

제 출 문

보건복지부장관 귀하

이 보고서를 “ 항바이러스 screen system 개발 및 항바이러스, 항암치료제 개발(생명공학연구소/이영익) ” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999 . 5 . . .

참 여 기 업 명 : 고려 폴리머

제 1세부과제명 : 항바이러스 탐색 시스템 개발

(제1세부연구기관/세부과제책임자): 이 영익

제 2세부과제명 :

(제2세부연구기관/세부과제책임자):

위탁과제명 :

(위탁연구기관/위탁연구책임자):

요 약 문

I. 제 목

항바이러스 screen system 개발 및 항바이러스, 항암치료제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

HBV 항바이러스 활성을 갖는 천연물로부터 순수 단일 화합물질을 분리, 정제하며 이에 대한 항바이러스 활성의 재검증 및 물리화학적 특성을 규명하고 이로써 HB 바이러스에 의한 감염 및 이에 의해 발생하는 간암을 근본적으로 치료할 수 있는 새로운 치료제 개발에 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

연구추진일정표의 계획대로 자체개발한 ELISA 방법을 통해 항바이러스, 항암 활성을 측정하는 시스템을 확립하였다. 천연물로부터 항바이러스, 항암 활성물질을 탐색하는 1차 개발과정을 마쳤으며, 천연물 조추출물로부터 순수물질을 분리, 정제하는 연구를 수행하였다. 분리, 정제되는 추출물 분획을 각 정제단계마다 이미 확립된 HBeAg ELISA 혹은 HBsAg ELISA 방법을 통한 항바이러스, 항암 활성을 측정하였으며 역가가 좋은 추출물 및 정제물에 대하여 Southern blot 및 Northern blot 실험을 통해 분자수준에서의 바이러스 복제 등에 관련된 활성 감소를 검증하였다. 천연물로부터의 효과적인 순수물질 분리 정제 방법 역상 HPLC 방법으로 확립하였으며 현재 분리된 순수물질에 대한 물리화학적 특성연구를 진행하고 있고 구조해석을 위한 연구기반 확보 및 순수물질을 대량으로 확보하는 연구를 진행 중이다.

IV. 연구개발결과

- Crude한 후보 천연물질의 분획 및 항 HBV 활성 검증
 - ① 1차 정제물 분획에 대한 항 HBV 활성 평가
 - ② 2차 정제물 분획에 대한 항 HBV 활성 평가
 - ③ 순수물질 정제 및 세포에 대한 시료의 세포독성 결정
- 분리정제된 추출물로부터 Southern blot 방법을 이용하여 바이러스복제 검증
- 분리정제된 분획으로부터 Northern blot 방법을 이용하여 항바이러스활성 검증
- 최종 분리정제된 분획의 NMR (^1H , ^{13}C)에 의한 구조분석 작업

V. 연구개발결과의 활용결과 및 계획

천연추출물이 인체에 미치는 독성 및 돌연변이성 영향이 다른 합성물질에 비해 거의 없다는 큰 장점이 있기 때문에 제품으로 개발되는 생물학적 제제의 특허 획득을 포함한 판매 및 수출은 일단 개발된 물질의 효과가 우수할 경우 국내와 국외에서 아무런 문제없이 이루어질 수 있을 것으로 사료되며 현재까지 국산화되지 않아 수입하여 쓰고 있는 생물학적 의약제제를 국내에서 시판할 경우 수입대체효과가 커 외화절약에 일익을 담당하게 될 것으로 보인다.

영 문 요약 문 (SUMMARY)

Many plants have been empirically used as therapeutic agents with beneficial results in various diseases containing incurability.

However, some components of the plants induce harmful side effects.

Hence the necessity to develop basic research and experimental method to isolate and determine the biological mechanisms are required to estimate more accurately their curative properties and/or side effects.

In this project we used one plant which has been known for its medical properties as an anti-HBV effect for a long time.

In order to isolate the chemical and biological compound to determine the actual mechanisms of its anti-HBV effect, we started to isolate the compound using various chemical analysis technique.

The compound were dissolved as a methanol soluble fraction.

By using many steps of biochemical analysis, including LH-20 column chromatography we isolate one compound which showed anti-HBV effect in tissue culture analysis.

To determine the exact structure of the compound, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, Mass spectroscopy, $^1\text{H-}^1\text{H}$ cosy, $^{13}\text{C-}^1\text{H}$ cosy, HMBC, HMQC method used.

Exact structure of the compound was determined which showed strong anti-HBV effect.

목 차

- 제 1 장 서론 6
- 제 2 장 국내·외 기술개발 현황 7
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 12
- 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 29
- 제 5 장 연구개발결과의 활용성과 및 계획 30
- 제 6 장 기타 중요변경사항 30

제 1 장 서론

효과있는 치료제가 없어 임상 의사들이 큰 곤란을 겪고 있는 HBV에 의한 만성간염은 전 세계적으로 약 3억의 인구가 감염되어 있어 세계적인 의료관심의 대상이 되어 왔으나 대부분의 바이러스에서 그러하듯 항 HBV 의약품 개발에도 큰 진전이 없는 실정이다. 현재 바이러스학이 상당히 발전하여 HBV를 포함한 대부분의 인체에 질병을 일으키는 바이러스의 증식과정이 상당부분 알려졌으며 이 바이러스들에 대한 치료제의 개발 경쟁이 치열해지고 있다. 지금까지 항바이러스 제제 개발에 사용되어 온 nucleoside analogue를 이용한 방법 이외에 천연물로부터의 신물질개발에 의한 항바이러스제제 개발이 성공리에 이루어진다면 제약산업뿐만 아니라 다른 생물학 분야에 까지 광범위하게 이용될 것으로 보인다.

이상적인 간염바이러스치료는 감염된 간세포를 활발하게 파괴시키고 간염바이러스에 대한 중화항체의 도움으로 재생하고 있는 간세포에 재감염되는 것을 막으며 또한 HBV의 증식을 억제시켜 궁극적으로 간염바이러스를 제거하는 것일 것이다(그림 1). 간염바이러스는 강력한 암발병인자로서 우리나라 암 사망률 제 3위인 간암환자의 70%가 B형, 10%가 C형 간염바이러스에 의한 것으로 판명되어 전염경로의 차단과 바이러스 증식의 방지가 간암 공포에서 벗어날 수 있는 지름길이란 결론이다.

그러므로 우리는 HBV 항바이러스 활성을 갖는 천연물로부터 분리된 순수물질에 대한 항바이러스 활성을 검증하며 확인된 물리화학적 성질을 바탕으로 순수물질을 대량 확보한다. 정제된 천연물의 특성과 구조를 해석하고 특허를 출원하여 의약품으로 개발하기 위한 기본 준비를 수행한다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

