



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0097925  
(43) 공개일자 2009년09월16일

(51) Int. Cl.

A61N 5/06 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7014482

(22) 출원일자 2007년12월12일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년07월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/087264

(87) 국제공개번호 WO 2008/073979

국제공개일자 2008년06월19일

(30) 우선권주장

11/981,340 2007년10월31일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

노미어 메디컬 테크놀로지스, 인크.

미국 02452 메사추세츠주 왈탐 스위트 109 웨이벌  
리 오크스 로드 307

(72) 발명자

본스타인, 에릭

미국 01760 메사추세츠주 나티크 폰드 로드 232

(74) 대리인

양영준, 양영환

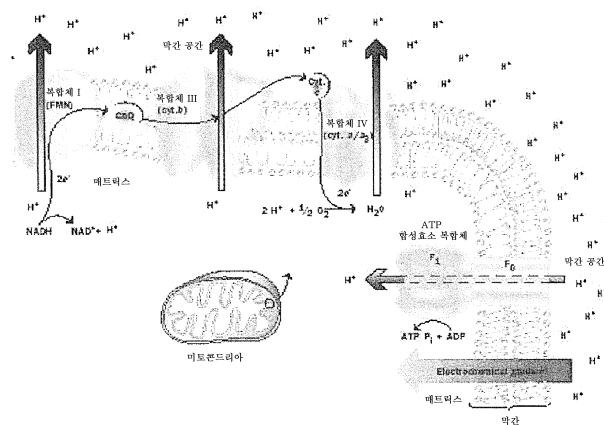
전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) 세포의 정상-상태 막 전위의 근적외선 전자기 변형

### (57) 요약

광학 탈분극 효과를 통해 모든 방사선 조사된 세포의 생물에너지 정상-상태 막횡단 및 미토콘드리아 전위 ( $\Delta\psi$ -steady)를 변경하기 위해 근적외선 광 에너지 및 방사선량을 적용하기 위한 시스템 및 방법을 본원에서 개시한다. 상기 탈분극은 방사선 조사된 미토콘드리아 및 형질막의 막횡단 전위  $\Delta\psi$ 의 절대값의 동시 감소를 일으킨다. 많은 세포 동화 반응 및 약물-내성 메카니즘은 막 전위  $\Delta\psi$ 의 감소, 양성자 구동력  $\Delta p$ 의 제후된 약화, 및 인산화 전위  $\Delta G_p$ 의 연관된 저하에 의해 덜 기능적으로 되고/되거나 경감될 수 있다. 방사선 조사 노출 영역 내에서, 막 전위  $\Delta\psi$ 의 감소는 세균, 진균 및 포유동물 세포에서 일제히 일어날 것이다. 상기 막 탈분극은 표적화된 바람직하지 않은 세포에 대해서만 항미생물, 항진균 및/또는 항신생물 약물을 강화시키는 능력을 제공한다.

### 대표도 - 도7



(30) 우선권주장

11/981,431	2007년10월31일	미국(US)
11/981,486	2007년10월31일	미국(US)
60/874,424	2006년12월12일	미국(US)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

유효량의 적합한 약제, 및

표적 부위를 방사선 조사하기 위해 NIMELS 방사선량  $T_n$ 에서 NIMELS 방사선  $\lambda_n$ 의 출력을 생산하도록 형성되고 배열된 NIMELS 광 생성 레이저

를 포함하며, 여기서 상기 출력은 방사선 조사된 세포막의 막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 를 변경시켜 NIMELS 효과를 생성할 수 있고, 상기 NIMELS 효과는 상기 약물을 강화시키는 것인 치료 시스템.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시스템이 상기 표적 부위에서 생물학적 모이어티 (moiety)에 바람직하지 않은 손상을 피하도록 형성되고 배열되는 것인 치료 시스템.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 NIMELS 광 생성 레이저가 870 nm 또는 930 nm 또는 둘 모두의 파장을 사용하여 NIMELS 방사선의 상기 출력을 생산하도록 형성되고 배열되는 것인 치료 시스템.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 NIMELS 광 생성 레이저가 약 50 내지 약 1200초의 시간 동안 표적 부위를 방사선 조사 ( $T_n$ )하도록 형성되고 배열되는 것인 치료 시스템.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 NIMELS 방사선량이 상기 표적 부위에서 약  $100 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $2000 \text{ J/cm}^2$ 의 에너지 밀도를 제공하는 것인 치료 시스템.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 표적 부위에서 상기 출력을 산란시키기 위해 형성되고 배열된 광 분산 팁 (dispersion tip)을 더 포함하는 치료 시스템.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 기하학적 플랫폼 (flat top) 강도 분포를 갖는 출력을 생성하도록 형성되고 배열된 광 전달 서브시스템을 더 포함하는 치료 시스템.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 광 전달 서브시스템이 플랫폼 렌즈를 포함하는 것인 치료 시스템.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 광섬유를 포함하는 광 전달 시스템을 더 포함하는 치료 시스템.

### 청구항 10

제1항에 있어서, 정상-상태 막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -steady를 과도-상태 막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -trans로 변경시킬 수 있는 NIMELS 효과를 생성하기 위해 표적 부위에서 총 에너지 또는 전력 또는 출력 시간의 계산에 기초하여 상기 에너지 출력을 조정하도록 형성되고 배열된 방사선량 제어기 (controller)를 더 포함하는 치료 시스템.

### 청구항 11

제1항에 있어서, 상기 약제가 항균제, 항진균제, 항신생물제 및 이들의 조합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 치료 시스템.

## 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 항균제가  $\beta$ -락탐, 당펩티드, 시클릭 폴리펩티드, 마크롤리드, 케톨리드, 아닐리노우라실, 린코사미드, 클로람페니콜, 테트라사이클린, 아미노글리코시드, 바시트라신, 세파졸린, 세팔로스포린, 무피로신, 니트로이미다졸, 퀴놀론 및 플루오로퀴놀론, 노보바이오신, 폴리믹신, 양이온성 세제 항생제, 옥사졸리디논 또는 다른 헤테로시클릭 유기 화합물, 글리실사이클린, 지질펩티드, 시클릭 지질펩티드, 플루로뮤틸린, 및 그라미시딘, 답토마이신, 리네졸리드, 안사마이신, 카르바세뎀, 카르바페넴, 모노박탐, 플라텐시마이신, 스트렙토그라민, 티니다졸, 및 이들의 임의의 염을 비롯한 이들의 조합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 치료 시스템.

## 청구항 13

제11항에 있어서, 상기 항진균제가 폴리엔, 아졸, 이미다졸, 트리아졸, 알릴아민, 에키노칸딘, 시클로피록스, 플루시토신, 그리세오폴빈, 아모로로핀, 소다린, 및 이들의 임의의 염을 비롯한 이들의 조합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 치료 시스템.

## 청구항 14

제11항에 있어서, 상기 항신생물제가 악티노마이신, 안트라사이클린, 블레오마이신, 플리카마이신, 미토마이신, 탁산, 에토포시드, 테니포시드 및 이들의 조합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 치료 시스템.

## 청구항 15

유효 치료량의 약제;

지질 이중층의 장쇄 지방산 내의 C-H 공유 결합을 선택적으로 방사선 조사하기 위한 표적 부위의 방사선 조사를 위해 NIMELS 방사선량 Tn에서 NIMELS 방사선  $\lambda_n$ 을 생산하도록 형성되고 배열된 NIMELS 광 생성 레이저; 및

NIMELS 방사선량 Tn에서 상기 NIMELS 방사선  $\lambda_n$ 를 표적 부위에 전달하기에 적합한 광 전달 시스템

을 포함하며, 여기서 상기 공유 결합의 표적화된 방사선 조사는 방사선 조사된 세포막의 막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 를 변경시키기 위해 실시하고,  $\lambda_n$  및 Tn의 조합은 (i) 사이토크롬 사슬을 방사선 조사하고, (ii) 막의 생물에너지 열역학적 정상-상태 조건에서 전이 상태의 에너지 스트레스 및/또는 레독스 스트레스 중 하나로 변경시키기 위해 적합하고, 상기 광 전달 시스템은 바람직한 숙주 세포를 손상시키지 않으면서 상기 표적 부위에 상기 NIMELS 방사선량 Tn에서 상기 NIMELS 방사선  $\lambda_n$ 를 전달하도록 형성되고 배열된 것인 치료 시스템.

## 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 NIMELS 광 생성 레이저가 약 50 내지 약 1200초의 시간 동안 표적 부위를 방사선 조사 (Tn)하도록 형성되고 배열되는 것인 치료 시스템.

## 청구항 17

제15항에 있어서, 상기 NIMELS 방사선량이 표적 부위에서 약 100 J/cm<sup>2</sup> 내지 약 2000 J/cm<sup>2</sup>의 에너지 밀도를 제공하는 것인 치료 시스템.

## 청구항 18

제15항에 있어서, 상기 약제가 항균제, 항진균제, 항신생물제 및 이들의 조합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 치료 시스템.

## 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 항신생물제가 악티노마이신, 안트라사이클린, 블레오마이신, 플리카마이신, 미토마이신 및 이들의 조합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 치료 시스템.

## 청구항 20

제18항에 있어서, 상기 항균제가  $\beta$ -락탐, 당펩티드, 시클릭 폴리펩티드, 마크롤리드, 케톨리드, 아닐리노우라실, 린코사미드, 클로람페니콜, 테트라사이클린, 아미노글리코시드, 바시트라신, 세파졸린, 세팔로스포린, 무피

로신, 니트로이미다졸, 퀴놀론 및 플루오로퀴놀론, 노보바이오신, 폴리믹신, 양이온성 세제 항생제, 옥사졸리디논 또는 다른 헤테로시클릭 유기 화합물, 글리실사이클린, 지질펩티드, 시클릭 지질펩티드, 플루로뮤틸린, 및 그라미시딘, 답토마이신, 리네졸리드, 안사마이신, 카르바세뎀, 카르바페넴, 모노박탐, 플라텐시마이신, 스트렙토그라민, 티니다졸, 및 이들의 임의의 염을 비롯한 이들의 조합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 치료 시스템.

#### 청구항 21

제18항에 있어서, 상기 항진균제가 폴리엔, 아졸, 이미다졸, 트리아졸, 알릴아민, 에키노칸딘, 시클로피록스, 플루시토신, 그리세오폴빈, 아모롤로핀, 소다린, 및 이들의 임의의 염을 비롯한 이들의 조합물로 이루어지는 군 중에서 선택되는 것인 치료 시스템.

#### 청구항 22

제15항에 있어서, 상기 시스템이 양성자 구동력 (proton motive force)  $\Delta p$ 를 변경시키도록 형성되고 배열되고, 여기서 생물학적 모이어티 또는 생물학적 오염물 내의 세포는 생물학적 모이어티 또는 생물학적 오염물 내에서 단백질, RNA, DNA, 펩티도글리칸, 리포타이코 (lipoteichoic) 산, 및 지질의 합성을 포함한 적절한 성장 및 생식을 위해 필요한 필수 영양분을 섭취하거나 적당한 ATP를 제조하는 것이 방지되는 것인 치료 시스템.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 시스템이 양성자 구동력  $\Delta p$ 에 연계되는 약제의 에너지 의존성 배출을 손상시키도록, 변경된 깁스 (Gibbs) 자유 에너지값 ( $\Delta G_p$ )을 통해 이용가능한 ATP의 저하에 의해 약제를 강화시키도록 형성되고 배열되는 것인 치료 시스템.

#### 청구항 24

제15항에 있어서, 상기 시스템이 미생물 병원체에 대한 임의의 조직, 모이어티, 또는 용액 내의 항미생물제 강화 수준을 나타내는 NIMELS 효과 (Ne)를 2 내지 10의 값으로 생성하도록 형성되고 배열되는 것인 치료 시스템.

#### 청구항 25

제15항에 있어서, 상기 광 전달 시스템이 플랫폼 렌즈, 광섬유 또는 분산 팁을 포함하는 것인 치료 시스템.

#### 청구항 26

표적 부위를 방사선 조사하기 위해  $\lambda_n$  및  $T_n$ 을 조합하는 것;

상기 표적 부위에서  $\Delta p$ -mito-mam 및/또는  $\Delta p$ -plas-Bact를 동시에 감소시키는 것; 및

상기 표적 부위에 항균제를 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것

을 포함하며, 여기서 상기 표적 부위에서 하나 이상의 세포 동화 경로의 억제가 달성되는 것인, 세포 동화 경로를 억제하고 항균 분자에 대한 세포 내성 메커니즘을 약화시키기 위해 표적 부위의 세포에서  $\Delta \mu H^+$  또는  $\Delta \mu X^+$ 를 감소시키는 방법.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 세균 트랜스펩티다제 효소의 활성 부위에 결합하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 펩티도글리칸 생합성인 방법.

#### 청구항 28

제26항에 있어서, 상기 표적화된 세균 동화 경로가, 세포벽 중간체 내의 아실-D-알라닌-D-알라닌기에 결합하여 N-아세틸뮤라민산 (NAM)- 및 N-아세틸글루코사민 (NAG)-펩티드 서브유닛의 펩티도글리칸 매트릭스 내로의 통합을 방지함으로써 그람 양성 세균에서 펩티도글리칸의 적합한 형성을 방지하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 펩티도글리칸 생합성인 방법.

#### 청구항 29

제26항에 있어서, 상기 표적화된 세균 동화 경로가, C<sub>55</sub>-이소프레닐 피로포스페이트에 결합하여 피로포스파타제가 C<sub>55</sub>-이소프레닐 피로포스페이트와 상호작용하는 것을 방지함으로써 빌딩 블록 (building block) 펩티도글리칸을 내막 밖으로 옮기는데 이용가능한 C<sub>55</sub>-이소프레닐 피로포스페이트의 양을 감소시키는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 펩티도글리칸 생합성인 방법.

#### 청구항 30

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 세균 리보솜의 서브유닛 50S 서브유닛 내의 23S rRNA 분자에 결합하여 세포 내에 펩티딜-tRNA를 축적시켜, α-아미노산의 활성화를 위해 필요한 유리 tRNA를 고갈시키고, 리보솜으로부터 펩티딜 tRNA의 조기 해리를 일으킴으로써 펩티드 전이를 억제하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성인 방법.

#### 청구항 31

제30항에 있어서, 상기 항미생물제가 50S 세균 리보솜 서브유닛의 23S RNA의 2개의 도메인에 동시에 결합하여 세균 리보솜 서브유닛 50S 및 30S의 형성을 억제하는 것인 방법.

#### 청구항 32

제30항에 있어서, 상기 항미생물제가 그의 친지성을 증가시키기 위해 염소화되고, 세균 리보솜의 50S 서브유닛의 23S 부분에 결합하고, 활성 부위 (A-부위)로부터 펩티딜 부위 (P-부위)로의 펩티딜-tRNA의 전좌를 방지하여 트랜스펩티다제 반응을 억제하는 것인 방법.

#### 청구항 33

제30항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 30S 세균 리보솜 서브유닛에 결합하여 리보솜의 수혜자 부위 (A-부위)에 대한 아미노-아실 tRNA의 결합을 차단하고, 그에 의해 코돈-안티코돈 상호작용 및 단백질 합성의 연장기를 억제하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성인 방법.

#### 청구항 34

제33항에 있어서, 상기 항미생물제가 옥타히드로테트라센-2-카르복스아미드 골격을 갖는 폴리케타이드 항미생물제의 통상적인 하위군과 상이한 배향으로 보다 강하게 상기 세균 리보솜에 결합하는 것인 방법.

#### 청구항 35

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 특이적 아미노아실-tRNA 합성효소에 결합하여 특정한 아미노산 또는 그의 전구체의 그의 상호적합성 tRNA 중 하나에 대한 에스테르화를 방지하고, 그에 의해 아미노아실-tRNA의 형성을 방지하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성인 방법.

#### 청구항 36

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 30S 리보솜 서브유닛의 16S rRNA와 상호작용하면서 23S rRNA의 도메인 V를 통해 50S rRNA에 결합하여 시작기 전에 세균 단백질 합성을 억제함으로써 단백질 합성 포르밀-메티오닌의 개시인자 (f-Met-tRNA) 및 30S 리보솜 서브유닛의 결합을 방지하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성인 방법.

#### 청구항 37

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 펩티딜 트랜스퍼라제 중심에 가까운 23S rRNA P 부위의 구역 내의 단백질 L3에서 세균 리보솜의 50S 서브유닛과 상호작용하여, 펩티딜 트랜스퍼라제 활성 및 펩티딜 전달을 억제하고, P-부위 상호작용을 차단하며, 활성 50S 리보솜 서브유닛의 정상적인 형성을 방지하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성인 방법.

#### 청구항 38

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 토포이소머라제 II (DNA 가이라제 (gyrase)) 및/또는 토포이소머라제 IV를 억제하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제 및 전사인 방법.

#### 청구항 39

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 그람-양성 세균에서 염색체 DNA의 복제를 위해 요구되지만 그람-음성 세균에는 존재하지 않는 효소인 DNA 중합효소 IIIC를 억제하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제 및 번역인 방법.

#### 청구항 40

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 토포이소머라제 II (DNA 가이라제) 및/또는 토포이소머라제 IV 및/또는 DNA 중합효소 IIIC를 억제하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제 및 전사인 방법.

#### 청구항 41

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 포스파티딜에탄올아민-풍부 세포질막에 대해 작용하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 세균 인지질 생합성인 방법.

#### 청구항 42

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, II형 지방산 합성의 필수 효소인  $\beta$ -케토아실-(아실-운반-단백질 (ACP)) 신타제 (synthase) I/II (FabF/B)의 선택적 표적화를 통해 세균 지방산 생합성을 억제하는 상기 항미생물제에 의해 동시-표적화되는 세균 지방산 생합성인 방법.

#### 청구항 43

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 세균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -plas-bact의 유지이고, 상기 항미생물제는 그람 양성 세포질막에 결합하여 탈분극 및 막 전위의 손실을 유발함으로써 단백질, DNA 및 RNA 합성의 억제를 일으켜 세균 세포막 기능을 파괴하는 것인 방법.

#### 청구항 44

제26항에 있어서, 상기 항미생물제가 세균 세포벽의 투과성을 증가시켜, 무기 양이온이 비제한적인 방식으로 상기 벽을 통해 이동하도록 함으로써 세포질과 세포외 환경 사이의 이온 구배를 파괴하는 것인 방법.

#### 청구항 45

제26항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 세균 막 선택적 투과성 및 세균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -plas-bact의 유지이고, 상기 항미생물제가 진행 세포의 중성 막 표면에 비해 상기 세균 막의 음전하를 갖는 표면에 대해 선택적이고 막 투과화 및 세균 세포막의 궁극적인 천공 및/또는 붕괴를 일으켜 세균 세포 내용물의 누출 및 막횡단 전위의 파괴를 촉진시키는 양이온성 항균 펩티드인 방법.

#### 청구항 46

제26항에 있어서, 상기 항미생물제가 새로 합성된 세균 폴리펩티드의 N-말단으로부터 포르밀기의 제거를 촉매하는 세균 프로테아제 펩티드 데포르밀라제를 억제하는 것인 방법.

#### 청구항 47

제26항에 있어서, 상기 항미생물제가 세균에서 2-성분 조절 시스템을 억제하고, 상기 조절 시스템은 포유동물 막에는 존재하지 않는 과정인 세균 형질막을 가로지르는 신호 변환을 통해 그들의 환경에 반응하는 능력을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 48

제26항에 있어서, 상기 항미생물제가, 상기 항미생물제를 약화 또는 불활성화시키고/시키거나 배출 펌프 억제제로서 작용하여, 상기 항미생물제의 효과의 회복을 돕기 위해 표적화된 세균이 내성 메카니즘으로서 생산하는 임의의 단백질 또는 효소에 대한 경쟁적 억제제로서 작용하는 제2 분자와 조합되거나 함께 전달되는 것인 방법.

#### 청구항 49

표적 부위를 방사선 조사하기 위해  $\lambda n$  및  $Tn$ 을 조합하는 것;

표적 부위에서  $\Delta p$ -mito-mam 및/또는  $\Delta p$ -plas-Bact를 동시에 감소시키는 것; 및

다수의 항균제를 상기 표적 부위에 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것

을 포함하며, 여기서 표적 부위에서 하나 이상의 세포 동화 경로의 억제가 달성되는 것인, 세포 동화 경로를 억제하고 항균 분자에 대한 세포 내성 메카니즘을 약화시키기 위해 표적 부위의 세포에서  $\Delta \mu H^+$  또는  $\Delta \mu x^+$ 를 감소시키는 방법.

#### 청구항 50

제49항에 있어서, 하나 이상의 상기 항미생물제가, 상기 항미생물제 중 하나를 약화 또는 불활성화시키고/시키거나 배출 펌프 억제제로서 작용하여 상기 항미생물제의 효과의 회복을 돕기 위해 표적화된 세균이 내성 메카니즘으로서 생산하는 임의의 단백질 또는 효소에 대한 경쟁적 억제제로서 작용하는 제2 분자와 조합되는 것인 방법.

#### 청구항 51

표적 부위를 방사선 조사하기 위해  $\lambda n$  및  $Tn$ 을 조합하는 것;

표적 부위에서  $\Delta p$ -mito-mam,  $\Delta p$ -mito-Fungi,  $\Delta p$ -plas-Fungi를 동시에 감소시키는 것; 및

상기 표적 부위에 항진균제를 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것

을 포함하며, 여기서 상기 표적 부위에서 하나 이상의 세포 동화 경로의 억제가 달성되는 것인, 세포 동화 경로를 억제하고 항진균 분자에 대한 세포 내성 메카니즘을 약화시키기 위해 표적 부위의 세포에서  $\Delta \mu H^+$  또는  $\Delta \mu x^+$ 를 감소시키는 방법.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 진균 세포막에서 기존의 인지질의 구조를 파괴하는 상기 항진균제에 의해 동시-표적화되는 인지질 생합성인 방법.

#### 청구항 53

제51항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, C-14 탈메틸화 단계에서 에르고스테롤 생합성을 억제하여, 형질막 구조의 파괴를 통해 에르고스테롤 고갈 및 막 성분으로서 에르고스테롤의 기능을 저해하는 라노스테롤 및 다른 14-메틸화된 스테롤의 축적을 일으키는 상기 항진균제에 의해 동시 표적화되는 에르고스테롤 생합성인 방법.

#### 청구항 54

제51항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 스쿠알렌 에폭시다제를 억제하고, 이는 다시 진균 세포에서 에르고스테롤 생합성을 억제하여 진균 세포막이 증가된 투과성을 갖도록 하는 상기 항진균제로 동시-표적화되는 에르고스테롤 생합성인 방법.

#### 청구항 55

제51항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 d14-환원효소 및 d7,d8-이소머라제를 억제하는 상기 항진균제로 동시-표적화되는 에르고스테롤 생합성인 방법.

#### 청구항 56

제51항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, (1,3) $\beta$ -D-글루칸 신타제를 억제하고, 이는 다시 진균 세포벽에서  $\beta$ -D-글루칸 합성을 억제하는 상기 항진균제로 동시-표적화되는 진균 세포벽 생합성인 방법.

#### 청구항 57



제51항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 세포막의 전이 온도를 효과적으로 변화시켜 막 내에 공극이 형성하도록 하여 진균 세포막 내에 유해한 이온 채널을 형성시키는, 진균 세포막 내의 스테롤 (주요 스테롤은 에르고스테롤임)과 결합하는 상기 항진균제로 동시-표적화되는 진균 스테롤 생합성인 방법.

#### 청구항 58

제57항에 있어서, 상기 항진균제가 약제로부터의 독성을 방지하기 위해 지질, 리포좀, 지질 복합체 및/또는 콜로이드성 분산액으로의 전달을 위해 제형화되는 것인 방법.

#### 청구항 59

제51항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 단백질 합성이고, 상기 항진균제가 시토신 투과효소 (permease)에 의해 진균 세포 내로 흡수되고, 5-플루오로우라실 (5-FU)로 탈아미노화되고, 뉴클레오시드 트리포스페이트로 전환되고, RNA 내로 통합되고, 여기서 미스코딩 (miscoding)을 일으키는 5-FC인 방법.

#### 청구항 60

제51항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가 진균 연장 인자 EF-2를 억제하는 상기 항진균제로 동시-표적화되는 진균 단백질 합성인 방법.

#### 청구항 61

제51항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 하나 이상의 효소 키틴 신타제 2의 작용을 억제함으로써 진균 키틴 생합성을 억제하는 상기 항진균제로 동시-표적화되는 진균 키틴 생합성인 방법.

#### 청구항 62

제61항에 있어서, 상기 항진균제가 출아 출현 및 성장, 접합 및 포자 형성 동안 키틴의 합성에 필요한 효소인 키틴 신타제 3의 작용을 억제하는 것인 방법.

#### 청구항 63

제51항에 있어서, 상기 항진균제가 다가 양이온  $Fe^{+3}$  또는  $Al^{+3}$ 을 킬레이팅하여, 미토콘드리아 전자 수송 및 세포성 에너지 생산을 담당하는 금속-의존성 효소의 억제를 일으키고, 또한 진균 세포 내에서 과산화물의 정상적인 분해를 억제하는 것인 방법.

#### 청구항 64

제51항에 있어서, 상기 항진균제가 진균에서 2-성분 조절 시스템을 억제하고, 상기 조절 시스템이 진균 형질막을 가로지르는 신호 변환을 통해 환경에 반응하는 것인 방법.

#### 청구항 65

제51항에 있어서, 상기 항진균제가, 상기 항진균제를 약화 또는 불활성화시키고 배출 펌프 억제제로서 작용하여, 상기 항진균제의 효과의 회복을 돕기 위해 표적화된 진균이 내성 메카니즘으로서 생산하는 임의의 단백질 또는 효소에 대한 경쟁적 억제제인 제2 분자와 조합되는 것인 방법.

#### 청구항 66

표적 부위를 방사선 조사하기 위해  $\lambda n$  및  $Tn$ 을 조합하는 것;

표적 부위에서 세포 내의  $\Delta p$ -mito-mam, 및/또는  $\Delta p$ -mito-fungi, 및/또는  $\Delta p$ -plas-fungi를 동시에 감소시키는 것; 및

상기 표적 부위에 다수의 항진균제를 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것

을 포함하며, 여기서 표적 부위에서 하나 이상의 세포 동화 경로의 억제가 달성되는 것인, 세포 동화 경로를 억제하고 항진균 분자에 대한 세포 내성 메카니즘을 약화시키기 위해 표적 부위의 세포에서  $\Delta \mu H^+$  또는  $\Delta \mu x^+$ 를 감소시키는 방법.

#### 청구항 67

제66항에 있어서, 하나 이상의 상기 항진균제가, 상기 항진균제 중 하나를 약화 또는 불활성화시키고 배출 펌프 억제제로서 작용하여, 상기 항진균제의 효과의 회복을 돕기 위해 표적화된 진균이 내성 메카니즘으로서 생산하는 임의의 단백질 또는 효소에 대한 경쟁적 억제제인 제2 분자와 조합되는 것인 방법.

#### 청구항 68

표적 부위를 방사선 조사하기 위해  $\lambda_n$  및 Tn을 조합하는 것;

$\Delta p$ -mito-mam 및/또는 포유동물 형질막횡단 전위  $\Delta \Psi$ -plas-mam를 감소시키는 것; 및

표적 부위에 항신생물제를 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것

을 포함하며, 여기서 표적 부위에서 하나 이상의 세포 동화 경로의 억제가 달성되는 것인, 세포 동화 경로를 억제하고 항신생물제에 대한 세포 내성 메카니즘을 약화시키기 위해 표적 부위의 세포에서  $\Delta \mu H^+$  또는  $\Delta \mu x^+$ 를 감소시키는 방법.

#### 청구항 69

제68항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, DNA 내의 구아닌 핵염기와 가교-결합하여, DNA 복제에 필요한 과정인 DNA 가닥의 풀림 및 분리를 불가능하게 함으로써 DNA 복제를 억제하는 상기 항신생물제에 의해 동시 표적화되는 DNA 복제인 방법.

#### 청구항 70

제68항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, DNA의 동일한 가닥 또는 DNA의 상이한 가닥 내의 2개의 상이한 7-N-구아닌 잔기와 반응하는 상기 항신생물제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제인 방법.

#### 청구항 71

제68항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 항대사물질로서 작용함으로써 DNA 복제 및 세포 분열을 억제하는 상기 항신생물제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제인 방법.

#### 청구항 72

제68항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 미세관 기능을 방지함으로써 세포 분열을 억제하는 상기 항신생물제에 의해 동시-표적화되는 세포 분열인 방법.

#### 청구항 73

제68항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 세포가 G1상 및 DNA의 복제로 들어가는 것을 방지함으로써 DNA 복제 및 세포 분열을 억제하는 상기 항신생물제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제인 방법.

#### 청구항 74

제68항에 있어서, 상기 표적화된 동화 경로가, 미세관의 안정성을 향상시켜, 후기 (anaphase) 동안 염색체의 분리를 방지하는 상기 항신생물제에 의해 동시-표적화되는 세포 분열인 방법.

#### 청구항 75

제68항에 있어서, 표적화된 동화 경로가, 적합한 DNA 수퍼코일링 (supercoiling)을 붕괴시킴으로써 DNA의 전사 및 복제를 모두 저해하는, I형 또는 II형 토포이소머라제의 억제에 의해 DNA 복제 및 세포 분열을 억제하는 상기 항신생물제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제인 방법.

### 명세서

### 기술분야

<1> 본 발명은 일반적으로 탈분극 효과를 통해 방사선 조사된 세포의 생물에너지 정상-상태 막횡단 및 미토콘드리아

전위를 변형시킬 선택된 에너지 및 방사선량 (dosimetry)에서 적외선 광 방사선 (optical radiation)를 생성하기 위한 방법 및 시스템에 관한 것이고, 보다 특히, 표적 세균 및/또는 진균 및/또는 암 세포에서 항미생물 및 항진균 화합물을 강화시키기 위해 막 탈분극을 위한 방법 및 시스템에 관한 것이다.

## 배경 기술

- <2> 항미생물제에 내성인 세균, 진균 및 다른 생물학적 오염물의 세계적인 발생은 인류에게 그 존재에 대해 중대한 위협을 한다. 설과 약물 (sulphonamide, 1936년에 처음 사용됨) 및 페니실린 (1942, 화이자 파마슈티칼스 (Pfizer Pharmaceuticals))의 발견 이래로, 지구 전체에서 상당량의 모든 종류의 항미생물제의 활용으로 내성 오염물 및 병원체의 발생과 확산을 위한 중요한 환경이 생성되었다. 특정 내성 오염물들은 병원과 일반 환경에서 만연하기 때문에 비상한 역학적 유의성을 갖는다. 항생제의 광범위한 사용은 내성 세균, 예를 들어, 메티실린-내성 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) (MRSA) 및 반코마이신-내성 장구균 (VRE)의 생성을 자극할 뿐만 아니라, 진균 유기체 (진균증), 예를 들어 칸디다 (*Candida*)의 감염에 대한 우호적인 환경을 생성한다.
- <3> 살균성인 강력한 항진균제 (예를 들어, 암포테리신 B (AmB))가 존재하지만, 칸디다혈증으로 인한 사망률은 여전히 약 38%로 유지되고 있다. 일부 경우에, 약물-내성 진균을 치료하기 위해, 고용량의 AmB가 투여되어야 하고, 이는 종종 콩팥독성 및 다른 부작용을 일으킨다. 더욱이, 항미생물제 또는 항생제의 과용은 살아있는 유기체 내에 생물농축을 일으킬 수 있고, 이는 또한 포유동물 세포에 세포독성일 수 있다. 세계 인구 증가와 약물 내성 세균 및 진균의 유행을 고려할 때, 세균 또는 진균 감염의 발생 증가는 가까운 장래에 약해지지 않고 계속될 것으로 예상된다.
- <4> 현재, 세균 및 진균 감염에 대한 이용가능한 치료법은 항균 및 항진균 치료제의 투여, 또는 일부 경우에 감염된 영역의 수술적 사조직 제거를 포함한다. 항균 및 항진균 요법 단독으로는 치유력이 거의 없기 때문에, 특히 새로 출현하는 약물 내성 병원체 및 외관을 많이 손상시키는 수술 요법의 극히 높은 이환율 측면에서, 미생물 감염을 치료 또는 예방하기 위해 새로운 전략을 개발해야 하는 것이 시급하다.
- <5> 따라서, 표적화된 세균 및 진균 (생물학적 오염물) 이외의 생물학적 모이어티 (moiety) (예를 들어, 포유동물 조직, 세포 또는 특정 생화학적 제제, 예를 들어 단백질 제제)에 참을 수 없는 위험 및/또는 참을 수 없는 유효 효과 없이 주어진 표적 부위 내에/그 부위에서 세균 또는 진균 감염의 위험을 감소시킬 수 있는 방법 및 시스템이 필요하다.
- <6> <발명의 개요>
- <7> 본 발명은 미생물 및/또는 신생물-관련 병리학적 상태를 약화시키거나 제거하기 위해 필요한 항미생물 분자 (항미생물제) 및/또는 항신생물 분자 (항신생물제)의 최소 억제 농도 (MIC)를 감소시켜, 그렇지 않으면 안전한 인간 용량에서 더 이상 기능을 보이지 않을 약제가 보조 요법제로서 다시 유용하도록 하기 위한 방법 및 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 방법 및 시스템에 따라, 선택된 에너지 및 방사선량에서 근적외선 광 방사선 (본원에서 "근적외선 미생물 제거 시스템"을 의미하는 NIMELS로 알려짐)이 사용되어 방사선 조사된 영역 내에서 모든 막의 탈분극을 일으키고, 이는 방사선 조사된 세포의 막 전위  $\Delta\psi$ 의 절대값을 변경할 것이다.
- <8> 본 발명의 다른 특징 및 잇점은 다음의 실시태양의 상세한 설명에 기재될 것이고, 부분적으로 설명으로부터 명백할 것이거나, 본 발명의 실시예에 의해 습득될 수 있다. 본 발명의 그러한 특징 및 잇점은 특히 기록된 설명 및 그에 첨부된 청구의 범위에 지적된 시스템, 방법 및 기구에 의해 실현되고 얻어질 것이다.

## 발명의 상세한 설명

- <31> 본 명세서에서 사용될 때, 단수형 부정관사 ("a", "an") 및 정관사 ("the")는 내용이 명백하게 그렇지 않을 것을 나타내지 않는 한 그들이 나타내는 복수형의 용어를 또한 포함한다. 예를 들어, "NIMELS 파장"은 설명된 NIMELS 파장의 범위 내의 임의의 파장 및 그러한 파장의 조합을 또한 포함한다.
- <32> 본원에서 사용될 때, 구체적으로 그렇지 않은 것을 나타내지 않으면, 단어 "또는"은 "및/또는"의 "포함의" 의미로 사용되고, "어느 하나/또는"의 "배제의" 의미가 아니다.
- <33> 용어 "약"은 대략, 가까이, 대충 또는 부근을 의미하도록 본원에서 사용된다. 용어 "약"은 수치 범위와 연관하여 사용될 때 경계를 기재된 수치값 초과 및 미만으로 연장함으로써 범위를 변경시킨다. 일반적으로, 용어 "약"은 수치값을 20%의 변이로 진술된 값 초과 및 미만으로 변경시키도록 본원에서 사용된다.

- <34> 본 발명은 미생물 및/또는 신생물-관련 병리학적 상태를 악화시키거나 제거하기 위해 필요한 항미생물 분자 (항미생물제) 및/또는 항신생물 분자 (항신생물제)의 최소 억제 농도 (MIC)를 감소시켜, 그렇지 않으면 안전한 인간 용량에서 더 이상 기능을 보이지 않을 항미생물제가 보조 요법제로서 다시 유용하도록 하기 위한 방법 및 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 방법 및 시스템에 따라, 선택된 에너지 및 방사선량에서 근적외선 광 방사선 (본원에서 "근적외선 미생물 제거 시스템"을 의미하는 NIMELS로 알려짐)이 사용되어 방사선 조사된 영역 내에서 막의 탈분극을 일으키고, 이는 방사선 조사된 세포의 막 전위  $\Delta\Psi$ 의 절대값을 변경할 것이다.
- <35> 상기 변경된  $\Delta\Psi$ 는 모든 영향을 받은 막의 양성자 구동력 (proton motive force)  $\Delta p$ , 및 생물에너지의 체류된 약화를 일으킬 것이다. 따라서, NIMELS 방사선 조사의 효과 (NIMELS 효과)는 인간 숙주를 감염시켜 해를 끼치는 미생물에 대해 기존의 항미생물 분자를 강화시킬 수 있다. 이들 효과는 화학삼투 전기화학 에너지를 필요로 하는 덜 기능적인 많은 세포 동화 반응 (예를 들어, 세포벽 형성) 및 약물-내성 메카니즘 (예를 들어, 배출 (efflux) 펌프)을 기능하도록 만들 것이다. 따라서, 그들의 기능적 에너지 필요를 위해 막 전위  $\Delta\Psi$ , 양성자 구동력  $\Delta p$ , 또는 인산화 전위  $\Delta G_p$ 를 이용하는 임의의 막 결합된 세포 내성 메카니즘 또는 동화 반응이 본 발명의 방법 및 시스템에 의해 영향을 받을 것이다.
- <36> 본 발명의 방법 및 시스템은, 포유동물 세포가 일반적으로 세균 또는 진균 세포를 손상시키려고 의도되는 처리 (분자 또는 약물을 사용한)에 의해 영향을 받지 않는다는 사실에 의해 가능하게 된 선택도로 항미생물 및/또는 항진균 약물을 표적화된 바람직하지 않은 세포 (예를 들어, 피부에서 MRSA 또는 칸디다 감염)에 대해서만 강화시키기 위해 광 방사선을 이용한다.
- <37> 예시적인 실시태양에서, 본 발명의 방법 및 시스템에 따라 사용되는 적용된 광 방사선 조사는 본원에 기재된 바와 같은 NIMELS 방사선량에서 약 850 nm 내지 약 900 nm 범위의 하나 이상의 파장을 포함한다. 하나의 측면에서, 약 865 nm 내지 약 875 nm의 파장이 이용된다. 다른 측면에서, 상기 적용된 방사선은 NIMELS 방사선량에서 약 905 nm 내지 약 945 nm의 파장을 갖는다. 하나의 측면에서, 상기 적용된 광 방사선은 약 925 nm 내지 약 935 nm의 파장을 갖는다. 특정 측면에서, 930 nm의 파장 (또는 그를 포함한 좁은 파장 범위)이 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 측면에서, 다수의 파장 범위는 각각 870 및 930 nm를 포함한다.
- <38> 그의 생물에너지 시스템이 본 발명에 따른 NIMELS에 의해 영향을 받을 수 있는 미생물 병원체는 미생물, 예를 들어, 세균, 진균, 곰팡이, 미코플라스마, 원충, 및 기생충을 포함한다.
- <39> 하나의 실시태양에서, 본 발명의 방법 및 시스템은 피부 또는 상처 감염을 일으키는 것으로 알려진 감염성 엔티티 (entity), 예를 들어 스타필로코커스 및 장구균을 치료하고/하거나 감소시키고/시키거나 제거하는데 사용된다. 스타필로코커스 및 장구균 감염은 종기, 큰 종기, 수포성 농가진 및 열상 피부 증후군과 같은 피부 병태를 일으키는 것을 알려진, 신체 상의 대부분의 임의의 피부 표면에 관여될 수 있다. 에스. 아우레우스는 또한 스타필로코커스 식중독, 장염, 골수염, 독성 쇼크 증후군, 심장내막염, 수막염, 폐렴, 방광염, 패혈증 및 수술 후 상처 감염의 원인이 된다. 스타필로코커스 감염은 환자가 병원 또는 장기 요양 시설에 있는 동안 획득될 수 있다. 한정된 인구집단과 항생제의 광범위한 사용으로 에스. 아우레우스의 항생제-내성 균주가 발달하게 되었다. 상기 균주는 메티실린 내성 스타필로코커스 아우레우스 (MRSA)로 불린다. MRSA에 의해 유발된 감염은 종종 매우 다양한 항생제 (특히  $\beta$ -락탐)에 내성이고, 비-MRSA 미생물에 의해 유발된 감염보다 유의하게 더 높은 이환율 및 사망률, 더 고비용 및 더 긴 입원 기간과 연관된다. 병원에서 MRSA 감염에 대한 위험 인자는 콧구멍의 집락형성 (colonization), 수술, 선행 항생제 요법, 중환자실 입상, MRSA-집락형성된 환자 또는 의료종사자에 대한 노출, 병원에 48시간 이상 체류, 및 유치 카테터 (indwelling catheter) 또는 피부를 관통하는 다른 의료 장비를 갖는 것을 포함한다.
- <40> 다른 실시태양에서, 본 발명의 방법 및 시스템은 피부 칸디다증으로 공지된 감염성 엔티티를 치료하고/하거나 감소시키고/시키거나 제거하는데 사용된다. 이들 칸디다 감염은 피부에 관계되고, 신체 상에서 거의 임의의 피부 표면을 점령할 수 있다. 그러나, 가장 종종 발생하는 것은 따뜻하거나 습기차거나 접히는 영역 (예를 들어 겨드랑이 및 사타구니) 내이다. 피부 칸디다증은 매우 보편적이다. 칸디다는 기저귀 발진의 가장 보편적인 원인이고, 기저귀 내부의 따뜻하고 습기찬 조건을 이용한다. 이들 감염을 일으키는 가장 보편적인 진균은 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*)이다. 칸디다 감염은 또한 당뇨 및 비만이 있는 개인에서 매우 보편적이다. 칸디다는 또한 손발톱진균증으로 불리는 손발톱의 감염, 손발톱을 둘러싸는 피부의 감염 (손발톱주위염) 및 구석 입술염으로 불리는 입 가장자리 주위의 감염을 일으킬 수 있다.
- <41> 용어 "NIMELS 방사선량"은 본 발명에 따른 대상 파장이 반응성 산소종 ("ROS")을 생성하여, 표적 부위에서 생물학적 오염물의 수준을 감소시킬 수 있는 전력 밀도 (W/cm<sup>2</sup>) 및 에너지 밀도 (J/cm<sup>2</sup>) (여기서 1 와트 (Watt) = 1

줄 (Joule)/초) 값을 나타낸다. 상기 용어는 또한 ROS의 동시 생성과 함께 항미생물제 또는 항신생물제의  $\Delta\Psi$  저하를 통해 생물학적 오염물의 감수성을 증가시키기 위해 세포에 방사선을 조사하는 것을 포함하고, 그렇지 않으면 오염물은 상기 약제에 내성이다. 상기 방법은 생물학적 오염물 이외의 숙주 대상의 조직에 대해 참을 수 없는 위험 및/또는 참을 수 없는 부작용 없이 실시될 수 있다.

<42> 항진균 또는 항균 또는 항신생물제의 "강화"는 본 발명의 방법 및 시스템이 상기 약제가 본 발명의 방법 및 시스템의 부재 하에보다 더 낮은 농도에서 진균, 세균 또는 암의 성장 및/또는 증식을 억제하도록 진균, 세균 또는 암의 내성 메커니즘을 충분히 방해하는 것을 의미한다. 내성이 본질적으로 완전한 경우, 즉, 약제가 세포에 대해 효과가 없는 경우에는, 강화는 약제가 치료상 허용되는 용량에서 병원성 세포의 성장 및/또는 증식을 억제하여, 질병 상태를 치료할 것임을 의미한다.

<43> 본원에서 사용될 때, 용어 "미생물"은 미시적인 유기체를 나타내고, 정의 상 너무 작아서 인간의 눈에 보이지 않는다. 본 발명의 목적에서, 미생물은 세균, 진균, 고세균 (archaea), 원생생물 등일 수 있다. 단어 '미생물의'는 미생물에 속하거나 관련되는 것으로서 정의된다.

<44> 본원에서 사용될 때, 용어 "세포막 (또는 형질막 또는 미토콘드리아막)"은 모든 살아있는 세포에서 공통적인 구조를 갖는 반투과성 지질 이중층을 나타낸다. 이는 주로 무수한 중요한 세포성 과정에 관여하는 단백질 및 지질을 함유한다. 본 발명의 표적인 세포막은 단백질/지질 비가 >1이다. 달리 말하면, 함유물 (또는 모이머티, 즉, 숙주 조직) 내에서 표적 막은 건조 중량으로 49.99% 초과 지질을 함유하지 않는다.

<45> 본원에서 사용될 때, 용어 "미토콘드리아"는 대부분의 진핵 세포 (포유동물 세포 및 진균)에서 발견되는 막에 둘러싸인 소기관을 나타낸다. 미토콘드리아는 세포에 대한 화학 에너지원으로서 사용되는 ATP의 대부분의 진핵 세포 공급물을 생성하기 때문에 "세포의 발전소"이다. 미토콘드리아는 인지질 이중층 및 단백질로 이루어진 내막 및 외막을 포함한다. 그러나, 2개의 막은 상이한 특성을 갖는다. 미토콘드리아 외막은 전체 소기관을 둘러싸고, 진핵생물 형질막에 유사한 단백질-대-인지질 비를 갖고, 미토콘드리아 내막은 크리스테 (cristae)로서 알려진 내부 구획을 형성하고, 원핵생물 형질막에 유사한 단백질-대-인지질 비를 갖는다. 이는 사이토크롬과 같은 단백질이 정확하고 효율적으로 기능하도록 하기 위해 보다 큰 공간을 허용한다. 전자 수송 시스템 ("ETS")은 미토콘드리아 내막 상에 위치한다. 미토콘드리아 내막 내에는 또한 상기 막을 가로질러 대사체를 수송하는 고도로 제어된 수송 단백질이 존재한다.

<46> 본원에서 사용될 때, 용어 "유동 모자이크 모델 (Fluid Mosaic Model)"은 막횡단 수송을 돕는 보다 큰 다양한 매립된 단백질을 갖는 구조상 및 기능상 비대칭적인 지질-이중층으로서 생물학적 막의 널리 확산된 개념을 나타낸다. 유동 모자이크 모델은 인지질이 거의 힘들이지 않고 막 내에서 위치를 이동하기 때문에 (유동) 및 막 내에 존재하는 모든 인지질, 단백질 및 당단백질의 조합이 세포에 밖으로부터 볼 때 모자이크 영상을 제공하기 때문에 이렇게 이름 붙여졌다. 상기 모델은 열역학적 및 기능적 고려사항을 주의 깊게 균형을 맞춘 것이다. 막 열역학의 변경은 막의 기능에 영향을 미친다.

