



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0154142
(43) 공개일자 2022년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/255 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/255 (2013.01)
A61P 3/10 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7034718
(22) 출원일자(국제) 2021년03월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년10월05일
(86) 국제출원번호 PCT/NL2021/050168
(87) 국제공개번호 WO 2021/182958
국제공개일자 2021년09월16일
(30) 우선권주장
20163157.9 2020년03월13일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에이에이치브이 인터네셔널 비.브이.
네덜란드 8042 피씨 졸 스호케르웨그 10
(72) 발명자
스트레프렌드, 게릿 잔
네덜란드 8042 피씨 졸 스호케르웨그 10 내
드 루이즈, 잔
네덜란드 8042 피씨 졸 스호케르웨그 10 내
(74) 대리인
특허법인 무한

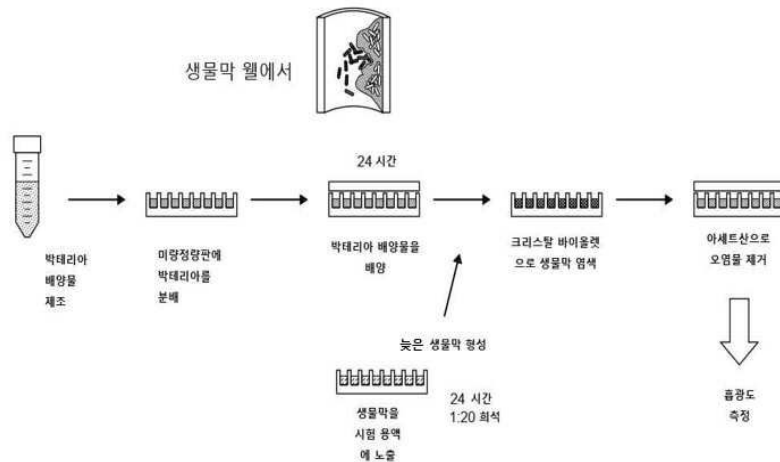
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 생물막 형성 방해 및 생물막 관련 질환 치료용 조성물

(57) 요약

본 개시내용은 티오황 함유 조성물, 특히 프로필-프로판 티오설파네이트(PTSO) 및 프로필-프로판-티오설파네이트(PTS)에 관한 것이다. 이러한 조성물은 감염을 치료하고 생체내 및 시험관내 모두에서 생물막을 감소 또는 분해하는데 유용하다. 특히, 이러한 조성물은 유선염, 디지털 피부염 및 만성 상처 감염을 포함하나 이에 제한되지 않는 생물막 관련 질환의 치료에 유용하다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 31/04 (2018.01)

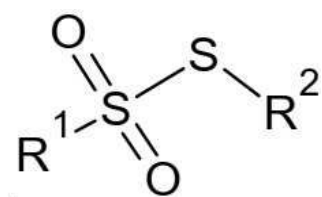
명세서

청구범위

청구항 1

생물막 관련 질환의 치료에 사용하기 위한, 하기 화학식 I에 따른 화합물 또는 하기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하고 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없는 조성물:

[화학식 I]



상기 화학식 I에서, R¹ 및 R²는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택된다.

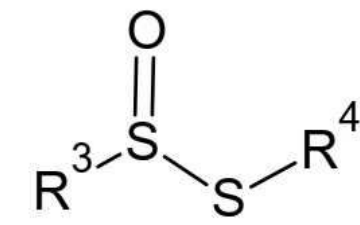
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물이 프로필-프로판 티오설피네이트(PTS0)인, 화합물 또는 조성물.

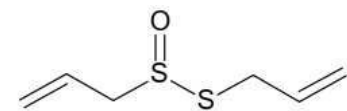
청구항 3

제1항에 있어서, 하기 화학식 II에 따른 화합물을 추가로 포함하는, 화합물 또는 조성물:

[화학식 II]



상기 화학식 II에서, R³ 및 R⁴는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되되, 단, 화학식 II는

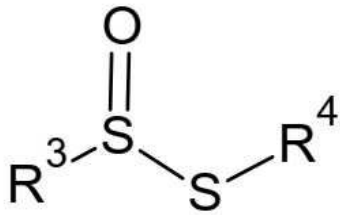


가 아니며, 바람직하게는 화학식 II에 따른 화합물은 프로필-프로판-티오설피네이트(PTS)이다.

청구항 4

생물막 관련 질환의 치료에 사용하기 위한, 하기 화학식 II에 따른 화합물 또는 하기 화학식 II에 따른 화합물을 포함하고 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없는 조성물:

[화학식 II]



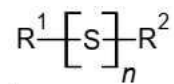
상기 화학식 II에서, R³ 및 R⁴는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되되, 단, 화학식 II는

가 아니고, 바람직하게는 상기 화합물은 프로필-프로판-티오설피네이트(PTS)이다.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 화학식 III의 화합물을 추가로 포함하는, 화합물 또는 조성물:

[화학식 III]



상기 화학식 III에서, n은 1, 2 또는 3이고, R¹ 및 R²는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되되,

단, 화학식 III은 가 아니다.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사용이 바람직하게는 항진균제 또는 항생제로부터 선택된, 항균제의 투여를 추가로 포함하는 것인, 화합물 또는 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사용이 항염증제의 투여를 추가로 포함하는 것인, 화합물 또는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료가 생물막 형성 또는 성장의 감소 및/또는 생물막의 분해 또는 감소를 위한 것인, 화합물 또는 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물막-관련 질환이 만성 및/또는 지속성 감염인 것인, 화합물 또는 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물막-관련 질환이 디지털 피부염(digital dermatitis) 또는

만성 상처 감염인 것인, 화합물 또는 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물막-관련 질환이 유선의 감염이고, 바람직하게는 생물막-관련 질환이 유선염인 것인, 화합물 또는 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료가 포유동물을 위한 것인, 화합물 또는 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료가 반추동물, 바람직하게는 젖소를 위한 것인, 화합물 또는 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물에 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없는, 화합물 또는 조성물.

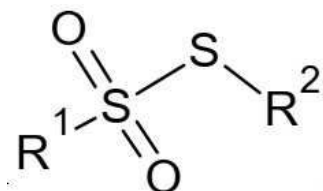
청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물막이 박테리아, 효모, 진균, 미세조류, 또는 이들의 조합을 포함하는, 화합물 또는 조성물.

청구항 16

하기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하는 조성물을 생물막 관련 질환의 치료를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 생물막 관련 질환을 치료하는 방법:

[화학식 I]



상기 화학식 I에서, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되고,

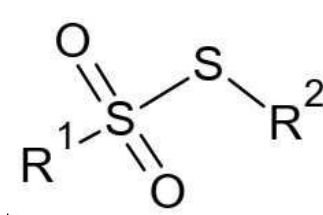
바람직하게는 상기 화합물은 프로필-프로판 티오설피네이트(PTSO)이고,

여기서 상기 조성물에는 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없다.

청구항 17

하기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하는 조성물로 적어도 부분적으로 코팅된 표면을 갖는 물품:

[화학식 I]



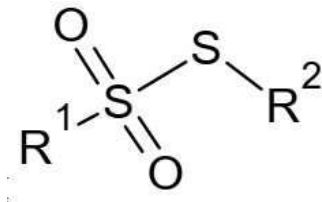
상기 화학식 I에서, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 상기 조성물에는 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없고, 바람직하게는 상기 물질이 세정 제품, 의료 기기 또는 수술 기기이다.

청구항 18

표면 상의 생물막 형성 또는 성장을 방지 또는 감소시키거나 표면 상의 생물막을 분해 또는 감소시키기 위한 시험관 내 방법으로서,

상기 방법은 표면 상의 생물막 형성 또는 성장을 방지 또는 감소시키기 위해 또는 표면 상의 생물막을 분해 또는 감소시키기 위해, 표면에 조성물을 도포하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 조성물은 하기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하는, 방법:

[화학식 I]

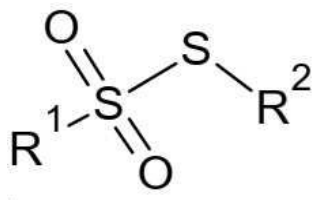


상기 화학식 I에서, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 상기 조성물에는 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없다.

청구항 19

상기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하는 조성물:

[화학식 I]



상기 화학식 I에서, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 상기 조성물에는 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없고, 상기 조성물은 약제학적 조성물 또는 기능성 식품이다.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 PTSO인, 물질, 방법 또는 조성물.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 바람직하게는 항진균제 또는 항생제로부터 선택된 항균제를 추가로 포함하는, 물질, 방법 또는 조성물.

청구항 22

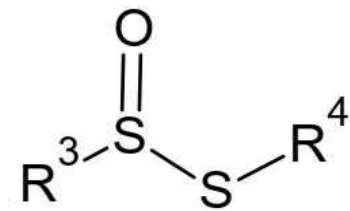
제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 항염증제를 추가로 포함하는, 물질, 방법 또는 조성물.

성물.

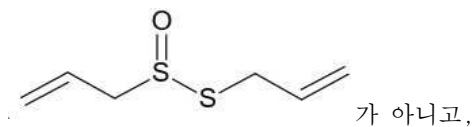
청구항 23

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 하기 화학식 II에 따른 화합물을 추가로 포함하고/하거나, 상기 조성물이 하기 화학식 III의 화합물을 추가로 포함하는, 물품, 방법 또는 조성물:

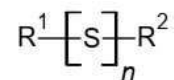
[화학식 II]



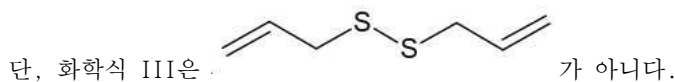
상기 화학식 II에서, R^3 및 R^4 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 단, 화학식 II는



[화학식 III]



상기 화학식 III에서, n 은 1, 2 또는 3이고, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며,



발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 개시내용은 티오황 함유 조성물, 특히 프로필-프로판 티오설포네이트(PTS0) 및 프로필-프로판-티오설피네이트(PTS)에 관한 것이다. 이러한 조성물은 감염을 치료하고 생체내 및 시험관내 모두에서 생물막을 감소 또는 분해하는데 유용하다. 특히, 이러한 조성물은 유선염, 디지털 피부염 및 만성 상처 감염을 포함하나 이에 제한되지 않는 생물막 관련 질환의 치료에 유용하다.

배경 기술

[0002]

유방의 건강 상태는 건강 및 웰니스(wellness) 관점뿐만 아니라 경제적 관점 모두에서 낙농 동물에게 필수적인 역할을 한다. 유선염으로 알려진 젖소와 같은 낙농 동물의 유선 감염은 전 세계 낙농장에 상당한 경제적 영향을 미친다. 연간 전체 글로벌 손실은 40 내지 50억 유로로 추산된다. 낙농 유선염에서 유방은 침입하는 미생물에 대한 효과적인 방어 반응을 할 수 없다. 유선염을 일으키는 미생물을 죽이는 낙농 동물의 능력을 손상시킬 수 있는 유방 수준의 균형을 방해하는 몇 가지 요인이 알려져 있다. 결과적으로, 숙주 방어 기전은 유방의 박테리아성 군집화 및 임상 또는 무증상 유선염의 발병으로 이어지는 침입하는 병원체를 제거하기 위해 효율적인 방어 반응을 촉발하지 못할 수 있다.

[0003]

박테리아성 군집화, 특히 젖소의 유방에 박테리아성 저장소가 형성되는 것은 일반적으로 퇴치하기 어렵기 때문에 항생제를 사용하거나 사용하지 않는 특정 치료 전략에도 불구하고 지속될 수 있는 만성 감염을 유발할 수 있

다. 젖소의 유방의 박테리아성 감염의 지속성과 관련된 중요한 요소는 상피 접착, 생물막 생성 및 식세포 작용에 대한 박테리아의 감수성이다.

[0004] 몇 가지 예를 들면, 젖소의 유선염을 통제하거나 예방하기 위해 항생제 치료 및 예방접종과 같은 몇 가지 전략이 사용되었으며 질병의 임상적 및 경제적 결과를 감소시켰다. 그러나 대부분의 치료법과 전략은 질병 개선에 거의 또는 전혀 효과가 없다. 몇 가지 이유가 효능 부족을 설명할 수 있다. 첫째, 단일 성분 백신에 대한 잠재적 항원으로 다수의 독성 인자가 제안되었지만, 실험적 시험에서 단일 인자에 대한 면역 유도가 젖소의 유선염을 유발하는 박테리아에 대한 강력한 보호를 제공하기에 충분하지 않다는 것이 입증되었다. 둘째, 박테리아성 항원은 면역원성이 낮고 적절한 보조제가 필요하다. 셋째, 유선염 통제의 주요 과제는 예를 들어 박테리아에 의한 생물막 형성의 결과로 유방의 박테리아성 폴에 도달할 수 있는 효과적인 항생제이다.

[0005] 박테리아와 같은 미생물은 반드시 생물막을 생성할 필요는 없지만, 예를 들어 상피 세포에 접착할 수 있다면 숙주에서 생존할 가능성이 훨씬 더 높다. 접착은 일련의 부착 및 분리를 포함하는 활성 과정이며, 결과적으로 생물막이 형성되고, 이는 미생물의 상당한 유전적 및 후속 생리학적 변화를 수반하며, 그 결과 그 중에서도 거의 모든 종류의 항생제에 대한 감수성이 상실된다. 따라서, 항생제에 내성을 갖는 박테리아성 병원체의 출현 및 유병률 증가로 인해 박테리아성 유방 감염의 관리가 점점 더 어려워지고 있다. 어떤 경우에는 저용량의 항생제가 생물막 형성을 향상시킬 수 있으며 이는 항생제의 치명적인 영향을 피하는 박테리아의 자연 방어 기전을 시사한다. 이러한 복잡하고 문제가 많은 상황으로 인해 유선염은 최근 몇 년 동안 전반적인 유방 건강 개선에 진전이 있었음에도 불구하고 젖소에서 가장 중요한 질병 중 하나로 남아 있다.

[0006] 또한 젖소에게 항생제를 자주 또는 지속적으로 투여하면 항생제와 분해산물도 분뇨에서 발견된다. 항생제와 분해산물을 포함하는 분뇨는 토양에 퍼진다. 항생제의 존재는 토양의 박테리아성 다양성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이는 환경에 바람직하지 않은 결과이다. 젖소의 감염을 치료하기 위한 대체 조성물은 환경을 통한 항생제의 확산 및 토양의 미생물군집 회복을 방지할 것이다.

[0007] 박테리아성 생물막에 대한 설명은 훨씬 더 일찍 과학 문헌에서 찾을 수 있지만, 생물막의 의미는 1982년 Costerton이 황색 포도상구균이 심장 박동기 리드에 생물막을 형성한 것을 관찰하면서 알려졌다. 후속 연구 및 임상 관찰 결과 박테리아성 생물막이 임플란트 및 카테터, 보철 장치 및 기타 이식된 생체 재료에서 발견될 수 있음이 밝혀졌다. 구강 내 치주 점막(치태), 비강(만성 부비동염), 내이(중이염), 혈관 및 심장 판막(심내막염), 폐포 표면(다발성 폐 질환) 또는 담도 및 방광과 같은 인간 및 동물 조직의 생물학적 표면에도 미생물 생물막이 형성될 수 있다는 관찰이 더욱 관련있다.

[0008] 생물막 형성의 첫 번째 단계는 표면에 세포의 부착을 포함한다. 두 번째 단계에서는, 세포의 여러 층이 있는 성숙한 구조의 형성과 함께 세포 증식이 발생한다. 박테리아를 더욱 보호하는 점액층이 또한 형성된다. 예를 들어, Melchior et al. Veterinary Journal 2006 171:398-407 참조. 임계 질량에 도달하면, 생물막의 가장 바깥쪽 세포층이 '플랑크톤 유기체'를 방출할 수 있다. 이러한 유기체는 다른 표면에 추가로 대량 서식할 수 있다. 생물막은 생체 조직, 내재된 의료 기기, 산업 또는 음용수 시스템 배관 또는 자연 수생 시스템을 비롯한 다양한 표면에 형성될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 모든 감염이 생물막의 발달로 이어지는 것은 아니다.

[0009] 지난 20년 동안의 연구에 따르면 집단 생물막 형성은 정족수 감지(quorum sensing; QS)라고 하는 박테리아성 통신 시스템에 의해 촉진된다. QS는 박테리아에 의해 그것들의 환경으로 영구적으로 배설되는 작은 화학 분자(소위 자가 유도 물질, AI)에 의해 발생한다. 이러한 신호 분자(예를 들어, 올리고펩티드(AIP) 또는 N-아세틸 호모 세린 락톤(AHL))는 이웃에 있는 다른 박테리아에 의해 특정 수용체를 통해 인식되고 모니터링된다. AI의 특정 밀도(정족수)에 도달하면, 박테리아성 세포는 집단적으로 유전자 발현을 변경하고 독성 인자를 생성하여 신체 세포를 공격하거나 대사 경로를 활성화하여 조직 표면에서 생물막을 형성한다. 생물막 형성은 초기에 주로 다당류인 큰 중합체로 구성된 세포외 기질(matrix)의 형성을 포함하며, 성숙 시 단백질과 지질에 의해 안정화되어 3차원 구조를 생성한다.

[0010] 생물막 감염이 일단 확립되면 근절하기가 매우 어려울 수 있다. 성숙한 생물막은 간헐적으로 플랑크톤 세포를 방출한다. 이것은 간헐적으로 악화되는 만성 감염으로 이어질 수 있다. 항생제나 숙주의 면역 반응이 플랑크톤 세포로 인한 증상을 해결할 수 있지만 성숙한 생물막은 남을 수 있다.

[0011] 생물막의 보호를 받는 미생물 세포는 종종 신체의 자연 면역 반응뿐만 아니라 항생제에 더 내성이 있다. 휴면 박테리아는 대사적으로 비활성이므로 박테리아성 세포벽 구성성분의 합성(페니실린 및 세팔로스포린 및 반코마

이신과 같은 베타-락탐 항생제의 표적) 및 급속 단백질(아미노글리코사이드, 테트라사이클린, 매크로라이드 및 리네졸리드의 표적) 및 DNA 합성(플루오로퀴놀론 및 리팜피신) 또는 엽산 합성(설펜아미드, 아미노피리미딘(예를 들어, 트리메소프림))과 같은 많은 항생제의 전형적인 표적을 발현하지 않는다. 따라서 항생제 치료만으로는 일반적으로 생물막 감염을 근절하기에 충분하지 않다(참조: Wu et al. Int J Oral Sci. 2015 Mar; 7(1): 1-7). 항생제는 분산된(플랑크톤) 박테리아에 대해 효과적일 수 있지만, 생물막 내에서 미생물을 박멸하는 데 필요한 최소한의 항생제 농도에 도달하는 것은 어렵다. 다양한 시험관 내 실험에서 생물막에서 성장하는 박테리아가 동일한 균주의 플랑크톤 박테리아와 비교할 때 다양한 항균제에 대해 10 내지 1,000배 더 저항력이 있음이 입증되었다(참조: 예를 들어, Amorena et al. 1999 J. Antimicrob. Chemother. 44:43-55; Ceri et al., 1999 J. Clin. Microbiol. 37:1771-1776; and Olson et al., 2002 Can. J. Vet. Res. 66:86-92). Olsen 등은 생물막 유도 항생제 저항력 및 내성의 다양한 기전을 검토한다(Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015 34:877-886).

- [0012] 젖소 유선염의 경우 황색 포도상구균의 현장 균주에 대한 연구에서 보고되었다(Melchior, Gaastra & Fink-Gremmels, J. Vet. Med. 2006 53:326-332). MIC50, 최소 박테리아 농도(BMIC) 및 MBEC(최소 생물막 박멸 농도)는 유선염에 감염된 젖소에서 분리된 7개의 균주에 대해 결정되었다. 테스트한 항생제에는 페니실린, 아목시실린, 클록사실린, 세팔로틴, 세포페라존, 세프퀴눔, 클록사실린/페니실린 조합, 클록사실린/페니실린 조합, 린코마이신, 피롤리마이신, 티로신, 네오마이신, 젠타마이신, 트리메소프림/절과메톡사졸, 플로르페니콜 및 다노플록사신과 같은 젖소 유선염 치료에 일반적으로 사용되는 항생제를 포함한다. 테스트한 모든 항생제에 대해 MIC(플랑크톤 박테리아)와 MBEC(생물막 박멸 농도)의 차이는 256배 이상, 매우 자주 2048배 이상 차이가 났다.
- [0013] 항생제가 생물막 형성을 자극할 수 있다는 증거도 있다. 예를 들어, 일부 항생제(예를 들어, 테트라사이클린, 퀴노프리스틴-달포프리스틴 및 에리트로마이신)는 박테리아의 착생(adherence)을 촉진하는 박테리아에서 유전자(예를 들어, *ica* 유전자)의 발현을 자극할 수 있다(Melchior et al., 상기 참조). 흥미롭게도, 황색 포도상구균 유선염 분리주(isolate) 중에서 *ica* 유전자의 높은 유병률이 있는 것으로 나타났다(상기 Melchior et al.에서 검토됨). 이러한 결과는 유방 감염이 생물막 형성과 관련이 있다는 가설을 뒷받침한다.
- [0014] 생물막은 또한 휴면 박테리아를 포함할 수 있다. 생물막은 면역 세포 활동에 영향을 미치고 면역 세포에 대한 물리적 장벽으로 작용하는 조절제/억제제를 활성화하는 것을 포함하는 숙주의 면역 반응을 회피하기 위해 여러 기전을 사용하지만(Gonzalez Pathog Dis. 2018 Apr; 76(3)), 휴면 상태에서 벗어나 활성화될 수 있다. 일반적으로 면역 체계는 활성 박테리아에 대해서만 작용하므로 휴면 박테리아는 개인의 면역 체계를 벗어날 수 있다. 휴면 박테리아는 생물막에서 분리되어 빠르게 활성화되어 숙주에 해로울 수 있다.
- [0015] 진균 관련 생물막은 또한 플랑크톤 세포에 비해 항진균제에 더 저항성이 있는 것으로 알려져 있다(참조, 예를 들어, Fanning and Mitchell PLOS Pathog 2012 8:e1002585 for a review). 따라서 항균 효과가 있는 화합물이 생물막의 치료 또는 예방에 항상 적합한 것은 아니다.
- [0016] 성숙한 생물막에서 1차 대사의 하향 조절(유전자 이동)에 의해 휴면 단계가 채택된다. 휴면은 생물막 박테리아가 단백질 및 DNA 합성 및 세포벽 재건과 같은 항생제에 대한 전형적인 표적의 발현을 거의 완전히 억제하는 것을 포함한다. 결과적으로 생물막은 본질적으로 항생제에 둔감하며 종종 플랑크톤(자유 부동) 박테리아보다 항생제에 대해 1000배 이상 내성이 있다. 또한, 생물막에서 발견되는 더 높은 세포 밀도는 수평 유전자 전달의 가능성을 상당히 증가시키며, 이는 내성이 증가하거나 독성 프로파일이 변경된 균주의 출현 가능성을 증가시킨다. 임상 결과는 일반적인(현대의) 항생제에 대한 표현형 내성이다.
- [0017] 이러한 생물막의 보호 환경에서는 박테리아의 생존 시간이 증가한다. 더욱이, 자가 구축된 불활성 다당류가 풍부한 기질은 비면역원으로 생물막에 포함된 박테리아를 인식(PAMPS - 병원체 관련 분자 패턴을 통해) 및 숙주의 면역 세포에 의한 빨아들임으로부터 보호한다.
- [0018] 생물막의 형성은 의료, 산업 및 자연 환경에서 심각한 부정적인 결과를 초래할 수 있다. 특히 생물막 관련 감염(즉, 생물막 관련 질환)은 인간과 동물 모두에서 심각한 문제이다. 이러한 질환은 재발성 급성 에피소드 및 항균 요법 및/또는 숙주 방어에 대한 내성을 갖는 만성 염증 반응을 특징으로 할 수 있다. 상처 생물막은 조직 복구를 지연시켜 만성 상처를 유발한다. 생물막 감염은 현재 모든 인간 미생물 감염의 최대 80%를 차지한다고 제안되었다(Bartell JA et al., 20 Evolutionary highways to persistent bacterial infection. Nature Communications (2019) 10:629 and Sharma et al. 2019 Antimicrobial Resistance and Infection Control 8:76). Jamal 등은 국립보건연구원(National Institute of Health)이 미생물 감염의 65% 및 만성 감염의 80%가 생물막 형성과 관련이 있다고 보고했다(Journal of Chinese Medical Association 81:7-11). 생물막 및 생물막

관련 질환은 문헌에서 광범위하게 논의되었다; 참조, 예를 들어, Sharma et al. 2019 Antimicrobial Resistance and Infection Control 8:76; Roy et al. 2018 Virulence 9:522-554; 및 Jamal et al. 2018 Journal of the Chinese Medical Association 81:7-11. Vestby 등은 박테리아 생물막과 질병에서의 역할을 검토한다(항생제(바젤). 2020 Feb; 9(2): 59). 생물막 감염에 대한 포괄적인 개요는 2014년 유럽 미생물학 및 감염병 임상 학회에서 발표되었다, 참조 David Lebeaux et al. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2014; doi:10.1128/MMBR.00013-14.

