



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0117439

(43) 공개일자 2015년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/52 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0042897

(22) 출원일자 2014년04월10일

심사청구일자 2014년04월10일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

송재준

서울특별시 서초구 신반포로 9 73동 504호(반포동, 주공아파트)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 5 항

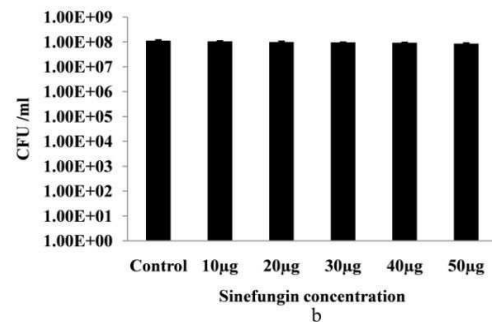
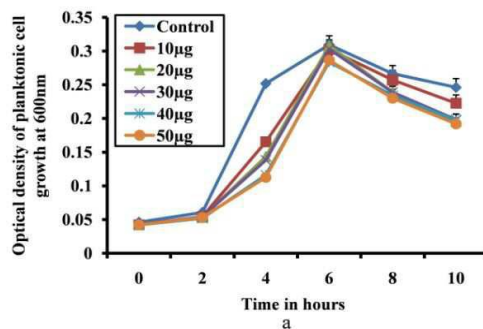
(54) 발명의 명칭 바이오필름에 의해서 유발되는 감염증의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 및 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신편진을 유효성분으로 포함하는, 바이오필름에 의해서 유발되는 감염증의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 및 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 약학적 조성물 및 코팅용 조성물은 우수한 항균 효과를 보유하며, 바이오필름 형성 억제에 탁월한 효능을 나타내는 바, 바이오필름에 의해서 유발되는 각종 감염증의 예방 또는 치료, 및 각종 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물 등에 형성되는 바이오필름을 억제하기 위한 코팅용 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

신편진을 유효성분으로 포함하며, 바이오필름에 의해서 유발되는 감염증의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 감염증은, 충치, 치주염, 중이염, 근골격 감염, 괴사성 근막염, 담관계 감염, 골수염, 세균성 전립선염, 자연 판막의 심내막염, 낭포성 섬유증 폐렴, 멜로이도시스 (meloidosis), 병원내 감염 (nosocomial infection), ICU 폐렴, 요로 카테터 방광염 (urinary catheter cystitis), 복막 투석 (CAPD) 복막염 및 담도 배액관 폐쇄 (biliary stent blockage)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 감염증인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 바이오필름은 살모넬라균 (*Salmonella* spp.), 적리균 (*Shigella* spp.), 장염비브리오 (*Vibrio parahaemolyticus*), 콜레라균 (*Vibrio cholerae*), 대장균 O-157 (*Escherichia coli* O-157), 캄필로박터 (*Campylobacter jejuni*), 위막성 대장염균 (*Clostridium difficile*), 웰치균 (*Clostridium perfringens*), 엘시니아 장염균 (*Yersinia enterocolitica*), 피로리균 (*Helicobacter pylori*), 아메바 적리균 (*Entamoeba histolytica*), 세레우스균 (*Bacillus cereus*), 보툴리누스균 (*Clostridium botulinum*), 인플루엔자균 (*Haemophilus influenzae*), 폐렴구균 (*Streptococcus pneumoniae*), 클라미디아 폐렴균 (*Chlamidia pneumoniae*), 레지오넬라 폐렴균 (*Legionella pneumoniae*), 부란하멜라균 (*Branhamella catarrhalis*), 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코플라즈마 (*Mycoplasma pneumoniae*), A형 용원균 (*Streptococcus pyogenes*), 디프테리아균 (*Corynebacterium diphtheriae*), 백일해균 (*Bordetella pertussis*), 옴버그균 (*Chlamidia psittaci*), 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*), 메티실린 내성 황색 포도상 구균 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 대장균 (*Escherichia coli*), 폐렴 간균 (*Klebsiella pneumoniae*), 엔테로박터 (*Enterobacter* spp.), 프로테우스속 (*Proteus* spp.), 아시네토박터 (*Acinetobacter* spp.), 장구균 (*Enterococcus faecalis*), 포도상 구균 (*Staphylococcus saprophyticus*) 및 B형 용원균 (*Streptococcus agalactiae*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 균에 의해서 형성된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

신편진을 유효성분으로 포함하며, 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물에 코팅되는 것을 특징으로 하는 코팅용 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 바이오필름에 의해서 유발되는 감염증을 예방 및 치료하기 위한 약학적 조성물, 및 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*, pneumococci)는 어린이 및 노인에게서 폐렴, 뇌수막염, 균혈증 (bacteremia), 및 중이염 (otitis media, OM)을 발생시키는 주된 원인이다 (Ispahani *et al.*, 2004; Kadioglu, 2008). 폐렴균의 군락형성 및 질병은 종종 바이오필름의 형성과 관련이 있다 (Hall-Stoodley L &

et al., 2006).

[0003] 대부분의 박테리아는 일반적으로 물속에서 플랑크톤 형태 (planktonic form)로 존재하지만, 영양분의 감소나 항생제의 공격 등으로 생존조건이 열악해지는 경우, 고체의 표면에 붙어서 군락을 형성하는 바이오필름의 형태로 표현형이 변화하게 된다. 따라서, 바이오필름은 세균, 효모, 곰팡이 등 미생물이 특정조건에서 인체 (피부, 구강, 치아 등)나 설비 (배관, 저장탱크 등) 등의 표면에 필름처럼 부착되어 있는 미생물의 집합체라 할 수 있으며, 그 자체가 미생물의 서식처로도 제공되어 균의 서식을 가속화하기도 한다. 이러한 바이오필름의 미생물은 산업계 및 의학계 전반에서 심각한 문제를 일으킬 수 있으므로, 이에 대한 연구가 요구되는 상황이다.

[0004] 착생 박테리아는 숙주 표면 및 서로에 대해서 부착되어 외부 기질 (exopolysaccharide, EPS)에 의해서 덮인 다층 구조를 형성하게 된다 (Costerton *et al.*, 1999; Wolcott *et al.*, 2008). 즉, 바이오필름의 형성은 박테리아가 당단백으로 이루어진 기질을 세포 주위에 3차원적으로 형성하고, 이것이 주위의 고형물에 부착되는 과정을 통하여 이루어지며, 박테리아는 정족수 감지 (quorum sensing, QS)라는 일련의 과정을 통하여 부족한 영양물질을 기질 내에 가두어 두고 외부의 공격 (항생물질, 저산소)으로부터 자신을 보호할 수 있게 된다. 또한, 바이오필름의 형성으로 인해 박테리아의 생존에 필요한 대사율을 낮춤으로써, 소량의 영양물질로도 생존이 가능하게 되어 열악한 환경에서의 생존가능성이 높아지게 된다. 바이오필름은 실제로 자연계에서는 흔히 볼 수 있는 현상으로, 일정한 유속을 가지고 있는 강에서도 바위의 표면에 박테리아들이 바이오필름의 형태로 서식하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 바이오필름 중의 박테리아는 항생제 및 숙주 방어 시스템에 대해서 증진된 내성을 나타내며, 이는 종종 지속적이며 치료가 어려운 감염증으로 이어진다 (Kania *et al.*, 2008; Vlastarakos *et al.*, 2007). 다양한 연구들에 의해서 폐렴균성 바이오필름이 폐니실린, 테트라사이클린, 림파피신, 아목실린, 에리쓰로마이신, 클린다마이신 및 레보플록사신에 대해서 현저하게 높은 내성을 갖는다는 사실이 보고된 바 있다 (del Prado *et al.*, 2010; Garcia-Castillo *et al.*, 2007). Marks 등은 (2012), 마우스의 비인두 조직 (nasopharyngeal tissue) 상에 형성된 폐렴균성 바이오필름이 플랑크톤성 바이오필름에 비해서 젠타마이신 및 페니실린 G에 대해서 더욱 내성을 갖는다는 사실을 보고한 바 있다 (Marks *et al.*, 2012). 따라서, 폐렴균성 바이오필름에 대한 항미생물성 화합물을 개발하기 위해서는, 대안적인 항미생물성 표적을 검색해야 하는 시급한 필요성이 존재한다.

