



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0078404
(43) 공개일자 2024년06월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/107 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
A61K 36/258 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/1075 (2013.01)
A61K 31/352 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2024-0046852 (분할)
(22) 출원일자 2024년04월05일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2022-0095654
원출원일자 2022년08월01일
심사청구일자 2022년08월01일
- (30) 우선권주장
1020210100389 2021년07월30일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
케이디바이오 주식회사
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 비114-에이1호(회기동, 경희대학교 네오르네상스관)
- (72) 발명자
김연주
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 생명과학대학 508호
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 18 항

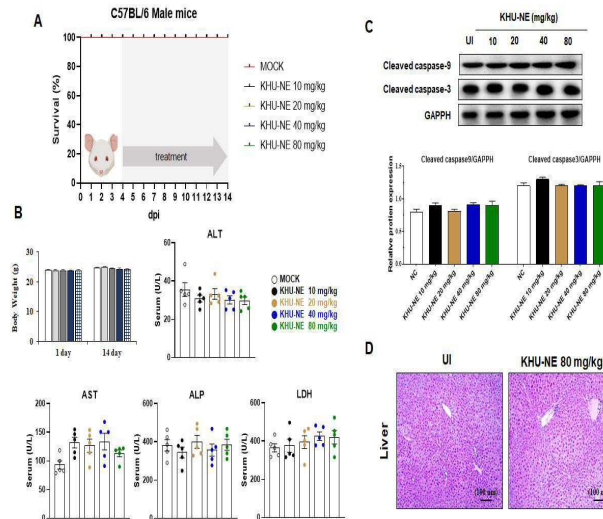
(54) 발명의 명칭 항바이러스 조성물 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 실리디아닌을 포함하는 인삼 금 나노에멀전을 포함하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 조성물은 현저한 항바이러스 효과가 있음을 확인하였는 바, 바이러스 질환의 치료, 예방 및 개선이나, 염증 질환의 치료, 예방 및 개선을 위한 제약, 의약품, 식품 및 화장품 등의 분야에서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61K 36/258 (2013.01)

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2023.02)

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 31/14 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는, 항바이러스용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 금 나노입자는 인삼뿌리 추출물을 포함하는 것인, 항바이러스용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 인삼 뿌리 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 것인, 항바이러스용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 인삼 금 나노입자는 인삼 뿌리 추출물 및 금이온(Au^{3+})를 혼합한 후 상기 금이온을 환원시켜 제조된 것인, 항바이러스용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 수중유(o/w)나노에멀전을 형성하는 것인, 항바이러스용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 수중유 나노에멀전은 인삼 종자유를 더 포함하는 것인, 항바이러스용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 수중유 나노에멀전은 계면활성제를 더 포함하는 것인, 항바이러스용 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 수중유 나노에멀전은 인삼 금 나노입자, 실리디아닌, 인삼 종자유 및 계면활성제를 혼합한 후 초음파 처리하여 제조된 것인, 항바이러스용 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 사스-코로나바이러스-2(Covid 19), 사스-코로나바이러스 및 메르스-코로나바이러스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인, 항바이러스용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 바이러스 감염 질환은 사스-코로나바이러스-2(Covid 19), 사스-코로나바이러스 및 메르스-코로나바이러스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 감염 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 염증 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 염증 질환은 폐렴, 진균성 염증 또는 다기관염증증후군인 것인, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 항염증용 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 염증 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 염증 질환 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 실리디아닌을 포함하는 인삼 금 나노에멀전을 포함하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 산삼은 두릅나무과의 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)으로써, 이러한 인삼의 효능은 신진대사 촉진 작용, 혈당 강하, 혈압강하, 면역력 향상, 암세포 억제, 피로 회복 및 노화 방지 효능을 보유하고 있다. 이는 인삼에 존재하는 활성성분인 진세노사이드(Ginsenoside)에 의한 효능으로써, 진세노사이드는 구조에 따라 프로토파낙사다이올계 진세노사이드(Protopanaxadiol-type ginsenoside), 프로토파낙사트라이올계 진세노사이드(Protopanaxatriol-type ginsenoside), 그리고 올레아난계 진세노사이드(Oleanane-type ginsenoside)로 분류된다.

[0004] 진세노사이드 흡수율을 측정한 식약처 자료에 따르면 실험대상자의 25%가 장내 미생물의 효소 비활성화로 인해 진세노사이드를 온전히 혈액으로 흡수하지 못했다. 또한, 진세노사이드를 흡수했다 하더라도 개인별로 효능에 대한 차이를 보였으며 성별 및 나이와는 관련이 없는 것으로 나타났다. 이는 인삼의 효능이 사람마다 다른 이유가 장내 미생물 때문이라는 결론을 도출하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는, 항바이러스용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 항염증용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 항바이러스용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 용어, 인삼은 두릅나무과(Araliaceae)에 속한 식물로, 다른 식물과 비교할 때, 성장이 매우 느리고, 다년생인 식물이며, 대부분은 한국, 중국의 북동쪽, 또는 시베리아 극동지역에서 발견되는 식물을 의미한다. 구체적으로, 상기 인삼은 인삼(*panax ginseng*), 홍삼(*red ginseng*) 또는 산삼(*wild ginseng*)을 선택할 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 용어, 인삼 금 나노입자(MG-AuNPs)는 상기 인삼 추출물에 금 나노입자가 결합된 형태로, 상기 나노입자는 크기가 최소한 1~100nm인 초미세 입자로, 작은 크기에 기인하는 특이하고도 다양한 성질을 보이는 입자를

의미한다.

- [0018] 본 발명에서 금 나노입자는 구체적으로 인삼 뿌리 또는 잎 추출물, 홍삼 뿌리 추출물 또는 산삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된, 본 발명의 금 나노입자는 각 추출물의 생리활성 물질을 포함하고 있어, 실리디아닌과 결합된 형태로 항바이러스능을 가짐에 따라 유용하게 활용될 수 있다.
- [0020] 상기 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 조성물은 인삼 금 나노 에멀전(SMG-AuNEs) 상태로 사용될 수 있으며, 이때 상기 인삼 금 나노 에멀전은 수중유(o/w) 나노에멀전을 형성하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 에멀전은 유상 또는 수상의 섞이지 않는 액체 중 하나 이상을 미립자 상태(분산질)로 다른 액체(분산매)에 분산시켜 놓은 혼합상을 말한다. 에멀전은 분산상의 입도 크기에 따라, 통상적으로, 매크로에멀전, 마이크로에멀전, 나노에멀전으로 나누어진다. 이 때 에멀전의 안정도, 유동학적 특성, 질감 등은 에멀전을 구성하고 있는 오일/물/계면활성제 시스템의 각 성분들의 물성과 각 성분들 간의 혼화성(miscibility), 수/유 계면의 장력에 의해 결정된다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 인삼 뿌리 추출물 또는 산삼 뿌리 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로부터 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 산삼 뿌리 또는 인삼 뿌리 70%(v/v) 에탄올 추출물인 것이 바람직하다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 추출물은 원물로부터 침출액으로 짜내고 침출액을 증발시켜 농축한 제제를 의미하는 것으로, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제 물 또는 정제물일 수 있다.
- [0024] 상기 인삼 뿌리는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있고, 세척하여 그대로 사용하거나 건조하여 사용할 수 있으며, 건조방법으로는 양건, 음건, 열풍건조, 자연 건조하는 방법 등을 모두 사용할 수 있다.
- [0025] 상기 산삼 뿌리 또는 인삼 뿌리 추출물의 추출 온도는 20 내지 40℃인 것이 바람직하다.
- [0026] 또한 추출방법으로는 열수추출법, 침지추출법, 환류추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파 추출법, 용출법, 압착법 등의 다양한 방법이 사용될 수 있으나 이에 제한되지는 않고, 바람직하게는 침지추출법으로 추출된 것이다.
- [0027] 상기 인삼 뿌리 추출물 또는 산삼 뿌리 추출물은 당업계에서 알려진 통상의 방법으로 상온에서 냉침, 가열 및 여과하여 액상물을 얻을 수 있으며, 또는 추가로 용매를 증발, 분무건조 또는 동결건조할 수도 있다. 또한 상기 인삼 뿌리 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수도 있다. 또한 상기 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획으로도 얻을 수 있다.
- [0028] 본 발명의 구체예에서, 상기 인삼 금 나노입자는 인삼 뿌리 추출물 및 금이온(Au³⁺)을 혼합한 후 상기 금이온을 환원시켜 제조된 것이 바람직하다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 실리디아닌(silydianin)은 실리빈, 이소실리빈 및 실리크리스틴과 함께 실리마린 복합체를 이루는 플라보리그난의 한 종류이다. 실리마린은 항산화, 항암 및 신경 보호 활성이 알려져 있으나, 그 활성 성분인 실리디아닌은 효능에 대해 연구되지 않았다.
- [0030] 본 발명의 구체예에서, 상기 수중유 나노에멀전은 인삼 종자유를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 인삼 종자유는 인삼 종자를 배유 및 껍질로 분리한 후 가열압착하여 추출된 오일을 의미한다.
- [0032] 본 발명의 구체예에서, 상기 수중유 나노에멀전은 계면활성제를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0033] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 계면활성제는 Tween 80 및 Span 80의 혼합물인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 전체 조성물에 대하여 Tween 80 2부피% 및 Span 80 1부피%로 혼합되는 것이나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0034] 본 발명의 구체예에서, 상기 수중유 나노에멀전은 인삼 금나노입자, 실리디아닌, 인삼 종자유 및 계면활성제를 혼합한 후 초음파 처리하여 제조된 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 인삼 금 나노입자 70 내지 90부피부, 실리디아닌 1 내지 10부피부, 인삼 종자유 1 내지 15부피부 및 계면활성제 1 내지 15 부피부로 혼합한 후 초음파

처리하여 제조된 것이다.

