



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년08월30일
(11) 등록번호 10-1060331
(24) 등록일자 2011년08월23일

(51) Int. Cl.

A61K 31/05 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2005-7007230

(22) 출원일자(국제출원일자) 2003년10월14일

심사청구일자 2008년10월08일

(85) 번역문제출일자 2005년04월26일

(65) 공개번호 10-2005-0071627

(43) 공개일자 2005년07월07일

(86) 국제출원번호 PCT/IT2003/000626

(87) 국제공개번호 WO 2004/041260

국제공개일자 2004년05월21일

(30) 우선권주장

RM2002A000562 2002년11월06일 이탈리아(IT)

(56) 선행기술조사문현

W02001008671 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

(73) 특허권자

시그마타우 인두스트리에 파르마슈티케 리우니테
에스.피.에이.

이탈리아 로마 00144 비알레 샤큐스파아레 47

(72) 발명자

가라시, 엔리코

이탈리아 포메지아 아이-00040 케이엠. 30,400,
비아 폰티나, 시그마-타우 인두스트리에 파르마슈
티케 리우니테 에스.피.에이.

팔라마라, 안나, 테레사

이탈리아 포메지아 아이-00040 케이엠. 30,400,
비아 폰티나, 시그마-타우 인두스트리에 파르마슈
티케 리우니테 에스.피.에이.

(74) 대리인

백남훈, 한라특허법인

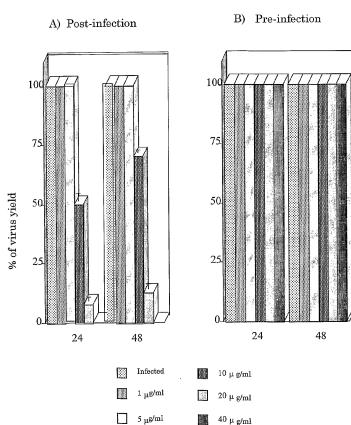
전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이정아

(54) 인플루엔자 바이러스 감염의 치료에 유용한 약제의 제조를 위한 레스베라트롤의 용도

(57) 요약

인플루엔자 치료용 약제의 제조를 위한 레스베라트롤의 용도를 개시한다. 상기 약제는 바이러스 복제를 통해 그의 치료 활성을 발휘한다.

대 표 도 - 도1

특허청구의 범위

청구항 1

유효 성분으로서 레스베라트롤을 포함하고, 인플루엔자 바이러스 복제를 억제하여 인플루엔자 바이러스 감염의 치료에 유용한 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 바이러스가 인간 인플루엔자 바이러스인 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 수의학 분야에서 바이러스 감염의 치료에 유용한 약학 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 바이러스 감염의 치료를 위한 약제의 제조에서 유효 성분으로서 레스베라트롤의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 레스베라트롤, 즉 3,4,5-트리하이드록시스틸벤은 적포도주의 공지된 유익한 성질들과 관련하여 그의 근본적인 성질들 중 하나가 최근에 집중적으로 연구되어 왔다(Life Sci., 71, 2145-52, 2002).

[0003] 레스베라트롤은 50 내지 100 $\mu\text{g}/\text{g}$ 범위의 양으로 검은 포도 껍질에 위치하며 적포도주 중의 그의 농도 범위는 1.5 내지 3 mg/ℓ 이다.

[0004] 다수의 연구들이 레스베라트롤의 항암 활성을 입증하였으며, 그의 작용 기전들을 하기와 같이 세분할 수 있다: 염증 및 발암 과정에 관여하는 다양한 유전자들의 발현을 조절할 수 있는 전사 인자 NF- κ B의 활성화 억제 (Lancet, 341, 1103-1104, 1993; Science, 275, 218-220, 1997; Proc. Natl. Acad. Sc., 94, 14138-14143, 1997; Life Science, 61, 2103-2110, 1997; Brit. J. Pharm., 126, 673-680, 1999; J. Immunol., 164, 6509-6519, 2000); 포유동물의 상피 세포에서 단백질 키나제 C(Bioch., 38, 13244-13251, 1999), 리보뉴클레오티드 리터타제(FEBS Lett., 421, 277-279, 1998) 및 사이클로-옥시게나제-2(COX-2)를 포함한 다양한 단백질들의 억제(Ann. N.Y. Acad. Sci., 889, 214-223, 1999; Carcinog., 21, 959-963, 2000); 카스파제 2, 3, 6 및 9의 활성화 (FASEB J., 1613-1615, 2000) 및 공지된 종양 억제인자인 유전자 p53의 조절(Cancer Research, 59, 5892-5895, 1999; Clin. Bioch., 34, 415-420, 2001).

[0005] 레스베라트롤의 유익한 작용들 중에서, 세포 내 산화 압력을 일으키는 다양한 물질 및/또는 조건들에 의해 생성되는 손상 효과를 중화시키는 상기 언급한 능력에 의해 암시되는 그의 산화 방지 활성을 또한 언급해야 한다 (Free Radic. Res., 33, 105-114, 2000).

[0006] 레스베라트롤은 혈관 내피 수준에서 산화 질소의 생산에 의해 혈관 이완을 유도하고(Cancer Res., 59, 2596-01, 1999), 혈소판에서 트롬복산(Clin. Chim. Acta, 235, 207-219, 1995; Int. J. Tissue React., 17, 1-3, 1995) 및 호중구에서 류코트리엔의 합성을 억제하며, 저밀도 지단백질(LDL)의 산화와 응집을 방지한다(Lancet, 341, 1103-1104, 1993; Life Sci., 64, 2511-2521, 1999).

[0007] 최근에, 헤르페스 단순 DNA 바이러스에 대한 레스베라트롤의 억제 활성이 생체 외 실험 시스템을 기초로 하여 입증되었다(Antiv. Res., 43, 145-155, 1999).

[0008] 본 발명의 저자 및 다른 연구팀들에 의해 획득된 데이터는 다수의 산화 방지 물질들이 생체 외에서 파라인플루엔자 센다이 바이러스(SV) 유형 1, 헤르페스 단순 1 바이러스(HSV-1) 및 후천성 면역 결핍 바이러스(HIV)의 복제를 억제할 수 있음을 밝혔다(AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1997: 1537-1541; Biochem. Biophys. Res.

Commun., 1992; 188, 1090-1096; Antivir. Res., 1995, 27, 237-253). 산화 방지 물질의 항바이러스 효능이 또한 쥐 AIDS(MAIDS) 모델에서뿐만 아니라 HSV1 각막염에서 입증되었다(AIDS Res. Hum. Retroviruses, 1996; 12, 1373-1381; Exp. Eye. Res., 2000; 70, 215-220).

[0009] 인플루엔자는 결과로서 심각한 공중 보건 문제와 주요한 헬스케어 경제 영향을 갖는 전 세계적인 전염병학적 문제이다. 인플루엔자의 원인 바이러스는 만연되어 있으며 매우 감염성이다. 불행하게도, 현재 이용 가능한 요법들은 여전히 충분히 유효하지 않으며 종종 내성 바이러스 균주를 도태시키고(Fields, cap47, 1533-79, 2001), 더욱이 백신접종 캠페인은 백신 예방 고유의 단점들 이외에 상기 바이러스의 극단적인 항원 변이성으로 인해 아직까지 만족스러운 염호를 제공하지 못한다(Fields, cap47, 1533-79, 2001).

