(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0064285
(43) 공개일자 2025년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/88 (2006.01) *A23K 10/30* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61P 31/16* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/88 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0149759
(22) 출원일자 2023년11월02일
심사청구일자 2023년11월02일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이종수
대전광역시 서구 둔산로 155, 109동 1203호 (둔산동, 크로바아파트)
디조이사 마하나마
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

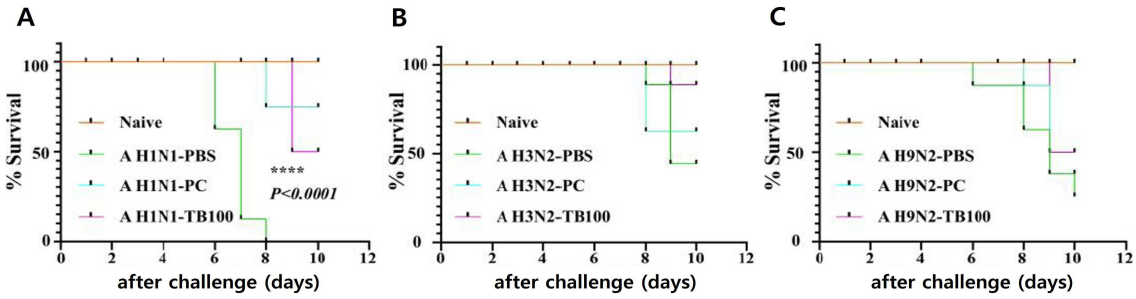
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **코스투스 스페시오수스 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 코스투스 스페시오수스 추출물은 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 우수하므로, 항바이러스용 약학, 건강기능식품, 수의학적 조성물 또는 사료 첨가제 등에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61P 31/16 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/324 (2013.01)
(72) 발명자
세네비라트네 아말 나야나지스
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동)
자야디라가 애리야와라 해와게 디미라 툴샨
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345365507
과제번호	2021R1A6A1A03045495
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	동물의과학연구소
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물의 추출 용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인플루엔자 A 바이러스는 H1N1, H3N2 또는 H9N2 아형(subtype)인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 약학 조성물.

청구항 4

코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 건강기능 식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 캔디, 츄잉껌, 젤리 및 음료로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 수의학적 조성물.

청구항 7

코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 사료 조성물.

청구항 8

인간을 제외한 동물에게 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 투여하는 것을 특징으로 하는 동물의 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 증진시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이러스(virus)는 라틴어로 독성물질을 의미하며, 세균여과지를 통과하는 일군의 감염형 병원성 입자이다. 바이러스는 숙주세포의 종류에 따라 박테리오파지, 식물 바이러스, 동물 바이러스로 분류하기도 하며, 핵산의 종류에 따라 DNA 바이러스, RNA 바이러스로 분류할 수도 있다. 최근 다양한 바이러스 질병이 사회적으로 큰 문제를 일으킴에 따라 바이러스 질병의 예방 또는 치료에 대한 고민이 사회적으로 큰 관심을 불러일으키고 있다.

[0003] 특히, 인플루엔자(influenza) 바이러스는 독감, 신종플루, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴 및 조류독감과 같은 급성 호흡기 질환을 유발하며, 대부분 수일간 앓고 회복되나 노약자나 만성 질환자들에게는 치명적인 합병증을 초래할 수 있다. 인플루엔자 바이러스는 핵산의 유형에 따라 A, B, C형으로 분류되며, A형 인플루엔자 바이러스는 표면항원인 적혈구응집소(Hemaglutinine, HA) H1~H16과 뉴라민분해효소(Neuraminase, NA) N1~N9의 조합에 의해서 다양한 아형(subtype)이 결정된다.

[0004] 인플루엔자 바이러스는 기침이나 재채기를 할 때 공기 중에 퍼지는 비말을 통해서 전파된다. 동물에서 사람으로의 감염은 흔하지 않으나 인플루엔자 바이러스에 감염된 동물의 분비물에 직접 닿거나 간접적으로 인간이 접촉했을 때 감염될 수 있다고 알려져 있고, 평균 2일 정도의 잠복기를 거친 뒤 38℃ 이상의 고열, 두통, 근육통, 피로감 등의 전신증상과 기침, 인후통, 가래 등의 호흡기 증상이 나타난다. 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 질병 치료에 주로 쓰이는 약물은 아만타딘(amantadine), 자나미비르(zanamivir), 리만타딘(rimantadine) 또는 오셀타미비르(oseltamivir) 등과 같은 화학 치료제이다. 그러나, 이와 같은 화학 치료제는 증상을 완화하는 정도에 불과하며, 경구투여 시 구토와 현기증 등의 부작용 및 내성 바이러스의 출현이 보고되고 있다. 따라서, 이러한 화학 치료제를 대신할 수 있는 우수한 항바이러스 활성을 가지는 천연 소재 개발에 관한 연구가 필요하다.

