



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0016243
(43) 공개일자 2018년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/50 (2015.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/50 (2013.01)

A61K 2035/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0018137

(22) 출원일자 2017년02월09일

심사청구일자 2017년02월09일

(30) 우선권주장

1020160099634 2016년08월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

송재준

서울특별시 서초구 신반포로 9, 73동 504호 (반포본동, 주공아파트)

야다브, 무케시 쿠마르

서울특별시 구로구 구로동로 148, 이비인후과 (구로동, 고려대부속구로병원)

고윤영

서울특별시 구로구 구로동로 148, 이비인후과 (구로동, 고려대부속구로병원)

(74) 대리인

특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 양막 추출물 또는 융모막 추출물을 함유하는 향균용 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명의 일실시예에 따르면, 융모막(chorion membrane) 및 상피세포층을 포함하는 양막(amnion membrane) 중 하나 이상의 막 추출물을 유효성분으로 포함하는, 향균용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

Y10S 514/8995 (2013.01)

Y10S 514/90 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C2835

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 첨단의료기술개발

연구과제명 Dual kill switch를 탑재한 골재생용 세포치료제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.12.01 ~ 2017.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

음모막(chorion membrane) 및 상피세포층을 포함하는 양막(amnion membrane) 중 하나 이상의 막 추출물을 유효 성분으로 포함하는, 향균용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 폐렴구균(*Streptococcus pneumonia*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 균주에 대한 항균 활성을 갖는, 향균용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 항생제 내성 균주에 대한 항균 활성을 갖는, 향균용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 항생제 내성 균주는 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), 반코마이신 내성 장구균(VRE, Vancomycin resistant *Enterococcus*), 항생제 내성 대장균(*Escherichia coli*), 항생제 내성 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 항생제 내성 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 항생제 내성 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 균주인, 향균용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 막 추출물의 농도가 0.05 μ g/ml 내지 1,000 μ g/ml인, 향균용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 바이오필름 형성을 억제하는, 향균용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 바이오필름은 충치, 치주염, 중이염, 근골격 감염, 피사성 근막염, 담관계 감염, 골수염, 세균성

전립선염, 자연 판막의 심내막염, 낭포성 섬유증 폐렴, 멜로이도시스(meloidosis), 병원내 감염(nosocomial infection), ICU(intensive care unit) 폐렴, 요로 카테터 방광염(urinary catheter cystitis), 복막 투석(CAPD, chronic ambulatory peritoneal dialysis) 복막염 및 담도 배액관 폐쇄(biliary stent blockage)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 감염증을 유발하는, 항균용 조성물.

청구항 8

태반으로부터 음모막 및 상피세포층을 포함하는 양막 중 하나 이상의 막을 분리하는 단계;

상기 분리된 막을 항생제가 첨가된 인산완충식염수(PBS, Phosphate Buffer Saline) 또는 생리식염수로 세척하는 단계;

상기 세척된 막을 분쇄하는 단계;

상기 분쇄된 막 및 완충용액을 혼합하고, 8시간 내지 24시간 동안 추출하는 단계; 및

추출물의 상층액을 수집 및 여과하여 막 추출물을 수득하는 단계;를 포함하는, 항균용 조성물의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조성물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 폐렴구균(*Streptococcus pneumonia*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 균주에 대한 항균 활성을 갖는, 항균용 조성물의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 조성물은 항생제 내성 균주에 대한 항균 활성을 갖는, 항균용 조성물의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 항생제 내성 균주는 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), 반코마이신 내성 장구균(VRE, Vancomycin resistant *Enterococcus*), 항생제 내성 대장균(*Escherichia coli*), 항생제 내성 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 항생제 내성 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 항생제 내성 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 균주인, 항균용 조성물의 제조방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 조성물은 바이오필름 형성을 억제하는, 항균용 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 양막 추출물 또는 용모막 추출물을 함유하는 항균용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 포도상구균(*Staphylococcus*) 속 세균은 자연계에 널리 분포하며, 환경에 대한 저항성이 강하여 생물체에 기생하지 않고도 장기간 생존할 수 있는 세균이다. 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)는 포도상구균(*Staphylococcus*) 속 세균 중 하나의 종(species)으로, 평소에는 건강한 사람의 피부, 비강, 상기도, 비뇨기, 소화기 등에 상재하며, 공기, 바닥, 집기 등의 주변 환경에도 존재하고, 인후의 점막 등 구강 내에서도 상재한다.

[0004] 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 인간과 동물에 감염하여 수술 후 감염, 농양, 심장 내막염 및 독소 증후군 등의 심각한 질병을 유도하는 대표적인 병원성 세균으로서, 이들이 발생시키는 TSST-1, EF, alpha, beta, delta 등의 독소는 심각한 식중독을 유발하기도 한다.

[0005] 즉, 이들은 면역력이 정상인 상태에서는 문제를 일으키지 않으나 수술, 화상, 면역력 결핍 질환 감염 등 면역력이 저하된 상태에서 피부의 상처나 호흡기를 통하여 기회 감염될 수 있다. 이들은 국소 및 전신감염을 유발하는 그람-양성 구균으로 화농성 감염의 80% 이상을 차지하는 감염성 질환의 주요 원인균이다. 또한, 황색포도상구균은 구강 내에서도 인후염이나 편도염 등의 각종 항생제 내성균주 감염 질환을 일으킨다.

[0006] 페니실린(Penicillin) 등의 β -락탐(lactam)계 항생제가 개발되어 사용되었을 초기에는 황색포도상구균에 대한 β -락탐계 항생제의 감수성이 높아 치료가 수월하게 진행되었다. 그러나, β -락탐계 항생제의 사용이 빈번해짐에 따라, 황색포도상구균은 β -락탐계 항생제 불활성화 효소인 β -락타마이즈(lactamase)를 생성하는 원리로 점차 내성을 보유하게 되었다. 그 후, β -락타마이즈에 의하여 불활성화되지 않는 메티실린(methicillin)이 개발되어 황색포도상구균의 감염 치료에 사용되었으나, 1960년대 초반 페니실린에 내성을 보유하는 항생제 내성균주인 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)이 발견되었다.

[0007] MRSA는 어떤 항생제에도 저항할 수 있게 된 일명 슈퍼박테리아(super bacteria) 또는 항생제 내성균의 예시로 언급된다. 슈퍼박테리아는 항생제를 극복할 수 있는 자연적인 돌연변이체로서, 내성 유전자를 다른 세균들에게 전달시켜 주므로, 내성균의 확대가 신속하게 이루어 질 수 있다. 이러한 항생제 내성균은 β -락탐계 항생제 뿐만 아니라 다른 항생제에도 내성을 보유하고, 내성은 점차 강해져 결과적으로 어떠한 항생제에도 저항할 수 있게 되므로, 이에 관한 연구의 필요성이 증대되고 있다.

[0008] 특히, MRSA는 해당과정을 통하여 당질을 대사함으로써 유기산을 생산할 수 있으며, 이러한 당질대사 과정은 세균의 생존에 필요한 중요한 에너지 획득 기전이다. MRSA가 생산한 유기산은 pH를 하강시켜 바이오필름 형성을 촉진하고, 이에 따라 환자에 주입된 임플란트(implant), 의료용품 또는 의료기기에 바이오필름(biofilm)을 형성할 수 있다. 한 번 형성된 바이오필름은 제거가 용이하지 않으므로 패혈증 등의 심각한 병원성 감염을 발생시킬 수 있다.

[0009] 한편, 반코마이신(vancomycin)은 메티실린을 대체하기 위하여 개발된 치료제로써, MRSA가 반응하는 항생제이나, 청신경장애, 신장장애, 간장애, 균교대증 및 아나필락시성 쇼크 등의 심각한 부작용 문제가 있다. 또한, 슈퍼박테리아 항생제인 자이복스(Zyvox)도 부작용이 발생할 수 있으며, MRSA에 내성이 생기기 시작하여 약효가 급격히 떨어지고 있는 현실이다.

[0010] 상기 언급한 바와 같이, MRSA는 다중약물내성을 보이는 특성과 바이오필름을 형성하는 특성을 보유하고 있어 활성 저해가 용이하지 않은 세균이다. 따라서, 부작용 발생을 억제하면서도 MRSA의 감염을 효과적으로 치료할 수 있는 신규한 조성물의 개발이 촉구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 부작용 발생을 억제하면서도 다양한 박테리아, 특히 MRSA와 같은 항생제 내성 균주에도 우수한 항균 활성을 나타내는 조성물을 제공하는 것

이다.

[0013] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 일실시에에 따르면, 융모막(chorion membrane) 및 상피세포층을 포함하는 양막(amnion membrane) 중 하나 이상의 막 추출물을 유효성분으로 포함하는, 향균용 조성물이 제공된다.

[0016] 일측에 따르면, 상기 조성물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주에 대한 항균 활성을 가질 수 있다.

[0017] 일측에 따르면, 상기 조성물은 항생제 내성 균주에 대한 항균 활성을 가질 수 있다.

[0018] 일측에 따르면, 상기 항생제 내성 균주는 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), 반코마이신 내성 장구균(VRE, Vancomycin resistant *Enterococcus*), 항생제 내성 대장균(*Escherichia coli*), 항생제 내성 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 항생제 내성 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 항생제 내성 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주일 수 있다.

[0019] 일측에 따르면, 상기 막 추출물의 농도가 0.05 μ g/ml 내지 1,000 μ g/ml일 수 있다.

[0020] 일측에 따르면, 상기 조성물은 바이오필름 형성을 억제할 수 있다.

[0021] 일측에 따르면, 상기 바이오필름은 충치, 치주염, 중이염, 근골격 감염, 괴사성 근막염, 담관계 감염, 골수염, 세균성 전립선염, 자연 관막의 심내막염, 낭포성 섬유증 폐렴, 멜로이도시스(meloidosis), 병원내 감염(nosocomial infection), ICU(intensive care unit) 폐렴, 요로 카테터 방광염(urinary catheter cystitis), 복막 투석(CAPD, chronic ambulatory peritoneal dialysis) 복막염 및 담도 배액관 폐쇄(biliary stent blockage)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 감염증을 유발할 수 있다.

[0022] 다른 일실시에에 따르면, 태반으로부터 융모막 및 상피세포층을 포함하는 양막 중 하나 이상의 막을 분리하는 단계; 상기 분리된 막을 항생제가 첨가된 인산완충식염수(PBS, Phosphate Buffer Saline) 또는 생리식염수로 세척하는 단계; 상기 세척된 막을 분쇄하는 단계; 상기 분쇄된 막 및 완충용액을 혼합하고, 8시간 내지 24시간 동안 추출하는 단계; 및 추출물의 상층액을 수집 및 여과하여 막 추출물을 수득하는 단계;를 포함하는, 향균용 조성물의 제조방법이 제공된다.

[0023] 일측에 따르면, 상기 조성물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주에 대한 항균 활성을 가질 수 있다.

[0024] 일측에 따르면, 상기 조성물은 항생제 내성 균주에 대한 항균 활성을 가질 수 있다.

[0025] 일측에 따르면, 상기 항생제 내성 균주는 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), 반코마이신 내성 장구균(VRE, Vancomycin resistant *Enterococcus*), 항생제 내성 대장균(*Escherichia coli*), 항생제 내성 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 항생제 내성 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 항생제 내성 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주일 수 있다.

[0026] 일측에 따르면, 상기 조성물은 바이오필름 형성을 억제할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 조성물은 양막, 융모막과 같은 막 추출물을 유효성분으로 포함함으로써, 부작용을 최소화하면서도 다양한 박테리아, 특히 항생제 내성 균주에 대한 우수한 항균 활성을 보유할 수 있다.

