



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.
A61K 31/192 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0128125
(43) 공개일자 2006년12월14일

(21) 출원번호 10-2005-0049313
(22) 출원일자 2005년06월09일
심사청구일자 2005년06월09일

(71) 출원인 인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 소재성
서울 마포구 삼성 래미안아파트 103/604
전정민
인천 남동구 만수2동 신동아 아파트 9/106

(74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 만델산을 유효성분으로 함유하는 질염 치료제

(57) 요약

본 발명은 만델산을 유효성분으로 함유하는 질염 치료제에 관한 것으로, 본 실험에서 사용한 만델산은 질 내 정상균의 생장에는 영향을 미치지 않으면서 병원균에는 생장 억제 효과를 보이는 차별성 있는 분별 저해 효과를 보이며, 병원균의 대수기 및 정체기의 생균율을 감소시키는 효과를 가지고 있어, 만성적인 질염의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

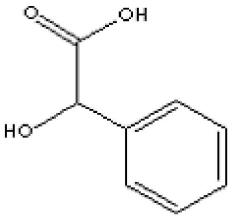
도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

하기 화학식 1로 표시되는 만델산을 함유하는 질염 치료제.

<화학식 1>



청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 질염은 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 속, 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*) 속, 에셰리히아 콜리(*Escherichia coli*) 속, 리스테리아 모노사이토젠(*Listeria monocytogenes*) 속, 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*) 속, 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*) 속, 쉬겔라 소네이(*Shigella sonnei*) 속, 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 속, 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 속 및 스태필로코커스 아레우스(*Staphylococcus aureus*) 속으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1 종 이상의 균에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 질염 치료제.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 질염은 에셰리히아 콜리(*Escherichia coli*) 속 또는 스태필로코커스 아레우스(*Staphylococcus aureus*) 속 균에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 질염 치료제.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 질염 치료제는 질 내 정상균의 성장에는 영향을 미치지 않으면서 병원균의 성장만을 저해하는 분별 저해 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 질염 치료제.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 질염 치료제는 만델산 외에 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose), 젤라틴, 마그네슘 스티레이트 탈크, 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상의 부형제를 함유하는 것을 특징으로 하는 질염 치료제.

청구항 6.

제 1항에 있어서, 상기 질염 치료제는 정제, 산제, 캡슐제, 크림, 연고, 젤리, 거품, 세척제 및 질 삽입물로 이루어진 군 중에서 선택되어지는 제제의 형태인 것을 특징으로 질염 치료제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 만델산을 유효성분으로 포함하는 질염 치료제에 관한 것이다.

인간의 구강계, 소화계, 비뇨 생식기계의 정상균총으로 서식(Elmer *et al.* 1996, Pavlova *et al.* 1997)하는 락토바실러스 종(*Lactobacillus* spp.)은 여성의 질 내에 정상 우점균총으로 존재하면서 여러가지 병원성 미생물의 성장 억제 물질을 생성하여 기회성 감염을 최소화하며, 여러 종류의 유기산, 과산화수소, 박테리오신 등을 생산하여 병원균의 성장을 저해하고, 장내에 병원균의 부착 등을 방해하여 생태계의 안정과 균형을 유지한다(Salminen, S. *et al.* 1996). 락토바실러스 종은 글리코겐(glycogen)을 젖산(lactic acid)으로 분해하여 양분으로 섭취하는데, 이때 대사 산물인 젖산이 질 내의 산도를 일정하게 유지시켜 주는 역할을 하며, pH를 산성화하여 병원성 세균을 무력화시키고, 생성된 과산화수소는 세포에 강한 산화작용 및 단백질 구조를 파괴하여 병원균을 사멸시킨다.

질 내의 산도는 강한 산성이며, 대장·소장 등과 마찬가지로 여러 종류의 균이 살고 있는데, 그 대부분은 락토바실러스 종으로 정상균총을 이루고 있다. 사춘기 이전의 질 내는 피부와 유사한 산도인 pH 6~8 정도의 중성에 가까운 산성이 유지되지만, 사춘기가 되어 성호르몬이 분비되기 시작하면 신체의 변화 함께 질 상피세포의 증식이 시작되면서 세포 내에는 글리코겐이 축적되기 시작하며, 세포나 균에서 나오는 효소에 의해 젖산으로 분해된다. 그 결과 질 내의 pH는 4.5 이하의 강한 산성이 된다. 그러나, 세균성 질염이 발생하면 우점균인 락토바실러스 종의 수가 감소하고 혐기성 세균인 카르테네렐라 바지날리스(*Gardnerella vaginalis*)가 증가하는 상태가 되면, 분비물이 심한 악취를 띠고, pH가 증가하게 된다.

질염을 일으키는 원인은 세균이나 바이러스 감염, 항생제 복용이나 피임약 복용, 과다한 질 세정제 사용 등 다양하다. 또한, 질염의 종류는 여러 가지가 있는데 가장 흔한 질염은 세균성 질염이다. 세균성 질염은 젖산균에 의해 유지되던 약산성의 질 내 환경이 여러 원인에 의해 파괴되어 정상시에 소수의 병원균이 많아짐으로 인해 발생한다. 질염의 주된 증상으로는 속옷을 적실 정도로 냉이 많아지며, 냉에서 특유의 생선 비린내 같은 악취가 나며, 질의 분비물이 많아지고, 가려움증 등이 있다.

그 다음으로 흔한 질염은 칸디다성 질염이다. 칸디다성 질염은 몸에 저항력이 떨어져 있을 때 질 내 환경이 균형을 잃으면서 곰팡이가 균이 빠른 속도로 증식하게 되면서 감염되며, 주된 증상은 흰색 혹은 황백색의 점성이 있는 냉이 나오며, 가렵고 따끔거리고 화끈거리는 것이다.

