



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0040848
(43) 공개일자 2024년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01)

(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23V 2002/00 (2023.08)

(21) 출원번호 10-2022-0119584

(22) 출원일자 2022년09월21일

심사청구일자 2022년09월21일

(71) 출원인

대한민국(환경부 국립생물자원관장)

인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물
자원관 (경서동)

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(주)윗상

강원도 춘천시 한림대학길 1, 창업보육센터 1231
2호(옥천동)

(72) 발명자

손연경

서울특별시 서초구 서초대로 385, 3동 1003호(서
초동, 진흥아파트)

이사라

경기도 고양시 일산동구 일산로 30, 605호(
백석동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인오암

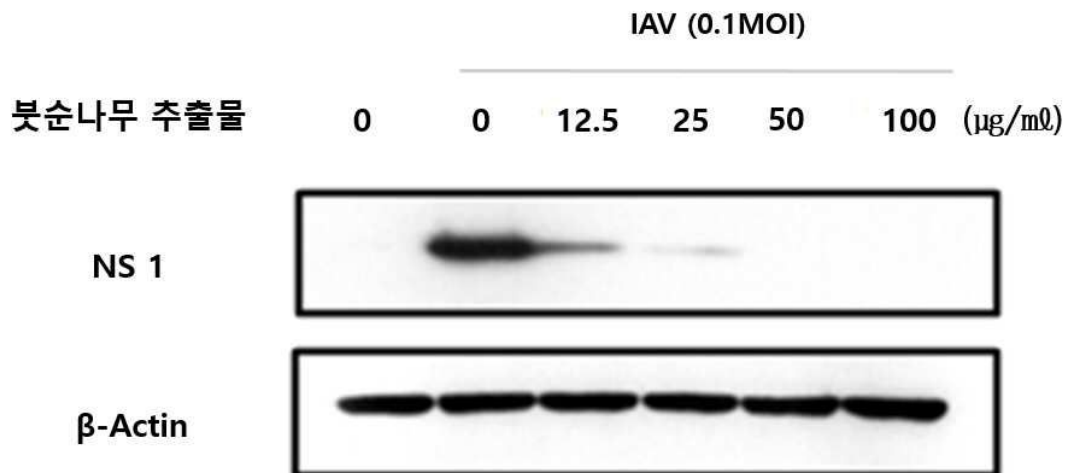
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 붓순나무 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물

(57) 요약

본 발명은 붓순나무 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로서, 상기 추출물이 H1N1의 M2나 NS1과 같은 바이러스의 필수 구성 인자의 발현을 억제하는 효능이 우수하고 바이러스가 처리된 세포가 사멸되지 않고 지속적으로 생존하는 것을 확인할 수 있다. 이에 붓순나무 추출물이 포함된 약학 조성물 또는 건강기능식품은 H1N1과 같은 인플루엔자 A 계열의 바이러스 질환의 치료용 조성물 또는 이들 질환의 예방과 개선을 위한 건강기능식품으로서 용이하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/21 (2013.01)

(72) 발명자

이승기

인천광역시 서구 송학로 457, 403동 1404호(검암동, 삼보해피하임)

정은희

인천광역시 서구 청라에메랄드로76번길 14, 157동 1703호(청라동, 호반베르디움)

이채원

인천광역시 서구 가정로223번길 28, 107동 1001호(석남동, 석남금호어울림)

김가륜

인천광역시 서구 청라한대로72번길 7-31, 1407호(청라동)

전성호

강원특별자치도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교 생명과학과 8312호 (옥천동)

홍은채

경기도 의정부시 백석로 33, 104동 402호(호원동, 삼익1차아파트)

김진우

서울특별시 강동구 강동대로53길 66, 501동 301호(성내동, 한솔애리즈아파트)

심재훈

강원도 춘천시 방송길 77, 106동 2101호(온의동, 춘천 센트럴타워 푸르지오)

정현모

강원도 춘천시 후만로 37, 602동 405호(후평동, 주공6단지아파트)

류도현

경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 성균관대학교 화학관동 330624 카이탈 소재 핵심연구지원센터(천천동)

