(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년10월22일
(11) 등록번호 10-1453744
(24) 등록일자 2014년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/22 (2006.01) *A61K 33/20* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0059000
(22) 출원일자 2013년05월24일
심사청구일자 2013년05월24일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020070081257 A*
KR1020110072473 A*
KR1020090072527 A
KR1020120104803 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이후장
경남 진주시 석갑로 45, 110동 801호 (평거동, 들말흥한아파트)
(74) 대리인
한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

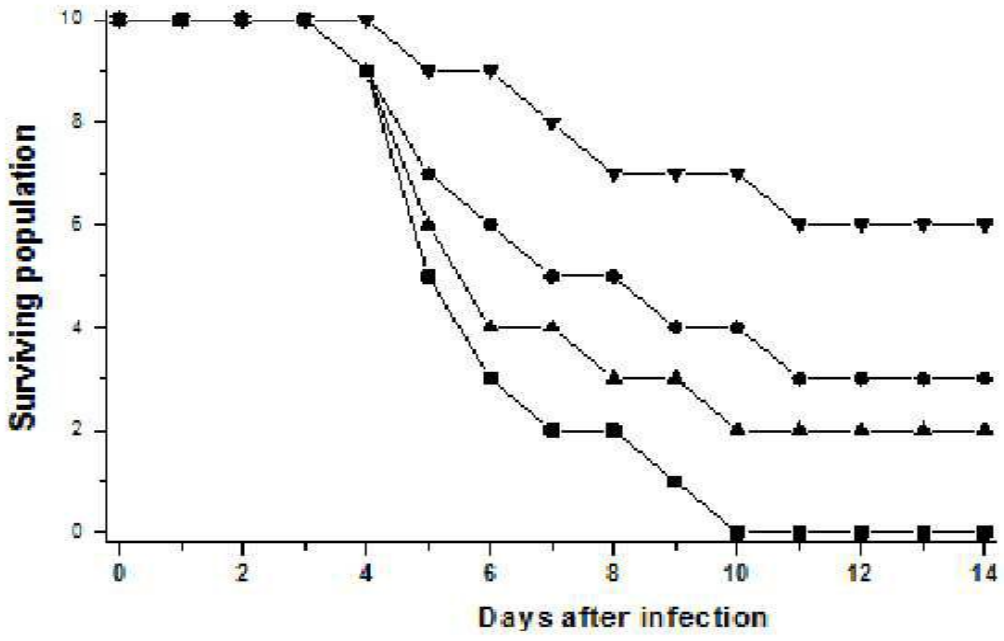
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 **오배자와 염소산나트륨을 포함하는 돼지 연쇄상구균증 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 돼지 연쇄상구균증 치료용 조성물에 관한 것으로 더 상세하게는 오배자와 염소산나트륨을 포함하는 돼지 연쇄상구균증 치료용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012-1118
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구-추가지원)
연구과제명 인수공통전염병 유발 세포내 기생세균의 에너지대사와 증식 저해물질의 탐색 및 이의 적용
기 여 율 1/1
주관기관 경상대학교
연구기간 2010.09.30 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

오배자 추출물 10 내지 15 중량부 및 염소산나트륨 1 내지 3 중량부를 유효성분으로 함유하는 연쇄상구균증 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 오배자 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 오배자 분말을 가용하여 추출한 추출물인, 연쇄상구균증 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

치료대상 동물은 포유동물, 어류 또는 가금류인, 연쇄상구균증 치료용 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

오배자 추출물 10 내지 15 중량부 및 염소산나트륨 1 내지 3 중량부를 유효성분으로 함유하는 연쇄상구균증 세균 감염의 예방 및 개선용 동물사료 첨가제.

