(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0176867
(43) 공개일자 2024년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/535 (2006.01) *A01N 43/80* (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01) *A23K 20/137* (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61P 31/10* (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01) *A61Q 19/10* (2006.01)
C11D 3/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/535 (2013.01)
A01N 43/80 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0077040
(22) 출원일자 2023년06월15일
심사청구일자 2023년06월15일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(72) 발명자
김병식
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 아산공학관 429호
박지혜
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 신공학관 지하1층 B161호
최상호
서울특별시 관악구 관악로 1, 서울대학교 농업생명과학대학 200동 8118호
(74) 대리인
특허법인태동

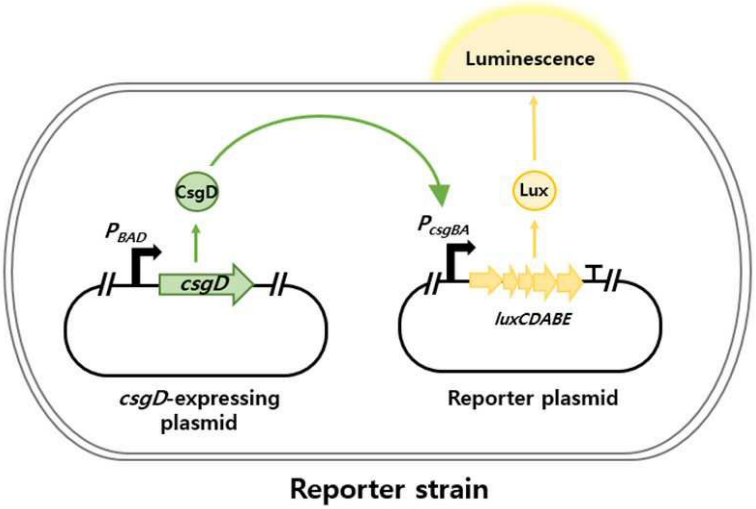
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **생물막 형성 억제를 통한 장관 병원성 세균 저해용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 생물막 형성 억제를 통한 장관 병원성 세균 저해용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 화합물은 전사 조절자인 CsgD의 활성을 특이적으로 저해하여 병원성 대장균 또는 살모넬라의 생물막 형성을 억제한다. 이를 통해 이들 미생물이 식품 또는 상피세포 표면에 부착 및 증식하는 것을 억제할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 균주의 생장을 저해하지 않아 내성 유발 가능성을 낮출 수 있는 장점이 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A01P 1/00 (2021.08)
A23K 20/137 (2016.05)
A23L 33/10 (2022.01)
A61K 8/49 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 31/10 (2018.01)
A61Q 17/005 (2013.01)
A61Q 19/10 (2013.01)
C11D 3/28 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1475012487
과제번호	20162공동기142
부처명	식품의약품안전처
과제관리(전문)기관명	식품의약품안전평가원
연구사업명	식품등안전관리(R&D)
연구과제명	유통식품에서 항생제 내성 유발 최소화를 위한 위해세균 제어기술 개발 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단, 이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.11.30

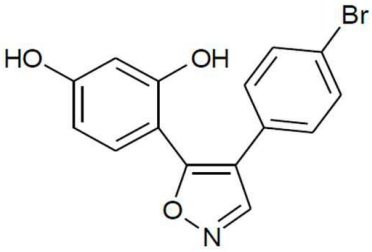
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 병원성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 병원성 대장균은,

장관병원성 대장균(EPEC) 또는 장출혈성 대장균(EHEC)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

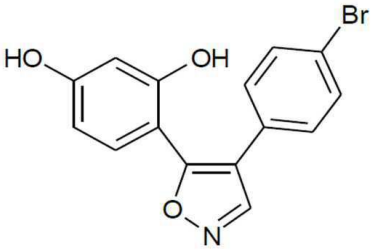
상기 병원성 대장균 감염증은,

장염, 설사, 식중독, 장출혈성 대장염, 출혈성 설사증, 출혈성 빈혈, 급성 신부전증, 용혈성 요독 증후군 및 혈전성 혈소판 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인, 약학 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 살모넬라 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 5

제4항에 있어서,

상기 살모넬라 감염증은,

식중독, 창자열(enteric fever), 위장염, 세균혈증, 동맥염, 간농양, 비장농양, 담낭염, 뇌수막염, 뇌실염, 경막하축농, 뇌종양, 폐염, 폐암, 방광염, 신우신염, 난소염, 고환염, 부고환염, 전립선염, 골수염, 감염정 관절염, 반응성 관절염 및 장티푸스로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인, 약학 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제4항에 있어서,

상기 병원성 대장균 또는 살모넬라는,

피감염 대상에 부착 및 증식하기 위해, 생물막을 형성하는 특징이 있는, 약학 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제4항에 있어서,

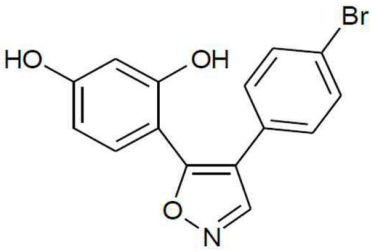
상기 화학식 1의 화합물은,

생물막의 형성을 억제하는 특징이 있는, 약학 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 식품 첨가제.

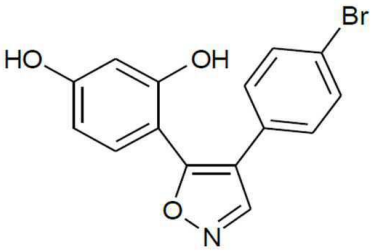
[화학식 1]



청구항 9

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제.

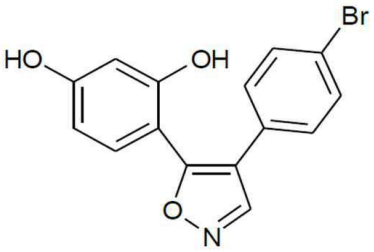
[화학식 1]



청구항 10

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 소독용 제제.

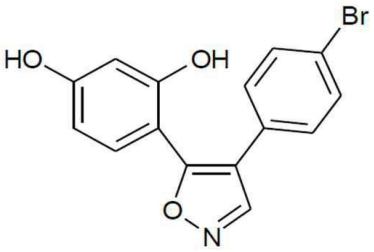
[화학식 1]



청구항 11

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 세정제 조성물.

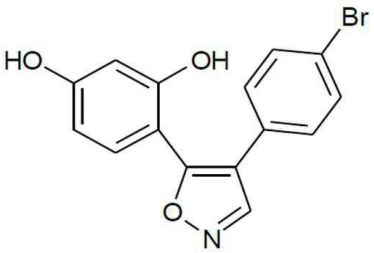
[화학식 1]



청구항 12

하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 신선식품 보존제.

