(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0163955
(43) 공개일자 2023년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/73 (2006.01) *A61K 31/7048* (2006.01)
A61K 36/22 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/73 (2013.01)
A61K 31/7048 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0127690(분할)
(22) 출원일자 2023년09월25일
심사청구일자 2023년09월25일
(62) 원출원 특허 10-2022-0063114
원출원일자 2022년05월23일
심사청구일자 2022년05월23일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
에이피알지 주식회사
경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 120, 19층 1911호(영덕동, 유타워)
(72) 발명자
강세찬
경기도 수원시 영통구 청명로 16, 405호
권정은
경기도 수원시 영통구 반달로 76, 204호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김보열

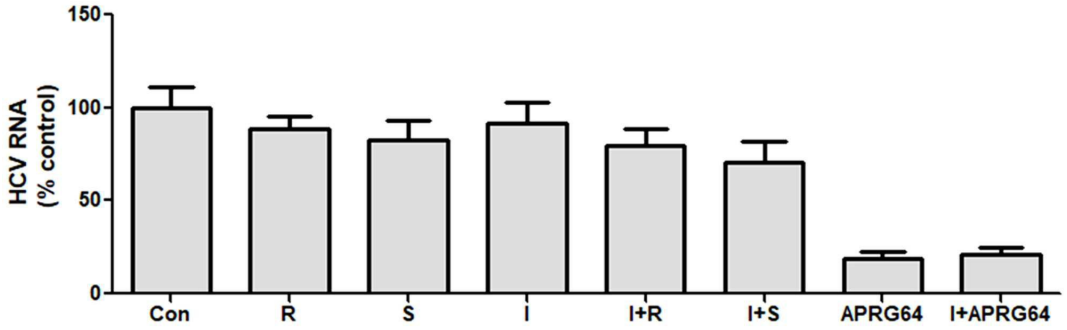
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **IRF-1 유전자 발현 증가용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 IRF-1 유전자 발현 증가용 조성물에 관한 것으로, 용아초 추출물 및 오배자 추출물을 포함하며, IRF-1 유전자 발현 증가 효과가 우수하므로, IRF-1 유전자 발현을 증가시키기 위한 원료, 약학적 조성물 및 건강기능식품 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 36/22 (2013.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자
이영근
경기도 수원시 영통구 영통로90번길 4-27 늘푸른 벽산아파트 109동 2003호
박대원
서울특별시 강북구 삼양로111길 32
최순호
경기도 수원시 영통구 영통로 498 황골마을주공1단지아파트 136동 706호
김경미
경기도 수원시 팔달구 효원로249번길 46-8, 508호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345341033
과제번호	2020R1A6A3A01100042
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	용아초 (Agrimonia eupatoria, A. pilosa)로부터 인체감염 RNA바이러스 억제 작용점에 따른 유효성분 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2021.09.01 ~ 2022.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

용아초 추출물 및 오배자 추출물로 이루어진 혼합 추출물, 또는 아피게닌-7-b-D-O-글루쿠로나이드(apigenin-7-b-D-O-glucuronide)를 포함하는 IRF-1(Interferon regulatory factor 1) 유전자 발현 증가용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 용아초 추출물 및 오배자 추출물의 중량비는 1:10 내지 10:1인 것인 IRF-1 유전자 발현 증가용 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 추출물의 추출용매는 에탄올수용액인 것인 IRF-1 유전자 발현 증가용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 에탄올수용액의 에탄올 및 물의 부피비는 5:5인 것인 IRF-1 유전자 발현 증가용 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 C형 간염 바이러스 억제 활성을 나타내는 성분을 더 포함하는 것인 IRF-1 유전자 발현 증가용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 IRF-1 유전자 발현 증가용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus, HCV)는 주로 수혈 및 지역 특이적 감염(communityacquired)에 의해 일어난다. HCV에 감염되면, 그 징후가 나타나는 경우 약 20%는 급성 간염으로 진행되고 약 80% 정도가 만성 간염으로 진행되고 이 중 약 30%가 간경화 및 간암으로 진행된다. 최근의 보고에 의하면, 전세계적으로 약 2억명 이상이 HCV에 감염되어 있으며 미국 내에서는 450만 명 이상으로 추정되며 유럽에서도 500만 명 이상이 C형 간염 환자인 것으로 알려져 있다.

