



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월20일
(11) 등록번호 10-1331148
(24) 등록일자 2013년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/47 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) A23K 1/14 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0108832
(22) 출원일자 2010년11월03일
심사청구일자 2012년03월16일
(65) 공개번호 10-2011-0049722
(43) 공개일자 2011년05월12일
(30) 우선권주장
1020090105438 2009년11월03일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
조민경 외 3명, 자생식물 추출물의 세포 분산 활성, 생약학회지, 2004년 3월, 제35권 제1호, 페이지 62-79.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
이형규
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
김재화
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(74) 대리인
이원희
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 8 항

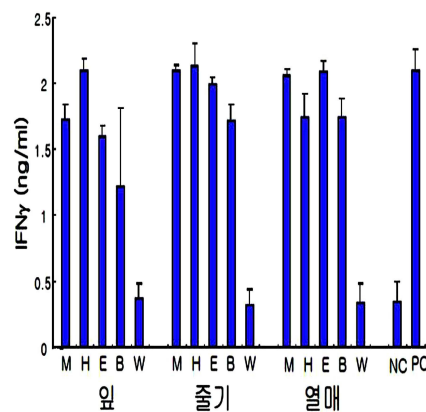
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 유동 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유동(*Aleurites fordii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 유동 추출물 또는 이의 분획물은 자연살해(natural killer, NK)세포에서 면역 관련 사이토카인인 인터페론-감마(interferon- γ , IFN- γ)의 분비 유도성을 갖고, NK 세포 활성화를 통해 강력한 항바이러스 활성을 나타내므로, 바이러스성 질환에 탁월한 효과가 있으므로 항바이러스용 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

오세량

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

안경섭

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

진영원

경기도 고양시 일산 동구 식사동 777번지 동국대학교 약학대학

김두영

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

송재성

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

강호범

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

최인표

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

권두한

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이희구

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

김찬수

제주특별자치도 서귀포시 동홍중앙로90번길 4-11, 나동 109 (동홍동, 일호 2차아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

유동(*Aleurites fordii*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유동 추출물은 유동 건조물을 물, $C_1 \sim C_2$ 의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 유동 건조물은 유동 잎, 줄기 또는 열매인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항의 유동 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 제조된 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 유기용매는 헥산, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

유동 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 개선용 건강식품.

청구항 9

삭제

청구항 10

유동 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 개선용 사료첨가제.

청구항 11

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 유동(*Aleurites fordii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인류가 앓고 있는 많은 감염성 질환은 바이러스에 의한 것으로, 광견병, 천연두, 척수염, 간염, 황열, 면역 결핍증, 뇌염 및 에이즈 등 여러 가지 심각한 질병의 원인이 된다. 이러한 바이러스에 의한 감염성 질환은 감기, 홍역, 볼거리 및 수두 등과 같이 매우 전염성이 강하며 급성 증세를 나타낼 뿐만 아니라 호흡기, 소화기 장애를 나타내기도 하고, 홍역 및 사이토메갈로 바이러스와 같은 것은 선천성 이상을 유발하며, 종양 바이러스로 알려진 바이러스는 인체에 종양 및 암을 유발한다. 따라서 항바이러스제에 대한 연구는 오래전부터 현재까지 활발하게 진행되고 있다. 항바이러스제(antiviral drug)는 인체내에 침입한 바이러스의 작용을 약화시키거나 소멸하게 하는 약제로 오셀타미비르(타미플루), 자나미비르(틸렌자), 인터페론, 면역 글로불린 제제 등이 있다. 그러나 바이러스 감염에 따른 질병의 예방 및 치료에 사용되어 온 기존의 항바이러스제들은 이들 약물에 대한 돌연변이 바이러스에 의한 바이러스의 내성 및 부작용으로 지속적인 사용에 문제가 있다. 따라서 상기 종래 항바이러스제가 갖는 문제점을 해결할 수 있는 새로운 천연물 유래의 항바이러스제의 개발이 요구되고 있으며, 특히 의약품 및 식품 첨가물로서 사용하기에 적합하도록 독성이 없는 천연소재 개발이 요구되고 있다.

[0003] 한편, 인터페론-감마(interferon- γ , IFN- γ)는 면역시스템의 활성화된 T 세포 및 자연살해(natural killer, NK)세포가 바이러스, 기생충 및 종양세포와 같은 외부물질의 침입에 대응하여 생성하는 천연 단백질이다. IFN- γ 는 바이러스 감염의 중요 지시자인 이중나선 RNA의 존재에 대응하여 T-헬퍼1(Th1) 세포, 세포독성 T(cytotoxic T, Tc)세포, 수지상세포(dendritic cell) 또는 NK세포 등에 의해 분비되는 이량체 사이토카인으로서, 타입 II(type II) 인터페론에 속한다. IFN- γ 는 본래부터 대식세포(macrophage) 활성화로 불릴 만큼 식세포 활성화작용이 강하며, 현재 연구된 바에 의하면 약 30개 정도의 유전자의 전사 변화를 유도하여 다양한 면역 및 세포 반응(대식세포의 항원제시 증가, 대식세포에서 리소좀(lysosome) 활성화 증가 및 활성화, Th2 세포 활성화 억제, 정상세포에서 클래스 I MHC 분자의 발현증가, 백혈구세포의 이동성 증가 및 NK세포 활성화의 증가)을 생성하는 것으로 알려져 있다. IFN- γ 는 숙주세포내의 바이러스 복제를 억제하고, NK세포를 활성화시키며, 림프세포에 대한 항원제시를 증가시키고, 숙주세포의 바이러스 감염에 대한 내성을 증가시킴으로써 면역 반응을 돕는다. 항원이 매칭되는 T 세포 및 B 세포에 제시되면 이들 세포들이 증식하여 외부물질을 전략적이고 특이적인 방법으로 제거한다. 이러한 점에서 항원제시는 면역반응에서 매우 중요한 기작이다.

[0004] NK세포는 선천 및 획득 면역 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. NK세포는 세포독성 및 사이토카인 생성을 통해 이의 효능(effector function)을 매개하고, 수용체 및 표적세포에 대한 리간드에 의해 매개되는 세포독성 효능 세포로 기능한다. 세포독성에 대한 NK 특이 수용체로는 자연 세포독성 수용체(natural cytotoxic receptors, NCRs)로 불리는 NKp46(Sivori, S. et al., *J Exp Med*, 186: 1129-1136, 1997), NKp30(Pende, D. et al., *J Exp Med*, 190: 1505-1516, 1999) 및 NKp44(Cantoni, C. et al., *J Exp Med*, 189: 787-796, 1999) 등이 있다. NCRs에 대한 리간드는 인플루엔자 바이러스(influenza virus, IV)의 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA), 센다이 바이러스(Sendai virus, SV)의 헤마글루티닌-뉴라미니다아제(hemagglutinin-neuraminidase, HN)(Arnon, T. I. et al., *Eur J Immunol*, 31: 2680-2689, 2001) 및 막-결합된 헤파린 설페이트 프로테오글리칸(membrane-associated heparin sulfate proteoglycans)(Bloushtain, N. et al., *J Immunol*, 173: 2392-2401, 2004) 등이 알려져 있다. 또한, NK세포는 IFN- γ 와 같은 사이토카인 분비를 통해 획득 면역 반응의 발달을 돕는데 중요한 역할을 하며(Stetson, D. B. et al., *J Exp Med*, 198: 1069-1076, 2003), IFN- γ 가 쥐 사이토메갈로바이러스(murine cytomegalovirus) 감염에서 항바이러스 활성을 갖는다는 것이 보고되었다. NK세포는 직접적인 선천 방어 및 획득 면역 반응의 형성에 모두 관여하고 있다. 몇 가지 마우스 모델에서 NK세포가 종양

의 발달과 미생물 감염을 억제하였다. 특히, NK세포는 마우스 사이토메갈로바이러스(mouse cytomegalovirus, MCMV) 감염의 초기 단계에서 직접 바이러스 감염된 세포를 사멸시키고 IFN- γ 를 생성시킴으로써 조절자 역할을 한다. NK세포내에서 IFN- γ 생성에 대한 주요 경로는 프로테인키나제C θ (Protein kinase C, PKC θ)의 활성화에 의존한다. Tassi 연구진은 면역수용체 타이로신 활성화 부위(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAMs)를 통해 신호를 전달하는 NK세포 수용체가 관여함으로써 PKC θ 가 신속하게 활성화된다고 보고하였다. PKC θ 결핍 마우스로부터 NK세포를 분석한 결과, PKC θ 는 ITAM 매개 IFN- γ 분비에서 필수 요소라는 것이 밝혀졌다(Tassi, I. et al., *Blood*, 112: 4109-4116, 2008).

