



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0030863
(43) 공개일자 2020년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/353 (2006.01) A01N 43/16 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61P 31/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/353 (2013.01)

A01N 43/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0109650

(22) 출원일자 2018년09월13일

심사청구일자 2018년09월13일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김기영

경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호 (죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)

김다슬

경기도 안산시 단원구 광덕3로 25, 107동 1301호 (초지동)

신유경

경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호 (죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)

(74) 대리인

특허법인 하나

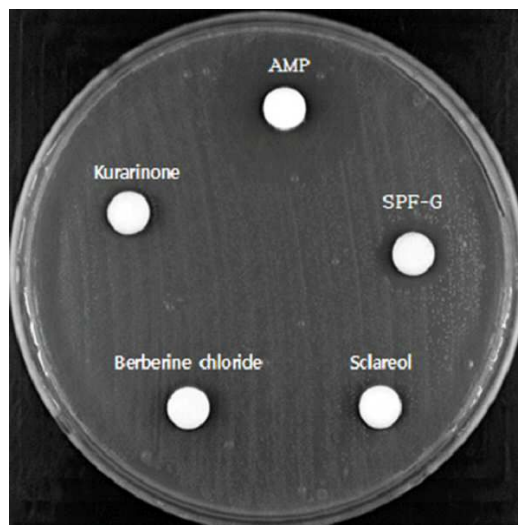
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 소포라플라바논 G를 유효성분으로 포함하는 향균 조성물

(57) 요약

본 발명은 향균 조성물에 관한 것으로, 식물 추출물에서 유래한 화합물을 포함하여 신체 안정성이 우수하고 엔테로코커스 패시움에 특이적인 향균 효과가 있는 향균 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 31/02 (2018.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A61P 31/10 (2018.01)

A01N 2300/00 (2013.01)

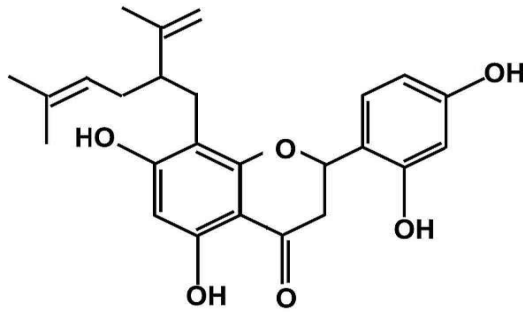
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*)에 대한 항균 활성을 가지는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 엔테로코커스 패시움의 세포벽을 파괴하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

메탄올, 에탄올, 소디움도데실설페이트, 트리톤(Triton) X-100 또는 이들의 혼합물을 더 포함하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

하나 이상의 항균제 또는 항진균제를 더 포함하는 조성물.

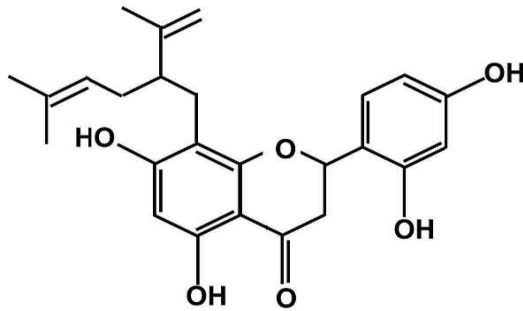
청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 엔테로코커스 패시움에 의한 감염증 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균 보조제.

[화학식 1]



청구항 8

제7항의 항균 보조제; 및

암피실린, 반코마이신 또는 스트렙토마이신;을 포함하고 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*)의 성장을 저해하는 항균 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항균 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 식물 추출물 유래 단일 화합물을 포함하여 생체 안정성이 우수할 뿐만 아니라, 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*)에 대한 특이적 작용 활성을 가지는 항균 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 엔테로코커스 속(*Enterococcus*, 장알균)은 그람 양성인 알균(구균)으로, 쌍알균 또는 짧은 사슬의 형태를 하고 있다. 혈액이 들어 있지 않은 배지에서도 잘 자란다.

[0003] 장알균은 엔테로코커스 파이칼리스(*E. faecalis*), 엔테로코커스 패시움(*E. faecium*), 엔테로코커스 아비움(*E. avium*), 엔테로코커스 갈리나룸(*E. gallinarum*), 엔테로코커스 카셀리플라버스(*E. casseliflavus*) 등 19종(species)이 알려져 있다.

[0004] 인체에서 검출되는 장알균은 엔테로코커스 파이칼리스가 가장 흔하며, 그 다음 엔테로코커스 페숨, 엔테로코커스 아비움 순서이다. 엔테로코커스 패시움은 엔테로코커스 파이칼리스에 비해 항생제 내성 정도가 더 심하여 병원 감염 측면에서 중요하다.

