(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0076247
(43) 공개일자 2012년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/37 (2006.01) *A61K 31/366* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0138318
(22) 출원일자 2010년12월29일
심사청구일자 2010년12월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
송문정
서울특별시 성북구 종암로25길 30, 삼성래미안아파트 101동 1402호 (종암동)
한진아
경기도 시흥시 은행로149번길 3, 성원아파트 102동 504호 (은행동)
이동호
서울특별시 성북구 정릉1동 1020번지 우성아파트 105-802
(74) 대리인
김선애

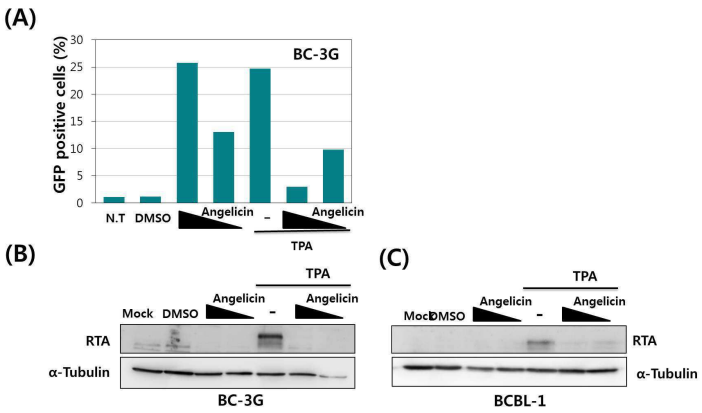
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **안젤리신을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 안젤리신(angelicin) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물을 제공한다. 상술한 본 발명에 의하면 감마허피스바이러스 등 허피스바이러스에 의한 질환 내지 질병을 약물독성 또는 약물내성 없이 효율적으로 치료 또는 예방할 수 있는 이점이 있다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

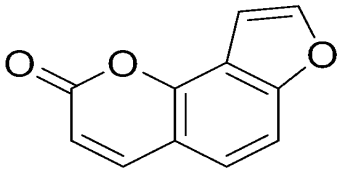
과제고유번호	A09102109010000100
부처명	보건복지부(구 한국보건산업진흥원)
연구사업명	보건의료기술개발사업
연구과제명	허피스바이러스감염 종양세포의 재활성 유도물질 작용점 연구
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2009.05.01 ~ 2010.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	A09102110020000100
부처명	보건복지부(구 한국보건산업진흥원)
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	허피스바이러스감염 종양세포의 재활성 유도물질 작용점 연구
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1로 표시되는 안젤리신(angelicin) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

(화학식 1)



angelicin

Chemical Formula: $C_{11}H_6O_3$
Exact Mass: 186.0317
Molecular Weight: 186.1635

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 안젤리신은 보골지(*Psoralea corylifolia*)에서 유래된 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 감마허피스바이러스에 항바이러스 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 감마허피스바이러스는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr Virus, EBV) 또는 카포시육종 허피스바이러스(Kaposi's sarcoma associated virus, KSHV)인 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 알파허피스바이러스에 항바이러스 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 베타허피스바이러스에 항바이러스 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 전염성단핵구증, 버킷림프종, 코인두암종, B림프종양, 위암, 카포시육종 및 B림프종양으로 이루어진 그룹에서 선택되는 질환에 치료효과가 있는 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 안젤리신은 15 ~ 120 ㎍/㎖의 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 안젤리신을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 감마허피스바이러스 등 허피스바이러스에 의한 질환 내지 질병을 효율적으로 치료 또는 예방할 수 있는 안젤리신을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체 허피스바이러스 대부분은 국내 70-80% 이상의 높은 감염률을 나타내며, 한 번 감염되면 잠복감염을 형성하고, 숙주에서 잠복감염과 재활성을 반복하여 평생 동안 감염성 유지하는 대표적인 만성바이러스이다(표 1. 인체 만성바이러스의 특징 참조).

표 1

[0003]

인체허피스바이러스		종류	잠복감염	주요 질병
HHV-1	Herpes simplex virus-1	알파	신경계	단순포진, 뇌염
HHV-2	Herpes simplex virus-2	알파	신경계	생식기 포진 (STD), 뇌염
HHV-3	Varicells-Zoster virus	알파	신경계	수두, 대상포진
HHV-4	Epstein-Barr virus	감마	B림프계	전염성단핵구증, 버킷림프종, 코인두암종, B림프종양, 위암
HHV-5	Human cytomegalovirus	베타	림프계	전염성단핵구증, 선천기형, 망막염, 실명
HHV-6	Human herpesvirus-6	베타	T림프계	돌발진, 뇌수막염, 전염성 단핵구증, 전격성 간염, 비전형적 림프구증식증
HHV-7	Human herpesvirus-7	베타	T림프계	
HHV-8	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	감마	B림프계	카포시육종, B림프종양

[0004] 허피스바이러스들은 대표적인 기회감염 (opportunistic infection)으로서 면역기능 저하에 따른 재활성이나 선천감염을 통해 다양한 질병을 유발하고 환자의 면역상태에 따라 치명적인 감염 예후를 나타낸다. VZV(Varicells-Zoster virus)의 예방 생백신을 제외한 나머지 7종의 인체 허피스바이러스에 대해서는 예방 백신이나 치료 백신 모두 없는 실정이다.

[0005] 장기이식 (organ transplant) 및 조혈모세포 이식 (Hematopoietic Stem Cell Transplant)의 증가, 인체면역결핍바이러스 (HIV-1) 감염 등, 면역 저하에 따른 재활성 허피스바이러스 감염제어가 중요한 이슈가 되고 있다.

[0006] 또한, 허피스바이러스의 지속감염으로 인한 노년층 인구의 면역 저하(리뷰 논문: Koch et al, Cytomegalovirus infection: a driving force in human T cell immunosenescence, Ann N Y Acad Sci. 2007 1114:23-35)는 최고속으로 고령화 사회에 진입하고 있는 우리나라 실정에서 중요한 보건 사회적 부담으로 작용할 것이다.

[0007] 한편, 허피스바이러스 가운데 감마허피스바이러스는 림프세포에 잠복 감염되어 종양을 일으킬 수 있으며, 상피세포나 섬유세포에서는 용해성 감염(lytic infection)을 일으키는 것으로 알려져 있다. 감마허피스바이러스에는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr Virus, 이하, 'EBV'라고 함)와 카포시육종 허피스바이러스(Kaposi's sarcoma associated virus, 이하, 'KSHV'라고 함)가 있다.

[0008] 통상 허피스바이러스는 높은 감염률을 특징으로 하는데, 특히 EBV의 경우 우리나라를 포함한 전세계 인구의 90 % 이상이 혈청 양성반응을 나타낸다. EBV는 잠복감염에 의한 만성 감염시 코인두암종(nasopharyngeal carcinoma, NPC), 위암종(gastric carcinoma, GC), 버킷림프종 (Burkitt's lymphoma BL), 이식후 B 세포 림프종(post-transplant B cell lymphomas, PTBL), 및 호지킨림프종(Hodgkin's disease, HD) 등 다종의 종양들의 형성과 깊은 연관성이 있다 (Roizman, 2007).

