



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0097052

(43) 공개일자

2014년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/605 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0072348(분할)

(22) 출원일자

2014년06월13일

심사청구일자

2014년06월13일

(62) 원출원

특허 10-2014-0011655

원출원일자

2014년01월29일

심사청구일자

2014년01월29일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김경현

서울특별시 서초구 잠원로 195, 334동 304호(잠원동, 신반포한신아파트)

정미숙

서울특별시 도봉구 삼양로144길 33 (쌍문동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

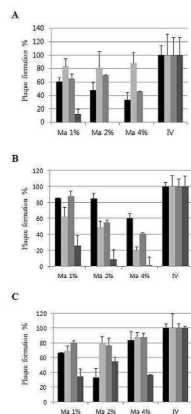
(54) 발명의 명칭 오디를 유효성분으로 포함하는 오소믹소바이러스에 대한 항바이러스 조성물

(57) 요약

본 발명은 칼리시바이러스와 오소믹소바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 칼리시바이러스와 오소믹소바이러스의 증식 및 복제를 저해하는 활성이 매우 우수하므로, 아직까지 백신이나 치료제가 개발되어 있지 않은 노로바이러스, 고양이 칼리시바이러스에 효과적인 치료제로 사용될 수 있다.

뿐만 아니라, 내성이 나타나고 있는 오소믹소바이러스 조류인플루엔자 및 인체인플루엔자 항바이러스제에 대한 유효성분으로 천연식물을 이용함에 따라 안정성이 인정된다는 점에서 본 발명의 조성물을 포함하는 식품을 집단 급식소에서 제공시 노로바이러스로 인한 식중독을 감소시킬 수 있고, 내성 및 신변종 바이러스에 대한 대체소재로서 사회경제적으로 매우 의미 있는 개발이 될 것으로 기대된다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

이지혜

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

배선영

서울특별시 강북구 삼양로138길 8, 303호 (수유동)

오미

서울특별시 강북구 덕릉로 93, 삼보힐오피스텔 706호(번동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A103001

부처명 보건복지가족부

연구사업명 범부처 인플루엔자 사업

연구과제명 바이러스-숙주 선천성 면역 상호작용 기반 신규 항바이러스 타겟 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 범부처 인플루엔자 사업단

연구기간 2011.07.01 ~ 2012.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

오디를 유효성분으로 포함하는 sH1N1, H3N2, 및 인플루엔자 B 바이러스로 이루어진 군에서 선택된 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 오디는 과실, 껍질 및 씨로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로부터 얻어진 착즙물 또는 추출물의 형태로 포함되는 것인, 항바이러스 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 추출물은 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 아세트산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 용매를 사용하는 용매 추출, 또는 환류냉각 추출로 얻어진 것인, 항바이러스조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 인플루엔자 바이러스에 의한 소화기 또는 호흡기 질환을 예방 또는 치료하기 위한 것인, 항바이러스 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 오디를 0.001 중량% 내지 99.9 중량%로 포함하는 것인, 항바이러스 조성물.

청구항 6

오디의 과실, 껍질 및 씨로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로부터 얻어진 착즙물 또는 추출물을 포함하는, sH1N1, H3N2, 및 인플루엔자 B 바이러스로 이루어진 군에서 선택된 인플루엔자 바이러스의 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식품은 식품 첨가제, 음료 또는 음료 첨가제인, 식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 착즙물 또는 추출물을 0.00001 중량% 내지 100 중량% 로 포함하는, 식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 복분자 및/또는 오디를 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인플루엔자 바이러스

[0003] 인플루엔자 바이러스는 세계적으로 매년 25-50만 명의 목숨을 빼앗고 소아의 10-40%가 감염되고 있으며, 국가 경제적 손실을 야기하는 심각한 글로벌 질환을 유발한다. 1918년 스페인 독감 대유행 이후, 1957년 아시아 독감, 1968년 홍콩 독감 등 수십 년 주기로 인플루엔자 대유행이 나타났으며, 2009년 H1N1 인플루엔자 바이러스 (2009pdm)의 출현으로 세계적으로 27만명이 감염되었고, 3200명 이상이 사망하였다. 남반구에서 높은 전염성의

새로운 변이주 창궐 가능성 때문에 대유행 대책을 세우고 있음에도 사회적 과장과 우려는 줄지 않고 있다.

- [0004] 인플루엔자는 오한, 발열, 근육통, 기침을 동반하는 급성 호흡기 질환으로 보통 감염자의 기침이나 재채기를 통해 공기 중으로 배출되는 aerosol을 통해서 인체-인체 전파에 따라 감염된다. 조류의 배설물 등으로도 전염될 수 있으며, 감기와 비교되는데 감기는 아데노바이러스, 라이노바이러스, 콕사키바이러스, 코로나바이러스 등의 감염으로 발생하는 호흡기 질환으로 보통 근육통이나 빠른 고열을 동반하지 않는다.
- [0005] 인플루엔자 감염은 오소믹소비리대(orthomyxoviridae)에 속하는 인플루엔자 바이러스에 의하여 야기되며, RNA 바이러스로서 항원 변이가 상대적으로 쉽기 때문에 감염인구 집단 내에서의 반복적인 재감염이 가능하다. 인체 감염을 일으키는 인플루엔자 바이러스는 A, B 형으로 바이러스 표면의 HA(hemagglutinin)과 NA(neuraminidase)에 의하여 바이러스 항원 변이가 결정된다. 바이러스 표면 단백질 HA, NA의 유전적 조합에 따라 H1 - H16 및 N1 - N9 아형이 생성되며, 이 중에서 A형 인체 인플루엔자 바이러스의 아형은 H1, H2, H3의 세 가지, N1, N2 두 가지의 서로 다른 조합에 의해 결정된다. B형 인플루엔자가 대유행을 일으키지 못하는 이유는 A형과 달리 사람에게만 감염을 일으키기 때문에 동물 바이러스로부터의 유전자를 얻는 일이 없다.
- [0006] 인플루엔자 항바이러스제인 oseltamivir, amantadine이 각각 NA, M2채널에 작용하지만 내성 바이러스 문제가 심각하다. 돼지 유래 2009pdm H1N1은 oseltamivir, zanamivir가 아직 효과적이기는 하지만, 이미 oseltamivir에 내성을 갖는 H5N1, H1N1, zanamivir에 내성을 갖는 B형이 보고되었으며, 신종 H1N1에 대한 내성 바이러스도 2009년 여름부터 여러 나라에서 보고되고 있다.
- [0007] 인플루엔자 바이러스의 life cycle은 인체세포에서 대략 2-3일 소요된다. 바이러스 HA가 인식하는 인체세포 수용체는 호흡기 상피세포에 존재하는 terminal sialic acid(SA)이며, 인체 세포 표면의 당단백질 혹은 당지질에 노출된 galactose(Gal)에 a-2,6로 결합한다. 그러나 조류인플루엔자 바이러스 HA는 일반적으로 SAa-2,3-Gal을 인지한다. 바이러스가 세포에 성공적으로 침입하기 위해서는 HA가 인체 수용체에 결합해야 하지만, 동시에 바이러스 입자가 세포 안으로 들어가야만 한다. 즉, 인플루엔자 바이러스 HA의 구조적 변화에 따른 막 융합(membrane fusion)을 이루게 되고, 내포작용(endocytosis)에 의하여 세포 내로 침입해야 한다.
- [0008] 이처럼 중요한 역할을 수행하는 HA는 인체 면역시스템 공격에 따른 선택적 압력(selection pressure)을 받으며, 다른 단백질에 비하여 바이러스 진화에 매우 중요하다. 그러나 아직까지는 HA를 타겟(target)으로 하는 항바이러스제는 개발되지 않고 있다. HA의 높은 변이율에 따른 백신개발이 어렵고, NA 효소 저해제를 기반으로 하는 타미플루(tamiflu), 리렌자(relenza) 등 기존 항바이러스제에 대한 내성 바이러스가 출현함에 따라, 새로운 항바이러스제의 개발이 절실한 실정이다.
- [0009] 노로바이러스
- [0010] 식품 위해 병원체 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(CDC December 15, 2010). 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.
- [0011] 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 생존 할 수 있다. 이는 음식물과 물을 통해 사람에게 전달될 수도 있고, 환자와의 직접 접촉이나 공기를 통해서도 감염될 수 있다. 노로바이러스 10개 입자만 섭취해도 식중독이 유발될 수 있고, 증상이 소멸된 이후에도 2주간 전염이 가능할 정도로 강력한 감염력을 갖고 있다.
- [0012] 노로바이러스는 단일가닥(single strand) 양성(positive) RNA 바이러스로서 7.5 kb RNA 게놈(genome)을 갖고 있으며, 3개의 주된 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 때

문이다.

[0013] 특히 인체 노로바이러스는 사람의 장(腸)에서만 증식하고, 현재까지 세포배양이 불가능하기 때문에 관련 연구가 미흡하여 아직까지 백신이나 치료제 개발이 안 되어 있다. 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.

[0014] 식중독 치료와 관련하여 항생제(antibiotic drug)는 박테리아로 인한 식중독을 치료함에 있어서 탁월한 효과를 발휘하지만 바이러스성 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. 급속한 노령화에 따른 노인인구와 식생활 변화에 따른 만성질환 환자의 증가로 인하여, 천연식품 소재 수요가 폭발적으로 성장할 것으로 예상되며, 이는 자연상태에서 얻어지는 천연식품 소재는 가공소재에 비하여 부작용이 상대적으로 적기 때문이다.

[0015] 한편, 식중독 대체 바이러스로 알려진 고양이 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 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 이에, 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 부작용 또는 독성 등의 우려가 없으며 노로바이러스에 의한 소화기 감염 바이러스, 고양이 칼리시바이러스 및 인플루엔자 바이러스에 의한 호흡기 감염 바이러스에 대한 저해 효과가 뛰어난 천연물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 이에, 본 발명자들은 상기 종래 기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력하여, 세포기반 바이러스 활성을 저해하는 저해제 스크리닝을 통하여 인플루엔자 바이러스, 칼리시바이러스, 노로바이러스를 대상으로 국내 고유 자생식물을 탐색한 결과, 특히 복분자(*Rubus Coreanus*) 및 오디(*Morus alba*)가 뛰어난 항바이러스 활성을 가짐을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0018] 이에 본 발명의 바람직한 일 구현예는 복분자 및 오디로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스(calicivirus) 또는 오소믹소바이러스(orthomyxovirus)에 대한 항바이러스 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 항바이러스 조성물은 척추동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류에 투여되는 의약 조성물의 형태이거나 식품 조성물, 식기, 주방용품, 생활용품, 기타 각종 물건의 세척제, 소독제, 통상의 항바이러스제 등 통상적으로 알려진 모든 형태로의 적용이 가능하다.

