



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0138842
(43) 공개일자 2015년12월10일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0165878(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2015년11월25일
심사청구일자 2015년11월25일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2014-0033001
원출원일자 2014년03월20일
심사청구일자 2014년03월20일</p> | <p>(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
김경현
서울시 서초구 잠원로 195, 334동 304호(잠원동, 신반포한신아파트)</p> <p>정미숙
서울특별시 종로구 창경궁로 265, 103동705호(명륜2가,아남아파트)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인다나</p> |
|---|--|

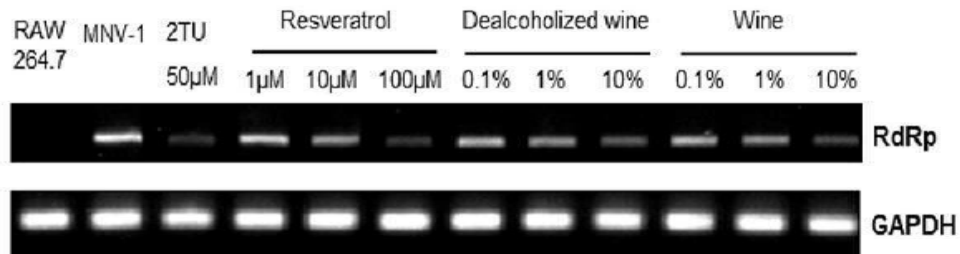
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 레스베라트롤을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 및 고양이과 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물

(57) 요약

본 발명은 레드와인을 포함하는, 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도13



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/2132 (2013.01)

(72) 발명자

오미

서울특별시 강북구 덕릉로 93, 706호(번동, 삼보힐
오피스텔)

이지혜

서울특별시 강북구 한천로105길 23, 113동 505호(
번동, 주공1단지아파트)

배선영

경기도 부천시 소사구 경인로392번가길 34-5, 302
호(소사본동, 조은맨션)

명세서

청구범위

청구항 1

레스베라트롤을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 및 고양이과 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 노로바이러스에 의한 식중독 또는 장염을 예방 또는 치료하기 위한 것인 항바이러스 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 칼리시바이러스에 의한 고양이과 동물의 호흡기 질환을 예방 또는 치료하기 위한 것인 항바이러스 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스의 세포 부착, 세포내침입 또는 바이러스 복제를 저해하는 것인 항바이러스 조성물.

청구항 5

레스베라트롤을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 및 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

레스베라트롤을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 및 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 레스베라트롤을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 및 고양이과 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 노로바이러스 및 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

식품 위해 병원체는 박테리아와 바이러스로 크게 나눌 수 있다. 노로바이러스는 선진국의 경우 비세균성 장염의 90% 이상 발병원인으로 알려져 있으며, 전 세계 모든 연령층에 발생하는 식중독의 주요 원인체이다. 미국 질병관리본부 2011년 1월 보고에 따르면, 식중독 원인 가운데 노로바이러스가 46%로 1위를 차지하고 있으며, 노로바이러스 식중독 발생 시설은 장기요양원이 가장 높았고, 식당, 선박 및 학교 순으로 나타나 노로바이러스 식중독은 주로 집단급식 시설에서 발생함을 알 수 있다. 미국에서 매년 미국인 6명 중 1명에 해당하는 4천 8백만 명이 식중독에 걸리고, 128,000명이 입원하며 3,000명이 사망한다. 사망에 이르는 식중독 환자의 90%는 노로바이러스 병원체에 의한 것이다. 우리나라의 경우, 노로바이러스 식품위해 환자 수는 계속적으로 증가하여 2006년 이후 신종플루 영향을 받은 2009년을 제외하고는 전체 식중독 환자 대비 약 30%를 차지하며, 병원성 대장균과 함께 집단급식소 식중독 발생의 주요 원인체로 집계되고 있다.

[0003]

노로바이러스는 건조하고 기온이 낮은 겨울철에 생존할 수 있는 바이러스로 물리·화학적으로 안정한 구조를 가지고 있어 실온에서 10일, 10℃ 해수 등에서 30-40일, 영하 20℃ 이하의 조건에서 장기간 생존할 수 있다. 이는 음식물과 물을 통해 사람에게 전달될 수도 있고, 환자와의 직접 접촉이나 공기를 통해서도 감염될 수 있다. 노로바이러스 10개 입자만 섭취해도 질병이 유발될 수 있고, 증상이 소멸된 이후에도 2주간 전염이 가능할 정도로

강력한 감염력을 갖고 있다.

[0004] 노로바이러스는 단일가닥(single strand) 양성(positive) RNA 바이러스로서 7.5 kb RNA 게놈(genome)을 갖고 있으며, 3개의 주된(primary) ORF 중에서 ORF2와 ORF3가 캡시드(capsid) 단백질 유전정보를 갖고 있다. ORF2와 ORF3는 각각 VP1, VP2를 발현하며, VP1은 주요 캡시드(major capsid) 단백질로 바이러스 캡시드 어셈블리(capsid assembly)에 관여하며, VP2의 기능은 아직까지 불확실하다. 노로바이러스는 다양한 유전형(genotype) 종류를 갖고 있지만, 여러 세포주(strain)에 대한 연구가 아직까지 제한적인 것은 그만큼 바이러스 세포배양이 어렵기 때문이다.

[0005] 특히 인체 노로바이러스는 사람의 장(腸)에서만 증식하고, 현재까지 세포배양이 불가능하기 때문에 관련 연구가 미흡하여 아직까지 백신이나 치료제가 없다. 그러나 대체물(surrogate)로서 뮤린(murine) 노로바이러스가 RAW 264.7 세포에서 배양이 가능하게 되면서 관련 바이러스 연구가 활발해지고 있다. RAW 264.7 세포는 STAT1이 결핍된(STAT1^{-/-}) 면역력이 약해진 쥐로부터 얻은 마우스 단핵 백혈구 대식세포주(mouse leukemic monocyte macrophage cell line)로서, 뮤린 노로바이러스-1(MNV-1)이 배양되는 유일한 세포 시스템이다. STAT1은 항바이러스 인터페론 신호전달에 의하여 고발현되는 유전자 단백질 중의 하나이다.

[0006] 식중독 치료와 관련하여 항생제(antibiotic drug)는 박테리아로 인한 식중독을 치료함에 있어서는 탁월한 효과를 발휘하지만 바이러스로 인한 식중독에는 치료효과가 없으며, 특히 바이러스로 인한 식중독의 주된 원인이 되는 노로바이러스의 감염을 예방할 수 있는 백신 또는 치료제가 아직 개발되지 않은 실정이다. 따라서 선진국형 생활패턴 변화로 인한 노로바이러스 감염이 급증하고 있는 시점에서, 노로바이러스를 제어할 수 있는 천연물을 발굴하여 집단급식소에서 섭취한다면 노로바이러스 식중독을 감소시킬 수 있으므로 사회경제적으로 매우 의미 있는 개발이 될 것으로 기대된다.

