



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0012528
(43) 공개일자 2016년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0094084

(22) 출원일자 2014년07월24일

심사청구일자 2014년07월24일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

대한민국(환경부 국립생물자원관장)

인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물자원관 (경서동)

(72) 발명자

송문정

서울특별시 성북구 종암로25길 30, 101동 1402호 (종암동, 삼성래미안아파트)

김은실

인천광역시 서구 청라에메랄드로 78, 1302호(연희동, 딜라이트타워 1차)

오경희

서울특별시 강남구 선릉로 206, 102-2104(대치동, 동부센트레빌아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

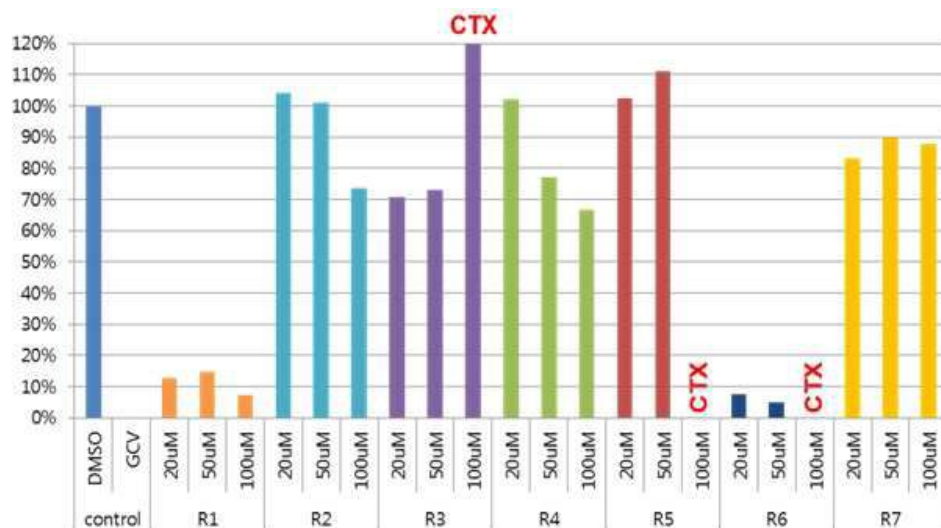
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 감마 허피스바이러스 감염의 개선 및 치료에 사용하기 위한 아카세틴 및 아피제닌의 용도

(57) 요약

본 발명은 감마 허피스바이러스 감염의 개선 및 치료에 사용하기 위한 화학식 1의 화합물, 즉 아카세틴 및 아피제닌의 용도를 제공한다. 본 발명에 따르면, 화학식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 부작용 및 독성 발현율이 적고 생체 친화적이고 약물내성 없이 감마 허피스바이러스 감염 질환을 치료할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



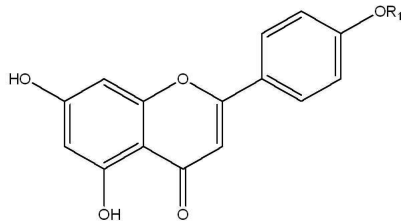
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 감마 허스피바이러스 감염 치료용 의약 조성물.

[화학식 1]



상기 식에서,

R₁은 CH₃ 또는 H이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은 아카세틴(acacetin)인 감마 허스피바이러스 감염 치료용 의약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은 아피제닌(apigenin)인 감마 허스피바이러스 감염 치료용 의약 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 감마 허스피바이러스는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr Virus, EBV) 또는 카포시육종 허스피바이러스(Kaposi's sarcoma associated virus, KSHV)인 감마 허스피바이러스 감염 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

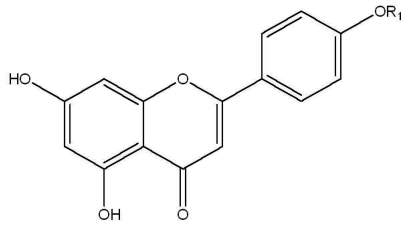
상기 조성물은 전염성단핵구증, 버킷림프종, 코인두암종, B림프종양, 위암, 카포시육종 및 B림프종양으로 이루어진 그룹에서 선택되는 질환의 치료를 위한 것인 감마 허스피바이러스 감염 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

화학식 1의 화합물 또는 그의 생리학적으로 허용되는 염을 포함하는 감마 허스피바이러스 감염 개선용 식품 조

성물.

[화학식 1]



상기 식에서,

R₁은 CH₃ 또는 H이다.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은 아카세틴(acacetin)인 감마 허스피바이러스 감염 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은 아피제닌(apigenin)인 감마 허스피바이러스 감염 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 감마 허스피바이러스는 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr Virus, EBV) 또는 카포시육종 허스피바이러스(Kaposi's sarcoma associated virus, KSHV)인 감마 허스피바이러스 감염 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 전염성단핵구증, 버킷림프종, 코인두암종, B림프종양, 위암, 카포시육종 및 B림프종양으로 이루어진 그룹에서 선택되는 질환의 치료를 위한 것인 감마 허스피바이러스 감염 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 감마 허스피바이러스 감염의 개선 및 치료에 사용하기 위한 아카세틴 및 아피제닌의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인체 허스피바이러스 대부분은 국내 70-80% 이상의 높은 감염률을 나타내며, 한 번 감염되면 잠복감염을 형성하고, 숙주에서 잠복감염과 재활성을 반복하여 평생 동안 감염성 유지하는 대표적인 만성바이러스이다(표 1. 인체

만성바이러스의 특징 참조).

표 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

또한, 최근 장기이식 및 조혈모세포이식, HIV 감염으로 인한 면역결핍환자의 경우 약물의 독성이 심하게 나타나고, 더 중요하게는 이들 환자에서 약물내성의 돌연변이 출현이 증가하고 있다 (Danve-Szatanek C et al.

Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. J Clin Microbiol. 2004 42(1):242-9.; Limaye AP et al. *Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants.* Lancet 2000; 356:645649; Marfori JE et al. *Development of new cytomegalovirus UL97 and DNA polymerase mutations conferring drug resistance after valganciclovir therapy in allogeneic stem cell recipients.* J Clin Virol 2007; 38:120-125).

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

발명의 내용

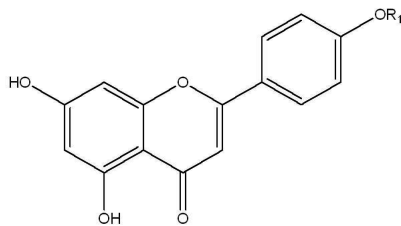
해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 약물독성 및 약물내성은 없으면서 감마 히피스바이러스 감염을 효과적으로 개선 또는 치료할 수 있는 새로운 성분을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 이를 위해, 본 발명은 화학식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 감마 히피스바이러스 감염의 개선 또는 치료용 조성물, 치료상 유효량의 화학식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 감마 히피스바이러스 감염의 치료 방법, 감마 히피스바이러스에 대한 항바이러스제의 제조를 위한 화학식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염의 신규 용도를 제공한다.

화학식 1



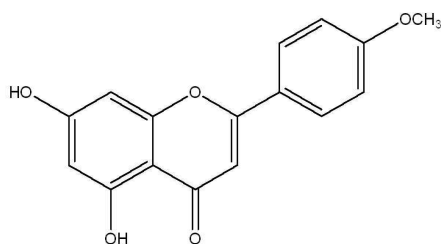
[0016]

[0017] 상기 식에서,

[0018] R₁은 CH₃ 또는 H이다.

[0019] 한 구체예에서, 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2의 구조를 갖는 아카세틴(acacetin)일 수 있다.

화학식 2



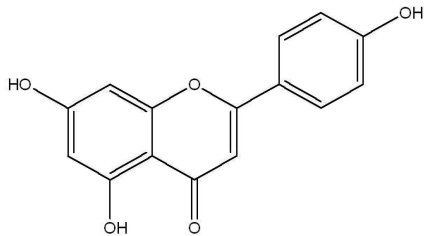
[0020]

[0021] 아카세틴 (acacetin; 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-flavone)은 아카시아나무 또는 아까시나무라고 불리는 Robinia

pseudoacacia L. (black locust)에서 주로 발견되는 0-메틸화 플라본 (O-methylated flavone) 성분으로, *Turnera diffusa* (damiana)와 양치류 *Asplenium normale*에서도 발견된다. 아카세틴은 아피제닌을 골격으로 아피제닌 4'-O-메틸트랜스퍼라제에 의해 S-아데노실 메티오닌으로부터 메틸기를 공급받아 합성되는 2차대사물질이다. 아카세틴은 항염증 및 진통작용뿐 아니라 다양한 암 세포주에 대한 항암효능이 보고된 바 있다(Jaganathan and Mandal, 2009). 아카세틴은 이전 연구에서 헤르페스바이러스 (herpesvirus), 아데노바이러스 (adenovirus), 코로나바이러스 (coronavirus)와 로타바이러스 (rotavirus) 등에 대한 항바이러스 효능이 없는 것으로 보고되었고 (Debiaggi M1, Tateo F, Pagani L, Luini M, Romero E. 1990 Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica*. 13(3):207-13.), HIV가 잠복감염 된 세포에서 자극에 의해서 활성화되는 HIV의 재활성 및 복제를 억제 할 수 있음이 보고된 바 있다 (Critchfield et al., Critchfield JW1, Butera ST, Folks TM. 1996 Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1996 12(1):39-46.). 또 최근에는 고농도의 아카세틴에서 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능이 나타난다고 보고된 바 있다 (1. Wu Q, Yu C, Yan Y, Chen J, Zhang C, Wen X. 2010 Antiviral flavonoids from *Mosla scabra*. *Fitoterapia*. 81(5):429-33).

[0022] 다른 구체예에서, 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 3의 구조를 갖는 아피제닌(apigenin)일 수 있다.

화학식 3



[0023]

[0024]

아피제닌 (apigenin, 5,7,4' -trihydroxyflavone)은 아까시나무 추출물에서 발견될 뿐 아니라 오렌지, 사과, 체리, 포도 등의 과일과 양파, 파슬리, 샐러리, 보리, 토마토 등의 야채나 차, 와인 등의 음료에 풍부하게 존재하는 플라본 계열 화합물로서 (UmiKalsom, Y. and Harborne, J.B. (1991). "Flavonoid distribution in asplenioid ferns". *Pertanika* 14 (3): 297-300., Zhao, J, Dasmahapatra, AK, Khan, SI, and Khan, IA (2008). "Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*)". *Journal of Ethnopharmacology* 120 (3): 387-393.) 항산화효과, 항염증효과 및 항암효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다 (1. Tong X, Pelling JC. 2013 Targeting the PI3K/Akt/mTOR axis by apigenin for cancer prevention. *Anticancer Agents Med Chem*. 13(7):971-8). 또한, 아피제닌은 조류독감바이러스, C형간염바이러스, HSV-1 및 HIV-1 바이러스에 대한 항바이러스 효능이 보고된 바 있다(Sithisarn P, Michaelis M, Schubert-Zsilavec M, Cinatl J Jr. 2013 Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. *Antiviral Res*. 97(1):41-8., Manvar D, Mishra M, Kumar S, Pandey VN. 2012 Identification and evaluation of anti hepatitis C virus phytochemicals from *Eclipta alba*. *J Ethnopharmacol*. 144(3):545-54).