[0010] 바이러스 복제를 공격하는 다양한 전략들 중에 최근의 연구(J. of Virol., 74, 1781-1786, 2000)는 특정한 바이러스 리보핵산 단백질을 세포질로 수송함에 있어서 단백질 M1의 중요한 역할을 보고하였다. 이는 상기 바이러스의 복제 주기에 근본적인 단계인 것으로 보이며, 따라서 바이러스 복제의 억제가 단백질 M의 억제된 합성으로 인한 감염된 세포 핵 중의 핵단백질의 유지를 통해 추구될 수 있다. 이러한 현상은 키나제 기능을 갖는 세포 단백질의 억제에 기인할 수도 있다. 실제로, 최근에 키나제의 억제가, 인플루엔자 바이러스의 복제에 대한 강력한 억제 작용과 함께 세포핵의 NP를 유지시킴이 입증되었다(Nature Cell. Biol., 3, 301-5, 2001; J. of Virol., 74, 1781-86, 2000).

[0011] GSH는 세포 산화환원 시스템에서 중요한 산화방지제인 것으로 공지되어 있으며 다양한 바이러스들의 복제와 연관되어 왔다. 실제로, 본 발명자들에 의해 수행된 선행 연구들은 바이러스 감염 동안 감염 자체의 결과로서 GSH의 감소가 관찰될 수 있음을 입증하였다(Rotilio et al., "Oxidative stress on cell activation in viral infection", 143-53, 1993; Palamara et al., Antiviral Research, 27, 237-53, 1995).

[0012] 공지된 세포사멸 기전의 비정상적인 조절은 다양한 인간 질병들, 예를 들어 다수의 자가면역성, 감염성 또는 신경성 질병, 예를 들어 AIDS 및 암의 원인이 되는 근원 인자이다.

[0013] 선행 연구들에서, 레스베라트롤이 세포의 세포사멸 유도를 통해 종양 세포를 제거함이 개시되었다. 최근에, 텐호퍼(Tinhofer I.) 등에 의해 수행된 연구(FASEB J., 18, 1613-15, 2001)는 레스베라트롤에 의해 유도된 세포사멸의 첫 번째 사건이 미토콘드리아 막 전위($\Delta \Phi_m$)의 변경, 반응성 산소 종(ROS)의 방출 및 카스파제 2, 3, 6 및 9의 활성화를 특징으로 함을 밝혔다. 상기 인플루엔자 바이러스는 바이러스 균주 및 감염 배수에 따라 다양한 퍼센트로 세포사멸을 유도함이 또한 공지되어 있다.

발명의 요약

[0014] 본 발명에 이르러 레스베라트롤이 인플루엔자 바이러스 복제에 대해 억제 작용을 발휘하는 것으로 밝혀졌다. 대단히 놀라운 방식으로, 레스베라트롤이 예상된 산화방지 활성을 통해서가 아닌, 인플루엔자 바이러스 복제 과정에서 중요한 역할을 하는 세포 효소인 단백질 키나제 C의 특정한 억제 기전을 통해 인플루엔자 바이러스 복제에 억제 작용을 발휘함이 또한 밝혀졌다. 따라서 레스베라트롤의 사용에 의해 제공된 주요 이점은 상기 바이러스를 간접적으로, 즉 상기 바이러스 입자 자체보다는 상기 바이러스의 작용성 세포 구조를 방해함으로써 공격하는 능력일 것이다. 따라서 이러한 유형의 접근법은 가장 통상적인 항바이러스 약물에 대한 내성 현상의 발생을 피하면서, 상기 바이러스를 억제시킬 수 있다.

[0015] 따라서, 본 발명의 한 가지 목적은 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 및/또는 치료에 유용한 양제의 제조를 위한 레스베라트롤의 용도이다. 본 발명의 바람직한 용도에서, 레스베라트롤을 인간 인플루엔자 바이러스에 대해 사용한다. 본 발명의 보다 넓은 용도에서, 본 발명의 목적은 또한 수의학 분야에서 인플루엔자 바이러스 감염의 치료에 유용한 양제의 제조를 위한 레스베라트롤의 용도를 포함한다.

발명의 상세한 설명

[0016] 본 발명의 효능을 예시하기 위해서, 인플루엔자 바이러스 A/PR8/34, 서브유형 H1N1(이후부터 간단히 바이러스 PR8이라 칭함)을 사용하여 생체 외 연구를 수행하였다. 상기 균주를 순수하게 예로서 사용하였으며, 본 발명을 상기 용어의 일반적인 의미로 상기 인플루엔자 바이러스에 적용할 수 있음을 물론이다.

[0028] 물질 및 방법

[0029] 레스베라트롤은 통상적으로 시중에서 구입할 수 있거나 또는 문헌에 보고된 공지된 방법을 사용하여 수득할 수 있는 제품이다. 상기 물질을 DMSO(80 mg/ml) 중에 용해시켜 사용하였다. 실험에 사용된 농도는 RPMI 1640 중의 일련의 희석에 의해 얻었다. 대조용 샘플들을 모두 상기 레스베라트롤의 용해에 사용된 동일한 용량의 DMSO로 처리하였다. 이들 농도에서 상기 DMSO는 세포에 대해 독성 효과를 생성시키지 않았다.

[0030] 세포 배양

[0031] 인플루엔자 바이러스 복제의 연구를 위해서 MDCK 세포(개 신장 상피 세포)를 사용하였다. 상기 세포를 L-글루타민, 폐니실린-스트렙토마이신 및 10% 송아지 태아 혈청(FCS)이 첨가되고 37 °C, 5% CO₂ 분위기 중에서 유지되는 RPMI 배양 배지 중의 6- 및 24-웰 리브노(Libno) 플레이트 또는 T-25 바이알 중에서 배양하였다. 융합 세포 단층을 0.25% 트립신 용액으로 분리시키고, 원심분리시키고 새로운 배지에 재 시딩하였다. 혈구계를 사용하여 세포 수를 세고 트립판 블루 생육력 염색(0.02%)에 의한 제외를 이용하여 세포 생육력을 측정하였다.

[0032] 바이러스의 제조

[0033] 바이러스를 10-일 된 발육란 요막 공간에 적합하게 희석된 바이러스 혼탁액을 접종하여 생성시켰다. 상기 난을 37 °C에서 72 시간 동안 배양한 후에, 새로 형성된 바이러스 입자를 함유하는 요막 액을 +4 °C에서 원심분리에 의해 등명화시키고 -80 °C에서 보관하였다.

[0034] 바이러스의 적정

[0035] 상기 바이러스에 고유한 혈구를 응집시키는 능력을 근거로 적혈구응집소 기법을 사용하여 상기 바이러스를 적정하였다.

[0036] 상기 요막 액 중의 희석되지 않은 바이러스를 96-웰 플레이트에서 인산염 완충 염수(PBS)로 스칼라 염색에 의해 적정하고, 상기 플레이트에 0 Rh+ 그룹의 인간 혈구의 0.5% 혼탁액을 나중에 가하였다. 이어서 상기 플레이트를 주변 온도에서 적혈구 응집 반응이 일어나기에 충분히 오래 방치시켰다. 적혈구응집 단위(HAU)로 나타내는, 상기 샘플의 바이러스 역가를 완전한 적혈구응집을 발생시키는 최종 희석률로 나타내었다. 감염된 세포 부분 상의 바이러스의 방출을 감염 후 24 시간 및 48 시간째에 취한 감염된 샘플의 상등액에 대한 과정과 동일한 과정으로 평가하였다.