김동규

경기도 수원시 권선구 서수원로577번길 305, 201동 702호(금곡동, 수원모아미래도센트럴타운2단지)

박영훈

서울특별시 은평구 서오릉로24길 15, B동 602호(갈현동, 고은명가)

이율빈

강원도 춘천시 칠전서길 15-2, 202동 1001호(칠전동, 칠전대우2차아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

벗순나무 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 벗순나무의 잎, 줄기, 뿌리, 잎 또는 수피로부터 추출된 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 인플루엔자 A 바이러스의 활성을 저해하는 효능이 있는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 바이러스는 H1N1인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 추출물은 바이러스의 M2의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 추출물은 바이러스의 NS1의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 7

벗순나무 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 추출물은 벗순나무의 잎, 줄기, 뿌리, 잎 또는 수피로부터 추출된 것을 특징으로 하는 항바이러스용 건강기능식품.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 추출물은 인플루엔자 A 바이러스의 활성을 저해하는 효능이 있는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 건강기능식품.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 바이러스는 H1N1인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 건강기능식품.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 추출물은 바이러스의 M2의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 건강기능식품.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 추출물은 바이러스의 NS1의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 붓순나무 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 바이러스의 M2 및 NS1의 발현을 억제하는 효능이 있는 조성물인 것을 특징으로 한다.

배경 기술

[0002] Influenza virus의 항바이러스제는 크게 2종이 개발된 바 있다. Influenza virus의 생활사에서 바이러스 진입과정에 작용하는 M2 이온채널 단백질의 저해제인 Amantadine과 바이러스의 방출과정에 작용하는 뉴라미딘 분해효소(neuraminidase)의 저해제인 Tamiflu 등이 항바이러스제로 개발되어 사용되고 있다. 그러나 amantadine의 경우, 이미 내성바이러스가 생성되어 그 효용이 없어져 거의 사용되지 않는다. 실제 신종플루 팬데믹의 경우 Tamiflu가 유일하게 항바이러스제로 사용된 바 있다. 하지만, 이미 Tamiflu에 대한 내성바이러스도 출몰하여 새로운 항바이러스제에 대한 연구가 여전히 진행 중이다.

[0003] 붓순나무(*Illicium anisatum*)는 붓순나무과에 속하는 상록수교목이다. 수피와 열매에는 특유의 향기가 있어 향료로 쓰기도 한다. 목재는 부드럽고 촉감이 좋아서 양산대, 염주알, 주판알을 만드는 데 이용되었다. 잎이 상록이며 윤기가 있어 남쪽 지방의 정원수로도 적합하다고 알려져 있다. 열매는 심피가 바람개비처럼 배열하고 8각(角)이므로 중국에서는 이와 비슷한 종에 팔각(*I. verum*)이라는 이름이 있다. 외과피(外果皮)는 육질이고 내과피는 딱딱하다. 종자는 타원형이고 노란빛을 띤 갈색으로 광택이 있으며 독이 있다. 생가지를 부쳐 앞에 꽂으며, 일본에서는 이 나무를 산소 옆에 심으면 귀신이 침범하지 못한다는 전설 때문에 산소 주위에 심으며 관속에 넣기도 한다. 중국산 팔각(*I. verum*)은 독이 없기 때문에 음식에 넣거나 또는 건위제, 구풍제로 사용하는 데, 붓순나무를 팔각과 혼동하여 사용한 결과 중독을 일으키는 수가 있어 왔다. 한국의 진도, 완도, 제주도와 일본, 타이완, 중국 등지에 분포한다.

[0004] 한편, 본 발명자들은 붓순나무를 활용하기 위해 다양한 생리활성을 연구하던 중, 상기 붓순나무의 잎 추출물이 인플루엔자 A의 M2나 NS1 발현을 저해하는 효과가 있어 각종 다양한 바이러스 질환의 치료제로 이용가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제1732031호 (발명의 명칭 : 붓순나무 추출물을 포함하는 알레르기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 출원인 : 한국식품연구원, 등록일 : 2014.06.26)