[0019] 예를 들어, 병원 감염을 일으키는 유기체인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 낭포성 섬유증 폐 조직, 콘택트 렌즈 및 카테터 라인과 같은 다양한 표면에 생물막을 형성한다. 생물막으로 자라는 녹농균은 만성 상처에서도 발견되었으며 상처 치유 장애로 이어질 수 있다. 생물막, 특히 녹농균 생물막은 기관지확장증, 만성 폐쇄성 폐 질환 및 만성 비부비동염과 같은 호흡기 질환에서도 만성 감염을 유발한다. 의료 기기에 형성된 생물막은 박테리아의 저장소 역할을 하여 체내로 흘러들어가 만성 전신 감염을 유발할 수 있다. 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*, 효모)는 병원에서 발견되는 가장 흔한 곰팡이 생물막이지만 치료하기가 극히 어렵고 일반적인 항진균제 치료에 잘 반응하지 않는다.

[0020] 박테리아 생물막 형성에 대한 선구적인 연구는 젖소의 재발성 유선염과 복잡한 상처 감염에 관여하기 때문에 황색 포도상구균(그람 양성) 및 녹농균(그람 음성)에 초점을 맞췄다. 또한, 연쇄상구균 종(*Streptococcus* spp.), 조류 병원성 대장균(*E. coli*)(APEC) 및 캄필로박터 제주니(*C. jejuni*) 생물막의 생물막 형성은 이러한 박테리아 종들이 공중 보건 관련성이 있기 때문에 주목을 받았다. 그 후, 흉막폐렴(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) (돼지에서 치명적일 수 있는 심각한 폐 감염), 대장균(국소 및 전신 감염 및 전신 패혈증, 종종 가금류에서 치명적임), 개와 고양이의 피부 및 장 질환 및 말의 상처 감염과 자궁내막염을 포함하는 기타 중요한 동물 병원체는 생물막 감염으로 인식되었다. 생물막 형성은 거의 모든 미생물의 일반적인 특성이므로 이 목록은 비배타적이다.

[0021] 따라서, 생물막 관련 질환의 대체 치료에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

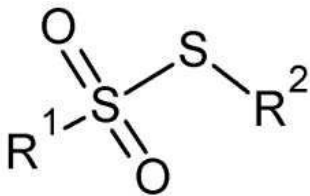
해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0022] 본 개시내용은 다음의 바람직한 실시양태를 제공한다.

[0023] 1. 생물막 관련 질환의 치료에 사용하기 위한, 하기 화학식 I에 따른 화합물 또는 하기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하고 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없는 조성물:

[0024] [화학식 I]



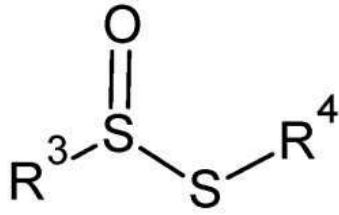
[0025]

[0026] 상기 화학식 I에서, R¹ 및 R²는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0027] 2. 실시양태 1에 있어서, 상기 화합물이 프로필-프로판 티오설피네이트(PTS0)인, 화합물 또는 조성물.

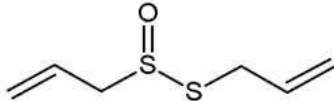
[0028] 3. 실시양태 1에 있어서, 하기 화학식 II에 따른 화합물을 추가로 포함하는, 화합물 또는 조성물:

[0029] [화학식 II]



[0030]

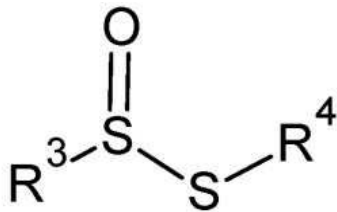
[0031] 상기 화학식 II에서, R^3 및 R^4 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되되, 단, 화학식 II는



가 아니며, 바람직하게는 화학식 II에 따른 화합물은 프로필-프로판-티오설피네이트(PTS)이다.

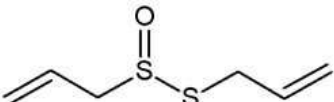
[0032] 4. 생물막 관련 질환의 치료에 사용하기 위한, 하기 화학식 II에 따른 화합물 또는 하기 화학식 II에 따른 화합물을 포함하고 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없는 조성물:

[0033] [화학식 II]



[0034]

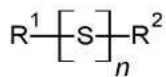
[0035] 상기 화학식 II에서, R^3 및 R^4 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되되, 단, 화학식 II는



가 아니고, 바람직하게는 상기 화합물은 프로필-프로판-티오설피네이트(PTS)이다.

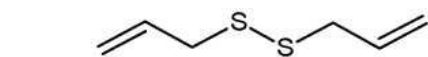
[0036] 5. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 하기 화학식 III의 화합물을 추가로 포함하는, 화합물 또는 조성물:

[0037] [화학식 III]



[0038]

[0039] 상기 화학식 III에서, n 은 1, 2 또는 3이고, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되되, 단, 화학식



III은 가 아니다.

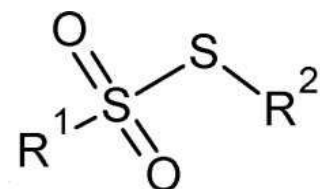
[0040] 6. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 사용이 바람직하게는 항진균제 또는 항생제로부터 선택되는

항균제의 투여를 추가로 포함하는, 화합물 또는 조성물.

- [0041] 7. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 사용이 항염증제의 투여를 추가로 포함하는 것인, 화합물 또는 조성물.
- [0042] 8. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료가 생물막 형성 또는 성장의 감소 및/또는 생물막의 분해 또는 감소를 위한 것인, 화합물 또는 조성물.
- [0043] 9. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 생물막-관련 질환이 만성 및/또는 지속성 감염인 것인, 화합물 또는 조성물.
- [0044] 10. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 생물막-관련 질환이 디지털 피부염(digital dermatitis) 또는 만성 상처 감염인 것인, 화합물 또는 조성물.
- [0045] 11. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 생물막-관련 질환이 유선의 감염이고, 바람직하게는 생물막-관련 질환이 유선염인 것인, 화합물 또는 조성물.
- [0046] 12. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료가 포유동물을 위한 것인, 화합물 또는 조성물.
- [0047] 13. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 치료가 반추동물, 바람직하게는 젖소를 위한 것인, 화합물 또는 조성물.
- [0048] 14. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물에 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없는, 화합물 또는 조성물.
- [0049] 15. 선행하는 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 생물막이 박테리아, 효모, 진균, 미세조류, 또는 이들의 조합을 포함하는, 화합물 또는 조성물.

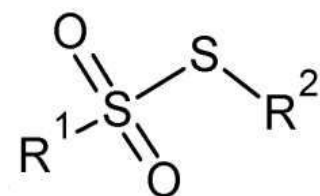
- [0050]
- [0051] 16. 하기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하는 조성물을 생물막 관련 질환의 치료를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체에서 생물막 관련 질환을 치료하는 방법:

[0052] [화학식 I]



- [0053]
- [0054] 상기 화학식 I에서, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되고,
- [0055] 바람직하게는 상기 화합물은 프로필-프로판 티오설피네이트(PTSO)이고,
- [0056] 여기서 상기 조성물에는 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없다.
- [0057] 17. 하기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하는 조성물로 적어도 부분적으로 코팅된 표면을 갖는 물품:

[0058] [화학식 I]

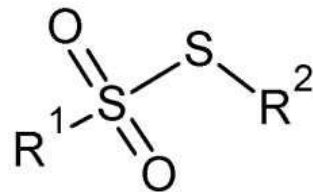


- [0059]
- [0060] 상기 화학식 I에서, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형

알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 상기 조성물에는 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없고, 바람직하게는 상기 물품이 세정 제품, 의료 기기 또는 수술 기기이다.

[0061] 18. 표면 상의 생물막 형성 또는 성장을 방지 또는 감소시키거나 표면 상의 생물막을 분해 또는 감소시키기 위한 시험관 내 방법으로서, 상기 방법은 표면 상의 생물막 형성 또는 성장을 방지 또는 감소시키기 위해 또는 표면 상의 생물막을 분해 또는 감소시키기 위해, 표면에 조성물을 도포하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 조성물은 하기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하는, 방법:

[0062] [화학식 I]

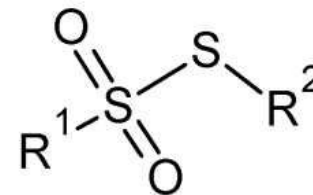


[0063]

[0064] 상기 화학식 I에서, R¹ 및 R²는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 상기 조성물에는 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없다.

[0065] 19. 하기 화학식 I에 따른 화합물을 포함하는 조성물:

[0066] [화학식 I]



[0067]

[0068] 상기 화학식 I에서, R¹ 및 R²는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 여기서 상기 조성물에는 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없고, 상기 조성물은 약제학적 조성물 또는 기능성 식품이다.

[0069]

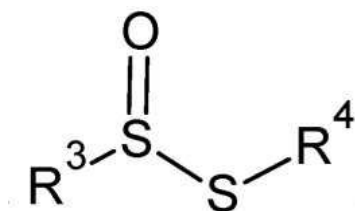
[0070] 20. 실시양태 16 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 화합물이 PTSO인 물품, 방법 또는 조성물.

[0071] 21. 실시양태 16 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 바람직하게는 향진균제 또는 항생제로부터 선택된 항균제를 추가로 포함하는 물품, 방법 또는 조성물.

[0072] 22. 실시양태 16 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 항염증제를 추가로 포함하는 물품, 방법 또는 조성물.

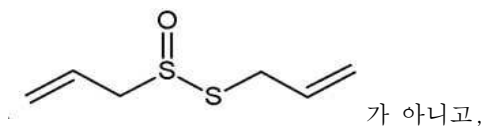
[0073] 23. 실시양태 16 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물이 하기 화학식 II에 따른 화합물을 추가로 포함하고/하거나, 상기 조성물이 하기 화학식 III의 화합물을 추가로 포함하는, 물품, 방법 또는 조성물:

[0074] [화학식 II]

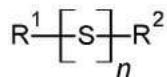


[0075]

[0076] 상기 화학식 II에서, R^3 및 R^4 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 단, 화학식 II는

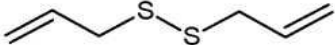


[0077] [화학식 III]



[0078]

[0079] 상기 화학식 III에서, n 은 1, 2 또는 3이고, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며,

[0080] 단, 화학식 III은  가 아니다.

도면의 간단한 설명

[0081] 도 1. 미량정량판(microtiter plate)의 웰 측정에서 생물막 박멸에 대한 QS1 및 QS2의 영향을 측정하는 데 사용되는 절차를 나타낸다. 도 1a는 미량정량판에서 생물막을 측정하는 데 사용되는 방법을 도시하고, 도 1b는 페그(peg) 상에서 생물막 형성을 측정하는 방법을 도시한다.

도 2a. 풍부한 배지 조건에서 녹농균 및 황색 포도상구균의 생물막 형성에 대한 QS1 및 QS2의 효과. 도 2b. 최소 배지 조건에서 녹농균 및 황색 포도상구균의 낮은 생물막 형성에 대한 QS1 및 QS2의 효과. 왼쪽 도면: 웰에서 낮은 생물막 형성에 미치는 영향; 오른쪽 도면: 페그 상에서의 낮은 생물막 형성에 미치는 영향. 중요성 수준은 별표로 표시된다(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$).

도 3a. 착유 후 유방에서 직접 방출되는 생물막; 도 3b PTSO/PTS 정제로 치료한 지 1 내지 3일 후 유선염이 있는 젖소의 착유 후 우유를 체질한 후 수득한 생물막.

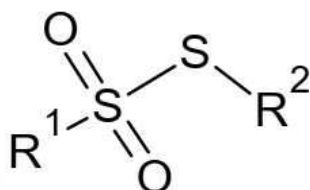
도 4. 감염(직선 화살표) 및 치유(점선 화살표)의 진행.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 본 개시내용은 생물막의 형성을 감소, 분해 및/또는 방지하는데 유용한 화합물을 제공한다. 본 명세서에 기재된 화합물은 놀랍게도 매우 이질적인 미생물 집단을 포함하는 생물막(예를 들어, 실시예 2 참조) 뿐만 아니라 공지된 인간 병원체를 포함하는 생물막(예를 들어, 실시예 3 및 4 참조)을 분해하는 것으로 밝혀졌다. 본 개시내용은 화합물이 시험관내 뿐만 아니라 생체내에서도 생물막에 대해 활성이고 전신적으로(예를 들어, 경구로) 및 국소적으로(예를 들어, 실시예 5 내지 8 참조) 투여될 수 있음을 추가로 제공한다.

[0083] 본 개시내용은 화학식 I에 따른 티오설포네이트를 제공한다:

[0084] [화학식 I]



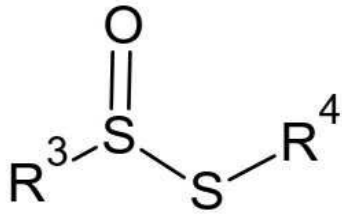
[0085]

[0086] 상기 화학식 I에서, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알

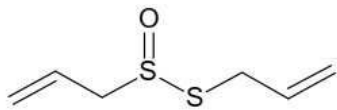
킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택된다.

[0087] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 화학식 II에 따른 티오설피네이트를 제공한다:

[0088] [화학식 II]



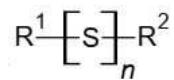
[0090] 상기 화학식 II에서, R^3 및 R^4 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되며, 단, 화학식 II는



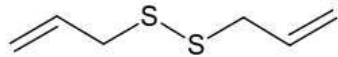
가 아니다.

[0091] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 화학식 III의 화합물을 제공한다:

[0092] [화학식 III]

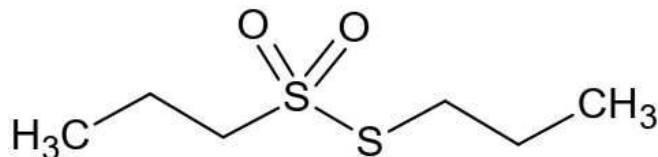


[0094] 상기 화학식 III에서, n 은 1, 2 또는 3이고, R^1 및 R^2 는 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알킬, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알케닐, 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 알키닐, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 사이클로알킬, 선택적으로 치환된 헤테로사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되고, 단, 화학식

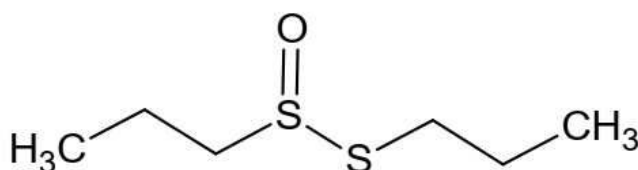


III은 가 아니다.

[0095] 화학식 I, II 또는 III의 화합물들은 본원에서 '화합물', '치료 화합물' 또는 '치료 티오황 화합물'로 지칭된다. 화합물들은 화학식 I, II 또는 III의 염을 포함한다. 바람직하게는, 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II를 갖는다. 화학식 I 또는 화학식 II를 갖는 화합물은 화학식 III을 갖는 화합물과 함께 사용될 수 있다. 보다 바람직하게는, 화합물은 화학식 I을 갖는다. 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 프로필-프로판 티오설피네이트(PTS)이다. PTS의 구조는 다음과 같다:



[0097] 바람직하게는, 화학식 II의 화합물은 프로필-프로판-티오설피네이트(PTS)이다. PTS의 구조는 다음과 같다:



- [0100] 프로필 프로판 티오설폰네이트(PTSO) 및 프로필 프로판 티오설피네이트(PTS)는 파과(Allium family)에 속하는 식물에서 발견되는 천연 화합물이다. 예를 들어, Allium sativum(마늘), Allium cepa (양파), Allium ampeloprasum (부추), Allium schoenoprasum (골파)(chive) 및 Allium chinense (중국 양파). 화합물은 천연 공급원에서 추출하거나 합성으로 생산할 수 있다. 화합물 PTS 및 PTSO도 모두 상업적으로 이용 가능하다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 화합물은 식물과 같은 천연 공급원으로부터 수득된다. 화합물은 다양한 방법으로 식물 재료에서 추출될 수 있다. 적절한 방법은 화합물의 화학적 특성에 따라 다르다. 예를 들어, 비극성 용매로 추출을 시작하고 극성이 증가하는 용매로 추출할 수 있다. 대안적으로, 식물의 화합물을 알코올로 추출할 수 있다. 이러한 추출은 예를 들어 약 80% PTSO 및 약 20% PTS를 함유할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 중량 기준으로 적어도 3:1, 바람직하게는 약 4:1의 비율로 PTSO 및 PTS를 포함한다. 이론에 얽매이지 않는 것은 아니지만, 본 개시내용은 항생물막 활성이 주로 PTSO로 인한 것임을 제공한다.
- [0102] 마늘 추출물은 이전에 식이 보조제에 사용되는 것으로 기재되었다. 마늘은 전 세계적으로 재배되는 허브이다. 양파, 부추, 및 골파와 관련이 있다. 마늘 추출물과 특히 알리신 화합물은 다양한 종류의 질병을 치료할 수 있는 가능성에 대해 연구되었다. 심장 및 혈액계와 관련된 병태에 가장 일반적으로 사용된다. 이러한 병태에는 고혈압, 혈액 내 높은 수치의 콜레스테롤 또는 기타 지방, 동맥 경화가 포함된다.
- [0103] 예를 들어, 갈리콘(Garlicon)은 마늘 추출물을 포함하는 정제이다. 이것은 특수 제형, 즉 장용(enteric) 코팅 정제로, 제어된 온도 하에 건조된 마늘 가루로 기재된다. 이 코팅은 위를 통과하는 동안 정제를 보호하고, 소장에서 용해되어 내용물을 방출한다. 갈리콘은 높은 혈청 콜레스테롤 수치와 심장 질병의 위험을 보호하는 것으로 제시된다. 추가로, EP 2110128은 항생제에 대한 대안으로서 동물 사료의 천연 첨가제로서 Alliaceae 유래 화합물의 사용을 개시하고 있다.
- [0104] 다수의 상이한 화합물을 포함하는 마늘 추출물과 달리, PTSO는 미량 성분이지만, 본원에서 제공되는 조성물은 바람직하게는 천연 마늘 추출물보다 더 높은 농도로 PTSO를 포함한다. 추가로, 천연 마늘 추출물은 각각 상이한 (때로는 원하지 않는) 효과를 갖는 다수의 상이한 물질을 함유하지만, 본 명세서에 제공된 조성물은 마늘 추출물에서 다른 성분의 원치 않는 부작용 없이 PTSO를 제공하는 데 유용하다. 또한, PTSO가 강화된 조성물은 더 높은 투여량을 허용한다.
- [0105] 예를 들어, 마늘 추출물은 강한 냄새가 있다. 동물에게 이러한 마늘 추출물이 제공되면 이러한 냄새는 우유 및 계란과 같은 동물성 제품에서도 발견된다. 소비자는 이러한 냄새가 나는 제품을 부패한 것으로 인식하고 이러한 냄새는 이러한 제품의 맛에도 영향을 미칠 수 있다. 실제로 마늘 추출물을 사용하는 동안 수집된 동물성 제품은 일반적으로 폐기해야 한다. 사람이 마늘 추출물을 섭취하면 체취와 구취를 유발할 수 있다.
- [0106] 대조적으로, 본 명세서에 개시된 치료 화합물은 바람직하게는 진술한 마늘 추출물의 부정적인 효과를 갖지 않는다. 예를 들어, 농장 동물의 경우 이는 생성된 동물 제품(예를 들어, 우유 및 계란)이 소비자에게 적합하다는 점에서 상업적 이점이 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 조성물을 필요로 하는 개체에게 본 명세서에 개시된 바와 같은 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 치료는 체취, 구취, 체액(예를 들어, 우유)에서 비정상적인 냄새의 존재를 유발하지 않고, 또는 조류의 경우, 계란에서 비정상적인 냄새가 나지 않거나 최소한 마늘 추출물 보다 덜한다.
- [0107] 본 개시내용은 본원에 개시된 바와 같은 화합물을 포함하는 조성물, 특히 화학식 I을 갖는 화합물 및/또는 화학식 II를 갖는 화합물을 포함하는 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 이러한 조성물에는 디알릴 티오설피네이트가 실질적으로 없다. 디알릴 티오설피네이트는 알리신이라는 이름으로 더 잘 알려져 있다. 알리신은 유기황 화합물이다. 생마늘을 썰거나 으깨면 알리나아제라는 효소가 알리인을 알리신으로 전환시켜 신선한 마늘의 향을 내는 역할을 한다. 생성된 알리신은 불안정하고 디알릴 이황화물과 같은 일련의 다른 황 함유 화합물로 빠르게 변한다. 마늘 한 쪽에는 약 5mg 내지 18mg의 알리신이 들어 있다.
- [0108] 본원에 사용된 "실질적으로 없는"은 5 중량% 미만의 디알릴 티오설피네이트를 포함하는 조성물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 1 중량% 미만의 디알릴 티오설피네이트, 바람직하게는 0.5 중량% 미만의 디알릴 티오설피네이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 치료상의 티오황 화합물(예를 들어, PTSO 및 PTS) 대 디알릴 티오설피네이트의 중량비를 10:1 이상, 보다 바람직하게는 100:1 이상으로 포함한다.
- [0109] 본 개시내용의 조성물은 또한 바람직하게는 디알릴-디설피드가 실질적으로 없다. 일부 실시양태에서, 조성물은 1 중량% 미만의 디알릴 티오설피네이트, 바람직하게는 0.5 중량% 미만의 디알릴 티오설피네이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 화학식 I 및/또는 화학식 II를 갖는 화합물(예를 들어, PTSO 및 PTS) 대 디알릴-디

설피드의 중량비를 10:1 이상, 보다 바람직하게는 100:1 이상으로 포함한다.