[0020] 본 발명의 다른 바람직한 일 구현 예는 복분자 및 오디로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 바람직한 일 구현 예는 복분자 및 오디로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0022] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0023] 천연물 소재

- [0024] 우리나라는 식물상이 다양해서 각종 자생식물의 보고이며, 한의학을 중심으로 일찍부터 수백 년간 경험이 축적되어 있기 때문에, 어느 나라보다 천연 식품소재를 개발하는데 필요한 정보와 자원이 상존하는 매우 유리한 위치에 있다. 그러나 국내에는 아직 활성기반 항바이러스 스크리닝이 완결되지 않은 자생식물이 많다. 특히 복분자, 오디와 같은 국내 고유식물은 최근 매우 유용한 가치가 발견되고 있을 뿐만 아니라, 바이러스 질환 스크리닝이 아직까지 활발하게 연구되지 않은 불모의 자생식물이다. 항바이러스 활성을 갖는 복분자 및 오디 부산물 혹은 즙에서 분리 동정될 화합물은 다국적 제약회사에서 큰 관심을 갖게 될 고부가가치 소재가 될 것이다.
- [0025] 특히 사회적으로 급속한 노령화에 따른 노인인구와 식생활 변화에 따른 만성질환 환자의 증가로 인하여, 천연식품 소재에 대한 수요가 폭발적으로 성장할 것으로 예상된다. 이는 자연상태에서 얻어지는 천연물 소재가 화합물 소재에 비하여 부작용이 상대적으로 적기 때문이다. 노로바이러스 및 인플루엔자 바이러스 감염에 따른 사망률이 노년층과 면역저하 환자의 경우에는 매우 높은 것으로 알려져 있다. 복분자 및 오디의 부산물 혹은 착즙물을 이용한 항노로 혹은 항인플루엔자 바이러스 천연물 소재를 단체급식시설 등에서 직접 활용이 가능하도록 하거나 노년층 및 면역저하 환자를 위한 제어소재로 실용화 된다면 산업적인 활용도가 매우 높을 것으로 판단된다.
- [0026] 복분자와 오디
- [0027] 장미과에 속하는 복분자(*Rubus coreanus*)는 우리나라의 제주도 및 남부지역이 주요산지로 초여름에 검붉은 열매를 수확하여 식용하며, 한방에서는 강장제 등으로 이용한다 (The oriental medicine dictionary, 2001). 복분자에는 다양한 폴리페놀 화합물이 함유되어 있어 항산화 활성, 심혈관 질환 예방, 불안 및 우울증 예방과 치료, 비노기능 강화, 당뇨 합병증, 항헬리코박터 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 복분자 열매에는 케세틴(quercetin) 및 다양한 페놀산 (phenolic acids)과 안토시아닌 색소인 시아니딘-3-글루코시드 (cyanidin-3-glucoside, C3G)와 시아니딘-3-람노글루코시드 (cyanidin-3-rhamnoglucoside)가 함유되어 있다 (Korean J. Pharmacogn. 1996). 복분자 열매는 생과로 이용되기도 하지만, 대부분은 주스로 착즙하거나 술의 원료로 사용한다. 복분자 씨를 이용한 주스와 건강보조제가 생산되고 있으나 (제이크린베리너), 이를 항바이러스 소재로 활용하기 위한 연구는 거의 전무한 실정이다.
- [0028] 최근 연구 보고에서 복분자의 항산화 작용, 항암 효과, 병원성 대장균 및 살모넬라 등에 대한 항박테리아 작용 등이 밝혀졌으며, 단순포진 바이러스 타입 1(herpes simplex virus type 1), B형 간염 바이러스(hepatitis B virus)에 대한 항바이러스 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다(Phytother Res. 2001).
- [0029] 오디는 뽕나무(*Morus alba*)의 열매로서, 시아니딘-3-글루코시드, 루틴(rutin) 등의 색소가 다량 함유되어 있으며 항산화활성에 관여하는 라스베라트롤(resveratrol) 등의 생리활성 물질을 포함하고 있고(Korean J. Crop Sci. 2011), 쥘, 발효액, 식초, 술 및 화장품의 원료로 이용되며 그 생산량이 매년 증가하고 있다.
- [0030] 이제까지 다양한 폴리페놀 화합물이 함유된 식물 추출물의 항바이러스 작용이 제시되었지만, 특이한 점은 분리된 단일 폴리페놀 화합물에서는 항바이러스 작용이 나타나지 않은 반면, 다양한 페놀 화합물을 함유하는 식물 추출물에서 효과가 높게 나타났다는 점이다. 이는 각 페놀 화합물의 시너지효과에 의하여 항바이러스 작용이 나타나고 있는 것으로 예측되고 있다(J. Med. Plants Res. 2009).
- [0031] 한편, 항바이러스 천연물 소재는 바람직하게는 식물성 소재의 즙과 부산물을 주원료로 할 수 있다. 이와 관련하여 복분자나 오디는 착즙 및 술 제조 후 버려지는 부산물(씨, 껍질 등의 찌꺼기)의 양이 매우 많은데, 부산물에서는 씨가 가장 많은 부분을 차지한다. 복분자 열매에서 씨는 약 14%를 차지하며, 복분자 또는 오디의 주스 및 술 소비가 지속적으로 증가하는 점을 감안하면, 착즙 및 술 생산 후 버려지는 부산물의 양 또한 증가하고 있음을 알 수 있다. 따라서 원료 획득이 용이하며 매우 경제적이란 장점이 있다.
- [0032] 본 발명에서는 복분자 (*Rubus coreanus*) 및 오디(*Morus alba*), 특히 이들의 부산물 혹은 즙이 칼리시바이러스과(caliciviridae), 노로바이러스(norovirus) 및 고양이 칼리시바이러스(feline calicivirus), 그리고 오소믹소바이러스과(orthomyxoviridae)에 속하는 인플루엔자 바이러스에 대해 우수한 항바이러스 활성을 가짐을 최초로 밝혔다.
- [0033] 이에 본 발명의 바람직한 일 구현 예는 복분자 및 오디로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스에 대한 항바이러스 조성물, 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 및 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 명세서에서, ‘치료’는 증상의 경감 또는 개선, 질환 범위의 감소, 질환 진행의 지연 또는 완화, 질환 상태

의 개선, 경감 또는 안정화, 부분적 또는 완전한 회복, 생존의 연장 기타 다른 이로인 치료 결과 등을 모두 포함하는 의미로 사용된다.

- [0035] 복분자 및 오디는 바람직하게는 이들의 과실, 껍질 및 씨로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로부터 얻어진 착즙물 또는 추출물의 형태로 포함될 수 있다.
- [0036] 복분자 및 오디의 착즙물은, 바람직하게는 이들의 과실을 예컨대 착즙기 등의 기계를 사용하거나 또는 손으로 물리적인 힘을 가하여 짜낸 즙일 수 있다.
- [0037] 또한 복분자 및 오디의 추출물은 바람직하게는 이들의 과실 또는 부산물을 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출, 또는 환류냉각 추출 등 통상의 천연 추출물의 제조방법에 사용되는 다양한 방법을 사용하여 추출한 것일 수 있으며, 바람직하게는 초음파 추출물, 용매 추출물 또는 열수 추출물일 수 있고, 보다 바람직하게는 열수 추출물일 수 있다.
- [0038] 초음파 추출을 할 경우 바람직하게는 30 내지 70kHz로 10℃ 내지 35℃에서 15 내지 35분간 이루어질 수 있다. 상기 범위에 미달할 경우 폴리페놀 성분 등 유용한 기능성 성분의 추출량이 충분치 못한 문제가 있으며, 상기 범위를 초과할 경우 바람직한 유효성분 추출량의 증대 효과는 미미한 반면 제조비용이 증가하여 바람직하지 않다.
- [0039] 용매 추출은 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 (예: 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등), 아세트산 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 용매를 사용하여 이루어질 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올 수용액, 바람직하게는 65~75%(v/v)의 에탄올을 사용함으로써 폴리페놀 등의 성분을 보다 다량으로 추출할 수 있다.
- [0040] 복분자 및 오디의 부산물로부터 얻어진 추출물일 경우, 바람직하게는 상기 부산물 즉, 씨나 껍질에 물리적인 힘을 가하여 분말 형태로 제조한 후에 추출 단계를 거쳐 얻어진 것일 수 있다.
- [0041] 상기 복분자 및/또는 오디의 착즙물 또는 추출물은 추가로 여과, 열처리, 농축 및/또는 동결건조 공정 등을 더욱 수행하여 제조할 수 있다. 상기 여과과정을 수행함으로써 추출액 등에 남아 있는 잔사 등을 제거할 수 있으며, 상기 열처리를 수행하여 효소를 파괴시킴으로써 즙을 안정화 시킬 수 있으며, 상기 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 수분을 제거할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 구현 예에 따른 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스에 대한 항바이러스 조성물은 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스의 증식과 복제를 저해함으로써 항바이러스 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [0043] 칼리시바이러스는 바람직하게는 노로바이러스(norovirus) 또는 고양이 칼리시바이러스(feline calicivirus)이며, 오소믹소바이러스는 바람직하게는 조류인플루엔자 또는 인체인플루엔자 등의 다양한 인플루엔자 바이러스일 수 있다.
- [0044] 노로바이러스는 분류학상 칼리시바이러스과(Caliciviridae)에 속하며 단일가닥의 RNA를 갖는 소형구형 바이러스(small round structured virus, SRSV)로 불리기도 하다가 최근 노로바이러스로 공식 명명된 식중독 바이러스이다. 노로바이러스와 함께 칼리시바이러스과에 속하는 고양이 칼리시바이러스(feline calicivirus)도 단일가닥의 RNA를 지니고 있으며 유전학적, 생화학적, 물리화화적인 특성이 노로바이러스와 유사하여 노로바이러스의 대체 모델로 이용되고 있다. 노로바이러스의 경우 인체세포 감염 후, 급성 위장염을 일으키는 병원체로서 현재까지 이에 대한 효과적인 치료제나 백신이 개발되어 있지 않은 실정이다.
- [0045] 인플루엔자 바이러스는 8개의 네거티브 스트랜드(negative strand) RNA 단편(segment)으로 이루어져 있으며, 각각의 RNA 단편은 하나 혹은 두 개의 단백질 유전자를 포함하고 있다. 인플루엔자 바이러스는 돌연변이율(mutation rate)이 높아 진화속도가 매우 빠르다. 특히 바이러스 표면 당단백질인 헤마글루티닌(hemmagglutinin)은 숙주세포의 면역시스템에 의한 선택압(selection pressure)을 받아 다른 바이러스 단백질에 비하여 바이러스 진화가 높으며, 주요 항원인식 에피토프(epitope) 제공 단백질로 역할이 매우 중요하다.
- [0046] 본 발명의 일 구현 예에 따른 항바이러스 조성물은 후술할 실시예 3 및 도 3a-3d에서 확인할 수 있듯이, 상기 복분자 및/또는 오디의 착즙물 또는 추출물을 바이러스의 감염 이전(pre-treatment)이나 동시에 처리한 경우(co-treatment)에 높은 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타나, 바이러스의 세포 부착 혹은 내부 이행(internalization) 단계를 억제함으로써 바이러스의 증식과 복제를 저해하는 특징이 있음을 확인할 수 있었다.
- [0047] 본 발명 조성물의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성은 동시에 처리한 경우(co-treatment)에 복분자

및/또는 오디의 착즙물 또는 추출물의 농도에 따른 증가를 보여(도 6-9), 이들 바이러스에 대한 저해활성은 각각 다른 양상을 보임을 알 수 있다. 또한 다양한 종류의 인플루엔자 바이러스(H1N1, H3N2, 2009pdm H1N1, 및 influenza B 아형)에 대해서 처리한 경우에도 높은 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타나 인플루엔자 바이러스의 종류를 불문하고 폭넓은 항바이러스 활성을 가짐을 확인할 수 있다.

