



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0104308
(43) 공개일자 2013년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/73 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0025699

(22) 출원일자 2012년03월13일

심사청구일자 2012년03월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김경현

서울 서초구 잠원동 신반포한신아파트 25차 334동 304호

정미숙

서울 종로구 명륜동2가 아남아파트 103동 705호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

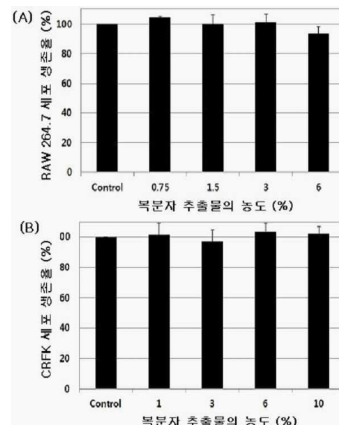
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물

(57) 요약

본 발명은 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 복분자 추출물을 포함하는 조성물은 칼리시바이러스의 증식 및 복제를 저해하는 활성이 매우 우수하므로, 아직까지 백신이나 치료제가 개발되어 있지 않은 노로바이러스 및 고양이 칼리시바이러스에 효과적인 치료제로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 천연식물인 복분자의 추출물을 이용하는 것이므로 안정성이 인정된다는 점에서 본 발명의 조성물을 포함하는 식품을 집단 급식소에서 제공시 노로바이러스로 인한 식중독을 감소시킬 수 있어 사회경제적으로 매우 의미 있는 개발이 될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이지혜

서울 강북구 번3동 242번지 주공1단지아파트 107동
405호

오미

서울 강북구 번동 449-22 삼보힐오피스텔 706호

배선영

서울 강북구 수유2동 279-50 303호

특허청구의 범위

청구항 1

복분자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 복분자 추출물은 착즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 물, 에탄올, 에탄올 수용액 및 아세트산 수용액으로 이루어진 군에서 선택된 용매를 사용하는 용매 추출, 또는 환류냉각 추출로 얻어진 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 복분자 추출물은 칼리시바이러스의 증식과 복제를 저해함으로써 항바이러스 활성을 나타내는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 칼리시바이러스는 노로바이러스 또는 고양이 칼리시 바이러스인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 노로바이러스에 의한 식중독 또는 장염, 또는 칼리시바이러스에 의한 고양이과 동물의 호흡기 질환을 예방 또는 치료하기 위한 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 복분자 추출물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 노로바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식품은 식품 첨가제, 음료 또는 음료 첨가제인, 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 복분자 추출물을 0.00001 중량% 내지 100 중량% 로 포함하는 것인, 조성물.

명 세 서

기술분야

[0001] 본 발명은 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 복분자 추출물 (*Rubus coreanus* extract)을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[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. 미국 질병 관리본부 2011년 1월 보고에 따르면, 식중독 원인 가운데 노로바이러스가 46%로 1위를 차지하고 있으며, 노로바이러스 식중독 발생 시설은 장기요양원이 가장 높았고, 식당, 선박 및 학교 순으로 나타나 노로바이러스 식중독은 주로 집단급식 시설에서 발생함을 알 수 있다. 미국에서 매년 미국인 6명 중 1명에 해당하는 4천 8백만 명이 식중독에 걸리고, 128,000명이 입원하며 3,000명이 사망한다. 사망에 이르는 식중독 환자의 90%는 노로바이러스 병원체에 의한 것이다 (CDC December 15, 2010). 우리나라의 경우, 노로바이러스 식품위해 환자 수는 계속적으로 증가하여 2006년 이후 신종플루 영향을 받은 2009년을 제외하고는 전체 식중독 환자 대비 약 30%를 차지하며, 병원성 대장균과 함께 집단급식소 식중독 발생의 주요 원인체로 집계되고 있다.

[0003] 노로바이러스는 건조하고 기온이 낮은 겨울철에 생존할 수 있는 바이러스로 물리·화학적으로 안정한 구조를 가지고 있어 실온에서 10일, 10℃ 해수 등에서 30-40일, 영하 20℃ 이하의 조건에서 장기간 생존 할 수 있다. 이는 음식물과 물을 통해 사람에게 전달될 수도 있고, 환자와의 직접 접촉이나 공기를 통해서도 감염될 수 있다. 노로바이러스 10개 입자만 섭취해도 질병이 유발될 수 있고, 증상이 소멸된 이후에도 2주간 전염이 가능할 정도로 강력한 감염력을 갖고 있다.

[0004] 노로바이러스는 단일가닥(single strand) 양성(positive) RNA 바이러스로서 7.5 kb RNA 게놈(genome)을 갖고 있으며, 3개의 주된(primary) ORF 중에서 ORF2와 ORF3가 캡시드(capsid) 단백질 유전정보를 갖고 있다. ORF2와 ORF3는 각각 VP1, VP2를 발현하며, VP1은 주요 캡시드(major capsid) 단백질로 바이러스 캡시드 어셈블리(capsid assembly)에 관여하며, VP2의 기능은 아직까지 불확실하다. 노로바이러스는 다양한 유전형(genotype) 종류를 갖고 있지만, 여러 세포주(strain)에 대한 연구가 아직까지 제한적인 것은 그만큼 바이러스 세포배양이 어렵기 때문이다.

[0005] 특히 인체 노로바이러스는 사람의 장(腸)에서만 증식하고, 현재까지 세포배양이 불가능하기 때문에 관련 연구가 미흡하여 아직까지 백신이나 치료제 개발이 안 되어 있다. 그러나 대체물 (surrogate)로서 뮤린(murine) 노로바이러스가 RAW 264.7 세포에서 배양이 가능하게 되면서 관련 바이러스 연구가 활발해지고 있다. RAW 264.7 세포는 STAT1이 결핍된 (STAT1-/-) 면역력이 약해진 쥐로부터 얻은 마우스 단핵 백혈구 대식세포주(mouse leukemic monocyte macrophage cell line) 로서, 뮤린 노로바이러스-1 (MNV-1)이 배양되는 유일한 세포 시스템이다. STAT1은 항바이러스 인터페론 신호전달에 의하여 고발현되는 유전자 단백질 중의 하나이다.

