

명세서

발명의 명칭: 인삼열매 다당체를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제용 조성물

기술분야

- [1] 본 명세서는 인삼열매 다당체를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제용 조성물에 관하여 기술한다.

배경기술

- [2] 인플루엔자는 감염 초기 증상이 일반 감기(급성 바이러스형 비인두염)과 유사하여 독감이라는 명칭으로 불리우나 그 원인과 병증이 전혀 상이한 질병이다. 주로 리노바이러스(rhinovirus), 코로나 바이러스(coronavirus), 아데노바이러스(adenovirus), 호흡기거대세포바이러스(respiratory syncytial virus) 등에 의해서 유발되는 감기와 달리, 인플루엔자는 인플루엔자 바이러스에 의해서 유발된다.
- [3] 인플루엔자는 고열, 오한, 근육통, 관절통과 같은 심각한 병증을 나타내며, 고열과 합병증 발병 위험이 높아 사망에 이를 수도 있다. 고병원성 또는 고감염성 신종 또는 변종 인플루엔자 바이러스에 의한 팬데믹 인플루엔자(pandemic influenza) 발생 시 대규모 사망 위험이 있어 이에 대한 대책이 필요한 실정이다.
- [4] 인플루엔자의 치료는 인플루엔자 바이러스 자체를 타겟팅하여 바이러스의 활성이나 감염 매커니즘을 직접적으로 차단하는 것에 의하여 가능하다. 인플루엔자 치료제로 M2 억제제인 아만타딘(amantadine)과 리만타딘(rimantadine), 뉴라미니데이즈(neuraminidase, NA) 억제제인 리렌자(zanamivir, Relenza®)와 타미플루(oseltamivir, Tamiflu®)가 상용되며, M2 억제제는 A형 인플루엔자 바이러스에만 작용하며, NA 억제제는 A형 및 B형 인플루엔자 바이러스에 효과를 나타낸다. 타미플루의 경우 오심, 구토, 신경계나 정신계의 이상 등의 부작용을 가지고 있으며, 타미플루를 포함한 상기 상용 치료제들에 대한 내성 양상이 보고된 바 있다.
- [5] 이에, 인플루엔자 바이러스 감염을 예방하거나 또는 감염을 억제하여 치료하는 효과가 우수하면서 부작용과 내성이 없는 소재에 대한 요구가 존재한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 일 관점에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 부작용 없이 효과적으로 인플루엔자 감염을 예방 또는 억제하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 다른 관점에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 인플루엔자 타겟 치료제로 작용하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 또 다른 관점에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 인플루엔자 바이러스의

감염 메커니즘을 차단하여 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

- [9] 또 다른 관점에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 뉴라미니데이즈 활성을 억제하여 인플루엔자 바이러스 감염을 억제하는 효과를 나타내는 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 또 다른 관점에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 인플루엔자 바이러스 A형 및 B형 모두에 작용 가능한 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 또 다른 관점에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 낮은 투여량에서 현저하게 우수한 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제 효과를 나타내는 조성물을 제공하는 것이다.
- [12] 또 다른 관점에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 천연물로서 부작용이 없거나 낮으며, 내성이 없는 인플루엔자 감염 예방 또는 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 일 실시예에서, 본 발명은 인삼열매 다당체를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 일 관점에서, 본 발명은 부작용 없이 효과적으로 인플루엔자 감염을 예방 또는 억제하는 조성물을 제공할 수 있다.
- [15] 다른 관점에서, 본 발명은 인플루엔자 타겟 치료제로 작용하는 조성물을 제공할 수 있다.
- [16] 또 다른 관점에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스의 감염 메커니즘을 차단하여 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제할 수 있는 조성물을 제공할 수 있다.
- [17] 또 다른 관점에서, 본 발명은 뉴라미니데이즈 활성을 억제하여 인플루엔자 바이러스 감염을 억제하는 효과를 나타내는 조성물을 제공할 수 있다.
- [18] 또 다른 관점에서, 본 발명은 인플루엔자 바이러스 A형 및 B형 모두에 작용 가능한 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [19] 또 다른 관점에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 낮은 투여량에서 현저하게 우수한 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제 효과를 나타내는 조성물을 제공할 수 있다.
- [20] 또 다른 관점에서, 본 발명은 천연물로서 부작용이 없거나 낮으며, 내성이 없는 인플루엔자 감염 예방 또는 억제용 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 종래 인플루엔자 치료제의 인플루엔자 저해 메커니즘을 나타낸 모식도로, 헤마글루티닌(haemagglutinin) 저해 (a), mRNA 합성 저해 (b),

뉴라미니데이즈(neuraminidase) 저해 (c)를 나타낸다.

