



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월30일  
(11) 등록번호 10-1852784  
(24) 등록일자 2018년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 38/08 (2006.01) A61K 31/145 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01) A61L 15/44 (2006.01)  
A61L 15/46 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)  
A61L 29/16 (2006.01) A61L 31/16 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-7024561  
(22) 출원일자(국제) 2010년03월31일  
심사청구일자 2015년02월12일  
(85) 번역문제출일자 2011년10월18일  
(65) 공개번호 10-2012-0003893  
(43) 공개일자 2012년01월11일  
(86) 국제출원번호 PCT/GB2010/000631  
(87) 국제공개번호 WO 2010/112848  
국제공개일자 2010년10월07일  
(30) 우선권주장  
0905451.1 2009년03월31일 영국(GB)  
61/165,396 2009년03월31일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
W02008093058 A2\*  
W02007050565 A2\*  
W02007062272 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
노바바이오틱스 리미티드  
영국, 에이비21 9티알 애버딘 크레이브스톤 크루  
익생크 빌딩  
(72) 발명자  
오닐, 데보라  
영국, 애버딘 에이비21 9티알, 크레이브스톤, 더  
크루익생크 빌딩 노바바이오틱스 리미티드  
머서, 데리  
영국, 애버딘 에이비21 9티알, 크레이브스톤, 더  
크루익생크 빌딩  
새리어, 세드릭  
영국, 애버딘 에이비21 9티알, 크레이브스톤, 더  
크루익생크 빌딩  
(74) 대리인  
권혁수, 송윤호

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 광희찬

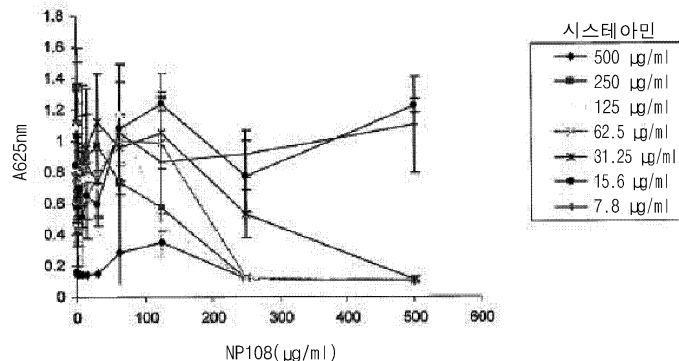
(54) 발명의 명칭 바이오필름 유기체 억제

(57) 요약

본 발명은 적어도 두 항바이오필름제를 포함하는 제품에 관한 것으로서, 항바이오필름제 중 적어도 하나는 항미생물 펩티드이다. 다른 항바이오필름제는 일반적으로 분산제 또는 항-부착제이다. 또한 미생물 감염의 치료에 사용되는 제품의 용도를 개시한다.

대표도 - 도11

조합 vs P.aeruginosa BAA47 바이오필름 세포들의 활성



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

박테리아에 의한 피부 및 상처 감염, 중이 감염, 위장관계 감염, 복막 감염, 비뇨생식기계 감염, 구강 연조직 감염, 치태 형성, 눈 감염, 심내막염, 그리고 낭포성 섬유증에서의 감염으로 구성된 그룹에서 선택된 질병 또는 병증의 예방, 경과의 지연, 또는 치료하는데 사용하기 위한, 시스테아민을 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

#### 청구항 47

삭제

#### 청구항 48

삭제

#### 청구항 49

삭제

#### 청구항 50

삭제

#### 청구항 51

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오필름들의 억제 및 처리와 관련하여 유용한 제품(product), 조성물, 방법 및 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 미생물 바이오필름은 세포 밖의 기질 중합 물질에 내포되고 생물체 또는 비-생물 표면에 부착된 미생물 세포들의 군집이다. 다양한 미생물(연관된 박테리오파지 및 다른 바이러스와 더불어, 박테리아, 균류, 그리고/또는 원생동물)이 이와 같은 바이오필름에서 발견될 수 있다. 바이오필름은 성질상 어디에나 있고 여러 주위 환경에서 흔히 발견된다. 바이오필름은 과학계 및 의료계에서 여러 감염들에 연루되고 특히 감염치료 방해에 일조를 하는데 연루된 것으로 널리 인식되고 있다.

[0003] 바이오필름은 포유류에서 많은 질병 상태의 기병성 인자로서 사람에서 감염의 약 80%에 연관되어 있다. 감염의 예로서, 피부 및 상처 감염, 중이 감염, 위장관 감염, 복막 감염, 비뇨생식기 감염, 구강 연조직 감염, 치태 형성, 눈 감염(콘택트 렌즈 오염 포함), 심내막염, 낭포성섬유증에서의 감염, 그리고 관절 인공기관, 치아 임플란트, 카테터 및 심장 임플란트 같은 유치(indwelling) 의료 기기의 감염 등이 있다.

[0004] 플랑크톤성 미생물(즉, 액체 환경에 부유하는 또는 성장하는 미생물)은, 임상 및 연구실 표준 협회(CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute) 및 항균제 내성 테스트 유럽 공동체(EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)이 기술한 바와 같이, 전형적으로 항균제 내성 연구를 위한 모델로 사용된다. 바이오필름의 미생물은 그 상대 플랑크톤성 미생물보다 항균 치료에 현저히 더 저항한다. 하지만, 바이오필름 미생물의 항균제 내성에 대한 연구의 표준 방법이 없다.

[0005] 바이오필름 형성은 미생물의 표면 부착 능력에만 유일하게 한정되는 것은 아니다. 바이오필름에서 미생물 성장은, 미생물이 초기에 성장하는 실제 물리적인 기체(substratum)와 상호작용하는 것보다 미생물들 사이에서 상호작용을 가능하게 한다. 예를 들어, 이 현상은 접합성 유전자 전달을 돕는다. 접합성 유전자 전달은 플랑크톤 세포들 사이에서보다 바이오필름의 세포들 사이에서 훨씬 높은 비율로 발생한다. 이는, 박테리아 사이의 수평적 유전자 전달을 위한 더욱 많은 기회가 있다는 것을 의미하고, 내성 미생물에서 감염성 미생물로의 항균 저항성(antimicrobial resistance) 또는 독성 결정 유전자 전달을 용이하게 할 수 있기 때문에 중요하다. 박테리아는 퀴럼센싱(quorum sensing)이라고 알려진 정보전달체계에 의해서 서로 정보를 주고받는다. 퀴럼센싱을 통해서 신호 분자들이 배출되고 배출된 신호 분자들의 집결이 주위 미생물에 의해서 감지된다. 퀴럼센싱으로 박테리아는 그 행동을 조절할 수 있고, 따라서 그 생존 능력을 향상시킬 수 있다. 퀴럼센싱에 대한 반응은 영양소 이용에 대한 적응, 동일한 영양소를 두고 경쟁할 수 있는 다른 미생물에 대한 방어, 그리고 박테리아에게 해로울 수 있는 독성 물질의 회피를 포함한다. 숙주(예를 들어, 인간, 다른 동물 또는 식물) 감염 동안, 숙주의 면역 반응을 피하여 성공적인 감염이 이루어지도록 독성을 조절하는 것이 병원성 박테리아에게는 아주 중요하다.

[0006] 바이오필름 형성은 많은 감염성 질병, 예를 들면 낭포성 섬유증 및 치주염에서 그리고 혈액순환 및 요로 감염에서 유지 의료 기기의 존재로 인해서 발생하는 감염에서 아주 중요한 역할을 한다. 바이오필름 관련 미생물이 그 숙주에서 병을 유발하는 제안된 기작은: (1) 항미생물제의 바이오필름 기질 통과 지연, (2) 유지 의료 기기 바이오필름으로부터 세포들의 분리 또는 세포들의 응집, (3) 내독소의 생성, (4) 숙주 면역 체계에 대한 내성, (5) 항미생물 저항성 그리고/또는 독성 결정 유전자의 수평 유전자 전달을 통한 저항성 생성을 위한 기생위치(niche) 제공, 그리고 (6) 변형된 성장을 (즉, 신진대사 휴면)을 포함한다(Donlan and Costerton, Clin Microbiol Rev 15: 167-193, 2002; Parsek and Singh, Annu Rev Microbiol 57: 677-701, 2003; Costerton JW, Resistance of biofilm to stress In The biofilm primer (Springer Berlin Heidelberg). pp 56-64. 2007).

[0007] 최근 실험에서 바이오필름 내에서 특별화된 비-대사성 지속 세포(perister cell)(휴면 세포)의 작은 소군집의 존재를 확인했다. 이 세포들이 항미생물제에 대한 바이오필름의 높은 저항성/내성을 책임지는 것으로 생각된다. 다제(multi-drug) 내성 지속 세포들이 플랑크톤성 군집 및 바이오필름 군집 모두에 존재하고, 효모 및 박테리아가 이 소군집에 생존기능을 부여하는 유사한 전략을 내는 것으로 추측된다. 중합 기질에 의한 보호로 인해 지속 세포들이 제거되는 것을 피할 수 있고 지속 세포들은 재-군집의 근거로 작용할 수 있다. 지속 세포들이 바이오필름의 다제 내성을 크게 책임지고 있다는 증거가 있다(LaFleur et al., Antimicrob Agents Chemother. 50: 3839-46, 2006; Lewis, Nature Reviews Microbiology 5, 48-56).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 바이오필름 형성을 억제하고 미생물 바이오필름과 관련한 증상을 치료하는 보다 나은 요법에 대한 요구가 여전히 있다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 측면에 따르면, 적어도 2개의 항바이오필름제를 포함하는 제품이 제공된다. 상기 항바이오필름제 중 적어도 하나는 항균 펩티드이다. 다른 항바이오필름제는 분산제 또는 항접착제이다.

[0010] 여기서, 용어 "항바이오필름제"는 미생물 바이오필름의 성장을 없애거나 억제할 수 있는 약제를 기술하는데 사용된다. 항바이오필름제는 바이오필름의 구조, 예를 들어 세포 밖의 점액 기질을 파괴하거나, 바이오필름 내의 미생물 세포들의 성장을 없애거나 억제할 수 있다.

[0011] 본 발명은 또한 환경에서 바이오필름 형성을 방지하는 방법을 제공하는바, 상기 방법은 상기 환경에 항균 펩티드를 제공하는 단계를 포함한다. 유익하게는, 상기 방법은 본 발명에 따른 제품을 상기 환경에 제공하는 단계를 포함한다.

[0012] 본 발명은 또한 예방 또는 요법으로 미생물 감염, 구체적으로는 미생물 바이오필름의 치료를 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 치료적으로 유효량의 항균 펩티드, 예를 들어 양이온성 펩티드를 제공하는 단계를 포함한다. 전형적으로 이 방법은 치료적으로 유효량으로 제1 항바이오필름제 및 제2 항 바이오필름제의 연속적 제공 또는 조합 제공을 포함한다. 제2 항바이오필름제는 제1 항바이오필름제와 다르며, 제1 항바이오필름 및 제2 항바이오필름 중 적어도 하나는 항미생물 펩티드 예를 들어 양이온성 펩티드이다.

[0013] 상술한 활성제는 자유 조합 또는 고정 조합으로 제공될 수 있다. 자유 조합은 모든 활성제를 자유 조합으로 포함하는 조합 패키지로 제공될 수 있다. 고정 조합은 종종 정제 또는 캡슐이다.

[0014] 본 발명은 항미생물 펩티드, 또는 상술한 활성제들의 조합의 예방 또는 치료에 의해 미생물 감염 특히 미생물 바이오필름 감염의 치료를 위한 약제의 제조에 사용하는 용도를 포함한다.

[0015] 본 발명에 따른 제품은 그 중에서도 바이오필름 근절에 필수 단계인 지속 세포들에 대한 항균력(항균 활성)(antibacterial activity)을 입증하였다는 점에서 이점을 가진다.

[0016] 본 발명의 약제는 약학적으로 허용가능한 염들의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용가능한 염들은 전통적인 화학적 방법에 의한 염기성 또는 산성 모이어티를 함유하는 모 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이 같은 염들은 유리 산 또는 염기 형태의 화합물들을 물 또는 유기 용매 또는 이 둘의 혼합에서 적절한 염기 또는 산의 화학량론적 양과 반응시키는 것에 의해 준비될 수 있으며, 일반적으로 에테르, 아세트산 에틸, 에탄올, 이소프로판올, 또는 아세토니트릴 같은 비수계 용매가 선호된다. 적절한 염들의 목록은

Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., US, 1985, p. 1418에서 찾을 수 있으며, 그 내용은 본 명세서에 포함된다; 또한 also Stahl et al, Eds, "Handbook of Pharmaceutical Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, 2002를 참조하라. "약학적으로 허용가능한"이라는 문구는 여기서 과도한 독성, 가려움증, 알레르기 반응 또는 다른 문제 혹은 합병증 없이 합리적인 이득/위험 비율에 걸맞는 사람 또는 경우에 따라서는 동물의 조직과의 접촉을 위한 사용에 적합한 안전한 의료 판단의 범위 내의 화합물, 제품, 조성물, 그리고/또는 제형(dosage form)을 가리키는데 사용된다.

[0017] 본 발명은 개시된 화합물의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는데, 모 화합물은 그것의 산성 염 또는 염기성 염, 예를 들어 무기 또는 유기 산들 또는 염기들로부터 형성되는 전통적인 비-독성 염들 또는 제4급 암모늄염들을 만드는 것에 의해 변형될 수 있다. 이 같은 산 첨가 염들은 아세트산염(acetate), 아디핀산염(adipate), 알긴산염(alginate), 아스파르트산염(aspartate), 벤조산염(benzoate), 벤젠술폰산염(benzenesulfonate), 중황산염(bisulfate), 낙산염(butyrate), 구연산염(citrate), 캄포르산염(camphorate), 캄포르술폰산염(camphorsulfonate), 시클로펜탄프로피온산염(cyclopentanepropionate), 디글루콘산염(digluconate), 도데실황산염(dodecylsulfate), 에탄술폰산염(ethanesulfonate), 푸마르산염(fumarate), 글루코헵타논산염(glucoheptanoate), 글리세로인산염(glycerophosphate), 헤미황산염(hemisulfate), 헵타논산염(heptanoate), 헥사논산(hexanoate), 염화수소산염(hydrochloride), 브롬화수소산염(hydrobromide), 요오드화수소산염(hydroiodide), 2-히드록시에탄술폰산염(2-hydroxyethanesulfonate), 젖산염(lactate), 말산염(maleate), 메탄술폰산염(methanesulfonate), 2-나프탈렌술폰산염(2-naphthalenesulfonate), 니코틴산염(nicotinate), 옥살산염(oxalate), 파코인산염(pamoate), 펙틴산염(pectinate), 과황산염(persulfate), 3-페닐프로피온산염(3-phenylpropionate), 피크르산염(picrate), 피발산염(pivalate), 프로피온산염(propionate), 숙신산염(succinate), 타르타르산염(tartrate), 티오시안산염(thiocyanate), 토실레이트(tosylate), 운데카논산염(undecanoate)을 포함한다.

[0018] 염기성 염들은 암모늄염, 알칼리금속염(예: 나트륨염, 칼륨염), 알칼리회토류금속염(예: 칼슘염, 마그네슘염), 유기염기를 갖는 염(예: 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민), 아미노산을 갖는 염(예: 아르기닌, 리신 등)들을 포함한다.

[0019] 또한 염기성 질소-함유기들은: 염화-, 브롬화-, 요오드화- 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 같은 저급 할로젠화 알킬; 디메틸, 디에틸, 디부틸 같은 황산디알킬(dialkyl sulfate); 그리고, 황산디아밀(diamyl sulfate), 염화-, 브롬화-, 요오드화- 데실, 라우릴, 미리스틸 그리고 스테아릴 같은 긴 사슬 할라이드, 브롬화- 벤질 및 페네틸 같은 할로젠화 아랄킬, 그리고 기타 화합물 같은 물질(agent)로 4기화(quaternized)될 수 있다.

[0020] 본 발명은 따라서 약학적 물질을 포함하는데, 이 약학적 물질은 적어도 제1 항바이오피름제 및 제2 항바이오피름제를 포함한다. 제2 항바이오피름제는 제1 항바이오피름제와 다르며, 제1 항바이오피름제 및 제2 항바이오피름제 중 적어도 하나는 항미생물 펩티드 예를 들어 양이온성 펩티드이다.

