(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0110886
(43) 공개일자 2019년10월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/02 (2017.01) *A61K 31/4035* (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01) *A61P 31/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 63/02 (2013.01)
A61K 31/4035 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0032896
(22) 출원일자 2018년03월21일
심사청구일자 2018년03월21일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
미첼 로버트 제임스
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
임한솔
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
최성열
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

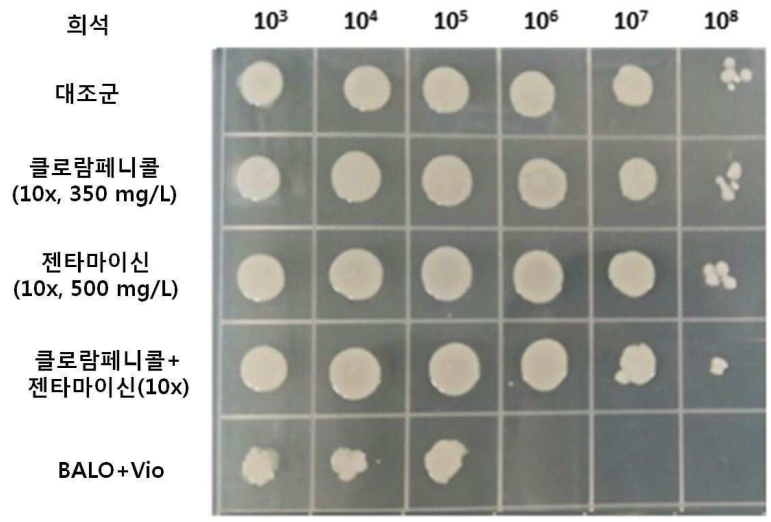
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인을 포함하는 항균 조성물**

(57) 요 약

델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인을 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다. 일 양상에 따른 조성물은 델로비브리오 박테리오보루스과 바이오라세인을 조합하여 사용하는 경우에도 각 항생물질의 항생능이 변하지 않으므로 병용 투여에 적합하다. 또한 항생제 내성균을 억제하거나 다양한 균이 존재하는 환경에서 복합 균주를 동시에 억제하는 항균 효과가 우수하여 항균용 의약외품 조성물이나 균에 의한 감염의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017M1A3A3A02016642
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 우주기초원천기술개발사업
연구과제명 포식성 미생물과 바이오라세인을 이용한 미소중력 환경에서의 다제내성병원균 처리 연구
기 여 율 1/1
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.04.25 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

델로비브리오 박테리오보루스(*Bdellovibrio bacteriovorus*) 및 바이오라세인(violacein)을 포함하는 항균 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 항생제 내성균을 억제하는 것인 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 복합 균주를 억제하는 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 바이오라세인은 20㎎/L 농도로 포함되는 것인 조성물.

청구항 5

델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인을 포함하는 항균용 의약외품 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 항생제 내성균을 억제하는 것인 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 복합 균주를 억제하는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 바이오라세인은 20㎎/L 농도로 포함되는 것인 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인을 포함하는 항균 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항생제 사용의 원칙은 가장 적절한 한 가지 항생제를 사용하는 것이지만, 현실적으로 한 가지 항생제만 사용하기에 곤란한 경우가 있으므로, 항생제를 2종 이상 사용하는 병용 투여를 하기도 한다.

[0003] 항생제의 병용 투여는 중증 감염증의 초기 치료에서 병원체가 확인되기 전까지 효과적인 항균 범위를 확보하기 위해 시행하는 경우, 혼합감염으로 인해 단독 항생제로는 항균 범위를 포괄할 수 없는 경우, 내성균주의 출현을 막기 위한 경우, 항생제 간의 상승작용(synergic effect) 또는 상가작용(additive effect)이 잘 알려진 경우에 수행될 수 있다.

[0004] 최근에는 항생제의 과다 사용으로 인한 항생제 내성 균주의 등장과 혼합감염에 대한 노출의 증가로 인해 항생제의 병용 투여가 더욱 필요해진 실정이다.

[0005] 그러나, 항생제의 병용 투여시, 투여된 두 가지 이상의 항생제가 서로 상호작용을 일으켜 약효의 변화가 일어나거나 부작용을 나타내는 등 약리적 상호작용에 의해 부작용을 나타내는 경우가 많다. 예를 들어, 페니실린은 살균성 항생물질로 클로람페니콜이나 테트라사이클린과 같은 정균성 항생물질과 길항적으로 작용하여 페니실린의 살균작용을 억제할 수 있고, 아미노글리코사이드계의 네오마이신은 다른 항생물질의 흡수를 억제하며 특히 페니

실린계 항생물질의 흡수를 방해할 수 있고, 엠피실린과 린코마이신, 젠타마이신, 카나마이신, 폴리믹신B, 스트렙토마이신 등은 병용 투여시 침전물을 형성할 수 있으므로, 병용 투여는 매우 주의하여 사용해야 한다.

[0006] 따라서, 병용 투여에 따른 부작용을 나타내지 않으면서도 항생능이 우수한 항생물질의 병용 투여 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 병용 투여에 의해 부작용을 나타내지 않으면서도 항균 효과가 우수한 조성물로서, 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

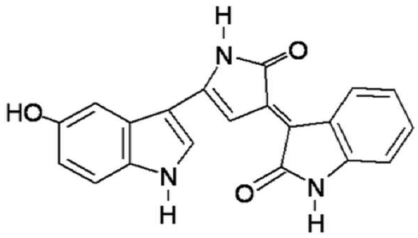
과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 델로비브리오 박테리오보루스(*Bdellovibrio bacteriovorus*) 및 바이오라세인을 포함하는 항균 조성물을 제공한다.

[0009] 본 명세서에서 용어 "델로비브리오 박테리오보루스(*Bdellovibrio bacteriovorus*)"는 분류학적으로 델로비브리오 속에 속하는 그람 음성균 및 호기성 세균을 말하며, 다른 그람 음성균들을 포식하는 포식 미생물이나, 그람 양성균에 대해서는 포식 능력이 거의 없는 것으로 알려져 있다. 델로비브리오 박테리오보루스와 병용 투여하기에 적합한 다른 항생물질에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

[0010] 상기 델로비브리오 박테리오보루스는 델로비브리오 박테리오보루스 HD100(NCBI Genbank 등록번호 BX842601.2), 또는 델로비브리오 박테리오보루스 109J 를 포함할 수 있다.

[0011] 본 명세서에서 용어 "바이오라세인(violacein)"은 박테리아로부터 생산되는 보라색 색소로서, 하기의 화학식을 갖는다:

[0012] 

.

