(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0061743
(43) 공개일자 2022년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/423 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 35/74 (2015.01) *A61P 31/04* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) *C12P 17/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/423 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-0148080
(22) 출원일자 2020년11월06일
심사청구일자 2020년11월06일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
중원대학교 산학협력단
충청북도 괴산군 괴산읍 문무로 85, 중원대학교 내
(72) 발명자
남상집
경기도 광명시 하안로 320, 1012동 607호(하안동, 고층주공아파트)
임병관
경기도 용인시 기흥구 기흥로116번길 60, 512동 303호(신갈동, 기흥파크뷰)
(74) 대리인
유미특허법인

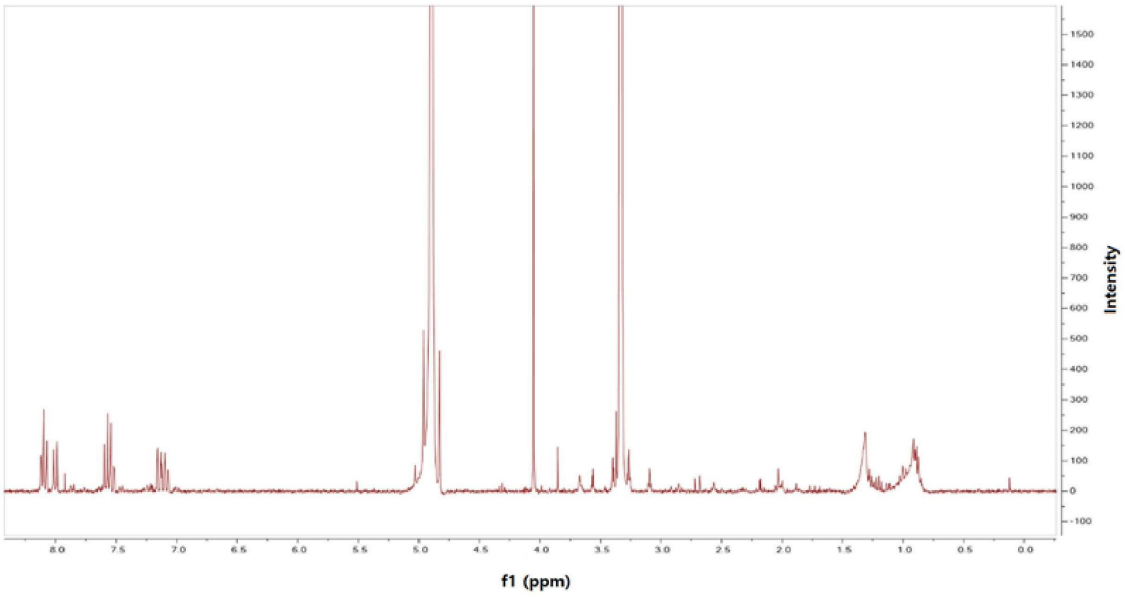
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **항바이러스용 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 항바이러스용 조성물은 천연물 유래로 세포 독성이 적은 안전한 물질이며, 바이러스의 생육을 효과적으로 억제하여 바이러스 감염을 예방, 치료, 개선할 수 있어 항바이러스 효능을 가지는 약제 개발을 위한 조성물의 제조에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 35/74 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)
A61P 31/12 (2018.01)
C12P 17/14 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345316952
과제번호	2017R1D1A1B03028172
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	해양방선균유래 수족구병유발 바이러스 억제 효능 천연물 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.05.31

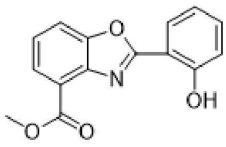
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는, 항바이러스용 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양물로부터 분리된 것인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 화합물은 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물을 분획 추출하여 얻어진 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 분획 추출은 물, 에틸 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하는 것인, 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 화합물은 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물을 분획 추출하고, 상기 분획 추출물을 추가로 분리한 소분획물에서 얻어진 것인, 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 화합물은 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물을 분획 추출하고, 상기 분획 추출물을 추가로 분리한 소분획물을 분리 및 정제한 2차 소분획물에서 얻어진 것인, 조성물.

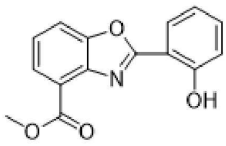
청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 엔테로 바이러스에 대한 항바이러스 효능을 가지는 것인, 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는, 엔테로 바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 조성물:

[화학식 1]



청구항 9

제8항에 있어서, 상기 감염증은 장염, 수족구병, 구협염, 포진성 구협염, 소아마비, 척수성 소아마비, 수막염, 유아 무균성 수막염, 및 뇌염으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물, 건강기능식품, 또는 의약외품 조성물인, 조성물.

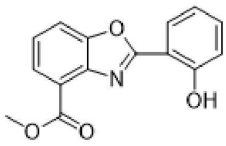
청구항 11

스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 분획 추출하는 단계; 및

분획 추출물을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는,

하기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체의 제조방법:

[화학식 1]



청구항 12

제11항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 분획 추출하여 유기용매 층에서 분획 추출물을 얻는 단계;

상기 분획 추출물을 추가로 분획하여 소분획물을 얻는 단계; 및

상기 소분획물을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 제조방법.

청구항 13

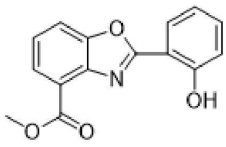
스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 분획 추출하는 단계; 및

분획 추출물을 분리 및 정제하는 단계를 포함하며,

하기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는,

항바이러스용 조성물의 제조방법:

[화학식 1]



청구항 14

제13항에 있어서, 상기 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 분획 추출하여 유기용매 층에서 분획 추출물을 얻는 단계;

상기 분획 추출물을 추가로 분획하여 소분획물을 얻는 단계; 및

상기 소분획물을 분리 및 정제는 단계를 포함하는, 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항바이러스용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이러스는 인류의 건강을 위협하는 수많은 난치병들에 대한 대표적인 원인 중 하나로서, 엔테로 바이러스(Entero virus), 치쿤군야 바이러스(Chickungunya Virus), 사스 바이러스(SARS virus), 메르스 바이러스 (MERS virus) 및 지카 바이러스(Zika virus) 등의 난치성 RNA 바이러스들이 인류에게 심각한 위험을 초래하고 있는 상황이다. 대부분의 유행병들은 증상이 조금씩 다르지만 그 유행시기는 대략 정해져 있어, 전 세계적으로 이를 감별하여 예방 또는 치료하기 위해 막대한 자본을 투자하고 있다.

[0003] 우리나라에서는 봄-여름철에 엔테로 바이러스(Entero virus)가 어린 영유아들에게서 유행한다. 특히 최근에는 3세 미만의 어린 영아를 보육시설에 맡기는 경우가 많아지면서 아이들이 더 쉽게 바이러스에 노출되고 있다. 엔테로 바이러스는 장염, 수족구병, 헤르판지나(포진성 구협염), 척수성 소아마비, 유아 무균성 수막염, 뇌염 등을 일으키는 원인으로 잘 알려져 있다. 엔테로 바이러스는 심할 경우 환자를 사망에 이르게 할 정도로 치명적인 만큼 이들의 증식을 억제할 수 있는 바이러스 치료제의 개발이 시급한 상황이지만, 현재 이 바이러스들을 효과적으로 억제할 수 있는 치료제 또는 예방제가 전무한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 하나의 목적은, 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는 항바이러스 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0005] 본 발명의 또 다른 목적은, 항바이러스 조성물의 제조방법 및 상기 조성물을 생산할 수 있는 균주를 제공하기 위한 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은, 항바이러스 효능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체의 추출물, 상기 배양물의 추출물, 및 상기 파쇄물의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 항바이러스 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은, 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 유기용매로 분획추출하는 단계; 및 분획추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은, 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 유기용매로 분획추출하는 단계; 및 분획추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계를 포함하며, 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는, 항바이러스용 조성물의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 항바이러스제들은 다양한 기전(mechanism)을 통해 바이러스를 억제할 수 있는데, 그 중 다음과 같은 두 가지 기전은 바이러스를 효과적으로 억제하는데 사용될 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0010] 첫 번째는, S-adenosylhomocysteine(이하, SAH) 가수분해효소(hydrolase)를 억제하는 것이다. SAH 가수분해효소는 NAD+를 조효소로 이용하는 테트라머(tetramer) 형태의 효소로서, SAH를 아데노신(adenosine, Ado)과 호모시스테인(homocysteine, Hcy)으로 가역적으로 가수분해하는 역할을 하며, 생체내 단백질, 지질, 핵산뿐만 아니라 히스타민, 노르에피네프린같은 체내물질들의 메틸화(methylation)에 매우 중요한 효소이다. 이러한 SAH 가수분해효소의 억제는 SAH의 축적을 유발하며, 과잉의 SAH는 순차적으로 S-adenosylmethionine(AdoMet)-dependent transmethylase의 억제 및 바이러스 mRNA의 캡핑(capping)를 억제하여 바이러스의 복제에 필요한 단백질이 제대로 만들어지지 못하게 하기 때문에, 결과적으로 항바이러스 효과를 나타내게 된다. 대부분의 동물 DNA 바이러스뿐만 아니라 RNA 바이러스도 mRNA 캡핑에 메틸화 효소(viral mRNA guanosine N7-methytransferases, O-2′-methytransferase)가 필수적이므로, SAH 가수분해효소는 광범위 항바이러스제의 개발에 있어서 필수적인 요소로 간주된다. 즉, RNA 바이러스 치료제의 개발과 SAH 가수분해효소 저해제의 개발은 높은 상관성을 갖고 있는 것으로 여겨진다.