[0006] 특히, 인체의 감염성 질환에 있어서 바이오필름은 임상적으로 많은 문제를 일으키게 된다. 예를 들어, 치아의 표면에 바이오필름의 형태로 박테리아가 존재하여 치석을 형성할 경우에는 충치와 치주질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 구강의 건강 요소와 관련하여 가장 커다란 영향을 끼치는 요소는 치아의 부식 또는 충치, 잇몸 질환 혹은 치주질환, 그리고 불쾌한 입냄새의 발생이라고 할 수 있으며, 그 근본 원인은 구강에 서식하는 병원균들에 의해 형성되는 바이오필름이다. 상기 병원균들은 구강 표면에 부착되지 않은 상태에서는 타액 등의 용액 상태로 존재하다가 양치질이나 음료섭취와 함께 쉽게 제거될 수 있어, 구강에 질환을 일으킬 기회가 매우 적다. 그러나, 상기 병원균들은 효과적인 생존을 위하여 구강 표면에 부착되는 성질이 있어, 바이오필름을 형성하게 된다. 일단 바이오필름이 형성되면, 외부의 물리, 화학적 자극에 대한 방어력이 현저하게 커지기 때문에, 일반적인 물리적 방법으로 제거하기 어려울 뿐만 아니라, 독성이 매우 강한 항균제를 사용하거나 많은 양의 항균제를 사용하여야만 일시적으로 제거될 수 있다. 이러한 바이오 필름은 방치될 경우, 더욱 두터워지고 강해져 치석을 형성하여 수많은 세균의 서식처가 되어 각종 구강 질환을 일으키게 된다. 또한, 중심정맥관이나 이식물의 표면에 바이오필름이 존재하는 경우에는 일반적인 항생제로 제거가 되지 않고 바이오필름에서 박테리아가 떨어져 나오면서 주기적인 발열을 보이는 양상의 세균감염을 나타내게 된다. 또한, 기관절개관, 인공와우 이식기 등 이식물이나 의료용 재료의 표면에서도 바이오필름의 형성이 보고되고 있다.

[0007] 효과적인 항-바이오필름 전략은 표면에 대한 미생물 부착 및 군락형성을 억제하고, 바이오필름 형성을 조절하는 신호 분자들을 방해하며, 바이오필름 기질의 분해를 수반하여야 한다 (Bala *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2008). 스트렙토코커스 뉴모니아에 있어서, 정족수 감지 신호는 바이오필름 군집을 조절하고, 공간적 배치, 세포들의 응집, 및 외부 기질 형성을 조절하는데 핵심적인 역할을 수행한다 (Trappetti *et al.*, 2011; Vidal *et al.*, 2011). 자가유도제-2 (Autoinducer-2, AI-2)는 폐렴균에서의 유일한 QS 분자이며, 이는 활성화 메틸 사이클 (activated methyl cycle, AMC)을 통해서 S-라이보실호모시스테인 라이에이즈 (S-ribosylhomocysteine lyase, LuxS)에 의해서 합성된다 (Surette & Bassler, 1999). AMC에서, S-아데노실-L-메티오닌 (SAM)은 중요 분자이며, 이는 메티오닌 재순환, 생분자들의 메틸화 및 AI-2의 생합성을 위한 메틸기를 공급한다 (Bassler *et al.*, 1997; Markham & Pajares, 2009). 더 나아가, 5'-메틸티오아데노신/S-아데노실호모시스테인 (MTA/SAH)과 같은 AMC의 부산물들은 박테리아에 대해서 독성을 갖는다 (Beeston & Surette, 2002). 스트렙토코커스 뉴모니아에 있어서, SAH의 독성제거는 MTA/SAH 뉴클레오시테이즈 (Pfs) 및 S-라이보실호모시스테인 라이에이즈 (Lux

S)에 의해서 수행되며, 이러한 경로는 인간에는 존재하지 않는다 (Markham & Pajares, 2009; Sun *et al.*, 2004; Winzer *et al.*, 2002).

[0008] SAM은 AMC의 중심 분자로서, 메티오닌의 재순환, 생분자들의 메틸화, AI-2의 생합성, 및 폴리아민 생합성에 관여한다 (Borchardt, 1980; Parveen & Cornell, 2011). 한편, 신편진 (sinefungin)은 천연 뉴클레오사이드이면서 SAM의 구조적 유사체이다. 신편진은 DNA, RNA, 단백질 및 다른 분자들에 관련된 트랜스메틸화 반응들을 저해한다 (Barbes *et al.*, 1990; Fuller & Nagarajan, 1978; McCammon & Parks, 1981; Paolantonacci *et al.*, 1985). 이러한 신편진의 항진균성, 항바이러스성, 및 항원충성 활성이 보고된 바 있다 (Perez-Leal *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2006). 그러나, 박테리아에 대한 신편진의 효과에 대해서는 아직까지 연구된 바가 없다.

[0009] 현재까지 바이오필름에 의한 감염의 치료는 감염원이 되는 이식물을 제거하거나, 바이오필름의 서식처를 물리적으로 제거하는 것이 유일한 해결책으로 알려져 있는 바, SAM의 활성을 변화시킬 경우 폐렴균성 바이오필름에 대해서 억제 효과가 있다는 점을 가정해볼 수 있고, SAM의 유사체인 신편진을 사용할 경우, 효과적인 바이오필름 억제용 조성물을 제공할 수 있는 가능성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에, 본 발명자들은 신편진이 세균 증식 및 바이오필름 형성 억제에 탁월한 효과를 나타낸다는 점에 기초하여, 신편진을 유효성분으로 포함하는, 바이오필름에 의해서 유발되는 감염증의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물, 및 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 따라서, 상기 첫 번째 과제를 해결하기 위해서, 신편진을 유효성분으로 포함하며, 바이오필름에 의해서 유발되는 감염증의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 두 번째 과제를 해결하기 위해서, 신편진을 유효성분으로 포함하며, 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 코팅용 조성물은 우수한 항균 효과를 보유하며, 바이오필름 형성 억제에 탁월한 효능을 나타내는 바, 바이오필름에 의해서 유발되는 각종 감염증의 예방 또는 치료, 및 각종 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물 등에 형성되는 바이오필름을 억제하기 위한 코팅용 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a는 다양한 농도의 신편진과 함께 *Streptococcus pneumoniae*를 성장시킨 경우 ($10 \mu\text{g}$ 내지 $50 \mu\text{g ml}^{-1}$), 성장 정도를 시간대별로 관찰한 그래프로서, 1:100으로 희석된 세포 현탁액을 다양한 시간대에서 (0, 2, 4, 6, 8 및 10 시간), 다양한 농도의 신편진과 함께, 37°C , 5% CO_2 중에서 성장시켰으며, 광학 밀도는 600 nm에서 측정하였다. 도 1b는 다양한 농도의 신편진과 함께 성장된 폐렴균의 CFU 카운트를 6 시간 경과 후 측정한 그래프로써, 배양 6 시간 후에, $100 \mu\text{l}$ 의 분획들을 연속적으로 희석시키고, 박테리아를 계수하기 위해서 혈 아가 플레이트 상에 플레이트하였다. 오차 막대들은 평균 수치의 표준 편차를 나타낸다.

도 2는 신편진의 폐렴균성 인 비트로 바이오필름 성장에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다. 도 2a 및 2b는, 다양한 농도의 신편진과 함께 18 시간 동안 바이오필름을 성장시킨 다음, 바이오필름의 생질량을 크리스탈-바이올렛 마이크로적정기 플레이트 분석법에 의해서 측정하고, 폐렴균성 바이오필름의 CFU 카운트를 수행한 그래프이고, 도 2c 및 2d는, 이미 기구축된 바이오필름에 대한 다양한 농도의 신편진의 효과를 도시한 그래프로써, 도 2c는 크리스탈-바이올렛 마이크로적정기 분석법으로 바이오필름의 생질량을 측정한 그래프이고, 도 2d는 폐렴균성 바이오필름의 CFU 카운트를 측정한 그래프이다. 오차 막대들은 평균 수치의 표준 편차를 나타낸다. 유의성은 Student's *t* test에 의해서 결정하였다 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

도 3은 다양한 시간 간격들 (6, 12, 18 및 24 시간)로 성장된 *Streptococcus pneumoniae* 인 비트로 바이오필름

들에 대한 신펴진 ($35 \mu\text{g ml}^{-1}$)의 억제 효과를 나타낸 그래프이다. 페렴균성 바이오필름은 다양한 시간대에서 $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 신펴진과 함께 배양되었으며, 바이오필름 생질량은 크리스탈-바이올렛 마이크로플레이트 분석법에 의해서 정량화하였다. 도 3a는 6 시간에서 바이오필름 성장; 2b는 12 시간에서 바이오필름 성장; 2c는 18 시간에서 바이오필름 성장; 2d는 24 시간에서 바이오필름 성장을 나타낸 그래프이다. 실험들은 3중으로 3회 실시하였다. 오차 막대들은 평균 수치의 표준 편차를 나타낸다. 결과들은 Student's *t* test에 의해서 유의성 있었다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$).

도 4는 신펴진 존재 및 부존재 하에서 성장된 바이오필름들의 주사 전자현미경 (SEM) 영상들을 도시한 것이다. 패널 a, b, 및 c는 신펴진 부존재 하에서 성장된 바이오필름들에 대한 대표적 SEM 영상들로서; 바이오필름은 두껍고 3차원 구조로 잘 조직되어 있었다. 패널 d, e, 및 f는 $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 신펴진과 함께 성장된 바이오필름들에 대한 대표적 SEM 영상들로서; 바이오필름은 얇고, 분산되고, 세포 무리들이 조직적 구조 없이 관찰되었다. 도면의 축적 막대는 10, 5, 및 $3 \mu\text{m}$ 이다.

