



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0155842
(43) 공개일자 2022년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/01 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)

A61P 31/12 (2006.01) *A61P 31/14* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/01 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0063630

(22) 출원일자 2021년05월17일

심사청구일자 2021년05월17일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이종수

대전광역시 서구 둔산로 155, 109동 1203호(둔산동, 크로바아파트)

(74) 대리인

최규환

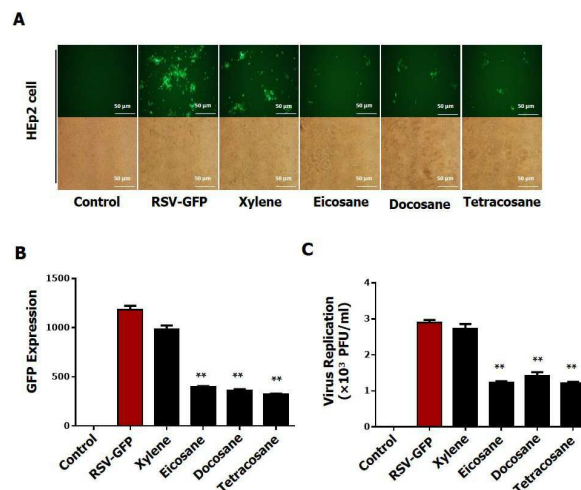
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 알케인을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물

(57) 요약

본 발명은 화학식 1로 표시되는 알케인 화합물 또는 이의 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 세포에서 호흡기세포융합바이러스(Respiratory syncytial virus, RSV)의 증식을 저해하므로, 항바이러스용 약학, 건강기능식품 또는 의약품 조성물로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 31/14 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112941
과제번호	2019R1A2C2008283
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	바이러스 감염에 대응하는 숙주 방어면역 조절인자들의 기작연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128339
과제번호	2018M3A9H4078699
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	신규 구제역 백신보조제 개발과 전임상 적용
기 여 율	1/2
과제수행기관명	(주)중앙백신연구소
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

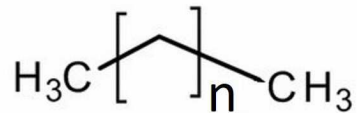
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학 조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, n은 18 내지 22의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이러스는 파라믹소비리데(Paramyxoviridae)인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 파라믹소비리데(Paramyxoviridae) 바이러스는 호흡기세포융합바이러스(Respiratory syncytial virus)인 것을 특징으로 하는 항바이러스용 약학 조성물.

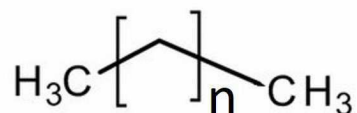
청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 에어로졸, 외용제, 좌제 및 주사제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 약학 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, n은 18 내지 22의 정수이다.

청구항 6

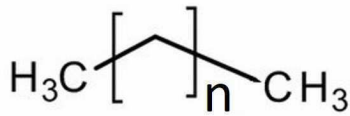
제5항에 있어서, 상기 건강기능 식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 캔디, 츄잉껌, 젤리 및 음료로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함

유하는 항바이러스용 의약외품 조성물.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, n은 18 내지 22의 정수이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알케인을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알케인(alkane)은 고리가 없는 사슬형 탄화수소로, 일반식 $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$ 로 나타낼 수 있는 화합물을 총칭하며 오직 탄소와 수소의 단일 결합으로만 이루어져 있다. 포함된 탄소의 수에 따라 메테인(methane; 탄소수=1), 에테인(ethane; 탄소수=2), 프로페인(propane; 탄소수=3), 뷰테인(butane; 탄소수=4), 펜테인(pentane; 탄소수=5), 헥세인(hexane; 탄소수=6), 헵테인(heptane; 탄소수=7), 옥테인(octane; 탄소수=8) 등 여러 가지가 있다. 알케인의 분자량이 커지면 그에 비례해서 분자를 감싸고 있는 전자가 많아지고 분자 표면적도 커지게 되어 반데르발스 힘(van der Waals)이 세진다. 따라서, 알케인의 분자량이 커질수록 끓는점이 높아진다. 탄소 수가 1~4개인 알케인은 상온(25℃)에서 기체 상태로 존재하고, 탄소 수가 5~17개인 알케인은 액체 상태로 존재하며, 탄소 수가 18개 이상인 알케인은 고체 상태로 존재한다.

