(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월12일
(11) 등록번호 10-1897803
(24) 등록일자 2018년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A23L 33/125 (2016.01) *A61K 8/60* (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0154258
(22) 출원일자 2017년11월17일
심사청구일자 2017년11월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130080917A*
CN104688753 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
김성준
서울특별시 광진구 뚝섬로 35길 32(우성3차 아파트 306동 105호)
안대균
경기도 고양시 일산서구 강선로 169, 1509동 1203호
김범태
대전광역시 유성구 계룡로 92 CJ나인파크 102동 1502호
(74) 대리인
이원희

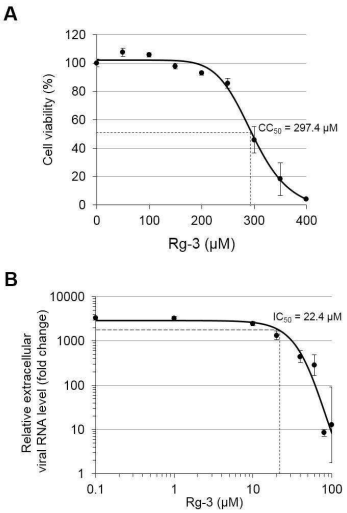
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 **아르보바이러스 감염 저해제**

(57) 요 약

본 발명은 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 바이러스 감염 저해제에 관한 것으로써, 본 발명에 따른 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 세포 내 아르보바이러스 유전체를 저해하고 아르보바이러스 단백질을 감소시킬 뿐만 아니라, 아르보바이러스에 의한 세포 사멸 보호 효과를 나타내므로 아르보바이러스의 감염을 예방, 개선 또는 치료하는데 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/125 (2016.08)
A61K 8/602 (2013.01)
A61Q 11/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 KKM1701-2
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 국가과학기술연구회
연구사업명 융합연구사업
연구과제명 (CEVI)(3A)(화학)해외 유입 고위험 신종바이러스 예방에 효과적인 백신 후보물질 발굴 및 효능평가시스템
기 여 율 1/1
주관기관 한국화학연구원
연구기간 2017.01.01 ~ 2017.07.31

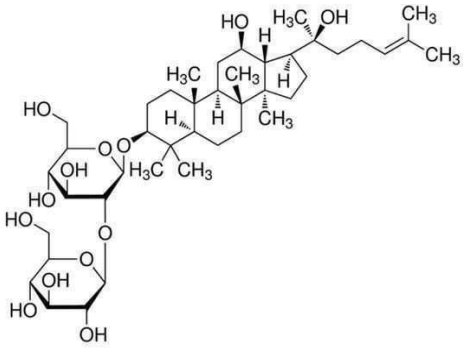
명 세 서

청구범위

청구항 1

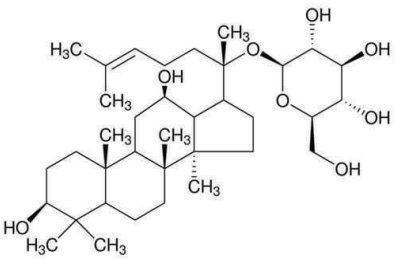
하기 Rg3 또는 Compound K의 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 지카바이러스(Zika virus), 뎅기바이러스(Dengue virus), 황열병 바이러스(Yellow fever virus), 일본뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus), 및 세인트루이스바이러스(St. Louis encephalitis virus)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 플라비바이러스과 플라비바이러스속 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[Rg3]



;

[Compound K]



.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 플라비바이러스과 플라비바이러스속 바이러스는 지카바이러스 또는 뎅기바이러스인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

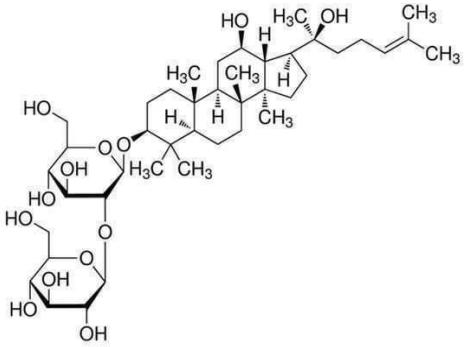
제1항에 있어서,

상기 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 세포 내 지카바이러스(Zika virus), 뎅기바이러스(Dengue virus), 황열병 바이러스(Yellow fever virus), 일본뇌염바이러스(Japanese encephalitis virus), 및 세인트루이스바이러스(St. Louis encephalitis virus)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 플라비바이러스과 플라비바이러스속 바이러스의 유전체를 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

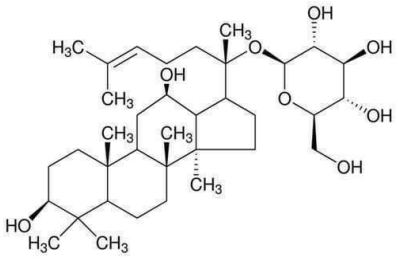
하기 Rg3 또는 Compound K의 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 지카바이러스(Zika virus), 뎅기바이러스(Dengue virus), 황열병 바이러스(Yellow fever virus), 일본뇌염바이러스(Japanese encephalitis virus), 및 세인트루이스바이러스(St. Louis encephalitis virus)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 플라비바이러스과 플라비바이러스속 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물:

[Rg3]



;

[Compound K]



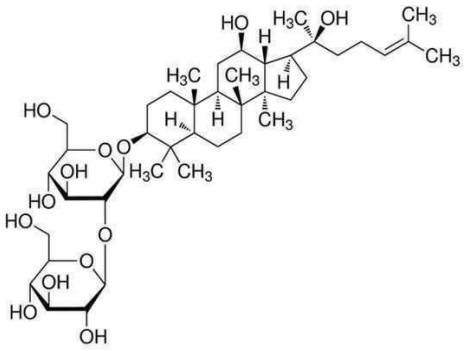
.

청구항 9

하기 Rg3 또는 Compound K의 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 지카바이러스(Zika virus), 뎅기바이러스(Dengue virus), 황열병 바이러스(Yellow fever virus), 일본뇌염바이러스(Japanese encephalitis virus), 및 세인트루이스바이러스(St. Louis encephalitis virus)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 플라비바이러스과 플라비바이러스속 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 구

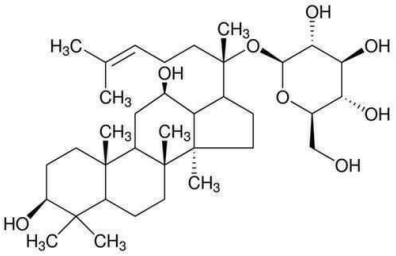
강청정제:

[Rg3]



;

[Compound K]



.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 구강청정제는 전체 중량에 대하여 트리클로산을 0.005~1.0중량%로 더 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는 구강청정제.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 구강청정제는 전체 중량에 대하여 불소화합물을 0.001~3중량%로 더 포함할 수 있는 것을 특징으로 하는 구강청정제.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 구강청정제는 정제형, 액상형 또는 분무형의 형태를 가지는 것을 특징으로 하는 구강청정제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 흡혈 절지동물에 의해 매개되는 바이러스 감염에 대한 저해제에 관한 것으로, 구체적으로는 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 바이러스 감염 저해제에 관한 것이

다.

배 경 기 술

[0003] 최근 기후 변화 등으로 흡혈 절지동물에 의해 매개되는 아르보바이러스(Arbovirus, arthropod-borne virus)에 의한 감염병이 지속적으로 증가하고 있다. 상기 아르보바이러스는 척추동물 숙주간에 생물학적 전파를 통해 유지되는 바이러스로 정의된다. 이들은 척추동물내에서 증식하고 바이러스 혈증(viremia)을 유발시키고, 절지동물의 조직내에서 증식하고 외잠복기(extrinsic incubation period) 이후에 무는 곤충에 의하여 또 다른 척추동물로 전파된다.

[0005] 대표적인 아르보바이러스는 치군군야(Chikunguya), 오뇽뇽(O'Nyong Nyong), 로스 리버(Ross River), 신디비스(Sindbis) 및 마야로(Mayaro)를 포함하는 토가바이러스(Togaviridae) 과, 알파바이러스(Alphavirus) 속 바이러스; 황열(yellow fever), 뎅기열(denfue fever), 일본 뇌염(Japanese encephalitis) 바이러스, 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus), 온대성 유라시아의 진드기 매개 뇌염 바이러스(tick-borne encephalitis virus) 및 키야사나 삼림병(Kyasanur forest disease) 및 옴스크 출혈열(omsk hemorrhagic fever)의 원인이 되는 바이러스를 포함하는 플라바이러스(Flaviviridae) 과, 플라비바이러스(Flavivirus) 속 바이러스; 분야바이러스(Bunyaviridae) 과, 분야바이러스(Bunyavirus) 속 바이러스; 플리보바이러스(Phlebovirus) 속 바이러스, 나이로바이러스(Nairovirus) 속 바이러스; 등을 들 수 있다.

[0007] 상기 아르보바이러스 중 감염의 속도가 빠르고 수명에 치명적인 바이러스로는 뎅기바이러스(Dengue virus), 지카바이러스(Zika virus), 치쿤군야바이러스(Chikungunya virus), 황열병 바이러스(Yellow fever virus), 웨스트나일바이러스(West nile virus), 일본뇌염바이러스(Japanese encephalitis virus), 세인트루이스바이러스(St. Luise virus) 등이 있으며, 이집트숲모기(Aedes aegypti) 또는 흰줄숲모기(Aedes albopictus)의해 주로 전파된다.

[0009] 지카바이러스는 1947년 우간다 원숭이에서 처음 발견된 바이러스로 2015년 브라질 등 중남미를 중심으로 유행병으로 발병한 모기 매개 신종 바이러스이다. 2015년 유행하기 전까지는 인체 감염자 수가 비교적 적었고, 인체 감염 시 비교적 가벼운 증상만을 보였다. 하지만, 임신부에게 감염될 경우, 태아의 머리 및 뇌가 기형적으로 작은 소두증을 유발한다는 사실이 최근에서야 알려져 그 심각성이 대두되었다.

