



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월16일

(11) 등록번호 10-2215336

(24) 등록일자 2021년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/45 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/45 (2013.01)

A61K 9/0014 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0076722

(22) 출원일자 2020년06월23일

심사청구일자 2020년06월23일

(56) 선행기술조사문헌

임태진, et al., Korean J. Plant Res. Vol. 24(4) : pp.456-460 (2011) (2011.08.31. 공개)*

Kirsten Gescher, et al., Fitoterapia 82 (2011) pp.408-413 (2010.12.01. 공개)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

유한회사 햇살마을

강원도 인제군 남면 원남로 69

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

전성호

강원도 춘천시 한림대학길 1, 생명과학과 8313호

신수용

강원도 춘천시 한림대학길 1, 생명과학과 8312호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

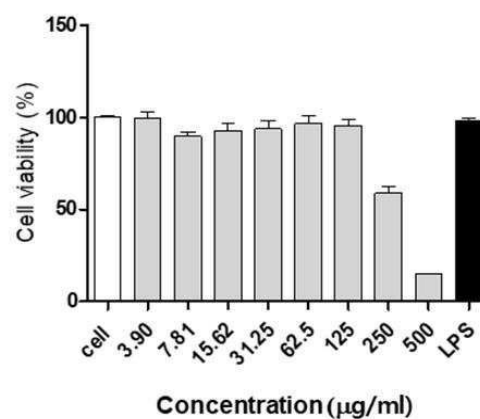
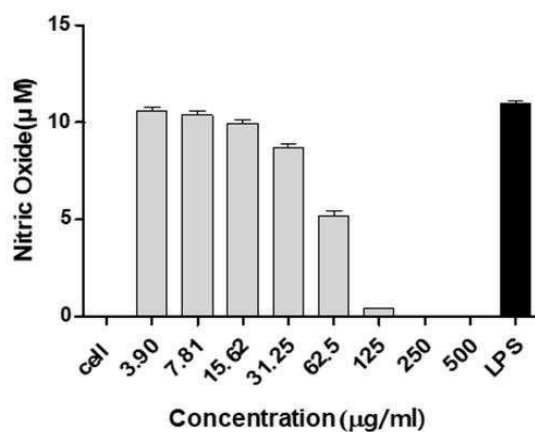
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 큰만병초 추출물을 포함하는 항바이러스 조성물

(57) 요약

본 발명은 큰만병초 추출물을 포함하는 항바이러스 조성물에 관한 것으로, 큰만병초 추출물 또는 이의 분획물을 포함하며, 바이러스 증식 억제 효과가 있는 항바이러스 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)

(73) 특허권자

주식회사 이뮤노맥스

서울특별시 성북구 안암로 145 ,312-2호(안암동5가,고려대학교자연계캠퍼스산학관)

재단법인춘천바이오산업진흥원

강원 춘천시 후평동 198-53 하이테크벤처타운 생물동 112호

(72) 발명자

심재훈

강원도 춘천시 지식로 67, 210동 201호

정현모

경기도 구리시 동구릉로 151, 105동 205호

유희수

강원도 인제군 남면 자작나무숲길 69

윤정호

서울시 서초구 반포대로 10길 35, 101동 902호

이용진

강원도 춘천시 퇴계로 220-20, 308동 1505호

유근형

강원도 춘천시 안마산로 133, 106동 3005호

권태형

강원도 춘천시 소양강로 32, 바이오 2동 202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H20190588

과제번호 H20190588

부처명 교육과학기술부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 산학협력선도대학육성사업

연구과제명 큰만병초 추출물의 항-바이러스 효능연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한림대학교 산학협력단

연구기간 2019.06.01 ~ 2020.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

큰만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 추출물의 부탄올 분획물을 포함하며, 인플루엔자바이러스(Influenza virus)에 대한 항바이러스 효과가 있는 것을 특징으로 하는 항바이러스 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은,

피부 외용제인 것을 특징으로 하는 항바이러스 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 큰만병초 추출물을 포함하는 바이러스 감염 억제, 개선, 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 바이러스는 인체에 가장 치명적 질병을 유발하는 병원체로 전체 인류의 10% 이상은 급성 또는 만성 바이러스 질환을 앓고 있으며, 사스나 메르스, 조류 인플루엔자와 같이 유전적, 환경적 변이로 인해 새로운 바이러스 질환이 언제든지 출현할 가능성이 높아 인류를 위협하고 있다.