- [0035] 본 발명의 구체예에서, 상기 수중유 나노에멀전은 수분 입자 크기가 1 내지 600 nm인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 100 내지 500 nm, 더욱 바람직하게는 실온 조건에서 200 내지 300 nm이다.
- [0036] 본 발명의 구체예에서, 상기 수중유 나노에멀전은 제타전위가 10 내지 30 mv인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 22 내지 26 mv이며, 가장 바람직하게는 24.20 mv이다.
- [0037] 본 발명에서 "항바이러스"는 병원성 바이러스의 증식 또는 복제를 억제하여 바이러스 감염을 감소, 억제 또는 예방하는 효과를 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 항바이러스 활성에 의해 바이러스의 증식 또는 복제가 억제되는 "병원성 바이러스"는 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 이의 예로는 동물 또는 사람에서 질병을 일으키는 바이러스로, 병원성 바이러스의 예로는 오소믹소비리데(Orthomyxoviridae) 속 바이러스, 피코르나비리데(Picornaviridae) 속 바이러스, 레트로비리데(Retroviridae) 속 바이러스, 헤르페스(Herpes) 속 바이러스, 필로비리데(Filoviridae)속 바이러스, 코로나비리데(Coronaviridae) 속 바이러스, 헤파드나비리데(Hepadnaviridae) 속 바이러스, 플라비비리데(Flaviviridae) 속 바이러스, 부나비리데(Bunyaviridae) 속 바이러스 등을 포함할 수 있다. 병원성 바이러스는 예를 들어 인플루엔자 바이러스, B형 및 C형 간염 바이러스, 뇌심근염 바이러스, 뎅고 바이러스(Mengovirus), 에볼라바이러스(Ebolavirus), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus; SARS), 중동호흡기증후군 코로나바이러스(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS), 레오바이러스(Reovirus), HIV (human immunodeficiency virus), HCMV (human cytomegalovirus), 또는 한탄 바이러스 등일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 보다 구체적으로, 상기 바이러스는 코로나 바이러스일 수 있고, 구체적으로는 상기 코로나바이러스는 사스-코로나바이러스-2(Covid 19), 사스-코로나바이러스 및 메르스-코로나바이러스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 보다 구체적으로는 사스- 코로나바이러스-2일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 구체예에서는 SARS-CoV-2에 의해 유도된 Covid-19 감염 동물 모델을 이용하여 본 발명의 상기 조성물을 투여하여 항바이러스능 및 바이러스 감염 질환의 치료, 예방 및 개선 효과를 확인한 바 있다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 바이러스 감염 질환의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0043] 상기 '인삼 금 나노입자' 및 '실리디아닌'는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0044] 본 발명의 용어, 바이러스 감염 질환은 바이러스의 감염에 의해 발병되는 질환을 의미한다. 상기 용어, "감염"은 병원성 미생물이 숙주가 되는 생물체의 체내에 침입하여, 발육증식한 상태를 의미한다. 본 발명의 바이러스 감염 질환은 바이러스에 의해 감염되어 발생할 수 있는 모든 질환을 포함할 수 있다.
- [0045] 구체적으로, 오소믹소비리데(Orthomyxoviridae) 속 바이러스, 피코르나비리데(Picornaviridae) 속 바이러스, 레트로비리데(Retroviridae) 속 바이러스, 헤르페스(Herpes) 속 바이러스, 필로비리데(Filoviridae)속 바이러스, 코로나비리데(Coronaviridae) 속 바이러스, 헤파드나비리데(Hepadnaviridae) 속 바이러스, 플라비비리데(Flaviviridae) 속 바이러스, 부나비리데(Bunyaviridae) 속 바이러스 등을 포함할 수 있다. 병원성 바이러스는 예를 들어 인플루엔자 바이러스, B형 및 C형 간염 바이러스, 뇌심근염 바이러스, 뎅고 바이러스(Mengovirus), 에볼라바이러스(Ebolavirus), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus; SARS), 중동호흡기증후군 코로나바이러스(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus; MERS), 레오바이러스 (Reovirus), HIV (human immunodeficiency virus), HCMV (human cytomegalovirus), 또는 한탄 바이러스 등의 감염에 의해 발생할 수 있는 질환을 의미할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 구체적으로, 코로나 바이러스에 감염에 의한 질환일 수 있고, 더욱 구체적으로 사스-코로나바이러스-2(Covid 19), 사스-코로나바이러스 및 메르스-코로나바이러스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 감염 질환일 수 있고, 보다 구체적으로는 사스- 코로나바이러스-2의 감염 질환일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 용어, "사스-코로나바이러스-2(SARS-CoV-2)"는 호흡기 질환인 코로나바이러스 질환-19(coronavirus disease 2019; COVID-19)를 야기하는 바이러스 균주이다. 국립보건원(National Institutes of Health; NIH)에

의해 공지된 바와 같이, 사스-코로나바이러스(SARS-CoV)의 계승자(successor)이다. SARS-CoV-2는 양성 단일가닥 RNA 바이러스(positive-sense single-stranded RNA virus)이다. 인간에서 전염성이 있으며(contagious), 세계 보건기구(World Health Organization; WHO)는 국제적 공중보건 비상사태(Public Health Emergency of International Concern; PHEIC)로 COVID-19의 진행성 팬데믹(ongoing pandemic)을 선언하였다.

- [0048] SARS-CoV-2는 분류학적으로 SARS-CoV의 계통(strain)으로, 동물원성 감염증의 기원(zoonotic origins)을 가지며, 박쥐 코로나바이러스와 근접한 유전적 유사성을 갖는 것으로 간주된다. 상기 SARS-CoV-2는 주로 사람들 간의 긴밀한 접촉을 통해 및/또는 기침이나 재채기시 발생하는 비말을 통해 전파되며, 주로 수용체 안지오텐신 전환 효소 2(receptor angiotensin converting enzyme 2; ACE2)에 결합하여 인간 세포에 진입한다.
- [0049] 본 발명의 용어, "사스-코로나바이러스(SARS-CoV)"는 외피를 지닌 베타 코로나바이러스 속에 속하는 ssRNA 바이러스이다. 전체 게놈이 29,727 뉴클레오타이드로 구성되며, 현재까지 알려진 RNA 바이러스 중에서 가장 큰 게놈을 갖는 바이러스이다. 사스-코로나바이러스의 게놈은 11개의 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)을 갖고 있으며 23종에 달하는 단백질을 코딩하고 있는 것으로 알려졌다. 사스-코로나바이러스의 주요 구조 단백질은 뉴클레오키프(nucleocapsid, N), 스파이크(spike, S), 멤브레인(membrane, M), 스몰 엔벨로프(small envelope, E) 단백질임이 밝혀졌다
- [0050] 이들 단백질에 대한 염기서열 분석결과, 사스-코로나바이러스가 다른 코로나바이러스와 비교하여 약 40 ~ 50% 정도의 매우 낮은 서열 상동성을 가짐이 밝혀졌다. 코로나바이러스의 항원성에 따른 계통발생학적 분류에 따르면, 사스 코로나바이러스는 α , β 및 γ 그룹 중 β 그룹과 유연관계가 높은 것으로 나타났다.
- [0051] 본 발명의 용어, "메르스-코로나바이러스(MERS-CoV)"는 2012년 9월 24일에 새롭게 발견된 베타 코로나바이러스 속에 속하는 ssRNA 바이러스로, 5'-복제효소-구조 단백질(spikeenvelope-membrane-nucleocapsid)-poly(A)-3'[5'-ORF1a/b-S-E-M-N-poly(A)]의 구조를 갖는다. 메르스-코로나바이러스 게놈은 계통 발생적으로 계통군 A, 계통군 B로 분류되는데, 초기 메르스 사례들은 계통군 A였고(EMC/2012 and Jordan-N3/2012), 새로 보고된 사례들은 유전적으로 별개인 계통군 B이다(Emerging Infectious Diseases, Vol. 20, No. 6, June 2014).
- [0053] 본 발명의 약학적 조성물은 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함함으로써, 바이러스의 감염에 의한 급성 염증 반응을 억제하는 효과가 뛰어남을 확인하였는 바, 바이러스 감염 질환의 치료, 예방 및 개선에 유용하게 사용할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 시리아 햄스터의 SARS-CoV-2에 의해 유도된 Covid-19 감염 동물 모델을 이용하여 본 발명의 상기 조성물을 투여한 경우 폐조직의 염증성 사이토카인의 발현 억제로 인한 폐렴 염증반응의 감소, 체중감소 억제 효과를 확인하였으며, 장기간 투여에 의한 독성을 유발하지 않음을 확인하였다.
- [0055] 본 발명의 용어 "예방"은, 상기 약학적 조성물의 투여로 암 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0056] 또한, 본 발명의 용어 "치료"는, 상기 약학적 조성물의 투여로 암 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0057] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체, 부형제 또는 희석제를 의미할 수 있으며, 구체적으로, 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)이 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0059] 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0060] 상세하게는, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제

는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0061] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[0062] 상기 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 조성물이 각각 1일 0.0001 내지 1000mg/kg으로, 구체적으로는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여되도록, 상기 약학적 조성물을 투여할 수 있다.