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제1197451호 (발명의 명칭 : 팔각회향, 곱향, 창출의 건조 분쇄물 또는 극성용매 추출액을 이용한 동물용 항 바이러스 조성물, 출원인 : 주식회사 인트론바이오테크놀로지 외 1인, 등록일 : 2009.10.23)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 붓순나무 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물을 제공하는 데에 있다. 상기 조성물은 바이러스의 M2 및 NS1의 발현을 억제하는 효능이 있는 조성물인 것을 특징으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 붓순나무 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.
- [0008] 상기 추출물은 붓순나무를 물, C1~C4 알코올 또는 이들의 혼합용액을 용매로 하여 추출된 것이다.
- [0009] 상기 추출물은 붓순나무의 잎, 줄기, 뿌리, 잎 또는 수피로부터 추출된 것일 수 있다.
- [0010] 상기 추출물은 인플루엔자 A 바이러스의 활성을 저해하는 효능이 있는 것일 수 있다. 상기 바이러스는 H1N1일 수 있다. 또한 상기 추출물은 바람직하게는 바이러스의 M2 또는 NS1의 발현을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0011] 상기 추출물은 25 μ g/ml에서 24시간 동안 바이러스 감염된 세포의 생존율을 약 15~20배 가량 증가시켜 세포가 지속적으로 생존되게 하는 것을 특징으로 한다.
- [0012] 본 발명은 이에 붓순나무 추출물을 함유하는 항바이러스용 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0013] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0014] 상기 붓순나무 추출물은 붓순나무를 물, C1~C4 알코올 또는 이들의 혼합용액을 용매로 하여 추출할 수 있으며, 상기 C1~C4 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 및 이소부탄올로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 추출물은 또한 30~90%(v/v) 알코올 수용액 추출물, 바람직하게는 50~80%(v/v) 알코올 수용액 추출물일 수 있다.
- [0015] 상기 붓순나무 추출물의 제조시 사용되는 물, C1~C4 알코올 또는 이들의 혼합용액은 붓순나무 사용 중량 기준 1~40배 부피(1kg 기준 1~40 l)를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 5~40배 부피를 사용할 수 있다. 상기 붓순나무 추출물의 추출조건은 20~100℃에서 1분~48시간일 수 있다. 상기 과정은 1~4번까지 반복할 수 있다.
- [0016] 또한, 당분야의 통상적인 방법으로서 상기 붓순나무의 물, C1~C4 알코올 또는 이들의 혼합용액 추출물을 물에 녹인 후에 n-헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 n-부탄올로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 용매를 사용하여 추가적으로 분획하여 분획물로 제조할 수 있다.
- [0017] 또다른 방법으로는, 붓순나무를 물, C1~C4 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출 농축하여 얻은 붓순나무 추출물에, 물을 가하여 현탁한 후, 바람직하게는 붓순나무 추출물의 중량의 1~1000배, 더 바람직하게는 1~500배, 가장 바람직하게는 1~50배의 물을 가하여 현탁한 후, 상기 현탁물에 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 및, 부탄올로 이루어진 군에서 선택되는 용매를 가하여 얻은 에리트로플레움 포르디 분획물로 제조할 수 있다. 상기 붓순나무 분획물은 바람직하게는, 붓순나무를 물, C1~C4 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출 농축하여 얻은 붓순나무 추출물을 물에 현탁한 후 헥산과 혼합하여 얻은 헥산층의 농축물, 상기 헥산층을 제거하고 남은 잔사(물층)에 클로로포름을 혼합하여 얻은 클로로포름층의 농축물, 또는 상기 클로로포름층을 제거하고 남은 잔사(물층)에 에틸아세테이트를 혼합하여 얻은 에틸아세테이트층의 농축물, 상기 에틸아세테이트층을 제거하고 남은 잔사(물층)에 부탄올을 혼합하여 얻은 부탄올층의 농축물, 또는 상기 부탄올층을 제거하고 남은 잔사(물층)의 농축물일 수 있다. 한편, 이 외의 분획조건은 제한되지는 않으나, 상기 붓순나무 추출물에 붓순나무 추출물의 중량의 1~50배의 물을 가하여 현탁물을 제조한 후, 상기 물과 동량의 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 및, 부탄올로 이루어진 군에서 선택되는 용매를 가하여 분획할 수 있다. 또한, 헥산층을 제거한 후 남은 잔사에 클로로포름을 가하고, 클로로포름층을 제거하고 남은 잔사에 에틸아세테이트를 가하고, 에틸아세테이트층을 제거하고 남은 잔사에 부탄올을 가할 때에도, 단계적으로 이루어 질 때도 역시 잔사와 동량의 각 용매(클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올)를 순차적으로 가하여 분획할 수 있다.
- [0018] 상기 붓순나무 추출물 또는 이의 분획물의 제조온도는 20 내지 100℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 추출 또는 분획 시간은 특별히 제한되는 것은 아니나, 10분 내지 2일 이내에 추출하는 것이 바람직하며, 추출용 기기로는 통상의 추출기기, 초음파분쇄추출기 또는 분획기를 이용할 수 있다. 이렇게 제조된 붓순나무 추출물 또는 분획물은 열풍건조, 감압건조 또는 동결건조하여 용매를 제거할 수 있다. 또한, 상기 붓순나무 추출물 또는 분획물은 컬럼크로마토그래피를 이용하여 정제하여 사용할 수 있다.
- [0019] 상기 붓순나무 추출물은 상법에 따라, 유기용매(알코올, 에테르, 아세톤 등)에 의한 추출, 헥산과 물의 분배,