마지막으로 질염을 일으키는 또 다른 원인으로는 트리코모나스라는 기생충에 의해 생기는 트리코모나스 질염이다. 성관계로 전파되는 트리코모나스는 운동성이 좋아 요도와 방광까지 침입, 심하면 방광염이나 골반염을 일으킬 수 있다. 현대 여성들이 빈번하게 새로운 성 상대를 찾고 과거보다 여러 사람들을 상대로 관계를 갖는 경우가 많아져 요즘에는 이 기생충에 의해 질염에 걸리는 경우가 전체 질염의 15~20%가 된다(Katherine *et al.* 2003). 이 질염의 증상은 물처럼 다량의 냉이 흐르게 되며, 누런색 혹은 녹색색을 띄기도 한다.

따라서, 질염을 예방하고 치료하기 위한 질염 치료 방법이 많이 연구되어져, 메트로니다졸(Metronidazole)과 같은 질염 치료제를 경구 투여하는 방법 또는 크림 형태의 항생제를 사용하는 것이 일반적이다. 그러나 항생제를 사용할 경우 정상 세균총인 락토바실러스 종까지 제거하게 되어 만성적인 질염이 재발되어 완전한 치료가 어렵다.

한편, 만델산(Mandelic acid, MA)은 자연적으로 발생하는 산인 알파 히드록실산(alpha hydroxyl acid)으로 구성되며, 아몬드에서 가수분해하여 분리한 추출물을 농축시킨 유기산으로, 각종 피부와 관련된 질병 및 상처의 치료에 사용되며 세포에 독성을 갖고 있지 않다. 만델산은 항균성을 보이며 여드름균의 성장을 억제시키며, 특히 알파 히드록실기가 피부가 노화됨에 따라 수분이 쉽게 빠져나가는 것을 막아줌으로써 건조한 피부를 촉촉하게 해주며, 만델산의 알파 히드록실기는 피부를 자극시키지 않으면서 피부가 착색되는 것을 막아주는 효과가 있다. 또한, 35 ~ 50 g/l의 농도로 소변(urine)에 용해시킨 만델산은 HIV(Herpseviruses 1 및 2) 또는 네이세리아 고노로에(*Neisseria gonorrhoeae*)와 같은 병원균에 대해서 저해 효과를 보이며, 그람(Gram) 양성, 음성균 모두에 항균 활성을 갖고 있으며, 시험관 내(In vitro) 실험상에서 돌연변이 유발 요인을 갖고 있지 않고, 낮은 급성 독성률을 갖고 있다(Lourens *et al.* 2002). 특히, 만델산의 폴리머 형태는 정자의 운동성을 저해하여 피임약으로도 이용되며 인체에도 무해하여 복용이 가능하다(Keizou *et al.* 1991). 이 외에도 속주 세포나 정자를 통한 감염 여부를 판단할 수 있는 분석 물질이나 의약품 제조의 중간 생산물로 분석 시약용에도 쓰인다.

이에 본 발명자들은 질 내 정상균인 락토바실러스 종에는 영향을 미치지 않으면서 질염을 일으키는 병원균의 성장을 억제하는 물질을 연구하던 중, 만델산이 락토바실러스 종의 생장은 억제하지 않고, 병원균에 대해 우수한 항균 활성을 나타내어 질염 치료제로 유용하게 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 만델산을 함유하는 질염 치료제를 제공하고자 한다.

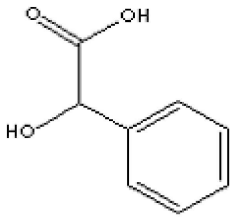
발명의 구성

본 발명은 만델산을 함유하는 질염 치료제를 제공한다.

이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 만델산을 함유하는 질염 치료제를 제공한다.

<화학식 1>



화학식 1의 만델산을 질 내의 정상균인 락토바실러스 종 및 질염을 일으킬 수 있는 병원균에 대해 스프레이 테스트, 페이퍼 디스크 테스트한 결과, 락토바실러스 종의 성장에는 큰 영향을 미치지 않지만, 병원균인 바실러스 세레우스 ATCC 49063(*Bacillus cereus* ATCC 49063), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 에셰리히아 콜리 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 리스테리아 모노사이토젠 KCTC 3710(*Listeria monocytogenes* KCTC 3710), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*), 쉬겔라 소네이 ATCC 9290(*Shigella sonnei* ATCC 9290), 에르시니아 엔테로콜리티카 ATCC 23715(*Yersinia enterocolitica* ATCC 23715), 슈도모나스 에루지노사 KCTC 1636(*Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1636) 및 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881(*Staphylococcus aureus* KCCM 40881)에 대해서는 성장 억제 효과를 나타낸다.

또한, 만델산은 균주의 지체기, 대수기 및 정체기의 모든 성장 단계에서 락토바실러스에 큰 영향을 주지 않지만, 병원균의 경우 만델산을 첨가한 배지에서 배양했을 때, 만델산이 첨가되지 않은 일반 배지에서 배양했을 때 보다 대수기 및 정체기의 생균수를 감소시킨다.

또한, SEM을 통해 만델산이 첨가된 배지에서 배양한 세포의 표면을 만델산이 첨가되지 않은 배지에서 배양한 세포의 표면과 비교해보면, 락토바실러스의 경우 만델산의 영향이 적지만, 병원균의 경우, 세포 표면에 구멍이 크게 뚫리고 깎여지며, 균체군데 깊게 파이는 현상을 관찰할 수 있다.

따라서, 화학식 1의 만델산은 정상균인 락토바실러스의 성장에는 영향을 미치지 않으면서, 병원균의 생균율을 떨어뜨리므로 만성 질염을 치료할 수 있는 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 질염 치료제는 약학적 조성물이 될 수 있으며, 상기 만델산에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

본 발명의 질염 치료제는 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

즉, 화학식 1의 만델산은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 만델산에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제, 크림, 연고, 젤리, 거품, 세척제 및 질 삽입물이 포함된다. 비수용성제, 현탁

용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 또한 질염 치료의 효능 증진을 위해 칼슘이나 비타민 D₃를 첨가할 수 있다.

본 발명의 질염 치료제의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 만델산의 양을 기준으로 0.01~1000mg이고, 하루 수회로 나누어 투여될 수 있다.