[0063] 상기 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0064] 본 발명의 약학적 조성물을 매일 투여 또는 간헐적으로 투여해도 좋고, 1일당 투여 횟수는 1회 또는 2~3회로 나누어 투여하는 것이 가능하다. 두 유효성분이 각각 단체인 경우의 투여횟수는 같은 횟수여도 좋고, 다른 횟수로 해도 된다. 또한, 본 발명의 조성물은 암 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 다른 약물 치료와 병용하여 사용할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0065] 상기 개체란 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적으로는, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0066] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 조성물 또는 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 나노에설전을 수컷 쥐(8주령)에 10 내지 80mg/kg/day 14일간 경구투여 후 독성을 평가한 결과 독성이 유발하지 않음을 확인하였고, 1mg/kg 내지 10mg/kg 농도에서 처리하였고, 보다 구체적으로 3mg/kg, 6mg/kg, 9mg/kg 농도에서 감염 후 1 내지 6 일(dpi)로 경구 치료하여 급성염증반응 감소 효과를 확인한 바 있다.

[0067] 이를 통해 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 조성물이 항바이러스 효과 및 바이러스 감염에 의한 예방, 개선 및 치료효과를 가짐을 알 수 있었다.

[0069] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

[0070] 상기 '인삼 금 나노입자', '실리디아닌' 및 '바이러스 질환'은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0071] 본 발명에서 사용되는 용어 "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미한다.

[0072] 본 발명에서 상기 의약품 조성물은 바이러스 감염질환의 예방 또는 개선 효과를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0073] 본 발명의 의약품 조성물에는 상기 성분 외에 필요에 따라 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 본 발명의 효과를 해하지 않는 한 제한되지 않으며, 예를 들어 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제,

방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

- [0075] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0076] 상기 '인삼 금 나노입자', '실리디아닌' 및 '바이러스 질환'은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0077] 본 발명의 용어 "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강 식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [0078] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 염증성 질환의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0079] 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강 식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다.
- [0080] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 본 발명의 화합물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [0081] 본 발명의 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 암 질환의 예방 또는 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있으므로, 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0082] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [0083] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0084] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아조산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0085] 본 발명의 화합물은 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에

유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

- [0086] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.
- [0087] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강음료 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0088] 본 발명의 식품 조성물은 바이러스 감염 질환의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0091] 상기 '인삼 금 나노입자', '실리디아닌', '예방', '치료', 및 '약학적 조성물'은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0092] 상기 염증 질환은 특정 조직의 손상 또는 감염에 대한 생체 내 반응으로 나타난 염증에 의해 발생한 질환으로, 구체적으로는 바이러스로 유발된 염증으로 인한 질환을 의미하고, 보다 구체적으로는 바이러스로 유발된 폐렴, LPS에 의해 유도되는 전신성 염증 또는 다기관염증증후군일 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니다.
- [0093] 상기 폐렴은 바이러스 감염에 의해 발생하는 폐의 염증으로 폐의 정상적인 기능에 장애가 생겨 발생하는 폐 증상과 신체 전반에 걸친 전신적인 증상, 예컨대 호흡기계 자극에 의한 기침, 염증 물질의 배출에 의한 가래, 숨쉬는 기능의 장애에 의한 호흡곤란 등이 증상을 포함할 수 있고, 그 외 구역, 구토, 설사 등 소화기 증상, 두통, 피로감, 근육통, 관절통 등의 전신 질환, 발열, 오한 등을 포함하는 질환일 수 있다.
- [0094] 상기 다기관 염증증후군은 온몸에 염증 반응이 일어나는 질환으로, 소아 다기관염증증후군(MIS-C, Multisystem inflammatory syndrome in children)이라고도 불리며, 코로나19와 연관성이 있는 것으로 추정되는 질환으로, 고열, 피부발진, 심할 경우 심장 동맥의 염증을 동반한 독성쇼크 증상이 나타나는 것으로 보고된다.
- [0096] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 항염증용 조성물을 제공한다.
- [0097] 상기 '인삼 금 나노입자', '실리디아닌', 및 '염증'은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0099] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0100] 상기 '인삼 금 나노입자', '실리디아닌', '예방', '개선', 및 '식품 조성물'은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0102] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0103] 상기 '인삼 금 나노입자', '실리디아닌', '예방', '개선', 및 '의약품 조성물'은 상기에서 설명한 바와 같다.

발명의 효과

[0105] 본 발명의 인삼 금 나노입자 및 실리디아닌을 포함하는 조성물은 현저한 항바이러스 효과가 있음을 확인 하였는 바, 바이러스 질환의 치료, 예방 및 개선이나, 염증 질환의 치료, 예방 및 개선을 위한 제약, 의약품, 식품 및 화장품 등의 분야에서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0107] 도 1은 산삼 뿌리 추출물과 나노에멀전(SWGAuNE) 합성의 개략도를 나타낸 것이다.

도 2는 나노에멀전 액적을 나타낸 것이다.

도 3은 합성된 나노입자의 UV-Vis 스펙트럼의 반응 조건 평가결과이다. 여기에서, (A) WG 추출물; (B) 금염 농도; (C) WG-AuNPs의 UV-vis 스펙트럼의 시간 및 (D) 온도 및 WG-AuNPs 나노입자 합성 중 색상 변화 패턴을 나타내는 각 사진들이다.

도 4는 합성된 WG-AuNPs의 최적화된 조건을 나타낸 것이다.

도 5는 HLB 값에 따른 계면활성제 최적화를 나타낸 것이다.

도 6은 나노에멀전 제조를 위한 최적화 매개변수를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 금 나노 에멀전(KHU-NE)을 SARS-CoV-2에 감염된 동물모델에 투여한 임상 추적결과로, (A) 현재 연구의 연구 계획(B-C) n일(dpi)에 표준화된 체중은 다음과 같이 계산되었다: n일에 동물의 초기 체중의 %. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. 그룹 비교는 사후 테스트와 함께 일원 ANOVA 테스트를 사용하여 수행되었다.

도 8은 본 발명의 금 나노 에멀전(KHU-NE) 투여에 따른 실험 동물의 폐 무게에 미치는 영향을 나타낸 것이다. (A) 바이러스 감염 4일 및 7일 후 폐의 형태 (B) 수집 후 실험 동물의 폐 무게를 측정된 결과이며, 폐 중량의 백분율은 다음과 같이 계산하였다: 폐 중량(g)/체중(g) * 100. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. (C) 바이러스 계층 사본/ β -액틴 유전자 사본에서 발현된 바이러스 RNA 수율(RT-qPCR 분석을 사용하여 측정)을 기반으로 한 폐에서의 바이러스 복제결과이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시되며, 일원 ANOVA unpaired t-test에 의해 결정된 SARS-CoV-2 감염군과 비교하여 *, $p < 0.05$ 이다.

도 9는 본 발명의 금 나노 에멀전(KHU-NE) 투여 요법에 따른 폐 조직학적 변화를 나타낸 것이다. (A-B) 조직 섹션을 헤마톡실린-에오신(H&E)으로 염색하였으며, 모든 병리학적 데이터는 병리학자가 검토하고 확인하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시되며, 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다. *, One-way ANOVA unpaired t-test에 의해 결정된 SARS-CoV-2 감염 그룹과 비교하여 $p < 0.05$ 이다.

도 10은 4 dpi에서 SARS-CoV2 감염에 대한 금 나노 에멀전(KHU-NE) 투여의 효과를 평가하기 위한 전염증성 유전자 발현의 비교한 결과이다. (A-F) 총 RNA는 폐의 우엽에서 분리되었다. IL-1 β , IL-6, IL-17A, MCP-1 및 TNF- α 는 염증 유발 유전자로 선택하였고 IL-10은 항염증 유전자로 선택하였다. cDNA 합성 후, 이들 유전자의 발현 수준을 실시간 qPCR로 분석하였다. β -액틴의 발현 수준을 내부 대조군으로 사용하였고, 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 11은 7 dpi에서 SARS-CoV2 감염에 대한 금 나노 에멀전(KHU-NE) 투여의 효과를 평가하기 위한 전염증성 유전자 발현의 비교한 결과이다. (A-F) 총 RNA는 폐의 우엽에서 분리되었습니다. IL-1 β , IL-6, IL-17A, MCP-1 및 TNF- α 는 염증 유발 유전자로 선택하였고 IL-10은 항염증 유전자로 선택하였다. cDNA 합성 후, 이들 유전자의 발현 수준을 실시간 qPCR로 분석하였다. β -액틴의 발현 수준을 내부 대조군으로 사용하였고, 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시된다.