- [0048] 오디의 경우 부산물의 추출물에 비해 즙이 총 페놀 함량이 더욱 높았고, 복분자의 경우 이와 달리, 복분자 부산물의 물 및 에탄올추출물이 복분자 즙에 비해서 총페놀 함량이 많음을 알 수 있었다(실시예 2). 복분자의 항바이러스 활성은 씨 에탄올추출물, 씨 메탄올추출물, 씨 물 추출물, 착즙물의 순으로 나타나, 특히 항인플루엔자 활성은 시료의 총페놀 함량 또는 함유된 페놀화합물의 종류 또는 페놀화합물의 시너지 효과(synergistic effect) 등에 관계 있는 것으로 보인다.
- [0049] 상기 항바이러스 조성물은 상기 조성물이 적용되는 분야에서 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제 등을 더욱 포함하여 척추동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류에 투여되는 의약 조성물의 형태 또는, 식기, 주방용품, 생활용품, 기타 각종 물건의 세척제, 소독제, 통상의 항바이러스제 등 통상적으로 알려진 모든 형태로 제조될 수 있으며, 이 경우 조성물 총 중량에 대하여 상기 복분자 및 오디로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 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.
- [0050] 칼리시바이러스 감염 질환은 바람직하게는 노로바이러스에 의한 식중독 또는 장염일 수 있으며, 또한 고양이 칼리시바이러스에 의한 고양이과 동물의 호흡기 질환일 수 있다. 오소믹소바이러스 감염 질환은 바람직하게는 인플루엔자바이러스에 의한 소화기 또는 호흡기 질환일 수 있으며, 조류를 포함한 동물의 경우 소화기 및/또는 호흡기 질환일 수 있고, 인간의 경우 호흡기 질환일 수 있다. 따라서 본 발명의 항바이러스 조성물은 바람직하게는 이와 같은 질환을 예방 또는 치료하기 위한 것일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 구현 예에 따른 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 복분자 및 오디로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 바람직하게는 이들의 착즙물 또는 추출물을 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.
- [0052] 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.
- [0053] 상기 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분인 상기 복분자 및/또는 오디의 착즙물 또는 추출물 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 복분자 및 오디로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 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.
- [0054] 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.
- [0055] 본 발명의 바람직한 다른 일 구현 예에 따라, 복분자 또는 오디의 과실, 껍질 및 씨로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로부터 얻어진 착즙물 또는 추출물을 포함하는, 식중독 또는 인플루엔자 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물이 제공된다.
- [0056] 상기 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스 감염 질환은 바람직하게는 노로바이러스 혹은 오소믹소바이러스 감염 질환일 수 있으며, 이에 대해서는 상술한 바와 같다.
- [0057] 보다 바람직하게는 노로바이러스 감염으로 인한 식중독 혹은 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 호흡기 질환일 수 있으며, 두 질환 모두 바이러스에 의해 초래되기 때문에 박테리아성 질환과 같은 2차 감염 문제가 아니라면 항생제는 효과가 없다. 이에 본 발명자들이 상기 복분자 및/또는 오디의 착즙물 또는 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 식품 조성물을 제공함으로써 감염을 효과적으로 방지할 수 있다. 상기 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0058] 본 명세서에서 식품이라 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.

[0059] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 복분자 및/또는 오디의 착즙물 또는 추출물을 유효성분으로 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. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0060] 노로바이러스 혹은 인플루엔자 바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선의 효과를 목적으로 하는 본 발명의 일 구현 예에 따른 식품 조성물에 있어서, 상기 복분자 및/또는 오디의 착즙물 또는 추출물의 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 0.01~100 중량%, 보다 바람직하게는 1~10 중량%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

[0061] 본 발명의 복분자 및 오디 성분을 포함하는 조성물은 칼리시바이러스 또는 오소믹소바이러스의 증식 및 복제를 저해하는 활성이 매우 우수하므로, 노로바이러스, 고양이 칼리시바이러스 및 조류인플루엔자를 비롯한 인플루엔자 바이러스에 효과적인 치료제로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 천연식물인 복분자 부산물 혹은 즙 및 오디 부산물 혹은 즙 등을 이용하는 것이므로 재활용성 및 안전성이 인정된다는 점에서 본 발명의 조성물을 포함하는 식품을 제공시 노로바이러스로 인한 식중독이나 조류인플루엔자이나 인플루엔자 질환을 감소시킬 수 있어 사회경제적으로 매우 의미 있는 개발이 될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 실시예 1에서 제조된 시료(복분자 및 오디의 부산물 및 즙)의 항바이러스 활성(바이러스 용균반 형성 저해 활성) 측정 스킴(scheme)을 나타낸 것이다. 구체적으로 각 시료(inhibitor)를 각각 세포 혹은 바이러스와 감염 전 미리 배양(incubation) 하였을 때 (pre-cell(A)/virus(B) treatment), 시료와 바이러스를 동시에 세포에 감염시켰을 때 ((C)co-treatment), 바이러스의 세포 감염 1시간 이후 시료를 첨가하였을 때 ((D)post-treatment)의 대략적인 실험 scheme이다.

도 2a는 실시예 1에서 제조된 복분자 부산물 및 오디 부산물이 RAW 264.7 세포(위), CRFK 세포(중간), MDCK 세포(아래)에 미치는 세포독성 실험결과를 나타낸 것이다(0.0625-1% 농도에서 1시간 동안 측정).

도 2b는 실시예 1에서 제조된 오디즙이 RAW 264.7 세포(위), CRFK 세포(중간), MDCK 세포(아래)에 미치는 세포독성 실험결과를 나타낸 것이다(각각 0.0002-0.1%, 0.3-10%, 및 0.25-4% 농도에서 1시간 동안 측정).

도 2c는 실시예 1에서 제조된 복분자 즙이 RAW 264.7 세포(위), CRFK 세포(아래)에 미치는 세포독성 실험결과를 나타낸 것이다(각각 0.75-6% 및 1-10% 농도에서 1시간 동안 측정).

도 3a 및 3b는 각각 실시예 1에서 제조된 복분자 부산물인 씨 에탄올 추출물(A)과 오디 부산물인 씨 에탄올 추출물의 MNV-1(위)와 FCV-F9(아래)에 대한 항바이러스 활성을 MOI 값 0.001에서 용균반 감소(plaque reduction) 활성으로 나타낸 것이다.

도 3c는 실시예 1에서 제조된 오디 즙의 칼리시바이러스 MNV(위)와 FCV-F9(아래)에 대한 항바이러스 활성을 각각 비교 분석하여 용균반 감소 활성으로 나타낸 것이다. (MNV의 MOI 값 0.001, FCV-F9의 MOI 값 0.001 및 0.01)

도 3d는 실시예 1에서 제조된 복분자 즙의 칼리시바이러스 MNV(위)와 FCV-F9(아래)에 대한 항바이러스 활성을 각각 비교 분석하여 용균반 감소 활성으로 나타낸 것이다. (MNV의 MOI 값 0.001 및 0.001, FCV-F9의 MOI 값 0.0001, 0.001 및 0.01)

도 4는 실시예 1에서 제조된 각 시료의 다양한 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 세포병변 억제(CPE reduction) 활성으로 정량적으로 나타낸 결과이다((a) 복분자 부산물인 씨의 메탄올 추출물, (b) 복분자 부산물인 씨의 물 추출물, (c) 오디 즙; MDCK+IV는 MDCK에 인플루엔자 바이러스를 감염시킨, 시료 무첨가군).

도 5는 실시예 1에서 제조된 복분자 부산물인 씨 추출물의 2종의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 세포병변 억제 활성 정도의 현미경 사진으로 나타낸 것이다((A) 계절변이주 인플루엔자 바이러스에 대한 복분자 씨의 물 추출물 (위) 및 메탄올 추출물(아래)의 세포병변 억제활성, (B) 2009pdm 인플루엔자 바이러스에 대한 복분자 씨의 물 추출물 (위) 및 메탄올 추출물 (아래)의 세포병변 억제활성).

도 6은 실시예 1에서 제조된 오디 즙의 다양한 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인하기 위하여 (A) 바이러스에 오디 즙을 전 처리하였을 때, (B) 오디 즙과 바이러스를 동시에 세포에 감염시켰을 때 (co-treatment), (C) 바이러스 감염시킨 후에 오디즙을 처리하였을 때 각 변이주에서 용균반 형성 저해 활성을 정량적으로 나타낸 결과이다.

도 7은 실시예 1에서 제조된 복분자 즙의 다양한 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인하기 위하여 (A) 바이러스에 복분자 즙을 전 처리하였을 때, (B) 복분자 즙과 바이러스를 동시에 세포에 감염시켰을 때 (co-treatment), (C) 바이러스 감염시킨 후에 복분자 즙을 처리하였을 때 각 변이주에서 용균반 형성 저해 활성을 정량적으로 나타낸 결과이다.

도 8은 실시예 1에서 제조된 복분자 부산물인 씨 추출물의 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인하기 위하여, 복분자 부산물인 씨 추출물과 바이러스를 동시에 세포에 감염시켰을 때 (co-treatment) 각 변이주에서 용균반 형성 저해 활성을 정량적으로 나타낸 결과이다((A) 70%(v/v) 에탄올추출물, (B) 물추출물).

도 9는 실시예 1에서 제조된 복분자 부산물인 씨 추출물의 항바이러스 활성에 따른 (A) 인플루엔자 바이러스 계절변이주, 및 (B) 2009pdm 인플루엔자 바이러스에 대한 용균반형성 저해 결과 그래프와 사진을 나타낸 것이다. 씨 추출물과 바이러스를 동시에 세포에 감염시킨 결과 (co-treatment)이며, 각 변이주에서 70%(v/v) 메탄올 추출물 (왼쪽), 및 물 추출물(오른쪽)의 효과를 나타낸 것이다.

도 10은 실시예 1에서 제조된 오디 부산물인 씨 추출물의 항바이러스활성에 따른 다른 인플루엔자 바이러스 계절변이주(sH1N1) 및 2009pdm 인플루엔자 바이러스(pH1N1)에 대한 용균반형성 저해 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 바이러스와 씨 추출물을 감염 전에 미리 배양 (incubation)하였을 때의 결과 (pre-virus treatment)이며, 각 변이주에서 70%(v/v) 에탄올 추출물의 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0064] 실시예 1. 복분자 및 오디의 씨 추출물 및 과실즙 제조

[0065] 복분자 및 오디는 7~8월에 수확한 것으로 선운산농협(고창군 전라북도)에서 구입하여 본 실시예에서 사용하였다.

