

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2010/143919 A2

PCT

(43) 국제공개일
2010년 12월 16일 (16.12.2010)

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/185 (2006.01) A61P 17/06 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003791
- (22) 국제출원일: 2010년 6월 11일 (11.06.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0052446 2009년 6월 12일 (12.06.2009) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 대전 유성구 어은동 52번지, 305-333 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 김영국 (KIM, Young-Kook) [KR/KR]; 대전 유성구 전민동 엑스포아파트 409동 1601호, 305-762 Daejeon (KR). 최정호 (CHOI, Jung Ho) [KR/KR]; 대전 동구 신안동 260-12, 300-060

Daejeon (KR). 이경 (LEE, Kyeong) [KR/KR]; 대전 서구 둔산동 1369 넥서스밸리 B동 313호, 302-120 Daejeon (KR). 최순용 (CHOI, Soon-Yong) [KR/KR]; 대전 서구 월평동 누리아파트 106동 801호, 302-280 Daejeon (KR). 김관희 (KIM, Koanhoi) [KR/KR]; 대전 유성구 노은동 521 열매마을아파트 901동 1805호, 305-768 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 서울 강남구 삼성동 159-9 도심공향타워 6층 한얼국제특허사무소, 135-973 Seoul (KR).

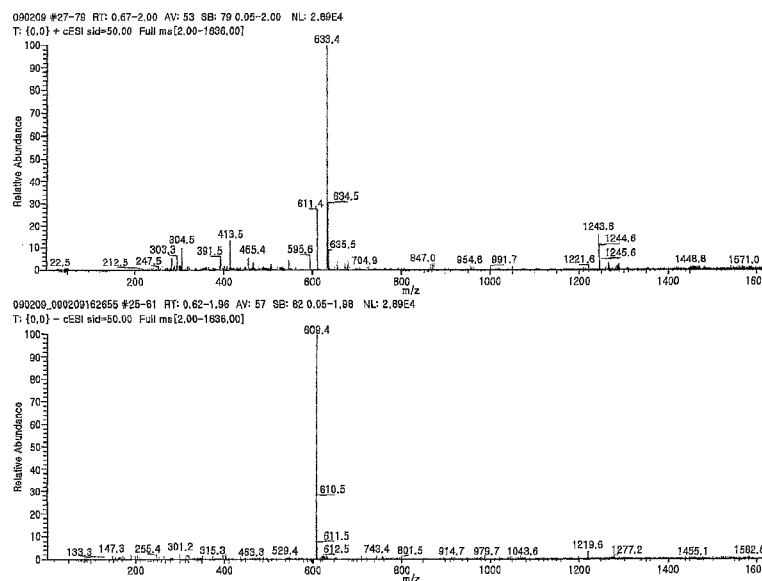
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD AND COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING IL-6-MEDIATED DISEASES OR RHINOVIRUS INFECTIONS

(54) 발명의 명칭: IL-6에 의해 매개되는 질환 또는 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위한 방법 및 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a use of *Hippophae rhamnoides* extract or compounds isolated therefrom for preventing or treating IL-6-mediated diseases or rhinovirus infections. More particularly, the present invention relates to a method and composition which can prevent and treat rhinovirus infections and IL-6-mediated diseases using an extract from *Hippophae rhamnoides* or quercetin 3-glucoside-7-rhamnoside isolated from the extract, by inhibiting a signal transduction pathway specifically induced by IL-6.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2010/143919 A2



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, SE, SI, SK, SM,

TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 산자나무 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 IL-6에 의해 매개되는 질환 또는 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료에 사용하는 용도에 관한 것으로, 보다 자세하게는 산자나무 추출물 또는 이로부터 분리된 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 이용하는, 특히적으로 IL-6에 의해 유도되는 신호전달체계를 저해하여 IL-6에 의해 매개되는 질환을 예방하고 치료할 수 있음은 물론, 라이노바이러스의 감염성 질환을 예방하고 치료할 수 있는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: I L -6에 의해 매개되는 질환 또는 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위한 방법 및 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 산자나무 추출물 또는 이로부터 분리된 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 이용하여, 특이적으로 IL-6에 의해 유도되는 신호전달체계를 저해하여 I L -6에 의해 매개되는 질환 또는 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인간 라이노바이러스(HRV)는 일반 감기(common cold)를 유발하는 바이러스로서, 독감(인플루엔자) 바이러스와는 달리, 코막힘, 콧물, 재채기, 기침, 인후통, 오한, 두통, 권태감 등의 증상을 유발하고 천식, 만성기관지염 등의 급성 호흡질환을 유발시키거나 악화시키기도 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 폐렴, 축농증, 중이염을 일으키기도 한다. 또한, 인간 라이노바이러스 양성 환자는 폐기능 저하, 호산구와 림프구수 증가, 기관지 점막에 호산구가 침윤되는 등의 증상이 나타나는 것으로 알려져 있다. 인간 라이노바이러스 양성과 말초혈중의 많은 백혈구의 수, 많은 다형핵 림프구의 수 사이에 각각 관련성이 나타났다.
- [3] 특히 인간 라이노바이러스와 천식의 관계가 알려져 있으며, 천식 환자와 비천식 환자 각각에서 기관지 점막 생검 표본을 채취하여 비교한 결과, 하기도 조직에서 인간 라이노바이러스가 발견되는 빈도는 비천식군에 비해 천식군에서 유의하게 높았으며, 인간 라이노바이러스의 존재와 천식의 임상적 중증도에도 상관관계가 있고, 인간 라이노바이러스가 하기도의 만성 염증에 관여하고 있다는 보고가 있다.
- [4] 구체적으로, 천식군 30례(이 중, 아스피린 감수성 천식 7례)와 대조군 23례에서 기관지 점막 표본을 채취하고, 정밀도 높은 검사법인 *in situ* 역전사 폴리머라제 연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 분석한 결과, 인간 라이노바이러스 감염률은 대조군이 22%인데 비해 천식군은 73%로 양쪽군 사이에 통계학적으로 유의차($P < 0.001$)가 나타났다. 이 검사법에서는 표본의 염색 패턴이 정확히 2종류로 나뉘었는데, 염색 범위가 점막 표면에 한정되고 윤곽이 뚜렷한 점 모양인 '국한'형과 표본 전체에 나타나고 일부에 한정되지 않는 '확산'형이다.
- [5] 최근 인간 라이노바이러스의 유전자지도가 완성되었다고 보고되었다. 미국 위스콘신 대학 메디슨, 메릴랜드대학, 크레이그 벤티연구소가 공동연구한 결실로 인간 라이노바이러스 99종의 변종의 유전자 지도를 완성하였다. 인간 라이노바이러스는 체내에서 2개의 변종이 동시에 한 환자를 감염시켜 환자의 체내에서 유전물질을 서로 교환하여 완전히 새로운 변종을 만드는 등 의외로 복잡하다는 것을 알아내었다. 결국 인간 라이노바이러스는 크게 A, B, C

그룹으로 나눌 수 있고, 그 중에서 C 그룹은 폐 말단까지 침투한다고 보고되었다. 바이러스 변종이 많아 변종 하나하나에 대한 백신을 만드는 것은 어렵지만, 바이러스 내부성분은 변종에 관계없이 매우 비슷하다는 사실을 밝혀 공통적인 요인을 타겟으로 감기치료제의 개발가능성을 시사하였다.