[0011] 세계보건기구(WHO)의 보고서에 따르면 2017년 현재 지카바이러스는 브라질, 푸에르토리코 등 76 개의 나라에서 발병되고 있다. 지구 온난화로 인한 기후 변화, 아열대성 기후 지역 확산 등으로 인한 모기의 활동 범위 확대, 활동 시기 증가, 모기 개체수가 증가 등이 원인이며, 이에 따른 지카바이러스 감염 또한 확산될 우려가 있다. 최근에는 성인에서도 급성 뇌염을 일으키는 사례가 보고되어 치료제 개발이 시급하다.

[0013] 최근, 기존의 FDA에서 승인받은 몇몇 약물이 *in vitro*에서 지카바이러스 저해에 효과를 보이고 있다(비특허문헌 1). 특히 현재 시판 중인 C형 간염바이러스의 복제효소를 타겟으로 하는 뉴클레오타이드유사체인 Sofosbuvir의 지카바이러스에 대한 항바이러스 효과도 *in vitro*에서 보고되었으나 아직까지 임상적 유효성 및 안정성은 보고된바 없다.

[0015] 또한, 뎅기바이러스의 경우 전 세계적으로 100여개 이상 국가에서 발생하며, 전 세계 인구의 거의 절반이 뎅기 감염증 위험에 노출되어 있다. 뎅기 쇼크는 적절한 치료를 받지 못할 경우 사망률이 20%에 이를 수 있다. 최근한 연구에 의하면 연간 뎅기 바이러스 감염자수는 3억 9000여명이며, 증상을 보이는 감염증 환자수는 9천600 여명이 예상된다고 보고되었다. 전 세계적으로 90억원이 매년 손실을 보고 있고, 감염자수 또한 매해 증가하고 있다. 그러나 현재까지 뎅기 감염증에 대한 치료제는 개발되지 못하였다.

[0017] 나아가, 치쿤군야바이러스에 의한 감염증은 주로 아프리카 및 아시아에서 보고되었으나, 2000년대 이후 유럽 및 아메리카에서 대유행을 일으켜 오고 있다. WHO 따르면, 2015년에 감염의심환자가 69만여명이었으며, 3만명 정도가 확진 판정을 받았고, 2016년에는 감염의심환자가 35만명 정도이며, 이중 14만여명이 확진환자였다. 감염증세가 뎅기바이러스 및 지카바이러스와 유사하여 구분하기 어려우나, 바이러스명이 심한 관절통으로인한 몸이 구부러지는 상태의 현지어 '치쿤군야' 로부터 유래된 만큼 심한 관절통을 수반하는 것으로 알려져 있다. 국내에서는 2010년 법정감염병으로 지정되었고, 국내 자체발생 보고는 없으나, 2013년도 이후 국외 여행객으로부터 5건 발생하여, 국외여행객의 주의가 필요하다. 역시 현재까지 개발된 백신 및 치료제는 없다.

[0018]

[0019] 최근 말라리아를 포함하여 모기에 의한 여러 바이러스의 동시감염 사례가 지속적으로 보고되고 있다. 예로

인도, 나이지리아를 여행한 젊은 남성에게서 치쿤군야바이러스, 뎅기바이러스, 말라리아의 동시 감염사례 및 콜롬비아에서 지카바이러스, 뎅기바이러스 및 치쿤군야바이러스 세종의 바이러스에 동시감염된 임신부 환자 사례 등이 보고되고 있다. 또한 나이지리아 거주인 310명의 감염사례를 분석한 결과, 뎅기바이러스, 웨스트나일바이러스, 황열병바이러스 및 치쿤군야 바이러스의 1종이상의 동시감염사례가 76.8% 이상으로 보고되어 그 심각성이 대두되고 있다.

[0021] 인삼 및 홍삼 (*Panax ginseng*)은 한국을 포함하는 동남아시아지역에서 전통적으로 다양한 질병의 예방 및 면역기능강화 등의 건강기능식품으로 잘 알려져 왔다. 인삼 및 홍삼은 진세노사이드 등의 다양한 생리활성물질을 포함하고 있는데, 최근 이러한 생리활성물질들이 단순한 질병 예방 및 면역기능 강화 효과뿐만 아니라, 탁월한 항바이러스 효과도 보여 항바이러스 저해제로서의 중요한 후보 물질로 연구되어 왔다(비특허문헌 2).

[0023] 본 발명자들은 인삼 또는 홍삼 추출물로 잘 알려진 진세노사이드 유도체 중, 특정 구조를 가지는 성분이 지카바이러스, 뎅기바이러스, 치쿤군야바이러스 등의 아르보바이러스 저해제로서 탁월한 효능을 나타냄을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0025] (비특허문헌 0001) Cell Host & Microbe, 2016;20:259270, Antiviral Res. 2017;137:134-140, Scientific Reports, 2017;7:40920, Nature Medicine, 2016;22:11011107;

(비특허문헌 0002) J Ginseng Res. 2016;40(4):309-314.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0026] 본 발명의 목적은 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0028] 본 발명의 다른 목적은 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는데 있다.

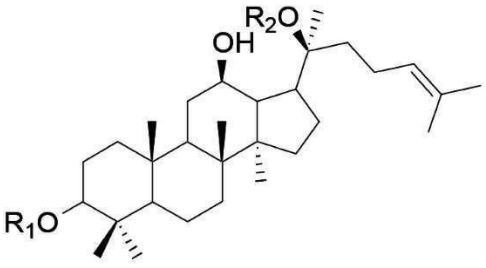
[0030] 본 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 개선용 구강청정제를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0032] 상기 목적을 해결하기 위하여,

[0033] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0034] [화학식 1]

[0035] 

[0036] (상기 화학식 1에서,

[0037] R_1 및 R_2는 본 발명의 명세서에서 정의한 바와 같다).

[0039] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0041] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 개선용 구강청정제를 제공한다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 또는 구강청정제를 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0045] 나아가, 본 발명은 아르보바이러스 감염의 예방 또는 치료에 있어서의, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 또는 구강청정제의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0047] 본 발명에 따른 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 세포 내 아르보바이러스 유전체를 저해하고 아르보바이러스 단백질을 감소시킬 뿐만 아니라, 아르보바이러스에 의한 세포 사멸 보호 효과를 나타내므로 아르보바이러스의 감염을 예방, 개선 또는 치료하는데 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 실시예 1의 인간 간암세포(Huh7)에서 Rg3의 세포독성 및 지카바이러스에 의한 세포사멸 보호 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 실시예 1의 지카바이러스 증식 저해효과를 자손 바이러스 유전체 감소 및 세포 내 지카바이러스 E 단백질 감소를 보여준다.

도 3은 실시예 1의 인간 신장세포(HEK293)에서의 세포독성을 보여주는 그래프이다.

도 4은 실시예 1의 인간 신장세포(HEK293)에서 지카바이러스 증식 저해효과 및 바이러스에 의한 세포사멸 보호 효과를 보여주는 그래프이다.

도 5는 실시예 1로 처리한 숙주세포로부터 지카바이러스 입자의 방출 저해를 보여주는 그래프이다.

도 6은 실시예 1의 인간 간세포(Huh7)에서의 뎅기바이러스 및 치쿤군야바이러스의 증식 저해효과를 보여주는 그래프이다.

도 7은 실시예 2의 인간 간세포(Huh7)에서의 지카 바이러스, 뎅기바이러스 및 치쿤군야 바이러스의 증식 저해효과를 보여주는 그래프이다.

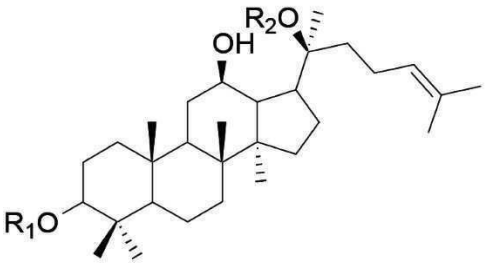
도 8은 실시예 2의 인간 간암세포(Huh7)에서 Compound K의 세포독성 및 지카바이러스에 의한 세포사멸 보호 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0052] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0053] [화학식 1]



[0054]

[0055] 상기 화학식 1에서,

[0056] R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 수소, -Glc, -Glc$^{2-1}$Glc, -Glc$^{6-1}$Glc, -Glc$^{6-1}$Xyl, -Glc$^{6-1}$ara(p), 또는 -Glc$^{6-1}$ara(f)이고,

[0057] 이때, 상기 Glc는 β-D-글루코오스; Ara(p)는 α-L-아라비노피라노오스; Ara(f)는 α-L-아라비노퓨라노오스; Xyl은 자일로오스이다.

[0059] 이하, 본 발명에 따른 약학적 조성물에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0061] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 아르보바이러스는 흡혈 절지동물에 의해 매개되는 아르보바이러스(Arbovirus, arthropod-borne virus)로서 척추동물 숙주간에 생물학적 전파를 통해 유지되는 바이러스를 의미한다. 이러한 아르보바이러스는 척추동물내에서 증식하고 바이러스 혈증(viremia)을 유발시키고, 절지동물의 조직내에서 증식하고 외잠복기(extrinsic incubation period) 이후에 무는 곤충에 의하여 또 다른 척추동물로 전파된다.

