



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0129450
(43) 공개일자 2019년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/03 (2006.01) A23K 10/30 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61P 31/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/03 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2018-0054108

(22) 출원일자 2018년05월11일

심사청구일자 2018년05월11일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

조태오

광주광역시 광산구 왕버들로132번길 35, 605동
1403호(수완동, 광주 수완6차 대방 노블랜드)

오원근

서울특별시 관악구 행운10길 21, 102동 902호(봉
천동, 관악파크푸르지오아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

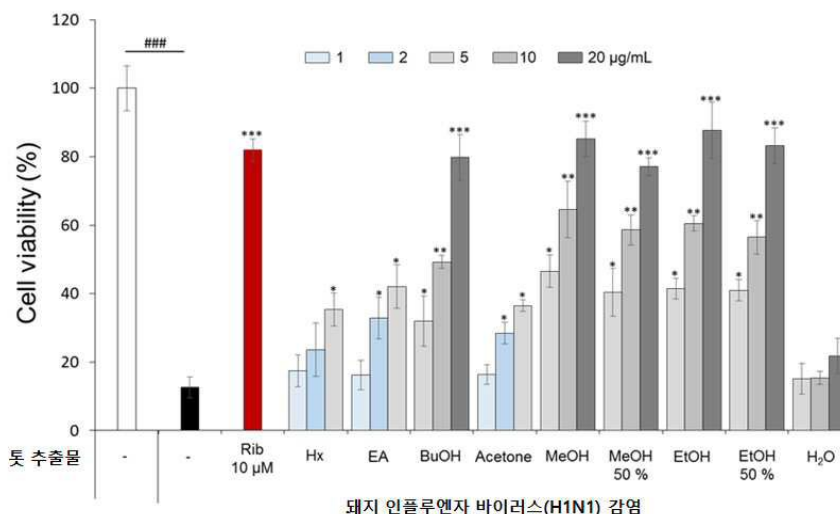
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **톳 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 톳(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 톳 추출물이 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 있으며, 동속이종인 다른 해조류 추출물에 비해 항바이러스 활성이 우수하다는 것을 확인함으로써, 본 발명의 톳 추출물을 인플루엔자의 예방 또는 치료용 의약품, 건강기능식품, 동물사료 첨가제 또는 천연소독제 등의 개발시에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61P 31/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2250/202 (2013.01)

(72) 발명자

이준식

광주광역시 서구 풍암1로 53, 제105동 206호(풍암동, 현대·삼환아파트)

조광원

광주광역시 남구 회재로1186번길 20, 104동 1004호(주월동)

초효문

서울특별시 관악구 관악로 1(신림동) 서울대학교 약학대학 21동 319호

정소영

광주광역시 남구 독립로 102, 103동 1703호(백운휴먼시아)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20170431

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양갈조식물자원기탁등록보존기관

기 여 율 1/3

주관기관 조선대학교산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJT200669

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 해양생명공학기술개발사업

연구과제명 해양바이오지역특화선도기술개발(해조류유래식/의약소재개발)

기 여 율 2/3

주관기관 조선대학교산학협력단

연구기간 2018.04.01 ~ 2019.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

툇(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 툇 추출물은 툇을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 툇 추출물은 툇을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물을 증류수로 현탁한 후, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

툇(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 툇 추출물은 툇을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 툇 추출물은 툇을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물을 증류수로 현탁한 후, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 개선용 건강기능식품.

청구항 7

툇(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 동물 약품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 툇 추출물은 툇을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 동물 약품.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 톳 추출물은 톳을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물을 증류수로 현탁한 후, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 동물 약품.

청구항 10

톳(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 개선용 동물 사료 첨가제.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 톳 추출물은 톳을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 개선용 동물 사료 첨가제.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 톳 추출물은 톳을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물을 증류수로 현탁한 후, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 개선용 동물 사료 첨가제.

청구항 13

톳(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방용 천연소독제.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 톳 추출물은 톳을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 예방용 천연소독제.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 톳 추출물은 톳을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물을 증류수로 현탁한 후, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 예방용 천연소독제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 톳(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 독감으로 알려져 있는 인플루엔자(influenza)는 인플루엔자 바이러스에 의한 급성 호흡기 질환이다. 인플루엔자는 우리나라를 비롯하여 전 세계에서 발생하며, 계절 구분이 있는 지역에서는 매년 겨울에 소규모로 유행되고 있다. 인플루엔자는 전염성이 강하고, 노인이나 소아, 다른 질환을 앓고 있는 사람이 걸리면 사망률이

증가하고 합병증의 발생이 증가하고, 일부 지역에 한정된 발병이 아닌, 새로운 종류의 인플루엔자 바이러스에 의해 짧은 시간에 넓은 지역에서 유행하게 되면 전 세계적인 문제가 될 수 있어 인플루엔자의 예방 및 치료는 중요한 사회적 이슈 중 하나이다.

[0003] 인플루엔자 바이러스(influenza virus)는 오르소믹소비리데(orthomyxoviridae)과에 속하는 RNA 바이러스로서 A, B 및 C형으로 분류된다. 특히, A형 바이러스의 경우 사람에게 주로 감염이 확인되고, B 또는 C형에 비하여 돼지, 기타 포유류 및 다양한 야생조류에서 감염이 확인되는 바이러스이며, 최근 전 세계적으로 문제가 되고 있는 조류 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus), 돼지 인플루엔자 바이러스(swine influenza virus) 및 신종 인플루엔자 바이러스(influenza A virus subtype H1N1) 등이 이에 속한다.

[0004] 인플루엔자 바이러스의 표면에는 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA, H)과 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA, N)라는 두 가지의 단백질이 존재하는데, 헤마글루티닌 및 뉴라미니다아제의 조합에 의해 인플루엔자 바이러스의 아형(subtype)이 결정된다(Schnitzler, S.U., et al., 2009; Wright, P.F., et al., 2007). 즉, 헤마글루티닌은 16종이 있고, 뉴라미니다아제에는 9종이 있어, 총 144종류의 인플루엔자 바이러스가 발생할 수 있는 것이다. 조류의 경우, 인플루엔자 바이러스 감염은 주로 H5형, H7형 및 H9형이 관련되어 있고, 인간의 경우, H1형, H2형 및 H3형과 2가지 형태의 뉴라미니다아제(N1 및 N2)만이 관련되어 있으므로, 이론적으로는 인간은 조류 인플루엔자 바이러스에 감염되지 않아야 한다. 그러나 최근에 조류 인플루엔자 바이러스가 유전자 재조합 과정을 거치지 않은 상태에서 직접적으로 사람에게 전파된 예가 발생하고 있다.