- [6] 한편, 인간 라이노바이러스에 의하여 유발된 호흡기 질환을 가진 환자들에서 증상의 악화는 염증성 사이토카인인 인터루킨-6 (IL-6) 의 농도 상승과 연관되어 있다.
- [7] 사이토카인은 생체 내 여러 종류의 세포에서 분비하여 세포 증식, 분화, 활성화 등에 관여하는 폴리펩타이드나 글리코프로테인으로 면역 및 염증반응에 중요한 역할을 한다. 여러 종류의 자가 면역질환 및 염증 질환들의 증상은 무척 다양하지만 병인기전의 공통점 중의 하나로 면역 반응이나 조직의 손상, 회복을 조절하는 여러 사이토카인의 생성을 들 수 있다. 염증 질환의 병변조직에서 염증성 사이토카인인 IL-1 α , IL- β , TNF α , IL-6, IL-12 등의 발현이 증가 되어 있다. 또한, 루푸스 환자의 혈청에서는 TNF α , IL-1, IL-6, IL-10, IFN α , IFN γ 등이 증가되어있으며, 췌그랜 증후군 환자의 타액선에서도 TNF α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TGF β 의 발현이 보고되었다.
- [8] 특히, IL-6는 대표적인 염증성 질환, 자가 면역질환 및 암세포에서도 중요하게 관여하는 사이토카인으로서는 여러 장기에서 다양한 기능을 수행한다. IL-6는 많은 세포 종류에서 발현됨이 알려져 있으며, 대표적으로 면역반응, 염증, 조혈과정, 세포의 증식 및 분화 등 다양한 생물학적 기능에 관련되어 있다(Naka 등 2002). IL-6의 작용은 수용체에 의하여 매개되는데 2가지 종류의 수용체, 즉 IL-6에 특이한 수용체인 IL-6R과 IL-6 패밀리의 공통수용체인 gp130가 IL-6의 복합수용체로서 작용한다. IL-6은 먼저 IL-6R과 결합하게 되고, IL-6과 IL-6R의 복합체는 다시 2개의 gp130과 결합하여 활성의 수용체 복합체를 형성하여 세포 내로의 신호전달을 개시한다. 야누스 키나제 2(Janus Kinases 2, JAK2)는 인산전이(transphosphorylation)에 의하여 활성화된다. 활성화된 JAK2에 의해 수용체 세포질 영역(cytoplasmic domains)의 여러 티로신 잔기(tyrosine residues)가 인산화(phosphorylation)되고, 이것은 SH₂나 다른 포스포티로신 바인딩 모티프(phosphotyrosine binding motif)를 가지고 있는 STAT3(signal transducers and activators of transcription 3)와 같은 세포질 내 단백질의 도킹 사이트(docking site) 역할을 하게 된다. 수용체의 세포질 영역에 결합한 STAT3는 JAK2에 의해 인산화된 후 수용체에서 떨어져 나온다. 활성화된 STAT3들은 세포질 내에서 서로 결합하여 호모다이머(homodimer) 또는 헤테로다이머(heterodimer)를 이룬 후 핵(nucleus) 내로 들어가 타겟 유전자의 인식 서열(recognition sequence)에 결합하여 전사(transcription)를 증가시킨다(Levy, D.E., 등, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3, 651-62, Darnell, J.E., Jr., *Science*, 1997, 277, 1630-1635).
- [9] 특히, IL-6 시그널링 패쓰웨이(signaling pathway)의 중간 전달자인 STAT3는 골수종, 유방 암종, 전립선 암, 뇌 종양, 두경부 암종, 흑색종, 백혈병 및 림프종,

특히 만성 골수성 백혈병 및 다발성 골수종을 포함하여 여러 형태의 암에 관여하는 것으로 보고되었다(Niu 등, *Cancer Res.*, 1999, 59, 5059-5063). 쥐 및 인간의 전립선 암 양쪽에서 유래된 세포들은 구조적으로 활성화된 STAT3을 갖는 것으로 밝혀졌으며, STAT3는 일부 급성 백혈병(Gouilleux-Gruart, V. 등, *Leuk.Lymphoma*, 1997, 28, 83-88) 및 T 세포 림프종(Yu, C.L. 등, *J.Immunol.*, 1997, 159, 5206-5210)에서 구조적으로 활성화되는 것으로 밝혀졌다. 흥미롭게도, STAT3은 만성 림프성 백혈병에서 세린 잔기 위에 구조적으로 인산화 되는 것으로 밝혀졌다(Frank, D.A. 등, *J.Clin.Invest.*, 1997, 100, 3140-3148). STAT3은 다발성 골수종을 가진 환자로부터의 골수 단핵 세포 및 배양액 양쪽 모두에서, 골수종 종양 세포에서 구조적으로 활성화된 것으로 밝혀졌다. 이러한 세포는 Fas-매개 세포고사(apoptosis)에 내성이고 높은 수준의 Bcl-xL을 발현한다. STAT3 시그널링은 세포고사에 대한 내성을 부여함으로써 골수종 종양 세포의 생존을 위해 필수적인 것으로 밝혀졌다(Catlett-Falcone, R. 등, *Immunity*, 1999, 10, 105-115).

- [10] 산자나무(*Hippophae rhamnoides*)는 보리수과의 식물로서, 버드나무를 닮은 관목으로 암수가 따로 자란다. 동경 2-69도와 북위 27-69도 내의 여러 지역에서 자생하는데, 산자나무는 일반명으로 씨벅틴(*Seabuckthorn*)으로 불리고, 키가 2.5m까지 자라며, 잎은 너비가 좁고 아랫면이 은색이다. 열매는 공 모양이고 오렌지 빛이 도는 노란색이며 지름이 8mm 정도이다. 영국 동부와 남동부 해안의 모래언덕에 많으며, 유럽과 아시아의 산악지대에도 널리 퍼져 있다. 중국의 내몽고지역과 러시아의 시베리아지역 캐나다의 오지 등 저온이며 척박한 지역에서도 서식하는 식물이다.
- [11] 여러 연구자들에 의하여 산자나무의 유효성분에 관련된 연구가 많이 진행되어 왔다. 특히, 산자나무 열매에서 각종 천연 바타민(A, B, C, E, P, K)의 함량이 정량, 정성분석되었으며, 각종 아미노산들의 함량 및 각종 유용금속류의 함유량이 분석되었다. 또한, 각종 영양소의 함유량에 관한 연구와 산자나무 열매를 식품으로 이용하기 위한 기초자료로 열매관련 물성 연구가 진행되었다(*J. Agric. Food Chem.*, Vol.47, pp 3480~3488). 그리고 중국을 중심으로 하여, 산자나무 *Hippophae rhamnoides ssp. sinensis* 15종, *Hippophae rhamnoides ssp. yunnanensis* 7종, *Hippophae rhamnoides ssp. wolongensis* 5종, *Hippophae rhamnoides ssp. stellatopilosa* 4종, *Hippophae rhamnoides ssp. tibetana* 3종에서 유래한 여러 가지 플라보노이드들을 HPLC 표준화작업에 의해 12종의 플라보노이드로 분류하여 이들의 다양성이 보고되었다(*J. of Chromatography A*, Chu Chen, 1154, pp 250~259). 그리고 중국을 중심으로 여러 지역에서 자생하고 있는 각종 산자나무들로부터 성분 분리연구를 수행하여 분리된 12종의 플라보노이드들의 함량이 비교되었으며, 퀘세틴 3-O-소포로사이드-7-람노사이드, 퀘세틴 3-O-루티노사이드, 퀘세틴 3-O-글루코사이드, 퀘세틴, 캄페롤 3-O-소포로사이드-7-람노사이드, 캄페롤 7-O-람노사이드, 캄페롤, 이소르함네틴,

이소르함네틴 3-O-소포로사이드-7-람노사이드, 이소르함네틴 3-O-루티노사이드, 이소르함네틴 3-O-글루코사이드, 이소르함네틴 3-O-글루코사이드-7-람노사이드에 대하여 보고되었다.

