(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 8 월 18 일 (18.08.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/173247 A2

(51) 국제특허분류:
A61K 36/05 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/409 (2006.01) *A01N 65/03* (2009.01)
A61K 31/12 (2006.01) *A01N 43/90* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01) *A01N 35/04* (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/002046

(22) 국제출원일: 2022 년 2 월 10 일 (10.02.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0019462 2021 년 2 월 10 일 (10.02.2021) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION**) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, 940동 311호, Seoul (KR). 충북대학교 산학협력단 (**CHUNGBUK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 28644 충청북도 청주시 서원구 충대로 1, Chungcheongbuk-do (KR).

(72) 발명자: 오원근 (**OH, Won Keun**); 08735 서울시 관악구 행운10길 21, 102동 902호, Seoul (KR). 이바울 (**LEE, Ba Wool**); 49322 부산시 사하구 승학로131번길 39, 1동 403호, Busan (KR). 초효문 (**CHO, Hyo Moon**); 08787 서울시 관악구 남부순환로218길 1, 504호, Seoul (KR). 폰스 호르헤 (**PONCE, Jorge**); 08826 서울시 관악구 관악로 1, 가족생활관 935동 307호, Seoul (KR). 최영기 (**CHOI, Young Ki**); 28627 충청북도 청주시 서원구 탑골로 6, 108동 706호, Chungcheongbuk-do (KR). 김은하 (**KIM, Eun Ha**); 04381 서울시 용산구 이촌로34길 29, 101동 1707호, Seoul (KR). 김세미 (**KIM, Se Mi**); 30101 세종시 마음안로 34, 506동 401호, Sejong (KR).

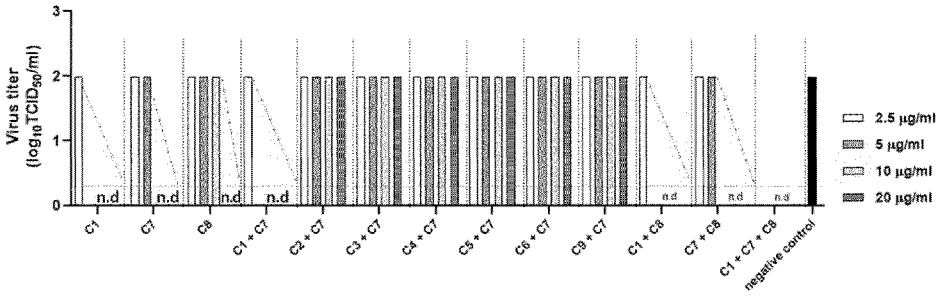
(74) 대리인: 특허법인 공간 (**GHONG-GAN INTERNATIONAL PATENT LAW FIRM**); 35209 대전시 서구 둔산서로 137, 5층, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) **Title:** COMPOSITION CONTAINING CHLORELLA SP. EXTRACT AND PHEOPHYTINIZED FRACTION THEREOF OR PORPHYRIN- OR CAROTENONE-BASED COMPOUND OBTAINED THEREFROM AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF CORONAVIRUS DISEASE-19

(54) **발명의 명칭:** 클로렐라(Chlorella sp.)추출물 및 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 수득한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물



(57) **Abstract:** The present invention relates to a composition containing a *Chlorella* sp. extract and a pheophytinized fraction or a porphyrin- or carotenone-based compound isolated therefrom as an active ingredient for prevention or treatment of coronavirus disease-19. The composition has an increased content of the porphyrin-based compounds pheophytin A (compound 1) and phenophytin B (compound 2), which are active compounds, through a chemical method and further contains a carotenone-based compound, thereby finding advantageous applications particularly in the treatment and prevention of coronavirus disease-19 in humans through the synergistic antiviral activity thereof.

(57) **요약서:** 본 발명은 클로렐라(*Chlorella* sp.) 추출물 및 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 화학적 방법을 통하여 활성화합물인 폴피린계 화합물인 페오피틴 A(화합물 1) 과 페오피틴 B(화합물 2) 의 함량을 높이고 또한 카로테논계 화합물을 더 포함함으로써 항바이러스 활성의 상승작용을 통하여 특히 사람의 신종코로나 바이러스 감염의 치료와 예방에 유용하게 이용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

WO 2022/173247 A2

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 클로렐라(Chlorella sp.)추출물 및 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 수득한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 신종코로나 바이러스(SARS-CoV-2) 감염에 대하여 회복능을 보이는 클로렐라(*Chlorella* sp.) 추출물과 분획물 또는 구성화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 신종코로나의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 물리 화학적 방법을 사용하여 추출물의 활성성분의 함량을 높이고 구성화합물 간의 상승효과를 나타내도록 제조함으로써 신종 코로나 바이러스 감염의 예방, 개선 또는 치료에 상승효과를 갖는 생약조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 코로나바이러스는 코로나바이러스과(*Coronaviridae*)에 속하는 RNA 바이러스로서 전자현미경으로 보았을 때 표면의 스파이크(spikes) 모양이 튀어나와 있어 왕관 또는 태양의 코로나를 연상시킴으로 인하여 그 이름이 붙여졌다(Englund et al., 2019). 코로나바이러스과에는 2개의 아과인 코로나바이러스 아과(*Coronavirinae*)와 토로바이러스 아과(*Torovirinae*)가 있으며 코로나바이러스는 전자에 속해있다. 코로나바이러스 아과는 다시 4개의 속(genus)인 알파-코로나바이러스(*Alphacoronavirus*), 베타-코로나바이러스(*Betacoronavirus*), 감마-코로나바이러스(*Gammacoronavirus*), 델타-코로나바이러스(*Deltacoronavirus*)로 나뉘어진다. 이 중 전자의 두 속인 알파와 베타-코로나바이러스는 사람과 동물에게 감염을 일으키고, 감마와 델타는 동물에게 감염을 일으킨다고 알려져 있다. 인간 코로나바이러스는 1960년대 중반에 처음 발견되었고, 현재까지 사람을 감염시키는 것으로 7종이 확인되었으며 이중 HCoV-229E, HCoV-NL63는 알파-코로나바이러스에, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV는 베타-코로나바이러스에 속해있다. 이외에도 돼지, 개, 고양이, 박쥐, 말 등 동물을 감염시켜 병원성을 나타내고 있다.

[3] 전 세계는 지난 2000년 이후 20년 동안 두 번의 코로나바이러스인 사스(SARS, 급성호흡기증후군)와 메르스(MERS, 중동호흡기증후군) 감염위기를 겪었고, 현재는 2019년 12월 중국 우한에서 발원한 코로나19(COVID-19)의 대유행 감염위기를 겪고 있다. 이들 코로나 바이러스는 모두 베타-코로나바이러스 속에 속해있지만 각기 다른 전파력과 치명률을 나타내었다. 사스의 경우, SARS-CoV를 병원체로 하여 2003년 2월에 중국에서 발생하였으며, 2020년 03월

03일 발표된 WHO의 통계자료(WHO, Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report - 43, 2019)에 따르면 전 세계적으로 26개 국가가 감염되었으며 8,096명의 확진자, 774명의 사망자를 낳음으로 인해 9.6%의 치명률을 보였다. 메르스의 경우, MERS-CoV를 병원체로 하여 2012년 중동지역 아라비아에서 발생하였으며, 동일 통계자료에 의하면 전 세계적으로 27개 국가가 감염되었으며 2,494명의 확진자, 858명의 사망자를 낳음으로 인해 전파력은 낮지만 34-35%의 높은 치명률을 보였다. 2019년 12월에 중국에서 발생하여 현재까지도 지속되고 있는 COVID-19의 경우, 만 1년이 된 현재시점은 2020년 12월 23일 기준 218개 국가가 감염되었으며, 7840만명의 확진자, 172만명의 사망자를 낳음으로 인해 높은 전파력과 함께 상대적으로 다른 코로나 바이러스 질환인 사스나 메르스에 비하여 낮은 2.2%의 치명률을 보이고 있다. 그러나, 다른 바이러스에 비하여 증상이 발현되기 전에도 바이러스를 전파할 수 있는 가능성으로 인하여 COVID-19에 대한 국가적인 대응력을 어렵게 하고 있다. 전 세계 모든 국가들은 현 상황을 타개하기 위하여 다국적 제약회사를 중심으로 백신의 개발과 승인이 이루어지고 있는 상황이다(Park, 2020).

[4] 현재까지 COVID-19를 해결하기 위해 개발된 치료제는 없는 상황이며 각국의 다국적 제약회사를 중심으로 백신을 개발하여 대응에 나서고 있다. 그러나, 비록 백신이 효과적으로 작용한다 하더라도 코로나바이러스는 증식과정에서 돌연변이 및 빈번한 유전자 재조합현상이 일어나기 때문에, 백신의 효용성이 오래가지 못할 가능성이 높다. 또한, 기존에 개발된 백신에 듣지 않는 새로운 변이주 코로나 바이러스가 발생할 확률도 항상 존재한다.

[5] 전 세계 다국적 제약회사는 단기간 동안 효과적인 치료제를 개발하는 것이 어려운 상황이기 때문에 약물 재창출(Drug Repositioning)을 활용하여 기허가된 약물 또는 허가되지 않았으나 이미 임상시험 데이터가 존재하는 약물을 대상으로 코비드-19 치료제를 찾고자 노력하고 있고 긴급 사용승인을 받고 있다. 비록 약물 재창출을 통하여 개발하는 것이 비용과 시간 면에서 큰 장점이 있지만 특허 및 허가와 관련된 여러 문제가 있다. 또한 본질적으로 이들 단일물질 또한 내성바이러스의 출현으로 그 효용성이 오래가지 않을 수 있다. 이러한 이유로 백신과 신약개발 뿐만 아니라 이와 동시에 우리의 가까이에 있으며 쉽게 이용하여 음식으로 섭취할 수 있는 식물의 COVID-19에 대한 보호효과를 과학적으로 명확히 증명하고, 사람들이 활용할 수 있게 하는 것도 COVID-19를 극복을 위한 필요한 전략이라 할 수 있다.

[6] 한편, 클로렐라는 민물에 자라는 녹조류에 속하는 단세포 생물로서 플랑크톤의 일종이며 단백질, 엽록소, 비타민, 무기질, 아미노산 등 각종 영량소가 풍부하여 미국항공우주국(NASA)에서 우주인의 식품으로 연구되어 유명해졌다. 또한 세계의 주요 장수국 중 하나인 일본의 50세 이상 인구의 73%가 클로렐라 제품을 복용할 만큼 건강식품으로 인식되고 있다. 현재까지 알려진 클로렐라의 효능으로는 단백질 공급, 신진대사 촉진, 면역력 증진이 알려져 있으며 특히

클로렐라 추출물인 CGF(Chlorella growth factor)가 어린이 성장 발육을 촉진시킨다는 것과 조혈 작용을 활발하게 하는 것으로 알려졌다.

[7] 클로렐라의 주요 구성성분인 엽록소이며, 엽록소는 폴피린계 화합물, 클로로필 A(chlorophyll A)와 클로로필는 B(chlorophyll B)를 들 수 있으며, 조리과정 또는 소화과정을 통하여 탈메탈화, 탈피틸화, 탈카르보메톡실화가 일어나 페오피틴류(pheophytin), 파이로페오피틴류(pyropheophytin), 클로로필라이드류(chlorophyllide), 페오폴바이드류(pheophorbide) 등의 유도체가 생성될 수 있다(Hayes & Ferruzzi, 2020). 이러한 물질들은 녹색식물들이 공통적으로 함유하고 있는 주요성분으로서, 백혈구감소증, 아플라톡신, 암 등에 임상효과가 보고되었으며 또한 HIV, herpes virus에 대한 억제작용도 있는 것으로 확인되었으나 (Ulbricht et al., 2014), 신종 코로나바이러스의 치료 또는 예방에 관하여는 확인된 바 없다.

[8] 종래 기술로 한국등록특허 제102169476호는 제2형 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개시하고 있으며, 천식치료제인 자피를루카스트(Zafirlukast)와 통풍치료제인 설핀파이라존(Sulfinpyrazone)의 SARS-CoV-2에 대한 억제능을 나타내었다. 한국공개특허 제1020200063275호는 코로나바이러스 예방 및 치료제를 개시하고 있으며, 칼슘, 인산, 엽산, 퀘세틴 등 14종 물질의 혼합물을 신종코로나 바이러스의 예방 및 치료제로 제시하고 있다. 한국공개특허 제1020200131784호는 제2형 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개시하고 있으며, AI 딥러닝 알고리즘을 통해 2,700여개의 FDA 승인약물로부터 자피를루카스트(Zafirlukast)와 설핀파이라존(Sulfinpyrazone), 알로푸리놀(Allopurinol) 등을 포함한 후보약물을 도출하였다. 그러나 이들 모두 본 발명의 구성에서 차이점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 목적은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 또는 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 또는 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품을 제공하는 데 있다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 또는 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염 예방용 소독제를 제공하는

데 있다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 클로렐라(*Chlorella* sp.) 추출물의 구성성분 및 이들 간의 조합에 따른 혼합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 동물 약품을 제공하는 데 있다.