[0005] 돼지 인플루엔자(swine influenza)는 1918년에 처음으로 보고되었으며, 인간이 가지고 있는 인플루엔자 바이러스 수용체(N-acetylneuraminic acid α 2,6 galactose)와 조류가 가지고 있는 인플루엔자 바이러스 수용체(N-acetylneuraminic acid α 2,3 galactose)를 동시에 가지고 있어, 조류인플루엔자 바이러스가 돼지의 몸 안에서 재배열(reassortment) 또는 적응(adaptation)을 통해 사람에게 감염될 수 있는 바이러스 혼합용기(mixing vessels)의 역할을 한다고 알려져 있다. 2009년 멕시코에서 처음 발병하여 전 세계로 전염되었던 신종 인플루엔자(novel influenza)는 돼지 인플루엔자 바이러스 H1N1형이 돼지에게 감염되어 인간에게 전염이 가능한 바이러스로 변이된 것이다(Dawood, F.S., et al., 2009; Zimmer, S.M., et al., 2009).

[0006] 신종 인플루엔자(신종플루)는 기본적으로 감기처럼 고열, 기침 등의 증상이 나타나는데 현재 상태보다 인간에게 치명적인 바이러스로 변할 가능성이 높다. 세계보건기구(WHO)가 집계하는 신종플루의 감염자 수는 2009년 10월 초까지 그 수가 34만 3200명에 달하였고, 사망자는 4,000명을 넘어섰으며, 2010년 세계보건기구는 신종플루의 현황을 6단계인 대유행 상태로 격상한 사례가 있다. 신종플루는 일반 독감과 비슷하게 발열, 인후통, 기침, 콧물 또는 코막힘의 증상을 보여 주었으며, 2009년 발생한 H1N1의 신종플루는 일반 독감보다 심한 치명적인 폐 손상을 유발하는 병리적 현상을 보여주었다.

[0007] 인플루엔자 바이러스에 의한 인플루엔자의 발병을 예방하기 위해서는 백신의 확보가 필수적이나 예방적 차원의 국가적 백신 대책으로는 매년 항원변이가 일어나는 RNA 바이러스를 모두 예방할 수 있는 백신을 만드는 것이 거의 불가능하다. 따라서 조류 인플루엔자, 돼지 인플루엔자 및 신종 인플루엔자 또는 이들의 변이 및 혼합에 의한 새로운 병원체에 의한 질병에 대비하기 위해서는 이를 예방하고 치료할 수 있는 치료제의 개발이 필수적이다.

[0008] 현재 인플루엔자의 치료제로는 바이러스 기원의 뉴라미니다아제에 대한 선택적인 저해물질로 개발된 경구용 치료제인 타미플루(tamiflu, 성분명: oseltamivir phosphate)와 흡입형인 리렌자(relenza, 성분명: zanamivir) 등이 있다. 타미플루의 경우에는 오심, 구토, 신경계나 정신계의 이상과 같은 부작용이 보고되었으며, 일본의 경우 타미플루 승인 후 확인된 소아 환자의 사망이 15건 정도였다. 또한, 경구용 치료제인 타미플루는 내성 바이러스의 출현에 대한 신속한 대응이 어렵다는 문제점을 가지고 있으며, 최근에는 타미플루에 대한 내성 바이러스의 출현이 보고되고 있으며(Lee, J.Y., 2009; Hauge, S.H., et al., 2009) 타미플루 내성 바이러스의 인간 대 인간 전염도 발견되고 있는 실정이다. 따라서 신규의 인플루엔자 치료제 개발은 인간의 보건 안전에 필수적인 사항이다.

[0009] 일반적으로 새로운 성분의 약제를 개발하기 위해 기존 약제를 실험적으로 변형시키는 것보다는 전통 의학에서 사용되고 있는 천연물 약제들로부터 새로운 활성 성분을 찾는 것이 여러 가지 면에서 장점이 많다. 특히 이러한 활성 성분들은 오랫동안 사용되어 왔기 때문에 약물에 의한 독성 염려가 적다. 이러한 사실은 인플루엔자 바이러스 치료제로 사용되는 타미플루의 출발물질이 중국의 토착식물인 '스타아니스' 열매가 주원료가 되어 개발된 것으로부터 알 수 있다. 또한, 천연물 자체를 바이러스 치료제로 사용할 수 있다면 수집 및 분리 과정을 거치지 않으므로 대량 시료를 확보하기가 용이하며 가축 사료에 혼합하여 공급할 수 있는 장점을 갖고 있다.

- [0010] 톳(*Sargassum fusiforme*; *Hizikia fusiforme*)은 다년생 갈조류에 속하는 해조류로, 중국, 일본 및 우리나라 조간대 하부에 분포하고 있으며, 주로 제주도와 남해안에서 자연산을 채취하여 이식 양식을 통하여 생산되고 있다. 톳에는 칼슘, 요오드, 철 등의 무기 염류가 많이 포함되어 혈관경화를 막아주고, 상용으로 섭취할 시, 치아가 건강해지고 머리털이 윤택해지며, 임산부에게는 태아의 뼈를 튼튼하게 해주는 등, 예로부터 기호식품의 하나로 알려져 있다. 현재까지 보고된 톳의 생리 활성으로는 항암, 항산화, 면역억제, HIV-1 억제 작용 등이 보고되고 있다(Fan, S., et al., 2017; Zhou, J., et al., 2008; Chen, X., et al., 2012; Paskaleva, E.E., et al., 2006; Paskaleva, E.E., et al., 2008).
- [0011] 이에, 본 발명자들은 톳 추출물을 이용하여 항바이러스 활성을 연구하는 과정에서 톳 추출물이 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.
- [0012] 종래 선행기술로서 중국공개특허 제105853670호 및 제106309679호에는 해조(*Sargassum*)가 포함된 중국 약재 혼합물의 조류 인플루엔자 치료 효과가 기재되어 있으나, 본 발명의 톳 추출물의 인플루엔자 치료 효과는 기재되어 있지 않다. 또한, 중국공개특허 제106309470호에는 톳의 다당류의 호흡기세포융합바이러스(RSV) 및 인간 엔테로바이러스(EV71)에 대한 항바이러스 효과가 기재되어 있으나, 본 발명의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과는 기재되어 있지 않다.
- [0013] 비특허문헌인 Paskaleva, E.E., et al., 2006 및 Paskaleva, E.E., et al., 2008에는 톳 추출물의 HIV-1에 대한 항바이러스 효과가 기재되어 있고, Park, S.Y., et al., 2016에는 톳 추출물의 노로바이러스에 대한 항바이러스 효과가 기재되어 있으나, 본 발명의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효과는 기재되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0014] (특허문헌 0001) 중국공개특허 제105853670호, Medicine for treating avian flu, 2016. 08. 17. 공개.
- (특허문헌 0002) 중국공개특허 제106309679호, Traditional chinese veterinary medicine preparation for treating avian influenza, 2017. 01. 11. 공개.
- (특허문헌 0003) 중국공개특허 제106309470호, Application of *Sargassum fusiforme* polysaccharide, 2017. 01. 11. 공개.