[0005] 포스포리파제C γ (phospholipase C γ , PLC γ)는 IFN- γ 분비에서 매우 본질적인 기초 인자이다. IFN- γ 의 기저 수준은 PLC γ 2-결핍 NK세포내에서 현저하게 감소하였고, 야생형 세포와는 달리, 항NK1.1에 의한 자극에 의해서도 IFN- γ 분비가 증가되는 결과를 보이지 않았다(Caroux, A. et al., *Blood*, 107: 994-1002, 2006). PLC γ 2 결핍 NK세포들은 IFN- γ 또는 과립구-마크로파지 콜로니자극인자(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 생성 능력이 심각하게 손상되었고, PLC γ 2는 NK1.1 매개 사이토카인 생성뿐만 아니라 NKG2D에서도 중요한 역할을 한다(Regunathan, J. et al., *J Immunol*, 177: 5365-5376, 2006). 마우스내에서 Fc수용체(FcRs)의 γ -사슬을 포함하며, 이 수용체는 결합된 어댑터 ITAMs(adaptor's ITAMs)의 티로신 잔기 인산화 결과에 이르게 되고, 이는 다시 비장 티로신 키나제(spleen tyrosine kinase, Syk)를 모이게 한다. 상기 키나제는 T 세포 활성화용 링커, 76 kDa, PLC, PI3K 및 Erk 키나제를 포함하는 다수의 하부 신호전달 매개자들을 활성화시킨다. 종합적으로 이 신호전달 매개자들은 유전자 전사, NK세포가 표적세포들을 용해시키는데 사용하는 용해성 과립의 엑소사이토시스(exocytosis)를 위한 세포 프로그램을 개시하고, 친염증성 케모카인 및 사이토카인, 특히 IFN- γ 를 생성시킨다(Tassi, I. et al., *J Immunol*, 175: 749-754, 2005). 상기와 같이, IFN- γ 는 항바이러스 작용, 항증식작용 및 면역조절작용을 하므로, 감염, 다양한 바이러스 감염성 질환 및 암 치료에 이용되고 있다.

[0006] 한편, 대부분의 바이러스는 숙주의 IFN 반응에 대하여 자신을 보호하기 위해, 면역 회피 전략을 나타낸다. 특히, 바이러스에 의한 IFN- γ 신호 억제에 대한 다양한 기작이 보고되고 있다. 예를 들면, 엡스타인-바(Epstein-barr) 바이러스는 IFN- γ 수용체 유전자 발현을 저해하여 항바이러스성 IFN 반응을 막고(Morrison, T. E., et al., *Immunity* 15:787-799, 2001), 인간 종양-유도 헤르페스 바이러스(herpesvirus)에 의해 IFN- γ 수용체 1이 저해(Li, Q., *J Virol* 81, 2117-2127, 2007)된다고 알려져 있다. 그러므로, IFN의 분비 및 활성을 촉진시켜 항바이러스 활성 및 면역 활성을 높일 수 있는 물질의 개발이 필요하다.

[0007] 유동(*Aleurites fordii*)은 쌍떡잎식물 쥐손이풀목 대극과의 낙엽교목으로 학명은 *Aleurites fordii*이고, 흔히 기름오동나무라고도 한다. 중국이 원산지이며 한국의 남부해안지방에서도 자란다. 나무의 높이는 약 7.5 ~ 10 m까지 자라고, 나무껍질은 잿빛을 띠는 갈색이고 피목이 있으며 굵은 가지가 사방으로 퍼진다. 잎은 어긋나서 자라고 심장 모양 또는 동그란 모양이며 꽃은 5월에 붉은빛이 도는 흰색으로 핀다. 열매는 삭과로서 9월이면 성숙하는데 둥글고 세 개의 종자가 들어있다. 남부지방에서는 유동을 녹음수나 정원수로 심으며, 종자에서는 기름을 채취하는데, 이 기름을 "동유"라고 한다. 동양에서는 동유를 전통적으로 불을 밝히는데 썼으며, 현대에도 산업용으로 중요하게 이용되고 있다.

[0008] 유동의 열매는 동양 전통의학에서 통토평담, 소종독, 이이 변의 효능이 있으며, 풍담후비(후두결핵, 후두매독 등), 개선, 단독, 화상, 농포창, 식적복창, 대소변 불리를 치료하는데 사용되었다. 뿌리는 소식, 이수, 화담, 살충의 효능이 있으며, 식적비만, 수종, 고창, 효천, 나력, 회충증을 치료하는데 사용되었다. 잎은 소종, 해독의 효능이 있어 용창, 단독, 겸창, 동창, 개선, 이질 치료에 사용하였다(정보섭, 신민교, 도해향약대사전, 영림사, 서울, pp.741-742, 1998).

[0009] 유동의 화학성분연구를 통해 유동에 디테르페노이드에스터(diterpenoid esters), 스테롤(sterols), 탄닌(tannins), 오일(oil), 쿠마린(coumarin), 쿠마로리그난(coumarolignan)계 화합물들이 함유되어있다는 연구결과가 알려져 있다(Ishikura, N. et al., *J. Botanical Magazine*, 88: 41-45, 1975; Nonaka, G. et al., *Chem. Pharm. Bull.* 38: 861-865, 1990; Fozdar, B. I. et al., *Phytochemistry* 28, 2459-2461, 1989; Hiroto, M. et al., *Agricultural and Biological Chemistry* 43, 2523-2529, 1979; Okuda, T. et al., *Phytochemistry* 14, 509-515, 1975). 유동에 대한 생리활성 연구로는 인간 다형핵 백혈구 활성화 인자(human polymorphonuclear leukocyte activating factor), 인간 호중구 활성화 인자(human neutrophil-activating factor) 등이 밝혀졌으며, 유동의 추출물 및 디테르펜에스터(diterpene esters)에 의해 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr

virus) 활성이 유도된다고 보고되었다. 또한, 유동의 12-O-헥사데카노일-16-하이드록시포볼 13-아세테이트(12-O-hexadecanoyl-16-hydroxyphorbol 13-acetate)는 인간 T-림프구친화성 바이러스 타입 I(human T-lymphotrophic virus type I, HTLV-I)에 의해 유도되는 림프구의 콜로니 형성을 증대시키는 효능이 있다고 보고되었다. 유동의 12-O-팔미토일-16-하이드록시포볼 13-아세테이트(12-O-Palmitoyl-16-hydroxyphorbol 13-acetate), 12-O-팔미토일-4-디옥시-4β-16-하이드록시포볼 13-아세테이트(12-O-palmitoyl-4-deoxy-4β-16-hydroxyphorbol 13-acetate)는 어류에 대한 독성이 로테논(rotenone)과 유사한 정도라는 것이 밝혀졌다(Hiroto, M. et al., *Agricultural and Biological Chemistry* 43, 2523-2529, 1979; Okuda, T. et al., *Phytochemistry* 14, 2513-2514, 1975; Shichijo, S. et al., *Journal of Clinical + Laboratory Immunology* 27, 183-189, 1988; Matsuda, S. et al., *International Journal of Cancer* 38, 859-865, 1986; Shichijo, S. et al., *Arerugi* 34, 190-197, 1985; Ito, Y. et al., *Cancer Letters* 18, 87-95, 1983). 그러나, 유동의 항바이러스 활성 및 면역 활성 작용에 관하여 보고된 바는 없다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 종래 항바이러스제가 갖는 문제점을 해결할 수 있는, 식물로부터 유래된 천연 추출물로부터 항바이러스용 물질을 발굴하기 위해 연구하던 중, 유동의 잎, 줄기 및 열매 추출물, 및 이의 분획물이 자연살해(natural killer, NK)세포에서 인터페론-감마(interferon-γ, IFN-γ)의 분비를 현저히 증가시켜 항바이러스 효능을 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 유동(*Aleurites fordii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유동(*Aleurites fordii*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 유동 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 제조된 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 유동 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

[0015] 아울러, 본 발명은 유동 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 질환의 예방 및 개선용 사료첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 유동(*Aleurites fordii*) 추출물 또는 이의 분획물은 자연살해(natural killer, NK)세포에서 면역 관련 사이토카인인 인터페론-감마(interferon-γ, IFN-γ)의 분비 유도성을 통해 강력한 항바이러스 활성을 나타내어 바이러스성 질환에 탁월한 효과가 있으므로, 항바이러스용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 유동 잎, 줄기 및 열매 각각의 메탄올 추출물, 이로부터 분획한 n-헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 또는 물 분획물을 NK92세포에 처리한 후, IFN-γ의 분비량을 분석한 그래프이다:

M: 유동 메탄올 추출물;

H: 유동 n-헥산 분획물;

E: 유동 에틸아세테이트 분획물;

B: 유동 부탄올 분획물;

W: 유동 물 분획물;

NC: 음성대조군; 및

PC: 양성대조군.

도 2는 유동 잎, 줄기 및 열매 각각의 추출물을 분획한 분획물을 NK92 세포에 처리한 후, IFN- γ 의 분비량을 분석한 그래프이다.

A: 유동 잎 노르말 헥산 분획물;

B: 유동 열매 노르말 헥산 분획물;

C: 유동 줄기 노르말 헥산 분획물; 및

D: 유동 열매 에틸아세테이트 분획물.