도 5는 $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 신펴진 존재 및 부존재 하에서 성장된 바이오필름들의 무세포 상등액 중 자가유도체-2의 생산 변화를, *vibro harveyi* 리포터 균주를 사용하여 측정한 것이다. *V. harveyi* 리포터 균주는 무세포 상등액과 함께 15 시간 동안 배양하였으며, 발광 반응을 측정하였다. 오차 막대들은 평균 수치의 표준 편차를 나타낸다. 유의성은 Student's *t* test에 의해서 결정하였다 (* $p < 0.05$).

도 6은 $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 신펴진으로 접종된 래트의 중이 중에서 페렴균성 균락화를 정량화한 그래프이다. CFU 카운트를 사용하여, 대조군에 대해서 신펴진이 공급된 박테리아 현탁액으로 처리된 샘플들의 전체 수포 용해물 (whole bulla lysate) 중 박테리아를 계수하였다. 오차 막대들은 평균 수치의 표준 편차를 나타낸다. 결과들은 Student's *t* test에 의해서 유의성 있었다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$).

도 7은 *Streptococcus pneumoniae*에서, 호모시스테인 및 활성화된 메틸 사이클의 사이클 산물을 체계적으로 도시한 다이어그램이다. 메티오닌은 SAM 합성효소에 의해서 SAM으로 변환된다. SAM의 메틸기가 다양한 메틸기 수용체로 공여됨으로써 SAH가 생산되고, MTA/SAH 뉴클레오시테이즈 (pfs)가 먼저 SAH를 S-라이보실호모시스테인 (SRH)으로 변환시키며, 이는 다시 LuxS에 의해서 호모시스테인으로 재순환된다. 이러한 반응의 부산물로서, 4,5-다이하이드록시-2,3-펜탄디온이 생산되며, 이는 자발적으로 자가유도체-2를 생성하게 된다. SAM이 탈카르복실화되면, 스페르미딘 합성효소 (speE)에 의해서 축대화되는 것처럼 MTA (메틸티오아데노신)이 생산된다. 스페르미딘 (폴리아민)은 푸트레신으로부터의 이러한 반응의 부산물이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

[0016]

본 발명은, 신펴진을 유효성분으로 포함하며, 바이오필름에 의해서 유발되는 감염증의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0017]

하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 신펴진 (sinefungin)은 페렴구균 (*Streptococcus pneumoniae*)의 유전자 발현을 감소시켜 바이오필름의 형성을 억제함으로써 항균효과가 우수하며, 따라서 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0018]

본 발명에서, 바이오필름에 의해 유발되는 감염증은 항균효과로 억제될 수 있는 감염증일 수 있으며, 이는 기존의 소독제, 항생제로 치료하던 감염증과 질병 진단시 감염증이 유발될 수 있는 경우를 포함한다. 이러한 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예로는, 이에 제한되지 않으나, 충치, 치주염, 중이염, 근골격 감염, 괴사성 근막염, 담관계 감염, 골수염, 세균성 전립선염, 자연 판막의 심내막염, 낭포성 섬유증 폐렴, 멜로이도시스 (meloidosis), 및 병원내 감염 (nosocomial infection), 예컨대 ICU 폐렴, 요로 카테터 방광염 (urinary catheter cystitis), 복막 투석 (CAPD) 복막염 및 담도 배액관 폐쇄 (biliary stent blockage)를 포함한다.

[0019]

바이오필름이 형성될 수 있는 위치로는, 봉합, 적출부, 동정맥부, 공막돌출술 (scleral buckle) 부위, 콘택트 렌즈, IUD, 기관 튜브, 히크만 카테터 (Hickman catheter), 중심 정맥 카테터, 인공 심장 판막, 판막 그래프트, 정형외과 기기, 음경 보형물 등을 예로 들 수 있으며, 기타 다른 예들이 Costerton J et al 및 Costerton J and Steward (2001 Battling Biofilms, Scientific American pp 75-81)에 의한 논문에 기재되어 있고, 상기 논문은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 기타, 바이오필름이 형성될 수 있는 위치로는, 치주농주 (gum

disease) 및 강(cavity)으로 진행될 수 있는 충치, 눈 감염으로 진행될 수 있는 콘택트 렌즈, 만성 감염이 될 수 있는 귀 및 폐렴이 될 수 있는 폐를 포함한다.

[0020] 본 발명에 있어서, 감염은 양성 섬유증일 수 있으며, 이는 피부 감염, 화상 감염 및/또는 상처 감염으로부터 초래될 수 있다. 본 발명의 조성물은 면역 저하 개체에서 감염을 치료하는데 특히 적합할 수 있다.

[0021] 한편, 바이오필름은 병원균에 의해 유발되어 형성될 수 있는데, 병원균이라 함은, 이에 제한되지는 않으나, 세균이나 바이러스 등 병의 원인이 되는 미생물을 일컫는 것으로서, 장관 감염증, 호흡기 감염증, 요로 감염증 등 각종 감염증의 원인균을 말한다. 이러한 원인균의 구체적인 예로는, 살모넬라균 (*Salmonella* spp.), 적리균 (*Shigella* spp.), 장염비브리오 (*Vibrio parahaemolyticus*), 콜레라균 (*Vibrio cholerae*), 대장균 0-157 (*Escherichia coli* 0-157), 캄필로박터 (*Campylobacter jejuni*), 위막성 대장염균 (*Clostridium difficile*), 웰치균 (*Clostridium perfringens*), 엘시니아 장염균 (*Yersinia enterocolitica*), 피로리균 (*Helicobacter pylori*), 아메바 적리균 (*Entamoeba histolytica*), 세레우스균 (*Bacillus cereus*), 보툴리누스균 (*Clostridium botulinum*), 인플루엔자균 (*Haemophilus influenzae*), 폐렴구균 (*Streptococcus pneumoniae*), 클라미디아 폐렴균 (*Chlamidia pneumoniae*), 레지오넬라 폐렴균 (*Legionella pneumoniae*), 부란하멜라균 (*Branhamella catarrhalis*), 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코플라즈마 (*Mycoplasma pneumoniae*), A형 용련균 (*Streptococcus pyogenes*), 디프테리아균 (*Corynebacterium diphtheriae*), 백일해균 (*Bordetella pertussis*), 음병균 (*Chlamidia psittaci*), 녹농균 (*Pseudo monas aeruginosa*), 메티실린 내성 황색 포도상 구균 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), 대장균 (*Escherichia coli*), 폐렴 간균 (*Klebsiella pneumoniae*), 엔테로박터 (*Enterobacter* spp.), 프로테우스속 (*Proteus* spp.), 아시네토박터 (*Acinetobacter* spp.), 장구균 (*Enterococcus faecalis*), 포도상 구균 (*Staphylococcus saprophyticus*), B형 용련균 (*Streptococcus agalactiae*) 등을 들 수 있다.

[0022] 본 발명에서 소독이라 함은, 병원균을 사멸시키는 것을 말하며, 비병원성 미생물의 잔존 여부는 문제로 하지 않는다. 상기 소독제는 과산화수소 (hydrogen peroxide), 염소제 (chlorine), 요오드제 (iodophors), 페놀, 알코올류, 클로로헥시딘 글루코네이트 (chlorhexidine gluconate), 트리클로산 (triclosan) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0023] 상기 질병 진단시에는 의료기기 등을 이용하여 진단하는 것을 포함하되, 의료기기 표면이 고분자 재료나 금속 재료인 의료기기가 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0024] 또한, 본 발명의 조성물은 신편진과 함께 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 혼합물일 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수도 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수도 있다. 더 나아가, 당분야의 적절한 방법으로, 또는 Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수도 있다.

[0025] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 투여량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 상기 신편진의 일일 투여량은 0.5 ~ 3.0 mg/kg, 바람직하게는 약 1.0 ~ 2.0 mg/kg이나, 임상결과에 따라 가감될 수 있으며, 하루 일회 내지 수회에 걸쳐 분할투여하는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 조성물은 바이오필름에 의해 유발되는 감염증의 예방 또는 치료 효과를 위하여 단독으로, 또는 기존의 소독제나 항생제, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제와 병용하여 사용될 수도 있다.

[0027] 한편, 본 발명은 신편진을 유효성분으로 포함하며, 바이오필름 형성을 억제하기 위한 코팅용 조성물을 제공한다.

[0028] 상기 코팅제는 의료기기, 의료용 재료, 의료용 이식물에 코팅되는 것을 특징으로 한다.

[0029] 상기 의료기기는, 이에 제한되지는 않으나, 진찰 및 진단용기기 (Consultation & diagnosis equipment), 임상 검사용기기 (Clinical examination equipment), 방사선관련기기 (Radiology equipment), 수술관련기기 및 장비 (Surgical apparatus & equipment), 치료관련기기 (Cure apparatus & equipment), 재활의학 및 물리치료기

(Physiotherapy apparatus), 안과관련기기 (Ophthalmic apparatus), 치과관련기기 (Dental apparatus), 중앙공급 설 관련기기 (Central supply equipment), 병원설비 및 응급장비 (Hospital accommodation & emergency equipment), 한방관련기기 (Oriental medicine & equipment), 제약관련기기 (Pharmaceutical equipment), 비만 및 건강관련기기 (Obesity cure & healthcare equipment), 의료용품, 소모품 등을 예로 들 수 있다.

