

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0046193 (43) 공개일자 2011년05월04일
(51) Int. Cl. <i>A61K 36/758</i> (2006.01) <i>A61P 31/16</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0103074 (22) 출원일자 2009년10월28일 심사청구일자 2009년10월28일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 김경현 서울특별시 서초구 잠원동 대림아파트 1동 1206호 조기준 경기도 남양주시 와부읍 덕소4리 대영 8동 301호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 이문섭	

전체 청구항 수 : 총 8 항

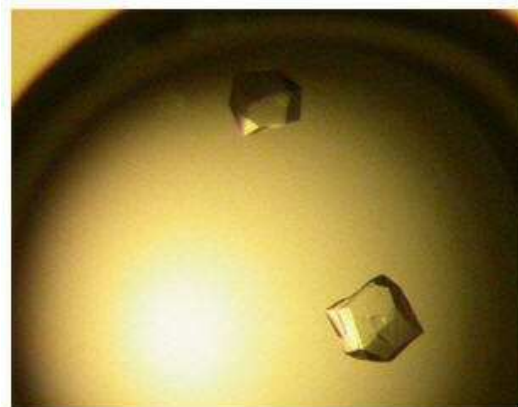
(54) 산초나무 추출물을 함유하는 항 바이러스용 조성물

(57) 요약

본 발명은 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물을 함유하는 항 바이러스용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 산초나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 산초나무(*Zanthoxylum*)로부터 산초 또는 초피 정유 추출물을 추출할 수 있으며, 상기 정유 추출물을 DSF(differential scanning fluorimetry)를 이용한 고속 high-throughput 리간드 스크리닝을 수행하는 경우, H1 그룹 및 H3 그룹의 HA 단백질에 공통적으로 결합하는 것을 확인함으로써, 본 발명의 추출물이 HA 단백질에 대한 타겟 효능이 뛰어난 것을 확인하였다. 따라서, 상기 산초나무 추출물을 이용한 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물로서의 사용이 기대된다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

이지혜

서울특별시 강북구 번동 242번지 주공 1단지 107동
405호

정미숙

서울특별시 도봉구 쌍문동 419

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-S3-AA-002

부처명 질병관리본부

연구관리전문기관

연구사업명 질병관리본부 용역사업

연구과제명 신종 인플루엔자 바이러스 유전정보 분석 DB 구축 및 바이러스 항원 구조기반 수용체 결
합 특이성 분석

기여율

주관기관 고려대학교

연구기간 2009년 09월 01일 ~ 2010년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물은 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 유기용매 추출 또는 환류냉각 추출방법으로 추출되는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물은 산초(*Zanthoxylum schinifolium*) 또는 초피(*Zanthoxylum piperitum*) 추출물인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 산초(*Zanthoxylum schinifolium*) 추출물은 에스트라골(estragole), 헥사데카노익산(hexadecanoic acid) 및 올레익산(oleic acid)을 함유하는 산초 정유인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 초피(*Zanthoxylum piperitum*) 추출물은 리모넬(limonene), 제라닐아세테이트(geranyl acetate) 및 β -미르센(β -myrcene)을 함유하는 초피 정유인 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물은 인플루엔자 바이러스의 HA(hemagglutinin) 단백질에 결합하여 숙주세포 내로의 막 융합(membrane fusion)을 저해함으로써 항 바이러스 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물은 인플루엔자 바이러스 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 및 H16으로 구성된 군에서 선택된 그룹 1 및 인플루엔자 바이러스 H3, H4, H7, H10, H14 및 H15로 구성된 군에서 선택된 그룹 2의 HA(hemagglutinin) 단백질에 공통적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 인플루엔자 바이러스 예방 및 치료용 조성물.

청구항 8

시험관 내에서 숙주세포에 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물을 처리하는 것을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 HA(hemagglutinin) 단백질의 막 융합(membrane fusion) 저해 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물을 함유하는 항 바이러스용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 산초나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자 바이러스는 매년 유행을 일으키고, 때때로 세계적 대유행을 일으킨다. 전 세계적으로 매년 25 ~ 50 만 명의 목숨을 빼앗고 소아의 10 ~ 40%가 감염되고 있으며, 국가 경제적 손실을 야기하는 심각한 글로벌 질환을 유발한다. 1918년 스페인 독감 대유행 이후, 1957년 아시아 독감, 1968년 홍콩 독감 등 수십 년 주기로 인플루엔자 대유행이 나타났으며, 2009년 돼지 유래 H1N1 인플루엔자 바이러스(S-OIV)의 출현으로 WHO는 41년 만에 처음으로 멕시코 독감을 phase 6인 대유행으로 선포하였다. 2009년 9월 현재 국내 신종 인플루엔자 환자가 1만 명을 넘어섰으며, 8번째 사망자가 발생하였고, 세계적으로는 27만명이 감염되었고, 3200명 이상이 사망하였다. H1N1(S-OIV)는 인체 H3N2, 돼지독감, 조류독감 바이러스 유전자가 재배열하여 만들어진 3중 재배열(triple reassortant)로 판명되었다(NEJM, 2009). 남반구에서 높은 전염성의 새로운 변이주 창궐 가능성 때문에 대유행 대책을 세우고 있음에도 사회적 파장과 우려는 줄지 않고 있다.

[0003] 인플루엔자 감염은 오르소믹소바이러스(orthomyxoviridae)에 속하는 인플루엔자 바이러스에 의하여 야기되며, RNA 바이러스로서 항원 변이가 상대적으로 쉽기 때문에 감염인구 집단 내에서의 반복적인 재감염이 가능하다. 인플루엔자 바이러스는 A, B, C 형 세 가지가 있으며, 인체 감염을 일으키는 인플루엔자 바이러스는 A, B 형으로 바이러스 표면의 HA(hemagglutinin)와 NA(neuraminidase)에 의하여 바이러스 항원 변이가 결정된다. 바이러스 표면 단백질 HA, NA의 유전적 조합에 따라 H1 - H16 및 N1 - N9 아형이 생성되며, 이 중에서 A형 인체 인플루엔자 바이러스의 아형은 H1, H2, H3의 세 가지, N1, N2 두 가지의 서로다른 조합에 의해 결정된다. B형 인플루엔자가 대유행을 일으키지 못하는 이유는 A형과 달리 사람에게만 감염을 일으키기 때문에 동물 바이러스로부터의 유전자를 얻는 일이 없다. C형 인플루엔자는 대부분 증상이 없고, 인체감염 보고는 거의 없다.