컬럼크로마토그래피에 의한 방법 등, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법을 단독 또는 적절하게 조합한 방법을 이용하여 분획 또는 정제하여 사용할 수 있다.

[0020] 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography), 실리카겔 진공 액체 크로마토그래피(silica gel vacuum liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 중에서 선택될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 붓순나무 추출물을 함유하는 항바이러스용 약학 조성물을 제공한다. 상기 붓순나무 추출물은 본 발명의 약학 조성물에 0.001~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다.

[0022] 상기 약학 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 약학 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, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 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 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 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 단순희석제인 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, 동결건조 제제, 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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 치료받을 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 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 약학 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 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 추출물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0025] 또한, 본 발명은 붓순나무 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 항바이러스용 건강기능식품을 제공한다. 상기 붓순나무 추출물은 본 발명의 건강기능식품에 0.001~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액체 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림, 유제품, 스프, 이온음료, 음료수, 알코올 음료, 껌, 차 및 비타민 복합제 등이 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명은 붓순나무 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로서, 상기 추출물이 H1N1의 M2나 NS1과 같은 바이러스의 필수 구성 인자의 발현을 억제하는 효능이 우수하고 바이러스가 처리된 세포가 사멸되지 않고 지속적으로 생존하는 것을 확인할 수 있다. 이에 붓순나무 추출물이 포함된 약학 조성물 또는 건강기능식품은 H1N1과 같은 인플루엔자 A 계열의 바이러스 질환의 치료용 조성물 또는 이들 질환의 예방과 개선을 위한 건강기능식품으로서 용이하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물 및 비교예 1의 팔각 추출물의 세포독성을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물 및 비교예 1의 팔각 추출물의 M2 막단백질의 유전자 발현 억제 효능을 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물의 NS1 단백질의 발현 억제 효능을 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물 및 비교예 1의 팔각 추출물이 처리된 세포의 생존능을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 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 완전해지도록, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0029] <실시예 1. 붓순나무 추출물의 제조>

- [0030] 붓순나무 잎 건조시료 300g을 10배 volume의 70%(v/v) 에탄올 수용액에서 3시간동안 70℃에서 추출하였다. 추출 후 얻은 액상을 취해, 감압농축기를 사용하여 농축을 진행하였고, 동결건조를 진행하여 얻은 건조시료를 DEPC treated water 에 10mg/ml 농도로 녹여 실험을 진행하였다.

[0031] <비교예 1. 팔각 추출물의 제조>

- [0032] 팔각 잎을 원료로 이용하여 실시예 1의 방법으로 추출물을 제조하였다.

[0033] <실험예 1. 세포 독성 확인 - WST assay>

- [0034] nomall cell인 MDCK(Madin-Darby canine kidney) 세포에서 붓순나무 추출물과 팔각 추출물의 세포 독성을 확인하였다.