[0009] KSHV는 가장 최근(1994년)에 발견된 인체 감염 허피스바이러스로서, 카포시 육종 (Kaposi's sarcoma, KS)과, B 세포 림프종의 일종인 원발성 삼출성 림프종(primary effusion lymphoma: PEL)이나 다중심성 캐슬만병(multicentric Castleman's disease)의 원인 바이러스이다 (Alkan et al, 1997; Huang et al, 1995,; Liberman et al, 1990; Moore et al, 1994).

[0010] 존재하는 기존 항허피스바이러스제제는 대부분 바이러스 DNA 중합효소 (DNA pol)을 타겟으로 개발되었다. 그 중, 아실클로버(acyclovir) 및 그 유도체는 허피스바이러스의 티미딘 키나아제(thymidine kinase, 이하, 'TK'라고 함)에 의해서 특이적으로 인산화 된 후 DNA pol에 의해 복제되는 바이러스 게놈으로 끼어들어 DNA 조기 종결(premature termination)을 유도하는 약물로, 개발 후 지난 40여 년 동안 가장 많이 사용되었다. 이외에 피로인산 유사체(pyrophosphate analogue)와 같은 포스카르네트(forscarnet) 등의 약물이 상용되고 있다.

[0011] 이들은 알파-허피스바이러스의 치료에는 유효한 반면, 베타나 감마허피스바이러스의 초기감염증 (예: 전염성 단핵구증) 또는 재활성 감염에는 그 임상적인 역가가 제한적이다. 특히, 감마허피스바이러스의 제어에 유용하게 사용될 수 있는 항바이러스제는 존재하지 않아 주로 스테로이드 계열의 약물을 통한 대증요법에 의존하고 있는 실정이다.

[0012] 또한, 최근 장기이식 및 조혈모세포이식, HIV 감염으로 인한 면역결핍환자의 경우 약물의 독성이 심하게 나타나고, 더 중요하게는 이들 환자에게서 약물내성의 돌연변이 출현이 증가하고 있다 (Danve-Szatanek C et al. *Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up.* J Clin Microbiol. 2004 42(1):242-9.; Limaye AP et al. *Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants.* Lancet 2000; 356:645-649; Marfori JE et al. *Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients.* J Clin Virol 2007; 38:120-125).

[0013] 대부분의 약물내성 돌연변이는 TK나 바이러스 DNA pol에 대한 돌연변이로서, 새로운 타겟이나 메카니즘을 가지는 항허피스바이러스제 신약 후보 물질 개발이 매우 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

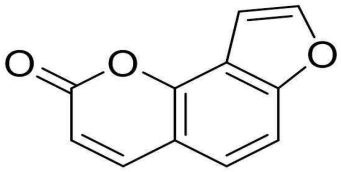
[0014] 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명은 약물독성 및 약물내성이 없는 항허피스바이러스 활성을 갖는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르며, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 안젤리신(angelicin) 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항허피스바이러스용 약학적 조성물을 제공한다.

화학식 1



angelicin

Chemical Formula: $C_{11}H_6O_3$
Exact Mass: 186.0317
Molecular Weight: 186.1635

[0017]

[0018] 본 발명의 약학적 조성물은 HSV-1, HSV-2, VZV의 알파허피스바이러스와 HCMV와 같은 베타허피스바이러스 등과 같은 허피스바이러스의 감염치료에 유용하다. 바람직하게 특별한 항바이러스제가 존재하지 않은 감마허피스바이러스에 유용하고 더욱 바람직하게는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr Virus, EBV) 또는 카포시육종 허피스바이러스(Kaposi's sarcoma associated virus, KSHV)에 유용하다.

[0019] 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명에 의한 조성물은 전염성단핵구증, 버킷림프종, 코인두암종, B림프종양, 위암, 카포시육종 및 B림프종양으로 이루어진 그룹에서 선택되는 질환에 치료효과가 있는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명에 사용된 안젤리신은 상업적으로 정제된 화합물을 구입하거나 합성하여 사용할 수도 있으나, 바람직하게는 상기 화합물을 함유하는 식물 특히 보골지(*Psoralea corylifolia*)의 추출물에서 분리한 것을 사용할 수 있는데, 보골지 추출물로부터의 분리방법은 보골지로부터 안젤리신을 분리할 수 있는 방법이라면 모두 이용할 수 있다. 예를 들어 안젤리신의 극성 또는 비극성 용매 가용 추출물을 증류수 등으로 수회 분획 및 세척하여 정제한 후에 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다(Harborne J .B. et al., Phytochemical methods: A guide to moderntechniques of plant analysis., 3rd Ed., pp 6-7, 1998).

[0021] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 안젤리신은 15 ~ 120 ㎍/㎖의 농도로 함유되어 있는 것이 바람직하다. 상기 범위 내에서는 독성없이 항바이러스 효능을 효과적으로 발휘할 수 있다.

[0022] 상기의 화학식들의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식의 화합물에 존재할 수 있는 히드록시기의 염을 포함하며, 히드록시기의 염으로는 리튬, 나트륨, 칼륨 등의 알카리 금속류염, 마그네슘, 칼슘 등의 알카리 토금속류염을 들 수 있다. 바람직하게는 생리학적으로 허용 가능한 나트륨, 칼륨, 칼슘과의 염 등을 들 수 있으며, 이들 염들은 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명의 안젤리신은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 무독성염 및 용매화물로 제조될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염으로는 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0024] 본 발명의 안젤리신의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 안젤리신에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔설포네이트 (토실레이트) 염이 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0025] 본 발명의 조성물에서, 바람직하게는 조성물 총중량에 대하여 상기 안젤리신을 0.0001 내지 90 중량%로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에서, 바람직하게는 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 주사제,

크림, 젤, 패취, 분무제 또는 연고제 제형 제형을 가질 수 있다. 본 발명의 안젤리신을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0026] 상기 안젤리신을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 제형 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0027] 또한, 상기 안젤리신을 유효성분으로 함유하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 화합물은 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명에 대해 보다 상세하게 설명한다.

[0031] 인체 감마허피스바이러스에 대한 항바이러스제 개발은 잠복감염된 B세포주를 재활성 시킨 뒤 약물에 의한 저해 효과를 웨스턴블럿(western blot)이나 리얼-타임 PCR(real-time PCR)에서 관찰하기 때문에 많은 비용과 시간, 그리고 노동력을 요구하는 시스템에 전적으로 의존하고 있는 현실이다. 이에 편의성과 효율성이 매우 떨어져서 스크리닝 시스템으로는 적절하지 않다.

[0032] 감마허피스바이러스 중 마우스 감마허피스바이러스(MHV-68)는 높은 유전자적 상동성을 갖는 인체 감마허피스바이러스의 동물모델로서 잠복 감염뿐 아니라 활성 감염(lytic replication)을 실험실 세포주에서 용이하게 확인할 수 있다.

[0033] 본 발명자들은 녹색형광단백질(enhanced green fluorescence protein)이 삽입된 리포터바이러스(BC-3G, 특허출원제10-2009-0056926호 참조), MHV-68/EGFP 바이러스의 GFP 발현을 readout으로 삼아 효율적인 항바이러스제 스크리닝 시스템을 확보하고 있다.

[0034] 상기 세포-기반 스크리닝 시스템으로 천연물 유래 단일 화합물들 116 여종을 대상으로 항허피스바이러스 활성을 검색한 결과 안젤리신(angelicin)이 유효하게 바이러스의 증식을 억제하는 결과를 확보하였다.