[0066] 1-1. 복분자 및 오디의 부산물(씨 추출물) 제조

[0067] 복분자 및 오디 각각의 씨를 선별하고 이를 살수 세척하여 동결건조한 후 균질기 (homogenizer)로 분쇄 (grinding) 하였다. 갈아놓은 파우더(powder) 형태의 씨 분말을 mesh (1 mm pore size)를 이용하여 선별하고 선별된 씨 분말 1g을 70%(v/v) 메탄올 10ml, 70%(v/v) 에탄올 10ml, 및 물 10ml와 각각 혼합하여 초음파 (ultrasonic sound)(Powersonic 420, 화신기기, 한국)를 이용하여 20℃에서 약 50kHz로 20분간 추출한 다음, 약 10,000rpm에서 4℃로 60분 원심분리를 수행한 후, 상등액을 모았다. 상등액은 약 40℃로 진공농축기 (rotary evaporator)(Eyela, N-N series, Japan)를 이용하여 용매를 제거한 다음 동결건조하여 복분자 및 오디 각각의 부산물(복분자 씨 에탄올 추출물, 복분자 씨 메탄올 추출물, 복분자 씨 물 추출물, 오디 씨 에탄올 추출물)을 제조하였다.

[0068] **1-2. 복분자 및 오디의 착즙물(즙) 제조**

[0069] 복분자 및 오디 각각의 생과를 세척하여 거즈에 싼 후, 100% 과즙을 착즙하고 63℃에서 30분간 처리하여 효소 활성을 제거하고 미생물을 파괴하였다. 이후 약 15,000rpm에서 4℃로 30분 원심분리를 수행한 후, 상등액을 모아 즙을 제조하였다.

[0070] 계속해서 복분자 부산물 혹은 즙 및 오디 부산물과 즙 각각의 칼리시바이러스 (뮤린노로바이러스, 고양이 칼리시바이러스), 인플루엔자바이러스에 대한 항바이러스 활성을 평가하기 위한 시료로서, 상기 제조된 복분자 및 오디 각각의 부산물 및 즙을 0.2 μm syringe filter로 여과한 후 분주하여 초저온 냉동고에 보관하며 사용하였다.

[0071] **실시예 2. 복분자 부산물 혹은 즙 및 오디 부산물과 즙의 총 폴리페놀 함량 측정**

[0072] 상기 실시예 1에서 제조된 복분자 및 오디의 부산물과 즙의 총 폴리페놀 화합물 함량을 Folin-Ciocalteu 방법으로 평가하였다.

[0073] 즉, 실시예 1에서 제조된 각 시료 5μl에 증류수 75μl, Folin-Ciocalteu's reagent (Sigma) 5μl 을 첨가한 후 상온에서 1분간 유지한 다음 20%(w/v) Na₂CO₃ 5μl을 넣고 실온에 2시간 방치한 후 분광광도계 (SpectraMax M2, Molecular Devices Corp. USA)로 765 nm 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 갈산 (Gallic acid)을 이용하여 표준곡선을 작성한 다음 폴리페놀 화합물의 함량을 계산하였으며 (J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2003, 32, 338-345; Korean J. Food Sci. Technol 2011, 43, 341-347), 계산된 폴리페놀 화합물 함량값은 각각 gallic acid equivalents (GAEs) 복분자 부산물 에탄올추출물 1.70±0.09mg/ml, 복분자 부산물 물추출물 2.39±0.02mg/ml, 오디 부산물 에탄올추출물 0.30±0.00mg/ml, 복분자 즙 0.64±0.01mg/ml, 오디 즙 2.54±0.15mg/ml 였다.

[0074] **실시예 3. 항바이러스 활성 평가**

[0075] **3-1. 바이러스의 배양**

[0076] 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 활성을 평가하기 위해, 인체 노로바이러스의 대체물로서 뮤린 노로바이러스 인 MNV-1(서강대학교) 및 FCV-F9(ATCC, Manassas, VA, USA)를 각각 사용하였다. 각 바이러스에 대한 숙주세포로는 뮤린 노로바이러스의 경우 RAW 264.7 세포주(ATCC, Manassas, VA, USA), FCV의 경우 CRFK 세포주(ATCC, Manassas, VA, USA)를 사용하였으며 상기 숙주세포들은 각각 100x Antibiotic-Antimycotic(Gilbo, Grand Island, NY), 10%(v/v) 우태아혈청(fetal bovine serum (FBS), Hyclone Lab, Logan, Utah)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) (Gibco, Grand Island, NY) 를 기본 배지로 하여 37℃, 5% CO₂배양기(incubator)에서 24-72 시간 간격으로 계대 배양하였다.

[0077] 또한 오소믹소바이러스, 특히 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 평가하기 위해, MDCK(Madin-Darby canine kidney) 세포 (ATCC, Manassas, VA, USA)를 숙주세포로 사용하여 1x antibody(Gilbo, Grand Island, NY), 10%(v/v) 우태아혈청(fetal bovine serum (FBS), Hyclone Lab, Logan, Utah)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(Gibco, MD)을 배지로 하여 5% CO₂ 배양기에서 37℃로 배양하였다.

[0078] 이후 RAW 264.7, CRFK, 및 MDCK 세포를 조직 배양 플레이트(tissue culture plate)에 각각 2.0x10⁶ cell/ml, 2.0x10⁵ cell/ml로 분주하여 24 시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 배양하고, MNV-1 5.0x10⁵ PFU/ml, FCV-F9 2x10⁶ PFU/ml, 및 인플루엔자 바이러스 2x10⁶ PFU/ml를 실험 MOI(multiplicity of infection) (접종바이러스양/세포수)에 맞게 희석하여 접종시킨 후, 37℃, 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 1시간 동안 배양하여 각 바이러스를 감염시켰다.

[0079] 인플루엔자 바이러스는 국립보건원에서 분양 받은 A/Brisbane/59/2007 (sH1N1), A/Korea/01/2009 (pdmH1N1),

A/Brisbane/10/2007 (H3N2), 및 B/Florida/4/2006의 4종의 strain을 본 실험에 사용하였다.(본 실험방법과 관련하여서는 Su X and D' Souza DH. Grape seed extract for control of human enteric viruses. Appl Environ Microbiol 2011; 77:3982-3987. Su X, Sangster MY, and D' Souza DH. Time-dependent effects of pomegranate juice and pomegranate polyphenols on foodborne viral reduction. Foodborne Pathog Dis 2011; 8:1177-1183를 참조함)

3-2. 세포 독성 측정

A. 실험방법

상기 실시예 1에서 제조된 복분자 및 오디의 부산물(70%(v/v) 에탄올 추출물)과 증의 세포 독성 실험은 MTT assay(Applied Microbiology, 2009, 49, 806-808)로 세포 생존율(cell viability)을 측정하는 방법으로 수행하였다. 구체적으로, 96 well에 RAW 264.7, CRFK, MDCK cell을 well 당 각각 1.5×10^6 , 2.0×10^5 , 2.0×10^5 cell/ml로 분주(seeding)하고 24시간 후에 상기 실시예 1의 시료(복분자 및 오디의 부산물 및 증)를 농도별로 첨가하여 1-72시간까지 37℃, 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 배양하였다. MTT를 최종 농도 0.5 mg/ml로 첨가하여 2시간 후에 UV-Vis 분광광도계(spectrophotometer) (SpectraMax M2, Molecular Devices Corp. USA) 570 nm에서 흡광도(absorbance)를 측정(MTT assay)하였다. 세포 생존율은 무첨가군에 대한 상대적인 %로 계산하여 나타내었다.

B. 결과

도 2a에 나타난 바와 같이, 복분자 및 오디의 부산물(씨 추출물)은 0.0625-1% 농도에서 RAW 264.7 세포와 CRFK 세포에 대해 세포독성이 없음을 알 수 있었고, MDCK 세포에 대해서는 복분자 씨 추출물 약 0.1-100ug/ml와 오디 씨 추출물 1-100ug/ml에서 세포독성이 없음을 알 수 있었다.

또한 도 2b에 나타난 바와 같이, 오디 증의 경우 약 0.0002-0.1%(v/v) 에서 RAW 264.7 세포에 대한 독성이 없는 것으로 나타났으며, CRFK 세포에 대해서는 약 0.3-10%(v/v) 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 나타났다. 또한 오디 증은 MDCK 세포에 대해서는 0.25%에서 4%(v/v)에 이르기까지의 농도에서 세포 독성이 없는 것으로 나타나 매우 안전하게 사용 가능함을 확인할 수 있었다.

복분자 증의 경우, 도 2c에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포에 대해 6%(v/v)의 농도에 이르기까지 세포 독성이 없는 것으로 나타났으며, 또한 CRFK 세포에 대해 10%(v/v)의 농도에서도 세포 독성이 없는 것으로 나타나 매우 안전하게 사용 가능함을 확인할 수 있었다.

3-3. 항칼리시바이러스 활성 측정

A. 실험방법

실시예 1에서 제조된 복분자 및 오디 시료를 상기 실시예 3-2에 따라 세포에 독성이 없는 것으로 확인된 농도범위로 측정된 바와 같이 시점을 각각 달리하여 첨가한 후, 부산물의 첨가 시점에 따른 항바이러스 활성을 후보물질이 첨가된 것과 무첨가군의 용균반 차이로 비교 분석하였다(무첨가군의 용균반 형성 정도를 100%로 하여 산정함).

i) 전 처리시(Pre-treatment) 항바이러스 활성 측정 (도 1의 A, B)

천연 식물인 실시예 1의 복분자 및 오디 시료에 각각의 세포(도 1의 A) 또는 바이러스(도 1의 B)를 혼합하여 각각 1시간씩 배양(incubation) 시킨 후, 바이러스 저해 정도를 확인하여, 천연 식물 복분자 혹은 오디의 부산물인 씨 추출물과 증이 바이러스 감염 전의 바이러스 및 세포에 미치는 영향을 확인하였다.

구체적으로 각각의 세포를 24 well에 분주하고(10% FBS를 함유하는 DMEM 배지 well 당 1.5×10^6 의 생존 세포 분주), 실시예 1의 복분자 및 오디 시료를 RAW 264.7 또는 CRFK 세포 또는 바이러스에 각각 첨가 (도 3의 A~D에 제시된 농도로 첨가)하여 1시간 동안 배양한 후 바이러스를 세포에 감염시켜 다시 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 이후 1.5%(w/v) 아가로스(agarose), 5%(v/v) FBS, 그리고 1%(v/v) PS 포함된 DMEM 배지 (Gilbo, Grand

Island, NY) 를 넣고 42시간 동안 37℃ 배양기에서 배양하고 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 용균반을 측정하였다.

ii) 바이러스 감염과 동시에 처리시(Co-treatment) 항바이러스 활성 측정(도 1의 C)

각각의 세포를 상기 i)과 같이 24 well에 분주하여 배양하고, 바이러스와 실시예 1의 복분자 및 오디 시료를 상기 기술된 농도로 동시에 첨가하여 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 이후 1.5%(w/v) 아가로스(agarose), 5%(v/v) FBS, 그리고 1%(v/v) PS 가 포함된 DMEM 배지를 넣고 42시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 후 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 용균반을 측정하였다.

iii) 후 처리시(Post-treatment) 항바이러스 활성 측정(도 1의 D)

세포를 상기 i)과 같이 24 well에 분주하여 배양하고, 바이러스를 감염시킨 후 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 바이러스를 완전히 제거한 후, 실시예 1의 복분자 및 오디 시료를 각 상기 기술된 농도로 첨가한 DMEM 배지를 첨가하여 1시간 동안 37℃에서 배양한 다음 배지를 완전히 제거하였다. 1.5%(w/v) 아가로스(agarose), 5%(v/v) FBS, 그리고 1%(v/v) PS 가 포함된 DMEM 배지를 넣은 후 약 42시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 후, 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 용균반을 측정하였다.