[0007] 한편, 식중독 대체 바이러스로 알려진 고양이과 칼리시바이러스(feline calicivirus)는 고양이과에 속하는 동물의 감염을 일으키는 바이러스로서 소화기관 보다는 호흡기 감염이 특징이다. 상기 바이러스는 고양이 호흡기 감염 원인의 약 50%를 차지하고 있는 매우 중요한 바이러스로서 최근에는 가정에서 키우는 애완용 고양이에게 적용되는 고양이용 백신이 개발되고 있다. 따라서 상기 고양이 칼리시바이러스에 대한 효과적인 치료제를 개발할 경우 가정용 고양이뿐만 아니라 동물원에서 사육되는 치타 등 다양한 고양이과 동물에도 또한 널리 적용이 가능할 것으로 전망된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 레드와인을 포함하는, 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 레드와인을 포함하는, 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 레드와인을 포함하는, 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 뮤린(Murine) 노로바이러스 세포배양 연구에 기반을 둔 천연물 바이오 소재 개발을 위하여 예의 연구 노력한 결과, 세포기반 항바이러스 활성연구를 이용한 저해제 연구를 통해 레드와인이 뛰어난 항 노로바이러스 활성을 갖는 것을 확인하였으며, 또한 상기 노로바이러스의 대체모델인 고양이 칼리시바이러스에 대해서도 우수한 항바이러스 활성을 가진다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 이에 본 발명의 일구현예는, 레드와인을 포함하는, 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것이다.

[0014] 상기 항바이러스 조성물은 척추동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류에 투여되는 의약 조성물의 형태이거나

나 식품 조성물, 식기, 주방용품, 생활용품, 기타 각종 물건의 세척제, 소독제, 통상의 항바이러스제 등 통상적으로 알려진 모든 형태의로의 적용이 가능하다.

[0015] 또 다른 일구현에는 레드와인을 포함하는, 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0016] 또 다른 일구현에는 레드와인을 포함하는, 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명에서 ‘레드와인’이란, 카베르네 소비뇽(Cabernet Sauvignon), 메를로(Merlot), 피노 누와(Pinot Noir), 시라(Syrah), 쉬라즈(Shiraz) 등 적포도를 원료로 하여 껍질과 씨, 알맹이 일부 또는 모두를 사용해 제조한 붉은 빛의 와인일 수 있다. 레드와인은 다양한 성분들이 복합된 혼합 추출물로서, 구체적으로 카테킨(catechin), 갈릭산(gallic acid), 3,4-디하이드록시벤조산 (3,4-dihydroxybenzoic acid), 레스베라트롤(resveratrol), 퀘세틴-3-글루쿠로니드 (quercetin-3-glucuronide), 카페인산(caffeic acid), 퀘세틴(quercetin), 미리세틴(myricetin), p-쿠마린산(p-coumaric acid), 클로로겐산(chlorogenic acid), 시아니딘-3-글루코사이드(cyanidin-3-glucoside) 및 시아니딘-3-루티노사이드 (cyanidin-3-rutinoside)의 폴리페놀 화합물을 포함할 수 있으며(도 2), 이 외에도 특히 포도에 대한 발효 또는 성숙과정을 거침으로써 탄닌성분, 칼륨, 아연 등의 미네랄, 비타민 B1, B2, E등의 비타민 성분이 포함될 수 있다.

[0019] 구체적으로, 상기 레드와인은 알코올이 함유된 레드와인 또는 알코올이 제거된 레드와인일 수 있다.

[0020] 보다 구체적으로, 알코올이 제거된 레드와인은 통상의 레드와인을 농축한 후 3차 증류수를 첨가하여 제조한 것일 수 있다.

[0021] 종래 레드와인은 심장순환계 질환, 암, 당뇨 및 신경질환에 좋은 영향을 줄 수 있다고 보고된바 있다(Rastija and Medic-Saric, 2009; Gonzalez-Burgos et al. 2013). 본 발명에서는 나아가 레드와인이 칼리시바이러스과(caliciviridae), 특히 노로바이러스(norovirus) 및 고양이 칼리시바이러스(feline calicivirus)에 대해 우수한 항바이러스 활성을 가짐을 최초로 밝혔다.

[0022] 구체적으로, 본 발명자들은 실시예를 통하여 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인을 각각 전처리, 동시처리 또는 후처리하여 바이러스의 용균반 형성 저해 활성을 측정하였으며, 상기 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 시료의 바이러스의 용균반 형성 저해 활성이 바이러스에 전처리한 경우 및 동시에 처리한 경우 매우 뛰어난 것을 확인하였다(도 7 및 도 8). 또한, 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인이 농도 의존적으로 MNV-1와 FCV-F9의 복제에 관여하는 RdRp mRNA를 강력하게 감소시킴으로써 바이러스의 복제 초기 기작에 중요한 저해활성을 확인하였다(도 13 및 도 14).

[0023] 이에 따라 본 발명의 구체적인 일구현에는 레드와인을 포함하는 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 감염 질환은 바람직하게는 노로바이러스에 의한 식중독 또는 장염일 수 있으며, 또한 바람직하게는 고양이 칼리시바이러스에 의한 고양이과 동물의 호흡기 질환일 수 있다.

[0024] 또한, 구체적으로 본 발명 조성물의 일구현에는 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스의 세포 부착, 세포 내 침입 또는 바이러스의 복제를 저해하는 활성을 나타낼 수 있다.

[0025] 본 명세서에서, ‘치료’는 증상의 경감 또는 개선, 질환의 범위의 감소, 질환 진행의 지연 또는 완화, 질환 상태의 개선, 경감 또는 안정화, 부분적 또는 완전한 회복, 생존의 연장 기타 다른 이로온 치료 결과 등을 모두 포함하는 의미로 사용된다.

[0026] 본 발명의 일구현에 따른 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 레드와인을 단독으로 포함할 수 있음은 물론이나, 이외에도 제형, 사용 방법 및 사용 목적에 따라 당 분야에 사용되는 통상의 방법에 따라 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 상기 조성물은 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 예컨대 경구 투여시에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽 등의 제형으로 제공될 수 있다.

[0027] 상기 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 상기 레드와인 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 조

성물 총 중량에 대하여 상기 레드와인을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량%, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

[0028] 바람직한 투여량은 투여대상 및/또는 질환의 치료 또는 예방에 적합한 함량이 될 수 있으며, 이는 투여대상의 연령, 성별, 일반 건강 상태 및 체중, 질병의 종류 및 중증도, 제형의 종류, 조성물에 함유된 다른 성분의 종류 및 함량, 조성물의 분비율, 투여경로 및 기간 등을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으나, 바람직하게는 성인기준 1일 50 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

[0029] 본 발명에서, ‘노로바이러스’는 분류학상 칼리시바이러스과 (Caliciviridae)에 속하며 단일가닥의 RNA를 갖는 바이러스로, 생김새로 인하여 소형구형 바이러스(small round structured virus, SRSV)로 불리기도 하다가 최근 노로바이러스로 공식명명 된 식중독 바이러스이다. 노로바이러스 식중독은 감염된 환자의 토사물, 분변 및 신체 접촉에 의한 것이며 식수 및 어패류, 과일, 채소 등 즉석섭취가 가능한 식품이 오염된 경우 10~100개의 작은 입자로도 질병을 일으킬 수 있으며, 입자가 매우 작아 공기 중에 에어로졸 형태로 부유하기 때문에 집단감염이 급속도로 발생하여 공중보건학상 큰 위협이 되고 있다. 노로바이러스 식중독 발생 시설은 장기요양원이 가장 높았고, 식당, 선박 및 학교 순으로 나타나 노로바이러스 식중독은 주로 집단급식 시설에서 발생함을 알 수 있다.