[0037] 바이러스 감염

[0038] MDCK 세포의 융합 단층을 PBS로 세척하고 상기 바이러스로 감염시켰다(0.2의 감염 배수[m.o.i.]). 특히, 상기 바이러스를 FCS 없이 RPMI로 적합하게 희석하였으며 상기 세포에 최소의 부피로 가하였다. 37 °C에서 1 시간 배양 후(상기 바이러스의 흡착 기간)에 접종물을 제거하고, 상기 단층을 PBS로 세척하여 과잉의 흡착되지 않은 바이러스를 제거한 후에 2% FCS를 함유하는 새로운 배지에서 유지시켰다. 레스베라트롤을 하기의 처리 스케줄에 따라 다양한 농도(1, 5, 10, 15, 20 및 40 µg/ml)로 가하였다: a) 배양 24 시간 전(전-); b) 감염 세포에 대한 바이러스의 흡착 직후(후-); 및 c) 감염 세포에 대한 바이러스 흡착 24 시간 전 및 흡착 직후(전-후). 모든 경우에, 상기 물질을 전체 실험 과정 동안 배양시켰다. 배양 후 24 시간 및 48 시간째에, 상등액 중에 방출된 바이러스를 적혈구응집 단위의 평가에 의해 적정하였다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 감염 후 첨가된 레스베라트롤은 용량 의존적인 방식으로 바이러스 감염을 억제시켰다. 20 µg/ml의 농도에서, 바이러스 역가가 감염되고 처리되지 않은 대조군에 비해 87%까지 감소하였으며, 이때 상기 감염되지 않은 세포에 대해 어떠한 독성 효과도 검출되지 않았다. MDCK 세포에 대한 가능한 독성 정도를 측정하기 위해서, 상기 세포를 다양한 농도(5, 10, 15, 20 및 40 µg/ml)에서 단층의 융합 후에 레스베라트롤로 처리하였다. 수득된 결과는 인플루엔자 바이러스의 현저한 억제를 일으킨 용량(10 내지 20 µg/ml)에서 세포 수의 약간의 감소가 관찰되었으며, 이는 추정 상 세포 증식의 느린 하강에 기인하는 듯 하다(도 2A). 그러나, 상기 용량에서 세포의 어떠한 형태 상 변화도 관찰되지 않았다. 그러나, 바이러스 복제가 완전히 차단된 40 µg/ml의 농도에서, 세포 생육력의 증가와

함께 독성 효과가 관찰되었다(도 2B). 이러한 결과를 근거로, 하기의 실험에서 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 용량을 사용하였으며, 이는 부작용 없이 최대의 항바이러스 활성을 생성시켰다.

[0039] 항바이러스 활성의 특성화

레스베라트롤에 의해 조절되는 바이러스 복제 주기의 단계들을 확인할 목적으로, 상기 물질을 바이러스 생활사의 다양한 단계들에 대해 상이한 처리 스케줄에 따라 가하였다. 첫 번째 단계에서, 레스베라트롤이 상기 바이러스의 세포 내로의 유입을 간섭하는지를 평가하기 위해서, 상기 물질을 오직 바이러스 흡착 단계 동안(37 °C에서 1 시간 동안) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 가하고 이어서 제거하였다. 24 시간 후 바이러스 복제의 측정은 대조용 세포에서 얻은 복제에 필적할만함이 입증되었으며, 따라서 이는 상기 바이러스의 유입이 상기 약물에 의해 억제되지 않았음을 나타낸다(도 3). 더욱이, 레스베라트롤이 상기 바이러스를 직접 불활성화시킬 수 있는지를 평가하기 위해서, 상기 바이러스를 상기 물질과 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 37 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 이후에, 상기와 같이 처리된 바이러스를 1:500으로 희석하고 세포의 감염에 사용하였다. 이러한 조건 하에서, 바이러스 복제의 감소는 관찰되지 않았다. 상기 결과는 레스베라트롤이 바이러스 입자를 직접 불활성화시키지 않음을 암시한다. 두 번째 단계에서, 세포를 감염시키고, 다시 동일한 농도(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 사용하여 레스베라트롤로 처리하였으나, 상기 물질을 배양 후 다양한 시간(0, 3, 6 및 9 시간)으로 가하였다. 배양 후 24 시간째에 HAU/mL로서 평가된 바이러스 복제는 오직 레스베라트롤을 감염 3 시간 이내에 첨가하는 경우에만 현저하게 억제되는 것으로 나타났다(도 4B). 대조적으로, 감염 직후 첨가된 레스베라트롤을 다양한 시간(0, 3, 6, 9 및 24 시간)에 제거하는 경우, 상기 처리를 9 시간 이상 지속시킨 경우에만 복제의 억제가 관찰되었다. 또한, 도 4에 제공된 결과는 항바이러스 활성이 일단 얻어졌으면 상기 처리의 중단 시에 역전되지 않음을 보인다.

[0041] 바이러스 복제를 또한 면역형광에 의해 감염된 세포 표면의 바이러스 항원의 발생 분석을 사용하여 평가하였다. 면역형광에 의한 바이러스 단백질의 분석을 녹색을 방출하는 필터(FITC)(렌즈 100x)를 사용하는 형광 현미경을 사용하여 수행하였다. 커버 슬라이드 상에서 24 시간 동안 배양한 MDCK 세포를 감염시키고, 감염 후 18 시간째에 4 °C에서 15 분 동안 메탄올-아세톤(1:1)으로 고정시켰다. 이후에, 상기 세포를 PBS로 2 회 세척하고, PBS-TRITON 0.1% 용액으로 5 분간 삼출시켰다. 비 특이성 부위들을 PBS 중에 용해시킨 1% 우유를 사용하여 주변 온도에서 30 분간 봉쇄시켰다. 이후에, 바이러스 단백질에 특이적인 단클론 항체(마우스 항-인플루엔자 NP 및 마우스 항-인플루엔자 M)를 가하고, 주변 온도에서 30 분 동안 PBS로 1:50으로 희석시켰다. 1 차 항체를 플루오레세인(항-마우스 FITC, Sigma)에 결합된 2 차 항체로 검출하였다.

[0042] 바이러스 단백질의 합성에 대한 분석 및 레스베라트롤의 항바이러스 활성과의 상관성

[0043] 바이러스 단백질을 웨스턴 블러팅에 의해 분석하였다. 바이러스 감염 후 상이한 시점에서, 세포들을 특정한 용해 완충액을 사용하여 용해시켰다. 이어서 동등한 양의 단백질들을 SDS 중의 폴리아크릴아미드 겔 상에 부하하였다. 전기 영동 후에, 상기 단백질들을 니트로셀룰로즈 멤브레인으로 옮기고 항-인플루엔자 다클론 항체로 처리하였다. 배양 및 적합한 세척 후에, 상기 필터를 페옥시다제에 결합된 2 차 항체로 처리하고 바이러스 단백질을 페옥시다제 기질(루미놀)(상기는 효소와 반응 시 빛을 방출하며 방사능 사진판 상에 자국을 남긴다)을 사용하여 화학발광 기법(ECL)에 의해 두드리지게 하였다. 상기 세포를 다양한 농도(5, 10, 15 및 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 레스베라트롤로 처리하였다. 바이러스 단백질의 보다 양호한 영상화를 위해서, 상기 전기영동 실행을 10% 폴리아크릴아미드 겔(도 7A) 및 구배 겔(도 7B)을 사용하여 수행하였다. 레스베라트롤은 15 및 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 말기 인플루엔자 바이러스 적혈구응집소(H0-H1, H2) 및 기질 단백질(M)의 합성을 거의 전적으로 억제하였다. 대조적으로, 상기 말기 단백질의 정도보다 적지만, 초기 뉴클레오팜시드 단백질들(핵단백질[NP] 및 폴리머라제 단백질[P])의 발현이 억제되었다.

