(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0131072
(43) 공개일자 2021년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/353 (2006.01) *A61K 31/192* (2006.01)
A61K 36/489 (2006.01) *A61K 36/70* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 1/02* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/353 (2013.01)
A61K 31/192 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0049422
(22) 출원일자 2020년04월23일
심사청구일자 2020년04월23일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김기영
경기도 용인시 수지구 푸른솔로 49, 706동 1302호(죽전동, 도담마을7단지뜨리에체아파트)
김다슬
경기도 안산시 단원구 광덕동로 25, 107동 1301호(고잔동, 안산레이크타운푸르지오)
(74) 대리인
특허법인 하나

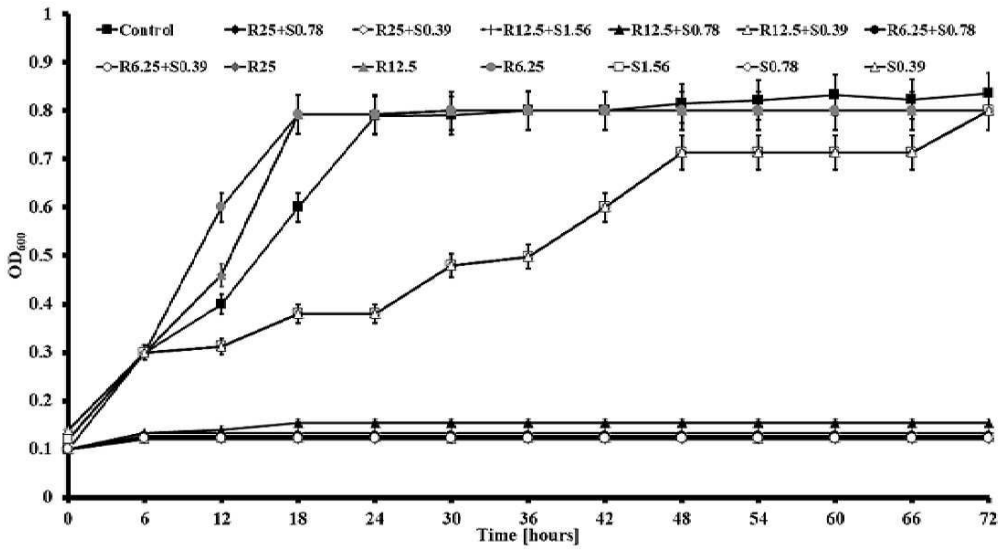
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **소포라플라바논 G 및 레인을 포함하는 구강균에 대한 항균용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G) 및 레인(Rhein)을 포함하는 구강균에 대한 항균용 조성물 및 구강균에 대한 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 36/489 (2013.01)
A61K 36/70 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 1/02 (2018.01)
A61P 31/04 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	GRRC 경희 2018-B4 (20192227)
과제번호	GRRC 경희 2018-B4 (20192227)
부처명	경기도
과제관리(전문)기관명	경기도
연구사업명	글로벌의약품소재개발연구센터
연구과제명	미토콘드리아 특이 질환 치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2018.07.01 ~ 2020.06.30

명 세 서

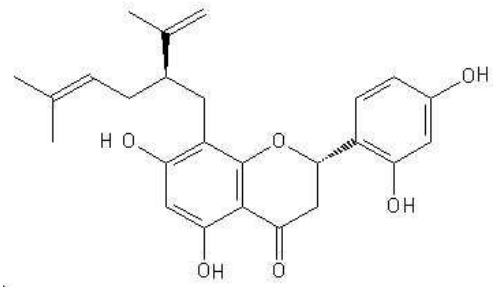
청구범위

청구항 1

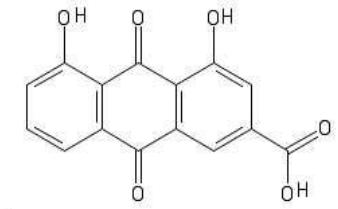
하기 화학식 1의 소포라플라바논 G(Sophoraflavanon G); 및

하기 화학식 2의 레인(Rhein)을 포함하는 구강균에 대한 항균용 조성물.

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 화학식 1의 소포라플라바논 G는 고삼(*Sophora flavescens*)으로부터 분리된 것인, 항균용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 화학식 2의 레인은 대황(*Rheum undulatum*)로부터 분리된 것인, 항균용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 구강균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*), 스트렙토콕커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*), 액티노마이세스 비스코서스(*Actinomyces viscosus*, *A. viscosus*), 후소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) 및 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 균인 것인, 항균용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 메탄올, 에탄올, 소디움도데실설페이트, 트리톤(Triton) X-100 또는 이들의 혼합물을 더 포함하

는 항균용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 하나 이상의 항균제를 더 포함하는 항균용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

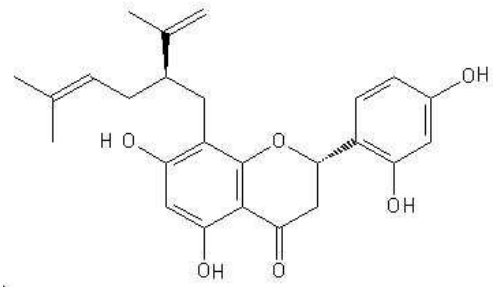
상기 항균제는 옥시테트라사이클린, 옥사실린 및 암피실린으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 항균용 조성물.