[0011] 두 번째는, 바이러스 RNA 중합효소(polymerase)를 저해하는 것이다. RNA 바이러스들은 기질인 Nucleoside-5'-triphosphate(NTP)가 RNA 중합효소(polymerase)에 의해 RNA 사슬(chain)로 삽입되어 복제된다. 따라서, RNA 중합효소를 저해하는 물질 또한 항바이러스제 역할을 할 수 있으며, 체내에서 3인산염(triphosphate)으로 전환되어 바이러스 RNA 중합효소를 선택적으로 억제하거나 바이러스 RNA 사슬로 직접 삽입되어 연쇄종결반응(chain termination)을 유도하는 물질을 이용하면 효과적인 항바이러스제를 개발할 수 있을 것으로 여겨진다.

[0012] 현재 상용화되고 있는 항바이러스제로는 iododeoxyuridine(IDU), 아시클로버(acyclovir, ACV), azidothymidine(AZT)와 같은 뉴클레오사이드(nucleoside) 유도체나 interferon(IFN)과 같은 단백질이 대부분이지만, 이들 물질은 세포독성, 간독성, 과-내성 등 여러 가지 부작용을 나타내며, 또한, 인간 인플루엔자바이러스A와 B 및 조류인플루엔자 바이러스에 대한 치료제로 개발된 oseltamivir phosphate(이른바, 타미플루)의 경우도 노약자에게 투여하게 되면 구토, 기관지염, 두통, 기침, 현기증 등의 부작용이 보고되고 있다. 아울러, 기존 약물에 대한 내성균주의 출현이 증가되고 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 부작용이나 제한된 약효 때문에 기존의 항바이러스 물질들은 바이러스 질환을 효율적으로 치료하기에는 많은 한계가 있다. 따라서 세포독성과 같은 부작용이 적고 안전한 신규 항바이러스 물질 개발의 필요성은 지속적으로 요구되고 있으며, 기존 화학합성 의약품들의 부작용을 회피하기 위해서 부작용이 적고 안전한 천연물로부터 항바이러스 활성을 갖는 물질을 탐색하기 위한 연구가 필요하다.

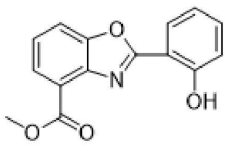
[0013] 본 발명자들은 효과적인 항바이러스 효능을 나타내는 물질을 발굴하고자 예의 노력하였고, 그 결과 해양퇴적토에서 분리한 미생물 중 해양 방선균 (Marine *Streptomyces*)으로부터 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터를 분리하였으며, 상기 화합물이 바이러스의 증식을 효과적으로 저해할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0014] 본 발명의 일 예에 따르면 남극의 해양 퇴적토로부터 분리된 스트렙토마이세스 속 균주 분획물의 항바이러스 효능을 검증하였고, 세부 검증을 통해 스트렙토마이세스 속 균주에서 분리된 화학식 1의 화합물인 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 항바이러스 효과를 확인하였다. 구체적으로, 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터를 96well 세포배양 접시에 배양된 HeLa 세포에 100-0.0001 μg/ml 농도별로 세포배양액에 첨가하여 처리하고 바이러스를 10^5 pfu/ml 로 18시간 동안 감염시킨 후 세포의 증식 검출 시약인 Cell Counting Kit 8 (CCK-8) 10 μl를 넣고 2시간 동안 더 배양하였다. 그 다음 Microplate reader (Molecular device, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존을 확인하여 항바이러스 효능을 확인하였다. 상기 결과를 표현한 도 5와 같이 HeLa 세포의 생존율은 바이러스 감염 후 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 처리 농도에 의존적으로 증가하였으며, 이로부터 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 우수한 바이러스 증식 억제 효능을 확인하였다. 또한 바이러스 막단백질의 생산과 숙주단백질 절단 효소의 활성을 확인하여 직접적인 항바이러스 효능을 확인 하였다 (도 3).

[0016] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0017] 본 발명의 일 예는 하기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는, 항바이러스용 조성물에 관한 것이다:

[0018] [화학식 1]

[0019] 

[0020] 본 발명의 "4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터"는 화학식 1로 표시되는 물질 및 이와 유사한 것으로 해당 분야에서 인지될 수 있는 유도체, 이성질체 등을 제한 없이 포함할 수 있다. 이하에서 별도의 설명이 없는 한, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효(활성)성분으로서 상기 화학식 1의 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터 뿐 아니라, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 이성질체(바람직하게, 광학 이성질체) 또는 유도체가 모두 포함되며, 이들은 모두 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0021] 본 발명의 유효성분인 "4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터"은 염, 특히 약학적으로

허용 가능한 염의 형태로 존재할 수 있다. 염으로는 당업계에서 통상적으로 사용되는 염을 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명의 용어 “약학적으로 허용되는 염”은, 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0022] 또한, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분으로, 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 수화물 등의 용매화물, 및 가능한 유도체와 이성질체, 바람직하게, 광학 이성질체를 제한 없이 포함한다. 상기 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 수화물, 용매화물, 유도체 및 이성질체는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터로부터 제조할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 항바이러스용 조성물은 화학식 1의 화합물인 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 유효성분으로 포함하며, 상기 조성물은 약학적 조성물, 화장료 조성물, 피부 외용제 조성물, 건강기능식품, 또는 의약외품 조성물일 수 있으며, 이들은 주사제, 용액, 타블렛, 캡슐, 연고, 외용연고, 크림, 에센스, 폼, 화장수, 영양화장수, 유연수, 유연화장수, 팩, 유액, 메이크업베이스, 비누, 세정료, 입욕제, 선크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클린싱, 오일, 파운데이션, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제형을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 항바이러스 효능을 가지는 약학 조성물일 수 있다.

[0024] 본 발명에서 "항바이러스" 효능은 예컨대 엔테로 바이러스 감염증의 예방, 치료, 또는 개선일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 일반적인 바이러스 감염증을 예방, 치료 또는 개선하는 모든 활성을 포함한다.

[0025] 본 발명의 조성물에 포함되는 "4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터", 이의 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 이성질체(바람직하게, 광학 이성질체) 또는 유도체는 바이러스 증식 또는 생장을 저해할 수 있다.

[0026] 상기 "바이러스 증식 저해"는 체내, 또는 체외에서 S-adenosylhomocysteine(이하, SAH) 가수분해효소(hydrolase)를 억제하는 것, 바이러스 RNA 중합효소(polymerase)를 저해하는 것과 같이 체내, 또는 체외에서 바이러스의 증식을 억제하는 기전을 모두 포함할 수 있다.

[0027] 상기 "바이러스 생장 저해"는 바이러스가 숙주 세포에 부착되는 것을 저해하는 것, 숙주 세포 내부로의 침입 개시를 억제하는 것, 침입한 바이러스를 공격하고 분해를 촉진하는 것, 바이러스의 증식을 억제하는 것과 같이 세포에서 바이러스의 활성을 낮추고 감염력을 억제하는 기전을 모두 포함할 수 있다.

[0028] 상기 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물 용매화물, 이성질체(바람직하게, 광학 이성질체) 또는 유도체는 바이러스, 특히 엔테로 바이러스 증식을 저해하여 탁월한 항바이러스 효능을 나타내므로, 엔테로 바이러스 감염증 및 이와 관련된 질환, 예를 들어 장염, 수족구병, 구협염, 포진성 구협염, 소아마비, 척수성 소아마비, 수막염, 유아 무균성 수막염, 뇌염으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 질환을 예방, 개선, 완화 또는 치료할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 구체적인 일 실시예에서, 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터는 대조군 대비 두배 이상의 항바이러스 활성을 나타냄을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 유효성분으로서 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물, 용매화물, 유도체 또는 이성질체를 포함하는 항바이러스 조성물은 탁월한 바이러스 증식 저해 활성을 나타내어 바이러스 감염증 예방용 제제 또는 치료용 약물에 유용하다.