- [0110] 일부 실시양태에서, 활성 성분의 50 중량% 이상, 바람직하게는 90 중량% 이상이 본원에 개시된 화학식 I, II 또는 III에 따른 화합물인 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 유일한 활성 성분이 화학식 I, II 또는 III에 따른 화합물이고, 선택적으로 추가의 항균제 및/또는 항염증제를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 활성 성분의 50 중량% 이상, 바람직하게는 90 중량% 이상이 본원에 개시된 화학식 I 또는 II에 따른 화합물인 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 유일한 활성 성분이 화학식 I 또는 II에 따른 화합물이고, 선택적으로 추가의 항균제 및/또는 항염증제를 포함하는 조성물이 제공된다.
- [0111] 본원에 개시된 화합물 및 이를 포함하는 조성물은 감염의 치료 또는 예방에 유용하다. 예를 들어, 특정 용도는 호흡기 감염, 장 감염, 사람의 유방 감염, 동물의 유방 감염, 피부 감염, 방광 감염, 귀 감염, 전신 감염, 관절 감염, 뇌 감염의 치료 또는 예방을 위한 것이다.
- [0112] 본원에 사용된 "감염"은 예를 들어 질병을 유발할 수 있는 병원성 감염을 지칭한다. 특히 이러한 감염은 박테리아 또는 곰팡이 감염이다. 바람직한 실시양태에서, 감염은 박테리아 감염이다. 박테리아 및 진균은 거의 모든 곳에서 발견되며 매우 다양한 형태로 존재한다. 대부분은 해롭지 않으며 실제로 지구상의 생명체에 필수적이며 식물, 동물 및 인간의 건강에 필수적이다. 예를 들어, 박테리아와 진균이 숙주와 공생하는 인간과 동물의 장내 미생물군집은 소위 장내 박테리아총(gut flora)이다. 또한 박테리아는 면역 체계의 일부를 형성하는 피부에 자연적으로 존재한다. 또 다른 예는 대부분 박테리아와 진균으로 구성된 토양 생물학이다. 일부 박테리아 및 진균은 예를 들어 동물이나 인간에서 병원성 감염을 일으킬 수 있다. 이러한 병리학적 감염은 감염된 개인의 질병 및 병으로 이어질 수 있다.
- [0113] 본원에 사용된 "감염의 치료"는 감염의 중증도 및/또는 기간의 감소 및/또는 감염으로 인한 증상의 중증도 및/또는 기간의 감소를 지칭한다. 바람직하게는, 상기 치료는 개체의 건강을 회복시킨다. 바람직하게는, 개체는 질병 증상이 더 적거나 더 짧은 시간을 갖는다. 본원에 사용된 "감염 예방"은 감염 또는 감염과 관련된 하나 이상의 증상의 발병을 예방하거나 대안적으로 지연시키는 것을 지칭한다.
- [0114] 박테리아, 미세조류, 진균 등과 같은 일부 미생물은 생물막을 형성할 수 있다. 본원에 개시된 화합물은 또한 생물막 형성 또는 성장의 예방 또는 감소 및/또는 생물막의 분해 또는 감소에 유용하다. 바람직하게는, 화합물 및 이를 포함하는 조성물은 생물막 관련 질환의 치료 또는 예방에 유용하다.
- [0115] 생물막이라는 용어는 처음에 기술 및 환경 미생물학에서 자연 또는 인공 표면에 부착된 고착 박테리아 및 기타 미생물 군집을 설명하는 데 사용되었다. 미생물 생물막의 형성은 박테리아가 부착되어 유기 중합체로 구성된 끈적끈적한 막을 생성하는 표면에 박테리아의 군집화에 의해 시작된다. 이 1차 박테리아막은 조류 및 원생동물, 진균 및 원생동물과 같은 다른 미생물을 끌어들이는 가지적인 다층 생물막을 형성한다. 이러한 3차원 생물막은 본질적으로 어디에나 있으며 물과 접촉하는 모든 표면에서 발견된다. 공중 보건 우려의 대상은 도시 상수도 및 가정용 수도관 및 장치의 미생물 생물막이다. 이러한 다층 환경 생물막에 대한 화학식 I, II 및 III에 따른 화합물의 효능은 실시예 2 및 3에서 입증된다.
- [0116] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "생물막"은 계면(보통 고체/액체)에 농축되고 전형적으로 세포외 중합체성 점액 기질에 의해 둘러싸인 미생물 집단을 지칭한다. 생물막은 생물 또는 무생물 표면에 형성될 수 있으며 자연, 산업 및 병원 환경에서 발견된다. 생물막은 박테리아, 고박테리아, 원생동물, 진균 및 조류와 같은 다양한 유형의 미생물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 생물막은 박테리아, 미세조류(예를 들어, 프로토타카 종) 또는 진균을 포함한다.
- [0117] 본원에 사용된 "생물막 관련 질환의 치료"는 본원에서 "생물막 관련 질환"으로도 지칭되며, 질환의 중증도 및/또는 기간의 감소 및/또는 질환의 증상, 특히 감염 증상으로 인한 중증도 및/또는 기간의 감소를 지칭한다. 바람직하게는, 상기 치료는 개체의 건강을 회복시킨다. 바람직하게는, 개체는 질병 증상이 더 적거나 더 짧은 시간을 갖는다.
- [0118] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "생물막 형성 또는 성장의 예방 또는 감소"는 생물막 형성 또는 성장의 예방, 지연 또는 감소를 지칭한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이러한 생물막 형성 또는 성장의 감소는 미처리 생물막의 성장과 비교하여 생물막의 성장을 늦출 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 생물막 형성 또는 성장을 감소시키는 데 유용하다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "생물막의 분해 또는 감소"는 생물막이 부분적으로 또는 완전히 제거되는 것을 의미한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 이러한 치료 후에도 플랑크톤 박테리아가 여전히 존재할 수 있다.

- [0119] 본원에 개시된 화합물은 생물막, 예를 들어 세포외 점액 기질의 구조를 파괴할 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물은 세포 접착을 억제하는 데 유용하다. 특히, 화합물은 미생물 생물막, 특히 자유로운 살아있는 미생물에서 접하는 모든 세포 유형의 정적 또는 살아있는 표면에 대한 접착(박테리아를 죽이지 않고)을 방지할 수 있다.
- [0120] 이론에 구속되고자 하는 것은 아니지만, 본 개시내용은 본 명세서에 개시된 치료 화합물이 정족수 감지에 영향을 미침으로써 그 효과의 일부를 발휘할 수 있음을 제안한다. 정족수 감지(QS) 신호전달은 예를 들어 박테리아 독성 인자의 발현을 제어하는 데 중요한 역할을 한다. QS는 단일 세포가 박테리아 수와 신호전달 분자의 밀도를 감지할 수 있도록 하는 주변 환경에서 신호전달 분자의 축적을 포함하므로 박테리아 집단 전체가 조직화된 반응을 할 수 있다. 이러한 세포-세포 통신 시스템은 운동성, 독성, 포자 형성, 항생제 생산, DNA 교환 및 생물막과 같은 보다 복잡한 다세포 구조의 발달과 같은 박테리아의 다양한 기능을 조절한다. 따라서 QS 신호전달 시스템과의 간섭은 지속되는(만성) 박테리아 감염을 퇴치하기 위한 새로운 전략을 제공할 수 있다. 정족수 감지 억제(Quorum Quenching; QQ) 능력이 있는 자연 발생 화합물과 같은 특정 물질의 능력은 접착 방지 화합물 및 생물막 형성을 방해하는 화합물로 사용될 수 있다.
- [0121] 본원에 개시된 화합물은 생물막-관련 질환을 치료하는데 특히 유용하며, 여기서 질환은 만성 및/또는 지속적인 감염을 특징으로 한다. 지속적 감염 및 만성 감염은 종종 같은 의미로 사용되지만 상이한 기전을 기반으로 한다. 지속적인 감염은 일반적으로 면역 방어에 의해 억제되지만 이러한 면역 방어가 약화되면 활성화될 수 있다. 지속적인 감염은 종종 무증상이며 면역 방어가 병원체를 제어하지 못하는 경우에만 임상적으로 보인다. 지속적인 감염은 종종 무증상이지만, 당업자는 예를 들어 환자 샘플(예를 들어, 혈액 또는 소변)에서 미생물을 검출하는 것을 포함하여 이러한 지속적인 감염을 검출하는 수단을 잘 알고 있다. 만성 감염에서 병원체는 세포 그룹/조직의 일부(예를 들어, 관절 또는 폐 조직)에 남아 있다. 환자는 감염의 급성기보다 경미할 수 있지만 항상 질병의 증상이 있다.
- [0122] 생물막 질병의 가장 두드러진 예는 젖소 유선염이다. 젖소 유선염은 젖소의 유선 감염에 대한 임상 용어이며 여러 병원체에 의해 유발될 수 있으며, 가장 흔한 형태는 황색 포도상구균, 우베리스 연쇄상구균(*Streptococcus uberis*), 아갈락티아 연쇄상구균(*Streptococcus agalactia*), 디스갈락티아 연쇄상구균(*Streptococcus dysgalactiae*) 뿐만 아니라 세라티아 마레센스(*Serratia marcescens*) 및 기타 조건 병원성 장내박테리아 및 프로토타카 종이고, 후자는 세계의 많은 지역에서 공격적이고 치료 불가능한 유선염을 일으키는 새로운 병원체로 간주된다. 본 발명은 이러한 미생물을 포함하는 생물막을 본원에 개시된 화합물 및 조성물로 처리하는 것을 포함한다.
- [0123] 본원의 실시예는 생물막 감염에서 광범위한 활성을 입증하는 젖소의 다양한 야외 시험(field trial)에서 PTSO의 놀라운 효능을 기재한다. 생물막 감염의 또 다른 두드러진 예는 만성적인 치유되지 않는 상처 감염이다. 젖소의 알려진 생물막 관련 질병인 디지털 피부염은 이러한 지연된 상처 치유 과정의 한 예이며 PTSO로 성공적으로 치료되었다(실시예 7 참조). 일부 실시양태에서, 본 발명의 화합물에 의해 치료된 상처는 예를 들어 황색 포도상구균; 연쇄상 구균; 그람 음성 박테리아, 예를 들어 트레포네마 종(*Treponema* spp.), 대장균(*Escherichia coli*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*); 또는 효모/진균, 예를 들어 칸디다 종(알비칸스), 클라도스포리디움 허바룸(*Cladosporidium herbarum*), 트리코스포룸(*Trichosporum*), 로도스포리디움(*Rhodospiridium*) 및 말라세지아(*Malassezia*)를 포함한다.
- [0124] 현재 일반적으로 생물막 관련 미생물은 심내막염, 골수염, 부비동염, 요로 감염, 만성 전립선염, 치주염, 낭포성 섬유증 환자의 만성 폐 감염, 중이염, 각종 병원체 감염, 특히 알려진 모든 유치 장치(카테터, 임플란트)와 관련된 것을 포함하는 많은 수의 감염을 유발하는 것으로 인식되고 있다. 생물막 질병의 부담은 중요하며 의료에서 주요 관심사를 나타낸다.
- [0125] 거의 모든 박테리아 종은 현재 스트레스 조건에서 생물막을 형성할 수 있는 것으로 알려져 있지만, 현재 임상 실습에서는 관련 감염이 생물막이 아닌 경우에도 거의 완전히 치료 내성이 있기 때문에 몇 가지 박테리아 및 곰팡이 종이 주요 관심 대상이고, 같은 종 및 균주의 플랑크톤 형태는 일반적인 치료제(항생제 및 항진균제/진균제)에 대해 매우 우수한 민감성을 나타낸다.
- [0126] 생물막 관련 치료 내성으로 인해 주요 임상 문제가 되는 병원체의 예는 다음과 같다:
- [0127] 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) - 폐 아스페르길루스증(진균성 질병)
- [0128] 부르크홀데리아 세파시안(*Burkholderia cepacia*) - 폐낭포성 섬유증 중복감염

- [0129] 칸디다 종(효모) - 위장관 및 비뇨생식기의 점막 표면
- [0130] 가드네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*) (비뇨 생식기 관)
- [0131] 대장균(다발성 장기 및 폐혈증)
- [0132] 녹농균(낭포성 섬유증을 포함한 다발성 기관 및 폐 감염)
- [0133] 황색 포도상구균(다발성 조직 및 상처 감염, 병원 감염)
- [0134] 표피 포도상구균(다발성 조직 및 상처 감염)
- [0135] 스테노트로포모나스 말토피리아(*Stenotrophomonas maltophilia*)(만성 호흡기 질환).
- [0136] 이러한 생물막 관련 질환 및 생물막 관련 미생물의 치료는 본 발명에 포함된다.
- [0137] 미생물 생물막은 박테리아뿐만 아니라 기타 미생물, 특히 병원성 진균(다발성 아스페르길루스 관련 폐질환의 주요 원인인 아스페르길루스 푸미가투스) 및 위장관 및 요로-생식기 관 점막 표면에 서식하는 효모(칸디다 종)에 의해 형성된다. 가장 널리 퍼진 임플란트 관련 생물막은 황색 포도상구균(MSSA 및 MRSA), 칸디다 알비칸스, 녹농균, 폐렴 클렙시엘라 및 엔테로코커스 페칼리스에 의해 형성된다. 또한, 예를 들어 프로토테카 종과 같은 미세조류는 생물막을 형성할 수 있고 인간과 동물에서 질병의 원인이 된다(프로토테코시스).
- [0138] 일부 실시양태에서, 생물막은 트레포네마 종(*Treponema* spp), 예르시아니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코커스 아갈락티아(*Streptococcus agalactiae*), 스트렙토코커스 디스갈락티아(*Streptococcus dysgalactiae*), 스트렙토코커스 우베리스(*Streptococcus uberis*), 세라티아 마레센스(*Serratia marescens*), 트루페렐라 피오게네스(*Trueperella pyogenes*), 만헤이미아 페렴(*Mannheimia haemolytica*), 파스튜렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 버크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*), 헤모필루스 인플루엔자(*Hemophilus influenza*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 푸소박테리움 네크로포룸(*Fusobacterium necrophorum*), 코리네박테리움 슈도투베르쿨로시스(*Corynebacterium pseudotuberculosis*), 스트렙토코커스 종(*Streptococcus* spp.), 포르피로모나스 진기발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 엔테로코커스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*), 임균(*Neisseria gonorrhoeae*), 대장균(*Escherichia coli*), 장염균(*Salmonella enteritidis*), 및 녹농균 중 어느 하나로부터 선택되는 박테리아를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물막은 압시디아 종(*Absidia* spp.), 악티노마이세스 종(*Actinomyces* spp.), 아스페르길루스 종(*Aspergillus* spp.), 보트리티스 종(*Botrytis* spp.), 칸디다 종(*Candida* spp.), 센트로스포라 종(*Centrospora* spp.), 세팔로스포리움 종(*Cephalosporium* spp.), 세라토시스티스 종(*Ceratocystis* spp.), 채토코니디움 종(*Chaetoconidium* spp.), 채토뮴 종(*Chaetomium* spp.), 클라도스포리움 종(*Cladosporium* spp.), 콜레토티리쿰 종(*Colletotrichum* spp.), 콘디오보루스 종(*Conidiobolus* spp.), 풀비아 종(*Fulvia* spp.), 푸사리움 종(*Fusarium* spp.), 게오트리쿰 종(*Geotrichum* spp.), 기나르디아 종(*Guignardia* spp.), 헬민토스포리움 종(*Helminthosporium* spp.), 히스토플라스마 종(*Histoplasma* spp.), 레시토포라 종(*Lecytophora* spp.), 말라세지아 종(*Malassezia* spp.), 넥트리아 종(*Nectria* spp.), 노카르디아 종(*Nocardia* spp.), 오스포라 종(*Oospora* spp.), 오피오볼루스 종(*Ophiobolus* spp.), 파에실로마이세스 종(*Paecilomyces* spp.), 파라콕시디오이데스 브라질리엔시스(*Paracoccidioides brasiliensis*), 푸른곰팡이 종(*Penicillium* spp.), 피마토티리쿰 종(*Phymatotrichum* spp.), 피토포토라 종(*Phytophthora* spp.), 피티움 종(*Pythium* spp.), 피에드라이아 호르타이(*Piedraia hortai*), 리족토니아 종(*Rhizoctonia* spp.), 리조푸스 종(*Rhizopus* spp.), 로도스포리디움 종(*Rhodosporidium* spp.), 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* spp.), 스케로티움 종(*Sclerotium* spp.), 스크레오티니아 종(*Sclerotinia* spp.), 토룰롭시스 종(*Torulopsis* spp) 및 트리코피톤 종(*Trichophyton* spp.)으로부터 선택되는 진균을 포함한다.
- [0139] 칸디다(*Candida*), 아스페르길루스(*Aspergillus*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 트리코스포론(*Trichosporon*), 콕시디오이데스(*Coccidioides*) 및 폐포자충(*Pneumocystis*)과 같은 많은 의학적으로 중요한 진균은 생물막을 생성하는 것으로 알려져 있다. 일부 실시양태에서 생물막은 미세조류, 예를 들어 프로토테카 종(*Prototheca* spp.)을 포함한다.
- [0140] 특정 실시양태에서, 박테리아 감염 또는 생물막 관련 질환은 그람-음성 박테리아에 의해 유발된다. 특정 실시양태에서, 박테리아 감염 또는 생물막 관련 질환은 다제내성(multidrug-resistant) 박테리아에 의해 유발된다. 특정 실시양태에서, 박테리아 감염은 메티실린 내성 황색 포도상구균(MRSA) 관련 감염 또는 표피 포도상구균(예를

들어, MRSE) 관련 감염이다.

- [0141] 바람직한 실시양태에서, 생물막 유발 박테리아는 대장균이고, 바람직하게는 생물막 감염은 재발성 요로 감염, 카테터 관련 요로 감염 또는 담도 감염이다.
- [0142] 바람직한 실시양태에서, 생물막 유발 박테리아는 녹농균이고, 바람직하게는 생물막 감염은 낭포성 섬유증 폐 감염, 만성 상처 감염, 카테터 관련 요로 감염, 만성 비부비동염, 만성 중이염, 기관지 확장증, 만성 폐쇄성 폐 질환 또는 콘택트 렌즈 관련 각막염이다.
- [0143] 바람직한 실시양태에서, 생물막 유발 박테리아는 황색 포도상구균이고, 바람직하게는 생물막 감염은 만성 골수염, 만성 비부비동염, 심내막염, 만성 중이염, 또는 (정형외과) 임플란트이다.
- [0144] 바람직한 실시양태에서, 생물막 유발 박테리아는 표피 포도상구균이고, 바람직하게는 생물막 감염은 중심 정맥 카테터, 정형외과 이식, 또는 만성 골수염이다.
- [0145] 바람직한 실시양태에서, 생물막 유발 박테리아는 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)이고, 바람직하게는 생물막 감염은 비인두 감염, 만성 비부비동염, 만성 중이염, 또는 만성 폐쇄성 폐 질환에서의 감염이다.
- [0146] 바람직한 실시양태에서, 생물막 유발 박테리아는 화농연쇄상구균(*Streptococcus pyogenes*)이고, 바람직하게는 생물막 감염은 구강 및 비인두의 감염, 재발성 편도선염이다.
- [0147] 생물막 감염의 임상 징후는 내과 의사에게 알려져 있다(예를 들어, Table 1 of Wu et al. Int J Oral Sci. 2015 Mar; 7(1): 1-7 참조). 이러한 생물막 질환은 만성 감염을 유발할 수 있다. 급성 감염 대 만성 감염의 결정은 또한 개업의에게 알려져 있다. 예를 들어, 메이오클리닉(Mayo Clinic)에 따르면 1년에 4번 이상의 효모 감염 발생은 만성 효모 감염의 존재를 나타내는 반면 6개월 동안 2번 이상의 방광 감염 발생은 만성 방광 감염(재발성 요로 감염이라고도 함)의 존재를 나타낸다.
- [0148] 박테리아의 병리학적 감염을 치료하는 가장 일반적인 방법은 항생제를 사용하는 것이다. 현재 항생제는 주로 성장 의존적 기전을 통해 작동하며 빠르게 분열하는 박테리아를 표적으로 한다. 그러나 비복제성 또는 느리게 성장하는 박테리아(예를 들어, 휴면 지속 세포, 생물막)는 높은 수준의 항생제 내성 및/또는 저항력을 나타내어 지속적이고 반복적인 감염에 기여한다. 본원에 개시된 화합물은 항생제 저항성 박테리아, 항생제 내성 박테리아, 및 항생제 지속성 박테리아를 포함하는 감염 또는 생물막에서의 사용에 적합하다. 본 명세서에 개시된 화합물은 또한 2차 요법으로서, 또는 오히려 이전 치료(예를 들어, 항균 치료)에 반응하지 않은 개체 또는 예를 들어, 1년 또는 6개월 이내에 회복된 질환에 적합하다.
- [0149] 본 개시내용은 또한 생물막에 의해 유발되거나 생물막과 관련된 임의의 질환을 치료하기 위한 본원에 개시된 바와 같은 화합물 및 이를 포함하는 조성물을 제공한다. 생물막에 의해 유발되거나 생물막과 관련된 질환은 당업자에게 잘 알려져 있다. 특히 이러한 질환은 생물막 관련 감염이다. 치료에 적합한 질환은 예를 들어 박테리아성 전립선염, 박테리아성 질염, 담도 감염, 만성 부비동염, 만성 폐 질환, 충치, 심내막염, 신장 결석, 후두염, 낭포성 섬유증에서의 폐 감염, 치은염, 유선염, 중이염, 병원내의(혈류) 감염, 폐쇄성 폐질환, 골수염, 중이염, 치주염, 폐렴 전립선염, 비부비동염, 부비동염, 편도염, 결핵, 요로 감염 및 상처 감염을 포함한다. 예를 들어 마이코플라즈마증(*Mycoplasma Bovis*)는 유방 감염 및 관절 감염을 일으키는 것으로 알려져 있다. 생물막 관련 질환에는 유치 장치(예를 들어, 의료 임플란트, 카테터 등)에 형성된 생물막으로 인해 유발된 질환도 포함된다. 일반적으로 이러한 질환은 임플란트를 제거/교체하여 치료한다. 바람직한 실시양태에서 질환은 유선염이다. 일부 실시양태에서, 질환은 유선염이 아니다. 일부 실시양태에서 치료는 염증성 장질환, 특히 대장염을 위한 것이 아니다.
- [0150] 본 명세서에 개시된 바와 같은 화합물 및 조성물은 또한 본 명세서에 추가로 개시된 바와 같이 관절 보철물 및 심장 판막과 같은 이식된 의료 장치의 감염을 치료 및 예방하는 데 유용하다.
- [0151] 본 발명의 화합물은 젖소의 유방에 효과가 있는 것으로 나타났다. 이것은 화합물이 혈액-우유 장벽을 통과할 수 있음을 나타낸다. 우유의 누출을 방지하기 위해 유방 상피 세포 사이의 투과성이 낮은 밀착 접합에 의해 혈액-우유 장벽이 형성된다. 혈류와 우유 사이의 단단한 장벽을 통과한다는 것은 화합물이 혈액 장벽을 통과하여 뇌의 감염을 치료하고 장 상피를 통과하여 생물막 관련 질환을 전신적으로 치료할 수 있음을 나타낸다. 실시예의 데이터는 또한 화합물을 치료에 적합하게 만드는 약동학적 특성을 포함하여 생체내 안전성 및 효능을 입증한다.
- [0152] 본 개시내용은 박테리아 감염 또는 생물막에 반응하여 염증을 예방하거나 감소시키기 위한, 본원에 개시된 바와

같은 화합물 및 이를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 염증은 병원체와 같은 유해한 자극에 대한 신체 조직의 복잡한 생물학적 반응의 일부이며 면역 세포 및 분자 매개체와 관련된 보호 반응이다. 염증의 기능은 병원체를 제거하는 것이다.

[0153] 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 화합물 또는 이를 포함하는 조성물을 사용한 개체의 치료는 동물, 바람직하게는 젖소의 임상 염증을 예방하거나 감소시킨다. 바람직하게는 치료는 유방의 (임상) 염증을 예방하거나 감소시킨다. 또 다른 실시양태에서, 화합물 및 이를 포함하는 조성물을 사용한 개체의 치료는 인간의 (임상) 염증을 예방하거나 감소시킨다. 예를 들어, 치료는 피부의 염증을 예방하거나 감소시키며, 바람직하게는 습진을 예방한다.

[0154] 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 본 명세서에 개시된 화합물 또는 이를 포함하는 조성물로 개체를 치료하면 생물막 형성 또는 성장이 감소되고/거나 생물막이 분해 또는 감소된다. 따라서 개체는 더 이상 병원체의 존재하에 염증 반응으로 반응하지 않는다. 즉, 이러한 생물막 내의 생물막 및 병원체의 제거는 염증 반응을 감소시키고 임상 염증을 예방한다.

[0155] 생물막을 처리하는 동안 미생물(예를 들어, 박테리아 및 진균)이 생물막에서 방출된다. 어떤 경우에는 개체의 면역 체계가 활성화 미생물에 반응할 것이다. 이것은 조직의 염증을 유발할 수 있다. 활성화된 면역 세포와 염증 반응은 예를 들어 젖샘과 같은 조직을 손상시킬 수도 있다. 따라서 염증 반응의 억제제 조직 손상을 예방하거나 감소시킬 수 있다. 예를 들어 젖샘이 덜 손상되고 젖소의 젖 생산이 더 빨리 회복된다.

[0156] 또한 조직이 손상되고 염증이 끝난 후 신체는 복구를 시작한다. 여전히 존재하는 대식세포는 새로운 혈관 생성을 자극한다. 그들은 또한 섬유아세포의 유인을 보장한다. 이러한 섬유아세포는 궁극적으로 육아 조직(granulation tissue)의 형성을 유발한다. 예를 들어, 젖소를 치료하는 경우, 우유 생산 조직 대신 흉터 조직이 형성될 수 있다. 따라서 젖소의 우유 생산량은 염증 이전보다 낮을 수 있다.