[0021] 제1 항바이오피름제(The First Antibiofilm Agent)

[0022] 제1 항바이오피름제는 항미생물(antimicrobial) 펩티드 예를 들어 항박테리아(antibacterial) 펩티드를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 제1 항바이오피름제는 항미생물 펩티드(이후부터 "제1 항미생물제")이다. 제1 항미생물제는 하기 화학식 I의 아미노산을 포함할 수 있다:

[0023]  $((X)_1(Y)_m)_n$  (I)

[0024] 상기 화학식(I)에서, 1 및 m은 1에서 10의 정수, 예를 들어 1에서 5의 정수이고; n은 1에서 10의 정수이고; X 및 Y는 같거나 다를 수 있으며 독립적으로 소수성 또는 양이온성 아미노산이다.

[0025] 바람직하게, 제1 항미생물제는 상기 화학식(I)에서 X 및 Y가 양이온성 아미노산인 상기 화학식(I)에 따른 아미노산을 포함한다.

[0026] 항미생물제는 2에서 200 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 3, 4, 5, 6, 또는 7개에서 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산을 포함하는, 3, 4, 5, 6, 또는 7개에서 100개의 아미노산을 포함할 수 있다. 또는 펩티드는 아미노산 27개 이상을, 전형적으로는 27개에서 300개, 적적하게는 27개에서 200개를 포함할 수 있다.

- [0027] 펩티드는 100개 내지 200개의 아미노산을, 20개 내지 200개의 아미노산을, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 42개, 또는 45개와 같이 20 내지 45개의 아미노산을 포함할 수 있다. 펩티드는 3 내지 15개의 아미노산을, 예를 들어 5 내지 15개의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0028] 여기에서 사용된 "소수성"이라는 용어는 생리학적 pH에서 전하를 띠지않고(uncharged), 극성을 띠지 않으며(unpolar), 일반적으로 수성 용액에 의해서 반발하는 측쇄(side chain)를 갖는 아미노산을 가리킨다.
- [0029] 여기에 사용된 "양이온성"이라는 용어는 0 또는 그보다 큰 순전하(net charge)를 갖는 아미노산을 가리킨다. 일반적으로 용어 "양이온성"은 0보다 큰 순전하를 갖는 아미노산을 가리킨다.
- [0030] 일반적으로 소수성 아미노산 잔기는 -1.10 또는 그보다 큰 소수성을 가지며 0 또는 그보다 큰 전하를 가진다. 소수성 아미노산은 루신페닐아민, 프롤린, 알라닌, 트립토판, 발린, 이소루신, 메티오닌을 포함할 수 있다.
- [0031] 바람직하게 X 및/또는 Y는 양이온성 아미노산으로서, 예를 들어 히스티딘, 아르기닌 및 리신으로 구성된 그룹에서 선택될 수 있다. 바람직하게 X 및/또는 Y는 아르기닌 또는 리신일 수 있다. X 및/또는 Y는 비자연 아미노산에서 선택될 수 있다. 예를 들어 양이온성 아미노산 오르니틴일 수 있다.
- [0032] X 및/또는 Y는 양이온성 아미노산의 광학이성질체일 수 있다. 예를 들어 D- 또는 L-아미노산 일 수 있다. 더욱이 X 및/또는 Y는 교번(alternating amino acids) 아미노산일 수 있다.
- [0033] 아미노산은 자연적으로 발생하는 아미노산 또는 합성 아미노산일 수 있다. 본 발명은 또한 상기 아미노산들의 알려진 이성질체(구조적, 입체-, 형태 및 배위 이성질체) 및 구조적 유사체, 자연적(예를 들어 전사후 변형) 또는 화학적 변형들, 예를 들어 여기에 한정되는 것은 아니며, 인산화, 글리코실화, 술폰화 및/또는 수산화(hydroxylation) 등의 변형을 포함한다.
- [0034] 본 발명의 일 실시 예에 따른 펩티드는 양이온성 또는 소수성 아미노산 X 및 Y의 하나 또는 그 이상의 치환을 포함할 수 있다. 그러나, 펩티드는 대부분 양이온성 또는 소수성 아미노산 X 및 Y 를 포함할 것이다. 전형적으로 펩티드는 1개 내지 5개의 치환을, 적절하게는 1개 내지 3개의 치환을, 일반적으로는 1개의 치환을 포함할 수 있다. 치환은 말단이거나 말단이 아닐 수 있다.
- [0035] 치환은 아미노산 또는 비-아미노산으로 구성될 수 있다. 치환은 전하를 띠거나 전하를 띠지 않을 수 있다. 전형적으로 하나 또는 그 이상의 치환은 전하를 띠지 않는 아미노산이다. 대안적으로 또는 추가적으로 하나 또는 그 이상의 치환은 시스테인 같은 비-아미노산일 수 있다.
- [0036] 바람직하게, X 및 Y는 동일하며 리신 또는 아르기닌이다.
- [0037] 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 펩티드는 주로 아르기닌 아미노산을 포함하며, 이는 하나 또는 그 이상의 아미노산(아르기닌은 아님)으로 치환될 수 있다.
- [0038] 일반적으로 펩티드는 7개 내지 20개의 아르기닌 아미노산을 포함하며, 선택적으로 1개 내지 5개의 비-아르기닌 아미노산, 전형적으로 3개 내지 5개의 비-아르기닌 치환체로 치환된다.
- [0039] 대안적으로 펩티드는 7개 내지 20개의 리신 아미노산을 포함하며, 선택적으로 1개 내지 5개의 비-리신 아미노산, 전형적으로 3개 내지 5개의 비-리신 치환체로 치환된다.
- [0040] 본 발명의 다른 실시 예에 따르면, 펩티드는 27개 내지 300개의 리신 아미노산을, 일반적으로는 27개 내지 200개의 리신 아미노산을 포함할 수 있다. 전형적으로 펩티드는 비-리신 아미노산으로 비-말단 치환체를 포함하지 않는다.
- [0041] 화학식 (I)의 펩티드에서 1 및 m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있으며, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.
- [0042] 화학식 (I)의 펩티드에서 1은 1일 수 있으며, n은 1일 수 있으며, m은 4에서 9까지, 예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다.
- [0043] 화학식 (I)의 펩티드에서 1, n 및/또는 m은 1에서 5까지 예를 들어 1, 2, 3, 4, 또는 5일 수 있다.
- [0044] 화학식 (I)의 펩티드에서, 1 및 m은 0에서 7까지의 정수이고 n은 1에서 10 까지의 정수일 수 있다.
- [0045] 화학식 (I)의 펩티드에서, 1 및 m은 0, 1 또는 2일 수 있고, n은 1에서 10까지의 정수일 수 있다.
- [0046] 화학식 (I)의 펩티드에서 X 및 Y는 동일할 수 있고, l은 0이고, m은 1이고, n은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10

일 수 있다.

- [0047] 화학식 (I)의 펩티드에서 X 및 Y는 동일할 수 있고, l 및 m은 1일 수 있고 n은 2, 3, 4 또는 5일 수 있다.
- [0048] 화학식 (I)의 펩티드에서 X 및 Y는 동일할 수 있고, l은 1이고, m은 2이고, n은 1, 2, 3 또는 4일 수 있다.
- [0049] 화학식 (I)의 펩티드에서 X 및 Y는 동일할 수 있고, l 및 m은 2이고, n은 1, 2, 3 또는 4일 수 있다.
- [0050] 바람직하게, 제1 항미생물제는 폴리리신 및 폴리아르기닌으로 구성된 그룹에서 선택되는 펩티드 서열을 포함한다.
- [0051] 일 실시 예에서, 제1 항미생물제는 폴리리신을 포함한다.
- [0052] 대안적인 실시 예에서, 제1 항미생물제는 폴리아르기닌을 포함한다.
- [0053] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 바이오필름 억제 처리에 제1 항미생물제를 사용하는 용도를 제공한다.
- [0054] 전형적으로 제1 항미생물제는 아래와 같이 본 발명의 제품 조형(form of the product)이다.
- [0055] 제2 항바이오필름제(The Second Antibiofilm Agent)
- [0056] 제2 항바이오필름제는 바이오필름의 형성을 방해하는 물질일 수 있다. 예시적으로, 제2 항바이오필름제는 박테리아 부착, 소수성 또는 점액(slime) 생성을 방지할 수 있다. 제2 항바이오필름제는 분산제(dispersant) 및 항-부착체로부터 선택될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 제2 항바이오필름제는 펩티드가 아니다.
- [0058] 용어 "분산제"는 바이오필름의 입자를 분산시킬 수 있는 임의의 물질을 가리키기 위해서 사용된다. 특별히, 분산제는 박테리아 같은 미생물에 의해서 생산되는 점액(slime), 바이오필름 미생물이 부착하는 세포에 의해 생산되는 점액(mucous) 같은 바이오필름의 일부를 구성하는 점액(mucous), 및 박테리아 같은 바이오필름 미생물에 의해 생산되는 점액의 분산을 촉진한다.
- [0059] 분산제는 점액용해제(mucolytic agent)일 수 있다. 점액용해제는 DNA 분해효소(DNase), 알긴산분해효소(alginase), 단백질 분해효소(protease), 또는 탄수화물분해효소(carbohydrase) 같은 효소일 수 있다. 대안적으로, 점액용해제는 아미노티올 같은 아민 또는 에틸렌디아민아세트산(EDTA) 같은 작은 분자일 수 있다. 아민은 아세틸시스테인 및 시스테아민으로부터 선택될 수 있다.
- [0060] 용어 "항-부착제"는 세포들, 단백질들 그리고 기관들 즉 미생물들 사이의 부착을 방지하여 바이오필름 형성을 억제하거나 바이오필름 자기-파괴를 촉진할 수 있는 임의의 물질을 가리키기 위해 사용된다. 특별히, 항-부착제는 특별히 살아있는 미생물, 예를 들어 플랑크톤성 세포들에서 미생물성 바이오필름에서 발견되는 모든 유형의 세포의 표면 또는 기질에 부착하는 것을 방지할 수 있다. 항-부착제는, 여기에 한정되는 것은 아니며, 히알루론(hyaluronan), 헤파린 또는 카보폴(Carbopol) 934를 포함할 수 있다.
- [0061] 제2 항바이오필름제는 항박테리아제일 수 있다. 항박테리아제는 예를 들어 점액용해 및 항박테리아 활성을 모두 갖는 점액용해제 같은 점액용해제일 수 있다. 바람직하게는 항박테리아제는 시스테아민이다.
- [0062] 본 발명의 제품(The Products of the Invention)
- [0063] 본 발명의 제품은 항미생물 펩티드를 포함한다.
- [0064] 바람직한 제품은 항미생물 펩티드 및 점액용해제를 포함한다.
- [0065] 본 발명에 따른 제품에서 제1 항바이오필름제와 제2 항바이오필름제의 비율은 1:10 내지 10:1; 일반적으로는 적어도 2:1, 예를 들어 적어도 3:1 또는 4:1일 수 있다. 일 실시 예에 따르면, 제1 항바이오필름제와 제2 항바이오필름제의 비율은 대략 1:1이다. 바람직하게는 제1 항바이오필름제는 양이온성 펩티드이고 제2 항바이오필름제는 점액용해제이고, 양이온성 펩티드와 점액용해제의 비율은 2:1 내지 4:1이다. 본 발명의 다른 실시 예에 따르면, 양이온성 펩티드와 점액용해제의 비율은 대략 1:1이다.
- [0066] 활성제들(active agents)은 동시에, 순차적으로 또는 개별적으로 투여될 수 있다. 활성제들은 조합 패키지로 제공될 수 있다. 조합 패키지는 활성제들 각각의 동시, 개별 또는 순차 투여에 대한 처방전과 함께 본 발명에 따

른 제품을 포함할 수 있다. 순차 투여에서는 활성제들이 임의의 순서로 투여될 수 있다.

- [0067] 본 발명의 제품의 활성제들은 하나 또는 그 이상의 약학적으로 허용가능한 희석제, 부형제 및/또는 담체(carrier)를 포함하는 약학적 조성물로 제공될 수 있다. 이는 고정 및 자유 조합 모두에 적용된다.
- [0068] 본 발명의 실시 예에 따른 활성제들은 업계에 잘 알려진 적절한 경로를 따라, 바람직하게는 그 같은 경로에 적합한 약학적 조성물 형태로 목적하는 치료를 위해 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 활성 화합물들 및 조성물은 예를 들어 비경구적으로, 경구적으로, 비강 내로, 기관지 내로, 장으로, 경피적으로, 허 밑으로, 직장으로, 질 내로, 눈 내로, 또는 국부적으로 투여될 수 있다. 국소적 및 전신적 투여 모두가 고려된다.
- [0069] 비경구적 투여를 위해(여기서 "비경구적"은 정맥내, 근육내, 장내, 복강내, 흉골내(intrasternal), 피하 및 관절내 주사를 포함하는 투여 방식을 가리키며, 정맥주사(연속 정맥주사 포함)와의 융합이 가장 선호된다) 대응하는 수용성 염의 살균 수용액과 함께 수용액 프로필렌글리콜 내의 용액이 적용될 수 있다. 이 같은 수용액은 필요에 따라 적절하게 완충될 수 있고, 액체 희석제는 적절한 생리식염수 또는 글루코스로 등장액으로 된다. 이 같은 수용액은 특별히 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 주사 목적에 적합하다. 이와 관련하여, 적용된 살균 수용성 매질(media)은 모두 업계에 잘 알려진 표준 기술에 의해 쉽게 얻어질 수 있다.
- [0070] 본 발명의 제품들은 또한 비강내로 또는 흡입에 의해 투여될 수 있고 적절한 분사제와 함께 또는 분사제 없이 가압 용기, 펌프, 스프레이, 아토마이저(atomiser), 네블라이저(nebuliser) 건식 가루 흡입기 또는 에어로졸 스프레이 배급 형태로 쉽게 전달될 수 있다.
- [0071] 대안적으로, 본 발명의 제품들은 좌약 또는 페서리(pessary) 형태로 투여되거나, 젤, 히드로젤, 로션, 용액, 크림, 연고 또는 가루 형태로 국소적으로 적용될 수 있다. 본 발명의 제품들은 피부에, 경피적으로, 예를 들어 피부 패치, 피부 데포(depot) 또는 피하 주사에 의해서 투여될 수 있다. 또한 폐 경로 또는 직장 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0072] 경구 투여에서는, 약학적 조성물이: 예를 들어, 정제, 캡슐, 서스펜션 또는 액체 형태일 수 있다. 약학적 조성물은 바람직하게는 활성제 성분의 특별 양을 포함하는 단위 투여 제형(dosage unit)으로 만들어진다. 이 같은 투여 제형의 예는, 젓당 같은 통상적인 첨가제; 옥수수 전분 또는 감자 전분; 결정 셀룰로스, 셀룰로스 유도체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴 같은 바인더(binder); 옥수수 전분, 감자 전분 또는 나트륨카르복시메틸셀룰로스 같은 분해제(disintegrator); 그리고, 탈크 또는 스테아린산 마그네슘 같은 윤활제를 갖는 캡슐, 정제, 가루, 알갱이 또는 서스펜션을 포함한다. 활성 성분은 또한 조성물로서 주사에 의해 투여될 수 있는데, 예를 들어 염분(saline), 텍스트로스 또는 적절한 담체로 사용될 수 있는 것이 있다.
- [0073] 본 발명의 제품들은 또한 경구 제형으로/경구 제형에서 적용될 수 있는데, 여기서 제품은 필름, 테이프, 젤, 마이크로스피어(microsphere), 로젠지(lozenge), 검, 덴트리피스(dentrifice) 및 구강청결제로부터 선택되는 담체로 제형화될 수 있다.
- [0074] 투여되는 치료적인 활성 화합물 및 본 발명의 화합물 및/또는 조성물을 사용하여 병증을 치료하기 위한 약물투여방법(dosage regimen)의 양은 다양한 인자, 예를 들어, 치료대상 개인의 약동학적 특성뿐만 아니라 연령, 몸무게, 환자의 성별 및 의학적 상태, 병의 정도, 투여 경로 및 빈도, 그리고 적용된 특별한 화합물에 영향을 받으며, 따라서 매우 다양하게 변할 수 있다. 투여량은, 화합물이 전신적이 아니라 국소적으로 투여되고, 치료가 아니라 예방 목적이거나, 줄어든다.
- [0075] 이 같은 처치는 필요하면 그리고 치료하는 의사에 의해 필요하다고 판단되는 기간동안 빈번히 투여될 수 있다. 당업자는 약물투여방법 또는 투여되는 저해제(inhibitor)의 치료적으로 유효량은 개개인에 따라 최적화될 필요가 있다는 것을 이해할 것이다. 약학적 조성물은 활성 성분을, 0.1 내지 2000mg 범위로, 바람직하게는 0.5 내지 500mg 범위로, 그리고 가장 바람직하게는 1 내지 200mg 범위로 포함할 수 있다. 일일 투여량은 몸무게 기준으로 0.01 내지 100mg/kg, 바람직하게는 0.01 내지 50mg/kg 그리고 가장 바람직하게는 1 내지 20mg/kg이 적절하다. 일일 투여량은 1회 내지 4회로 나누어 투여될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 제품들은 바람직하게는 호흡기계(respiratory tract)를 통해 투여된다. 따라서, 본 발명은 또한 본 발명의 제품을 함하는 약학적 에어로졸 제형들을 제공한다. 또한 본 발명의 제품을 함유하는 네블라이저 또는 흡입기가 제공된다.
- [0077] 추가적으로, 본 발명의 제품들은 지효성 약제로 제형화되는데 적합할 수 있다. 이렇게 제형화되어, 활성제들을, 예를 들어 장관계 또는 호흡기계, 일정 시간에 걸쳐서, 방출할 수 있다. 폴리락타이드-글리콜산염, 리포솜,

마이크로에멀션, 마이크로입자 또는 왁스 같은 중합성 물질로부터 코팅, 외피(envelope) 그리고 보호 매트릭스가 만들어질 수 있다. 이 같은 코팅, 외피 및 보호 매트릭스는 유치 의료 기기, 예를 들어 스텐트, 카테터, 복강 투석 튜브, 배수기(drainage device) 등을 코팅하는데 유용하다.

