(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0022249
(43) 공개일자 2023년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 37/46 (2006.01) *A01N 25/10* (2006.01)
A01N 47/44 (2006.01) *A01P 1/00* (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01) *A61L 2/00* (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 37/46 (2013.01)
A01N 25/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7001482
(22) 출원일자(국제) 2021년06월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년01월12일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/065984
(87) 국제공개번호 WO 2021/250283
국제공개일자 2021년12월16일
(30) 우선권주장
2008980.1 2020년06월12일 영국(GB)

(71) 출원인
아미코트 에이에스
노르웨이, 트롬쇠 9019 사이케후스베겐 23
(72) 발명자
스텐센, 웬치
노르웨이, 크발뢰이슬레타 9102 스몰블롬스트베겐 36
스벤드센, 존 시구르드
노르웨이, 크발뢰이슬레타 9102 스몰블롬스트베겐 36
(74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **생분해성 폴리에스테르를 포함하는 의료기기 및 재료**

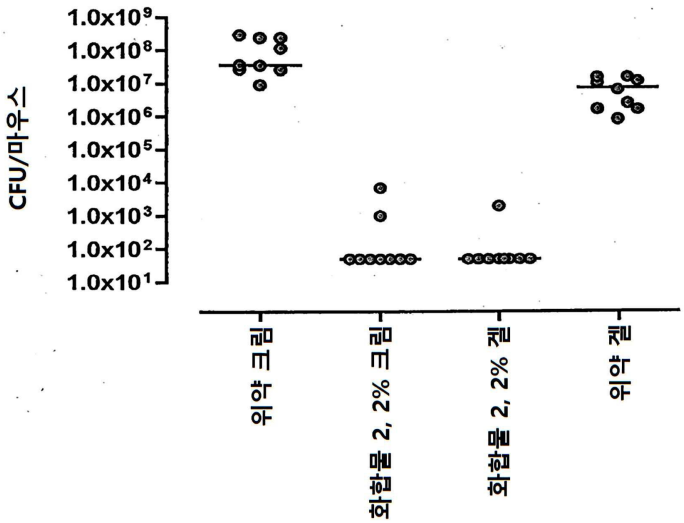
(57) 요 약

본 발명은 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제제를 제공한다:

AA-AA-AA-X-Y (I).

본 발명은 이들 제제의 제조 방법, 상기 제제를 포함하는 봉합재와 같은 의료 기기 및 상기 기기를 제조하는 방법을 더 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A01N 47/44 (2013.01)
A01P 1/00 (2021.08)
A61K 38/06 (2013.01)
A61L 2/0005 (2013.01)
A61P 31/00 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

제제로서,

하기 화학식 (I)의 화합물:

AA-AA-AA-X-Y (I)

여기서, 임의의 순서로, 상기 AA(아미노산) 모이어티 중 2개는 양이온성 아미노산이고 상기 AA 중 1개는 친유성 R 기를 갖는 아미노산이며, 상기 R 기는 14-27개의 비수소 원자를 갖고;

X는 분지형 또는 비분지형 C_1-C_{10} 알킬기 또는 아릴기에 의해 치환될 수 있는 N 원자이며, 상기 알킬기 또는 아릴기는 N, O 및 S로부터 선택된 최대 2개의 헤테로원자를 포함할 수 있고; 및

Y는 R_1-R_2-R_3, R_1-R_2-R_2-R_3, R_2-R_2-R_1-R_3, R_1-R_3 및 R_4로 이루어진 군으로부터 선택되며,

여기서:

R_1은 C, O, S 또는 N이며,

R_2는 C이고;

각각의 R_1 및 R_2는 C_1-C_4 알킬기에 의해 치환되거나 비치환될 수 있고;

R_3은 각각 5개 또는 6개의 비수소 원자를 갖는 1 내지 3개의 시클릭기를 포함하는 기이고, 상기 시클릭기 중 2개 이상은 융합될 수 있고 상기 시클릭기 중 하나 이상은 치환될 수 있고; R_3은 최대 15개의 비수소 원자를 포함하고; 및

R_4는 2-20개의 비수소 원자를 갖는 지방족 모이어티이며, 상기 모이어티는 선형 분지형 또는 시클릭(cyclic)임,

과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는, 제제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 펩티드인, 제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 양이온성 아미노산은 아르기닌 및/또는 리신인, 제제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 친유성 R 기는 융합되거나 연결될 수 있는 2개 이상의 시클릭기(cyclic groups)를 포함하는 것인, 제제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 친유성 R 기를 갖는 아미노산은 트리부틸 트립토판(tributyl tryptophan, Tbt) 또는 Phe (4-(2-나프틸)), Phe (4-(1-나프틸)), Bip (4-n-Bu), Bip (4-Ph) 또는 Bip (4-TBu)로부터 선택된 비페닐알라닌 유도체로부터 선택되는, 제제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 화학식 (II):

AA_1-AA_2-AA_1-X-Y (II)

여기서:

AA_1은 양이온성 아미노산이고;

AA_2는 친유성 R 기를 갖는 아미노산이며, 상기 R 기는 14-27개의 비수소 원자를 갖고; 및

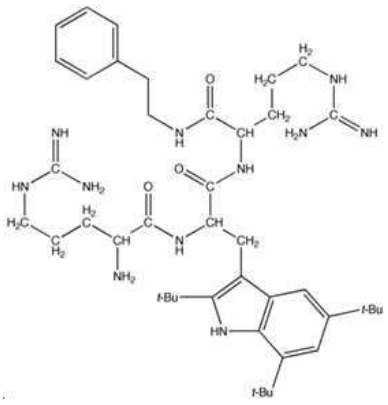
X 및 Y는 제1항에 정의된 바와 같음,

의 화합물인, 제제.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은



구조식을 갖는, 제제.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리에스테르가 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리디옥사논 및 폴리카프로락톤 및 이들의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 제제.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리에스테르가 0.1 내지 8 dL/g의 고유 점도를 갖는 것인, 제제.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리에스테르가 3,000 내지 30,000의 분자량을 갖는 것인, 제제.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리에스테르가 폴리(D,L-락타이드-코-글리콜라이드), 폴리(L-락타이드) 또는 폴리카프로락톤인 것인, 제제.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제제는 제어 방출 제제인 것인, 제제.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화학식 (I)의 화합물이 상기 폴리에스테르를 통해 방출가능하게 분산되는 것인, 제제.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 제제를 포함하거나 이로 이루어진 의료 기기로서,

바람직하게는 상기 의료 기기는 상기 제제를 그 위에 코팅으로 포함하는 것인, 의료 기기.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 의료 기기가 수술용 패스너(surgical fastener) 또는 임플란트인, 기기.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 의료 기기가 봉합재인, 기기.

청구항 17

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 제제를 제조하는 방법으로서,

상기 방법은 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 상기 생분해성 폴리에스테르를 용융시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 제제의 제조 방법으로서,

상기 방법은 화학식 I의 화합물, 생분해성 폴리에스테르, 및 상기 화합물 및 상기 폴리에스테르를 용해할 수 있는 하나 이상의 용매의 혼합물을 형성하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 방법은

(i) 화학식 (I)의 화합물을 포함하는 제1 용액을 제공하는 단계;

(ii) 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제2 용액을 제공하는 단계, 여기서 상기 제2 용액은 상기 제1 용액과 혼화성임; 및

(iii) 상기 제1 용액과 제2 용액을 혼합하는 단계;

를 포함하는, 방법.

청구항 20

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 정의된 의료 기기의 제조 방법으로서,

상기 방법은

(i) 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 제제를 제공하는 단계; 및

(ii) 상기 제제를 의료 기기에 적용하는 단계;

를 포함하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 기기를 상기 제제에 침지시키거나 상기 기기 상에 상기 제제를 페인팅함으로써 상기 제제가 적용되는 것인, 방법.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서,

상기 제제를 상기 의료 기기에 적용 후 건조시키는 것인, 방법.

청구항 23

치료 요법에 사용하기 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 제제.

청구항 24

대상체의 감염을 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 제제.

청구항 25

감염의 치료 또는 예방 방법으로서,

상기 방법은 치료적 유효량의 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 정의된 제제를 이를 필요로 하는 대상체에게 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항미생물 제제, 특히 소형 펩티드 또는 펩티드-유사 분자와 혼합된 중합체를 포함하는 제제에 관한 것이다. 이들 제제는 특히 의료 기기에 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 카테터, 정형외과 기기 및 기타 임플란트와 같은 의료 기기와 봉합재 등과 같은 수술용 패스너(surgical fastener)의 사용이 증가하고 있다. 기기 설계 및 수술 절차의 개선에도 불구하고, 이러한 의료 기기와 관련된 감염은 여전히 주요 관심사이다. 기존 항생제 치료는 종종 실제 감염 부위의 낮은 수준의 항생제 농도로 인해 실패한다. 도입된 생체재료/기기에 대한 생물막의 존재는 약물 내성 균주의 존재와 마찬가지로 항생제 치료의 효능을 손상시킬 수 있다.

[0003] 항생제 방출 코팅은 봉합재 및 카테터와 같은 의료 기기용으로 알려져 있다. 그러나 환자는 내성 세균에 감염될 수 있으며 국소 방출 패턴으로 인해 항생제의 농도 구배가 존재하여 내성 세균에 대한 경쟁 선택의 위험이 증가한다. 특히, 트리클로산을 함침시킨 봉합재가 시판되고 있으나, 이 항생제가 남용되어 내성 세균주를 발생시켰고, 나아가 다른 항생제에 대한 교차내성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 보건 당국으로부터 이것의 사용을 제한하라는 압력을 받고 있다. 트리클로산으로 코팅된 봉합재가 수술 부위 감염의 발생을 감소시킨다는 연구 결과가 있지만, 클로르헥시딘과 같은 다른 활성제로 코팅된 봉합재에 대한 데이터는 제한적이다(Onesti 등 2018 European Review for Medical and Pharmacological Sciences 22: 페이지 5729-5739).

[0004] 수술 후 상처 감염은 미국에서 세 번째로 흔한 병원 감염이다. 수술 부위 감염은 환자에게 큰 불편을 야기하고 잠재적으로 생명을 위협하는 사건이며 입원 기간을 연장시킨다. 봉합재 및 기타 외과용 패스너의 표면에 대한 미생물 부착은 절개 감염 발생의 원인 중 하나로 인식되었다.

[0005] 따라서, 기기 자체의 콜로니화를 제한할 뿐만 아니라 항미생물제의 제어 방출을 제공하도록 작용할 수 있는 대체 봉합재 및 기타 의료 기기에 대한 명확한 필요성이 존재한다.

[0006] 본 발명자들은 특정 소형 항미생물 펩티드를 생분해성 폴리에스테르와 조합하여 그 자체로(예를 들어, 3D 프린팅으로 제조된 기기) 또는 다른 의료 기기의 코팅으로서 사용될 수 있는 재료를 제공할 수 있음을 발견했다.

[0007] 항미생물 펩티드는 항생제 내성 균주를 비롯한 광범위한 플랑크톤 박테리아 및 생물막에 대해 활성이 있기 때문에 새로운 항미생물제로서 유망한 후보이다. 더욱이, 박테리아는 단백질 표적에 작용하기 보다는 지질 막의 파괴를 포함하는 그들의 작용 방식으로 인해 신속하게 작용하는 펩티드에 대한 내성을 덜 발달시킬 것이다. 그러나, 제어 방출을 제공할 수 있는 기질(substrate) 내로 펩티드를 제제화하는 것은 간단하지 않고, 펩티드는 일반적으로 다른 종류의 약제에 비해 가용성이 불량하고, 일반적으로 펩티드를 기질 내로 조합하거나 혼합(compounding)하는 데 필요할 수 있는 온도의 종류에서 분해된다.

[0008] 본 발명자들은 활성 항미생물제 즉, 항미생물제의 제어 방출을 제공하기 위해 사용될 수 있고 침출 가능(leachable)하고 주변 환경에서 박테리아 성장을 억제할 수 있는 재료를 제조할 수 있었다. 항미생물제는 또한 재료 내에서 및/또는 중합체와 항미생물제의 혼합물로 코팅된 기기 상에서 미생물 성장을 제어하도록 작용한다.

발명의 내용

[0009] 따라서, 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제제를 제공하고,

[0010] AA-AA-AA-X-Y (I)

[0011] 임의의 순서로, 상기 AA (아미노산) 모이어티 중 2개는 양이온성 아미노산, 바람직하게는 리신 또는 아르기닌이지만, pH 7.0에서 양전하를 갖는 히스티딘 또는 임의의 비유전적으로 코딩된 또는 변형된 아미노산일 수 있고, 상기 AA 중 1개는 큰 친유성 R 기를 갖는 아미노산이고, R 기는 14-27개 이상의 비수소 원자를 갖고 바람직하게는 융합 또는 연결될 수 있는 2개 이상, 예를 들어 2 또는 3개 이상의 시클릭기를 포함하며, 이들 시클릭기는 일반적으로 5개 또는 6개의 비수소 원자, 바람직하게는 6개의 비수소 원자 (융합된 고리의 경우에, 물론 비수소 원자는 공유될 수 있음)를 포함할 수 있고;

[0012] X는 N 원자이며, 이는 분지형 또는 비분지형 C_1-C_{10} 알킬기 또는 아릴기, 예를 들어 메틸, 에틸 또는 페닐에 의해 치환될 수 있지만 바람직하게는 치환되지 않으며, 상기 알킬기 또는 아릴기는 N, O 및 S로부터 선택된 최대 2개의 헤테로원자를 포함할 수 있고;

[0013] Y는 R_1-R_2-R_3, R_1-R_2-R_2-R_3, R_2-R_2-R_1-R_3, R_1-R_3 및 R_4로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0014] 여기서

[0015] R_1은 C, O, S 또는 N, 바람직하게는 C이고;

[0016] R_2는 C이고;

[0017] 각각의 R_1 및 R_2는 C_1-C_4 알킬기에 의해 치환되거나 비치환될 수 있고, 바람직하게는 Y는 R_1-R_2-R_3(R_1은 바람직하게는 C임)이고 바람직하게는 이 기는 치환되지 않으며, 이때 Y가 R_1-R_2-R_2-R_3 또는 R_2-R_2-R_1-R_3인 경우 바람직하게는 R_1 및 R_2 중 하나 이상이 치환되고;

[0018] R_3은 각각 5 또는 6 개의 비수소 원자(바람직하게는 모든 C 원자이지만 N, O 또는 S 를 임의로 포함함) 의 1 내지 3 개의 시클릭기를 포함하는 기이고, 2 개 이상의 시클릭기가 융합될 수 있고; 고리 중 하나 이상은 치환될 수 있고, 이들 치환은 극성기를 포함할 수 있지만, 일반적으로 포함하지 않을 것이고, 적합한 치환기는 할로겐, 바람직하게는 브롬 또는 플루오린 및 C_1-C_4 알킬기를 포함하고; R_3 은 최대 15 개의 비수소 원자, 바람직하게는 5-12 개, 가장 바람직하게는 페닐을 포함하며;

[0019] R_4는 2-20개의 비수소 원자를 갖는 지방족 모이어티이고, 바람직하게는 이들은 탄소 원자이지만 산소, 질소 또는 황 원자가 포함될 수 있고, 바람직하게는 R_4는 3-10개, 가장 바람직하게는 3-6개의 비수소 원자를 포함하고 모이어티는 선형, 분지형 또는 시클릭일 수 있다. R_4기가 시클릭기를 포함하는 경우 이는 바람직하게는 X의 질소 원자에 직접 결합된다.

[0020] 바람직한 화합물은 선형 또는 분지형인 R_4기, 특히 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, sec부틸, tert부틸, 펜틸 및 이의 이의 이성질체, 헥실 및 이의 이의 이성질체 등을 포함하는 선형 또는 분지형 알킬기를 포함하고; 프로필, 이소프로필, 부틸 및 이소부틸이 특히 바람직하다.

[0021] 일부 구현예에서, R_4는 6-16개의 비수소 원자를 갖는 지방족 모이어티(바람직하게는 알킬기)이고, 바람직하게는 이들은 탄소 원자이지만, 산소, 질소 또는 황 원자가 포함될 수 있고, 모이어티는 선형, 분지형 또는 시클릭일 수 있다.

[0022] 일부 바람직한 구현예에서, R_4는 이소프로필기다.

[0023] 시클릭기를 포함하는 R_4기 중에서, R_4가 시클로헥실 또는 시클로펜틸인 분자가 바람직하다.

[0024] 양이온성 아미노산을 제공할 수 있는 적합한 비유전적으로 코딩된 아미노산 및 변형된 아미노산은 리신, 아르기닌 및 히스티딘의 유사체, 예컨대 호모리신, 오르니틴, 디아미노부티르산, 디아미노피멜산, 디아미노프로피온산

및 호모아르기닌 뿐만 아니라 트리메틸리신 및 트리메틸오르니틴, 4-아미노피페리딘-4-카르복실산, 4-아미노-1-카르밤이미도일피페리딘-4-카르복실산 및 4-구아니디노페닐알라닌을 포함한다.

[0025] AA의 큰 친유성 R 기는 O, N 또는 S와 같은 헤테로 원자를 포함할 수 있고, 일반적으로 1개 이하의 헤테로원자, 바람직하게는 질소이다. 이러한 R 기는 바람직하게는 2개 이하의 극성기를 가질 것이며, 더욱 바람직하게는 없거나 1개를 가질 것이며, 가장 바람직하게는 어떠한 극성기도 갖지 않을 것이다.

[0026] 상기 화합물, 바람직하게는 펩티드는 바람직하게는 화학식 (II)의 화합물이고,

[0027] AA_1-AA_2-AA_1-X-Y (II)

[0028] 여기서,

[0029] AA_1은 양이온성 아미노산, 바람직하게는 리신 또는 아르기닌이지만 히스티딘 또는 pH 7.0에서 양전하를 갖는 비유전적으로 코딩된 또는 변형된 아미노산일 수 있고;

[0030] AA_2는 큰 친유성 R 기를 갖는 아미노산이고, R기는 14-27개의 비수소 원자를 갖고 바람직하게는 2 개 이상, 예를 들어 2 또는 3 개의 융합 또는 연결될 수 있는 시클릭기를 포함하며, 이들 시클릭기는 일반적으로 5 또는 6 개의 비수소 원자, 바람직하게는 6 개의 비수소 원자를 포함할 수 있고;

[0031] X 및 Y는 상기 정의된 바와 같다.

[0032] 더욱 바람직한 화합물은 화학식 (III) 및 (IV)의 화합물을 포함한다:

[0033] AA_2-AA_1-AA_1-X-Y (III)

[0034] AA_1-AA_1-AA_2-X-Y (IV)

[0035] 여기서, AA_1, AA_2, X 및 Y는 상기 정의된 바와 같다. 화학식 (II)의 분자가 더욱 바람직하다.