[0004] 인체 및 동물 바이러스가 동일한 숙주에 동시 감염되었을 때 일어나는 항원 대변이(antigenic shift)는 인수공통 감염형인 A형 인플루엔자에서 일어나며, 높은 이환율과 사망률을 갖게되어 대유행으로 이어지고 있다. 항원 소변이(antigenic drift)는 같은 아형 내에서의 변이로 A, B형 인플루엔자 바이러스에서 매년 누적되어 나타난다. 인플루엔자 바이러스 주요 표면 항원인 HA와 NA 유전자에서의 빈번한 변이 외에도 M2이온 채널, 바이러스 RNA package와 복제기능을 갖는 핵단백질(nucleoprotein)이 최근 항바이러스 신약개발 타겟(target)으로 이용되고 있다.

[0005] 인플루엔자 백신은 지난 수십 년간 inactivated 백신으로 개발되어 왔지만, 소아나 젊은이의 경우 백신효과가 60 ~ 80%에 불과하며, 노인의 경우 이 효과는 더욱 떨어진다. 개량된 형태인 live attenuated 백신(FluMist®)은 현재 2 ~ 49세 사람에게 적용되고 있고 inactivated 백신보다 효과가 높다. 그러나, 이들 백신은 유효란을 이용하기 때문에, 인플루엔자 대유행이 닥치게 될 경우, 유효란의 공급부족, 유효란 단백질 및 화합물에 따른 부작용이 있다. 따라서 이를 극복하기 위한 세포 배양(cell culture)을 이용한 백신개발이 활발히 연구되고 있다. 또한, 인플루엔자 항바이러스제인 oseltamivir, amantadine이 각각 NA, M2채널에 작용하지만 내성 바이러스 문제가 심각하다. 돼지 유래 S-OIV H1N1은 oseltamivir, zanamivir가 아직 효과적이기는 하지만, 이미 oseltamivir에 내성을 갖는 H5N1, H1N1 및 zanamivir에 내성을 갖는 B형이 보고되었으며, 신종 H1N1에 대한 내성 바이러스도 2009년 여름부터 여러 나라에서 보고되고 있다.

[0006] 인플루엔자 바이러스의 life cycle은 1) 인체 수용체 결합, 2) 세포 침입과 uncoating, 3) 세포내에서 전사 및 복제, 4) 바이러스 particle assembly, 5) 세포 밖으로 바이러스 방출 단계를 거치면서 인체세포에서 대략 2 ~ 3일 소요된다. 바이러스 HA가 인식하는 인체세포 수용체는 호흡기 상피세포에 존재하는 terminal sialic acid(SA)이다. SA는 인체 세포 표면의 당단백질 혹은 당지질에 노출된 galactose(Gal)에 α -2,6로 결합한다. 그러나 조류 독감 바이러스 HA는 일반적으로 SA α -2,6-Gal을 인지한다. 바이러스가 세포에 성공적으로 침입하기 위해서는 HA가 인체 수용체에 결합해야 하지만, 동시에 바이러스 입자가 세포 안으로 들어가야만 한다. 즉, 인플루엔자 바이러스 HA의 구조적 변화에 따른 막 융합(membrane fusion)을 이루게 되고, 내포작용(endocytosis)에

의하여 세포 내로 침입해야 한다.

[0007] 이와같이 인플루엔자 바이러스 HA는 여러 기능을 하는데 (1) 인체 상부기도(upper respiratory tract) 점막 상피 세포 수용체 SAa-2,6-Gal에 결합하여 호흡기관을 감염시키는 조직 친화성(tissue tropism)의 역할, (2) 수용체에 결합한 다음 막 융합(membrane fusion)을 이용하여 세포내로 침입하는 역할, (3) 인체 면역시스템이 인지하여 감염을 차단하는 항원 결정기(epitope)의 역할을 수행한다. 이처럼 중요한 역할을 수행하는 HA는 인체 면역시스템 공격에 따른 선택적 압력(selective pressure)을 받으며, 다른 단백질에 비하여 바이러스 진화에 매우 중요하다. 그러나 아직까지는 HA를 타겟(target)으로 하는 항바이러스제는 개발되지 않고 있다. 하지만 HA의 높은 변이율에 따른 백신개발이 어렵고, NA 효소 저해제를 기반으로 하는 타미플루(tamiflu), 리렌자(relenza) 등 기존 항바이러스제에 대한 내성 바이러스가 출현함에 따라, 새로운 항바이러스제의 개발이 절실한 실정이다.

[0008] 한편, 바이러스 예방이나 치료약 발굴을 위하여 이제까지 사용되어온 바이러스 증식 억제 항바이러스 효능 실험은 동물 혹은 인체세포에 이용한 바이러스 역가 측정을 통해서 세포 수준에서의 바이러스 증식 억제능, 세포 독성능을 측정하는 것이 일반적이다. 최근 새롭게 개발된 방법으로 DSF(Differential scanning fluorimetry)를 이용한 고속 리간드 스크리닝 방법은 바이러스 타겟 단백질에 강하게 결합하는 화합물을 이용하여 단백질 변성 전이온도 변화를 측정함으로써 천연 혼합물부터 단일 화합물에 이르기까지 손쉽게 대량 고속 스크리닝이 가능하다는 장점이 있다. 더욱 중요한 점은 바이러스 증식 억제나 세포 독성에 비하여, DSF 스크리닝은 타겟 단백질에 결합하는 화합물을 분자수준에서 직접 탐색할 수 있기 때문에 혁신신약이나 천연물 신약으로의 개발, 즉 선도물질을 빠른 시간에 확보할 수 있는 장점이 있다. 이에, 2008년 하버드 대학 연구팀이 퀴논 화합물인 TBHQ(tert-butyl hydroquinone)이 HA에 결합하는 구조를 규명하여, HA를 타겟으로 하는 새로운 항 바이러스제를 개발하였다(도 6)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006]. 개발된 TBHQ는 H3, H4, H7 등의 HA 단백질이 속하는 인플루엔바 바이러스 그룹 2에만 효능을 갖는다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, DSF(diffrential scanning fluorimetry)를 이용한 고속 high-throughput 리간드 스크리닝을 수행하여 인플루엔자 바이러스 타겟(target) 단백질 HA를 대상으로 국내 고유 자생식물에서 얻은 추출물을 탐색하는 경우, 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물이 HA 단백질에 뛰어난 타겟 효과를 갖음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010]

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 인플루엔자 바이러스 타겟 단백질 HA에 높은 결합효과로 막 융합(membrane fusion) 억제효과를 갖는 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물을 이용한 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0013] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 상기 산초나무(*Zanthoxylum*)는 운향과(Rutaceae family)에 속하는 낙엽관목으로 높이 3m, 수관폭 2m로 우산모양을 이루며 작은 가지에 가시가 있다. 잎은 기수 1회 우상복엽으로 어긋난다. 소엽은 13 ~ 12개로 피침형 또는 타원상 피침형이며 길이 1.5 ~ 5cm로서 가장자리에 파상의 잔톱니가 있다. 꽃은 9월에 피는데 연한 녹색이고 향기가 없다. 열매는 녹색이고 길이 4mm로서 흑색 종자가 들어 있다. 전국 어디에서나 자생하며 수직적으로는 높이 1000m까지 자란다. 추위에 강하며 건조한 곳, 습한 곳 어디에서나 생육이 가능하다. 한방에서는 건위, 온중, 제습, 정장, 구충, 해어성독(解魚腥毒) 등의 효능이 있다 하여 과피를 소화불량, 식적(食積), 위하수, 구토, 해소, 치통, 이질, 설사, 회충구제 등을 위한 치료제로 사용한다. 또한 어린 잎은 식용하고 열매는 향미료로도 쓰인다.