[0006] 식중독 치료와 관련하여 항생제 (antibiotic drug)는 박테리아로 인한 식중독을 치료함에 있어서는 탁월한 효과를 발휘하지만 바이러스로 인한 식중독에는 치료효과가 없으며, 특히 바이러스로 인한 식중독의 주된 원인이 되는 노로바이러스의 감염을 예방할 수 있는 백신 또는 치료제가 아직 개발되지 않은 실정이다. 따라서 선진국형 생활패턴 변화로 인한 노로바이러스 감염이 급증하고 있는 시점에서, 노로바이러스를 제어할 수 있는 천연물을 발굴하여 집단급식소에서 섭취한다면 노로바이러스 식중독을 감소시킬 수 있으므로 사회경제적으로 매우 의미 있는 개발이 될 것으로 기대된다.

[0007] 한편, 식중독 대체 바이러스로 알려진 고양이 칼리시바이러스(feline calicivirus)는 고양이과에 속하는 동물의 감염을 일으키는 바이러스로서 소화기관 보다는 호흡기 감염이 특징이다. 상기 바이러스는 고양이 호흡기 감염 원인의 약 50% 를 차지하고 있는 매우 중요한 바이러스로서 최근에는 가정에서 키우는 애완용 고양이에게 적용되는 고양이용 백신이 개발되고 있다. 따라서 상기 고양이 칼리시바이러스에 대한 효과적인 치료제를 개발할 경우 가정용 고양이뿐만 아니라 동물원에서 사육되는 치타 등 다양한 고양이과 동물에도 또한 널리 적용이 가능할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 부작용 또는 독성 등의 우려가

없으며 노로바이러스 및 고양이 칼리시바이러스 등 칼리시바이러스에 대한 저해 효과가 뛰어난 천연물을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들이 무린(Murine) 노로바이러스 세포배양 연구에 기반을 둔 천연물 바이오 소재 개발을 위하여 예의 연구 노력한 결과, 세포기반 항바이러스 활성연구를 이용한 저해제 연구를 통해 노로바이러스 타겟(target)에 천연물 중 특히 복분자 추출물이 뛰어난 항 노로바이러스 활성을 갖는 것을 확인하였으며, 또한 상기 노로바이러스의 대체모델인 고양이 칼리시바이러스에 대해서도 복분자 추출물이 우수한 항바이러스 활성을 가진다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0010] 이에 본 발명의 일 구현예는 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스(calicivirus)에 대한 항바이러스 조성물을 제공한다.
- [0011] 상기 항바이러스 조성물은 척추동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류에 투여되는 의약 조성물의 형태이거나 식품 조성물, 식기, 주방용품, 생활용품, 기타 각종 물건의 세척제, 소독제, 통상의 항바이러스제 등 통상적으로 알려진 모든 형태의 적용이 가능하다.
- [0012] 또 다른 구현예는 복분자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스(calicivirus) 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명의 다른 일 구현예는 복분자의 추출물을 포함하는 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0015] 최근 컴퓨터 기술의 발달로 가상현실 프로그램을 이용한 단백질 구조기반 화합물 설계 방법이 신약 개발에 적용되어, 라이브러리에 기초한 가상 스크리닝이 매우 활발하게 진행되고 있다. 화합물 라이브러리를 이용하면 기존의 미생물 혹은 천연물을 이용하는 신약개발에 비하여 훨씬 짧은 기간 내에 라이브러리에 보관된 수천만 개에 달하는 화합물의 활성 여부를 모니터할 수 있는 장점을 갖고 있다. 그러나 라이브러리 화합물은 주로 고리(ring) 화합물에 국한된 지극히 제한된 화합물 다양성(diversity)을 보이는 단점을 갖고 있다.
- [0016] 이를 해결할 수 있는 방안이 바로 기존에 수행되어 오던 천연물 스크리닝이며, 국내에는 아직도 여러 활성을 기반으로 한 스크리닝이 완결되지 않은 자생식물이 있다. 특히 복분자와 같은 국내 고유식물은 최근 매우 유용한 가치가 발견되고 있을 뿐만 아니라, 특히 바이러스 질환에 대한 스크리닝이 아직까지 활발하게 연구되지 않은 불모의 자생식물로서 항바이러스 활성을 갖는 복분자 추출물이나 추출물에서 분리 동정된 단일 화합물(single compound)은 다국적 제약회사에서 큰 관심을 갖게 될 고부가가치 소재가 될 것이다.
- [0017] 장미과에 속하는 복분자(*Rubus coreanus*)는 우리나라의 제주도 및 남부지역이 주요산지로 초여름에 검붉은 열매를 수확하여 식용하며, 한방에서는 강장제 등으로 이용되고 있다. 복분자에는 다양한 폴리페놀 화합물이 함유되어 있어 항산화 활성, 심혈관 질환 예방, 불안 및 우울증 예방과 치료, 비노기능 강화, 당뇨 합병증, 항헬리코박터 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.
- [0018] 구체적으로 복분자 열매에는 퀘세틴(quercetin) 및 다양한 페놀산(phenolic acids)과 안토시아닌 색소인 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside, C3G)와 시아니딘-3-람노글루코시드(cyanidin-3-rhamnoglucoside)가 함유되어 있으며, 미성숙 복분자 열매에는 갈로탄닌(gallotannin), 엘라기탄닌(ellagitannin), 갈산(gallic acid), 2,3-(S)-HHDP-D-글루코피라노시드(2,3-(S)-HHDP-D-glucopyranoside), 상퀸(sanguin) H-4 및 H-6가 함유되어 있다.
- [0019] 이제까지 다양한 폴리페놀 화합물이 함유된 식물 추출물의 항바이러스 작용이 제시되었지만, 특이한 점은 분리된 단일 폴리페놀 화합물에서는 항바이러스 작용이 나타나지 않은 반면, 다양한 페놀 화합물을 함유하는 식물 추출물에서 효과가 높게 나타났다는 점이다. 이는 각 페놀 화합물의 시너지효과에 의하여 항바이러스 작용이 나타나고 있는 것으로 예측되고 있다(J. Med. Plants Res. 2009).
- [0020] 최근 연구 보고에서 복분자의 항산화 작용, 항암 효과, 병원성 대장균 및 살모넬라 등에 대한 항박테리아 작용 등이 있다는 것이 밝혀졌으며, 바이러스와 관련하여서는 단순포진 바이러스 타입 1(herpes simplex virus type 1), B형 간염 바이러스(hepatitis B virus)에 대한 항바이러스 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다(Phytother Res. 2001).