[0044] 전령 RNA의 합성에 대한 분석

[0045] 바이러스 단백질의 억제 기전을 확인하기 위해서, 감염되고 상술한 상이한 농도의 레스베라트롤로 처리된 MDCK 세포를 문현[Tobita et al. J. General Virol., 78, 563-566, 1997]에 개시된 PCR 기법에 의해 분석하였다. 상기 바이러스로 감염되고/되거나 레스베라트롤로 처리된 MCDK 세포를 시약 GIBCO BRL TRIZOL로 균질화시켰다. 주변 온도에서 5 분 동안 배양한 후에, 클로로포름(샘플 당 0.2 mL)을 가하고 상기 샘플을 15 내지 30 °C에서 3 분간 배양하였다. 이어서 상기를 +4 °C에서 15 분 동안 10,000 rpm으로 원심분리시키고 RNA를 함유하는 수

성상을 회수하였다. 이소프로판을 0.5 mL을 가하고 샘플을 15 내지 30 °C에서 10 분간 배양하고 이어서 원심분리시켰다. 수득된 상등액을 제거하고 RNA 침전물을 2 내지 8 °C에서 5 분간 8,000 rpm에서 75% 에탄올로 처리하였다. 마지막으로, 상기 침전물을 공기 건조시키고 물-DEPC(디에틸 피로카보네이트) 20 μL에 용해시켰다.

[0046] 수득된 RNA를 역 전사효소를 사용하여 전사시켰다. 상기 역전사를 랜덤 프라이머, 즉 4 개의 데옥시뉴클레오티드(dNTP=dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 디티오트레이톨(DTT) 및 RT 완충제(Life Technologies)로 이루어진 혼합물 중의 각 샘플의 RNA 5 μL에 대해 수행하였다. 상보적인 DNA(cDNA)의 합성을 상기 혼합물을 22 °C에서 10 분, 이어서 42 °C에서 60 분간 방치시켜 수행하고, 마지막으로 반응물을 75 °C에서 10 분간 불활성화시켰다. 상기와 같이 수득된 cDNA를 이어서 PCR에 사용하였다.

[0047] Taq 폴리머라제를 PCR에 사용하였다. PCR을 각각 95, 48 및 72 °C의 온도에서 변성, 어닐링 및 연장의 3 개의 단계에서 수행하였다. 상기 주기를 20 회 반복하였다. 상기 바이러스 RNA 증폭에 사용된 올리고뉴클레오티드는 적혈구응집소 단백질(HA)을 암호화하는 바이러스 유전자의 경우 5' 프라이머: 5'-ACCAAAATGAAGGCAAACC-3', 3' 프라이머: 5'-TTACTGTTAGACGGGTGAT-3'; 기질 단백질(M)을 암호화하는 바이러스 유전자의 경우 5' 프라이머: 5'-ATGAGTCTTCTAACCG-3', 3'-프라이머: 5'-ACTGCTTGTCATGT-3'이었다. 상기 PCR 산물에 대해 에티디움 브로마이드를 넣어 DNA를 UV 투과조명기로 표시한 완충액 중의 1% 아가로스 겔상에서 전기영동(100 볼트)을 수행하였다.

[0048] 수득된 샘플들을 각각 바이러스 감염 후 4, 8 및 20 시간째에 평가하였다. 상기 바이러스 단백질 HA 및 M에 대한 전령 RNA는 대조용 또는 레스베라트롤로 처리된 그룹에서 4 시간째에 관찰되지 않았다. 상기 결과는 감염 후 20 시간 째 mRNA의 합성이 레스베라트롤에 의한 처리에 영향을 받지 않음을 나타낸다. 4 시간째의 상기 관찰은 레스베라트롤이 상기 단백질들에 대한 전령 합성을 단지 저연시킴을 나타낸다(도 8). 이러한 결과는 감염 후 8 시간째에 평가 시 레스베라트롤이 20 μg/mL의 용량에서 상기 말기 바이러스 단백질(HA 및 M)에 대한 전령 RNA의 방출을 저연시킴을 암시한다.

단백질 NP의 국소화

[0049] 인플루엔자 바이러스에 의해 감염된 세포에서 단백질 키나제 C의 억제가 감염된 세포 핵의 핵단백질 유지와 함께 단백질 M 발현을 상당히 감소시킴을 고려하여(J. Virol., 74, 1781-86, 2000), 바이러스 PR8로 감염되고 20 μg/mL 농도의 레스베라트롤로 처리 또는 처리되지 않은 MDCK 세포를 특이적인 항-M 및 항-NP 항체로 염색하고 형광 현미경 하에서 관찰하였다. 상기 결과는 감염되지 않은 세포에서 NP가 핵과 세포질 모두에서 관찰되고 M1은 세포질에 우세한 반면, 레스베라트롤로 처리된 세포에서는 NP가 핵에서 유지되며 현저하게 억제된 M은 동등하게 오직 핵에서만 관찰될 수 있음을 밝혔다. 이러한 현상은 키나제 작용을 갖는 세포 단백질의 억제에 기인할 수 있다. 상기 데이터는 상기 항바이러스 작용 기전이 상술한 키나제 작용을 갖는 단백질들의 억제와 관련될 수 있음을 암시한다(FEBS Letters, 45, 63-7, 1999).

화원 및 산화된 글루타치온의 분석

[0050] 글루타치온 분석을 요오도아세트산에 의한 유리 티올의 S-카복시메틸-유도체의 형성에 이은 1-플루오로-2,4-디니트로벤젠 반응 후의 NH₂ 말단 그룹의 2,4-디니트로페닐 유도체로의 전환의 결과로서 수행하였다(Anal. Biochem., 106, 55-62, 1980).

[0051] MDCK 세포를 긁힘 기법에 의해 분리시켰다. 이후에, 상기 세포를 1,200 rpm에서 5 분 동안 원심분리시켰다. 상기 세포를 PBS로 2 회 세척하고 원심분리 후에 수득된 침전물을 완충액 200 μL에 재 혼탁시켰다. 동결 및 해동의 반복된 주기에 의해 수득된 세포 용해물을 5% 메타인산 중의 침전에 의해 단백질 제거하였다. 22,300 g에서 원심분리 후에, 상등액 중에 존재하는 저분자량 티올을 10% 요오도아세트산(v/v)으로 유도체화하고 분말 형태의 NaHCO₃으로 중화시켰다. 암실에서 1 시간 배양 후에 1.5% 1-클로로-2,4-디니트로벤젠(v/v) 용액을 가하였다(1.5 mL/절대 에탄올 98.5 mL). 상기 시약을 가한 후에, 샘플을 암실에서 12 시간 동안 배양하고, 다양한 종의 글루타치온을 μ본다파크(Bondapak) 3.9x300 mm(Millipore) NH₂ HPLC 컬럼에 의해 분리시켰다. 전체

GSH 함량을 측정하기 위해서 정제된 GSH에 대해 수득된 표준 곡선을 기준으로 작성하였다. 상기 GSH 함량을 용해물 샘플 중에 존재하는 GSH nmol/단백질 mg으로 나타낸다. 단백질 농도를 로우리법을 사용하여 계산하였다(Biol. Chem., 193, 265-75, 1951). 상기 방법은 다수의 아미노산, 예를 들어 트립토판, 티로신, 시스테인

및 히스티딘의 폐놀 그룹의 존재로 인해, Cu²⁺ 이온을 갖는 알칼리 용액 중의 폴린-키오칼테유 시약을 환원시키는 단백질의 능력을 이용한다. 트립토판과 티로신은 이들의 특히 반응성인 폐놀 그룹, -SH 그룹을 통한 시스테인, 및 이미다졸 고리를 갖는 히스티딘에 의해 반응한다. 상기 환원 반응 산물을 단백질의 방향족 아미노산과의 반응에 의해 염색된 화합물들의 형성에 의해 검출한다. 실제로, 상기 용액은 695 nm에서 피크 흡수를 갖는 특별히 짙은 청색을 띤다. 따라서 상기 흡수 비율을 근거로, 표준으로서 다양한 농도의 드립 소 일부분을 사용하여 얻은 직선 눈금 곡선에 대해 상기 단백질들의 농도를 얻는다.