[13] 본 발명의 목적은 클로렐라(*Chlorella* sp.) 추출물의 구성성분 및 이들 간의 조합에 따른 혼합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 동물 사료 첨가제를 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

[14] 본 발명은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 또는 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[15] 상기 클로렐라 추출물은 폴피린(porphyrin)류의 클로로필 a(chlorophyll a), 클로로필 a'(chlorophyll a'), 클로로필 b(chlorophyll b), 클로로필 b'(chlorophyll b'), 페오피틴 a(pheophytin a), 페오피틴 a'(pheophytin a'), 페오피틴 b(pheophytin b), 페오피틴 b'(pheophytin b'), 카로테논계 화합물인 α-apo-13-carotenone 또는 β-apo-13-carotenone으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 페오피틴 a(pheophytin a), 페오피틴 a'(pheophytin a'), 페오피틴 b(pheophytin b), 페오피틴 b'(pheophytin b'), α-apo-13-carotenone 또는 β-apo-13-carotenone 으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상을 포함할 수 있다.

[16] 상기 클로렐라 추출물은 클로렐라(*Chlorella* sp.) 분말을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 헥산, 아세톤, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 클로렐라 추출물은 클로렐라를 70~100% C1 내지 C4의 저급 알코올 수용액 또는 저급 알코올 또는 아세톤으로 추출한 추출물이거나, 또는, 이들의 헥산 분획물 및 추출물을 페오피틴화한 헥산 분획물일 수 있다. 상기 클로렐라 추출물은 클로렐라(*Chlorella* sp.)에 95% 에탄올을 사용하여 2시간 동안 교반하여 3회에 걸쳐 추출한 후, 물 또는 0.5 N 염산수용액과 헥산으로 용매 추출하여 획득한 헥산 분획물을 감압 농축하여 제조할 수 있다.

[17] 상기 폴피린(porphyrin)류의 클로로필 a(chlorophyll a), 클로로필 a'(chlorophyll a'), 클로로필 b(chlorophyll b), 클로로필 b'(chlorophyll b'), 페오피틴 a(pheophytin a), 페오피틴 a'(pheophytin a'), 페오피틴 b(pheophytin b), 페오피틴 b'(pheophytin b')는 엽록소를 생산하는 모든 식물에서 비슷한 조건으로 제조될 수 있다.

[18] 상기 클로렐라 추출물에 포함되는 화합물은 클로렐라를 70~100% C1 내지 C4의 저급 알코올 수용액 또는 저급 알코올 또는 아세톤으로 추출한 추출물의 헥산 분획물 및 추출물을 페오피틴화한 헥산 분획물을 분리하여 얻을 수 있으며, 바람직하게는 100% 메탄올 또는 95% 에탄올로 추출한 추출물 또는 추출물을 페오피틴화한 헥산 분획물을, 크로마토그래피로 분리하여 얻을 수 있다. 상기

크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), LH-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), RP-18 컬럼 크로마토그래피(RP-18 column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등이 이용될 수 있다.

[19] 본 발명의 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물은 클로렐라 분말을 각각 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 헥산, 아세톤, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것일 수 있다.

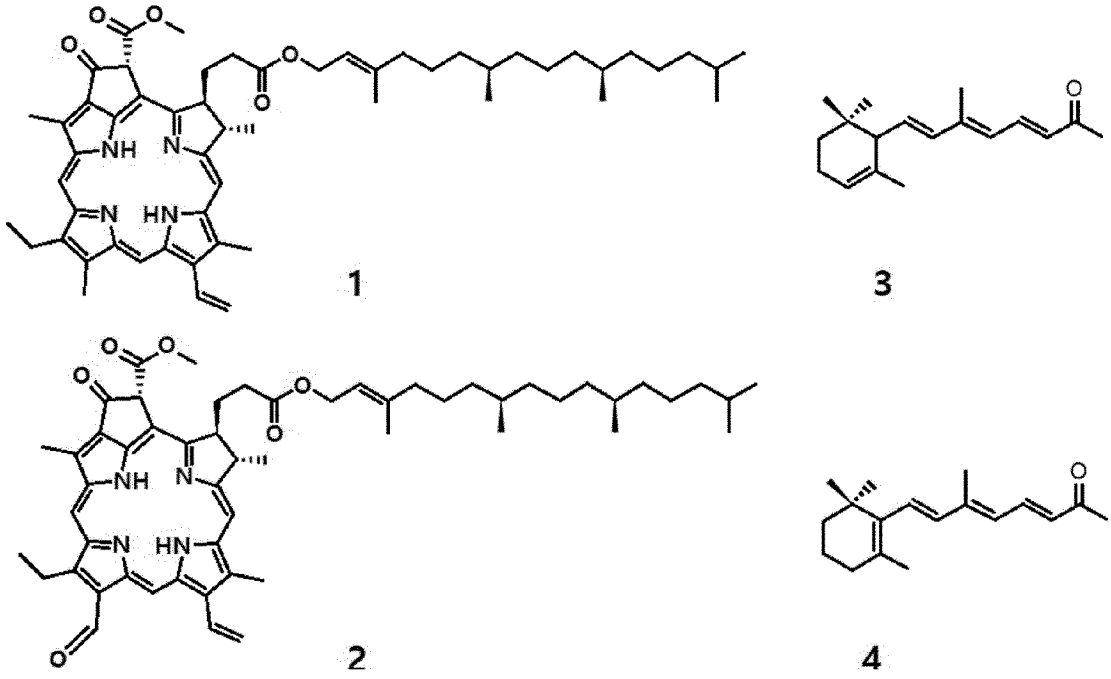
[20] 본 발명의 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 0.05 ~ 10 %(w/v) 의 구연산수용액에 현탁시킨 후, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[21] 또한 본 발명의 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 물에 현탁시킨 후, 60 ℃에서 30분 ~ 48시간 방치한 다음, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[22] 본 발명의 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물은 하기 화학식 1의 페오피틴 A (화합물 1), 페오피틴 B (화합물 2), 알파-아포-13-카로테논(화합물 3) 및 베타-아포-13-카로테논(화합물 4) 으로 이루어진 군으로부터 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[23] [화학식 1]

[24]



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

[26] 상기 클로렐라 추출물 및 페오피틴화 헥산 분획물 또는 이로부터 분리된 폴피린계 또는 카로테논계 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 포함 되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 클로렐라 추출물 및 페오피틴화 헥산 분획물 또는 이로부터 분리된 폴피린계 또는 카로테논계 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 사용 될 수 있다.

[27] 상기 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. 상기 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상 될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 점막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 및 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[28] 본 발명은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 또는 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[29] 상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물은 클로렐라 분말을 각각 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 헥산, 아세톤, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것일 수 있다. 또한 상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 0.5 ~ 1.0 N의 염산수용액에 현탁시키거나, 0.05 ~ 10 %(w/v) 의 구연산수용액에 현탁시키거나, 물에 현탁시킨 후, 60 ℃에서 30분 ~ 48시간 방치한 다음, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[30] 상기 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품은 페오피틴 A (화합물 1), 페오피틴 B (화합물 2), 알파-아포-13-카로테논(화합물 3) 및 베타-아포-13-카로테논 (화합물 4) 으로 이루어진 군으로부터 하나 이상을 포함할 수 있다.

[31] 본 발명은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 또는 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염 예방용 소독제를 제공한다.

[32] 상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물은 클로렐라 분말을 각각 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 헥산, 아세톤, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것일 수 있다. 또한 상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 0.5 ~ 1.0 N의 염산수용액에 현탁시키거나, 0.05 ~ 10 %(w/v) 의 구연산수용액에 현탁시키거나, 물에 현탁시킨 후, 60 ℃에서 30분 ~ 48시간 방치한 다음, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것일 수 있다.

[33] 상기 신종코로나 바이러스 감염 예방용 소독제은 페오피틴 A (화합물 1), 페오피틴 B (화합물 2), 알파-아포-13-카로테논(화합물 3) 및 베타-아포-13-카로테논(화합물 4) 으로 이루어진 군으로부터 하나 이상을 포함할 수 있다.

[34] 본 발명은 클로렐라(*Chlorella* sp.) 추출물의 구성성분 및 이들 간의 조합에 따른 혼합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 동물 약품 또는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 동물 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[35] 본 발명에 따른 신종코로나 바이러스 감염에 대하여 세포병변 회복능을 보이는 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 및 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한

폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 제조함으로써 동물 및 인체에서 신종코로나의 감염의 예방 또는 치료용 의약품으로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 화합물은 녹색식물인 엽록소에서 제조될 수 있으며 동물 및 인체에서 신종코로나의 감염의 예방 또는 치료용 의약품으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[36] 도 1은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물을 포함한 각 분획물에서의 폴피린계 또는 카로테논계 화합물의 존재유무와 상대적 함유여부를 보여주는 크로마토그램이다.

[37] 도 2는 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 및 각 분획물과 클로렐라 유래 단일화합물의 신종코로나 바이러스(SARS-CoV-2) 감염에 대한 세포병변 회복능을 나타낸 그래프이다.

[38] 도 3은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 분획물의 혼합을 통하여 신종코로나 바이러스(SARS-CoV-2) 감염에 대한 상승된 세포병변 회복능을 나타낸 그래프이다.

[39] 도 4는 클로렐라(*Chlorella* sp.) 활성 소분획물(C1.1-C1.8)의 화학적 성분 구성을 보여주는 크로마토그램이다.

[40] 도 5는 클로렐라(*Chlorella* sp.) 활성 소분획물의 혼합을 통하여 신종코로나 바이러스(SARS-CoV-2) 감염에 대한 상승된 세포병변 회복능을 나타낸 그래프이다.

[41] 도 6은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물을 무기산의 농도를 달리함으로 (A) 페오피틴화하여 페오피틴 A와 B의 상대적 함량 변화를 나타낸 크로마토그램과 (B) 페오피틴화 분획을 포함한 추출물 및 분획물에서 활성물질인 아포-13-카로테논계 화합물들의 존재 유무를 나타낸 크로마토그램이다.

[42] 도 7은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물을 유기산의 농도를 달리함으로 페오피틴화하여 페오피틴 A와 B의 상대적 함량 변화를 나타낸 크로마토그램이다.

[43] 도 8은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물을 가온 처리시간을 달리함으로 페오피틴화하여 페오피틴 A와 B의 상대적 함량 변화를 나타낸 크로마토그램이다.

[44] 도 9는 시금치(*Spinacia oleracea*)추출물을 무기산의 농도를 달리함으로 페오피틴화하여 페오피틴 A와 B의 상대적 함량 변화를 나타낸 크로마토그램이다.

[45] 도 10은 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물과 폴피린계 및 카로테논계 화합물을 포함한 페오피틴화 분획물, 그리고 페오피틴 A와 B 혼합물의 신종코로나 바이러스(SARS-CoV-2) 감염에 대한 저해능을 동물실험을 통하여 확인된 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[46] 본 발명자는 생리활성물질자원은행의 천연물 추출물을 대상으로 신종코로나 바이러스에 대한 약리활성을 갖는 후보천연을 발굴하기 위한 연구하는 중 클로렐라의 추출물이 뛰어난 항바이러스 효과가 있음을 확인함을 시작으로 하여 활성기반 분획 및 분리법(Bioactivity-guided fractionation and isolation) 및 활성물질의 함량 극대화법을 통하여 활성물질과 이들의 상승조합을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[47] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정 되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[48] **<실시예 1. 클로렐라 추출물 및 분획물의 제조>**

[49] 클로렐라(*Chlorella* sp.) 분말은 시중의 업체로부터 구입하여 100 g으로 95% 에탄올을 사용하여 엽록소 파괴를 최소화하기 위하여 교반하여 3회 추출하였다. 추출액을 건조 후, 2.1 g의 조추출물을 수득하였다. 이 후, 활성기반 분획 및 분리법(Bioactivity-guided fractionation and isolation)에 의한 활성물질을 규명하기 위하여 중압액체크로마토그래피(MPLC, Medium Pressure Liquid Chromatography)를 사용하여 다음의 조건(용매: EA/MeOH/H_2O; 컬럼: Reverleris C18, 120 g; 유속: 15 ml/mL; 검출파장: 365, 400 nm; 기울기용리: 0-40 min 0/70/30 → 0/100/0 (EA/MeOH/H_2O), 40-110 min 0/100/0 → 50/50/0, 110-130 min 50/50/0 → 100/0/0)으로 9개의 분획물(C1-C9)을 나누었으며 각 소분획에 대한 HPLC 크로마토그램을 확인하였으며, HRMS(High resolution mass spectrometry)와 UV 패턴 및 기존 보고된 분광학적 자료를 참고하여 각 분획이 함유하고 있는 주 화합물을 도 1에 표시하였다. 확보된 추출물을 비롯한 9개의 소분획물과 더불어 이후 실험에서는 Sigma-Aldrich로부터 클로렐라 유래 물질 중 단일물질로 클로로필 a, 클로로필 b, 동클로로필나트륨, 베타-카로틴을 구입하여 SARS-CoV-2에 대한 저해능을 함께 측정하였다.