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 장관 병원성 세균 저해용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 생물막 형성 억제를 통한 장관 병원성 세균 저해용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 항생제는 미생물을 죽이거나 성장을 저해하는 물질로, 전 세계적으로 식중독균을 억제하기 위하여 식품 생산/유통/소비 환경 내 항생제를 사용하고 있다. 그러나 항생제의 오남용에 따라 항생제에 내성을 가진 내성균들이 발생하기 시작했고 내성 유전자는 균들의 수평적 전달을 통해 전파되었다. 항생제 내성균의 확산은 식품 안전 및 공중 보건을 위협하며 막대한 사회/경제적 손실을 야기하였다. 이에, 전 세계적으로 내성을 유발하지 않는 항생제 대체물질 발굴 및 유해균 제어기술 개발이 추진되고 있다. 즉, 내성의 최소화를 위해 세균의 생장을 저해하는 것이 아닌 세균의 독성만을 저해함으로써 병원성을 감소시키는 전략이 제시된다. 이는 세균 생장에 대해 선택 압력을 최소화함으로써 저항성을 감소한다는 장점이 있다.

[0004] 한편, 생물막이란 표면에 세균이 부착 및 증식하면서 형성하는 일종의 막으로, 세균이 분비하는 단백질, 당질, DNA 등 다양한 EPS (extracellular polymeric substance)에 의해 생성된다. 장출혈성 대장균 및 살모넬라는 생물막을 형성함으로써 식품 표면으로부터의 부착력을 가지고 외부의 스트레스와 항생물질, 숙주의 면역시스템 등에 내성을 가진다는 특징이 있다. 생물막이 형성된 식중독 세균을 섭취할 경우, 위산 및 면역세포 등 생체 방어기전을 회피하는데 도움을 주어 식중독 위험성을 높일 수 있다. 생물막 형성으로 인해 만성화된 병원성 세균은 식중독뿐만 아니라 피부염, 패혈증 및 화농성 질환 등 다양한 질환을 유발하는 문제가 있다. 따라서 생물막 형성은 식중독 세균의 중요한 독성 요인으로 작용하여, 이를 억제하기 위해 생물막의 구성인자들을 제어하는 방법 등이 연구되고 있다.

[0005] 구체적으로, 내성 유발의 최소화를 위해 병원균이 질병을 일으키는 능력만을 독성으로 정의한 이전 개념과는 달리 최근에는 독소 생성/전달 시스템, 독성 발현 조절인자, 전사 조절인자, 그리고 세균의 숙주 부착능력을 억제하는 등 병원성 인자를 표적으로 하여 병원성을 감소시키는 전략이 제시되었다. 이 접근 방식은 넓은 범위의 세균을 표적으로 제어할 수 있으며 생장 저해로 받는 압력보다 약한 압력을 가하므로 저항성이 감소하는 장점이 있다. 이에 따라, 항생제 대체품으로는 항균 백신, 면역 조절제, 박테리오파지, 박테리오파지의 엔도라이신, 항균 펩타이드(AMP), 식물 추출물, 박테리아 간 쿼럼 센싱(QS) 억제제 등이 제안된 바 있다.

[0006] 이에, 본 발명자는 병원성 대장균 및 살모넬라에 의해 유발되는 산업적 문제를 해결하고자 예의 노력한 끝에, 병원성 대장균 또는 살모넬라에 작용하여 식품 또는 세포 표면으로의 부착 저해효능이 우수한 화합물을 발굴함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1373770호 (2014.03.06.)에는, 백지 추출물을 유효성분으로 함유하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1348177호 (2013.12.30.)에는, 패장 추출물을 유효성분으로 함유하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관하여 개시되어 있다.

발명의 내용

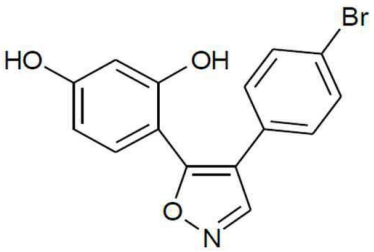
해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 병원성 대장균 또는 살모넬라 저해용 조성물 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 병원성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 이때, 상기 병원성 대장균은, 일 예로 장관병원성 대장균(EPEC) 또는 장출혈성 대장균(EHEC)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0015] 이때, 상기 병원성 대장균 감염증은, 일 예로 장염, 설사, 식중독, 장출혈성 대장염, 출혈성 설사증, 출혈성 빈혈, 급성 신부전증, 용혈성 요독 증후군 및 혈전성 혈소판 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 살모넬라 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 이때, 상기 살모넬라 감염증은, 일 예로 식중독, 창자열(enteric fever), 위장염, 세균혈증, 동맥염, 간농양, 비장농양, 담낭염, 뇌수막염, 뇌실염, 경막하축농, 뇌종양, 폐염, 폐암, 방광염, 신우신염, 난소염, 고환염, 부고환염, 전립선염, 골수염, 감염정 관절염, 반응성 관절염 및 장티푸스로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0018] 이때, 상기 병원성 대장균 또는 살모넬라는 피감염 대상에 부착 및 증식하기 위해, 생물막을 형성하는 특징이 있다. 또한, 상기 화학식 1의 화합물은 생물막의 형성을 억제하는 특징이 있다.

[0019] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 식품 첨가제를 제공한다.

[0020] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제를 제공한다.

[0021] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 소독용 제제를 제공한다.

[0022] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 세정제 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 신선식품 보존제를 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 화합물은 전사 조절자인 CsgD의 활성을 특이적으로 저해하여 병원성 대장균 또는 살모넬라의 생물막 형성을 억제한다. 이를 통해 이들 미생물이 식품 또는 상피세포 표면에 부착 및 증식하는 것을 억제할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 균주의 생장을 저해하지 않아 내성 유발 가능성을 낮출 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 고처리량 스크리닝 시스템 구축을 위한 리포터 균주의 모식도이다.

도 2는 본 발명에 따른 고처리량 스크리닝 시스템을 이용하여 선별된 화합물(CsgD 저해제)을 나타낸 결과이다.

도 3은 장출혈성 대장균을 대상으로 선별된 13종 화합물의 CsgD 억제물질로서의 작용 여부를 확인한 결과이다.

도 4는 선별된 3종 화합물의 처리 시, CsgD가 전사를 조절하는 *csgBA* 오페론 내 유전자인 *csgB* 및 *csgA*의 발현량의 변화에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 5는 최종 선정된 A4 화합물의 처리로 인한 장출혈성 대장균의 생물막 형성 저해능을 확인한 결과이다.

도 6은 최종 선정된 A4 화합물의 처리로 인한 식품 표면의 병원성 대장균의 부착 저해능을 확인한 결과이다.

도 7은 최종 선정된 A4 화합물의 처리로 인한 HeLa 세포 표면의 병원성 대장균의 부착 저해능을 확인한 결과이다.

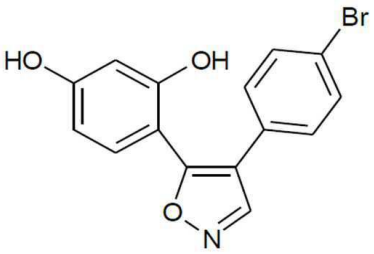
도 8은 최종 선정된 A4 화합물의 처리로 인한 Caco-2 세포 표면의 병원성 대장균의 부착 저해능을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 하기에서는 중복되는 내용의 혼잡을 방지하기 위하여, 중복되는 내용의 기재를 생략하고자 하였다. 즉, 하기의 내용만으로 발명의 내용이 한정되는 것은 아니고, 전체적인 발명의 내용에 따라 발명의 내용이 해석되어야 할 것이다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에서는 한국화합물은행에서 분양받은 대표 화합물 및 천연물 총 8,201종에 대하여 고처리량 스크리닝을 진행한 결과, CsgD의 활성을 저해하는 화합물들을 1차 선별하였으며, 선별된 화합물들 중 컬리(Curli) 오페론의 관련 유전자(*csgB* 및 *csgA*)의 발현량을 가장 효과적으로 감소시키는 화합물을 최종적으로 선정하였다. 이를 'A4 ([4-(4-(4-Bromophenyl)isoxazol-5-yl)benzene-1,3-diol])'라 명명하였다. 'A4'의 구체적인 화학구조는 하기 화학식 1에 나타내었다.

