(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0052258
(43) 공개일자 2018년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/03 (2006.01) *A01N 43/16* (2006.01)
A23K 20/121 (2016.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/357 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/03 (2013.01)
A01N 43/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0149377
(22) 출원일자 2016년11월10일
심사청구일자 2016년11월10일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
조태오
광주광역시 광산구 왕버들로132번길 35, 605동 1403호
오원근
서울특별시 관악구 행운10길 21, 102동 902호(봉천동, 관악파크푸르지오아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 15 항

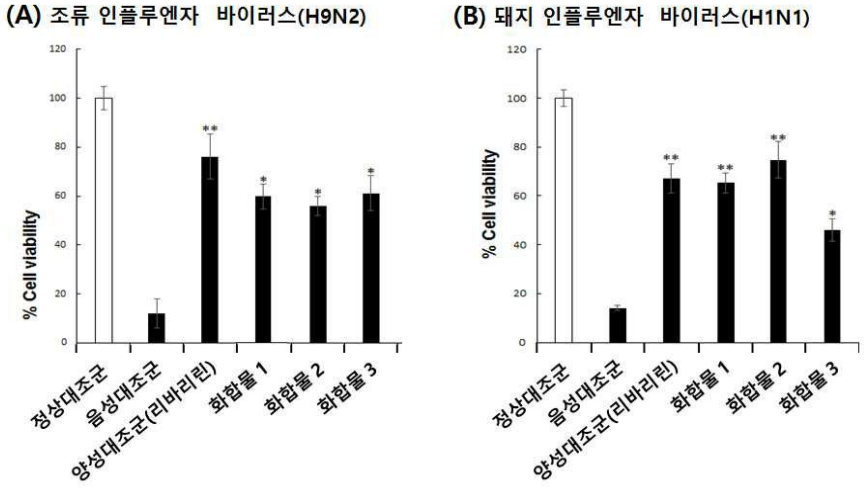
(54) 발명의 명칭 **감태 추출물 또는 이로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 감태(*Ecklonia cava*) 추출물 또는 이로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

감태 추출물 또는 이로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물인 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′ -비에콜(6,6′ -bieckol)(화합물 3)이 조류 인플루엔자 바이러스 또는 돼지 인플루엔자 바이러스에 대해 항바이러스 활성을 가지고 있어, 인플루엔자 예방 및 치료용 조성물 개발에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23K 20/121 (2016.05)
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 31/357 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)

(72) 발명자
이준식
광주광역시 서구 풍암1로 53, 105동 206호
조광원
광주광역시 광산구 풍영로170번길 39-26 대방노블랜드 5차 505동 1502호
하티킴쿠이
서울특별시 관악구 대학길 125 (신림동)
초효문
광주광역시 서구 금화로 293, 103동 2104호(화정동, 꽃담마을 e-편한세상)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525005028
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 해양생명공학기술개발사업
연구과제명 해양바이오 지역특화 선도기술 개발(해조류 유래 식/의약 소재 개발)
기 여 율 1/1
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2015.09.01 ~ 2016.07.31

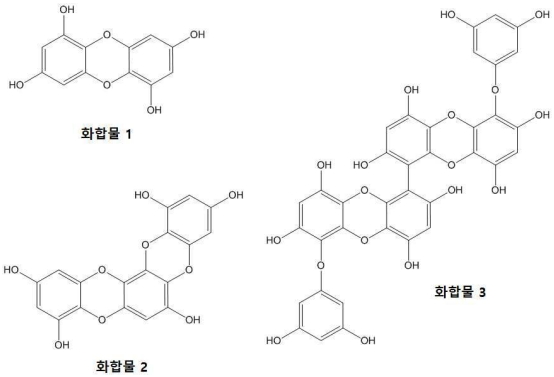
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

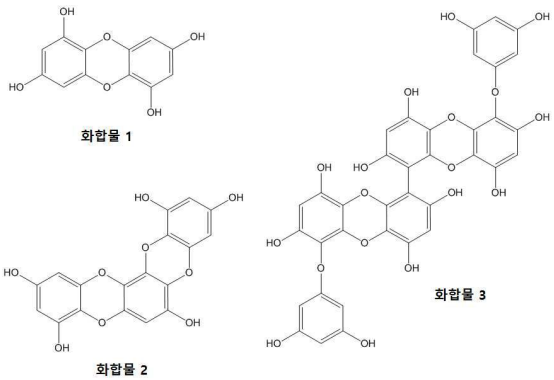
제1항에 있어서,

상기 감태 추출물은 감태를 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 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]

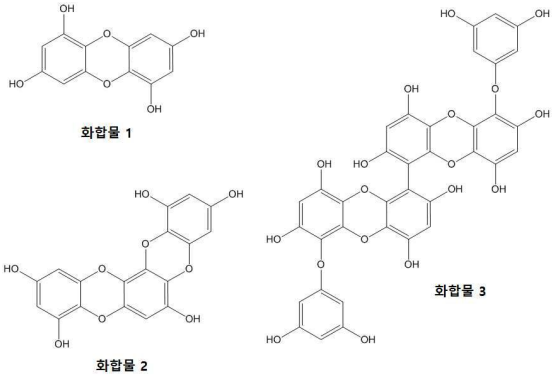


청구항 4

하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥

시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 건강기능식품.

[화학식 1]



청구항 5

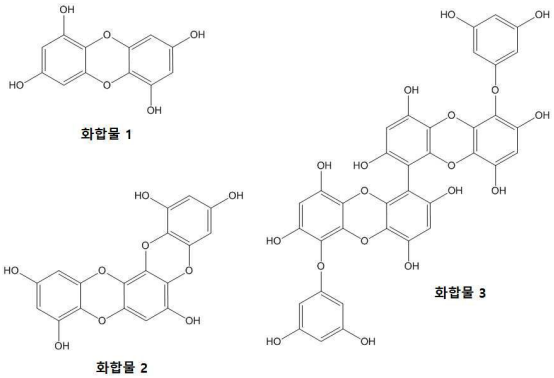
제4항에 있어서,

상기 감태 추출물은 감태를 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 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 건강기능식품.

청구항 6

감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 건강기능식품.

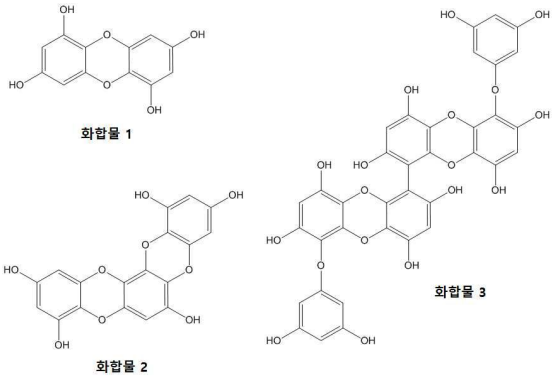
[화학식 1]



청구항 7

하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 동물 약품.