청구항 8

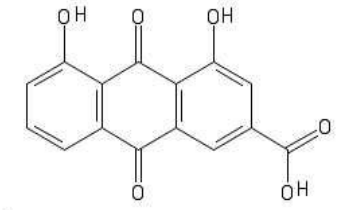
하기 화학식 1의 소포라플라바논 G; 및

하기 화학식 2의 레인을 포함하는 구강균에 의한 감염증 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 구강균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(Streptococcus mutans, *S. mutans*), 스트렙토콕커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*), 액티노마이세스 비스코서스(*Actinomyces viscosus*, *A. viscosus*), 후소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) 및 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 균인 것인, 약학적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

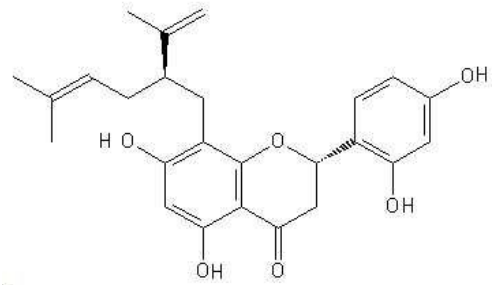
상기 조성물은 옥시테트라사이클린, 옥사실린 및 암피실린으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 항균제를 더 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 11

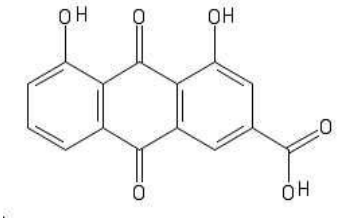
하기 화학식 1의 소포라플라바논 G; 및

하기 화학식 2의 레인을 포함하는 구강균에 대한 항균 보조제.

[화학식 1]



[화학식 2]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G) 및 레인(Rhein)을 포함하는 구강균에 대한 항균용 조성물 및 구강균에 대한 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*은 구강 내 감염의 주요 원인균이로, 성인의 약 60%가 이들에 의하여 치아 우식과 치주 질환을 겪고 있다. 이러한 구강 내 질환은 대개 치면, 치은 또는 치은하방에 군집을 이루는 상주 세균에 의한 감염질환들로서, 사람의 구강 내에는 500종 이상의 세균이 존재하는 것으로 보고되었다.

[0003] 치주 질환과 치아 우식증으로 대표되는 구강 내 질환의 가장 중요한 요인은 구강 내 상주세균으로 구성된 치태라고 할 수 있다. 치주 질환 및 치아 우식증과 관련된 주요 세균들은 주로 그람음성균으로 치주 질환의 시작과 진행에 연관되어 있다.

[0004] 한편, 최근 구강 내 질환뿐만 아니라 구강 내 세균들이 폐렴이나 심혈관질환 등의 전신질환과도 연관이 있는 것으로 보고되었다. 최근 이러한 문제점을 해결하고 약물의 부작용으로부터 안전하게 사용할 수 있는 구강 치료제에 대한 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1555214호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G) 및 레인(Rhein)을 포함하는 구강균에 대한 항균용 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

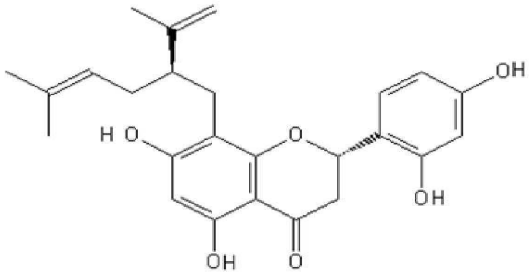
[0007] 본 발명의 다른 목적은 소포라플라바논 G 및 레인을 포함하는 구강균에 의한 감염증 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 소포라플라바논 G 및 레인을 포함하는 구강균에 대한 항균 보조제를 제공하고자 하는 것이다.

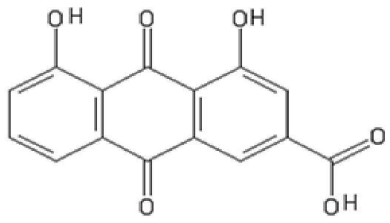
과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 측면은 하기 화학식 1의 소포라플라바논 G; 및 하기 화학식 2의 레인을 포함하는 구강균에 대한 항균용 조성물에 관한 것이다.

화학식 1

[0010] 

화학식 2

[0011] 

[0012] 상기 화학식 1의 소포라플라바논 G는 (2s)-2-(2,4-디 히드록시 페닐) -5,7- 디 히드 록시 -8- -[(2R) -5- 메틸 -2-(프로프 -1- 엔 -2- 일) 헥스 -4- 엔 -피라딘 -1- 일] -2,3- 디 히드로 -4H- 크로 멘 -4- 온 (2S)-2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-[(2R)-5-methyl-2-(prop-1-en-2-yl)hex-4-en-1-yl]-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one으로 명명될 수 있다.