[0030] 상기 의료용 재료는 그 재질에 따라 금속재료, 무기재료, 고분자재료, 복합재료 등으로 구분된다. 금속재료는 코발트계, 크롬계, 스테인레스스틸계, 티타늄계 및 탈탄계 등으로 구분되며, 무기재료는 생체유리 (bioglass) 및 세라믹계 등이 포함되고, 고분자재료에는 천연 고분자재료, 바이오플라스틱, 합성고분자재료, 합성고무, 합성섬유 등이 포함되며, 의료용 복합재료는 섬유강화플라스틱 (Fiber reinforced plastics)계, 유리섬유, 탄소섬유 등을 예로 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0031] 상기 의료용 이식물 (medical implants)들에는 도뇨관 (catheter)처럼 매우 간단한 것부터 인공장기 (artificial organs)나 감지기 (sensors)처럼 매우 복잡하고 정교한 장치까지 다양한 이식물들이 포함된다. 그러나, 질병의 치료나 생활의 불편함을 해소시켜 주기 위해 환자의 피하에 이식하는 의료용 이식물이 본래의 의도와는 달리 환자의 생명을 위협하는 원인이 되기도 하는데, 이는 의료용 이식물을 환자에게 이식하는 과정에서 심각한 감염이 발생할 수 있기 때문이다. 병원에서 발생한 감염증의 절반 이상이 의료용 장치의 이식과 관련 있으며, 의료용 이식물의 구체적 예로는, 혈관 내 인공 삽입물, 스텐트, 심장 스텐트, 말초 스텐트, 정형외과용 이식물, 뼈 또는 관절 보형물, 인공 심장, 인공 심장 밸브, 피하 및/또는 근육 내 이식물을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 상기 의료기기의 표면은 고분자재료 또는 금속재료가 바람직하다.

[0033] 상기 고분자재료는 의료활동에 쓰이는 고분자재료 즉, 진단과 치료를 포함한 각종 의료행위에 쓰이는 의료기구나 신체 일부를 대신하기 위해 인공장기로 사용되는 중합체를 말한다. 활용되는 분야로는 수혈용 주머니를 비롯한 수혈용 장비, 주사기, 소프트 콘택트렌즈, 인공신장용 필터, 요도, 심장의 판막, 인공 혈관, 뼈, 피부, 힘줄, 귀, 턱, 안구, 치아 및 치아 충전제 등이 있다. 사용되는 물질로는 폴리염화비닐, 폴리에틸렌, 천연고무, 실리콘고무, 폴리프로필렌, 폴리우레탄 등을 예로 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 상기 금속재료는 스테인리스강, 코발트합금, 타이타늄합금, 금속생체재료, 코발트크롬합금, 티타늄합금, 탄탈륨, 형상기억합금 (Shape memory alloys) 등을 예로 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0036] 박테리아 균주 및 배양 조건

[0037] *S. pneumoniae* D-39 균주는 (NCTC 7466) 캡슐화된, 혈청형 2 병원성 균주를 사용하였으며, 이는 Health Protection Agency Culture Collections (HPA, Salisbury, UK)로부터 획득하였다. 박테리아는, 5% v/v 양혈 (sheep blood)로 보충된, 대두 성분을 트립신으로 처리한 배지 (tryptic soy broth, TSB; BD Difco, Detroit, MI, USA) 중에서, 또는 혈액 아가 (blood agar, BA; Hye In, Seoul, Korea) 상에서, 37℃, 5% CO₂ 대기 조건으로 배양하였다. *Vibro harveyi* (*V. harveyi*) 균주 MM32 (ATCC BAA-1121) (Miller *et al.*, 2004)는 자가유도체 생분식 (autoinducer bioassay, AB) 배지 상에서, 30℃ (Greenberg *et al.*, 1979)에서 배양하였다. 신펜진 (sc-203263)은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다.

[0038] 플랑크톤성 세포 성장에 대한 신펜진의 효과

[0039] *S. pneumoniae*는 다양한 농도의 신펜진과 함께 (10, 20, 30 40 및 50 µg ml⁻¹), 37℃, 5% CO₂에서, 다양한 시간대 동안 성장시켰다 (0 h - 10 h). 600 nm (OD₆₀₀)에서의 광학 밀도를, SpectraMax plus 384 자동화 마이크로플레이트 판독기 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 2시간 간격으로 측정하였다. 배양 6시간 경과 후에, 100 µL의 분획을 연속적으로 희석시키고, 콜로니 형성 유닛들 (colony forming units, CFU)을 계수하기 위해서 BA 상에 플레이팅하였다. 플랑크톤성 세포 성장의 감소 백분율은 대조군 (미처리) 샘플들의 수치로부터 신펜진-처리 샘플들의 수치를 차감함으로써 계산하였다. 실험은 각 시간대에서 3개 샘플들을 사용하여 3회 반복하였다.

[0040] 인 비트로 바이오필름 성장에 대한 신펜진의 효과

[0041] 인 비트로 폐렴균성 바이오필름 성장을 96-웰, 평바닥, 폴리스티렌 마이크로적정 플레이트 (BD falcon, Sparks,

MD, USA)에서, 정적 모델 (Oggioni *et al.*, 2006)을 사용하여 수행하였다. 요약하면, BA 상에서 밤새 배양된 *S. pneumoniae*의 신선한 균락을 끓어내서 TSB+1% 글루코오스 배지에서 배양하였다 (Moscoso *et al.*, 2006). 중간-로그 상 (mid-logarithmic phase) 세포 현탁액 (1×10^8 CFU ml⁻¹)을 신선한 멸균 TSB+1% 배지로 1:100 희석하였으며, 200 μ L의 분획을 96-웰 마이크로적정 플레이트의 웰 중에 접종한 다음, 37°C, 5% CO₂ 중에서 배양하였다. 배양 이후에, 배지를 폐기하고, 플레이트들을 200 μ L의 멸균 포스페이트 완충 식염수 (PBS)로 3회 세척하였다. 이후, 플레이트들을 건조시키고, 50 μ L의 크리스탈 바이올렛 (CV; 0.1%)으로 15분 동안 염색하였다. 과량의 염색약을 따라내고, 플레이트들을 멸균 증류수로 3회 세척하였다. 바이오필름을 200 μ L의 95% 에탄올에 용해시키고, 전술한 자동화 스펙트로미터를 사용하여 OD₅₇₀ nm를 측정하였다. 데이터는 3회 측정의 평균값을 나타낸다.

[0042] 바이오 필름 성장에 대한 다양한 농도의 신편진의 효과

[0043] 폐렴균성 바이오필름에 대한 신편진의 농도의존성 효과를 알아보기 위해서, *S. pneumoniae* 바이오필름을 10-50 μ g ml⁻¹의 신편진으로 전술한 바와 같이 18시간 동안 배양하였다. 바이오필름의 생질량은 전술한 바와 같이 CV-마이크로적정기 플레이트 분석법에 의해서 측정하였다. 생질량에 있어서 백분율 감소는 신편진 없이 성장된 대조군 바이오필름의 생질량을 차감함으로써 계산하였다. 바이오필름 박테리아의 개수는 전술한 바와 같이 측정하였다 (즉, CFU).

[0044] 기구축된 바이오필름에 대한 신편진의 효과

[0045] 폐렴균성 바이오필름을 마이크로적정 플레이트 웰들 중에서 12시간 동안 구축하였다. 형성된 바이오필름은 다양한 농도의 신편진에 6시간 동안 노출시켰으며, CV-마이크로적정 플레이트 분석법에 의해서 분석하였고, 세포 생존도는 CFU 개수에 의해서 측정하였다.

[0046] 바이오필름 형성에 있어서, 신편진에 대한 노출 시간 효과

[0047] 폐렴균성 바이오필름을 35 μ g ml⁻¹의 신편진 존재 하에서 6, 12, 18 및 24시간 동안 제조하였다. 각각의 시점에서, 바이오필름 생질량을 전술한 바와 같이 측정하였다.

[0048] 바이오필름의 주사 전자 현미경 (Scanning electron microscopy, SEM) 분석

[0049] 인 비트로 바이오필름을, 35 μ g ml⁻¹의 신편진이 존재하는 조건 및 신편진이 존재하지 않는 조건 하에서, 24-웰 조직 배양 플레이트 중에서 18 시간 동안 배양하였으며, SEM에 의해서 분석하였다. 배지를 제거하고, 플레이트들을 멸균 PBS로 천천히 2회 세척함으로써 플랑크톤성 세포들을 제거하였다. 샘플들을 0.1 M 포스페이트 완충 용액 중의 2% 글루타르알데하이드에 침지시킴으로써 사전고정시키고, PBS 중에 용해된 1% 오스믹산 중에서 2시간 동안 사후고정시켰다. 샘플들을 에탄올 및 t-부틸 알콜의 등급 시리즈 중에서 처리하고, 모델 ES-2030 동결 건조기 (Hitachi, Tokyo, Japan) 중에서 건조시키고, IB-5 이온 코팅기 (Eiko, Kanagawa, Japan)를 사용하여 백금 코팅하고, S-4700 전계 발광 주사 전자 현미경 (Hitachi)을 사용하여 관찰하였다.