[0157] 본 명세서에 기재된 화합물에 더하여, 염증 반응을 억제하고 예를 들어 젖샘에서 조직 손상을 감소시키기 위해 추가의 항염증 약물이 투여될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 치료(치료 및 예방 모두)는 항염증제의 투여를 추가로 포함한다. 항염증제는 예를 들어 이부프로펜, 파라세타몰, 아스피린, 디클로페낙, 케토프로펜, 톨메틴, 에토돌락 및 페노프로펜과 같은 비스테로이드성 항염증제(cox/lox 억제제)를 포함한다. 커큐민, 생강, 스피룰리나, 카이엔, 계피, 정향, 세이지, 로즈마리, 블랙 페퍼, 천연 아스피린, 보스웰리아, 상귀나리아 및/또는 녹차와 같은 천연 항염증제도 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법 및 용도는 본원에 개시된 치료 티오황 화합물과 항염증제의 조합 치료를 포함한다. 화합물은 함께 또는 별도로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 치료 티오황 화합물을 항염증제와 함께 포함하는 조성물이 제공된다.

[0158] 일부 실시양태에서, 방법은 바람직하게는 생물막 형성 또는 성장을 방지하거나 감소시키고, 생물막을 분해 또는 감소시키고/감소시키거나 박테리아 또는 진균 감염을 치료 또는 예방하기 위해 본원에 개시된 화합물을 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 질병 또는 질환 또는 감염의 치료(예를 들어, 치료제) 또는 예방(예를 들어, 예방제)을 위해 개체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서 개체는 생물막 관련 감염을 갖거나 발병할 위험이 있다.

[0159] 조성물은 임의의 개체, 특히 동물에게 투여될 수 있다. 바람직하게는, 동물은 반추동물(예를 들어, 젖소 및 염소)이고, 보다 바람직하게는 젖소이다. 일부 실시양태에서, 동물은 젖소가 아니다. 바람직하게는, 동물은 단일 위, 설치류, 비인간 영장류, 돼지, 말, 개, 고양이 또는 조류와 같은 비반추동물이다. 일부 실시양태에서 동물은 인간이다. 일부 실시양태에서 동물은 비인간 동물이다. 일부 실시양태에서, 동물은 어류, 연체동물 및 갑각류와 같은 수생 동물이 아니다. 바람직하게는, 동물은 포유동물 또는 새이다.

[0160] 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 본 개시내용은 본원에 개시된 조성물이 단일 투여 후에 유리한 효과를 가질 수 있음을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 효과는 본원에 개시된 조성물의 단일 경구 투여를 제공함으로써 달성된다. 이러한 경구 투여는 예를 들어 본원에 개시된 화합물의 연장된 방출을 제공하는 정제일 수 있다.

[0161] 본 개시내용은 또한 다중 투여를 제공한다. 예를 들어, 조성물은 하루, 매일, 매주 또는 매월 1회 이상 제공될 수 있다. 예시적인 실시양태에서, 조성물은 일주일 동안 또는 증상이 완화될 때까지 매일 1회 제공될 수 있다.

[0162] 본원에 기재된 약제학적 제제의 실제 투여 수치는 환자에게 독성이 없이 특정 환자, 조성물 및 투여 방식에 대한 원하는 치료 반응을 달성하는 데 효과적인 활성 성분의 양을 얻기 위해 다양할 수 있다. 선택된 투여량 수치는 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설 속도, 치료 기간, 기타 약물, 화

합물 및/또는 조합하여 사용되는 물질, 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 치료되는 환자의 이전 병력, 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사한 요인을 포함한 다양한 요인에 따라 달라진다. 당해 분야에 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사는 필요한 약제학적 조성물의 유효량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0163] 일부 실시양태에서, 반추동물, 특히 젖소는 본 명세서에 개시된 화합물 1g 이상, 바람직하게는 2g 이상, 더욱 바람직하게는 5g 이상을 제공받는다. 일부 실시양태에서, 반추동물, 특히 젖소에게 적어도 3g의 PTSO가 제공된다. 반추동물용 화합물을 포함하는 조성물은 바람직하게는 경구 정제로 제공된다.

[0164] 더 적은 양의 화합물이 더 작은 반추동물, 예를 들어 염소에게 투여될 수 있다는 것은 당업자에게 명백하다. 실시예는 3.84g PTSO와 0.96g PTS를 포함하는 정제를 젖소에 투여하는 것을 기재한다. 젖소의 평균 체중이 약 650kg이므로 이는 약 5.9mg/kg PTSO 및 1.5mg/kg PTS의 투여량에 해당한다. 통상의 기술자는 더 작은 동물이 더 높은 대사율을 갖고 따라서 더 작은 동물이 체중 기준으로 더 많은 약물 투여량을 필요로 한다는 것을 알고 있다. 동물 간, 및 인간과 동물 간의 투여량 변환은 Nair 및 Jacob(J Basic Clin Pharm. 2016년 3월-2016년 5월; 7(2): 27-31) 및 Holliday(1967 The Relation of Metabolic Rate to Body Weight and Organ Size. A Review. Pediat.Res.1:185-195) 등에서 보고되었다.

[0165] 본원에 개시된 방법 및 용도의 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 화합물의 적어도 5mg/일 (예를 들어 경구 투여에 의해) 인간에게 제공된다. 바람직하게는, 적어도 10mg/일의 화합물이 제공된다. 일부 실시양태에서, PTSO는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg의 투여량으로 인간에게 제공된다. 이러한 양의 화합물은 화합물을 전신으로 (예를 들어, 경구로) 제공할 때 특히 유용하다. 당업자는 국소(예를 들어, 피부, 잇몸, 상처에) 투여될 때 더 적은 양이 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 본 명세서에 개시된 조성물은 바람직하게는 적어도 1주일 동안 또는 증상이 완화될 때까지 제공된다. 이러한 조성물은 여러 번(예를 들어, 1주에 1회, 월 1회, 1년에 2회 등) 제공될 수 있지만, 1회 사용 후에 예방 및 치료 효과가 관찰된다.

[0166] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 화합물을 1종 이상의 추가 제제, 예컨대 항생제(예를 들어, 항균제, 항바이러스제, 항진균제), 항염증제, 해열제 및 진통제와 함께 포함하는 조성물이 제공된다.

[0167] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 화합물은 항진균제 또는 항생제와 같은 항미생물제와 함께 사용된다. 이론에 얽매이지 않는 것은 아니지만, 본 개시내용은 본 명세서에 개시된 화합물이 생물막을 표적으로 한다는 것을 제공한다. 그러면 항균 약물은 파괴된 생물막에 남아 있는 플랑크톤 세포와 미생물 세포에 효과를 발휘할 수 있다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 항균제와 본원에 기재된 화합물의 조합은 항균제의 투여량 및/또는 투여 빈도를 감소시킬 수 있다.

[0168] 병용 치료에 사용될 수 있는 예시적인 항균제는 항진균제, 예를 들어 미코나졸, 케토코나졸, 에코나졸, 테르비나핀, 시클로피록스, 톨나프테이트, 세르타코나졸, 술폰아미드, 암포테리신 b, 클로록실레놀, 클리오퀴놀, 부테나핀, 나프티핀, 니스타틴, 및 클로트리마졸을 포함한다. 예시적인 항생제는 페니실린, 테트라사이클린, 세팔로스포린, 퀴놀론, 린코마이신, 마크로라이드, 설폰아미드, 글리코펩티드, 아미노글리코사이드, 및 카바페넴을 포함한다.

[0169] 본 개시내용은 항균제와 함께 본원에 개시된 화합물(특히 화학식 I의 화합물)을 포함하는 조성물을 제공한다. 숙련된 의사가 이해할 수 있는 바와 같이, 화합물 및 항균제는 또한 별도로 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 화합물 및 항균 요법은 중첩된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 화합물을 사용한 요법은 항균 요법에 선행한다.

[0170] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 식품 또는 기능성 식품으로서 또는 식품 또는 기능성 식품으로 제공된다. 본 명세서에서 "기능성 식품"이라는 용어는, 영양학적 특성뿐만 아니라 건강 증진 또는 질병 위험 감소와 같은 특정 기능을 수행하기 위해 제조된 식품을 지칭한다. 이러한 기능성 식품은 식이보충제 또는 (동물성) 식품첨가물로서 지칭될 수 있다. 이를 위해 미네랄, 비타민, 지방산, 유익한 효과가 있는 박테리아, 식이섬유, 및 항산화제 등과 같은 생물학적 활성 화합물이 첨가된다. 이러한 식품은 경구 섭취에 적합한 임의의 형태, 예를 들어 액체, 겔, 분말, 알약, 정제 또는 겔 캡슐 형태일 수 있다.

[0171] 기능성 식품은 또한 동물 소화물, 예를 들어 깨끗하고 분해되지 않은 동물 조직의 화학적 및/또는 효소적 가수분해로부터 생성된 임의의 물질을 포함할 수 있다. 기능성 식품은 또한 건조된 맥주 효모, 예를 들어 양조 산업의 부산물인 건조된 불활성 제제를 포함할 수 있다. 동물성 소화물 및 건조된 맥주 효모는 기능성 식품의 기호성을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 기능성 식품에 존재하는 경우, 동물성 소화물은 기능성 식품의 약 10% 내지 약 90%를 구성하고, 건조된 맥주 효모는 기능성 식품의 약 1% 내지 약 30%를 구성한다.

- [0172] 예시적인 실시양태에서, 본 개시내용은 펙틴, 유카, 비타민 E, 탄산칼슘, 프로바이오틱스, 식물 추출물, 허브 및 오레가노를 포함하는 조성물을 제공한다. 바람직하게는 상기 조성물은 약 1 내지 5g의 치료 티오황 화합물을 포함한다. 상기 조성물은 특히 젖소의 치료를 위한 정제로서 적합하다. 실시예에 기술된 바와 같이, 조성물은 우유의 세포 수를 감소시키고 유선염을 치료하는데 적합하다.
- [0173] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 바와 같은 치료 티오황 화합물을 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제와 함께 포함하는 조성물을 제공한다. (예를 들어, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997 참조). 본원에 사용된 용어 "약제학적으로 허용되는"은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제나 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 제제, 물질 또는 조성물, 및/또는 이들 제형의 조합 또는 조성물을 지칭한다. 또한, "약제학적으로 허용되는 희석제 또는 담체"라는 용어는 하나의 기관 또는 신체의 일부로부터 다른 기관 또는 신체의 일부로 펩티드를 운반하거나 수송하는 데 관여하는 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예를 들어 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질을 지칭한다.
- [0174] 약제학적 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식으로 투여될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. 약제학적 조성물은 비경구, 국소(안구 포함), 경구, 설하, 경피 또는 흡입과 같은 임의의 경로에 의한 투여를 위한 일상적인 절차에 따라 제형화될 수 있다. 비경구 투여는 예를 들어 정맥내, 근육내, 동맥내, 관상동맥내, 척추강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 바람직한 경로는 경구 또는 국소 투여이다.
- [0175] 조성물은 액체, 반고체 및 고체 제형과 같은 임의의 적합한 형태일 수 있다. 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 로젠지, 크림 또는 액체 제제(특히 피부 또는 눈에 투여용), 예를 들어 멸균 비경구 용액 또는 현탁액 또는 스프레이, 에어로졸 형태 또는 기타 통상적인 흡입 방법의 형태일 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 경구, 비강, 국소(볼 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 비경구 투여에 적합한 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 크림, 겔, 연고, 로션, 폼, 현탁액, 스프레이, 에어로졸, 또는 분말 에어로졸 형태의 국소 조성물이다. 조성물은 피부에 투여하는데 특히 유용하다. 적합한 조성물은 또한 구강 관리 조성물, 예를 들어 치약(toothpaste), 치약(dentifrice), 치아 분말, 치아 젤, 치은연하 젤, 구강 세정제/구강 세척제, 인공 타액, 의치 제품, 마우스 스프레이, 로젠지, 경구 정제 및 츄잉 껌을 포함한다.
- [0176] 본 개시내용은 또한 표면 상의 생물막 형성 또는 성장을 방지 또는 감소시키고/시키거나 표면 상의 생물막의 분해 또는 감소를 위한 본원에 개시된 바와 같은 조성물의 시험관내 용도를 제공한다. 바람직하게는, 상기 방법은 표면 상의 생물막 또는 생물막 형성을 감소시키기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 방법은 표면에 부착된 생물막을 본원에 개시된 조성물과 접촉시키는 것을 포함한다. 조성물은 예를 들어 세정 또는 살균 조성물을 포함한다.
- [0177] 임의의 표면은 이러한 표면을 코팅하기 위해 본원에 개시된 조성물로 처리될 수 있다. 표면은 예를 들어 조성물에 분무, 침지 또는 담글 수 있다. 표면에는 유리, 금속, 다공성 및 비다공성 표면이 포함된다. 표면은 또한 식품 산업에서 볼 수 있는 장비 또는 병원 및 의료 시설에서 볼 수 있는 의료 장비와 같이 오염될 수 있는 장비의 외부 및 내부 및 표면뿐만 아니라 배관 시스템(예를 들어, 싱크대 배수구), 조리대, 건축 자재, 덕트, 클린 룸에 존재한다. 표면은 또한 파이프의 내부 또는 외부, 예를 들어 배수 뿐만 아니라 수영장, 탱크(예를 들어, 양식용), 정화 필터, 변기, 싱크대, 온실 표면을 지칭한다. 표면에는 물통에서와 같은 물도 포함된다.
- [0178] 일부 실시양태에서 표면은 보철(고관절 임플란트, 치과 임플란트, 인공 관절, 음성 보철, 음경 보철), 기계적 심장 판막, 심장 박동기, 동정맥 선트, 공막 버클, 카테터 (예를 들어, 중심 정맥 카테터, 혈관 내 카테터, 요도 카테터, 히크만(Hickman) 카테터, 복막 투석 카테터, 기관내 카테터), 고막절개관, 기관절개관, 외과용 봉합사, 뼈 앵커, 뼈 나사, 안내 렌즈, 콘택트 렌즈, 자궁 내 장치, 대퇴부 이식편 또는 혈관 이식편과 같은 의료 기기의 표면이다. 의료 기기로부터의 기타 감염에는 복부 배액관, 담도관 스텐트, 유방 임플란트, 심장 박동기, 뇌척수액 선트, 콘택트 렌즈, 제세동기, 의치, 전기 투석기, 기관 내 튜브, 유치 도뇨관, 자궁 내 장치, 정맥 카테터, 관절 보철물, 기계적 심장 판막, 신루술 튜브, 정형외과 임플란트, 복막 투석 카테터, 인공 심장 판막, 인공 관절 동종이형 정형외과 장치, 조직 충전제, 요도 스텐트, 혈관 보철, 인공호흡기 관련 폐렴, 심실 보조 장치, 심실 유도, 심실 선트, 및 음성 보철물로부터의 감염을 포함한다.
- [0179] 일부 실시양태에서 표면은 클램프, 집게, 가위, 피부 갈고리, 튜브, 바늘, 견인기, 스케일러, 드릴, 끌, 줄, 또

는 튕과 같은 수술 장치의 표면이다.

- [0180] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "포함하다" 및 이의 활용은 단어 뒤에 오는 항목이 포함되지만 구체적으로 언급되지 않은 항목이 배제되지 않음을 의미하는 비제한적인 의미로 사용된다. 또한, 동사 "이루어지다"는 "필수적으로 이루어지다"로 대체될 수 있는데, 이는 본원에 정의된 바와 같은 화합물 또는 부가 화합물이 구체적으로 확인된 것보다 추가 구성요소(들)를 포함할 수 있음을 의미하며, 상기 추가 구성요소(들)는 발명의 고유한 특성을 변경하지 않는 추가 구성요소(들)이다.
- [0181] 관사 한("a" 및 "an")은 본 명세서에서 관사의 문법적 대상의 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하는 데 사용된다. 예로서, "구성요소"는 하나의 구성요소 또는 하나 이상의 구성요소를 의미한다.
- [0182] 수치(대략 10, 약 10)와 관련하여 사용될 때 "대략" 또는 "약"이라는 단어는 바람직하게는 그 값이 값의 1% 이상 또는 이하 10의 주어진 값일 수 있다.
- [0183] 본원에 개시된 화합물 및 조성물은 요법으로서 및 치료적 치료에 유용하고, 따라서 약제로서 유용할 수 있고 약제의 제조 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 인간 또는 동물 신체의 치료가 아닌 방법 및/또는 인간의 생식계열 유전적 정체성을 변형시키는 공정을 포함하지 않는 방법을 제공한다.
- [0184] 여기서 세포는 인간 생식 세포주가 아니다.
- [0185] 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 참고문헌은 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.
- [0186] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 설명된다. 이들 실시예는 본 발명의 범위를 제한하지 않고, 단지 본 발명을 명확히 하는 역할을 한다.
- [0187] 실시예
- [0188] 파(Allium)에서 분리된 여러 화합물은 항생제에 대한 대안을 개발하기 위해 박테리아에 미치는 영향을 확인하기 위해 시험관 내에서 연구되었다. 예를 들어, Sorlozano-Puerto 등(Biomed Research International 2018 Article ID 7861207)은 MIC50 및 MIC90 값뿐만 아니라 MBC50 및 MBC90 값(후자는 직접적인 살균 효과를 입증하는 데 사용됨)을 항균 효능의 척도로 결정하기 위해 권장 표준 방법(CLSI)을 사용하여 다수의 인간 병원체(479 명의 상이한 환자로부터 얻은 임상 샘플에서 분리된 212개의 그람 음성 간균 및 267개의 그람 양성 구균)에 대한 PTS 및 PTSO의 항균 활성을 기재한다. PTSO 및 PTS에 대한 데이터를 이러한 병원체에 대한 임상 실습에서 사용되는 다양한 항생제와 비교했다. 결과는 모든 박테리아 균주에 대해 항생제의 더 낮은 MIC 값으로 표시되는 바와 같이 테스트 패널의 여러 항생제가 PTSO 또는 PTS보다 더 효과적임을 보여준다. 이러한 시험관 내 발견에 기초하여, 당업자는 PTSO 또는 PTS를 박테리아성 감염 치료에서 일반적인 항생제에 대한 유용한 대안으로 고려하지 않을 것이다.
- [0189] Sorlozano-Puerto 등은 플랑크톤 미생물의 성장 억제를 측정한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 플랑크톤 미생물에 대한 화합물의 효과는 생물막에 대한 이러한 화합물의 효과를 나타내지 않는다. 이것은 본 명세서에서 이전에 논의된 바와 같이 다수의 항균제에 대해 입증되었으며 문헌에서도 잘 알려져 있다. 예를 들어, Roy 등은 생물막의 박테리아가 기존 항생제에 대한 내성을 약 1000배 증가시켰음을 나타낸다(2018 Virulence 9:522-554).
- [0190] 플랑크톤 미생물에 관한 연구와 대조적으로, 본 실험은 생물막 상에서 PTSO 및 PTS의 효과를 처음으로 증명한다. 이러한 분석에서 배지 및 배양 조건(혈류에서 발생하는 것과 유사한 전단력으로 스트레스를 유도하기 위한 플레이트의 지속적인 교반)은 박테리아와 같은 미생물을 자극하여 신속하게 생물막을 형성한다. 이러한 생물막 분석은 생물막 형성을 방지할 가능성을 평가하기 위해 실험 시작부터 시험 화합물(예를 들어, PTSO)을 첨가하거나, 또는 생물막 용해 효과(예를 들어, 기존 생물막이 PTSO로 처리된 실시예 2에 해당)를 평가하기 위해 성숙한 생물막에 시험 화합물을 첨가하는 두 가지 방식으로 수행될 수 있다.
- [0191]
- [0192] 생물막 분석에서 화합물의 주요 작용 기전은 정족수 감지의 억제 및 박테리아의 집착 및 합성을 초래하는 다음의 집단적 유전자 전환 또는 생물막의 3차원 구조를 형성하기 위한 세포의 기질의 조립과 관련이 있다. 이러한 기전은 순수 항균/항균성 "살상" 효과와 완전히 상이하다. 화합물이 생물막 분석에서 효과적으로 테스트되었지만 항균 효과가 없는 경우(예를 들어, 생물막 구조를 불안정하게 하기 위해 특정 생물막 단백질에 대해 개발된 특정 항체), 화합물을 항생제와 결합하여 생물막에서 방출된 박테리아를 죽일 수 있다. 이것은 특히 동물의 면

역 체계가 손상된 경우이다. PTSO와 같은 물질이 (비록 다른 기전에 의한 것일지라도) 약간의 항균 효과가 있는 경우, 이는 임상 치료에서 바람직한 추가 효과로 간주되어 선천적 면역계에 의한 박테리아 개체군의 박멸을 지원한다.

[0193]

[0194]

실시에 2 내지 4는 시험관내 생물막 분석을 사용한 본 발명의 화합물의 효과를 기술한다. 이러한 분석은 플랑크톤 미생물의 성장 억제를 측정하는 Sorlozano-Puerto 등에 기재된 것과 같은 분석과 상당히 다르다. 본 실시예는 놀랍게도 본 발명의 화합물이 생물막 박멸에 효과가 있음을 입증한다.

[0195]

실시예 1 PTSO 및 PTS의 분리

[0196]

범위: PTSO 및 PTS는 56% PTSO 및 14% PTS를 포함하는 식물 추출물(본 명세서에서 "PTSO/PTS 농축 식물 추출물"로 지칭됨)로부터 분리되었다.

[0197]

연구 설계: 화합물의 극성에 따른 용출 순서는 HPLC에서 추정하고 분리 조건은 이동상으로 헵탄 및 에틸아세테이트를 사용하여 TLC에서 전개된다. 길이 110cm, 직경 25cm의 플래시 컬럼을 헵탄 중 15kg 실리카(ACROS Organics™의 입자 크기 40 내지 60 μm)로 채우고 컬럼을 밤새 안정화되도록 두었다. 극성을 0%에서 40%까지 점진적으로 증가시켜 정제를 수행하였다. 관심 분획인, PTS(= 피크 6) 및 PTSO(= 피크 7)는 둘 다 1 H-nmr로 식별되며, 이동상을 20리터 사용한 후 용리되기 시작했으며 2리터 분획 크기로 수집되었다. 각 화합물의 TLC 식별에 따라 분획을 분리하고 각 화합물(PTS 또는 PTSO)에 해당하는 분획을 합쳤다. 용매를 회전 증발기로 증발시켜 표 1에 요약된 바와 같이 PTS(32435-2-A)의 정제된 분획 및 PTSO의 2개의 정제된 분획(MHA32435-2-B, MHA32435-2-C)을 수득했다.

[0198]

98% 이상의 필요한 순도는 분획 MHA32435-2-C(= PTSO)에서만 달성되었으며 분획 MHA32435-2-A(PTS) 및 MHA32435-2-B(= PTSO의 2차 분획)는 98% 이하의 순도를 나타냈고, 원하는 순도를 얻기 위해 두 번째 플래시 크로마토그래피에 의해 개별적으로 추가 정제가 필요했다.

[0199]

PTS(MHA32435-2-A)의 재정제(repurification)는 에틸 아세테이트와 헵탄을 이동상으로 사용하고, 극성을 0%에서 20%로 증가시키므로써 2kg 실리카(ACROS Organics™의 입자 크기 40 내지 60 μm)로 플래시 컬럼(50cm 길이 및 20cm 직경)을 패키징하여 수행되었다. 관심 분획을 250ml 분획 크기로 수집하고, TLC로 식별하고 조합했다. 용매를 회전 증발기로 증발시켜 98% 이상의 순도로 PTS(EWR32514-01-1)를 수득했다.

[0200]

PTSO의 불순한 분획(MHA32435-2-B)의 재정제는 MHA32435-2-A와 동일한 이동상을 사용하고 3kg의 실리카(컬럼 패킹용)의 차이를 사용하여 동일한 플래시 컬럼에서 수행되었는데, 극성을 0% 내지 30%로 증가시키고, 분획 크기는 100ml였다. 재정제 결과 표 1의 개요와 같이 순도가 98% 이상인 PTSO의 두 가지 분획(EWR32514-02-1 및 EWR32514-02-02)이 생성되었다.