[화학식 1]



청구항 8

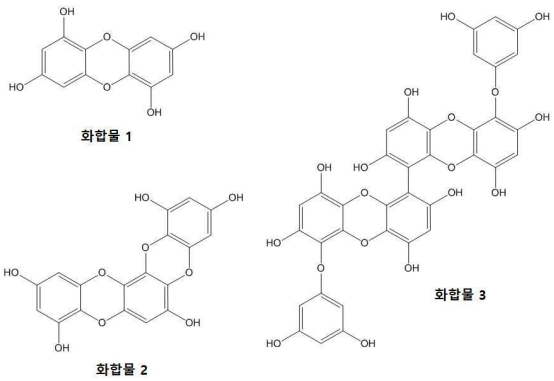
제7항에 있어서,

상기 감태 추출물은 감태를 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 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 동물 약품.

청구항 9

감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 동물 약품.

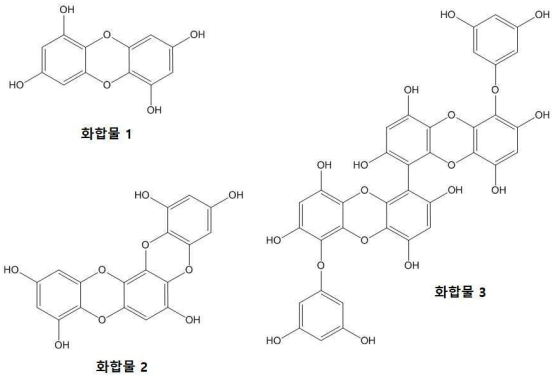
[화학식 1]



청구항 10

하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 동물 사료 첨가제.

[화학식 1]



청구항 11

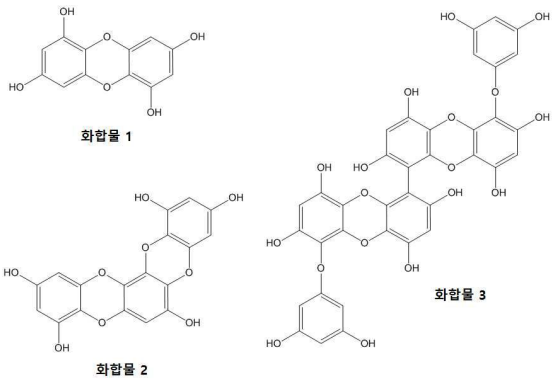
제10항에 있어서,

상기 감태 추출물은 감태를 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 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 동물 사료 첨가제.

청구항 12

감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 동물 사료 첨가제.

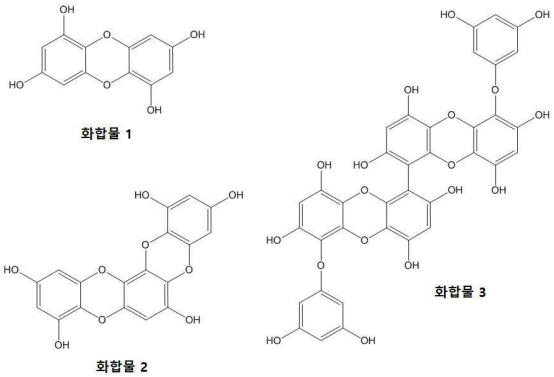
[화학식 1]



청구항 13

하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방용 천연소독제.

[화학식 1]



청구항 14

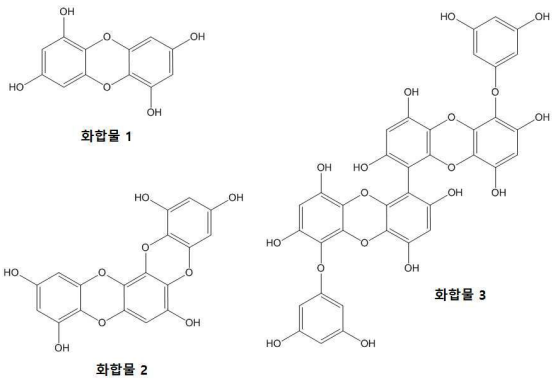
제13항에 있어서,

상기 감태 추출물은 감태를 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 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방용 천연소독제.

청구항 15

감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방용 천연소독제.

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 감태(*Ecklonia cava*) 추출물 또는 이로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 자세하게는, 조류 인플루엔자(avian influenza) 또는 돼지 인플루엔자(swine influenza)의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 높아지고 합병증의 발생이 증가하며, 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 오르소믹소비리대(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] 조류 인플루엔자(avian influenza, AI)는 닭과 오리, 칠면조 등 가금류를 접촉하는 방법 이외에도 야생조류와 철새들을 통해서 빠르게 전파된다. 최근 들어 조류 인플루엔자는 주기적으로 발생하고 있으며, 보다 오랫동안 지속되는 특징을 보이고 있다. 2014년 1월 16일에 전북 고창에서 발생한 조류 인플루엔자는 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스인 H5N8형으로 확진된 이후, 전국적으로 발생하여 닭, 오리 등 가금류의 살처분수가 1,200만 마리를 넘는 등 초유의 피해가 발생하였으며, 살처분 보상비와 소득액 구입비 등 직간접적인 손실을 포함하여 기회 손실 비용이 1조원 이상에 달하는 것으로 추정되고 있다. 2014년도 여름에 잠시 소강상태였던 조류 인플루엔자는 2014년 9월 24일 전남 영암에서 첫 발생한 이후 2015년 현재까지 그 발생 빈도나 강도가 확장일로에 있다. 2015년 2월에는 대도시 지역의 하천에서 채취한 야생조류의 분변에서 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스인 H5N8형이 검출되었고, 바이러스가 발생한 지역의 개에게서도 조류 인플루엔자 바이러스의 항체가 검출되고 있는 실정이므로, 이의 예방 및 치료는 국가적으로도 중요한 이슈이다.

[0006] 또한, 2013년도에 중국에서 발생한 신종 H7N9형 조류 인플루엔자 바이러스에 의한 조류 인플루엔자는 인간에게도 치명적인 바이러스로 2013년 4월 28일까지 H7N9형 바이러스에 감염된 환자 118명 중 24명이 사망함으로써, 치사율이 20% 이상에 달하는 강력한 질병이었다. 2015년에는 중국을 다녀온 캐나다 여성이 H7N9형 조류 인플루엔자 바이러스에 감염된 것이 보고되었을 정도로 감염에 대한 우려가 지속적으로 증가하고 있다. 이들 조류 인플루엔자 바이러스에서 공통적으로 관찰되는 점은 바이러스의 아미노산 변이가 발생하는 유전자 변이로, 사람과 사람 사이의 전염이 가능한 것으로 변이될 수 있다는 가능성을 보여주는 것이다.