[0004] 바이러스 감염에 의한 질환의 발병 조절 연구는 예방 차원의 백신 개발과 인터페론 등의 면역 세포 활성 물질의 발굴, 특정 바이러스의 숙주세포 부착 또는 세포 내 증식 억제를 위한 단클론 항체의 발굴 등 다양한 접근이 가능하다.

[0005] 세균이나 진균 등과 같이 하나의 독립적인 생명체를 이루는 기타 병원체와 달리, 개체의 증식을 전적으로 숙주 세포의 대사기구에 의존하는 바이러스의 생활사에 따라, 아직까지 항생제와 같이 광범위하게 작용하는 항바이러스 물질에 대하여는 연구 개발이 미미한 실정이다.

[0006] 한편 최근에는 특정 바이러스의 숙주세포 부착 또는 세포 내 증식 억제, 숙주세포의 항바이러스 신호체계를 조절하는 신규 물질의 발굴 등을 통한 바이러스 질환 치료제의 개발이 시도되고 있다. 이에 따라, 기존 항바이러스제의 부작용 등의 문제를 극복하고 다양한 바이러스 감염에 작용하는 항바이러스 신호체계에 대한 이해와 이를 이용한 바이러스 질환 치료제의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1595889호(2016.02.15.)에는 복분자를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 조성물이 기재되어 있다.
- (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1487302호(2015.01.22.)에는 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증성 질환 예방, 개선용 조성물이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 큰만병초의 항바이러스 효능을 확인하고, 이를 이용한 항바이러스용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 큰만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 큰만병초 추출물은, 바람직하게는 큰만병초 에탄올 추출물인 것이 좋다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 분획물은, 바람직하게는 큰만병초 추출물의 메틸렌클로라이드 분획물, 큰만병초 추출물의 에틸아세테이트분획물 또는 큰만병초 추출물의 *n*-부탄올 분획물인 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 바이러스는, 바람직하게는 인간면역결핍바이러스(HIV), B형간염바이러스(HBV), 에볼라 바이러스(Ebola virus), 라사바이러스(Lassa virus), 헤르페스바이러스(HSV-1) 또는 인플루엔자바이러스(Influenza virus)인 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은, 바람직하게 피부 외용제일 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명은 큰만병초 추출물 또는 이의 분획물을 포함하며, 바이러스 증식 억제 효과가 있는 항바이러스 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 다양한 바이러스에 광범위하게 적용되는 항바이러스 조성물의 가능성을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 큰만병초 추출물의 면역 조절 효과(왼쪽 그래프) 및 세포독성(오른쪽 그래프)를 확인한 그래프이다.
- 도 2는 큰만병초 추출물의 항바이러스 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 큰만병초 추출물의 분획물 제조 단계를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 큰만병초 분획물의 항염 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 큰만병초 분획물의 항바이러스 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 큰만병초 추출물과 큰만병초 부탄올 분획물의 NF- κ B 활성 억제 효과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 큰만병초 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스 조성물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 항바이러스는 바이러스 감염 억제, 바이러스 증식 억제, 바이러스의 숙주세포 감염 억제, 바이러스의 숙주세포에서의 증식 억제, 바이러스의 배출에 관여하는 숙주세포의 작동 저해 등의 효과를 말한다.
- [0021] 큰만병초(*Rhododendron brachycarpum*)는 강원지역에서 재배되는 천연 소재로, 진달래과(*Ericaceae*) 진달래속(*Rhododendron*)에 속한다. 큰만병초는 항균작용, 진통 완화, 항산화 등 다양한 생리작용을 조절하는 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 큰만병초는 안드로메도독신 등 독성 성분이 있으므로, 독성이 제거되지 않은 상태로는 식품으로 사용이 불가능하며, 이에 따라 비누 등 공산품을 중심으로 생산하고 있다.
- [0022] 한편, 본 발명의 발명자는 최근 진달래과 식물의 항염 및 항바이러스 효과를 나타내는 것을 확인하고, 큰만병초

추출물에 대하여 항바이러스 효능을 확인하고자 하였다. 이에, 강원도 인제군 남전1리 햇살마을에서 제공한 큰만병초를 이용하여 면역조절 및 항바이러스 효과를 확인하였다.