[0031] [화학식 1]

[0032] 

[0034] 한편, 하기에서는 본 발명에 따른 'A4' 화합물의 적합한 용도를 제공하고자 한다.

[0035] 이에, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 병원성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 살모넬라 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0037] 이때, 상기 병원성 대장균은, 일 예로 장관병원성 대장균(EPEC) 또는 장출혈성 대장균(EHEC)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0038] 장관병원성 대장균(Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)은 개발도상국에서 치명적인 유아 설사의 중요한 원인균으로서 모든 병원성대장균 중 가장 잘 알려졌다. 독소를 생산하지 않으나, 다양한 폭의 대형 밧줄과 같은 섬모성 부착인자를 사용하여 포유류의 소장에 부착한 후 정상적인 미세 융모의 파괴를 일으킴과 동시에 세포골격형성에 관여하는 인자들(actin, myosin light chain, tail 등)의 축적으로 독특한 병변현상(Attaching and effacing lesion, A/E lesions)인 받침대 구조물을 형성, 집락화하는 것이 특징이다. 미세융모의 파괴로 인한 흡수장애와 장관내 염증 등으로 수양성 설사를 유발한다.

[0039] 장출혈성 대장균(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)은 100개 미만의 개체에 의해서도 출혈성 대장염 및 용혈성 요독증후군을 일으키며 장관병원성 대장균과 유사한 특징적인 조직병리학적 병변, 즉 받침대 모양의 구조물을 형성하여 장관에 집락화한 후 강력한 세포독소성인 시가독소(shiga toxin)를 생산하는 것이 특징이다. STEC, VTEC, EHEC 세 가지 모두 장출혈성 대장균을 칭한다. 다른 대장균들 보다도 위험도가 매우 높은 것으로 알려졌다.

[0040] 살모넬라(*salmonella*)는 진정세균강 진정세균목에 속하는 균으로, 그람(Gram)음성의 간균으로, 포자는 없으나 대부분은 편모가 있고 운동성을 가진다. 상피세포, M세포, 대식세포, 수지상 세포 등 다양한 종류의 세포를 감염시켜, 사람이나 동물에 티푸스성 질환을 일으키고, 또 식중독의 원인이 되기도 한다. 대부분의 감염은 배설물

에 의한 식품의 오염으로부터 발생한다. 항원형은 장티푸스형과 비장티푸스형의 두 종류로 구분되며, 이중 위장관 질병을 일으키는 비장티푸스형이 더 흔하다. 비장티푸스형 살모넬라 균류는 사람뿐만 아니라 다른 동물들로 감염시킬 수 있는 인수공통감염성을 가지며, 장티푸스형 살모넬라 균류는 사람에게만 감염되는 것으로 알려졌다.

[0041] 이때, 상기 병원성 대장균 또는 살모넬라는 피감염 대상에 부착 및 증식하기 위해, 생물막을 형성하는 특징이 있다. 또한, 상기 화학식 1의 화합물은 생물막의 형성을 억제하는 특징이 있다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명의 화합물은 컬리(Curli) 구조 유전자들의 발현을 조절하는, 전사조절자 CsgD의 활성을 감소시키는 화합물이다. 본 발명의 화합물은 생물막 형성에 관여하는 컬리 구조 유전자(*csgB* 및 *csgA*)들의 발현량을 감소시킴에 따라, 장출혈성 대장균이 식품의 표면 및 상피세포에 부착을 저해하였음 확인한 바 있다.

[0043] 따라서, 본 발명의 화합물은 CsgD 단백질에 의해 컬리 구조 유전자의 발현이 조절되어 생물막이 형성되는 기전을 가지는 미생물이라면 본 발명에서 확인한 바와 같은 저해 효과가 동일하게 발생할 것인데, 이와 같은 미생물의 예로는 병원성 대장균(일 예로서, 장관병원성 대장균(EPEC), 장출혈성 대장균(EHEC)) 및 살모넬라가 있다.

[0044] 본 발명에서 발굴한 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물은 기존에 발견된 적 없는 CsgD의 신규한 저해물질로 확인된다. 특히, 병원성 대장균 및 살모넬라의 독성 발현은 세포 부착에서부터 시작하므로 본 발명에 따른 화합물은 이의 세포 부착력을 저해함으로써 병원균의 감염을 예방할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 화합물은 박테리아의 생장을 저해하지 않기 때문에 항생제처럼 내성을 유발할 가능성도 적다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 영향을 받는 질환, 즉 병원성 대장균 감염증 또는 살모넬라 감염증을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0046] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 병원성 대장균 감염증 또는 살모넬라 감염증에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0047] 이때, 상기 병원성 대장균 감염증은, 병원성 대장균 감염에 의해 유발되는 것으로써 일 예로 장염, 설사, 식중독, 장출혈성 대장염, 출혈성 설사증, 출혈성 빈혈, 급성 신부전증, 용혈성 요독 증후군 및 혈전성 혈소판 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0048] 이때, 상기 살모넬라 감염증은, 살모넬라 감염에 의해 유발되는 것으로써 일 예로 식중독, 창자열(enteric fever), 위장염, 세균혈증, 동맥염, 간농양, 비장농양, 담낭염, 뇌수막염, 뇌실염, 경막하축농, 뇌종양, 폐염, 폐암, 방광염, 신우신염, 난소염, 고환염, 부고환염, 전립선염, 골수염, 감염정 관절염, 반응성 관절염 및 장티푸스로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학 조성물은 상기 화합물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0050] 본 발명의 약학 조성물은 상기한 화합물 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 필요한 경우, 항산화제, 부형제, 희석제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 계면 활성제, 결합제, 충진제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기한 화합물은 약학 조성물의 전체의 중량을 기준으로 0.00001중량% 내지 99.99중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 90중량%, 보다 바람직하게는 0.1중량% 내지 70중량%, 더욱 바람직하게는 0.1중량% 내지 50중량%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 약학 조성물의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.

[0054] 즉, 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간

및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물의 일일 투여량은 약 0.01 내지 1,000mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 100mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.

[0055] 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수 회에 나누어 투여될 수도 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0056] 본 발명의 약학 조성물은 병원성 대장균 감염증 또는 살모넬라 감염증을 예방 또는 치료하기 위하여 추가적으로 호르몬 치료, 약물치료 등의 다양한 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

[0057] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학 조성물이 도달할 수 있는 한, 특별한 제한 없이 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.

[0058] 상기 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있으며, 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명의 약학 조성물을 이용한 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 유성 현탁액, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

[0060] 본 발명의 약학 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 락토오스, 사카로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 등과 같은 윤활유; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕해제 등을 사용할 수 있으며, 방향제, 시럽제, 감미제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.