<47> 본원에서 사용될 때, 용어 "막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ " (막횡단 전위  $\Delta\Psi$ 에 대조적으로)는 막 표면에서 고도로 수화된 지질 헤드 (친수성)와 이중층의 저극성 내부 (소수성) 사이에서 형성된 전위를 나타낸다. 지질 이중층은 본래 쌍극성 기 및 분자, 주로 인지질 및 물의 에스테르 연결의 구조적 조직화로부터 생성되는 실질적인 막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 를 갖는다.  $\Psi_d$ 는 막 표면에서 이온에 의존하지 않고, 5가지 상이한 쌍극자 전위를 설명하도록 본원에서 사용될 것이다.

<48> 1) 포유동물 형질막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ -plas-mam;

<49> 2) 포유동물 미토콘드리아막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ -mito-mam;

<50> 3) 진균 형질막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ -plas-fungi;

<51> 4) 진균 미토콘드리아막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ -mito-fungi; 및

<52> 5) 세균 형질막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ -plas-bact.

<53> 본원에서 사용될 때, 용어 "막횡단 전위"는 막 (치수 mV)에 의해 분리된 수성상들 사이의 전기 전위 차이를 나타내고, 기호 ( $\Delta\Psi$ )로 제시될 것이다.  $\Delta\Psi$ 는 막 표면에서 이온에 의존하고, 3가지 상이한 형질막횡단 전위를 설명하도록 본원에서 사용될 것이다.

<54> 1) 포유동물 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -plas-mam;



- <55> 2) 진균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -plas-fungi;
- <56> 3) 세균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -plas-bact.
- <57> 본원에서 사용될 때, 용어 "미토콘드리아 막횡단 전위"는 미토콘드리아 내막 (치수 mV)에 의해 분리된 구획들 사이의 전기 전위 차이를 나타내고, 2가지 상이한 미토콘드리아 막횡단 전위를 설명하도록 본원에서 사용될 것이다.
- <58> 1) 포유동물 미토콘드리아 막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -mito-mam;
- <59> 2) 진균 미토콘드리아 막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -mito-fungi.
- <60> 미토콘드리아에서, 영양분 (예를 들어, 글루코스)으로부터의 전위 에너지는 세포 대사 과정에 이용가능한 활동 에너지로 전환된다. 연속적인 산화-환원 반응 동안 방출된 에너지는 미토콘드리아 매트릭스로부터 막간 공간으로 양성자 ( $H^+$  이온)를 펌핑시킨다. 그 결과, 막이 분극될 때 미토콘드리아막에서 화학삼투 전기 전위 차이가 존재한다 ( $\Delta\Psi$ -mito-mam 또는  $\Delta\Psi$ -mito-fungi).  $\Delta\Psi$ -mito-mam 및  $\Delta\Psi$ -mito-fungi는 미토콘드리아 기능성의 중요한 파라미터이고, 세포의 에너지 상태 (레독스 (redox) 상태)에 대한 직접적인 정량 값을 제공한다.
- <61> 본원에서 사용될 때, 용어 "포유동물 형질막횡단 전위 ( $\Delta\Psi$ -plas-mam)"는 수성상들 사이의 포유동물 세포 형질막 내의 전기 전위 차이를 나타낸다. 포유동물 형질막 전위는 주로  $H^+$  이온 (양성자)과 함께 생성되는 세균 및 진균  $\Delta\Psi$ 와 다르다. 포유동물 형질막에서,  $\Delta\Psi$ 의 주요 촉진인자 (facilitator)는 전기생성  $Na^+/K^+$ -ATPase 펌프이다.  $\Delta\Psi$ -plas-mam은 막횡단  $K^+$  확산 (세포의 내부로부터 외부로)의 부가적인 품질 및 전기생성  $Na^+/K^+$ -ATPase 펌프에 의해 생성된다. 포유동물 ATP는 미토콘드리아 내에서 양성자 펌프를 통해 생성된다.
- <62> 본원에서 사용될 때, 용어 "진균 형질막횡단 전위 ( $\Delta\Psi$ -plas-fungi)"는 진균 세포 형질막 내의 전기 전위 차이를 나타낸다. 진균 형질막 전위는 막-결합  $H^+$ -ATPase (기능하기 위해 ATP를 필요로 하는 고용량 양성자 펌프)에 의해 생성된다. 상기  $H^+$ -ATPase 펌프는 진균 성장 및 안정한 세포 대사 및 유지를 위해 필요하다. 진균 ATP는 미토콘드리아 내에서 생성된다.
- <63> 본원에서 사용될 때, 용어 "세균 형질막횡단 전위 ( $\Delta\Psi$ -plas-bact)"는 세균 세포 형질막 내의 전기 전위 차이를 나타낸다. 세균 형질막 전위는 세균 형질막 내에서 정상적인 전자 수송 및 산화적 인산화와 함께 일어나는 세균 형질막을 가로지르는 전자 및 양성자 ( $H^+$ )의 정상-상태 유동 (전좌 (translocation))에 의해 생성된다. 모든 전자 수송 회로의 공통적인 특징은 막횡단 양성자 구배 (gradient)를 생성시키는 양성자 펌프의 존재이다. 세균은 미토콘드리아가 없지만, 호기성 세균은 진핵생물 미토콘드리아에서 일어나는 것과 본질적으로 동일한 과정에 의해 산화적 인산화 (ATP 생산)를 수행한다. 본원에서 사용될 때, 용어 "P-클래스 (class) 이온 펌프"는 ATP-결합 부위를 함유하는 (즉, 이는 기능하기 위해 ATP를 필요로 한다) 막횡단 능동 수송 단백질 조립체 (assembly)를 나타낸다. 수송 과정 동안, 단백질 서브유닛 중 하나가 인산화되고, 수송된 이온은 인산화된 서브유닛을 통해 이동하는 것으로 생각된다. 상기 클래스의 이온 펌프는 포유동물 형질막 내의  $Na^+/K^+$ -ATPase 펌프를 포함하고, 이는 동물 세포의 전형적인  $Na^+$  및  $K^+$  전기화학 전위 ( $\Delta Na^+/K^+$ ) 및 pH 구배를 유지한다. P-클래스 이온 펌프의 다른 중요한 멤버는 양성자 ( $H^+$  이온)을 세포 밖으로,  $K^+$  이온을 세포 내로 수송한다.
- <64> 본원에서 사용될 때, 용어 " $Na^+/K^+$  ATPase"는 모든 동물 세포의 형질막 내에 존재하는 P 클래스 이온 펌프를 나타내고, 이는 하나의 ATP 분자의 가수분해를 동물 세포의 전형적인  $Na^+$  및  $K^+$  전기화학 전위 및 pH 구배를 유지시키는 3개의  $Na^+$  이온의 배출 및 2개의  $K^+$  이온의 도입에 연계시킨다. 진균 세포 (또한 진핵생물) 내의 내부-음전하 막 전위는 상이한 ATP에 의해 동력을 제공받는 양성자 펌프에 의한 세포 밖으로  $H^+$  이온의 수송에 의해 생성된다.
- <65> 본원에서 사용될 때, 용어 "이온 교환체 (exchanger) 및 이온 채널"은 ATP-독립 시스템인 막횡단 단백질을 나타내고, 포유동물 세포에서 형질막 전위를 확립하는 것을 돕는다.
- <66> 본원에서 사용될 때, 용어 "레독스 (환원/산화 반응에 대한 약어)"는 전자 전달을 포함한 일련의 매우 복잡한 과정을 통한 세포 내에서 예를 들어 당의 산화의 복잡한 과정을 설명한다. 레독스 반응은 공여체 분자로부터

수혜자 분자로 전자가 전달되는 화학 반응이다. 용어 레독스는 환원 및 산화의 2가지 개념으로부터 유래하고, 다음과 같이 간단한 용어로 설명할 수 있다:

- <67> 산화는 분자, 원자 또는 이온에 의한 전자의 손실을 설명한다.
- <68> 환원은 분자, 원자 또는 이온에 의한 전자의 획득을 설명한다.
- <69> 본원에서 사용될 때, 용어 "레독스 상태"는 설명되는 세포의 레독스 환경 (또는 산화 스트레스의 수준)을 설명한다.
- <70> 본원에서 사용될 때, 용어 "정상-상태 형질막횡단 전위 ( $\Delta\Psi$ -steady)"는 방사선 조사의 부재 하에 장래에 계속될, 본 발명의 방법 및 시스템에 따른 방사선 조사 전의 포유동물, 진균 또는 세균 세포의 정량적 형질막 전위를 나타낸다.
- <71> 예를 들어, 정상적인 전자 수송 및 산화적 인산화 동안 일어나는 세균 세포막을 가로지르는 전자 및 양성자의 정상-상태 유동은 막을 가로질러 일어나는 통상적인 레독스 반응의 일정한 유동으로 인해 정상-상태일 것이다. 이와 반대로, 상기 레독스 상태의 임의의 변형은 과도-상태 막 전위를 유발할 것이다.  $\Delta\Psi$ -steady는 종에 기초하여 3가지 상이한 정상-상태 형질막횡단 전위를 설명하도록 본원에서 사용될 것이다:
- <72> 1) 정상-상태 포유동물 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -steady-mam;
- <73> 2) 정상-상태 진균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -steady-fungi;
- <74> 3) 정상-상태 세균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -steady-bact.
- <75> 본원에서 사용될 때, 용어 "과도-상태 형질막 전위 ( $\Delta\Psi$ -tran)"는 방사선 조사가 형질막의 생물에너지를 변화시킨, 본 발명의 방법 및 시스템에 따른 방사선 조사 후의 포유동물, 진균 또는 세균 세포의 형질막 전위를 나타낸다. 세균에서, 형질막에 ETS 및 사이토크롬이 존재하기 때문에  $\Delta\Psi$ -tran은 또한 세포의 레독스 상태를 변화시킬 것이다.  $\Delta\Psi$ -tran은 본 발명의 방법을 사용하여 방사선 조사하지 않고서는 일어나지 않을 상태이다.  $\Delta\Psi$ -tran은 종에 기초하여 3가지 상이한 과도-상태 형질막횡단 전위를 설명하도록 본원에서 사용될 것이다:
- <76> 1) 과도-상태 포유동물 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -tran-mam;
- <77> 2) 과도-상태 진균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -tran-fungi;
- <78> 3) 과도-상태 세균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -tran-bact.
- <79> 본원에서 사용될 때, 용어 "정상-상태 미토콘드리아 막 전위 ( $\Delta\Psi$ -steady-mito)"는 방사선 조사의 부재 하에 장래에 계속될, 본 발명의 방법 및 시스템에 따른 방사선 조사 전의 포유동물 또는 진균 미토콘드리아의 정량적 미토콘드리아 막 전위를 나타낸다.
- <80> 예를 들어, 정상적인 전자 수송 및 산화적 인산화 동안 일어나는 미토콘드리아 내막을 가로지르는 전자 및 양성자의 정상-상태 유동은 막을 가로질러 일어나는 통상적인 레독스 반응의 일정한 유동으로 인해 정상-상태일 것이다. 상기 레독스 상태의 임의의 변형은 과도-상태 미토콘드리아 막 전위를 유발할 것이다.  $\Delta\Psi$ -steady-mito는 종에 기초하여 2가지 상이한 정상-상태 미토콘드리아 막 전위를 설명하도록 본원에서 사용될 것이다:
- <81> 1) 정상-상태 미토콘드리아 포유동물 전위  $\Delta\Psi$ -steady-mito-mam;
- <82> 2) 정상-상태 미토콘드리아 진균 전위  $\Delta\Psi$ -steady-mito-fungi.
- <83> 본원에서 사용될 때, 용어 "과도-상태 미토콘드리아 막 전위 ( $\Delta\Psi$ -tran-mito-mam 또는  $\Delta\Psi$ -tran-mito-fungi)"는 방사선 조사가 미토콘드리아 내막의 생물에너지를 변화시킨, 본 발명의 방법 및 시스템에 따른 방사선 조사 후의 포유동물 또는 진균 세포의 막 전위를 나타낸다. 포유동물 및 진균 세포에서, 미토콘드리아 내막에 전자 수송 시스템 (ETS) 및 사이토크롬이 존재하기 때문에  $\Delta\Psi$ -tran-mito는 또한 세포의 레독스 상태를 변화시킬 것이다. 이들 미토콘드리아 ( $H^+$ ) 구배는 무수한 세포 기능을 위해 적당한 ATP를 생산하기 위해 미토콘드리아 내에서 생성되므로,  $\Delta\Psi$ -tran-mito는 또한 (양성자 구동력)  $\Delta p$ -mito-mam 및  $\Delta p$ -mito-fungi에 강하게 영향을 미칠 수 있다.  $\Delta\Psi$ -tran-mito는 본 발명의 방법 및 시스템에 따른 방사선 조사 없이는 일어나지 않을 상태이다.  $\Delta\Psi$ -tran-mito는 종에 기초하여 2가지 상이한 과도-상태 미토콘드리아 막 전위를 설명하도록 본원에서 사용될 것이다:
- <84> 1) 과도-상태 미토콘드리아 포유동물 전위  $\Delta\Psi$ -tran-mito-mam;

- <85> 2) 과도-상태 미토콘드리아 진균 전위  $\Delta\psi$ -tran-mito-fungi.
- <86> 본원에서 사용될 때, 용어 "사이토크롬"은 헴 (heme)기를 함유하고 전자 수송을 수행하는 막 결합된 헴단백질을 나타낸다. 본원에서 사용될 때, 용어 "전자 수송 시스템 (ETS)"은 세포의 에너지 전류 (currency)인 ATP를 생산하는 생화학적 반응을 매개하는 일련의 막-회합 전자 운반체 (사이토크롬)을 설명한다. 원핵생물 세포 (세균)에서, 이는 형질막에서 일어난다. 진핵생물 세포 (진균 및 포유동물 세포)에서, 이는 미토콘드리아에서 일어난다.
- <87> 본원에서 사용될 때, 용어 "pH 구배 ( $\Delta\text{pH}$ )"는 막의 양 측면 상의 2개의 벌크상 (bulk phase) 사이의 pH 차이를 나타낸다.
- <88> 본원에서 사용될 때, 용어 "양성자 전기화학 구배 ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) (치수  $\text{kJ mol}^{-1}$ )"는 막을 가로질러 전기적 및 화학적 특성, 특히 양성자 구배를 의미하고, 세포 내에서 작동하기 위해 이용가능한 세포성 전위 에너지의 종류를 나타낸다. 양성자 펌프를 포함한 능동 수송에 참여하는 막의 2개의 측면 사이의 상기 양성자 전기화학 전위 차이는 때때로 화학삼투 전위 또는 양성자 구동력으로도 불린다. 임의의 수단에 의해  $\Delta\mu\text{H}^+$ 가 감소될 때, 영향을 받은 세포에서 세포 동화 경로 및 내성 메카니즘은 억제되는 것은 당연하다. 이는 표적 부위만을 방사선 조사하기 위해  $\lambda\text{n}$  및  $\text{Tn}$ 을 조합함으로써 달성될 수 있거나, 표적 부위로의 전달을 위해 형성되고 배열된 약제의 동시 또는 순차적인 투여로 더욱 향상될 수 있다 (즉, ( $\lambda\text{n}$  및  $\text{Tn}$ ) + (약물 분자(들))을 사용한 동화 경로의 동시-표적화).
- <89> 본원에서 사용될 때, 용어 "이온 전기화학 구배 ( $\Delta\mu\text{x}^+$ )"는 이온 ( $\text{H}^+$  이외의)의 농도 구배에 의해 유발된 막을 가로지르는 전기적 및 화학적 특성을 의미하고, 세포 내에서 작동하기 위해 이용가능한 세포성 전위 에너지의 종류를 나타낸다. 포유동물 세포에서,  $\text{Na}^+$  이온 전기화학 구배는 세포 밖으로  $\text{Na}^+$ 의 능동 수송에 의해 형질막을 가로질러 유지된다. 이는 양성자 전기화학 전위와 상이한 구배이지만, ATP 연계된 펌프로부터 생성되고, 상기 ATP는 포유동물 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta\text{p-mito-mam}$ )으로부터 산화적 인산화 동안 생산된다. 임의의 수단에 의해  $\Delta\mu\text{x}^+$ 가 감소될 때, 영향을 받은 세포에서 세포 동화 경로 및 내성 메카니즘이 억제되는 것은 당연하다. 이는 표적 부위만을 방사선 조사하기 위해  $\lambda\text{n}$  및  $\text{Tn}$ 을 조합함으로써 달성될 수 있거나, 표적 부위로의 전달을 위해 형성되고 배열된 약제의 동시 또는 순차적인 투여로 더욱 향상될 수 있다 (즉, ( $\lambda\text{n}$  및  $\text{Tn}$ ) + (약물 분자(들))을 사용한 동화 경로의 동시-표적화).
- <90> 본원에서 사용될 때, 용어 "세균 동화 경로의 동시-표적화"는 (동화 경로에 영향을 미치기 위해 표적 부위에서 세포의 ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) 및/또는 ( $\Delta\mu\text{x}^+$ )의  $\lambda\text{n}$  및  $\text{Tn}$  저하) + (동일한 세균 동화 경로에 영향을 미치기 위해 약물 분자(들))을 나타내고, 약물 분자를 사용하여 억제될 수 있는 임의의 다음의 세균 동화 경로를 나타낼 수 있다:
- <91> 여기서, 표적화된 동화 경로는 세균 세포벽 내의 펩티도글리칸과 가교결합하는 세균 트랜스펩티다제 효소 (페니실린 결합 단백질)의 활성 부위에 결합하는 약제에 의해 동시-표적화되는 펩티도글리칸 생합성이다. 이들 효소의 억제는 궁극적으로 세포 용해 및 사멸을 일으킨다;
- <92> 여기서, 표적화된 세균 동화 경로는 세포벽 중간체 내의 아실-D-알라닌-D-알라닌기에 결합하고 따라서 N-아세틸 뮤라민산 (NAM)- 및 N-아세틸글루코사민 (NAG)-펩티드 서브유닛의 펩티도글리칸 매트릭스 내로의 통합을 방지하여 (글리코실 전이 (transglycosylation) 및/또는 펩티드 전이 (transpeptidation)에 작용함으로써 펩티도글리칸 생합성을 효과적으로 억제하여), 그람 양성 세균에서 펩티도글리칸의 적절한 형성을 방지하는 약제에 의해 동시-표적화되는 펩티도글리칸 생합성이다;
- <93> 여기서, 표적화된 세균 동화 경로는  $\text{C}_{55}$ -이소프레닐 피로포스페이트에 결합하고 피로포스파타제가  $\text{C}_{55}$ -이소프레닐 피로포스페이트와 상호작용하는 것을 방지하여, 빌딩 블록 (building block) 펩티도글리칸을 내막 밖으로 옮기기 위해 이용가능한  $\text{C}_{55}$ -이소프레닐 피로포스페이트의 양을 감소시키는 약제에 의해 동시-표적화되는 펩티도글리칸 생합성이다;
- <94> 여기서, 표적화된 동화 경로는 세균 리보솜의 서브유닛 50S 서브유닛 내의 23S rRNA 분자에 결합하여, 세포 내에 펩티딜-tRNA의 축적을 일으키고, 따라서  $\alpha$ -아미노산의 활성화를 위해 필요한 유리 tRNA를 고갈시키고, 리보솜으로부터 펩티딜 tRNA의 조기 해리를 일으킴으로써 펩티드 전이를 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성이다;



- <95> 여기서, 동시-표적화된 약제는 50S 세균 리보솜 서브유닛의 23S RNA의 2개의 도메인에 동시에 결합하고, 그에 의해 세균 리보솜 서브유닛 50S 및 30S (리보솜 서브유닛 조립체)의 형성을 억제할 수 있고; 여기서, 동시-표적화된 약제는 세균 세포 내로 관통하도록 그의 친지성을 증가시키기 위해 염소화되고, 세균 리보솜의 50S 서브유닛의 23S 부분에 결합하고, 아미노아실 부위 (A-부위)로부터 펩티딜 부위 (P-부위)로 펩티딜-tRNA의 전좌를 방지하여, 트랜스펩티다제 반응을 억제하고, 이는 리보솜으로부터 불완전한 펩티드가 방출되도록 한다;
- <96> 여기서, 표적화된 동화 경로는 30S 세균 리보솜 서브유닛에 결합하여 리보솜의 수혜자 부위 (A-부위)에 결합하는 아미노-아실 tRNA의 부착을 방지하고, 그에 의해 코돈-안티코돈 상호작용 및 단백질 합성의 연장기를 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성이다;
- <97> 여기서, 동시-표적화된 약제는 옥타히드로테트라센-2-카르복사미드 골격을 갖는 폴리케타이드 항미생물제의 통상적인 하위군과 상이한 배향으로 보다 강하게 세균 리보솜에 결합하여, tet(M) 리보솜 및 tet(K) 배출 유전자 결정인자를 갖는 에스. 아우레우스의 균주에 대해 활성이 된다;
- <98> 여기서, 표적화된 동화 경로는 특정한 아미노산 또는 그의 전구체의 그의 상호적합성 tRNA 중 하나에 대한 에스테르화를 방지하도록 특이적 아미노아실-tRNA 합성효소에 결합하고, 따라서 아미노아실-tRNA의 형성을 방지하여, 세균 단백질 내로 필수 아미노산의 통합을 중단시키는 약제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성이다;
- <99> 여기서, 표적화된 동화 경로는 30S 리보솜 서브유닛의 16S rRNA와 상호작용하면서 23S rRNA의 도메인 V를 통해 50S rRNA에 결합함으로써 시작기 전에 세균 단백질 합성을 억제하여, 단백질 합성 포르밀-메티오닌의 개시인자 (f-Met-tRNA), 및 30S 리보솜 서브유닛의 결합을 방지하는 약제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성이다;
- <100> 여기서, 표적화된 동화 경로는 펩티딜 트랜스퍼라제 중심에 가까운 23S rRNA P 부위의 구역 내의 단백질 L3에서 세균 리보솜의 50S 서브유닛과 상호작용하여, 펩티딜 트랜스퍼라제 활성 및 펩티딜 전달을 억제하고, P-부위 상호작용을 차단하고, 활성 50S 리보솜 서브유닛의 정상적인 형성을 방지하는 약제에 의해 동시-표적화되는 세균 단백질 생합성이다;
- <101> 여기서, 표적화된 동화 경로는 토포이소머라제 II (DNA 가이라제 (gyrase)) 및/또는 토포이소머라제 IV를 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제 및 전사이다;
- <102> 여기서, 표적화된 동화 경로는 DNA 중합효소 IIIC (그램-양성 세균에서 염색체 DNA의 복제를 위해 요구되지만, 그람-음성 세균에는 존재하지 않는 효소)를 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제 및 번역이다;
- <103> 여기서, 표적화된 동화 경로는 토포이소머라제 II (DNA 가이라제) 및/또는 토포이소머라제 IV 및/또는 DNA 중합효소 IIIC를 억제하는 약물 하이브리드 화합물에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제 및 전사이다;
- <104> 여기서, 표적화된 동화 경로는 포스파티딜에탄올아민-풍부 세포질막에 대해 작용하고 다른 국소 (topical) 상승제와 조합하여 잘 작동하는 국소 약제에 의해 동시-표적화되는 세균 인지질 생합성이다;
- <105> 여기서, 표적화된 동화 경로는  $\beta$ -케토아실-(아실-운반-단백질 (ACP)) 신타제 (synthase) I/II (FabF/B) (II형 지방산 합성에서 필수 효소)의 선택적 표적화를 통해 세균 지방산 생합성을 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 세균 지방산 생합성이다;
- <106> 여기서, 표적화된 동화 경로는 세균 형질막횡단 전위  $\Delta\psi$ -plas-bact의 유지이고, 동시-표적화 약제는 세포 내로 관통하는 것이 아니라 주로 그람 양성 세포질막에 결합하여, 탈분극 및 막 전위의 손실을 유발하여 단백질, DNA 및 RNA 합성의 억제를 일으킴으로써 그 자체에 대한 세균 세포막 기능의 다수의 측면을 파괴한다;
- <107> 여기서, 동시-표적화 약제는 세균 세포벽의 투과성을 증가시키고, 따라서 무기 양이온이 비제한적인 방식으로 벽을 통해 이동하도록 하여, 세포질과 세포외 환경 사이의 이온 구배를 파괴한다;
- <108> 여기서, 표적화된 동화 경로는 세균 막 선택적 투과성 및 세균 형질막횡단 전위  $\Delta\psi$ -plas-bact의 유지이고, 동시-표적화 약제는 진행 세포의 중성 막 표면에 비해 세균 막의 음전하를 띤 표면에 대해 선택적이고, 원핵생물 막 투과화 및 세균 세포막의 궁극적인 천공 및/또는 붕괴를 일으켜, 세균 세포 내용물의 누출 및 막횡단 전위의 파괴를 촉진시키는 양이온성 항균 펩티드이다;
- <109> 여기서, 동시-표적화 약제는 새로 합성된 세균 폴리펩티드의 N-말단으로부터 포르밀기의 제거를 촉매하는 세균

프로테아제 펩티드 데포르밀라제를 억제한다;

- <110> 여기서, 동시-표적화 약제는 세균 형질막을 가로지르는 신호 변환 (이들 신호 변환 과정은 포유동물 막에는 없다)을 통해 그들의 환경에 반응하는 능력과 같은, 세균에서 2-성분 조절 시스템을 억제한다.
- <111> 본원에서 사용될 때, 용어 "진균 동화 경로의 동시-표적화"는 (동화 경로에 영향을 미치기 위해 표적 부위에서 세포의 ( $\Delta \mu H^+$ ) 및/또는 ( $\Delta \mu x^+$ )의  $\lambda n$  및  $Tn$  저하) + (동일한 진균 동화 경로에 영향을 미치기 위해 약제)를 나타내고, 약제를 사용하여 억제될 수 있는 임의의 다음의 진균 동화 경로를 나타낼 수 있다:
- <112> 여기서, 표적화된 동화 경로는 진균 세포막에서 기존의 인지질의 구조를 파괴하고 다른 국소 상승제와 조합으로 잘 작동하는 국소 약제에 의해 동시-표적화되는 인지질 생합성이다;
- <113> 여기서, 표적화된 동화 경로는 C-14 탈메틸화 단계 (사이토크롬 P-450 효소 14-a-스테롤 탈메틸효소에 의해 촉매된 3-단계 산화 반응의 일부)에서 에르고스테롤 생합성을 억제하여, 형질막 구조의 파괴를 통해 에르고스테롤 고갈, 및 막 성분으로서 에르고스테롤의 '벌크' 기능을 저해하는 라노스테롤 및 다른 14-메틸화 스테롤의 축적을 일으키는 약제에 의해 동시-표적화되는 에르고스테롤 생합성이다;
- <114> 여기서, 표적화된 동화 경로는 효소 스쿠알렌 에폭시다제를 억제하고, 이는 다시 진균 세포에서 에르고스테롤 생합성을 억제하여 진균 세포막이 증가된 투과성을 갖도록 하는 약제로 동시-표적화되는 에르고스테롤 생합성이다;
- <115> 여기서, 표적화된 동화 경로는 별개의 구분되는 지점에서 에르고스테롤 생합성 경로에서 2개의 효소, 즉, d14-환원효소 및 d7,d8-이소머라제를 억제하는 약제로 동시-표적화되는 에르고스테롤 생합성이다;
- <116> 여기서, 표적화된 동화 경로는 효소 (1,3) $\beta$ -D-글루칸 신타제를 억제하고, 이는 다시 진균 세포벽에서  $\beta$ -D-글루칸 합성을 억제하는 약제로 동시-표적화되는 진균 세포벽 생합성이다;
- <117> 여기서, 표적화된 동화 경로는 세포막의 전이 온도를 효과적으로 변화시키고 막 내에 공극이 형성하도록 하여 진균 세포막 내에 유해한 이온 채널을 형성시키는, 진균 세포막 내의 스테롤과 결합하는 (동시-표적화 약제가 결합하는 주요 스테롤은 에르고스테롤임) 약제로 동시-표적화되는 진균 스테롤 생합성이다;
- <118> 여기서 동시-표적화된 약제는 약제로부터의 독성을 방지하기 위해 지질, 리포좀, 지질 복합체 및/또는 콜로이드성 분산액 내의 전달을 위해 제형화된다;
- <119> 여기서, 표적화된 동화 경로는 시토신 투과효소 (permease)에 의해 진균 세포 내로 흡수되고, 5-플루오로우라실 (5-FU)로 탈아미노화되고, 뉴클레오시드 트리포스페이트로 전환되고, RNA 내로 통합되어 여기서 미스코딩 (miscoding)을 일으키는 5-FC인 약제로 동시-표적화되는 단백질 합성이다;
- <120> 여기서, 표적화된 동화 경로는 그의 포유동물 대응물과 기능상 구분되는 진균 연장 인자 EF-2 및/또는 포유동물 세포에 없는 진균 연장 인자 3 (EF-3)를 억제하는 약제로 동시-표적화되는 진균 단백질 합성이다;
- <121> 여기서, 표적화된 동화 경로는 하나 이상의 효소 키틴 신타제 2 (진균에서 1차 격벽 (septum) 형성 및 세포 분열에 필요한 효소)의 작용을 억제함으로써 진균 키틴 생합성을 억제하는 약제로 동시-표적화되는 진균 키틴 생합성 (N-아세틸-D-글루코사민의  $\beta$ -(1,4)-연결된 단일중합체)이다;
- <122> 여기서, 동시-표적화된 약제는 효소 키틴 신타제 3 (출아 (bud) 출현 및 성장, 접합, 및 포자 형성 동안 키틴의 합성에 필요한 효소)의 작용을 억제한다;
- <123> 여기서, 동시-표적화 약제는 다가 양이온 ( $Fe^{+3}$  또는  $Al^{+3}$ )을 킬레이팅하여, 미토콘드리아 전자 수송 및 세포성 에너지 생산을 담당하는 금속-의존성 효소의 억제를 일으키고, 또한 진균 세포 내에서 과산화물의 정상적인 분해를 억제한다;
- <124> 여기서, 동시-표적화 약제는 진균 형질막을 가로지르는 신호 변환을 통해 그들의 환경에 반응하는 능력과 같은, 진균에서 2-성분 조절 시스템을 억제한다.
- <125> 본원에서 사용될 때, 용어 "암 동화 경로의 동시-표적화"는 (동화 경로에 영향을 미치기 위해 표적 부위에서 세포의 ( $\Delta \mu H^+$ ) 및/또는 ( $\Delta \mu x^+$ )의  $\lambda n$  및  $Tn$  저하) + (비-암성 세포보다 더 큰 정도로 동일한 암 동화 경로에 영향을 미치기 위해 약제)를 나타내고, 약제를 사용하여 억제될 수 있는 임의의 다음의 암 동화 경로를 나타낼 수 있다:

- <126> 여기서, 표적화된 동화 경로는 DNA 이중 나선 가닥 내의 구아닌 핵염기와 가교결합하여 가닥이 풀리고 분리 (이는 DNA 복제에 필요하다)될 수 없도록 함으로써 DNA 복제를 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제이다;
- <127> 여기서, 표적화된 동화 경로는 DNA의 동일한 가닥 또는 DNA의 상이한 가닥 내의 2개의 상이한 7-N-구아닌 잔기와 반응할 수 있는 약제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제이다;
- <128> 여기서, 표적화된 동화 경로는 항대사물질로서 작용함으로써 DNA 복제 및 세포 분열을 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제이다;
- <129> 여기서, 표적화된 동화 경로는 미세관 기능을 방지함으로써 세포 분열을 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 세포 분열이다;
- <130> 여기서, 표적화된 동화 경로는 세포가 G1상 (DNA 복제의 개시) 및 DNA의 복제 (S상)로 들어가는 것을 방지함으로써 DNA 복제 및 세포 분열을 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제이다;
- <131> 여기서, 표적화된 동화 경로는 미세관의 안정성을 향상시켜, 후기 (anaphase) 동안 염색체의 분리를 방지하는 약제에 의해 동시-표적화되는 세포 분열이다;
- <132> 여기서, 표적화된 동화 경로는 적합한 DNA 수퍼코일링 (supercoiling)을 붕괴 (upsetting)시킴으로써 DNA의 전사 및 복제를 모두 저해할, I형 또는 II형 토포이소머라제의 억제에 의해 DNA 복제 및 세포 분열을 억제하는 약제에 의해 동시-표적화되는 DNA 복제이다.
- <133> 본원에서 사용될 때, 용어 "양성자 구동력 ( $\Delta p$ )"은 막을 가로지르는 양성자 및 전압 구배의 조합으로서 에너지의 저장 (일종의 배터리와 같이 작용하는)을 나타낸다.  $\Delta p$ 의 2개의 성분은  $\Delta \Psi$  (막횡단 전위) 및  $\Delta pH$  ( $H^+$ 의 화학 구배)이다. 달리 말하면,  $\Delta p$ 는  $H^+$  막횡단 전위  $\Delta \Psi$  (음전하 (산성) 외부) 및 막횡단 pH 구배  $\Delta pH$  (알칼리성 내부)로 이루어진다. 전기화학 구배의 형태로 저장된 상기 전위 에너지는 화학삼투 동안 생물학적 막 (미토콘드리아 내막 또는 세균 및 진균 형질막)을 가로지르는 수소 이온의 펌핑에 의해 생성된다.  $\Delta p$ 는 세포 내에서 화학적, 삼투적 또는 기계적 작업을 위해 사용될 수 있다. 양성자 구배는 일반적으로 ATP 합성을 구동하기 위해 산화적 인산화에서 사용되고, 세균, 진균 또는 포유동물 세포, 예를 들어 암성 세포에서 배출 펌프를 구동하기 위해 사용될 수 있다.  $\Delta p$ 는 종에 기초하여 막 내에서 4가지 상이한 양성자 구동력을 설명하도록 본원에서 사용될 것이고, 수학적으로 ( $\Delta P = \Delta \Psi + \Delta pH$ )로서 정의된다.
- <134> 1) 포유동물 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-mam);
- <135> 2) 진균 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-Fungi);
- <136> 3) 진균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-Fungi);
- <137> 4) 세균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-Bact).
- <138> 본원에서 사용될 때, 용어 "포유동물 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-mam)"은 포유동물 미토콘드리아 내막을 가로질러 ( $H^+$ ) 전기화학 구배의 형태로 저장된 전위 에너지를 나타낸다.  $\Delta p$ -mito-mam은 포유동물 미토콘드리아 내에서 ATP 합성을 구동하도록 산화적 인산화에서 사용된다.
- <139> 본원에서 사용될 때, 용어 "진균 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-fungi)"은 진균 미토콘드리아 내막을 가로질러 ( $H^+$ ) 전기화학 구배의 형태로 저장된 전위 에너지를 나타낸다.  $\Delta p$ -mito-fungi는 진균 미토콘드리아 내에서 ATP 합성을 구동하도록 산화적 인산화에서 사용된다.
- <140> 본원에서 사용될 때, 용어 "진균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-Fungi)"은 진균 형질막을 가로질러 ( $H^+$ ) 전기화학 구배의 형태로 저장된 전위 에너지를 나타내고, 막-결합된  $H^+$ -ATPase에 의한 형질막을 가로지르는 수소 이온의 펌핑에 의해 생성된다. 상기 형질막-결합된  $H^+$ -ATPase는 기능하기 위해 ATP를 필요로 하는 고용량 양성자 펌프이다. 상기  $H^+$ -ATPase를 위한 ATP는  $\Delta p$ -mito-Fungi로부터 생성된다.  $\Delta p$ -plas-Fungi는 진균 세포에서 배출 펌프를 구동하기 위해 사용될 수 있다.
- <141> 본원에서 사용될 때, 용어 "세균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-Bact)"은 세균 형질막을 가로질러 전기화학

구배 ( $H^+$ )의 형태로 저장된 전위 에너지를 나타내고, 화학삼투 동안 형질막을 가로지르는 수소 이온의 펌핑에 의해 생성된다.  $\Delta p$ -plas-Bact는 세균 형질막에서 ATP 합성을 구동하도록 산화적 인산화에서 사용되고, 세균 세포에서 배출 펌프를 구동하도록 사용될 수 있다.

- <142> 본원에서 사용될 때, 용어 "동화 경로"는 보다 작은 단위로부터 분자를 구성하는 세포 대사 경로를 나타낸다. 이들 반응은 에너지를 요구한다. 많은 동화 경로 및 과정은 아데노신 트리포스페이트 (ATP)에 의해 동력을 제공한다. 이들 과정은 단순한 분자, 예를 들어 단일 아미노산 및 복잡한 분자, 예를 들어 펩티도글리칸, 단백질, 효소, 리보솜, 세포성 소기관, 핵산, DNA, RNA, 글루칸, 키틴, 단순 지방산, 복합 지방산, 콜레스테롤, 스테롤 및 에르고스테롤의 합성을 포함할 수 있다.
- <143> 본원에서 사용될 때, 용어 "에너지 변환 (transduction)"은 펌프 막을 가로질러 양성자를 펌핑하고 양성자 전기화학 구배로도 알려진 전기화학 전위를 생성하기 위해 전자 전달 반응을 이용하는, 막 내에 매립된 호흡 복합체를 통한 양성자 전달을 나타낸다.
- <144> 본원에서 사용될 때, 세포 내에서 용어 "에너지 변환"은 에너지의 교환 및 전환을 가능하게 만들도록 끊임없이 깨지고 생성되는 화학 결합을 나타낸다. 일반적으로 보다 농축된 형태로부터 덜 농축된 형태로 에너지의 변환이 세포의 호흡을 책임지는 모든 생물학적 또는 화학적 과정의 구동력인 것으로 말해진다.
- <145> 본원에서 사용될 때, 용어 "작폴립제 (uncoupler)"는 ATP의 합성으로부터 막의 양성자 전기화학 구배 ( $\Delta \mu H^+$ )로 저장된 에너지의 분리를 일으키는 분자 또는 장비를 나타낸다.
- <146> 본원에서 사용될 때, 용어 "작폴기 (uncoupling)"는 ATP의 합성으로부터 막의 양성자 전기화학 구배 ( $\Delta \mu H^+$ )로 저장된 에너지의 분리를 일으키기 위해 작폴립제 (분자 또는 장비)의 사용을 나타낸다.
- <147> 본원에서 사용될 때, 용어 "아데노신 5'-트리포스페이트 (ATP)"는 세포내 에너지 전달의 "분자 전류"로서 기능하는 다중기능적 뉴클레오타이드를 나타낸다. ATP는 세포 내에서 대사를 위한 화학 에너지를 수송하고, 세포성 호흡의 과정 동안 에너지원으로서 생산된다. ATP는 많은 효소 및 많은 일련의 세포성 과정, 예를 들어 생합성 반응, 배출 펌프 기능 및 동화성 세포 성장 및 분화에 의해 소비된다.
- <148> 본원에서 사용될 때, 용어 "아데노신 디포스페이트 (ADP)"는 ATPase에 의한 ATP 탈인산화의 생성물이다. ADP는 ATP 합성에 의해 다시 ATP로 전환된다. 호기성 호흡하는 세포에서, 생리학적 조건 하에, ATP 신타제는 에너지원으로서 ETS에 의해 생성된 양성자 구동력  $\Delta p$ 를 사용하면서 ATP를 생성하는 것으로 이해된다. 상기 방식으로 에너지를 생성하는 전체 과정을 산화적 인산화로 칭한다. 산화적 인산화의 전체 반응 순서는  $ADP + P_i \rightarrow ATP$ 이다. 생물학적 반응을 구동시키는 근원적인 힘은 반응물과 생성물의 깁스 (Gibbs) 자유 에너지이다. 깁스 자유 에너지는 작업하기 위해 이용가능한 ("자유") 에너지이고, 용어 깁스 자유 에너지 변화 ( $\Delta G$ )는 작업하기 위해 막 내에서 이용가능한 자유 에너지의 변화를 나타낸다. 상기 자유 에너지는 엔탈피 (enthalpy;  $\Delta H$ ), 엔트로피 (entropy;  $\Delta S$ ) 및 온도의 함수이다 (엔탈피 및 엔트로피는 아래에 논의한다).
- <149> 본원에서 사용될 때, 용어 "인산화 전위 ( $\Delta G_p$ )"는 ATP, ADP 및  $P_i$  농도의 임의의 주어진 세트에서 ATP 합성을 위한  $\Delta G$ 를 나타낸다 (치수:  $\text{kJ mol}^{-1}$ ).
- <150> 본원에서 사용될 때, 용어 "CCCP"는 호흡 사슬의 고도의 독성 이온운반체 (ionophore) 및 작폴립제인 카르보닐시아나이드 m-클로로페닐히드라존을 나타낸다. CCCP는 막을 통한 양성자의 전도도를 증가시키고, ATP 합성을  $\Delta \mu H^+$ 로부터 작폴기하고  $\Delta \Psi$  및  $\Delta pH$  모두를 소산시킴으로써 고전적인 작폴립제로서 작용한다.
- <151> 본원에서 사용될 때, 용어 "탈분극" (비하전 (de-energization))은 세포의 형질막 또는 미토콘드리아 막 전위  $\Delta \Psi$ 의 절대값의 감소를 나타낸다. 임의의 세균 형질막의 탈분극이 ATP의 손실 및 증가된 유리 라디칼 (radical) 형성을 일으킬 것이라는 것은 당연하다. 임의의 진핵 세포의 미토콘드리아 탈분극이 ATP의 손실 및 증가된 유리 라디칼 형성을 일으킬 것이라는 것도 당연하다.
- <152> 본원에서 사용될 때, 용어 "엔탈피 변화 ( $\Delta H$ )"는 막 시스템의 엔탈피 또는 열 함량의 변화를 나타내고, 막 시스템의 열역학 전위의 인용 또는 설명이다.
- <153> 본원에서 사용될 때, 용어 "엔트로피 변화 ( $\Delta S$ )"는 분자 수준에서 보다 무질서한 상태로 막 시스템의 엔트로피의 변화를 나타낸다.
- <154> 용어 "레독스 스트레스"는 세포의 표준 환원/산화 전위 ("레독스") 상태와 상이한 세포 상태를 나타낸다. 레독스



스 스트레스는 증가된 수준의 ROS, 감소된 수준의 글루타티온, 및 세포의 레독스 전위를 변경시키는 임의의 다른 상황을 포함한다.

<155> 본원에서 사용될 때, 용어 "반응성 산소종"은 다음 카테고리 중 하나를 나타낸다:

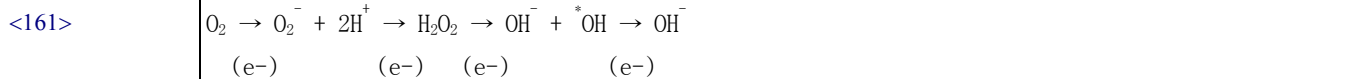
<156> a) 슈퍼옥시드 (Superoxide) 이온 라디칼 ( $O_2^-$ );

<157> b) 과산화수소 (비-라디칼) ( $H_2O_2$ );

<158> c) 히드록실 라디칼 ( $^*OH$ );

<159> d) 히드록시 이온 ( $OH^-$ ).

<160> 이들 ROS는 일반적으로 반응 연쇄를 통해 발생한다:



<162> 본원에서 사용될 때, 용어 "단일항 (singlet) 산소"는 (" $1O_2$ ")를 나타내고, 삼중항-여기된 (triplet-excited) 분자와의 상호작용을 통해 형성된다. 단일항 산소는 그의 전자가 역평행 스핀 (spin)으로 존재하는 비-라디칼 종이다. 단일항 산소  $1O_2$ 는 그의 전자의 스핀 제한을 갖지 않기 때문에 매우 높은 산화력을 갖고, 쉽게 막 (예를 들어, 다가불포화 지방산 또는 PUFA를 통해) 아미노산 잔기, 단백질 및 DNA를 공격할 수 있다.

<163> 본원에서 사용될 때, 용어 "에너지 스트레스"는 세포 내의 ATP 수준을 변경시키는 상태를 나타낸다. 이는 미토콘드리아 및/또는 형질막에서 전자 수송, 및 짝풀기제 또는  $\Delta\Psi$  변경 방사선에 대한 노출의 변화일 수 있다.

<164> 본원에서 사용될 때, 용어 "NIMELS 효과"는 본 발명을 이용하여  $\Delta\Psi$ -steady로부터  $\Delta\Psi$ -trans로 세포의 형질막 및 미토콘드리아막 수준에서 방사선 조사된 세포의 생물에너지 "상태"의 변형을 나타낸다. 구체적으로, NIMELS 효과는 그들의 에너지 필요를 위해 양성자 구동력 또는 화학삼투 전위를 이용하는 세포 동화 경로 또는 항미생물제 및/또는 암 내성 메커니즘을 약화시킬 수 있다.

<165> 본원에서 사용될 때, 용어 "주변세포질 공간 또는 주변세포질"은 그람-음성 세균에서 형질막과 외막 사이의 공간 및 그람-양성 세균 및 진균, 예를 들어 칸디다 및 트리코피톤 (*Trichophyton*) 종에서 형질막과 세포벽 사이의 공간을 나타낸다. 상기 주변세포질 공간은 영양분 획득, 펩티도글리칸의 합성, 전자 수송, 및 세포에 독성인 물질의 변형을 포함한 다양한 생화학적 경로에 관여된다. MRSA와 같은 그람-양성 세균에서, 주변세포질 공간에서  $\beta$ -락타마제 효소가 페니실린계 항생제를 불활성화시키기 때문에 주변세포질 공간은 임상학상 매우 중요하다.

<166> 본원에서 사용될 때, 용어 "배출 펌프"는 분자 (예를 들어 항생제, 항진균제, 또는 독)를 세포로부터의 제거를 위해 세포의 세포질 또는 주변세포질로부터 외부 환경으로 에너지 의존 방식으로 이출시키는 능동 수송 단백질 조립체를 나타낸다.

<167> 본원에서 사용될 때, 용어 "배출 펌프 억제제"는 세포로부터 분자를 이출시키는 배출 펌프의 능력을 저해하는 화합물 또는 전자기 방사선 전달 시스템 및 방법을 나타낸다. 특히, 본 발명의 배출 펌프 억제제는  $\Delta\Psi$ -steady-mam,  $\Delta\Psi$ -steady-fungi 또는  $\Delta\Psi$ -steady-bact의 변형을 통해 치료적 항생제, 항진균제, 항신생물제 및 독을 세포로부터 방출시키는 펌프의 능력을 저해할 전자기 방사선의 형태이다.