[50] **<실시예 2. 신종코로나 바이러스에 대한 클로렐라 추출물 및 분획물의 억제능 확인>**

[51] 본 발명의 클로렐라 추출물 및 분획물이 코로나 바이러스의 증식에 미치는 영향을 확인하고자 세포변성효능 (Cytopathic effect (CPE)) 어세이를 실시하였다.

[52] **2-1. 코로나 바이러스의 준비**

[53] SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, NMC-CoV-02 strain)는 충북대학교(청주, 한국)에서 VERO 세포를 호스트(host)로 하여 배양한 후 제공된 것을 사용하였다. SARS-CoV-2 바이러스를 mono-layered VERO 세포에 접종하고 3일 후 바이러스 배양 상층액 분액을 채취하고, 바이러스를 10%[v/v] FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양 유지된 VERO 세포에 접종하여

항바이러스 활성 측정에 사용하였다.

[54] **실시예 2-2. CPE 어세이**

[55] 상기 실시예 2-1에서 준비된 SARS-CoV-2 바이러스를 VERO 세포에 감염시킨 후, 상기 실시예 1에서 제조한 추출물 및 분획물을 처리하여 CPE 어세이를 실시하였다. 96-웰(well) 플레이트에 2×10^4세포/웰의 밀도로 VERO 세포를 분주하여 10%[v/v] FBS(fetal bovine serum), 1%[v/v] PS(penicillin+streptomycin) 및 L-글루타민(L-glutamine, 500㎖ 배지 기준 2㎖ 첨가)을 포함한 DMEM 배양액에서 하루 동안 증식시킨 뒤 배양액을 PBS 용액으로 세척하였다. 상기 세척된 VERO 세포에 SARS-CoV-2 바이러스가 100 $TCID_{50}$의 농도로 포함된 감염 배지(infection media : DMEM+1㎍/㎖ trypsin) 50㎕를 넣어, 2시간 동안 감염시킨 후 배양액을 PBS 용액으로 세척하였다. 이후, 본 발명의 추출물 및 분획물을 농도별로 각각 처리하여, (infection media : DMEM+0.2㎍/㎖ trypsin)을 포함한 DMEM 배양액에서 3일 동안 배양하고, 바이러스에 대한 효과를 측정하였다. 배양 3일 후, VERO 세포의 생존여부를 측정하기 위하여 추출물 및 분획물의 농도에 따라 CPE 효과를 확인하였다. 추출물 및 분획물의 농도에 따라 바이러스 역가 측정 결과를 도 2에 나타내었다.

[56] 도 2에서 보는 바와 같이, 클로렐라로부터 분획하여 얻은 분획물 중 분획물 1(C1), 7(C7)과 8(C8) 분획물에서 SARS-CoV-2에 대한 증식 저해효과를 나타내었다. 도 1과 각 분획물의 물리 화학적 성질을 비교 하였을 시, C1은 복합물이며 C7과 C8은 각기 페오피틴 B와 A가 주 화합물로 포함되어 있는 부분임을 확인하였다. 클로렐라 각 분획물에서 카로테노이드 계열 화합물을 주 화합물로 포함하고 있는 C2와 C3 분획에서는 저해능을 나타내지 않았으며 또한, 클로로필 A와 B가 각각 주 화합물로 포함되어 있는 분획인 분획물 C5와 C4에서도 저해능을 보이지 않았다. 이러한 결과는, 동일 배지 실험에서 Sigma-Aldrich로부터 구입하여 얻은 단일물질 (클로로필 A, 클로로필 B, 동클로로필나트륨, 베타-카로틴)을 SARS-CoV-2에 대한 저해능을 평가하였으며 저해활성을 보이지 않은 결과와 일치하였다. 따라서 클로렐라에서 저해활성을 보이는 물질은, 분획물 C1에 포함되어 있는 물질과 분획물 C7 및 C8의 주화합물인 페오피틴 B와 A가 SARS-CoV-2에 대하여 저해능을 나타내는 물질임을 확인하였다.

[57] **<실시예 3. 신종코로나 바이러스에 대한 활성분획물(C1-C9)의 조합에 따른 시너지 효과 확인>**

[58] 상기 실시예 2에서 가장 강한 억제능을 나타낸 분획물 C1, C7, C8의 조합에 따른 시너지 효과를 확인하기 위하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 세포병변억제효과 어세이를 수행하였으며, 그 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3을 참고하였을 때, 단일 분획에서 가장 강한 활성을 나타낸 분획물 C1과 C7, C8간의 조합은 각각의 단일 분획을 처리하였을 때보다 강한 시너지 효과가 나타남을 확인할 수 있었다. 특히 분획물 C1이 포함된 조합인 C1 + C7과 C1 + C8에서 C1이

포함되어 있지 않은 C7 + C8보다 더 강한 억제효과를 나타냄으로 C1에 포함된 화합물이 C7과 C8의 효과와 상승작용이 있음을 확인하였다. 또한 분획물 C1 + C7 + C8에서 C1 + C7과 C1 + C8보다 더욱 강한 저해능을 나타내었으므로 분획물 C1의 구성물질을 확인하였다.

[59] **<실시예 4. 활성분획물 C1의 소분획물 제조>**

[60] 상기 실시예 3에서 가장 강한 활성을 나타낸 C1분획에 대하여 다음의 조건(용매: MeOH/H_2O(0.1% FA); 컬럼: Reverleris C18, 120 g; 유속: 15 ml/mL; 검출파장: 365, 400 nm; 기울기용리: 0-80 min 10/0 → 100/0, 80-120 min 100/0)으로 8개의 분획물(C1.1-C1.8)을 나누었으며 각 소분획에 대한 HPLC 크로마토그램을 확인하고 도 4에 나타내었다.

[61] **<실시예 5. 신종코로나 바이러스에 대한 활성소분획물(C1.1-C1.8)의 조합에 따른 시너지 효과 확인>**

[62] 상기 실시예 3의 결과를 바탕으로 C1으로부터 시너지효과를 나타내는 물질을 규명하기 위하여 조합의 변수를 C1을 제외하고 두 번째로 강한 억제능을 나타낸 C7 로 고정하여 C1의 소분획물(C1.1 - C1.8)과의 시너지 효과를 확인하였다. 이의 결과는 도 5에 나타내었다. 도 5를 참고하였을 때, C1.6과 C1.7이 단일 소분획 중 가장 강력한 효과를 나타내었다. 이를 통하여 C1.6과 C1.7에 활성에 관여하는 물질이 포함되어 있음을 예상할 수 있으며, 상기 실시예 4의 도 4를 참고하였을 때 C1.6과 C1.7은 동일 계열의 물질이 포함되어 있음을 UV 패턴을 통해 예상할 수 있었다. 한편, C7과의 조합에서는 C1.6이 가장 강력한 상승효과를 나타내었다. 하지만 C1.6은 특히 열에 불안정하여 다른 형태로 변형된다는 것을 추가실험을 통해 확인하였기에, 비교적 안정한 C1.7으로부터 활성물질을 분리하기 위한 실험에 착수하였다.

[63] **<실시예 6. 활성분획물로부터 화합물의 분리>**

[64] 상기 실시예 2 내지 5에서 가장 강력한 활성을 나타낸 분획물 C1.6과 C7 및 C8로부터 활성물질을 분리하기 위한 실험을 진행하였다. 먼저, C7(37.7 mg)와 C8(13.7 mg)로부터 단일물질을 얻기 위하여 고성능액체크로마토그래피(HPLC, High Performance Liquid Chromatography)를 사용하여 다음의 조건(용매: A-MeOH/H_2O, B-EA; 컬럼: YMC triart C18 10x250; 유속: 3 ml/mL; 검출파장: 450, 654 nm; 기울기용리: 0-25 min 50/50 (A/B) (C7), 0-26 min 54/46 (A/B) (C8))으로 분리를 진행하였고 그 결과, 각각 pheophytin B(0.3)(화합물 2)와 pheophytin A(1.1 mg)(화합물 1)를 획득하였다.

[65] 또한, 소분획물 C1.7을 고성능액체크로마토그래피(HPLC, High Performance Liquid Chromatography)를 사용하여 다음의 조건(용매: A-MeCN, B-H_2O(0.1% FA); 컬럼: Optimapak C18 10x250; 유속: 4 ml/mL; 검출파장: 330, 450 nm; 기울기용리: 0-25 min 55/45 (A/B))으로 β-apo-13-carotenone(1.0 mg)(화합물 3)을 분리하였다.

[66] **<실시예 7. 클로렐라부터 분리한 화합물의 물리 화학적 구조 확인>**

[67] 실시예 **7-1.** 페오피틴 **A** (화합물 1)

[68] Pheophytin A;

[69] 암청색 파우더;

[70] ESIMS *m/z* 871.6 $[M + H]^+$;

[71] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 800 MHz): δ_H 3.22 (1H, s, H-2a), 7.98 (1H, dd, *J* = 17.6, 11.2 Hz, H-3a), 6.16 (1H, d, *J* = 11.2 Hz, H-3b), 6.27 (1H, d, *J* = 18.4 Hz, H-3b), 9.37 (1H, s, H-5), 3.38 (3H, s, H-7a), 3.67 (2H, m, H-8a), 1.68 (3H, t, *J* = 8.0 Hz, H-8b), 9.50 (1H, s, H-10), 3.67 (3H, s, H-12a), 6.24 (1H, s, H-13b), 3.86 (3H, s, H-13d), 4.44 (1H, m, H-17), 4.47 (1H, m, H-18), 1.78 (3H, d, *J* = 7.2, H-18a), 8.54 (1H, s, H-20).

[72] ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ_C 142.0 (C-1), 131.8 (C-2), 12.1 (C-2a), 129.1 (C-3a), 136.3 (C-3b), 136.2 (C-4), 97.5 (C-5), 155.7 (C-6), 136.2 (C-7), 11.3 (C-7a), 145.2 (C-8), 19.5 (C-8a), 17.4 (C-8b), 151.0 (C-9), 104.4 (C-10), 137.9 (C-11), 129.1 (C-12), 12.1 (C-12a), 129.0 (C-13), 189.6 (C-13a), 64.7 (C-13b), 172.2 (C-13c), 51.1 (C-13d), 149.6 (C-14), 105.2 (C-15), 161.2 (C-16), 52.8 (C-17), 29.8 (C-17a), 172.9 (C-17c), 50.1 (C-18), 23.1 (C-18a), 169.6 (C-19), 93.1 (C-20).

[73] 실시예 **7-2.** 페오피틴 **B** (화합물 2)

[74] Pheophytin B;

[75] 갈색 파우더;

[76] ESIMS *m/z* 885.5 $[M + H]^+$;

[77] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 800 MHz): δ_H 3.38 (1H, s, H-2a), 7.99 (1H, dd, *J* = 17.7, 10.4 Hz, H-3a), 6.23 (1H, dd, *J* = 12.6, 1.7 Hz, H-3b), 6.37 (1H, br d, *J* = 18.0 Hz, H-3b), 10.35 (1H, s, H-5), 11.13 (3H, s, H-7a), 9.63 (1H, s, H-10), 3.68 (3H, s, H-12a), 6.24 (1H, s, H-13b), 3.91 (3H, s, H-13d), 4.20 (1H, br d, *J* = 8.8 Hz, H-17), 4.40-4.60 (1H, m, H-18), 8.54 (1H, s, H-20).