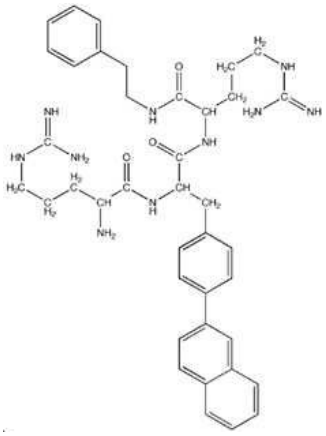
[0036] 상기 화합물 중에서, 특정 화합물이 특히 바람직하다. 특히, 본원에서 AA_2로 편리하게 지칭되는, 큰 친유성 R 기를 갖는 아미노산이 트리부틸 트립토판(Tbt) 또는 비페닐알라닌 유도체, 예컨대 Phe (4-(2-Naphthyl)) [본원에서 Bip(4(2Naphthyl))로도 지칭됨], Phe (4-(1-Naphthyl)) [본원에서 Bip (4-(1-Naphthyl)로 지칭됨], Bip (4-n-Bu), Bip (4-Ph) 또는 Bip (4-T-Bu); Phe (4-(2-Naphthyl)) 및 Tbt가 가장 바람직한 화합물이다. 일부 바람직한 구현예에서, 큰 친유성 R 기를 갖는 아미노산은 트리부틸 트립토판(Tbt)이다.

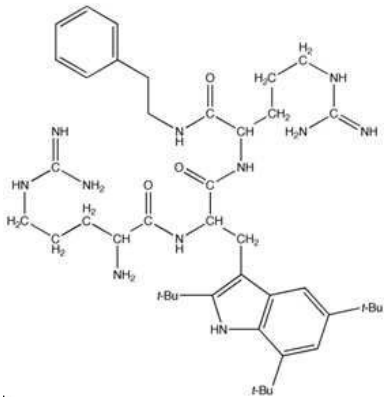
[0037] 화합물의 또 다른 바람직한 기는 Y가 상기 정의된 바와 같은 R_1-R_2-R_3이고, 바람직하게는 R_1 및 R_2가 비치환되고, 가장 바람직하게는 R_1 및 R_2가 모두 탄소 원자인 화합물이다.

[0038] 화합물의 추가의 바람직한 기는 -X-Y가 함께 $-NHCH_2CH_2Ph$ 기인 화합물이다.

[0039] 화합물은 모든 거울상이성질체 형태, 아미노산 R 기 및 C-말단 캡핑기 "-X-Y" 내의 키랄 중심으로부터 생성된 D 및 L 아미노산 및 거울상이성질체를 포함한다. α 아미노산 뿐만 아니라 β 및 γ 아미노산은 모두 AA 단위로 간주될 수 있는 N 치환된 글리신이기 때문에 용어 '아미노산' 내에 포함된다. 본 발명의 분자는 베타 펩티드 및 뎁시펩티드를 포함한다.

[0040] 가장 바람직한 화합물은 하기와 같다:

[0041] 

[0042] 

[0043] t-Bu는 3급 부틸기를 나타낸다. 아미노산 2,5,7-트리스-tert-부틸-L-트립토판을 포함하는 제2 화합물은 본 발명에서 가장 바람직한 화합물(본원에서 AMC-109로도 지칭됨)이다. Arg, 특히 Lys 대신에 다른 양이온성 잔기를 포함하는 상기 화합물의 유사체 또한 매우 바람직하다. 상기 정의된 바와 같은 대안적인 C 말단 캡핑기를 포함하는 유사체 또한 매우 바람직하다.

[0044] 화합물의 추가의 바람직한 기는 -X-Y가 함께 $-NHCH(CH_3)_2$, $-NH(CH_2)_5CH_3$, $-NH(CH_2)_3CH_3$, $-NH(CH_2)_2CH_3$, $-NHCH_2CH(CH_3)_2$, -NH시클로헥실 및 -NH시클로펜틸로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물이고, 특히 -X-Y가 $-NHCH(CH_3)_2$ 또는 $-NH(CH_2)_5CH_3$ 기인 화합물이 바람직하다. 화합물의 특히 바람직한 기는 -X-Y가 함께 $-NHCH(CH_3)_2$ 이다.

[0045] 바람직한 화합물은 AA_1이 아르기닌이고, AA_2가 트리부틸 트립토판이고 및 -X-Y가 함께 $NHCH(CH_3)_2$인 화합물이다.

[0046] 본 발명에서 사용하기 위한 화합물은 바람직하게는 펩티드이다.

[0047] 화학식 (I) 내지 (IV)의 화합물은 펩티드 유사체 및 본원에 기질되고 정의된 펩티드의 펩티드 유사체일 수 있고, 또한 본 발명에 따른 용도의 화합물을 나타낸다. 펩티드 유사체는 일반적으로 이의 펩티드 등가물의 극성, 3차원 크기 및 기능성(생체활성)을 보유하지만 펩티드 결합은 종종 더 안정한 결합에 의해 대체된 것을 특징으로 한다. '안정한'은 가수분해 효소에 의한 효소적 분해에 대해 더욱 내성인 것을 의미한다. 일반적으로, 아미드 결합(아미드 결합 대용물)을 대체하는 결합은 아미드 결합의 많은 특성, 예를 들어 형태, 입체 부피, 정전기 특성, 수소 결합 가능성 등을 보존한다. "Drug Design and Development"의 14장, Krogsgaard, Larsen, Liljefors 및 Madsen (Eds) 1996, Horwood Acad. Pub는 펩티드 유사체의 설계 및 합성을 위한 기술에 대한 일반적인 논의를 제공한다. 현재, 분자가 효소의 특이적 활성 부위보다는 막과 반응하는 경우, 친화성 및 효능 또는 기질 기능을 정확하게 모방하는 것으로 기재된 문제 중 일부는 관련이 없으며, 펩티드 유사체는 주어진 펩티드 구조 또는 필요한 작용기의 모티프를 기초로 하여 용이하게 제조될 수 있다.

[0048] 적합한 아미드 결합 대용물은 하기 기를 포함한다: N-알킬화(Schmidt, R. 등, Int. J. Peptide Protein Res., 1995, 46,47), 레트로-인버스 아미드(Chorev, M and Goodman, M., Acc. Chem. Res, 1993, 26, 266), 티오아미

드(Sherman D.B. and Spatola, A.F. J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, 433), 티오에스테르, 포스포네이트, 케토메틸렌(Hoffman, R.V. and Kim, H.O. J. Org. Chem., 1995, 60, 5107), 하이드록시메틸렌, 플루오로비닐(Allmendinger, T. 등, Tetrahydron Lett., 1990, 31, 7297), 비닐, 메틸렌아미노(Sasaki, Y and Abe, J. Chem. Pharm. Bull. 1997 45, 13), 메틸렌티오(Spatola, A.F., Methods Neurosci, 1993, 13, 19), 알칸(Lavielle, S. et. Al., Int. J. Peptide Protein Res., 1993, 42, 270) 및 설폰아미도(Luisi, G. 등 Tetrahedron Lett. 1993, 34, 2391).

[0049] 본 발명의 펩티드 유사체 화합물은 일반적으로 아미노산과 크기 및 기능이 거의 동등한 3개의 식별 가능한 서브유닛(AA 단위)을 가질 것이다. 따라서, 용어 '아미노산'은 펩티드 유사체 화합물의 등가 서브유닛을 지칭하기 위해 본원에서 편리하게 사용될 수 있다. 더욱이, 펩티드 유사체는 아미노산의 R 기와 상응한기를 가질 수 있으며 적합한 R 기 및 N 및 C 말단 변형기의 논의는 약간의 수정을 가하여 펩티드 유사체 화합물에 대해 적용한다.

[0050] 상기 참조된 교재에서 논의된 바와 같이, 아미드 결합의 대체뿐만 아니라, 펩티드 유사체는 더 큰 구조적 모이어티를 디- 또는 트리펩티드 유사체 구조로 대체하는 것을 포함할 수 있고, 이 경우에, 아졸-유래된 유사체와 같은 펩티드 결합을 포함하는 유사체 부분이 디펩티드 대체물로서 사용될 수 있다. 그러나, 상기 논의된 바와 같이 아미드 결합이 대체된 펩티드 유사체 및 이에 따른 펩티드 유사체 골격이 바람직하다.

[0051] 적합한 펩티드 유사체는 아미드 결합이 환원제, 예를 들어 보란 또는 수소화 시약, 예컨대 리튬 알루미늄-수소화물로의 처리에 의해 메틸렌 아민으로 환원되어진 환원된 펩티드를 포함한다. 이러한 환원은 분자의 전체 양이온성을 증가시키는 추가의 이점을 갖는다.

[0052] 다른 펩티드 유사체는 예를 들어 아미드-기능화된 폴리글리신의 단계적 합성에 의해 형성된 펩토이드를 포함한다. 일부 펩티드 유사체 골격은 이의 펩티드 전구체, 예컨대 과메틸화된 펩티드로부터 용이하게 입수가능할 것이고, 적합한 방법은 문헌 Ostresh, J.M. 등 in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91, 11138-11142에 기재되어 있다. 강염기성 조건은 O-메틸화에 비해 N-메틸화를 선호하며 펩티드 결합 및 N-말단 질소에서 질소 원자의 일부 또는 전부의 메틸화를 초래할 것이다.

[0053] 바람직한 펩티드 유사체 골격은 폴리에스테르, 폴리아민 및 이의 유도체뿐만 아니라 치환된 알칸 및 알켄을 포함한다. 펩티드 유사체는 바람직하게는 본원에 논의된 바와 같이 변형될 수 있는 N 및 C 말단을 가질 것이다.

[0054] 본 발명에 따른 용도의 화합물 (예를 들어, 펩티드)은 항미생물 활성 (일반적으로 항박테리아 활성)을 나타내고, 특히 이들은 직접적인 막-영향 메커니즘을 통해 세포독성 효과를 발휘하고 막 작용 항미생물제로 지칭될 수 있다. 이들 화합물은 세포 막을 용해, 불안정화 또는 심지어 천공한다. 이는 표적 세포, 예를 들어 세포 표면 수용체의 단백질성 성분에 작용하거나 이와 상호작용하는 작용제에 비해 뚜렷한 치료 이점을 제공한다. 돌연변이는 항생제 내성을 초래하는 표적 단백질의 새로운 형태를 초래할 수 있지만, 세포독성 효과를 방지하기 위해 지질막에 급진적인 변화가 발생할 가능성은 훨씬 더 적다. 용해 효과는 매우 빠른 세포 사멸을 야기하므로 박테리아가 증식할 기회를 갖기 전에 박테리아를 사멸시키는 이점을 갖는다. 또한, 분자는 표적 미생물을 사멸시키거나 이에 이에 해를 주는 다른 유용한 특성, 예를 들어 단백질 합성을 억제하는 능력을 가질 수 있고, 따라서 이들은 다중-표적 활성을 가질 수 있다.

[0055] 본 발명에 사용하기 위한 화합물은 임의의 편리한 방식으로 합성될 수 있다. 일반적으로, 존재하는 반응성기 (예를 들어, 아미노, 티올 및/또는 카르복실)는 전체 합성 동안 보호될 것이다. 따라서, 합성에서의 최종 단계는 본 발명의 보호된 유도체의 탈보호일 것이다.

[0056] 펩티드를 구축하는 데 있어서, C-말단 출발 절차가 바람직하지만, C-말단 또는 N-말단에서 원칙적으로 출발할 수 있다.

[0057] 펩티드 합성 방법은 당업계에 잘 알려져 있지만, 본 발명의 경우 고체상 지지체 상에서 합성을 수행하는 것이 특히 편리할 수 있으며, 이러한 지지체는 당업계에 잘 알려져 있다.

[0058] 아미노산에 대한 다양한 보호기가 알려져 있으며 적합한 아민 보호기는 카르보벤족시 (또한 Z로 표시됨), t-부톡시카르보닐 (또한 Boc로 표시됨), 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤젠 술포닐 (Mtr) 및 9-플루오레닐메톡시-카르보닐 (또한 Fmoc로 표시됨)을 포함할 수 있다. 펩티드가 C-말단부로부터 구축되는 경우, 추가된 각각의 새로운 잔기의 α-아미노기에 아민-보호기가 존재할 것이고, 다음 커플링 단계 전에 선택적으로 제거될 필요가 있을 것임을 알 수 있다.

[0059] 예를 들어, 사용될 수 있는 카르복실 보호기는 용이하게 절단된 에스테르기, 예컨대 벤질 (Bzl), p-니트로벤질

(ONb), 펜타클로로페닐 (OPClP), 펜타플루오로페닐 (OPfp) 또는 t-부틸 (OtBu) 기, 뿐만 아니라 고체 지지체 상의 커플링기, 예를 들어 폴리스티렌에 연결된 메틸기를 포함한다.

[0060] 티올 보호기는 p-메톡시벤질 (Mob), 트리틸 (Trt) 및 아세트아미도메틸 (Acm)을 포함한다.

[0061] 아민- 및 카르복실-보호기를 제거하기 위한 광범위한 절차가 존재한다. 그러나, 이들은 사용된 합성 전략과 일치해야 한다. 측사슬 보호기는 다음 커플링 단계 전에 일시적인 α-아미노 보호기를 제거하는 데 사용되는 조건에 대해 안정해야 한다.

[0062] 아민 보호기, 예컨대 Boc 및 카르복실 보호기, 예컨대 tBu는 산 처리, 예를 들어 트리플루오로아세트산에 의해 동시에 제거될 수 있다. 티올 보호기, 예컨대 Trt는 산화제, 예컨대 요오드를 사용하여 선택적으로 제거될 수 있다.

[0063] 혼합(Compounding, "혼합된(compounded)")은 두 가지 중합체 또는 중합체와 하나 이상의 첨가제의 혼합(mixing) 및/또는 조합(blending)을 설명하는 데 사용되는 용어이다. 이것은 용융 상태에서 조합하거나 용액에서 여러 성분을 결합하여 편리하게 달성할 수 있다. 이러한 접근 방식 모두 본원의 실시예에 기재되어 있다. 생성된 혼합물은 이상적으로는 균질하거나 거의 균질하다. 의심의 여지를 없애기 위해, 혼합은 폴리에스테르와 화학식 (I)의 화합물 사이의 공유 결합을 수반하지 않고, 오히려 혼합은 폴리에스테르와 화학식 (I)의 화합물 사이의 비공유적, 방출가능한 결합을 초래한다. 따라서, 화합물은 폴리에스테르와 방출가능하게 회합되는 것으로 고려된 것일 수 있다.

[0064] 따라서, 화학식 (I)의 화합물은 본 발명의 제제로부터 방출될 수 있다(또는 제제로부터 침출되거나 제제로부터 확산될 수 있다). 이는 화학식 (I)의 화합물이 항미생물 활성을 갖기 때문에 본 발명의 맥락에서 중요하고, 사용 시 화합물이, 예를 들어 상처, 수술 부위의 감염, 또는 의료 기기의 이식 부위를 예방하거나 치료하기 위해 항미생물 활성을 필요로하는 부위로 제제로부터 방출될 수 있는 것이 바람직하다.

[0065] 바람직하게는, 사용 시 제제로부터 화학식 (I)의 화합물의 제어된 (즉, 지속된) 방출이 존재한다. 예를 들어, 적어도 6, 8, 12 또는 14시간 동안 치료적 유효량의 화합물의 방출이 존재할 수 있다. 치료적 유효량은 바람직하게는 표적 박테리아에 대한 화합물의 최소 억제 농도 (MIC)를 초과하는 농도의 화합물을 국소 환경으로의 전달을 초래할 것이다. 활성 화합물과 혼합되지 않은 생분해성 폴리에스테르 층을 본 발명의 제제 위에 (예를 들어 의료 기기의 외부 층으로서) 적용함으로써 방출 시간을 연장할 수 있다.

[0066] 본 발명의 제제로부터 방출되는 활성 화합물의 능력은 임의의 적합한 방법에 의해 용이하게 결정될 수 있고, 당업자는 이러한 방법에 익숙하다. 적합한 방법은 본원의 실시예에 기재되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 제제로 코팅된 봉합재는 박테리아 (예를 들어, 스타필로코쿠스(Staphylococcus) 속의 박테리아)로 접종된 한천 플레이트와 접촉될 수 있고, 적절한 배양후, 봉합재 주위의 "억제 구역" (즉, 박테리아 성장을 갖지 않거나 감소된 박테리아 성장을 갖는 구역)의 존재에 대해 플레이트를 검사할 수 있다. "억제 구역" (예를 들어, 항미생물 화합물을 포함하지 않는 대조군 봉합재를 사용한 시험과 비교하여)의 존재는 화합물이 제제로부터 방출될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0067] 본 발명의 제제는 생체내에서 화학식 (I)의 화합물을 방출하는 제어 방출 제제로 고려될 수 있다. 화학식 (I)의 화합물은 폴리에스테르를 통해(또는 적어도 부분적으로 분산) 분산 (해제가능하게 분산)되는 것으로 고려될 수 있다.

[0068] 화학식 (I)의 화합물은 폴리에스테르가 미생물 콜로니화 및 생물막 형성에 대해 내성이 있게 한다. 따라서 코팅 및/또는 기기는 효과적으로 스스로를 깨끗하게 유지하며, 이는 거주지 또는 기타 의료 기기가 종종 미생물 부착 및 성장 장소이기 때문에 매우 유리하다.

[0069] 액체 매질 시험은 활성 화합물의 방출과 항-콜로니 효과를 모두 평가하는 데 사용할 수 있다. 본 발명의 폴리에스테르로 코팅된 기기는 액체 박테리아 브로쓰에 침지될 수 있다. 누출 효능(방출)은 브로쓰에서 살아남은 박테리아의 수를 세어 결정되며 항-콜로니화 효능은 박테리아 브로쓰에 노출된 후 기기에 부착된 살아있는 박테리아의 수를 세어 결정한다.

[0070] 본 발명에서 사용되는 생분해성 중합체는 반복되는 에스테르 그룹을 포함하지만 다른 관능 그룹도 포함할 수 있으므로 폴리에스테르로 분류된다. 전형적으로 이들은 에스테르 그룹에 의해 종결되지만 유리 카르복실산 그룹 또는 알킬 에스테르 그룹이 말단 그룹으로 사용될 수 있다. 에스테르 말단 및 알킬 에스테르 그룹으로 캡핑된 중합체는 일반적으로 유리 카르복실산 그룹보다 분해 시간이 더 길다.