[0061] 본 발명의 약학 조성물의 비경구 투여 방법으로는, 근육 내 투여, 경피 투여, 정맥 내 투여, 복강 내 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명의 약학 조성물을 이용한 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 크림 등을 들 수 있다.

[0063] 본 발명의 약학 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 약학 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 약학 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.

[0065] 본 발명의 약학 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.

[0066] 본 발명의 약학 조성물을 연고, 오일, 크림, 도포용 파우더, 피부 외용제 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.

[0068] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 식품 첨가제를 제공한다.

[0069] 본 발명에 따른 식품 첨가제는 식품에 첨가하여, 병원성 대장균 또는 살모넬라가 식품에 부착하여 병원성을 나타내는 것을 예방하여 안전한 식품 섭취가 가능하다.

[0070] 본 발명의 식품 첨가제에 있어, 상기한 화합물의 함량은 특별히 제한되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 식품 첨가제의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.

[0072] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 사료 첨가제를 제공한다.

[0073] 상기 사료 첨가제에 있어서, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.001~1.0 중량% 함유할 수 있다. 이는 그 함량이 조성물 총 중량에 대해 0.001 중량% 미만이면 그 저해 효과를 충분히 발휘할 수 없으며, 1.0 중량%를 초과하는 경우에는 제형의 안정성 및 안전성에 문제를 야기하기 때문이다.

[0074] 본 발명의 상기 첨가제는 통상의 배합사료에 섞어서 경구투여의 방법으로 급여하며, 계속 투여 또는 과다 투여 시에도 면역저하 등의 내성이나 부작용의 문제가 거의 없다.

[0076] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 소독용 제제를 제공한다.

[0077] 본 발명에 있어서, 상기 소독용 제제는 향료, 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0078] 상기 소독용 제제는 손 또는 보건의료용품 세척용으로 이용이 가능하며, 이외에도 오염으로 인한 세척 또는 소독이 필요한 피부, 의복, 생활용품, 가구, 실내 바닥 등 통상적으로 방역이 필요한 표면에 모두 사용 가능하다.

[0079] 상기 소독용 제제는 오염된 표면에 직접 분사 방식 또는 세척하고자 하는 용품을 담갔다가 꺼내는 침수 방식으로 사용할 수 있으며, 사용 전 세척 및 사용 후 세척 모두 가능하다.

[0080] 상기 보건의료용품은 친수성 및 소수성 물질들로 오염되어 세척이 필요한 것이라면 특별한 제한없이 적용이 가능하며, 수술용 기구, 보건 마스크, 의료용 마스크, 두건, 방호복, 패드, 수건, 천, 의류 등과 같은 보건의료용품을 예시할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0082] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 세정제 조성물을 제공한다.

[0083] 본 발명의 세정제 조성물은 세정제 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 추가로 더 포함할 수 있으며, 예컨대 안정화제, 용해화제 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0085] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있다.

[0086] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0087] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0088] 본 발명의 세정제 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타

우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0089] 본 발명의 세정제 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 제형 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비 함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0091] 본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물을 유효성분으로 포함하는 신선식품 보존제를 제공한다.

[0092] 상기 식품 보존제는 식품 보존제 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.001 ~ 10.0 중량% 함유할 수 있다.

[0093] 또한, 본 발명의 식품 보존제는 상기 화합물 외에 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 추가로 함유할 수 있다. 구체적으로 이에 제한되는 것은 아니나, 식품 위생목적의 다른 첨가물, 예컨대 젖산 등의 유기산이나 미생물생육 억제물질 등이 있다.

[0094] 본 발명의 식품 보존제는 식품 보존 필요성에 맞게 편리하고 적합한 방법으로 액상, 고상, 파우더 형태 등으로 다양하게 제제화될 수 있다.

[0095] 이때, 식품보존제는 식품에 침지, 분무 또는 혼합하여 사용할 수 있으며, 이러한 보존제의 식품에 대한 첨가비율은 식품 전체 중량의 0.01%~10%의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0096] 이때, 식품보존제가 처리될 수 있는 식품의 예로는 과일, 야채, 과일이나 야채의 건조제품이나 절단제품, 과일주스, 야채주스, 이들의 혼합주스이거나 침류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효유식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 중 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0097] 본 발명의 화합물의 바람직한 적용량은 식품보존제를 사용해야 하는 식품의 중량, 제형, 유통기한 등에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0099] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 또는 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0101] **[실시예 1: 고처리량 스크리닝(HTS) 시스템 구축을 위한 리포터 균주 제작]**

[0102] 장출혈성 대장균의 생물막 형성에 관여하는 전사 조절자 CsgD의 활성을 특이적으로 억제하는 물질을 찾기 위한 고처리량 스크리닝 시스템을 구축하였다. 1차 리포터 균주는 컬리(Curli)가 결실된 *E. coli* DH5α에 아라비노즈에 의해 CsgD의 발현을 유도하는 발현벡터와 CsgD가 결합하여 활성화되는 프로모터를 삽입하여 루시퍼레이즈(Luciferase) 단백질의 발현 하에 발광하는 리포터 플라스미드를 공동 형질전환하여 제작하였다 (도 1). 도 1은 본 발명에 따른 고처리량 스크리닝 시스템 구축을 위한 리포터 균주의 모식도이다.

[0103] 화합물이 실제 타겟 균주인 장출혈성 대장균에서도 작용하는지를 확인하기 위해 *E. coli* ATCC 43895 (EDL933) 균주에 앞서 제작한 리포터 플라스미드를 삽입하였으며, 양성 대조군으로 *csgD*가 결실된 *E. coli* ATCC 43895 △*csgD* 균주에 동일한 리포터 플라스미드를 삽입하여 2차 리포터 균주를 제작하였다.

[0105] **[실시예 2: 병원성 대장균 저해제의 선별]**

[0106] **1. 고처리량 스크리닝을 사용한 화합물 선별**

[0107] 한국화합물은행에서 분양받은 대표 화합물 및 천연물 총 8,201종에 대한 고처리량 스크리닝을 진행하였다. 앞서 제작한 1차 리포터 균주를 이용함으로써, 화합물 처리 시 리포터 균주의 발광량이 감소하는 것을 확인하고자 하

였다. 이는 화합물이 CsgD의 활성을 특이적으로 저해함으로써 리포터 플라스미드의 프로모터에 부착하는 CsgD의 양을 줄이고 최종적으로 루시퍼레이즈(Luciferase)의 발현을 억제하여 발광량을 감소시키는 원리를 이용한 것이다.

[0108] 이를 위하여, 먼저 밤새 배양한 1차 리포터 균주의 배양액을 항생제가 첨가된 LB 배지에 1/100로 접종한 후 OD_{600}=0.5까지 배양하였다. 이후 20 μM의 화합물 또는 2% DMSO가 처리된 96-웰 미량정량판(well microtiter plate)에 100 ㎕의 배양액을 분주한 뒤, 37℃ 배양기에서 200 rpm으로 진탕 배양하고, 1시간 간격으로 흡광도와 발광도를 측정하여 RLU을 계산하였다.

[0109] L-아라비노스를 첨가하지 않은 LB 배지에서 배양한 1차 리포터 균주를 양성 대조군으로, 0.0001% L-아라비노스를 첨가한 LB 배지에서 배양한 1차 리포터 균주를 음성 대조군으로 이용함으로써, %inhibition 값을 계산하였다.