[0050] 자가유도체 분석

[0051] AI-2의 생산에 대한 변화를 검출하기 위해서 *V. harveyi* MM32를 정성적 리포터 균주로 사용하였다. *V. harveyi* MM32 (BB120 luxN::Tn5 luxS::Tn5)는 AI-2를 센싱할 수 있기 때문에 이상적인 리포터 균주이지만, 그 자체로 AI-2를 합성할 수는 없다 (Miller *et al.*, 2004). 리포터 균주는 AB 배지에서 16시간 동안 성장시킨 다음, 1:5,000으로 희석하였다. 희석된 리포터 균주 중 총 90%를 96-웰 플레이트에 가하였다. *S. pneumoniae* 바이오필름을 전술한 바와 같이 18시간 동안 35 μ g ml⁻¹의 신편진이 존재하는 조건 및 신편진이 존재하지 않는 조건 하에서 성장시켰으며, 응집된 세포들을 분산시키기 위해서 3초 동안 음파처리 하였다. 이어서, 1 ml의 세포 현탁액을 원심분리하고, 필터 살균하였다. 10%의 여과된 상등액을 90% 리포터 균주에 가하였다. 박테리아가 존재하지 않는 배지를 음대조군으로 사용하였다. 플레이트들을 30°C에서 15시간 동안 배양하였으며, 리포터 균주의 발광을, 발광미터 (Glomax Multi-detection system Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 모니터링하였다.

[0052] 인 비보 폐렴균 균락형성

[0053] 인 비보 균락형성을 조사하기 위해서, 래트 (rat) OM 모델을 사용하였다. 동물 실험 프로토콜은 동국대학교 일산 병원 (대한민국, 경기도)의 동물 연구 및 보호 위원회에 의해서 검수 및 승인을 받았다. 20마리의

무병원성, 체중 150-200 g의 스프라그 다울리 래트들 (Sprague Dawley rats)은 오리엔트 바이오사 (대한민국, 경기도)로부터 입수하였다. 모든 래트들은 사용 이전에 귀현미경 관찰을 통해서 비정상적인 중이를 갖는지 확인하였으며, 감염-프리 구역에 2시간 동안 분리 보관하였다. 래트들은 무작위로, 박테리아에 감염된 그룹 ($n = 8$), $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 신편진과 함께 박테리아에 감염된 그룹 ($n = 8$), 또는 아무런 조치를 취하지 않은 그룹 (대조군, $n = 4$)으로 그룹별 나누었다. 3×10^7 CFU의 *S. pneumoniae*를 함유하는 50 마이크로리터의 세포 현탁액을 오른쪽 귀의 고막을 통해서, 투베르쿨린 주사기 및 27-게이지 바늘을 사용하여 중이강 내로 주사하였다 (Yadav *et al.*, 2012b). 접종 1주일 후에 동물들을 희생시키고, 중이 수포 (bulla)를 무균적으로 획득하였다. 고막을 제거하고, 귀를 세척하여 플랑크톤성 박테리아를 제거하였다. 수포를 균질화한 다음, CFU 계수를 위해서 연속적으로 희석 및 BAP 상에 플레이팅하였다.

[0054] 정량적 실시간 RT-PCR을 사용한, 인 비트로 형성된 바이오필름의 유전자 발현 정량

[0055] $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 신편진이 존재하는 조건 및 신편진이 존재하지 않는 조건 하에서 18시간 동안 성장된 바이오필름에서의 *luxS*, *pfs* 및 *speE* 유전자들의 발현을 실시간 RT-PCR에 의해서 정량하였다. 바이오필름을 세척하고, 부착된 세포들을 긁어낸 다음, 즉시 RNA 추출을 수행하였다. 세포 펠렛들을 $100 \mu\text{l}$ (3 mg mL^{-1}) 라이소자임 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 중에서 4분 동안 배양함으로써 용해시켰다. 전장 RNA를, RNeasy Total RNA Isolation System Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여, 제조업체의 사용지침에 일부 수정을 가하여 추출하였다. On-column DNase (Qiagen) 처리를 20-25°C에서 10분 동안 수행하였다. RNA 품질은 스펙트럼 분석하였다.

[0056] cDNA는 제조업체의 사용지침에 따라서 ImProm-II Reverse Transcriptase Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 합성하였다. *speE* 유전자에 대한 프라이머들을, 하기 표 1의 *S. pneumoniae* D39 균주의 뉴클레오타이드 서열로부터 표준 방법에 의해서 디자인하였다.

표 1

유전자	프라이머 서열	앰플리콘 크기 (염기쌍)
<i>speE</i>	F-5'-GACTTTGCTGCAGGCTAGA-3' R-5'-AAATGGATCTGTCGCATCGT-3'	120
<i>luxS</i>	F-5'-TATGTTTCGCTTGATTGGG-3' R-5'-GCCGGCAGTAGGGATAGAGT-3'	105
<i>pfs</i>	F-5'-TTGCTGCTATGCCAGAAGAA-3' R-5'-TTCCCCAAAACAACCTGCTC-3'	76
<i>gyrB</i>	5'-CAGATCAAGAAATCAAACCTCAA-3' 5'-CAGCATCATCTACAGAACTC-3'	172

[0058] *luxS*, *pfs* 및 *gyrB* (하우스-키팅) 유전자들에 대해서 사용되는 프라이머들은 기존에 보고된 바가 있다 (Oggioni *et al.*, 2004; Yadav *et al.*, 2012a). 실시간 RT-PCR은 총 부피 $20 \mu\text{l}$ 로서, $10 \mu\text{l}$ 의 2X SYBR Green PCR Master Mix (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA), 3 pmol의 전방 및 후방 프라이머들 각각, $4 \mu\text{l}$ 의 cDNA, 및 뉴클리에이즈 미함유수 (nuclease-free water)로 구성되는 용액 내에서 수행하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분 동안 초기변성, 95°C에서 15초 동안 변성시키는 사이클 45회, 56°C에서 10초 동안 어닐링, 72°C에서 15초 동안 연장, 및 72°C에서 5분 동안 최종연장으로 구성되며, 60-95°C에서 용융 곡선 분석을 수행하였다. 뉴클리에이즈 미함유수를 포함하는 음대조군 및 역전사 효소가 존재하지 않는 대조군을 각 RT-PCR 실험에 포함시켰다. 상대 유전자 발현은 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 방법을 사용하여 분석하였다 (Livak & Schmittgen, 2001). 참고 유전자는 *gyrB* 이었으며, 표준 조건은 신편진 없이 성장된 바이오필름이었다.

[0059] 통계적 분석

[0060] 수치들은 3회 수행된 각 실험들의 평균으로서 계산하였으며, 이를 대조군들과 비교하였다. 2가지 평균 수치들 사이의 차이는 Student's *t*-test에 의해서 계산하였다. 통계적으로 유의미한 테스트들은 $p\text{-value} < 0.05$ 로 셋팅되었다.