[0201]

표 1: PTSO/PTS 농축 식물 추출물로부터 피크 6 및 피크 7 순도 및 회수율(%)

PTSO/PTS 농축 식물 추출물 (992gr)로부터 PTS(피크 6) 및 PTSO(피크 7)의 첫번째 단계 정제					
피크	무게(gr)	HPLC	¹ H-nmr	순도(%)	회수율 %
6 (= PTS)	64	MHA32435-2-A	MHA-32435-2-A	93	6 86(두 분획 모두로부터)
7 (= PTSO)	651	MHA32435-2-C	MHA-32435-2-C	99	
7 (= PTSO)	198	MHA32435-2-B	MHA32435-2-B	72	
피크 6 및 피크 7(72 순도를 갖는 분획)의 두번째 단계 재정제					
6 (= PTS)	46	EWR32514-01-1	EWR32514-01-4	99	5 82 (순도 98% 이상의 모든 분획으로부터)
7 (= PTSO)	123	EWR32514-02-1	EWR32514-02-4	99	
7 (= PTSO)	39	EWR32514-02-02	EWR32514-02-5	99	

[0202]

[0203] 이 실시예에서 PTSO 및 PTS가 고순도로 정제되었음을 입증한다. 순도가 99% 초과인 샘플을 본 명세서의 실시예에 나타낸 바와 같이 사용하고 "순수 PTSO" 및 "순수 PTS"로 지칭한다.

[0204] **실시예 2. PBR(광생물 반응기: Photo Bio-Reactor)에서의 생물막**

[0205] PTSO, PTS 및 DPD(디프로필 디설파이드)의 항생물막 효과를 결정하기 위해 유리관 반응기인 PBR에서 통제된 조건하에 생물막을 성장시켰다. 생물막 형성이 유리관에서 명확하게 보이기 때문에 광생물 반응기가 모델계로 사용되었다. 성숙한 생물막이 형성된 후, 순수 PTSO, PTS 또는 DPD의 농도를 증가시키고 순수 PTSO, PTS 또는 DPD의 적정에 의해 생물막을 제거하고 투여량을 결정하여 생물막이 박멸된 것으로 확인했다. 이후, 딥 시퀀싱(deep sequencing)에 의해 생물막의 미생물 조성을 결정하였다.

[0206] **연구 설계**

[0207] **중속영양 미생물 생물막:** 생물막은 26.5리터 유리 광생물반응기(PBR)에서 배양되었으며 튜브 길이는 37m 포함. 급협(LGEM의 GemTube RD-25 유리). PBR은 22리터의 멸균되지 않은 배지로 채워졌다(표 1).

[0208] 표 2. 생물막 배양 배지 조성

이온	농도
다량 요소	
NH ₄ ⁺	0.3 mM
K ⁺	10 mM
Ca ₂ ⁺	6.8 mM
Mg ₂ ⁺	3.1 mM
NO ₃ ⁻	18 mM
SO ₄ ²⁻	4.6 mM
PO ₄ ³⁻	2.4 mM
미세 요소	
Fe ₂ ⁺	31 uM
Mn ₂ ⁺	14 uM
Zn ₂ ⁺	10 uM
B ⁻	65 uM
Cu ₂ ⁺	1.5 uM
Mo ₂ ⁺	1 uM

[0209]

[0210] 배지는 1g/l 글루코스를 추가로 함유하였다. 접종은 Delfgauw 근처의 Zuidpolder에서 500ml의 배수로 물을 첨가하여 이루어졌다. 공기는 1.0리터/분의 속도로 펌핑되었다: 이 설정에서 배지의 PBR을 통한 배지 순환은 가능한 낮았지만 PBR에서 배지 순환을 실현하기 위해 안정적인 유지가 있었다. PBR은 빛에 노출되는 것을 방지하기 위해 어두운 플라스틱 스크린으로 덮여 있다. 인큐베이션은 12 내지 18℃에서 이루어졌고, pH는 1.5일에 1회, 주 5회 5.2 내지 5.7로 조절하였다. 총 5g/l 글루코스 투여 후, (1주 후) 유리관의 전체 내부 표면을 덮는 끈적 끈적한 층(생물막)이 형성되었다. 배지는 생물막이 형성되었을 때 글루코스가 없는 신선한 배지로 교체되었다.

[0211] 표에 나타낸 바와 같이 PTSO, PTS 또는 DPD가 PBR에 첨가되었다. 실시예 1에 나타낸 바와 같이 순수 PTSO 및 PTS를 수득하였고, 1000x 희석된 혼합물의 초음파 처리에 의해 물에서 안정한 용액을 제조하였다. DPD(디프로필 디설파이드 98% 이상의 순도)는 Sigma에서 공급했다. 각 첨가 단계 후에 생물막 배양물을 24시간 동안 배양하여 생물막의 안정성을 관찰하였다.

[0212] 생물막 및 상청액의 호기성, 혐기성/미호기성 및 진균성 CFU의 수는 다음과 같은 표준 작업 절차에 따라 결정되었다: ml당 호기성 콜로니 형성 단위(CFU/ml)는 <https://www.iso.org/standard/53728.html>를 참조;

- [0213] 혐기성 CFU's/ml의 측정은 <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AN0025A#/AN0025A> 참조(플레이트는 무산소 용기에서 배양됨) 및 진균에 대한 콜로니 형성 단위 수와 관련하여 http://edgeanalytical.com/wp-content/uploads/Food_AOAC-997.02.pdf 참조(표 2 참조).
- [0214] 생물막의 미생물 집단의 구성은 메타게놈 분석(일루미나 딥 시퀀싱(Illumina deep sequencing))을 사용하여 결정되었다.
- [0215] 생물막의 또 다른 샘플을 채취하고 일부를 추가 연구를 위한 집중 물질로 영하 80도에 보관했다. 생물막의 다른 부분은 가벼운 초음파 처리에 의해 용해되었고 상기에 기재된 바와 같이 콜로니 형성 단위의 호기성, 혐기성 및 진균 수를 결정하는 데 사용되었다. 이후 배지 내 콜로니 형성 미생물의 수가 처리 전 생물막 내 미생물의 수와 일치하는지 여부를 계산하였다. 이러한 방식으로 처리에 의해 미생물이 사멸되었는지 또는 박테리아가 살아 남아 있고 생물막만 가용화되었는지를 계산하였다.
- [0216] *PTSO에 의한 생물막 박멸*
- [0217] 현미경 분석 결과 진균, 원생동물 및 박테리아가 혼합된 것으로 나타났다.
- [0218] 메타게놈 분석은 생물막이 고도로 혼합된 집단으로 구성되어 있음을 보여주었다. 최소 611개의 서로 다른 속(genus) 박테리아가 확인되었다. 5개의 가장 풍부한 속과 그들의 상대적인 풍부도는 다음과 같다: 슈도모나스(Pseudomonas) 46%, 악시도보락스(Acidovorax) 13%, 버크홀데리아(Burkholderia) 4%, 아크로모박터(Achromobacter) 4% 및 렐리오티아(Lelliotia) 3%. 적어도 5가지 다른 속들(genera)의 진균이 확인되었다. 5개의 가장 풍부한 속과 그들의 상대적인 풍부도는 다음과 같다: 클라도보트리움(Cladobotryum) 5%, 에미리셀롭시스(Emiricellopsis) 31%, 푸시콜라(Fusicola) 17%, 무코르(Mucor) 37% 및 로젤라(Rozella) 10%.
- [0219] PTSO를 첨가하면 생물막이 분해된다. 이것은 0.05 ul/l PTSO의 첫 번째 투여 후에 생물막에서 무리가 방출되어 시각화될 수 있었던 반면, 0.65 ul/l의 총 투여량에서는 생물막이 상당히 얇아졌고 최고 투여량에서 거의 완전히 분해된 것처럼 보인다.
- [0220] PTSO가 생물막의 불안정화 효과가 있는지 또는 단순히 미생물을 죽이는 지 여부를 조사하기 위해 처리 전 생물막에서 샘플을 채취하고 처리 전후에 액체 배지 샘플을 채취하여 위에서 설명한 바와 같이 배양하여 콜로니 형성 단위의 수를 결정했다. ml 당 생물막 및 상청액에서 콜로니 형성 단위는 도금 기술에 의해 추정되었으며 표 3에 보고되어 있다. 이후 배지 내 콜로니 형성 미생물의 수가 처리 전 생물막 내 미생물의 수와 일치하는지 여부를 계산하였다. 이러한 방식으로 처리에 의해 미생물이 사멸되는지 또는 박테리아가 살아 남아 있고 생물막만 가용화되었는지 여부를 계산하였다(표 6).
- [0221] 표 3. 다양한 투여량의 PTSO를 첨가한 후 종속 영양 성장 생물막의 가용화 동안 방출된 세포 수. 호기성, 혐기성/미호기성 및 진균성 CFU의 수는 본 명세서에 기술된 바와 같은 표준 작업 절차에 따랐다.

일	투여량 (PTSO ul /배양물 l)	누적 투여량 (PTSO ul /배양물 l)	24시간 후 호기성 CFU (x 1000)	24시간 후 혐기성 CFU (x 1000)	24시간 후 진균성 CFU (x 1000)
0	0	0	300	47	18
2	0.05	0.05	2,033	383	150
6	0.1	0.15	3,367	750	150
8	0.5	0.65	6,267	1,127	517
13	1.0	1.65	17,333	4,400	20,333
15	2.0	3.65	5,867	2,933	1,567

- [0222]
- [0223] 가장 낮은 PTSO 투여량에서도 호기성, 혐기성/미호기성 및 진균성 CFU가 증가한다. 이것은 낮은 투여량에서도 PTSO가 박테리아의 후속 방출과 함께 생물막 층을 분해하기 시작함을 나타낸다. PTSO의 최고 농도에서 호기성, 혐기성/미호기성 및 진균성 CFU의 감소는 더 높은 투여량에서 PTSO가 플랑크톤 미생물에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

[0224]

[0225] *PTS에 의한 생물막 박멸*

[0226] 생물막은 전술한 바와 같이 성장하였다. 메타게놈 분석은 생물막이 고도로 혼합된 집단으로 구성되어 있음을 보여주었다. 최소 362개의 서로 다른 속 박테리아가 확인되었다. 5개의 가장 풍부한 속과 그들의 상대적인 풍부도는 다음과 같다: 슈도모나스(Pseudomonas) 72%, 라울텔라(Raoultella) 6%, 플라보박테리움(Flavobacterium) 3%, 엔테로박터(Enterobacter) 1.5% 및 악시드보락스(Acidovorax) 1%.

[0227] 11.65 ul/l의 순수 PTS를 첨가한 후 생물막의 시각적 분해가 감지되었다. 생물막의 가용화는 배양물에서 호기성, 혐기성 박테리아 및 진균 모두에 대한 CFU의 증가를 초래했다(표 3).

[0228] 표 4. 다양한 투여량의 PTS를 첨가한 후 종속 영양 성장 생물막의 가용화 동안 방출된 세포 수. 호기성, 혐기성/미호기성 및 진균성 CFU의 수는 본 명세서에 기술된 바와 같은 표준 작업 절차에 따랐다.

추가 번호	정제된 PTS 투여량 (ul/l)	정제된 PTS 총 투여량 (ul/l)	호기성 CFU (x 1000)	혐기성 CFU (x 1000)	진균성 CFU (x 1000)
0	0	0.0	1600	453.333	14.333
1	0.05	0.05	600	536.667	11.667
2	0.10	0.15	466.667	129	90
3	0.50	0.65	1000	19.6676	23.667
4	1.00	1.65	1190	216	25.333
5	2.50	4.15	1003.333	253.333	24
6	2.5	6.65	1566.667	290.000	19.333
7	2.50	9.15	1410	74.667	12.667
8	2.50	11.65	540	59	12
9	2.50	14.15	1430	573.333	103.333
10	2.50	16.65	2366.667	1033.333	223.333
11	2.50	19.15	2200	930	273.333
12	2.50	21.65	1183.333	620	126.667
13	2.50	23.15	756.667	234	59
14	2.50	2.65	230	109.333	12.333

[0229]

[0230] PTS의 첫 번째 투여 전에 이미 생물막에서 미생물의 특정 PTS-투여량 독립적 방출이 있었던 반면, 생물막은 눈에 띄게 안정적이었다. 지점 0에서의 첫 번째 측정은 인공물일 가능성이 있다. PTS0와 유사하게, PTS는 생물막의 분해를 나타내는 상청액에서 살아있는 미생물의 증가를 초래한다. 더 높은 투여량에서, CFU의 감소는, 더 높은 투여량에서 PTS가 플랑크톤 미생물에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

[0231] *DPD에 의한 생물막 박멸*

[0232] 생물막은 전술한 바와 같이 성장하였다. 현미경 분석은 생물막이 진균과 박테리아로 구성되어 있음을 보여주었다. 생물막의 미생물 집단과 관련하여 상당한 차이가 예상되지 않았기 때문에 미생물 집단 분석은 수행되지 않았다.

[0233] 표 5에 나타난 바와 같이 DPD를 배양물에 첨가하였다. 처음 7회 투여 동안 반응기에 생물막이 존재했는데, 이는 DPD의 추가 투여량에 따라 시각적으로 성장하거나 축소되지 않았다. 8회 투여 후, 167 ul 순수 DPD/리터 배양물 (= 160 mg 순수 DPD/리터)의 총 첨가로 생물막이 유리로부터 방출되기 시작하고 배지에 용해되었다. 이 과정은 317 ul 순수 DPD/리터 순수 배양물의 총 투여량으로 계속되었다. 더 높은 투여량에서는 이전에 두꺼운 생물막이

위치했던 유리에 생물막 반점만 남게 되었다. DPD의 추가 첨가는 얇은 생물막의 나머지 부분을 제거하지 못했다.

[0234] 표 5. 다양한 투여량의 DPD를 첨가한 후 종속 영양 성장 생물막의 가용화 동안 방출된 세포 수. 호기성, 혐기성/미호기성 및 진균성 CFU의 수는 본 명세서에 기술된 바와 같은 표준 작업 절차에 따랐다.

DPD 투여량 (순수 DPD ul /배양물 1)	총 투여량 DPD(누적) (ul/l)	24시간 후 호기성 CFU (x 1000)	24시간 후 혐기성 CFU (x 1000)	24시간 후 진균성 CFU (x 1000)
0	0	413333	48333	31000
0,50	1	400000	45333	33333
1,00	2	440000	43333	29000
5,00	7	390000	43333	35000
10,00	17	403333	39333	25333
50,00	67	376667	40333	24000
50,00	117	426667	37667	22333
50,00	167	563333	43000	18333
50,00	217	1766667	267000	18667
50,00	267	1413333	340000	17000
50,00	317	936667	100000	223333
50,00	367	163333	35667	273333
50,00	417	107333	19333	24333
50,00	467	103333	9333	12667
50,00	517	98333	5467	8000

[0235] 표 5에 따르면, DPD(화학식 III의 예시적인 화합물)는 약 167 ul/l의 총 투여량 이후에 생물막에 영향을 미치기 시작하는 것으로 보인다. 더 높은 농도에서 호기성, 혐기성/미호기성 및 진균성 CFU의 감소는 더 높은 투여량에서 DPD가 플랑크톤 미생물에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

[0237] 표 6. PBR 배지에서 지시된 화합물에 의한 처리 전후의 생물막에서 콜로니 형성 단위의 총 수

[0238] 0*은 생물막이 사라졌음을 의미한다.

PBR 실험	배양물 부피에 대한 생물막 부피 %	총(생물막에서 방출) 콜로니 형성 단위/ml(x 1000)	
실험 1(PTSO)(중속 영양 농축 배양물)		생물막에서	배양 상층액에서
치료 시작 전	18	205,000	365
0.9 mg 순수 PTSO/배양물 1	0	0*	42,000
실험 2(PTS)(중속 영양 농축 배양물)			
치료 시작 전	11	36,000	2,068
20 mg 순수 PTS/배양물 1	0	0	3,403
실험 3(DPD)(중속 영양 농축 배양물)			
치료 시작 전	7	52,000	493
208 mg 순수 DPD/배양물 1	0	0	3,403

[0239]

[0240] 표 6의 데이터로부터 놀랍게도 생물막에서 검출되는 미생물의 수의 변동이 높음에도 불구하고 아마도 생물막의 높은 이질성으로 인해 표시된 분자의 생물막 박멸 효과가 미생물을 죽이고 생물막 가용화에 의해 생물막을 가용화하는 것이 아니라 그러한 방식으로 미생물 생리학을 변경함으로써 생물막만이 불안정화되고 가용화된다는 것이 분명해졌음을 입증했다.

[0241] 실시예 3. 시험관내 생물막 분석

[0242] 연구 설계: 생물막 형성은 그람 양성 황색 포도상구균 (*S. aureus*) 및 그람 음성 녹농균 (*P. aeruginosa*)으로 연구되었다. 이 표본은 잠재적인 병원체이며 2개의 PTSO 함유 샘플의 생물막 박멸 효과를 시험관 내에서 조사했다.

[0243] 시험된 조성물은 다음과 같은 조성을 갖는다:

[0244] QS1: 236mg PTSO/PTS가 풍부한 식물 추출물과 530mg/리터 PTSO 및 133mg/리터 PTS를 250ml 탈염수와 혼합했다.

[0245] QS2: 실시예 1에 나타난 바와 같이 수득된 135mg의 순수 PTSO를 밤새 교반함으로써 250ml의 탈염수로 희석하고, 이는 물 중 540mg/리터 PTSO에 상응한다.

[0246] 생물막 형성은 그람 양성 황색 포도상구균 ATCC 6538 (*S. aureus*) 및 그람 음성 녹농균 ATCC 9027 (*P. aeruginosa*)를 사용하여 연구되었다. 실험 방법은 ASTM-E2799-17 (MBEC 분석 ASTM International, West Conshohocken, PA, 2017을 사용하여 녹농균 생물막에 대한 소독제 효능을 테스트하기 위한 표준 테스트 방법)로부터 채택되었다. 이 방법에서는 녹농균이 사용되었으며 이 실시예에서는 황색 포도상구균에 대한 효과를 테스트하기 위해 동일한 테스트도 적용되었다. 최소 생물막 박멸 농도(Minimum Biofilm Eradication Concentration; MBEC) 분석은 다양한 미생물의 생물막에 대한 제제의 효능을 결정하기 위한 고처리량 스크리닝 도구이다. 96웰 플레이트에서 성장한 생물막에 대한 QS1 및 QS2의 효과를 테스트하기 위해 두 가지 방법이 사용되었다. 도 1a는 미량정량판(microtiter plate)에서 생물막을 측정하는 데 사용되는 방법을 도시하고, 그림 1b는 페그(peg) 상에서 생물막 형성을 측정하는 방법을 도시한다.

[0247] 간단히 말해서, 녹농균 및 황색 포도상구균의 밤새 배양물을 0.1(OD600)로 희석하였다. 이후, 박테리아 현탁액을 1:9 비율로 최소 또는 풍부한 배지에서 96개의 웰 플레이트에 피펫팅하였다. 최소 배지의 구성은 다음과 같다; 카제인, 0.5%; 글루코스, 2g/l; $MgSO_4$, 1mM; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5mg/L. pH를 pH 7.3으로 설정한 후 멸균하였다. 풍부한 배지에는 다음과 같은 영양소가 포함되어 있다; 카제인 펩톤, 17g/L; 소이 펩톤, 3g/L; 디-칼륨 수소 포스페이트, 2.5g/L; 염화나트륨, 5g/L; 글루코스 일수화물, 2.5g/L. pH를 7.3으로 설정한 후 멸균하였다. 96개 웰 플레이트를 37°C에서 24시간 동안 배양하고 생물막이 형성되었다. 이후 도 1과 같이 생물막을 시험 용액에 노출시킨다.

[0248] 초기 생물막 형성은 0 내지 24시간 기간에 발생하고 늦은 생물막 형성은 24 내지 48시간 기간에 발생한다. 현탁

액을 버리고 웰/페그를 탈염된 H₂O로 세척한다. 이어서 크리스탈 바이올렛(0.1%)을 첨가하고 15분 동안 염색을 수행하고; 이후에는 H₂O로 탈염하여 세척한다. 따라서, 생물막은 실시예 4에서와 같이 아세트산으로 오염물을 제거하고 미량정량판으로 옮겨졌다. 흡광도는 550nm에서 측정되었다.

[0249] **결과 및 논의:**

[0250] MBEC 분석은 도 2에서와 같이 생물막(형성)에 대한 QS1 및 QS2의 영향을 결정하는 데 사용되었다. 결과는 퍼센트 성장으로 표시되고 (실행기가 없는 박테리아에 대해 100%로 정규화됨); 'peg'(도면)라는 단어의 추가는 폴리스티렌 원뿔 상에서의 성장을 나타내고; 'peg'가 없는 것은 미량정량판의 웰 내부에서의 성장을 나타낸다. 도 2a (늦은 생물막 형성)에서 도시된 바와 같이, QS1 및 QS2가 두 박테리아 표본 모두에 대해 풍부한 배지에 추가될 때 웰에서 성장 억제가 관찰되었다. 또한, QS1 및 QS2를 첨가하면 최소 배지 조건에서 웰과 페그(peg) 상에서 녹농균 및 황색 포도상구균의 성장 억제가 발생했다(도 2b).

[0251] 생물막 분석(ASTM-E2799)을 근거로, 녹농균 및 황색 포도상구균에서 QS1 및 QS2에 의한 명확한 생물막 억제 성장 효과가 관찰되었다. 두 박테리아의 생물막은 생물막 형성 동안 본 분석에서 QS1 및 QS2에 의해 강하게 영향을 받았다.

[0252] **실시예 4. 시험관내 생물막 분석**

[0253] **범위:** 본 명세서에 기술된 바와 같이, 플랑크톤 미생물에 대한 화합물의 효과는 생물막에 대한 이러한 화합물의 효과를 나타내지 않는다. 그러나 생물막 감염을 연구하기 위한 시험관 내 모델이 개발되었으며 이러한 모델의 결과는 생체 내 효과를 더 잘 예측할 수 있다. 예를 들어, Bahamondez-Canas et al. Biomedicines. 2019 Jun; 7(2): 34는 상처 생물막 감염을 연구하기 위한 다수의 시험관 내 모델을 설명한다. 이 예에서는 잠재적인 병원성 박테리아 황색 포도상구균 및 우베리스 연쇄상구균(*Streptococcus uberis*), 젖소의 유선염 및 인간의 황색 포도상구균과 관련된 미생물 표본의 다양한 균주를 사용하여 시험관 내 실험을 수행했다.

[0254] **연구 설계:**

[0255] 이 실시예에서는 다음 박테리아 균주를 사용했다.

[0256] ATCC 무리에서 얻은 황색 포도상구균 ATCC 25923; 유선염이 있는 젖소에서 분리된 임상 균주로 설명된 황색 포도상구균 074는 네덜란드 위트레흐트 대학교 수의학부 교수 Fin가 친절하게 제공했다. 균주에 대한 정보는 다음에서 추가로 제공된다: Melchior, M. B., Fink-Gremmels, J., & Gastra, W. (2006). Comparative Assessment of the Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis in Biofilm Versus Planktonic Culture. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 53(7), 326-332; ATCC 무리에서 수득한 황색 포도상구균 ATCC 15564 및 유선염이 있는 젖소에서 임상적으로 분리한 우베리스 연쇄상구균, 불가리아 Trakia 대학의 수의 미생물학, 감염 및 기생충 질병과 수집의 일부이다.

[0257] 최소 생물막 억제 농도(MBIC) 및 미세역가 생물막 박멸 농도(MBEC)는 표 7에 표시된 바와 같이 정의 및 측정된다.

[0258] 표 7. 이 연구에서 MBIC 90 및 MBEC 결정에 적용된 방법.

매개변수	참조	정의
MBIC 90	Haney EF, Trimble MJ, Cheng JT, Vallé Q, Hancock REW. Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides. Biomolecules. 2018 May 21;8(2):29.	90% 이상의 생물막 형성을 억제하는 최저 농도
MBEC	Cruz CD, Shah S, Tammela P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. BMC Microbiol. 2018 Nov 3;18(1):173.	사용된 분석의 검출 한계 미만으로 생물막 세포 수를 줄이는 데 필요한 최소 농도

[0259]

[0260] 표 7에 요약된 방법을 적용하여, 상기 언급된 박테리아를 실시예 1에 기재된 바와 같은 PTSO/PTS 농축 식물 추출물, 순수 PTSO 및 순수 PTS 및 실시예 2에 기재된 바와 같은 DPD로 시험하였다. 결과는 아래 표에 나와 있다.

