



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0097016
(43) 공개일자 2016년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/483 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/483 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0018801
(22) 출원일자 2015년02월06일
심사청구일자 2015년02월06일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청원군 강외면 오송생명2로 187
(72) 발명자
이성준
서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 104동 402호 (청담동, 청담공원아파트)
송문정
서울특별시 성북구 종암로25길 30, 101동 1402호 (종암동, 삼성래미안아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이치영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 12 항

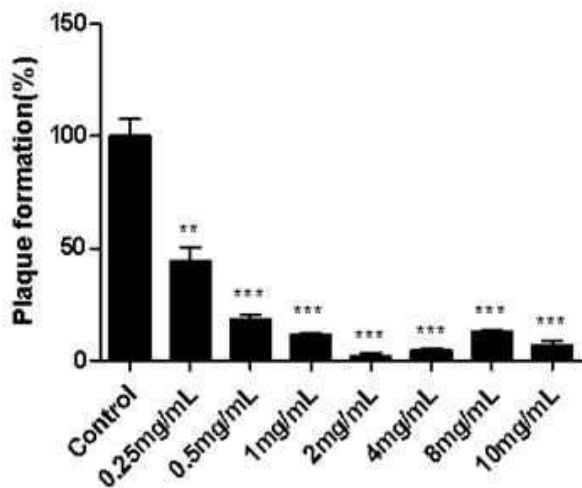
(54) 발명의 명칭 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물

(57) 요약

본 발명은 조각자 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 노로바이러스(Norovirus) 활성 및 증식을 억제하는 조각자 추출물을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물은 식중독을 유발하는 노로바이러스를 억제하는 활성이 매우 우수하며, 천연물 유래 추출물이기 때문에 안정성이 인정되어 각종 식품 및 약품, 조리기구 등에 직접 적용이 가능한 장점을 가져 소비자가 노로바이러스에 노출되는 빈도를 최대한 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도1



	Plaque formation(%)
Control	100
0.25mg/mL	44.56
0.5mg/mL	18.65
1mg/mL	11.40
2mg/mL	2.07
4mg/mL	4.66
8mg/mL	12.95
10mg/mL	6.74

(72) 발명자

고광표

서울특별시 서초구 효령로 391, 6동 508호 (서초동, 무지개아파트)

유현주

인천광역시 남동구 석산로169번길 25 (간석동)

김도경

서울특별시 동대문구 무학로45길 30, 205호 (용두동)

이희정

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 연구심사동 A 미생물과 (식품의약품안전처)

주인선

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 연구심사동 A 미생물과 (식품의약품안전처)

이정수

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 연구심사동 A 미생물과 (식품의약품안전처)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 14162MFDS973

부처명 식품의약품안전처

연구관리전문기관 식품의약품안전평가원

연구사업명 노로바이러스 식중독 근원적 예방 연구

연구과제명 노로바이러스 저감화 기술개발 및 제어 물질탐색 연구

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교

연구기간 2014.03.01 ~ 2014.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조각자 추출물은 착즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출 또는 환류 냉각 추출로 수득하는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 용매 추출은 에탄올, 메탄올, 아세톤, 헥산(hexane), 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 물 또는 이들의 혼합물로 추출한 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 노로바이러스인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 노로바이러스는 뮤린노로바이러스 또는 휴먼노로바이러스인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.

청구항 6

조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 건강기능성 식품.

청구항 8

조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 사료첨가제.

청구항 9

조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 식품 소스 또는 샐러드 드레싱.

청구항 10

조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 식품첨가제.

청구항 11

조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 사멸제.