[0005] 장알균은 정상 균무리(상재균)로 장, 입 안, 질, 요도에 서식한다. 장알균은 병을 일으키는 능력은 낮지만, 환경에 대한 적응력이 강하여 생물체에 기생하지 않고도 장기간 생존할 수 있다.

[0006] 따라서 장알균은 환자 장관에 정착한 균에 의한 내인성 감염(환자 장내에 원래 있던 장알균이 그 환자에게 질병을 유발한 것)뿐 아니라, 환자나 보균하고 있는 의료 종사자의 손이나 의료기기, 병원 환경으로부터 감염될 수 있다.

[0007] 한편, 최근 항생제 내성 문제가 심각해지면서 이 균에 의한 병원 감염이 현저히 증가하고 있다.

[0008] 반코마이신 내성 장알균(VRE)은 1986년 처음 보고되었는데, 메티실린 내성 황색포도알균(MRSA)과 함께 병원 감염의 중요한 원인균이며, 치료가 어려운 감염 관리의 주요 대상 세균이다.

[0009] 우리나라에서는 반코마이신 내성 장알균이 1992년 처음 보고된 이후 급증하여 2005, 2006년도의 경우 2, 3차 병원에서는 엔테로코커스 패시움의 20 내지 30%가 반코마이신 내성 장알균으로 알려졌다.

[0010] 몸에 침입한 반코마이신 내성 장알균이 감염을 일으킨다면 요로 감염이 가장 흔하다. 요로의 구조에 이상이 있거나 요로에 의료기구를 삽입했던 환자에게 주로 감염을 일으킨다. 요로나 복강 또는 간담도 쪽을 수술한 후에 반코마이신 내성 장알균 균혈증이 발생할 수 있다.

[0011] 복부 수술 후에는 창상(수술 시 절개한 부위) 감염이나 복강 내 감염을 일으킬 수 있다. 그 외에도 심내막염,

호흡기 감염, 뇌수막염 등을 일으킬 수 있다
(<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=927067&cid=51007&categoryId=51007>).

[0012] 상기 반코마이신 내성 장알균은 반코마이신이 아닌 다른 항생제로 치료하고 있으나, 다른 항생제의 사용으로 새로운 내성 균주의 발생이 야기될 수 있으며, 제거하고자 하는 미생물 외에 유익한 미생물에 대한도 영향일 미칠 수 있다는 문제점이 있다.

[0013] 따라서, 반코마이신 내성 장알균의 일종인 엔테로코커스 패시움 감염에 특이적으로 작용하면서도 인체에 유해성이 적은 항균 물질에 대한 개발이 시급한 실정이다.

발명의 내용

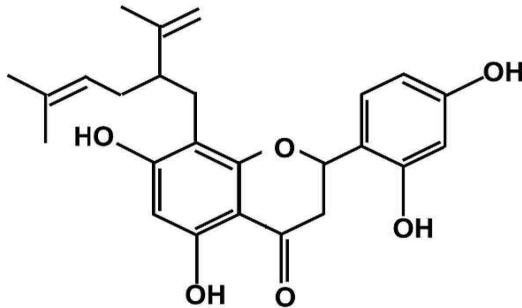
해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 식물 추출물에서 유래하고 엔테로코커스 패시움 균주에만 특이적으로 작용하는 환경 친화적인 항균 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물이 제공된다.

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*)에 대한 항균 활성을 가질 수 있다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 상기 엔테로코커스 패시움의 세포벽을 파괴할 수 있다.

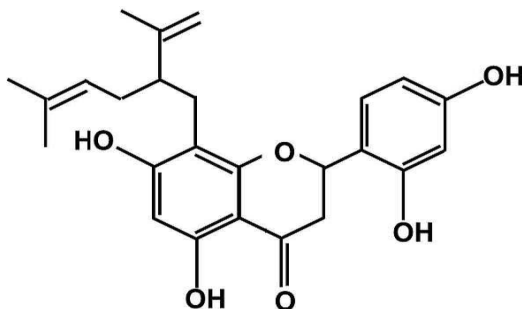
[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 메탄올, 에탄올, 소디움도데실설페이트, 트리톤(Triton) X-100 또는 이들의 혼합물을 더 포함할 수 있다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 하나 이상의 항균제 또는 항진균제를 더 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 엔테로코커스 패시움에 의한 감염증 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0023] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균 보조제가 제공된다.