- [22] 도 2는 β -글루코실 야리브 시약에 의해 아라비노갈락탄을 검출하는 반응을 모식적으로 나타낸 것이다.
- [23] 도 3은 인삼열매 수용성 물질의 분획을 나타낸 그래프이다.
- [24] 도 4는 인삼열매 다당체의 크로마토그래피 결과를 나타낸 그래프이다.
- [25] 도 5는 표준물질, 인삼열매 다당체 및 홍삼근 다당체의 β -글루코실 야리브 시약 처리에 의한 침전환을 나타낸 사진이다.
- [26] 도 6은 표준물질, 인삼열매 다당체 및 홍삼근 다당체의 β -글루코실 야리브 시약 처리에 의한 침전환 면적을 비교하여 나타낸 그래프이다.
- [27] 도 7은 CVT 처리 군의 NWS 바이러스 접종 시 뉴라미니데이즈 활성 저해 효과를 확인한 그래프이다.
- [28] 도 8은 인삼열매 다당체 처리 군의 NWS 바이러스 접종 시 뉴라미니데이즈 활성 저해 효과를 확인한 그래프이다.
- [29] 도 9는 CVT 처리 군의 CA 바이러스 접종 시 뉴라미니데이즈 활성 저해 효과를 확인한 그래프이다.
- [30] 도 10은 인삼열매 다당체 처리 군의 CA 바이러스 접종 시 뉴라미니데이즈 활성 저해 효과를 확인한 그래프이다.
- [31] 도 11은 시험예 4의 동물모델에서의 인플루엔자 감염 실험 스케줄을 나타낸 모식도이다.
- [32] 도 12는 바이러스 접종 후 3일 후의 폐병변지표를 나타낸 그래프이다.
- [33] 도 13은 바이러스 접종 후 5일 후의 폐병변지표를 나타낸 그래프이다.
- [34] 도 14는 바이러스 접종 후 7일 후의 폐병변지표를 나타낸 그래프이다.
- [35] 도 15는 인삼열매 다당체를 투여한 경우 바이러스 접종 후 3일 후의 폐병변 조직 사진을 나타낸 것이다.
- [36] 도 16은 CVT 투여군, 양성 대조군 및 음성 대조군의 바이러스 접종 후 7일 후의 폐병변 조직 사진을 나타낸 것이다.
- [37] 도 17은 인삼열매 다당체를 투여한 경우 바이러스 접종 후 3일 후의 폐병변 조직 사진을 나타낸 것이다.
- [38] 도 18은 CVT 투여군, 양성 대조군 및 음성 대조군의 바이러스 접종 후 7일 후의 폐병변 조직 사진을 나타낸 것이다.
- [39] 도 19는 바이러스 접종 후 3일 후의 바이러스 감염수준을 확인한 RT-PCR 결과이다.
- [40] 도 20은 바이러스 접종 후 5일 후의 바이러스 감염수준을 확인한 RT-PCR 결과이다.
- [41] 도 21은 바이러스 접종 후 7일 후의 바이러스 감염수준을 확인한 RT-PCR 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [42] 이하, 첨부한 도면들을 참조하여, 본 출원의 실시예들을 보다 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 본 출원에 개시된 기술은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 단지, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 출원의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 도면에서 각 구성요소를 명확하게 표현하기 위하여 구성요소의 폭이나 두께 등의 크기를 다소 확대하여 나타내었다. 또한, 설명의 편의를 위하여 구성요소의 일부만을 도시하기도 하였으나, 당업자라면 구성요소의 나머지 부분에 대하여도 용이하게 파악할 수 있을 것이다. 또한, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 본 출원의 사상을 다양한 다른 형태로 구현할 수 있을 것이다.
- [43] 본 발명 일 실시예에 따르면, 인삼열매 다당체를 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제용 조성물을 제공할 수 있다. 인삼열매 다당체는 특정 성분 및 구조에 의하여 인플루엔자 바이러스의 활성 또는 감염 저해 효과를 나타내며, 구체적으로 뉴라미니데이즈 활성 저해 효과가 우수하다. 이에 따라 본 발명 실시예들에 따른 조성물은 현저하게 우수한 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제 효과를 나타낼 수 있다.
- [44] 인플루엔자 바이러스는 A, B, C형 등으로 분류되며, A형 및 B형이 일반적이며, 가장 유행하는 종류는 A형 인플루엔자 바이러스이다. A형 인플루엔자 바이러스는 Orthomyxoviridae에 속하는 외피막(envelope)을 가지는 single-standed negative-sense RNA 바이러스로, 표면항원인 16종의 헤마글루티닌(Haemaglutinine) (H1~H16)와 9종의 뉴라미니데이즈(Neuraminase) (N1~N9)에 의해서 아형이 결정된다.
- [45] 도 1은 종래 인플루엔자 치료제인 아만타딘(amantadine)과 리렌자(zanamivir, Relenza®), 타미플루(oseltamivir, Tamiflu®), 리바비린(ribavirin)의 인플루엔자 바이러스 생활 주기 저해 메커니즘을 나타낸다. 인플루엔자 바이러스 타게팅 치료제의 대표적 저해 메커니즘은 (a) 바이러스의 세포 침투에 관여하는 헤마글루티닌(haemagglutinin) 저해, (b) mRNA 합성 저해, 및 (c) 바이러스 방출을 위한 뉴라미니데이즈(neuraminidase) 저해를 들 수 있다.
- [46] 본 발명 일 실시예에 따른 인삼열매 다당체는 상기 뉴라미니데이즈 활성을 저해하여 감염된 세포로부터 인플루엔자 바이러스가 방출되지 못하므로 다른 세포를 감염시키는 것을 막을 수 있다.
- [47] 본 발명 일 실시예에 따른 인삼열매 다당체는 인플루엔자 바이러스의 증식을 저해하여 항바이러스 효과를 나타내며, 이에 따라 인플루엔자 바이러스 감염 예방, 억제 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [48] 상기 인플루엔자 바이러스는 상기 인삼열매 다당체의 뉴라미니데이즈 활성 억제 작용에 의해 감염이 예방 또는 억제되는 인플루엔자 바이러스로서 예를 들어 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스 또는 C형 인플루엔자