[0013] 바이오라세인은 그람 양성균에 대한 항생 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 그람 음성균에 대한 정균작용이 제한적이거나 존재하지 않는다고 알려져 있다. 바이오라세인은 포유류에 대한 독성이 낮은 장점을 갖는다. 바이오라세인과 병용 투여하기에 적합한 다른 항생물질에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

[0014] 상기 바이오라세인은 *Chromobacterium*, *Collimonas*, *Duganella*, *Iodobacter*, *Janthinobacterium*, *Microbulbifer*, *Pseudoaltermonas* 속에 속하는 종으로부터 직접 분리하여 수득하거나 당업계의 제조업자로부터 수득할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0015] 본 명세서에서 용어 "항균" 또는 "항균 활성"은 세균이나 곰팡이와 같은 미생물에 대해 저항하는 성질을 의미하며, 보다 상세하게는 항생물질 등이 세균의 성장 또는 증식을 억제하는 특성을 의미한다.

[0016] 상기 조성물에서, 항생제에 내성이 없는 균주뿐만 아니라 항생제 내성균을 억제하는 것일 수 있다.

[0017] 상기 항생제 내성균은 다제내성균(multidrug-resistant organism: MDRO)일 수 있다. 본 명세서에서 용어 "다제내성균"은 한 가지 이상의 항생제에 내성을 갖는 균으로, 항생제 내성 그람 음성균 및 항생제 내성 그람 양성균을 포함할 수 있고, 페니실린계 항생제, 메티실린계 항생제, 퀴놀론계 항생제, 반코마이신계 항생제, 카바페넴계 항생제 및 아미노글리코사이드계 항생제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 균주일 수 있다. 구체적으로는 반코마이신내성황색포도상구균(Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: VRSA), 반코마이신내성장구균(Vancomycin-resistant *enterococci*: VRE), 메티실린내성황색포도상구균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA), 다제내성녹농균(Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: MRPA), 다제내성아시네토박터바우마니균(Multidrug-resistant *Acinetobacter Baumanni*: MRAB), 또는 카바페넴내성장내세균속균종(Cabapenem-resistant Enterobacteroceae: CRE)일 수 있으나, 이에 제한되는

것은 아니다.

[0018] 상기 조성물에서, 단일 균주뿐만 아니라, 복합 균주를 억제하는 것일 수 있다.

[0019] 본 명세서에서 용어 "복합 균주"는 두 가지 이상의 균주를 지칭한다. 예를 들어, 그람 양성균 및 그람 음성균을 포함할 수 있다. 개체가 복합 균주에 의해 감염되는 것을 다중감염 또는 복합감염(multiple infection)이라고 한다.

[0020] 상기 그람 양성균은 스타필로코쿠스 속(*Staphylococcus* sp.), 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 스트렙토코쿠스 속(*Streptococcus* sp.) 또는 엔테로코쿠스 속(*Entercoccus* sp.) 균주를 포함할 수 있다.

[0021] 상기 그람 음성균은 살모넬라 속(*Salmonella* sp.), 아시네박터 속(*Acinebacter* sp.), 에스케리아 속(*Escherichia* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) 또는 크렙시엘라 속(*Klebsiella* sp.) 균주를 포함할 수 있다.

[0022] 환경에서의 미생물 균주는 그람 양성균 및 그람 음성균이 혼합되어 있는 것이 대부분이므로, 본 발명의 조성물은 다양한 균주가 혼합되어 있는 환경에도 우수하게 적용될 수 있다.

[0023] 상기 조성물은 균주의 성장 또는 증식을 억제할 수 있다. 예를 들어, 미생물의 세포벽 합성을 억제하거나, 세포막 투과를 변화시켜 세포막 내 에너지원 및/또는 단백질 등을 밖으로 유출시키거나, 단백질의 합성을 억제하거나, 핵산의 합성을 억제하거나, 엽산 합성을 억제하고 미생물의 내부물질을 영양분으로 흡수하여 균주의 성장 또는 증식을 억제하는 것일 수 있다.

[0024] 상기 조성물에서, 바이오라세인 및 델로비브리오 박테리오보루스는 병용 투여(combination)시 각각의 항생물질의 항균능을 감소시키지 않는 것을 특징으로 한다.

[0025] 원인을 알 수 없는 중증 감염을 치료하거거나 치료 효과의 범위를 넓히기 위해, 또는 혼합 감염으로 인하여 항생물질의 단독 투여로는 항균 범위를 포괄할 수 없는 경우 항생물질을 병용 투여 할 수 있다. 그러나, 항생물질을 병용 투여하는 경우 항생물질 사이의 상호 작용에 의해 항생물질의 항균능이 감소하는 등 예측하지 못한 부작용이나 문제점이 발생할 수 있다. 본 발명에 따르면, 바이오라세인 및 델로비브리오 박테리오보루스를 조합하여 처리하는 경우 바이오라세인의 그람 양성균에 대한 항균능과 델로비브리오 박테리오보루스의 그람 음성균에 대한 항균능이 유지된다. 따라서, 상기 조성물은 델로비브리오 박테리오보루스와 바이오라세인이 서로의 항생범위를 보완하여 넓은 스펙트럼의 항생범위를 가질 수 있으므로, 항생제 내성균 또는 복합 균주의 억제를 위한 병용 처리에 적합하다.

[0026] 상기 조성물에서, 델로비브리오 박테리오보루스는 증식하여 항생 활성을 나타내기에 적합한 양으로, 예를 들면 약 10^7 PFU/ml로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 델로비브리오 박테리오보루스는 미생물인 특성상 조성물 내에서 증식할 수 있으므로 당업자에 의해 적절한 범위 내에서 선택되어 바람직한 양으로 조성물 내에 포함될 수 있다.

[0027] 상기 조성물에서, 바이오라세인은 약 20mg/L 농도로 포함되는 것일 수 있다.

[0028] 다른 양상은 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인을 포함하는 항생제 내성균 또는 복합 균주에 의한 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0029] 상기 항생제 내성균 또는 복합 균주에 의한 감염은 통상적인 항생제 내성균 또는 복합 균주에 의한 감염증을 통칭하나, 구체적으로 상기 균의 감염에 의한 질환인 중이염, 폐렴, 인후두염, 편도염, 기관지염, 신우신염, 방광염, 임균성 요도염, 부스럼, 옹종, 모낭염, 연조직염, 감염성 죽종, 피하농양, 생인손, 창상감염, 패혈증, 기관지염, 감염시 기관지 확장증, 만성 호흡기 질환 2차 감염, 폐농양, 농흉, 담관염, 담낭염, 복막염, 신우신염, 바토린선염, 자궁내감염, 자궁부속기염, 골반사강염, 자궁주위염, 악골주위 연조직염, 악염, 수술시 감염증 또는 요도염등을 포함할 수 있다.

[0030] 상기 조성물에서, 바이오라세인 및 델로비브리오 박테리오보루스는 병용 투여시 처리 용량을 감소시킴으로써 단독 투여시보다 독성을 감소시킬 수 있으며 복합 감염 질병이 발생하였을때 보다 효과적으로 작용할 수 있을 뿐 아니라 두 항생물질의 함량을 줄이면서도 병원균에 대한 항균 효력이 우수한 효과가 있어 개체의 질병의 예방과 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0031] 상기 조성물에는 추가적 치료의 효과를 얻기 위하여 항균 활성이 입증된 성분이 추가로 포함될 수 있다. 기존의 다른 항생제 또는 기타의 효능이 입증된 물질과 병용될 경우에는 본 발명의 조성물이 생물막을 억제하거나 분해

해 줌으로 기존 항생제나 기타의 효능이 입증된 물질이 초기 목적대로 효능을 발휘할 수 있게 된다.