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 보조제; 및 암피실린, 반코마이신 또는 스트렙토마이신을 포함하고

엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*)의 성장을 저해하는 항균 조성물이 제공된다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명에 따르면, 상기 항균 조성물은 식물 추출물에서 유래한 화합물을 유효성분으로 포함하므로 체내 독성이 낮고 원인균에 대해 항균 효과가 우수하다.
- [0028] 상기 항균 조성물은 엔테로코커스 패시움에만 활성을 나타내므로 전체 사용량이 감소되어 내성 발생의 빈도를 저감시킬 수 있으며, 부작용이 최소화될 수 있다.
- [0029] 상기 항균 조성물은 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성을 증가시켜 다른 항생제를 병용 투여시 항생 효과를 극대화시킬 수 있다.
- [0030] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

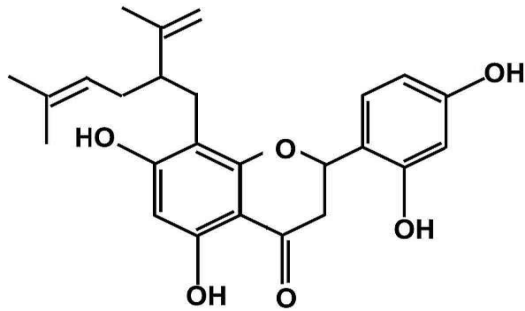
도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 시료 처리에 따른 엔테로코커스 패시움의 성장이 관찰되지 않는 구역을 나타낸 것이다.
- 도 2는 시료 처리에 따른 엔테로코커스 패시움의 성장 곡선을 나타낸 것이다.
- 도 3은 펩티도글리칸(PGN) 농도에 따른 소포라플라바논 G(SPF-G)에 의한 엔테로코커스 패시움의 성장 곡선을 나타낸 것이다.
- 도 4는 소포라플라바논 G(SPF-G)의 농도에 따른 엔테로코커스 패시움의 세포 내 물질 유출 정도를 나타낸 것이다.
- 도 5는 시료 처리에 따른 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성을 측정하는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 하기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 또한, 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략될 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0034] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0035] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다. 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.
- [0036] 본 발명의 일 측면에 따르면, 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물이 제공된다.

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 상기 화학식 1의 화합물은 고삼(*Sophora flavescens* Ait root.) 추출물에서 분리될 수 있다.

[0040]

상기 고삼은 쌍떡잎 식물 장미목 콩과에 속하며, 해발 1000m 이하의 초지에서 흔히 자라는 여러 해 살이 풀로 우리나라 각처의 산과 들에 자생한다. 가을에 뿌리를 캐어 씻어 말린 것을 고삼이라고 하며 약재로 사용된다.

[0041]

상기 고삼의 주요 활성 성분으로는 마트린(matrine), 옥시마트린 (Oxymatrine)과 소포라플라바논 G(sophoraflavanone G), 큐라리논(kurarinone)을 포함한 알칼로이드(alkaloid)와 플라보노이드(flavonoid), 사포닌(saponin)을 함유하고 있어 한약재의 원료로 사용된다.

[0042]

상기 고삼은 기관지염과 역균작용, 마비작용 등이 있을 뿐만 아니라 항암 작용, 항알러지, 항부정맥, 항균작용, 이뇨작용 등의 약리 효과가 보고 되어 있어 다양한 질환에 사용된다.

[0043]

상기 화합물을 분리하기 위한 식물은 식물 종뿐만 아니라 이로부터 유도된 식물 세포 및 식물 세포 현탁 배양액을 모두 포함할 수 있다.

[0044]

상기 화학식 1의 화합물인 소포라플라바논 G(sophoraflavanone G, SPF-G)를 효과적으로 추출하기 위하여 상기 고삼 뿌리를 핀밀(pin mill) 또는 볼밀(ball mill) 분쇄기로 100 내지 200 메쉬로 분쇄될 수 있으며, 50 내지 99 %의 저급 알코올로 3회 열수 추출한 다음 감압 농축할 수 있다.

[0045]

상기 열수 추출된 엑스는 증류수에 용해시켜 현탁 시킨 후, 여과하여 물 불용성 층 및 물 가용성 층으로 분리할 수 있으며, 상기 물 가용성 층은 에테르 또는 메틸렌클로라이드와 같은 비극성 유기용매에 의해 탈지될 수 있다.

[0046]

상기 물 가용성층은 소포라플라바논 G 뿐만 아니라 다양한 불순물을 함유할 수 있으므로, 상기 물 가용성층을 비극성 유기용매로 탈지시켜 고삼 뿌리의 불순물을 제거할 수 있으며, 바람직하게는 상기 탈지 공정이 3회 실시될 수 있다.

[0047]

또한, 상기 고삼 뿌리 추출물에 함유된 화학식 1의 화합물은 당해 기술 분야에 널리 알려진 크로마토그래피법에 의해 분리될 수 있다. 상기 고삼 추출물에 함유된 화학식 1의 화합물은 추가적인 크로마토그래피, 예컨대, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피법에 의해 분리될 수 있으며, 단일 화합물을 분리하기 위한 공지된 다양한 방법론이 적용될 수 있다.

[0048]

예컨대, 상기 비극성 유기용매가 제거된 후, 컬럼 크로마토그래피용 비이온성 수지에 흡착될 수 있다. 상기 컬럼 크로마토그래피는 당해 기술 분야에 널리 알려진 통상적인 방법으로 수행될 수 있다.