[0078] 본 발명의 제품들은 여기에 정의된 각 활성제의 상승효과를 나타내는 유효량을 포함할 수 있다. 본 발명은 따라서 상승효과를 나타내는 유효량의 (1) 제1 항바이오피름제 (2) 제2 항바이오피름제를 포함하는 제품을 포함한다. 제2 항바이오피름제는 제1 항바이오피름제와 다르며 전형적으로 항미생물 펩티드이다. 제품은 예를 들어 바이오피름 감염 같은 미생물 감염의 치료에서 약물의 동시, 개별 또는 순차 투여를 위한 약제의 제조에 사용될 수 있다. 여기에 사용된 "상승효과를 나타내는"은 둘 또는 그 이상의 본 발명의 제품의 약물(agent)이 협동하여 개별적으로 사용된 약물의 예상되는 합산 효과보다 더 큰 효과를 나타내는 둘 또는 그 이상의 약물의 행동을 서술할 수 있다.

[0079] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명의 제품이 적용 또는 접착(attach)되는 기재(substrate)가 제공된다. 바람직하게 기재는 상처에 적용하기에 적합하고 또는 상처 부위에 전달하기에 적합하다. 바람직하게, 기재는, 항바이오피름 효과를 나타내기 위해서, 본 발명의 제품들의 활성제들을 기재로부터 상처 기부(wound bed)로 전달하도록 한다. 기재는 드레싱, 예를 들어 상처 드레싱일 수 있다. 드레싱은 직물 소재(fabric material)를 포함하거나 아교 유사 소재(collagen-like material)일 수 있다. 기재는 상처에 적용하기에 적합한 임의의 형태일 수 있으며, 전형적으로 기재는 히드로겔, 콜로이드, 연고, 크림, 젤, 포말(foam) 또는 스프레이 형태일 수 있다.

[0080] 본 발명의 제품은 또한 쇄해제 또는 살생물제로의/살생물제에 적용될 수 있다. 이 점에서, 본 발명의 펩티드 또는 약학적 조성물은, 단독 또는 다른 쇄해제와 함께 치료될 표면에 적용될 수 있다. 여기에 사용된 "치료될 표면"은 여기에서 정의된 기재일 수 있으며 의료 기기 및 유치 기기, 예를 들어 스텐트, 카테터, 복강 투석 튜브, 배출 소자, 관절 보철, 치아 임플란트 등을 포함한다.

[0081] 방법 및 용도(Methods and Use)

[0082] 본 발명은 환경에서 바이오피름 형성을 억제하는 방법을 제공하며, 이 방법은 본 발명에 따른 산물을 환경에 투입하는 단계를 포함한다. 이 방법은 생체내(in vivo) 또는 생체외(ex vivo) 일 수 있다.

[0083] 본 발명의 일 실시 예에 따르면, 상기 방법은 항미생물 펩티드를 투여하는 단계를 포함한다.

[0084] 유리하게, 상기 방법은:

[0085] 제1 항바이오피름제와 제2 항바이오피름제를 투여하는 단계를 포함하며, 제1 항바이오피름제 및 제2 항바이오피름제 중 적어도 하나는 항미생물 펩티드, 예를 들어 양이온성 펩티드이다.

[0086] 환경은 박테리아, 균류, 효모, 바이러스 및 원충으로부터 선택된 임의의 바이오피름 형성 미생물을 포함한다.

[0087] 전형적으로, 미생물은 박테리아, 예를 들어 그람-양성 또는 그람-음성 박테리아이다. 박테리아 병원체는 *Staphylococcus* spp., 예를 들어, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus* spp., 예를 들어, *Enterococcus faecalis*; *Streptococcus pyogenes*; *Listeria* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Mycobacterium* spp., 예를 들어, *Mycobacterium tuberculosis*; *Enterobacter* spp.; *Campylobacter* spp.; *Salmonella* spp.; *Streptococcus* spp., 예를 들어, *Streptococcus* Group A or B, *Streptococcus pneumoniae*; *Helicobacter* spp., 예를 들어, *Helicobacter pylori*; *Neisseria* spp., 예를 들어, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*; *Borrelia burgdorferi*; *Shigella* spp., 예를 들어, *Shigella flexneri*; *Escherichia coli*; *Haemophilus* spp., 예를 들어, *Haemophilus influenzae*; *Chlamydia* spp., 예를 들어, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*; *Francisella tularensis*; *Bacillus* spp., 예를 들어, *Bacillus anthracis*; *Clostridia* spp., 예를 들어, *Clostridium botulinum*; *Yersinia* spp., 예를 들어, *Yersinia pestis*; *Treponema* spp.; *Burkholderia* spp.; 예를 들어, *Burkholderia mallei* and *B. pseudomallei* 로 구성된 그룹에서 선택된 박테리아 종으로부터 유도될 수 있다.

[0088] 특별히 박테리아는 *Pseudomonas* spp., 예를 들어 *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus* spp., 예를 들어 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; *Haemophilus* spp., 예를 들어 *Haemophilus influenzae*; *Burkholderia* spp., 예를 들어 *Burkholderia cepacia*; *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., 예를 들어 *Propionibacterium acnes* 를 포함할 수 있다. 바람직하게 박테리아는 *Pseudomonas* spp., 예를 들어

*Pseudomonas aeruginosa* 및 *Staphylococcus* spp., 예를 들어 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*로부터 선택된다.

- [0089] 바이러스 병원체는: 인간면역결핍바이러스(HIV1 & 2); 인간 티 셀 루케미아 바이러스(HTLV1 & 2); 에볼라 바이러스; 인유두종 바이러스(예를 들어, HPV-2, HPV-5, HPV-8, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-52, HPV-54, HPV-56); 파포마바이러스; 리노바이러스; 폴리오바이러스; 허피스바이러스; 아데노바이러스; 엡스타인 바르 바이러스; 인플루엔자 바이러스, B형 및 C형 감염 바이러스, 바리올라바이러스, 로타바이러스 또는 SARS 코로나바이러스로 이루어진 그룹에서 선택된 바이러스로부터 유도될 수 있다.
- [0090] 기생충성 병원체는: *Trypanosoma* spp. (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*), *Leishmania* spp., *Giardia* spp., *Trichomonas* spp., *Entamoeba* spp., *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp., *Schistosoma* spp., *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium* spp., *Isospora* spp., *Balantidium* spp., *Loa Loa*, *Ascaris lumbricoides*, *Dirofilaria immitis*, *Toxoplasma* spp., 예를 들어, *Toxoplasma gondii* 로 이루어진 그룹에서 유도될 수 있다.
- [0091] 균류 병원체는 *Candida* spp., (예를 들어, *C.albicans*), *Epidermophyton* spp., *Exophiala* spp., *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp., (예를 들어, *T.rubrum* and *T.interdigitale*), *Tinea* spp., *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Blastoschizomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp., *Paracoccidiomyces* spp., *Sporotrix* spp., *Absidia* spp., *Cladophialophora* spp., *Fonsecaea* spp., *Phialophora* spp., *Lacazia* spp., *Arthrographis* spp., *Acremonium* spp., *Actinomadura* spp., *Apophysomyces* spp., *Emmonsia* spp., *Basidiobolus* spp., *Beauveria* spp., *Chrysosporium* spp., *Conidiobolus* spp., *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Graphium* spp., *Leptosphaeria* spp., *Malassezia* spp., *Mucor* spp., *Neotestudina* spp., *Nocardia* spp., *Nocardiosis* spp., *Paecilomyces* spp., *Phoma* spp., *Piedraia* spp., *Pneumocystis* spp., *Pseudallescheria* spp., *Pyrenochaeta* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Sporobolomyces* spp., *Syncephalastrum* spp., *Trichoderma* spp., *Trichosporon* spp., *Ulocladium* spp., *Ustilago* spp., *Verticillium* spp., *Wangiella* spp.로부터 유도될 수 있다.
- [0092] 본 발명의 다른 실시 예에 따르면, 미생물은 균류, 특히 칸디다일 수 있다.
- [0093] 본 발명의 방법은 여기에 한정되는 것은 아니며, 가구, 업무 현장, 실험실, 산업 환경, 수생 환경(예: 파이프라인 시스템), 의료 기기(여기에 정의된 것 같은 치과 기기 또는 치과 임플란트 같은 유치 기기를 포함함), 사람 몸 같은 동물 신체를 포함하는 다양한 환경에서 바이오필름의 형성을 최소화 또는 억제하는 데 사용될 수 있다.
- [0094] 본 발명의 방법은 따라서 치아 또는 의치 같은 치과 임플란트에 치태(plaque) 또는 카리에스(caries)가 형성되는 것을 방지하기 위해 구강에 사용될 있다.
- [0095] 본 발명의 방법은 특히 미생물 감염의 치료에서 신체에 바이오필름이 형성되는 것을 억제 또는 제한하는데 사용될 수 있다. 바이오필름 감염과 관련된 증상은 국소적 감염, 경구 감염 그리고 전신 감염을 포함할 수 있다. 국소 감염은 상처, 궤양 및 병변 예를 들어 베인 상처(cut) 또는 화상 같은 피부 상처 및 관련 증상을 포함할 수 있다.
- [0096] 경구 감염은 치은염, 치주염 및 점막염을 포함할 수 있다.
- [0097] 전신 감염은 낭포성 섬유증 및 예를 들어 위장관, 비뇨생식기관 또는 호흡기관계 감염 같은 점막 감염과 관련된 다른 병증을 포함한다.
- [0098] 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 제품의 치료적으로 유효량을 포유동물에 투여함으로써, 포유동물 특히 사람에게서 미생물 바이오필름 감염으로 인한 관련된 질병 또는 병변의 진행을 치료, 억제 또는 지연하는 방법을 제공한다.
- [0099] "유효량" 또는 "치료적으로 유효량"은 건전한 의료 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 가려움증, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 원하는 효과를 제공하기에 충분한, 합리적인 이득/위험 비율에 걸 맞는, 하나 또는 그 이상의 물질의 양을 의미한다.
- [0100] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 방법은 항미생물 펩티드를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0101] 유리하게, 상기 방법은 제1 항바이오필름 및 제2 항바이오필름을 투여하는 단계를 포함하며, 제1 항바이오필름

및 제2 항바이오피름 중 적어도 하나는 항미생물 펩티드, 예를 들어 양이온성 펩티드이다.

- [0102] 본 발명은 또한 상술한 활성제들의 조합을 사용한 예방 또는 요법에 의해 미생물 감염, 특히 미생물 바이오피름 감염의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본 발명 제품의 용도를 제공한다.
- [0103] 추가적으로 본 발명은 예방 또는 요법에 의해 미생물 감염, 특히 미생물 바이오피름 감염의 치료를 위한 의약의 제조에 상술한 항미생물 펩티드를 사용하는 용도를 제공한다.
- [0104] 따라서, 본 발명의 제품은 피부 및 상처 감염, 중이 감염, 위장관계 감염, 복막 감염, 비뇨생식기계 감염, 구강 연조직 감염, 치아 치태 형성, 눈 감염(콘택트 렌즈 감염 포함), 심내막염, 낭포성 섬유증에서의 감염, 그리고 여기에 기술된 것 같은 유지 의료 기기의 감염으로 구성된 그룹에서 선택된 질병 또는 병증의 예방, 경과의 지연, 또는 치료에 유용하다.
- [0105] 본 발명은 또한 본 발명의 제품이 하나 또는 그 이상의 항생제 같은 항미생물제와 함께 포유동물에 투여되는 치료 방법을 제공한다.
- [0106] 본 발명의 발명자들은 몇몇 분산제들, 특히 점액용해제들이 바이오피름 지속 세포들의 성장을 저해한다는 놀라운 사실을 발견하였다. 따라서 본 발명은 또한 환경에서 바이오피름 형성의 치료/억제 방법을 포함하며, 이 방법은 점액용해제, 예를 들어 시스테아민을 환경에 투입(투여)하는 것을 포함한다. 점액용해제는 단독 또는 다른 항미생물제 예를 들어 항미생물 펩티드와 함께 투여될 수 있다.
- [0107] 본 발명은 또한 예방 또는 요법에 의해 미생물 감염, 특히 미생물 바이오피름 감염의 치료 방법을 제공하는데, 이 방법은 치료적으로 유효량의 분산제, 특히 점액용해제 예를 들어 시스테아민을 투여하는 것을 포함한다.
- [0108] 본 발명은 또한 분산제, 특히 점액용해제 예를 들어 시스테아민을 미생물 감염 특히 미생물 바이오피름 감염의 치료를 위한 약제의 제조에 사용하는 용도를 제공한다.
- [0109] 본 명세서에 언급된 활성제들은 다양한 형태, 예를 들어 유리 산, 유리 염기, 에스테르 및 다른 전구체 약물, 염 그리고 상호변이성체(tautomer)로 존재할 수 있으며, 본 발명은 활성제들의 모든 다양한 형태를 포함한다.
- [0110] 이 명세서의 발명의 내용 및 청구범위에서, 단수는 문맥상 다르게 한정하지 않을 경우 복수를 포함한다. 특히, 부정관사가 사용된 경우(단복수를 나타내는 어구가 없는 경우), 문맥이 다르게 언급하지 않는다면, 단수뿐만 아니라 복수도 고려하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0111] 본 발명의 어떤 측면, 실시 예 또는 예들과 관련하여 언급된 특징들, 정수들, 특성들, 화합물들, 화학적 모이티드들 또는 기들은 양립이 불가능하지 않는다면 다른 측면, 실시 예 또는 예에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0112] 이 명세서의 발명의 내용 및 청구범위에서, 용어 "포함", "함유" 및 그 어법적 변형, 예를 들어 "포함한다", "포함하는" 등은 "포함하지만 한정되는 것은 아니다"는 것을 의미하며, 다른 모이티, 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하는 것은 아니다.
- [0113] "대략"이라는 용어는 일반적으로 언급된 수치의 10% 정도 또는 그 이하를 포함하는 것이다.
- [0114] 본 발명의 다른 측면 및 실시 예는 이하의 설명 및 청구범위에 기술된다.
- [0115] 본 발명이 첨부된 도면을 참조하여 단지 범례로서 설명될 것이다.

## 발명의 효과

- [0116] 본 발명의 실시 예에 따르면 바이오피름 형성을 억제하고 미생물 바이오피름과 관련한 증상을 치료할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

- [0117] 도1은 *P.aeruginosa* ATCC BAA-47 플랑크톤 세포들에 대한 NP108 및 NM001(시스테인)의 항균력을 도시한다.
- 도2는 *P.aeruginosa* ATCC BAA-47 플랑크톤 세포들에 대한 NP108 및 NM001(시스테인) 조합의 항균력을 도시한다.
- 도3은 *S.auREUS* DSM 11729 플랑크톤 세포들에 대한 NP108 및 NM001(시스테인)의 항균력을 도시한다.
- 도4는 *S.auREUS* DSM 11729 플랑크톤 세포들에 대한 NP108 및 NM001(시스테인) 조합의 항균력을 도시한다.
- 도5는 그람-양성 및 그람-음성 박테리아 바이오피름 세포들에 대한 NP339 활성을 도시한다.

도6은 그람-양성 및 그람-음성 박테리아 지속 세포들에 대한 NP339 활성을 도시한다.

도7은 그람-양성 및 그람-음성 박테리아 바이오필름 세포들에 대한 NP341 활성을 도시한다.

도8은 그람-양성 및 그람-음성 박테리아 지속 세포들에 대한 NP341 활성을 도시한다.

