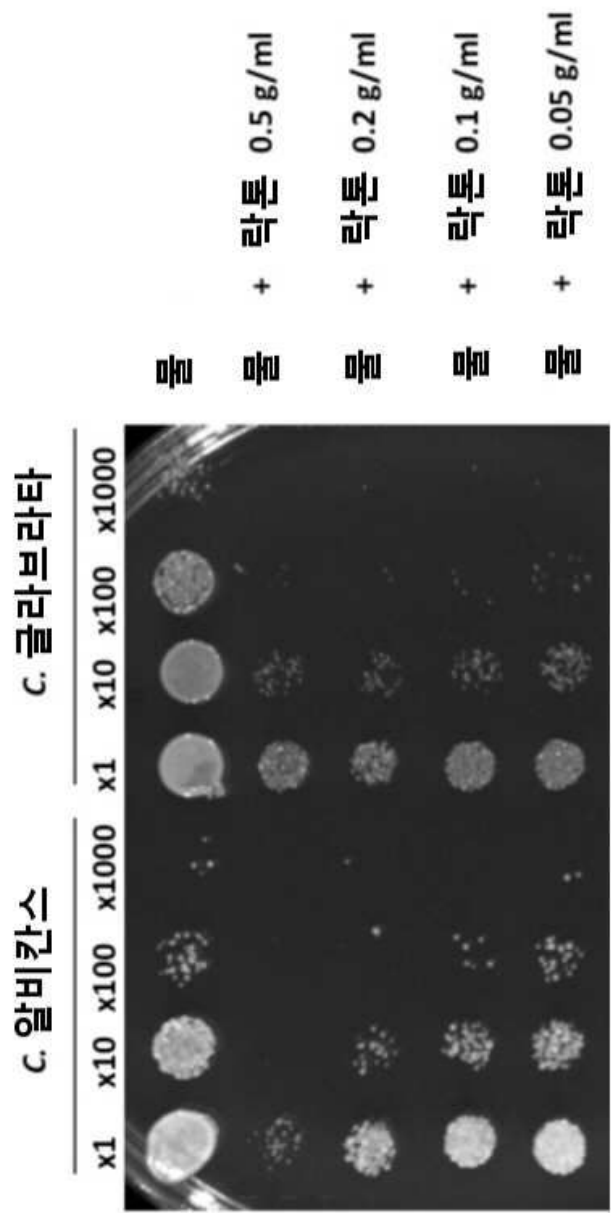
a



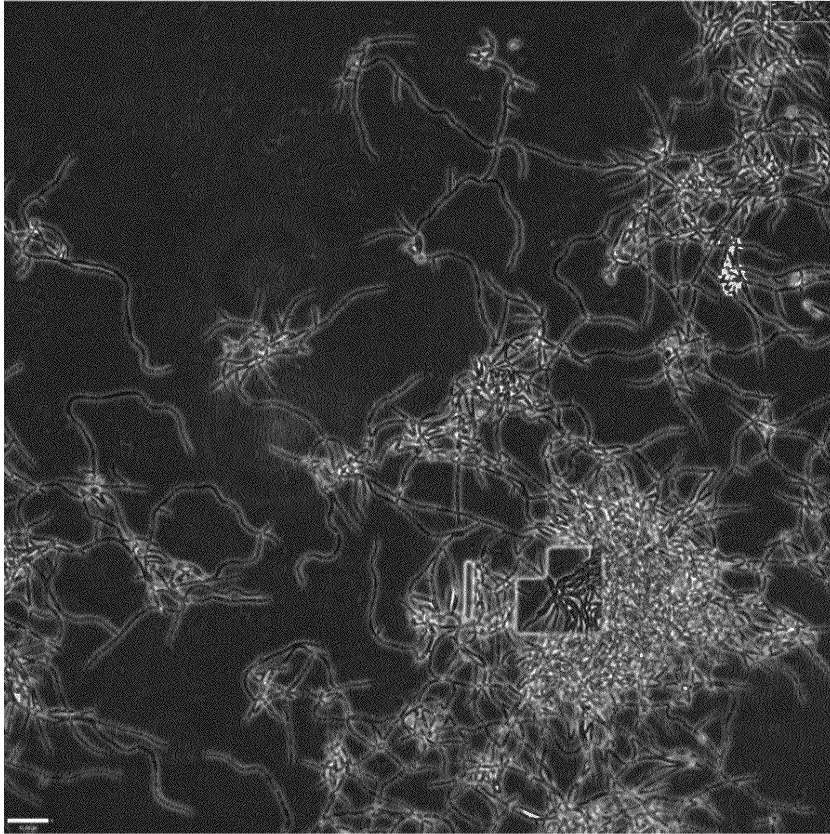
b



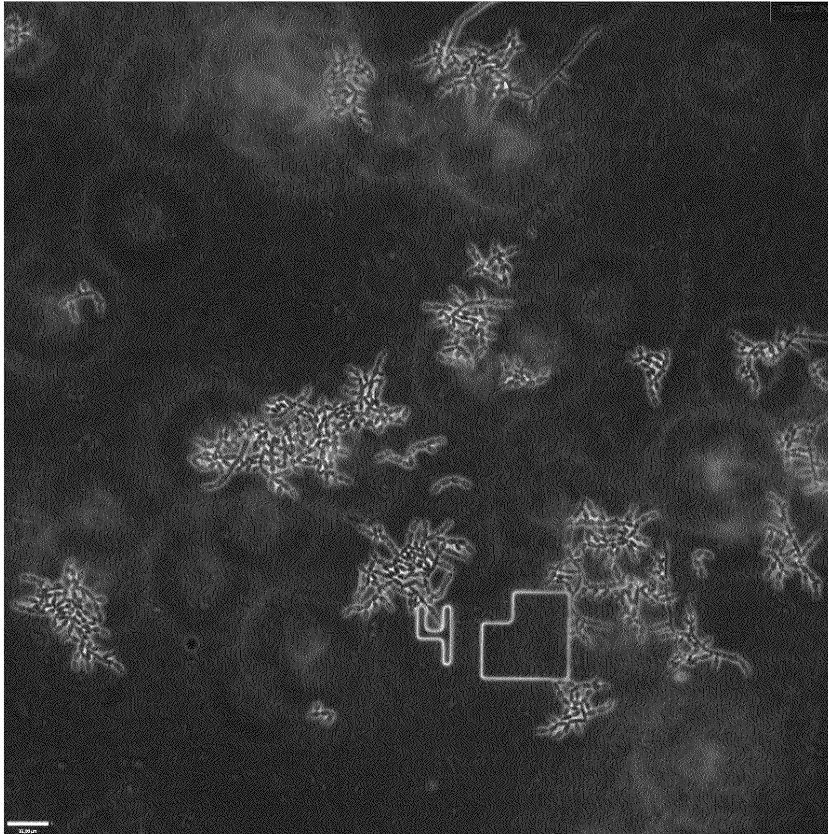
도면7



도면8a



도면8b



도면9

바이오필름
(OD₅₆₀)