[0003] C형 간염 바이러스는 장기간의 지속적인 감염에 의해 약 50%의 인체에서 간염을 일으킨다. 그러나, 감염된 이후의 장기간 동안 간염으로 발전하는 동안 증상이 없는 경우가 대부분이며, 현재까지 예방 백신 역시 개발되어 있지 않다. 오랫동안 미국 등에서는 인터페론 알파 단독 또는 인터페론 알파 주사와 리바비린의 경구투여에 의한 치료에 의존해 왔으나 치료 효과 및 작용기전이 불명확하다. 인터페론 알파 외에도 인터페론 베타 및 인터페론 감마 사용되고 있으나, 인터페론에 의해 감작되는 유전자는 인터페론의 종류에 따라 중복되므로, 어떻게 리바비린의 치료효과가 증대되는지 또한 불명확하다. 최근에는 인터페론 감마가 IRF-1의 발현을 증가시켜 MHC II의 발현 조절에 따른 리바비린 효과 증대 활성이 보고되어 C형 간염치료시 인터페론 감마와 리바비린의 병용요법이 사용되고 있으나, 인터페론 감마 주사가 반드시 병행되므로 치료비 부담이 막대하며, 인터페론 외에 IRF-1의 발

현을 증가시키는 의약품이 발견된 바 없다.

[0004] 따라서, 인터페론 주사의 병용이 필요없으면서도, 경구 투여를 통하여 C형 간염을 치료할 수 있는 치료제에 대한 개발이 요구되고 있다. 다만, 현재까지 인터페론 주사의 병용이 필요 없으면서도 경구로 투여되어 C형 간염을 효과적으로 치료할 수 있는 치료제는 개발되지 못한 상황이다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 C형 간염 치료 효과가 우수하면서도 Interferon Regulatory Factor 1(IRF-1) 발현 증가 활성을 동시에 보유하여 인터페론 주사없이 경구투여로만 C형 간염을 치료할 수 있는 치료제를 개발하기 위한 연구를 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2008-0084477호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 용아초 추출물 및 오배자 추출물로 이루어진 혼합 추출물, 또는 아피게닌-7-b-D-O-글루쿠로나이드(apigenin-7-b-D-O-glucuronide)를 포함하는 IRF-1(Interferon regulatory factor 1) 유전자 발현 증가용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양상은 용아초 추출물(*Agrimonia pilosa*) 및 오배자(*Galla rhois*) 추출물로 이루어진 혼합 추출물, 또는 아피게닌-7-b-D-O-글루쿠로나이드(apigenin-7-b-D-O-glucuronide)를 포함하는 IRF-1(Interferon regulatory factor 1) 유전자 발현 증가용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다. 용아초 및 오배자를 물로 세척하여 이물질을 제거한 후 그늘에서 건조하고, 용아초 및 오배자에 각각 적당한 양의 용매를 첨가하여 완전히 침지되도록 하며, 이때, 용아초 및 오배자는 건조된 상태 그대로 사용하거나 분쇄하여 분말 형태로 사용할 수 있다. 용아초 및 오배자는 각각 통상의 추출용매를 이용하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는, (a) 탄소수 1~4의 무수 또는 함수 저급 알코올(예를 들어, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 및 노말-부탄올 등), (b) 상기 저급 알코올과 물과의 혼합용매, (c) 아세톤, (d) 에틸 아세테이트, (e) 클로로포름, (f) 1,3-부틸렌글리콜, (g) 헥산, (h) 디에틸에테르, (i) 부틸아세테이트 (j) 클로로포름-메탄올 또는 (k) 물을 이용하여 추출할 수 있고, 더욱 바람직하게는 50%(v/v) 에탄올수용액으로 추출할 수 있다. 추출시 실온에서 함침하거나 가온할 수 있다

[0010] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 추출물의 추출용매는 에탄올수용액일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 에탄올수용액의 에탄올 및 물의 부피비는 5:5일 수 있다.

[0012] 본 발명의 조성물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여될 수 있는 다양한 제형으로 제제화될 수 있으며, 제제화될 경우에는 당업계에서 일반적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조될 수 있다.

[0013] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등과 혼합되어 제조될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0014] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함되며, 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트

와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명의 조성물의 인체에 대한 효과적인 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 약 0.001 내지 1000mg/kg/일이고, 바람직하게는 0.1 내지 500mg/kg/일 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여될 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 용아초 추출물 및 오배자 추출물의 중량비는 1:10 내지 10:1일 수 있다.

