



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2016년04월27일  
 (11) 등록번호 10-1612051  
 (24) 등록일자 2016년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 36/537* (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)  
*A61P 31/00* (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2011-0138328  
 (22) 출원일자 2011년12월20일  
 심사청구일자 2013년04월05일  
 (65) 공개번호 10-2013-0071032  
 (43) 공개일자 2013년06월28일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 US20090221542 A1  
 US20020151584 A1  
 KR1020000037814 A

(73) 특허권자  
**한국생명공학연구원**  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
 (72) 발명자  
**이우송**  
 대전 유성구 과학로 125  
**류영배**  
 대전 유성구 과학로 125  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**손민**

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **단삼 추출물을 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물**

**(57) 요약**

본 발명은 단삼 추출물, 이의 분획물, 또는 화학식 1 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 의약품 조성물 및 사료첨가제, 및 상기 사료첨가제를 포함하는 사료에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 단삼 추출물, 이의 분획물, 또는 화학식 1 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나로 표시되는 화합물은 코로나 바이러스의 3CL 프로테아제 활성을 억제하는 효과를 나타내므로 코로나 바이러스 감염의 예방 및 치료 등에 유용하게 사용될 수 있다.

(72) 발명자

**김영민**

대전 유성구 과학로 125

**박수진**

대전 유성구 과학로 125

**권형준**

대전 유성구 과학로 125

**노문철**

대전 유성구 과학로 125

**오현미**

대전 유성구 과학로 125

**정형재**

대전 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345144598

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래기반기술개발사업

연구과제명 바이러스감염제어용생물소재개발

기여율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

단삼 추출물의 헥산 또는 에틸아세테이트 분획물이 유효성분인 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물로서, 상기 추출물은 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것인, 약제학적 조성물.

**청구항 2**

단삼 추출물 또는 이의 분획물이 유효성분인 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 코로나 바이러스는 사스(SARS), 돼지(Pocine), 또는 소(Bovine) 코로나 바이러스인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 코로나 바이러스 감염으로 야기되는 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴, 또는 돼지독감인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가지는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

**청구항 6**

단삼 추출물의 헥산 또는 에틸아세테이트 분획물이 유효성분인 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물로서, 상기 추출물은 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것인, 식품 조성물.

**청구항 7**

단삼 추출물 또는 이의 분획물이 유효성분인 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

**청구항 8**

단삼 추출물의 헥산 또는 에틸아세테이트 분획물이 유효성분인 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물로서, 상기 추출물은 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것인, 의약외품 조성물.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 상기 의약외품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 구강청결제, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 가습기 충전제, 마스크, 연고제 및 필터충진제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제조에 사용되는 것을 특징으로 하는 의약외품 조성물.

**청구항 10**

단삼 추출물 또는 이의 분획물이 유효성분인 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물.

**청구항 11**

단삼 추출물의 헥산 또는 에틸아세테이트 분획물이 유효성분인 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 사료 첨가제로서, 상기 추출물은 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것인, 사료 첨가제.

**청구항 12**

단삼 추출물 또는 이의 분획물이 유효성분인 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 사료 첨가제.

**청구항 13**

제11항 또는 제12항에 기재된 사료첨가제를 함유하는 사료.

**청구항 14**

단삼 추출물의 핵산 또는 에틸아세테이트 분획물을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 코로나 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 방법으로서, 상기 추출물은 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알코올 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 추출한 것인, 방법.

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 단삼 추출물, 이의 분획물, 또는 화학식 1 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물, 의약외품 조성물 및 사료 첨가제, 및 상기 사료 첨가제를 포함하는 사료에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 코로나 바이러스(coronavirus)는 1937년 닭에서 처음 발견된 뒤 개, 돼지, 조류 등의 동물을 거쳐 1965년에는 사람에게서도 발견되었다. 개기일식 때 태양의 광구가 달에 가려졌을 때 그 둘레에서 하얗게 빛나는 현상인 코로나 현상과 생김새가 비슷하여 이러한 이름이 붙여졌다.

[0003] 지금까지 코로나 바이러스는 사람에게는 거의 감염되지 않고 주로 개, 돼지, 소 등의 동물에 감염되는 병원균으로 인식되어 왔다. 사람에게 감염될 때에도 호흡기 증상을 유발하는 여러 바이러스 가운데 하나로서 단순한 감기를 유발하거나 어린이에게 위험성이 그리 높지 않은 설사 등의 장질환을 일으키는 경우가 있을 뿐이었다. 그러나, 2003년 3월 중순 처음으로 발생하여 세계적으로 100명이 넘는 사망자와 3,000여 명의 환자를 발생시킨 중증급성호흡기증후군(사스:SARS)의 원인균이 신종(변종) 코로나 바이러스인 것으로 알려지면서 점차적으로 주목

받기 시작하였다.

