



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0045259

(43) 공개일자 2015년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/08 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01) A61K 31/192 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0124743

(22) 출원일자 2013년10월18일

심사청구일자 2013년10월18일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

인경수

경기 고양시 덕양구 소원로181번길 20, 702동 201호 (행신동, 서정마을7단지)

장대식

서울 성북구 월계로36길 27, 102동 201호 (장위동, 꿈의숲대명루첸아파트)

신한보

서울 영등포구 양평로18길 23, (양평동4가)

(74) 대리인

이원희

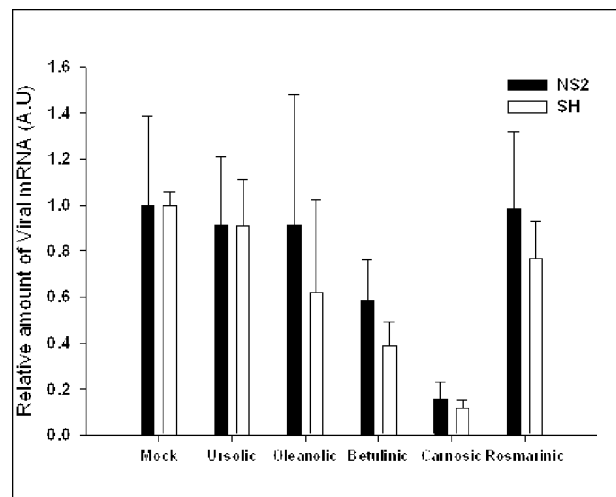
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 카르노스산을 유효성분으로 함유하는 항 호흡기융합바이러스 활성을 가지는 조성물

(57) 요약

본 발명은 카르노스산(Carnosic acid)을 유효성분으로 함유하는 항 호흡기융합바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV) 활성을 가지는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 로즈마리 추출물로부터 분리한 카르노스산이 호흡기융합바이러스 A 및 B 타입 둘 다에 대하여 항바이러스 효과를 보이고, 기존에 치료제로 사용 중인 리바비린과 비교하여 카르노스산이 효과적이었으며, 타입-I 인터페론 생산 없이 바이러스 유전자 발현을 유의적으로 억제하고 호흡기융합바이러스 감염 및 복제를 억제하여 세포 생존에 영향을 끼침을 확인함으로써, 본 발명의 조성물이 호흡기융합바이러스로 인한 호흡기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

대표도 - 도4



명세서

청구범위

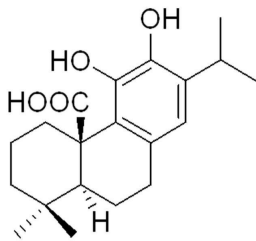
청구항 1

카르노스산(Carnosic acid)을 유효성분으로 함유하는 항 호흡기융합바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV)용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 카르노스산은 하기 [화학식 1]로 표기되는 것을 특징으로 하는 항 호흡기융합바이러스용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 카르노스산은 로즈마리(*Rosmarinus officinalis*) 추출물로부터 수득한 것을 특징으로 하는 항 호흡기융합바이러스용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 카르노스산은 로즈마리 에틸아세테이트 분획물로부터 수득한 것을 특징으로 하는 항 호흡기융합바이러스용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 호흡기융합바이러스는 호흡기융합바이러스 A 타입 또는 호흡기융합바이러스 B 타입인 것을 특징으로 하는 항 호흡기융합바이러스용 약학적 조성물.

청구항 6

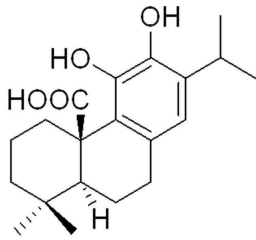
카르노스산을 유효성분으로 함유하는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 카르노스산은 하기 [화학식 1]로 표기되는 것을 특징으로 하는 호흡기융합바이러스 감염

으로 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 호흡기 질환은 감기 증후군, 급성기관지염, 급성세기관지염, 비인두염, 급성후두기관지염 및 폐렴으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

카르노스산을 유효성분으로 함유하는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 건강 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 카르노스산(Carnosic acid)을 유효성분으로 함유하는 항 호흡기융합바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV) 활성을 가지는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인간 호흡기융합바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV)는 파라믹소바이러스(Paramyxovirus) 과에 속하는 단일가닥(single-stranded) RNA 바이러스로서, 영유아 및 노인 등에게 심각한 하기도 감염과 같은 호흡기 감염성 질환을 유발하여, 특히 만성 심장병을 앓고 있는 영유아 또는 면역저하 환자의 경우에는 호흡기융합바이러스 감염은 가혹하게도 사망을 초래하기도 한다. 전 세계적으로 2005년에는 5세 이하 영유아의 사망 중 66,000-199,000 건은 급성 호흡기융합바이러스 감염에 의한 것으로 보고되었다(Nair et al., 2010). 하지만, 현재까지 현재 사용가능한 항 호흡기융합바이러스 치료제가 개발되어 있지 않고, 뉴클레오시드 유사체(nucleoside analog)인 리바비린(Ribavirin)이 치료제로 유일하게 허가되어 있으나 그 효능이 높지 않고 독성 또는 부작용 등의 부정적인 이유로 사용이 권장되지 않고 있다(American Academy of Pediatrics Subcommittee on D, Management of B, 2006). 또한, 리바비린은 호흡기융합바이러스에 의한 세기관지염(bronchiolitis) 환자에게는 임상적인 치료 효율이 급격히 저하됨이 보고되었다(Guerguerian et al., 1999; Hall et al., 1983; Law et al., 1997; Moler et al., 1996). 한편, 호흡기융합바이러스 중화용 항체(palivizumab, MedImmune)를 이용한 면역학적예방(immunoprophylaxis)는 심각한 호흡기융합바이러스 질환에 대한 실질적인 예방책으로 사용되고 있으나, 아직까지 공식적으로 허가된 백신이 없는 실정이다. 따라서, 효율적이고 안전한 백신 및 치료제 개발이 시급하다.

[0003]

현재까지 호흡기융합바이러스 억제 효과가 있는 천연 화합물로 아멘토플라본(amentoflavone)(Ma et al., 2001); 아나기린(anagyrene), 옥시마트린(oxymatrine), 소포라놀(sophoranol), 우고닌(wogonin) 및 옥실린(oroxylin) A(Ma et al., 2002); 3-알파-하이드록시-롭-20(2 9)-엔-23,28-디오익 산(3- α -hydroxy-lup-20(2 9)-ene-23,28-dioic acid) 및 3-에피-부톨리닉 산 3-O-설페이트(3- β -betulinic acid 3-O-sulfate)(Li et al.,

2007); 및 시미시푸긴(cimicifugin)(Wang et al., 2012)이 지금까지 알려져 있다.

[0004] 카르노스산(Carnosic acid, CAS #3650-09-7)은 로즈마리(*Rosmarinus officinalis*) 및 일반 세이지(*Salvia officinalis*)에서 발견되는 벤젠다이올 아비에탄(benzenediol abietane) 디테르펜(diterpene)으로서, 음식에서 강력한 보존력 및 항산화능을 가지고 있다. 또한, 카르노스산은 유방암 세포(Einbond et al., 2012), 난소암 세포(Tai et al., 2012) 및 전립선암 세포(Kar et al., 2012)에서 아폽토시스(apoptosis)를 유발하는 성장억제 활성이 있음이 보고되었다. 뿐만 아니라, 카르노스산이 HIV(human immunodeficiency virus) 프로테아제 활성을 억제함에 대하여 보고된 바가 있으나(Paris et al., 1993), 아직까지 카르노스산의 항 바이러스 활성은 알려진 바가 없다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 호흡기융합바이러스에 대한 천연물 치료제 개발을 위해 노력한 결과, 로즈마리 추출물이 기존에 치료 효과가 확인된 리바비린과 비교하여 유의적인 항바이러스 효과를 나타내고, 상기 로즈마리 추출물로부터 분리한 화합물들 중 카르노스산 화합물이 호흡기융합바이러스 A 및 B 타입 모두에 대하여 가장 유의적인 항 호흡기융합바이러스 활성을 나타내며, 타입-I 인터페론 생산 없이 바이러스 유전자 발현을 유의적으로 억제하고 호흡기융합바이러스 감염 및 복제를 억제하여 세포 생존에 영향을 끼침을 확인함으로써, 본 발명의 조성물이 호흡기융합바이러스로 인한 호흡기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 카르노스산(Carnosic acid)을 유효성분으로 함유하는 항 호흡기융합바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV)용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 카르노스산을 유효성분으로 함유하는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 건강식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 카르노스산(Carnosic acid)을 유효성분으로 함유하는 항 호흡기융합바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV)용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 카르노스산을 유효성분으로 함유하는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 아울러, 본 발명은 카르노스산을 유효성분으로 함유하는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 로즈마리(*Rosmarinus officinalis*) 추출물로부터 분리한 카르노스산(Carnosic acid)은 항 호흡기융합바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV) 활성을 가지는 리바비린과 비교하여 호흡기융합바이러스 A 및 B 타입 모두에 대하여 유의적인 항바이러스 효과를 나타내고, 타입-I 인터페론 생산 없이 바이러스 유전자 발현을 유의적으로 억제하고 호흡기융합바이러스 감염 및 복제를 억제하여 세포 생존에 영향을 끼침을 확인함으로써, 본 발명의 카르노스산을 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012]

도 1은 로즈마리(*Rosmarinus officinalis*), 가중나무(*Ailanthus altissima*), 백미꽃(*Cynanchum atratum*) 추출물의 항 호흡기융합바이러스 활성을 나타낸 도이다:

x축: 추출물의 농도(Conc. of extracts, 단위: $\mu\text{g}/\text{ml}$); 및

Ribavirin: 호흡기융합바이러스 치료제 리바비린.

도 2는 로즈마리(*R. officinalis*), 가중나무(*A. altissima*), 백미꽃(*C. atratum*) 추출물의 바이러스 생존 억제 활성을 확인한 도이다:

y축: 플라크 수(Number of Plaques, 단위: Log_{10})

Vehicle: 비이클(DMSO);

*: $P < 0.05$; 및

** : $P < 0.01$

도 3은 로즈마리 총(total) 에탄올(EtOH) 추출물, 및 이의 에틸아세테이트(EtOAc) 분획물, 헥산(Hexane) 분획물 및 부탄올(BuOH) 분획물의 항 호흡기융합바이러스 효과를 확인한 도이다:

x축: 추출물의 농도(Conc. of extracts, 단위: $\mu\text{g}/\text{ml}$).