[0032] 본 발명에서 조성물의 세균에 대한 감염 치료 용도에 있어, 조성물의 유효 용량은 보통으로 숙련된 의사가 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 특정 용량은 치료하고자 하는 인간을 포함한 동물의 일령 또는 연령, 체중 및 임상 증상과 투여방법에 의해 좌우될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 도포, 분무, 분사 및 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배 설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료에 효과적인 투 여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 통해 투여할 수 있다.

[0033] 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 조성물 은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수도 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를추가 적으로 포함할 수도 있다.

[0034] 본 발명의 조성물의 세균 관련한 질환의 치료에의 활용은 기존의 항생제에 기반한 치료에 비해 추가적 이점을 제공할 수 있다. 본 발명의 일구현예로, 생물막을 형성하는 균주가 생물학적 환경에 존재할 수도 있고 비생물학적 환경에 존재할 수도 있으므로, 델로비브리오 박테리오보로스의 세포 외 단백질 분해 효소를 포함하는 조성물을 생물막을 형성 하는 균주가 존재할 수 있는 환경에 처리하여 생물막의 형성을 억제하거나 제거함으로써 환경 소독 또는 환경 정화를 할 수 있고, 의료기구 등에 처리하는 경우 의료 세정을 할 수 있다. 이러한 목적의 조성물에는 추가적 효과를 얻기 위하여 박테리아에 대해 항균 활성이 입증된 성분이 추가로 포함될 수 있으며, 통상의 소독용, 의료세정용, 환경 정화용 조성물에 들어가는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 이에 한정되는 것은 아니지만 본 발명의 조성물을 스프레이 형태로 생물막 형성을 막고자 하는 부분, 즉 인공관절, 도뇨관 표면, 내시경 또는 상처에 뿌리는 방법으로 사용하는 것을 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 생물막 형성 부위에의 도포, 분무 또는 분사하여 사용할 수도 있다.

[0035] 다른 양상은 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인을 포함하는 항균용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0036] 상기한 바와 같이, 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인을 병용 처리하는 경우, 일반적인 단일 균주나 항생제에 내성이 없는 균주 뿐만 아니라 복합 균주 또는 항생제 내성균에 대해 매우 강한 항균 활성을 가지므로, 항균용 의약외품 조성물로 사용할 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 용어 "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미하며, 피부 외용제 및 개인위생용품도 포함한다. 상기 피부 외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태로 제조되어 사용될 수 있다. 상기 개인위생용품에는 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 비누, 화장품, 물티슈, 휴지, 샴푸, 피부 크림, 얼굴 크림, 치약, 립스틱, 향수, 메이크업, 파운데이션, 볼터치, 마스카라, 아이섀도우, 선스크린 로션, 모발 손질 제품, 에어프레쉬너 겔 또는 세정겔일 수 있다. 또한, 본 발명의 의약외품 조성물의 또 다른 예로 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충진제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제가 있다.

발명의 효과

[0038] 일 양상에 따른 조성물은 포식 미생물과 바이오라세인을 조합하여 사용하는 경우에도 개별 항생물질의 항생능이 변하지 않으므로 병용 투여에 적합하다. 또한 항생제 내성균을 억제하거나 다양한 균이 존재하는 환경에서 복합 균주를 동시에 억제하는 항균 효과가 우수하여 항균용 의약외품 조성물이나 균에 의한 감염의 예방 또는 치료용

조성물에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 *S.aureus, B. cereus, S.epidermidis, A.baumannii, E.coli, K.pneumoniae*에 대한 바이오라세인의 항생능을 평가한 결과이다.

도 2는 *S.aureus, B. cereus, S.epidermidis, A.baumannii, E.coli, K.pneumoniae*에 대한 델로비브리오 박테리오보루스의 항생능을 평가한 결과이다.

도 3은 *A.baumannii*을 델로비브리오 박테리오보루스로 처리하고 바이오라세인이 존재 또는 부존재할 경우 생존능을 측정한 그래프이다.

도 4는 *S.aureus*를 바이오라세인으로 처리하고 델로비브리오 박테리오보루스가 존재 또는 부존재할 경우 생존능을 측정한 그래프이다.

도 5는 *A.baumannii*와 *S.aureus*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 *K.pneumoniae*와 *S.aureus*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 *A.baumannii*와 *S.epidermidis*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 *K.pneumoniae*와 *S.epidermidis*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 *A.baumannii, K.pneumoniae, B. cereus,* 및 *S.aureus*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 혼합 배양체 각각에 클로람페니콜 350mg/L, 젠타마이신 500mg/L, 클로람페니콜과 젠타마이신을 동시에 처리(클로람페니콜+젠타마이신), 델로비브리오 박테리오보루스와 바이오라세인을 동시에 처리(BALO+Vio)하고 24시간 후 생존능을 관찰한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **실시예 1. 미생물 및 항생물질 준비**

[0042] **1.1 미생물 및 배양 조건**

[0043] 항생물질로 처리될 미생물을 다음과 같이 준비하였다. LB 플레이트에 스트리킹으로 접종하고자 하는 미생물을 배양하였다. 사용하는 미생물은 다제내성 임상적 격리된 아시네토박터 바우마니(Multidrug resistant clinical isolated *Acinetobacter baumannii*), 다제내성 임상적 격리된 그렙시엘라 뉴모니아(Multidrug resistant clinical isolated *Klebsiella pneumoniae*), 바실러스 세레우스 ATCC14579(*Bacillus cereus* ATCC14579), 황색포도상구균 ATCC25923(*Staphylococcus aureus* ATCC25923), 표피포도상구균 ATCC14990(*Staphylococcus epidermidis* ATCC14990), 대장균 K12 MG1655(*Escherichia coli* K12 MG1655)이다. 배양된 미생물에서 1개의 콜로니를 채취하고 배양하였다. 배양조건은 50ml 코니컬 튜브에 15mL LB 배양액을 넣고 250RPM, 37℃에서 24시간 배양하였다.

[0044] **1.2 항생물질 준비**

[0045] 항생물질인 포식미생물 및 바이오라세인을 다음과 같이 준비하였다.

[0046] 포식미생물인 델로비브리오 박테리오보루스 HD100(*Bdellovibrio bacteriovorus* HD100)는 DSMZ(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)로부터 구입하였다. 델로비브리오 박테리오보루스를 액체 배양액에 평균 1.0 X 10^9 PFU/ml 포함되도록 준비하였다.