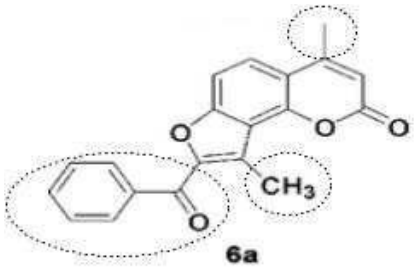
[0035] 상기의 시스템을 활용하여 본 발명자들이 발굴한 안젤리신(angelicin)은 솔라렌(psoralen)의 이성질체(isomer)로서 천연물인 콩과의 '보골지' (*Psoralea corylifolia*)로부터 분리된 단일 화합물이다(화학식 1).

[0036] 안젤리신(angelicin)은 UVA 빛 하에서 유사분열을 방해하고, HIV와 같은 레트로바이러스(retrovirus)의 증식을 억제한다는 보고가 있었으나 그 기전은 알려져 있지 않은 상태이다 (G. Miolo *et al.* 1994). 그 외, 안젤

리신(angelicin)의 생물학적 기능으로는 사람의 적혈구의 γ-globin mRNA의 증식을 촉진시켜 지중해성빈혈 치료에 이용될 수 있다는 보고가 있다(I. Lampronti *et al*. 2009). 또한, 안젤리신(angelicin)의 유도체 6a(화학식 2)는 최근 항인플루엔자 활성을 가지는 것으로 보고되었다 (Yeh et al, 2010)

화학식 2

[0037]



6a

[0038] 그러나, 지금까지 알려진 논문이나 특허에 대한 문헌 조사를 통해서는 안젤리신(angelicin)이 항허피스바이러스 기능을 나타낸다는 보고는 없었기에, 본 발명은 안젤리신(angelicin)의 새로운 항허피스바이러스제로서의 기능을 제시할 뿐 아니라 나아가서는 특정화된 항바이러스제가 존재하지 않는 감마허피스바이러스 감염제어를 위한 새로운 항바이러스 제제를 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0039] 상술한 바와 같이 구성된 본 발명에 따르면, 안젤리신은 천연물 추출물 성분으로서 상대적으로 부작용 및 독성 발현율이 적고 생체 친화적이고 약물내성 없이 허피스바이러스에 의한 질환 또는 질병을 치료할 수 있는 효과가 있다.

[0040] 특히 본 발명은 감마허피스바이러스의 제어에 유용하게 사용될 수 있는 항바이러스제가 존재하지 않은 감마허피스바이러스에 의해 유발되는 다양한 질환 또는 질병을 매우 효율적으로 치료 또는 예방할 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명에 의한 안젤리신은 새로운 개념의 항허피스바이러스 활성을 가진 유용한 물질로서, 활성을 떨어뜨리지 않으면서 독성, 부작용이 있는 항허피스바이러스제의 용량을 의미있게 감량시킬 수 있는 병용투여제로서도 이용될 수도 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 본 발명에 의한 안젤리신 처리에 의한 MHV-68/EGFP 바이러스 복제 제어 결과를 나타내는 도면이다.

도 2는 본 발명에 의한 안젤리신의 마우스감마허피스바이러스에 대한 항바이러스 효능을 검증한 결과를 나타내는 도면이다.

도 3은 본 발명에 의한 안젤리신의 MHV-68/EGFP에 대한 바이러스 유전자 발현 억제를 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 4는 본 발명에 의한 안젤리신의 KSHV에 대한 항바이러스 작용을 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 5는 본 발명에 의한 안젤리신의 EBV에 대한 항바이러스 작용을 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 6은 본 발명에 의한 안젤리신의 BHK-21세포주에 대한 독성 분석 결과를 나타내는 도면이다.

도 7은 본 발명에 의한 안젤리신의 KSHV 감염 세포주(BC-3G,BCBL-1)와 EBV 감염 세포주(B95.8), 비감염세포주(DG75)에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 8은 본 발명에 의한 안젤리신의 항바이러스 작용단계를 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1. 마우스 감마허피스바이러스에 대한 항바이러스 효능을 가지는 천연물 유래 단일화합물 스크리닝: 안젤리신의 발굴**

[0045] 본 발명자들은 본 발명자들의 세포-기반 스크리닝 시스템(BC-3G, 특허 출원제10-2009-0056926호 참조)으로 천연물 유래 단일 화합물들 116 여종을 대상으로 항허피스바이러스 활성을 검색한 결과 안젤리신(angelicin)이 유효하게 바이러스의 증식을 억제하는 결과를 확보하였다.

[0046] 보다 상세하게, 본 발명자들은 천연물에서 분리된 단일화합물 라이브러리를 이용하여 천연물유래 단일화합물이 BHK21 (baby hamster kidney fibroblast cells) 세포주에 감염된 MHV-68/EGFP 바이러스 복제에 미치는 영향을 형광현미경으로 관찰한 EGFP 발현 정도를 기준으로 스크리닝 한 결과 세포독성이 심하지 않으면서 리포터바이러스의 복제를 억제시킨 안젤리신(angelicin)을 발굴하였다.

[0047] 바이러스만 처리한 샘플과 단일화합물의 용매(solvent)인 DMSO만 처리한 샘플을 항바이러스 효과가 없는 음성대조군로 하고, 이미 감마허피스바이러스의 항바이러스제로 증명된 항바이러스제인 간시클로버(ganciclovir, GCV: 20㎍/㎖), DNA 폴리머라제(DNA polymerase)의 억제제인 phosphoanoic acid (PAA: 100㎍/㎖)를 처리한 샘플을 양성대조군로 하여 항바이러스 효과 여부를 판단하였다. 모든 화합물은 바이러스 감염 3시간 전부터 바이러스접종액 배양시 (1시간 동안), 그 이후 세포배양시에 BHK-21세포주의 배양액에 처리하였다.

[0048] 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이, 안젤리신 항바이러스 효과가 증가하여, 이를 통해 안젤리신이 항 감마허피스바이러스 활성을 가짐을 확인하였다. 즉, MHV-68/EGFP 바이러스를 BHK-21세포주에 MOI=0.5로 감염시켰을 때, 바이러스 감염 단독이나 안젤리신의 용매(solvent)인 DMSO를 처리했을 때와 비교하였을 때, 안젤리신을 처리한 샘플(sample)에서 EGFP 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, 안젤리신에 의해 농도 의존적(15㎍/㎖, 30㎍/㎖, 60㎍/㎖)으로 바이러스의 복제가 억제되는 것을 GFP 발현이 줄어드는 것으로 확인하였다. GFP는 MHV-68/GFP 복제로 인한 GFP 발현 신호를 나타낸다. 이를 통해 안젤리신이 농도의존적 항감마허피스바이러스 활성을 가짐을 확인하였다(도 1).

[0049] **실시예 2. 마우스 감마허피스바이러스에 대한 항바이러스 효능을 가지는 안젤리신의 효과**

[0050] 1) 실시예 1의 스크리닝으로 찾아낸 안젤리신의 효과를 검증하기 위해 다양한 농도의 안젤리신이 존재하는 조건에서 MHV-68/EGFP 바이러스를 BHK21세포주에 MOI가 0.5가 되도록 감염시킨 후 2 일간의 배양기간 후 세포를 MHV-68/EGFP의 유전자인 ORF45와 M9의 단백질 양을 비교하는 웨스턴블럿(western blot)을 진행하고, 배양상층액은 베로 세포(Vero cell)에 감염시켜 플라그 에세이(plaque assay)를 진행함으로써 감염성 비리온 생산 정도를 측정하였다.