[0007] 돼지 인플루엔자(swine influenza)는 1918년에 처음으로 보고되었으며, 돼지는 인간이 가지고 있는 인플루엔자 바이러스 수용체(N-acetylneuraminic acid α2,6 galactose)와 조류가 가지고 있는 인플루엔자 바이러스 수용체(N-acetylneuraminic acid α2,3 galactose)를 동시에 가지고 있어, 조류 인플루엔자 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).

[0008] 인플루엔자 바이러스에 의한 인플루엔자의 발병을 예방하기 위해서는 백신의 확보가 필수적이나 예방적 차원의 국가적 백신 대책으로는 매번 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.

[0009] 현재 조류 인플루엔자, 돼지 인플루엔자 및 신종 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 있어(Lee J.Y., 2009; Hauge S.H., et al.,

2009) 신규의 인플루엔자 치료제 개발이 필요한 실정이다.

[0010] 최근 의약품, 식품 및 화장품 분야에서 기능성 소재 개발 및 응용에 관한 연구가 활기를 띄고 있다. 특히나 생체 친화형이면서 안정성이 확보된 천연 육상 식물 추출물 또는 갈조류와 같은 해양 식물 추출물에서 약리적으로 잠재적 가치가 있는 생물학적 활성을 나타내는 성분들이 많이 보고되었다(Moore R.E., 1978; Koyanagi S., et al., 2003).

[0011] 감태(*Ecklonia cava*)는 다시마목 미역과에 속하는 갈조류의 일종으로, 한반도와 일본 등 온대 연안에 분포한다. 감태는 한국의 제주도에서 풍부하게 생산되며, 식품 첨가물, 가축 사료, 비료, 의약품 분야에서 널리 사용된다(Heo S.J., et al., 2005; Yoo C.Y., et al., 2015). 감태에는 카로테노이드(carotenoid), 후코이단(fucoidan) 및 플로로탄닌(phlorotannin) 등의 성분들이 존재하는 것으로 알려져 있고(Yoo C.Y., et al., 2015), 최근 많은 연구를 통해 감태 추출물이 항산화, 항염증, 항알러지, 티로시나아제(tryrosinase) 저해활성 및 콜라겐나아제(collagenase) 발현 저해 등의 활성이 있는 것으로 보고되었다(Kim A.R., et al., 2009; Heo S.J., et al., 2009; Le Q.T., et al., 2009; Joe M.J., et al., 2006).

[0012] 이에, 본 발명자는 천연물 약제를 대상으로 한 항바이러스제에 대해 연구하는 과정에서, 감태 추출물 또는 이로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물들이 인플루엔자 바이러스에 대해 우수한 항바이러스 활성을 갖고 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

[0013] 종래 선행기술로서 일본등록특허 제4105535호에는 해조 유래의 플로로탄닌을 주성분으로 하는 항바이러스제가 기재되어 있으나, 인플루엔자 바이러스가 기재되어 있지 않아 본 발명의 구성과 차이가 있다. 또한, 한국등록특허 제1542882호에는 감태 추출물, 그의 분획물, 플로로탄닌계 화합물을 포함하는 약학 조성물이 기재되어 있으나, 바이러스성 출혈성 패혈증 치료 효과가 기재되어 있어 본 발명의 구성과 상이하다. 한국공개특허 제2011-0086473호에는 감태 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물이 기재되어 있으나, 본 발명의 플로로탄닌계 화합물 및 인플루엔자 바이러스는 기재되지 않아 그 구성에 있어서 차이가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 일본등록특허 제4105535호, 항바이러스성 물질, 2008. 04. 04. 등록.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제1542882호, 감태 추출물을 포함하는 어류 바이러스성 출혈성 패혈증에 대한 예방 또는 치료용 조성물, 2015. 08. 03. 등록.

(특허문헌 0003) 한국공개특허 제2011-0086473호, 감태 추출물을 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물 및 3CL 프로테아제 활성의 억제용 조성물, 2011. 07. 28. 공개.

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) 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 0002) Hauge S.H., et al., Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007~2008, Emerg. Infect. Dis., 15, 155-162, 2009.

(비특허문헌 0003) Heo S.J., et al., Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds, Bioresour. Technol., 96(14), 1613-1623, 2005.

(비특허문헌 0004) Heo S.J., et al., Effects of phlorotannins isolated from Ecklonia cava on melanogenesis and their protective effects against photo-oxidation stress induced by UV-B radiation, Toxicol. In Vitro., 23(6), 1123-1130, 2009.

(비특허문헌 0005) Joe M.J., et al., The inhibitory effects of eckol and dieckol from Ecklonia stolonifera on the expression of matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts, Biol. Pharm. Bull., 29(8), 1735-1739, 2006.

(비특허문헌 0006) Kim A.R., et al., Isolation and identification of phlorotannins from Ecklonia stolonifera with anti-oxidant and anti-inflammatory properties, J. Agric. Food Chem., 57(9), 3483-3489, 2009.

(비특허문헌 0007) Koyanagi S., et al., Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and anti-tumor activities, Biochem. Pharm., 65(2), 173-179, 2003.

(비특허문헌 0008) Le Q.T., et al., Inhibitory effects of polyphenols isolated from marine alag Ecklonia cava on histamine release, Process Biochem., 44(2), 168-176, 2009.

(비특허문헌 0009) 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 0010) Moore R.E., Algal nonisoprenoids, marine natural products, chemical and biological perspective, ed. P.J. Scheure, 1, 44, Academic Press, New York, 1978.

(비특허문헌 0011) Schnitzler S.U., et al., An update on swine-origin influenza virus a/h1n1: A review, Virus Genes, 39(3), 279-292, 2009.

(비특허문헌 0012) Wright P.F., et al., Orthomyxoviruses, Fields' Virology, 5th ed. New York:Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams&Wilkins, 1691-1740, 2007.

(비특허문헌 0013) Yoo C.Y., et al., Antioxidant and Cellular Protective Activities of Ecklonia cava Extracts against Reactive Oxygen Species, J. Soc. Cosmet. Sci. Korea, 41(3), 287-294, 2015.

(비특허문헌 0014) Zimmer S.M., et al., Historical perspective-emergence of influenza A (H1N1) viruses, N. Engl. J. Med., 361, 279-285, 2009.