비특허문헌

- [0015] (비특허문헌 0001) Chen, X., et al., A polysaccharide from *Sargassum fusiforme* protects immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice, *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 1114-1119, 2012.
- (비특허문헌 0002) Dawood, F.S., et al., Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans, *N. Engl. J. Med.*, 360, 2605-2615, 2009.
- (비특허문헌 0003) Fan, S., et al., Antitumor effects of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells, *Food Chem. Toxicol.*, 102, 53-62, 2017.
- (비특허문헌 0004) Hauge, S.H., et al., Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007~2008, *Emerg. Infect. Dis.*, 15, 155-162, 2009.
- (비특허문헌 0005) Lee, J.Y., The resistance situation of antiviral agent in Korea: 2008-2009 oseltamivir resistance of seasonal influenza A/H1N1, *Infect. Chemother.*, 41(Suppl 2), S20-S24, 2009.
- (비특허문헌 0006) Park, S.Y., et al., Inactivation of murine norovirus-1 in the edible seaweeds *Capsosiphon fulvescens* and *Hizikia fusiforme* using gamma radiation, *Food Microbiology*, 56, 80-86, 2016.
- (비특허문헌 0007) Paskaleva, E.E., et al., Inhibition of highly productive HIV-1 infection in T cells, primary human macrophages, microglia, and astrocytes by *Sargassum fusiforme*, *AIDS Res. Ther.*,

3, 15, 2006.

(비특허문헌 0008) Paskaleva, E.E., et al., Sargassum fusiforme fraction is a potent and specific inhibitor of HIV-1 fusion and reverse transcriptase, Virol. J., 5, 8, 2008.

(비특허문헌 0009) Schnitzler, S.U., et al., An update on swine-origin influenza virus a/h1n1: A review, Virus Genes, 39(3), 279-292, 2009.

(비특허문헌 0010) Wright, P.F., et al., Orthomyxoviruses, Fields' Virology, 5th ed. New York:Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams&Wilkins, 1691-1740, 2007.

(비특허문헌 0011) Zhou, J., et al., Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant properties of acidic polysaccharides from Sargassum fusiforme, J. Zhejiang Univ. Sci. B., 9(9), 721-727, 2008.

(비특허문헌 0012) Zimmer, S.M., et al., Historical perspective-emergence of influenza A (H1N1) viruses, N. Engl. J. Med., 361, 279-285, 2009.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 톳(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 톳(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 동물 약품에 관한 것이다.

[0018] 또한, 본 발명은 톳(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 개선용 건강기능식품, 동물사료 첨가제 또는 예방용 천연소독제에 관한 것이다.

[0019] 상기 톳 추출물은 톳을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물일 수 있다.

[0020] 상기 톳 추출물은 톳을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤(acetone), 에틸아세테이트(ethyl acetate) 및 헥산(hexan)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물을 증류수로 현탁한 후, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 분획하여 얻은 부탄올 분획물 또는 에틸아세테이트 분획물일 수 있다.

[0021] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0022] 본 발명은 톳(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0023] 상기 톳 추출물은 톳을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트 및 헥산으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등일 수 있다. 바람직하게는 에탄올, 메탄올 및 부탄올이다. 더 바람직하게는 50%(v/v) 메탄올 및 50%(v/v) 에탄올이다.

[0024] 상기 용매는 톳 중량의 2배 내지 500배의 중량을 가할 수 있다.

[0025] 또한, 상기 톳 추출물은 톳을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트 및 헥산으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물을 증류수로 현탁한 후, 유기용매로 분획하여 얻은 분획물일 수 있다.

[0026] 상기 유기용매는 C1 내지 C4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 헥산 및 아세톤 등일 수 있다. 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등 일 수 있다. 바람직하게는 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올일 수 있고, 더 바람직하게는 에틸아세테이트 또는 부탄올이며, 가장 바람직하게는 부탄올이다.

- [0027] 상기 톳 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물 일 수 있다.
- [0028] 상기 약학적 조성물은 상기 톳 추출물 및 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체를 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 톳 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 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, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 상기 약학적 조성물의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0031] 상기 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 점막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0032] 또한, 상기 톳 추출물을 포함하는 조성물은 건강기능식품일 수 있다.
- [0033] 상기 건강기능식품은 상기 톳 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 톳 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.
- [0035] 상기 톳 추출물을 포함하는 조성물은 또한, 동물사료 첨가제일 수 있다.
- [0036] 상기 동물사료 첨가제는 본 발명의 톳 추출물이 동물용 사료에 0.001중량% 내지 30중량%, 바람직하게는 0.001중량% 내지 10중량%, 가장 바람직하게는 0.001중량% 내지 5중량%로 첨가될 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 톳 추출물을 포함하는 조성물은 천연소독제일 수 있다.
- [0038] 상기 천연소독제는 인플루엔자 바이러스의 소독용 조성물로, 액제, 정제, 과립제, 산제 등의 다양한 형태의 제제로 제조가 가능하다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명은 톳(*Sargassum fusiforme*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 톳 추출물이 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 있으며, 동숙이종인 다른 해조류 추출물에 비해 항바이러스 활성이 우수하다는 것을 확인하였다.
- [0040] 이를 통해, 본 발명의 톳 추출물을 인플루엔자의 예방 또는 치료용 의약품, 건강기능식품, 동물사료 첨가제 또는 천연소독제 등의 개발시에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 톳 추출물의 돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인한 결과를 보여주고 있다.
- 도 2는 톳 추출물의 세포독성을 확인한 결과를 보여주고 있다.
- 도 3은 톳 분획물의 돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인한 결과를 보여주고 있다.
- 도 4는 톳 분획물의 세포독성을 확인한 결과를 보여주고 있다.
- 도 5는 톳 추출물 또는 분획물의 돼지 인플루엔자 바이러스 표면 단백질인 뉴라미다아제 단백질 발현 억제 효과를 확인한 결과를 보여주고 있다.
- 도 6은 톳 추출물 또는 분획물의 돼지 인플루엔자 바이러스 표면 단백질인 뉴라미다아제 및 헤마글루티닌 단백질 발현 억제 효과를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과로, (A)는 각 단백질 발현을 밴드로 확인한 결과를, (B)는 단백질 발현 정도를 수치화한 결과를 보여주고 있다.
- 도 7은 톳과 동속이종인 해조류 추출물과 톳 추출물의 세포독성(A) 및 돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성(B)을 비교한 결과를 보여주고 있다.
- 도 8은 톳 추출물의 항바이러스 활성이 코로나 바이러스 대비, 인플루엔자바이러스에 현저히 높음을 보여주고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [0043] <실시예 1. 톳 추출물의 제조 및 항바이러스 활성 측정>
- [0044] 실시예 1-1. 톳 추출물의 제조
- [0045] 본 발명에서 사용된 톳(*Sargassum fusiforme*)은 광주광역시에 소재하는 조선대학교 해양갈조식물자원 은행에서 분양받았다.
- [0046] 톳 3g에 하기 표 1에 해당되는 각각의 용매 15ml씩을 가한 후 초음파 추출기로 2시간씩 총 3회에 걸쳐 추출하였다. 이후, 고형분을 제거하여 추출액을 얻었고, 얻은 추출액을 감압 농축하여 추출물을 제조한 후, 추출량을 확인하였고, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

