



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월24일
(11) 등록번호 10-1310033
(24) 등록일자 2013년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/28 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0012716

(22) 출원일자 2013년02월05일

심사청구일자 2013년02월05일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110109246 A

Mi-Ran Kim et al., Arch. Pharm. Res., Vol.27,
No.10, pp1029-1033, 2004

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (공동, 충남대학교)

(72) 발명자

서상희

대전광역시 서구 둔산로 223, 4동 502호(둔산동,
청솔아파트)

김희만

인천광역시 부평구 부영로 165, 112동 609호(산곡
동, 우성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 7 항

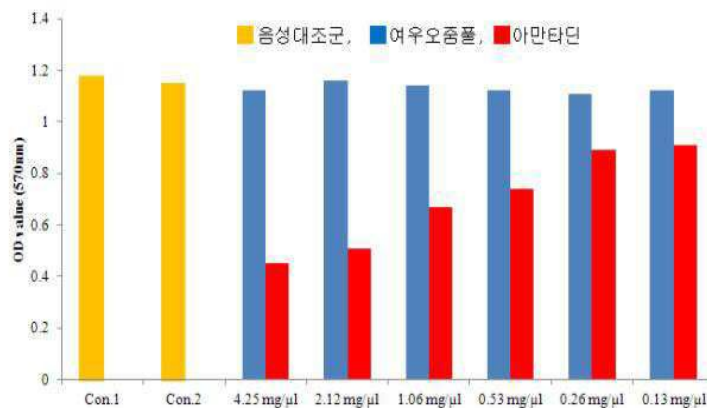
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 항인플루엔자용 조성물

(57) 요약

본 발명은 여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 조성물 및 개선용 건강기능성 식품에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 여우오줌풀 추출물은 인체감염증 고병원성 인플루엔자 바이러스(A/Vietnam/HN36285/2010 H5N1), 신종 독감 바이러스(A/California/07/2009 H1N1), 계절 독감 바이러스(A/Wisconsin/15/09 H3N2) 및 계절 독감 바이러스(B/Brisbane/60/2008)와 같은 인플루엔자 바이러스 증식의 감소 및 억제 효과가 우수하여 인플루엔자 바이러스 감염으로 유발될 수 있는 항인플루엔자 바이러스 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다. 또한 본 발명에 따른 여우오줌풀 추출물은 세포에 독성을 유발하지 않기 때문에 체내 안전성이 높은 특징이 있어 인플루엔자 바이러스 감염을 예방 또는 개선할 수 있는 기능성 건강식품의 소재로도 사용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

강용명

대전광역시 서구 계룡로394번길 22-6, 402호(갈마동, 소현빌라)

구근본

대전광역시 유성구 신성로84번길 43-6, 406호(신성동, 수정빌라)

이승은

충청북도 음성군 음성읍 설성로 22, 105동 408호(한성진주아파트)

성정숙

경기도 화성시 동탄숲속로 95, 818동 801호(능동, 동탄숲속마을 광명메이루즈)

장인복

충청북도 음성군 음성읍 반기문로 45-15, 103동 401호(금광 포란재아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A084411
부처명	보건산업진흥원
연구사업명	조류인플루엔자 대유행 대응기술 개발
연구과제명	조류인플루엔자 대유행 대응기술 개발
주관기관	보건산업진흥원
연구기간	2008.11.01 ~ 2013.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 여우오줌풀의 지상부를 100% 메탄올을 이용하여 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 여우오줌풀 추출물은 0.1~20mg/ul의 농도로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스는 인체감염증 고병원성인 인플루엔자 바이러스인 A/Vietnam/HN36285/2010 H5N1, 신종 독감 바이러스인 A/California/07/2009 H1N1, 계절 독감 바이러스인 A/Wisconsin/15/09 H3N2 또는 계절 독감 바이러스인 B/Brisbane/60/2008인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴, 조류독감 및 염소 독감으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가지는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 7