[0071] 특히 적합한 중합체는 폴리락타이드(D 또는 L 형태), 폴리글리콜리드, 폴리디옥사논 및 폴리카프로락톤을 포함한다. 이러한 동일한 단량체를 포함하는 공중합체(블록 공중합체 포함)가 또한 사용될 수 있으며, 예를 들어 D- 및 L-락타이드(L-락타이드 중합체가 바람직함), 락타이드 및 글리콜라이드 및 락타이드 및 카프로락톤의 공중합체가 사용될 수 있다. 폴리(D,L-락타이드-코-글리콜리드)의 50:50 거울상이성질체 혼합물이 바람직하다. 트리메틸렌 카보네이트 단량체를 포함하는 공중합체를 포함하는 중합체가 또한 적합할 수 있다. 공중합체의 단량체 비율은 다양할 수 있지만 락타이드를 포함하는 공중합체는 일반적으로 50% 이상, 예를 들어 적어도 60% 또는 %70 락타이드 단량체를 포함한다. 따라서 제제는 단일 중합체 유형, 단일 공중합체 또는 하나 이상의 중합체 및/또는 공중합체의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0072] 생분해성 중합체는 일반적으로 합성된다. 생분해성 중합체의 사용은 생의학 분야에서 잘 알려져 있다. 본 발명에 사용되는 생분해성 중합체는 무독성이어야 하고 환자가 이물질로 인지하지 않아야 한다. 생분해 생성물은 또한 비세포독성이어야 하고 신체에서 쉽게 제거되어야 한다.

[0073] 생분해성은 사용 시, 즉 동물의 신체에서(또는 접촉 시) 분해 속도로 판단된다. 생분해성 폴리에스테르는 또한 생체 흡수성(즉, 신체에 의해 분해 및 흡수됨)이라고 불릴 수 있다. 분해는 중합체마다 크게 다르지만 일반적으로 1주 또는 2주에서 4년 이상이다. 바람직하게, 현장에서, 폴리에스테르는 6개월 미만, 예를 들어 2-4개월 내에 완전히 분해될 것이다. 다른 바람직한 실시예에서 중합체는 최대 4년 또는 그 이상 동안 지속될 수 있다. 당업자는 관심 있는 상이한 중합체의 분해 시간을 알고 있고 의도된 용도에 따라 중합체를 선택할 수 있다. 예를 들어, 봉합재는 단 1주 또는 몇 주 동안만 지속되는 것이 바람직할 수 있는 반면, 일부 임플란트, 예를 들어 정형외과 또는 심장 임플란트는 수년 동안 신체에 남아 있을 수 있다. 화학식 (I)의 화합물과의 혼합은 중합체의 분해 속도에 크게 영향을 미치지 않는다.

[0074] 중합체의 고유 점도(dL/g로 측정)는 또한 중합체마다 다를 것이며, 전형적으로 0.1 또는 0.2 내지 6 또는 8, 바람직하게는 0.5 내지 2.5, 보다 바람직하게는 0.8 내지 2.2, 가장 바람직하게는 0.8 내지 1.2이다.

[0075] 분자량(중량 평균)은 또한 선택한 중합체와 관심 있는 특정 의학적 적용에 따라 달라진다. 일반적인 분자량은 3,000~30,000, 예를 들어 5,000~25,000이다. 최대 50,000의 분자량이 있지만 일부예에서는 80,000, 100,000 이상이 사용될 수 있다. 바람직한 분자량은 3,000 내지 20,000, 예를 들어 3,000 내지 10,000 또는 15,000이다.

[0076] 겔 투과 크로마토그래피는 고유 점도와 분자량을 모두 측정하는 데 사용할 수 있다.

[0077] 적합한 의료용 생분해성 폴리에스테르 공급체에는 Evonik(Resomer® 범위)가 포함된다. 적합한 중합체는 상업적으로 쉽게 입수할 수 있으며 알코올 및 산의 직접 축합, 개환 중합 및 금속 촉매 중합 반응을 비롯한 다수의 반응에 의해 편리하게 합성될 수 있다.

[0078] 본 발명의 제제의 제조에는 2가지 별개의 접근법이 편리하게 사용될 수 있다.

[0079] 먼저, 폴리에스테르와 화학식 (I)의 화합물을 함께 용융시켜 혼합할 수 있다. 중합체를 먼저 용융시킨 후 화학식 (I)의 화합물을 첨가하거나 용융 전에 화합물을 첨가할 수 있다. 화합물의 첨가는 중합체의 녹는점에 큰 영향을 미치지 않는다. 화학식 (I)의 화합물, 특히 화학식 (I)의 펩티드가 이들을 생분해성 폴리에스테르와 혼합하는데 필요한 가열을 견딜 수 있다는 것은 매우 놀라운 일이다. 이러한 분자는 예기치 않은 열 안정성을 보여준다.

[0080] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제제의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 용융시키는 것을 포함한다. 본원에 기재된 본 발명의 다른 측면의 실시예는 필요한 부분만 약간 수정하여 본 발명의 이러한 측면에 적용된다. 이러한 용융을 통한 혼합은 바람직하게는 급속 가열, 예를 들어 섭씨 120-230도(폴리에스테르의 융점에 따라 다름)로 5분 미만, 예를 들어 4분 미만, 예를 들어 약 3분 내에 가열하여 수행된다. 이런 식으로 중합체는 펩티드가 분해되기 전에 녹는다. 화학식 (I)의 화합물은 바람직하게는 최대 2분 또는 3분 동안 고온(예를 들어, 100도 초과)에만 노출된다(혼합물로의 열 전달 허용), 혼합물은 폴리에스테르가 녹고 화학식 (I)의 화합물과 혼합되자마자 열원에서 제거된다. 이 구현예에서, 약 섭씨 230도 미만의 녹는점을 갖는 폴리에스테르가 바람직하다.

[0081] 대안적으로, 그리고 바람직하게는, 중합체 및 화학식 (I)의 화합물은 용매를 사용하여 혼합될 수 있다. 한 구현예에서 생분해성 중합체는 제1 용매에 용해되고 화학식 (I)의 화합물은 제1 용매와 혼화성인 제2 용매에 용해된 다음 두 용액이 혼합된다. 두 용매는 바람직하게는 약간의 극성 성질을 갖는 유기 용매인 것이 바람직하다.

[0082] 두 용매는 혼화성이고 중합체 및 화학식 (I)의 화합물을 각각 용해시킬 수 있도록 선택되어야 한다. 용매는 또한 혼합될 때 성분을 용매화하는 능력을 유지해야 하며, 혼합될 때 혼화성 용매라도 성분 중 하나의 침전을 초래할 수 있다. 중합체에 적합한 용매는 클로로포름, 에틸 아세테이트, 아세톤 및 테트라히드로푸란(THF)을 포함하고; 극성 비양성자성 용매가 바람직할 수 있다. 화학식 (I)의 화합물에 적합한 용매는 더욱 다양하며 물, 메탄올, 에탄올, 클로로포름, THF 및 DMSO를 포함한다. 중합체에 대한 바람직한 용매는 에틸 아세테이트이고 화학식 (I)의 화합물에 대한 용매는 알코올, 예를 들어 에탄올이다.

[0083] 대안적으로, 화학식 (I)의 화합물 및 중합체 둘 모두는 혼합 전, 혼합시 또는 혼합 후에 단일 용매에 용해될 수 있다. 이 접근법에 적합한 용매는 THF 및 클로로포름을 포함한다. 화학식 (I)의 화합물을 장시간, 예를 들어 적어도 4시간, 바람직하게는 적어도 12시간, 아마도 1일 이상, 가능하게는 최대 7일 또는 14일 동안 용매, 예를 들어 THF와 조합하는 것이 필요할 수 있다. AMC-109와 같은 화학식 (I)의 화합물이 THF 및 클로로포름에 가용성이라는 것은 매우 놀라운 일이다.

[0084] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제제의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 화학식 (I)의 화합물, 생분해성 폴리에스테르, 및 상기 화합물 및 상기 폴리에스테르를 용해할 수 있는 하나 이상의 용매의 혼합물을 형성하고, 임의로 상기 혼합물을 건조시키는 것을 포함한다.

[0085] 바람직한 구현예에서 본 발명은 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제제의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 (i) 화학식 (I)의 화합물을 포함하는 제1 용액을 제공하는 단계; (ii) 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제2 용액을 제공하는 단계, 여기서 상기 제2 용액은 제1 용액과 혼화성임; 및 (iii) 상기 제1 용액과 제2 용액을 혼합하는 단계를 포함한다. 본원에 기재된 본 발명의 다른 측면의 실시예는 필요한 부분만 약간 수정하여 본 발명의 이러한 측면에 적용된다. 제1 및 제2 용액을 생성하기 위해 사용되는 용매는 동일하거나 상이할 수 있다. 바람직한 용매는 상기에 기재되어 있다.

[0086] 혼합 후 생성된 혼합물을 건조할 수 있으며, 이는 능동 또는 수동 공정일 수 있으며, 수동 건조 공정은 예를 들어 1-6일과 같이 며칠이 걸릴 수 있다.

[0087] 폴리에스테르를 화학식 (I)의 화합물과 혼합하는 또 다른 방법은 전기방사(electrospinning)이다. 전기방사는 중합체 용액에서 섬유를 만들 수 있는 전기유체역학 현상에 의해 지배되는 잘 알려진 전압 구동 프로세스이다. 전기방사 방법을 통해 본 발명에 따른 제제를 얻기 위해, 폴리에스테르 및 화학식 (I)의 화합물을 포함하는 용액(또는 "방사 용액")을 화합물을 포함하는 섬유로 전기방사한다. 이 용액은 편리하게 상기 논의된 바와 같이 혼화가능하고 중합체 또는 화학식 (I)의 화합물을 개별적으로 용해시킬 수 있는 2개의 용매를 포함할 수 있다. 또는 THF와 같은 단일 용매를 사용할 수 있다. 적합한 전기방사 방법은 Scaffaro 등, European Polymer Journal 96 (2017), 266-277에 기술된 바와 같다.

[0088] 혼합된 중합체 제제 중 화학식 (I)의 화합물의 양은 w/w 기준으로 2 또는 3%에서 25 또는 30%까지, 전형적으로 4 내지 15 또는 20%일 수 있다.

[0089] 본 발명의 제제는 바람직하게는 의료 기기에 코팅으로서 첨가되지만, 일부 의료 기기는 본 발명의 제제로 구성될 수 있거나 의료 기기는 예를 들어 3D 프린팅을 통해 제제로 만들어진 섹션 또는 구성요소를 가질 수 있다. 따라서 본 발명의 추가 측면은 본원에서 정의된 바와 같은 본 발명의 제제로 부분적으로 코팅된 것을 포함하는 코팅된 의료 기기다. 바람직하게는 기기의 전체 외부 표면이 본 발명의 제제로 코팅된다. 이 코팅은 기기의 표면(체액을 포함하여 신체와 접촉하는 모든 표면)에 제제 층을 형성한다. 층의 두께는 원하는 기능성을 제공하도록, 특히 원위치에서 원하는 제어 방출 프로파일을 제공하도록 선택될 것이다.

[0090] 본 발명의 추가의 측면은 의료 기기에 적용된 본원에 정의된 바와 같은 본 발명의 제제를 제공한다.

[0091] 기기에는 봉합재, 수술용 패스너, 카테터, 라인 등, 고관절 및 무릎 임플란트와 같은 정형외과용 임플란트를 포함한 임플란트, 치과용 임플란트, 핀, 스텐트, 심장 박동 기기 및 뇌심부 자극 기기가 포함된다. 봉합재가 특히 바람직하다.

[0092] 코팅될 기기는 본 발명의 용융된 제제 또는 생분해성 폴리에스테르, 화학식 (I)의 화합물 및 하나 이상의 용매를 모두 포함하는 혼합물에 (아마도 수회, 예를 들어 3-10번) 침지될 수 있고, 말리거나 건조될 수 있다. 적합한 용매 및 혼화성 용매 혼합물은 본원에서 논의된 바와 같다. 침지 방법은 봉합재와 같은 기기에 특히 적합한다. 이러한 침지 방법은 봉합재와 같은 기기에 특히 적합하다. 대안적으로, 본 발명의 제제는 의료 기기, 예를

들어 임플란트에, 기기의 표면 상에의 페인팅에 의해, 예를 들어 분무 페인팅에 의해 적용될 수 있다. 본 발명의 제제를 포함하는 의료 기기는 또한 3-D 인쇄에 의해 제조될 수 있다.

[0093] 본 발명의 제제가 적용될 수 있는 적합한 봉합재는 흡수성의, 임의로 편조된 봉합재를 포함한다. 이러한 봉합재는 나일론으로 제조될 수 있고, Ethicon(에티콘), 서길론(Surgilon) 및 누롤란(Nurolan) 봉합재를 포함한다. 본 발명의 제제 이외의 임의의 코팅이 없거나 또는 감소된 수준의 코팅을 갖는 봉합재를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 봉합재는 먼저 처리되어 실리콘 코팅을 제거할 수 있다.

[0094] 흡수성(생분해성) 봉합재는 본 발명에 따른 바람직한 의료 기기며 다음과 같이 형성될 수 있다. 이들은 락트산(단독으로 또는 조합된 거울상 이성질체 형태 모두), 글리콜산, 카프로락톤 및 디옥사논을 포함하는 그룹으로부터 선택된 단량체로부터 폴리에스테르로 편리하게 제조된다. 봉합재의 특성을 조정하기 위해 이러한 단량체 중 두 가지(또는 그 이상)를 공중합하거나, 다른 단일 중합체의 더 짧은 가닥을 블록 중합하는 것이 일반적이다. 흡수성 봉합재에서 가장 일반적인 중합체는 L-젖산(L-lactic)과 글리콜산의 공중합체인 PLGA이며 바람직하게는 약 90%의 글리콜산과 약 10%의 L-젖산(L-lactic)으로 만들어진다. 폴리글락틴 910은 이러한 공중합체 중 하나이며 높은 인장 강도를 가지며 흡수성 봉합재의 필라멘트로 편리하게 사용된다. 코팅은 필라멘트 질량의 2-10%의 양으로 적용된 락타이드-글리콜라이드 공중합체(예: 폴리글락틴 370)의 65/35 몰비인 것이 바람직하다. 취급 특성을 위해 동일한 양의 스테아린산칼슘을 첨가할 수 있다(즉, 코팅 중합체와 동일). 화학식 I의 화합물은 바람직하게는 코팅 또는 이에 적용되는 추가 코팅에서 혼합되지만 필라멘트에서도 혼합될 수 있다.

[0095] 본 발명의 봉합재는 봉합재 길이 미터당 화학식 (I)의 화합물 0.5-10mg, 바람직하게는 1-5, 예를 들어 1-3mg/m를 포함할 수 있다.

[0096] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 의료 기기를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 (i) 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제제를 제공하는 단계; 및 (ii) 상기 제제를 의료 기기에 적용(예를 들어, 기기를 상기 제제 또는 도장, 예를 들어 분무 도장 에 침지함으로써, 상기 제제를 기기 상에 또는 봉합재의 필라멘트 부분과 같은 기기의 코어에 침지함으로써)하는 단계를 포함한다. 제제를 의료 기기에 적용한 후 능동적으로 건조(예: 약간의 가열 또는 기류 적용)하거나 건조되도록 할 수 있다. 본원에 기재된 본 발명의 다른 측면의 실시예는 필요한 부분만 약간 수정하여 본 발명의 이러한 측면에 적용된다. 용매를 포함한 제제가 적용되는 경우, 용매는 건조 중에 증발하고 상기 의료 기기에 본 발명의 제제를 포함하거나 이로 구성된 코팅(또는 층)을 남길 것이다.

[0097] 유사한 방법에서, 본 발명은 본 발명의 의료 기기를 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 (i) 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제제를 제공하는 단계; 및 (ii) 상기 제제를 백킹 시트(backing sheet) 또는 다른 담체에 적용하는 단계를 포함한다. 이러한 방식으로 본 발명의 제제로 구성되거나 본질적으로 구성되는 의료 기기는 예를 들어 필름, 멤브레인, 시트 또는 접착제를 형성하도록 제조될 수 있다.

[0098] 추가의 측면은 화학식 (I)의 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제제, 또는 이러한 제제가 적용된 의료 기기를 제공하며, 여기서 제제는 본 발명의 방법에 의해 제조된다. 본원에 기재된 본 발명의 다른 측면의 구현예는 필요한 부분만 약간 수정하여 본 발명의 이러한 측면에 적용한다.

[0099] 본 발명의 추가의 측면은 치료 요법에 사용하기 위한 본 발명의 제제 및 기기를 제공한다.

[0100] "치료 요법(therapy)"은 치료 및 예방을 포함하며, 즉 이는 치료 및 예방 용도 둘 다를 포함한다.

[0101] 일부 구현예에서, 본 발명은 대상체의 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 제제 또는 의료 기기를 제공한다. 일부 바람직한 구현예에서, 감염 또는 잠재적 감염은 수술 부위 감염 또는 상처 감염, 예를 들어 꿰매거나 다른 수술용 패스너에 의한 봉합을 필요로 하는 상처 또는 기타 부위이다. 다른 바람직한 구현예에서, 감염 또는 잠재적 감염은 임플란트 (상기 논의된 바와 같음)와 연관된 것이고 기기 상의 또는 그 주위의 생물막 형성을 포함한다.

[0102] 바람직하게는, 감염은 박테리아 감염, 예를 들어 그람-양성 박테리아 (예를 들어, 스타필로코쿠스(Staphylococcus) 또는 스트렙토코쿠스(Streptococcus) 속의 박테리아)에 의한 감염이다. 일부 구현예에서, 감염은 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus) 감염이다. 일부 구현예에서, 감염은 스타필로코쿠스 에피더미디스(Staphylococcus epidermidis) 감염이다.

[0103] 본 발명의 제제, 기기, 용도 및 방법은 바람직하게는 광범위한 박테리아, 특히 그람 양성 및 그람 음성 박테리아에 대해, 예를 들어 스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 슈도모나스 에루지노사(Pseudomonas

aeruginosa), 대장균(Escherichia coli) 및 엔테로코커스 패시움(Enterococcus faecium) 모두에 대해 효과적이다(활성 화합물의 방출 및/또는 전체적 또는 부분적 항콜로니화 효과를 통해 주변 환경에서 박테리아 성장의 전체적 또는 부분적 억제).

[0104] 본 발명의 추가의 측면은 대상체에서 박테리아 성장을 억제하는데 사용하기 위한 본 발명의 제제 또는 의료 기기를 제공한다. 본원에 기재된 본 발명의 다른 측면의 구현예는 필요한 부분만 약간 수정하여 본 발명의 이러한 측면에 적용한다.

[0105] 본 발명의 추가의 측면은 치료 요법에 사용하기 위한, 바람직하게는 대상체의 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명의 제제 또는 기기를 제공한다. 본원에 기재된 본 발명의 다른 측면의 구현예는 필요한 부분만 약간 수정하여 본 발명의 이러한 측면에 적용한다.

[0106] 대안적으로, 본 발명은 감염의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 제제 또는 기기를 적용 (또는 투여)하는 것을 포함하는, 감염의 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 본 발명의 다른 측면의 구현예는 필요한 부분만 약간 수정하여 본 발명의 이러한 측면에 적용한다.

[0107] 대안적으로, 본 발명은 감염을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 제제 또는 의료 기기의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 적용(또는 투여)하는 것을 포함한다.