도9는 그람-양성 및 그람-음성 박테리아 바이오필름 세포들에 대한 NM001(시스테인) 활성을 도시한다.

도10은 그람-양성 및 그람-음성 박테리아 지속 세포들에 대한 NM001(시스테인) 활성을 도시한다.

도11은 *P.aeruginosa* ATCC BAA-47 바이오필름 세포들에 대한 NP108 및 NM001(시스테인) 조합의 항균력을 도시한다.

도12는 *P.aeruginosa* ATCC BAA-47 지속 세포들에 대한 NP108 및 NM001(시스테인)의 항균력을 도시한다.

도13은 *P.aeruginosa* ATCC BAA-47 지속 세포들에 대한 NP108 및 NM001(시스테인) 조합의 항균력을 도시한다.

도14는 (a) *P.aeruginosa* DSM 1128, (b) *P.aeruginosa* ATCC BAA-47, (c) *P.aeruginosa* DSM 1299, (d) *P.aeruginosa* ATCC 27853 바이오필름 세포에 대한 NP339 및 NM001(시스테인) 조합의 항균력을 도시한다.

도15는 (a) *P.aeruginosa* DSM 1128, (b) *P.aeruginosa* ATCC BAA-47 지속 세포에 대한 NP339 및 NM001(시스테인) 조합의 항균력을 도시한다.

도16은 *S.aureus* DSM 11729 바이오필름 세포에 대한 NP108 및 NM001(시스테인)의 항균력을 도시한다.

도17은 *S.aureus* DSM 11729 바이오필름 세포에 대한 NP108 및 NM001(시스테인) 조합의 항균력을 도시한다.

도18은 *S.aureus* DSM 11729 지속 세포에 대한 NP108 및 NM001(시스테인)의 항균력을 도시한다.

도19는 *S.aureus* DSM 11729 지속 세포에 대한 NP108 및 NM001(시스테인)의 조합의 항균력을 도시한다.

도20 및 도21은 *P.aeruginosa* 27853 플랑크톤 세포에 대한 N-아세틸시스테인(도20(a)) 및 도20(b)) 및 NM001(시스테인)(도21(a) 및 도21(b)) 단독 및 NP341과의 조합의 점액용해제의 활성을 도시한다.

도22a는 처리하지 않은 24시간 후의 대조군 *S.aureus* 바이오필름을 도시한다.

도22b는 NM001(시스테인) 2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *S.aureus* 바이오필름을 도시한다.

도22c는 콜리스틴 0.2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *S.aureus* 바이오필름을 도시한다.

도22d는 펩티드 NP108 2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *S.aureus* 바이오필름을 도시한다.

도23a는 처리하지 않은 24시간 후의 대조군 *S.aureus* 바이오필름을 도시한다.

도23b는 NM001(시스테인) 2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *S.aureus* 바이오필름을 도시한다.

도23c는 콜리스틴 0.2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *S.aureus* 바이오필름을 도시한다.

도23d는 펩티드 NP108 2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *S.aureus* 바이오필름을 도시한다.

도24a는 처리하지 않은 24시간 후의 대조군 *P.aeruginosa* 바이오필름을 도시한다.

도24b는 NM001(시스테인) 2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *P.aeruginosa* 바이오필름을 도시한다.

도24c는 콜리스틴 0.2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *P.aeruginosa* 바이오필름을 도시한다.

도24d는 펩티드 NP108 2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *P.aeruginosa* 바이오필름을 도시한다.

도25a는 처리하지 않은 24시간 후의 대조군 *P.aeruginosa* 바이오필름을 도시한다.

도25b는 NM001(시스테인) 2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *P.aeruginosa* 바이오필름을 도시한다.

도25c는 콜리스틴 0.2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *P.aeruginosa* 바이오필름을 도시한다.

도25d는 펩티드 NP108 2mg/ml로 처리한 후 24시간 후의 *P.aeruginosa* 바이오필름을 도시한다.

도26은 *P.aeruginosa* PAO1 바이오필름에 대한 NP432 단독 및 NM001(시스테인)과의 조합 또는 NP108과의 조합의 활성을 도시한다.

도27은 *P.aeruginosa* PA01 바이오필름에 대한 NP455 단독 및 NM001(시스테인)과의 조합 또는 NP108과의 조합의 활성을 도시한다.

도28은 *P.aeruginosa* PA01 바이오필름에 대한 NP458 단독 및 NM001(시스테인)과의 조합 또는 NP108과의 조합의 활성을 도시한다.

도29는 *P.aeruginosa* PA01 바이오필름에 대한 NP462 단독 및 NM001(시스테인)과의 조합 또는 NP108과의 조합의 활성을 도시한다.

도30은 *S.aureus* ATCC25923 바이오필름에 대한 NP432 단독 및 NM001(시스테인)과의 조합 또는 NP108과의 조합의 활성을 도시한다.

도31은 *S.aureus* ATCC25923 바이오필름에 대한 NP445 단독 및 NM001(시스테인)과의 조합 또는 NP108과의 조합의 활성을 도시한다.

도32는 *S.aureus* ATCC25923 바이오필름에 대한 NP458 단독 및 NM001(시스테인)과의 조합 또는 NP108과의 조합의 활성을 도시한다.

도33은 *S.aureus* ATCC25923 바이오필름에 대한 NP462 단독 및 NM001(시스테인)과의 조합 또는 NP108과의 조합의 활성을 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0118] 표1은 그람-음성 *P.aeruginosa* 계통(strain) 및 그람-양성 *Staphylococcus* spp.에 대하여 검사한 항미생물제의 활성의 요약이다.

[0119] 표2는 그람-음성 *S.epidermidis*, *S.aureus* 및 *P.aeruginosa* 에 대하여 검사한 항미생물제의 활성의 요약이다.

표 2

							Exp#1-2
		MIC ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) at pH 7					
NP	Sequence	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. aureus</i> DSMZ11729	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1128	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299	<i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47
NP432	RRRFRFFFRFR	<7.8	31.25	62.5	62.5	15.6	15.6
NP438	HHHFRFFFRFR	<7.8	>500	>500	>500	500	>500
NP441	HHPRRKPRRKRHH	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP445	KKFPWRLRLRYGRR	<7.8	500	500	62.5	31.25	31.25
NP449	KKPRRKPRRKRKK	31.25	250	125	250	125	250
	-cyst						
NP451	HHPRRKPRRKRHH	125	500	500	>500	>500	>500
	-cyst						
NP457	RRRRR-cyst	31.25	125	125	>500	>500	250
NP458	RRRRRHH-cyst	31.25	250	250	250	125	62.5

							Exp#3
		MBC ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) following MIC at pH 7					
NP	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. aureus</i> DSMZ11729	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1128	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299	<i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47
NP432		16	250	500	250 (2)	32 (2)	250
NP438		125	>500	>500	>500	>500	>500
NP441	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP445		62.5	>500	>500	250	125	250
NP449		125	>500	250	500 (2)	250 (2)	>500
NP451	>500	125	>500	>500	>500	>500	>500
NP457	>500	125 (2)	62.5	125 (2)	>500	>500	>500
NP458		500	125	250	>500	>500	>500

		Exp#4		Exp#3		Exp#4			
		MIC ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) pH5.5		MIC ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) pH5.5, 320 mM NaCl		MBC ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) at pH5.5		MBC ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) pH5.5, 320 mM NaCl	
NP	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299	<i>S. aureus</i> 11729	<i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47	<i>S. aureus</i> 11729	<i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47	<i>S. aureus</i> 11729	<i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47	<i>S. aureus</i> 11729	<i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47
NP432		>500	125	>500	125	>500	125	>500	>500
NP438		>500	125	>500	62.5	>500	>500	>500	>500
NP441	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP445		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP449		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP451	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500
NP457	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP458		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

[0120]

[0121] 실시 예들

[0122] 박테리아 바이오필름들에 대한 항균력

[0123] 물질 및 방법

[0124] 1.1 박테리아 계통

[0125] *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *P. aeruginosa* BAA-47(PA01), *P. aeruginosa* DSM1128, *P. aeruginosa* DSM1299 및 *S. epidermidis* ATCC35984, *S. epidermidis* ATCC12228, *Staphylococcus aureus* 25923, 그리고 메티실린-내성 *Staphylococcus aureus* DSM 11729(MRSA)(DSMZ, Braunschweig, 독일)이 본 연구에 사용되었다. 4개

의 *P. aeruginosa* 임상 균주(clinical isolate)(NH57388A-D, Hoffmann et al., 2005, 2007)가 항균제 내성 테스트에 사용되었다.

[0126] 1.2 항미생물 화합물의 준비

[0127] 본 연구에서 항미생물제로 양이온성 펩티드 NP108가 사용되었으며, 이는 10-20kDa 폴리-리신, 브롬화수소산염 및 시스테인(NM001)에 대응한다. 두 물질은 모두 시그마-알드리히(길링햄, 영국)로부터 입수되었고 원액(stock solution)이 20mg/ml로 1-14 MΩcm 순수(pure water)(퓨릿(Purite) HP40 물 정화 시스템, 옥손, 영국)에서 준비되었다. 용해되면, 준비된 물질이 0.22μm 필터(밀리포어, 왓포드, 영국)를 사용하여 걸러지고 살균된 후 영하 20℃에서 보관되었다.

[0128] 아래의 본 출원인 노바바이오텍스사의 항미생물 펩티드들이 또한 연구되었다.

[0129]	NP339	dRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdR
[0130]	NP340	Ac-dRdRdRdRdRdRdRdRdRdR-CONH
[0131]	NP341	dRdRdRdRdRdRdRdRdRdR-CONH
[0132]	NP352	RRRRRRRRRRRRRR
[0133]	NP432	RRRFRFFRFRRR
[0134]	NP438	HHHFRFFRFRRR
[0135]	NP441	HHPRRKPRRPKRHH
[0136]	NP445	KKFPWRLRLRYGRR
[0137]	NP449	KKPRRKPRRPKRKK-cysteamine
[0138]	NP451	HHPRRKPRRPKRHH-cysteamine
[0139]	NP457	RRRRR-cysteamine
[0140]	NP458	RRRRRHH-cysteamine

[0141] 노바바이오텍스사의 항미생물 펩티드는 Fmoc 합성을 사용하여 NeomPS(Strasbourg, 프랑스)에 의해서 합성되었으며 적어도 순도가 95%였다.

[0142] 1.3 박테리아 접종원의 준비

[0143] 박테리아 접종원(inoculum)이, 탁도 방법 M26-A에 기술되어 있는 맥파랜드 탁도 표준으로 표준화된, 밀러-힌톤 배지에서 활발하게 성장하는 배양으로부터 희석 방법에 의해 수립되었다.

[0144] 1.4 최소 억제 농도(MIC: Minimum Inhibitory Concentration)의 결정

[0145] 바이오필름 형성을 방지하기 위하여, 박테리아 접종원 및 항미생물제 모두가 동시에 플레이트(plate)에 첨가되었다. 플레이트가 37℃에서 24시간 동안 배양되었고 마이크로타이트리 플레이트 리더(microtitre plate reader)(바이오텍 파워웨이브 XS, Winooski, 미국)에서 광학밀도가 625nm로 측정되었다. 박테리아 성장의 완전한 억제를 보이는 최소 농도로서 최소억제농도가 획득되었다.

[0146] 1.5 분수억제농도(FIC: Fractional Inhibitory Concentration)의 결정

[0147] 분수억제농도는 항미생물제들의 조합이 상승효과를 나타내는지, 단순 가산효과(additive effect)를 나타내는지,

억제적인지 또는 중립적인지를 가리키는 상호반응 계수에 대응한다. 분수억제농도는 아래와 같이(Singh et al., 2000) 항미생물제의 조합에 따른 활성(물질 A+물질 B의 최소억제농도)을 항미생물제 단독에 따른 활성(물질 A 단독 또는 물질 B 단독의 최소억제농도)과 비교하여 결정된다.

[0148]  $FIC = MIC_{A[조합]} / MIC_{A[단독]} + MIC_{B[조합]} / MIC_{B[단독]}$

[0149] 두 항미생물제의 단순 가산 조합은 FIC 인덱스가 1이나, 상승효과를 나타내는 조합에서는 FIC 인덱스가 1보다 작다. 중립 조합에서는 FIC가 1 및 4 사이일 것이며, FIC 인덱스가 4보다 클 경우는 두 항미생물제 사이의 억제 효과를 가리킨다.

[0150] 박테리아 바이오필름에 대한 두 항미생물제의 조합에서 상호작용을 평가하기 위해서 FIC가 또한 계산되었다. MIC 대신에 MBEC을 사용하여 동일한 방법이 적용되었다.

[0151] 1.6 최소-바이오필름박멸농도(MBEC: Minimum-Biofilm Eradication Concentration) 결정

[0152] 웰러-힌톤에서 총 100 $\mu$ l 부피의 박테리아 접종원이 96-웰 플레이트(챌린지 플레이트) 각각에 첨가되었고 플레이트는 바이오필름이 형성되도록 24rpm으로 자이로회전 요동 플랫폼(Grant-bio PS 3-D, Shepreth, 영국) 상에서 37℃에서 24시간 동안 배양되었다.

[0153] 챌린지 플레이트들이 멸균 PBS (1x)로 세정 되었고 웰러-힌톤에서 항미생물제들에 대한 두 배(two-fold) 연속 희석이 챌린지 플레이트들에 첨가되었다. 챌린지 플레이트들이 24rpm으로 자이로회전 요동 플랫폼(Grant-bio PS 3-D, Shepreth, 영국) 상에서 37℃에서 24시간 동안 배양되었다.

[0154] 각 챌린지 플레이트들로부터 회수된 상청액이 프레시 플레이트로 전달되었으며, 마이크로타이트리 플레이트 리더(microtitre plate reader)(바이오텍 파워웨이브 XS, Winooski, 미국)에서 광학밀도가 625nm로 측정되었다. 박테리아의 성장이 없는 최소 항미생물제 농도에 의해 MBEC가 구해졌다.

[0155] 1.7 바이오필름에서 지속 세포들의 예상

[0156] 상청액을 챌린지 플레이트로부터 전달한 후, 바이오필름이 멸균 PBS(1x)로 한번 세정되었다. 멸균 PBS(1x)에 4  $\mu$ M SYTO9 및 20  $\mu$ M 요오드화 프로피디움(PI)을 포함하는 100 $\mu$ l BacLight 생/사 형광 염색 용액(Invitrogen, Paisley, 영국)가 챌린지 플레이트들의 웰들에 첨가되었다. 플레이트들은 이어서 상온에서 15분 동안 암실에서 배양되었고, 감도 50으로 세팅된 형광 마이크로타이트리 플레이트 리더(BioTek Synergy, HT, Winooski, 미국)을 사용하여 SYTO9 형광은 485(ex)/528(em)에서, PI 형광은 485(ex)/645(em)에서 측정되었으며, 바닥 광학 위치가 선택되었다. 산 박테리아, 죽은 박테리아의 확인 및 바이오필름의 사진이 가능한 Aviovert 40 형광 현미경(Zeiss, Gottingen, 독일)을 사용하여 바이오필름의 직접 관찰이 100 내지 400-배 확대로 이루어졌다.

[0157] 지속 세포들의 상대적인 생존 능력이 생/사 형광 측정 비율에 의해서 결정되었고, 현미경 관찰이 사용되어 산 세포들의 존부를 확인하였다.

[0158] 2 결과들

[0159] 2.1 바이오필름 형성 억제

[0160] 그람-양성 및 그람-음성 박테리아에 의한 바이오필름 형성 억제를 알아보기 위해서, 박테리아 접종원들 및 항미생물제들이 동시에 플레이트에 첨가되었다. 항미생물제들의 농도는 그람-음성 박테리아 *P. aeruginosa* ATCC BAA-47에 대해서는 0~500 $\mu$ g/ $\mu$ l NP108 및 0~320 $\mu$ g/ $\mu$ l 시스테아민이고, 그람-양성 MRSA에 대해서는 0~1000 $\mu$ g/ $\mu$ l NP108 및 0~320 $\mu$ g/ $\mu$ l 시스테아민이었다.

[0161] 2.1.1 *P. aeruginosa* ATCC BAA-47에 대한 활성

[0162] NP108의 MIC는 62.5 $\mu$ g/ $\mu$ l 이었고 시스테아민의 경우 320 $\mu$ g/ $\mu$ l 이었다. NP108은 250 $\mu$ g/ $\mu$ l에서 살균작용을 나타내었으나, 시스테아민은 320 $\mu$ g/ $\mu$ l 에서도 살균작용을 나타내지 않았다(데이터 없음).

