

명세서

발명의 명칭: 잔탄검 또는 후코이단

포함하는 항인플루엔자 바이러스용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 잔탄검 또는 후코이단을 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 대한 항바이러스 조성물, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 이를 이용한 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인플루엔자 바이러스는 오르쏘믹바이러스에 속하며 계절마다 수 천에서 수만 명의 생명을 앗아가는 대표적인 병원성 바이러스이다. 20세기 이후 인플루엔자는 중을 넘나들면서 변종을 일으키며 유행성 감기를 주도하고 이미 밝혀진 약제를 무의미하게 만들 정도로 돌연변이율이 높은 바이러스이다. 유행성 독감이라고 흔히 일컬어지는 이 질병은 일반적으로 오한, 발열, 인후염, 근육통, 기침, 무력감과 불쾌감을 유발하는데 이런 비특이적인 증상은 일반적인 감기에 비해 그 정도가 심할 뿐 생명에 위협을 줄 정도로 치명적이지 않으나 폐렴이나 라이증후군을 동반할 시 치명적인 합병증을 유발할 수 있다. 보통 감염자의 기침이나 가래, 재채기를 매개로 호흡기 감염이 주로 일어나는데 다른 동물(특히 조류)로부터 인간에게 감염이 될 때 변종이 많이 발생한다. 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 바이러스 A, 인플루엔자 바이러스 B, 인플루엔자 바이러스 C의 세 가지 형이 있다. 이 중 동물 중 간 전염을 통해 대유행을 야기시켰던, 2009년에 유행했던 인플루엔자 독감, 일명 신종플루는 인플루엔자 A H1N1 타입으로 멕시코에서 처음 발병해 여러 변종이 생겨남으로써 여러 국가로 번져 나갔고 국제보건기구(WHO)는 이를 '세계적 유행'으로 규정한 바 있다. 보통 독감의 경우 정제된 불활성화 균주를 감기 유행 시기 이전에 주입해 주는 방식으로 예방을 통한 방어적 치료가 일반적이거나 독감 유행 시기에 이미 증상이 발생한 환자의 경우 예방이 불가하므로 치료의 방식으로 증상을 완화시켜야만 한다. 이렇게 속수무책으로 퍼져 나가던 신종플루의 확산을 멈추게 한 '타미플루'의 경우 효과적인 면에서는 탁월하지만, 심심치 않게 섭취 후 환각 증세 발생과 같은 부작용 사례가 언론을 통해 종종 보도되고 있다.
- [3] 종래 인플루엔자의 치료에 사용되는 약물로는 오셀타미비르(상품명: 타미플루), 자나미비르(상품명: 릴렌자), 페라미비르(Peramivir), 아만타딘(Amantadine) 등이 있다. 타미플루로 불리는 오셀타미비르가 현재 H1N1 인플루엔자 A형의 치료에 주로 사용되고 있다. 타미플루는 세계에서 유일하게 독점 생산하는 조류 인플루엔자(AI) 치료제이다. 바이러스를 증식시키는 효소

기능을 막아 치료 효과를 내는 항바이러스제이며, 증상이 발생한 뒤 48시간 안에 복용해야 효과가 크다. 주요 치료 효과는 독감 증세의 악화 감소, 기관지염이나 폐렴 등 2차 합병증 발생 감소, 독감 잠복 기간의 감소 등이다. 이는 인플루엔자 A와 B의 치료제로도 쓰인다. 자나미비르는 자나미비어(Zanamivir)로도 불리며 상품명은 릴렌자(Relenza)이다. 이는 뉴라미니다아제 저해제로 작용하여 인플루엔자 A 및 B형의 치료에 사용되고 있다. 그러나 오셀타미르는 심각한 구토증세가 나타나는 부작용이 있으며, 자나미비르는 항바이러스 효과는 높지만, 생체 이용률이 낮고 신장에서의 배출이 빠르다는 단점이 있다.

- [4] 이러한 배경 하에서, 감염 억제 및 치료 효과가 우수한 항바이러스제의 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 잔탄검(Xanthan gum) 또는 후코이단(Fucoidan)을 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 대한 항바이러스 조성물을 제공하는 것이다.
- [6] 본 발명의 다른 목적은 잔탄검 또는 후코이단을 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 의한 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 잔탄검 또는 후코이단을 유효성분으로 포함하는 조성물의 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 잔탄검 또는 후코이단을 유효성분으로 포함하는 조성물의 인플루엔자 바이러스 감염 치료를 위한 의약품의 제조를 위한 용도를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 잔탄검(Xanthan gum) 또는 후코이단(Fucoidan)을 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 대한 항바이러스 조성물에 관한 것이다.
- [11] 본 발명에서, 상기 "잔탄검(Xanthan gum)"은 천연물 유래 다당체로 독성이 낮으며 크산토모나스 속(Xanthomonas) 박테리아인 콩 불마름병균(Xanthomonas campestris)의 발효에 의해 생산되는 체외분비 다당류이다. 잔탄검 수용액은 낮은 농도에서 높은 점도를 가지며 넓은 온도범위(10-70 °C)와 pH(pH 6-9), 전해진 농도에 대해서도 점성이 거의 일정하게 유지되는 특성이 있다. 이러한 유변학적 특성으로 인해 잔탄검은 식품, 제약 등의 산업에서 현탁액의 안정제, 점증제, 교화제 등으로 사용된다.

- [12] 본 발명에서, 상기 "후코이단(Fucoidan)"은 수용성 식이섬유의 일종으로 미역, 다시마 등의 갈조류에 함유되어 있는 다당류이다. 갈조류의 채취시기 및 종에 따라 후코이단의 평균 분자량이 100,000-2,000,000 Da으로 다양하며, 후코이단의 생리활성에 중요한 영향을 미치는 후코오즈(fucose) 함량 및 황산기 함량도 차이가 있다.
- [13] 본 발명에서, 상기 "인플루엔자 바이러스(Influenza virus)"는 표면에 당단백질인 적혈구 응집소 즉, 헤마글루티닌(hemaglutinine, HA)과 뉴라미니데이스(neuraminidase, NA) 등 2개의 표면 항원을 지니고 있고 내부에는 분절된 8개의 RNA가 존재한다. HA는 숙주세포의 표면에 있는 시알산 잔기와 결합해 바이러스를 숙주세포에 부착시켜 침투할 수 있게 만들어준다. NA는 감염된 숙주 세포에서 증식을 마친 바이러스가 세포 표면의 이당류 부분과 뉴라민산(neuraminic acid) 잔기 사이의 알파-케토시딕 결합(α -ketosidic bond)을 끊어 바이러스가 또 다른 숙주세포로 증식하도록 유도하는 역할을 한다. 체내 바이러스 방어 기제는 HA를 인식해 숙주 세포 결합을 방해하거나 NA에 결합해 감염된 숙주 세포 속 바이러스가 근접 세포로의 증식을 억제하는 방식으로 작용한다. 그러나 HA 16종과 NA 9종의 다양한 조합을 통해 바이러스는 수많은 경우의 돌연변이를 발생시켜 방어 기제에 대한 내성을 지닌다.
- [14] 구체적으로, 상기 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A 바이러스인 것일 수 있으며, 상기 인플루엔자 A 바이러스는 H1N1형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [15] 본 발명에서, 상기 "항바이러스"는 바이러스의 다양한 아형 및 변이형 바이러스 입자가 숙주세포에 유입되는 것을 억제하거나 감염 후 숙주세포 내에서 바이러스 입자가 복제 또는 증식하는 것을 억제하는 모든 기작 및 활성을 말한다.
- [16] 구체적으로, 상기 조성물은 인플루엔자 바이러스로 인한 엔데믹(endemic), 프리-판데믹(prepandemic) 또는 판데믹(pandemic, 전세계 대유행)에 대한 면역조치용으로 사용될 수 있다.
- [17] 상기 면역조치(immunization)는 감염 질환의 예방을 위하여 면역을 유도하는 것으로서, 생체 내 면역력을 강화시키거나 획득하는 모든 방식을 포함한다.
- [18] 본 발명의 다른 일 측면은 잔탄검 또는 후코이단을 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스에 의한 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [19] 본 발명에서, 상기 "인플루엔자 바이러스 감염"은 인플루엔자 바이러스 중 하나에 의해 폐 및/또는 기도가 감염된 것이다. 호흡기 질환을 동반하며, 염증 반응이 심화되면 조직 손상까지 이어질 수 있다.
- [20] 본 발명 일 실시예에서는 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 염증 및 조직 손상에 대해 잔탄검 및/또는 후코이단 투여시 완화 효과를 나타냄을 확인하였다. 구체적으로, 바이러스 감염 전/후 투여시 인플루엔자 바이러스 감염 증상 중