[0015] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물은 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 유기

용매 추출(에컨대, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 알코올용매 추출) 또는 환류냉각 추출방법으로 추출되는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 수증기 증류추출하여 산초나무의 추출물을 얻어내었다.

[0016] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물은 산초(*Zanthoxylum schinifolium*) 또는 초피(*Zanthoxylum piperitum*) 추출물인 것을 특징으로 한다. 상기 산초와 초피는 한의학에서 방향성 건위, 소염, 이뇨, 구충제로서 사용되고 위장을 자극하여 신진대사를 항진시키는 기능이 있으며, 치통, 신경통, 저혈압, 감기, 중풍 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 초피는 중국, 일본에서 Chinese pepper, Japanese pepper로 불리면서 향신료로 사용되어 왔고, 국내에서는 김치의 고추 대신 사용되었으며, 한약재 등으로 사용되었다. 또한, 상기와 같은 약용식물의 정유 성분은 면역력 증강, 항암 효과, 노화 억제, 항균력 등의 활성을 지니기 때문에, 천연 향신료나 감미료, 방부제로 이용되어 왔다. 서구에서는 식물 정유를 사용하여 정신적 질병을 치유하는 향기요법으로도 이용되고 있다. 상기 산초 및 초피의 정유는 주로 테르펜(terpenoid) 화합물로서 생물학적 활성이 발견되면서 향식재, 음료, 화장품 및 청결제 등에 사용이 증가되고 있다.

[0017] 본 발명의 상기 산초(*Zanthoxylum schinifolium*) 추출물은 에스트라골(estragole), 헥사데카노익산(hexadecanoic acid) 및 올레익산(oleic acid)을 함유하는 산초 정유인 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 초피(*Zanthoxylum piperitum*) 추출물은 리모넨(limonene), 제라닐아세테이트(geranyl acetate) 및 β -미르센(β -myrcene)을 함유하는 초피 정유인 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물은 인플루엔자 바이러스의 HA(hemagglutinin) 단백질에 결합하여 숙주세포 내로의 막 융합(membrane fusion)을 저해함으로써 항 바이러스 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다. 인플루엔자 바이러스는 인체세포 감염 후, 세포 내의 단백질 생성 리보솜 시스템을 이용하여 바이러스 단백질을 복제하여 새로운 바이러스 입자(particle)를 생성하는데, 이때 생성되는 바이러스 표면 HA 단백질은 HA0 전구체 형태를 하고 있다. HA0는 인체에 분포되어 있는 트립타제 클라라(tryptase clara) 혹은 mini-plasmin 등의 프로테아제(protease) 효소에 의하여 HA1 + HA2로 나뉘게 된다. HA0 전구체가 proteolytic cleavage에 따른 가수분해가 일어나지 않으면 인플루엔자 바이러스는 감염능력을 상실하게 된다. 잘려진 HA1 + HA2는 활성형 HA를 형성하게 되어 이웃하는 인체세포에 다시 막 융합(membrane fusion)으로 침입하여 감염시키게 된다. 따라서, 활성형 HA 단백질에 강력하게 결합하는 리간드는 막 융합(membrane fusion)에 필요한 구조변화를 저해하기 때문에 바이러스는 감염 능력을 잃게 된다 [Virology, 1980; Virology, 1975].

[0019] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물은 인플루엔자 바이러스 H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 및 H16으로 구성된 군에서 선택된 그룹 1 및 인플루엔자 바이러스 H3, H4, H7, H10, H14 및 H15로 구성된 군에서 선택된 그룹 2의 HA(hemagglutinin) 단백질에 공통적으로 결합하는 것을 특징으로 한다. 인플루엔자 바이러스 HA는 서열에 따라 그룹 1, 2로 나뉘어지는데, 그룹 1에는 H1, H2, H5 등이 속하며, 그룹 2에는 H3, H4, H7 등이 속한다. 2008년 하버드 대학 연구팀이 개발한 TBHQ(tert-butyl hydroquinone)는 그룹 2에만 효능을 갖고 있는데 반하여 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006], 본 발명의 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물은 인플루엔자 바이러스 HA에 따른 그룹 1, 2에 공통적으로 효능을 갖는 장점이 있다.

[0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 시험관 내에서 숙주세포에 산초나무(*Zanthoxylum*) 추출물을 처리하는 것을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 HA(hemagglutinin) 단백질의 막 융합(membrane fusion)을 저해하는 방법을 제공한다. 상기 숙주세포는, 인플루엔자 바이러스 질환의 치료 대상인 숙주와 동일종의 상업적으로 구입가능한 세포주를 이용할 수 있다.

[0021] 상기 방법은 구체적으로 하기 단계들을 포함할 수 있다.

[0022] a) 시험관 내에 숙주세포를 준비하는 단계;

[0023] b) 인플루엔자 바이러스 또는 정제된 HA 단백질을 처리하는 단계; 및

[0024] c) 산초나무 추출물을 처리하는 단계.

[0025] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 산초나무 추출물은 수증기 증류 추출하여 정유형태로 추출하는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명의 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물은 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들은 비경구 투여(에컨대, 정맥

내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 치료용 약제의 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0029] 실시예 1. 산초 및 초피 정유물의 추출 및 분석

[0030] 본 발명의 산초 및 초피 건조 시료는 2008년 10월 경남 산청군에서 채집한 산초 열매 및 초피 열매와 과피 시료를 구입하여 사용한 것이다.

[0031] 1-1). 산초 및 초피 정유물의 추출

[0032] 산초 및 초피 건조 시료 1 kg을 마쇄하여 클레벤저 형태(Clavenger type) 장치(Hanil Labtech Ltd, Incheon, Korea)를 이용하여 2시간 동안 수증기 증류하였다. 시료 플라스크 하단에 deodorized distilled water 1L를 넣고 상단에 산초 또는 초피 분말을 담은 거즈 주머니를 넣은 후, 가열하여 발생하는 수증기와 향기 성분을 냉각 장치에 통과시켰다. 이를 튜브(falcon conical tube)에 모아 상층에 위치한 정유만을 따로 분리한 후, 여과하여 산초 및 초피 정유를 얻었다. 산초의 정유 추출물은 0.03%이었으며, 초피의 정유 추출물은 0.5%이었다.

