

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0026550

(43) 공개일자 2020년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/48 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/05 (2006.01) *A61K 31/085* (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01) *A61K 31/7048* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) *A61P 31/16* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/48 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0104633

(22) 출원일자 2018년09월03일

심사청구일자 2018년09월03일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김승현

서울특별시 서초구 고무래로 94, 101동 203호 (서초동, 서초4차현대아파트)

박선주

서울특별시 중구 청계천로 400, 102동 2206호 (황학동, 롯데캐슬베네치아)

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **골담초 추출물 또는 이의 유래 화합물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물****(57) 요약**

본 발명은 골담초 추출물 또는 이로부터 유래한 화합물을 유효성분으로 포함하고 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니다제 억제 활성을 가지는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/05 (2013.01)
A61K 31/085 (2013.01)
A61K 31/343 (2013.01)
A61K 31/7048 (2013.01)
A61P 31/12 (2018.01)
A61P 31/16 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2B4006742

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 Chemical dereplication과 가상탐색을 이용한 천연물 유래 neuraminidase 활성 억제 소재 개발(2/3)

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

글담초(*Caragana sinica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물.

청구항 2

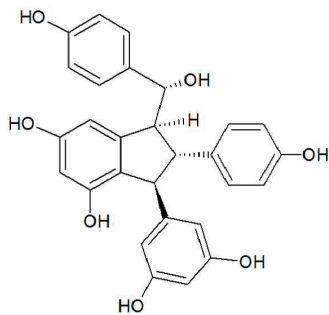
제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매로 추출된 항바이러스용 조성물.

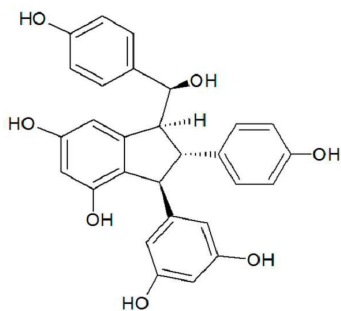
청구항 3

하기 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물.

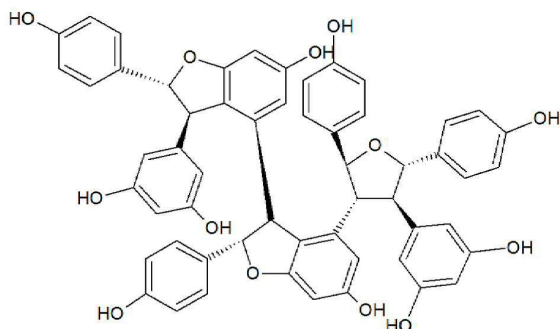
[화학식 1]



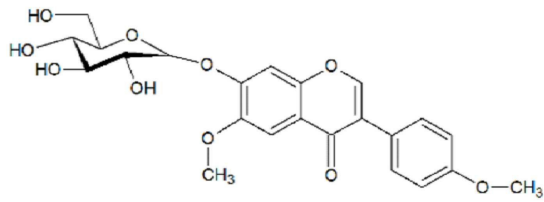
[화학식 2]



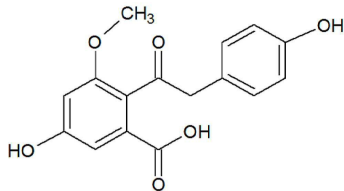
[화학식 3]



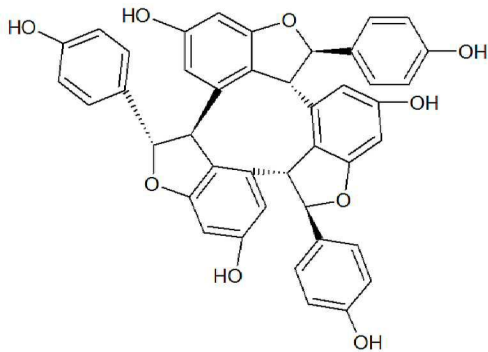
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



청구항 4

제3항에 있어서,

상기 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물은 골담초 추출물로부터 분리된 항바이러스용 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제3항에 있어서,

상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스인 항바이러스용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스 또는 C형 인플루엔자 바이러스인 항바이러스용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 인플루엔자 바이러스의 감염으로 인한 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염 또는 폐렴인 항바이러스용 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제3항에 있어서,

뉴라미니데이즈(neuraminidase) 활성을 억제하는 항바이러스용 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제3항의 항바이러스용 조성물을 유효성분으로 포함하는 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제3항의 항바이러스용 조성물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 골담초(*Caragana sinica*) 추출물 또는 이의 유래 화합물을 포함하는 항바이러스용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자 바이러스는 급성 호흡기 질환을 일으키는 전염성이 매우 강하며, 소아, 고령자, 심폐질환 환자에게 심각한 호흡기 질환 증상을 유발하는 바이러스 중 하나이다.

[0003] 인플루엔자 바이러스는 분류학적으로 오르토믹소바이러스(Orthomyxovirus)에 속하며 A, B 및 C의 3가지 형이 있으며 특히 유행적으로 확산되는 형은 A 또는 B형이다.