[0023] 본 발명의 큰만병초 추출물은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라, 즉 통상적인 온도와 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 제조될 수 있으며, 일 예로 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 부틸 아세테이트, 디에틸에테르, 디클로로메탄, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 추출용매를 이용한 용매 추출법, 초임계 추출법 및 초음파 추출법 중 선택되는 어느 하나의 추출법을 통해 수득될 수 있으나, 바람직하게는 에탄올을 용매로 사용하는 것이 좋다.

[0024] 큰만병초 추출물(Rb0)은 250 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 세포 독성을 나타냈으나, 125 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않았다. 또한, 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 처리 농도에서 큰만병초 추출물(Rb0)은 인플루엔자 바이러스에 대해 감염 억제, 증식 억제 효과를 보였다.

[0025] 한편, 큰만병초 추출물(Rb0)을 분획하여 큰만병초 *n*-헥세인 분획물(RbH), 큰만병초 메틸렌클로라이드 분획물(RbM), 큰만병초 에틸아세테이트 분획물(RbE), 큰만병초 부탄올 분획물(RbB) 및 큰만병초 수용층(RbW)을 수득하였다. 이중, 큰만병초 메틸렌클로라이드 분획물(RbM)은 높은 NO생성 저해 효과를 보였으나, 세포독성 또한 매우 높은 것으로 나타났다. 반면, 큰만병초 에틸아세테이트 분획물(RbE) 및 큰만병초 부탄올 분획물(RbB)은 세포독성이 낮으면서도 NO 생성 저해 효과를 보였다. 또한, 큰만병초 부탄올 분획물(RbB) 및 큰만병초 메틸렌클로라이드 분획물(RbM)은 높은 항바이러스 효과를 보였다.

[0026] 한편, 바이러스 감염에 따라 숙주세포의 IKK 단백질이 활성화되면 NF- κ B의 조절자인 I κ B의 인산화와 이에 따른 단백질의 분해가 유도되며, I κ B가 제거되어 자유로워진 NF- κ B는 활성화되어 핵으로 이동하고, 타겟 유전자의 발현을 촉진하는 전사인자로 작용한다. 이에, 큰만병초 에탄올 추출물(Rb0) 및 부탄올 분획물(RbB)이 인플루엔자 바이러스에 감염된 세포에서 유도되는 산화적 스트레스 경로(NF- κ B)에 영향을 미치는지 확인한 결과, 바이러스 감염에 의해 유도되는 NF- κ B 활성화 경로가 억제되는 것을 확인하였다. 즉, A형 인플루엔자 바이러스(H1N1) 처리에 따라 핵으로 이동하는 NF- κ B는 큰만병초 에탄올 추출물(Rb0) 및 부탄올 분획물(RbB) 처리에 의해 억제되는 점을 확인하였다.

[0027] 한편, 바이러스 중 일부 외피형 바이러스(enveloped virus)는 증식된 바이러스의 어셈블리와 세포 외 배출 과정에서 숙주세포의 소낭을 매개로 하는 수송 복합체(endosomal sorting complex required for transport, ESCRT)를 사용하는데, 본 발명의 큰만병초 추출물은 ESCRT 시스템을 사용하는 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)(H1N1)에 대해 효과적인 항바이러스 효능을 보이는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명의 조성물은 동일한 ESCRT 시스템을 사용하는 인간면역결핍바이러스(HIV), B형간염바이러스(HBV), 에볼라바이러스(Ebola virus), 라사바이러스(Lassa virus), 헤르페스바이러스(HSV-1) 등과 같은 외피형 바이러스에도 효과가 있을 것으로 판단되었다.

[0028] 한편, 본 발명의 조성물은 약학 조성물일 수 있는데, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다. 또한, 치료 및 예방제가 약제인 경우 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등이 추가적으로 포함될 수 있다.

[0029] 한편, 본 발명의 약학 조성물의 제형은 사용 방법에 따라 바람직한 형태로 제조될 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니멘트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 안연고제(OPHTHALMIC OINTMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 전제(DECOCTIONS), 침제-INFUSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLASMA), 캡셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 톤크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다. 특히, 피부 외용제 형태의 제형인 것이 바람직하다.