[0061] 결과

- [0062] 플라크톤성 세포 성장에 대한 신펜진의 효과
- [0063] 다양한 농도의 신펜진과 함께 페렴균을 시간대별로 성장시킨 실험으로부터 신펜진의 박테리아 사멸 효과를 알 수 있었다. 신펜진 처리된 샘플들에서 박테리아의 성장은, 대조군 샘플들 (미처리)에 비해서 느렸다. 또한, 신펜진 처리된 샘플과 대조군 샘플들에서, 중간-로그 상에서 현저한 성장 차이가 관찰되었다 (접종 후 4시간 경과). 그러나, 로그 상의 말단 (접종 후 6시간 경과)에서는, 플라크톤성 박테리아 성장 억제에 대해서 그다지 현저한 효과가 없었다 (도 1(a)). 6시간 성장된 박테리아의 CFU 카운트 또한 신펜진 처리된 샘플들과 미처리된 샘플들에서 그다지 현저한 차이점이 관찰되지 않았다 (도 1(b)).
- [0064] 인 비트로 바이오필름 성장에 대한 신펜진의 효과
- [0065] 신펜진은 페렴균성 바이오필름의 인 비트로 형성을 억제함
- [0066] 신펜진과 함께 배양된 샘플들에서 현저하게 ($p < 0.05$) 감소된 바이오필름 생질량 및 CFU 카운트가 관찰되었다. 신펜진의 억제 효과는 농도의존적이었다 (도 2(a) 및 (b)). $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (최저 농도) 및 $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (최고 농도)의 신펜진과 함께 배양된 바이오필름들은 현저한 ($p < 0.05$) 생질량 감소를 나타내었는 바, 각각 15 % 및 53 % 감소를 나타내었다.
- [0067] 기구축된 바이오필름에 대한 신펜진의 효과
- [0068] 페렴균성 바이오필름을 12시간 동안 생성하였으며, 다양한 농도의 신펜진과 함께 6시간 동안 배양하였다. 10, 20, 30, 및 $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 신펜진에서는 바이오필름 생질량 및 생존 카운트의 현저한 감소가 관찰되지 않은 반면에, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 신펜진은, 비록 백분율 감소는 낮았지만, 바이오필름 생질량 및 생존 카운트에서 현저한 감소를 야기하였다 (단지 5 %의 바이오필름만 감소) (도 2(c) 및 (d)).
- [0069] 시간에 따른 바이오필름 억제
- [0070] 다른 시간대에서 배양된 바이오필름들에 대한 신펜진의 효과를 결정하기 위해서, 바이오필름들을 신펜진과 함께, 또한 신펜진 없이 6, 12, 18, 및 24 시간 동안 생성하였다. 바이오필름 생질량의 현저한 감소 ($p < 0.05$)가 모든 시간대에서 명확하게 관찰되었다 (도 3).
- [0071] 페렴균성 바이오필름의 SEM
- [0072] 신펜진 존재 ($35 \mu\text{g ml}^{-1}$) 및 부존재 하에서 성장된 바이오필름들을 SEM으로 조사하였다. 신펜진 부존재 하에서는, 고도로 조직화된 바이오필름이 제조되었다. 이러한 바이오필름들은 특성상 이종성 (heterogeneous)을 나타내며, 세포들이 기질 내에 함입되어 서로 및 플레이트 베이스에 연결된 구조를 갖는다. 응집된 세포들은 현저한 깊이를 갖는 3차원 구조를 형성하였다 (도 4(a), (b) 및 (c)). 이와는 대조적으로, $35 \mu\text{g ml}^{-1}$ 의 신펜진과 함께 배양된 바이오필름들은 얇고, 박테리아는 무리 중에 분산되었다. 세포-to-세포 연결은 관찰되지 않았으며, 바이오필름들은 조직화되지 않았다 (도 4(d), (e), 및 (f)).
- [0073] 자가유도체 분석
- [0074] 신펜진 존재 및 부존재 하에서 성장된 바이오필름들의 무세포 상등액에 대해서, *V. harveyi* MM32 리포터 균주를 통한 AI-2 생산을 조사하였다 (도 5). 15시간 경과 이후에, 리포터 균주는 AI-2 유도 발광 반응을 나타내었는 바, 신펜진 존재 하에서 배양된 샘플들 보다는 미처리된 샘플들로부터의 상등액에서 그 정도 현저하게 높았다. 발광 반응은 미처리된 샘플들과 비교할 때, 처리된 샘플들에서 92% 감소하여 관찰되었다. 이러한 결과들은 신펜진이 페렴균성 바이오필름에서 AI-2의 생산을 방해 및 감소시킨다는 사실을 나타낸다.
- [0075] 신펜진은 인 비보 페렴균성 군락 형성을 억제함
- [0076] 인 비보 실험 결과, 박테리아 접종 1 주일 경과 후 신펜진으로 접종된 래트로부터 분리된 수포 용해액 (bullalysate)에서 박테리아가 더 소량으로 회수되었다. 박테리아만으로 처리된 그룹의 평균 CFU 카운트는 5.98×10^3 ($SD = 4649$)이었으며, 신펜진으로 처리된 그룹은 1.70×10^3 ($SD = 2533$)이었다. 신펜진 처리된 래트 수포에서 70% 더 적은 양 ($p < 0.05$)의 박테리아가 회수되었다 (도 6).
- [0077] 인 비트로 바이오필름의 유전자 발현 정량

- [0078] 정량적 RT-PCR을 통해서, 신편진 없이 성장된 바이오필름에 비해서 신편진과 함께 성장된 바이오필름에서 *luxS*, *pfs*, and *speE*의 유전자 발현이 현저하게 (> 2 배) 감소한다는 사실을 확인하였다. *luxS*의 발현은 신편진과 함께 성장된 바이오필름에서 8.53배 ($p = 0.001$) 감소하였다. *pfs* 유전자의 발현은 2.88배 ($p = 0.006$) 감소하였다. 유사하게, *speE* 유전자는 3.22배 ($p = 0.01$) 하방조절되었다. 유전자 주석 (gene annotation) 결과, *luxS* 및 *pfs* 유전자들은 메티오닌 경로 유전자들로서, AMC를 통해서 시스테인을 재순환시키며, QS 분자 AI-2는 AMC의 부산물이었다 (도 7). 이러한 경로에서, SAM은 메틸 공여기로 기능한다. *luxS* 및 *pfs* 유전자들은 박테리아에 독성을 띄는 SAH 및 SRH를 제거하는 반응을 촉매하는 효소들을 암호화한다. *speE* 유전자는 탈카복실화된 SAM에 의한 스페르미딘 촉매반응의 생합성에 관여한다.
- [0079] **검토**
- [0080] SAM은 AI-2 및 폴리아민의 생합성으로 이어지는 SAH/MTA를 생산하기 위한 거대분자의 메틸화에서 활성화된 메틸기 공여체로서 기능하는 중요한 뉴클레오사이드이다. 따라서, 특정 기질 유사체에 의해서 SAM 활성을 억제하는 것은 자가유도체-2의 합성을 억제할 수 있으며, 따라서 바이오필름 생성의 감소를 야기할 수 있고, 독성을 완화할 수 있다.
- [0081] 본 발명에서는, SAM의 뉴클레오사이드 유사체이자, 메틸트랜스퍼레이즈 저해제인 신편진이, 인 비트로 및 인 비보 균락형성에서 폐렴균성 바이오필름에 대해서 미치는 효과를 분석하였다.
- [0082] 다양한 농도의 신편진과 함께 배양된 폐렴균의 플랑크톤성 성장은, 신편진이 정세균성 (bacteriostatic)을 갖는다는 사실을 보여준다. 활동적으로 성장하는 세포들에 대해서 신편진은 현저한 저해 효과를 나타내었다 (로그 상). 바이오필름 성장을 억제한 농도에서 플랑크톤성 세포 성장 억제는 그다지 두드러지지 않았는데, 이는 신편진이 바이오필름 성장 억제제일 수 있다는 점을 의미한다. 인 비트로 바이오필름에 대한 신편진의 억제 효과는 농도의존적이었다. 본 발명에서는 인비트로 성장된 바이오필름에 대한 시간에 따른 신편진의 억제 효과를 테스트하였다 (Lizcano *et al.*, 2010). 테스트된 모든 시간 지점들에서, 신편진과 함께 성장된 바이오필름 샘플들에서 낮은 바이오필름 생질량 및 CFU 카운트가 관찰되었다. 아마도, 신편진은 폐렴균성 바이오필름 형성을 조절하는 것으로 보고된 바 있는 정족수 감지 시스템 (*luxS*-AI-2)을 억제하는 것으로 보인다 (Vidal *et al.*, 2011; Vidal *et al.*, 2013). 기구화된 바이오필름들을 신편진으로 처리하는 경우 바이오필름 생질량 및 CFU 카운트에서 그다지 현저한 감소는 관찰되지 않았는데, 이는 신편진이 박테리아를 사멸시키지는 못한다는 점을 의미한다. 신편진의 억제 효과는 바이러스, 균류, 및 원생동물에서 보고된 바 있다 (Perez-Leal *et al.*, 2011; Zingg *et al.*, 1996).
- [0083] 신편진 존재 및 부존재 하에서 성장된 바이오필름들의 아키텍처에 있어서 차이점을 SEM을 통해서 확인하였다. SEM 결과, 신편진과 함께 성장된 바이오필름들이 기질에 대한 연결 및 두께 측면에서 현저하게 다르고, 비조직화되어 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 그들은 또한 세포-to-세포 연결이 상실되었으며, 기존 보고와 유사한 마이크로-균락이 존재하지 않았다 (Vidal *et al.*, 2011).
- [0084] 래트 OM 모델을 사용하여, 신편진으로 처리된 래트 수포에서 폐렴균이 현저하게 낮게 회수되는 것을 알 수 있었다. 이는 신편진이 폐렴균의 인 비보 균락화를 억제한다는 사실을 말해준다. 기존에, QS에 결함이 있는 돌연변이 박테리아 균주는 독성이 덜한 감염을 야기한다는 사실이 보고된 바 있다 (Gutierrez, 2009). 마우스에서 QS-결함이 있는 비내 (intranasal) *S. pneumoniae* 감염은 폐 또는 혈류로 전파됨에 있어서 덜 효과적이었다 (Strother *et al.*, 2003).
- [0085] QS는 폐렴균성 바이오필름을 조절하며, AI-2는 *S. pneumoniae*에서 유일한 QS 분자이다. 박테리아 QS를 억제함으로써 감염성 질환들을 예방 및 치료하는 사향에 대해서 다양한 연구들이 보고된 바 있다 (Martin *et al.*, 2008). 따라서, 본 발명의 다음 목표는 AI-2 생합성에서의 변화를 검출하는 것이다. 본 발명에서는, 신편진 처리된 샘플들에서 현저하게 낮은 AI-2 유도된 발광 반응을 검출하였으며, 이는 신편진이 AI-2 생합성을 방해한다는 것을 의미한다. 유사하게, Shourther 등은 (Strother *et al.*, 2003) *V. harveyi* AI-2 리포터 균주에서 생발광을 유도하는 *luxS* 돌연변이 균주의 능력이 현저하게 감소됨을 보고한 바 있다.
- [0086] 다음으로, 본 발명에서는 AI-2 생합성 경로 유전자들 (*luxS* 및 *pfs*)의 유전자 발현에서 변화를 탐지하였다. *luxS* 및 *pfs* 유전자의 발현이 현저하게 감소된 점은 SAM 의존성 메틸트랜스퍼레이즈 활성이 억제되었기 때문일 수 있다. 암호화된 Pfs 및 LuxS 효소들은 바이오 필름 생성 및 AI-2의 생산에 필요하다 (Schauder *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2011). *S. pneumoniae*에서, *luxS*는 독성 유전자이며, 반응능 (competence), 동족살육 (fratricide), 및 바이오필름 형성의 중추적인 조절자이고, *luxS* 돌연변이 균주는 폐렴균성 바이오필름 형성에

