



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0096093
(43) 공개일자 2013년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/73 (2006.01) A61P 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0017638

(22) 출원일자 2012년02월21일

심사청구일자 2012년02월21일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

장형진

서울특별시 동대문구 제기동 이수브라운스톤아파트 101동 104호

김기석

서울특별시 송파구 가락본동 22-5 신성빌라 101호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

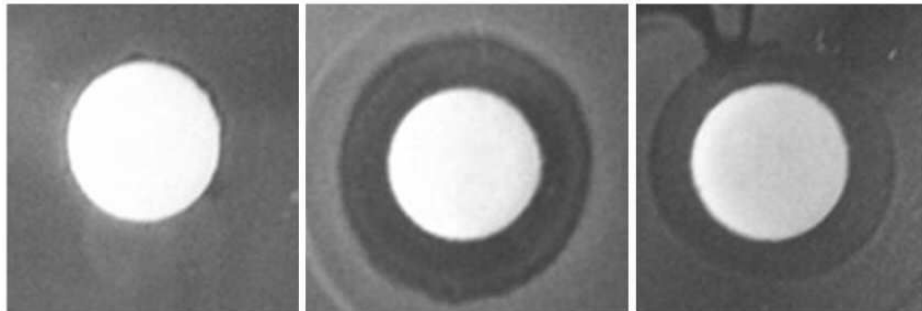
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 선학초 추출물을 유효성분으로 함유하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 선학초 추출물을 유효성분으로 함유하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 선학초 추출물은 장출혈성 대장균 O157:H7에 대한 항균활성을 우수하게 나타냄으로써, 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



증류수

암피실린

선학초 에탄올 추출물

(72) 발명자

양혜정

서울특별시 동대문구 회기동 경희대학교 한의과대
112호

최은경

경기도 안산시 단원구 와동 788-10번지 201호

특허청구의 범위

청구항 1

선택초 추출물을 유효성분으로 함유하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 선택초 추출물은 선택초를 물, C₁~C₄의 알콜 또는 물과 C₁~C₄의 알콜의 혼합용매로 추출하여 얻은 것을 특징으로 하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 C₁~C₄의 알콜은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 선택초 추출물은 장출혈성 대장균 0157:H7에 대한 항균활성을 갖는 것을 특징으로 하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 장출혈성 대장균 감염증은 장출혈성 대장균 0157:H7에 의해 감염되어 유발되는 것을 특징으로 하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 장출혈성 대장균 0157:H7에 의해 감염되어 유발되는 장출혈성 대장균 감염증은 출혈성 대장염, 출혈성 설사증, 출혈성 빈혈, 급성 신부전증, 용혈성 요독 증후군 및 혈전성 혈소판 감소증으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 선택초 추출물을 유효성분으로 함유하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 병원성 대장균은 독성형질, 일상 역학, 임상 형질 및 병리생리학적 작용기전에 따라 장출혈성 대장균(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EHEC), 장독소 대장균(Enterotoxigenic *Escherichia coli*; ETEC), 장병원성 대장균(Enteropathogenic *Escherichia coli*; EPEC) 및 장침입성 대장균(Enteroinvasive *Escherichia coli*; EIEC)의 4개의 그룹으로 나누어진다.

[0003] 이 중에서 장출혈성 대장균은 1982년 미국에서 햄버거 식중독 사례를 계기로 대장균 0157:H7이 발견됨으로써 알려졌다. 장출혈성 대장균은 출혈성 대장염(hemorrhagic colitis; HC)의 원인균으로서, 장관에 장착 후 베로독소(verotoxin, shiga-like toxin)를 생산하여 장관 상피세포에 손상을 준다. 베로독소는 세포에 들어가기 위해 세포 표면에 수용체가 있어야 하나 소, 돼지, 사슴 등에는 수용체가 없어 장출혈성 대장균에 의한 감염을 일으키지 않는다. 이에 반해, 사람은 수용체가 있어 장출혈성 대장균에 의한 감염을 일으키게 된다.