청구항 12

조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스에 의한 식중독 예방용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 조각자 추출물을 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 노로바이러스(Norovirus) 활성 및 증식을 억제하는 조각자 추출물을 함유하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식품 위해 병원체는 박테리아와 바이러스로 크게 나눌 수 있다. 노로바이러스는 선진국의 경우 비세균성 장염의 90% 이상 발병원인으로 알려져 있으며, 전 세계 모든 연령층에 발생하는 식중독의 주요 원인체이다. 노로바이러스는 전염성이 강해 대규모 발생 위험성을 가지고 있다. 이 때문에 세계 각국에서 노로바이러스로 인한 식중독 예방 및 관리를 위해 여러 법규를 시행하고 있다. 미국 질병관리본부조사(CDC)에 의하면 수인성으로 인한 장염 환자의 70% 이상이 노로바이러스에 의한 것으로 보고되고 있다. 국내에는 1999년 처음 보고되어 2003-2004년 대형식중독을 일으키며 주목받기 시작하여 2007년 1~5월까지 발생한 식중독 사고 중 40% 이상이 노로바이러스가 원인체로 밝혀지는 등, 매년 노로바이러스에 의한 식중독발생이 증가하고 있어 집단식중독 유발 병원체의 효과적인 관리를 위해 2006년 질병관리본부는 신고대상 병원체로 지정하여 감시를 강화하고 있다(김경란, 김영목, 이은우, 이대성, 이명숙 *et al.*, 2009, *생명과학회지* 19:928-933). 식중독으로 인한 사회경제적 비용은 연간 약 1조 3천억 원에 달한다고 보고되었으며, 지속적으로 증가하고 있다. 특히, 노로바이러스에 의한 급성 장염이 전체 식중독의 30%를 차지한다고 계산하더라도 노로바이러스에 의한 손실액만 약 4천억 원 이상으로 추정된다. 이에 국내에서는 노로바이러스에 의한 식중독을 법정 전염병으로 지정하였으며, 질병관리본부에서 노로바이러스의 유행 여부를 지속적으로 감시 및 조사하고 있다.

[0003] 노로바이러스는 칼리시바이러스(Calicivirus)과이고 약 7.6 kb의 단일가닥 RNA 유전체로 구성되어 있다. 노로바이러스에는 5개의 유전그룹(GI~GV)이 있는데, 이 중 GI과 GII는 휴먼노로바이러스로 사람에게 병을 유발하고 급성 위장염을 일으킨다. 이 두 그룹은 감염, 분자 생물학, 전염학 그리고 계통학적으로 굉장히 다르며, 최근 이 두 그룹에서 30가지의 서로 다른 유전형이 캡시드 유전자의 베이스 시퀀스에 따라 분류되었다고 한다(김종임, 박귀성 *et al.*, 2011, *Journal of Bacteriology and Virology* 41:287-293). 이렇게 다양한 유전형 때문에 노로바이러스 감염에 대한 약이나 백신이 개발되기 어렵다. 최근에, B 세포에 휴먼노로바이러스를 감염시킨 사례가 나타났지만(Melissa K. *et al.*, 2014, *Science*, 346:755-759) 아직까지는 관련 연구가 원활하게 진행되지 못하는 실정이다. 그러나 휴먼노로바이러스의 대체 시스템(surrogate system)인 뮤린노로바이러스(GV 그룹)는 RAW 264.7 세포에 배양이 되기 때문에 비교적 연구가 활발히 진행되어 휴먼노로바이러스 저감화 연구의 대체 역할을 하고 있다(Christine E. W., Larissa B. T., and Virgin I. V. H. W. *et al.*, 2006, *J. Virol.*, 80:5104-5112).

[0004] 한편 노로바이러스 제거를 위한 대표적인 저감화 기법으로는 지하수에 열처리, 자외선 처리 및 필터 여과 등을 시행하는 물리적인 방법과 염소, 오존 등의 살균제를 처리하는 화학적 방법이 있다. 화학적 저감화 방법은 비용이 저렴하다는 장점이 있으나 소독 부산물 및 잔여물이 있다는 단점이 있다. 물리적 저감화 방법은 소독 부산물 및 잔여물이 적지만, 잔류효과가 낮아 2차 오염의 가능성이 있다. 따라서 이를 보완하기 위한 연구가 필요하다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 바이러스 제거과정에서 발생하는 불필요한 부산물 및 잔여물과 바이러스 제거 효율이 떨어지는 단점을 극복하고 효과적으로 바이러스를 제거하기 위한 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물을 개발하고, 이를 이용할 경우, 특이적으로 노로바이러스에 대한 저해 효과를 보임과 동시에 노로바이러스에 감염된 세포의 사멸이 일어나지 않는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 바이러스 제거과정의 효율을 높이기 위한 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 특히 노로바이러스에 대해 조각자 추출물을 이용함으로써 식중독을 예방하고, 노로바이러스에 감염된 세포의 사멸이 발생하지 않고 식품, 약품 및 조리기구 등에 직접적으로 적용이 가능한 안정성 있는 노로바이러스 활성 억제용 조각자 추출물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 사료첨가제를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 식품 소스 또는 샐러드 드레싱을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 식품첨가제를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 사멸제를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스에 의한 식중독 예방용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물은 식중독을 유발하는 노로바이러스를 억제하는 활성이 매우 우수하며, 천연물 유래 추출물이기 때문에 안정성이 인정되어 각종 식품 및 약품, 조리기구 등에 직접 적용이 가능한 장점을 가져 소비자가 노로바이러스에 노출되는 빈도를 최대한 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 조각자 추출물 조성물과 묶인노로바이러스를 72시간 동안 4℃에서 반응시킨 후, RAW 264.7 세포에 1시간 동안 처리한 후 나타난 플라크 형성 저해 활성을 나타낸 그래프이다. 각각의 발현정도는 평균±SEM으로 나타내었다. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.005 vs. control)