청구항 6

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 돼지 연쇄상구균증 치료용 조성물에 관한 것으로 더 상세하게는 오배자와 염소산나트륨을 포함하는 돼지 연쇄상구균증 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] *Streptococcus suis(S. suis)*는 그람-음성의 세균으로 사람과 돼지에서 뇌수막염염, 심내막염, 패혈증, 패혈성 관절염, 폐렴, 유산 등을 유발하는 인수공통전염병이다(Wisselink H.J *et al., Vet. Microbiol.,* 113: 73-82, 2006). 전세계적으로, *S. suis*의 감염은 양돈산업에 심각한 경제적 손실을 야기하고 있으며, 돼지의 건강관리상에 많은 문제를 유발시키고 있다. *S. suis*는 상기도와 소장에 기생하며(Robertson, I.D. *et al., Vet. Rec.,* 124: 391-394, 1989), 감염된 성돈에서는 무증상의 잠복기 상태로 주변 돼지들을 지속적으로 감염시킨다(Sriskandan, S. *et al., PLoS Med.,* 3: e187, 2006). 감염된 어린 돼지의 경우에는, 뇌수막염, 패혈증으로 폐사하게 된다. *S. suis*는 감염된 동물과의 직접적인 접촉을 통해 사람에게 감염되는 인수공통전염병으로(Kennedy, K.J *et al., Med. J. Aust.,* 189: 413, 2008), 주로 동남·동서남 아시아에서 사람들에게 뇌수막염을 유발시키고 있다. 2005년, 중국의 사천지역에서 215명이 돼지로부터 유래한 *S. suis*에 감염되어 38명이 사망한 바 있다(Yu, H *et al.,Emerg. Infect. Dis.,* 12: 914-920, 2006).

[0003] 현재, *S. suis*의 감염증의 예방과 치료에 마그로라이드계와 플루오르퀴놀린계 항생제들이 주로 사용되고 있으나(Wang, L. *et al., Braz. J. Microbiol.,* 40: 980-987, 2009), *S. suis*의 내성이 증가함에 따라, 치료효과가 현저히 낮아지고 있다.

[0004] 오랜 동안, 한국과 중국을 포함한 아시아의 많은 국가들에서 한약제가 감염병 치료제로 사용되고 있다. 오배자(*Galla Rhois*)는 오래 전부터 사람의 설사, 지속적인 기침, 그리고 갑작스런 발한 등을 치료하기 위해 사용되어 왔다. 오배자는 메틸갈레이트, 갈릭산과 같은 많은 탄닌 성분을 함유하고 있는데(Chen, J.C. *et al., J. Ethnopharmacol.,* 103: 385-391, 2006), 갈릭산으로부터 형성된 가수성 탄닌 폴리머인 갈로탄닌은 항균 효과를 갖고 있으며(Pettinari, A. *et al., Antioxid. Redox Signal.,* 8: 121-129, 2006), 메틸갈레이트와 갈릭산은 대장균과 연쇄상구균들에 대한 항균효과를 갖고 있는 것으로 보고되어 있다(Ahn, Y.J. *et al., J. Appl. Microbiol.,* 84: 439-443, 1998).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러나, 아직까지 *S. suis*의 치료제 개발은 초기단계에 있다. 이에 본 발명은 돼지 연쇄상구균증 치료용 조성물에 관한 것으로서, 돼지 연쇄상구균증 치료에 사용된 항생제를 대체할 수 있는 치료조성물 개발에 관한 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, 오배자 추출물 및 염소산나트륨을 유효성분으로 함유하는 연쇄상구균증 치료용 조성물이 제공된다.

[0007] 상기 연쇄상구균증 치료용 조성물에 있어서, 상기 오배자 추출물은 오배자를 물, C1 내지 C4의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용하여 추출한 추출물일 수 있다.

[0008] 상기 연쇄상구균증 치료용 조성물은 치료대상 동물은 포유동물, 어류 및 가금류일 수 있다.

[0009] 상기 연쇄상구균증 치료용 조성물은 상기 오배자 추출물 10 내지 15 중량부 및 상기 염소산나트륨 1 내지 3 중량부를 포함할 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 관점에 따르면, 오배자 추출물 및 염소산나트륨을 유효성분으로 함유하는 연쇄상구균증 세균 감염의 예방 및 개선용 동물사료 첨가제가 제공된다.

[0011] 상기의 동물사료 첨가제는 침지, 분무 또는 혼합하여 동물사료에 첨가하는 것을 특징으로 하는 동물사료 첨가제일 수 있으며, 상기 동물사료 첨가제를 포함하는 사료가 제공될 수 있다.

