



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월12일

(11) 등록번호 10-2350121

(24) 등록일자 2022년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/20 (2006.01) A23L 3/3463 (2017.01)
 A23L 3/3508 (2006.01) A23L 3/3562 (2006.01)
 A61K 31/431 (2006.01) A61K 31/7028 (2006.01)
 A61K 8/36 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
 A61K 8/60 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
 A61Q 17/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/20 (2013.01)
 A23L 3/34635 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0100128

(22) 출원일자 2020년08월10일

심사청구일자 2020년08월10일

(56) 선행기술조사문헌

US20140228312 A1*

US20070225220 A1*

Scientific Reports, 8, 873/1-9, 2018.

Biosci. Biotech. Biochem., 57(12), 2194-2195, 1993.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

건국대학교 산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

양영현

서울특별시 송파구 가락로 187, 30동 207호(송파동, 한양아파트)

송현석

서울특별시 광진구 광나루로 440, 105호(화양동)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 9 항

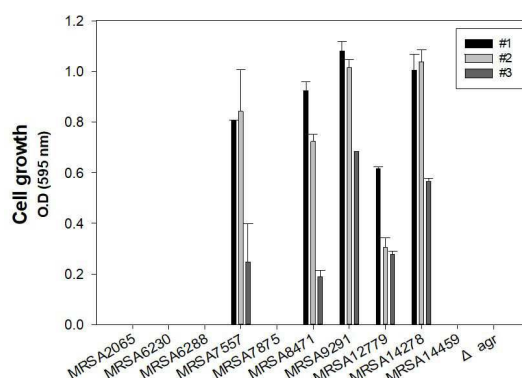
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 항생제 내성 황색포도상구균 억제용 항균 조성물

(57) 요약

본 발명은 항생제 내성 황색포도상구균 억제용 항균 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항생제, 지방산 및 계면활성제의 복합 성분으로 이루어져 보다 효과적으로 항생제 내성 황색포도상구균을 억제할 수 있는 항균 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23L 3/3508 (2013.01)
A23L 3/3562 (2013.01)
A61K 31/431 (2013.01)
A61K 31/7028 (2013.01)
A61K 8/361 (2013.01)
A61K 8/49 (2013.01)
A61K 8/602 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61Q 17/005 (2013.01)

(72) 발명자

김재석

서울특별시 송파구 올림픽로4길 42, 3동 606호(잠실동, 우성아파트)

김현중

서울특별시 노원구 섭발로 139, 111동 202호(공릉동, 공릉풍림아파트)

한영훈

서울특별시 광진구 용마산로1길 78, 1동 602호(중곡동, 대영아파트)

이선미

경기도 용인시 수지구 상현로42번길 40, 273동 503호(상현동, 상현마을 금호베스트빌 3단지)

박솔이

서울특별시 광진구 아차산로 355, B동 1413호(자양동)

이혜수

경기도 용인시 수지구 성북2로 174, 102동 1102호(성북동, 성동마을 수지자이1차)

박예림

인천광역시 부평구 경인로890번길 57, 엔에스파크 102동 1002호(부평동)

최태림

서울특별시 관악구 당곡6길 49, 202호(봉천동)

박준영

서울특별시 영등포구 당산로54길 11, 103동 1701호(당산동, 래미안당산1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 18900

과제번호 PE18900

부처명 해양수산부

과제관리(전문)기관명 해양수산부

연구사업명 연구용역

연구과제명 지구온난화에 따른 북극 극지 미생물의 지방산 변화 관측을 통한 membrane fluidity 변화 연구

기 여 율 50/100

과제수행기관명 건국대학교

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711105033

과제번호 2017M3A9E4077234

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 다제내성 황색 포도구균 신규 독성/내성 조절 인자 연구

기 여 율 50/100

과제수행기관명 건국대학교

연구기간 2020.02.01 ~ 2020.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 향균 조성물로서,
상기 항생제는 옥사실린이고, 상기 지방산은 팔미트산이며, 상기 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트인 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 억제용 향균 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 항생제는 0 초과 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 상기 지방산은 0 초과 내지 1.5 mg/ml 이하, 상기 계면활성제는 0 초과 내지 0.5 % (v/v %) 이하로 포함되는 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 억제용 향균 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 조성물의 함량은 항생제 내성 황색포도상구균에 대한 각 성분별 MIC₅₀ 농도를 기반으로 박스-벤켄 디자인 (Box-benhken design)에 의해 도출된 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 억제용 향균 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 황색포도상구균은 항생제 내성 황색포도상구균인 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 억제용 향균 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 황색포도상구균은 메티실린 내성 황색포도상구균인 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 억제용 향균 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 화장료 조성물로서,

상기 항생제는 옥사실린이고, 상기 지방산은 팔미트산이며, 상기 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트인 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 억제용 화장료 조성물.