[0110] %Inhibition은 아래 수식으로 계산하여 퍼센테이지(%)로 나타내었다.

[0111] [수학식 1]

[0112] $$\%\ Inhibition = 100 \times \frac{(RLU\ of\ the\ sample\ treated\ with\ a\ compound - RLU\ of\ the\ negative\ control)}{(RLU\ of\ the\ positive\ control\ -\ RLU\ of\ the\ negative\ control)}$$

[0114] 실험 결과, 50% 이상의 %inhibition을 보이며 색이 없고 박테리아의 생장 저해를 일으키지 않는 화합물 13종을 선별하였다 (도 2). 도 2는 본 발명에 따른 고처리량 스크리닝 시스템을 이용하여 선별된 화합물(CsgD 저해제)을 나타낸 결과이다.

[0115] 즉, 야생형 *CsgD* 유전자를 가진 1차 리포터 균주에서 50% 이상의 *CsgD*의 저해를 보이며, 박테리아의 생장 저해를 보이지 않는 화합물 13종을 선별한 결과이다.

[0117] 한편, 선별된 13종의 화합물들이 실제 장출혈성 대장균에서도 CsgD 억제물질로서 작용하는지를 확인하기 위하여, 2차 리포터 균주를 이용한 2차 스크리닝을 진행하였다.

[0118] 구체적으로, 밤새 배양한 2차 리포터 균주의 배양액을 항생제가 첨가된 LB 배지에 1/100로 접종한 후 OD_{600}=0.2까지 배양하였다. 이후, 20 μM의 화합물이 처리된 시험튜브(test tube)에 1 ㎖ 배양액 1 ㎖를 분주한 뒤, 37℃ 배양기에서 200 rpm으로 진탕 배양하였다. %inhibition 값 계산은 상기와 동일하게 진행되었다.

[0119] 실험 결과, 50% 이상의 %inhibition을 보이는 화합물 중에서 CsgD가 아닌 다른 조절자 단백질을 타겟으로 한 스크리닝 시스템에서도 높은 %inhibition을 보이는 186-B5와 213-G4를 제외하였다. 최종적으로 고처리량 스크리닝을 이용하여 3종의 화합물 (51-D11, 56-B5, 237-A4(A4))을 "히트 화합물(Hit molecule)"로 선정하였다 (도 3). 도 3은 장출혈성 대장균을 대상으로 선별된 13종 화합물의 CsgD 억제물질로서의 작용 여부를 확인한 결과이다.

[0121] **2. CsgD 억제물질 선정**

[0122] 선별된 히트 화합물 처리 시 CsgD가 전사를 조절하는, 컬리(Curli)의 구조유전자인 *csgB*와 *csgA*의 발현량이 감소하는지를 확인하기 위하여 qRT-PCR을 진행하였다. 구체적으로, 밤새 배양한 *E. coli* ATCC 43895를 LB 배지에 1/100로 접종한 후 OD_{600}=0.2까지 배양하였다. 이후 20 μM의 화합물이 처리된 시험 튜브에 1 ㎖ 배양액을 분주한 뒤, 37℃ 배양기에 200 rpm으로 진탕 배양하였다.

[0123] 이때, *csgD*가 결실된 장출혈성 대장균을 양성 대조군으로, 화합물을 대신하여 2% DMSO를 처리한 장출혈성 대장균 야생형 균주를 음성 대조군으로 이용하였다. 3시간 후에 500 ㎕ 배양액을 5,000 g 5분 원심분리하여 상등액을 버리고 펠렛을 1× PBS로 재현탁하였다.

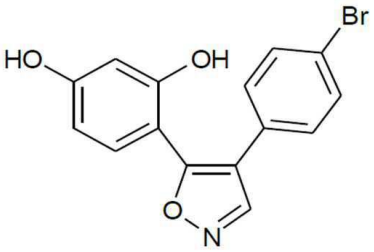
[0124] 이후, RNAProtect bacteria reagent를 처리하여 전사체의 변화를 최소화한 뒤, RNeasy mini kit를 사용해 total RNA를 추출하였다. 이때 gDNA의 오염을 없애기 위해 추출 과정에서 DNase를 처리하였다. 추출한 RNA의 농도 및 순도를 측정하고 1% 아가로오스 겔에 전기영동을 내려 밴드의 유무를 확인하였다.

[0125] qRT-PCR을 위한 상보 DNA (cDNA)를 cDNA 합성 키트를 사용해 합성하였고, SYBR supermix와 프라이머를 사용하여 qPCR 기기를 통해 *csgB*와 *csgA*의 발현량을 상대 정량하였다. 이때, *rpoA* 하우스키핑 유전자(housekeeping gene)에 대해서도 발현량을 측정하여 이를 기준으로 보정하였다.

[0126] 실험 결과, 선별된 3종의 히트 화합물 중에서 '213-A4'로 명명된 화합물에서 *csgB*와 *csgA* 유전자들의 발현량이 가장 유의하게 감소함을 확인하였으며, 이에 해당 화합물을 CsgD 억제제로 선정해 'A4'이라 재명명하였다 (도 4). 도 4는 선별된 3종 화합물의 처리 시, CsgD가 전사를 조절하는 *csgBA* 오페론 내 유전자인 *csgB* 및 *csgA*의 발현량의 변화에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

[0127] 본 발명에 따른 'A4' 화합물의 화학명은 [4-(4-(4-Bromophenyl)isoxazol-5-yl)benzene-1,3-diol] 이며, 화합물의 구조는 하기 화학식 1과 같다.

[0128] [화학식 1]

[0129] 

[0131] **[실험예 1: A4 처리로 인한 생물막 형성 저해 효능 확인]**

[0132] 컬리(Curli)는 생물막의 구성인자로, 최종적으로 A4를 처리하였을 때 장출혈성 대장균의 생물막 형성능이 감소하는지를 크리스탈 바이올렛 염색법을 통해 확인하였다.

[0133] 구체적으로, 밤새 배양한 *E. coli* ATCC 43895를 LB 배지에 1/100로 접종한 후 OD_{600}=0.2까지 배양하였다. 1 ㎖의 배양액을 5,000 g 5분 동안 원심분리하여 상등액을 버리고 펠렛을 새 LB 배지 1 ㎖로 재현탁한 뒤, 새 LB 배지를 이용하여 1/4으로 희석하였다.

[0134] 이후, 20 μM의 화합물이 처리된 96-웰 미량정량판에 희석한 배양액 200 ㎕를 분주한 뒤, 30℃ 배양기에 50 rpm으로 진탕 배양하였다. 12시간 배양한 뒤, 1× PBS를 이용해 2번 세척하고 30분간 건조하였다. 또한, 1% 크리스탈 바이올렛 용액을 이용하여 15분간 염색하고 용액을 제거한 뒤, 1×PBS를 이용해 2번 세척하고 30분간 건조하였다.

[0135] 이후, 100% EtOH를 넣고 10분간 용출하고, 용출액을 새 96-웰 미량정량판에 분주하고 OD_{570}을 측정하였다. 이때, *csgD*가 결실된 장출혈성 대장균을 양성 대조군으로, A4 화합물을 대신하여 2% DMSO를 처리한 장출혈성 대장균 야생형 균주를 음성 대조군으로 이용하였다.