여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 개선용 건강기능성 식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 바이러스 감염을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 여우오줌풀 추출물의 신규한 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인플루엔자 바이러스는 급성 호흡기 질환을 일으키는 전염성이 매우 강한 감염 병원체로, 특히 고령자, 소아, 특정한 만성질환자, 면역부전환자에 있어서 심각한 호흡기 증상을 유발하는 바이러스 중 하나로 심각할 경우 사망까지 가능하다. 인플루엔자 바이러스는 A, B, C형의 3가지 형이 있으며 특히 유행적으로 확산되는 형은 A, B형으로 알려져 있다. 그러나 3가지 형의 인플루엔자 바이러스는 공통의 기작으로 감염 기작을 가지고 있을 것으

로 사료된다

- [0003] 인플루엔자 바이러스는 시알산(Sialic acid)과 관련이 있으며, 특히 바이러스 표면에는 당단백질인 적혈구 응집소(Hemagglutinin, HA)와 뉴라미니다아제(Neuraminidase, NA)가 존재하고 내부에는 8개의 분절되어진 RNA가 존재한다. 적혈구 응집소는 머리와 줄기로 구성된 삼량체(Trimer) 형태이고, 이중 머리 부분은 대부분의 항원변이와 관련되어 있으며 숙주세포의 세포막에 존재하는 시알산을 우선적으로 인식하여 바이러스를 숙주세포에 부착시키고, 자신이 가지고 있는 효소인 뉴라미니다아제 작용으로 시알산을 파괴시켜 세포 속으로 침입하는 것으로 보고되어 있다(Chandrasekaran et al., 2008; Mark, 2007).
- [0004] 최근 인플루엔자 바이러스 질환은 양계, 양돈 산업에만 한정되어 있지 않고 인체에 대한 감염으로 인하여 사람에게 질병을 일으키는 것으로 보고되어 있어, 인플루엔자 바이러스를 치료하기 위해 아만타딘(Amantadine), 리만타딘(Rimantadine), 자나미비(Zanamivir), 오셀타미비르(Oseltamivir) 등 4가지 물질이 미국식품의약품 안전청(FDA)으로부터 승인받아 사용되고 있으나, 심각한 부작용으로 인해 기존 의약품과 유사한 감염 억제 효과와 안전성이 우수한 새로운 인플루엔자 바이러스제의 개발에 대한 필요성이 증가하고 있다. 특히 식물, 동물, 광물, 미생물과 이들의 대사산물을 이용하여 합성의약품에 비해 부작용이 적은 천연물의약품 개발이 대두되고 있다.
- [0005] 한편, 본 발명자들은 여우오줌풀이 우수한 항인플루엔자 바이러스 활성이 있음을 최초로 규명하였으며, 특히 인플루엔자 바이러스 4종을 대상으로 인플루엔자 바이러스 증식 억제 효능을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 특허출원 10-2010-0028890