도 2는 도 1의 플라크 형성 저해 활성 결과를 이용하여 바이러스 증식의 50% 억제 농도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 조각자 추출물 조성물의 세포독성 실험결과를 나타낸 것으로, 조각자 추출물 조성물을 RAW 264.7 세포에 농도별 (5, 20, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$)로 24시간 처리한 후, MTT 용액을 3시간 처리하여 관찰한 세포 생존정도를 나타낸 그래프이다. 각각의 생존정도는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명에서는, 조각자 추출물의 노로바이러스 저감화 효과를 평가하기 위해 체외(in vitro) 배양이 가능한 뮤린노로바이러스(Murine Norovirus)를 이용하여 플라크 어세이(Plaque assay)를 실시하였고, 조각자 추출물의 처리농도에서 잠재적인 독성을 평가하기 위해 세포 생존율 측정법(MTT assay)을 수행하여 향후 약품, 식품 및 조리기구에서 노로바이러스 활성을 줄일 수 있는 소재를 개발하고자 하였다. 본 발명에서는 휴먼노로바이러스의 배양방법 및 동물모델의 개발이 더딘 이유로 휴먼노로바이러스의 대체 시스템인 뮤린노로바이러스를 사용하였고, 뮤린노로바이러스에 대해 나타나는 항바이러스 효과는 휴먼노로바이러스에도 동일하게 적용되는 것을 의미한다(Christine E. W., Larissa B. T., and Virgin I. V. H. W. *et al.*, 2006, *J. Virol*, 80:5104-5112).
- [0018] 본 발명의 일 실시예에서는, 채취한 조각자 재료를 건조시킨 후 건조 중량에 대해 10배의 90% 에탄올을 첨가하여 24시간 동안 실온에서 추출한 후, 여과액에서 불용성 물질을 제거하고 농축 및 동결 건조하여 조각자 추출물을 준비하였다.
- [0019] 본 발명의 다른 실시예에서는, 조각자 추출물 조성물을 뮤린노로바이러스와 72시간, 4℃에서 반응시킨 후 RAW 264.7 세포에 처리한 결과 바이러스에 의해 형성된 플라크의 수가 대조군 대비 유의적으로 감소하였고, 이를 통해 조각자 추출물의 노로바이러스에 대한 항바이러스 활성을 확인하였다(도 1).
- [0020] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 조각자 추출물을 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 및 10 mg/mL의 농도 범위에서 뮤린노로바이러스 증식의 50% 억제 농도를 시험한 결과, 조각자 추출물의 IC_{50} 가 0.3061 mg/mL인 것으로 확인되었다. 이는 매우 낮은 농도의 조각자 추출물에서도 뮤린노로바이러스 증식 50% 억제 효과를 나타내어 높은 항바이러스 활성을 보임을 확인하였다(도 2).
- [0021] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 조각자 추출물은 착즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출 또는 환류냉각 추출로 수득되는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 용매 추출인 것을 특징으로 할 수 있지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 용매 추출은 에탄올, 메탄올, 아세톤, 헥산(hexane), 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 물 또는 이들의 혼합물로 추출한 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 90% 에탄올인 것을 특징으로 할 수 있지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 바이러스는 노로바이러스인 것을 특징으로 하며, 더욱 자세하게는 뮤린노로바이러스 또는 휴먼노로바이러스인 것을 특징으로 할 수 있지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에서, 조각자는 중국원산의 장미목 콩과 낙엽교목인 조각자나무의 가시를 의미한다. 생김새는 큰 가지 여러 개가 갈라져 있고 큰 가지에는 작은 가지가 달려 있다. 색은 적자색 혹은 적갈색이며 가지 끝 부분은 광택이 있다. 조각자는 에틸 갈레이트(ethyl gallate), 카페인산, 에리오딕티올(eriodictyol), 퀘르세틴(quercetin), (-)-에피카테킨(epicatechin) 등의 성분을 포함한다.
- [0026] 본 발명에서, 용매는 용액의 매체가 되어 용질을 녹이는 물질로, 주로 액체나 기체상을 띤다. 용매가 액체상태에 있는 경우에는 무기용매와 유기용매로 구분할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용매는 무기용매인 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물로부터 선택되는 용매일 수 있다. 물을 용매로 사용할 경우, 열수추출법을 통하여 용매 추출물을 제조할 수 있다. 유기용매는 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤 등의 극성용매와 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산, 디클로로메탄 등의 비극성용매일 수 있다. 예를 들어, 상기 탄소수 1 내지 5의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올 등으로부터 선택될 수 있다. 용매는 2종 이상 사용할 수 있으며, 용매의 극성에 따라 순차적으로 사용하거나 혼합하여 사용하여, 각 용매 추출물을 제조할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0027] 본 발명에서, 노로바이러스는 칼리시바이러스(Calicivirus)과이고 스스로 mRNA로 작용하는 약 7.6 kb의 단일가