청구항 12

항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 식품 첨가제로서,

상기 항생제는 옥사실린이고, 상기 지방산은 팔미트산이며, 상기 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트인 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 억제용 식품 첨가제.

청구항 13

항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 사료 첨가제로서,

상기 항생제는 옥사실린이고, 상기 지방산은 팔미트산이며, 상기 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트인 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 억제용 사료 첨가제.

청구항 14

항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 의약품 조성물로서,

상기 항생제는 옥사실린이고, 상기 지방산은 팔미트산이며, 상기 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트인 것을 특징으로 하는 황색포도상구균 억제용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항생제 내성 황색포도상구균 억제용 항균 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 항생제, 지방산 및 계면활성제의 복합 성분에 의하여 보다 효과적으로 항생제 내성 황색포도상구균을 억제할 수 있는 항균 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자연계에 널리 분포되어 있는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*; *S. aureus*)은 세계적으로 널리 알려진 식중독균 중의 하나로, 황금색 색소를 생성하고 용혈성을 가지며 응고효소(coagulase)를 생성하는 종으로, 화농성 질환이나 창상감염 등의 피부감염, 골관절염, 폐렴, 패혈증 등을 일으키는 병원성 높은 대표적인 유해세균으로 알려져 있다.

[0003] 황색포도상구균은 일반적으로 환경에 대한 저항성이 강하여 건강한 성인의 비강, 피부, 구강 등에서도 존재하고 동물의 상처부위를 통한 전염이나 식품의 생산과정, 제조 공정 등의 여러 단계를 거치면서 식품 유통망을 타고 짧은 시간에 전국적으로 전파될 수 있으며, 전파된 황색포도상구균은 사람에게 전이되어 또 다른 매개체가 될 수 있다. 따라서 황색포도상구균과 같은 유해세균을 억제하기 위하여 사람과 동물의 질병 치료와 예방에 항생제를 사용하고 있으나, 황색포도상구균에 의한 식중독 발생률은 노로 바이러스와 살모넬라, 병원성 대장균과 함께 꾸준히 높은 수치를 나타내고 있으며 매년 발생이 증가되고 있다