- [0029] 따라서, 이들 성분을 포함하는 조성물은 박테리아 감염으로부터 발생될 수 있는 감염성 질환, 예를 들어 이비인후과 영역의 삼출성, 만성 중이염과 부비동염 질환 등에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0030] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 태반에서 분리한 양막, 융모막, 양막/융모막 복합체 및 양막 추출물과 융모막 추출물을 나타낸 사진이다.
- 도 2는 양막 추출물 농도에 따른 박테리아 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 항생제 내성 균주에 대한 양막 추출물의 MIC(minimal inhibitory concentration)를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 양막 추출물의 박테리아 종류별 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 양막 추출물 농도에 따른 박테리아 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 양막 추출물의 박테리아 종류별 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 추출물 종류에 따른 박테리아 배양 억제 지역을 나타낸 이미지이다.
- 도 8은 MSSA 균에 대한 양막 추출물의 살균 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 대장균에 대한 양막 추출물의 살균 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 10은 녹농균에 대한 양막 추출물의 살균 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 11은 대장균에 대한 양막 추출물 및 융모막 추출물의 농도별 항균 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 12는 폐렴구균에 대한 양막 추출물의 농도별 항균 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 13은 양수(AF), 양막 추출물(AME), 융모막 추출물(CME), 양막(AM), 융모막(CM) 및 융모막 분쇄물(CME crude)의 MRSA에 대한 배양 억제 지역을 나타낸 이미지이다.
- 도 14는 양수(AF), 양막 추출물(AME), 융모막 추출물(CME), 양막(AM), 융모막(CM) 및 항생제(Erythromycin, Oxacillin 및 Ampicillin)의 MRSA, MSSA 및 대장균(*E.coli*)에 대한 배양 억제 지역을 나타낸 이미지이다.
- 도 15는 추출물의 종류 및 농도에 따른 녹농균의 플랑크토닉 성장 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 16은 추출물의 종류 및 농도에 따른 녹농균의 바이오필름 형성 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 17은 추출물의 종류 및 농도에 따른 미리 형성된 녹농균 바이오필름 제거 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 18은 추출물의 종류 및 농도에 따른 폐렴구균의 바이오필름 형성 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 19는 양막 추출물의 농도에 따른 미리 형성된 폐렴구균 바이오필름 제거 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.
- [0034] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0035] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0036] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속

하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

- [0037] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0039] 일실시예에 따르면, 융모막(chorion membrane) 및 상피세포층을 포함하는 양막(amnion membrane) 중 하나 이상의 막 추출물을 유효성분으로 포함하는, 항균용 조성물이 제공된다.
- [0040] 상기 막 추출물은 양막 추출물 또는 융모막 추출물일 수 있고, 이들의 혼합물(이하, "양막/융모막 복합 추출물"이라 함)일 수도 있다. 이 때, 혼합물은 상기 양막 추출물과 융모막 추출물을 독립적으로 추출한 후 혼합한 것일 수 있고, 이와 달리 상기 양막/융모막 복합체로부터 추출한 것일 수도 있다.
- [0041] 본 명세서에서 사용한 용어 "양막(amnion membrane)"은 태반을 구성하는 가장 내부에 위치한 막으로, 양수와 태아를 둘러싸고 있어 외부의 병원균으로부터 태아를 보호하고, 양수와 태아의 생체항상성을 유지하여 태아가 정상적으로 성장/발달 할 수 있는 환경을 조성하는 역할을 한다.
- [0042] 상기 양막은 표피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 전환 성장인자(transforming growth factor, TGF- β), 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF) 및 간장 성장인자(hepatic growth factor, HGF)등을 포함한다. 또한, 콜라겐으로 구성된 세포외 기질과 상피세포로 구성되어 있으며 항염증(anti-inflammation), 항균(anti-bacterial) 성분을 포함하고 있으며 혈관생성 조절 성분(angiogenic modulatory properties)들이 있다.
- [0043] 또한, 상기 양막은 그람-음성과 그람-양성의 박테리아 중, 곰팡이, 및 바이러스에 대하여 항균성을 갖는 베타-디펜신(β -defensin), 칼프로텍틴(Calprotectin; MRP8/14), 유비퀴틴(Ubiquitin) 및 항균/투과성 증가 단백질(Bactericidal/permeability-increasing protein: BPI)을 포함한다. 특히, BPI는 그람-음성균과 지질다당체(lipopolysaccharide)에 대항하는 숙주 방어의 중요한 요소로서, 원내 감염 혹은 인공호흡기 관련 감염에 중요한 역할을 한다.
- [0044] 본 명세서에서 사용한 용어 "융모막(chorion membrane)"은 상기 양막과 맞붙어 있는 막으로서, 불투명하며 망상 세포층, 기저층, 영양배엽세포층으로 이루어진 두꺼운 막을 지칭한다.
- [0045] 종래에는, 양막을 생체막의 형태로 사용하고자 하는 경우, 그 자체의 활용이 제한적이며 다양한 신체부위의 적용에 어려움이 있었다. 특히, 양막이 포함하고 있는 상피세포층을 제거하지 않으면 염증 반응으로 인한 부작용이 발생할 수 있다는 문제점이 있었다. 또한, 종래에는 융모막이 제거된 양막을 사용하는 것이 일반적이었는데, 이는 융모막에 포함된 콜라겐층과 세포층으로 인한 부작용을 방지하기 위한 것이었다.
- [0046] 그러나, 양막의 상피세포층과 융모막에는 다양한 성장인자뿐 아니라 항균성 물질들이 다량 포함되어 있으므로, 본 발명자들은 상피세포층을 제거하지 않은 양막과 함께 융모막을 이용하여 이들의 단독 또는 혼합 추출물을 제조하였으며, 상기 추출물의 항균 효과를 규명하였다.
- [0047] 본 명세서에서 사용한 용어 "항균" 또는 "항균 활성"이란, 세균이나 곰팡이와 같은 미생물에 대해 저항하는 성질을 의미하며, 보다 상세하게는 항생물질 등이 세균의 성장 또는 증식을 억제하는 특성을 의미한다.
- [0048] 상기 조성물이 항균 활성을 나타내는 박테리아는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 폐렴구균(*Streptococcus pneumonia*)으로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 본 명세서에서 사용한 용어 "황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)"이란, 생육함에 따라 세포집괴(덩어리)를 형성하는 그람-양성의 통성혐기성 세균을 의미한다. 상기 황색포도상구균은 일반적으로 건강한 사람이나 가축의 피부와 비강 표면에 존재하고, 내열성인 외독소를 생산하여 식중독을 일으키며, 식세포를 죽이는 독소(류코시딘), 용혈소, 응고효소 등을 분비하여 감염숙주세포의 내성에서 벗어나 화농성감염증을 일으킬 수 있다.

[0050] 최근 병원내 등에서 대부분의 항생물질에 내성을 나타내는 균주인 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) 및 퀴놀론 내성 황색포도상구균(QRSA, Quinolone resistant *Staphylococcus aureus*) 역시 황색포도상구균에 속한다.

[0051] 상기 조성물은 전술한 균주 외에도, 통상 슈퍼박테리아로 호칭되는 항생제 내성 균주에 대한 항균 활성을 가질 수 있다. 구체적으로, 상기 항생제 내성 균주는 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), 반코마이신 내성 장구균(VRE, Vancomycin resistant *Enterococcus*), 항생제 내성 대장균(*Escherichia coli*), 항생제 내성 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 항생제 내성 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 항생제 내성 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주일 수 있고, 바람직하게는 MRSA일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 본 명세서에서 사용한 용어 "내성 균주"는 임의의 질환 및 이의 합병증, 또는 임의의 박테리아성 장애 및 이의 합병증을 치료 또는 예방하기 위해 약물을 지속적으로 사용한 결과, 항생제에 대한 내성을 나타내는 세균을 의미한다. 항생제의 예로는 세팔로스포린, 퀴놀론 및 플루오로퀴놀론, 페니실린, 베타 락타마제 억제제, 카르바페넴, 모노박탐, 마크롤리드 및 린코사민, 글리코펩티드, 리팜핀, 옥사졸리디논, 테트라사이클린, 아미노글리코시드, 스트렙토그라민 및 숄폰아미드 등이 있으며, 항생제 내성 균주는 이들 항생제를 처리하는 경우에도 내성을 나타낼 수 있다.

표 1

Antibiotics	CCARM 3108	CCARM 3969	CCARM 3912	CCARM 3807
[CEP] Cephalothin	128.0	-	-	
[CHL] Chloramphenicol	-	4.0	2.0	4.0
[CIP] Ciprofloxacin	8.0	≥ 0.12	≥ 0.12	128.0
[CLI] Clindamycin	-	≥ 0.12	≥ 128.0	≥ 128.0
[ERY] Erythromycin	≥ 128.0	≥ 128.0	≥ 128.0	≥ 128.0
[GM] Gentamicin	≥ 128.0	4.0	16.0	32.0
[NOR] Norfloxacin	32.0	0.5	0.5	≥ 128.0
[OXA] Oxacillin	≥ 128.0	4.0	≥ 128.0	≥ 128.0
[PEN] Penicillin	-	8.0	8.0	16.0
[RIF] Rifampin	-	≥ 0.12	≥ 0.12	≥ 0.12
[SXT]Trimethoprim-sulfamethoxazole	-	0.5	0.5	0.5
[TET] Tetracycline	-	≥ 0.12	≥ 0.12	16.0
[TEI] Teicoplanin	2.0	-	-	-
[VAN] Vancomycin	2.0	0.5	1.0	≥ 0.12

[0055] (단위: $\mu\text{g}/\text{ml}$)

[0057] 상기 표 1은 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA) 균주에 대한 항생제 유효량에 관한 표이다. CCARM(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes)은 항생제 내성 균주 은행을 지칭하며, 각 번호는 CCARM에서 명명한 MRSA 균들의 균주 명칭을 의미한다. Erythromycin 항생제의 경우 MRSA에 대한 유효량은 $128\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상이다.

[0058] 본 발명자들은 실험을 통해 MRSA에 대한 Erythromycin 항생제의 억제 효과를 확인하였으며, 다른 항생제들에 비해 고농도를 사용하는 항생제를 대조균으로 사용하였다.

[0059] 이러한 실험을 통해, 상기 막 추출물이 일정 범위 내의 농도로 존재하는 경우 우수한 항균 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다. 항균 효과를 나타내는 유효 농도 또는 유효량의 범위는 박테리아의 종류에 따라 다소 상이할 수 있으나, 상기 막 추출물의 농도는 $64\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 $512\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 대부분의 박테리아에 대한 항균 효과를 나타내었다(실시예 3 내지 10). 다만, 바이오필름 성장 억제와 관련하여, 폐렴구균의 경우 다른 박테리아에 비해 상

대적으로 저농도인 80ng/ml부터 바이오필름의 성장을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다(실시예 15).

- [0060] 최소 농도 측정법을 통해, 각 균주에 대한 상기 막 추출물이 항균 효과를 갖는 최소 농도를 측정한 결과에서도, 최소 유효 농도는 64 μ g/ml 또는 128 μ g/ml로 측정되었다. 따라서, 상기 막 추출물의 농도는 0.05 μ g/ml 내지 1,000 μ g/ml일 수 있으며, 바람직하게는 64 μ g/ml 내지 512 μ g/ml, 더욱 바람직하게는 128 μ g/ml 내지 512 μ g/ml일 수 있다. 또한, 폐렴구균의 바이오필름 성장 억제에 관해서는, 상기 막 추출물의 바람직한 농도가 0.08 μ g/ml 내지 512 μ g/ml일 수 있다.
- [0061] 상기 항균용 조성물은 상기 막 추출물뿐만 아니라, 병원성 세균에 대한 항균 활성을 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 항균용 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 항균용 조성물은 항균용 약학적 조성물일 수 있다.
- [0062] 본 명세서에서 사용한 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 임의의 대상 조성물 또는 성분을 하나의 기관, 또는 신체의 부분으로부터 다른 기관, 또는 신체의 부분으로의 운반 또는 수송하는 것에 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질과 같은 제약상 허용가능한 물질, 조성물 또는 비히클을 지칭하며, 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 스테아린산 마그네슘 및 광물유를 들 수 있다.
- [0063] 또한, 상기 항균용 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 막 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0064] 뿐만 아니라, 상기 항균용 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 병원성 세균 및 내성균에 대한 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0065] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 막 추출물을 유효성분으로 포함하는 의약품 항균용 조성물을 제공한다. 즉, 본 발명은 병원성 미생물 또는 내성균에 의한 감염성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 의약품 조성물을 제공할 수 있다.
- [0066] 상기 의약품 조성물은 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0067] 상기 의약품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 한편, 양막 추출물 및/또는 용모막 추출물을 포함하는 상기 조성물은 단순 항균 효과뿐만 아니라, 박테리아에 의한 바이오필름 형성을 억제할 수 있다. 이러한 효과는 상기 바이오필름에 의해 유발될 수 있는 감염증의 억제 효과까지 포함하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0069] 구체적으로, 상기 바이오필름은 충치, 치주염, 중이염, 근골격 감염, 피사성 근막염, 담관계 감염, 골수염, 세

균성 전립선염, 자연 판막의 심내막염, 낭포성 섬유증 폐렴, 멜로이도시스(meloidosis), 병원내 감염(nosocomial infection), ICU(intensive care unit) 폐렴, 요로 카테터 방광염(urinary catheter cystitis), 복막 투석(CAPD, chronic ambulatory peritoneal dialysis) 복막염 및 담도 배액관 폐쇄(biliary stent blockage)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 감염증을 유발할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 또한, 상기 바이오필름이 형성될 수 있는 위치로는 봉합, 적출부, 동정맥부, 공막돌출술(scleral buckle) 부위, 콘택트 렌즈, IUD, 기관 튜브, 히크만 카테터(Hickman catheter), 중심 정맥 카테터, 인공 심장 판막, 판막 그레이트, 정형외과 기기, 음경 보형물 등을 예로 들 수 있으며, 기타 다른 예들이 Costerton J et al 및 Costerton J and Steward (2001 Battling Biofilms, Scientific American pp 75-81)에 의한 논문에서 기재되어 있고, 상기 논문은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 기타, 바이오필름이 형성될 수 있는 위치로는, 치주농주(gum disease) 및 강(cavity)으로 진행될 수 있는 충치, 눈 감염으로 진행될 수 있는 콘택트 렌즈, 만성 감염이 될 수 있는 귀 및 폐렴이 될 수 있는 폐를 포함한다.

