



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0035675
(43) 공개일자 2022년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/424 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/424 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0117705
(22) 출원일자 2020년09월14일
심사청구일자 2020년09월14일

(71) 출원인
재단법인 제주테크노파크
제주특별자치도 제주시 중앙로 217, 9층 (이도이동, 제주벤처마루)
한국 한의학 연구원
대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)
나눔제약 주식회사
경상북도 영천시 금호읍 금창로 208-65
(72) 발명자
김기욱
제주특별자치도 제주시 인다4길 12, 102동409호(아라일동, 천일아파트)
전형식
제주특별자치도 제주시 인다4길 3, 401호(아라일동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인세원

전체 청구항 수 : 총 11 항

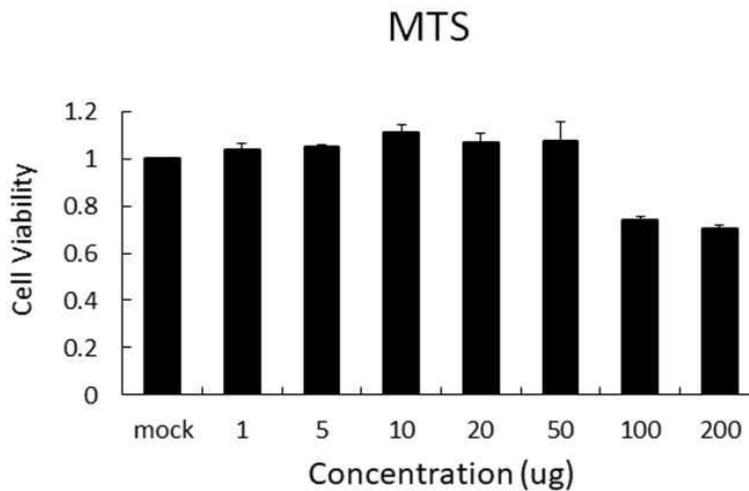
(54) 발명의 명칭 **들의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물**

(57) 요약

본 발명은 **들의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물**에 관한 것으로, **들의분말을 용매추출하여 제조되는 **들의 추출물**이 유효성분으로 함유된다.**

상기와 같이 **들의 추출물**이 유효성분으로 함유되는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물은 우수한 항바이러스 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포독성이 낮아 예방목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)
A61P 31/16 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)

도기식

경상북도 영천시 금호읍 금창로 208-65

(72) 발명자

마진열

대구광역시 동구 경안로 956, 407동 805호(각산동,
 대구혁신 LH4단지)

조원경

대구광역시 동구 금강로21길 30, 107동 803호(괴전
 동, 안심역코오롱하늘채)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711100480
과제번호	KSN1812101
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국한의학연구원
연구사업명	한국한의학연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)
연구과제명	선행연구 생물전환과제를 활용한 심화글로벌 의약품(안질환) 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한국한의학연구원
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545021014
과제번호	316006055SB010
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발(R&D)
연구과제명	제주산 흑무 및 유색무 육성을 통한 건강기능식품 개발사업
기 여 율	1/2
과제수행기관명	(재)제주테크노파크
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 돌의 추출물이 5 내지 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 함유되는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 돌의 추출물은 10 내지 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 함유되는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 돌의 추출물은 항바이러스 인자인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 유도하는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 돌의 추출물은 돌의 분말 100 중량부에 물 및 탄소수가 1 내지 4인 알코올로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 용매 500 내지 1500 중량부를 혼합하고 상온에서 20 내지 30시간 동안 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 돌의 추출물은 돌의 분말 100 중량부에 에탄올 1000 중량부를 혼합하고 상온에서 24시간 동안 추출하여 제조되는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스인 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스

용 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제가 더 포함되는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 에어로졸, 외용제, 좌제 및 주사제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물.

청구항 10

돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 캔디, 츄잉껌, 젤리 및 음료로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 우수한 항바이러스 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포독성이 낮아 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 독감은 인류에게 심각한 의학적, 경제학적, 사회적 문제로 대두되고 있으며, 매년 전 세계에서 5억 명이 넘는 사람들이 독감에 걸리는데, 그 중 약 2백만 명이 사망하는 것으로 조사되고 있다. 특히, 1918년 제1차 세계대전 중 발생한 '스페인 독감'의 경우 현대판 흑사병이라고 할만큼 막대한 인명피해를 초래했다. 1918~19년 사이에 대략 2천만~5천만 명이 사망한 것으로 추정되고 있다.

[0004] 과학기술기획평가원이 최근 발간한 '신종 감염병 발생 및 피해 현황' 보고서에 따르면 2000년 이후 6대 신종 감염병(사스, 신종인플루엔자, 조류인플루엔자, 에볼라바이러스, 메르스, 지카바이러스) 발생에 따른 전 세계 사회 및 경제적 손실액이 8000억달러(약 864조원)에 달하는 것으로 집계됐다. 신종 감염병 별로는 중증호흡기증후군(SARS, 2003년)은 29개국 8098명이, 신종플루(H1N1, 2009년)는 전 세계적으로 13만명 이상 각각 감염된 것으로

로 조사됐다. 조류인플루엔자(H7N9, AI, 2013년) 인체 감염증은 주로 중국에서 발생했다. 특히 2016년 10월 이후 AI 인체감염 환자가 429명이 나타났고, 지난해 초 사망자만 99명에 달하며 치사율이 40%로 나타났다. 에볼라 바이러스(에볼라출혈열, 2014년)의 치사율도 41%로 AI 인체 감염증에 못지 않은데, 주로 아프리카에서 창궐하는 에볼라바이러스는 2만4509명이 감염된 것으로 나타났다. 또한, 2015년 국내 유행으로 대규모 피해를 끼친 중동 호흡기증후군(메르스)은 중동 및 북아프리카 등 12개국에서 발생했는데, 1040명이 감염됐고, 치사율도 37%로 높은 편이었다.