[0062] 상기 아르보바이러스로서 바람직하게는 상기 아르보바이러스는 지카바이러스(Zika virus), 뎅기바이러스(Dengue virus), 황열병 바이러스(Yellow fever virus), 일본뇌염바이러스(Japanese encephalitis virus), 및 세인트루이스바이러스(St. Louis encephalitis virus)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 플라비바이러스과; 및 치쿤군야바이러스(Chikungunya virus), 웨스트나일바이러스(West nile virus) 및 로스리버 바이러스(Ross River virus)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 토가바이러스과로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있고, 지카바이러스, 뎅기바이러스, 치쿤군야바이러스 등이 보다 바람직하다.

[0064] 본 발명에 따른 아르보바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분은 상기 화학식 1로 표시되는 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다.

[0066] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 화학식 1의 진세노사이드 유도체로는 바람직하게는 프로토파낙시디올(Protopanaxadiol)군에 해당하는 Rb1, Rb2, Rg3, F2, Rh2, Ra, Rd, Ra 및 Compound Y, Compound K, Compound O, Compound Mc 등으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0068] 보다 바람직하게는 상기 R_1 및 R_2가 각각 독립적으로 수소, -Glc, -Glc$^{2-1}$Glc 또는 -Glc$^{6-1}$Glc인 진세노사이드 유도체 일 수 있으며, 보다 더 바람직하게는 상기 R_1가 수소 또는 -Glc$^{2-1}$Glc 이고, R_2는 수소 또는 -Glc인 진세노사이드 유도체일 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명에 따른 화학식 1의 진세노사이드 유도체는 생체 내에서 프로토파낙시디올 군으로 전환될 수 있는 진세노사이드 뿐만 아니라, 진세노사이드의 프로드럭(prodrug) 형태를 포함할 수 있다.

[0072] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 화학식 1의 진세노사이드 유도체는 식물로부터 추출되거나 화학적으로 합성된 것일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 인삼 및 홍삼의 추출물로부터 분리하여 단일 화합물로 정제되어 사용될 수도 있으나, 인삼 및 홍삼 추출물에 포함되어 있는 형태로도 사용할 수 있다.

[0074] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 본 발명에 따른 화학식 1의 진세노사이드 유도체의 약학적으로 허용가능한 염은 유기산 또는 무기산을 이용하여 형성된 산 부가염 일 수 있다. 상기 유기산은, 예를 들면 포름산, 아세트산, 프로피온산, 락트산, 부티르산, 아이소부티르산, 트리플루오로아세트산, 말산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 숙신산, 숙신산 모노아미드, 글루탐산, 타르타르산, 옥살산, 시트르산, 글리콜산, 글루쿠론산, 아스코르브산,

벤조산, 프탈산, 살리실산, 안트라닐산, 디클로로아세트산, 아미노옥시 아세트산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 및 메탄술폰산계 염을 포함하며; 무기산은, 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산, 탄산 및 붕산계 염을 포함한다. 상기 언급된 산 부가염은 당업계에 공지된 방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0076] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 화학식 1의 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 항바이러스 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 이러한 유효량은 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 약학적 조성물의 화학식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용되는 염은 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있으며, 1㎍/일~ 1g/kg/일의 용량으로 투여할 수 있다.

[0078] 본 발명의 약학적 조성물은 유효 성분인 화학식 1의 진세노사이드 유도체 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.

[0080] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0081] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 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 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 약제 제제 형태는 에어로졸, 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제, 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

[0085] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 구강내, 비강내, 경피, 흡입, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있으나, 본 발명의 대상이 되는 아르보바이러스는 침 및 오줌에서 활성을 잃지 않을 수 있다고 보고된 바에 의해, 예방을 위해서는 구강청정제와 같은 액제의 형태로 만들어 구강내로 투여할 수 있다.

[0087] 본 발명에 따른 진세노사이드 유도체는 하기 실험예를 통하여, 지카바이러스, 뎅기바이러스, 치쿤군야 바이러스의 자손 방출을 효과적으로 저해하고, 세포 독성이 낮음을 확인한 바, 안전하고도 효과적인 아르보바이러스 저해제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0089] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0091] 건강기능식품이란, 화학식 1의 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 함유되어 있는 식물의 추출물 또는 그의 분획물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다.

[0093] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 알코올, 음료류, 과자류, 다이어트바, 유제품, 육류, 초코렛, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

[0094] 예를 들면, 본 발명의 건강기능식품 조성물이 드링크제와 같은 음료류로 제조되는 경우 화학식 1의 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 함유되어 있는 식물의 추출물 또는 그의 분획물 이외에도 구연산, 액상과당, 설탕,포도당, 초산, 사과산, 과즙, 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0096] 상술한 건강기능식품에 있어서의 화학식 1의 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 함유되어 있는 식물의 추출물 또는 그의 분획물의 첨가량은, 대상인 건강기능식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규

정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 과립, 정제 또는 캡슐형태의 식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량% 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다. 한 구체예에서, 본 발명의 건강기능식품은 드링크와 같은 음료의 형태일 수 있다.

[0098] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 개선용 구강청정제를 제공한다.

[0099] 본 발명의 유효성분으로부터 아르보바이러스 예방을 위해서는 구강청정제와 같은 액제의 형태로 만들어 구강내로 투여할 수 있다.

[0100] 본 발명의 구강청정제는 화학식 1로 표시되는 진세노사이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염외에도 구강청정제의 향미나 사용감을 향상시키기 위해 민트, 시나믹알데히드, 메틸살리실레이트, 레모노일, 시트랄과 같은 향료를 함유할 수있다. 추가로 함유되는 향료의 함량은 0.1~1.0중량%일 수 있다.

[0102] 또한, 본 발명의 구강청정제는 잇몸질환 예방 및 항균효과가 큰 것으로 널리 알려져 있는 트리클로산을 0.005~1.0중량%, 보다 바람직하게는 0.01~0.3중량%를 함유할 수 있다. 0.005중량% 이하가 되면 조성물 내에서 트리클로산의 항균효과를 기대할 수 없게 되고, 1.0중량% 이상을 사용하면, 항균물질의 과다 복용으로 인해 생길 수 있는 세균들의 내성 증가를 유발할 우려가 있다.

[0104] 나아가, 본 발명의 구강청정제는 치아 에나멜질의 내산성을 증가시켜 치아의 우식예방에 효과가 있는 불소화합물, 예를 들어 불화나트륨 및 제일불소인산나트륨을 단독 또는 혼합 사용할 수 있다. 불소화합물의 함량은 구강청정제 총 중량에 대하여 0.001~3중량%, 바람직하게는 0.005~1.0중량%이며, 유효 불소량인 1200ppm(국내 사용허용치)을 넘지 않도록 하는 것이 바람직하다. 불소 함량이 너무 많으면, 구강내 불소 중독증을 초래해 구강의 안전성에 영향을 주게 된다. 일반적으로 구강청정제는 1회 사용량이 치약보다 많기 때문에 치약 조성물에 비해 불소화합물을 적게 사용해야만 한다.

[0106] 또한, 본 발명의 구강청정제는 구강청정제의 일반적인 성분인 습윤제, 기포제, 감미제, 용제 및 기타 성분들을 포함할 수 있다.

[0107] 습윤제로서는 솔비톨, 글리세린, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등을 들 수 있으며, 그 함량은 구강청정제 총 중량에 대하여 1~30중량%, 바람직하게는 5~20중량%이다. 일반적으로 구강청정제에 사용되는 기포제로는 라우릴황산나트륨, 라우로일사코신산나트륨 등의 음이온성 계면활성제; 폴리옥시에틸렌과 폴리옥시프로필렌 공중합체(Poloxamer) 등의 비이온성 계면활성제를 단독 또는 혼합 사용할 수 있으며, 그 함량은 0.1~10중량%, 바람직하게는 0.3~5중량%이다.

[0109] 나아가, pH 조정제로 제일인산나트륨 또는 제삼인산나트륨, 및 에칠렌디아민테트라아세테이트이나트륨(EDTA 2Na)등을 사용할 수 있으며, 조성물의 pH는 약산성 또는 중성 영역인 5.0~8.0이 바람직하다. 일반적으로 조성물의 pH가 낮을수록 조성물의 안정성을 확보하기가 쉬워지나, 조성물의 pH가 5.0 이하가 되면 조성물의 산성으로 인해 구강내 산성화도의 증가와 같은 좋지 않은 영향을 미칠수가 있으며, pH가 8.0 이상이 되면 조성물의 안정성을 확보하기 어려운 단점이 있다.

[0111] 또한, 본 발명은 감미제로서는 삭카린, 스테비오사이드 등이 사용될 수 있으며, 그 함량은 0.01~0.5중량%가 바람직하다. 또한 양치시 상쾌한 정도를 증가시키기 위해 에탄올을 함유할 수 있으며, 그 함량은 전체 중량에 대해 0.1~15중량%, 바람직하게는 1~10중량%이다.

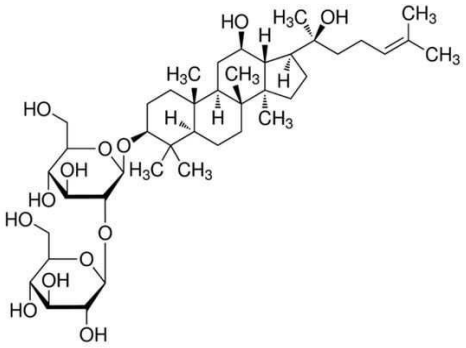
[0113] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 또는 구강청정제를 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 아르보바이러스 감염의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0115] 나아가, 본 발명은 아르보바이러스 감염의 예방 또는 치료에 있어서의, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품 조성물 또는 구강청정제의 용도를 제공한다.

[0117] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0118] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

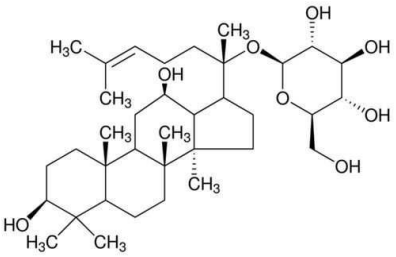
[0120] **<실시예 1> 진세노사이드 Rg3**



[0121]

[0122] 진세노사이드 Rg3은 Sigma로부터 구입하여 사용하였으며, 제품번호는 Cat# 64139이다.