[0013] 상기 화학식 2의 레인은 4,5- 디 하이드 록시 -9,10- 디 옥소 안트라센 -2- 카르 복실 산 4,5-dihydroxy-9,10-dioxoanthracene-2-carboxylic acid으로 명명될 수 있다.

[0014] 본 발명에서 '소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G)'는 휘발성 피토시데스(Phytocides)의 한 종류이다. 상기 피토시데스는 식물에서 추출한 항균성 유기 화합물로, 식물 면역 및 생태계 내 유기체 간의 관계에 중요한 역할을 하는 물질이며, 또한 박테리아, 진균 및 원생동물의 성장과 발달을 저지하거나 죽이는 작용을 한다. 양파, 마늘, 고추냉이, 소나무, 참나무, 유칼립투스, 소포라 속에 속하는 식물 등이 피토시데스를 생산한다. 상기 피토시데스의 항균력의 범위는 종에 따라 크게 나뉘며, 원생동물, 박테리아, 곰팡이, 곤충에 영향을 주로 주지만, 동물에는 영향이 적은 경우가 많다.

[0015] 상기 소포라플라바논 G는 고삼(*Sophora flavescens*), 소포라 파키카르(*Sophora pachycarpa*) 또는 소포라 엑시

구아(*Sophora exigua*)로부터 분리될 수 있다.

[0016] 구체적으로, 상기 화학식 1의 소포라플라바논 G는 고삼으로부터 분리된 것일 수 있다.

[0017] 본 발명에서 '고삼(*Sophora flavescens*)'은 쌍떡잎 식물 장미목 콩과에 속하며, 해발 1000 m 이하의 초지에서 흔히 자라는 여러 해 살이 풀로 우리나라 각처의 산과 들에 자생한다. 가을에 뿌리를 캐어 씻어 말린 것을 고삼이라 하며, 상기 고삼은 항알러지, 항부정맥, 항균작용, 이뇨작용 등의 약리 효과가 보고되어 있어 다양한 질환에 대해 약재로 활용되고 있다.

[0018] 상기 고삼의 주요 활성 성분으로는 마트린(matrin), 옥시마트린(Oxymatrine), 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G), 큐라리논(kurarinone), 알칼로이드(alkaloid), 플라보노이드(flavonoid) 및 사포닌(saponin)을 함유하고 있다.

[0019] 상기 고삼은 40℃ 미만의 저온의 물 또는 60℃ 이상의 고온의 물을 용매로 하여 추출될 수 있으며, 또는 알코올을 용매로 하여 추출될 수 있다. 상기 알코올은 탄소수 1내지 6의 지방족 알코올일 수 있으며, 구체적으로 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 핵산 등이 사용 될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0020] 상기 알코올 추출물은 유기용매 및 물로 분배 추출될 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1내지 10의 지방족 탄화수소, 탄소수 1내지 10의 지방족 할로겐화 탄화수소 및 탄수소 2 내지 10의 에스테르 중에서 선택될 수 있다.

[0021] 상기 고삼 추출물에 함유된 화학식 1의 소포라플라바논 G 화합물은 추가적인 크로마토그래피, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피법에 의해 분리될 수 있으며, 단일 화합물을 분리하기 위한 공지된 다양한 방법이 적용될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 '레인(Rhein)'은 루바브(Rhubarb)에서 얻은 안트라퀴논 그룹의 물질이다.

[0023] 상기 레인은 대왕(*Rheum undulatum*), 장엽대황(*Rheum plamatum*), 세나레티 큘라타(*Cassia reticulate*)로부터 분리될 수 있다.

[0024] 구체적으로, 상기 화학식 2의 레인은 대황(*Rheum undulatum*)으로부터 분리된 것일 수 있다.

[0025] 본 발명에서 '대황'은 마디풀과에 속하는 다년생 숙근성 초본의 식물로서, 뿌리 및 뿌리줄기(근경)에 안트라키논 유도체 3.2~6.6%와 타닌질 8.2~3.6% 등을 함유하고 있다. 주요성분으로는 레인 $C_{15}H_8O_6$(녹는 점 321~325℃), 알로에모딘 $C_{15}H_{10}O_5$, 에모딘 $C_{15}H_{10}O_5$(프란큘라 에모딘), 크리소파놀$C_{15}H_{10}O_4$(크리소판산), 파스치온 $C_{16}H_{12}O_5$(파리에탄) 등이 있고, 그 외 유리 안트라키논을 소량 포함한다.

[0026] 상기 대황은 300℃ 이상의 고온의 물을 용매로 하여 추출될 수 있으며, 또는 알코올을 용매로 하여 추출될 수 있다. 상기 알코올은 탄소수 1내지 6이 지방족 알코올일 수 있으며, 구체적으로 메탄올, 에탄올, 이소프로판올, 부탄올, 핵산 등이 사용 될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0027] 상기 알코올 추출물은 유기용매 및 물로 분배 추출될 수 있다. 상기 유기용매는 탄소수 1내지 10의 지방족 탄화수소, 탄소수 1내지 10의 지방족 할로겐화 탄화수소 및 탄수소 2 내지 10의 에스테르 중에서 선택될 수 있다.