[0047] 바이오라세인은 바이오라세인 생산 균주인 *Duganella violaceinigra* NI28을 사용하여 생산하였다. 구체적으로, *Duganella violaceinigra* NI28을 NA 플레이트게 스트리킹하고 30℃에서 밤새 배양하였다. 단일 콜로니를 영양배지(Difco, USA) 3ml을 포함하는 멸균된 15ml 코니칼 튜브(SPL, Korea)에 옮기고 30℃, 250 rpm에서 밤새 배양하였다. 에어레이션을 증가시키기 위해서, 100 ml 배플 플라스크 내의 신선한 NB 배지 20 ml에 상기 기술한 밤샘 배양액 2ml (10%v/v)을 첨가하고 다시 30℃, 250 rpm에서 48시간 동안 배양하였다.

[0048] 배양 후, 아세톤 보일링 방법(Rodrigues et al., 2013)에 따라 바이오라세인을 추출하였다.

[0049] **실험예 1. 항생물질의 항생능 평가**

[0050] 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인의 항생능을 평가하기 위해서, 상기 실시예 1에서 준비한 *A.baumannii*, *K.pneumoniae*, *B. cereus*, *S.aureus*를 HEPES 완충액(BALO salt 추가됨)에 OD600이 1.0이 되도록 준비하였다. 이때의 CFU는 일반적으로 $1x10^8$에서 $1x10^9$을 나타낸다. 이후 *B.bacteriovorus* HD100은 PPR0.05로 맞추어 처리하고, 바이오라세인은 20mg/L 농도에 맞춰 처리한 후 24시간 이후의 각 미생물의 CFU를 측정하였다.

[0051] 도 1은 *S.aureus, B. cereus, S.epidermidis, A.baumannii, E.coli, K.pneumoniae*에 대한 바이오라세인의 항생능을 평가한 결과이다.

[0052] 도 2는 *S.aureus, B. cereus, S.epidermidis, A.baumannii, E.coli, K.pneumoniae*에 대한 델로비브리오 박테리오보루스의 항생능을 평가한 결과이다.

[0053] 도 1에 나타낸 바와 같이, 24시간 동안 바이오라세인을 처리함에 따라 그람 양성균인 *S.aureus, B. cereus,* 및 *S.epidermidis*의 생존능이 감소하였다.

[0054] 도 2에 나타낸 바와 같이, 24시간 동안 델로비브리오 박테리오보루스를 처리함에 따라 그람 음성균인 *A.baumannii, E.coli,* 및 *K.pneumoniae*의 생존능이 감소하였다.

[0055] 따라서, 그람 양성균에 대해 항생능을 갖는 것으로 알려진 바이오라세인이 그람 양성균인 *S.aureus, B. cereus,* 및 *S.epidermidis*에 대한 항생능을 나타내었고, 그람 음성균에 대해 항생능을 갖는 것으로 알려진 델로비브리오 박테리오보루스가 그람 음성균인 *A.baumannii, E.coli,* 및 *K.pneumoniae*에 대한 항생능을 나타내는 것을 확인하였다.

[0056] **실험예 2. 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인이 서로의 항생능에 미치는 영향 확인**

[0057] 항생물질인 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인을 병용처리할 경우, 서로의 항생능에 상호 간섭을 하는지 확인하기 위해 다음과 같이 병용처리 후 항생능을 평가하였다.

[0058] 그람 음성균인 *A.baumannii*을 델로비브리오 박테리오보루스로 처리하고 바이오라세인이 존재 또는 부존재할 경우 생존능을 측정한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0059] 그람 양성균인 *S.aureus*를 바이오라세인(20mg/L)으로 처리하고 델로비브리오 박테리오보루스가 존재 또는 부존재할 경우 생존능을 측정한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0060] 도 3에 나타낸 바와 같이, 그람 음성균인 *A.baumannii*는 바이오라세인이 존재 여부에 관계 없이 델로비브리오 박테리오보루스에 의해 생존능이 감소한 것을 확인하였다.

[0061] 도 4에 나타낸 바와 같이, 그람 양성균인 *S.aureus*는 델로비브리오 박테리오보루스의 존재 여부에 관계 없이 바이오라세인에 의해 생존능이 감소한 것을 확인하였다.

[0062] 즉, 서로 다른 항생물질인 델로비브리오 박테리오보루스와 바이오라세인은 서로의 항생능에 영향을 주지 않아 단독 처리하는 경우와 동일한 항생능을 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 델로비브리오 박테리오보루스와 바이오라세인은 병용 투여하여도 각각의 항생물질의 선택적 제거능이 변하지 않음을 확인하였다.

[0063] **실험예 3. 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인의 복합 균주에 대한 항생능 확인**

[0064] 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인의 복합 균주에 대한 항생능을 평가하기 위해 다음과 같이 실험하였다.

[0065] **3.1. 2종의 혼합 배양체**

[0066] 상기 실시예 1에서 준비한 *A.baumannii, K.pneumoniae,* 및 *S.aureus*를 BALO(Bdellovibrio-and-like organisms)

염이 추가된 HEPES 완충액에 OD600이 1.0이 되도록 준비하였다. *A.baumannii*와 *S.aureus*의 희석액, 및 *K.pneumoniae*와 *S.aureus*의 희석액을 1:1 비율로 혼합하여 2종의 혼합 배양체를 제조하였다. 혼합 배양체와 단일 미생물에 각각 HEPES만 처리(Control), 바이오라세인만 처리(Violacein), *B.bacteriovorus* HD100만 처리(BALO), 또는 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100을 병용처리(Dual)하였다. 이 때, *B.bacteriovorus* HD100은 PPRO.05로 맞추어 처리하고 바이오라세인은 20mg/L로 처리하였고, 처리 24시간 후에 미생물의 CFU를 측정하였다.

[0067] 도 5는 *A.baumannii*와 *S.aureus*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0068] 도 6은 *K.pneumoniae*와 *S.aureus*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0069] 도 5에 나타낸 바와 같이, 그람 음성균인 *A.baumannii*은 바이오라세인만 처리한 경우 대조군에 비해 생존능의 변화가 없었던 반면 델로비브리오 박테리오보루스만 처리한 경우 및 바이오라세인과 델로비브리오 박테리오보루스를 병용처리한 경우에는 생존능이 유의적으로 감소하였다. 그람 양성균인 *S.aureus*는 델로비브리오 박테리오보루스만 처리한 경우 대조군에 비해 생존능의 변화가 없었던 반면 바이오라세인만 처리한 경우 및 바이오라세인과 델로비브리오 박테리오보루스를 병용처리한 경우에는 생존능이 유의적으로 감소하였다. *A.baumannii*와 *S.aureus*의 혼합 배양체는 바이오라세인과 델로비브리오 박테리오보루스를 단독으로 처리한 경우 생존능이 감소하였으나, 병용처리한 경우에 생존능이 현저히 감소하였다.

