



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월29일
(11) 등록번호 10-1651948
(24) 등록일자 2016년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/233 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/238 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 36/233 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0140516

(22) 출원일자 2015년10월06일

심사청구일자 2015년10월06일

(56) 선행기술조사문헌

신현수, 한약재 스크리닝을 통한 코로나바이러스의 증식 억제제 조사 및 억제기전 규명. 아주대학교 석사학위논문. 2006년 12월 22일.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

이현광

충청남도 계룡시 엄사면 변영3길 43, 103동 410호
(비사벌아파트)

(72) 발명자

정주영

대전광역시 서구 둔산남로 127 목련아파트,
203-907

이현광

충청남도 계룡시 엄사면 변영3길 43, 103동 410호
(비사벌아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 4 항

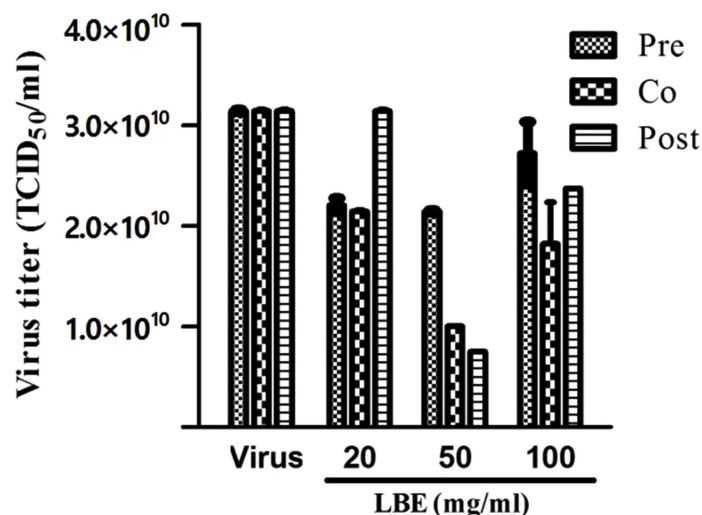
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 코로나바이러스에 대한 항 바이러스용 조성물

(57) 요약

본 발명은 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 장기 복용시에도 부작용이 없어 안전하게 사용할 수 있으며 코로나바이러스 감염 질환에 대한 예방 및 치료에 효능이 있는 항바이러스제 약학 조성물과 코로나바이러스에 대한 저항력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 포유동물용 건강식품 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 시호나 방풍 또는 그 혼합물을 물과 C1-C3의 알콜로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물로 추출한 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스에 대한 항바이러스제 약학 조성물과 포유동물용 건강식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/238 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

김영중

대전광역시 서구 월평북로 11 주공아파트, 206-602

김태원

대전광역시 유성구 왕가봉로 23 열매마을11단지,
1101-903

김현태

대전광역시 대덕구 동춘당로15번길 98-5, 1층

박세라

경기도 의정부시 흥선로24번길 14-1

정다영

대전광역시 유성구 배울2로 6 한화꿈에그린,
106-1601

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0198732

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단

연구사업명 자율편성형 도약연구기술개발사업

연구과제명 고양이 전염성 복막염 항바이러스제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

시호와 방풍의 혼합물을 물과 C1~C3의 알콜로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물로 추출한 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 고양이 전염성 복막염 바이러스에 대한 항바이러스제 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서,

시호 및 방풍의 혼합물은 시호와 방풍이 1:5 ~ 5:1의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는 코로나바이러스에 대한 항바이러스제 약학 조성물.

청구항 5

시호와 방풍의 혼합물을 물과 C1~C3의 알콜로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물로 추출한 추출물을 함유하며 고양이 전염성 복막염 바이러스에 대한 저항력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 포유동물용 건강식품 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 5 항에 있어서,

