

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 2월 10일 (10.02.2022) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2022/031151 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/11 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61P 31/14 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/010527
- (22) 국제출원일: 2021년 8월 9일 (09.08.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0099490 2020년 8월 7일 (07.08.2020) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR). 주식회사 지에이치팜 (GH-PHARM CO., LTD.) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 고려대로 73, 310호(안암동5가, 고려대학교 의과대학 문숙의학관), Seoul (KR). 재단법인 경기도경제과학진흥원 (GYEONGGIDO BUSINESS & SCIENCE ACCELERATOR) [KR/KR]; 16229 경기도 수원시 영통구 광교로 107 (이의동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 박길홍 (PARK, Gil Hong); 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR).

김태우 (KIM, Tae Woo); 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR). 김명환 (KIM, Myung Hwan); 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR). 파티바다트리베니 (PATIVADA, Triveni); 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR). 헤마선다르알라벨리 (HEMASUNDAR, Alavilli); 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR). 순드라라잔나가순다라판디안 (SOUNDARAJAN, Nagasundarapandian); 10497 경기도 고양시 덕양구 화정로 65, 1515호(화정동, 한화오벨리스크), Gyeonggi-do (KR). 홍성수 (HONG, Seong Su); 16229 경기도 수원시 영통구 광교로 107 (이의동), Gyeonggi-do (KR). 최윤희 (CHOI, Yun Hyeok); 16229 경기도 수원시 영통구 광교로 107 (이의동), Gyeonggi-do (KR). 최춘환 (CHOI, Chun Whan); 16229 경기도 수원시 영통구 광교로 107 (이의동), Gyeonggi-do (KR).

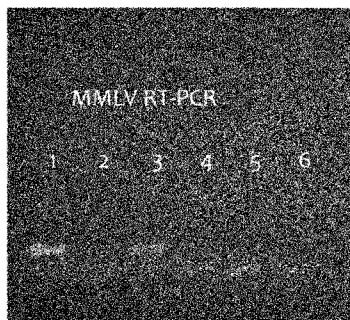
(74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook); 06247 서울시 강남구 논현로 401, 3층 (역삼동, 청송빌딩) 시원국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(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,

(54) Title: ANTIVIRAL COMPOSITION COMPRISING EASTERN BRAKENFERN EXTRACT OR FRACTION THEREOF

(54) 발명의 명칭: 고사리 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용 조성물

MMLV 역전사효소 RT-PCR AA



- BB 1. 증류수(양성대조군) + RNA
CC 2. 고사리 열수추출물 + RNA
DD 3. EA 상층액 열수층 + RNA
EE 4. EA 분획물 + RNA
FF 5. Bu 상층액 열수층 + RNA
GG 6. Bu 분획물 + RNA

AA ... MMLV reverse transcriptase RT-PCR
BB ... Distilled water (positive control) + RNA
CC ... Eastern brackenfern hot water extract + RNA
DD ... EA supernatant hot water layer + RNA
EE ... EA fraction + RNA
FF ... Bu supernatant hot water layer + RNA
GG ... Bu fraction + RNA

(57) Abstract: The present invention relates to an antiviral composition comprising an Eastern brackenfern extract or a fraction thereof and, more specifically, to a composition comprising an Eastern brackenfern root extract or a fraction thereof as an active ingredient for prevention or treatment of RNA virus infection symptoms. The Eastern brackenfern extract provided by the present invention has excellent inhibitory activity against reverse transcriptase and RNA virus proliferation and as such, can be very advantageously used for developing a prophylactic or therapeutic agent for RNA virus infection symptoms.

(57) 요약서: 본 발명은 고사리 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고사리 뿌리줄기 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명이 제공하는 고사리 추출물은 역전사 효소를 억제하는 활성 및 RNA 바이러스의 증식을 억제하는 활성이 매우 뛰어나, RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료제 개발에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, 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 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 고사리 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용 조성물

기술분야

[1] 본 출원은 2020년 8월 7일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2020-0099490호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

[2]

[3] 본 발명은 고사리 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고사리 뿌리줄기 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[4] 바이러스(virus)는 라틴어로 독성물질을 의미하며, 세균여과지(0.22 μ m)를 통과하는 일군의 감염형 병원성 입자이다. 바이러스는 숙주세포의 종류에 따라 박테리오파지, 식물 바이러스, 동물 바이러스로 분류하기도 하며, 핵산의 종류에 따라 DNA 바이러스, RNA 바이러스로 분류할 수 있다. 최근 신종 플루, AI, 코로나바이러스 및 구제역 등 다양한 바이러스 질병이 사회적으로 큰 문제를 일으켰으며, 이에 따라 바이러스 질병의 효과적인 대책에 대한 고민이 사회적으로 큰 관심을 불러일으키고 있다.

[5]

[6] 현재 바이러스성 질병을 예방하기 위한 가장 좋은 방법은 백신접종이지만, 바이러스에 의한 질병의 경우, 대체로 많은 바이러스 혈청형(아형) 생성 등에 따른 백신의 효율성 문제가 중요하게 제기되고 있다. 이러한 백신의 문제점을 보완해 줄 수 있는 바이러스 예방용 억제제의 개발 및 보급이 매우 중요한 시점이다.

[7]

[8] 특히, 2020년 1월, COVID-19 원인으로 확인된 SARS-CoV-2는 전세계로 확산되었으며 최근 세계 보건기구 (WHO)에 의해 전염병으로 선언되었다. 새로운 코로나 바이러스는 전염성이 높고 병원성인 것으로 보고되어 감염된 환자에게 심각한 폐렴 증상을 유발한다. 이 바이러스는 특히 노인 및/또는 심혈관 질환, 당뇨병, 만성 호흡기 질환 및 암과 같은 근본적인 질병을 가진 사람들에게 심각한 위협이 될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 하지만, 아직까지도 SARS-CoV-2와 같은 신종 바이러스 감염을 효과적으로 예방하고 치료할 수 있는 제제의 개발이 완성되지 못한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 이에, 본 발명자는 RNA 바이러스 감염증을 효과적으로 예방하고 치료할 수 있는 천연물 유래의 항바이러스 제제를 개발하기 위해 예의 연구를 거듭한 결과, 고사리 추출물이 역전사효소(reverse transcriptase)를 효과적으로 억제하여 RNA 바이러스의 증식을 저해한다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [10]
- [11] 따라서, 본 발명의 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명의 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 이루어진 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [13] 또한, 본 발명의 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 필수적으로 이루어진 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [14]
- [15] 본 발명의 다른 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 또한, 본 발명의 다른 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 이루어진 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [17] 또한, 본 발명의 다른 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 필수적으로 이루어진 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [18]
- [19] 본 발명의 다른 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공하는 것이다.
- [20] 또한, 본 발명의 다른 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 이루어지는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공하는 것이다.
- [21] 또한, 본 발명의 다른 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 필수적으로 이루어지는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공하는 것이다.
- [22]
- [23] 본 발명의 다른 목적은 RNA 바이러스 감염증 치료용 제제를 제조하기 위한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물의 용도를 제공하는 것이다.