[0025]

또한, 본 발명에서 유효성분으로 사용하는 화학식 1의 화합물은 생체 내에서 화학식 1의 화합물로 전환되어 감마 헤르페스바이러스에 대한 항바이러스 효능을 나타내게 되는 화학식 1의 화합물의 프로드럭 형태를 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 프로드럭은 화학식 1의 화합물의 배당체일 수 있다.

[0026]

또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물의 약학적 또는 생리학적으로 허용가능한 염은 유기산 또는 무기산을 이용하여 형성된 산 부가염일 수 있다. 상기 유기산은, 예를 들면 포름산, 아세트산, 프로피온산, 락트산, 부티르산, 아이소부티르산, 트리플루오로아세트산, 말산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 숙신산, 숙신산 모노아미드, 글루탐산, 타르타르산, 옥살산, 시트르산, 글리콜산, 글루쿠론산, 아스코르브산, 벤조산, 프탈산, 살리실산, 안트라닐산, 디클로로아세트산, 아미노옥시 아세트산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 및 메탄술폰산계 염을 포함하며; 무기산은, 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산, 탄산 및 붕산계 염을 포함한다. 상기 언급된 산 부가염은 당업계에 공지된 방법을 통하여 상기 화학식 1의 화합물로부터 제조될 수 있다.

- [0027] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 화학식 1의 화합물은 감마 허피스바이러스에 대한 항바이러스 효능을 나타낸다.
- [0028] 화학식 1의 화합물은 감마 허피스바이러스, 특히 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr Virus, EBV) 또는 카포시육종 허피스바이러스(Kaposi's sarcoma associated virus, KSHV)의 감염의 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0029] 이에 한정되는 것은 아니나, 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 감마 허피스바이러스의 감염에 의해 야기되는 질환의 치료 또는 개선을 위해 사용될 수 있으며, 이러한 질환으로는 전염성단핵구증, 버키파임프증, 코인두암증, B림프종양, 위암, 카포시육종 및 B림프종양을 포함한다.
- [0030] 본 발명에 사용된 화학식 1의 화합물은 화학적으로 합성하거나 상기 화합물을 함유하는 식물의 추출물로부터 분리 또는 반합성하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 화학식 1의 화합물은 식물의 추출물 또는 그의 분획물에 포함된 형태로 상기 조성물 중에 포함되거나, 식물의 추출물 또는 그의 분획물로부터 분리된 화합물로서 상기 조성물 중에 포함될 수 있다.
- [0031] 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 의약 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.
- [0032] 한 구체예에서, 본 발명은 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 감마 허피스바이러스 감염 치료용 의약 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 의약 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0034] 상기 의약 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0035] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 증, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다.
- [0036] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 회석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0037] 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0038] 또한 본 발명은 치료상 유효량의 화학식 1의 화합물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 감마 허피스바이러스 감염의 치료 방법을 제공한다.
- [0039] 여기에서 사용된 용어 "대상체"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0040] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의로 인해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조

성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 화학식 1의 화합물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01 mg/kg~200 mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0041] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 화학식 1의 화합물을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 화학식 1의 화합물 또는 그의 생리학적으로 허용되는 염을 포함하는 감마 허피스바이러스 감염 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 알코올 음료류, 과자류, 다이어트바, 유제품, 육류, 초코렛, 피자, 라면, 기타 면류, 견류, 아이스크림류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

[0044] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제와 같은 음료류로 제조되는 경우 화학식 1의 화합물 또는 화학식 1의 화합물이 함유되어 있는 상기 예시한 식물의 추출물 또는 그의 분획물 이외에도 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 조산, 사과산, 과즙, 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명은 상기 감마 허피스바이러스 감염의 개선용 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 건강기능식품이란, 화학식 1의 화합물 또는 화학식 1의 화합물이 함유되어 있는 상기 예시한 식물의 추출물 또는 그의 분획물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 이와 같은 건강식품에 있어서의 화학식 1의 화합물 또는 화학식 1의 화합물이 함유되어 있는 상기 예시한 식물의 추출물 또는 그의 분획물의 첨가량은, 대상인 건강식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 과립, 정제 또는 캡슐형태의 식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량% 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다. 한 구체예에서, 본 발명의 건강기능식품은 음료의 형태일 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명에 따르면, 화학식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염은 부작용 및 독성 발현율이 적고 생체 친화적이고 약물내성 없이 감마 허피스바이러스 감염 질환을 치료할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 화학식 1의 화합물의 마우스 감마 허피스바이러스에 대한 항바이러스 효능을 검증한 결과를 나타내는 도면이다.

도 2는 화학식 1의 화합물의 EBV에 대한 바이러스 유전자 발현 억제를 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 3은 화학식 1의 화합물의 KSHV에 대한 항바이러스 작용을 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 4는 화학식 1의 화합물의 RTA 단백질 발현 억제를 분석한 웨스턴 블롯의 결과를 나타내는 도면이다.

도 5는 아카세틴과 아제피닌의 배로 세포주에 대한 세포 독성 분석 결과를 나타내는 도면이다.

도 6은 EBV감염세포주인 B95.8과 Raji 세포주에서의 아카세틴의 항바이러스 효능 및 BZLF1 및 BMRF1 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 7은 KSHV 감염세포주인 BC-3G와 BC-3에서의 아카세틴의 항바이러스 효능 및 ERK의 인산화에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 8은 EBV감염세포주인 B95.8과 Raji 세포주에서의 아피제닌의 항바이러스 효능 및 BZLF1 및 BMRF1 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 9는 KSHV 감염세포주인 BC-3G와 BC-3에서의 아피제닌의 항바이러스 효능 및 ERK의 인산화에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

도 10은 아카세틴과 아피제닌의 IC50 값을 측정한 결과를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0049] 실시예 1. 마우스 감마허피스바이러스에 대한 항바이러스 효능

[0050] 아까시나무 (*Robinia pseudoacacia* L.; black locust tree)에서 발견되는 아카세틴 및 아피제닌을 포함하는 하기 7종의 물질에 대한 항바이러스 효능을 시험하였다.