- [0030] 한편, 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 투여량은 투여방법, 투여제형, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 유효성분인 큰만병초 추출물을 기준 (건조중량)으로 하였을 때 1일 0.1 내지 100 mg/kg (체중)으로 1회 이상 투여 가능하다. 다만, 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태와 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.
- [0031] 한편, 본 발명의 조성물이 식품 조성물일 경우, 본 발명의 큰만병초 추출물을 또는 이의 분획물이 첨가됨으로써, 항바이러스 기능성을 기대할 수 있다. 식품 조성물의 제형으로는 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반 음료, 초콜렛, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 한편, 본 발명의 조성물이 화장료 조성물일 경우, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 화장수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림, 에센스, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 수중유(O/W)형 및 유중수(W/O)형 중 선택되는 어느 하나의 기초화장료 제형; 스킨; 로션; 아이크림; 수딩젤; 연고; 마스크팩용 제형; 바디워시용 제형; 필링젤; 수중유형 및 유중수형 메이크업베이스; 파운데이션; 스킨케어; 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케익, 아이섀도, 치크칼라 및 아이브로우 펜슬류 중 선택되는 어느 하나의 색조화장료 제형; 두피용 제형; 중에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다. 특히, 본 발명의 큰만병초 추출물을 또는 이의 분획물이 첨가된 핸드크림 제형으로 제조됨으로써, 항바이러스 효능을 기대할 수 있다.
- [0034] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- [0036] **[실시예 1 : 큰만병초 추출물 제조]**
- [0037] 강원도 인제군 남전리에서 채배한 큰만병초 잎 20 kg을 세척 후 50 ℃에서 24시간 건조하여 건조 중량 5 kg의 큰만병초 잎을 수득하였다. 큰만병초 잎에 50 L의 70 %(v/v) 에탄올을 가하고 80 ℃에서 2시간 추출한 뒤, 농축 및 동결건조하여 500g의 큰만병초 추출물(분말)을 수득하였다. 이하 큰만병초 추출물(Rb0) 또는 큰만병초 에탄올 추출물(Rb0)이라 한다.
- [0039] **[실험예 1 : 큰만병초 추출물의 세포독성 및 면역 조절 효과 확인]**
- [0040] 상기 실시예 1에서 제조한 큰만병초 추출물의 세포독성에 의한 세포 사멸 여부를 확인하기 위해 마우스의 복강 대식세포주인 RAW 264.7 세포 위에 시료를 25 μ g/well 로 2배씩 희석하여 처리하고 24시간 배양한 후, MTT assay 를 수행하였다. CellTiter 96[®] AQuecus ONE Solution Assay Kit(Promega, Madison, WI, USA)를 40 μ l/well씩 2시간 처리하고 490 nm에서 microplate reader(Thermo)를 이용하여 O.D. 값을 측정하였다.
- [0041] 면역 조절 효과를 확인하기 위해 lipopolysaccharide (LPS)를 100ng/ml의 농도로 처리한 RAW264.7 세포에 다양한 농도의 시료를 처리한 후 대식세포 활성 시 분비되는 Nitric Oxide (NO) 양의 변화를 측정하였다. RAW264.7 세포를 96 well plate에 분주 후 배양하면서 시료를 농도별로 희석하여 처리하고 24시간 배양한 후, 배양세포의 상층액 50 μ l를 취하여 Griess reagent(sulfanilamide Solution 50 μ l 처리 후 10분, NED Solution 50 μ l 처리 후 10분, PROMEGA)와 실온에서 반응시키고 microplate reader(Thermo)를 이용하여 490 nm에서 NO의 양을 측정하였다.
- [0042] 실험 결과, 도 1에서 보듯이 큰만병초 추출물은 마우스 복강 유래 대식세포(RAW 264.7)의 면역 활성을 효과적으로 억제하는 점을 확인하였다. 도 1의 왼쪽 그래프에서, LPS 처리에 의해 유도되는 NO 생성량이 시료의 농도 의존적으로 감소하는 점을 확인하였다.
- [0043] 한편, 도 1의 오른쪽 그래프에서 보듯이, 큰만병초 추출물 250 μ g/ml 이상의 농도에서는 세포 독성을 나타내는 점을 확인하였다. 그러나 면역 조절 효과를 보인 15 μ g/ml 이상 250 μ g/ml 미만의 농도에서는 세포독성을 나타내지 않은 점을 확인할 수 있다.
- [0045] **[실험예 2 : 큰만병초 추출물의 항바이러스 효과 확인]**
- [0046] 상기 실시예 1에서 수득한 큰만병초 추출물의 항바이러스 효과를 확인하고자 MDCK 세포주에 A형 인플루엔자 바이러스(H1N1)를 감염시켜 큰만병초 추출물의 바이러스의 감염 및 증식 억제능을 분석하였다.
- [0047] MDCK 세포주에 A형 인플루엔자 바이러스(H1N1)를 감염시켜 생성되는 바이러스를 모은 후, 1/10 비율로 순차적으로 희석시킨 후 MDCK 세포에 재감염시켜 생성되는 바이러스 플라크 수의 변화를 대조군과 비교하였다.