[0136] 실험 결과 A4 처리 시, 양성 대조군 대비하여 생물막 형성이 1.63배 감소함에 따라, A4의 처리가 장출혈성 대장균을 대상으로 우수한 생물막 형성 저해능을 부여함을 확인하였다 (도 5). 도 5는 최종 선정된 A4 화합물의 처리로 인한 장출혈성 대장균의 생물막 형성 저해능을 확인한 결과이다.

[0138] **[실험예 2: A4 처리로 인한 식품/세포 표면 부착 저해 효능 확인]**

[0139] **1. 식품 표면 부착 저해능**

[0140] 생물막(biofilm)은 식품 표면 부착에도 영향을 미친다고 보고되었다. 이에 실제 A4를 처리하였을 때 식품 표면 부착능을 감소시키는지를 확인하기 위하여 식품 부착 분석(food attachment assay)을 진행하였다. 식품 부착 분석에 진행할 식품 샘플로는 병원성 대장균의 식중독 사고가 보고되었던 시금치와 로메인 상추를 이용하였다.

[0141] 구체적으로, 밤새 배양한 *E. coli* ATCC 43895를 LB 배지에 1/100로 접종한 후 OD_{600}=0.2까지 배양하였다. 10^7 균주가 든 배양액을 5,000 g 5분 원심분리하여 상등액을 버리고 펠렛을 5% D-만노스(mannose)가 첨가된 DMEM 배지

로 재현탁하였다.

[0142] 이후, 300 ppm의 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite) 용액으로 멸균한 식품 샘플($1cm^2$)을 둔 24-웰 플레이트에 20 μM의 A4 화합물을 처리한 배양액 500 ㎖를 분주하고, 30℃ 배양기에 정치 배양하였다. 12시간 배양한 뒤, 1× PBS를 이용해 3번 세척하여 식품 표면에 붙지 않은 균들을 제거하였다.

[0143] 멸균한 유리비드(glass beads)와 0.3% triton X-100이 든 마이크로튜브에 식품 샘플을 둔 후, 5분간 강하게 균질화하여 식품 표면에 부착한 균들을 회수하였다. 이후 LB 배지로 십진 희석하여 LB 아가 플레이트에 균액을 도말함으로써 CFU (colony forming unit)를 계산하였다.

[0144] 이때 *csgD*가 결실된 장출혈성 대장균을 양성 대조군으로, A4 화합물을 대신하여 2% DMSO를 처리한 장출혈성 대장균 야생형 균주를 음성 대조군으로 이용하였다.

[0145] 실험 결과, A4 처리 시, 양성 대조군과 대비하여 시금치 표면 부착능은 2.56배, 로메인 상추 표면 부착능은 2.55배 감소하였다. 이러한 결과는 A4 처리가 장출혈성 대장균의 식품 표면으로의 부착능을 매우 우수하게 저해함을 의미하는 것이다 (도 6). 도 6은 최종 선정된 A4 화합물의 처리로 인한 식품 표면의 병원성 대장균의 부착 저해능을 확인한 결과이다.

[0147] **2. 세포 표면 부착 저해능**

[0148] 실제 A4를 처리하였을 때 세포 표면 부착능을 감소시키는지를 확인하기 위하여, HeLa 세포와 Caco-2 세포를 이용한 세포 부착 분석(cell adhesion assay)을 진행하였다.

[0149] 구체적으로, 밤새 배양한 *E. coli* ATCC 43895를 LB 배지에 1/100로 접종한 후 OD_{600}=0.2까지 배양한 후, 1% FBS가 첨가된 DMEM에 트랜스퍼(transfer)하였다. 이후, 24-웰 세포 배양 플레이트에 붙여둔 HeLa 세포와 Caco-2 세포 각각에 이를 MOI(multiplicity of infection) 100으로 감염하였으며, 동시에 20μM의 A4 화합물을 처리하였다.

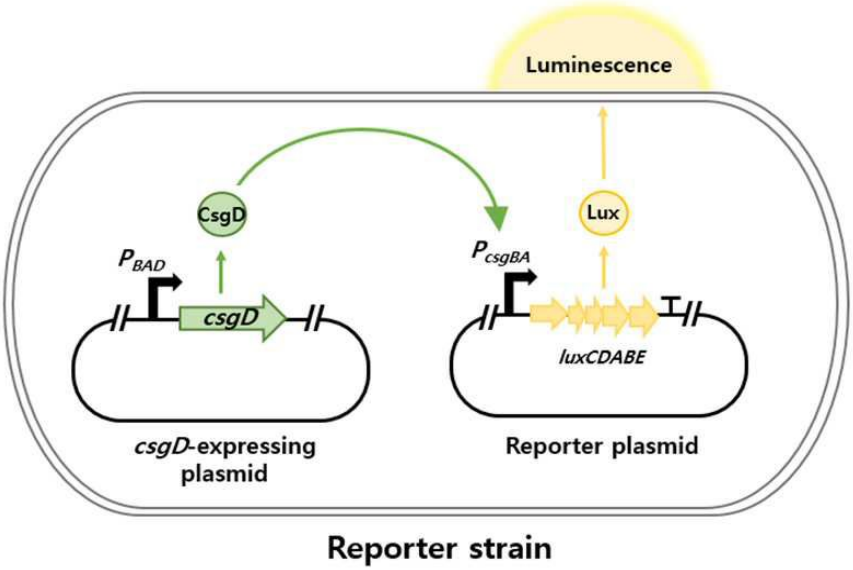
[0150] 이후, 37℃, 5% CO_2에서 3시간 배양한 뒤, DBPS를 이용해 2번 세척하여 세포 표면에 붙지 않은 균주를 제거하였다. 이후 0.5% triton X-100를 넣고 5분간 실온에 배양하여, 셀 표면에 부착한 균들을 회수하였다. 그 후, LB 배지로 십진 희석하여 LB 아가 플레이트에 균액을 도말함으로써 CFU을 계산하였다.

[0151] 이때 *csgD*가 결실된 장출혈성 대장균을 양성 대조군으로, 화합물을 대신하여 2% DMSO를 처리한 장출혈성 대장균 야생형 균주를 음성 대조군으로 이용하였다.