발명의 내용

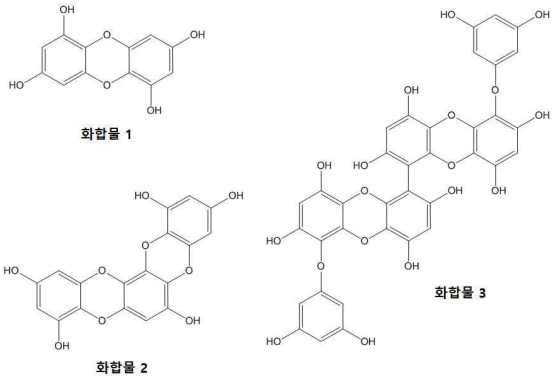
해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 감태(*Ecklonia cava*) 추출물 또는 이로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′ -비에콜(6,6′ -bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0018] [화학식 1]

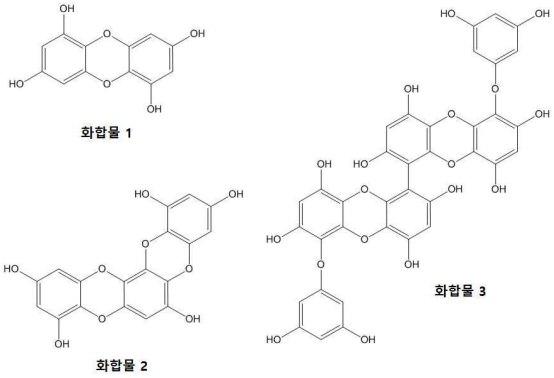


[0019]

[0020] 상기 감태 추출물은 감태를 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.

[0021] 또한, 본 발명은 감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

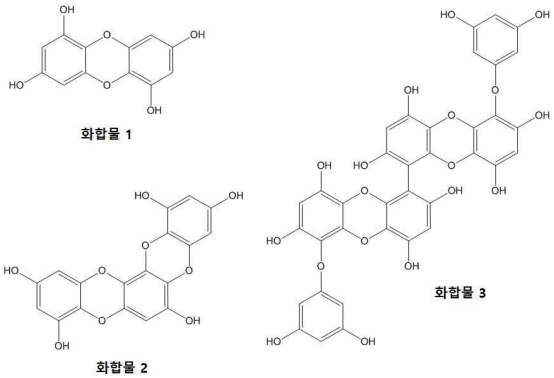
[0022] [화학식 1]



[0023]

[0024] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0025] [화학식 1]

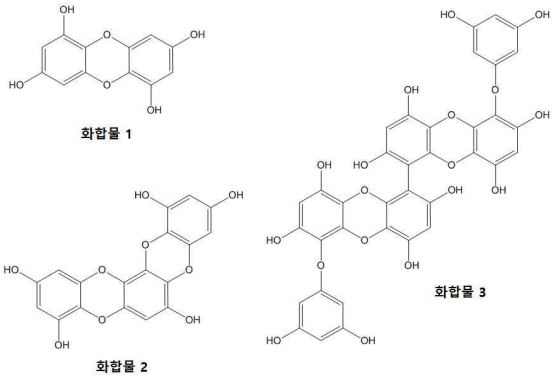


[0026]

[0027] 상기 감태 추출물은 감태를 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.

[0028] 또한, 본 발명은 감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

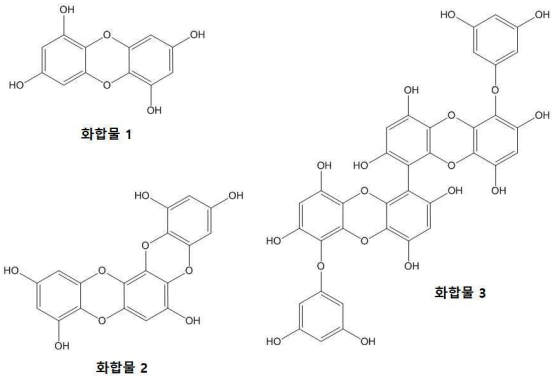
[0029] [화학식 1]



[0030]

[0031] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 동물 약품에 관한 것이다.

[0032] [화학식 1]

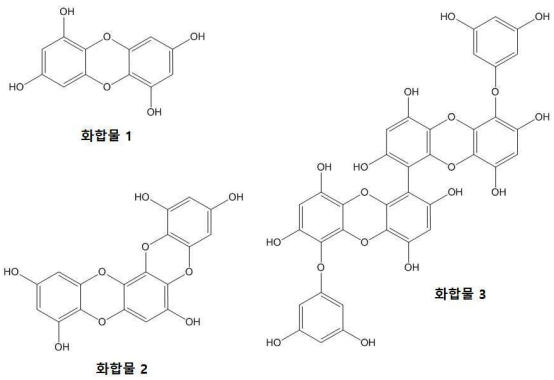


[0033]

[0034] 상기 감태 추출물은 감태를 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.

[0035] 또한, 본 발명은 감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방 또는 치료용 동물 약품에 관한 것이다.

[0036] [화학식 1]

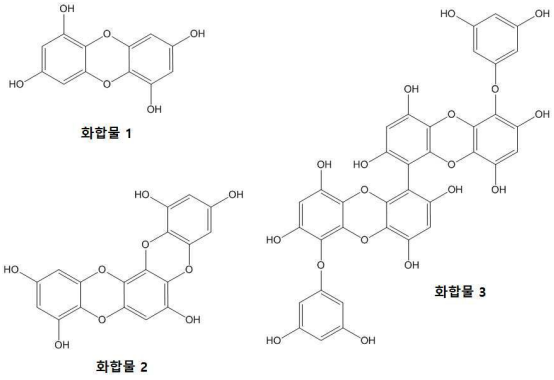


[0037]

[0038] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을

유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 동물사료첨가제에 관한 것이다.

[0039] [화학식 1]

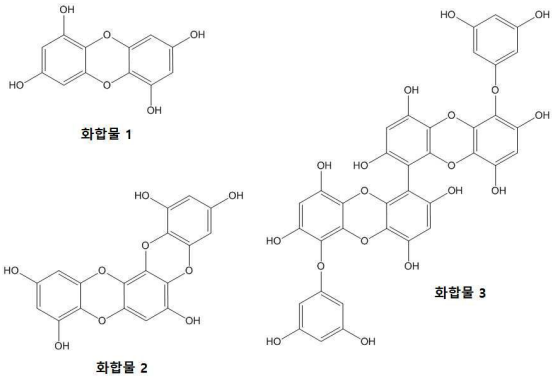


[0040]

[0041] 상기 감태 추출물은 감태를 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.

[0042] 또한, 본 발명은 감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 개선용 동물 사료 첨가제에 관한 것이다.

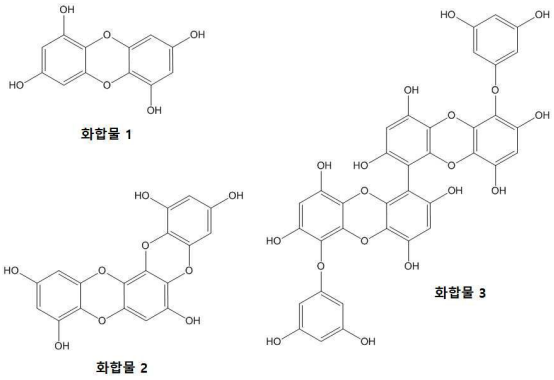
[0043] [화학식 1]



[0044]

[0045] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 포함하는 감태(*Eckonia cava*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방용 천연소독제에 관한 것이다.