- [0004] 코로나바이러스는 사람과 동물에서 주로 폐렴과 장염을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 간혹 신경계 감염과 간염을 유발하는 것으로도 알려져 있다. 코로나바이러스는 코로나바이러스과(*Coronaviridae*)에 속하며 구형의 외막을 가지는, 약 100-120 nm 크기의 positive sense RNA 바이러스이다(Master, 2006). 코로나바이러스는 가장 외막에 있는 spike 단백질 (S), hemagglutinin-esterase (HE) 단백질, transmembrane (M) 단백질, small membrane (E) 단백질 및 nucleocapsid (N) 단백질 등 총 5개의 구조 단백질로 이루어져 있다(Lai and Homes, 2001. *Fields Virology*). 이 중 spike 단백질은 세포 수용체와 결합하는 리간드 역할을 하며, 숙주세포와 바이러스간의 융합을 유도하는 단백질로 가장 변이가 심한 단백질로 알려져 있다.
- [0005] 코로나바이러스는 크게 3가지 혈청형으로 나누어진다. 제 1 혈청형은 돼지의 전염성 장염을 발생시키는 원인체로, 이 질환은 국내에서도 발생하고 있으며, 어린 자돈에 100% 가까운 발병율과 70% 이상의 폐사율을 야기하고 있어 국내 양돈업에서 중요하게 다루어지고 있다. 제 2 혈청형으로는 가축에서 중요하게 취급되고 있는 소 코로나바이러스 감염증이 있다. 제 3 혈청형으로는 닭에서 호흡기, 비노기 및 산란장애를 유발하는 닭 전염성 기관지염이 있다. 소 코로나바이러스는 다른 혈청형 바이러스와는 달리 바이러스의 외막에 제2의 spike인 hemagglutinin이 있어서 형태학적, 혈청학적 및 유전학적으로 구별이 된다. 특히, 제 2 혈청형은 2002년 중국을 중심으로 발생하여 전 세계를 공포에 몰아넣었던 사스 코로나바이러스가 속해 있는 혈청형으로 매우 중요하다. WHO 통계에 의하면 사스 코로나바이러스는 총 8500명이 감염되었고 이 중 800명이 사망한 것으로 보고되었다. 최근 사스 코로나바이러스가 박쥐에서 유래하여 사람에게 전파된 것으로 밝혀져 이종 간의 전파로 인한 코로나 바이러스 감염이 큰 문제가 되고 있다.
- [0006] 코로나바이러스 제어용 타겟은 세포침입 저해, 사이토카인(IFN), RNA 복제 억제 그리고 바이러스 프로테아제(protease) 저해로 나눌 수 있다. 현재 가장 활발히 연구되고 있는 코로나바이러스 제어용 타겟으로는 바이러스 프로테아제(viral protease)인 3C-like protease (3CL<sup>pro</sup> 또는 3CL 프로테아제)와 papain like protease (PL<sup>pro</sup> 또는 PL 프로테아제)이 있으며, 특히 세계적으로 3CL 프로테아제를 타겟으로 한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 발리노마이신(valinomycin, IC<sub>50</sub> = 0.85 μM), 레제르핀(reserpine, IC<sub>50</sub> = 3.4 μM) 및 TL3은 현재 신약으로 개발되거나 혹은 임상단계에 있다.
- [0007] 이러한 연구들에 맞춰서 생물소재인 편백나무, 측백나무, 삼나무에서 분리 정제된 테르페노이드(terpenoid)와 리그노이드(lignoid) 화합물군이 타겟 프로테아제의 강한 저해활성을 가지는 것을 Wen C. C. (*J. Med. Chem.* 2007)가 발표하였으며, 녹차와 홍차로부터 분리된 TF3 (theaflavin-3,3'-digallate)가 프로테아제 저해제로 알려져 있다(Chen, C.-N. et al., *eCAM*, 2005). 소수의 생물소재로부터의 코로나바이러스 타겟 프로테아제 개발을 제외하고는, 이 외의 모든 저해제들이 합성 펩타이드로 보고되고 있다. 또한, 바이러스의 세포변성(CPE) 억제 효과를 가진 대표적인 소재로는 약용식물인 감초(*Licorice*)로부터 분리된 배당체 화합물인 글라이씨라이진(glycyrrhizin)과 추출물에서 활성을 나타내는 것을 바탕으로 하여, 이와 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다(Hoever et al., *J. Med. Chem.* 2005, Cinatl et al., *Lancet*, 2003).
- [0008] 현재까지 개발된 항바이러스들은 심한 부작용을 나타내고 있으므로, 그 응용에 있어서 많은 주의가 필요하다. 또한 백신의 개발은 유행하는 바이러스의 형과 백신의 바이러스가 맞지 않으면 효과가 낮다는 문제점이 있기 때문에 감염 억제 효과가 뛰어나고 안정성이 우수한 새로운 코로나 바이러스제의 개발의 필요성이 증가하고 있다. 또한, 사스-코로나바이러스의 3CL 프로테아제는 변이가 적고 구조가 밝혀져 있어 사스-코로나바이러스뿐만 아니라 같은 혈청형의 소 코로나바이러스, 다른 혈청형의 돼지 코로나바이러스에도 적용할 수 있어 매우 좋은 타겟이라 할 수 있다.
- [0009] 이에 본 발명자들은 코로나바이러스의 전사와 복제에 중요한 역할을 하는 3CL 프로테아제 및 다양한 타겟을 선정하여 바이러스를 억제할 수 있는 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 단삼 추출물, 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 페난트라퀴논계 탄수화 화합물들이 3CL 프로테아제에 대한 억제활성을 가지고, 개체에 독성을 일으키지 않음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0010] 본 발명의 목적은 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물 및 이를 이용한 코로나 바이

러스 감염의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 위한 의약품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 위한 사료 첨가제 및 사료를 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

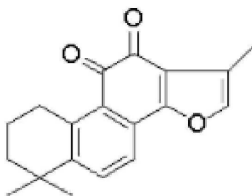
[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태로서, 본 발명은 단삼 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0015] 다른 양태로서, 본 발명은 단삼 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0016] 또 다른 양태로서, 본 발명은 단삼 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

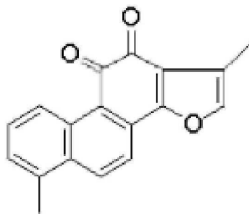
[0017] 또 다른 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0018] [화학식 1]



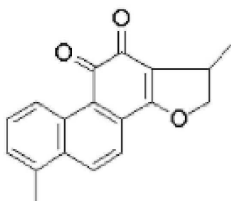
[0019]

[0020] [화학식 2]



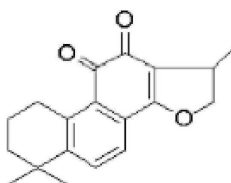
[0021]

[0022] [화학식 3]