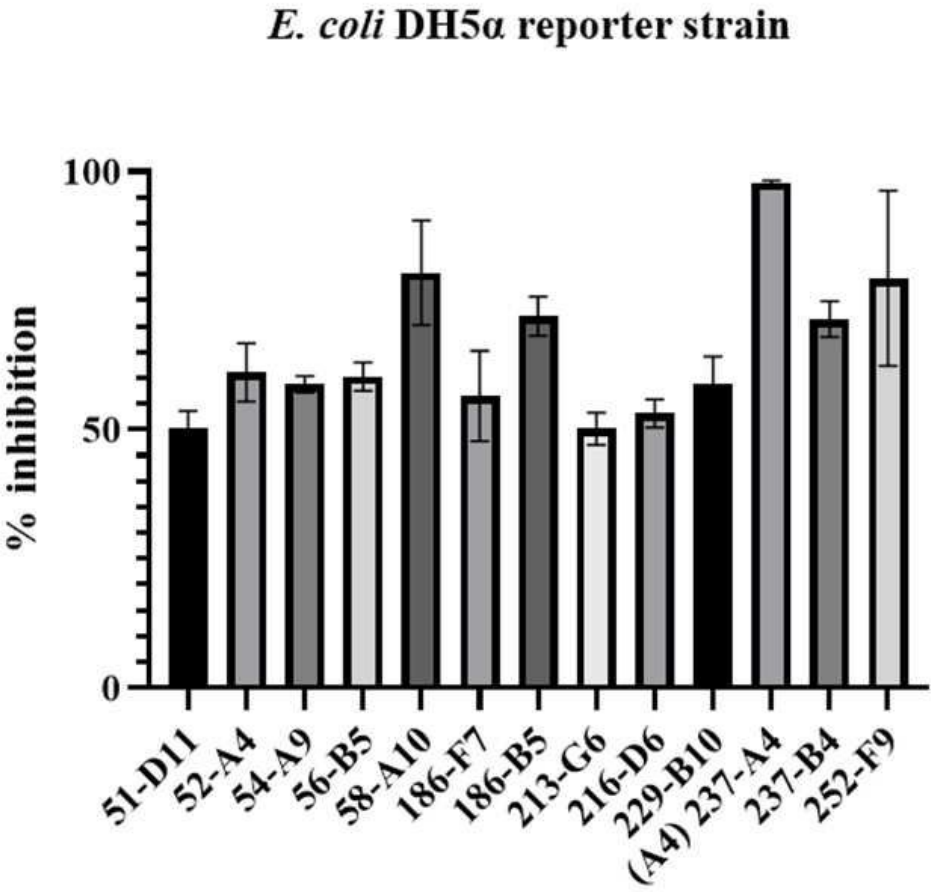
[0152] 실험 결과 A4 처리 시, 양성 대조군 대비하여 HeLa 세포 부착능은 1.83배, Caco-2 세포 부착능은 2.45배 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 A4 처리가 장출혈성 대장균의 세포 표면으로의 부착능을 매우 우수하게 저해함을 의미하는 것이다 (도 7 내지 8). 도 7은 최종 선정된 A4 화합물의 처리로 인한 HeLa 세포 표면의 병원성 대장균의 부착 저해능을 확인한 결과이고, 도 8은 최종 선정된 A4 화합물의 처리로 인한 Caco-2 세포 표면의 병원성 대장균의 부착 저해능을 확인한 결과이다.

도면

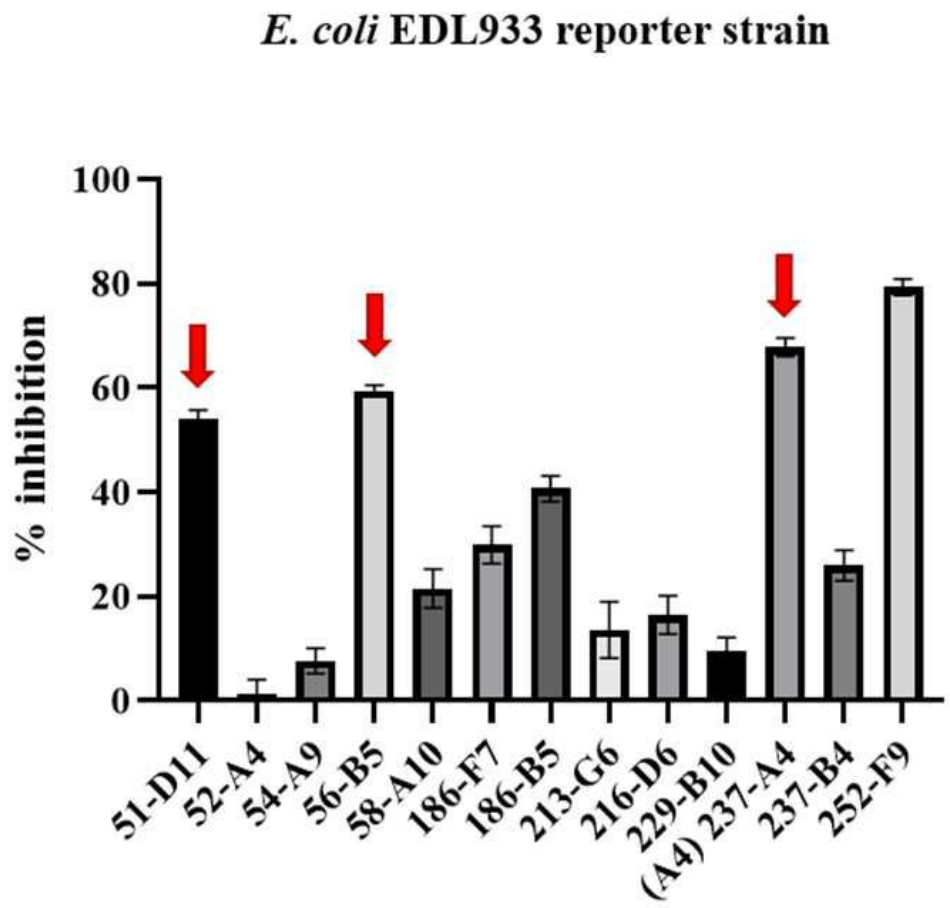
도면1


Luminescence
CsgD
Lux
P_{BAD}
csgD
P_{csgBA}
luxCDABE
csgD-expressing plasmid
Reporter plasmid
Reporter strain

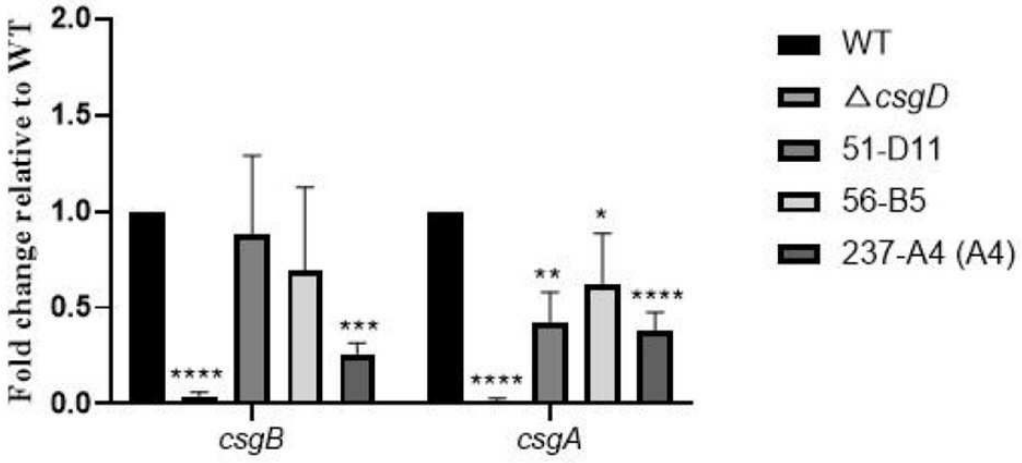
도면2


E. coli DH5α reporter strain
% inhibition
100
50
0
51-D11
52-A4
54-A9
56-B5
58-A10
186-F7
186-B5
213-G6
216-D6
229-B10
(A4) 237-A4
237-B4
252-F9