시호 및 방풍의 혼합물은 시호와 방풍이 1:5 ~ 5:1의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 하는 포유동물용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 코로나바이러스에 대한 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 장기 복용시에도 부작용이 없어 안전하게 사용할 수 있으며 코로나바이러스 감염 질환에 대한 예방 및 치료에 효능이 있는 항바이러스제 약학 조성물과 코로나바이러스에 대한 저항력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 포유동물용 건강식품 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 코로나바이러스는 포유류나 조류에서 호흡기 질환, 소화기 질환 등을 일으키는 RNA 바이러스로, RNA 바이러스의 특성 상 체내에서 유전정보를 복제하는 과정에서 돌연변이가 쉽게 일어난다. 코로나바이러스의 돌연변이는 변종 간 면역이 공유되지 않아 백신 개발이 어렵고 공통된 치료제 역시 알려져 있지 않기 때문에 치료와 더불어 예방이 더욱 중요하다.
- [0003] 고양이 전염성 복막염은 생후 1살 이전의 어린 고양이과 동물에서 주로 발병하며, 유발율이 17% 정도이지만 치사율은 거의 100%에 달하여 고양이 질병 중 가장 치명적이고 치료가 어려운 질병이다.
- [0004] 고양이 전염성 복막염은 고양이 장 코로나 바이러스(Feline enteric coronavirus, FECV)의 유전적 돌연변이에 의해 발생된 고양이 전염성 복막염 바이러스(Feline Infectious Peritonitis Virus, FIPV)에 의해 발병하며, FIPV가 세포와 조직에 강하게 결합하여 신장의 집합 관이나 장벽에 병변 발생을 일으키고 오염된 음식이나, 침구, 소변이나 대변을 통해 전염되는 것을 특징으로 한다. 감염된 개체는 초기에 상당기간 무증상으로 질병매개자의 역할을 하여 장기간 바이러스를 확산시킬 수 있는 전파의 위험성이 높다. 발병 시 식욕 부진, 발열, 황달, 설사, 체중감소, 신경증상 및 포도막 염과 같은 임상증상을 나타내고 점차 복수가 차며 호흡곤란이 일어나지만, 병의 진행이 느려 증상이 매우 천천히 나타나므로 초기에 발견하기가 힘들다. 또한 일단 발병하면 적절한 치료방법이 알려져 있지 않고 사망률이 매우 높은 매우 치명적인 질병이다. 예방 백신의 효과에 대해서는 역시 아직까지 논란이 많은 상태이다.
- [0005] 최근 많은 연구자들이 천연물 유래 phytochemical의 효능 (항바이러스, 항염증, 면역증진제 등)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 항바이러스에 대한 효능은 1970년대 영국에서부터 시작하여 현대에 이르기까지 많은 분야에서 연구가 진행되고 있다. 그 예로, Enteric coronavirus(Rosa nukana: 마늘 추출물), respiratory syncytial virus (RSV)(Sambucus racemose: 딱총나무 줄기 추출물), parainfluenza virus type 3(이포모시스 추출물), rotavirus(Lomatium dissectum 뿌리 추출물)를 들 수 있으며 국내 연구로는 아주대 의과대학의 연구에 의하면 고삼, 오가피, 지유, 사상자 추출물이 코로나 바이러스 증식을 억제하는 항바이러스 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 아직까지 코로나 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 갖는 식물에 대한 연구는 많지 않다. 천연물 유래의 추출물은 민간요법에 의해 오랜기간 사용되어 왔기 때문에 안전성이 확립되어 있어, 그 효능이 입증된다면 부작용없이 장기간 복용할 수 있으므로 치료뿐 아니라 예방의 차원에서 더욱 유용하게 사용될 수 있다.
- [0006] 시호(Bupleurum Chinese)는 미나리과 여러해살이풀로서 북시호, 뿔미나리라고도 하며, 한국, 일본, 중국, 몽골, 시베리아, 유럽 등지에 분포한다. 뿌리에는 사포닌과 지방유, 알칼로이드 등이 들어있어, 한방에서 해열, 진통, 강장제나 호흡기, 소화기, 순환기 질환에 약제로 쓴다.
- [0007] 방풍(Ledebouriellas Seseloides)은 산형화목 미나리과의 세해살이풀로 중국 북동부, 화베이, 내몽골 원산이며 약료작물로 사용된다. "방풍"이라는 이름은 풍을 막아준다는 뜻으로 두통, 오한, 발열, 전신통과 중풍으로 인한 반신불수, 마비동통 등 풍병(風病)을 치료하는 데 매우 중요한 약제이다. 주요성분은 쿠마린이며 루틴과 탄닌이 포함되어 있다. 약리작용으로는 해열, 진경, 면역활성화, 항알레르기, 항궤양, 항균, 피부개선균 억제 등이 보고되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 종래 기술의 문제점을 해소하기 위하여 코로나바이러스 감염 질환에 대한 예방 및 치료에 유용한 코로나바이러스에 대한 항바이러스제 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한 본 발명은 코로나바이러스에 의한 감염의 위험성을 줄이고, 바이러스와의 접촉 시에도 유발율을 감소시킬 수 있도록 코로나바이러스에 대한 저항력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 포유동물용 건강식품 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 시호나 방풍 또는 그 혼합물을 물과 C1~C3의 알콜로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물로 추출한 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스에 대한 항바이러스제 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0011] 본 발명의 추출물은 고양이, 개, 소, 돼지, 인간 등의 포유동물에서 호흡기 질환, 소화기 질환, 간질환, 뇌질환 등을 일으키는 바이러스인 코로나바이러스(coronavirus)에 대해 항바이러스 활성을 가진다.
- [0012] 코로나바이러스의 일종인 고양이 전염성 복막염 바이러스(FIPV)에 대한 사전 실험에 의하면, 물 이외에 C1~C3의 알콜이나 C1~C3의 알콜과 물의 혼합물을 사용하여 추출한 경우에도 물 추출물과 동일 또는 유사한 효능을 나타내었다. 또한 하기 실시예에 별도의 결과를 기재하지는 않았으나 시호나 방풍의 추출물을 단독으로 사용하는 경우에도 항바이러스 효능을 나타내었으나, 혼합 처방 시 더욱 효능이 우수하였기에 하기 실시예에서는 혼합 처방에 대한 결과만을 기재하였다. 시호와 방풍의 혼합물을 사용하는 경우에는 그 중량비가 1:5 ~ 5:1의 중량비로 혼합되었을 때 혼합 처방에 의한 상승 효과를 나타내었다.
- [0013] 본 발명의 조성물을 예방 및 치료용 약제로 이용하기 위해서는 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 정제, 캡슐제, 트로키제, 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제 또는 주사용 제제나 비말제 등의 비경구투여용 제제로 제형화하여 코로나바이러스에 대한 항바이러스제로 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 제제의 형태, 투여경로, 포유동물의 종, 연령, 무게 및 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 증상의 정도 등에 따라 처방자의 판단에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 일반적인 투여량은 0.001mg/kg·일~10g/kg·일이다. 본 발명의 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0014] 시호나 방풍 또는 그 혼합물을 물과 C1~C3의 알콜로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 또는 둘 이상의 혼합물로 추출한 추출물을 함유하며 코로나바이러스에 대한 저항력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 포유동물용 건강식품 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명의 조성물은 코로나바이러스 감염에 대한 치료 뿐 아니라 예방에도 탁월한 효능을 나타내었으며, 장기간 복용 시에도 부작용 없이 안전하게 복용할 수 있으므로 건강식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 건강식품 조성물은 정제, 캡슐제, 환제, 분말제 또는 액제일 수 있으며, 그 자체로 음용하거나 각종 식품이나 음료에 0.01~100 중량%의 비율로 첨가하여 사용할 수 있다. 또한 인간 이외의 포유동물에 사용되는 경우에는 사료에 첨가하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 이상과 같이 본 발명의 조성물에 의하면 호흡기 질환, 소화기 질환, 간질환, 뇌질환 등을 일으키는 바이러스인 코로나바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타내며, 오랜 기간 대체요법에서 해열, 진경 등에 이용되어온 소재를 이용한 조성물로서, 장기간 복용에 대한 안정성이 확보되어 있어 독성이나 부작용에 대한 우려없이 안전하게 사용할 수 있으며 약물 내성을 유발하지 않으므로 코로나바이러스 감염으로 인한 질병의 예방 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명의 조성물의 FIPV에 대한 항바이러스능을 보여주는 그래프.
- 도 2는 본 발명의 조성물의 FIPV에 대한 항바이러스능을 보여주는 RT-PCR 결과 및 그래프.
- 도 3은 본 발명의 조성물이 염증성 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 보여주는 RT-PCR 결과 및 그래프.
- 도 4는 본 발명의 조성물에 의한 동물실험에서 혈액 내 백혈구 수와 A/G 비의 변화를 보여주는 그래프.