[0033] 1-2). 가스크로마토그래피-질량분석기(GC-MS) 분석

[0034] 상기 추출된 추출물의 향기 성분을 분석하기 위해, 가스크로마토그래피-질량분석기(Agilent 6890 gas chromatography/5973 mass selective detector)(Agilent Co.)를 사용하였다.

[0035] 먼저, 마이크로 시린지(micro-syringe)를 사용하여 실시예 1-1에서 추출한 정유 1 μ l를 분석기 내에 주입하였다. 컬럼(column)은 HP-5MS(30m length $\times$ 0.25mm i.d. $\times$ 0.25 μ m film thickness)를 장착하였으며, 운반가스(carrier gas)로 헬륨(helium)가스를 이용하고 가스의 유속을 1.0 ml/min으로 하였다. 오븐(Oven) 온도는 40 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지시킨 후, 분당 2 $^{\circ}$ C씩 상승시켜 220 $^{\circ}$ C까지 올린 후 5분간 유지시켰다. 주입기(injector)와 검출기(detector)의 온도는 각각 200 $^{\circ}$ C와 250 $^{\circ}$ C로 하였으며, 질량 분석기(mass selective detector)의 이온화 에너지는 70 eV, scanning mass range는 m/z 33-330으로 하였다.

[0036] 상기 가스크로마토그래피-질량분석기를 이용한 초피와 정유 추출물 정유의 측정 결과는 도 1a, 1b에 나타내었다.

[0037] 1-3). 향기 성분의 동정

[0038] 향기 성분의 확인은 각 성분의 질량 스펙트럼(mass spectrum)과 on-line computer library(Wiley 275)(Agilent Co.)의 질량 스펙트럼(mass spectrum)을 비교하여 확인하였다. 산초 정유는 에스트라골(estragole), 헥사데카노익산(hexadecanoic acid), 올레익산(oleic acid), 2,4-데카디에날(2,4-decadienal), 2-운데세날(2-undecenal), 2-데세날(2-decenal), 카리오필린옥사이드(caryophyllene oxide) 등을 함유하며, 초피 정유는 리모넨(limonene), 제라닐아세테이트(geranyl acetate), β -미르센(β -myrcene), 시트로넬랄(citronellal), 페란드랄(phellandral), 이소푸레골(isopulegol), 크립톤(crypton) 등이 함유되어 있다.

[0039] 각 성분의 RIs(retention indices)는 n-파라핀(n-paraffin)(Aldrich Co, Cat No. 298506, hydrocarbon C5-C30, Milwaukee WI, USA)을 이용하여 계산하였으며 [이상인, 본초학, 수서원 (1981) 서울, p255], 계산된 값을 기존의 문헌에 제시되어 있는 값과 비교하여 확인하였다 [김재길, 원색천연 약물대사전 (1984) 서울, p358; 한국생약학회, 생약요람, 녹지사 (1984) 서울, p213]. 산초 정유 및 초피 정유 추출물의 성분 분석결과는 하기 표

1과 2에 나타내었으며, 각 수치는 상대 몰퍼센트(mol%)로 나타낸 것이다.

[표 1. 산초 열매로부터 추출된 산초 정유의 조성]

에스트라골 (estragole)	올레익산 (oleic acid)	헥사데카노익산 (hexadecanoic acid)	2,4-데카디에날 (2,4-decadienal)
33.3	21.9	23.1	3.5
2-운데세날 (2-undecenal)	2-데세날 (2-decenal)	카리오필린옥사이드 (caryophyllene oxide)	기타
2.9	1.6	0.2	13.7

[표 2. 초피 열매로부터 추출된 초피 정유의 조성]

리모넨 (limonene)	제라닐아세테이트 (geranyl acetate)	β -미르센 (β -myrcene)	시트로넬랄 (citronellal)
55.8	6.1	5.7	3.8
페란드랄 (phellandral)	이소푸레골 (isopulegol)	크립톤 (crypton)	기타
3.0	2.3	1.5	21.8

실시예 2. 인플루엔자 바이러스 및 유전자의 확보

본 발명에 사용된 인플루엔자 바이러스는 국립보건연구원으로부터 A/Thailand/CU44/2006(H1N1), A/GYEONGNAM/684/2006(H3N2), B/California/01/2007 바이러스를 확보하여 사용하였다.

이후, RT-PCR을 이용하여 각각의 인플루엔자 바이러스 HA 유전자를 확보하였다. 즉, H1, H3, B 형의 인플루엔자 바이러스를 유정란 및 MDCK cells(Madin-Darby canine kidney cells)에서 증폭시켜 확보한 후, 바이러스 배양액에 세포 용해(cell lysis) 용액, 에탄올 처리 등의 과정을 거쳐서 바이러스 RNA를 분리하였다. 바이러스 배양액에서 추출한 RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행한 후, HA cDNA 유전자를 확보하였다. 상기 RT-PCR과정을 좀 더 자세히 설명하면 다음과 같다.

바이러스 배양액에서 추출한 RNA 10 μ l에 RT-PCR master mixture (RNA free water, SuperScript III RT TaqMix, 0.1mM MgCl₂) 40 μ l를 섞어 총 50 μ l 반응액을 만든 후 multiplex real-time RT-PCR을 수행하여 전기영동으로 증폭된 밴드를 확인하였다 (도 2a(A)). 이때 상용된 프라이머는 forward primer: ACT ACT GGA CTC TGC TKG AA reverse primer: AAG CCT CTA CTC AGT GCG AA 를 사용하였다. 또한 상기 전기영동으로 확인된 RNA 10 μ l에 master mixture (5 $\times$ strand buffer, 2.5 mM dNTP, 0.1 M DTT, RNase out (40 Unit/ μ l), Super script III reverse transcriptase, primer-Uni R) 10 μ l를 섞어 총 반응액 20 μ l를 35 $^{\circ}$ C 10분, 42 $^{\circ}$ C 60분, 95 $^{\circ}$ C 5분, 4 $^{\circ}$ C로 RT-PCR을 수행하여 cDNA 유전자를 합성하였다. 합성된 cDNA는 Taq polymerase로 94 $^{\circ}$ C 3분 수행하였다. 이후, 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 과정을 35 cycle 수행한 후, 72 $^{\circ}$ C 7분, 4 $^{\circ}$ C로 PCR을 수행한 후 전기영동으로 증폭된 밴드를 확인하였으며, 상기 전기영동 결과는 도 2a(B)에 나타내었다. 또한 2007-2008년 도 백신주인 A/H1N1 (A/SOLOMON Islands/3/2006), A/H3N2(A/WISCONSIN/67/2005), B (B/MALAYSIA/2506/2004)를 대조군으로 비교하였다.