상기 i)~iii)은 정확성을 고려하여 3회 반복 실험하였고 용균반 계수(plaque counting) 결과는 SAS software (version 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA)와 ANOVA로 분석되었으며 Duncan's multiple range test로 결과를 도출해내었다. 결과 자료는 오차 p<0.05의 신뢰도를 갖고 있다.

iv) 용균반 검사(Plaque assay)

세포에 각각 바이러스를 37℃, 5% CO₂배양기에서 한 시간 감염 (infection)시킨 다음 2일간 배양한 후 세포 단층(monolayers)을 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 바이러스 용균반(plaque) 분석을 하였다.

B. 결과

복분자 및 오디 시료를 이용하여, 상술한 방법으로 바이러스 저해 활성을 측정한 결과를 도 3a~3d에 나타냈다.

세포를 이용하여 pre-treatment, co-treatment, post-treatment로 달리 항바이러스 활성을 측정한 결과, 상기 실시예 1에서 제조된 복분자 및 오디 시료의 항바이러스 활성은 전 단계에서 모두 우수하게 나타났으나, 특히 co-treatment시에 상대적으로 더 높은 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 복분자 및 오디 시료는 노로 바이러스의 생활사(life cycle) 중 특히 복제와 증식 기작에 가장 중요한 저해활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한 상기 시료들은 murine 노로바이러스 외에 feline calicivirus (FCV)에 대해서도 항바이러스 활성을 보임으로써, 식중독 대체 바이러스 (surrogate)에 대한 활성을 통해서 식중독 저해소재로서 매우 유용함을 확인할 수 있었다. 한편, 항 뮤린 노로바이러스 활성과 달리, FCV에 대해서는 상기 시료의 저해활성이 pre-FCV의 pre-treatment에서도 높게 나타남을 확인할 수 있었다. 즉, 상기 실시예 1에서 제조된 시료는 FCV와 관련하여 바이러스 입자 또는 세포 수용체(receptors) 결합에 직접 저해 작용을 하는 것으로 나타나, RAW 264.7 세포 및 MNV-1에 대한 저해활성과 다른 양상을 보임을 알 수 있었다.

3-4. 항인플루엔자바이러스 활성 측정

실시예 1에서 제조된 복분자 및 오디 시료의 항인플루엔자바이러스 활성 정도를 평가하기 위하여 세포병변저해 활성(CPE reduction assay)과 용균반 검사(plaque reduction assay) 방법으로 비교하였다(도 4~10).

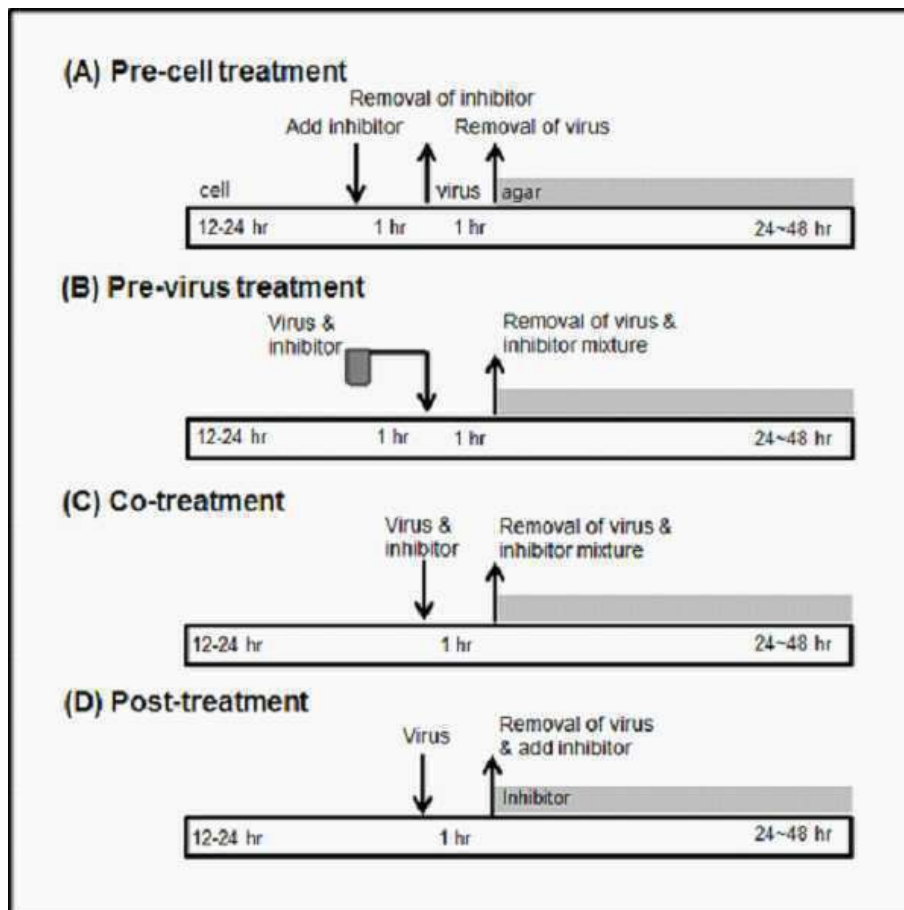
다른 실험방법은 상기 실시예 3의 방법을 따르되, 인플루엔자 바이러스의 세포병변저해활성은 DMEM- 25mM HEPES, 2% BSA 1% PS에 2 ug/ml trypsin을 첨가한 배지를 사용하여 측정하여 도 4 및 도 5에 나타냈으며, 용균반 검사는 1.5%(w/v) 아가로스(agarose), 25 mM HEPES, 2% BSA 1% PS가 포함된 2 x L-15 media에 2 ug/ml trypsin이 첨가된 배지를 넣은 후 약 48~72시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 후, 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛

으로 염색하여 용균반을 측정하여 도 6 내지 도 10에 각각 나타냈다.

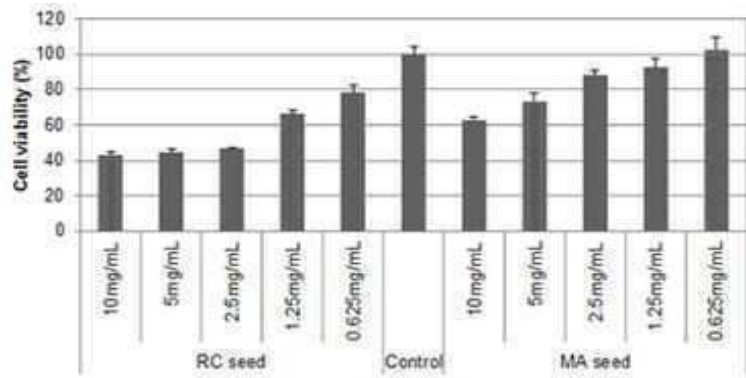
- [0106] 복분자와 오디의 즙 시료는 1-4% 이내의 농도에서, 복분자 부산물인 씨의 70%(v/v) 에탄올추출물은 0.5-50 ug/mL, 70 %(v/v) 메탄올 추출물은 0.001-0.1%(v/v), 물추출물은 0.01-1%(v/v)의 농도에서, 그리고 오디 부산물인 씨의 70%(v/v) 에탄올추출물은 1-100 ug/mL의 농도에서 각각 항 바이러스 실험을 수행하였다.
- [0107] MDCK 세포를 이용한 바이러스 증식 저해와 관련하여 인플루엔자 바이러스 종류 및 추출용매를 각각 달리하여 실험한 결과, 도 4 내지 10에 나타난 바와 같이 인플루엔자 바이러스의 종류와 추출용매 등에 관계없이 일관된 항 바이러스 활성을 보임을 확인할 수 있었다.
- [0108] 이처럼 음료 등의 식품으로 용이하게 섭취 가능한 복분자 및 오디의 항바이러스 활성이 특히 우수함을 알 수 있어 본 발명의 일 실시예에 따른 복분자 부산물 혹은 즙 및 오디 부산물 혹은 즙을 포함하는 식품 조성물은 바이러스로 인한 식중독이나 인플루엔자 질환에 대한 효과적인 기능식품으로 적용 가능할 것으로 기대된다.