[0017] 본 발명의 IRF-1 유전자 발현 증가용 조성물에 포함되는 용아초 추출물 및 오배자 추출물의 중량비가 1:10 내지 10:1, 바람직하게는 6:4일 경우, 인터페론 감마 대비 IRF-1 유전자 발현을 약 50% 이상 증가시킬 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 C형 간염 바이러스 억제 활성을 나타내는 성분을 더 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 조성물은 인터페론 감마 대비 IRF-1 유전자 발현 증가 효과가 현저히 우수하므로, C형 간염 바이러스 감염 치료에 있어서 종래 인터페론 감마 주사와 병용 사용이 필요한 치료제와 병용 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 종래 인터페론 감마의 주사 경로의 투여가 아닌 경구 경로로 투여되므로, 종래 경구로 투여되는 C형 간염 바이러스 감염 치료제와 효과적으로 병용될 수 있으며, 환자의 투약 편의성을 현저히 개선할 수 있다.

[0020] 본 발명의 조성물에 더 포함될 수 있는 C형 간염 바이러스 억제 활성을 나타내는 성분은 체내에서 C형 간염 바이러스의 억제 활성을 나타내는 물질이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0021] 본 발명의 조성물은 C형 간염 치료 효과가 우수하면서도 동시에 현저한 IRF-1 발현 증가 활성을 갖는다는 점에서, 본 발명의 조성물은 단독으로 C형 간염 바이러스 감염의 예방 또는 치료에 활용될 수 있다. 이를 위하여, 본 발명의 조성물은 C형 간염 바이러스 약학적 조성물 및 건강기능식품으로 제조될 수 있다.

[0022] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 제조될 경우, 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종 기제 및/또는 첨가물을 포함할 수 있으며, 그 효과를 감소시키지 않는 범위 내에서 비이온 계면활성제, 실리콘 폴리머, 체질안료, 향료, 방부제, 살균제, 산화 안정화제, 유기 용매, 이온성 또는 비이온성 증점제, 유연화제, 산화방지제, 자유 라디칼 파괴제, 불투명화제, 안정화제, 에몰리언트(emollient), 실리콘, α-히드록시산, 소포제, 보습제, 비타민, 곤충 기피제, 향료, 보존제, 계면활성제, 소염제, 물질 P 길항제, 충전제, 중합체, 추진제, 염기성화 또는 산성화제, 또는 착색제 등 공지의 화합물을 더 포함하여 제조될 수 있다.

[0023] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 제조될 경우, 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있으며, 투여량은 성인 기준으로 0.001 내지 1000㎎/kg일 수 있다.

[0024] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 제조될 경우, 다양한 제형으로 투여될 수 있는데, 경구 투여 시 환제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 등의 고형제제 형태로 투여될 수 있으며, 여러 가지 부형제, 예를 들어, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 더 포함할 수 있다. 구체적으로, 분말, 과립, 정제 또는 캅셀 형태로 제형화할 경우, 이의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 예를 들어, 락토오스, 덱스트로스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 인산칼슘, 규산칼슘, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및/또는 광물유가 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 제제화에 일반적으로 사용되는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함하여 조제될 수 있으며, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 또는 탈크 같은 윤활제를 더 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여시 다양한 제형으로 투여될 수 있는데, 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드, 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들어, 습윤제 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 구체적으로, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 및 동결건조제제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 또한, 치료제의 효능 증진을 위해 칼슘이나 비타민 D3를 첨가할 수 있다.

[0025] 이러한 조성물은 단위-용량(1회분) 또는 다중-용량(수 회분) 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알에 제시될 수 있고, 사용 직전에 멸균성 액상 담체, 예를 들어, 주사용 수의 부가만을 요구하는 동결-건조 조건하에 저장될 수 있다. 즉석의 사용제 및 현탁제는 멸균성 산제, 과립제 및 정제로부터 제조할 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물이 건강기능식품으로 제조될 경우, 건강기능식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 향미제로서 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0027] 예를 들어, 본 발명의 조성물이 드링크제로 제조될 경우에는 본 발명의 조성물 외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액 및/또는 감초 추출액 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 조성물이 건강기능식품으로 제조될 경우, 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0029] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0030] IRF-1 유전자 발현 증가용 조성물에 따르면, 용아초 추출물 및 오배자 추출물을 포함하며, IRF-1 유전자 발현 증가 효과가 우수하므로, IRF-1 유전자 발현을 증가시키기 위한 원료, 약학적 조성물 및 건강기능식품 등으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 용아초 추출물 및 오배자 추출물의 C형 간염 바이러스 억제 효과를 나타낸 그래프이다. R: 리바비린; S: 소발디; I: 인터페론 감마; I+R: 인터페론 감마+리바비린; I+S: 인터페론 감마+소발디; APRG64: 용아초 주정추출물+오배자 주정추출물 혼합물; I+APRG64: 인터페론 감마+용아초 주정추출물+오배자 주정추출물 혼합물.