바이러스 중 하나 이상일 수 있다. 상기 인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 예를 들어 H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H6N1, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9, H9N2 또는 H10N7 중 하나 이상의 인플루엔자 바이러스일 수 있다.

- [49] 인삼열매 다당체는 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 지상부 중 열매 부위로부터 유래한 다당 성분일 수 있다. 일 예에서, 상기 인삼열매는 인삼의 열매 과육, 과피, 또는 과육 및 과피를 모두 포함하는 부위일 수 있다.
- [50] 상기 인삼열매 다당체는 인삼열매를 에탄올을 사용하여 추출한 후, 에탄올에 용해되지 않은 추출 비가용 성분으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 상기 에탄올 추출 비가용 성분을 물을 사용하여 추출하여 수용성 성분만을 분리해낼 수 있으며, 이 수용성 성분에 포함된 인삼열매 다당체를 유효성분으로 사용할 수 있다. 예를 들어 상기 수용성 성분을 농축하고, 에탄올로 침전시킨 후, 저분자량 성분을 제거하여 인삼열매 다당체를 얻을 수 있다.
- [51] 예를 들어, 종자를 제거한 인삼열매를 50-100% 에탄올을 사용하여 추출한 후, 추출 비가용 성분을 부피 3-10배의 물로 가온 추출하여 수용성 추출물을 얻는다. 수용성 추출물을 고형분이 10-50 중량%가 되도록 농축하고, 여기에 부피 2-5배의 에탄올을 사용하여 침전시킨 후, 분획분자량(Molecular Weight Cut off) 10,000-30,000 으로 분리하여 저분자량 성분을 제거하여 인삼열매 다당체를 얻을 수 있다. 상기 저분자량 성분의 제거는 한외여과막을 이용한 한외여과 등의 여과, 투석, 2-10배 부피의 50-100% 에탄올로 1-10회 반복 용해 처리 등에 의해 수행할 수 있다. 일 예에서, 상기 저분자량 성분 제거 후 건조를 수행할 수 있다. 상기 건조는 동결, 열풍, 분무 또는 진공 처리 등에 의할 수 있다.
- [52] 일 예에서, 상기 인삼열매의 수용성 성분을 물 추출하기 전에 효소 처리를 더 포함할 수 있다. 상기 효소는 식품에 사용되는 효소라면 제한없이 사용 가능하나, 예를 들어 아밀라아제, 프로테아제, 펙티나아제, 리파아제, 셀룰라아제, 자일라아제, 베타-글루카나아제, 또는 풀룰라나아제 중에서 선택될 수 있다. 상기 효소 처리는 예를 들어 40~60°C에서 10~60분간 효소와 반응시킬 수 있다.
- [53] 상기 인삼열매 다당체는 아라비노즈, 갈락토즈, 갈락투론산 및 글루쿠론산을 포함할 수 있다.
- [54] 일 예에서, 상기 다당체 총 중량에 대하여 갈락투론산 및 글루쿠론산을 합계 함량으로 0.1 중량% 이상, 0.2 중량% 이상, 0.3 중량% 이상, 0.4 중량% 이상, 0.5 중량% 이상, 0.6 중량% 이상, 0.7 중량% 이상, 0.8 중량% 이상, 0.9 중량% 이상, 1 중량% 이상, 2 중량% 이상, 3 중량% 이상, 4 중량% 이상, 5 중량% 이상, 6 중량% 이상, 7 중량% 이상, 8 중량% 이상, 9 중량% 이상, 또는 10 중량% 이상이고, 25 중량% 이하, 24 중량% 이하, 23 중량% 이하, 22 중량% 이하, 21 중량% 이하, 20 중량% 이하, 19 중량% 이하, 18 중량% 이하, 17 중량% 이하, 16 중량% 이하, 15 중량% 이하, 14 중량% 이하, 13 중량% 이하, 12 중량% 이하, 11 중량% 이하, 10

중량% 이하, 9 중량% 이하, 8 중량% 이하, 7 중량% 이하, 6 중량% 이하, 5 중량% 이하, 또는 4 중량% 이하로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 함량은 0.1 중량% 내지 25 중량%, 또는 0.5 중량% 내지 20 중량%일 수 있다.