도 5는 본 발명의 조성물에 의한 동물실험에서 영상학적 분석결과를 보여주는 이미지 및 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [0020] **실시예 1 : 추출물의 제조**
- [0021] 시호와 방풍은 건조된 뿌리를 대전 중도 한약국에서 구입하여 사용하였다. 시호와 방풍의 건근 각각 또는 중량비 5:1~1:5으로 혼합한 혼합물을 고온고압추출기에 넣고 총 건근 중량의 10배의 물을 가한 후 상온 상압에서 24시간 침지하여 수화되도록 한 후 100~110℃에서 48시간 추출하였다. 추출이 완료되면 여과하여 고형분을 제거하고 상등액을 농축하여 사용하였다. 추출물의 수율은 건근의 중량 대비 70%였다.
- [0022] **실시예 2 : 항바이러스능 측정**
- [0023] **1) in-vitro에서의 바이러스 억제능 분석**
- [0024] 실시예 1에서 제조한 추출물 중 시호:방풍 3:1(w/w)의 추출물을 사용하여 바이러스 억제능을 분석하였다. 바이러스 억제능 분석을 위하여 Felis catus whole fetus cell line(Fcwf-4, ATCC No. CRL-2787) 및 FIP virus(FIPV, VR-2108)를 미국세포주은행에서부터 구입하였으며, RPMI 1640 (Invitrogen, UK) containing 10% non-inactivated Fetal Bovine Serum(FBS, BioWest, MO, USA), 2mM L-glutamine을 이용하여 세포를 배양하였다.
- [0025] 보다 상세하게는, Fcwf-4 세포를 24-well 플라스틱 배양기의 각 웰에 2×10^5 cells/well의 농도로 주입하여 부착시키고 1X PBS 완충액으로 2회 세척하였다.
- [0026] 먼저 시료의 전처리군은(Pre) 실시예 1에서 제조한 추출물을 Fcwf-4 세포가 부착된 웰에 20, 50 및 100 μ g/ml의 농도로 투여하여 1시간동안 처리하고 1X PBS 완충액으로 2회 세척하였다. 이후 1%FBS 배지로 교환한 후 FIPV를 최소 TCID₅₀/ml의 농도인 1.0×10^4 TCID₅₀/ml의 농도로 접종하여 1시간 동안 감염시켰다. FIPV 접종 1시간 후 10% FBS 배지로 교환한 후 세포를 배양하였다.
- [0027] 시료의 동시처리군은(Co) Fcwf-4 세포가 부착된 웰에 실시예 1에서 제조한 추출물을 20, 50 및 100 μ g/ml의 농도로 투여하는 것과 동시에 FIPV를 최소 TCID₅₀/ml의 농도인 1.0×10^4 TCID₅₀/ml의 농도로 접종하고 1%FBS 배지에서 1시간 동안 처리하였다. FIPV 접종 1시간 후 10% FBS 배지로 교환한 후 세포를 배양하였다.
- [0028] 시료의 후처리군(Post)은 Fcwf-4 세포가 부착된 웰에 FIPV를 최소 TCID₅₀/ml의 농도인 1.0×10^4 TCID₅₀/ml의 농도로 접종하여 1%FBS 배지에서 1시간 동안 감염시켰다. FIPV 접종 1시간 후 10% FBS 배지로 교환하고 실시예 1에서 제조한 추출물(LBE)을 20, 50 및 100 μ g/ml의 농도로 투여하여 세포를 배양하였다.
- [0029] FIPV 접종 및 추출물을 투여하지 않은 Fcwf-4를 대조군으로, FIPV만을 접종하고 추출물을 투여하지 않은 Fcwf-4를 Virus군으로 하였다.
- [0030] 각 실험군에서의 바이러스의 농도와, 염증성 사이토카인의 분비량을 측정하여 본 발명에 의한 추출물이 항 바이러스 효과를 나타내는 지 검증하였다.
- [0031] 먼저, 각 실험군의 Fcwf-4 세포를 5% CO₂, 37℃, 10% FBS 배지에서 3일간 배양한 후 세포변성 에세이(cytopathic assay)에 의해 viral titer를 측정하였다. 즉, 배양 3일 후 각 실험군의 세포배양액을 e-tube에