[0108] 본원에 기재된 본 발명의 다른 측면의 실시예는 필요한 부분만 약간 수정하여 본 발명의 이러한 측면에 적용된다.

[0109] 치료적 유효량은 임상 평가 및 선택된 화학식 (I)의 화합물에 대한 표적 박테리아에 대한 MIC 값에 기초하여 결정될 것이다.

[0110] 본 발명의 추가의 측면은 치료 요법에 사용하기 위한, 바람직하게는 대상체의 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물을 제공하며, 여기서 상기 화합물은 상기 화합물과 혼합된 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 제제로서, 또는 상기 제제가 적용된 의료 기기의 형태로 대상체에게 투여 (또는 적용)된다. 본원에 기재된 본 발명의 다른 측면의 구현예는 필요한 부분만 약간 수정하여 본 발명의 이러한 측면에 대해 적용한다.

[0111] 본원에 사용된 용어 "대상체" 또는 "환자"는 임의의 포유동물, 예를 들어 인간 및 임의의 가축, 가정용 또는 실험실용 동물을 포함한다. 구체적 예는 마우스, 래트, 돼지, 고양이, 개, 양, 토끼, 소 및 원숭이를 포함한다. 그러나, 바람직하게는, 대상체 또는 환자는 인간 대상체이다. 따라서, 본 발명에 따라 치료된 대상체 또는 환자는 바람직하게는 인간일 것이다.

[0112] 일부 구현예에서, 대상체 또는 환자는 감염을 갖는 환자, 또는 감염을 갖는 것으로 의심되는 환자, 또는 감염을 가질 위험이 있는 (또는 걸린) 환자이다. 위험이 있는 환자는 바람직한 환자 군이고, 의학적 임플란트를 필요로 하거나 수술을 받아야 하거나 또는 외과적 또는 다른 상처를 봉합할 필요가 있는 환자를 포함한다. 이들 환자에 대해, 본 발명의 제제를 포함하는 본 발명에 따른 의료 기기 예를 들어 봉합재, 기타 패스너 또는 정형외과용 임플란트가 선택될 수 있다. 이러한 기기는 기기 주위의 환자의 신체에서 무감염 국소 환경을 장려하기 위해 화학식 (I)의 항미생물 화합물을 방출하고, 기기 상에/ 내에 화학식 (I)의 화합물의 존재는 박테리아에 의한 기기 자체의 콜로니화를 억제한다.

[0113] 본 발명은 또한 본 발명의 의료 기기 중 하나 이상을 포함하는 키트를 제공한다. 바람직하게는, 상기 키트는 본원에 기재된 치료 방법 및 용도에서 사용하기 위한 것이다. 바람직하게는, 상기 키트는 키트 성분의 사용을 위한 설명서를 포함한다. 바람직하게는, 상기 키트는 예를 들어 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 감염을 치료 또는 예방하기 위한 것이고, 임의로 이러한 감염을 치료하기 위한 키트 성분의 사용을 위한 설명서를 포함한다.

[0114] 전체 출원 전반에 걸쳐 사용된 바와 같이, 용어 "a" 및 "an"은 언급된 성분 또는 단계 중 "적어도 하나", "적어도 첫 번째", "하나 이상" 또는 "복수"를 의미하는 의미로 사용되며, 그 후 상한이 구체적으로 언급되는 경우를 제외한다.

[0115] 또한, 용어 "포함한다", "구성한다", "가진다" 또는 "갖는다", 또는 다른 등가의 용어가 본원에서 사용되는 경우, 일부 보다 구체적인 구현예에서 이들 용어는 용어 "이루어진다" 또는 "본질적으로 이루어진다", 또는 다른 등가의 용어를 포함한다.

[0116] 본 발명은 이제 하기 비제한적인 실시예 및 도면을 참조하여 추가로 기재될 것이다:

도면의 간단한 설명

[0117] 도 1은 뮤린 피부 감염 모델에서 스타필로코쿠스 아우레우스 (Staphylococcus aureus) FDA486에 대한 화합물 2를 사용한 1일 국소 치료의 효과를 보여주는 그래프이다. 콜로니 형성 단위 (CFU)의 수는 Y-축에 제시되고, 마우스에 적용된 국소 치료의 유형은 X-축에 제시된다. 화합물 2는 또한 본원에서 AMC-109로 지칭된다.

도 2는 뮤린 피부 감염 모델에서 스트렙토코쿠스 피오게네스(Streptococcus pyogenes)에 대한 화합물 2를 사용한 1일 국소 치료의 효과를 보여주는 그래프이다. 콜로니 형성 단위 (CFU)의 수는 Y-축에 제시되고, 마우스에 적용된 국소 치료의 유형은 X-축에 제시된다. 화합물 2는 또한 본원에서 AMC-109로 지칭된다.

도 3은 뮤린 피부 감염 모델에서 스타필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus*) FDA486에 대한 1일 국소 치료의 효과를 보여주는 그래프이다. 각각의 마우스를 오전 9, 정오 12 및 오후 3 에서 치료하였다. 피부 생검을 오후 6 에서 수집하였다. 중앙값이 제시된다.

도 4는 뮤린 피부 감염 모델에서 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) CS301에 대한 1일 국소 치료의 효과를 보여주는 그래프이다. 각각의 마우스를 오전 7, 오전 10 및 오후 1 에서 치료하였다. 피부 생검을 오후 4 에서 수집하였다. 중앙값이 제시된다.

도 5는 뮤린 피부 감염 모델에서 스타필로코쿠스 아우레우스(*S. aureus*) FDA486에 대한 1일 국소 치료의 효과를 보여주는 그래프이다. 각각의 마우스를 오전 9, 정오 12 및 오후 3 에서 치료하였다. 피부 생검을 오후 6 에서 수집하였다. 중앙값이 제시된다.

도 6은 코팅된 봉합재의 추출에 의해 방출되는 AMC-109의 양을 정량 분석한 그래프이다. 첫 번째 데이터 세트는 Test-01 배치에서 가져오고, 다음 세 데이터 세트는 Test-02 배치의 세가지 다른 봉합재다.

도 7은 처음 사용했을 때 S. aureus에 대한 성장 억제 분석 결과를 보여주는 사진이다.

도 8은 봉합재에 노출된 후 성장 배지에서 CFU에 의해 측정된 액체 배지에서의 박테리아 성장에 대한 AMC 코팅된 봉합재의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 실시예 9에 기재된 바와 같은 억제 구역을 보여주는 사진이다.

도 10은 다양한 봉합재를 배치한 접종된 TSB를 포함하는 웰의 사진이다. 번호가 매겨진 웰은 다음과 같다:

1: AMC-109로 코팅된 S. aureus 에티본드(Ethibond)

2: 비코팅된 S. aureus 에티본드(Ethibond)

3: S. aureus 성장 제어

4: AMC-109로 코팅된 S. epidermidis 에티본드(Ethibond)

5: 비코팅된 S. epidermidis 에티본드(Ethibond)

6: S. epidermidis 성장 제어

도 11은 생분해성 폴리에스테르 RG502 및 L206S를 함유하는 AMC-109에 대한 누출(총량의 백분율) 대 시간(분)을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0118] **실시예 1**

[0119] **펩티드 합성**

[0120] 화학 물질

[0121] 보호된 아미노산 Boc-Trp-OH, Boc-Arg-OH, Boc-4-페닐-Phe 및 Ac-Arg-OH는 Bachem AG로부터 구입한 반면, Boc-4-요오도페닐알라닌, Boc-3,3-디페닐알라닌 및 Boc-(9-안트릴)알라닌은 Aldrich로부터 구입하였다. 펩티드의 C-말단을 구성하는 벤질아민, 2-페닐에틸아민, 3-페닐프로필아민, (R)-2-페닐프로필아민, (S)-2-페닐프로필아민, N,N-디메틸벤질아민, N,N-디에틸벤질아민 및 N,N-디벤질아민은 Acros 에서 구입한 N-에틸벤질아민을 제외하고 Fluka에서 구입했다.Diisopropylethylamine(DIPEA), 1-하이드록시벤조트리아졸(1-HOBt), 클로로트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyCloP) 및 O-(벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'테트라메틸우로늄 헥사플루오로

포스페이트(HBTU)는 Fluka로부터 구입하였다. 4-n-부틸페닐보론산, 4-t-부틸페닐보론산, 4-비페닐보론산, 2-나프틸보론산, 트리오르토-톨릴포스핀, 벤질브로마이드 및 팔라듐 아세테이트는 Aldrich에서 구입했다. 용매는 Merck, Riedel-de Haën 또는 Aldrich로부터 구입하였다.

[0122] 아미노산의 제조

[0123] *Boc-2,5,7-트리-tert-부틸트립토판-OH의 제조*: 트리플루오로아세트산(19 mL) 중의 H2N-Trp-OH(1.8 g, 8,8 mmol), t-BuOH(4,7 g, 63,4 mmol)의 혼합물을 70° C에서 3시간 동안 교반하였다. 생성된 중간-갈색 반투명 용액의 부피를 실온에서 30분 동안 회전 증발기 상에서 감소시키고, 이어서 7%(중량 기준) NaHCO3 60 mL를 적가함으로써 분쇄하였다. 이어서, 수득된 회색/백색 과립상 고체를 진공 여과에 의해 회수하고, 실온에서 24시간 동안 진공 하에 건조시켰다. 생성물을 물 중의 40% 에탄올의 거의 비등하는 혼합물로부터 결정화에 의해 단리하였다. 부피는 일반적으로 조 생성물의 그램당 대략 20 mL이다.

[0124] 조로부터의 제1 결정화는 샘플 중의 모든 다른 물질에 대해 80 내지 83% 순도(HPLC) 및 공지된 TBT 유사체에 대해 대략 94 내지 95% 순도의 단리된 생성물을 생성한다. 이 단계에서의 수율은 60 내지 65%의 범위이다.

[0125] *Boc-4-요오도페닐알라닌의 벤질화*. Boc-4-요오도페닐알라닌(1당량)을 물 중의 90% 메탄올에 용해시키고, 약한 알칼리성 pH(리트머스 페이퍼에 의해 측정)가 될 때까지 탄산세슘을 첨가하여 중화시켰다. 용매를 회전 증발에 의해 제거하고, 톨루엔을 사용한 반복된 공비 증류에 의해 Boc-4-요오도페닐알라닌의 세슘 염 중의 잔류 물을 추가로 감소시켰다. 생성된 건조 염을 디메틸포름아미드(DMF)에 용해시키고, 벤질브로마이드(1.2당량)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 6 내지 8시간 동안 교반하였다. 반응 종료 시, DMF를 감압 하에 제거하고, 표제 화합물을 포함하는 오일을 형성하였다. 이 오일을 에틸 아세테이트에 용해시키고, 생성된 용액을 동일한 부피의 시트르산 용액(3회), 중탄산나트륨 용액 및 염수로 세척하였다. 표제 화합물을 용리액으로서 디클로로메탄:에틸 아세테이트(95:5)를 사용하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 85% 수율로 담황색 오일로서 단리하였다. 결정질 벤질 Boc-4-요오도페닐알라닌은 n-헵탄으로부터 재결정화에 의해 수득될 수 있었다.

[0126] *스즈키 커플링에 대한 일반적 절차*: 벤질 Boc-4-요오도페닐알라닌(1당량), 아릴보론산(1.5당량), 탄산나트륨(2당량), 팔라듐 아세테이트(0.05당량) 및 트리 오르토-톨릴포스핀(0.1당량)을 디메톡시에탄(6ml/벤질 Boc-4-요오도페닐알라닌) 및 물(1ml/벤질 Boc-4-요오도페닐알라닌)의 탈기된 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 아르곤 하에 유지하고, 80° C로 4 내지 6시간 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 실리카겔 및 탄산나트륨의 짧은 패드를 통해 여과하였다. 필터 케이크를 에틸 아세테이트로 추가로 세척하였다. 여액을 합하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 생성물을 용리액으로서 에틸 아세테이트 및 n-헥산의 혼합물을 사용하는 플래쉬 크로마토그래피에 의해 단리하였다.

[0127] *Boc-Bip(n-Bu)-OBn의 제조*: 표제 화합물을 스즈키 커플링에 대한 일반적 절차를 사용하여 4-n-부틸페닐보론산으로부터 53% 수율로 제조하였다. Boc-Bip(n-Bu)-OBn을 80:20 에틸 아세테이트:n-헥산 용리액을 사용하여 단리하였다.

[0128] *Boc-Bip(t-Bu)-OBn의 제조*: 표제 화합물을 스즈키 커플링에 대한 일반적 절차를 사용하여 4-t-부틸페닐보론산으로부터 79% 수율로 제조하였다. Boc-Bip(t-Bu)-OBn을 80:20 에틸 아세테이트:n-헥산 용리액을 사용하여 단리하였다.

[0129] *Boc-Bip(4-Ph)-OBn의 제조*: 표제 화합물을 스즈키 커플링에 대한 일반적 절차를 사용하여 4-비페닐보론산으로부터 61% 수율로 제조하였다. Boc-Bip(4-Ph)-OBn을 n-헵탄으로부터 조 생성물의 재결정화에 의해 단리하였다.

[0130] *Boc-Bip(4-(2-나프틸))-OBn의 제조*: 표제 화합물을 스즈키 커플링에 대한 일반적 절차를 사용하여 2-나프틸보론산으로부터 68% 수율로 제조하였다. Boc-Bip(4-(2-나프틸))-OBn을 n-헵탄으로부터 조 생성물의 재결정화에 의해 단리하였다.

[0131] *Boc-Bip(4-(1-나프틸))-OBn의 제조*: 표제 화합물을 스즈키 커플링에 대한 일반적인 절차를 사용하여 2-나프틸보론산으로부터 제조하였다. Boc-Bip(4-(1-나프틸))-OBn을 n-헵탄으로부터 조 생성물의 재결정화에 의해 단리하였다.

[0132] *벤질 에스테르의 탈에스테르화에 대한 일반적인 절차*: 벤질 에스테르를 DMF 중에 용해시키고, 촉매로서 탄소 상 10% Pd를 사용하여 주위 압력에서 2일 동안 수소화시켰다. 반응의 종료 시에, 촉매를 여과에 의해 제거하고, 용매를 감압 하에 제거하였다. 유리 산을 디에틸 에테르로부터 재결정화에 의해 단리하였다.

[0133] *Boc-Bip(4-n-Bu)-OH의 제조*: 표제 화합물을 탈에스테르화에 대한 일반적인 절차를 사용하여 Boc-Bip(n-Bu)-OBn으로부터 61% 수율로 제조하였다.

[0134] *Boc-Bip(4-t-Bu)-OH의 제조*: 표제 화합물을 탈에스테르화에 대한 일반적인 절차를 사용하여 Boc-Bip(t-Bu)-OBn으로부터 65% 수율로 제조하였다.

[0135] *Boc-Bip(4-Ph)-OH의 제조*: 표제 화합물을 탈에스테르화에 대한 일반적인 절차를 사용하여 Boc-Bip(4-ph)-OBn으로부터 61% 수율로 제조하였다.

[0136] *Boc-Bip(4-(2-나프틸))-OH의 제조*: 표제 화합물을 탈에스테르화에 대한 일반적인 절차를 사용하여 Boc-Bip(4-(2-나프틸))-OBn으로부터 68% 수율로 제조하였다.

[0137] *Boc-Bip(4-(2-나프틸))-OH의 제조*: 표제 화합물을 탈에스테르화에 대한 일반적인 절차를 사용하여 Boc-Bip(4-(2-나프틸))-OBn으로부터 68% 수율로 제조하였다.

[0138] *HBTU를 사용한 용액 상 펩티드 합성에 대한 일반적인 절차*. 펩티드를 하기 일반적인 절차에 따라 Boc 보호 전략을 사용하여 단계적 아미노산 커플링에 의해 용액 중에서 제조하였다. 유리 아미노기 (1 eq) 및 Boc 보호된 아미노산 (1.05 eq) 및 1-히드록시벤조트리아졸 (1-HOBt) (1.8 eq)를 갖는 C-말단 펩티드 부분을 DMF (2-4 ml/mmol 아미노 성분) 중에 용해시킨 후, 디이소프로필에틸아민 (DIPEA) (4.8 eq)을 첨가하였다. 혼합물을 얼음 상에서 냉각시키고, O-(벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N' 테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HBTU) (1.2 eq)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 주위 온도에서 1-2시간 동안 진탕시켰다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트로 희석하고, 시트르산, 중탄산나트륨 및 염수로 세척하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 생성된 펩티드의 Boc 보호 기를 무수 메탄올 중 95% TFA 또는 아세틸클로라이드를 사용하여 암실에서 탈보호시켰다.

[0139] PyCloP를 사용한 용액 상 아미드 형성. Boc-Arg-N$(CH_2)_2$의 합성. 건조 DCM (알루미나를 통해 여과됨) (2 ml) 및 DMF (1 ml) 중 Boc-Arg-OH (1 eq), NH$(CH_2Ph)_2$ (1.1 eq) 및 PyCloP (1 eq)의 용액. 용액을 얼음 상에서 냉각시키고, DIPEA (2 eq)를 교반 하에 첨가하였다. 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 증발시키고, 에틸 아세테이트 중에 재용해시키고, 시트르산, 중탄산나트륨 및 염수로 세척하였다. 용매를 진공 하에 제거하고, 생성된 펩티드의 Boc 보호기를 95% TFA를 사용하여 암실에서 탈보호시켰다.

[0140] *펩티드 정제 및 분석*. 펩티드를 용리액으로서 물 및 아세토니트릴 (0.1% TFA를 둘 다 포함함)의 혼합물을 사용하여 Delta-Pak (워터스) C_{18} 칼럼 (100 Å, 15 mm, 25 x 100 mm) 상에서 역상 HPLC를 사용하여 정제하였다. 펩티드를 분석용 Delta-Pak (Waters) C_{18} 칼럼 (100 Å, 5 mm, 3.9 x 150 mm) 및 VG Quattro사중극자 질량 분광계 (VG Instruments Inc., Altringham, UK)에서 양이온 전기분무 질량 분석법을 사용하여 RP-HPLC에 의해 분석되었다.

[0141] **실시예 2**

[0142] *본원에 정의된 펩티드의 시험관내 활성*.

[0143] **재료 및 방법**

[0144] ***항미생물제.***

[0145] 미리 칭량된 화합물 1 및 화합물 2의 바이알을 Lytix BiopharmaAS에 의해 공급하였다.

[0146]

일반적인 화학식: AA_1-AA_2-AA_1-XY			
	AA_1	AA_2	XY
화합물 1	Arg	Phe(4-(2-나프틸))	$NHCH_2CH_2Ph$
화합물 2	Arg	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	$NHCH_2CH_2Ph$

[0147] ***박테리아 단리물.***

[0148] 이 연구에 사용된 박테리아 단리물은 세계적으로 GR Micro Ltd.에 저장되고, 희석되지 않은 말 혈청의 고단백질 매트릭스 중의 조밀한 현탁액으로서 -70 ° C에서 급속 동결된, 최소의 하위-배양으로 유지되는 다양한 공급원으로부터 유래되었다. 사용된 종 및 이의 특징은 표 1에 열거되어 있다. 이들은 54 그람-양성 박테리아, 33 그람-

음성 박테리아 및 10 진균을 포함하였다.