[0071] 구체적으로, 상기 감염증은 낭성 섬유증일 수 있으며, 이는 피부 감염, 화상 감염 및/또는 상처 감염에 의해 유발될 수 있다. 상기 조성물은 면역력이 저하된 개체에서 감염을 치료하는데 특히 적합하게 사용될 수 있다.

[0072] 한편, 상기 바이오필름은 병원균에 의해 형성될 수 있으며, 이들 병원균은 세균이나 바이러스 등 병인이 되는 미생물을 칭하는 것으로 장관 감염증, 호흡기 감염증, 요로 감염증 등 각종 감염증의 원인균을 의미한다.

[0073] 상기 원인균은 전술한 황색포도상구균, 표피포도상구균, 녹농균, 대장균 및 폐렴구균일 수 있고, 메티실린 내성 황색포도상구균, 반코마이신 내성 장구균 등 항생제 내성 균주일 수도 있다.

[0074] 그 밖에, 상기 원인균의 구체적 예로는 살모넬라균(*Salmonella* spp.), 적리균(*Shigella* spp.), 장염비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*), 콜레라균(*Vibrio cholerae*), 대장균 0-157(*Escherichia coli* 0-157), 캄필로박터(*Campylobacter jejuni*), 위막성 대장염균(*Clostridium difficile*), 웰치균(*Clostridium perfringens*), 엘시니아 장염균(*Yersinia enterocolitica*), 피로리균(*Helicobacter pylori*), 아메바 적리균(*Entamoeba histolytica*), 세레우스균(*Bacillus cereus*), 보툴리누스균(*Clostridium botulinum*), 인플루엔자균(*Haemophilus influenzae*), 클라미디아 폐렴균(*Chlamidia pneumoniae*), 레지오넬라 폐렴균(*Legionella pneumoniae*), 부란하멜라균(*Branhamella catarrhalis*), 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*), 마이코플라즈마(*Mycoplasma pneumoniae*), A형 용련균(*Streptococcus pyogenes*), B형 용련균(*Streptococcus agalactiae*), 디프테리아균(*Corynebacterium diphtheriae*), 백일해균(*Bordetella pertussis*), 움병균(*Chlamidia psittaci*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 엔테로박터(*Enterobacter* spp.), 프로테우스속(*Proteus* spp.), 아시네토박터(*Acinetobacter* spp.), 장구균(*Enterococcus faecalis*) 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 이와 같이 상기 양막 추출물 및/또는 용모막 추출물이 박테리아의 성장을 억제하여 이들로부터 형성되는 바이오필름을 억제할 수 있기 때문에, 이들 막 추출물은 항균용 조성물 뿐만 아니라, 특정 재질을 보호하기 위한 코팅 조성물로도 적용될 수 있다. 구체적으로, 상기 코팅 조성물은 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물에 코팅될 수 있다.

[0076] 상기 의료기기로는 진찰 및 진단기기(Consultation & diagnosis equipment), 임상검사기기(Clinical examination equipment), 방사선관련기기(Radiology equipment), 수술관련기기 및 장비(Surgical apparatus & equipment), 치료관련기기(Cure apparatus & equipment), 재활의학 및 물리치료기(Physiotherapy apparatus), 안과관련기기(Ophthalmic apparatus), 치과관련기기(Dental apparatus), 중앙공급실 관련기기(Central supply equipment), 병원설비 및 응급장비(Hospital accommodation & emergency equipment), 한방관련기기(Oriental medicine & equipment), 제약관련기기(Pharmaceutical equipment), 비만 및 건강관련기기(Obesity cure & healthcare equipment), 의료용품, 소모품 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] 상기 의료용 재료는 그 재질에 따라 금속재료, 무기재료, 고분자재료, 복합재료 등으로 구분될 수 있다. 금속재료는 코발트계, 크롬계, 스테인레스스틸계, 티타늄계 및 탈탄계 등으로 구분되며, 무기재료는 생체유리(bioglass) 및 세라믹계 등이 포함되고, 고분자재료에는 천연 고분자재료, 바이오플라스틱, 합성고분자재료, 합성고무, 합성섬유 등이 포함되며, 의료용 복합재료는 섬유강화플라스틱(Fiber reinforced plastics)계, 유리섬유, 탄소섬유 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 상기 의료용 이식물(medical implants)에는 도뇨관(catheter)처럼 매우 간단한 것부터 인공장기(artificial organs)나 감지기(sensors)와 같이 매우 복잡하고 정교한 장치까지 다양한 이식물들이 포함될 수 있다.

그러나, 질병의 치료나 생활의 불편함을 해소시켜 주기 위해 환자의 피하에 이식하는 의료용 이식물이 본래의 의도와는 달리 환자의 생명을 위협하는 원인이 되기도 하는데, 이는 의료용 이식물을 환자에게 이식하는 과정에서 심각한 감염이 발생할 수 있기 때문이다. 병원에서 발생한 감염증의 절반 이상이 의료용 장치의 이식과 관련 있으며, 의료용 이식물의 구체적 예로는, 혈관 내 인공 삽입물, 스텐트, 심장 스텐트, 말초 스텐트, 정형외과용 이식물, 뼈 또는 관절 보형물, 인공 심장, 인공 심장 밸브, 피하 및/또는 근육 내 이식물을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0079] 상기 의료기기의 표면은 고분자재료 또는 금속재료가 바람직할 수 있다. 상기 고분자재료는 의료활동에 쓰이는 고분자재료 즉, 진단과 치료를 포함한 각종 의료행위에 쓰이는 의료기구나 신체 일부를 대신하기 위해 인공장기로 사용되는 중합체를 의미한다. 활용되는 분야로는 수혈용 주머니를 비롯한 수혈용 장비, 주사기, 소프트 콘택트렌즈, 인공신장용 필터, 요도, 심장의 판막, 인공 혈관, 뼈, 피부, 힘줄, 귀, 턱, 안구, 치아 및 치아 충전제 등이 있다. 사용되는 물질로는 폴리염화비닐, 폴리에틸렌, 천연고무, 실리콘고무, 폴리프로필렌, 폴리우레탄 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 금속재료는 스테인리스강, 코발트합금, 타이타늄합금, 금속생체재료, 코발트크롬합금, 티타늄합금, 탄탈륨, 형상기억합금(Shape memory alloys) 등을 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0081] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 태반으로부터 융모막 및 상피세포층을 포함하는 양막 중 하나 이상의 막을 분리하는 단계; 상기 분리된 막을 항생제가 첨가된 인산완충식염수(PBS, Phosphate Buffer Saline) 또는 생리식염수로 세척하는 단계; 상기 세척된 막을 분쇄하는 단계; 상기 분쇄된 막 및 완충용액을 혼합하고, 8시간 내지 24시간 동안 추출하는 단계; 및 추출물의 상층액을 수집 및 여과하여 막 추출물을 수득하는 단계;를 포함하는, 항균용 조성물의 제조방법이 제공된다.

[0082] 상기 조성물은 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 폐렴구균(*Streptococcus pneumonia*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 균주에 대한 항균 활성을 가질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0083] 또한, 상기 조성물은 항생제 내성 균주에 대한 항균 활성을 가질 수 있다. 구체적으로, 상기 항생제 내성 균주는 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), 반코마이신 내성 장구균(VRE, Vancomycin resistant *Enterococcus*), 항생제 내성 대장균(*Escherichia coli*), 항생제 내성 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 항생제 내성 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 및 항생제 내성 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 균주일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 각 균주의 구체적인 종류 및 이들의 특징은 전술한 것과 같다.

[0084] 한편, 상기 조성물은 단순 항균 효과 외에도 상기 균주들이 밀집되어 바이오필름이 형성되는 것을 억제할 수 있다. 상기 바이오필름 형성의 원인균 및 이에 의해 유발되는 감염증에 관해서는 전술한 것과 같다.

[0085] 종래에는 양막을 생체막의 형태 또는 분쇄물로 사용하고자 하는 경우, 염증반응으로 인한 부작용 또는 콜라겐 층과 세포 층으로 인한 부작용을 방지하고자, 양막의 상피세포층과 융모막을 제거하는 단계를 포함하였다. 그러나, 양막의 상피세포층과 융모막에는 다양한 성장인자뿐 아니라 항균성 물질들이 다량 포함되어 있으므로, 본 발명자들은 상피세포층을 제거하지 않은 양막 뿐만 아니라 융모막을 단독 또는 혼합 사용하여 추출물을 제조하였다.

[0087] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0089] 실시예 1: 양막 추출물 및 융모막 추출물 제조

[0090] 태반의 탯줄을 중심으로 칼집을 내어 양막을 태반으로부터 박리하여 채취하였다. 채취한 양막을 1% 페니실린/스트렙토마이신 항생제가 첨가된 PBS 또는 생리식염수로 세척하였다. 양막의 점액질과 혈액을 제거한 후 균질기(homogenizer)를 이용하여 분쇄시키고, 양막에 대하여 1:1의 중량비로 완충용액 PBS를 넣어 하룻밤 동안 4℃에 방치함으로써 단백질을 방출시켰다. 초음파 분쇄기를 이용하여 단백질을 방출을 보조한 후, 원심분리기를 이용하여 추출물의 상층액을 수집하고 여과멸균(syringe filter)하여 -80℃에 보관하였다. 양막 추출물은 단백질

의 농도를 측정하여 실험에 사용하였다. 동일한 방법을 사용하여, 용모막 추출물을 제조하였다. 도 1은 태반에서 분리한 양막, 용모막, 양막/용모막 복합체 및 양막 추출물과 용모막 추출물을 나타낸 사진이다.

실시예 2: 한천 확산법 및 MIC / MBC (minimal inhibitory concentration/minimal bacterial concentration) 결정 실험 방법

항균 효과를 측정하기 위하여, 한천 플레이트에 균을 접종한 후 항균 조성물을 디스크 또는 종이 스트립의 표면에 배치하여, 박테리아의 성장 정도를 측정하는 한천 확산법을 이용하였다.

보다 구체적으로는, 균을 1 내지 2×10^8 CFU의 ML-1(0.5 맥팔랜드 표준)까지 배양액 배지에서 성장시킨 후, 무균 멸균 면봉을 이용하여 균들을 혈액 한천 플레이트(blood agar plate)에 균일하게 도말하고, 5분 동안 건조시켰다(상기 혈액 한천 플레이트는 5%(v/v)의 양 혈액을 포함(BAPS)). 멸균 디스크에 항생제 조성물, 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 또는 양막/용모막 복합 추출물(AME/CM)을 도포하고 플레이트에 배치한 후 37 °C에서 하룻밤 동안 배양하여 박테리아의 성장 정도를 관찰하였다.

항생제의 최저 농도는 박테리아의 성장을 억제하기 위해 필요한 MIC로 정의되며, 이는 항생제의 2 배 희석액을 미세 적정 플레이트에 균과 함께 접종하고 배양한 후, 다음 날 가시적인 성장을 기준으로 항생제의 최저 농도를 기록함으로써 도출하였다.