<168> "배출 펌프 내성 메커니즘을 활용하는" 세포는 세균 또는 진균 또는 암 세포가 항균 및/또는 항진균 및/또는 항신생물제를 그들의 세포질 또는 주변세포질로부터 세포의 외부 환경으로 이출시켜, 세포 내에서 이들 물질의 농도를 세포의 성장 및/또는 증식을 억제하기 위해 필요한 농도 미만으로 감소시키는 것을 의미한다.

<169> 세포 성장의 맥락에서, 용어 "억제하다"는 세포 집단의 성장 및/또는 증식의 속도가 감소하고, 가능하다면 중지하는 것을 의미한다.

<170> 단백질 화학에서, 1차 구조는 아미노산의 선형 배열을 나타내고, 2차 구조는 선형 아미노산 구조가 나선 또는  $\beta$ -과형 (pleated) 시트 구조를 형성하는지를 나타내고, 단백질 또는 임의의 다른 거대분자의 3차 구조는 그의

3차원 구조이거나 달리 말하면 전체 단일쇄 분자의 그의 공간 조직 (입체형태 포함)이고; 4차 구조는 다수-서브 유닛 복합체 내의 다수의 3차 구조 단백질 분자의 배열이다.

- <171> 본원에서 사용될 때, 용어 "단백질 스트레스"는 효소 및 막 수송에 참여하는 다른 단백질을 포함한 단백질의 3차 및 4차 구조에서 열역학 변형을 나타낸다. 상기 용어는 단백질의 변성, 단백질의 미스폴딩 (misfolding), 단백질의 가교결합, 사슬간 및 사슬내 결합, 예를 들어 디설피드 결합의 산소-의존적 및 독립적 산화 모두, 개별 아미노산의 산화 등을 포함하나 이로 제한되지 않는다.
- <172> 용어 "pH 스트레스"는 세포내 pH의 변형, 즉, 약 6.0 미만으로 세포내 pH의 감소 또는 약 7.5 pH 초과로 세포내 pH의 증가를 나타낸다. 이는 예를 들어, 세포를 본원에 기재된 본 발명에 노출시키고, 세포막 성분을 변경시키거나 정상-상태 막 전위  $\Delta\Psi$ -steady의 변화를 유발함으로써 일어날 수 있다.
- <173> 본원에서 사용될 때, 용어 "항진균 분자"는 살진균성 또는 정진균성인 화합물 또는 화합물을 나타낸다. 주요 효능은 내성 진균 균주에서 동화 반응 및/또는 배출 펌프 활성을 억제함으로써, 또는 에너지를 위해 양성자 구동력 또는 화학삼투 전위를 필요로 하는 다른 내성 메카니즘을 억제함으로써 항진균 분자를 강화시키는 본 발명의 능력이다.
- <174> 본원에서 사용될 때, 용어 "항균 분자 (또는 항균제)"는 살균성 또는 정균성인 화합물 또는 화합물을 나타낸다. 다른 주요 효능은 내성 세균 균주에서 배출 펌프 활성을 억제함으로써, 또는 에너지를 위해 양성자 구동력 또는 화학삼투 전위를 필요로 하는 동화 반응 및/또는 내성 메카니즘을 억제함으로써 항균 분자를 강화시키는 본 발명의 능력에 있다.
- <175> 본원에서 사용될 때, 항균 또는 항진균 분자의 "억제 농도-미만"은 집단 내의 대다수의 표적 세포를 억제하기 위해 요구되는 농도 미만의 농도를 나타낸다. (하나의 측면에서, 표적 세포는 치료를 위해 표적화되는 세포이고, 세균, 진균 및 암 세포를 포함하나 이로 제한되지 않는다). 일반적으로, 억제 농도 미만은 구체적으로 달리 진술하지 않으면 표적 세포의 성장 또는 증식을 적어도 10% 감소시키기 위해 요구되는 농도로서 정의되는 최소 억제 농도 (MIC) 미만의 농도를 나타낸다.
- <176> 본원에서 사용될 때, 용어 "최소 억제 농도" 또는 MIC는 미생물의 성장을 억제시키는 최저 유효 또는 치료 농도로서 정의된다.
- <177> 본원에서 사용될 때, 용어 제약 물질 또는 분자 (예를 들어, 항균 또는 항진균제)의 "치료 유효량"은 NIMELS와 함께, 표적 (병원성) 세포에 의해 유발된 하나 이상의 증상을 부분적으로 또는 완전히 경감시킬 물질의 농도를 나타낸다. 특히, 치료 유효량은 NIMELS와 함께 (1) 환자의 신체에서 표적 세포의 집단을 제거하지 않더라도 감소시키거나, (2) 환자의 신체에서 표적 세포의 증식을 억제하거나 (즉, 중지시키지 않더라도 느리게 하거나), (3) 감염의 확산을 억제하거나 (즉, 중지시키지 않더라도 느리게 하거나), (4) 감염과 연관된 증상을 경감하는 (그렇지 않으면 제거하는) 물질의 양을 나타낸다.
- <178> 본원에서 사용될 때, 용어 "상호작용 계수"는 표적 세포에서 NIMELS 레이저 및/또는 항미생물 분자 사이의 정균/살균 및/또는 정진균/살진균 상호작용의 크기의 수치 표현으로서 정의된다.
- <179> 생물학적 막에서 에너지 변환의 열역학
- <180> 본 발명은 세포막 생물학적 열역학 (생물에너지)를 교란시키고, 그 결과로 인한 방사선 조사된 세포의 적당하게 정상적인 에너지 변환 및 에너지 전환을 하는 능력 감소에 관한 것이다.
- <181> 본 발명의 방법 및 시스템은 동일한 막에서  $\Delta\Psi$  및  $\Delta p$ 의 추가 변경을 유도하도록  $\Psi_d$ -plas-mam,  $\Psi_d$ -mito-mam,  $\Psi_d$ -plas-fungi,  $\Psi_d$ -mito-fungi 및  $\Psi_d$ -plas-bact를 광학적으로 변경 및 변형시킨다. 이는 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 의 변화를 유발하는, 지질 이중층의 장쇄 지방산 내의 C-H 공유 결합의 표적화된 근적외선 방사선 조사에 의해 유발된다.
- <182> 상기 생물에너지 변형의 과정을 이해하는 것을 돕기 위해, 생물학적 막에서 막 생물에너지 및 에너지 변환에 대한 열역학 적용에 대해 다음과 같은 설명을 제시한다. 우선, 막 (지질 이중층, 도 1 참조)은 쌍극성 기 및 분자, 주로 인지질 (도 2) 및 물의 에스테르 연결의 구조적 회합으로부터 생성되는 유의한 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 를 갖는다. 이들 쌍극성 기는 탄화수소 상이 외막 구역에 관하여 양전위가 되도록 배향된다 (도 3). 쌍극자 전위의 정도는 대체로 크고, 대개 수백 밀리볼트이다. 제2의 주요 전위 (막을 가로지른 전하의 분리)는 막횡단 전위  $\Delta\Psi$ 를 생성한다. 막횡단 전위는 막의 2개의 측면에서 벌크 수성상들 사이의 전기 전위 차이로서 정의되고, 막을 가로질러 전하를 띤 분자의 선택적 수송으로부터 생성된다. 대개, 세포막의 세포질 측면에서 전위는 세포의

생리학적 용액에 대해 음전위이다 (도 4A).

- <183> 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 는 모든 형질막 및 미토콘드리아막의 정전기 전위의 크고 기능상 중요한 부분을 구성한다.  $\Psi_d$ 는 막 내부의 전기장을 변형시켜, 비극성 이중층 중심에 실질적인 양전하를 생성시킨다. 상기 "양전하"의 결과로서, 지질 막은 양전하 및 음전하를 띤 소수성 이온 사이의 침투율에서 실질적인 (예를 들어, 6차수 이하의 크기) 차이를 나타낸다.  $\Psi_d$ 는 또한 친지성 이온에 대한 막 투과성에서 중요한 역할을 한다.
- <184> 수많은 세포성 과정, 예를 들어 단백질 (효소)의 결합 및 삽입, 단백질의 측면 확산, 리간드-수용체 인식, 및 내인성 및 외인성 분자에 대한 막 융합에서 특정 단계는 막 이중층의 물리적 특성  $\Psi_d$ 에 크게 의존한다. 모델 막 시스템에서 연구에서는 순수한 지질에서 등온 상 전이, 상이한 상 분리, 및 혼합물 내에 개별 성분들의 구분되는 클러스터링 (clustering)을 유발시키는 1가 및 다가 이온의 능력을 설명하였다. 막에서, 상기한 것과 같은 변화는 막-매립된 단백질 및 사이토크롬 (도 4B)의 입체형태적 동역학에 대해, 보다 구체적으로, 그들의 작동 사이클 동안 그들의 막횡단 도메인에서 큰 입체형태적 재배열을 하는 단백질 (도 5)에 대해 물리적인 영향을 발휘할 수 있다. 가장 중요하게는,  $\Psi_d$ 의 변화는 막 효소 활성을 조절하는 것으로 생각된다.
- <185> 에너지 변환
- <186> 생물학적 막에서 에너지 변환은 일반적으로 다음의 3개의 상호관계된 메커니즘을 포함한다.
- <187> 1) 레독스 에너지의 막 양성자 전기화학 구배  $\Delta \mu H^+$ 로도 불리는 막횡단 이온성 전기화학 전위로 저장된 "자유 에너지"로의 변환. 양성자 펌프를 포함한 능동 수송에 참여하는 막의 2개의 측면들 사이의 상기 양성자 전기화학 전위 차이는 때때로 화학삼투 전위 또는 양성자 구동력으로도 불린다.
- <188> 2) 포유동물 세포에서,  $(Na^+)$  이온 전기화학 구배  $\Delta \mu Na^+$ 는 세포 밖으로  $(Na^+)$ 의 능동 수송에 의해 형질막을 가로질러 유지된다. 이는 양성자 전기화학 전위와 다른 구배이지만, 포유동물 미토콘드리아 양성자 구동력  $\Delta p-mito-mam$ 로부터 산화적 인산화 동안 생산된 ATP를 통해 (펌프)로부터 생성된다.
- <189> 3) 세포 내의 요구되는 용해질 및 대사체의 동시 축적과 함께 막을 가로질러 능동 수송을 추진하도록 ATP를 생성하기 위한 상기 "자유 에너지"의 이용 (에너지 전환)은 인산화 전위  $\Delta G_p$ 로 불린다. 즉,  $\Delta G_p$ 는 ATP, ADP 및  $P_i$  농도의 임의의 주어진 세트에서 ATP 합성을 위한  $\Delta G$ 이다.
- <190> 정상-상태 막횡단 전위 ( $\Delta \Psi$ -steady)
- <191> 막 "시스템"의 상태는 그의 화학 전위 구배  $\Delta \mu H^+$  및 E (에너지)의 값이 일시적으로 독립적이고, 시스템의 가장자리를 가로질러 에너지의 흐름 (flux)이 없을 때 평형이다.  $\Delta \mu H^+$  및 E의 막 시스템 변수는 일정하지만, 시스템을 가로질러 움직이는 에너지의 순수한 흐름이 존재하면, 상기 막 시스템은 정상-상태이고, 일시적 의존성이다.
- <192> 세포 (호흡하고, 성장하고, 분할하는 세포)의 상기 일시적 의존성 정상-상태 막횡단 및/또는 미토콘드리아 전위 ( $\Delta \Psi$ -steady)에 초점을 맞춘다. 정상적인 전자 수송 및 산화적 인산화 동안 전자 및 양성자의 유동, 또는 미토콘드리아 또는 형질막을 가로지르는  $N^+/K^+$  이온의 유동의 상기 "정상-상태"는 내인성 또는 외인성 사건에 의해 방해되지 않는다면 아마도 장애에 계속될 것이다. 막 열역학의 임의의 외인성 변형은 과도-상태 막횡단 및/또는 미토콘드리아 전위  $\Delta \Psi$ -trans를 일으킬 것이고,  $\Delta \Psi$ -steady로부터  $\Delta \Psi$ -trans로의 상기 변화가 본 발명의 목적이다.
- <193> 상태 변수  $\Delta \Psi$ -steady와  $\Delta \Psi$ -trans 사이의 수학적 관계는 상태 방정식으로 불린다. 열역학에서, 상태 함수 (상태 양)는 시스템의 전류 상태에만 의존하는 특성 또는 시스템이다. 이는 시스템이 그의 특정 상태를 얻는 방식에 의존한다. 본 발명은 막의 생물에너지를 열역학적 정상-상태 조건  $\Delta \Psi$ -steady로부터 전이 상태  $\Delta \Psi$ -trans에서 에너지 스트레스 및/또는 레독스 스트레스 중 하나로 이동시키도록 일시적 의존 방식으로 막횡단 및/또는 미토콘드리아 전위  $\Delta \Psi$ 의 상태의 전이를 용이하게 한다.
- <194> 이는  $\Delta \Psi$ -steady-mam,  $\Delta \Psi$ -steady-fungi,  $\Delta \Psi$ -steady-Bact,  $\Delta \Psi$ -steady-mito-mam 및  $\Delta \Psi$ -steady-mito-fungi에서 일어날 수 있다. 이론에 매이기를 바라지 않지만, 상기 전이는 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 의 변화를 일으키는 지질 이중층의 장쇄 지방산 내의 C-H 공유 결합의 표적화된 근적외선 방사선 조사 (930 nm 파장을 사용하는), 및 막의  $\Delta \Psi$ -steady 및 레독스 전위를 동시에 변경시킬 사이토크롬 사슬의 표적화된 근적외선 방사선 조사 (870 nm의  $\lambda$ 를 사용하는)에 의해 유발되는 것으로 생각된다.

- <195> 열역학 제1 법칙 및 막
- <196> 열역학 제1 법칙 (막 시스템에 대해 진실인)의 원칙적인 측면은 격리된 시스템의 에너지가 보존되고, 열 및 일이 모두 에너지의 동등한 형태로서 간주되는 것이다. 따라서, 막 시스템의 에너지 수준 ( $\Psi_d$  및  $\Delta\Psi$ )은 주어진 거리에 걸쳐 또는 부피의 요소 내에서 각각 힘 또는 압력 작용에 의해 발휘되는 기계적 일의 증가 또는 감소; 및/또는 막 내의 온도 구배를 통해 전도된 비-파괴적인 열에 의해 변경될 수 있다.
- <197> 상기 법칙 (에너지 보존의 법칙)은 그의 주변으로부터 격리된 시스템의 총 에너지는 변하지 않는 것을 가정한다. 따라서, 시스템에 일정량의 (에너지) 열 및 일의 첨가는 시스템의 에너지의 변화로 반영되어야만 한다.
- <198> 적외선 방사선의 흡수
- <199> 적외선 방사선의 개별 광자는 자외선 방사선의 광자에서 보이는 것과 같은 전자 전이 (분자로)를 유도하기에 충분한 에너지를 함유하지 않는다 (예를 들어, 전자-볼트로 측정될 때). 그 때문에, 적외선 방사선의 흡수는 분자 결합의 가능한 진동 및 회전 상태에서 작은 에너지 차이를 갖는 화합물에 제한된다.
- <200> 정의 상, 적외선 방사선을 흡수하는 막 이중층에 있어서, 적외선 광자를 흡수하는 지질 이중층의 분자 결합 내의 진동 또는 회전은 막의 쌍극자 전위에서 순수한 변화를 일으켜야 한다. 적외선 방사선의 주파수 (파장)가 흡수하는 분자 (즉, 장쇄 지방산 내의 C-H 공유 결합)의 진동 주파수와 일치하면, 방사선은 흡수되어  $\Psi_d$ 의 변화를 일으킬 것이다. 이는  $\Psi_d$ -plas-mam,  $\Psi_d$ -mito-mam,  $\Psi_d$ -plas-fungi,  $\Psi_d$ -mito-fungi 및  $\Psi_d$ -plas-bact에서 일어날 수 있다. 즉, 본원에 기재된 방법 및 시스템을 사용하여 모든 세포 지질 이중층의 엔탈피 및 엔트로피 ( $\Delta H$  및  $\Delta S$ )의 직접적이고 표적화된 변화를 일으킬 수 있다.
- <201> 본 발명은 위에서 소개하고 부분적으로 실험 데이터로부터 유도된 통찰의 조합에 기초하고, 이는 다음의 것들을 포함한다:
- <202> 특유한 단일 파장 (870 nm 및 930 nm)이 ROS 및 독성 단일항 산소 반응의 생성 및 상호작용의 결과로서 세균 세포 (원핵생물), 예를 들어 이. 콜라이 및 (진핵생물), 예를 들어 차이니스 햄스터 난소 세포 (CHO)를 치사시킬 수 있음이 이해된다 (예를 들어, 그 전체 내용을 본원에 참조로 포함시킨 미국 특허 출원 10/649910 (2003년 8월 26일 출원)과 미국 특허 출원 10/776106 (2004년 2월 11일 출원) 참조). 상기 NIMEL 시스템을 사용하여, 개별 870 nm 및 930 nm 파장을 피하는 대신, 본 발명의 레이저 시스템 및 과정 (NIMEL 시스템)은 치료적 레이저 시스템을 위해 상기 파장의 사용을 유리하게 활용하기 위해 광 포획 (optical trap)에서 사용되는 것과 같은 공 초점 레이저 현미경에서 전형적으로 발견되는 것보다 5 로그 더 작은 전력 밀도 ( $\sim 500,000 \text{ w/cm}^2$  작은 전력)에서 파장을 조합하는 것이 확립되었다.
- <203> 이는 방사선 조사 영역 내의 모든 세포의  $\Delta\Psi$ -steady-mam,  $\Delta\Psi$ -steady-fungi,  $\Delta\Psi$ -steady-Bact,  $\Delta\Psi$ -steady-mito-mam 및  $\Delta\Psi$ -steady-mito-fungi의 변경, 조작 및 탈분극의 명확한 목적을 위해 이루어진다. 이는 본 발명에서 지질 이중층의 장쇄 지방산 내의 C-H 공유 결합의 표적화된 근적외선 방사선 조사 (930 nm 에너지를 사용하는)에 의해 달성되어, 방사선 조사 영역 내의 모든 세포의 쌍극자 전위  $\Psi_d$ -plas-mam,  $\Psi_d$ -mito-mam,  $\Psi_d$ -plas-fungi,  $\Psi_d$ -mito-fungi 및  $\Psi_d$ -plas-bact의 변화를 일으킨다. 두번째로, 사이토크롬 사슬의 근적외선 방사선 조사 (870 nm를 사용하는)은 사이토크롬을 갖는 막 (즉, 세균 형질막, 및 진균 및 포유동물 미토콘드리아)의  $\Delta\Psi$ -steady 및 레독스 전위를 추가로 변경할 것이다.
- <204> 직접적 발색단 (chromophore) (사이토크롬 및 장쇄 지방산 내의 C-H 결합)으로서 작용하여, 본 발명의 방사선 조사 경로 내의 모든 세포성 지질 이중층에 대해 막 지질 및 사이토크롬의 분자 동역학에서 직접적 엔탈피 및 엔트로피 변화가 존재할 것이다. 이는 방사선 조사된 세포 내의 모든 막에서 각각의 막 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 를 변경시키고, 동시에 막 전위  $\Delta\Psi$ 의 절대값을 변경시킬 것이다.
- <205> 상기 변화는 선형 1-광자 과정으로 NIMEL 시스템으로부터 에너지를 흡수할 때 지질 및 사이토크롬의 메탈로-단백질 반응 중심의 유의하게 증가된 분자 운동 (즉,  $\Delta S$ )을 통해 일어난다. 지질 이중층 및/또는 사이토크롬 내의 작은 열역학 이동으로도 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 를 변화시키기에 충분할 것이므로, 부착된 전자 수송 단백질 또는 막횡단 단백질의 분자 형상 (및 따라서 효소적 반응성)은 덜 기능적으로 될 것이다. 이는 방사선 조사된 세포 내의 모든 막에서  $\Delta\Psi$ 에 직접적으로 영향을 미치고 변형시킬 것이다.
- <206> NIMELS 효과는 중요하게는 세포막에 대한 열적 또는 제거적인 (ablative) 기계적 손상 없이 본원에 기재된 방법 및 시스템에 따라 일어난다. 상기 조합되고 표적화된 저용량 방식은 그렇지 않으면 에너지의 광선 경로 내의



모든 막에 실제 기계적 손상을 일으킬 기존의 방법과 구분되는 변화 및 개선이다.

<207> 막 엔트로피 및 열역학 제2 법칙

<208> 열의 다른 형태의 에너지로의 전환은 결코 완벽하지 않고, (열역학 제2 법칙에 따라) 항상 엔트로피의 증가가 동반되어야 한다. 엔트로피 (막 내의)는 반응에서 그의 변화가 (에너지) 열 입력 또는 출력 및 회합된 분자 재 배열에서의 변화로 인한 반응의 방향을 설명하는 상태 함수이다.

<209> 열 및 기계적 에너지는 그들의 기초적인 성질 (에너지의 형태로서)에서는 동등하지만, 열 에너지를 일로 전환시키는 능력에는 제한이 있고, 즉, 너무 많은 열은 막 구조물을 영구적으로 손상시키고, 양 방향에서 일 또는 유익한 에너지 변화를 방지할 수 있다.

<210> NIMELS 효과는 지질 이중층의 수준에서 방사선 조사된 세포의 엔트로피 "상태"를 일시적 의존 방식으로 변형시킬 것이다. 상기 엔트로피의 증가는 모든 방사선 조사된 막 (미토콘드리아 및 형질)의  $\Psi_d$ 을 변경시키고, 따라서 세포막을 가로지르는 전자 및 양성자의 "정상-상태" 유동을 열역학적으로 변경시킬 것이다 (도 6 및 7). 이는 다시 정상-상태 막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -steady를 과도-상태 막 전위 ( $\Delta\Psi$ -tran)로 변화시킬 것이다. 상기 현상은 다음의 것에서 일어날 것이다:

<211> 1) 포유동물 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -plas-mam;

<212> 2) 진균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -plas-fungi;

<213> 3) 세균 형질막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -plas-bact;

<214> 4) 포유동물 미토콘드리아 막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -mito-mam; 및

<215> 5) 진균 미토콘드리아 막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -mito-fungi.

<216> 이는 막 물질 특성을 변경시킬 수 있을 정도의 동역학적 무질서 (막 내에서)를 유발하는, 유동 모자이크 막 내의 장쇄 지방산의 C-H 결합의 수준에서 표적화된 엔탈피 변화의 직접적인 결과이다. 상기 유동 모자이크는 엔트로피가 증가하고, 전자 수송 단백질의 3차 및 4차 특성을 파괴할 수 있어서, 레독스 스트레스, 에너지 스트레스 및 후속적인 ROS의 생성을 유발하고, 이는 막을 더욱 손상시키고 추가로 생물에너지를 변경시킬 것이다.

<217> 호흡하는 세포의 전자 수송 시스템의 주요 기능은 정상-상태 조건 하에 에너지를 변환시키는 것이다. 본 발명에 따른 기술은 상기 변환 과정 상의 많은 관련 열역학적 상호작용을 일시적으로 기계-광학적으로 짝풀기하기 위해 사용된다. 이는 막의 양성자 전기화학 구배  $\Delta\mu H^+$  및 양성자 구동력 및  $\Delta p$ 의 절대적 정량 값을 변경시키려는 명확한 의도로 이루어질 수 있다. 상기 현상은 특히 다음의 것에서 일어날 수 있다:

<218> 1) 포유동물 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-mam);

<219> 2) 진균 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-fungi);

<220> 3) 진균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-fungi); 및

<221> 4) 세균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-Bact).

<222> 상기 현상은 다시 ATP의 인산화 및 합성에 이용가능한 Gibbs 자유 에너지 값  $\Delta G$  ( $\Delta G_p$ )을 감소시킬 수 있다. 본 발명은 필수적인 에너지 의존 동화 반응을 억제하고/하거나, 약물 요법을 강화시키고/시키거나, 세포 내성 메카니즘 (항미생물, 항진균 및 항신생물 분자에 대한)을 저하하기 위해 (많은 이들 내성 메카니즘은 이들 분자에 저항하고/하거나 배출시키기 위해 그들의 에너지 필요를 위해 양성자 구동력 또는 화학삼투 전위를 이용하므로) 이들 현상을 수행한다.

<223>  $\Delta\Psi$ -steady의 변형의 결과로서 유리 라디칼 생성

<224> 산화적 인산화 및 다른 생물에너지 작업을 위한 화학적 짝풀림제의 작용은 막 (형질 또는 미토콘드리아)의 하전 상태에 의존하는 것으로 생각된다. 또한, 세균 막 또는 진핵생물 미토콘드리아 내막의 하전 상태는 세포 호흡 및 전자 수송 동안 일어나는 1차 양성자 전좌 사건에 의해 확립되는 전기화학 양성자 구배  $\Delta\mu H^+$ 인 것으로 생각된다.

<225>  $\Delta\mu H^+$ 를 직접 소산시키는 (탈분극시키는) 물질 (예를 들어, 양성자 또는 보상 이온의 이동에 대해 커플링 막을 투과화함으로써)은 에너지 커플링을 단락시키고, 막 전위  $\Delta\Psi$ -steady의 감소를 유발함으로써 생물에너지 작업

을 억제한다. 이는 호흡 (1차 양성자 전좌)이 빠르게 계속되는 동안 일어날 것이다.

- <226> 예를 들어, 산화적 인산화의 고전적 짝폴립제인 카르보닐 시아나이드 m-클로로페닐히드라존 (CCCP)은 호흡이 계속될 때 막 전위  $\Delta\Psi$ -steady의 감소를 유도하고, ROS의 동시 생성을 유도한다. 이들 물질 (짝폴립제)은 그들의 효과가 모든 세균, 진균 및 포유동물 세포에 상응하게 독성이기 때문에 일반적으로 항미생물제, 항진균제 또는 항신생물제로서 사용될 수 없다.
- <227> 그러나, 항미생물제, 항진균제 또는 항신생물제에 내성인 많은 표적 세포에서,  $\Delta p$  짝폴립제 (CCCP와 같은)는 배출 펌프에 요구되는 에너지 구배를 붕괴시키고, 따라서 이들 약물의 세포내 축적을 크게 증가시킬 것으로 나타났다. 이들 결과는 일부 내성 메카니즘 (예를 들어, 약물 배출 펌프)이 양성자 구동력에 의해 구동되는 것을 명백하게 나타낸다. "표적 세포" 손상만을 유일하게 달성하도록 상기 효과를 이용하는 방법이 존재하면, 상기 선택도는 짝폴립제의 보편적인 손상 성질에 대한 명백한 개선이 될 것이다.
- <228> 본 발명의 과학적 발견 및 실험 데이터는 막이 광학적으로 탈분극될 때, ROS의 생성이 또한 영향을 받은 세포의 탈분극을 더욱 강화시키고, 본 발명의 항균 효과를 더욱 강화시킬 수 있음을 보여준다 (실시에 VIII 참조)
- <229> NIMELS 레이저를 사용한 방사선 조사에 의한 유리 라디칼 및 ROS 생성
- <230>  $\Delta\Psi$ -steady를 변경시키고 동시에 막 에너지 변환 과정의 많은 관련 열역학적 상호작용을 기계-광학적으로 변형 시킴으로써, 본 발명은 다음의 방사선 조사된 막의  $\Delta\mu H^+$  및  $\Delta p$ 를 저하시킴으로써 광학 짝폴립제로서 작용할 수 있다.
- <231> 1) 포유동물 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-mam);
- <232> 2) 진균 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-Fungi);
- <233> 3) 진균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-Fungi);
- <234> 4) 세균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-Bact).
- <235> 상기 저하된  $\Delta p$ 는 변경된 레독스 상태 때문에 일련의 유리 라디칼 및 라디칼 산소종이 생성되도록 할 것이다. 유리 라디칼 및 반응성 산소종의 생성은 실험적으로 입증되었고, 다음에서  $\Delta\Psi$ -steady의  $\Delta\Psi$ -trans로의 변경과 함께 본원에서 설명된다 (실시에 VIII 참조):
- <236> 1)  $\Delta\Psi$ -steady-mam + (NIMELS 처리)  $\rightarrow\rightarrow \Delta\Psi$ -trans-mam.
- <237> 2)  $\Delta\Psi$ -steady-fungi + (NIMELS 처리)  $\rightarrow\rightarrow \Delta\Psi$ -trans-fungi.
- <238> 3)  $\Delta\Psi$ -steady-bact + (NIMELS 처리)  $\rightarrow\rightarrow \Delta\Psi$ -trans-bact.
- <239> 4)  $\Delta\Psi$ -mito-fungi + (NIMELS 처리)  $\rightarrow\rightarrow \Delta\Psi$ -trans-mito-fungi.
- <240> 5)  $\Delta\Psi$ -mito-mam + (NIMELS 처리)  $\rightarrow\rightarrow \Delta\Psi$ -trans-mito-mam.
- <241>  $\Delta\Psi$ -steady + (NIMELS 처리)  $\rightarrow\rightarrow \Delta\Psi$ -trans 현상으로 인해 변경된 레독스 상태 및 유리 라디칼과 ROS의 생성은 지질 과산화와 같이 생물학적 막에 심각한 추가의 손상을 일으킬 수 있다.
- <242> 지질 과산화
- <243> 지질 과산화는 미생물 및 포유동물계에서 생물학적 세포 손상 및 사멸의 주요 원인이다. 상기 과정에서, 강한 산화제는 다불포화 지방산 (PUFA)을 함유하는 막 인지질의 파괴를 일으킨다. 막 손상의 심각성은 막 유동성의 국소적인 감소 및 이중층 완전성의 완전한 파괴를 일으킬 수 있다.
- <244> 미토콘드리아막 (포유동물 세포 및 진균)의 과산화는 ATP의 부적당한 생산 및 세포성 에너지 사이클의 붕괴를 일으키는, 호흡 사슬에 대해 불리한 결과를 일으킬 것이다. 형질막 (세균)의 과산화는 막 투과성을 해치고, 포린 (porin) 및 배출 펌프와 같은 막 단백질의 기능장애, 신호 변환의 억제 및 부적합한 세포 호흡 및 ATP 형성 (즉, 원핵생물은 미토콘드리아를 갖지 않으므로 원핵생물에서 호흡 사슬은 형질막 내에 수용된다)을 일으킬 수 있다.
- <245> 유리 라디칼
- <246> 유리 라디칼은 짝을 이루지 않은 전자를 포함하는 원자 또는 분자로서 정의된다. 유리 라디칼이 생물학적 환경에서 일으킬 수 있는 손상의 예는 탄소 중앙 유리 라디칼을 생성시킬 다불포화 지방산 (PUFA)의 비스-알릴

(bis-allylic) C-H 결합으로부터 1개의 전자 (기존의 또는 생성된 유리 라디칼을 통해) 제거를 포함한다.

<247>  $R^{\bullet} + (PUFA)-CH \text{ (비스-알릴 C-H 결합)} \rightarrow (PUFA)-C^{\bullet} + RH$

<248> 상기 반응은 생물학적 막의 지질 과산화 손상을 개시할 수 있다. 유리 라디칼은 또한 비-라디칼 분자에 첨가되어, 유리 라디칼 생성물 ( $A^{\bullet} + B \rightarrow A-B^{\bullet}$ ) 또는 비-라디칼 생성물 ( $A^{\bullet} + B \rightarrow A-B$ )을 생산할 수 있다.

<249> 그의 예는  $^{\bullet}OH$ 에 의한 방향족 화합물의 수산화일 수 있다.

<250> 반응성 산소종 (ROS)

<251> 산소 기체는 실제로 유리 라디칼 종이다. 그러나, 이는 2개의 짝을 이루지 않은 전자를 바닥 상태에서 평행 스핀을 갖는 상이한  $\pi$ -항-결합 오비탈 내에 함유하기 때문에, (스핀 제한) 규칙은 일반적으로  $O_2$ 가 촉매 없이 평행 스핀을 갖는 한 쌍의 전자를 받는 것을 방지한다. 결과적으로,  $O_2$ 는 한번에 하나의 전자를 받아야만 한다.

<252> 추가의 라디칼 종을 생성시킬, 산소의 1개의 전자 감소를 자극할 수 있는 많은 유의한 공여체가 세포 (원핵생물 및 진핵생물) 내에 존재한다.

<253> 이들은 일반적으로 다음과 같이 분류되었다:

<254> 수퍼옥시드 이온 라디칼 ( $O_2^{\bullet -}$ ).

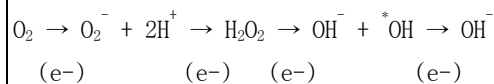
<255> 과산화수소 (비-라디칼) ( $H_2O_2$ ).

<256> 히드록실 라디칼 ( $^{\bullet}OH$ ).

<257> 히드록시 이온 ( $OH^{\bullet}$ ).

<258> 반응 연쇄는 다음과 같다:

<259>



<260> 수퍼옥시드

<261> 세포에 대한 이들 분자의 위험성은 문헌에 잘 분류되어 있다. 예를 들어, 수퍼옥시드는 산화제 또는 환원제로서 작용할 수 있다.

<262>  $NADH \rightarrow NAD^+$

<263> 유기체의 대사에 보다 중요하게, 수퍼옥시드는 사이토크롬 C를 환원시킬 수 있다. 일반적으로 지질 (즉, 막) 단백질, 및 DNA와 수퍼옥시드 ( $O_2^{\bullet -}$ )의 반응 속도는 너무 느려서 생물학적 유의성을 갖지 않는 것으로 생각된다.

양성자화 형태의 수퍼옥시드 히드رو퍼옥실 라디칼 ( $HO_2^{\bullet}$ )은 ( $O_2^{\bullet -}$ )보다 더 낮은 환원 전위를 갖지만, PUFA로부터 수소 원자를 제거할 수 있다. 또한 중요하게는, ( $HO_2^{\bullet}$ )의 pKa 값은 4.8이고, 생물학적 막 주위의 (산성) 미세 환경은 히드رو퍼옥실 라디칼의 형성에 유리할 것이다. 또한, 임의의 유리  $Fe^{+3}$ 과 수퍼옥시드 ( $O_2^{\bullet -}$ )의 반응은 "퍼페릴 (perferryl)" 중간체를 생성할 것이고, 이는 또한 PUFA와 반응하고 지질 (막) 과산화를 유도할 수 있다.

<264> 과산화수소

<265> 과산화수소 ( $H_2O_2$ )는 우수한 산화제가 아니고 (혼자서는), PUFA로부터 수소를 제거할 수 없다. 그러나 이는 생물학적 막을 (다소 쉽게) 가로지를 수 있어서, 세포의 다른 영역에서 위험하고 유해한 효과를 발휘한다. 예를 들어, ( $H_2O_2$ )는 미세세포 환경 내부의 전이 금속 (예를 들어  $Fe^{+2}$  및  $Cu^{+}$ )과 고도로 반응성이고, 이는 히드록실 라디칼 ( $^{\bullet}OH$ )을 생성할 수 있다 (펜톤 (Fenton) 반응으로도 알려짐). 히드록실 라디칼은 생물학에서 알려진 가

장 반응성 종의 하나이다.

#### <266> 히드록실 라디칼

<267> 히드록실 라디칼 ( $\cdot\text{OH}$ )은 거의 모든 종류의 생물학적 분자와 반응할 것이다. 이는 본질적으로 히드록실 라디칼 ( $\cdot\text{OH}$ ) 확산 속도 및 ( $\cdot\text{OH}$ ) 생성의 부위 가까이에서 반응할 분자의 존재 (또는 부재)에 의해 제어되는 매우 빠른 반응 속도를 갖는다. 실제로, 히드록실 라디칼 ( $\cdot\text{OH}$ )에 대한 표준 환원 전위 ( $E_0'$ )는 (+2.31 V)이고, 상기 값은 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )보다 7x 더 크고, 생물학적 관련 유리 라디칼 중에서 가장 반응성인 것으로 분류된다. 히드록실 라디칼은 단백질 및 DNA를 손상시키는데 추가로 생물학적 막에서 지질 과산화를 개시할 것이다.

#### <268> PUFA의 과산화로부터 생성된 반응성 산소종

<269> 더욱이, 지질 과산화의 발생 (임의의 공급원으로부터)은 PUFA로부터 다음과 같은 3가지 다른 반응성 산소 중간체 분자를 생성시킬 것이다:

<270> (a) 알킬 히드رو퍼옥시드 ( $\text{ROOH}$ );

<271>  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 마찬가지로, 알킬 히드رو퍼옥시드는 기술적으로 라디칼 종이 아니지만, 전이 금속, 예를 들어  $\text{Fe}^{+2}$  및  $\text{Cu}^+$ 의 존재 하에 불안정하다.

<272> (b) 알킬 퍼옥실기 ( $\text{ROO}^\cdot$ ); 및

<273> (c) 알콕실기 ( $\text{RO}^\cdot$ ).

<274> 알킬 퍼옥실기 및 알콕실기는 극도의 반응성 산소종이고, 또한 추가의 지질 과산화의 전과 과정에 기여한다. 방사선 조사된 세포의 변경된 레독스 상태 및  $\Delta\Psi$ -steady + (NIMELS 처리)  $\rightarrow \Delta\Psi$ -trans 현상으로 인한 유리 라디칼 및 ROS의 생성은 본 발명의 다른 대상이다. 이는 세포 생물에너지를 추가로 변경시키고/시키거나, 필요한 에너지 의존 동화 반응을 억제하고/하거나, 약물 요법을 강화시키고/시키거나, 항미생물, 항진균 및 항신생물 분자에 대한 세포 내성 메커니즘을 저하시키기 위한 상가적 효과이다.

<275> ROS 과다생산은 세포성 거대분자, 특히 지질을 손상시킬 수 있다. 지질 산화는 생물학적 막의 소-규모 구조적 동역학과 또한 그들의 보다 거시적인 측면 조직을 모두 변형시키고, 쌍극자 모멘트  $\Psi_d$ 의 성분의 충전 (packing) 밀도 의존 재배향을 변경시키는 것으로 나타났다. 아실 사슬 (지질 내의)의 산화적 손상은 이중 결합의 손실, 사슬 단축, 및 히드رو퍼옥시기의 도입을 유발한다. 따라서, 이들 변화는 지질 이중층의 구조적 특징과 동역학 및 쌍극자 전위  $\Psi_d$ 에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

#### <276> 항미생물제 내성

<277> 항미생물제 내성은 항미생물약 또는 분자의 효과에서 생존하는 미생물을 능력으로서 정의된다. 항미생물제 내성은 자연적으로 천연 선택을 통해, 랜덤 (random) 돌연변이를 통해, 또는 유전 공학처리를 통해 진화할 수 있다. 또한, 미생물은 플라스미드 교환과 같은 메커니즘을 통해 서로 내성 유전자를 전달할 수 있다. 미생물이 몇 개의 내성 유전자를 보유하면, 이는 다제-내성 또는 비공식적으로 "수퍼버그 (superbug)"로서 불린다.

<278> 병원성 세균 및 진균에서 다제-약물 내성은 상기 유기체로 감염된 환자의 치료에 있어서 심각한 문제이다. 현재, 인간 사용에 안전한 새로운 항미생물약을 생성하거나 개발하는 것은 매우 비싸고 어렵다. 또한, 모든 공지된 항미생물제 클래스 및 메커니즘에 도전하는 진화된 내성 돌연변이체 유기체가 존재하였다. 따라서, 장기 유효성을 유지하는 항미생물제는 거의 없었다. 항미생물약 내성의 대부분의 메커니즘은 알려져 있다.

<279> 미생물이 항미생물제에 대해 내성을 나타내는 4가지 주요 메커니즘은 다음과 같다:

<280> a) 약물 불활성화 또는 변형;

<281> b) 표적 부위의 변경;

<282> c) 대사 경로의 변경; 및

<283> d) 약물 투과성의 감소 및/또는 세포 표면 상의 능동 배출의 증가에 의한 약물 축적의 감소.

#### <284> 내성 미생물 예

- <285> 스태필로코커스 아우레우스 (에스. 아우레우스)는 현재 인간 사회를 괴롭히는 주요 내성 세균 병원체 중 하나이다. 상기 그람 양성 세균은 주로 세계 성인 인구의 절반 가까이의 점막 및 피부 상에서 발견된다. 에스. 아우레우스는 모든 공지의 클래스의 항생제로부터의 압력에 극히 적응가능하다. 에스. 아우레우스는 페니실린에 대한 내성이 1947년에 발견된 첫 번째 세균이다. 그 이래로, 메티실린 및 옥사실린에 대해 거의 완전한 내성이 발견되었다. "수퍼버그" MRSA (메티실린 내성 스태필로코커스 아우레우스)는 1961에 처음 검출되었고, 현재 세계의 병원과 지역사회 내에 편재하고 있다. 오늘날, 미국에서 모든 에스. 아우레우스 감염의 절반 이상이 페니실린, 메티실린, 테트라사이클린 및 에리트로마이신에 대해 내성이다. 최근에, 다음 새로운 클래스의 항생제 (최후 수단의 항미생물제) 당펩티드 및 옥사졸리디논에서 유의한 내성이 보고되었다 (반코마이신은 1996년 이래로, 자이복스 (Zyvox)는 2003년 이래로).
- <286> 새로운 변이체 CA-MRSA (지역사회 획득 MRSA)가 또한 최근에 유행병으로서 나타났고, 괴사 패혈증 및 괴사 근막염을 포함한 일군의 급속하게 진행되는 치명적인 질병의 원인이 되고 있다. 지역사회-연관 (CA)-MRSA 감염의 돌발발생은 교정 시설, 운동부, 군 신병, 신생아실에서 및 활동적인 동성애 남성 사이에서 매일 보고되고 있다. CA-MRSA 감염은 현재 많은 도시 지역에서 거의 풍토병인 것으로 보이고, 대부분의 CA-에스. 아우레우스 감염을 일으킨다.
- <287> 학계 및 의료계에서는 기존의 항미생물약의 강화제 및 세균 및 진균에서 약물 내성 시스템의 억제제를 찾으려고 시도하였다. 상기 강화제 및/또는 억제제는 인간에 무독성이면 병원성 및 약물-내성 미생물로 감염된 환자의 치료에 매우 유용할 것이다. 미국에서, 80% 정도로 많은 개인들이 일부 지점에서 에스. 아우레우스로 집락형성되어 있다. 대부분은 간헐적으로만 집락형성되지만, 20-30%는 지속적으로 집락형성되어 있다. 의료종사자, 당뇨가 있는 사람 및 투석을 받는 환자가 모두 높은 집락형성률을 갖는다. 앞코구멍은 성인에서 집락형성의 주된 부위이고; 다른 가능한 집락형성 부위는 겨드랑이, 직장 및 회음부를 포함한다.
- <288> 세균에서  $\Delta\Psi$ -steady의 선택적 약물학적 변경
- <289> 지질펩티드로 불리는 비교적 새로운 클래스의 살균성 항생제가 존재하고, 그 중에서 담토마이신이 처음 FDA 승인된 멤버이다. 상기 항생제는 현재 시판 중인 다른 항생제와 구분되는 작용 메커니즘을 통해 실질적으로 모든 임상 관련 그람-양성 세균 (예를 들어 MRSA)를 신속하게 치사시킬 수 있는 것으로 (시험관 내에서 및 생체 내에서) 입증되었다.
- <290> 담토마이신의 작용 메커니즘은 세균의 세포질막 내로 지질펩티드 화합물의 칼슘-의존 통합을 포함한다. 분자 수준에서, 2개의 아스파르트레이트 잔기 (담토마이신 분자 내의) 사이의 칼슘 결합이 그의 순수 음전하를 감소시키고, 그람-양성 세균의 세포질막에서 대개 발견되는 음전하를 띤 인지질과 보다 잘 작용하도록 허용한다. 일반적으로 치료 수준에서 진균 또는 포유동물 세포와의 상호작용이 없고, 따라서 이는 매우 선택적인 분자이다.
- <291> 담토마이신의 효과는 막횡단 막 전기 전위 구배  $\Delta\mu H^+$ 를 소산시키는 세균 세포질막에 대한 상기 칼슘-의존 작용으로부터 기인하는 것으로 제안되었다. 이는 단지 세균막의 선택적인 화학적 탈분극에 효력이 있다. 정확하게 하전된 세포질막의 유지가 세균 세포의 생존 및 성장에 필수적이라는 것은 잘 알려져 있지만, 그럼에도 불구하고 탈분극 (상기 방식으로)은 그 자체로 및 자연히 세균 치사 작용이 아니다. 예를 들어, 칼륨 이온의 존재 하에 탈분극을 일으키는 항생제 발리노마이신은 CCCP의 경우에서와 같이 정균성이지만 살균성이 아니다.
- <292> 이와 반대로, 그의 주요 성분이 막횡단 전기 전위 구배  $\Delta\mu H^+$ 인 양성자 구동력  $\Delta p$ 의 부재 하에, 세포는 ATP를 만들 수 없거나, 성장 및 생식을 위해 필요한 필수 영양분을 취할 수 없다.  $\Delta\mu H^+$ 의 붕괴는 담토마이신에 의해 생성된 유사하지 않은 (유해한) 효과를 설명한다 (예를 들어, 단백질, RNA, DNA, 펩티도글리칸, 리포타이코 (lipoteichoic) 산 및 지질 생합성의 억제).
- <293> 약물 담토마이신에 관한 선행 기술에 대한 추가의 연구에서는 (담토마이신에) 겐타미신 또는 미노사이클린을 첨가하면 MRSA에 대한 그의 살균 활성을 향상시키는 것으로 제안한다. 겐타미신 및 미노사이클린은 모두 에너지 의존 펌프를 통해 MRSA 세포 밖으로 배출될 수 있고, 30S 세균 리보솜의 수준에서 단백질 합성 (동화 기능)의 억제제이다. 이는 담토마이신에 의한 막횡단 전기 전위 구배  $\Delta\mu H^+$ 의 소산이 특정 항미생물약을 강화시킬 수 있음을 나타낸다. 이는 막 전위  $\Delta\Psi$ 의 감소, 및 단백질 합성의 동화 기능을 위해 ATP가 이용가능하지 않다는 사실 (즉, 동시 저하된  $\Delta Gp$ )에 의해 내성 메커니즘이 덜 유용하게 된 결과로서 일어날 것이다.
- <294> 상기 내용에 기초하여, 주어진 표적 영역에서 세포의 막 전위  $\Delta\Psi$  ( $\Delta\Psi$ -steady + (NIMELS 처리)  $\rightarrow\rightarrow\Delta\Psi$ -



trans)를 안전하게 감소시킴으로써 표적 세포 내의 약물 배출 펌프의 활성 및/또는 동화 반응을 광학적으로 억제할 수 있는 것이 명백하게 바람직할 것이다. 본 발명에 따른 방법은 임의의 외인성 화학 물질, 예를 들어 담토마이신에 무관하게 선택된 적외선 파장, 예를 들어, 870 nm 및 930 nm를 사용하여 상기 및 다른 과정을 달성한다. 이는 동일한 과정을 달성하기 위해 침투성 약물을 필요로 하는 기존의 선행 기술의 방법에 비해 명백한 개선이다.