- [0035] MDCK 세포에 각각의 추출물을 다양한 농도(0, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하고 24시간 배양하였다. 이후 남아있는 세포를 이용하여 WST-1 Cell Proliferation Assay System을 이용한 WST-1 assay를 진행하였다.(37℃, 1hr) 흡광도는 Microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 통해 450nm 파장에서 측정하였다. 결과값은 아무것도 처리하지 않은 세포군의 세포증식능을 100%로 환산하여 각각의 붓순나무 추출물 및 팔각 추출물 처리에 따른 세포증식능 변화를 상대적으로 나타내었으며 이에 대한 결과를 도 1에 나타내었다.

- [0036] 도 1의 결과를 참고하면, 붓순나무 추출물과 팔각 추출물 모두 해당 처리농도에서 세포 생존능이 90% 이상인 것으로 확인된다.

[0037]

[0038] <실험예 2. 추출물 처리에 따른 바이러스 마커의 발현 확인>

- [0039] M2 막단백질은 인플루엔자 바이러스를 구성하는 이온 채널로서, 바이러스의 활성 저해 여부를 위해 확인하는 대표적인 마커 중 하나이다. 인플루엔자 바이러스 A로는 H1N1 (A/Brisbane/59/2007)를 한국질병관리본부 병원체자원은행(Korea Centers for Disease Control and Prevention ;KCDC)에서 분양받아 사용하였다.

- [0040] MDCK 세포에 인플루엔자 A 바이러스 시료(0.1MOI)와 실시예 1의 붓순나무 추출물, 비교예 1의 팔각 추출물을 동시 처리하고 24시간 배양하였다. 이 후 MDCK 세포에서 TRIzol (Invitrogen, Waltham, MA, USA) 시약을 이용하여 Total RNA를 정제한 뒤, amfiRivert cDNA Synthesis Platinum Master Mix (Enzyme Mix, 2X Buffer Mix) (GenDEPOT)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 이후 M2 Primer와 함께 end-point PCR을 진행하였고 증폭된 DNA 구간은 Ethidium bromide (EtBr)가 포함된 1.5wt% Agarose를 통해 검출하였다.

- [0041] 각 유전자의 primer는 하기 문헌을 참고하여 다음의 서열로 합성된 것을 이용하였다(ACT1 : Canine house keeping gene).

- [0042] Terrier, O., Josset, L., Textoris, J. et al. Cellular transcriptional profiling in human lung epithelial cells infected by different subtypes of influenza A viruses reveals an overall down-

regulation of the host p53 pathway. Virol J 8, 285 (2011).

[0043] M2 forward : 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA-3'

[0044] M2 reverse : 5'-GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA-3'

[0045] ACT1 forward : 5'-AATTCACGGCACAGTCAAGGC-3'

[0046] ACT1 reverse : 5'-AACATACTCAGCACCAGCATCACC-3'

[0047] 실험결과 도 2에 나타내었는데, 인플루엔자 A 바이러스만을 처리한 군(IVA) 대비 실시예 1의 붓순나무 추출물을 처리하였을 때 12.5~100 μ g/ml에서 모두 M2의 유전자 발현량이 현저히 감소하는 것으로 확인되기에, 본 발명의 붓순나무 추출물이 바이러스의 증식을 억제하는 효능이 매우 뛰어나다는 것을 알 수 있다(IC₅₀= 약 7.46 μ g/ml).

[0048] 그러나 이에 반해, 비교예 1의 팔각 추출물의 경우, 100, 50 μ g/ml의 고농도에서는 M2 유전자 발현이 다소 억제되는 것으로 보이나, 이보다 낮은 농도인 12.5, 25 μ g/ml에서는 항바이러스 활성이 거의 나타나지 않고 M2 유전자가 그대로 발현하였다.

[0049] <실험예 3. 바이러스 필수 단백질 NS1의 발현 확인>

[0050] 다음으로 확인한 타겟인 NS1은 바이러스 단백질로, 바이러스에 필수적인 비구조 단백질이다. 실제 발현되는 단백질 양을 가시적으로 확인하기 위해 western blot을 진행하여 NS1의 단백질 발현량을 확인하였다.