보다 구체적으로는, 임상 및 실험실 표준 협회(Clinical and Laboratory Standards Institute) 가이드라인에 따라서 MIC 또는 MBC를 broth micro-dilution method으로 측정하였다.

예를 들면, MHB(황색포도상구균의 배양액)에서 황색포도상구균(*S. aureus*)을 37 °C 조건으로 배양한 후, MHB 배양액을 10배 희석하여 적정 성장 단계까지 37 °C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 적정 수에 도달한 황색포도상구균 배양액을 96웰 플레이트에 넣은 뒤, AME/CME, AME 또는 CME를 첨가하였으며, 아무것도 첨가하지 않은 균을 대조군으로 사용하였다. 이 때, 세균 현탁액에 1×10^5 내지 5×10^5 콜로니 형성 단위(CFU)($1 \sim 5 \times 10^5$ colony-forming units(cfu)/mL)의 최종 농도를 획득하도록 각 추출물을 첨가하였다. 플레이트를 37 °C에서 24 시간 동안 배양하고 박테리아의 성장은 분광 광도계로 600nm(OD600)에서의 광학 밀도를 측정하여 평가 하였다. MIC는 AME/CME, AME 또는 CME 각 균에서 가시적인 성장 최저 농도로 정의하고, MBC는 99.9% 초과(>99.9%)의 초기 접종 감소 관찰 최소 농도로 정의하였다.

실시예 3: 양막 추출물(AME) 농도에 따른 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*S.epidermidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 대장균(*E.coli*)에 대한 항균 효과

양막 추출물의 농도를 각각 64, 128, 256, 512 µg/ml로 준비하였다. 배양되어 준비된 황색포도상구균, 표피포도상구균, 녹농균 및 대장균 각각의 배지에 양막 추출물을 농도별로 처리하여 배양한 후 박테리아의 양을 측정하였다.

표 2

	Control	AME 64 µg/ml	AME 128 µg/ml	AME 256 µg/ml	AME 512 µg/ml	Media only
<i>S. aureus</i> (MRSA 3903)	0.350319	0.340322	0.3489	0.1858	0.0679	0.0621
<i>S. epidermidis</i>	0.31158	0.31125	0.3018	0.064	0.0628	0.0621
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.3846	0.16305	0.0605	0.06016	0.06315	0.0621
<i>E.coli</i>	0.7111	0.060733	0.0593	0.0596	0.0125	0.0621

상기 표 2는 양막 추출물 농도에 따른 박테리아의 양을 나타낸 것이고, 도 2는 상기 표 2를 그래프로 나타낸 것

이다.

[0105] 상기 표 2 및 도 2를 참고하면, 대장균(*E. coli*)에서는 상대적으로 소량인 $64\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 양막 추출물만으로도 항균 효과를 보였으며, 황색포도상구균(*S. aureus*)은 $512\mu\text{g}/\text{ml}$, 표피포도상구균(*S. epidermidis*)은 $256\mu\text{g}/\text{ml}$, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 $128\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 뚜렷한 항균 효과를 확인할 수 있었다.

[0107] **실시예 4: 항생제 감수성, 내성 황색포도상구균(MSSA, MRSA)에 대한 양막 추출물(AME)의 항균 효과**

[0108] 메티실린 감수성 황색포도상구균(MSSA, Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*)과 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*)들을 이용하여, 항생제 감수성/내성균에 대한 양막 추출물의 항균 효과를 확인하였다.

[0109] 상기 실시예 2에 기재된 MIC(minimal inhibitory concentration) 결정 방법에 따라 MIC를 측정한 결과, MSSA 및 MRSA(표 3 및 도 3)에 대한 양막 추출물의 최저 농도는 $128\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 것으로 확인되었다.

표 3

	Control	AME $64\mu\text{g}/\text{ml}$	AME $128\mu\text{g}/\text{ml}$	AME $512\mu\text{g}/\text{ml}$	Media only
MRSA 3108	0.3415	0.3279	0.0775	0.067	0.0479

[0113] 이에 따라, 준비된 MSSA 29213, MRSA 3912, MRSA 3807, MRSA 3969, MRSA 3108 각각의 배지에 양막 추출물 $128\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하여 배양한 후 박테리아의 양을 측정하였다.

표 4

	Control	AME $128\mu\text{g}/\text{ml}$
MSSA 29213	0.2616	0.0701
MRSA 3912	0.3047	0.0653
MRSA 3807	0.3146	0.064733
MRSA 3969	0.3235	0.0649
MRSA 3108	0.3494	0.0659
Media	0.064	0.065

[0117] 상기 표 4는 양막 추출물 처리에 따른 종류별 박테리아의 양을 나타낸 것이고, 도 4는 상기 표 4를 그래프로 나타낸 것이다.

[0118] 상기 표 4 및 도 4를 참고하면, 준비된 MSSA 및 MRSA의 표준 균주들 모두에서 대조균에 비하여 박테리아 양이 약 20% 미만으로 감소된 것으로 나타나, MSSA 및 MRSA에 대한 양막 추출물의 배양 억제 효과를 확인할 수 있었다.

[0120] **실시예 5: 용모막 추출물(CME) 농도에 따른 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 표피포도상구균(*S. epidermidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 대장균(*E. coli*)에 대한 항균 효과**

[0121] 상기 실시예 3과 같이, 용모막 추출물의 농도를 각각 64 , 128 , 256 , $512\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 준비하였다. 배양되어 준비된 황색포도상구균, 표피포도상구균, 녹농균 및 대장균 각각의 배지에 양막 추출물을 농도별로 처리하여 배양한 후 박테리아의 양을 측정하였다.

표 5

	Control	CME 64 μ g/ml	CME 128 μ g/ml	CME 256 μ g/ml	Media only
S. aureus (MRSA 3903)	0.350319	0.342367	0.346433	0.29366	0.067
S. epidermidis	0.31158	0.3211	0.313	0.28667	0.067
Pseudomonas aeruginosa	0.3846	0.2111	0.0609	0.067	0.067
E.coli	0.7111	0.7298	0.5432	0.06636	0.067

상기 표 5는 용모막 추출물 농도에 따른 박테리아의 양을 나타낸 것이고, 도 5는 상기 표 5를 그래프로 나타낸 것이다.

상기 표 5 및 도 5를 참고하면, 대장균(*E. coli*)에서는 256 μ g/ml 농도의 용모막 추출물이 항균 효과를 보였으며, 황색포도상구균(*S. aureus*)과 표피포도상구균(*S. epidermidis*)은 256 μ g/ml 이상, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)은 128 μ g/ml에서 각각 뚜렷한 항균 효과를 확인할 수 있었다.

실시예 6: 항생제 감수성, 내성 황색포도상구균(MSSA, MRSA) 및 녹농균에 대한 용모막 추출물(CME)의 항균 효과

상기 실시예 4와 같이, 메티실린 감수성 황색포도상구균(MSSA)과 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA) 및 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)을 이용하여, 항생제 감수성/내성균에 대한 양막 추출물의 항균 효과를 확인하였다.

상기 실시예 2에 기재된 MIC(minimal inhibitory concentration) 결정 방법에 따라, MIC를 측정한 결과, MSSA, MRSA 및 녹농균에 대한 용모막 추출물의 최저 농도는 128 μ g/ml인 것으로 확인되었다.

이에 따라, 준비된 MSSA 29213, MRSA 3912, MRSA 3807, MRSA 3969, MRSA 3108 및 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 각각의 배지에 용모막 추출물 128 μ g/ml을 처리하여 배양한 후 박테리아의 양을 측정하였다.

표 6

	Control	CME 128 μ g/ml
MSSA 29213	0.56925	0.0738
MRSA 3912	0.51765	0.0726
MRSA 3807	0.5489	0.06895
MRSA 3969	0.5019	0.07045
MRSA 3108	0.5849	0.0708
Pseudomonas	0.31383	0.0667

상기 표 6은 용모막 추출물 처리에 따른 종류별 박테리아의 양을 나타낸 것이고, 도 6은 상기 표 6을 그래프로 나타낸 것이다.

상기 표 6 및 도 6을 참고하면, 준비된 MSSA, MRSA의 표준 균주들 및 녹농균 모두에서 대조균에 비하여 박테리아 양이 약 20% 미만으로 감소된 것으로 나타나, 용모막 추출물 128 μ g/ml 농도에서 MSSA, MRSA 및 녹농균 배양 억제 효과를 확인할 수 있었다.

[0138] **실시예 7: 항생제 감수성, 내성 황색포도상구균(MSSA, MRSA)에 대한 추출물 종류별 항균 효과**

[0139] 메티실린 감수성 황색포도상구균(MSSA), 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA)에 대한 양막 추출물(AME), 융모막 추출물(CME) 및 양막/융모막 복합 추출물(AME/CME)의 항균 효과를 확인하였다.

[0140] 준비된 MSSA 29213, MRSA 3912, MRSA 3807, MRSA 3969, MRSA 3108의 각 배지에 항생제(Erythromycin) 128 μ g/ml, 양막 추출물 128 μ g/ml, 융모막 추출물 128 μ g/ml, 및 양막/융모막 복합 추출물 128 μ g/ml을 각각 처리한 후, 배양 억제 지역의 크기를 측정하였다.

[0141] 도 7은 추출물 종류에 따른 박테리아 배양 억제 지역을 나타낸 이미지이다. MSSA는 항생제 감수성 균이기 때문에, 항생제(Erythromycin)에 의한 강한 억제 효과를 확인하였으며, 양막 추출물 또는 융모막 추출물에 의해서도 성장 억제 효과를 확인하였다. 특히, 이들 중 양막 추출물에 의한 억제효과가 가장 좋은 것으로 나타났다.

[0142] 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA)은 항생제에 의한 성장 억제 효과를 확인하지 못한 반면, 균주에 따라 다소 차이는 있으나 양막 추출물, 융모막 추출물 또는 양막/융모막 복합 추출물은 모두 MRSA의 배양을 억제하는 것을 확인하였다.

[0144] **실시예 8: 항생제 감수성 황색포도상구균(MSSA), 대장균(*E.coli*) 및 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대한 양막 추출물(AME)의 살균 효과**

[0145] 각각의 균을 준비한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 late log phase까지 TSB 배지 배양하였다. 배양된 배지에 항균 조성물을 첨가하여 배양하였으며, 대조군은 멸균된 물을 사용하였다. 0시간, 3시간, 6시간 후 각 실험군의 세포액을 순차적으로 희석하여 한천 플레이트에 균일하게 도포하였다. CFU 는 37 $^{\circ}$ C에서 플레이트를 하룻밤 배양 한 후 계수함으로써 살균 효과를 측정하였다.

[0146] MSSA에 대한 양막 추출물의 살균 효과를 측정하기 위하여, MSSA 배양 배지를 준비한 후, 양막 추출물 128 μ g/ml를 첨가하고 배양하여 CFU를 측정하였다.

표 7

	MSSA Control	MSSA + AME 128 μ g/ml
0 hrs	5.12 x 10 ⁸	5.13 x 10 ⁸
3 hrs	3.38 x 10 ⁹	1.87 x 10 ⁷
6 hrs	4.00 x 10 ⁹	4.00 x 10 ⁷

[0150] 상기 표 7은 MSSA 균에 대한 양막 추출물의 살균 효과를 나타낸 것이고, 도 8은 상기 표 7을 그래프로 나타낸 것이다. 상기 표 7 및 도 8을 참고하면, 양막 추출물 처리 후 3시간, 6시간 경과 시점에 MSSA 균에 대한 살균 효과를 확인할 수 있다.