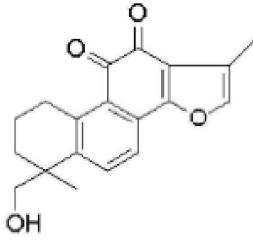
[0023]

[0024] [화학식 4]



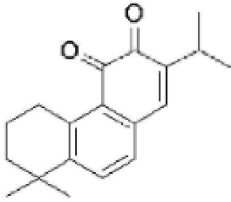
[0025]

[0026] [화학식 5]



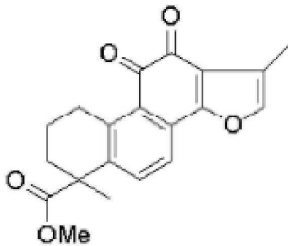
[0027]

[0028] [화학식 6]



[0029]

[0030] [화학식 7]



[0031]

[0032] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0033] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.

[0034] 또 다른 양태로서, 본 발명은 단삼 추출물, 이의 분획물, 또는 상기 화학식 1 내지 화학식 7 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 사료 첨가제, 및 상기 사료 첨가제를 함유하는 사료를 제공한다.

[0035] 또 다른 양태로서, 본 발명은 단삼 추출물, 이의 분획물, 또는 상기 화학식 1 내지 화학식 7 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 코로나 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0036] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0037] 본 발명은 단삼 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명의 조성물은 코로나 바이러스 표면에 존재하면서 바이러스 복제에 필수적인 기능을 하는 3CL 프로테아제의 활성을 억제하여 코로나 바이러스가 호흡기관 내 다른 세포로 확산되는 것을 차단함으로써 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 코로나 바이러스 감염을 억제하거나 발병을 지연시키는 모

든 행위를 의미할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 코로나 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0041] 상기 코로나 바이러스는 사스(SARS), 돼지(Pocine), 또는 소(Bovine) 코로나 바이러스일 수 있으며, 바람직하게는 사스(SARS) 코로나 바이러스일 수 있다. 또한 상기 코로나 바이러스는 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 및 폐렴의 질환을 야기할 수 있으며, 본 발명의 조성물은 코로나 바이러스로 야기될 수 있는 상기 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0042] 일반적으로 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)이란 꿀풀과에 속하는 여러해살이 야생 풀뿌리식물로 줄기는 자줏빛으로 겹겹질은 붉은 빛을 띠고, 속은 자줏빛을 띠고 있으며 한약제로 쓰이는 식물일 수 있다.

[0043] 본 발명에서 단삼은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.

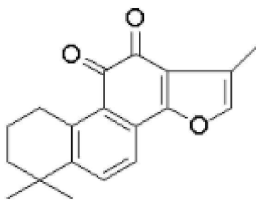
[0044] 상기 단삼 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 여과법 및 환류추출법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있다. 바람직하게는 세척 및 건조로 이물질이 제거된 단삼의 뿌리를 분쇄하여 얻은 단삼 건조물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알코올로 추출한 추출물일 수 있고, 가장 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올로 추출한 추출물일 수 있다. 이때, 추출용매는 단삼의 건조중량의 2 ~ 20 배로 하는 것이 바람직하다. 일례로 단삼 뿌리 건조물을 세절한 후 추출용기에 넣고 C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올을 넣고 일정기간 상온에서 방치한 다음, 여과하여 알코올 추출물을 얻을 수 있다. 이때, 추출은 상온에서 1주 동안 방치하는 것이 바람직하며, 이후에 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 거칠 수 있다.

[0045] 한편, 본 발명에서 단삼 추출물의 분획물은 상기 추출물로부터 분획하여 얻을 수 있으며, 분획용매는 그 종류가 제한되지 않는다. 예를 들어, 보다 구체적으로, 상기 단삼 분획물은 단삼 추출물을 물에 현탁시킨 후 헥산 및 에틸아세테이트로 각각 분획함으로써 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물 및 물 분획물을 각각 얻을 수 있다. 본 발명에서 단삼 추출물의 분획물은 바람직하게 헥산 분획물, 또는 에틸아세테이트 분획물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 에틸아세테이트 분획물일 수 있다.

[0046] 다른 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1 내지 화학식 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0047] **화합물1: 탄쉬논 IIA(Tanshinone IIA)**

[0048] [화학식 1]

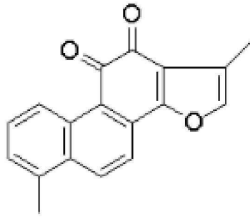


[0049]

[0050] **화합물2: 탄쉬논 I(Tanshinone I)**

[0051] [화학식 2]

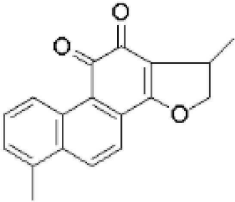




[0052]

[0053] **화합물3: 디하이드로탄쉬논(Dihydrotanshinone)**

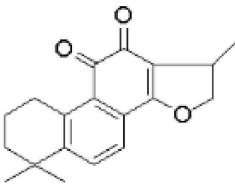
[0054] [화학식 3]



[0055]

[0056] **화합물4: 크립토탄쉬논(Cryptotanshinone)**

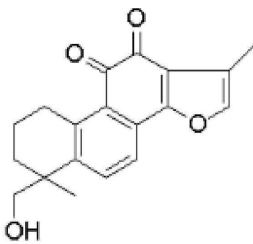
[0057] [화학식 4]



[0058]

[0059] **화합물5: 탄쉬논 IIB(Tanshinone IIB)**

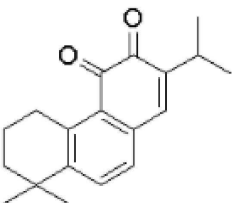
[0060] [화학식 5]



[0061]

[0062] **화합물6: 로즈마리퀴논(Rosmariquinone)**

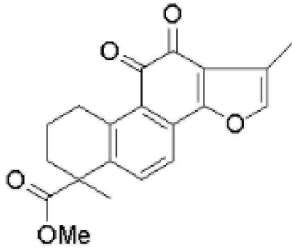
[0063] [화학식 6]



[0064]

[0065] **화합물7: 메틸 탄쉬논네이트(Methyl tanshinonate)**

[0066] [화학식 7]



[0067]

[0068]

본 발명에 따른 상기 화학식 1 내지 7로 표시되는 화합물들은 단삼에 존재하는 대표적인 활성 성분으로, 상기 화합물들을 분리하기 위한 방법은 하기와 같이 수행될 수 있다.