- [0021] 본 발명에서는 나아가 복분자 (*Rubus coreanus*) 추출물이 칼리시바이러스과(caliciviridae), 특히 노로바이러스(norovirus) 및 고양이 칼리시바이러스(feline calicivirus)에 대해 우수한 항바이러스 활성을 가짐을 최초로 밝혔다.
- [0022] 이에 본 발명의 바람직한 일 구현예는 복분자의 추출물을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스(calicivirus) 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 명세서에서, ‘치료’는 증상의 경감 또는 개선, 질환의 범위의 감소, 질환 진행의 지연 또는 완화, 질환 상태의 개선, 경감 또는 안정화, 부분적 또는 완전한 회복, 생존의 연장 기타 다른 이로인 치료 결과 등을 모두 포함하는 의미로 사용된다.
- [0024] 복분자 추출물은 착즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출, 또는 환류냉각 추출 등 통상의 천연 추출물의 제조방법에 사용되는 다양한 방법에 따라 추출된 것일 수 있으며, 바람직하게는 착즙 추출 또는 용매 추출된 것일 수 있다.
- [0025] 착즙 추출이란 복분자에 착즙기 등의 기계 또는 손으로 물리적인 힘을 가하여 즙액을 짜내는 것을 의미하며, 용매 추출은 바람직하게는 물, 에탄올, 에탄올 수용액 및 아세트산 수용액으로 이루어진 군에서 선택된 용매를 사용하여 이루어질 수 있다.
- [0026] 보다 바람직하게는 상기 복분자 추출물은 복분자의 열매를 물로 추출한 복분자의 수 추출물 또는 착즙액일 수 있다.
- [0027] 상기 복분자 추출물은 수득된 추출액(또는 착즙액)에 대해 여과과정을 수행하거나 농축 및/또는 동결건조를 더욱 수행하여 제조할 수 있다. 상기 여과과정을 수행함으로써 추출액 등에 남아 있는 잔사 등을 제거할 수 있으며, 상기 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 수분을 제거할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에 따른 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 칼리시바이러스의 증식과 복제를 저해함으로써 항바이러스 활성을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 칼리시바이러스는 바람직하게는 노로바이러스(norovirus) 또는 고양이 칼리시바이러스(feline calicivirus)일 수 있다.
- [0030] 노로바이러스는 분류학상 칼리시바이러스과(Caliciviridae)에 속하며 단일가닥의 RNA를 갖는 바이러스로, 생김새로 인하여 소형구형 바이러스(small round structured virus, SRSV)로 불리기도 하다가 최근 노로바이러스로 공식명명된 식중독 바이러스이다. 노로바이러스와 함께 칼리시바이러스과에 속하는 고양이 칼리시바이러스(feline calicivirus)는 마찬가지로 단일가닥의 RNA를 지니고 있으며 유전학적, 생화학적, 물리화학적인 특성이 노로바이러스와 유사하여 노로바이러스의 대체모델로 이용되고 있다.
- [0031] 본 발명자들의 실험결과, 복분자 추출물은 노로바이러스 뿐만 아니라 고양이 칼리시바이러스에 대해서도 높은 항바이러스 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0032] 특히 노로바이러스의 경우 인체세포 감염 후, 급성 위장염을 일으키는 병원체로서 현재까지 이에 대한 효과적인 치료제나 백신이 개발되어 있지 않은 실정이다.
- [0033] 그런데 본 발명의 일 구현예에 따른 조성물은 후술할 실험예 2, 도 3 및 도 4에서 확인할 수 있듯이, 상기 조성물을 노로바이러스의 바이러스 감염과 동시에 처리한 경우(co-treatment) 및 바이러스 감염 이후에 처리한 경우(post-treatment)에 특히 높은 항바이러스 활성을 갖는 것으로 나타나, 세포 내 바이러스의 감염 이후 증식을 억제함으로써 바이러스의 복제 기작을 저해하는 특징이 있음을 확인할 수 있었다.
- [0034] 상술한 바와 같이 본 발명 조성물의 노로바이러스에 대한 활성이 주로 바이러스 감염과 동시에 처리한 경우 및 바이러스 감염 이후에 처리한 경우에 특히 우수한 것으로 나타난 것과는 달리, 고양이 칼리시바이러스(FCV)에 대한 항바이러스 활성은 전처리시(pre-treatment), 특히 복분자 추출물을 바이러스와 함께 배양한 후 바이러스를 감염시킨 경우에 더욱 높은 것으로 나타나(도 5 및 도 6 참조) 양 바이러스에 대한 저해활성은 각각 다른 양상을 보임을 알 수 있었다.
- [0035] 칼리시바이러스 감염 질환은 바람직하게는 노로바이러스에 의한 식중독 또는 장염일 수 있으며, 또한 바람직하게는 고양이 칼리시바이러스에 의한 고양이과 동물의 호흡기 질환일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예에 따른 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 복분자 추출물을 단독으로

포함할 수 있음은 물론이나, 이외에도 제형, 사용 방법 및 사용 목적에 따라 당 분야에 사용되는 통상의 방법에 따라 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0037] 상기 조성물은 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 예컨대 경구 투여시에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽 등의 제형으로 제공될 수 있다.

[0038] 상기 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 유효성분인 상기 복분자 추출물 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 복분자 추출물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량%, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

[0039] 바람직한 투여량은 투여대상 및/또는 질환의 치료 또는 예방에 적합한 함량이 될 수 있으며, 이는 투여대상의 연령, 성별, 일반 건강 상태 및 체중, 질병의 종류 및 중증도, 제형의 종류, 조성물에 함유된 다른 성분의 종류 및 함량, 조성물의 분비율, 투여경로 및 기간 등을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있으나, 바람직하게는 성인기준 1일 50 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

[0040] 본 발명의 바람직한 다른 일 구현예에 따라, 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물이 제공된다.

[0041] 상기 칼리시바이러스 감염 질환은 바람직하게는 노로바이러스 감염 질환일 수 있으며, 보다 바람직하게는 노로바이러스 감염으로 인한 식중독일 수 있다.

[0042] 노로바이러스 식중독은 감염된 환자의 토사물, 분변 및 신체접촉에 의한 것이며 식수 및 어패류, 과일, 채소 등 즉석섭취가 가능한 식품이 오염된 경우 10~100개의 작은 입자로도 질병을 일으킬 수 있으며, 입자가 매우 작아 공기 중에 에어로졸 형태로 부유하기 때문에 집단감염이 급속도로 발생하여 공중보건학상 큰 위협이 되고 있다. 노로바이러스 식중독 발생 시설은 장기요양원이 가장 높았고, 식당, 선박 및 학교 순으로 나타나 노로바이러스 식중독은 주로 집단급식 시설에서 발생함을 알 수 있다.