[0051] 도 2는 안젤리신 처리에 의한 MHV-68/EGFP 바이러스 단백질 발현(A)과 감염성 비리온 생산(B) 감소를 분석한 것을 나타낸다. PAA와 GCV라는 항바이러스제와 안젤리신에 의한 MHV-68의 Lytic 유전자인 ORF45와 M9에 대해 단백질 발현정도를 확인하였다. 그 결과 PAA와 GCV, 안젤리신을 처리했을 때 단백질 발현이 줄어드는 것이 관찰되었다. 특히 음성대조군(Negative control)인 바이러스만 있는 샘플(virus only sample)과 DMSO에 비해 안젤리신 처리에 의해 감염성 비리온 생산 정도가 줄어드는 것을 플라그 에세이(plaque assay)를 통해 나온 바이러스의 수치(역가 : titer) 로 확인하였고 웨스턴블럿(western blot)을 통해 특정 단백질의 밴드 굵기가 줄어드는 것을 확인하였다 (도 2). 상층액을 Vero 세포에 감염시켜 바이러스의 역가는 상층액 100㎕당 나타나는 PFU(Plaque forming unit)로 확인하였다. 안젤리신을 처리했을 때 농도 의존적으로 감염성 비리온 생산이 감소하는 것을 확인하였다. 안젤리신은 각각 15㎍/㎖, 30㎍/㎖, 60㎍/㎖ 처리하였고 PAA는 100㎍/㎖, GCV는 20㎍/㎖ 처리하였다. 이로써 안젤리신이 MHV-68에 대한 항바이러스 효과가 있음을 검증하였다.

[0052] 2) 안젤리신이 바이러스 게놈 복제에 영향을 주는 지 알아보기 위해 MHV-68 유전체 DNA의 ORF56 부위에 대해 리얼타임 PCR(Real-time PCR)을 진행하여 genomic DNA viral load의 차이를 측정하였다. 바이러스 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 바이러스 전사체 차이를 비교하여 유전자 발현정도 차이를 분석하는 RT-PCR, RT-Q-PCR을 진행하여 확인하고 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3의 위 패널은 안젤리신과 PAA, GCV에

의한 MHV-68의 유전자인 ORF56이 BHK-21세포의 게놈 DNA(genomic DNA)내에서의 비율을 알아보기 위해 게놈 DNA(genomic DNA) 50 ng당 들어있는 ORF56을 리얼-타임 PCR(Real-time PCR)로 측정한 후 아무 처리하지 않은 샘플을 기준으로 하여 상대적인 양을 비교한 결과를 나타낸 것이다. 도 3의 아래 패널은 전사체양의 차이를 비교하기 위해 RNA를 분리하여 cDNA로 합성한 후 ORF50, ORF29에 대해 RT-PCR을 진행하여 gel상의 밴드 굵기로 전사체의 양을 비교한 결과를 나타낸 것이다. 바이러스의 대표적인 극초기 전사체인 RTA의 상대적 발현은 RT-Q-PCR로 비교하였다. 두 실험기법 모두에서 actin의 발현을 loading control로 사용하였다.

[0053] 도 3에 나타난 바와 같이, 음성대조군(negative control)에 비해 안젤리신을 처리한 샘플에서는 viral load나 전사체 생산이 줄어드는 것을 확인하였다. 양성대조군(positive control)인 PAA, GCV를 처리한 샘플과 비교해서도 안젤리신의 처리 농도에 의존적으로 바이러스 게놈의 양이 줄어들고 ORF50과 ORF29, 그리고 RTA에 대해 전사체양이 줄어드는 것을 확인하였다. 따라서 안젤리신이 바이러스 유전체내 DNA 복제를 억제하고 유전자 발현을 줄여주는 것을 검증하였다.

[0054] **실시예 3. 인체 감마-2 허피스바이러스, KSHV에 대한 안젤리신의 항바이러스 효과**

[0055] 마우스 감마허피스바이러스의 모델에서 확인한 안젤리신의 항바이러스 효과가 유사한 인체 감마허피스바이러스에 대해서도 동일한 효과를 나타내는 지 확인하기 위해, KSHV가 잠복감염된 세포인 BC-3G 세포주와 BCBL-1 세포주에 진행하였다. KSHV와 MHV-68은 모두 감마-2허피스바이러스에 속한다.

[0056] 도 4의 A는 BC-3G 세포에서 TPA에 의한 바이러스 재활성 유도능을 안젤리신이 억제할 수 있는지 유세포분석기(flow cytometry)로 분석한 결과를 나타낸다. 도 4의 B와 C는 바이러스의 Lytic 단백질인 RTA의 발현양을 웨스턴블럿으로 확인한 결과를 나타낸다. 이때 안젤리신을 처리한 후 1시간 뒤 TPA(20ng/㎖)을 처리하였다.

[0057] 본 실험실에서 확보하고 있는 BC-3G는 바이러스의 활성 감염(lytic replication)에 의해 GFP를 발현하는 리포터 세포주이다. BC-3G에 안젤리신을 처리하고 바이러스의 재활성을 유도하는 물질인 TPA를 처리했을 때 GFP 발현 세포의 비율을 확인한 결과 안젤리신을 처리했을 때 재활성 유도 비율이 감소함을 확인하였다 (도 4의 A).

[0058] 이를 분자생물학적 방법으로 증명하기 위해 KSHV 잠복감염 세포주인 BC-3G의 KSHV의 활성기 바이러스 복제의 극초기 유전자인 RTA 단백질 발현정도 차이를 웨스턴블럿(western blot)으로 확인하였다. 도 4의 B에 나타난 바와 같이 TPA를 처리한 샘플의 단백질 발현양에 비해 안젤리신을 함께 처리한 샘플에서는 RTA 발현양이 줄어드는 것을 확인하였다.

[0059] 이와 같은 효과가 다른 KSHV + 세포주인 BCBL-1에서도 TPA와 함께 안젤리신을 처리한 경우 RTA 단백질 발현이 줄어드는 동일한 결과를 확인하였다 (도 4의 C). 이를 통해 안젤리신이 인체 감마허피스바이러스인 KSHV의 바이러스 증식을 억제하는 항바이러스 효과를 나타냄을 검증하였다.

[0060] **실시예 4. 인체 감마-1-허피스바이러스, EBV에 대한 안젤리신의 항바이러스 효과**

[0061] 임상적으로 중요한 또 다른 인간 감마허피스바이러스이고, 감마-1 허피스바이러스인 EBV에 대해서도 안젤리신이 항바이러스 효과를 가지는지 확인하였다.

[0062] EBV가 잠복감염된 B95.8, Raji, HR-1 세포주에 안젤리신 (60 또는 120 ㎍/㎖)를 미리 1시간동안 처리한 후 TPA (20 ng/㎖)로 바이러스 재활성을 유도하여 안젤리신이 바이러스 재활성에 미치는 영향을 EBV의 대표적인 활성 유전자(lytic gene)인 EA-D의 단백질 발현정도를 확인하는 웨스턴블럿(western blot)과 면역형광법(immunofluorescence assay)을 수행한 바, 마우스 감마허피스바이러스나 KSHV에서 나타난 항바이러스효과가 동일하게 나타났다 (도 5).