<295> 다제약물 내성 배출 펌프

<296> 다제약물 내성 배출 펌프는 현재 그람-양성 세균, 그람-음성 세균, 진균 및 암 세포에 존재하는 것으로 알려져 있다. 배출 펌프는 일반적으로 광범위한 내성 메커니즘을 부여하는 다중-특이성의 트랜스포터 (transporter)를 갖는다. 이들은 항미생물제 내성의 다른 메커니즘, 예를 들어 항미생물제 표적의 돌연변이 또는 항미생물 분자의 효소적 변형의 효과를 강화할 수 있다. 항미생물제에 대한 능동 배출은 이트라코나졸 및 테르비나핀을 포함한 대부분의 항진균 화합물과 함께,  $\beta$ -락탐 항미생물제, 마크롤리드, 플루오로퀴놀론, 테트라사이클린 및 다른 중요한 항생제에 대해 임상적으로 관련될 수 있다.

<297> 배출 펌프 내성을 사용하여, 미생물은 항미생물제 또는 독성 화합물을 포획하여 세포의 외부 (환경)로 방출시켜, 물질의 세포내 축적을 감소시키는 능력을 갖는다. 일반적으로, 하나 이상의 이들 배출 펌프의 과다-발현은 그의 억제 활성을 위해 필요한 역치로 물질의 세포내 축적을 방지하는 것으로 간주된다. 미생물에서 보편적으로, 약물의 배출은 전기화학 전위 및/또는 이들 단백질 펌프의 필요를 위해 필요한 에너지 (ATP)를 생성하는 양성자 구동력에 연계된다. 이는 다음의 것을 포함한다:

<298> 1) 포유동물 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-mam);

<299> 2) 진균 미토콘드리아 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -mito-fungi);

<300> 3) 진균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-fungi); 및

<301> 4) 세균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-bact).

<302> 계통발생학상, 세균 항생제 배출 펌프는 5개의 슈퍼패밀리에 속한다:

<303> (i) ABC (ATP-결합 카세트), 이는 ATP 가수분해에 의해 하전된 주요 능동 트랜스포터임;

<304> (ii) SMR [DMT (약물/대사체 트랜스포터) 슈퍼패밀리의 작은 다제약물 내성 서브패밀리];

<305> (iii) MATE [MOP (다제약물/올리고당-지질/단당류 플립파제 (flippase)의 다중-항미생물제 구축 (extrusion) 서브패밀리) 슈퍼패밀리];

<306> (iv) MFS (주요 촉진인자 슈퍼패밀리); 및

<307> (v) RND (내성/근류형성 (nodulation)/분할 슈퍼패밀리), 이는 이온 구배에 의해 구동된 모든 2차 능동 트랜스포터임.

<308> 배출 펌프를 억제하기 위한 본 발명의 방식은 방사선 조사된 영역 내에서 막  $\Delta p$ 의 전반적인 변형 (광학 탈분극)으로, 전기화학 구배를 저하시키고, 이는 인산화 전위  $\Delta G_p$  및 펌프의 기능적 에너지 필요를 위해 이용가능한 에너지를 저하시킬 것이다. 동일한 광생물학적 메커니즘이 정상적인 성장을 위한 영양분의 흡수를 비롯한 표적 세포의 많은 상이한 동화 및 에너지 구동된 메커니즘을 억제하도록 하는 것이 또한 본 발명의 목적이다.

<309> 배출 펌프 에너지의 감소: 메커니즘의 구동력 표적화

<310> 오늘날, 배출 펌프 억제제로서 임상에서 사용하기 위해 개발된 "에너지-차단제 (blocker)" 패밀리의 분자에 속하는 약물은 없다. 배출 펌프의 "일반적" 억제제인 것으로 밝혀진 몇 개의 분자가 존재한다. 2개의 그러한 분자는 레세르핀 및 베라파밀이다. 이들 분자는 원래 각각 혈관 모노아민 트랜스포터의 억제제 및 막횡단 칼슘 도입의 차단제 (또는 칼슘 이온 길항제)로서 인식되었다. 베라파밀은 암 세포 및 특정 기생충에서 MDR 펌프의 억제제로서 알려져 있고, 또한 토브라마이신의 활성을 개선시킨다.

<311> 레세르핀은 MDR 배출 펌프의 기능에 요구되는 막 양성자 구동력  $\Delta p$ 의 생성을 변경시킴으로써 Bmr 및 NorA (2개의 그람-양성 배출 펌프)의 활성을 억제한다. 이들 분자는 항생제 (즉, 테트라사이클린)의 구축에 관련된 ABC 트랜스포터를 억제할 수 있지만, 세균의 배출을 차단하기 위해 필요한 농도는 인간에서 신경독성이다. 지금까지, 담토마이신을 사용한 유사한 실험의 문헌에서 언급되지 않았다. 진균 약물 배출은 주로 2개 군의 막-결합된 수송 단백질, 즉, ATP-결합 카세트 (ABC) 트랜스포터 및 주요 촉진인자 슈퍼패밀리 (MFS) 펌프에 의해 매개

된다.

<312> 세균 형질막횡단 전위  $\Delta \Psi$ -plas-bact 및 세포벽 합성

<313> 정상적인 세포 대사 동안, 양성자는 세포질막을 통해 구축되어  $\Delta \Psi$ -plas-bact를 형성한다. 상기 기능은 또한 세균 형질막 부근의 좁은 구역을 산성화시킨다 (pH를 저하시킨다). 그람 양성 세균 바실러스 섭틸리스 (*Bacillus subtilis*)에서, 양성자 전도체를 첨가함으로써 전자 수송 시스템이 차단될 때 펩티도글리칸 자가용해소 (autolysin)의 활성은 증가하는 (즉, 더 이상 억제되지 않는) 것으로 나타났다. 이는  $\Delta \Psi$ -plas-bact 및  $\mu H^+$  (세포의 효소 기능을 위한 저장 에너지에 무관하게)이 잠재적으로 세포벽 동화 기능 및 생리학에 대해 현저하고 활용가능한 영향을 갖는다는 것을 제안한다.

<314> 또한,  $\Delta \Psi$ -plas-bact 작폴립체는 펩티도글리칸 합성에 관여되는 뉴클레오티드 전구체의 축적, 및 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) (펩티도글리칸의 주요 생체중합체 중 하나)의 수송 억제와 함께 펩티도글리칸 형성을 억제하는 것으로 나타났다.

<315> 또한, 그람 양성 및 그람 음성 병원체에서  $\Delta \Psi$ -plas-bact를 감소시키는 테키플레신 (tachypleisin)으로 불리는 항미생물 화합물이 언급되었다 (그 전체를 본원에 참조로 포함시킨 미국 특허 5,610,139; Antimicrobial compositions and pharmaceutical preparations thereof). 상기 화합물은 치사량-미만 농도에서 MRSA에서 세포벽 합성 억제제  $\beta$ -락탐 항생제 암피실린을 강화시키는 능력을 갖는 것으로 나타났다. 광학적으로 저하된  $\Delta \Psi$ -plas-bact의 다수의 영향 (즉, 증가된 세포벽 자가용해, 억제된 세포벽 합성, 및 세포벽 항미생물제 강화)을 세균 세포벽을 표적으로 하는 임의의 다른 관련 항미생물제 요법에 연계시키는 것이 바람직하다. 이는 세포벽 억제성 항미생물 화합물에 대한 내성 메카니즘으로서 배출 펌프를 갖지 않는 그람 양성 세균, 예를 들어 MRSA에서 특히 관련된다.

<316> 세포벽 억제성 화합물은 세포벽에 대한 효과를 나타내기 위해, 그람 음성 세균에서 필요한 것과 같이, 그람 양성 세균에서 막을 통해 도입될 필요가 없다. 실험적 증거는 NIMELS 레이저 및 그의 동시의 광학  $\Delta \Psi$ -plas-bact 저하 현상이 MRSA에서 세포벽 억제성 항미생물제와 상승적임을 입증하였다 (실시예 XII 참조). MRSA는 펩티도글리칸 억제성 항미생물제에 대해 기능하는 배출 펌프를 갖지 않으므로, 이는 동화성 (주변세포질) ATP 연계된 기능의 억제를 통해 기능해야 하고, 효과적이기 위해 세포 내로 들어갈 필요가 없다.

<317>  $\Delta \Psi$ -plas-fungi 및  $\Delta \Psi$ -mito 진균: 정확한 세포 기능 및 항진균 내성을 위한 필수조건

<318> 정상적인 세포 대사 동안,  $\Delta \Psi$ -mito-fungi는 미토콘드리아 내에서 전자 수송 시스템을 통해 생성되고, 이어서 미토콘드리아 ATP 신타제 효소 시스템을 통해 ATP를 생성한다. 이어서, ATP는 형질막-결합  $H^+$ -ATPase에 전력을 공급하여  $\Delta \Psi$ -plas-fungi를 생성한다. 진균 미토콘드리아 ATP 신타제는 화학물질 폴리고디알 (polygodial)에 의해 용량-의존 방식으로 억제되는 것으로 이전에 밝혀졌다 (그 전체를 본원에 참조로 포함시킨 문헌 [Lunde and Kubo, Antimicrob Agents Chemother 2000 July; 44(7): 1943-1953] 참조). 세포질 ATP 농도의 상기 유도된 감소가  $\Delta \Psi$ -plas-fungi를 생성하는 형질막-결합  $H^+$ -ATPase의 억제를 일으키고, 상기 장애는 다른 세포 활성을 더욱 약화시키는 것으로 추가로 밝혀졌다. 추가로,  $\Delta \Psi$ -plas-fungi의 저하는 형질막 생물에너지 및 열역학 파괴를 유발하여, 양성자 구동력을 붕괴시키고 따라서 영양분 섭취를 억제하는 양성자의 유입을 일으킬 것이다.

<319> 더욱 중요하게는, ATP는 진균 형질막 지질 에르고스테롤의 생합성에 필요하다. 에르고스테롤은 오늘날 의약으로 사용되는 대다수의 관련 시판 항진균 화합물 (즉, 아졸, 테르비나핀 및 이트라코나졸)에 의해 표적화되는 구조적 지질이다.

<320> 연구에서는 2개의 항미생물제 펩티드 (Pep2 및 Hst5)가 ATP가 진균 세포 밖으로 배출되도록 하는 (즉, 세포내 ATP 농도를 고갈시키는) 능력을 갖고, 상기 저하된 세포질 ATP는 항진균제의 ATP-의존성 배출 펌프인 ABC 트랜스포터 CDR1 및 CDR2의 불활성화를 일으키는 것을 보여준다.

<321> 배출 펌프 억제 및 동화 반응에 대한 강화제로서, 진균에서 막을 탈분극시키고 세포성 ATP를 고갈시키기 위해 광학적 방법을 사용하는 것이 유리하다. 따라서, 필수 세포 기능, ATP 생성을 억제하고, 항진균 화합물을 강화시키기 위해  $\Delta \Psi$ -plas-fungi 및/또는  $\Delta \Psi$ -mito-fungi를 광학적으로 변경시키는 것이 바람직할 것이다.

<322> 따라서, (배출 펌프를 통한) 약물 내성을 방지하기 위한 하나의 전략은 세포내 ATP의 수준을 감소시켜, ATP-의존성 배출 펌프의 불활성화를 유도하는 것이다. 진균 병원체에서, 상기 직무를 달성하기 위해 허용되는 화학 물질은 없었다. 그러나, NIMELS 효과는 상기 목표를 광학적으로 달성하는 능력을 갖고, 실험적 증거는 진균 내

에서 NIMELS 레이저 및 현상이 항진균 화합물과 상승적임을 입증하였다 (실시에 XIII 참조).

- <323> 상기 NIMELS 효과는 세포막에 대한 열적 또는 제거적인 기계적 손상을 일으키지 않으면서 본원에 기재된 방법 및 시스템에 따라 일어날 것이다. 상기 조합되고 표적화된 저용량 방안은, 그렇지 않으면 에너지의 광선 경로 내의 모든 막에 실제 기계적 손상을 일으킬 모든 기존의 방법과는 구분되는 변화 및 개선이다.
- <324> 첫 번째 측면에서, 본 발명은 NIMELS 광선의 경로 내의 모든 막의 쌍극자 전위  $\Psi_d$  ( $\Psi_d$ -plas-mam,  $\Psi_d$ -mito-mam,  $\Psi_d$ -plas-fungi,  $\Psi_d$ -mito-fungi 및  $\Psi_d$ -plas-bact)를 변형시켜, 동일한 막에서  $\Delta\Psi$  및  $\Delta p$ 의 추가의 변경의 캐스케이드를 가동시키는 방법을 제공한다.
- <325> 모든 방사선 조사된 세포의 생물에너지 정상-상태 막 전위  $\Delta\Psi$ -steady ( $\Delta\Psi$ -steady-mam,  $\Delta\Psi$ -steady-fungi,  $\Delta\Psi$ -steady-Bact,  $\Delta\Psi$ -steady-mito-mam 및  $\Delta\Psi$ -steady-mito-fungi)는  $\Delta\Psi$ -trans 값 ( $\Delta\Psi$ -trans-mam,  $\Delta\Psi$ -trans-fungi,  $\Delta\Psi$ -trans-Bact,  $\Delta\Psi$ -trans-mito-mam 및  $\Delta\Psi$ -trans-mito-fungi)으로 변경된다. 이는 동시의 탈분극 및 모든 방사선 조사된 세포에 대한  $\Delta p$ 의 절대값 ( $\Delta p$ -mito-mam,  $\Delta p$ -mito-Fungi,  $\Delta p$ -plas-Fungi 및  $\Delta p$ -plas-Bact)에서 정량가능한 변경을 일으킨다.
- <326> 상기 현상은 표적 부위를 목적하는 파장(들), 전력 밀도 수준(들) 및/또는 에너지 밀도 수준(들)의 광 방사선으로 조사함으로써, 표적화된 생물학적 오염물 (세균 및 진균) 이외의 주어진 표적 부위 내의/부위에서 생물학적 대상 (예를 들어, 포유동물 조직, 세포 또는 특정 생화학 제제, 예를 들어 단백질 제제)에 참을 수 없는 위험 및/또는 참을 수 없는 유해 효과 없이 발생한다.
- <327> 특정 실시태양에서, 상기 적용된 광 방사선은 본원에 기재된 바와 같이 NIMELS 방사선량에서 파장이 약 850 nm 내지 약 900 nm일 수 있다. 예시적인 실시태양에서, 약 865 nm 내지 약 875 nm의 파장이 이용된다. 추가의 실시태양에서, 상기 적용된 방사선은 NIMELS 방사선량에서 파장이 약 905 nm 내지 약 945 nm일 수 있다. 특정 실시태양에서, 상기 적용된 광 방사선은 파장이 약 925 nm 내지 약 935 nm일 수 있다. 이하에 예시되는 대표적인 비-제한적 실시태양에서, 사용된 파장은 930 nm이다.
- <328> 생물에너지 정상-상태 막 전위는 아래 나타낸 바와 같이 예시적인 실시태양에서 변형될 수 있고, 각각 870 및 930 nm를 묶는 범위를 포함하는 다수의 파장 범위를 사용할 수 있다.
- <329> NIMELS 강화 크기 척도 (Potentiation Magnitude Scale; NPMS)
- <330> 앞에서 보다 상세히 논의된 바와 같이, NIMELS 파라미터는 레이저 다이오드 (diode)의 평균 단일 또는 추가 출력 전력 및 다이오드의 파장 (870 nm 및 930 nm)을 포함한다. 상기 정보는 표적 부위에서 레이저 광선(들)의 면적 (cm<sup>2</sup>), 레이저 시스템의 전력 출력 및 방사선 조사의 시간과 조합으로, 본 발명에 따른 효과적이고 안전한 방사선 조사 프로토콜을 계산하기 위해 사용될 수 있는 정보의 세트를 제공한다.
- <331> NIMELS 레이저를 사용하여 이용가능한 이들 신규한 내성 역전 및 항미생물제 강화 상호작용에 기초하여, 각각의 특유한 항미생물제 및 레이저 방사선량에 대해 유효할 "강화 효과"에 대한 정량 값이 필요하다.
- <332> NIMELS 레이저에 대한 임의의 상이한 방사선량 값 및 검사되는 주어진 항미생물제에 대한 임의의 MIC 값의 실행을 고려할 새로운 세트의 파라미터가 정의된다. 이는 NIMELS 시스템을 사용하는 임의의 주어진 실험 또는 처리 파라미터 내에서 병원성 유기체의 CFU를 정량하는 변수의 세트만을 생성함으로써 NIMELS 레이저 시스템 및 방법에 간단히 맞추어질 수 있다.
- <333> 이들 파라미터는 NIMELS 강화 크기 척도 (NPMS)로 불리는 척도를 생성하고, 전력 및/또는 처리 시간을 사용하여, 화상을 입고 손상되는 인접한 조직에 대한 안전성의 측정치를 또한 생성하면서, 내성을 역전시키고/시킴거나 항미생물제의 MIC를 강화시키는 NIMELS 레이저 고유 현상을 활용한다. NPMS 척도는 1 내지 10의 NIMELS 효과 수 (Ne)을 측정하고, 여기서 목표는 항미생물제 농도 및 NIMELS 방사선량의 임의의 안전한 조합에서 병원체의 CFU 계수의 감소에서  $\geq 4$ 의 Ne를 얻는 것이다. CFU 계수는 본원에서 병원성 유기체를 정량하기 위해 사용되지만, 다른 정량 수단, 예를 들어, 염료 검출 방법 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 방법이 A, B, 및 Np 파라미터에 대한 값을 얻기 위해 또한 사용될 수 있다.
- <334> NIMELS 효과 수 Ne는 항미생물제의 조합된 억제/평균 효과가 건강한 조직에 해를 끼치지 않으면서 병원체 표적에 대한 NIMELS 레이저와 어느 정도까지 상승적인지 나타내는 상호작용 계수이다.
- <335> NIMELS 강화 수 (Np)는 주어진 농도에서 항미생물제가 건강한 조직에 해를 끼치지 않으면서 병원체 표적에 대해 상승적인지 또는 길항적인지 나타내는 값이다. 따라서, 표준 실험 또는 처리 파라미터의 주어진 세트 내에서



- <336> ·  $A = \text{NIMELS 단독에서 병원체의 CFU 계수}$ ;
- <337> ·  $B = \text{항미생물제 단독에서 병원체의 CFU 계수}$ ;
- <338> ·  $N_p = (\text{NIMELS} + \text{항미생물제})\text{에서 병원체의 CFU 계수}$ ;
- <339> ·  $N_e = (A+B) / 2N_p$ .
- <340> NIMELS 효과 수  $N_e$ 의 해석:
- <341> 여기서,  $2N_p < A + B$ 이면, (주어진) 항미생물제는 사용된 농도 및 방사선량에서 NIMELS 레이저를 사용하여 성공적으로 강화되었다.
- <342> 다음에,  $N_e = 1$ 이면, 강화 효과가 없다.  $N_e > 1$ 이면, 강화 효과가 있다.  $N_e \geq 2$ 이면, 항미생물제에 대해 적어도 50% 강화 효과가 있다.  $N_e \geq 4$ 이면, 항미생물제에 대해 적어도 75% 강화 효과가 있다.  $N_e \geq 10$ 이면, 항미생물제에 대해 적어도 90% 강화 효과가 있다.
- <343> 샘플 계산 1:
- <344> ·  $A = 110 \text{ CFU}$ .
- <345> ·  $B = 120 \text{ CFU}$ .
- <346> ·  $N_p = 75 \text{ CFU}$ .
- <347> ·  $N_e = (110 \text{ CFU} + 120 \text{ CFU}) / 2(75) = 1.5$ .
- <348> 샘플 계산 2:
- <349> ·  $A = 150 \text{ CFU}$ .
- <350> ·  $B = 90 \text{ CFU}$ .
- <351> ·  $N_p = 30 \text{ CFU}$ .
- <352> ·  $N_e = (150 \text{ CFU} + 90 \text{ CFU}) / 2(30) = 4$ .
- <353> 일반적으로, 항미생물제는 비싸고, 대체로 계의 신장 및/또는 간 손상을 포함할 수 있는 바람직하지 않은 부작용과 연관되므로, 미생물 감염을 치료할 때 보다 저용량의 항미생물제를 사용하는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 항미생물제의 MIC를 저하시키고/시키거나 강화시키는 방법을 고안하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명은 치료되는 영역이 NIMELS 레이저 시스템으로 동시에 처리될 때 항미생물 분자의 MIC를 감소시키는 시스템 및 방법을 제공한다.
- <354> 국소화된 내성 병소 감염 (예를 들어, 피부, 당뇨병 발, 욕창)에 대해 항미생물제의 MIC가 감소되면, 이들 감염을 치료하기 위한 보다 오래되고 보다 싸고 보다 안전한 많은 항미생물제의 치료 효능이 회복될 것이다. 따라서, NIMELS 레이저의 첨가에 의해 항미생물제의 MIC를 감소시키면 (예를 들어, 하나의 측면에서  $> 1$ , 다른 측면에서  $\geq 4$ , 또 다른 측면에서  $\geq 10$ 인  $N_e$ 의 값을 생성시키면) 항생제의 일단 상실된 치료 효능을 회복하는데 있어서 긍정적인 전진을 나타낸다.
- <355> 따라서, 하나의 측면에서, 본 발명은 방사선 조사된 세포의 막 전위  $\Delta\psi$ 를 감소시킬 방사선 조사된 영역 내에서 막의 탈분극을 통해 미생물 병원체를 근절하거나 적어도 약화시키기 위해 필요한 항미생물 분자의 MIC를 감소시킬 방법 및 시스템을 제공한다. 상기 약화된  $\Delta\psi$ 는 모든 영향을 받은 막의 양성자 구동력  $\Delta p$  및 연합된 생물에너지의 제후된 약화를 일으킬 것이다. 상기 "NIMELS 효과"가 인간 숙주를 감염시켜 해를 끼치는 미생물에 대해 기존의 항미생물 분자를 강화시키는 것이 본 발명의 추가의 목적이다.
- <356> 특정 실시태양에서, 상기 적용된 광 방사선은 본원에 기재된 바와 같이 NIMELS 방사선량에서 파장이 약 850 nm 내지 약 900 nm이다. 예시적인 실시태양에서, 약 865 nm 내지 약 875 nm의 파장이 사용된다. 추가의 실시태양에서, 상기 적용된 방사선은 NIMELS 방사선량에서 파장이 약 905 nm 내지 약 945 nm이다. 특정 실시태양에서, 상기 적용된 광 방사선은 파장이 약 925 nm 내지 약 935 nm이다. 하나의 측면에서, 사용된 파장은 930 nm이다.
- <357> 본 발명에 따른 NIMELS 레이저 시스템에 의해 그들의 생물에너지 시스템이 영향을 받는 미생물 병원체는 미생물, 예를 들어, 세균, 진균, 곰팡이, 미코플라스마, 원충 및 기생충을 포함한다. 아래에 나타난 예시적인 실시태양에서는 각각 870 및 930 nm를 묶는 범위를 포함하는 다수의 파장 범위를 사용할 수 있다.

- <358> 본 발명의 하나의 측면에 따른 방법에서, 고려되는 파장 범위에 의한 방사선 조사는 독립적으로, 순차적으로, 혼합된 비로, 또는 본질적으로 동시에 수행된다 (그 모두는 펄스파 (pulsed) 및/또는 연속파 (CW) 작업을 이용할 수 있다).
- <359> 생물학적 오염물에 대한 NIMELS 방사선량에서 NIMELS 에너지를 사용하는 방사선 조사는 항미생물제의 투여 전에, 그에 후속적으로, 또는 그와 동시에 적용된다. 그러나, NIMELS 방사선량에서 상기 NIMELS 에너지는 항미생물제가 감염된 개인 또는 다른 포유동물에서 "피크 혈장 수준"에 도달된 후 투여될 수 있다. 동시-투여된 항미생물제는 내성 표적 오염물의 임의의 자연적 감수성 변이체에 대해 항미생물 활성을 가져야 함에 주목해야 한다.
- <360> 본 발명의 방법 및 시스템에 따라 방사선 조사되는 파장은 약 0.01 M 이하, 또는 약 0.001 M 이하, 또는 약 0.0005 M 이하의 항미생물제의 농도에서 오염물의 감수성을 유사한 비-내성 오염물 균주의 수준으로 증가시킨다.
- <361> 본 발명의 방법은 표적 부위 내에서 미생물 오염물의 진행을 느리게 하거나 제거하고/하거나, 오염물과 연관된 적어도 일부 증상 또는 무증상 병리 상태를 개선하고/하거나, 항미생물제에 대한 오염물의 감수성을 증가시킨다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 생물학적 대상에 대한 유해 효과 없이 생물학적 오염물이 내성을 진화시키거나 획득한 항미생물제에 대한 생물학적 오염물의 감수성을 증가시킴으로써, 표적 부위 내에서 미생물 오염물의 수준을 감소시키고/시키거나 항미생물 화합물의 활성을 강화시킨다. 미생물 오염물의 수준의 감소는 예를 들어, 처리전 수준에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 50%, 70% 이상일 수 있다. 항미생물제에 대한 생물학적 오염물의 감수성에 관하여, 감수성은 적어도 10% 강화된다.
- <362> 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 다른 측면에 따른 방법을 실행하기 위한 시스템을 제공한다. 상기 시스템은 방사선을 생성하기 위한 레이저 발진기 (oscillator), 방사선의 용량을 계산하고 제어하기 위한 제어기 (controller), 및 방사선을 적용 구역을 통해 치료 부위로 전하기 위한 전달 조립체 (시스템)를 포함한다. 적합한 전달 조립체/시스템은 중공 도파관, 광섬유 및/또는 자유 공간/광선 광 전송 성분을 포함한다. 적합한 자유 공간/광선 광 전송 성분은 조준 (collimating) 렌즈 및/또는 구경 조리개 (aperture stop)를 포함한다.
- <363> 하나의 형태에서, 시스템은 이중 파장 근적외선 광원으로서 기능하기 위해 2개 이상의 고체 상태 다이오드 레이저를 사용한다. 2개 이상의 다이오드 레이저는 통합 제어 (unified control)를 갖는 단일 하우징 내에 위치할 수 있다. 2개의 파장은 약 850 nm 내지 약 900 nm 및 약 905 nm 내지 약 945 nm의 2개의 범위에서의 방출을 포함할 수 있다. 본 발명의 레이저 발진기는 본원에 개시된 범위 중 하나에서 단일 파장 (또는 피크 값, 예를 들어 중심 파장)을 방출하도록 사용된다. 특정 실시태양에서, 상기 레이저는 실질적으로 약 865-875 nm 및 약 925-935 nm 범위 내의 방사선을 방출하도록 사용된다.
- <364> 본 발명에 따른 시스템은 제조하고자 하는 각각의 개별 파장 범위에 대해 적합한 광원을 포함할 수 있다. 예를 들어, 적합한 고체 상태의 레이저 다이오드, 가변 초단 (ultra-short) 펄스 레이저 발진기, 또는 이온-도핑된 (doped) (예를 들어, 적합한 희토류 원소를 사용하여) 광섬유 또는 섬유 레이저가 사용된다. 하나의 형태에서, 적합한 근적외선 레이저는 티탄-도핑된 사파이어를 포함한다. 다른 종류의 고체 상태, 액체 또는 기체 이득 (gain) (활성) 매질을 갖는 것을 포함한 다른 적합한 레이저원이 본 발명의 범위 내에서 사용될 수 있다.
- <365> 본 발명의 하나의 실시태양에 따라, 치료 시스템은 실질적으로 약 850 nm 내지 약 900 nm의 제1 파장 범위에서 광 방사선을 생성하도록 채용된 광 방사선 생성 시스템, 광 방사선이 적용 구역을 통해 전해지도록 하는 전달 조립체, 및 단위 면적당 전해진 방사선의 전력 밀도 및 에너지 밀도의 시간 적분 (integral)이 소정의 역치 미만이 되도록 적용 구역을 통해 전해진 방사선의 용량을 제어하기 위한 광 방사선 생성 장비에 작동가능하게 접속된 제어기를 포함한다. 또한, 특히 실질적으로 약 865 nm 내지 약 875 nm의 제1 파장 범위에서 광 방사선을 생성하도록 채용된 치료 시스템이 상기 실시태양 내에 있다.
- <366> 추가의 실시태양에 따라, 치료 시스템은 실질적으로 약 905 nm 내지 약 945 nm의 제2 파장 범위의 광 방사선을 생성하도록 형성되는 광 방사선 생성 장비를 포함하고; 특정 실시태양에서, 주목되는 제1 파장 범위는 광 방사선 생성 장비에 의해 동시에 또는 동시에/순차적으로 생산된다. 또한, 특히 약 925 nm 내지 약 935 nm의 제1 파장 범위에서 광 방사선을 생성하도록 채용된 치료 시스템이 상기 실시태양의 범위 내에 있다.
- <367> 치료 시스템은 제2 파장 범위 (및 적용되는 경우에 제1 파장 범위)의 광 방사선을 적용 구역을 통해 전하기 위한 전달 조립체 (시스템), 및 실질적으로 제1 파장 범위 또는 실질적으로 제2 파장 범위 또는 이들의 임의의 조합의 방사선을 선택적으로 생성하도록 광 방사선 생성 장비를 제어하기 위해 작동가능한 제어기를 추가로 포함

할 수 있다.

- <368> 하나의 실시태양에 따라, 전달 조립체는 의료 장비의 광 전송 범위 내의 위치에서 환자 조직 내에 삽입하기 위해 형성되고 배열된 단부를 갖는 하나 이상의 광섬유를 포함하며, 여기서 방사선은 의료 장비를 둘러싸는 조직에 NIMELS 방사선량에서 전달된다. 전달 조립체는 자유 광선 광학 시스템을 추가로 포함할 수 있다.
- <369> 추가의 실시태양에 따라, 치료 시스템의 제어기는 방사선의 용량을 제어하기 위해 전력 리미터 (limiter)를 포함한다. 제어기는 환자의 프로필을 저장하기 위한 메모리 (memory), 및 작동자 (operator)에 의해 입력된 정보에 기초하여 특정 표적 부위에 필요한 용량을 계산하기 위한 방사선량 계산기를 추가로 포함할 수 있다. 하나의 측면에서, 메모리는 또한 상이한 종류의 질병 및 치료 프로필, 예를 들어, 특정 용도와 연관된 방사선의 패턴 및 방사선의 용량에 관한 정보를 저장하기 위해 사용될 수 있다. 광 방사선은 치료 시스템으로부터 적용 부위로 상이한 패턴으로 전달될 수 있다. 방사선은 연속파 (CW) 또는 펄스파, 또는 각각의 조합으로서, 예를 들어, 단일 파장 패턴으로 또는 다중-파장 (예를 들어, 이중-파장) 패턴으로 생산되고 전달될 수 있다. 예를 들어, 2개의 파장의 방사선이 동일한 치료 부위에 다중송신되거나 (multiplexed) (광학상 조합되거나) 동시에 전해질 수 있다. 편광 광선 분리기 (splitter) (결합기 (combiner))의 사용, 및/또는 적합한 거울 및/또는 렌즈로부터 집중된 출력의 중첩, 또는 다른 적합한 다중송신/조합 기술을 포함하나 이로 제한되지 않는 적합한 광학 조합 기술이 사용될 수 있다. 별법으로, 방사선은 교대 패턴으로 전달될 수 있고, 여기서 2개의 파장의 방사선이 동일한 치료 부위에 교대로 전달된다. 2개 이상의 펄스 사이의 간격은 본 발명의 NIMELS 기술에 따라 원하는 대로 선택될 수 있다. 각각의 처리는 임의의 이들 전송 방식을 조합할 수 있다. 전달된 광 방사선의 강도 분포는 원하는 대로 선택될 수 있다.
- <370> 예시적인 실시태양은 탑-햇 (top-hat) 또는 실질적으로 탑-햇 (예를 들어, 사다리꼴 등) 강도 분포를 포함한다. 가우스 (Gaussian)와 같은 다른 강도 분포가 사용될 수 있다.
- <371> 본원에서 사용될 때, 용어 "생물학적 오염물"은 표적 부위와 직접적 또는 간접적 접촉 시에 표적 부위 (예를 들어, 환자의 감염된 조직 또는 장기) 상에 또는 표적 부위에 근접한 포유동물 (예를 들어, 수여자에게 이식된 세포, 조직 또는 장기의 경우에, 또는 환자 상에 사용되는 장비의 경우에) 상에 원치 않는 및/또는 유해한 효과 (들)을 일으킬 수 있는 오염물을 의미하는 것으로 의도된다. 본 발명에 따른 생물학적 오염물은 표적 부위에서 일반적으로 발견되는 것으로 당업자에게 알려진 미생물, 예를 들어, 세균, 진균, 곰팡이, 미코플라스마, 원충, 기생충이다.
- <372> 당업자는 본 발명의 방법 및 시스템이 당업자에게 일반적으로 공지된 다양한 생물학적 오염물과 관련하여 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 다음 목록은 전적으로 본 발명의 방법 및 장치에 따라 표적화될 수 있는 광범위한 미생물을 예시하는 목적으로 제공되고, 본 발명의 범위를 제한하려고 의도되지 않는다.
- <373> 따라서, 생물학적 오염물 (병원체)의 예시적인 비제한적인 예는 임의의 세균, 예를 들어, 에스케리치아 (*Escherichia*), 엔테로박터 (*Enterobacter*), 바실러스, 캄필로박터 (*Campylobacter*), 코리네박테리움 (*Corynebacterium*), 클렙시엘라 (*Klebsiella*), 트레포네마 (*Treponema*), 비브리오 (*Vibrio*), 스트렙토코커스 (*Streptococcus*) 및 스태필로코커스 (*Staphylococcus*)를 포함하나 이로 제한되지 않는다.
- <374> 더욱 예시하기 위해, 고려되는 생물학적 오염물은 임의의 진균, 예를 들어, 트리코피톤, 마이크로스포룸 (*Microsporium*), 에피더모파이톤 (*Epidermophyton*), 칸디다, 스코폴라리옵시스 브레비카울리스 (*Scopulariopsis brevicaulis*), 푸사리움 (*Fusarium*) 종, 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 종, 알터나리아 (*Alternaria*), 아크레모늄 (*Acremonium*), 사이탈리디늄 디미디아툼 (*Scytalidium dimidiatum*), 및 사이탈리디늄 히알리눔 (*Scytahdinium hyalinum*)을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 기생충, 예를 들어 트리파노조마 (*Trypanosoma*) 및 말라리아 기생충, 예를 들어 플라즈모디움 (*Plasmodium*) 종, 및 곰팡이; 미코플라스마 및 프리온이 또한 표적화되는 생물학적 오염물일 수 있다. 인간 면역-결핍 바이러스 및 다른 레트로바이러스, 헤르페스 바이러스, 파르보바이러스, 필로바이러스 (filovirus), 서코바이러스 (circoviruses), 파라믹소바이러스, 사이토메갈로바이러스, 간염 바이러스 (B형 간염 및 C형 간염 포함), 폭스 (pox) 바이러스, 토가 (toga) 바이러스, 엡스타인-바아 (Epstein-Barr) 바이러스 및 파르보바이러스를 포함하는 바이러스가 또한 표적화될 수 있다.
- <375> 방사선 조사할 표적 부위가 생물학적 오염물로 이미 감염될 필요가 없음이 이해될 것이다. 실제로, 본 발명의 방법은 감염 전에 "예방적으로" 사용될 수 있다. 추가의 실시태양은 의료 장비, 예를 들어 카테터 (예를 들어, IV 카테터, 중심 정맥관, 동맥 카테터, 말초 카테터, 투석 카테터, 복막 투석 카테터, 경막외 (epidural) 카테터), 인공 관절, 스텐트 (stent), 외고정 (external fixator) 핀, 흉관, 영양관 (gastronomy feeding tube) 등

에 대한 사용을 포함한다.

- <376> 특정된 경우에, 방사선 조사는 완화 목적뿐만 아니라 예방 목적일 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 감염의 증상을 치료 또는 경감시키기 위해 치료적으로 효과적인 시간 동안 조직(들)을 방사선 조사하기 위해 사용된다. 표현 "치료 또는 경감하는"은 치료를 받지 않은 개인의 증상에 비해 본 발명에 따라 치료되는 개인의 증상을 감소시키고/시키거나 예방하고/하거나 역전시키는 것을 의미한다.
- <377> 당업자는 본 발명이 임의의 미생물, 진균 및 바이러스 감염에 의해 유발되거나 연관되는 다양한 질병과 관련하여 유용함을 이해할 것이다 (그 전체를 본원에 참조로 포함시킨 문헌 [Harrison's, Principles of Internal Medicine, 13<sup>th</sup> Ed, McGraw Hill, New York (1994)] 참조). 특정 실시태양에서, 본 발명에 따른 방법 및 시스템은 공지의 항미생물제 조성물의 투여에 의해 감염을 치료하기 위해 당업계에서 이용가능한 전통적인 치료 방법 (예를 들어, 그 전체를 본원에 참조로 포함시킨 문헌 [Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed, 1990, Pergmon Press] 참조)과 병행하여 사용된다. 용어 "항미생물제 조성물", "항미생물제"는 인간을 포함한 동물에 투여되고, 미생물 감염의 증식을 억제하는 (예를 들어, 항균성, 항진균성 및 항바이러스성) 화합물 및 이들의 조합물을 나타낸다.
- <378> 고려되는 광범위한 용도는 예를 들어 몇 가지만 언급하면 다양한 피부과, 족부의학, 소아과 및 일반 의약을 포함한다. 처리되는 표적 부위와 부여된 에너지 사이의 상호작용은 과장(들); 표적 부위의 화학적 및 물리적 특성; 광선의 전력 밀도 또는 방사도 (irradiance); 연속파 (CW) 또는 펄스 방사선 조사가 사용되는지의 여부; 레이저 광선 점 (spot) 크기; 노출 시간, 에너지 밀도, 및 임의의 이들 파라미터를 사용한 레이저 방사선 조사의 결과로서 표적 부위의 물리적 특성의 임의의 변화를 포함한 많은 파라미터에 의해 정의된다. 또한, 표적 부위의 물리적 특성 (예를 들어, 흡수 및 산란 계수, 산란 비등방성 (anisotropy), 열 전도도, 열 용량, 및 기계적 강도)도 또한 전체 효과 및 결과에 영향을 미칠 수 있다.
- <379> NIMELS 방사선량은 대상 과장이 ROS를 생성하여, 표적 부위에서 생물학적 오염물의 수준을 감소시키고/시키거나 생물학적 오염물 이외의 생물학적 모이어티 (예를 들어, 포유동물 세포, 조직 또는 장기)에 대해 참을 수 없는 위험 및/또는 참을 수 없는 부작용 없이 ROS의 동시 생성과 함께  $\Delta\Psi$ 의 저하를 통해 상기 오염물이 내성을 보이는 항미생물제에 대해 생물학적 오염물의 감수성을 증가시키기 위해 오염물을 방사선 조사할 수 있는 전력 밀도 ( $W/cm^2$ ) 및 에너지 밀도 ( $J/cm^2$ ; 여기서 1 와트 = 1 줄/초) 값을 나타낸다.
- <380> 그 전체를 본원에 참조로 포함시킨 문헌 [Boulnois, 1986, Lasers Med. Sci. 1:47-66 (1986)]에서 논의된 바와 같이, 낮은 전력 밀도 (또한 방사도로 칭함) 및/또는 에너지에서, 레이저-조직 상호작용은 순수하게 광학 (광화학)으로서 설명될 수 있는 반면, 보다 높은 전력 밀도에서, 광-열 상호작용이 일어난다. 이하에 예시된 특정 실시태양에서, NIMELS 방사선량 파라미터는 외인성 약물, 염료 및/또는 발색단과 함께 광동역학 요법에 전통적으로 사용되는 영역에서 공지의 광화학 및 광-열 파라미터 사이에 놓이지만, 외인성 약물, 염료 및/또는 발색단을 필요로 하지 않으면서 광동역학 요법의 분야에서 기능할 수 있다.
- <381> 의료용 레이저 적용을 위한 에너지 밀도 (감응 (fluence), 또는 입자 또는 방사선 흐름 및 시간의 곱 (또는 적분)으로도 표현가능함)는 대개 약  $1 J/cm^2$ 에서 약  $10,000 J/cm^2$  (5 차수의 크기)로 변하는 반면, 전력 밀도 (방사도)는 약  $1 \times 10^{-3} W/cm^2$ 에서 약  $10^{12} W/cm^2$  (15 차수의 크기)로 변한다. 전력 밀도와 방사선 조사 노출 시간 사이의 역 상관관계를 고려하면, 임의의 의도된 특정한 레이저-조직 상호작용을 위해 대략 동일한 에너지 밀도가 요구되는 것을 관찰할 수 있다. 그 결과로서, 레이저 노출 지속시간 (방사선 조사 시간)은 레이저-조직 상호작용의 성질 및 안전성을 결정하는 주요 파라미터이다. 예를 들어, 생체내 조직의 열 증발 (비-체거적인)을 수학적으로 탐색하는 경우에 (문헌 [Boulnois 1986] 참조),  $1000 J/cm^2$ 의 에너지 밀도를 생성하기 위해 (표 1 참조), 임의의 다음 방사선량 파라미터를 사용할 수 있음을 알 수 있다:

표 1

<382>

불느와 (Boulnois) 표를 기초로 유도된 값의 예		
전력 밀도	시간	에너지 밀도
$1 \times 10^5 W/cm^2$	0.01 sec	$1000 J/cm^2$
$1 \times 10^4 W/cm^2$	0.10 sec	$1000 J/cm^2$
$1 \times 10^3 W/cm^2$	1.00 sec	$1000 J/cm^2$



- <383> 상기 수열은 조직 내의 생물학적 오염물에 대한 NIMELS 상호작용을 위해 사용될 수 있는 적합한 방법 또는 기본 알고리즘을 설명한다. 즉, 상기 수학적 관계는 레이저-조직 상호작용 현상을 달성하기 위해 역 상관관계이다. 상기 근본 원리는 에너지 밀도 및 시간 및 전력 파라미터에서 NIMELS 실험 데이터의 삽입과 함께 NIMELS 에너지에 의해 부여된 관찰된 항미생물 현상을 위한 방사선량 계산을 위한 기초로서 사용될 수 있다.
- <384> 방사선 조사되는 표적 부위에서 특정 상호작용에 기초하여 (예를 들어, 표적 부위의 화학적 및 물리적 특성; 연속파 (CW) 또는 펄스 방사선 조사가 사용되는지의 여부; 레이저 광선 점 크기; 임의의 이들 파라미터를 사용한 레이저 방사선 조사의 결과로서 표적 부위의 물리적 특성, 예를 들어, 흡수 및 산란 계수, 산란 비등방성, 열전도도, 열 용량, 및 기계적 강도의 임의의 변화), 당업자는 목적하는 에너지 밀도를 얻기 위해 전력 밀도 및 시간을 조정할 수 있다.
- <385> 본원에 제공된 실시예는 시험관내 및 생체내 치료 모두의 맥락에서 상기 관계를 보여준다. 따라서, 예를 들어, 직경이 1-4 cm인 점 크기에 대한 손발톱진균증 또는 감염된 상처를 치료하는 맥락에서, "변성" 및 "조직 과열" 수준보다 훨씬 미만의 수준인 안전하고 비-손상/최소 손상시키는 열 레이저-조직 상호작용 내에 놓이도록 전력 밀도 값은 약  $0.5 \text{ W/cm}^2$ 에서 약  $5 \text{ W/cm}^2$ 으로 변화였다. 다른 적합한 점 크기가 사용될 수 있다. 상기 역 상관관계에서, 이들 과장을 사용한 NIMELS 상호작용을 위해 필요한 역치 에너지 밀도는 목적하는 에너지가 전달되는 한 점 크기에 무관하게 유지될 수 있다. 예시적인 실시태양에서, 광 에너지는 균일 기하 분포를 통해 조직으로 전달된다 (예를 들어, 플랫폼 (flat-top) 또는 탑-햇 진행). 상기 기술을 사용하여, ROS를 생성하기 위해 충분한 적합한 NIMELS 방사선량 (NIMELS 효과)은 생물학적 오염물의 수준을 감소시키고/시키거나 상기 오염물이 내성을 보이는 항미생물제에 대한 생물학적 오염물의 감수성을 증가시키기 위해 요구되지만 "변성" 및 "조직 과열" 수준 미만의 역치 에너지 밀도에 도달하도록 계산될 수 있다.
- <386> 생체 내에서 미생물을 표적화하기 위해 본원에 예시된 NIMELS 방사선량 (예를 들어, 손발톱진균증)은 약 100 내지 700초 동안 약  $200 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $700 \text{ J/cm}^2$ 이다. 이들 전력 값은 광제거적 또는 광열적 (레이저/조직) 상호작용과 연관된 전력 값에 접근하지 않는다.
- <387> 조준된 레이저 광선의 강도 분포는 광선의 전력 밀도에 의해 주어지고, 레이저 출력 전력 대 에너지 내의 원의 면적 ( $\text{cm}^2$ ) 및 에너지의 공간 분포 패턴의 비로서 정의된다. 따라서, 면적  $1.77 \text{ cm}^2$ 의 입사 가우스 (Gaussian) 광선 패턴을 갖는  $1.5 \text{ cm}$  방사선 조사 점의 조명 패턴은  $1.77 \text{ cm}^2$  방사선 조사 면적 내에 적어도 6개의 상이한 전력 밀도 값을 생성할 수 있다. 이들 변하는 전력 밀도는 1 (외부 주변 상에)에서 중심점에서의 6까지의 점의 표면적에 걸쳐서 강도 (또는 전력의 농도)에서 증가시킨다. 본 발명의 특정 실시태양에서, 전통적인 레이저 광선 방출과 연관된 상기 고유한 오차를 극복하는 광선 패턴이 제공된다. NIMELS 파라미터는 다음과 같이 처리 시간 ( $T_n$ )의 함수로서 계산될 수 있다:  $T_n = \text{에너지 밀도/전력 밀도}$ .
- <388> 특정 실시태양에서 (예를 들어, 아래의 시험관내 실험 참조),  $T_n$ 은 약 50 내지 약 300초이고; 다른 실시태양에서,  $T_n$ 은 약 75 내지 약 200초이고; 또 다른 실시태양에서,  $T_n$ 은 약 100 내지 약 150초이다. 생체내 실시태양에서,  $T_n$ 은 약 100 내지 약 1200초이다.
- <389> 상기 관계 및 목적하는 광학 강도 분포, 예를 들어, 본원에 기재된 플랫폼 조명 기하학을 사용하여, 일련의 생체내 에너지 파라미터가 시험관 내에서 NIMELS 미생물 오염제거 요법을 위해 효과적인 것으로서 실험적으로 입증되었다. 따라서, 주어진 표적 부위에 대한 핵심 파라미터는 다양한 상이한 점 크기 및 전력 밀도에서 NIMELS 요법에 요구되는 에너지 밀도인 것으로 나타났다.
- <390> "NIMELS 방사선량"은 본 발명에 따른 대상 과장이 표적 부위 내의  $\Delta\Psi$ 를 광학적으로 감소시킬 수 있는 제1 역치 지점으로부터 제2 종점까지, 및/또는 생물학적 모이어터 상에 참을 수 없는 유해 위험 또는 효과가 검출되는 (예를 들어, 열 손상, 예를 들어 천공) 값 직전에 ROS의 생성을 통해 오염물이 내성을 보이는 항미생물제에 대한 생물학적 오염물의 감수성을 증가시키기까지의 전력 밀도 및/또는 에너지 밀도의 범위를 포함한다. 당업자는 특정 상황 하에 표적 부위 (예를 들어, 포유동물 세포, 조직, 또는 장기)에서 유해 효과 및/또는 위험이 본 발명의 방법에 따라 발생하는 고유한 잇점의 면에서 수용될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 고려되는 중지 지점은 유해 효과가 상당하고 따라서 바람직하지 않은 지점 (예를 들어, 세포 사멸, 단백질 변성, DNA 손상, 이환율 또는 사망률)이다.
- <391> 특정 실시태양에서, 예를 들어, 생체내 용도에 대해, 본원에서 고려되는 전력 밀도 범위는 약  $0.25$  내지 약  $40 \text{ W/cm}^2$ 이다. 다른 실시태양에서, 전력 밀도 범위는 약  $0.5 \text{ W/cm}^2$  내지 약  $25 \text{ W/cm}^2$ 이다.