[0070] 도 6에 나타낸 바와 같이, 그람 음성균인 *K.pneumoniae*는 바이오라세인만 처리한 경우 대조군에 비해 생존능의 변화가 없었던 반면 델로비브리오 박테리오보루스만 처리한 경우 및 바이오라세인과 델로비브리오 박테리오보루스를 병용처리한 경우에는 생존능이 유의적으로 감소하였다. 그람 양성균인 *S.aureus*는 델로비브리오 박테리오보루스만 처리한 경우 대조군에 비해 생존능의 변화가 없었던 반면 바이오라세인만 처리한 경우 및 바이오라세인과 델로비브리오 박테리오보루스를 병용처리한 경우에는 생존능이 유의적으로 감소하였다. *K.pneumoniae*와 *S.aureus*의 혼합 배양체는 바이오라세인과 델로비브리오 박테리오보루스를 단독으로 처리한 경우 생존능이 감소하였으나, 병용처리한 경우에 생존능이 현저히 감소하였다.

[0071] 따라서, 바이오라세인과 델로비브리오 박테리오보루스를 병용처리하는 경우, 단독처리에 비해서 그람 양성균과 그람 음성균이 혼합된 2종의 혼합 배양체를 효과적으로 항생할 수 있음을 확인하였다.

[0072] 추가적으로 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에서 준비한 *A.baumannii*, *K.pneumoniae*, 및 *S.epidermidis*를 BALO(Bdellovibrio-and-like organisms) 염이 추가된 HEPES 완충액에 OD600이 1.0이 되도록 준비하였다. *A.baumannii*와 *S.epidermidis*의 희석액, 및 *K.pneumoniae*와 *S.epidermidis*의 희석액을 1:1 비율로 혼합하여 2종의 혼합 배양체를 제조하였다. 혼합 배양체와 단일 미생물에 각각 HEPES만 처리(Control), 또는 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100을 병용처리(Dual Treatment)하였다. 이 때, *B.bacteriovorus* HD100은 PPRO.05로 맞추어 처리하고 바이오라세인은 20mg/L로 처리하였고, 처리 24시간 후에 미생물의 CFU를 측정하였다.

[0073] 도 7은 *A.baumannii*와 *S.epidermidis*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0074] 도 8은 *K.pneumoniae*와 *S.epidermidis*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0075] 도 7에 나타낸 바와 같이, 그람 음성균인 *A.baumannii*, 그람 양성균인 *S.epidermidis* 및 복합 배양체 모두 바이오라세인과 델로비브리오 박테리오보루스를 병용처리에 의해 생존능이 유의적으로 감소하였다.

[0076] 도 8에 나타낸 바와 같이, 그람 음성균인 *K.pneumoniae*, 그람 양성균인 *S.epidermidis* 및 복합 배양체 모두 바이오라세인과 델로비브리오 박테리오보루스를 병용처리에 의해 생존능이 유의적으로 감소하였다.

[0077] **3.2. 4종의 혼합 배양체**

[0078] 상기 실시예 1에서 준비한 *A.baumannii*, *K.pneumoniae*, *B. cereus*, 및 *S.aureus*를 BALO(Bdellovibrio-and-like organisms) 염이 추가된 HEPES 완충액에 OD600이 1.0이 되도록 준비하였다. 각각의 미생물의 희석액을 1:1:1:1 비율로 혼합하여 4종의 혼합 배양체를 제조하였다. 혼합 배양체에 HEPES만 처리(Control), 바이오라세인만 처리(Violacein), *B.bacteriovorus* HD100만 처리(BALO), 또는 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100을 병용처리(Dual)하였다. 이 때, *B.bacteriovorus* HD100은 PPRO.05로 맞추어 처리하고 바이오라세인은 20mg/L로 처리하였

고, 처리 24시간 후에 미생물의 CFU를 측정하였다.

[0079] 도 9는 *A.baumannii*, *K.pneumoniae*, *B. cereus*, 및 *S.aureus*의 혼합 배양체에 대한 바이오라세인 및 *B.bacteriovorus* HD100의 병용처리 효과를 확인하기 위해 CFU를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0080] 도 9에 나타낸 바와 같이, 바이오라세인 또는 델로비브리오 박테리오보루스를 단독으로 처리한 경우와 병용처리한 경우 모두 대조군에 비해서 혼합 배양체의 생존능이 감소하였다. 특히 바이오라세인 및 델로비브리오 박테리오보루스를 병용처리한 경우에 혼합 배양체의 생존능이 가장 낮게 관찰되었다.

[0081] 따라서, 바이오라세인 및 델로비브리오 박테리오보루스는 병용처리할 경우 서로의 항생능에 영향을 주지 않고 4종 이상의 혼합 배양체를 효과적으로 항생할 수 있음을 확인하였다.

[0082] **실험예 4. 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인의 다제내성균에 대한 항생능 확인**

[0083] 델로비브리오 박테리오보루스 및 바이오라세인의 다제내성균에 대한 항생능을 평가하기 위해서 하기와 같이 실험하였다. 실시예 1에 기재한 바와 동일하게 준비된 다제내성 *A.baumannii*와 다제내성 *S.aureus*를 1:1로 혼합하여 혼합 배양체를 준비하였다.

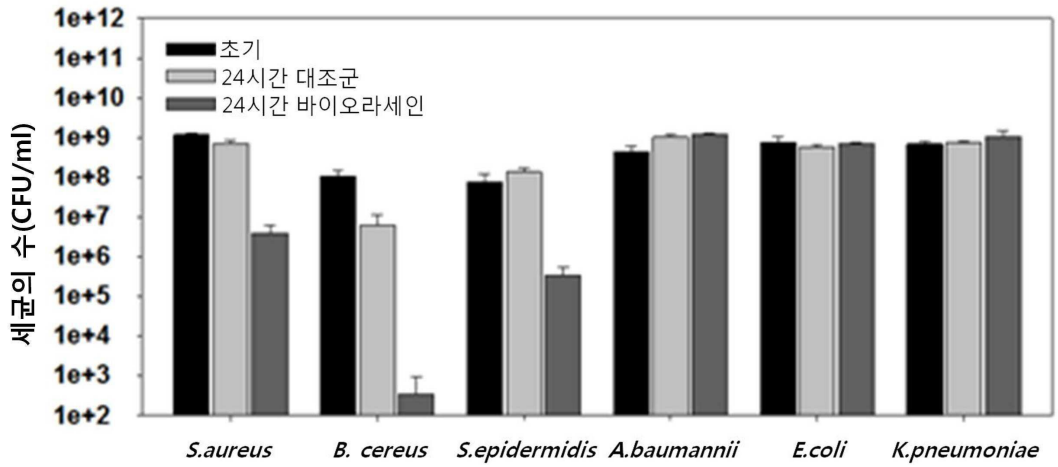
[0084] 혼합 배양체를 LB 한천배지에 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8로 희석하여 분주하였다. 분주된 혼합 배양체 각각에 클로람페니콜 350mg/L, 젠타마이신 500mg/L, 클로람페니콜과 젠타마이신을 동시에 처리(클로람페니콜+젠타마이신), 델로비브리오 박테리오보루스와 바이오라세인을 동시에 처리(BALO+Vio)하고 24시간 후 생존능을 관찰하고 사진을 도 10에 나타내었다.