[0054] 항바이러스 활성과 산화환원 상태의 조절간의 가능한 상관성을 평가하기 위해서, 상이한 레스베라트를 농도로 처리되고 상기 바이러스로 감염되거나 감염되지 않은 MDCK 세포의 세포 GSH 농도를 감염 후 24 시간째에 HPLC 분석에 의해 평가하였다. 놀랍게도, 감염되지 않은 MDCK 세포에 첨가된 레스베라트를은 처리되지 않은 세포에 비해 세포 내 GSH 수준을 감소시켰다(도 6). 감염된 세포에 대한 레스베라트의 첨가는 바이러스 복제의 억제를 통해, 상기 감염에 의해 감소된 GSH 수준을 복원시키지 못했다.

세포사멸의 분석

[0055] 세포사멸의 분석에 관하여, MDCK 세포를 바이러스 PR8로 감염시켰다. 바이러스 흡착 후에, 상기 세포를 다양한 농도(5, 10, 15 및 20 µg/ml)의 레스베라트를로 처리하였다. 감염 후 24 시간째에, 상기 세포를 0.25% 트립신 용액을 사용하여 분리시키고 이어서 1,200 rpm에서 5 분 동안 원심분리시키고, 상기와 같이 수득된 침전물을 프로피디움 요오다이드로 표지 후 FACS 기법에 의해 분석하였다.

[0056] 세포사멸에 의한 세포사의 유도가 레스베라트의 항바이러스 효과와 관련이 있는지를 평가하기 위해서, MDCK 세포를 상기 바이러스로 감염 또는 감염시키지 않고 다양한 농도의 상기 물질로 처리하였다. 세포사멸에 의한 세포사를 프로피디움 요오다이드로 표지한 후 FACS에 의해 평가하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 레스베라트를은 감염되지 않은 세포에서 상기 용량에 따라(각각 5 및 20 µg/ml) 8 내지 32% 범위의 특정한 정도의 세포사멸에 의한 세포사를 일으켰다. 상기 감염은 그 자체가 감염된 세포의 12%에서 세포사멸을 유도하였다. 증가된 용량의 첨가는 사망률의 증가를 야기시켰지만, 항바이러스 용량의 상기 약물로 처리된 비 감염 세포와 감염 세포간에 현저한 차이는 관찰되지 않았다(각각 35% 및 37% 세포사멸).

[0057] 본 발명의 결과에 대한 추가적인 확인 및 실시예에 의해, 하기 생체 내 연구들을 개시한다.

실시예

[0058] 4 주된 암컷 순계 Balb/c AnCr IBR 마우스를 사용하였다. PBS 중에 용해된 레스베라트를을 인플루엔자 바이러스에 의한 감염 후 다양한 시간에 복강 내 경로를 통해 상기 동물에게 투여하였다. 상기 레스베라트를 농도는 생체 외 유효 범위(10 내지 20 µg/ml)와 유사한 상기 동물 혈중 용량 범위가 얻어지도록 선택하였다.

[0059] 상기 마우스에게 인플루엔자 바이러스 A/PR을 함유하는 혼탁액을 에테르와 함께 광 마취 후 2 HAU/마우스의 감염 배수로 비내(i.n.) 접종하였다. 선행 실험 데이터를 근거로, 상기 인플루엔자 바이러스는 상기 감염 배수에서 출혈성 폐렴을 발생시키며, 이로 인해 감염 후 1 주일까지 상기 동물의 80%가 사망하게 된다. 감염 경향을 모니터하기 위해서, 생존 곡선의 연구이외에 바이러스학 및 면역학적 매개변수들을 모두 모니터하였다.

[0060] 바이러스학적 매개변수로서, 바이러스 부하를 측정하였다. 감염 후 상이한 시점들에서, 감염된 마우스 및 대조용 마우스의 폐를 샘플로서 취하고, 칭량하고 항생제를 함유하는 RPMI에서 균질화시켰다. 원심분리 후에, 상등액을 적합하게 희석하고 바이러스 부하를 CPE-50% 시험에 의해 분석하였다. 상기 방법을 기본으로, 융합성 MDCK 세포를 2% FCS에서 항생제가 첨가된 RPMI로 연속적으로 희석된 상등액으로 감염시키고 5% CO₂ 분위기 하에 37 °C에서 3 일간 배양하였다. 마지막으로, 각각의 희석에 대해서, 양성 효과를 나타내는 웰들을 카운트하고 리드 앤드 뮤엔치 식(the Reed and Muench formula)에 따라 음성 세포병변 효과를 나타내는 것들과 비교하였다. CPE-50% 역가를 단위/ml로 계산하였다.

[0061] 면역학적 매개변수로서, 염증성 사이토카인의 수준을 ELISA 방법을 사용하여 평가하였다. 96-웰 플레이트를 상기 실험을 위해 사용하였다. 상기 플레이트를 상기 연구하려는 사이토카인에 대한 단클론 항체로 코팅하고,

4 °C에서 밤새 배양하였다. 나중에, 카보네이트 완충액 중의 1% BSA 200 μ l/웰을 37 °C에서 30 분 동안 가하였다. 이어서 0.25% TBS + 트윈 20으로 세척을 수행하고 샘플들을 37 °C에서 4 시간 동안 가하였다. 기준 곡선으로서 재조합 사이토카인들을 스칼라 희석비로 사용하였다. 이어서 세척을 수행하고 첫 번째 것과 다른 항-사이토카인 다클론 항체를 가하고 +4 °C에서 밤새 방치시켰다. 이후에, 0.5% TBS + 트윈 20을 갖는 세척물에 2 nM MgCl₂를 가하고 세 번째 항체를 37 °C에서 4 시간 동안 알칼리성 포스파타제 효소에 결합시켰다. 마지막으로, 상기 효소에 대한 기질(100 μ l/웰)을 가하고 ELISA 판독기 및 405 nm 필터를 사용하여 판독을 수행하였다. 하기의 항체들을 분석하였다: 1) 단클론 래트 항-마우스 TNF-알파/재조합 마우스 IL-6; 2) 재조합 마우스 TNF-알파/재조합 마우스 IL-6; 3) 다클론 토끼 항-마우스 TNF-알파/다클론 염소 항-마우스 IL-6; 4) 염소 항-토끼 IgG-알칼리성 포스파타제/항-염소 IgG 알칼리성 포스파타제.

[0063] 레스베라트롤의 효능을 마우스에서 실험용 인플루엔자 바이러스 감염 모델에서 연구하였다. 상기 모델에서, 상기 바이러스의 비 내 접종은 심각한 출혈성 폐렴을 발생시켜 감염 7 내지 10 일 이내에 상기 동물을 사망에 이르게 한다. 감염된 동물의 생존율을 근거로 평가되는 바와 같이, 상기 실험 디자인은 상기 연구 물질의 치료 효능에 대한 평가를 고려한다. 이를 위해서, 레스베라트롤을 감염 후 수 시간으로부터 출발하여, 7 일간 매일 다양한 용량으로 상기 동물에게 투여하였다. 수득된 결과는 처리되지 않은 동물의 사망률이 80% 정도로 높은 반면, 레스베라트롤(1 mg/kg)의 투여는 상기 사망률을 현저히 감소시키고 상기 감염된 동물의 60%가 생존하였음을 나타낸다(도 9).