추출 용매	톳 추출물	
	추출량(mg)	추출함량(%)
증류수	647.8	21.59
50%(v/v) 에탄올	736.5	24.55
100%(v/v) 에탄올	102.3	3.41
50%(v/v) 메탄올	1000.9	33.65
100%(v/v) 메탄올	249.3	8.31
부탄올	22.5	0.75
아세톤	33.9	1.13
헥산	48.3	1.61
에틸아세테이트	32.7	1.09

- [0047]
- [0048] 실시예 1-2. 톳 추출물의 항바이러스 활성 확인
- [0049] 상기 실시예 1-1에서 추출한 톳 추출물의 항바이러스 활성을 확인하기 위해 중앙백신연구소로부터 제공받은 돼지 인플루엔자 바이러스 H1N1(A/Sw/Kor/CAN1/04, KCTC11165BP)을 이용하였고, 바이러스 감염에 의한 감염세포의 생존율을 분석함으로써 항바이러스 활성을 확인하였다.

[0050] 96웰 플레이트(96 well plate)에 웰 당 1×10^4 개의 MDCK(Madin-Darby, canine kidney) 세포를 분주한 후 5% FBS(fetal bovine serum), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin) 및 0.4% L-글루타민(L-glutamine)이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 넣고 하루 동안 배양한 후, 배양액을 버리고 PBS(phosphate buffer saline) 용액으로 세척하였다. 이후 세포에 감염매지(infection media, DMEM+0.5% BSA(bovine serum albumin)+1 μ g/ml trypsin)를 넣고, 돼지 인플루엔자 바이러스를 50 TCID₅₀/100 μ l/웰의 농도가 되도록 접종하고, 상기 실시예 1-1에서 제조한 톳 추출물을 농도별(1, 2, 5, 10, 20 μ g/ml)로 처리한 후 5일 동안 배양하였다. 이때, 세포에 아무것도 처리하지 않은 것을 정상 대조군으로 이용하였고, 바이러스만을 처리한 것을 음성 대조군으로, 항바이러스제인 리바비린(ribavirin) 10uM을 처리한 것을 양성 대조군으로 이용하였다.

[0051] 5일 동안 배양한 세포를 이용하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 어세이를 수행하였다. 배양한 세포에 MTT 용액을 넣고 37℃에서 반응시킨 후 배양액을 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide) 200 μ l를 넣었다. 피펫팅으로 잘 섞어 준 다음 10분 동안 방치한 후 550nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다. 이때, 정상 대조군의 세포 생존율 100%를 기준으로 각 용매에 따른 추출물에 의한 세포 생존율을 계산하였고, 그 결과를 도 1 및 표 2에 나타내었다. 표 2의 경우, 각 용매에 따른 추출물의 항바이러스 활성으로 인해 인플루엔자 바이러스에 의한 세포사멸이 억제되었으므로, 추출물에 의한 세포 생존율을 항바이러스 활성과 동일한 개념으로 사용하였다.

표 2

톳 추출물	처리농도	돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성(%)
증류수(H ₂ O)	10 μ g/ml	15.4
50%(v/v) 에탄올(EtOH 50%)	10 μ g/ml	56.5
100%(v/v) 에탄올(EtOH)	10 μ g/ml	60.5
50%(v/v) 메탄올(MeOH 50%)	10 μ g/ml	58.6
100%(v/v) 메탄올(MeOH)	10 μ g/ml	64.7
부탄올(BuOH)	10 μ g/ml	49.2
아세톤(Acetone)	5 μ g/ml	36.5
헥산(Hx)	5 μ g/ml	35.3
에틸아세테이트(EA)	5 μ g/ml	42.1
리바비린(Rib)	10uM	81.9

[0052]

[0053] 도 1 및 상기 표 2에서 보여주듯이, 돼지 인플루엔자 바이러스만을 처리한 음성 대조군의 경우, 바이러스에 의해 세포사멸이 이루어지는 반면에, 항바이러스제인 리바비린을 처리한 양성 대조군의 경우에는 바이러스에 의한 세포사멸이 억제되는 것을 알 수 있었다. 또한, 본 발명의 톳 추출물을 처리한 경우에는 50%(v/v) 에탄올, 100%(v/v) 에탄올, 50%(v/v) 메탄올, 100%(v/v) 메탄올, 부탄올 및 에틸아세테이트 톳 추출물이 인플루엔자 바이러스에 의한 세포사멸 억제 활성, 즉 항바이러스 활성이 가장 좋으며, 아세톤 및 헥산 톳 추출물의 경우에도 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 있는 것을 확인하였다. 반면에 증류수를 이용하여 추출한 톳 추출물의 경우에는 추출량이 많았지만(상기 표 1 참조) 항바이러스 활성은 약하게 나타났다. 이는, 항바이러스 활성을 갖는 톳 추출물을 확보하기 위해서는 유기용매를 이용하는 것이 필요하다는 것을 보여주고 있다.

[0054] 실시예 1-3. 톳 추출물의 세포독성 확인

[0055] 상기 실시예 1-1의 톳 추출물에 의한 세포독성 여부를 확인하기 위해 MTT 어세이를 진행하였다.

[0056] 96웰 플레이트(96 well plate)에 웰 당 1×10^4 개의 MDCK 세포를 분주한 후 5% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 0.4% L-글루타민이 포함된 DMEM 배지를 넣고 하루 동안 배양한 후, 배양액을 버리고 PBS 용액으로 세척하였다. 이후 세포에 새 배지를 넣고, 상기 실시예 1-1에서 제조한 톳 추출물을 각각 5, 10, 20 μ g/ml이 되도록 처리한 후 5일 동안 배양하였다. 이때, 세포에 아무것도 처리하지 않은 것을 정상 대조군으로 이용하였다.

[0057] 5일 동안 배양한 세포를 이용하여 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 MTT 어세이를 수행하였다. 이때, 정상 대조군의 세포 생존율 대비 각각의 추출물에 의한 세포 생존율을 %로 환산하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0058] 도 2에서 보여주듯이, 상기 실시예 1-1의 톳 추출물 대부분이 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서 세포독성이 거의 없었고, 헥산 추출물, 에틸아세테이트 추출물 및 아세톤 추출물의 경우에는 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포 독성이 있는 것으로 나타났다.

[0059] 상기 표 1의 용매에 따른 추출량, 도 1 및 표 2의 항바이러스 활성 및 도 2의 세포독성 결과를 통해, 50%(v/v) 메탄올이 최적의 용매이지만, 식품에 사용 가능한 용매 조건을 고려하여 50%(v/v) 에탄올을 용매로 하여 추출하는 것을 추출 조건으로 결정하였다.

[0060] <실시예 2. 톳 분획물의 제조>

[0061] 상기 실시예 1-1에서 추출한 톳 추출물을 용매 분획방법을 적용하여 물, 부탄올, 에틸아세테이트 및 헥산 용매를 이용하여 극성 순으로 성분을 용출시켜 분획물을 제조하였다.