하나인 체중 감소가 완화되었으며(표 3, 표 8, 도 1 및 도 5), 염증세포의 침윤이 감소되었고(표 5, 표 9, 도 2 및 도 6), 폐 및 비강에서 바이러스 역가 역시 감소된 것을 확인하였다(폐: 표 10, 표 11, 도 3 및 도 7, 비강: 표 12, 표 13, 도 3 및 도 8).

- [21] 본 발명의 조성물은 예방 또는 치료목적으로 투여시 모두 인플루엔자 바이러스에 대한 억제 효과를 나타내면서도 염증을 완화하고 폐 조직내 손상을 감소시킬 수 있다. 특히, 독성이 강한 인플루엔자 바이러스의 경우, 항염증 작용이 실패할 경우 대량의 염증세포가 폐로 침투하면서 과다한 염증성 사이토카인이 분비되면서 사이토카인 폭풍이 일어날 수 있는 바, 상기와 같은 본 발명의 약학적 조성물은 이에 대해 효과적으로 대응할 수 있다.
- [22] 또한, 상기 본 발명의 약학적 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 유발될 수 있는 질환에 대한 예방 또는 치료 용도로 적용될 수 있다. 예를 들면, 상기 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 유발될 수 있는 질환은 감기, 독감, 기침, 재채기, 콧물, 근육통, 인후염, 폐혈증, 폐렴, 비강 폐색, 후두염, 목의 통증, 원소리, 두통, 부기강에 대한 통증, 비염, 인두염, 기관지염, 천식, 발열, 호흡 곤란, 전신 무기력 및 오한으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [23] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 조성물이 인플루엔자 바이러스에 의한 감염의 발생을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [24] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 조성물이 인플루엔자 바이러스에 의한 감염의 증상이 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [25] 구체적으로, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여 제제인 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로 비내 또는 비강 내 투여되는 것일 수 있다. 상기 비내 또는 비강내 투여는 스프레이, 에어로솔 또는 흡입(inhalation) 형태로 투여될 수 있다.
- [26] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 적용될 수 있으며, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 성별, 연령, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [27] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 적용될 수 있으며, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 성별, 연령, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [28] 본 발명의 다른 측면은 상기 약학적 조성물을 포함하는 인플루엔자 바이러스의 예방 또는 치료용 키트에 관한 것이다.

- [29] 본 발명의 키트는 그 종류가 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 형태의 키트를 사용할 수 있다. 본 발명의 키트는 잔탄검 또는 후코이단이 개별 용기에 담긴 형태, 또는 다른 약제 또는 부형제와 하나 이상의 구획으로 나누어진 한 개의 용기 내에 담긴 형태로 포장되어 있을 수 있으며, 각 활성 성분은 각각 1회 투여 용량의 단위 용량 형태로 포장되어 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [30] 상기 키트 내의 잔탄검 또는 후코이단은 투여 대상 개체의 건강 상태 등에 따라 적절한 시기에 투여될 수 있으며, 필요에 따라 추가적인 다른 약제와도 동시, 순차적, 또는 역순으로 병용투여 될 수 있다.
- [31] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 바이러스 감염의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.
- [32] 본 발명의 용어 "개체"는 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 증상이 호전될 수 있는 인플루엔자 바이러스 감염을 가진 동물 또는 인간을 포함한다. 본 발명에 따른 치료용 조성물을 개체에게 투여함으로써, 인플루엔자 바이러스 감염을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.
- [33] 본 발명의 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 치료용 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [34] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [35] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 약학적 조성물의 인플루엔자 바이러스 감염의 치료 용도에 관한 것이다.
- [36] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 항바이러스 조성물의 인플루엔자 바이러스 감염 치료를 위한 의약품의 제조를 위한 용도에 관한 것이다. 상기 항바이러스 조성물은 잔탄검 또는 후코이단을 유효성분으로 포함한다.

발명의 효과

- [37] 본 발명의 잔탄검 또는 후코이단을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 조성물은 인플루엔자 바이러스에 대해 예방 및 치료 효과를 나타내며 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 조직병변의 발생 및 염증세포의 침윤을 감소시키는 바, 인플루엔자 바이러스에 의한 감염증의 예방 또는 치료를 위한 항바이러스제 개발에 이용될 수 있다.
- [38] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [39] 도 1은 인플루엔자 바이러스 감염 전 시험물질 투여 시의 체중 변화를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [40] 도 2는 인플루엔자 바이러스 감염 전 시험물질 투여 시의 조직병리학적 평가 결과를 점수화하여 나타낸 것이다.
- [41] 도 3은 인플루엔자 바이러스 감염 전 시험물질 투여 시, 폐에서의 M2 및 polPA 유전자 카피수를 통해 바이러스 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [42] 도 4는 인플루엔자 바이러스 감염 전 시험물질 투여 시, 비강에서의 M2 및 polPA 유전자 카피수를 통해 바이러스 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [43] 도 5는 인플루엔자 바이러스 감염 후 시험물질 투여 시의 체중 변화를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 6은 인플루엔자 바이러스 감염 후 시험물질 투여 시의 조직병리학적 평가 결과를 점수화하여 나타낸 것이다.
- [45] 도 7은 인플루엔자 바이러스 감염 후 시험물질 투여 시, 폐에서의 M2 및 polPA 유전자 카피수를 통해 바이러스 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [46] 도 8은 인플루엔자 바이러스 감염 후 시험물질 투여 시, 비강에서의 M2 및 polPA 유전자 카피수를 통해 바이러스 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [47] 도 9는 인플루엔자 바이러스 감염 전 시험물질 투여시 잔탄검 함량에 따른 체중 변화를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [48] 도 10은 인플루엔자 바이러스 감염 전 시험물질 투여시 잔탄검 함량에 따른 조직병리학적 평가 결과를 점수화하여 나타낸 것이다.
- [49] 도 11은 인플루엔자 바이러스 감염 전 시험물질 투여시 잔탄검 함량에 따른 폐에서의 바이러스 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [50] 도 12는 인플루엔자 바이러스 감염 전 시험물질 투여시 잔탄검 함량에 따른 비강에서의 바이러스 역가를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [51] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [52] **제조예 1. 시험물질의 제조**
- [53] 하기 표 1의 구성에 따른 시험물질을 제조하였다. 구체적으로, 약 0.8 mL 정제수에 벤조산, 시트르산 및 솔비톨(D-sorbitol)을 투입, 교반하여 용해시켰다. 이후 하기 표 1에 나타난 각 실시예 구성에 따라 주요 성분으로서 HPMC, 잔탄검, 벤토나이트, 후코이단 각각을 칭량하여 넣고 2 시간 이상 교반하여 용해시키고, 이후 정제수를 가하여 총량 1 mL가 되도록 하였다.