[0005] 그러나, 많은 수의 항 인플루엔자 약물이 존재 함에도 불구하고, 매년 독감 전염병감염은 여전히 높은 수준이며, 최근 개발된 약물은 현재 순환하는 인플루엔자 바이러스 균주에 대해 매우 효과적이지만, 바이러스의 내성속도는 약물이나 백신의 개발속도 보다 더 빠르게 진화하고 있다. 이와 관련하여, 광범위한 활성 범위를 갖는 새로운 치료 접근법 및 약물이 필요한 실정이다.

[0006] 이에 따라, 인플루엔자 감염 퇴치 효과를 나타내는 다양한 종류의 약물이 실험 및 임상 연구가 in vitro, in vivo 수준에서 진행되고 있지만, 새로운 바이러스의 출현속도에 비해 약물의 개발은 기초수준에 머물고 있는 것이 현실이다.

[0007] 최근 항바이러스 약물로 알려진 lopinavir/ritonavir, darunavir/umifenovir, oseltamivir, favipiravir, remdesivir, chloroquine, hydroxychloroquine, azithromycin, tocilizumab 및 interferon-β 등의 물질은 사스바이러스나 COVID-19의 치료제로서 임상연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재 COVID-19는 백신이나 치료제가 미개발된 상태로 천연물이나 기존에 약물을 이용한 약물재창출 방식을 활용한 치료제의 개발이 활발하게 진행되고 있다.

[0008] 항바이러스에 가장 활성을 갖는 천연물로는 polyphenols and flavonoids (quercetin, luteolin, hesperetin, amentoflavone, tetra-O-gallyl-β-D-glucose, sinigrin, forsythoside A, psoralidin, tomentin B, terrestrimine, broussoualchalcone, papyriflavonol A)이 알려져 있다. 또한 알칼로이드(alkaloids)인 (lycorine, tylophorine, 7-methoxycryptopleurine, jubanine H, nummularine B), 안트라퀴논 (anthraquinones)인 천연물(aloe-emodin, emodin), 사포닌 (glycyrrhizin, escinidin, saikosaponin B2), 테르펜(terpenes)인 (curcumin, betulinic acid, savinin, iguesterin, dihydrotanshinone I, cryptotanshinone, 3β-friedelanol, chrysanthemum B), 쿠마린(coumarins)인 (leptodactylone, xanthoangelol E), diarylheptanoids (hirsutenone), and 렉틴(lectins) 계열의 (APA, UDA, HHA, alstotide 1) 등이 알려져 있다.

[0009] 바이러스는 세 가지 유형의 당 단백질인 헤마글루티닌(HA), 뉴라미니다제(NA) 및 바이러스 이온채널(M2)의 통합된 표면인 지질막으로 코팅된 직경이 80 내지 100nm의 입자인데, 유전자 구조를 보면, 리보핵 단백질(RNP)은 8개, 핵 단백질과 폴리머 라제 복합체의 3개 subunit과 복합체에서 단일 가닥 네거티브 극성 RNA로 구성되어 있다. 바이러스는 세포에 침투한 후에 리보 핵 단백질이 핵에 도달하여 바이러스 게놈 분절의 전사, 번역 및 복제가 일어나게 된다.

[0010] 바이러스 특이적 RNA의 전사 및 복제는 바이러스 폴리머라제 복합체에 의해 수행된다. 진핵 세포의 폴리머라제와 달리 바이러스 폴리머라제는 오류수정 메커니즘이 없다. 따라서 바이러스 게놈의 돌연변이 빈도는 다양한 추정치에 따라 복제주기 당 10^{-4} 내지 10^{-6} 개의 뉴클레오티드로, 이것은 박테리아와 진핵 생물의 돌연변이 속도보다 몇 배나 더 높으며, 복제기간이 짧기 때문에 인플루엔자 바이러스 등은 돌연변이 등과 같은 변이가 빠르게 일어난다. 돌연변이의 빠른 출현은 바이러스가 숙주의 면역반응과 방어망을 무능케 한다. 따라서 예방 접종 및 자연 발병으로 인한 인구의 면역층 형성에도 불구하고 매년 전염병을 일으킬 수 있다. 또한 항 바이러스 약물사용의 결과로 바이러스의 약물 내성 균주가 발생하여 항 바이러스 화학 요법의 효과가 감소하고 있다.

[0011] 한편 돌의{*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino}는 Cucurbitaceae과 *Gynostemma* BI 속에 포함된다. 동북아시아와 동남아시아에 널리 분포되어있다. *G. pentaphyllum*은 중국에서 수백 년 동안 식품 및 보조 제품에 사용되어 왔으며 주로 Qingling Mountains와 Yangtze River의 남쪽에 분포되어있다. 한의학에 따르면 *G. pentaphyllum*의 맛과 본질은 약간 쓴 맛, 중성, 따뜻하다. *G. pentaphyllum*는 명나라때부터 혈뇨, 부종, 인두의 통증, 목의 열과 부종, 중앙과 외상을 치료하는데 민간에서 사용되어 왔다. 현재 많은 돌의 제품들은 미국, 중국, 유럽각국에서 차, 정제, 인스턴트 파우더, 캡슐, 경구 액체 및 타정 등이 출시되어 있으며, 음료, 스포츠 음료, 콜라, 맥주, 비스킷, 빵 및 국수에 첨가제로 사용하기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록 제1047755호(2011.07.01)
- (특허문헌 0002) 대한민국 특허등록 제2092832호(2020.03.18)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 우수한 항바이러스 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포독성이 낮아 예방목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 목적은 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물을 제공함에 의해 달성된다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 특징에 따르면, 상기 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 돌의 추출물이 5 내지 40 μ g/mL로 함유된다.
- [0018] 본 발명의 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 돌의 추출물은 10 내지 20 μ g/mL로 함유된다.
- [0019] 본 발명의 더욱 바람직한 특징에 따르면, 상기 돌의 추출물은 항바이러스 인자인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 유도하는 것으로 한다.
- [0020] 본 발명의 더욱 바람직한 특징에 따르면, 상기 돌의 추출물은 돌의 분말 100 중량부에 물 및 탄소수가 1 내지 4인 알코올로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 용매 500 내지 1500 중량부를 혼합하고 상온에서 20 내지 30시간 동안 추출하여 제조된다.
- [0021] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 돌의 추출물은 돌의 분말 100 중량부에 에탄올 1000 중량부를 혼합하고 상온에서 24시간 동안 추출하여 제조된다.
- [0022] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스이다.
- [0023] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제가 더 포함된다.
- [0024] 본 발명의 더욱 더 바람직한 특징에 따르면, 상기 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 에어로졸, 외용제, 좌제 및 주사제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 갖는다.
- [0026] 또한, 본 발명의 목적은 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물을 제공함에 의해서도 달성될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 특징에 따르면, 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 캔디, 츄잉껌, 젤리 및 음료로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 제형을 갖는다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물은