도 4는 우르솔릭산(Ursolic), 올레아놀산(Oleanolic), 베틀린산(Betulinic), 카르노스산(Carnosic), 및 로즈마린산(Rosmarinic)의 호흡기융합바이러스 NS2 및 SH 단백질의 발현량을 RT-qPCR로 확인한 도이다:

y축: 바이러스 mRNA 발현의 상대량(Relative amount of Viral mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 5는 카르노스산(carnosic), 카테콜(catechol), 및 카르노솔(carnosol)의 호흡기융합바이러스 F 단백질(F protein)의 발현량을 RT-qPCR로 확인한 도이다:

y축: 바이러스 mRNA 발현의 상대량(Relative amount of Viral mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 6은 호흡기융합바이러스를 감염한 A549 세포에서 우르솔릭산(Ursolic), 올레아놀산(Oleanolic), 베틀린산(Betulinic), 카르노스산(Carnosic), 및 로즈마린산(Rosmarinic)의 인터페론-베타(interferon- β) 발현에 대한 효과를 나타낸 도이다:

y축: 인터페론-베타 mRNA(interferon- β mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 7은 호흡기융합바이러스를 감염한 A549 세포에서 우르솔릭산(Ursolic), 올레아놀산(Oleanolic), 베틀린산(Betulinic), 카르노스산(Carnosic), 및 로즈마린산(Rosmarinic)의 인터페론-람다(interferon- λ) 발현에 대한 효과를 나타낸 도이다:

y축: 인터페론-람다 mRNA(interferon- λ mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 8은 호흡기융합바이러스를 감염하지 않은 A549 세포에서 우르솔릭산(Ursolic), 올레아놀산(Oleanolic), 베틀린산(Betulinic), 카르노스산(Carnosic), 및 로즈마린산(Rosmarinic)의 인터페론-베타(interferon- β) 발현에 대한 효과를 나타낸 도이다:

y축: 인터페론-베타 mRNA(interferon- β mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 9는 MTT 검사를 통해 카르노스산의 세포독성(cytotoxicity) 여부를 확인한 도이다:

x축: 카르노스산의 농도(Conc. of Carnosic acid, 단위: $\mu\text{g}/\text{ml}$).

도 10은 A549 세포에 카르노스산 농도를 달리 처리한 경우 호흡기융합바이러스 F 단백질(F protein), NS2 및 SH 단백질의 발현량을 RT-qPCR로 확인한 도이다:

x축: 카르노스산의 농도(Conc. of Carnosic acid, 단위: $\mu\text{g}/\text{ml}$);

y축: 바이러스 mRNA 발현의 상대량(Relative amount of Viral mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 11은 HEp-2 세포에 카르노스산 농도를 달리 처리한 경우 호흡기융합바이러스 F 단백질(F protein), NS2 및 SH 단백질의 발현량을 RT-qPCR로 확인한 도이다:

x축: 카르노스산의 농도(Conc. of Carnosic acid, 단위: $\mu\text{g}/\text{ml}$);

y축: 바이러스 mRNA 발현의 상대량(Relative amount of Viral mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 12는 세포에 리바비린 농도를 달리 처리한 경우 호흡기융합바이러스 F 단백질(F protein), NS2 및 SH 단백질의 발현량을 RT-qPCR로 확인한 도이다:

x축: 리바비린의 농도(Conc. of Ribavirin, 단위: $\mu\text{g}/\text{ml}$);

y축: 바이러스 mRNA 발현의 상대량(Relative amount of Viral mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 13은 호흡기융합바이러스를 감염시킨 세포에 카르노스산 농도를 달리하여(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리한 다음 2일(2day) 및 4일(4day)째에 용균반 검사(plaque assay)를 실시한 결과, 카르노스산의 바이러스 억제 활성을 확인한 도이다:

y축: 바이러스 역가(Virus titers, 단위: log pfu/ml); 및

Mock: 무처리군.

도 14는 호흡기융합바이러스 B/KR(RSV B/KR)를 A549 세포에 감염시킨지 12 시간 또는 24 시간 이후 카르노스산(Carnosic acid)을 처리한 효과를 NS2 단백질 특이적인 프라이머로 RT-qPCR한 결과를 나타낸 도이다:

y축: 바이러스 mRNA 발현의 상대량(Relative amount of Viral mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 15는 호흡기융합바이러스 B/KR(RSV B/KR)를 A549 세포에 감염시킨지 12 시간 또는 24 시간 이후 카르노스산(Carnosic acid)을 처리한 효과를 G 단백질 특이적인 프라이머로 RT-qPCR한 결과를 나타낸 도이다:

y축: 바이러스 mRNA 발현의 상대량(Relative amount of Viral mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 16은 A549 세포에 호흡기융합바이러스를 감염시키기 전후에 시기에 따라 달리 카르노스산(Carnosic acid)을 처리한 경우 F 및 NS2 단백질의 발현 억제효과를 확인한 도이다:

y축: 바이러스 mRNA 발현의 상대량(Relative amount of Viral mRNA, 단위: A.U); 및

Mock: 무처리군.

도 17은 A549 세포에 인간 호흡기융합바이러스(hRSV) A2를 감염시킨 세포에 카르노스산을 한 시간 동안 처리한 후 세척하여 카르노스산을 제거한 다음, 바이러스 감염 후 48 시간 이후에 바이러스의 F 및 NS2 단백질 발현을 확인한 도이다:

Car-: 카르노스산 없이 hRSV를 감염시킨 세포인 처리군;

Car+: 카르노스산을 포함하는 hRSV 접종원(inoculum)을 감염시킨 세포를 PBS로 세척한 처리군;

Car++: hRSV 접종원을 감염시킨 세포를 카르노스산을 포함하는 배지에서 배양한 처리군;

y축: 바이러스 mRNA 발현의 상대량(Relative amount of Viral mRNA, 단위: A.U); 및
Mock: 무처리군.

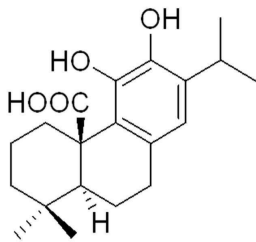
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 카르노스산(Carnosic acid)을 유효성분으로 함유하는 항 호흡기융합바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV)용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 카르노스산은 하기 [화학적 1]로 표기되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다:

[화학적 1]



상기 카르노스산은 로즈마리(*Rosmarinus officinalis*) 추출물로부터 수득한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 카르노스산은 로즈마리 에틸아세테이트 분획물로부터 수득한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 호흡기융합바이러스는 호흡기융합바이러스 A 타입 또는 호흡기융합바이러스 B 타입인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

또한, 본 발명은 카르노스산을 유효성분으로 함유하는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 카르노스산은 상기 [화학적 1]로 표기되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 카르노스산은 로즈마리 추출물로부터 수득한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 카르노스산은 로즈마리 에틸아세테이트 분획물로부터 수득한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 호흡기융합바이러스는 호흡기융합바이러스 A 타입 또는 호흡기융합바이러스 B 타입인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

상기 호흡기 질환은 감기 증후군, 급성기관지염, 급성세기관지염, 비인두염, 급성후두기관지염 및 폐렴으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 인간 호흡기융합바이러스에 대한 천연물 항바이러스제를 개발하고자, 다양한 식물 추출물의 항-호흡기융합바이러스 활성을 미세중화반응 검사(microneutralization assay)로 인간 호흡기융합바이러스에 감염된 세포에서 hRSV F 단백질 발현을 확인한 결과, 특히 로즈마리 추출물이 대조군 리바비린과 유사한 수준으로 hRSV F 단백질 발현 억제 활성을 보임을 확인하였다(도 1 참조). 또한, 상기 로즈마리 추출물의 호흡기융합바이러스 생산력을 확인하기 위한 호흡기융합바이러스가 감염된 세포에 상기 로즈마리 추출물을 처리하여 바이러스 생산량-감소 검사(viral yield-reduction assay)를 수행한 결과, 로즈마리 추출물을 처리한 경우 비이클 처리군과 비교하여 약 66 배로 바이러스 생산이 감소하였으나, 다른 추출물 처리군은 변화가 적거나 유의미한 변화가 없음을 확인하였다(도 2 참조). 로즈마리 추출물로부터 항 호흡기융합바이러스 효능에

대한 유효성분을 찾기 위해, 분획물을 제조한 다음 여러 분획물의 호흡기융합바이러스 복제에 대한 억제 활성을 비교한 결과, 에틸아세테이트 분획물이 로즈마리 추출물과 가장 유사함을 확인하였다(도 3 참조).

[0028]

상기 로즈마리 에틸아세테이트 분획물로부터 크로마토그래피의 실리카겔을 이용하여 하기 [화학식 1] 내지 [화학식 5]로 표기되는 화합물들(우르솔릭산, 올레아놀산, 베톨린산, 카르노스산 및 로즈마린산)을 동정한 다음, 상기 화합물들에 대하여 호흡기융합바이러스 억제 활성을 NS1 단백질 및 SH 단백질의 mRNA 발현량으로 비교한 결과, 카르노스산이 가장 유의적인 바이러스 억제 활성을 가짐을 확인하였다(도 4 참조). 가장 유의적인 호흡기융합바이러스 억제능을 확인한 카르노스산과 유사한 구조의 화합물인 카테콜(화학식 6 참조) 및 카르노솔(화학식 7 참조)과 hRSV F 단백질 발현량을 비교한 결과에서도, 카르노솔 및 카테콜은 유의적인 활성이 나타나지 않았으나, 카르노스산은 유의적인 수준으로 호흡기융합바이러스를 억제함을 확인하였다(도 5 참조).