도 12는 금 나노 에멀전(KHU-NE)의 독성실험결과이다. 특정 독성은 정상 마우스의 생리학 및 조직학에서 분명하지 않았다. (A) 정상 마우스는 14일 동안 10, 20, 40 및 80 mg/kg/day의 KHU-NE로 처리되었다. (B) 체중은 실험의 첫 날과 마지막 날(KHU-NE 마지막 투여 후 24시간 후 및 단식 후 12시간 후)에 측정하였다. 실험 말미에 ALT, AST, ALP 및 LDH를 포함한 주요 간 효소의 평균 혈청 수준은 효소 또는 자외선 분석을 사용하여 측정되었으며, 두 가지 세포 사멸 효소인 cleaved caspase-3 및 cleaved caspase-9의 평균 단백질 발현 수준은 Western blot assay(C)로 평가하였고, 간 조직학적 구조를 H&E 염색(D)으로 시험하였다. CV, 중심 정맥. 스케일 바 =

100 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0108] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0110] 실시예 1. 인삼 금 나노입자 및 금 나노 에멀전의 제조

[0111] 1-1. 실험재료

[0112] 산삼(인삼) 뿌리와 발효인삼씨유는 경기도 (대한민국 남양주)에서 입수하였다. 실리디아닌 분말 형태는 천연자원센터 (중앙대학교, 서울, 대한민국)에서 수집하였다. Hydrogen tetrachloroaurate (III) hydrate (금염), Tween 80, Span 80은 Sigma-Aldrich Chemicals(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 항생제 페니실린 스트렙토마이신, 태아 소 혈청(FBS 옵티 골드) 및 트립신-EDTA(1X)는 GenDEPOT Inc. (San Antonio, TX, USA)에서 구입하였다. 인산염 완충 식염수는 Biosesang (대한민국 성남)에서 구입하였다. pyruvate와 high glucose가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)은 (Gen DEPOT, MA, USA)에서 구입하였다. Cellular ROS 염색 키트, Abcam(Cambridge, UK)에서 얻은 프라이머 및 본 연구에 사용된 항체는 Cell signaling technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. MTT, 디메틸 설펝사이드(DMSO)는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 이 연구에 사용된 모든 유형의 시약은 고품질이며 상업적으로 이용 가능하다.

[0113]

[0114] 1-2. 산삼 뿌리 추출물의 제조

[0115] 신선한 산삼 뿌리 샘플을 수돗물로 반복 세척하고 자연 건조시켰다. 그 다음 뿌리를 분쇄기로 건조시켜 가루로 만들었다. 이후, 산삼 뿌리 분말 100g을 70% 에탄올 500mL에 충분히 현탁시키고 37°C에서 24시간 동안 보관하였다. 이 과정을 2회 더 반복하고 합한 추출물을 여과하고 50 °C에서 회전 증발기로 증발시켰다. 그 후, 증발된 추출물을 동결 건조시키고 추가 사용을 위해 4°C에 보관하였다.

[0117] 1-3. 산삼뿌리추출물을 이용한 금 나노입자 합성

[0118] 먼저 산삼 동결건조 뿌리 추출물 10mg을 멸균수 20mL에 녹였다. 그 다음 Au 염을 1mM의 최종 농도로 해당 반응 혼합물에 첨가하였다. Au³⁺에서 Au 원자로의 환원을 위해, 반응 혼합물을 오일 베스에서 10분 동안 80 °C로 유지하자, 반응 혼합물에서 금 나노 입자의 형성을 나타내는 색상 변화가 현저하게 나타났다. 그 후, 반응 혼합물을 14500rpm에서 20분 동안 원심분리하여 정제하고 다른 성분을 제거하였다. 침전된 알갱이(WG-AuNPs)를 원심분리(12,000rpm, 10분, 4°C)로 수집하고 철저히 세척하고 멸균수에 재현탁했다. 현탁액을 공기 건조시켜 분말 WG-AuNP를 수득하였다.

[0120] 1-4. 실리디아닌 함유 산삼 금 나노에멀전의 제조

[0121] 고압초음파법으로 본 발명의 나노에멀전을 제조하였다. 구체적으로, SWG-AuNE를 제조하기 위해 인삼씨유, 계면활성제 및 보조계면활성제의 최적화를 먼저 수행하였다. 다음으로, 계면활성제의 비율을 선택하고 고정하기 위해 HLB 값은 Griffins 법칙을 이용해 두 계면활성제를 혼합하여 계산하였다. Griffin에 따르면, 유화제는 친수성 그룹과 친유성 그룹을 결합한 분자로 구성되며, 이러한 두 반대 그룹의 크기 및 강도의 균형을 HLB라고 한다. 편의상 이러한 그룹의 유효 균형에는 숫자 값이 할당된다.

$$\frac{S1 \times HLB1 + S2 \times HLB2}{S1 + S2}$$

[0122]

[0123] HLB 값 1 = 계면활성제 1 HLB 값,

- [0124] HLB 값 2 = 계면활성제 2 HLB 값
- [0125] 계면활성제 1(%) = 1에서 가져온 계면활성제의 양
- [0126] 계면활성제 2(%) = 2에서 가져온 계면 활성제의 양
- [0127] 이 연구는 Tween 80을 계면활성제 1로, span 80을 계면활성제 2로 사용함.

[0129] 그런 다음 인삼씨유와 계면활성제의 비율을 달리하여 총 4개의 샘플을 준비하여 안정성을 평가하였다. 최적화된 샘플을 S1, S2, S3 및 S4로 명명하였다.

[0130] 이를 위해 WG-AuNPs는 물에 용해하고 silydianin은 70% 에탄올에 용해하였다. 실온에서 계속 교반하면서 비커에 물과 GS 오일을 넣었다. 그 다음, 4:2 비율((계산된 HLB 값 11.43임)의 계면활성제 혼합물 (tween 80 및 span 80)을 천천히 한 방울씩 첨가하였다.

[0131] 다음으로, 용해된 WG-AuNPs 및 silydianin을 교반 혼합물에 한 방울씩 혼합하였다. 그 후, 초음파 처리기 (Hielscher, Ultrasonic 기술)에 의해 30분 동안 10초 펄스 속도, 80% 진폭으로 고초음파 처리를 수행하였다. 시각적 안정성을 확인하기 위해 7일간 4세트를 준비하였다. 그 중에서 가장 최적화된 WG-AuNE를 동결 건조하고 특성화 및 세포 실험을 위해 4 °C로 유지하였다. 이 방법으로 수중유(o/w) 나노에멀전은 물, silydianin(5%), 산삼금나노입자, 인삼씨유, 계면활성제 tween 80 및 보조 계면활성제 span 80을 사용하여 제조하였다.

[0133] 1-5. 나노에멀전의 합성 및 특성화

[0134] (1) WG-AuNP(Wild Ginseng Nanoparticles)의 생합성

[0135] WG-AuNPs 합성을 위한 최적의 조건은 시간, WG와 HAuCl₄의 농도, 온도에 따라 모니터링하였다. 노란색에서 보라 색으로 변하는 색상 변화를 육안으로 관찰하고 흡광도를 측정하여 합성 방법을 최적화하였다. 그 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, 성공적인 WG-AuNPs 합성을 위한 최적의 조건은 10mg WG, 1mM HAuCl₄, 80° C, 수조에서 10분이었다. 도 3(A, B, C, D)은 WG-AuNPs의 최대 흡수를 관찰하기 위한 UV-Vis 분광법으로, 이를 통해 λ_{max} 값이 545 nm임을 확인할 수 있다.

[0137] 1-6. HLB 값에 의한 나노에멀전의 최적화 과정

[0138] 먼저 최적의 비율을 확인하기 위해 계면 활성제를 최적화하고 HLB 차트에 따라 공식을 적용하여 값을 계산하였다. 이 연구에서 4% tween 80 및 2% span 80은 11.43의 값으로 최적화하였다(도 5). 여기서 Tween 80과 Span 80의 HLB 값은 각각 15와 4.3다.

[0140] 다양한 비율의 물, 계면 활성제, 샘플과 오일을 혼합하여 제제의 가시적 안정성을 확인하였다(도 6). 그 결과, 도 6에서 확인할 수 있듯이, 1주 후, S4는 거의 크림색으로 변했고 S1과 S2에서 침전물이 발견되는 것을 확인하였다. S1, S2, S3 및 S4 중 가장 최적화된 S3 샘플을 DLS 측정, PDI 지수 및 zeta potential에 의한 저장 안정성 평가(4, 25 및 60° C에서 90일 동안 안정성 연구)에 추가로 사용하였다. 모든 측정은 실온에서 3번씩 수행되었고, 24~48시간의 샘플 준비와 다양한 온도에서의 저장이 수행되었다.

[0141] 마지막으로, SWG-AuNE는 30mg의 WG-AuNPs와 인삼씨유(8%), 계면활성제(6%)를 포함하는 81% 수성 부분을 포함하고 5% silydianin (30mg)을 혼합하였다.

[0143] 실시예 2. 항바이러스능의 확인

[0144] 2-1. 시리아 햄스터의 바이러스 감염

[0145] 수컷 시리아 햄스터(Mesocricetus auratus; 품종 RjHan: AURA, 8주, 90-150g)를 9개 그룹(그룹당 n = 7개)으로 분리하고 사료는 중앙실험동물 주식회사(서울특별시 서초구 바우피로 7길)에서 얻었다. 본 실험은 실내온도 23 ± 3°C, 상대습도 55 ± 15%, 환기횟수 10~20회/h, 조명시간 12시간으로 하여 전북대학교병원 실험동물실(한국 전

라북도 전주시)에서 실시하였다. 사육기간 중 동물실의 온/습도, 환기횟수, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정하였다. 물은 정수된 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 폴리카보네이트 음수병을 사용하였다. 깔개는 (주)코아텍(경기도 평택시 진위면 동천리)에서 공급받았다. 순화, 투여, 채혈 기간에는 폴리카보네이트 사육상자(W235 x L 380 x H 175 mm)를 사용하였다. 사육상자, 깔개 및 물병은 모두 주 1회 이상 교체하였다. 순화 과정에서 각 그룹의 평균 체중은 순위화한 체중에 따라 최대한 균일하게 분포하였다.