[0261] 표 8: 황색 포도상구균 균주 및 우베리스 연쇄상구균용 MBIC 90.

박테리아 균주	PTSO/PTS 농축 식물 추출물 $\mu\text{g/ml}$	DPD $\mu\text{g/ml}$	PTSO $\mu\text{g/ml}$	PTS $\mu\text{g/ml}$
황색 포도상구균 ATCC 25923	64	>1024	128	128
황색 포도상구균 074	64	>1024	128	128
황색 포도상구균 ATCC 15564	64	>1024	128	128
우베리스 연쇄상구균	>64	>1024	128	512

[0262]

[0263] 표 9: 황색 포도상구균 균주 및 우베리스 연쇄상구균에 대한 MBEC(생물막 박멸).

박테리아 균주	PTSO/PTS 농축 식물 추출물 µg/ml	DPD µg/ml	PTSO µg/ml	PTS µg/ml
황색 포도상구균 ATCC 25923	512	>1024	512	>1024
황색 포도상구균 074	512	1024	256	256
황색 포도상구균 ATCC 15564	512	>1024	256	256
우베리스 연쇄상구균	256	>1024	512	64-128

[0264]

[0265] 가장 낮은 MBEC 값은 PTSO/PTS 농축 식물 추출물에서 관찰되었으며, 그 다음이 PTSO 단독 및 PTS 단독이었다. 로그 희석 시리즈로 데이터를 취득할 때, 수치적 차이는 희석 단계를 하나만 나타낸다. 종합하면, 시험관내 실험은 본 발명의 화합물의 항생물막 활성을 입증하였으며, 이는 하기 실시예에 기재된 임상적 발견에 의해 뒷받침된다.

[0266]

실시예 5 내지 8: 생체 내 생물막 관련 질환의 치료

[0267]

본원에 개시된 화합물의 생체내 효과를 입증하기 위해, PTSO 및 PTS를 생체내 다수의 생물막 관련 질환에 대해 시험하였다.

[0268]

젖소 유선염은 매년 전 세계적으로 수백만 마리의 젖소에게 영향을 미치는 질병이다. 이 질병은 매우 상이한 다양한 박테리아 및 경우에 따라 젖소의 유선을 침범하여 지속적인 감염과 염증 반응을 일으키는 효모에 의해 발생한다. 소의 유선염은 다양한 그람 양성 및 그람 음성 병원체를 유발할 수 있으며 개별 병원체의 유병률은 국가와 대륙에 따라 어느 정도 다를 수 있다. 모든 형태의 유선염의 가장 두드러진 임상 징후는 유방 조직의 (만성) 염증 반응으로 인해 인간이 섭취하도록 의도된 우유의 체세포 수의 바람직하지 않은 증가이다. 이 2차 염증은 우유 생산을 감소시켜 농부에게 심각한 경제적 손실을 초래한다. 지난 수십 년 동안 유선염의 원인으로 진단된 1차 감염원을 치료하기 위해 단독으로 또는 조합하여 다양한 종류의 항생제를 포함하는 수많은 약제학적 제품이 표시되어 있다. 이러한 약제학적 제품은 박테리아 감염과 싸우기 위해 전신적으로(주사) 또는 유두 채널을 통해 국소적으로 제공된다. 그러나 이러한 큰 노력에도 불구하고, 젖소 유선염은 일반적으로 일시적으로만 효과가 있는 항생제 요법과 많은 원인에서 유선염의 임상 지표인 체세포 수(SCC)가 높게 유지되어 우유 생산량에 부정적인 영향을 미치기 때문에 젖소에서 가장 만연한 질병으로 남아 있다.

[0269]

유선염은 알려진 생물막 관련 질환이다. 박테리아 생물막의 형성은 박테리아 생물막 형성을 선호하는 조건에서 유선염 병원체를 배양하는 시험관내 실험(염색 후 정량화 가능하고 생물막 형성을 유도하는 유전자 측정)과 감염된 젖소의 유방 조직에서 생물막 기질을 염색하여 그대로 입증되었다. 예를 들어, Schonborn S and Kromker V (2016 Journal Veterinary Microbiology, 30:196:126-128)의 도 1은 유선염으로 고통받는 젖소로부터 유방 조직의 생물막 기질을 도시한다.

[0270]

지난 10년 동안의 생물의학 연구에 따르면 생물막 형성은 유방 감염과 젖소 유선염의 경우뿐만 아니라 인간과 동물의 조직에 침입하여 지속적인 감염과 염증을 일으키는 미생물의 일반적인 특성이다. 현재까지 미생물 생물막은 인간과 동물의 감염성 질병에 대한 현대 치료에서 해결되지 않은 주요 과제 중 하나이다.

[0271]

하기 실시예에서 제공된 임상 증거는 젖소 유선염 및 감염된 만성 상처(예를 들어, 디지털 피부염 및 UCD)와 같은 중요한 생물막 질병의 치료에서 PTSO(및 덜 파생된 PTS)의 예상치 못한 치료 효과를 보여주었다. PTSO의 적용이 처리된 젖소의 체세포 수의 오래 지속되는 안정적인 감소와 직접적인 관련이 있음을 입증하는 여러 현장

추적이 설명되어 있으며, 이는 박테리아 치료 및 조직 재생을 제안한다. 추가 실시예는 생물막과 관련된 만성 상처(즉, 디지털 피부염 및 UCD(Udder Cleft Dermatitis))에 대한 영향을 기재한다.

[0272] 이러한 발견은 일반적인 항생제가 생물막 감염에 효과가 없다는 것이 일반적으로 인식되고 있기 때문에 주목할 만하다. 이러한 관찰은 인간 및 수의학의 수많은 과학 기사에 설명되어 있으며, 모두 반복적이고 지속적인 감염과 조직 염증 및 손상의 주요 원인으로 생물막 형성을 제안한다. 원형 생물막 감염에 대한 PTSO 및 PTS의 제시된 실험(시험관 내) 및 생체내(임상 관찰) 효능은 이러한 화합물이 생물막 감염을 예방하고 해결하기 위해 임상 실험에서 효과적으로 사용될 수 있음을 보여준다. 생물막 형성 및 분해는 분자와 미생물 간의 직접적인 상호작용으로 발생하므로 숙주(동물 또는 인간)와 무관하다. 생물막 형성에 관여하는 기전은 박테리아 종 사이에 고도로 보존되어 있기 때문에 화합물이 인간과 동물의 광범위한 생물막 감염에 대해 효과적이라고 가정할 수도 있다. 실시예는 또한 PTSO 및 PTS가 경구 투여될 수 있고 별개의 부위(예를 들어, 유선 및 발톱)에서 효과를 발휘할 수 있음을 보여준다.

[0273] **실시예 5 유선염**

[0274] *범위*

[0275] 우유의 세포 수 또는 체세포 수(SCC) 상의 3.84g PTSO와 0.96g PTS가 포함된 정제의 효과를 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

[0276] SCC는 면역계에서 볼 수 있는 구역(quarter)에 있는 병원체의 양과 관련이 있다. 각 젖소의 세포 수는 우유 생산 등록(MPR)으로 측정되었다. 이 MPR은 모든 농장에서 30 내지 40일마다 주기적으로 수행된다.

[0277] 체세포 수(SCC)는 우유 품질의 주요 지표이다. 체세포의 대부분은 유선염을 유발하는 병원체에 대한 면역 반응으로 보통 우유에 점점 더 많이 존재하는 백혈구(백혈구)와 감염이 발생했을 때 유방 내부에서 흘러나오는 우유 생산 세포인 소수의 상피 세포이다. 염증은 종종 유방 구역 중 하나에서 발생하여 이 유방에서 세포 수가 증가한다. 그러나 유방의 다른 구역 중 하나와 희석되기 때문에 세포 수의 총 증가는 더 낮아질 것이다. SCC는 우유 1ml당 세포 수로 정량화된다. SCC는 예를 들어 유선염을 유발하는 병원체에 의한 (무증상) 유방 감염의 존재를 나타내고 우유 품질의 주요 지표를 제공한다. SCC와 유선염의 관계는 Sharma et al., 2011 Asian-Aust J Anim Sci 24:429-438에서 검토된다.

[0278] *SCC 및 MPR*

[0279] SCC 데이터는 우유 생산 등록(MPR)에서 추출되었다. MPR은 개별 젖소당 생산된 우유의 모든 세부사항(예를 들어, SCC)을 보여주는 데이터베이스이다. 선택된 농장의 MPR은 30 내지 40일마다 주기적으로 제공되었다. SCC는 우유 1ml당 세포 수로 정량화된다. 일반적으로 SCC 값이 100,000 이하인 개별 젖소는 '감염되지 않은' 젖소를 나타내며 무증상 유선염으로 인한 상당한 생산 손실이 없었다. 150,000의 임계값 SCC는 젖소가 유선염에 감염되었는지 여부를 결정한다. 150,000개 이상의 결과를 가진 젖소는 적어도 한 구역에 감염될 가능성이 높다. 중요한 병원체에 감염된 젖소의 SCC는 300,000 이상이다.

[0280] *실시예 5.1*

[0281] 상기 기재된 정제에 의한 18마리의 젖소의 세포수 조사.

[0282] 상기 정제로 9마리의 젖소에서 세포수에 대한 조사 및 11마리의 무처리 젖소와의 비교.

[0283] 3개의 농장이 연구를 위해 선택되었다. 표 10은 농장의 규모와 생산된 우유에 대한 정보를 보여준다.

[0284] 표 10: 실시예 5.1에 사용된 농장에 대한 설명

	농장 1	농장 2	농장 3
농장 규모	550마리 젖소	200마리 젖소	250마리 젖소
리터 수(연간 젖소당 평균)	11.500 리터	11.200 리터	8.200 리터
우유의 평균 지방 비율	4.0 %	4.6 %	4.3 %
우유의 평균 단백질 비율	3.5 %	3.7 %	3.5 %
착유 방법	로봇 착유	로봇 착유	로봇 착유
야외로의 접근	예	예	예

[0285]

[0286] 250,000개 세포/ml 이상의 처리 전 SCC를 갖는 젖소를 정제 투여를 위해 선택하였다. 각 농장에서 다음 수의 젖소가 선택되었다:

[0287]

- 농장 1에서: 6마리 젖소;

[0288]

- 농장 2에서: 7마리의 젖소;

[0289]

- 농장 3에서: 5마리 젖소.

[0290]

이것은 총 18마리의 젖소에서 결정되었다.

[0291]

SCC 데이터는 치료 전과 치료 후 3개의 MPR에서 분석되었다.

[0292]

결과 및 논의

[0293]

18마리 젖소의 우유의 수와 평균 체세포 수는 표 11에 나와 있다. 처리 후 모든 젖소는 MPR 3에서 150,000개 세포/ml 미만의 세포 수가 있었다. MPR3는 치료 후 약 80 내지 100일이다. 총 60%가 100,000개 세포/ml 미만의 세포 수를 갖는다.

[0294] 표 11. 18마리 젖소의 우유 수 및 평균 체세포 수(x 1000).

	젖소 번호	체세포 수			
		MPR 0	MPR 1	MPR 2	MPR 3
농장 1	젖소 1	385	856	106	45
	젖소 3	289	145	148	133
	젖소 4	256	85	105	104
	젖소 5	304	19	30	32
	젖소 6	371	243	59	17
	젖소 9	2354	1077	507	91
농장 2	젖소 2	311	45	27	53
	젖소 5	361	816	345	119
	젖소 6	444	168	356	17
	젖소 8	473	126	139	115
	젖소 10	265	18	33	131
	젖소 11	414	124	623	198
	젖소 12	318	507	84	46
	젖소 1	3096	223	19	24
	젖소 2	258	25	17	26
	젖소 3	580	115	82	51
	젖소 5	358	14	9	14
농장 3	젖소 8	228	107	52	178
	평균	615	262	152	77

[0295]

[0296]

결론

[0297]

정제 처리 후 우유의 SCC가 선택된 젖소에서 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 PTS0/PTS가장에서 흡수된 후 혈류로 들어가는 것을 분명히 보여주었기 때문에 매우 놀랍다. PTS0/PTS는 본원에 기재된 유선염 임상 시험에서 경구로 주어졌다. 임상적으로 상당한 효과가 유방 조직에서 관찰되었기 때문에, 이는 PTS0/PTS가 반추위를 통과할 뿐만 아니라(반추위 미생물에 대한 안정성을 나타냄) 간 후 혈류에도 도달함을(경미하거나 미미한 간의 생체 변형 및 불활성화를 나타냄) 시사하고, 궁극적으로 유선은 치료적으로 효과적인 농도로 제공된다. 이 실시예는 정제가 SCC를 효과적으로 감소시킴에 따라 유방 관련 감염에 대한 우수한 치료 효과를 나타낸다. 또한, 모든 젖소는 MPR 3 후 150,000 세포/ml보다 낮은 SCC를 나타내어 본 연구의 모든 개별 젖소에 대한 효과를 나타낸다.

[0298]

실시예 5.2

[0299]

분석을 위해 농장 1 및 농장 2가 아래 표시된 바와 같이 사용되었다. MRP0(처리 전)의 세포 수를 기준으로 젖소를 선택했다. 200.000 세포/ml 및 500.000 세포/ml 사이의 젖소는 같은 기간에 3.84g PTS0와 0.96g PTS가 포함된 정제로 처리되거나 처리되지 않았다.

[0300]

처리된 그룹의 젖소에 대해 다음 수의 젖소를 선택했다.

[0301]

농장 1: 젖소 5마리

[0302]

농장 2: 젖소 4마리

[0303]

처리되지 않은 그룹의 젖소에 대해 다음 수의 젖소가 선택되었다.

[0304] 농장 1: 젖소 5마리

[0305] 농장 2: 젖소 6마리

[0306] 처리된 그룹과 처리되지 않은 그룹에 대해, 150,000 세포/ml SCC 수치는 어린 젖소(어린 암소)의 우유에서 건강한 최대 세포 수치를 기반으로 선택되었다. 이 수치 미만의 젖소의 비율은 표 12에 나와 있다. 그 결과, 처리된 그룹에서 150,000 미만의 젖소 비율이 증가하는 반면 처리되지 않은 그룹은 증가하지 않는 것으로 나타났다. 처리된 그룹은 MPR4 후에 마침내 100%에 도달한다. 처리되지 않은 젖소는 SCC에서 큰 확산을 보였고 세포 수의 임의의 상당한 감소를 나타내지 않았다.

[0307] 표 12: 처리가 있거나 없는 150,000 세포/ml 미만의 SCC를 나타내는 젖소의 비율 및 관련 P-값. 실험의 모든 젖소가 각 MPR의 SCC에 대해 테스트된 것은 아니다: 이는 마지막 2개 열에 표시된다.

	150.000 세포/ml 미만으로 처리된 비율 (평균 SCC x 1000)	150.000 세포/ml 미만으로 처리되지 않은 비율	P-값	SCC에서 테스트한 젖소의 수	SCC에서 테스트되지 않은 젖소의 수
MPR0 (치료 전)	0% (290)	0% (290)		9	11
MPR1	89% (159)	36% (431)	0.028	9	11
MPR2	89% (111)	18 % (322)	0.005	9	11
MPR3	89% (77)	33% (212)	0.050	9	9
MPR4	100% (75)	29% (320)	0.021	7	7

[0308]

[0309] 200.000 내지 500.000 세포/ml 사이의 세포 수가 있는 젖소에 대한 정제 투여는 처리되지 않은 젖소와 비교하여 체세포 수를 감소시키는 데 효과적인 것으로 분명히 나타났다.

[0310] 실시예 5.3

[0311] 이 연구는 80마리의 최소 소떼 규모(Holstein)로 착유 로봇을 사용하여 9개 농장에서 수행되었다. SCC가 증가한 젖소만 포함되었다. 젖소는 밀리리터당 300,000개 이상의 세포가 측정될 경우 증가된 SCC를 갖는 것으로 간주된다. 젖소는 비수유 기간 전 5개월까지 수유 초기 단계에 있었다. 이러한 방식으로 더 오랜 기간 동안 모니터링할 수 있다.

[0312] SCC 데이터는 MPR을 기반으로 수집되었다. 3.84g의 PTS0와 0.96g의 PTS가 포함된 정제로 처리된 젖소를 SCC에 대한 효과에 대해 분석했다. 이후 SCC 감소를 보인 젖소 수와 총 세포 수 감소에 대한 데이터를 평가하였다. 또한 연령의 영향이 있는 경우 수유 단계가 상이한 젖소 그룹 간에 비교가 이루어졌다.

[0313] 정제 투여 후 SCC 감소

[0314] MPR 데이터 세트당 SCC 감소를 나타내는 젖소의 양에 대한 결과는 표 13에 표시된다. 정제 투여 후 첫 번째 MPR은 63마리의 젖소 모두에 대해 이용 가능했다. 44마리의 젖소에 대해 정제 투여는 SCC를 효과적으로 감소시켰다. 42마리의 젖소의 경우 SCC는 300,000세포 미만이었다. 48마리의 젖소에 대해 두 번째 MPR 측정이 가능했다. 31마리의 젖소의 경우, 정제 투여 전보다 SCC가 낮았다. 그 중 31마리의 소는 300,000 세포 미만의 SCC를 보였다. 세 번째 MPR 측정은 12마리의 젖소에만 사용할 수 있다. 이 12마리의 젖소 중 9마리의 젖소는 정제를 투여하기 전보다 여전히 세포 수가 적었다.

[0315] 또한, 세포 수의 총 감소도 평가되었다. 첫 번째 MPR의 결과는 표 14에 나열되고, 두 번째 MPR의 결과는 표 15

에 나열된다. 결과는 SCC의 감소를 나타내는 대부분의 젖소가 100,000 내지 500,000개의 세포 그룹으로 분류된다는 것을 보여준다. 정제 투여 전 평균 SCC 감소량과 투여 후 평균 SCC 감소량을 비교하면 평균 감소량은 250,000 세포/ml이다.

표 13: 세포 수가 감소된 젖소 수(SCC)

	젖소의 총 수	감소된 젖소 수	300K 미만의 세포수를 갖는 젖소 수
정제 후 첫 번째 MPR	63	44	42
정제 후 두 번째 MPR	48	31	31
정제 후 세 번째 MPR	12	9	8

표 14: 첫 번째 MPR에서 세포 수 감소

세포에서 감소	젖소의 수	비율
0 내지 100.000개 세포	11	17%
100.000 내지 500.000개 세포	19	30%
501.000 이상의 세포	12	19%
효과 없음	21	33%

표 15: 두 번째 MPR에서 세포 수 감소

세포에서 감소	젖소의 수	비율
0 내지 100.000개 세포	6	13%
101.000 내지 500.000개 세포	17	35%
501.000 이상의 세포	8	17%
효과 없음	17	35%

수유기

어린 젖소(첫 번째 또는 두 번째 수유기)는 나이트 동물보다 정제 투여 후 SCC 감소에서 더 두드러진 효과를 나타낼 수 있다. 연구에 포함된 63마리의 젖소 중 32마리는 첫 번째 또는 두 번째 수유(어린 젖소)에 있고, 나머지 31마리는 세 번째부터 여섯 번째까지 다양하다. 첫 번째 또는 두 번째 수유 중인 젖소 중 총 32마리의 젖소 중 23마리가 세포 수 수치가 감소했다(72%). 이미 여러 차례 수유를 한 31마리의 젖소에 대해 18마리의 젖소에서 세포 수 수치가 감소했다(58%). 놀랍게도 이것은 치료가 첫 번째 또는 두 번째 수유 중인 젖소에 더 나은 효과가 있음을 나타낸다. 어린 젖소의 경우 두 번째 MPR 측정 후에도 세포 수가 더 낮게 유지되었다. 이것은 (무임상) 유선염의 존재 표시로 간주되는 SCC 감소에 대한 PTSO/PTS 함유 정제의 효능을 명확하게 보여준다.

실시예 5.4

SCC 값이 높은 젖소의 우유는 플록(floc)으로 우유에서 선택할 수 있는 생물막에서 조사되었다. SCC가 높은 소의 신선한 우유에서 플록이 분리되었다. 현미경 관찰을 위해 샘플을 준비하고(표준 그래프 염색 및 크리스탈 바이올렛으로 염색) NIKON 형광 현미경을 사용하여 관찰했다. 박테리아가 검출되었다. 생물막을 한천 플레이트에 플

레이팅하고 박테리아를 분리했다.

- [0326] 황색 포도상구균의 경우, 100ul 우유 샘플을 3.5% L-텔루라이트가 포함된 5% 난황 에멀전이 있는 Baird-Parker 한천에 플레이팅했다. 플레이트를 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 양 혈액 한천에서 동정된 (identified) 황색 포도상구균 콜로니의 순수 배양물을 제조하였다. 우베리스 연쇄상구균의 분리와 관련하여, 100ul 우유 샘플을 10mg/ml 폴리믹신 및 네오마이신과 함께 양 혈액 한천에 플레이팅하고, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 콜로니를 채취하고 5% 양 혈액 한천에 다양한 플레이팅을 하여 순수 배양물을 제조하였다. 분리된 균주를 1.5ml TSB(트립톤 소이 브로스)-배지 + 20% 글리세롤에 동결시켰다. 균주 식별은 Vitek2 (Biomérieux Benelux B.V., Amersfoort, The Netherlands)에 의해 수행되었다.
- [0327] 생물막의 제조를 위해, 세포를 TSB-배지에서 10^8 CVE/ml의 농도로 희석하였다. 20 ul를 96 웰 플레이트에서 2 g/l 글루코스를 함유하는 180 ul TSB 배지로 옮겼다. 플레이트를 스테이킹(staking) 없이 37℃에서 5일 동안 배양하였다. 이후, 과량의 배지를 제거하고 생물막을 과량의 PBS 포스페이트 완충 염수로 행구었다. 웰을 공기 중에서 건조시키고 상기에 기재된 바와 같이 현미경 염색 및 분석을 위해 준비했다.
- [0328] 우유에 대한 효과는 PTSO/PTS 정제 (3.84g PTSO + 0.96g PTS)를 젖소에 투여한 후 며칠 동안 모니터링했다.
- [0329] *결과 및 논의*
- [0330] 우유에서 분리된 생물막의 현미경 관찰은 생물막 관련 세포의 존재를 분명히 보여주었다. 이 세포는 순수 배양물을 준비하는 데 사용되었으며 황색 포도상구균 및 우베리스 연쇄상구균으로 확인되었다. 그런 다음 생물막을 시험관 내에서 배양했다. 이것은 유선염 감염과 관련하여 생물막의 관여를 분명히 보여주었다.
- [0331] 젖소에게 PTSO/PTS 정제를 투여한 직후, 처리된 젖소의 우유가 유방에서 나올 때 덩어리를 포함했다(도 3a 및 3b). 부서지기 쉬운 우유는 며칠 동안 유방에서 나오고 그 후에 젖소는 다시 정상적인 우유를 생산하기 시작했다. 이후에는 유방의 붉은 감염색이 사라지고 이후 몇 주 동안 SCC가 크게 감소했다. 위에서 설명한 관찰은 PTSO/PTS 정제 투여 후 유선염의 일반적인 치유 과정이다.
- [0332] *실시예 5.5*
- [0333] 세포 수는 유방 건강에 대한 중요한 지표이며 3.84g PTSO와 0.96g PTS를 포함하는 정제가 유방 건강에 미치는 영향을 연구하기 위해 측정된다. 두 개의 다른 농장에서 온 20마리의 젖소로 구성된 두 그룹을 검사한다. 젖소는 마지막 MPR 또는 마지막에서 두 번째 MPR에서 세포 수가 250,000 세포/ml 한도를 초과할 때 선택된다. 연구 그룹의 각 젖소는 PTSO/PTS 정제를 제공하기 전에 샘플링된다. 정제를 받은 후 젖소를 매주 1회 샘플링하여 3개월 동안의 체세포수 분석 및 3개월에 걸쳐 매주 세포수 분석을 수행하였다.
- [0334] 매주 측정된 두 농장의 평균 세포 수는 표 16에 나와 있다.

[0335] 표 16: 농장 1과 농장 2에서 3개월 동안 측정된 평균 세포 수.