[0046] [화학식 1]



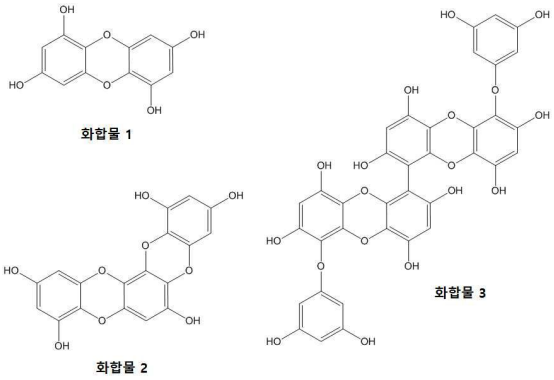
[0047]

[0048] 상기 감태 추출물은 감태를 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.

[0049] 또한, 본 발명은 감태로부터 분리된 하기 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 조류 인플루엔자 또는 돼지 인플루엔자 예방용 천연소독제에 관한 것이다.

[0050] [화학식 1]

[0051] 

[0052] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0053] 상기 감태 추출물은 감태를 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, 이소프란올, 부탄올 등일 수 있다. 바람직하게는 에탄올, 부탄올 및 아세톤이다. 가장 바람직하게는 에탄올 및 부탄올이다.

[0054] 상기 용매는 감태 중량의 5배 내지 500배의 중량을 가할 수 있다.

[0055] 또한, 상기 감태 추출물은 감태를 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트 및 헥산으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 용매로 추출한 추출물을 농축하여 얻은 농축액을 희석한 희석액을 이온교환수지가 충전되어 있는 컬럼 크로마토그래피에 가하여 유기용매로 용출시켜 분획한 분획물일 수 있다.

[0056] 상기 희석액은 감태 추출물의 농축액에 물을 가하여 만들 수 있으며, 농축액 중량의 10배 내지 50배의 중량을 가할 수 있다.

[0057] 상기 이온교환수지는 디아이온 HP-20(Diaion HP-20), SP825, AXT204, XAD1600T, MN200, SP70, SP710 등에서 선택하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 디아이온 HP-20, SP825, AXT204, XAD1600T 및 MN2000이며, 가장 바람직하게는 디아이온 HP-20이다.

[0058] 상기 유기용매는 C1 내지 C4의 저급 알코올 및 아세톤 일 수 있다. 상기 C1 내지 C4의 저급 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프란올, 부탄올 등 일 수 있다. 바람직하게는 에탄올 및 아세톤이며, 가장 바람직하게는 70% 에탄올이다.

[0059] 상기 감태로부터 분리된 화학식 1의 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3) 화합물은 감태 추출물을 크로마토그래피로 분획하여 얻을 수 있으며, 상기 크로마토그래피는 디아이온 HP-20 컬럼 크로마토그래피(diaion HP-20 column chromatography), 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), RP-18 컬럼 크로마토그래피(RP-18 column chromatography), LH-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 조제용 역상-고성능 액체 크로마토그래피(preparative reversed-phase high performance chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피 (high-performance liquid chromatography) 등에서 선택하여 사용할 수 있다.

[0060] 한편, 본 발명의 화합물은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 합성될 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수도 있다.

[0061] 상기 감태 추출물 또는 이로부터 분리된 플로로탄닌계 화합물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에

따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 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, 덱스트로즈, 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 감태 추출물 또는 이로부터 분리된 플로로탄닌계 화합물에 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, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0062] 상기 약학 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 0.01㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0063] 상기 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 점막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 감태 추출물 또는 이로부터 분리된 플로로탄닌계 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0064] 또한, 본 발명은 감태 추출물 또는 이로부터 분리된 플로로탄닌계 화합물을 함유하는 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 감태 추출물 또는 이로부터 분리된 플로로탄닌계 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다. 상세하게는, 본 발명은 감태 추출물 또는 이로부터 분리된 플로로탄닌계 화합물을 함유하는 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 인플루엔자 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0065] 상기 동물사료첨가제는 동물용 사료의 첨가제로 이용될 수 있으며, 본 발명의 감태 추출물 또는 이로부터 분리된 플로로탄닌계 화합물이 동물용 사료에 0.001중량% 내지 30중량%, 바람직하게는 0.001중량% 내지 10중량%, 가장 바람직하게는 0.001중량% 내지 5중량%로 첨가될 수 있다.

[0066] 상기 천연소독제는 인플루엔자 바이러스의 소독용 조성물로, 액제, 정제, 과립제, 산제 등의 다양한 형태로의 제제로 제조가 가능하다.

발명의 효과

[0067] 본 발명은 감태(*Ecklonia cava*) 추출물 또는 이로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 감태 추출물 또는 이로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물인 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3)이 조류 인플루엔자 바이러스 또는 돼지 인플루엔자 바이러스에 대해 항바이러스 활성이 있음을 확인하였다.

[0068] 이를 통해, 본 발명의 감태 추출물 또는 이로부터 분리한 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol)(화합물 1), 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 및 6,6′-비에콜(6,6′-bieckol)(화합물 3) 화합물을 인플루엔자의 예방 또는 치료용 의약품, 건강기능식품, 동물사료 첨가제 또는 천연소독제 등의 개발시에 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1은 감태 추출물의 종류에 따른 항바이러스 활성을 보여주고 있는 것으로, 돼지 인플루엔자 바이러스(H1N1)를 이용하였다.

도 2는 감태 추출물로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물(화합물 1 내지 화합물 3)의 세포 독성을 확인한 결과를 보여주고 있다.

도 3은 본 발명의 플로로탄닌계 화합물(화합물 1 내지 화합물 3)의 (A) 조류 인플루엔자 바이러스(H9N2) 및 (B) 돼지 인플루엔자 바이러스(H1N1)에 대한 항바이러스 활성을 확인한 결과를 보여주고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 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.

[0071] **<실시예 1. 감태 추출물의 제조 및 항바이러스 활성 측정>**

[0072] **실시예 1-1. 감태 추출물의 제조**

[0073] 감태는 광주광역시에 소재하는 조선대학교 해양갈조식물자원 은행에서 분양받았다.

[0074] 감태 30g에 하기 표 1에 해당되는 각각의 용매 300㎖을 넣고 3시간 동안 초음파 추출하고, 고형분을 제거하여 추출액을 얻었다. 얻은 추출액을 감압 농축하여 추출물을 제조한 후, 추출량을 확인하였고, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0075]

추출 용매	감태 추출물	
	추출량	추출함량 (%)
증류수	1.0g	3.47
50% 에탄올(ethanol)	750.6mg	2.50
70% 에탄올(ethanol)	378.1mg	1.26
100% 에탄올(ethanol)	70.1mg	0.23
100% 메탄올(methanol)	126.6mg	0.42
부탄올(butanol)	56.9mg	0.19
아세톤(acetone)	68.8mg	0.23
에틸아세테이트(ethyl acetate)	46.0mg	0.15
헥산(hexan)	44.4mg	0.15

[0076] **실시예 1-2. 감태 추출물의 항바이러스 활성 확인**

[0077] 상기 실시예 1-1에서 추출한 감태 추출물의 항바이러스 활성을 확인하기 위해 중앙백신연구소로부터 제공받은 조류 인플루엔자 바이러스 H9N2(A/chicken/Korea/01310/2001) 및 돼지 인플루엔자 바이러스 H1N1(A/Sw/Kor/CAN1/04, KCTC11165BP)을 이용하였고, 바이러스 감염에 의한 세포의 생존율을 분석함으로써 항바이러스 활성을 확인하였다.