- <392> 추가의 실시태양에서, 전력 밀도 범위는 약  $0.5 \text{ W/cm}^2$  내지 약  $10 \text{ W/cm}^2$ 의 값을 포함할 수 있다. 본원에서 예시되는 전력 밀도는 약  $0.5 \text{ W/cm}^2$  내지 약  $5 \text{ W/cm}^2$ 이다. 약  $1.5$  내지 약  $2.5 \text{ W/cm}^2$ 의 생체내 전력 밀도가 다양한 미생물에 대해 효과적인 것으로 나타났다.
- <393> 실험 데이터는 생체 내에서 (예를 들어, 발톱)보다는 시험관내 세팅 (예를 들어, 플레이트)에서 생물학적 오염물을 표적화할 때 더 높은 전력 밀도 값이 일반적으로 사용됨을 나타내는 것으로 보인다.
- <394> 특정 실시태양에서 (아래의 시험관내 실시예 참조), 본원에서 고려되는 에너지 밀도 범위는  $50 \text{ J/cm}^2$  초과이지만 약  $25,000 \text{ J/cm}^2$  미만이다. 다른 실시태양에서, 에너지 밀도 범위는 약  $750 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $7,000 \text{ J/cm}^2$ 이다. 또 다른 실시태양에서, 생물학적 오염물이 시험관내 세팅 (예를 들어, 플레이트) 또는 생체 내에서 (예를 들어, 발톱 또는 둘러싸는 의료 장치)에서 표적화되어야 하는지에 따라 에너지 밀도 범위는 약  $1,500 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $6,000 \text{ J/cm}^2$ 이다. 특정 실시태양에서 (아래 생체내 실시예 참조), 에너지 밀도는 약  $100 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $500 \text{ J/cm}^2$ 이다. 또 다른 생체내 실시태양에서, 에너지 밀도는 약  $175 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $300 \text{ J/cm}^2$ 이다. 또 다른 실시태양에서, 에너지 밀도는 약  $200 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $250 \text{ J/cm}^2$ 이다. 일부 실시태양에서, 에너지 밀도는 약  $300 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $700 \text{ J/cm}^2$ 이다. 일부 다른 실시태양에서, 에너지 밀도는 약  $300 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $500 \text{ J/cm}^2$ 이다. 또 다른 실시태양에서, 에너지 밀도는 약  $300 \text{ J/cm}^2$  내지 약  $450 \text{ J/cm}^2$ 이다.
- <395> 미생물 종의 다양한 시험관 내 처리를 위해 경험적으로 시험된 전력 밀도는 약  $1 \text{ W/cm}^2$  내지 약  $10 \text{ W/cm}^2$ 이다.
- <396> 당업자는 주어진 상황에 대해 본원에서 고려되는 전력 밀도 및 에너지 밀도 내에서 특히 적합한 NIMELS 방사선량 값의 확인은 일상적인 실험법을 통해 경험적으로 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 치주 치료와 함께 근적외선 에너지를 사용하는 당업자 (예를 들어, 치과의사)는 각각의 주어진 환자와 연관된 요건에 기초하여 전력 밀도 및 에너지 밀도를 일상적으로 조정한다 (예를 들어, 조직 색상, 조직 구조물 및 병원체 침입의 깊이의 함수로서 파라미터를 조정한다). 한 예로서, 밝은 색상 조직 (예를 들어, 멜라닌 결핍 환자)에서 치주 감염의 레이저 치료는 보다 어두운 조직보다 더 큰 열 안전성 파라미터를 가질 것이고, 이는 보다 어두운 조직이 근적외선 에너지를 보다 효율적으로 흡수할 것이고, 따라서 이들 근적외선 에너지를 조직 내에서 열로 보다 빠르게 전환시키기 때문이다. 따라서, 상이한 치료 프로토콜에 대한 다수의 상이한 NIMELS 방사선량 값을 확인하기 위해 당업자의 능력이 명백히 필요하다.
- <397> 아래에 예시된 바와 같이, 항생제 내성 세균은 본 발명에 따라 효과적으로 치료될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 본 발명의 방법은 전통적인 요법과 조합하거나, 그 대신에 또는 심지어 연속적으로 효과적인 치료 방안으로서 사용되어, 전통적인 방안을 증대하기 위해 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 항생제 치료와 조합될 수 있다. 용어 "항생제"는  $\beta$ -락탐, 페니실린 및 세팔로스포린, 반코마이신, 바시트라신, 마크롤리드 (에리스로마이신), 케톨리드 (텔리트로마이신, 린코사미드 (클린도마이신), 클로람페니콜, 테트라사이클린, 아미노글리코사이드 (겐타미신), 암포테리신, 아닐리노우라실, 세파졸린, 클린다마이신, 무피로신, 술폰아미드 및 트리메토프림, 리팜실린, 메트로니다졸, 퀴놀론, 노보비오신, 폴리믹신, 옥사졸리디논 클래스 (예를 들어, 리네졸리드), 글리실사이클린 (예를 들어, 티게사이클린), 시클릭 지질펩티드 (예를 들어, 담토마이신), 플루로퓨틸린 (예를 들어, 레타파몰린) 및 그라미시딘 등과 그의 임의의 염 또는 변이체를 포함하나 이로 제한되지 않는다. 테트라사이클린이 이뮤노사이클린, 클로르테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 데메클로사이클린, 메타사이클린, 독시사이클린 및 미노사이클린 등을 포함하나 이로 제한되지 않는 것도 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 이해된다. 아미노글리코사이드 항생제가 겐타미신, 아미카신 및 네오마이신 등을 포함하고 이로 제한되지 않는 것도 또한 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 이해된다.
- <398> 아래에 예시된 바와 같이, 항진균제 내성 진균은 본 발명의 방법에 따라 효과적으로 치료될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 본 발명의 방법은 전통적인 요법과 조합하거나, 그 대신에 또는 심지어 연속적으로 효과적인 치료 방안으로서 사용되어, 전통적인 방안을 증대하기 위해 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 항진균제 치료와 조합될 수 있다. 용어 "항진균제"는 폴리엔, 아졸, 이미다졸, 트리아졸, 알릴아민, 에키노칸딘, 시코피록스, 플루시토신, 그리세오폴빈, 아모롤로핀, 소다린 및 이들의 조합물 (그의 염 포함)을 포함하나 이로 제한되지 않는다.
- <399> 아래에 예시된 바와 같이, 항신생물제 내성 암은 본 발명의 방법에 따라 효과적으로 치료될 수 있는 것으로 여겨진다. 또한, 본 발명의 방법은 전통적인 요법과 조합하거나, 그 대신에 또는 심지어 연속적으로 효과적인 치료 방법으로서 사용되어, 전통적인 방안을 증대하기 위해 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명은 항신생물제 치료와 조합될 수 있다. 용어 "항신생물제"는 악티노마이신, 안트라사이클린, 블레오마이신, 플리카마이신, 미토마이신, 탁산, 에토포시드, 테니포시드 및 이들의 조합물 (그의 염 포함)을 포함하나 이로 제한

되지 않는다.

<400> 세균 및 진균에서 약물 내성 시스템의 억제제, 또는 항미생물제의 강화제를 발견하려고 시도한 선행 기술의 공통적인 원리는 항상 상기 물질이 임의의 고유한 값을 갖도록 감염된 포유동물 조직에 무독성이어야 한다는 것에 있다. 또한, 항상 항미생물제는 포유동물 숙주에 공통적인 아닌 세균 또는 진균 세포 과정에 영향을 미치고, 따라서 일반적으로 안전하고 성질 및 설계에서 치료적이라는 사실이었다. 선행 기술에서, 항미생물제, 강화제 및/또는 내성 역전 엔티티가 또한 병원체를 손상시키는 것과 동일한 방식으로 포유동물 세포에 영향을 미치면, 치료제로서 안전하게 사용될 수 없었다.

<401> 본 발명에서는, 실험 데이터 (예를 들어, 실시예 I-X 참조)가 모든 세포 종류 사이에서  $\Delta\psi$  및  $\Delta p$ 의 보편적인 변경을 지지하고, 따라서 모든 세포막의 전기-기계적 측면뿐만 아니라 전기-역학적 측면도 또한 적절하게 분리될 수 있는 다른 특성을 갖는다는 개념을 도출한다. 이는 병원성 세포 (바람직하지 않은 세포)뿐만 아니라 광선의 경로 내의 모든 세포가 탈분극으로 영향을 받는 것을 나타낸다.

<402> NIMELS 시스템의 광생물학 및 세포 에너지학 데이터가 이미 조명되었는지 (즉, 모든 막 에너지학이 원핵생물 및 진핵생물 중에 걸쳐서 동일한 방식으로 영향을 받는지) 재확인함으로써, 본 발명에 따른 기술은 항미생물 분자를 치료 계획에 추가하고 바람직하지 않은 세포에서(만) 상기 분자를 강화시킴으로써 바람직하지 않은 세포에서 독립적으로 활용되도록 상기 보편적인 광학 탈분극 효과를 이용한다. 그러한 표적화된 치료 성과는 NIMELS 레이저의 보편적인 탈분극의 효과를 활용할 수 있고, 이는 세균 및 진균에 대해서보다 치료 광선의 경로 내의 포유동물 세포에 대해 더 등급이 나누어지고 과도적일 수 있다. 따라서, 실험 데이터가 제안하는 바와 같이, 포유동물 세포의 일시적 및 에너지학상 강건도 (robustness) 측정치는 세균 또는 진균 세포에서 보이는 것보다 광학 탈분극 및 ROS 생성의 측면에서 더 커야 한다.

<403> 아래 실시예는 광생물학 및 세포 에너지학에 대한 본 발명자들의 현재의 이해 및 세포 과정에 적용된 바와 같은 열역학의 보존과 연계된 보편적인 광학 막 탈분극의 개념을 입증하는 실험적 증거를 제공한다.

## 실시예

<404> 다음 실시예는 본 발명의 예시적인 실시태양을 설명하기 위해 포함되고, 본 발명의 범위를 제한하려고 의도되지 않는다. 당업자는 특정 실시태양에서 많은 변화가 이루어질 수 있고, 본 발명의 취지와 범위로부터 벗어나지 않으면서 유사한 결과를 계속 얻을 수 있음을 이해할 것이다.

<405> 실시예 I

## 표 2

감수성, 중간반응성 및 내성 에스. 아우레우스에 대한 MIC 값				
스테필로코커스 중에 대한 최소 억제 농도 (MIC) 설명용 표준물질 ( $\mu\text{g/ml}$ )				
항미생물제	감수성	중간반응성	내성	
페니실린				
	$\leq 0.12$	-	$\geq 0.25$	
메티실린				
	$\leq 8$	-	$\geq 16$	
아미노글리코사이드				
겐타미신	$\leq 4$	8	$\geq 16$	
카나마이신	$\leq 16$	32	$\geq 64$	
마크롤리드				
에리스로마이신	$\leq 0.5$	1-4	$\geq 8$	
테트라사이클린				
테트라사이클린	$\leq 4$	8	$\geq 16$	
플루오로퀴놀론				
시프로플록사신	$\leq 1$	2	$\geq 4$	
엽산 (folate) 경로 억제제				
트리메토프림	$\leq 8$	-	$\geq 16$	
안사마이신				
리팜핀	$\leq 1$	2	$\geq 4$	

<407>

실시예 II

<408>

세균 방법: 시험관내 MRSA 실험에 대한 NIMELS 치료 파라미터

<409>

다음 파라미터는 시험관내 실험 V 및 VIII-XII을 위해 MRSA에 적용된, 본 발명에 따른 일반적인 세균 방법을 예시한다.

<410>

A. MRSA에 대한 실험 물질 및 방법:

### 표 3

<411>

CFU 계수 방법		
시간 (시)	업무	FTE (시)
T-18	배양액을 밤새 접종함 글리세롤 원액으로부터 직접 50 ml	1
T-4	스타터 (starter) 배양액 설정 LB 배지 내에 3가지 희석액 1:50, 1:125, 1:250	1
	스타터 배양액의 OD <sub>600</sub> 모니터링	4
T0	플래이팅 배양액의 제조. 오전 10:00에, OD <sub>600</sub> =1.0인 배양액을 PBS (최종 부피 50 ml) 내에 1:300으로 희석하고, RT에서 1시간 동안 저장한다. (실온은 ~25℃이어야 함)	1
T +1	24-웰 플래이트의 접종. 2 ml 분취액을 24-웰 플래이트 내의 예비-지정된 웰 내로 분배하고, NOMIR로 옮긴다.	1
T +2 내지 +8	처리된 샘플의 희석. 레이저 처리 후, 각각의 웰로부터 100 μl을 PBS 내에 1:1000의 최종 희석액으로 연속 희석한다.	4
	처리된 샘플의 플래이팅. 100 μl의 최종 희석액을 항생제와 함께 및 항생제 없이 TSB 아가 상에 5중으로 (5X) 플래이팅한다 (웰 당 10 TSB 플래이트).	2
	플래이트를 37℃에서 18-24시간 동안 인큐베이팅한다.	
T +24	각 플래이트 상의 콜로니를 계수한다.	6

<412>

이. 콜라이 및 씨. 알비칸스 시험관내 시험을 사용하는 모든 NIMELS 방사선 조사에 대해 유사한 세포 배양 및 운동학 프로토콜을 수행하였다. 따라서, 예를 들어, 씨. 알비칸스 ATCC 14053 액체 배양액을 YM 배지 (21g/L, 디프코 (Difco)) 내에서 37℃에서 성장시켰다. 표준화된 현탁액을 24-웰 조직 배양 플래이트 내의 선택된 웰 내로 분취하였다. 레이저 처리 후에, 100 μl을 각각의 웰로부터 제거하고, 1:1000으로 연속적으로 희석하여 초기 배양액의 1:5x10<sup>6</sup>의 최종 희석액을 얻었다. 각각의 최종 희석액의 분취액을 별개의 플래이트 상으로 확산시켰다. 이어서, 플래이트를 37℃에서 약 16-20시간 동안 인큐베이팅하였다. 수동 콜로니 계수를 수행하고 기록하였다.

### 표 4

<413>

ΔΨ 및 ROS 분석 방법		
시간 (시)	업무	FTE (시)
T-18	배양액을 밤새 접종함 글리세롤 원액으로부터 직접 50 ml	1
T-4	스타터 배양액 설정 LB 배지 내에 3가지 희석액 1:50, 1:125, 1:250	1
	스타터 배양액의 OD <sub>600</sub> 모니터링	4



T0	플레이팅 배양액의 제조. 오전 10:00에, OD <sub>600</sub> =1.0인 배양액을 PBS (최종 부피 50 ml) 내에 1:300으로 희석하고, RT에서 1시간 동안 저장한다. (실온은 ~25℃이어야 함)	1
T +1	분석을 위한 24-웰 플레이트의 접종. 2 ml 분취액을 24-웰 플레이트 내의 예비-지정된 웰 내로 분배하고, NOMIR로 옮긴다.	1
T +2 내지 +8	처리된 샘플의 회석. 레이저 처리 후, 각각의 대조 및 레이저 처리 샘플을 개별 분석의 지시에 따라 처리하였다.	4

<414> 다시, 이. 콜라이 및 씨. 알비칸스 시험관내 분석 시험을 사용하는 모든 NIMELS 방사선 조사에 대해 유사한 세포 배양 및 운동학 프로토콜을 수행하였다. 따라서, 예를 들어, 씨. 알비칸스 ATCC 14053 액체 배양액을 YM 배지 (21 g/L, 디프코) 내에서 37℃에서 성장시켰다. 표준화된 현탁액을 24-웰 조직 배양 플레이트 내의 선택된 웰 내로 분취하였다. 레이저 처리 후에, 각각의 레이저 처리 및 대조 샘플을 개별 분석의 지시에 따라 처리하였다.

<415> 실시예 III

<416> 포유동물 세포 방법: 시험관내 HEK293 (인간 배아 신장 세포) 실험에 대한 NIMELS 처리 파라미터

<417> 다음 파라미터는 시험관내 실험을 위해 HEK293 세포에 적용된, 본 발명에 따른 일반적인 세균 방법을 예시한다.

<418> A. HEK293 세포에 대한 실험 물질 및 방법

<419> HEK293 세포를 24-웰 플레이트의 적절한 웰 내로  $1 \times 10^5$  세포/ml의 밀도 (0.7 ml 총 부피)로 Freestyle 배지 (인비트로젠 (Invitrogen)) 내에서 접종하였다. 세포를 가습 인큐베이터 내에서 실험 전에 37℃에서 8% CO<sub>2</sub> 내에서 약 48시간 동안 인큐베이팅하였다. 세포는 대략  $3 \times 10^5$  총 세포에 동등한 실험 시간에 약 90% 융합도를 보였다. 처리 직전에, 세포를 예온된 포스페이트 완충 염수 (PBS) 내에 세척하고, 처리 동안 2 ml의 PBS를 덮었다.

<420> 레이저 처리 후, 세포를 웰로부터 기계적으로 제거하고, 15 ml 원심분리관에 옮겼다. 미토콘드리아 막 전위 및 총 글루타티온을 키트 제조자의 지시에 따라 결정하였다.

<421> 실시예 IV

<422> CRT+ (황색) 및 CRT- (백색) 에스. 아우레우스에 대한 NIMELS 시험관내 시험

<423> 본 발명자들은 crt 유전자 (황색 카로테노이드 색소)를 제거하도록 유전 공학처리된 에스. 아우레우스의 crt- (백색) 돌연변이체를 사용하여 실험을 수행하였고, 이들 돌연변이체를 야생형 (황색) 에스. 아우레우스에 대한 앞서 결정된 비-치사 용량의 NIMELS 레이저로 처리하였다. 본 실험의 목적은 NIMELS 레이저를 사용하여 라디칼 산소종 (ROS) 생성 및/또는 단일항 산소 생성의 현상에 대해 시험하기 위한 것이다. 학술 문헌에서, 류 (Liu) 등은 중성구에 대한 황색 에스. 아우레우스 (카로테노이드) 색소의 항산화 보호 활성을 시험하기 위해 이전에 유사한 모델을 사용하였다 (그 전체를 본원에 참조로 포함시킨 문헌 [Liu et al, *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity, Vol. 202, No 2, July 18, 2005, 209-215] 참고).

<424> 에스. 아우레우스 내의 금색 색상은 유기체를 단일항 산소로부터 보호할 수 있는 카로테노이드 (항산화제) 색소에 의해 부여되는 것으로 이전에 측정되었고, 상기 카로테노이드 색소를 생산하지 않는 돌연변이체가 단리될 때 (crt-), 돌연변이체 콜로니는 외관이 "백색"이고, 산화 치사에 대해 보다 감수성이고, 손상된 중성구 생존을 갖는다.

<425> 비-치사 방사선량의 NIMELS 레이저 (야생형 에스. 아우레우스에 대한)는 90%까지의 돌연변이체 "백색" 세포를 일관적으로 치사시키고, 정상적인 에스. 아우레우스를 치사시키지 않은 것으로 밝혀졌다. 에스. 아우레우스의 2개의 균주의 유일한 유전자 차이는 돌연변이체에서 항산화제 색소의 결핍이다. 상기 실험 데이터는 라디칼 산소종 및/또는 단일항 산소의 내인성 생성이 "백색" 에스. 아우레우스를 치사시킨다는 것을 강하게 시사한다.

표 5

테이타:  
D1 - D4 황색 야생형 에스. 아우레우스  
D5 - D6 백색 "crt" 돌연변이체 에스. 아우레우스

플레이트 번호	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
D1	11	1.5	720	7920	4481.793	6.224712
D2	11.5	1.5	720	8280	4685.511	6.507654
D3	12	1.5	720	8640	4889.228	6.790595
D4	12.5	1.5	720	9000	5092.946	7.073536
플레이트 번호	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
D5	11	1.5	720	7920	4481.793	6.224712
D6	11.5	1.5	720	8280	4685.511	6.507654
D7	12	1.5	720	8640	4889.228	6.790595
D8	12.5	1.5	720	9000	5092.946	7.073536

샘플 D1 - D4 황색 야생형 에스. 아우레우스.  
샘플 D5 - D6 백색 "crt-" 돌연변이체 에스. 아우레우스

표 6

에스. 아우레우스 연구 (ATCC 12600 WT & CRTM-)			
샘플	대조 CFU	레이저 처리 CFU	대조군의 %
D1	203	44	18.48
	274	55	
	291	35	
	241	46	
	268	56	
D2	270	155	46.76
	303	133	
	266	110	
	245	111	
	321	148	
D3	315	87	25.32
	344	101	
	310	100	
D4	350	71	7.21
	395	75	
	405	23	
	472	31	
	401	30	
	403	32	
D5	359	31	35.05
	530	163	
	534	194	
	520	192	
	552	194	
D6	520	188	20.00
	252	54	
	262	46	
	248	50	
	273	70	
D7	270	41	14.68
	276	40	
	169	30	
	260	38	
	259	35	
D8	296	42	1.68
	323	6	
	348	3	
	423	9	
	408	6	
	340	7	

실시예 V

- <429> MRSA, 썬. 알비칸스 및 이. 콜라이 내의  $\Delta\Psi$  변경에 대한 NIMELS 시험관내 시험
- <430> 다른 원형질 구성분의 상당한 염색 없이 15 내지 30분 내에 무손상 세포에 의해 흡수되어 무손상 세포 내에 축적될 수 있는 선택된 형광 염료가 존재한다. 막 전위의 이들 염료 표시자는 수년 동안 이용가능하였고, 세포 생리학을 연구하기 위해 사용되었다. 그들의 스펙트럼 형광 특성이 막횡단 전위  $\Delta\Psi$ -steady의 값의 변화에 반응성이므로, 이들 염료의 형광 강도는 쉽게 모니터링할 수 있다.
- <431> 이들 염료는 일반적으로 세포외 배지와 막 또는 막의 세포질 사이의 전위-의존 분배에 의해 작동한다. 이는 전압 전위와 염료 상의 이온 전하의 상호작용을 통해 염료의 재분포에 의해 일어난다. 상기 형광은 양성자단 카르보닐 시아나이드 m-클로로페닐히드라존 (CCCP)에 의해 약 5분 내에 제거될 수 있고, 이는 염료 농도의 유지가 기능적 ETS 및  $\Delta p$ 에 의해 유지되는 내부-음전하 막횡단 전위에 의존적임을 나타낸다.
- <432> 가설 시험:
- <433> 귀무 (null) 가설은  $\mu_1 - \mu_2 = 0$ 이다:
- <434>  $\mu_1$ 은 카르보시아닌 염료로 처리한 대조 세포 배양액 (레이저 없음) 내의 형광 강도이다.
- <435>  $\mu_2$ 는 NIMELS 레이저로부터 치사량-미만의 방사선량으로 예비-방사선 조사된 동일한 세포 배양액 내의 형광 강도이다.
- <436> 데이타는 세포의 형광이 NIMELS 레이저 시스템을 사용한 (세포의) 예비-처리에 의해 소산되는 (방사선 조사되지 않거나 "레이저 처리하지 않은" 세포의 대조군보다 적은) 것을 가리키고, 이는 NIMELS 레이저가 형질막을 통해 세포의 호흡 과정 및 산화적 인산화와 상호작용함을 나타낸다.
- <437>  $\mu_1 - \mu_2 = 0$ 은 세포 배양액에 대한 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사가  $\Delta\Psi$ -steady에 대한 영향을 보이지 않음을 지지할 것이다.
- <438>  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 은 세포 배양액에 대한 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사가  $\Delta\Psi$ -steady에 대해 소산 또는 탈분극 효과를 갖는다는 것을 지지할 것이다.
- <439> 물질 및 방법:
- <440> BacLight™ 세균 막 전위 키트 (B3495Q, 인비트로젠). BacLight™ 세균 막 전위 키트는 카르보시아닌 염료 DiOC2(3) (3,3'-디에틸옥사카르보시아닌 요오다이드, 성분 A) 및 CCCP (카르보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존, 성분 B)를 둘 모두 DMSO 및 1 x PBS 용액 (성분 C) 내에서 제공한다.
- <441> DiOC2(3)은 모든 세균 세포에서 초록 형광을 나타내지만, 염료 분자 자체로서 적색 방출을 향한 형광 이동은 보다 큰 막 전위에 의해 유발된 보다 높은 세포질 농도에서 연관된다. CCCP와 같은 양성자 이온운반체는 양성자 구배를 제거하여, 보다 높은 초록 형광을 유발함으로써 막 전위를 파괴한다.
- <442> MRSA에서 막 전위  $\Delta\Psi$ 의 검출
- <443> 초록 형광 방출은 치사량-미만의 방사선량에서 대조 및 레이저 처리한 샘플에 대한 집단 평균 형광 강도를 사용하여 계산하였다.

**표 6a**

MRSA 방사선량 진행				
제1 레이저 처리 절차: 870 및 930 모두				
제2 레이저 처리 절차: 930 단독				
파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)
16분 동안 4.25W에서 870 및 4.25W에서 930, 이어서	8.5	1.5	1.77	960
7분 동안 8.5W에서 930	8.5	1.5	1.77	420

- <445> 데이타는 레이저 처리한 세포가 도 8에 보이는 바와 같이 보다 적은 "초록 형광"을 가지므로  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 을 보

여준다. 이들 MRSA 샘플은 치사량-미만의 NIMELS 방사선량을 사용하여  $\Delta\Psi$ -steady-bact의  $\Delta\Psi$ -trans-bact 중 하나로의 명백한 변경 및 저하를 보였다.

씨. 알비칸스에서 막 전위  $\Delta\Psi$ 의 검출

초록 형광 방출은 아래 표 7에 나열된 치사량-미만의 방사선량에서 대조 및 레이저 처리한 샘플에 대한 집단 평균 형광 강도를 사용하여 계산하였다.

표 7

제1 레이저 처리 절차: 870 및 930 모두				
제2 레이저 처리 절차: 930 단독				
파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)
레이저 #1				
시험 (H-1) 18분 동안 4W에서 870 및 4W에서 930, 이어서	8.0	1.5	1.77	1080
시험 (H-1) 8분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	480
레이저 #2				
시험 (H-2) 18분 동안 4.25W에서 870 및 4.25W에서 930, 이어서	8.5	1.5	1.77	1080
시험 (H-2) 8분 동안 8.5W에서 930	8.5	1.5	1.77	480
레이저 #3				
시험 (H-3) 20분 동안 4W에서 870 및 4W에서 930, 이어서	8.0	1.5	1.77	1200
시험 (H-3) 10분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	600

테이타는 레이저 처리한 씨. 알비칸스 세포가 도 9에 보이는 바와 같이 보다 적은 "초록 형광"을 가지므로  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 을 보여준다. 이들 씨. 알비칸스 샘플은 증가하는 (치사량-미만) NIMELS 방사선량을 갖는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량을 사용하여  $\Delta\Psi$ -steady-fungi의  $\Delta\Psi$ -trans-fungi 중 하나로의 명백한 변경 및 저하를 보였다.

이. 콜라이에서 막 전위  $\Delta\Psi$ 의 검출

적색/초록 비는 치사량-미만의 방사선량에서 대조 및 레이저 처리한 샘플에 대한 집단 평균 형광 강도를 사용하여 계산하였다.

테이타는 레이저 처리한 세포가 도 19에 보이는 바와 같이 보다 적은 "초록 형광"을 가지므로  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 을 보여준다. 이들 이. 콜라이 샘플은 치사량-미만의 NIMELS 방사선량을 사용하여  $\Delta\Psi$ -steady-bact의  $\Delta\Psi$ -trans-bact 중 하나로의 명백한 변경 및 저하를 보였다.

실시예 VI

치사량-미만의 레이저 방사선량을 사용하여 씨. 알비칸스 내의  $\Delta\Psi$ -mito에 대한 NIMELS 시험관내 시험

가설 시험:

귀무 가설은  $\mu_1 - \mu_2 = 0$ 이다:

a)  $\mu_1$ 은 미토콘드리아 막 전위 검출 키트로 처리한 대조 세포 배양액 미토콘드리아 내의 형광 강도이다.

b)  $\mu_2$ 는 NIMELS 레이저로부터 치사량-미만의 방사선량으로 예비-방사선 조사되고 미토콘드리아 막 전위 검출 키트로 처리된 동일한 세포 배양액 내의 형광 강도이다.

테이타는 미토콘드리아의 형광이 NIMELS 레이저 시스템을 사용한 (세포의) 예비-처리에 의해 소산된 (대조 레이저 처리하지 않은 세포보다 적은) 것을 가리키고, 결과는 NIMELS 레이저가 진균 및 포유동물 세포의 미토콘드리아 내에서 세포의 호흡 과정 및 산화적 인산화와 상호작용함을 나타낸다.

$\mu_1 - \mu_2 = 0$ 은 세포 배양액 미토콘드리아에 대한 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사가  $\Delta\Psi$ -steady에 대해 영향

을 보이지 않음을 지지할 것이다.

<461>  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 은 세포 배양액에 대한 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사가  $\Delta\Psi$ -steady-mito에 대해 소산 또는 탈분극 효과를 갖는다는 것을 지지할 것이다.

<462> 물질 및 방법:

<463> 미토콘드리아 막 전위 검출 키트 (APO LOGIX JC-1) (셀 테크놀로지 인크 (Cell Technology Inc, 미국 94043 캘리포니아주 마운트뷰 스위트 D 랭스토프 애브뉴 950)).

<464> 미토콘드리아 막 전위 ( $\Delta\Psi$ )의 손실은 세포자멸을 증명하는 지표이다. APO LOGIX JC-1 분석 키트는 세포에서 미토콘드리아 막 전위를 측정한다.

<465> 비-세포자멸 세포에서, JC-1 (5,5',6,6'-테트라클로로-1,1',3,3'-테트라에틸벤즈이미다졸릴카르보시아닌 요오다이드)는 세포질 (초록) 내에 단량체로서 존재하고, 또한 적색으로 착색되는 미토콘드리아 내에 응집체로서 축적된다. 그 반면에, 세포자멸 및 괴사 세포에서, JC-1은 단량체 형태로 존재하고, 세포질을 초록색으로 착색시킨다.

## 표 8

칸디다 알비칸스 방사선량 표					
제1 레이저 처리 절차: 870 및 930 모두					
제2 레이저 처리 절차: 930 단독					
시험	파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)
칸디다 미토 1	시험 (H-3) 16분 동안 4.25W에서 870 및 4.25W에서 930, 이어서	8.5	1.5	1.77	960
	시험 (H-3) 10분 동안 8.5W에서 930	8.5	1.5	1.77	600

<467> (APO LOGIX JC-1) 키트는 초록 형광의 적색 형광으로의 전환에 의해 막 전위를 측정한다. 도 10A에서, 적색 색상의 외관을 측정하고 플로팅하였고, 이는 무손상 막을 갖는 세포에서만 일어날 것이고, 초록 대 적색의 비를 대조 및 레이저 처리한 샘플 모두에 대해 도 10B에 도시한다.

<468> 명백하게 본 시험에서, 적색 형광은 레이저 처리한 샘플에서 감소한 한편, 초록 대 적색의 비는 증가하여, 탈분극을 나타낸다. 이들 결과는 막횡단  $\Delta\Psi$  시험과 동일하다 (즉, 두 데이터는 탈분극을 보여준다).

<469> 이들 결과는 또한  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 이고, 세포 미토콘드리아에 대한 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사가  $\Delta\Psi$ -steady-mito에 대해 소산 또는 탈분극 효과를 갖는다는 것을 보여주고, 이는 칸디다 알비칸스  $\Delta\Psi$ -steady-mito-fungi의  $\Delta\Psi$ -trans-mito-fungi로의 명백한 감소를 나타낸다.

## <470> 실시예 VII

<471> 치사량-미만의 레이저 방사선량을 사용하는  $\Delta\Psi$ -mito 인간 배아 신장 세포에 대한 NIMELS 시험관내 시험

<472> 가설 시험:

<473> 귀무 가설은  $\mu_1 - \mu_2 = 0$ 이다:

<474> a)  $\mu_1$ 은 미토콘드리아 막 전위 검출 키트로 처리한 포유동물 대조 세포 배양액 미토콘드리아 (레이저 없음) 내의 형광 강도이다.

<475> b)  $\mu_2$ 는 NIMELS 레이저로부터 치사량-미만의 방사선량으로 예비-방사선 조사되고 미토콘드리아 막 전위 검출 키트로 처리된 동일한 포유동물 세포 배양액 내의 형광 강도이다.

<476> 데이터는 미토콘드리아의 형광이 NIMELS 레이저 시스템을 사용한 (세포의) 예비-처리에 의해 소산된 (대조 레이저 처리하지 않은 세포보다 적은) 것을 가리키고, 결과는 NIMELS 레이저가 포유동물 세포의 미토콘드리아 내에서 세포의 호흡 과정 및 산화적 인산화와 상호작용함을 나타낸다.

<477>  $\mu_1 - \mu_2 = 0$ 은 포유동물 세포 배양액 미토콘드리아에 대한 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사가  $\Delta\Psi$ -steady-



mito-mam에 대해 영향을 보이지 않음을 지지할 것이다.

<478>  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 은 포유동물 세포 배양액에 대한 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사가  $\Delta\Psi$ -steady-mito-mam에 대해 소산 또는 탈분극 효과를 갖는다는 것을 지지할 것이다.

<479> 물질 및 방법:

<480> 미토콘드리아 막 전위 검출 키트 (APO LOGIX JC-1) (셀 테크놀로지 인크; 미국 94043 캘리포니아주 마운틴뷰 950 랭스토프 애비뉴 스위트 D).

<481> 미토콘드리아 막 전위 ( $\Delta\Psi$ )의 손실은 세포자멸을 증명하는 지표이다. APO LOGIX JC-1 분석 키트는 세포에서 미토콘드리아 막 전위를 측정한다.

<482> 비-세포자멸 세포에서, JC-1 (5,5',6,6'-테트라클로로-1,1',3,3'-테트라에틸벤즈이미다졸릴카르보시아닌 요오다이드)는 세포질 (초록) 내에 단량체로서 존재하고, 또한 적색으로 착색되는 미토콘드리아 내에 응집체로서 축적된다. 그 반면에, 세포자멸 및 괴사 세포에서, JC-1은 단량체 형태로 존재하고, 세포질을 초록색으로 착색시킨다.

## 표 9

포유동물 세포 방사선량				
제1 레이저 처리 절차: 870 및 930 모두				
제2 레이저 처리 절차: 930 단독				
파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)
시험 (H-2) 18분 동안 4.25W에서 870 및 4.25W에서 930, 이어서	8.5	1.5	1.77	1080
시험 (H-2) 10분 동안 8.5W에서 930	8.5	1.5	1.77	600

<484> HEK-293 (인간 배아 신장 세포)  $\Delta\Psi$ -mito 시험:

<485> (APO LOGIX JC-1) 키트는 초록 형광의 적색 형광으로의 전환에 의해 막 전위를 측정한다. 도 11A에서, 적색 색상의 외관을 측정하고 플로팅하였고, 이는 무손상 막을 갖는 세포에서만 일어날 것이고, 초록 대 적색의 비를 대조 및 레이저 처리한 샘플 모두에 대해 도 11B에 도시한다.

<486> 명백하게 본 시험에서, 적색 형광은 레이저 처리한 샘플에서 감소한 한편, 초록 대 적색의 비는 증가하여, 탈분극을 나타낸다. 이들 결과는  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 이고, 포유동물 세포 미토콘드리아에 대한 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사가  $\Delta\Psi$ -steady-mito-mam에 대해 소산 또는 탈분극 효과를 갖는다는 것을 보여주고, 이는 포유동물  $\Delta\Psi$ -steady-mito-mam의  $\Delta\Psi$ -trans-mito-mam로의 명백한 감소를 나타낸다.

<487> 실시예 VIII

<488> 반응성 산소종 (ROS)에 대한 NIMELS 시험관내 시험

<489> 상기 선행 실시예에서  $\Delta\Psi$  시험에 사용된 것에 상응하는 치사량-미만의 레이저 방사선량을 사용한 세균 막형단  $\Delta\Psi$ -steady-bact의  $\Delta\Psi$ -trans-bact로의,  $\Delta\Psi$ -steady-mito-fungi의  $\Delta\Psi$ -trans-mito-fungi로의, 및  $\Delta\Psi$ -steady-mito-mam의  $\Delta\Psi$ -trans-mito-mam로의 레이저 변경 후에, 반응성 산소종 (ROS)의 생성에 대한 상기 시험관내 시험을 수행하였다.

<490> 물질 및 방법:

<491> 총 글루타티온 정량 키트 (도진도 레보라토리스 (Dojindo Laboratories, 일본 구마모토 861-2202 가미카시키키-군 마시키키-마치 2025-5 타바루 구마모토 테크노 리서치 파크).

<492> 글루타티온 (GSH)은 동물 조직, 식물 조직, 세균 및 효모 내의 가장 풍부한 티올 (SH) 화합물이다. GSH는 반응성 산소종에 대한 보호 및 단백질 SH기의 유지와 같은 많은 상이한 역할을 할 수 있다. 이들 반응 동안, GSH는 글루타티온 디설피드 (GSSG: GSH의 산화된 형태)로 전환된다. GSSG는 글루타티온 환원효소에 의해 효소적으로 환원되므로, GSH가 유기체 내에서 우세한 형태이다. 엘만 (Ellman) 시약으로 알려진 DTNB (5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산))는 티올 화합물의 검출을 위해 개발되었다. 1985에, DTNB 및 글루타티온 환원효소에 의한 글루

타티온 순환 시스템이 고도로 민감한 글루타티온 검출 방법을 생성하는 것으로 제안되었다. DTNB 및 글루타티온 (GSH)은 반응하여 2-니트로-5-티오벤조산 및 글루타티온 디설피드 (GSSG)를 생성시킨다. 2-니트로-5-티오벤조산은 황색 생성물이므로, 샘플 용액 내의 GSH 농도는 412 nm에서 흡광도 측정치에 의해 결정될 수 있다. GSH는 GSSG로부터 글루타티온 환원효소에 의해 생성되고, DTNB와 다시 반응하여 2-니트로-5-티오벤조산을 생산한다. 따라서, 상기 순환 반응은 총 글루타티온 검출의 감수성을 개선시킨다.

- <493> 유의한 농도에서, ROS는 글루타티온 항산화 시스템의 성분 (카탈라제, 퍼옥시다제, GSH)에 의해 그의 환원 속도를 초과하는 속도에서 표적과 급속하게 특이적으로 반응할 것이다.
- <494>  $\Delta \Psi$ -steady-bact를  $\Delta \Psi$ -trans-bact 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 MRSA 내의 글루타티온의 검출
- <495> 도 12에 도시된 결과는  $\Delta \Psi$ -steady-bact를  $\Delta \Psi$ -trans-bact 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 MRSA 내의 총 글루타티온의 감소를 명백하게 보여주고, 이는 막횡단  $\Delta \Psi$ -steady-bact의  $\Delta \Psi$ -trans-bact 중 하나로의 치사량-미만 변경을 갖는 ROS의 생성의 증거이다.
- <496> 막횡단  $\Delta \Psi$ -steady를  $\Delta \Psi$ -trans 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 이. 콜라이 내의 글루타티온의 검출
- <497> 도 20에 도시된 결과는  $\Delta \Psi$ -steady-bact를  $\Delta \Psi$ -trans-bact 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 이. 콜라이 내의 총 글루타티온의 감소를 명백하게 보여주고, 이는 막횡단  $\Delta \Psi$ -steady-bact의  $\Delta \Psi$ -trans-bact 중 하나로의 치사량-미만 변경을 갖는 ROS의 생성의 증거이다.
- <498>  $\Delta \Psi$ -steady-mito-fungi를  $\Delta \Psi$ -trans-mito-fungi로, 후속적으로  $\Delta \Psi$ -steady-fungi를  $\Delta \Psi$ -trans-fungi 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS에서 씨. 알비칸스 내의 글루타티온의 검출
- <499>  $\Delta \Psi$ -steady-mito-fungi를  $\Delta \Psi$ -trans-mito-fungi로, 후속적으로  $\Delta \Psi$ -steady-fungi를  $\Delta \Psi$ -trans-fungi 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 씨. 알비칸스 내의 글루타티온의 검출
- <500> 도 13에 도시된 결과는  $\Delta \Psi$ -steady-mito-fungi를  $\Delta \Psi$ -trans-mito-fungi로, 후속적으로  $\Delta \Psi$ -steady-fungi를  $\Delta \Psi$ -trans-fungi 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 씨. 알비칸스 내의 총 글루타티온의 감소를 명백하게 보여주고, 이는 막횡단  $\Delta \Psi$ -steady-mito-fungi의  $\Delta \Psi$ -trans-mito-fungi로, 후속적으로  $\Delta \Psi$ -steady-fungi의  $\Delta \Psi$ -trans-fungi 중 하나로의 치사량-미만 변경을 갖는 ROS의 생성의 증거이다.
- <501>  $\Delta \Psi$ -steady-mito-mam을  $\Delta \Psi$ -trans-mito-mam으로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 HEK 293 (인간 배아 신장 세포) 내의 글루타티온의 검출
- <502> 도 14에 도시된 결과는  $\Delta \Psi$ -steady-mito-mam을  $\Delta \Psi$ -trans-mito-mam로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 HEK-293 (인간 배아 신장 세포) 내의 총 글루타티온의 감소를 명백하게 보여주고, 이는 막횡단  $\Delta \Psi$ -steady-mito-mam의  $\Delta \Psi$ -trans-mito-mam으로의 NIMELS-매개된 치사량-미만 변경을 갖는 ROS의 생성의 증거이다.
- <503> 실시예 IX
- <504> 에리쓰로마이신 및 트리메토프림과 함께 MRSA에 대한 치사량-미만 용량의 NIMELS 레이저의 영향 평가
- <505> 본 실시예에서, 치사량-미만 용량의 NIMEL 레이저가 항생제 에리쓰로마이신의 효과를 MRSA에서 항생제 트리메토프림보다 더 강화시킬 것인지를 결정하였다. 배출 펌프는 에리쓰로마이신 내성에서 주요 인자로서 역할을 한다. 그람 양성 에스. 아우레우스에서 트리메토프림 배출 펌프 내성 메카니즘은 보고되지 않았다.
- <506> 배경: 에리쓰로마이신은  $\beta$ -락탐 페니실린과 매우 유사한 항균 작용 범위를 갖는 마크롤리드 항생제이다. 과거에, 이는 피부 및 기도에 영향을 미치는 매우 다양한 그람-양성 세균 감염의 치료에 효과적이었고, 사용하기에 가장 안전한 항생제 중 하나로 간주되었다. 과거에, 에리쓰로마이신은 페니실린에 알레르기가 있는 사람들에게 사용되었다. 에리쓰로마이신의 작용 메카니즘은 세균 단백질 합성을 차단함으로써 세균의 성장 및 복제를 방지하는 것이다. 이는 에리쓰로마이신이 세균 리보솜의 50S 내의 23S rRNA 분자에 결합하여, 성장하는 펩티드 사슬의 배출을 차단하여, 펩티드의 전좌를 억제함으로써 달성된다. 에리쓰로마이신 내성 (다른 마크롤리드에서와 같이)은 만연하고 널리 확산되어 있고, 2가지 유의한 내성 시스템을 통해 달성된다:
- <507> A) 불감성이도록 50S 리보솜 서브유닛 내의 23S rRNA의 변형.