[0029]

또한, 로즈마리 분획물로부터 동정한 화합물들의 인터페론 생성과의 연관성을 비교 확인한 결과, 모든 화합물은 인터페론-베타 또는 인터페론-람다의 발현량을 증진시키지 않았고, 특히 카르노스산을 처리한 세포에서 인터페론-베타 또는 인터페론-람다의 생산량이 바이러스 감염 이후 비이클을 처리한 세포에서의 인터페론의 생산량과 비교하여 현저히 낮음을 확인함으로써, 카르노스산의 호흡기융합바이러스의 억제 활성은 인터페론의 유도에 의한 것이 아님을 확인하였다(도 6 및 도 7 참조). 이러한 카르노스산의 비특이적 세포독성이 호흡기융합바이러스의 복제에 영향력이 있는지 확인하고자 세포독성 검사를 수행한 결과, 카르노스산은 항바이러스 검사시 농도에서 어떠한 세포독성도 나타내지 않음을 확인하였다(도 9 참조).

[0030]

카르노스산에 의한 호흡기융합바이러스의 활성 억제 효과를 확인하고자, 세포 종류, 카르노스산의 처리 농도, 또는 카르노스산의 처리 시기를 달리하여 호흡기융합바이러스의 활성 검사를 실시한 결과, 세포 종류에 무관하게 호흡기융합바이러스(hRSV A2)의 억제 활성이 있음을 확인하였다(도 10 및 도 11 참조). 또한, 동일한 조건의 세포에 리바비린을 처리한 결과, IC_{50} 값은 $17.08 \mu M$ 임을 확인하였다(도 12 참조). 뿐만 아니라, hRSV A2(MOI 0.1)를 감염시킨 A549 세포에 카르노스산을 농도를 달리 처리하여 바이러스의 생존율을 용균반 검사 및 바이러스 생산량-감소 검사로 확인한 결과 바이러스의 번식력이 유의적으로 감소하였고(도 13 참조), hRSV B 유형에 대한 호흡기융합바이러스 억제 효과를 확인한 결과 카르노스산에 의하여 hRSV의 A 유형 및 B 유형 모두 억제함을 확인하였다(도 14 및 도 15 참조). 또한, 시간-첨가 연구를 통해 카르노스산을 매개로 한 호흡기융합바이러스 mRNA 합성 억제 반응속도(kinetics)를 조사하기 위하여, 세포에 호흡기융합바이러스를 감염시키기 전후에 시기에 따라 달리 카르노스산을 처리한 결과, F 및 NS2 단백질의 발현을 유의적으로 억제함을 확인하였다(도 16 참조). 또한, 세포에 인간 호흡기융합바이러스를 감염시킨 세포에 카르노스산을 처리한 시간을 달리하여 hRSV F 및 NS2 단백질 발현량을 확인한 결과, 카르노스산 처리 시간이 길수록 바이러스 복제에 대한 억제능이 증가함을 확인하였다(도 17 참조).

[0031]

따라서, 본 발명의 카르노스산은 항 호흡기융합바이러스 활성을 확인한 로즈마리 에틸아세테이트 분획물로부터 동정되었고, 기존의 호흡기융합바이러스 억제제인 리바비린과 비교하여 호흡기융합바이러스 A 및 B 타입 모두에 대하여 유의적인 항바이러스 효과를 나타내며, 타입-I 인터페론 생산 없이 바이러스 유전자 발현을 유의적으로 억제하고, 호흡기융합바이러스 감염 및 복제를 억제하여 세포독성이 있음을 확인함으로써, 본 발명의 카르노스산을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 항 호흡기융합바이러스용 또는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환의 예방 및 치료용으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0032]

본 발명의 조성물의 치료상으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효용성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0033]

본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같

은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 단백질의 단편을 0.0001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함한다.

[0035] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0036] 아울러, 본 발명은 카르노스산을 유효성분으로 함유하는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환 예방 및 치료용 건강식품을 제공한다.

[0037] 상기 카르노스산은 상기 [화합식 1]로 표기되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0038] 상기 카르노스산은 로즈마리 추출물로부터 수득한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0039] 상기 카르노스산은 로즈마리 에틸아세테이트 분획물로부터 수득한 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0040] 상기 호흡기융합바이러스는 호흡기융합바이러스 A 타입 또는 호흡기융합바이러스 B 타입인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 상기 호흡기 질환은 감기 증후군, 급성기관지염, 급성세기관지염, 비인두염, 급성후두기관지염 및 폐렴으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0042] 본 발명의 카르노스산은 항 호흡기융합바이러스 활성을 확인한 로즈마리 에틸아세테이트 분획물로부터 동정되었고, 기존의 호흡기융합바이러스 억제제인 리바비린과 비교하여 호흡기융합바이러스 A 및 B 타입 모두에 대하여 유의적인 항바이러스 효과를 나타내며, 타입-I 인터페론 생산 없이 바이러스 유전자 발현을 유의적으로 억제하고, 호흡기융합바이러스 감염 및 복제를 억제하여 세포독성이 있음을 확인함으로써, 본 발명의 카르노스산을 유효성분으로 함유하는 건강식품은 항 호흡기융합바이러스용 또는 호흡기융합바이러스 감염으로 유발되는 호흡기 질환의 예방 및 치료용으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0043] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0044] 본 발명의 카르노스산은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 카르노스산의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 다당류, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

- [0046] 상기 외에 본 발명의 건강식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0047] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 조성물은 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0049] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0050] <실시예 1> 세포 및 바이러스 배양
- [0051] 인간 후두암(larynx carcinoma) 세포주 HEp-2(CCL-23) 및 인간 폐암 상피 세포주(adenocarcinoma alveolar basal epithelial cell line) A549를 10% FBS(fetal bovine serum), 페니실린(penicillin) 및 스트렙토마이신(streptomycin) 100 U/mL를 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 37℃ 조건으로 배양하였다. 또한, 인간 호흡기융합바이러스(Respiratory syncytial virus; RSV) A2 및 인간 호흡기융합바이러스(RSV) KR/B(서브그룹(subgroup) B)는 Jang 등(2011)에서 사용한 바이러스를 이용하였다. 상기 두 바이러스는 감염다중도(multiplicity of infection; MOI)가 0.01일 때 소규모로 배양하여 미리 준비해둔 분리 스타크(isolate stock)를 HEp-2 세포에 감염하여 증폭하였다. 상기 두 바이러스는 McKimm-Breschkin(2004)에 의해 공지된 바와 같이 용균반 검사(plaque assay)에 의해 적정되어 세포변성(cytopathic) 효능이 60% 이상 나타날 때 수득하였다.
- [0052] <실시예 2> 로즈마리(*Rosmarinus officinalis*) 추출물의 호흡기융합바이러스 복제에 대한 억제 활성 확인
- [0053] 인간 호흡기융합바이러스에 대한 천연물 항바이러스제를 개발하고자, 다양한 식물 추출물의 항-호흡기융합바이러스 활성을 미세중화반응 검사(microneutralization assay)를 통해 확인하였다.
- [0054] 구체적으로, 본 발명에 사용한 로즈마리(*R. officinalis* L.), 가중나무(*Ailanthus altissima*), 백미꽃(*Cynanchum atratum*) 식물은 서울 재래시장에서 구입하여 사용하였다. 대조군으로 호흡기융합바이러스의 치료제인 리바비린(Ribavirin)을 사용하였다. 또한 미세중화반응 검사는 공지된 방법(Johnson et al., 1997)에 따라 수행하였다. 먼저 순차적으로 희석한 상기 각각의 메탄올 식물 추출물을 hRSV A2 바이러스 1000 pfu(plaque-forming units)를 포함하는 HEp-2 세포(5×10^4 세포/웰)에 추가하였다. 감염 후 3일째에 세포를 3.7% 포름알데히드(formaldehyde)로 고정하였다. 5% 탈지 우유(skim milk)로 블락킹(blocking)한 다음, 마우스 항-F 모노클로날 항체(Sino Biological) 및 HRP(horseradish peroxidase)-복합 항-마우스 IgG를 사용하여 ELISA(enzyme-linked immune sorbent assay)를 시행함으로써 바이러스의 복제에 관련된 호흡기융합바이러스(hRSV) F(fusion) 단백질의 발현을 확인하였다. 각 시행을 3회 반복하여 실시하였고, 그 결과를 스튜던트 t-검정(Student's t-test) 통계적으로 분석하였다. 대조군 및 처리군을 비교하여 유의성을 검토했다($P < 0.05$ (*) 또는 0.01(**)).
- [0055] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 로즈마리, 가중나무, 백미꽃 추출물 및 리바비린에 대하여 인간 호흡기융합바이러스에 감염된 세포에서 hRSV F 단백질의 발현을 확인한 결과, 모두 각 처리 농도에 비례하여 hRSV F 단백질 발현이 억제되고, 특히 대조군 리바비린과 유사한 수준으로 로즈마리 추출물이 hRSV F 단백질 발현 억제 활성을 보임을 확인하였다(도 1).
- [0056] <실시예 3> 로즈마리 추출물의 호흡기융합바이러스 생산 억제 활성 확인
- [0057] hRSV F 단백질 발현 억제 활성을 가지는 천연물 소재인 로즈마리 추출물의 호흡기융합바이러스 생산에 대한 효과를 확인하고자, 호흡기융합바이러스가 감염된 세포에 상기 로즈마리 추출물을 처리하여 바이러스 생산량-감소

검사(viral yield-reduction assay)를 수행하였다.

[0058] 구체적으로, 상기 <실시예 1>와 같은 방법으로 배양한 A549 세포에 호흡기융합바이러스(hRSV A2) 접종원을 처리하기 이전, 비이클(vehicle), 상기 <실시예 2>에서 사용한 로즈마리 추출물, 가중나무 추출물, 또는 백미꽃 추출물(각 20 μ g/ml)을 1 시간 동안 각각 처리하였다. 그런 다음, 상기 세포에 호흡기융합바이러스 MOI 0.5를 첨가하고 1 시간 동안 배양하였다. 세포에서 바이러스가 없는 입자(Free virus particles)를 제거하기 위해, PBS(phosphate-buffered saline)로 세포를 3번 세척한 다음, 2% FBS과 비이클(DMSO) 또는 카르노스산(20 μ g/ml)을 포함하는 배지에서 추가적으로 배양하였다. 바이러스를 감염시킨 후 3일 후에 용균반 검사(plaque assay)를 하여 바이러스 역가(Viral titer, 단위: pfu/mL)를 측정하였다.