[0005] 한편, 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*)는 스리랑카, 인도와 같은 남아시아 국가에서 전통 의약품으로 널리 사용되고 있는 다년생 뿌리줄기 식물로, 크레페 진저(Crepe-ginger), 스파이럴 진저(spiral ginger) 또는 인슐린 식물(insulin plant)이라는 이름으로 알려져 있다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1077920호에는 '울금 추출물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 조성물 및 뉴라미니데이즈 활성의 억제용 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1846425호에는 '땅콩버섯 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '코스투스 스페시오수스 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포에 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 열수 추출물을 전처리하고, 인플루엔자 A 바이러스(H1N1)를 감염시킨 결과, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물 무처리구 대비 바이러스의 수는 감소하고, Raw 264.7 세포의 생존율은 증가한 것을 확인하였다. 또한, BALB/c 마우스에 코스투스 스페시오수스 열수 추출물을 경구투여한 후, 인플루엔자 A 바이러스(H1N1, H3N2 또는 H9N2)를 각각 감염시킨 후, 생존율을 측정한 결과, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물 무처리구 대비 마우스의 생존율이 증가하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 코스투스 스페시오수스 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 코스투스 스페시오수스 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 코스투스 스페시오수스 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 사료 첨가제를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 동물에게 코스투스 스페시오수스 추출물을 투여하는 것을 특징으로 하는 동물의 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 증진시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물은 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스 활성이 우수하므로, 항바이러스용 약학, 건강기능식품, 수의학적 조성물 또는 사료 첨가제 등에 다양하게 활용될 수

있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포에 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 전처리하고, GFP(green fluorescence protein)가 융합된 인플루엔자 A 바이러스(H1N1 PR8-GFP)를 감염시킨 후, 형광 현미경 및 광학 현미경으로 관찰한 세포의 사진(A), GFP 발현양을 측정한 결과(B), 세포의 생존율을 분석한 결과(C) 및 바이러스의 수를 측정한 결과(D)이다. MO: media only, VO: virus only, PC: positive control, 스케일 바(scale bar)=100 μm.

도 2는 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포에 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 처리한 후, IFN-β(A) 및 IL-6(B)의 발현량을 분석한 결과이다. MO: media only, PC: positive control.

도 3은 *in vivo* 도전 감염 분석을 위한 실험 계획을 나타낸 모식도이다.

도 4는 *in vivo* 도전 감염 분석 결과로, 5주령의 암컷 BALB/c 마우스에 PBS, IFN-β 또는 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 투여하고, 인플루엔자 A 바이러스 H1N1(A), H3N2(B) 또는 H9N2(C)를 투여하여 도전감염을 유도한 후, 생존율을 측정한 결과이다. Naive는 아무것도 처리하지 않은 음성 대조군이고, PC는 IFN-β을 투여한 양성 대조군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 따른 항바이러스용 약학 조성물에 있어서, 상기 코스투스 스페시오수스 추출물은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0017] (1) 코스투스 스페시오수스 잎을 세척하고 건조한 후, 분말화하는 단계;

[0018] (2) 상기 단계 (1)의 분말에 추출용매를 넣고 추출하는 단계; 및

[0019] (3) 상기 단계 (2)의 추출물을 여과하여 건조한 후, 희석하는 단계.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (2)에서 추출용매는 물, C_1~C_4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물일 수 있고, 바람직하게는 물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명에 있어서, 상기 단계 (2)에서 추출은 90~110℃에서 140~160분 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명에 따른 항바이러스용 약학 조성물에 있어서, 상기 인플루엔자 A 바이러스는 독감, 신종플루, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴 및 조류독감 중에서 선택된 어느 하나의 질환을 유발시키는 것일 수 있으며, 바람직하게는 H1N1, H3N2 또는 H9N2 아형(subtype)인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "항바이러스(antivirus)"는 바이러스의 성장 또는 생존을 감소, 방지, 억제 또는 제거하는 능력을 의미한다.