[0051] 본 실시예 및 도면에서, 이들 화합물은 상기 화합물명과 함께 병기된 R1 내지 R7의 약어로도 표현된다.

[0052] 마우스 감마 허피스바이러스인 MHV-68을 이용한 플라그 에세이(plaque assay)를 통해 아까시나무 함유 단일물질 7종의 항바이러스 효능을 시험하였다. 먼저 베로(Vero) 세포주에 R1 내지 R7의 시료들을 20, 50, 100 μ M의 농도로 3시간 동안 전 처리한 후, MHV-68 바이러스를 베로(Vero) 세포주에 100 pfu/well로 감염시켰다. 바이러스 제거 후, 전처리와 같은 농도로 시료를 첨가한 배지에서 상기 세포를 5일 동안 배양하고, 형성된 플라그 수를 측정하였다. 그 결과, 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, R2, R3, R4, R5, R7는 MHV-68의 복제를 억제하는 효능을 보여주지 못한 반면, R1, R6은 20 μ M의 저농도에서도 뚜렷한 항바이러스 효능이 나타났다.

[0053] 실시예 2. 인체 감마-1 허피스바이러스, EBV에 대한 항바이러스 효능

[0054] 마우스 감마허피스바이러스의 모델에서 확인한 화합식 1의 화합물의 항바이러스 효과가 유사한 인체 감마허피스 바이러스에 대해서도 동일한 효과를 나타내는 지 확인하기 위해, 인간 감마허피스바이러스이고, 감마-1 허피스 바이러스인 EBV에 대해 항바이러스 효능을 확인하였다.

[0055] EBV가 잠복감염된 B95.8세포주에 시료 (10, 20, 50 μ M 또는 2, 5, 10, 20, 50 μ M)를 미리 1시간동안 처리한 후 TPA (20 ng/ml)로 바이러스 재활성을 유도하였다. 재활성 유도 24시간 후 세포를 수거하여 DMSO 처리한 대조군과 비교하여 아1 내지 R5의 시료가 바이러스 복제에 미치는 영향을 EBV의 대표적인 활성 유전자(lytic gene)인 EA-D의 단백질 발현정도를 확인하는 웨스턴블롯(western blot)을 통해 조사하였다. 그런 다음, 대조군으로 사용된 알파-튜불린의 강도로 EA-D의 단백질의 강도를 나누어 바이러스 단백질 발현량을 정량적으로 분석하였다. 그 결과, 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이 모든 시료 처리군에서 용량의존적인 항바이러스 효능이 나타났으며, 그 중에서도 R1, R3, R6가 탁월한 항바이러스 효능을 나타내었다.

[0056] 실시예 3. 인체 감마-2 허피스바이러스, KSHV에 대한 항바이러스 효능

[0057] 인간 감마허피스바이러스이고, 감마-2 허피스바이러스인 KSHV에 대한 항바이러스 효능을 확인하기 위해, KSHV가 잠복감염된 세포인 BC-3G 세포주에 대해 항바이러스 효능을 확인하였다.

[0058] 본 실험실에서 확보하고 있는 BC-3G는 바이러스의 활성 감염(lytic replication)에 의해 GFP를 발현하는 리포터 세포주이다. BC-3G에 R1 내지 R7의 시료((10, 20, 50, 100 μ M)를 처리하고 1시간 후 바이러스의 재활성을 유도하는 물질인 TPA(20ng/ml)를 처리하였다. 24 시간 후, 유세포분석기 (FACS)로 살아있는 세포 중 재활성에 진입하여 바이러스 복제가 이루어진 세포의 수를 EGFP(+) 세포수로 분석하였으며, 실험은 3회 반복하였다. 그 결과, 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, R4 (Taxifolin), R5 (Myricetin)의 화합물들은 용량 의존적인 항바이러스 효능 보이며, R1 (Acacetin), R6 (Apigenin) 고농도에서 세포독성을 보이거나 저농도 (10 μ M)에서 강한 항바이러스 효능을 나타냈다. R3 (Fisetin)는 용량 의존적인 항바이러스 효능을 보이지만, 세포독성이 강한 것으로 파악되었다.

[0059] 이를 분자생물학적 방법으로 증명하기 위해 KSHV 잠복감염 세포주인 BC-3G의 KSHV의 활성기 바이러스 복제의 극 초기 유전자인 RTA 단백질 발현정도 차이를 웨스턴블롯(western blot)으로 확인하였다. BC-3G에 R1 내지 R7의 시료(20uM)를 처리하고 1시간 후 바이러스의 재활성을 유도하는 물질인 TPA(20ng/ml)를 처리하였다. 24 시간 후, 세포를 수거하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0060] 그 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, TPA를 처리한 DMSO 처리군의 단백질 발현양에 비해 R1, R3, R6 처리군의 경우 RTA 발현양이 줄어드는 것을 확인하였다. 즉, R1, R3, R6은 20 uM로 처리했을 때, 바이러스 단백을 감소시키는 항바이러스 효능을 나타냈다.

[0061] 실시예 4. 화학식 1의 화합물의 세포독성

[0062] 항바이러스 효과를 보이는 화학식 1의 화합물이 세포에 독성을 미치는지 확인하기 위해 MTT 어세이를 수행하였다. MHV-68 감염 실험시 사용한 배로 세포주에 시료를 농도별로 처리하고, 24시간 후 살아있는 세포의 양을 측정하였다. 무처리 대조군의 측정치를 100%로 정한 뒤 각 실험군의 상대적인 세포생존율을 분석하였다. 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, 아카세틴과 아피제닌 모두 100uM 부근에서 CC50를 가지는 것을 확인하였다.