우수한 항바이러스 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포독성이 낮아 예방목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 탁월한 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 본 발명의 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물을 제조예 2를 통해 배양된 세포에 적용한 후에 MTS 시약으로 처리하여 측정된 독성을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물을 제조예 2를 통해 배양된 세포에 적용한 후에 세포독성을 현미경으로 촬영하여 나타낸 사진이다.
- 도 3은 본 발명의 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물을 제조예 2를 통해 배양된 세포에 처리한 후에 인플루엔자 바이러스(PR8-GFP)를 감염시키고 형광현미경으로 관찰하여 나타낸 사진이다(Mock; 음성 대조군, PR8-GFP; 인플루엔자 바이러스 감염군, PR8-GFP/IFN-β; 인터페론 베타 처리군, PR8-GFP/돌의 10μg/mL; 돌의 10 μg/mL 처리군, R8-GFP/돌의 20μg/mL; 돌의 20μg/mL 처리군).
- 도 4 내지 5는 본 발명의 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물의 인플루엔자 바이러스(PR8-GFP)에 대한 항바이러스 효능을 CCK-8 어세이 방법을 통하여 확인한 결과로, 도 4는 CCK-8 시약을 세포에 처리한 사진이며, 도 5는 도 4를 수치화하여 도식화한 그래프로서 바이러스를 처리하지 않은 음성대조군의 세포 생존률을 100%로 한 후 상대적인 세포 생존률을 계산하였다(Mock; 음성 대조군, PR8-GFP; 인플루엔자 바이러스 감염군, PR8-GFP/IFN-β; 인터페론 베타 처리군, PR8-GFP/돌의 5 μg/mL; 돌의 5μg/mL 처리군, PR8-GFP/돌의 10μg/mL; 돌의 10μg/mL 처리군, R8-GFP/돌의 20μg/mL; 돌의 20μg/mL 처리군).
- 도 6 내지 8은 본 발명의 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물을 인플루엔자 바이러스(PR8-GFP)와 동시 감염시킨 후 항바이러스 효능을 형광현미경으로 관찰한 결과(Mock; 음성 대조군, PR8-GFP; 인플루엔자 바이러스 감염군, PR8-GFP/IFN-β; 인터페론 베타 처리군, PR8-GFP/돌의 10μg/mL; 돌의 10μg/mL 처리군, R8-GFP/돌의 20 μg/mL; 돌의 20μg/mL 처리군)로, 도 6은 형광현미경으로 촬영한 사진이며, 도 7은 각 세포를 유세포분석기를 사용하여 GFP 발현을 확인한 히스토그램이고, 도 8은 유세포분석기를 통해 발현된 GFP 단백질의 형광값을 수치화하여 PR8-GFP 바이러스에 의한 형광값을 기준으로 상대적으로 비교한 그래프이다.
- 도 9는 본 발명의 제조예 2를 통해 배양된 RAW 264.7 세포에 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물 10 또는 20μg/mL와 PR8-GFP 바이러스를 동시에 감염시킨 후에 세포를 모아 단백질을 분리하여 인플루엔자 바이러스 단백질 HA, PA, M2의 발현 정도를 비교한 결과이다(HA; Hamagglutinin A, M2; Matrix 1 protein).
- 도 10은 본 발명의 제조예 2를 통해 배양된 RAW 264.7 세포에 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물 20μg/mL과 PR8-GFP 바이러스를 동시에 감염시킨 후 세포를 고정하고 바이러스 단백질 HA, M2, NA, NP, NS1, PA 발현을 면역형광염색법으로 확인 결과이다. DAPI는 세포의 핵을 염색하며, Merge는 핵과 바이러스 단백질의 위치를 동시에 표시한 결과이다(-; 음성 대조군, PR8-GFP; 인플루엔자 바이러스 감염군, PR8-GFP/돌의; 돌의 20μg/mL 처리군), (NA; Neuraminidase, NP; Nucleoprotein, NS1 (Non-structural protein 1)).
- 도 11 내지 13은 본 발명의 제조예 2를 통해 배양된 RAW 264.7 세포에 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물 PR8-GFP 바이러스 처리 anti-viral cytokine mRNA를 qPCR법으로 분석하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하에는, 본 발명의 바람직한 실시예와 각 성분의 물성을 상세하게 설명하되, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 발명을 용이하게 실시할 수 있을 정도로 상세하게 설명하기 위한 것이지, 이로 인해 본 발명의 기술적인 사상 및 범주가 한정되는 것을 의미하지는 않는다.
- [0034] 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하며, 돌의 추출물이 5 내지 40μg/mL로 함유되는 것이 바람직하다.
- [0035] 상기 돌의 추출물이 5μg/mL 미만으로 함유되면 항바이러스 효과가 미미하며, 상기 돌의 추출물이 40μg/mL를 초과하여 함유되면 세포 독성을 나타내기 때문에 바람직하지 못하며, 상기 돌의 추출물은 10 내지 20μg/mL로 함유

되는 것이 가장 바람직하다.