[0048] 실험 결과, 도 2에서 보듯이, A형 인플루엔자 바이러스(H1N1)를 감염시킨 MDCK 세포에 큰만병초 추출물을 처리할 경우, 바이러스 감염에 의해 생성되는 플라크의 수가 농도의존적으로 감소하는 점을 확인하였다. 큰만병초 추출물의 항바이러스 효과는 $IC_{50} = 47.2 \mu\text{g/ml}$ 로 나타났다.

[0050] [실시예 2 : 큰만병초 추출물의 분획물 제조]

[0051] 상기 실험에 2를 바탕으로 큰만병초 추출물의 항염 및 항바이러스 효능을 나타내는 유효물질을 발굴하고자 큰만병초 추출물에 유기용매를 가하여 분획물을 제조하였다(도 3 참조).

[0052] 상기 실시예 1에서 수득한 큰만병초 잎 추출물(분말) 150 g을 정제수에 현탁하고, 분획할때기를 이용하여 극성에 따라 순차적으로 분획하였다. 수득한 분획물을 각각 감압농축 및 동결건조하여, 큰만병초 *n*-헥세인 분획물(RbH), 큰만병초 메틸렌클로라이드 분획물(RbM), 큰만병초 에틸아세테이트 분획물(RbE), 큰만병초 부탄올 분획물(RbB) 및 큰만병초 수용층(RbW)을 수득하였다.

표 1

	건조 중량 (g)
큰만병초 <i>n</i> -헥세인 분획물(RbH)	36
큰만병초 메틸렌클로라이드 분획물(RbM)	0.5
큰만병초 에틸아세테이트 분획물(RbE)	5
큰만병초 부탄올 분획물(RbB)	19
큰만병초 수용층(RbW)	50

[0055] [실험예 3 : 큰만병초 분획물의 항염 효과 확인]

[0056] 상기 실시예 2에서 제조한 큰만병초 분획물의 세포 사멸 여부 및 면역 조절 효과를 확인하고자 상기 실험에 1과 동일한 방법으로 실험하였다.

[0057] 실험 결과, 큰만병초 *n*-헥세인 분획물(RbH)은 LPS 처리에 의해 유도되는 NO 생성량에 영향을 미치지 않았다. 한편, 도 4에서 보듯이, 큰만병초 메틸렌클로라이드 분획물(RbM)은 가장 높은 NO 생성 저해 효과를 보였으나 세포 독성 또한 매우 높은 것으로 나타났다. 큰만병초 에틸아세테이트 분획물(RbE) 및 큰만병초 부탄올 분획물(RbB)은 세포독성이 낮으면서도 NO 생성 저해 효과를 보였다. 큰만병초 수용층(RbW)도 NO 생성 저해 효과를 나타내었으나, 다른 유기용매 분획물에 비해 효과가 미미한 것으로 나타났다.

[0059] [실험예 4 : 큰만병초 분획물의 항바이러스 효과 확인]

[0060] 상기 실시예 2에서 수득한 큰만병초 분획물의 항바이러스 효과를 확인하고자 상기 실험에 2와 동일한 방법으로 실험하였으며, 각 추출용매에 따른 분획물을 $50 \mu\text{g/ml}$ 씩 처리하였다.

[0061] 실험 결과, 큰만병초 *n*-헥세인 분획물(RbH)은 항바이러스 효과가 나타나지 않았으며, 도 5에서 보듯이, 큰만병초 부탄올 분획물(RbB) 및 큰만병초 메틸렌클로라이드 분획물(RbM)이 가장 높은 항바이러스 효과(1000분의 1 이하로 감소)를 보였고, 큰만병초 에틸아세테이트 분획물(RbE)은 효과가 미미하였으며, 큰만병초 수용층(RbW)은 변화가 없었다.