[0049]

상기 분리된 화학식 1의 화합물은 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*)에 대한 특이적 항균 활성을 보유하므로 엔테로코커스 패시움의 항균 조성물로 활용될 수 있다.

[0050]

즉, 상기 조성물은 특정 균주에 대한 특이적인 항균 활성을 보유하므로 광범위한 사용이 유도되지 않고 내성 발생률이 최소화될 수 있으며, 생체 안전성이 우수하다.

[0051]

본 발명자들은 상기 소포라플라바논 G를 엔테로코커스 패시움에 처리하는 경우, 엔테로코커스 패시움의 성장을 억제할 뿐만 아니라 엔테로코커스 패시움을 사멸시켰다(실험예 1).

[0052]

또한, 엔테로코커스 패시움의 사멸 기작과 관련하여, 소포라플라바논 G가 엔테로코커스 패시움의 세포벽의 원료인 펩티도글리칸과 결합함으로써 엔테로코커스 패시움의 세포벽이 파괴되어 사멸할 수 있다(실험예 2 및 3).

[0053]

더불어, 상기 소포라플라바논 G를 엔테로코커스 패시움에 처리하면 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성이 향

상되었고, 세포막 투과성을 향상시키는 물질을 소포라플라바논 G와 함께 처리하는 경우 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성이 더욱 현저하게 증가되었다(실험예 4).

- [0054] 상기 세포막 투과성을 향상시키는 물질은 메탄올, 에탄올, 소듐도데실설페이트, 트리톤(Triton) X-100 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 트리톤(Triton) X-100인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 상기 항균 조성물은 하나 이상의 항균제 또는 항진균제를 더 포함할 수 있다.
- [0056] 상기 항균제 또는 항진균제는 암피실린, 아미카신, 젠타마이신, 토브라마이신, 스트렙토마이신, 네틸마이신, 카나마이신, 시프로플록사신, 노르플록사신, 오픈록사신, 트로바플록사신, 로메플록사신, 레보플록사신, 에녹사신, 나프티리딘, 술폰아미드, 폴리믹신, 클로르암페니콜, 네오마이신, 파라모모마이신, 콜리스티메테이트, 박시트라신, 반코마이신, 테트라사이클린, 리팜핀, 시클로세린, 베타-락탐, 세팔로스포린, 암포테리신, 플루코나졸, 플루시토신, 나타마이신, 미코나졸, 케토코나졸, 코르티코스테로이드, 디클로페낙, 플루르비프로펜, 케토롤락, 수프로펜, 코몰린, 로독사미드, 레보카바스틴, 나파졸링, 안타졸린 및 페니라미만으로 구성된 군으로부터 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0057] 상기 소포라플라바논 G를 처리하여 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성이 향상되는 경우, 병용 투여되는 항균제 또는 항진균제를 엔테로코커스 패시움의 세포 내에 더욱 효과적으로 투입시킬 수 있으므로, 소량의 항균제 또는 항진균제로도 우수한 항균 효과를 발휘할 수 있어, 내성 발생률을 최소화 할 수 있다.
- [0058] 즉, 상기 항균제 또는 항진균제는 상기 화학식 1의 화합물과 복합적으로 적용됨으로써 그 사용량이 현저히 저감될 수 있으며, 상승 효과로 인해 항균 활성이 개선될 수 있다.
- [0059] 또한, 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 항균 조성물을 유효성분으로 포함하는 엔테로코커스 패시움에 의한 감염증 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0060] 상기 조성물은 엔테로코커스 패시움 또는 반코마이신에 대한 내성을 가진 엔테로코커스 패시움에 의한 질환을 효과적으로 완화할 수 있으며, 상기 엔테로코커스 패시움에 의한 감염 질환은 균혈증, 요로감염, 세균성 심내막염, 폐렴 및 수막염 등이 있을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 상기 항균 조성물이 약학적 조성물로 사용되는 경우, 유효성분으로서 소포라플라바논 G 이외에 추가로 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물(예: 락토스, 아밀로스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염 용액, 알코올, 아라비아 고무, 식물성 기름(예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0064] 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0065] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 “약학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0066] 또한 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0067] 구체적으로 상기 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지

150mg, 바람직하게는 0.01내지 100mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다.

[0068] 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0069] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실험예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0070] **실험예 1 : 엔테로코커스 패시움에 대한 항균 활성 실험**

[0071] **1-1. 엔테로코커스 패시움에 대한 성장 저해 평가**

[0072] 상기 화학식 1의 화합물(소포라플라바논 G, SPF-G)의 엔테로코커스 패시움에 대한 항균 활성을 평가하였다.

[0073] 상기 SPF-G의 엔테로코커스 패시움에 대한 성장 저해 효과를 확인하고자 EUCAST(the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)에서 제시한 broth microdilution assay를 사용하였다.