[0004] 전 세계적으로 인플루엔자 바이러스 치료제 개발을 위한 연구가 진행되고 있다. 대표적으로 아만타딘(Amatadine), 리만타딘(Rimatadine), 자나미비르(Zanamivir) 및 오셀타미비르(Oseltamivir)가 미국식품의약품 안전청(FDA)으로부터 승인 받아 인플루엔자 바이러스 치료제로 사용되고 있다.

[0005] 그러나 바이러스 증식에 필수적인 세포막 단백질인 M2 단백질의 이온채널을 차단하여 바이러스의 탈외피(uncoating)를 방해하여 항바이러스 작용을 하는 M2 억제제 아만타딘(Amatadine), 리만타딘(Rimatadine)은 인플루엔자 바이러스 A형에만 효과가 있고, 내성을 가진 바이러스가 발생하였으며, 신경계 및 위장에 심각한 부작용이 있는 것으로 보고되고 있다.

[0006] 한편, 1999년 이후, 바이러스의 증식에 중요한 역할을 하면서도 내성 발생빈도가 적으며, A 및 B형 인플루엔자 바이러스 모두에 안정적으로 작용하는 뉴라미니데이즈의 저해제인 자나미비르(Zanamivir), 오셀타미비르(Oseltamivir)가 개발되었다.

[0007] 그러나, 자나미비르의 경우, 항바이러스 효과가 우수하나, 생체이용율이 낮고 신장에서 빠르게 배출되는 단점이 있으며, 오셀타미르는 심각한 구토증세가 나타나는 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.

[0008] 따라서, 현재까지 개발된 항바이러스 치료제들은 상기에서 살펴본 내성 내지 심각한 부작용 때문에 그 응용에 많은 주의가 필요하다.

[0009] 또한 백신은 유행하는 바이러스의 형과 맞지 않으면 효과가 미미하므로 감염 억제 효과가 뛰어나고 안정성이 우수한 천연물 소재의 인플루엔자 바이러스 치료제의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 바이러스의 감염 억제에 있어 골담초 추출물 및 이의 유래 화합물의 역할을 명확하게 규명하여, 인플루엔자 바이러스의 뉴라미니데이즈 억제 활성이 우수한 항바이러스용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

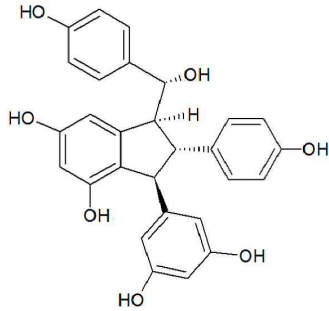
[0011] 본 발명의 일 측면에 따르면, 골담초(*Caragana sinica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물이

제공된다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 추출물은 물, 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매로 추출될 수 있다.

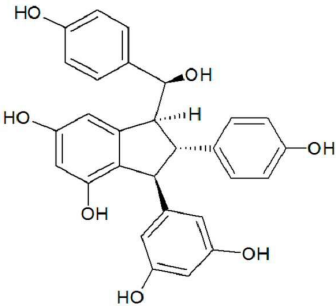
[0013] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 하기 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 조성물이 제공된다.

[0014] [화학식 1]



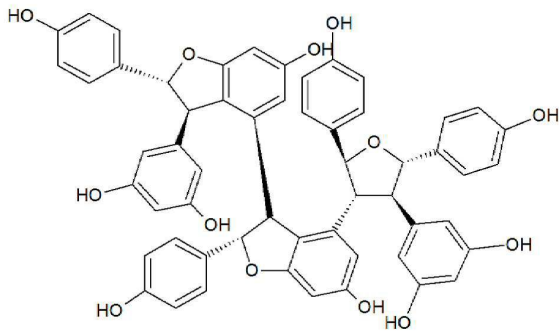
[0015]

[0016] [화학식 2]



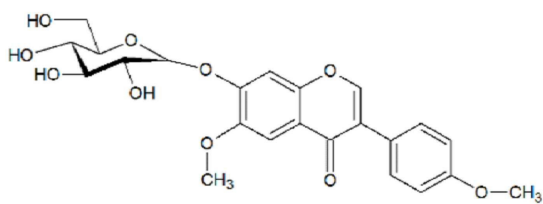
[0017]

[0018] [화학식 3]



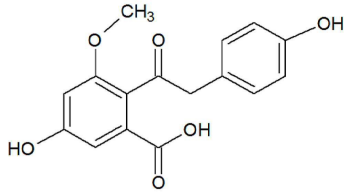
[0019]

[0020] [화학식 4]



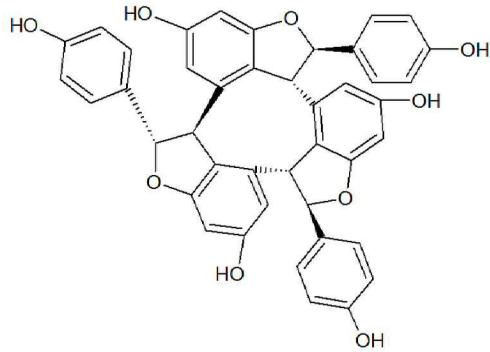
[0021]

[0022] [화학식 5]



[0023]

[0024] [화학식 6]



[0025]

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물은 골담초 추출물로부터 분리될 수 있다.