도 3은 유동 잎, 줄기 및 열매 각각의 메탄올 추출물을 NK92세포에 농도별로 처리한 후, IFN- γ 의 분비량을 분석한 그래프이다.

도 4는 유동 추출물이 처리된 NK92 세포에서 IFN- γ mRNA의 발현을 RT-PCR을 통해 시간대별로 확인한 그림이다.

도 5는 Bay-11(NF- κ B 활성 억제자) 또는 로테린(PKC 활성억제자)의 처리에 따라 유동 추출물에 의해 유도되는 IFN- γ 생성 변화를 나타낸 그림이다.

도 6은 유동 추출물이 처리된 NK92 세포의 활성화에 관여하는 세포표면물질의 발현 변화를 FACS로 분석한 그림이다.

도 7은 인플루엔자 바이러스가 감염된 폐 상피세포주 A549 세포에서 유동 추출물의 처리에 의한 IFN- α 및 β 의 mRNA 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0019]

본 명세서에서 사용되는 용어 "추출물"은 당업계에서 조추출물(crude extract)로 통용되는 의미를 갖지만, 광의적으로는 하기 분획물도 포함한다.

[0020]

본 명세서에서 사용되는 용어 "분획물"은 추출 시 이용한 용매와 다른 용매를 이용하여 본 발명에서 목적으로 하는 활성을 분획하여 얻은 활성 분획물(fraction)을 의미한다.

[0021]

본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 바이러스성 질환을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0022]

본 발명에서 사용되는 용어 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 바이러스성 질환의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0023]

본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0024]

본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 바이러스성 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.

[0025]

본 명세서에서 사용되는 용어 "사료"는 가축의 생명을 유지하고 젖, 고기, 알, 털가죽 등을 생산하는 데 필요한 유기 또는 무기 영양소를 공급하는 물질을 의미한다.

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명은 유동(*Aleurites fordii*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 유동 추출물은 또는 이의 분획물은 당업계에 공지된 다양한 추출방법에 의해 수득할 수 있다.
- [0029] 상기 유동 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다:
- [0030] 1) 유동(*Aleurites fordii*)에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0031] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및
- [0032] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압농축한 후 건조하는 단계.
- [0033] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 유동은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 유동은 건조된 잎, 줄기 또는 열매가 모두 사용가능하다.
- [0034] 상기 추출용매는 당업계에서 통상적으로 이용하는 어떠한 추출용매도 사용가능하며, 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, 환류추출, 초임계 추출 또는 아임계추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 유동 분량에 2 내지 20배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20 내지 50℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 24시간이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 3 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0035] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0036] 상기 유동 추출물의 분획물은 유동 추출물에 추가로 유기용매를 가하여 유기용매 분획물을 제조하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다:
- [0037] 상기 방법에 있어서, 유기용매는 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 추출용매도 사용가능하며, 탄소수 1 ~ 4의 무수 또는 함수 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 또는 노말-부탄올 등), 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 1,3-부틸렌글리콜, 헥산, 디에틸에테르 또는 부틸아세테이트 등을 사용할 수 있다. 상기 유기용매는 헥산, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0038] 상기 유동 추출물에 극성이 낮은 것부터 높은 것 순으로 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올, 물을 순차적으로 가하여 각 유기용매 층의 분획물을 수득하는 것이 바람직하고, 분획물은 분별칼대기를 이용하여 분획하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 각 유기용매 층의 분획물을 모두 이용할 수 있다. 구체적으로, 유동 추출물을 증류수에 현탁하고 헥산을 가하여 헥산층을 분리하고, 남은 물층에 다시 에틸아세테이트를 가하여 에틸아세테이트층을 분리하며, 남은 물층에 또 다시 부탄올을 가하여 부탄올 층을 분리할 수 있다. 각 유기용매 층의 분획물을 모두 이용할 수 있다.
- [0039] 상기 유동 추출물 또는 이의 분획물은 자연살해(natural killer, NK)세포에서 인터페론-감마(interferon- γ , IFN- γ)의 분비 유도 작용을 통해 항바이러스 활성을 나타내는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0040] 상기 바이러스성 질환은 인플루엔자바이러스(influenza virus), 신종인플루엔자A(Influenza A virus subtype H1N1), 조류인플루엔자바이러스(avian influenza virus), 리노바이러스(rhinovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 코로나바이러스(coronavirus), 파라인플루엔자바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 합포체 바이러스(respiratory syncytial virus), 포진 바이러스(Herpesvirus, HSV), 후천성 면역결핍 증후군 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV) 및 간염바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 바

이러스에 의해 감염되는 질환인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

- [0041] 본 발명자들은 유동 추출물 또는 이의 분획물의 항바이러스 활성을 알아보기 위해, 유동 추출물 또는 이의 분획물의 인터페론-감마(interferon- γ , IFN- γ) 분비 유도능을 효소결합면역흡수분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 통하여 확인하였다. 그 결과, 유동 잎, 줄기 또는 열매 추출물, 또는 이의 분획물(n-헥산, 에틸아세테이트 또는 부탄올 분획물)은 NK세포에서 IFN- γ 의 분비를 현저히 증가시켰고(표 1, 도 1 및 도 2 참조), 유동 추출물의 농도에 의존적으로 IFN- γ 의 분비가 증가함을 확인하였다(도 3 참조). IFN- γ 의 mRNA 발현도 유동 추출물이 처리된 NK92 세포에서 현저하게 증가하였다(도 4 참조). 한편, 유동 추출물에 의한 IFN- γ 생성의 유도는 BayII 처리에 의해 NK92 세포 내에서 감소하는 것을 확인됨으로써, 유동 추출물에 의한 IFN- γ 생성의 유도가 NF- κ B 신호전달에 의해 매개됨을 확인하였고, PKC 신호전달 억제자인 로테린의 처리에 의해 IFN- γ 생성이 감소됨으로써 NF- κ B 신호전달의 상위신호전달자는 PKC의 활성화에 의한 것임을 확인하였다(도 5 참조). 유동 추출물이 NK92 세포의 표면물질의 발현에 미치는 영향을 FACS 분석을 통해 확인한 결과, NK 세포의 활성화에 관여하는 NKG2C 및 D의 발현이 현저하게 증가하였고, NK 세포의 자연살해 활성화와 관련된 NKp44의 발현이 현저히 증가한 것으로 확인되었다(도 6 참조). 아울러, 유동 추출물을 인플루엔자 바이러스가 감염된 A529 세포에 처리함으로써 IFN- β 발현의 증가가 더욱 빨라지는 것을 확인하였다(도 7 참조). 이때, 상기 IFN- γ 는 자연살해(natural killer, NK)세포에서 대식세포(macrophage) 활성화로 불릴 만큼 식세포 활성화작용이 강하고, 면역 및 세포 반응을 생성하는 것으로 알려진 사이토카인이다. 이에, 유동 추출물 또는 이의 분획물이 IFN- γ 의 분비 및 NK 세포의 활성을 유도함으로써 강력한 항바이러스 활성을 가짐을 확인하였다.
- [0042] 따라서, 본 발명의 유동 추출물 또는 이의 분획물은 바이러스성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 약학적 조성물은 총 중량에 대하여 상기 유동 추출물 또는 이의 분획물은 0.1 내지 50 중량부인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0045] 상기 약학적 조성물은 상기 설명된 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정하지 않는다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences*(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0046] 본 발명의 약학적 조성물의 적절한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 조성물의 경구 투여량은 1일 당 0.0001 ~ 100 mg/kg(체중)인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명은 약제학적으로 유효한 양의 유동 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 바이러스성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [0050] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이나 이에 한정하지 않는다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여기간, 투여방법, 제거율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0051] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피크, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [0052] 상기 투여 방법은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 자궁내 경막 주사, 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0053] 상기 바이러스성 질환은 인플루엔자바이러스(influenza virus), 신종인플루엔자A(Influenza A virus subtype H1N1), 조류인플루엔자바이러스(avian influenza virus), 리노바이러스(rhinovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 코로나바이러스(coronavirus), 파라인플루엔자바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 합포체 바이러스(respiratory syncytial virus), 포진 바이러스(Herpessvirus, HSV), 후천성 면역결핍 증후군 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV) 및 간염바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 바이러스에 의해 감염되는 질환인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0054] 본 발명의 유동 추출물 또는 이의 분획물은 자연살해(natural killer, NK)세포에서 면역 관련 사이토카인인 인터페론-감마(interferon- γ , IFN- γ)의 분비 유도성 및 NK 세포 활성화를 통해 강력한 항바이러스 활성을 나타내어 바이러스성 질환에 탁월한 효과가 있으므로, 바이러스성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0055] 또한, 본 발명은 유동 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 질환의 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0056] 상기 바이러스성 질환은 인플루엔자바이러스(influenza virus), 신종인플루엔자A(Influenza A virus subtype H1N1), 조류인플루엔자바이러스(avian influenza virus), 리노바이러스(rhinovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 코로나바이러스(coronavirus), 파라인플루엔자바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 합포체 바이러스(respiratory syncytial virus), 포진 바이러스(Herpessvirus, HSV), 후천성 면역결핍 증후군 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV) 및 간염바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 바이러스에 의해 감염되는 질환인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0057] 본 발명의 유동 추출물 또는 이의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 건강식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다.
- [0059] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 유동 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0060] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.
- [0061] 상기 외에 본 발명의 유동 추출물 또는 이의 분획물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 유동 추출물 또는 이의 분획물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물