- [0163] 160 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 시스테아민의 존재하에서, NP108의 MIC는 31.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 감소하였다. 시스테아민의 농도가 두 배(즉 320 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 되었을 때, NP108의 존재 여부와 상관없이 성장이 발견되지 않았다.
- [0164] 이 조합에 대한 FIC 결정은, 항미생물제가 단순 가산 효과(FIC=1)를 나타낸다는 것을 가리킨다. 더욱이, 살균활성은 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및 320 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민의 존재에서 얻어졌으며, 이는 이 물질들의 단순 가산 효과를 확인시킨다.
- [0165] 2.1.2 *S. aureus* DSM 11729에 대한 활성
- [0166] NP108의 MIC는 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  이고 시스테아민의 경우 320 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  보다 크다. NP108D는 125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 살균효과를 나타내었으나, 시스테아민은 320 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  에서도 살균작용을 나타내지 않았다(데이터 없음).
- [0167] 시스테아민의 농도 증가는 주어진 NP108의 임의의 농도에서 높은 억제력을 보였다. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민에서, NP108의 MIC는 31.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  로 감소하였고, 320 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 시스테아민이 첨가되었을 때는 15.625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 감소하였다.
- [0168] 이 조합에 대한 FIC 결정은 항미생물제들이 적어도 단순 가산 효과(FIC < 1)를 나타낸다는 것을 가리킨다. 더욱이, 살균효과는 62.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및  $\geq 80\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민(데이터 미도시) 뿐만 아니라 31.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및  $\geq 160\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민에서도 확인되었으며, 이는 이 물질들의 단순 가산 효과를 확인시킨다.
- [0169] 부록 1은 *S. aureus* DSM 11729 플랑크톤성 세포들에 대한 짧은 선형 펩티드들 (NP339, NP340, NP341 및 NP352)의 시간대별 활성을 보여준다.
- [0170] 부록 2는 *S. aureus* DSM 11729 및 *P. aeruginosa* BAA-47 플랑크톤성 세포들에 대한 NP339 및 NP341의 활성뿐만 아니라 NP108, 시스테아민, 양 화합물의 조합의 활성을 요약한다.
- [0171] 2.2 형성된 바이오필름의 파괴
- [0172] 박테리아 바이오필름에 대한 NP108 및 시스테아민의 활성 측정이 24시간 경과된 바이오필름에 대해서 수행되었으며, 조합에서 두 화합물의 활성에 또한 결정되었다. 박테리아 바이오필름에 대한 항미생물제의 활성이 바이오필름 세포 및 지속 세포에 대한 활성에 의해 결정되었다.
- [0173] 2.2.1 박테리아 바이오필름에 대한 NP339 활성
- [0174] 도5는 *Staphylococcus* 종의 바이오필름에 대한 NP339의 높은 활성을 보여주는데, MBEC가 156 내지 625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  으로 나타났다. *S. aureus* 25923에 대한 NP399 최고량에서 광학 밀도의 증가는 미생물 바이오필름의 복잡하고 이종적인 성질에 기인한 결함(artefact)인 것 같다. 대조적으로 NP339는 *P. aeruginosa* BAA-47(PAO-1) 성장을 감소시켰으나, 심지어 테스트된 최고량(즉, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )은 바이오필름 세포들을 100% 억제하기에는 충분하지 않았다.
- [0175] 도6은 지속 세포들에 대하여 NP339가 효과를 나타내는 것을 증명한다. 테스트한 4개의 계통의 바이오필름 세포들에 대한 NP339 활성과는 대조적으로, *P. aeruginosa* BAA-47(PAO1)의 지속 세포들보다 *Staphylococcus* 종의 지속 세포들에 대해서 덜 효과적이었다.
- [0176] NP339는 625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 *P. aeruginosa* BAA-47(PAO1) 지속 세포들의 생존 능력을 억제할 수 없었다.
- [0177] 2.2.2 박테리아 바이오필름에 대한 NP341 활성
- [0178] 도5의 NP339와 동일하게, NP341은 바이오필름 세포 생존 능력에서 상당한 감소를 보였다. MRSA 11729 및 *S. epidermidis* 12228 에 대한 MBEC는 625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  이었다. NP341은 2 내지 3배 양(factor)으로 MRSA 11729 및 *P. aeruginosa* BAA-47(PAO1) 바이오필름 세포들의 생존 능력을 감소시켰다.

- [0179] NP339에서 확인한 바와 같이, *P. aeruginosa* 지속 세포들의 생존 능력은  $625\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 완전히 억제되었다. 3개의 *Staphylococcus* 종의 지속 세포들의 생존 능력은 25 내지 50% 까지 감소 되었다.
- [0180] 2.2.3 박테리아 바이오필름에 대한 시스테아민 활성
- [0181] 도9는 시스테아민이 그람-양성 및 그람-음성 박테리아의 바이오필름 세포들에 대한 항균 효과를 가진다는 것을 입증한다.
- [0182] 도10은 그람-양성 및 그람-음성 박테리아의 바이오필름 세포들에 대한 시스테아민의 활성을 보여준다.
- [0183] 여기에서 제시된 결과는 그람-양성 및 그람-음성 박테리아의 바이오필름 세포들에 대한 짧은 선형 양이온성 펩티드 NP339 및 NP341의 항균력을 보여준다. 이 화합물들은 그람-음성 박테리아보다 그람-양성 박테리아 바이오필름 세포들에 대해서 보다 효과적인 것으로 보이는데, 지속 세포들에 대해서는 반대의 결과를 보이는 것 같다. 시스테아민은 높은 농도에서 바이오필름 세포들에 대한 활성을 보였지만, 테스트한 최저 농도(즉,  $625\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )에서는 그람-양성 및 그람-음성 지속 세포들 모두의 생존 능력을 억제하였다.
- [0184] 2.2.4 *P. aeruginosa* ATCC BAA-47에 대한 NP108 및 시스테아민 조합의 활성
- [0185] 이 두 항미생물제의 조합은  $250\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및  $62.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민으로 박테리아 성장을 완전히 억제하였다.  $31.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민을  $500\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108에 첨가하여도 동일한 효과를 얻었으나,  $31.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민 +  $250\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108은 박테리아 성장을 단지 부분적으로 억제하였다.
- [0186] MBEC 값들( $\text{MBEC}_{\text{NP108[단독]}} > 500\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $\text{MBEC}_{\text{NP108[조합]}} = 250\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $\text{MBEC}_{\text{시스테인[조합]}} = 62.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $\text{MBEC}_{\text{시스테인[단독]}} = >100,000\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )로 얻은 FIC는  $\sim 0.5$ 였으며, 이는 두 항미생물제 사이에 상승효과가 있음을 의미한다. 이는 플랑크톤성 세포들에 대한 NP108/시스테인 조합의 활성에서 얻은 결과(도2)와 일치한다.
- [0187] 세포들의 상대적인 생존 능력을 결정하기 위하여, 지속 세포들에 대한 NP108 및 시스테아민의 활성이 형광 염색 방법을 사용하여 측정되었다. 사용된 핵산-결합 형광 분자들은 SYTO9 및 PI였으며, 이는 각각 모든 박테리아 세포(녹색 형광) 및 막-붕괴 세포(적색 형광)를 투과한다. 따라서 방출된 형광 비율 녹색(생존)/적색(사멸)은 박테리아 군집의 상대적인 생존 능력을 보여주며, 바이오필름 내에서 지속세포들에 대응하는 잔존하는 생존 세포들의 존재를 예측하는데 사용된다.
- [0188] 도12는 NP108 또는 시스테아민으로 처리된 바이오필름의 상대적인 생존 능력이 상당히 여전한 것을 보여주는데, 이는 *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 지속 세포들에 대한 이 화합물들의 활성이 없다는 것을 가리킨다.
- [0189] 도13은 NP108 및 시스테아민의 조합이 *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 지속 세포들에 대하여, 이들 화합물 단독보다(도12), 높은 활성을 나타내는 것을 증명한다. 이 세포들에 대한 가장 효과적인 조합은  $250\sim 500\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및  $62.5\sim 500\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민 조합이다. 이 조합은 바이오필름 내에서 최저 상대 생존 능력을 나타냈었다. 비슷한 결과가  $31.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및  $500\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민에서 나타났으며  $250\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민에서는 단지 부분적인 억제가 관찰되었다.
- [0190] 지속 세포들에 대한 이 화합물들의 활성은 바이오필름 세포들(도11)에 대해서 얻어진 최적 조합의 프로파일에 대해서 유사성을 보였다. 더욱이, 형광 염색된 바이오필름을 현미경으로 직접 관찰한 결과,  $250\sim 500\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및  $62.5\sim 500\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민(테이터 미도시)의 존재하에서 생존 세포를 관찰할 수 없었기 때문에, 지속 세포들에 대한 이 조합의 활성을 확인할 수 있었다.
- [0191] 2.2.5 *P. aeruginosa*에 대한 NP339 및 시스테아민의 조합의 활성
- [0192] 도14(a)~(d)는 *Pseudomonas aeruginosa* 4 계통에 대한 시스테아민 및 NP339의 활성(NP339  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$  및  $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$  농도에 대해서 시스테아민의 농도를  $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 까지 증가시키면서 측정)을 보여준다.
- [0193] 이 데이터는 시스테아민과 조합한 NP339의 *P. aeruginosa* 바이오필름 세포들에 대한 항균력이 증가하는 것을 명백히 보여준다. 다음의 도면들은 이 계통의 2개에 대한 지속 세포들에 대한 이 조합의 활성에 대한 예를 보여준다.

- [0194] 도16은 *S. aureus* DSM 11729 바이오필름 세포들에 대한 NP108 및 시스테아민 활성을 보여준다. 시스테아민의 MBEC는  $250\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 였으나, NP108은  $125\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 이 세포들의 성장을 억제하였다.
- [0195] NP108 및 시스테아민의 조합은  $31.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및  $62.6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민의 존재하에서 박테리아 성장을 완전히 억제하였으며, 어느 한 화합물의 낮은 농도로는 부분적인 억제가 나타났다(도17). 따라서, 이 MBEC 값들 ( $\text{MBEC}_{\text{NP108}[\text{단독}]} = 125\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $\text{MBEC}_{\text{NP108}[\text{조합}]} = 31.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $\text{MBEC}_{\text{시스테인}[\text{단독}]} = 250\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,  $\text{MBEC}_{\text{시스테인}[\text{조합}]} = 62.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )로 얻은 FIC는 0.5였으며, 이는 그람-양성 박테리아의 바이오필름에 대한 이 두 항미생물제 사이의 상승효과가 있음을 가리킨다. 비슷한 결과가 그람-음성 박테리아에 대해서도 나타났다(도11). 이는 또한 *S. aureus* DSM 11729 플랑크톤성 세포들에 대한 NP108/시스테인 조합으로부터 얻은 결과와 일치한다(도4).
- [0196] *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 지속 세포들에 대한 활성이 없다는 결과(도12)와 유사하게, NP108 또는 시스테아민으로 처리된 *S. aureus* DMS 11729 바이오필름의 상대적인 생존 능력이 상당히 여전하였으며 이는 그람-양성 박테리아의 지속 세포들에 대해 낮은 농도에서 이 화합물들이 활성이 낮다는 것을 가리킨다(도18).
- [0197] NP108 및 시스테아민의 조합은 이 화합물 단독보다(도19) *S. aureus* DMS 11729 지속 세포들에 대한 높은 활성을 보였다. 이 세포들에 대한 가장 효과적인 조합은  $250\sim 500\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및  $125\sim 250\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민의 조합이다. 이 조합은 바이오필름 내에서 최저 상대적인 생존 능력을 보였다. 비슷한 결과가  $62.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP108 및  $500\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민으로 얻어졌다. 이 화합물 중 어느 하나가 낮은 농도인 조합은 바이오필름 내에서 높은 상대적인 생존 능력을 보였다.
- [0198] 그람-음성 지속 세포들과 달리, 형광 염색된 *S. aureus* DSM 11729 바이오필름을 직접 현미경을 관찰한 결과 잔류 생존 세포들이 NP108 및 시스테아민의 최고 조합 농도에서 보였다(데이터 미도시).
- [0199] 표1은 짧은 그람-양성 및 그람-음성 박테리아에 대한 아르기닌 펩티드 NP339, NP341, 폴리-리신 NP108, 시스테아민 그리고 NP108 및 시스테아민의 조합의 활성을 요약한 것이다.
- [0200] 표1: 그람-음성 *P. aeruginosa* 계통 및 그람-양성 *Staphylococcus* 종에 대한 테스트한 항미생물제의 활성에 대한 요약. []안의 숫자는 테스트한 계통의 최대 숫자를 가리킨다. MMC: 최소억제농도, MBEC: 최소바이오필름박멸 농도, FIC:분수억제농도

표 1

[0201]

			<i>P. aeruginosa</i> 계통 (7)	<i>Staphylococcus</i> spp (4)
	MIC ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )			
		NP108	31.25 - 500	16 - 125
		NP339	62.5	4 - 128
		NP341	31.25	250
		Cysteamine	300 - 2,500	300 - 625
	NP108 /	Cysteamine	31.25 / 160	31.25 / 40
FIC:	NP108 /	Cysteamine	1	0.6
	MBEC ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )			
		NP108	250 - >500	125 - 250
		NP339	>5,000	156 - 625
		NP341	>5,000	625 - >5,000
		Cysteamine	>5,000	> 25,000
	NP108 /	Cysteamine	125/125 - 250/62.5	31.25/62.5 - 125/125
FIC:	NP108 /	Cysteamine	$\leq 0.75$	0.5 - 1
	Persisters ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )			
		NP108	250 - >500	>500
		NP339	625	625 - >5,000
		NP341	625	625 - >5,000
		Cysteamine	500 - 6,250	6,250 - 12,500
	NP108 /	Cysteamine	62.5/250 250/62.5	- >250/>250
FIC:	NP108 /	Cysteamine	0.75 - 1	$\leq 0.5$

[0202] 노트:

[0203] 1- 부록 1은 *Staphylococcus aureus* DSM 11729에 대한 테스트된 짧은 아르기닌 항미생물제의 MIC를 보여준다.

[0204] 2- 부록2는 *P. aeruginosa* ATCC 27853에 대한 NP341과 조합한 점액용해제 시스테아민 및 N-아세틸시스테인의 활성을 보여준다.

[0205] 부록 1: 데이터(미도시)는 메티실린 내성(methicillin-resistant) *S. aureus* (MRSA) DSM 11729 플랑크톤성 세포들에 대한 48시간에 걸친 짧은 선형 아르기닌 펩티드의 활성을 증명하였다. 범례에서 도실했바와 같이 테스트된 농도 범위는  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  이다. 시간대별 활성은 박테리아 성장 억제가 항미생물제의 용량 및 세포들에 노출된 시간과 관련이 있다는 것을 보여준다. 완전한 살균 활성이 48-시간 동안  $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$  이상의 농도의 NP339, NP340, NP352에서 관찰되었다:  $0.125\mu\text{g}/\mu\text{l}$  및  $0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$  농도에서는 적어도 24시간 동안 완전한 억제를 보였으며, 낮은 농도 예를 들어  $0.06\mu\text{g}/\mu\text{l}$  및  $0.03\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서는 각각 적어도 20시간 및 15시간 동안 완전한 억제를 보였다. 비슷한 결과가, 다만  $0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서는 48-시간 동안 완전한 억제가 나타난 것을 제외하고는, NP341에서도 얻어졌다.

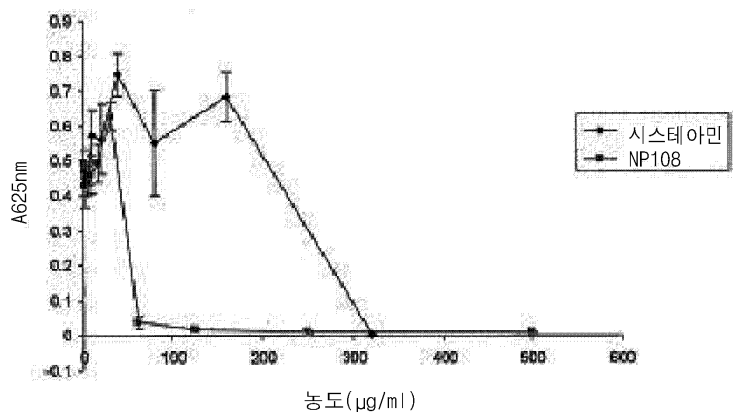
[0206] 부록 2:  $3\sim 6\mu\text{g}/\mu\text{l}$  N-아세틸시스테인과의 조합에서, 단지  $205\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 NP341이 MBEC에 도달하는데 필요했다(도 20a). 이 두 화합물의 조합에 따른 비슷한 활성 증가가 지속 세포들에 대해서도 관찰되었다:  $1024\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP341+ $3128\mu\text{g}/\mu\text{l}$  N-아세틸시스테인은 지속 세포들의 대략 75%를 억제하였는데, 이는 이 두 화합물 중 어느 하나만을 사용했을 때(도20b)보다 훨씬 높은 억제 수준이다.