[0069]

먼저, 단삼을 물, C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 단삼 추출물을 얻는다(단계 1). 상기 단삼은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있으며, 깨끗이 세척하고 건조하여 사용한다. 상기 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올 등의 저급 알코올을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 메탄올 또는 에탄올을 사용할 수 있다.

[0070]

상기 단계 1에 있어서, 상기 단삼 추출물을 얻는 단계는 건조된 단삼을 음건 세절 추출 효율을 높이기 위하여 분말상태로 만든 후 추출용기에 넣고 적당한 양의 알코올을 첨가하고, 이를 상온에서 5일 동안 방치한 후 거름종이 등으로 여과하여 수행될 수 있다. 이러한 추출 과정은 수회 반복될 수 있으며, 이후에 농축 또는 동결건조 등의 방법이 추가적으로 수행될 수 있다.

[0071]

이어서, 상기 단계 1에서 얻은 단삼 추출물에 물을 가하여 현탁시키고, 헥산 및 에틸아세테이트를 사용하여 순차적으로 분획하여 단삼 분획물을 얻는다(단계 2). 이 때, 통상의 분별 추출 방법을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 분별 깔대기를 사용할 수 있다. 상기 단삼 분획물은 헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 및 물 분획물로 얻을 수 있다.

[0072]

그 후, 상기 단계 2에서 얻은 단삼 에틸아세테이트 분획물을 실리카겔 크로마토그래피로 화합물을 분리하고 정제하여 상기 화학식 1 내지 화학식 7의 화합물을 얻을 수 있다(단계 3). 상기 화합물 분리를 위한 실리카겔 크로마토그래피를 수행하는 경우, 이동상으로는 *n*-헥산, *n*-헥산 에틸아세테이트, 클로로포름아세톤 혼합용매 및 메탄올을 사용하는 것이 바람직하고, 추가되는 크로마토그래피에서는 *n*-헥산아세톤 혼합용매를 사용할 수 있다. 이때 사용되는 *n*-헥산에틸아세테이트 혼합용매의 부피비는 50:1 ~ 1:5 부피비가 바람직하며, 클로로포름아세톤 혼합용매일 경우에는 150:1 ~ 1:4 부피비가 바람직하다. 상기 크로마토그래피는 단일 화합물이 정제될 때까지 1회 내지 수회에 걸쳐 수행할 수 있으며, 필요에 따라 농축, 재결정을 실시할 수 있다.

[0073]

또한, 본 발명의 상기 화학식 1 내지 화학식 7로 표시되는 화합물들은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이

트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0074] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1 내지 화학식 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다.

[0075] 또한, 본 발명의 상기 화학식 1 내지 화학식 7로 표시되는 화합물은 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염으로 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0076] 한편, 본 발명의 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다.

[0077] 상기 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물인 경우 상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 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, 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), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0078] 상기 약제학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0079] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다.

[0080] 본 발명에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 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. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0081] 본 발명의 조성물은 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0082] 또 다른 양태로서, 본 발명은 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 상기 화학식 1 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0083] 본 발명의 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 화학식 1 내지 화학식 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나로 표시되는 화합물은 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 단삼 추

출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리된 화합물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물, 분획물 또는 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 0.01 ~ 10 중량%, 바람직하게는 0.05 ~ 1 중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

[0084] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0085] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0086] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 이들 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0087] 또 다른 양태로서, 본 발명은 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 상기 화학식 1 내지 화학식 7 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0088] 본 발명의 조성물은 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료를 목적으로 의약외품 조성물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 추출물 또는 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0089] 바람직하게는, 상기 의약외품 조성물은 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 멀티슈, 세제비누, 핸드워시, 가슴기 충전제, 마스크, 연고제 또는 필터충진제일 수 있다.

[0090] 또 다른 양태로서, 본 발명은 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 상기 화학식 1 내지 화학식 7 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선용 사료 첨가제를 제공한다.

[0091] 상기 사료첨가제는 3CL 프로테아제의 활성을 억제함을 통하여 항바이러스 효능을 가지므로 가금류, 가축 등에게 꾸준히 섭취하게 함으로써 바이러스성 질환을 예방할 수 있고, 이미 발생한 바이러스성 질환을 개선시킬 수 있다. 사료는 영양가, 주성분, 유통, 수분 함량 배합상태 및 가공형태 등에 따라 여러 가지로 분류할 수 있으며, 상기 사료는 조사료, 농후사료, 보충사료, 단백질사료, 녹말사료, 지방질사료 또는 섬유질사료가 사용가능하나, 이에 한정하지 않는다.

[0092] 또한 상기 사료 첨가제는 추가적으로 가금류 및 가축 등에 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 본 발명에 있어서는 상기 사료첨가제를 그대로 또는 공지의 담체, 안정제 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수 있으며, 그 형상으로서서는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다. 본 발명의 사료첨가제를 공급하는 경우는 가금류 및 가축 등에 대하여 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다.