도면

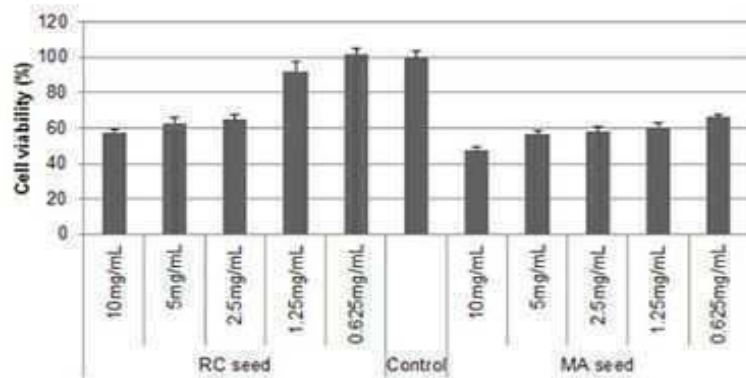
도면1



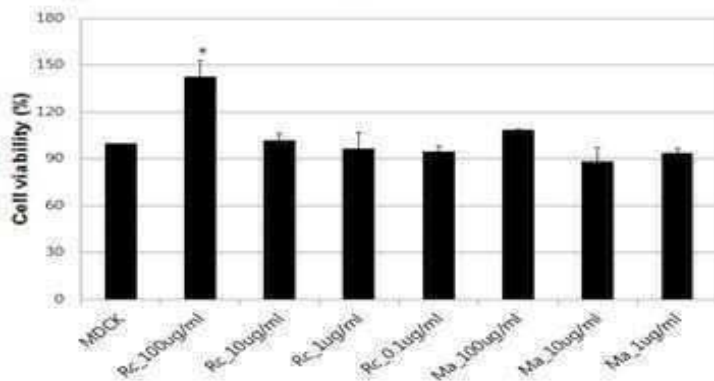
도면2a



RAW 264.7

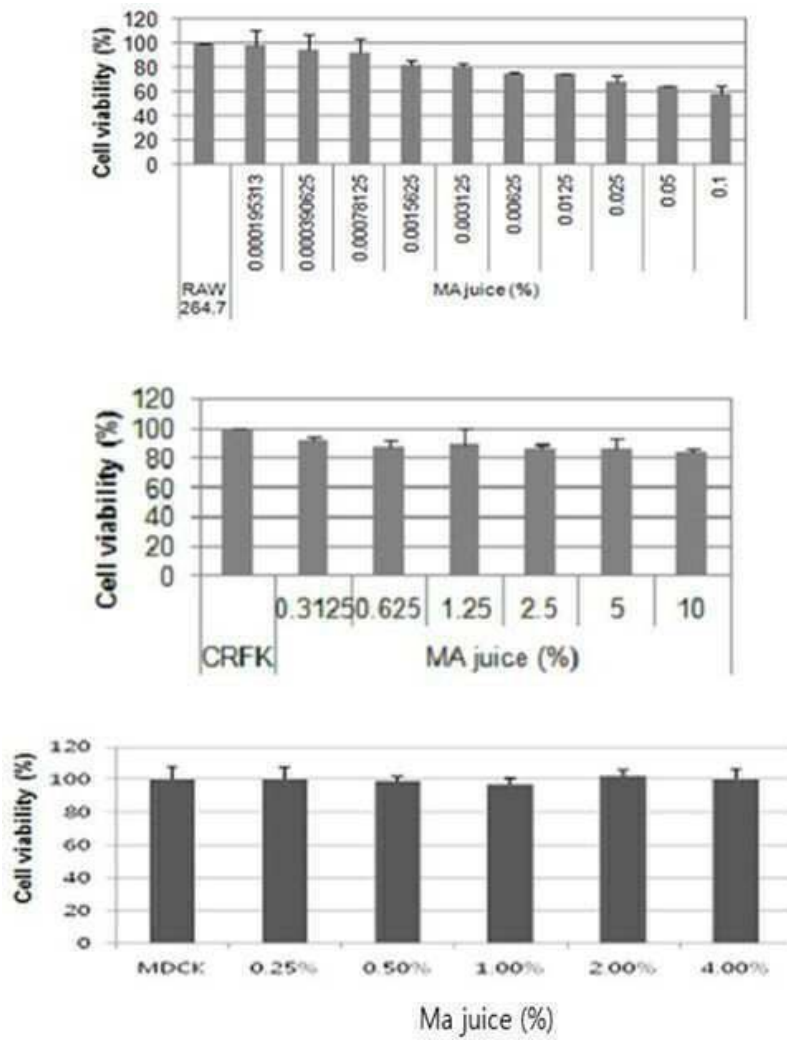


CRFK

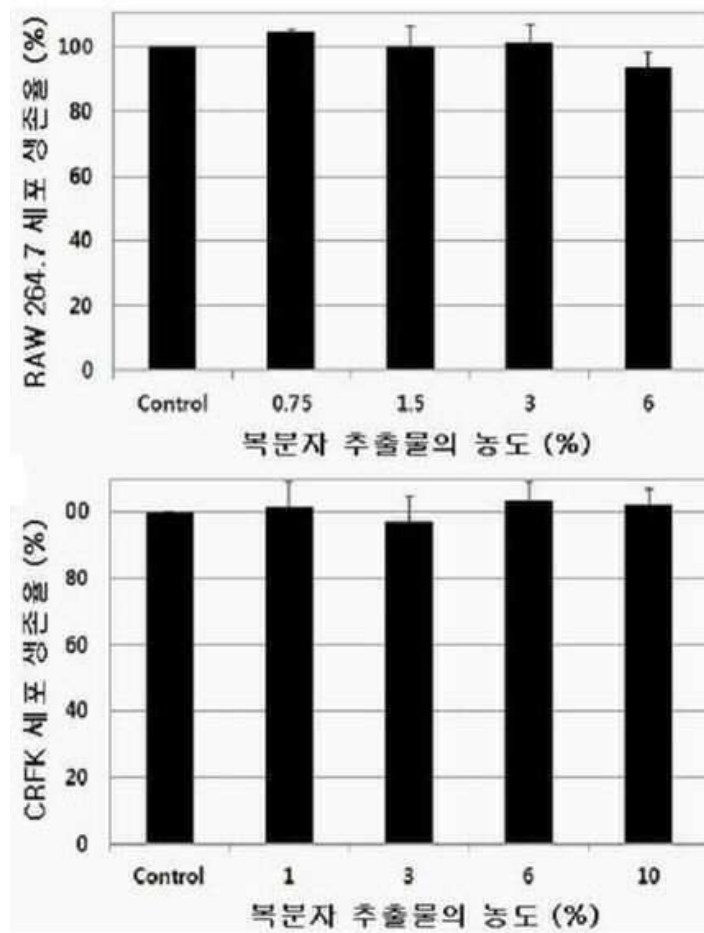


Rc (Rc seed), Ma (Ma seed) on MDCK

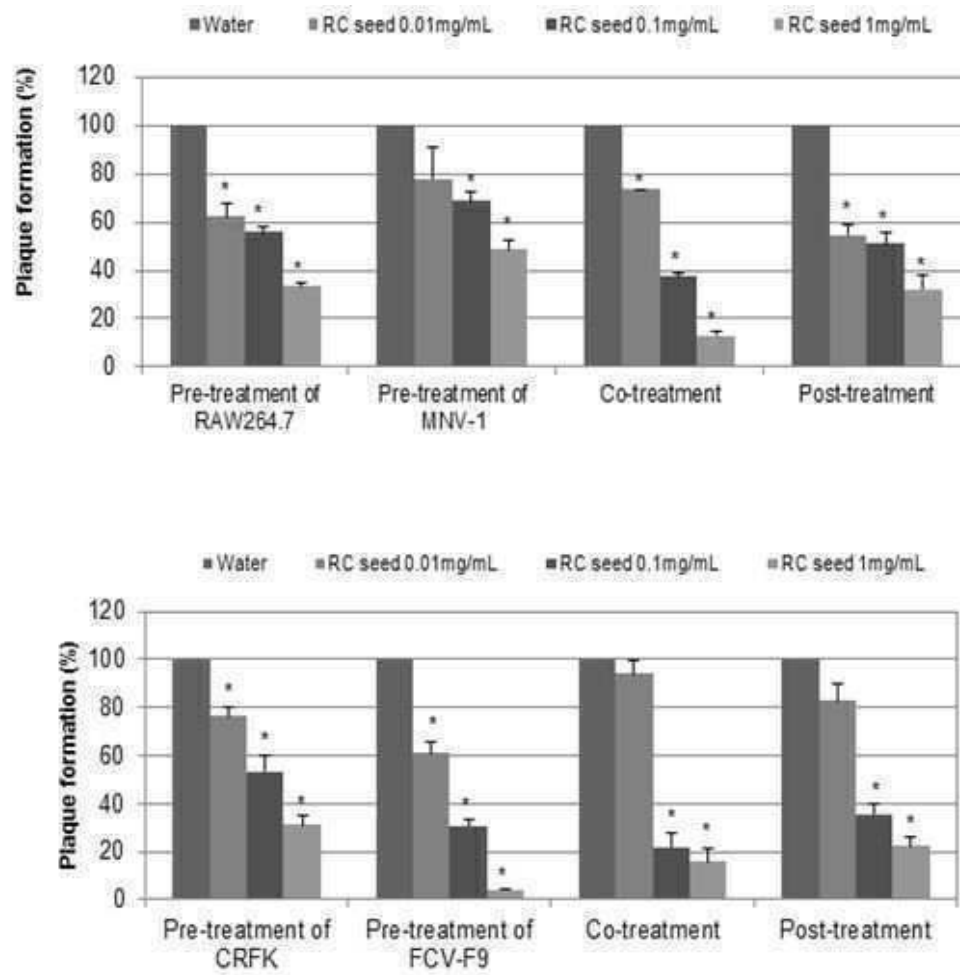
도면2b