[0003] 한편, 호흡기세포융합바이러스(respiratory syncytial virus, RSV)는 파라믹소비리데(Paramyxoviridae) 과의 폐렴바이러스(Pneumovirus) 속에 속하는 바이러스로, 바이러스 표면의 F 단백질이 근처 세포와 막 융합을 유도한다고 하여 이름이 붙여졌다. RSV는 하부 호흡기 감염의 주된 원인이며 영아기나 유아기에 많이 발생한다고 알려져 있다. 또한, RSV의 G 단백질이 GAGs라고 불리는 이당체로 구성된 세포 외 기질과 결합함으로써 세포 내로 진입이 시작되며, F 단백질은 RhoA 단백질과 상호작용하며 바이러스의 부착을 중재한다. 바이러스의 유전자 발현과 복제는 세포질에서 일어나며 바이러스가 세포질에 진입하면 뉴클레오펙시드와 유전체가 방출된다.

[0004] 이러한 RSV 예방법으로, F 단백질을 표적하는 단클론성 항체인 팔리비주맙(Palivizumab, MedImmune)을 미성숙 영아 또는 심장, 폐 질환을 가진 영유아를 위한 백신으로 사용하고 있으나, 높은 가격으로 인해 사용이 매우 제한적이다. 현재까지 RSV의 치료는 보조적 치료에 국한되어져 왔으며, 항바이러스제로 사용되고 있는 아드레날린, 기관지 확장제, 스테로이드, 항생제 및 리바비린(ribavirin)은 RSV 치료에 효과가 없는 것으로 보고되었다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1563219호에는 '카르노스산을 유효성분으로 함유하는 항 호흡기세포융합바이러스 활성을 가지는 조성물'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2017-0090424호에는 '호흡기 세포융합 바이러스(RSV)의 복제에 대하여 저해 활성을 갖는 피페리딘 치환된 피라졸로[1,5-A] 피리미딘 유도체'가 개시되어 있으나, 본 발명의 '알케인을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 조성물'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 HEp2 세포에 GFP가 융합된 RSV를 감염시키고 에이코산(eicosane, $\text{C}_{20}\text{H}_{42}$), 도코산(docosane, $\text{C}_{22}\text{H}_{46}$) 및 테트라코산(tetracosane, $\text{C}_{24}\text{H}_{50}$)을 각각 처리한 후 항바이러스 활성을 분석한 결과, 에이코산, 도코산, 테트라코산이 HEp2 세포에서 RSV 역가를 감소시키고, RSV-G 단백질의 발현을 저해하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학 조성물을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 의약품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 알케인 화합물은 호흡기세포융합바이러스에 대한 항바이러스 활성이 우수하므로, 항바이러스용 약학, 건강기능식품 또는 의약품 조성물 등에 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

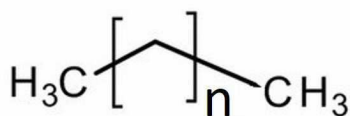
도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 HEp2 세포에 RSV-GFP를 감염시키고 알케인을 처리한 후, GFP 발현을 분석한 결과이다.
- 도 2는 HEp2 세포에 RSV-GFP를 감염시키고 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리한 후, GFP 발현(A, B) 및 RSV 역가(C)를 분석한 결과이다.
- 도 3은 HEp2 세포에 RSV-GFP를 감염시키고 에이코산(A), 도코산(B) 및 테트라코산(C)을 농도별로 처리한 후, EC₅₀(좌측 패널) 및 CC₅₀ 값(우측 패널) 분석을 위한 GFP 발현 및 세포수를 측정된 결과이다.
- 도 4는 HEp2 세포에 RSV-GFP를 감염시키고 에이코산(EIC), 도코산(DOC) 및 테트라코산(TET)을 각각 처리한 후, RSV-G 단백질의 mRNA 발현량을 분석한 결과이다.
- 도 5는 HEp2 세포에 RSV-GFP를 감염시키고 에이코산(A), 도코산(B) 및 테트라코산(C)을 각각 처리한 후, RSV-G 단백질의 발현량을 분석한 결과이다.
- 도 6은 HEp2 세포에 RSV-GFP를 감염시키고 에이코산, 도코산, 테트라코산 및 이들의 혼합물(1:1:1)을 각각 처리한 후, GFP 발현(A) 및 RSV 역가(B)를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 약학 조성물을 제공한다.