[0124] **<실시예 2> 진세노사이드 Compound K**



[0125]

[0126] 진세노사이드 Compound K는 앰보연구소(Ambo institute, http://www.ambo.co.kr)로부터 구입하여 사용하였다.

[0128] **<실험예 1> 지카바이러스 감염 인간 간암세포(Huh7)에서의 진세노사이드 Rg3의 저해효과**

[0129] 본 발명에 따른 진세노사이드 Rg3의 지카바이러스 감염 저해효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

[0131] 1. 지카바이러스 감염 세포 사멸 관찰

[0132] 인간 간암세포(Huh7)에 지카바이러스를 감염 후, 일정시간이 지나면 지카바이러스 감염에 의한 세포 사멸 효과(cytopathic effect)가 관찰되며, 이때 세포 외부의 상층액에 존재하는 지카바이러스의 유전체를 측정하여 지카바이러스 저해효과를 측정할 수 있다. 구체적으로, Huh7 세포(1- 5 x 10^4 세포수)를 96-well 플레이트에 배양한 후, 0.5 - 2 MOI의 지카바이러스를 3시간 동안 감염시켰다. 다음으로, 진세노사이드 Rg3를 농도별 (0-100 μM)로 처리한 후, 지카바이러스 감염에 의한 Huh7세포의 세포사멸이 보이는 3-5일 후에 지카바이러스 유전체를 분리한다. 유전체 분리는 세포 외부 상층액 (140 μl)에서 Qiagen 사의 viral RNA extraction kit을 이용하여 진행하였다(3회 반복, triplicate). 분리된 유전체는 kit에 포함되어 있는 carrier RNA 및 감염에 의한 지카바이러스 RNA가 함께 존재하며, carrier RNA가 월등히 많다. 따라서, 분리된 RNA를 정량 후, 동일 양 (500 ng - 1 μg)의 RNA로부터 지카바이러스 특이적인 프라이머 (forward primer: 5'- GGA TGG TGC AAA GGG AAG GC -3', reverse primer: 5'- GGG GGA GTC AGG ATG GTA CT -3')를 이용하여 real-time qRT-PCR(Biorad, CFX96)을 통하여 분석하였다 (각 시료 당 2회 반복, duplicate).

[0134] 도 1은 실시예 1의 인간 간암세포(Huh7)에서 Rg3의 세포독성 및 지카바이러스의 자손 바이러스 생성 감소 효과를 나타낸 그래프이다.

[0136] 도 1에 나타난 바와 같이, 지카바이러스가 감염되지 않은 세포에서 Rg3의 50%의 세포 독성을 보이는 농도는 297.4 uM 이었다 (도 1A). 지카바이러스가 감염되지 않는 시료를 기준으로 바이러스 유전체의 상대적 양을 비교하면, 농도별로 지카바이러스 유전체 감소 효과를 볼 수 있었다(도 1B). 50%의 바이러스 감소 효과를 보이는 농도는 22.4 μM 이었다.

[0138] 2. 지카바이러스 감염 세포 내 지카바이러스 E (envelope) 단백질 관찰

[0139] 상기 실험에서 외부 상층액 제거 후, MTT assay 방법 (3회 반복, triplicate)으로 측정한 결과, 감염되지 않는

세포를 100% 기준으로 하였을 때, 감염된 세포에서는 80% 이상의 세포사멸을 보였으며, 진세노사이드 Rg3 농도에 의존적으로 세포 사멸 저해효과가 나타남을 알 수 있다(도 2A). 진세노사이드 Rg3 처리에 따른 지카바이러스 저해효과를 바이러스가 감염된 세포에서의 지카바이러스 E (envelope) 단백질을 관찰함으로서 재확인하였다. 상기 실험에서와 유사한 방법으로 바이러스 감염 및 Rg3 처리 후, 4% paraformaldehyde를 이용하여 세포를 고정(fixation) 하였다. 이 후, 지카바이러스 E 단백질을 인식하는 항체 (GeneTex, GTX133314) 및 형광이 표지된 항체를 이용하여 바이러스 감염된 세포 수의 감소를 확인하였다.

[0141] 도 2는 실시예 1의 지카바이러스 증식 저해효과를 지카바이러스에 의한 세포사멸 저해 및 지카바이러스 E 단백질에 대한 항체를 이용하여 측정한 분석을 보여준다.

[0143] 도 2에 나타난 바와 같이, Rg3 50 μM 및 100 μM 농도에서 바이러스 E 단백질을 발현하는 세포수가 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 도 1에서 볼 수 있듯이, Huh7세포에서 진세노사이드 Rg3는 100 μM 까지 세포 독성 및 세포 증식에 큰 영향을 미치지 않는 바, 지카바이러스 감염에 의한 세포 사멸 저해는 진세노사이드 Rg3의 효과임이 명백하다.

[0145] 따라서, 진세노이드에 의한 지카바이러스 저해 효과는 자손 바이러스 유전체의 감소뿐만 아니라, 세포 사멸 보호 및 세포 내 바이러스 단백질을 감소 등의 우수한 효과를 나타내는 바, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 바이러스 저해제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0147] **<실험예 2> 지카바이러스 감염 인간 신장세포(HEK293)에서의 진세노사이드 Rg3의 저해효과**

[0148] 상기 실험예 1의 진세노사이드 Rg3의 지카바이러스 저해효과가 인간 간암세포 특이적인 현상이 아님을 증명하기 위해 인간 신장세포인 HEK293세포에서도 관찰하였다. 실험예 1에 기술된 동일한 방법으로 측정하였으며, 매우 유사한 결과를 도출할 수 있었다.

[0150] 도 3는 실시예 1의 인간 신장세포(HEK293)에서의 세포독성을 보여주는 그래프이다.

[0151] 도 4은 실시예 1의 인간 신장세포(HEK293)에서 지카바이러스 증식 저해효과 및 바이러스에 의한 세포사멸 보호 효과를 보여주는 그래프이다.

[0153] 도 4에 나타난 바와 같이, Rg3 50 μM 및 100 μM 농도에서 세포 외부의 바이러스 유전체가 95% 이상 감소하였으며(도 4A), 지카바이러스에 의한 세포사멸 또한 Rg3 농도에 따라 저해됨을 알 수 있다(도 4B). 또한, 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, HEK293 세포에서도 진세노사이드 Rg3는 100 μM 까지 세포 독성 및 세포 증식에 큰 영향을 미치지 않는 바(도 3), Rg3의 지카바이러스 저해 효과는 세포 특이적으로 일어나는 현상이 아님을 확인하였다.

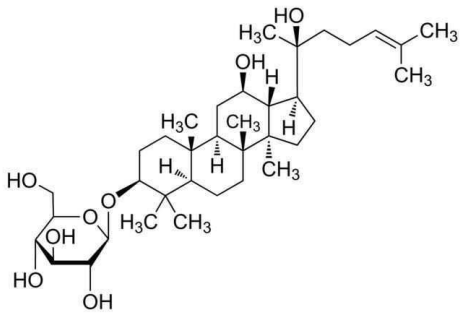
[0155] 따라서, 진세노이드에 의한 지카바이러스 저해 효과는 자손 바이러스 유전체의 감소뿐만 아니라, 세포 사멸 보호 및 세포 내 바이러스 단백질을 감소 등의 우수한 효과를 나타내는 바, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 바이러스 저해제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0157] **<실험예 3> 치료지수(therapeuctic index) 도출**

[0158] 상시 실험예 1의 진세노사이드 Rg3의 치료지수를 유사 화합물인 Rh2 및 compound K와의 치료지수와 비교하였다. 치료지수는 약물의 독성용량을 유효용량으로 나눈 값으로 계산되며, 치료지수가 클수록, 안전성이 큰 약물이다.

[0159] 약물의 특이성을 살피기 위하여 Rg3와 구조적으로 매우 유사한 Rh2 및 compound K를 함께 비교하였다. 이때, Rh2의 화학 구조는 하기와 같다.

[0161] [Rh2의 화학구조]

[0162] 

[0164] 실험예1 과 유사한 방법으로 Rh2와 compound K의 50% 세포사멸 농도 및 50% 자손 바이러스 유전체 감소 농도를 구한 후, 치료지수를 계산하였다.

[0166] 표 1은 Rg3, Rh2, compound K의 치료지수를 도출한 결과이다.

표 1

[0167]

화합물	CC_{50}(μM)	EC_{50}(μM)	TI
Rg3	297.4	22.4	13.3
Rh2	40.2	31.9	1.3
Compound K	36.2	20.7	1.8

[0168] 상기 표 1에서, TI는 치료 지수(Therapeutic index)를 나타내며,

[0169] 그 값은 하기 수학식 1에 의해 계산된 것이다.

[0171] [수학식 1]

[0172] $TI=CC_{50}/EC_{50}$

[0174] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 Rg3는 50% 세포사멸 농도(CC_{50})가 Rh2 및 Compound K에 비하여 현저하게 높은 값을 나타내고, Rg3 및Compound K는 Rh2에 비하여 현저하게 낮은 50% 자손 바이러스 유전체 감소 농도(EC_{50})를 나타내는 것을 알 수 있다. 이로부터 본 발명의 Rg3 및 Compound K는 유사한 구조를 나타내는 Rh2와 비교하여 우수한 TI 수치를 나타냄을 확인하였다.

[0175] 특히, Rg3은 Rh2와 비교하여 7배 이상의 현저하게 높은 CC_{50} 값을 나타내었으며, EC_{50} 값 또한 Rh2와 비교하여 약 70% 수준의 낮은 값을 나타내었으며, 10배 이상 높은 TI 값을 나타냄을 확인하였다.