현재 HBV 감염환자에게 시행되는 유일한 치료법은 인체자체의 면역체계에 의존하는 방법뿐이다. 그러나 HBV에 대한 면역작용이 한편으로는 HBV를 제거한다해도 다른 한편으로는 간 세포를 파괴하고 있기 때문에, 때로는 면역작용의 부작용으로 치명적인 질환으로 이행하게 된다. 이러한 문제는 질병의 진행을 예측하기 어렵기 때문에 빠르고 효율적인 감염치료를 위해서는 항 바이러스 요법과 면역치료법을 복합적으로 사용하는 것이 바람직하다. 즉 바이러스 감염이 효과적으로 치유되기 위해서는, 감염된 간세포가 CTL에 의해 파괴되고, 바이러스에 대한 중화항체가 파괴된 간세포로부터 방출된 바이러스입자를 제거하여 재생된 간세포에로의 재감염을 막으며 한편으로는 바이러스 증식이 억제되어야 할 것이다. 지금까지 인터페론, 핵산 유도제, 면역조절물질을 포함한 여러방법으로 B형 간염바이러스를 치료해 본 결과 (표 1), 인터페론- α 만이 거의 유일하게 효과를 나타내며 미국에서 치료제로서 인정받았다. 인터페론- α 는 Scullard등에 의하여 1900년대 중반에 B형 만성간염의 치료제로서 처음 시험되어 HBV의 복제를 억제하는 효과를 나타내었고 (J. Infect Dis 1981 : 143, 772-783) 그 후 재조합 IFN- α 가 생산됨에 따라 폭발적으로 그 사용이 증가되었다. 현재 IFN- α 의 치료효과는 1주일 3번씩 최소 3개월동안 투여하였을 때 평균 20%의 환자에서 바이러스증식억제에 치료효과를 나타내었다. 그러나 지속적인 억제효과를 나타내지 못하고 특히 동양사람들에게서 많은 모자간의 수직감염에 의한 환자나 어린이들인 경우 IFN- α 에 대한 tolerance를 나타내어 그 치료효과가 낮았다. B형 간염바이러스에 감염된 급성 및 만성 환자들 중 50% 이하의 환자들만이 IFN- α 치료법에 적합하다는 것이 최근 알려졌다. 환자들 중 바이러스에 대한 영향으로 간에서 생성되는 각종 효소들(AST, SGOT, ALT, SGPT 등)의 양이 증가하는 경우에만 이 IFN- α 치료법을 사용했을 때 치료효과를 기대할 수 있다는 것이다. 따라서 IFN- α 에 대한 내성을 갖는 환자들을 치료할 수 있는 B형 간염바이러스치료제의 개발 또한 시급한 실정이다. B형 간염 바이러스의 증식을 억제시킬 수 있는 방법들은 바이러스가 수용체에 부착하는 것을 저해한다던가, 바이러스의 활성화 단백질이나 중합효소의 활성을 특이적으로 저해하는 물질들을 찾는 방법을 들 수 있다. 최근 plant origin의 천연물이 HB 바이러스 항원과 항체의 binding을 저해하며 바이러스복제를 억제한다는 보고와 함께 천연물로부터 antihepatitis activity를 갖는 물질의 screening에 박차를 가하게 되었지만 그 작용기작에 대해서는 현재까지 명확히 밝혀진 것이 없는 실정이다.

표 1. Antiviral/immunomodulatory agents that have been evaluated in humans

Interferons

α

β^*

γ †

Antiviral agents

Acyclovir †

Adenine arabinoside (ARA-A/ARA-AMP) ‡

Dideoxyinosine †

Ribavirin*

Fialuridine †

Azidothymidine †

Foscarnet †

Lamivudine*

Immunomodulatory agents

Prednisolone †

IL-2 †

Thymosin †

Levamisole †

GM-CSF*

Vaccines*

Adoptive immune transfer*

Combination therapy

IFN- α or - β + IFN- γ § ¶

IFN- α + prednisone §

IFN- α + levamisole §

IFN- α + IL-2 §

IFN- α + ARA-AMP § ¶

IFN- α + acyclovir §

*Limited data; †ineffective; ‡serious adverse effects; § no added benefit; ¶ increased adverse effect. compared to IFN- α alone.

(Lok 등 Journal of Hepatitis 1, 105-124 (1994) 에서 발췌)

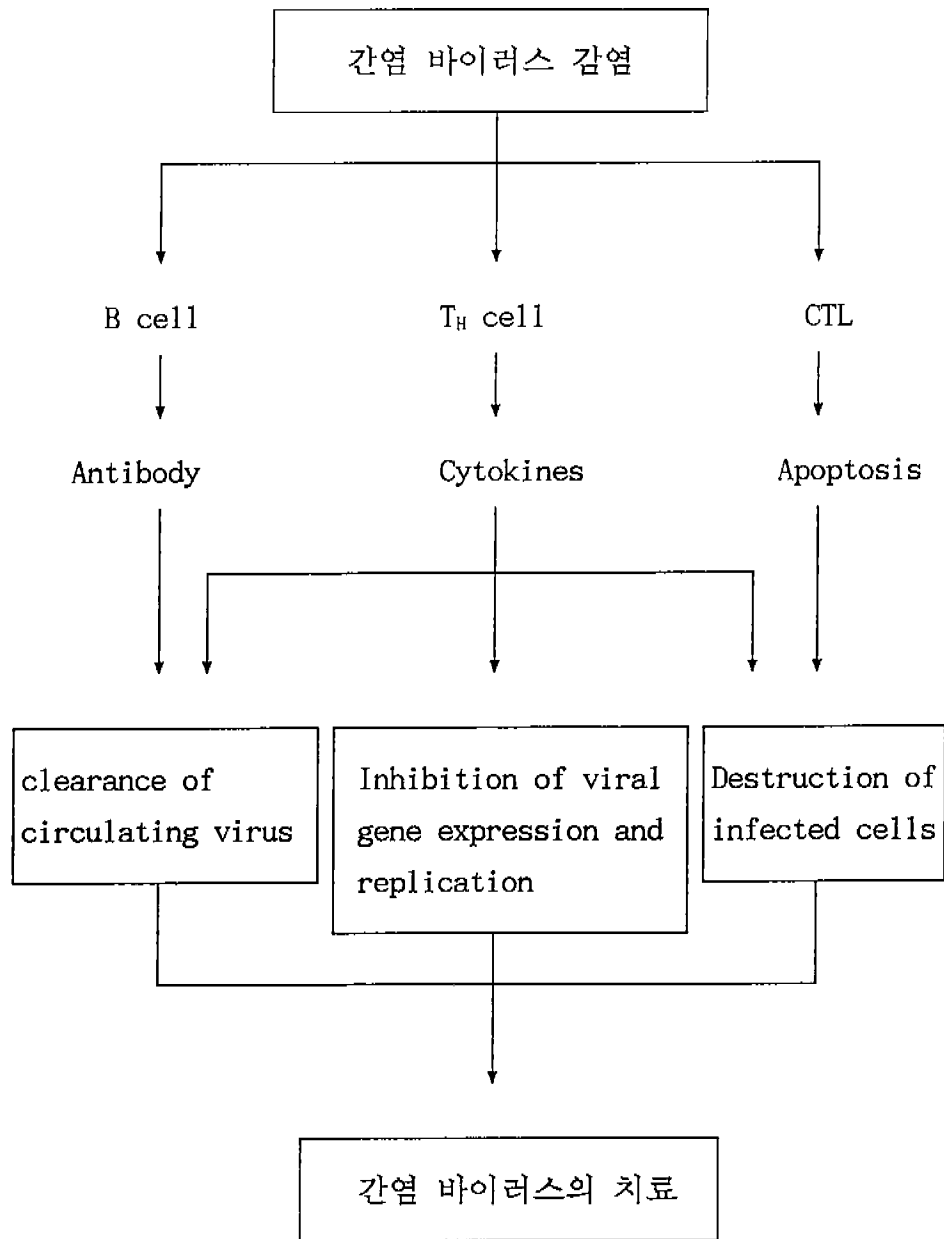


그림 1. 간염바이러스 감염에 대한 면역반응과 치료

표 2. B형 간염 치료제를 개발하는 미국의 생물공학회사 (1996년)