100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

- [0062] 본 발명의 유동 추출물 또는 이의 분획물은 NK 세포에서 면역 관련 사이토카인인 IFN- γ 의 분비 유도성 및 NK 세포 활성화를 통해 강력한 항바이러스 활성을 나타내어 바이러스성 질환에 탁월한 효과가 있으므로, 바이러스성 질환의 예방 또는 개선용 건강식품에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0063] 아울러, 본 발명은 유동 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 질환의 예방 및 개선용 사료첨가제를 제공한다.
- [0064] 상기 바이러스성 질환은 인플루엔자바이러스(influenza virus), 신종인플루엔자A(Influenza A virus subtype H1N1), 조류인플루엔자바이러스(avian influenza virus), 리노바이러스(rhinovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 코로나바이러스(coronavirus), 파라인플루엔자바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 합포체 바이러스(respiratory syncytial virus), 포진 바이러스(Herpesvirus, HSV), 후천성 면역결핍 증후군 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV) 및 간염바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 바이러스에 의해 감염되는 질환인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0065] 상기 사료첨가제는 항바이러스 효능을 가지므로 가금류, 가축 등에게 꾸준히 섭취하게 함으로써 바이러스성 질환을 예방할 수 있고, 이미 발생한 바이러스성 질환을 개선시킬 수 있다. 사료는 영양가, 주성분, 유통, 수분 함량 배합상태 및 가공형태 등에 따라 여러 가지로 분류할 수 있으며, 상기 사료는 조사료, 농후사료, 보충사료, 단백질사료, 녹말사료, 지방질사료 또는 섬유질사료가 사용가능하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0066] 본 발명의 사료첨가제에는 유동 추출물 또는 이의 분획물이 0.1 ~ 20% 중량부, 지방분해효소(Lipase)가 0.001 ~ 0.01% 중량부, 제 3 인산칼슘이 1 ~ 20% 중량부, 비타민E가 0.01 ~ 0.1% 중량부, 효소분말이 1 ~ 10% 중량부, 유산균이 0.1 ~ 10% 중량부, 바실러스(Bacillus) 배양액이 0.01 ~ 10% 중량부 및 포도당은 20 ~ 90% 중량부로 구성되어 있는 것이 바람직하나, 특별히 이에 한정하는 것은 아니며, 유동 추출물 또는 이의 분획물이 유효량으로 첨가되어 있다면, 본 발명의 사료첨가제로서 가능하다.
- [0067] 상기 유효량이란, 가금류, 가축 등이 꾸준히 섭취하게 함으로써 바이러스성 질환을 예방하거나, 이미 발생한 바이러스성 질환을 개선할 수 있는 양을 의미한다. 또한, 첨가에 의한 이익을 넘는 악영향이 생기지 않는 양이 바람직하다.
- [0068] 또한 상기 사료첨가제는 추가적으로 가금류 및 가축 등에 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 본 발명에 있어서는 상기 사료첨가제를 그대로 또는 공지의 담체, 안정제 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로서 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다. 본 발명의 사료첨가제를 공급하는 경우는 가금류 및 가축 등에 대하여 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 유동 추출물 또는 이의 분획물은 NK세포에서 면역 관련 사이토카인인 IFN- γ 의 분비 유도성 및 NK 세포의 활성화를 통해 강력한 항바이러스 활성을 나타내어 바이러스성 질환에 탁월한 효과가 있으므로, 바이러스성 질환의 예방 또는 개선용 사료첨가제에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0070] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0071] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0072] <실시예 1> 유동 추출물의 제조
- [0073] <1-1> 유동(*Aleurites fordii*) 잎, 줄기 또는 열매 메탄올 추출물의 제조
- [0074] 유동(*Aleurites fordii*)은 제주도 서귀포에서 채취하여, 건조된 유동 잎, 줄기 및 열매 각각 2 kg에 메탄올 4 ℓ를 가한 후, 상온에서 순환시키면서 24시간 동안 추출하여 여과 상층액을 회수하였다. 추출 후, 용매를 감압 농축하여 유동 잎, 줄기 및 열매 메탄올 추출물을 각각 276 g, 120 g 및 100 g 수득하였다.

- [0075] <비교예 1> 원화 메탄올 추출물의 제조
- [0076] 항인플루엔자 바이러스 활성이 보고된 원화(*Daphne genkwa*)(대한민국 특허 출원번호:10-2009-0034132)를 경기도 용인에서 채취하였고, 원화 총 건조물을 사용하여 상기 실시예 <1-1>의 유동 메탄올 추출물 제조방법에 따라 원화 메탄올 추출물을 제조하였다.
- [0077] <실시예 2> 유동 추출물로부터 분획물의 제조
- [0078] <2-1> 유동 n-헥산 분획물의 제조
- [0079] 상기 <실시예 1>에서 수득한 유동 잎, 줄기 및 열매 메탄올 추출물을 각각 증류수 1.5 ℓ에 현탁시키고, n-헥산 1.5 ℓ를 가하여 혼합 후, n-헥산가용성 분획부와 물가용성 분획부를 분리하였으며, 이 과정을 3회 반복 실시하여 n-헥산가용성 분획부를 여과, 감압농축하여 유동 잎, 줄기 및 열매 n-헥산 분획물을 각각 27.6 g, 28 g 및 4 g 수득하였다.
- [0080]
- [0081] <2-2> 유동 에틸아세테이트 분획물의 제조
- [0082] 상기 실시예 <2-1>의 유동 잎, 줄기 및 열매 n-헥산 분획물을 분리하고 남은 각각의 나머지 분획부에 에틸아세테이트 1.5 ℓ를 가하여 혼합 후, 에틸아세테이트 분획부를 분리하였으며, 이 과정을 3회 반복 실시하여 에틸아세테이트 분획부를 여과, 감압농축하여 유동 잎, 줄기 및 열매 에틸아세테이트 분획물을 각각 80 g, 18 g 및 40 g 수득하였다.
- [0083] <2-3> 유동 부탄올 분획물의 제조
- [0084] 상기 실시예 <2-2>의 유동 잎, 줄기 및 열매 에틸아세테이트 분획물을 분리하고 남은 각각의 나머지 분획부에 부탄올 1.5 ℓ를 가하여 혼합 후, 부탄올 분획부를 분리하였으며, 이 과정을 3회 반복 실시하여 부탄올 분획부를 여과, 감압농축하여 유동 잎, 줄기 및 열매 부탄올 분획물을 각각 55 g, 24 g, 및 12 g 수득하였다.
- [0085] <실시예 3> 유동 추출물 또는 이의 분획물의 인터페론-감마(interferon- γ , IFN- γ) 분비 유도 활성 확인
- [0086] <3-1> 자연살해(natural killer, NK)세포의 배양
- [0087] 인터루킨-2(interleukin-2, IL-2) 의존성 자연살해(natural killer, NK)세포주 NK92(human NK lymphoma)는 미국 미생물보존센터(American Type Culture Collection, ATCC)로부터 구입하였다. NK92세포는 20% 우태아혈청(fetal calf serum, FCS)(HyClone, Logan, UT), 2 mM L-글루타메이트(glutamate), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 페니실린(penicillin), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신(streptomycin)(Life Technologies)을 포함하고 100 U/ml의 IL-2(Chiron, Emeryville, CA)가 첨가된 α -MEM(α -minimal essential medium)(Life Technologies, Karlsruhe, Germany) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.
- [0088] <3-2> 효소결합면역흡수분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 통한 유동 추출물 또는 이의 분획물의 인터페론-감마(interferon- γ , IFN- γ) 분비 유도 활성 확인
- [0089] 상기 실시예 <3-1>에 따라 배양한 NK92 세포의 세포배양액에 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 유동 잎, 줄기 또는 잎 추출물, 및 이의 분획물(n-헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 또는 물 분획물)을 각각 처리하여 37°C에서 18시간 동안 배양한 후, 세포를 제거하고 상등액을 수득하였다. NK92세포의 세포배양액에 존재하는 인간 IFN- γ 의 정량은 상업적으로 구입가능한 모노클로날 항체(mAb)(Endogen)를 사용하여 제조자가 지시한 프로토콜에 따라 효소결합면역흡수분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 수행하였다. 이때, 원화 추출물 및 디메틸설폭사이드(Dimethylsulfoxide, DMSO)를 각각 양성(PC) 및 음성(NC) 대조군으로 사용하였다. IFN- γ 의 정량값은 3회 분

석한 값의 평균±표준편차로 표시하였다.