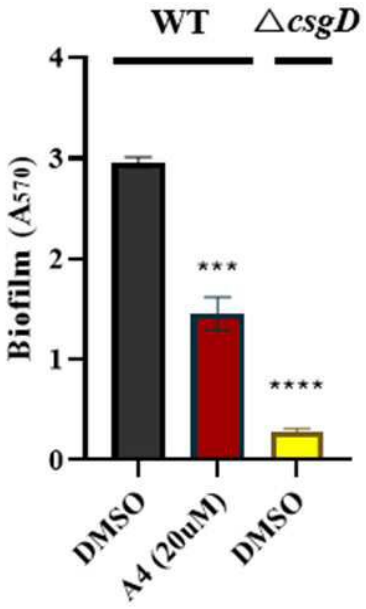
도면3


E. coli EDL933 reporter strain
% inhibition
100
80
60
40
20
0
51-D11
52-A4
54-A9
56-B5
58-A10
186-F7
186-B5
213-G6
216-D6
229-B10
(A4) 237-A4
237-B4
252-F9

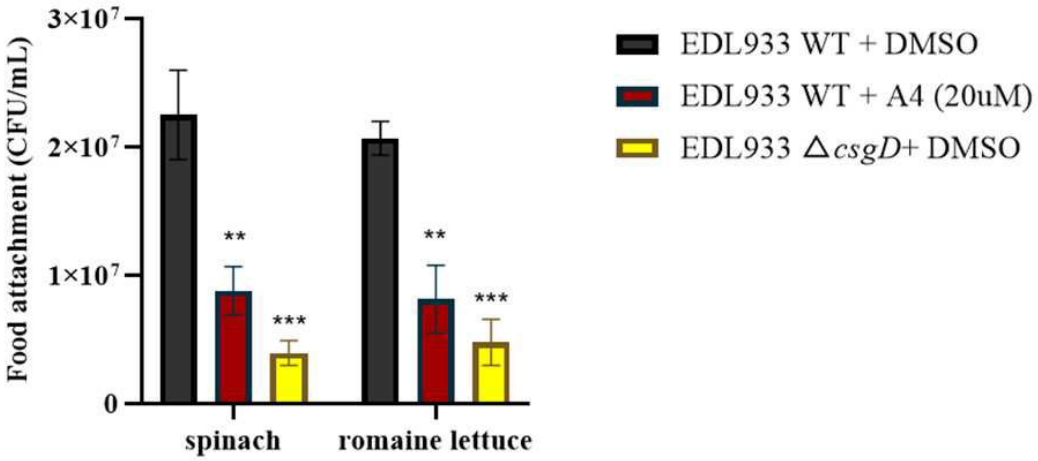
도면4


Fold change relative to WT
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
****
***
****
**
*
****
csgB
csgA
WT
△csgD
51-D11
56-B5
237-A4 (A4)

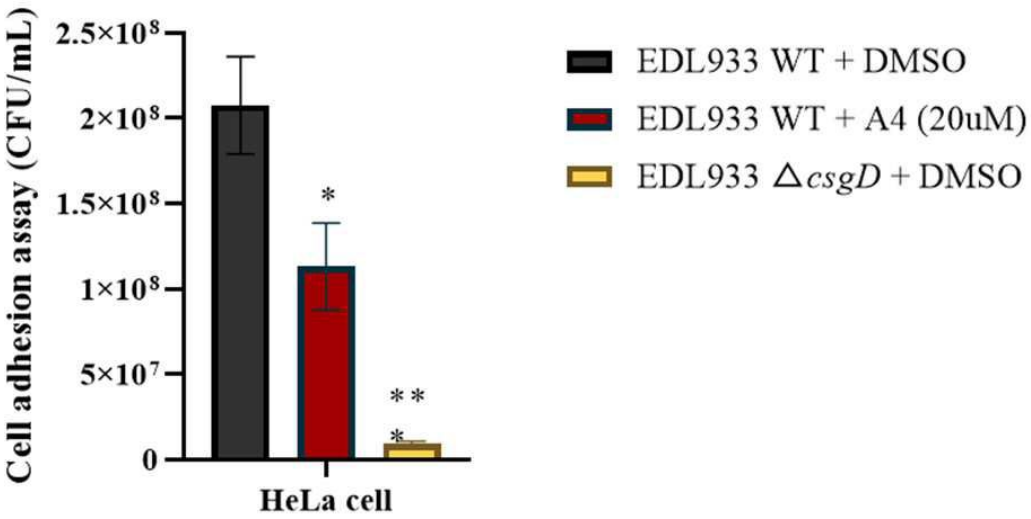
도면5


WT
△csgD
Biofilm (A570)
4
3
2
1
0
***
****
DMSO
A4 (20uM)
DMSO

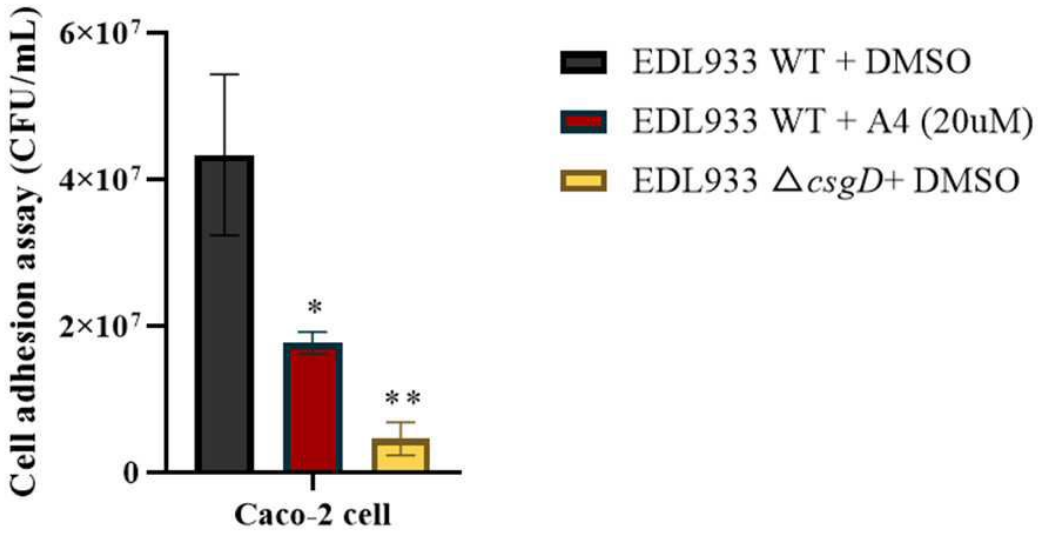
도면6


3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
Food attachment (CFU/mL)
**
***
**
***
spinach
romaine lettuce
EDL933 WT + DMSO
EDL933 WT + A4 (20uM)
EDL933 △csgD+ DMSO

도면7


Cell adhesion assay (CFU/mL)
2.5×10⁸
2×10⁸
1.5×10⁸
1×10⁸
5×10⁷
0
*
**
*
HeLa cell
EDL933 WT + DMSO
EDL933 WT + A4 (20uM)
EDL933 ΔcsgD + DMSO

도면8


Cell adhesion assay (CFU/mL)
6×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
0
*
**
Caco-2 cell
EDL933 WT + DMSO
EDL933 WT + A4 (20uM)
EDL933 ΔcsgD+ DMSO