[24]

[25] 본 발명의 다른 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 RNA 바이러스 감염증 치료 방법을 제공하는 것이다.

[26]

[27] 본 발명의 다른 목적은 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 제제를 제조하기 위한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물의 용도를 제공하는 것이다.

[28]

[29] 본 발명의 다른 목적은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[30] 전술한 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[31] 또한, 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 이루어진 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[32] 또한, 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 필수적으로 이루어진 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[33]

[34] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[35] 또한, 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 이루어진 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[36] 또한, 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 필수적으로 이루어진 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[37]

[38] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[39] 또한, 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매

분획물로 이루어지는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[40] 또한, 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물로 필수적으로 이루어지는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[41]

[42] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 RNA 바이러스 감염증 치료용 제제를 제조하기 위한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물의 용도를 제공한다.

[43]

[44] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 RNA 바이러스 감염증 치료 방법을 제공한다.

[45]

[46] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 제제를 제조하기 위한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물의 용도를 제공한다.

[47]

[48] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스 방법을 제공한다.

[49]

[50] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[51]

[52] 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[53]

[54] 상기 고사리(*Pteridium aquilinum*)는 양치식물 고사릿과에 속한 여러해살이 풀이다. 굵은 땅속줄기가 뻗으면서 잎이 나오는 데, 어린잎은 꼬불꼬불하게 말리고 흰 솜과 같은 털로 덮여 있다. 다 자란 잎은 깃꼴 겹잎이다. 어린잎은 나물로 먹는다. 고사리는 잎, 줄기, 뿌리 등의 부위를 포함하고 있으나, 본 발명에서 상기 고사리 추출물은 바람직하게는 고사리의 뿌리줄기(rhizome) 추출물인 것을 특징으로 할 수 있다.

[55]

[56] 본 발명의 용어, "추출물"은 고사리를 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기

추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[57]

[58] 상기 고사리를 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[59]

[60] 본 발명의 상기 고사리 추출물은, 추출물의 제조시 추출 효율을 증대시키기 위해 상기 원료에 대한 전처리 과정을 포함할 수 있으며, 예를 들어 고사리를 건조시킨 후 세절하여 사용할 수 있다.

[61]

[62] 본 발명의 추출물은 물 및 탄소수 1 내지 8의 유기용매로 이루어지는 군에서 선택되는 하나 이상의 것을 사용하여 추출되는 것일 수 있다. 본 발명에서 추출용매는 식용 가능한 단수 또는 복수 종류의 용매일 수 있으나, 바람직하게는 물, 주정, 및 탄소수 1 내지 6의 알코올[메탄올(C1), 에탄올(C2), 프로판올(C3), 부탄올(C4), 펜탄올(C5), 헥산올(C6)]로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것을 사용할 수 있다. 더 바람직하게는, 본 발명에서 상기 고사리 추출물은 물을 용매로 추출한 것일 수 있다.

[63]

[64] 본 발명의 추출물은 여과 및/또는 농축하여 액상으로 사용할 수 있고, 분무건조 또는 동결건조 등 통상의 건조 공정을 통하여 고형화하여 사용할 수 있다. 상기 건조 공정에서는 분무건조 또는 동결건조 전 텍스트린 등을 혼합하여 건조할 수 있다.

[65]

[66] 본 발명의 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[67]

[68] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법, 및 이들의 조합 등이 있다. 구체적으로, 고사리 뿌리줄기를 추출하여 얻은 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 들 수 있다.

[69]

[70]

본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexan), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 등의 비극성 용매; 또는 이들의 혼합용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로, 헥산, 에틸 아세테이트, 부탄올(butanol) 또는 물이 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 본 발명에서 상기 분획물은 고사리 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물 또는 부탄올 분획물일 수 있다.

[71]

[72]

또한, 상기 추출물 또는 분획물은 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있지만, 이제 제한되는 것은 아니다.

[73]

[74]

본 발명의 일 양태에서, 상기 바이러스는 RNA 바이러스인 것을 특징으로 할 수 있다. RNA 바이러스는 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용해 RNA로 된 자신의 유전정보를 DNA로 만들어 이를 숙주의 DNA 사이에 끼워 넣음으로써 숙주가 바이러스의 유전정보를 대신 복제하게끔 만드는 바이러스를 의미한다.

[75]

[76]

본 발명에서 상기 RNA 바이러스는 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 아말가비리대 (Amalgaviridae), 비르나비리대 (Birnaviridae), 크리소비리대 (Chrysoviridae), 시스토비리대 (Cystoviridae), 엔도르나비리대 (Endornaviridae), 하이포비리대 (Hypoviridae), 메가비르나비리대 (Megabirnaviridae), 파르티티비리대 (Partitiviridae), 피코비르나비리대 (Picobirnaviridae), 레오비리대 (Reoviridae), 토티비리대 (Totiviridae), 콰드리비리대 (Quadriviridae), 아르테리비리대 (Arteriviridae), 코로나비리대 (Coronaviridae), 메소나비리대 (Mesoniviridae), 로니비리대 (Roniviridae), 디시스트로비리대 (Dicistroviridae), 이플라비리대 (Iflaviridae), 마르나비리대 (Marnaviridae), 피코르나비리대 (Picornaviridae), 세코비리대 (Secoviridae), 알파플렉시비리대 (Alphaflexiviridae), 베타플렉시비리대 (Betaflexiviridae), 감마플렉시비리대 (Gammaflexiviridae), 티모비리대 (Tymoviridae), 보르나비리대 (Bornaviridae), 필로비리대 (Filoviridae), 파라믹소비리대 (Paramyxoviridae), 랍도비리대 (Rhabdoviridae), 니아미비리대 (Nyamiviridae) 칼리시비리대 (Caliciviridae), 플라비비리대 (Flaviviridae), 루테오비리대 (Luteoviridae), 토가비리대 (Togaviridae), 뉴모바라대 (Pneumoviridae), 아레나비리대 (Arenaviridae), 델타비리대 (Deltavirus), 및 오르토믹소비리대 (Orthomyxoviridae) 바이러스로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[77]