- [0036] 상기 돌의 추출물은 아래 도 11 내지 13에 나타난 것처럼, 항바이러스 인자인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6를 유도하는데, 특히 돌의 추출물이 10 내지 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 함유되었을때, 상기에 나열된 항바이러스 인자의 유도효과가 월등하게 향상되는 것을 알 수 있다.
- [0037] 또한, 상기 돌의 추출물은 돌외를 건조한 후에 분쇄하는 과정으로 제조되는 돌의 분말 100 중량부에 물 및 탄소수가 1 내지 4인 알코올로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상으로 이루어지는 용매 500 내지 1500 중량부를 혼합하고 상온에서 20 내지 30시간 동안 추출하는 과정으로 제조되며, 돌의 분말 100 중량부에 질량농도가 70%인 에탄올 1000 중량부를 혼합하고 상온에서 24시간 동안 추출하여 제조되는 것이 바람직하다.
- [0038] 또한, 상기의 과정을 통해 제조되는 돌의 추출물은 추출물의 희석액 또는 농축액, 추출물을 건조하여 얻어지는 건조물 또는 조제물 또는 정제물 중 어느 하나의 형태로 적용될 수도 있다.
- [0039] 돌외는 최근 수십 년 동안 약리학적 연구로 항균, 항암, 노화 방지, 항 피로, 항 케양, 저지혈증 및 면역조절활성 등의 효능이 보고되고 있는데, 돌외의 다양한 약리학적 효능은 사포닌, 아미노산, 다당류, 플라보노이드, 유기산, 미량 원소 및 기타 화학 물질을 포함한 다양한 화학 성분으로부터 기인한다.
- [0040] 또한, 상기의 돌의 추출물이 항바이러스 활성을 갖는 바이러스의 일 예로는 오르토믹소비리대(Orthomixoviridae), 람도비리대(Rhabdoviridae), 파라믹소비리대(Paramixoviridae), 허피스비리대(Herpesviridae) 및 피코나비리대(Picornaviridae) 중에서 선택된 하나 이상의 바이러스이며, 바람직하게는 인플루엔자 바이러스이다.
- [0041] 또한, 상기 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제가 더 포함될 수 있는데, 상기 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제의 종류는 본 발명에 따른 항바이러스용 약학적 조성물의 효과를 저해하지 않는 한 특별히 한정되지 않고 어떠한 것이든 사용가능하나, 예를 들면 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제, 운할제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제의 대표적인 예로는, 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 글리세린, 아카시아 고무, 알지네이트, 칼슘포스페이트, 칼슘카보네이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 팜물유, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일, 주사가능한 에스테르, 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우리지 등을 들 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁액 에멀전, 시럽제, 에어로졸, 외용제, 좌제 및 주사제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형으로 제조될 수 있는데, 본 발명에 따른 항바이러스용 약학적 조성물의 제제화 방법은 기술분야에 공지된 통상의 방법에 따라 수행될 수 있으며, 특별히 제한되지 않는다.
- [0043] 또한, 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여될 수 있으며, 투여량은 투여대상의 연령, 성별, 체중, 상태, 질병의 정도, 약물의 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 제제화 방법, 투여량, 투여 경로, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물은 박테리아 감염성 질병 또는 바이러스 감염성 질병의 예방 및 치료에 이용될 수 있으며, 유효 성분으로 돌의 추출물 외에 다른 약학적 활성 성분을 함께 포함하거나, 또는 다른 유효 성분을 포함하는 약학 조성물과 혼합되어 이용될 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물은 돌의 추출물을 유효성분으로 함유한다.
- [0047] 또한, 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제로는 포도당, 과당, 말토오스, 슈크로스, 텍스트린, 시클로텍스트린과 같은 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올과 같은 천연 탄수화물, 타우마틴, 스테비아 추출물 등의 천연 향미제, 사카린, 아스파르트산 등의 합성 향미제, 착색제, 펙트산 또는 그의 염, 알긴산 또는 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드

증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 또한, 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 캔디, 츄잉검, 젤리 및 음료로 이루어진 군으로부터 선택되는 형태일 수 있는데, 항바이러스용 건강기능식품 조성물 내에 돌의 추출물의 함량은 식품의 형태, 풍미, 맛 등을 고려하여 적절하게 선택될 수 있으며, 예를 들어 건강기능식품 전체 중량에 대하여 0.01~30 중량%의 범위일 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물의 형태, 조성 및 제조방법 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있다.

[0051] 이하에서는, 본 발명에 따른 돌의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물의 제조방법 및 그 제조방법을 통해 제조된 항바이러스용 약학적 조성물의 물성을 실시예를 들어 설명하기로 한다.

[0053] <제조예 1> 돌의 추출물의 제조

[0054] 돌의 건조한 후에 분쇄하여 제조된 돌의 분말 100 중량부를 질량농도가 70%인 에탄올 1000 중량부에 혼합하고 22℃의 온도로 24시간 동안 용매추출하여 돌의 추출물을 제조하였다.

[0056] <제조예 2> 세포배양

[0057] 마우스 대식 세포주 RAW 264.7 세포를 준비하여 10% 소 태아혈청(Fetal bovine serum, FBS), 100 U/ml 페니실린(penicillin) 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 RPMI-1640 배지(Hyclone)를 사용하여 배양하되, 상기 세포는 37℃, 95% 습도, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였으며 2 내지 3일마다 새로운 배양액으로 계대 배양하였다.

[0059] <실시예 1> 세포독성 확인

[0060] 상기 제조예 2를 통해 제조된 RAW 264.7 세포를 96 well 세포 플레이트에서 seeding(1×10^5 /well)하고, 상기 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물을 1µg/mL에서 200µg/mL까지 농도별로 24시간 처리한 후, MTS 시약을 10µl 투입하여 2시간 동안 반응시킨 후에 490nm 파장에서 흡광도를 측정하여 아래 도 1 내지 2에 나타내었다.