[0063] 실시예 5. 아카세틴의 항바이러스 효능 및 기전 연구

[0064] 1) EBV에 대한 아카세틴의 항바이러스 효능 및 기전 연구

[0065] EBV감염세포주인 B95.8과 Raji 세포주에서 아카세틴의 항바이러스 효능 검증하고 항바이러스 효능의 기전을 조사하였다. 실시예 2와 마찬가지로, EA-D의 단백질 발현정도를 확인하는 웨스턴블롯(western blot)을 수행하였다. B95.8에는 TPA (20 ng/ml)를 처리하고, Raji에는 TPA (20 ng/ml)와 소듐 부티레이트(NaB)(3mM)를 처리하여 바이러스의 재활성을 유도하였다. 실시예 2에 따른 B95.8을 이용한 실험에서 아카세틴 10 uM 처리 시 EBV 바이러스 단백질인 EA-D를 현저하게 줄여주는 결과를 확인했기 때문에 아카세틴은 그보다 낮은 농도까지 처리하여 실험을 진행하였다. 실험 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, B95.8과 Raji에서 모두 가장 낮은 처리농도 2 uM에서도 바이러스 단백질이 줄어있는 것을 확인 했으며, 용량 의존적인 항바이러스 효능을 보였다(도 6A 및 6D).

[0066] 이와 같은 아카세틴의 항바이러스 효능을 아카세틴 처리 후 세포에서 RNA를 추출한 후, cDNA를 합성하여 바이러스 유전자들에 대한 특이적인 프라이머들을 사용하여RT-Q-PCR 을 수행함으로써 mRNA level에서도 확인하였다 (Cho et al, Antiviral activity of angelicin against gammahepesviruses, Antiviral Res. 2013;100(1):75-83). 모든 RT-Q-PCR에서는 세포유전자인 베타-액틴의 mRNA 레벨로 보정하여 진행하였다. BZLF1은 EBV 복제 시작과 함께 발현하는 극초기유전자 (immediate early gene)이고 BMRF1은 그 하위 단계에서 발현하는 초기유전자 (early gene)이다. 실험 결과, 아카세틴은 B95.8과 Raji 세포주에서 2uM부터 바이러스 전사물 BZLF1, BMRF1을 용량의존적으로 저해하는 강력한 항바이러스 효능을 보였다 (도 6B, 6C, 6E 및 6F).

[0067] 2) KSHV에 대한 아카세틴의 항바이러스 효능 및 기전 연구

[0068] KSHV 감염세포주인 BC-3G와 BC-3에서 아카세틴의 항바이러스 효능 검증하고 항바이러스 효능의 기전을 조사하였다.

[0069] 항바이러스 효능은 실시예 3과 동일한 방식으로 확인하였다. 앞서 실시예 4-1에서 EBV 감염세포주에 처리한 것과 같이 아카세틴을 2 uM, 5 uM, 10 uM, 20 uM, 50 uM의 농도로 처리하였다. 그 결과, 도 7(좌측 도면)에서 볼 수 있는 바와 같이, 아카세틴이 용량의존적인 방식으로 바이러스의 활성감염을 억제하는 것을 GFP positive cell의 비율과 바이러스 단백질의 감소로 확인하였다.

[0070] 이러한 아카세틴의 항바이러스 효능의 기전을 알아보기 위해 KSHV 재활성에 중요한 신호로 알려진 ERK의 인산화를 확인하였다. KSHV 잠복 감염 BC-3 세포주에TPA 또는 TPA와 소듐 부티레이트(NaB)를 처리하여 바이러스를 재활성 시키는 한편, 아카세틴을 농도 별로 함께 처리한 후 세포를 수거하여 바이러스 단백질 RTA와 K8에 대한 항체와 ERK와 인산화-ERK를 감지할 수 있는 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 실험 결과, 도 7(우측 도면)에서 볼 수 있는 바와 같이, DMSO를 처리한 대조군과 비교했을 때 아카세틴을 처리한 경우에도

Phosphorylated ERK (pERK)가 줄지 않는 것으로 나타났다.

실시예 6. 아피제닌의 항바이러스 효능 및 기전 연구

1) EBV에 대한 아피제닌의 항바이러스 효능 및 기전 연구

실시예 5와 동일한 방법으로 아피제닌의 EBV에 대한 항바이러스 효능 및 기전을 조사하였다. 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 아피제닌을 2uM로 처리했을 때도 B95.8과 Raji에서 바이러스 단백질이 현저하게 줄어있는 것을 확인 했으며, 용량 의존적인 항바이러스 효능을 보였다 (도 8A, 8D). 또한, 아피제닌의 처리는 EBV의 극초기유전자인 BZLF1의 mRNA양을 현격하게 줄이며, 그 하위단계인 BMRF1의 전사량을 용량 의존적으로 줄이는 결과를 보였다 (도 8B, 8C, 8E, 8F). 이를 통해 아피제닌이 바이러스 복제의 초반에 작용하여 항바이러스 효능을 가질 것을 예상할 수 있었다.

2) KSHV에 대한 아피제닌의 항바이러스 효능 및 기전 연구

실시예 5와 동일한 방법으로 아피제닌의 KSHV에 대한 항바이러스 효능 및 기전을 조사하였다. 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 아피제닌이 용량 의존적인 방식으로 바이러스의 활성 감염을 억제하는 것을 GFP positive cell의 비율과 바이러스 단백질의 감소로 확인하였다(도 9의 좌측 도면). 또한, 아피제닌을 처리한 경우 용량 의존적으로 ERK의 인산화가 억제되는 결과를 확인하였다(도 9의 우측 도면). 따라서, 아피제닌은 ERK의 인산화를 억제하는 기전을 통해 바이러스의 활성 복제를 억제하는 것으로 예상되었다.