[0030] ‘고양이 칼리시바이러스(feline calicivirus)’는 노로바이러스와 함께 칼리시바이러스과에 속하는 것으로서, 마찬가지로 단일가닥의 RNA를 지니고 있으며 유전학적, 생화학적, 물리화학적인 특성이 노로바이러스와 유사하여 노로바이러스의 대체모델로 이용되고 있다.

[0031] 본 발명의 또 다른 일구현에는 레드와인을 포함하는 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서의 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품, 음료 및 음료 첨가제 등을 모두 포함하는 의도이다.

[0033] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 레드와인을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g이다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0034] 노로바이러스 또는 고양이과 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선의 효과를 목적으로 하는 본 발명의 일구현예에 따른 식품 조성물에 있어서, 상기 레드와인의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 100 중량%, 바람직하게는 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 바람직하게는 0.01~100중량%, 보다 바람직하게는 1~10중량%로 포함될 수 있으며, 구체적으로는 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.01 g 내지 100 g, 바람직하게는 1 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 레드와인을 포함하는 조성물은 칼리시바이러스의 부착, 증식 및 복제를 저해하는 활성이 매우 우수하므로, 아직까지 백신이나 치료제가 개발되어 있지 않은 노로바이러스 및 고양이 칼리시바이러스에 효과적인 치료제로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 안정성이 인정된다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 및 레스베라트롤 시료의 항바이러스 활성 측정을 위한 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 레드와인의 폴리페놀 화합물 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 레드와인 및 알코올이 제거된 레드와인이 농도에 따라 CRFK 세포주에 미치는 세포독성 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 레드와인 및 알코올이 제거된 레드와인이 농도에 따라 RAW 264.7 세포주에 미치는 세포독성 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 레스베라트롤이 농도에 따라 CRFK 세포주에 미치는 세포독성 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 레스베라트롤이 농도에 따라 RAW 264.7 세포주에 미치는 세포독성 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 FCV-F9에 레드와인 또는 알코올이 제거된 레드와인 시료를 전처리한 경우 및 FCV-F9와 함께 레드와인 또는 알코올이 제거된 레드와인 시료를 처리한 경우의 바이러스의 용균반 형성 저해 활성을 측정하여 나타낸 것이다.

도 8은 MNV-1에 레드와인 또는 알코올이 제거된 레드와인 시료를 전처리한 경우 및 MNV-1과 함께 레드와인 또는 알코올이 제거된 레드와인 시료를 처리한 경우의 바이러스의 용균반 형성 저해 활성을 측정하여 나타낸 것이다.

도 9는 CRFK 세포주에 레드와인 또는 알코올이 제거된 레드와인 시료를 전처리한 경우 및 레드와인 또는 알코올이 제거된 레드와인 시료를 후처리한 경우의 FCV-F9의 용균반 형성 저해 활성을 측정하여 나타낸 것이다.

도 10은 RAW264.7 세포주에 레드와인 또는 알코올이 제거된 레드와인 시료를 전처리한 경우 및 레드와인 또는 알코올이 제거된 레드와인 시료를 후처리한 경우의 MNV-1의 용균반 형성 저해 활성을 측정하여 나타낸 것이다.

도 11은 CRFK 세포주에 레스베라트롤 시료를 전처리한 경우, FCV-F9에 레스베라트롤 시료를 전처리한 경우, FCV-F9와 레스베라트롤 시료를 동시에 처리한 경우 및 FCV-F9에 의한 감염 후 레스베라트롤 시료를 처리한 경우 각각의 용균반 형성 저해 활성을 측정하여 나타낸 것이다.

도 12는 RAW264.7 세포주에 레스베라트롤 시료를 전처리한 경우, MNV-1에 레스베라트롤 시료를 전처리한 경우, MNV-1과 레스베라트롤 시료를 동시에 처리한 경우 및 MNV-1에 의한 감염 후 레스베라트롤 시료를 처리한 경우 각각의 용균반 형성 저해 활성을 측정하여 나타낸 것이다.

도 13은 RAW 264.7 세포에 MNV-1를 감염시키면서 동시에 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 및 레스베라트롤을 농도별로 첨가한 후 RT-PCR 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 CRFK 세포에 FCV-F9를 감염시키면서 동시에 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 및 레스베라트롤을 농도별로 첨가한 후 RT-PCR 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0039] 실시예 1. 레드와인, 레스베라트롤 시료의 제조

[0040] 레드와인 (12.5% alcohol, v/v)은 Chateau Bel Air, Bordeaux superieur 2007, (프랑스)을 실험에 사용하였다. 알코올을 제거한 레드와인은 Boban, N et.al., 2010.(Antimicrobial effects of wine: separating the role of polyphenols, pH, ethanol, and other wine components. Journal of Food Science 75 (5), 322-326.)에 기재된 방법에 따라 실험에 사용한 레드와인을 30℃에서 진공농축기(rotary evaporator)를 이용하여 용량을 약 50%로 농축한 후, 손실된 용량만큼의 3차 증류수를 첨가하여 제조하였다. 레스베라트롤 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)은 phosphate buffered saline (PBS)에 용해하여 실험에 사용하였다.

[0041] 이후 후술할 실시예에서 무린노로바이러스 및 고양이과 칼리시바이러스에 대한 활성을 평가하기 위한 시료로서, 상기 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 및 레스베라트롤을 0.2 μ m 시린지필터(syringe filter)로 여과한 후, 분주하여 초저온 냉동고에 보관하며 사용하였다.

[0043] 실시예 2. 레드와인의 폴리페놀 화합물 분석

[0044] 2-1. 실험방법

[0045] Cantos et al.(2000) (Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. Journal of Agricultural Food Chemistry 48 (10), 4606-4612.)의 방법을 사용하여 레드와인의 폴리페놀화합물 분석을 수행하였다. LCMS-8040 액상 크로마토그래피 질량분석계 (Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, Shimazu, Japan)와 Shim-pack XR-ODSII column (2.0 x 75 mm, 2.2 μ m, Shimazu)이 장착된 Nexera UHPLC system (Shimazu)을 이용하여 분석하였으며, 이동상은 용매 A(0.1% 포름산)와 용매 B (0.1%의 포름산을 포함하는 아세토나이트릴(acetonitrile))을 사용하였고, 용매 A와 B를 1.5분 동안 95:5, 그 후 8분간 65:35, 그리고 10분간 0:100의 비율로 조정하였으며 이동상의 유속은 0.4 mL/min, 검출 파장은 280 nm이었다.