흡거 담고 Fcwf-4 세포를 1×10^4 cells/well의 농도로 $100 \mu\text{l}$ 를 주입하여 부착시키는 것과 동시에 세포 배양액을 혈청이 없는 배지와 함께 1×10^9 까지 희석하여 96웰 플라스틱 배양기에 세포와 함께 주입하여 3일간 모니터링 하였다. 이후 세포변성효과가 나타난 웰을 기산하여 Hierholzer & Killington(Virology Methods Manual, Academic Press, pp24-32, 1996)에 의해 개발되어진 TCID₅₀ 계산법을 활용하여 추출물의 TCID₅₀을 계산하고 그 결과를 도 1에 도시하였다. 도 1로부터 본 발명의 추출물에 의해 바이러스의 수가 크게 감소하며, 치료 뿐 아니라 예방에 대해서도 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0032] 이와 별도로 각 실험군에서의 FIP 바이러스의 농도를 PCR에 의해 측정하고, 그 결과를 도 2에 도시하였다. 각 실험군의 Fcwf-4 세포를 5% CO₂, 37℃, 10% FBS 배지에서 3일간 배양한 후 QiAmp[®] ViralRNAextractkit(Qiagen, Valencia, CA, USA)과 TRIZOL (Invitrogen, CA)를 이용하여 제작사의 프로토콜에 따라 총 RNA를 추출하였다. 추출된 총 RNA로부터 QuantiTect[®] reverse transcriptional kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)와 ReverTraAce[®] qPCR RT kit (TOYOBO, Osaka, Japan)를 사용하여 제작사의 프로토콜에 따라 하기 서열번호 1과 2의 프라이머를 사용하여 rt-PCR에 의해 FIPV-N 바이러스를 정량하였다.

[0033] 서열번호 1 : 5`-CAACTGGGGAGATGAACCT-3` (정방향)

[0034] 서열번호 2 : 5`-GGTAGCATTTGGCAGCGTTA-3` (역방향)

[0035] PCR의 조건은 초기 95℃에서 5분동안 변성(denaturation)과 풀림(annealing)을 시킨 후 55℃에서 30~40 사이클 동안 PCR을 진행하고 72℃에서 1분 30초 동안 반응시켰다. Bio-rad 회사에 나온 소프트웨어인 Image-Lab으로 PCR에 의한 바이러스를 정량분석하였다. PCR에 의한 바이러스의 정량에서도 바이러스 타이터의 결과와 마찬가지로 본 발명의 추출물의 처리에 의해 바이러스의 수가 감소함을 확인할 수 있었다. 특히, 추출물의 함량이 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 낮은 농도에서는 예방 효과가 우수하며, 처리 농도가 높아질수록 치료효과가 우수함을 예측할 수 있었다.