- [0093] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 사료첨가제를 함유하는 사료를 제공한다.
- [0094] 상기 설명한 사료첨가제를 다양한 동물의 사료나 음수의 원료 및 첨가제로 사용할 수 있으며, 상기 사료첨가제를 포함하는 사료 조성물로 사용할 수 있다.
- [0095] 또 다른 양태로서, 본 발명은 단삼 추출물, 이의 분획물, 또는 상기 화학식 1 내지 7 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 코로나 바이러스 감염을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0096] 단삼 추출물, 이의 분획물, 또는 화학식 1 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 코로나 바이러스 감염의 발병 또는 발병가능성이 있는 개체에게 투여하는 단계를 포함하여 코로나 바이러스 감염 질환을 치료할 수 있다.
- [0097] 상기 코로나 바이러스는 사스(SARS), 돼지(Pocine), 또는 소(Bovine) 코로나 바이러스일 수 있다. 또한, 상기 코로나 바이러스 감염 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 및 폐렴일 수 있다.
- [0098] 본 발명에서 용어, "개체"란 코로나바이러스에 이미 감염되었거나 감염될 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고 본 발명의 추출물, 분획물 또는 화합물을 포함하는 조성물을 개체에 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물로 다양한 코로나바이러스 아형 또는 변이형의 인간 코로나바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물로 다양한 코로나바이러스 아형 또는 변이형의 코로나바이러스로 감염된 인간을 치료할 수 있다. 또한, 다양한 코로나바이러스 아형 또는 변이형의 코로나바이러스로 감염된 돼지 또는 소를 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물은 기존의 코로나바이러스 감염 질환의 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.
- [0099] 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

**발명의 효과**

- [0100] 본 발명에 따른 단삼 추출물, 이의 분획물, 또는 화학식 1 내지 7로 표시되는 화합물 중 어느 하나로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물, 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물, 의약품 조성물 또는 사료첨가제용 조성물로 사용할 수 있으며, 3CL 프로테아제의 활성을 억제하는 효과를 나타냄으로써 다양한 코로나 바이러스에 대하여 살바이러스 효과를 동시에 나타내므로 코로나 바이러스 감염의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0101] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0102] **실시예 1: 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 제조**
- [0103] 본 실시예에서 사용한 단삼은 일반적으로 한약재상이나 자연에서 쉽게 채집할 수 있는 것으로, 시중에서 구입한 단삼의 뿌리를 파우더 형태로 분쇄하여 사용하였다.
- [0104] 단삼 2.5 kg에 95% 에탄올(EtOH) 10 ℓ를 가하여 실온에서 7일간 방치하고, 여과지로 여과한 후 농축하여 단삼의 에탄올 추출물(140 g)을 수득하였다.

- [0105] **실시예 2 : 단삼 추출물로부터 단삼 분획물 및 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물의 분리 및 정제**
- [0106] 상기 실시예 1에서 수득한 단삼 뿌리의 에탄올 추출물 100 g에 물 2ℓ를 넣어 현탁시켰다. 이를 분별 깔대기에 넣어 헥산 가용추출물 (20 g), 에틸아세테이트 가용추출물 (31 g) 및 물 가용추출물 (50 g)을 수득하였다.
- [0107] 상기에서 수득한 헥산 가용추출물 20 g을 헥산, 아세톤 및 이들의 혼합용매(40:1 ~ 1:6)를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피[실리카겔 500 g, 70~230 메쉬(mesh)]를 수행하여 5개의 분획물(Fr.1~5)로 분리하였다. 이 중 세 번째 분획물을 세부적으로 세 개의 분획물로 나누었다. 나누어진 세 개의 분획물 중 첫 번째 분획물(Sub. Fr. 3.1, 2 g)은 아세토니트릴 : 증류수 혼합용매를 이동상으로하여 단리 HPLC를 이용하여 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물 1(120 mg)과 2(80 mg)을 수득하였다. 계속적으로 나누어진 두 번째(Sub. Fr. 3.2, 3 g)은 아세토니트릴 : 증류수 혼합용매(80:20)를 이동상으로하여 단리 HPLC를 이용하여 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물 3(50 mg)을 수득하였다. 또한, 세 번째 분획물(Sub. Fr. 3.3, 4 g)은 메탄올 : 증류수 (10:0 ~ 1:5) 혼합용매 조건으로 한 역상 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 조건으로 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물 4(10 mg)을 수득하였다.
- [0108] 계속적으로 다섯 개의 분획물 중(Fr. 1~5), 네 번째 분획물(Fr. 4, 5 g)을 헥산, 아세톤 및 이들의 혼합용매 (10:0 ~ 0:10)를 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피[실리카겔 500 g, 70~230 메쉬(mesh)]를 수행하여 5개의 분획물(Sub. Fr. 4.1 ~ 4.5)로 분리하였다. 화합물 5(12 mg)와 6(13 mg)은 두 번째 분획물(Sub. Fr. 4.2, 1 g)에서 메탄올, 증류수 혼합용매(10:0 ~ 1:5)를 이동상으로 하여 역상 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 수득하였다. 또한 네 번째 분획물(Sub. Fr. 4.4, 0.65 g)은 메탄올, 증류수 혼합용매(10:0 ~ 1:5)를 이동상으로 하여 역상 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 7(15 mg)을 수득하였다.
- [0109] 상기에서 수득한 화합물 7종은 상기 화학식 1로 표시되는 탄쉬논 IIA(Tanshinone IIA), 화학식 2로 표시되는 탄쉬논 I(Tanshinone I), 화학식 3으로 표시되는 디하이드로 탄쉬논(Dihydrotanshinone), 화학식 4로 표시되는 크립토탄쉬논(cryptotanshinone), 화학식 5로 표시되는 탄쉬논 IIB(Tanshinone IIB), 화학식 6으로 표시되는 로즈마리퀴논(Rosmariquinone), 화학식 7로 표시되는 메틸 탄쉬논네이트(Methyl tanshinonate)였다.
- [0110] **실시예 3: 재조합 단백질의 발현 및 준비**
- [0111] **3.1. 대장균 (*E. coli*)를 이용한 사스(SARS) 코로나바이러스 3CL 프로테아제의 준비**
- [0112] 활성 단백질을 발현하기 위하여 사스(SARS) 코로나바이러스 3CL 프로테아제의 유전정보[GenBank: DM169957.1]를 바탕으로 SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup>/pET-23d유전자를 합성하였다. 합성된 유전자는 대장균에 형질전환 하였고, 유전자가 포함된 형질전환체를 얻었다. SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup>/pET-23d 플라스미드를 가지는 대장균[*E. coli* BL21 DE3]은 암피실린(100 µg/ml)이 첨가된 1 L의 LB 배지(1%(w/v) 트립톤, 0.5%(w/v) 효모 추출액, 0.5%(w/v) NaCl)에서 OD<sub>600</sub> 값이 0.5에 도달할 때까지 37℃의 온도에서 교반을 해주면서 배양하였다. 여기에 활성화 인자로서 IPTG(Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가한 후, 18℃로 옮겨 10시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 원심분리를 통해 얻어진 세포를 0.5 % Triton X-100과 300 mM NaCl이 포함된 20 mM 인산나트륨(pH 7.5) 버퍼에 현탁하여 초음파파쇄기를 이용하여 파쇄하고 원심분리를 통해 얻은 상등액을 단백질 정제에 이용하였다. 사스 3CL 프로테아제는 메티오닌을 시작으로 327개의 아미노산으로 구성되며, C-말단에는 6개의 히스티딘 태그가 붙어있어 단백질 정제가 용이하다. 얻어진 세포파쇄액을 평형화 완충액[20 mM 인산나트륨(pH 7.5)와 0.5 M NaCl]으로 미리 평형화된 니켈-세파로스 칼럼[GE healthcare]에 흡착시키고 100 mM 이미다졸(imidazole)이 포함된 평형화 완충액을 이용하여 세척해 준 후, 300~500 mM 이미다졸(imidazole)이 포함된 평형화 완충액을 이용하여 용출하였다. 용출되어 얻어진 3CL 프로테아제는 SDS-전기영동으로 정제된 밴드를 통하여 확인하였고, 0.2 mM NaCl과 1 mM DTT가 첨가된 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충 용액으로 투석을 한 후, 단백질 분석에 이용하였다.
- [0113] **3.2. 돼지 코로나 바이러스(porcine corona virus)에서 유래한 3CL 프로테아제의 준비**
- [0114] 돼지 코로나 바이러스에서 얻어진 3CL 프로테아제를 코딩하는 유전자를 pET-23d 벡터에 클로닝하였다. 클로닝