[0085] 도 10에 나타낸 바와 같이, 기존의 항생제인 클로람페니콜, 젠타마이신을 고농도로 처리하는 경우에 10^7 또는 10^8로 희석할 때 다제내성균의 혼합 배양체의 생존능이 감소하였음을 확인하였다. 반면, 이에 비해서 델로비브리오 박테리오보루스와 바이오라세인을 병용처리하는 경우는 10^3로 희석한 경우부터 다제내성균의 혼합 배양체의 생존능이 감소하였음을 확인하였다.

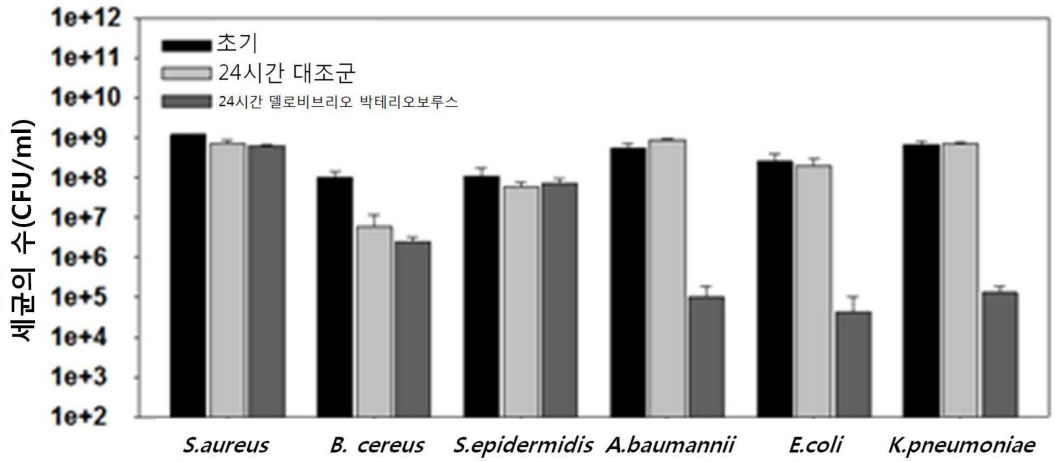
[0086] 따라서, 델로비브리오 박테리오보루스와 바이오라세인을 포함하는 조성물은 기존 항생제의 고농도 처리에 비하여 다제내성균의 혼합 배양체에 대한 항균활성이 우수한 것을 알 수 있다.

도면

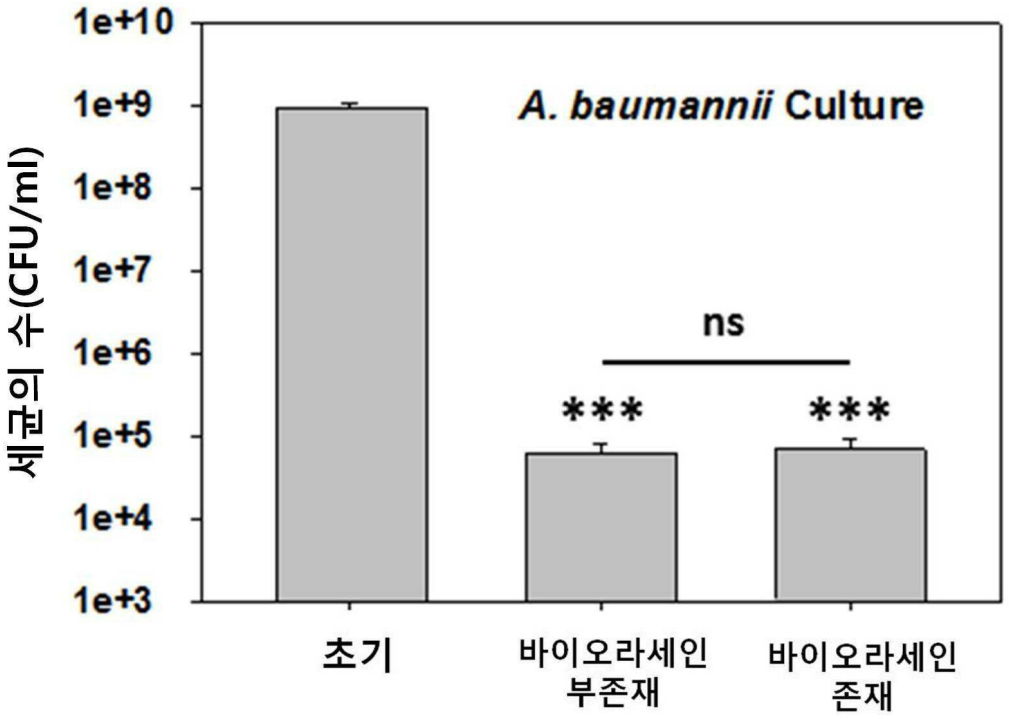
도면1



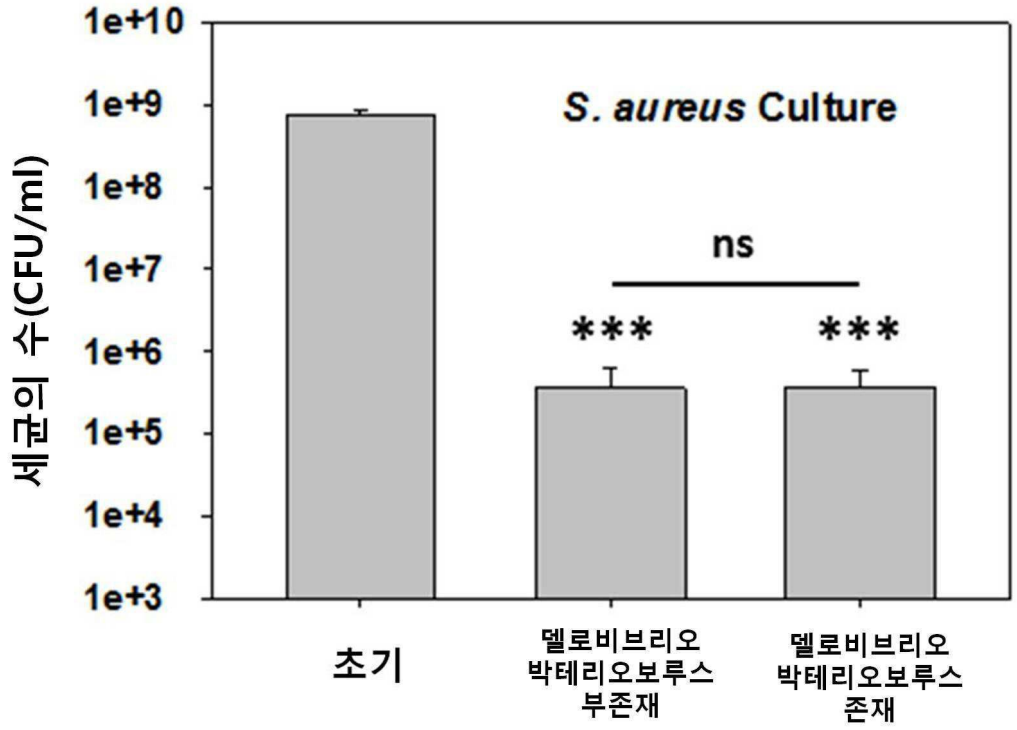
도면2


1e+12
1e+11
1e+10
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
1e+3
1e+2
세균의 수(CFU/ml)
초기
24시간 대조군
24시간 델로비브리오 박테리오보루스
S.aureus
B. cereus
S.epidermidis
A.baumannii
E.coli
K.pneumoniae