기업명	개발내용
Apollon	바이러스 항원을 코드하는 DNA로 구성된 백신을 개발
BioChem Pharma	B형 간염을 치료하는 화합물을 동정
Biogen	재조합 β -IFN을 B형 치료용으로 개발
Chiron	antisense 화합물을 이용한 치료제 개발
Cytel	MHC 수용체에 결합하는 바이러스 절편 개발
Hybridon	antisense 화합물을 La Roche사와 공동 개발
Innovir	바이러스 RNA를 자르는 리보자임 개발
Protein Design Labs	사람 단세포군 항체를 만성 B형 환자를 목표로 개발
Vical	바이러스 항원을 발현하는 세포를 변환하는 DNA 개발

바이러스 간염에 대한 새로운 치료제는 생물공학회사들에게 좋은 목표가 되고 있으며 B형 간염환자를 치료하기 위한 매년의 시장규모가 미국의 경우 예방백신 1.5억불, 치료제가 5억불을 형성하고 있고 일본의 경우 예방백신 22억엔, 치료제 900억엔의 시장이 있다. 현재 B형 간염바이러스에 대한 치료제를 개발하는 미국의 생명공학회사와 연구내용을 표 2.에 정리하였다. 새로운 치료제를 개발하고 특허를 통해 이익을 행사하려는 노력이 계속되고 있으며, SmithKline Beecham 사가 Engerix-B라는 새로운 B형 간염백신으로 2004년까지의 특허권을 획득하고 1996년 현재 세계적으로 5.8억불의 판매를 달성한 예가 좋은 성공 사례가 되고 있다.

현재 국내에서 간염치료제로 판매되어지고 있는 약품은 많이 있지만 대부분 일반 간장 약의 범주에 속하는 것이므로 이들을 제외하면 간염치료제로 인식될수 있는 것들로 IFN- α , 편자황, 레가론정, 리코백, 디디비 등이 있다. IFN- α 의 경우 1990년이후 매년 10억원을 상회하는 양을 수입하고 있으나 국내 간염환자수의 1%에도 미치지 못하는 환자들만이 IFN- α 치료요법을 투여받고 있다. IFN- α 가 간염치료제로 인정받고 있으면서도 치료에 크게 활용되지 않는 것은 이 약제가 아직도 가격이 비싸고 치료율이 50% 정도에 머무르고 있기 때문이다. IFN- α 를 제외한 기타 약품의 시장 규모도 점차 확대되고 있어 이들을 모두 합한 국내 간염치료제 시장규모는 1995년에 약 170억원에 달하고 있다.

본 과제는 이미 항바이러스성 물질의 분리과정을 진행중에 있으며 아래에 기술한 바와 같이 이미 이 연구에 대한 많은 업적을 국내외적으로 인정받고 있다. 또한 분석 시스템에

연관되어 3편의 특허를 출원하는 등 이 과제를 효과적으로 수행할 수 있는 인적, 기술적 요소를 확보한 상태이기 때문에 제품의 개발에 필요한 기간 및 비용을 줄일 수 있어 가장 효과적이고 효율적인 방법으로 HBV에 대한 항바이러스성 제제를 개발할 수 있을 것이다. 이미 천연물로부터 항바이러스 후보물질을 동물세포배양, 효소반응 등을 이용한 활성측정법, 바이러스 유전자 단계에 미치는 영향의 수치화 등 강력한 분자생물학적 기술을 동원하여 탐색하였으며 찾아낸 후보물질의 분석 및 대량분리, 생산은 국내의 기술력을 유기적으로 연결하는 공동연구를 통해 빠르게 수행할 수 있다. 천연추출물이 인체에 미치는 독성 및 돌연변이성 영향이 다른 합성물질에 비해 거의 없다는 큰 장점이 있기 때문에 제품으로 개발되는 생물학적 제제의 특허 획득을 포함한 판매 및 수출은 일단 개발된 물질의 효과가 우수할 경우 국내와 국외에서 아무런 문제없이 이루어질 수 있을 것으로 사료되며 현재까지 국산화되지 않아 수입하여 쓰고 있는 생물학적 의약품제를 국내에서 시판할 경우 수입 대체효과가 커 외화절약에 일익을 담당하게 될 것으로 보인다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구수행 방법

가. ELISA를 이용한 Viral protein productivity 검증

간염 바이러스의 HBe항원을 Behring ELISA processor(III)를 사용하여 검증하였다.

- ① 100mm culture disk에 HBe 항원을 분비하는 세포(2×10^5)를 plating 한다.
- ② overnight 배양하여 serum free 배지로 change시킨 후 일정농도의 약제를 처리한다.
- ③ 36시간 배양 후 배지를 sampling 한다.
- ④ Sampling한 배지중 $100\mu\text{l}$ 씩 취하여 test well에 넣는다. 이때 positive, negative control well도 준비한다.
- ⑤ 습열사태로 37°C 에서 1시간 배양한다.
- ⑥ Asporator로 배양액을 버리고 PBS로 4회정도 washing한다.
- ⑦ Anti-HBe-POD conjugate를 $100\mu\text{l}$ 씩 넣고 37°C 에서 1시간 배양한다.
- ⑧ PBS로 4회 정도 washing한다.
- ⑨ working chromogen TMB solution $100\mu\text{l}$ 를 넣고 25°C 에서 30분 배양한다.
- ⑩ 이 효소반응은 stopping solution $100\mu\text{l}$ 로 정지시킨다.
- ⑪ 결과적으로 얻어지는 color intensity를 ELISA reader로 읽어 sample중의 HBeAg 농도를 알아낸다.

나. Southern blot method를 이용한 바이러스 복제 검증

- ① Electrophoresis (100V, O/N)
- ② Denaturation for 1h
- ③ Neutralization for 1h
- ④ Nitrocellulose paper or Nylon membrane, O/N
- ⑤ Air-dry nitrocellulose paper
- ⑥ baking 80°C for 2hrs or UV cross-linking
- ⑦ Pre-hybridization at 61.5°C for 30min
- ⑧ Hybridization at 60°C , O/N
- ⑨ Washing, 4 times 2 X SSC, 0.1% SDS for 20 min