[0059] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 로즈마리 추출물을 처리한 경우 비이클 처리군과 비교하여 약 66 배로 바이러스 생산이 감소하였으나, 가중나무 추출물 처리군은 약 2.2배 감소하였고, 백미꽃 추출물 처리군은 유의미한 변화가 없음을 확인하였다(도 2). 따라서 로즈마리 추출물이 유의적인 항 호흡기융합바이러스 활성을 지님을 확인하였다.

[0060] <실시예 4> 로즈마리 분획물의 호흡기융합바이러스 억제 활성 확인

[0061] 상기 <실시예 2> 및 <실시예 3>에서 유의적인 항 호흡기융합바이러스 효능을 지닌 로즈마리 추출물로부터 유효성분을 찾기 위해, 순차적으로 용매를 달리하여 분획물을 제조한 다음 여러 분획물의 호흡기융합바이러스 복제에 대한 억제 활성을 미세중화반응 검사를 통해 비교하였다.

[0062] 구체적으로, 분획물 제조를 위하여 상기 <실시예 2>의 로즈마리를 이용하였다. 바우처 표본(voucher specimen, 2012-ROOF01호)은 경희대학교 약학대학 천연물신약연구실로부터 입수하였다. 상기 로즈마리의 상층부를 공기 건조하여 분쇄하여 수득한 건물 12.5 g을 70% 에탄올(EtOH)로 해리법(maceration)을 통해 3회 추출하였다. 70% EtOH 추출물 3.11 g을 40℃ 진공에서 혼합 및 농축하였다. 상기 추출물을 H₂O 100 mL에서 현탁한 다음, n-헥산(n-hexane) 3×100 mL, 에틸아세테이트(ethyl acetate; EtOAc) 3×100 mL, 및 부탄올(butanol; BuOH) 3×100 mL에 순차적으로 분획하여, 각각 n-헥산 분획물 719.7 mg, 에틸아세테이트 분획물 950.2 mg, 부탄올 분획물 460.6 mg, 및 물 분획물 966.5 mg를 수득하였다. 각 분획물을 이용하여 상기 <실시예 2>에 기재한 방법으로 미세중화반응 검사를 실시하였다.

[0063] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 에틸아세테이트 분획물이 로즈마리 총 에탄올 추출물과 유사하게 유의적인 호흡기융합바이러스 억제 활성을 가지고 있음을 확인하였다(도 3).

[0064] <실시예 5> 로즈마리 분획물로부터 유효성분 화합물의 동정

[0065] 호흡기융합바이러스 억제 활성을 유도하는 유효성분을 확보하고자, 가장 유의적인 항 호흡기융합바이러스 활성이 있는 에틸아세테이트 분획물을 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)의 실리카겔(silica gel)에 통과시켜 순수한 화합물을 동정하였다.

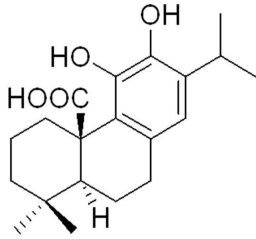
[0066] 구체적으로, 상기 <실시예 2>의 로즈마리 에틸아세테이트 분획물을 컬럼 크로마토그래피의 실리카겔에 통과시켜 순수한 화합물을 수득하도록 하였다. 먼저, 상기 <실시예 2>의 로즈마리 에틸아세테이트 분획물 940 mg을 순차적으로 n-헥산-EtOAc-MeOH v/v 비율을 각각 7:3:0, 0:1:0, 0:9:1, 0:4:1으로 하고 마지막에는 100% 메탄올을 이용하여 총 7 개의 분획(F01-F07)으로 회석하였다. 그런 다음, 분획 F02를 MeOH-H₂O v/v 비율을 4:1 내지 19:1로 하여 크로마토그래피의 역상(reversed-phase) 실리카겔을 통과시켰다. 또한, 분획 F03를 MeOH-H₂O v/v 비율을 19:1로 하여 크로마토그래피의 역상 실리카겔을 통과시켰다. 상기와 같은 방법으로 분획 F07을 실리카겔에 통과시켰다. 수득한 화합물을 순도 95% 이상으로 얻기 위해 HPLC(high-performance liquid chromatography)를 수행하였고, 상기 화합물을 동정하고자 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance; NMR) 분광법을 시행하였다.

[0067] 그 결과, [화학적식 1] 및 [화학적식 5]에 나타난 바와 같이, 분획 F02를 크로마토그래피의 실리카겔에 통과시킨 결과 카르노스산(Carnosic acid, 화학식 1) 및 베틀린산(betulinic acid, 화학식 5)을 수득하였다. 또한, [화학적식 3] 및 [화학적식 4]에 나타난 바와 같이, 분획 F02를 크로마토그래피의 실리카겔에 통과한 결과 우르솔릭산(Ursolic acid, 화학식 3) 및 올레아놀산(oleanolic acid, 화학식 4)을 수득하였다. [화학적식 2]에 나타난 바

와 같이, 분획 F07를 실리카겔에 통과하여 로즈마린산(rosmarinic acid, 화학식 2)을 수득하였다.

[0068] [화학식 1]

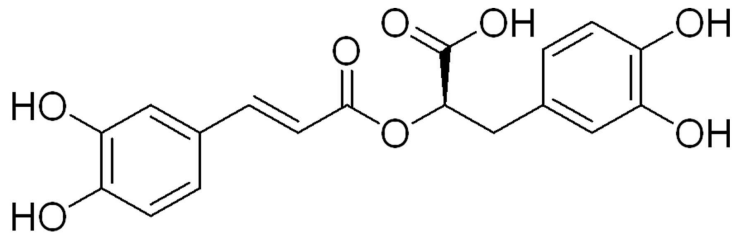
[0069] 카르노스산(Carnosic acid)



[0070]

[0071] [화학식 2]

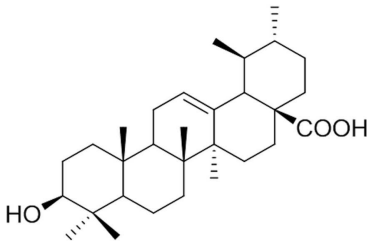
[0072] 로즈마린산(Rosmarinic acid)



[0073]

[0074] [화학식 3]

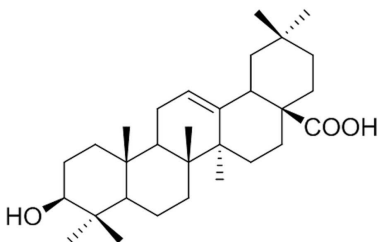
[0075] 우르솔릭산(Ursolic acid)



[0076]

[0077] [화학식 4]

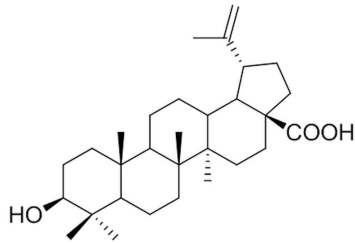
[0078] 올레아놀산(Oleanolic acid)



[0079]

[0080] [화학식 5]

[0081] 베틀린산(Betulinic acid)



[0082]

[0083] <실시예 6> 로즈마리로 부터 분리한 화합물의 항 호흡기융합바이러스 활성 비교 확인

[0084] 로즈마리 분획물로부터 동정한 화합물들에 대하여 호흡기융합바이러스 억제 활성을 비교하고자, 호흡기융합바이러스에 감염된 세포에 우르솔릭산, 올레아놀산, 베틀린산, 카르노스산 및 로즈마린산을 각각 처리하여, 호흡기융합바이러스 NS2 및 SH 단백질의 발현량 측정을 위해 RT-qPCR(reverse-transcription quantitative real-time polymerase chain reaction)을 실시하였다.

[0085] 구체적으로, 상기 <실시예 5>에서 수득한 우르솔릭산, 올레아놀산, 베틀린산, 카르노스산 및 로즈마린산 화합물을 준비하였다. 또한, 호흡기융합바이러스(hRSV MOI 0.5)를 처리하기 1 시간 전부터 A549 세포를 상기 <실시예 1>과 같은 방법으로 배양하였다. 호흡기융합바이러스를 무처리한 세포 또는 호흡기융합바이러스(hRSV)를 1 시간 동안 감염시킨 세포로부터 RNeasy RNA extraction kit(Qiagen)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 총 RNA를 분리하였다. 상기 총 RNA 1 mg을 oligo₂₀(dT) 프라이머, Superscript III 역전사효소(Invitrogen) 및 CFX-9000(Bio-Rad) real-time PCR을 이용하여 cDNA를 합성하였고, 그런 다음 합성한 cDNA 2 μ l에 대하여 정량적 PCR을 수행하였다. hRSV A2 바이러스의 복제능을 분석하기 위하여 SH 단백질 및 NS1 단백질(non-structural protein 1)에 특이적인 프라이머를 이용하여 바이러스 유전자의 발현량을 분석하였다. 구체적인 프라이머 정보는 표 1에 나타낸 바와 같다. 이때 β -액틴을 대조군으로 사용하여 mRNA 수준을 정규화하였다. 결과의 통계학적 분석은 상기 <실시예 2>와 같이 수행하였다.

[0086] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 우르솔릭산, 올레아놀산, 베틀린산, 카르노스산 및 로즈마린산에 대하여 NS1 단백질 및 SH 단백질의 mRNA 발현량을 비교한 결과, 카르노스산의 경우에 가장 유의적인 바이러스 억제 활성을 가짐을 확인하였다(도 4).