[0146] 중증 급성 호흡기 질환(SARS-CoV-2)(NCCP No. 43330)은 국가병원체자원은행에서 제공받았고, Vero E6에서 바이러스 양을 정량화한 다음, 시리아 햄스터 당 105PFU(100 μ l)로 감염시켰으며, 이는 전북대학교 인수공통전염병 연구소 ABSL-3 특수시설 내에서 진행하였다.

[0147] 비강 접종은 다음 그룹에 처리하였다: 감염군 SARS-CoV-2 및 비감염군 대신 감염 후 4일 및 7일(dpi)된 처리군으로 SARS-CoV-2 + KHU-NE Low(3 mg/kg), SARS-CoV-2 + KHU-NE Medium(6 mg/kg) 및 SARS-CoV-2 + KHU-NE High(9 mg/kg). SARS-CoV-2 감염 후 경구 치료는 1~6dpi로 투여되었다. 연구 단계 동안 모든 햄스터를 매일 검사하여 사망 징후를 확인하고 체중을 측정하였다. 동물사용지침에 따라 72시간 동안 체중이 20% 이상 감소한 모든 동물에 대해 안락사를 시행하였다. 모든 그룹은 바이러스 4-dpi 및 7-dpi 감염 처리 후 안락사되었다. 햄스터 폐를 적출하여 무게를 재고, 육안으로 검사한 후, 폐 조직 사진을 기록하였다. 또한, 적출된 폐의 좌우엽은 조직병리학적 연구를 위해 10% 포르말린에 고정하고 생화학적 연구를 위해 -70°C에서 냉동하였다.

[0148] 2-2. Hematoxylin 및 Eosin 염색

[0149] 시리안 햄스터의 폐 병리 점수를 폐 상피 손상 및 염증 정도에 따라 평가하였으며, 좌엽을 적출하여 포르말린에 보존한 다음 hematoxylin-eosin(H&E) 염색법으로 염색하였다. 폐포를 둘러싼 염증 세포의 침윤 정도는 염증의 중증도를 정량화하는 역할을 하였다(낮음). 염증 세포는 폐조직의 모든 작은 구성요소를 관통하나, 그 중 약 절반에 불과한 것이 있다 (중간). 폐 조직 전체에 걸쳐 염증 세포의 침윤이 있지만 50% 이상인 것이 있다(높음).

[0150] KHU-NE 투여 후, 간에서 C57BL/6 수컷 마우스의 조직병리학적 변화를 확인하기 위해, 고정된 간 슬라이스를 선택하고 탈수하고 녹인 파라핀 왁스로 포매하고 Leica RM 2155 마이크로톰(Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)(Kim et al. 2017; Choi et al. 2015)을 사용하여 5 μ m 두께로 절단하였다. 파라핀 부분은 상기와 같이 (Kim et al. 2017; Choi et al. 2015) hematoxylin-eosin(H&E) 염색법으로 염색하였다. 이후, 간 형태를 DP70 디지털 광학 현미경 시스템(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 고배율 필드(40x)에서 관찰하였다.

[0152] 2-3 실시간 RT-qPCR에 의한 바이러스 부하 측정

[0153] 4 및 7dpi의 균질화된 폐 샘플의 상등액은 감염되지 않은 대조군과 함께 4°C에서 10분 동안 원심분리하여 얻었다. 그 후, 각 시료의 상등액 100 μ l를 Invitrogen의 Trizol 시약 900 μ l와 합하고, 제조사의 지시에 따라 RNA 분리를 수행하였다. RNA를 cDNA로 전환시킨 후, SARS-CoV-2 바이러스에 특이적인 RNA 의존성 RNA 중합효소(RdRp) 및 E(envelop) 유전자의 발현을 프라이머를 이용하여 평가하였다.

[0155] 2-4 급성 염증반응 유전자 발현의 측정

[0156] TRIzol 시약 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 4 및 7 dpi의 균질화된 폐 조직으로부터 RNA를 추출하였다. AmfiRivert cDNA Synthesis Platinum Enzyme Mix (GenDEPOT)를 사용하여 총 RNA를 cDNA로 역전사하였다. AmfiSure qGreen Q-PCR Master Mix (GenDEOT)를 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 반응은 SYBR Premix Ex TaqTM II(TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan)와 Rotor-gene Q 실시간 PCR 검출 시스템(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 수행하였다. 이 연구에 사용된 유전자 특이적 프라이머 서열은 표 1과 표 2에 나열되어 있다. 표적 유전자 발현 수준을 계산하고 내인성 대조군 유전자(β -액틴)의 발현 수준과 비교하여 정규화하였다.

표 1

[0157] 세포 실험 in vitro에 사용된 primer 염기서열

Gene	Primer Sequence	
GAPDH	Forward	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'
	Reverse	5'-CCA CCA CCC TGT TGC TGT AG-3'
TNF- α	Forward	5'-AGC CCACGTCGTAGCAACCACCAA-3'

IL-1 β	Reverse	5'-AAC ACC CAT TCC CTT CAC AGA GCA AT-3'
	Forward	5'-TGC AGA GTT CCC CAA CTG GTA CAT C-3'
IL-6	Reverse	5'-GTG CTG CCT AAT GTC CCC TTG AATC-3'
	Forward	5'-GTT CTC TGG GAA ATC GTG GA-3'
IL-10	Reverse	5'-TGT ACT CCA GGT AGC TAT GG-3'
	Forward	5'-TAG AGC TGC GGA CTG CCT TCA-3'
IL-4	Reverse	5'-GGT CTT CAG CTT CTC ACC CAG-3'
	Forward	5'-TGA TCA CAA CAT TGC ATT TCA GCC-3'
IFN- γ	Reverse	5'-ACA CCA GAT TGT CAG TCA CTT GGG-3'
	Forward	5'-TAT CTC TTT CTA CCT CAG AC-3'
IL-2	Reverse	5'-GCA ATC ACA GTC TTG GCT AAT TAG-3'
	Forward	5'-CCT GAG CAG GAT GGA GAA TTA-3'
	Reverse	5'-TCC AGA ACA TGC CGC AGA G-3'

표 2

[0158]

햄스터 in vivo 실험에 사용된 primer 염기서열

Gene	Primer Sequence			
β -actin	Forward	5'-	ACTGCCGCATCCTCTTCCT	-3'
	Reverse	5'-	TCGTTGCCAATGGTGATGAC	-3'
IL-1 β	Forward	5'-	GGCTGATGCTCCCATTTCG	-3'
	Reverse	5'-	CACGAGGCATTCTGTGTGTTCA	-3'
IL-2	Forward	5'-	GTGCACCCACTTCAAGCTCTAA	-3'
	Reverse	5'-	AAGCTCCTGTAAGTCCAGCAGTAAC	-3'
IL-4	Forward	5'-	CCACGGAGAAAGACCTCATCTG	-3'
	Reverse	5'-	GGGTCACCTCATGTTGGAATAAAA	-3'
IL-6	Forward	5'-	TGCTCTCTTGGGACTGCTGC	-3'
	Reverse	5'-	CCAAACCTCCGACTTGTGA	-3'
IL-10	Forward	5'-	GGTTGCCAAACCTTATCAGAAATG	-3'
	Reverse	5'-	TTCACCTGTTCACAGCCTTG	-3'
IL-17a	Forward	5'-	ATGTCCAAACACTGAGGCCAA	-3'
	Reverse	5'-	GCGAAGTGGATCTGTTGAGGT	-3'
IFN-b	Forward	5'-	GGAAGTGCCAGAGGATGAAA	-3'
	Reverse	5'-	GCTGCTGTACCTCTTCTCTTT	-3'
Inf- γ	Forward	5'-	TGCATCTTGGCTTTGTGCTC	-3'
	Reverse	5'-	TCCCCTCCATTACGACATC	-3'
MCP-1 (Cc12)	Forward	5'-	CTGGACCAGAGTCAAGCTAAAT	-3'
	Reverse	5'-	GGAAAGGCAGTAGTAGACATTA	-3'
MIP-1a (Cc13)	Forward	5'-	GGTCCAAGAGTACGTCGCTG	-3'
	Reverse	5'-	GAGTTGTGGAGGTGGCAAGG	-3'
MIP-1b (Cc14)	Forward	5'-	CCAAGCCAGCTGTGGTATT	-3'
	Reverse	5'-	AACTCCAAGTCATTACGTACTC	-3'
TNF- α	Forward	5'-	CACCCACCGTCAAGGATTCA	-3'
	Reverse	5'-	TTGGCTGGGCAATGAAGAGT	-3'

[0160]

2-5 독성 평가

[0161]

KHU-NE의 독성 평가는 이전에 설명한 대로 수행하였다(Kim et al. 2017; Choi et al. 2015). KHU-NE(10, 20, 40 및 80 mg/kg/day)를 14일 동안 정상 마우스(그룹당 n=5)에 경구 투여하였다. 체중은 실험 첫 날과 마지막 날(KHU-NE 마지막 투여 후 24시간 및 금식 후 12시간)에 측정하였다. 마우스는 수의학적 마취 및 모니터링 장비(SurgiVet, Waukesha, WI, USA)를 사용하여 isoflurane(1.5-3.0%)의 흡입을 통해 마취하였다. 이후 흉부를 열고 심장 천자를 통해 혈액을 채취하였다. 그리고 간 우엽은 웨스턴 블롯 분석을 위해 동결하고, 간 좌엽은 0.3-0.5 cm 두께의 조각으로 절단하고 조직병리학적 분석을 위해 0.1 M 인산염 완충 식염수(pH 7.4)에 용해된 4% 파

라포름알데히드 용액에 침지하였다. Aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), ALP(alkaline phosphatase) 및 LDH(lactate dehydrogenase)의 혈청 수준은 ALT, AST, ALP 또는 LDH 검출 키트(Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 측정하였고, 제조업체의 지침에 따라 상기의 프로토콜(Kim et al. 2017; Choi et al. 2015)을 기반으로 Cobas 8,000 모듈식 분석기(Roche)를 사용하여 각각 분석하였다.