[0176] 또한, Rg3의 치료지수는 13.3으로 Rh2 (1.3)보다 월등히 높아 다른 유사 화합물보다 약물 효과 대비 안전성이 월등하였다. 특히, Rg3는 -Glc-Glc-의 구조를 가지고 있는데, 같은 위치의 -Glc- 구조를 가지고 있는 Rh2 및 -Glc- 구조가 없는 compound K에 비해 높은 안전성을 가지고 있으므로, Rg3의 -Glc-Glc- 구조가 특이성 및 안정성을 결정하는 중요한 인자로 작용함을 도출하였다.

[0177] 나아가, Compound K 또한 치료 지수가 유사한 구조를 나타내는 Rh2보다 약 1.3배 이상의 높은 값을 나타냄을 확인하였다.

[0179] **<실험예 4> 진세노사이드 Rg3 처리에 의한 숙주세포로부터 지카바이러스 입자의 방출 저해 효과**

[0180] 지카바이러스가 감염된 HEK293세포를 세포사멸이 일어나기 전에 수확한 후, 동일하게 나누어 각각에서 RNA 및 단백질을 분리하였다.

[0182] 세포 외 자손 바이러스 유전체 분석은 실험예 1과 유사한 방법으로 진행되었으며, 세포 내 바이러스 유전체 복제 정도는 지카바이러스 특이적인 프라이머 및 숙주세포 단백질인 β-actin의 프라이머 (forward: 5' GAT GCA GAA GGA GAT CAC TG -3'reverse: 5'CTG CTT GCT GAT CCA CAT -3'로 증폭한 후, β-actin 증폭정도 대비 지카바이러스 유전체 증폭 정도를 정규화(normalize)하여 분석하였다.

[0183] 단백질 분석의 경우, 분리된 단백질을 정량 한 후, 동일 양을 SDS-PAGE젤에서 분리한 후, 지카바이러스 E 단백질 항체 (GeneTex, GTX133314) 및 β-actin 항체를 이용하여 블로팅하였다. 또한, 정량적 분석을 위해 ImageJ (NIH, USA) 소프트웨어를 이용하여 지카바이러스 E 단백질의 양을 β-actin 양으로 정규화(normalize)하여 정량적으로 분석하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0185] 도 5는 실시예 1로 처리한 숙주세포로부터 지카바이러스 입자의 방출 저해를 보여주는 그래프이다.

[0187] 도 5에 나타난 바와 같이, 세포 외 바이러스 유전체의 경우 Rg3가 처리된 그룹에서는 95%이상 저해되었으나 (도 5A), 세포 내에서는 진세노사이드 Rg3를 처리한 그룹이 처리하지 않는 그룹에 비해 지카바이러스 유전체 복제가 높게 나타났다 (도 5B). 또한, 지카바이러스 단백질량 역시 진세노사이드 Rg3를 처리한 그룹이 처리하지 않은 그룹보다 많았으며, 세포 내 유전체 양과 매우 유사한 결과를 도출하였다 (도 5C).

[0188] 바이러스는 초기 감염 시 유전체를 복제하고 바이러스 단백질이 생성된 후, 자손 바이러스 증식을 위해 유전체

및 바이러스 단백질이 합체되어 세포 밖으로 방출되어야 한다. 이 과정에서 바이러스 방출이 일어나지 못하면 세포 내에서 유전체 및 바이러스 단백질이 축적되게 된다.

[0189] 따라서, 실험예 4로부터 도출된 진세노사이드 Rg3에 의한 자손 바이러스 유전체 저해 및 세포 내 바이러스 유전체 및 바이러스 단백질 축적 결과는 진세노사이드 Rg3가 숙주세포로부터 지카바이러스 입자의 방출을 저해하는 기작을 통해 바이러스 증식을 저해하는 것을 명백히 나타내는 것이다. 그러므로, 진세노사이드 Rg3의 이러한 기작 때문에, 기존에 알려진 뉴클레오사이드 기반의 바이러스 복제 저해제와 함께 사용할 수 있는 약물혼합치료요법으로 활용도 가능할 것으로 사료된다.

[0191] **<실험예 5> 진세노사이드 뎅기 및 치쿤군야 바이러스 저해효과**

[0192] 지카바이러스와 뎅기바이러스는 플라비비리대과 (*Flaviviridae* family)의 플라비바이러스속 (Flavivirus genus)에 속하는 바이러스로 두 바이러스 사이에 어느 정도 유사성이 있다고 알려져 있다. 예를 들면, 지카바이러스와 뎅기바이러스의 E 단백질 아미노산 서열로 계통수를 조사하였을 때, 두 바이러스의 E 단백질이 매우 유사하며, 이를 이용하여 지카바이러스 및 뎅기바이러스 모두 중화할 수 있는 중화항체 개발에 관한 내용이 최근 보고되었다 (Nature 2016;536, 4853). 또 다른 예로, 두 바이러스사이의 항체교차반응성 (sero-cross-reactivity)으로 인해 앞선 예와는 반대로 뎅기바이러스 항체가 항체 의존적으로 지카바이러스 감염을 심화 시킬 수 있다고 보고되어 있다(Nature Immunology, 2016;17:11021108).

[0193] 따라서, Rg3 역시 지카바이러스 뿐만 아니라 뎅기바이러스에도 항바이러스 효과를 보일 개연성이 있는 바, 이를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

[0194] 구체적으로, 실험예 1과 유사한 방법으로 실시예 1의 Rg3 (50 μM, 100 μM)의 뎅기 바이러스에 대한 항바이러스 효과를 측정하였다. 효과 측정을 위해 이미 보고된 뎅기바이러스 특이적인 프라이머 (Virol J. 2009;6:10)를 사용하였다.

[0196] 도 6A는 실시예 1 및 실시예 2의 인간 간세포(Huh7)에서의 뎅기바이러스 증식 저해효과를 보여주는 그래프이다.

[0198] 도 6A에서 알 수 있는 바와 같이, 세포외부의 자손 바이러스 증식정도가 Rg3의 경우, 50 μM 이상에서 90% 이상, 100 μM에서 95% 이상의 저해효과를 보였다 (도 6A).

[0199] 따라서, Rg3가 플라비바이러스속 (Flavivirus genus)에 속하는 지카바이러스 및 뎅기바이러스의 항바이러스 저해제로서 탁월한 효능이 있음을 알 수 있다.

[0201] 치쿤군야바이러스는 토가비리대과 (*Togaviridae* family)의 알파바이러스속 (alphavirus genus)에 속하는 바이러스로, 지카바이러스 및 뎅기바이러스의 전파매개인 이집트숲모기 (Aedes aegypti) 또는 흰줄숲모기 (Aedes albopictus)의해 매개되는 아르보바이러스 (arbovirus)의 일종이다. 또한, 상기 서술한 것처럼 모기매개 바이러스의 동시 감염성이 대두되는 만큼 진세노사이드의 치쿤군야 바이러스에의 항바이러스 효과도 중요하다. 따라서, Rg3가 치쿤군야 항바이러스 효과를 보일 개연성이 있는 바, 이를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

[0203] 구체적으로, 실험예 1과 유사한 방법으로 실시예 1의 Rg3 (50 μM - 150 μM의 치쿤군야바이러스에 대한 항바이러스 효과를 측정하였다. 효과 측정을 위해 이미 보고된 치쿤군야바이러스 특이적인 프라이머 (PLoS Med 3(7) e263)를 사용하였다.

[0205] 도 6B는 실시예 1 및 실시예 2의 인간 간세포(Huh7)에서의 치쿤군야바이러스 증식 저해효과를 보여주는 그래프이다.

[0207] 도 6B에서 알 수 있는 바와 같이, 세포외부의 자손 바이러스 증식정도가 Rg3의 경우, 150 μM 이상에서 50% 이상의 저해효과를 보였다.

[0208] 따라서, Rg3가 지카바이러스 및 뎅기바이러스의 전파매개인 이집트숲모기 (Aedes aegypti) 또는 흰줄숲모기 (Aedes albopictus)의해 매개되는 아르보바이러스 (arbovirus)의 일종인 치쿤군야 바이러스의 항바이러스 저해제로서 효능이 있음을 알 수 있다.

[0210] 따라서, Rg3가 모기매개 아르보바이러스 저해제로서 탁월한 효능이 있음을 알 수 있으므로, 동시 감염률이 높은 바이러스를 대상으로 다른 바이러스들의 감염성을 증가시키지 않을 뿐만 아니라, 세 종의 바이러스 모두에 탁월한 항바이러스 효과를 보이므로 보다 안정적이고 범용적인 항바이러스 저해제로 사용될 수 있다.

[0212] **<실험예 6> 진세노사이드 compound K의 지카바이러스, 뎅기바이러스 및 치쿤군야 바이러스 저해효과**

[0213] 진세노사이드들은 구조적으로 매우 유사한 화합물이며, 크게 20(S)-Protopanaxdiol군(Rb1, Rd, Rg3, F2, Rh2, Compound K 등) 및 20(S)-Protopanaxtriol군 (Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1 등)으로 나눌 수 있다. Rg3 및 compound K는 같은 20(S)-Protopanaxdiol군으로 분류되어 있다 (Molecules, 2015;20:19291-19309).

[0215] **1) 진세노사이드 compound K의 지카바이러스 저해효과**

[0216] 실험예 1과 동일한 방법으로 Huh7세포에서의 compound K의 지카바이러스 저해 효과를 측정하였다.

[0218] **2) 진세노사이드 compound K의 뎅기 및 치쿤군야 바이러스 저해효과**

[0219] 실험예 5과 동일한 방법으로 Huh7세포에서의 compound K의 뎅기 및 치쿤군야 바이러스 저해 효과를 측정하였다.