[0030] 이에, 본 발명의 또 다른 일 예는 상기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는, 엔테로 바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 감염증은 장염, 수족구병, 구협염, 포진성 구협염, 소아마비, 척수성 소아마비, 수막염, 유아 무균성 수막염, 및 뇌염으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다. 상기 조성물은 약학적 조성물, 건강기능식품, 화장료 조성물, 또는 의약외품 조성물인 것일 수 있다.

[0031] 본 발명의 항바이러스 활성을 갖는 약학 조성물에 포함되는 상기 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물 용매화물, 이성질체(바람직하게, 광학 이성질체) 또는 유도체의 유효량은 항바이러스 활성을 갖는 약학 조성물이 제품화되는 형태, 상기 화합물이 체내에 적용되는 방법 및 체내에 머무르는 시간 등에 따라 달라질 것이다. 예컨대, 상기 항바이러스 활성을 갖는 약학 조성물이 안테

로 바이러스 감염증 치료를 위한 의약품으로 제품화되는 경우에는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물 용매화물, 이성질체(바람직하게, 광학 이성질체) 또는 유도체를 포함할 수 있을 것이다. 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명에 따른 항바이러스 조성물에는 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 이성질체(바람직하게, 광학 이성질체) 또는 유도체를 상기 항바이러스 활성을 갖는 약학 조성물 총 중량 기준으로 0.0001 ~ 15 중량%, 예를 들어 0.001 ~ 10 중량%, 일 예로 0.001 ~ 5 중량%를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항바이러스 활성을 갖는 약학 조성물에 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터가 이를 포함하는 추출물 및/또는 분획물 형태로 포함되는 경우, 상기 항바이러스 활성을 갖는 약학 조성물 총 중량 기준으로 0.001 ~ 50 중량%, 예를 들어 0.01 ~ 30 중량%, 또는 0.1 ~ 10 중량%, 일 예로 1 ~ 5 중량% 포함할 수 있다. 그러나 상기 비율은 본 발명의 약학 조성물이 제조되는 제형에 따라 또 그것의 구체적인 적용 부위(얼굴, 목 등)나 그것의 바람직한 적용량 등에 따라 달라지는 것이기 때문에, 상기 비율은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

[0032] 본 발명에 따른 항바이러스 활성을 갖는 조성물은 약학 조성물일 수 있다. 본 발명에 따른 항바이러스 활성을 갖는 약학 조성물은 상기 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물, 용매화물, 유도체 또는 이성질체 이외에 미용학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제, 방향제, 계면활성제, 유화제, 충전제, 금속이온 봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 등이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 약학 조성물에 적용 가능한 공지된 모든 물질이 포함될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항바이러스 활성을 갖는 약학 조성물은 주사제, 연고, 외용액, 패치, 캡슐, 타블렛로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 제형으로 형성될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 공지된 모든 제형으로 형성될 수 있다. 한편, 상기와 같은 제형을 가지는 본 발명의 항바이러스 효능을 갖는 조성물이 연고, 페이스트, 크림 또는 겔 상태로 형성될 경우에는 동물성유, 식물성유, 확스, 파라핀, 전분, 트라가칸트 검, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 등을 더 포함할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 항바이러스 조성물이 용액 또는 유탁액 형태로 형성될 경우에는 용매, 용해화제, 유탁화제 등을 더 포함할 수 있다. 상기 용매, 용해화제, 유탁화제로는 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이 트, 에틸아세테이트, 벤질알코올, 벤질벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 등을 포함할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 항바이러스 조성물이 현탁액 형태로 형성될 경우에는 물, 에탄올, 프로필렌글리콜 등의 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 등의 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가, 트라가칸트 검 등을 더 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 단독 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합된 형태로 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 공지의 경구투여 또는 비경구투여 제제의 제형일 수 있다. 이에 따라, 본 실시예의 항바이러스 조성물은 상기 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물, 용매화물, 유도체 또는 이성질체 이외에 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제, 부형제 및/또는 담체를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 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, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 항바이러스 효능을 갖는 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 또는 비경구 투여(복강내, 직장, 정맥, 근육 또는 피하 주사, 또는 경피 투여)에 의해 투여될 수 있다. 이때, 비경구 경로는 경피 투여가 바람직하며, 그 중에서도 국소 도포일 수 있다. 본 발명에 따른 항바이러스 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 효과를 위해서 본 발명에 따른 항바이러스 약학 조성물은 0.1 ~ 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 항바이러스 약학적 조

성물의 비경구 경로 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 외용제의 경우 1 일당 1.0 ~ 3.0 ml를 1회 내지 수회로 나누어 도포할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명에 따른 항바이러스 조성물이 화장료 조성물, 예를 들어 클렌징 폼, 클렌징 크림 또는 클렌징 워터 등일 경우에는 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메칠타우레이트, 사르코시네이트계 화합물, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도 베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세라이드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체, 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등을 더 포함할 수 있다.

[0036] 상기 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터 (화학식 1을 갖는 화합물)는 구입한 것, 미생물에서 분리한 것, 합성한 것 등을 모두 포함할 수 있으며, 예를 들어 미생물에서 추출, 분리한 것, 일 예로 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces sp.*) 균주로부터 분리한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 화합물은 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양물로부터 분리된 것일 수 있다. 상기 스트렙토마이세스 속 균주는 일 예로 기탁번호 KCTC14340BP를 가지는 스트렙토마이세스 그리세올러스 (*Streptomyces griseolus*) SCO-774인 것일 수 있다.

[0037] 상기 스트렙토마이세스 그리세올러스 (*Streptomyces griseolus*) SCO-774 균주는 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터 생성능을 가지는 균주로서, 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터 생성능이 있음이 최초로 확인된 균주이다. 본 발명에 따른 항바이러스 활성을 갖는 조성물은 상기 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체의 추출물, 상기 배양물의 추출물, 및 상기 파쇄물의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0038] 상기 화합물은 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물을 분획 추출하여 얻어진 것일 수 있다. 상기 항바이러스 효능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주로부터 화학식 1을 갖는 화합물을 추출하는 방법은 공지의 미생물 추출방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 또한, 추출시 사용되는 추출용매도 물 또는 유기용매 등을 포함하여 미생물의 특성에 따라 당업계에 공지된 용매를 적절히 선택하여 추출할 수 있으나, 예를 들어 물, 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출될 수 있으며, 일 예로 에틸아세테이트 용매로 추출될 수 있다.

[0039] 상기 화합물은 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물을 분획 추출하여 분획 추출물을 얻고, 상기 분획 추출물을 추가로 분획하여 얻어진 소분획물에서 얻어지는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 화합물은 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물을 분획 추출하여 유기용매 층에서 유기용매 분획 추출물을 얻고, 상기 유기용매 분획 추출물을 추가로 분획 하여 얻어진 소분획물에서 얻어지는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물을 분획 추출하여 유기용매 층에서 유기용매 분획 추출물을 얻고, 상기 유기용매 분획 추출물을 역상 칼럼 크로마토그래피를 사용하여 추가로 분획하여 얻어진 소분획물에서 얻어지는 것일 수 있다. 상기 추출물의 소분획물은 유효성분인 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터를 다량 수득할 수 있는 분획 용매를 사용하여 제조될 수 있으며, 예를 들면 물과 알코올 (예를 들어 탄소수 1-3의 저급 알코올)의 혼합용매로 분획된 분획물, 일 예로 물 및 메탄올 분획물일 수 있다. 일 예로, 상기 소분획물은 상기 분획 추출물을 메탄올 20, 40, 50, 60, 70, 80 또는 100% 용액으로 추가로 분획하여 얻어진 것일 수 있다.

[0040] 상기 화합물은 상기 소분획물을 분리 및 정제하여 얻어지는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 화합물은 상기 소분획물을 예를 들어 HPLC 등으로 분리 및 정제하여 얻어지는 것일 수 있다. 즉, 상기 화합물은 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물을 분획 추출하고, 상기 분획 추출물을 추가로 분리한 소분획물을 분리 및 정제한 2차 소분획물에서 얻어지는 것일 수 있다. 상기 분획물, 소분획물, 또는 2차 소분획물은 화학식 1을 비롯하여 유용한 이차대사산물을 함유하여 우수한 항바이러스 효과를 나타낼 수 있다.