[0163] 2-6 면역블러팅법 (Immunoblotting)

[0164] 면역블러팅 분석은 전술한 방법에 따라 준비하였다 (Kim et al. 2017; Choi et al. 2015). 간략히, 간 조각을 '10mM Tris-Cl(pH 7.4), 0.5mM ethylene-diamine-tetra 아세트산, 0.25M 자당 및 프로테아제 억제제 혼합물'로 구성된 조직 용해 완충액을 사용하여, bullet blender 조직 균질화기((Next Advance, Inc., Troy, NY, USA)를 이용해 균질화하였다. Western blot assay, PVDF(polyvinylidene difluoride) 막으로의 단백질 전달 및 막 차단 전술한 대로 수행하였다(Kim et al. 2017; Choi et al. 2015). 세포막은 rat anti-cleaved caspase-3 (1:500, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), rat anti-cleaved caspase-9 (1:500, Cell Signaling Technology), 및 rabbit anti-GAPDH caspase-9 (1:5,000, Cell Signaling Technology) 1차 항체 및 horseradish peroxidase-conjugated 2차 항체(1:500, Vector Laboratories, Newark, CA, USA)를 사용하여 배양하였다. 모든 웨스턴 블롯 분석은 3회씩 수행했고 유사한 결과에 대해 독립적으로 3회씩 반복하였다. ImageJ 소프트웨어를 사용하여 단백질 밴드 밀도를 측정하였다.

[0166] 2-7 통계 분석

[0167] 이 실험 결과는 모수적 혹은 비모수적인 다중비교를 사용하여 계산하였다. 모수적 다중비교의 경우 정규성에 대한 데이터 평가를 위해 모수적 일원분산분석(One-way ANOVA)을 사용하였다. ANOVA 결과가 유의한 경우 Dunnett's multiple comparison test를 사후 검정으로 이용하였다. 비모수적 다중비교의 경우, Kruskal-Wallis' H-test로 검정하고, 결과가 유의한 경우 사후검정으로 Dunnett's multiple comparison test를 이용하였다. 통계적 분석은 Prism 7.04(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하고, p 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

[0169] 2-8. 시리아 햄스터의 SARS-CoV-2 감염 확인

[0170] KHU-NE(저, 중, 고) 투여가 SARS-CoV-2에 의해 유도된 Covid-19 패렴 진행에 미치는 영향을 검증하기 위해, SARS-CoV-2 비강투여 햄스터 감염동물모델을 이용하여 평가하였다. KHU-NE의 경구 투여는 감염 이후 1-6 dpi 동안 1일 1회 수행하였다(도 7a). 본 연구에 사용된 햄스터 모델의 경우 SARS-CoV-2 감염이 코로나19 패렴을 유발하면 동물의 체중이 감소하는 것으로 보고된 바 있다. 그 결과, 도 1b 내지 1c는 SARS-CoV-2 감염일과 이후 7일 동안 발생한 체중 감소의 차이를 나타낸다. 감염 당일 측정된 체중 대비 체중의 변화량을 산출하여 비교한 결과(0-7dpi), SARS-CoV-2 감염 후 2~7일이 지난 뒤(2~7 dpi) 비감염군에 비해 통계적으로 유의미한 체중 감소가 유발되는 것으로 나타났다. 고용량에서 KHU-NE는 감염된 그룹에 비해 SARS-CoV-2에 감염된 마우스의 체중 감소를 예방할 수 있었다.

[0172] 2-9. SARS-CoV-2 폐 병리학 분자상 변화

[0173] SARS-CoV-2 감염에 의해 나타나는 Covid-19 패렴의 진행에 대한 KHU-NE 투여의 영향을 확인하기 위해 SARS-CoV-2 감염 후 (4 및 7 dpi) 동물을 해부하였다. 이를 위해 폐를 분리하여 무게를 측정하였다. 조직 내 염증이 증가하면 조직의 무게도 증가할 수 있기 때문에 적출한 장기의 무게를 측정하여 비교하였다. 또한 SARS-CoV-2에 감염된 시리아 햄스터의 폐 병리를 평가하였다. 충혈 및/또는 출혈은 감염된 햄스터의 폐에서 관찰되었지만 감염되지 않은 햄스터의 폐에서는 관찰되지 않았다. 도 2A에서 이러한 이상은 감염되지 않은 햄스터 및 처리군의 폐에 발견되지 않음을 확인하였다. 도 2B에서, 감염 후 4dpi에서 폐 조직 무게는 그룹 간에 유사한 것을 확인하였다. 감염 후 7dpi 후에, 부검하여 폐 조직 무게를 측정한 결과, 감염군에서는 증가를 나타내었지만 처리군과의 사이에 유의한 차이는 없었다. 또한, 조직의 무게는 햄스터 체중 대비 백분율로도 계산되었다. 총 체중 대비 폐 무게를 비교해도 차이가 없는 것으로 나타났다.

[0174] SARS-CoV-2에 감염된 시리아 햄스터에 KHU-NE를 투여하여 폐 조직 내 SARS-CoV-2 양을 감소시키는 효과가 있는지 확인하였다. 이에, real-time qPCR 기법으로 E(envelop)-GENE 및 RdRp(RNA 의존성 RNA 중합효소) 유전자를 표적으로 하여, SARS-CoV-2 특이적 서열의 RNA copy number를 분석하였다. SARS-CoV-2 감염 후 4dpi 및 7dpi에서 SARS-CoV-2의 바이러스 역가를 분석한 결과, 비감염군에 비해 감염군에서 E 및 RdRp 유전자의 발현이 급격히 증가하였으며, KHU-NE의 투여는 도 2C에서 E 및 RdRp 유전자의 발현을 약간 억제하였다. 또한, 폐 조직을 제거하고 H&E 염색 후 병리학적 판독을 통해 SARS-CoV-2 감염으로 인한 폐 조직의 염증이 KHU-NE 투여 중 감소되었는지 확인하였다. 비감염군과 비교하면 SARS-CoV-2 감염은 병리학적으로 상당한 폐내 조직 염증을 유도했다. 도 3A 내지 3C에서 감염군과 KHU-NE (중간) 농도는 약간의 차이를 보였다. 따라서 중간 용량의 KHU-NE는 SARS-CoV-2 염증의 영향을 받은 폐 조직의 정상적인 기능을 회복할 수 있음을 확인하였다.

[0176] 2-10. 햄스터의 SARS-CoV-2 감염으로 인한 급성 염증 반응확인

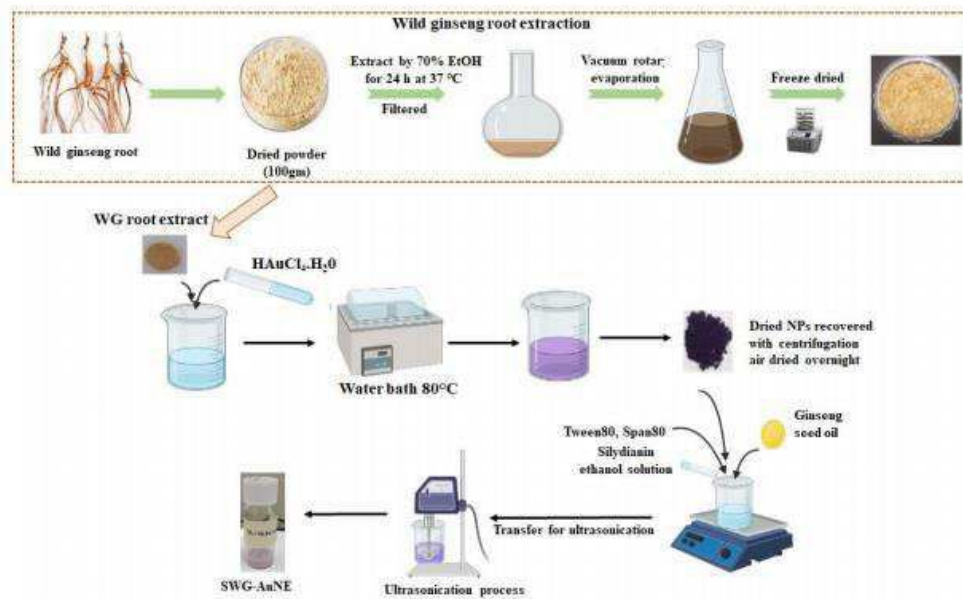
[0177] KHU-NE 투여가 Covid-19 폐렴 염증 반응의 정도에 미치는 영향을 조사하기 위해, 폐 조직에서 염증성 사이토카인 유전자 발현 수준을 조사하였다. 4, 7 dpi 이후, SARS-CoV-2 감염 후 급성 감염 초기에 발생하는 염증성 지표로, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1, TNF- α 를 평가하였다. 우리는 바이러스 접종 후 4 및 7 dpi에서 추출한 폐 조직에 존재하는 사이토카인의 양을 결정하기 위해 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR)을 사용했다. 4 dpi에서 SARS-CoV-2 감염군이 비감염군과 비교하여 염증성 사이토카인이 높게 발현되었으며, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A와 MCP-1의 경우 유의미하게 높게 발현되었다 (도 10 A-F). KHU-NE 투여 후 저농도 및 중농도 처리군에서 IL-6 수치가 급격히 감소하였고, IL-1 β 결과, 중농도 및 고농도 처리군에서 KHU-NE의 발현이 크게 억제되었다. IL-10, IL-17A, MCP-1 및 TNF- α 의 수준은 KHU-NE 투여 후 감소했지만 유의한 억제는 없었다. 7dpi에서 SARS-CoV-2 감염 후 TNF- α 이외의 사이토카인(IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, MCP-1)의 발현량이 증가했다(도 11A-F). MCP-1과 TNF- α 는 고농도의 KHU-NE 투여에 의해 약간만 억제되었지만, IL-1 β , IL-6, IL-10 및 IL-17A 사이토카인은 SARS-CoV-2 감염을 유의하게 감소시켰다. 따라서 본 상기 결과는 KHU-NE가 SARS-CoV-2 감염에 의해 유도된 급성 염증 반응에 4 dpi에 비해 7 dpi에서 더 잘 반응할 수 있음을 시사한다.