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 그러므로 본 발명의 목적은 여우오줌풀(*Carpesium macrocephalum* Franch & Sav.)을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 여우오줌풀(*Carpesium macrocephalum* Franch & Sav.)을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 여우오줌풀의 지상부를 100% 메탄올을 이용하여 추출한 추출물일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 여우오줌풀 추출물은 0.1~20mg/ul의 농도로 포함되어 있는 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스는 인체감염증 고병원성인 인플루엔자 바이러스인 A/Vietnam/HN36285/2010 H5N1, 신종 독감 바이러스인 A/California/07/2009 H1N1, 계절 독감 바이러스인 A/Wisconsin/15/09 H3N2 또는 계절 독감 바이러스인 B/Brisbane/60/2008인 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴, 조류독감 및 염소 독감으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형일 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 여우오줌풀(*Carpesium macrocephalum* Franch & Sav.)은 인체감염증 고병원성 인플루엔자 바이러스(A/Vietnam/HN36285/2010 H5N1), 신종 독감 바이러스(A/California/07/2009 H1N1), 계절 독감 바이러스(A/Wisconsin/15/09 H3N2) 및 계절 독감 바이러스(B/Brisbane/60/2008)와 같은 인플루엔자 바이러스 증식 감소 및 억제하는 효과가 우수하여 인플루엔자 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있고, 체내 안정한 특징이 있어 기능성 건강식품의 소재로도 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 본 발명에 따른 여우오줌풀 추출물을 각 농도별로 처리한 군과 아만타딘을 농도별로 처리한 군 및 아무 것도 처리하지 않은 군을 대상으로 세포 독성 여부를 조사한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 인플루엔자 바이러스의 활성 억제 작용이 우수하고 세포 내 독성을 유발하지 않는 새로운 인플루엔자 바이러스 치료제로서 여우오줌풀의 신규 용도를 제공한다는 점에 특징이 있다.
- [0019] 구체적으로 본 발명은 여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명에서 용어, “예방”이란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염을 억제시키거나 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 질병의 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 용어, “치료”란 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0022] 본 발명자들은 새로운 인플루엔자 바이러스 치료제를 개발하기 위해 여우오줌풀에 주목하였는데, 이는 종래 사용되고 있는 화학합성품에 의한 인플루엔자 바이러스 치료제의 경우 심각한 부작용이 초래되고 있어 안심하고 사용하지 못한다는 문제점을 고려하여 화학합성의약품에 비해 체내 부작용이 적은 치료제 발굴을 위해 천연물을 대상으로 연구하던 중, 여우오줌풀 추출물이 항인플루엔자 바이러스 활성이 우수하다는 사실을 확인하게 되었다.
- [0023] 여우오줌풀(*Carpesium macrocephalum*)은 아시아에 널리 분포하는 식물로서, 씨, 뿌리, 잎, 줄기 및 꽃이 해열제, 지혈제, 구충제 및 진통제로 한국과 중국에서 전통의약으로 사용되고 있으며, 특히 냄새가 고약해서 여우오줌풀이라고 이름이 붙여졌다. 또한 여우오줌풀은 긴 타원형 모양의 잎이 어긋난 형태를 가지고 있고 가장자리에 톱니가 있으며 위로 올라갈수록 작아지는데 약 60~100cm정도 자란다. 노란색 꽃은 8~9월에 원줄기와 가지 끝에서 두상꽃차례로 한송이씩 피며, 꽃차례 밑에 커다란 포가 달려있어 하나의 큰 꽃처럼 보인다.
- [0024] 한편, 이러한 여우오줌풀은 한방에서 구충제나 타박상 등의 약재로 사용되고 있을 뿐, 아직 여우오줌풀이 갖는 약학적 용도에 대해서는 알려진 것이 거의 없다.
- [0025] 이에 본 발명에서는 여우오줌풀의 추출물이 우수한 항인플루엔자 바이러스 활성이 있어, 인플루엔자 바이러스의 감염에 의해 유발될 수 있는 질환을 예방 및 치료할 수 있는 용도로 사용할 수 있음을 확인하였는데, 즉, 본 발명의 일실시예에 의하면, 100% 메탄올을 이용하여 수득한 여우오줌풀의 추출물이 인체감염증 고병원성 인플루엔자 바이러스(A/Vietnam/HN36285/2010 H5N1), 신종 독감 바이러스(A/California/07/2009 H1N1), 계절 독감 바이러스(A/Wisconsin/15/09 H3N2) 및 계절 독감 바이러스(B/Brisbane/60/2008)에 대해 우수한 항인플루엔자 바이러스 활성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0026] 따라서 이러한 실험 결과를 토대로 본 발명은 여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 상기 여우오줌풀 추출물은 종래의 물질을 추출하고 분리하는 방법을 이용하여 식물 또는 식물의 일 부분부터 수득될 수 있다. 줄기, 뿌리 또는 잎 등 식물로부터 목적하는 추출물을 획득하기 위하여 식물을 적절히 탈수하여 침연(macerated)하거나 단지 탈수하고, 목적하는 추출물은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 알려진 정제 방법을 이용하여 정제할 수 있다.
- [0028] 또한, 여우오줌풀로부터 추출물을 수득하는 방법은 열수추출방법, 유기용매 추출방법 등을 사용할 수 있는데,

상기 추출을 위한 적절한 용매로는 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 여우오줌풀의 지상부를 메탄올을 이용하여 추출할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및 치료용 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 여우오줌풀 추출물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 인플루엔자 바이러스에 의한 감염으로 발생하는 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[0030] 본 발명에 따른 여우오줌풀 추출물의 약학적으로 유효한 양은 상기 조성물에 대해 0.1~20mg/ul의 농도로 포함될 수 있으며, 체중에 대해서는 0.5 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 5 mg/day/체중kg으로 적용할 수 있다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료 기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0031] 또한, 상기에서 약학적으로 허용되는이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 인플루엔자 바이러스 감염 증상의 예방 및 개선용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0034] 따라서 본 발명은 여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 질환의 증상에 대한 예방 및 치료용 약제를 제공할 수 있다.