닥 RNA 유전체로 구성되어 있다. 이는 세 개의 개방형 해독틀(ORF, open reading frame) ORF1, ORF2, ORF3으로 이루어져 있다. ORF1은 바이러스 복제를 위해 필수인 단백질로 번역되고, ORF2는 주요 구조적 캡시드 단백질인 바이러스 단백질 1(VP1, viral protein 1)으로 번역된다. VP1은 N-말단 도메인, 외피(S, shell) 도메인, 돌출(protruding) 도메인 1(P1)과 돌출 도메인 2(P2)로 구성되어 있다. S 도메인의 시퀀스는 보존되고 P1과 P2 도메인의 시퀀스는 지속적으로 변화하여 항체 다양성을 유발한다. ORF3는 보조 구조적 캡시드 단백질인 바이러스 단백질 2(VP2)로 번역된다.

- [0028] 노로바이러스에는 5개의 유전그룹(GI ~GV)이 있는데, 이 중 GI 과 GII는 휴먼노로바이러스로 사람에게 병을 유발하고 급성 위장염을 일으킨다. 이 두 그룹은 감염, 분자 생물학, 전염학 그리고 계통학적으로 굉장히 다르며, 최근 이 두 그룹에서 30가지의 서로 다른 유전형이 캡시드 유전자의 베이스 시퀀스에 따라 분류되었다고 한다(김종임, 박귀성 *et al.*, 2011, *Journal of Bacteriology and Virology* 41:287-293). 이렇게 다양한 유전형 때문에 노로바이러스 감염에 대한 약이나 백신이 개발되기 어렵다. 최근에, B 세포에 휴먼노로바이러스를 감염시킨 사례가 나타났지만(Melissa K. *et al.*, 2014, *Science*, 346:755-759) 아직까지는 관련 연구가 원활하게 진행되지 못하는 실정이다. 그러나 휴먼노로바이러스의 대체 시스템(surrogate system)인 뮤린노로바이러스(GV 그룹)는 RAW264.7 세포에 배양이 되기 때문에 비교적 연구가 활발히 진행되어 휴먼노로바이러스 저감화 연구의 대체 역할을 하고 있다(Christine E. W., Larissa B. T., and Virgin I. V. H. W. *et al.*, 2006, *J. Virol.*, 80:5104-5112).
- [0029] 본 발명의 방법들에서 사용되는 임의의 추출물을 함유하는 화합물에 대한 치료적 유효량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 측정될 수 있다. 예를 들어, 선량(dose)은 세포 배양에서 결정된 IC₅₀(half maximal inhibitory concentration) 또는 EC₅₀(half maximal effective concentration)를 포함하는 순환 농도 범위를 얻기 위하여 동물 모델에서 계산될 수 있다. 그러한 정보는 인간에서의 유용한 선량을 더욱 정확히 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0030] 여기에 기재되어 있는 추출물을 함유하는 화합물들의 독성과 치료 효율성은, 예를 들어, LD₅₀(군집의 50%에 대한 치사량), ED₅₀(군집의 50%에 대해 치료 효과를 갖는 선량), IC₅₀(군집의 50%에 대해 치료 억제 효과를 갖는 선량)을 결정하기 위하여, 세포 배양 또는 실험동물에서의 표본 제약 과정들에 의해 산정될 수 있다. 독성과 치료 효과 간의 선량 비가 치료 지수이고 이것은 LD₅₀과 ED₅₀(또는, IC₅₀) 간의 비율로서 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 보이는 화합물들이 바람직하다. 이들 세포 배양 분석에서 얻어진 데이터는 인간에 사용하는 선량의 범위를 산정하는데 사용될 수 있다. 그러한 화합물들의 투여량(dosage)은 바람직하게는 독성이 없거나 거의 없는 상태에서 ED₅₀(또는, IC₅₀)을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다.
- [0031] 조각자 추출물의 투여량은 채용된 투여 형태와 이용된 투여 루트에 따라 상기 범위에서 변화될 수 있다. 정확한 산정, 투여 루트 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개개의 의사에 의해 선택될 수 있다(예를 들어, Fingl *et al.*, 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1 참조).
- [0032] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 실시예에서 얻은 조각자 추출물 조성물이 RAW 264.7 세포에 독성을 미치는지 알아보기 위해 세포 생존율 측정기법(MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) assay)로 세포생존율(cell viability)을 측정하는 방법을 수행하였다. MTT 용액은 수용성으로 노란색을 띠며 살아있는 세포의 미토콘드리아 내 탈수소효소에 의해 테트라졸륨(tetrazolium)의 링(ring) 구조가 끊어지며 청자색을 띠는 비수용성의 MTT 포르마잔(formazan) 결정으로 환원된다. 즉, 물질에 독성이 있어 세포 사멸 정도가 증가할수록 청자색이 열게 나타난다. 그 결과, 조각자 추출물 조성물을 각기 다른 4가지 농도로 처리하였을 때 모두 대조군 대비 색의 차이를 확인할 수 없었으므로 세포 사멸이 일어나지 않았다고 볼 수 있다(도 3). 이를 통해 조각자 추출물 조성물이 세포에 무해하다는 것을 알 수 있다.
- [0033] 본 발명은 다른 관점에서, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명에서, 의약 조성물에 사용된 담체는 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제 및 비히클을 포함하며 총괄적으로 "약제학적으로 허용되는 담체"한다. 본 발명의 의약 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 이온 교환, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨,