- [12] 식물 유래 플라보노이드나 당화 플라보노이드의 약리 활성에 대해서는 많이 알려져 있다(*Journal of antimicrobial chemotherapy*, L. C. Chiang, W. Chiang, M. C. Liu and C. C. Lin, Vol. 52, pp 194~198, 2003). 플라보노이드는 헤르페스 바이러스나 아데노바이러스 등에 대하여 항바이러스 효과가 있으며, 로부스타플라본(robustaflavone) 등과 같은 바이플라보노이드계 화합물은 인플루엔자 바이러스 등에 저해 효과가 있는 것으로 보고되고 있으나(*Planta Medica*, Vol. 65, pp 120~125), 항바이러스 효과가 탁월하게 나타나지는 않았다.
- [13] 이에, 본 발명자는 라이노바이러스의 감염성 질환을 예방 또는 치료할 수 있고 IL-6 신호전달체계를 저해하여 IL-6에 의해 매개되는 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 제제를 개발하기 위해 노력한 결과, 산자나무 추출물 또는 이로부터 분리된 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드 화합물이 항바이러스 활성 및 IL-6 신호전달체계를 저해하는 활성을 가지고 있어, 상기와 같은 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

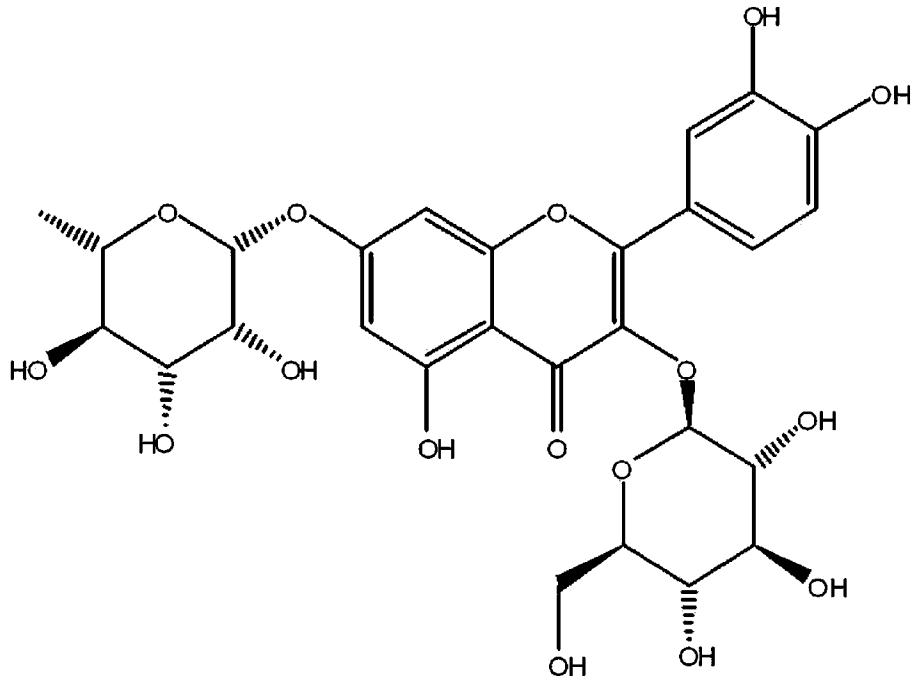
발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 발명은 산자나무 추출물 또는 이로부터 분리된 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 이용하여, 특이적으로 IL-6에 의해 유도되는 신호전달체계를 저해하여 IL-6에 의해 매개되는 질환 또는 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위한 방법 및 조성물을 제공함에 본 발명의 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [15] 하나의 양태로서, 본 발명은 산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, IL-6에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [16] 또한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, IL-6에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [17] [화학식 1]
- [18]



- [19] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 라이노바이러스 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [20] 또한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 라이노바이러스 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [21] 하나의 양태로서, 본 발명은 산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물을 포함하는 IL-6에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [22] 또한 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 유효성분으로 포함하는 IL-6에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [23] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물을 포함하는 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [24] 또한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 유효성분으로 포함하는 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [25] 본 발명의 치료 방법 및 조성물은 산자나무 추출물 또는 이로부터 분리된 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 이용하여, 염증성질환, 자가면역질환 또는 암을 유발하는 신호전달과정의 중요한 매개자로 작용하는 IL-6 수용체의 결합을 억제하여 IL-6에 의해 매개되는 질환을 예방하고 치료할 수 있는 효과가 있다.
- [26] 또한, 본 발명의 치료 방법 및 조성물은 산자나무 추출물 또는 이로부터 분리된

퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 이용하여, 라이노바이러스에 대한 항바이러스 효과에 의해 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료의 효과를 가짐은 물론 IL-6 신호전달체계 저해에 의해 라이노바이러스 감염성 질환의 악화를 억제할 수 있다.

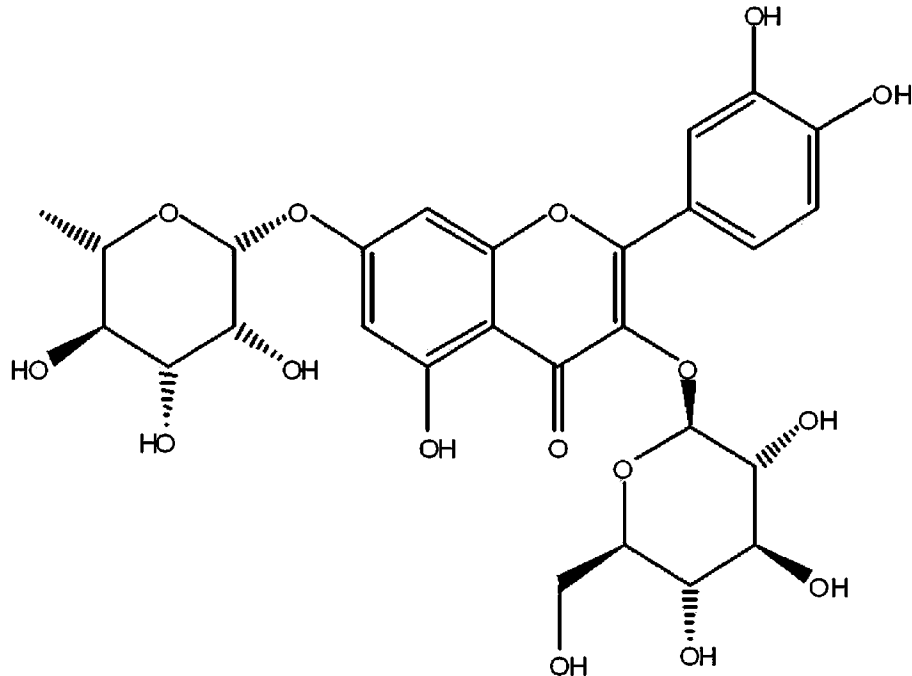
- [27] 또한, 본 발명의 화합물은 단백질이 아닌 저분자 화합물이기 때문에, 기존의 의약품으로 사용되는 단백질의 중화항체보다 의약산업에 이용성이 크다는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1은 본 발명에 따른 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 분자량측정 스펙트럼이다.
- [29] 도 2는 본 발명에 따른 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 수소핵자기공명 스펙트럼(DMSO *d*-6, 300MHz)을 나타낸 것이다.
- [30] 도 3은 본 발명에 따른 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 탄소핵자기공명 스펙트럼(DMSO *d*-6, 75MHz)을 나타낸 것이다.
- [31] 도 4는 본 발명에 따른 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 DEPT 스펙트럼(DMSO *d*-6, 75MHz)을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [32] 하나의 양태로서, 본 발명은 산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, IL-6에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [33] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물을 포함하는 IL-6에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [34] 본 발명의 상기 산자나무 추출물은 바람직하게 산자나무 열매 또는 잎의 추출물일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [35] 본 발명에서, 상기 산자나무 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올과 같은 C₁ 내지 C₄의 저급알콜 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 산자나무 추출물은 에탄올로 추출한 것이며, 가장 바람직하게는 상기 산자나무 추출물은 10 내지 100% 에탄올 추출물이다. 또한, 본 발명의 상기 추출물은 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물 및 이들 조정제물 또는 정제물 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [36] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, IL-6에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [37] 화학식 1



- [38] 또다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드(queracetin 3-O-glucoside-7-rhamniside)를 유효성분으로 포함하는 IL-6에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [39] 본 발명의 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드 화합물은 산자나무로부터 추출, 분리, 정제하여 얻는 것이 바람직하지만, 이에 제한되지는 않는다. 즉, 상기 화합물은 다른 원료로부터 추출, 분리, 정제하여 얻을 수도 있으며, 공지의 합성방법으로 제조될 수도 있고, 시판되는 시약으로도 사용할 수 있다.
- [40] 한편, 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서, 산자나무로부터 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 분리, 정제하는 방법을 제공한다. 분리, 정제하는 방법은 구체적으로 다음과 같다.
- [41] 우선, 산자나무로부터 에탄올 추출물을 제조하고, 감압농축하여 분획물을 수득한다. 그리고 상기 분획물에 대해 메탄올을 용매로 사용하여 크로마토그래피를 수행함으로써 IL-6 신호전달체계 저해활성을 갖는 활성분획을 수득한다. 마지막으로 상기 활성분획을 고속액체크로마토그래피로 분리하여 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 얻는다.
- [42] 본 발명의 상기 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드는 IL-6 신호전달체계를 저해하였다. 따라서, IL-6에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료하는데 효과가 있다.
- [43] IL-6는 대표적인 염증성 질환, 자가 면역질환 및 암세포에서도 중요하게 관여하는 사이토카인으로 여러 장기에서 다양한 기능을 수행한다. IL-6는 많은 세포 종류에서 발현됨이 알려져 있으며, 대표적으로 면역반응, 염증, 조혈과정, 세포의 증식 및 분화 등 다양한 생물학적 기능에 관련되어 있다.