[0078] 96웰 플레이트(96 well plate)에 웰 당 1×10^4개의 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(Dulbeco's Modified Eagle's Medium) 배지를 넣고 하루 동안 배양한 후, 배양액을 버리고 PBS(phosphate buffer saline)로 세척하였다. 이후 세포에 감염배지(infection media, DMEM+0.5% BSA(bovine serum albumin)+1㎍/㎖ trypsin)를 넣고, 돼지 인플루엔자 바이러스 또는 조류 인플루엔자 바이러스를 $50TCID_{50}$/100㎕/웰의 농도가 되도록 접종하고, 상기 실시예 1-1에서 제조한 감태 추출물의 최종 농도가 10 ㎍/㎖이 되도록 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.

[0079] 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㎕를 넣었다. 피펫팅으로 잘 섞어 준 다음 10분 동안 방치한 후 550㎚에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다. 이때, 정상 대조군의 세포생존율 100%를 기준으로 각 용매에 따른 추출물에 의한 세포생존율을 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 세포생존율을 항바이러스 활성과 동일한 개념으로 사용하였다.

표 2

[0080]

추출 용매	돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성(%)
증류수	15
50% 에탄올	34
70% 에탄올	49
100% 에탄올	13
100% 메탄올	38
부탄올	51
아세톤	63
에틸아세테이트	33
헥산	27

[0081] 도 1 및 상기 표 2에서 보여주듯이, 돼지 인플루엔자 바이러스를 처리한 음성 대조군의 경우 바이러스에 의해 세포사멸이 이루어지는 반면에, 항바이러스제인 리바비린을 처리한 양성 대조군의 경우에는 바이러스에 의한 세포사멸이 억제되는 것을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 감태 추출물의 경우에는 아세톤, 부탄올 및 70% 에탄올 추출물의 세포사멸 억제 활성, 즉 항바이러스 활성이 가장 좋은 것을 알 수 있다.

[0082] 따라서, 이 중 식품에 가용 가능한 70% 에탄올 용매로 하여 추출하는 것을 최적의 추출조건으로 결정하였다.

[0083] **<실시예 2. 감태 분획물의 제조>**

[0084] 상기 실시예 1-1에서 추출한 추출물을 디아이온 HP-20 컬럼 크로마토그래피(diaion HP-20 column chromatography)에 적용하여 분획물을 제조하였다.

[0085] 상기 실시예 1-1에서 추출한 추출물 중 70% 에탄올을 용매로 하여 추출한 감태 추출물을 물에 현탁한 후 HP-20 레진에 흡착시키고, 증류수를 흘려주어 불필요한 극성물질 및 염류를 제거하였다. 이후 70% 에탄올 및 아세톤을 이용하여 HP-20 레진에 흡착된 물질을 용출시킴으로써 70% 에탄올 및 아세톤 분획물을 획득하였다. 획득한 분획물의 항바이러스 활성을 확인하기 위해 상기 실시예 1-2에서 수행한 MTT 어세이를 수행하였고, 그 결과를 표 3에 나타내었다. 이때, 분획물의 최종 농도가 5㎍/㎖이 되도록 처리하였다.

표 3

[0086]

추출물	분획물	돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성(%)
70% 에탄올	70% 에탄올	77

[0087] 상기 표 3에서 보여주듯이, 감태 추출물을 디아이온 HP-20 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 분획한 70% 에탄올 분획물의 항바이러스 활성을 확인한 결과, 높은 항바이러스 활성을 보인다는 것을 확인하였다.

[0088] 또 다른 분획물인 아세톤 분획물의 경우, 70% 에탄올 분획물에 비해 항바이러스 활성이 낮게 나타나는 것을 확인하였다.

[0089] **<실시예 3. 플로로탄닌계 화합물의 분리>**

[0090] 건조된 감태 가루 100g에 70% 에탄올 2ℓ를 가한 후 하루 동안 3회에 걸쳐 초음파 추출하고, 이를 감압 농축하여 70% 에탄올 추출물 25g을 획득하였다. 획득한 추출물을 증류수 500㎖에 현탁하여 현탁액을 만들었다. 현탁액을 HP-20 컬럼 크로마토그래피에 가하여 통과시킨 후, 현탁액의 4배 정도의 증류수를 크로마토그래피에 가하여

HP-20 레진에 흡착되지 않은 물질을 용출시켰다. 이후 70% 에탄올 및 100% 아세톤을 각각 1ℓ씩을 순차적으로 가하여 용출시킴으로써 70% 에탄올 분획물(8g) 및 아세톤 분획물(1g)을 얻었다.

[0091] 이 중, 70% 에탄올 분획물을 메탄올/증류수 농도구배(1:3→5:1[v:v]) 조건으로 역상 컬럼 크로마토그래피(reverse phase column chromatography)(컬럼종류: RP-18, 컬럼크기: 2.0×3.0㎝, 입자크기:40~63㎛)를 수행하여 4개의 소분획물(F1~F4)을 얻었다.

[0092] 상기 소분획물 F2 1.8g을 아세토나이트릴(acetonitrile):물(20:80[v:v]) 등용매를 이동상으로 하여 0~10분 동안, 메탄올:물(76:24[v:v]) 등용매를 이동상으로 하여 10~50분 동안 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography)(컬럼종류: YMC J-sphere ODS-H80, 컬럼크기: 10×250㎜, 입자크기: 10㎛, 유속: 2㎖/min, UV detection: 254㎚)를 수행하여 화합물 1(3㎎) 및 화합물 3(3㎎)을 확보하였다.

[0093] 또한, 상기 소분획물 F3 5.3g을 아세토나이트릴:물(20:80[v:v]) 등용매를 이동상으로 하여 0~65분 동안 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography)(컬럼종류: YMC J-sphere ODS-H80, 컬럼크기: 10×250㎜, 입자크기: 10㎛, 유속: 2㎖/min, UV detection: 254㎚)를 수행하여 화합물 2(3㎎)을 확보하였다.