상기 유정란을 이용하여 인플루엔자 바이러스를 증식시키는 과정과 결과를 도 2b에 나타내었으며, MDCK 세포에 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 결과를 도 2c에 나타내었다. MDCK 세포에 H1N1, H3N2 및 B의 바이러스를 접종시키고 35 $^{\circ}$ C의 CO₂ 배양기(incubator)에서 하루가 지난 후 관찰한 결과, 도 2b에 나타낸 것과 같이, 바이러스에 감염된 MDCK 세포는 바이러스 감염에 의해서 세포병변효과(cytopathic effect; CPE)의 초기 단계가 진행되었고,

약 30시간 배양한 이후에는 감염시키지 않은 MDCK 세포에 비해 많은 수의 세포가 바이러스에 의해 파괴 되었다.

[0049] 또한, 바이러스 감염여부를 확인하기 위해 신속항원검사를 수행하였다. 신속항원검사는 면역크로마토그래피 원리로 인플루엔자바이러스 감염 검체로부터 감염여부를 신속하게 판단할 수 있는 검사로서, 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 막에 마우스 단일클론 안티-인플루엔자(anti-influenza) A, B 항체가 흡착되어 있어서 바이러스를 extraction reagent tube에 넣어서 파괴시킨 후 여기에 test strip을 담그면 바이러스의 핵단백(nucleoprotein) 항원과 test strip에 있는 항체가 반응하여 붉은 띠를 나타내게 된다. 검사 반응이 제대로 이루어지면 C 위치에 band가 보이고, strain이 A type일 경우에는 A 위치에, B type일 경우에는 B 위치에 band가 나타나게 된다. 검사 결과는 도 2d에 나타내었다.

[0050] 도 2d에 나타낸 것과 같이, 신속항원검사를 이용하여 H1, H3, B 형의 인플루엔자 바이러스를 진단한 결과, 각각 A(+), A(+), B(+) 반응 결과가 관찰되었다.

[0051] 실시예 3. 인플루엔자 바이러스 HA의 발현 및 정제

[0052] 3-1) HA construct 디자인

[0053] pAcGP67A transfer vector(BD Bioscience)의 신호 서열(signal sequence)의 down stream에 HA 유전자, thrombin cleavage sequence, foldon 유전자, (His)₆-tag sequence를 순서대로 클로닝하고, E. coli DH5a strain을 이용하여 플라스미드(plasmid)를 얻었다. 도 3a는 HA-foldon-(His)₆ gene construct 모식도를 나타내며, 도 3b는 PCR 결과와 PCR을 통해 얻은 HA 유전자를 pAcGP67A-foldon-(His)₆ 플라스미드에 클로닝한 후 제한효소(restriction enzyme)으로 확인한 결과를 나타낸다.

[0054] 각 HA 유전자는 H3을 기준으로 11 번 아미노산부터 505 번 아미노산까지 PCR을 수행하였기 때문에 약 1.5 - 1.6 kb의 크기를 갖는다.

[0055] 3-2) HA의 발현과 정제

[0056] HA를 BEVS(baculovirus expression system)를 이용하여 insert 세포에 발현시켰다.

[0057] 먼저, 상기 실시예 3-1에서 제조한 HA-foldon-(His)₆ 유전자가 들어있는 플라스미드를 Sf9 세포에 형질도입(transfection)시켜 baculovirus를 얻은 후, 다시 Sf9 세포를 이용하여 증폭 시킨 baculovirus를 Hi5 세포에 감염 시켜서 HA를 발현시켰다. 신호 서열(signal sequence)에 의해 분비(secretion)된 HA의 정제를 위해 배지를 수확(harvest)하여 Ni-NTA column으로 정제하였다. 결합된 분획만을 따로 모아서 Tris-HCl(pH 8.0) 버퍼에 투석한 후, TPCK-treated trypsin을 이용하여 HA1과 HA2로 가수분해 하고, foldon-(His)₆를 제거하였다. PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)를 이용하여 가수분해 반응을 정지 시킨 후 MonoQ column을 이용하여 정제시키고, 겔 여과(Superdex200HL gel filtration)를 이용하여 단일 peak의 삼량체(trimer) HA 단백질을 얻었다. HA의 발현 및 정제 결과는 도 3c와 3d에 나타내었다. 도 3c는 HA 플라스미드를 Sf9에 형질도입시켜 증폭시킨 baculovirus를 Hi5 세포에서 발현시킨 결과를 나타내며, 도 3d는 HA의 size exclusion 크로마토그래피를 이용한 정제결과를 나타낸다. 그 결과 Hi5 세포가 들어있는 4 개의 플라스크에 HA 유전자를 가지고 있는 baculovirus를 감염시키고, 각각 4 일째와 5 일째에 배지를 수확(harvest) 하여, Ni-NTA resin에 결합된 fraction만 전기영동을 하였다. 이때, HA0 형태에 해당하는 크기의 단백질을 확인하였다.

[0058] 실시예 4. 인플루엔자 바이러스 HA 단백질의 결정화

[0059] 실시예 3-2에서 정제시킨 HA를 commercial screening kit를 이용하여 결정화를 시도하였다.

[0060] 100 mM Tris-HCl(pH 7.0), 20% PEG3350, 200 mM 칼슘 아세테이트(calcium acetate) 조건에서 낮은 quality의 단백질 결정을 얻었다. 또한, 동일 조건에서 1,3-butane diol을 첨가제(additive)로 하여 보다 나은 quality의 단백질 단일 결정을 얻었다. 얻은 결정을 현미경(100×)으로 측정하였으며, 도 4에 측정된 결정모습을 나타내었다.

[0061] 도 4에 나타낸 것과 같이 인플루엔자 바이러스 H1 type의 HA 단백질 결정은 크기가 0.7 × 0.7 × 0.5nm의 크기

를 갖는 것으로 관찰되었다.

[0062] **실시예 5. 인플루엔자 바이러스 HA 기반 저해제 리간드 스크리닝**

[0063] 국내 고유 자생식물에서 얻은 추출물을 이용하여 타겟 단백질 HA를 대상으로 DSF(differential scanning fluorimetry)를 이용한 고속 high-throughput 리간드 스크리닝을 수행하였다.