[0090] 그 결과, 유동 추출물 또는 이의 분획물의 경우, 하기 표 1 및 도 1에 나타난 바와 같이, 유동 잎, 줄기 및 열매 메탄올 추출물을 처리한 각각의 NK92 세포에서는 약 1.7 ~ 2.0 ng/ml의 IFN- γ 가 분비되었다. 유동 잎, 줄기 또는 열매 추출물의 분획물인, 물층을 제외한 유기용매 분획물(노르말-헥산, 에틸아세테이트 또는 부탄올)을 처리한 경우에는, 노르말-헥산 분획물은 약 1.7 ~ 2.1 ng/ml, 에틸아세테이트 분획물은 약 1.5 ~ 2.0 ng/ml, 부탄올 분획물은 약 1.2 ~ 1.7 ng/ml의 IFN- γ 가 분비되었다. 유동 물 분획물은 약 0.3 ~ 0.4 ng/ml의 IFN- γ 를 분비하여, 유동 추출물 또는 유기용매 분획물에 비해 현저히 낮은 분비량을 보여 IFN- γ 분비 유도성이 거의 없는 것으로 나타났다. 유동 추출물 또는 이의 분획물을 처리한 세포는 모두 음성대조군(0.3 ng/ml)에 비해 현저히 높은 IFN- γ 분비량을 나타냈다(표 1 및 도 1). 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 유동 잎, 줄기 또는 열매 추출물의 분획물의 IFN- γ 분비 효과를 확인하였다(도 2). 이에, 유동 잎, 줄기 또는 열매 추출물, 또는 이의 분획물은 NK세포에서 IFN- γ 의 분비 유도 활성을 가짐을 확인하였다.

표 1

[0091]

시료(2 μ g/ml)		IFN- γ 분비량(ng/ml)
유동 잎	메탄올 추출물	1.7
	n-헥산 분획물	2.0
	에틸아세테이트 분획물	1.5
	부탄올 분획물	1.2
	물 분획물	0.4
유동 줄기	메탄올 추출물	2.0
	n-헥산 분획물	2.1
	에틸아세테이트 분획물	1.9
	부탄올 분획물	1.7
	물 분획물	0.3
유동 열매	메탄올 추출물	2.0
	n-헥산 분획물	1.7
	에틸아세테이트 분획물	2.0
	부탄올 분획물	1.7
	물 분획물	0.3
원화	메탄올 추출물 (양성대조군)	2.0
DMSO	음성대조군	0.3

[0092] <3-3> ELISA 분석을 통한 유동 추출물의 농도에 따른 인터페론-감마(interferon- γ , IFN- γ) 분비 유도 활성 확인

[0093] 유동 잎, 줄기 및 열매 메탄올 추출물 각각의 농도에 따른 INF- γ 분비량을 상기 실시예 <3-2>의 방법에 따라 수행하였다. 이때, 메탄올 추출물은 각각 0.01, 0.1, 1 또는 10 μ g/ml의 농도로 첨가하였다.

[0094] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 유동 잎 메탄올 추출물은 1 μ g/ml 이상의 농도에서 INF- γ 의 분비량이 현저히 증가하였고, 유동 줄기 또는 열매 메탄올 추출물에서는 10 μ g/ml의 농도에서 INF- γ 분비의 급격한 증가를 나타냈다. 이에, 유동 잎, 줄기 또는 열매 메탄올 추출물의 농도에 의존적으로 INF- γ 분비가 증가하는 것을 확인하였다(도 3).

[0095] <3-4> IFN- γ 분비 유도에 관련된 유전자 발현에 대한 유동 추출물 또는 이의 분획물의 효과 확인

[0096] NK92 세포에서 IFN- α 및 γ 유도에 관련된 mRNA 발현의 변화를 알아보기 위하여, RT-PCR을 수행하였다. NK92 세포 또는 폐 상피세포주인 A549를 2 ng의 유동 추출물로 12 시간 동안 배양하였다. 배양 후 15분, 30분, 45분, 1시간, 4시간, 및 12시간 뒤에 세포를 용해시킨 후에 공지된 프로토콜에 따라 RNA를 분리하여 RT-PCR을 통해 IFN- γ mRNA 발현을 분석하였다. 이때 사용한 IFN- γ 의 프라이머는 정방향 프라이머가 5'-TCCCATGGGTGTGTGTTTA-3' 이었고 역방향 프라이머는 5'-GTCAGGGTGCACCGG-3' 이었으며, GAPDH를 내부 표준으로서 사용하였는데 이때 사용된 GAPDH 정방향 프라이머는 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' 이었고 역방향 프라이머는 5'-ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT-3' 을 사용하였다.

- [0097] 상기 RT-PCR 반응은 상기 프라이머쌍과 *Taq* 폴리머라아제(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 수행하였다. 총 RNA는 표준 프로토콜에 따라 분리하였고, cDNA는 제조자의 지시에 따라 AccuScript High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Stratagene)를 사용하여 합성하였다. 합성한 1 μ l의 cDNA를 0.5 U *ExTaq* DNA 폴리머라아제, 1 $\times$ buffer 및 1mM dNTP mix(Takara)와 상기 프라이머 쌍으로 이루어진 20 μ l의 PCR 반응에 사용하였다. PCR 반응에 의한 증폭은 다음과 같은 조건에서 GeneAmp PCR system 2700(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 사용하여 수행하였다; 94℃에서 5분, 이어서 94℃에서 45초, 56℃에서 45초 및 72℃에서 1분을 25 내지 40 사이클 행한 후, 최종 연장반응은 72℃에서 7분간 수행하였다. PCR 프라이머는 Primer3 프로그램을 사용하여 디자인하였으며 Bioneer사(대한민국, 대전)로부터 구입하였다. PCR 생성물은 1.5% 아가로스젤상에서 분리하여 브롬화 에티듐(ethidium bromide, EtBr)으로 염색하여 Gel Doc 2000 UV trans-illuminator (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 시각화한 후에, Quantity One software(Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 분석하였다. 각 샘플들은 3회 이상 테스트하였으며 대표 데이터를 제시하였다.
- [0098] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, IFN- γ 의 전사체는 유동 추출물이 처리된 NK92 세포에서 2시간 후에 현저하게 증가하였고, 이는 IFN- γ 유도를 위한 유동추출물에 대한 반응은 전사 수준에서 1 내지 2 시간 이내에 유도되었음을 알 수 있었다(도 4).
- [0099] <실시예 4> 유동 추출물의 IFN- γ 생성 유도 효과에 대한 NF- κ B 신호전달 경로 의존성 확인
- [0100] 유동 추출물의 IFN- γ 생성 유도 효과가 NF- κ B 신호전달 경로에 의존적이라는 것을 입증하기 위하여, NF- κ B 억제자인 BayII, 또는 PKC 신호전달 억제자인 로테린(Rotterin)을 유동 추출물과 함께 NK92 세포에 처리하였다.
- [0101] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 유동 추출물에 의한 IFN- γ 생성의 유도는 BayII 처리에 의해 NK92 세포 내에서 감소되었고, 이는 BayII 농도에 의존적이었다. 이에, 유동 추출물에 의한 IFN- γ 생성의 유도가 NF- κ B 신호전달에 의해 매개됨을 알 수 있었다. 또한, PKC 신호전달 억제자인 로테린의 처리에 의해 IFN- γ 생성이 감소됨으로써 NF- κ B 신호전달의 상위신호전달자는 PKC의 활성화에 의한 것임을 알 수 있었다(도 5).
- [0102] <실시예 5> 유동 추출물의 세포표면물질에 대한 영향 확인
- [0103] 유동 추출물이 처리된 NK92 세포의 활성화에 관여하는 세포표면물질의 변화를 확인하기 위하여, 형광활성세포분류기(Fluorescence activated cell sorter, FACS)로 분석하였다. 이때, NK 세포의 활성 리간드(ligand)로 작용하는 NKG2A, C, 및 D, 자연살해활성과 관련된 NKp30, NKp44 및 Nkp46 세포표면물질의 발현을 분석하였다.
- [0104] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 유동 추출물이 처리된 NK92 세포는 NK 세포의 활성화에 관여하는 NKG2C 및 D의 발현이 현저하게 증가하였고, NK 세포의 자연살해 활성화와 관련된 NKp44의 발현도 현저히 증가한 것으로 확인되었다(도 6).
- [0105] <실시예 6> 바이러스가 감염된 폐 상피세포주에 대한 유동 추출물의 영향 확인
- [0106] 인플루엔자 바이러스가 감염된 세포에 대한 유동 추출물의 효과를 확인하기 위하여, 인플루엔자 바이러스가 침투된 폐 상피세포주인 A549 세포에 유동 추출물을 처리한 후 상기 실시예 <3-4>의 방법에 따라 RT-PCR을 실시하여 IFN- α 및 β 전사 활성도를 확인하였다.
- [0107] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 인플루엔자 바이러스가 처리된 A549 세포에서 24시간 후에 IFN- α 및 β 의 발현이 나타났고, 유동 추출물을 상기 바이러스가 처리된 A529 세포에 처리함으로써 IFN- α 의 발현량은 감소하였고, IFN- α 발현의 증가가 더욱 빨라지는 현상을 나타냈다(도 7).
- [0108] <제조예 1> 약학적 제제의 제조
- [0109] <1-1> 산제의 제조
- [0110] 유동 및 부탄올 분획물 2 g