[0151] 다음으로, 대장균에 대한 양막 추출물의 살균 효과를 측정하기 위하여, 대장균 배양 배지를 준비한 후, 양막 추출물 128 μ g/ml를 첨가하고 배양하여 CFU를 측정하였다

표 8

	E.coli Control	E. Coli + AME 128 μ g/ml	E. Coli + AME 256 μ g/ml
0 hrs	1.87 x 10 ⁸	1.80 x 10 ⁸	1.75 x 10 ⁸
3 hrs	1.00 x 10 ⁹	1.76 x 10 ⁷	1.00 x 10 ⁶
6 hrs	1.20 x 10 ⁹	5.52 x 10 ⁷	4.00 x 10 ⁵

[0155] 표 8은 대장균에 대한 양막 추출물의 살균 효과를 나타낸 것이고, 도 9는 상기 표 8을 그래프로 나타낸 것이다. 상기 표 8 및 도 9를 참고하면, 양막 추출물의 농도가 증가할수록 살균 효과 또한 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0156] 마지막으로, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대한 양막 추출물의 살균 효과를 측정하기 위하여, 녹농균 배양 배지를 준비한 후, 양막 추출물 128 μ g/ml를 첨가하고 배양하여 CFU를 측정하였다

표 9

	<i>Pseudomonas control</i>	<i>Pseudomonas</i> + AME 128 μ g/ml
0 hrs	2.59 x 10 ⁸	1.20 x 10 ⁸
3 hrs	6.80 x 10 ⁸	5.00 x 10 ⁷
6 hrs	1.16 x 10 ⁹	4.60 x 10 ⁶

[0160] 상기 표 9는 녹농균에 대한 양막 추출물의 살균 효과를 나타낸 것이고, 도 10은 상기 표 9를 그래프로 나타낸 것이다. 상기 표 9 및 도 10을 참고하면, 양막 추출물이 녹농균에 대해서도 효과적인 살균 작용을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0162] 실시예 9: 대장균 (*E.coli*)에 대한 추출물 농도별 항균 효과

[0163] 양막 추출물 및 용모막 추출물의 농도를 각각 32, 64, 128, 256 μ g/ml로 준비하였다. 배양되어 준비된 대장균 배지에 양막 추출물(AME) 또는 용모막 추출물(CME)을 농도별로 처리하여 배양한 후 박테리아의 양을 측정하였다.

표 10

	Control	32 μ g/ml	64 μ g/ml	128 μ g/ml	256 μ g/ml
AME	0.7111	0.617	0.060733	0.0593	0.0596
CME	0.7111	0.7255	0.7298	0.54232	0.066

[0167] 상기 표 10은 양막 추출물 및 용모막 추출물 농도에 따른 대장균 양을 나타낸 것이고, 도 11은 상기 표 10을 그래프로 나타낸 것이다.

[0168] 상기 표 10 및 도 11을 참고하면, 양막 추출물은 64 μ g/ml부터, 용모막 추출물은 256 μ g/ml 부터 대장균 성장 억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0170] 실시예 10: 폐렴구균(*Streptococcus pneumonia*)에 대한 양막 추출물 농도별 항균 효과

[0171] 양막 추출물(AME)을 각각 10, 20, 40, 80, 160, 320 μ g/ml 농도로 준비하였다. 배양되어 준비된 폐렴구균(*Streptococcus pneumonia*) 배지에 양막 추출물을 농도별로 처리하여 배양한 후 박테리아의 양을 측정하였다.

표 11

Control	AME 320 μ g/ml	AME 160 μ g/ml	AME 80 μ g/ml	AME 40 μ g/ml	AME 20 μ g/ml	AME 10 μ g/ml
0.60009	0.0687	0.0703	0.07283	0.2267	0.3781	0.595

표 11은 양막 추출물 농도에 따른 폐렴구균의 양을 나타낸 것이고, 도 12는 상기 표 11을 그래프로 나타낸 것이다. 표 11 및 도 12를 참고하면, 양막 추출물의 농도가 80 μ g/ml 이상인 경우에 폐렴구균에 대한 항균 효과가 월등히 향상되는 것을 확인할 수 있다.

실시예 11: 항생제 내성균(MRSA)에 대한 양수(AF), 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME), 양막(AM), 용모막(CM) 및 용모막 분쇄물(CME crude)의 항균 효과 비교

메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA)에 대하여 양수(AF), 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME), 양막(AM), 용모막(CM) 및 용모막 분쇄물(CME crude) 각각의 항균 효과를 확인하였다.

첫 번째 MRSA 3801 배지에, 양수(AF) 80 μ l, 용모막 추출물(CME) 128 μ g/ml, 양막(AM), 용모막(CM) 및 용모막 분쇄물(CME crude) 128 μ g을 각각 처리한 후, 배양 억제 지역의 크기를 측정하였다.

두 번째 MRSA 3801 의 배지에는, 양수(AF) 80 μ l, 양막 추출물(AME) 128 μ g/ml, 양막(AM), 용모막(CM) 및 용모막 분쇄물(CME crude) 128 μ g을 각각 처리한 후, 배양 억제 지역의 크기를 측정하였다.

도 13은 양수(AF), 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME), 양막(AM), 용모막(CM) 및 용모막 분쇄물(CME crude)의 MRSA에 대한 배양 억제 지역을 나타낸 이미지이다.

도 13을 참고하면, 양막 추출물 및 용모막 추출물의 경우, 동일하거나 유사한 양의 양막, 용모막, 양수 또는 용모막 분쇄물에 비하여 월등한 항균 효과를 나타내었다.

실시예 12: 항생제 내성, 감수성 황색포도상구균(MRSA, MSSA) 및 대장균(E. coli)에 대한 추출물 종류별 항균 효과 비교

상기 실시예 11의 결과를 기초로, 다양한 균주에 대한 각 추출물의 항균 효과를 기존 항생제(Erythromycin, Oxacillin 및 Ampicillin)의 항균 효과와 비교하며 확인하였다.

구체적으로, MRSA 배지, MSSA 배지 및 대장균(E.coli) 배지에 각각 양수(AF) 80 μ l, 양막 추출물(AME) 128 μ g/ml, 용모막 추출물(CME) 128 μ g/ml, 양막(AM) 및 용모막(CM)을 처리하고, 대조군으로 항생제인 Erythromycin, Oxacillin 및 Ampicillin을 각각 128 μ g/ml씩 처리한 후, 배양 억제 지역의 크기를 측정하였다.

도 14는 양수(AF), 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME), 양막(AM), 용모막(CM) 및 항생제(Erythromycin, Oxacillin 및 Ampicillin)의 MRSA, MSSA 및 대장균(E.coli)에 대한 배양 억제 지역을 나타낸 이미지이다.

도 14를 참고하면, 양막 추출물 및 용모막 추출물은 기존의 항생제와 동등 혹은 그 이상의 항균 효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 또한, 항생제 내성균인 MRSA에 대해 Erythromycin, Oxacillin과 달리 Ampicillin은 항균 효과를 나타내었으나, 양막 추출물과 용모막 추출물은 더욱 향상된 항균 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

실시예 13: 추출물의 종류 및 농도에 따른 녹농균(Pseudomonas aeruginosa)의 플랑크토닉 성장(planktonic growth) 억제 효과

녹농균(Pseudomonas aeruginosa)의 플랑크토닉(Planktonic)은 바이오필름과 같은 군집을 형성하기 이전의 상태로, 균들은 군집을 형성하지 않고 개별적으로 존재한다. 통상적으로, 균들은 플랑크토닉 상태로 생존하지만, 영양분이 없거나 환경이 악화되면 바이오필름을 형성한다.

양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 또는 양막/용모막 복합 추출물(AME+CME)의 농도를 각각 8, 16, 32, 64 μ g

/ml로 준비하였다. 배양된 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)의 배지에, 각 추출물을 농도별로 처리하여 배양한 후 녹농균의 양을 측정하였다.

표 12

	Control	8 μ g/ml	16 μ g/ml	32 μ g/ml	64 μ g/ml	Erythromycin 128 μ g/ml
AME	1.14	0.9847	0.7676	0.34147	0.1011	0.06447
CME	1.271	1.428	1.38	1.232	1.1818	0.06447
AME+CME	1.271	1.3529	1.3426	1.2795	0.5136	0.06447

상기 표 12는 추출물의 종류 및 농도에 따른 녹농균의 양을 나타낸 것이고, 도 15는 상기 표 12를 그래프로 나타낸 것이다.

상기 표 12 및 도 15를 참고하면, 낮은 농도의 양막 추출물에서도 녹농균의 성장 억제 효과가 우수하며, 농도가 높아질수록 항생제(Erythromycin)와 유사한 수준의 성장 억제 효과를 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다.

실시예 14: 추출물의 종류 및 농도에 따른 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)의 바이오필름 성장(biofilm growth) 억제 효과

바이오필름 성장 실험을 위해, 24 또는 96웰 폴리스티렌 평면 바닥 미세 적정 플레이트를 사용하였으며, 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 및 양막/용모막 복합 추출물(AME+CME)은 각각 8, 16, 32, 64, 128 μ g/ml의 농도로 준비하였다.

하룻밤 동안 배양된 박테리아(녹농균)를 배양액을 이용하여 1 : 200으로 희석하였다. 이 때, 희석 배양액으로 TSB 배양액을 사용하였다. 배양액으로 희석된 박테리아를 각각 24 또는 96 웰 플레이트로 옮기고, 각각의 웰에 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 또는 양막/용모막 복합 추출물(AME+CME)을 농도별로 첨가하였다.

37℃에서 24시간 동안 배양한 후, 배양액은 버리고 PBS로 3회 세척하였다. 그 후, 플레이트를 15분 동안 크리스탈 바이올렛(0.1 %) 50 μ l로 염색하고, 남은 염색물질은 PBS로 세척하여 제거하였다. 바이오필름에 부착된 크리스탈 바이올렛(CV) 염색물질은 에탄올 200 μ l에 용해시켰다. 570nm(OD570) 흡광도에서 분광 광도계(분자 프로브)를 사용하여 바이오필름 형성 값을 측정 하였다.

표 13

	Control	8 μ g/ml	16 μ g/ml	32 μ g/ml	64 μ g/ml	128 μ g/ml
AME	1.4136	1.1481	1.0588	0.144	0.0874	0.06241
CME	0.5102	0.49186	0.4166	0.4343	0.42	0.3555
AME+CME	0.5102	0.4945	0.5066	0.4271	0.265	0.244

상기 표 13은 추출물의 종류 및 농도에 따른 녹농균의 바이오필름 형성 값을 나타낸 것이고, 도 16은 상기 표 13을 그래프로 나타낸 것이다.

상기 표 13 및 도 16을 참고하면, 양막 추출물, 용모막 추출물 및 양막/용모막 복합 추출물 모두 녹농균에 의한 바이오필름 형성을 효과적으로 억제하였으며, 이들 중 양막 추출물에서 성장 억제 효과가 가장 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0209] 실시예 15: 추출물의 종류 및 농도에 따른 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)의 미리 형성된-바이오필름(pre-established biofilms) 억제 효과 확인

[0210] 바이오필름 성장 실험을 위해, 24 또는 96 웰 폴리스티렌 평면 바닥 미세 적정 플레이트를 사용하였으며, 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 또는 양막/용모막 복합 추출물(AME+CME)은 각각 256 및 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 준비하였다.

[0211] 하룻밤 동안 배양된 박테리아(녹농균)를 배양액을 이용하여 1 : 200으로 희석하였다. 이 때, 희석 배양액으로 TSB 배양액을 사용하였다. 배양액으로 희석된 박테리아를 각각 24 또는 96 웰 플레이트로 옮기고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 24 시간 동안 배양하여 바이오필름을 형성시켰다.

[0212] 형성된 바이오필름 상에 존재하는 플랑크톤 박테리아(planktonic bacteria: 군집을 형성하지 않은 개별 독립적으로 존재하는 부유세균)를 제거하기 위해 PBS 로 세척하였다. 바이오필름 상에 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 및 양막/용모막 복합 추출물(AME+CME)을 각각 농도별로 처리한 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 6시간 동안 추가로 배양 하였다.

[0213] 배양 완료 후, 배양액은 제거하고, 멸균 PBS로 2회 세척하였다. 이후, 플레이트를 15분 동안 크리스탈 바이올렛(0.1 %) 500 μL 로 염색하고, 남은 염색물질은 PBS로 세척하여 제거하였다. 바이오필름에 부착된 크리스탈 바이올렛(CV) 염색물질은 에탄올 200 μL 에 용해시켰다. 570nm(OD570) 흡광도에서 분광 광도계(분자 프로브)를 사용하여 바이오필름 형성 값을 측정하였다.

표 14

	Control	256 $\mu\text{g}/\text{mL}$	512 $\mu\text{g}/\text{mL}$
AME	1.728	0.54465	0.5114
CME	1.8448	0.6845	0.66373
AME+CME	1.8448	0.695	0.6785

[0217] 상기 표 14는 추출물의 종류 및 농도에 따른 바이오필름 형성 값을 나타낸 것이고, 도 17은 상기 표 14를 그래프로 나타낸 것이다.