- [54] [표1]

성분 (mg/ml)	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4	실시예 5	실시예 6	실시 예 7

HPMC	4.60	-	-	-	-	-	-
잔탄검	-	0.10	-	-	0.25	0.50	1.00
벤토나이트	-	-	9.00	-	-	-	-
후코이단	-	-	-	8.00	-	-	-
벤조산	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60
시트르산	0.10	-	0.40	0.30	-	-	-
솔비톨	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00	35.00
정제수	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량
총량	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

[55] 비교예 1. 부형제 조합

[56] 주요 성분인 HPMC, 잔탄검, 벤토나이트, 후코이단을 포함하지 않은 부형제 조합으로, 벤조산, 시트르산, 솔비톨 및 정제수를 혼합한 음성대조물질을 제조하였으며, 각 부형제의 함량은 상기 표 1에서의 함량과 동일하게 하였다. 이와 같이 제조된 음성대조물질을 비교예 1로 적용하였다.

[57] 비교예 2. 오셀타미비르(Oseltamivir)

[58] 양성대조물질 중 하나로 오셀타미비르를 시그마-알드리치(Sigma-aldrich)로부터 구입하여 비교예 2로 적용하였다.

[59] 오셀타미비르는 상품명 타미플루로 불리며, 항바이러스제로서 인플루엔자 바이러스에 의한 감염증을 치료하며 예방 목적으로 사용된다. 특히 인플루엔자 A형 바이러스가 변이를 일으켜 신종플루를 일으키는 H1N1 변이형도 억제하는 효과가 있다.

[60] 비교예 3. 콜드마스크 비강스프레이

[61] 양성대조물질 중 하나로 콜드마스크 비강스프레이(판매처: 한미약품)를 구입하여 비교예 3으로 적용하였다.

[62] 실험예 1. 바이러스 예방 효과 확인

[63] 특정 병원체 부재(SPF) 암컷 C57BL/6 마우스(7주령, 샘타코, Korea)를 사용하였다. 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 % 환경에서 12시간씩 명암을 주며 사육하였으며, 평균체중이 균일하게 분포되도록 각 시험군을 구성하였다.

[64] 또한, 인플루엔자 A H1N1 바이러스는 부화된 유정란에 접종하여 48 시간 후에 배양액을 회수하였으며, 회수한 바이러스를 정량하여 LD_{50} 을 계산하였다. 준비한 바이러스 용액을 1 LD_{50} 으로 희석하고 희석된 용액 30 μ l을 이용하였다.

[65] 상기 동물 모델을 대상으로 하여 각 시험군의 구성 및 시험물질의 투여량 설정 내용은 하기 표 2에 나타난 바와 같다. G1은 정상대조군, G2는 감염대조군이며, 비교예 1 내지 3은 각 G3 내지 G5 군으로, 실시예 1 내지 4의 각 물질은 G6

내지 G9 군으로서 바이러스 감염 2 시간 전 각 물질의 투여를 개시하여 8 시간 간격으로 1일 2회 투여(bis in die, BID)하는 것으로 7일간 투여하였다.

- [66] 비교예 2는 경구투여(Per oral, P.O)하였으며, 그 외 나머지 비교예 1, 3, 실시예 1 내지 4는 비강 투여(intranasal administration, I.N)하였다. 시험 동물을 경배부 피부 고정법으로 고정하였으며, 비교예 2의 경우 경구투여용 존데를 이용하여 위 내에 직접 투여하였다. 실시예 1, 2 및 4의 경우 스프레이를 통해 비강 내 분사 투여하였으며, 실시예 3의 경우 투여 전 잘 흔들어 현탁시킨 후 마이크로파이펫을 이용하여 비강 내 점적투여하였다.

- [67] [표2]

군	동물수 (마리)	감염 여부	투여물질	투여 횟수	투여 경로	1회 투여량 (mg/head)	1회 투여액량 (ul/head)	투여시점
G1	4	N	-	-	-	-	-	감염 2 시간 전 투여개시, 8 시간 간격 7일간 투여
G2	15	Y	-	-	-	-	-	
G3	15	Y	비교예 1	BID	I.N	-	20	
G4	15	Y	비교예 2	BID	P.O	0.1	20	
G5	15	Y	비교예 3	BID	I.N	0.024	20	
G6	15	Y	실시예 1	BID	I.N	0.092	20	
G7	15	Y	실시예 2	BID	I.N	0.002	20	
G8	15	Y	실시예 3	BID	I.N	0.18	20	
G9	15	Y	실시예 4	BID	I.N	0.16	20	

- [68] 1-1. 체중 확인

- [69] 1일 1회 전자저울을 이용하여 개체 별 체중을 측정하였다. 측정 결과, 하기 표 3 및 도 1에 나타난 바와 같이 양성대조물질을 투여한 G4 및 G5, 실시예 1 내지 4의 각 시험물질을 투여한 G6 내지 G9 군은 3 DPI(감염 후 3일) 이후로 G3 대조군 대비 유의하게 높은 수준으로 나타났다.

- [70] 인플루엔자 바이러스에 감염될 경우 과도한 세포 침윤물이 기도에 생겨 INF과 같은 염증 매개체가 생성되면서 체중 감소가 나타나게 된다. 본 발명 실시예 1 내지 4의 시험물질을 투여할 경우 인플루엔자 감염 증상 중 하나인 체중 감소가 약화됨을 확인하였다.