[0063] 도 5의 A, B 및 C는 안젤리신에 의해 EBV의 활성 단백질(lytic protein)인 EA-D의 발현에 미치는 영향을 B95.8, Raji, HR-1 세포주에서 웨스턴블럿(western blot)으로 분석한 결과를 나타낸 것이고, 도 5의 D는 Raji 세포주에서 면역형광법(immunofluorescence assay)으로 확인한 결과를 나타낸다.

[0064] **실시예 5. 안젤리신의 세포독성**

[0065] 1) BHK-21 세포에 대한 독성 실험

[0066] 항바이러스효과를 보이는 안젤리신이 세포에 독성을 미치는지 확인하기 위해 바이러스 복제가 가능한 BHK-21 세포에 Tryphan blue exclusion assay와 MTT assay를 진행하였다. 보다 상세하게 BHK-21 세포주에 DMSO에 용해시킨 안젤리신과 PAA, GCV를 처리한 후 day 1부터 day 3까지 매일 Trypan blue exclusion assay와 MTT assay를 수행하여 아무런 처리를 하지 않은 샘플의 측정치를 100%로 정한 뒤 상대적인 세포성장을 측정하였다(도 6). 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 안젤리신 120㎍/㎖이하의 농도에서 뚜렷한 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다. 이를 통해 60㎍/㎖농도 이하의 안젤리신의 항바이러스 효능이 세포독성에 의한 것이 아님을 확인하였다.

[0067] 2) BC-3G, BCBL-1, B95.8 세포주와 B95.8 세포주에 대한 독성 실험

[0068] 항바이러스효과를 가지는 안젤리신이 KSHV 잠복감염 세포주인 BC-3G와 BCBL-1 세포, 그리고 EBV 잠복감염 세포주인 B95.8 세포에 세포독성을 가지는 지 확인하기 위해 MTT assay와 Trypan blue exclusion assay를 진행하였다. 즉, BC-3G, BCBL-1, B95.8 세포주와 B95.8 세포주에 DMSO에 용해시킨 안젤리신 추출물을 처리한 후 day 1에서 day 3까지 MTT assay를 수행하여 아무런 처리를 하지 않은 샘플의 측정치를 100%로 정한 뒤 상대적인 세포성장을 측정하였다(도 7). Trypan blue exclusion assay 결과는 MTT assay와 같은 결과로 결과를 표현하지는 않았다. 그 결과 도 7에 나타난 바와 같이, 안젤리신이 BHK-21 세포주에 미치는 영향에 비해 BC-3G와 BCBL-1 세포, B95.8 세포에 미치는 세포독성이 약해 120㎍/㎖ 이상의 농도에서도 큰 세포독성을 나타내지 않았다.

[0069] **실시예 6. 안젤리신의 항바이러스 메커니즘**

[0070] 안젤리신이 바이러스의 생활사 중 어느 단계에 작용하여 항바이러스 효능을 나타내는 지 알아보기 위해, 감마허피스바이러스의 동물모델인 MHV-68을 감염시키기 3시간 전 안젤리신을 처리하는 전 처리(Pre treatment)와 감염시킨 후 1시간 뒤에 바이러스를 제거한 후 일반 FBS 포함하는 배지(media)로 바꾼 후 안젤리신을 처리하는 후 처리(post treatment)를 진행하였다. 모든 처리를 한 샘플을 All treatment라고 했을 때 각각의 펠릿(pellet)과 상층액으로 웨스턴블럿(western blot)과 플라그 에세이(plaque assay)를 진행하여 바이러스의 단백질양과 감염성 비리온 생산 정도를 확인하였다.

[0071] 도 8의 A는 두 샘플의 바이러스 단백질 발현 차이를 나타내고, 도 8의 B는 게놈 DNA(genomic DNA)내의 ORF56의 양을 리얼타임 PCR로 확인한 결과를 나타내고, 도 8의 C는 상층액을 이용하여 감염성 비리온 생산 차이를 확인한 결과를 나타내고, 도 8의 D는 세포에서 추출한 RNA로 ORF50 유전자의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸다.

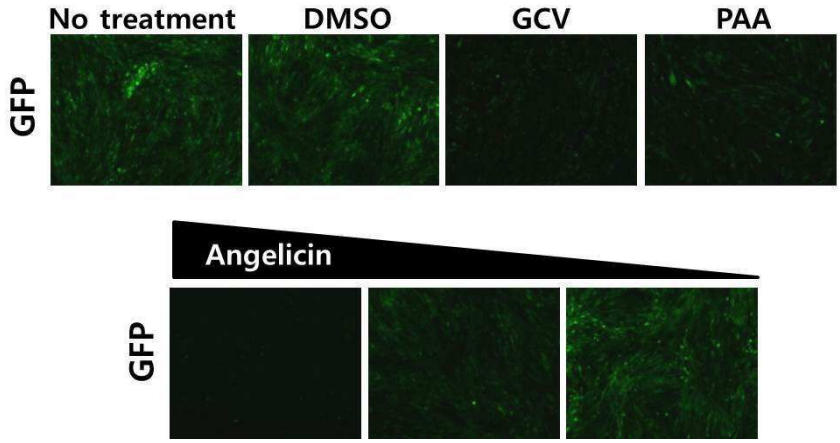
[0072] 도 8에 나타난 바와 같이, 전 처리(Pre treatment)만 진행한 샘플은 음성대조군(negative control)과의 약간 차이가 있는 것으로 보이나 후 처리(Post treatment)만 진행한 샘플은 바이러스 단백질 발현과 감염성 비리온 생산, 게놈 DNA(genomic DNA)내의 바이러스 유전체의 양, RTA의 유전자 발현정도가 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 (도 8). 이는 바이러스를 감염 전보다 감염 후 안젤리신을 처리했을 때 바이러스의 기능을 억제하는 항바이러스 효과가 우수하며 감마허피스바이러스감염에 대한 치료제로 사용할 수 있음을 의미한다.

[0073] 상술한 바와 같이, 감마허피스바이러스 감염의 경우, 보통 숙주의 림프구(lymphocytes)에서 평생감염을 일으키며 고령이나 장기이식 등으로 인한 면역저하 환자의 경우 감마허피스바이러스의 재활성화로 인한 문제가 야기될 수 있다. 감마허피스바이러스의 항바이러스 제제의 개발은 이런 질병들을 치료할 뿐 아니라 예방하는 차원에서도 임상적으로 중요하다 할 것이다.