[0111]	유당	1 g
[0112]	상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.	
[0113]	<1-2> 정제의 제조	
[0114]	유동 및 부탄올 분획물	100 mg
[0115]	옥수수전분	100 mg
[0116]	유 당	100 mg
[0117]	스테아린산 마그네	2 mg
[0118]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.	
[0119]	<1-3> 캡슐제의 제조	
[0120]	유동 줄기 부탄올 분획물	100 mg
[0121]	옥수수전분	100 mg
[0122]	유 당	100 mg
[0123]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0124]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.	
[0125]	<1-4> 환의 제조	
[0126]	유동 줄기 부탄올 분획물	1 g
[0127]	유당	1.5 g
[0128]	글리세린	1 g
[0129]	자일리톨	0.5 g
[0130]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.	
[0131]	<1-5> 과립의 제조	
[0132]	유동 열매 부탄올 분획물	150 mg
[0133]	대두추출물	50 mg
[0134]	포도당	200 mg
[0135]	전분	600 mg
[0136]	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	
[0137]	<제조예 2> 식품의 제조	
[0138]	본 발명의 유동 추출물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.	
[0139]	<2-1> 밀가루 식품의 제조	
[0140]	본 발명의 유동 열매 에틸아세테이트 분획물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵,	

케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0141] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0142] 본 발명의 유동 및 에틸아세테이트 분획물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0143] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0144] 본 발명의 유동 및 에틸아세테이트 분획물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0145] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0146] 본 발명의 유동 및 에틸아세테이트 분획물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0147] <2-5> 선식의 제조

[0148] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0149] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0150] 본 발명의 유동 및 에틸아세테이트 분획물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0151] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 유동 및 에틸아세테이트 분획물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0152] 곡물류(현미 30 중량부, 울무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0153] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0154] 유동 및 에틸아세테이트 분획물(3 중량부),

[0155] 영지(0.5 중량부),

[0156] 지황(0.5 중량부)

[0157] <제조예 3> 음료의 제조

[0158] <3-1> 건강음료의 제조

[0159] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 유동 및 에틸아세테이트 분획물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0160] <3-2> 야채 주스의 제조

[0161] 본 발명의 유동 및 에틸아세테이트 분획물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0162] <3-3> 과일 주스의 제조

[0163] 본 발명의 유동 줄기 에틸아세테이트 분획물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

[0164] <제조예 4> 사료첨가제의 제조

[0165] 본 발명자들을 유동 줄기 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 하여 하기와 같은 조성으로 사료첨가제를 제조하였다.

[0166] <사료첨가제의 조성>

[0167] 유동 줄기 에틸아세테이트 분획물: 0.1 ~ 20% 중량부,

[0168] 지방분해효소(Lipase): 0.001 ~ 0.01% 중량부,

[0169] 제 3 인산칼슘: 1 ~ 20% 중량부,

[0170] 비타민 E: 0.01 ~ 0.1% 중량부,

[0171] 효소 분말: 1 ~ 10% 중량부,

[0172] 유산균: 0.1 ~ 10% 중량부,

[0173] 바실러스(Bacillus) 배양액: 0.01 ~ 10% 중량부, 및

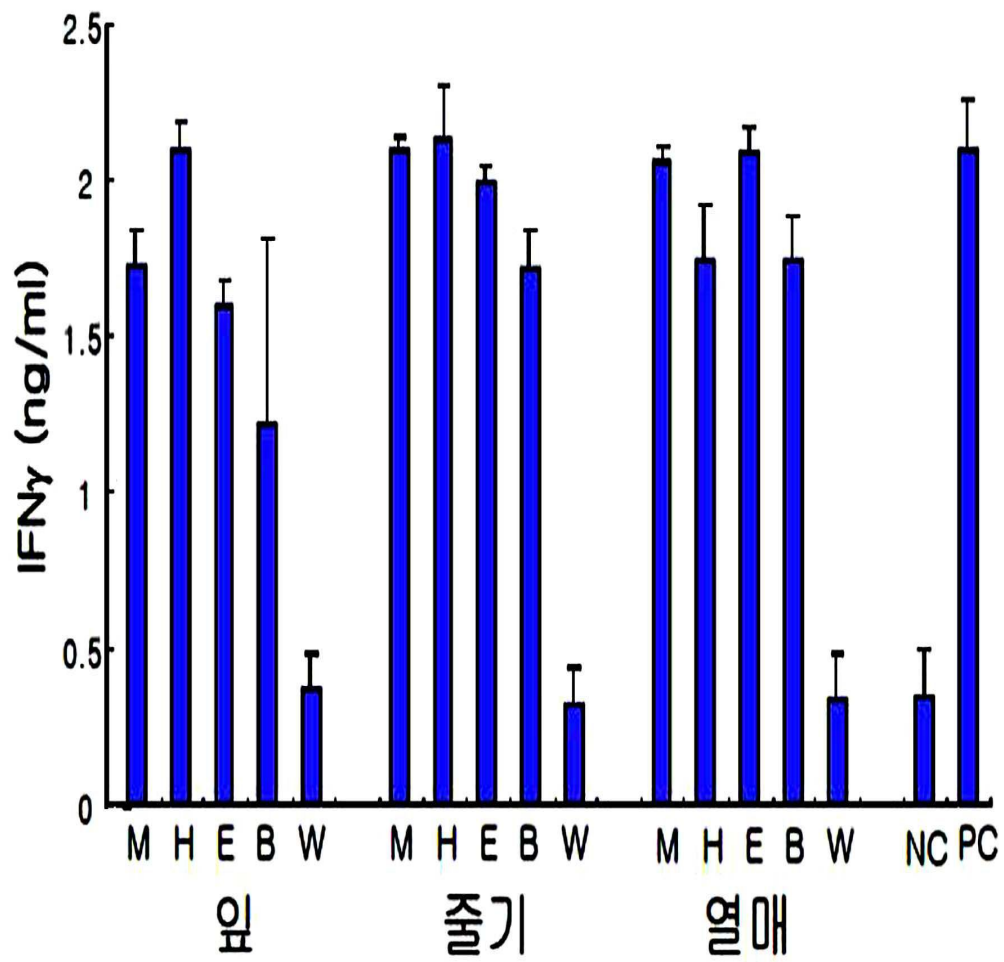
[0174] 포도당: 20 ~ 90% 중량부.

산업상 이용가능성

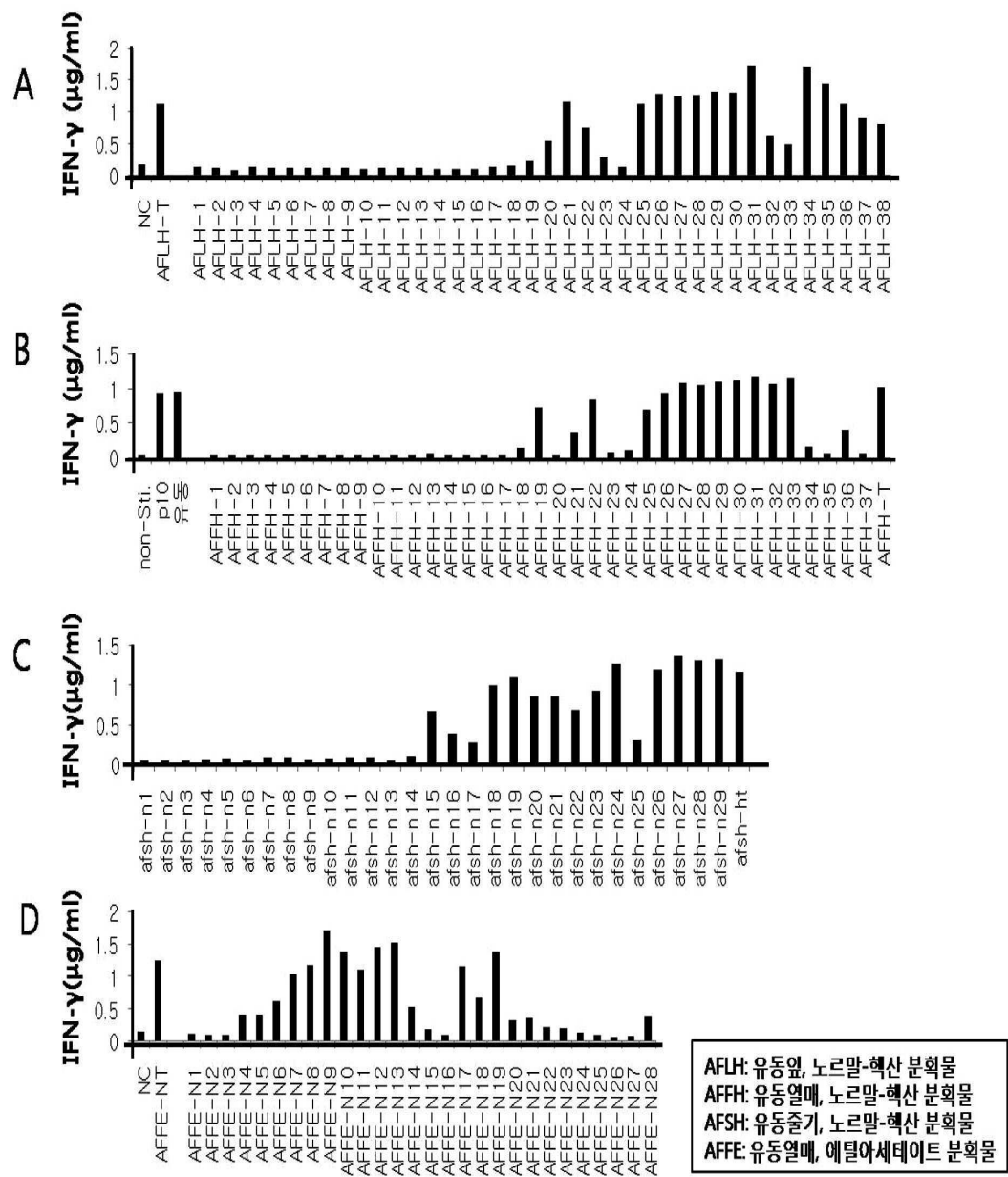
[0175] 상기와 같이, 본 발명의 유동 추출물 또는 이의 분획물은 항바이러스에 탁월한 효과가 있으므로 바이러스성 질환의 예방 및 치료용 약제, 또는 바이러스성 질환의 예방 및 개선용 건강식품 및 사료첨가제의 개발과 이들을 이용한 예방 또는 치료 방법 연구에 유용하게 이용될 수 있다.