화학식 1



- [0013]
- [0014] 상기 화학식 1에서, n은 18 내지 22의 정수이다.
- [0015] 본 발명에 따른 항바이러스용 약학 조성물에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 바람직하게는 n이 18인 에이코산(eicosane), n이 20인 도코산(docosane) 또는 n이 22인 테트라코산(tetracosane)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 명세서에서 용어 "항바이러스(antivirus)"는 바이러스의 성장 또는 생존을 감소, 방지, 억제 또는 제거하는 능력을 의미한다.

- [0017] 본 발명에서 "약학적으로 허용가능한 염"은 본 발명 화합물의 생물학적 특성을 유지하면서 독성을 나타내지 않거나 제약 용도로 부적절하지 않은 임의의 본 발명 화합물의 염을 나타낸다. 이러한 염은 당업계에 공지된 다양한 유기 및 무기 반대이온으로부터 유래할 수 있으며, 이들을 포함한다. 이러한 염으로는 유기 또는 무기산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 술팜산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 트리클로로아세트산, 프로피온산, 헥산산, 시클로 펜틸프로피온산, 글리콜산, 글루타르산, 피루브산, 락트산, 말론산, 숙신산, 소르브산, 아스코르브산, 말산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 3-(4-히드록시벤조일)벤조산, 크르산, 신남산, 만델산, 프탈산, 라우르산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 1,2-에탄-디술폰산, 2-히드록시에탄술폰산, 벤젠 술폰산, 4-클로로벤젠술폰산, 2-나프탈렌술폰산, 4-톨루엔술폰산, 캄포르산, 캄포르술폰산, 4-메틸비시클로 [2.2.2]-옥트-2-엔-1-카르복실산, 글루코헵톤산, 3-페닐프로피온산, 트리메틸아세트산, 테르트-부틸아세트산, 라우릴 황산, 글루콘산, 벤조산, 글루탐산, 히드록시나프토산, 살리실산, 스테아르산, 시클로헥실술팜산, 퀴산 또는 류콘산 등과 형성된 산 부가염; 또는 모 화합물에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온(예를 들면, 알칼리 금속 이온, 알칼리 토금속 이온 또는 알루미늄 이온), 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속수산화물(예컨대, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 알루미늄, 리튬, 아연 및 바륨 수산화물), 암모니아로 치환되거나, 또는 유기 염기, 예컨대 지방족, 지환족 또는 방향족 유기 아민, 예를 들면 암모니아, 메틸아민, 디메틸아민, 디에틸아민, 피콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 에틸렌디아민, 리신, 아르기닌, 오르니틴, 콜린, N,N'-디벤질에틸렌-디아민, 클로로프로카인, 디에탄올아민, 프로카인, N-벤질페네틸아민, N-메틸글루카민 피페라진, 트리스(히드록시메틸)-아미노메탄 또는 테트라메틸암모늄 히드록시드와 배위 결합한 경우에 형성된 염 등을 포함할 수 있다.
- [0018] 또한, 염의 예로는 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 암모늄 또는 테트라알킬암모늄 염 등이 있으며, 화합물이 염기성 관능기를 함유하는 경우에는 비독성유기산 또는 무기산과의 염, 예컨대 히드로할라이드(예를 들면, 히드로클로라이드 또는 히드로브로마이드), 술페이트, 포스페이트, 술포메이트, 니트레이트, 아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 트리클로로아세테이트, 프로피오네이트, 헥사노에이트, 시클로펜틸프로피오네이트, 글리콜레이트, 글루타레이트, 루베이트, 락테이트, 말로네이트, 숙시네이트, 소르베이트, 아스코르베이트, 말레이트, 말레에이트, 푸마레이트, 타르타레이트, 시트레이트, 벤조에이트, 3-(4-히드록시벤조일)푸마레이트, 타르타레이트, 시트레이트, 벤조에이트, 3-(4-히드록시벤조일)벤조에이트, 피크레이트, 신나메이트, 만델레이트, 프탈레이트, 라우레이트, 메탄술포네이트 메실레이트, 에탄술포네이트, 1,2-에탄-디술포네이트, 2-히드록시에탄술포네이트, 벤젠술포네이트(메실레이트), 4-클로로벤젠술포네이트, 2-나프탈렌술포네이트, 4-톨루엔술포네이트, 캄포르이트, 캄포르술포네이트, 4-메틸비시클로[2.2.2]-옥트-2-엔-1-카르복실레이트, 글루코헵토네이트, 3-페닐프로피오네이트, 트리메틸아세테이트, 테르트-부틸아세테이트, 라우릴 술페이트, 글루코네이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 히드록시나프토에이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 시클로헥실술포메이트, 퀴네이트 또는 류코네이트 염 등을 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 따른 항바이러스용 약학 조성물에 있어서, 상기 바이러스는 바람직하게는 파라믹소비리데(Paramyxoviridae)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 호흡기세포융합바이러스(Respiratory syncytial virus)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명에 따른 항바이러스용 약학 조성물은 호흡기세포융합바이러스에 대한 항바이러스 활성을 가지는 화합물을 유효성분으로 함유하므로, 바이러스 감염에 대한 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 항바이러스용 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 예를 들어 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 윤활제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제의 대표적인 예로는, 락토즈, 텍스트로스, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 글리세린, 아카시아 고무, 알지네이트, 칼슘포스페이트, 칼슘카보네이트, 칼슘실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일, 주사가능한 에스테르, 위캡슐, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우리지 등을 들 수 있다. 본 발명의 항바이러스용 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 에어로졸, 외용제, 좌제 및 주사제로 이루어진 군으로부터 선택되는 형태일 수 있다. 약학 조성물의 제제화 방법은 기술분야에 공지된 통상의 방법에 따라 수행될 수 있으며, 특별히 제한되지 않는다.
- [0022] 또한, 본 발명의 항바이러스용 약학 조성물의 투여량, 투여 경로, 구성성분 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있음이 통상의 기술자에게 명백하다.

