



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월05일  
(11) 등록번호 10-1162710  
(24) 등록일자 2012년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C01G 23/047 (2006.01) B82B 3/00 (2006.01)  
H01L 31/042 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2009-0100092  
(22) 출원일자 2009년10월21일  
심사청구일자 2010년06월28일  
(65) 공개번호 10-2010-0086923  
(43) 공개일자 2010년08월02일  
(30) 우선권주장  
1020090006078 2009년01월23일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020060015399 A\*  
WO2006046674 A1\*  
JP2005501018 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
(주) 비엔씨바이오팜  
경기 수원시 영통구 이의동 906-5번지 차세대융합기술연구원  
(72) 발명자  
김종우  
경기도 과천시 뚝골2로 19 (과천동)  
이상욱  
경기도 안양시 만안구 박달동 149-1 금호아파트 104동 302호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이성렬

(54) 발명의 명칭 도라지 추출물 또는 도라지 사포닌 화합물을 함유하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 항바이러스제로 유용한 도라지 사포닌 및/또는 이를 포함하는 도라지 추출물을 유효성분으로 함유하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 인체에 무해하고 C형 간염 바이러스의 증식을 억제하므로 C형 간염의 예방 또는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

(72) 발명자

**박상진**

경기도 안양시 동안구 관악대로106번길 29, 104동  
1902호 (비산동, 롯데낙천대아파트)

**신중철**

경기도 용인시 기흥구 신갈동 158 양현마을 신안  
아파트 313-702

**임중환**

대전광역시 서구 관저로 48, 구봉마을아파트 704  
동 705호 (관저동)

**양재원**

경기도 수원시 팔달구 경수대로642번길 21, 205호  
(우만동)

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

물, 유기용매 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출한 도라지 추출물; 및 상기 도라지 추출물에서 분리한 사포닌계 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 유기용매는 10 내지 100% 농도의 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올인 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 도라지 추출물은, 용매 추출한 도라지 추출물을 한외여과막으로 분리한 도라지 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 4

청구항 3에 있어서,

한외여과막은 분자량 한계 100,000, 5,000 또는 1,000 인 것을 사용하는 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 5

청구항 3에 있어서,

한외여과막으로 분리한 도라지 추출물은 분자량 1,000 이상 100,000 이하인 추출물 또는 분자량 1,000 이상 5,000 이하인 추출물인 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 6

청구항 3에 있어서,

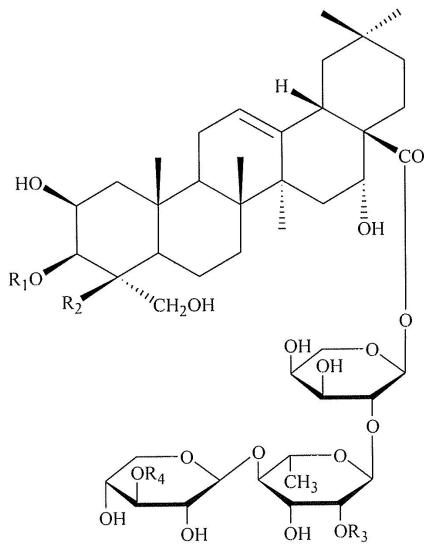
상기 도라지 추출물은, 한외 여과막으로 분리한 도라지 추출물을 분자량 한계 500 이하의 나노 여과막으로 분리한 분자량 500 이상 5,000 이하의 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 7

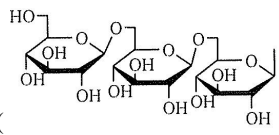
청구항 1에 있어서,

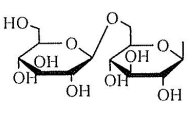
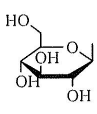
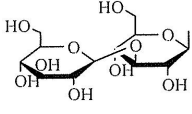
도라지 추출물에서 분리한 사포닌계 화합물은 하기 화학식 1의 사포닌 화합물 및 화학식 2의 (프로)사포게닌 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]




상기 화학식 1에서,

R<sub>1</sub>은 글루코피라노실-(1→6)-글루코피라노실-(1→6)-글루코피라노실 ( , 겐티오비오

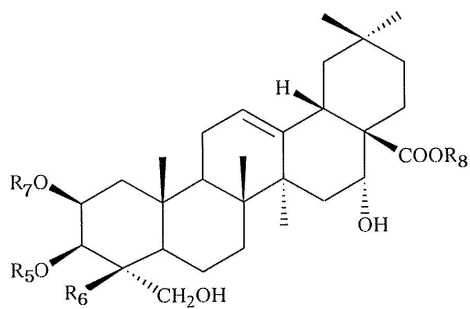
실 ( , 글루코실 ( ) 또는 라미나리비오실 ( )이고,

R<sub>2</sub>는 CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>3</sub>, COOH 또는 COOCH<sub>3</sub> 이며,

R<sub>3</sub>는 H 또는 아세틸이고,

R<sub>4</sub>는 H 또는 아피오실 ( )이다.

[화학식 2]



상기 화학식 2에서,

R<sub>5</sub>는 H, 글루코실 또는 라미나리비오실이고,

R<sub>6</sub>는 CH<sub>2</sub>OH 또는 CH<sub>3</sub>이며,

R<sub>7</sub>는 H이고,

또한, 상기  $R_6$  및  $R_7$ 은 서로 이어진  $-CO-$  일 수 있으며,

$R_8$ 은 H 또는  $CH_3$  이다.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서,

도라지 추출물에서 분리한 사포닌계 화합물은 도라지 용매 추출물을 역상 겔을 이용하여 분리하고, 이를 에탄올 또는 메탄올에 녹인 후 에틸 아세테이트로 결정화한 도라지 조(粗) 사포닌을 포함하는 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 9