있어서 현저한 감소를 나타낸다 (Romao *et al.*, 2006; Trappetti *et al.*, 2011; Vidal *et al.*, 2011). *luxS* 및 *pfs* 유전자들의 하방조절은 신펜진 처리된 샘플들에서 AI-2의 생합성을 감소시킬 수 있다 (Stroehrer *et al.*, 2003). *S. pneumoniae*에서, AI-1은 존재하지 않으며, AI-2가 바이오필름 형성, 외독소 합성, 및 항생제 내성 인자를 위한 효소들의 발현에 관여하는 유일한 QS 분자이다 (Winzer *et al.*, 2002). 따라서, *luxS* 및 *pfs* 유전자들의 하방조절은 AI-2의 생합성을 감소시키고, 이는 다시 조직화된 바이오필름의 공간적 배열 및 축적을 방해한다. 이전의 연구들은 MTA/SAH 뉴클레오시데이즈 억제제로 처리된 *Vibrio cholerae* 및 장출혈성 *E. coli* (EHEC) 균주 0157:H7은 AI-2를 합성하지 않고, 감소된 바이오필름 생성을 나타낸다는 사실을 보고한 바 있다 (Gutierrez, 2009). 기존 연구에서, 저메틸화 약물 (hypo-methylating drug)인 5-아자사이티딘 (5-azacytidine)이 AMC 유전자들에 대해서 유사한 하방조절을 보인다는 점이 보고된 바 있다 (Yadav *et al.*, 2012a).

[0087]

신펜진의 억제 효과에 대한 또 다른 이유는 AMC의 독성 부산물이 축적되기 때문일 수도 있다. 최근 보고들에 의하면, MTA 및 SAH와 같은 AMC의 기질들이 세포에 독성이며, 박테리아가 MTA/SAH 뉴클레오시데이즈 및/또는 SAH 가수분해효소 및 MTA 인산화효소의 조합 활성을 지녀서 이러한 억제성 뉴클레오사이드들을 제거한다고 알려져 있다 (Parveen & Cornell, 2011). *S. pneumoniae*에 있어서, 메티오닌은 SAM 합성효소 (*metK*에 의해서 암호화)에 의해서 SAM으로 변환되며, SAM-의존성 메틸트랜스퍼레이즈는 SAH 및 메틸화 산물들을 생성한다. SAH의 해독은 MTA/SAH 뉴클레오시데이즈 (Pfs)에 의해서 수행되어 S-라이보실호모시스테인 (SRH)이 합성된다 (Markham & Pajares, 2009; Sun *et al.*, 2004; Winzer *et al.*, 2002). 이어서, S-라이보실호모시스테인 분해효소 (LuxS)가 SRH를 호모시스테인 및 4,5-디히드록시-2,3-펜탄디온으로 더 분해하고, 이는 AI-2 QS 분자의 전구체이다 (도 7). 신펜진은 SAM의 유사체이며, SAM의 S-CH₃ (술포늄 잔기)가 C-NH₃ (아민)으로 치환된 형태를 갖는다. 따라서, 신펜진은, 효소의 메틸 공여기 부위를 차지함에 있어서 SAM과 경쟁함으로써, SAM-의존성 핵산 메틸전이효소를 저해하게 된다 (Horton *et al.*, 2005; Schluckebier *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2006). 따라서, 신펜진의 존재는 메틸화 과정에 간섭하고, *luxS* 및 *pfs* 유전자들을 하방조절함으로써, SAH, SRH, 및 MTA의 불균형을 야기할 수 있다. 유사하게, *Neisseria meningitidis pfs* 및 *luxS* 돌연변이에서도 성장결함이 관찰되었는 바, 이는 독성 SAH 및 MTA의 축적에 기인한 것이거나, 또는 박테리아 내의 대사 불균형에 기인한 것일 수 있다 (Heurlier *et al.*, 2009).

[0088]

탈카르복실화된 SAM은 스페르미딘의 생합성에 관여하며, 스페르미딘은 바이오필름에 관여하는 폴리아민이다. *speE*에 의해서 암호화되는 스페르미딘 합성효소는 푸트레신 (putrescine) 및 탈카르복실화된 SAM으로부터 스페르미딘을 합성하는 반응을 촉매한다 (Shah & Swiatlo, 2008). 이전의 연구들은 *speE*를 폐렴균 군락화, 폐렴, 및 침습성 감염에 관여하는 독성 유전자로 보고한 바 있다 (Shah *et al.*, 2011). 신펜진과 함께 성장된 바이오필름에 있어서 *speE* 유전자의 저발현은, 신펜진이 스페르미딘 생합성도 방해한다는 사실을 의미한다.

[0089]

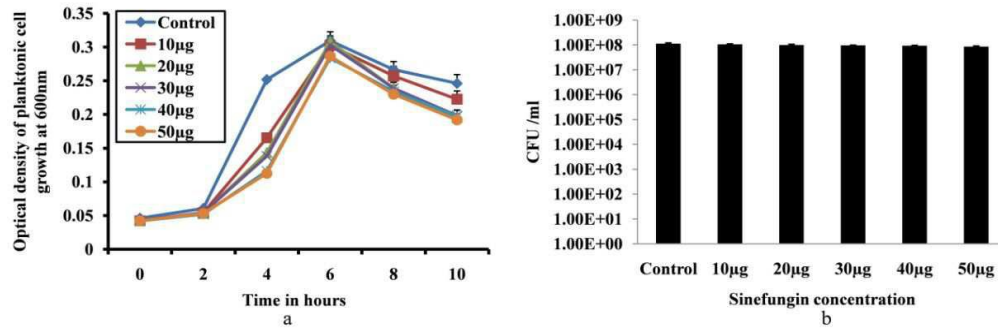
오직 몇몇 분자들만이 폐렴균성 바이오필름 억제에 대해서 효과적인 것으로 밝혀진 바 있다. Domenech 등 (2011)은 아미데이즈 LytA와 함께 성장된 폐렴균성 바이오필름이 80% 감소되는 점을 보고한 바 있으며, 최근에는, Sumitomo 등 (2012)이 S-카르복시메틸시스테인이 폐렴균이 인간 폐포상피세포들에 부착하는 것을 억제한다는 사실을 보고한 바 있다 (Domenech *et al.*, 2011; Sumitomo *et al.*, 2012). 유사하게, Trappetti 등 (2009)은 뉴라민가수분해효소 (neuraminidase) 억제제들인 DANA (즉, 2,3-다이드히드로-2-디옥시-N-아세틸뉴라민산), 자나미비르 (zanamivir), 및 오셀타미비르 (oseltamivir)가 폐렴균이 시알릭산-의존성 바이오필름을 형성하는 능력을 억제한다고 보고한 바 있다 (Trappetti *et al.*, 2009). 본 발명에서는, 최초로, 신펜진이 폐렴균의 인 비트로 바이오필름 성장 및 인 비보 중이 군락화를 억제한다는 사실을 밝혔다.