[0027] 일 실시예에 있어서, 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스일 수 있다.

[0028] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스 또는 C형 인플루엔자 바이러스일 수 있다.

[0029] 일 실시예에 있어서, 상기 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염 또는 폐렴 일 수 있다.

[0030] 일 실시예에 있어서, 상기 항바이러스용 조성물은 뉴라미니데이즈(neuraminidase) 활성을 억제시킬 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 바이러스 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

[0032] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 조성물이 제공된다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 일 측면에 따르면, 천연물인 골담초 추출물과 이로부터 유래되는 화합물은 인플루엔자 바이러스의 감염에 중요한 역할을 담당하는 효소인 뉴라미니데이즈에 대한 유의적인 억제 활성을 나타내므로 항바이러스용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0034] 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.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0036] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일

반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

- [0037] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.
- [0038] 이하, 본 발명의 실시예를 상세히 기술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 아니함은 자명하다.
- [0039] 본 발명의 일 측면에 따른 항바이러스용 조성물은 골담초(*Caragana sinica*) 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 상기 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A형 바이러스(Influenza A virus subtype H1N1), 인플루엔자 B형 바이러스(Influenza B virus subtype H1N1) 또는 인플루엔자 C형 바이러스(Influenza C virus subtype H1N1)인 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 또한, 상기 인플루엔자 바이러스는 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴을 일으킬 수 있다. 상기 항바이러스용 조성물은 뉴라미니데이즈(neuraminidase) 활성을 억제시킬 수 있다.
- [0042] 상기 뉴라미니데이즈는 당 가수분해효소로서, 세포 표면에 있는 당복합체, 특히, 당단백체의 말단에 있는 시알산(sialic acid)을 가수분해하는 효소로 알려져 있다. 구체적으로, 뉴라미니데이즈는 갈락토오스와 시알산의 α 2-3 및 α 2-6 위치에 있는 아세탈 결합을 선택적으로 가수분해한다.
- [0043] 또한, 상기 뉴라미니데이즈는 고등진핵세포와 많은 종류의 병원성 바이러스, 박테리아에 분포하며, 뉴라미니데이즈에 의한 시알산의 가수분해는 세포-세포신호전달 및 세포-세포인자에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0044] 인플루엔자 바이러스의 경우, 감염된 숙주세포에서 증식된 바이런(viron)이 세포의 당단백 말단에 있는 시알산과 결합되어 있는데, 상기 뉴라미니데이즈에 의해 시알산과 바이런이 가수분해되면, 새로운 세포로 바이러스가 확산되고, 상기 뉴라미니데이즈의 기능을 억제하면 바이러스의 확산이 저해될 수 있다.
- [0045] 현재까지 개발된 항인플루엔자 제제들은 내성 내지 심각한 부작용을 가지는 문제점을 가지고 있으므로, 새로운 항인플루엔자 바이러스 치료제에 대한 개발의 필요성이 제기되고 있다.
- [0046] 이에, 본 발명자들은 인플루엔자 바이러스의 감염에 대하여 예방 또는 개선 활성이 우수한 조성물을 발굴하기 위해, 다양한 천연물 또는 이에 유래한 화합물의 추출 및 분리 방법을 구체화하였으며, 뉴라미니데이즈 활성 억제 효과가 극대화된 상기 조성물을 개발하였다.
- [0047] 상기 항바이러스용 조성물은 인플루엔자 바이러스 표면에 존재하면서 바이러스 복제에 필수적인 기능을 하는 뉴라미니데이즈의 활성을 억제함으로써 인플루엔자 바이러스가 호흡기관 내 다른 세포로 확산되는 것을 차단하기 때문에 인플루엔자 바이러스 감염의 예방, 개선 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0048] 상기 “예방”은 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0049] 상기 “개선”은 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0050] 상기 “치료”는 조성물의 투여에 의해 인플루엔자 바이러스 감염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.
- [0051] 상기 “골담초(*Caragana sinica*)”는 콩과의 목본 식물로서 한국에 야생하고 있으며, 골담초의 뿌리는 골담초근(*Caraganae Radix*)으로 불리우며, 신경통, 류머티즘, 편두통, 관절염 등의 치료약으로 사용되어온 생약이다.
- [0052] 상기 골담초는 중국 원산으로, 우리나라 중부 이남의 산지와 마을 부근에서 나는 낙엽 관목이다. 키는 2 m 정도이며, 줄기에는 가시가 있다. 잎은 짝수 깃꼴겹잎, 작은 잎은 2쌍으로 넓은 타원형, 난형. 개화기는 5월경이고, 결실기는 8-10월 경이다. 뿌리는 9-10월 사이에 채취한다. 골담초의 뿌리에는 triterpene saponin, flavonoid,

isoflavonoid 및 stilbene 계열의 화합물들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0053] 상기 “추출물”은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에서 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다.