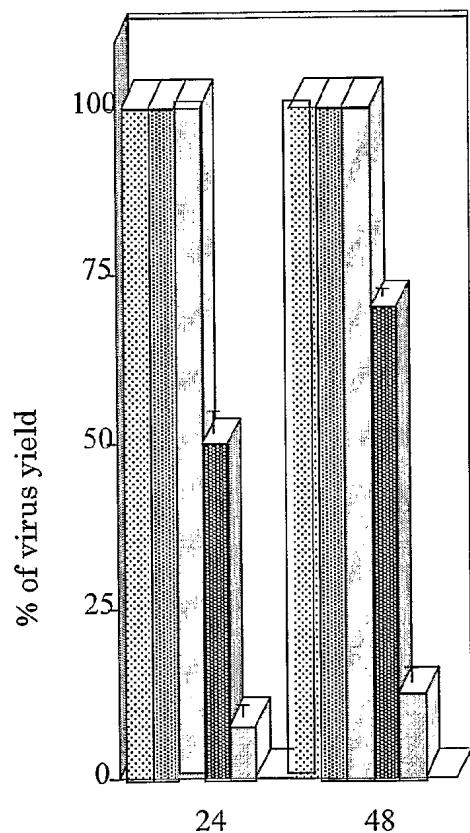
도면의 간단한 설명

- [0017] 이제 본 발명을 실시예 및 도면의 도움으로 상세히 예시할 것이며, 도면에서,
- [0018] 도 1은 MDCK 세포에서 인플루엔자 바이러스 PR8의 복제에 대한 레스베라트롤의 효과를 예시하며, 보다 정확하게, 도 1A는 감염 후 투여의 경우이고, 도 1B는 감염 전 투여의 경우이며, 도 1C는 감염 전- 및 후 투여의 경우이다.
- [0019] 도 2는 감염되지 않은 MDCK 세포의 융합 단층에 대한 레스베라트롤의 효과, 및 보다 정확하게 생육 가능한 세포의 수를 예시한다.
- [0020] 도 3은 레스베라트롤의 항바이러스 활성의 특징을 예시하며, 보다 정확하게 도 3A는 바이러스 흡착 중의 치료를 예시하고, 도 3B는 바이러스 입자에 대한 효과를 예시한다.
- [0021] 도 4는 레스베라트롤의 항바이러스 활성의 특징을 예시하며, 보다 정확하게 도 4A는 감염 직후의 투여 및 상이한 시점에서의 제거의 경우이고, 도 4B는 감염에 관한 상이한 시간에서의 첨가의 경우이다.
- [0022] 도 5는 레스베라트롤로 처리된 MDCK 세포의 세포사멸을 예시한다(다이아몬드: 감염 안됨, 사각형: 감염됨).
- [0023] 도 6은 레스베라트롤의 항바이러스 효과와 세포 내 산화환원 상태간의 상관성을 예시한다.
- [0024] 도 7은 인플루엔자 바이러스 PR8의 바이러스 단백질의 합성에 대한 레스베라트롤의 효과를 예시한다.
- [0025] 도 8은 말기 바이러스 단백질의 mRNA에 대한 PCR의 결과를 예시한다.
- [0026] 도 9는 인플루엔자 바이러스 PR8에 감염 후 생체 내 레스베라트롤의 효과를 예시한다.

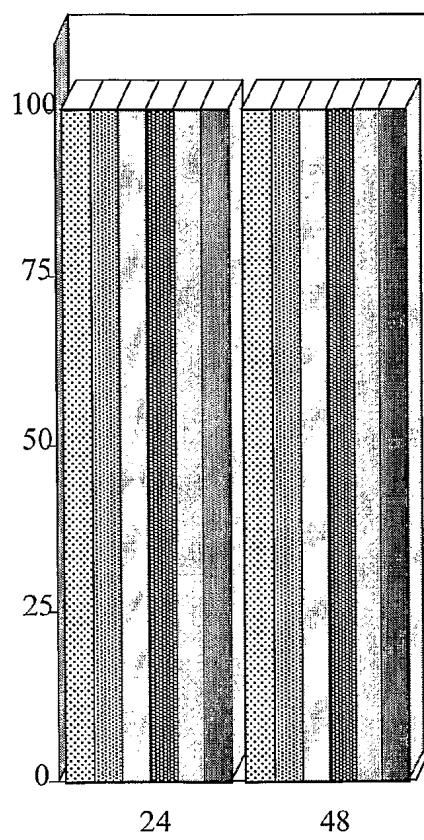
도면

도면1

A) Post-infection



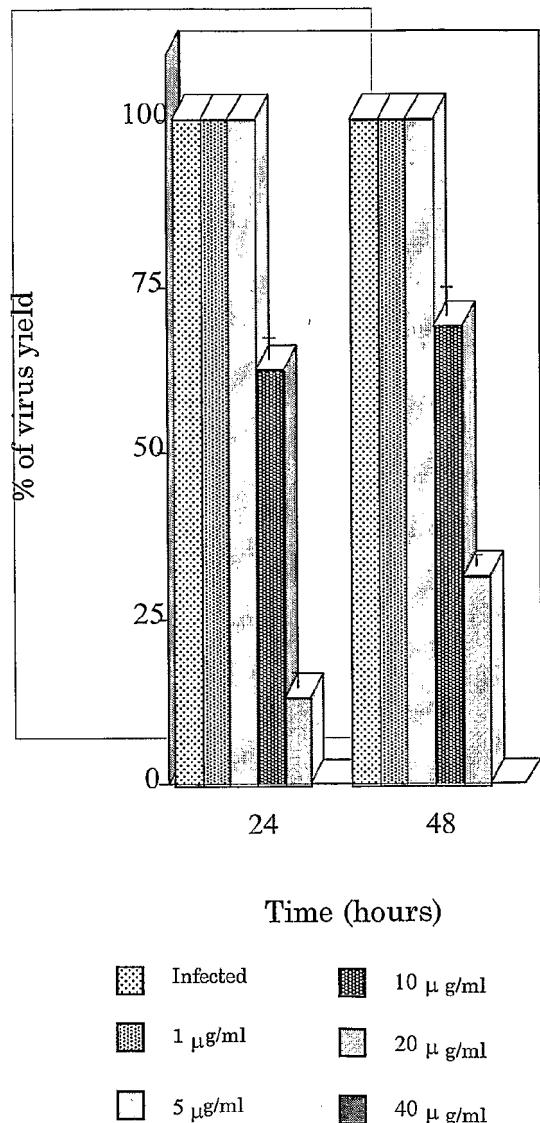
B) Pre-infection



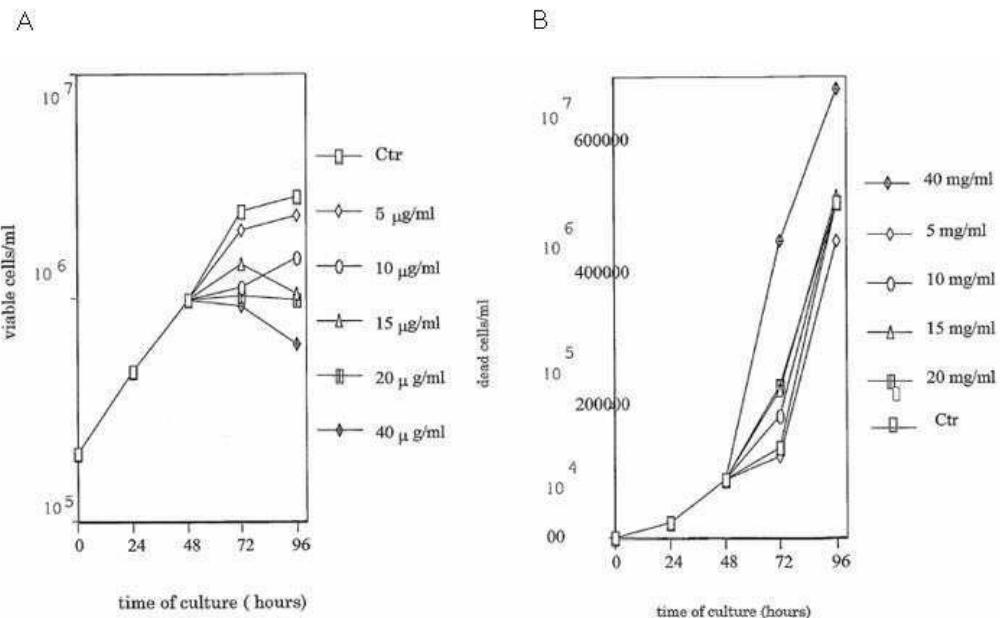
■ Infected
 ■ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 ■ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 ■ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 □ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 ▨ 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