표 1

본 발명의 RT-qPCR에 사용한 프라이머 정보

타겟 RNA	서열(5'→3')	서열번호
hRSV A2 F 단백질 정방향	CCACAATCCTCGCTGCAGTC	1
hRSV A2 F 단백질 역방향	GGCTCCTAGAGATGTGATAACGG	2
hRSV A2 NS2 단백질 정방향	ATTGGCATTAGCCTACAAAGCA	3
hRSV A2 NS2 단백질 역방향	CTTGACTTTGCTAAGAGCCATCT	4
hRSV A2 SH 단백질 정방향	AATTGGAAGCACACAGCTAC	5
hRSV A2 SH 단백질 역방향	TTGCATTGCCCCAATGTT	6
hRSV B G 단백질 정방향	ATGATTGCAATACTAAA	7
hRSV B G 단백질 역방향	ACACTGGTATACCAACC	8
인터페론-β 정방향	GAACCTTGACATCCCTGAGGAGATT	9
인터페론-β 역방향	TGCGGCGTCTCTTCT	10
인터페론-λ1(IL-29) 정방향	GGACGCCTTGAAGAGTCAC	11
인터페론-λ1(IL-29) 역방향	AGCTGGGAGAGGATGTGGT	12
인터페론-λ2(IL-28) 정방향	AGGGCCAAAGATGCCTTAGA	13
인터페론-λ2(IL-28) 역방향	TCCAGAACCTTCAGCGTCAG	14
β-액틴 정방향	TGCCGCATCCTCTTCTC	15
β-액틴 역방향	CGCCTTCACCGTTCCAGT	16

<실시예 7> 카르노스산 화합물의 호흡기융합바이러스 F 단백질 억제능 확인

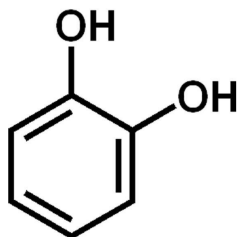
가장 유의적인 항 호흡기융합바이러스를 확인한 카르노스산과 유사한 구조의 화합물 카테콜(catechol, 화학식 6) 및 카르노솔(carnosol, 화학식 7)과의 비교를 위하여, 호흡기융합바이러스(hRSV) 융합 단백질(Fusion protein; F 단백질) 발현량을 RT-qPCR로 확인하였다.

구체적으로, 상기 <실시예 6>과 동일한 방법으로 세포를 준비하여 RT-qPCR을 수행하였다. 이때 F 단백질 특이적인 프라이머를 사용하였다(표 1).

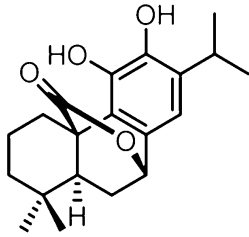
그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 카르노솔은 호흡기융합바이러스에 대하여 어떠한 바이러스 억제 활성도 보이지 않았고, 카테콜은 약간의 활성을 보였으나 유의적인 수준이 아니었으나, 카르노스산은 유의적인 수준으로 호흡기융합바이러스 억제함을 확인하였다(도 5).

[화학식 6]

카테콜(catechol)



[화학식 7]



그 결과, 도 6 내지 도 8에 나타난 바와 같이, 카르노스산의 호흡기융합바이러스의 억제 활성은 인터페론의 유도에 의한 것이 아님을 확인하였다. 구체적으로 모든 화합물은 인터페론-베타 또는 인터페론-람다의 발현량을 증진시키지 않았고, 카르노스산을 처리한 세포에서 인터페론-베타 또는 인터페론-람다의 생산량은 바이러스 감염 이후 비이클을 처리한 세포에서의 인터페론의 생산량과 비교하여 현저히 낮음을 확인하였다(도 6 및 도 7). 또한, 바이러스 감염이 없이 카르노스산을 처리하였을 경우에는 인터페론-베타가 유도되지 않음을 확인하였다.

카르노스산의 비특이적(nonspecific) 세포독성(cytotoxicity)이 호흡기융합바이러스의 복제에 영향을 미칠 수 있는지 확인하고자, 세포독성 검사를 수행하였다.

구체적으로, 세포 활성은 MTT(3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl-4-methylphenyltetrazolium bromide) 세포 활성 검사를 당업계에 알려진 방법으로 시행하여 결정하였다. 상기 <실시예 1>의 A549 세포를 카르노스산을 포함하는 DMEM 배지가 담긴 96 웰 플레이트에서 48 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, MTT(5 mg/ml)가 20 μ l 포함된 신선한 배지로 교체하고 4 시간 동안 추가적으로 배양하였다. 배지를 포함하는 MTT를 세포에 주입한 다음, 세포를 용해하고 불수용성 포마존(formazone)을 수용화하기 위하여 DMSO 200 μ l을 추가하였다. 용해물의 570 nm 흡광도를 마이크로플레이트 리더(microplate reader)로 측정하였다.

그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 카르노스산은 항바이러스 검사를 위한 농도에서 어떠한 세포독성도 나타내지 않음을 확인하였다(도 9). 또한, 50% 세포독성을 나타내는 카르노스산 농도는 130.8 $\mu\text{g/ml}$ 임을 확인하였다(도 9).

카르노스산에 의한 호흡기융합바이러스의 활성 억제 효과를 확인하고자, 세포 종류, 카르노스산의 처리 농도, 또는 카르노스산의 처리 시기를 달리하여 호흡기융합바이러스의 활성 검사를 실시하였다.

구체적으로, 세포의 종류는 A549 세포 또는 HEp-2 세포를 이용하였고, 상기 <실시예 1>에 기재한 바와 같이 배양하였다. 바이러스 종류는 hRSV A2 또는 RSV B/KR를 달리하여 상기 <실시예 1>과 같이 이용하였고, 이때 처리시간은 12 시간 또는 24 시간으로 실시하였다. 상기 <실시예 6>과 동일한 방법으로 세포를 준비하여 RT-qPCR을 수행하였다. 이때 호흡기융합바이러스의 F 단백질, NS2 단백질, SH 단백질 및 G 단백질 특이적인 프라이머를 사용하였다(표 1). 카르노스산의 농도를 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (60 μM) 또는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (150 μM)로 달리 처리하였고, 상기 카르노스산의 처리 이후 2일째 및 4일째에 용균반 검사(plaque assay)를 당업계에 알려진 방법으로 수행하였다.

또한 카르노스산 대신 기존의 호흡기융합바이러스 감염에 대한 치료제인 리바비린의 농도를 달리 처리함으로써 호흡기융합바이러스의 활성에 대한 영향을 측정하였다. 뿐만 아니라, 상기 <실시예 3>과 같은 방법으로 바이러스 생산량-감소 검사를 수행하였다.

[0109]

그 결과, 도 10 내지 도 15에 나타난 바와 같이, 세포 종류에 무관하게 호흡기융합바이러스(hRSV A2)의 억제 활성이 있음을 확인하였다. 구체적으로 A549 세포(도 10) 및 HEp-2 세포(도 11)에서 모두 카르노스산의 처리 농도와 비례하여 F단백질, NS2 단백질 및 SH 단백질의 mRNA 전사량이 모두 유의적으로 감소함을 확인하였다. 구체적으로, 측정된 IC_{50} (half-maximal inhibitory concentration) 값은 A549 세포 및 HEp-2 세포에서 각각 $19.58 \mu M$ ($6.51 \mu g/ml$) 및 $20.19 \mu M$ ($6.71 \mu g/ml$)임을 확인하였다(도 10 및 도 11). 또한, 동일한 조건의 A549 세포에 리바비린을 처리한 결과, IC_{50} 값은 $17.08 \mu M$ 임을 확인하였다(도 12). 뿐만 아니라, 도 13에 나타난 바와 같이, hRSV A2(MOI 0.1)를 감염시킨 A549 세포에 카르노스산을 $20 \mu g/ml$ 및 $50 \mu g/ml$ 로 달리 처리하여 바이러스의 생존율을 용균반 검사 및 바이러스 생산량-감소 검사로 확인한 결과, 바이러스의 번식력이 26 배 및 1160 배로 감소함을 확인하였다(도 13). 특히 $50 \mu g/ml$ 의 카르노스산을 처리한 경우 바이러스 감염 4일 후에는 호흡기융합바이러스가 더 이상 존재하지 않음을 확인하였다(도 13). 아울러, 카르노스산에 의하여 hRSV의 A 유형 및 B 유형 모두를 억제하는지를 확인하기 위하여 B 유형 임상적 분리물(clinical isolate)인 hRSV B/KR 바이러스를 이용하여 동일한 방법으로 항 바이러스 활성을 측정한 결과, 호흡기융합바이러스의 유형과 무관하게 항 바이러스 효과가 있음을 확인하였다(도 14 및 도 15).

[0110]

<실시예 11> 카르노스산의 호흡기융합바이러스 복제 및 감염 억제 활성 확인

[0111]

카르노스산에 의한 호흡기융합바이러스 억제 메커니즘을 파악하고자, 시간-첨가 연구(time-of-addition study)를 통해 카르노스산을 매개로 한 호흡기융합바이러스 mRNA 합성 억제 반응속도(kinetics)를 조사하였다.

[0112]

구체적으로, 실험 전날 A549 세포를 시딩하여(seed) 밤새도록 상기 <실시예 1>과 같은 방법으로 배양하였다. 세포에 호흡기융합바이러스 A2(MOI 0.5)를 감염시키기 전후에 시기에 따라 달리 카르노스산 $10 \mu g/ml$ 을 처리하였다. 바이러스에 의한 감염 초기에 카르노스산의 효과를 알아보기 위하여, 바이러스 접종 1 시간 전에 카르노스산을 처리하였다. 또한 바이러스가 안정적으로 내재화(internalization)될 수 있도록 접종 후 1 시간 동안 세포를 배양하였다. 그런 다음 바이러스와 카르노스산을 제거하기 위하여 PBS로 세척하였다. RT-qPCR 실험에 이용한 총 RNA는 바이러스 접종 이후 48 시간 시기에 상기 <실시예 6>과 같은 방법으로 준비하였다. 대조군은 카르노스산을 1 시간 동안 처리하고 바이러스 접종 전 세척을 하여, 세포의 생리적 측면에서 바이러스 감염 또는 복제에 카르노스산이 미칠 수 있는 요소를 제거하였다. 또한, 처리군은 하기와 같이 세 가지로 하였다:

[0113]

Car-: 카르노스산 없이 hRSV를 감염시킨 세포인 처리군;

[0114]

Car+: 카르노스산을 포함하는 hRSV 접종원(inoculum)을 감염시킨 세포를 PBS로 세척한 처리군; 및

[0115]

Car++: hRSV 접종원을 감염시킨 세포를 카르노스산을 포함하는 배지에서 배양한 처리군.