본 발명의 질염 치료제는 질염 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 화학식 1의 만델산(mandelic acid)의 질 내 미생물의 생장 억제 효과 측정

1-1: 균주 분리 및 배양

본 실험에서는 만델산의 질 내 미생물의 생장 억제 효과를 알아보기 위하여 균주를 분리 및 배양하였다. 이때 만델산은 상업적으로 판매하는 시약 수준의 만델산을 구입하여 사용하였다.

균주 선별을 위하여 정상균으로서 건강한 한국인 여성 질 내에서 분리한 105개의 락토바실러스 종(*Lactobacillus* spp.)을 각각 5 ml MRS 배지에 1 % 접종하여 37℃에서 12시간 동안 배양하였으며, 병원균으로서 바실러스 세레우스 ATCC 49063(*Bacillus cereus* ATCC 49063), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 에셰리히아 콜리 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7), 리스테리아 모노사이토젠 KCTC 3710(*Listeria monocytogenes* KCTC 3710), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*), 쉬겔라 소네이 ATCC 9290 (*Shigella sonnei* ATCC 9290), 예르시니아 엔테로콜리티카 ATCC 23715(*Yersinia enterocolitica* ATCC 23715)는 LB 배지에서, 슈도모나스 에루지노사 KCTC 1636(*Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1636)는 변형된 배지에서 200rpm으로 교반하면서 37℃에서 배양하였고, 스태필로코커스 아레우스 KCCM 40881(*Staphylococcus aureus* KCCM 40881)은 TSB 배지에서 200rpm으로 교반하면서 37℃에서 배양하였다. 각 균주 배양에 사용한 배지 조성은 표 1 및 2에 나타내었다.

【표 1】
MRS 및 LB 배지 조성

성분	MRS (g/ ℓ)	성분	LB (g/ ℓ)
글루코스(Glucose)	20		
트윈 80(Tween 80)	1		
암모늄 시트레이트(Ammonium citrate)	2		
소듐 아세테이트(Sodium acetate)	5	박토-효모 추출물(Bacto-yeast extract)	10
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	박토-트립톤(Bacto-tryptone)	5
MnSO ₄	0.05	NaCl	5
K ₂ HPO ₄	2	한천(Agar)	15
		pH	7.0
비프 추출물(Beef extract)	10		
효모 추출물(Yeast extract)	5		
프로티오스 펩톤(Proteose peptone #3)	10		

[표 2]
TSB 및 변형된 배지의 조성

성분	TSB (g/ℓ)	성분	변형 배지 (g/ℓ)
카세인의 판크레아틴 분해물 (Pancreatic digest of casein)	15	효모 추출물(Yeast extract)	10
소이빈 밀의 판크레아틴 분해물 (Pancreatic digest of soybean meal)	5	글루코스(Glucose)	5
NaCl	5	소듐 아세테이트(Sodium acetate)	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5		

1-2: 균주 선별

실시에 1-1에서 분리, 배양한 균주를 대상으로 BKC(Benzalkonium chloride)에 대한 최소억제농도(minimal inhibitory concentration; MIC)를 측정하였다. 측정 후, BKC에 대해 MIC가 높은 6개의 균주를 선별하였고, 이들을 대상으로 만델산에 대한 MIC를 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards) 방법으로 마이크로티터 플레이트(microtiter plate)를 사용하여 측정하였다.

락토바실러스 종(*Lactobacillus* spp.)과 병원균들을 5 ml 액체배지(broth)에서 혐기적 조건에서 12시간 동안 37℃에서 배양한 후, 마이크로원심분리 튜브(microcentrifuge tube)에 옮겨 15,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 배지 성분을 제거하기 위하여 0.85% 식염수(Saline)을 1 ml 첨가하여 완전히 현탁시킨 다음, 다시 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전된 세포 덩어리(cell pellet)는 0.85% 식염수 1 ml를 첨가하여 현탁시킨 후, 맥팔랜드(Macfarland) 방법을 이용하여 CFU(colony forming unit)가 10⁷ 이 되는 625nm에서의 흡광도(O.D₆₂₅, optical density)가 0.09가 되도록 마이크로티터 플레이트에 10%로 접종하였다. 만델산의 농도 범위를 155 µg/ml에서 10 mg/ml까지로 하여 균주에 처리하고, 37℃에서 24시간 동안 배양시킨 다음 분광광도계(Molecular Devices, VERSAmax microplate reader, USA)를 이용하여 600nm에서의 흡광도(O.D₆₀₀)를 측정하였다.

실험 결과는 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타난 바와 같이, 만델산은 정상균인 락토바실러스(*Lactobacillus*)에 대해 5 mg/ml에서도 성장 저해 효과를 나타내지 않아, 5 mg/ml 이하의 농도에서 성장에 영향을 끼치지 않음을 확인하였고, 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*), 에르시니아 엔테로콜리티카 ATCC 23715(*Y. enterocolitica* ATCC 23715), 쉬겔라 소네이 ATCC 9290(*S. sonnei* ATCC 9290), 리스테리아 모노사이토젠 KCTC 3710(*L. monocytogenes* KCTC 3710)과 같은 병원균에서는 저농도에서 성장에 많은 저해를 보였다. 또한, 에세리히아 콜리 O157:H7(*E. coli* O157:H7), 살모넬라 엔테리티디스(*S. enteritidis*), 살모넬라 갈리나룸(*S. gallinarum*)의 경우, 다른 병원균보다 높은 농도인 2.5 mg/ml에서 만델산의 MIC가 나타났다.

따라서, 저농도의 만델산은 질 내의 정상균의 성장에는 영향을 미치지 않으며, 질병을 일으킬 수 있는 병원균에 대해서만 성장을 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

실시에 2: 화학식 1의 만델산에 대한 스프레이 테스트(spray test)

정상균 및 병원균에 대한 만델산의 성장 억제 효과를 보기 위하여 하기와 같이 스프레이 테스트를 실시하였다.