[0035] 특히 본 발명에서 상기 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 이에 제한되지는 않으나, 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴, 조류독감 또는 염소독감을 포함할 수 있다.

[0036] 나아가 본 발명에 따른 조성물은 천연물인 여우오줌풀 추출물을 사용하므로, 체내에 대해 독성 및 부작용도 없어 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있으므로, 상기 본 발명의 조성물을 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 질환 증상의 예방 및 개선을 위한 식품용 조성물로도 사용할 수 있다.

[0037] 그러므로 본 발명의 식품용 조성물은 여우오줌풀 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 개선용 건강기능성 식품으로 용이하게 활용될 수 있다.

[0038] 본원에서 상기 “식품”이란, 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 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[0039] 본원발명에 따른 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0040] 또한, 상기 “기능성 식품”이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을

특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0041] 또한, 본원발명에서 상기 “음료”란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 본 발명의 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0042] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0043] 본원발명의 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0045] <실시예 1>

[0046] 여우오줌풀 추출물의 제조

[0047] 여우오줌풀(*Carpesium macrocephalum* Franch. & Sav.)의 지상부는 2006년 8월 수원 서둔동에서 채취하여 시료로 이용하였으며 종의 동정은 농촌진흥청 약용작물과 소속 식물분류전문가에게 확인받았다(Voucher Number : MPS001044). 채취된 여우오줌풀 지상부는 세척, 건조시킨 후 분쇄하여 분말화시키고 가속용매추출장치(accelerated solvent extractor, ASE)를 이용해 50℃에서 100%의 메탄올로 추출하였고 추출액을 여과한 후에 rotary evaporator (JP-SD1000, Eyela, Tokyo Rikikatai, Japan)로 감압농축하여 용매를 제거하여, 여우오줌풀 분말 120g으로부터 12g의 여우오줌풀 추출물을 수득하였다.

[0048] <실시예 2>

[0049] 여우오줌풀 추출물의 세포독성 평가

[0050] 여우오줌풀 추출물의 세포독성 평가를 위해 사용한 세포주는 MDCK 세포(Madin-Darby, Canine Kidney)로 세포 독성 실험 전에 먼저 실시예 1에서 제조한 여우오줌풀 추출물을 100 μ l DMSO 용액에 용해시켜 사용하였으며, 사용 전까지는 -70℃의 온도에서 보관하였다.

[0051] 세포 독성 실험을 위해, 먼저, 10% Fetal Bovine Serum(FBS)와 1% 페니실린(100 U/ml)/streptomycin (100 U/ml)이 포함되어 있는 DMEM 배양액을 이용하여 상기 세포주(MDCK)를 5% CO₂ 및 37℃의 온도조건에서 배양하였다. 이후 배양된 세포를 96 웰 플레이트에 분주하고, 여우오줌풀을 농도별(8.5mg/ul~0.133mg/ul)로 DMEM 배양액으로 희석한 다음, MDCK 세포에 처리하고 48시간 동안 세포 독성 여부를 관찰하였다. 보다 구체적으로 여우오줌풀 추출물 원액인 17mg/ul를 2배~128배 DMEM 배양액으로 희석한 다음 MDCK 세포에 처리하여 세포 독성 여부를 관찰하였다. 음성 대조군으로 추출물이 첨가되지 않은 DMEM 배양액을 세포에 접종하였으며 양성 대조군으로 세포독성 물질로 알려진 아만타딘(Amantadine hydrochloride, Sigma-Aldrich Co.)을 여우오줌풀과 동일한 농도별 조건으로 DMEM 배양액에 희석하여 세포에 접종하였다. 세포독성을 관찰하기 위하여 MTT assay를 수행하였다.

MTT assay는 세포 독성 또는 생존율을 측정하는 실험방법으로 탈수소 효소작용에 의하여 노란색 soluble substrate인 MTT tetrazolium이 cell안에 침투하여 mitochondria 속에서 적자색을 띄는 insoluble의 formazan product (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)로 환원 시키는 mitochondria의 능력을 이용하는 검사법이다. 2. 48시간 배양 이후 10 μ l의 MTT Reagent(0.05mg)을 각 well에 첨가한다. Orbital shaker를 이용하여 40rpm, 1분 동안 shaking 한 후 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 배양기에 4시간 동안 배양한다. 4시간 배양이후 각 well의 상층액을 모두 제거한 후 100 μ l의 Crystal Dissolving Solution(Cayman MTT cell proliferation assay kit)을 첨가 한다. 3분 후 ELISA reader를 이용하여 570nm 파장으로 OD값을 측정한다.