[0149] ***최소 억제 농도 (MIC)의 결정.***

[0150] MIC를 임상 및 실험실 표준 연구소 (CLSI, 이전의 NCCLS)에 의해 공개된 항미생물제 감수성 시험을 위한 하기 마이크로브로쓰 희석 방법을 사용하여 결정하였다.

[0151] M7-A6 Vol 23 No 2 January 2003 호기성으로 성장하는 박테리아에 대한 희석 항미생물제 감수성 시험 방법; Approved Standard - Sixth Edition. M100-S15 Vol 25 No 1 January 2005 항미생물제 감수성 시험을 위한 성능 표준; Fifteenth Informational Supplement. M11-A6 Vol 24 No 2 혐기성 세균의 항미생물제 감수성 시험 방법; Approved Standard - Sixth Edition. M27-A2 Vol 22 No 15 효모의 배지 희석 항진균제 감수성 시험을 위한 참조 방법; Approved Standard - Second Edition. M38-A Vol 22 No 16 사상균의 배양액 희석 항진균제 감수성 시험을 위한 참조 방법; Approved Standard.

[0152] MIC 평가는 GR Micro Ltd.에서 제조된, 항박테리아제 또는 항진균제를 포함하는 습윤 플레이트를 사용하여 수행하였다.

[0153] 대략 10^5 콜로니-형성 단위(CFU)/mL의 초기 접종물을 갖는 호기성 박테리아에 대해, 양이온-조정된 뮐러-힌톤 브로쓰(Oxoid Ltd, Basingstoke, UK 및 Trek Diagnostic Systems Ltd, East Grinstead, UK)(연쇄구균 종(*Streptococcus* spp.), 코리네박테리움 제이케리움(*Corynebacterium jeikeium*) 및 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)에 대한 5% laked horse 혈액으로 보충됨)액체 배지를 사용하였다.

[0154] 헤모필루스 인플루엔자에 대해 헤모필루스 시험 배지 (0.5% 효모 추출물을 포함하는 뮐러-힌톤 브로쓰(Mueller-Hinton broth) 및 15 mg/L의 각각의 헤마틴 및 NAD를 포함하는 헤모필루스 시험 배지 보충물 (모두 Oxoid Ltd, Basingstoke, UK)을 사용하였고, 대략 10^5 CFU/mL로 접종하였다.

[0155] 보충된 브루셀 브로쓰(SBB)는 대략 10^6 CFU/mL의 접종물을 갖는 혐기성 균주에 사용되었다. SBB는 1% 펩톤, 0.5% 'Lab-lemco', 1% 포도당 및 0.5% 염화나트륨으로 구성되며 5㎍/L 해민 및 1㎍/L 비타민 K(둘 다 Sigma Aldrich Ltd.에서 얻음)로 구성된 배양액이다.

[0156] 효모 및 사상균 MIC를 MOPS 완충 RPMI 1640 배지(Sigma Aldrich Ltd로부터 입수한 MOPS 완충액, Invitrogen Ltd로부터 입수한 RPMI 1640, Paisley, Scotland)에서 수행하였다. 효모 접종물은 7.5×10^2 - 4×10^3 CFU/mL 범위였고, 사상균은 대략 8×10^3 - 1×10^5 CFU/mL였다.

[0157] 일반적인 관행에 따라 뮐러-힌톤 브로쓰 를 포함하는 모든 플레이트를 미리 제조하고, 제조 당일에 -70° C에서 냉동시키고, 사용 당일에 해동시켰다. 진균, 헤모필루스 및 혐기성 MIC 측정은 모두 동일한 날에 제조된 플레이트에서 수행하였다.

[0158] 동결이 펩티드의 활성에 영향을 미치는지 여부를 평가하기 위해, 새로 제조된 뮐러-힌톤 브로쓰를 포함하는 플레이트를 사용하여 일부 MIC 측정을 반복하였다.

[0159] ***대조균 균주.***

[0160] 하기 대조군 (참조) 균주를 시험된 균주의 패널에 포함시켰다.

[0161] 에스케리키아 콜라이 ATCC 25922

[0162] 스타필로코쿠스 아우레우스 ATCC 29213

[0163] 엔테로코쿠스 패칼리스 ATCC 29212

[0164] 스트렙토코쿠스 뉴모니아에 ATCC 49619

[0165] 슈도모나스 아에루기노사 ATCC 27853

[0166] 칸디다 크루세이 ATCC 6258

[0167] 하기 대조군 균주는 시험 균주 패널에 추가되었고, 비교기가 범위 내에 있음을 확인하기 위해 적절한 경우 포함되었다.

[0168] 헤모필루스 인플루엔자 ATCC 49247

[0169] 칸디다 파라프실로시스 ATCC 22019

[0170] 박테로이데스 프라질리스 ATCC 25285

[0171] 에게르텔라 렌타 ATCC 43055

[0172] **결과**

[0173] 그 결과를 단일 라인 목록으로 표 1에 나타내었다. 반복 대조 균주 결과를 표 2에 나타내었다. 대조군 균주 결과는 동결되거나 신선하게 사용된 뮐러-힌톤 브로쓰를 포함한 플레이트로부터의 데이터를 포함하여 고도로 재현 가능함을 알 수 있다. 동결 플레이트는 또한 다른 박테리아 균주에 대한 MIC에 영향을 미치지 않았다.

[0174] 수득된 MIC 데이터는 매우 고무적이며, 펩티드가 매우 넓은 활성 스펙트럼을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0175] **표 1**: 2개의 항미생물 펩티드의 시험관내 활성 및 그람-양성 박테리아, 그람-음성 박테리아 및 진균의 패널에 대한 비교의 단일 라인 목록.

[0176]

종 및 특성	화합물 1	화합물 2
Candida albicans ATCC90028 - 참조 균주	2	8
Candida albicans ATCC24433 - 참조 균주	2	8
Candida tropicalis ATCC750 - 참조 균주	2	4
Candida parapsilosis ATCC90018 - 참조 균주	4	16
Candida (Issatchenkia) krusei ATCC6258 - 참조 균주	4	4
Aspergillus niger - G.R. Micro 소장	4	8
Trichophyton mentagrophytes - G.R. Micro 소장	16	8
Trichophyton interdigitale - G.R. Micro 소장	8	8
Microsporum canis - G.R. Micro 소장	8	8
Cryptococcus neoformans - G.R. Micro 소장	4	4
Escherichia coli ATCC25922 - 항생제-감수성 균주	32	8
Escherichia coli ATCC32518 - β-락타마제 양성 임상 분리주	32	8
Escherichia coli - 다중-약물 내성 임상 분리주	32	8
Klebsiella aerogenes NCTC11228 - 항생제-감수성 균주	32	16
Klebsiella aerogenes - 다중-약물 내성 임상 분리주	64	16
Enterobacter sp - 항생제-감수성 임상 분리주	32	4
Enterobacter sp - 다중-약물 내성 임상 분리주	64	16
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 - 항생제-감수성 균주	16	8
Pseudomonas aeruginosa - 다중-약물 내성 임상 분리주	32	4
Stenotrophomonas maltophilia - 항생제-감수성 임상 분리주	64	8
Salmonella sp - 항생제-감수성 임상 분리주	16	8
Salmonella sp - 다중-약물 내성 임상 분리주	16	8
Shigella sp - 항생제-감수성 임상 분리주	32	8
Morganella morganii - 다중-약물 내성 임상 분리주	≥128	16
Haemophilus influenzae - β-락타마제 음성 임상 분리주	≥128	8
Haemophilus influenzae - β-락타마제 양성 임상 분리주	≥128	8
Haemophilus influenzae β-락타마제 음성 암피실린-내성 임상	≥128	8
Moraxella catarrhalis - β-락타마제 양성 임상 분리주	4	4
Moraxella catarrhalis - 감소된 플로로퀴놀린 감수성 임상	8	8
Acinetobacter baumanii - 항생제-감수성 임상 분리주	64	16
Staphylococcus aureus ATCC 29213 - 항생제-감수성 대조군 균주	4	2
Staphylococcus aureus ATCC 25923 - 항생제-감수성 대조군 균주	4	4
Staphylococcus aureus ATCC 43300 - 메티실린-내성 대조군 균주	4	2
Staphylococcus aureus - 메티실린-내성 임상 분리주	4	4
Staphylococcus aureus - 다중-약물-내성 임상 분리주	8	4
Staphylococcus aureus - 테이코플라닌-중간내성(teicoplanin-intermediate) 임상 분리주	4	4
Staphylococcus epidermidis 항생제 감수성 임상 분리주	16	8

[0177]

종 및 특성	화합물 1	화합물 2
Staphylococcus epidermidis 메티실린-내성 임상 분리주	2	4
Staphylococcus haemolyticus - 항생제 감수성 임상 분리주	4	4
Staphylococcus saprophyticus - 항생제 감수성 임상 분리주	1	1
Enterococcus faecalis - ATCC 29212 항생제-감수성 대조군 균주	4	4
Enterococcus faecalis 반코마이신-감수성 임상 분리주	8	8
Enterococcus faecalis 반코마이신-내성 (VanA) 임상 분리주	16	8
Enterococcus faecalis 반코마이신-내성 (VanB) 임상 분리주	16	16
Enterococcus faecalis 고수준 젠타마이신-내성 임상 분리주	16	8
Enterococcus faecium 반코마이신-감수성 임상 분리주	8	8
Enterococcus faecium 반코마이신-내성 (VanA) 임상 분리주	16	8
Enterococcus faecium 반코마이신-내성 (VanB) 임상 분리주	8	4
Enterococcus gallinarum 반코마이신-내성 (VanC) 임상 분리주	4	4
Streptococcus pneumoniae - ATCC 49619 항생제-감수성 대조군	32	16
Streptococcus pneumoniae - 페니실린-감수성 임상 분리주	64	32
Streptococcus pneumoniae - 페니실린-중간내성(intermediate)	32	32
Streptococcus pneumoniae - 페니실린-내성 임상 분리주	32	16
Streptococcus pneumoniae - 다중-약물 내성 임상 분리주	64	32
Streptococcus pyogenes - 마크롤라이드 (MLS) 내성 임상 분리주	32	16
Streptococcus pyogenes - 마크롤라이드 (M-type) 내성 임상	32	16
Corynebacterium jeikeium - 항생제-감수성 임상 분리주	32	16
Corynebacterium jeikeium - 다중-약물 내성 임상 분리주	32	8
Listeria monocytogenes - 항생제-감수성 임상 분리주	32	16
MU50 Staphylococcus aureus (MRSA) - VISA 형 균주	4	4
EMRSA3 Staphylococcus aureus (MRSA) - SSCmec 유형 1	4	4
EMRSA16 Staphylococcus aureus (MRSA) - SSCmec 유형 2	4	4
EMRSA1 Staphylococcus aureus (MRSA) - SSCmec 유형 3	8	8
EMRSA15 Staphylococcus aureus (MRSA) - SSCmec 유형 4	4	4
HT20011254 Staphylococcus aureus (MRSA) - PVL 양성	4	4
Streptococcus agalactiae - 항생제-감수성 임상 분리주	16	8
Streptococcus agalactiae - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	32	16
Group C Streptococcus - 항생제-감수성 임상 분리주	32	16
Group C Streptococcus - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	64	32
Group G Streptococcus - 항생제-감수성 임상 분리주	32	8
Group G Streptococcus - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	32	16
Streptococcus mitis - 항생제-감수성 임상 분리주	64	16
Streptococcus mitis - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	≥128	32
Streptococcus constellatus - 항생제-감수성 임상 분리주	64	32
Streptococcus constellatus - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	64	32
Streptococcus oralis - 항생제-감수성 임상 분리주	64	32
Streptococcus oralis - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	32	32

[0178]

종 및 특성	화합물 1	화합물 2
Streptococcus bovis - 항생제-감수성 임상 분리주	64	32
Streptococcus bovis - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	8	8
Streptococcus sanguis - 항생제-감수성 임상 분리주	64	32
Streptococcus sanguis - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	32	32
Clostridium perfringens - 항생제-감수성 임상 분리주	≥128	32
Clostridium difficile - 항생제-감수성 임상 분리주	32	16

[0179] **표 2**: ATCC 대조군 균주에 대한 2개의 항미생물 펩티드 및 비교물질의 시험관내 활성

[0180] (시험 균주 패널 이외의 ATCC 대조군 균주를 포함)

[0181]

균주 No.	종 및 특성	화합물		플레이트 유형
		1	2	
GP01	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 항생제-감수성 대조군 균주	8	4	냉동 MHB
GP01	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 항생제-감수성 대조군 균주	4	4	냉동 MHB
GP01	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 항생제-감수성 대조군 균주	4	2	신선한 MHB
GN01	*Escherichia coli* ATCC 25922 항생제-감수성 균주	32	8	냉동 MHB
GN01	*Escherichia coli* ATCC 25922 항생제-감수성 균주	32	8	냉동 MHB
GN01	*Escherichia coli* ATCC 25922 항생제-감수성 균주	16	8	신선한 MHB
GN10	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 항생제-감수성 균주	16	8	냉동 MHB
GN10	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 항생제-감수성 균주	32	8	냉동 MHB
GN10	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 항생제-감수성 균주	8	8	신선한 MHB
GP11	*Enterococcus faecalis* - ATCC 29212 항생제-감수성 대조군 균주	8	8	냉동 MHB
GP11	*Enterococcus faecalis* - ATCC 29212 항생제-감수성 대조군 균주	8	8	냉동 MHB
GP11	*Enterococcus faecalis* - ATCC 29212 항생제-감수성 대조군 균주	4	4	신선한 MHB
	Haemophilus influenzae - ATCC	32	4	HTM
	Candida parapsilosis ATCC 22019	4	8	RPMI 1640
FO5	*Candida (Issatchenkia) krusei* ATCC 참조 균주	8	8	RPMI 1640
FO5	*Candida (Issatchenkia) krusei* ATCC 참조 균주	8	8	RPMI 1640
	Bacteroides fragilis - ATCC 25285	64	64	SBB
	Eggerthella lenta - ATCC 43055	16	32	SBB

[0182] MHB, 뮐러-힌톤 브로쓰; HTM, 해모필루스 시험 배지; SBB, 보충된 브루셀라 브로쓰.

[0183] **실시예 3 트립신 분해 및 항미생물 활성에 대한 안정성**

[0184] 화학식 AA_1-AA_2-AA_1-$NHCH_2CH_2Ph$의 화합물을 이의 트립신 내성 및 항미생물 활성에 대해 시험하였다.

[0185] **펩티드 반감기의 측정 및 계산**

[0186] 각각의 펩티드를 0.1 M NH_4HCO_3 완충액 (pH 6.5)에 용해시켜 1 mg/ml의 최종 펩티드 농도를 수득하였다. 트립신 용액은 1 mg의 트립신을 50 ml의 0.1 M NH_4HCO_3 완충액 (pH 8.2)에 용해시켜 제조하였다. 안정성 측정을 위해, 250 ml의 새로 제조된 트립신 용액 및 250 ml의 펩티드 용액을 2 ml의 0.1 M NH_4HCO_3 완충제 (pH 8.6) 중에서 37 ° C에서 진동 테이블 상에서 인큐베이션하였다. 0.5 ml의 분취량을 상이한 시간 간격으로 샘플링하고, 1% TFA를 포함하는 0.5 ml 물:아세토니트릴 (60:40 v/v)로 희석하고, 상기 기재된 바와 같이 RP-HPLC에 의해 분석하였다. 0 시간 및 37 ° C에서 20 시간 후에 트립신 첨가가 없는 샘플을 음성 대조군으로서 사용하였다. 검정의 처음 5시간 동안 취한 샘플에 대한 254 nm에서의 피크 면적의 적분을 사용하여 $t_{1/2}$을 생성하였다. 처음 24시간 동안 어떠한 분해도 나타내지 않은 펩티드를 안정한 것으로 분류하였다.

[0187] **항미생물 검정**

[0188] 스타필로코커스 아우레우스, 균주 ATCC 25923, 메티실린 내성 스타필로코커스 아우레우스(MRSA) 균주 ATCC 33591 및 메티실린 내성 스타필로코커스 에피더미디스(MRSE) 균주 ATCC 27626에 대한 MIC 측정은 표준 방법을 사용하여 Toslab AS에 의해 수행되었다. Amsterdam, D (1996) 액체 배지에서의 항미생물제의 감수성 시험은 문헌[Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed (Lorian, V, Ed) pp 75-78, Williams and Wilkins Co, Baltimore]에 기재되어 있다.

[0189] **표 3**은 반감기($t_{1/2}$) 및 MIC로서 나타나는 항미생물 활성으로서 트립신에 대한 AA_1-AA_2-AA_1-$NHCH_2CH_2Ph$ 펩티드의 안정성을 나타낸다.

단백질	AA1	AA2	τ1/2[a] (h)	MIC[b] (μM)		
				S.aureus[c]	*MRSA*[d]	*MRSE*[e]
화합물 6[f]	Arg	Trp	7	145	97	81
화합물 5	Arg	Bip(4-Ph)	안정한	5	3	3
화합물 4	Lys	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	안정한		3	<2
화합물 3	Arg	Phe(4-(1-나프틸))	20		3	3
화합물 2	Arg	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	안정한	<3	<3	<3
화합물 1	Arg	Phe(4-(2-나프틸))	안정한	4	<3	<3

[0190]

[0191] [a]코넬 대학으로부터의 Medical Calculator를 사용하여 반감기를 계산.

[0192] [b]최소 억제 농도

[0193] [c]스태필로코쿠스 아우레우스 균주 ATCC 25923.

[0194] [d]메티실린 내성 스타필로코쿠스 아우레우스 ATCC 33591

[0195] [e]메티실린 내성 스타필로코쿠스 표피 ATCC 27626

[0196] [f] 본 발명에 대한 화합물 정의 내에 있지 않음

[0197] **실시예 4 화합물 2의 생체내 활성**

[0198] 마우스의 피부를 스타필로코쿠스 아우레우스 또는 스트렙토코쿠스 피오게네스로 감염시키고, 후속적으로 3시간 간격으로 총 3회의 치료를 제공하였다. 마지막 치료 3시간 후, 피부 생검을 수집하고, 피부 샘플에 존재하는 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 결정하였다.

[0199] 결과는 마우스당 콜로니 형성 단위의 수로서 표현된 도 1 및 2에 도시되어 있다.