[0116]

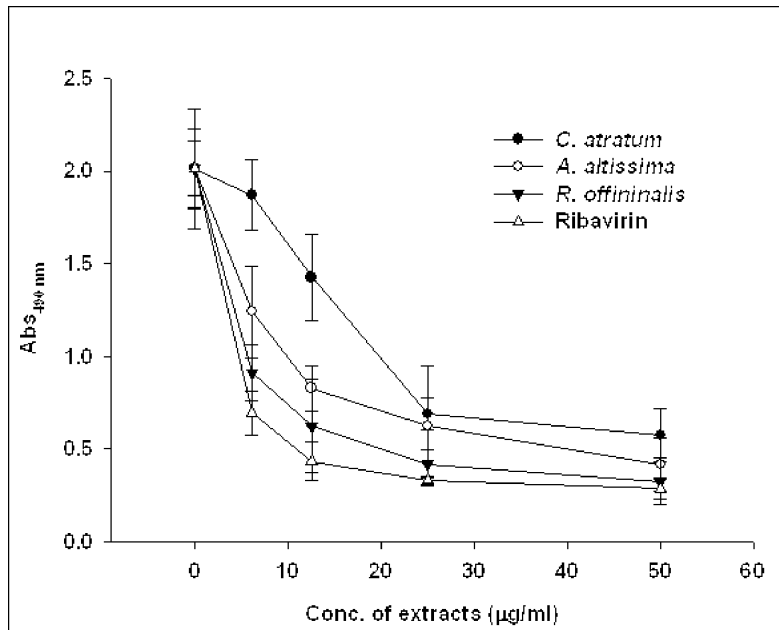
그 결과, 도 16 및 도 17에 나타난 바와 같이, 세포에 호흡기융합바이러스를 감염시키기 전후에 시기에 따라 달리 카르노스산을 처리한 결과, F 및 NS2 단백질의 발현을 유의적으로 억제함을 확인하였다(도 16). 호흡기융합바이러스를 감염하기 3 시간 전에 카르노스산을 미리 처리한 경우에, 호흡기융합바이러스 F 및 NS2 단백질의 mRNA 합성량이 약 80% 감소함을 확인하였다. 또한, 이와 유사하게 호흡기융합바이러스 감염 이후 4 시간까지도 F 및 NS2 단백질의 mRNA 합성량이 약 80%가 감소하였으나, 그 이후 8 시간 또는 12 시간이 지난 다음에는 상기 mRNA 합성량이 약 70% 또는 약 50% 감소하여 그 감소 수준이 적어지는 것을 확인하였다(도 16).

[0117]

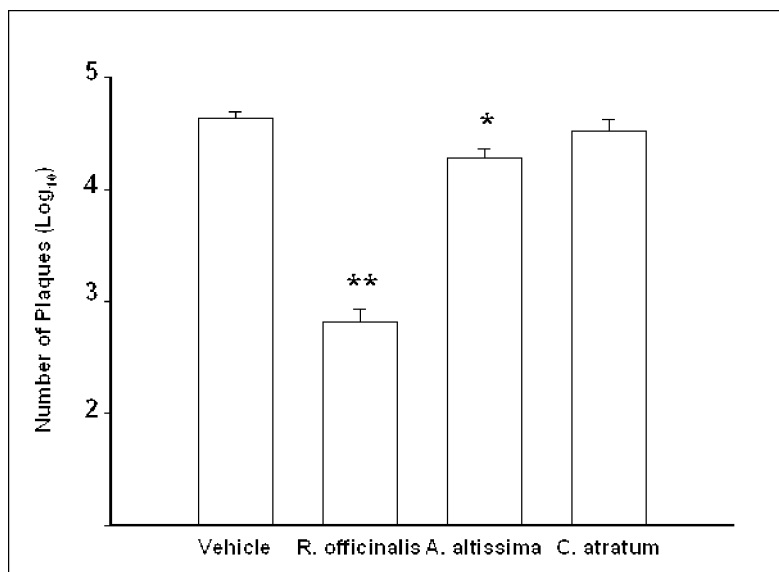
또한, 세포에 인간 호흡기융합바이러스 A2를 감염시킨 세포에 카르노스산을 한 시간 동안 처리한 후 세척하여 카르노스산을 제거한 다음, 바이러스 감염 후 48 시간 이후에 바이러스의 F 및 NS2 단백질 발현을 확인한 결과, 처리군 Car+의 경우에는 처리군 Car-의 경우의 약 50% 수준이었고, 처리군 Car++의 경우가 처리군 Car-의 경우의 약 10% 수준으로 급격히 감소함으로써 카르노스산의 바이러스 복제에 대한 유의적인 억제 효과를 확인하였다(도 17). 또한, 처리군 Car-의 경우는 무처리 대조군과 유의적인 차이가 없으므로써 카르노스산의 항 호흡기융합바이러스 활성이 세포의 생리, 구체적으로 인터페론의 생산 또는 수용체의 발현에는 무관함을 확인하였다(도 17).