[0028] 상기 대황 추출물에 함유된 화학식 2의 레인은 추가적인 크로마토그래피, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피법에 의해 분리 될 수 있으며, 단일 화합물을 분리하기 위한 공지된 다양한 방법이 적용될 수 있다.

[0029] 구체적으로, 상기 구강균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*), 스트렙토콕커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*), 액티노마이세스 비스코서스(*Actinomyces viscosus*, *A. viscosus*), 후소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) 및 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 균일 수 있다.

[0030] 보다 구체적으로, 상기 구강균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스 KACC16833, 스트렙토콕커스 소브리누스KCTC5809, 액티노마이세스 비스코서스 KCTC9146, 후소박테리움 뉴클레아툼 KCTC2640 및 포르피로모나스 긴기발리스 KCTC5809로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0031] 상기 스트렙토코쿠스 뮤탄스 KACC16833, 스트렙토콕커스 소브리누스KCTC5809, 액티노마이세스 비스코서스 KCTC9146, 후소박테리움 뉴클레아툼 KCTC2640 및 포르피로모나스 긴기발리스 KCTC5809는 농촌진흥청 농업유전자원정보센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC, Jeonju, Korea), 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Daejeon, Korea)로부터 분양받을 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에서 소포라플라바논 G 및 레인을 포함하는 조성물의 최소억제농도(MIC)를 확인한 결과, 소포라플라바논 G 또는 레인을 단독으로 처리하였을 때와 비교하여 구강균에 대한 최소억제농도가 낮은 것으로 나타났으며, 모든 구강균에 대한 감수성이 있는 것을 확인하였다(표 1 및 표 2).

[0033] 본 발명의 일 실시예에서 소포라플라바논 G 및 레인을 포함하는 조성물의 농도별 성장 저해 활성을 확인한 결과, 농도 상관없이 전반적으로 성장 저해 활성 효과가 우수하게 나타남을 확인하였다(도 1 및 표 3).

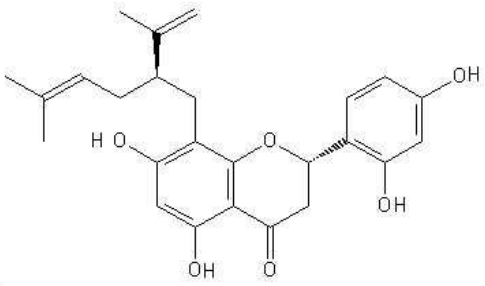
[0034] 상기 결과를 통해, 소포라플라바논 G 및 레인을 혼합함으로써 구강균에 대한 항균효과가 현저하게 향상되며, 기존 항생제와 달리 구강 균주에 대한 내성이 없는 것을 확인하였다.

[0035] 상기 조성물은 메탄올, 에탄올, 소디움도데실설페이트, 트리톤(Triton) X-100 또는 이들의 혼합물을 더 포함할 수 있다.

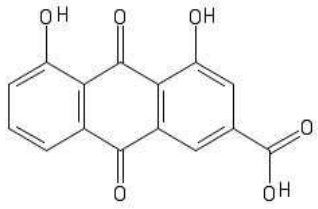
[0036] 상기 조성물은 하나 이상의 항균제를 더 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 항균제는 옥시테트라사이클린, 옥사실린 및 암피실린으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0037] 본 발명의 다른 일 측면은 하기 화학식 1의 소포라플라바논 G; 및 하기 화학식 2의 레인을 포함하는 구강균에 의한 감염증 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0038] [화학식 1]

[0039] 

[0040] [화학식 2]

[0041] 

[0042] 상기 '소포라플라바논 G' 및 '레인'에 관한 설명은 전술한 바와 동일하다.

[0043] 본 발명에서 '구강균에 의한 감염증'은 스트렙토코쿠스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*, *S. mutans*), 스트렙토콕커스 소브리누스(*Streptococcus sobrinus*, *S. sobrinus*), 액티노마이세스 비스코서스(*Actinomyces viscosus*, *A. viscosus*), 후소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*), 포르피로모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 또는 이들의 조합을 원인균으로 하여 발생하는 구강 질환을 모두 포함한다.

[0044] 구체적으로, 상기 구강균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스, 스트렙토콕커스 소브리누스, 액티노마이세스 비스코서스, 후소박테리움 뉴클레아툼 및 포르피로모나스 긴기발리스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 균일 수 있다.