[0041] 본 발명의 또 다른 일 예는 항바이러스 효능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체의 추출물, 상기 배양물의 추출물, 및 상기 파쇄물의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 항바이러스 조성물에 관한 것이다. 상기 배양물의 추출물은 상기 배양물의 분획 추출물인 것일 수 있다. 상기 조성물은 상기 배양물의 분획 추출물을 포함하는 것일 수 있다. 상기 배양물의 추출물은 상기 배양물의 분획 추출물 중 유기용매 층, 상기 유기용매 층을 분리한 분획물, 또는 이들 둘 모두를 포함하는 것일 수 있다. 상기 건조물과 농축물은 배양물을 통상적인 방법으로 건조 또는 농축하여 얻어진 것을 의미한다.

[0042] 상기 조성물은 상기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는 것일 수 있다. 상기 화학식 1을 갖는 화합물은 상기 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양물로부터 분리된 것일 수 있다. 상기 균주는 남극 해양퇴적토로부터 분리된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 화학식 1을 갖는 화합물은 스트렙토마이세스 속 SC0774 균주의 추출물로부터 분리된 것일 수 있다. 일 예로, 스트렙토마이세스 속 SC0774 균주 또는 상기 균주의 배양물을 에틸 아세테이트로 추출한 추출물로부터 분리된 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 또 다른 일 예는 스트렙토마이세스 속 균주(*Streptomyces* sp.,)에 에틸 아세테이트를 가하여 추출물을 얻는 단계를 포함하는 화학식 1의 수득 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 상기 추출물에서 유기용매를 제거하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 균주는 기탁번호 KCTC14340BP를 가지는 스트렙토마이세스 속 SC0774 균주인 것일 수 있다.

[0044] 상기 조성물은 엔테로바이러스에 대한 항바이러스 효능을 가지는 것일 수 있다. 상기 스트렙토마이세스 속 균주로부터 분리된 화학식 1의 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터는 항바이러스 효능을 가지며, 구체적으로 안테로 바이러스에 대한 우수한 항바이러스 효능이 있는 것으로 나타났다. 상기 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터는 안테로 바이러스의 생장을 저해하여 안테로 바이러스가 유발할 수 있는 여러 감염증을 예방, 치료, 개선할 수 있다.

[0045] 이에, 본 발명의 또 다른 일 예는 항바이러스 효능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체의 추출물, 상기 배양물의 추출물, 및 상기 파쇄물의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 엔테로바이러스 감염증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 일 예로, 상기 균주는 기탁번호 KCTC14340BP를 가지는 스트렙토마이세스 속 SC0774 균주인 것일 수 있다.

[0046] 상기 감염증은 장염, 수족구병, 구협염, 포진성 구협염, 소아마비, 척수성 소아마비, 수막염, 및 뇌염으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0047] 상기 배양물은 상기 균주의 배양물을 포함하고 상기 균주는 포함하지 않는 무세포 (cell-free) 배양물, 또는 스트렙토마이세스 속 균주와 함께 배양 배지를 포함하는 것일 수 있다. 상기 배양 배지는 상기 균주를 배양하게 위하여 공지의 적절한 배지를 선택할 수 있으나, 유용한 이차대사산물의 생산에 최적 조건을 제공하기 위하여, 배양 배지는 마린 브로스(Marine broth (BD)), SYP, 해수가 포함된 배양액 (SYP SW: 10 g/L 전분, 2 g/L 효모 추출물, 4 g/L 펩톤) 등일 수 있다. 상기 마린 브로스(Marine broth)의 배지 형태는 고체배지와 액체배지 모두 가능하며, 바람직하게는 액체배지일 수 있다. 상기 SYP SW 배지 형태는 고체배지와 액체배지 모두 가능하며, 바람직하게는 액체 배지일 수 있다. 배양물을 얻기 위한 배양기간은 유효한 이차대사 산물의 생산이 활발한 약 4일 이상, 예를 들어 4 내지 20일, 일 예로 6 내지 15일의 기간인 것일 수 있다.

[0048] 상기 마린 브로스의 배지는 녹말(Soluble starch), 효모 추출물(Yeast extract), 펩톤(Peptone), 해양 소금(sea salt)을 사용한다. 고체배지 같은 경우는 400mL 기준으로 녹말(Soluble starch) 4g, 효모 추출물(Yeast extract) 1.6g, 펩톤(Peptone) 0.3g, 한천 (Agar) 7.2g, 해양 소금(sea salt) 13.9g에 증류수(Distilled water) 400 mL을 추가한다. 액체배지 같은 경우는 4L 기준으로 녹말(Soluble starch) 40g, 효모 추출물(Yeast extract) 16g, 펩톤(Peptone) 8g, 해양 소금(sea salt) 139g에 증류수 (Distilled water) 4L을 추가한다.

[0049] 본 발명의 또 다른 일 예는, 항바이러스 효능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체의 추출물, 상기 배양물의 추출물, 및 상기 파쇄물의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 상기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체 제조용 조성물에 관한 것이다.

[0050] 본 발명의 또 다른 일 예는, 항바이러스 효능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체의 추출물, 상기 배양물의 추출물, 및 상기 파쇄물의 추출물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 항바이러스 조성물 제조용 조성물에 관한 것이다. 상기 항바이러스 조성물은 엔테로 바이러스에 대한 항바이러스 조성물인 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 또 다른 일 예는, 스트렙토마이세스 속 균주를 이용한 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 제조방법에 관한 것이다. 상기 제조방법은, 상기 스트렙토마이세스 속 균주를 포함하는 조성물에 추출 용매를 가하여 추출물을 얻는 단계; 및 상기 추출물을 분리 및 정제하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 본 발명에 따른 수득방법에 의해 항바이러스 조성물의 유효성분으로서 유용한 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터를 용이하게 수득할 수 있다.

[0052] 또는, 본 발명의 일 예는 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 유기용매로 분획추출하는 단계; 및 분획추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 상기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체의 제조방법에 관한 것이다.

[0053] 또는, 본 발명의 일 예는 항바이러스 효능을 가지는 스트렙토마이세스 속 균주를 배양하는 단계를 포함하는, 항바이러스용 조성물의 제조방법에 관한 것이다. 상기 제조방법은 상기 균주의 배양물을 분획 추출하는 단계; 및 상기 분획 추출물을 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 상기 제조방법은 상기 분획 추출물을 분리하여 상기 화학식 1을 갖는 화합물을 얻는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0054] 또는, 본 발명의 일 예는 스트렙토마이세스 속 균주 또는 상기 균주의 배양액을 유기용매로 분획추출하는 단계; 및 분획추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계를 포함하며, 상기 화학식 1을 갖는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 이성질체, 또는 유도체를 포함하는, 항바이러스용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0055] 상기 추출 용매는 스트렙토마이세스 속 균주에서 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터를 추출할 수 있는 용매라면 제한 없이 선택할 수 있으나, 유기용매, 예를 들어, 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 유기용매를 사용할 수 있고, 일 예로 에틸아세테이트일 수 있다.

[0056] 상기 추출은 초임계추출, 고압추출 또는 초음파추출법 등의 추출장치를 이용한 방법, 또는 셀라이트 또는 폴리스티렌 또는 폴리아마드 흡착수지를 이용하는 방법으로 대체 가능하나 이에 한정하지 않는다. 추출 시의 용매량이나 추출 온도는 당업자가 적절히 변경할 수 있으나, 추출 시 용매를 배양액 분량의 1 내지 3 부피 배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 상온에서 추출하는 것이 바람직하다. 추출 회수는 1 내지 3회인 것이 바람직하며, 감압건조는 회전진공농축기(Rotary Vacuum Evaporator)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 감압건조 시 온도는 예를 들어 20 ~ 40 ℃, 일 예로 30℃ 일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0057] 추가적으로, 본 발명에 따른 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터 제조 방법은 상기 추출 용매를 가하여 추출물을 얻는 단계 전에, 스트렙토마이세스 균주를 배양하여 상기 균주를 포함하는 조성물을 제조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명에 따른 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터 제조 방법은 상기 추출 용매를 가하여 추출물을 얻은 후, 상기 추출물에서 추출 용매, 바람직하게 유기 용매를 제거하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 유기용매의 제거는 당 분야에서 공지된 방법을 제한 없이 사용하여 수행할 수 있다.

[0059] 상기 분리 정제방법은 공지의 방법을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 크로마토그래피를 사용할 수 있다. 상기 "크로마토그래피"는 크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 크로마토그래피를 제한 없이 사용할 수 있으며, 예를 들어 플래시크로마그래피(TLC), 역상 액체크로마토그래피일 수 있다. 상기 크로마토그래피는 물 및 알코올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 전개 용매로 사용하여 수행될 수 있다.