[0074] 96 well plate에 OD₆₀₀=0.1의 엔테로코커스 패시움(KACC 11954, CCARM 5506)을 넣어준 후 각 화합물을 최대 100 µg/mL로부터 2배씩 희석하여 처리하였다.

[0075] 각 플레이트는 30 °에서 24 또는 48시간 배양한 후, 세포의 성장을 억제하는 최소 농도인 MIC (Minimum Inhibitory concentration) 값을 구하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

[0076] 하기 표 1은 SPF-G와 기준에 널리 사용되는 항균제의 엔테로코커스 패시움 에 대한 MIC 값을 비교한 것이다.

표 1

[0077]

구분	화합물	MIC 값 (µg/mL)			
		KACC 11954		CCARM 5506	
		24H	48H	24H	48H
실시예	Sophoraflavanone G	6.25	12.5	6.13	12.5
비교예 1	Ampicillin	1.5625	6.25	3.125	6.25
비교예 2	Vancomycin	>100	>100	0.78	0.78
비교예 3	Streptomycin	>100	>100	>100	>100
비교예 4	Acetylshikonin	25	50	12.5	12.5
비교예 5	6,8-Diprenylorobol	25	50	25	50
비교예 6	Kurarinone	25	50	25	50
비교예 7	Pimaric acid	100	100	100	100
비교예 8	Corosolic acid	12.5	25	12.5	25
비교예 9	Oleanolic acid	>100	>100	>100	>100
비교예 10	Ursolic acid	>100	>100	>100	>100
비교예 11	Berberine chloride form	>100	>100	>100	>100
비교예 12	Sclareol	>100	>100	>100	>100

[0078] 표 1을 참조하면, SPF-G를 처리하는 경우, 기존의 항생제(Ampicillin, Vancomycin, Streptomycin)를 처리하는 경우와 비슷한 수준의 엔테로코커스 패시움에 대한 성장 저해 효과를 보였으며, 특히, Corosolic acid와 비교하여 엔테로코커스 패시움의 성장을 현저하게 저해시켰다.

[0079] **1-2. 엔테로코커스 패시움에 대한 세포 사멸능 평가**

[0080] 상기 성장을 저해하는 SPF-G의 농도에서 SPF-G를 제거한 후 엔테로코커스 패시움의 생존을 확인함으로써, SPF-G가 엔테로코커스 패시움의 성장을 억제할 뿐만 아니라 사멸시키는 역할도 하는지 확인하였다.

[0081] 상기 SPF-G의 농도에 따라 엔테로코커스 패시움 생존 여부를 확인하기 위해 SPF-G의 농도를 상기 MIC 값에 따라서 진행하였으며, 그 중 세포 성장이 관찰되지 않는 경우 배지를 바꾸어 준 후 MBC(Minimum Bactericidal Concentration) test를 수행하였다.

[0082] 96 well plate에 OD₆₀₀=0.1의 엔테로코커스 패시움을 넣어준 후 SPF-G 및 Ampicillin을 농도별(25 또는 50 µg/mL)로 처리하였다.

[0083] 37℃ 에서 24 시간 배양한 뒤 plate에 접종시키고 나서 24시간 배양하였다. 모든 실험은 3회 실시하였다.

표 2

구분	MIC($\mu\text{g/mL}$)		MBC($\mu\text{g/mL}$)	
	SPF-G	Ampicillin	SPF-G	Ampicillin
CCARM 5506	25	50	25	50

표 2를 참조하면, Ampicillin 및 SPF-G를 제거한 배지에서 엔테로코커스 패시움의 성장하지 않았다. 상기 결과는 엔테로코커스 패시움의 성장을 억제하는 동시에 사멸시키는 Ampicillin과 마찬가지로, SPF-G가 엔테로코커스 패시움의 성장을 억제할 뿐만 아니라, 엔테로코커스 패시움을 사멸시킬 수 있음을 시사한다.

1-3. Disc diffusion assay

상기 SPF-G의 엔테로코커스 패시움에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 고체 배지를 활용한 Disc diffusion assay를 수행하였다.

도1은 각 화합물의 처리에 의해 엔테로코커스 패시움의 성장이 관찰되지 않는 구역의 크기를 나타낸 것으로, 상기 성장이 관찰되지 않는 구역의 측정값은 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

구분	Inhibition zone(nm)	
	KACC 11954	CCARM 5506
Ampicillin	19	2.5
Kurarionone	9	1
Sophoraflavanone G	13	1.2
Berberine chloride	-	-
Sclareol	-	-

도 2 및 표 3을 참조하면, Paper disc 8mm기준으로, SPF-G의 경우 엔테로코커스 패시움(KACC11954: 1.52cm, CCARM 5506: 1.6cm)의 성장을 저해 하였으며, 상기 엔테로코커스 패시움에 대한 성장 저해 효과는 항생제인 Ampicillin 및 Kurarinone를 처리한 경우와 비교하여 동등하거나 더 높은 수준임을 확인하였다.