[0024] 본 발명에 따른 항바이러스용 약학 조성물은 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 가지는 코스투스 스페시오수스 추출물을 유효성분으로 함유하므로, 바이러스 감염에 대한 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 항바이러스용 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 예를 들어 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제의 대표적인 예로는, 락토즈, 덱스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 글리세린, 아카시아 고무, 알지네이트, 칼슘포스페이트, 칼슘카보네이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일, 주사가능한 에스테르, 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우리지 등을 들 수 있다. 본 발명의 항바이러스용 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽제, 에어로졸, 외용제, 좌제 및 주사제로 이루어진 군으로부터 선택되는 형태일 수 있다. 약학 조성물의 제제화

방법은 기술분야에 공지된 통상의 방법에 따라 수행될 수 있으며, 특별히 제한되지 않는다.

[0026] 또한, 본 발명의 항바이러스용 약학 조성물의 투여량, 투여 경로, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있다.

[0027] 본 발명의 항바이러스용 약학 조성물은 유효성분으로 코스투스 스페시오수스 추출물 외에 다른 약학적 활성 성분을 함께 포함하거나, 또는 다른 항바이러스 활성 성분을 포함하는 약학 조성물과 혼합되어 이용될 수 있다.

[0028] 본 발명은 또한, 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 항바이러스용 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 코스투스 스페시오수스 추출물 및 인플루엔자 A 바이러스는 전술한 바와 같다.

[0030] 본 발명에 따른 항바이러스용 건강기능식품 조성물은 인플루엔자 A 바이러스러스에 대한 항바이러스 활성을 가지는 코스투스 스페시오수스 추출물을 유효성분으로 함유하므로, 인플루엔자 A 바이러스 감염에 대한 예방 또는 개선용으로 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 항바이러스용 건강기능식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제는 포도당, 과당, 말토오스, 슈크로스, 덱스트린, 시클로덱스트린과 같은 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올과 같은 천연 탄수화물, 타우마틴, 스테비아 추출물 등의 천연 향미제, 사카린, 아스파르탐산 등의 합성 향미제, 착색제, 펙트산 또는 그의 염, 알긴산 또는 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 항바이러스용 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 캔디, 츄잉검, 젤리 및 음료로 이루어진 군으로부터 선택되는 형태일 수 있다. 항바이러스용 건강기능식품 중의 코스투스 스페시오수스 추출물의 함량은 식품의 형태, 풍미, 맛 등을 고려하여 적절하게 선택될 수 있으며, 예를 들어 건강기능식품 전체 중량에 대하여 0.01~30 중량%의 범위일 수 있다. 본 발명의 항바이러스용 건강기능식품의 형태, 조성 및 제조방법 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있음이 통상의 기술자에게 명백하다.

[0032] 본 발명은 또한, 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명의 항바이러스용 수의학적 조성물에 있어서, 상기 코스투스 스페시오수스 추출물 및 인플루엔자 A 바이러스는 전술한 바와 같다.

[0034] 본 발명의 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메칠파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다.

[0035] 본 발명에 따른 수의학적 조성물의 유효한 양은 동물의 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강상태 또는 성별에 따른 본 발명의 유효성분에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 수의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한, 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스용 사료 첨가제를 제공한다.

[0037] 본 발명의 항바이러스용 사료 첨가제에 있어서, 상기 코스투스 스페시오수스 추출물 및 인플루엔자 A 바이러스는 전술한 바와 같다.

[0038] 본 발명의 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다. 본 발명에서 용어 "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다. 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명은 또한, 인간을 제외한 동물에게 코스투스 스페시오수스(*Costus speciosus*) 추출물을 투여하는 것을 특징으로 하는 동물의 인플루엔자 A 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0040] 상기 동물의 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 항바이러스 활성 증진에 있어서, 본 발명에 따른 코스투스 스페시오수스 추출물의 투여량, 투여경로, 투여 시기 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있다.