- [44] 본 발명에서 “IL-6에 의해 매개되는 질환”은 염증성질환, 자가면역질환 및 암일 수 있으며, 구체적으로는 천식, 건선, 아토피, 골다공증, 루푸스, 크론씨병, 혈관협착, 암전이, 이식거부, 관절염, 알츠하이머, 골수종, 유방암종, 전립선암, 뇌종양, 두경부암종, 흑색종, 백혈병, 다발성 골수종 중 어느 하나 이상일 수 있다. 그러나 이에 한정하는 것은 아니고, 통상적으로 주지된 염증성질환, 자가면역질환 또는 암에 관련된 질환들도 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.
- [45] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 포함하는, 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [46] 또다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 라이노바이러스 감염성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.
- [47] 본 발명의 상기 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드는 특히 라이노바이러스의 증식을 억제할 수 있을 뿐만 아니라, IL-6 신호전달체계 저해에 의해 라이노바이러스 감염성 질환의 악화를 억제할 수 있다.
- [48] 본 발명에서 “라이노바이러스 감염성 질환”은 라이노바이러스에 의한 감염성 질환을 포함한다. 상기 질환은 일반 감기(common cold), 천식, 만성기관지염 등의 급성 호흡질환, 폐렴, 축농증, 중이염을 포함하며, 감기의 증상은 코막힘, 콧물, 재채기, 기침, 인후통, 오한, 두통, 권태감 등의 증상 중 하나 또는 그 이상을 포함한다.
- [49] 본 발명에서 “질환의 예방 또는 치료”란, 상기 질환의 예방, 완전한 또는 부분적인 치료를 포함한다. 이는 또한 증상의 감소, 증상의 개선, 증상의 고통 경감, 질환의 발생을 감소를 포함한다.
- [50] 본 발명의 구체적인 실시예에서 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드는 IL-6 반응성 STAT3 리포터 유전자 분석 결과, 각 농도에서 농도 의존적으로 IL-6 매개성 리포터 유전자 발현을 저해하였으며, 50% 저해하는 농도는 43.37 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.
- [51] 본 발명의 구체적인 실시예에서 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드는 비교 세포 성장률(%)(수학식 1)과 바이러스에 대한 증식억제능(%)(수학식 2) 계산 결과, 비교약제로 사용한 제니스틴(Genistin)과 리바비린(Ribavirin)보다 산자나무 추출물에서 25배 이상, 순수 분리된 활성물질 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드는 180배 이상의 바이러스 증식 억제능이 나타났다.
- [52] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 투여한 동물에서는 주목할 만한 임상증상이 나타나거나 폐사된 동물은 관찰되지 않았다. 또한, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.
- [53] 본 발명의 상기 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를

포함하는 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.

- [54] 본 발명의 상기 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 투여할 때, 유효용량은 일반적으로 성인환자 체중 1kg 당 1 내지 100mg/일이고, 바람직하게는 5 내지 20mg/일이다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 성별, 연령, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 약제혼합 및 질환의 중증도에 따라 적절하게 변화될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [55] 본 발명에서, 상기 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 통상의 방법에 의해 제조되는 모든 염, 수화물 및 용매화물이 포함된다.
- [56] 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매(예를 들어, 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴)를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(예를 들어, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.
- [57] 이때, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있는데, 무기산으로는 염산, 브롬산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산(citric acid), 초산, 젖산, 주석산(tartaric acid), 말레인산, 푸마르산(fumaric acid), 포름산, 프로피온산(propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 갈록투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.
- [58] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예를 들어, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [59] 본 발명에 따른 약제 조성물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 및 부형제를 사용하여 조제한다.
- [60] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 트로키제(troches), 로렌지(lozenge), 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭실제(elixirs) 등이 포함된다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는

젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제; 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유된다. 캡슐 제형의 경우, 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유한다.

- [61] 또한, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내주사 주입방식일 수 있다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서, 상기 화학식 1의 화합물을 안정제, 완충제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제 등을 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플이나 바이알의 단위 투여형으로 제제한다. 비수성용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [62] 본 발명의 상기 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 포함하는 조성물은 식품 조성물일 수 있다.
- [63] 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분은 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드(예를 들어, 포도당, 과당 등), 디사카라이드(예를 들어, 말토스, 슈크로스, 올리고당 등) 및 폴리사카라이드(예를 들어, 덱스트린, 사이클로덱스트린 등)와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제(예를 들어, 타우마틴, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등과 같은 스테비아 추출물) 및 합성 향미제(예를 들어, 사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [64] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [65] 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [66] 이하, 본 발명은 다음 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는바, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [67]

- [68] 실시예 1 : 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 분리 및 정제
- [69] 건조시킨 산자나무 열매 1kg에 100% 에탄올 4L를 가하고, 빛이 차단된 실온에서 72시간 동안 추출하여 에탄올 추출물을 제조한 후, 이를 감압농축하여 분획물을 수득하였다. 실제로 동물실험을 하기 위한 활성물질을 추출할 때에는 95% 주정을 이용하여 서늘하고 어두운 장소에서 72시간 동안 추출한 후, 감압농축하여 실험에 사용하였다.
- [70] 순수한 활성물질을 분리하기 위하여, 상기 농축된 분획물을 메탄올에 용해시킨 후, 세파덱스 LH-20(sephadex LH-20)에 메탄올을 용매로 사용하여 크로마토그래피를 수행하였다. 그런 다음 IL-6 신호전달체계를 저해하는 활성을 갖는 활성분획을 모아 감압농축하였다.
- [71] 상기 활성분획을 물-메탄올(40% 메탄올) 용출용매를 이용하여 고속 액체 크로마토그래피(컬럼: C18, 유속: 1.5ml/분, 220nm 검출)를 수행하였다. 이때, 유지시간 17분대에 활성분획을 분리하고, 감압건조하여 화학식 1로 표시되는 화합물 998mg을 얻었다.
- [72]
- [73] 실시예 2 : 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 이화학적 특성 분석
- [74] 상기 실시예 1에서 순수하게 분리, 정제된 화합물의 이화학적인 특성을 분석하였다. 상기 화합물의 분자량을 측정하기 위하여 ESI-MS(electrospray ionization mass spectrometry, Fisons VG Quattro 400 mass spectrometer, USA)를 이용하였으며, 구조를 규명하기 위하여 핵자기공명(NMR) 방법을 이용하였다.
- [75] 상기 화합물에 대하여 물질의 성상, 분자량, 분자식 및 질량을 분석한 결과, 본 발명에 따른 화합물의 이화학적인 특성으로 성상은 용기에 박막형태로 붙어있고, 화합물의 질량분석치(M+H)⁺는 611m/z로 측정되었으며, (M+Na)⁺는 633m/z로 측정되어 화학식 1로 표시되는 화합물의 분자량은 610으로 확인되었으며, 분자식은 C₂₇H₃₀O₁₆로 추정되었다(도 1).
- [76] 상기 화합물을 DMSO *d*-6에 녹여 5mm의 NMR 튜브 내에 넣고, 수소 및 탄소 핵자기공명을 측정하였다. 각 용매의 피이크를 내부 표준물질로 하거나 TMS(tetramethylsilane)의 피이크를 기준으로 하여 측정하였다.
- [77] 수소 핵자기공명 스펙트럼(도 2), 탄소 핵자기공명 스펙트럼(도 3), DEPT 스펙트럼(도 4)을 분석하여 상기 화합물의 구조를 조사한 결과, 상기 화합물은 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드(Romani A. et al 2000, *J. Agric Food. Chem* 48(9) 4091-4096에서 규명)와 일치하였다.
- [78]
- [79] 실시예 3 : 산자나무 추출물 및 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 IL-6 저해활성 검증
- [80] pSTAT3-TA-Luc 플라스미드(Clontech, Palo Alto, CA)를 주형으로 사용하였다. 올리고뉴클레오티드 [AGAGGGTAACGGTACCGTGCTTCCCGAA CGTTGCTTCC (Kpn I 사이트 함유): 서열번호 1]와 올리고뉴클레오티드

[GTACGCAAGG CTCGAGCTACGTTCGGGAAGCAACGTTC (Xho I 사이트 함유): 서열번호 2]를 각각 정방향 프라이머(forward primer)와 역방향 프라이머(reverse primer)로 사용하여, STAT3 DNA 바인딩 시퀀스를 써모사이클러(thermocycler)로 증폭하였다.