주	세포 수-농장 1 (x 1000 세포/ml)	세포 수-농장 2 (x 1000 세포/ml)
0	742	562
1	797	1487
2	988	1410
3	816	739
4	1162	1102
5	530	676
6	409	936
7	201	738
8	169	292
9	180	312
10	273	200
11	242	403
12	206	389

[0336]

[0337] 두 농장의 결과는 처음 약 6주 동안 세포 수가 급격히 감소한 후 7주 후에 점진적으로 감소함을 나타낸다. 투여량의 예상 효과와 일치한다. 결론은 PTS0/PTS-정제의 첫 번째 투여량으로 처리한 후 세포 수가 250,000개 세포/ml보다 높은 젖소는 세포 수가 약 250,000개 세포/ml로 크게 감소한 것으로 나타났다. 이 실시예에서 SCC 감소에 대한 효과가 현저하게 길다는 것이 입증되었다.

[0338] 실시예 5.6

[0339] 4개의 개별 농장과 총 47마리의 젖소를 대상으로 3.84g PTS0와 0.96g PTS가 포함된 정제가 SCC에 미치는 영향을 조사했다.

[0340] 연구 설계

[0341] 농장 1: 11마리의 젖소, 첫 번째 처리 후 총 3개의 MPR.

[0342] 농장 2: 8마리의 젖소, 첫 번째 처리 후 총 9개의 MPR.

[0343] 농장 3: 16마리의 젖소, 첫 번째 처리 후 총 13개의 MPR.

[0344] 농장 4: 12마리의 젖소, 첫 번째 처리 후 총 2개의 MPR.

[0345] 농장에 대한 추가 데이터는 표 17에 나열되어 있다.

[0346] 표 17. 농장 1 내지 4의 데이터.

	농장 1	농장 2	농장 3	농장 4
농장 규모	170 마리 젖소	200 마리 젖소	100 마리 젖소	250 마리 젖소
리터 수(연간 젖소당 평균)	8,000 리터	11,200 리터	9,000 리터	10,000 리터
착유 방법	팔러 착유(Parlour milking)	로봇 착유	팔러 착유	로타리 착유(Rotary Milking)
야외로의 접근	예	예	예	예

[0347]

[0348] 결과 및 논의

[0349] 각 농장의 우유의 평균 세포 수는 표 18에 나와 있다.

[0350] 표 18

	MPR 0	MPR 1	MPR 2	MPR 3	MPR 4
평균	1856.787	707.5319	447.3261	225.3438	213.7727
젖소의 수	47	47	46	32	22

[0351]

[0352] 모든 경우에 SCC 수는 치료 후에 낮아진다. 농장 2 및 3의 경우 지속적으로 낮은 SCC 값을 보여주는 다중 MPR을 사용할 수 있다. 이것은 장기간에 걸쳐 SCC 감소에 대한 정제의 효과를 나타낸다.

[0353] 실시예 5.7

[0354] 캘리포니아 헨포드에 있는 5,500마리의 젖소 농장에서, 체세포 수와 우유 생산 통계를 매월 측정하여 3.84g PTSO와 0.96g PTS가 포함된 정제가 유방 건강에 미치는 영향을 연구했다. 젖소는 아래에 표시된 바와 같이 다양한 기준에 따라 선택되었고 아래 표시된 대로 처리되었다. SCC 저하에 대한 PTSO/PTS 정제 대 대조군의 효능을 테스트했다.

[0355] 목적은 치료 후 다음 그룹을 비교할 때 상당한 차이가 있는지 여부를 조사하는 것이었다.

[0356] · PTSO/PTS 처리군 대 대조군에서의 더 낮은 총 평균 SCC

[0357] · PTSO/PTS 처리군 대 대조군에서의 20K 미만의 더 많은 젖소

[0358] · PTSO/PTS 처리군 대 대조군에서의 100K 미만의 더 많은 젖소

[0359] 먼저 젖소를 다음 그룹으로 분류했다:

[0360] 무증상의 높은 SCC 젖소를 지원하기 위해 PTSO/PTS를 사용한 농장 시험의 선택 기준

[0361] · 현재 SCC >200,000(SCC>200)

[0362] · 이전 SCC >200,000(PSCC>200)

[0363] · 첫 번째 및 두 번째 수유 동물(LACT<3)

[0364] · 유선염 치료 횟수(XMAST) <3

[0365] · "번식 금지" 젖소가 아님

[0366] · 건조 후 60일 이내가 아님. DCC < 145(이는 Days Carried Calf(현재 임신한 동물의 현재 임신 기간)를 의미한다). 최소 2개월의 추가 테스트 날짜 SCC 데이터가 필요했기 때문에 데이터를 얻기 전에 젖소가 말라붙지 않았다.

[0367] · 두 개의 동일한 그룹으로 나뉜다.

[0368] · 수유별로 정렬. 수유 내에서 SCC별로 정렬한 다음 그룹 AABB 등을 할당한다.

[0369] · 수유, SCC, PSCC, XMAST, ECM(=에너지 보정 우유)에 대한 균등 그룹. 우유의 지방과 단백질 함량을 기준으로 생산량을 표준화하는 공식이다. 생산 및 우유 성분이 서로 다른 젖소/소떼를 비교하는 데 사용된다. 예를 들어, 저지방 및 저 단백질을 포함하는 매우 높은 생산량의 젖소를 높은 지방 및 높은 단백질을 포함하는 낮은 생산량의 젖소와 비교할 수 있다.

[0370] 총 100마리의 젖소가 선택되었고, 50마리의 젖소가 1개의 PTSO/PTO 정제로 치료를 위해 선택되었고, 50마리의 젖소는 처리되지 않고 비교에 사용되었다(대조군).

[0371] 6주 후 PTSO/PTS 처리군의 평균 SCC(323K)는 대조군(523K)보다 38% 낮았고, 200K 미만의 SCC(처리군 젖소 24마리 대 대조군 젖소 15마리) 및 100K 미만의 SCC(처리군 젖소 13마리 대 대조군 젖소 7마리)의 젖소가 훨씬 더 많았다.

[0372] 실시예 5.8

[0373] 네덜란드의 3개 농장에서, 유선염을 나타내는 체세포 수(>200,000 세포/ml)가 증가한 18마리의 젖소를 선택하여 3.84g PTSO와 0.96g PTS가 포함된 정제를 받았다. 체세포 수는 30일의 일정한 간격으로 세 번 측정되었다. 처리 전, 18마리의 젖소는 평균 체세포 수가 600,000개 세포/ml를 초과했다. 첫 번째 측정에서, 평균 체세포 수는 50% 이상 개선된 300,000 세포/ml 미만이었다. 두 번째 측정 날짜에서, 그룹의 평균은 감염된 것으로 간주되는 젖소의 임계값 200,000 세포/ml 미만이었다. 세 번째 측정에서는 평균이 100,000 세포/ml 미만으로 감소한 것으로 나타났다. 공식적으로 높은 체세포 수를 가진 것으로 분류된 이 젖소는 이제 프리미엄을 받을 수 있는 우유를 생산하고 있다.

[0374] 실시예 5.9

[0375] 다른 고객 유제품에 대한 두 번째 시험에서, 3.84g의 PTSO와 0.96g의 PTS가 포함된 정제로 치료한 결과를 표준 항생제 건식 젖소 치료를 받은 젖소(대조군 젖소)와 비교했다. 실시예 5.8과 같이, 두 그룹 모두 초기에 체세포 수가 많은 젖소로 구성되었다. 9마리의 젖소가 PTSO/PTS 정제를 투여받도록 선택되었고 11마리가 대조군으로 연구되도록 선택되었다(표 19 참조). 참가자의 체세포 수는 총 3개의 데이터 수집에 대해 일정한 간격으로 측정되었다. 처리 후 첫 번째 측정 날짜(MPR 1)에서, PTSO/PTS 처리된 젖소의 89%는 대조군 젖소의 36%와 비교하여 150,000 세포/ml 미만의 체세포 수를 보였다. 네 번째 측정에서, 기존 방식으로 처리된 젖소의 29%와 비교하여 모든 PTSO/PTS 처리된 젖소는 체세포 수를 150,000 세포/ml 미만으로 낮추었다.

[0376] 표 19

	150K SCC 미만의 처리군 %	150K SCC 미만의 대조군 %	p-값	처리군 젖소의 수	대조군 젖소의 수
MPR 0 (치료 전)	0	0		9	11
MPR 1	89	36	0.028	9	11
MPR 2	89	18	0.005	9	11
MPR 3	89	33	0.050	9	9
MPR 4	100	29	0.021	7	7

[0377]

[0378] 실시예 5.10

[0379] 4개 농장에서 검사 결과가 높은 젖소의 체세포 수 변화를 시간 경과에 따라 측정했다. 처리 전, 선택된 농장 1 젖소(n=11)의 평균 체세포 수가 3,500,000 세포/ml 이상이었고, 선택된 농장 2 젖소(n=8)의 평균 체세포 수가 거의 600,000 세포/ml, 농장 3 젖소(n=16)의 평균 체세포 수는 거의 893,000 세포/ml였으며, 선택된 농장 4 젖소(n=12)의 평균 체세포 수는 2,288,000 세포/ml였다. 세포 수는 월간 우유 제품 등록 중에 측정되었다. MPR 0 과 MPR 1 사이에 3.84g PTSO와 0.96g PTS(젖소당 1개)를 포함하는 정제로 처리했다. 선택된 젖소의 평균 체세포 수는 MPR1에 의해 모든 농장에서 크게 감소했다. MPR 3에 따르면 선택된 모든 젖소의 78%가 250,000 세포/ml 미만의 체세포 수를 보였다. 모든 젖소의 평균 SCC는 처리 4개월 후 200,000 세포/ml 미만이었고 테스트 기간 동안(즉, 처리 후 최소 6개월까지) 200,000 세포/ml 미만으로 유지되었다.

[0380] 실시예 5.11

[0381] 전통적인 건식 젖소 치료(Dry Cow Therapy; DCT)의 효과적인 대안

[0382] 워터포드 공과대학(Waterford Institute of Technology)에서 수행된 독립적인 연구에서 PTSO/PTS는 대안적인 건조 처리로 테스트되었다. 17마리의 젖소는 PTSO/PTS 정제로 처리된 반면 16마리의 젖소는 전통적인 건조 처리를 받았다. PTSO/PTS 정제는 3.84g의 PTSO와 0.96g의 PTS를 포함하고 건조 3주 전에 투여되었다. 대조군은 건조 요법에 사용되는 통상적인 항생제를 포함하는 통상적인 치료를 같은 날에 받았다. 이 두 가지 건조 방법을 비교하면 전통적으로 처리된 젖소의 60%에 비해 PTSO/PTS 처리된 젖소의 23.5%가 감염되었다. 젖소를 세 그룹으로 나누었다: 낮은 체세포 수 젖소(<200,000), 중간 체세포 수 젖소(200,000 내지 400,000) 및 높은 체세포 수 젖소(>400,000). 젖소를 건조 전 체세포 수를 기준으로 분류했을 때, PTSO/PTS 처리는 낮은 SCC 젖소의 92.9%(14마리의 젖소 중 13마리)에서 성공적이었던 반면, 블랭킷 DCT는 이 개체군의 50%(12마리의 젖소 중 6마리)를 치

료하는 데만 성공했다. 중간 체세포 수 그룹의 결과는 낮은 체세포 수 젖소와 유사하였다. 체세포 수가 많은 젖소의 경우, PTSO/PTS 정제는 젖소의 50%(1/2)에서 효과적인 건식 젖소 치료였으며, 블랭킷 DCT는 젖소의 50%(1/2)에서 효과적이었다. 이것은 체세포 수가 9,993,400 세포/ml인 이상치(outlier) PTSO/PTS 처리된 젖소가 포함되었다. 이 젖소는 146%의 감소를 보여 1,560,000 세포/ml의 체세포 수로 분만했으며, 추가 치료 없이 다음 12주 동안 계속해서 감소했다.

[0383] 실시예 5.12

[0384] PTSO/PTS 정제를 평가하기 위해 외부 제3자 클리닉에서 연구를 수행했다. 3.84g의 PTSO와 0.96g의 PTS가 포함된 정제를 투여한 후 5개 농장의 총 16마리 동물을 높은 세포 수의 변화에 대해 모니터링했다. 14마리의 동물이 연구를 완료했다. 평균 44개 이상에서 평균 45%(685,000개 내지 378,000개)의 세포 수 감소가 입증되었다.

[0385] 또한, 각 구역에서 병원체 검출 및 지속성에 대한 평가를 실시하였다. 6개 농장의 19마리 젖소에서 세포가 상승한 20개 구역을 샘플링하고 배양했다. 1일차에는 다양한 병원체(우베리스 연쇄상구균, 황색 포도상구균, 대장균 등)가 12개 구역에서 검출되었고, 8개 구역에서는 병원체가 검출되지 않았다. 병원체가 검출된 12개 구역 중 42일째에 병원체는 4개 구역에서만 검출 가능하고 8개 구역에서는 검출되지 않았다. 이는 병원체를 67% 감소시킨 것과 같다.

[0386] 실시예 5.12

[0387] Upper Bavaria에서 수행된 무증상 유선염에 대한 실제 연구에서, 3.84g PTSO 및 0.96g PTS를 포함하는 정제 투여 전후의 세포 수 발달에 대한 변화에 대해 총 14마리 유선염이 있는 젖소를 제시했다. 또한, 선택된 유방 구역에서 다양한 시간 간격으로 치료 후 병원체의 존재 및 수를 조사하였다.

[0388] 연구 설계

[0389] 세포 수는 유방 건강에 대한 중요한 지표이며 3.84g PTSO와 0.96g PTS를 포함하는 정제가 5개 농장에서 14마리 동물의 유방 건강에 미치는 영향을 연구하기 위해 측정된다. 마지막 MPR 또는 마지막에서 두 번째 MPR에서 세포 수가 250,000 세포/ml의 한계를 초과할 때 젖소를 선택했다. 연구 그룹의 각 젖소의 우유는 정제를 제공하기 전에 샘플링되었다. 처리 후, 젖소는 적절한 시간 간격으로 샘플링되었고 샘플은 유방의 체세포 수 및 감염된 구역에 대해 분석되었다. 또한, 적절한 시간 간격을 두고 미생물 병원성 표본을 식별하고 숫자를 결정했다.

[0390] 결과 및 논의

[0391] 표 20에는 처리 후 다양한 시간 간격에서 검출된 병원체, 체세포 수에 대한 측정 결과가 제시되어 있다. 처리 전 세포 수는 250,000 세포/ml 이상으로 감염이 있음을 강력하게 나타내며, 대부분의 젖소에서 그 수가 증가하고 있다. MPR -0과 MPR +1 사이에 치료가 제공되었다. 치료 후, t는 0의 감염에서 1일째에 병원체 검출이 있는 10개 구역에서 14/15일에 7개 구역으로 병원체 감소가 관찰되었다. 병원체는 여전히 관찰되었으며(3 구역 감소, 30%에 해당) 42/43/44일에도 원래 병원체는 원래 감염된 구역의 7 구역(70%) 감소에 해당하는 3 구역에서 여전히 검출되었다. 그러나 실험의 시간 간격에서 7마리의 젖소가 다른 병원성 박테리아에 감염되었고 이 젖소는 퇴각해야 했다(결과는 표시되지 않음). 모든 젖소에서 체세포 수는 처리 후 7일째에 감소했다. SCC는 염증 수치에 대해 일반적으로 인정되는 척도이기 때문에, 치료는 염증에 대한 명확한 억제 효과를 보였다. 흥미롭게도, SCC 수는 처리 후 7일째에 이미 상당히 낮아졌고, 36 내지 55일 후에는 평균 세포 수가 45% 감소했다(685,000개에서 378,000개 세포/ml로).

[0392] 그러나 대부분의 경우 병원체는 여전히 검출 가능했다. 또한, 생물막 덩어리가 2일째부터 높은 비율로 유방을 떠나고 있었고 완전히 제거되었다. 이것은 생물막이 염증의 원인이 되며 유방에 여전히 존재하는 플랑크톤 세포가 아님을 강력하게 나타낸다. 플랑크톤 세포의 수는 더 이상 감지할 수 없을 때까지 시간이 지남에 따라 감소했으며, 이 감소는 면역계의 작용 반응에 의해서만 발생할 수 있다. 이것은 세포를 죽이지 않고 생물막을 제거하는 것이 염증을 조절하기에 충분하며 면역계가 감염을 조절하는 역할을 한다는 것을 보여주었다.

[0393] 표 20. 3.84g의 PTSO와 0.96g의 PTS가 포함된 정제로 처리한 후 젖소당 체세포 수 발달 및 유방 구역당 병원체 존재.

농장	젖소 번호	MPR* - 2	MPR - 1	MPR - 0	MPR + 1**
1	1	70	137	456	382
	2	38	238	388	126
	3	195	356	366	264
2	4	25	40	2244	553
	5	292	1726	1320	1076
	6	31	262	733	491
3	7	173	1303	453	251
	8	233	423	403	342
	9	92	598	445	263
	10	93	123	407	275
	11	56	26	579	317
4	12	2540	749	502	348
	13	n.r.***	577	636	224
5	14	369	466	658	374

[0394]

[0395]

*: MPR(우유 생산 기록) x 1000; **, 7일째의 MPR

[0396]

또한, 병원체(병원체) 검출이나 개별 구역별 병원체 지속성에 대한 평가를 실시하였다. 6개 농장의 19마리 젖소의 세포 증가가 있는 20개 구역을 조사했다(우유 샘플, 배양 접근). 1일차에는 다양한 병원체(우베리스 연쇄상구균, 황색 포도상구균, 대장균 등)가 12개 구역에서 검출되었으며 8개 구역에서는 병원체가 검출되지 않았다. 1일차에 병원체가 검출된 12개 구역 중 42일차에 병원체는 4개 구역에서만 검출 가능하고 8개 구역에서는 검출되지 않았다. 이는 병원체를 67% 감소시킨 것과 같다.

[0397]

이 실험에서 PTSO/PTS가 장에서 흡수되어 유선으로 운반된다는 것이 분명하다. 이후 PTSO/PTS는 생물막의 방출이 일어날 만큼 충분히 높은 농도로 생물막(박테리아가 숨어 있는 일종의 "요새"로 간주될 수 있음)에 들어간다. 생물막 용해 및 박리 과정이 일어나는 정확한 기전은 불분명하지만 화합물이 이러한 효과를 유발한다는 것은 놀라운 일이다.

[0398]

실시예 6 프로토테카

[0399]

유선염의 매우 치명적인 변종은 생물막 형성 미세조류 프로토테카 종에 의해 발생한다 Connalves et al., 2015, Dairy Sci 98 (6): 3613-3621. Valessa et al, Cienc. Rural vol.49 no.2 Santa Maria Feb 28, 2019). 프로토테카 조프피(Prototheca zopfii)로 인한 유선염은 여러 국가에서 설명되었고, 전 세계적으로 증가하고 있으며 이러한 미세조류의 일상적인 치료에 대한 고유한 내성으로 인해 심각한 문제를 나타낸다(Pieper et al., 2012, J. Dairy Sci. 95:5635-5644). 이 내성은 대식세포를 감염시키고 생존하는 능력과 유방 조직을 침범하는 능력과 관련이 있으며, 이는 우유에서 정기적으로 발생하는 프로토테카 조프피의 지속적인 감염을 유발한다(Marques et al., 2006, J. Dairy Sci. 89:4202-4204). 또한, 유방에서 생물막을 형성할 수 있음이 관찰되었다(Shahid et al. 2020, Sci Rep 10, 698).

[0400]

프로토테카 종의 전염은 착유 중 감염된 젖소와 건강한 젖소 사이에서, 정기적이고 집중적인 항생제 치료 중(Pieper et al., 2012), 및 젖소의 착유 전 준비 중 위생 부족 사이에서 발생한다. 또한, 프로토테카 조프피는 분변에서 생존하며 모든 환경을 오염시킨다.

[0401]

유제품 환경에서 스테인리스 스틸, 유리, 고무 및 폴리프로필렌과 같은 표면은 미생물에 의해 오염된다. 결과적

으로 미생물은 이러한 표면에 증식하여 생물막을 생성할 수 있다(Davies, 2003. Nat. Rev. Drug Discov. 2:114-122).

[0402] 항생제를 사용한 프로토테카 종에 의해 유발된 유선염의 치료는 프로토테카 종 감염이 일시적으로 개선될 뿐이고, 생체 내 감염 및 원인 물질이 제거되지 않는다 (Costa et al., 1996. Mycopathologia 133:85-88). 따라서 프로토테카 조프피에 감염된 젖소를 도태시키는 것은 질병을 줄이기 위한 유일한 통제 조치는 아니더라도 권장되는 것 중 하나이다.

[0403] 범위: Upper Bavaria에서 수행된 (무증상)임상 유선염에 대한 실제 연구에서, 총 14마리의 유선염이 있는 젖소를 대상으로 4.8g PTSO 및 1.2g PTS를 함유하는 정제 투여 전후의 세포수 발달에 대한 변화를 제시하였다. 또한, 선택된 유방 구역에서 다양한 시간 간격으로 치료 후 프로토테카의 존재 및 수를 조사하였다.

[0404] 연구 설계

[0405] 세포 수는 유방 건강에 대한 중요한 지표이며 44마리 동물의 유방 건강에 대한 PTSO/PTS 정제 제품의 영향을 연구하기 위해 측정되었다. 우유의 마지막 MPR에서 세포수가 250,000 세포/ml 한도를 초과했을 때 젖소를 선택했고, 우유에서 미세조류 프로토테카가 입증되었다. 이후 PTSO/PTS 정제가 승인되었다. 처리 후, 젖소는 매월 1회 샘플링되었고, 샘플은 실험 종료 시 유방에서 미세조류 프로토테카의 존재 및 세포 수에 대해 분석되었다.

[0406] 결과 및 논의

[0407] 표 21에는 시간 경과에 따른 체세포 수 및 실험 종료 시 프로토테카의 존재에 대한 측정 결과가 제시되어 있다.

[0408] 표 21. 체세포 수(SCC) 및 SCC는 PTSO/PTS 정제로 처리하고 실험 종료 시 프로토테카가 존재한 후 시간이 지남에 따라 변화한다.

젖소 수	SCC t = 0	SCC t=1개월	SCC t = 2개월	SCC t=1 마이너스 SCC t=2	프로토테카 테스트
837	1146	3528	3012	516	+
4631	5011	3497	2975	522	+
4827	1877	3190	453	2737	+
4927	4358	671	2177	-1506	+
4941	2190	3401	2151	1250	+
5027	2473	3997	3063	934	-
5083	3784	1162	3804	-2642	+
5116	530	617	280	337	+
5147	542	488	414	-74	-
5470	582	539	132	-407	-
5485	1511	1059	383	-676	-
5505	1109	5404	1491	3913	+
5544	246	197	124	-73	-
5581	436	423	696	-237	-
5586	4052	3994	2847	1147	+
5674	3370	2645	3649	-1004	+
5706	3186	2552	640	1912	+

[0409]

5807	931	1292	1152	140	+
5841	652	62	220	-158	+
5880	1030	637	431	206	-
5889	1427	2027	352	1675	-
5916	1811	285	442	-157	-
5945	1078	370	162	208	-
5998	2944	951	1433	-482	-
6011	960	691	158	533	-
6026	1699	1386	1284	102	+
6041	4586	5176	7009	-1833	-
6078	650	238	113	125	-
6081	2951	2627	1374	1253	+
6131	708	564	191	373	-
6140	1731	48	466	-418	-
6152	1114	1479	1101	378	-
6181	1462	1366	2918	-1552	+
6182	1901	2423	1821	602	+
6186	1209	1849	625	1224	+
6192	3522	5401	6439	-1038	-
6195	3935	4432	2535	1897	-
6230	1528	895	487	408	-
6241	1892	1456	203	1253	-
6252	3211	3034	2802	232	+
6275	511	404	689	-285	-
6282	522	1562	1312	250	-
6556	2438	3355	1745	1610	-

[0410]

[0411]

*: MPR(우유 생산 기록) x 1000; **, 7일째 MPR; ***:

[0412]

처리 전 세포 수는 250,000개 세포/ml 이상으로 감염이 존재하고 대부분의 젖소에서 그 수가 증가하고 있음을 강력하게 나타낸다. 모든 젖소에서 체세포 수는 처리 후 7일째에 감소했다. SCC는 감염에 따른 염증의 정도를 나타내는 척도이기 때문에 치료는 염증을 억제하는 효과가 뚜렷했다. 흥미롭게도, SCC 수는 처리 후 7일째에 이미 상당히 낮아졌고, 36 내지 55일 후에는 평균 세포 수가 45% 감소했다(685,000개에서 378,000개 세포/ml로).