[0036] 염증에 대한 효과를 예측하기 위하여, 추출물의 선처리군(도 3의 (A))과 후처리군(도 3의 (B))의 배양액에서의 염증성 사이토카인의 농도를 RT-PCR에 의해 측정하고 그 결과를 도 3에 도시하였다. 하기 표 1의 프라이머를 사용한 것을 제외하고는 전술한 FIPV-N의 rt-PCR과 동일한 방법에 의해 염증성 사이토카인을 정량하였다. 비교를 위하여 고양이 전염성 복막염의 증세 완화에 도움이 되는 것으로 알려진 chloroquine의 처리군의 염증성 사이토카인 분비량을 함께 측정하였다.

표 1

GAPDH	정방향	5`-GGAGAAAGCTGCCAAATACG-3`	서열번호3
	역방향	5`-TCACAAGTGTGTTGGGTGAC-3`	서열번호4
IL-6	정방향	5`-ATCACTACTGGTCTTCAGGA-3`	서열번호5
	역방향	5`-TTACATTATCCGAACAGCCCC-3`	서열번호6
TNF- α	정방향	5`-CCCATGTAGTAGCAAACCCCC-3`	서열번호7
	역방향	5`-GTCTGGTAGGAAACGGCAAA-3`.	서열번호8

[0037]

[0038] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 추출물은 고양이 전염성 복막염의 증세 완화에 효과가 있는 것으로 알려진 Chloroquine과 마찬가지로 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 발현을 감소시키는 효과가 있었으며, 감소 정도는 Chloroquine과 유사하거나 그보다 더 우수하였다.

[0039] **2) 동물실험**

[0040] 실시예 1에서 제조한 시호:방풍 3:1(w/w)의 추출물(LBE)을 사용하여 고양이 전염성 복막염에 대한 추출물의 효능을 검증하였다. 월령 12~14개월 미만 고양이 9마리를 대전 유성 시장에서 구입하여 실험에 사용하였으며 충남대학교 공동동물실험센터에서 사육하며 실험하였다. 고양이는 각 군당 3마리씩 대조군, 바이러스군, LBE 군 세 개의 군으로 나누었다. 바이러스군과 LBE군의 고양이는 진정상태를 유도한 후 FIPV(3.6×10^4 TCID₅₀)을 입으로 접종시켰다. 접종 직후부터 LBE 군은 실시예 1에서 제조한 추출물 중 시호:방풍 3:1(w/w)의 추출물 3ml/kg을 매일 경구투여 하였다. 이후 자유급이하면서 경과를 관찰하였으며, 일주일에 한번씩 채혈하였다. 바이러스 접종 27일 후 Computed tomography(CT, AlexionTM, Toshiba, Japan) 및 Ultrasonography(iU22, Philips, Netherland)에 의해 영상학적 분석을 실시하였으며, 28일 제 희생 후 부검에 의해 각 장기의 변성을 확인하였다.

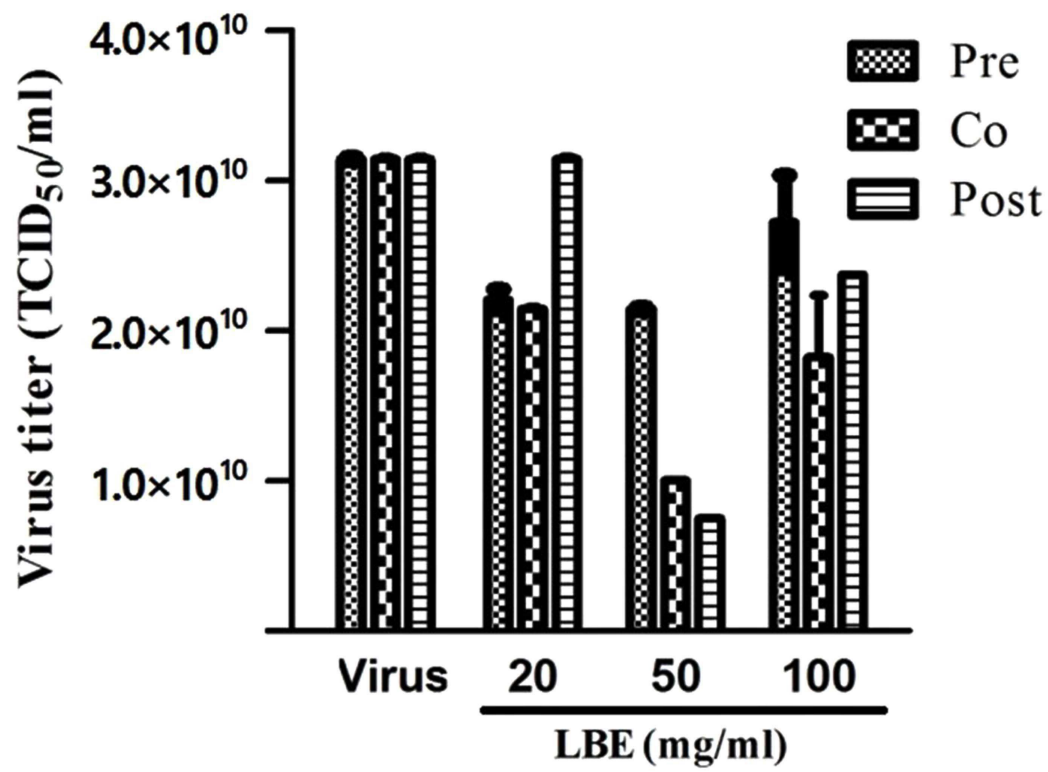
[0041] 먼저 임상학적 평가를 위한 행동학적 관찰에서는 바이러스군의 고양이에서는 접종 14일부터 구토, 설사, 식욕부진, 기력저하 등의 임상학적 증상들이 나타나기 시작하였으나, LBE군에서는 기력 저하 및 설사, 식욕부진 등의 임상적 소견이 거의 나타나지 않았다.