[78] 실시예 **7-3.** 알파-아포-**13**-카로테논 (화합물 3)

[79] α-apo-13-carotenone;

[80] 노란색 수지;

[81] ESIMS *m/z* 259.2 $[M + H]^+$;

[82] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 800 MHz): δ_H 7.54 (1H, dd, *J* = 15.2, 11.2 Hz), 6.16 (1H, d, *J* = 15.2 Hz), 6.15 (1H, d, *J* = 15.6 Hz), 6.14 (1H, d, *J* = 11.4 Hz), 5.79 (1H, dd, *J* = 16.0, 9.6 Hz), 5.44 (1H, br s), 2.29 (3H, s), 2.22 (1H, d, *J* = 9.1 Hz), 2.00 (3H, s), 1.58 (3H, s), 1.44 (1H, m), 1.20 (1H, m), 0.91 (3H, s), 0.83 (3H, s).

[83] ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ_C 198.7, 145.3, 139.5, 136.0, 135.5, 133.8, 129.6, 127.4, 121.6, 55.1, 32.8, 31.7, 27.9, 27.8, 27.1, 23.2, 23.2, 13.7.

[84] 실시예 **7-4.** 베타-아포-**13**-카로테논 (화합물 4)

[85] β-apo-13-carotenone;

[86] 노란색 수지;

[87] ESIMS *m/z* 259.2 $[M + H]^+$;

[88] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 800 MHz): δ_H 7.57 (1H, dd, J = 15.2, 12.0 Hz), 6.42 (1H, d, J = 16.0 Hz), 6.16-6.19 (3H, m), 2.30 (3H, s), 2.06 (3H, s), 2.02-2.06 (2H, m), 1.72 (3H, s), 1.59-1.63 (2H, m), 1.47-1.48 (2H, m), 1.03 (6H, s).

[89] ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 200 MHz): δ_C 198.5, 145.6, 139.3, 137.5, 136.7, 131.3, 129.3, 127.7, 39.6, 34.3, 33.1, 28.9, 27.6, 21.7, 19.1, 13.1.

[90] 상기 결과에 따라 클로렐라 추출물 중 페오피틴 A, 페오피틴 B 및 아포-13-카로테논계 화합물인 알파-아포-13-카로테논 (화합물 3) 또는 베타-아포-13-카로테논 (화합물 4)이 SARS-CoV-2에 대하여 저해능을 나타내었으며, 이들의 혼합물은 SARS-CoV-2에 대하여 상승적으로 뛰어난 항바이러스 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[91] **<실시예 8. 페오피틴화 분획물 제조법>**

[92] 상기 실시예 2 내지 5의 결과를 바탕으로 본 발명자들은 클로로필 추출물을 항바이러스 활성을 갖는 페오피틴의 함량을 현저히 높일 수 있는 페오피틴화 분획물을 제조하는 방법을 확립하였다.

[93] **실시예 8-1. 무기산을 이용한 페오피틴화 분획물 제조**

[94] 무기산을 이용한 페오피틴화 반응을 확립하기 위하여 클로렐라 분말을 95% 에탄올로 교반하여 추출한 추출물을 사용하여 염산수용액의 조건을 0.1 N, 0.5 N, 1 N로 달리하여 페오피틴화를 시행하였다. 산을 처리하지 않은 추출물과 서로 다른 조건의 페오피틴 분획물에서의 페오피틴 A 및 페오피틴 B의 증감변화를 확인하기 위하여 상기 추출물 및 페오피틴화 분획물을 100% 아세톤으로 녹여 1 mg/mL의 농도로 맞추어 다음의 분석조건(용매: A-EA/MeOH/H_2O (15/65/20), B-EA/MeOH/H_2O (60/30/10); 컬럼: YMC triart C18 4.6x250; 유속: 1.5 ml/min; 검출파장: 210, 254, 450, 654 nm; 기울기용리 (A/B): 0-6 min(유속: 1.3 ml/min) 100/0, 6-7 min(유속: 1.3 → 1.5 ml/min) 100/0 → 70/30, 7-10 min 70/30, 10-11 min 70/30 → 60/40, 11-12 min 60/40 → 50/50, 12-13 min 50/50 → 0/100, 13-24 min 0/100, 24-26 min 0/100 → 100/0, 26-26.1 min 100/0)으로 UHPLC를 사용하여 분석하였으며 그 결과를 도 6에 나타내었다. 각 물질의 분자량에 대한 정보와 우측의 각 물질 고유의 UV-Vis 흡수 스펙트럼을 기존문헌과의 비교를 통하여 654 nm에서 추출물의 23.703 min, 21.217 min, 19.423 min, 17.900 min에서 각기 페오피틴 A, 페오피틴 B, 클로로필 A 및 클로로필 B가 확인이 되었으며, 0.1 N HCl에서는 클로로필 A 및 클로로필 B에 해당하는 피크의 면적이 줄어듬과 동시에 페오피틴 A 및 페오피틴 B에 해당하는 피크의 면적이 증가함을 알 수 있었다. 0.5 N에는 클로로필 A와 클로로필 B에 해당하는 피크는 확인되지 않았고 페오피틴 A와 페오피틴 B의 피크의 면적이 증가하였으며, 1.0 N에서는 동일한 양상을 나타내었다. 이를 통하여 0.5 N의 염산수용액을 사용하였을 때, 클로로필 A와 클로로필 B의 탈메탈이 충분히 일어나서 페오피틴 A와 페오피틴 B로 각기 전량 전환됨을 확인하였다.

[95] **실시예 8-2. 유기산을 이용한 페오피틴화 분획물 제조**

[96] 페오피틴화 조건 설정함 있어서 식물에 존재하면서 안전한 유기산인 구연산을 사용하여 농도를 달리함으로 실험을 수행하였다. 상기 클로렐라 추출물을 0.05 ~ 10 %(w/v) 의 구연산수용액에 현탁시킨 후, 이후 과정은 실시예 8-1과 동일한 방법으로 실험을 진행하였으며 그 결과를 도 7에 크로마토그램으로 나타내었다. 결과를 참고하였을 때, 구연산 0.5% 이상에서 클로로필 A와 B가 전량 페오피틴 A와 B로 전환되었다는 것을 알 수 있으므로, 안전한 유기산을 사용함으로 페오피틴 A와 B를 쉽게 만들 수 있음과 구연산과 같은 유기산이 포함된 식품을 클로렐라와 함께 섭취 시, 페오피틴 A와 B의 함량이 증가됨으로 SARS-CoV-2에 대한 상승된 보호효과를 기대할 수 있다.

[97] **실시예 8-3. 열처리 방법을 이용한 페오피틴화 분획물 제조**

[98] 페오피틴화 조건 설정에 있어서 열처리에 따른 페오피틴화의 조건을 설정하기 위하여 상기 실시예 8-1과 동일한 방법으로 클로렐라 추출물을 물에 현탁시킨 후 60 ℃에서 열처리 시간을 30분~48시간으로 달리하여 실험을 진행하였으며 그 결과를 도 8에 크로마토그램으로 나타내었다. 결과를 참고하였을 때, 24시간 처리 시, 대부분의 클로로필 A와 B가 페오피틴 A와 B로 전환된 것을 알 수 있었으며, 48시간 처리 시, 클로로필 A와 B는 확인되지 않았다. 이를 통하여 식품의 열처리 가공을 통하여 페오피틴 A와 B의 함량이 증가함으로, SARS-CoV-2에 대한 상승된 억제능을 기대할 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한, 엽록체를 포함한 식물의 잎 자체를 60℃ 건조기에 방치한 후, 페오피틴 A와 B의 변화도를 측정하는 사전실험의 결과를 통하여 클로렐라 분말 자체를 건조기에 방치하였을 때에도 페오피틴화가 일어날 수 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는, 일반적인 식품의 가공과정에 있어서 끓는 물에 짧은 시간 열처리를 하는 데치기(blanching) 방법을 통한 페오피틴화로의 적용 또한 가능하다.

[99] **<실시예 9. 시금치 추출물의 페오피틴화 분획물의 제조>**

[100] 상기 실시예 8의 페오피틴화는 클로렐라에 국한되지 않고, 초록색 잎의 식물에까지 적용될 수 있음을 확인하기 위해 대표적으로 클로로필 A와 B의 함량이 높다고 알려진 시금치를 대상으로 페오피틴화 분획물을 얻기 위하여 상기 실시예 8-1과 동일한 방법으로 페오피틴화 *n*-헥산 분획물을 수득하였다. 이뿐 아니라 상기 실시예 8-2 및 8-3과 같이 구연산 및 열처리에 따른 페오피틴화 분획물의 수득 또한 가능하다. 이의 결과는 도 9에 나타내었다. 도 9의 우측의 UV-Vis 흡수 스펙트럼에서 볼 수 있듯이, 비교 대상인 클로로필 A, 클로로필 B, 페오피틴 A 및 페오피틴 B의 특이적인 UV 패턴을 통하여 물질을 확인하였다.

[101] **<실시예 10. 동물실험을 위한 페오피틴 A 및 B의 대량분리>**

[102] 상기 실시예 5의 결과를 바탕으로 동물 모델에서 효능을 확인하기 위하여 페오피틴 A와 B의 대량분리를 위한 실험을 진행하였다. 대량의 물질을 분리하기 위해 클로로필 A와 B가 많이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있는 시금치로부터 단일 물질을 분리하였다. 5.0 kg의 시금치를 클로로필 A와 B의 손실을 최소화하기 위하여 아세톤을 사용하여 교반하여 3회 추출하였다. 이 후, 상기

실시예 8-1의 방법을 사용하여 페오피틴화 분획을 확보하여 73 g을 확보하였으며 페오피틴 A, B와 더불어 카로테논 유도체가 포함되어 있음을 크로마토그램을 통해 확인하였다. 또한 페오피틴화분획물을 대상으로 다음의 조건 (순상컬럼크로마토그래피, 입자크기: 43-60 ㎛; *n*-hexane:Acetone = 3:1)으로 페오피틴 A와 B 각각 1.95 g, 0.76 g 을 분리하였다.

[103] **<실시예 11. 클로렐라로부터 분리한 활성화합물의 조합에 따른 신종코로나 바이러스 억제능의 동물 효능평가>**

[104] 본 실험을 진행하기 위하여 100 g의 체중을 갖고 있는 골든햄스터 (syrian gloden hamster)를 군당 9마리씩 준비하였으며, 1주간의 적응기간을 가진 후, 12시간 간격의 낮(오전 7시~오후 17시)과 밤의 주기에 따라 관리하였다. 군은 1) 대조군 (DMSO:PEG400:DW = 1:8:16용액), 2) 페오피틴 A + B 투여군 (25 mg/head/day), 3) 페오피틴 분획물 투여군 (25 mg/head/day), 4) 클로렐라 추출물 (25 mg/head/day) 의 총 3개 군으로 나뉘어 실시하였다.

[105] 모든 그룹의 햄스터에 SARS-CoV-2 (NMC-CoV-02) 바이러스를 비강을 통하여 수당 $10^{4.0}$ $TCID_{50}$으로 공격접종 한 후 공격 접종 일부터 매일 동일한 시간에 1회씩(24시간마다) 화합물을 0.5㎖씩 경구 투여하였다. 공격 접종 3일째 및 7일째에, 햄스터의 비강조직과 폐 조직에서 바이러스 역가를 측정하였다. 각 조직에서의 바이러스 역가 결과는 도 10에 나타내었다.

[106] 도 10에서 보는 바와 같이, 비강 조직결과 대조군 (5dpi: 4.9$log_{10}$$TCID_{50}$/g, 7dpi: 3.0$log_{10}$$TCID_{50}$/g)과 비교 시, 페오피틴 A + B (5dpi: 3.8$log_{10}$$TCID_{50}$/g, 7dpi: 1.9$log_{10}$ $TCID_{50}$/g), 페오피틴분획물 (5dpi: 2.1$log_{10}$$TCID_{50}$/g, 7dpi: 1.8$log_{10}$$TCID_{50}$/g), 클로렐라 추출물 (5dpi: 2.6$log_{10}$$TCID_{50}$/g, 7dpi: 1.9$log_{10}$$TCID_{50}$/g) 군 모두 공격 접종 5일과 7일에서 유의성 있게 바이러스 역가가 낮아진 결과를 확인하였다. 특히 5 dpi에서 페오피틴화 분획물에서 가장 강한 활성을 나타내어, 클로렐라 추출물 또는 페오피틴 A + B 혼합물보다 항바이러스 활성의 속도가 빠른 것을 알 수 있었다.