- [0023] 본 발명의 항바이러스용 약학 조성물은 유효성분으로 화학식 1로 표시되는 화합물 외에 다른 약학적 활성 성분을 함께 포함하거나, 또는 다른 항바이러스 활성 성분을 포함하는 약학 조성물과 혼합되어 이용될 수 있다.
- [0024] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 항바이러스용 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 화합물 및 바이러스는 전술한 바와 같다.
- [0026] 본 발명에 따른 항바이러스용 건강기능식품 조성물은 호흡기세포융합바이러스에 대한 항바이러스 활성을 가지는 화합물을 유효성분으로 함유하므로, 호흡기세포융합바이러스 감염에 대한 예방 또는 개선용으로 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 항바이러스용 건강기능식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 이용될 수 있는 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제는 포도당, 과당, 말토오스, 슈크로스, 텍스트린, 시클로텍스트린과 같은 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올과 같은 천연 탄수화물, 타우마틴, 스테비아 추출물 등의 천연 향미제, 사카린, 아스파르탐산 등의 합성 향미제, 착색제, 펙트산 또는 그의 염, 알긴산 또는 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 항바이러스용 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 캔디, 츄잉검, 젤리 및 음료로 이루어진 군으로부터 선택되는 형태일 수 있다. 항바이러스용 건강기능식품 중의 화학식 1로 표시되는 화합물의 함량은 식품의 형태, 풍미, 맛 등을 고려하여 적절하게 선택될 수 있으며, 예를 들어 건강기능식품 전체 중량에 대하여 0.01~30 중량%의 범위일 수 있다. 본 발명의 항바이러스용 건강기능식품의 형태, 조성 및 제조방법 등은 기술분야에 공지된 통상의 기술로부터 적절히 선택될 수 있음이 통상의 기술자에게 명백하다.
- [0028] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항바이러스용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 항바이러스용 의약품 조성물에 있어서, 상기 화합물 및 바이러스는 전술한 바와 같다.
- [0030] 본 발명에서, "의약품 조성물"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 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 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미하며, 구체적으로 피부 외용제 또는 개인위생용품일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 의약품 조성물은 항바이러스 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.00001 내지 10 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 조성물을 의약품 첨가물로 사용할 경우, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 의약품 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제, 패치, 또는 필터 충전제일 수 있다.
- [0034] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] **재료 및 방법**
- [0037] **1. 세포 배양 및 바이러스 증식**
- [0038] HEp2 세포(Human Epithelial type 2, ATCC CCL-23)를 10% FBS 및 1% 항생제가 포함된 DMEM(Doubecco's modified eagle medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. GFP(green fluorescence protein)가 융합된 호흡기세포융합바이러스(respiratory syncytial virus, RSV)인 RSV-GFP를 HEp2 세포에서 증식시켜 사용하

였다.