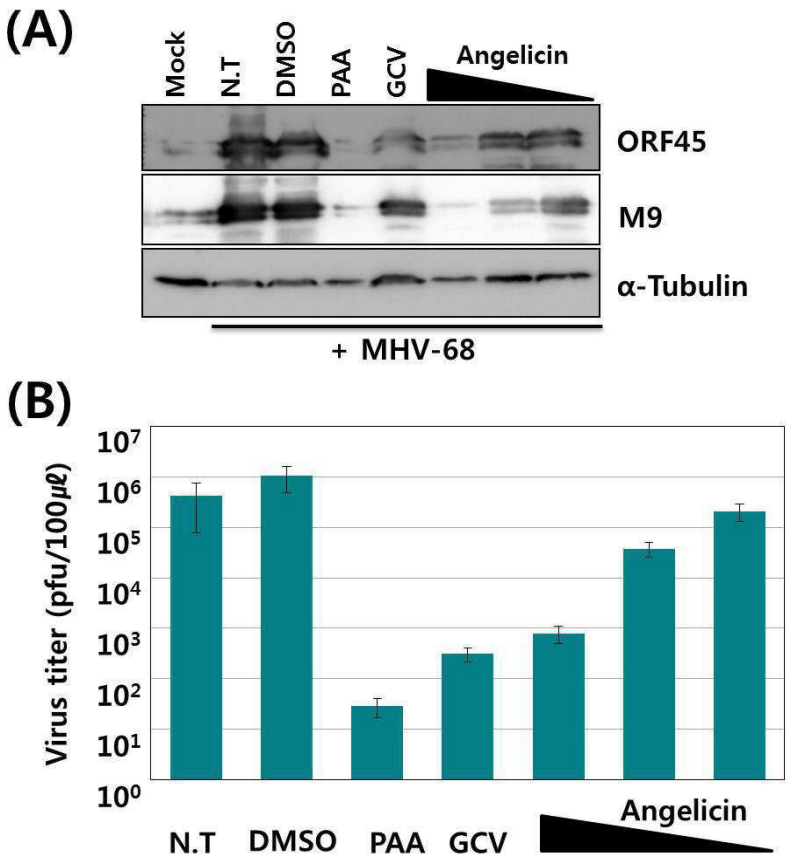
[0074] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

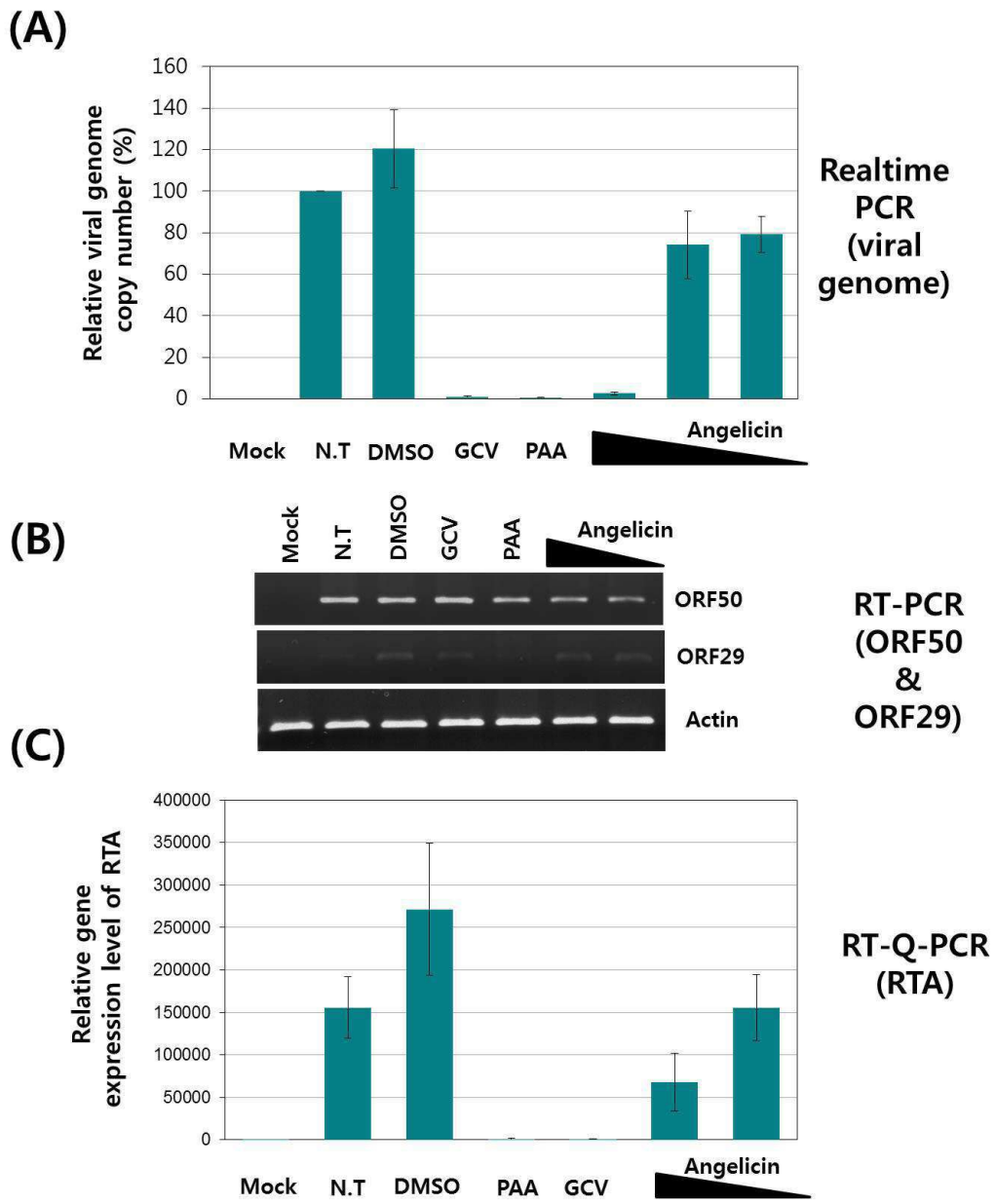
도면1


No treatment
DMSO
GCV
PAA
GFP
Angelicin
GFP

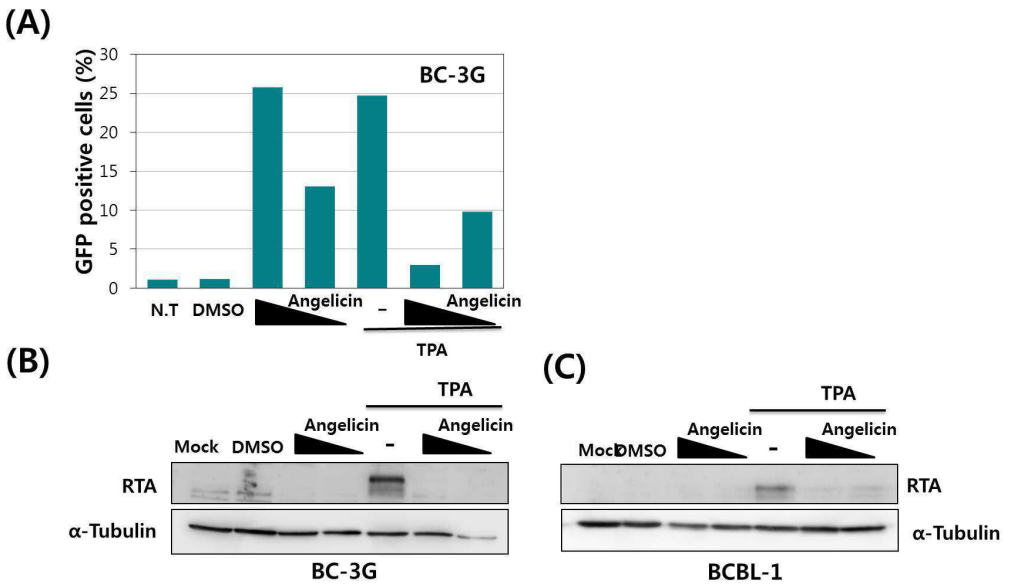
도면2


(A)
Mock
N.T
DMSO
PAA
GCV
Angelicin
ORF45
M9
α-Tubulin
+ MHV-68
(B)
Virus titer (pfu/100μℓ)
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
N.T
DMSO
PAA
GCV
Angelicin