[107] 또한, 폐 조직결과 대조군 (7dpi: 3.2$log_{10}$$TCID_{50}$/g)과 비교 시, 페오피틴 A + B (7dpi: 2.2$log_{10}$$TCID_{50}$/g), 페오피틴분획물 (7dpi: 1.8$log_{10}$$TCID_{50}$/g), 클로렐라 추출물 (7dpi: 2.0$log_{10}$$TCID_{50}$/g) 군 모두 공격 접종 7일에서 유의성 있게 바이러스 역가가 낮아진 결과를 확인하였다.

[108] 상기 결과를 통하여 클로렐라 추출물 또는 페오피틴A 및 B의 혼합물이 SARS-CoV-2에 강력한 항바이러스 활성을 갖고 있으며, 페오피틴화분획물은 클로렐라 추출물 또는 페오피틴A 및 B의 혼합물보다 더 높은 항바이러스 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이는 도 6A와 6B에서 알 수 있듯이, 페오피틴화분획물에 포함된 페오피틴A 및 B 이외의 물질, 예를 들어 아포-13-카로테논계 화합물과 같은 카로테논 유도체가 포함됨을 통하여 카로테논유도체와 페오피틴A 및 B와 시너지 효과를 일으켜 강력한 항바이러스 활성을 갖는 것임을 유추할 수 있다.

[109] **<제제예 1. 약학적 제제>**

[110] **제제예 1-1. 정제의 제조**

[111] 본 발명의 클로렐라 추출물 (또는 페오피틴화 분획물) 20 g 또는 페오피틴 A, 페오피틴 B, 알파-아포-13-카로테논 및 베타-아포-13-카로테논으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 200 mg 을 각각 락토오스 175.9 g, 감자전분 180 g 및 콜로이드성 규산 32 g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160 g, 활석 50 g 및 스테아린산 마그네슘 5 g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[112] **제제예 1-2. 주사액제의 제조**

[113] 본 발명의 페오피틴 A, 페오피틴 B, 알파-아포-13-카로테논 및 베타-아포-13-카로테논으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 100 mg, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르브산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 ㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20 ℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[114] **<제제예 2. 식품 제조>**

[115] **제제예 2-1. 조리용 양념의 제조**

[116] 본 발명의 클로렐라 추출물 (또는 페오피틴화 분획물) 또는 페오피틴 A, 페오피틴 B, 알파-아포-13-카로테논 및 베타-아포-13-카로테논으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 을 각각 조리용 양념에 1중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[117] **제제예 2-2. 밀가루 식품의 제조**

[118] 본 발명의 클로렐라 추출물 (또는 페오피틴화 분획물) 또는 페오피틴 A, 페오피틴 B, 알파-아포-13-카로테논 및 베타-아포-13-카로테논으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 을 각각 밀가루에 0.1중량% 로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

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

[120] 본 발명의 클로렐라 추출물 (또는 페오피틴화 분획물) 또는 페오피틴 A, 페오피틴 B, 알파-아포-13-카로테논 및 베타-아포-13-카로테논으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 2 을 각각 육즙에 0.1중량%로 첨가하여 건강 증진용 수프 및 육즙을 제조하였다.

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

[122] 본 발명의 클로렐라 추출물 (또는 페오피틴화 분획물) 또는 페오피틴 A, 페오피틴 B, 알파-아포-13-카로테논 및 베타-아포-13-카로테논으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 을 각각 우유에 0.1중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[123] **제제예 2-5. 야채주스 제조**

[124] 본 발명의 클로렐라 추출물 (또는 페오피틴화 분획물) 20 g 또는 페오피틴 A,

페오피틴 B, 알파-아포-13-카로테논 및 베타-아포-13-카로테논으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 200 mg을 각각 토마토주스 또는 당 근주스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[125] **제제예 2-6. 과일주스 제조**

[126] 본 발명의 클로렐라 추출물 (또는 페오피틴화 분획물) 20 g 또는 페오피틴 A, 페오피틴 B, 알파-아포-13-카로테논 및 베타-아포-13-카로테논으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 200 mg 을 사과주스 또는 포도주스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

청구범위

[청구항 1] 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 또는 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물은 클로렐라 분말을 각각 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 헥산, 아세톤, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물.

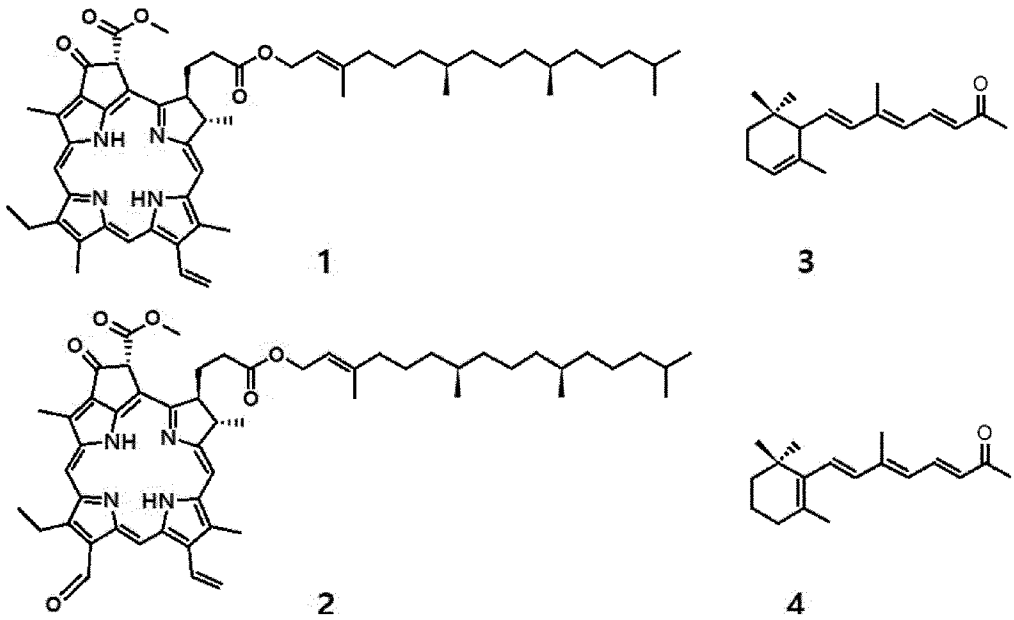
[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 0.5 ~ 1.0 N의 염산수용액에 현탁시킨 후, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 0.05 ~ 10 %(w/v) 의 구연산수용액에 현탁시킨 후, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 물에 현탁시킨 후, 60 ℃에서 30분 ~ 48시간 방치한 다음, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물은 하기 화학식 1의 페오피틴 A (화합물 1), 페오피틴 B (화합물 2), 알파-아포-13-카로테논 (화합물 3) 및 베타-아포-13-카로테논(화합물 4)으로 이루어진 군으로부터 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



[청구항 7] 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 또는 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물은 클로렐라 분말을 각각 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 헥산, 아세톤, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품.

[청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 0.5 ~ 1.0 N의 염산수용액에 현탁시킨 후, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품.

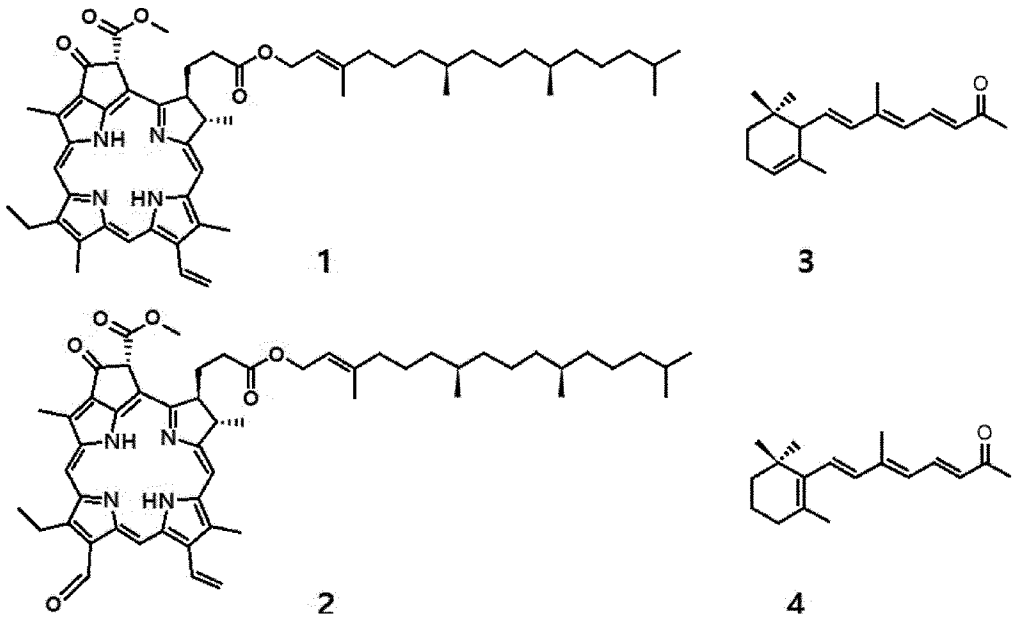
[청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 0.05 ~ 10 %(w/v) 의 구연산수용액에 현탁시킨 후, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품.

[청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 물에 현탁시킨 후, 60 ℃에서 30분 ~ 48시간 방치한 다음, 헥산,

메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품.

[청구항 12] 제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 신종코로나 바이러스 감염의 증상 의료용품은 하기 화학식 1의 페오피틴 A (화합물 1), 페오피틴 B (화합물 2), 알파-아포-13-카로테논 (화합물 3) 및 베타-아포-13-카로테논(화합물 4) 으로 이루어진 군으로부터 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염의 예방 또는 증상 개선용 건강기능식품.

[화학식 1]



[청구항 13] 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물 또는 이의 페오피틴화 분획물 또는 이로부터 분리한 폴피린계 또는 카로테논계 화합물을 유효성분으로 포함하는 신종코로나 바이러스 감염 예방용 소독제.

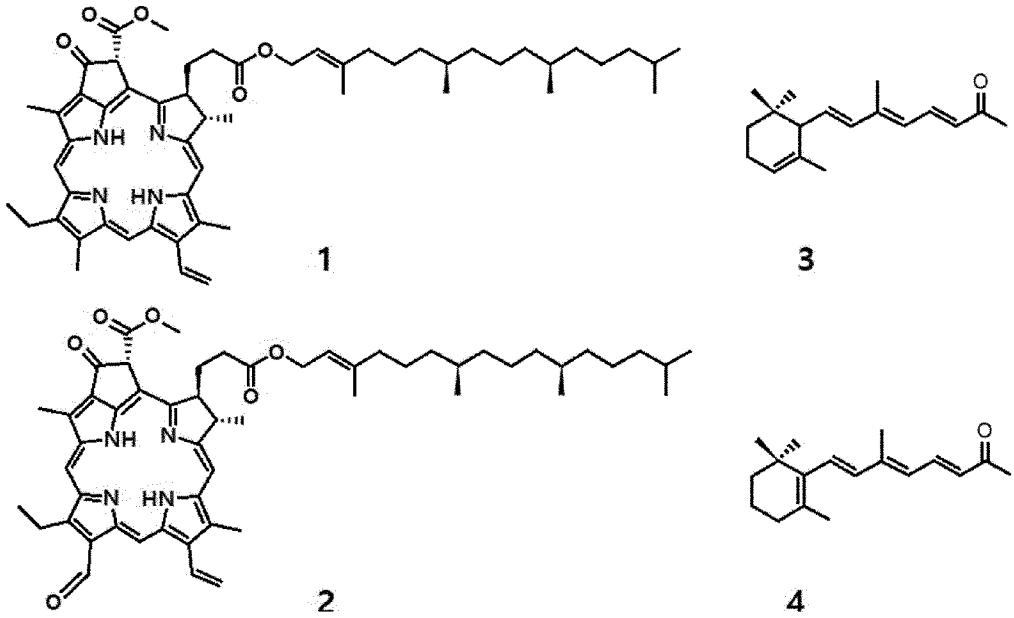
[청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 0.5 ~ 1.0 N의 염산수용액에 현탁시킨 후, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염 예방용 소독제.

[청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 0.05 ~ 10 %(w/v) 의 구연산수용액에 현탁시킨 후, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염 예방용 소독제.