2. 화합물 처리

에이코산(eicosane), 도코산(docosane), 테트라코산(tetracosane), 도트리아콘테인(dotriacontane), 트리테트라콘테인(tritetracontane) 및 헵타코세인(heptacosane)은 Sigma(USA)의 제품을 구입하여 사용하였으며, RSV-GFP가 감염된 HEp2 세포에 농도별로 처리한 후, 항바이러스 활성에 대한 실험을 수행하였다.

3. 통계분석

모든 실험은 독립된 3반복으로 수행하였고, 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계분석은 GraphPad Prism software version 6(GraphPad Software, USA)를 이용하여 수행하였다. 모든 결과에서 *은 $p<0.05$, **은 $p<0.01$, ***은 $p<0.001$ 을 의미한다.

실시예 1. 알케인 화합물의 항바이러스 활성에 대한 스크리닝

HEp2 세포에 MOI(multiplicity of infection) 0.1로 RSV-GFP를 감염시킨 후, 1% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 37℃로 배양하였다. 2시간 후, PBS로 세척하고 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교체한 후, 에이코산, 도코산, 테트라코산, 도트리아콘테인, 트리테트라콘테인 및 헵타코세인을 각각 100 mM씩 처리하였다. 48시간 후, Glomax multi-detection system(Promega, USA)을 이용한 형광 측정을 통해 GFP 발현을 분석하였다.

그 결과, 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리한 실험구의 GFP 발현이 RSV-GFP 단독 처리구 대비 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 반면, 도트리아콘테인, 트리테트라콘테인 및 헵타코세인을 각각 처리한 실험구는 RSV-GFP 단독 처리구와 유의적 차이가 없는 것을 확인하였다(도 1). 따라서, 알케인 화합물 중 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 선택하여 이후 항바이러스 실험을 진행하였다.

실시예 2. RSV 역가 분석

HEp2 세포에 MOI 0.1로 RSV-GFP를 감염시키고 2시간 후, 100 mM의 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리하였다. 48시간 후, 형광현미경을 이용하여 세포 사진을 촬영하였고, Glomax multi-detection system(Promega, USA)을 이용한 형광측정을 통해, GFP 발현을 분석하였으며, Nguyen 등(2010, PLoS Pathog. 6, e1001049)에 기술된 방법에 따른 plaque assay를 통해 RSV-GFP 역가를 측정하였다.

그 결과, 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리한 실험구의 GFP 발현 및 RSV 역가가 RSV-GFP 단독 처리구 대비 현저하게 감소한 것을 확인하였다(도 2).

실시예 3. RSV에 대한 EC_{50} 및 CC_{50} 값 측정

HEp2 세포에 MOI 0.1로 RSV-GFP를 감염시키고 2시간 후, 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리하였다. 48시간 후, EC_{50} (effective concentration) 값 및 CC_{50} (cytotoxic concentration) 값을 측정하였다. EC_{50} 값은 GFP 발현이 50%가 되는 화합물의 농도로 계산하였고, CC_{50} 값은 Cell counting kit-8(Dojindo Molecular Technologies, USA)를 이용하여 세포수가 50%가 되는 화합물의 농도로 계산하였다. 또한, CC_{50}/EC_{50} 값을 계산하여 SI(selectivity index)로 나타내었다.

그 결과, HEp2 세포에서 에이코산, 도코산 및 테트라코산의 RSV에 대한 EC_{50} 값은 각각 86.41 ± 2.36 , 71.25 ± 4.23 및 74.95 ± 1.25 mM이었고, CC_{50} 값은 각각 314.24 ± 8.25 , 389.25 ± 7.14 및 250.04 ± 1.27 mM이었으며, SI 값은 각각 3.65, 5.44 및 3.33인 것을 확인하였다(도 3).

[0058] 실시예 4. RSV-G 단백질 발현양 측정

[0059] HEp2 세포에 MOI 0.1로 RSV-GFP를 감염시키고 2시간 후, 100 mM의 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리하였다. 6, 12, 24 및 36시간 후의 세포에서 총 RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 Quantitative RT-PCR(qRT-PCR)을 수행하였다.