[0061] 아래 도 1에 나타난 것처럼, MTS 시약으로 확인했을 때는 50µg/mL까지 세포독성이 없었으나, 아래 도 2에 나타난 것처럼, 농도별로 돌의 추출물을 처리하고 24시간 후 세포를 현미경으로 관찰한 결과, 50µg/mL에서 세포 독성이 발현되었다.

[0063] <실시예 2> 인플루엔자 바이러스 감염예방 효능 확인

[0064] 1)형광현미경을 이용한 항바이러스 효능 확인

[0065] 상기 제조예 1에서 제조된 돌의 추출물 10µg/mL와 20µg/mL를 상기 제조예 2를 통해 배양된 Raw 264.7 세포에 처리한 후 12시간 뒤에 형광 단백질(green fluorescence protein; gfp)를 부착한 인플루엔자 바이러스(PR8-GFP virus)를 10 MOI 감염시킨 뒤 12 또는 24 시간 동안 더 배양한 후, 세포 내에서의 VSV-gfp virus의 복제(replication)를 gfp 형광 발현을 통해 관찰하여 아래 도 3에 나타내었다.(양성대조군으로 1000U/ml의 IFN-β를 사용하였다.)

[0066] 아래 도 3에 나타난 것처럼, 돌의 추출물을 처리한 후 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 경우에 바이러스가 복제하면서 나타내는 형광이 감소하는 것을 알 수 있다.

[0067] 2)인플루엔자 바이러스에 의한 CPE(cytopathic effect) 억제 확인

[0068] 인플루엔자 바이러스가 복제하고 증식하면 세포가 죽으면서 CPE 현상이 나타난다. 따라서 돌의 추출물이 인플루

엔자 바이러스에 대한 CPE가 억제되어 세포 생존률이 증가하는지 확인하고자 CCK-8 어세이를 진행하였다.

[0069] 구체적으로, 상기와 동일한 방법으로 돌의 추출물로 전처리하여 배양한 세포에 바이러스를 감염시킨 후 24 시간 후 CCK-8 용액을 넣어서 2시간 반응시켜 발색된 결과를 아래 도 4에 나타내었다. 또한 상등액을 모아서 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존률을 배지에 대한 백분율로 계산하여 아래 도 5에 나타내었다.

[0070] 아래 도 5에 나타난 것처럼, 본 발명의 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물을 처리한 후에 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 경우 세포 생존이 농도의존적으로 증가하는 것을 알 수 있다.

[0071] 따라서, 돌의 추출물이 인플루엔자 바이러스의 복제에 의한 CPE를 억제함으로써 인해 항바이러스 효능이 나타내는 것을 것을 확인하였다.

[0073] <실시에 3> 인플루엔자 바이러스 감염 및 증식 억제 효능 확인

[0074] 1)형광현미경을 이용한 항바이러스 효능 확인

[0075] 상기 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물 10 또는 20 μ g/mL와 인플루엔자 바이러스(PR8-GFP virus)를 동시에 상기 제조예 2를 통해 배양된 Raw 264.7 세포에 감염시키고 24시간 후 GFP 형광을 촬영하여 아래 도 6에 나타내었다.

[0076] 아래 도 6에 나타난 것처럼, 상기 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물의 존재하에서 GFP 형광이 현저하게 감소 되는 것을 알 수 있다.

[0077] 2)유세포분석을 통한 항바이러스 효능 확인

[0078] 도 7은 도 6에서 확인된 세포를 원심분리로 모아 질량농도가 3.7%인 포르말린 용액으로 고정 한 후에, PBS(Phosphate buffered saline) 용액에 재현탁하여 유세포분석기(FACS, Fluorescence activated cell sorter)로 형광의 발현 정도를 분석한 히스토그램 결과이며, 도 8은 유세포분석기로 얻은 형광값을 수치화하여 그래프로 비교분석한 결과이다.

[0079] 도 8에 나타난 것처럼, 본 발명의 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물이 인플루엔자 바이러스의 감염과 증식 억제에 탁월한 효능이 있는 것을 알 수 있다.

[0080] 3)Western blot 분석을 통한 인플루엔자 바이러스 단백질 발현 억제 효능 확인

[0081] 상기 실시예 2에서 형광현미경을 이용한 항바이러스 효능 확인에서 수행했던 방법으로 돌의 추출물과 바이러스를 동시에 처리한 RAW 264.7 세포를 원심분리하여 모은 후 상등액을 버리고 세포를 파쇄한 후에 RIPA 버퍼에 세포를 현탁하고 단백질을 정량하여 30 μ g을 SDS-PAGE로 전기영동한 후 PVDF membrane으로 이동시켰다.

[0082] 아래 도 9에 나타난 것처럼, 인플루엔자 단백질인 HA, PA, M2에 대한 항체를 이용하여 확인한 결과 본 발명의 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물이 바이러스 단백질의 발현을 억제하는 것을 알 수 있다.

[0083] 4)형광면역분석법 (Immuno fluorescence technique)을 통한 인플루엔자 바이러스 단백질 발현 억제 효능 확인

[0084] 상기 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물과 인플루엔자 바이러스를 24시간 감염시킨 후 세포를 PBS로 세척하고 질량농도가 100%인 메탄올 용액에 5분, 3.7% 포르말린 용액에 10분간 고정하였다. 1% BSA와 0.05% tween-20이 함유된 PBS용액에서 1시간 blocking, 바이러스 단백질 HA, M2, NA, NP, PA에 대한 1차 항체에 1시간 반응시킨 후 PBS로 3번 세척하고 Alexa588이 결합된 2차 항체와 반응하였다 (Red 형광). PBS로 3번 세척한 후 DAPI 용액을 첨가하여 핵을 염색한 후(blue 형광) 형광현미경으로 merge하여 두 가지 색의 형광을 겹쳐서 확인하였다.

[0085] 그 결과, 아래 도 10에 나타난 바와 같이 본 발명의 제조예 1을 통해 제조된 돌의 추출물의 존재하에서 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 경우 모든 바이러스 단백질의 발현이 억제되었으며, 이는 돌의 추출물이 인플루엔자 바이러스의 감염을 억제함으로써 항바이러스 효능을 부여하는 것을 입증하는 결과이다.