염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로즈-계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-차단 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다.

[0035] 본 발명에 따른 의약 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다.

[0036] 본 발명의 의약 조성물의 투여 방법으로는 경구 및 비경구 투여가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

[0037] 본 발명의 의약 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형될 수 있다. 본 발명의 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매중의 멸균 주사용액 또는 현탁액(예, 1,3-부탄디올중의 용액)일 수 있다. 허용적으로 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링겔 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 불휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 어떠한 불휘발성 오일도 사용할 수 있다. 올레산 및 이의 글리세라이드 유도체와 같은 지방산이 약제학적으로 허용되는 천연 오일(예, 올리브유 또는 피마자유), 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 것과 마찬가지로 주사 제제에 유용하다.

[0038] 본 발명의 의약 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만 캡슐, 정제 및 수성 현탁액 및 용액을 포함하여 경구적으로 허용되는 어떠한 용량형으로도 경구 투여될 수 있다. 경구용 정제의 경우, 흔히 사용되는 담체로는 락토즈 및 옥수수 전분이 포함된다. 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제가 또한 전형적으로 첨가된다. 캡슐형으로 경구 투여하는 경우 유용한 희석제로는 락토즈 및 건조된 옥수수 전분이 포함된다. 수성 현탁액이 경구 투여될 때 활성 성분은 유화제 및 현탁화제와 배합된다. 필요한 경우, 감미제 및/또는 풍미제 및/또는 착색제가 첨가될 수 있다.

[0039] 본 발명의 의약 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다. 이들 조성물은 본 발명의 화합물을 실온에서 고형이지만 직장 온도에서는 액상인 적합한 비자극성 부형제와 혼합하여 제조할 수 있다. 이러한 물질로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 코코아 버터, 밀랍 및 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다.