- <508> B) 세포 밖으로 약물의 배출.
- <509> 트리메토프림은 요로 감염의 치료에 역사적으로 사용된 항생제이다. 이는 디히드로엽산 환원효소 억제제로서 알려진 항미생물제의 클래스의 멤버이다. 트리메토프림은 디히드로엽산의 유사체이므로, 트리메토프림의 작용 메카니즘은 세균 디히드로엽산 환원효소 (DHFR)의 시스템을 저해하는 것이다. 이는 효소에 대한 천연 기질보다 1000배 더 큰 친화도로 인해 DHFR의 경쟁적 억제를 유발한다.
- <510> 따라서, 트리메토프림은 분자 테트라히드로엽산의 합성을 억제한다. 테트라히드로엽산은 DNA 뉴클레오티드 티미딜레이트의 드 노보 (de novo) 합성에서 필수 전구체이다. 세균은 환경 (즉, 감염 숙주)으로부터 엽산을 취할 수 없고, 따라서 그들 자신의 테트라히드로엽산의 드 노보 합성에 의존성이다. 효소의 억제는 궁극적으로 DNA 복제를 방지한다.
- <511> 트리메토프림 내성은 일반적으로 정상 염색체 DHFR, 또는 약물 내성 DHFR 효소의 과다생산으로 인해 발생한다. 트리메토프림 내성 에스. 아우레우스에 대한 보고 문헌은 내성이 염색체적으로 매개된 종류이거나, 큰 플라스미드 상에 코딩되는 것을 보여주었다. 일부 균주는 염색체 및 플라스미드-매개된 트리메토프림 내성을 모두 나타내는 것으로 보고되었다. 그람 양성 병원체 에스. 아우레우스에서, 트리메토프림에 대한 내성은 유전자 돌연변이로 인한 것이고, 트리메토프림이 세포 밖으로 능동적으로 배출되는 것은 보고되지 않았다.
- <512> 세균 내의 배출 펌프
- <513> 세균 및 진균에서 약물 내성의 주요 경로는 세포의 세포질 내에서 치료 농도가 달성되지 않도록 세포 밖으로 항생제의 능동 이출 (배출)이다.
- <514> 항생제 (및 다른 유해한 분자)의 능동 배출은 그람 양성 세균의 세포질막 및 그람 음성 세균의 외막 내의 일련의 막횡단 단백질에 의해 매개된다.
- <515> 임상에서, 배출 펌프를 통해 매개되는 항생제 내성은 마크롤리드, 테트라사이클린 및 플루오로퀴놀론에 대한 그람 양성 세균에서 가장 관련된다. 그람 음성 세균에서,  $\beta$ -락탐 배출 매개된 내성도 임상적으로 관련성이 높다.
- <516> 가설 시험:
- <517> 귀무 가설은  $\mu_1 - \mu_2 = 0$  및  $\mu_1 - \mu_3 = 0$ 이다:
- <518> a)  $\mu_1$ 은 대조군으로서 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 치사량-미만의 방사선량이고;
- <519> b)  $\mu_2$ 는 유효 수준 바로 미만의 내성 MIC에서 트리메토프림을 첨가한 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 동일한 치사량-미만의 방사선량이고;
- <520> c)  $\mu_3$ 은 유효 수준 바로 미만의 내성 MIC에서 에리쓰로마이신을 첨가한 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 동일한 치사량-미만의 방사선량이다.
- <521> 데이터는 항생제 트리메토프림 또는 에리쓰로마이신의 첨가가 치사량-미만의 방사선 조사 후에 다음과 같이 이들 MRSA 콜로니의 성장을 감소시킴을 보여준다:
- <522>  $\mu_1 - \mu_2 = 0$ 은 트리메토프림의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타내지 않음을 지지할 것이다.
- <523>  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 은 트리메토프림의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타냄을 지지할 것이다.
- <524>  $\mu_1 - \mu_3 = 0$ 은 에리쓰로마이신의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타내지 않음을 지지할 것이다.
- <525>  $\mu_1 - \mu_3 > 0$ 은 에리쓰로마이신의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타냄을 지지할 것이다.

표 10

실험				대조 (레이저 없음)			
		트리메토프림	에리스로마이신			트리메토프림	에리스로마이신
	아가	2 ug/ml	4 ug/ml		아가	2 ug/ml	4 ug/ml
B-4 1	84	110	39	B-4 1	180	213	196
B-4 2	88	125	35	B-4 2	230	198	168
B-4 3	120	138	39	B-4 3	241	240	175
B-4 4	114	115	28	B-4 4	220	220	177
B-4 5	117	100	27	B-4 5	웨손됨	145	195

결과:

본 실험은 NIMELS 시스템을 사용한 치사량-미만의 레이저 파라미터 하에서,  $\mu_1 - \mu_2 = 0$  및  $\mu_1 - \mu_3 \geq 0$ 임을 명백하게 보여주었다. 이는 배출 펌프가 억제되고, 에리스로마이신에 대한 내성이 MRSA의  $\Delta \Psi$ -steady-bact에 대한 NIMELS 효과에 의해 역전되는 것을 가리킨다.

실시예 X

테트라사이클린 및 리팜핀과 함께 MRSA에 대한 치사량-미만 용량의 NIMELS 레이저의 영향 평가

본 실험의 목적은 치사량-미만 용량의 NIMEL 레이저가 항생제 테트라사이클린의 효과를 MRSA에서 항생제 리팜핀보다 더 강화시킬 것인지 관찰하기 위한 것이다. 배출 펌프는 잘 연구되어 있고, 테트라사이클린 내성에서 주요 인자로서 기능한다. 그러나, 그람 양성 에스. 아우레우스에서 리팜핀 배출 펌프 내성 메커니즘은 보고되지 않았다.

본 실험은 또한 앞서 에리스로마이신 및 트리메토프림을 사용하여 실행하였고, 데이터는 NIMELS 효과가 에리스로마이신에 대한 배출 펌프 내성 메커니즘을 손상시킬 수 있음을 나타낸다.

테트라사이클린:

테트라사이클린은 정균성 항생제로서 간주되고, 이는 단백질 합성을 억제함으로써 세균의 성장을 방해하는 것을 의미한다. 테트라사이클린은 효소 아미노아실-tRNA의 결합을 통해 세균 30S 리보솜의 작용을 억제함으로써 이를 달성한다. 테트라사이클린 내성은 종종 테트라사이클린의 에너지-의존성 배출을 코딩하거나 테트라사이클린의 작용으로부터 세균 리보솜을 보호하는 단백질을 코딩하는 새로운 유전자의 획득 때문이다.

리팜핀:

리팜핀은 세균 RNA 합성효소 억제제이고, RNA의 연장을 직접 차단함으로써 기능한다. 리팜피신은 미코세균 감염을 치료하기 위해 일반적으로 사용되지만, 또한 푸시딘산 (정균성 단백질 합성 억제제)과 조합되어 메티실린-내성 스타필로코커스 아우레우스 (MRSA)의 치료에서도 효과를 보인다. MRSA에서 배출 펌프를 통한 리팜핀 내성은 보고되지 않았다.

가설:

귀무 가설은  $\mu_1 - \mu_2 = 0$  및  $\mu_1 - \mu_3 = 0$ 이다:

a)  $\mu_1$ 은 대조군으로서 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 치사량-미만의 방사선량이고;

b)  $\mu_2$ 는 유효 수준 바로 미만의 내성 MIC에서 테트라사이클린을 첨가한 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 동일한 치사량-미만의 방사선량이고;

c)  $\mu_3$ 은 유효 수준 바로 미만의 내성 MIC에서 리팜핀을 첨가한 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 동일한 치사량-미만의 방사선량이다.

데이터는 항생제 테트라사이클린 또는 리팜핀의 첨가가 치사량-미만의 방사선 조사 후에 다음과 같이 이들 MRSA 콜로니의 성장을 감소시킴을 보여준다:

$\mu_1 - \mu_2 = 0$ 은 테트라사이클린의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장

에 대해 유해한 효과를 나타내지 않음을 지지할 것이다.

<544>  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 은 테트라사이클린의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타냄을 지지할 것이다.

<545>  $\mu_1 - \mu_3 = 0$ 은 리팜핀의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타내지 않음을 지지할 것이다.

<546>  $\mu_1 - \mu_3 > 0$ 은 리팜핀의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타냄을 지지할 것이다.

표 11

실험				대조군			
	아가	리팜핀 90ug/ml	테트라사이클린 4ug/ml		아가	리팜핀 90 ug/ml	테트라사이클린 4ug/ml
E1-1	307	210	42		E1-1	270	183
E1-2	300	200	56		E1-2	210	210
E1-3	300	280	46		E1-3	224	166
E1-4	310	378	48		E1-4	해손됨	228
E1-5	250	280	42		E1-5	215	188
E2-1	246	272	18		E2-1	240	274
E2-2	254	320	28		E2-2	310	210
E2-3	174	330	27		E2-3	190	180
E2-4	170	해손됨	16		E2-4	257	240
E2-5	240	284	18		E2-5	275	
E3-1	310	270	72		E3-1	280	288
E3-2	280	225	67		E3-2	320	280
E3-3	260	284	45		E3-3	310	210
E3-4	210	200	47		E3-4	320	290
E3-5	220	해손됨	74		E3-5	320	300

<547>

<548> 결과:

<549> 본 실험은 NIMELS 시스템을 사용한 치사량-미만의 레이저 파라미터 하에서,  $\mu_1 - \mu_2 = 0$  및  $\mu_1 - \mu_3 \geq 0$ 임을 명백하게 보여주었다. 이는 배출 펌프가 억제되고, 테트라사이클린에 대한 내성이 MRSA의  $\Delta\Psi$ -steady-bact에 대한 NIMELS 효과에 의해 역전되는 것을 가리킨다.

<550> 실시예 XI

<551> 메티실린과 함께 MRSA에 대한 치사량-미만 용량의 NIMELS 레이저의 영향 평가 및 세포벽 합성의  $\Delta\Psi$ -plas-bact 억제

<552> 메티실린:

<553> 메티실린은 그람-양성 세균, 특히  $\beta$ -락타마제-생산 유기체, 예를 들어 그렇지 않으면 대부분의 페니실린에 대해 내성일 에스. 아우레우스에 의해 유발된 감염을 치료하기 위해 이전에 사용된  $\beta$ -락탐이지만, 더 이상 임상에서 사용되지 않는다. 용어 메티실린-내성 에스. 아우레우스 (MRSA)는 모든 페니실린에 내성인 에스. 아우레우스 균주를 설명하기 위해 계속 사용된다.

<554> 작용 메커니즘:

<555> 다른  $\beta$ -락탐 항생제와 같이, 메티실린은 펩티도글리칸 (세균 세포벽)의 합성을 억제함으로써 작용한다.

<556> 그람 양성 세균 바실러스 섭틸리스에서, 양성자 전도체를 첨가함으로써 ETS가 차단될 때 펩티도글리칸 자가용해소의 활성은 증가하는 (즉, 더 이상 억제되지 않는) 것으로 나타났다. 이는  $\Delta\Psi$ -plas-bact 및  $\Delta\mu H^+$  (세포의 효소 기능을 위한 저장 에너지에 무관하게)이 잠재적으로 세포벽 동화 기능 및 생리학에 대해 현저하고 활용가



능한 영향을 갖는다는 것을 제안한다.

- <557> 또한,  $\Delta\Psi$ -plas-bact 짝폴립체는 펩티도글리칸 합성에 관여되는 뉴클레오타이드 전구체의 축적, 및 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) (펩티도글리칸의 주요 생체중합체 중 하나)의 수송의 억제와 함께 펩티도글리칸 형성을 억제하는 것으로 보고되었다.
- <558> 가설 시험:
- <559> 바시트라신은 성장하는 세포벽에 대한 광학적으로 저하된  $\Delta\Psi$ -plas-bact의 다중 영향 (즉, 증가된 세포벽 자가용해, 억제된 세포벽 합성)을 강화시킬 것이다. 이는 세포벽 억제성 항미생물 화합물에 대한 내성 메카니즘으로서 배출 펌프를 갖지 않는 그람 양성 세균, 예를 들어 MRSA에서 특히 관련된다.
- <560> 귀무 가설은  $\mu_1 - \mu_2 = 0$  및  $\mu_1 - \mu_3 = 0$ 이다:
- <561> a)  $\mu_1$ 은 대조군으로서 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 치사량-미만의 방사선량이고;
- <562> b)  $\mu_2$ 는 유효 수준 바로 미만의 내성 MIC에서 메티실린을 첨가한 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 동일한 치사량-미만의 방사선량이다.
- <563>  $\mu_1 - \mu_2 = 0$ 은 메티실린의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타내지 않음을 지지할 것이다.
- <564>  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 은 메티실린의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타냄을 지지할 것이다.
- <565> 결과:
- <566> 도 15에 도시된 바와 같이, 본 실험은 NIMELS 시스템을 사용한 치사량-미만의 레이저 파라미터 하에서,  $\mu_1 - \mu_2 \geq 0$ 임을 명백하게 보여주었고, 이는 메티실린의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 CFU 계수에 의해 나타난 바와 같이 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타내는 것을 의미한다. 이는 메티실린 (배출 펌프와 관계없이)이 MRSA의  $\Delta\Psi$ -steady-bact에 대한 NIMELS 효과에 의해 강화되는 것을 제안한다.
- <567> 따라서, NIMELS 레이저 및 그의 동시의 광학적  $\Delta\Psi$ -plas-bact 저하 현상은 MRSA에서 세포벽 억제성 항미생물제와 상승적이다. 이론에 매이는 것을 바라지 않지만, MRSA는 메티실린에 대한 배출 펌프를 갖지 않으므로 이는 동화 (주변세포질) ATP 연계된 기능의 억제를 통해 기능할 것이다.
- <568> 실시예 XII
- <569> 바시트라신과 함께 MRSA에 대한 치사량-미만 용량의 NIMELS 레이저의 영향 평가 및 세포벽 합성의  $\Delta\Psi$ -plas-bact 억제
- <570> 바시트라신은 바실러스 섭틸리스에 의해 생산된 시클릭 폴리펩티드의 혼합물이다. 독성이고 사용하기 어려운 항생제이므로, 바시트라신은 일반적으로 경구로 사용될 수 없지만, 국소로 사용된다.
- <571> 작용 메카니즘:
- <572> 바시트라신은 C<sub>55</sub>-이소프레닐 피로포스페이트 (펩티도글리칸 세균 세포벽의 빌딩 블록을 그람 음성 유기체에서 내막 및 그람 양성 유기체에서 형질막 밖으로 옮기는 분자)의 탈인산화를 저해한다.
- <573> 그람 양성 세균 바실러스 섭틸리스에서, 양성자 전도체를 첨가함으로써 ETS가 차단될 때 펩티도글리칸 자가용해소의 활성은 증가하는 (즉, 더 이상 억제되지 않는) 것으로 나타났다. 이는  $\Delta\Psi$ -plas-bact 및  $\Delta\mu H^+$  (세포의 효소 기능을 위한 저장 에너지에 무관하게)이 잠재적으로 세포벽 동화 기능 및 생리학에 대해 현저하고 활용가능한 영향을 갖는다는 것을 나타낸다.
- <574> 또한,  $\Delta\Psi$ -plas-bact 짝폴립체는 펩티도글리칸 합성에 관여되는 뉴클레오타이드 전구체의 축적, 및 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc) (펩티도글리칸의 주요 생체중합체 중 하나)의 수송의 억제와 함께 펩티도글리칸 형성을 억제하는 것으로 보고되었다.

- <575> 가설 시험:
- <576> 바시트라신은 성장하는 세포벽에 대한 광학적으로 저하된  $\Delta\Psi$ -plas-bact의 다중 영향 (즉, 증가된 세포벽 자가 용해, 억제된 세포벽 합성)을 강화시킨다. 이는 세포벽 억제성 항미생물 화합물에 대한 내성 메커니즘으로서 배출 펌프를 갖지 않는 그람 양성 세균, 예를 들어 MRSA에서 특히 관련된다.
- <577> 귀무 가설은  $\mu_1 - \mu_2 = 0$  및  $\mu_1 - \mu_3 = 0$ 이다:
- <578> a)  $\mu_1$ 은 대조군으로서 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 치사량-미만의 방사선량이고;
- <579> b)  $\mu_2$ 는 유효 수준 바로 미만의 내성 MIC에서 바시트라신을 첨가한 MRSA에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 동일한 치사량-미만의 방사선량이다.
- <580>  $\mu_1 - \mu_2 = 0$ 은 바시트라신의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타내지 않음을 지지할 것이다.
- <581>  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 은 바시트라신의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타냄을 지지할 것이다.
- <582> 결과:
- <583> 도 16에 도시된 바와 같이, 본 실험은 NIMELS 시스템을 사용한 치사량-미만의 레이저 파라미터 하에서,  $\mu_1 - \mu_2 \geq 0$ 임을 명백하게 보여주었고, 이는 바시트라신의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 MRSA 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타내는 것을 의미한다. 도 16에서, 화살표는 도시된 2개의 샘플에서 MRSA 성장 또는 그의 결핍을 지시한다. 이는 바시트라신 (배출 펌프와 관계없이)이 MRSA의  $\Delta\Psi$ -steady-bact에 대한 NIMELS 효과에 의해 강화되는 것을 제안한다.
- <584> 따라서, NIMELS 레이저 및 그의 동시의 광학적  $\Delta\Psi$ -plas-bact 저하 현상은 MRSA에서 세포벽 억제성 항미생물제와 상승적이다. 이론에 매이는 것을 바라지 않지만, MRSA는 바시트라신에 대한 배출 펌프를 갖지 않으므로 이는 아마도 동화 (주변세포질) ATP 연계된 기능의 억제를 통해 기능한다.
- <585> 실시예 XIII
- <586> 라미실 (Lamisil) 및 스포라녹스 (Sporanox)와 함께 써. 알비칸스에 대한 치사량-미만 용량의 NIMELS 레이저의 영향 평가
- <587> 본 실험의 목적은 치사량-미만 용량의 NIMEL 레이저가 써. 알비칸스에서 항진균 화합물 라미실 및/또는 스포라녹스의 효과를 강화시킬 것인지 관찰하기 위한 것이다.
- <588> 도입:
- <589> 진균 세포에서 세포질 ATP 농도의 감소는  $\Delta\Psi$ p-fungi를 생성하는 형질막-결합  $H^+$ -ATPase의 억제를 일으키고, 상기 장애는 다른 세포 활성을 약화시키는 것으로 밝혀졌다. 추가로,  $\Delta\Psi$ p-fungi의 저하는 형질막 생물에너지 및 열역학 파괴를 유발하여, 양성자 구동력을 붕괴시키고 따라서 영양분 섭취를 억제하는 양성자의 유입을 일으킨다. 더욱 중요하게, ATP는 진균 형질막 지질 에르고스테롤의 생합성에 필요하다. 에르고스테롤은 라미실 및 스포라녹스 (및 그의 제네릭 (generic) 대응물)를 비롯한 오늘날 의약으로 사용되는 대다수의 관련 시판 항진균 화합물 (즉, 아졸, 테르비나핀 및 이트라코나졸)에 의해 표적화되는 구조적 지질이다.
- <590> 또한, 최근에, 2개의 신규한 항미생물 펩티드 (Pep2 및 Hst5)가 ATP가 진균 세포 밖으로 배출되도록 하는 (즉, 세포내 ATP 농도를 고갈시키는) 능력을 갖고, 상기 저하된 세포질 ATP는 항진균제의 ATP-의존성 배출 펌프인 ABC 트랜스포터 CDR1 및 CDR2의 불활성화를 일으키는 것으로 나타났다.
- <591> 라미실:
- <592> 라미실 (다른 알릴아민과 같이)은 스쿠알렌 에폭시다제 (진균 세포벽 합성 경로의 일부인 효소)를 억제함으로써 에르고스테롤 합성을 억제한다.
- <593> 스포라녹스:

- <594> 이트라코나졸 (스포라녹스)의 작용 메카니즘은 다른 아졸 항진균제와 동일하고; 에르고스테롤의 진균 사이토크롬 P450 옥시다제-매개된 합성을 억제한다.
- <595> 가설:
- <596> 씨. 알비칸스에 대한 치사량-미만의 방사선량에서 NIMELS 레이저는 진균에서 막을 탈분극시키고 세포성 ATP를 고갈시킴으로써 광학적으로 저하된  $\Delta\Psi$ -plas-fungi 및/또는  $\Delta\Psi$ -mito-fungi 때문에 라미실 및 스포라녹스를 강화시킨다.
- <597> 귀무 가설은  $\mu_1 - \mu_2 = 0$  및  $\mu_1 - \mu_3 = 0$ 이다:
- <598> a)  $\mu_1$ 은 대조군으로서 씨. 알비칸스에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 치사량-미만의 방사선량이고;
- <599> b)  $\mu_2$ 는 유효 수준 바로 미만의 내성 MIC에서 스포라녹스를 첨가한 씨. 알비칸스에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 동일한 치사량-미만의 방사선량이고;
- <600> c)  $\mu_3$ 은 유효 수준 바로 미만의 내성 MIC에서 라미실을 첨가한 씨. 알비칸스에 대한 NIMEL 레이저 시스템으로부터의 동일한 치사량-미만의 방사선량이다.
- <601> 데이터는 항진균제 라미실 및/또는 스포라녹스의 첨가가 치사량-미만의 방사선 조사 후에 다음과 같이 이들 씨. 알비칸스 콜로니의 성장을 감소시킴을 나타낸다:
- <602>  $\mu_1 - \mu_2 = 0$ 은 스포라녹스의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 씨. 알비칸스 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타내지 않음을 지지할 것이다.
- <603>  $\mu_1 - \mu_2 > 0$ 은 스포라녹스의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 씨. 알비칸스 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타냄을 지지할 것이다.
- <604>  $\mu_1 - \mu_3 = 0$ 은 라미실의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 씨. 알비칸스 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타내지 않음을 지지할 것이다.
- <605>  $\mu_1 - \mu_3 > 0$ 은 라미실의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 씨. 알비칸스 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타냄을 지지할 것이다.

## 표 12

칸디다 알비칸스 NIMELS 방사선량 표					
제1 레이저 처리 절차: 870 및 930 모두					
제2 레이저 처리 절차: 930 단독					
시험	파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)
AF-8	시험 (H-1) 18분 동안 4.25W에서 870 및 4.25W에서 930, 이어서	8.0	1.5	1.77	
AF-8	시험 (H-1) 12분 동안 8.5W에서 930	8.0	1.5	1.77	

## 표 13

콜로니 계수

군	중복	대조군			실험		
		아가	라미실 0.5 µg/ml	스포라녹스 0.5 µg/ml	아가	라미실 0.5 µg/ml	스포라녹스 0.5 µg/ml
AF8	1	220	280	311	n.d.	78	80
	2	320	n.d.	295	249	74	107
	3	266	290	360	330	101	110
	4	248	335	332	209	70	86
	5	190	334	320	244	90	91

<607>

- <608> 결과:
- <609> 본 실험은 NIMELS 시스템을 사용한 치사량-미만의 레이저 파라미터 하에서,  $\mu_1 - \mu_2 > 0$  및  $\mu_1 - \mu_3 > 0$ 임을 명백하게 보여주었고, 이는 라미실의 첨가가 치사량-미만의 NIMEL 방사선 조사 후에 씨. 알비칸스 콜로니의 정상적인 성장에 대해 유해한 효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 이는 에르고스테롤 생합성 억제제 (라미실 및 스포라노스)가 NIMELS 레이저 시스템의 치사량-미만의 방사선량 방사선 조사에 의해 강화됨을 제안한다.
- <610> 실시예 XIV
- <611> NIMELS 방사선량 계산
- <612> 다음의 실시예는 본원에 기재된 파장에서 다양한 일반적으로 발견되는 미생물의 생활력에 영향을 미치는 NIMELS 방산의 능력을 묘사하는 선택된 실험을 설명한다. 예시된 미생물은 이. 콜라이 K-12, 다제-약물 내성 이. 콜라이, 스타필로코커스 아우레우스, 메티실린-내성 에스. 아우레우스, 칸디다 알비칸스, 및 트리코피톤 루브룸 (*Trichophyton rubrum*)을 포함한다.
- <613> 앞에서 보다 상세히 논의된 바와 같이, NIMELS 파라미터는 레이저 다이오드의 평균 단일 또는 추가 출력 전력, 및 다이오드의 파장 (870 nm 및 930 nm)을 포함한다. 상기 정보는 표적 부위에서 레이저 광선(들)의 면적 ( $\text{cm}^2$ )과 조합으로, 본 발명에 따른 효과적이고 안전한 방사선 조사 프로토콜을 계산하기 위해 사용될 수 있는 정보의 초기 세트를 제공한다.
- <614> 주어진 레이저의 전력 밀도는 표적 부위에서 NIMELS의 전위 효과를 측정한다. 전력 밀도는 임의의 주어진 레이저 출력 전력 및 광선 면적의 함수이고, 다음 식을 사용하여 계산할 수 있다.
- <615> 단일 파장에 대해:
- <616> 1) 전력 밀도 ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) = 레이저 출력 전력/광선 직경 ( $\text{cm}^2$ )
- <617> 이중 파장 처리에 대해:
- <618> 2) 전력 밀도 ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) = 레이저 (1) 출력 전력/광선 직경 ( $\text{cm}^2$ ) + 레이저 (2) 출력 전력/광선 직경 ( $\text{cm}^2$ )
- <619> 광선 면적은 다음 식에 의해 계산할 수 있다:
- <620> 3) 광선 면적 ( $\text{cm}^2$ ) = 직경 ( $\text{cm}$ )<sup>2</sup> \* 0.7854 또는
- <621> 광선 면적 ( $\text{cm}^2$ ) =  $\text{Pi} * \text{반경}(\text{cm})^2$ .
- <622> 일정 기간에 걸쳐 특정 출력 전력에서 작동하는 하나의 NIMELS 레이저 다이오드 시스템에 의해 조직 내로 전달된 총 광자 에너지는 줄 단위로 측정되고, 다음과 같이 계산된다:
- <623> 4) 총 에너지 (줄) = 레이저 출력 전력 (와트) \* 시간 (초)
- <624> 일정 기간에 걸쳐 특정 출력 전력에서 두 NIMELS 레이저 다이오드 시스템 (두 파장)에 의해 동시에 조직 내로 전달된 총 광자 에너지는 줄 단위로 측정되고, 다음과 같이 계산된다:
- <625> 5) 총 에너지 (줄) = [레이저 (1) 출력 전력 (와트) \* 시간 (초)] + [레이저 (2) 출력 전력 (와트) \* 시간 (초)]
- <626> 실제에서, 최대 NIMELS 유익한 반응을 위한 용량을 정확하게 측정하기 위해 방사선 조사 처리 영역 위의 총 에너지의 분포 및 할당을 이는 것이 유용하다 (그렇지만 필수적이지는 않다). 총 에너지 분포는 에너지 밀도 (줄/ $\text{cm}^2$ )로서 측정될 수 있다. 아래에서 논의하는 바와 같이, 주어진 파장의 빛에 대해, 에너지 밀도는 조직 반응을 결정하는데 있어서 가장 중요한 인자이다. 하나의 NIMELS 파장에 대한 에너지 밀도는 다음과 같이 유도될 수 있다:
- <627> 6) 에너지 밀도 (줄/ $\text{cm}^2$ ) = {레이저 출력 전력 (와트) \* 시간 (초)}/광선 면적 ( $\text{cm}^2$ )
- <628> 7) 에너지 밀도 (줄/ $\text{cm}^2$ ) = 전력 밀도 ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) \* 시간 (초)
- <629> 2개의 NIMELS 파장이 사용되고 있을 때, 에너지 밀도는 다음과 같이 유도될 수 있다:
- <630> 8) 에너지 밀도 (줄/ $\text{cm}^2$ ) = {레이저 (1) 출력 전력 (와트) \* 시간 (초)}/광선 면적 ( $\text{cm}^2$ ) + {레이저 (2) 출력 전

력 (와트) \* 시간 (초))/광선 면적 ( $\text{cm}^2$ ), 또는

9) 에너지 밀도 ( $\text{줄}/\text{cm}^2$ ) = 전력 밀도 (1) ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) \* 시간 (초) + 전력 밀도 (2) ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) \* 시간 (초)

특정 용량에 대한 처리 시간을 계산하기 위해, 당업자는 다음 식 중 하나를 사용하여 에너지 밀도 ( $\text{J}/\text{cm}^2$ ) 또는 에너지 (J)뿐만 아니라 출력 전력 (W) 및 광선 면적 ( $\text{cm}^2$ )을 사용할 수 있다:

10) 처리 시간 (초) = 에너지 밀도 ( $\text{줄}/\text{cm}^2$ )/출력 전력 밀도 ( $\text{W}/\text{cm}^2$ )

11) 처리 시간 (초) = 에너지 (줄)/레이저 출력 전력 (와트)

본 실시예에 예시된 바와 같은 방사선량 계산은 번거로울 수 있기 때문에, 치료 시스템은 모든 연구된 치료 가능성 및 방사선량을 저장하는 컴퓨터 데이터베이스를 또한 포함할 수 있다. 제어기 내의 컴퓨터 (방사선량 및 파라미터 계산기)는 상기 설명된 식에 기초한 알고리즘을 사용하여 예비프로그래밍되어, 임의의 작동자는 스크린 상에서 데이터 및 파라미터를 쉽게 검색하고, 추가의 필요한 데이터 (예를 들어: 점 크기, 요구되는 총 에너지, 각각의 과장의 시간 및 펄스 폭, 방사선 조사되는 조직, 방사선 조사되는 세균)를 임의의 다른 필요한 정보와 함께 입력할 수 있어서, 유리한 치료 성과를 위해 필요한 임의의 및 모든 알고리즘 및 계산은 방사선량 및 파라미터 계산기에 의해 생성되고, 따라서 레이저에 의해 실행될 수 있다.

요약하면, 아래의 실시예에서, 세균 배양액을 NIMELS 레이저에 노출시킬 때, 세균 치사율 (처리후 배양 플레이트 상에서 콜로니 형성 단위 (CFU)를 계수함으로써 측정할 때)은 93.7% (다제-약물 내성 이. 콜라이) 내지 100% (모든 다른 세균 및 진균)이었다.

#### 실시예 XV

#### 세균 방법: 시험관내 이. 콜라이 표적화를 위한 NIMELS 처리 파라미터

다음 파라미터는 문헌에 열 손상과 연관된 것으로 제시된 온도 훨씬 미만의 최종 온도에서 이. 콜라이에 적용된, 본 발명에 따른 방법을 예시한다

#### A. 이. 콜라이 K-12에 대한 실험 물질 및 방법:

이. 콜라이 K12 액체 배양액을 Luria Bertani (LB) 배지 (25 g/L) 내에서 성장시켰다. 플레이트는 35 mL의 LB 플레이트 배지 (25 g/L LB, 15 g/L 세균학적 아가)를 함유하였다. 배양액 희석은 PBS를 사용하여 수행하였다. 모든 프로토콜 및 조작은 무균 기술을 사용하여 수행하였다.

#### B. 성장 운동학

접종 배양액으로부터 취한 다수의 50 mL LB 배양액을 접종하고 37°C에서 밤새 성장시켰다. 다음날 아침에, 가장 건강한 배양액을 선택하고 사용하여, 37°C에서 50 mL LB 내로 5% 접종하고, 배양액이 정지상이 될 때까지 30 내지 45분마다 측정치를 취하여 시간에 따른 O.D.<sub>600</sub>을 모니터링하였다.

#### C. 마스터 스톡 (Master Stock) 생산

로그상의 배양액 (O.D.<sub>600</sub> 약 0.75)을 출발물질로 사용하고, 이 배양액 10 mL에 4°C에서 10 mL의 50% 글리세롤을 첨가하고, 20개의 크리오바이알 (cryovial) 내로 분취하고, 액체 질소 내에서 급속 동결하였다. 이어서, 크리오바이알을 -80°C에서 저장하였다.

#### D. 액체 배양

이. 콜라이 K12의 액체 배양을 앞서 설명된 바와 같이 구성하였다. 100  $\mu\text{L}$ 의 분취액을 하위배양액으로부터 제거하여, PBS 내에 1:1200로 연속 희석하였다. 상기 희석액을 실온에서 약 2시간 동안 또는 O.D.<sub>600</sub>의 추가의 증가가 관찰되지 않을 때까지 인큐베이팅하여, PBS 현탁액 내의 세포가 유의한 배가 없이 정적 상태 (성장)에 도달하는 것을 보장하였고, 비교적 일관된 수의 세포를 시험을 위해 추가로 분취할 수 있다.

K12 희석액이 정적 상태인 것으로 일단 결정된 후, 2 mL의 상기 현탁액을 주어진 방사선량 파라미터에서 선택된 NIMELS 실험을 위해 24-웰 조직 배양 플레이트 내의 선택된 웰 내로 분취하였다. 플레이트를 사용을 위해 준비할 때까지 (약 2시간) 실온에서 인큐베이팅하였다.

레이저 처리 후, 100  $\mu\text{L}$ 을 각각의 웰로부터 제거하여, 1:1000으로 연속 희석하여  $1:12 \times 10^5$ 의 최초 K12 배양액의 최종 희석액을 얻었다. 3 x 200 L의 각각의 최종 희석액의 분취액을 별개의 플레이트 상으로 3중으로 확산시켰



다. 이어서, 플레이트를 37℃에서 약 16시간 동안 인큐베이팅하였다. 수동 콜로니 계수를 수행하고 기록하였다. 각각의 플레이트의 디지털 사진을 또한 찍었다. 에스. 아우레우스 및 씨. 알비칸스 시험관내 시험을 사용하는 모든 NIMELS 방사선 조사 시험에 대해 유사한 세포 배양 및 운동학 프로토콜을 수행하였다. 예를 들어, 씨. 알비칸스 ATCC 14053 액체 배양액을 YM 배지 (21 g/L, 디프코) 내에서 37℃에서 성장시켰다. 표준화된 현탁액을 24-웰 조직 배양 플레이트 내의 선택된 웰 내로 분취하였다. 레이저 처리 후, 100  $\mu$ l을 각각의 웰로부터 제거하여, 1:1000으로 연속 희석하여, 1:5x10<sup>5</sup>의 초기 배양액의 최종 희석액을 얻었다. 3x100  $\mu$ l의 각각의 최종 희석액을 별개의 플레이트 상으로 확산시켰다. 이어서, 플레이트를 37℃에서 약 16-20시간 동안 인큐베이팅하였다. 수동 콜로니 계수를 수행하고 기록하였다. 각각의 플레이트의 디지털 사진을 또한 찍었다.

<650>

트리코피톤 루브룸 ATCC 52022 액체 배양액을 37℃에서 펩톤-텍스트로스 (PD) 배지에서 성장시켰다. 표준화된 현탁액을 24-웰 조직 배양 플레이트 내의 선택된 웰 내로 분취하였다. 레이저 처리 후에, 분취액을 각각의 웰로부터 제거하여, 별개의 플레이트 상으로 확산시켰다. 이어서, 플레이트를 37℃에서 약 91시간 동안 인큐베이팅하였다. 66시간 및 91시간 인큐베이션 후 수동 콜로니 계수를 수행하고 기록하였다. 대조 웰에서는 모든 유기체가 성장한 반면, 본원에 기재된 바와 같이 레이저-처리된 웰의 100%는 성장하지 않았다. 각각의 플레이트의 디지털 사진을 또한 찍었다.

<651>

열 시험을 PBS 용액에 대해, 실온에서 출발하여 수행하였다. 12분 레이저 처리 사이클에서 사용하기 위해 10 와트의 NIMELS 레이저 에너지가 이용가능하였고, 그 후 시스템의 온도를 44℃의 임계 역치에 가까이 상승시켰다.

## 표 14

시험관내 NIMELS 방사선량에 대한 시간 & 온도 측정치

NIMELS 출력 전력 (W)	광선 점 1.5 cm 직경 겹침 면적 (cm <sup>2</sup> )	처리 시간 (초)	총 에너지 (줄)	에너지 밀도 (방사 노출) (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (방사도) (W/cm <sup>2</sup> )	출발 온도	최종 온도
플레이트 1-N -- 3.0 + 3.0 = 6.0 W	1.76	720	4320	2448	3.40	20.5 °C	34.0 °C
플레이트 2-N -- 3.5 + 3.5 = 7.0 W	1.76	720	5040	2858	3.97	20.7 °C	36.5 °C
NIMELS 출력 전력 (W)	광선 점 1.5 cm 직경 겹침 면적 (cm <sup>2</sup> )	처리 시간 (초)	총 에너지 (줄)	에너지 밀도 (방사 노출) (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (방사도) (W/cm <sup>2</sup> )	출발 온도	최종 온도
플레이트 3-N - 4.0 + 4.0 = 8.0 W	1.76	720	5760	3268	4.54	21.0 °C	38.5 °C
플레이트 4-N - 4.5 + 4.5 = 9.0 W	1.76	720	6480	3679	5.11	2.0 °C	41.0 °C
플레이트 5-N - 5.0 + 5.0 = 10.0 W	1.76	720	7200	4089	5.68	21.0 °C	40.5 °C
플레이트 6-N - 5.5 + 5.5 = 11 W	1.76	720	7920	4500	6.25	21.0 °C	46.0 °C
플레이트 7-N - 7.0 + 7.0 = 14.0 W	1.76	360	5040	2863	7.95	21.0 °C	47.0 °C
플레이트 8-N - 7.5 + 7.5 = 15 W	1.76	360	5400	3068	8.52	21.7 °C	47.2 °C

<652>

<653>

실시예 XVI

<654>

이. 콜라이 시험관내 표적화를 위한 NIMELS 레이저 파장 930 NM에 대한 방사선량값

본 실험은 NIMELS 단일 파장  $\lambda = 930 \text{ nm}$ 이 포유동물 조직에 대한 안전한 열 파라미터 내에서 시험관 내에서 이. 콜라이에 대해 정량가능한 항균 효능과 연관됨을 입증한다.

시험관내 실험 데이터는 5400 J의 930 nm 단독을 사용하는 시스템 내로의 총 에너지의 역치 및 3056 J/cm<sup>2</sup>의 에너지 밀도가 25% 더 적은 시간으로 만나면, 100% 항균 효능이 여전히 달성가능함을 입증한다.

### 표 15

시험관내 이. 콜라이 표적화를 위한 열-미만 NIMELS ( $\lambda = 930$ ) 방사선량

출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	이. 콜라이 치사 %
7.0	1.5	720	5040	2852	3.96	40.2%
8.0	1.5	720	5760	3259	4.53	100.0%
10.0	1.5	540	5400	3056	5.66	100.0%

시험관내 실험 데이터는 또한  $\lambda = 930 \text{ nm}$ 의 단일 에너지를 사용하는 처리가 포유동물 조직에 대한 안전한 열 파라미터 내에서 세균 중 에스. 아우레우스에 대해 시험관내 항균 효능을 갖는 것을 입증한다.

또한, 5400 J의 시스템 내로의 총 에너지의 역치 및 3056 J/cm<sup>2</sup>의 에너지 밀도가 에스. 아우레우스 및 다른 세균 종과 25% 더 적은 시간으로 만나면, 100% 항균 효능이 여전히 달성될 것으로 생각된다.

### 표 16

시험관내 에스. 아우레우스 표적화를 위한 열-미만 NIMELS ( $\lambda = 930$ ) 방사선량

출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	에스. 아우레우스 치사 %
7.0	1.5	720	5040	2852	3.96	24.1%
8.0	1.5	720	5760	3259	4.53	100.0%

시험관내 실험 데이터는 또한  $\lambda = 930 \text{ nm}$ 의 NIMELS 단일 파장이 포유동물 조직에 대한 안전한 열 파라미터 내에서 시험관 내에서 씨. 알비칸스에 대해 항진균 효능을 가짐을 보여주었다.

또한, 5400 J의 시스템 내로의 총 에너지의 역치 및 3056 J/cm<sup>2</sup>의 에너지 밀도가 25% 더 적은 시간으로 만나면, 100% 항진균 효능이 여전히 달성될 것으로 생각된다.

### 표 17

시험관내 씨. 알비칸스 표적화를 위한 열-미만 NIMELS ( $\lambda = 930$ ) 방사선량

출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	씨. 알비칸스 치사 %
8.0	1.5	720	5760	3259	4.53	100.0%
9.0	1.5	720	6840	3681	5.11	100.0%

### 실시예 XVII

시험관 내에서 NIMELS 레이저 파장 870 nm에 대한 방사선량 값

시험관내 실험 데이터는 또한 이. 콜라이에 대해 870 nm 단독의 파장을 사용하여 7200 J의 총 에너지 및 4074 J/cm<sup>2</sup>의 에너지 밀도 및 5660 W/cm<sup>2</sup>의 전력 밀도까지 유의한 치사가 달성되지 않았음을 입증한다.

표 18

이. 콜라이 연구 - 단일 파장  $\lambda = 870 \text{ nm}$

출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	전력 밀도 ( $\text{W}/\text{cm}^2$ )	대조 CFU	NIMELS CFU	차이 대조-NIMELS	이. 콜라이 치사 %
6.0	1.5	720	4320	2445	3.40	90	95	(5)	-5.6%
7.0	1.5	720	5040	2852	3.96	94	94	0	0.0%
8.0	1.5	720	5760	3259	4.53	93	118	(25)	-26.9%
9.0	1.5	720	6480	3667	5.09	113	112	1	0.9%
10.0	1.5	720	7200	4074	5.66	103	111	(8)	-7.8%
10.0	1.5	540	5400	3056	5.66	120	101	19	15.8%

에스. 아우레우스에서  $\lambda = 870 \text{ nm}$  단독의 방사선을 사용하여 대등한 결과가 또한 관찰되었다.

에스. 아우레우스에서  $\lambda = 870 \text{ nm}$  단독의 방사선을 사용하여 대등한 결과가 또한 관찰되었다.

실시예 XVIII

870 nm와 930 nm 광 에너지 사이에서 NIMELS의 특유한 교대적 상승 효과

시험관내 실험 데이터는 또한 교대될 때 (870 nm 이후 930 nm), 2개의 NIMELS 파장 ( $\lambda = 870 \text{ nm}$  및 930 nm) 사이에 상가 효과가 존재함을 입증한다. 제1 방사도로서 870 nm NIMELS 파장의 존재는 제2의 930 nm NIMELS 파장 방사도의 항균 효능의 효과를 향상시키는 것으로 밝혀졌다.

시험관내 실험 데이터는 상기 상승적 효과 (870 nm 파장을 930 nm 파장에 조합하는)로 인해 930 nm 광 에너지를 감소시키는 것을 허용함을 입증한다. 본원에 나타난 바와 같이, (870 nm 이후 930 nm) 파장이 교대 방식으로 조합될 때 광 에너지는 NIMELS 100% 이. 콜라이 항균 효능에 요구되는 총 에너지 및 에너지 밀도의 약 1/3로 감소하였다.

시험관내 실험 데이터는 또한 상기 상승 메카니즘으로 인해 동일량의 870 nm 광 에너지를 시스템에 첨가한 후 930 nm 에너지를 20% 더 높은 전력 밀도에서 첨가하면 930 nm 광 에너지 (총 에너지 및 에너지 밀도)를 NIMELS 100% 이. 콜라이 항균 효능에 필요한 총 에너지 밀도의 약 1/2로 감소시키는 것이 가능함을 입증한다.

표 19

교대하는 NIMELS 파장으로부터의 이. 콜라이 데이터						
출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	전력 밀도 ( $\text{W}/\text{cm}^2$ )	이. 콜라이 치사 %
8W/8W	1.5	540/180 12분	4320/1440= 5760	2445/815= 3529	4.53/4.53	100.0%
10W/10W	1.5	240/240 8분	2400/2400= 4800	1358/1358= 2716	5.66/5.66	100.0%

930 nm 광 에너지는 870 nm 광 에너지보다 더 빠른 속도로 시스템을 가열하므로, 상기 상승적 능력은 인간 조직 안전성에 중요하고, 처리 동안 가능한 한 최소량의 열을 발생시키는 것이 포유동물 시스템에 유익하다.

NIMELS 광 에너지 (870 nm 및 930 nm)가 다른 세균 중에서 상기 방식으로 교대되면, 100% 항균 효과는 또한 본질적으로 동일할 것으로 생각된다.

시험관내 실험 데이터는 또한 진균을 방사선 조사하는 동안 교대될 때 (870 nm 이후 930 nm), 2개의 NIMELS 파장 (870 nm 및 930 nm) 사이에 상가 효과가 또한 존재함을 입증한다. 제1 방사도로서 870 nm NIMELS 파장의 존재는 제2의 930 nm NIMELS 파장 방사도의 항진균 효능의 효과를 수학적으로 향상시킨다.

시험관내 실험 데이터 (아래 표 참조)는 동일량의 870 nm 광 에너지를 시스템에 첨가한 후 930 nm 에너지를 세균 중 항균 효능을 위해 요구되는 것보다 20% 더 높은 전력 밀도에서 첨가하면 상기 상승 메카니즘으로 인해 930 nm 광 에너지 (총 에너지 및 에너지 밀도)를 NIMELS 100% 항진균 효능에 필요한 총 에너지 밀도의 약 1/2로 감소시킬 수 있음을 입증한다.

표 20

<679>

교대하는 NIMELS 파장으로부터의 씨. 알비칸스 데이터						
출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	씨. 알비칸스 치사 %
10W/10W	1.5	240/240 8분	2400/2400= 4800	1358/1358= 2716	5.66/5.66	100.0%*

<680>

930 nm 광 에너지는 870 nm 광 에너지보다 더 빠른 속도로 시스템을 가열하므로, 상기 상승적 능력은 인간 조직 안전성에 중요하고, 처리 동안 가능한 한 최소량의 열을 발생시키는 것이 포유동물 시스템에 유익하다.

<681>

NIMELS 광 에너지 (870 nm 및 930 nm)가 다른 진균 중에서 상기 방식으로 교대되면, 100% 항균 효과는 또한 본질적으로 동일할 것으로 생각된다.