[0218] 상기 표 14 및 도 17을 참고하면, 이미 형성된 녹농균 바이오필름에 대하여 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 및 양막/용모막 복합 추출물(AME+CME) 모두 바이오필름 억제 및 제거 효과를 나타내었으며, 특히 양막 추출물이 이러한 억제 및 제거 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다.

[0220] 실시예 16: 추출물의 종류 및 농도에 따른 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)의 바이오필름 성장 (biofilm growth) 억제 효과

[0221] 바이오필름 성장 실험을 위해, 24 또는 96 웰 폴리스티렌 평면 바닥 미세 적정 플레이트를 사용하였으며, 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 및 양막/용모막 복합 추출물(AME+CME)은 각각 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 준비하였다. 대조군으로는 항생제(Erythromycin) 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 준비하였다.

[0222] 하룻밤 동안 배양된 박테리아(폐렴구균)를 배양액을 이용하여 1 : 200으로 희석하였다. 이 때, 희석 배양액으로 BHI 배양액을 사용하였다. 배양액으로 희석된 박테리아를 각각 24 또는 96 웰 플레이트로 옮기고, 각각의 웰에 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 또는 양막/용모막 복합 추출물(AME+CME)을 농도별로 첨가하였다.

[0223] 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18시간 동안 배양한 후, 배양액은 버리고 PBS로 3회 세척하였다. 그 후, 플레이트를 15분 동안 크리스탈 바이올렛(0.1 %) 50 μL 로 염색하고, 남은 염색물질은 PBS로 세척하여 제거하였다. 바이오필름에 부착된 크리스탈 바이올렛(CV) 염색물질은 에탄올 200 μL 에 용해시켰다. 570nm(OD570) 흡광도에서 분광 광도계(분자 프로브)를 사용하여 바이오필름 형성 값을 측정 하였다.

표 15

	Control	5ng/ml	10ng/ml	20ng/ml	40ng/ml	80ng/ml	Erythromycin 0.2μg/ml
AME	0.38266	0.3704	0.3643	0.4435	0.1071	0.057	0.0544
CME	0.38266	0.339	0.3387	0.3339	0.402	0.2509	0.0544
AME+CME	0.38266	0.3528	0.3541	0.4524	0.4447	0.0624	0.0544

상기 표 15는 추출물의 종류 및 농도에 따른 폐렴구균의 바이오필름 형성 값을 나타낸 것이고, 도 18은 상기 표 15를 그래프로 나타낸 것이다.

상기 표 15 및 도 18을 참고하면, 양막 추출물(AME), 용모막 추출물(CME) 및 양막/용모막 복합 추출물(AME+CME)은 모두 폐렴구균의 바이오필름 형성을 효과적으로 억제하였으며, 특히 양막 추출물은 80μg/ml 농도에서 항생제 0.2μg/ml 농도와 유사한 수준으로 바이오필름 형성을 억제하는 것을 알 수 있다.

실시예 17: 양막 추출물의 농도에 따른 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)의 미리 형성된-바이오필름(pre-established biofilms) 억제 효과 확인

바이오필름 성장 실험을 위해, 24 또는 96웰 폴리스티렌 평면 바닥 미세 적정 플레이트를 사용하였으며, 양막 추출물(AME)은 256 및 512μg/ml의 농도로 준비하였다. 대조군으로는 항생제(Erythromycin) 128 μg/ml 을 준비하였다.

하룻밤 동안 배양된 박테리아(폐렴구균)를 배양액을 이용하여 1 : 200으로 희석하였다. 이 때, 희석 배양액으로 BHI 배양액을 사용하였다. 배양액으로 희석된 박테리아를 각각 15웰 플레이트로 옮기고, 37℃에서 18시간 동안 배양하여 바이오필름을 형성시켰다.

형성된 바이오필름 상에 존재하는 플랑크토닉 박테리아(planktonic bacteria)를 제거하기 위해 PBS 로 세척하였다. 바이오필름 상에 양막 추출물(AME)을 농도별로 처리한 후, 37℃에서 6시간 동안 추가로 배양 하였다.

배양 완료 후, 배양액은 제거하고, 멸균 PBS로 2회 세척하였다. 이후, 플레이트를 15분 동안 크리스탈 바이올렛(0.1 %) 500μl로 염색하고, 남은 염색물질은 PBS로 세척하여 제거하였다. 바이오필름에 부착된 크리스탈 바이올렛(CV) 염색물질은 에탄올 200μl에 용해시켰다. 570nm(OD570) 흡광도에서 분광 광도계(분자 프로브)를 사용하여 바이오필름 형성 값을 측정하였다.

표 16

Control	AME 128μg/ml	AME 256μg/ml	Erythromycin 128μg/ml
0.2744	0.1124	0.10568	0.10711

상기 표 16은 양막 추출물의 농도에 따른 바이오필름 형성 값을 나타낸 것이고, 도 19는 상기 표 16을 그래프로 나타낸 것이다. 상기 표 16 및 도 19를 참고하면, 양막 추출물(AME)은 이미 형성된 폐렴구균 바이오필름을 효과적으로 억제 및 제거하는 것을 확인할 수 있다.

이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

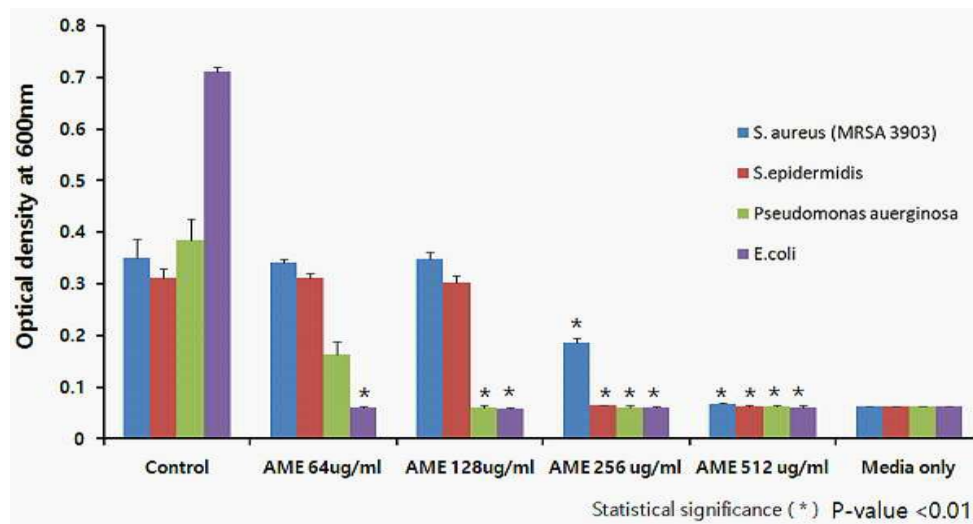
[0241] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