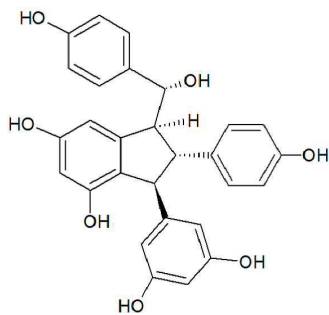
[0054] 예컨대, 상기 골담초 추출물은 물, 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 추출할 수 있으며, 바람직하게는 메탄올을 사용할 수 있다. 또한, 골담초로부터 추출물을 추출하는 방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 초음파 추출 등의 다양한 방법을 통하여 추출할 수 있지만, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0055] 상기 제조된 추출물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 예컨대, 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 농축은 감압 농축기, 건조는 동결건조법 등을 수행할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0056] 또한, 상기 용매로 추출한 추출물은 이후, 헥산, 메틸렌클로라이드, 아세톤, 에틸아세테이트, 에틸 에테르, 클로로포름, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 용매로 분획과정을 더욱 실시할 수도 있다. 상기 분획시 온도는 4℃ 내지 120℃일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

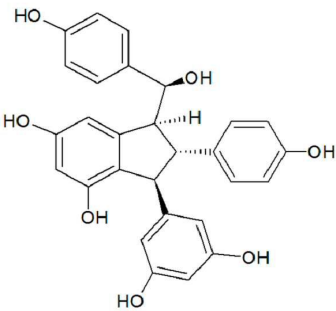
[0057] 본 발명의 일 측면에 따른 항바이러스용 조성물은 하기 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0058] [화학식 1]



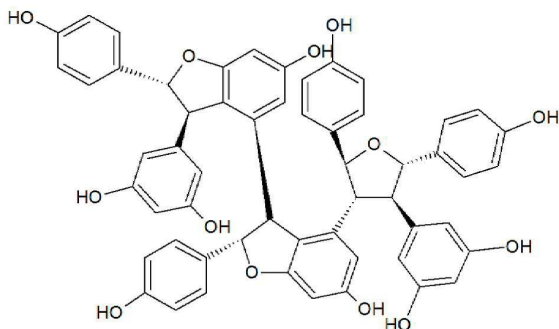
[0059]

[0060] [화학식 2]



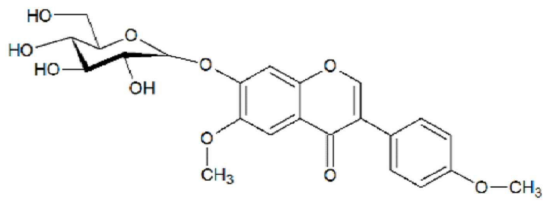
[0061]

[0062] [화학식 3]



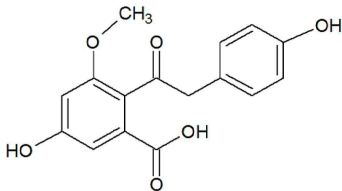
[0063]

[0064] [화학식 4]



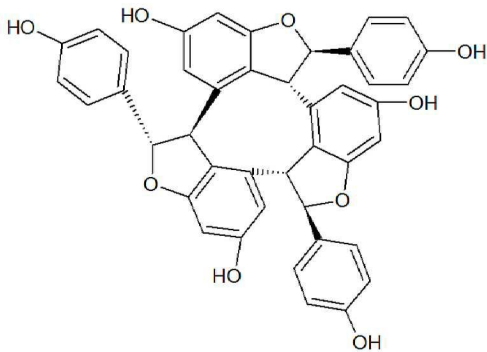
[0065]

[0066] [화학식 5]



[0067]

[0068] [화학식 6]



[0069]

[0070] 상기 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물은 골담초 추출물로부터 분리될 수 있다.

[0071] 상기 “유효성분으로 포함하는”은 이를 섭취하는 개체에 항바이러스 효과를 나타낼 수 있을 정도로 뉴라미니데이즈 활성을 억제하기에 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다.

[0072] 상기 골담초 추출물 또는 이로부터 분리된 상기 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물은 생체에 적용될 수 농도에 있어서 안전성이 우수하므로(실험예 2 및 3), 당업자가 다양한 변수를 고려하여 양적 상한을 적절히 조정할 수 있다.

[0073] 또한, 본 발명자들은 골담초 추출물 또는 이로부터 분리된 상기 화학식 1 내지 6 중 어느 하나로 표시되는 화합물이 뉴라미니데이즈의 활성을 현저하게 억제시킴으로써(실험예 1), 인플루엔자 바이러스의 감염을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있음을 확인하였다.

[0074] 이에, 본 발명에 따른 상기 항바이러스용 조성물은 인플루엔자 바이러스의 감염 질환에 대한 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 이용될 수 있다.

[0075] 상기 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.