[0004] 역사적으로 대부분의 황색포도상구균은 페니실린, 메티실린, 암피실린 같은 베타락탐 항생제 (β -lactam antibiotics)를 이용하여 치료를 진행하였으나, 변종으로 내성이 발생하였다. 이러한 변종은 오랜 기간의 항생제의 남용으로 인하여 다제내성 박테리아라는 결과를 낳았다. 그 중에 메티실린 내성 황색포도상구균은 옥사실린(Oxacillin) 또는 세포시틴(Cefoxitin) 항생제에 내성을 나타내는 황색포도상구균을 칭한다. 포도상구균은 사람의 피부나 구강인 후 점막 등에 정상적으로 존재하는 균이지만 항암제 치료를 받는 환자, 수술을 받은 환자, 혈액투석을 받는 환자, 장기 이식환자, 노인, 면역저하 환자, 만성 기저질환자 등에서 침습적인 시술이나 수술 등을 통해 감염을 유발할 수가 있다. 주요 증상으로는 피부 및 연조직 감염, 골관절염, 균혈증, 폐렴, 식중독 등 감염부위나 경로에 따라 다양한 감염증을 유발한다. 다시 말해서, 메티실린 내성 황색포도상구균은 의료시설의 질병 유발률 및 사망률에 더해 의료비용을 증가시키는 주요한 원인이다. 메티실린 내성 황색포도상구균이 진단이 되면, 치료법은 감염유형, 감염경로, 증상의 심각성, 항생제에 대한 반응을 기반으로 치료를 진행하게 된다. 주요 항생제로는 클린다마이신 (Clindamycin), 테트라사이클린 (Tetracycline) 계열인 독시사이클린 (Doxycycline)과 미노사이클린(Minocycline), 트리메토프림 (Trimethoprim), 설파메톡사졸 (Sulfamethoxazole), 리팜핀 (Rifampin), 리네졸리드 (Linezolid), 답토마이신 (Daptomycin), 테이코플라닌 (Teicoplanin), 반코마이신(Vancomycin), 아목시실린(Amoxicillin), 아지스로마이신(Azithromycin) 등이 있다. 하지만 황색포도상구균은 자연적으로 변종이 빠르게 나타나며 항생제를 남용하게 될 경우 미생물의 빠른 적응력에 의해 항생제 내성을 띠게 되는 항생제 내성균을 초래할 수가 있어, 이러한 문제점을 개선할 수 있는 물질들에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 항생제 내성을 가지는 황색포도상구균에 대한 항균활성을 가지고, 기존 항생제의 부작용을 최소화한 항균 조성물을 제공하기 위해 예의 노력한 결과, 항생제, 지방산 및 계면활성제를 혼합 사용할 경우, 항생제 내성 황색포도상구균에 대해 높은 항균활성을 가지는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2017-0052323호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 해결하려는 과제는 항생제, 지방산 및 계면활성제를 포함하는 항생제 내성 황색포도상구균에 대한 항균 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한 항생제, 지방산 및 계면활성제를 포함하는 화장료 조성물, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은, 항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 항균 조성물을 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은, 항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 화장료 조성물을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은, 항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 식품 첨가제를 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은, 항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 사료 첨가제를 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은, 항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 의약품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명은 항생제, 지방산 및 계면활성제를 포함하는 황색포도상구균 억제용 항균 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명에 따르면, 기존의 단일 항생제 사용으로 인한 항생제 내성 메카니즘을 피할 수가 있고 기존의 항생제 농도보다 낮은 농도에서 메티실린 등 다양한 항생제 내성 황색포도상구균의 성장저해가 가능하다. 또한 본 발명에 따른 조성물은 항생제 내성 황색포도상구균에 대하여 우수한 항균 활성을 나타내므로, 의약품, 의약외품, 화장품, 식품 첨가제 또는 사료 첨가제 등에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 옥사실린 (Oxacillin) 부분 억제 농도(sub-inhibitory concentration)를 구하여 MIC50 농도를 구하기 위하여, 옥사실린의 농도와 세포 성장의 관계를 분석한 그래프이다.
- 도 2는 팔미트산 (palmitic acid)의 부분 억제 농도(sub-inhibitory concentration)를 구하여 MIC50 농도를 구하기 위하여, 팔미트산의 농도와 세포 성장의 관계를 분석한 그래프이다.
- 도 3은 소르비탄 트리올리에이트 (sorbitan trioleate) 부분 억제 농도(sub-inhibitory concentration)를 구하여 MIC50 농도를 구하기 위하여, 소르비탄 트리올리에이트와 세포 성장의 관계를 분석한 그래프이다.
- 도 4는 옥사실린 (Oxacillin), 팔미트산 (palmitic acid), 소르비탄 트리올리에이트 (sorbitan trioleate)의 요인분석을 통해 각각의 상관관계를 등고선 선도 (contour plot)으로 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 최적화 조건에 따른 3가지 조성의 조성물을 이용하여 Δagr 변이주 및 임상균주의 성장저해 정도를 분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예를 통하여 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명하는 실시예에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 이하의 실시예에 의해 본 발명이 제한되어서는 안 된다.
- [0017] 본 발명은 항생제, 지방산 및 계면활성제를 포함하는 황색포도상구균 억제용 항균 조성물을 제공한다. 이를 통해 인체에 독성이 없고 부작용이 적으며 항생제에 내성을 가진 황색포도상구균에 대한 항균효과 우수한 항균활성을 가진 조성물을 제공하는 효과가 있다. 더욱 구체적으로 반응표면분석법을 이용하여 지방산 및 계면활성제와 항생제의 복합효과를 최적화한 조성물을 이용하여 옥사실린 등의 항생제에 내성을 나타내는 다제내성 황색포도상구균의 성장을 효과적으로 저해할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 "항균(antimicrobial)"의 의미는 어떤 농도에서 미생물의 성장 또는 생존을 감소, 방지, 억제, 또는 제거하는 능력을 의미한다.
- [0019] 본 발명의 "항균용 조성물"은 세균과 같은 미생물의 생육을 저해하는 활성을 가진 조성물로서, 항미생물제를 총칭하는 의미인 항생제와 같은 의미일 수 있고, 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 모든 형태가 포함될 수 있으며, 예를 들어, 의약품, 의약외품, 식품 첨가제 또는 사료 첨가제 등의 형태일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 항균 조성물은 반코마이신(vancomycin), 세팔로스포린(cephalosporin), 엠피실린(ampicillin), 나프실린(nafcillin) 등과 같은 베타-락탐(β -lactam) 계열 항생제를 비롯하여 아미노글리코사이드(aminoglycoside) 및 마크로라이드(macrolides)에 내성을 가지는 황색포도상구균에 대한 항균활성을 가질 수 있으며, 특히 메티실린(Methicillin)에 내성이 있는 황색포도상구균에 대한 항균활성을 가질 수 있다.
- [0021] 상기 메티실린 내성 황색포도상구균(methicillin-resistant staphylococcus aureus; MRSA)은 페니실린(메티실린, 디클록사실린, 남실린, 옥사실린 외)과 세팔로스포린을 포함한 β -락탐계 항생물질 등 거의 모든 항생제에 강한 내성을 지닌 세균으로 대부분 병원내 감염으로 발생한다. 또한, MRSA는 사람에게 감염되어 여러 가지 난치병을 일으키는 세균으로 다제내성 황색포도상구균 또는 '옥사실린 내성 황색포도상구균'(ORSA)이라고도 한다.
- [0022] 본 발명은 항생제, 지방산 및 계면활성제를 포함하는 황색포도상구균 억제용 항균 조성물을 제공하며, 여기서 항생제는 베타락탐계 항생제일 수 있다. 상기 베타락탐계 항생제는 메티실린, 디클록사신, 옥사실린, 플루클록