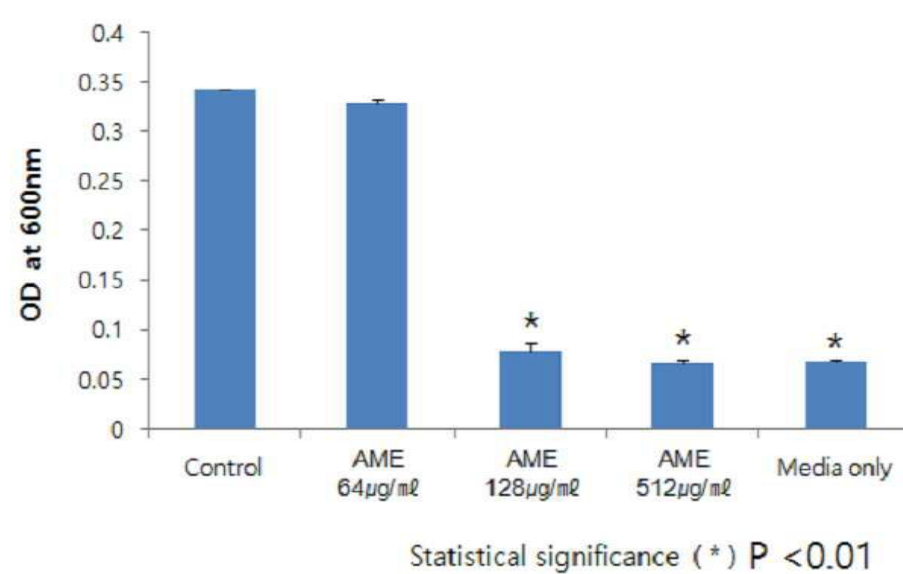
도면1



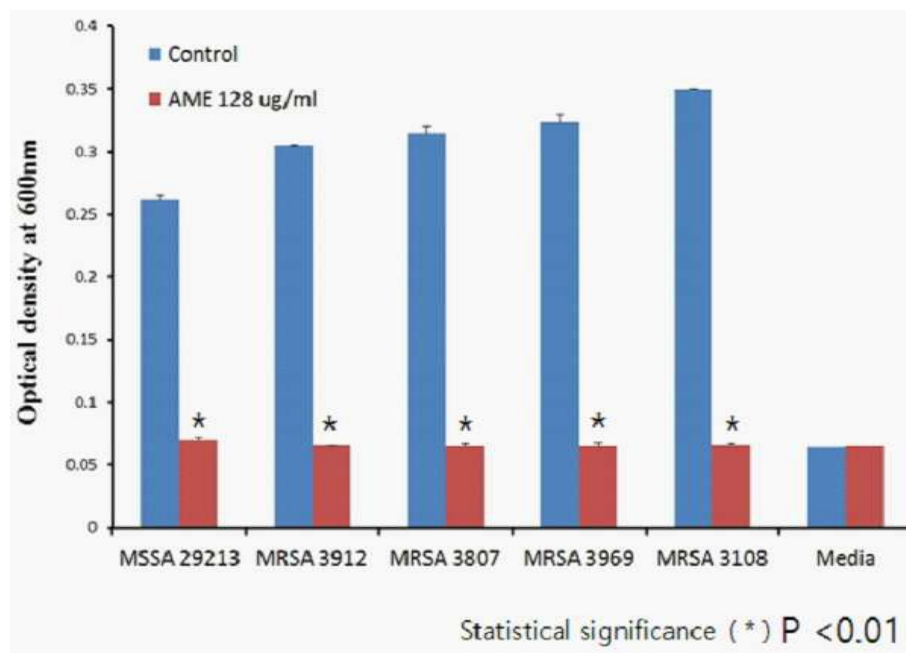
도면2



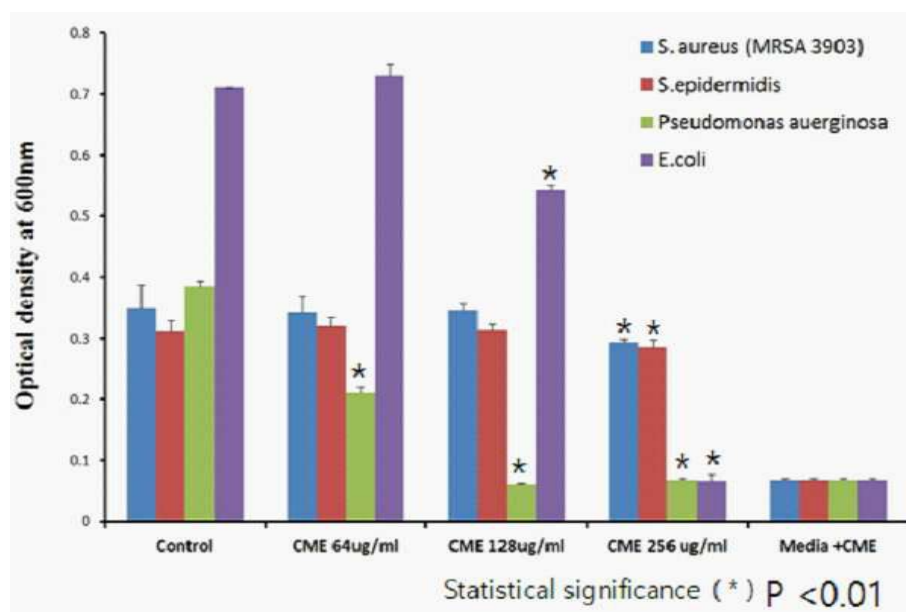
도면3



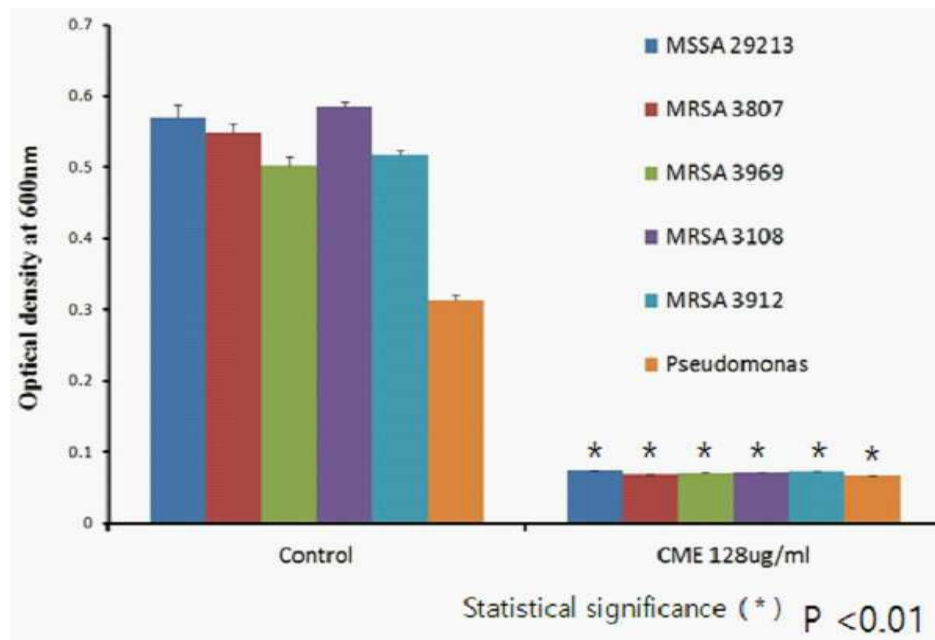
도면4



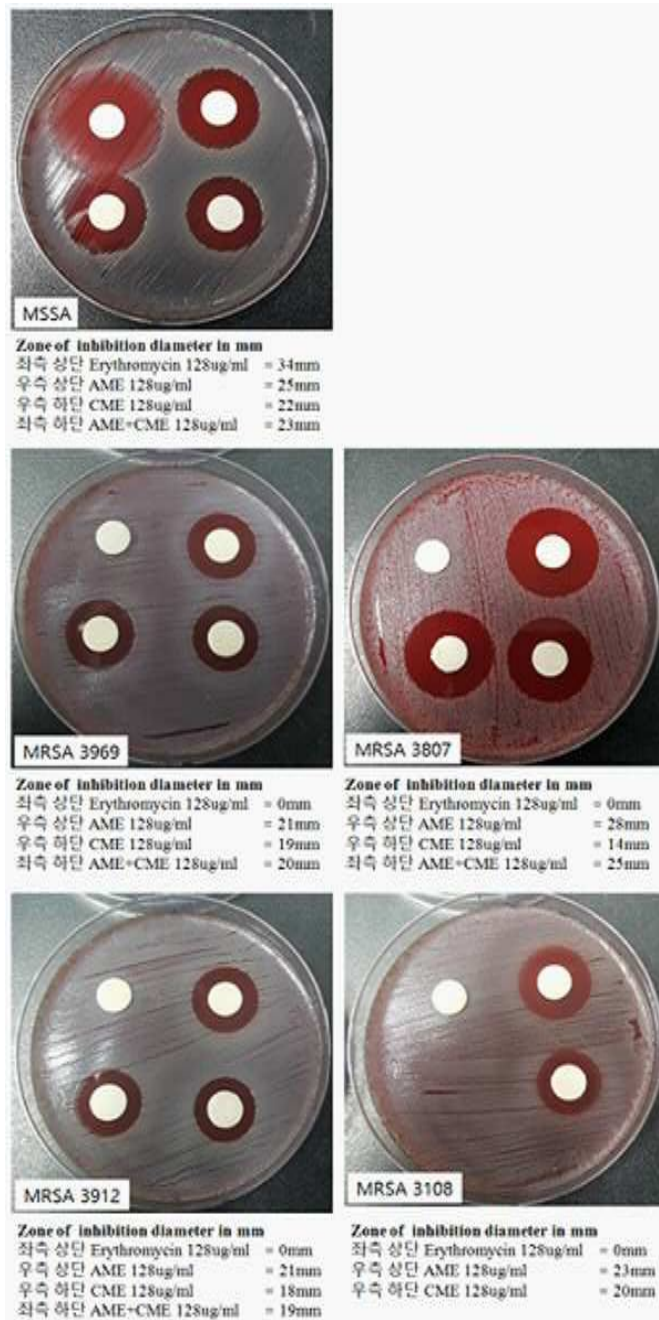
도면5



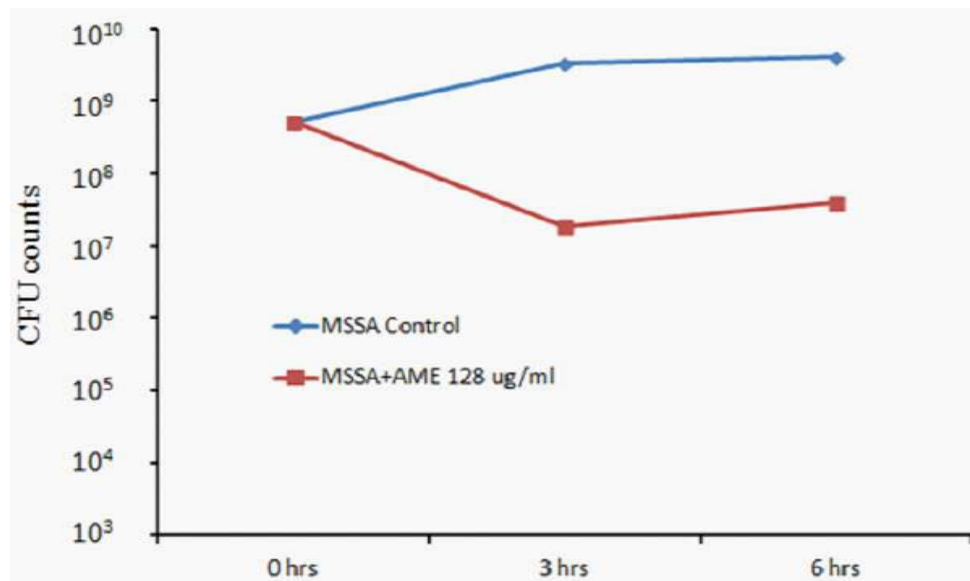
도면6



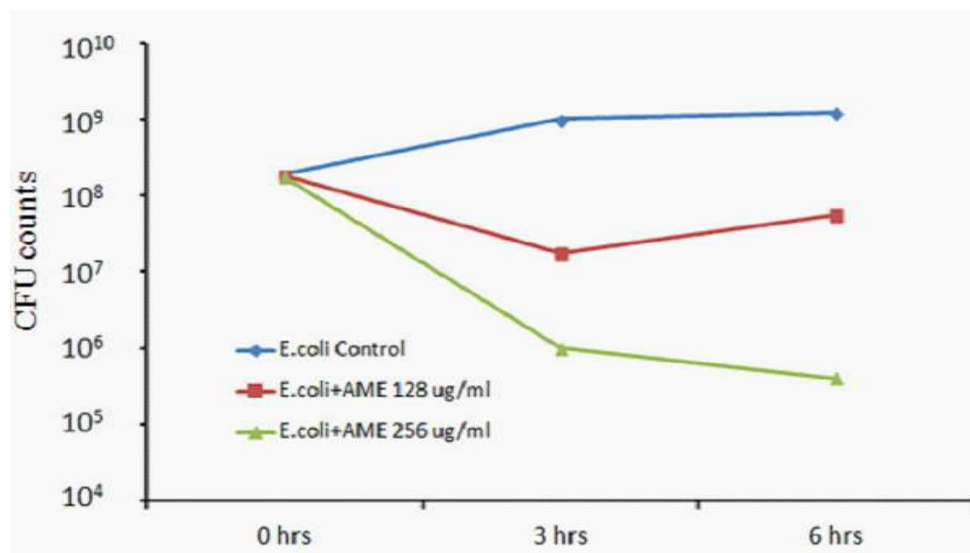
도면7



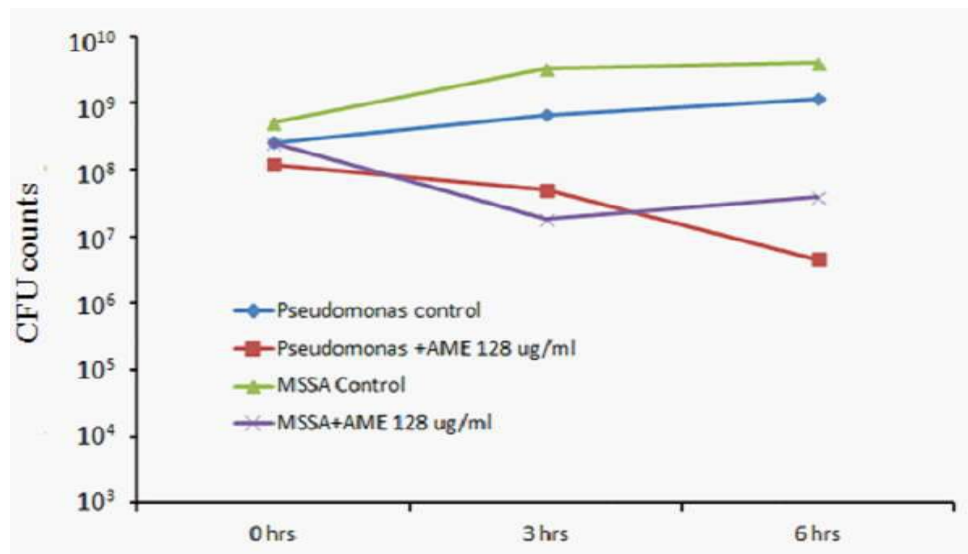
도면8