표 1

[0060] qRT-PCR 분석에 이용한 프라이머

증폭 유전자	프라이머 서열(5'-3')	서열번호
RSV-G	F: CCAAACAACCCAATAATGATTT	서열번호 1
	R: GCCCAGCAGGTTGGATTGT	서열번호 2
GAPDH	F: TGACCACAGTCCATGCCATC	서열번호 3
	R: GACGGACACATTGGGGGTAG	서열번호 4

[0061] 그 결과, 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리하고 24시간 및 36시간 후, RSV-G 단백질의 mRNA 발현양이 RSV-GFP 단독 처리구 대비 현저하게 감소한 것을 확인하였다(도 4).

[0062] 또한, HEp2 세포를 배양하고 MOI 0.1로 RSV-GFP를 감염시키고 2시간 후, 100 mM의 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리하였다. 0, 24, 36 및 48시간 후의 세포에서 단백질을 추출하고 anti-RSV-G 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였고, ImageQuant LT 7.0(GE-Life Science, USA) 소프트웨어를 이용하여 밴드의 세기를 분석하였다.

[0063] 그 결과, 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리한 실험구의 RSV-G 단백질의 발현양이 RSV-GFP 단독 처리구 대비 현저하게 감소한 것을 확인하였다(도 5).

[0064] 상기 결과를 통해, 에이코산, 도코산 및 테트라코산은 HEp2 세포에서 RSV의 증식을 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0066] 실시예 5. 시너지 효과 분석

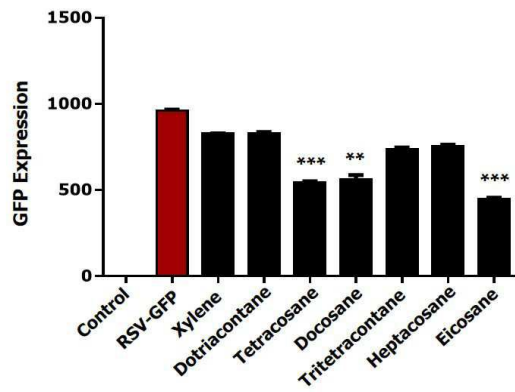
[0067] 에이코산, 도코산 및 테트라코산의 항바이러스 활성에 대한 시너지 효과를 분석하기 위하여, HEp2 세포에 MOI 0.1로 RSV-GFP를 감염시키고 2시간 후, 에이코산, 도코산 및 테트라코산 각각 또는 이들의 혼합물(1:1:1)을 처리하고 48시간 후, GFP 발현 및 RSV-GFP 역가를 측정하였다.

[0068] 그 결과, 에이코산, 도코산 및 테트라코산을 각각 처리했을 때와 상기 화합물의 1:1:1 혼합물을 처리했을 때의 GFP 발현 및 RSV-GFP 역가는 유의적 차이가 없는 것을 확인하였다(도 6).

[0069] 상기 결과를 바탕으로, 모든 알케인류 화합물이 항바이러스 활성을 가지는 것은 아니며, 알케인류 화합물 중 에이코산, 도코산 또는 테트라코산의 항바이러스 활성이 현저히 우수한 것을 알 수 있었다.