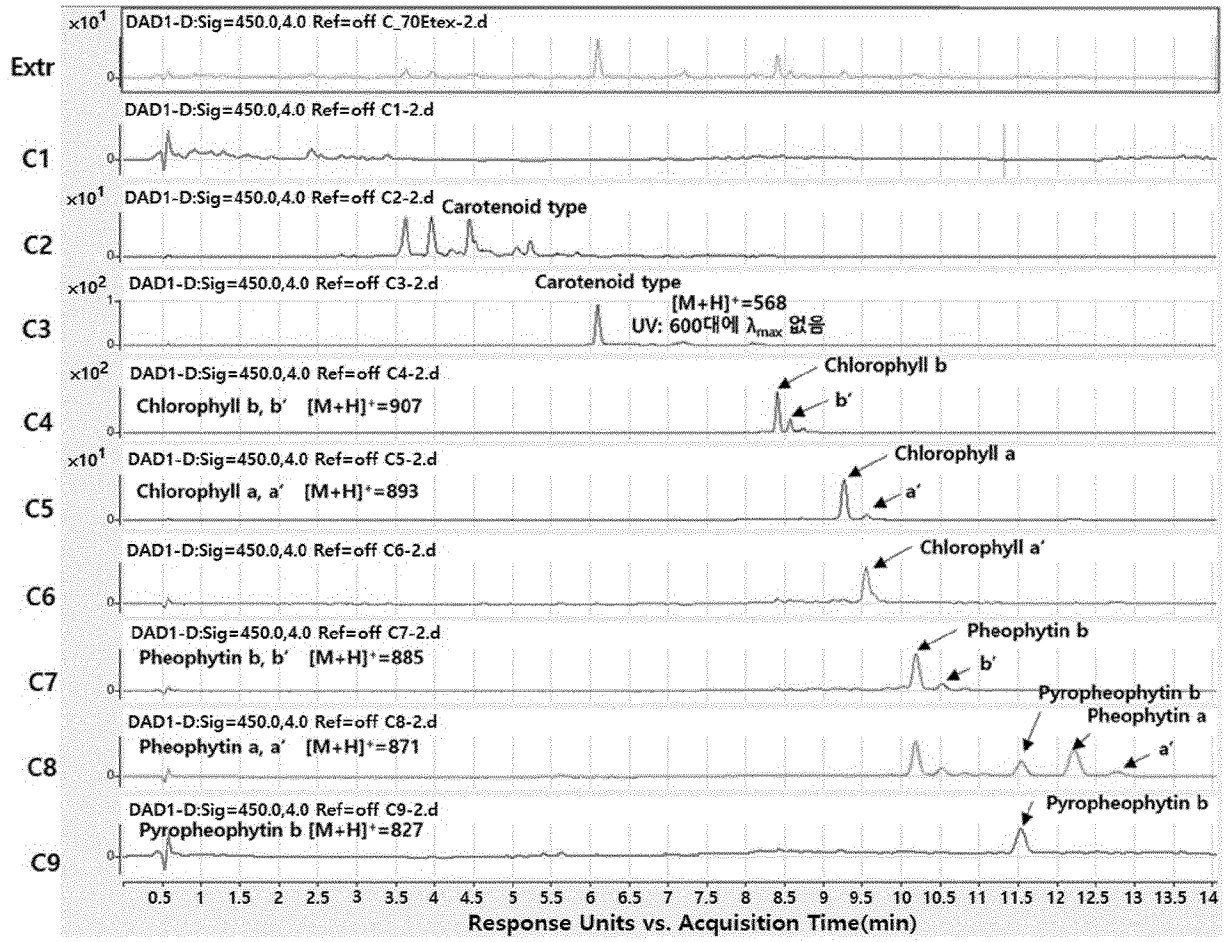
[청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 클로렐라(*Chlorella* sp.)추출물의 페오피틴화 분획물은 클로렐라 추출물을 물에 현탁시킨 후, 60 ℃에서 30분 ~ 48시간 방치한 다음, 헥산, 메틸렌 클로라이드, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염 예방용 소독제.

[청구항 17] 제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에서 있어서,
상기 신종코로나 바이러스 감염 예방용 소독제은 하기 화학식 1의 페오피틴 A (화합물 1), 페오피틴 B (화합물 2), 알파-아포-13-카로테논 (화합물 3) 및 베타-아포-13-카로테논(화합물 4) 으로 이루어진 군으로부터 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 신종코로나 바이러스 감염 예방용 소독제.

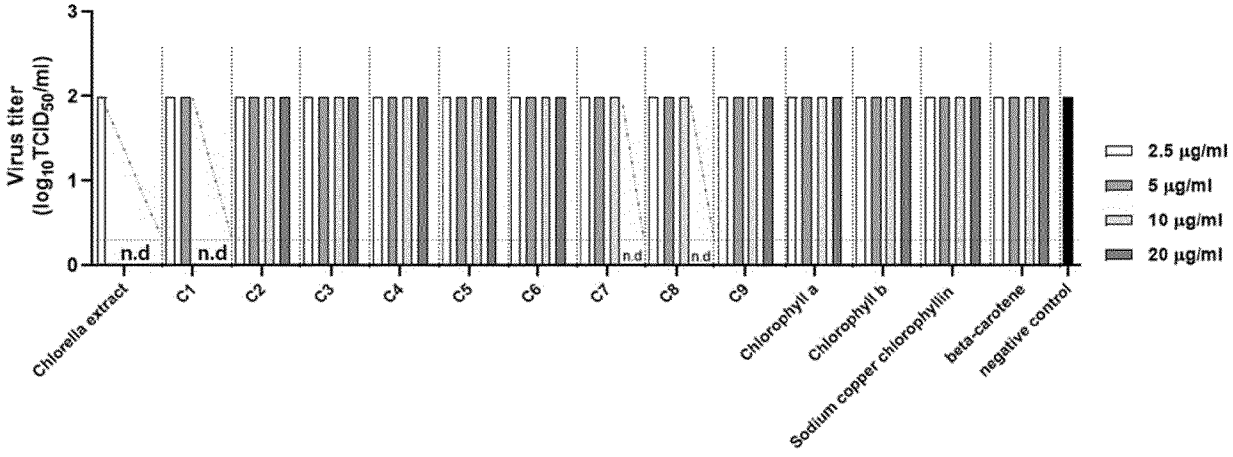
[화학식 1]



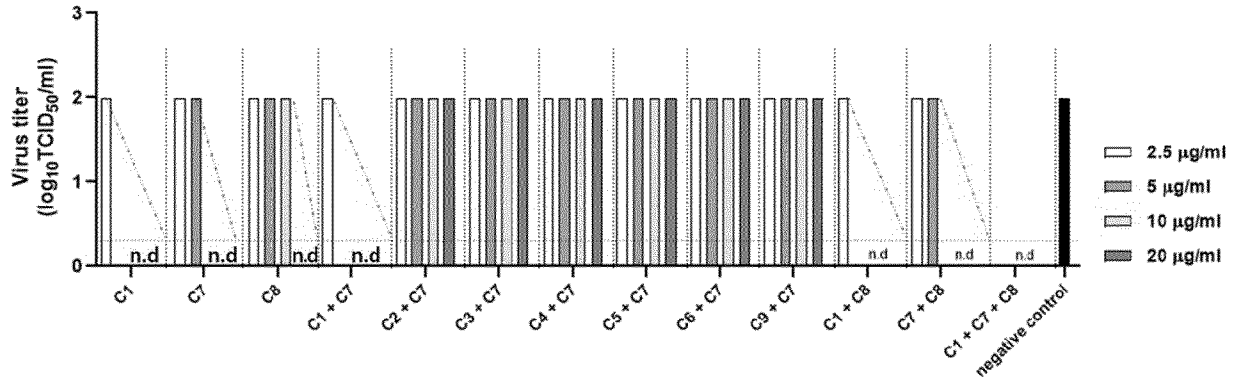
[도1]


Extr
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C_70Etex-2.d
C1
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C1-2.d
C2
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C2-2.d
Carotenoid type
C3
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C3-2.d
Carotenoid type
[M+H]+=568
UV: 600대에 λmax 없음
C4
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C4-2.d
Chlorophyll b, b' [M+H]+=907
Chlorophyll b
b'
C5
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C5-2.d
Chlorophyll a, a' [M+H]+=893
Chlorophyll a
a'
C6
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C6-2.d
Chlorophyll a'
C7
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C7-2.d
Pheophytin b, b' [M+H]+=885
Pheophytin b
b'
C8
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C8-2.d
Pheophytin a, a' [M+H]+=871
Pyropheophytin b
Pheophytin a
a'
C9
DAD1-D:Sig=450.0,4.0 Ref=off C9-2.d
Pyropheophytin b [M+H]+=827
Pyropheophytin b
0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 9 9.5 10 10.5 11 11.5 12 12.5 13 13.5 14
Response Units vs. Acquisition Time(min)

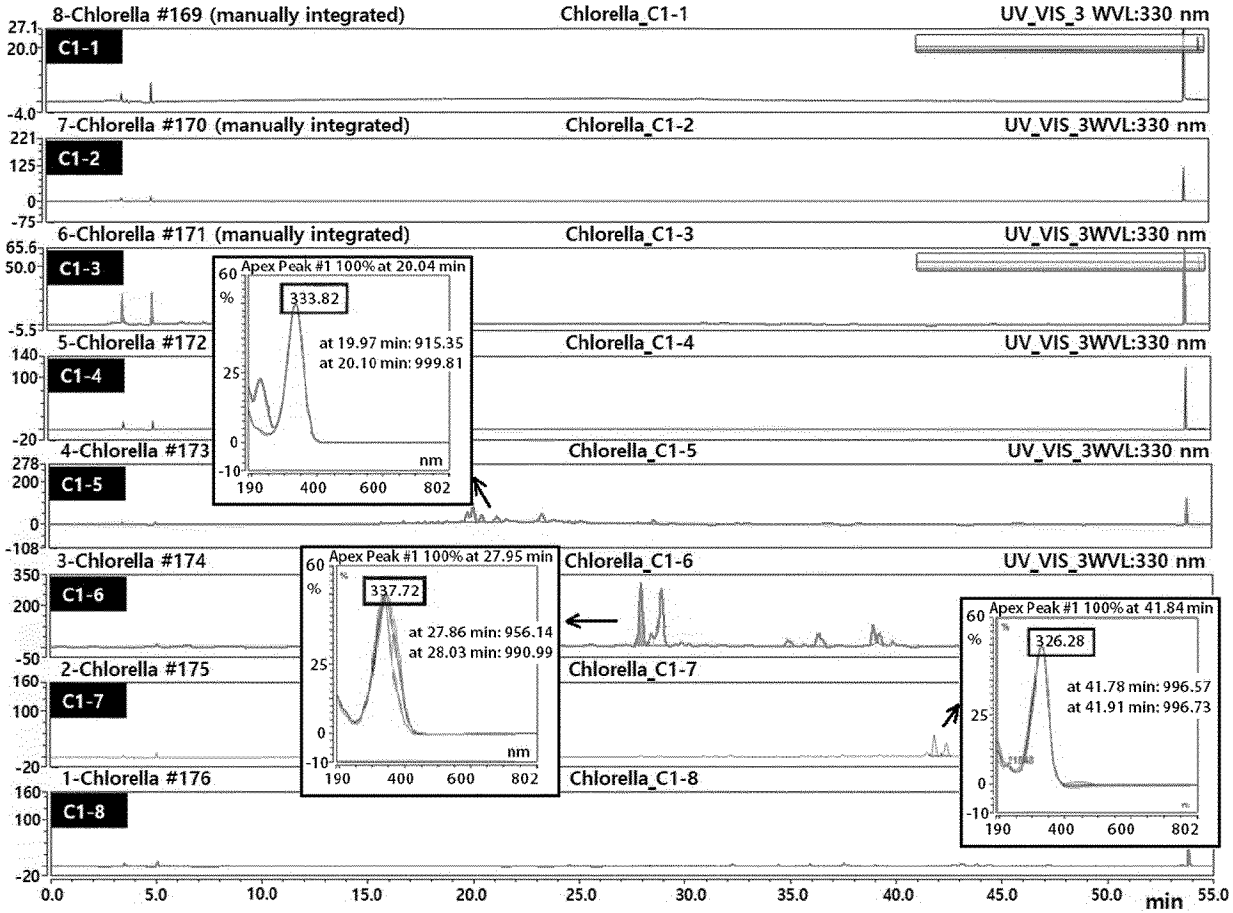
[도2]