사신, 아목시실린, 암피실린, 피페라실린, 티카실린, 아즐로실린 및 카르베니실린으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0023] 상기 지방산은 팔미트산 (palmitic acid), 스테아르산 (stearic acid), 아라킨산 (arachidic acid)으로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는 팔미트산일 수 있다. 지방산은 천연 항생제로 인간의 조직이나 체액에서 발견이 된다. 유리 지방산은 전자전달계방해, 세포 대사체의 유출, 지방산 합성경로 억제, 세포막 효소활성 억제, 과산화물 생성 등을 통하여 항생효과를 띠고 있다. 이중 팔미트산은 인체에 가장 흔한 포화지방산으로 음식의 섭취 또는 다른 지방산, 탄수화물, 아미노산 등으로부터 생합성이 가능하다.

[0024] 상기 계면활성제는 소르비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate), 소르비탄 모노스테아레이트(sorbitan monostearate), 소르비탄 트리올레이트(sorbitan trioleate)로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는 소르비탄 트리올레이트일 수 있다. 계면활성제는 물에 녹기 쉬운 친수성 부분과 기름에 녹기 쉬운 소수성 부분을 가지고 있는 화합물이다. 이러한 성질 때문에 비누나 세제 등으로 많이 활용되어 오고 있다. 계면활성제는 HLB값(Hydrophilic-lipophilic balance)으로 친수성 및 친유성 정도를 나타낼 수가 있고 값이 낮을수록 소수성에 가깝고 높을수록 친수성이 높다. 이러한 특성계면활성제도 최근 주목받고 있는 물질로서, 황색포도상구균의 주요한 문제점인 바이오필름 생성 저해를 할 수 있다. 계면활성제의 특성상 바이오필름 형성 억제 외에도 세포막의 투과성을 높여 균의 생존률을 낮출 수가 있다. 그 이외에도 계면활성제는 황색포도상구균의 감염시 특적인 세포 소수성을 이용한 부착활성을 막는 작용을 할 수가 있다.

[0025] 상기 항균 조성물에 있어서, 상기 항생제는 0 초과 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하, 상기 지방산은 0 초과 내지 1.5 mg/ml 이하, 상기 계면활성제는 0 초과 내지 0.5 % (v/v %) 이하로 포함될 수 있다. 이와 같은 함량 범위로 조성물을 구성함으로써, 항생제 내성 황색포도상구균의 항생제 내성 메카니즘 또는 내성 획득 요인을 보다 효과적으로 피할 수 있을 뿐만 아니라 황색포도상구균의 억제 효과도 더욱 상승시킬 수 있다.

[0026] 상기 조성물의 함량은 항생제 내성 황색포도상구균에 대한 각 성분별 MIC₅₀ 농도를 기반으로 박스-벤켄 디자인 (Box-benhken design)에 의해 도출될 수 있다. 더욱 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 옥사실린 (Oxacillin) 등의 항생제, 팔미트산 (palmitic acid) 등의 지방산, 소르비탄 트리올레이트 (sorbitan trioleate) 등의 계면활성제의 각각 부분저해 농도 (sub-inhibitory concentration) 범위 내에 MIC₅₀ 농도를 구할 수 있고, 상기 MIC₅₀ 농도를 이용하여 반응표면 분석법을 이용하여 세포성장 저해가 최고가 되는 최적조합을 구할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 화장료 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 상기 유효성분 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들이 포함되며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다. 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 통상적으로 함유되는 화장료 조성물에 본 발명의 유효성분이 0.1 내지 50 중량%, 바람직하게는 1 내지 10 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수(스킨), 영양 화장수(밀크로션), 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 식품 첨가제를 제공할 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품 첨가물로 사용하는 경우, 상기 유효성분이 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[0029] 또한, 본 발명은 항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 사료 첨가제를 제공할 수 있다. 본 발명의 조성물이 사료 첨가물로 사용하는 경우, 상기 유효성분이 그대로 첨가하거나 다른 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용