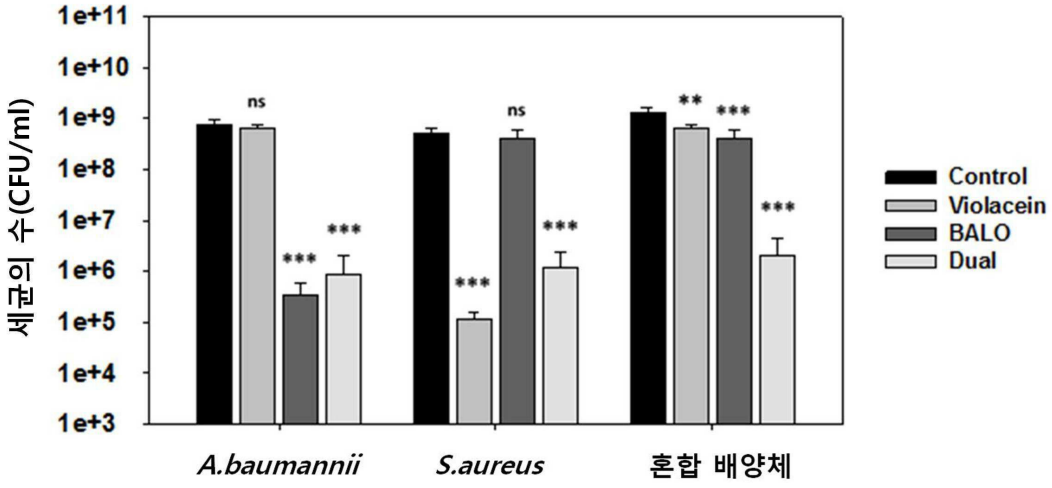
도면3


1e+10
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
1e+3
세균의 수(CFU/ml)
A. baumannii Culture
ns
***
***
초기
바이오라세인 부존재
바이오라세인 존재

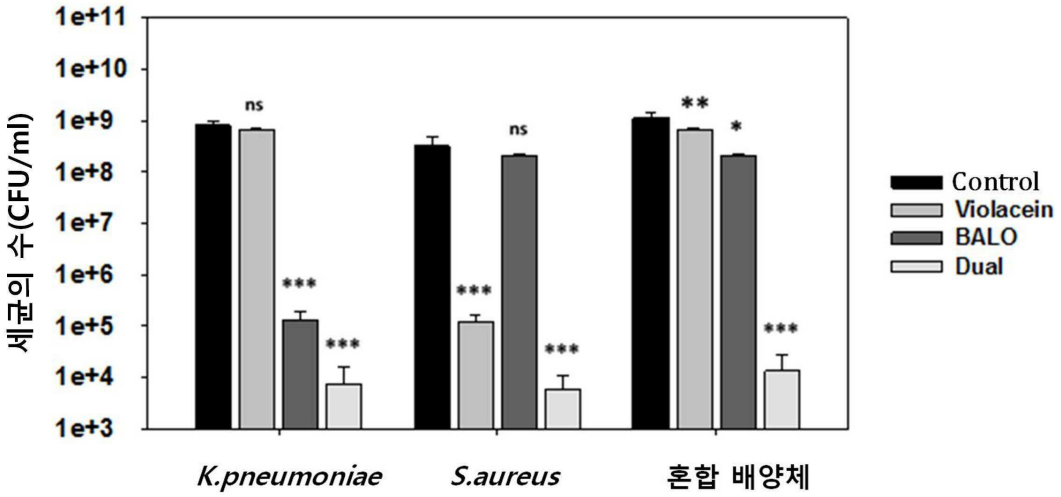
도면4


1e+10
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
1e+3
세균의 수(CFU/ml)
S. aureus Culture
ns
***
***
초기
델로비브리오 박테리오보루스 부존재
델로비브리오 박테리오보루스 존재

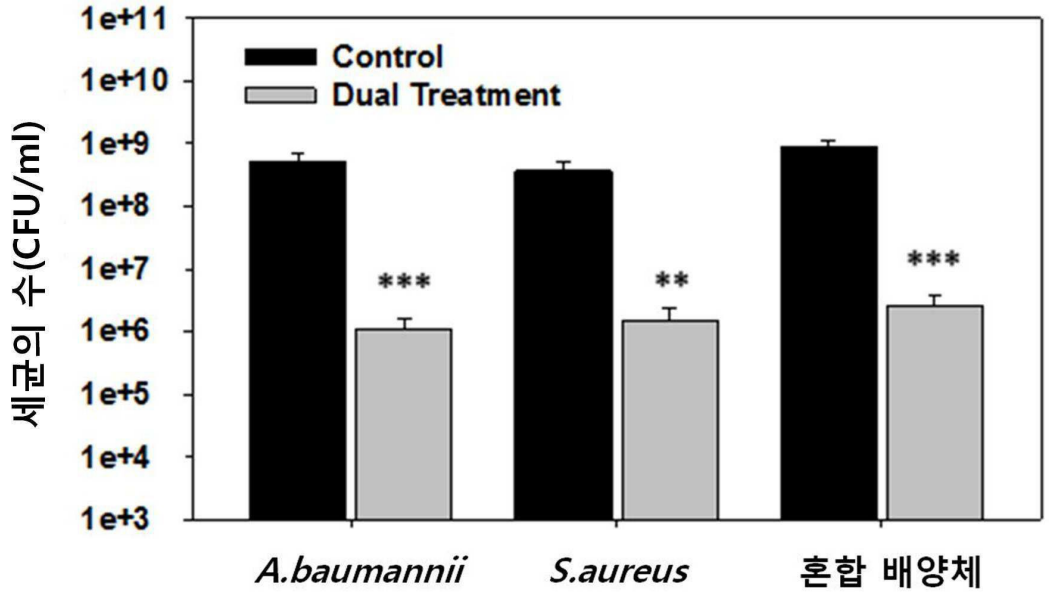
도면5


1e+11
1e+10
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
1e+3
세균의 수(CFU/ml)
ns
***
***
ns
***
***
**
***
***
A.baumannii
S.aureus
혼합 배양체
Control
Violacein
BALO
Dual