도 2는 용아초 추출물 및 오배자 추출물의 IRF-1 발현 증가 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3은 용아초 유효성분 및 오배자 유효성분의 IRF-1 발현 증가 활성을 나타낸 그래프이다. PGG: 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose; EA: ethyl gallate; GA: gallic acid; A-7-O-G: apigenin-7-b-D-O-glucuronide.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 본 발명을 하나 이상의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] **제조예 1. 용아초 추출물의 제조**

[0035] 용아초(*Agrimonia pilosa*)의 잎은 서울의 BioKorea Co LTd(Seoul)에서 구입하고, 바우처 표본(BMRI-RG-1601)은 한국 용인 경희대학교 바이오메디컬연구센터에 기탁하였다. 건조된 샘플(20kg)을 80±2℃에서 6시간 동안 50% 에탄올수용액으로 추출한 다음 여과하였다. 그 후, 회전 증발기를 사용하여 농축시키고 동결건조하여 최종적으로 용아초 추출물 1.57kg을 수득하였으며, 사용전까지 4℃에서 보관하였다.

[0037] **제조예 2. 오배자 추출물의 제조**

[0038] 오배자(*Galla rhois*)는 서울의 BioKorea Co LTd(Seoul)에서 구입하였고, 바우처 표본(BMRI-RG-1602)은 한국 용인 경희대학교 바이오메디컬연구센터에 기탁하였다. 건조된 샘플(20kg)을 80±2℃에서 6시간 동안 50% 에탄올수

용액으로 추출한 다음 여과하였다. 그 후, 회전 증발기를 사용하여 농축시키고 동결건조하여 최종적으로 오배자 추출물 11.59㎏을 수득하였으며, 사용전까지 4℃에서 보관하였다.

[0040] **제조예 3. 용아초 추출물 및 오배자 추출물의 6:4 혼합물(APRG64) 제조**

[0041] 제조예 1에서 제조한 용아초 추출물과 제조예 2에서 제조한 오배자 추출물을 6:4의 중량비로 혼합하여 용아초 추출물 및 오배자 추출물의 6:4 혼합물(APRG64)을 제조하였다.

[0043] **실시예 1. C형 간염 바이러스에 대한 APRG64 단독의 억제 효과 확인**

[0044] 제조예 3에서 제조한 용아초 추출물 및 오배자 추출물의 6:4 혼합물(APRG64)이 C형 간염 바이러스 억제 효과를 나타내는지 hollow fiber assay를 수행하여 확인하였다.

[0045] 구체적으로, VERO 세포(한국세포주은행)를 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)을 함유하는 EMEM 배지에서 배양하여 준비하였다. 그 후, Vero 세포에 C형 간염 바이러스를 MOI 1:1 또는 10:1로 혼합하고, 1×10^{6} cells/mL 농도가 되도록 계수하여 hollow fiber에 seeding한 후 양끝을 sealing하여 6-웰 플레이트에 넣어 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 12시간 동안 배양한 후, ALB/c nude mouse(6주령, 수컷)의 피하 조직에 이식하였다. 이식 후 다음날부터 4주간 시험물질을 주사하거나 경구투여하였다. 인터페론 감마 주사는 1주일에 1번, 총 경구 투여는 1일 1회, 4주간 진행하였다. 대조군(Con)은 C형 간염 바이러스를 혼합한 Vero 세포를 hollow fiber에 넣고 이식하여 준비하였으며, 실험군은 표 1과 같이 준비하였다.