[0179] 2-11. 마우스에서 KHU-NE 투여의 체계적 안전성

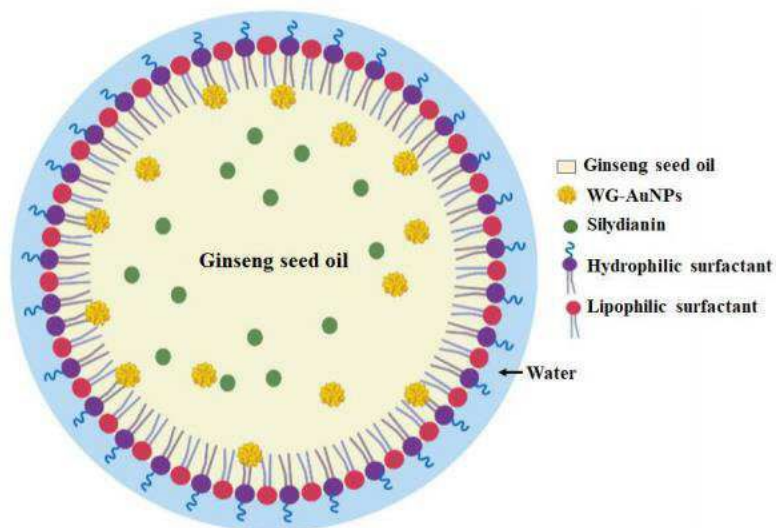
[0180] KHU-NE가 특정 독성을 나타내는지 알아보기 위해 정상적인 수컷 쥐(8주령)에 KHU-NE(10-80 mg/kg/day)를 14일 동안 경구 투여하고 독성을 평가하였다. KHU-NE의 투여는 실험 종료일에(도 12A), 주요 간 효소(ALT, AST, ALP 및 LDH, 그림 6B)의 평균 혈청 수준, 평균 간 수준, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 (도 12C), H&E 염색에 의한 간의 조직학적 구조(도 12D)의 변화에 유의한 영향을 미치지 않았다. 이 결과는 KHU-NE의 장기간 투여가 유의한 독성을 유발하지 않음을 시사한다.

도면

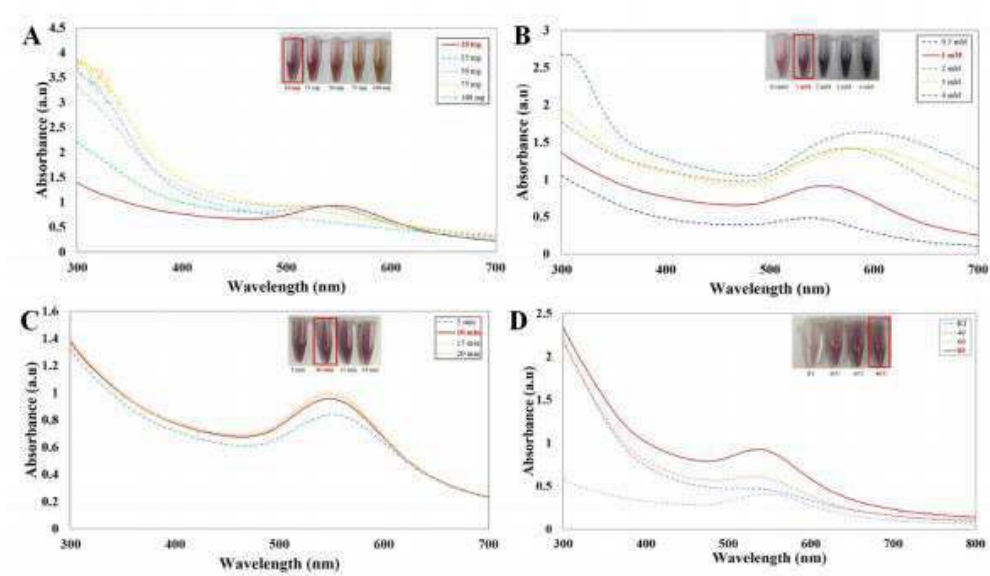
도면1



도면2



도면3



도면4

Table 4. Optimized conditions of synthesized WG-AuNPs

Parameter	Optimized condition
WG extract	10 mg
Gold salt (HAuCl ₄)	1 mM
Time	10 min
Temperature	80 °C

도면5

Table 5. The Optimization of surfactants by HLB value

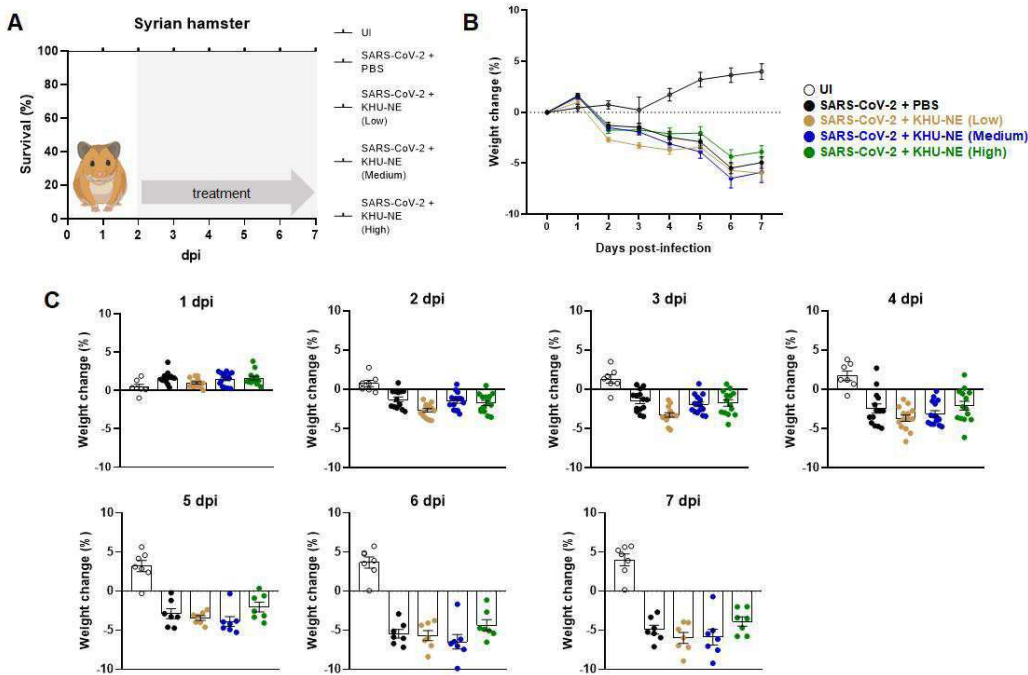
Surfactant (mixed)	Composition (V/V)	HLB value
Tween 80: Span 80	4:1	12.86
Tween 80: Span 80	4:3	10.41
Tween 80: Span 80	4:2	11.43
Tween 80: Span 80	7:2	12.62