- [55] 상기 갈락투론산은 다당체 총 중량에 대하여 0.1 중량% 이상, 0.2 중량% 이상, 0.3 중량% 이상, 0.4 중량% 이상, 0.5 중량% 이상, 0.6 중량% 이상, 0.7 중량% 이상, 0.8 중량% 이상, 0.9 중량% 이상, 1 중량% 이상, 2 중량% 이상, 3 중량% 이상, 4 중량% 이상, 5 중량% 이상, 6 중량% 이상, 7 중량% 이상, 8 중량% 이상, 9 중량% 이상, 또는 10 중량% 이상이고, 20 중량% 이하, 19 중량% 이하, 18 중량% 이하, 17 중량% 이하, 16 중량% 이하, 15 중량% 이하, 14 중량% 이하, 13 중량% 이하, 12 중량% 이하, 11 중량% 이하, 10 중량% 이하, 9 중량% 이하, 8 중량% 이하, 7 중량% 이하, 6 중량% 이하, 5 중량% 이하, 또는 4 중량% 이하로 포함할 수 있다. 상기 함량은 예를 들어 0.1 중량% 내지 20 중량%, 0.1 중량% 내지 15 중량%, 1 중량% 내지 5 중량%, 5 중량% 내지 15 중량%, 또는 0.5 중량% 내지 5 중량%일 수 있다.
- [56] 상기 글루쿠론산은 다당체 총 중량에 대하여 0.1 중량% 이상, 0.2 중량% 이상, 0.3 중량% 이상, 0.4 중량% 이상, 0.5 중량% 이상, 0.6 중량% 이상, 0.7 중량% 이상, 0.8 중량% 이상, 0.9 중량% 이상, 1 중량% 이상, 2 중량% 이상, 3 중량% 이상, 4 중량% 이상, 5 중량% 이상, 6 중량% 이상, 또는 7 중량% 이상이고, 10 중량% 이하, 9 중량% 이하, 8 중량% 이하, 7 중량% 이하, 6 중량% 이하, 5 중량% 이하, 또는 4 중량% 이하로 포함할 수 있다. 상기 함량은 예를 들어 0.1 중량% 내지 10 중량%, 0.5 중량% 내지 5 중량%, 또는 0.1 중량% 내지 5 중량%일 수 있다.
- [57] 일 예에서, 상기 아라비노즈는 다당체 총 중량에 대하여 2 중량% 내지 30 중량%로 포함할 수 있다.
- [58] 일 예에서, 상기 갈락토즈는 다당체 총 중량에 대하여 5 중량% 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.
- [59] 상기 인삼열매 다당체는 아라비노갈락탄(arabinogalactan) 구조를 높은 비율로 포함한다. 아라비노갈락탄 구조의 검출은 β -글루코실 야리브 시약(β -glucosyl Yariv reagent)을 이용할 수 있다. 도 2에 β -글루코실 야리브 시약에 의해 아라비노갈락탄을 검출하는 반응을 모식적으로 나타낸다. β -글루코실 야리브 시약은 1,3,5-tri-(β -글루코피라노실-옥시페닐라조)-2,4,6-트리하이드록시벤젠(4-1,3,5-tri-(4- β -glucopyranosyl-oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene)로, 아라비노갈락탄 중 II형의 아라비노- β -3,6-갈락탄(arabino- β ,6-galactan)과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성한다. β -글루코실 야리브 시약을 처리하여 생성되는 적색 침전환의 면적과 아라비노갈락탄 구조의 함유 농도는 농도의존적으로 비례한다. 상기 인삼열매 다당체는 동일농도의 표준 아라비노- β -3,6-갈락탄(arabino- β ,6-galactan)에서 생성되는 침전환 크기를 100%로 할 때 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 또는 80% 이상이고,