청구항 7에 있어서,

화학식 1의 사포닌 화합물은 데아피오플라티코사이드 E (deapioplatycoside E), 플라티코사이드 E (platycoside E), 플라티코딘  $D_3$  (platycodin  $D_3$ ), 폴리갈라신  $D_2$  (polygalacin  $D_2$ ), 폴리갈라신 D (polygalacin D), 플라티콘산 A (platyconic acid A), 데아피오플라티코딘  $D_2$  (deapioplatycodin  $D_2$ ), 플라티코딘  $D_2$  (platycodin  $D_2$ ), 데아피오플라티코딘 D (deapioplatycodin D), 플라티코딘 D (platycodin D), 2"-O-아세틸-데아피오플리갈라신  $D_2$  (2"-O-acetyl-deapiopolygalacin  $D_2$ ), 2"-O-아세틸-폴리갈라신  $D_2$  (2"-O-acetyl-polygalacin  $D_2$ ) 및 플라티콘산 A 메틸 에스테르 (platyconic acid A methyl ester) 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 10

청구항 7에 있어서,

화학식 2의 (프로)사포게닌 화합물은 플라티코디게닌 (platycodigenin), 폴리갈라신산 (polygalacic acid), 플라티코게닌산 A 락톤 (platycogenic acid A lactone), 플라티코게닌산 A 락톤 3-O-글루코피라노사이드 (platycogenic acid A lactone 3-O-glucopyranoside), 플라티코디게닌 3-O-글루코피라노사이드 28-메틸 에스테르 (platycodigenin 3-O-glucopyranoside 28-methyl ester) 및 플라티코디게닌 3-O-라미나리비오사이드 28-메틸 에스테르 (platycodigenin 3-O-laminaribioside 28-methyl ester) 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 11

청구항 8 또는 청구항 10에 있어서,

(프로)사포게닌 화합물은 도라지 조 사포닌을 가수분해 하여 제조되는 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 12

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

1종류 이상의 C형 간염 바이러스 증식 억제제를 추가로 포함하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 13

청구항 12에 있어서,

C형 간염 바이러스 증식 억제제는 면역 조절제, 신호전달계 조절제, 항바이러스제, HCV 폴리머라제 (NS5B) 억제제, HCV 프로테아제 (NS3/4A) 억제제, HCV 헬리카제 (NS3 helicase) 억제제, HCV NS4B 억제제, HCV NS5A 억제제, HCV 바이러스의 세포 침입 (cell entry) 억제제 및 HCV 어셈블리 억제제로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 14

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

면역조절제인 인터페론; 및 리바비린을 추가로 포함하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

## 청구항 15

청구항 13에 있어서,

면역조절제는 natural 인터페론, 인터페론- $\alpha$ , 인터페론- $\beta$ , 인터페론- $\gamma$ , 폐결화된 (pegylated)-인터페론, 알부민-결합 (albumin-linked) 인터페론 및 사이토카인으로 이루어진 군에서 선택되는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

## 청구항 16

물, 유기용매 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출한 도라지 추출물; 및 상기 도라지 추출물에서 분리한 사포닌계 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 C형 간염 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 항바이러스제로 유용한 도라지 사포닌 또는 이를 포함하는 도라지 추출물 및 이들을 유효성분으로 함유하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus, HCV: 이하 "HCV"라 함)는 주로 수혈 및 지역 특이적 감염 (community-acquired)에 의해 일어난다. HCV에 감염되면, 그 징후가 나타나는 경우 약 20%는 급성 간염으로 진행되고 약 80% 정도가 만성 간염으로 진행되고 이 중 약 30%가 간경화 및 간암으로 진행된다. 최근의 보고에 의하면, 전 세계적으로 약 2억명 이상이 HCV에 감염되어 있으며 미국 내에서는 4백 50만명 이상으로 추정되며 (최대 천오백만명까지 될 것으로 추정됨) 유럽에서도 5백만명 이상이 C형 간염 환자인 것으로 알려져 있다.

[0003] 현재까지 C형 간염에 대한 탁월한 백신이나 효과적인 치료제는 존재하지 않기 때문에 세계의 많은 제약회사와 연구소에서 C형 간염 치료제를 개발하고 있다. C형 간염은 B형 간염과 비교하여 전 세계적으로 고른 분포를 보이고 있으며, 간경화와 간암으로 전이되는 비율이 B형 간염보다 월등히 높다. 그리고 만성 간염으로의 진행 비율이 훨씬 높는데 이러한 진행 기전에 대한 연구는 아직도 진행 중이다. 또한, C형 간염은 수혈을 통해서 뿐만 아니라 정맥주사를 통한 약물 사용이나 문신을 하는 것에 의해서도 감염이 가능하지만 주로 직접적인 혈액 접촉에 의해서 감염된다. C형 간염 바이러스에 감염이 되면 대부분의 환자가 만성으로 진행되며 다시 간경화와 간암으로 진행되게 된다. 따라서 효과적인 백신과 치료제의 개발이 절실한 상태이다. HCV는 바이러스주 (strain) 간에 그 유전형 (genotype)이 다양하고 돌연변이 (mutation)가 일어나는 경우가 많은데, HCV에 의한 만성간염이 된 경우 유전적 변이형 (genetic variants)에 의해 재감염 (reinfection), 동시감염 (coinfection) 등이 일어나기도 한다. 이 때문에 C형 간염의 효과적인 백신 개발은 성공하기가 매우 어렵다.

[0004] 현재 C형 간염의 치료방법으로는 인터페론-알파 (interferon- $\alpha$ )와 리바비린 (Ribavirin)을 병용 사용하는 치료법이 시행되고 있으나 그 치료율이 낮고 부작용이 매우 심한 편이다. 인터페론 요법의 경우 전혀 반응을 보이지 않는 경우가 약 25%이고, 일시적으로 반응하다가 재발하는 경우가 약 25% 정도이다. 나머지 약 50%의 환자에서는 치료 종료 후까지 에이젤티 (ALT)치가 정상으로 유지되고 HCV RNA가 음성이 되는데 그 중에서 50% 정도는 치료 종료 후 3-6개월 내에 재발하므로 결국 25% 정도에서만 6개월 이상 치료효과가 유지되는 지속적 바이러스 반응 (sustained viral response)을 보이는 셈이다. 또한, C형 간염 바이러스에는 6가지 유전자형 (genotype)이 존재하는데 우리나라에 가장 많은 1b형은 2, 3형에 비해 인터페론 치료에 좋은 반응을 보이지 않는다. 이러한 이유로 리바비린과 병용요법을 사용하는데 이 경우 치료 효과가 2배 정도 높아지는 것으로 나타났으나, 리바비린만을 단독으로 사용하는 경우에는 효과가 거의 없고 적혈구가 파괴되어 빈혈 등의 부작용이 나타나므로, 주로 인터페론 치료에 반응이 없거나 재발한 경우에 처방하는 것으로 알려져 있다. 따라서

지금까지는 HCV에 특이적으로 작용하여 증식을 억제함으로써 C형 간염을 효과적으로 치료하는 항바이러스제는 개발되지 못한 상태이다.