<682>

실시예 XIX

<683>

$\lambda$ =870 nm와  $\lambda$ =930 nm 광 에너지 사이에서 NIMELS 특유한 동시 상승 효과

<684>

시험관내 실험 데이터는 동시에 (870 nm를 930 nm와 조합함) 사용될 때 2개의 NIMELS 파장 (870 nm 및 930 nm) 사이에 상가 효과가 존재함을 또한 입증한다. 동시 방사도로서 870 nm NIMELS 파장 및 930 nm NIMELS 파장의 존재는 NIMELS 시스템의 항균 효능의 효과를 절대적으로 향상시킨다.

<685>

시험관내 실험 데이터 (예를 들어, 아래 표 IX 및 X 참조)는  $\lambda$  = 870 nm 및  $\lambda$  = 930 nm (본 실시예에서 동시에 사용된)를 조합하면 930 nm 광 에너지 및 밀도를 본 발명에 따른 단일 처리를 사용할 때 요구되는 총 에너지 및 에너지 밀도의 약 절반으로 효과적으로 감소시킴을 입증한다.

표 21

<686>

조합된 NIMEL 파장으로부터 이. 콜라이 데이터						
출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	이. 콜라이 치사 %
870 nm/930 nm						
5W+5W= 10W	1.5	720	3600 (x2)= 7200	2037 (x2)= 4074	5.66	100.0%

표 22

<687>

조합된 NIMEL 파장으로부터 에스. 아우레우스 데이터						
출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	에스. 아우레우스 치사 %
870 nm/930 nm						
5W+5W= 10W	1.5	720	3600 (x2)= 7200	2037 (x2)= 4074	5.66	98.5%
5.5W+5.5W= 11W	1.5	720	3960 (x2)= 7920	2241 (x2)= 4482	6.22	100%

<688>

930 nm 광 에너지는 870 nm 광 에너지보다 더 빠른 속도로 시스템을 가열하므로, 상기 동시 상승적 능력은 인간 조직 안전성에 중요하고, 처리 동안 가능한 한 최소량의 열을 발생시키는 것이 포유동물 시스템에 유익하다.

<689>

NIMELS 광 에너지 (870 nm 및 930 nm)가 다른 세균 중에서 상기 방식으로 동시에 사용되면, 100% 항균 효과는 또한 본질적으로 동일할 것으로 생각된다 (도 17, 18 및 19 참조).

<690>

시험관내 실험 데이터는 또한 진균에 대해 동시에 사용될 때 2개의 NIMELS 파장 (870 nm 및 930 nm) 사이에 상가 효과가 존재함을 입증한다. 동시 방사도로서 870 nm NIMELS 파장 및 930 nm NIMELS 파장의 존재는 NIMELS 시스템의 항진균 효능의 효과를 향상시키는 것으로 밝혀졌다.

<691>

시험관내 실험 데이터는 (870 nm 이후 930 nm) 파장을 동시 방식으로 조합할 때 상기 상승적 효과 (870 nm 파장을 동시 방사선 조사를 위해 930 nm 파장에 연결함)로 인해 930 nm 광 에너지를 NIMELS 100% 씨. 알비칸스 항

진균 효능을 위해 요구되는 총 에너지 및 에너지 밀도의 약 1/2로 감소시키는 것이 가능함을 입증한다.

표 23

<692>

조합된 NIMELS 파장으로부터 칸디다 알비칸스						
출력 전력 (W) 870 nm/930 nm	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	씨. 알비칸스 치사 %
5W+5W=10W	1.5	720	3600 (x2)= 7200	2037 (x2)= 4074	5.66	100%

<693>

따라서, NIMELS 파장 ( $\lambda = 870 \text{ nm}$  및  $930 \text{ nm}$ )은 항균 및 항진균 효능을 달성하기 위해 교대 방식으로 또는 동시에 또는 상기 방식의 임의의 조합으로 사용될 수 있어서, 최소화되는 온도 증가와 연관된  $\lambda = 930 \text{ nm}$ 에서의 노출을 감소시킨다.

<694>

시험관내 실험 데이터는 또한 이. 콜라이가  $\lambda = 830 \text{ nm}$ 의 (대조) 파장 단독으로 방사선 조사될 때, 다음 파라미터에서, 대조  $830 \text{ nm}$  레이저는 12분 방사선 조사 사이클 동안 0의 항균 효능을 나타냈고, 최소 NIMELS 방사선량에 대한 동일한 파라미터에서  $\lambda = 930 \text{ nm}$ 의 방사선을 사용할 때 100% 항균 및 항진균 효능과 연관되었음을 입증한다.

표 24

<695>

이. 콜라이 단일 파장 $\lambda = 830 \text{ nm}$					
출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
8.0	1.5	720	5760	3259	4.53
9.0	1.5	720	6480	3667	5.09

<696>

시험관내 실험 데이터는 또한 안전한 열 방사선량에서 적용될 때,  $\lambda = 830 \text{ nm}$ 의 광체를  $\lambda = 930 \text{ nm}$ 와 조합하여 사용할 때 상가 효과가 거의 없음을 입증한다. 제1 방사도로서  $830 \text{ nm}$  대조 파장의 존재는 제2의  $930 \text{ nm}$  NIMELS 파장과 상승적 항균 효능을 생산하는데 있어서  $870 \text{ nm}$  NIMELS 파장의 향상 효과에 비해 훨씬 열등하다.

표 25

<697>

치환된 교대하는 $830 \text{ nm}$ 대조 파장으로부터의 이. 콜라이 데이터						
출력 전력 (W) 830 nm/930 nm	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	이. 콜라이 치사 %
8W/8W	1.5	540/180 12분	4320/1440= 5760	2445/815= 3529	4.53/4.53	0%
10W/10W	1.5	240/240 8분	2400/2400= 4800	1358/1358= 2716	5.66/5.66	65%

<698>

시험관내 실험 데이터는 또한 안전한 열 방사선량에서 적용될 때, 동시에 사용시에  $830 \text{ nm}$  파장 및 NIMELS  $930 \text{ nm}$  파장에서의 상가 효과가 보다 적음을 입증한다. 실제로, 시험관내 실험 데이터는 시판  $830 \text{ nm}$ 에 비해  $870 \text{ nm}$ 가  $930 \text{ nm}$ 와 동시에 조합될 때 100% 이. 콜라이 항균 효능을 달성하기 위해 17% 더 적은 총 에너지, 17% 더 적은 에너지 밀도, 및 17% 더 적은 전력 밀도가 요구됨을 입증한다. 이는 다시 NIMELS 파장으로 처리되는 생체내 시스템에 대한 열 및 해로움을 실질적으로 감소시킨다.

표 26

<699>

치환된 동시의 $830 \text{ nm}$ 대조 파장으로부터의 이. 콜라이 데이터						
출력 전력 (W) 830 nm/930 nm	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	이. 콜라이 치사 %



5W+5W=10W	1.5	720	3600 (x2)= 7200	2037 (x2)= 4074	5.66	91%
5.5W+5.5W=11W	1.5	720	3960 (x2)= 7920	2250 (x2)= 4500	6.25	90%
6W+6W=12W	1.5	720	3960 (x2) =8640*	2454 (x2)= 4909*	6.81*	100%

<700> 치사된 세균의 양:

<701> 시험관내 데이타는 또한 시험관 내에서 NIMELS 레이저 시스템이 2,000,000 ( $2 \times 10^6$ ) 콜로니 형성 단위 (CFU)의 이. 콜라이 및 에스. 아우레우스를 함유하는 세균의 용액에 대해 효과적임을 (열 내성 범위 내에서) 보여주었다. 이는 감염된 인간 궤양 조직의 1 g 샘플에서 일반적으로 보이는 것보다 2x의 증가이다. 브라운 (Brown) 등은 시험한 당뇨 환자의 75%에서 미생물 세포가 모두 적어도 100,000 CFU/g이고, 환자의 37.5%에서 미생물 세포의 양은 1,000,000 ( $1 \times 10^6$ ) CFU 초과였음을 보고하였다 (그 전체를 본원에 참조로 포함시킨 문헌 [Brown et al, Ostomy Wound Management, 401:47, issue 10, (2001)] 참조).

<702> 열 파라미터:

<703> 시험관내 실험 데이타는 또한 NIMELS 레이저 시스템이 인간 조직에 대한 안전한 열 내성 범위 내에서 100% 항균 및 항진균 효능을 달성할 수 있음을 입증한다.

<704> 실시예 XX

<705> NIMELS에 대한 온도 저하의 효과

<706> 세균 종의 냉각:

<707> 시험관내 실험 데이타는 또한 레이저 처리 사이클 전에 세균 샘플의 출발 온도를 PBS 내에서 2시간 동안 4°C로 실질적으로 저하시킴으로써, NIMELS 레이저 시스템을 사용한 임의의 현재 재현가능한 항균 에너지에서 광학 항균 효능이 달성되지 않았음을 입증하였다.

<708> 실시예 XXI

<709> 트리코피톤 루브룸에 대한 NIMELS의 효과

<710> 본 실시예는 교대 또는 동시 방식으로 사용될 때 NIMELS 파장 (870 nm 및 930 nm)의 효과를 보여준다.

## 표 27

<711>

NIMELS 트리코피톤 루브룸 시험 - 교대 파장						
실험	출력 전력 (W) 870 nm/930 nm	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
1	8W/8W	1.5	540/180 12분	4320/1440= 5760	2445/815= 3529	4.53/4.53
2	10W/10W	1.5	240/240 8분	2400/2400= 4800	1358/1358= 2716	5.66/5.66
실험 1 = 최소 효과						
실험 2 = 모든 플레이트에서 100% 치사						

## 표 28

<712>

NIMELS 트리코피톤 루브룸 - 동시 파장						
실험	출력 전력 (W) 870 nm/930 nm	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
3	5W+5W=10W	1.5	720 12분	3600(x2)= 7200	2037(x2)= 4074	5.66

4	5.5W+5.5W=11W	1.5	720	3960(x2)= 7920	2250(x2)= 4500	6.25
5	6W+6W=12W	1.5	720	3960(x2)= 8640	2454(x2)= 4909	6.81
실험 3, 4 및 5 = 모든 플레이트에서 100% 치사						

표 29

<713>

NIMELS 트리코피톤 루브룸 - 단일 파장						
실험 $\lambda=930$	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
6	8.0	1.5	720	5760	3259	4.53
7	9.0	1.5	720	6840	3681	5.11
실험 6 및 7 = 모든 플레이트에서 100% 치사						

표 30

<714>

대조 트리코피톤 루브룸 - 830 nm/930 nm 교대						
실험 $\lambda=830$ & $\lambda=930$	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
8	8W/8W	1.5	540/180 12분	4320/1440= 5760	2445/815= 3529	4.53/4.53
9	10W/10W	1.5	240/240 8분	2400/2400= 4800	1358/1358= 2716	5.66/5.66
실험 8 = 효과 없음						
실험 9 = 100% 치사						

<715> 상기 표 XVIII에 설명된 바와 같은 처리는 100% 치사를 일으켰다.

표 31

<716>

$\lambda = 830$ nm 및 930 nm를 사용하는 트리코피톤 루브룸의 시험관내 표적화					
출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
5+5=10	1.5	720	3600(x2)=7200	2037(x2)=4074	5.66

<717> 실시예 XXII

<718> MRSA/항미생물제 강화

<719> 본 실시예는 메티실린에 대한 항미생물제 감수성을 증가시키기 위해 MRSA의 시험관내 표적화에서 NIMELS 파장 ( $\lambda = 830$  nm 및 930 nm)의 사용을 보여준다. 4회의 별개의 실험을 수행하였다. 이들 4회의 실험에 대한 데이터 세트를 아래의 표에 제시한다. 또한 도 17을 참조하고, 이 도면은 (a) MRSA 콜로니의 성장 억제에서 NIMELS와 메티실린, 페니실린 및 에리트로마이신과의 상승적 효과 (상기 데이터는 페니실린 및 메티실린이 세균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-Bact)을 억제하여 약물과 동시-표적화되는 펩티도글리칸 합성 동화 과정을 억제함으로써 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에 의해 강화됨을 보여준다), 및 (b) NIMELS 효과가 단백질 합성 동화 과정 및 에리트로마이신 내성 배출 펌프를 위한 에너지를 공급하는 세균 형질막 양성자 구동력 ( $\Delta p$ -plas-Bact)을 억제하기 때문에, 에리트로마이신이 보다 큰 정도로 강화되는 것을 보여준다.

<720> 물질:

표 32

<721>

세균			
ATCC® 번호: 서식의 상단 서식의 하단	BAA-43™	가격:	
유기체	스태필로코커스 아우레우스 아종 아우레우스 로젠바흐 (Rosenbach); 스타필로코커스 아우레우스 로젠바흐로서 기탁됨.		
명칭	HSJ216	단리:	1998 포르투갈 리스본 병원 [51476]
기탁자	H De Lencastre		
생물안전성 수준:	2	선적:	동결건조
성장 조건:	ATCC 배지 260: 탈섬유화 양 혈액을 함유하는 트립티카제 대두 (soy) 아가 성장 조건: 호기성 온도: 37.0C		
허가/서식:	상기 언급된 MTA에 추가로, 상기 ATCC 물질의 이송을 위해 다른 ATCC 및/또는 규제 허가가 요구될 수 있다. ATCC 물질을 구입하는 이가 허가를 받을 긍정적인 책임이 있다. 여러분의 소재지로 선적을 위한 구체적인 요건에 관한 정보에 대해서는 <a href="#">여기를 클릭</a> 하십시오.		
관련 생성물			
주석:	MRSA의 브라질 클론 [12386]		
적용:	메티실린에 대한 내성 [51476]		
참조:	51476: de Sousa MA, et al. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone. J. Clin. Microbiol. 36: 2590-2596, 1998. PubMed: 9705398 12386: Herminia De Lencastre, personal communication, 전체 교시내용을 본원에 참고로 포함한다.		

<722>

CFU 계수를 위한 일반적인 방법:

표 33

<723>

시간 (시)	업무	FTE (시)
-18	배양액을 밤새 접종함 글리세롤 원액으로부터 직접 50 ml	
-4	스타터 배양액 설정 3가지 희석액 1:50, 1:125, 1:250 스타터 배양액의 OD <sub>600</sub> 모니터링	
0	플래이팅 배양액의 제조. 오전 10:00에, OD <sub>600</sub> =1.0인 배양액을 PBS (최종 부피 50 ml) 내에 1:300으로 희석하고, RT에서 1시간 동안 저장한다. (실온은 ~25°C이어야 함)	
+1	24-웰 플래이트의 접종. 2 ml 분취액을 24-웰 플래이트 내의 예비-지정된 웰 내로 분배하고, NOMIR로 옮긴다 (총 8개의 24-웰 플래이트).	
+2 내지 +8	처리된 샘플의 희석. 레이저 처리 후, 각각의 웰로부터 100 µl을 PBS 내에 1:1000의 최종 희석액으로 연속 희석한다.	
	처리된 샘플의 플래이팅. 100 µl의 최종 희석액을 30 µg/ml 메티실린과 함께 및 메티실린 없이 TSB 아가 상에 3중으로 플래이팅한다 (웰 당 6 TSB 플래이트).	
	플래이트를 37°C에서 18-24시간 동안 인큐베이팅한다.	
+24	각 플래이트 상의 콜로니를 계수한다 (총 96 플래이트).	

표 34

MRSA 방사선량 진행 11-06-06 실험 #1

제1 레이저 처리 절차:

870 및 930 모두

제2 레이저 처리 절차:

930 단독

파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	초기 온도 ℃	최종 온도 ℃
시험 (1) 12분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	720	7200	4074	5.66	24.4	44
시험 (1) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	44	46.8
시험 (2) 12분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	26.5	48.1
시험 (2) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	48.1	47.4
시험 (3) 10분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	600	6000	3395	5.66	25.7	43.1
시험 (3) 4분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	240	1920	1086	4.53	43.1	44.8
시험 (4) 10분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	600	6600	3735	6.22	22.9	45.2
시험 (4) 4분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	240	1920	1086	4.53	45.2	45.3
시험 (5) 8분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	480	4800	2716	5.66	24.2	43.2
시험 (5) 4분 동안 7W에서 930	7.0	1.5	1.77	240	1680	951	3.96	43.2	43.8
시험 (6) 8분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	480	5280	2988	6.22	25.3	42.7
시험 (6) 4분 동안 7W에서 930	7.0	1.5	1.77	240	1680	951	3.96	42.7	44.9
시험 (7) 6분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	360	3600	2037	5.66	26.2	40.6
시험 (7) 4분 동안 7W에서 930	7.0	1.5	1.77	240	1680	951	3.96	40.6	44
시험 (8) 6분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	360	3960	2241	6.22	26	42
시험 (8) 4분 동안 7W에서 930	7.0	1.5	1.77	240	1680	951	3.96	42	44.2

<724>

<725>

MRSA 연구에 대한 독립적인 보고, 2006년 11월 7일

<726>

(MRSA 데이터 진행 11-07-06 실험 #1)

<727>

실험 1 - 설계:

<728>

8가지 상이한 레이저 용량을 사용하여 로그상으로 성장하는 MRSA의 염수-현탁액을 처리하고, A1 내지 H1으로 표지하였다.

<729>

처리된 및 대조군의 처리되지 않은 현탁액을 희석하고, 30 µg/ml 메티실린을 함유하거나 함유하지 않는 트립틱 (tryptic) 대두 아가 상에 삼중으로 플레이팅하였다.

<730>

37℃에서 24 hr 성장시킨 후, 콜로니를 계수하였다.

<731>

대조군 (처리되지 않은) 및 처리된 MRSA 모두에 대해 메티실린을 함유하는 및 함유하지 않는 플레이트 사이에서 CFU (콜로니 형성 단위)를 비교하였다.

<732>

실험 1 - 결과:

<733>

조건 D1 내지 H1은 처리된 및 처리되지 않은 샘플에서 메티실린 플레이트 상에서 CFU의 유사한 감소를 보여주었다.

<734>

조건 A1, B1 및 C1은 처리되지 않은 대조군에 비해 레이저 처리된 샘플에서 각각 30%, 33% 또는 67% 더 적은 CFU를 보여주었다.

<735>

이는 샘플 A1, B1 및 C1에 대해 수행된 처리는 MRSA를 메티실린의 효과에 대해 감작시켰음을 나타낸다.

표 35

MRSA 데이터 진행 11-07-06 실험 #1

		메티실린 (Meth)		CFU	AVG	CFU/ml	Meth 효과	레이저 효과 (+ Meth)
A1	대조군	없음	1	224	203.7	6.11E+08		
			2	266				
			3	121				
		있음	1	207	141.7	4.25E+08	0.695581	
			2	137				
			3	81				
	실험군	없음	1	132	134.3	4.03E+08		
			2	143				
			3	128				
		있음	1	99	99.7	2.99E+08	0.741935	0.7035
			2	96				
			3	104				
B1	대조군		1	235	188.3	5.65E+08		

			2	220				
			3	110				
		있음	1	166	169.3	5.08E+08	0.899115	
			2	192				
			3	150				
	실험군	없음	1	213	200.3	6.01E+08		
			2	199				
			3	189				
		있음	1	102	113.3	3.40E+08	0.565724	0.6693
			2	107				
			3	131				
C1	대조군	없음	1	280	320.3	9.61E+08		
			2	242				
			3	439				
		있음	1	240	406	1.22E+09	1.26743	
			2	466				
			3	512				
	실험군	없음	1	187	184	5.52E+08		
			2	189				
			3	176				
		있음	1	95	132.3	3.97E+08	0.719203	0.3259
			2	176				
			3	126				
D1	대조군	없음	1	251	184	5.52E+08		
			2	125				
			3	176				
		있음	1	171	154	4.62E+08	0.836957	
			2	141				
			3	150				
	실험군	없음	1	221	203.7	6.11E+08		
			2	180				
			3	210				
		있음	1	164	155.3	4.66E+08	0.762684	1.0087
			2	153				
			3	149				
E1	대조군	없음	1	142	225.3	6.76E+08		
			2	268				
			3	266				
		있음	1	147	131.3	3.94E+08	0.58284	
			2	121				
			3	126				
	실험군	없음	1	226	258.3	7.75E+08		
			2	217				
			3	332				
		있음	1	181	214.3	6.43E+08	0.829677	1.632
			2	232				
			3	230				
F1	대조군	없음	1	223	226.7	6.80E+08		



			2	260				
			3	197				
			1	197	198	5.94E+08	0.873529	
		있음	2	188				
			3	209				
			1	223	237.7	7.13E+08		
	실험군	없음	2	256				
			3	234				
			1	206	197	5.91E+08	0.828892	0.9949
		있음	2	179				
			3	206				
			1	214	224	6.72E+08		
G1	대조군	없음	2	217				
			3	241				
			1	246	219.3	6.58E+08	0.979167	
		있음	2	222				
			3	190				
			1	243	242.7	7.28E+08		
	실험군	없음	2	261				
			3	224				
			1	193	210.7	6.32E+08	0.868132	0.9605
		있음	2	237				
			3	202				
			1	252	255.3	7.66E+08		
H1	대조군	없음	2	267				
			3	247				
			1	188	192.3	5.77E+08	0.753264	
		있음	2	206				
			3	183				
			1	232	245	7.35E+08		
	실험군	없음	2	232				
			3	271				
			1	211	199.7	5.99E+08	0.814966	1.0381
		있음	2	212				
			3	176				

<738>

표 36

MRSA 방사선풀 진행 11-07-06 실험 #2

MRSA 방사선풀 진행 11-07-06  
제1 레이저 처리 절차: 870 및 930 모두  
제2 레이저 처리 절차: 930 단독

파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	초기 온도 ℃	최종 온도 ℃
시험 (1) 12분 동안 5W에서	10.0	1.5	1.77	720	7200	4074	5.66	23.4	45.3
870 및 5W에서 930, 이어서									
시험 (1) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	45.3	46.8
시험 (2) 12분 동안 5W에서									
870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	720	7200	4074	5.66	21.2	45.5
시험 (2) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	45.5	47.7
시험 (3) 12분 동안 5W에서									
870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	720	7200	4074	5.66	21.6	47.0
시험 (3) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	47.0	49.0
시험 (4) 12분 동안 5.5W에서									
870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	20.4	50.3
시험 (4) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	50.3	50.1
시험 (5) 12분 동안 5.5W에서									
870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	24.0	50.9
시험 (5) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	50.9	50.2
시험 (6) 12분 동안 5.5W에서									
870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	23.0	48.2
시험 (6) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	48.2	48.3
시험 (7) 14분 동안 5W에서									
870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	840	8400	4753	5.66	22.0	48.3
시험 (7) 8분 동안 7W에서 930	7.0	1.5	1.77	480	3360	1901	3.96	48.3	44.2
시험 (8) 14분 동안 5W에서									
870 및 5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	840	9240	5229	6.22	22.0	47.6
시험 (8) 8분 동안 7W에서 930	7.0	1.5	1.77	480	3360	1901	3.96	47.6	46.2

<739>

<740>

MRSA 연구에 대한 독립적인 보고, 2006년 11월 8일

<741>

(MRSA 데이터 진행 11-08-06 실험 #2)

<742>

실험 2 - 설계:

<743>

실험 1에서 및 앞서 확립된 유효 용량에 기초한 8가지 상이한 레이저 용량을 사용하여 로그상으로 성장하는 MRSA의 염수-현탁액을 처리하고, A2 내지 H2로 표지하였다.

<744>

처리된 및 대조군의 처리되지 않은 현탁액을 회석하고, 30 µg/ml 메티실린을 함유하거나 함유하지 않는 트립틱 대두 아가 상에 삼중으로 플레이팅하였다.

<745>

37℃에서 24 hr 성장시킨 후, 콜로니를 계수하였다.

<746>

실험 2 - 결과:

<747>

메티실린을 함유하는 및 함유하지 않는 플레이트 상의 CFU의 비교는 A2 및 B2를 제외한 모든 레이저 처리된 샘플에서 메티실린의 유효성의 유의한 증가를 보여주었다. 상기 데이터를 아래 표 37에 표 형식으로 요약한다

표 37

그룹	메티실린 감수성의 배수 증가
A2	0.84
B2	0.91
C2	3.20
D2	2.44
E2	4.33
F2	2.13
G2	3.47
H2	1.62

<748>

표 38

MRSA 데이터 진행 11-08-06 실험 #2

NOMIR MRSA 연구 07-08 NOV 2006								
		메티실린 (Meth)		CFU	AVG	CFU/ml	Meth 효과	레이저 효과 (+ Meth)
A2	대조군	없음	1	51	49.3	1.48E+08		
			2	43				
			3	54				
		있음	1	35	35.7	1.07E+08	0.72	
			2	47				
			3	25				
	실험군	없음	1	49	47	1.41E+08		
			2	45				

<749>

		있음	3	47				
			1	39	41	1.23E+08	0.87	1.15
			2	48				
			3	36				
B2	대조군	없음	1	97	71.3	2.14E+08		
			2	47				
			3	70				
		있음	1	47	49.7	1.49E+08	0.7	
			2	56				
			3	46				
	실험군	없음	1	32	34.7	1.04E+08		
			2	34				
			3	38				
		있음	1	27	26.7	8.00E+07	0.77	0.54
			2	28				
			3	25				
C2	대조군	없음	1	60	55.7	1.67E+08		
			2	65				
			3	42				
		있음	1	42	55.3	1.66E+08	0.99	
			2	71				
			3	53				
	실험군	없음	1	35	40.3	1.21E+08		
			2	38				
			3	48				
		있음	1	16	12.7	3.80E+07	0.31	0.23
			2	12				
			3	10				
D2	대조군	없음	1	108	85.3	2.56E+08		
			2	85				
			3	63				
		있음	1	20	52	1.56E+08	0.61	
			2	65				
			3	71				
	실험군	없음	1	9	9.3	2.80E+07		
			2	9				
			3	10				
		있음	1	5	2.3	7.00E+06	0.25	0.04
			2	1				
			3	1				
E2	대조군	없음	1	52	59.7	1.79E+08		
			2	60				
			3	67				
		있음	1	68	62.3	1.87E+08	1.04	
			2	66				
			3	53				
	실험군	없음	1	8	11	3.30E+07		
			2	12				

<750>

		있음	3 1	13 2	2.7	8.00E+06	0.24	0.04
			2	2				
			3	4				
F2	대조군	없음	1	125	87.7	2.63E+08		
			2	73				
			3	65				
		있음	1	62	71	2.13E+08	0.81	
			2	64				
			3	87				
	실험군	없음	1	37	41	1.23E+08		
			2	43				
			3	43				
		있음	1	13	15.7	4.70E+07	0.38	0.22
			2	15				
			3	19				
G2	대조군	없음	1	77	80	2.40E+08		
			2	110				
			3	53				
		있음	1	75	83.3	2.50E+08	1.04	
			2	92				
			3	83				
	실험군	없음	1	26	28	8.40E+07		
			2	28				
			3	30				
		있음	1	10	8.3	2.50E+07	0.3	0.1
			2	7				
			3	8				
H2	대조군	없음	1	77	105.7	3.17E+08		
			2	156				
			3	84				
		있음	1	76	76.7	2.30E+08	0.73	
			2	72				
			3	82				
	실험군	없음	1	28	28.3	8.50E+07		
			2	36				
			3	21				
		있음	1	13	12.7	3.80E+07	0.45	0.17
			2	12				
			3	13				

<751>

표 39

<752>

NOMIR MRSA 연구에 대한 개략적인 프로토콜 - 2006년 11월 9일 (11-09-06 실험 #3)			
방법:			
시간 (시)	업무	FTE (시)	
T-18	배양액을 밤새 접종함 글리세롤 원액으로부터 직접 50 ml	1	
T-4	스타터 배양액 설정 3가지 희석액 1:50, 1:125, 1:250	1	
	스타터 배양액의 OD <sub>600</sub> 모니터링	4	
T0	플레이팅 배양액의 제조. 오전 10:00에, OD <sub>600</sub> =1.0인 배양액을 PBS (최종 부피 50 ml) 내에 1:300으로 희석하고, RT에서 1시간 동안 저장한다. (실온은 ~25℃이어야 함)	1	
T +1	24-웰 플레이트의 접종 (총 8개의 플레이트). 2 ml 분취액을 24-웰 플레이트 내의 예비-지정된 웰 내로 분배하고, NOMIR로 웁긴다 (총 8개의 24-웰 플레이트).	1	
T +2 내지 +8	처리된 샘플의 희석. 레이저 처리 후, 각각의 웰로부터 100 µl을 PBS 내에 1:1000의 최종 희석액 으로 연속 희석한다.	4	



	처리된 샘플의 플레이팅. 100 $\mu$ l의 최종 희석액을 30 $\mu$ g/ml 메티실린과 함께 및 메티실린 없이 TSB 아가 상에 5중으로 (5X) 플레이팅한다 (웰 당 10 TSB 플레이트).	2
	플레이트를 37°C에서 18-24시간 동안 인큐베이팅한다.	
T +24	각 플레이트 상에서 콜로니를 계수한다 (총 160개의 플레이트).	6

표 40

MRSA 방사선량 진행 11-09-06 실험 #3

MRSA 방사선량 진행 11-09-06  
제1 레이저 처리 절차: 870 및 930 모두  
제2 레이저 처리 절차: 930 단독

파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 ( $\text{cm}^2$ )	시간 (초)	총 에너지 출 (J)	에너지 밀도 (J/ $\text{cm}^2$ )	전력 밀도 (W/ $\text{cm}^2$ )	초기 온도 C	최종 온도 C
시험 (1) 12분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	22.0	48.1
시험 (1) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	48.1	47.7
시험 (2) 12분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	22.9	48.8
시험 (2) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	48.8	48.7
시험 (3) 12분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	22.8	48.9
시험 (3) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	48.9	48.9
시험 (4) 12분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	24.0	50.3
시험 (4) 6분 동안 8W에서 930	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	50.3	50.5
시험 (5) 14분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	840	8400	4753	5.66	23.7	48.4
시험 (5) 9분 동안 6W에서 930	6.0	1.5	1.77	540	3240	1833	3.40	48.4	45.0
시험 (6) 14분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	840	8400	4753	5.66	23.5	49.2
시험 (6) 9분 동안 6W에서 930	6.0	1.5	1.77	540	3240	1833	3.40	42.9	46.3
시험 (7) 14분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	840	8400	4753	5.66	25.6	49.9
시험 (7) 9분 동안 6W에서 930	6.0	1.5	1.77	540	3240	1833	3.40	49.9	46.3
시험 (8) 14분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	840	8400	4753	5.66	22.1	48.0
시험 (8) 9분 동안 6W에서 930	6.0	1.5	1.77	540	3240	1833	3.40	48.0	46.0

<753>

<754>

MRSA 연구에 대한 독립적인 보고, 2006년 11월 9일-10일

<755>

MRSA 데이터 진행 11-10-06 실험 #3.

<756>

실험 3 - 설계:

<757>

실험 1 및 2에서 및 앞서 확립된 유효 용량에 기초한 8가지 상이한 레이저 용량을 사용하여 로그상으로 성장하

는 MRSA의 염수-현탁액을 처리하고, A3 내지 H3으로 표지하였다.

<758> 처리된 및 대조군의 처리되지 않은 현탁액을 희석하고, 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  메티실린을 함유하거나 함유하지 않는 트립틱 대두 아가 상에 5중으로 플레이팅하였다.

<759> 37°C에서 24 hr 성장시킨 후, 콜로니를 계수하였다.

<760> 실험 3 - 결과:

<761> 메티실린을 함유하는 및 함유하지 않는 플레이트 상의 CFU의 비교는 모든 레이저 처리된 샘플에서 메티실린의 유효성의 유의한 증가를 보여주었다. 상기 데이터를 아래에 표 형식으로 요약한다.

**표 41**

그룹	메티실린 감수성의 증가 배수
A3	1.98
B3	1.62
C3	1.91
D3	2.59
E3	2.09
F3	2.08
G3	3.16
H3	2.97

<762>

표 42

MRSA 데이터 진행 11-10-06 실험 #3

NOMIR MRSA 연구 2006년 11월 9일-10일								
		메티실린 (Meth)		CFU	AVG	CFU/ml	Meth 효과	레이저 효과 (+ M)
A3	대조군	없음	1	41	47	1.41E+08		
			2	63				
			3	46				
			4	49				
			5	36				
			1	35	48.4	1.45E+08	1.03	
		있음	2	45				
			3	52				
			4	66				
			5	44				
	실험군	없음	1	24	31.4	9.42E+07		
			2	34				
			3	26				
			4	33				
			5	40				
		있음	1	23	16.2	4.86E+07	0.52	0.33
			2	15				
			3	14				
			4	16				
			5	13				
B3	대조군	없음	1	109	72	2.16E+08		
			2	61				
			3	59				
			4	61				
			5	70				
		있음	1	61	71.4	2.14E+08	0.99	
			2	79				
			3	51				
			4	68				
			5	98				
	실험군	없음	1	27	31.2	9.36E+07		
			2	25				
			3	39				
			4	24				
			5	41				
		있음	1	9	19	5.70E+07	0.61	0.27
			2	22				
			3	23				
			4	25				
			5	16				
C3	대조군	없음	1	46	57.6	1.73E+08		
			2	60				
			3	60				
			4	66				
			5	56				
		있음	1	70	58.4	1.75E+08	1.01	
			2	54				
			3	52				
			4	51				

<763>

	실험군	없음	5	65				
			1	52	38.2	1.15E+08		
			2	34				
			3	38				
			4	34				
			5	33				
		있음	1	12	20.2	6.06E+07	0.53	0.35
			2	26				
			3	22				
			4	24				
			5	17				
D3	대조군	없음	1	50	50.6	1.52E+08		
			2	45				
			3	55				
			4	54				
			5	49				
		있음	1	58	51.2	1.54E+08	1.01	
			2	46				
			3	43				
			4	59				
			5	50				
	실험군	없음	1	7	9.2	2.76E+07		
			2	10				
			3	8				
			4	9				
			5	12				
		있음	1	6	3.6	1.08E+07	0.39	0.07
			2	3				
			3	1				
			4	5				
			5	3				
E3	대조군	없음	1	47	54.8	1.64E+08		
			2	55				
			3	71				
			4	45				
			5	56				
		있음	1	56	50.6	1.52E+08	0.92	
			2	48				
			3	48				
			4	52				
			5	49				
	실험군	없음	1	50	53.2	1.60E+08		
			2	65				
			3	49				
			4	46				
			5	56				
		있음	1	15	23.6	7.08E+07	0.44	0.47
			2	24				

<764>

			3	26				
			4	27				
			5	26				
F3	대조군	없음	1	57	72.4	2.17E+08		
			2	142				
			3	62				
			4	52				
			5	49				
	있음		1	65	53.2	1.60E+08	0.73	
			2	50				
			3	54				
			4	40				
			5	57				
	실험군	없음	1	29	28.4	8.52E+07		
			2	39				
			3	25				
			4	23				
			5	26				
		있음	1	13	9.8	2.94E+07	0.35	0.18
			2	10				
			3	14				
			4	5				
			5	7				
G3	대조군	없음	1	60	57.8	1.73E+08		
			2	53				
			3	54				
			4	66				
			5	56				
	있음		1	56	67.6	2.03E+08	1.17	
			2	56				
			3	70				
			4	63				
			5	93				
	실험군	없음	1	23	22.8	6.84E+07		
			2	24				
			3	21				
			4	21				
			5	25				
		있음	1	9	8.4	2.52E+07	0.37	0.12
			2	11				
			3	5				
			4	8				
			5	9				
H3	대조군	없음	1	64	72.4	2.17E+08		
			2	86				
			3	72				
			4	45				
			5	95				

<765>

		있음	1	72	75.2	2.26E+08	1.04	
			2	75				
			3	71				
			4	79				
			5	79				
	실험군	없음	1	20	23.8	7.14E+07		
			2	17				
			3	23				
			4	28				
			5	31				
		있음	1	6	8.4	2.52E+07	0.35	0.11
			2	12				
			3	4				
			4	9				
			5	11				

<766>



표 43

<767>

NOMIR MRSA 연구에 대한 개략적인 프로토콜 - 2006년 11월 10일 방법:		
시간 (시)	업무	FTE (시)
T-18	배양액을 밤새 접종함 글리세롤 원액으로부터 직접 50 ml	1
T-4	스타터 배양액 설정 3가지 희석액 1:50, 1:125, 1:250	1
	스타터 배양액의 OD <sub>600</sub> 모니터링	4
T0	플레이팅 배양액의 제조. 오전 10:00에, OD <sub>600</sub> =1.0인 배양액을 PBS (최종 부피 50 ml) 내에 1:300으로 희석하고, RT에서 1시간 동안 저장한다. (실온은 ~25°C이어야 함)	1
T +1	24-웰 플레이트의 접종 (총 6개의 플레이트). 2 ml 분취액을 24-웰 플레이트 내의 예비-지정된 웰 내로 분배하고, NOMIR 로 옮긴다 (총 6개의 24-웰 플레이트).	1
T +2 내지 +8	처리된 샘플의 희석. 레이저 처리 후, 각각의 웰로부터 100 µl을 PBS 내에 1:1000의 최종 희석액 으로 연속 희석한다.	4
	처리된 샘플의 플레이팅. 100 µl의 최종 희석액을 다음 방식으로 TSB 아가 상에 5중으로 (5X) 플레이 팅한다: 24 웰 플레이트 #1 및 2는 30 µg/ml 메티실린과 함께 및 메티실린 없이. 24 웰 플레이트 #3 및 4는 µg/ml 페니실린과 함께 및 페니실린 없이. 24 웰 플레이트 #5 및 6은 µg/ml 에리스로마이신과 함께 및 에리스로마이신 없이. (웰 당 10 TSB 플레이트).	2
	플레이트를 37°C에서 18-24시간 동안 인큐베이팅한다.	
T +24	각 플레이트 상에서 콜로니를 계수한다 (총 120개의 플레이트).	6

표 44

MRSA 방사선량 진행 11-10-06 실험 #4

MRSA 방사선량 진행 11-10-06  
제1 레이저 처리 절차: 870 및 930 모두  
제2 레이저 처리 절차: 930 단독

파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)	총 에너지 줄	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )	초기 온도 ℃	최종 온도 ℃
시험 (1) 12분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	22.3	46.3
시험 (1) 6분 동안 8W에서 930 (메티실린 플레이트)	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	46.3	47.6
시험 (2) 14분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	840	8400	4753	5.66	23.1	47.1
시험 (2) 9분 동안 6W에서 930 (메티실린 플레이트)	6.0	1.5	1.77	540	3240	1833	3.40	47.1	44.3
시험 (3) 12분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	24.4	48.4
시험 (3) 6분 동안 8W에서 930 (페니실린 G 플레이트)	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	48.4	47.1
시험 (4) 14분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	840	8400	4753	5.66	23.3	47.9
시험 (4) 9분 동안 6W에서 930 (페니실린 G 플레이트)	6.0	1.5	1.77	540	3240	1833	3.40	47.9	45.0
시험 (5) 12분 동안 5.5W에서 870 및 5.5W 에서 930, 이어서	11.0	1.5	1.77	720	7920	4482	6.22	22.9	50.2
시험 (5) 6분 동안 8W에 서 930 (에리트로마이신 플레이트)II	8.0	1.5	1.77	360	2880	1630	4.53	50.2	51.6
시험 (6) 14분 동안 5W에서 870 및 5W에서 930, 이어서	10.0	1.5	1.77	840	8400	4753	5.66	24.2	50.3
시험 (6) 9분 동안 6W에 서 930 (에리트로마이신 플레이트)	6.0	1.5	1.77	540	3240	1833	3.40	50.3	43.6

<768>

<769>

MRSA 연구에 대한 독립적인 보고, 2006년 11월 10일-11일

<770>

(MRSA 데이터 진행 11-10-06 실험 #4)

<771>

실험 4 - 설계:

<772>

선행 실험에서 확립된 유효 용량에 기초한 2가지 상이한 레이저 용량을 사용하여 로그상으로 성장하는 MRSA의 염수-현탁액을 처리하고, A4 내지 F4로 표지하였다.

<773>

처리된 및 대조군의 처리되지 않은 현탁액을 희석하고, 30 µg/ml 메티실린 (그룹 A4 및 B4), 0.5 µg/ml 페니실린 G (그룹 C4 및 D4) 또는 4 µg/ml 에리트로마이신 (그룹 E4 및 F4)을 함유하거나 함유하지 않는 트립틱 대두아가 상에 5중으로 플레이팅하였다.

<774>

37℃에서 24 hr 성장시킨 후, 콜로니를 계수하였다.

<775>

실험 4 - 결과:

<776>

레이저 처리는 시험된 각각의 항생제에 대한 MRSA의 감수성을 몇 배 증가시킨다. 상기 데이터를 아래에 요약한다.

<777>

시리즈	약물
A4	메티실린

B4	메티실린
C4	페니실린
D4	페니실린
E4	에리쓰로마이신
F4	에리쓰로마이신

표 45

그룹	항생제 감수성의 증가 배수
A4	2.19
B4	2.63
C4	2.21
D4	3.45
E4	50.50
F4	9.67

표 46

MRSA 데이터 진행 11-10-06 실험 #4

OMIR MRSA 연구 2006년 11월 10일-11일								
		약물		CFU	AVG	CFU/ml	약물 효과	레이저 효과 (+ 약물)
A4	대조군	없음	1	84	92	2.76E+08		
			2	95				
			3	69				
			4	106				
			5	106				
		있음	1	97	86.2	2.59E+08	0.94	
			2	104				
			3	82				
			4	58				
			5	90				
	실험군	없음	1	82	84.4	2.53E+08		
			2	80				
			3	85				
			4	90				
			5	85				
		있음	1	37	36.2	1.09E+08	0.43	0.42
			2	33				

			3	36				
			4	39				
			5	36				
B4	대조군	없음	1	86	105	3.15E+08		
			2	142				
			3	105				
			4	97				
			5	95				
		있음	1	149	132.6	3.98E+08	1.26	
			2	101				
			3	119				
			4	153				
			5	141				
	실험군	없음	1	73	88.8	2.66E+08		
			2	84				
			3	109				
			4	89				
			5	89				
		있음	1	46	42.4	1.27E+08	0.48	0.32
			2	34				
			3	42				
			4	44				
			5	46				
C4	대조군	없음	1	211	143.8	4.31E+08		
			2	138				
			3	114				
			4	145				
			5	111				
		있음	1	106	108.4	3.25E+08	0.75	
			2	99				
			3	102				
			4	113				
			5	122				
	실험군	없음	1	84	90.2	2.71E+08		
			2	84				
			3	87				
			4	107				
			5	89				
		있음	1	25	30.4	9.12E+07	0.34	0.28
			2	33				
			3	19				
			4	33				
			5	42				
D4	대조군	없음	1	111	123.6	3.71E+08		
			2	110				
			3	135				
			4	107				
			5	155				

<780>

		있음	1	101	132.8	3.98E+08	1.07	
			2	111				
			3	138				
			4	132				
			5	182				
		없음	1	73	75.6	2.27E+08		
			2	86				
			3	93				
			4	74				
			5	52				
	실험군	있음	1	14	23.8	7.14E+07	0.31	0.18
			2	23				
			3	22				
			4	29				
			5	31				
E4	대조군	없음	1	122	125.6	3.77E+08		
			2	154				
			3	127				
			4	116				
			5	109				
		있음	1	199	127	3.81E+08	1.01	
			2	125				
			3	103				
			4	101				
			5	107				
	실험군	없음	1	17	17.6	5.28E+07		
			2	20				
			3	18				
			4	21				
			5	12				
		있음	1	0	0.4	1.20E+06	0.02	0
			2	1				
			3	0				
			4	0				
			5	1				
F4	대조군	없음	1	117	177.8	5.33E+08		
			2	126				
			3	318				
			4	166				
			5	162				
		있음	1	186	155.4	4.66E+08	0.87	
			2					
			3	121				
			4	132				
			5	168				
	실험군	없음	1	60	66.4	1.99E+08		
			2	54				
			3	60				

<781>

		있음	4	102				
			5	56				
			1	2	5.8	1.74E+07	0.09	0.04
			2	7				
			3	6				
			4	6				
			5	8				

<782>

<783> 실시예 XXIII

<784> 생체내 안전성 시험 - 인간 환자

<785> 시험관내 섬유모세포 연구 후, 본 발명자는 방사선 조사된 조직을 화상을 입히거나 달리 손상시키지 않으면서 인간 피부 조직에 전달될 수 있는, 안전한, 최대 수준의 에너지 및 노출 시간을 확인하기 위해 자신에게 방사선량 적정을 수행하였다.

<786> 본 발명자가 사용한 방법은 NIMELS 레이저를 사용하여 상이한 길이의 시간 및 전력 세팅 동안 엄지발가락에 방사선을 조사하는 것이었다. 상기 자가-노출 실험의 결과를 아래에 기재한다.



표 47

조합 파장 방사선량

파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)	총 에너지 출	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
870 nm	1.5	1.5	1.77	250	375	212	0.85
930 nm	1.5	1.5	1.77	250	375	212	0.85
조합	3.0	1.5	1.77	250	750	424	1.70

표 48

$\lambda = 930 \text{ nm}$ 에서 방사선량

파라미터	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)	총 에너지 출	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
930 nm	3.0	1.5	1.77	120	360	204	1.70

인간 피부 조직에 대한 이들 레이저 에너지의 열 안전성을 보장하기 위해 시간/온도 평가를 표로 작성하였다 (데이터를 제시하지 않음). 하나의 레이저 절차에서, 엄지발가락을 870 nm 및 930 nm에 233초까지 노출하면서, 레이저 적외선 온도계를 사용하여 발톱 표면 온도를 측정하였다. 37.5℃의 표면 온도에서, 870 nm 및 930 nm를 함께 1.70 W/cm<sup>2</sup>의 조합 전력 밀도로 사용하는 상기 방사선량을 사용하면 통증이 발생하였음을 발견하였고, 레이저를 켜다.

제2 레이저 절차에서, 엄지발가락을 930 nm에 142초까지 노출하면서, 다시 레이저 적외선 온도계를 사용하여 발톱 표면 온도를 측정하였다. 36℃의 표면 온도에서, 930 nm를 단독으로 1.70 W/cm<sup>2</sup>의 전력 밀도에서 사용하면, 통증이 발생하였음을 발견하였고, 레이저를 켜다.