[0052] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 여우오줌풀 추출물을 각 농도별로 처리한 모든 군에서 추출물을 넣지 않은 음성대조군과 비슷한 OD 값을 보인 것으로 보아 세포 독성이 관찰되지 않았다. 하지만 아만타딘(Amantadine hydrochloride)을 첨가하여 세포에 접종한 경우 OD 값이 감소하는 것으로 보아 세포독성이 관찰되었으며 세포독성은 아만타딘(Amantadine hydrochloride)의 농도가 감소함에 따라 점차 감소하였다.

[0053] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 여우오줌풀 추출물이 세포에 독성을 유발시키지 않아 체내 안정할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

[0054]

[0055] <실시예 3>

[0056] 여우오줌풀 추출물의 항바이러스 분석

[0057] 본 발명자들은 상기 실시예에서 수득한 여우오줌풀 추출물이 항바이러스 활성이 있는지 확인하기 위해, 혈구응집반응시험(Hemagglutination test)을 다음과 같이 수행하였다. 앞서 준비된 MDCK 세포를 따뜻한 인산완충식염수(Phosphate buffer saline)을 이용하여 세척한 후, <표 1>에 제시된 인플루엔자 바이러스 4종각각을 100 TCID₅₀/ml (Stock용 바이러스의 10⁻⁵ 농도)로 하여 MDCK 세포에 접종하였다. 접종 후 1시간 동안 38 $^{\circ}$ C에서 배양하고 접종된 바이러스 용액을 제거한 후 여우오줌풀 원액 또는 희석추출물을 500 μ l 용량으로 처리하여 3일동안 38 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 이때 상기 희석은 여우오줌풀 원액을 대상으로 하기 표2와 같이 희석(2, 4, 8, 16, 32, 64, 128배 희석)하여 사용하였으며, 배양 후 상층액을 2진 희석하여 0.5% 칠면조 혈구와 반응시켜 혈구응집억제반응을 확인하였다.

표 1

[0058] 인플루엔자 바이러스 4종

구분	인플루엔자 바이러스
1	인체감염증 고병원성인 인플루엔자 바이러스(A/Vietnam/HN36285/2010 H5N1)
2	신종 독감 바이러스(A/California/07/2009 H1N1)
3	계절 독감 바이러스(A/Wisconsin/15/09 H3N2)
4	계절 독감 바이러스(B/Brisbane/60/2008)

[0059] 그 결과, 표 2에서 나타난 바와 같이, 인플루엔자 바이러스 4종을 여우오줌풀 추출물 농도별(원액~128배 희석)로 MDCK 세포에 접종하였을 경우, 대조군에 비해 바이러스 증식이 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 바이러스 증식 억제 정도는 처리한 여우오줌풀 추출물의 농도 의존적으로 비례하는 것으로 나타났다. 또한, 참고로 하기 표 2에 기재된 수치는 HA (Hemagglutination) 테스트 결과를 나타낸 것으로, 2진으로 나타낸 이유는 HA test시 샘플을 2진으로 희석하기 때문이며, HA test는 바이러스의 정량화 방법으로서, 예를 들어 추출물이 128배 희석된 경우에는 항인플루엔자 효과가 떨어지기 때문에 바이러스가 2³~2⁴으로 많이 나타나지만 추출물 원액의 경우 항인플루엔자 효과가 강하기 때문에 거의 바이러스 증폭이 나타나지 않는다.

표 2

[0060]

바이러스구분	추출물	추출물 희석 배수							
		원액	2	4	8	16	32	64	128

1	여우 오줌풀	0	0	2	2	2^2	2^3	2^3	2^4
2		0	0	0	2	2	2^3	2^3	2^3
3		0	0	0	2^2	2^2	2^3	2^3	2^3
4		0	0	2	2^2	2^2	2^2	2^2	2^3
대조군		2^8							

[0061] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에 대한 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1