[0051] 인플루엔자 A 바이러스 시료(0.1MOI)와 붓순나무 추출물을 처리하고 24시간 배양한 MDCK 세포에 PRO-PREPTM Protein Extraction Solution (iNTRON Biotechnology Inc., Seoul, Korea)을 사용하여 단백질을 정제한 뒤, Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통해 분리하였다. 이후 Trans-Blot[®] SD semi-dry electrophoretic transfer cell (Bio-rad, Philadelphia, PA, USA)을 통해 Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)으로 단백질을 이동시켰다. Membrane은 0.1(v/v)% Tween20 (VWR, Avantor, Radnor, PA, USA)와 5(w/v)% Skim milk (BD DifcoTM, Le Pont-de-Claix, France)가 포함된 Tris buffered saline (TBS)에 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 0.1%(v/v) Tween20 (VWR)이 포함된 TBS (1X TBST)로 Membrane을 세척한 뒤 NS1 항체 (SC-130568) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)를 4℃에서 12시간 이상 반응시켰다. 이후 2차 항체로 Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (7076S) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 사용하여 1시간 이상 반응시켰다. 마지막으로 Chemiluminescence Western Imaging System (Supernova-Q1800, CENTRONICS, Daejeon, Korea)를 사용하여 단백질 발현량을 검출하였다. house keeping gene의 단백질은 β -actin(3700S) (Cell Signaling Technology)을 사용하였다.

[0052] 확인 결과, 도 3과 같이, 붓순나무 추출물 처리 군에서 비구조 단백질인 NS1의 발현이 모두 줄어들어 있는 것을 확인할 수 있었고, IC₅₀도 M2 발현에서와 유사하게 나타났다.

[0053] <실험예 2. 바이러스 증식 억제능 확인 - Plaque assay>

[0054] 인플루엔자 A 바이러스 (IAV) 적정을 위해, 12 웰 플레이트 (3×10^5 Cells)에서 MDCK 세포를 성장시키고, 37℃에서 1일간 인큐베이션하였다. 1시간 동안 세포를 감염시키고 serum Free media로 희석된 1(w/v)% 아가로스 로 도말하였다. 2일 후 세포를 3.5% 포르말데하이드로 고정하고 1% 크리스탈 바이올렛(Sigma-C0075) 염료로 염색하였다(바이러스 비감염 정상세포일수록 바이올렛으로 염색됨). 이후 plate 이미지를 Image J 프로그램을 통해 면적을 계산하여 그래프로 나타내었고, 이에 대한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0055] 도 4를 참고하면, 농도 의존적으로 virus만을 단독으로 처리한 well과 대비하여 시료를 처리한 well의 세포 생존능이 증가하였고, 팔각 추출물 보다 붓순나무 추출물 시료를 처리한 well에서의 세포 생존능이 높음을 확인할 수 있다. 특히, 상기 붓순나무 추출물은 25 μ g/ml에서 24시간 동안 바이러스만 처리한 실험군 대비, 정상세포의 생존율을 약 15~20배 가량 증가시켰다. 즉, 농도 의존적으로 시료의 농도가 높을수록 낮은 plaque 형성을 보였고, 이는 앞선 결과들과 같은 경향으로, 정상 세포의 영향은 줄어들며, virus 감염 및 증식 능력을 저해하는 항바이러스 효능이 있다는 것을 시사한다.

[0056] 이상의 결과를 통해 붓순나무 추출물이 팔각 추출물에 비해 유전자, 단백질, virus life cycle 실험에서 바이러스의 감염 및 증식능 억제 능력이 현저하게 우수함을 확인할 수 있다.

[0057] <제제예 1. 약학적 제제 - 정제의 제조>

[0058] 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물 200g을 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.