[0076] 이때, 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0077] 또한, 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및

시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

- [0078] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 “약학적으로 유효한 양”은 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 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.
- [0079] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래 의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하 여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0080] 구체적으로 상기 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활 성을 및 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지 150mg, 바람직하게는 0.01내지 100mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0081] 상기 “건강기능식품 조성물”은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형된 것을 특징으로 한다.
- [0082] 본 발명의 조성물에 첨가 할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다. 또한, 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수 화물, 향 미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충전제, 팩트산 및 그의 염, 일간산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, PH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다.
- [0083] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈 크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소 르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다.
- [0084] 상기 향미제로서 천연 향미제타우마틴, 스테비아추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0085] 상기 외에 본 발명에 따른 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등 의 풍미제, 착색제 및 충전제, 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, PH 조 절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0086] 그 밖에도 상기 건강기능식품 조성물은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이 러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0087] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 이에 한정하는 것은 아니나, 락토스, 텍스트로즈, 슈 크로스, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오 일로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상이 사용되는 것이 바람직하다.
- [0088] 이하, 본 발명의 실시예에 관하여 상세히 서술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0089] **제조예 1 : 골담초 추출물의 제조**
- [0090] 골담초 추출물을 제조하기 위하여 건조된 골담초 뿌리(경동시장, 대한민국) 2.4 kg을 잘게 부수어 메탄올 10 ℓ 로 3회 반복 추출하였다.
- [0091] 상기 과정을 통해 수득한 골담초 추출물을 감압 농축하여 골담초 추출물(실시예 1) 266.46 g을 수득하였다(수득 율: 9 %).
- [0092] **제조예 2 : 골담초 분획물의 제조**

[0093] 상기 골담초 추출물을 물에 현탁한 후 분획 깔대기를 이용하여 n-hexane, CHCl₃ 및 EtOAc로 분획하여 각각 10.82, 44.11 및 7.12g의 분획물을 수득하였다.

[0094] **제조예 3 : 스틸벤 화합물의 분리 및 구조결정**

[0095] 상기 제조예 2에서 수득한 n-hexane 및 CHCl₃ 분획물을 합하여(54.93 g) 실리카겔 레진으로 충전한 칼럼에 크로마토그래피를 실시하였다. 전매용매로 n-hexane-acetone(40:1 → 1:1)를 사용하여 두개의 소분획 3G와 3H를 수득하였다.

[0096] 상기 3G는 CHCl₃-MeOH(7:1)을 전매용매로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시한 후 40% acetonitrile을 전매용매로 하여 prep-HPLC를 실시하여 화합물 3(실시예 4, 46.4 mg)을 수득하였다.

[0097] 상기 3H는 CHCl₃-MeOH-Water(3:1:0.15)를 전매용매로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시한 후 35% acetonitrile을 전매용매로 prep-HPLC를 실시하여 화합물 4(실시예 5, 8.2 mg)를 수득하였다.

[0098] 상기 제조예 2에서 수득한 EtOAc 분획물은 CHCl₃-MeOH(40:1 → 1:1)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 4개의 소분획 4C, 4D, 4E 및 4F를 수득하였다.

[0099] 상기 4D 분획을 YMC를 이용한 컬럼 크로마토그래피를 MeOH-Water(1.2:1)를 전매용매로 분리를 실시한 후 25% acetonitrile로 prep-HPLC를 실시하여 화합물 5(실시예 6, 15.2 mg)를 수득하였다.

[0100] 상기 4E 분획은 YMC column에 MeOH-Water(1.2:1)로 크로마토그래피를 실시하여 8A 및 8C 소분획을 수득하였다. 각각에 20% acetonitrile 및 40% acetonitrile로 prep-HPLC를 실시하여 화합물 6(실시예 7, 10.0 mg)과 화합물 1(실시예 2, 18.3 mg) 및 화합물 2(실시예 3, 7.9 mg)을 수득하였다.

[0101] 상기 분리된 6종의 화합물은 하기 HR-ESI-MS를 통하여 분자식을 추정하였고, 하기 ¹H 및 ¹³C NMR을 통하여 구조를 확인하였으며, 상기 분광학적 분석 결과를 문헌과 비교하여 화합물 1 내지 6이 각각 화학식 1 내지 6으로 표시되는 카라가시닌 D(caragasinin D), 카라가시닌 E(caragasinin E), 코보페놀 A(kobophenol A), 아프로모신-7-O-글루코시드(afrormosin-7-O-glucoside), 5-히드록시-2-[2-(4-히드록시페닐)아세틸]-3-메톡시벤조익산(5-hydroxy-2-[2-(4-hydroxyphenyl)acetyl]-3-methoxybenzoic acid) 및 알파-비니페린(α-viniferin)인 것으로 결정하였다.

[0102] 상기 분광학적 분석 결과는 하기의 화학식 1 내지 6과 같다.