- [71] [표3]

체중(Body weight)			
UNIT: % to 0 DPI(Mean ± S.D)			
DPI	시험군		
	G1	G2	G3
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
1	101.35 ± 0.69	96.80 ± 1.76***	96.30 ± 1.85***
2	104.87 ± 0.91	98.72 ± 1.98***	95.66 ± 2.44***,###

3	105.28 ± 1.43	97.36 ± 2.71 ^{***}	93.85 ± 2.81 ^{***,##}
4	103.97 ± 0.62	97.57 ± 2.44 ^{**}	91.83 ± 3.10 ^{***,###}
5	104.90 ± 2.33	96.17 ± 2.37 ^{***}	92.25 ± 3.31 ^{***}
6	-	94.44 ± 0.94	90.53 ± 3.16
7	-	93.44 ± 1.31	88.49 ± 3.25
DPI	시험군		
	G4	G5	G6
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
1	96.86 ± 1.40 ^{***}	96.76 ± 1.52 ^{***}	97.02 ± 1.63 ^{***}
2	98.36 ± 2.41 ^{***,\$}	96.37 ± 2.08 ^{***,#}	96.82 ± 1.67 ^{***}
3	98.71 ± 3.01 ^{***,\$\$\$}	96.76 ± 2.08 ^{***,\$}	97.14 ± 1.63 ^{***,\$\$}
4	100.15 ± 2.84 ^{\$\$\$}	96.34 ± 2.52 ^{***,\$\$}	96.15 ± 3.00 ^{***,\$\$}
5	99.52 ± 2.15 ^{*,#,\$\$\$}	98.20 ± 3.02 ^{*,\$\$\$}	97.10 ± 1.79 ^{***,\$\$}
6	97.56 ± 1.98 ^{\$\$}	97.89 ± 2.26 ^{\$\$}	99.52 ± 3.68 ^{\$\$\$}
7	94.73 ± 4.14 ^{\$}	98.58 ± 2.70 ^{\$\$\$}	99.14 ± 3.76 ^{\$\$\$}
DPI	시험군		
	G7	G8	G9
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
1	96.64 ± 2.34 ^{***}	98.02 ± 1.51 ^{**}	97.10 ± 2.42 ^{***}
2	95.73 ± 2.88 ^{***,##}	99.14 ± 2.47 ^{***,\$\$\$}	97.04 ± 2.45 ^{***}
3	96.56 ± 2.92 ^{***,\$}	100.14 ± 2.76 ^{*,#,\$\$\$}	97.89 ± 2.92 ^{***,\$\$\$}
4	95.29 ± 3.10 ^{***,\$}	99.68 ± 3.36 ^{\$\$\$}	97.68 ± 2.64 ^{*,\$\$\$}
5	98.03 ± 3.14 ^{***,\$\$\$}	99.50 ± 3.75 ^{*,\$\$\$}	99.60 ± 3.02 ^{*,\$\$\$}
6	100.14 ± 3.42 ^{#,\$\$\$}	101.13 ± 4.00 ^{##,\$\$\$}	99.78 ± 2.93 ^{#,\$\$\$}
7	99.49 ± 3.60 ^{#,\$\$\$}	97.97 ± 4.32 ^{\$\$\$}	98.26 ± 3.60 ^{\$\$\$}
DPI: days post-infection ***/**/* A significant difference at p<0.001/p<0.01/p<0.05 level compared to the G1 ###/ A significant difference at p<0.01/p<0.05 level compared to the G2 \$\$\$/\$ A significant difference at p<0.001/p<0.05 level compared to the G3			

[72] 1-2. 조직병리학적 검사

- [73] 인플루엔자 A 바이러스(H1N1) 1 LD₅₀ 역가로 감염된 C57BL/6 마우스에서 본 발명의 시험물질 투여시의 인플루엔자가 유도한 염증과 조직 손상에 미치는 영향을 평가하였다. 바이러스 감염 시험 디자인 및 시험군은 상기 표 2에 나타난 바와 같으며, G1을 제외한 나머지 시험군의 동물들을 대상으로 바이러스 접종일로부터 3 일째, 5 일째, 7 일째에 일별로 군당 5 마리씩 안락사하여 부검하였다. G1의 경우 바이러스 접종일로부터 5 일째 모두 안락사하여 부검하였다. 지정된 부검일 외 동물들은 바이러스 접종일로부터 7 일째까지 관찰하였다.
- [74] 부검 시 PBS에 적신 면봉을 이용하여 비강을 스왑(swap)하여 바이러스 역가 측정용으로 분석 전까지 -70 °C에 동결 보관하였다.
- [75] 적출한 폐는 병변 부위가 포함되게 조직을 둘로 나누어 조직병리검사용은 10 % 중성완충포르말린(neutral buffered formalin, NBF)에 고정하였으며, 바이러스 역가 측정용은 분석 전까지 -70 °C에 동결 보관하였다.
- [76] 10% NBF에 고정된 조직은 삭정, 탈수, 파라핀 포매, 박절 등 일반적인 조직처리 과정을 거쳐 조직병리학적 검사를 위한 검체를 제작한 뒤, Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 실시하고, 광학 현미경(Olympus BX53, Japan)을 이용하여 조직병리학적 변화를 관찰하였다. 폐에서의 병변을 관찰하고, 염증세포 침윤 정도에 따라 점수화하여 평가하였으며, 기준은 하기 표 4에 나타난 바와 같다.
- [77] [표4]

점수(Score)	점수 기준
0	병변 및 염증세포의 침윤이 관찰되지 않음(None)
1	염증세포가 실질(parenchymal) 내 흩어져 있음(Minimal)
2	염증세포가 실질의 <1/3 내에 응집됨(Mild)
3	염증세포가 실질의 1/3 내지 2/3 내에 응집됨(Moderate)
4	염증세포가 실질의 > 2/3 내에 응집됨(Severe)

- [78] 그 결과, 하기 표 5 및 도 2에 나타난 바와 같이, 감염 3일째(3 DPI)에 G4 및 G7의 점수는 G2 및 G3에 비해 유의하게 낮았으며, 감염 7 일째까지 양성대조물질을 투여한 G4 및 G5, 실시예 1 내지 4의 각 시험물질을 투여한 G6 내지 G9 군의 점수는 G2 및 G3에 비해 낮게 나타남을 확인하였다.

- [79] [표5]

조직병리학적 검사			
UNIT: 점수			
DPI	시험군		
	G1	G2	G3
3	-	1.4 ± 0.5	1.2 ± 0.4

5	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.8	2.2 ± 0.4
7	-	3.4 ± 0.5	3.0 ± 0.0
DPI	시험군		
	G4	G5	G6
3	$0.2 \pm 0.4^{#,\$}$	0.6 ± 0.5	0.6 ± 0.5
5	1.0 ± 1.0	1.4 ± 0.9	1.6 ± 1.1
7	$1.4 \pm 0.9^{##,\$}$	2.0 ± 1.2	2.2 ± 0.8
DPI	시험군		
	G7	G8	G9
3	$0.0 \pm 0.0^{#,\$}$	0.6 ± 0.5	0.6 ± 0.5
5	1.2 ± 0.8	1.2 ± 1.1	1.4 ± 1.1
7	$1.4 \pm 0.9^{#,\$}$	2.2 ± 1.3	$1.2 \pm 0.8^{##,\$}$
DPI: days post-infection ###/ A significant difference at $p < 0.01$ / $p < 0.05$ level compared to the G2 \$\$/\$\$ A significant difference at $p < 0.01$ / $p < 0.05$ level compared to the G3			

[80] 이와 같은 결과는 본 발명 실시예 1 내지 4의 시험물질을 예방 목적으로 투여할 경우 인플루엔자 바이러스에 의한 폐조직 손상 및 병변 발생을 감소시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