실시예 7. 아카세틴 및 아피제닌의 IC50 값 측정

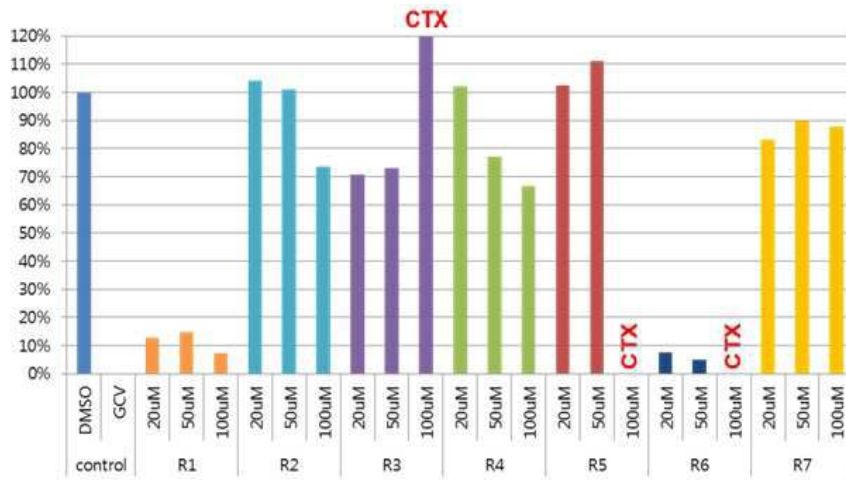
아카세틴은 0.05 uM 0.1 uM 0.2 uM, 0.4 uM, 0.8 uM, 1.6 uM, 3.2 uM, 6.4 uM, 12.8 uM, 25.6 uM, 50.0 uM의 농도로, 아피제닌은 0.05 uM, 0.1 uM, 0.2 uM, 0.4 uM, 0.8 uM, 1.6 uM, 3.2 uM, 4.8 uM, 6.4 uM, 12.8 uM, 25.6 uM, 30.0 uM의 농도로 베로 세포에 각각 처리하여 MHV-68으로 감염시킨 후, plaque reduction assay를 통해 아카세틴과 아피제닌의 IC₅₀값을 측정하였다. 각 농도당 3개의 샘플을 사용했고, DMSO를 처리한 샘플과 비교하여 상대적인 플라그 수의 감소를 측정하였다.

그 결과, 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 아카세틴의 IC₅₀는 3.888 uM이며, 아피제닌의 IC₅₀는 2.670 uM 정도로 측정되어 높은 항바이러스 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

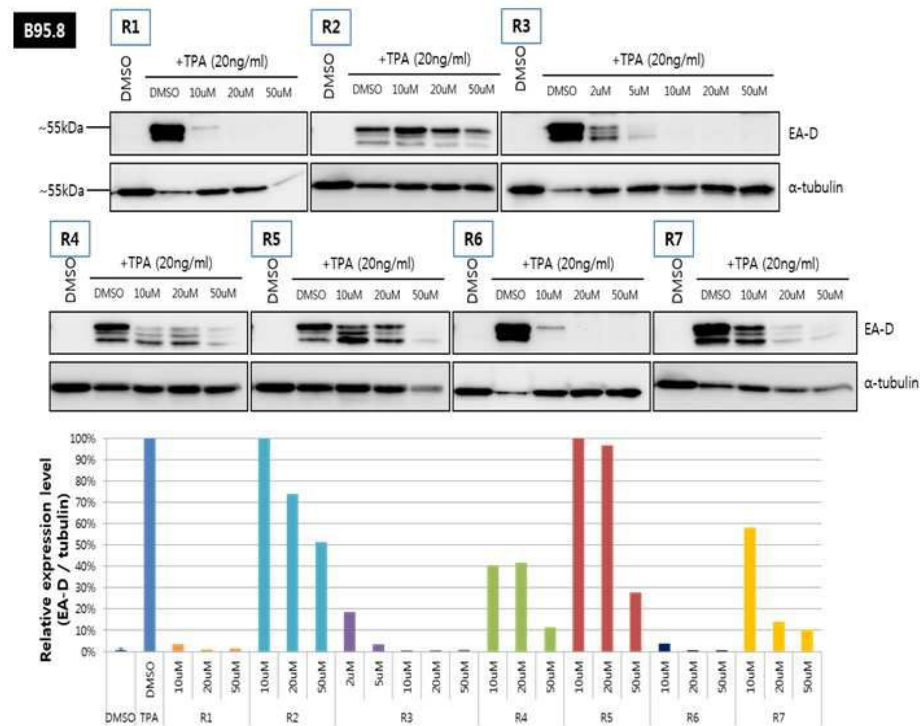
이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 아카세틴 및 아피제닌은 현재로서 뚜렷한 치료제가 존재하지 않는 감마 헤르페스바이러스 감염의 치료 및 개선을 위해 유용하게 사용할 수 있다.