1 X SSC, 0.1% SDS for 20 min

0.3 X SSC, 0.1% SDS for 20 min

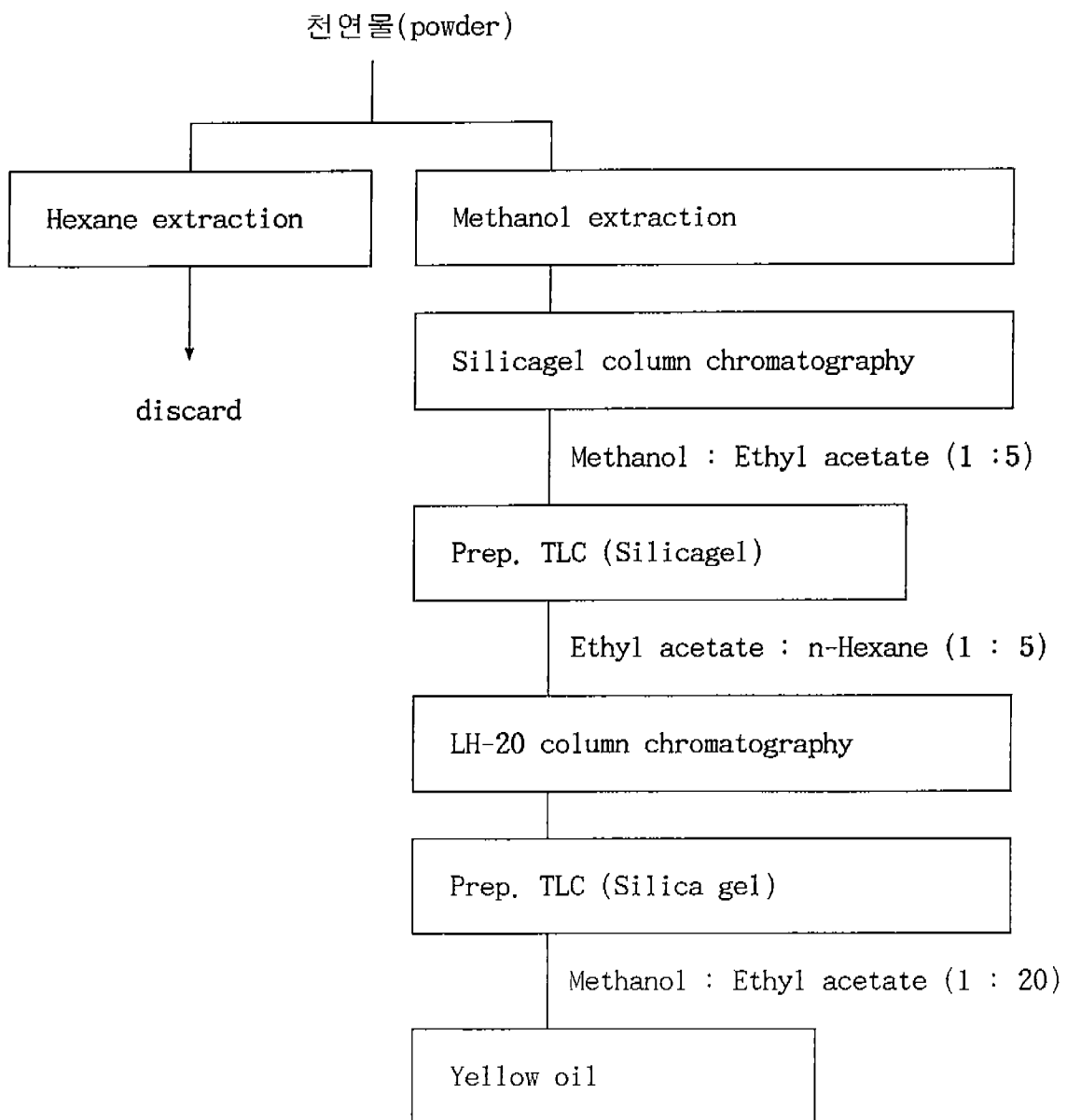
0.1 X SSC, 0.1% SDS for 20 min

⑩ Wrapping

⑪ 1 X-ray film exposure

⑫ Developing

다. 천연물의 추출방법



라. 분리정제된 물질의 물리·화학적 특성조사 및 구조해석

- 발색반응 (color reaction)
- 녹는점 (melting point)
- Ultra violet (UV) spectrum
- Infrared (IR) spectrum
- 물질의 성장 : color, 물성
- 용해도
- EA (Elemental Analysis)
- 각종용매에서의 Rf 값 (이동치)
- 구조해석 : $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, Mass
NOE (Nuclear overhauser effect)
NOESY
 $^1\text{H-}^1\text{H}$ cosy
 $^{13}\text{C-}^1\text{H}$ cosy
HMBC, HMQC

2. 연구수행 결과

• Crude한 후보 천연물질의 분획 및 항 HBV 활성 검증

① 1차 정제물 분획에 대한 항 HBV 활성 평가

1차적으로 분획 추출한 물질에 대하여 항 HBV 활성을 검색한 결과 효능이 나타난 후보물질에 대하여 항바이러스 활성을 ELISA 방법을 통하여 평가하였다. 7개의 분획들을 1A에서 1G까지로 명명하였으며 각 분획에 대한 HBe 항원 ELISA 결과를 그림 1에 나타내었다.

② 2차 정제물 분획에 대한 항 HBV 활성 평가

항 HBV 활성검색 결과 뛰어난 효능을 보인 1D, 1E, 1F, 1G번 분획에 대하여 여러 가지의 용매를 이용한 재정제를 실시하였다. 시료의 crude aqueous extract에 methanol을 1:2의 비율로 넣어 separation funnel을 사용하여 시료를 완전히 녹인 다음 저온에서 정치하여 overnight 시켰다. 생성된 침전물과 상층을 원심분리기로 15,000rpm, 30분동안

분리시킨 후 Whatman filter paper No.1으로 여과한 후 항 HBV 활성을 ELISA 법으로 조사하였다. 이와 같은 방법을 이용하여 새로운 분획 2A에서 2G까지를 얻었으며 이에 대한 항바이러스 활성을 평가하였다(그림 2). 1, 2차 정제를 통하여 활성이 좋은 분획을 선정할 수 있었으며 효율적으로 분리 및 정제하는 방법을 확립할 수 있었다.

③ 순수물질 정제 및 세포에 대한 시료의 세포독성 결정

분획 중 항 HBV 활성이 뛰어난 분획에 대하여 역상 HPLC 방법으로 순수물질에 가깝도록 정제하였으며(그림 3.) 시료에 의한 세포독성을 시험하였다. 시료에 의한 세포독성은 시료를 농도별로 희석하여 well당 1.0×10^4 개의 세포가 배양되어있는 96 well plate에 각각 첨가한 다음 10일까지 장기간 배양하면서 세포의 모양, 형질 변화 및 50% cytotoxic dose(CD50)를 산출하였다. HeLa, HepG2, Hep3B, Chang Liver 등의 세포에 대하여 시험해본 결과 시료에 의한 세포독성은 거의 관찰되지 않았으며 세포의 모양, 형질에 미치는 영향도 없는 것으로 나타났다(데이터 실지 없음). 역상 HPLC 방법으로 얻어진 분획에 대하여 독성 조사와 함께 항 HBV 활성을 같이 평가하기 위해 처리하는 시료의 양은 늘리고 세포의 수를 100mm culture disk당 HBe 항원을 분비하는 세포 2×10^5 대신 1×10^4 으로 줄여서 10일동안 배양하였다. 이에 대하여 ELISA 법에 의해 항 HBV 활성을 평가한 결과, 세포에는 독성 등의 영향이 없으면서 HBe 항원의 양을 현저하게 줄이는 결과가 나타나 이 분획의 활성 및 안전성이 뛰어난 것으로 평가되었다. 또한 직접적이지는 않지만 간접적으로 항바이러스 활성의 척도가 될 수 있는 HBs 항원에 대한 이 물질의 활성도 동시에 검증해 본 결과 HBs 항원의 양을 줄이는 데도 역가가 좋음을 알 수 있었다 (그림 4.). 최종적으로 3차,4차 분획까지 정제하여 HBe 항원에 대하여 물질 활성을 검증해 본 결과 처음 1차 분획때 정제했을 때 보다 결과가 좋은 것으로 나타났다. (그림 5. 그림 6.)

마지막으로 최초 분획과 마지막 최종분획된 HBe 항원에 대하여 물질활성 결과를 나타내었다. (그림 7.)

- 분리정제된 추출물의 구조해석에 대한 결과를 나타내었다. (그림 8-10.)
- 분리정제된 추출물로부터 Southern blot 방법을 이용하여 바이러스복제 검증

효소측정법에 이용한 같은 종류의 동물세포에 조추출물을 단계적으로 처리한 후 이 동물세포로부터 genomic DNA를 추출하여 조추출물이 HBV의 복제에 미치는 영향을 관찰하였다. 대조군과 비교하였을때 천연물 조추출물을 처리한 동물세포에서 HBV의 복제가 급격히 감소되는 것을 관찰하였다. (그림 11.).