도면1C

C) Pre-post infection

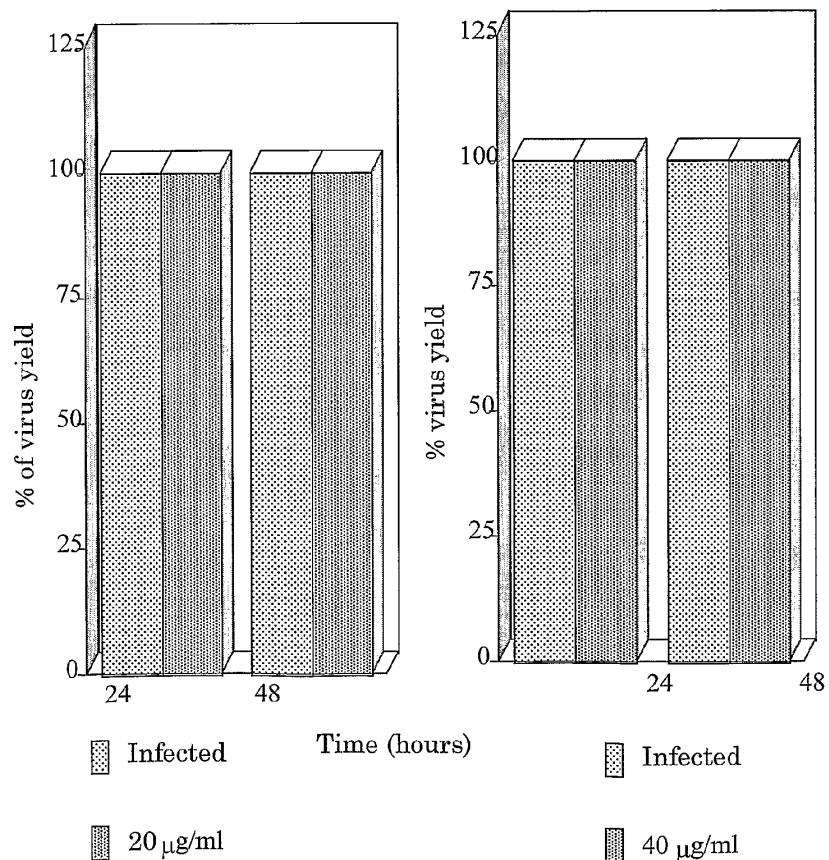


도면2

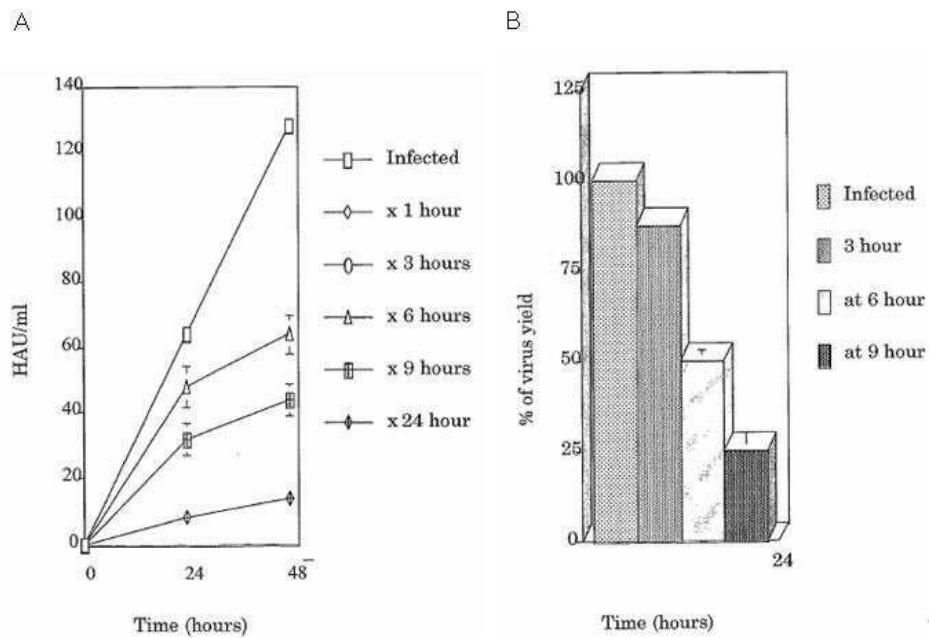


도면3

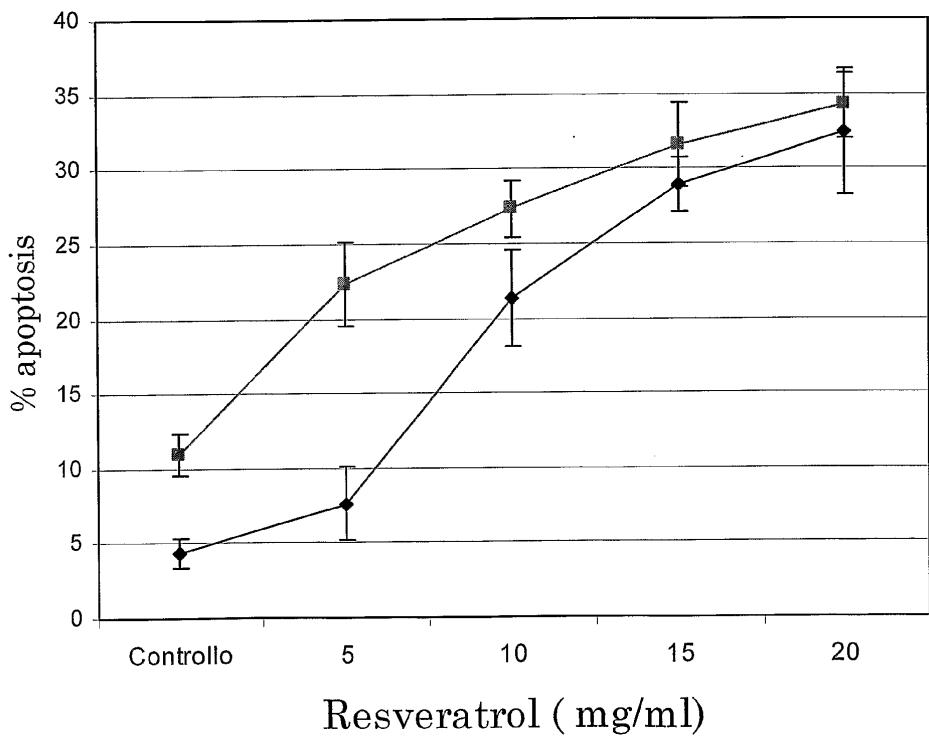
A) Treatment during virus absorption B) Effect on virus particle