[0047] **2-2. 결과**

[0048] 레드와인에서 총 90.39 μ g/mL의 폴리페놀화합물이 확인되었으며, 확인된 폴리페놀화합물은 46.04 μ g/mL의 카테킨(catechin), 19.35 μ g/mL의 갈릭산(gallic acid), 6.06 μ g/mL의 3,4-디하이드록시벤조산(3,4-dihydroxybenzoic acid), 5.27 μ g/mL의 레스베라트롤(resveratrol), 5.20 μ g/mL의 퀘세틴-3-글루루로니드(quercetin-3-glucuronide), 4.49 μ g/mL의 카페인산(caffeic acid), 2.28 μ g/mL의 퀘세틴(quercetin), 0.92 μ g/mL의 미리세틴(myricetin), 0.72 μ g/mL의 p-쿠마린산(p-coumaric acid), 0.04 μ g/mL의 클로로젠산(chlorogenic acid), 0.01 μ g/mL의 시아니딘-3-글루코사이드(cyanidin-3-glucoside) 및 0.01 μ g/mL의 시아니딘-3-루티노사이드(cyanidin-3-rutinoside)이었다(도 2).

[0050] **실시예 3. 항바이러스 활성 평가**

[0051] **3-1. 바이러스의 배양**

[0052] 인체 노로바이러스의 대체물로서 무린 노로바이러스인 MNV-1(Dr. Herbert Virgin (Washington University School of Medicine, St Louis, USA)로부터 분양받음), FCV-F9 (VR-782, ATCC, Manassas, VA, USA)를 각각 사용하였다. 각 바이러스에 대한 숙주세포로는 무린 노로바이러스의 경우 RAW 264.7 세포주 (ATCC TIB-71), FCV의 경우 CRFK 세포주(ATCC CCL-94)를 사용하였으며 상기 숙주세포들은 각각 100x Antibiotic-Antimycotic(Gibco, Grand Island, NY), 10%(v/v) 우태아혈청 (fetal bovine serum (FBS), Hyclone Lab, Logan, Utah)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY)를 기본 배지로 하여 37℃, 5% CO₂ 배양기 (incubator)에서 24-72시간 간격으로 계대 배양하였다.

[0053] RAW 264.7 및 CRFK 세포를 조직 배양 플레이트 (tissue culture plate)에 각각 2.0×10^6 , 2.0×10^5 cell/ml로 분주하여 24 시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하고, MNV-1 5.0×10^5 PFU/ml, FCV-F9 2×10^6 PFU/ml를 실험조건 감염다중도 (multiplicity of infection, MOI)에 맞게 희석하여 접종시킨 후, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 동안 배양하여 각 바이러스를 감염시켰다.

[0055] **3-2. 세포 독성 측정**

[0056] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여, 세포 생존율 (cell viability)을 측정함으로써 항바이러스 실험에 사용할 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 및 레스베라트롤 시료의 세포 독성을 측정하였다.

[0057] 구체적으로, 96 웰(well)에 RAW 264.7 및 CRFK 세포를 웰당 각각 1.5×10^6 cells/ml 및 2.0×10^5 cells/ml로 분주 (seeding)하고 24시간 후에 각 시료를 농도별로 첨가하여 1-72시간까지 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 이후, MTT를 최종 농도 0.5 mg/mL로 첨가하여 2시간 후에 UV-Vis 분광광도계(spectrophotometer) 570 nm에서 흡광도 (absorbance)를 측정하였다. 세포 생존율은 무첨가군에 대한 상대적인 %로 계산하여 나타내었다.

[0058] 상기 분석을 수행한 결과, 레드와인과 알코올이 제거된 레드와인이 각각 10% 농도에서 CRFK 세포와 RAW 264.7 세포에 대해 세포독성이 없었으며, 레스베라트롤은 CRFK 세포와 RAW 264.7 세포에 대하여 100 μ M과 50 μ M농도에서 각각 독성이 없는 것으로 나타나 각 해당농도에서 매우 안전하게 사용 가능함을 확인할 수 있었다(도 3 내

지 도 6).

3-3. 용균반 검사에 의한 항바이러스 활성 측정

레드와인 및 알코올이 제거된 레드와인 시료를 상기 3-2에 따라 세포에 독성이 없는 것으로 확인된 농도범위로 시점을 각각 달리하여 첨가한 후, 시료의 첨가 시점에 따른 항바이러스 활성을 후보물질이 첨가된 것과 무첨가군의 용균반 차이로 비교 분석하였다 (무첨가군의 용균반 형성 정도를 100%로 하여 산정함).

(1) 세포에 시료 전처리(pre-treatment)시 항바이러스 활성 측정

레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 또는 레스베라트롤 시료와 세포 또는 바이러스를 각각 혼합하여 1시간씩 배양한 후, 바이러스 저해 정도를 확인함으로써 바이러스 감염 전에 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 및 레스베라트롤이 세포 또는 바이러스에 미치는 영향을 확인하였다.

우선, 세포에 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 또는 레스베라트롤 시료를 전처리 하였을 때의 효과를 관찰하였다.

세포에 대한 전처리(pre-treatment of cell)에 있어서, RAW 264.7세포, CRFK 세포를 각각 24 웰에 분주하고, 시료와 세포를 1시간 동안 인큐베이션 시킨 후, 시료를 제거한 후, 시료와 혼합하지 않은 바이러스를 감염시켰다.

(2) 바이러스에 시료 전처리(pre-treatment)시 항바이러스 활성 측정

RAW 264.7 및 CRFK 세포 각각을 24 웰(well)에 분주하고(10% FBS를 함유하는 DMEM 배지, well 당 1.5×10^6 의 생존 세포 분주), 상기와 같이 시료에 혼합하여 1시간 동안 배양한 MNV-1 및 FCV-F9 바이러스를 분주한 세포에 감염시킨 후, 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 이후, 1.5%(w/v) 아가로스 (agarose), 5%(v/v) FBS 및 1%(v/v) PS(penicillin-streptomycin)가 포함된 DMEM 배지를 넣고 42시간 동안 37℃ 배양기에서 배양하고 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛 (crystal violet)으로 염색하여 용균반을 측정하였다.

(3) 바이러스 감염과 시료를 동시에 처리시(co-treatment) 항바이러스 활성 측정

RAW 264.7 및 CRFK 세포 각각을 상기 (1)과 같이 24 웰에 분주하여 배양하고, 바이러스와 시료를 상기 기술된 농도로 동시에 첨가하여 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 이후 1.5%(w/v) 아가로스, 5%(v/v)FBS 및 1%(v/v) PS(penicillin-streptomycin)가 포함된 DMEM 배지를 넣고 42시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 후 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 용균반을 측정하였다.