Virus titer (log10TCID50/ml)
n.d
Chlorella extract
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
Chlorophyll a
Chlorophyll b
Sodium copper chlorophyllin
beta-carotene
negative control
2.5 μg/ml
5 μg/ml
10 μg/ml
20 μg/ml

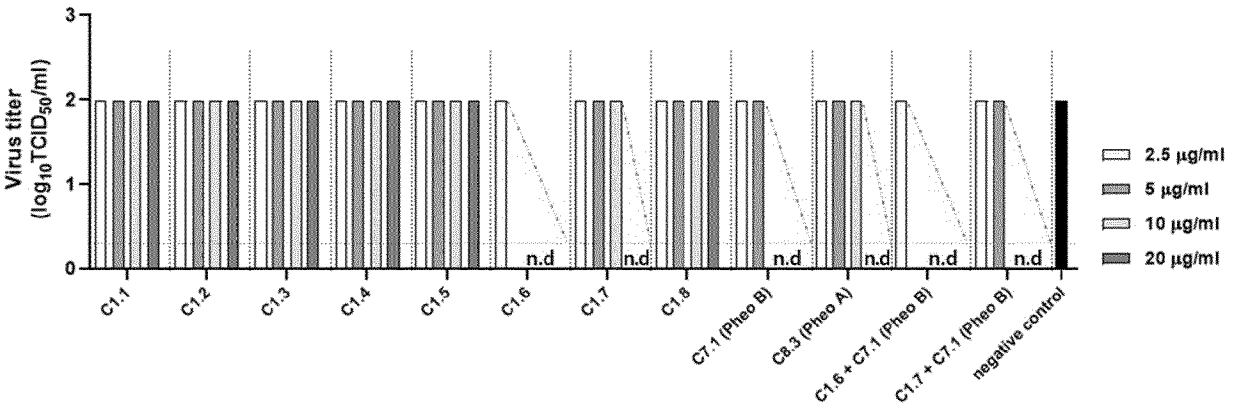
[도3]


Virus titer (log10TCID50/ml)
n.d
C1
C7
C8
C1 + C7
C2 + C7
C3 + C7
C4 + C7
C5 + C7
C6 + C7
C9 + C7
C1 + C8
C7 + C8
C1 + C7 + C8
negative control
2.5 μg/ml
5 μg/ml
10 μg/ml
20 μg/ml

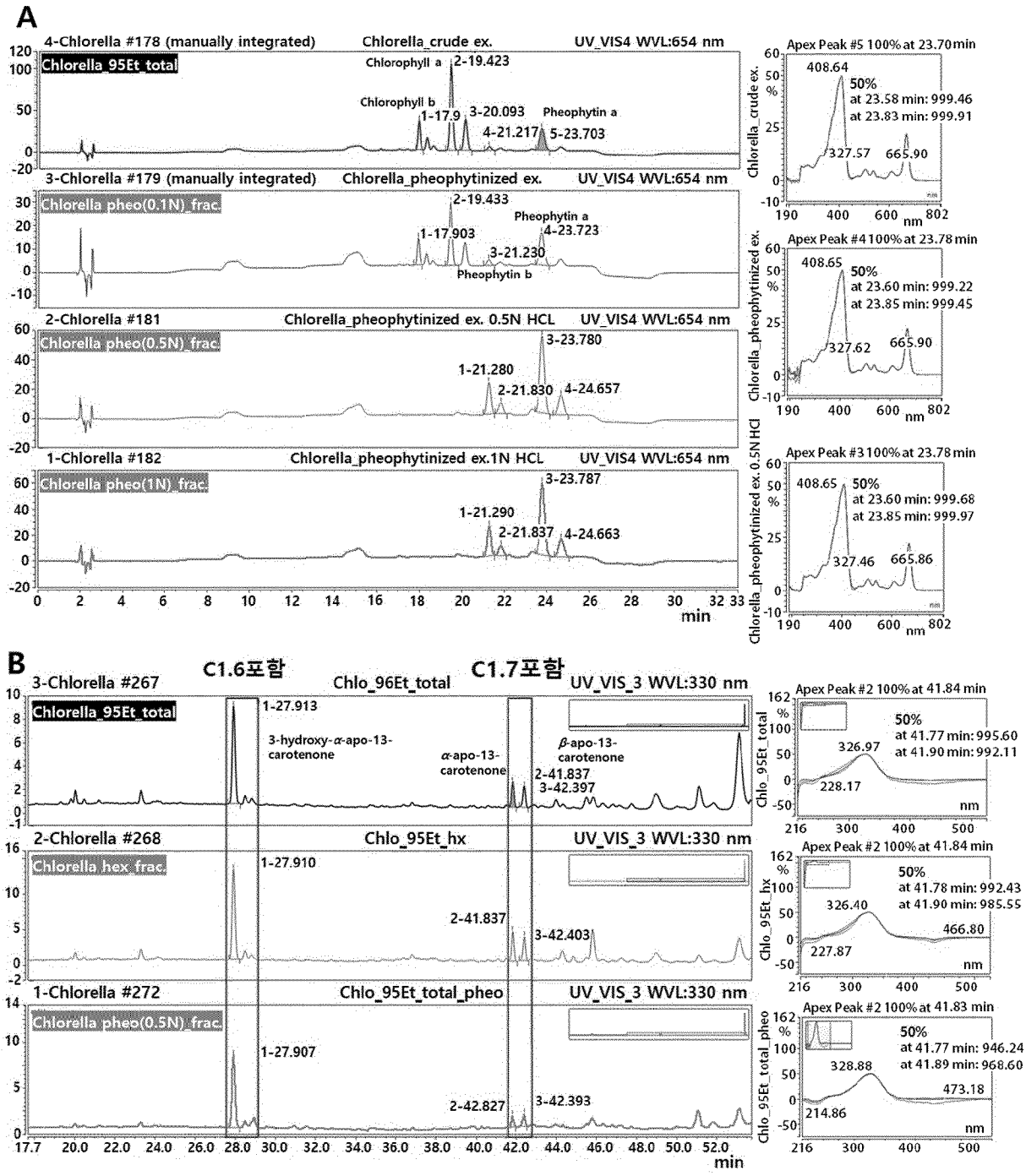
[도4]


8-Chlorella #169 (manually integrated)
Chlorella_C1-1
UV_VIS_3 WVL:330 nm
C1-1
7-Chlorella #170 (manually integrated)
Chlorella_C1-2
UV_VIS_3WVL:330 nm
C1-2
6-Chlorella #171 (manually integrated)
Chlorella_C1-3
UV_VIS_3WVL:330 nm
C1-3
Apex Peak #1 100% at 20.04 min
333.82
at 19.97 min: 915.35
at 20.10 min: 999.81
5-Chlorella #172
Chlorella_C1-4
UV_VIS_3WVL:330 nm
C1-4
4-Chlorella #173
Chlorella_C1-5
UV_VIS_3WVL:330 nm
C1-5
3-Chlorella #174
Chlorella_C1-6
UV_VIS_3WVL:330 nm
C1-6
Apex Peak #1 100% at 27.95 min
337.72
at 27.86 min: 956.14
at 28.03 min: 990.99
2-Chlorella #175
Chlorella_C1-7
C1-7
Apex Peak #1 100% at 41.84 min
326.28
at 41.78 min: 996.57
at 41.91 min: 996.73
1-Chlorella #176
Chlorella_C1-8
C1-8
nm
min

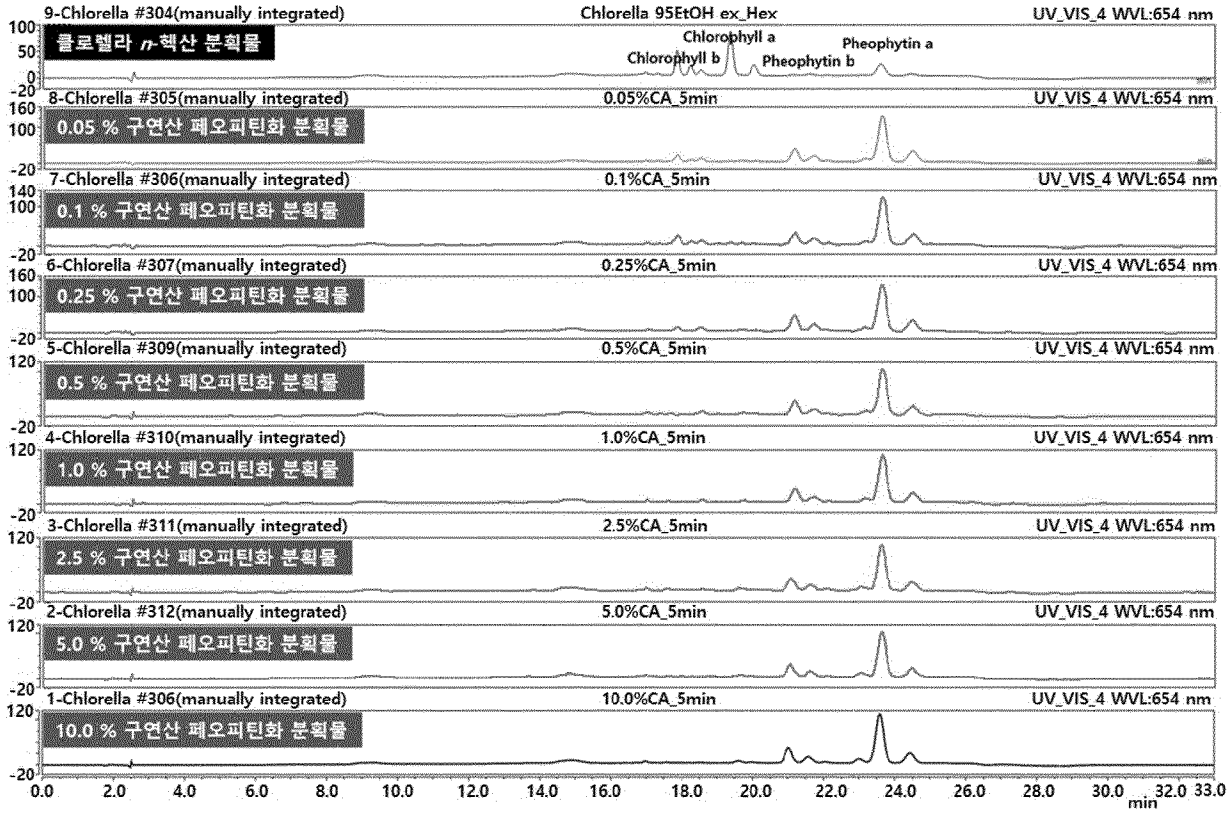
[도5]


Virus titer
(log10TCID50/ml)
n.d
C1.1
C1.2
C1.3
C1.4
C1.5
C1.6
C1.7
C1.8
C7.1 (Pheo B)
C8.3 (Pheo A)
C1.6 + C7.1 (Pheo B)
C1.7 + C7.1 (Pheo B)
negative control
2.5 μg/ml
5 μg/ml
10 μg/ml
20 μg/ml