[0207] 시스테아민 또는 N-아세틸시스테인과 NP341의 조합은 화합물 단독의 활성과 비교해서 증가된 항균력을 보인다. *P. aeruginosa* ATCC27853에 대한 NP341 단독의 MBEC 는  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  이상이고 시스테아민의 경우  $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$  이상(도 21a)이다. 이는 *P. aeruginosa* ATCC27853 바이오필름 세포들에 대하여 이 두 화합물의 협동 효과가 없다는 것을 가리킨다. 하지만 협동은 지속 세포들에 대해서는 관찰되었다:  $205\mu\text{g}/\mu\text{l}$  NP341+ $3\mu\text{g}/\mu\text{l}$  시스테아민은 지속 세포들의 대략 75%를 억제하였는데, 이는 이 두 화합물 단독보다 훨씬 높다(도21b).

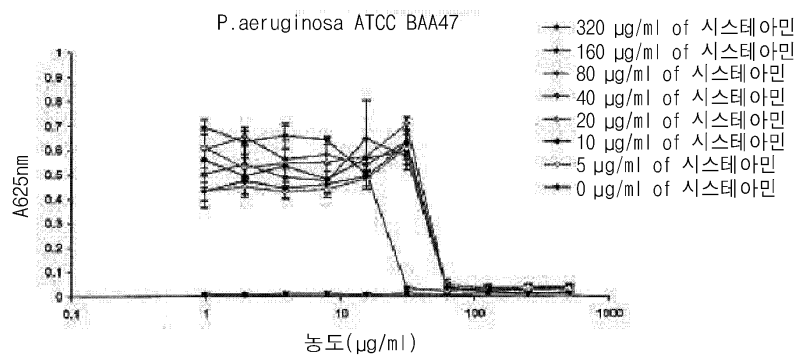
[0208] NP339와 조합으로 사용될 때, 시스테아민의 추가는 비록 소량일지라도 NP339의 MBEC 값을 감소시키는데 도움을 준 것을 확인하였다(도14a-d). 더 흥미로운 것은, NP339와 시스테아민의 조합은 또한 *P. aeruginosa* DSM1128 및 *P. aeruginosa* BAA-47 지속 세포들에 대하여 증가된 활성을 나타내었다는 것이다(15a-b).