도면6

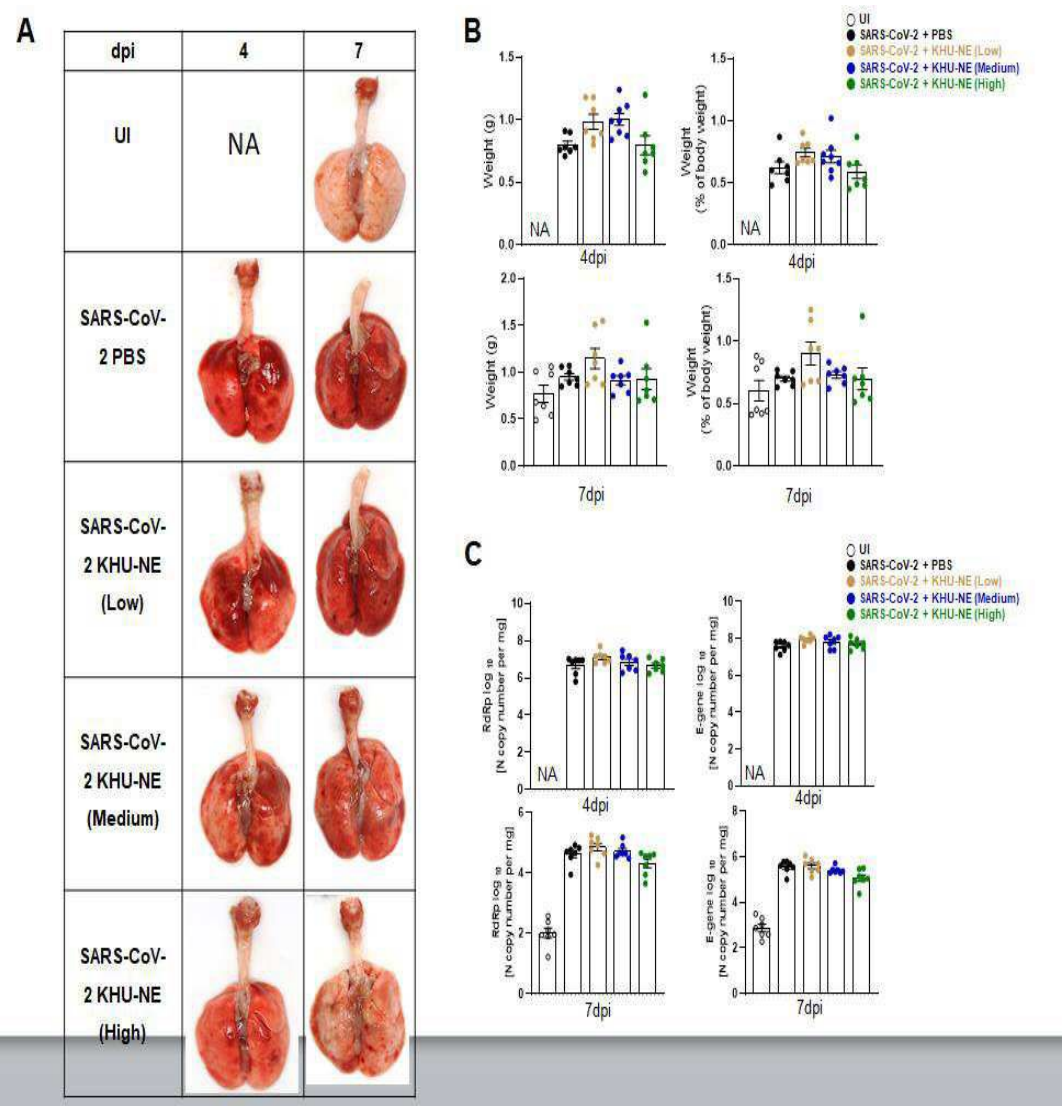
Table 6. The Optimization parameter for nanoemulsion preparation

Sample	WG-AuNPs (Aqueous solution)	Ginseng seed oil	Silydianin	Surfactants (Tween 80 & span 80)
S1	80%(30mg)	10%	5%(30mg)	5%
S2	79%(30mg)	9%	5%(30mg)	7%
S3	81%(30mg)	8%	5%(30mg)	6%
S4	85%(30mg)	7%	5%(30mg)	9%

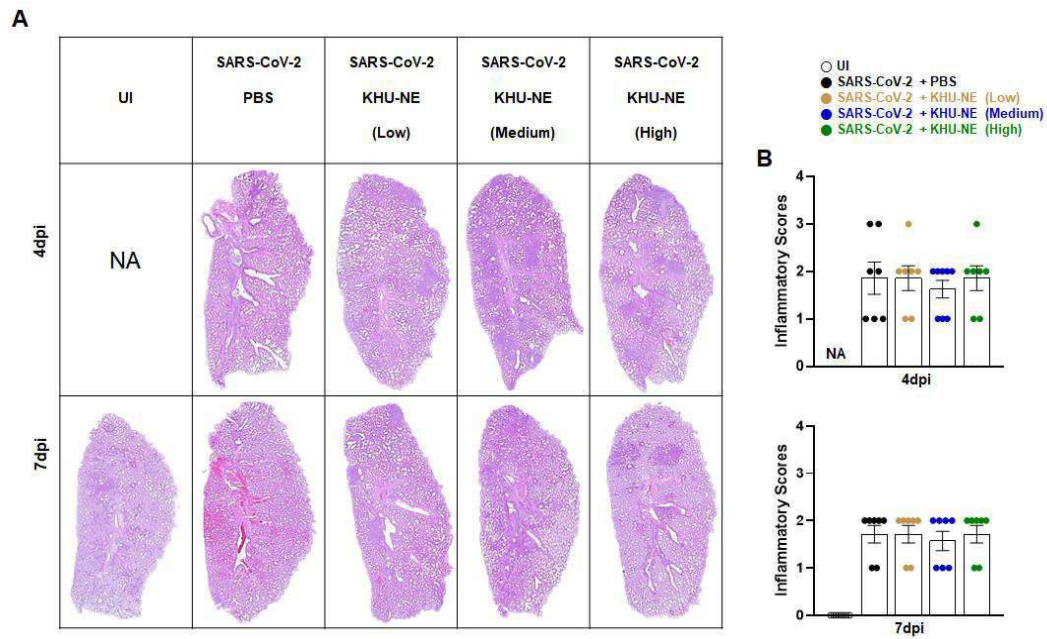
도면7



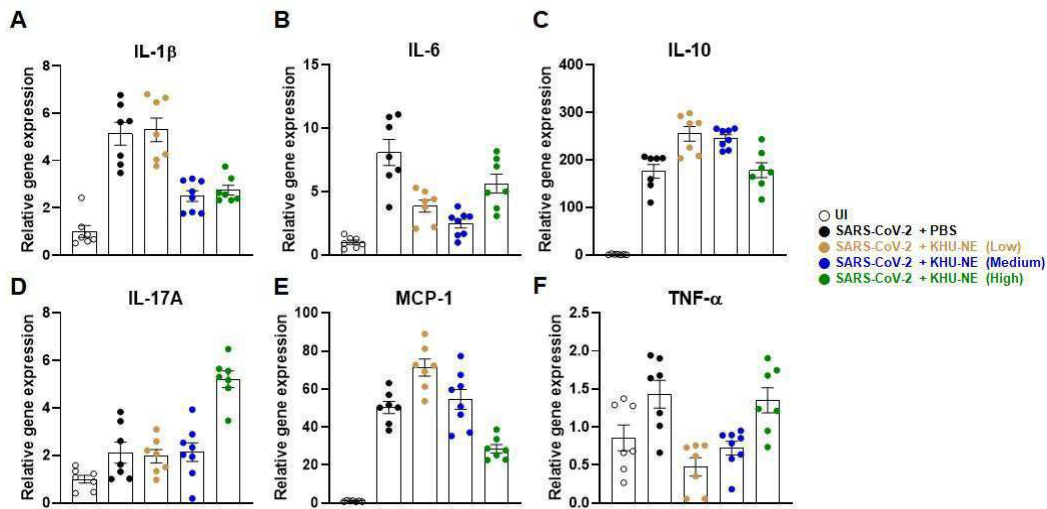
도면8



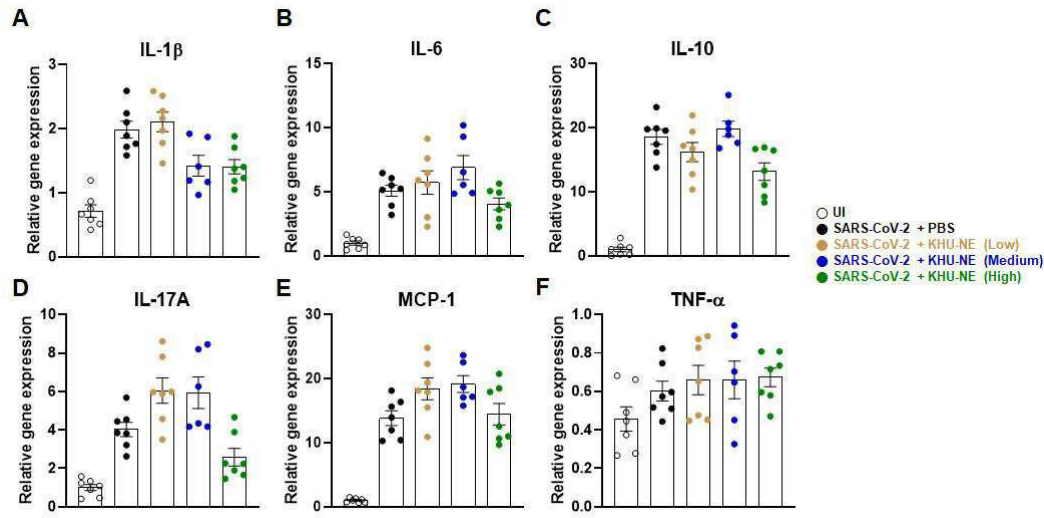
도면9



도면10



도면11



도면12