[78] 본 발명의 바람직한 일 양태에서, 상기 RNA 바이러스는 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 신종 인플루엔자 A 바이러스(Influenza A virus subtype H1N1), 조류 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus), 리노 바이러스(rhinovirus), 코로나 바이러스(coronavirus), 파라 인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 합포체 바이러스(respiratory syncytial virus), 후천성 면역결핍 증후군 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV), 레트로바이러스(retrovirus) 및 C형 간염 바이러스로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[79]

[80] 본 발명에서 상기 코로나 바이러스는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV) 및 중동 호흡기 증후군(MERS) 코로나바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[81]

[82] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법으로 투여 경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. 상기 담체로는 모든 종류의 용매, 분산매질, 수중유 또는 유중수 에멀전, 수성 조성물, 리포솜, 마이크로비드 및 마이크로솜이 포함된다.

[83]

[84] 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양, 즉 RNA 바이러스 감염증을 예방하거나 증상을 완화하고 치료하기 충분한 양으로 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어 일반적인 1일 투여량으로는 약 0.01 내지 1000mg/kg의 범위로 투여될 수 있으며, 바람직하게는, 약 1 내지 100mg/kg의 범위로 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 바람직한 투여량 범위 내에서 1회 또는 수회로 분할 투여할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 통상의 기술자가 적절하게 선택할 수 있다.

[85]

[86] 투여 경로로는 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하, 직장, 또는 체장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 가장 바람직하게는 경구적으로 투여될 수 있다.

[87]

[88] 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여하는 경우, 적합한 경구 투여용 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 형태로 제형화할 수 있다. 적합한

담체의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 상기 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[89]

[90] 또한, 비경구적으로 투여하는 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피투여제 및 비강 흡입제 등의 형태로 당 업계에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다.

[91]

[92] 또한, 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제 또는 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액 또는 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르 (예로, 올레인산에칠 등), 알코올류(예로, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜 또는 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제 (예로, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 (예로, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약제학적 담체를 포함할 수 있다.

[93]

[94] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 덱스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.

[95]

[96] 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 당업계에 공지되어 있는 것을 참고로

할 수 있다.

[97]

[98] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 카보하이트레이트(예를 들어, 글루코스, 만노즈, 슈크로즈 또는 텍스트란), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 및/또는 보존제를 추가로 포함할 수 있다.

[99]

[100] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.

[101]

[102] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 투여하거나, 바이러스 감염의 치료 효과가 있는 공지의 화합물과 병용하여 투여할 수 있다.

[103]

[104] 본 발명은 또한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[105]

[106] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다.

[107]

[108] 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 건강식품으로는 고사리 추출물의 유산균 발효물을 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 상기 고사리 추출물과 RNA 바이러스 감염증에 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다. 또한, 기능성 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 옻, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 고사리 추출물의 발효물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 고사리 추출물을 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.

[109]

- [110] 본 발명의 식품 조성물 중 고사리 추출물의 바람직한 함유량으로는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 최종적으로 제조된 식품 중 0.1 내지 90 중량%이다. 더 바람직하게는, 본 발명의 고사리 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품 조성물은 특히, RNA 바이러스 감염증에 치료 효과가 있는 것으로 알려진 활성 성분과 함께 혼합하여 건강기능식품 또는 식이 보충제의 형태로 제조될 수 있다.
- [111]
- [112] 본 발명은 또한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물을 제공한다.
- [113]
- [114] 본 발명에서 상기 항바이러스용 조성물은 전술한 약학적 조성물 및 식품 조성물을 제외한 일체의 조성물을 포함하며, 이의 비 제한적인 예시로 항바이러스용 화장품 조성물, 항바이러스용 피부 외용제 조성물, 항바이러스용 의약품 조성물 등이 포함될 수 있다.
- [115]
- [116] 상기 조성물이 화장품 조성물 또는 피부 외용제 조성물인 경우, 적합한 제형으로는 예를 들면, 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고 또는 스프레이의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(Foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- [117]
- [118] 상기 화장품 조성물 또는 피부 외용제 조성물은 화합물에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(Foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 피부용 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한, 상기 성분들은 피부 과학 분야에 서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- [119]
- [120] 한편, 상기 조성물이 의약품 조성물인 경우, 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 혼합되어 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [121]
- [122] 상기 의약품은 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어 소독청결제,

샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.

[123]

[124] 본 발명이 제공하는 상기 항바이러스용 조성물은 일상생활 전반에서 RNA 바이러스 감염에 대비하기 위한 용도로 활용이 될 수 있다.

[125]

[126] 본 발명은 RNA 바이러스 감염증 치료용 제제를 제조하기 위한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물의 용도를 제공한다.

[127]

[128] 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 RNA 바이러스 감염증 치료 방법을 제공한다.

[129]

[130] 본 발명은 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 제제를 제조하기 위한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물의 용도를 제공한다.

[131]

[132] 본 발명은 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스 방법을 제공한다.

[133]

[134] 본 발명의 상기 '유효량'이란 개체에 투여하였을 때, RNA 바이러스 감염증의 개선, 치료, 예방, 검출, 진단 또는 RNA 바이러스 감염증의 억제 또는 감소 효과를 나타내는 양을 말하며, 상기 '개체'란 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 상기 효과가 필요한 환자(patient) 일 수 있다.

[135]

본 발명의 상기 '치료'는 RNA 바이러스 감염증 또는 RNA 바이러스 감염증의 증상을 개선시키는 것을 포괄적으로 지칭하고, 이는 상기 질환을 치유하거나, 실질적으로 예방하거나, 또는 상태를 개선시키는 것을 포함할 수 있으며, 상기 질환으로부터 비롯된 한 가지 증상 또는 대부분의 증상을 완화시키거나, 치유하거나 예방하는 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[136]

[137] 본 명세서에서 용어 "을 포함하는(comprising)"이란 "함유하는(including)" 또는 "특징으로 하는(characterized by)"과 동일한 의미로 사용되며, 본 발명에 따른 조성물 또는 방법에 있어서, 구체적으로 언급되지 않은 추가적인 구성 성분 또는 방법의 단계 등을 배제하지 않는다. 또한 용어 "로 이루어지는(consisting of)"이란 별도로 기재되지 않은 추가적인 요소, 단계 또는 성분 등을 제외하는 것을

의미한다. 용어 "필수적으로 이루어지는(essentially consisting of)"이란 조성물 또는 방법의 범위에 있어서, 기재된 물질 또는 단계와 더불어 이의 기본적인 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질 또는 단계 등을 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[138]

발명의 효과

[139] 본 발명이 제공하는 고사리 추출물은 역전사 효소를 억제하는 활성 및 RNA 바이러스의 증식을 억제하는 활성이 매우 뛰어나, RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료제 개발에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

[140]

도면의 간단한 설명

[141] 도 1은 고사리 뿌리줄기 추출물 또는 분획물의 MMLV(Moloney murine leukemia virus) 역전사 효소 억제 활성을 평가한 결과이다(EA: 에틸아세테이트, Bu: 부탄올).