도면

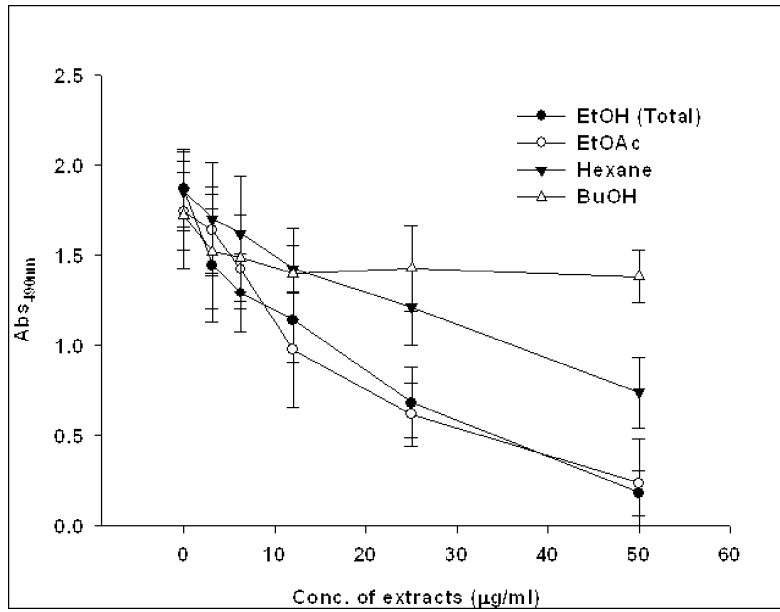
도면1



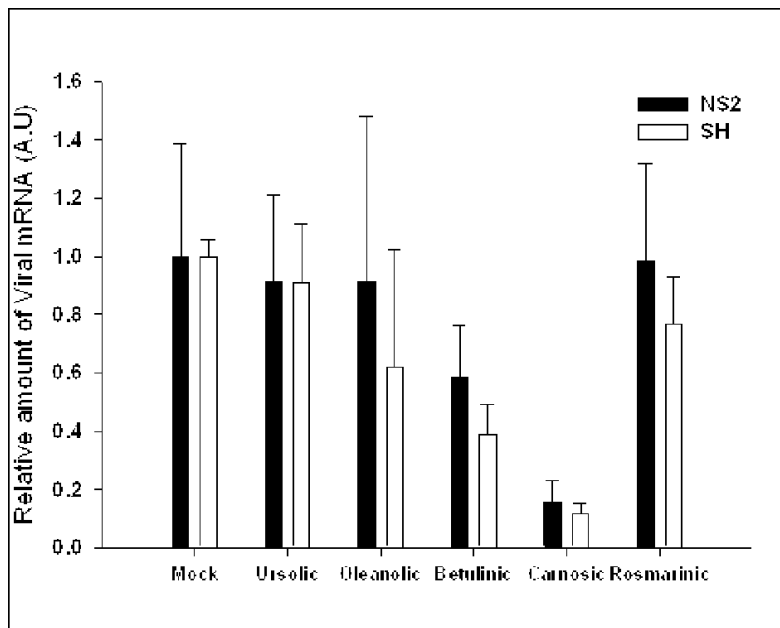
도면2



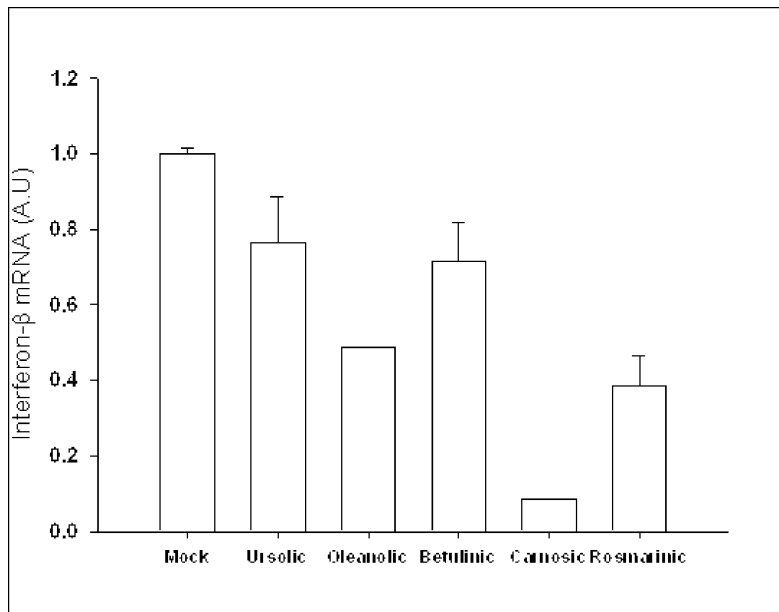
도면3



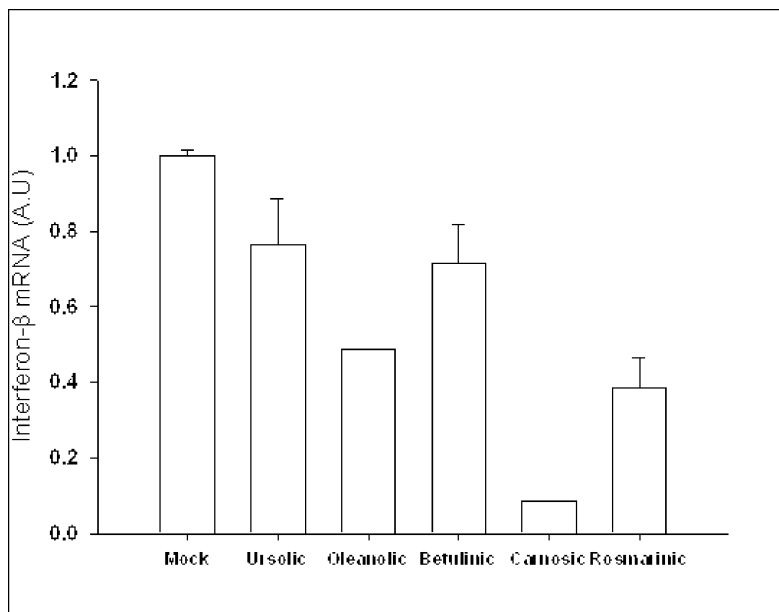
도면4



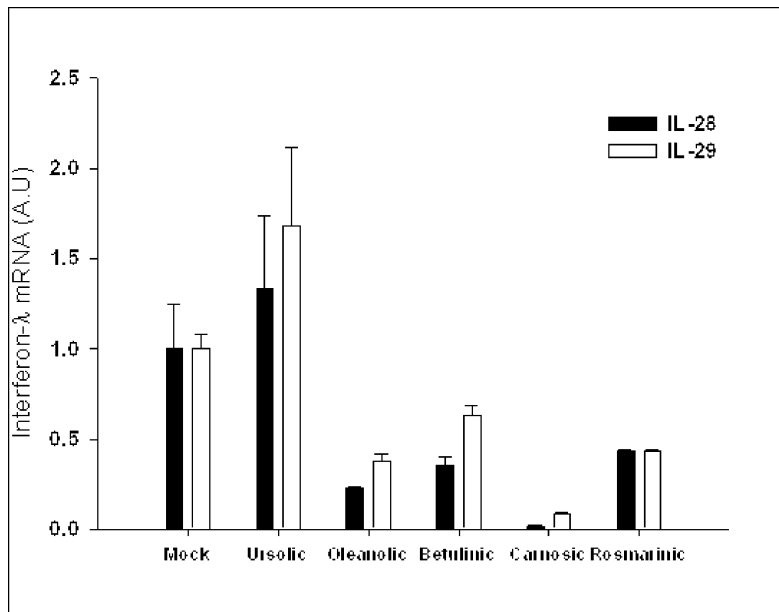
도면5



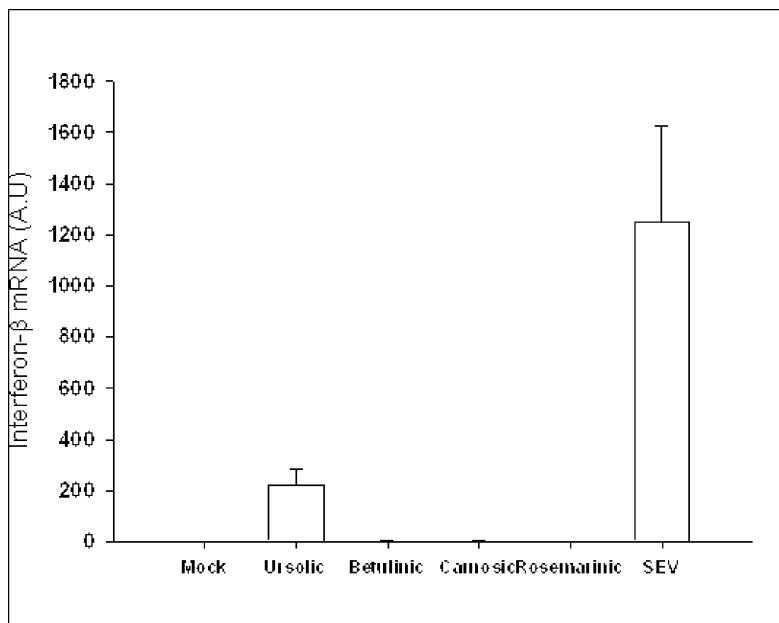
도면6



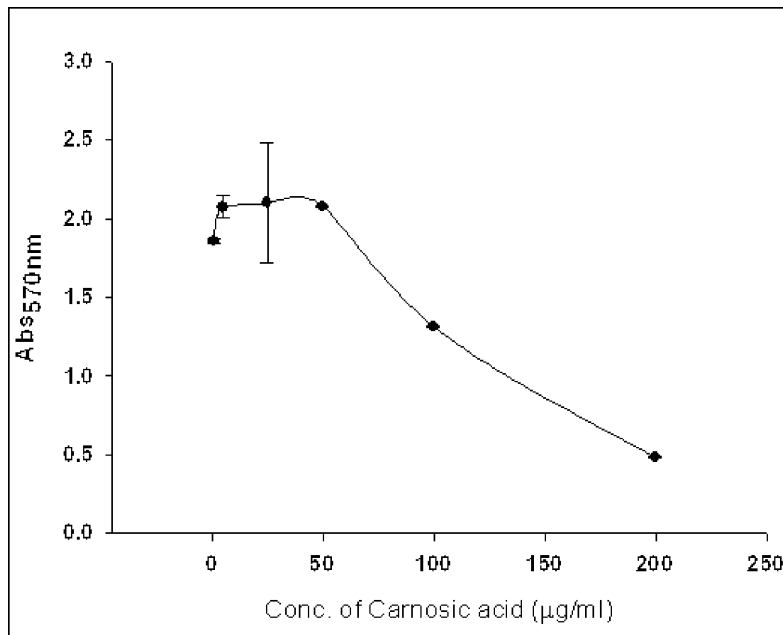
도면7



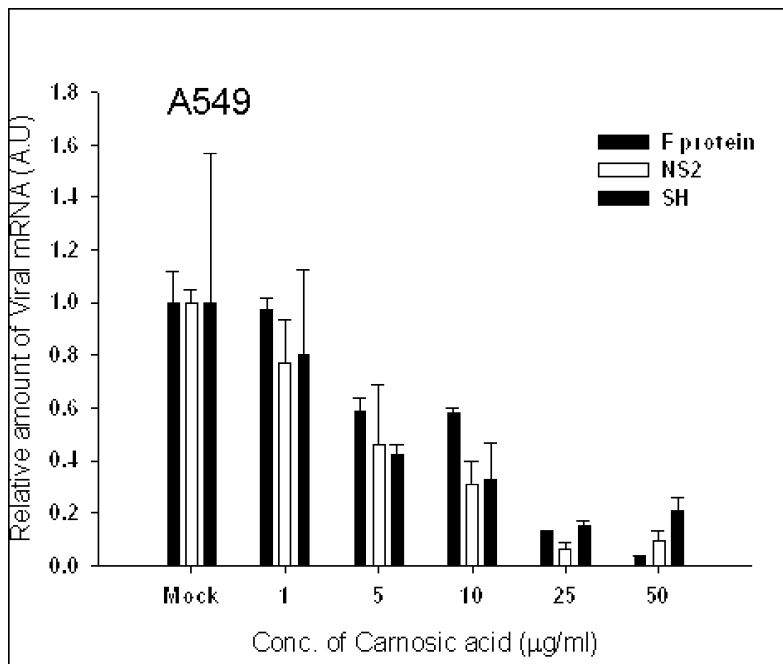
도면8



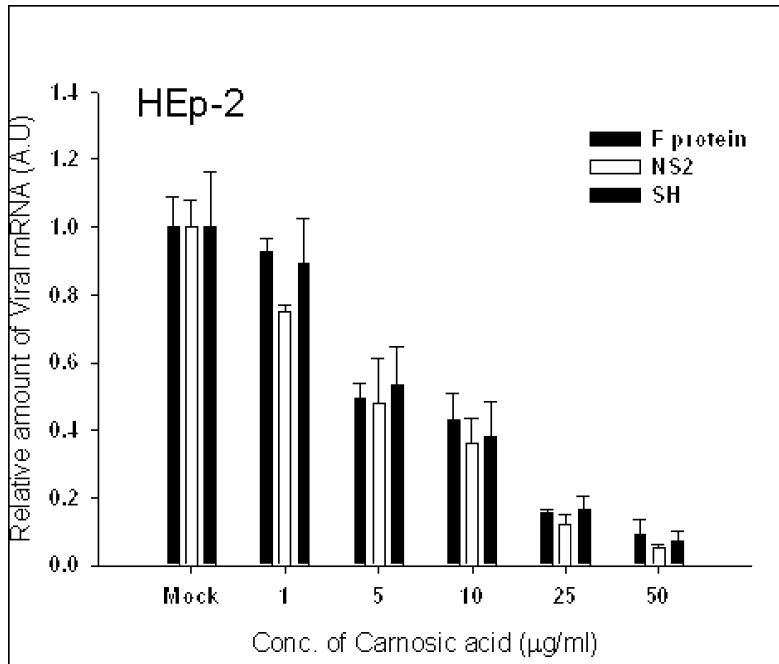
도면9



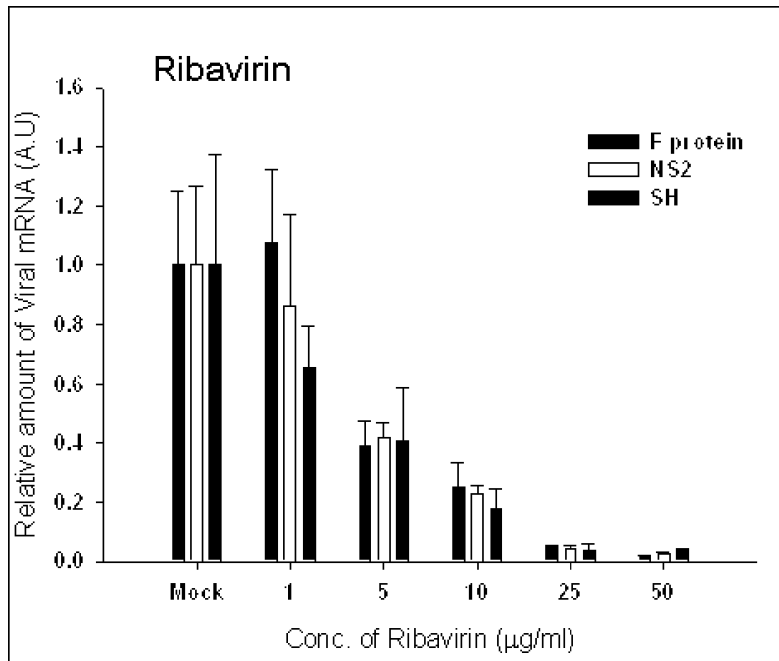
도면10



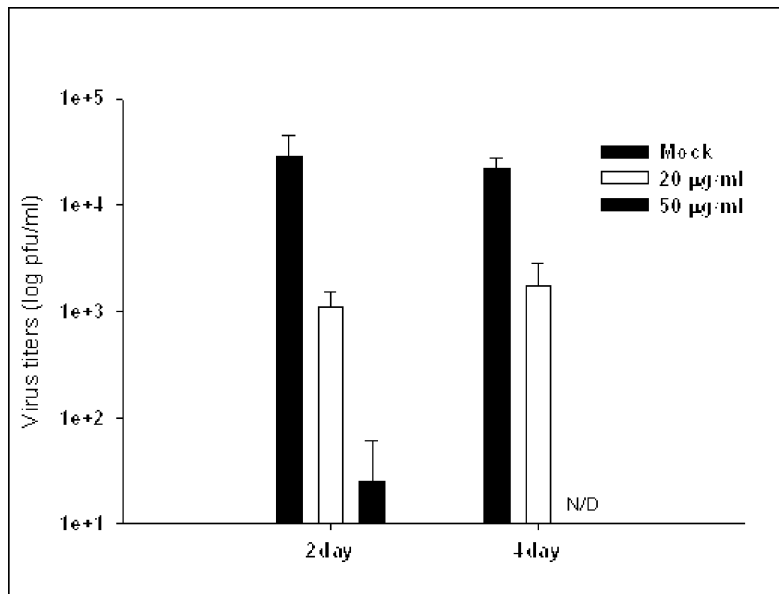
도면11



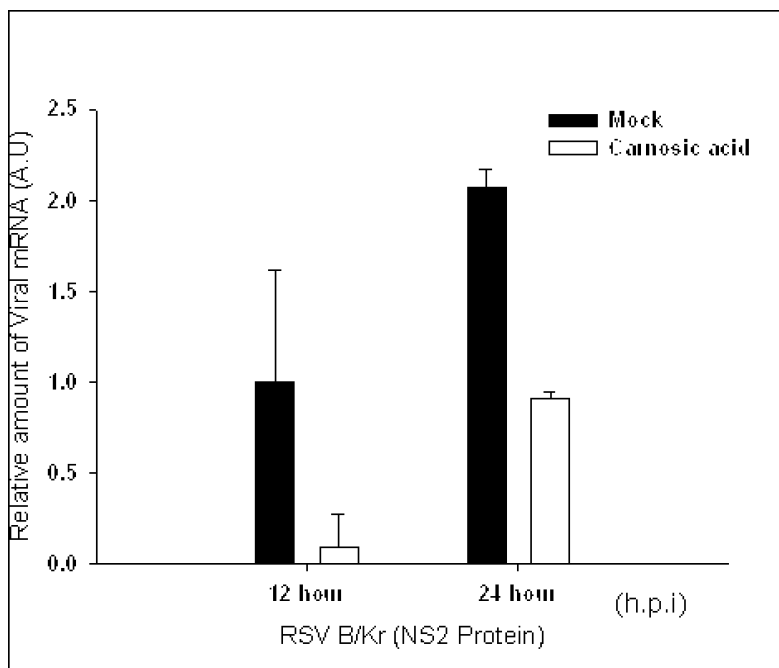
도면12



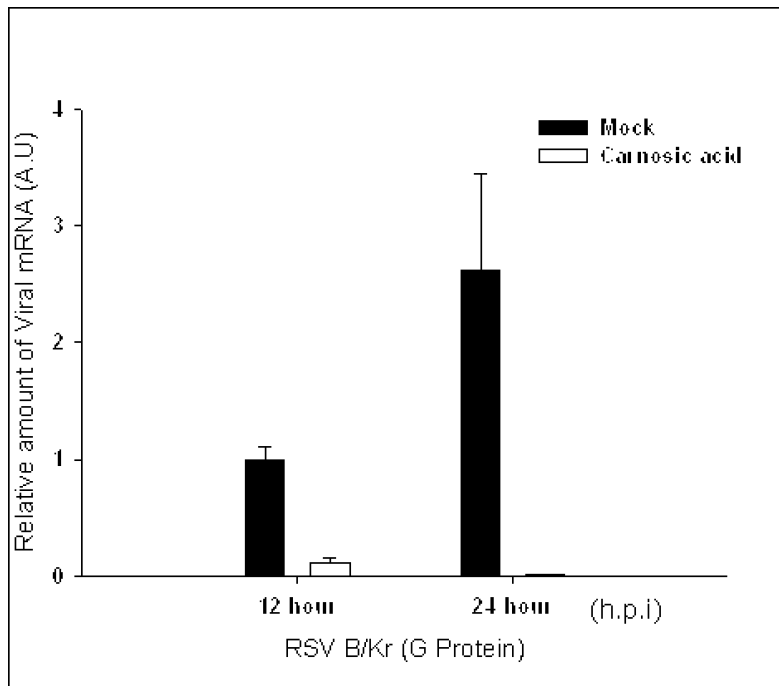
도면13



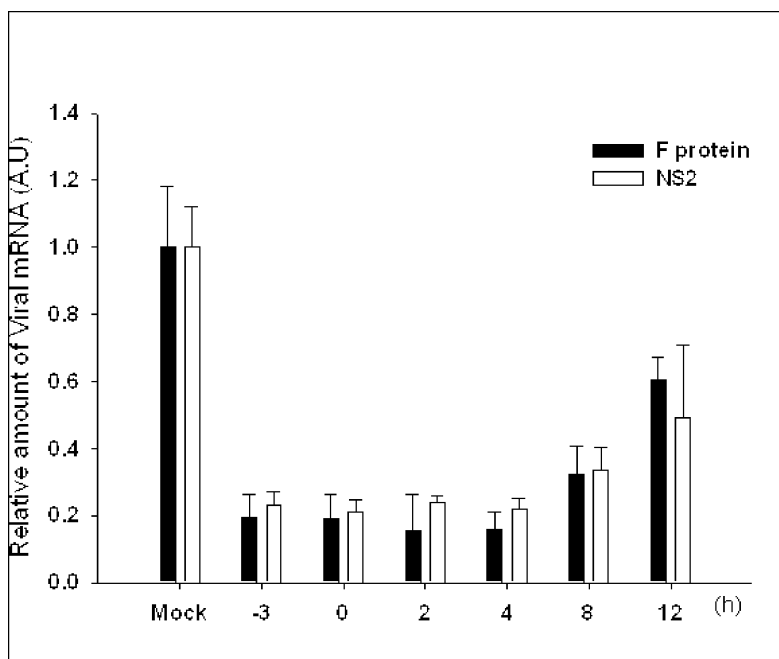
도면14



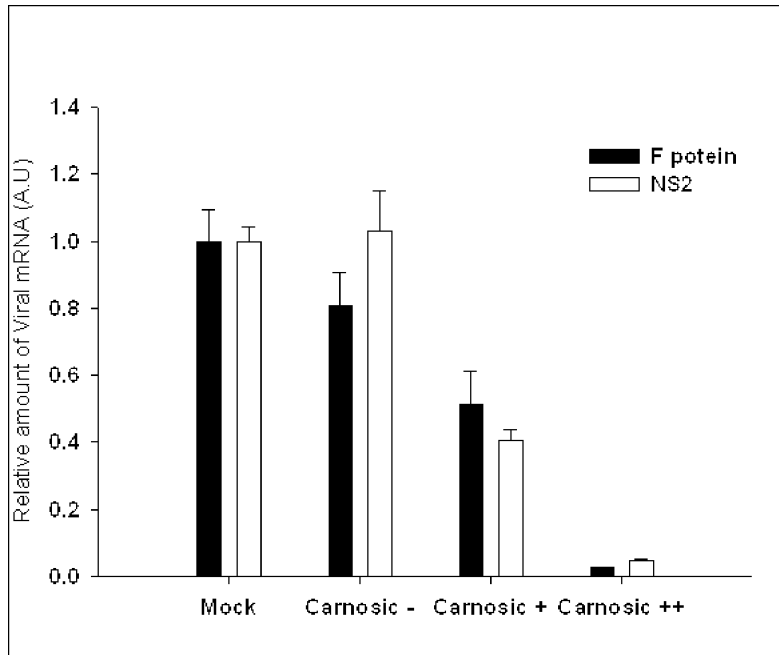
도면15



도면16



도면17



서열 목록

- <110> Kyunghee University Industry Cooperation Foundation
- <120> Composition comprising carnosic acid having anti-Respiratory syncytial virus activity
- <130> 13p-07-69
- <160> 16
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> hRSV A2 F forward
- <400> 1
- ccacaatcct cgctgcagtc
- <210> 2
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223>
- > hRSV A2 F reverse

<400>	2	
ggctcctaga gatgtgataa cgg		23
<210>	3	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hRSV A2 NS2 forward	
<400>	3	
attggcatta agcctacaaa gca		23
<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hRSV A2 NS2 reverse	
<400>	4	
cttgactttg ctaagagcca tct		23
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hRSV A2 SH forward	
<400>	5	
aattggaagc acacagctac		20
<210>	6	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hRSV A2 SH reverse	
<400>	6	
ttgcatttgc cccaatgtt		19
<210>	7	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> hRSV B G forward

<400> 7

atgattgcaa tactaaa

17

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hRSV B G reverse

<400> 8

acactgggtat accaacc

17

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> interferon beta forward

<400> 9

gaactttgac atccctgagg agatt

25

<210> 10

<211> 17

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> interferon beta reverse

<400> 10

tgcggcgtcc tccttct

17

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> interferon lambda1(IL-29) forward

<400> 11

ggacgccttg gaagagtcac

20

<210> 12

<211> 19

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	interferon lambda1(IL-29) reverse	
<400>	12	
	agctgggaga ggatgtggt	19
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	interferon lambda1(IL-28) forward	
<400>	13	
	agggccaaag atgccttaga	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	interferon lambda1(IL-28) reverse	
<400>	14	
	tccagaacct tcagcgtcag	20
<210>	15	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta actin forward	
<400>	15	
	tgccgcatcc tcttcctc	18
<210>	16	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta actin reverse	
<400>	16	
	cgccttcacc gttccagt	18