- 90% 이하, 80% 이하, 70% 이하 또는 60% 이하 크기의 침전환 면적을 나타낼 수 있다. 예를 들어 상기 침전환 면적은 50% 내지 90%, 50% 내지 80% 일 수 있다.
- [60] 상기 인삼열매 다당체의 중량평균분자량은 10 kDa 이상일 수 있다. 상기 인삼열매 다당체는 분자량 70 kDa 내지 80 kDa에서 주 피크(peak)를 가질 수 있다.
- [61] 상기 인삼열매 다당체는 다양한 다당 성분의 총합체로서, 포함되는 성분들의 조합에 의한 상승효과를 통하여 현저한 인플루엔자 바이러스의 활성 또는 감염 저해 효과를 나타내며, 구체적으로 뉴라미디네이즈 활성 저해 효과가 우수하다.
- [62] 본 발명 실시예들에 따른 조성물은 상기 유효성분을 포함하는 다양한 형태의 식품 첨가제 또는 기능성 식품으로 제공될 수 있다. 상기 유효성분을 포함하는 발효유, 치즈, 요구르트, 주스, 생균제제 및 건강식품 등으로 가공될 수 있으며, 그 외 다양한 식품 첨가제의 형태로 사용될 수 있다.
- [63] 본 발명의 실시예들에 따른 조성물은 건강 식품용 조성물일 수 있다.
- [64] 본 발명의 실시예에 따른 건강식품용 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.0001중량% 내지 99중량%, 예를 들어 0.01 중량% 내지 60중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [65] 본 실시예에 따른 건강식품용 조성물은 유효성분 기준 하루에 체중 1 kg당 0.001~500 mg, 예를 들어 0.005~100 mg, 0.01~50mg, 0.01~10mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 제공될 수 있다. 상기 조성물은 유효성분을 상기 와 같은 소량 사용으로도 상술한 효과를 유의하게 나타낼 수 있다.
- [66] 구체예에서, 상기 건강 식품용 조성물은 환제, 캡슐제, 정제, 과립제, 카라멜제 또는 드링크제 등으로 제형화할 수 있다. 다른 구체예에서, 액제, 분말, 과립, 정제 또는 티백 등의 형태로 가공될 수도 있다.
- [67] 상기 조성물은 단순 음용, 주사 투여, 스프레이 방식 또는 스퀴즈 방식 등의 다양한 방법으로 투여될 수 있다.
- [68] 상기 조성물은 본 발명의 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 함유할 수 있다. 예를 들어, 물성 개선을 위하여 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 무기염류, 유화제 및 합성 고분자 물질 등의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 그 외에도, 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당 및 해초 엑기스 등의 보조 성분을 더 포함할 수도 있다. 상기 성분들은 제형 또는 사용 목적에 따라서 당업자가 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 그 첨가량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 성분들의 첨가량은, 조성물 전체 중량을 기준으로, 0.01중량% 내지 5 중량%, 예를 들어 0.01중량% 내지 3중량% 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69] 본 발명 일 실시예에서, 상기 조성물은 약학 조성물일 수 있다.
- [70] 본 실시예에서, 상기 조성물은 인삼열매 다당체를 포함하여 인플루엔자 바이러스 감염을 예방, 감염 감소 또는 인플루엔자를 치료할 수 있는 조성물일

수 있다.

- [71] 일예에서, 상기 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물일 수 있다. 상기 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 독감, 인후염, 기관지염 및 폐렴 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [72] 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 연질 또는 경질 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [73] 본 발명 실시예들에 따른 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용되는 것이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 불화수소산, 브롬화수소산, 포름산 아세트산, 타르타르산, 젖산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 톨루엔술폰산, 나프탈렌술폰산 등을 사용할 수 있다.
- [74] 본 발명 실시예들에 따른 조성물은 목적하는 바에 따라 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있으며, 하루에 체중 1 kg당 0.001~500 mg, 예를 들어 0.005~100 mg, 0.01~50mg, 0.01~10mg의 양으로 투여되도록 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여 시간, 투여 방법, 배설률, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [75] 본 발명 실시예들에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 연질 또는 경질 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 연고, 크림 등의 피부 외용제, 좌제, 주사제 및 멸균 주사용액 등을 비롯하여 약제학적 제제에 적합한 어떠한 형태로든 제제화하여 사용될 수 있다.
- [76] 본 발명 다른 실시예에 따르면, 상기 인삼열매 다당체의 인플루엔자 바이러스 감염 예방 또는 억제 용도를 제공할 수 있다. 상기 용도는 인플루엔자 감염 감소

용도 또는 인플루엔자를 치료하는 용도, 또는 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환의 예방 용도 또는 치료용도를 포함할 수 있다. 인삼열매 다당체와 효과, 투여 형태 등에 관하여는 상술한 바와 같으므로 기재를 생략한다.