배양 플레이트(Culture plate)의 MRS 한천배지(1.5% agar) 및 LB 한천배지(1.5% agar) 위에 CFU가 10⁷ 가 되도록 희석한 정상균인 락토바실러스와 병원균인 스태필로코커스 아레우스 KCCM 40881(*S. aureus* KCCM 40881) 및 에세리히아 콜리 O157:H7(*E. coli* O157:H7)을 각각 200 µl 씩 도말하고 3분 동안 건조시켰다. 건조 후, 만델산의 농도가 0.5M, 1M 이 되도록 제조한 용액(1M의 NaCl, 50% EtOH, pH 5.0)을 플레이트에 100 µl/회의 양으로 2번 분사시켜 도말(spreeding)하여 3분 동안 건조시켰다. 건조된 플레이트는 37℃에서 24시간 동안 배양시켰고, 콜로니를 계수하였다. 이때, 50% EtOH 만을 처리한 균을 대조군으로 사용하였다.

결과는 도 2 및 도 3에 나타내었다.

도 2에 나타난 바와 같이, 락토바실러스는 1M의 만텔산에서도 콜로니가 관찰되었지만, 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881 및 에셰리히아 콜리 O157:H7는 0.5M의 만텔산 농도에서 콜로니가 관찰되지 않았다.

또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 도 2의 결과를 0.5M과 1M 농도의 만텔산 농도에 따른 각 균주의 생균율(%) 막대 그래프로 나타내면, 락토바실러스에 비하여 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881 및 에셰리히아 콜리 O157:H7의 생균율(%)이 현저히 감소했음을 알 수 있었다. 0.5M의 만텔산에서 락토바실러스의 생균율이 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881보다 약 6배, 1M의 만텔산에서는 약 15배 높은 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 본 실험에서도 실시예 1에서의 결과와 같이 만텔산이 정상균의 성장에는 영향을 미치지 않으면서, 병원균에 대해서만 높은 성장 억제 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

실시예 3: 화학식 1의 만텔산에 대한 페이퍼 디스크 테스트(paper disc test)

정상균과 병원균에 대한 만텔산의 분별 저해효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 페이퍼 디스크 테스트를 실시하였다.

배양 플레이트(Culture plate)의 MRS 한천배지(1.5% agar) 및 LB 한천배지(1.5% agar) 위에 정상균인 락토바실러스와 병원균인 에셰리히아 콜리 O157:H7, 리스테리아 모노사이토젠 KCTC 3710 및 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881 $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml을 각각 포함하는 LB, MRS, TSB 배지의 0.7% 반고체 한천(soft agar)를 10ml 씩 골고루 덮어 굳힌 후, 페이퍼 디스크(ϕ 6mm, Advantec Co., USA)를 치상하고, 직간접적인 기술(direct and deferred technique)을 참고하여 만텔산을 농도 별로 적하시켰다. 이 후 플레이트를 37°C에서 12시간 배양하였고, 항균력은 플레이트 상의 저해환(clear zone)의 유무와 크기로 확인하였다.

결과는 도 4에 나타내었다.

도 4에 나타난 바와 같이, 모든 병원균들에 대해 1M의 만텔산에서 저해환 크기가 가장 크게 나타났으며 평균 저해환의 크기는 2~3 cm이었다. 락토바실러스의 경우는 저해환이 거의 나타나지 않아 병원균들보다 만텔산에 대한 내성이 우수하다는 것을 알 수 있다.

따라서, 본 실험을 통해 만텔산이 병원균만의 성장을 억제하는 분별 억제 효과를 가지고 있으며, 1M 까지는 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 4: 화학식 1의 만텔산이 균주의 성장 단계(growth phases)에 미치는 영향 측정

락토바실러스와 병원균의 성장 단계에 따른 만텔산의 분별 저해효과를 알아보기 위하여 균주의 성장 단계를 크게 지체기(Lag phase), 대수기(Exponential phase), 정체기(Stationary phase)별로 나누어 만텔산을 처리하여 실험하였다.

일반 액체배지(MRS, LB, pH 5.0)에 락토바실러스와 병원균을 1% 접종하여 대조군, 지체기군, 대수기군 및 정체기군을 준비하였다. 이때, 각 성장 단계에서 성장에 따른 분별 저해효과를 비교하기 위하여 대조군으로 일반 액체배지(pH 5.0, MRS, LB)에 락토바실러스와 병원균을 1% 접종하여 0시간에서 24시간까지 2시간 간격으로 생균수를 측정하여 성장 곡선(growth curve)을 작성하였다. 지체기군으로는 일반 액체배지(MRS, LB, pH 5.0)에 1M NaCl를 첨가한 배지 및 1M NaCl과 10mM 만텔산을 첨가한 배지에 락토바실러스와 병원균을 1% 접종하여 0, 4, 12시간 경과 후의 생균수를 측정하였다. 대수기군과 정체기군으로는 일반 액체배지에 배양한 락토바실러스와 병원균을 15,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 균체를 일반 액체배지(MRS, LB, pH 5.0)에 1M NaCl를 첨가한 배지 및 1M NaCl과 10mM 만텔산을 첨가한 배지에 현탁시켜 배양하고, 대수기군은 4, 8, 16시간 경과 후, 정체기군은 10, 14, 22시간 경과 후에 생균수를 측정하였다.

모든 측정 결과를 성장 곡선으로 작성했으며, 도 5 내지 도 7에 나타내었다.

도 5에 나타난 바와 같이, MRS 배지에서 배양한 락토바실러스는 지체기, 대수기 및 정체기 모두에서 NaCl만을 첨가한 배지에서 배양시켰을 때와 NaCl과 만텔산이 혼합되어 있는 배지에서 배양시켰을 때의 생균수가 모두 일정하였다.

반면에, 도 6 및 도 7에 나타난 바와 같이, LB 배지에서 배양한 에셰리히아 콜리 O157:H7 및 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881는 대수기와 정체기에서 각각 NaCl 만을 첨가한 배지에서 배양시켰을 때와 NaCl과 만델산이 혼합되어 있는 배지에서 배양시켰을 때의 생균수에 차이를 보였다. 또한, 대수기에서 두 균주 모두 생균수가 많이 감소함을 관찰할 수 있었다.