[81] 1-3. 바이러스 역가 측정

[82] 바이러스 감염 후 5 일째에 채취된 폐 조직을 이용하여 폐 조직 내에 존재하는 바이러스의 양을 real-time qRT-PCR에 의하여 정량하였다. 채취된 폐 조직을 WizoTM (WizbioSolution, Seongnam, Korea) 시약 일정량을 넣고 조직 분쇄용 비드를 이용하여 분쇄하여 상층액으로부터 총 RNA(total RNA)를 추출하였다. 추출된 total RNA는 Nanodrop(NanoDrop2000, Thermo scientific)을 이용하여 정량하였다. Total RNA 1 μ g을 WizScriptTM cDNA synthesis kit(WizbioSolution)을 이용하여 cDNA를 합성한 후, 일정량의 cDNA 반응물을 이용하여 WizPureTM qPCR Master-UDG(WizbioSolution) 시약에 의하여 제품 설명서에 따라 real-time qPCR에 적용하였다. 인플루엔자 바이러스(A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)) 특이적으로 M2(matrix protein 2) 및 pol PA(polymerase PA)에 대한 프라이머 및 프로브를 이용하여 폐 조직 내에 존재하는 바이러스 유전자를 정량하였다. 폐 조직에 존재하는 바이러스의 RNA 양은 총(total) RNA 1 ng당 바이러스 유전자의 카피(copy) 수를 산출하여 표시하였다. 각 프라이머 및 프로브 서열은 하기 표 6에 나타난 바와 같다.

[83] [표6]

유전자	종류	방향	서열(5'~3')	서열번호
M2	M 프라이머	정방향 (Forward)	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA	1
		역방향 (Reverse)	GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA	2
	M 프로브	-	[FAM]TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAG[BHQ1]	3
Pol PA	PR8-PA 프라이머	정방향 (Forward)	CGGTCCAAATTCCTGCTGA	4
		역방향 (Reverse)	CATTGGGTTCTTCCATCCA	5
	PR8-PA 프로브	-	[HEX]CCAAGTCATGAAGGAGAGGGAATACCGCT[BHQ1]	6

[84] 이후 표준곡선(standard graph)를 작성하고 샘플 내 상기 각 유전자를 대입하여 바이러스 잔존량을 정량분석하였다.

[85] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 본 발명 실시예 1 내지 4의 시험물질 투여시 폐에서의 M2 및 polPA 유전자의 감소는 크게 나타나지 않았다. 반면, 비강의 경우 본 발명 실시예 1 내지 4의 시험물질 투여시 도 4에 나타난 바와 같이 M2 및 polPA 유전자의 감소가 나타나 비강을 통한 인플루엔자 바이러스의 감염 예방 효과가 있음을 확인하였다. 특히 실시예 1, 2 및 4를 투여한 G6, G7 및 G9 군에서 더욱 뚜렷한 바이러스 역가 감소 효과가 나타남을 확인하였다.

[86] **실험예 2. 바이러스 치료 효과 확인**

[87] 상기 실험예 1과 동일한 방식으로 동물 모델을 구성하고 인플루엔자 A H1N1 바이러스를 투여하여 감염시켰다. 다만, 치료 효과 확인의 경우 바이러스 감염 후 시험물질을 투여하였다.

[88] 구체적으로, 각 시험군의 구성 및 시험물질의 투여량 설정 내용은 하기 표 7에 나타난 바와 같다. G1은 정상대조군, G2는 감염대조군이며, 비교예 1 내지 3은 각 G3 내지 G5 군으로, 실시예 1 내지 4의 각 물질은 G6 내지 G9 군으로서 바이러스 감염 24 시간 후 각 물질의 투여를 개시하여 8 시간 간격으로 1일 2회 투여(bis in die, BID)하는 것으로 6일간 투여하였다. 투여 경로에 따른 투여방식은 상기 실험예 1과 동일하다.

[89] [표7]

군	동물수 (마리)	감염 여부	투여물질	투여 횟수	투여 경로	1회 투여량 (mg/head)	1회 투여액량 (ul/head)	투여시점
G1	4	N	-	-	-	-	-	감염 24 시간 후 투여개시, 8 시간 간격 6 일 간 투여
G2	15	Y	-	-	-	-	-	
G3	15	Y	비교예 1	BID	I.N	-	20	
G4	15	Y	비교예 2	BID	P.O	0.1	20	
G5	15	Y	비교예 3	BID	I.N	0.024	20	
G6	15	Y	실시예 1	BID	I.N	0.092	20	
G7	15	Y	실시예 2	BID	I.N	0.002	20	
G8	15	Y	실시예 3	BID	I.N	0.18	20	
G9	15	Y	실시예 4	BID	I.N	0.16	20	

[90] 2-1. 체중 확인

[91] 1일 1회 전자저울을 이용하여 개체 별 체중을 측정하였다. 측정 결과, 하기 표 8 및 도 5에 나타난 바와 같이 감염 5 일째(5 DPI), 실시예 1 내지 4의 각 시험물질을 투여한 G6 내지 G9 군은 G3 대조군 대비 유의하게 높은 수준으로 나타났다.

[92] 이와 같은 결과로부터, 감염 후에 본 발명 실시예 1 내지 4의 시험물질을 투여할 경우에도 인플루엔자 감염 증상 중 하나인 체중 감소가 약화될 수 있음을 확인하였다

[93] [표8]

체중(Body weight)			
UNIT: % to 0 DPI(Mean ± S.D)			
DPI	시험군		
	G1	G2	G3
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
1	98.34 ± 1.04	98.13 ± 1.53	97.03 ± 1.09
2	98.36 ± 1.90	95.85 ± 1.56	96.23 ± 1.78
3	100.29 ± 3.64	96.09 ± 1.85	95.47 ± 3.43
4	101.28 ± 2.05	97.87 ± 1.82	94.88 ± 2.51 [*]
5	104.59 ± 1.76	97.33 ± 3.21 [*]	94.01 ± 2.90 ^{***}
6	-	95.11 ± 2.43 ^{**}	93.12 ± 1.76 ^{***}
7	-	92.53 ± 2.73 ^{**}	89.33 ± 6.35 ^{***}
DPI	시험군		
	G4	G5	G6
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
1	96.35 ± 1.80	97.40 ± 1.65	97.64 ± 3.47
2	95.82 ± 3.03	96.90 ± 2.55	96.74 ± 4.87
3	95.76 ± 4.77	97.10 ± 3.64	96.69 ± 4.92
4	93.96 ± 2.64 [*]	96.40 ± 3.84	96.06 ± 5.84
5	94.75 ± 3.47 ^{**}	96.57 ± 4.94 [*]	95.41 ± 5.53 ^{**}
6	91.73 ± 1.66 ^{***}	97.13 ± 0.95 [*]	90.70 ± 5.36 ^{***}
7	90.01 ± 3.20 ^{**}	93.39 ± 4.26 [*]	88.52 ± 6.81 ^{***}
DPI	시험군		

	G7	G8	G9
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
1	96.87 ± 2.60	97.94 ± 2.27	97.64 ± 3.47
2	96.33 ± 3.46	96.47 ± 2.00	96.74 ± 4.87
3	96.97 ± 3.09	96.54 ± 3.60	96.69 ± 4.92
4	96.51 ± 4.23	95.11 ± 3.76*	96.06 ± 5.84
5	97.53 ± 3.69*	94.31 ± 4.23***	95.41 ± 5.53**
6	96.58 ± 4.64*	94.61 ± 5.34**	90.70 ± 5.36***
7	93.85 ± 6.41*	92.33 ± 6.37**	88.52 ± 6.81***
DPI: days post-infection			
***/**/* A significant difference at p<0.001/p<0.01/p<0.05 level compared to the G1			

[94] 2-2. 조직병리학적 검사

[95] 상기 실험에 1-2와 동일한 방식으로 바이러스 접종일로부터 3 일째, 5 일째, 7 일째에 일별로 군당 5 마리씩 안락사하여 부검하였으며, G1의 경우 바이러스 접종일로부터 5 일째 모두 안락사하여 부검하고 조직병리를 관찰하였다. 이후 상기 표 4와 동일한 점수 기준으로 평가하였다.