[0042] 도 4는 각 실험군의 고양이의 채혈에서 백혈구 수와 A/G(알부민/글로블린) 비를 측정한 결과이다. 백혈구의 수치는 바이러스의 접종에 의해 크게 증가하여 바이러스군에서는 14일째 가장 높았으며, LBE군에서는 백혈구 증가가 바이러스군에 비해 완만하였다. 그러나 14일 이후에는 개체간 차이가 커서 통계적으로 유의성은 관찰되지 않았다. 만성염증의 지표가 되는 A/G 비율은 바이러스 접종에 의해 크게 감소하였으나 LBE군에서는 감소정도가 현저하게 완화되었으며, 바이러스군에서는 시간의 경과에 따라 점차 감소추세를 나타낸 것에 반해 LBE 군에서는 점차 회복되는 추세를 나타내어 염증이 완화된 것을 보여주었다.

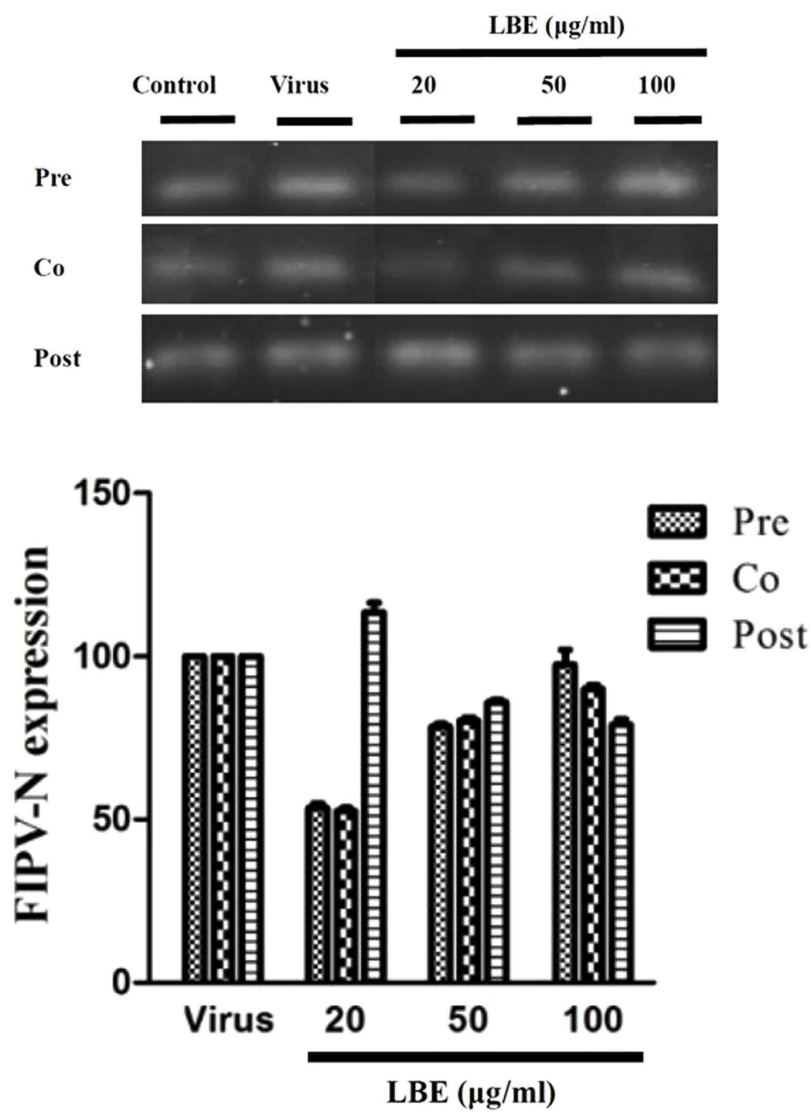
[0043] 도 5는 CT 및 초음파의 영상학적 분석 결과이다. 도 5의 영상 의학적 분석결과 바이러스군의 고양이에서 장간막 림프절 비대를 확인할 수 있으며, 부검결과 삼출형 FIP에서 관측되는 흉수 및 복수는 발견되지 않았으나 실질성이라고도 불리는 화농성 육아종이 발견되어 비삼출형 FIP에 감염된 것을 알 수 있었다. 바이러스군에 비해 LBE 군에서는 림프절 비대 정도가 적었다.