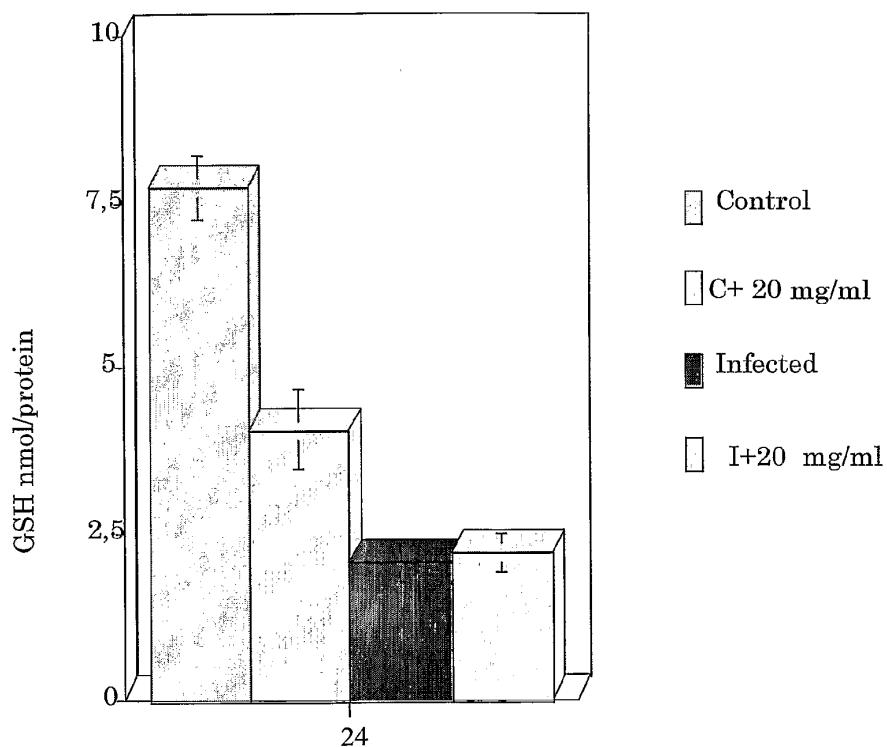
도면4



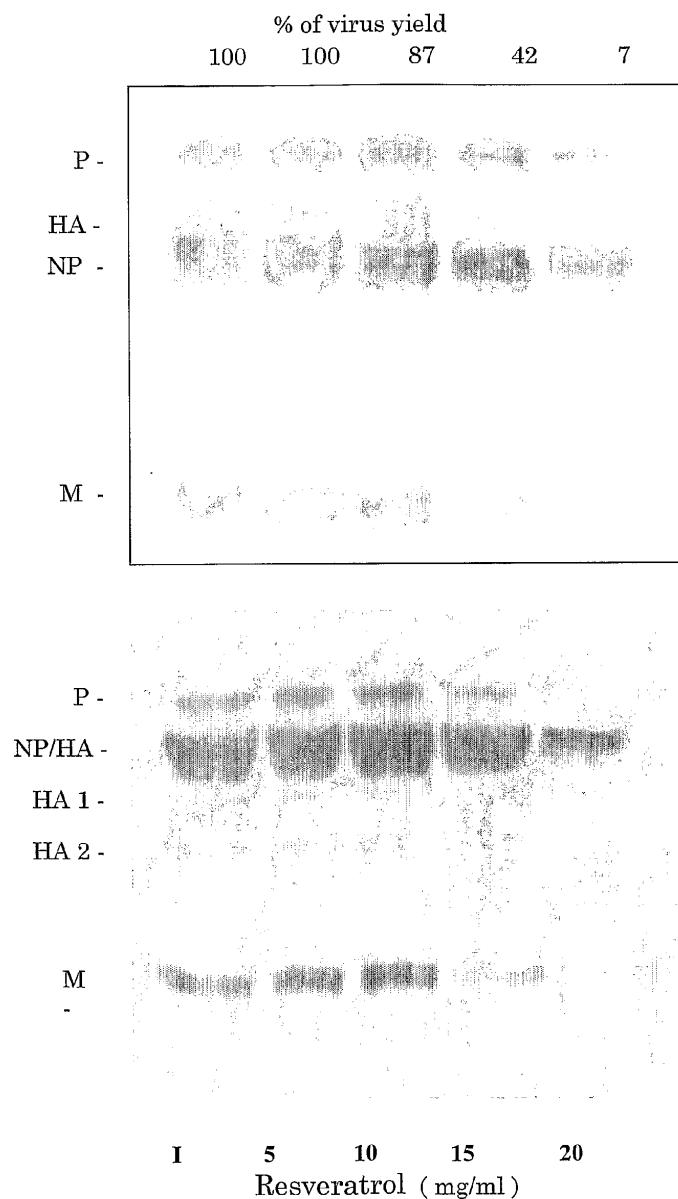
도면5



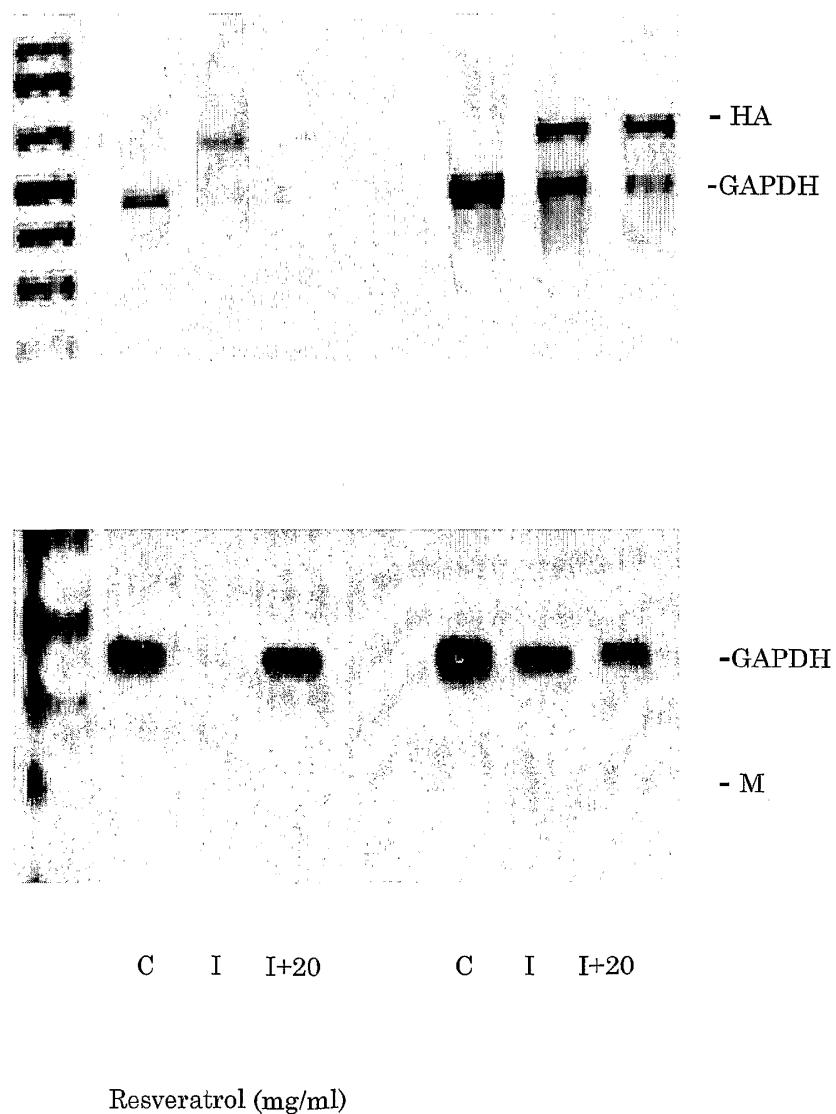
도면6



도면7



도면8



도면9