[96] 그 결과, 하기 표 9 및 도 6에 나타난 바와 같이, 모든 부검 차수에서 실시예 1 내지 4의 각 시험물질을 투여한 G6 내지 G9 군에서의 염증세포 침윤 정도는 G3 전반적으로 G3 대비 낮은 경향을 보였으며, 감염 5 일(5 DPI), 7일째(7 DPI)에 G4, G7 및 G9의 점수는 G2 및 G3에 비해 유의하게 낮은 것으로 나타났다. 특히, G7 및 G9의 염증세포 침윤 정도는 현저히 낮은 수준으로 나타남을 확인하였다.

[97] [표9]

조직병리학적 검사			
UNIT: 점수			
DPI	시험군		
	G1	G2	G3
3	-	1.6 ± 1.1	1.6 ± 0.5
5	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.4	2.8 ± 0.4
7	-	3.6 ± 0.5	3.2 ± 0.4
DPI	시험군		
	G4	G5	G6
3	0.8 ± 0.4	1.0 ± 0.7	1.0 ± 0.7

5	$1.4 \pm 0.5^{\#,\$}$	2.0 ± 1.0	1.8 ± 0.8
7	$1.8 \pm 0.8^{\#,\$}$	2.6 ± 0.9	2.4 ± 1.3
DPI	시험군		
	G7	G8	G9
3	1.2 ± 0.4	1.0 ± 0.7	1.0 ± 0.7
5	$1.4 \pm 0.9^{\#,\$}$	2.0 ± 1.0	$1.2 \pm 0.8^{\#,\$}$
7	$1.6 \pm 0.5^{\#\$, \$\$}$	2.4 ± 1.3	$1.6 \pm 0.5^{\#\$, \$\$}$
DPI: days post-infection $\#/\#/\#$ A significant difference at $p < 0.01/p < 0.05$ level compared to the G2 $\$/\$/\$$ A significant difference at $p < 0.01/p < 0.05$ level compared to the G3			

[98] 이와 같은 결과는 인플루엔자 바이러스 감염 이후에 본 발명 실시예 1 내지 4의 시험물질을 투여하더라도 인플루엔자 바이러스에 의한 폐조직 손상 및 병변 발생을 감소시킬 수 있는 바, 인플루엔자 바이러스에 대한 치료 효과가 있음을 나타내는 것이다.

[99] 2-3. 바이러스 역가 측정

[100] 상기 실험예 1-3과 동일한 방식으로 폐 및 비강 스왑 샘플에서 RNA를 추출하고, qRT-PCR을 통해 M2 및 polPA 유전자를 검출하여 바이러스 잔존량을 정량분석하였다.

[101] 그 결과, 하기 표 10, 표 11 및 도 7에 나타난 바와 같이 7 DPI 부검 개체 폐조직의 경우, G3 대조군 대비 G5 양성대조군, 시험물질 투여군인 G7 및 G9 군의 M2 및 polPA 유전자가 모두 감소되어 있음을 확인하였다. 또한, G6 군의 경우 5 DPI 부검 개체의 폐조직에서 G3 대조군 대비 M2 및 polPA 유전자가 모두 감소되어 있음을 확인하였다.

[102] [표10]

바이러스 역가(폐)			
M2 UNIT: copies/ng			
DPI	시험군		
	G1	G2	G3
3	-	78.08 ± 102.34	27.33 ± 30.14
5	0.00 ± 0.00	37.48 ± 34.71	115.52 ± 117.42
7	-	11.46 ± 9.89	4.61 ± 4.87
DPI	시험군		
	G4	G5	G6

3	35.02 ± 60.34	25.57 ± 26.40	13.90 ± 11.61
5	8.98 ± 10.54	107.90 ± 176.40	35.34 ± 49.38
7	8.86 ± 7.64	4.53 ± 6.94	6.38 ± 4.72
DPI	시험군		
	G7	G8	G9
3	6.61 ± 9.18	14.52 ± 22.43	30.11 ± 25.51
5	43.52 ± 88.41	54.11 ± 99.04	126.93 ± 155.92
7	3.18 ± 3.12	11.40 ± 12.05	2.41 ± 2.38

[103] [표11]

바이러스 역가(폐)			
polPA UNIT: copies/ng			
DPI	시험군		
	G1	G2	G3
3	-	2715.87 ± 3666.96	1009.60 ± 1413.18
5	0.00 ± 0.00	491.84 ± 540.21	1242.72 ± 1200.10
7	-	174.77 ± 228.20	63.05 ± 63.85
DPI	시험군		
	G4	G5	G6
3	1453.46 ± 2714.18	645.15 ± 794.64	432.91 ± 335.67
5	132.86 ± 104.09	2282.70 ± 4021.43	465.80 ± 648.05
7	165.93 ± 182.61	53.94 ± 79.55	76.27 ± 50.37
DPI	시험군		
	G7	G8	G9
3	54.76 ± 77.74	407.23 ± 767.51	1050.61 ± 914.06
5	1223.43 ± 1798.12	472.83 ± 780.71	1462.30 ± 1905.12
7	47.74 ± 55.54	176.85 ± 152.72	29.74 ± 34.23

[104] 또한, 하기 표 12, 표 13 및 도 8에 나타난 바와 같이 7 DPI 부검 개체 비강 샘플의 경우, G3 대조군 대비 G5 양성대조군, 시험물질 투여군인 G6, G7 및 G9 군의 M2 및 polPA 유전자가 모두 감소되어 있음을 확인하였다.

[105] [표12]

바이러스 역가(비강)

M2 UNIT: copies/mL			
DPI	시험군		
	G1	G2	G3
3	-	720.63 ± 1188.14	0.00 ± 0.00
5	0.00 ± 0.00	865847.04 ± 1930483.29	825281.04 ± 1845384.51
7	-	30780.88 ± 66589.93	28537.64 ± 63675.62
DPI	시험군		
	G4	G5	G6
3	0.00 ± 0.00	327630.74 ± 698396.61	399.55 ± 893.43
5	67612.73 ± 117098.05	8039152.61 ± 10368970.73	5387.49 ± 11770.65
7	264852.85 ± 236609.52	515.45 ± 666.50	11598.79 ± 18410.41
DPI	시험군		
	G7	G8	G9
3	96744.31 ± 208185.08	359.83 ± 804.59	3470.91 ± 6150.44
5	137.75 ± 252.03	60885.81 ± 133470.76	599.00 ± 1339.41
7	14499.47 ± 32421.80	39763.68 ± 87024.28	3305.15 ± 7390.53

[106]

[표13]