[0005] HCV는 1989년 클로닝 (molecular cloning)에 의해 RNA 게놈 (genome)이 분리되었고 (Choo, Q-L, *et al.*, 1989, Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science 244:359-362), 그 이후로 HCV에 대한 분자 생물학적 연구가 진행되어 왔지만 효과적인 세포 배양 시스템 (cell culture system)과 동물실험 모델의 부족으로 인해 제약이 있었다. 그러나 최근 안정하게 HCV의 복제 (replication)를 할 수 있는 hepatoma 세포주 (hepatoma cell line)가 개발되어 이러한 문제들을 해결할 수 있게 되었다 (Lohmann, V., F. Korner, J-O Koch, U. Herian, L. Theilmann, R. Bartenschlager, 1999, Replication of subgenomic hepatitis c virus RNAs in a hepatoma cell line. Science 285:110-113). HCV RNA 레플리콘 (Replicon)은 전체 HCV 유전자를 포함하는 전체 길이 레플리콘 (full length replicon)과 구조 단백질 (structural proteins)을 제외한 서브게노믹 레플리콘 (subgenomic replicon)이 있다. HCV RNA 레플리콘은 HCV 5' 말단과 HCV IRES, 네오마이신 저항 유전자 (resistant gene, neomycin transferase gene), EMCV (encephalomyocarditis virus)의 IRES를 가지는 바이시스트로닉 레플리콘 (bicistronic replicon)이며, HCV 비구조단백질 (nonstructural proteins)은 NS3에서 NS5B, 그리고 HCV 3' 말단 (untranslational region)을 포함하는 서열로 구성되어 있다. 현재 HCV의 각 유전자형 (genotype)에 대한 레플리콘이 개발되어 다양한 환자에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0006] 한편, 본 발명자들은 도라지로부터 분리된 도라지 사포닌 또는 이를 포함하는 도라지 추출물이 HCV 레플리콘에 대하여 우수한 저해 활성을 보여주고 있어 향후 C형 간염의 예방 또는 치료제로 활용될 수 있다는 가정 하에 본 발명을 완성하였다.

[0007] 도라지 (Platycodi Radix)는 동아시아지역에 자생 혹은 재배되고 있는 초롱꽃과 (Campanulaceae) 도라지속 (Platycodon)에 속하는 유일한 다년생 식물 도라지 (*Platycodon grandiflorum* A. DC.)의 뿌리를 일컫고 생약 명으로는 길경 (桔梗)이라고 한다.

[0008] 도라지의 함유 성분으로는 탄수화물 (당)이 90 % 이상을 차지하고 단백질이 2.4 %, 지질 0.1 % 그리고 회분이 1.5 % 정도 존재한다고 보고되어 있다. 그 외에 트리테르페노이드 사포닌 (triterpenoid saponin) [플라티코딘 (platycodin) A, C, D, D<sub>2</sub>, 폴리갈라신 (polygalacin) D, D<sub>2</sub> 등 24 종류가 보고되고 있음]이 약 2% 정도 존재하고 있으며 이들 사포닌 성분들은 도라지의 다양한 약리 효능의 유효성분으로 주목받고 있다. 그 밖에도 도라지에는  $\alpha$ -스피나스테롤 ( $\alpha$ -spinasterol),  $\Delta 7$ -스티그마스테롤 ( $\Delta 7$ -stigmasterol),  $\alpha$ -스피나스테릴- $\beta$ -D-글루코사이드 ( $\alpha$ -spinasteryl- $\beta$ -D-glucoside) 등 스테로이드 (steroid) 화합물이 약 0.03 % 정도 함유되어 있다. 탄수화물은 포도당, 과당, 설탕, 케스토스 등 이당류 혹은 삼당류가 대부분을 차지하고 이눌린 (inulin), 플라티코디닌 (platycodin) (과당 10분자 정도의 다당류) 등의 다당류가 보고되고 있다.

[0009] 한방에서 길경의 효능은, 동의보감 (東醫寶鑑), 향약집성방 (鄉藥集成方), 신농본초경 (神農本草經), 본초강목 (本草綱目), 천금익방 (天金翼方) 등 다수의 본초서 또는 한의학서에 나타난 길경의 약리작용 및 응용사례를 종합하여 보면 유소독 (有毒), 흑무독 (或無毒), 이오등 (利五藤), 온중 (溫中), 보혈기 (補血氣), 하충독 (下蟲毒), 소담 (消痰), 배농 (排膿), 보허 (補虛), 양혈 (養血), 제사 (除邪), 하기 (下氣), 관흉 (寬胸), 이장 (利腸), 청폐 (淸肺), 지수 (止嗽), 청열 (淸熱), 통란 (通亂), 이무 (利霧) 등이 기재되어 있고, 복만장명 (腹滿腸鳴), 경계기 (驚悸氣), 흉협통 (胸脇痛), 한열 (寒熱), 풍비 (風痺), 해역 (咳逆), 심복통 (心腹痛), 하리 (下痢), 전근 (轉筋), 소아열 (小兒熱), 폐기축 (肺氣促), 담연 (淡筵), 오로칠상 (五勞七傷), 폐옹 (肺癰), 후비비 (喉痺鼻), 한구 (寒嘔), 구설창 (口舌瘡), 적목종통 (赤目腫痛), 흉폐체기 (胸肺滯氣), 탁타종농 (濁唾腫膿) 등의 증상에 활용하였다고 보고되어 있다.

[0010] 또한 현대 의학적인 관점에서 연구된 도라지의 약리 효능으로는 뇌신경세포 보호효과 (문헌 [Yoo Ki-Yeon *et al.*, *Neurosci. lett.* 444(1), 97-101 (2008)]참고), 항 비만효과 (문헌 [Zhao, H. L. *et al.*, *J. Food. Sci.* 73(8), H195-H200, (2008)]참고), 간기능 보호 효과 (문헌 [Lee, K.J.*et al.*, *Toxicol. Lett.* 147, 271-282, (2004)]참고), 면역기능 조절 활성 (문헌 [Ahn, K.S. *et al.*, *Life Sci.* 76, 2315-2328, (2005)]참고) 및 세포 독성 (문헌 [Lee, Kyung Jin *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 46(5), 1778-1785 (2008); Zhang, Lin *et al.*, *Molecules* 12(4), 832-841, (2007)]참고) 등이 보고되고 있다.