목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

- [0030] 또한, 본 발명은 항생제, 지방산 및 계면활성제를 유효성분으로 포함하는 황색포도상구균 억제용 의약외품 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 유효성분이 의약외품 조성물로 사용할 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 본 발명의 의약외품은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 하기와 같은 단계를 포함하는 방법으로 메티실린 내성 황색포도상구균의 생장이 완전하게 저해되는지 확인할 수 있다: 1) 옥사실린(Oxacillin)을 이용하여 메티실린 내성 황색포도상구균의 부분 억제 농도(sub-inhibitory concentration) 중 MIC₅₀ 농도를 구하는 단계; 2) 팔미트산(palmitic acid)을 이용하여 메티실린 내성 황색포도상구균의 부분 억제 농도(sub-inhibitory concentration) 중 MIC₅₀ 농도를 구하는 단계; 3) 소르비탄 트리올리에이트(sorbitan trioleate)을 이용하여 메티실린 내성 황색포도상구균의 부분 억제 농도(sub-inhibitory concentration) 중 MIC₅₀ 농도를 구하는 단계; 4) 반응표면 분석법(Response surface methodology)을 이용하여 배치별 실험값을 구하는 단계, 본 단계는 각 각각 요인별 MIC₅₀ 농도를 기반으로 박스-벤켄 디자인(Box-benhken design)에 의해 도출될 수 있음.; 5) 실험값을 적용하여 완전2차모델 (full quadritic model) $f(x,y,z)=ax^2+by^2+cz^2+dx+eyz+fxz+gx+hy+iz+j, (a,b,c \neq 0)$ 의 계수를 정하는 단계; 6) 완전2차 모델을 통하여 등고선 선도 (contour plot) 이용하여 각각 요인별 상관관계를 나타내는 단계; 및 7) 최적화 과정을 통하여 세포생장을 억제하는 조건을 구하고 유효성을 입증하고 여러 종류의 메티실린 내성 황색포도상구균에 적용하는 단계.
- [0032] 보다 구체적으로, 베타 락탐계열(β -lactam)의 항생제 중 메티실린 내성 균주 치료에 사용이 되는 옥사실린(oxacillin)을 이용하여 항생제 농도별 메티실린 내성 황색포도상구균의 성장 저해 정도를 파악한 후 부분 억제 농도 (sub-inhibitory concentration)를 구해 MIC₅₀에 해당하는 옥사실린(oxacillin) 농도를 구한다. 팔미트산 (palmitic acid)의 경우에도 농도별 메티실린 내성 황색포도상구균의 성장저해 정도를 파악 후 MIC₅₀에 해당하는 농도를 구한다. 마지막으로, 계면활성제인 소르비탄 트리올리에이트(sorbitan trioleate)의 농도별 황색포도상구균의 성장저해 정도를 파악 후 MIC₅₀에 해당하는 농도를 구한다. 다음으로, 각각의 성장저해농도를 이용하여 미니탭을 이용하여 반응표면 분석법을 이용한 박스-벤켄 디자인 (Box-behnken design)을 이용하여 각각의 요인별 MIC₅₀ 농도를 배치하고 이에 해당하는 요인별 실험을 최소 3반복 이상 실험을 진행하여 오차를 줄인다. 이후에 나온 실험값을 적용하여 완전2차모델 (full quadritic model) $f(x,y,z)=ax^2+by^2+cz^2+dx+eyz+fxz+gx+hy+iz+j, (a,b,c \neq 0)$ 을 적용하고 각각의 계수를 흡광도에 따른 세포생장 (Optical density at 595 nm) 값에 따라 분석을 하여 p값이 0.05보다 작은 경우(통계적으로 유의미=귀무가설을 기각하고 대립가설을 채택)에 의해 각각의 계수를 구한다. 이 후에 함수식을 이용하여 각각의 요인의 상관관계에 따른 등고선 선도(contour plot) 또는 표면곡선(surface plot)을 통하여 각각의 요인별 상관관계를 분석한다. 이후 반응 최적화를 통하여 옥사실린(Oxacillin), 팔미트산(palmitic acid), 소르비탄 트리올리에이트(sorbitan trioleate)의 농도를 설정하여 이에 따른 반응(세포 성장) 값을 0으로 하는 조건을 설정한다. 최적화 조건을 설정한 이후에 실제로 위에서 산출한 모델이 실제 모델에 유의미하게 적용되는지 확인하기 위하여 각 조건별로 실험을 하여 메티실린 내성 황색포도상구균의 생장이 완전하게 저해되는지 확인을 한다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면 다음의 단계를 포함하여 메티실린 내성 황색포도상구균의 성장을 저해하는 최적화 조건을 테스트할 수 있다: 1) 메티실린 내성 황색포도상구균을 전배양하는 단계; 2) 전배양한 균주를 옥사실린 (Oxacillin), 팔미트산 (palmitic acid), 소르비탄 트리올리에이트 (sorbitan trioleate)을 포함한 Tryptic soybean broth 배지에서 배양하여 요인 분석을 통해 최적화 조건을 구하는 단계; 및 3) 세포 성장 저해에 대한 유의미성 검정 단계. 여기서 단계 1)의 전배양은 호기 조건에서 30 내지 37℃, 100 내지 300rpm, 및 12 내지 24시간 동안 배양하는 것이 바람직하고, 37℃ 24시간 동안 정지배양하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0034] 본 발명에 따르면, 항생제에 대한 높은 내성을 가지는 균체의 생장을 효과적으로 저해할 수 있다. 기존의 메티실린 내성 황색포도상구균에 대하여 단일 항생제를 처방할 경우 포도상구균의 적응 메카니즘 또는 변이 과정을 통하여 항생제 내성이 생길 수 있는 변수가 있었다. 본 발명과 같이 항생제, 지방산 및 계면활성제를 병용 사용하는 경우 메티실린 등 항생제 내성 황색포도상구균의 항생제 내성 메카니즘 또는 내성 획득 요인을 피할 수 있