[0062] 상기 실시예 1-1에서 제조한 톳 추출물 중 50%(v/v) 에탄올을 용매로 하여 추출한 톳 추출물 730mg을 증류수에 현탁하고, 이후 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 순으로 각 용매를 1ml씩 가하여 각 용매에 해당되는 분획물을 확보하였고, 확보한 분획물의 분획량 및 추출함량을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

분획 용매	톳 분획물	
	추출량(mg)	추출함량(%)
헥산	36.6	5.01
에틸아세테이트	10.8	1.48
부탄올	58.11	7.96
증류수	624.5	85.50

[0063]

[0064] 실시예 2-2. 톳 분획물의 항바이러스 활성 확인

[0065] 상기 2-1에서 제조한 톳 분획물을 이용하여 상기 실시예 1-2와 동일한 방법으로 톳 분획물의 항바이러스 활성을 확인하였다. 이때, 각 분획물의 농도가 2, 5, 10, $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하였고, 그 결과를 도 3 및 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

톳 분획물	처리농도	돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성(%)
헥산(Hx)	$5\mu\text{g}/\text{ml}$	31.4
에틸아세테이트(EA)	$5\mu\text{g}/\text{ml}$	52.4
부탄올(BuOH)	$20\mu\text{g}/\text{ml}$	79.2
증류수(H_2O)	$20\mu\text{g}/\text{ml}$	26.9
리바비린(Rib)	10uM	75.9

[0066]

[0067] 도 3 및 상기 표 4에서 보여주듯이, 부탄올 분획물을 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 처리한 경우, 50%(v/v) 에탄올 톳 추출물 및 양성 대조군으로 이용한 리바비린과 유사한 정도의 항바이러스 활성을 나타내는 것을 확인하였고, 에틸아세테이트 분획물의 경우에도 항바이러스 활성이 높게 나타났다.

[0068] 실시예 2-3. 톳 분획물의 세포독성 확인

[0069] 상기 실시예 2-1의 톳 분획물에 의한 세포독성 여부를 확인하기 위해 상기 실시예 1-3과 동일한 방법으로 MTT 어세이를 진행하였고, 상기 실시예 2-1의 톳 분획물을 5, 10, $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하였고, 그 결과를 도 4에

나타내었다.

[0070] 도 4에서 보여주듯이, 상기 실시예 2-1의 톳 분획물 대부분이 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하의 농도에서 세포독성이 거의 없었고, 에틸아세테이트 분획물 및 헥산 분획물의 경우에는 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포 독성이 있는 것으로 나타났다.

[0071] 상기 표 3의 용매에 따른 추출량, 도 3 및 표 4의 항바이러스 활성 및 도 4의 세포독성 결과를 통해, 부탄올을 용매로 하여 분획한 톳 분획물이 가장 우수한 항바이러스 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

[0072] 상기 실시예 1 및 실시예 2의 결과를 통해, 본 발명의 톳 추출물 및 분획물이 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 우수함을 알 수 있었다.

[0073] <실시예 3. 톳 추출물의 인플루엔자 바이러스 표면 단백질 억제 효과 확인>

[0074] 인플루엔자 바이러스의 표면에는 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)과 뉴라미니다아제(neuraminidase, NA)라는 두 가지 단백질이 존재하며, 이러한 바이러스 표면 단백질에 의해 감염이 일어난다. 따라서, 본 발명의 톳 추출물의 항바이러스 활성을 확인하기 위해 인플루엔자 바이러스 표면 단백질 발현에 있어서 본 발명의 톳 추출물의 억제 효과를 형광 현미경과 웨스턴 블롯(Western blot) 방법을 이용하여 확인하였다.

[0075] 실시예 3-1. 형광 현미경을 이용한 바이러스 표면 단백질 억제 효과 확인

[0076] 8웰 챔버 슬라이드(LAB-TEK, NUNC, Thermo Fisher Scientific, USA)에 MDCK 세포를 분주하여 배양하고, 0.01 MOI(multiplicity of infection)로 돼지 인플루엔자 바이러스(H1N1 바이러스)를 2시간 동안 처리하여 세포에 감염시켰다. 이후, 세포를 PBS로 세척한 후, 세포에 상기 실시예 1의 톳 추출물 또는 실시예 2의 톳 분획물이 하기 표 5에 기재된 농도로 포함되어 있는 DMEM 배지를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 이때, 아무것도 처리하지 않은 세포를 정상 대조군으로, 돼지 인플루엔자 바이러스만을 처리한 세포를 음성 대조군으로, 리바비린을 처리한 세포를 양성 대조군으로 이용하였다.

[0077] 배양한 세포를 4°C 에 냉장 보관된 PBS를 이용하여 3회 세척한 뒤, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 용액을 30분 동안 처리하여 세포를 고정시켰다. 고정시킨 세포에 1% BSA(bovine serum albumin) 용액을 처리하여 1시간 동안 블로킹(blocking)시킨 후, 돼지인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 단백질을 인식하는 단일클론 항체(Gene Tex Co., San Antonio, TX, USA)를 처리하였다. 이후, 형광물질이 결합되어 있는 2차 항체(FITC-conjugated goat anti-Rb IgG 항체, Abcam, Cambridge, UK)를 처리하고, 500nM DAPI 용액을 이용하여 추가적으로 세포 내 DNA를 염색하였다. 염색한 세포를 마운팅 용액(mounting solution)(Vectashield, Vector Laboratories Inc., USA)으로 고착 시킨 후, 형광현미경(Olympus ix70 Fluorescence Microscope, Olympus Corporation, Tokyo, Japan)을 이용하여 돼지 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 단백질의 발현 정도를 관찰하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

표 5

톳 추출물	처리농도
50%(v/v) 에탄올 추출물(EtOH 50% 톳 추출물)	$20\mu\text{g}/\text{ml}$
증류수 분획물(H_2O 톳 분획물)	$20\mu\text{g}/\text{ml}$
부탄올 분획물(BuOH 톳 분획물)	$20\mu\text{g}/\text{ml}$
에틸아세테이트 분획물(EA 톳 분획물)	$10\mu\text{g}/\text{ml}$
헥산 분획물(Hx 톳 분획물)	$5\mu\text{g}/\text{ml}$
리바비린(Rib)	10uM

[0078]

[0079] 도 5에서 보여주듯이, 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군에 비해 돼지 인플루엔자 바이러스를 처리한 음성 대조군에서는 뉴라미니다아제 단백질의 발현이 강하게 나타나는 것을 확인하였다. 반면에, 상기 실시예 1의 톳 추출물 또는 실시예 2의 부탄올 톳 분획물 및 에틸아세테이트 톳 분획물을 처리한 경우에는 뉴라미니다아제 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 그러나 상기 실시예 2의 증류수 톳 분획물 및 헥산 톳 분획물의 경우에는 돼지 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제 단백질 발현 억제 효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는

상기 실시예 2-2의 톳 분획물의 항바이러스 효과를 확인한 결과와 일치한다는 것을 알 수 있었다.