- [0011] [참고 문헌 1] Yoo Ki-Yeon. *et al.*, *Neurosci. lett.* 444(1), 97-101, (2008)
- [0012] [참고 문헌 2] Zhao, H. L. *et al.*, *J. Food Sci.* 73(8), H195-H200, (2008)
- [0013] [참고 문헌 3] Lee, K. J. *et al.*, *Toxicol. Lett.* 147, 271-282, (2004)
- [0014] [참고 문헌 4] Ahn, K. S. *et al.*, *Life Sci.* 76, 2315-2328, (2005)
- [0015] [참고 문헌 5] Lee, K. J. *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 46(5), 1778-1785, (2008)
- [0016] [참고 문헌 6] Zhang, L. *et al.*, *Molecules* 12(4), 832-841, (2007)

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

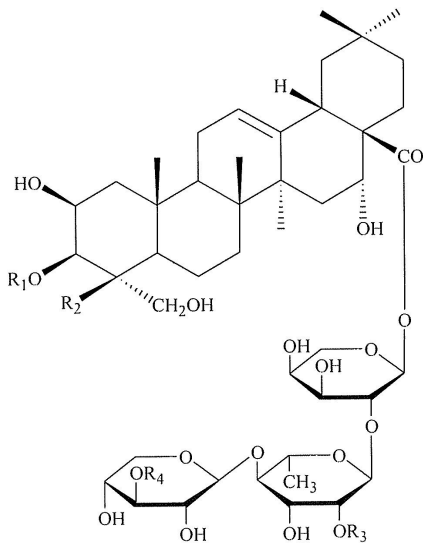
- [0017] 본 발명의 목적은 C형 간염 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제 해결수단

- [0018] 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 유효 성분으로서 도라지 사포닌 또는 이를 포함하는 도라지 (*Platycodon grandiflorum*) 추출물 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 유효성분으로서 도라지 사포닌 또는 이를 포함하는 도라지 추출물 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 C형 간염의 예방 또는 치료제로서 단독으로 사용하거나, 인터페론과 함께 또는 인터페론 및 리바비린과 함께 사용할 수 있으며, 또한 다른 면역 조절제 (immune modulator), 신호전달계 (cell signalling) 조절제, 항바이러스제, HCV 폴리머라제 (NS5B) 억제제, HCV 프로테아제 (NS3/4A) 억제제, HCV 헬리카제 (NS3 helicase) 억제제, HCV NS4B 억제제, HCV NS5A 억제제, HCV 바이러스의 세포 침입 (cell entry) 억제제, HCV 어셈블리 (assembly) 억제제를 포함한 모든 종류의 C형 간염 바이러스 증식 억제제 중에서 1종류 또는 2종류 이상이 혼합된 조성물과 함께 병용하여 사용할 수 있다.
- [0020] 여기서 인터페론은 모든 형태의 인터페론을 나타내며, natural 인터페론, 인터페론-알파 ( $\alpha$ ), 인터페론-베타 ( $\beta$ ), 인터페론-감마 ( $\gamma$ ), pegylated-인터페론, 알부민-결합 (albumin-linked) 인터페론 등을 모두 포함하며, 하나 이상을 선택하여 사용할 수 있고, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0021] 항바이러스제는 리바비린, 라미부딘, 아만타딘 등의 약제 중에서 하나 이상을 선택하여 사용할 수 있으며 이것들로 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 구체적으로, 본 발명에서는 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출한 도라지 추출물; 및 상기 도라지 추출물에서 분리한 사포닌계 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0023] 상기 유기용매는 10 내지 100% 농도의 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올인 것이 바람직하다.
- [0024] 또한, 상기 도라지 추출물은, 용매 추출한 도라지 추출물을 한외여과막으로 분리한 도라지 추출물을 포함한다.
- [0025] 이때 한외여과막은 분자량 한계 100,000, 5,000 또는 1,000 인 것을 사용하며, 이렇게 한외여과막으로 분리한 도라지 추출물은 분자량 1,000 이상 100,000 이하인 추출물 또는 분자량 1,000 이상 5,000 이하인 추출물이다.
- [0026] 또한, 상기 도라지 추출물은, 한외 여과막으로 분리한 도라지 추출물을 분자량 한계 500 이하의 나노 여과막으로 분리한 분자량 500 이상 5,000 이하의 추출물을 포함한다.
- [0027] 도라지 추출물에서 분리한 사포닌계 화합물은 하기 화학식 1의 사포닌 화합물 및 화학식 2의 (프로)사포게닌 화합물을 포함한다:



[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] 상기 화학식 1에서,

[0031] R<sub>1</sub>은 글루코피라노실-(1→6)-글루코피라노실-(1→6)-글루코피라노실 ( ), 겐티오비오

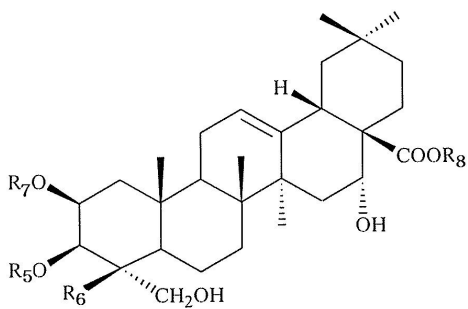
실 ( ), 글루코실 ( ) 또는 라미나리비오실 ( )이고,

[0032] R<sub>2</sub>는 CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>3</sub>, COOH 또는 COOCH<sub>3</sub> 이며,

[0033] R<sub>3</sub>는 H 또는 아세틸이고,

[0034] R<sub>4</sub>는 H 또는 아피오실 ( )이다.