(4) 바이러스 감염 후 시료를 후처리(post-treatment)시 항바이러스 활성 측정

RAW 264.7 및 CRFK 세포 각각을 상기 (1)과 같이 24 웰에 분주하여 배양하고, 바이러스를 감염시킨 후 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 바이러스를 완전히 제거한 후, 시료를 각 상기 기술된 농도로 첨가한 DMEM 배지를 첨가하여 1시간 동안 37℃에서 배양한 다음 배지를 완전히 제거하였다. 1.5%(w/v) 아가로스, 5%(v/v) FBS 및 1%(v/v) PS(penicillin-streptomycin)가 포함된 DMEM 배지를 넣은 후 약 42시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 후, 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 용균반을 측정하였다.

(5) 실험결과

상기 (1) 내지 (4)는 정확성을 고려하여 3회 반복 실험하였고 용균반 계수(plaque counting) 결과는 SAS software와 ANOVA로 분석하였으며, Duncan's multiple range test로 결과를 도출해내었다. 결과 자료는 오차 $p < 0.05$ 의 신뢰도를 갖고 있다.

상술한 방법으로 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 시료를 이용하여, 바이러스 저해 활성을 측정한 결과를

도 7 내지 도 10에 나타내었다. 세포를 분주한 후, FCV-F9, MNV-1 각각의 바이러스에 대한 상기 (2) 및 (3)의 경우의 바이러스의 용균반 형성 저해 활성을 측정한 결과, 상기 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 시료의 바이러스의 용균반 형성 저해 활성은 상기 (2) 및 (3)의 경우 모두에서 높은 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다 (도 7 및 도 8). 그러나 FCV-F9, MNV-1 각각의 바이러스에 대한 상기 (1) 및 (4)의 경우의 바이러스의 용균반 형성 저해 활성을 측정한 결과 (도 9 및 도 10), 상기 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 시료의 바이러스의 용균반 형성 저해 활성은 상기 (1) 및 (4)의 경우 모두에서 낮은 저해활성을 보였다. 이로부터, 본 발명자들은 레드와인 및 알코올이 제거된 레드와인 시료가 노로바이러스의 생활사(life cycle) 중 특히 바이러스의 세포 부착 및 세포내부로 들어가는 (internalization) 기작에 중요한 저해활성을 나타내는 것임을 확인하였다.

레스베라트롤 시료를 이용하여, 상술한 방법으로 바이러스의 용균반 형성 저해 활성을 측정한 결과를 도 11 및 도 12에 나타내었다. FCV-F9, MNV-1 각각의 바이러스에 대한 상기 (1) 내지 (4)의 경우의 바이러스의 용균반 형성 저해 활성을 측정한 결과, 상기 레스베라트롤 시료의 바이러스의 용균반 형성 저해 활성은 상기 (2) 및 (3)의 경우에서 높은 저해활성을 나타내었다. 이로부터, 본 발명자들은 레스베라트롤 시료가 노로바이러스의 생활사(life cycle) 중 특히 바이러스의 세포 부착 및 세포내부로 들어가는 (internalization) 기작에 중요한 저해활성을 나타내는 것임을 확인하였다. 도 7 내지 도 12 내의 2-TU(2-thiouridine)(Berry & Associates, Inc., USA)는 양성대조군 (positive control)으로 사용하여 나타내었다.

3-4. RT-PCR에 의한 항바이러스 활성 측정

RAW 264.7 세포 또는 CRFK 세포를 DMEM, 5% FBS 및 1% PS(penicillin-streptomycin)가 함유된 12웰 플레이트 (plates)에 1×10^6 /well 또는 1×10^5 /well 밀도로 깔고 MNV-1 (MOI 0.01) 또는 FCV-F9 (MOI 0.001)를 각각 세포에 감염시키면서 동시에 레드와인(0.1, 1 및 10%), 알코올이 제거된 레드와인(0.1, 1 및 10%) 및 레스베라트롤(1, 10 및 100 μ M)을 각각 첨가하고 2시간 반응시켰다. 반응 후 배지를 첨가하여 24시간 동안 배양하고 RNeasy kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 세포에서 바이러스 RNA를 추출하였다.

Oligo dT, random hexamer, MNV-1 및 FCV-F9 각각에 대한 RdRp primers(Bioneer, Daejeon, Korea, primer sequences), MultiScribe™ 역전사 효소(reverse transcriptase, RT-Master Mix kit, ABI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 RT-PCR 분석을 하였다. 사용한 프라이머는 다음과 같다.

MNV-1에 대한 RdRp forward 프라이머(서열번호 1); 5'-GGAATTCATATGCTTCCCCGCCCTCAGGCACCTAT-3'

MNV-1에 대한 RdRp reverse 프라이머(서열번호 2); 5'-ATAAGAAATGCGCCGCATCCTCATTCACAAAGACTGCTGA-3'.

FCV-F9에 대한 RdRp forward 프라이머(서열번호 3); 5'-CGGTGTTTGATTGGCC-3'

FCV-F9에 대한 RdRp reverse 프라이머(서열번호 4); 5'-GACACCATCATCCCCGTA-3'

GAPDH (MNV-1), beta-actin (FCV-F9) 유전자를 내부대조군 (endogenous control)로 사용하였다. GAPDH (MNV-1), beta-actin (FCV-F9)의 forward 및 reverse 프라이머는 다음과 같다.

GAPDH (MNV-1)에 대한 forward 프라이머(서열번호 5); 5'-AACGACCCCTCATTGAC-3'

GAPDH (MNV-1)에 대한 reverse 프라이머(서열번호 6); 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3'

beta-actin (FCV-F9)에 대한 forward 프라이머(서열번호 7); 5'-ACGAGCGGTTCCGC-3'

beta-actin (FCV-F9)에 대한 reverse 프라이머(서열번호 8); 5'-GATCTTGATCTTCATCGTGC-3'

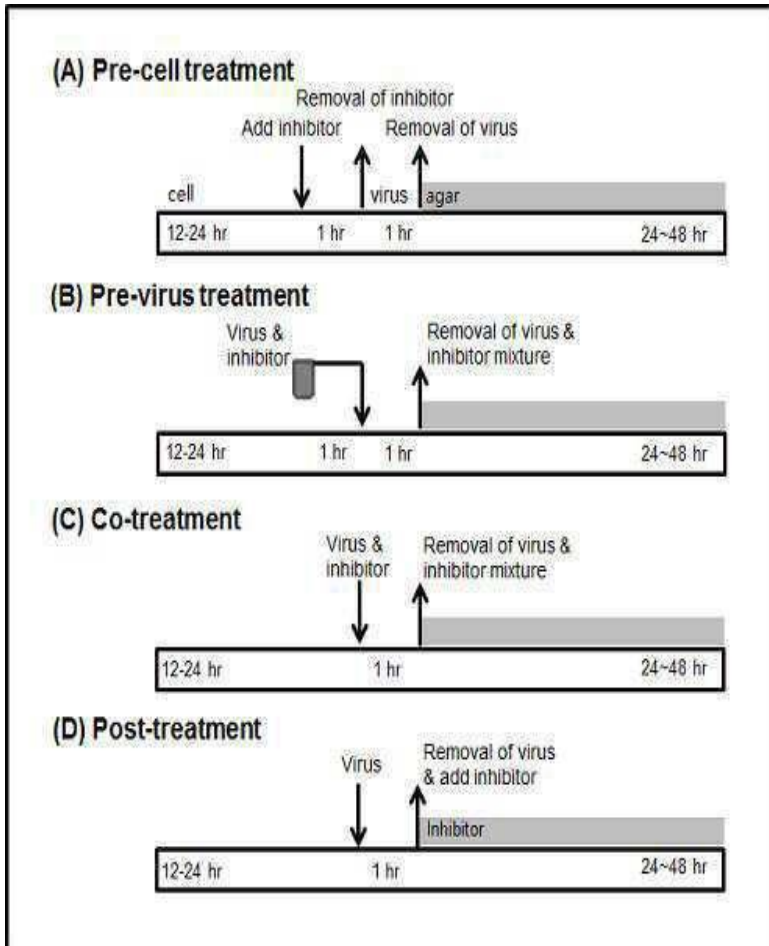
cDNA의 증폭을 위하여 처음 95℃에서 10분, 95℃에서 15초(denaturation), 60℃에서 1분(annealing), 72℃에서 1분(extension), 35사이클(cycles) 반응시키고, 72℃에서 5분(final extension) 반응시킨 후, 1.5% 아가로스 젤 전기영동을 하였다.