[0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **재료 및 방법**

[0045] **1. 세포 배양 및 바이러스 증식**

[0046] 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포 또는 HEp2 세포(Human Epithelial type 2, ATCC CCL-23)를 10%(v/v) FBS(Fetal Bovine Serum)와 1%(v/v) 항생제가 포함된 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium) 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하였다. *in vitro* 항바이러스 활성 분석에는 GFP(green fluorescence protein)가 융합된 인플루엔자 바이러스 A/Puerto Rico/8/1934 strain(H1N1 PR8-GFP)을 HEp2 세포에서 증식시켜 사용하였고, *in vivo* 항바이러스 활성 분석에는 인플루엔자 바이러스 A/Puerto Rico/8/1934 strain(H1N1), A/Philipines/2/2008 strain(H3N2) 및A/Chicken/Korea/116/2004 strain(H9N2)을 HEp2 세포에서 각각 증식시켜 사용하였다.

[0048] **2. 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100) 제조**

[0049] 코스투스 스페시오수스 잎을 세척하고 50℃에서 3일 동안 건조한 후, 분말화한 후, 끓는 물 2 ℓ에 상기 건조 잎 분말 130 g을 넣고 100℃에서 150분 동안 추출하였다. 이후, 0.45 ㎛ 필터로 여과하여 동결건조한 후, 10%(v/v) FBS와 1%(v/v) 항생제가 포함된 DMEM 배지 또는 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 희석하여 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 제조하여 이후 실험에 사용하였다.

[0051] **3. 통계분석**

[0052] 모든 실험은 독립된 3반복으로 수행하였고, 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계분석은 GraphPad Prism software version 6(GraphPad Software, USA)를 이용하여 수행하였다. 모든 결과에서 ***은 $p<0.001$, ****은 $p<0.0001$을 의미한다.

[0054] **실시예 1. *in vitro* 항바이러스 활성 분석**

[0055] 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포를 12웰 플레이트에 2.5×10^5 세포/웰로 접종(seeding)하고 10%(v/v) FBS 및 1%(v/v) 항생제가 포함된 DMEM 배지에서 37℃, 12시간 동안 배양한 후, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 독성을 보이지 않는 안전한 농도인 5, 10, 20 또는 40 ㎍/㎖로 각각 전처리하고 37℃에서 12시간 동안 배양하였다. 이후, MOI(multiplicity of infection) 0.1로 인플루엔자 A 바이러스(H1N1 PR8-GFP)를 감염시키고, serum-free DMEM 배지에서 37℃, 2시간 동안 배양한 후, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교체하고 37℃,

24시간 동안 추가로 배양하였다. 이후, 형광 현미경을 이용하여 GFP 형광을 관찰하였고, Glomax multi-detection system(Promega, USA)을 이용한 형광 측정을 통해 GFP 발현 및 바이러스의 수를 측정하였으며, 트립판 블루(trypan blue) 염색을 통해 세포 생존율을 분석하였다. 10% FBS가 포함된 DMEM 배지만 처리하여 정상군(MO: media only)으로 이용하였고, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 전처리하지 않고 바이러스만 감염시켜 음성 대조군(VO: virus only)으로 이용하였으며, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100) 대신 IFN-β를 전처리하고 바이러스를 감염시켜 양성 대조군(PC: Positive control)으로 이용하였다.

[0056] 그 결과, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 전처리한 후, 인플루엔자 A 바이러스(H1N1 PR8-GFP)를 감염시킨 실험구는 인플루엔자 A 바이러스(H1N1 PR8-GFP) 단독 처리구 대비 GFP 발현 및 바이러스의 수는 현저하게 감소하고, 세포 생존율은 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 1).

[0058] **실시예 2. 항바이러스 활성 마커 발현 분석**

[0059] 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100) 처리에 의한 항바이러스 활성 마커로 알려진 IFN-β 및 IL-6의 발현량을 분석하였다. 구체적으로, 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포를 12웰 플레이트에 2.5×10^5 세포/웰로 접종(seeding)하고 10%(v/v) FBS 및 1%(v/v) 항생제가 포함된 DMEM 배지에서 37℃, 12시간 동안 배양한 후, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100) 20 또는 40 ㎍/㎖을 각각 처리하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상층액을 회수하여 ELISA 키트(BD Biosciences)를 통한 IFN-β 및 IL-6의 발현량 분석을 수행하였다. 10% FBS가 포함된 DMEM 배지만 처리하여 대조군(MO: media only)으로 이용하였고, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100) 대신 10 ng/㎖의 LPS(lipopolysaccharide)를 처리하여 양성 대조군(PC: Positive control)으로 이용하였다.