[142]

[143] 도 2는 고사리 뿌리줄기 추출물 또는 분획물의 AMV(Avian myeloblastosis virus) 역전사 효소 억제 활성을 평가한 결과이다(EA: 에틸아세테이트, Bu: 부탄올).

[144]

[145] 도 3은 고사리 뿌리줄기 열수 추출물(A), 이의 에틸아세테이트 분획물(B) 및 에틸아세테이트 분획물을 제외한 나머지 분획물(C)의 항바이러스 활성을 SARS-CoV-2가 감염된 vero 세포에서 평가한 결과이다.

[146]

[147] 도 4는 고농도의 고사리 뿌리줄기 열수 추출물(A), 이의 에틸아세테이트 분획물(B) 및 에틸아세테이트 분획물을 제외한 나머지 분획물(C)의 vero 세포에 대한 독성을 평가한 결과이다.

[148]

발명의 실시를 위한 형태

[149] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[150]

[151] 1. 고사리 뿌리줄기 추출물 제조

[152] 고사리 뿌리줄기(rhizome)를 100°C에서 물에 48시간 끓인 후 고형성분을 제거하여 고사리 열수추출물을 얻었다.

[153]

[154] 고사리 열수 추출물을 동일한 부피의 에틸아세테이트와 혼합하고 1시간 방치한 후 원심분리하여 상층액 열수층과 에틸아세테이트층을 분리하여 각각 시료로 사용하였다. 이렇게 얻은 고사리 에틸아세테이트 추출액을 rotary

evaporator로 에틸아세테이트를 증발시켰다. 이렇게 얻은 고사리 열수 추출물의 에틸아세테이트 분획물을 최소량의 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹인 후 phosphate-buffered saline(PBS)로 완전히 용해하여 고사리 에틸아세테이트 분획물로 사용하였다.

- [155] 구체적으로, 고사리 추출물은 전라남도 남원시에서 구입한 고사리 뿌리줄기 5kg을 깨끗이 씻은 후 물 30L를 첨가하여 48시간 끓인 후 냉장보관한 것을 열수추출물로 사용하였다. 열수추출물에 동일한 부피의 에틸아세테이트(ethylacetate, EA)를 첨가하고 잘 혼합하고 원심분리로 상층액 열수층과 EA층을 분리 수거한 후, EA 층을 rotary evaporator로 건조하여 EA 분획물로 사용하였다. EA 분획물을 최소량의 DMSO에 녹인 후 PBS로 희석하였는데, 이때 희석 배수는 수율을 대략 70%로 예상하여 열수추출물 원래 부피의 70%까지 희석하였다.

[156]

- [157] 또한, 열수추출물을 동일한 부피의 부타놀(butanol, Bu)을 첨가하고 잘 혼합하고 원심분리하여 상층액 열수층과 부타놀 층을 분리 수거한 후, 부타놀 층을 rotary evaporator로 건조하여 Bu 분획물로 사용하였다. Bu 분획물을 최소량의 DMSO에 녹인 후 물로 희석하였는데, 이때 희석 배수는 수율을 대략 70%로 예상하여 열수추출물 원래 부피의 70%까지 희석하였다.

[158]

[159] **2. 고사리 뿌리줄기 추출물의 세포독성 평가 (MTT assay)**

- [160] 본 발명의 고사리 EA 분획물이 세포에 독성 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다.

[161]

- [162] 상기 실험방법에 기재된 바에 따라 C6(rat glial cell), NIH3T3(mouse embryo fibroblast cell-line)를 96웰 플레이트에 배양한 뒤 각 화합물을 농도별로 세포 배지에 첨가하고 48시간 동안 배양한 뒤 MTT를 투여한 뒤, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 생존한 세포의 수를 나타내는 지표로서 하단의 식으로 계산되며, 3회의 실험으로 재현성을 확인하였다.

- [163] 세포증식율(%)= $\text{OD}_{550}(\text{sample})/\text{OD}_{550}(\text{control})$

[164]

- [165] 그 다음 세포 증식율의 변화에 근거하여 LD₅₀(Lethal Dose 50)값을 산출하였다.

- [166] 그 결과 표 1에 나타난 바와 같이, C6와 NIH3T3에서 고사리 열수추출물과 EA 분획물의 LD₅₀값이 >5mM로 세포독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[167]

[168] [표1]

Sample	LD ₅₀ (μM) Based on MTT Assay	
	C6	NIH3T3
고사리 열수추출물	>5,000	>5,000
고사리 EA 분획물	>5,000	>5,000

[169] 3. 고사리 뿌리줄기 추출물의 RNA virus 역전사효소 억제활성 평가

[170] 실험에 사용한 역전사효소는 Moloney murine leukemia virus(MMLV)(Bioline, A Meridian Life Science Company) 및 Avian myeloblastosis virus(AMV)(TaKaRa, Japan) RNA virus의 역전사효소를 사용하였다. Template RNA로부터 cDNA를 합성하기 위하여 먼저, template RNA, oligo(dT)₁₈ 혹은 random hexamer(혹은 GSP) primer, 10mM dNTP 혼합물, DEPC-treated water를 반응액의 총부피가 10μL가 되도록 혼합한 후 70°C에서 5분간 반응시키고 얼음에서 최소 1분간 냉각시켜서 priming 반응을 완료하였다. 그 후 5X 역전사반응 완충액, RNase inhibitor, MMLV 혹은 AMV 역전사효소, DEPC-treated water, 역전사효소 억제 후보물질을 총 10μL가 되게 잘 혼합하여 역전사반응액을 만들었다. 역전사효소 억제 후보물질로는 고사리 열수추출물, EA 분획물, EA 상층액 열수층, Bu 분획물, Bu 상층액 열수층을 사용하였다. 역전사 반응액을 priming 반응액에 첨가하고 잘 혼합하였다. 역전사반응은 45°C에서 30분간 진행하였다. 85°C에서 5분간 처리하여 반응을 종료시킨 후 ice-cold 에탄올로 cDNA를 침전시키고 원심분리로 cDNA를 얻어서 Taq PCR 반응 전까지 -20°C에 보관하였다.