[0004] 장출혈성 대장균 0157:H7은 사람에서, 특히 어린이와 노인에게 있어서 용혈성 요독 증후군(hemolytic uremic syndrom; HUS)을 일으킬 수 있는 대장균으로, 신장 기능의 상실이 일어날 수 있으며, 모든 연령에서의 감염이 보고되어 있다. 또한, 장출혈성 대장균 0157:H7은 가축에서 어린 송아지의 출혈성 설사증(hemorrhagic dysentery)과 이유자돈에서 부종병(edema disease)을 일으키는 것으로 알려져 있다. 송아지의 경우 이들 균주

에 의해 생성되는 독소에 의해 출혈성 설사를 일으키는 경우 별다른 치료제가 없는 실정이며, 질병에서 회복되는 경우나 어미소의 경우 무증상으로 보균하면서 균을 계속적으로 배출하여 이 질병의 전염원이 되고 있다. 반면, 이유자돈의 부종병을 일으키는 균종은 변이형으로서 사람의 질병과는 무관한 것으로 알려져 있다.

[0005] 종래의 장출혈성 대장균 감염증의 치료 방법으로는, 항생제, 인간 면역글로불린 제제, 및 소의 초유의 면역글로불린 항체를 이용한 방법 등이 사용되어 왔다. 항생제를 이용한 방법으로는 포스포마이신이 주로 사용되어 왔으나, 포스포마이신이 박테리아 세포에 결합된 베로독소의 방출을 일으켜 장출혈성 대장균 세포를 죽이는 것을 발견하였다. 그 이후로, 포스포마이신을 환자에게 투여하는 것이 제한되어 왔다. 또한, 인간 면역글로불린 제제는 장출혈성 대장균 감염증 환자의 치료를 위해 투여되었으나 그 효과가 분명하지 않으며, 베로독소 1을 중화시키거나 베로독소 2는 중화시키지 않아 부작용을 나타낸다고 보고되어 있다. 따라서, 인간 면역글로불린 제제는 장출혈성 대장균 감염증의 치료에 효과가 거의 없음을 알 수 있다. 또한, 소의 초유의 면역글로불린 항체를 이용한 방법은 다량의 혈청 항체를 얻기 위해서 비용이 많이 소요되며 분리 및 보관에 따른 기술적 문제점이 있다. 혈청 항체의 경우 혈액으로부터 혈청과 면역글로불린의 분리 및 보관에 따른 제반 기술 및 소요 경비가 고가인 점이 있어 실용적이지 못하고, 초유의 경우 제한된 기간에만 분비되기 때문에 충분한 양의 초유항체 생산은 불가능한 실정이다.

[0006] 일반적으로, 베로독소를 생성하는 장출혈성 대장균(EHEC)은 이미 잘 알려져 있는 E. coli O157:H7 이외에도 O26 및 O111 등 다양한 혈청형이 장출혈성 대장균 감염증 환자에서 분리되고 있으며, 다양한 혈청형의 베로독소 생성 대장균이 소 등의 가축에서 널리 분포하는 것으로 조사되고 있다. 특정 혈청형의 베로독소를 생성하는 대장균을 예방 백신의 항원으로 이용하는 경우 그 혈청형만을 예방할 수 있는 제한적인 효과만 기대할 수 있다. 따라서, 모든 혈청형이 공통적으로 생성되고 병증 유발의 직접적인 원인이 되는 독소에 대한 연구로, 유전자 재조합 기술을 이용한 변이주 작성 즉, 독소를 생성하는 유전자의 변이를 일으켜 약독주를 작성하려는 연구가 진행되어 왔으나 실용화에는 안전성 문제 등 많은 노력과 시일이 소요될 것으로 예상된다. 이와 관련된 연구로, 대한민국 등록특허공보 10-766775호에는 장출혈성 대장균 감염증의 원인균인 쉬가독소(shigatoxins) 또는 동일 개념인 베로독소(verotoxins)를 생성하는 장출혈성 대장균(EHEC)을 국내 소에서 분리하여 백신주로 이용하고, 이들 백신주에서 분비하는 쉬가독소를 대량 생산 및 불활화하여 무독화된 쉬가독소를 유효성분으로 함유하는 장출혈성 대장균 감염증 예방용 독소이드 백신에 관하여 기재되어 있다.