[0060] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

발명의 효과

[0061] 본 발명에 따른 항바이러스용 조성물은 천연물 유래로 세포 독성이 적은 안전한 물질이며, 바이러스 증식을 효과적으로 억제하여 바이러스 감염을 예방, 치료, 개선할 수 있어 항바이러스 효능을 가지는 약제 또는 화장품 개발을 위한 조성물의 제조에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 해양 퇴적토로부터 분리된 본 발명의 일 예에 따른 스트렙토마이세스 속 SC0774 균주의 Marine 고체배지에서의 형태를 나타낸 도면으로, 위의 왼쪽은 배지 플레이트의 앞면을 나타낸 것이고, 위의 오른쪽은 배지 플레이트의 뒷면을 나타낸 것이며, 아래의 왼쪽은 균주 부분을 확대하여 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 예에 따른 스트렙토마이세스 속 SC0774 균주의 추출물을 분획하여 각 분획물의 항바이러스 효능을 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 예에 따른 스트렙토마이세스 속 SCO774 균주 추출물의 분획물 처리에 따른 바이러스의 막 단백질 생산 및 바이러스 단백질 절단효소의 활성을 western blot 분석으로 검증한 것을 보여주는 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 예에 따른 스트렙토마이세스 속 균주 추출물의 F6 분획의 HPLC 분리 결과를 나타낸 도면이다. 본 발명의 일 예에 따른 스트렙토마이세스 속 균주의 전체 추출물 분획 후, 그 중 항바이러스 효능이 가장 뛰어난 Fraction 6에서 해당 효능을 나타내는 물질인 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터를 순수하게 분리한 크로마토그램이다. UV 254 nm에서 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터가 분리된 피크를 화살표로 나타내었다.

도 5는 본 발명의 일 예에 따른 스트렙토마이세스 속 균주 추출물의 2차 분획물의 항바이러스 효능을 나타낸 도면이다. 항바이러스 효능이 우수한 F6 분획을 HPLC로 분리하고, 분리된 각 물질의 농도 의존적 안테로 바이러스 생장 억제 효과를 확인한 결과를 나타냈다. F6-7 물질이 가장 항바이러스 효능이 좋은 것을 알 수 있으며, 이 물질은 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터로 동정되었다.

도 6a는 본 발명의 일 예에 따른 스트렙토마이세스 속 균주에서 분리된 화합물인 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 ^{1}H NMR (300MHz) 데이터를 나타낸 도면이다.

도 6b는 본 발명의 일 예에 따른 스트렙토마이세스 속 균주에서 분리된 화합물인 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 LC-MS 결과를 나타낸 도면이다.

도 6c는 본 발명의 일 예에 따른 스트렙토마이세스 속 균주에서 분리된 화합물인 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 자외선 스펙트럼 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0065] **실시예 1. 균주 분리 및 동정**

[0066] **(1) 해양퇴적토 내 균주의 분리**

[0067] 남극 해양퇴적토 시료에서 채집된 퇴적토를 클린벤치에서 건조 후, 건조물을 멸균된 해수에 현탁하여 1/2로 희석한 뒤, ISP 1 SW (ISP 1 파우더 1.6g/L, 해염 34.74g/L, 1차 증류수 400ml), ISP 4 SW (ISP 4 파우더 3.7g/L, 해염 34.74g/L, 1차 증류수 400ml) 고체배지에 접종하고, 27℃에서 배양하면서 생성된 단일 균주를 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 다시 접종하여 순수한 균주를 분리 및 선별하였다. 분리된 균주를 SCO774로 명명하였으며, SCO-774 균주는 도 1과 같이 스트렙토마이세스 속 (*Streptomyces sp.*)에 속하는 균주들과 유사한 형태적 양상이 관찰되었다. 도 1은 해양 퇴적토로부터 분리된 SCO774 균주의 Marine 고체배지에서의 형태를 나타낸 도면으로, 위의 왼쪽은 배지 플레이트의 앞면을 나타낸 것이고, 위의 오른쪽은 배지 플레이트의 뒷면을 나타낸 것이며, 아래의 왼쪽은 균주 부분을 확대하여 나타낸 것이다.

[0069] **(2) 균주의 동정**

[0070] 해양퇴적토에서 분리된 SCO774 균주의 종 동정을 위해 마린 브로스(Marine broth) 액체배지에서 4일 동안 27℃에서 배양된 균주 1ml을 취하여 “Tissue Genomic DNA Isolation kit”(Cosmogenetech co, Ltd.. Seoul, South Korea)를 이용하여 제조사 프로토콜에 의하여 genomic DNA를 추출하였다. 종 분석을 위해 16S rRNA 유전자 증폭을 518F 및 805R 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 “PCR purification kit” (Cosmogenetech co, Ltd.. Seoul, South Korea)을 이용하여 정제 후, capillary electrophoresis(Applied Biosystems 3730XL)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. PCR에 사용한 프라이머 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

[0071]

종류	서열 (5’ -> 3’)	서열번호
518F	CCAGCAGCCGCGGTAATAC	1
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	2

805R	GACTACCAGGGTATCTAATC	3
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	4

[0072] SCO-774 균주로부터 얻어진 16S rRNA 유전자 염기서열을 GenBank/EMBL/DDBJ 데이터베이스의 BLAST 서치를 활용하여 균주들의 정보와 비교하였다. 동정 결과, 본 발명의 SCO-774 균주는 Streptomyces 속에 속하는 스트렙토마이세스 그리세올러스 (*Streptomyces griseolus*) 균주로 동정되었다. 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 속 SCO-774 균주의 16S rRNA genes 염기서열을 표 2에 나타내었다 (서열번호 5):

표 2

[0073]

구분	16S rRNA	서열번호
SCO-774	CATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCTTTCGGGGTGGATTAGTGGC GAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAACA CTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTG ATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCT TCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCC AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTCACGT CGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAAT TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGC TGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTG GCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTC AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT TGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGG GGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCTTGGG CTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATGTCGCAAGGCGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGT TCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACG TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGG AGGGAGCTGTCGAAGTGG	5

[0074] 스트렙토마이세스 그리세올러스 (*Streptomyces griseolus*) SCO774 균주를 한국생명공학연구원에 2020년 10월 21일 자로 기탁하여 수탁번호 KCTC14340BP를 부여받았다.

[0076] **실시예 2. 균주 추출물의 항바이러스 효능 검증 (1)**

[0077] **(1) 균주 추출물의 1차 분획**

[0078] 스트렙토마이세스 그리세올러스 SCO774 균주를 2.5L 배양 용기 내에서 해수가 포함된 1리터 배양액(10 g/L 전분, 2 g/L 효모 추출물, 4 g/L 펩톤)에 7일 동안 27℃, 130 rpm 조건에서 배양하였다. 스트렙토마이세스 SCO774 균주 배양액에 에틸 아세테이트 1L를 넣어 극성에 따라 두 층을 분리하고, 이로부터 에틸 아세테이트 층을 얻었다. 이후 에틸 아세테이트 층으로부터 진공회전 농축기를 이용하여 유기 용매를 제거하고 이의 농축된 에틸 아세테이트 추출물을 얻었다.

[0079] 상기 에틸 아세테이트 추출물(4.0 g)을 물 및 메탄올 혼합용매로 분획하되, 메탄올의 농도를 20 내지 100%로 단계적 구배에 따르는 C-18 실리카를 이용한 역상 칼럼 크로마토그래피로 총 8개 분획 (F1 내지 F7 및 FW)으로 분획하였다.

[0081] **(2) 항바이러스 효능 검증**

[0082] 스트렙토마이세스 그리세올러스 SCO774 균주 추출물의 항바이러스 효능과 세포독성을 HeLa 세포를 사용하여 확인하였다. 96well 세포배양 접시에 배양된 HeLa 세포에 스트렙토마이세스 그리세올러스 SCO774 균주 추출물의 분획물 F6 및 F7을 각각 0.01 ug/ml, 0.1 ug/ml, 1ug/ml, 또는 10ug/ml 농도로 세포배양액에 첨가하여 처리하고, 엔터로바이러스 (Entero virus) 를 10^5 pfu/ml 로 18시간 동안 감염시킨 후 세포의 증식 검출 시약인 Cell Counting Kit 8 (CCK-8) 10 μl를 첨가하고 2시간 동안 더 배양하였다. 그 다음 Microplate reader (Molecular device, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 생존을 확인하여 항바이러스 효능을 확인하였다.