고 또한 상승효과를 기대할 수 있다.

[0035] 실시예

[0036] 균주, 배지 및 배양 조건

[0037] 내성 테스트를 위한 야생형 균주로 *Staphylococcus aureus* USA300-0114 (LAC) (CDC 2003)을 사용하였고, 내성이 보다 높게 나오는 돌연변이 균주로 Δagr 변이주 (Cheung et al. 2011)를 사용하였다. Δagr 변이주는 USA300(LAC) WT에서 유래된 변이주인 것이 바람직 하다. 본 실시예에서 미생물은 Tryptic soybean broth 배지에 총 부피에 대하여 1%로 접종되어 24시간 동안 배양 후, 배지가 있는 96-well plate에 접종되어 24시간 배양될 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 균주는 TSB (Tryptic soybean broth) 한천 및/또는 liquid broth에서 배양되었다. 전배양(pre-culture)을 위해, TSB 한천 플레이트로부터의 균주의 단일 콜로니를 사용하여 5 mL의 TSB 배지를 접종하였다. 이어서, 세포 배양 현탁액의 1 % (v / v)를 항생제 내성 시험을 위해 96-웰 플레이트에 접종하고 달리 언급하지 않는 한 인큐베이터에서 37 °C에서 24 시간 동안 세포 배양을 수행하였다.

[0038] <실시예 1> 각 요인별 농도에 따른 세포성장 억제 확인

표 1

Factor	Level of factor		
	-1	0	1
Oxacillin ($X_1, \mu\text{g/ml}$)	0	50	100
Palmitic acid ($X_2, \text{mg/ml}$)	0	0.75	1.5
Span85 ($X_3, \%$)	0	0.25	0.5

[0040] 옥사실린 (Oxacillin), 팔미트산 (palmitic acid), 소르비탄 트리올리에이트 (sorbitan trioleate)을 이용한 세포성장곡선 도 1, 도2, 도3에 최대성장의 50%가 되는 부분 억제 농도(sub-inhibitory concentration)을 구하여 MIC50 농도를 구하고 고, MIC50 농도를 각각 요인별 농도의 최대치인 1로 잡아서 표 1에 나타내었다 (표 1). 표 1에서 반응 표면 분석법(Response surface methodology) 중 박스-벤켄 디자인 (Box-behnken design)을 통한 요인 배치분석에 의해 각 요인별 농도에 따른 세포성장 억제 정도를 확인하였다.