[171] 이렇게 합성한 cDNA를 Taq PCR(Elpisbio)로 증폭하여 cDNA 합성 여부를 확인하였다(도 1, 2). PCR grade 증류수, Taq polymerase, 완충액, primer, cDNA를 혼합하여 총반응액의 부피가 20μL가 되게 하였다. 반응액을 initial denature 95°C 3분, denature 95°C 10초, anneal Tm-4°C 10초, extend 72°C 10초/kbp로 35 cycle 반응시켰다. 증폭된 DNA를 아가로스 젤 전기영동으로 분리하여 육안으로 확인하였다.

[172]

[173] 그 결과 도 1 및 2에서 확인할 수 있듯이, 고사리 열수추출물, EA 분획물, Bu 분획물, Bu 상층액 열수층을 처리한 역전사효소 반응의 Taq PCR은 cDNA가 증폭되지 않아서 상기 고사리 열수추출물, EA 분획물, Bu 분획물, Bu 상층액 열수층에는 MMLV(도 1)와 AMV(도 2) 역전사효소를 억제하는 화합물이 있어서 template RNA로부터 cDNA 합성을 완전히 억제한 것을 확인하였다.

[174]

[175] EA 상층액 열수층은 Taq PCR 확인 결과 역전사효소에 의한 cDNA 합성을 억제하는 물질이 없는 것으로 확인되었다. 따라서 고사리 열수추출물에 있는

역전사효소 억제물질은 에틸아세테이트로 100% 추출할 수 있는 것을 확인하였다.

[176]

[177] **4. 고사리 뿌리줄기 추출물의 항바이러스 효과**

[178] SARS-CoV-2 바이러스에 대한 고사리 추출물의 항바이러스 효과를 Vero Cell에서 검증하였다. Vero Cell은 10% FBS가 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco Lab Inc., Grand Island, NY)에서 37°C 온도와 5%의 CO₂에서 배양하였다. 96 wells cell plate(Greiner, Nurtigen, Germany)에 배양된 Vero Cell을 Well당 1 x 10⁴ cell로 분주하고 24시간 배양하였다. 96 wells cell plate에서 배양된 Vero Cell에 100TCID₅₀/50μL 농도로 희석된 Betacov/Korea/KCDC03/2020 바이러스를 감염시켰다. 37°C 온도와 5%의 CO₂ 농도 조건에서 1시간 30분동안 배양하였다. 상기 제조된 고사리 열수 추출물(A), EA 분획물(B), 그리고 EA 분획물을 제외한 분획물(C)을 2-fold 그리고 10-fold 계단적으로 희석하고 0.2μg/mL 농도의 TPCK treated trypsin 포함한 No FBS DMEM으로 교체했다. 37°C 온도와 5%의 CO₂ 농도 조건에서 72시간 동안 배양하였다. 고사리 추출물에 의해서 억제된 SARS-CoV-2 바이러스는 CPE를 확인하고, 10% Crystal Violet (Sigma-aldrich, St. Louis, MO)을 통해 염색하여 최소 항바이러스 억제 농도를 결정했다. 양성대조군으로 롬데시비르(RDV)를 사용하였다.

[179]

[180] 이에 대한 결과를 도 3에 나타내었다.

[181] 도 3에 나타낸 바와 같이, 고사리 뿌리줄기 열수추출물(A) 및 EA 분획물(B)은 농도 의존적으로 우수한 항바이러스 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 하지만, EA 분획물을 제외한 분획물(C)에서는 항바이러스 활성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다.

[182]

[183] 한편, 도 4에는 고농도의 고사리 뿌리줄기 열수추출물(A), EA 분획물(B) 및 EA 분획물을 제외한 분획물(C)의 바이러스 감염 vero 세포주/바이러스 비감염 vero 세포주에 대한 세포독성을 나타내었는데, 고사리 뿌리줄기 열수추출물(A) 및 EA 분획물(B)은 별다른 독성을 나타내지 않았지만, EA 분획물을 제외한 분획물(C)에서는 비감염 vero 세포주에서도 세포가 사멸한 것으로 확인되었다.

산업상 이용가능성

[184] 본 발명이 제공하는 고사리 추출물은 역전사 효소를 억제하는 활성 및 RNA 바이러스의 증식을 억제하는 활성이 매우 뛰어나, RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료제 개발에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