[0094] **<실시예 4. 감태로부터 분리한 화합물의 물리 화학적 구조 확인>**

[0095] **실시예 4-1. 디벤조[1,4]디오신-2,4,7,9-테트라올(화합물 1)**

[0096] Dibenzo[1,4]dioxine-2,4,7,9-tetraol;

[0097] 갈색 분말;

[0098] UV (메탄올) λ_{max} ㎚(log ε) 196(2.24), 230(2.81)

[0099] HRESIMS *m/z* 247.0284[M-H]$^-$(calcd for $C_{12}H_8O_6$ 248.0321);

[0100] ^{1}H-NMR(DMSO-d_6, 300 MHz) δ 5.96(2H, d, *J* = 2.7Hz, H-β3, H-8), 5.78(2H, d, *J* = 2.7Hz, H-1, H-6).

[0101] ^{13}C-NMR(DMSO-d_6, 75 MHz) δ 152.83(C-2, C-7), 145.81(C-4, C-9), 142.78(C-5a, C-10), 122.86(C-4a C-9a), 98.26(C-3, C-8), 93.87(C-1, C-6).

[0102] **실시예 4-2. 디옥시노데히드로에콜(화합물 2)**

[0103] Dioxinodehydroeckol;

[0104] 갈색 분말;

[0105] UV (메탄올) λ_{max} ㎚(log ε) 195(2.26), 235(2.85);

[0106] ESIMS *m/z* 369[M-H]$^-$;

[0107] ^{1}H-NMR(DMSO-d_6, 300 MHz) δ 6.10(1H, s, H-7), 6.05(1H, d, *J* = 2.7Hz, H-2), 6.01(1H, d, *J* = 2.7Hz, H-10), 5.84(1H, d, *J* = 2.7Hz, H-4), 5.82(1H, d, *J* = 2.7Hz, H-12).

[0108] ^{13}C-NMR(DMSO-d_6, 75 MHz) δ 153.25(C-3), 152.98(C-11), 146.06(C-1), 145.91(C-9), 142.02(C-4a), 141.66(C-12a), 140.1(C-6), 137.13(C-7a), 131.53(C-13b), 122.60(C-8), 122.45(C-13a), 122.19(C-14a), 98.76(C-2, C-10), 97.9(C-7), 93.89(C-4, C-12).

[0109] **실시예 4-3. 6,6′-비에콜(화합물 3)**

[0110] 6,6′-bieckol;

[0111] 갈색 분말;

[0112] UV (메탄올) λ_{max} ㎚(log ε) 198(2.31), 210(2.34), 230(2.27);

[0113] ESIMS *m/z* 743[M+H]$^+$, 741[M-H]$^-$

[0114] ^{1}H-NMR(DMSO-d_6, 300 MHz) δ 6.09(s, H-3), 6.04(1H, s, H-8), 5.80(1H, d, J = 1.8Hz, H-4'), 5.74(1H, d, J = 2.1Hz, H2', H-6').

[0115] ^{13}C-NMR(DMSO-d_6, 75 MHz) δ 160.45(C-1'), 158.93(C-3', C-5), 151.32(C-7), 145.43(C-2), 144.48(C-9), 141.87(C-4), 141.35(C-5a), 137.2(C-10), 123.61(C-1), 122.74(C-9a), 121.98(C-4a), 99.67(C-6), 97.81(C-8), 97.78(C-3), 96.18(C-4'), 93.74(C-2', C-6').

[0116] **<실시예 5. 감태 추출물로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물의 세포독성 확인>**

[0117] 상기 실시예 3에서 분리한 화합물 1 내지 화합물 3에 의한 세포독성을 확인하기 위해 MTT 어세이를 진행하였다.

[0118] 96웰 플레이트(96 well plate)에 웰 당 1×10^{4}개의 MDCK(Madin-Darby, canine kindney) 세포를 분주한 후 5% FBS(fetal bovine serum), 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin) 및 0.4% L-글루타민(L-glutamine)이 포함된 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium) 배지를 넣고 하루 동안 배양한 후, 배양액을 버리고 PBS(phosphate buffer saline) 용액으로 세척하였다. 이후 세포에 새 배지를 넣고, 상기 실시예 3에서 분리한 화합물 1 내지 화합물 3을 각각 100uM이 되도록 처리한 후 5일 동안 배양하였다. 이때, 세포에 아무것도 처리하지 않은 것을 정상 대조군으로 이용하였고, 감태 추출물로부터 분리한 본 발명의 화합물 1 내지 화합물 3과 함께 분리된 화합물인 플로로글루시놀(phloroglucinol) 및 푸코푸로에콜 A(fucofuroeckol A)도 세포독성에 대한 대조군으로 처리하였다.

[0119] 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㎕를 넣었다. 피펫팅으로 잘 섞어 준 다음 10분 동안 방치한 후 550㎚에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 확인하였다. 이때, 정상 대조군의 세포생존율 대비 각각의 화합물에 의한 세포생존율을 백분율(%)로 환산하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0120] 도 2에서 보여주듯이, 본 발명의 화합물 1 내지 화합물 3과 함께 분리된 푸코푸로에콜 A 화합물의 경우에는 세포독성을 나타내는 반면에, 본 발명의 화합물 1 내지 화합물 3은 세포독성이 없는 것으로 확인하였다.

[0121] **<실시예 6. 감태 추출물로부터 분리한 플로로탄닌계 화합물의 항바이러스 활성 확인>**

[0122] 상기 실시예 3에서 분리한 화합물 1 내지 화합물 3의 항바이러스 활성을 확인하였다. 실험방법은 상기 실시예 1-2의 방법과 동일하게 수행하였다. 이때, 각각의 화합물의 농도는 2uM 내지 80uM로 하여 처리하였으며, 바이러스 및 화합물을 처리하지 않은 군을 정상 대조군으로, 바이러스만 처리한 군을 음성 대조군으로, 항바이러스제인 리바비린(ribavirin) 10uM을 처리한 군을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0123] 각각 화합물의 항바이러스 활성을 확인한 결과를 도 3 및 표 4에 나타내었다. 도 3의 경우 각각의 화합물을 20uM로 처리한 군의 항바이러스 활성을, 표 4는 돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 화합물의 EC_{50}(the half maximal effective concentration)값을 나타내고 있다.

표 4

[0124]

구분	돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성 (EC_{50}, uM)
화합물 1	23.95±2.00
화합물 2	23.41±4.72
화합물 3	27.48±2.74
리바비린	5.58±1.62

[0125] 도 3에서 보여주듯이, 본 발명의 화합물 1 내지 화합물 3이 조류인플루엔자 바이러스(A) 및 돼지인플루엔자 바이러스(B)에 의한 세포사멸을 억제한다는 것을 알 수 있다.

[0126] 또한, 상기 표 4에서 보여주듯이, 본 발명의 화합물 1 내지 화합물 3이 돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

[0127] 이를 통해, 본 발명의 화합물 1 내지 화합물 3이 조류 인플루엔자 바이러스 또는 돼지 인플루엔자 바이러스의

감염에 의한 인플루엔자의 예방 및 치료 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0128] **<실시예 7. 독성 실험>**

[0129] **실시예 7-1. 급성독성**

[0130] 본 발명의 감태 70% 에탄올 추출물을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 30마리를 대조군과 실험군에 각각 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 30% PEG-400만을 투여하고, 실험군은 감태 70% 에탄올 추출물을 1.0g/kg/일의 농도로 경구 투여하였다.