[0045] 보다 구체적으로, 상기 구강균은 스트렙토코쿠스 뮤탄스 KACC16833, 스트렙토콕커스 소브리누스KCTC5809, 액티노마이세스 비스코서스 KCTC9146, 후소박테리움 뉴클레아툼 KCTC2640 및 포르피로모나스 긴기발리스 KCTC5809로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

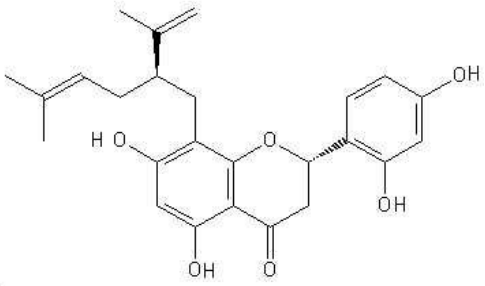
[0046] 또한, 상기 조성물은 옥시테트라사이클린, 옥사실린 및 암피실린으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 항균제를 더 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명의 일 실시예에서 소포라플라바논 G 및 레인을 포함하는 조성물의 최소억제농도(MIC) 및 성장 저해 활성을 확인한 결과, 소포라플라바논 G 또는 레인을 단독으로 처리하였을 때와 비교하여 구강균에 대한 최소억제농도가 낮고, 농도 상관 없이 성장 저해 활성 또한 효과가 우수함을 확인하였다(표 1 내지 표 3 및 도 1).

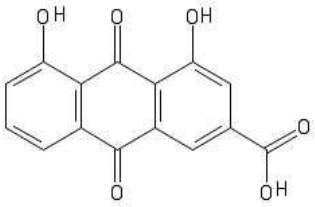
[0048] 상기 결과를 통해 소포라플라바논 G 및 레인의 항균 활성이 효과적임을 확인하였는 바, 구강균 감염에 의해 발생하는 구강 질환 치료 및 예방에 활용할 수 있음을 확인하였다.

[0049] 본 발명의 또 다른 일 측면은 하기 화학식 1의 소포라플라바논 G; 및 하기 화학식 2의 레인을 포함하는 구강균에 대한 항균 보조제에 관한 것이다.

[0050] [화학식 1]

[0051] 

[0052] [화학식 2]

[0053] 

[0054] 상기 '소포라플라바논 G' 및 '레인'에 관한 설명은 전술한 바와 동일하다.

[0055] 상기 항균 보조제는 옥시테트라사이클린, 옥사실린 및 암피실린으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 항생제에 대한 항균 보조제일 수 있다.

발명의 효과

[0056] 본 발명의 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G, SPF-G) 및 레인(Rhein)을 포함하는 조성물은 식물에서 유래한 단일 화합물로 인체에 대한 독성이 적고, 항균활성이 우수하여, 구강균에 의한 질환 예방, 개선 및 치료 목적의 조성물로 다양하게 활용될 수 있다.

[0057] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야한다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G, SPF-G) 및 레인(Rhein) 비율에 따른 *P. gingivalis*의 성장 곡선을 그래프로 나타낸 것이다.

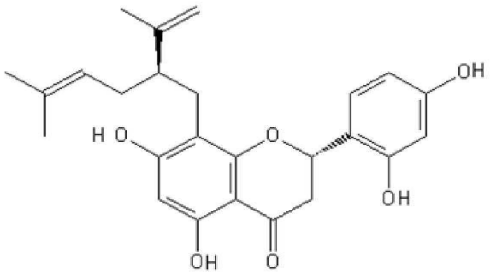
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예에 관하여 상세히 서술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0060] **실시예 1. 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone) 분리**

[0061] 고삼(*Sophora flabescens*) 추출물에 함유된 화학식 1의 화합물은 물을 이용하여 분배 추출하였으며, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 분리하여, 하기 화학식 1의 소포라플라바논 G 화합물을 수득하였다.

[0062] [화학식 1]

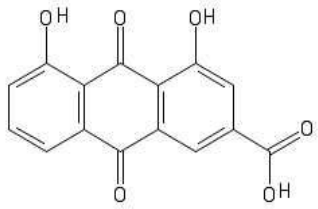


[0063]

[0064] **실시예 2. 레인(Rhein) 분리**

[0065] 대황(*Rheum undulatum*) 추출물에 함유된 화학식 2의 화합물은 물을 이용하여 분배 추출하였으며, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 분리하여, 하기 화학식 2의 레인 화합물을 수득하였다.

[0066] [화학식 2]



[0067]

[0068] **실험예 1. 소포라플라바논 G 및 레인의 구강균에 대한 항균활성**

[0069] 소포라플라바논 G(Sophoraflavanone SPF-G) 및 레인(Rhein)의 구강균에 대한 최소억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위해, broth microdilution assay를 수행하였다.

[0070] 먼저, 96 웰(well) 플레이트에 OD600=0.1의 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*을 넣어준 후, 각 화합물을 최대 100 μg/mL로부터 2배씩 희석하여 처리하였다. 각 플레이트는 37°에서 24시간 배양한 다음, 세포의 성장을 억제하는 최소 농도로 MIC (Minimum Inhibitory concentration) 값을 구하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였다.

[0071] *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*에 대한 양성 대조군으로 옥시테트라사이클린, 옥사실린, 암피실린을 사용하였다. MIC 값은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0072]

화합물	MIC 값(μg/mL)				
	S. mutans	*A. viscosus*	*F. nucleatum*	*P. gingivalis*	*S. sobrinus*
옥시테트라사이클린 (Oxytetracycline)	50	0.195	0.195	100	1.56
옥사실린(Oxacillin)	>100	1.56	0.195	1.56	>100
암피실린(Ampicillin)	>100	>100	>100	>100	>100
소포라플라바논 G(Sophoraflavanone G)	3.125	3.125	3.125	>100	3.125
레인(Rhein)	100	100	6.25	25	25

[0073] 그 결과, 옥시테트라사이클린은 *S. mutans* (KACC16833: 50 μg/mL), *S. sobrinus* (KCTC5809: 1.56 μg/mL), A. viscosus (KCTC9146: 0.195 μg/mL), *F. nucleatum* (KCTC2640: 0.195 μg/mL), *P. gingivalis* (KCTC5809: 100 μg/mL)의 성장을 저해함을 확인하였다.