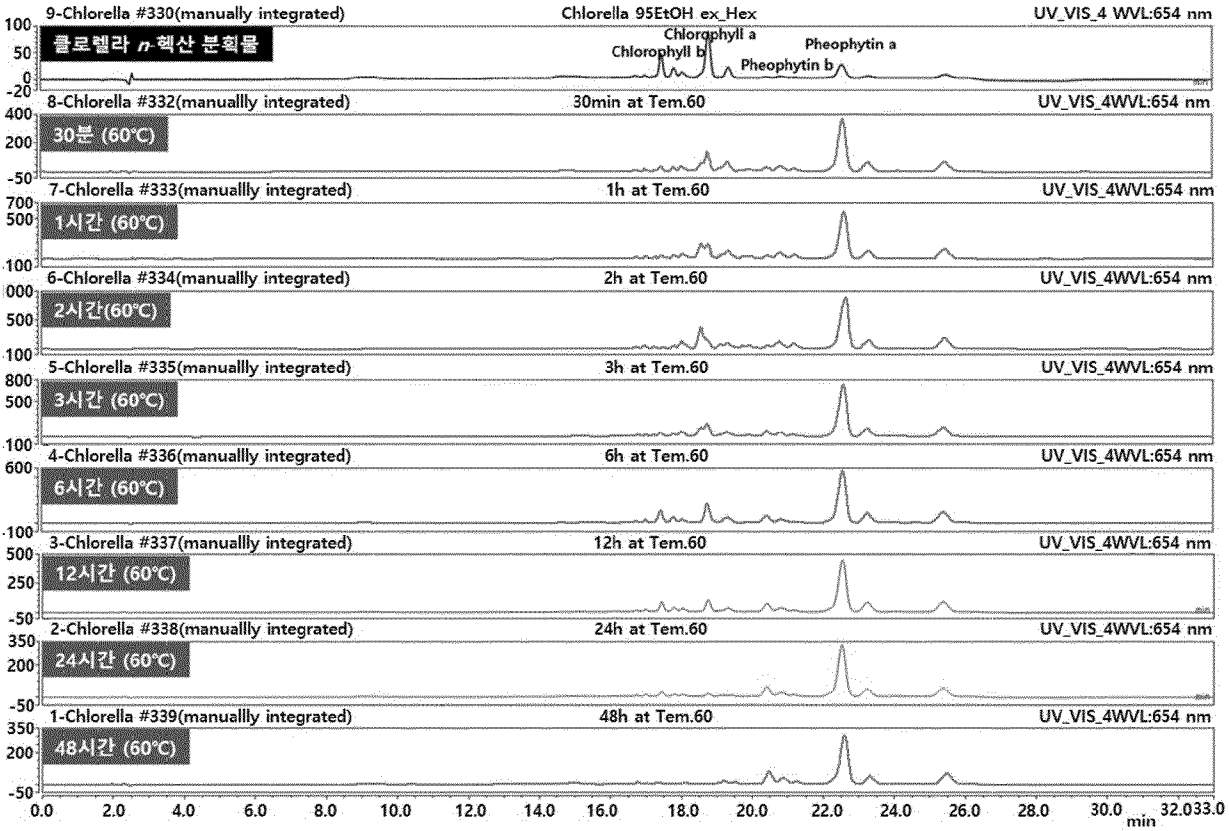
[도6]


A
4-Chlorella #178 (manually integrated)
Chlorella_crude ex.
UV_VIS4 WVL:654 nm
Chlorella_95Et_total
Chlorophyll a
Chlorophyll b
Pheophytin a
Pheophytin b
3-Chlorella #179 (manually integrated)
Chlorella_pheophytinized ex.
Chlorella pheo(0.1N) frac.
2-Chlorella #181
Chlorella_pheophytinized ex. 0.5N HCL
Chlorella pheo(0.5N) frac.
1-Chlorella #182
Chlorella_pheophytinized ex.1N HCL
Chlorella pheo(1N) frac.
min
Apex Peak #5 100% at 23.70 min
Apex Peak #4 100% at 23.78 min
Apex Peak #3 100% at 23.78 min
B
C1.6포함
C1.7포함
3-Chlorella #267
Chlo_96Et_total
UV_VIS_3 WVL:330 nm
Chlorella_95Et_total
3-hydroxy-α-apo-13-carotenone
α-apo-13-carotenone
β-apo-13-carotenone
2-Chlorella #268
Chlo_95Et_hx
Chlorella hex frac.
1-Chlorella #272
Chlo_95Et_total_pheo
Chlorella pheo(0.5N) frac.
Apex Peak #2 100% at 41.84 min
Apex Peak #2 100% at 41.84 min
Apex Peak #2 100% at 41.83 min

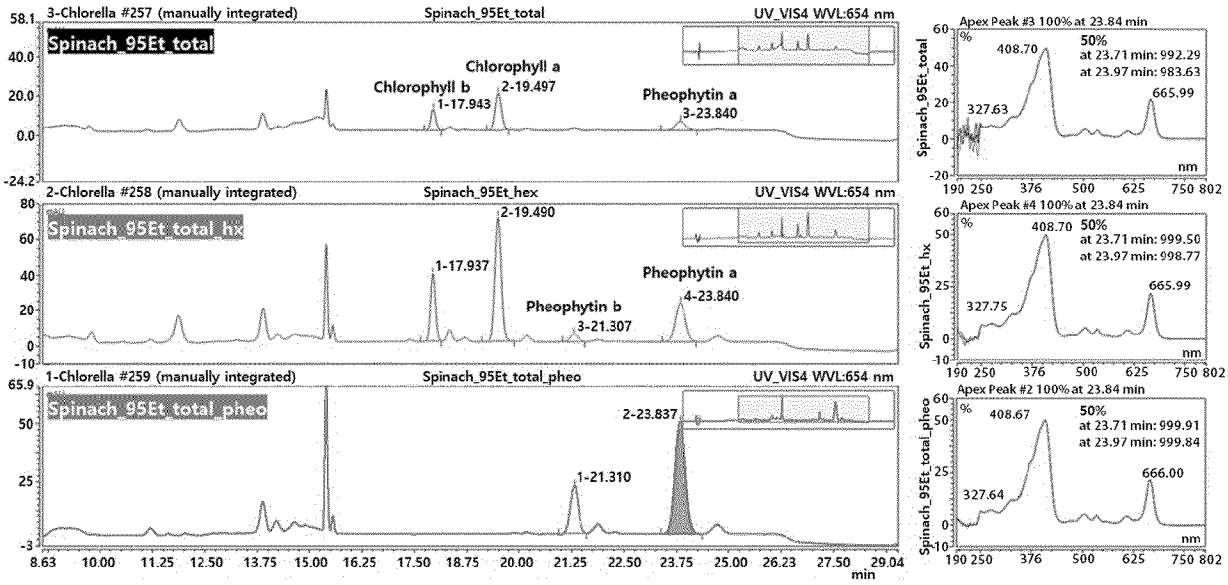
[도7]


9-Chlorella #304(manually integrated)
Chlorella 95EtOH ex_Hex
UV_VIS_4 WVL:654 nm
클로렐라 n-헥산 분획물
Chlorophyll a
Chlorophyll b
Pheophytin a
Pheophytin b
8-Chlorella #305(manually integrated)
0.05%CA_5min
0.05 % 구연산 폐오피틴화 분획물
7-Chlorella #306(manually integrated)
0.1%CA_5min
0.1 % 구연산 폐오피틴화 분획물
6-Chlorella #307(manually integrated)
0.25%CA_5min
0.25 % 구연산 폐오피틴화 분획물
5-Chlorella #309(manually integrated)
0.5%CA_5min
0.5 % 구연산 폐오피틴화 분획물
4-Chlorella #310(manually integrated)
1.0%CA_5min
1.0 % 구연산 폐오피틴화 분획물
3-Chlorella #311(manually integrated)
2.5%CA_5min
2.5 % 구연산 폐오피틴화 분획물
2-Chlorella #312(manually integrated)
5.0%CA_5min
5.0 % 구연산 폐오피틴화 분획물
1-Chlorella #306(manually integrated)
10.0%CA_5min
10.0 % 구연산 폐오피틴화 분획물
min

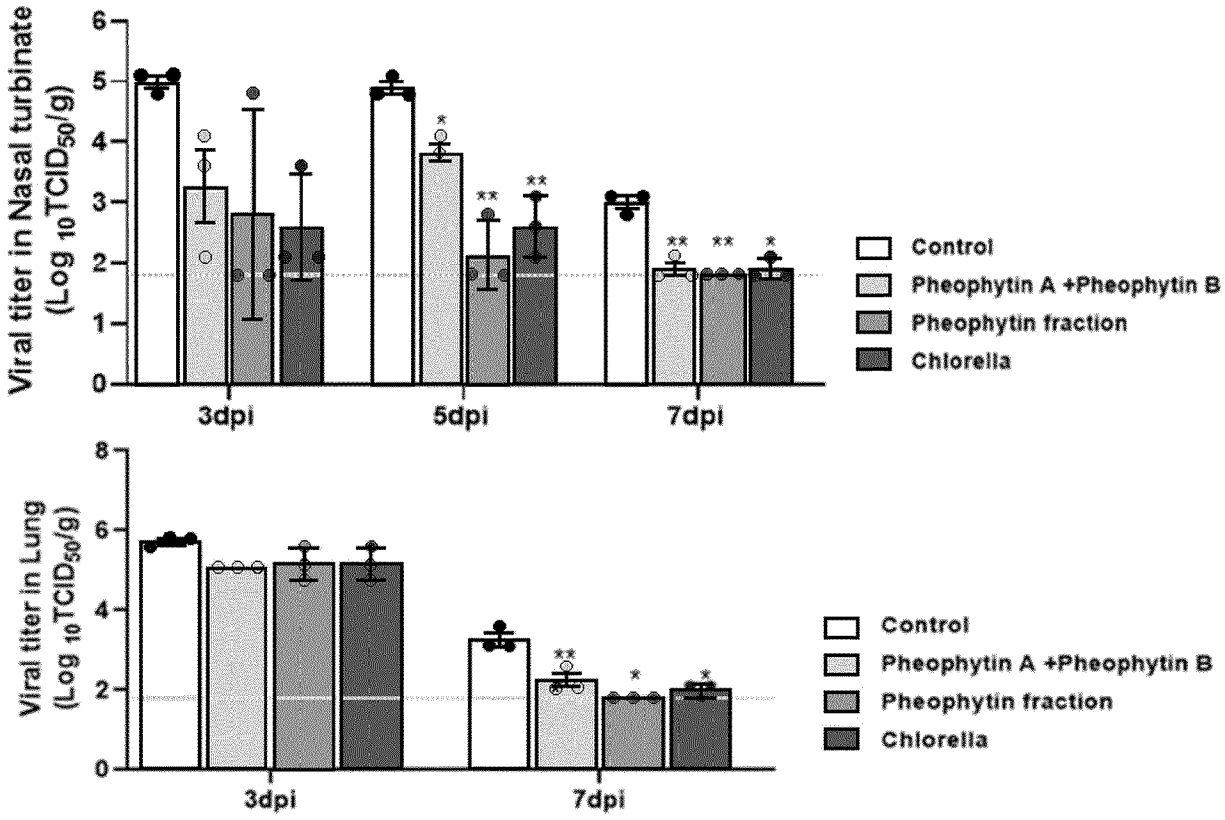
[도8]


9-Chlorella #330(manually integrated)
Chlorella 95EtOH ex_Hex
UV_VIS_4 WVL:654 nm
클로렐라 n-헥산 분획물
Chlorophyll a
Chlorophyll b
Pheophytin a
Pheophytin b
8-Chlorella #332(manuallly integrated)
30min at Tem.60
UV_VIS_4WVL:654 nm
30분 (60℃)
7-Chlorella #333(manuallly integrated)
1h at Tem.60
1시간 (60℃)
6-Chlorella #334(manuallly integrated)
2h at Tem.60
2시간(60℃)
5-Chlorella #335(manuallly integrated)
3h at Tem.60
3시간 (60℃)
4-Chlorella #336(manuallly integrated)
6h at Tem.60
6시간 (60℃)
3-Chlorella #337(manuallly integrated)
12h at Tem.60
12시간 (60℃)
2-Chlorella #338(manuallly integrated)
24h at Tem.60
24시간 (60℃)
1-Chlorella #339(manuallly integrated)
48h at Tem.60
48시간 (60℃)
min

[도9]


3-Chlorella #257 (manually integrated)
Spinach_95Et_total
UV_VIS4 WVL:654 nm
Spinach_95Et_total
Chlorophyll b
1-17.943
Chlorophyll a
2-19.497
Pheophytin a
3-23.840
2-Chlorella #258 (manually integrated)
Spinach_95Et_hex
UV_VIS4 WVL:654 nm
Spinach_95Et_total_hx
2-19.490
1-17.937
Pheophytin a
4-23.840
Pheophytin b
3-21.307
1-Chlorella #259 (manually integrated)
Spinach_95Et_total_pheo
UV_VIS4 WVL:654 nm
Spinach_95Et_total_pheo
2-23.837
1-21.310
min
Apex Peak #3 100% at 23.84 min
50%
at 23.71 min: 992.29
at 23.97 min: 983.63
408.70
327.63
665.99
Spinach_95Et_total
Apex Peak #4 100% at 23.84 min
50%
at 23.71 min: 999.50
at 23.97 min: 998.77
408.70
327.75
665.99
Spinach_95Et_hx
Apex Peak #2 100% at 23.84 min
50%
at 23.71 min: 999.91
at 23.97 min: 999.84
408.67
327.64
666.00
Spinach_95Et_total_pheo
nm

[도10]


Viral titer in Nasal turbinate
(Log 10TCID50/g)
3dpi
5dpi
7dpi
Control
Pheophytin A +Pheophytin B
Pheophytin fraction
Chlorella
Viral titer in Lung
(Log 10TCID50/g)
3dpi
7dpi
Control
Pheophytin A +Pheophytin B
Pheophytin fraction
Chlorella