[0103] **화합물 1(화학식 1, 실시예 2, caragasinin D로 명명)**

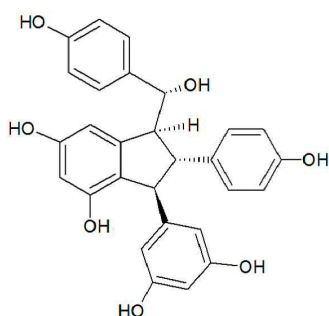
[0104] White amorphous powder

[0105] $[\alpha]_D^{20}$: +80.0 (c=1.0 in MeOH)

[0106] Molecular formula: C₂₈H₂₄O₇

[0107] ESI-QTOF/MS *m/z* 471.1452 [M-H]⁻ (calcd for C₂₈H₂₃O₇, 471.1444)

[0108] [화학식 1]



[0109]

[0110] **화합물 2(화학식 3, 실시예 4, caragasinin E로 명명)**

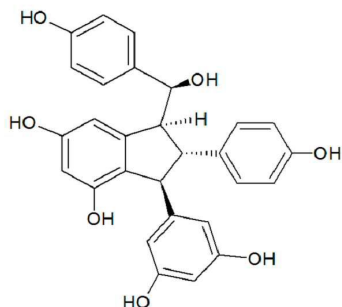
[0111] White amorphous powder

[0112] $[\alpha]_D^{20}$: +80.0 (c=1.0 in MeOH)

[0113] Molecular formula: $C_{28}H_{24}O_7$

[0114] ESI-QTOF/MS m/z 471.1448 $[M-H]^-$ (calcd for $C_{28}H_{23}O_7$, 471.1444)

[0115] [화학식 2]



[0116]

[0117] 상기 화학식 1 및 2의 1H 및 ^{13}C NMR 값은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

위치	화학식 1		화학식 2	
	$\delta_H^{1,3}$ (J in Hz)	$\delta_C^{1,2}$	$\delta_H^{1,3}$ (J in Hz)	$\delta_C^{1,2}$
1		135.65		136.13
2, 6	6.91, d(8.2)	127.98	7.07, d(8.3)	129.43
3, 5	6.68*	114.50	6.70*	115.32
4		158.00		157.30
7	4.47, d(7.7)	75.85	4.54, d(8.4)	77.25
8	3.32, m	61.34	3.31, m	63.24
9		147.84		147.61
10		105.31		105.65
11		155.41		155.09
12	6.29, d(2.2)	101.46	6.22, d(2.3)	102.44
13		158.26		158.80
14	6.60, d(2.2)	121.32	5.61, d(2.3)	122.65
1'		137.84		140.20
2', 6'	6.67*	127.65	6.94, d(8.4)	128.73
3', 5'	6.62*	114.89	6.70*	115.93
4'		156.23		156.33
7'	3.04, m	57.76	3.66, m	57.98
8'	4.12, d(4.0)	55.69	4.16, d(3.3)	57.03
9'		148.24		149.84
10', 14'	6.06, d(2.1)	106.04	6.10 d(2.1)	107.06
11', 13'		158.2		159.29
12'	6.19, t(2.1)	101.46	6.16, t(2.1)	101.19

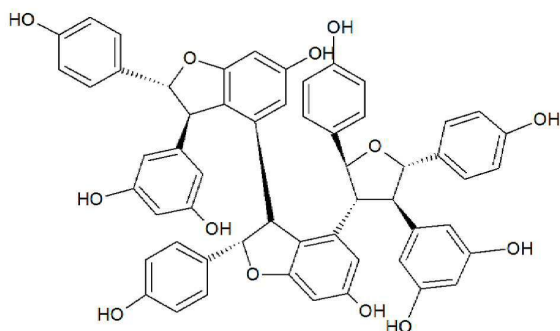
[0119] 화합물 3(화학식 3, 실시예 4, kobophenol A)

[0120] White amorphous powder

[0121] Molecular formula: $C_{56}H_{44}O_{12}$

[0122] ESI-QTOF/MS m/z 908.2838 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{56}H_{45}O_{12}$, 908.2832)

[0123] [화학식 3]



[0124]

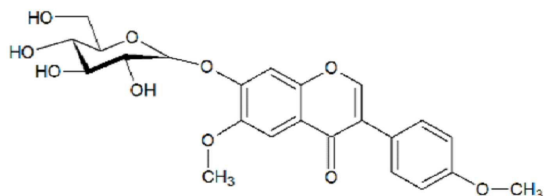
[0125] 화합물 4(화학식 4, 실시예 5, afrormosin-7-O-glucoside)

[0126] Yellow amorphous powder

[0127] Molecular formula: $C_{23}H_{24}O_{10}$

[0128] ESI-QTOF/MS m/z 461.1367 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{23}H_{24}O_{10}$, 461.1370)

[0129] [화학식 4]



[0130]

[0131] 상기 화학식 3 및 4의 1H 및 ^{13}C NMR 값은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

위치	화학식 3		위치	화학식 4	
	$\delta_H^{1,4}$ (J in Hz)	$\delta_C^{1,3}$		$\delta_H^{2,4}$ (J in Hz)	$\delta_C^{2,3}$
1a		135.63	2	8.43, s	153.36
2a, 6a	7.29, d(8.1)	126.85	3		122.80
3a, 5a	6.83, d(8.9)	116.69	4		174.31
4a		158.33	5	7.49, s	104.72
7a	5.45, d(1.3)	92.98	6		147.50
8a	4.21, d(1.3)	58.64	7		151.58
9a		148.00	8	7.34, s	103.44
10a, 14a	5.95, brs	107.03	9		151.25
11a		159.56	10		117.81
12a	5.94, s	102.22	1'		124.29
13a		159.56	2', 6'	7.54, d(8.6)	130.08
			3', 5'	7.00, d(8.6)	113.64
1b		134.10	4'		158.97
2b, 6b	6.15, d(8.8)	129.07	1''	5.18, d(5.8)	99.61
3b, 5b	6.41, d(8.0)	116.19	2''		73.02
4b		157.21	3''		76.75
7b	5.01, d(3.7)	94.101	4''		69.58