에셰리히아 콜리 O157:H7의 경우, 대수기에서는 NaCl과 만델산이 혼합되어 있는 배지에서 배양시켰을 때, 일반 배지에 비하여 4시간 후에 10^4 배, 8시간 후에 10^5 배의 생균수가 감소하였다. 또한, 정체기에서는, NaCl과 만델산이 혼합되어 있는 배지에서 배양했을 때, NaCl 만을 첨가한 배지에서 배양했을 때보다 12시간 후에 10^2 배의 생균수가 감소했으며, 일반 배지에서 배양했을 때보다 4시간 후에 10^2 배, 12시간 후에 10^4 배의 생균수가 감소하였다.

스타필로코커스 아레우스 KCCM 40881의 경우, 대수기에는 NaCl 만을 첨가한 배지에서 배양시켰을 때, 일반 배지에 비하여 4시간 후는 10배, 8시간 후는 10^2 배의 생균수가 감소하였다. 또한, 정체기에는 NaCl과 만델산이 혼합되어 있는 배지에서 배양했을 때, 일반 배지보다 4시간 후에 10^2 배, 8시간 후에 10^3 배의 생균수가 감소하였으며, NaCl 만을 첨가한 배지보다 12시간 후에 10^2 배의 생균수가 감소하였다.

또한, 락토바실러스와 병원균 사이 뿐만 아니라 병원균들 간에서 지체기, 대수기, 정체기에서 생균수 차이를 보였다. 지체기에서 락토바실러스와 병원균인 에셰리히아 콜리 O157:H7 및 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881 모두 생균수가 거의 일정하게 나타났다. 그러나, 에셰리히아 콜리 O157:H7의 경우 지체기 이후 12시간 경과 후에 생균수가 10배 감소되었고, 대수기와 정체기에서는 10^3 배 이상 생균수가 감소하였다. 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881는 지체기 이후 12시간 경과 후에는 생균수가 일정하였지만 대수기와 정체기에서는 10^2 배 이상 생균수의 감소를 보였다. 이처럼 세 균주 모두 생장곡선에 따른 생장 저해 정도가 다름을 보였고, 락토바실러스는 지체기, 대수기, 정체기에서 만델산에 의해 생장에 영향을 많이 받지 않는 것으로 나타났다. 반면에 병원균들은 만델산에 의해 생장에 저해를 많이 받는다는 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 지체기에서 보다 대수기나 정체기에서 영향을 더 많이 받는 것을 알 수 있었다.

실시예 5: 화학식 1의 만델산 처리 후 균주의 형태학적 변화 측정

균주와 생장 단계에 따른 만델산의 저해 효과 정도를 알아보기 위하여 SEM(scanning electron microscopy)을 이용하여 형태학적 변화를 관찰하였다.

일반 배지(MRS, LB)에서 배양된 세포를 대조군으로 하여 pH 5.0인 1M NaCl과 10mM 만델산이 혼합되어 있는 배지(MRS, LB)와 비교하였다. 정체기의 균주를 15,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 수거한 후, pH 8.0인 인산 완충용액(Phosphate buffer)으로 2번 세척, 현탁하였다. 그리고 균주 현탁액을 5mm×5mm 크기의 슬라이드 글라스(slide glass)에 5 μ l 떨어뜨려 얇게 묻힌 후, 실온에서 1시간 건조시켰다. 3~4 시간의 고정 과정을 거친 후, 10 분 간격으로 탈수 처리하여 자연건조를 시켰다. 그 후 표면을 전처리하여 FE-SEM(field emission scanning electron microscopy, Hitach S-4200)으로 7.0kv × 10.0k 조건에서 관찰하였다.

결과는 도 8에 나타내었다.

도 8에 나타난 바와 같이, 일반 배지(MRS, LB)에서 배양된 세포 표면은 락토바실러스 퍼멘툼 MS79, 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881 및 에셰리히아 콜리 O157:H7 모두 매끄럽고 둥근 모양이 관찰되어 세포가 손상되지 않았음을 볼 수 있었다. 반면에 1M NaCl과 10mM 만델산 배지에서 배양시킨 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881과 에셰리히아 콜리 O157:H7의 세포 표면은 매끄럽고 둥근 모양을 찾아볼 수가 없었으며, 세포 표면이 구멍이 크게 뚫리고 깎여졌으며, 군데 군데 깊게 파여 거칠게 손상된 것을 볼 수 있었다. 락토바실러스 퍼멘툼 MS79는 1M NaCl과 10 mM 만델산이 혼합된 배지에서 배양한 세포를 일반 배지에서 배양한 세포와 비교하였을 때, 만델산의 영향으로 대조군보다 길이가 약간 길어진 것을 관찰할 수 있었으며 NaCl의 영향으로 세포 표면이 파이고 매끄럽지 못한 부분이 관찰되었지만 전체적으로 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881과 에셰리히아 콜리 O157:H7에 비해 영향을 적게 받은 것을 관찰하였다.

따라서, 만델산이 정상균 보다는 병원균의 생존율을 감소시키는 효과를 세포표면 관찰을 통하여 확인할 수 있었다

하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

제제예 1: 산제의 제조

화학식 1의 만델산 2g

유당 1g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

실시예 2: 정제의 제조

화학식 1의 만델산 100mg

옥수수전분 100mg

유당 100mg

스테아린산 마그네슘 2mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

제제예 3: 캡슐제의 제조

화학식 1의 만델산 100mg

옥수수전분 100mg

유당 100mg

스테아린산 마그네슘 2mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

제제예 4: 지용성(W/O 제형) 연고의 제조

[표 3]

조성	함량(%)
화학식 1의 만델산	0.01-10.0
스테아릴 알콜	7.0
스테아린산	2.2
스쿠알렌	3.4
옥틸두오데칸올	5.0
올리브유	6.0
글리세린모노라우릴 지방산 에스테르	10.0
이소프로필 아디페이트	2.0
테고	0.3
카복실비닐폴리머	3.0
프로필렌 글리콜	5.0
코직산	0.05
알파-케토글루타민산	0.2
시스테인	0.2
파라벤류	0.3

평균 정제수 또는 0.02M 인산 또는 총용액	잔부
총량	100

연고 조제 시 상기 표 3의 조성 성분 중 카복시비닐폴리머 및 코직산을 제외한 나머지 성분을 60℃ 이상에서 유화시킨 다음 교반하면서 카복시 비닐폴리머를 가하였다. 냉각 후 적당한 점도를 갖을 때 코직산 등 나머지 수상성분을 교반하면서 균질이 되도록 서서히 가한 다음 성숙을 위해 방치한 후 완제품으로 하였다.