스트렙토마이세스 그리세올러스 SCO774 균주 추출물의 항바이러스 효능 확인 결과를 도 2에 나타냈다. 도 2에서 negative는 바이러스 미감염 음성대조군이고, positive는 약물 처리 없이 바이러스만 감염된 양성대조군이다. 도 2에 나타난 바와 같이, SCO774 균주 추출물의 분획물은 엔테로바이러스 생장 억제 효과를 가져 엔테로바이러스에 대한 항바이러스 효과를 보였다.

[0083] 항바이러스 효능이 가장 우수하게 나타난 F6 분획의 항바이러스 효과를 더욱 자세히 알아보기 위해, 바이러스의 증식과 관련된 바이러스 단백질 절단효소의 활성과 막단백질의 생산을 western blot 분석으로 검증하였다.

[0084] 구체적을, F6 분획과 바이러스를 HeLa 세포에 18시간 처리 후 PBS lysis buffer (1x phosphate buffer saline, 1 % Triton-X 100)를 사용하여 세포를 lysis하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 98℃에서 10분 가열 후 10 % SDS-PAGE gel에 loading 하여 100 volt로 3시간 전기영동 하였다. 전기영동 된 gel을 PVDF membrane을 사용하여 단백질 transfer를 진행하였다. Transfer 후 membrane을 5 % skim milk로 blocking 하고 anti-enterovirus VP1, eIF4G1, GAPDH antibody를 4℃에서 18 시간 반응시킨 후 ECL 용액을 사용하여 확인하였다.

[0085] 도 3에 나타난 바와 같이, F6 분획 처리 농도에 따라 바이러스의 증식을 나타내는 막단백질의 생산이 감소하였고, 특히 직접적인 바이러스의 증식 증거인 바이러스 생산 단백질 절단효소에 의해 절단되는 세포의 전사개시인자 eIF4G1의 파괴가 억제되어 뛰어난 항바이러스 효능을 알 수 있다.

[0087] **실시예 3. 균주 추출물의 항바이러스 효능 검증 (2)**

[0088] **(1) 균주 추출물의 2차 분획**

[0089] 실시예 2에서 우수한 항바이러스 효능을 보인 스트렙토마이세스 그리세올러스 SCO774 균주 추출물의 분획 중 80% MeOH 로 분획한 여섯 번째 분획인 F6 분획에서 유기용매를 제거하여 잔류물 184.9 mg을 얻었다. 그 잔류물을 6ml 메탄올에 녹이고, 그 용액에 대한 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 수행하여 7개의 물질을 분리하였다. 스트렙토마이세스 그리세올러스 SCO774 균주 추출물의 F6 분획의 HPLC 분리 결과를 도 4에 나타내었다. 사용한 고성능 액체 크로마토그래피의 조건은 다음과 같았다:

[0090] - 컬럼: Phenomenex Luna C-18 (2), 250×10.0 mm, 5 mm, 100 Å, UV = 254 nm)

[0091] - 용매 조건: 아세토나이트릴 (CH_3CN) : 물(H2O) = 30 : 70

[0092] - 용매 속도: 2.0 mL/분

[0094] **(2) 항바이러스 효능 검증**

[0095] 실시예 2의 (2) 와 실질적으로 스트렙토마이세스 그리세올러스 SCO774 균주 추출물의 2차 분획물의 항바이러스 효능 및 세포독성을 확인하여 도 5에 나타냈다. 도 5에 나타난 바와 같이, SCO774 균주 추출물의 2차 분획물 중 F6-7 피크 (4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터)이 가장 높은 항바이러스 효과를 보였다.

[0096] 스트렙토마이세스 그리세올러스 SCO774 균주 추출물의 F6 분획 중 F6-7 피크를 도 4에서 화살표로 나타내었다. F6-7 분획은 머무름 시간 12.5 내지 13분에서 분리된 것이었다.

[0098] **실시예 4. 화합물의 동정**

[0099] 실시예 3에서 가장 높은 항바이러스 효능을 보인 F6-7 분획의 유효성분을 NMR, LC-MS 및 자외선 스펙트럼(IR)을 통해 동정하고 그 결과를 각각 도 6a, 도 6b 및 도 6c에 나타내었다.

[0100] 도 6a의 ^{1}H NMR 결과에 나타난 바와 같이, ^{1}H NMR에서 6.0ppm에서 8.0ppm 사이에 벤젠고리를 포함하고 있는 것을 알 수 있으며, 커플링 패턴을 통해 1,2 치환기를 포함함을 알 수 있었다.

[0101] 또한, 도 6b의 LC-MS 결과에 나타난 바와 같이, 질량으로는 [M+H]가 270인 것을 확인 할 수 있었고, 따라서 분자량이 269인 천연물이며, 최종적으로 도 6c의 자외선 스펙트럼 비교 분석을 통해 SCO-774 균주 추출물 중의 4-벤족사졸카복실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터 (화학식 1)임을 확인하였다. 도 6c는 4-벤족사졸카복

실 산, 2-(2-하이드록시페닐)-, 메틸 에스터의 UV 모양이다.

[0102] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

수탁번호

[0103]

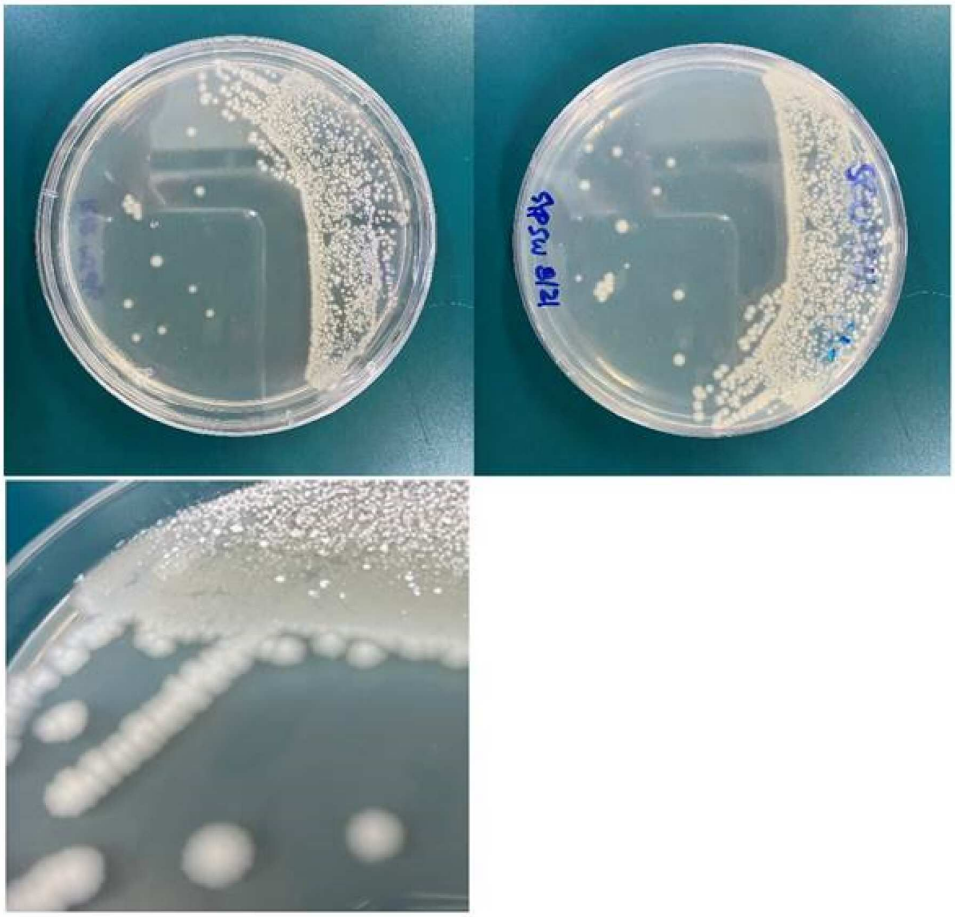
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14340BP