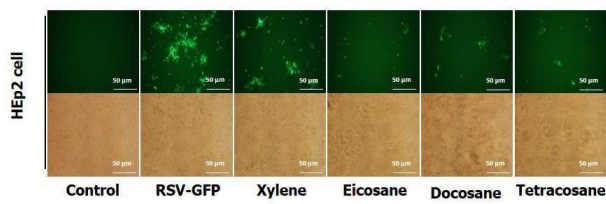
도면

도면1

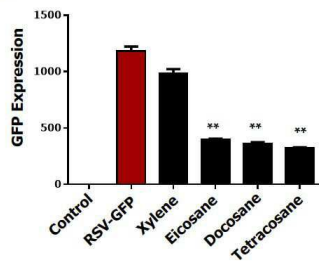


도면2

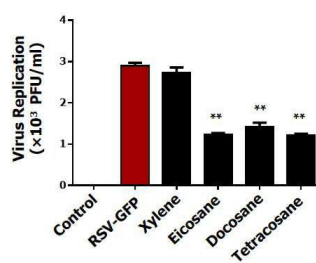
A



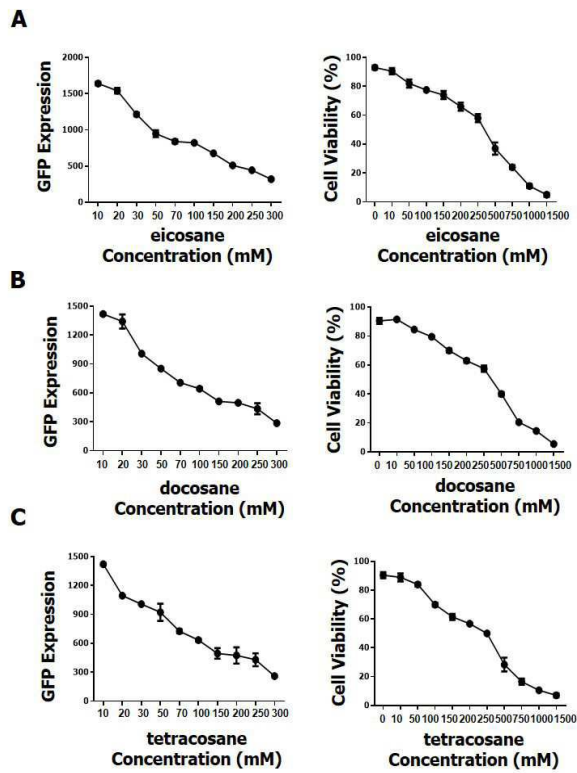
B



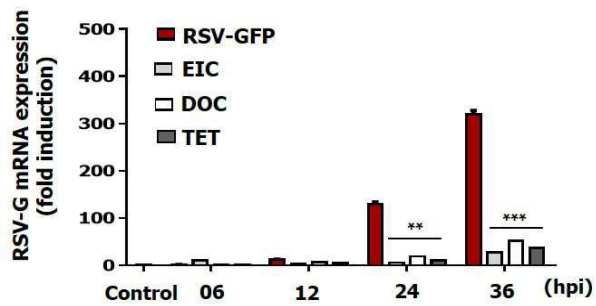
C



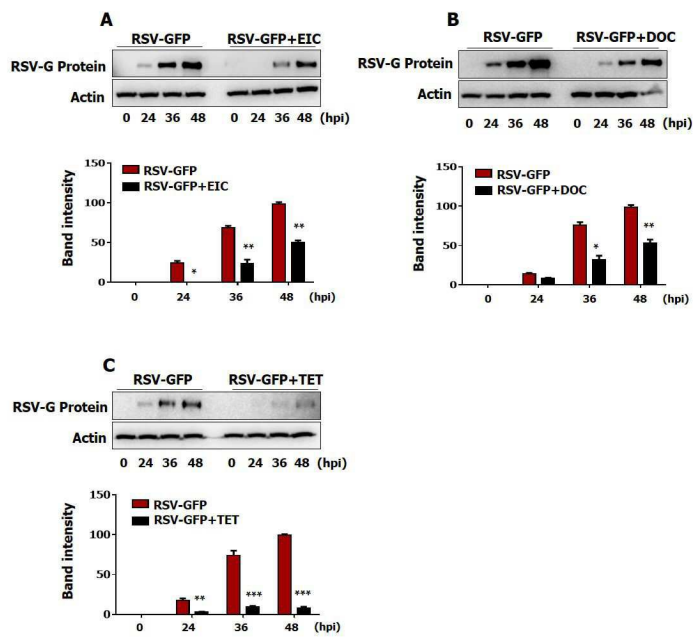
도면3



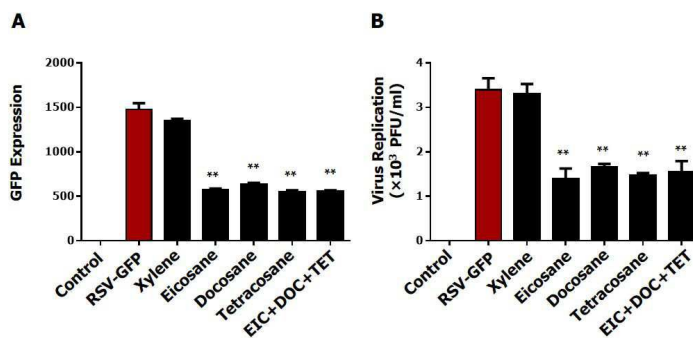
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Antiviral composition comprising alkane as effective component
- <130> PN21075
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1

ccaaacaaac ccaataatga ttt	23
<210> 2	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 2	
gcccagcagg ttggattgt	19
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
tgaccacagt ccatgccatc	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
gacggacaca ttgggggtag	20