바이러스 역가(비강)			
polPA UNIT: copies/mL			
DPI	시험군		
	G1	G2	G3
3	-	8173.31 ± 7070.26	10521.46 ± 19578.47
5	0.00 ± 0.00	42551552.83 ± 95009881.85	586.32 ± 1077.78
7	-	4738095.80 ± 10514434.11	3314005.76 ± 7390510.19
DPI	시험군		
	G4	G5	G6

3	687.83 ± 832.96	18236216.91 ± 38691441.18	11313.29 ± 18427.97
5	1905385.64 ± 2935251.54	411088263.44 ± 488467822.79	105133.35 ± 226762.09
7	26587812.07 ± 26169008.36	49594.24 ± 83919.74	1523582.19 ± 2434770.92
DPI	시험군		
	G7	G8	G9
3	5222876.41 ± 11628560.11	11808.16 ± 21575.74	107941.59 ± 196643.62
5	5438.77 ± 6900.60	3705803.49 ± 8212700.01	12887.58 ± 22429.61
7	2069412.39 ± 4607026.07	3269283.91 ± 7276365.49	430285.99 ± 960128.44

- [107] 상기와 같은 결과를 통해 본 발명의 실시예 1, 2 및 4의 시험물질 투여시 바이러스의 역가가 감소하는 바, 인플루엔자 바이러스 감염 치료에 유효함을 확인하였다.
- [108] **실험예 3. 잔탄검 함량에 따른 항바이러스 효과 확인**
- [109] 잔탄검 함량에 따른 항바이러스 효과를 확인하기 위하여, 상기 실험예 1과 동일한 방식으로 동물 모델을 구성하고 인플루엔자 A H1N1 바이러스를 투여하였다. 구체적인 시험군 구성 및 시험물질의 투여량 설정 내용은 하기 표 14에 나타난 바와 같다.
- [110] G1은 정상대조군, G2는 감염대조군이며, 음성대조물질인 부형제 조합에 관한 비교예 1 및 양성대조물질에 관한 비교예 3은 각각 G3 및 G4군이다. G5 내지 G7은 잔탄검 함량에 따라 저농도에서 고농도로 구성하였다. 바이러스 감염 2 시간 전 각 물질의 투여를 개시하여 8 시간 간격으로 1일 2회 투여(bis in die, BID)하는 것으로 7 일간 투여하였다. 투여 경로에 따른 투여방식은 상기 실험예 1과 동일하다.
- [111] [표14]

군	동물수 (마리)	감염 여부	투여물질	투여 횟수	투여 경로	1 회 투여량 (mg/head)	1 회 투여액량 (ul/head)	투여시점
G1	4	N	-	-	-	-	-	감염 2 시간 전 투여개시, 8 시간 간격 7 일간 투여
G2	18	Y	-	-	-	-	-	
G3	18	Y	비교예 1	BID	I.N	-	20	
G4	18	Y	비교예 3	BID	I.N	0.024	20	
G5	18	Y	실시예 5	BID	I.N	0.005	20	
G6	18	Y	실시예 6	BID	I.N	0.010	20	
G7	18	Y	실시예 7	BID	I.N	0.020	20	

[112] 3-1. 체중 확인

[113] 1일 1회 전자저울을 이용하여 개체 별 체중을 측정하였다. 측정 결과, 하기 표 15 및 도 9에 나타난 바와 같이 잔탄검을 투여한 G5 내지 G7 모든 실험군에서 G3 군 대비 높은 수준으로 나타났다. 즉, 잔탄검이 저농도로 투여되거나, 중농도, 고농도로 투여되더라도 인플루엔자 감염 증상 중 하나인 체중 감소가 악화될 수 있음을 확인하였다.

[114] [표15]

체중(Body weight)				
UNIT: % to 0 DPI(Mean ± S.D)				
DPI	시험군			
	G1	G2	G3	G4
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
1	100.14 ± 1.48	99.18 ± 1.44	99.89 ± 1.33	100.99 ± 2.07
2	100.70 ± 2.44	98.79 ± 2.08	98.24 ± 2.09	102.38 ± 2.29***
3	98.60 ± 2.27	98.90 ± 2.31	95.56 ± 2.06 ^s	99.78 ± 2.72***
4	100.98 ± 2.57	98.40 ± 3.86	93.18 ± 2.27 ^{\$\$\$}	98.87 ± 3.37***
5	104.77 ± 2.92	96.15 ± 3.24	89.82 ± 2.52 ^{\$\$\$}	97.32 ± 4.29***
6	107.01 ± 2.06	92.53 ± 5.61	86.51 ± 2.70 ^{\$\$\$}	93.43 ± 2.42**
7	105.75 ± 2.59	89.25 ± 6.54	83.29 ± 3.52 ^{\$\$\$}	88.38 ± 2.59
DPI	시험군			
	G5	G6	G7	
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	
1	101.62 ± 1.07*	100.07 ± 1.83	100.12 ± 2.47	
2	102.60 ± 1.31***	100.58 ± 3.46*	99.72 ± 2.58	
3	99.80 ± 2.04***	98.55 ± 2.42***	96.87 ± 1.83	
4	98.01 ± 1.90***	96.48 ± 2.04*	95.91 ± 3.27*	
5	97.27 ± 2.48***	95.91 ± 2.51***	95.56 ± 2.90***	
6	96.16 ± 1.97***	94.39 ± 3.58**	93.18 ± 4.81**	
7	95.69 ± 3.07***,##	87.97 ± 4.50	88.25 ± 7.49	
DPI: days post-infection				
\$\$\$/\$ A significant difference at p<0.001/p<0.05 level compared to the G1				

***/**/ A significant difference at $p<0.001/p<0.01/p<0.05$ level compared to the G3
 ## A significant difference at $p<0.01$ compared to the G4

[115] 3-2. 조직병리학적 검사

[116] 상기 실험에 1-2와 동일한 방식으로 바이러스 접종일로부터 3 일째, 5 일째, 7 일째에 일별로 군당 6 마리씩 안락사하여 부검하였으며, G1의 경우 바이러스 접종일로부터 5 일째 모두 안락사하여 부검하고 조직병리를 관찰하였다. 이후 상기 표 4와 동일한 점수 기준으로 평가하였다.

[117] 그 결과, 하기 표 16 및 도 10에 나타난 바와 같이 모든 부검 차수에서 실시예 5 내지 7의 각 시험물질을 투여한 G5 내지 G7 군에서의 염증세포 침윤 정도는 G3 대비 낮게 나타났다. 특히, 잔탄검을 저농도로 투여한 G5의 염증세포 침윤 정도는 현저히 낮은 수준으로 나타남을 확인하였다.