[0035] [화학식 2]



[0036]

[0037] 상기 화학식 2에서,

[0038] R<sub>5</sub>는 H, 글루코실 또는 라미나리비오실이고,

[0039] R<sub>6</sub>는 CH<sub>2</sub>OH 또는 CH<sub>3</sub>이며,

[0040] R<sub>7</sub>는 H이고,

- [0041] 또한, 상기  $R_6$  및  $R_7$ 은 서로 이어진  $-CO-$  일 수 있으며,
- [0042]  $R_8$ 은 H 또는  $CH_3$  이다.
- [0043] 상기 화학식 1의 사포닌 화합물은 데아피오플라티코사이드 E (deapioplatycoside E), 플라티코사이드 E (platycoside E), 플라티코딘  $D_3$  (platycodin  $D_3$ ), 폴리갈라신  $D_2$  (polygalacin  $D_2$ ), 폴리갈라신 D (polygalacin D), 플라티콘산 A (platyconic acid A), 데아피오플라티코딘  $D_2$  (deapioplatycodin  $D_2$ ), 플라티코딘  $D_2$  (platycodin  $D_2$ ), 데아피오플라티코딘 D (deapioplatycodin D), 플라티코딘 D (platycodin D), 2"-O-아세틸-데아피오플리갈라신  $D_2$  (2"-O-acetyl-deapiopolygalacin  $D_2$ ), 2"-O-아세틸-폴리갈라신  $D_2$  (2"-O-acetyl-polygalacin  $D_2$ ) 또는 플라티콘산 A 메틸 에스테르 (platyconic acid A methyl ester)를 포함한다.
- [0044] 또한, 상기 화학식 2의 (프로)사포게닌 화합물은 플라티코디게닌 (platycodigenin), 폴리갈라신산 (polygalacic acid), 플라티코게닌산 A 락톤 (platycogenic acid A lactone), 플라티코게닌산 A 락톤 3-O-글루코피라노사이드 (platycogenic acid A lactone 3-O-glucopyranoside), 플라티코디게닌 3-O-글루코피라노사이드 28-메틸 에스테르 (platycodigenin 3-O-glucopyranoside 28-methyl ester) 또는 플라티코디게닌 3-O-라미나리비오사이드 28-메틸 에스테르 (platycodigenin 3-O-laminaribioside 28-methyl ester) 중에서 선택되는 것을 포함한다.
- [0045] 한편, 도라지 추출물에서 분리한 사포닌계 화합물은 도라지 용매 추출물을 역상 겔을 이용하여 분리하고, 이를 에탄올 또는 메탄올에 녹인 후 에틸 아세테이트로 결정화한 도라지 조(粗) 사포닌을 포함하며, 상기 화학식 2의 (프로)사포게닌 화합물은 도라지 조 사포닌을 가수분해 하여 제조될 수 있다.
- [0046] 한편, 전술한 바와 같이, 본 발명의 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 1종류 이상의 C형 간염 바이러스 증식 억제제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 C형 간염 바이러스 증식 억제제는 면역 조절제, 신호전달계 조절제, 항바이러스제, HCV 폴리머라제 (NS5B) 억제제, HCV 프로테아제 (NS3/4A) 억제제, HCV 헬리카제 (NS3 helicase) 억제제, HCV NS4B 억제제, HCV NS5A 억제제, HCV 바이러스의 세포 침입 (cell entry) 억제제 및 HCV 어셈블리 억제제로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0048] 또한 본 발명의 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 면역조절제인 인터페론; 및 리바비린을 추가로 포함하는 것이 가능하다.
- [0049] 또한, 상기 면역조절제는 natural 인터페론, 인터페론- $\alpha$ , 인터페론- $\beta$ , 인터페론- $\gamma$ , 폐결화된-인터페론, 알부민-결합 인터페론 및 사이토카인으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명에서는 도라지 추출물을 포함하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과, 전술한 C형 간염 바이러스 증식 억제제를 병용 투여하는 방법을 제공한다.
- [0051] 특히, 도라지 추출물을 포함하는 C형 간염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 함께 면역 조절제와 리바비린을 동시에 선택하여 병용 투여하는 것이 바람직하다.
- [0052] 본 발명에서는 또한, 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출한 도라지 추출물; 및 상기 도라지 추출물에서 분리한 사포닌계 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 함유하는 C형 간염 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