[0064] 0.1 mg/ml의 HA 단백질이 들어있는 반응 용액(100 mM HEPES, pH 7.0, 150 mM NaCl) 48.5 μ l를 RT-PCR 기기용 튜브에 적용하였다. 500 mM이 되도록 DMSO에 각각의 리간드를 녹인 후 상기 반응 용액과 같은 조성의 용액에 10 배로 희석하였고, 희석된 용액 1 μ l를 위의 반응 용액에 첨가하여 최종농도가 1 mM이 되도록 하였다. 5000 배의 Sypro orange(invitrogen)를 상기 반응 용액과 같은 조성의 용액에 10 배로 희석하고, 0.5 μ l를 위의 반응 용액에 첨가하여 최종 5 배가 되도록 하였다. RT-PCR 기기를 이용하여 25 $^{\circ}$ C에서 90 $^{\circ}$ C까지 30 초당 0.5 $^{\circ}$ C씩 온도를 올리면서 fluorescence를 측정하였다. 이때, excitation wavelength는 492nm이고, emission wavelength는 610nm를 이용하였다. DSF 측정 결과는 도 5에 나타내었다.

[0065] 도 5(A)와 (B)는 각각 바이러스 그룹 1(upper)과 2(lower panel) HA에 대한 전이온도 T_m의 결과를 나타낸 것이다. T_m 값은 HA 단백질이 변성(denature)됨에 따라 증가하는 fluorescence의 크기를 'F' 라 하고, 온도를 'T' 라고 할 때, -(dF/dT)의 값을 T에 따라 플롯(plot) 하여 분석한 것이다. -(dF/dT)의 값이 가장 낮을 때의 온도가 T_m에 해당한다. 그룹 1에는 H1, H2, H5 type이 속하며, 그룹 2에는 H3, H4, H7 type이 속한다.

[0066] 도 5에 나타낸 것과 같이, H1의 경우 대조군(control)에 비해 KC2002, NC211, TBHQ, SC2740-B, SC2740-A를 첨가했을 때 약 1 ~ 3 도 T_m이 증가하고, H3의 경우 KC2002, TBHQ, SC2740-A를 첨가했을 때 약 1 ~ 3 도 T_m이 증가하였다.

[0067] 상기 스크리닝으로부터 가능성을 보이는 자생식물 추출물을 선별하여, 이 중 PNAS(2008)에 보고된 TBHQ와 비교 스크리닝을 수행한 결과, TBHQ에 필적할 수 있는 리간드 후보 물질 KC2002, SC2740-A, SC2740-B를 선정하였다.

산업이용 가능성

[0068] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 산초나무(*Zanthoxylum*)로부터 산초 또는 초피 정유 추출물을 추출할 수 있으며, 상기 정유 추출물을 DSF(differential scanning fluorimetry)를 이용한 고속 high-throughput 리간드 스크리닝을 수행하는 경우, H1 그룹 및 H3 그룹의 HA 단백질에 공통적으로 결합하는 것을 확인함으로써, 본 발명의 추출물이 HA 단백질에 대한 타겟 효능이 뛰어난을 확인하였다. 따라서, 상기 산초나무 추출물을 이용한 인플루엔자 바이러스 질환 예방 및 치료용 조성물로서의 사용이 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0069] 도 1a는 초피 추출물 정유의 GC-MS 크로마토그램을 나타낸다.

[0070] 도 1b는 산초 추출물 정유의 GC-MS 크로마토그램을 나타낸다.

[0071] 도 2a의 (A)는 인플루엔자 바이러스 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 이용하여 바이러스를 확인한 전기영동 결과를 나타내며, (B)는 H1N1, H3N2, B형 바이러스의 cDNA를 제조한 결과를 나타낸다.

[0072] 도 2b는 유정란을 이용한 인플루엔자 바이러스의 증식과 수확 과정을 나타낸다.

[0073] 도 2c는 인플루엔자 H1N1, H3N2, B형 바이러스의 MDCK 세포 감염 결과를 나타낸다.

[0074] 도 2d는 신속항원검사를 이용한 인플루엔자 바이러스 진단 결과를 나타낸다.

[0075] 도 3a는 HA-foldon-(His)₆ gene construct 모식도를 나타낸다.

[0076] 도 3b는 H1N1, H3N2, B형 바이러스의 HA 유전자의 PCR 결과를 나타낸다.

[0077] 도 3c는 HA 플라스미드를 Hi5 세포에서 발현시킨 결과를 나타낸다.

[0078] 도 3d는 size exclusion 크로마토그래피를 이용하여 HA를 정제한 결과를 나타낸다.

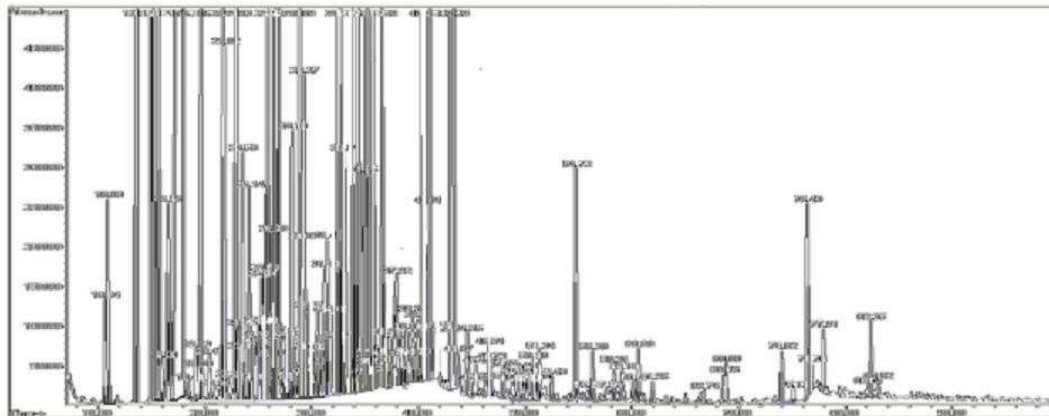
[0079] 도 4는 인플루엔자 바이러스 H1 type의 HA 단백질의 결정 모습을 측정한 결과이다.

[0080] 도 5는 DSF를 이용한 HA 결합 리간드 스크리닝 결과를 나타내며, 도 5(A)는 바이러스 그룹 1(upper)의 HA에 대한 전이온도 T_m 의 결과이며, 도 5(B)는 바이러스 그룹 2(lower panel)의 HA에 대한 전이온도 T_m 의 결과를 나타낸 것이다.