레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 및 레스베라트롤 시료가 MNV-1과 FCV-F9의 복제에 관여하는 RdRp mRNA에 미치는 저해활성을 RT-PCR로 분석한 결과를 도 13 및 도 14에 나타내었다. 도 13 및 도 14에 나타난 바와 같이, 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 및 레스베라트롤이 농도 의존적으로 MNV-1과 FCV-F9의 복제에 관여하는 RdRp mRNA를 강력하게 감소시킴을 알 수 있었다. 이로부터 레드와인, 알코올이 제거된 레드와인 및 레스베라트롤 시료가 노로바이러스의 생활사 (life cycle) 중 특히 바이러스의 복제 초기 기작에 중요한 저해활성을

나타내는 것을 확인하였다.

도면

도면1

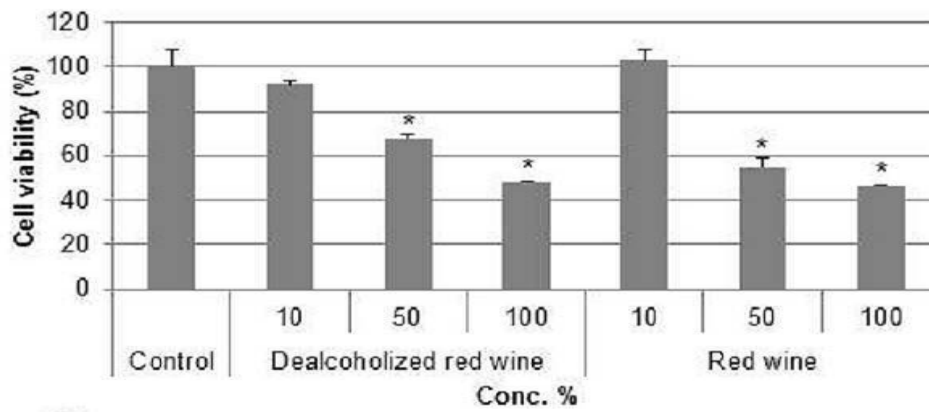


도면2

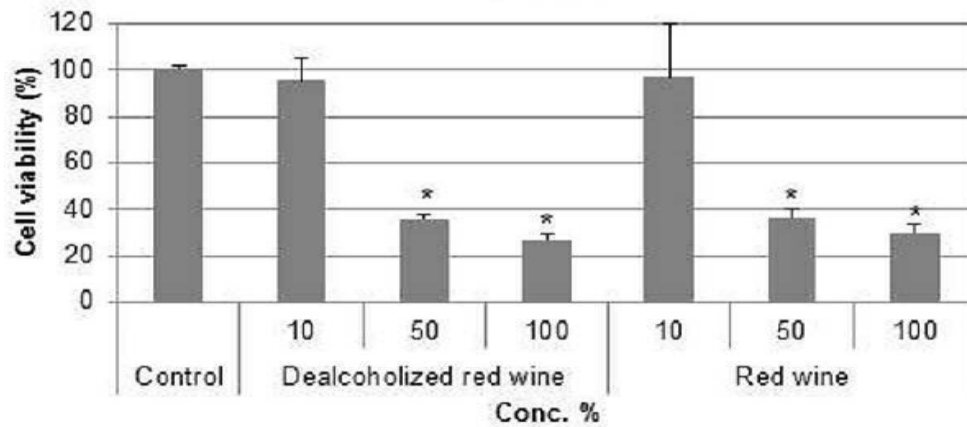
Polyphenol compounds	Contents (μg/mL)
Caffeic acid	4.49
Catechin	46.04
Chlorogenic acid	0.04
<i>p</i> -Coumaric acid	0.72
Cyanidin-3-glucoside	0.01
Cyanidin-3-rutinoside	0.01
3,4-Dihydroxybenzoic acid	6.06
Epigallocatechin-3-gallate	ND
<i>trans</i> -Ferulic acid	ND
Gallic acid	19.35
Myricetin	0.92
Quercetin	2.28
Quercetin-3-glucuronide	5.20
Resveratrol	5.27
Rutin	ND
Total	90.39

ND: Not detected.