[0074] 옥사실린은 *A. viscosus* (KCTC9146: 1.56 μg/mL), *F. nucleatum* (KCTC2640: 0.195 μg/mL), *P. gingivalis* (KACC: 1.56 μg/mL)의 성장을 저해하는 반면, *S. mutans* (KACC16833), *S. sobrinus* (KCTC5809)이 내성을 가지

는 것을 확인하였다.

[0075] 암피실린의 경우 *S. mutans* (KACC16833), *S. sobrinus* (KCTC5809), *A. viscosus* (KCTC9146), *F. nucleatum* (KCTC2640), *P. gingivalis* (KCTC5809)이 내성을 나타내었다.

[0076] 레인(Rhein)은 *S. mutans* (KACC16833: 100 μg/mL), *S. sobrinus* (KCTC5809: 25 μg/mL), *A. viscosus* (KCTC9146: 100 μg/mL), *F. nucleatum* (KCTC2640: 6.25 μg/mL), *P. gingivalis* (KCTC5809: 25 μg/mL)의 성장을 저해하였으나, 비교적 높은 농도에서 효과가 나타났다.

[0077] 소포라플라바논 G는 *S. mutans* (KACC16833: 3.125 μg/mL), *S. sobrinus* (KCTC5809: 3.125 μg/mL), *A. viscosus* (KCTC9146: 3.125 μg/mL), *F. nucleatum* (KCTC2640: 3.125 μg/mL)의 성장을 저해한 반면, *P. gingivalis* (KCTC5809)의 성장은 저해하지 못함을 확인하였다.

[0078] 상기 결과를 통해 소포라플라바논 G의 항균 활성이 레인 보다는 비교적 우수하게 나타나나, *P. gingivalis*에 대해서는 기존의 항생제에 비해 레인이 강력한 항균 효과를 가짐을 확인하였다. 다만, 기존의 항생제의 항균 효과와 비교하여, 소포라플라바논 G 및 레인의 항균효과가 특별히 현저하게 나타나지는 않았다.

[0079] **실험예 2. 소포라플라바논 G 및 레인 혼합물의 구강균에 대한 항균 활성**

[0080] 소포라플라바논 G 및 레인을 혼합하여, 구강균에 대한 항균 활성의 시너지 효과를 확인하는 실험을 수행하였다.

[0081] 소포라플라바논 G 및 레인 혼합물의 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*의 성장에 미치는 영향을 확인하고자, OD600=0.1의 구강균에 소포라플라바논 G 및 레인, 소포라플라바논 G 및 암피실린(AMP), 소포라플라바논 G 및 옥사실린(OXC), 소포라플라바논 G 및 옥시테트라사이클린(OXY)의 조합을 각각 처리한 뒤 37℃에서 박테리아를 기르면서 시간에 따른 성장을 관찰하였다.

[0082] FICI(Fractional inhibitory concentration index, 부분 억제 농도 지수)는 가장 효과적인 조합에서의 FIC(Fractional inhibitory concentration, 부분 억제 농도)의 값의 합으로, 항생제 병용 효과의 연구결과 해석시에 가장 일반적으로 사용된다. FICI가 0.5 이하이면 상승 작용, 2.0 이상이면 길항 작용, 그 사이 값이면 상가 작용으로 판단한다. 하기 수학식 1은 FIC의 계산법이다.

수학식 1

[0083] $$FIC=\frac{(A)}{MIC_A}$$

[0084] 여기에서, (A)란 약물 A와 병용으로 사용하고자 하는 약물을 병용 사용했을 때의 MIC를 일컬으며, MIC_A는 약물 A를 단독으로 사용했을 때의 MIC를 뜻한다. 하기의 수학식 2는 FICI의 계산법이다.

수학식 2

[0085] $$FICI=FIC_A+FIC_B=\frac{(A)}{MIC_A}+\frac{(B)}{MIC_B}$$

[0086] 실험 결과는 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0087]

Strain	화합물	MIC [μg/mL]				FICI
		소포라플라바논 G 단독	레인 단독	소포라플라바논 G + 레인	레인 + 소포라플라바논 G	
S. mutans	소포라플라바논 G	1.56	100	0.195	6.25	0.2

A. viscosus	소포라플라바논 G	3.125	100	0.0976	6.25	0.1
F. nucleatum	소포라플라바논 G	1.56	6.25	0.39	0.39	0.3
P. gingivalis	소포라플라바논 G	>100	25	0.78	1.56	-
S. sobrinus	소포라플라바논 G	3.125	25	0.39	0.39	0.2