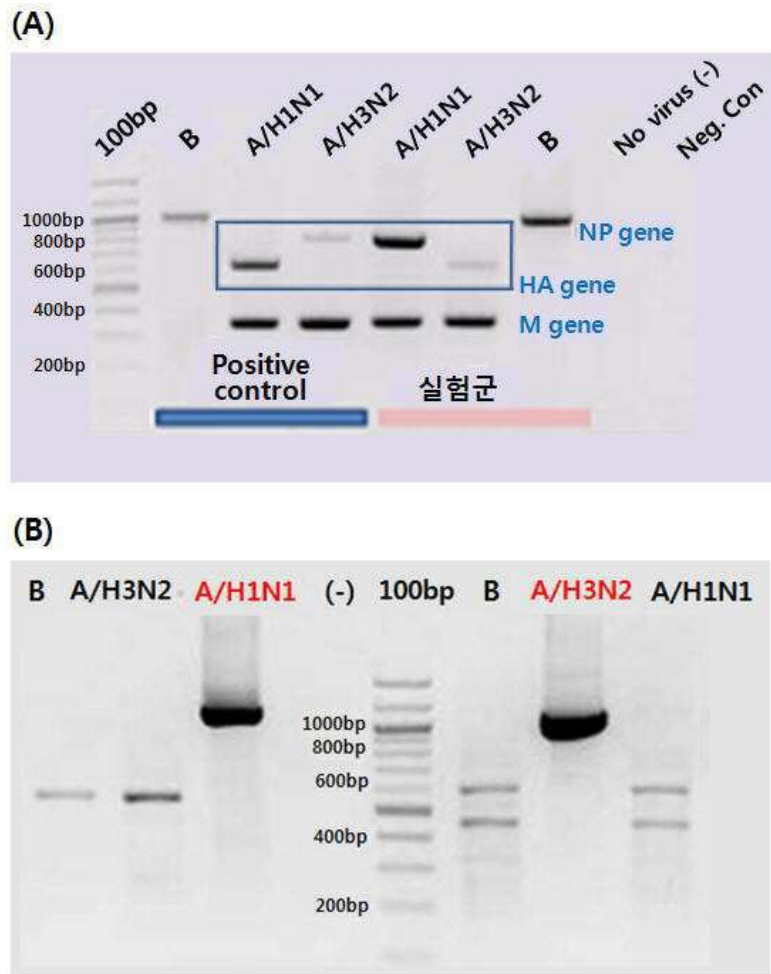
[0081] 도 6은 Differential scanning fluorimetry(DSF) 방법을 이용하여 TBHQ가 인플루엔자 바이러스 그룹 2 HA 단백질에 결합하였을 때 전이온도 T_m 의 변화를 측정한 결과이다.