[0059] <제제예 2. 식품 제조>

[0060] 제제예 2-1. 조리용 양념의 제조

[0061] 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물을 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0062] 제제예 2-2. 밀가루 식품의 제조

[0063] 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물을 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0064] 제제예 2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0065] 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물을 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0066] 제제예 2-4. 유제품(dairy products)의 제조

[0067] 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물을 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0068] 제제예 2-5. 야채주스 제조

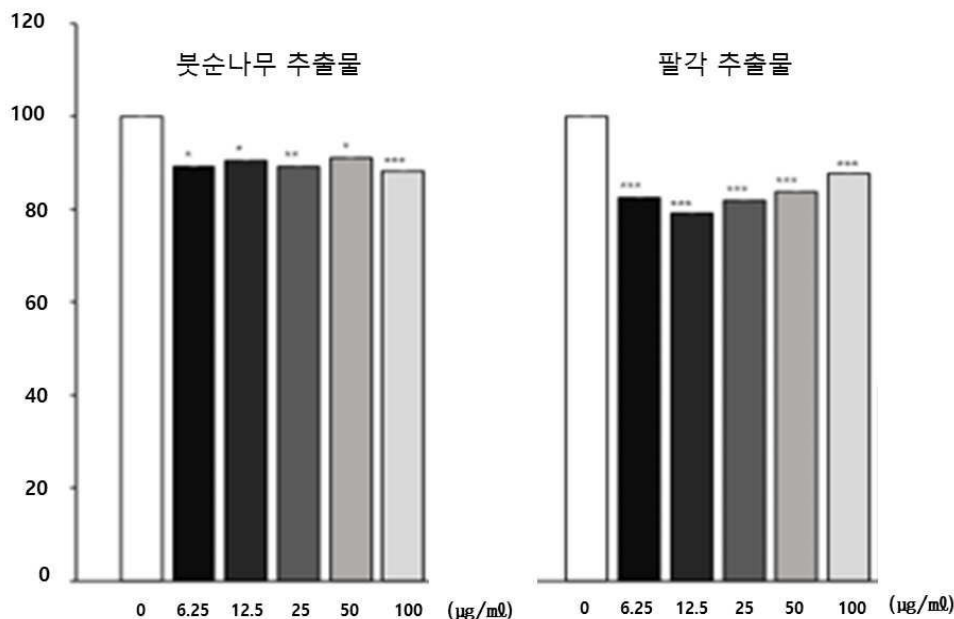
[0069] 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물 0.5g을 토마토주스 또는 당근주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0070] 제제예 2-6. 과일주스 제조

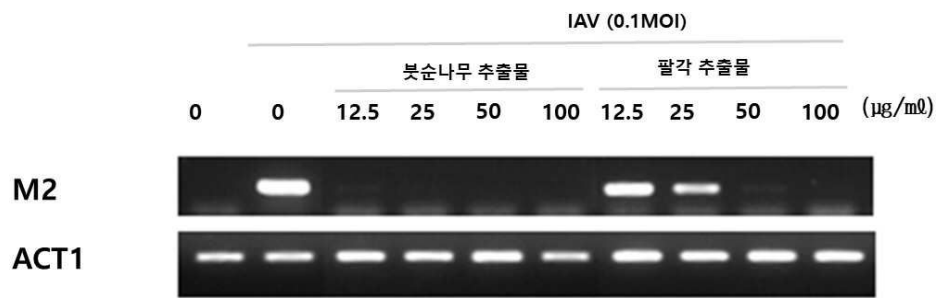
[0071] 본 발명의 실시예 1의 붓순나무 추출물 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

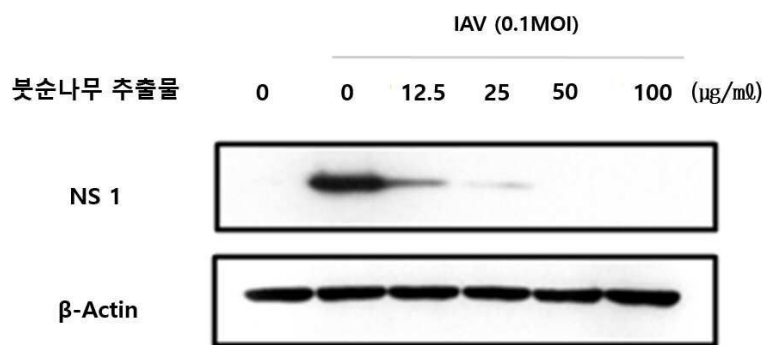
도면1



도면2



도면3



도면4