[81] 증폭한 PCR 생성물을 클로닝하고, 분리한 다음 pSTAT3-TA-Luc 플라스미드의 Kpn I/Xho I 사이트에 삽입하였다. 그리고 적어도 8개의 STAT3 DNA 바인딩 시퀀스 카피를 포함하여 pSTAT-3-TA-Luc보다 향상된 STAT3 리포터 유전자 분석(reporter gene assay)을 가능하게 하는 pSTAT3-TA-Luc6 컨스트럭트(construct)를 제조하였다.

[82] IL-6 반응성 STAT3 리포터 유전자 분석은 HepG2 세포(ATCC;HB-8065)에 10% FBS(Foetal Bovine Serum)(v/v), 카나마이신 설페이트(kanamycin sulfate) 60.0mg/l 및 탄산수소나트륨(NaHCO_3) 2.0g/l가 포함된 DMEM 배양액을 사용하여, 37°C에서 5% CO_2 의 조건으로 배양하였다. 96웰 플레이트에 5×10^4 셀/웰로 HepG2 세포를 분주하여 80% 융합되도록 키웠다. 이후 무혈청 배지 $50 \mu\text{l}$ 로 교환하고, 0.1 μg pSTAT3-TA-Luc6 컨스트럭트와 0.3 μl 리포펙타민(lipofectamin reagent)의 혼합액을 각 웰에 첨가하여 3시간 반응시킴으로써 pSTAT3-TA-Luc6 컨스트럭트를 트랜스펙션(분리된 핵산의 세포에의 감염)시켰다.

[83] 이후, 배지를 깨끗한 배양배지 $200 \mu\text{l}$ 로 바꾸어 24시간 배양하여 일시적인 트랜스펙션을 마무리하였다. 트랜스펙션된 세포를 1% BSA/DMEM으로 영양이 부족한 상태에서 배양(serum starvation)하고, 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 1시간 처리한 후 IL-6를 첨가하여 3시간 배양하였다. PBS로 씻어내고, 라이시스 버퍼(promega luciferase assay system) $50 \mu\text{l}$ 를 넣고, 1분간 교반해주었다. 그리고 여기에 30 내지 $100 \mu\text{l}$ 의 루시페라아제 물질(promega luciferase assay system)을 넣고 루미노미터(luminometer)로 5분 안에 측정하였다.

[84] 하기 표 1에 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 각기 다른 농도(100, 30, 10, 3 또는 $1 \mu\text{g/ml}$)에 대해 IL-6 매개성 루시페라아제가 저해되는 정도를 나타내었다.

[85] 표 1

시험물질	농도($\mu\text{g/ml}$)	평균(RLU)	$\pm$	표준편차(stdv)	억제률(%)
퀘세틴 3-글루코사이드-7- 람노사이드	100	13922.12		26.9	56.37
	30	19528.98		993.5	35.56
	10	22723.56		1133.5	23.71
	3	25679.02		284.3	12.75
	1	29048.29		1830.0	0.24

- [86] 상기 표 1을 통해 확인할 수 있듯이, 실시예 1에서 수득한 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 처리한 경우, 상기 화합물은 각 농도에서 농도의존적으로 IL-6 매개성 루시페라아제를 저해하였으며, 계산에 의하면 50% 저해하는 상기 화합물의 농도는 $43.37\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다.
- [87]
- [88] 실시예 4 : 산자나무 추출물 및 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 바이러스 증식 억제능 평가
- [89] 상기 실시예 1에서 얻은 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드에 대한 바이러스 증식억제능을 측정하기 위해 라이노바이러스(rhinovirus)를 사용하였다.
- [90] 라이노바이러스를 HeLa 세포에 감염시켜 증식배양시켰는데, HeLa 세포는 소아태아혈청이 10% 포함된 MEM medium 배지를 사용하여, 37°C 배양기에서 배양하였다. 그리고 바이러스 증식배양 및 항바이러스능 측정에 사용된 배지는 1% 혈청에 20mM의 MgCl_2 가 포함된 배양배지를 사용하였다.
- [91] HeLa 세포 2×10^4 개를 96웰 플레이트의 각 웰에 넣고 24시간 배양하였다. 24시간 후에 각 웰의 배양 상등액을 제거하고, TCID_{50} 으로 적정된 라이노바이러스 감염용액을 각 웰에 첨가하였다.
- [92] 그런 다음, 각각 최종농도가 100, 10, 1 또는 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 각 웰에 시험물질을 투여하였다. 각 시료에 대한 바이러스 증식 억제능은 48시간 후에 살아있는 세포를 SRB 분석법(Choi 등, 2009)으로 측정하였다. 각 웰에 70% 아세톤을 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후, 1시간 동안 -20°C 에 방치하고 증류수로 수회 세척하였다. 실온에서 건조시킨 후, 1%(v/v) 아세트산에 녹인 0.4%(w/v) SRB(sulforhodamine B) 용액 $100\mu\text{l}$ 를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 세포와 결합하지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) 아세트산으로 수회 세척한 다음 다시 건조시켰다. 10mM 트리스 용액(pH 10.5) $100\mu\text{l}$ 를 각 웰에 가하여 세포와 결합되어 있는 염색제를 충분히 녹인 후 562nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [93] 각 처리군은 바이러스를 처리하지 않은 군(A), 시험물질만 처리한 군(B), 바이러스만 처리한 군(C), 바이러스와 시험물질을 같이 처리한 군(D)으로 표기하였으며, 각각의 시료에 대한 비교 세포 성장률(%)(수학식 1)과 바이러스에 대한 증식억제능(%)(수학식 2)을 계산하였다. 이때, 시험물질로는 산자나무 에탄올 추출물, 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드, 퀘세틴, 루틴, 퀘세틴 3-람노사이드, 퀘세틴 3-글루코사이드, 제니스틴, 리바비린을 사용하였다.
- [94] 동일한 조건에서 수행한 세번의 실험결과 수치에 대한 평균과 표준편차로 계산한 값을 제시하였다. 시험물질의 세포독성능은 100, 10, 1 또는 $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 시험물질을 가하지 않은 웰의 세포와 비교하였다.
- [95]
- [96] 수학식 1

$$\text{세포 생존율}(\%) = \frac{A}{B} \times 100$$

[97] 수학적식 2

$$\text{바이러스 증식 억제능}(\%) = \frac{B - C}{D - C} \times 100$$

[98] 하기 표 2에 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 바이러스 증식 억제능(HeLa 세포주 내의 HRV3 바이러스)에 관한 실험결과를 나타내었다.

[99]

[100] 표 2

시험물질	CC ₅₀ ^a	IC ₅₀ ^b	TI ^c
산자나무 에탄올 추출물	>100	3.35±3.08	>29.85
퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드	>100	0.53±0.12	>188.68
퀘세틴	>100	N.D. ^d	-
루틴	>100	N.D. ^d	-
퀘세틴 3-람노사이드	>100	N.D. ^d	-
퀘세틴 3-글루코사이드	>100	N.D. ^d	-
제니스틴	>100	91.55±0.88	>1.09
리바비린	>100	86.34±4.09	>1.16

[101] [주] IC₅₀ 결과는 독립적인 실험으로 세번 반복하여 얻은 평균치임.

[102] a : HeLa 세포를 50% 줄이는 시료의 농도(/ml)임.

[103] b : 세포 병변을 50% 줄이는 시료의 농도(CPE)(/ml)임.

[104] c : 항 바이러스능 = CC₅₀ / IC₅₀ 임.

[105] d : 50% 이하의 최대 억제율로 인하여 본 실험에 대한 상기 시험물질의 농도 내에서 IC₅₀ 값이 측정되지 않음을 의미함.