하여 얻어진 PEDV-3CL<sup>pro</sup>/pET23d 유전자는 실시예 3.1에서와 같은 방법으로 대장균[E. coli BL21 DE3 codon plus]에 형질전환하였고, IPTG를 이용하여 과발현 시킨 후, 니켈-세파로스 칼럼[GE healthcare]을 이용하여 활성 단백질인 PEDV 3CL 프로테아제를 분리하였다. 분리된 단백질은 0.2 mM NaCl과 1 mM DTT가 첨가된 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충 용액으로 투석을 한 후, 단백질 분석에 이용하였다.

[0115] **3.3. 소 코로나 바이러스(bovine corona virus)에서 유래한 3CL 프로테아제의 준비**

[0116] 소 코로나 바이러스에서 얻어진 3CL 프로테아제를 코딩하는 유전자를 pET-23d 벡터에 클로닝하였다. 클로닝 하여 얻어진 KWD3-3CL<sup>pro</sup>/pET23d 유전자는 실시예 3.1과 3.2에서와 같은 방법으로 대장균[E. coli BL21 DE3 codon plus]으로부터 KWD3 3CL 프로테아제를 분리하였다.

[0117]

[0118] **실험예 1. 단삼 추출물, 이의 분획물 및 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물의 사스 코로나바이러스 3CL 프로테아제 (SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup>), 돼지 코로나바이러스 3CL 프로테아제 (PEDV 3CL<sup>pro</sup>), 소 코로나바이러스 (KWD3 3CL<sup>pro</sup>)에 대한 저해 활성 측정**

[0119] 본 발명의 실시예 1 및 2의 단삼 추출물, 이의 분획물 및 이들로부터 분리한 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물의 3CL 프로테아제에 대한 저해 활성을 FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) assay를 통하여 측정하기 위하여 형광 공여자인 EDNAS와 형광 소멸자인 DABCYL이 결합된 합성 펩타이드인 Dabcyl-KTSAVLQSGFKME-Edans를 기질로서 사용하였다. 기질의 절단으로 인해 EDANS와 DABSYL이 분리되었을 때 이를 형광으로 확인할 수 있다.

[0120] 실시예 1 및 2의 단삼 추출물, 이의 분획물 및 이들로부터 분리된 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물을 메탄올에 녹여 각각 20 μl씩 96웰 플레이트(96well plate)에 첨가하고 기질 Dabcyl-KTSAVLQSGFKME-Edans(최종농도, 2.5 μM)를 각각 50 μl를 넣었다. 이를 20 mM Bis-Tris 완충용액(pH 7.5) 80 μl와 혼합하고, 효소원인 3CL 프로테아제(효소 최종농도, 2.5 μg/mL) 50 μl를 첨가하여 상온에서 60분간 반응시켰으며, 형광 분광기로 360/40nm에서의 여기(excitation) 및 590/20nm에서의 방출(emission) 값을 측정함으로써 3CL 프로테아제의 저해 활성을 측정하였다.