[0043] 포도 (*Vitis vinifera*) 및 오렌지 (*Citrus sinensis*) 등은 우리나라에서 많이 소비되는 과일로서 껍질을 제거하지 않고 제공하여도 섭취가 가능하여 단체급식에서 활용하기 매우 유용한 과일이다.

[0044] 이에 본 발명자들이 상기 포도 및 오렌지의 노로바이러스에 대한 항바이러스 활성을 복분자와 비교해 본 결과, 복분자 추출물만이 바이러스 MOI (multiplicity of infection)(접종 바이러스양/세포수)에 관계없이 일관된 노로바이러스 증식 저해 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(실험예 3 및 도 7 참조)

[0045] 따라서 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 식품 조성물을 제공함으로써 집단 감염을 효과적으로 방지할 수 있다.

[0046] 상기 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 식품이란 함은 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 의미로서의 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품, 음료 및 음료 첨가제 등을 모두 포함하는 의도이다.

[0048] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g이다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0049] 노로바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선의 효과를 목적으로 하는 본 발명의 일 구현예에 따른 식품 조성물에 있어서, 상기 복분자 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 100 중량%, 바람직하게는 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 바람직하게는 0.01~100중량%, 보다 바람직하게는

1~10중량%로 포함될 수 있으며, 구체적으로는 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.01 g 내지 100 g, 바람직하게는 1 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 또 다른 바람직한 일 구현예는 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 조성물을 제공한다.

[0050] 상기 항바이러스 조성물은 상기 조성물이 적용되는 분야에서 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제 등을 더욱 포함하여 척추동물, 바람직하게는 인간을 포함하는 포유류에 투여되는 의약 조성물의 형태 또는, 식기, 주방용품, 생활용품, 기타 각종 물건의 세척제, 소독제, 통상의 항바이러스제 등 통상적으로 알려진 모든 형태로 제조될 수 있으며, 이 경우 조성물 총 중량에 대하여 상기 복분자 추출물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량%, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명의 복분자 추출물을 포함하는 조성물은 칼리시바이러스의 증식 및 복제를 저해하는 활성이 매우 우수하므로, 아직까지 백신이나 치료제가 개발되어 있지 않은 노로바이러스 및 고양이 칼리시바이러스에 효과적인 치료제로 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 천연식물인 복분자의 추출물을 이용하는 것이므로 안정성이 인정된다는 점에서 본 발명의 조성물을 포함하는 식품을 집단급식소에서 제공시 노로바이러스로 인한 식중독을 감소시킬 수 있어 사회경제적으로 매우 의미 있는 개발이 될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 복분자 추출물의 세포독성 실험결과를 나타낸 것이다((A) 복분자 추출물이 RAW 264.7 세포에 미치는 세포독성, (B) 복분자 추출물이 CRFK 세포에 미치는 세포독성. 복분자 추출물이 각각 0~6%, 1~10% 농도에서 1시간 동안 세포에 미친 결과임).

도 2는 복분자의 항바이러스 활성(바이러스 용균반 형성 저해 활성) 측정 스킴(scheme)을 나타낸 것이다. 구체적으로 추출물과 바이러스를 각각 세포 혹은 바이러스와 감염 전 미리 배양(incubation) 하였을 때 (pre-cell(A)/virus(B) treatment), 추출물과 바이러스를 동시에 세포에 감염시켰을 때 ((C)co-treatment), 바이러스의 세포 감염 1시간 이후 추출물을 첨가하였을 때 ((D)post-treatment)의 대략적인 실험 scheme이다.

도 3은 MOI 값 0.0001 및 0.001에서 복분자의 무린 노로바이러스 용균반 감소(plaque reduction) 활성, 구체적으로 복분자 추출물을 각각 세포 혹은 바이러스와 감염 전 미리 배양하였을 때 (pre-treatment), 추출물과 바이러스를 동시에 세포에 감염시켰을 때 (co-treatment), 바이러스의 세포 감염 1시간 이후 추출물을 첨가하였을 때 (post-treatment) 나타난 바이러스 용균반 형성 저해 활성을 각각 나타낸 것이다.

도 4는 복분자의 무린 노로바이러스 용균반 형성 사진을 나타낸 것이다. 구체적으로 복분자 추출물을 각각 세포 혹은 바이러스와 감염 전 미리 배양하였을 때 (pre-treatment), 추출물과 바이러스를 동시에 세포에 감염시켰을 때 (co-treatment), 바이러스의 세포 감염 1시간 이후 추출물을 첨가하였을 때 (post-treatment) 나타난 바이러스 용균반 형성 저해 활성을 나타낸 것이다.

도 5는 MOI 값 0.0001, 0.001 및 0.01에서 복분자의 FCV 용균반 감소(plaque reduction) 활성, 구체적으로 복분자 추출물을 각각 세포 혹은 바이러스와 감염전 미리 배양하였을 때 (pre-treatment), 추출물과 바이러스를 동시에 세포에 감염시켰을 때 (co-treatment), 바이러스의 세포 감염 1시간 이후 추출물을 첨가하였을 때 (post-treatment) 나타난 바이러스 용균반 형성 저해 활성을 나타낸 것이다.

도 6은 복분자의 FCV 용균반 형성 사진을 나타낸 것이다. 구체적으로 복분자 추출물을 각각 세포 혹은 바이러스와 감염 전 미리 배양하였을 때 (pre-treatment), 추출물과 바이러스를 동시에 세포에 감염시켰을 때 (co-treatment), 바이러스의 세포 감염 1시간 이후 추출물을 첨가하였을 때 (post-treatment) 나타난 바이러스 용균반 형성 저해 활성을 나타낸 것이다.

도 7A는 MOI 값 0.00001, 0.0001 및 0.001에서 복분자 추출물(RC), 포도 추출물(VV), 오렌지 추출물(CS)의 무린 노로바이러스에 대한 항바이러스 활성을 각각 비교 분석한 것이다. 도 7B는 MOI 값 0.001 및 0.01에서 복분자 추출물(RC), 포도 추출물(VV), 오렌지 추출물(CS)의 FCV에 대한 항바이러스 활성을 각각 비교 분석한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한

것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0054] 실시예 1. 복분자 추출물 제조

[0055] 7-8월에 수확한 복분자 생과(선운산농협, 고창군 전라북도)를 신선하고 건전한 것만 선별하여 과실의 불순물을 살수 세척하여 거즈에 싼 후, 100% 과즙을 착즙하고 63℃에서 30분간 처리하여 효소 활성을 제거하고 미생물을 파괴하였다. 이후 약 15000rpm에서 4℃로 30분 원심분리를 수행한 후, 상등액을 모아 복분자 추출물(착즙액)을 준비하였다.