[0413]

또한, 병원체(병원체) 검출이나 개별 구역별 병원체 지속성에 대한 평가를 실시하였다. 6개 농장의 19마리 젖소의 세포 증가가 있는 20개 구역을 조사했다(우유 샘플, 배양 접근). 1일차에는 다양한 병원체(우베리스 연쇄상구균, 황색 포도상구균, 대장균 등)가 12개 구역에서 검출되었으며, 8개 구역에서는 병원체가 검출되지 않았다. 1일째에 병원체가 검출된 12개 구역 중 42일째에 병원체는 4개 구역에서만 검출 가능하고 8개 구역에서는 검출되지 않았다. 이는 병원체를 67% 감소시킨 것과 같다.

[0414]

미세조류 프로토타카에 의한 유방 감염은 조류가 대부분의 항생제에 대해 둔감하기 때문에 일반적으로 젖소의 도태를 초래한다. 예기치 않게 PTSO/PTS는 감염을 완전히 해결하는 것으로 나타났으며 도태는 필요하지 않았다.

[0415]

실시예 7. 디지털 피부염

[0416]

만성 감염의 또 다른 범주는 생물막 형성 미생물에 의해 감염된 상처이다. 상처가 감염되면 미생물은 상처에 부착된 채로 남아 있는 생물막을 형성하기 시작한다. 미생물 EPS(세포외 고분자 물질)의 생산은 생물막이 몇 시간 내에 복잡한 3차원 구조를 형성하는 데 도움이 된다. 이러한 복잡한 구조는 상처의 방어 기전에 저항한다. 항생제가 박테리아를 공격하기 위해 적용되면, 생물막이 부분적으로만 박멸될 수 있으며 상처와 밑에 있는 조직은 감염된 상태로 남아 있다. 이러한 생물막은 만성 감염 및 치유되지 않는 상처를 유발하는 것으로 알려져 있다. 미국에서는 매년 약 1,600만의 새로운 생물막 기반 감염이 진단된다. 따라서 생물막은 상처 치유에 주요 장애물

이 된다. 병원성 미생물을 감염시키는 그러한 상처의 예는 박테리아(그람 양성 박테리아, 예를 들어 황색 포도상구균; 연쇄상 구균; 그람 음성 박테리아, 예를 들어 트레포네마 종(*Treponema* spp.), 대장균(*Escherichia coli*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*); 효모/진균, 예를 들어 칸디다 종(알비칸스), 클라도스포리디움 허바룸, 트리코스포룸, 로도스포리디움, 말라세지아이다.

[0417] 젖소의 우유 생산에 부정적인 영향을 미치는 상처 감염의 한 예는 디지털 피부염이다(Schlafer et al, 2008 Veterinary Microbiology 128, Issues 1-2: 118-125). 디지털 피부염(동의어는 털이 많은 발뒤꿈치 사마귀(hairy heel warts), 딸기 발 썩음병(strawberry foot rot), 모르텔라로병(mortellaro disease), 이탈리아 발 썩음병(Italian foot rot), 유두종 디지털 피부염(papillomatous digital dermatitis))은 젖소에게 고통을 일으키는 감염이다. 디지털 피부염 병변은 구근 사이의 궤양성 또는 증식성 덩어리이다(Beninger, 2018 et al, Vet Res 49:111). 디지털 피부염의 비용은 65마리의 젖소 농장에서 연간 젖소당 \$75이다(Bruijn et al., 2010, J. of Dairy Science Volume 93, Issue 6, 2419-2432). 비용은 조기 도태, 우유 손실 및 출산율 감소를 기반으로 한다.

[0418]

[0419] 디지털 피부염은 호기성 또는 혐기성 박테리아(Beninger, 2018 et al, Vet Res 49:111), 및 특히 트레포네마 종(*Treponema* spp)(Demirkan et al. 2018 J. of Dairy Science vol 101 (11) p. 10317 - 10326)에 의해 유발된다. 일반적으로 감염은 발톱 주변의 피부를 관통하는 트레포네마 종에 의해 시작된다. 트레포네마 종은 혐기성 그람 음성 박테리아이고 스피로헤타류(*spirochaetes*)에 속한다. 이 미생물은 발톱 근처에 있는 젖소의 피부, 우선적으로 발가락 사이의 갈라진 틈에 있는 발톱 사이에 침투할 수 있다. 이러한 피부염 병변에서 발생하는 생물막은 이질적인 미생물 군집을 구성한다.

[0420] 트레포네마와 같은 박테리아는 젖소의 땀이나 반추동물의 땀에 존재하며 디지털 피부염의 원인으로 간주된다. 면역 체계가 잘 작동하는 젖소는 디지털 피부염에 덜 민감하다. 주거, 위생, 환기 및 영양도 중요하다.

[0421] 포르말린 족욕은 디지털 피부염에 대한 예방 효과가 있으며 종종 적용된다. 그러나 포르말린은 젖소와 농부의 건강에 좋지 않은 것으로 알려져 있다. 발톱에 디지털 피부염이 있는 경우, 발톱을 잘 말리고 다듬은 후 2주에 1번 족욕으로 발톱을 소독한다. 또한, 감염된 피부는 일반적으로 이후에 항생제 함유 스프레이로 치료되며 이러한 방식으로 긍정적인 결과를 얻을 수 있다. 그러나 상처에는 종종 미생물 세포가 휴면 상태로 존재하는 얇은 층이나 생물막 반점이 형성된다. 박테리아 개체군의 일부만이 (항생제) 치료에 의해 사멸되는 반면, 나머지 세포는 치료가 끝난 후 증식하기 시작한다. 또한, 일반적으로 감염은 국소 생물막이 형성되고 항생제의 큰 분자가 거의 효과가 없는 진피층 피부 깊숙이 침투한다. 더욱이, 조직 및 생물층에서 세포 휴면 이외의 다른 형태의 항생제 내성에 선택적 압력이 가해진다. 이러한 이유로 대부분의 치료법과 전략은 디지털 피부염 개선에 거의 또는 전혀 효과가 없다.

[0422] 연구 설계

[0423] 상처와 부상을 치료하기 위해 개발된 두 가지 스프레이(스프레이 #1 및 스프레이 #2-PTSO)의 효과를 조사하기 위해 3개의 개별 농장에서 실험이 수행된다. 두 스프레이는 스프레이 #2-PTSO가 PTSO(3,2% PTSO w/w)도 포함한다는 점을 제외하고는 동일한 구성을 가지고 있다. 0.35 ml를 치료당 상처에 분무한다.

[0424] 13개 농장의 젖소는 디지털 피부염의 존재에 따라 선택된다. 디지털 피부염이 있는 이 젖소들을 선택하여 운동성과 M-점수에 대해 점수를 매겼다. 디지털 피부염 감염을 분류하기 위해, 6개의 분류가 설명되었다(Dopfer et al., 1997)(Berry et al., 2012). M-점수에 대한 설명은 다음과 같다: M0, 건강; M1(초기 단계), 작은 적색 및 민감하지만 활성 염증, 최소 손상 0 내지 2 cm; M2, 흰색 상피 가장자리 및 직립 모발이 있는 딸기와 유사한 적색 및 매우 민감한 손상, 매우 활성 염증 >2 cm; M3(치유 단계), 딱지로 덮인 궤양성 병변; M4, 만성 궤양으로의 변경; M4.1, M4와 M1의 조합, 부어오른 발톱 갈라진 틈이 있는 만성 단계. 운동 점수는 다음과 같이 정의된다: 1, 절름발이가 아니라 등을 곧게 펴고 걷는다. 2, 약간 절름발이, 약간 굽은 등으로 걷는다. 3, 서 있거나 걷는 동안 심하게 절름발이를 하고 허리를 굽혔다. 4, 서거나 걸을 때 심하게 절름발이를 하고 허리를 구부리며, 영향을 받은 다리는 서 있을 때만 사용한다. 5, 심하게 파행하고 허리를 굽혀 서 있고 더 이상 다리로 서지 않고 누워 있는 것을 선호한다.

[0425] M2 병변이 치료되면 치유는 다음과 같이 진행된다: 중간 단계(M3)는 치유 단계(M0)로 이어지거나 발톱 사이 균열이 부은 만성 단계(M4.1)로 바뀐다. M4.1은 효과적인 치료 후 M4에서 M3으로 치유된다. 예를 들어 도 4 참조.

[0426] 상처를 채점한 후 선택된 젖소는 다음과 같이 5개 그룹에 무작위로 분포된다: 그룹 1: 무처리(대조군); 그룹 2: 스프레이 #1로 처리; 그룹 3: 스프레이 #2-PTS0로 처리; 그룹 4: 스프레이 #1로 처리하고, 4.8g PTS0 및 1.2g PTS를 함유하는 정제 투여; 및 그룹 5: 스프레이 #2-PTS0로 처리 및 4.8g PTS0 및 1.2g PTS를 함유하고 스프레이 #1 또는 스프레이 #2-PTS0로 처리된 정제의 투여. 발톱은 2주 후 M-점수 및 운동성에 대해 점수를 매겼다. 가능하면 각 발톱을 다시 들어 올려 사진을 다시 찍었다.

[0427] 데이터 처리

[0428] 젖소의 점수는 그룹 1과 3 및 그룹 2와 3 사이에서 비교되었다. Fisher's Exact Test를 적용하여 통계적 유의성을 계산했다. M1, M2, M4 및 M4.1은 "치유되지 않은" 것으로 간주되었다. M3는 "치유중(healing)"으로 표시되고, M0은 "치유됨(healed)"으로 표시된다. 테스트를 위해 "치유중"과 "치유됨"을 결합했다.

[0429] 결과

[0430] 처리군당 M 점수는 표 22에 나와 있다. M4 점수를 가진 처리된 젖소의 대부분은 어느 스프레이로 처리하기 전에 1 또는 2의 운동 점수를 갖는다. 이 젖소들은 모두 처리 후 운동 점수가 1이었고 피부는 저녁을 처리한 후였다. 그룹 5의 젖소는 운동성에 대해 3점을 얻었지만 처리 직후 운동성에 대해 2점을 얻었으므로 즉각적인 개선이 관찰되었다. 디지털 피부염에 대한 결과는 M-점수로 결정되었다. 활동성(통증) 병변 M1, M2 및 M4.1이 있는 모든 젖소를 M3으로 이동했다.

[0431]

[0432] 4.8g PTS0와 1.2g PTS를 포함하는 정제와 스프레이 #1로 처리된 젖소는 M4 점수의 93%가 처리 후 M3로 이동하고 나머지는 M0으로 이동했음을 보여주었다. 스프레이 #2-PTS0를 사용하는 경우, t=0의 M2 점수가 M3으로 이동했다. M4 점수를 가진 젖소는 처리 후 M0(23%), M3(56%)으로 이동하거나 M4(21%)에 남아 있으므로 스프레이 #2-PTS0를 사용하면 상당한 개선이 관찰되었지만 PTS0/ PTS 정제를 이용한 추가적인 치료는 추가 효과를 보였다.

[0433] 대조군은 치료를 받지 않았고 예상대로 상황이 악화되었기 때문에 더 높은 M-점수를 보였다. 대부분의 젖소는 만성 그룹(M4)에 남아 있었다.

[0434] 표 22: 각 처리 전후의 M-점수. M3(굵게)는 "치유중"로 표시되고, M0은 "치유됨"(굵게)으로 표시된다.

그룹	0	1	2	3	4	4.1
1A		2		5	26	9
1B				8	34	
2A		1	1	4	59	3
2B	6			42	20	
3A		3	1	16	52	4
3B	10			44	22	
4A					6	3
4B	1			7	1	
5A			1	1	14	2
5B	4			9	5	

[0435]

[0436] 그룹 1: 대조군 2: 스프레이 #1; 그룹 3: 스프레이 #2-PTS0; 그룹 4: 스프레이 #1+PTS0/PTS 정제; 그룹 5: 스프레이 #2-PTS0+PTS0/PTS 정제. A는 처리 전 특정 M 점수를 받은 젖소의 수를 나타내고 B는 처리 후 특정 점수를 받은 젖소의 수를 나타낸다.

[0437] 통계적 분석이 수행되었고 Fisher's Exact Test는 그룹 2와 3(즉, PTS0가 있거나 없는 스프레이)을 비교할 때 P-값이 0.037이고, 그룹 1과 그룹 3(즉, 대조군 대 PTS0 스프레이)을 비교할 때 P-값이 0.010이었다.

[0438] 발톱의 건강은 두 스프레이 모두에서 개선되었지만, 통계적 P-값은 PTS0를 포함하는 스프레이가 PTS0가 없는 유사한 스프레이보다 개선된 효과를 나타냄을 보여준다(p=0.032). 스프레이 #1로 처리한 젖소는 처리가 PTS0/PTS 정제와 결합되었을 때 더 나은 결과를 보였다. 실시예는 PTS0의 국소 투여가 디지털 피부염과 같은 만성 생물막 관련 상처의 치료에 유용하다는 것을 보여준다.

[0439] 스프레이 #2-PTSO로 처리된 젖소의 경우, 만성 병변(M4, M4.1)보다 감염된 단계 M1 및 M2에서 더 큰 영향을 관찰했다. 이 치료를 연장함으로써 추가 개선이 달성될 가능성이 매우 높다. 운동성 점수가 4점인 젖소 한 마리는 치료를 받기 전 3다리로 걸었고, 나머지 다리의 발톱은 디지털 피부염에 의해 심하게 영향을 받아 사용할 수 없었다. 치료 후, 젖소는 치료의 진통 효과를 분명히 보여주는 4개의 발톱과 2의 운동 점수로 걸어갔다.

[0440] **실시예 8. 유방 구순 피부염**

[0441] 생물막 관련 만성 상처의 또 다른 예는 유방 구순 피부염(Udder Cleft Dermatitis: UCD)이다 (Sorge et al, 2019, J. Dairy Sci. 102:11470-11475; Waller et al, 2014, J. Dairy Sci. 97 :310-318). UCD는 유방과 복벽 사이 또는 유방의 앞부분 사이의 전방 접합부에 위치한 피부 병변이다. 병변의 모양과 크기는 다양하지만 두꺼워진 피부, 딱지, 고름 및 쉽게 출혈하는 상처가 흔한 소견이다. 유방 구순 피부염은 해부학적 위치와 영향을 받은 젖소가 질병의 일반적인 징후를 거의 나타내지 않기 때문에 발견하기 어려울 수 있다. UCD 유병률에 대한 연구는 거의 발표되지 않았으며 대부분은 주로 문제 무리로 분류되는 하나 또는 소수의 무리만 포함했다. 이러한 연구에서 무리 내 유병률은 0%에서 22% 사이로 다양했다. 그러나 최근 네덜란드 연구에서는 20개 무리가 포함되었으며 그 중 3개는 UCD가 없었지만 다른 무리의 무리 내 유병률은 2.5%에서 13% 사이였다(Amersfort et al., 2012). UCD의 병인은 명확하지 않지만 유방 형태 및 유방 부종과 같은 여러 요인이 역할을 하는 것으로 제안되었다. 패리티(parity) 및 DIM(우유의 일수)과 같은 젖소 요인도 UCD와 관련이 있다(Beattie and Taylor, 2000, J. Brit. Cattle Vet. Assoc.8, 377-380).

[0442] 병변은 뒷다리의 발가락 사이의 갈라진 틈의 발바닥 측면에서 가장 일반적으로 확인된다. 트레포네마 종은 많은 수의 활동성 병변에 일상적으로 존재한다. 병변은 만지면 고통스럽고 임상적 파행을 유발할 수 있다. 감염성은 일반적으로 젖소 때의 고질적인 감염을 초래하고(Plummer et al 2017, Vet Clin North Am Food Anim Pract 33(2):165-181), 큰 경제적 손실에 책임이 있다.

[0443] 연구 설계: 만성 UCD의 명확한 특성을 가진 두 마리의 젖소를 선택하고 실시예 7에 기재된 스프레이로 처리했다. 젖소 1(3076)은 0일 및 7일에 스프레이 #2-PTSO로 처리되었다. 젖소 2(2934)는 t=0에 스프레이 #1 및 7일에 스프레이 #2-PTSO로 처리되었다. 표 23 및 24는 처리 결과를 나타낸다.

[0444] 표 23. 0일 및 7일에 치료된 젖소 1(3076)의 상처 설명.

	0일차	7일차	14일차
점수	염증, 끈적임 및 만성 상처, 민감, 붉은 색, 염증성 수분	건조 상처, 민감하지 않고 염증이 없는 상처	염증이 없고 상처가 치유됨

[0445]

[0446] 표 24. 7일째에만 치료된 젖소 2(2934)의 상처 설명.

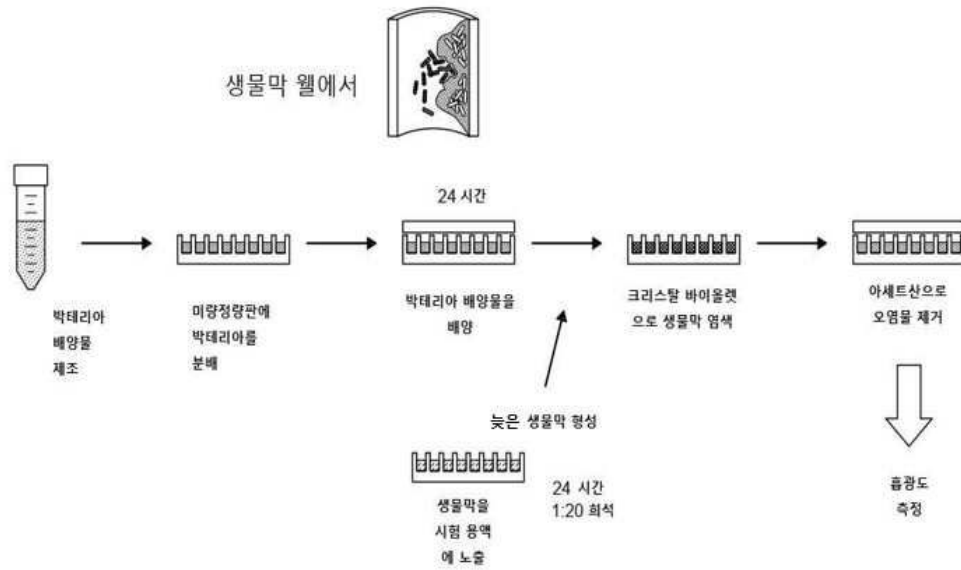
	0일차	7일차	14일차
점수	만성적이고 끈적끈적한 상처, 두꺼운 상처 딱지, 분명히 염증이 있고, 붉고 민감함	두꺼운 상처 딱지, 분명히 염증이 있고 붉고 민감함	얇은 상처 딱지, 염증 없음, 상처 치유

[0447]

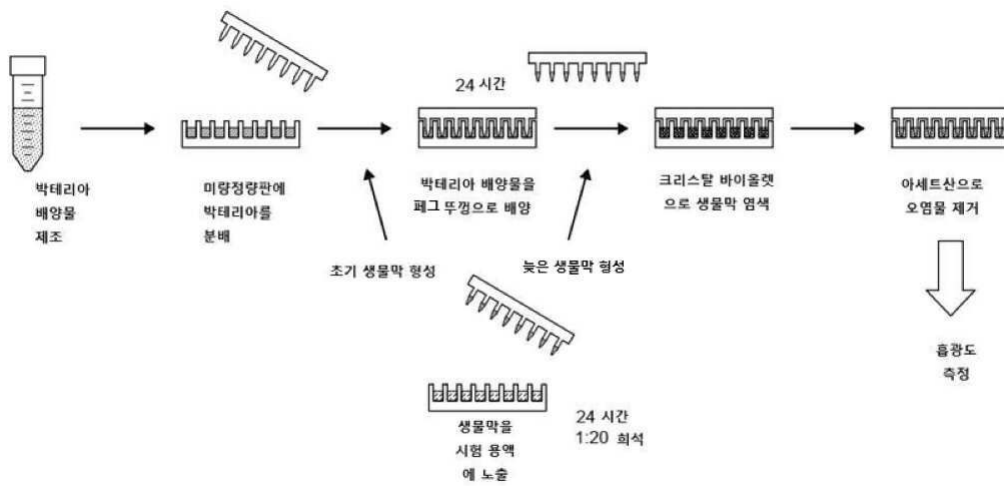
[0448] 젖소 1은 0일 및 7일차에 스프레이 #2-PTSO로 처리되었고 염증 감소가 즉시 관찰되었다. 젖소 2934를 0일차에 스프레이 #1로 처리했을 때 진행이 관찰되지 않았다. 7일차에 스프레이 #2로 처리한 후, 감염 감소에 이어 상처 치유와 관련하여 분명한 개선이 관찰되었다. 수백 마리의 젖소를 대상으로 이러한 실험을 반복했으며, 스프레이 #2-PTSO에 의한 UCD의 만성 끈적끈적한 상처의 개선 및 치유가 관찰되었다.

도면

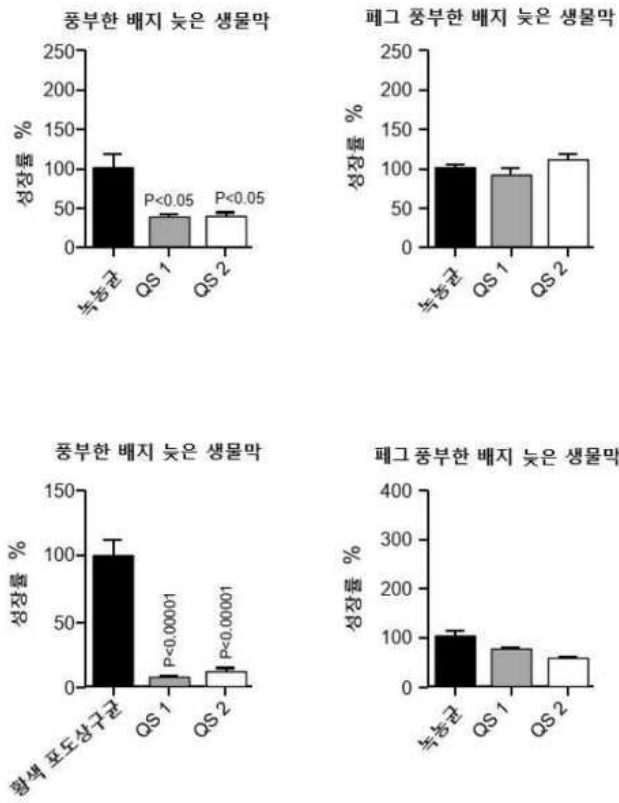
도면1a



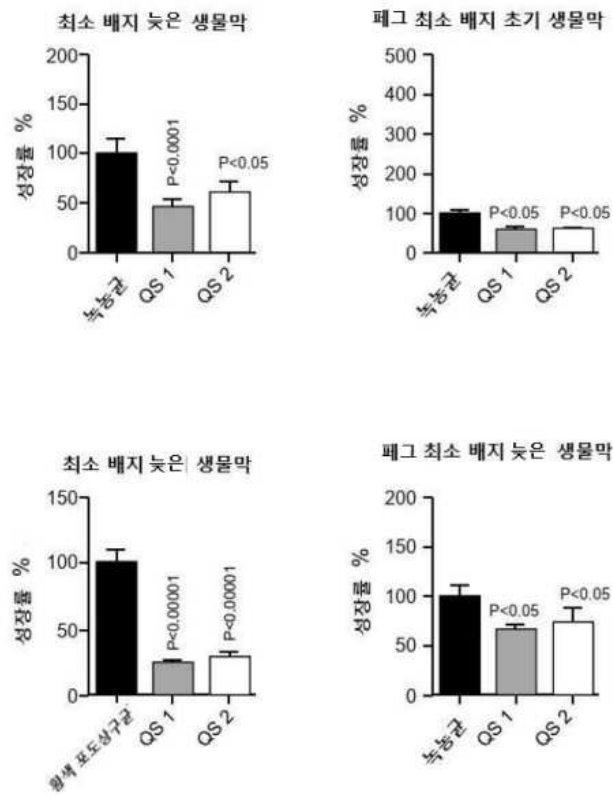
도면1b



도면2a



도면2b



도면3a



도면3b



도면4