[0012] 상기 연쇄상구균증 세균 감염의 예방 및 개선용 동물사료 첨가제는 상기 오배자 추출물 10 내지 15 중량부 및 상기 염소산나트륨 1 내지 3 중량부를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0013] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 오배자와 염소산나트륨 합제를 *S. suis* 감염 이유자돈에 대해 사료에 혼합하여 투여한 결과, 70%의 높은 생존률을 나타내어, 기존에 돼지 연쇄상구균증 치료에 사용된 항생제를 대체할 수 있는 치료조성물 개발에 매우 효과적이다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 오배자 추출물의 *S. suis*에 대한 항균효과에 관하여 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 오배자 추출물의 투여에 따른 *S. suis* 감염 마우스의 폐사율에 관하여 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 오배자 추출물, 염소산나트륨 및 오배자 추출물과 염소산나트륨 합제의 투여에 따른 *S. suis* 감염 이유자돈의 폐사율에 관하여 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 발명을 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하 실시예 및 실험예는 본 발명

의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전히 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0016] **실시예 1: 오배자의 *S. suis*에 대한 항균효과**

[0017] **균주 배양**

[0018] *S. suis* (KVCC-BA0700673)를 한국수의미생물자원센터로부터 분양받아 사용하였으며, 배양은 BHI 배지(brain heart infusion broth, Difco, 미국)에 37℃에서 18시간 동안 배양하여 사용하였다.

[0019] **오배자 추출**

[0020] GS-Bio(전주, 한국)로부터 얻은 오배자 분말을 종래에 알려진 방법에 따라 추출·분말화하였다(Ahn, Y.J. *et al, J. Appl. Microbiol.,* 84: 439-443, 1998). 1 kg의 오배자 분말을 60℃ 오븐에서 3일 동안 건조시킨 후 실온에서 메탄올로 추출하였다. 추출한 상층액을 Toyo filter paper no. 2 거름종이(Toyo Roshi Kaisha Ltd., 일본)로 걸러 잔류물질을 제거한 후 진공회전증발기(Iwai Co., 일본)을 사용하여 여과액을 농축하고 동결건조시켜 분말화하였다. 오배자 분말 1 kg으로 60 g의 동결건조 분말을 얻었다. 오배자 동결건조 분말을 생리식염수에 용해시켜 1 g/ml의 표준용액을 조제하였다. 표준용액을 실리카겔 컬럼크로마토그래피(70-230 mesh; Merck, 독일)와 고성능액체크로마토그래피(Delta Prep 4000, 캐나다)로 분석한 결과 45.8%의 탄닌(tannin), 16.4%의 메틸갈레이트(methyl gallate)와 4.3%의 갈릭산(gallic acid)을 함유하고 있었다.

[0021] **항균활성 측정**

[0022] 도 1은 오배자 추출물의 *S. suis*에 대한 항균효과를 나타낸 것이다. 배양된 *S. suis*를 인산완충식염수(pH 7.4)로 희석하여 2×10^4 CFU/ml로 조정한 배양 배지에 오배자 추출물 표준용액을 인산완충식염수로 0(■), 1(●), 2(▲), 5(▼) mg/ml로 희석하여 첨가한 후 8시간 동안 37℃에서 배양하였고, 배양 후 0, 2, 4, 8시간 마다 균수를 측정하였다. 각각 1 ml의 배양액을 2%(v/v)의 우태아혈청(Difco, 미국)이 포함된 한천배지에 배양하여 콜로니를 세어 CFUs(colony-forming units)로 나타내었다. 0시간의 균수를 100%로 하여 상대적 생존률로 나타내었다. *S. suis* 배지에 오배자 추출물을 배양한 결과, 배양 후 4, 8시간째에 오배자 추출물을 2 mg/ml 와 5 mg/ml 투여한 군에서 대조군에 비해 통계적으로 유의한 *S. suis*에 대한 항균 효과를 확인하였다. 종래에 보고된 바에 의하면, 오배자에서 분리된 10 mg/disc 농도의 탄닌은 장내구균(*Streptococcus faecalis*)의 성장은 억제한 반면, 비피더스균(*Bifidobacterium adolescentis* 및 *Bifidobacterium longum*)의 성장에는 별다른 영향을 주지 않았다(Ahn, Y.J. *et al., J. Appl. Microbiol.,* 84: 439-443, 1998).