표 1

[0047]

실험군	투여량
리바비린 투여군(R)	100mg/kg, 경구
소발디 투여군(S)	50mg/kg, 경구
인터페론 감마 주사군(I)	20만 IU(0.015mg), 피하
인터페론 감마 주사 및 리바비린 투여군(I+R)	20만 IU(0.015mg), 피하 100mg/kg, 경구
인터페론 감마 주사 및 소발디 투여군(I+S)	20만 IU(0.015mg), 피하 50mg/kg, 경구
APRG64 투여군(APRG64)	100mg/kg, 경구
인터페론 감마 주사 및 APRG64 투여군(I+APRG64)	20만 IU(0.015mg), 피하 100mg/kg, 경구

[0049] 4주 후 마우스를 희생하여 fiber를 회수한 후, 6-웰 플레이트에 넣어 배양하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 PrimeScript Ⅱ 1st strand cDNA synthesis Kit(Takara, Japan)를 사용하여 cDNA로 합성하였고, 표 2의 프라이머를 이용하여 다음의 PCR 조건으로 RNA의 발현양을 정량하였다: Polymerase는 95℃에서 10분간 pre-incubation하여 활성화시킨 후 95℃에서 15초, 57℃에서 1분, 72℃ 1분을 반복하여 총 40회를 실시하였다. 각 PCR 분석에 대한 결과는 하우스키핑(housekeeping) 유전자에 의해 β-actin으로 표준화하였다.

표 2

[0051]

프라이머명		핵산서열(5'→3')	서열번호
HCV	forward	TGCGGAACCGGTGAGTAC	서열번호 1
	reverse	AGGTTTAGGATTCGTGCTCAT	서열번호 2
beta-actin	forward	GCTGCTGAAGAGGCGCTT	서열번호 3
	reverse	GCTCCTCATCCATACCCTGATTTT	서열번호 4

[0053] 그 결과, 리바비린이나 소발디 단독투여는 C형 간염 바이러스에 대해 억제 효과가 낮은 것으로 나타났으나, 인터페론 주사와 병용시 그 효과가 2배 가까이 상승하는 것으로 확인되었다. 반면, APRG64는 인터페론 감마 주사의 병용 없이도 단독으로 C형 간염 바이러스에 대한 억제 효과가 우수한 것으로 확인되었다(도 1).

[0055] **실시예 2. APRG64의 IRF-1 발현 증가 효과 확인**

[0056] 리바비린과 같은 종래의 C형 간염 바이러스 감염 치료제의 경우, 그 효과를 증대시키기 위하여 인터페론 감마 주사와 병용으로 사용되고 있다. 반면, 실시예 1에 따르면, APRG64는 인터페론 감마 주사 병용 여부와 상관없이 높은 C형 간염 바이러스 억제 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 이에, APRG64가 IRF-1(Interferon regulatory factor 1)의 발현을 증가시켜 인터페론 감마 주사 병용 없이도 우수한 C형 간염 바이러스 억제 활성을 나타내는 것인지 확인하였다.

[0057] 구체적으로, 실시예 1에서 합성한 cDNA에 대하여 표 3의 프라이머를 이용하여 실시예 1과 동일한 조건으로 PCR 분석을 수행하였으며, PCR 분석 결과는 하우스키핑 유전자에 의해 β-actin으로 표준화하였다.

표 3

[0059]

프라이머명		핵산서열(5'→3')	서열번호
IRF-1	forward	TGCCTCCTGGGAAGATGA	서열번호 5
	reverse	CCTGGGATTGGTGTTATGC	서열번호 6

[0061] 그 결과, APRG64는 인터페론 감마 주사와 병용될 경우보다도 단독으로 사용시 더욱 높은 IRF-1 발현 증가 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(도 2).

[0062] 이와 같은 결과를 통하여, APRG64는 단독으로 IRF-1 발현 증가 활성을 증가시킬 수 있으므로, 인터페론 감마 주사 없이 단독으로 C형 간염 바이러스 감염을 효과적으로 치료할 수 있음이 확인되었다.

[0064] **실시예 3. APRG64 유래 IRF-1 발현 증가 활성 화합물 확인**

[0065] APRG64에 함유된 성분 중, IRF-1의 발현 증가 활성을 나타내는 성분을 확인하기 위하여, 용아초 또는 오배자의 유효성분인 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose(PGG), ethyl gallate(EA), gallic acid(GA) 및 apigenin-7-b-D-O-glucuronide(A-7-O-G)에 대해 IRF-1 발현 증가 활성을 분석하였다.