[0090]

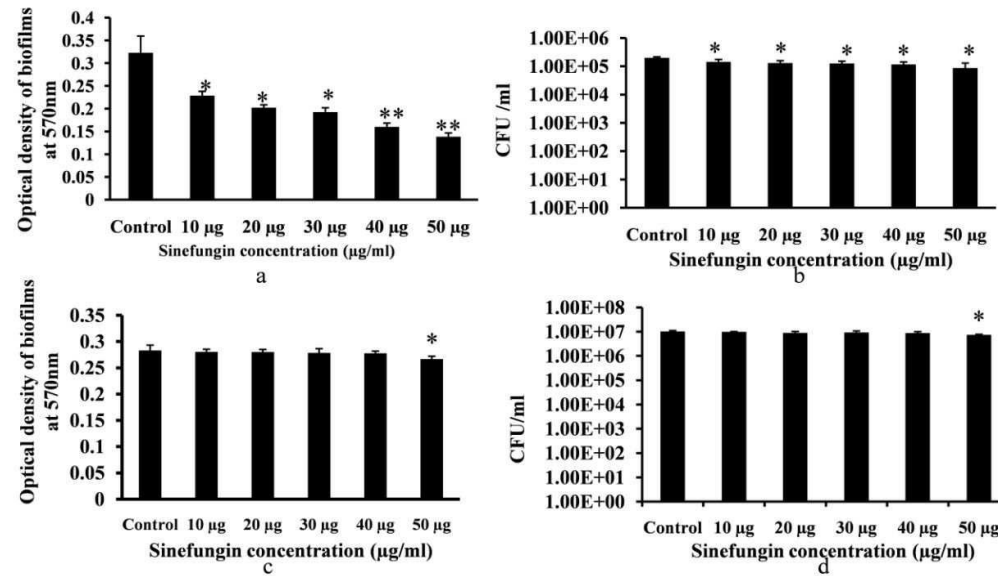
종합하면, 신펜진은 인 비트로 폐렴균성 바이오필름 성장을 억제하고, 조직화된 바이오필름의 형성을 감소시키며, AI-2 생산을 감소시키고, *luxS*, *pfs*, 및 *speE* 유전자들의 발현을 하방조절한다. 또한, 신펜진은 중이에서 폐렴균의 인 비보 군락 형성을 감소시킨다. 따라서, S-아테노실메티오닌 (SAM) 억제제는 폐렴균에 대한 신규한 항바이오필름제의 개발을 위해서 유망한 화합물로 사용될 수 있다.

도면

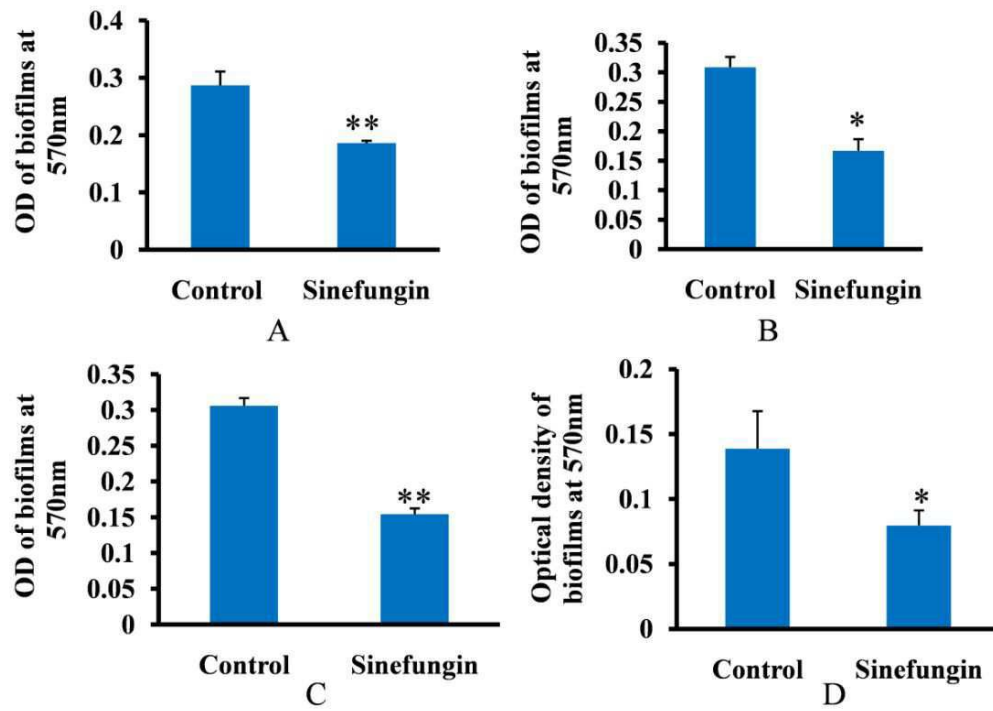
도면1



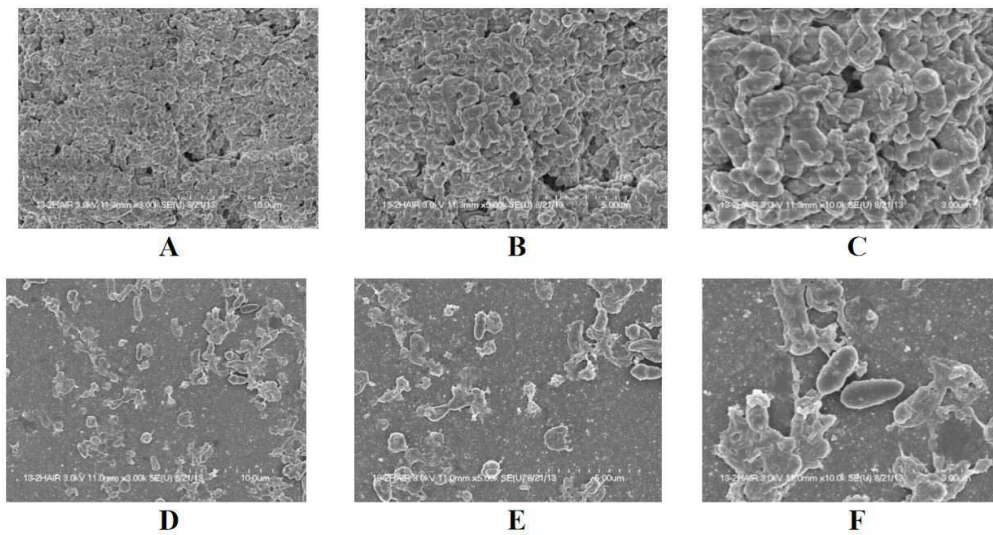
도면2



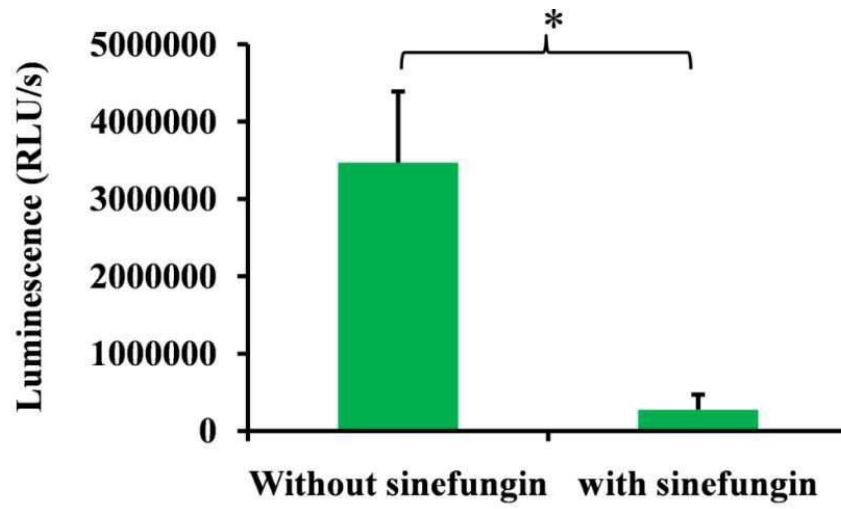
도면3



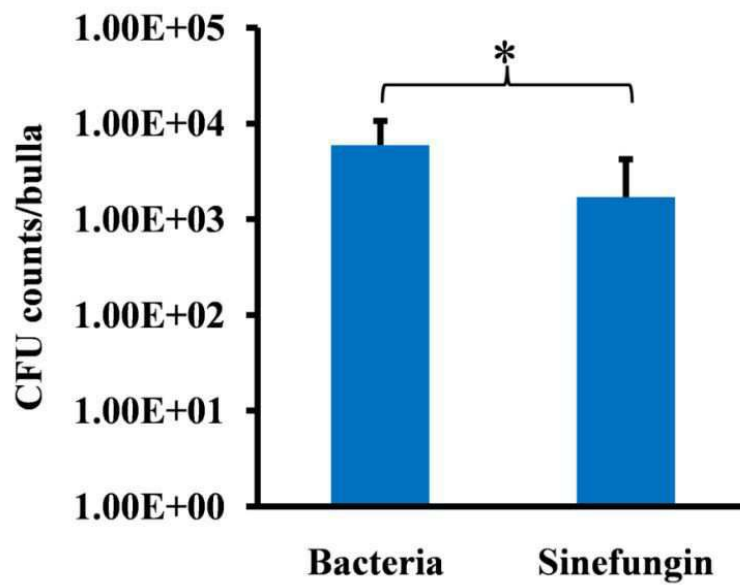
도면4



도면5



도면6



도면7