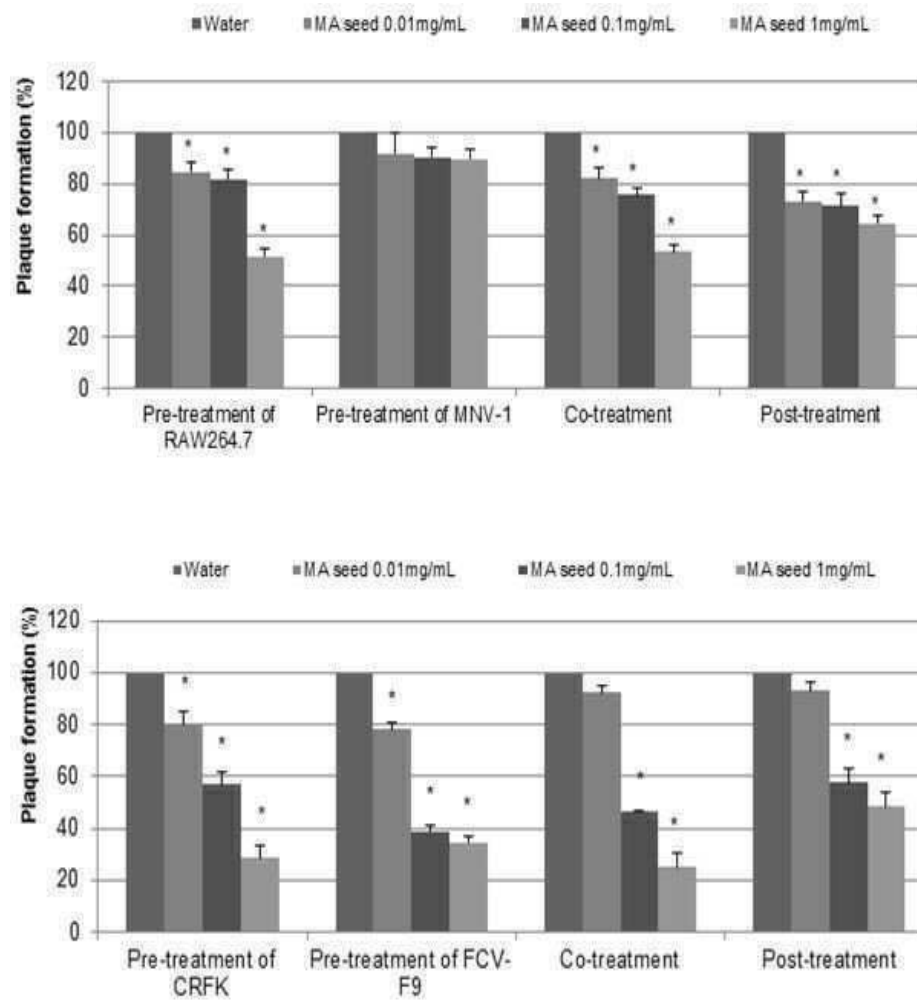
도면2c



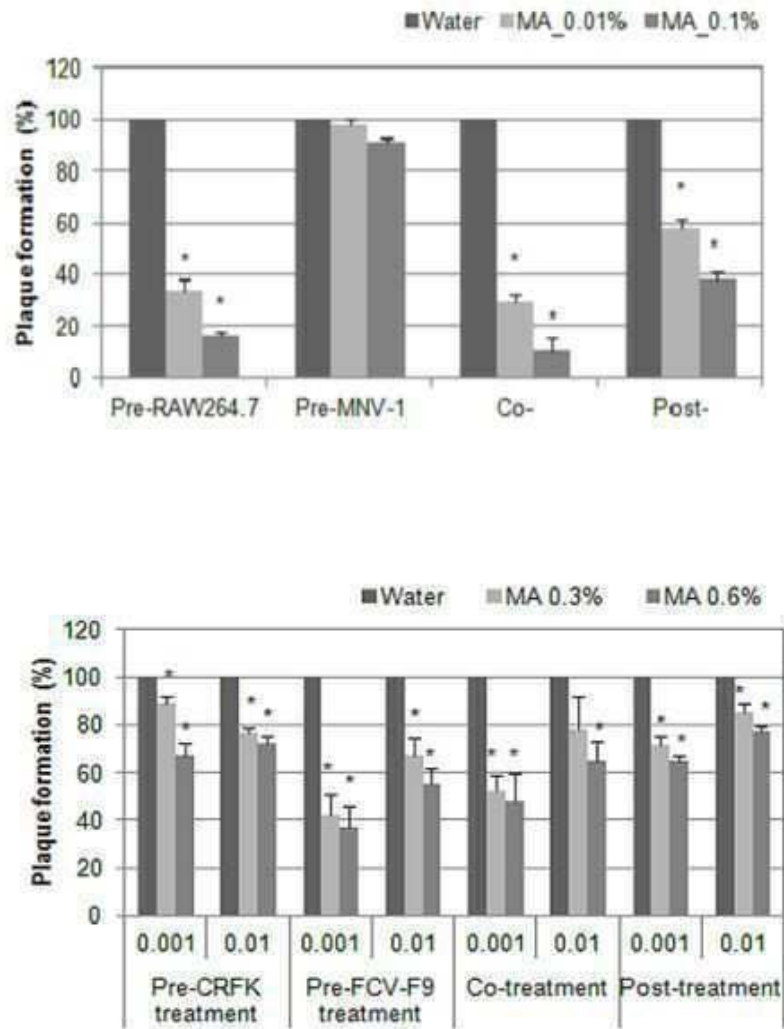
도면3a



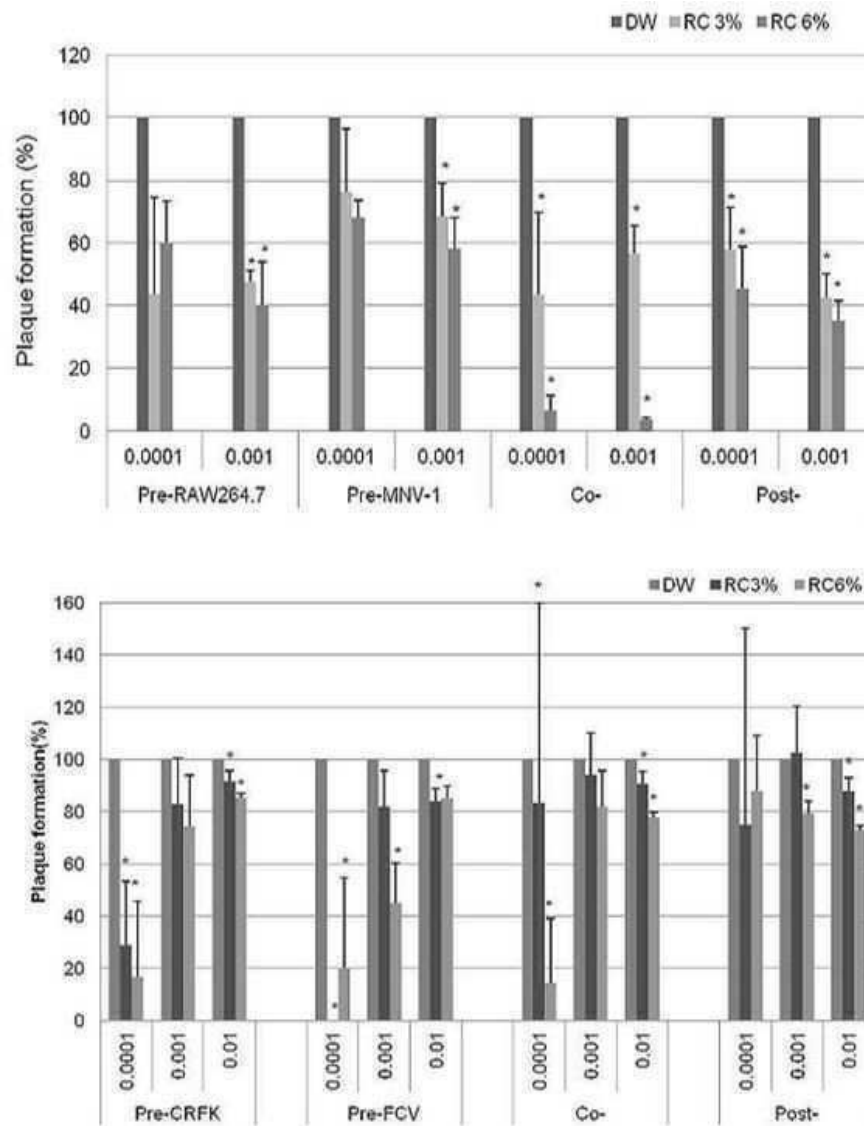
도면3b



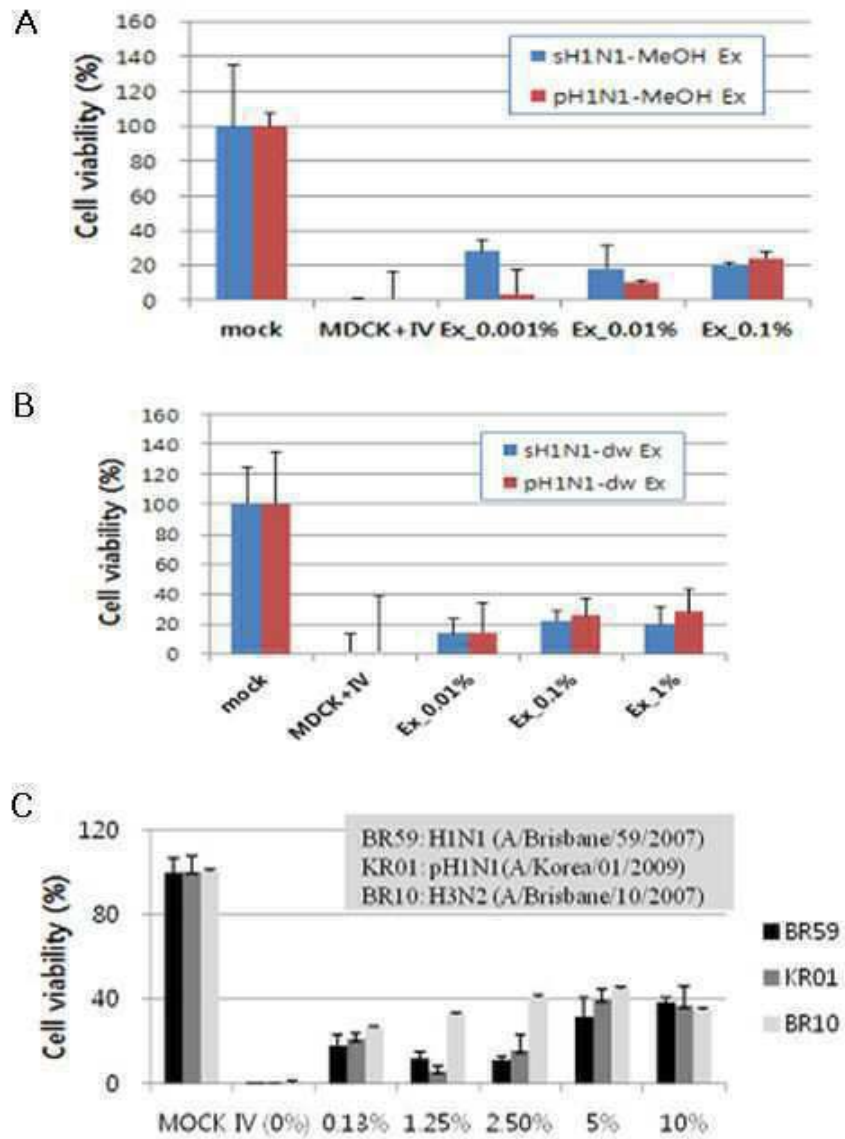
도면3c



도면3d

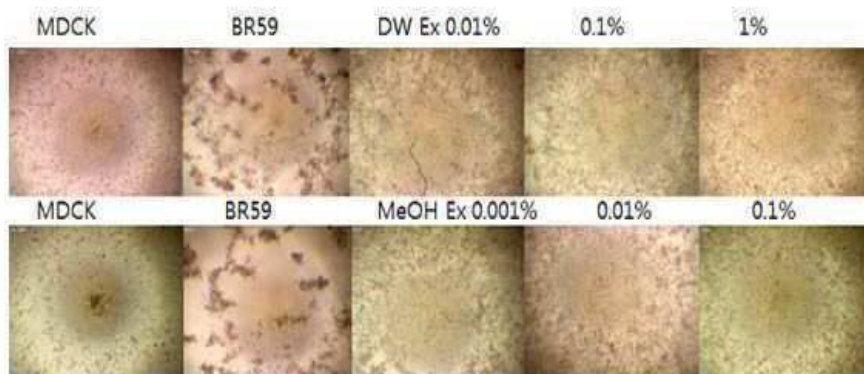


도면4

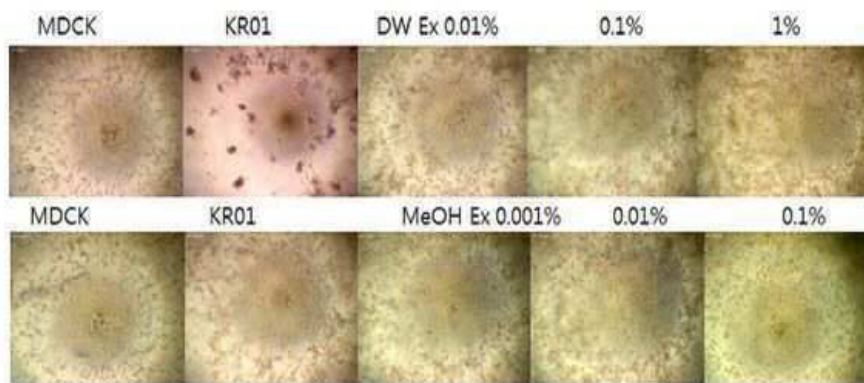


도면5