8b	3.38, d(3.7)	53.053	5''		77.21
9b		144.83	6''		60.64
10b		120.28	6-OCH ₃	3.88, s	55.16
11b		162.36	4'-OCH ₃	3.79, s	55.85
12b	6.49, d(2.1)	96.39			
13b		161.25			
14b	6.00, d(2.2)	108.86			
1c		132.03			
2c, 6c	6.43, d(8.0)	127.47			
3c, 5c	6.59, d(8.7)	115.58			
4c		156.12			
7c	5.05, d(4.0)	85.68			
8c	3.22, t(5.0)	52.65			
9c		134.12			
10c		124.70			
11c		161.07			
12c	6.02, d(2.2)	95.94			
13c		158.65			
14c	6.37, d(2.3)	111.05			
1d		139.57			
2d, 6d	7.02, d(8.7)	127.86			
3d, 5d	6.72, d(8.7)	116.12			
4d		157.91			
7d	5.13, d(10.7)	86.02			
8d	2.96, dd(10.7, 5.9)	62.21			
9d		136.65			
10d, 14d	5.65, d(2.4)	109.40			
11d, 13d		158.33			
12d	5.97, t(2.2)	103.43			

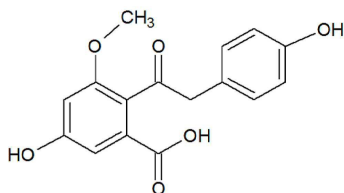
[0133] 화합물 5(화학식 5, 실시예 6, 5-hydroxy-2-[2-(4-hydroxyphenyl)acetyl]-3-methoxybenzoic acid)

[0134] Green oily material

[0135] Molecular formula: C₁₆H₁₄O₆

[0136] ESI-QTOF/MS *m/z* 302.0785 [M-H]⁻ (calcd for C₁₆H₁₃O₆, 301.0790)

[0137] [화학식 5]



[0138]

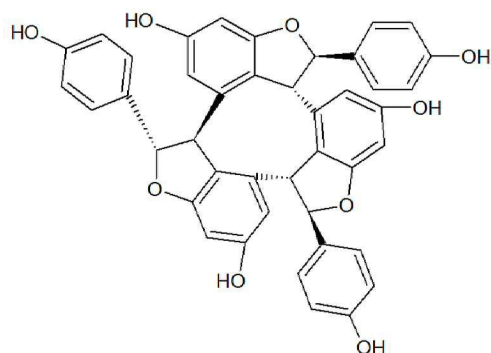
[0139] 화합물 6(화학식 6, 실시예 7, α-viniferin)

[0140] Colorless compound

[0141] Molecular formula: C₄₂H₃₀O₉

[0142] ESI-QTOF/MS *m/z* 677.1892 [M-H]⁻ (calcd for C₄₂H₂₉O₉, 677.1890)

[0143] [화학식 6]



[0144]

[0145] 상기 화학식 5 및 6의 ^1H 및 ^{13}C NMR 값은 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0146]

위치	화학식 5		위치	화학식 6	
	$\delta_{\text{H}}^{1,3} (J \text{ in Hz})$	$\delta_{\text{C}}^{1,2}$		$\delta_{\text{H}}^{1,3} (J \text{ in Hz})$	$\delta_{\text{C}}^{1,2}$
1		103.34	1a		132.51
2		107.53	2a, 6a	6.86, d(7.8)	128.12
3		161.33	3a, 5a	6.57, brs	116.00
4	5.83, brs	93.57	4a		158.14
5		171.56	7a	5.99, s	86.98
6	5.83, brs	91.83	8a	3.82, s	47.86
7		196.21	9a		141.41
8	3.04, s	42.05	10a		118.68
9	3.74, s	56.17	11a		162.01
10		174.56	12a	6.11, d(2.2)	98.43
			13a		159.69
1'		125.73	14a	5.74, d(2.3)	109.04
2'	6.96, d(8.3)	132.50			
3'	6.54, d(8.6)	115.67	1b		132.38
4'		157.18	2b, 6b	7.03, d(8.2)	128.35
5'	6.54, d(8.6)	115.67	3b, 5b	6.62, d(8.3)	116.42
6'	6.96, d(8.3)	132.50	4b		158.93
			7b	5.79, d(9.2)	90.98
			8b	4.52, d(9.2)	53.62
			9b		140.07
			10b		121.56
			11b		161.21
			12b	6.13, d(2.2)	96.88
			13b		159.76
			14b	6.57, brs	106.43
			1c		133.26
			2c, 6c	6.84, d(8.0)	129.26
			3c, 5c	6.62, d(8.3)	116.35
			4c		158.65
			7c	4.59, d(7.3)	96.47
			8c	4.38, d(7.3)	56.69
			9c		139.43
			10c		120.34
			11c		162.31
			12c	6.07, d(2.1)	97.15
			13c		161.28

			14c	6.37, d(2.3)	106.12
--	--	--	-----	--------------	--------

[0147] **실험예 1 : 뉴라미니테이즈 억제 활성 평가**

[0148] 상기 제조예 1에서 수득한 골담초 추출물 및 상기 제조예 3에서 수득한 화합물 1 내지 6의 뉴라미니테이즈 억제 활성을 확인하였다.