제제예 5: 크림의 제조

[표 4]

조성	함량(%)
화학식 1의 만델산	0.01-10.0
유동파라핀	6.0
스쿠알란	4.0
소르비탄세스퀴올레이트	0.5
폴리솔베이트 60	1.5
밀랍	10.0
카프릴릭/카프릭프리카리세라이드	5.0
부틸렌글리콜	6.0
프리에탄올아민	3.0
방부제	2.0
향료	미량
정제수	잔부
총량	100

상기 표 4의 조성으로 만델산을 함유하는 크림을 통상의 방법에 따라 제조할 수 있었다.

발명의 효과

본 발명에 따른 만델산은 질 내 정상균의 생장에는 영향을 미치지 않으면서 병원균에는 생장 억제 효과를 보이는 차별성 있는 분별 저해 효과를 보이며, 병원균의 대수기 및 정체기의 생균율을 감소시키는 효과를 가지고 있어, 만성적인 질염의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 균주 선별을 위한 본 발명에 따른 만델산의 질 내 정상균 및 병원균에 대한 생장 억제 효과 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명에 따른 만델산의 스프레이 테스트 결과를 보여주는 콜로니 사진을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 만델산의 스프레이 테스트 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명에 따른 만델산의 정상균 및 병원균에 대한 분별 생장 억제 효과 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명에 따른 만델산이 락토바실러스 퍼넨툼 MS79의 각 생장 단계에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

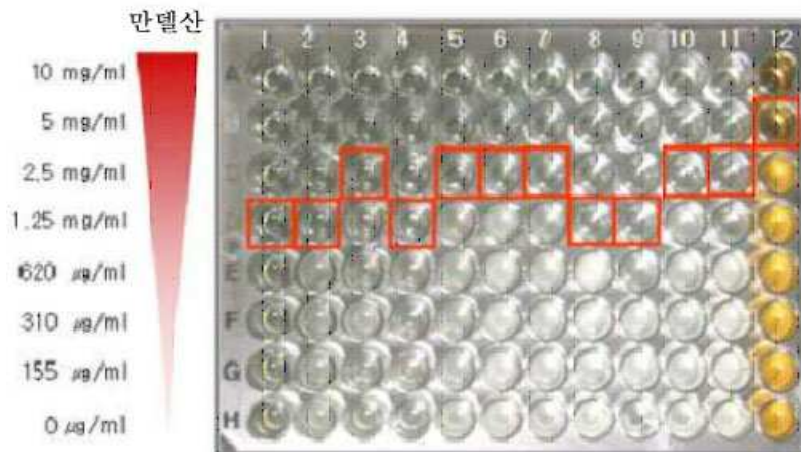
도 6은 본 발명에 따른 만델산이 에셰리히아 콜리 0157:H7의 각 생장 단계에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명에 따른 만델산이 스태필로코커스 아레우스 KCCM 40881의 각 생장 단계에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 8은 만델산 처리 후 균주들의 형태학상의 변화(Morphological changes)를 나타낸 도이다.