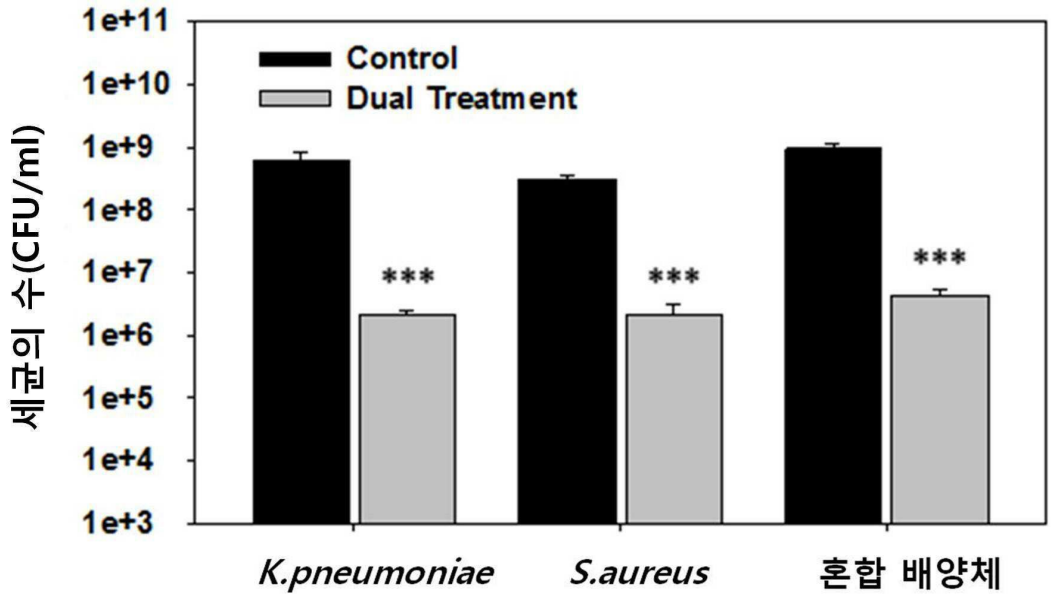
도면6


1e+11
1e+10
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
1e+3
세균의 수(CFU/ml)
ns
***
***
ns
***
***
**
*
***
Control
Violacein
BALO
Dual
K.pneumoniae
S.aureus
혼합 배양체

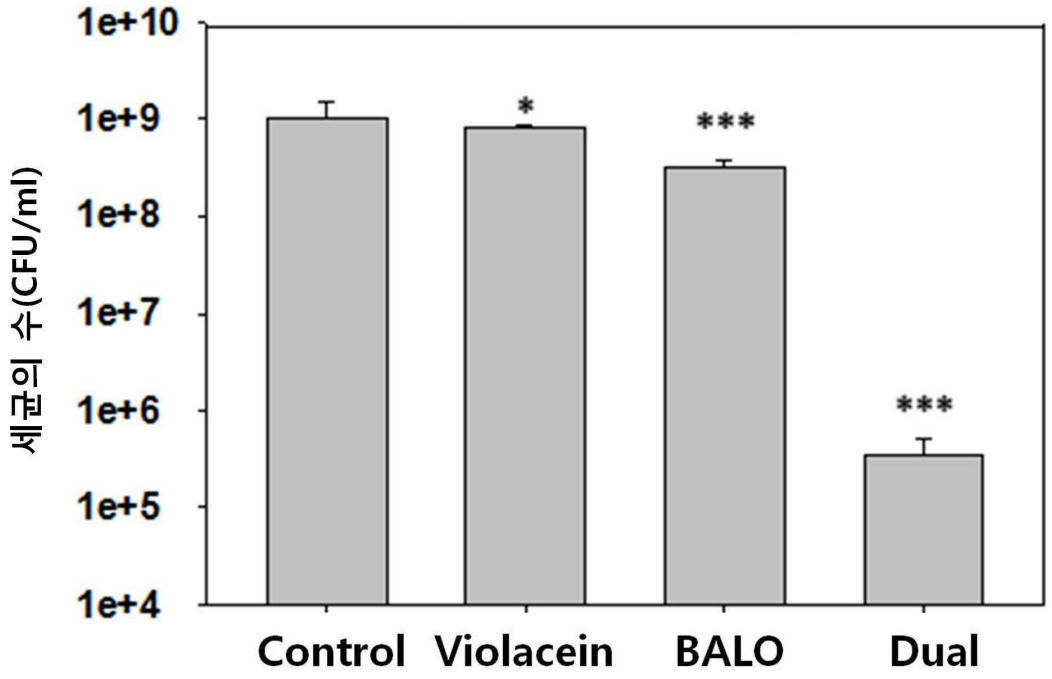
도면7


1e+11
1e+10
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
1e+3
세균의 수(CFU/ml)
Control
Dual Treatment
***
**
***
A.baumannii
S.aureus
혼합 배양체

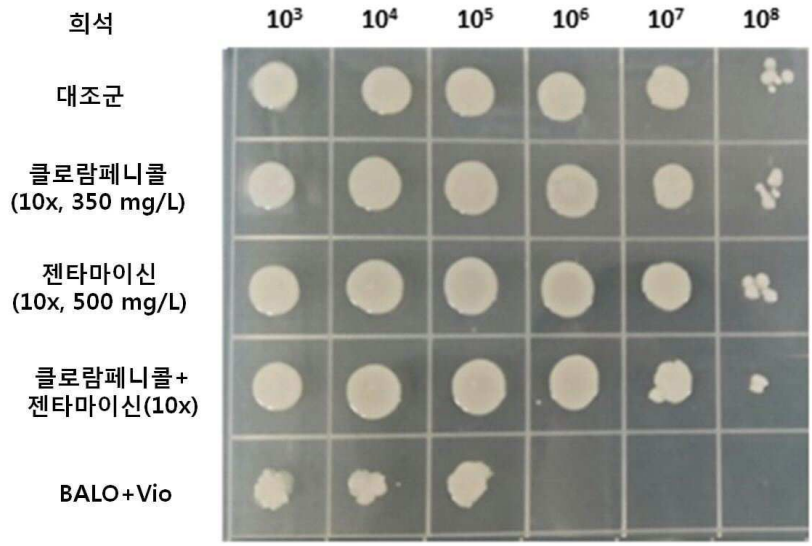
도면8


1e+11
1e+10
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
1e+3
세균의 수(CFU/ml)
Control
Dual Treatment
***
***
***
K.pneumoniae
S.aureus
혼합 배양체

도면9


1e+10
1e+9
1e+8
1e+7
1e+6
1e+5
1e+4
세균의 수(CFU/ml)
*
***
***
Control
Violacein
BALO
Dual

도면10


희석
10³
10⁴
10⁵
10⁶
10⁷
10⁸
대조군
클로람페니콜
(10x, 350 mg/L)
젠타마이신
(10x, 500 mg/L)
클로람페니콜+
젠타마이신(10x)
BALO+Vio