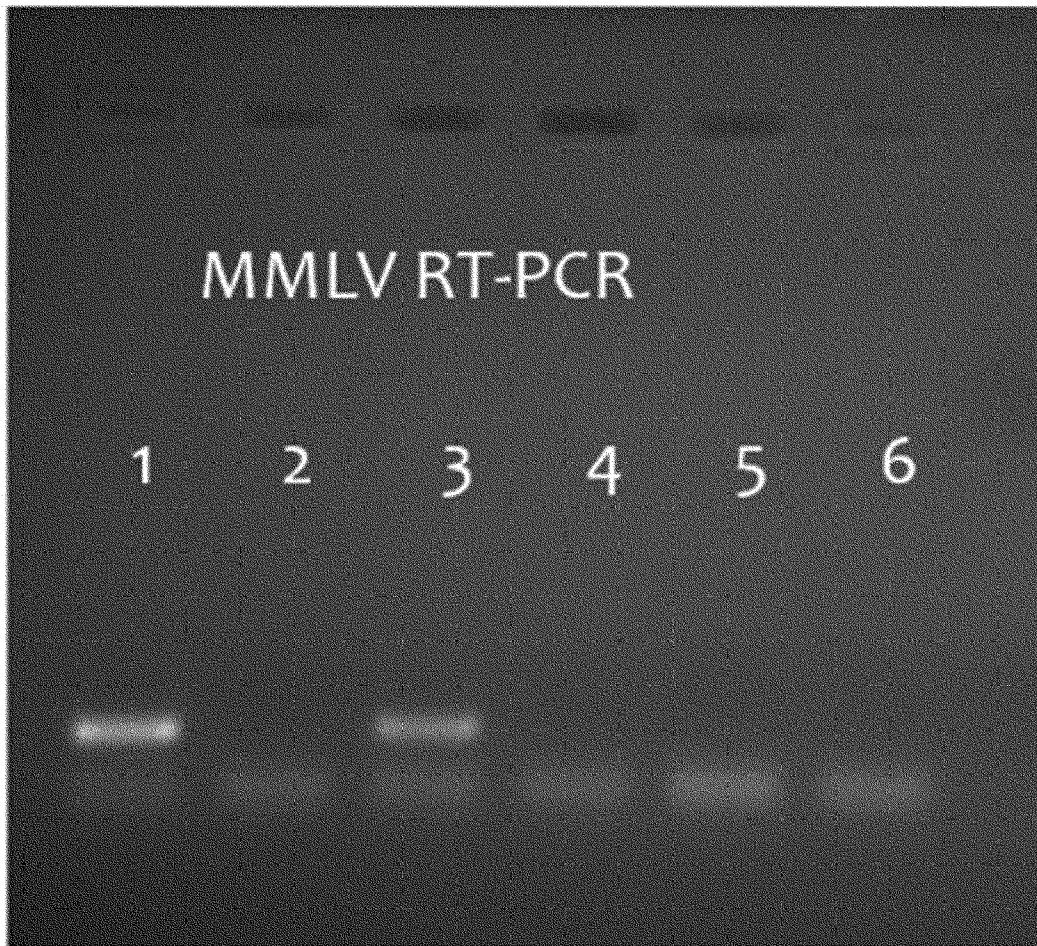
청구범위

- [청구항 1] 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 고사리 추출물은 고사리 뿌리줄기(Rhizome) 추출물인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 고사리 추출물은 물, 탄소수 1 내지 8의 유기용매 및 이의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 유기용매 분획물은 헥산, 에틸아세테이트 및 부탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 분획물인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 RNA 바이러스는 아말가비리대 (Amalgaviridae), 비르나비리대 (Birnaviridae), 크리소비리대 (Chrysoviridae), 시스토비리대 (Cystoviridae), 엔도르나비리대 (Endornaviridae), 하이포비리대 (Hypoviridae), 메가비르나비리대 (Megabirnaviridae), 파르티티비리대 (Partitiviridae), 피코비르나비리대 (Picobirnaviridae), 레오비리대 (Reoviridae), 토티비리대 (Totiviridae), 콰드리비리대 (Quadriviridae), 아르테리비리대 (Arteriviridae), 코로나비리대 (Coronaviridae), 메소니비리대 (Mesoniviridae), 로니비리대 (Roniviridae), 디시스트로비리대 (Dicistroviridae), 이플라비리대 (Iflaviridae), 마르나비리대 (Marnaviridae), 피코르나비리대 (Picornaviridae), 세코비리대 (Secoviridae), 알파플렉시비리대 (Alphaflexiviridae), 베타플렉시비리대 (Betaflexiviridae), 감마플렉시비리대 (Gammaflexiviridae), 티모비리대 (Tymoviridae), 보르나비리대 (Bornaviridae), 필로비리대 (Filoviridae), 파라믹소비리대 (Paramyxoviridae), 랍도비리대 (Rhabdoviridae), 니아미비리대 (Nyamiviridae) 칼리시비리대 (Caliciviridae), 플라비비리대 (Flaviviridae), 루테오비리대 (Luteoviridae), 토가비리대 (Togaviridae), 뉴모바라대 (Pneumoviridae), 아레나비리대 (Arenaviridae), 델타비리대 (Deltavirus), 및 오르토믹소비리대 (Orthomyxoviridae) 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 RNA 바이러스는 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 신종 인플루엔자 A 바이러스(Influenza A virus subtype H1N1), 조류 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus), 리노 바이러스(rhinovirus), 코로나 바이러스(coronavirus), 파라 인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 호흡기 합포체 바이러스(respiratory syncytial virus), 후천성

- 면역결핍 증후군 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV), 레트로바이러스(retrovirus) 및 C형 간염 바이러스로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 코로나 바이러스는 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV) 및 중동 호흡기 증후군(MERS) 코로나바이러스로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 8] 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 유효성분으로 포함하는 RNA 바이러스 감염증 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 고사리 추출물은 고사리 뿌리줄기(Rhizome) 추출물인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 고사리 추출물은 물, 탄소수 1 내지 8의 알코올 및 이의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출한 것을 특징으로 하는 식품 조성물.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 유기용매는 헥산, 에틸아세테이트 및 부탄올로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.
- [청구항 12] 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 조성물은 화장료 조성물, 피부 외용제 조성물 또는 의약품 조성물인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 조성물.
- [청구항 14] RNA 바이러스 감염증 치료용 제제를 제조하기 위한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물의 용도.
- [청구항 15] 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 RNA 바이러스 감염증 치료 방법.
- [청구항 16] RNA 바이러스에 대한 항바이러스용 제제를 제조하기 위한 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물의 용도.
- [청구항 17] 고사리(*Pteridium aquilinum*) 추출물 또는 이의 유기용매 분획물을 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함하는 RNA 바이러스에 대한 항바이러스 방법.

[도1]