[0023] **실시예 2: 마우스 감염**

[0024] 6주령된 40마리의 암컷 BALB/c 마우스 (평균 체중, 20.7±0.6g)를 샘타코 바이오(오산, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 적응시킨 후 본 발명에 사용하였다. 마우스는 각 그룹 당 10 마리씩 4 그룹으로 무작위로 나누어, 모든 마우스는 2×10^9 CFU/ml로 조정된 *S. suis*를 0.1 ml의 인산완충식염수에 녹여 복강 내 주입(intraperitoneal injection)하여 감염시켰다. 감염 후 대조군은 0.1 ml의 멸균한 인산완충식염수를 그리고 투여군1-3은 12일 동안 매 24시간 마다 각각 5, 10, 20 mg/kg 체중의 오배자 추출물을 경구 투여하였다. 물과 사료는 제한하지 않았으며 22±3℃ 온도, 40-70%의 습도와 12시간의 낮과 12시간 밤 주기(LD 12:12)를 유지하였다. 감염된 12일 동안 매일 모든 마우스의 병적과 생존여부를 관찰하여 기록하였다. 도 2는 오배자 추출물의 투여에 따른 *S. suis* 감염 마우스의 폐사율을 관찰한 그래프이며, 대조군(■), 오배자 추출물 5(●), 10(▲), 20(▼) mg/kg 체중 투여군을 나타낸다. 대조군은 *S. suis* 감염 후 8일째에 모두 폐사한 반면, 오배자 추출물 5, 10, 20 mg/kg 체중으로 투여한 군의 경우, *S. suis* 감염 12일째의 폐사율이 각각 80, 70, 50%를 나타내었다. Li에 의해 종래에 보고된 41 mg/kg 체중의 연교 추출물은 *S. suis*에 감염된 마우스의 폐사율을 25% 감소하였다. 본 발명에서 *S. suis* 감염 후 오배자 추출물 20 mg/kg 체중 투여군의 폐사율은 40%이며, *S. suis*에 항균효과가 있는 연교(Forsythia suspensa)의 추출물의 농도와 투여 기간은 유사하였다(Li, Y. *et al., The 5thInternational Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Wuhan, China,* 1-5, 2011). 결론적으로 본 발명의 결과는 오배자 추출물 20 mg/kg은 *S. suis* 감염 마우스에 치료에 효과적임을 확인하였다.

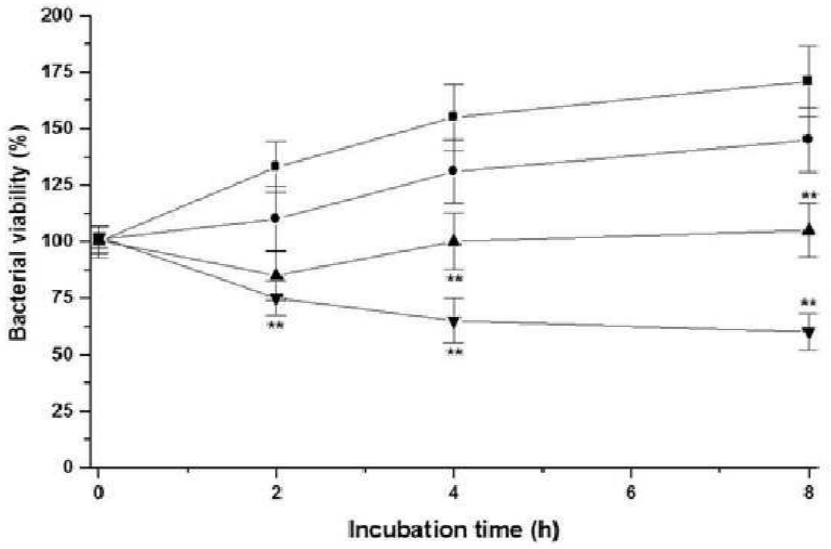
[0025] **실시예 3: 이유자돈 감염실험**

[0026] 5주령된 40마리의 이유자돈 (평균체중, 6.2±0.49 kg)을 가야육종(주) (경남 고성, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 적응시킨 후 본 발명에 사용하였다. 모든 이유자돈은 1.0×10^8 CFU/ml로 조정된 1 ml의 *S. suis*를 비강을 통해 분무 주입하여 감염시켰다. 감염된 이유자돈들은 10마리씩 4그룹으로 나누어, 대조군은 일반사료를 급이하