도면

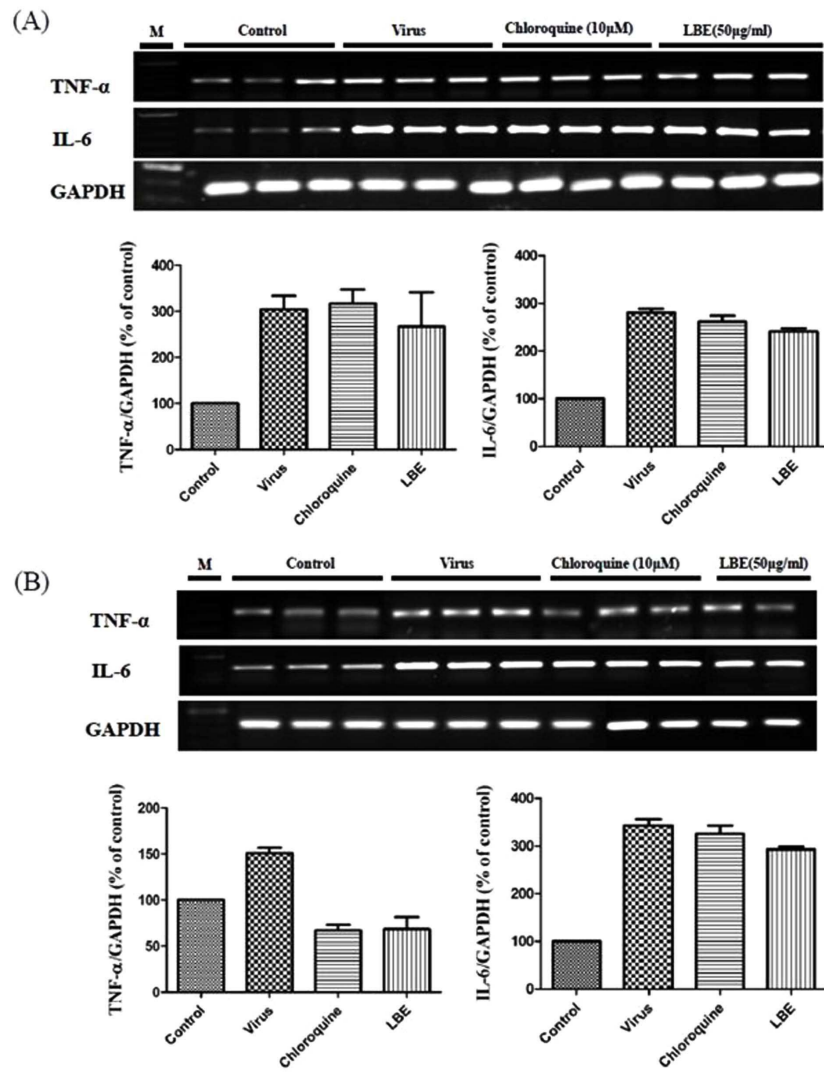
도면1



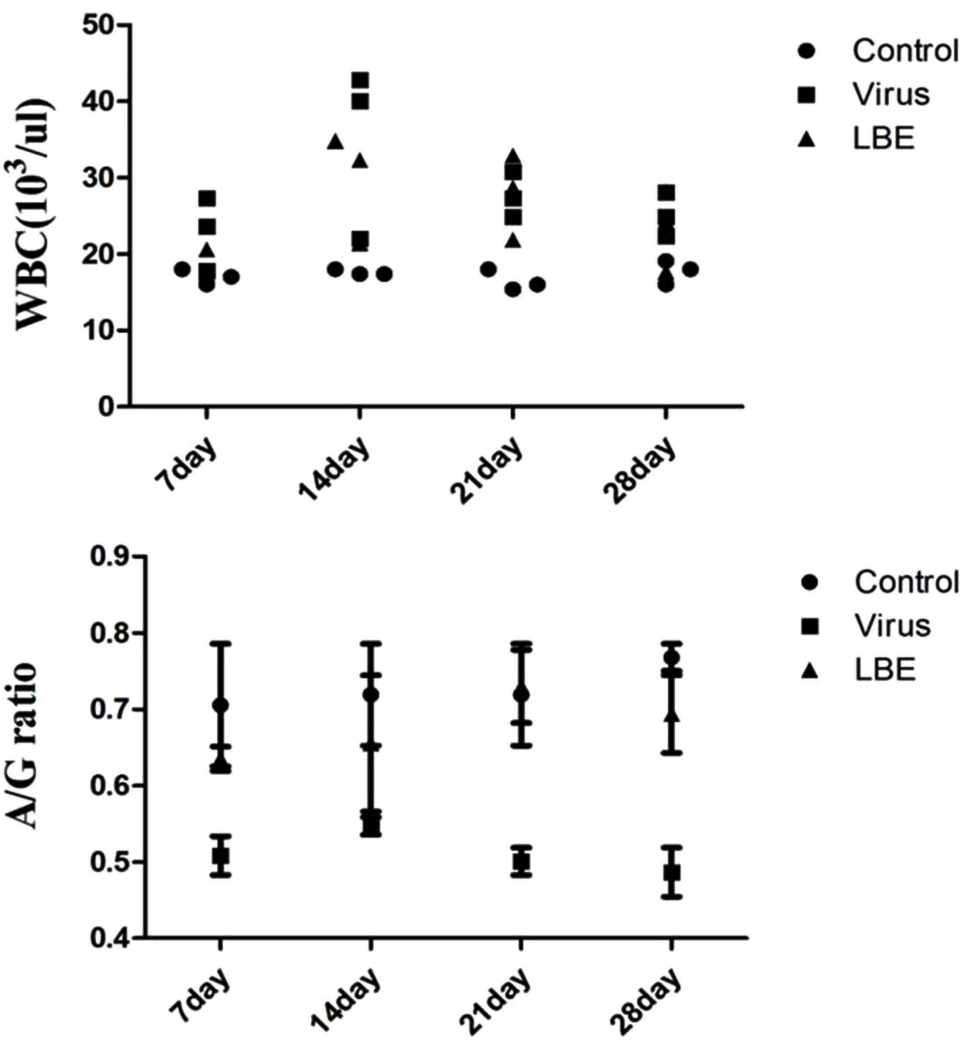
도면2



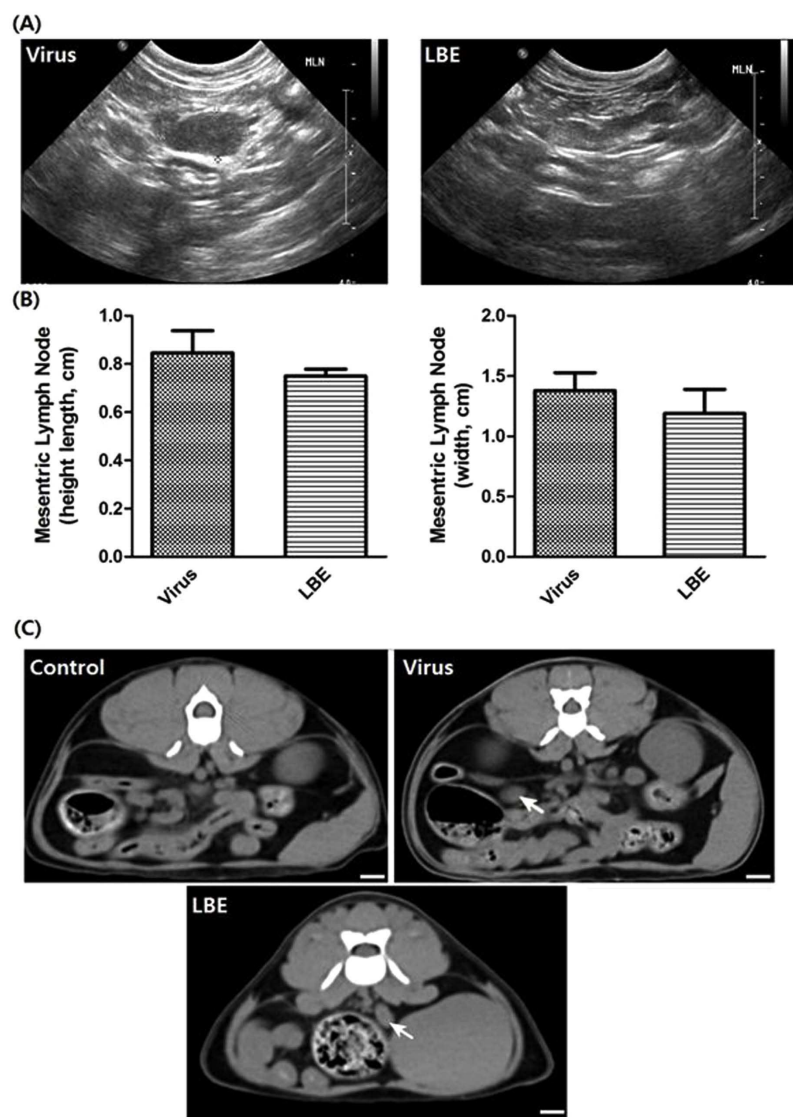
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> LEE, Hyun Gwang
The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Anti-Coronavirus Composition
- <130> P1015-691
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer

<400>	1	
caactgggga gatgaacct		19
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	2	
ggtagcattt ggcagcgta		20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	3	
ggagaaagct gccaaatag		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
tcacaagtgt gttgggtgac		20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
atcactactg gtcttcagga		20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	
	ttacattatc cgaacagccc	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	7	
	cccatgtagt agcaaacccc	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	8	
	gtctgtagg aaacggcaaa	20