[0221] 상기 지카, 뎅기 및 치쿤군야 바이러스 저해효과 측정 결과를 도 7에 나타내었다.

[0223] 도 7은 실시예 2의 인간 간세포(Huh7)에서의 지카 바이러스, 뎅기바이러스 및 치쿤군야 바이러스의 증식 저해효과를 보여주는 그래프이다.

[0225] 도 7A에 나타난 바와 같이, 뎅기 바이러스에 대한 세포외부의 자손 바이러스 증식정도가 Compound K의 경우, 25 μM에서 약 50% 이상의 저해효과를 보였다.

[0226] 도 7B에 나타난 바와 같이, 치쿤군야 바이러스에 대한 세포외부의 자손 바이러스 증식정도가 Compound K의 경우, 25 μM에서 약 50% 이상의 저해효과를 보였다.

[0227] 도 7C에 나타난 바와 같이, 지카 바이러스에 대한 세포외부의 자손 바이러스 증식정도가 Compound K의 경우, 30 μM에서 약 50% 이상의 저해효과를 보였다.

[0229] 따라서, Compound K가 지카바이러스 및 뎅기바이러스에서 현저하게 우수한 항바이러스 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 상기 지카 및 뎅기 바이러스의 전파매개인 이집트숲모기 (Aedes aegypti) 또는 흰줄숲모기 (Aedes albopictus)의해 매개되는 아르보바이러스 (arbovirus)의 일종인 치쿤군야 바이러스의 항바이러스 저해제로서 효능이 있음을 알 수 있다.

[0231] 결론적으로, Compound K는 모기매개 아르보바이러스 저해제로서 탁월한 효능이 있으므로, 동시 감염률이 높은 바이러스를 대상으로 다른 바이러스들의 감염성을 증가시키지 않을 뿐만 아니라, 세 종의 바이러스 모두에 탁월한 항바이러스 효과를 보이므로 보다 안정적이고 범용적인 항바이러스 저해제로 사용될 수 있다.

[0233] **<실험예 7> 지카바이러스 감염 인간 간암세포(Huh7)에서의 진세노사이드 Compound K의 저해효과**

[0234] 본 발명에 따른 진세노사이드 Compound K의 지카바이러스 감염 저해효과를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 또한, 본 발명의 Rg3 및 Compound K와 유사한 구조를 가지는 Rh2의 지카바이러스 감염 저해 효과 또한 검증하였다.

[0236] **<지카바이러스 감염 세포 사멸 관찰>**

[0237] 실험예 1과 유사한 방법을 사용하여 지카바이러스가 감염되지 않은 세포 및 지카바이러스가 감염된 세포에서 Compound K 및 Rh2의 세포 독성 여부를 평가하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0239] 도 8은 실시예 2 및 Rh2의 인간 간암세포(Huh7)에서 Compound K의 세포독성 및 지카바이러스에 의한 세포사멸 보호 효과를 나타낸 그래프이다.

[0241] 도 8에 나타난 바와 같이,

[0242] 지카바이러스 비감염세포에서 Rh2는 약 33 μM까지 세포 생존율이 90% 이상을 나타냈고(도 8A), Compound K는 약 30μM까지 세포 생존율이 90% 이상을 나타냄을 알 수 있다(도 8D).

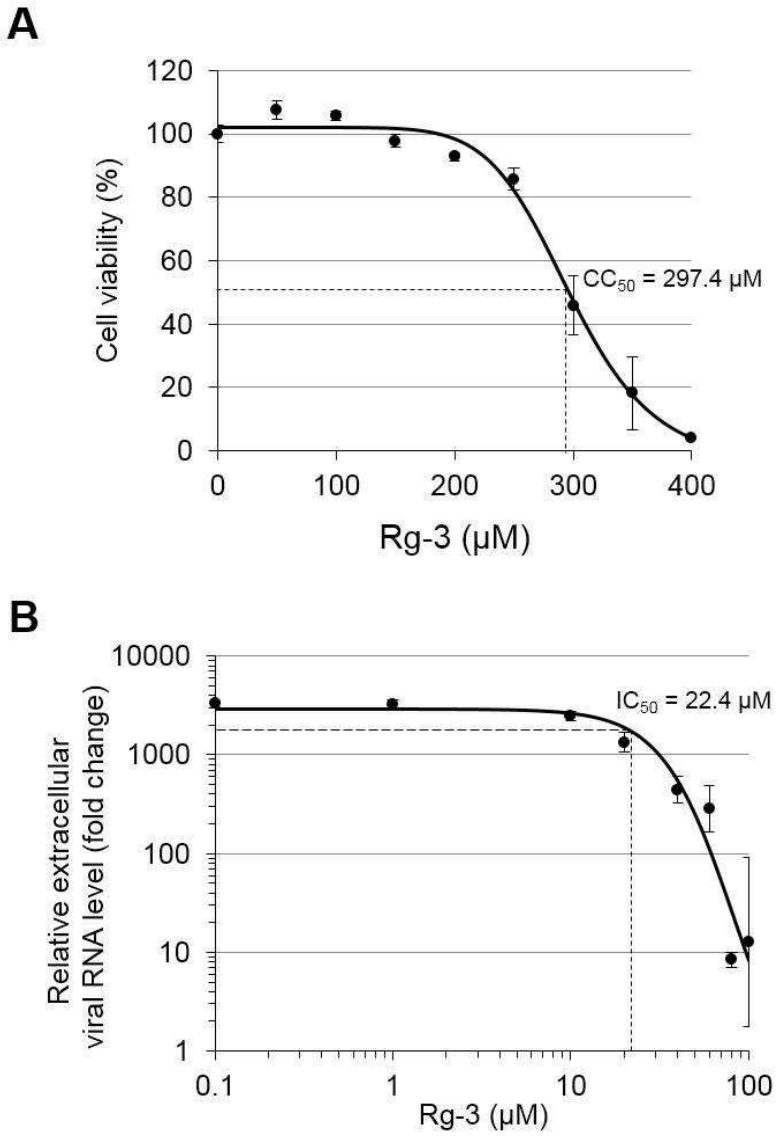
[0243] 또한, 지카바이러스 감염세포에서 Rh2는 35 μM 사용시에 Rh2 미처리군보다 약 2배정도 세포 사멸이 저해됨을 알 수 있고(도 8B), Compound K는 25 μM 사용시에 Compound K 미처리군보다 약 4배 이상 세포 사멸이 저해됨을 알 수 있다(도 8E).

[0244] 나아가, 지카바이러스가 감염되지 않는 시료를 기준으로 바이러스 유전체의 상대적 양을 비교하면, 농도별로 지카바이러스 유전체 감소 효과를 볼 수 있었다(도 8C 및 도 8F). 50%의 바이러스 감소 효과를 보이는 농도는 Rh2의 경우 31.9μM, Compound K의경우 20.7 μM 이었다.

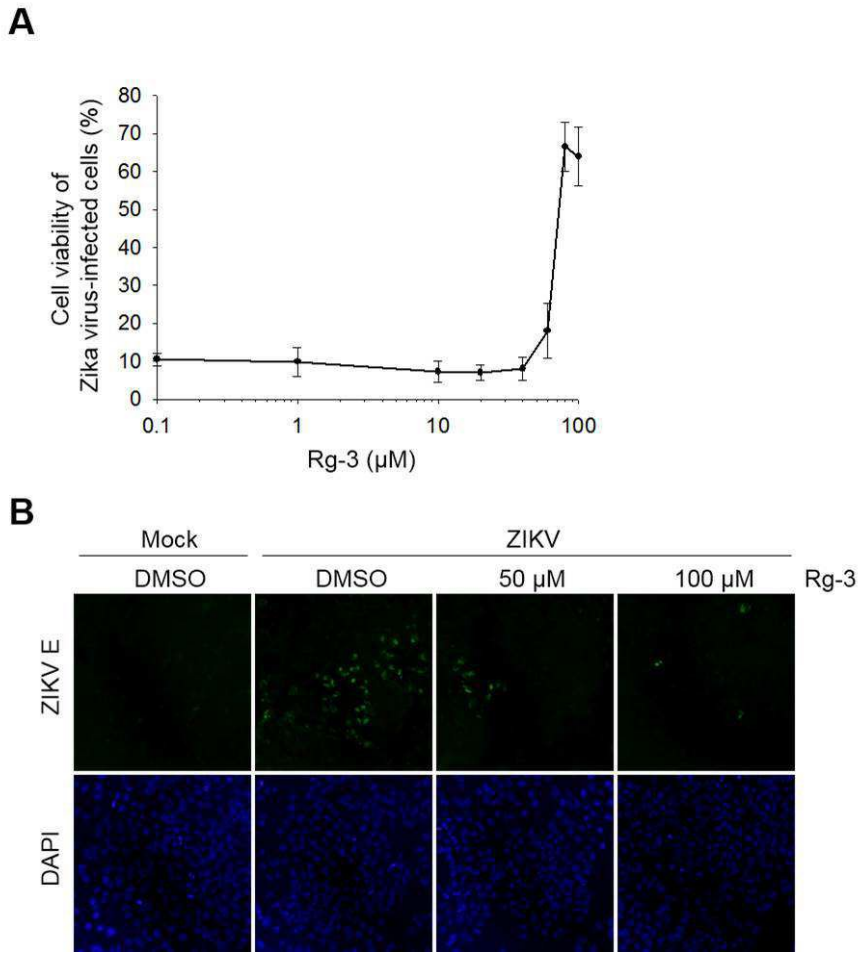
[0246] 상기 실험예 7의 결과를 통해, 본 발명의 Compound K는 Rh2보다 세포 독성은 유사하면서, 지카바이러스에 대한 항바이러스 효과는 우수함을 알 수 있다.