[0086] 5) qPCR에 의한 anti-viral cytokine 발현 촉진

[0087] RAW264.7 cells에 돌의추출물과 PR8-GFP 바이러스 처리 anti-viral cytokine mRNA를 qPCR법으로 분석하여 아래 도 11 내지 13에 나타내었다. 이때, qPCR분석에 사용된 primer는 아래 표 1에 나타내었다.

[0088] <표 1>

Primer sequences		
TNF- α	Forward	5'-CAAGGGACTAGCCAGGAG-3'
	Reverse	5'-TGCCTCTTCTGCCAGTTC-3'
IL-1 β	Forward	5'-CGTTCCCATTAGACAACCTGCA-3'
	Reverse	5'-GGTATAGATTCTTTCCTTTGAGGC-3'
IL-6	Forward	5'-ACGGCCTTCCCTACTTC-3'
	Reverse	5'-TTCCACGATTTCCAGAG-3'
β -actin	Forward	5'-AGCCATGTACGTAGCCATC-3'
	Reverse	5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGA-3'

[0089]

[0090]

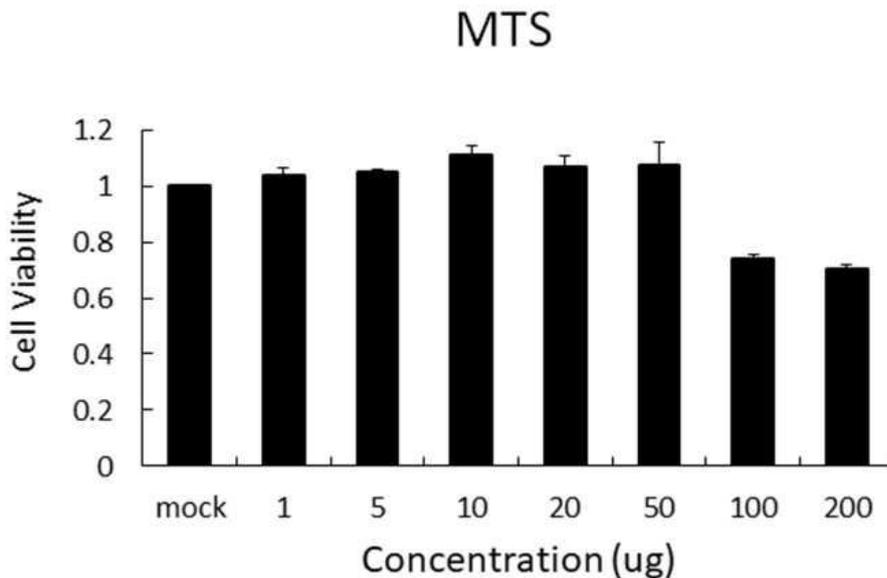
아래 도 11 내지 13에 나타낸 바와 같이, IL-1 β mRNA 발현은 MOCK 처리와 PR8-GFP 바이러스 처리에서 IL-1 β 발현의 유의적인 차이는 없었다. 그러나 돌외추출물 10, 20ug/ml 처리에서는 469.21, 270.96 fold 발현이 유도되었다(도 11). TNF- α 역시, 돌외추출물 10, 20ug/ml 처리에서 4, 5.79 fold 발현이 유도되었다(도 12). 또한, IL-6 발현은 돌외추출물 10, 20ug/ml 처리에서 각각 133.27, 273.52 fold 발현이 유도되었다(도 13).

[0092]

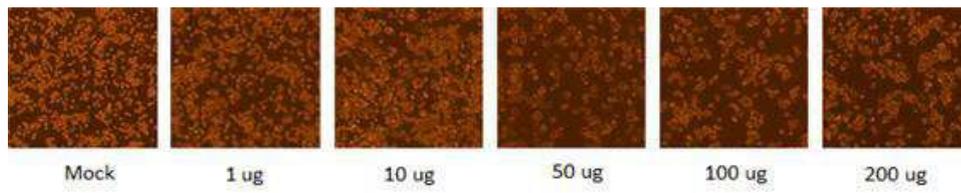
따라서, 본 발명에 따른 돌외 추출물을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물은 우수한 항바이러스 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 세포독성이 낮아 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