- [77] 본 발명 또 다른 실시예에 따르면, 상기 인삼열매 다당체를 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방용 또는 억제용 조성물을 제조하기 위한 인삼열매 다당체의 용도일 수 있다. 상기 용도는 인플루엔자 감염 감소 용도 또는 인플루엔자를 치료하는 용도, 또는 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환의 예방 용도 또는 치료용도를 포함할 수 있다. 인삼열매 다당체와 효과, 투여 형태 등에 관하여는 상술한 바와 같으므로 기재를 생략한다.
- [78] 본 발명 또 다른 실시예에 따르면, 상기 인삼열매 다당체를 대상에 투여하는 것을 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 방법, 인플루엔자 바이러스 억제 방법, 인플루엔자 감염 감소 방법, 또는 인플루엔자 치료 방법을 제공할 수 있다. 상기 방법은 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환의 예방 방법 또는 치료 방법을 포함할 수 있다. 상기 방법은 인삼열매 다당체를 포함하는 상술한 바와 같은 조성물을 대상에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 인삼열매 다당체와 효과, 투여 형태 등에 관하여는 상술한 바와 같으므로 기재를 생략한다.
- [79] 일 예에서, 상기 방법은 인플루엔자 바이러스 억제, 인플루엔자 감염 감소, 또는 인플루엔자 치료를 필요로 하는 대상에 인삼열매 다당체를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 투여는 인삼열매 다당체의 유효량을 대상에 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[80]

발명의 실시를 위한 형태

- [81] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[82]

[83] [제조예 1] 인삼열매 다당체의 제조

- [84] 종자를 제거한 인삼열매를 10배 부피의 90% 에탄올로 추출하여 수용성 성분을 침전시키고 상등액을 제거한다. 침전된 추출 비가용 성분을 부피 20배의 물로 90°C 5시간 가온 추출한다. 추출물을 고형분이 30중량%가 되도록 농축하고, 농축물의 부피 2배의 90% 에탄올을 가하여 침전시킨다. 침전된 수용성 성분의 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 결과를 도 3에 나타낸다. 침전물을 한외여과를 통해 분획분자량(Molecular Weight Cut off) 20,000으로 분리하여 저분자량 성분을 제거하고 동결 건조하여 70 내지 80kDa의 분자량을 주 피크(peak)로 하는 분자량 10kDa 이상의 인삼열매 다당체를 얻었다. 제조된 인삼열매 다당체의 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 결과는 도 4에

나타낸다.

- [85]
- [86] [제조예 2] 홍삼 다당체의 제조
- [87] 인삼열매 대신 홍삼근을 사용한 것을 제외하고는 상기 제조예 1과 동일한 방법으로 홍삼 다당체를 제조하였다.
- [88]
- [89] [시험예 1] 아라비노갈락탄의 검출
- [90] 아라비노- β -3,6-갈락탄의 존재를 확인하기 위한 β -글루코실 야리브 시약(β -glucosyl Yariv reagent; Biosupplies, Parkville, Australia)와의 반응성 검토는 Holst와 Clarke의 방법(Van Holst GJ, Clarke AE. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. Anal. Chem. 148: 446-450 (1985))에 따라 라디칼 겔 확산법(Single radical gel diffusion)으로 측정하였다.
- [91] β -글루코실 야리브 시약 10 μ g/ml를 함유한 0.15M NaCl 아가로즈 평판을 조제하고, 직경 2.5mm의 well을 만들어, 농도별로 희석한 표준 물질인 gum Arabic과 시료 5 μ g을 함유한 용액을 well에 각각 주입하였다. 상기 평판을 습윤 상태에서 15시간 정치시켜 반응시키고, 생성된 붉은색 침전환을 관찰하여 아라비노- β -3,6-갈락탄의 존재 유무를 관찰하였고, 시료와 β -글루코실 야리브 시약과의 반응성은 생성된 침전환의 넓이를 계산하여 상호 비교하였다. 시료로는 도 5에 나타난 바와 같이 표준물질 62.5, 125, 250, 500 및 1000 μ g/ml, 제조예 1 및 제조예 2의 다당체를 각각 100, 500 및 1000 μ g/ml의 농도로 사용하였다.
- [92] 생성된 붉은색 침전환의 면적을 측정하여 아라비노- β -3,6-갈락탄의 상대 함량을 도 6에 나타내었다. 도 6의 결과는 표준물질 1000 μ g/ml 농도 처리군에 대하여 각 시료 1000 μ g/ml 처리군의 면적을 비교한 것이다.
- [93] 도 6의 결과에서, 인삼열매 다당체는 홍삼 다당체 대비 2배 이상의 고함량으로 아라비노갈락탄 구조를 포함하는 것을 확인할 수 있다.
- [94]
- [95] [시험예 2] 인삼열매 다당체의 인플루엔자 바이러스 증식 억제 평가
- [96] 개의 신장세포주인 MDCK(Madin-Darby canine kidney, ATCC: CCL-34)를 이용하여 인삼열매 다당체의 항바이러스 효과를 확인하였다.
- [97] 96-well 마이크로플레이트(microplate)에 MDCK 세포를 각 well 당 1×10^5 /well이 되도록 넣고, EMEM 배지(penicillin 100 units, streptomycin 100 μ g, 10% FBS)에서 배양한다. MDCK 세포가 단층(monolayer)이 되면 항생제만 포함하는 EMEM 배지로 2회 세척한다. H1N1균주(Influenza A virus subtype/H1N1/pdm)를 100TCID₅₀이 되도록 희석하여 EP 튜브에 담아 둔다. 여기에 시료로서 상기 제조예 1의 인삼열매 다당체(APGP)를 농도별로 희석하여 각 튜브에 넣은 후 4°C에서 1시간 동안 반응 시킨다. 양성 대조군