[106]

[107] 상기 표 2를 통해 확인할 수 있듯이, 실시예 1에서 수득한 산자나무 추출물과 이로부터 분리,정제된 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드에 의한 바이러스 증식 억제능을 측정하기 위하여 라이노바이러스를 HeLa 세포에 감염시켜서 증식 배양하는 중에 시료를 농도별로 처리하여 바이러스 증식 억제능을 측정한 결과, 비교약제로 사용한 제니스틴(Genistin)과 리바비린(Ribavirin)보다 산자나무 추출물에서 25배 이상, 순수 분리된 활성물질 퀘세틴

3-글루코사이드-7-람노사이드는 180배 이상의 바이러스 증식 억제능이 나타났다.

[108]

[109] 실시예 5 : 산자나무 추출물 및 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 실험용 생쥐에 대한 경구투여 급성독성 시험

[110] 본 시험에 사용된 SD계 랫트(rat)는 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 조명시간 12시간(오전 6시~오후 6시), 환기횟수 10~20회/시간 및 조도 $150\sim 300$ 룩스(Lux)로 설정된 한국생명공학연구원 실험동물동에서 사육되었다. 시험 실시자들은 모두 고압증기멸균(121°C , 20분)된 작업복, 두건, 마스크 및 장갑 등을 착용하고 작업하였다.

[111] 랫트는 순화, 검역기간 동안에는 폴리카보네이트제 구두통형 사육상자($260\text{W}\times 410\text{L}\times 200\text{Hmm}$)에 수용되었으며, 투여 및 관찰기간 중에는 와이어사육상자($205\text{W}\times 350\text{L}\times 175\text{Hmm}$)에 한마리씩 수용되었다. 시험기간 중 사육상자는 시험번호 및 동물번호를 기입한 라벨지를 붙여 식별하였다.

[112] 6주령의 특정병원성부재(SPF) SD계 랫트를 군당 다섯마리로 나누어, 본 발명의 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 0.5% 메틸셀룰로오즈 용액에 현탁하여 10mg/kg의 용량으로 단회 경구투여 하였다. 투여 후, 동물의 폐사여부, 임상증상, 체중변화를 관찰하였고, 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 실시하였으며, 부검하여 육안으로 복강장기와 흉강장기의 이상여부를 관찰하였다.

[113] 그 결과, 본 발명의 산자나무 추출물 또는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 투여한 동물에서는 주목할 만한 임상증상이 나타나거나 폐사된 동물은 관찰되지 않았다. 또한, 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

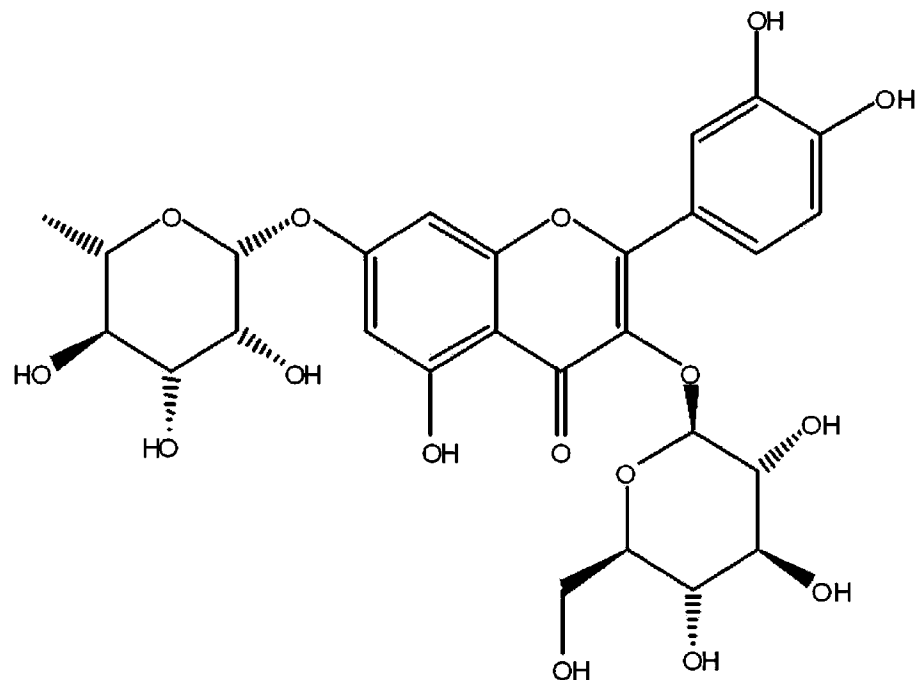
[114] 투여한 상기 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드 화합물은 랫트에서 10mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구 투여 최소 치사량(LD_{50})은 10mg/kg 이상으로 판단되었다.

[115] 본 발명은 이상에서 살펴본 바와 같이 바람직한 실시예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능할 것이다.

[116]

청구범위

- [청구항 1] 산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, IL-6에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 IL-6에 의해 매개되는 질환은 염증성질환, 자가면역질환 또는 암인 방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 IL-6에 의해 매개되는 질환은 천식, 건선, 아토피, 골다공증, 루푸스, 크론씨병, 혈관협착, 암전이, 이식거부, 관절염, 알츠하이머, 골수종, 유방암종, 전립선암, 뇌종양, 두경부암종, 흑색종, 백혈병, 다발성 골수종 중 어느 하나 이상인 방법.
- [청구항 4] 하기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, IL-6에 의해 매개되는 질환을 치료하는 방법.
- [화학식 1]



- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드는 산자나무로부터 분리된 것인 방법.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서, 상기 IL-6에 의해 매개되는 질환은 염증성질환, 자가면역질환 또는 암인 방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 IL-6에 의해 매개되는 질환은 천식, 건선, 아토피, 골다공증, 루푸스, 크론씨병, 혈관협착, 암전이, 이식거부, 관절염, 알츠하이머, 골수종, 유방암종, 전립선암, 뇌종양,

두경부암종, 흑색종, 백혈병, 다발성 골수종 중 어느 하나 이상인 방법.

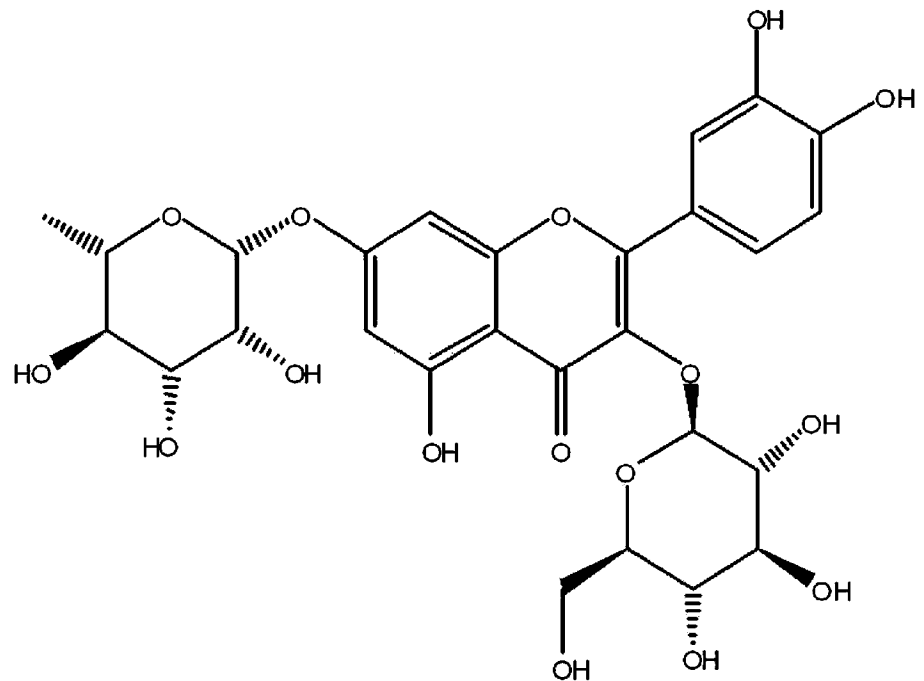
[청구항 8]

산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 라이노바이러스 감염성 질환을 치료하는 방법.

[청구항 9]

하기 화학식 1로 표시되는 케세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드의 치료학적으로 유효한 양을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 라이노바이러스 감염성 질환을 치료하는 방법.