도면

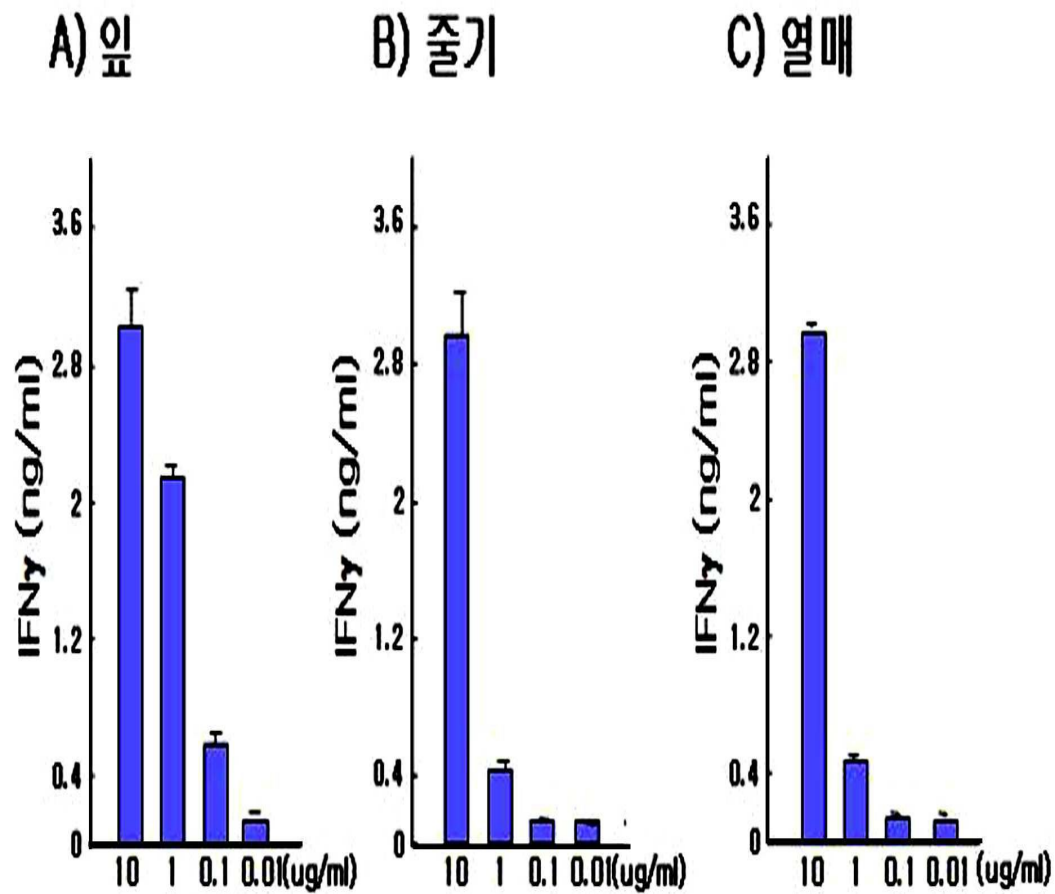
도면1



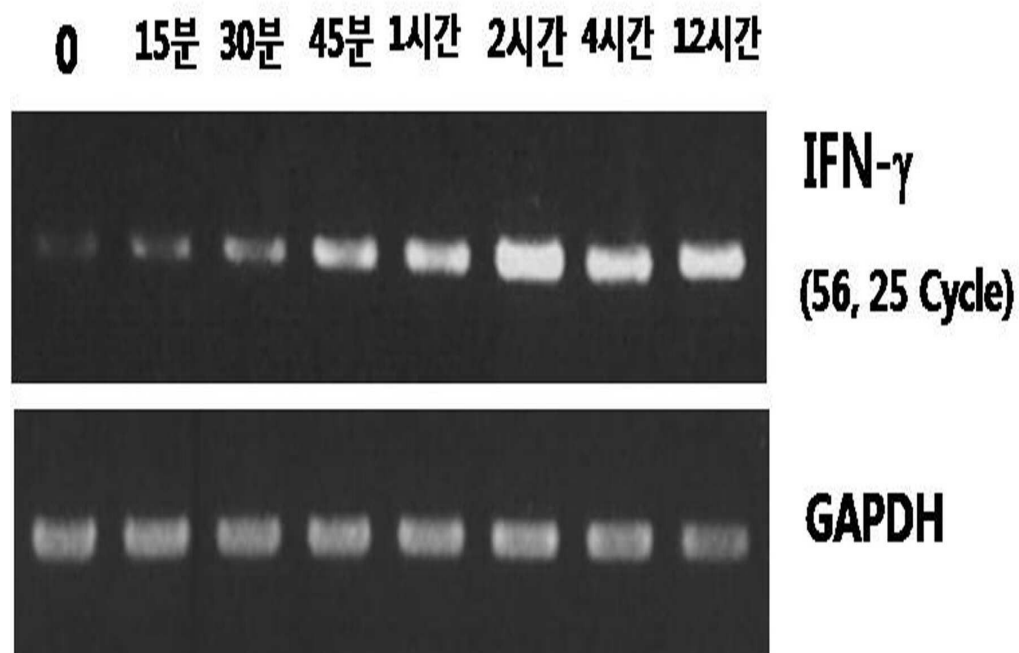
도면2



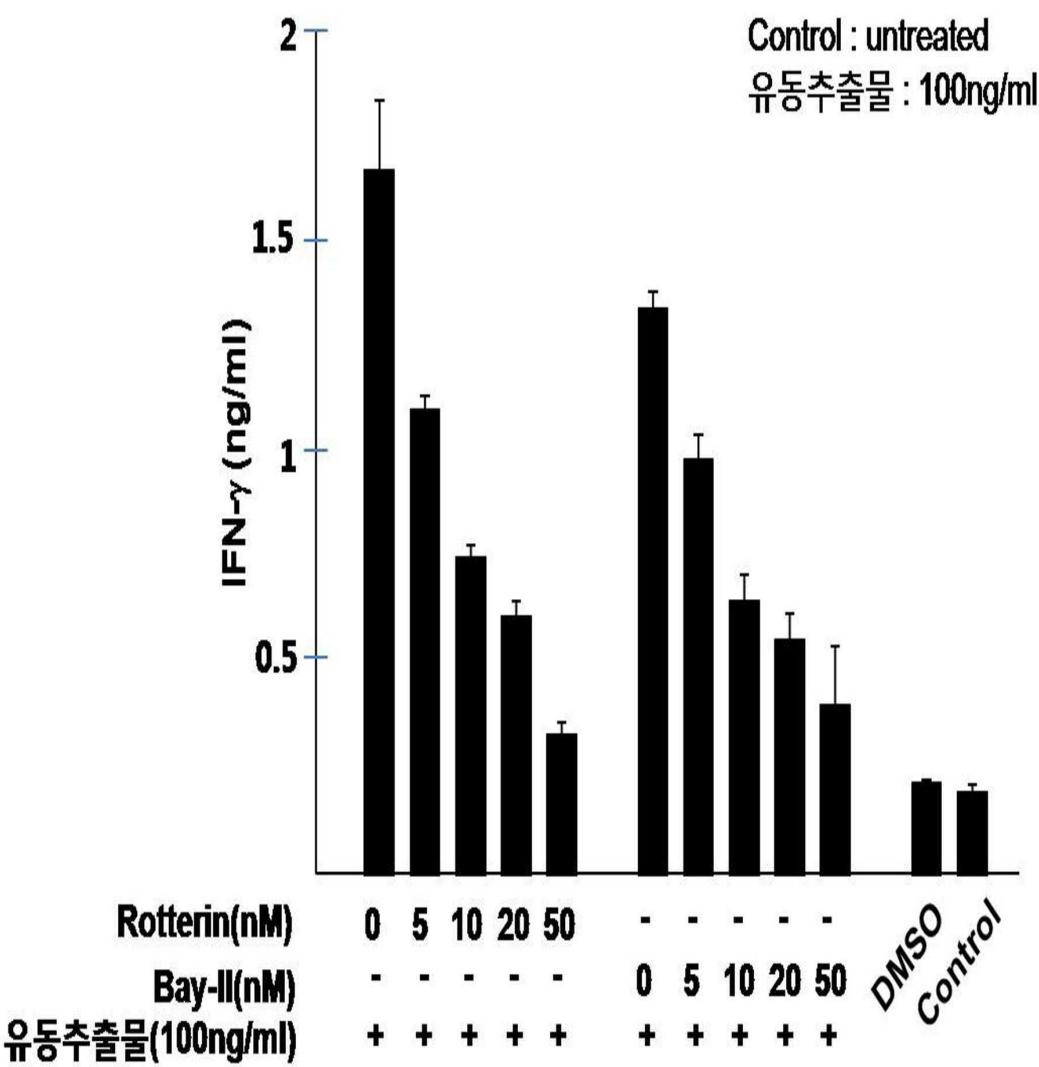
도면3