시료로 미국 인삼 (*Panax quinquefolium*) 추출물인 CVT-E002(COLD-FX®, 이하 “CVT”)를 사용하였다. 1시간 후 상기 반응액을 미리 세척한 MDCK 세포에 한 농도 당 3 well씩 각각 접종하여 35°C에서 1시간 동안 배양한다. 1시간 후 플레이트의 배지를 모두 제거하고 PBS로 1회 세척 후, 항생제와 10 μ g/mL 트립신이 첨가된 EMEM배지를 각 well에 100 μ l씩 분할하고 37°C에서 48-72시간 배양한다.

- [98] H1N1 균주 감염하고 시료를 무처리한 대조군에서 완전히 세포병변효과(Cytopathic effect, CPE)가 나타날 때까지 48~72시간 배양하고, 도립현미경으로 매일 세포 상태를 관찰한다. 세포병변효과는 감염에 의한 세포 라운딩(rounding), 탈리(detachment) 후 사멸(death)을 포함한다. 배양48~72시간 후 세포 생존률을 알아보기 위하여 Cell Counting kit-8(Dojin, Kumanoto, Japan, tetrazolium salt WST-8)을 각 well당 10 μ l 씩 넣고 35°C에서 2시간 반응시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [99] 인삼열매 다당체의 경우 0.78125-3.125 mg/ml 범위 내에서 인플루엔자 바이러스를 처리 한 경우 MDCK 세포의 세포병변효과(Cytopathic effect, CPE)가 억제되는 것을 확인 할 수 있었다.

[100] [표1]

시료	CC ₅₀ (mg/ml)	EC ₅₀ (mg/ml)	SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)
Cold-Fx (CVT)	7.50 $\pm$ 1.91	N/A	N/A
APGP	4.69 $\pm$ 1.10	0.59 $\pm$ 0.36	7.95

- [101] 상기 표 1은 시료 별 SI 지수(Selectivity index)를 나타낸다. CC₅₀ (50% cytotoxic concentration)값은 시료가 50% 세포 사멸을 유도하는 농도로서, 수치가 클수록 안전한 물질에 해당하고, EC₅₀ (50% inhibitory concentration)값은 바이러스가 50% 억제되는 농도로서, 수치가 작을수록 바이러스를 억제하는 효능이 우수한 것을 나타낸다.
- [102] SI 지수가 클수록 바이러스 증식 억제 효과가 우수한 것이며, 대조군인 CVT의 경우 항바이러스 효과가 전혀 나타나지 않는 반면 인삼열매 다당체의 경우 7.95의 높은 수치를 나타낸다. 이러한 수치는 생물학적으로 알려진 단독 물질인 EGCG (5.6), 레스베라트롤 (2) (Kim, Y.; Narayanan, S.; Chang, K.O. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antivir. Res.* 2010, 88, 227-235.)의 경우보다도 현저히 높은 값으로, 우수한 인플루엔자 바이러스 억제 효과를 나타내는 점을 알 수 있다.
- [103]
- [104] [시험예 3] 인삼열매 다당체의 뉴라미니데이즈 억제 분석
- [105] 인플루엔자 바이러스와 같이 바이러스의 증식에 바이러스 표면의 뉴라미니데이즈(NA) 단백질을 이용하는 바이러스들에 대한 항바이러스

활성을 측정하는 한 가지의 지표로써 사용된다.

뉴라미니데이즈(neuraminidase) 활성억제시험은 WHO (Standard operating procedure)에서 추천하는 방법에 준거하여 실시하였다.