[0056] 이후 후술할 실험예에서 복분자 추출물의 칼리시바이러스에 대한 활성을 평가하기 위한 시료로서, 상기 제조된 복분자 추출물(착즙액)을 0.2um syringe filter로 여과한 후 분주하여 초저온 냉동고에 보관하며 사용하였다.

[0057] 실험예 1. 복분자 추출물의 총 폴리페놀 함량 측정

[0058] 복분자 착즙의 총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 사용하였다. 상기 실시예 1에서 제조된 복분자 추출물(착즙액) 시료 0.1 ml에 Folin-Ciocalteu's reagent(Sigma) 0.2ml을 첨가한 후 상온에서 1분간 유지한 다음 5% Na₂CO₃ 3ml을 넣고 실온에 1시간 이상 방치한 후 분광광도계(SpectraMax M2, Molecular Devices Corp. USA)로 725 nm 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 갈산(Gallic acid)을 이용하여 표준곡선을 작성한 다음 폴리페놀 화합물의 함량을 계산하였으며 (J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2003, 32, 338-345; Korean J. Food Sci. Technol 2011, 43, 341-347), 값은 Gallic acid equivalents (GAEs) 0.64±0.01 mg/ml였다(미도시).

[0059] 실험예 2. 항바이러스 활성 평가

[0060] 2-1) 뮤린(Murine) 노로바이러스 및 고양이 칼리시바이러스(FCV)의 배양

[0061] 인체 노로바이러스의 대체물로서 뮤린 노로바이러스인 MNV-1 (서강대학교), 및 FCV-F9 (ATCC, Manassas, VA, USA)를 각각 사용하였다. 각 바이러스에 대한 숙주세포로는 뮤린 노로바이러스의 경우 RAW 264.7 세포주(ATCC, Manassas, VA, USA) 및 FCV의 경우 CRFK 세포주(ATCC, Manassas, VA, USA)를 사용하였으며 상기 숙주세포들은 각각 100x Antibiotic-Antimycotic (Gibco, Grand Island, NY), 10% (v/v) 우태아혈청(fetal bovine serum (FBS), Hyclone Lab, Logan, Utah)이 첨가된 Dulbecco's modified medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY)를 기본 배지로 하여 37℃, 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 24-72 시간 간격으로 계대 배양하였다.

[0062] RAW 264.7 및 CRFK 세포를 조직 배양 플레이트(tissue culture plate)에 각각 2.0x10⁶, 2.0x10⁵ cell/ml로 분주하여 24 시간 동안 37℃, 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 배양하고, MNV-1 5.0x10⁵ PFU/ml 및 FCV-F9 2x10⁶ PFU/ml를 실험 MOI에 맞게 희석하여 접종시킨 후, 37℃, 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 1시간 동안 배양하여 각 바이러스를 감염시켰다.

[0063] 2-2) 세포 독성 측정

[0064] A. 실험방법

[0065] 항바이러스 실험에 사용할 복분자 추출물의 세포 독성 실험은 MTT assay (Applied Microbiology, 2009, 49, 806-808)로 세포 생존율(cell viability)을 측정하는 방법으로 수행하였다.

[0066] 구체적으로, 96 웰(well)에 RAW 264.7 및 CRFK cell을 웰당 각각 1.5x10⁶, 2.0x10⁵ cell/ml로 분주(seeding)하고 24시간 후에 복분자 추출물을 농도별로 첨가하여 1-48시간까지 37℃, 5% CO₂ 배양기(incubator)에서 배양하였다. MTT를 최종 농도 0.5mg/ml로 첨가하여 2시간 후에 UV-Vis 분광광도계(spectrophotometer) (SpectraMax M2, Molecular Devices Corp. USA) 570nm에서 흡광도(absorbance)를 측정(MTT assay)하였다. 세포 생존율은 무첨가군에 대한 상대적인 %로 계산하여 도 1에 나타내었다.

[0067] **B. 결과**

[0068] 도 1에서 알 수 있듯이, 실시예 1에서 제조된 복분자 추출물은 RAW 264.7 세포에 대해 6%(v/v)의 농도에 이르기까지 세포 독성이 없는 것으로 나타났으며(도 1A), 또한 CRFK 세포에 대해 10%(v/v)의 농도에서도 세포 독성이 없는 것으로 나타나 매우 안전하게 사용 가능함을 확인할 수 있었다(도 1B).

[0069]

[0070] **2-3) 항노로바이러스 활성 측정**

[0071] **A. 실험방법**

[0072] 실시예 1의 복분자 추출물을 상기 실시예 2-2에 따라 세포에 독성이 없는 것으로 확인된 농도범위(3% 및 6%)로 도 2에 나타난 바와 같이 시점을 각각 달리하여 첨가한 후, 추출물의 첨가 시점에 따른 항바이러스 활성을 후보 물질이 첨가된 것과 무첨가군의 용균반 차이로 비교 분석하였다(무첨가군의 용균반 형성 정도를 100%로 하여 산정함).

[0073] **i) 전 처리시(Pre-treatment) 항바이러스 활성 측정 (도 2의 A 및 B)**

[0074] 천연 식물 추출물인 실시예 1의 복분자 추출물과 세포(도 2의 A) 또는 MNV-1 바이러스(도 2의 B)를 혼합하여 각각 1시간씩 배양(incubation) 시킨 후, MNV-1 저해 정도를 확인하여, 천연 식물 추출물이 바이러스 감염 전의 바이러스 및 세포에 미치는 영향을 확인하였다.

[0075] 구체적으로 RAW 264.7 세포를 24 웰에 분주하고 (5% FBS 를 함유하는 DMEM 배지 내 웰 당 1.5×10^6 의 생존 세포 분주), 실시예 1의 천연 복분자 추출물을 3% 및 6%의 농도로 세포 또는 바이러스에 각각 첨가하여 1시간 동안 배양한 후 바이러스를 세포에 감염시켜 다시 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 이후 1.5%(w/v) 아가로스(agarose), 5%(v/v) FBS, 그리고 1%(v/v) PS 포함된 DMEM 배지 (Gilbo, Grand Island, NY) 를 넣고 42시간 동안 37℃ 배양기에서 배양하고 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 용균반을 측정하였다.