[0149] 구체적으로, 96 well plate의 한 well 당 2배 농도의 working solution(100 μ M Amplex Red reagent, 0.2 U/mL HRP, 4 U/mL galactose oxidase and 500 μ g/mL Lfetuin) 50 μ L와 50 μ L의 뉴라미니테이즈를 가하였다.

[0150] 상기 well에 농도를 맞춘 실시예 1 내지 6을 10 μ L를 가하여 최종 농도가 20 μ M 이 되도록 하였다.

[0151] 양성대조군은 실시예 대신 항바이러스제로 사용되고 있는 망기페린(magiferin) 10 μ L를 가하였고, 음성대조군은 실시예 대신 DMSO를 10 μ L 가하였다.

[0152] dual syringe pump가 설치된 fluorescence plate reader(FLUOstar Omega; BMG Labtech, Durham, NC)로 37 $^{\circ}$ C에서 90 분간 형광을 측정하였다.

[0153] 뉴라미니테이즈 저해 활성은 60및 85분에 형광을 측정하여 양성대조군에 대한 상대적인 활성 억제 비율로 하여 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0154]

구분	60 분	85 분	양성대조군에 대한 상대적인 억제 활성 비율(60 분)	양성대조군에 대한 상대적인 억제 활성 비율(90 분)
음성대조군	61114	100176	0	0
양성대조군	23514	28271	1	1
실시예 1	41313	53459	0.57	0.53
실시예 2	31873	41445	0.74	0.68
실시예 3	36085	47384	0.65	0.60
실시예 4	34966	51575	0.67	0.55
실시예 5	51467	77256	0.46	0.37
실시예 6	39592	55091	0.59	0.51
실시예 7	24840	32642	0.95	0.87

[0155] 표 4를 참조하면, 실시예 1은 양성대조군에 비해 60분과 85분에서 0.57 및 0.53의 비율로 뉴라미니테이즈 활성을 억제하였다. 또한, 분리된 화합물 6종 모두 우수한 뉴라미니테이즈 억제 활성을 나타냈으며, 특히, 실시예 7(화합물 6)은 양성대조군과 거의 유사한 정도의 뉴라미니테이즈 억제 활성을 나타내었다.

[0156] **실험예 2 : 세포 독성 평가**

[0157] 골담초 추출물 및 이로부터 유래된 화합물의 세포에 대한 독성을 확인하기 위하여 인체 유래 세포인 HaCaT cell line 대하여 MTT assay를 수행하였다.

[0158] 각 HaCaT cell line 2×10^3 cells/0.1mL의 세포를 96-well tissue culture plates(Falcon)의 각 well에 넣은 후, DMSO를 사용하여 녹인 상기 실시예 1 내지 7을 최대 농도가 0.2 %를 초과하지 않도록 하여 100 μ g/mL 농도로 각각 culture plates에 첨가하였다.

[0159] 48시간 경과 후 10 μ L 5 mg/mL MTT(sigma Cat. M2128)를 첨가한 후, ELISA reader(VersaMax, Molecular Devises, USA)를 이용하여 540nm 흡광도에서 활성을 측정하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 수행되었다.

[0160] 그 결과 상기 실시예 1 내지 7의 시료를 처리한 경우 세포 성장이 저해되지 않았으며, 상기 결과는 실시예 1 내지 7의 시료가 세포독성이 없는 안전한 것임을 시사한다.

[0161] **실험예 3 : 독성 평가**

[0162] 식약청의 예규에 따라 ICR 마우스(male, 6 weeks, 오리엔트사로부터 구입)를 대상으로 급성독성을 평가하였다.

[0163] 그 결과, 실시예 1 내지 7은 300 mg/kg의 경구투여까지 급성독성을 보이지 않았다.

- [0164] 상기 실험예의 결과는 골담초 추출물 및 이의 유래한 화합물인 실시예 1 내지 7이 안전한 뉴라미니데이즈 활성 억제용 조성물로서 사용 가능함을 시사한다.
- [0165] **실험예 4 : 항바이러스 활성 평가**
- [0166] 개의 신장세포주인 MDCK(Madin-Darby canine kidney, ATCC: CCL-34)를 이용하여 인플루엔자 바이러스 H1N1(A/PR/8/34) 및 H9N2(A/Chicken/Korea/MS96/96)]에 대한 항바이러스 효과를 측정하였다.
- [0167] 상기 실시예 1 내지 7의 시료는 일부 차이가 있었으나, 뉴라미니데이즈 저해 활성과 비례하여 항바이러스 활성을 나타내었다.
- [0168] 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.
- [0169] 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.