[0131] 투여 24시간 후에 치사율을 조사한 결과, 30% PEG-400을 투여한 대조군과 1.0g/kg/일 농도의 감태 70% 에탄올 추출물을 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.

[0132] **실시예 7-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험**

[0133] 장기 독성 실험은 C57BL/6J 생쥐를 대상으로 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 8주 동안 본 발명의 감태 70% 에탄올 추출물을 1.0g/kg/일로 투여한 실험군과 30% PEG-400을 투여한 대조군의 동물로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamic-pyruvic transaminase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다.

[0134] 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 모든 조직에서 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0135] **<제제예 1. 약학적 제제>**

[0136] **제제예 1-1. 정제의 제조**

[0137] 본 발명의 감태 추출물 20g 또는 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 200㎎을 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.

[0138] **제제예 1-2. 주사액제의 제조**

[0139] 본 발명의 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2) 100㎎, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0140] **<제제예 2. 식품 제조>**

[0141] **제제예 2-1. 조리용 양념의 제조**

[0142] 본 발명의 감태 추출물 또는 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2)을 각각 조리용 양념에 1중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0143] **제제예 2-2. 밀가루 식품의 제조**

[0144] 본 발명의 감태 추출물 또는 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2)을 각각 밀가루에 0.1중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0145] **제제예 2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0146] 본 발명의 감태 추출물 또는 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2)을 각각 육즙에 0.1중량%로 첨가하여 건강 증진용 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0147] **제제예 2-4. 유제품(dairy products)의 제조**

[0148] 본 발명의 감태 추출물 또는 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2)을 각각 우유에 0.1중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0149] **제제예 2-5. 야채주스 제조**

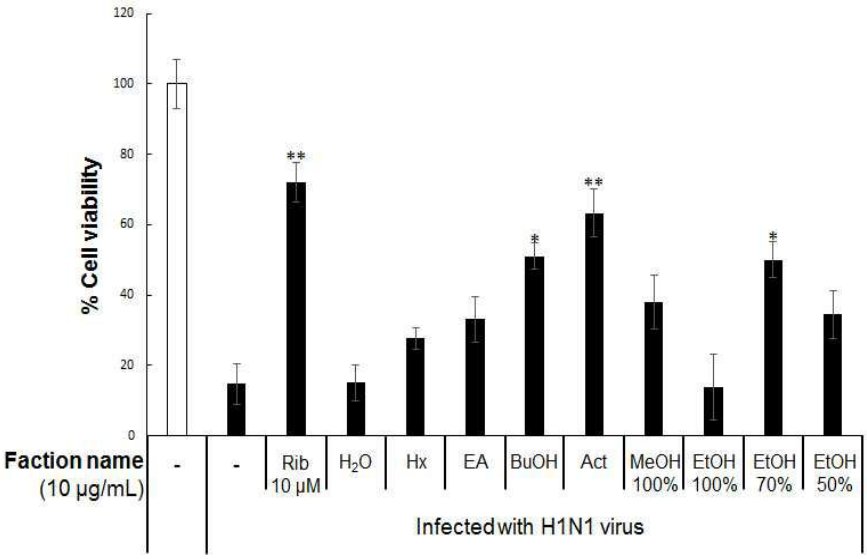
[0150] 본 발명의 감태 추출물 또는 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2)을 각각 토마토주스 또는 당근주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0151] **제제예 2-6. 과일주스 제조**

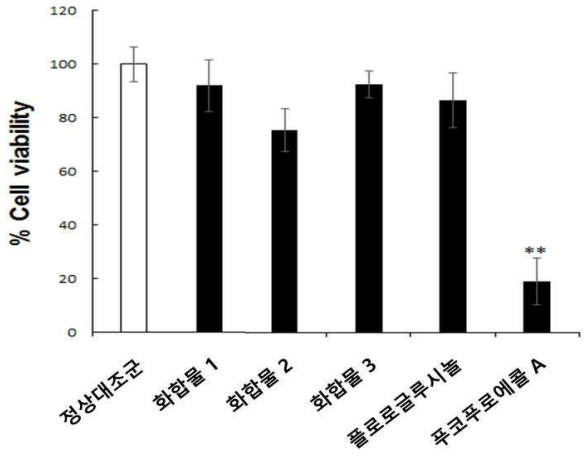
[0152] 본 발명의 감태 추출물 또는 디옥시노데히드로에콜(Dioxinodehydroeckol)(화합물 2)을 각각 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

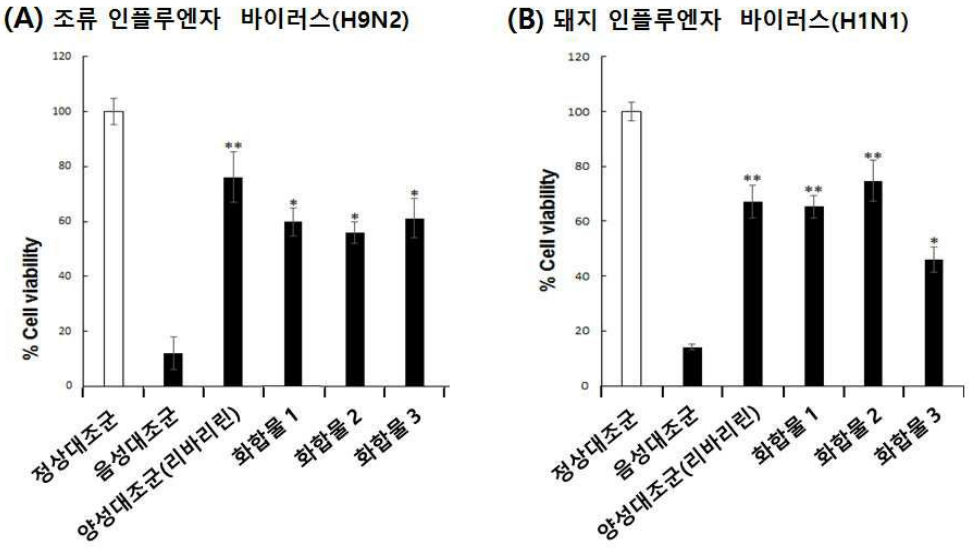
도면1



도면2



도면3


(A) 조류 인플루엔자 바이러스(H9N2)
% Cell viability
120
100
80
60
40
20
0
**
*
*
*
정상대조군
음성대조군
양성대조군(리바리린)
화합물 1
화합물 2
화합물 3
(B) 돼지 인플루엔자 바이러스(H1N1)
% Cell viability
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
*
정상대조군
음성대조군
양성대조군(리바리린)
화합물 1
화합물 2
화합물 3