- 분리정제된 분획으로부터 Northern blot 방법을 이용하여 항바이러스활성 검증

분자수준에서의 항바이러스 활성 정도를 알아보기 위하여 효소측정법에 이용한 같은 종류의 동물세포에 분리된 정제 분획을 단계적으로 처리한 후 이 동물세포로부터 total RNA를 추출하여 조추출물이 HBV의 복제에 미치는 영향을 관찰하였다. 대조군과 비교하였을 때 천연물 조추출물을 처리한 동물세포에서 HBV의 복제가 급격히 감소되는 것을 관찰하였다. (그림 12).

HBe ELISA with compound 1A to 1G

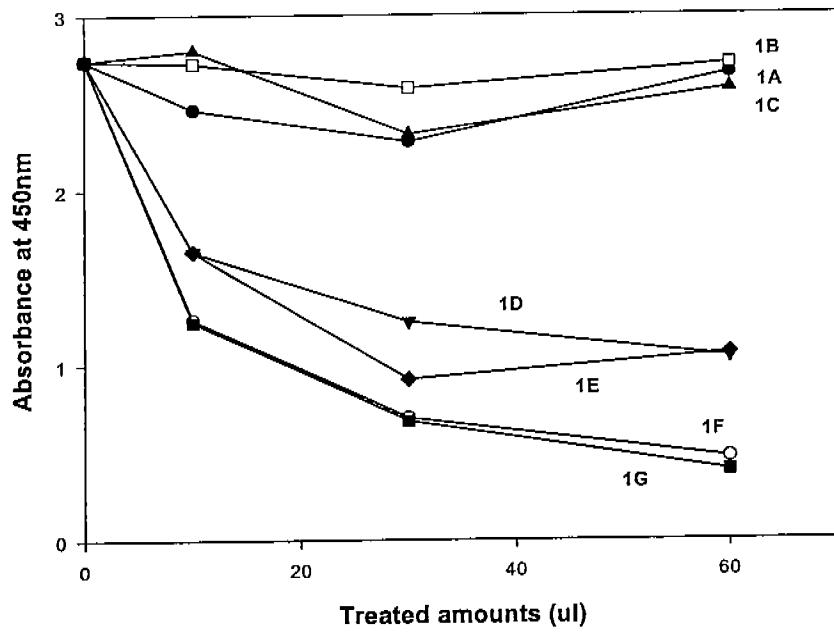


그림 1. 1차 분획물 1A - 1G 의 항바이러스 활성 평가

HBe ELISA with compound 2A to 2G

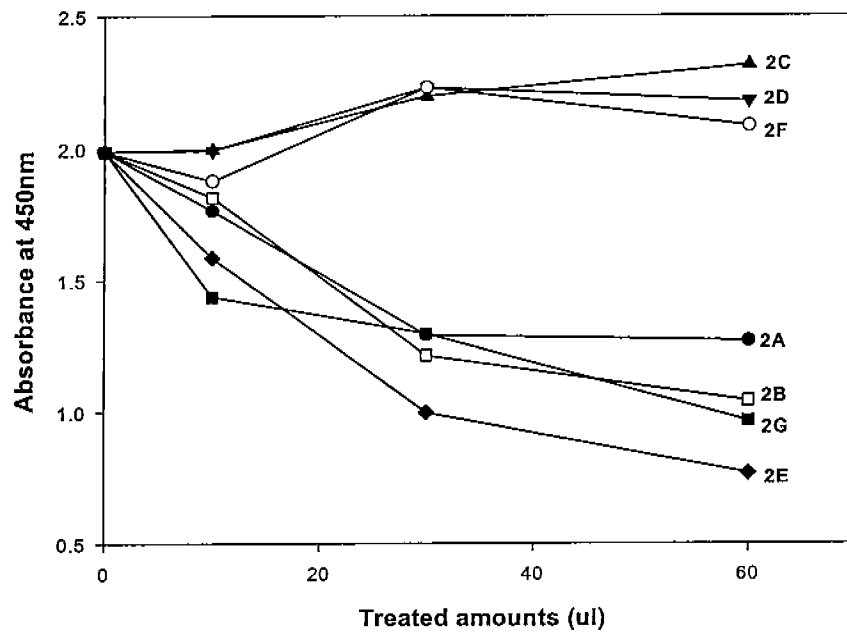


그림 2. 2차 분획물 2A ~ 2G 의 항바이러스 활성 평가

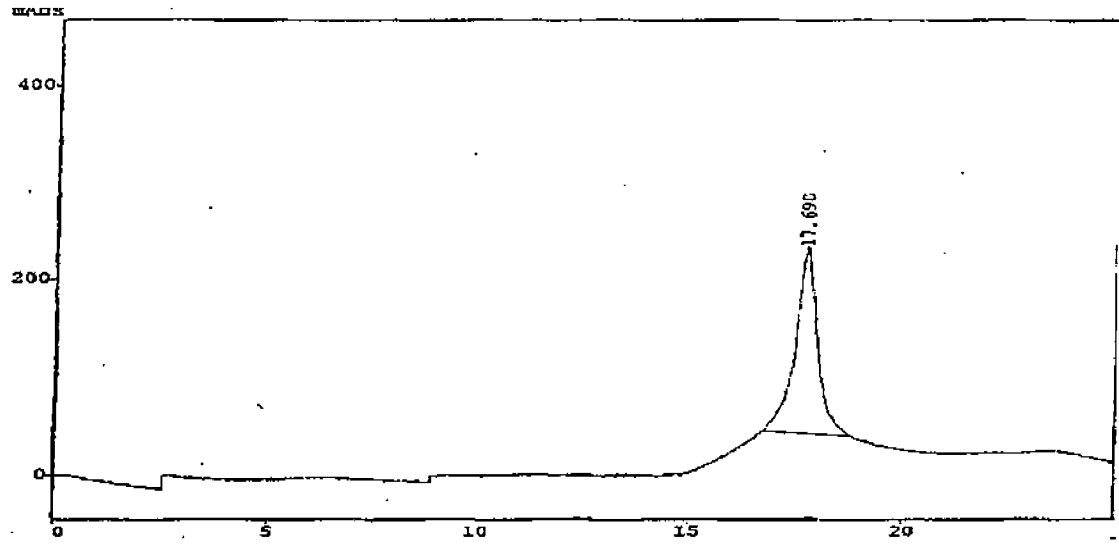


그림 3. 역상 HPLC 방법에 의한 순수물질군의 정제
(CAPCELL PAK C-18 column, MeOH-H₂O(9:1) mobile phase)