[0076] **ii) 바이러스 감염과 동시에 처리시(Co-treatment) 항바이러스 활성 측정(도 2의 C)**

[0077] RAW 264.7 세포를 상기 i)과 같이 24 웰에 분주하여 배양하고, MNV-1 바이러스와 실시예 1의 복분자 추출물을 각각 각각 3% 및 6%의 농도로 동시에 첨가하여 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 이후 1.5%(w/v) 아가로스(agarose), 5%(v/v) FBS, 그리고 1%(v/v) PS 가 포함된 DMEM 배지를 넣고 42시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 후 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색하여 용균반을 측정하였다.

[0078] **iii) 후 처리시(Post-treatment) 항바이러스 활성 측정(도 2의 D)**

[0079] RAW 264.7 세포를 상기 i)과 같이 24 웰에 분주하여 배양하고, MNV-1 바이러스를 감염시킨 후 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 바이러스를 완전히 제거한 후, 실시예 1의 복분자 추출물을 각각 3% 또는 6%의 농도로 첨가한 DMEM 배지를 첨가하여 1시간 동안 37℃에서 배양한 다음 배지를 완전히 제거하였다. 1.5%(w/v) 아가로스(agarose), 5%(v/v) FBS, 그리고 1%(v/v) PS 가 포함된 DMEM 배지를 넣은 후 약 42시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 후, 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 용균반을 측정하였다.

[0080] 상기 i)~iii)은 정확성을 고려하여 3회 반복 실험하였고 용균반 계수(plaque counting) 결과는 SAS software (version 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA)와 ANOVA로 분석되었으며 Duncan's multiple range test로 결과를 도출해내었다. 결과 자료는 오차 $p < 0.05$ 의 신뢰도를 갖고 있다.

[0081] **iv) 용균반 검사(Plaque assay)**

[0082] RAW 264.7 세포 및 CRFK 세포에 각각 MNV-1 바이러스 및 FCV 바이러스를 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 한 시간 감염

(infection)시킨 다음 1일간 배양한 후 세포 단층(monolayers)을 0.5%(v/v) 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 바이러스 용균반(plaque) 분석을 하였다.

[0083] B. 결과

[0084] 실시예 1의 복분자 추출물을 첨가하여, 상술한 방법으로 바이러스 용균반(plaque) 형성 저해 활성을 측정한 결과를 도 3 내지 도 6에 나타냈다.

[0085] RAW 264.7 세포를 이용하여 pre-treatment, co-treatment, post-treatment로 달리 항바이러스 활성을 측정한 결과, 상기 실시예 1의 복분자 추출물의 항바이러스 활성은 co-treatment, 및 post-treatment에서 상대적으로 더 높은 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 복분자 추출물은 뮈린 노로바이러스의 생활사(life cycle) 중 특히 복제와 증식 기작에 가장 중요한 저해활성을 나타내는 것으로 확인되었다 (도 3 및 도 4).

[0086] 실시예 1의 복분자 추출물은 murine 노로바이러스 외에 feline calicivirus (FCV)에 대해서도 항바이러스 활성을 보임으로써, 식중독 대체 바이러스 (surrogate)에 대한 활성을 통해서 식중독 저해소재로서 매우 유용함을 확인할 수 있었다. 한편, 복분자의 항 뮈린 노로바이러스 활성과 달리, FCV에서는 복분자 추출물 저해활성이 pre-CRFK 및 pre-FCV의 pre-treatment에서 더 높은 것으로 나타났다. 즉, 복분자 추출물이 바이러스 입자 또는 세포 수용체(receptors) 결합에 직접 저해 작용을 하는 것으로 나타나, 복분자 추출물이 RAW 264.7 세포 및 MNV-1에 대한 저해활성과 다른 양상을 보임을 알 수 있었다 (도 5 및 도 6).

[0087] 실험예 3. 포도 및 오렌지와의 항바이러스 활성 비교

[0088] 복분자 추출물의 항바이러스 활성 정도를 평가하기 위한 대조군으로서 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 포도 및 오렌지 추출물을 제조하여 도 2(C), 즉 co-treatment 방법으로 비교하였다.

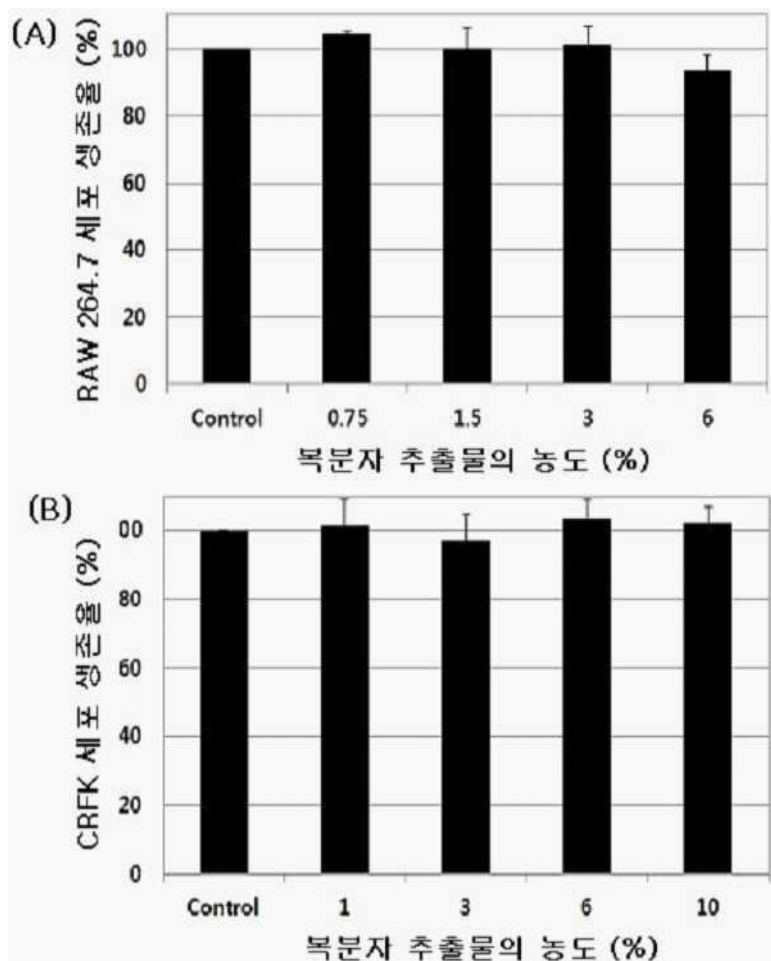
[0089] 도 7A에 나타난 바와 같이, RAW 264.7 세포를 이용한 MNV-1 바이러스 증식 저해와 관련하여 바이러스 MOI (multiplicity of infection)(접종 바이러스양/세포수)에 관계없이 일관된 항바이러스 활성을 보인 것은 실시예 1의 복분자 추출물이 유일하였다. 또한 상기 복분자 추출물은 세포수 대비 접종 바이러스 양이 0.00001 pfu/ml 인 매우 낮은 MOI 값에서도 포도 추출물(VV), 및 오렌지 추출물(CS)에 비해서 매우 유효성이 높고 월등한 항바이러스 활성을 보임을 확인할 수 있었다.