도면

도면1a



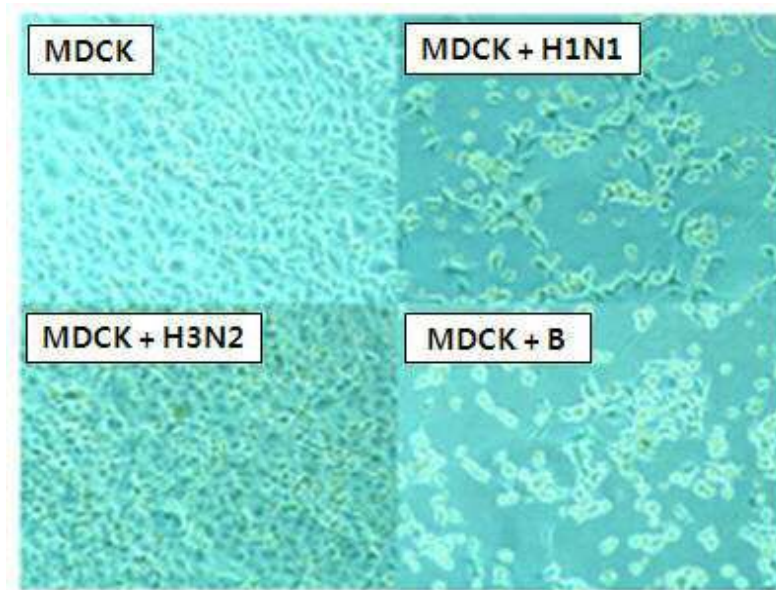
도면2a



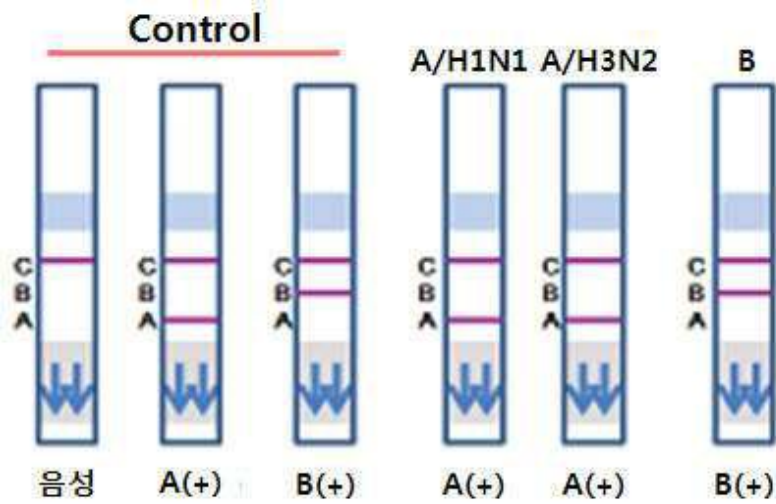
도면2b



도면2c



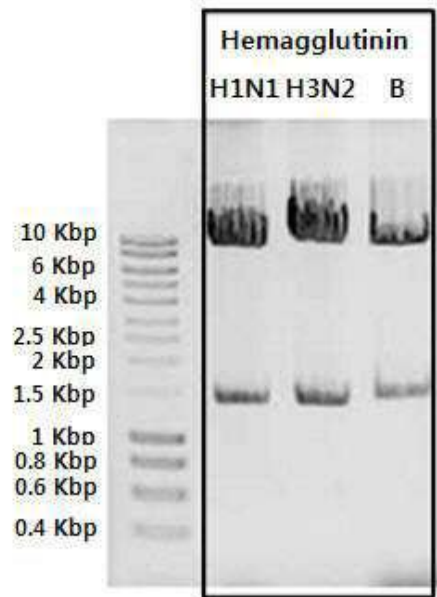
도면2d



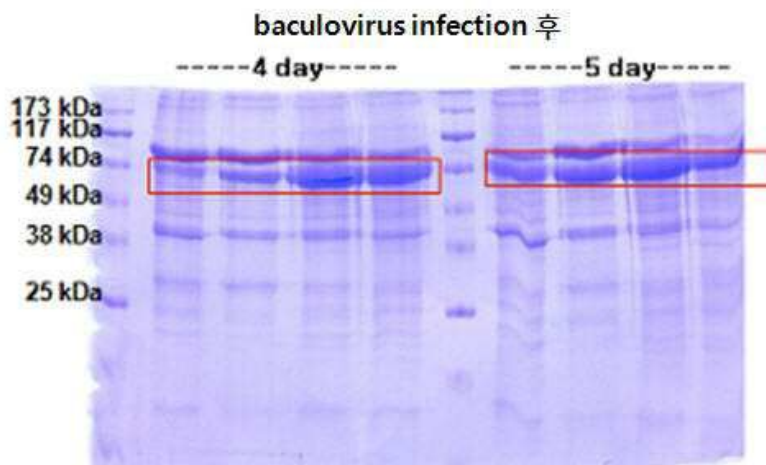
도면3a



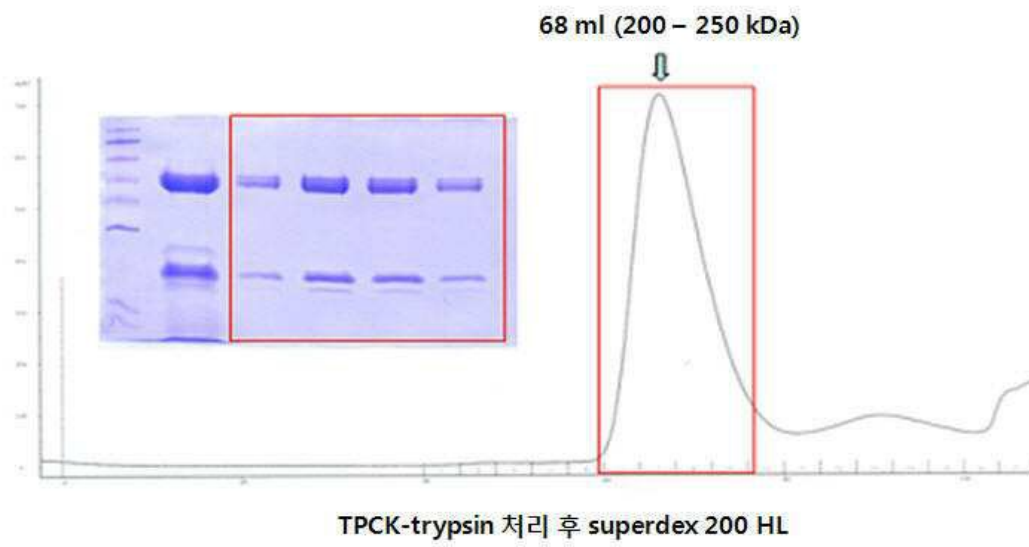
도면3b



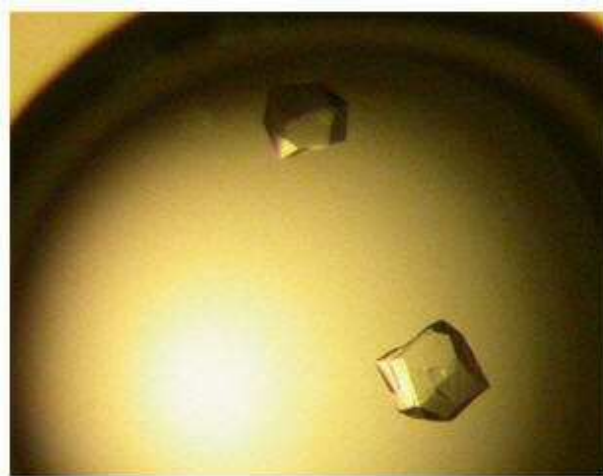
도면3c



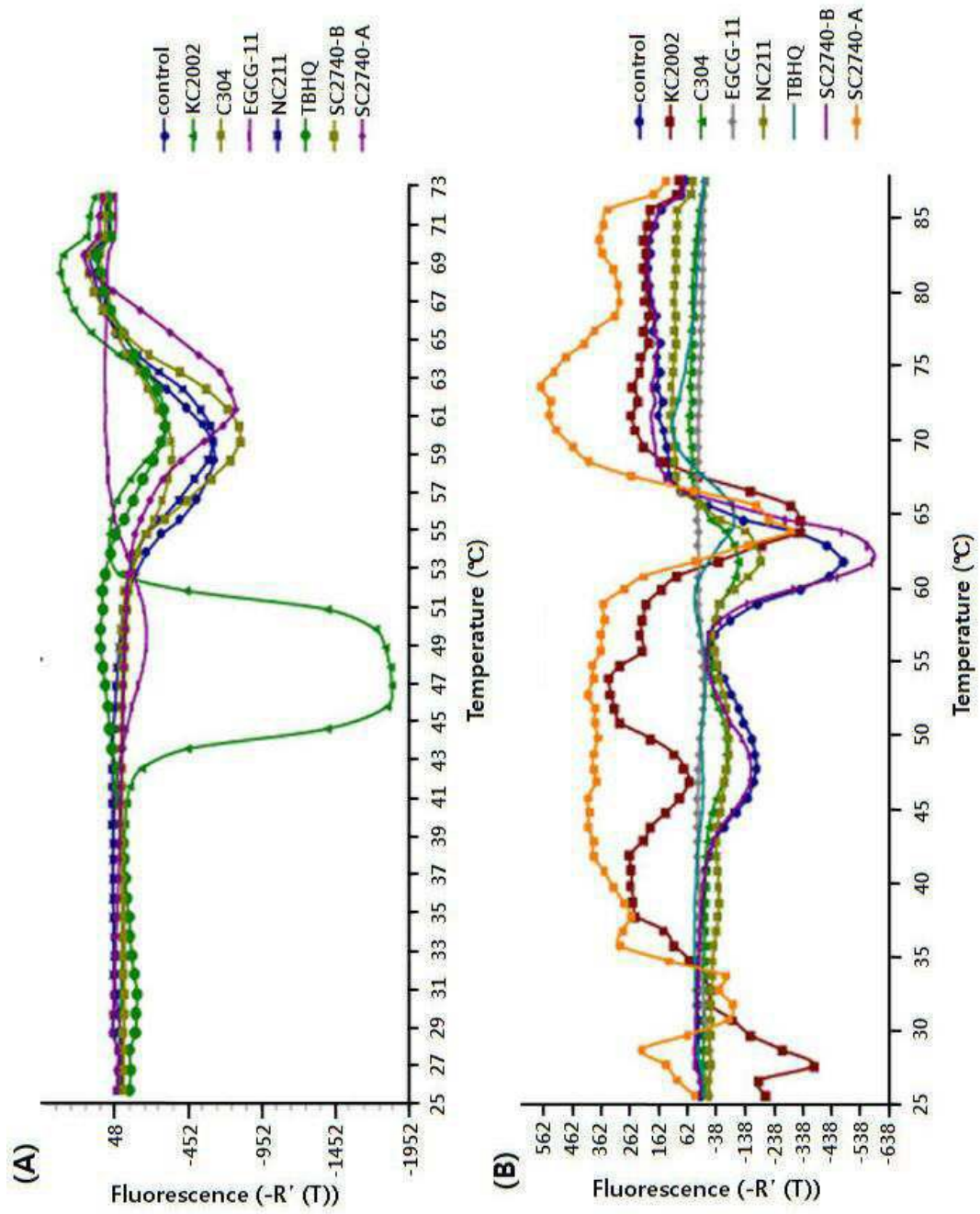
도면3d



도면4



도면5



도면6