도면

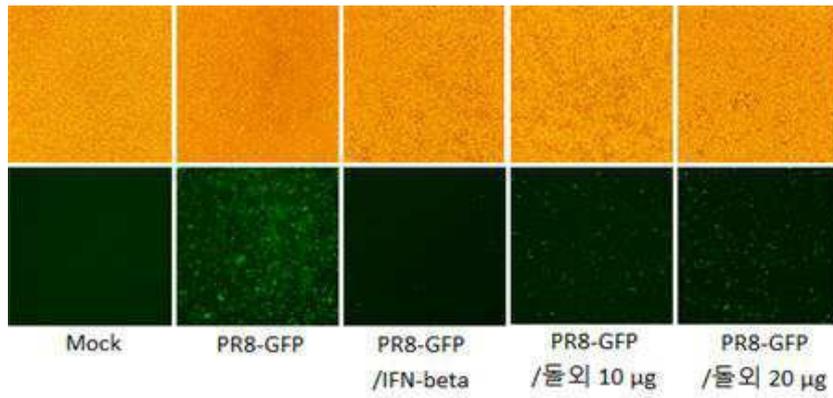
도면1



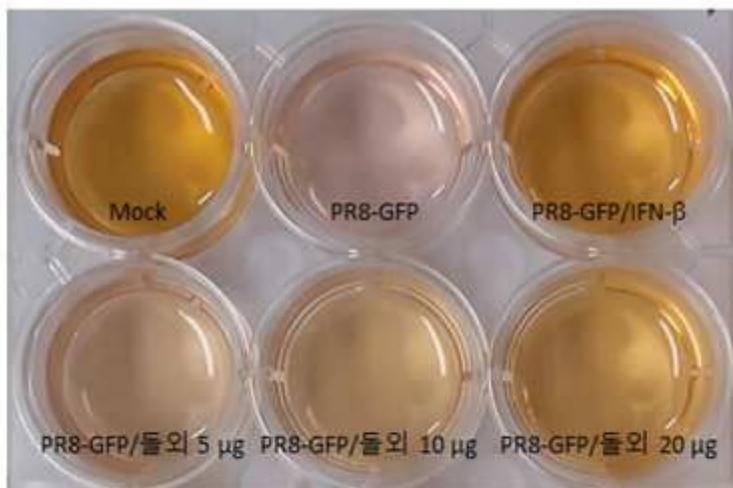
도면2



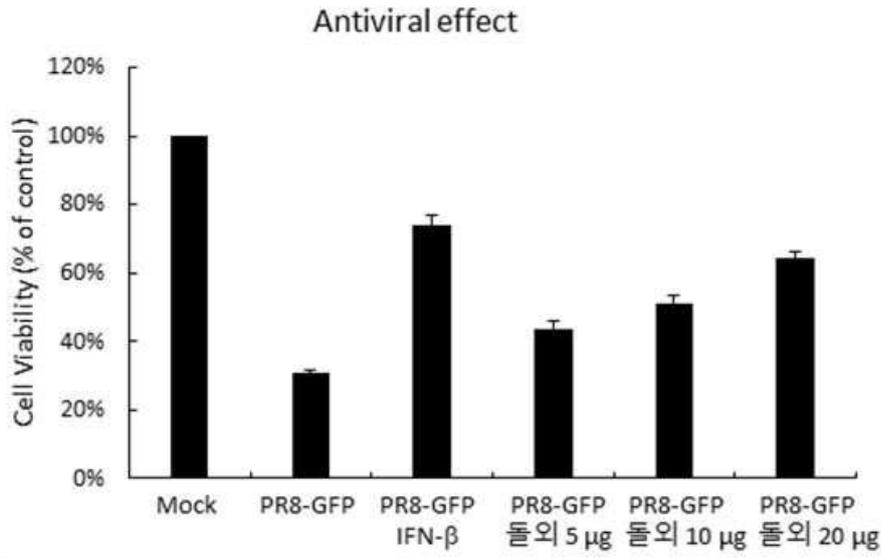
도면3



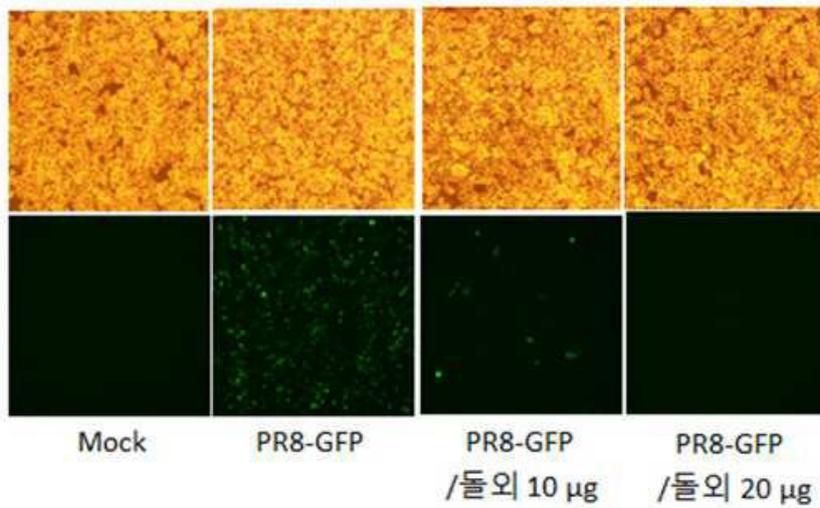
도면4



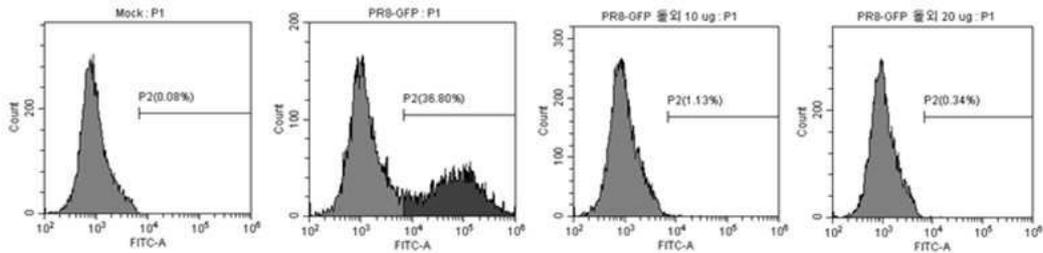
도면5