1-4. SPF-G의 농도에 따른 엔테로코커스 패시움의 성장 저해 평가

SPF-G의 농도를 달리 처리하는 경우 엔테로코커스 패시움의 성장에 미치는 영향을 확인하고자, OD₆₀₀=0.1 엔테로코커스 패시움에 SPF-G를 각각 MIC 농도(12.5 $\mu\text{g/mL}$)와 그 반의 양(6.25 $\mu\text{g/mL}$)을 처리한 후 37 °C에서 엔테로코커스 패시움을 기르면서 시간에 따른 성장을 관찰하였다(도 3).

도 2를 참조하면, SPF-G(MIC, 1/2MIC)를 처리하였을 때, SPF-G를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 엔테로코커스 패시움의 성장을 현저하게 억제시키는 것을 확인하였다.

실험예 2 : 엔테로코커스 패시움의 펩티도글리칸과 SPF-G의 결합 여부 확인 실험

Staphylococcus aureus 에 대한 SPF-G의 항균 기전 연구에서 SPF-G가 Staphylococcus aureus의 펩티도글리칸과 결합함으로써 Staphylococcus aureus에 대한 항균 효과를 보임이 알려져 있다.

이에, SPF-G가 엔테로코커스 패시움의 펩티도글리칸과 결합하여 항균 효과를 보이는지 확인하기 위해 SPF-G를 처리한 후, 엔테로코커스 패시움의 펩티도글리칸을 농도에 따라 첨가하여 엔테로코커스 패시움의 성장 변화를 관측하였다(Merkel, G.J. 1978; Kuhner, D., 2014).

구체적으로, SPF-G를 각각 6.25(1/2MIC) 및 12.5(MIC) $\mu\text{g/mL}$ 농도로 96 well plate에 넣은 후 OD₆₀₀=0.1의 엔테로코커스 패시움에 접종한 뒤 엔테로코커스 패시움에서 직접 추출한 펩티도글리칸(peptidoglycan, PGN)을 농도별(0.29 내지 150 $\mu\text{g/mL}$)로 처리한 후 24 시간 배양한 뒤 OD_{600nm}에서 엔테로코커스 패시움의 성장을 측정하여 도 4에 나타내었다.

도 3을 참조하면, SPF-G(MIC, 1/2MIC)를 처리한 경우, 펩티도글리칸의 농도가 100 $\mu\text{g/mL}$ 이하에서 엔테로코커스 패시움의 성장이 저해되었다.

- [0099] 그러나, 펩티도글리칸의 농도를 100 내지 150 $\mu\text{g/mL}$ 처리하는 경우, 엔테로코커스 패시움의 성장이 재개되었으며, 150 $\mu\text{g/mL}$ 의 펩티도글리칸을 처리하는 경우, SPF-G를 처리하지 않은 대조군(control)과 동등한 수준으로 세포가 성장하였다.
- [0100] 상기 결과는 SPF-G가 엔테로코커스 패시움 유래 펩티도글리칸과 결합하여 엔테로코커스 패시움의 세포벽 형성을 억제하거나 세포벽을 파괴함으로써 성장을 저해시킴을 시사한다.
- [0101] **실험예 3 : SPF-G 처리에 의한 엔테로코커스 패시움의 세포벽 파괴능 평가**
- [0102] SPF-G의 처리에 의해 엔테로코커스 패시움의 세포벽 파괴되어 세포 내의 물질이 밖으로 나오는지 확인하기 위하여 $\text{OD}_{600}=0.1$ 의 엔테로코커스 패시움에 SPF-G를 각각 6.25(1/2MIC) 및 12.5(MIC) $\mu\text{g/mL}$ 농도로 1시간 동안 처리한 후 분광 광도계(spectrophotometer)를 사용하여 260 및 280 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 5).
- [0103] 도 4를 참조하면, SPF-G(MIC, 1/2MIC)를 처리한 경우, 260 및 280 nm에서 흡광도가 증가하였으며, 상기 흡광도의 증가는 엔테로코커스 패시움의 세포벽이 파괴되어 세포 내 물질이 외부로 유출되었음을 시사한다.
- [0104] **실험예 4 : SPF-G 처리에 의한 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성 평가**
- [0105] SPF-G를 처리하는 경우, 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성에 미치는 영향을 확인하였다. 양성대조군으로는 세포막의 투과성을 증가시키는 화학물질인 Triton X-100을 사용하였다.
- [0106] $\text{OD}_{600}=0.1$ 의 엔테로코커스 패시움에 Triton X-100(Tx-100, 0.0001%), SPF-G(3.125 $\mu\text{g/mL}$)를 각각 또는 함께 처리하여 24시간 배양 후 OD_{600} 에서의 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0107] 도 5를 참조하면, Triton X-100 또는 SPF-G를 단독 처리하는 경우와 비교하여 Triton X-100 및 SPF-G를 함께 처리하였을 때, 세포 성장이 현저하게 억제되었으며, 상기 결과는 Triton X-100 및 SPF-G를 함께 처리하였을 때, 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성이 현저하게 증가함을 시사한다.
- [0108] 또한, 상기 결과는 엔테로코커스 패시움의 세포막 투과성이 증가되면 병용 투여될 수 있는 항균제 또는 항진균제를 엔테로코커스 패시움 내로 더욱 효과적으로 침투시킬 수 있어, 그 사용량이 현저히 저감되며, 내성 발생률 또한 최소화시킬 수 있음을 시사한다.
- [0109] **실험예 6 : 항균 보조능 평가**
- [0110] **6-1. 성장 저해 활성 평가**
- [0111] 상기 평가 결과에 따르면, SPF-G는 엔테로코커스 패시움의 세포벽을 파괴하거나, 세포막 투과성을 증가시킴으로써 항생제의 항균 활성을 증진시킬 수 있을 것으로 예측되었으므로, SPF-G의 항균 보조 활성을 평가하였다.
- [0112] 실험예 1-1과 동일한 방법으로 엔테로코커스 패시움에 대한 성장 저해 활성을 평가하되, SPF-G 동시 처리에 따른 효과를 확인하였다(표 4).