[0080] 실시예 3-2. 웨스턴 블롯을 이용한 바이러스 표면 단백질 억제 효과 확인

[0081] 6웰 플레이트에 MDCK 세포를 분주하고 플레이트 상에 90% 정도로 세포가 차도록 배양하였다. 배양한 세포에 돼지 인플루엔자 바이러스(H1N1 바이러스)를 0.01 MOI로 2시간 동안 처리하여 세포에 감염시켰다. 이후, 세포를 PBS로 세척한 후, 세포에 상기 실시예 1의 톳 추출물 또는 실시예 2의 톳 분획물이 상기 표 5에 기재된 농도가 되도록 포함된 DMEM을 넣고 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 이때, 아무것도 처리하지 않은 세포를 정상 대조군으로, 돼지 인플루엔자 바이러스를 처리한 세포를 음성 대조군으로, 리바비린을 처리한 세포를 양성 대조군으로 이용하였다.

[0082] 배양한 세포를 PBS로 세척하고, 100 μ l의 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer)(50mM NaF, 0.5%[v/v] NP-40, 1mM EDTA, 120mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 7.6)를 이용하여 세포를 파쇄하고 원심분리하여 세포 용출액을 확보하였다. 확보한 세포 용출액을 이용하여 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 10-12%[w/v] acrylamide gel)를 실시한 뒤, 세미-드라이 트랜스퍼(semi-dry transfer) 기기를 이용하여 PVDF(polyvinylidene fluoride) 멤브레인에 단백질을 이동(transfer)시켰다. 멤브레인은 5%[w/v] 탈지유로 1시간 동안 상온에서 처리하여 블로킹(blocking)시키고, 돼지 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다아제와 헤마글루티닌을 인식하는 1차 항체(AbFrontier Co., Ltd., Seoul, Korea)를 처리하여 반응 시킨 후, 각각의 1차 항체를 인식하는 2차 항체를 처리하고 ECL 용액을 이용하여 단백질 밴드를 확인하였다. 또한, 확인된 단백질 밴드의 밀도를 측정하여 단백질 발현 정도를 수치화 하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0083] 도 6(A)의 단백질 발현 밴드 결과 및 6(B)의 발현량을 수치화한 결과에서 보여주듯이, 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군에 비해 돼지 인플루엔자 바이러스를 처리한 음성 대조군에서 바이러스 표면 단백질인 뉴라미니다아제 및 헤마글루티닌 단백질 모두 발현이 증가하였다. 반면에, 상기 실시예 1의 톳 추출물 또는 실시예 2의 톳 분획물 중 부탄올 분획물 및 에틸아세테이트 분획물을 처리한 경우에는 뉴라미니다아제 및 헤마글루티닌 단백질의 발현이 현저히 억제된 것을 확인하였다.

[0084] 상기 실시예 3-1 및 실시예 3-2의 결과를 통해, 본 발명의 톳 추출물과 분획물이 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 우수함을 알 수 있었고, 분획물의 경우에는 부탄올 분획물 및 에틸아세테이트 분획물이 항바이러스 활성이 가장 우수하다는 것을 알 수 있었다.

[0085] <실시예 4. 톳 추출물 및 다른 해조류 추출물의 항바이러스 활성 비교>

[0086] 본 발명의 톳 추출물의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 우수함을 확인하기 위해 톳과 동속이종인 다른 해조류 추출물과 항바이러스 활성을 비교하였다.

[0087] 비교에 사용된 해조류는 6종으로 짝잎모자반(*Sargassum hemiphyllum*), 팽생이모자반(*Sargassum horneri*), 경단구슬모자반(*Sargassum muticum*), 알송이자반(*Sargassum confusum*), 큰열매모자반(*Sargassum macrocarpum*), 왜모자반(*Sargassum yezeense*)으로, 광주광역시 소재하는 조선대학교 해양갈조식물자원은행에서 분양받았다. 분양 받은 각 해조류는 상기 실시예 1-1의 톳 추출물 제조 방법과 동일한 방법으로 추출하였고, 추출 용매는 50%(v/v) 에탄올을 이용하였다.

[0088] 각 해조류 추출물의 항바이러스 활성을 확인하기 위해 상기 실시예 1-3과 동일한 방법으로 각 추출물에 의한 세포독성을 확인하였고, 그 결과를 도 7(A)에 나타내었다.

[0089] 도 7(A)에서 보여주듯이, 짝잎모자반, 팽생이모자반, 경단구슬모자반, 알송이자반의 경우에는 세포독성이 거의 나타나지 않는 반면에, 큰열매모자반과 왜모자반은 10 μ g/ml 이상의 농도에서 세포독성이 있음을 알 수 있었다.

[0090] 이를 바탕으로, 항바이러스 활성 확인 실험 진행시 세포독성이 관찰되지 않은 짝잎모자반, 팽생이모자반, 경단구슬모자반, 알송이자반은 최종 처리농도가 5, 10, 20 μ g/ml이 되도록 처리하였고, 세포독성이 있는 큰열매모자반과 왜모자반은 최종 처리농도가 1, 2, 5 μ g/ml이 되도록 처리하였다.

[0091] 상기 해조류 추출물의 항바이러스 활성 확인은 상기 실시예 1-2과 동일한 방법을 수행하여 확인하였고, 그 결과를 도 7(B) 및 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

해조류 추출물	처리 농도	돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성(%)
작잎모자반(<i>Sargassum hemiphyllum</i>)	20 μ g/ml	31.2
평생이모자반(<i>Sargassum horneri</i>)	20 μ g/ml	41.8
경단구슬모자반(<i>Sargassum muticum</i>)	20 μ g/ml	48.6
알송이자반(<i>Sargassum confusum</i>)	20 μ g/ml	44.7
큰열매모자반(<i>Sargassum macrocarpum</i>)	5 μ g/ml	40.0
왜모자반(<i>Sargassum yezoense</i>)	5 μ g/ml	44.6
톳(<i>S. fusiforme</i>)	20 μ g/ml	72.5
리바비린	10 μ M	74.7

[0092]

[0093]

도 7(B) 및 상기 표 6에서 보여주듯이, 본 발명의 톳 추출물의 돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 톳과 동속이종인 해조류 추출물들에 비해 높게 나타났고, 양성 대조군으로 이용한 리바비린과 비슷한 항바이러스 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0094]

이를 통해, 본 발명의 톳 추출물이 세포 독성이 거의 없으며, 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 높다는 것을 알 수 있었다. 또한, 톳은 현재 다른 모자반류에 비하여 대량 양식을 하고 있으므로, 산업적으로 적용 가능한 우수한 해조류임을 보여주는 것이다.