[0062] 특히, 큰만병초 부탄올 분획물(RbB)은 바이러스 감염에 의해 생성되는 플라크가 관찰되지 않을 정도로 항바이러스 효과가 우수한 점을 확인하였다.

[0064] [실험예 5 : 큰만병초 부탄올 분획물의 NF- κ B 활성 경로 억제 효과 확인]

[0065] 세포의 산화적 스트레스는 바이러스 등의 병원체의 감염이나, 온도 및 삼투압의 변화, 물리 화학적 외부 자극 등에 의해 유도되는 세포 내 신호전달 경로이다. 바이러스 감염에 따라 숙주세포의 IKK 단백질이 활성화되면 NF- κ B의 조절자인 I κ B의 인산화와 이에 따른 단백질의 분해가 유도되며, I κ B가 제거되어 자유로워진 NF- κ B는 활성화되어 핵으로 이동하고, 타겟 유전자의 발현을 촉진하는 전사인자로 작용한다.

[0066] 이러한 전사인자의 활성화는 염증성 사이토카인 등 주변 세포의 면역 활성을 유도하는 것으로 알려져 있으나, 최근의 연구들에 의하면 바이러스가 자신의 유전자 복제 및 증식을 위해서도 같은 신호전달 시스템을 사용하는 것으로 알려졌다 (Vlahos and Selemidis, 2014. *Molecular pharmacology* 86(6):747-759). 즉, 숙주세포에 침입한 바이러스는 TLR을 매개로 하는 산화적 스트레스 경로를 유도하며 이를 통해 TBK, MAPK 및 AKT 인산화효소 등을

활성화시키고, 이들은 바이러스의 증식에 유리한 환경을 제공한다. 따라서, 바이러스에 의해 유도되는 산화적 스트레스 신호 전달을 저해하는 물질을 항-바이러스 치료제로 개발하려는 연구가 활발히 시도되고 있다(Nacken et al., 2012. *Biological chemistry* 393(6):525-534.; Hirata et al., 2014. *Biochemical and biophysical research communications* 450(1):891-898;).

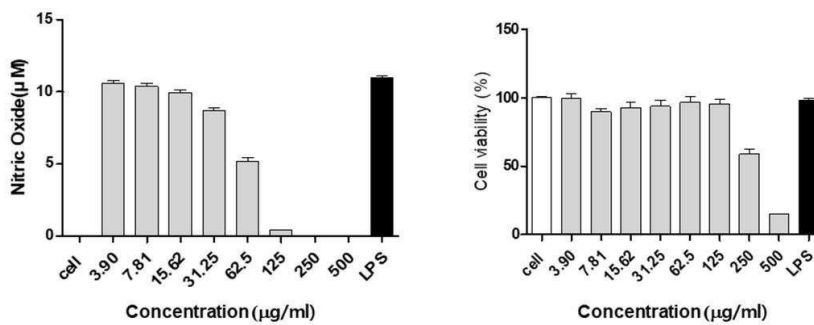
[0067] 이에 따라, 본 실험에서는 상기 실험 결과를 바탕으로 큰만병초 부탄올 분획물(RbB)이 바이러스에 감염된 세포에서 유도되는 산화적 스트레스 경로에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

[0068] 실험결과, 도 6에서 보듯이, 바이러스 감염에 의해 유도되는 NF- κ B 활성 경로가 억제되는 것을 확인하였다. 즉, A형 인플루엔자 바이러스(H1N1)를 처리하여 핵으로 이동하는 NF- κ B는 큰만병초 에탄올 추출물(Rb0) 및 부탄올 분획물(RbB) 처리에 의해 억제되는 점을 확인하였다. 대조군으로 사용한 Lamin B와 GAPDH는 각각 핵 및 세포질에서 특이적으로 발현되는 단백질로, 실험에서 핵과 세포질 분획의 분리가 제대로 되었음을 확인하는데 사용되었다.