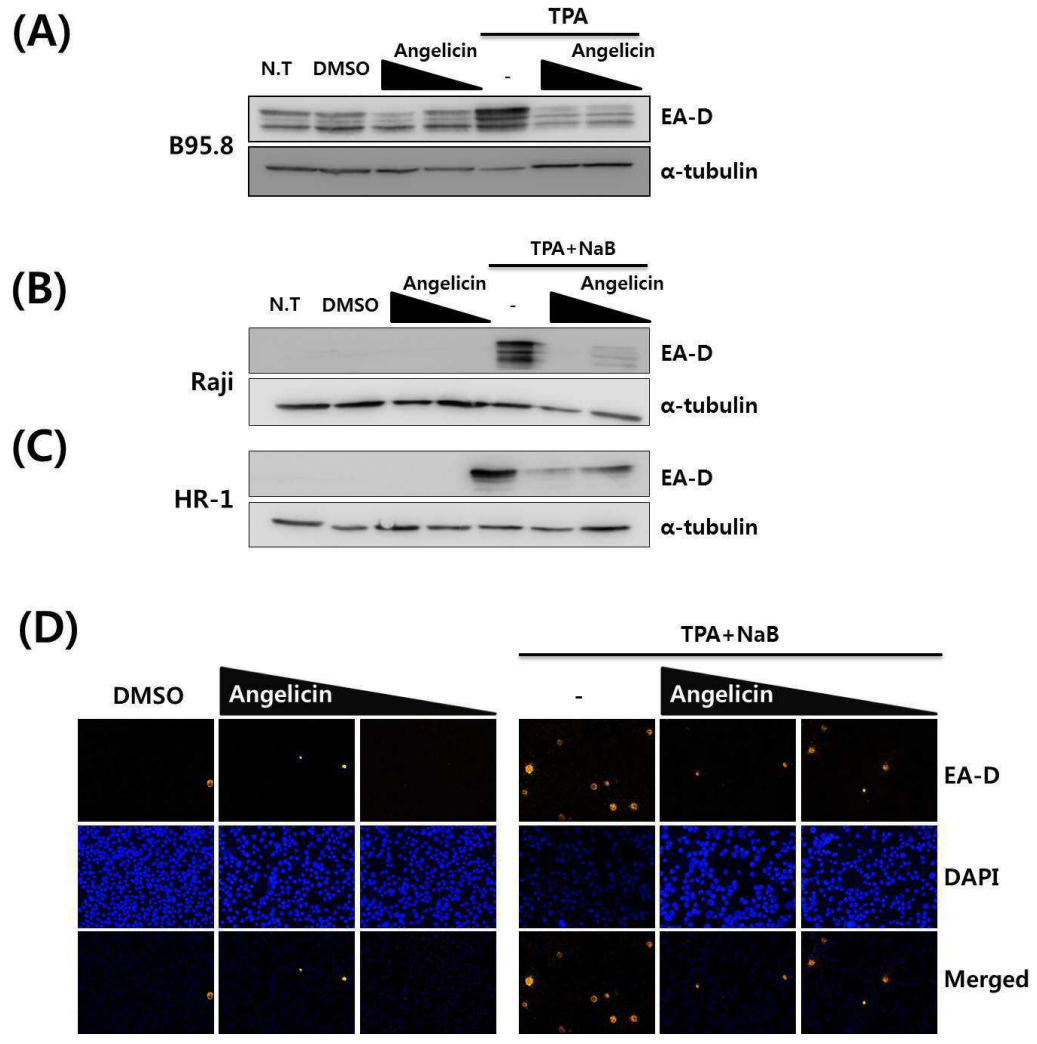
도면3


(A)
Relative viral genome copy number (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Mock
N.T
DMSO
GCV
PAA
Angelicin
Realtime PCR (viral genome)
(B)
Mock
N.T
DMSO
GCV
PAA
Angelicin
ORF50
ORF29
Actin
RT-PCR (ORF50 & ORF29)
(C)
Relative gene expression level of RTA
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Mock
N.T
DMSO
PAA
GCV
Angelicin
RT-Q-PCR (RTA)

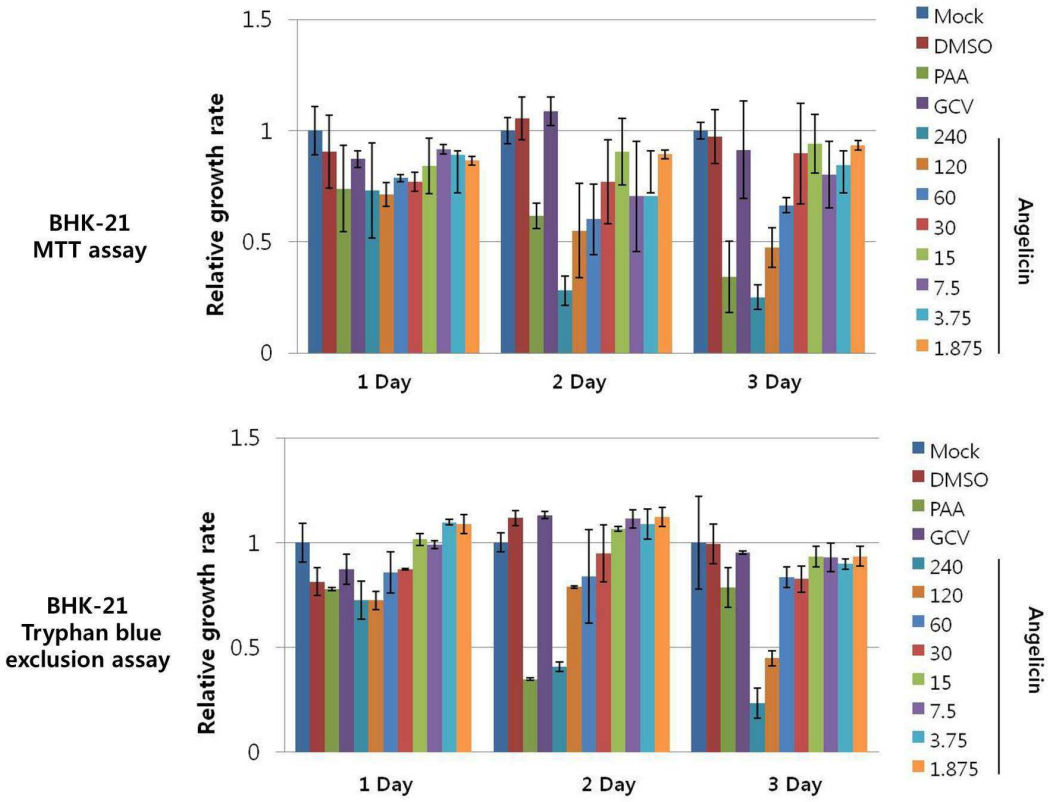
도면4


(A)
BC-3G
GFP positive cells (%)
30
25
20
15
10
5
0
N.T
DMSO
Angelicin
-
Angelicin
TPA
(B)
TPA
Angelicin
Angelicin
Mock
DMSO
-
RTA
α-Tubulin
BC-3G
(C)
TPA
Angelicin
Angelicin
Mock
DMSO
-
RTA
α-Tubulin
BCBL-1