## 효 과

- [0053] 본 발명에 따른 도라지 사포닌 또는 이를 포함하는 도라지 추출물 및 이들을 유효성분으로 함유하는 조성물은 인체에 무해하고 C형 간염 바이러스의 증식을 효과적으로 억제하므로 C형 간염의 예방 또는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0054] 본 발명의 도라지 추출물은 도라지를 물, 유기 용매 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 얻을 수 있는데, 유기 용매로는 메탄올 또는 에탄올과 같은  $C_{1-4}$  알코올, 에틸아세테이트, 헥산, 디클로로메탄 등을 예시할 수 있다. 바람직하게는 0 내지 100% 농도의  $C_{1-4}$  알코올 수용액, 더욱 바람직하게는 0 내지 100% 농도의 에틸알코올(주정) 수용액을 이용할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 도라지 추출물은 생도라지, 건조도라지 또는 이의 건조물을 분쇄한 분말을 용매 추출함으로써 제조할 수 있다.
- [0056] 구체적으로, 음지에서 건조하여 잘게 분쇄한 도라지에 도라지 부피의 2 내지 200배, 바람직하게는 10 내지 30배의 물 또는 유기용매를 첨가하고, 10 내지 100℃의 온도에서 추출한다. 상기 추출방법으로는 침지 추출, 초음파 추출, 환류 추출 등의 방법을 이용할 수 있으며 필요에 따라 2회 이상 반복하여 실시할 수 있다. 또한 상기에서 수득된 추출물을 여과 또는 원심분리하여 고형분을 제거하고 농축한 후 동결 건조 등의 방법으로 건조시켜 수분이 완전히 제거된 도라지 용매 추출물을 얻을 수 있다.
- [0057] 도라지 용매 추출물로부터 도라지 조 사포닌의 분리정제는 도라지 추출물에 물을 중량비로 5 - 50배를 가하여 완전히 용해시킨 후 역상겔 (RP-18, Diaion HP-20, MCI-gel등) 또는 이온 교환 (Ion exchange) 겔이 도라지 추출물 중량의 5 - 100배로 충전된 관을 이용하여 분리한다. 이들 겔이 충전된 관에 물 50 - 1000배량을 추가로 가하여 흡착되지 않은 당 성분, 아미노산 성분 등을 제거하고, 나머지를 10 - 100배량의 알코올 수용액으로 씻어낸다. 씻어낸 용액을 농축시킨 후 이를 다시 알코올 용액 (10-50배)에 녹이고 이후에 생성된 고형분을 제거하여 농축시켜 도라지 조 사포닌을 얻는다.
- [0058] 도라지 용매 추출물 또는 도라지 조 사포닌으로부터 사포닌의 분리정제는 도라지 조 사포닌을 중량비 5 - 20배의 물에 녹인 후 역상겔 (RP-18, MCI-gel등)로 충전된 칼럼이 장착된 MPLC, HPLC를 이용하여 분리정제하였다.
- [0059] 본 발명의 약학적 조성물은, 도라지 사포닌 또는 도라지 추출물을 조성물 총 중량의 0.1 내지 90중량%, 바람직하게는 10 내지 70 중량%의 양으로 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 도라지 사포닌 또는 이를 포함하는 도라지 추출물을 함유하는 약학적 조성물은 C형 간염 바이러스의 증식을 현저히 억제하여 우수한 C형 간염의 예방 및 치료 효과를 나타낸다.
- [0061] 본 발명의 도라지 사포닌 또는 이를 포함하는 도라지 추출물을 함유하는 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있으며, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 용액제, 유제, 현탁제, 에멀전, 시럽제 등의 경구용 제형물로 사용될 수 있다. 추출물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 추출물에 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 조합하여 제조할 수 있다. 또한, 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제를 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되며, 통상적으로 사용되는 물, 리퀴드 파라핀 또는 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명의 조성물에는 본 발명의 도라지 사포닌 또는 이를 포함하는 도라지 추출물을 함유하는 약학적 조성물 뿐 아니라 C형 간염의 예방 또는 치료제로 사용되는 인터페론 등의 면역 조절제, 신호전달계 조절제, 리바비린 등의 항바이러스제, HCV 폴리머라제 (NS5B) 억제제, HCV 프로테아제 (NS3/4A) 억제제, HCV 헬리카제 (NS3 helicase) 억제제, HCV NS4B 억제제, HCV NS5A 억제제, HCV의 세포 침입 억제제, HCV 어셈블리 억제제를 포함한 모든 종류의 C형 간염 바이러스 증식 억제제 또는 이들의 혼합물 등이 함께 포함될 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 근육 또는 정맥을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있고, 바람직한 투여량은 환자의 연령, 성별 및 체중, 건강 상태 및 질환의 중증도 등의 여러 관련인자에 비추어 당업자에 의해 적절하게 결정될 수 있다. 구체적으로 사람의 경우, 1일 투여량은 0.02 내지 1000 mg/kg 체중, 바람직하게는 1 내지 200 mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상

기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0064] 이하, 본 발명을 바람직한 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이로써 한정되는 것은 아니다.

[0065] **실시예 1 : 도라지 추출물의 제조**

[0066] 도라지 분말 1,000g 에 증류수 5,000 ml를 가하고 90℃에서 6시간 동안 2회 환류 추출한 후 냉각시켜 30분 동안 상온에서 원심 분리 (10,000 x g)하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 동결 건조시켜 분말상의 도라지 추출물 368 g (DrJ-1)을 얻었다.

[0067] 도라지 분말 1,000 g에 주정 에탄올 5,000 ml를 가하고 수욕 상에서 6시간 동안 2회 환류 추출한 후 냉각시켜 30분 동안 상온에서 원심 분리 (10,000 x g)하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 감압 건조하여 분말상의 도라지 추출물 136 g (DrJ-2)을 얻었다.

[0068] 도라지 분말 1,000 g에 메탄올 5,000 ml를 가하고 수욕 상에서 6시간 동안 2회 환류 추출한 후 냉각시켜 30분 동안 상온에서 원심 분리 (10,000 x g)하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 감압 건조하여 분말상의 도라지 추출물 205 g (DrJ-3)을 얻었다.

[0069] 도라지 분말 1,000 g에 주정 에탄올과 물을 혼합하여 표 1의 비율로 각각 5,000 ml가 되도록 가하고 수욕 상에서 6시간 동안 2회 환류 추출한 후 냉각시켜 30분 동안 상온에서 원심 분리 (회전 속도 10,000 x g)하여 고형분을 제거하였다. 원심 분리된 용액을 감압 건조하여 분말 상의 도라지 추출물을 다음과 같이 얻었다.

[0070] [표 1]

시료명	물	주정	도라지 추출물 량
DrJ-4	10%	90%	156g
DrJ-5	25%	75%	175g
DrJ-6	50%	50%	230g
DrJ-7	75%	25%	305g
DrJ-8	90%	10%	356g

[0072] **실시예 2 : 도라지 추출물로부터 조 사포닌의 분리**

[0073] **제조예 1: 도라지 물 추출물로부터 조 사포닌의 분리**

[0074] 실시예 1에서 제조한 도라지 물 추출물 (DrJ-1)로부터 아래와 같은 방법으로 조 사포닌을 분리하였다

[0075] 도라지 물 추출물 (DrJ-1) 100g을 물 1,000 ml에 녹여 500 ml의 역상 겔 (HP-20, RP-18, 또는 MCI 겔)로 충전된 컬럼 (50 × 250mm)에 주입하여 조 사포닌을 흡착시킨다. 흡착되지 않는 당 성분들 (글루코스, 솔비톨, 프락토스, 슈크로스 및 프락토올리고당 등 이눌린)을 제거하기 위하여 1,000 ml의 물 및 3-5 %의 아세트오니트릴 수용액 500 ml를 계속해서 흘려주고 아세트오니트릴을 없애기 위하여 다시 물 500 ml를 흘려준다. 당 성분들이 완전히 제거되면 30-90 % 에탄올 수용액 (500 ml)을 충분히 흘려주어 흡착된 성분을 탈착시켜 얻은 에탄올 수용액을 감압 증류하면 7g의 고형분을 얻는다. 얻어진 고형물을 에탄올 50 ml를 가하여 에탄올에 녹지 않는 부분을 여과해 내고, 얻어진 여액에 에틸아세테이트 100 ml를 가하여 생성된 고체를 여과하고 잘 건조시켜 6.5g 의 조사포닌 (DrJ-9)을 얻었다.