[0060] 그 결과, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 처리한 실험구의 IFN-β 및 IL-6의 발현량은 대조군 대비 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 2).

[0062] 상기 결과를 통해, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)은 IFN-β 및 IL-6의 발현을 증가시킴으로써 항바이러스 활성을 가지는 것을 알 수 있었다.

[0064] **실시예 3. *in vivo* 도전 감염 분석**

[0065] 5주령의 암컷 BALB/c 마우스(Hanil Laboratory Animal Center, 한국)를 그룹당 8마리씩 총 10그룹으로 나누어 5일 동안 적응시켰다. 이후, 5일째, 7일째, 9일째 및 11일째에 PBS, 1000 U의 IFN-β 또는 0.8 mg/㎖(8.4 mg/kg)의 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 경구 또는 비강 투여하였고, 12일째에 인플루엔자 A 바이러스(H1N1, H3N2 또는 H9N2)를 2×LD50으로 각각 비강 투여하여 도전감염을 유도하였다. 이후, 10일 동안 각 그룹의 마우스의 생존율을 매일 측정하였다(표 1, 도 3).

[0066] LD50값은 Reed and Muench 방법으로 계산하여 사용하였다. 구체적으로, 5주령의 BALB/c 마우스에 각 인플루엔자 A 바이러스(H1N1, H3N2 또는 H9N2)를 10배씩 희석하여 비강 투여(30 ㎕)한 후, 12일 동안 체중 및 생존율을 측정하였다. 실험에 사용한 마우스 중에서 50%가 사망한 농도를 LD50값으로 계산하였다.

표 1

[0067] *in vivo* 도전 감염 실험

Group		Inoculation Dose/mice	Route	Challenge
Naive		-	-	-
H1N1	H1N1-PBS	200 ㎕ PBS	Oral	H1N1 2×LD50 (Nasal)
	H1N1-PC	1000 U IFN-β	Nasal	
	H1N1-TB100	0.8 mg/㎖(8.4 mg/kg)	Oral	
H3N2	H3N2-PBS	200 ㎕ PBS	Oral	H3N2 2×LD50 (Nasal)
	H3N2-PC	1000 U IFN-β	Nasal	
	H3N2-TB100	0.8 mg/㎖(8.4 mg/kg)	Oral	
H9N2	H9N2-PBS	200 ㎕ PBS	Oral	H9N2 2×LD50 (Nasal)

H9N2-PC	1000 U IFN-β	Nasal
H9N2-TB100	0.8 mg/mℓ(8.4 mg/kg)	Oral

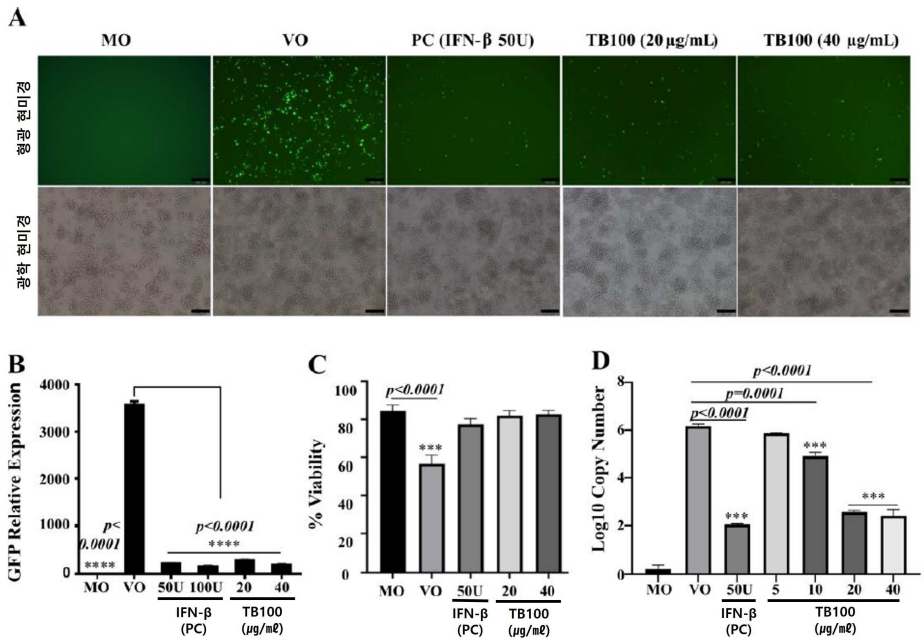
[0068] PC: positive control, LD50: median lethal dose.