도면

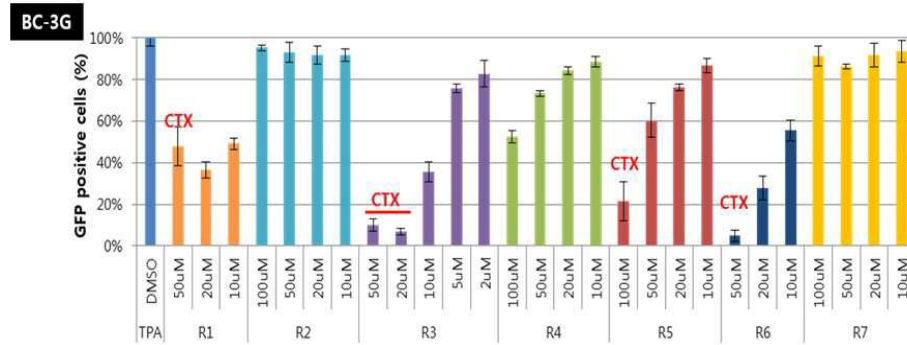
도면1



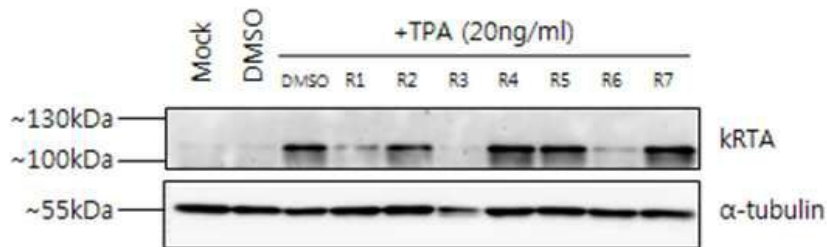
도면2



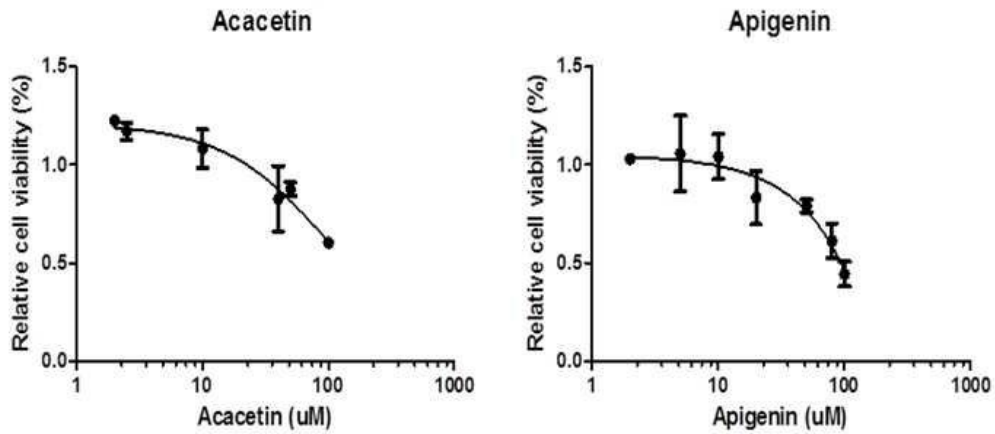
도면3



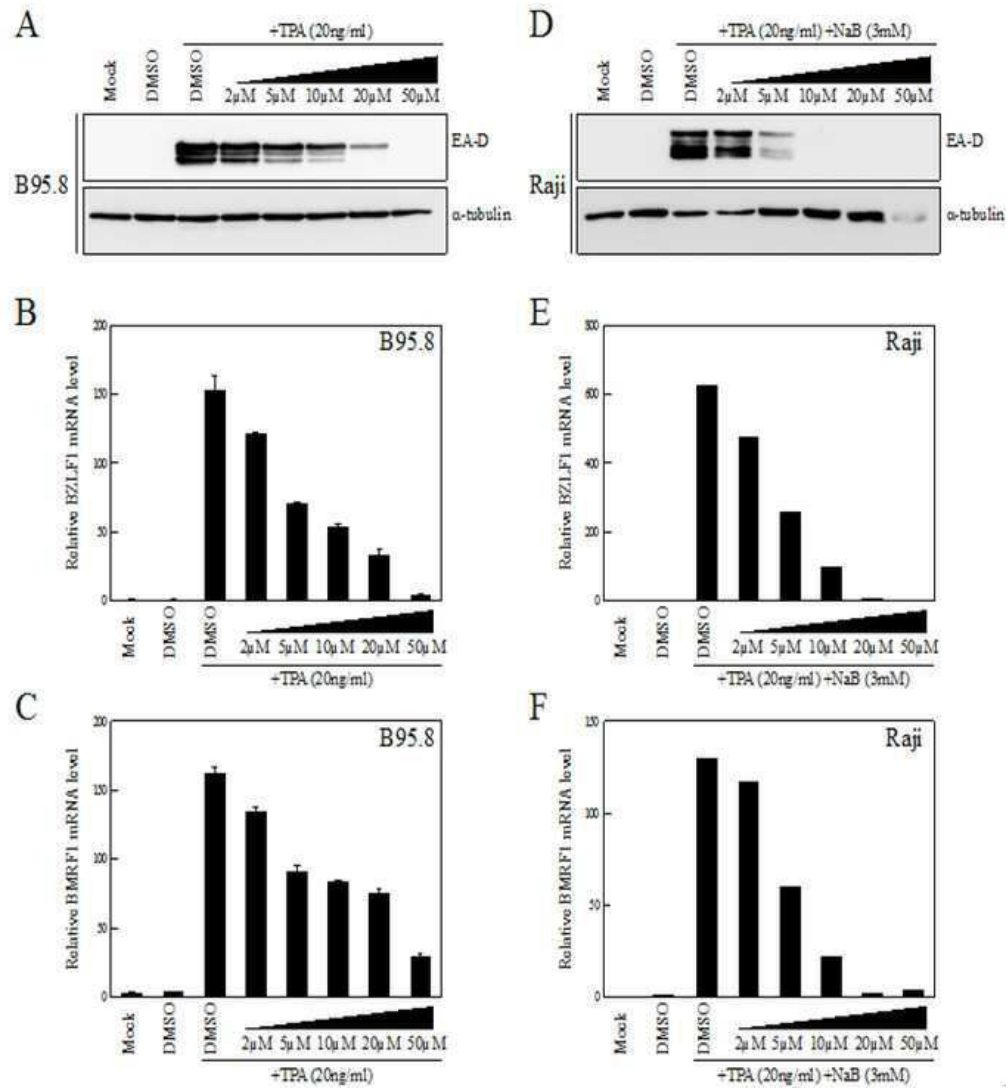