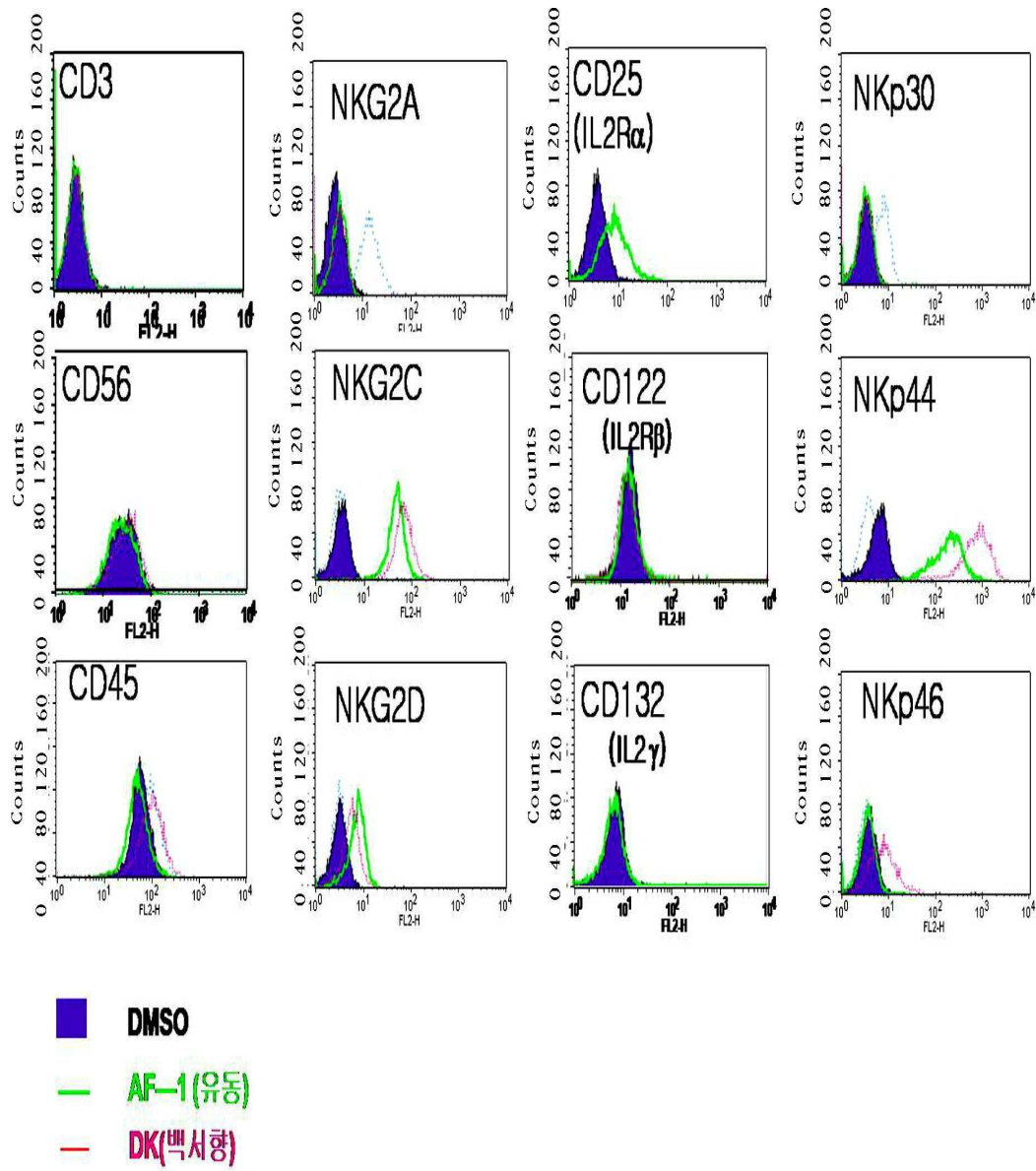
도면4



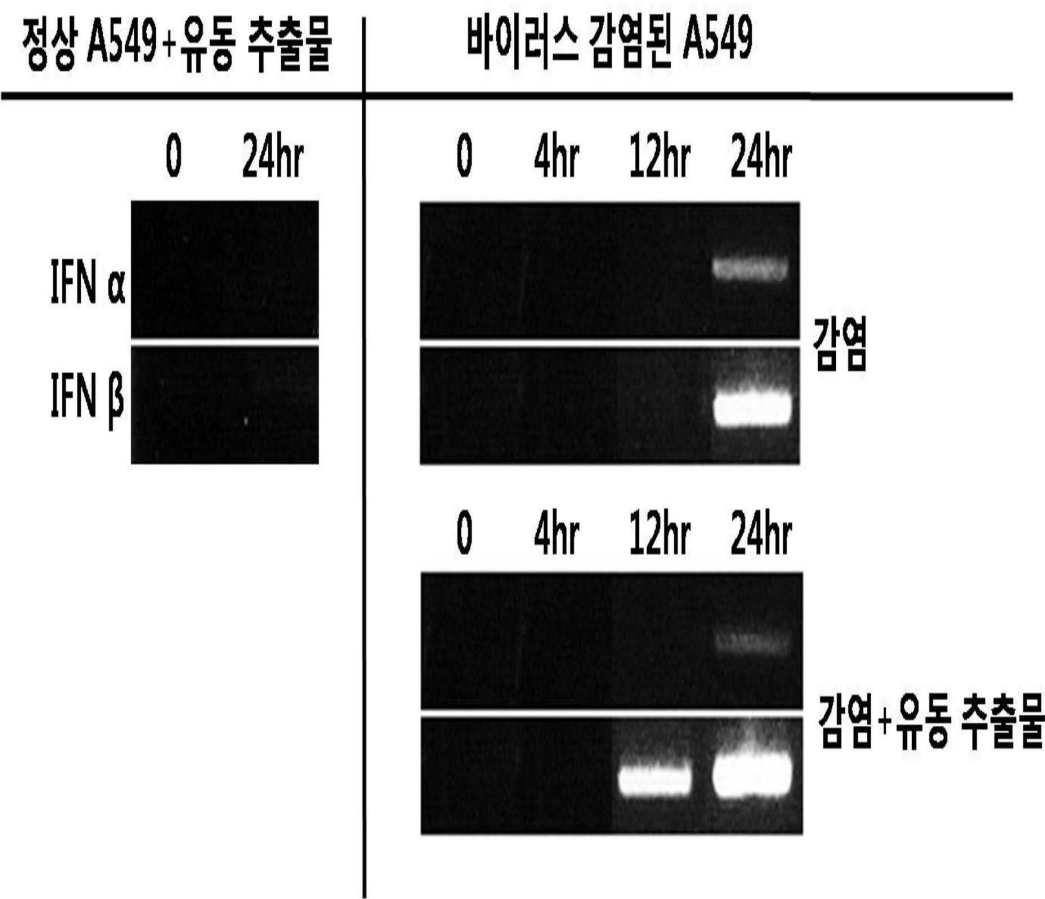
도면5



도면6



도면7



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)