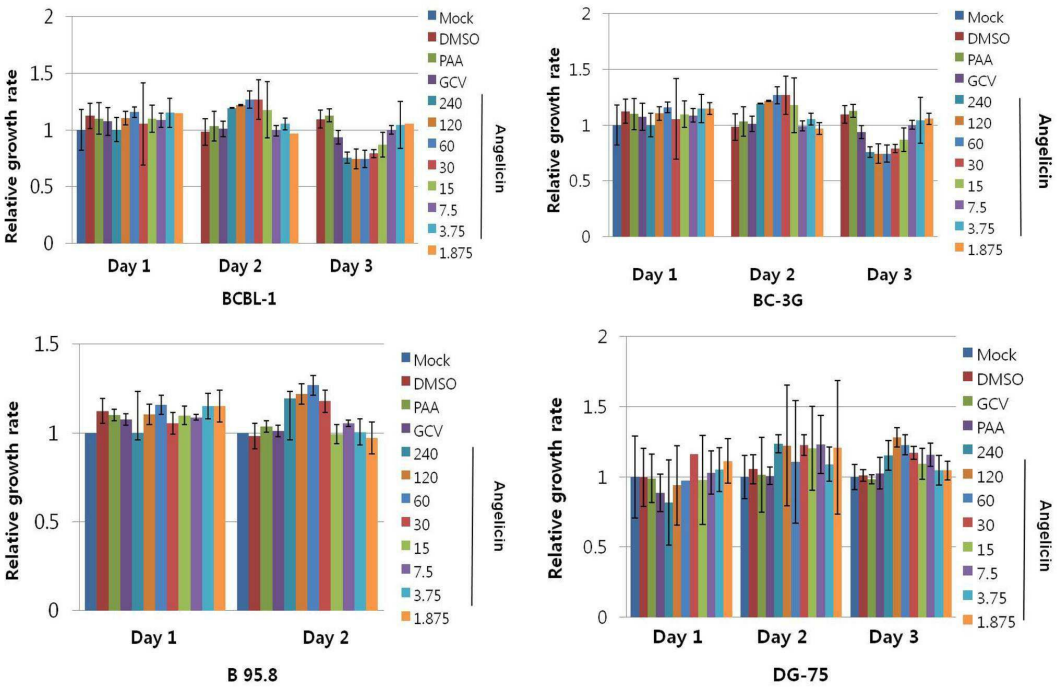
도면5


(A)
TPA
N.T
DMSO
Angelicin
-
Angelicin
B95.8
EA-D
α-tubulin
(B)
TPA+NaB
N.T
DMSO
Angelicin
-
Angelicin
Raji
EA-D
α-tubulin
(C)
HR-1
EA-D
α-tubulin
(D)
TPA+NaB
DMSO
Angelicin
-
Angelicin
EA-D
DAPI
Merged

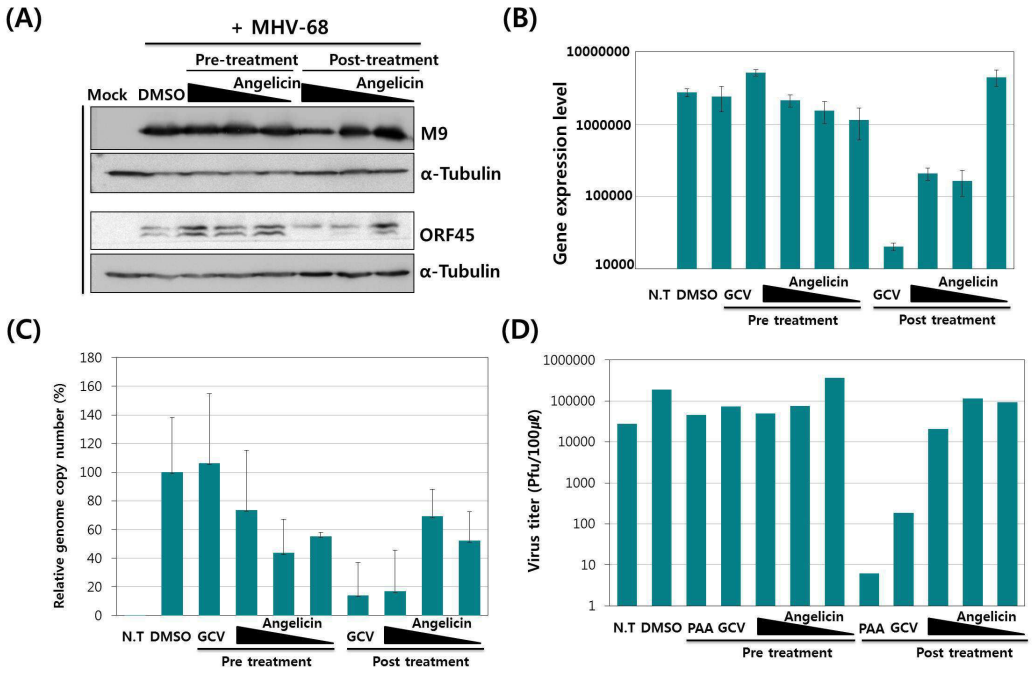
도면6


BHK-21
MTT assay
Relative growth rate
1.5
1
0.5
0
1 Day
2 Day
3 Day
Mock
DMSO
PAA
GCV
240
120
60
30
15
7.5
3.75
1.875
Angelicin
BHK-21
Tryphan blue
exclusion assay
Relative growth rate
1.5
1
0.5
0
1 Day
2 Day
3 Day
Mock
DMSO
PAA
GCV
240
120
60
30
15
7.5
3.75
1.875
Angelicin

도면7


Relative growth rate
2
1.5
1
0.5
0
Day 1
Day 2
Day 3
BCBL-1
Mock
DMSO
PAA
GCV
240
120
60
30
15
7.5
3.75
1.875
Angelicin
Relative growth rate
2
1.5
1
0.5
0
Day 1
Day 2
Day 3
BC-3G
Mock
DMSO
PAA
GCV
240
120
60
30
15
7.5
3.75
1.875
Angelicin
Relative growth rate
1.5
1
0.5
0
Day 1
Day 2
B 95.8
Mock
DMSO
PAA
GCV
240
120
60
30
15
7.5
3.75
1.875
Angelicin
Relative growth rate
2
1.5
1
0.5
0
Day 1
Day 2
Day 3
DG-75
Mock
DMSO
GCV
PAA
240
120
60
30
15
7.5
3.75
1.875
Angelicin

도면8


(A)
+ MHV-68
Pre-treatment
Post-treatment
Mock DMSO
Angelicin
Angelicin
M9
α-Tubulin
ORF45
α-Tubulin
(B)
Gene expression level
10000000
1000000
100000
10000
N.T DMSO GCV
Angelicin
GCV
Angelicin
Pre treatment
Post treatment
(C)
Relative genome copy number (%)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
N.T DMSO GCV
Angelicin
GCV
Angelicin
Pre treatment
Post treatment
(D)
Virus titer (Pfu/100μℓ)
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
N.T DMSO PAA GCV
Angelicin
PAA GCV
Angelicin
Pre treatment
Post treatment