[0007] 상기한 바와 같이, 현재 장출혈성 대장균 감염증 치료제는 그 효과가 일시적인 경우가 대부분이고, 부작용이 심하며, 안전성 등에 문제점이 있다. 따라서, 부작용을 최소화하고 인체에 무해하며 안전하게 복용할 수 있는 장출혈성 대장균 감염증 치료제의 개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

[0008] 한편, 선학초(*Agrimonia pilosa*)는 다년생 숙근초로 장미과에 속하며, 북반구 온대와 브라질 및 남아메리카 등에 10여 종이 분포하는 것으로 알려져 있다. 우리나라의 경우에는 야산의 길가, 들판 등에서 흔히 자라며, 용아, 용아초, 황아초, 황용초, 지선초, 짚신나물 등으로 부르기도 한다. 키는 15~60cm 쯤 자라고 전체에 흰 털이 있으며 버들잎 모양 또는 긴 타원 꼴의 쪽잎이 어긋나게 붙는다. 6~8월에 꽃대 위에 노란색의 작은 꽃이 모여서 핀다. 전통적으로 민간요법, 녹즙 등으로 널리 이용되어 왔고, 폐암, 간암, 식도암, 종양, 통증제거, 지형, 지사, 토혈, 혈뇨, 자궁출혈, 열기 등의 약용으로 널리 이용되어 왔다. 최근에는 선학초 추출물로부터 많은 물질들이 제약원료, 건강식품, 산채, 식물성 영양제 등으로 쓰여지고 있으며, 비타민 K, 탄닌, 정유, 루테올린-7-β-글루코시드, 아피게닌-7-β-글루코시드, 페놀성 배당체, 아그리모닌(agrimoniin), 아그리모노라이드 등이 알려져 있으며, 특히 아그리모닌의 항암효과가 잘 알려져 있다.

[0009] 상기한 바와 같이, 선학초의 다양한 약리활성은 보고되어 있지만, 장출혈성 대장균 감염증에 대한 예방 또는 치료 효과에 대해서는 아직까지 알려져 있지 않으며, 이에 대한 연구도 전무한 상태이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 선학초 추출물의 장출혈성 대장균 감염증에 대한 예방 또는 치료 효과에 대해 연구하던 중, 선학초 추출물이 장출혈성 대장균 O157:H7에 대한 항균활성을 우수하게 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 선학초 추출물을 유효성분으로 함유하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 선학초 추출물을 유효성분으로 함유하는 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명의 조성물의 유효성분인 선학초 추출물은 통상적인 추출 방법에 의해 얻을 수 있고, 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다. 통상적인 추출 방법은 초음파 추출법, 여과법 및 환류 추출법 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0015] 본 발명에서는 선학초 추출물을 하기와 같은 방법으로 추출하여 얻을 수 있다. 먼저, 선학초를 물로 깨끗이 세척하고 건조한 후 분쇄한다. 분쇄된 선학초에 물, C₁~C₄의 알콜 또는 물과 C₁~C₄의 알콜의 혼합용매를 가하고 1~5시간, 바람직하게는 2시간 동안 환류추출한다. 추출액을 여과하고, 잔사에 물, C₁~C₄의 알콜 또는 물과 C₁~C₄의 알콜의 혼합용매를 가하여 다시 2시간 동안 환류추출한다. 이때, 용매의 부피는 분쇄한 선학초 중량의 1~10 배, 바람직하게는 2~5배로 한다. 상기 C₁~C₄의 알콜은 메탄올 또는 에탄올 중에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 에탄올이다. 이후, 선학초 추출액을 여과하고 이전에 얻은 여과액과 합하여 감압 하에 농축한 다음 동결건조하여 분말 형태의 선학초 에탄올 추출물을 얻는다.
- [0016] 본 발명에 따른 선학초 추출물은 장출혈성 대장균 O157:H7에 대한 항균활성을 우수하게 나타냄으로써, 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0017] 상기 장출혈성 대장균 감염증은 장출혈성 대장균 O157:H7에 의해 감염되어 유발되며, 출혈성 대장염, 출혈성 설사증, 출혈성 빈혈, 급성 신부전증, 용혈성 요독 증후군 또는 혈전성 혈소판 감소증 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 조성물은 선학초 추출물과 함께 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 상기 선학초 추출물의 일일 투여량은 약 100~3000 mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명의 조성물은 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 선학초 추출물은 장출혈성 대장균 O157:H7에 대한 항균활성을 우수하게 나타냄으로써, 장출혈성 대장균 감염증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 선학초 추출물의 항균활성을 디스크 확산법으로 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽

게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0025] **실시예 1 : 선학초 추출물의 제조**

[0026] 선학초를 물로 깨끗이 세척하고 건조한 후 분쇄하였다. 분쇄된 선학초 600g에 3,000ml(선학초 함량의 5배량)의 80% 에탄올을 가하고 2시간 동안 환류추출하였다. 추출액을 여과하고, 잔사에 1,500ml의 80% 에탄올을 가하여 다시 2시간 동안 환류추출하였다. 추출액을 여과하고 이전에 얻은 여과액과 합하여 감압 하에 농축한 다음 동결 건조하여 분말 형태의 선학초 에탄올 추출물을 얻었다(39.73mg). 상기 얻어진 분말 형태의 선학초 에탄올 추출물에 증류수를 가하여 최종 농도가 10mg/ml 되도록 하고, 0.45 μ m 여과기로 여과하여 하기 실험에 사용하였다.

[0027] **실험예 1 : 선학초 추출물의 항균활성 측정 - 디스크 확산법**

[0028] 본 발명의 선학초 추출물의 항균활성을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0029] **1. 장출혈성 대장균 0157:H7의 배양**

[0030] *E. coli* 0157:H7 EDL932(*E. coli* 0157:H7; ATCC[®] 43894)를 LB(Luria-Bertani) 아가 플레이트에서 37℃에서 17시간 동안 성장시켰다. 분리된 콜로니를 고르고, 100ml의 멸균된 LB 배지[1ℓ 당 10g의 트립톤, 5g의 효모 추출액 및 10g의 염화나트륨]에 접종한 다음, 250rpm으로 흔들면서 37℃에서 17시간 동안 밤새도록 배양하였다. 미리 따뜻하게 데운 LB 배지를 이용하여 배양물을 1:100으로 희석하였다. 최종 흡광도(OD₆₀₀)가 0.8에 도달할 때까지 희석된 배양물을 250rpm으로 흔들면서 37℃에서 배양하였다. LB 배지를 이용하여 배양물을 1:10으로 희석한 후, 250rpm으로 흔들면서 37℃에서 배양하였다.

[0031] **2. 디스크 확산법에 의한 선학초 추출물의 항균활성 측정**

[0032] LB 배지 내에서 배양된 *E. coli* 0157:H7 200 μ l를 LB 아가 플레이트에 도말하고, 멸균된 6mm 여과지 디스크를 단단하게 플레이트에 놓았다. 상기 실시예 1에서 제조한 10mg/ml의 선학초 에탄올 추출물을 페이퍼 디스크에 처리한 후, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그 다음, 페이퍼 디스크 주변의 억제존(clear zone)의 직경을 측정하였다. 양성 대조군으로는 50mg/ml의 암피실린을 사용하였고, 음성 대조군으로는 증류수를 사용하였다.

[0033] 결과는 표 1 및 도 1에 나타내었다.

표 1

[0034]	선학초 추출물	억제존의 직경(mm)
	선학초 에탄올 추출물	9.1 $\pm$ 0.1
	양성대조군(암피실린)	9.9 $\pm$ 0.1
	음성대조군(증류수)	6.0 $\pm$ 0.0

[0035] 표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 선학초 추출물이 장출혈성 대장균 0157:H7에 대한 항균활성이 우수하게 나타남을 확인하였다.

[0036] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

[0037] **제제예 1 : 산제의 제조**

[0038] 선학초 추출물 200mg

[0039] 유당 100mg

[0040] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0041] **제제예 2 : 정제의 제조**

[0042] 선학초 추출물 200mg

- [0043] 옥수수전분 100mg
- [0044] 유 당 100mg
- [0045] 스테아르산 마그네슘 2mg
- [0046] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0047] **제제예 3 : 캡슐제의 제조**
- [0048] 선학초 추출물 200mg
- [0049] 옥수수전분 100mg
- [0050] 유 당 100mg
- [0051] 스테아르산 마그네슘 2mg
- [0052] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0053] **제제예 4 : 주사제의 제조**
- [0054] 선학초 추출물 200mg
- [0055] 만니톨 100mg
- [0056] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2mg
- [0057] 주사용 멸균 증류수 적량
- [0058] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2mℓ) 상기의 성분을 혼합하여 주사제를 제조하였다.

도면

도면1