[0040] 본 발명에 따른 의약 조성물의 경구 투여는 목적하는 치료가 국소 적용으로 접근이 용이한 부위 또는 기관과 관련이 있을 때 특히 유용하다. 피부에 국소적으로 적용하는 경우, 의약 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성 성분을 함유한 적합한 연고로 제형되어야 한다. 본 발명의 화합물을 국소 투여하기 위한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 유동 파라핀, 백색 와셀린, 프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리옥시프로필렌 화합물, 유화 왁스 및 물이 포함된다. 다른 방도로서, 의약 조성물은 담체에 현탁 또는 용해된 활성 화합물을 함유한 적합한 로션 또는 크림으로 제형될 수 있다. 적합한 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 광유, 솔비탄 모노스테아레이트, 폴리솔베이트 60, 세틸 에스테르 왁스, 세테아릴 알코올, 2-옥틸도데카놀, 벤질 알코올 및 물이 포함된다. 본 발명의 의약 조성물은 또한 직장 좌제에 의해 또한 적합한 관장제로 하부 장관으로 국소 적용할 수 있다. 국소 적용된 경피 패치가 또한 본 발명에 포함된다.

[0041] 본 발명의 의약 조성물은 비 내 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여할 수 있다. 이러한 조성물은 약제의 분야에 잘 알려진 기술에 따라 제조하며 벤질 알코올 또는 다른 적합한 보존제, 생체이용률을 증강시키기 위한 흡수 촉진제, 플루오로카본 및/또는 기타 본 분야에 알려진 가용화제 또는 분산제를 사용하여 염수중의 용액으로서 제조할 수 있다.

[0042] 특정 환자에 대한 특정 유효량은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 규정식, 투여 시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 변할 수 있음은 이해될 것이다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 의약 조성물은 어류의 피하세포에 투입할 경우 새낭 또는 소화관에 투여할 수 있다. 주사는 근육조직내의 근육세포 또는 다른 세포에 주사할 수 있으며 복강내의 내장세포에 주사할 수 있다.

[0044] 바람직한 양태로서, 구강내 투여를 위한 의약 조성물은 고체상의 부형제와 함께 활성 성분을 혼합함으로써 제조할 수 있으며 정제 또는 당의정 형태로 제조하기 위해 과립형태로 제조할 수 있다. 적합한 부형제로는 락토스,

슈크로스, 만니톨 및 소비톨과 같은 슈가 형태 또는 옥수수, 밀가루, 쌀, 감자 또는 다른 식물로부터 전분, 메틸 셀룰로스, 하이드로시프로필메틸-셀룰로스 또는 나트륨 카복시메틸셀룰로스와 같은 셀룰로스, 아라빅 검, 타가칸스 검을 포함하는 검류와 같은 카보하이드레이트 또는 젤라틴, 콜라겐과 같은 단백질 필러를 사용할 수 있다. 필요한 경우에는, 교차결합된 폴리비닐피롤리돈, 아가 및 알긴산 또는 나트륨 알긴산과 같은 각각의 염 형태의 붕해제 또는 용해제를 첨가할 수 있다.

- [0045] 바람직한 양태로서, 비경구적 투여의 경우 본 발명의 의약 조성물은 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는, 한스 용액 (Hank's solution), 링거 용액 (Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 물리적으로 적절한 완충용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입 (injection) 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 덧붙여서, 활성 성분의 현탁액은 적합한 유질의 주입 현탁액 (oily injection suspensions)으로 제조될 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 담체는 참기름과 같은 지방산 또는 에틸 올레이트, 트리글리세라이드 또는 리포솜과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 복수양이온성 비지질 아미노 폴리머(polycationic amino polymers)도 운반체로서 사용될 수 있다. 임의로, 현탁액은 화합물의 용해도를 증가시키고 고농도의 용액을 제조하기 위해 적합한 안정화제 또는 약제를 사용할 수 있다.
- [0046] 이상과 같은 안정화제, 완충제 혹은 흡착방지제를 가하여 본 발명 제제를 조제할 수 있지만, 특히 의료용 또는 동물약용 주사제로서 이용하는 경우는 삼투압비로서 허용되는 삼투압비는 1 내지 2가 좋다. 삼투압비는 약제화 시에 염화나트륨의 증감에 의해 조제할 수 있다.
- [0047] 본 발명은 또 다른 관점에서, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 건강기능성 식품에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명에서, 기능성 식품은, 예를 들어, 각종 식품류, 캔디, 초콜릿, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명은 또 다른 관점에서, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 사료첨가제에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명은 또 다른 관점에서, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 식품 소스 또는 쉐러드 드레싱에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명은 또 다른 관점에서, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염예방 및/또는 개선용 식품첨가제에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명에서 제조된 상기 조각자 추출물은 노로바이러스에 의해 발생하는 질병의 예방을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 50 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 20 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서, 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기의 향미제 이외의 것으로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0054] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0055] 본 발명은 또 다른 관점에서, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 사멸제에 관한 것이다.