[0088] * 소포라플라바논 G + 레인: 소포라플라바논 G 및 레인 처리 시 소포라플라바논 G의 MIC값, 레인 + 소포라플라바논 G: 소포라플라바논 G 및 레인을 처리 시 레인의 MIC값

[0089] 그 결과, 소포라플라바논 G 및 레인을 모두 포함하는 혼합물의 경우, 내성 없이 구강 균주에 대하여 전반적으로 우수한 항균 효과가 있음을 확인하였다. 특히, 상기 표 1에서 소포라플라바논 G는 *P. gingivalis*에 대해 내성을 가지고 있고, 레인은 *S. mutans* 및 *A. viscosus*에 대한 내성을 가지고 있는 것으로 나타났으나, 상기 혼합물에서는 세 균주 모두에 대해 항균 활성이 우수하게 나타났다.

[0090] 반면, 기존 항생제는 일부 구강균이 내성을 가지고 있으며, 구체적으로, 상기 5 종의 구강균이 암피실린에 대해 모두 내성을 가지고 있었고, *S. mutans*및 *S. sobrinus*의 경우는 옥사실린에 대한 내성도 가지고 있음을 확인하였다. 아울러, *P. gingivalis*는 소포라플라바논 G 및 암피실린에 대하여 저항성이 있음을 확인하였다.

[0091] 상기 결과는, 소포라플라바논 G 및 레인을 혼합함으로써 구강균의 항균 활성에 시너지 효과를 발휘하며, 기존 항생제에 비해 항균 효과가 우수한 조성물을 제공할 수 있음을 시사한다.

[0092] **실험예 3. 농도별 소포라플라바논 G 및 레인 혼합물의 구강균에 대한 항균 활성**

[0093] 소포라플라바논 G 및 레인 혼합의 농도별 *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*에 대한 항균 활성을 확인하기 위해, 고체 배지를 활용한 디스크 확산 검사(Disc diffusion assay)를 수행하였다.

[0094] 구체적으로, 소포라플라바논 G 및 레인을 농도에 비율에 따라서 *S. mutans*, *A. viscosus*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* 또는 *S. sobrinus*의 성장 저해 효과를 성장 저해에 따라 발생한 세포 성장이 관찰 되지 않는 구역의 크기를 측정하여 나타낸 것이다. 실험 결과는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0095]

화합물	Inhibition zone(nm)				
	S.mutans	*A.viscosus*	*F.nucleatum*	*P.gingivalis*	*S.sobrinus*
옥시테트라사이클린	2.0	2.3	2.8	1.0	2.3
소포라플라바논 G(SPF-G)	0.9	0.9	0.8	0.8	1.0
레인(RH)	1.0	0.9	1.2	0.8	1.2
RH(25 μg/mL)+SPF-G(0.78 μg/mL)	1.4	1.3	1.5	2.2	1.3
RH(25 μg/mL)+SPF-G(0.39 μg/mL)	1.0	1.0	1.4	1.9	1.0
RH(12.5 μg/mL)+SPF-G(1.56 μg/mL)	1.6	1.0	1.2	1.8	1.0
RH(12.5 μg/mL)+SPF-G(0.78 μg/mL)	1.5	1.0	1.2	1.7	1.0
RH(12.5 μg/mL)+SPF-G(0.39 μg/mL)	1.0	1.0	1.0	1.6	1.0
RH(6.25 μg/mL)+SPF-G(0.78 μg/mL)	-	0.8	1.2	1.8	0.8

[0096] 그 결과, 옥시테트라사이클린의 경우 *S. mutans* (KACC16833: 2.0 mm), *S. sobrinus* (KCTC5809: 2.3 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 2.3 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 2.8 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 1 mm)의 성장을 저해함을 확인하였다.

[0097] 소포라플라바논 G의 경우 *S. mutans* (KACC16833: 0.9 mm), *S. sobrinus* (KCTC5809: 1 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 0.9 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 0.8 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 0.8 mm)의 성장을 저해함을 확인하였다.

[0098] 레인의 경우 *S. mutans* (KACC16833: 1 mm), *S. sobrinus* (KCTC5809: 1.2 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 0.9 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 1.2 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 0.8 mm)의 성장을 저해함을 확인하였다.

[0099] RH(25 μg/mL)+SPF-G(0.78 μg/mL)의 경우 *S. mutans* (KACC16833: 1.4 mm), *S. sobrinus* (KCTC5809: 1.3 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 1.3 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 1.5 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 2.2 mm)의 성장을 저해함을 확인하였다.

[0100] RH(25 μg/mL)+SPF-G(0.39 μg/mL)의 경우, *S. mutans* (KACC16833: 1 mm), *S. sobrinus* (KCTC5809: 1 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 1 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 1.4 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 1.9 mm)의 성장을 저해함을 확인하였다.

[0101] RH(12.5 μg/mL)+SPF-G(1.56 μg/mL)의 경우, *S. mutans* (KACC16833: 1.6 mm), *S. sobrinus* (KCTC5809: 1 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 1 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 1.2 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 1.8 mm)의 성장을 저해함을 확인하였다.