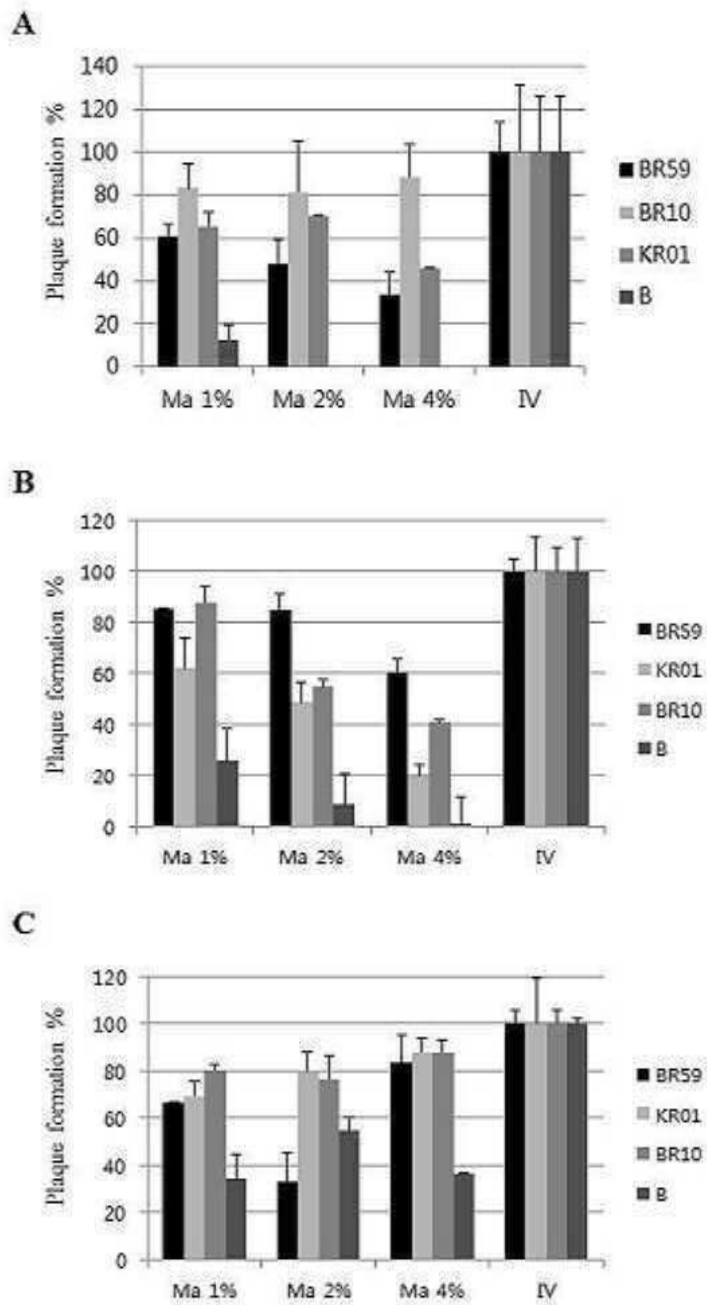
A



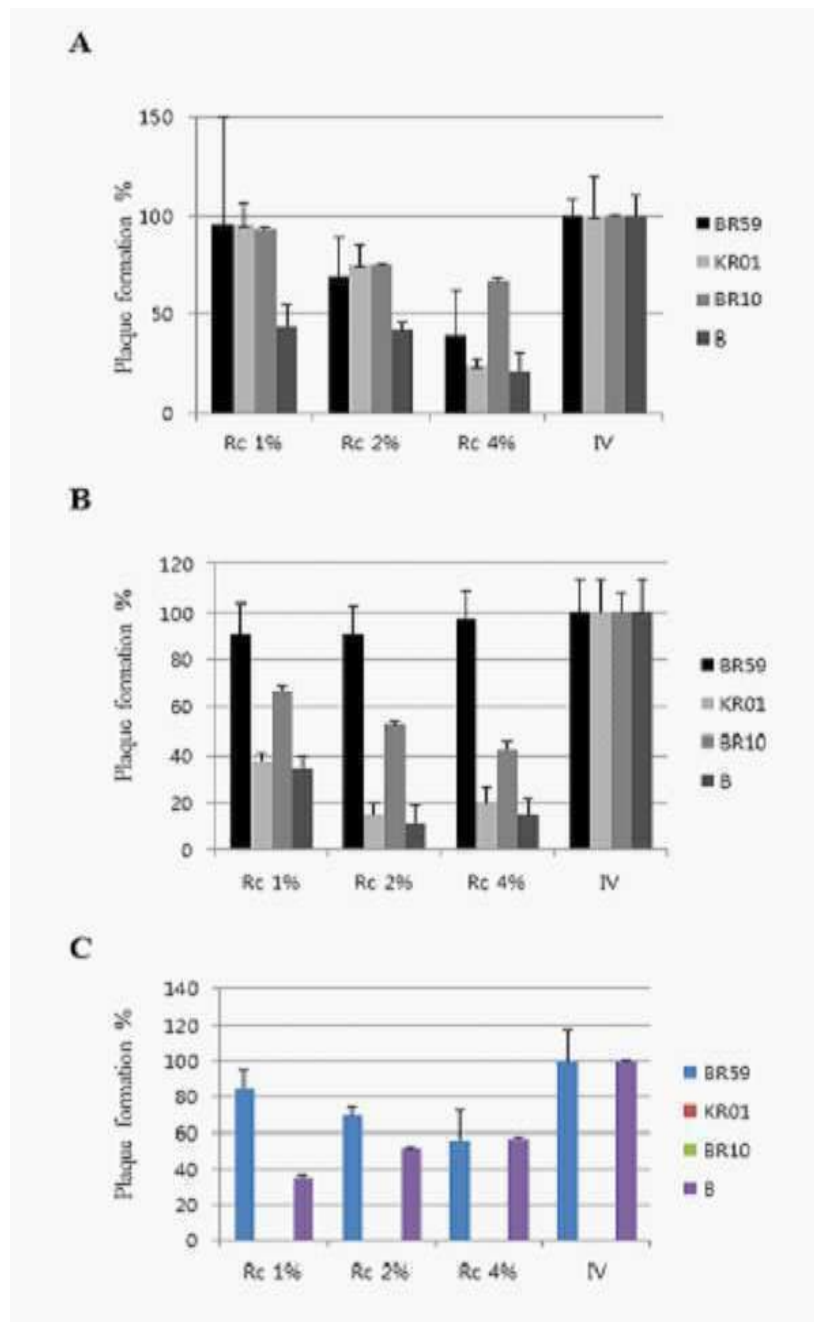
B



도면6

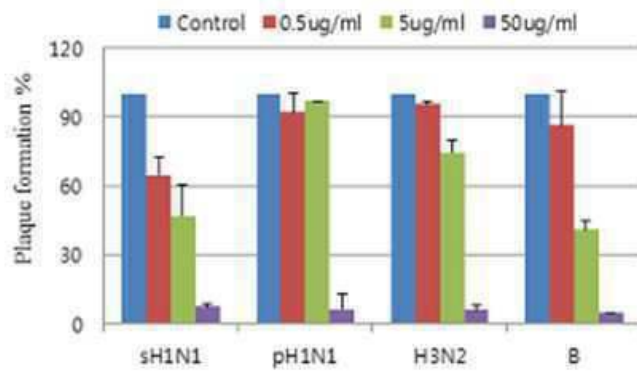


도면7

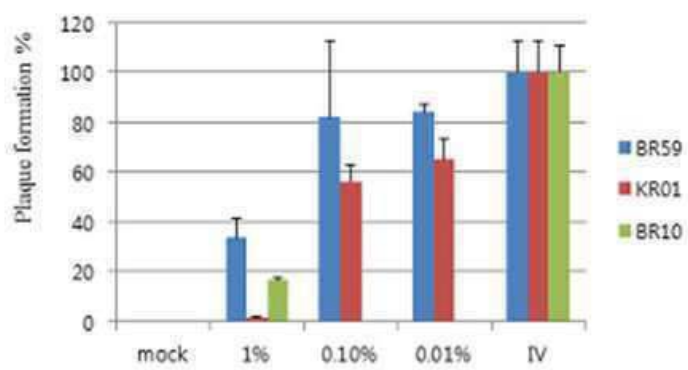


도면8

A

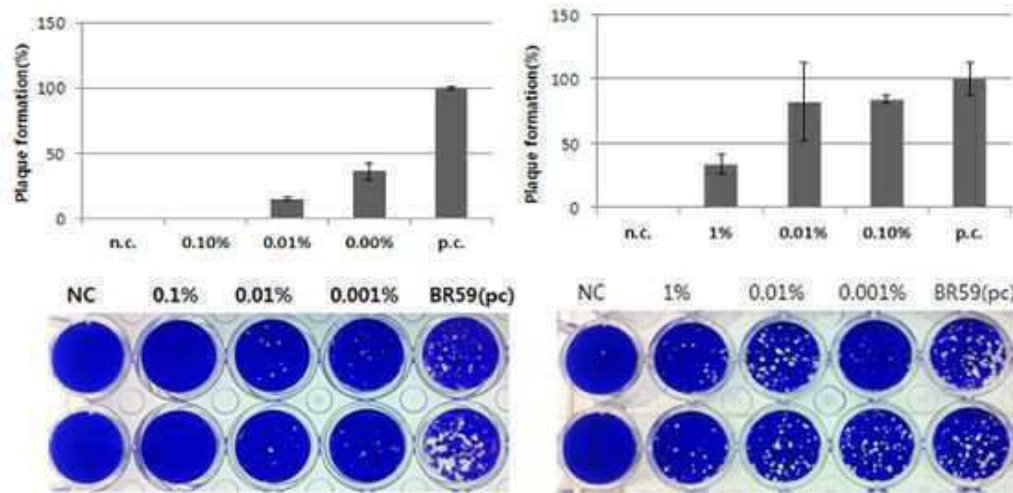


B

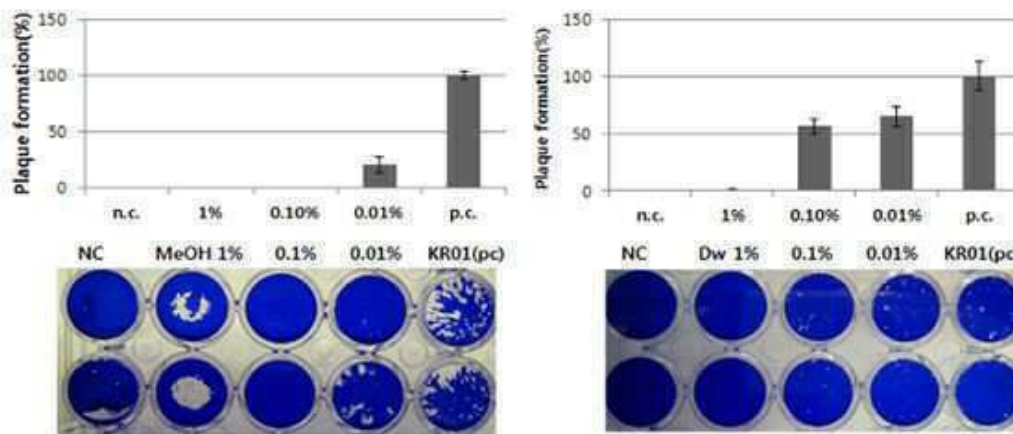


도면9

A



B



도면10