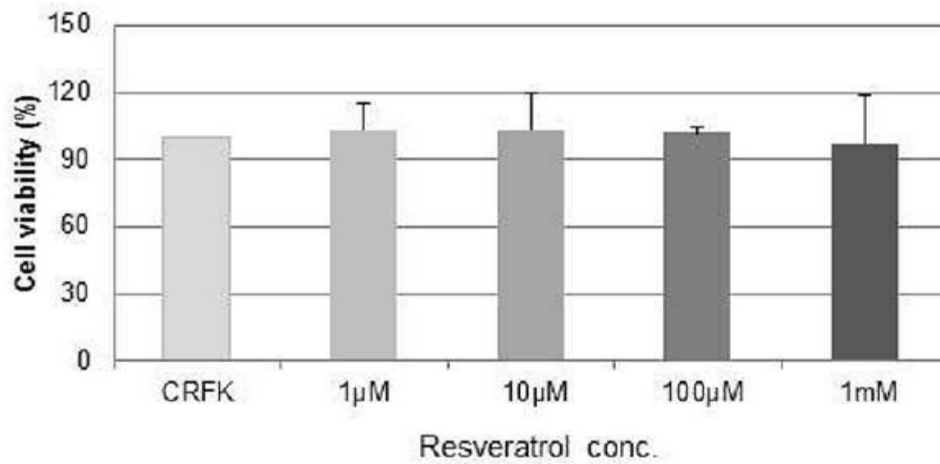
도면3



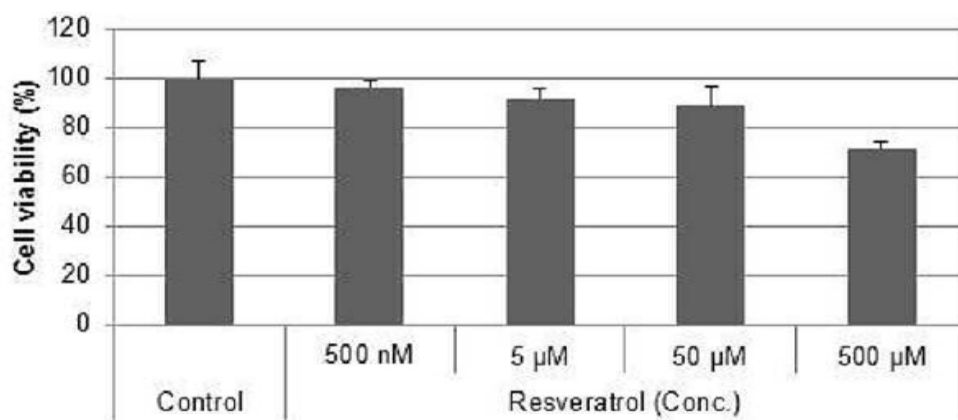
도면4



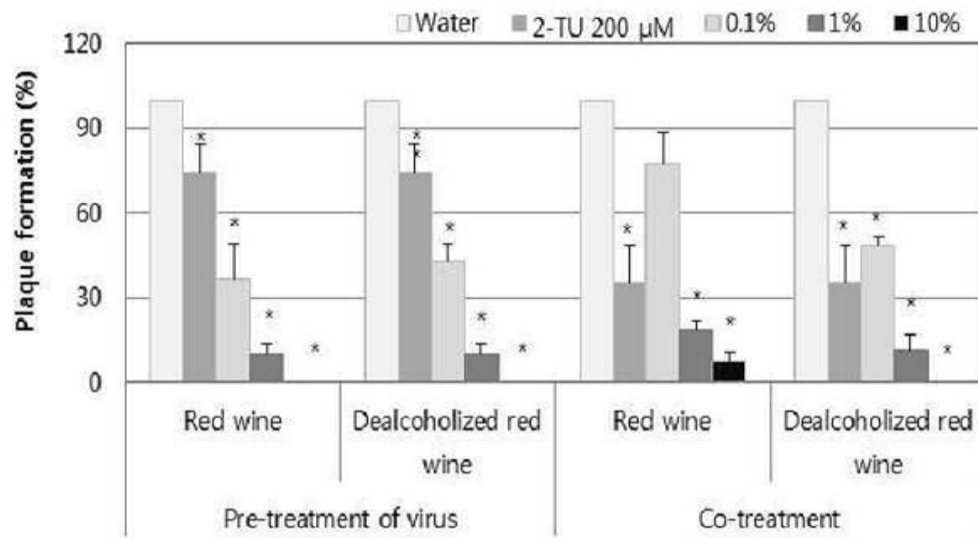
도면5



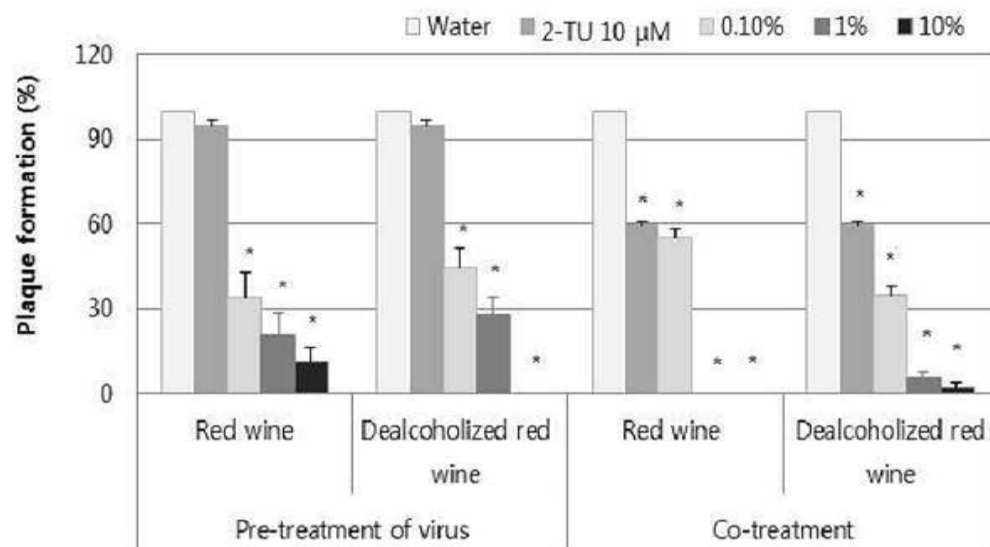
도면6



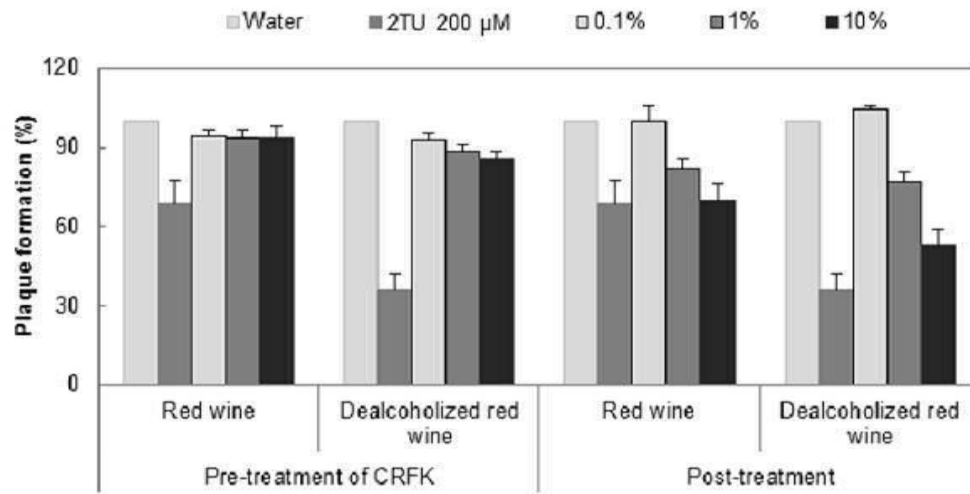
도면7



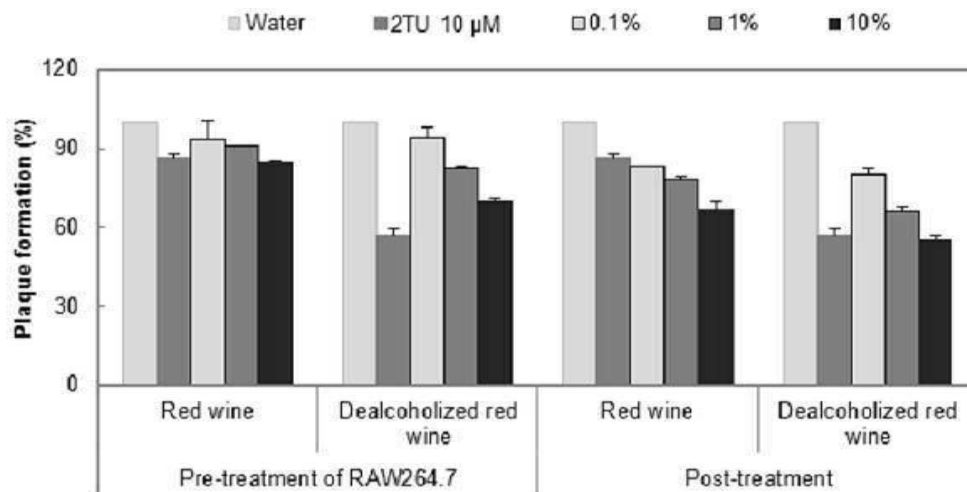
도면8



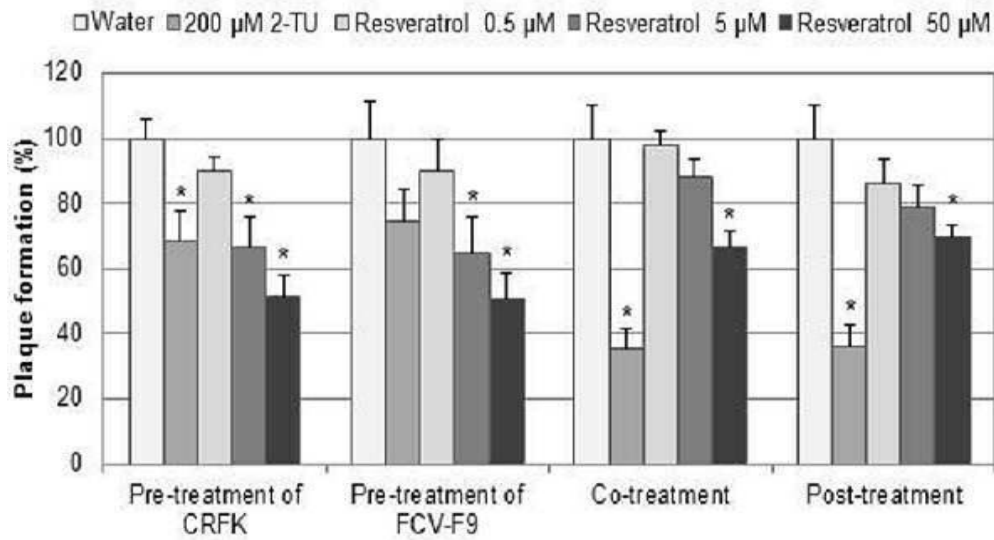
도면9



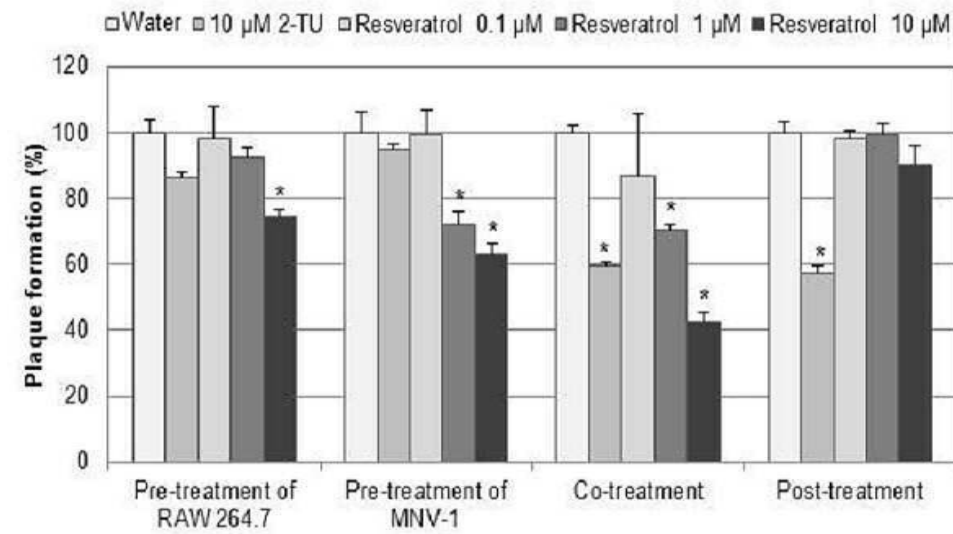
도면10



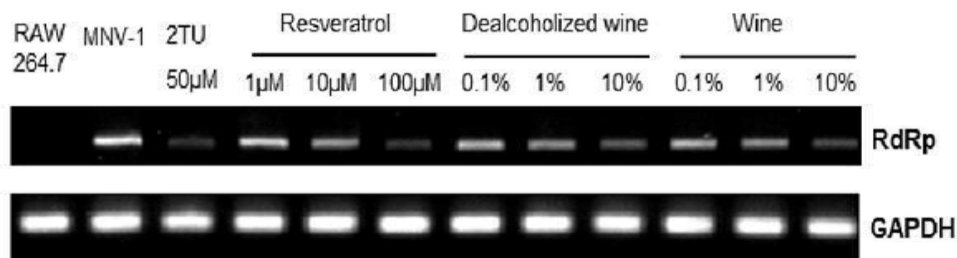
도면11



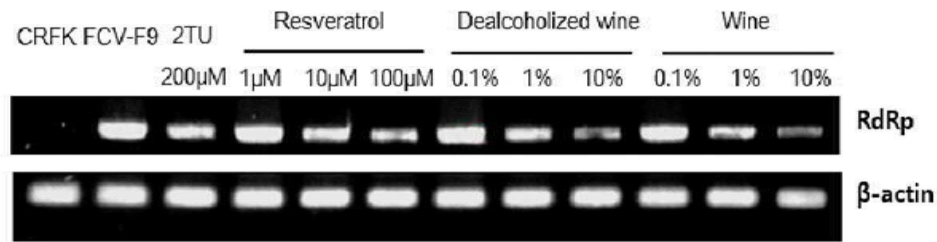
도면12



도면13



도면14



서열 목록

<110> CHUNG, MI-SOOK

<120> Antiviral composition comprising red wine

<130> DPP20140243KR

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MNV-1 RdRp forward primer

<400> 1

ggaattccat atgtttcccc gccctcagg cacctat

37

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MNV-1 RdRp reverse primer

<400> 2

ataagaatgc ggccgcatcc tcattcaca agactgctga

40

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FCV-F9 RdRp forward primer

<400> 3

cgggtgttga tttggcc

17

<210>	4	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FCV-F9 RdRp reverse primer	
<400>	4	
	gacaccatca tccccgta	18
<210>	5	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH(MNV-1) forward primer	
<400>	5	
	aacgaccct tcatgac	18
<210>	6	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH(MNV-1) reverse primer	
<400>	6	
	tccacgacat actcagcac	19
<210>	7	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin(FCV-F9) forward primer	
<400>	7	
	acgagcggtt ccgc	14
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin(FCV-F9) reverse primer	

<400> 8

gatcttgatc ttcacgtgc

20