[0090] 또한 도 7B에 나타난 바와 같이 CRFK 세포를 이용한 FCV 바이러스 증식 저해와 관련하여 바이러스 MOI(multiplicity of infection)(접종바이러스양/세포수) 0.001 및 0.01에서, 상기 복분자 추출물은 오렌지 추출물(CS) 및 포도 추출물(VV)에 비해 우수한 것으로 나타났으며, 특히 포도 추출물(VV)과 비교하여서는 현저히 유효성이 높고 월등한 항바이러스 활성을 보임을 확인할 수 있었다.

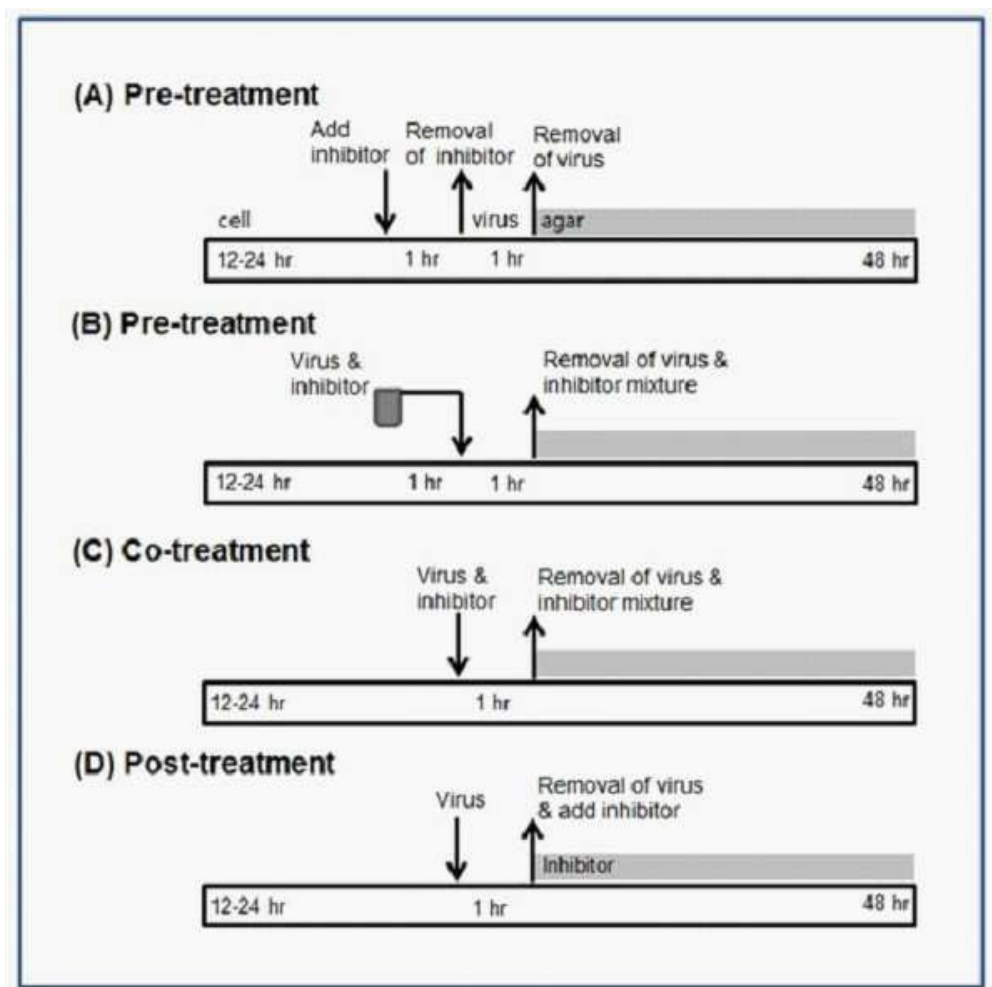
[0091] 이처럼 음료 등의 식품으로 용이하게 섭취 가능한 과일 중에서도 복분자의 칼리시바이러스에 대한 항바이러스 활성이 특히 우수함을 알 수 있어 본 발명의 일 실시예에 따른 복분자 추출물을 포함하는 식품 조성물은 식중독 등의 칼리시바이러스로 인한 질환에 대한 효과적인 기능식품으로 적용 가능할 것으로 기대된다.