[0076] **제조예 2: 도라지 주정 에탄올 추출물로부터 조 사포닌의 분리**

[0077] 실시예 1에서 제조한 도라지 주정 에탄올 추출물 (DrJ-2) 100 g을, 실시예 2의 제조예 1과 동일한 방법으로 조 사포닌을 분리 정제하여 8g 의 조 사포닌 (DrJ-10)을 얻었다.

- [0078] **제조예 3: 도라지 메탄을 추출물로부터 조 사포닌의 분리**
- [0079] 실시예 1에서 제조한 도라지 메탄을 추출물 (DrJ-3) 100 g을, 실시예 2의 제조예 1과 동일한 방법으로 조 사포닌을 분리 정제하여 9.8g의 조 사포닌(DrJ-11)을 얻었다.
- [0080] **실시예 3. 한외여과막 여과를 이용한 분자량별 도라지 조성물 제조**
- [0081] **제조예 1. 도라지 물 추출물들로부터 한외여과막 여과를 이용한 도라지 사포닌 함유 조성물 제조**
- [0082] 한외여과막 (ultra-filtration membrane)은 펠리콘 (Pellicon) 2 TFF 시스템 (Millipore USA, 제품번호 (PART# xi42 pm001)) 를 사용하였다. 실시예 1 에서 얻은 도라지 물 추출물 (DrJ-1) 100 g을 증류수 18,000 ml에 녹여 잔류물이 100 ml가 될 때까지 한외여과막 (Pellicon 2 100 KDa)을 통과시켰다. 남은 잔류물에 1,000 ml의 물을 추가하여 잔류물의 용량이 100 ml 이하가 될 때까지 계속 한외여과막 (Pellicon 2, 100 KDa)을 통과시켰다. 한외여과막을 통과한 여과물을 모아 감압 농축하여 분자량 100,000 이하 도라지 조성물 (DrJ-12) 80 g을 얻었다. DrJ-12 (분자량 100,000 이하 도라지 조성물) 70 g을 물 16,000 ml에 녹여 한외여과막 (Pellicon 2, 5 KDa)을 이용하여 상기와 같이 처리하여, 분자량 5,000 이하 도라지 조성물 (DrJ-13) 24 g 을 얻었다. DrJ-13 (분자량 5,000 이하 도라지 조성물) 14 g을 물 6,000 ml에 녹여 잔류물이 100 ml가 될 때까지 한외여과막 (Pellicon 2, 1 KDa)을 통과시켰다. 남은 잔류물에 1,000 ml의 물을 추가하여 잔류물의 용량이 100 ml 이하가 될 때까지 계속 한외여과막 (Pellicon 2, 1 KDa)를 통과시키고, 남은 잔류물 100 ml을 감압 농축시켜 분자량 1,000 이상 5,000 이하의 도라지 조성물 (DrJ-14) 10.4 g을 얻었다.
- [0083] 한편 실시예 1 에서 제조한 도라지 물추출물 (DrJ-1) 100 g을 상기와 같은 방법으로 한외여과막 (Pellicon 2, 100 KDa)을 통과시킨 후 여액을 한외여과막 (Pellicon 2, 1 KDa)으로 걸러 분자량 1,000 이상 100,000 이하의 도라지 조성물 (DrJ-15) 15.6 g을 얻었다.
- [0084] **제조예 2. 도라지 주정 에탄을 추출물들로부터 한외여과막을 이용한 도라지 사포닌 함유 조성물 제조**
- [0085] 실시예 1에서 제조한 도라지 주정 에탄을 추출물 DrJ-2을 실시예 3의 제조예 1에서 기술한 방법으로 처리하여 분자량 100,000 이하 도라지 조성물 (DrJ-16) 30 g, 분자량 5,000 이하 도라지 조성물 (DrJ-17) 19.5 g, 분자량 1,000 이상 5,000 이하의 도라지 조성물 (DrJ-18) 11.8 g 및 분자량 1,000 이상 100,000 이하의 도라지 조성물 (DrJ-19) 10.7 g 을 얻었다.
- [0086] **제조예 3. 도라지 메탄을 추출물로부터 한외여과막을 이용한 도라지 조성물 제조**
- [0087] 실시예 1에서 제조한 도라지 메탄을 추출물 DrJ-3을 실시예 3의 제조예 1에서 기술한 방법으로 처리하여 분자량 100,000 이하 도라지 조성물 (DrJ-20) 90 g, 분자량 5,000 이하 도라지 조성물 (DrJ-21) 70 g, 분자량 1,000 이상 5,000 이하의 도라지 조성물 (DrJ-22) 12.8 g 및 분자량 1,000 이상 100,000 이하의 도라지 조성물 (DrJ-23) 11.5 g 을 얻었다.
- [0088] **실시예 4. 도라지 물 추출물들로부터 나노여과막을 이용한 도라지 사포닌 함유 조성물 제조**
- [0089] 물 추출물로부터 얻어진 DrJ-13 8 g을 증류수 10,000 ml에 녹인 후 잔류물이 100 ml 이하가 될 때까지 나노여과막 (분자량 한계 500: nano Filtration Process Scale, Low)을 통과시키고, 잔류물에 물 1,000 ml을 첨가한 후 잔류물이 100 ml 이하가 될 때까지 반복하여 나노여과막 (분자량 한계 500: nano Filtration Process Scale, Low)을 통과시킨다. 잔류물을 감압농축하여 분자량 500 이상 5,000 이하인 도라지 조성물 (DrJ-24) 5 g을 얻었다.
- [0090] 분자량 한계 5,000 이하인 DrJ-17 (에탄을 추출물)과 DrJ-21 (메탄을 추출물)을 상기와 같은 방법으로 실시하여 분자량 500 이상 5,000 이하인 도라지 조성물 DrJ-25와 DrJ-26을 각각 얻었다.
- [0091] **실시예 5 : 도라지 사포닌의 분리 정제**

[0092] 문헌에 발표된 방법에 따라 도라지 사포닌 데아피오플라티코사이드 E (deapioplatycoside E), 플라티코사이드 E (platycoside E), 플라티코딘 D<sub>3</sub> (platycodin D<sub>3</sub>), 폴리갈라신 D<sub>2</sub> (polygalacin D<sub>2</sub>), 폴리갈라신 D (polygalacin D), 플라티콘산 A (platyconic acid A), 데아피오플라티코딘 D<sub>2</sub> (deapioplatycodin D<sub>2</sub>), 플라티코딘 D<sub>2</sub>, 데아피오플라티코딘 D, 플라티코딘 D, 2"-O-아세틸-데아피오플리갈라신 D<sub>2</sub>, 2"-O-아세틸-폴리갈라신 D<sub>2</sub> 등을 분리 정제하였다 (문헌 [Kim, Y. S. *et al.*, *Planta Med.* 71, 566-568, (2005); Choi, Y. H. *et al.*, *Molecules* 13(11), 2871-2879, (2008)] 참고).