Effect of Natural Product on HBsAg and HBeAg production of P17 cells

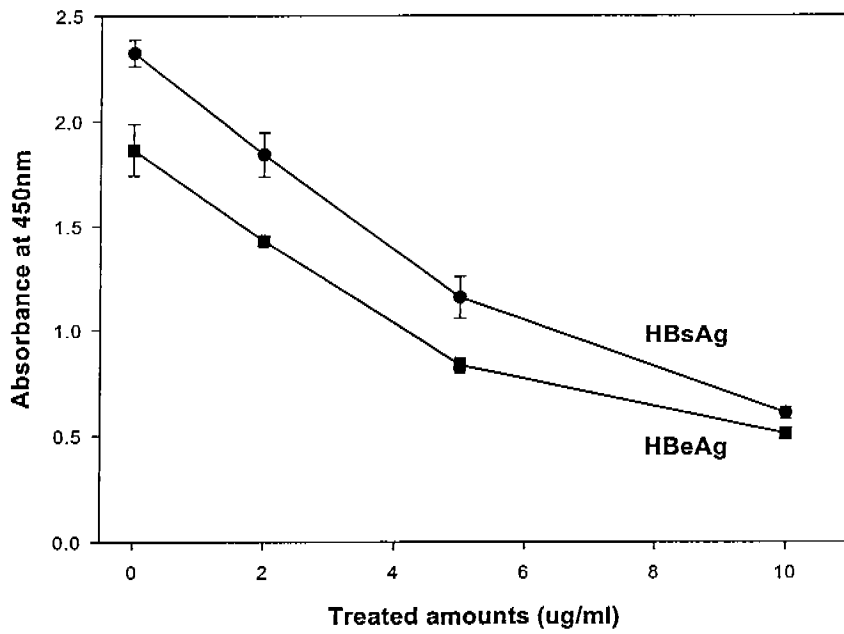


그림 4. 역상 HPLC 분획물(3)에 대한 HBe 및 HBs 항원 ELISA

HBeAg ELISA with second purification compounds of Natural Product.

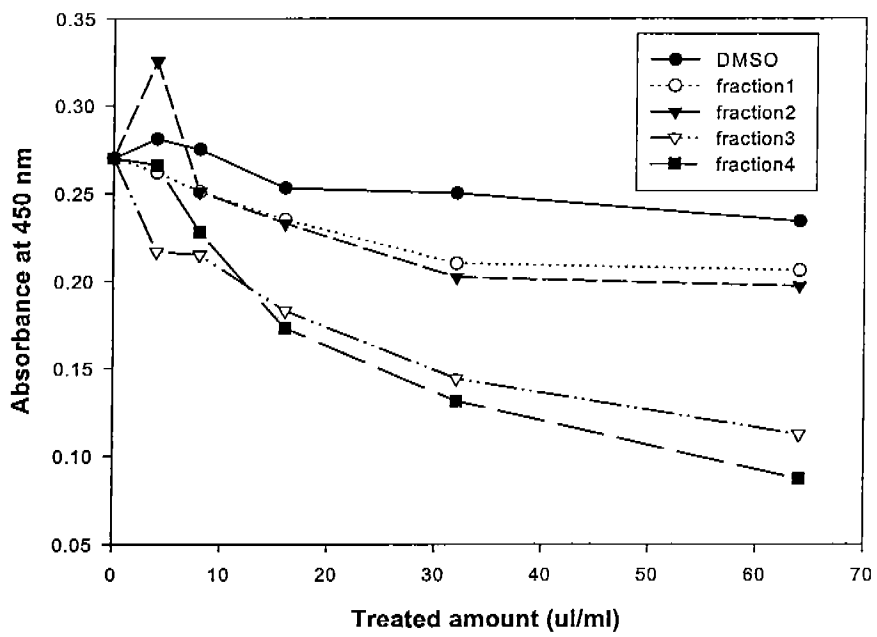


그림 5. 3차 분획물에 대한 HBeAg Elisa 평가

HBeAg Elisa with third purification compound of Natural product.

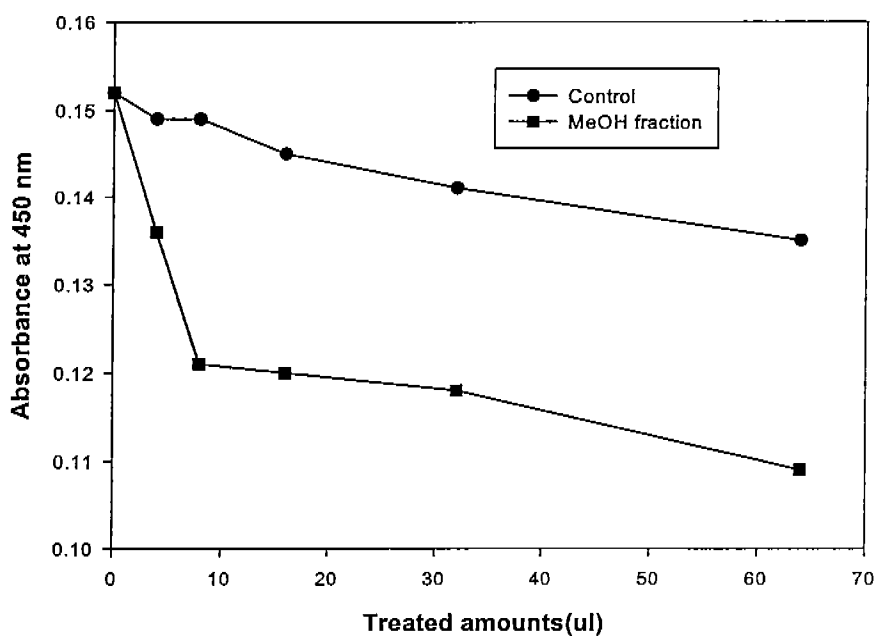


그림 6. 4차 분획물에 대한 HBeAg Elisa 평가

HBeAg ELISA with MeOH fraction
of Natural product.

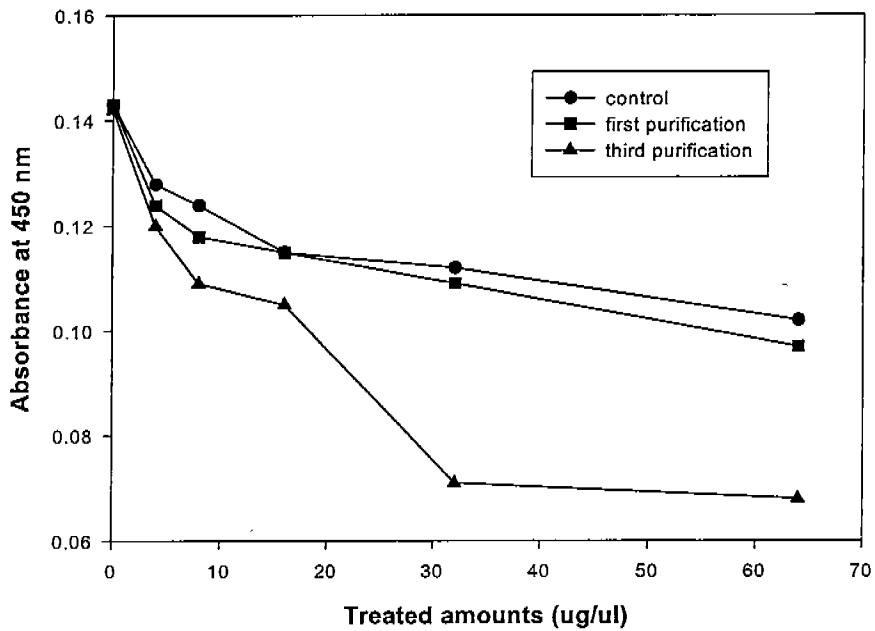


그림 7. 1차분획과 4차 분획에 대한
HBeAg ELISA 평가 비교.