도면

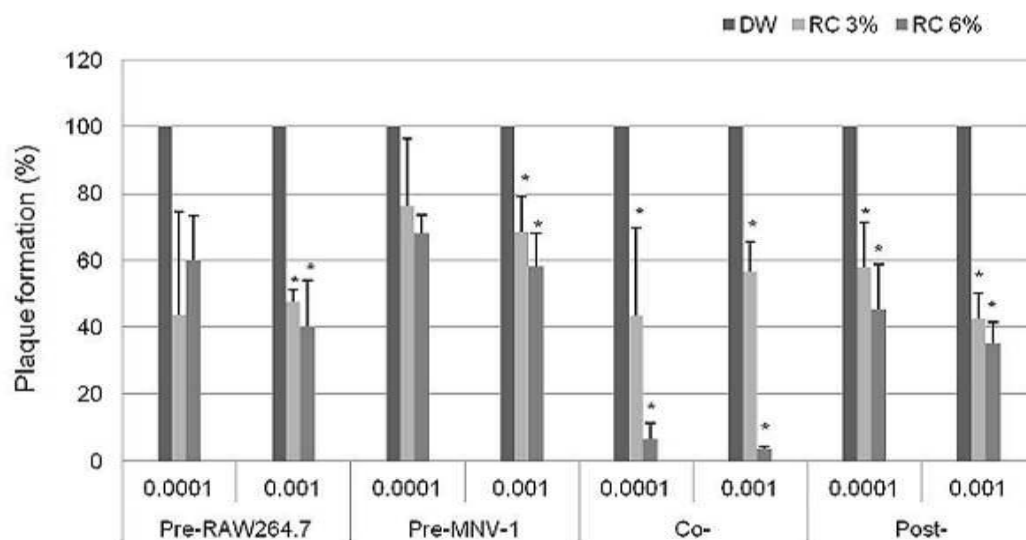
도면1



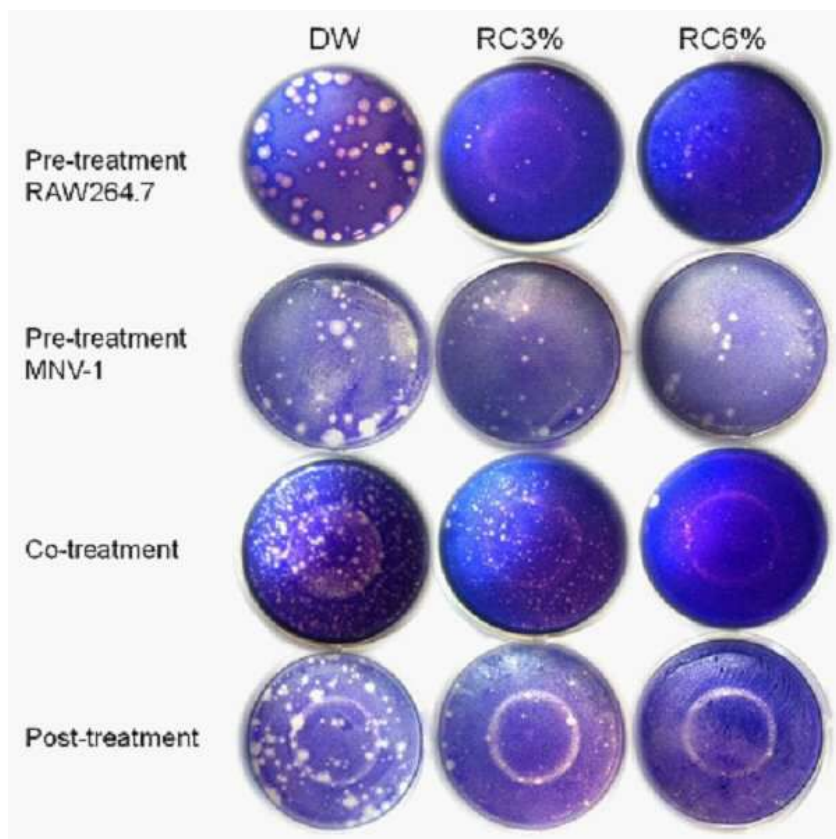
도면2



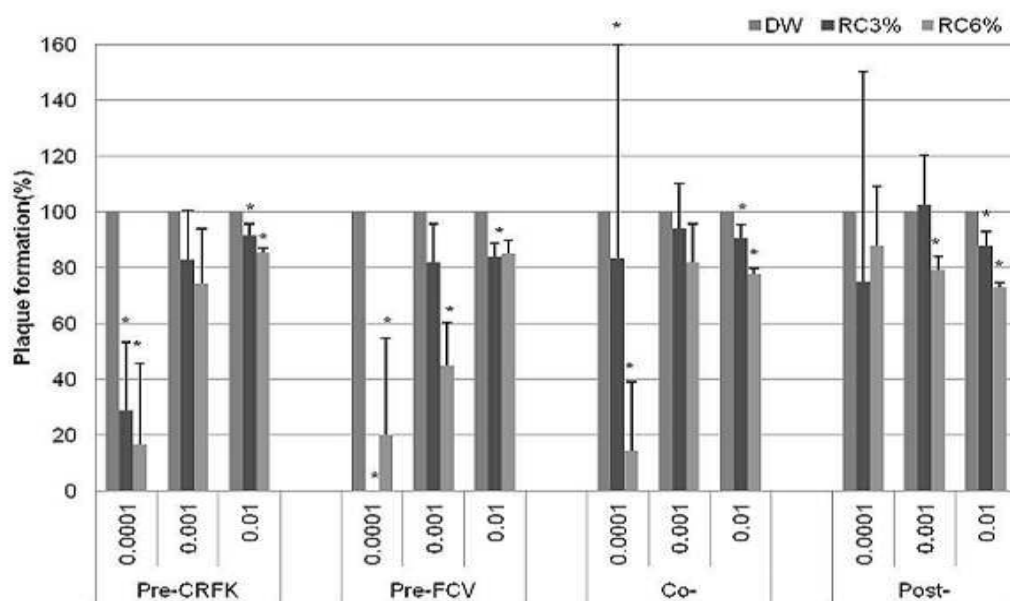
도면3



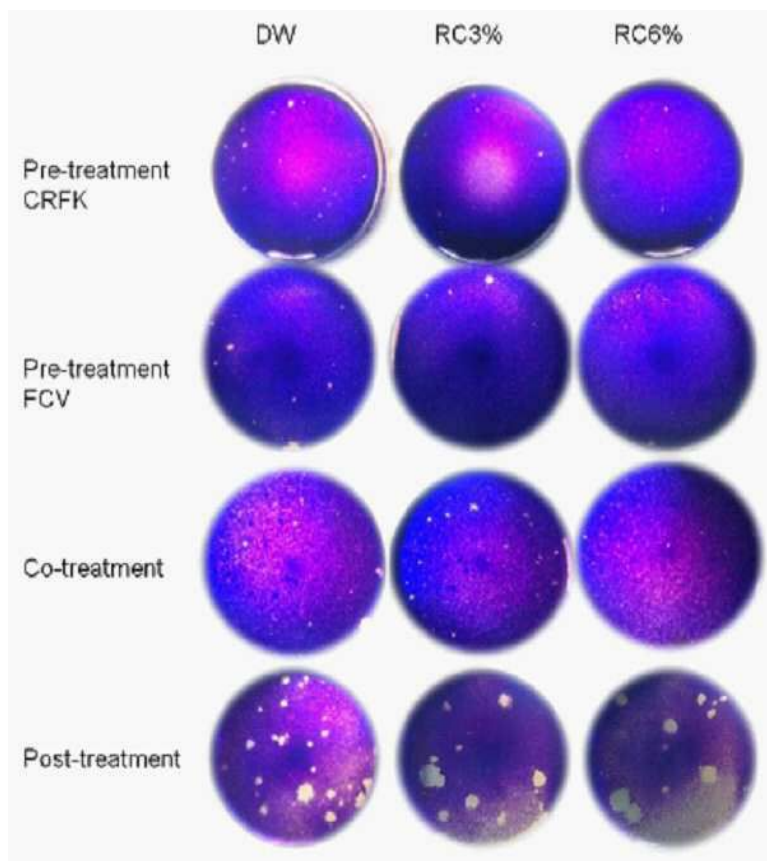
도면4



도면5



도면6



도면7