[0095]

<실시예 5. 톳 추출물의 바이러스 종류에 따른 항바이러스 활성 비교>

[0096]

톳 추출물이 노로바이러스-1(norovirus-1), HIV-1(human immunodeficiency virus-1) 등에 항바이러스 활성이 있음이 보고되었다. 따라서, 본 발명의 톳 추출물이 인플루엔자 바이러스 특이적 항바이러스 활성을 나타내는지 확인하기 위해 코로나 바이러스의 한 종류인 돼지 유행성 설사증 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)를 이용하여 항바이러스 활성을 비교하였다.

[0097]

톳 추출물의 항바이러스 활성을 확인하기 위해서, 상기 실시예 1-2의 방법과 동일하게 진행하였으며, PEDV를 감염시키기 위한 세포로는 MDCK 세포 대신 베로(VERO) 세포를 이용하였다. 톳 추출물의 경우에는 50% 에탄올 톳 추출물을 10 μ g/ml 및 20 μ g/ml이 되도록 처리하였고, 코로나 바이러스에 대한 양성 대조군으로는 아자우리딘 5 μ g/ml을, 인플루엔자 바이러스에 대한 양성 대조군으로는 리바비린 10 μ M을 처리하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0098]

도 8에서 보여주듯이, 50%(v/v) 에탄올 톳 추출물의 항바이러스 활성이 돼지 유행성 설사증 바이러스(PEDV) 대비 돼지 인플루엔자바이러스(H1N1)에서 더 높게 나타나는 것을 확인하였다.

[0099]

이를 통해, 본 발명의 톳 추출물은 인플루엔자 바이러스에 의한 세포 사멸을 저해함으로써, 인플루엔자 바이러스에 대한 선택적이고 우수한 항바이러스 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0100]

<제제예 1. 약학적 제제>

[0101]

제제예 1-1. 정제의 제조

[0102]

본 발명의 톳 추출물 20g을 각각 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0103]

제제예 1-2. 주사액제의 제조

[0104]

본 발명의 톳 추출물 100mg, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0105]

<제제예 2. 건강기능식품의 제조>

[0106]

제제예 2-1. 건강기능식품의 제조

[0107] 본 발명의 톳 추출물 20g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0108] **제제예 2-2. 건강기능성 음료의 제조**

[0109] 본 발명의 톳 추출물 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

[0110] **<제제예 3. 동물사료첨가제 제조>**

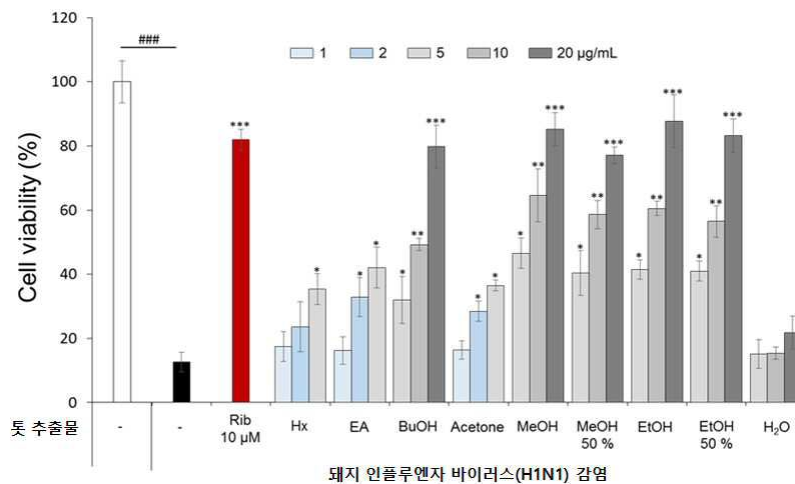
[0111] 본 발명의 톳 추출물 10g을 사료용 부형제 50g과 섞어 사료첨가제를 제조하였다. 그러나, 상기 배합비는 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 사료조성물 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조에 사용할 수 있다.

[0112] **<제제예 4. 소독제의 제조>**

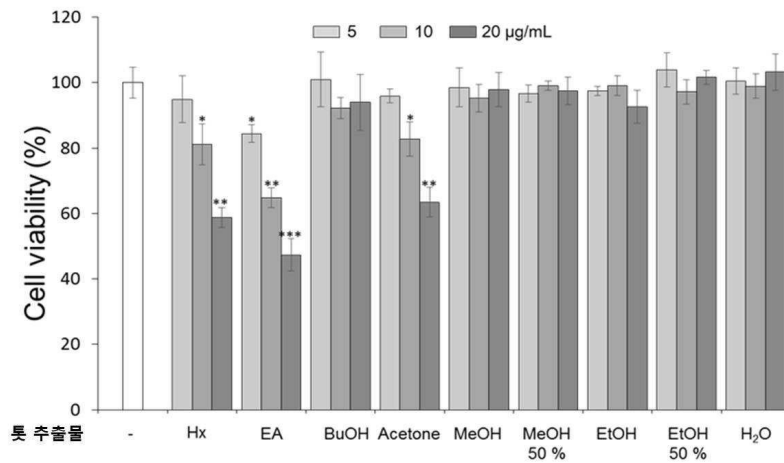
[0113] 본 발명의 톳 추출물 3g을 정제수 1,000ml에 가하여 무방부제용 천연소독제를 제조하였다.