도면4



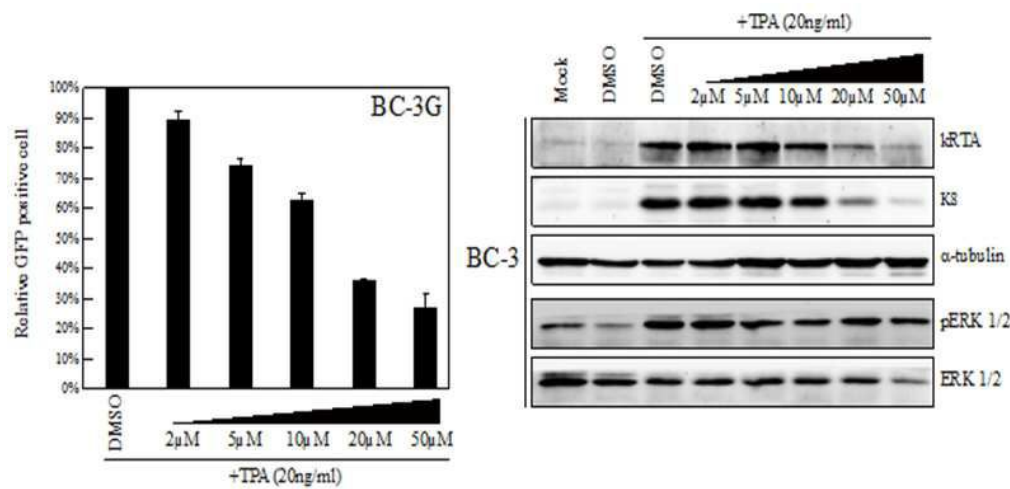
도면5



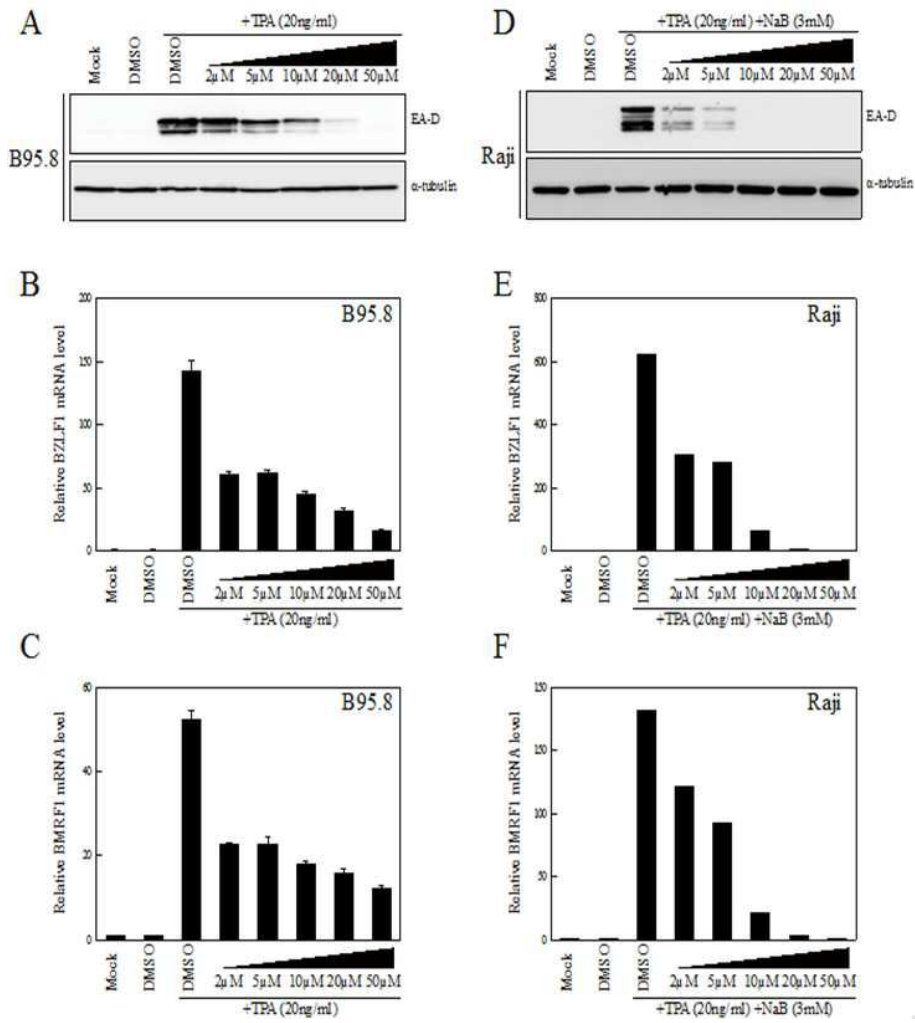
도면6



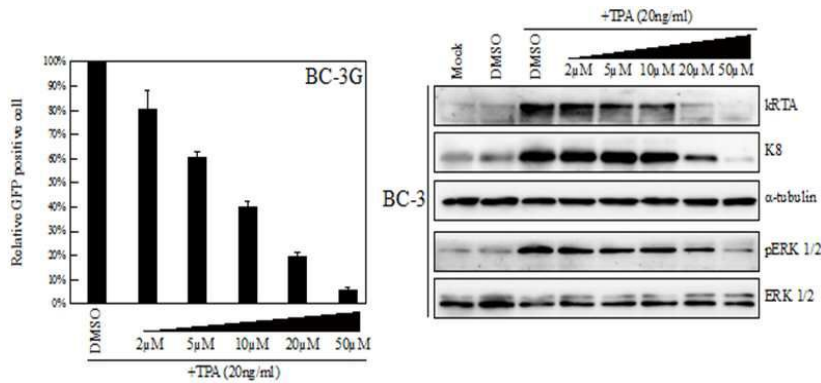
도면7



도면8



도면9



도면10