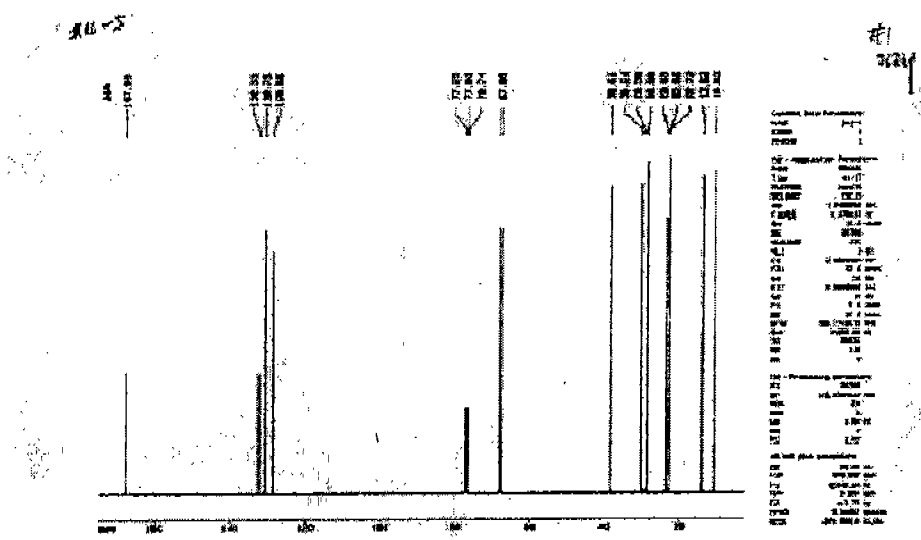


그림 8. 분획물 4의 ^{13}C NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Spectrum

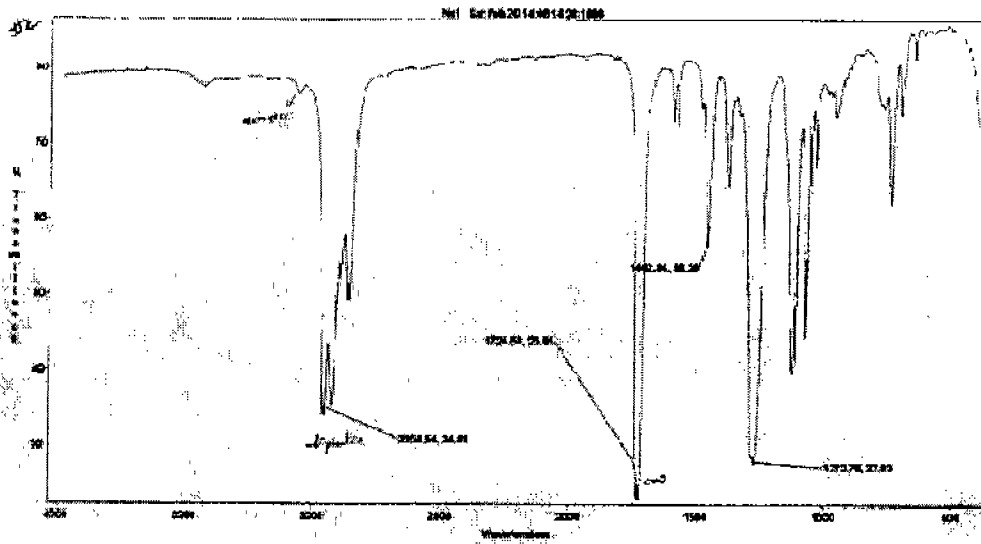


그림 9. 분획물 4의 IR (Infrared Spectrum)

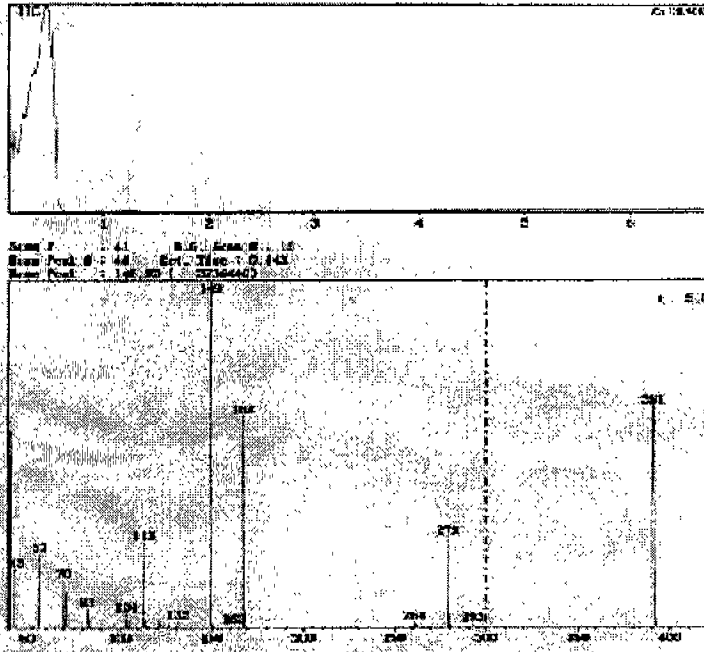


그림 10. 분획물 4의 Mass Spectroscopy

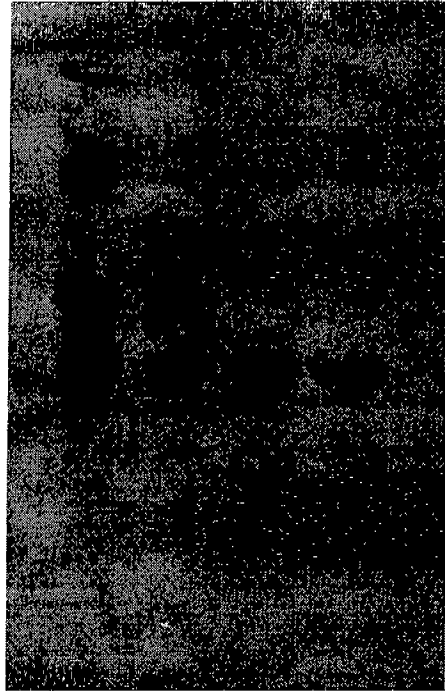


그림 11. Southern blot 방법을 통한 바이러스 복제 억제 검증
(Lane 1 : 무처리 대조군, Lane 2, 3, 4 : 2, 5, 10µg/ml 처리군)

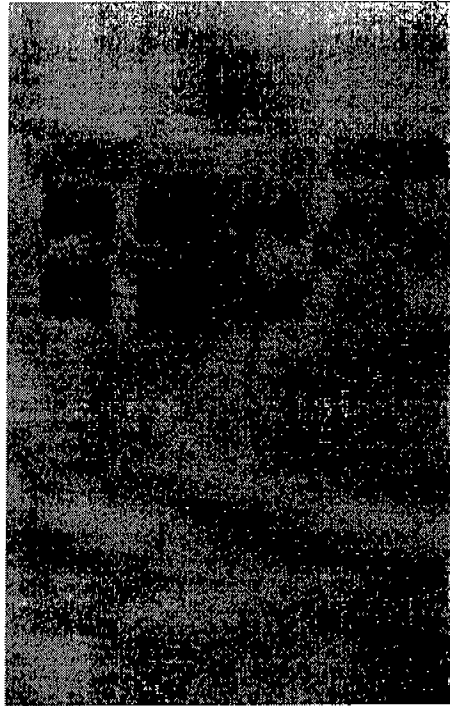


그림 12. Northern blot 방법을 통한 바이러스 복제 억제 검증
(Lane 1 : 무처리 대조군, Lane 2, 3, 4 : 2, 5, 10µg/ml 처리군)