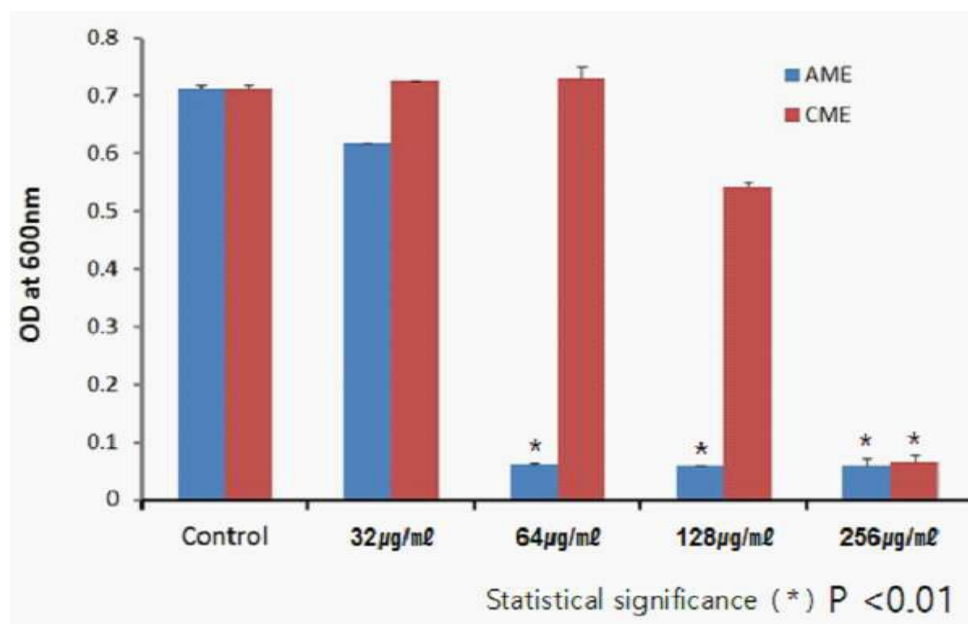
도면9



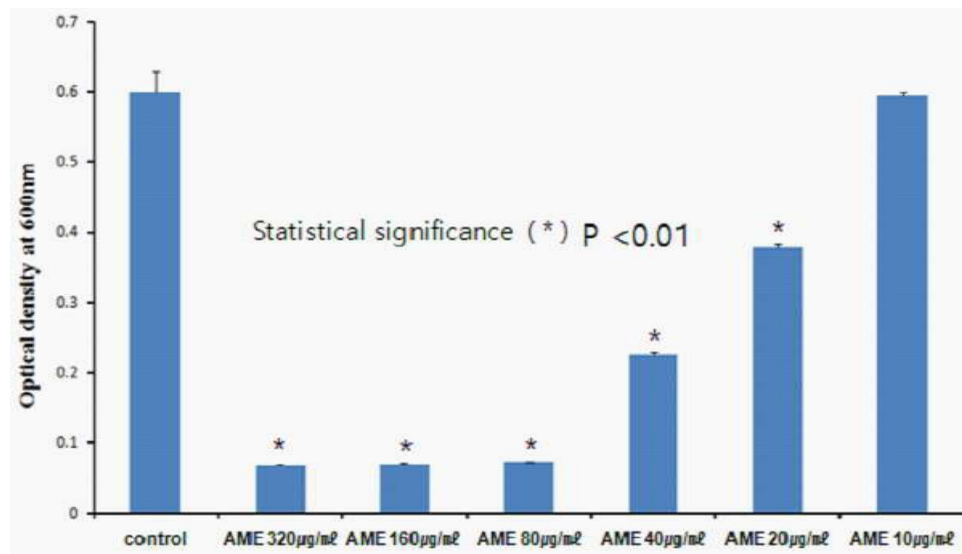
도면10



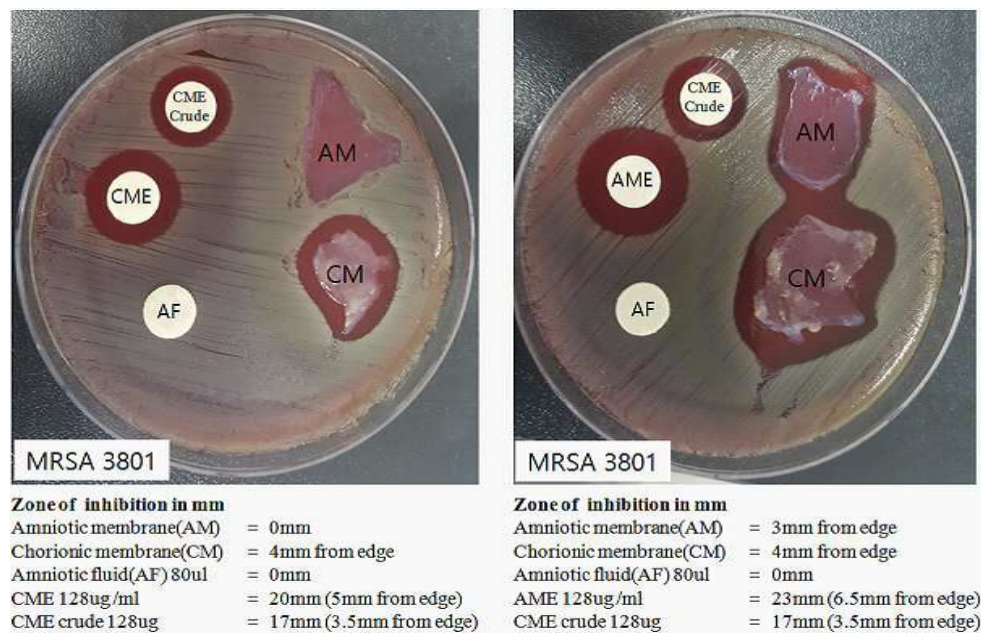
도면11



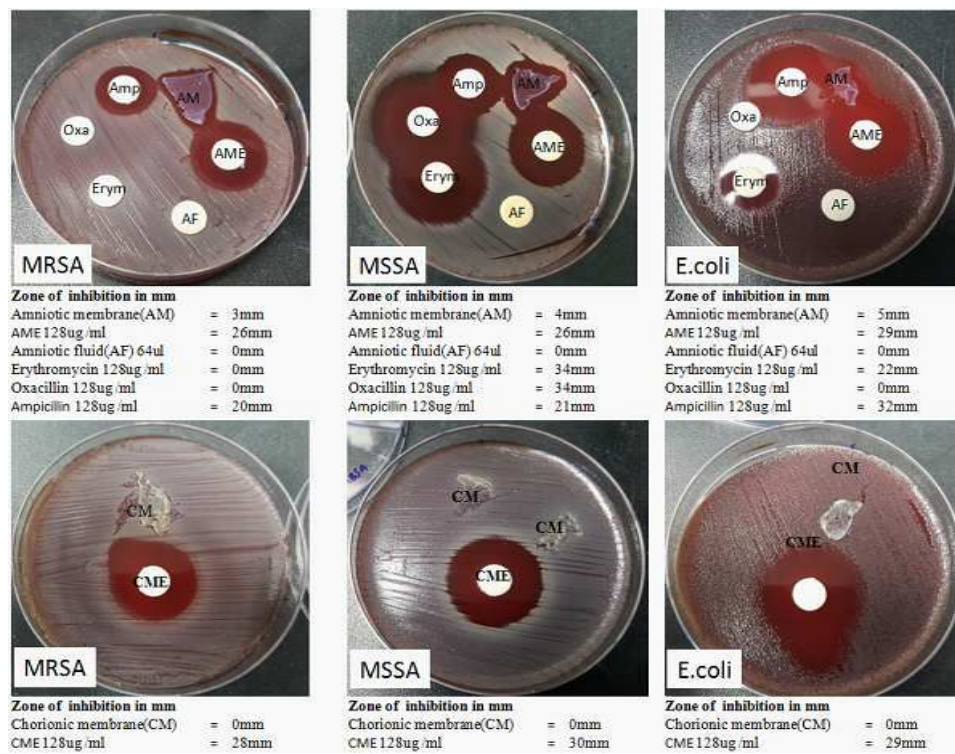
도면12



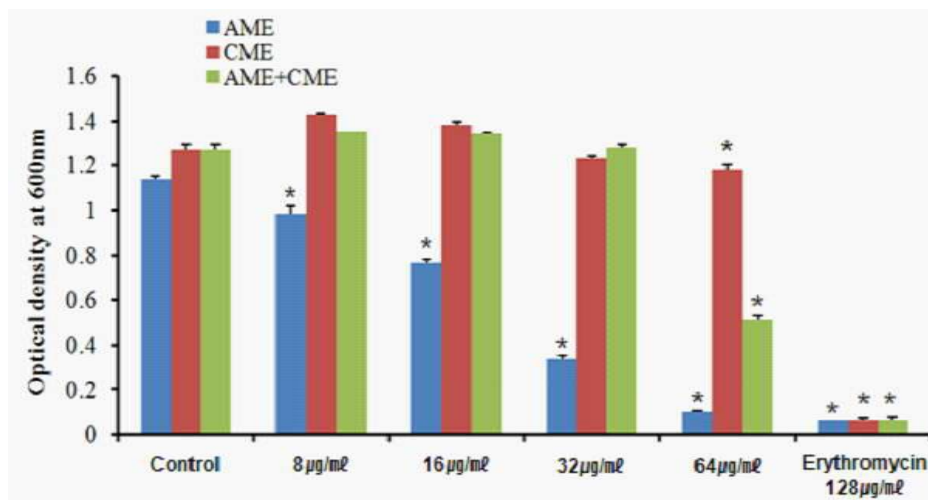
도면13



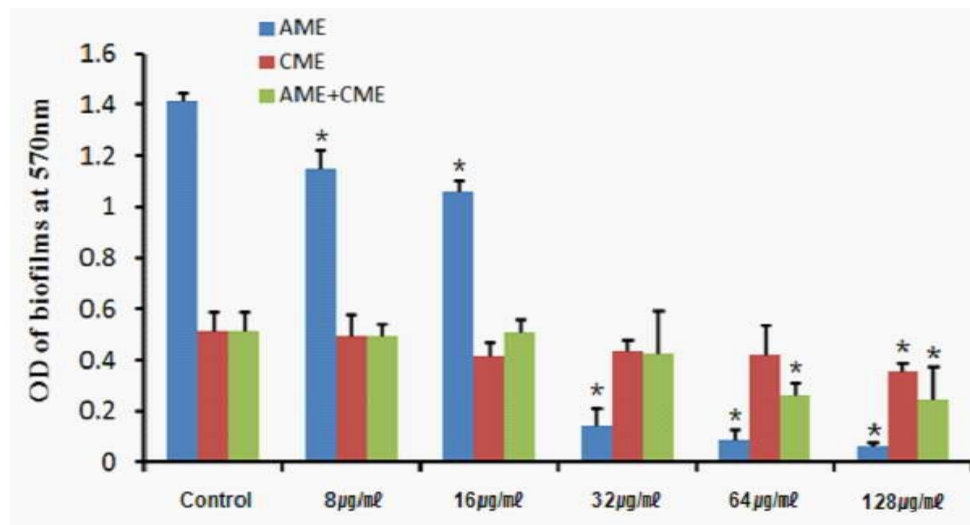
도면14



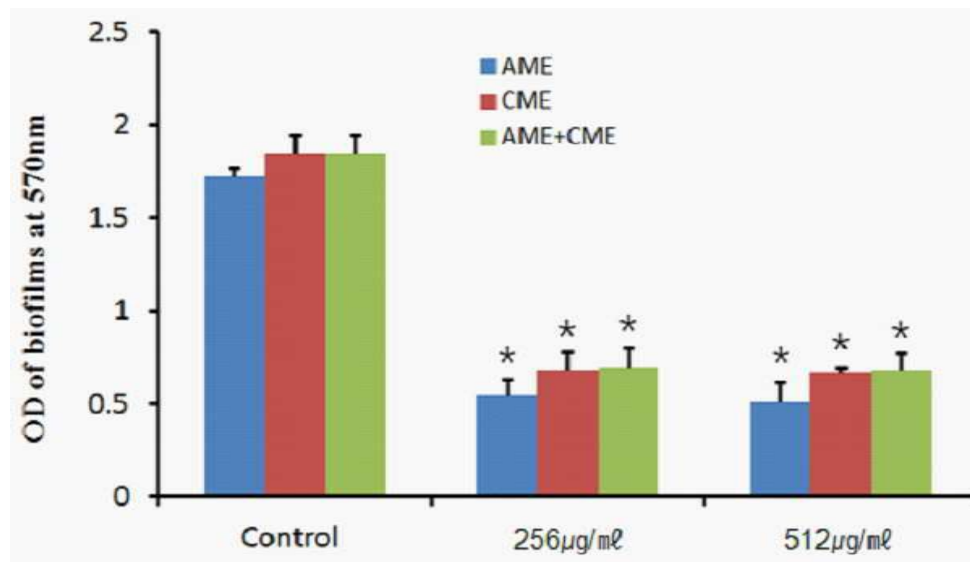
도면15



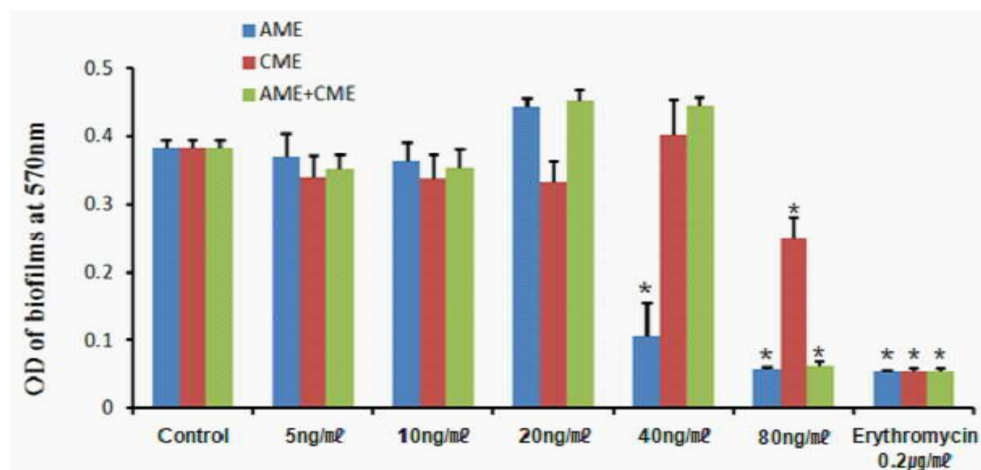
도면16



도면17



도면18



도면19