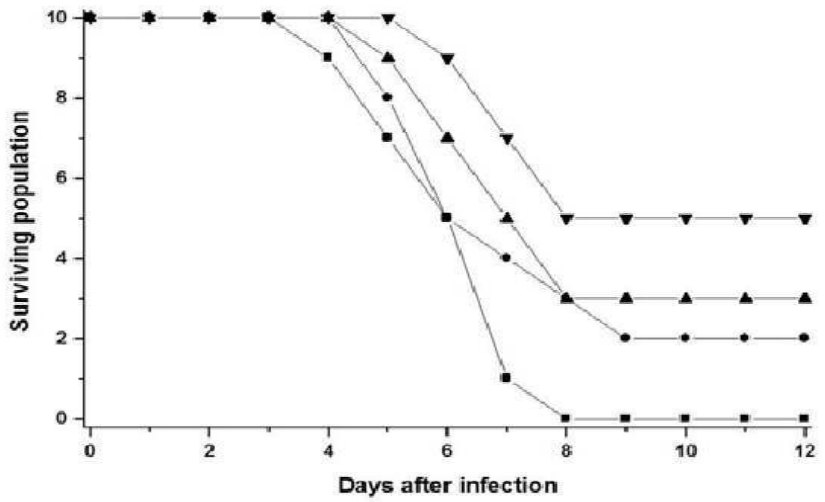
였다. 투여군1은 일반사료 1 kg 당 오배자 추출물 0.5%를 혼합하여 급이하였고, 투여군2는 일반사료 1 kg 당 0.8 g 염소산나트륨을 혼합하여 급이하였으며, 투여군3는 일반사료 1 kg 당 0.5% 오배자 추출물과 염소산나트륨 0.8 g를 혼합하여 급이하였다. 모든 이유자돈의 생존여부를 14일 동안 매일 관찰하여 기록하였다. 도 3은 오배자 추출물, 염소산나트륨 및 오배자 추출물과 염소산나트륨 합제의 투여에 따른 *S. suis* 감염 이유자돈의 폐사율을 나타낸 것으로, 대조군(■), 1 kg 일반사료 + 0.5% 오배자추출물(●), 1 kg 일반사료 + 0.8 g 염소산 나트륨(▲), 1 kg 일반사료 + 0.5% 오배자 추출물 + 0.8 g 염소산 나트륨(▼)으로 표시하였다. 대조군(■)의 경우, *S. suis* 감염 후 10일째에 모두 폐사하였으나, 염소산나트륨 0.8 g를 사료에 첨가하여 급이한 군의 경우(▲), *S. suis* 감염 후 14일째에 20%의 생존률을 나타내었으며, 오배자 추출물 0.5%를 사료에 첨가하여 급이한 군의 경우(●), *S. suis* 감염 후 14일째에 30%의 생존률을 나타냈다. 그러나 일반사료에 오배자 0.5%와 염소산나트륨 0.8 g을 혼합하여 합제를 투여한 군의 경우(▼), *S. suis* 감염 후 14일째에 60%의 높은 생존률을 나타내었고, 이는 기존에 돼지 연쇄상구균증 치료에 사용된 항생제를 대체할 수 있는 치료조성물로 사료된다.

도면

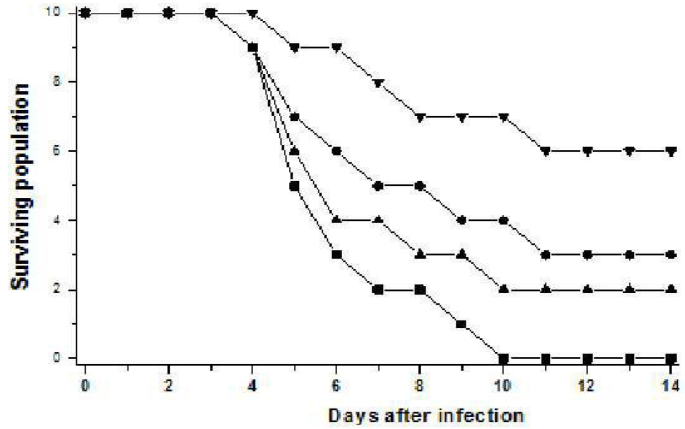
도면1



도면2


Surviving population
Days after infection
0
2
4
6
8
10
12

도면3


Surviving population
Days after infection
0
2
4
6
8
10
12
14