[0121] 측정 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

**표 1**

[0122] 단삼 추출물, 분획물 및 분리된 탄쉬논 화합물들의 3CL 프로테아제 저해활성

시료명	SARS-CoV 3CL 저해율 (IC <sub>50</sub> )	KWD3 3CL 저해율 (IC <sub>50</sub> )	PEDV 3CL 저해율 (IC <sub>50</sub> )
에탄올 추출물	25.2 μg/mL	16.2 μg/mL	566.2 μg/mL
헥산 분획물	10.2 μg/mL	3.2 μg/mL	344.5 μg/mL
에틸아세테이드 분획물	8.2 μg/mL	2.0 μg/mL	346.1 μg/mL
물 분획물	98.1 μg/mL	113.2 μg/mL	920.2 μg/mL
탄쉬논 IIA(Tanshinone IIA)	89.1 μM	67.9 μM	-
탄쉬논I(Tanshinone I)	38.7 μM	11.6 μM	-
디하이드로탄쉬논(Dihydro tanshinone I)	14.4 μM	0.7 μM	6.1 μM
크립토탄쉬논(Cryptotanshinone)	136.2 μM	143.3 μM	-
탄쉬논 IIB(Tanshinone IIB)	24.8 μM	15.2 μM	74.8 μM
로즈마리퀴논(Rosmariquinone)	11.0 μM	24.1 μM	-
메틸 탄시노네이트(Methyl tanshinonate)	21.1 μM	25.5 μM	65.7 μM

[0123] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 단삼 추출물 및 분획물 각각의 3CL 프로테아제에 대한 저해 활

성을 측정된 결과, SARS-CoV 3CL 프로테아제의 경우, 단삼의 에탄올 추출물, 헥산, 에틸아세테이트 및 물 분획물에서 각각 25.2, 10.2, 8.2 및 98.1  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 값을 나타냈으며, 특히 단삼의 헥산 및 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 저해활성을 가짐을 확인할 수 있었다. 이는 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물들이 헥산과 에틸아세테이트 분획물에 고루 함유되어 있기 때문이다.

[0124] 소 코로나바이러스 3CL 프로테아제의 경우, 단삼의 에탄올 추출물, 헥산, 에틸아세테이트 및 물 분획물에서 각각 16.2, 3.2, 2.0 및 113.2  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 값을 나타냈으며, 특히 단삼의 헥산 및 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 저해활성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0125] 돼지 코로나바이러스 3CL 프로테아제의 경우, 단삼의 에탄올 추출물, 헥산, 에틸아세테이트 및 물 분획물에서는 각각 566.2, 344.5, 346.1 및 920.2  $\mu\text{g/mL}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 값을 나타내었다.

[0126] 본 발명의 식물체인 단삼으로부터 분리한 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물들의 3CL 프로테아제에 대한 저해 활성을 측정된 결과, SARS-CoV 3CL 프로테아제의 경우 탄쉬논 IIA, 탄쉬논 I, 디하이드로탄쉬논 I, 크립토탄쉬논, 탄쉬논 IIB, 로즈마리퀴논 및 메틸 탄쉬논에서 각각 89.1, 38.7, 14.4, 136.2, 24.8, 11.0 및 21.1  $\mu\text{M}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 값을 나타내었고, 특히 디하이드로탄쉬논 I과 로즈마리퀴논이 각각 14.4 및 11.0  $\mu\text{M}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 값을 나타내어 높은 저해활성을 가짐을 확인하였다. 소 코로나바이러스 3CL 프로테아제의 경우 탄쉬논 IIA, 탄쉬논 I, 디하이드로탄쉬논 I, 크립토탄쉬논, 탄쉬논 IIB, 로즈마리퀴논 및 메틸 탄쉬논에서 각각 67.9, 11.6, 0.7, 143.3, 15.2, 24.1 및 25.5  $\mu\text{M}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 값을 나타내었으며, 특히 디하이드로탄쉬논 I이 소 코로나바이러스 3CL 프로테아제에서 0.7  $\mu\text{M}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 값을 나타내었는바 가장 높은 저해활성을 가짐을 확인할 수 있었다. 또한 돼지 코로나바이러스 3CL 프로테아제의 경우, 디하이드로탄쉬논 I, 탄쉬논 IIB, 메틸 탄쉬논에서 각각 6.1, 74.8, 65.7  $\mu\text{M}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 값을 나타내었으며, 특히 디하이드로탄쉬논 I 화합물이 6.1  $\mu\text{M}$ 의  $\text{IC}_{50}$ 값을 가져 가장 높은 저해활성을 나타내었음을 확인하였다.

[0127] 본 발명의 실험에 1을 통하여 단삼 추출물, 분획물 및 분리된 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물이 높은 3CL 프로테아제 저해활성을 가짐과 동시에 선택적인 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0128] **실험예 2: 본 발명의 화합물들의 급성 독성 실험**

[0129] 본 발명의 화합물들에 대한 급성 독성을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0130] 6주령의 특정 병원체 부재(SPF, specific pathogens free) C57BL/6J 마우스를 암수 각각 12 마리씩 4군(암수 각각 3마리/실험군)으로 나누어, 온도  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 습도  $55\pm 10\%$ , 조명 12L/12D의 동물실 내에서 사육하였다. 마우스는 실험에 사용되기 전 1주일 정도 순화시켰다. 실험동물용 사료(마우스 및 랫트용, (주)제일제당, 서울, 대한민국) 및 음수는 멸균한 후 공급하였으며 자유 섭취시켰다.