## 도면

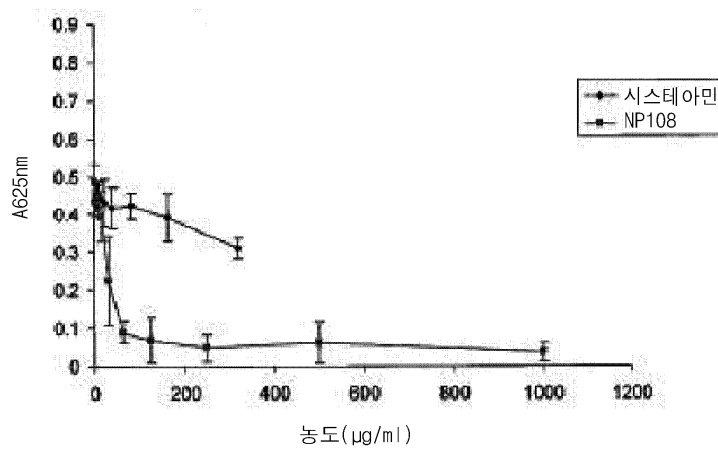
### 도면1



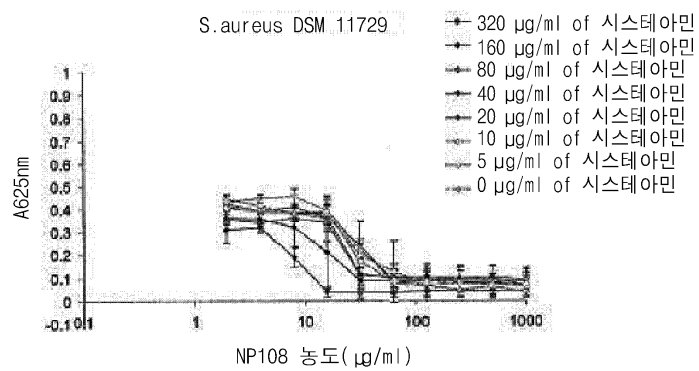
도면2



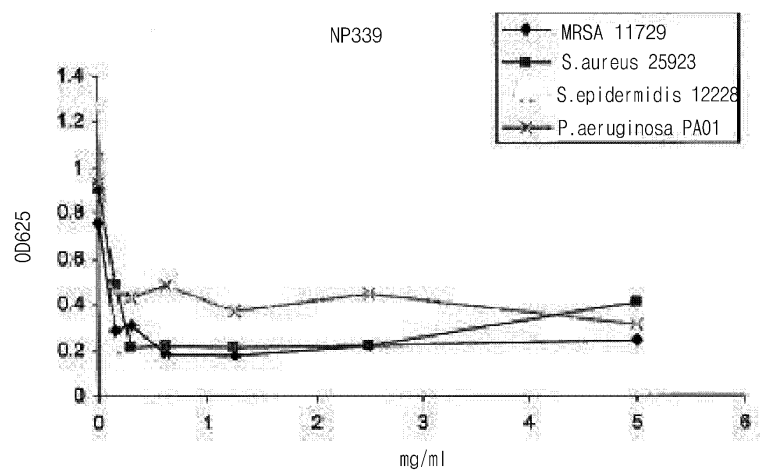
도면3



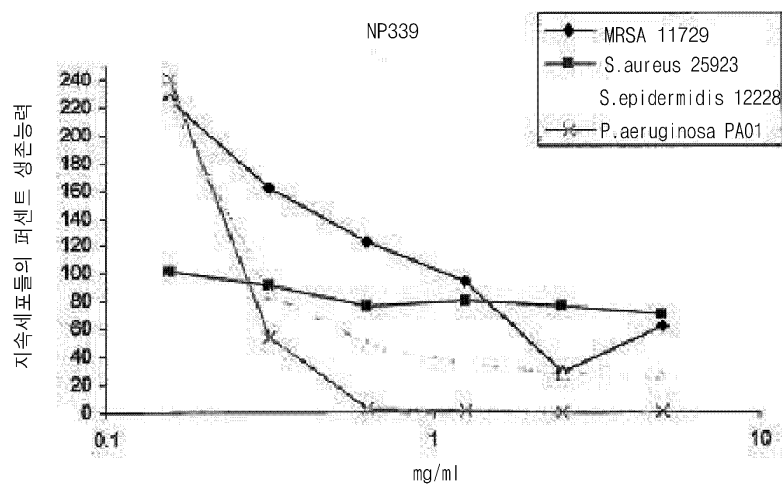
도면4



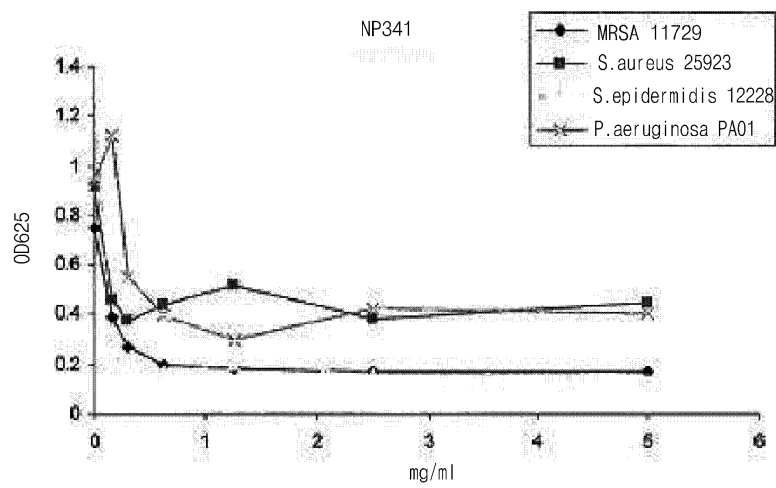
도면5



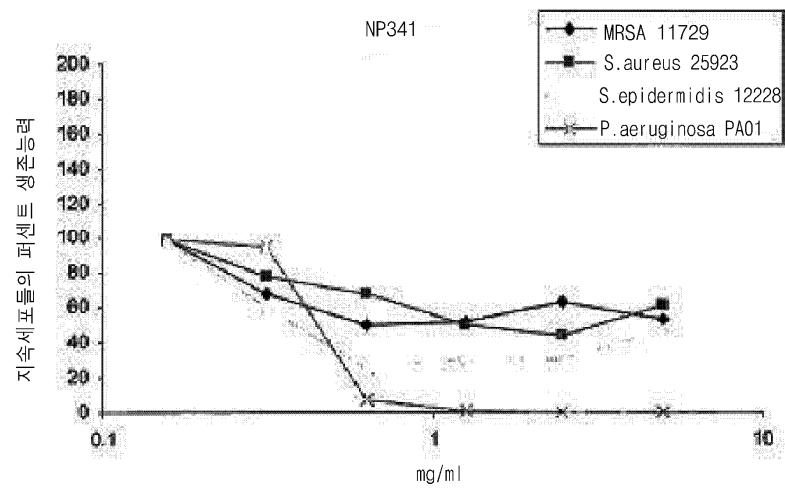
도면6



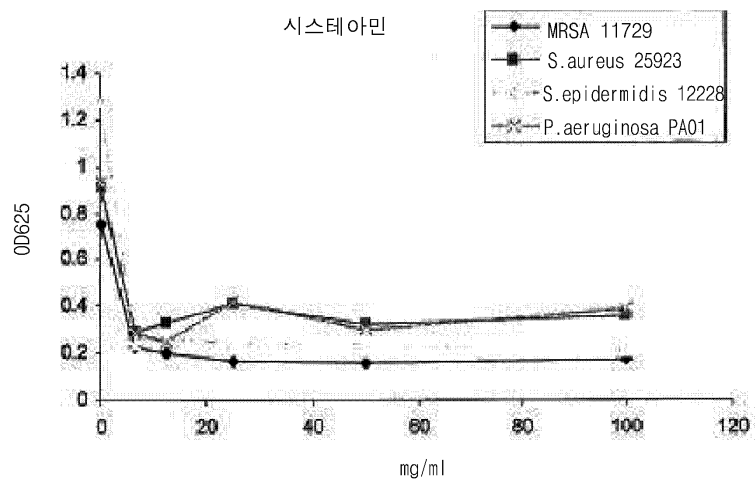
도면7



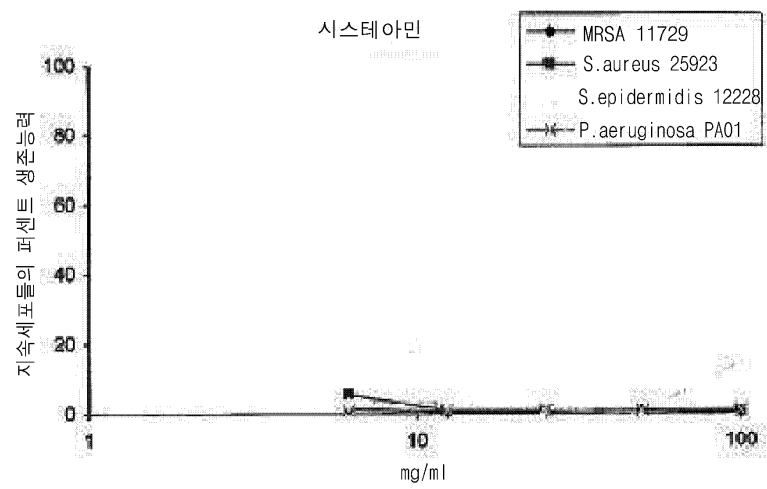
도면8



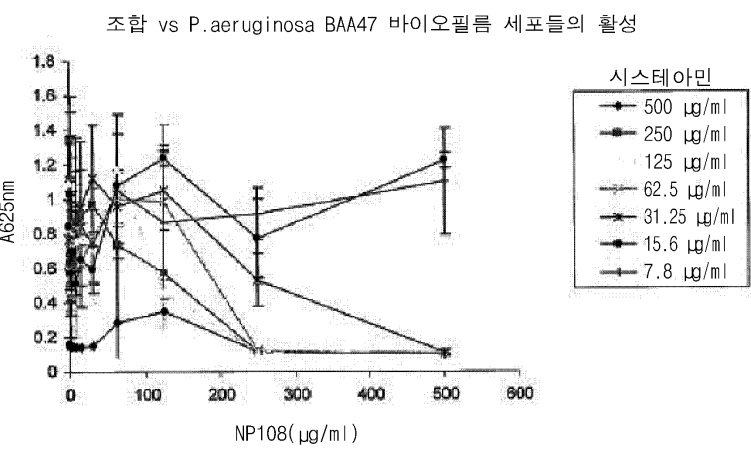
도면9



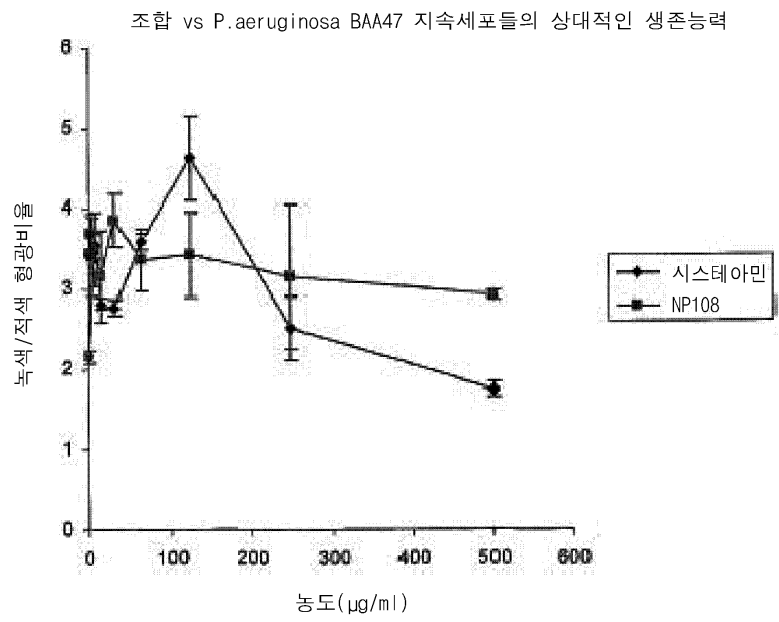
도면10



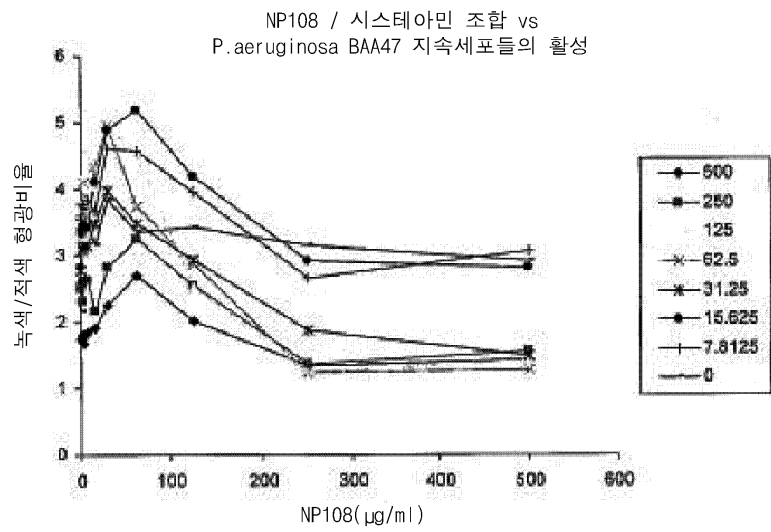
도면11



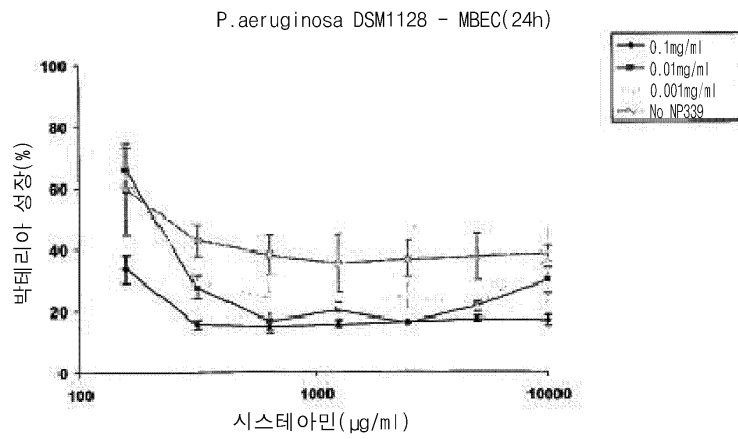
도면12



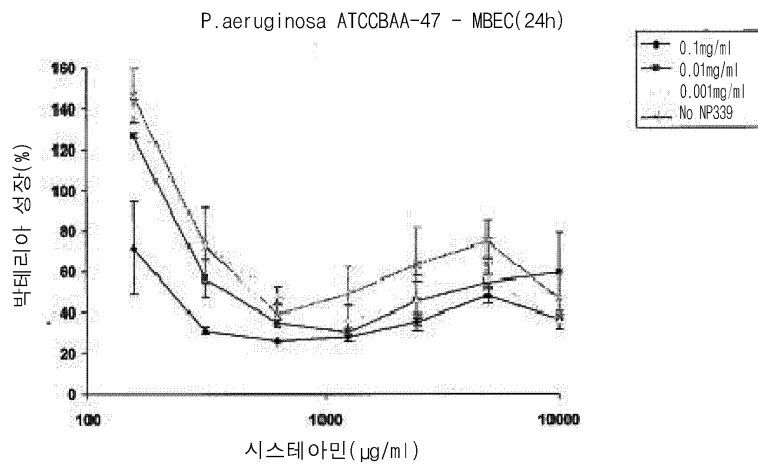
도면13



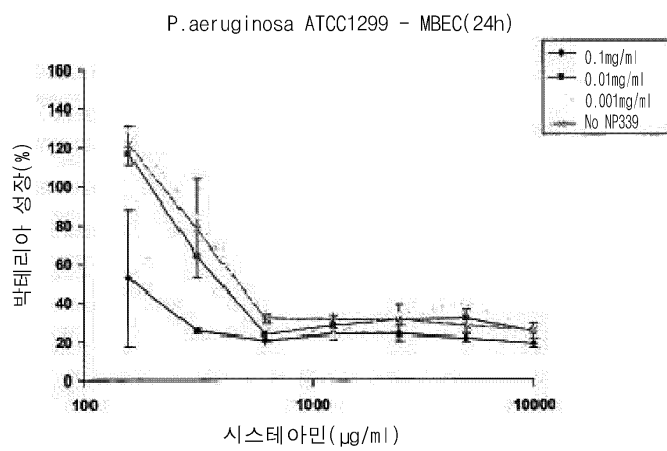
도면14a



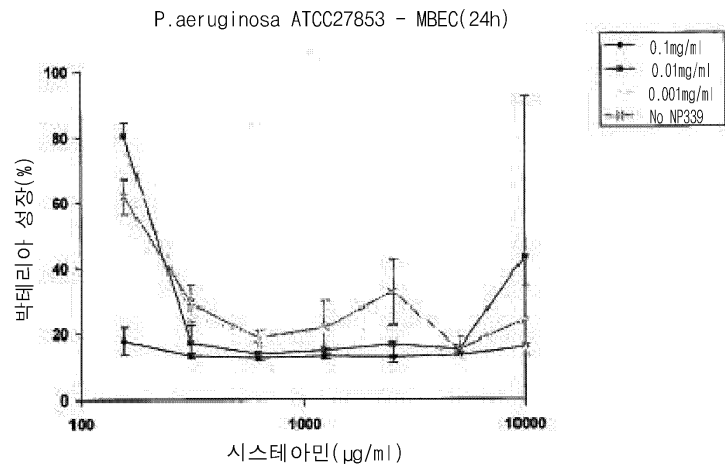
도면14b



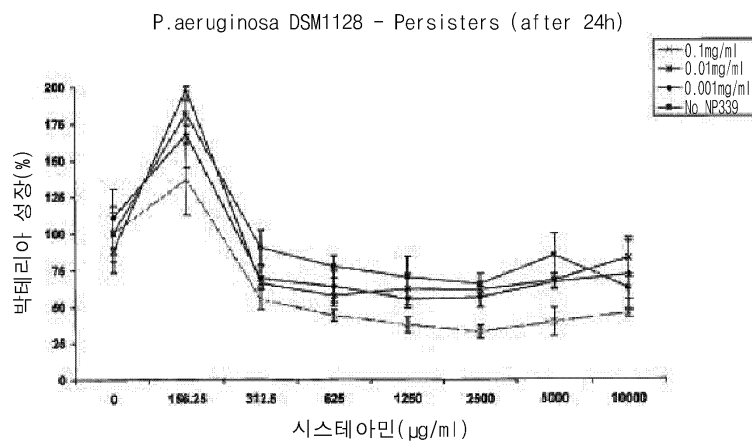
도면14c



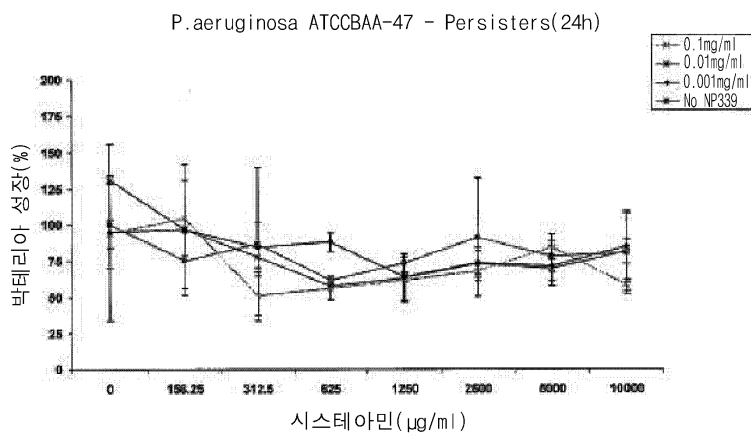
도면14d



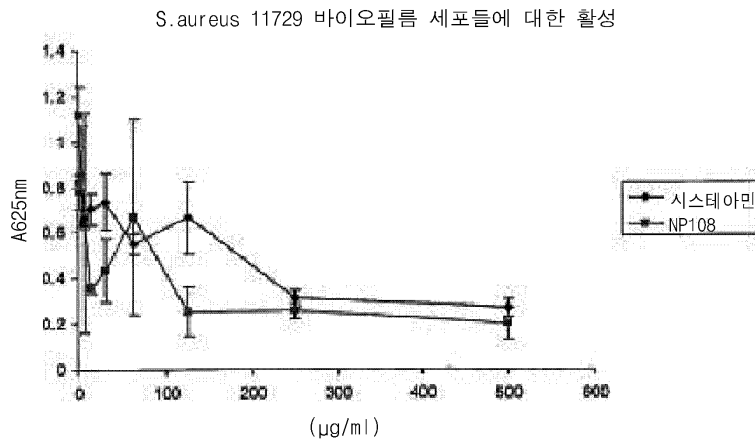
도면15a