- [106] 2종의 포유류 유래 H1N1 바이러스 균주 NWS (A/NWS/33) 및 CA (A/California/07/2009) 를 사용하여 뉴라미니데이즈 억제 IC50으로 효소 억제 활성을 분석하였다. 상기 바이러스 균주는 EMEM(Eagle's minimum essential medium) 배지 내에서 MDCK 세포주에 감염시킨 후 그 세포에서 바이러스를 활성화 시킨 바이러스 배양액을 사용하였다. 시료로서 제조예 1의 인삼열매 다당체(APGP)를 사용하고, 양성 대조군으로 미국 인삼 (*Panax quinquefolium*) 추출물인 CVT-E002(COLD-FX®, 이하 “CVT”)를 사용하여 시료 농도별 뉴라미니데이즈 활성 억제도를 분석하였다.
- [107] 농도별 시료액(APGP, CVT) 10 μ l와 바이러스 배양액 50 μ l를 실온에서 45분간 반응시킨 후, 200 μ M MUNANA 기질(2'-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid,) 50 μ l를 첨가한 후 1시간 반응시킨 다음, 83% 에탄올에 0.14 M NaOH이 녹여진 정지액 100 μ l을 첨가하여 반응을 종료시키고, spectrofluorophotometer(ABI/Perkin Elmer Biosystems)로 Ex. 360 nm/Em. 440 nm에서 fluorescence를 측정하여 효소활성억제율을 산출하였다. 시료를 첨가하지 않은 무처리 대조군의 fluorescence 값을 100%로 하여 억제율(%)를 도 7 내지 도 10에 나타낸다.
- [108] 도 7 내지 도 10의 결과에서, 인삼열매 다당체는 뉴라미니데이즈 활성을 농도의존적으로 억제하며, 인삼열매 다당체는 IC50 값이 양성 대조군인 CVT 대비 약 1/4~1/5로 나타나 현저하게 우수한 뉴라미니데이즈 활성 억제 효과를 가짐을 확인할 수 있다.
- [109]
- [110] [시험예 4] 동물 모델에서 인플루엔자 바이러스 감염 실험
- [111] 7주령 마우스(SPF BALB/c mouse)에 마우스용 зонде(zonde)를 사용하여 시료인 인삼열매 추출물(APGP) 0.5mg/kg, 5mg/kg, 50mg/kg, 양성 대조군 시료인 미국 인삼 (*Panax quinquefolium*) 추출물인 CVT-E002(COLD-FX®, 이하 “CVT”) 200mg/kg를 경구 투여하였다. 시료는 바이러스 접종 14일 전에 투여하고, 바이러스 접종 전 까지 하루에 1회씩 투여하였다. 인플루엔자 바이러스 접종은 에테르를 이용하여 마취한 뒤에 포유류인플루엔자 바이러스(Influenza A virus subtype/H1N1/NWS strain)를 LD0 또는 LD70의 용량으로 비강을 통해 접종 실시하였다. 도 11에 인플루엔자 바이러스 감염 실험 스케줄을 모식도로 나타낸다. 무처리 대조군(Negative control)은 시료 대신 PBS를 투여하고 바이러스 접종 없이 진행한 것이며, 바이러스 대조군(Virus control)은 시료 대신 PBS 투여 및 바이러스 접종을 하지 않은 실험군이다.
- [112] 상기와 같이 감염시킨 마우스를 이하의 바이러스 접종 시점으로부터 3일(3dpi),

5일(5dpi) 및 7일(7dpi) 시점에서의 조직 병변 및 바이러스 재분리율 실험에 제공하였다.

[113]

[114] [시험예 5] 동물모델에서의 조직병리학적 병변분석

[115] 상기 시험예 4에서와 같이 인플루엔자 바이러스를 접종시킨 마우스를 바이러스 접종 시점으로부터 각각 3일(3dpi), 5일(5dpi) 및 7일(7dpi) 시점에서 희생시키고, 폐 조직을 분리하여 H&E 염색을 통해 조직병리학적 병변 분석에 사용하였다. 도 15 내지 도 18은 폐 병변 조직 사진을 나타낸다. 병변 수를 카운트하여 수치화하였고, 이를 무처리 대조군(Negative control)을 100%로 하여 산출한 폐병변 지표(Lung index)를 도 12 내지 도 14에 나타낸다.

[116] 도 12 내지 도 14의 결과에서, 인삼열매 다당체의 경구 투여시 폐병변지표가 완화되는 것을 확인할 수 있다. 특히 양성 대조군인 CVT의 경우 인삼열매 다당체 투여량의 40배에 달하는 양을 처리하여야 인삼열매 다당체와 동등한 수준의 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

[117]

[118] [시험예 6] 바이러스 재분리율 분석

[119] 상기 시험예 4에서와 같이 인플루엔자 바이러스를 접종시킨 마우스를 바이러스 접종 시점으로부터 각각 3일(3dpi), 5일(5dpi) 및 7일(7dpi) 시점에서 희생시키고, 분리한 폐 조직에서 RNA를 추출한다. 추출된 RNA로 cDNA 합성 Kit를 이용하여 cDNA 라이브러리 구축 후, quantitative RT-PCR을 수행하여 재분리된 바이러스 copy 수를 산출하고, 바이러스 감염 수준을 확인하였다. 결과를 도 19 내지 도 21에 결과를 나타낸다.

[120] 도 19 내지 도 21의 결과에서 인삼열매 다당체의 투여 시 바이러스 감염 수준이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 특히, 도 19의 인삼열매 다당체 5, 50mg/kg/day 투여군의 경우에 바이러스 접종으로부터 3일까지 바이러스 감염이 전혀 발생하지 않는 것이 나타나며, 이로부터 인삼열매 다당체가 우수한 인플루엔자 바이러스 감염 예방 효과를 나타냄을 확인할 수 있다. 나아가, 양성 대조군인 CVT의 경우 인삼열매 다당체 투여량의 40배에 달하는 양을 처리하여야 인삼열매 다당체와 동등한 수준의 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.

[121]