[화학식 1]



[청구항 10]

산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물을 포함하는 IL-6에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

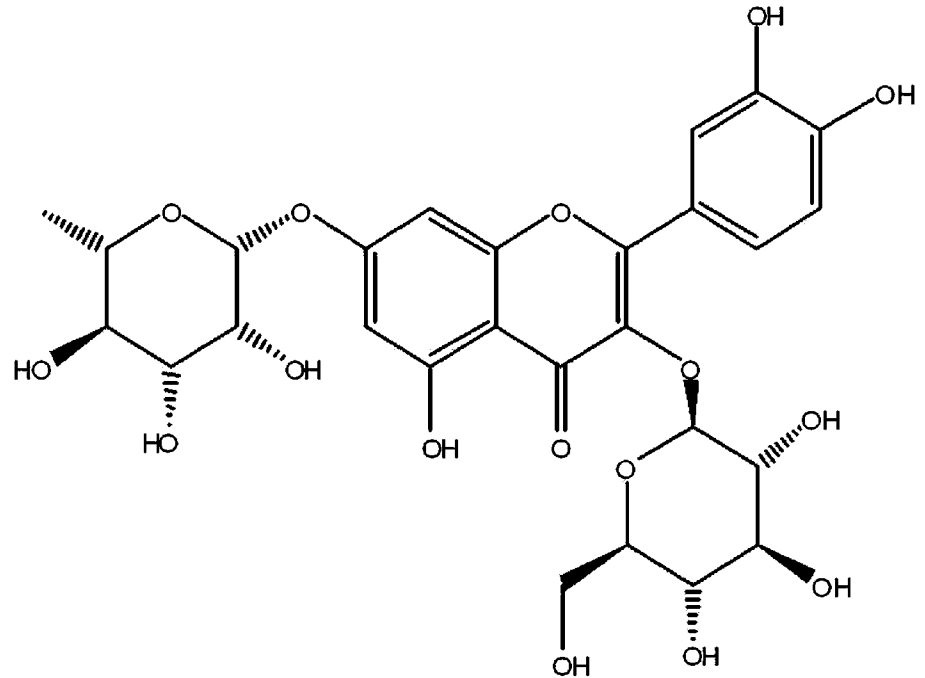
[청구항 11]

제10항에 있어서, 상기 추출물은 에탄올 추출물인 조성물.

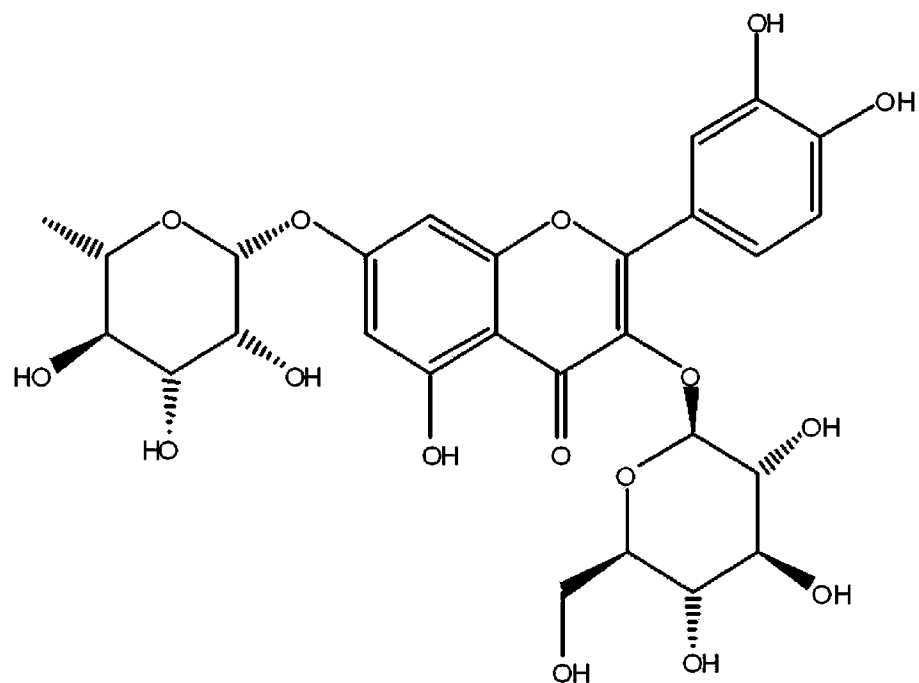
[청구항 12]

하기 화학식 1로 표시되는 케세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 유효성분으로 포함하는 IL-6에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



- [청구항 13] 제 12항에 있어서, 상기 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드는 산자나무(*Hippophae rhamnoides*)로부터 분리된 것인 조성물.
- [청구항 14] 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-6에 의해 매개되는 질환은 염증성질환, 자가면역질환 또는 암인 조성물.
- [청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 IL-6에 의해 매개되는 질환은 천식, 건선, 아토피, 골다공증, 루푸스, 크론씨병, 혈관협착, 암전이, 이식거부, 관절염, 알츠하이머, 골수종, 유방암종, 전립선암, 뇌종양, 두경부암종, 흑색종, 백혈병, 다발성 골수종 중 어느 하나 이상인 조성물.
- [청구항 16] 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 식품용인 조성물.
- [청구항 17] 산자나무(*Hippophae rhamnoides*) 추출물을 포함하는 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 추출물은 에탄올 추출물인 조성물.
- [청구항 19] 하기 화학식 1로 표시되는 퀘세틴 3-글루코사이드-7-람노사이드를 유효성분으로 포함하는 라이노바이러스 감염성 질환의 예방 또는 치료를 위한 조성물.
- [화학식 1]



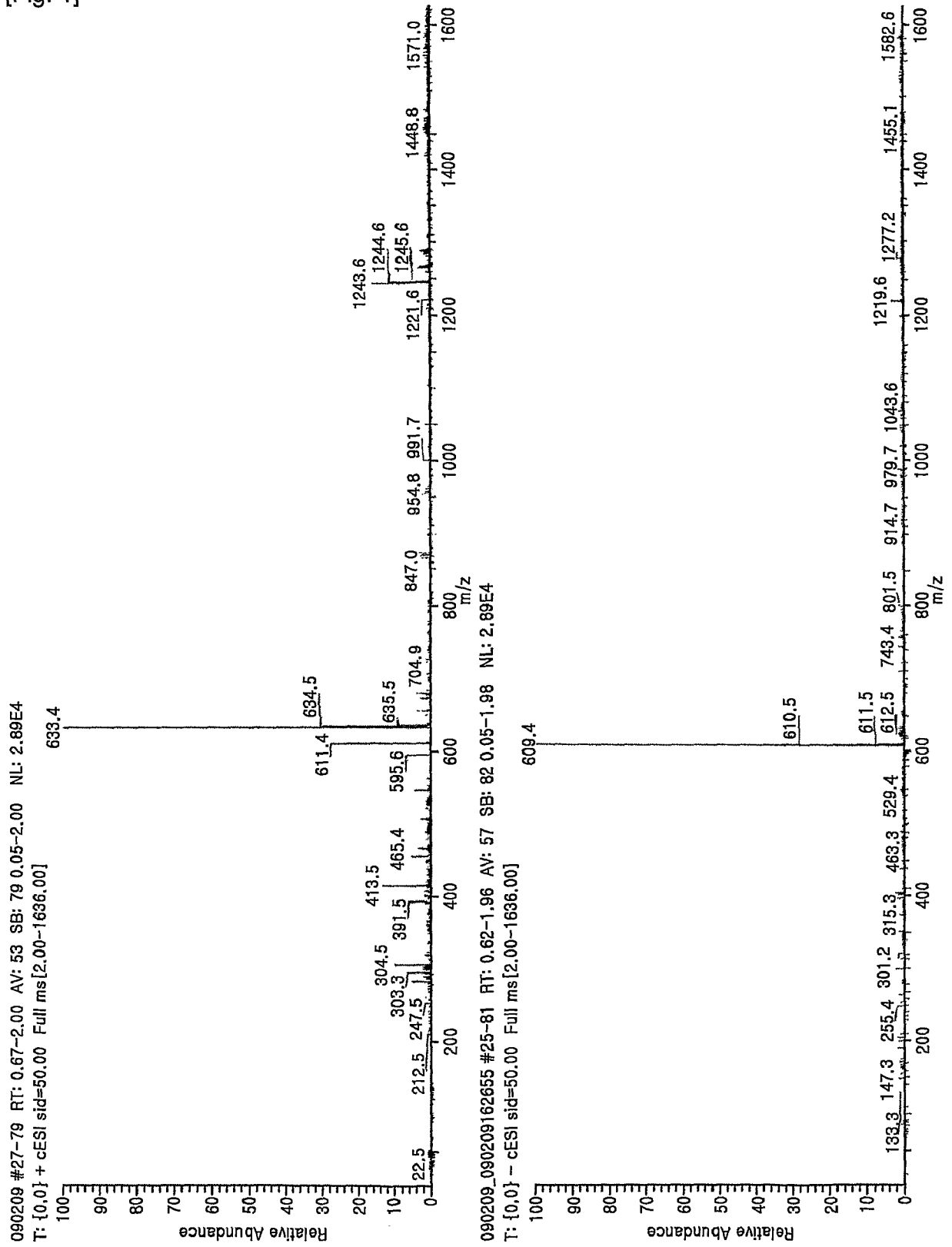
[청구항 20]

제 19항에 있어서, 상기 케세틴 3-글루코사이드-7-갈락토사이드는 산자나무로부터 분리된 것인 조성물.