도면

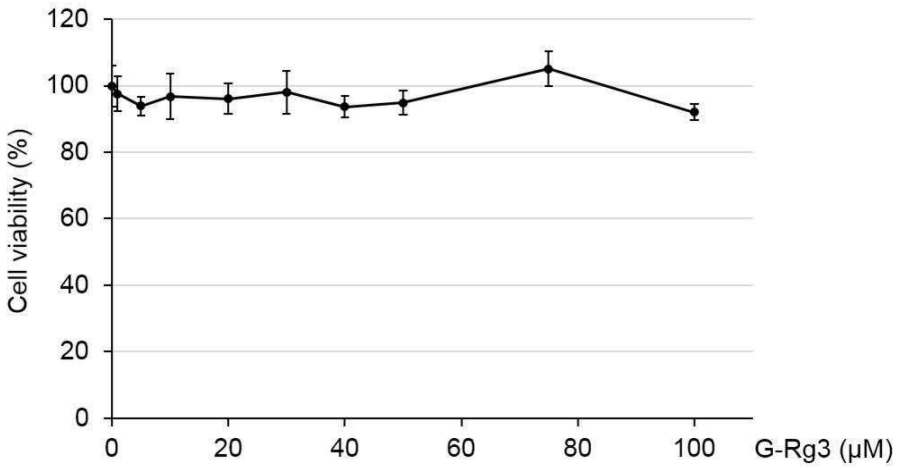
도면1



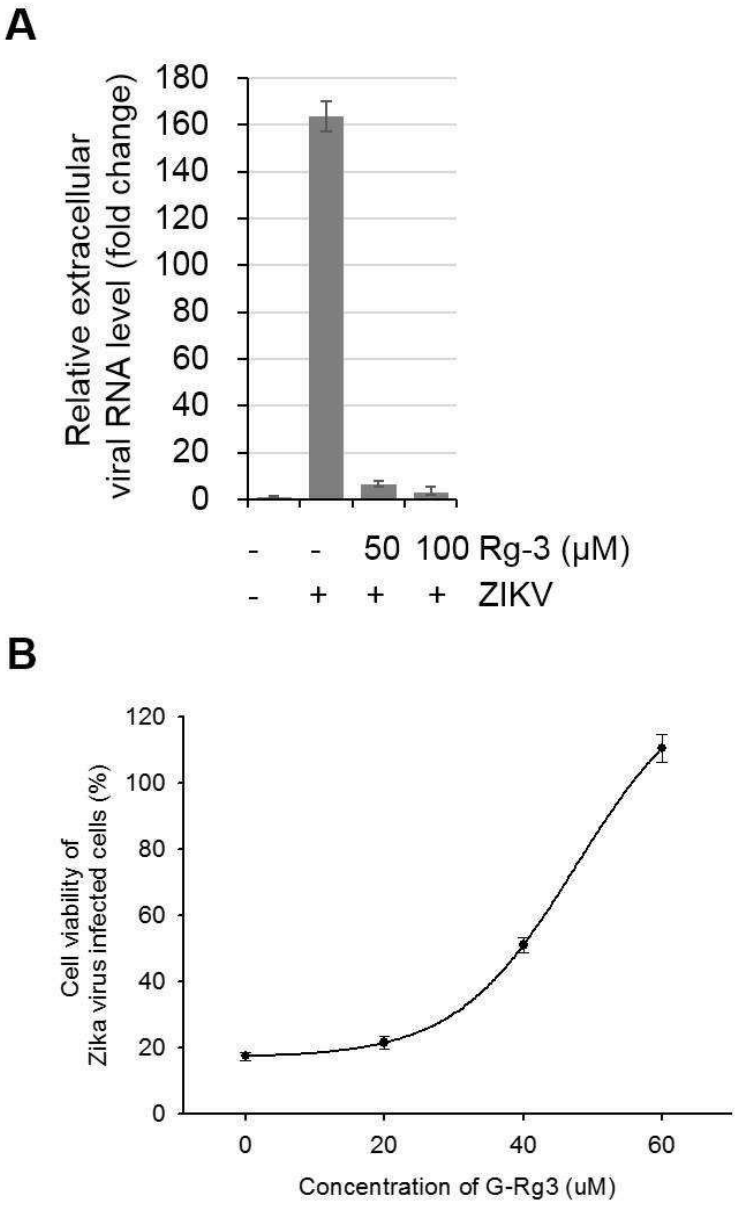
도면2


A
Cell viability of Zika virus-infected cells (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
Rg-3 (μM)
B
Mock
ZIKV
DMSO
DMSO
50 μM
100 μM
Rg-3
ZIKV E
DAPI

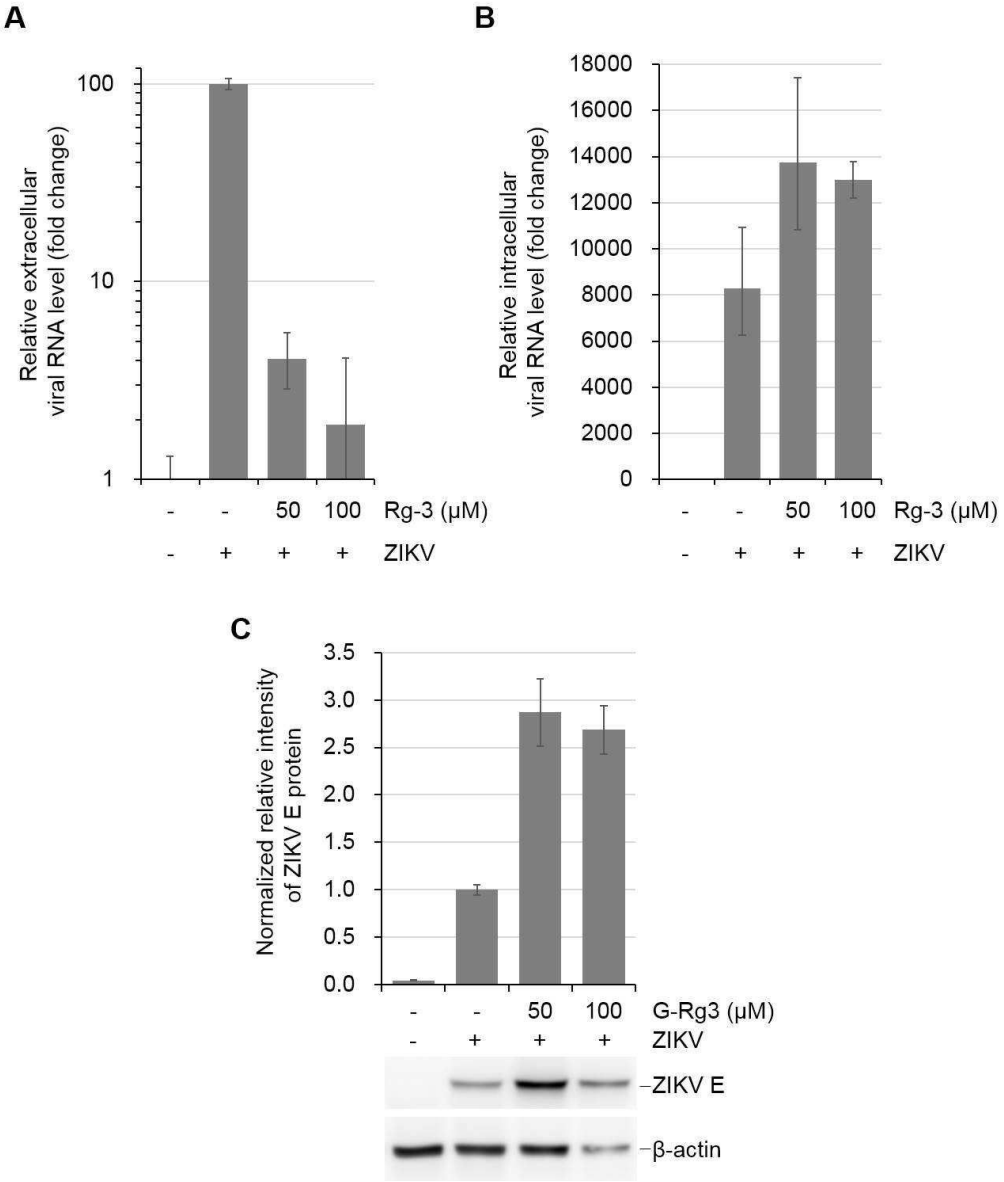
도면3


Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
G-Rg3 (μM)