도면

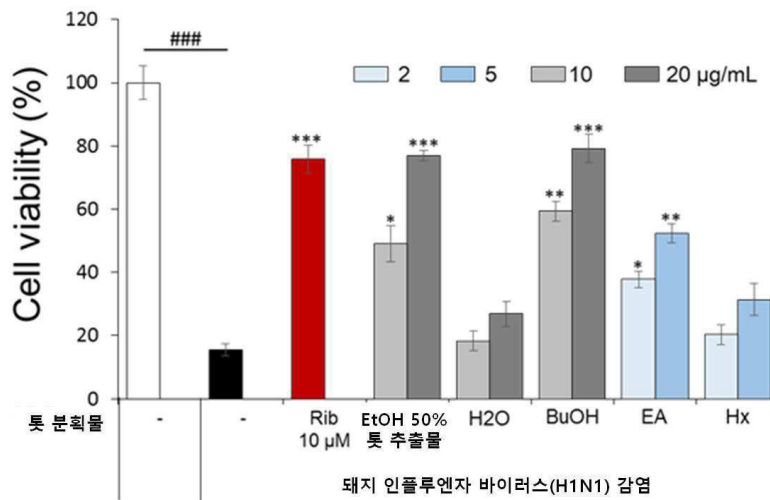
도면1



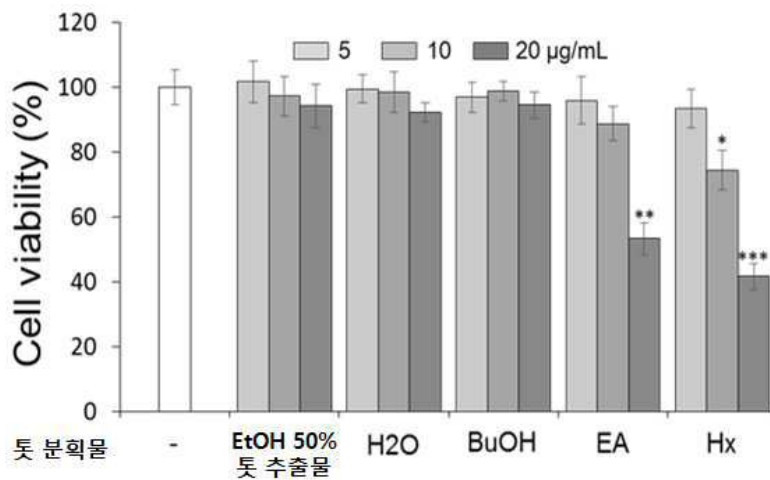
도면2



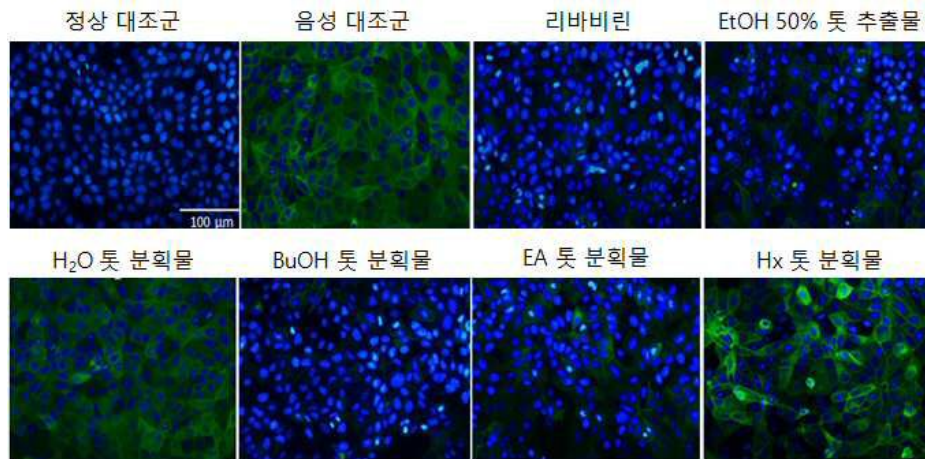
도면3



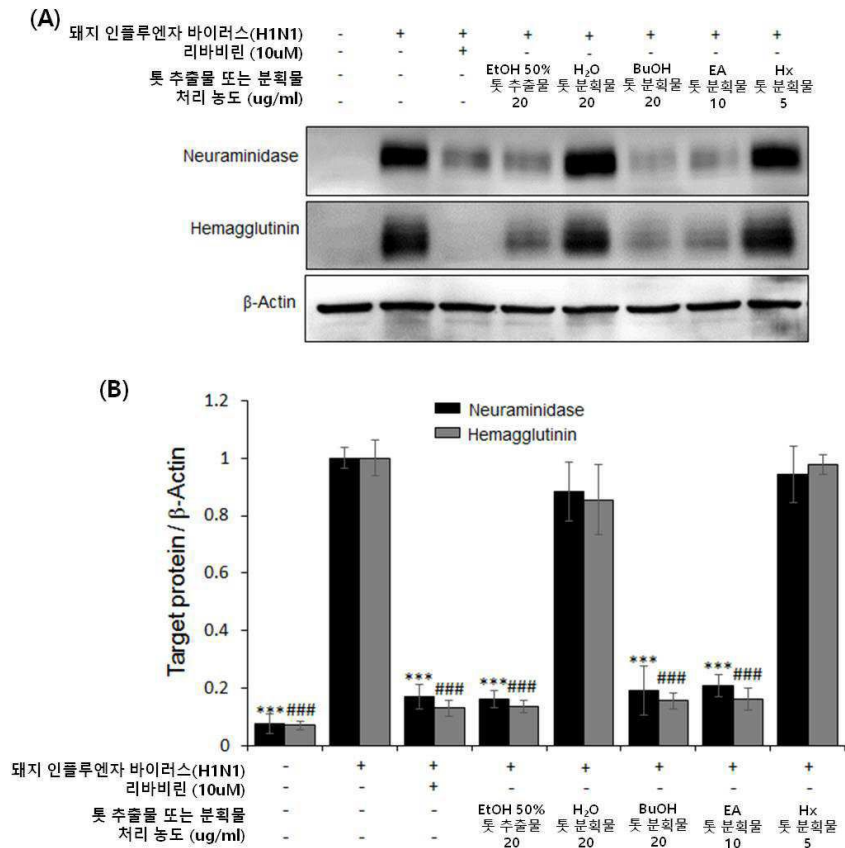
도면4



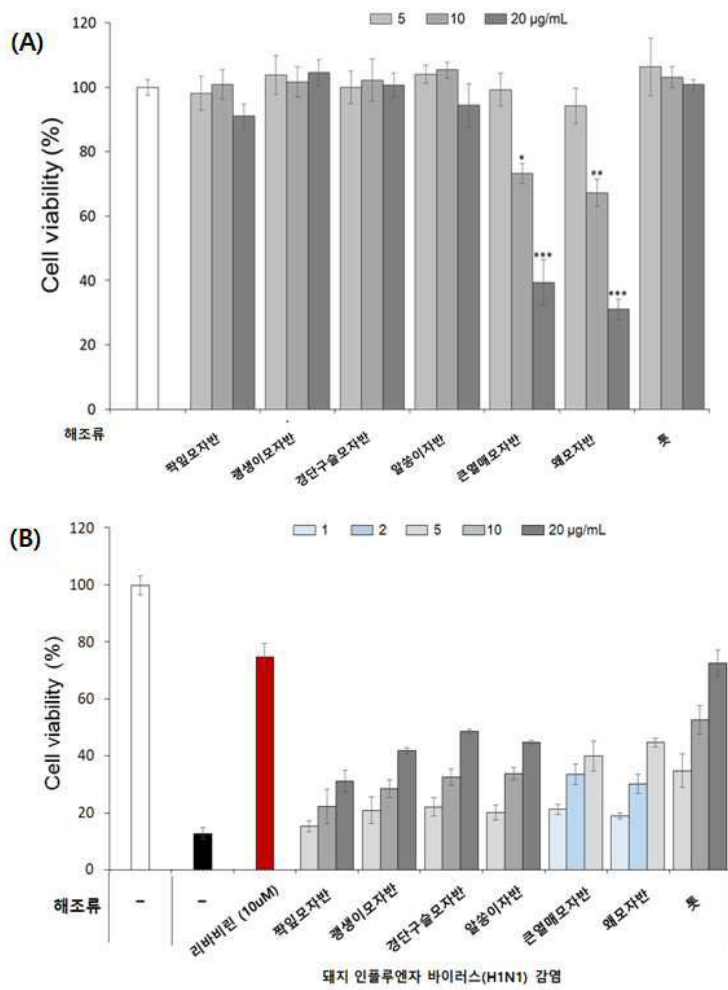
도면5



도면6



도면7



도면8