[0131] 상기 실시예 2에서 제조한 상기 화학식 1~7로 표시되는 화합물을 0.5% 트윈 80(tween 80)에 50 mg/mL 농도로 조제한 후, 마우스 체중 20 g 당 0.04 mL(100 mg/kg), 0.2 mL(500 mg/kg) 및 0.4 mL(1,000 mg/kg)씩 경구 투여하였다. 시료는 단회 경구 투여하였으며, 투여 후 7일 동안 다음과 같이 부작용 또는 치사 여부를 관찰하였다. 즉, 투여 당일은 투여 후 1시간, 4시간, 8시간, 12시간 뒤에, 그리고 투여 익일부터 7일째까지는 매일 오전, 오후 1회 이상씩 일반증상의 변화 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

[0132] 상기와 같은 급성 독성실험 결과, 시료를 투여한 모든 마우스에서 특기할 만한 임상증상이 나타나지 않았고 폐사된 마우스도 없었으며, 또한 체중변화, 혈액검사, 혈액생화학 검사, 부검소견 등에서도 독성변화는 관찰되지 않았다.

[0133] 따라서, 본 발명의 화합물들은 모든 마우스에서 1,000 mg/kg까지 독성변화를 나타내지 않았으며, 경구투여 최소 치사량(LD<sub>50</sub>)이 1,000 mg/kg 이상인 안전한 물질임을 확인할 수 있다.

[0134] 이하, 단삼 추출물 및 분획물, 및 이들로부터 분리한 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 함유한 약학적 제제 또는 건강식품의 예를 설명한다.



[0135] **제조예 1 : 약학적 제제의 제조**

[0136] **1-1. 산제의 제조**

[0137] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염

[0138] 2 g

[0139] 유당 1 g

[0140] 상기의 성분을 혼합한 후, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0141] **1-2. 정제의 제조**

[0142] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염  
100 mg

[0143] 옥수수 전분 100 mg

[0144] 유당 100 mg

[0145] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0146] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0147] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0148] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염  
100 mg

[0149] 옥수수 전분 100 mg

[0150] 유당 100 mg

[0151] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0152] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0153] **1-4. 주사액제의 제조**

[0154] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염  
10 µg/ml

[0155] 묽은 염산 BP pH 3.5로 될 때까지

[0156] 주사용 염화나트륨 BP 최대 1 ml

[0157] 적당한 용적의 주사용 염화나트륨 BP 중에 단삼 추출물, 분획물, 페난트라퀴논계 탄쉬논 화합물 또는 이의 염을 용해시키고, 생성된 용액의 pH를 묽은 염산 BP를 사용하여 pH 3.5로 조절하고, 주사용 염화나트륨 BP를 사용하여 용적을 조절하고 충분히 혼합하였다. 용액을 투명 유리로 된 5 ml 타입 I 앰플 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 공기의 상부 격자하에 봉입시키고, 120 °C에서 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사액제를 제조하였다.

[0158] **제조예 2: 건강식품의 제조**

[0159] **2-1. 조리용 양념의 제조**

[0160] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염 0.2 ~ 10 중량%로 건강 증진용 조

리용 양념을 제조하였다.

[0161] **2-2. 토마토 케찹 및 소스의 제조**

[0162] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염 0.2 ~ 1.0 중량%를 토마토 케찹 또는 소스에 첨가하여 건강 증진용 토마토 케찹 또는 소스를 제조하였다.

[0163] **2-3. 밀가루 식품의 제조**

[0164] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염 0.1 ~ 5.0 중량%를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0165] **2-4. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0166] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염 0.1 ~ 1.0 중량%를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0167] **2-5. 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

[0168] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염 10 중량%를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0169] **2-6. 유제품(dairy products)의 제조**

[0170] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염 0.1 ~ 1.0 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0171] **2-7. 선식의 제조**

[0172] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0173] 김정콩, 김정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0174] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0175] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0176] 곡물류(현미 30중량%, 울무 15중량%, 보리 20중량%),

[0177] 종실류(들깨 7중량%, 김정콩 8중량%, 김정깨 7중량%),

[0178] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염의 건조분말(1 중량%),

[0179] 영지(0.5중량%),

[0180] 지황(0.5중량%)

[0181] **2-8. 탄산음료의 제조**

[0182] 설탕 5~10%, 구연산 0.05~0.3%, 카라멜 0.005~0.02%, 비타민 C 0.1~1%의 첨가물을 혼합하고, 여기에 79~94%의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 85~98℃ 에서 20~180 초간 살균하여 냉각수와 1:4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5~0.82% 주입하여 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염을 함유하는 탄산음료를 제조하였다.

[0183] **2-9. 건강음료의 제조**

[0184] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

[0185] **2-10. 야채 주스의 제조**

[0186] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염 0.5g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채 주스를 제조하였다.

[0187] **2-11. 과일 주스의 제조**

[0188] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염 0.1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 과일 주스를 제조하였다.

[0189] **2-12. 가축용 사료의 제조**

[0190] 단삼 추출물 또는 이의 분획물, 또는 이들로부터 분리한 화합물이나 이의 염을 배합한 배합사료 및 기능성 사료 조성물을 제조하였다.

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 요약서

【보정세부항목】 청구항 2

【변경전】

분획물로 구성되는 유효성분을 포함하는

【변경후】

분획물이 유효성분인

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6

【변경전】

분획물을 유효성분으로 포함하는

【변경후】

분획물이 유효성분인

【직권보정 3】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7

**【변경전】**

분획물로 구성되는 유효성분을 포함하는

**【변경후】**

분획물이 유효성분인

**【직권보정 4】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 10

**【변경전】**

분획물로 구성되는 유효성분을 포함하는

**【변경후】**

분획물이 유효성분인

**【직권보정 5】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 11

**【변경전】**

분획물을 유효성분으로 포함하는

**【변경후】**

분획물이 유효성분인

**【직권보정 6】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 12

**【변경전】**

분획물로 구성되는 유효성분을 포함하는

**【변경후】**

분획물이 유효성분인

**【직권보정 7】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 1

**【변경전】**

분획물을 유효성분으로 포함하는

**【변경후】**

분획물이 유효성분인

**【직권보정 8】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 8

**【변경전】**

분획물을 유효성분으로 포함하는

**【변경후】**

분획물이 유효성분인