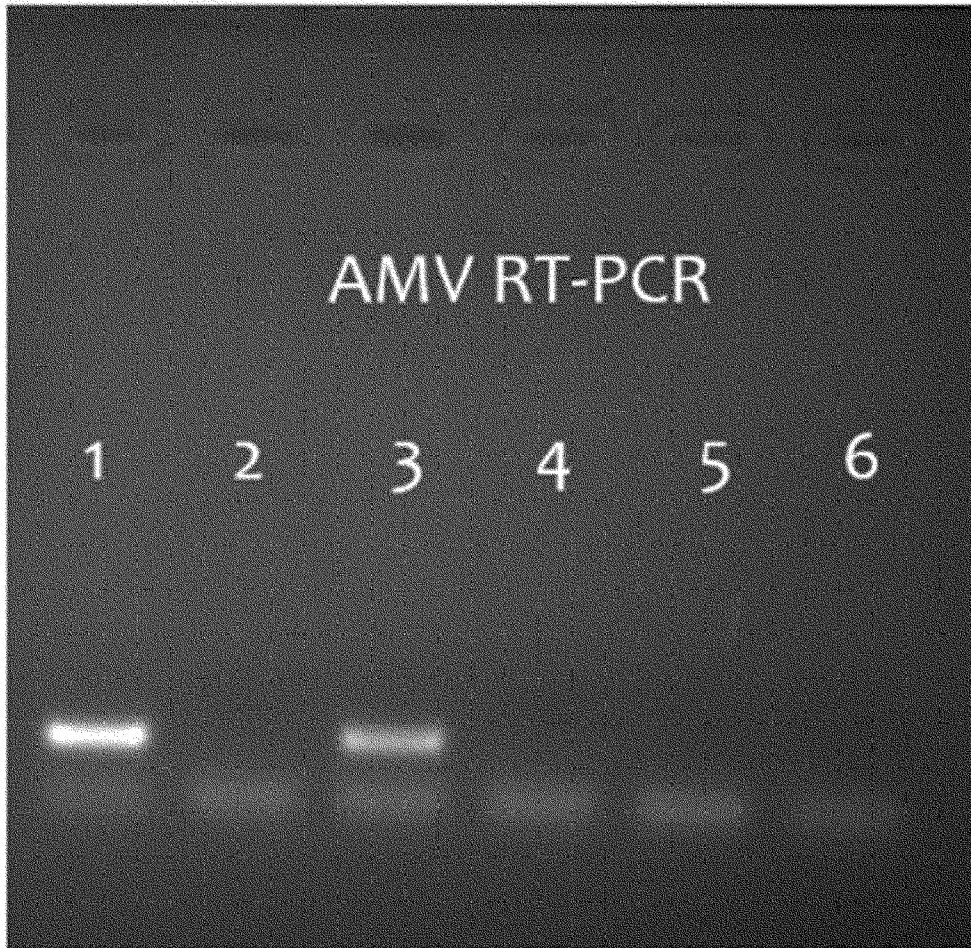
MMLV 역전사효소 RT-PCR



1. 증류수(양성대조군) + RNA
2. 고사리 열수추출물 + RNA
3. EA 상층액 열수층 +RNA
4. EA 분획물 + RNA
5. Bu 상층액 열수층 +RNA
6. Bu 분획물 + RNA

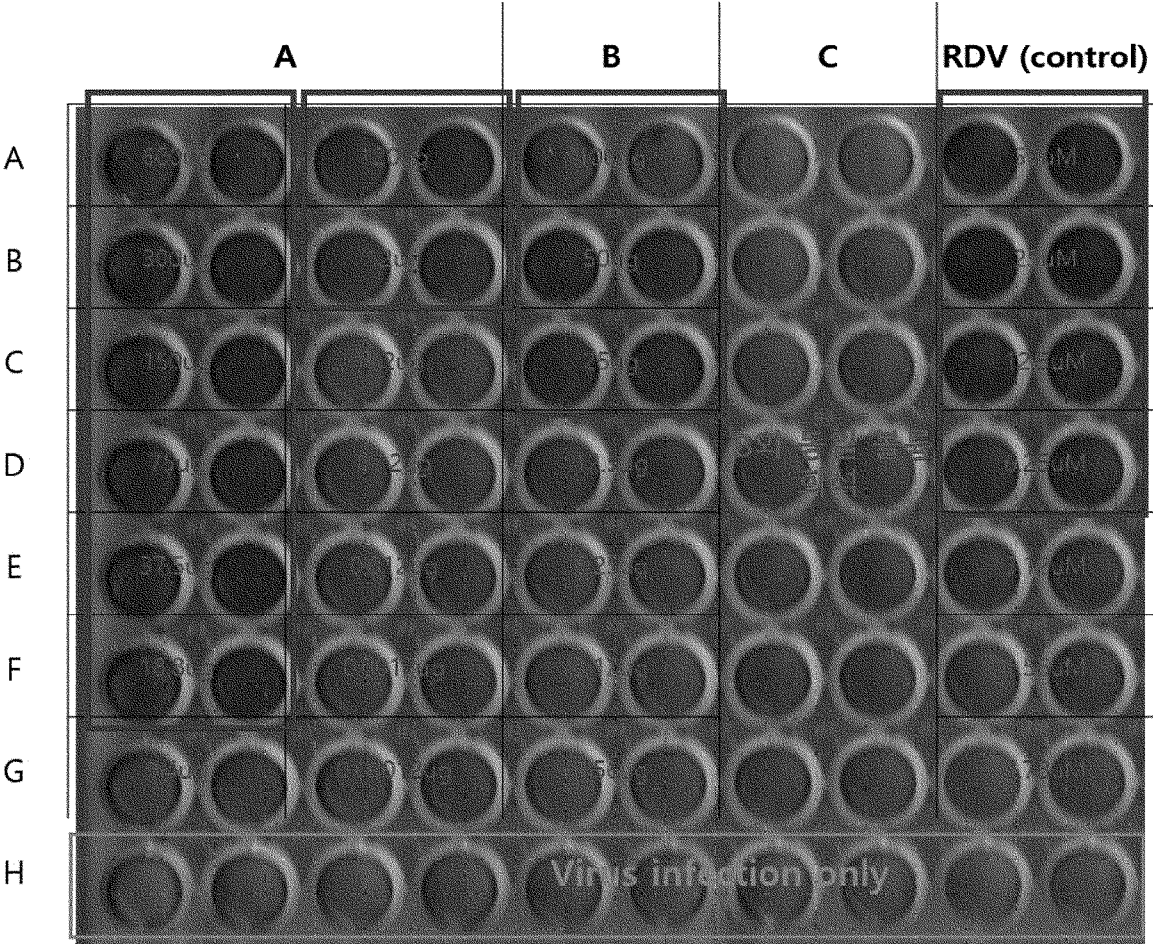
[도2]