#### 실시예 XXIV

#### 생체내 안전성 시험 - 제한된 임상 파일럿 (PILOT) 연구

상기 실험에 이어, 발에 손발톱진균증을 갖는 추가의 환자를 치료하였다. 이들 환자는 모두 무급 지원자였고, 고지에 의한 동의서 (informed consent)에 서명하였다. 상기 제한된 파일럿 연구의 기본 목표는 NIMELS 레이저 장치를 사용하여 시험관 내에서 달성되는 것과 동일한 수준의 진균 오염제거를 생체 내에서 달성하기 위한 것이다. 본 발명자들은 또한 자가-노출 실험 동안 본 발명자가 견딜 최대 시간 노출 및 온도 한계를 적용하도록 결정하였다. 고도로 제어되고 모니터링되는 환경에서, 3 내지 5개의 레이저 노출 절차를 각각의 대상에 대해 수행하였다. 4명의 대상을 모집하여, 치료하였다. 고지에 의한 동의서에 서명한 대상에게 보상하지 않았고, 절차 동안이라도 아무 때나 취소할 수 있음을 알려주었다.

제1 대상의 치료에 사용된 방사선량은 본 발명자의 자가-노출 동안 사용된 것과 동일하였다 (상기 제시함). 발톱의 표면 상의 온도 파라미터는 또한 자가-노출 시에 본 발명자가 발견한 온도와 동등하였다.

처리한 발톱에서는 발톱층을 둘러싸는 족부백선 및 낙질이 유의하게 감소하였고, 이는 진균에 대한 저장고로서 작용하는 발톱판의 오염제거를 나타낸다. 대조 발톱을 교차-절단 조직 절삭기 (bur)로 긁어내고, 부스러기를 구하여 균류학적 배지 상에 플레이팅하였다. 처리된 발톱을 정확하게 동일한 방식으로 긁어내고 플레이팅하였다.

발톱 부스러기를 배양하기 위해, Sabouraud 텍스트로스 아가 (2% 텍스트로스) 배지를 다음을 첨가하여 제조하였다: 전반적인 진균 시험을 위해 클로람페니콜 (0.04 mg/ml); 클로람페니콜 (0.04 mg/ml) 및 시클로헥시미드 (0.4 g/ml) (피부진균에 대해 선택적임); 클로람페니콜 (0.04 mg/ml) 및 그리세오폴빈 (20 µg/ml) (진균 성장에 대한 음성 대조군으로서 역할을 함).

처리 #1 및 처리 #2 (처리 #1의 3일 후에 수행함)에 대한 9일의 균류학적 결과는 동일하였고, 즉, 피부진균은 대조 발톱판 상에서 성장하고, 처리된 발톱판 상에서 성장하지 않았다. 처리된 판은 어떠한 성장도 보이지 않은 반면, 처리되지 않은 대조 배양판은 유의한 성장을 보였다.

제1 대상은 120일 동안 참여하였고, 동일한 프로토콜 하에 4개의 처리를 받았다. 도 18은 처리전 (A), 처리후 60일 (B), 처리후 80일 (C) 및 처리후 120일 (D) 발톱의 비교를 도시한다. 특히, 건강한 감염되지 않은 발톱판

이 발톱 면적의 50%를 덮고, 120일 후 건강한 큐티클로부터 성장하였다.

<799>

특정 실시태양을 본원에서 설명하였지만, 당업자는 본 발명의 방법, 시스템 및 기구가 그의 취지를 벗어나지 않으면서 다른 특이적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 실시태양은 모든 측면에서 본 발명을 제한하는 것이 아니라 예시하는 것으로서 간주되어야 한다. 인간 발톱이 불응성 (refractory) 렌즈로 작용하고, NIMELS 적외선 에너지의 일부를 분산 및/또는 반사시키는 것이 이해된다. 따라서, 조직을 화상/손상시키지 않으면서 최대 NIMELS 방사선량을 적정하기 위해 돼지 피부 용량/내성 연구를 수행하였다. 돼지 피부는 인간 피부에 대한 모델로서 사용되었다. 이들 연구는 동물보호법 (Animal Protection Act)의 규정에 따라 실험 동물 관리 및 이용에 관한 NIH 지침 (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)에 따라 수행하였다. 이들 시험을 아래에 나타낸다.

<800>

돼지 피부 용량/내성 연구

표 49

용량 ID	파라미터 (nm)	출력 전력 (W)	광선 점 (cm)	점의 면적 (cm <sup>2</sup> )	시간 (초)	총 에너지 (J)	에너지 밀도 (J/cm <sup>2</sup> )	전력 밀도 (W/cm <sup>2</sup> )
1	870	1.3	1.5	1.77	120	156	88	0.74
	930	1.3	1.5	1.77	120	156	88	0.74
	조합	2.6	1.5	1.77	120	312	177	1.47
	930 단독	2.6	1.5	1.77	50	130	74	1.47
2	870	1.3	1.5	1.77	140	182	103	0.74
	930	1.3	1.5	1.77	140	182	103	0.74
	조합	2.6	1.5	1.77	140	364	206	1.47
	930 단독	2.6	1.5	1.77	60	156	88	1.47
3	870	1.3	1.5	1.77	160	208	118	0.74
	930	1.3	1.5	1.77	160	208	118	0.74
	조합	2.6	1.5	1.77	160	416	235	1.47
	930 단독	2.6	1.5	1.77	70	182	103	1.47
4	870	1.3	1.5	1.77	180	234	132	0.74
	930	1.3	1.5	1.77	180	234	132	0.74
	조합	2.6	1.5	1.77	180	468	265	1.47
	930 단독	2.6	1.5	1.77	80	208	118	1.47
5	870	1.5	1.5	1.77	100	150	85	0.85
	930	1.5	1.5	1.77	100	150	85	0.85
	조합	3	1.5	1.77	100	300	170	1.7
	930 단독	3	1.5	1.77	40	120	68	1.7
6	870	1.5	1.5	1.77	120	180	102	0.85
	930	1.5	1.5	1.77	120	180	102	0.85
	조합	3	1.5	1.77	120	360	204	1.7
	930 단독	3	1.5	1.77	50	150	85	1.7
	870	1.5	1.5	1.77	140	210	119	0.85

<801>

7	930	1.5	1.5	1.77	140	210	119	0.85
	조합	3	1.5	1.77	140	420	238	1.7
	930 단독	3	1.5	1.77	60	180	102	1.7
	870	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군
8	930	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군
	조합	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군
	930 단독	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군
	870	1.15	2	3.14	100	115	37	0.37
9	930	1.15	2	3.14	100	115	37	0.37
	조합	2.3	2	3.14	100	230	73	0.73
	930 단독	2.3	2	3.14	40	92	29	0.73
	870	1.15	2	3.14	120	138	44	0.37
10	930	1.15	2	3.14	120	138	44	0.37
	조합	2.3	2	3.14	120	276	88	0.73
	930 단독	2.3	2	3.14	50	115	37	0.73
	870	1.15	2	3.14	140	161	51	0.37
11	930	1.15	2	3.14	140	161	51	0.37
	조합	2.3	2	3.14	140	322	102	0.73
	930 단독	2.3	2	3.14	60	138	44	0.73
	870	1.15	2	3.14	160	184	59	0.37
12	930	1.15	2	3.14	160	184	59	0.37
	조합	2.3	2	3.14	160	368	117	0.73
	930 단독	2.3	2	3.14	70	161	51	0.73
	870	1.15	2	3.14	180	207	66	0.37
13	930	1.15	2	3.14	180	207	66	0.37
	조합	2.3	2	3.14	180	414	132	0.73
	930 단독	2.3	2	3.14	80	184	59	0.73

<802>

	870	1.15	2	3.14	200	230	73	0.37
14	930	1.15	2	3.14	200	230	73	0.37
	조합	2.3	2	3.14	200	460	146	0.73
	930 단독	2.3	2	3.14	90	207	66	0.73
	870	1.15	2	3.14	240	276	88	0.37
15	930	1.15	2	3.14	240	276	88	0.37
	조합	2.3	2	3.14	240	552	176	0.73
	930 단독	2.3	2	3.14	120	276	88	0.73
	870	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군
20	930	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군
	조합	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군
	930 단독	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군	대조군

<803>

<804>

실시예 XXV

<805> 비-열 NIMELS 상호작용

<806> 비-열 NIMELS 상호작용에 대한 증거:

<807> 실험 (시험관내 수조 연구)을 통해, 시험관내 NIMELS 실험에서 도달된 온도가 병원체를 중화시키기 위해 그 자체로는 원래 충분히 높지 않은 것으로 입증되었다.

<808> 아래 표에서, 단순 이. 콜라이. 세균은 수조 내의 시험관 내에 47.5°C에서 연속적으로 8분 동안 접종될 때, 콜로니의 91% 성장을 달성하는 것을 명백하게 볼 수 있다. 따라서, 본질적으로 NIMELS 반응은 실제로 성질이 광화학적이고, 외인성 약물 및/또는 염료의 부재 하에 일어나는 것으로 나타났다.

표 50

수조 시험			
세균을 실온에서 3시간 동안 벤치 (bench) 상에 PBS 내에; 이어서 47.5°C에서 수조 내에 8분 동안 둔 후 플레이팅하였다.			
	대조군 8/26/2005		최종 8/26/2005
A	73	D	64
B	82	E	73
C	75	F	72
평균 성장 %		90.9% 생존	
8분 동안 47.5°C 후			

<809>

### 도면의 간단한 설명

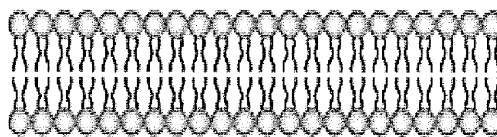
- <9> 본 발명의 측면들은 특성상 예시적이고 제한하는 것이 아닌 것으로 간주되어야 하는 첨부하는 도면과 함께 읽을 때 다음 설명으로부터 보다 충분히 이해될 수 있다. 도면은 반드시 일정 비율로 그려져야 하는 것은 아니고, 대신에 본 발명의 원리가 강조된다.
- <10> 도 1은 전형적인 인지질 이중층 (bilayer)을 보여준다.
- <11> 도 2는 인지질의 화학 구조를 보여준다.
- <12> 도 3은 인지질 이중층 막에서 쌍극자 (dipole) 효과 ( $\Psi_d$ )를 보여준다.
- <13> 도 4A는 NIMELS 방사선 조사 전의 정상-상태 막횡단 전위를 갖는 세균 형질막, 포유동물 미토콘드리아막 또는 진균 미토콘드리아막 내의 인지질 이중층을 보여준다. 도 4B는 NIMELS 방사선 조사 후의 세균 형질막, 포유동물 미토콘드리아막 또는 진균 미토콘드리아막 내의 과도-상태 (transient-state) 형질막 전위를 보여준다.
- <14> 도 5는 내부에 막횡단 단백질이 매립된 (embedded) 인지질 이중층을 보여준다.
- <15> 도 6은 전자 수송 및 양성자 펌프 (pump)의 일반적인 묘사를 보여준다.
- <16> 도 7은  $\Delta\Psi$ -mito-fungi 또는  $\Delta\Psi$ -mito-mam에 상응하는 진균 및 포유동물 세포 내의 미토콘드리아막의 일반적인 도면을 보여준다.
- <17> 도 8은 레이저 처리한 (lasing) 후 시간 (분)의 함수로서 대조 및 레이저 처리한 샘플에서 초록 형광 방출 강도에 의해 측정된 MRSA 막횡단 전위에 대한 NIMELS 방사선 조사 (단일 방사선량에서)의 효과를 보여준다.
- <18> 도 9는 대조 샘플에 비해 레이저 처리한 샘플에서 초록 형광 방출 강도의 강하 %에 의해 측정되는 씨. 알비칸스 (*C. albicans*) 막횡단 전위에 대한 NIMELS 방사선 조사 (다양한 방사선량에서)의 효과를 보여준다.
- <19> 도 10은 대조 및 레이저 처리한 샘플에서 적색 형광 방출 강도에 의해 측정된 씨. 알비칸스 미토콘드리아 막 전위에 대한 NIMELS 방사선 조사 (단일 방사선량에서)의 효과; 및 대조 및 레이저 처리한 샘플에서 적색 대 초록 형광의 비로서 측정되는 씨. 알비칸스 미토콘드리아 막 전위에 대한 NIMELS 방사선 조사 (단일 방사선량에서)의 효과를 보여준다.
- <20> 도 11은 대조 및 레이저 처리한 샘플에서 적색 형광 방출 강도에 의해 측정되는 인간 배아 신장 세포의 미토콘드리아 막 전위에 대한 NIMELS 방사선 조사 (단일 방사선량에서)의 효과; 및 대조 및 레이저 처리한 샘플에서

적색 대 초록 형광의 비로서 측정되는 인간 배아 신장 세포의 미토콘드리아 막 전위에 대한 NIMELS 방사선 조사 (단일 방사선량에서)의 효과를 보여준다.

- <21> 도 12는 NIMELS 방사선 조사 (몇몇 방사선량에서)의 결과로서 MRSA 세포에서 반응성 산소종 (ROS) 생성과 상호 관련되므로 MRSA에서 총 글루타티온 농도의 감소를 보여주고; 레이저 처리한 샘플에서 글루타티온 농도의 감소를 대조 샘플에 비한 백분율로서 보여준다.
- <22> 도 13은 NIMELS 방사선 조사 (몇몇 방사선량에서)의 결과로서 씨. 알비칸스 세포에서 반응성 산소종 (ROS) 생성과 상호관련되므로 씨. 알비칸스에서 총 글루타티온 농도의 감소를 보여주고; 레이저 처리한 샘플에서 글루타티온 농도의 감소를 대조 샘플에 대한 백분율로서 보여준다.
- <23> 도 14는 NIMELS 방사선 조사 (2가지 상이한 방사선량에서)의 결과로서 인간 배아 신장 세포에서 반응성 산소종 (ROS) 생성과 상호관련되므로 인간 배아 신장 세포에서 총 글루타티온 농도의 감소를 보여주고; 레이저 처리한 샘플에서 글루타티온 농도의 감소를 대조 샘플에 대한 백분율로서 보여준다.
- <24> 도 15는 MRSA 콜로니의 성장 억제에서 NIMELS 및 메티실린의 상승적 효과를 보여주고; 테이타는 메티실린이 치사량-미만의 (sub-lethal) NIMELS 방사선량에 의해 강화됨을 보여준다.
- <25> 도 16은 MRSA 콜로니의 성장 억제에서 NIMELS 및 바시트라신의 상승적 효과를 보여주고; 화살표는 도시된 2개의 샘플에서 MRSA 콜로니의 성장 또는 그의 결핍을 표시하고; 영상은 바시트라신이 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에 의해 강화됨을 보여준다.
- <26> 도 17은 MRSA 콜로니의 성장 억제에서 메티실린, 페니실린 및 에리쓰로마이신과 함께 NIMELS의 실험 데이터에 의해 표시되는 바와 같이 상승적 효과를 묘사하는 막대 그래프를 보여준다.
- <27> 도 18은 본 발명의 방법에 따라 치료한 전형적인 손발톱진균증 환자의 발톱의 외관에서 시간이 지남에 따른 개선을 보여주는 복합 도면이다. 패널 A는 기저선, 치료 전 감염된 발톱을 보여주고, 패널 B는 치료 60일 후 발톱을 보여주고, 패널 C는 치료 80일 후 발톱을 보여주고, 패널 D는 치료 100일 후 발톱을 보여준다.
- <28> 도 19는 치사량-미만의 NIMELS 방사선 조사에서 이. 콜라이 (*E. coli*)에서 감소된 막 전위의 검출을 예시한 것이다.
- <29> 도 20은 치사량-미만의 NIMELS 방사선 조사에서 이. 콜라이에서 증가된 글루타티온의 검출을 예시한 것이다.
- <30> 특정 실시태양이 도면에 묘사되고 그에 관련하여 설명되지만, 당업자는 묘사된 실시태양이 설명적이고, 나타낸 것의 변형 및 본원에 기재된 다른 것이 고안되고 실시될 수 있고, 본 발명의 범위 내에 있음을 이해할 것이다.

## 도면

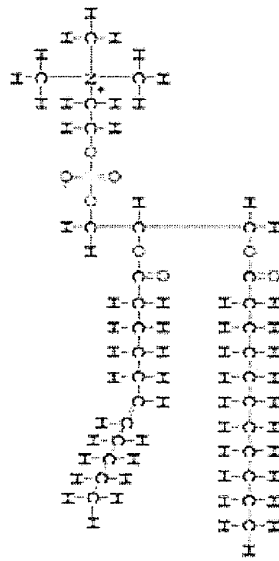
### 도면1



인지질 이중층

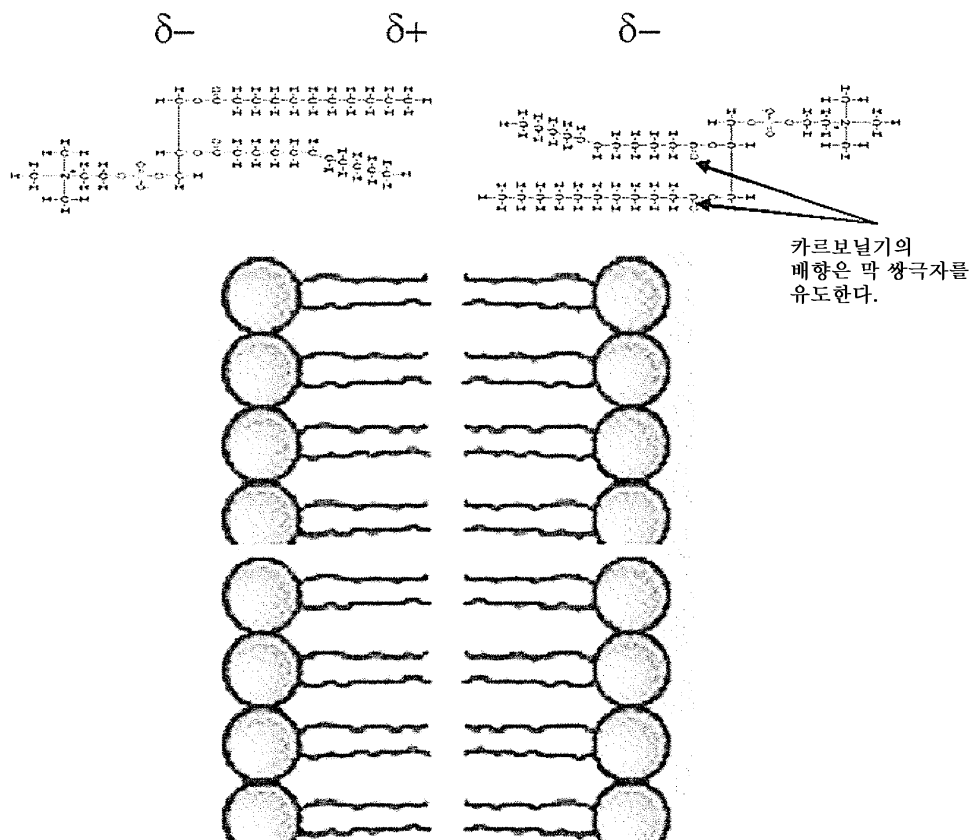


도면2

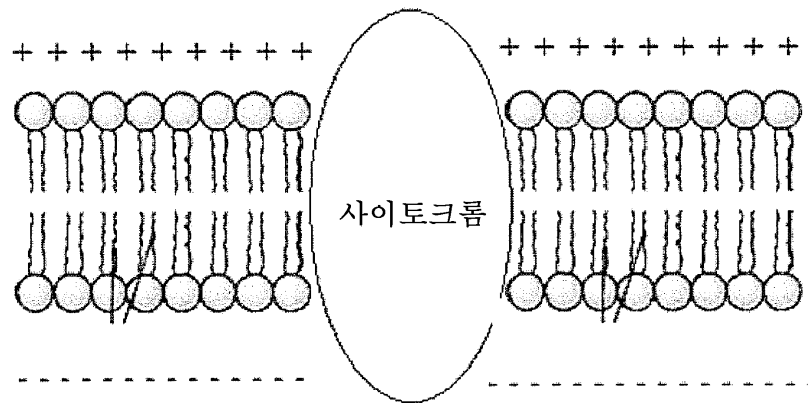


인지질

도면3

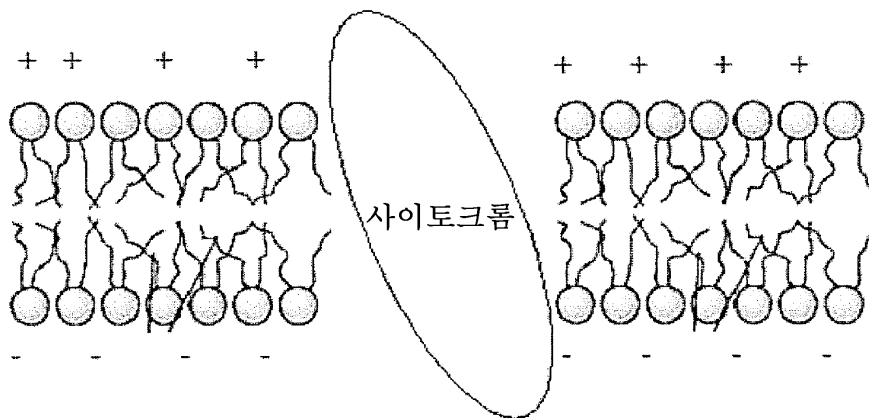


도면4A



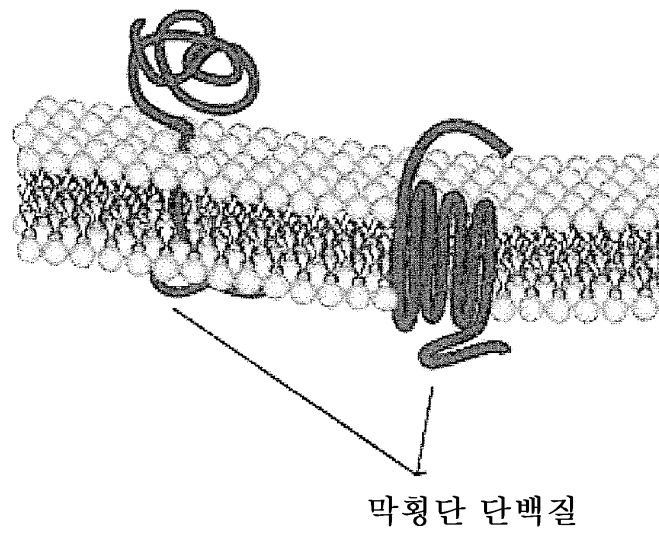
NIMELS 방사선 조사 전의  $\Delta\Psi$ -steady-Bact,  $\Delta\Psi$ -steady-mito-mam 및  $\Delta\Psi$ -steady-mito-fungi

도면4B

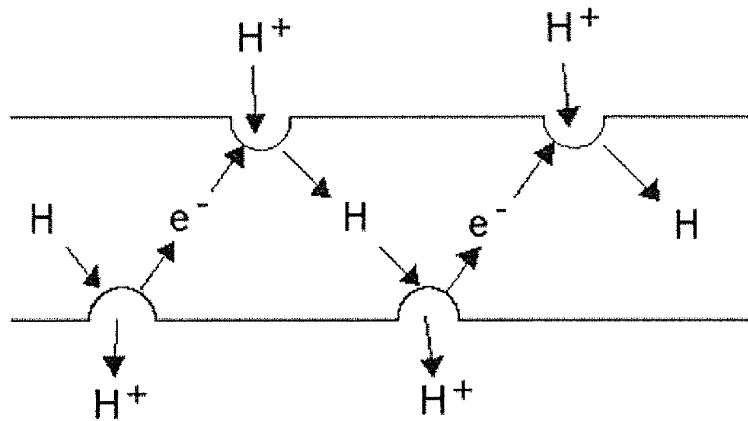


NIMELS 방사선 조사 동안 및 후의  $\Delta\Psi$ -trans-Bact,  $\Delta\Psi$ -trans-mito-mam 및  $\Delta\Psi$ -trans-mito-fungi

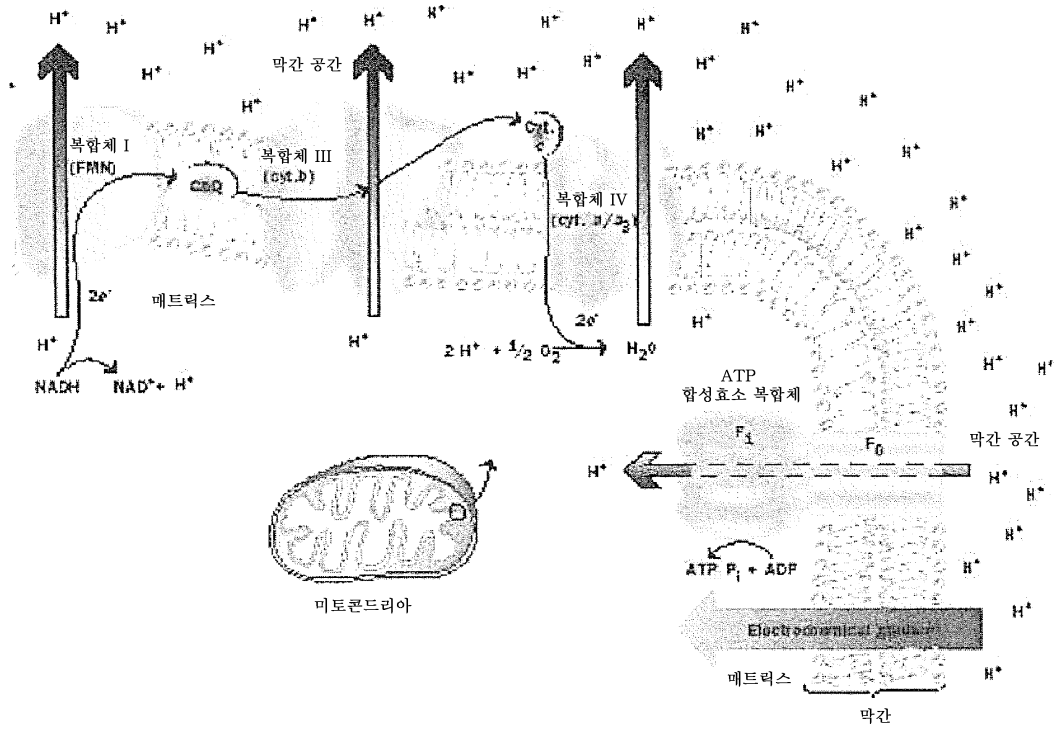
도면5



도면6

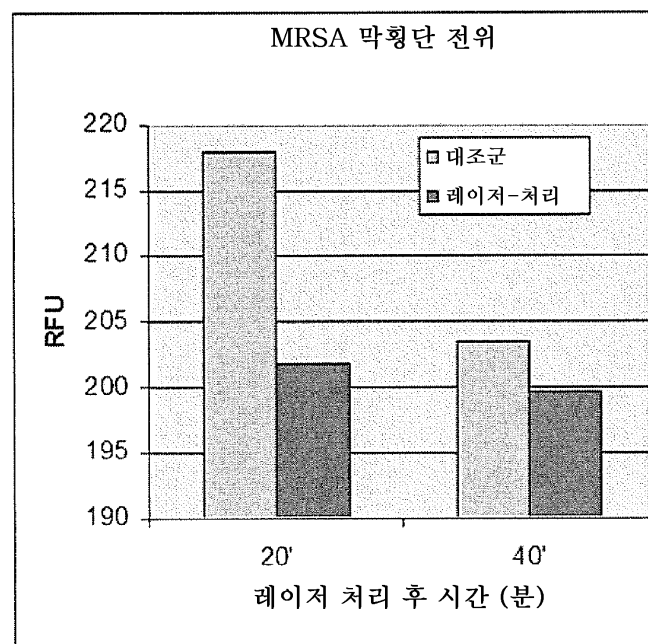


도면7



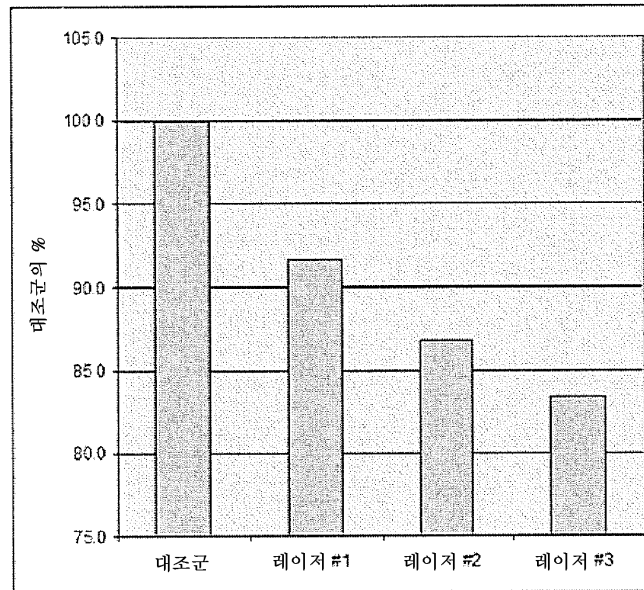
도면8

MRSA에서 막 전위  $\Delta\Psi$ 의 검출:



도면9

씨. 알비칸스에서 막 전위  $\Delta\Psi$ 의 검출



도면10

칸디다 알비칸스  $\Delta\Psi$ -mito 시험

차트 1

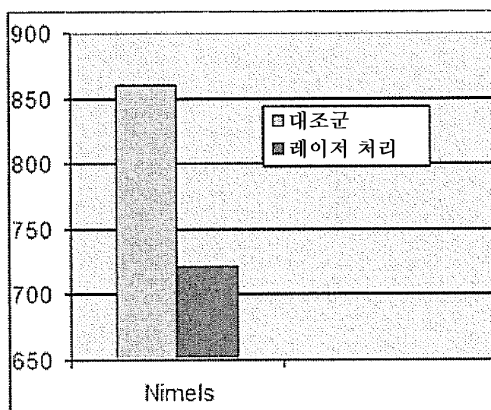
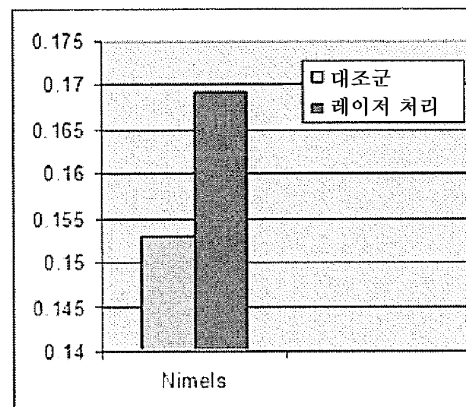


차트 2



도면11

HEK-293 (인간 배아 신장 세포)  $\Delta\Psi$ -mito 시험

차트 1

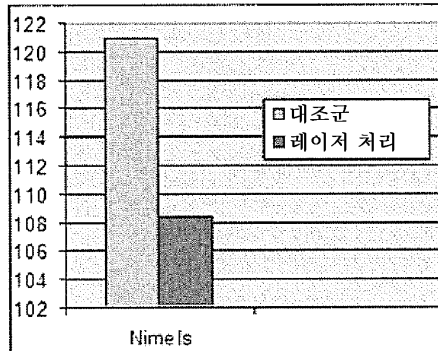
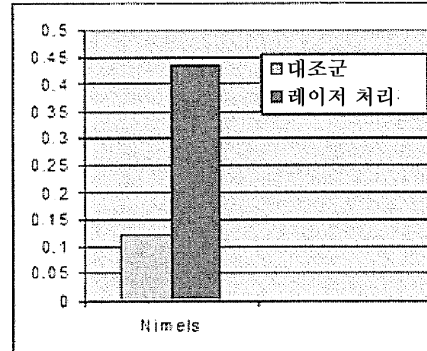
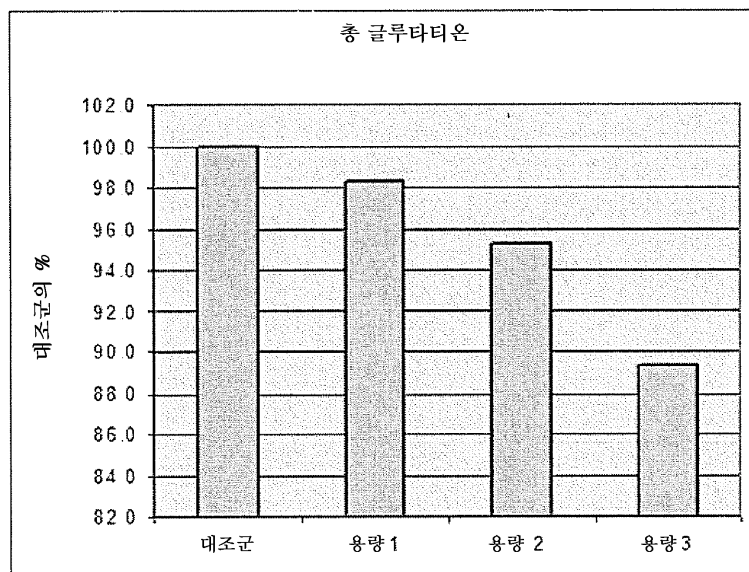


차트 2



도면12

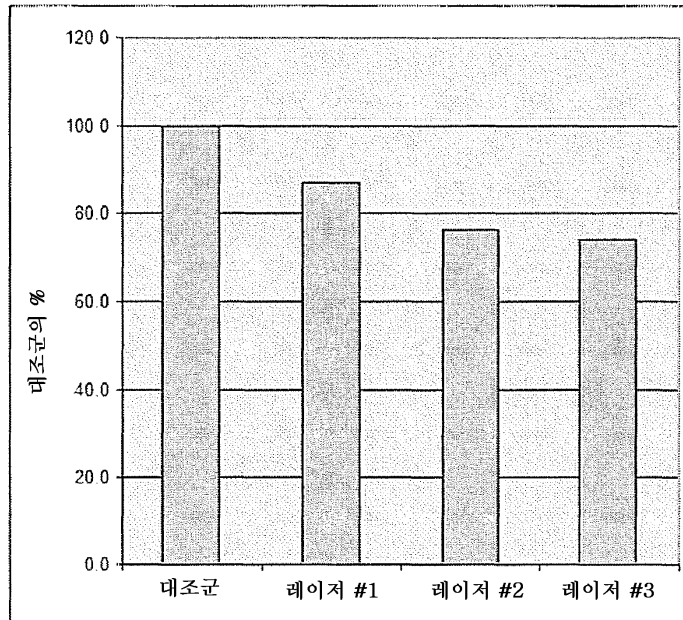
$\Delta\Psi$ -steady-bact를  $\Delta\Psi$ -trans-bact 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 MRSA 내에서 글루타티온의 검출





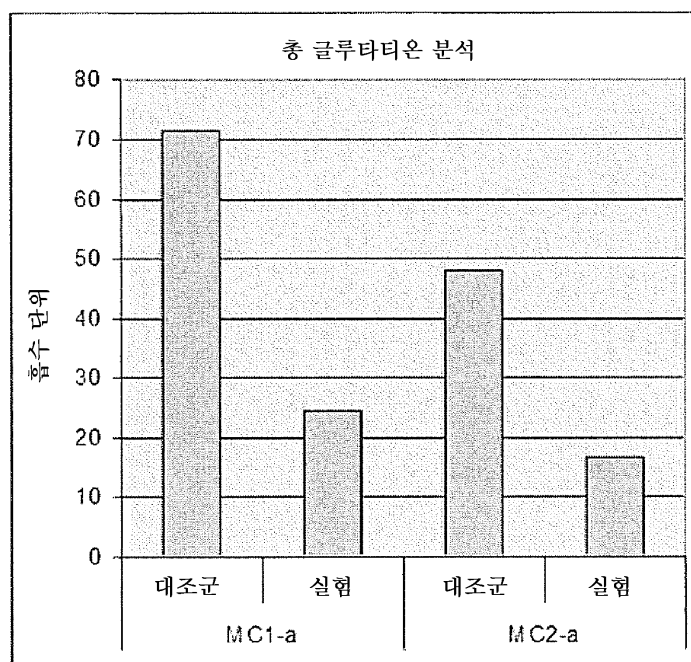
도면13

$\Delta\Psi$ -steady-mito-fungi를  $\Delta\Psi$ -trans-mito-fungi로 변경시키고 후속적으로  $\Delta\Psi$ -steady-fungi를  $\Delta\Psi$ -trans-fungi 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 써. 알비칸스 내에서 글루타티온의 검출

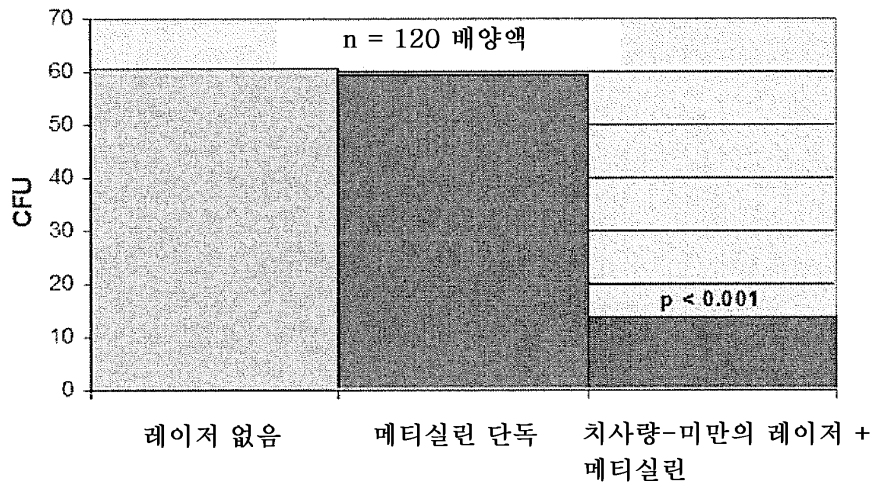


도면14

$\Delta\Psi$ -steady-mito-mam를  $\Delta\Psi$ -trans-mito-mam 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 HEK-293 (인간 배아 신장 세포) 내에서 글루타티온의 검출



도면15



결과 :

본 실험은 Nimels 시스템을 사용하는 치사량-미만의 레이저 파라미터 하에,  $\mu 1-\mu 2 \geq 0$ 임을 명백하게 보여준다. 이는 메티실린 (배출 펌프에 무관하게)이 MRSA의  $\Delta \Psi$ -steady-bact에 대한 NIMELS 효과에 의해 강화됨을 제안한다.

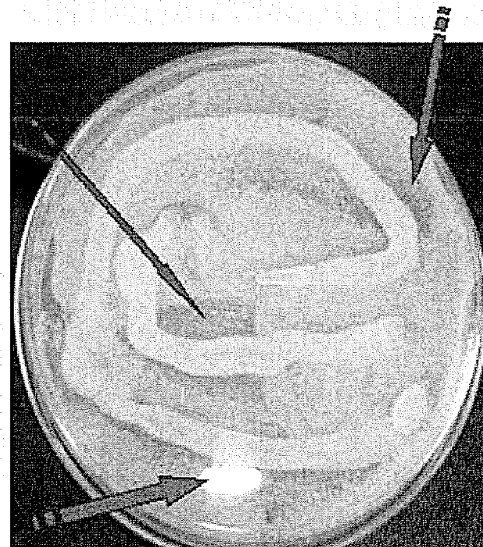
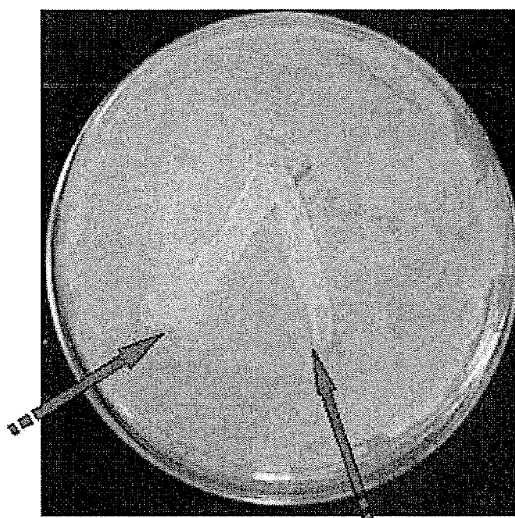
도면16

NOMIR  
Medical Technologies

일반명 바시트라신 500 IU 외용 w/MRSA-1

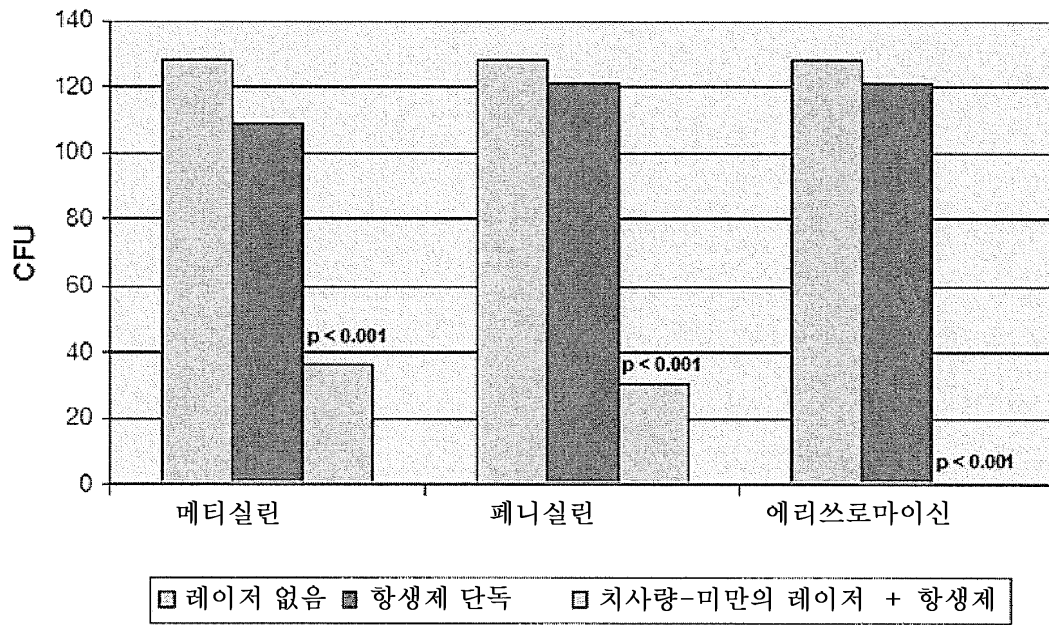
대조군 (레이저 없음)  
억제 대역이 없음

치사량-미만의 Nimels 레이저  
명백한 억제 대역



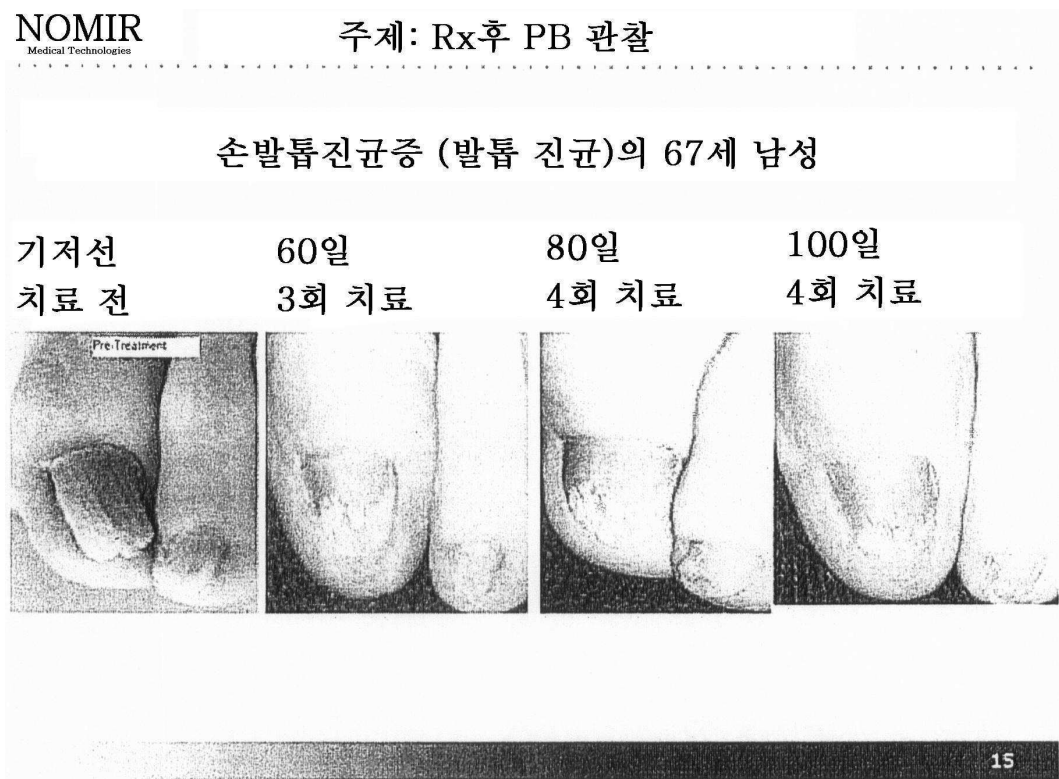


도면17



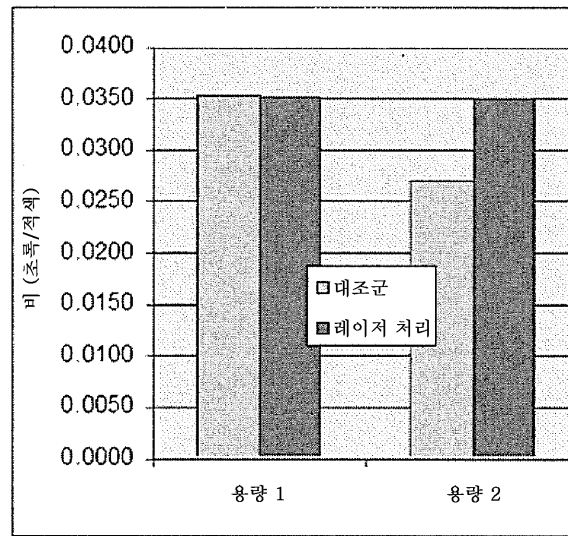
n = 각각의 항생제에 대해 30개의 배양액

도면18



도면19

이. 콜라이에 대한 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서  $\Delta\Psi$ -trans-bact



도면20

막형단  $\Delta\Psi$ -steady를  $\Delta\Psi$ -trans 중 하나로 변경시키는 치사량-미만의 NIMELS 방사선량에서 이. 콜라이 내에서 글루타티온의 검출