[0200] 실험 1(도 1)에서, 화합물 2를 2%(w/w)의 화합물 2를 포함하는 크림 또는 겔의 일부로서 쥐의 피부에 적용하였다. 화합물 2를 포함하지 않는 동일한 크림 또는 겔을 음성 대조군 (위약)으로 사용하였다. CFU의 수는 화합물 2를 포함하는 크림 또는 겔이 음성 대조군과 비교하여 뮤린 피부에 적용될 때 감소되었고, 이는 화합물 2가 스타필로코쿠스 아우레우스에 대해 항미생물 효과를 발휘하였음을 나타내는 것을 명백하게 알 수 있다. 담체, 크림 또는 겔의 성질은 유의한 효과를 갖지 않았다.

[0201] 실험 2(도 2)에서, 화합물 2를 1% 또는 2% 겔로서 2개의 상이한 농도로 적용하였다. 플라시보 겔 및 공지된 항박테리아 "박테로반"을 대조군으로서 사용하였다. 화합물 2를 포함하는 겔이 위약 겔 또는 박테로반보다 CFU의 수를 감소시키는데 더 효과적임을 알 수 있다. 2%의 화합물 2를 포함하는 겔은 단지 1%의 화합물 2를 포함하는 겔보다 더 효과적이었다.

[0202] **실시예 5**

[0203] 본 발명에서 사용되는 화합물의 제조 및 물리적, 항미생물성 및 용혈성 특성

[0204] 펩티드 합성 - 관련 정보는 또한 실시예 1에서 제공된다.

[0205] *화학 물질*:

[0206] 보호된 아미노산 Boc-Arg-OH, 및 Boc-4-페닐-Phe는 Bachem AG로부터 구입하였고, Boc-4-요오도페닐알라닌은 Aldrich로부터 구입하였다. 펩티드의 C-말단을 구성하는 이소프로필아민, 프로필아민, 헥실아민, 부틸아민, 헥사데실아민, 이소부틸아민, 시클로헥실아민 및 시클로펜틸아민은 Fluka에서 구입하였다. 디이소프로필에틸아민(DIPEA), 1-하이드록시벤조트리아졸(1-HOBt), 클로로트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyClοP) 및 O-(벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HBTU)를 플루카(Fluka)로부터 구입하였다. 4-n-부틸페닐보론산, 4-t-부틸페닐보론산, 4-비페닐보론산, 2-나프틸보론산, 트리오르토-톨릴포스핀,

벤질브로마이드 및 팔라듐 아세테이트는 Aldrich에서 구입하였다. 용매는 Merck, Riedel-de Haën 또는 Aldrich로부터 구입하였다.

[0207] *Boc-Phe(4-4'-비페닐)-OBn의 제조*: 표제 화합물을 스즈키 커플링에 대한 일반적인 절차를 사용하여 4-비페닐보론산으로부터 61% 수율로 제조하였다. Boc-Phe(4-4'-비페닐)-OBn을 n-헵탄으로부터 조 생성물의 재결정화에 의해 단리하였다.

[0208] *Boc-Phe(4-(2'-나프틸)-OBn의 제조*: 표제 화합물을 스즈키 커플링에 대한 일반적 절차를 사용하여 2-나프틸보론산으로부터 68% 수율로 제조하였다. Boc-Phe(4-(2'-나프틸))-OBn을 n-헵탄으로부터 조 생성물의 재결정화에 의해 단리하였다.

[0209] *Boc-Phe(4-4'-비페닐)-OH의 제조*: 표제 화합물을 Boc-Phe(4-4'-비페닐)-OBn으로부터 일반적인 탈에스테르화 절차를 사용하여 61% 수율로 제조하였다.

[0210] *Boc-Phe(4-(나프틸))-OH의 제조*: 표제 화합물을 68% 수율로 Boc-Phe(4-(2-나프틸))-OBn으로부터 탈에스테르화를 위한 일반적인 절차를 사용하여 제조하였다.

[0211] *HBTU를 이용한 용액상 펩티드 합성의 일반적인 절차*는 실시예 1에 기재되어 있다.

[0212] PyCloP를 사용한 용액 상 아미드 형성은 실시예 1에 기재되어 있다.

[0213] *펩티드 정제 및 분석*은 실시예 1에 기재되어 있다.

[0214] 표 4

[0215] 일반식: Arg-AA_2-Arg-X-Y

화합물	AA_2	XY	순도 (HPLC)
7	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	$NHCH(CH_3)_2$	
8	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	$NH(CH_2)_5CH_3$	
9	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	$NH(CH_2)_3CH_3$	87
10	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	$NH(CH_2)_2CH_3$	99
11	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	$NH(CH_2)_{15}CH_3$	80
12	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	$NHCH_2CH(CH_3)_2$	97
13	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	NH시클로헥실	95
14	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	NH시클로펜틸	91
15	Phe(4-4' -비페닐)Phe(4-4' -비페닐)	$NHCH(CH_3)_2$	
16	Phe(4-4' -비페닐)	$NH(CH_2)_5CH_3$	
17	Phe(4-(2' -나프틸))Phe(4-(2' -나프틸))	$NHCH(CH_3)_2$	
18	Phe(4-(2' -나프틸))	$NH(CH_2)_5CH_3$	

[0216]

[0217] **항미생물 검정**

[0218] 스타필로코커스 아우레우스, 균주 ATCC 25923, 메티실린 내성 스타필로코커스 아우레우스(MRSA) 균주 ATCC 33591 및 메티실린 내성 스타필로코커스 에피더미디스(MRSE) 균주 ATCC 27626에 대한 MIC 측정은 표준 방법을 사용하여 Toslab AS에 의해 수행되었다. Amsterdam, D (1996) 액체 배지에서의 항미생물제의 감수성 시험은 문헌[Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed (Lorian, V, Ed) pp 75-78, Williams and Wilkins Co, Baltimore]에 기재되어 있다.

[0219] 표 5

[0220] 본 발명에서 사용되는 화합물의 항미생물 및 독성 특성.

[0221]

화합물	*C.albic* (mg/L)	*S.aure* (mg/L)	MRSA (mg/	MRSE (mg/	*S.pyoge* (mg/L)	*E.co* (mg/	*P.aerugin* (mg/L)	EC5
7	25	<2	<2	<2	<2	7	7	720
8	5	2	2	<1	2	5	5	32
9	10	2	3	<2	2			350
10	10	2	3	<2	2			620
11	>100	5	4	4	6	>100	>100	38
12	10	<2	3	2	2			300
13	10	<2	2	2	<2			55
14	10	<2	>15	<2	2			340

[0222] **실시예 6**

[0223] 선택된 화합물의 시험관내 광범위 패널 스크리닝

[0224] **재료 및 방법**

[0225] ***항미생물제***

[0226] 예비-칭량된 화합물 7 및 화합물 8의 바이알을 Lytix Biopharma AS에 의해 공급하였다.

[0227]

일반적인 화학식: AA_1-AA_2-AA_1-X-Y			
	AA_1	AA_2	XY
화합물7	Arg	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	$NHCH(CH_3)_2$
화합물8	Arg	2,5,7-트리-tert-부틸트립토판	$NH(CH_2)_5CH_3$

[0228] ***박테리아 단리물***

[0229] 본 연구에 사용된 박테리아 분리물은 실시예 2에 기재된 바와 같다.

[0230] ***최소 억제 농도 (MIC)의 결정***

[0231] MIC를 실시예 2에 기재된 바와 같이 결정하였다.

[0232] **결과**

[0233] 그 결과는 단일 라인 목록으로서 표 6에 나타나있다.

[0234] 수득된 MIC 데이터는 매우 고무적이며, 펩티드가 매우 넓은 활성 스펙트럼을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0235] **표 6**: 그람-양성 박테리아, 그람-음성 박테리아 및 진균의 패널에 대한 2개의 항미생물성 펩티드의 시험관내 활성의 단일 라인 목록.

[0236]

종 및 특성	화합물 7 (mg/L)	화합물 8 (mg/L)
Candida albicans ATCC90028 - 참조 균주	32	4
Candida albicans ATCC24433 - 참조 균주	64	8
Candida tropicalis ATCC750 - 참조 균주	4	4
Candida parapsilosis ATCC90018 - 참조 균주	64	8
Candida (*Issatchenkia*) *krusei* ATCC6258 - 참조 균주	8	32
Aspergillus niger - G.R. Micro 소장	32	4
Trichophyton mentagrophytes - G.R. Micro 소장	8	4
Trichophyton interdigitale - G.R. Micro 소장	16	4
Microsporum canis - G.R. Micro 소장	16	4
Cryptococcus neoformans - G.R. Micro 소장	8	2
Escherichia coli ATCC25922 - 항생제-감수성 균주	32	4
Escherichia coli ATCC32518 - β-락타마제 양성 임상	32	8
Escherichia coli - 다중-약물 내성 임상 분리주	32	8
Klebsiella aerogenes NCTC11228 - 항생제-감수성 균주	64	8
Klebsiella aerogenes - 다중-약물 내성 임상 분리주	32	8
Enterobacter sp - 항생제-감수성 임상 분리주	64	8
Enterobacter sp - 다중-약물 내성 임상 분리주	≥12	8
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853 - 항생제-감수성 균주	32	8
Pseudomonas aeruginosa - 다중-약물 내성 임상 분리주	8	4
Stenotrophomonas maltophilia - 항생제-감수성 임상 분리주	32	4
Salmonella sp - 항생제-감수성 임상 분리주	16	8
Salmonella sp - 다중-약물 내성 임상 분리주	16	8
Shigella sp - 항생제-감수성 임상 분리주	32	4
Morganella morganii - 다중-약물 내성 임상 분리주	32	8
Haemophilus influenzae - β-락타마제 음성 임상 분리주	32	16
Haemophilus influenzae - β-락타마제 양성 임상 분리주	16	4
Haemophilus influenzae β-락타마제 음성 암피실린-내성 임상 분리주	16	8
Moraxella catarrhalis - β-락타마제 양성 임상 분리주	4	16
Moraxella catarrhalis - 감소된 플로로퀴놀린 감수성 임상 분리주	8	16
Acinetobacter baumanii - 항생제-감수성 임상 분리주	64	16

[0237]

종 및 특성	화합물 7 (mg/L)	화합물 8 (mg/L)
Staphylococcus aureus ATCC 29213 - 항생제-감수성 대조군 균주	8	4
Staphylococcus aureus ATCC 25923 - 항생제-감수성 대조군 균주	8	4
Staphylococcus aureus ATCC 43300 - 메티실린-내성 대조군 균주	8	4
Staphylococcus aureus - 메티실린-내성 임상 분리주	8	4
Staphylococcus aureus - 다중-약물-내성 임상 분리주	16	4
Staphylococcus aureus - 테이코플라닌-중간내성(teicoplanin-intermediate) 임상 분리주	16	4
Staphylococcus epidermidis 항생제 감수성 임상 분리주	4	8
Staphylococcus epidermidis 메티실린-내성 임상 분리주	4	2
Staphylococcus haemolyticus - 항생제 감수성 임상 분리주	4	4
Staphylococcus saprophyticus - 항생제 감수성 임상 분리주	2	0.5
Enterococcus faecalis - ATCC 29212 항생제-감수성 대조군 균주	16	4
Enterococcus faecalis 반코마이신-감수성 임상 분리주	32	4
Enterococcus faecalis 반코마이신-내성 (VanA) 임상 분리주	32	4
Enterococcus faecalis 반코마이신-내성 (VanB) 임상 분리주	≥128	8
Enterococcus faecalis 고수준 젠타마이신-내성 임상 분리주	64	8
Enterococcus faecium 반코마이신-감수성 임상 분리주	16	4
Enterococcus faecium 반코마이신-내성 (VanA) 임상 분리주	32	4
Enterococcus faecium 반코마이신-내성 (VanB) 임상 분리주	16	4
Enterococcus gallinarum 반코마이신-내성 (VanC) 임상 분리주	8	4

[0238]

종 및 특성	화합물 7 (mg/L)	화합물 8 (mg/L)
Streptococcus pneumoniae - ATCC 49619 항생제-감수성 대조군 균주	32	16
Streptococcus pneumoniae - 페니실린-감수성 임상 분리주	32	8
Streptococcus pneumoniae - 페니실린-중간내성(intermediate) 임상 분리주	32	16
Streptococcus pneumoniae - 페니실린-내성 임상 분리주	32	16
Streptococcus pneumoniae - 다중-약물 내성 임상 분리주	32	16
Streptococcus pyogenes - 마크롤라이드 (MLS) 내성 임상 분리주	16	8
Streptococcus pyogenes - 마크롤라이드 (M-type) 내성	16	8
Corynebacterium jeikeium - 항생제-감수성 임상 분리주	8	4
Corynebacterium jeikeium - 다중-약물 내성 임상 분리주	8	2
Listeria monocytogenes - 항생제-감수성 임상 분리주	16	8
MU50 Staphylococcus aureus (MRSA) - VISA 형 균주	16	4
EMRSA3 Staphylococcus aureus (MRSA) - SSCmec 유형 1	8	4
EMRSA16 Staphylococcus aureus (MRSA) - SSCmec 유형 2	16	4
EMRSA1 Staphylococcus aureus (MRSA) - SSCmec 유형 3	16	4
EMRSA15 Staphylococcus aureus (MRSA) - SSCmec 유형 4	8	4
HT20001254 Staphylococcus aureus (MRSA) - PVL 양성	8	4
Streptococcus agalactiae - 항생제-감수성 임상 분리주	8	8
Streptococcus agalactiae - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	16	8
Group C Streptococcus - 항생제-감수성 임상 분리주	16	8
Group C Streptococcus - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	32	16
Group G Streptococcus - 항생제-감수성 임상 분리주	16	8
Group G Streptococcus - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	16	8
Streptococcus mitis - 항생제-감수성 임상 분리주	32	16
Streptococcus mitis - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	64	16
Streptococcus constellatus - 항생제-감수성 임상 분리주	64	16
Streptococcus constellatus - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	32	16
Streptococcus oralis - 항생제-감수성 임상 분리주	64	16

[0239]

종 및 특성	화합물 7 (mg/L)	화합물 8 (mg/L)
Streptococcus oralis - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	64	16
Streptococcus bovis - 항생제-감수성 임상 분리주	32	8
Streptococcus bovis - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	8	2
Streptococcus sanguis - 항생제-감수성 임상 분리주	32	16
Streptococcus sanguis - 마크롤라이드-내성 임상 분리주	32	16
Clostridium perfringens - 항생제-감수성 임상 분리주	≥12	32
Clostridium difficile - 항생제-감수성 임상 분리주	64	32
Propionibacterium acnes- 항생제-감수성 임상 분리주		4
Propionibacterium acnes- 항생제-내성 임상 분리주		2

[0240] **실시예 7 화합물 7 및 8의 생체내 활성**

[0241] 마우스의 피부를 스타필로코쿠스 아우레우스 또는 스트렙토코쿠스 피오게네스로 감염시키고, 후속적으로 3시간 간격으로 총 3회의 치료를 제공하였다. 마지막 처리 3시간 후, 피부 생검을 수집하고, 피부 샘플에 존재하는 콜로니 형성 단위(CFU)의 수를 결정하였다. 결과는 마우스 당 콜로니 형성 단위의 수로서 표현된 도 3, 4 및 5에 도시되어 있다.

[0242] 실험 1(도 3)에서, 화합물 7을 2%(w/w)의 화합물 7을 포함하는 크림 또는 겔의 일부로서 쥐의 피부에 적용하였다. 화합물 7이 없는 동일한 크림 또는 겔을 음성 대조군(위약)으로서 사용하였다. 박트로반 2% 크림을 양성 대조군으로서 사용하였다. CFU의 수는 화합물 7을 포함하는 크림 또는 겔을 음성 대조군과 비교하여 쥐의 피부에

적용할 때 감소되었고, 이는 화합물 7이 스타필로코쿠스 아우레우스에 대해 항미생물 효과를 발휘함을 나타내는 것을 명백하게 알 수 있다. 표준 임상 치료제인 박트로반 2% 크림의 효능은 치료 요법 하에서 유의한 효과를 갖지 않았다. 담체, 크림 또는 겔의 성질은 유의한 효과를 갖지 않았다.

[0243] 실험 2(도 4)에서, 화합물 7을 1% 또는 2% 겔로서 2개의 상이한 농도로 적용하였다. 위약 겔 및 공지된 항박테리아 " 박트로반(무페리신)"을 대조군으로서 사용하였다. 화합물 7을 포함하는 겔은 위약 겔 또는 박트로반 보다 스트렙토코쿠스 피오게네스 CS 301 감염으로부터 CFU의 수를 감소시키는데 더 효과적인 것을 알 수 있다. 2%의 화합물 7을 포함하는 겔은 단지 1%의 화합물 7을 포함하는 겔보다 더 효과적이었다.

[0244] 실험 3(도 5)에서, 화합물 8을 쥐의 피부 감염 모델에서 스타필로코쿠스 아우레우스 FDA 486 감염에 대한 2% 크림 제제로 적용하였다. 위약 크림 및 2개의 공지된 항박테리아, "푸시딘(푸시드산) 연고 2%" 및 "박트로반(무페리신) 크림 2%"를 대조군으로서 사용하였다. 화합물 8을 포함하는 크림은 위약 및 푸시드산 또는 박트로반 보다 CFU의 수를 감소시키는데 더 효과적인 것을 알 수 있다.

[0245] **실시예 8 AMC-109 포함한 코팅을 사용한 흡수성 편조 봉합재의 제조**

[0246] 목적은 AMC-109를 포함하는 일반적인 생분해성 폴리(락타이드-코-글리콜라이드) 중합체로 브레이드 봉합재의 용액 코팅을 조사하는 것이다. 작업은 네가지 영역에서 이루어졌다.

[0247] 1. 폴리(락타이드-코-글리콜라이드) 중합체와 AMC-109를 용해시키는 용매(또는 용매 혼합물)의 제조

[0248] 2. "나출(naked)" 편조 흡수성 봉합재 재료를 위의 항목 1.의 용액으로 코팅

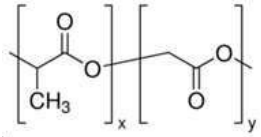
[0249] 3. 코팅된 봉합재에서 AMC-109의 누출을 조사

[0250] 4. 코팅된 봉합재의 미생물학적 효능 조사

[0251] **재료 및 방법:**

[0252] *고분자*

[0253] Resomer® RG 502, 폴리(락타이드-코-글리콜라이드) Sigma-Aldrich no. 719889는 락타이드:글리콜라이드 50:50 혼합물, 에스테르 종결재, Mw 7,000-17,000인 생분해성 중합체다. 상업용 흡수성 봉합재를 코팅하는 데 일반적으로 사용되는 생분해성 중합체와 유사하다. 화학 구조는 다음과 같다.

[0254] 

[0255] *펩티드*

[0256] AMC-109는 본원에서 "화합물 2"로 지칭되며 화학식 Arg-Tbt-Arg-$NHCH_2CH_2Ph$를 갖는다.