[0056] 본 발명은 또 다른 관점에서, 조각자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스에 의한 식중독 예방용 조성물에 관한 것이다.

[0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0058] **식물 추출물 준비**

[0059] 본 발명에서 사용된 조각자는 서울 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 채취한 재료를 건조시키고 건조 중량에 대해 10배의 90% 에탄올을 넣고 침지한 후 24시간 동안 실온에서 추출하였다. 그 후, 여과지(Whatman filter paper no.2)를 이용하여 여과하여 불용성 물질을 제거하였다. 여과액은 감압농축기를 이용하여 40℃ 이하에서 농축한 후 동결 건조하여 -80℃에서 보관하였다.

실시예 2

[0060] **바이러스의 배양**

[0061] 실시예 1에서 얻은 조각자 추출물 조성물의 항바이러스능을 측정하기 위해 사용된 바이러스는 노로바이러스의 대체 시스템인 뮤린노로바이러스를 대상으로 하였으며, RAW 264.7 세포(한국세포주은행)에서 증식배양하였다. RAW 264.7 세포는 10%의 소태아혈청, 1%의 HEPES(2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid), 1% 비필수아미노산(Nonessential amino acid), 1.5% 소듐바이카보네이트(sodium bicarbonate), 50 µg/mL의 겐타마이신(gentamicin)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium) 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

실시예 3

[0062] **바이러스 억제능 분석**

[0063] 실시예 1에서 얻은 조각자 추출물 조성물의 뮤린노로바이러스에 대한 바이러스 증식 억제능을 측정하기 위해서, RAW 264.7 세포를 6 well plate에 5×10^6 cell/well로 분주하고 하루 동안 단층으로 배양하였다. 조각자 추출물 조성물을 DMSO(Dimethyl sulfoxide)에 1 g/mL로 녹여서 각 농도(0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mg/mL)로 희석한 용액과 10^5 PFU/mL의 뮤린노로바이러스를 72시간 동안 4℃에서 반응시킨 후 DMEM으로 단계희석하였다. 6 well plate에서 세포가 90% 이상 차면 기존 배양액을 제거하고 단계희석한 뮤린노로바이러스를 각 웰에 투여하였다. 대조군은 동량의 DMSO를 처리하였다. 뮤린노로바이러스를 1시간 동안 RAW 264.7세포에 감염시킨 후 회수하였다. 그 후 2X MEM(Minimal essential media) 배지와 씨플라크 아가로스(seaplaque agarose)를 1:1로 섞은 용액을 3 mL씩 분주하고 30분 정도 굳힌 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 플라크가 형성될 때까지 2-3일 정도 배양하였다. 플라크가 관찰되면 2X MEM 배지와 씨플라크 아가로스를 1:1로 섞은 용액에 뉴트럴 레드 용액(neutral red solution) 1%를 넣어 균일하게 혼합한 후, well 당 3 mL씩 분주하였다. 30분 정도 굳힌 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에 넣고 1-2일 후 형성된 플라크 수를 측정하여 PFU/mL 단위로 정량 분석하였다. 또한 희석된 일련의 시험 샘플의 농도를 계산하여 바이러스 증식의 50% 억제 농도(IC₅₀)를 계산하였다.

[0064] 그 결과, 조각자 추출물 조성물의 농도가 높아짐에 따라 플라크 생성 개수가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 1). 이는 대조군에 비해 조각자 추출물 조성물을 처리했을 때 뮤린노로바이러스의 활성이 저해되는 것을 의미한다.

[0065] 또한, 조각자 추출물 조성물을 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 mg/mL의 농도범위에서 바이러스 증식의 50% 억제 농

도를 시험한 결과를 다음 도 2에 나타내었다. 실험 결과, 0.25 mg/mL 이하의 낮은 조각자 추출물 조성물 농도에 서 뮤린노로바이러스 증식 저해 효과를 나타내어 월등한 항바이러스 활성을 보임을 확인할 수 있었다.