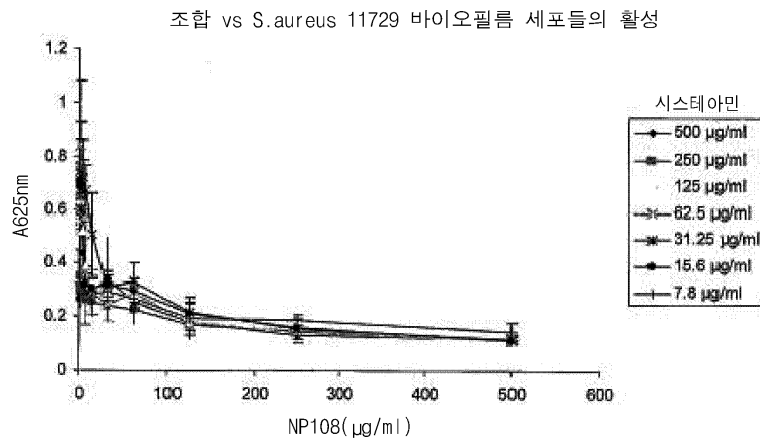
도면15b



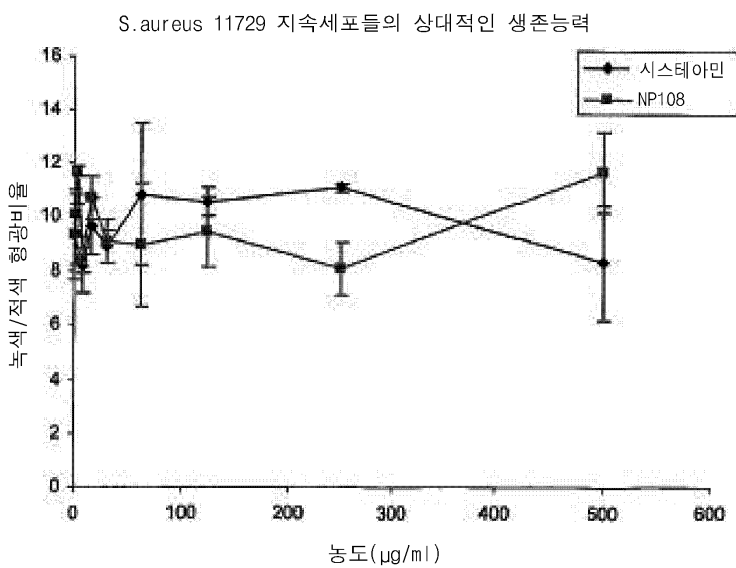
도면16



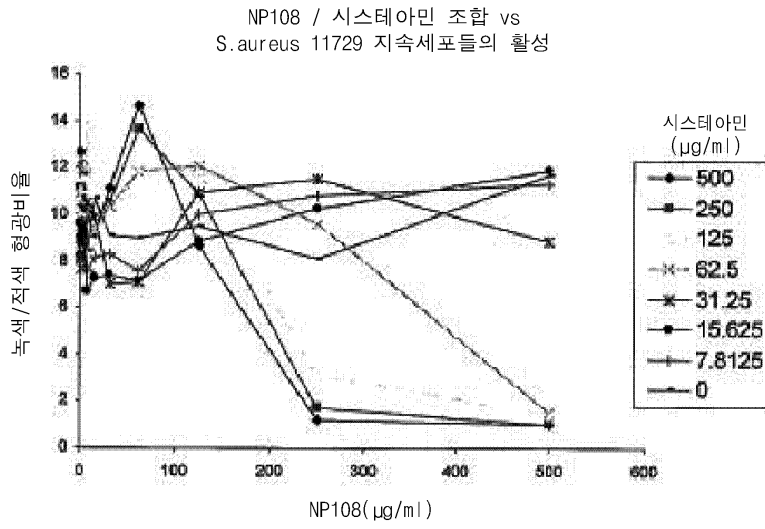
도면17



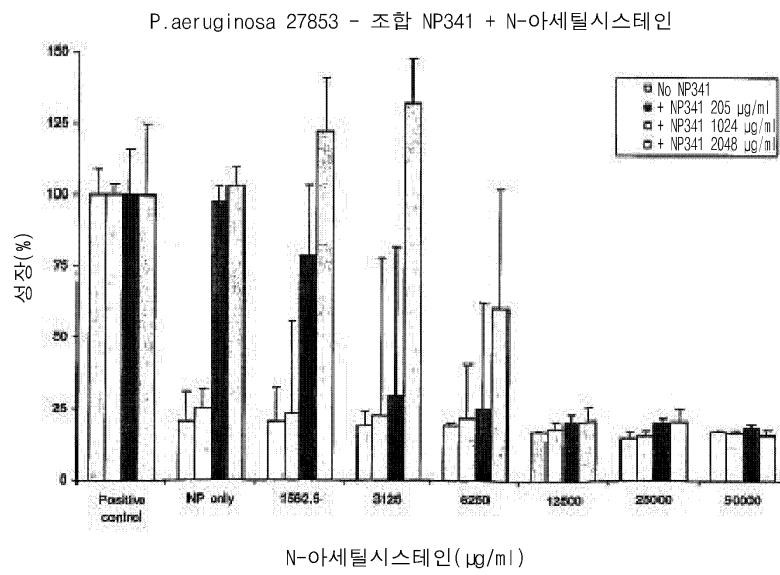
도면18



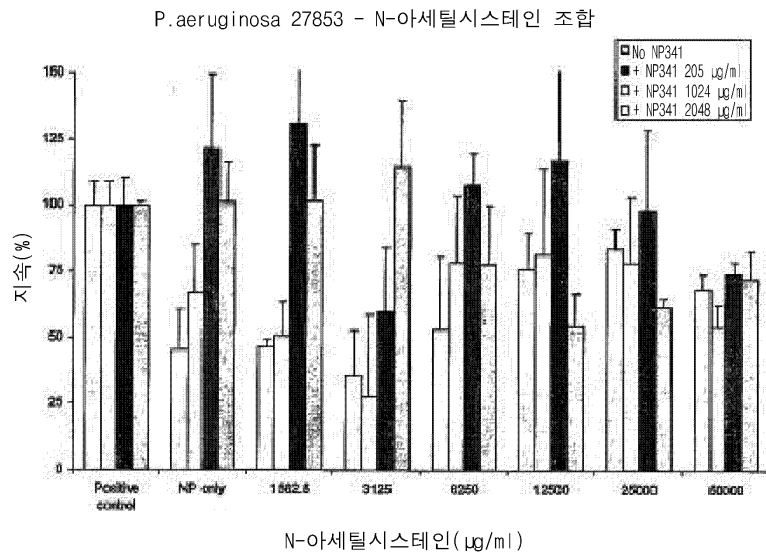
도면19



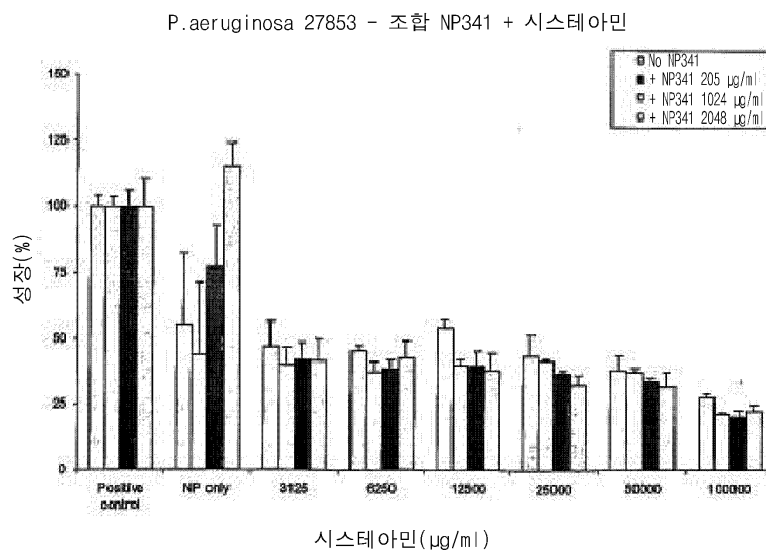
도면20a



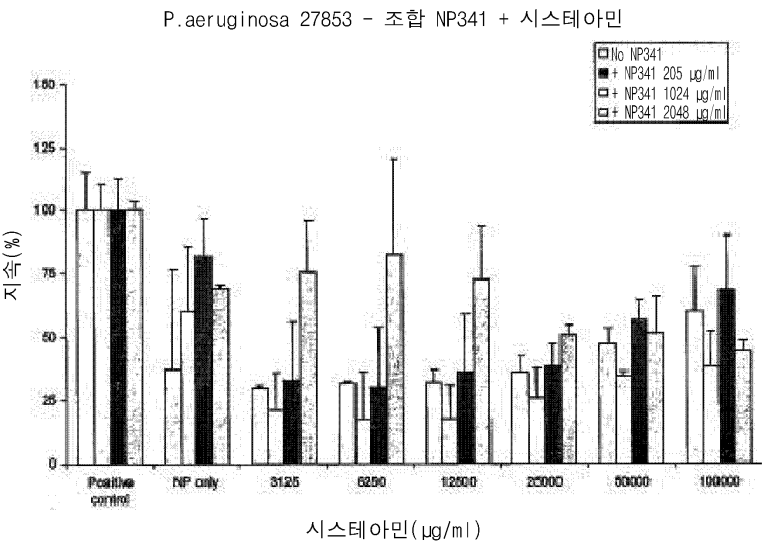
도면20b



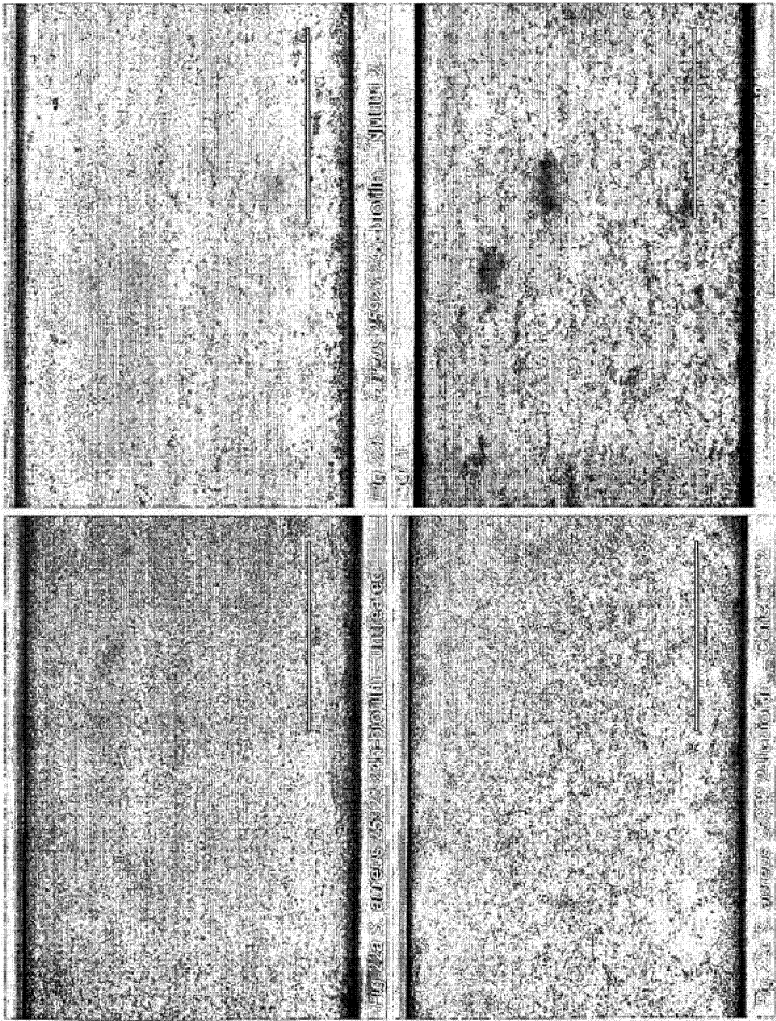
도면21a



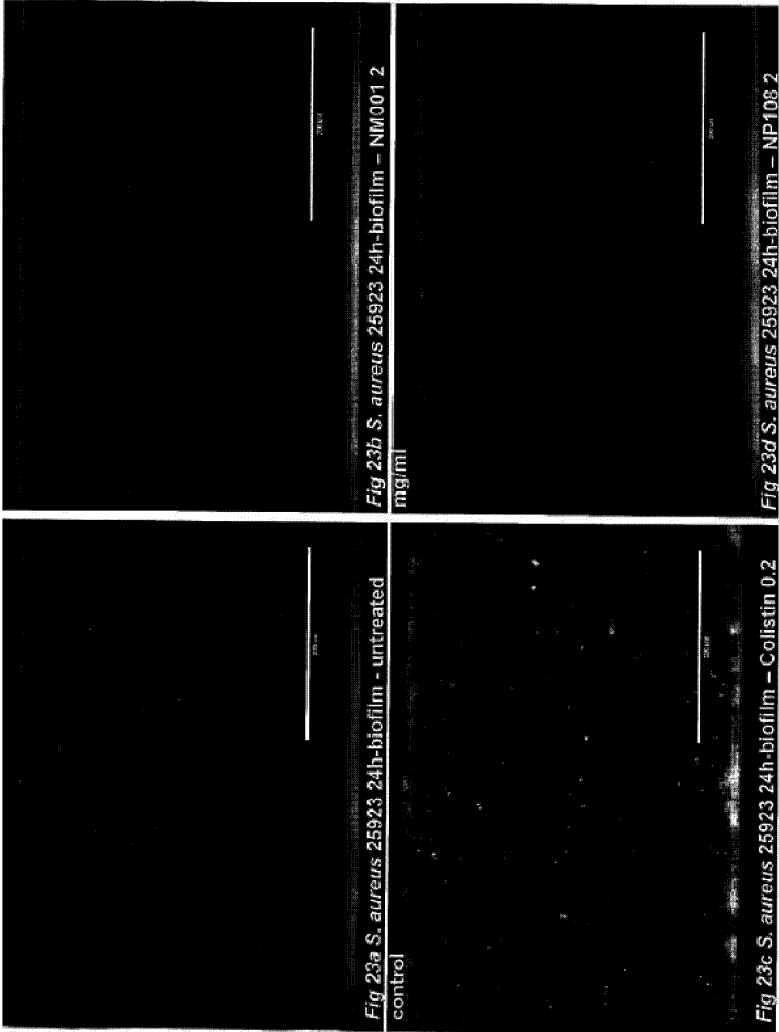
도면21b



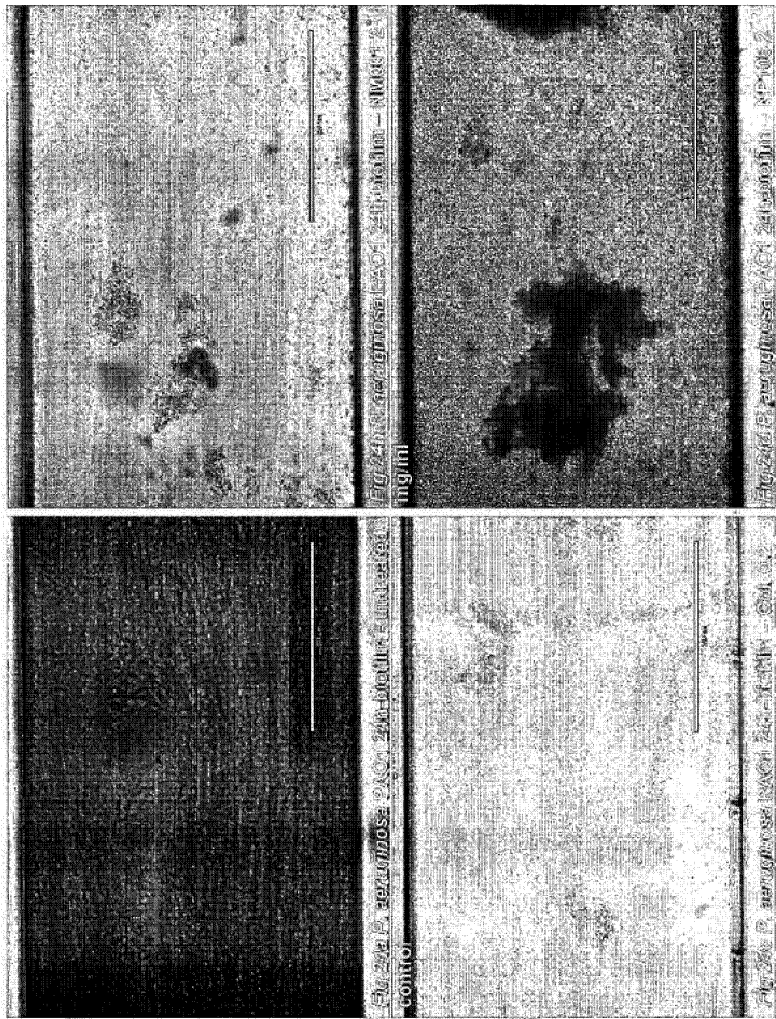
도면22



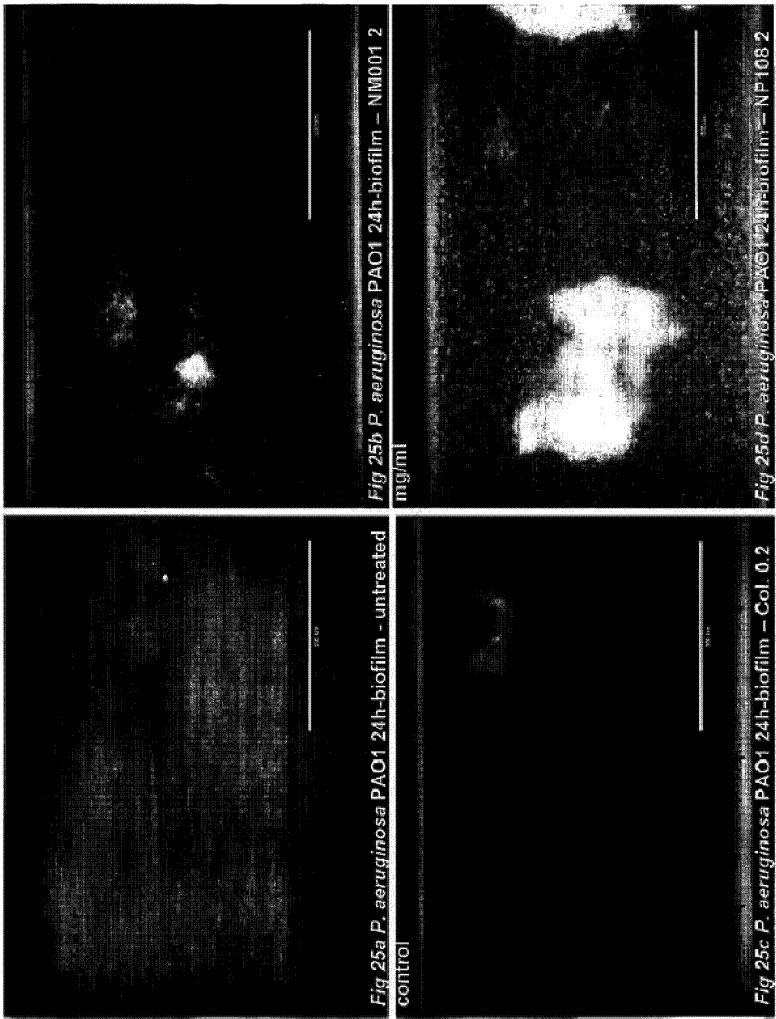
도면23



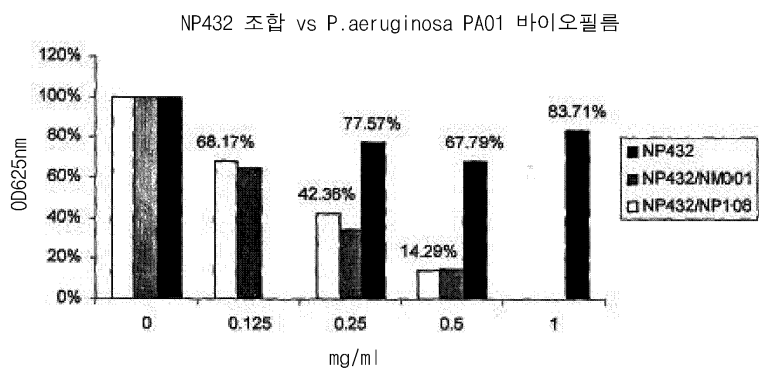
도면24



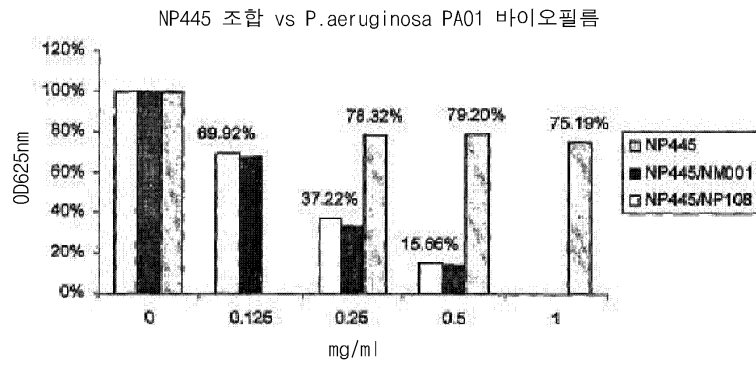
도면25



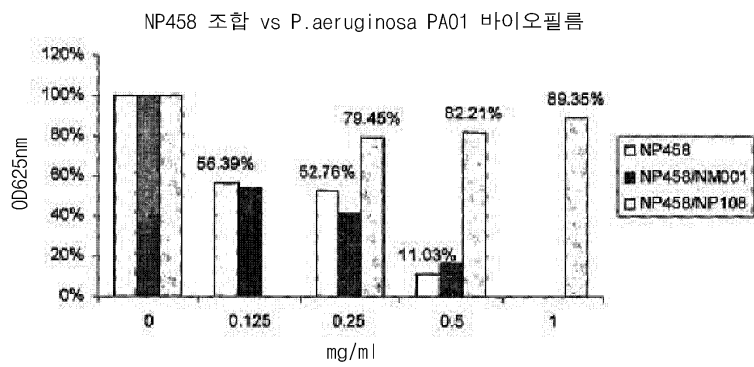
도면26



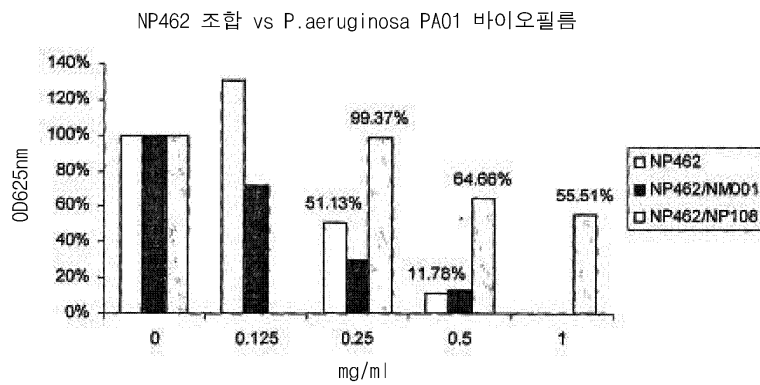
도면27



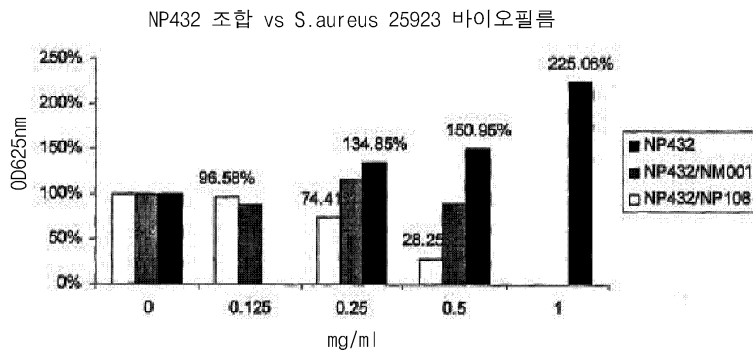
도면28



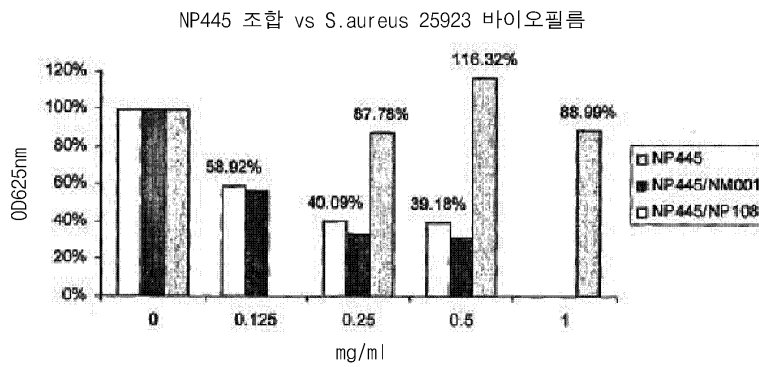
도면29



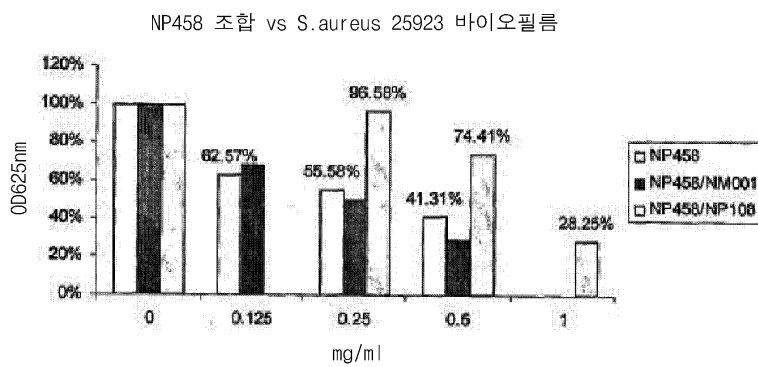
도면30



도면31



도면32



도면33