[118] [표16]

조직병리학적 검사				
UNIT: 점수				
DPI	시험군			
	G1	G2	G3	G4
3	-	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.5	1.3 ± 0.5
5	-	2.2 ± 0.4	2.7 ± 0.5	2.2 ± 0.4
7	0.0 ± 0.0	3.8 ± 0.4	4.0 ± 0.0	3.5 ± 0.5
DPI	시험군			
	G5	G6	G7	
3	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.4	1.2 ± 0.4	
5	2.2 ± 0.8	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.8	
7	$1.3 \pm 0.5^{**,\#}$	$2.7 \pm 0.8^*$	$2.8 \pm 1.0^*$	
DPI: days post-infection				
*** A significant difference at $p<0.01/p<0.05$ level compared to the G3				
## A significant difference at $p<0.01$ compared to the G4				

[119] 이와 같은 결과는 잔탄검의 모든 농도 범위에서 인플루엔자 바이러스에 의한 폐조직 손상 및 병변 발생을 감소시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

[120]

[121] 3-3. 바이러스 역가 측정

[122] 상기 실험에 1-3과 동일한 방식으로 폐 및 비강 스왑 샘플에서 RNA를 추출하고, qRT-PCR을 통해 M2 및 polPA 유전자를 검출하여 바이러스 잔존량을 정량분석하였다.

[123] 그 결과, 하기 표 17, 표 18 및 도 11에 나타나나 바와 같이 3 DPI 및 5 DPI 부감 개체 폐조직에서 G3 대조군 대비 시험물질 투여군인 G5 내지 G7 군의 M2 및 polPA 유전자가 모두 감소되어 있음을 확인하였다.

[124] [표17]

바이러스 역가(폐)				
M2 UNIT: copies/ng				
DPI	시험군			
	G1	G2	G3	G4
3	-	19.89 ± 12.97	23.61 ± 12.85	25.13 ± 7.46
5	-	39.19 ± 22.57	42.57 ± 38.62	17.34 ± 15.81
7	0.00 ± 0.00	16.13 ± 16.04	5.91 ± 5.82	23.22 ± 19.36
DPI	시험군			
	G5	G6	G7	
3	14.73 ± 11.33	10.09 ± 8.02	31.00 ± 38.36	
5	10.86 ± 9.22	38.74 ± 40.44	11.04 ± 10.39	
7	6.45 ± 10.63	16.24 ± 13.31	16.95 ± 15.56	

[125] [표18]

바이러스 역가(폐)				
polPA UNIT: copies/ng				
DPI	시험군			
	G1	G2	G3	G4
3	-	857.54 ± 532.06	989.44 ± 478.52	1070.80 ± 394.54
5	-	1404.37 ± 1147.11	2367.40 ± 2412.48	808.85 ± 742.05
7	0.04 ± 0.07	805.97 ± 689.61	530.64 ± 606.43	1414.91 ± 718.32
DPI	시험군			
	G5	G6	G7	
3	532.63 ± 426.17*	380.05 ± 360.48	1327.49 ± 1632.89	
5	458.61 ± 415.89	1711.80 ± 2046.23	365.94 ± 359.98	
7	340.79 ± 540.49 [#]	1241.74 ± 1057.86	808.61 ± 917.61	

A significant difference at $p < 0.05$ level compared to G4

- [126] 또한, 하기 표 19, 표 20 및 도 12에 나타난 바와 같이, 7 DPI 부검 개체 비강 샘플의 경우, G3 대조군 대비 시험물질 투여군인 G5 내지 G7 군의 M2 및 polPA 유전자가 모두 감소되어 있음을 확인하였다.

- [127] [표19]

바이러스 역가(비강)				
M2 UNIT: copies/ng				
DPI	시험군			
	G1	G2	G3	G4
3	-	0.25 ± 0.21	0.41 ± 0.32	0.64 ± 1.39
5	-	0.01 ± 0.03	0.04 ± 0.06	0.10 ± 0.19
7	0.01 ± 0.02	0.07 ± 0.10	0.43 ± 0.36	$0.11 \pm 0.09^*$
DPI	시험군			
	G5	G6	G7	
3	0.25 ± 0.37	0.33 ± 0.71	0.00 ± 0.00	
5	0.42 ± 0.74	0.10 ± 0.20	0.12 ± 0.20	
7	$0.06 \pm 0.09^{**}$	$0.01 \pm 0.01^{**}$	$0.03 \pm 0.05^{**}$	
**/* A significant difference at $p < 0.01/p < 0.05$ level compared to the G3				

- [128] [표20]

바이러스 역가(비강)				
polPA UNIT: copies/ng				
DPI	시험군			
	G1	G2	G3	G4
3	-	374.78 ± 853.33	29.90 ± 26.57	20.80 ± 40.74
5	-	1.08 ± 2.11	4.58 ± 7.60	3.59 ± 6.42
7	0.04 ± 0.07	4.97 ± 6.68	44.23 ± 47.42	15.09 ± 10.57
DPI	시험군			
	G5	G6	G7	
3	24.33 ± 43.38	39.47 ± 92.81	0.06 ± 0.09	
5	17.64 ± 24.67	5.16 ± 10.37	4.96 ± 7.01	
7	$10.53 \pm 8.46^*$	$2.97 \pm 5.49^*$	$3.04 \pm 4.80^*$	

* A significant difference at $p < 0.05$ level compared to G3

- [129] 상기와 같은 결과를 통해 잔탄검의 모든 농도 범위에서 인플루엔자 바이러스의 역가가 감소하는 바, 인플루엔자 바이러스의 예방 및/또는 치료에 유효함을 확인하였다.
- [130] 실험예 4. 통계학적 분석
- [131] 상기 각 실험예들의 결과에 대하여 자료의 정규성을 가정하고, 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 또는 비모수적인 다중비교(non-parametric multiple comparison procedures)를 이용하여 분석하였다.
- [132] 모수적인 다중비교의 경우, 자료의 정규성을 가정하였고, 모수적 일원분산분석(One-way ANOVA)으로 검정하였으며, 그 결과가 유의할 경우, Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 사후검정을 실시하여 시험군간 유의한 차이를 분석하였다. 비모수적인 다중비교의 경우, Kruskal-Wallis'H-test로 검정하여, 그 결과가 유의할 경우 사후분석인 Mann Whitney U test를 이용하여 시험군간 유의한 차이를 분석하였다. 통계학적 분석은 Prism 9.4.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하여 실시하였으며, p값이 0.05 미만일 경우, 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.
- [133] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [134] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 잔탄검(Xanthan gum) 또는 후코이단(Fucoidan)을 유효성분으로 포함하는, 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 대한 항바이러스 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A 바이러스인, 항바이러스 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 인플루엔자 A 바이러스는 H1N1형인, 항바이러스 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 면역조치용인,
항바이러스 조성물.
- [청구항 5] 잔탄검 또는 후코이단을 유효성분으로 포함하는,
인플루엔자 바이러스에 의한 바이러스 감염 질환의 예방 또는 치료용
약학적 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 인플루엔자 바이러스에 의한 바이러스 감염 질환은 감기, 독감,
인후염, 후두염, 인두염, 비염, 기관지염, 천식, 패혈증 및 폐렴으로
이루어진 군에서 선택되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 비경구 투여되는 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 비경구 투여는 비내 또는 비강 내 투여인 것을 특징으로 하는,
약학적 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 비내 또는 비강내 투여는 스프레이, 에어로솔 또는 흡입(inhalation)
형태로 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제5항의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인플루엔자
바이러스 감염의 치료방법.
- [청구항 11] 제5항의 약학적 조성물의 인플루엔자 바이러스 감염 치료 용도.
- [청구항 12] 제1항의 항바이러스 조성물의 인플루엔자 바이러스 감염 치료를 위한
의약품의 제조를 위한 용도.