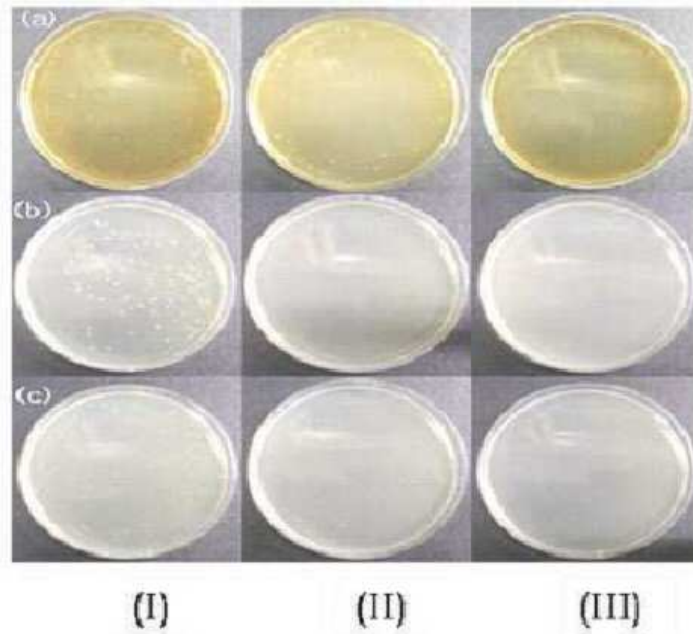
도면

도면1



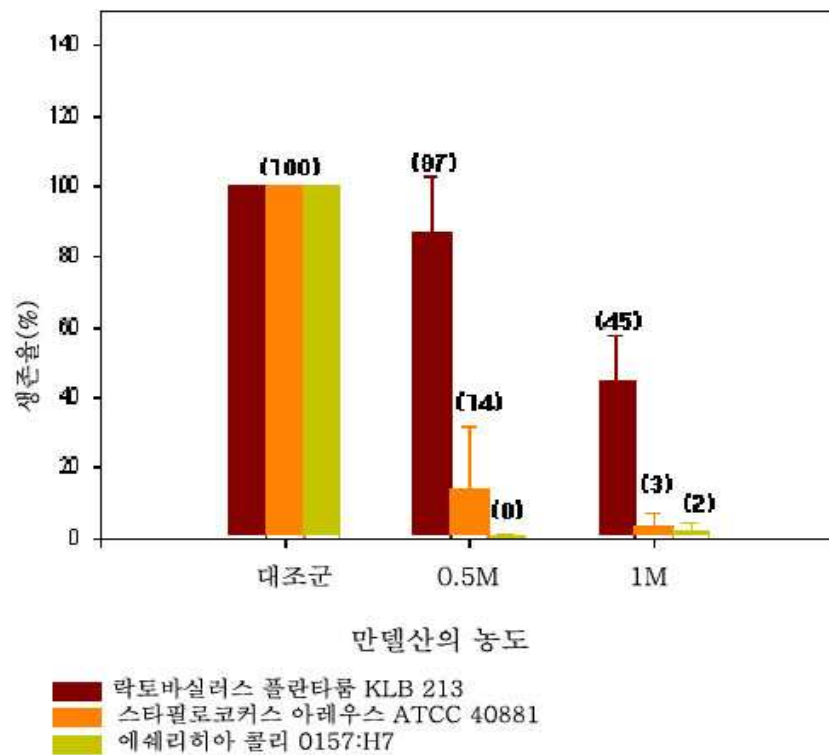
- 1: 예르시니아 엔테로콜리티카 ATCC 23715(*Yersinia enterocolitica* ATCC 23715)
- 2: 쉬겔라 소네이 ATCC 9290(*Shigella sonnei* ATCC 9290)
- 3: 에셰리히아 콜리(*Escherichia coli*)
- 4: 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)
- 5: 에셰리히아 콜리 0157:H7(*Escherichia coli* 0157:H7)
- 6: 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*)
- 7: 스타필로코커스 아레우스 KCCM 40881(*Staphylococcus aureus* KCCM 40881)
- 8: 바실러스 세레우스 ATCC 49063(*Bacillus cereus* ATCC 49063)
- 9: 리스테리아 모노사이토젠 KCTC 3710(*Listeria monocytogenes* KCTC 3710)
- 10: 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*)
- 11: 살모넬라 갈리나룸(*Salmonella gallinarum*)
- 12: 락토바실러스 퍼멘툼 MS79(*Lactobacillus fermentum* MS79)

도면2

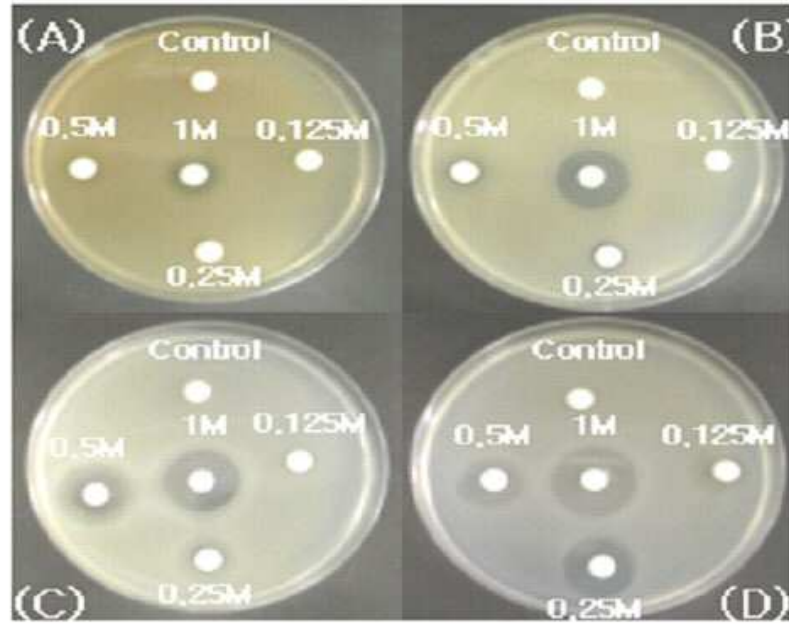


- I. 대조군 (50% EtOH)
 II. 1M NaCl + 0.5M만델산+ 50% EtOH (pH5.0)
 III. 1M NaCl + 1M만델산+ 50% EtOH (pH5.0)
- (a) 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum KLB 213)
 (b) 에세리히아 콜리(Escherichia coli O157:H7)
 (c) 스타필로코커스 아레우스(Staphylococcus aureus KCCM 40881)