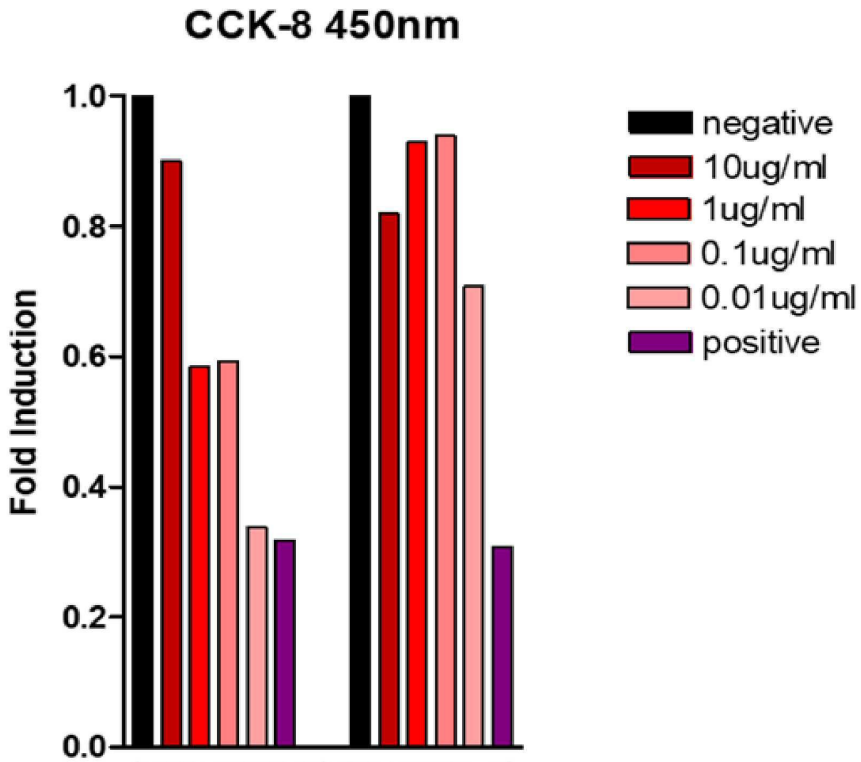
수탁일자 : 20201021

도면

도면1

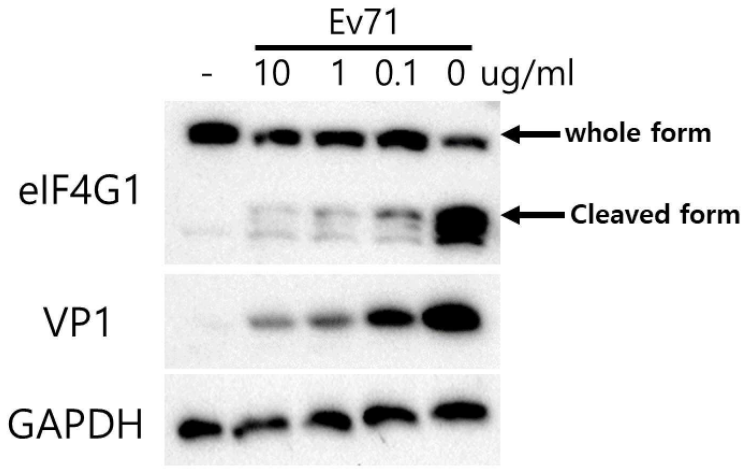


도면2

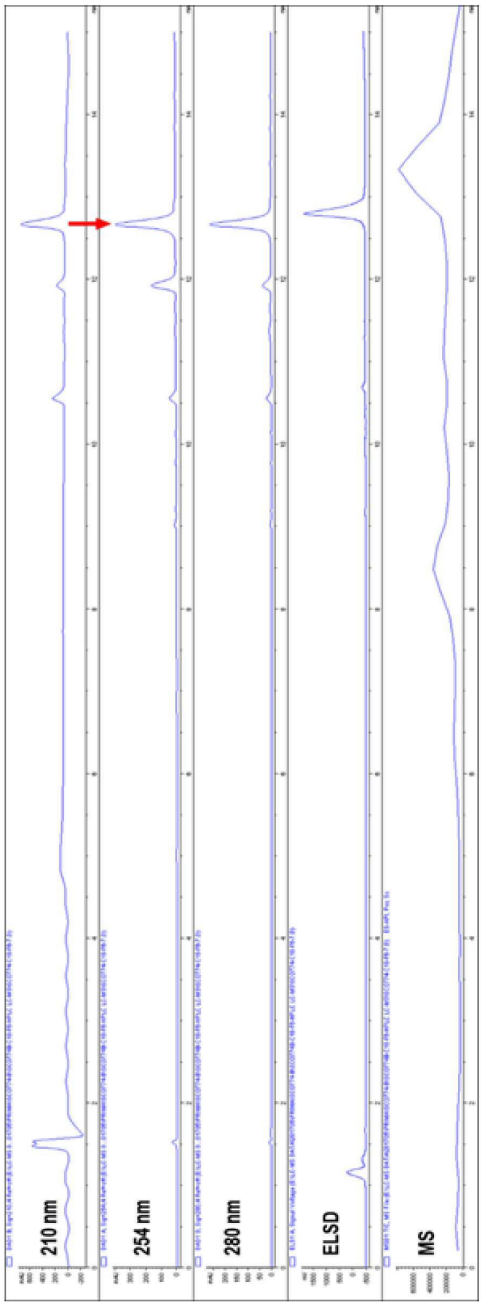


SCO774-C18-F6	SCO774-C18-F7
2.013	2.003
1.81	1.641
1.177	1.86
1.193	1.881
0.68	1.418
0.639	0.615

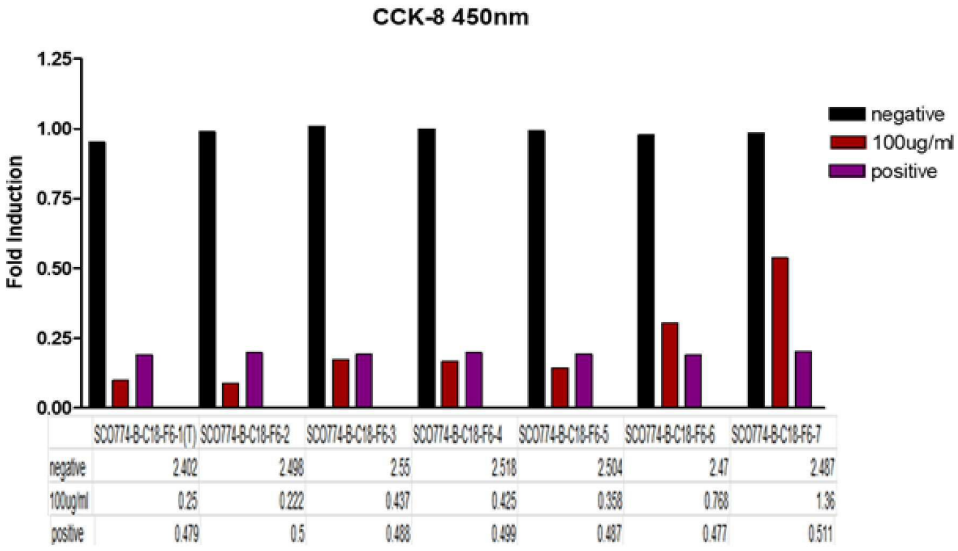
도면3



도면4

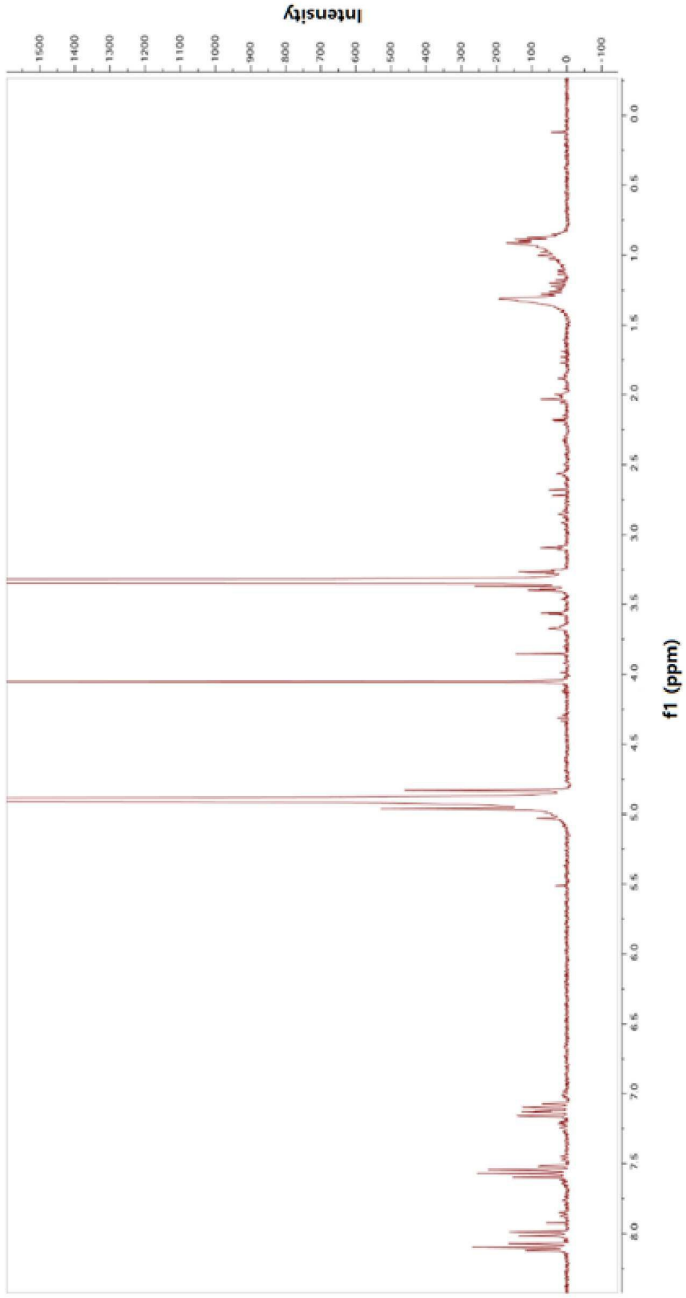


도면5

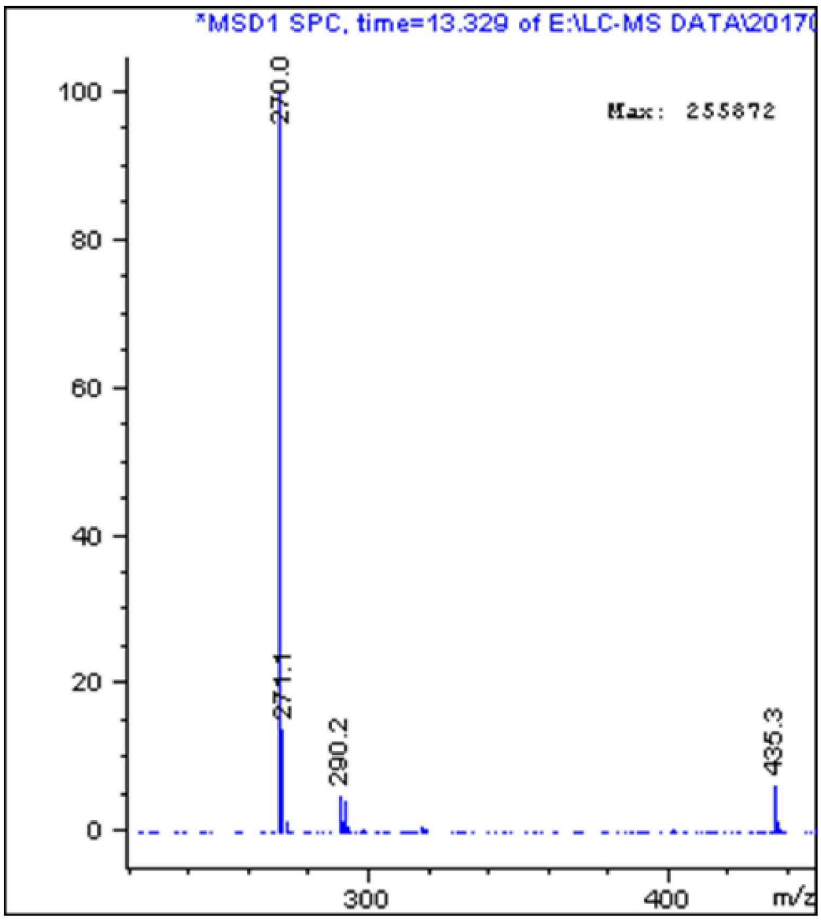


	SC0774-B-C18-F6-1(T)	SC0774-B-C18-F6-2	SC0774-B-C18-F6-3	SC0774-B-C18-F6-4	SC0774-B-C18-F6-5	SC0774-B-C18-F6-6	SC0774-B-C18-F6-7
negative	2.402	2.498	2.55	2.518	2.504	2.47	2.487
100ug/ml	0.25	0.222	0.437	0.425	0.358	0.768	1.36
positive	0.479	0.5	0.488	0.499	0.487	0.477	0.511

도면6a


Intensity
1500
1400
1300
1200
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
f1 (ppm)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0

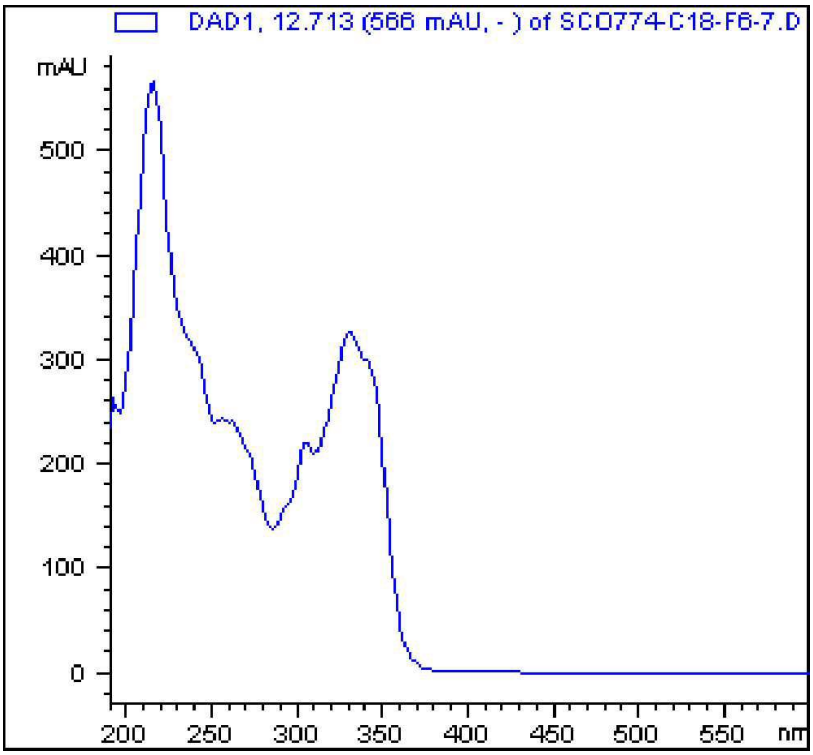
도면6b



[M+H]=270

[M]=269

도면6c



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

Jungwon IACF

<120> Composition for antivirus and Method for preparing the same

<130> DPP20203921KR

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 518F

<400> 1

ccagcagccg cggtaatac 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 27F

<400> 2

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 805R

<400> 3

gactaccagg gtatctaatc 20

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer 1492R

<400> 4

tacggytacc ttgttacgac tt 22

<210> 5

<211> 1440

<212>

DNA

<213> Streptomyces griseolus

<400> 5

catggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gatgaagcct 60

ttcggggtgg attagtggcg aacgggtgag taacacgtgg gcaatctgcc cttcactctg 120