표 4

구분	내용	MIC 값 ($\mu\text{g/mL}$)			
		KACC 11954		CCARM 5506	
		24H	48H	24H	48H
실시예 1	SPF-G + Ampicillin	1.25	4.97	0.93	3.96
실시예 2	SPF-G + Vancomycin	3.19	7.34	0.42	0.51
실시예 3	SPF-G + Streptomycin	2.96	9.15	1.84	7.53
비교예 1	SPF-G	6.25	12.5	6.13	12.5
비교예 2	Ampicillin	1.5625	6.25	3.125	6.25
비교예 3	Vancomycin	>100	>100	0.78	0.78
비교예 4	Streptomycin	>100	>100	>100	>100

- [0114] 평가 결과 SPF-G는 타 항생제와 함께 처리되었을 때 더욱 효과적으로 엔테로코커스 패시움의 성장을 저해하였으며, 특히 반코마이신 및 스트렙토마이신을 단독으로 처리하였을 때 매우 낮은 수준으로 측정되었던 항균 활성을 현저히 증가시켰다.

[0115] 6-2. Disc diffusion assay

[0116] 실험예 1-3과 동일한 방법으로 SPF-G 동시 처리에 따른 효과를 확인하였다.

표 5

[0117]

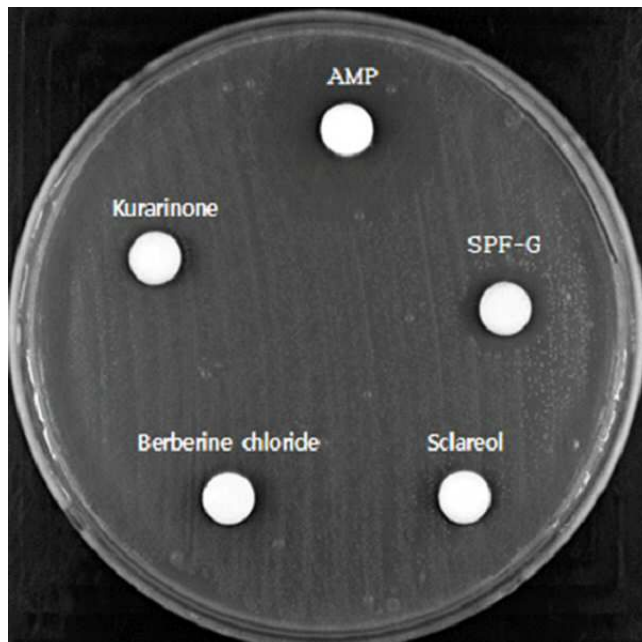
구분	내용	Inhibition zone(nm)	
		KACC 11954	CCARM 5506
실시예 1	SPF-G + Ampicillin	7.2	0.9
실시예 2	SPF-G + Vancomycin	5.1	1.0
실시예 3	SPF-G + Streptomycin	11.2	0.7
비교예 1	Sophoraflavanone G	13	1.2
비교예 2	Ampicillin	19	2.5
비교예 3	Vancomycin	23	7.4
비교예 4	Streptomycin	31	11.2

[0118] 평가 결과 SPF-G는 타 항생제와 함께 처리되었을 때 더욱 효과적으로 엔테로코커스 패시움의 성장을 저해하였으며, 상기 결과는 SPF-G가 엔테로코커스 패시움의 세포벽을 파괴시킴으로써 항생제에 의한 항균 활성을 현저히 증대시킬 수 있음을 시사한다. 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