도면3

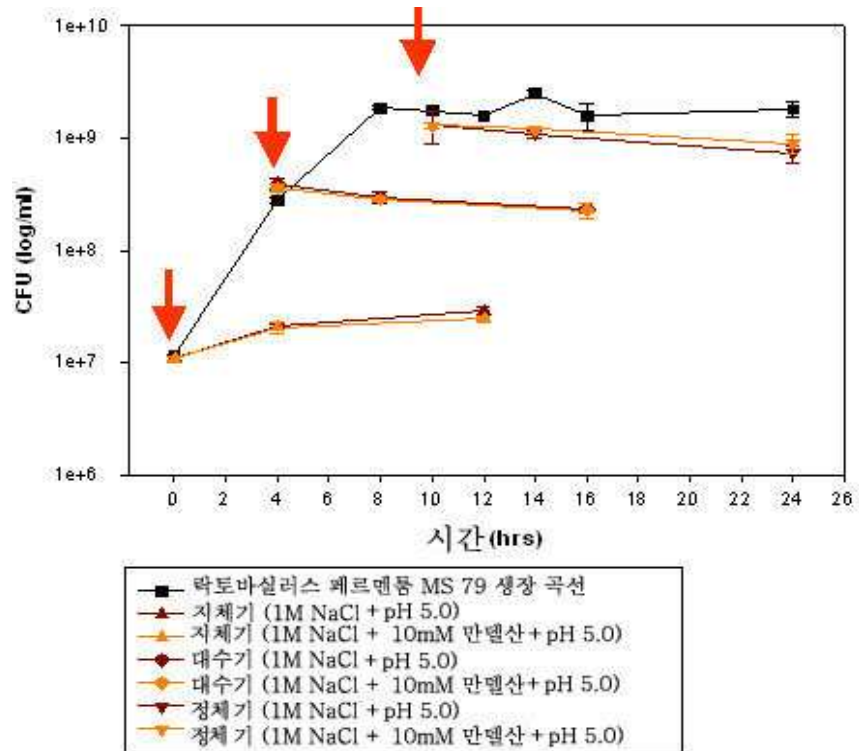


도면4

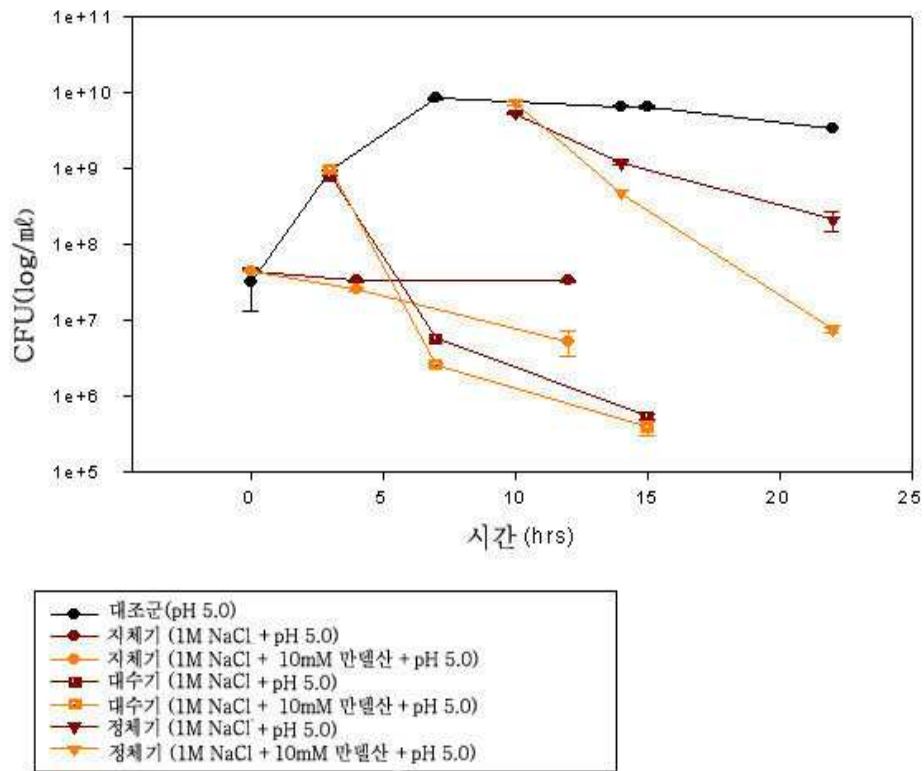


- (A) 락토바실러스 페르멘툼 MS79(*Lactobacillus fermentum* MS79)
 (B) 리스테리아 모노사이토젠 KCTC 3710(*Listeria monocytogenes* KCTC 3710)
 (C) 스탕필로코커스 아레우스 KCCM 40881(*Staphylococcus aureus* KCCM 40881)
 (D) 에셰리히아 콜리 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)

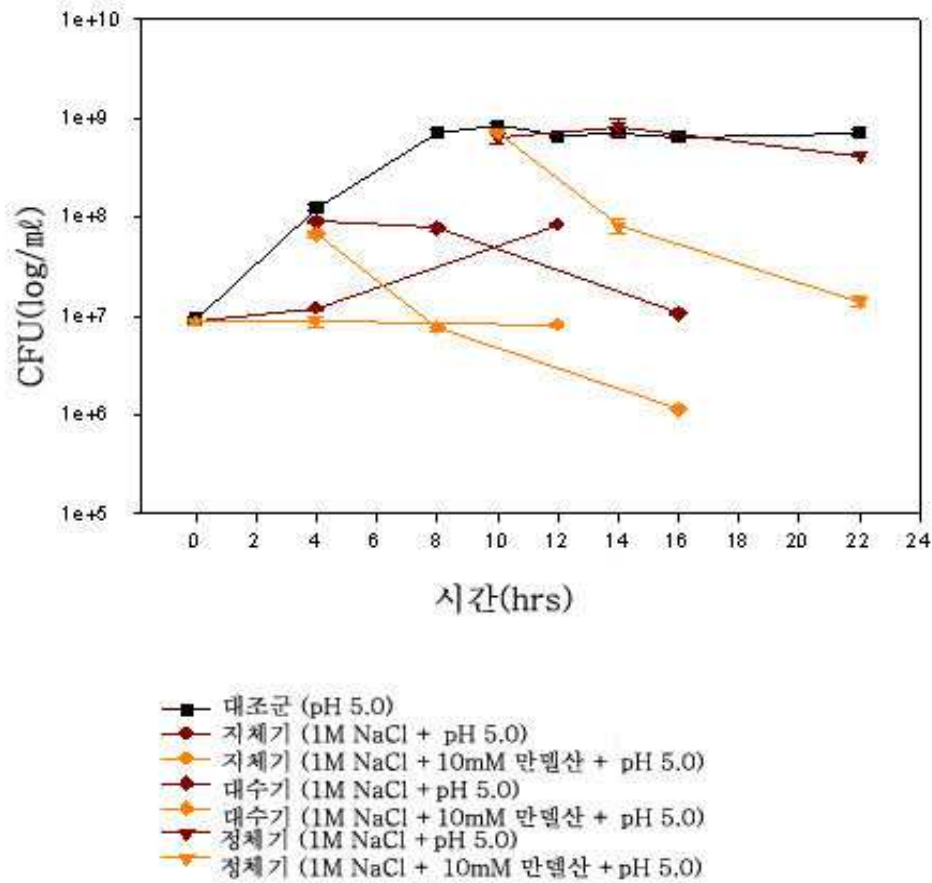
도면5



도면6



도면7



도면8