[0257] *봉합재*

[0258] Syneture Surgilon 크기 4-0, 실리콘 코팅이 있는 나일론 편조 봉합재를 조사에 사용했다.

[0259] *코팅된 봉합재 준비 절차*

[0260] 봉합재를 에틸 아세테이트로 세척하여 코팅 전에 이미 존재하는 코팅층의 대부분을 제거하였다.

[0261] Resomer® RG 502는 에틸 아세테이트에 용해되었고 AMC-109는 에탄올에 용해되었다. 첫 번째 테스트인 Test-01에서 50mg의 RG 502를 300㎕의 에틸 아세테이트에 용해하고 50㎕의 에탄올에 용해된 10mg의 AMC-109와 혼합했다. 두 번째 테스트인 Test-02에서 50mg의 RG 502를 400㎕의 에틸 아세테이트에 용해하고 110㎕의 에탄올에 용해된 10mg의 AMC-109와 혼합했다. 생성된 용매 혼합물은 균질하였다.

[0262] 봉합재 기본 재료(에틸 아세테이트 세척 후)를 코팅 용매 혼합물에 반복적으로 침지하여 코팅하였다.

[0263] 미생물학

[0264] ● 세균성 균주: 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus)

[0265] ● CFU(콜로니 형성 단위)의 수에 사용되는 봉합재:

[0266] o RG502 중합체를 포함하는 봉합재 Surgilon 4-0, 대조군

[0267] o RG502 중합체/AMC-109를 포함하는 봉합재 Surgilon 4-0

[0268] o 봉합재 Surgilon 4-0(nave), 대조군

[0269] ● 액체 Tryptic Soy Broth (TSB)

[0270] ● 뮐러 힌톤(Mueller Hinton, MH) 한천 플레이트

[0271] S. aureus의 콜로니를 혈액 한천 플레이트에서 채취하고, 0.5 McFarland 용액을 만들었으며($1x10^8$ CFU), 이 용액을 사용하여 다음을 수행했다.

[0272] 1. MH 한천 플레이트에 접종

[0273] 2. TSB에서 희석하여 $1x10^5$ CFU 획득

[0274] 억제 구역을 관찰하기 위해 봉합재를 아가 플레이트에 놓고 TSB에 접종하여 코팅된 봉합재 대 코팅되지 않은 봉합재의 항미생물 효과를 조사하였다.

[0275] 샘플은 37oC에서 16시간 동안 배양되었다.

[0276] TSB에 접종된 봉합재가 있는 튜브의 배양물을 연속 희석에 의한 CFU 결정에 사용했다. 코팅된 봉합재의 장기적 효과를 조사하기 위해 봉합재를 헹구고 37oC에서 16시간 동안 TSB에서 박테리아로 재접종했다.

[0277] 세가지 병렬 실험이 수행되었다.

[0278] CFU는 콜로니 수 후에 결정되었다.

[0279] **결과**

[0280] *코팅된 봉합재 준비*

[0281] 코팅된 봉합재는 봉합재를 Resomer RG-502 및 AMC-109 용액으로 처리하여 쉽게 생산할 수 있다. 용매 혼합물의 조성은 Resomer RG-502와 AMC-109를 모두 용해하고 혼합하는 능력(상 분리 또는 침전 방지)에 중요했다.

[0282] *AMC-109 방출량 정량 분석*

[0283] 코팅된 봉합재를 물로 추출하였다. 코팅된 봉합재를 0.4ml의 물에 넣고 30분 동안 정치시켰다. 봉합재를 제거하고, 건조시키고, 22시간 동안 두 번째로 추출하였다. 추출에 의해 방출된 AMC-109의 양에 대해 추출물을 분석하였다. 결과는 도 6에 있다.

[0284] **AMC-109 코팅 봉합재의 항미생물 효능 결정**

[0285] Resomer RG-502 및 AMC-109로 코팅된 봉합재의 항미생물 효능을 한천 성장 억제 분석 및 액체 브로쓰 분석으로 평가했다.

[0286] **1일차:**

[0287] 순(nave) 대조군 봉합재 및 RG-502(AMC-109 무첨가)로 코팅된 봉합재와 비교하여, AMC-109로 코팅된 봉합재 주변에서 억제 구역이 관찰되었다(도 7).

[0288] 첫날에 AMC-109 코팅된 봉합재를 포함하는 튜브의 TSB 배지에서 명백한 성장이 없었다. AMC-109 코팅된 봉합재에 대해 CFU 의 수 0, 500 및 $3x10^3$을 얻기 위해 CFU의 수를 희석했다. 대조군을 포함하는 튜브에서 눈에 띄는 성장이 있었고, 그 결과 CFU의 수가 $5.8x10^8$ 및 $4.7x10^8$(숫자는 평행선의 평균임)이 되었다(도 8).

[0289] **2일차:**

[0290] 2일째에 모든 튜브에서 눈에 띄는 성장이 있었고, Surgilon RG502/AMC가 있는 튜브와 대조군 사이에 눈에 띄는 차이가 없었다.

[0291] **결론**

[0292] 봉합재는 생분해성 중합체와 AMC-109 용액으로 쉽게 코팅할 수 있다. AMC로 코팅된 결과 봉합재는 16시간 동안 항미생물 효과를 나타낸다. AMC-109가 없는 최종 Resomer 층을 추가하여 즉각적인 확산을 줄이고 보다 지속적인 효과를 제공할 수 있다.

[0293] **실시예 9 - AMC-109/중합체 코팅을 사용한 봉합재**

[0294] *재료 및 방법*

[0295] 박테리아 균주: S. aureus ATCC29213 및 S. epidermidis RP42A

[0296] 봉합재: Ethibond® Excel 중합체 봉합재(Johnson & Johnson)를 폴리카프로락톤 + 5% AMC-109 코팅으로 덮었다. 중합체(즉, 폴리카프로락톤, 평균 분자량(MW) 약 14,000) 및 펩티드를 유리 바이알에서 120°C로 빠르게(약 3분 이상) 가열하여 용융시키고 폴리카프로락톤이 용융되면 혼합을 완료하였다. 봉합재를 용융된 혼합물에 담가 코팅하였다.

[0297] 대조군: 코팅되지 않은 Ethibond® Excel 봉합재

[0298] 한 실험에서 박테리아 콜로니를 0.5 McFarland로 희석하고 뮐러 힌톤 한천 플레이트에 펴 바른다. 두 번째 실험에서 콜로니를 0.5 McFarland로 희석하고 Tryptic Soy Broth(TSB)에 1:100으로 희석했다.

[0299] 첫 번째 실험에서 AMC 코팅된 봉합재 및 코팅되지 않은 대조군을 접종된 플레이트에 놓았다. 플레이트를 37° °C에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 두 번째 실험에서 AMC 코팅된 봉합재와 코팅되지 않은 대조군을 접종된 배지에 넣고 37° °C에서 16시간 동안 진탕 배양했다.

[0300] *결과*

[0301] S. epidermidis 및 S. aureus 모두에 대한 대조군과 비교하여 AMC-109 코팅된 봉합재 주변의 한천 플레이트에서 명확한 억제 영역이 관찰되었다(도 9).

[0302] AMC로 코팅된 에티본드(Ethibond) 봉합재의 일부가 첨가된 웰 1 및 4(도 10)에서 관찰된 박테리아 성장의 명백한 억제가 있었다.

[0303] 봉합재를 Syto 9 및 프로피듐 아이오다이드(Propidium iodide)로 추가로 염색하고 형광 현미경으로 조사했다. 코팅된 봉합재와 코팅되지 않은 봉합재 사이에는 분명한 차이가 있었다. 코팅되지 않은 봉합재에서 대량의 박테리아 성장이 관찰되었다.

[0304] **실시예 10: AMC-109로 코팅된 흡수성 봉합재**

[0305] 기술된 방법은 확장 가능하고 산업 개발에 적합하다.

[0306] **재료 및 방법:**

[0307] *봉합재*

[0308] ● Coviden(메드트로닉) 폴리솝 3-0

[0309] ● Ethicon Vicryl plus 3-0(트리클로산 함유, 양성 대조군)

[0310] 두 봉합재 모두 폴리글락틴 910의 내부 편조 필라멘트로 구성되며, 이 필라멘트는 칼슘 스테아레이트와 혼합된 폴리(D,L-락타이드-코-글리콜라이드)(락타이드:글리콜라이드 65:35)로 구성된 외부의 더 부드럽고 윤활성 있는 층으로 덮여 있다. Vicryl plus 봉합재에는 외층에 활성 성분으로 트리클로산이 추가로 포함되어 있다.

[0311] *고분자*

[0312] Resomer(Evonik) RG-502, 분해성 폴리(D,L-락타이드-코-글리콜라이드)(락타이드:글리콜라이드 50:50) Mw 7000 - 17000, 분해 시간 < 3개월.

[0313] *펩티드*

[0314] 이전과 같이 AMC-109.

[0315] *봉합재 스트리핑(stripping)*

[0316] 폴리솝 봉합재의 외층은 봉합재를 에틸 아세테이트로 10분 동안 세척한 다음 물로 2분 동안 세척하여 (부분적으로) 제거되었다. 봉합재를 코팅하기 전에 건조시켰다.

[0317] *봉합재 코팅 혼합물*

[0318] 하나의 바이알에서 에틸 아세테이트에 RG-502를 용해시키고 두 번째 바이알에서 에탄올에 AMC-109를 용해시켜 코팅 혼합물을 제조하였다. 두 용액을 혼합하여 에틸 아세테이트 0.5ml를 첨가하자 투명해지는 약간 혼탁한 용액을 생성하였다.

[0319] *봉합재 코팅*

[0320] 폴리솝 봉합재(6cm 조각으로 절단)를 코팅 혼합물에 10분 동안 담그고 건조시킨 후 새로 준비한 코팅 혼합물에 두 번째로 2분 동안 담근다.

[0321] 두 배치의 봉합재를 준비했는데, 하나는 화학적 추출 분석 및 억제 영역 테스트(실험 1)용이고 다른 하나는 액체 배지에서의 효능 테스트(실험 2)용이다.

[0322] 표 7. 코팅에 사용된 질량 및 부피.

[0323]

봉합재	RG502 (mg)	EtOAc (ml)	AMC-109 (mg)	EtOH (ml)	EtOAc	혼탁도
실험 1 15%	45.00	0.5	8	0.25	0.5	흐린
실험 1 5.9%	77.68	1.907	4.90	0.25	0	"투명한"
실험 1 control	50.00	1.00	0	0.25	0	
실험 2 15%	90.00	1.5	16.1	0.5	0.5	흐린
실험 2 6.1%	90.00	1.5	5.9	0.5	0.5	흐린

[0324] *추출*

[0325] 수성 추출을 위해 봉합재 샘플을 선택했다.

[0326] *첫 번째 추출*

[0327] 봉합재를 바이알에 넣고 물(1ml)을 첨가했다. 샘플을 1시간 동안 방치하였다. 추출 샘플을 HPLC로 분석하였다.

[0328] *두 번째 추출*

[0329] 첫 번째 추출의 봉합재 샘플을 새 바이알에 넣고 물(1ml)을 첨가하고 3.5시간 동안 추출했다. 두 번째 추출 샘플을 HPLC로 분석했다.

[0330] *미생물학적 평가*

[0331] 박테리아 균주:

[0332] ● 스타필로코쿠스 아우레우스 (8325)

[0333] ● 슈도모나스 에루지노사 (PAO1)

[0334] ● 대장균(Escherichia coli)

[0335] ● 엔테로코쿠스 패시움

[0336] 서로 다른 박테리아 균주의 밤새 콜로니를 사용하여 0.5% NaCl에서 0.5 McFarland($1x10^8$ CFU/ml) 용액을 만들고 2 ml LB(Lysogeny broth)가 있는 튜브에서 10^5 CFU/ml로 추가 희석했다. 박테리아 용액은 성장 구역 억제 테스

트를 위한 한천 플레이트의 접종 및 LB 배지에서 봉합재 테스트 샘플의 직접 접종을 위해 사용되었다. 모든 샘플을 37° C에서 18시간 동안 배양했다. CFU의 계수는 i) 테스트 샘플이 접종된 용액(LB-배지), 또는 ii) 용액(1ml NaCl, 0.5%)에서 헹구고 볼텍싱된(20초) 샘플로 연속 희석하여 수행되었다. 일련의 희석액(10^{-1}-10^{-6})을 1ml NaCl로 만들었다. 다양한 희석액에서 100μl를 혈액 한천 플레이트에 펴고 37° C에서 18시간 동안 추가로 배양했다.

[0337] **결과:**

[0338] *AMC-109 방출의 정량화*

[0339] 표 8. 수성 봉합재 추출물에서 발견된 AMC-109의 양(μg/ml).

[0340]

AMC-109	첫 번째 추출	두 번째 추출
15 %	21	4
5.9 %	5	NQ

[0341] *NQ는 정량화할 수 없음을 나타냄

[0342] 봉합재는 코팅시 0.4 내지 0.5mg 증가하였다. 수성 추출물의 AMC-109 농도는 표 8에 정리되어 있으며, 데이터는 고부하 봉합재가 추출 시 총 4.5시간 동안 25마이크로그램의 AMC-109를 수용액으로 방출한다는 것을 보여주었다. 저 로딩 봉합재는 유사한 조건에서 5마이크로그램 AMC-109를 방출했다.

[0343] AMC-109의 양은 고로딩 코팅에 내장된 AMC-109의 최소 30%가 4.5시간 이내에 물로 방출됨을 시사한다. 저부하 봉합재로부터의 방출은 약간 더 낮은 것으로 보인다.

[0344] *미생물학적 평가*

[0345] 성장 억제 구역은 15% AMC-RG502로 코팅된 폴리솝 주변에서 항상 관찰되었다. 이에 비해 Vicryl Triclosan은 S. aureus와 E. coli의 성장 억제만 나타냈다(표 9).

[0346] 표 9: 영역 억제 테스트

[0347]

		억제 구역			
		S. aureus	*P. aeruginosa*	*E. faecium*	*E. coli*
실험 1 15%	폴리솝 3-0	4 mm	2 mm	3 mm	3mm
실험 1 5.9%	폴리솝 3-0	2 mm	0 mm	1 mm	0mm
실험 1 대조군	폴리솝 3-0	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
트리클로산	비크릴	15 mm	0 mm	0 mm	3 mm

[0348] 박테리아 현탁액에 봉합재 테스트 물질을 직접 접종하면 모든 균주에 대해 15% AMC-109로 코팅된 봉합재에 대한 LB 배지에서 박테리아 성장이 감소했다. 트리클로산 코팅 봉합재는 S.aureus의 성장만을 억제했다, 표 10.

[0349] 표 10. LB 배지에 봉합재 테스트 샘플을 직접 접종한 CFU.

		콜로니 형성 단위 (CFU)			
		S. aureus	*P. aeruginosa*	*E. faecium*	*E. coli*
실험 2 15%	폴리솝 3-0	0	$3.4x10^5$	0	0
실험 2 6.1%	폴리솝 3-0	$3.2x10^6$	$1.0x10^9$	$1.6x10^3$	$6x10^8$
대조군	폴리솝 3-0	$6.0x10^8$	$1.0x10^9$	$4.6x10^7$	$1.5x10^8$
트리클로산	비크릴	80	$1.2x10^9$	$1.5x10^7$	$8.0x10^7$

[0350]

[0351] **결론**

[0352] AMC-109는 기재된 용액 코팅 기술을 사용하여 흡수성 봉합재에 통합될 수 있다. 코팅 용액이 혼탁하여 과포화 용액임을 나타낸다. 이는 코팅 효율을 증가시킬 수 있다.

[0353] AMC 코팅 봉합재는 4.5시간 이내에 AMC-109 함량의 30% 이상을 수성 환경으로 방출했다. AMC-109의 방출량은 봉합재에 혼합된 양에 따라 다르다.

[0354] AMC-109 코팅 봉합재는 트리클로산이 효과가 없는 중요한 병원균을 포함하여 다양한 그람 양성 및 그람 음성 박테리아에 대한 항-콜로니화 효능을 제공한다.

[0355] **실시예 11 AMC-109를 포함하는 생체흡수성 박막의 주조**

[0356] 11.1 생체흡수성 고분자

[0357] ● 디클로로메탄(DCM)에 용해된 Resomer L206S(폴리 L-락타이드 에스테르 말단)(Sigma Aldrich 719854), 클로로포름에 용해된 AMC-109

[0358] ● 테트라히드로푸란(THF)에 용해된 Resomer RG502(폴리-D,L- 락타이드-코-글리콜라이드)(Sigma Aldrich 719889), THF에도 용해된 AMC-109

[0359] 11.2 생체흡수성 박막의 제조

[0360] *주조 용액*

[0361] Resomer RG502 생체흡수성 고분자 재료와 AMC-109는 최종 도장 용액에서 생체흡수성 고분자 대비 AMC-109의 양이 5%가 되도록 별도로 THF에 용해시켰다. THF에서 AMC-109의 용해에는 몇 시간이 걸린다.

[0362] Resomer L206S 생체흡수성 고분자 재료와 AMC-109를 각각 디클로로메탄과 클로로포름에 따로 용해시켰다. AMC-109와 L206S의 비율은 위와 동일하였다.

[0363] *주조 공정*

[0364] 얇은 필름 샘플은 8ml의 캐스팅 용액을 알루미늄 호일에 얕은 압흔을 두거나 시계 접시에 페인팅 용액을 부어 준비했다. 건조 후(며칠) 박막 주조 필름을 표면에서 기계적으로 느슨하게 했다.

[0365] 11.3 AMC-109를 포함하는 생체흡수성 박막으로부터의 AMC-109 누출 측정

[0366] *추출*

[0367] 주조된 박막에서 샘플을 잘라내어 정확히 무게(100~150mg)를 측정하고, 샘플의 AMC-109 양을 계산했다. 샘플을 바이알에 넣고 물(2ml)을 첨가한 다음 바이알을 흔들었다. 6회 연속 추출이 수행되었다. 추출할 때마다 기존 추출물을 탈이온수(2ml)로 교체했다. 추출은 10초, 5분, 30분, 3시간, 22시간, 48시간의 진탕 기간으로 수행하였다. 각 추출물에서 AMC-109의 양은 미리 만들어진 표준 곡선을 사용하여 280nm에서 UV-분광광도법으로 결정되었다. 결과는 도 11에 도표로 표시된다.

[0368] 11.4 AMC-109를 포함하는 생체흡수성 박막의 미생물학적 평가

[0369] *박테리아 균주:*

[0370] ● 스타필로코쿠스 아우레우스 8325

[0371] *수정된 AATCC-100 방법*

[0372] S. aureus의 밤새 콜로니를 0.9% NaCl에서 0.5 McFarland로 희석하여 $1x10^8$ 박테리아의 박테리아 농도를 생성했다. 이 용액을 TSB에서 $1x10^5$ 박테리아로 추가 희석했다.