ggacaagccc tggaaacggg gtctaatacc ggataacact ctgtcccgca tgggacgggg 180

ttaaaagctc cggcggtgaa ggatgagccc gcggcctatc agcttgttgg tggggtgatg 240

gcctaccaag gcgacgacgg gtagccggcc tgagagggcg accggccaca ctgggactga 300

gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgaaagc 360

ctgatgcagc gacgccgcgt gagggatgac ggccttcggg ttgtaaacct ctttcagcag 420

ggaagaagcg aaagtgacgg tacctgcaga agaagcgccg gctaactacg tgccagcagc 480

cgcggtaata cgtagggcgc aagcgttgtc cggaattatt gggcgtaaag agctcgtagg 540

cggcttgtca cgtcggatgt gaaagcccgg ggcttaaccc cgggtctgca ttcgatacgg 600

gctagctaga gtgtggtagg ggagatcgga attcctggtg tagcggtgaa atgcgcagat 660

atcaggagga acaccggtgg cgaaggcgga tctctgggcc attactgacg ctgaggagcg 720

aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgttgggaa 780

ctaggtgttg gcgacattcc acgtcgtcgg tgccgcagct aacgcattaa gttccccgcc 840

tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccg cacaagcagc 900

ggagcatgtg gcttaattcg acgcaacgcg aagaacctta ccaaggcttg acatataccg 960

gaaagcatca gagatggtgc ccccccttgtg gtcggtatac aggtggtgca tggctgtcgt 1020

cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tgttctgtgt 1080

tgccagcatg cccttcgggg tgatggggac tcacaggaga ctgccggggt caactcggag 1140

gaaggtgggg acgacgtcaa gtcatcatgc cccttatgtc ttgggctgca cacgtgctac 1200

aatggccggt acaatgagct gcgatgtcgc aaggcggagc gaatctcaaa aagccggtct 1260

cagttcggat tggggtctgc aactcgaccc catgaagtcg gagttgctag taatcgcaga 1320

tcagcattgc tgcggtgaat acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacgtcacga 1380

aagtcggtaa cacccgaagc cggtggccca acccccttgtg ggagggagct gtcgaagtgg 1440

1440