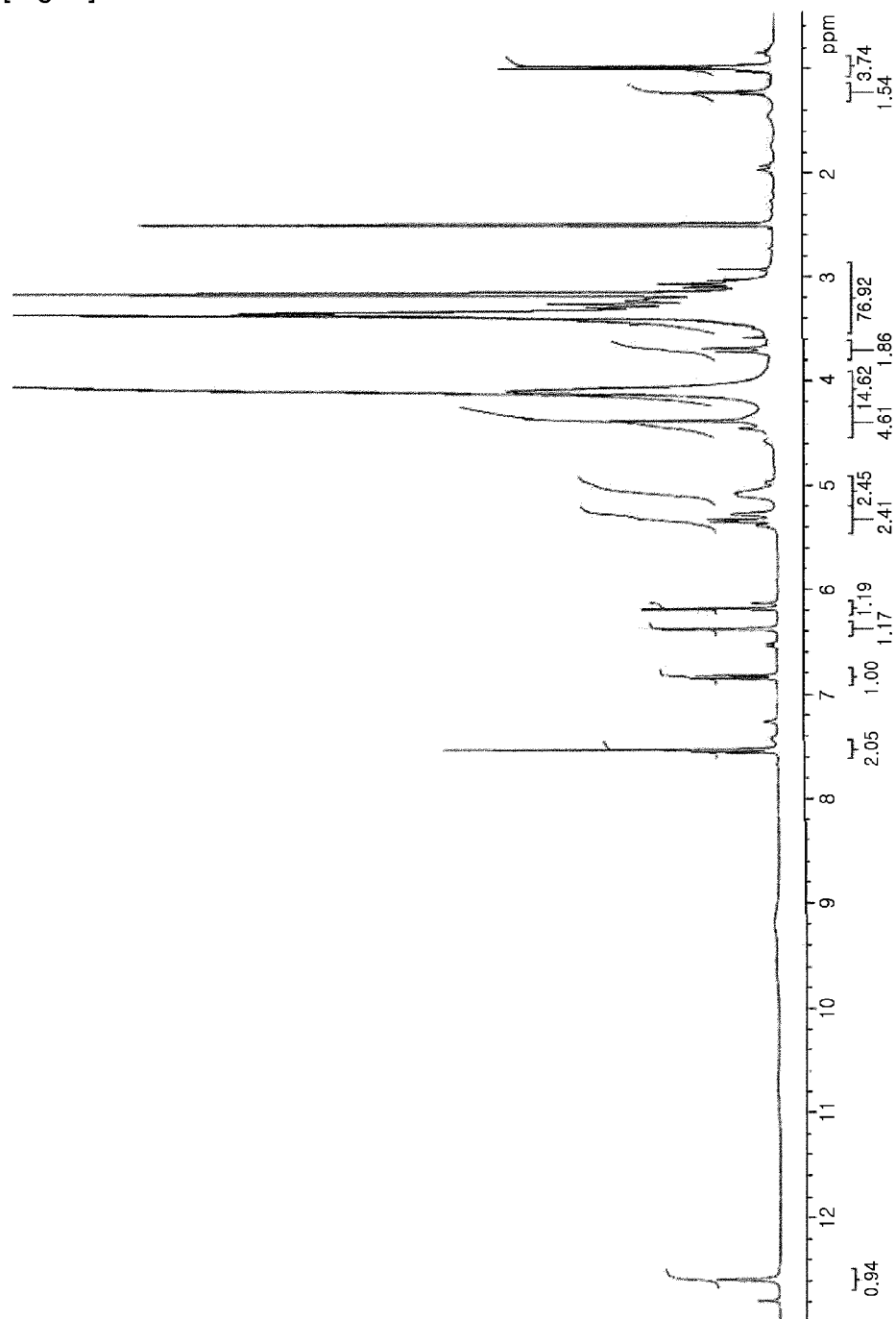
[청구항 21]

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 식품용인 조성물.

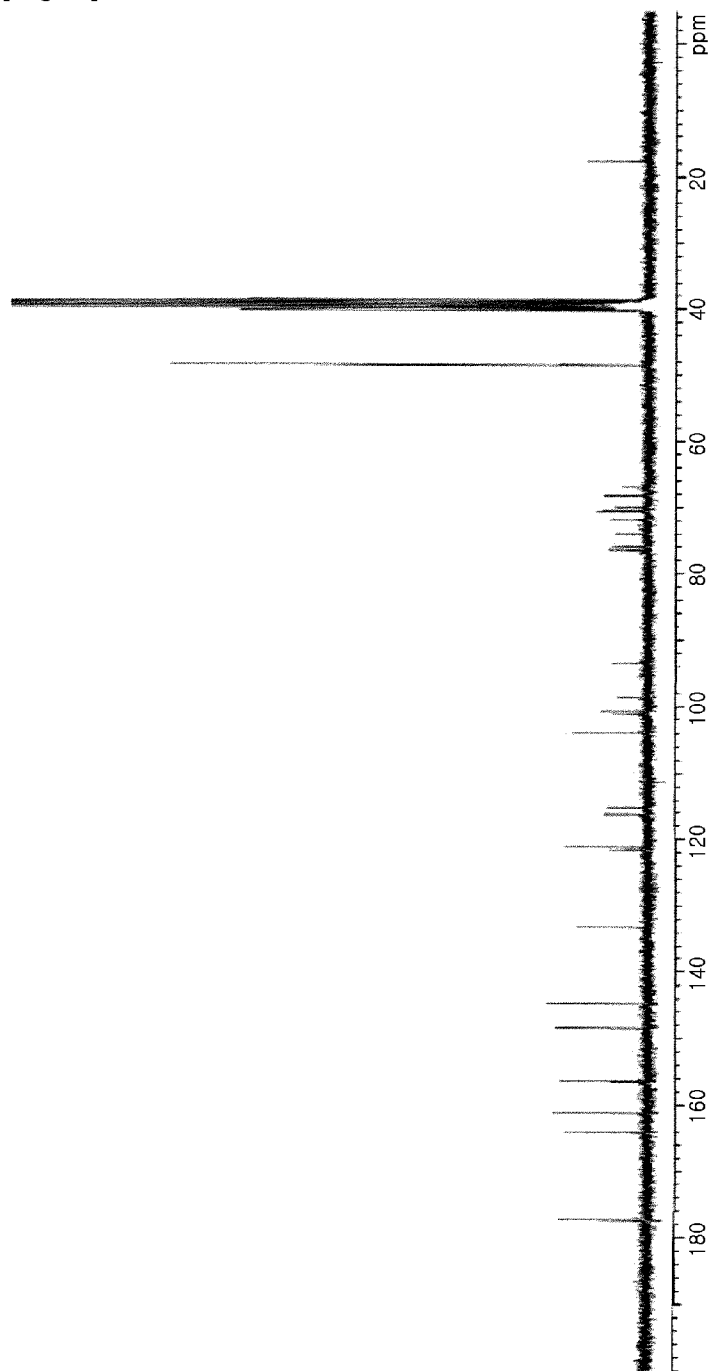
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