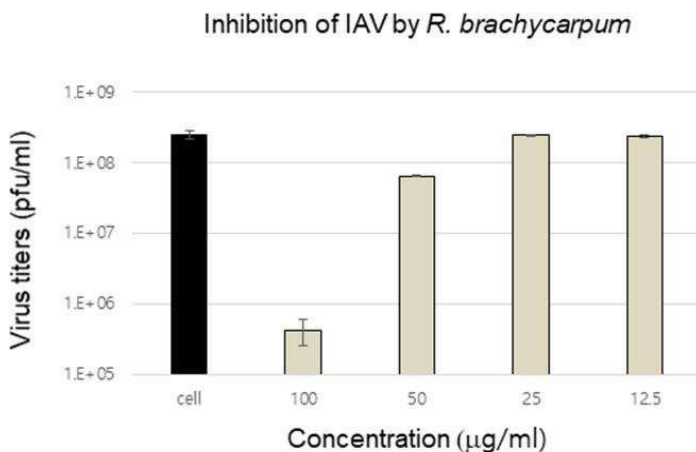
[0069] 이에 따라, 큰만병초 분획물 중 부탄올 분획물(RbB)이 가장 높은 항바이러스 효과를 나타내는 것으로 판단되었다.

도면

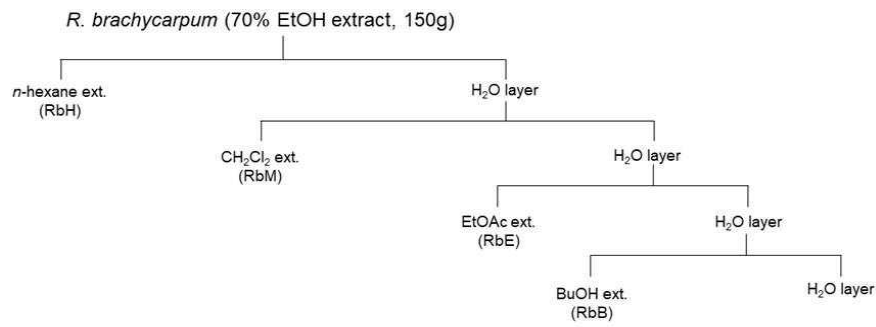
도면1



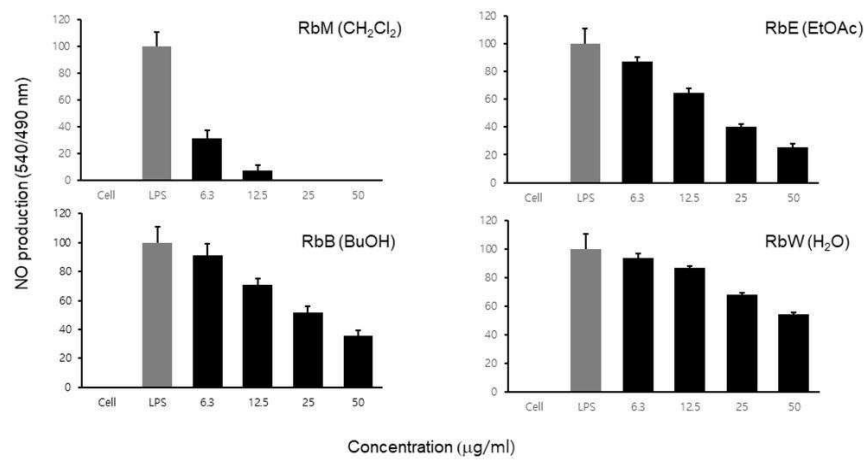
도면2



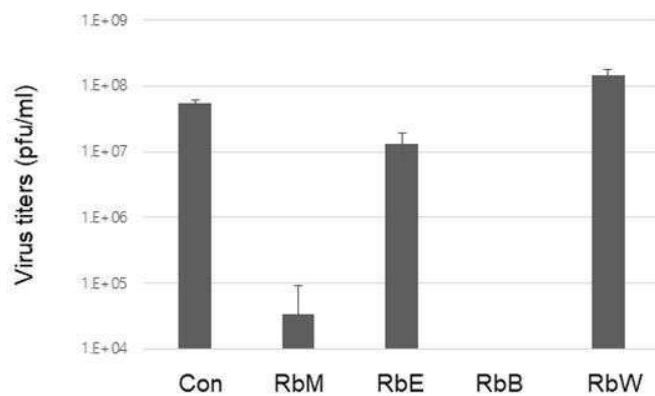
도면3



도면4



도면5



분획	추출용매	바이러스(평균)	표준오차
Con	-	5.50.E+07	7.07.E+06
RbM	CH ₂ Cl ₂	3.33.E+04	5.77.E+04
RbE	EtOAc	1.33.E+07	5.77.E+06
RbB	BuOH	-	-
RbW	H ₂ O	1.47.E+08	2.89.E+07

도면6