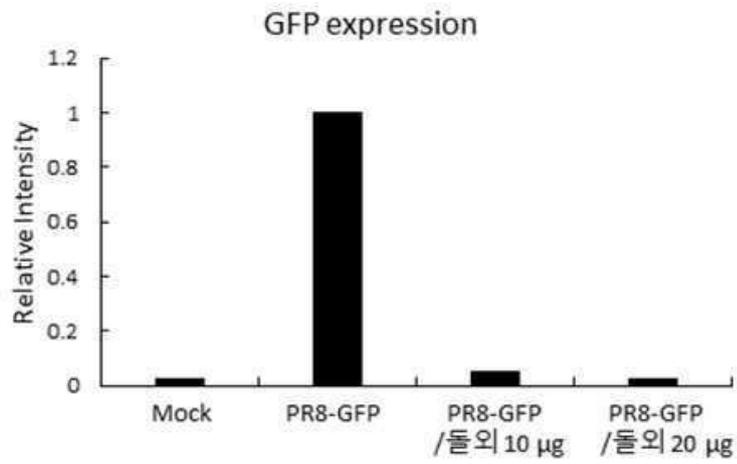
도면6



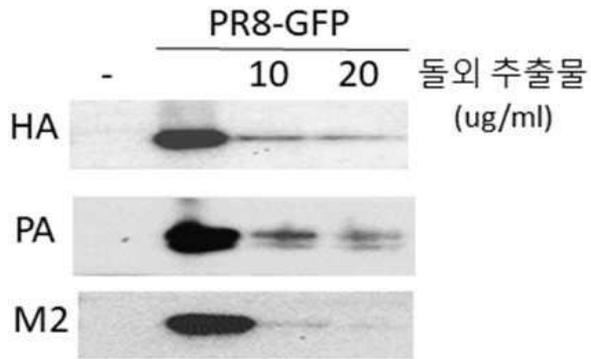
도면7



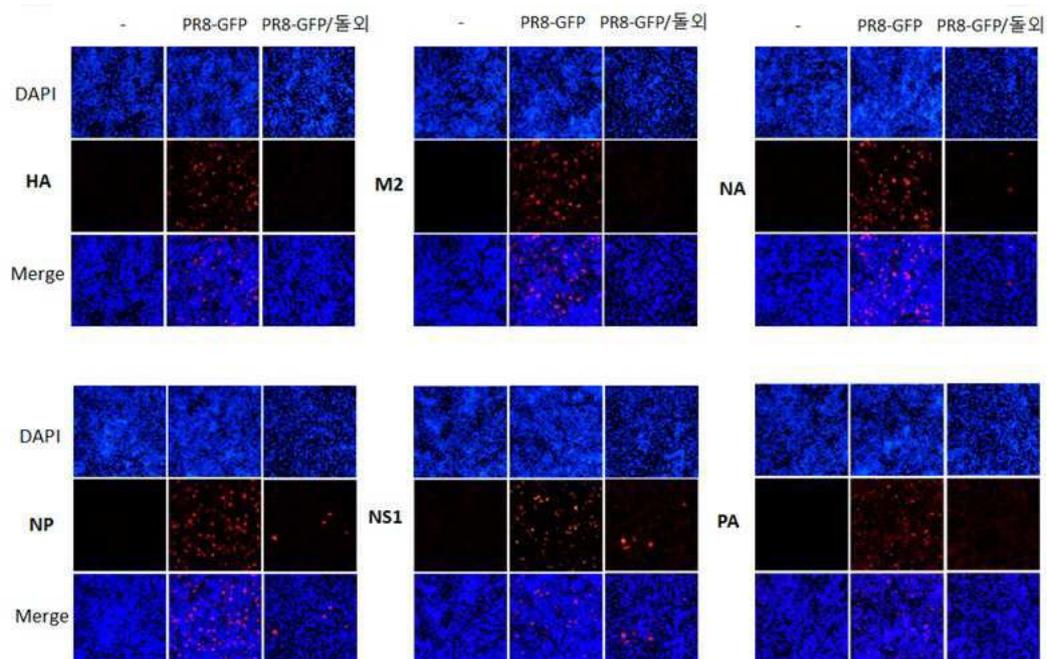
도면8



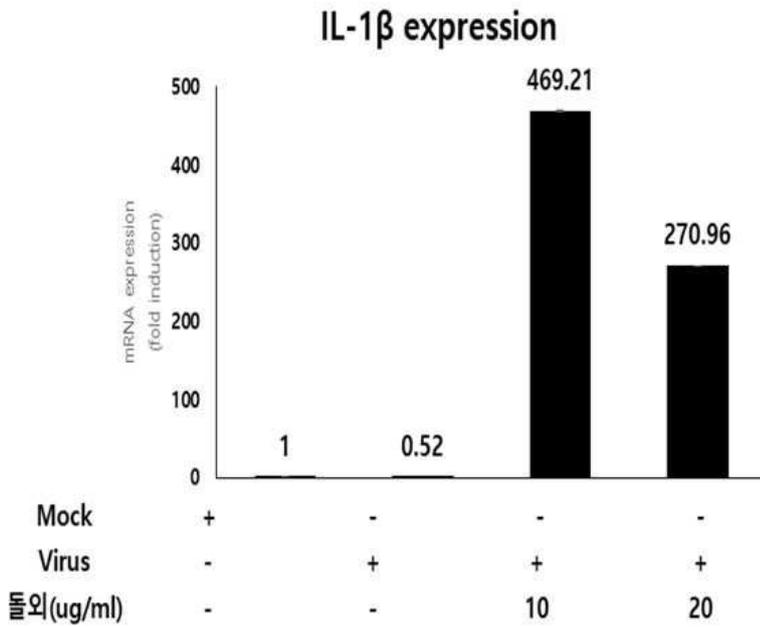
도면9



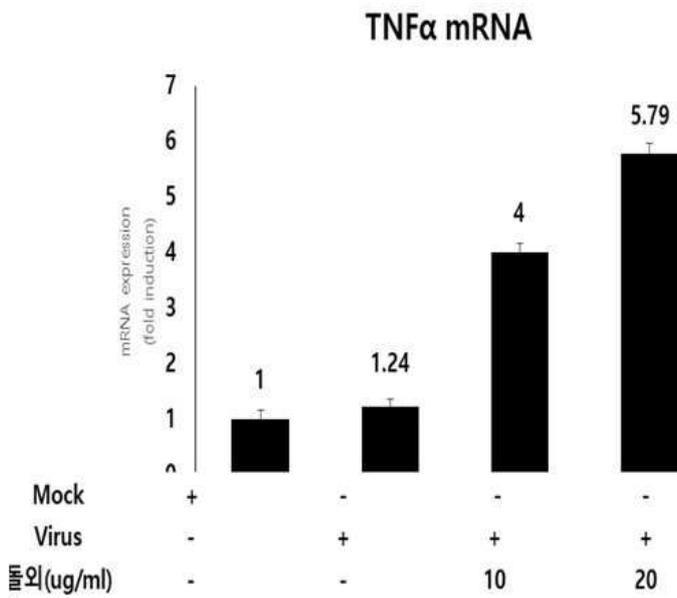
도면10



도면11



도면12



도면13