[0041] <실시예 2> 반응 표면 분석법을 이용한 성장저해 확인

[0042] 전배양을 위해 평균배지에서 황색포도상구균의 단일 콜로니를 Tryptic soybean broth 배지(3ml)에 접종하여 37 °C 200rpm 24시간 배양을 하였고, 그 후 각각의 요인 배치에 따른 조건에 따라서 본 배양을 수행하였다. 구체적으로 Tryptic soybean broth 배지를 이용하여 96-well plate에 200 μl 접종하여 37 °C 24시간 정지배양을 하였다. 이후 표 2와 같은 조성으로 확인한 메티실린 내성 황색포도상구균의 균 성장 결과를 이용하여 완전2차모델 (full quadritic model) $f(x,y,z)=ax^2+by^2+cz^2+dx+eyz+fxz+gx+hy+iz+j, (a,b,c \neq 0)$ 의 계수를 정하고 구한 함수가 유의미한지 통계적으로 분석하였다. 분산 분석 (analysis of variance, ANOVA)을 통하여 종속변수의 평균이 유의미한지 나타내었고, p값이 0이므로 귀무가설을 기각하고 대립가설을 채택하였다 (표 3). 이후 각 요인별 상관관계도를 등고선 선도 (contour plot)을 이용하여 나타내었다 (도 4). 도 4에서 나타내는 바와 같이 옥사실린 (Oxacillin), 팔미트산 (palmitic acid), 소르비탄 트리올리에이트 (sorbitan trioleate)의 각각의 농도가 높을수록 세포성장의 저해효과가 크지만, 팔미트산 (palmitic acid)과 소르비탄 트리올리에이트 (sorbitan trioleate)의 혼합효과는 서로 길항효과를 나타내었다.

표 2

Runs	Oxacillin (μg/ml)	Palmitic acid (mg/ml)	Span85 (%)	O.D (595 nm)
1	0	0	0.25	1.07±0.03
2	100	0	0.25	0.12±0.03
3	0	1.5	0.25	0.10±0.03
4	100	1.5	0.25	0.00±0.00
5	0	0.75	0	0.02±0.02
6	100	0.75	0	0.02±0.00
7	0	0.75	0.5	0.44±0.00
8	100	0.75	0.5	0.00±0.00
9	50	0	0	0.51±0.07
10	50	1.5	0	0.10±0.00
11	50	0	0.5	0.43±0.02
12	50	1.5	0.5	0.05±0.03
13	50	0.75	0.25	0.08±0.02
14	50	0.75	0.25	0.01±0.00
15	50	0.75	0.25	0.07±0.00

[0043]

표 3

Source	DF	SS	MS	F-value	Prob>F
Model	6	3.36120	0.56020	55.67	0.000
Error	38	0.38242	0.01006		
Total	44	3.74362			

[0044]

[0045]

[0046] <실시예 3> 배치 요인별 최적화과정을 통한 유효 검증

표 4

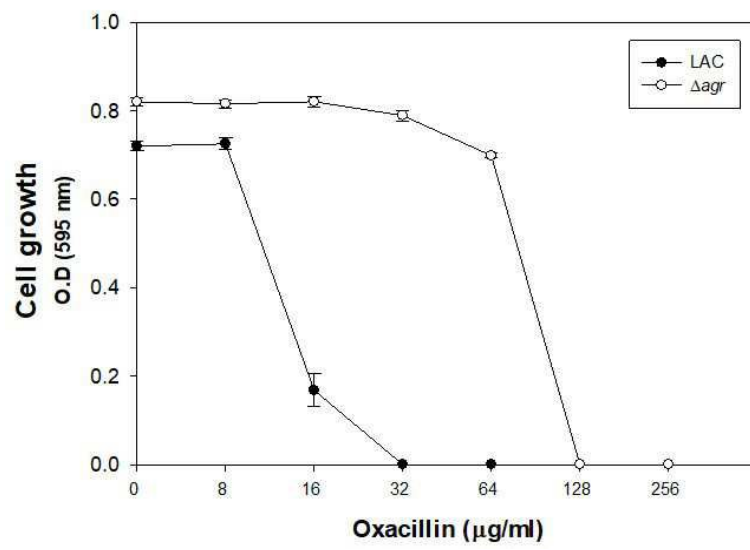
	Oxacillin(μg/ml)	Palmitic acid(mg/ml)	Span85(%)
#1	15	1.3	0.1
#2	50	1	0.08
#3	100	0.3	0.4

[0047]