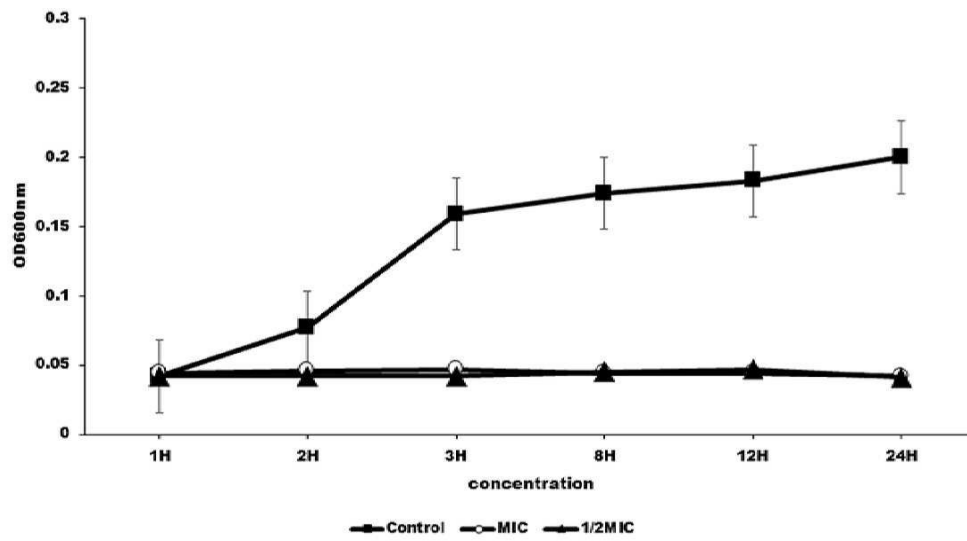
[0119] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

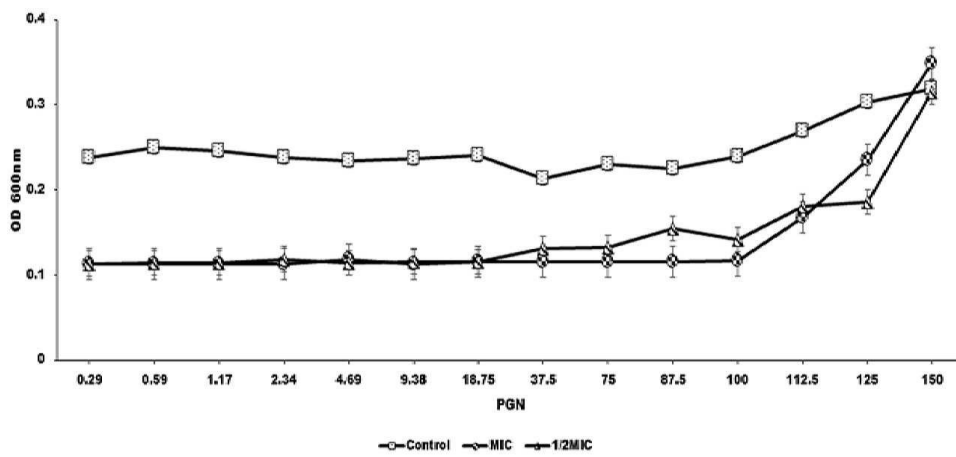
도면1



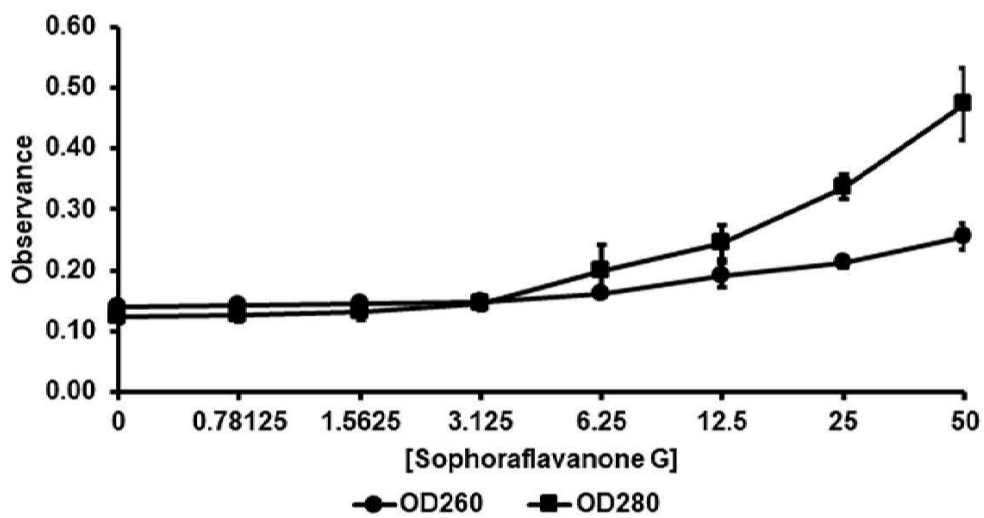
도면2



도면3



도면4



도면5