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 과제는 이미 항바이러스성 물질의 분리과정을 진행중에 있으며 아래에 기술한 바와 같이 이미 이 연구에 대한 많은 업적을 국내외적으로 인정받고 있다. 또한 분석 시스템에 연관되어 3편의 특허를 출원하는 등 이 과제를 효과적으로 수행할 수 있는 인적, 기술적 요소를 확보한 상태이기 때문에 제품의 개발에 필요한 기간 및 비용을 줄일 수 있어 가장 효과적이고 효율적인 방법으로 HBV에 대한 항바이러스성 제제를 개발할 수 있을 것이다. 이미 천연물로부터 항바이러스 후보물질을 동물세포배양, 효소반응 등을 이용한 활성측정법, 바이러스 유전자 단계에 미치는 영향의 수치화 등 강력한 분자생물학적 기술을 동원하여 탐색하였으며 찾아낸 후보물질의 분석 및 대량분리, 생산은 국내의 기술력을 유기적으로 연결하는 공동연구를 통해 빠르게 수행할 수 있다. 천연추출물이 인체에 미치는 독성 및 돌연변이성 영향이 다른 합성물질에 비해 거의 없다는 큰 장점이 있기 때문에 제품으로 개발되는 생물학적 제제의 특허 획득을 포함한 판매 및 수출은 일단 개발된 물질의 효과가 우수할 경우 국내와 국외에서 아무런 문제없이 이루어질 수 있을 것으로 사료되며 현재까지 국산화되지 않아 수입하여 쓰고 있는 생물학적 의약제제를 국내에서 시판할 경우 수입 대체효과가 커 외화절약에 일익을 담당하게 될 것으로 보인다.

제 5 장 연구개발결과의 활용성과 및 계획

가. 계량적 성과

전문학술지(편수)				학회발표(초록)		특 허(건수)				상품화	기타 (CD-ROM, 저서, 워크샵 개최 등)
국 외		국 내		국 외	국 내	국 외		국 내			
게제	투고중	게제	투고중			출원중	출원등록	출원중	출원등록		
1				1	2			1	3		

나. 성과내용기술

1. B형 간염 바이러스의 X단백질을 생성하는 박터 및 세포주 개발
한국, 출원번호 (96-1102), 출원일 (96. 4. 17.)
2. 사람 B형 간염바이러스의 X-단백질을 대장균으로부터 제조하는 방법
한국, 출원번호 (96-038474), 출원일 (96. 9. 5.), 등록일 (98. 12. 21), 등록번호 (제 180988호)
3. 사람 B형 간염바이러스의 X-단백질의 단일클론 항체 및 이의 제조방법.
한국 (특허 출원중, 1996), 등록일 (1999. 4. 17), 등록번호 (제 0208775호)
4. 필란두스 속 식물의 메탄올 추출물을 포함하는 간기능 개선 및 간염 치료용 의약 조성물
한국, 출원번호 (98-047284), 출원일 (98. 11. 5.)

제 6 장 기타 중요변경사항

없음

최종보고서 요약 (초록)

사 업 명	보건의료기술개발사업	관리번호	HMP-96-D-2-1043	
과 제 명	(국문)항바이러스SCREEN SYSTEM 개발 및 항바이러스,항암치료제 개발			
	(영문)Establishment of anti-virus screening system and development of anti-viral and anti-cancer agent.			
주관연구기관	한국과학기술연구원 생명공학연구소	주 관 연 구	(소속)생명공학연구소	
참 여 기 업	고려폴리머	책 임 자	(성명)이 영익	
연구개발비 (천 원)	계	214,500	총연구기간	1996 . 5 . ~1999 . 4 30.(2년11월)
	정부출연금	174,000	총 참여 연구원수	25명
	정부이외의 자의출연금			
	기업채부담금	40,500		

○ 연구개발목표 및 내용

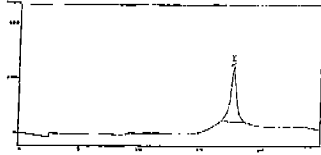
본 연구개발 목표는 HBV에 작용하여 HBV의 증식을 억제시킴으로써 HBV 바이러스에 의한 간염 및 이에 의하여 발생하는 간암을 근본적으로 치료할 수 있는 새로운 치료제 개발에 있다.

연구개발 목표는 HBV 항바이러스 활성을 갖는 천연물로부터 분리된 순수물질에 대한 항바이러스 활성을 검증하며 확인된 물리화학적 성질을 바탕으로 순수물질을 대량 확보한다. 또한 정제된 천연물의 특성과 구조를 해석하고 특허를 출원하여 의약품으로 개발하기 위한 기본 준비를 수행한다.

- ① 정제된 천연물의 물리화학적 특성 연구 진행
- ② 정제물에 대한 항바이러스 활성 평가 및 기작 규명
- ③ 정제물에 대한 ED₅₀ 및 CD₅₀ 규명
- ④ 정제물에 대한 구조해석 및 순수물질의 대량 확보
- ⑤ 결과를 바탕으로 특허 출원

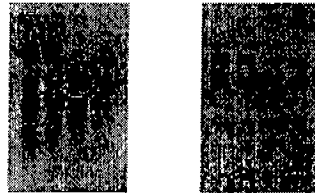
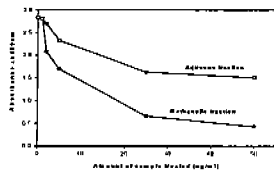
○ 연구결과

① 정제된 천연물의 물리화학적 특성 연구 진행



순수물질군을 정제하는데 성공. 간편한 방법을 이용하여 효과적으로 정제하는 방법을 확립.

② 정제물에 대한 항바이러스 활성 평가



처리한 양에 따른 ELISA, Southern, Northern 결과

③ 정제물에 대한 ED₅₀ 및 CD₅₀ 규명

ED₅₀ : Southern hybridization 방법에 의해 전개된 DNA를 크기가 작은 순서부터 각각 S (Single-stranded full-sized linear DNA), D1 (Partially double-stranded DNA), D2 (Circular DNA), I (Chromosomally integrated DNA)의 4개 부분으로 나눈 후 각각의 density를 (D1 + D2 + S)/I 의 계산식에 의하여 계산. 이에 의하여 HBV의 DNA 복제를 50% 줄이는 추출물의 농도를 EC₅₀ (50% effective concentration)로 결정.

CD₅₀ : HepG2 세포 및 2.2.15. 세포에 대한 세포 독성을 조사 96-well 플레이트에 well당 2x10⁴ 개의 세포를 100ul 첨가하고 37℃ 배양기에서 24시간 배양한 다음 여러 가지 농도의 추출물들을 4일 동안 처리. 배양액을 제거한 후 200ul의 염색용액(0.01% neutral red dye in PBS)을 분주하여 염색. 정착 용액(50% ethanol, 1% glacial acetic acid)을 가하여 30분 동안 교반시킨 후 510nm에서의 흡광도를 스펙트로포토메터로 읽음. 추출물이 첨가되지 않은 세포의 흡광도와 비교하여 50%의 흡광도 감소를 유발한 추출물의 농도를 CC₅₀ (50% cytotoxic concentration)로 결정

○ 연구결과

	HepG2 cell	2.2.15 cell
ED50(ug/ml)	530	602
CD50(ug/ml)	7	9
SI value	76	86

④ 정제물에 대한 구조해석, 순수물질 대량 확보

순수물질군 대량 확보 완료. 현재 구조해석 작업을 통해 거의 구조 분석 마무리중.

⑤ 결과를 바탕으로 특허 출원

특허출원 완료 : 대한민국 특허 98-047284