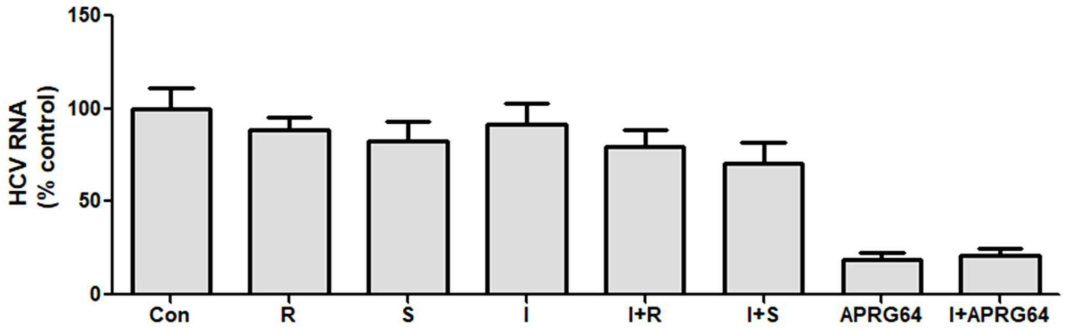
[0066] 구체적으로, 실험 물질로 PGG, ethyl gallate(EA), gallic acid(GA) 또는 apigenin-7-b-D-O-glucuronide을 사용한 것을 제외하면, 실시예 1과 동일한 방법으로 동물실험을 수행하였으며, 실시예 2와 동일한 방법으로 IRF-1 발현을 분석하였다.

[0067] 그 결과, A-7-O-G에서 IRF-1의 발현이 현저하게 증가된 것으로 확인되었다(도 3).

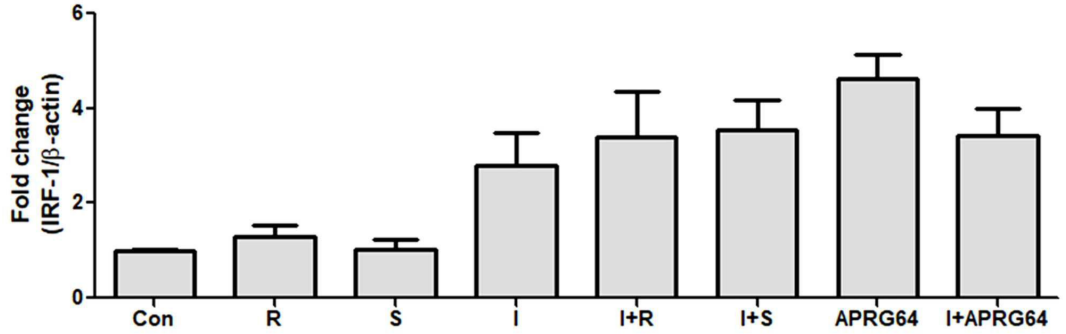
[0069] 이제까지 본 발명에 대하여 그 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

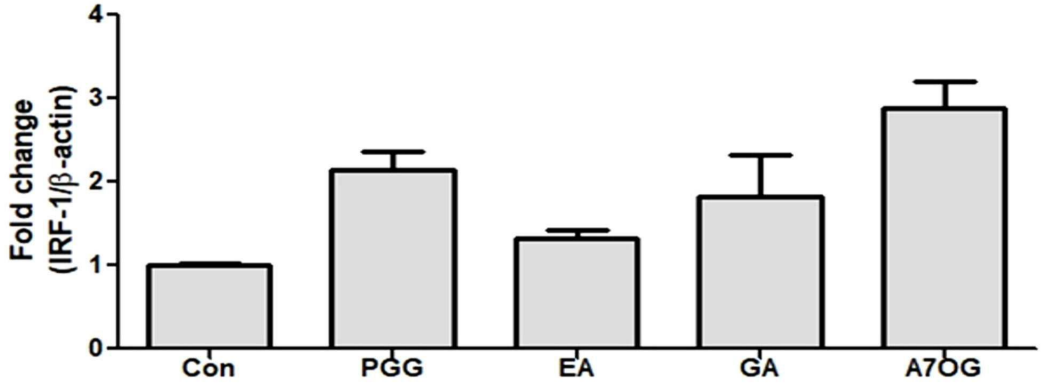
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.