실시예 4

독성 평가

실시예 1에서 얻은 조각자 추출물 조성물이 RAW 264.7 세포에 독성을 미치는지 알아보기 위해 세포 생존율 측정 기법(MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) assay)로 세포생존율(cell viability)을 측정하는 방법을 수행 하였다. 물질의 독성은 세포에 처리 후 사멸 정도를 측정하여 확인 가능한데 이는 MTT 용액을 활용하여 간단히 알 수 있다. MTT 용액은 수용성으로 노란색을 띠며 살아있는 세포의 미토콘드리아 내 탈수소효소에 의해 테트라 졸륨(tetrazolium)의 링(ring) 구조가 끊어지며 청자색을 띠는 비수용성의 MTT 포르마잔(formazan) 결정으로 환 원된다. 즉, 물질에 독성이 있어 세포 사멸 정도가 증가할수록 청자색이 열게 나타난다. 본 발명에서는 상기 실 시예에서 사용된 바이러스 처리 물질농도 중 네 가지인 1, 4, 8, 10 mg/mL를 선정하여 세포 독성을 측정하였다. 상기 실시 예에서 바이러스와 반응시킨 네 가지 농도는 RAW 264.7 세포에 처리할 때 DMEM 배지로 1/200 희석시 키게 되며, 결과적으로 세포 처리 농도는 5, 20, 40, 50 μ g/mL가 되어 이를 사용하였다. 대조군으로는 동량의 DMSO를 처리한 군으로 수행하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 2×10^4 으로 분주하여 24시간 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후, 배지를 흡입하고 DMEM 배지를 이용하여 선택한 4가지 농도로 희석한 물질을 세포에 처리하여 24시간 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 희석한 물질을 흡입한 후, MTT 용액(5 mg MTT, PBS 1 mL, DMEM 배지 9 mL)을 흡입한 물질과 동량 처리해 37°C, 3시간 배양하였다. MTT 용액을 흡입하고 흡입한 용액 과 동량의 DMSO를 분주해 MTT 포르마잔 결정을 녹여 나타난 청자색을 분광광계도로 수치화하였다.

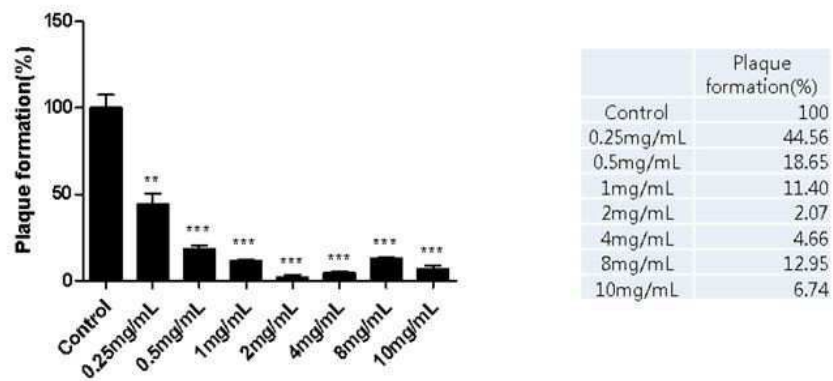
그 결과, 조각자 추출물 조성물을 4가지 농도로 처리하였을 때 모두 대조군 대비 색의 차이를 확인할 수 없었으 므로 세포 사멸이 일어나지 않았다고 볼 수 있다(도 3). 이는 조각자 추출물 조성물이 세포에 무해하다는 것을 시사한다.

통계분석은 두 그룹간 유의성 검사는 t-test 검정법을 이용하였고, 대조군과 비교하여 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 을 의미한다. 각 그래프의 오차막대는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다.

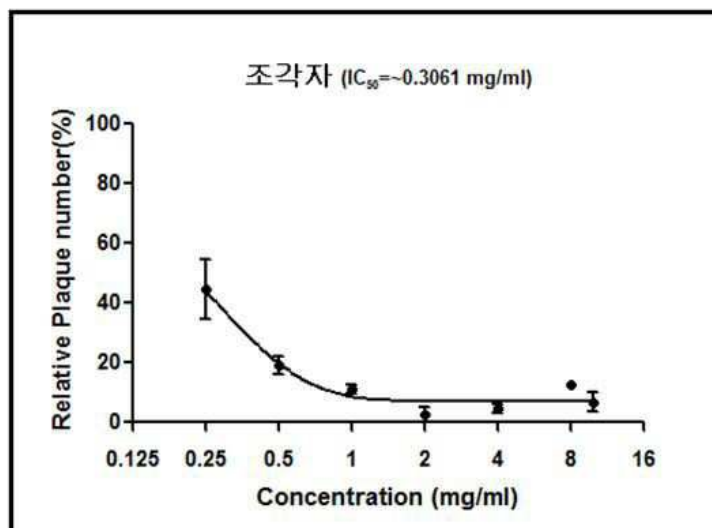
이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