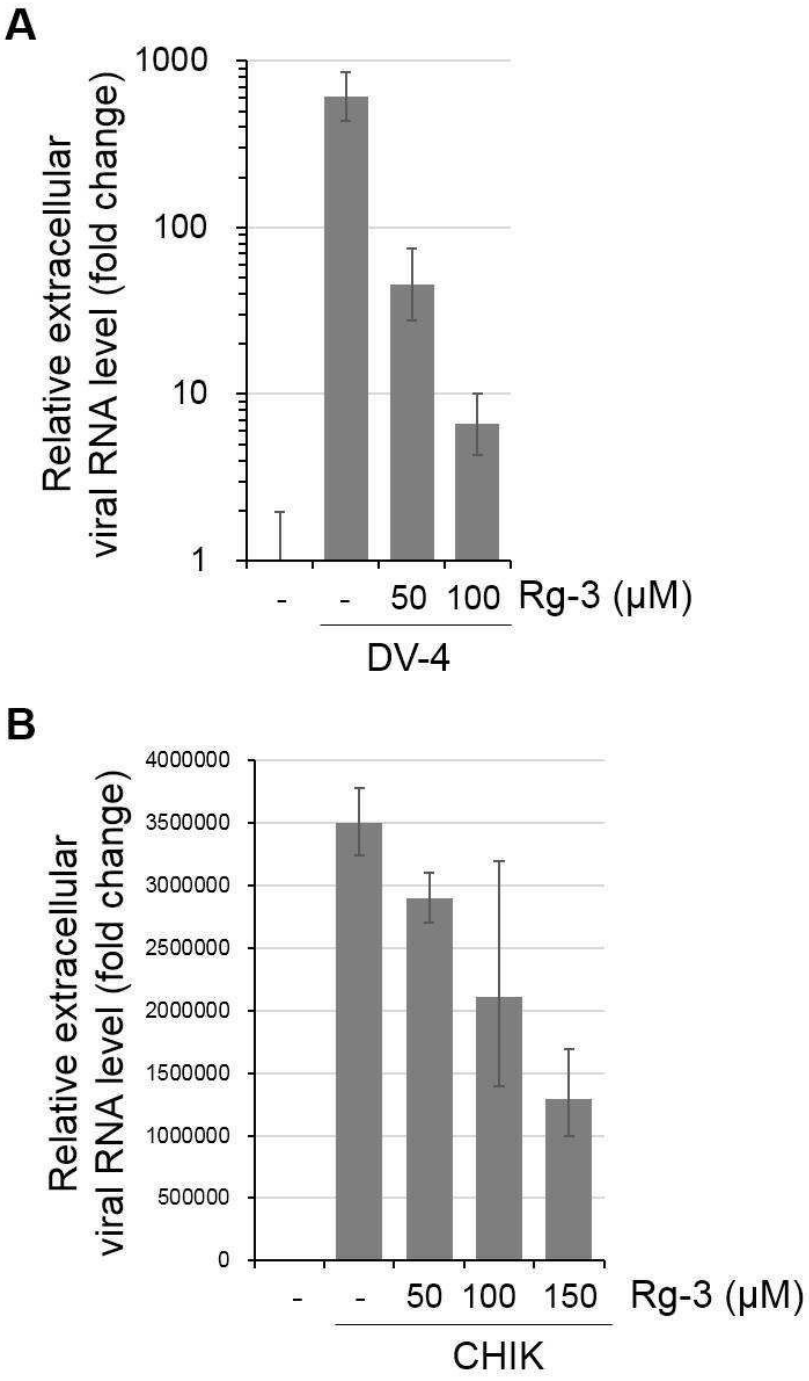
도면4


A
Relative extracellular viral RNA level (fold change)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
- - 50 100 Rg-3 (μM)
- + + + ZIKV
B
Cell viability of Zika virus infected cells (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
Concentration of G-Rg3 (uM)

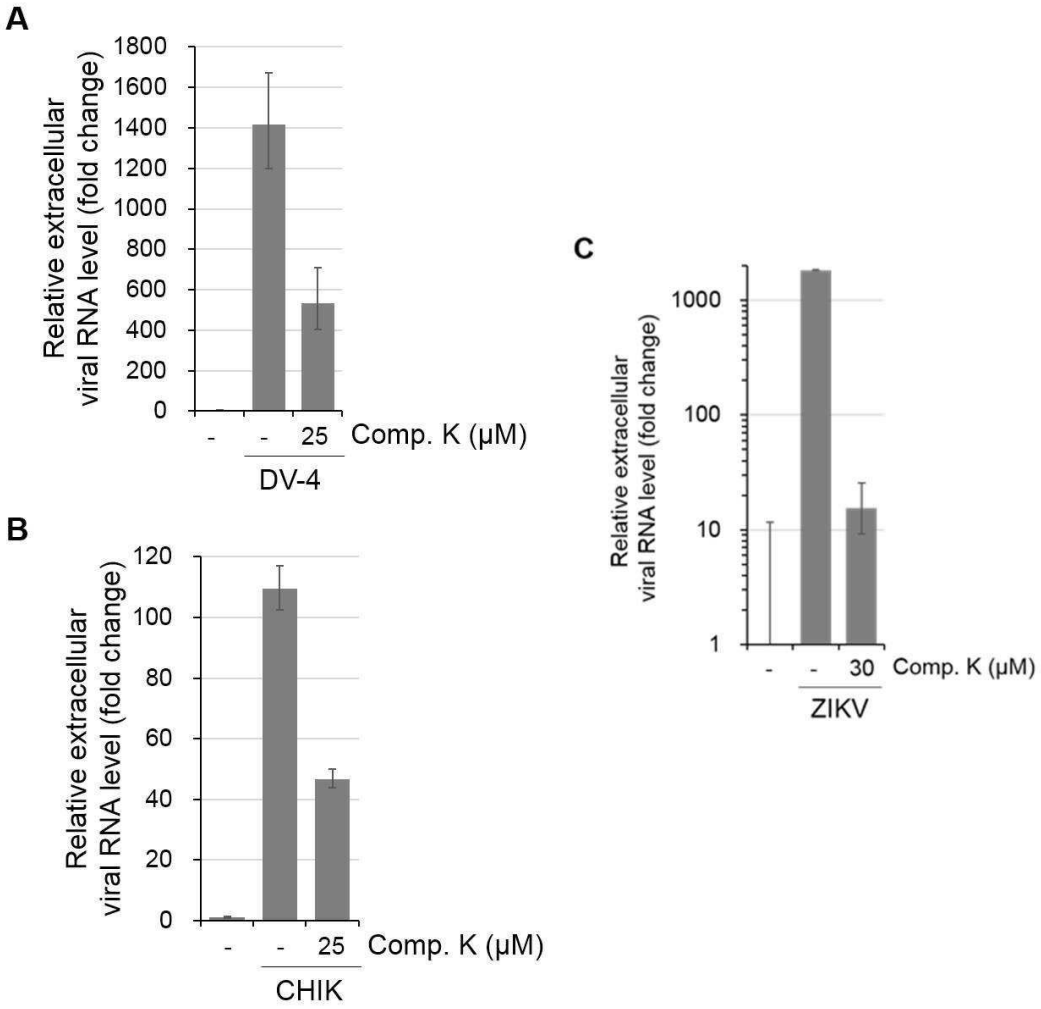
도면5


A
Relative extracellular viral RNA level (fold change)
100
10
1
- - 50 100 Rg-3 (μM)
- + + + ZIKV
B
Relative intracellular viral RNA level (fold change)
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
- - 50 100 Rg-3 (μM)
- + + + ZIKV
C
Normalized relative intensity of ZIKV E protein
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
- - 50 100 G-Rg3 (μM)
- + + + ZIKV
ZIKV E
β-actin

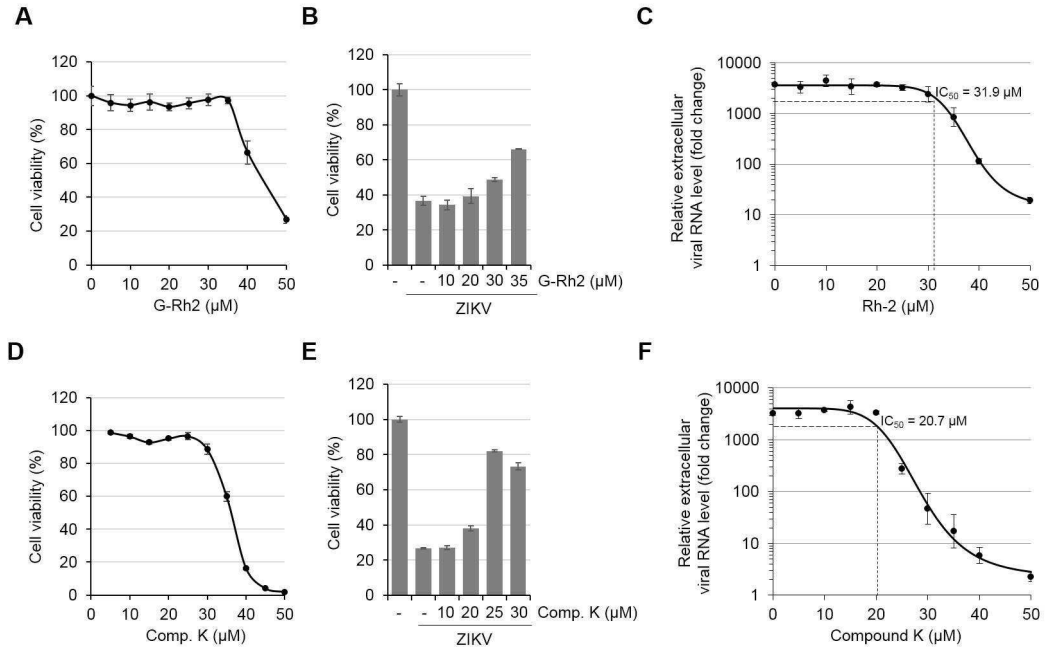
도면6


A
Relative extracellular viral RNA level (fold change)
1000
100
10
1
- - 50 100 Rg-3 (μM)
DV-4
B
Relative extracellular viral RNA level (fold change)
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
- - 50 100 150 Rg-3 (μM)
CHIK

도면7


A
Relative extracellular viral RNA level (fold change)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
- - 25 Comp. K (μM)
DV-4
B
Relative extracellular viral RNA level (fold change)
120
100
80
60
40
20
0
- - 25 Comp. K (μM)
CHIK
C
Relative extracellular viral RNA level (fold change)
1000
100
10
1
- - 30 Comp. K (μM)
ZIKV

도면8


A
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50
G-Rh2 (μM)
B
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
- - 10 20 30 35 G-Rh2 (μM)
ZIKV
C
Relative extracellular viral RNA level (fold change)
10000
1000
100
10
1
IC50 = 31.9 μM
0 10 20 30 40 50
Rh-2 (μM)
D
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50
Comp. K (μM)
E
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
- - 10 20 25 30 Comp. K (μM)
ZIKV
F
Relative extracellular viral RNA level (fold change)
10000
1000
100
10
1
IC50 = 20.7 μM
0 10 20 30 40 50
Compound K (μM)