AMV역전사효소 RT-PCR



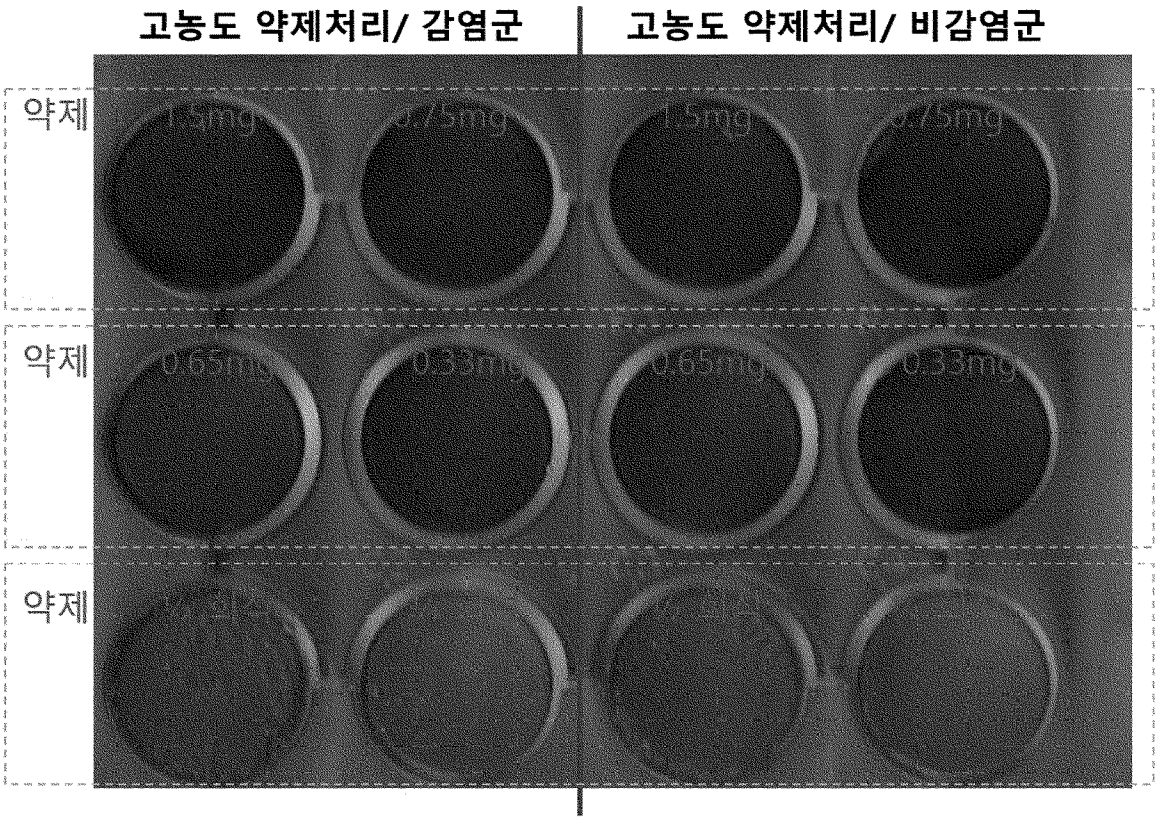
1. 증류수(양성대조군) + RNA
2. 고사리 열수추출물 + RNA
3. EA 상층액 열수층 +RNA
4. EA 분획물 + RNA
5. Bu 상층액 열수층 +RNA
6. Bu 분획물 + RNA

[도3]



양성(억제효능)부분

[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/010527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 36/11(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A23L 33/105(2016.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 36/11(2006.01); A01N 65/04(2009.01); A01N 65/08(2009.01); A23L 33/105(2016.01); A61K 36/899(2006.01); A61P 1/02(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 고사리(Pteridium aquilinum), 추출물(extract), RNA 바이러스(RNA virus), 뿌리줄기(rhizome), 코로나 바이러스(corona virus)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KR 10-2124592 B1 (GUSTAR CO., LTD.) 18 June 2020 (2020-06-18) See paragraphs [0008], [0029], [0030] and [0052]-[0059]; and table 3.	1-6,8-14,16 7
A	LATORRE, Andreia Oliveira et al. Immunomodulatory effects of Pteridium aquilinum on natural killer cell activity and select aspects of the cellular immune response of mice. Journal of Immunotoxicology. 2009, vol. 6, no. 2, pp. 104-114. See abstract; and pages 105-113.	1-14,16
A	KR 10-2019-0052567 A (REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)) 16 May 2019 (2019-05-16) See abstract; and claims 1-10.	1-14,16
A	GOMES, Joana et al. Glycophenotypic alterations induced by Pteridium aquilinum in mice gastric mucosa : synergistic effect with Helicobacter pylori infection. PLoS ONE. 2012, vol. 7, no. 6, article no. e38353, inner pp. 1-11. See abstract; and inner pages 2-8.	1-14,16
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 November 2021		Date of mailing of the international search report 29 November 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/010527**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020-060277 A1 (WONKWANG UNIVERSITY CENTER FOR INDUSTRY-ACADEMY et al.) 26 March 2020 (2020-03-26) See abstract; and claims 1-11.	1-14, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/010527

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **15,17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 15 and 17 pertain to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/010527

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR	10-2124592	B1	18 June 2020	None	
KR	10-2019-0052567	A	16 May 2019	None	
WO	2020-060277	A1	26 March 2020	KR 10-2020-0034451	A 31 March 2020
				KR 10-2020-0034452	A 31 March 2020
				KR 10-2061981	B1 02 January 2020
				KR 10-2167724	B1 19 October 2020
				KR 10-2167725	B1 19 October 2020

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/11(2006.01)i; A61P 31/14(2006.01)i; A23L 33/105(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/11(2006.01); A01N 65/04(2009.01); A01N 65/08(2009.01); A23L 33/105(2016.01); A61K 36/899(2006.01); A61P 1/02(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 고사리(Pteridium aquilinum), 추출물(extract), RNA 바이러스(RNA virus), 뿌리줄기(rhizome), 코로나 바이러스(corona virus)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	KR 10-2124592 B1 (구스타 주식회사) 2020.06.18 단락 [0008], [0029], [0030], [0052]-[0059]; 및 표 3	1-6,8-14,16 7
A	LATORRE, ANDREIA OLIVEIRA 등, 'Immunomodulatory effects of Pteridium aquilinum on natural killer cell activity and select aspects of the cellular immune response of mice', Journal of Immunotoxicology, 2009년, 6권, 2호, 페이지 104-114 요약; 및 페이지 105-113	1-14,16
A	KR 10-2019-0052567 A (대한민국(농촌진흥청장)) 2019.05.16 요약; 및 청구항 1-10	1-14,16
A	GOMES, JOANA 등, 'Glycophenotypic alterations induced by Pteridium aquilinum in mice gastric mucosa: synergistic effect with Helicobacter pylori infection', PLoS ONE, 2012년, 7권, 6호, 기사번호 e38353, 내부페이지 1-11 요약; 및 내부페이지 2-8	1-14,16
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년11월26일(26.11.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년11월29일(29.11.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **15,17**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 15 및 17은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2020-060277 A1 (WONKWANG UNIVERSITY CENTER FOR INDUSTRY-ACADEMY 등) 2020.03.26 요약; 및 청구항 1-11	1-14,16

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2124592 B1	2020/06/18	없음	
KR 10-2019-0052567 A	2019/05/16	없음	
WO 2020-060277 A1	2020/03/26	KR 10-2020-0034451 A	2020/03/31
		KR 10-2020-0034452 A	2020/03/31
		KR 10-2061981 B1	2020/01/02
		KR 10-2167724 B1	2020/10/19
		KR 10-2167725 B1	2020/10/19