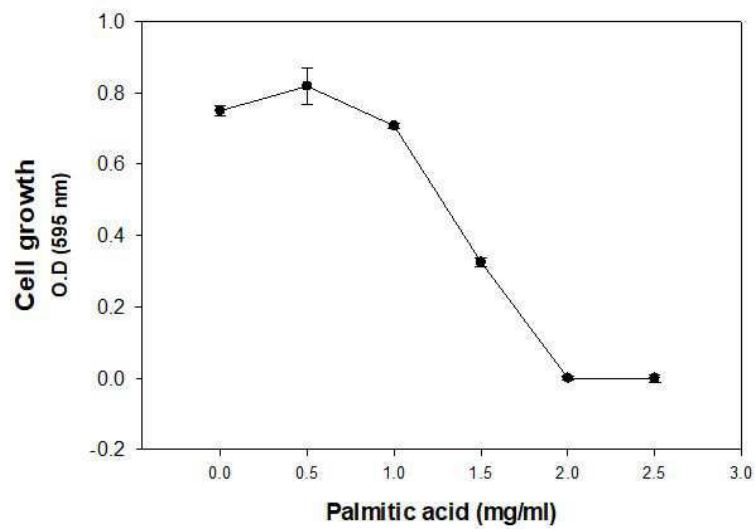
[0048] 표 4의 3가지 조성의 조성물을 이용하여 Δagr 변이주 및 임상균주의 성장저해 검정을 수행하였다. 구체적으로 옥사실린 (Oxacillin), 팔미트산 (palmitic acid), 소르비탄 트리올리에이트 (sorbitan trioleate)의 상관 관계에 따라 최적화 과정을 통하여 메티실린 내성 황색포도상구균의 생장이 0이 되는 조건을 3가지 잡아 유효성을 검증하였다. 실시예 2에 기재된 TSB (Tryptic soybean broth)에서 동일하게 전배양 (3ml) 진행 후에, 전배양된 균주를 표 4의 조성이 포함된 TSB (Tryptic soybean broth) 배지에 200 μl 접종하고, 37 °C 24시간 정치배양 하여 Δagr 변이주 및 임상 균주 샘플에 대하여 유효성 검증을 수행하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 나타내는 바와 같이, 최적화된 조건을 이용할 때 대체적으로 항생제 내성이 높은 임상 균주들에 대한 세포 성장 저해효과도 나타났다.

도면

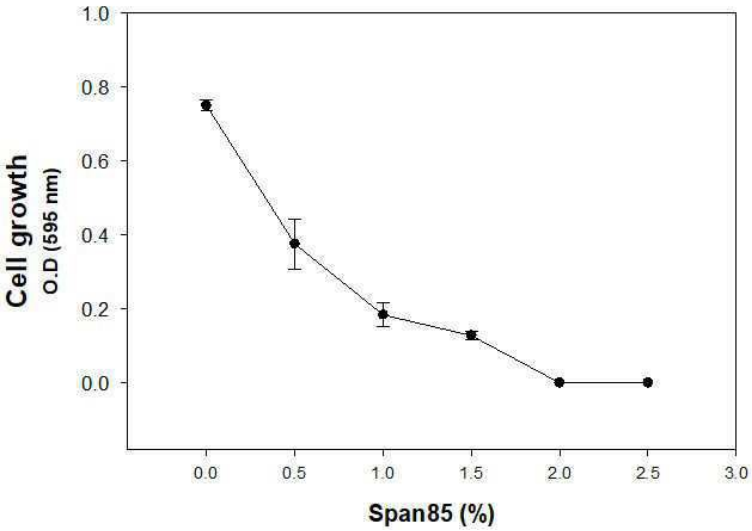
도면1



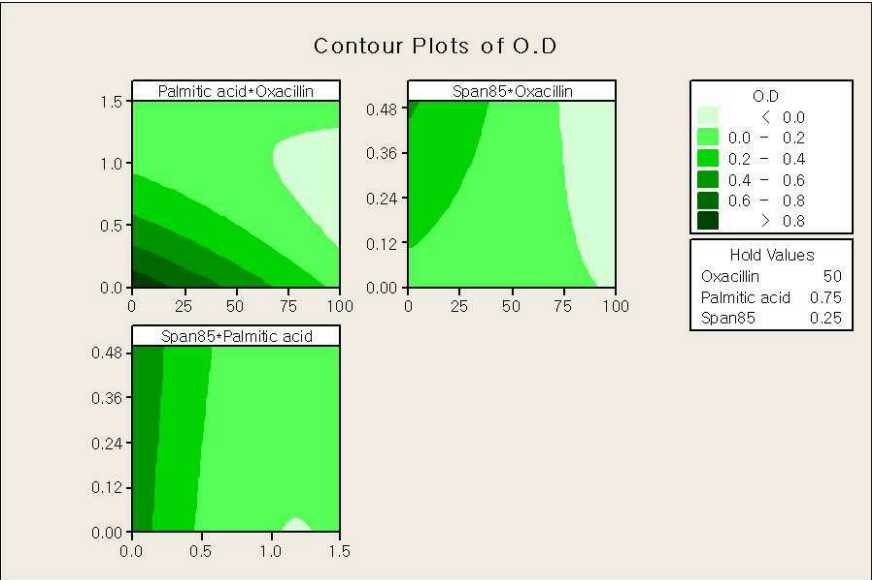
도면2



도면3



도면4



도면5