[0102] RH(12.5 μg/mL)+SPF-G(0.78 μg/mL)의 경우, *S. mutans* (KACC16833: 1.5 mm), *S. sobrinus* (KCTC5809: 1 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 1 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 1.2 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 1.7 mm)의 성장을 저해함을 확인하였다.

[0103] RH(12.5 μg/mL)+SPF-G(0.39 μg/mL)의 경우, *S. mutans* (KACC16833: 1 mm), *S. sobrinus* (KCTC5809: 1 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 1 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 1 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 1.6 mm)의 성장을 저해함을 확인하였다.

[0104] RH(6.25 μg/mL)+SPF-G(0.78 μg/mL)의 경우, *S. sobrinus* (KCTC5809: 0.8 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 0.8 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 1.2 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 1.8 mm)의 성장을 저해함을 확인하였으며, *S. mutans* (KACC16833)의 경우에는 성장을 저해하지 못하였다.

[0105] RH(6.25 μg/mL)+SPF-G(0.39 μg/mL)의 경우, *S. sobrinus* (KCTC5809: 0.8 mm), *A. viscosus* (KCTC9146: 0.8 mm), *F. nucleatum* (KCTC2640: 1.2 mm), *P. gingivalis* (KCTC5352: 1.8 mm)의 성장을 저해함을 확인하였으며 *S. mutans* (KACC16833)의 경우에는 성장을 저해하지 못하였다.

[0106] 또한, *P. gingivalis*의 경우에는 옥시테트라사이클린. 소포라플라바논 G 및 레인을 단독으로 처리한 것보다 RH+SPF-G의 농도의 비율에 따라서 처리한 것이 *P. gingivalis*에 대하여 강력한 항균 효과를 보이는 것으로 확인하였다.

[0107] **실험예 4. 소포라플라바논 G 및 레인 혼합물의 농도에 따른 구강균 성장 저해 활성**

[0108] 상기 항균 작용이 있는 것으로 확인이 된 소포라플라바논 G및 레인의 농도 비율에 따른 *P. gingivalis*의 성장에 미치는 영향을 확인하고자, OD600=0.1 *P. gingivalis*에 소포라플라바논 G 및 레인을 각각 비율별로 섞어서 처리한 후 37℃에서 박테리아를 기르면서 시간에 따른 성장을 관찰하였다(도 1).

[0109] 그 결과, 소포라플라바논 G 및 레인의 비율별 처리할 경우, *P. gingivalis*의 성장이 비율에 따라서 저해됨을 확인하였다. 즉 소포라플라바논 G 및 레인의 비율에 따라 *P. gingivalis*의 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

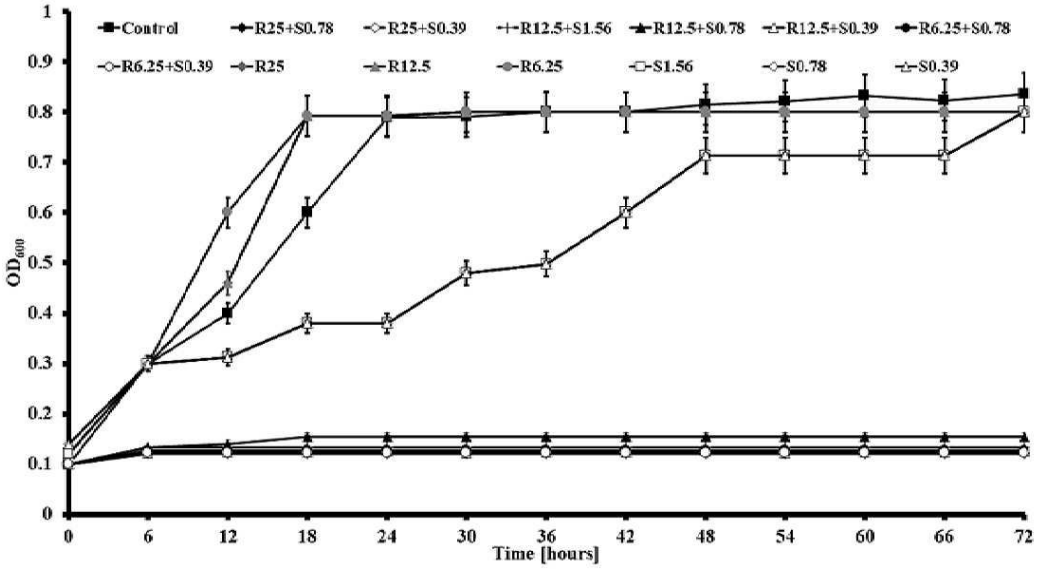
[0110] 상기 결과를 통해, 소포라플라바논 G 및 레인 혼합물이 다양한 농도에서 모두 구강균에 대한 우수한 항균 활성이 있음을 확인하였다.

[0111] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0112] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1


Control
R25+S0.78
R25+S0.39
R12.5+S1.56
R12.5+S0.78
R12.5+S0.39
R6.25+S0.78
R6.25+S0.39
R25
R12.5
R6.25
S1.56
S0.78
S0.39
OD600
Time [hours]
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54
60
66
72