[0373] L206S의 박막재료를 약 0.4×0.4cm의 조각으로 절단하였다. 그런 다음 재료를 dH_2O에 2분 동안 담그고 사용하기 전에 공기 건조했다. 샘플에 50㎕의 박테리아 용액($1x10^5$)을 접종했다. 샘플을 유리 슬라이드 위에 놓고 수분 챔버에서 37° C로 24시간 동안 배양했다. 각 시험 재료에 대해 두 개의 생물학적 복제물을 만들었다.

[0374] 인큐베이션 후 박막재료를 2분 동안 철저히 세척하여 용이하게 추출될 수 있거나 표면에 직접적으로 존재하는 AMC-109를 제거하였다. 그런 다음 1000㎕ NaCl에 넣고 45초 동안 볼텍싱한 후 연속 희석($0-10^{-6}$)을 만들고 CFU 계수를 위해 100㎕를 도금했다.

[0375] *미생물학적 효능*

[0376] *콜로니 형성 단위*

[0377] CFU의 수는 AMC 포함 물질에 대한 검출 한계 미만이었다. 대조군 물질과 비교하여 CFU 수치에서 7 로그 감소가 있었으며, 아래 표 참조한다.

[0378] 표. AMC-109를 포함하는 생체 흡수성 박막 샘플에 대한 CFU 값.

[0379]

TPU/중합체	AMC-109	대조군
L206S	0	$8.7\ x10^7$
RG502	*	*

[0380] * RG502 재료는 24시간 배양 기간 동안 분해되어 유리 슬라이드 표면에 강하게 부착되었다. 재료는 복구할 수 없었다.

[0381] **11.5 결론**

[0382] ● Resomers는 일부 용매에 의해 용해될 수 있으며, THF 및 디클로로메탄은 테스트된 용매 중에서 가장 일반적으로 적용된다.

[0383] ● AMC-109는 THF 또는 클로로포름 용액에서 용해된 중합체에 혼합될 수 있다. AMC-109를 용해시키는 용매는 리소머를 용해시키는 데 사용되는 용매와 혼합될 수 있어야 한다.

[0384] ● 생성된 주조 용액은 여러 표면에 적용되거나 박막 주조에 사용할 수 있다.

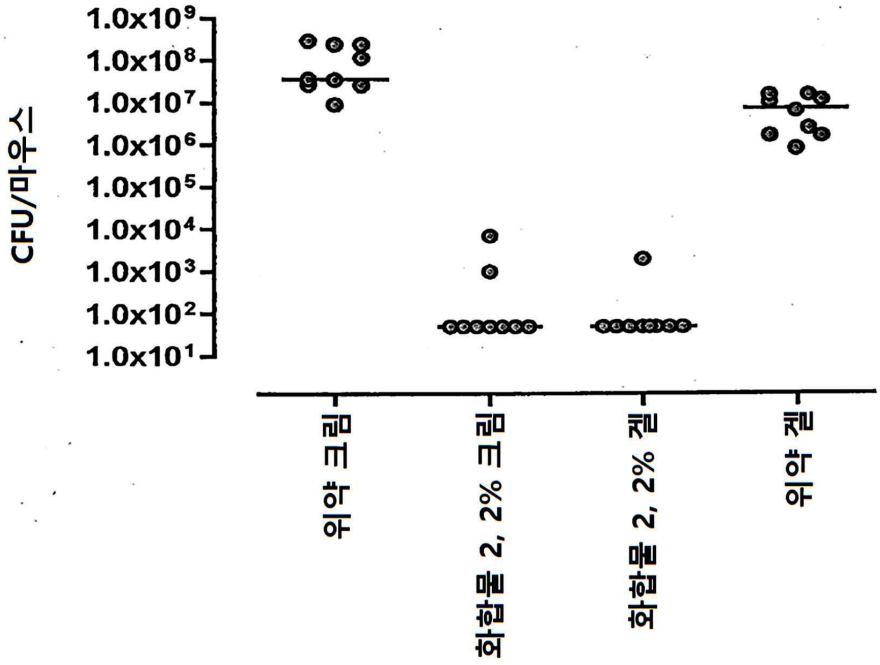
[0385] ● 캐스팅된 박막은 처음에는 빠르게 AMC-109를 누출하고, Resomer의 특성에 따라 최소 2일 동안 더 낮은 농도로 유지된다.

[0386] ● Resomer RG502 박막은 흥미로운 누출 거동을 보여준다. 중합체는 시간이 지남에 따라 분해되고 장기간에 걸쳐 AMC-109를 지속적으로 누출한다.

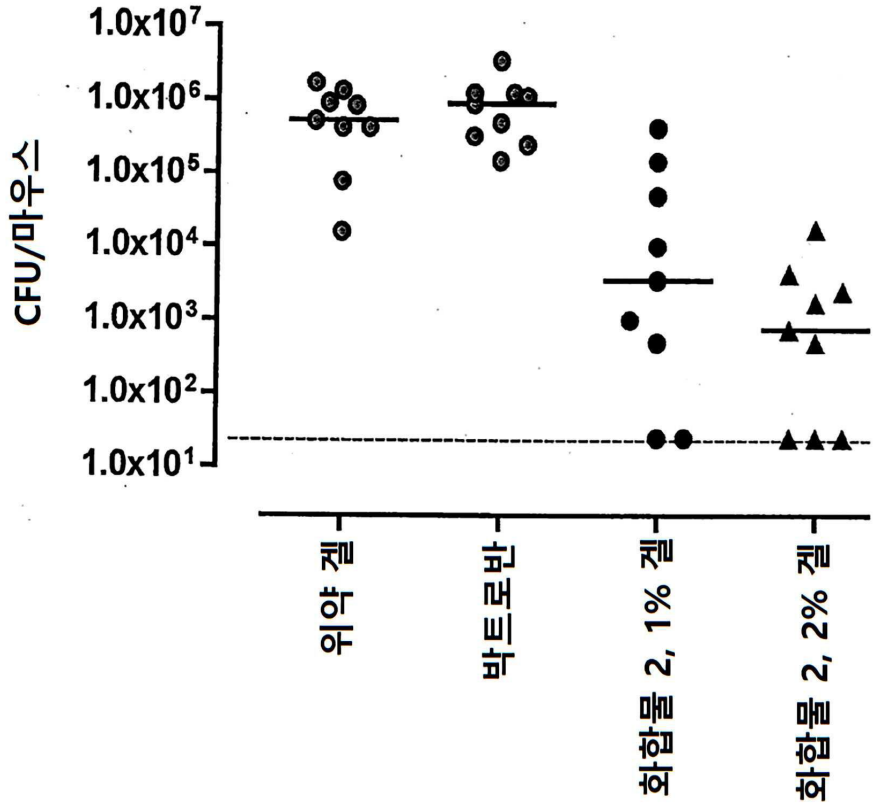
[0387] ● Resomer L206S 박막은 Resomer RG502처럼 빠르게 분해되지 않으며 더 오랜 시간 동안 활성을 가질 수 있다.

도면

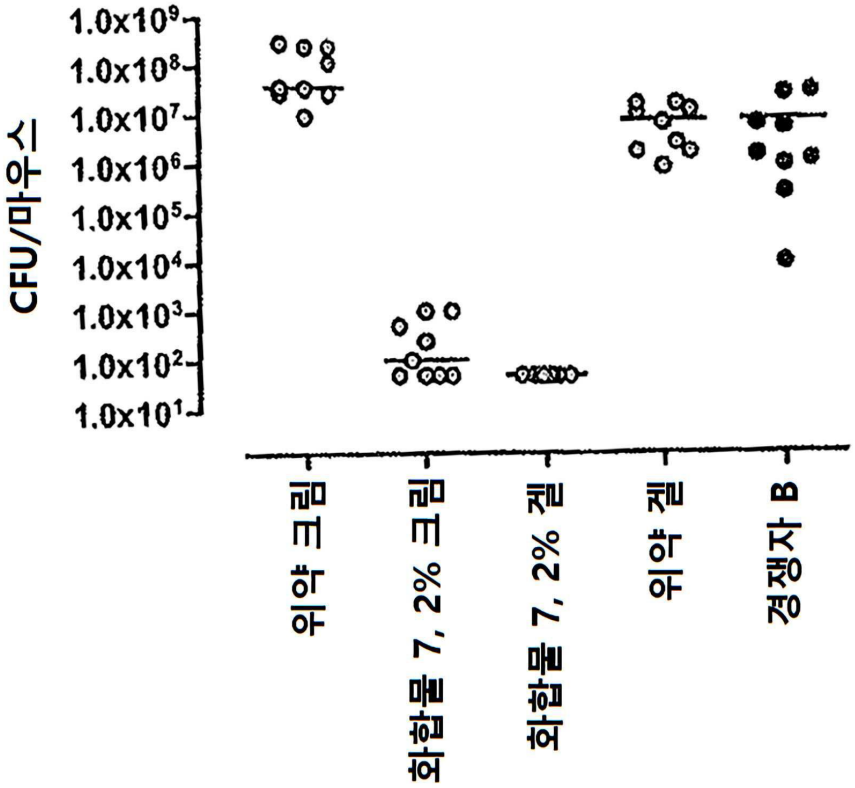
도면1


CFU/마우스
1.0x10⁹
1.0x10⁸
1.0x10⁷
1.0x10⁶
1.0x10⁵
1.0x10⁴
1.0x10³
1.0x10²
1.0x10¹
위약 크림
화합물 2, 2% 크림
화합물 2, 2% 겔
위약 겔

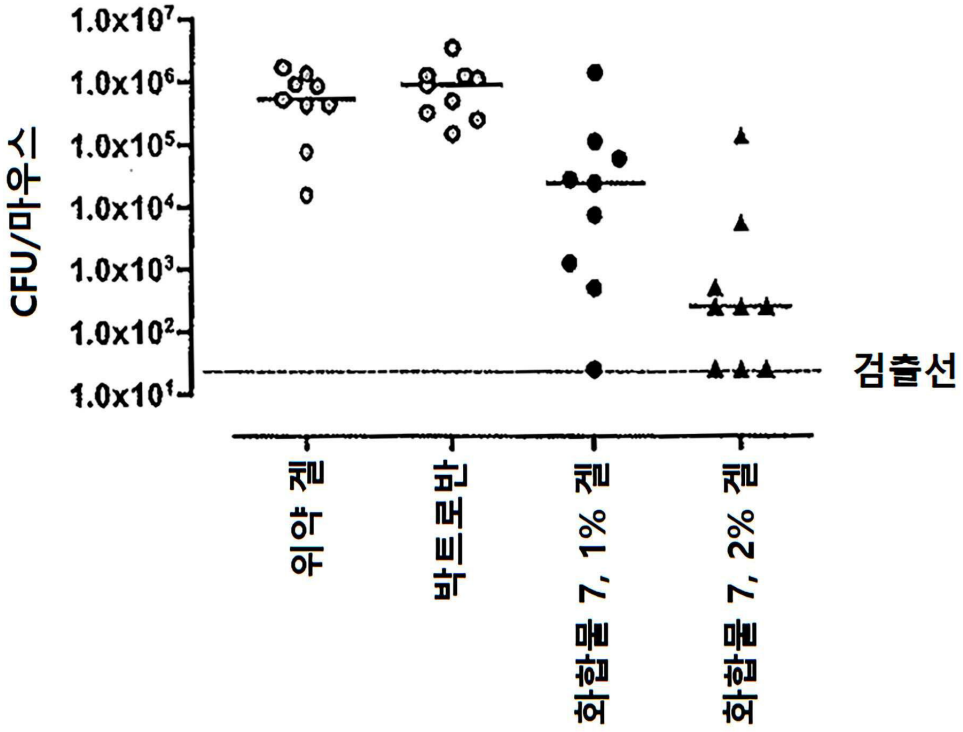
도면2


CFU/마우스
1.0x10⁷
1.0x10⁶
1.0x10⁵
1.0x10⁴
1.0x10³
1.0x10²
1.0x10¹
위약 겔
박트로반
화합물 2, 1% 겔
화합물 2, 2% 겔

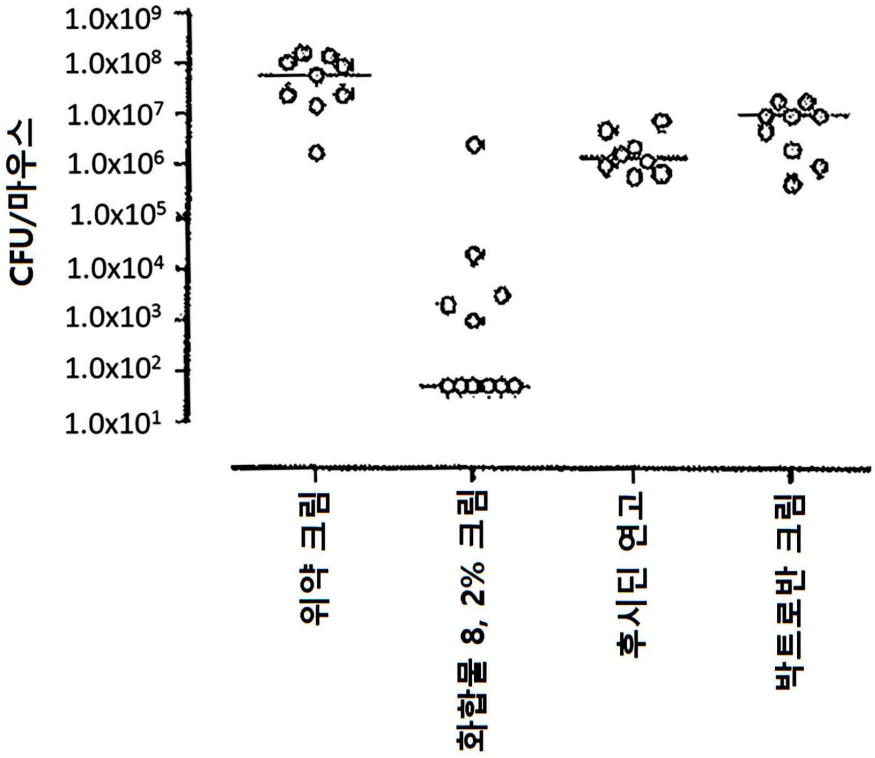
도면3


CFU/마우스
1.0x10⁹
1.0x10⁸
1.0x10⁷
1.0x10⁶
1.0x10⁵
1.0x10⁴
1.0x10³
1.0x10²
1.0x10¹
위약 크림
화합물 7, 2% 크림
화합물 7, 2% 겔
위약 겔
경쟁자 B

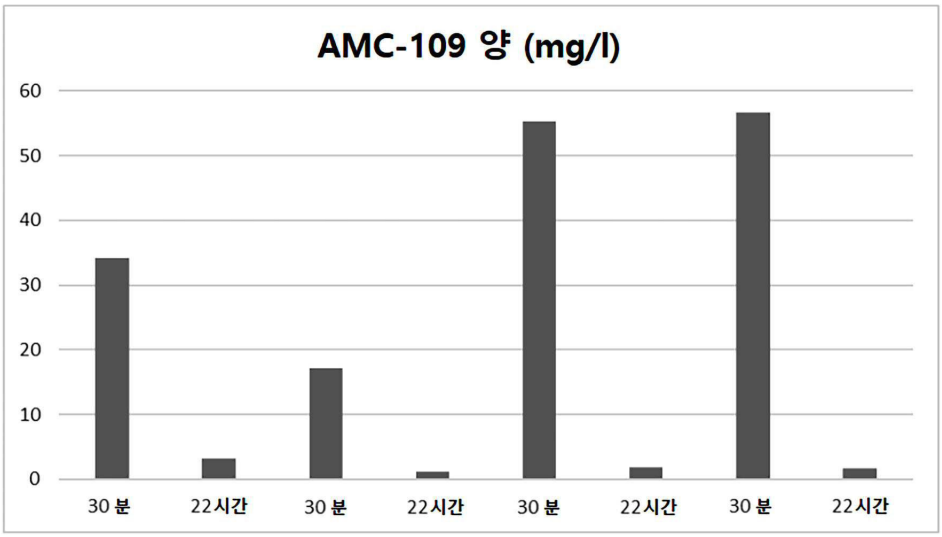
도면4


CFU/마우스
1.0x10⁷
1.0x10⁶
1.0x10⁵
1.0x10⁴
1.0x10³
1.0x10²
1.0x10¹
검출선
위약 겔
박트로반
화합물 7, 1% 겔
화합물 7, 2% 겔

도면5


CFU/마우스
1.0x10⁹
1.0x10⁸
1.0x10⁷
1.0x10⁶
1.0x10⁵
1.0x10⁴
1.0x10³
1.0x10²
1.0x10¹
위약 크림
화합물 8, 2% 크림
후시딘 연고
바르크림

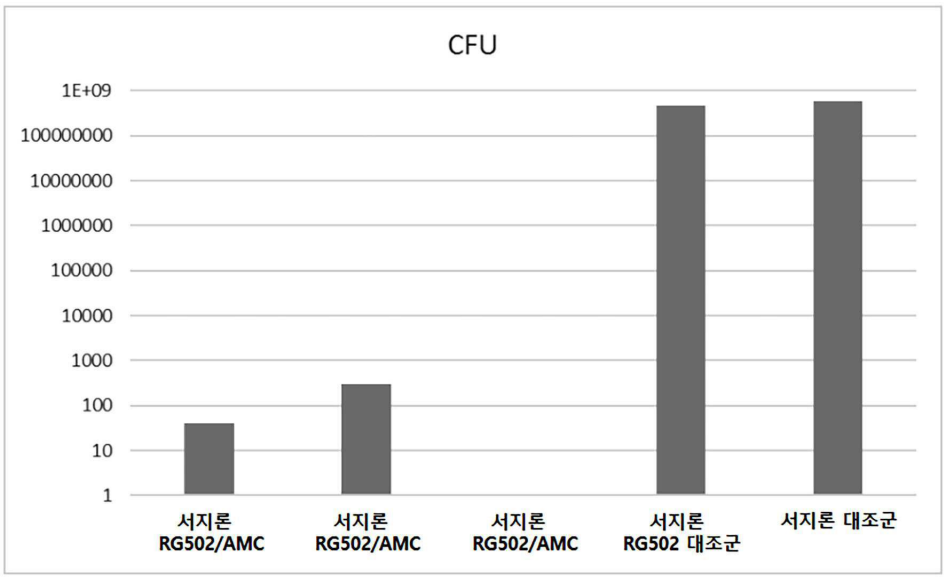
도면6


AMC-109 양 (mg/l)
60
50
40
30
20
10
0
30 분
22시간
30 분
22시간
30 분
22시간
30 분
22시간

도면7



도면8


CFU
1E+09
100000000
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
서지론 RG502/AMC
서지론 RG502/AMC
서지론 RG502/AMC
서지론 RG502 대조군
서지론 대조군

도면9


S.epidermidis
AMC 109
Control


ATCC 29213
S.aureus
AMC 109
Control

도면10



도면11