[0070] 그 결과, 아무것도 처리하지 않은 그룹(Naive)의 생존율은 100%인 것을 확인하였고, PBS를 투여하고 도전감염을 유도한 그룹(H1N1-PBS, H3N2-PBS 또는 H9N2-PBS)의 생존율은 도전감염후 6~8일째부터 현저하게 감소한 반면, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)을 투여하고 도전감염을 유도한 그룹(H1N1-TB100, H3N2-TB100 또는 H9N2-TB100)의 생존율은 도전감염후 10일째까지 50% 이상을 유지하는 것을 확인하였다(도 4).

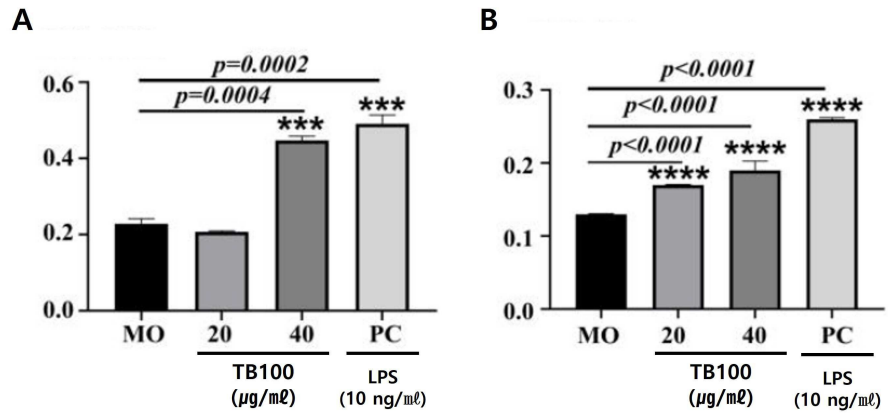
[0072] 상기 결과를 통해, 코스투스 스페시오수스 열수 추출물(TB100)은 인플루엔자 A 바이러스(H1N1, H3N2 또는 H9N2)에 대한 보호 효과가 우수한 것을 알 수 있었다.

도면

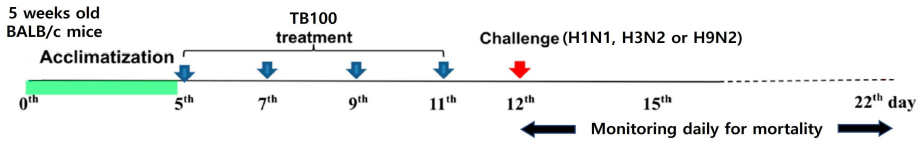
도면1



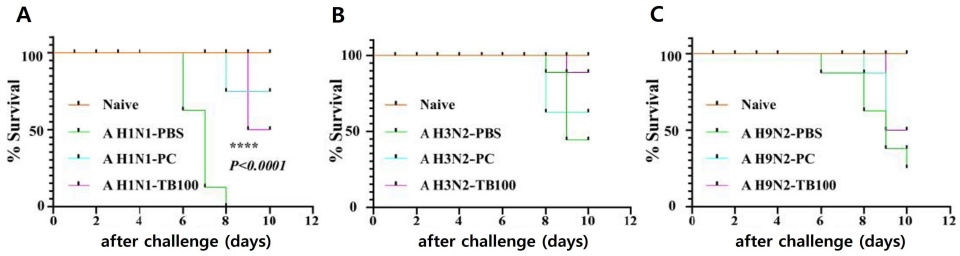
도면2



도면3


5 weeks old
BALB/c mice
Acclimatization
TB100
treatment
Challenge (H1N1, H3N2 or H9N2)
0th
5th
7th
9th
11th
12th
15th
22th day
Monitoring daily for mortality

도면4


A
B
C
% Survival
after challenge (days)
Naive
A H1N1-PBS
A H1N1-PC
A H1N1-TB100
****
P<0.0001
A H3N2-PBS
A H3N2-PC
A H3N2-TB100
A H9N2-PBS
A H9N2-PC
A H9N2-TB100