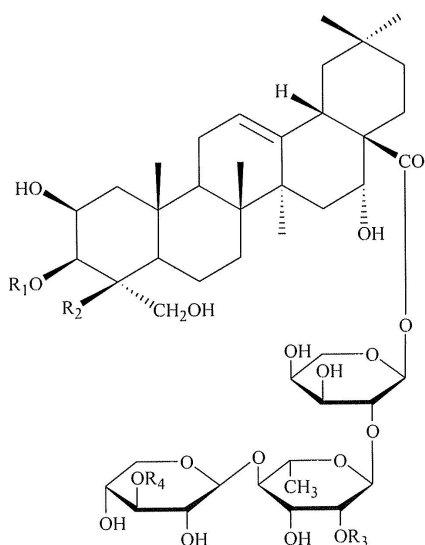
[0093] 즉, 실시예 1에서 얻어진 메탄올 추출물 220 g을 증류수 2.2 L에 현탁시킨 후, 다이아이온 에이치피-20 (Diaion HP-20) 컬럼 (Φ = 5.0 \* 100 cm)에 흡착시킨 후 10 L 증류수로 세척하고 동량의 20 % 메탄올, 동량의 85 % 메탄올, 동량의 메탄올 순서로 용출시켜 총 3개의 분획 (제 1 분획 내지 제 3 분획)으로 나누었다. 이 중 제 2 분획 (85 % 메탄올 용출분)을 RP-18 컬럼이 장착된 휴텍스 (Futecs) NS-3000i 시스템 HPLC를 이용하여 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26% 아세트니트릴을 용출 용매로 다음과 같이 12개의 사포닌을 분리하고 분광학적 데이터를 이용하여 1번 화합물 데아피오플라티코사이드 E (R<sub>t</sub> 25.18 min), 2번 화합물 플라티코사이드 E (R<sub>t</sub> 26.38 min), 3번 화합물 플라티코딘 D<sub>3</sub> (R<sub>t</sub> 35.41 min), 4번 화합물 폴리갈라신 D<sub>2</sub> (R<sub>t</sub> 41.28 min), 5번 화합물 폴리갈라신 D (R<sub>t</sub> 44.06 min), 6번 화합물 플라티콘산 A (R<sub>t</sub> 49.29 min), 7번 화합물 데아피오플라티코딘 D<sub>2</sub> (R<sub>t</sub> 57.49 min), 8번 화합물 플라티코딘 D<sub>2</sub> (R<sub>t</sub> 62.86 min), 9번 화합물 데아피오플라티코딘 D (R<sub>t</sub> 62.08 min), 10번 화합물 플라티코딘 D (R<sub>t</sub> 25.18 min), 11번 화합물 2"-O-아세틸-데아피오플리갈라신 D<sub>2</sub> (R<sub>t</sub> 81.13 min), 12번 화합물 2"-O-아세틸-폴리갈라신 D<sub>2</sub> (R<sub>t</sub> 83.13 min)임을 확인하였다. 한편 플라티콘산 A를 하기 참고 문헌 8의 방법에 따라 디아조메탄으로 메틸화하여 13번 화합물 플라티콘산 A 메틸에스테르를 얻었다.

[0094] [참고 문헌 7] Kim, Y. S. *et al.*, *Planta Med.* 71, 566-568, (2005)

[0095] [참고 문헌 8] Choi, Y. H. *et al.*, *Molecules* 13(11), 2871-2879, (2008)

[0096] 상기와 같이 도라지 추출물로부터 분리 정제된 사포닌 (1-13번 화합물)의 구조를 하기 화학식 1 및 표 2에 나타내었다.

[0097] [화학식 1]



[0098]

[0099] 상기 화학식 1에서, 도라지 추출물로부터 분리 정제된 사포닌 (1-13번 화합물)의 R<sub>1</sub>~R<sub>4</sub>는 하기 표 2와 같다.

[0100] [표 2]

[0101]

화합물 번호	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	글루코피라노실-(1→6)-글루코피라노실-(1→6)-글루코피라노실	CH <sub>2</sub> OH	H	H
2	글루코피라노실-(1→6)-글루코피라노실-(1→6)-글루코피라노실	CH <sub>2</sub> OH	H	아피오실



3	겐티오비오실	CH <sub>2</sub> OH	H	아피오실
4	라미나리비오실	CH <sub>3</sub>	H	아피오실
5	글루코실	CH <sub>3</sub>	H	아피오실
6	글루코실	COOH	H	아피오실
7	라미나리비오실	CH <sub>2</sub> OH	H	H
8	라미나리비오실	CH <sub>2</sub> OH	H	아피오실
9	글루코실	CH <sub>2</sub> OH	H	H
10	글루코실	CH <sub>2</sub> OH	H	아피오실
11	라미나리비오실	CH <sub>3</sub>	아세틸	H
12	라미나리비오실	CH <sub>3</sub>	아세틸	아피오실
13	글루코실	COOCH <sub>3</sub>	H	아피오실

[0102] 또한, 표 3a 및 표 3b에 도라지 추출물로부터 분리 정제된 사포닌 (1-13번 화합물)의 <sup>13</sup>C-NMR 화학적 이동값 (δ)을 나타냈다 (용매: DMSO-d<sub>6</sub>).

[0103]

[표 3a]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
carbon No 1	45.3	45.3	45.4	44.3	44.2	46.7	45.4	45.6	45.2	45.2	44.2	44.3	45.8
2	68.8	68.7	67.2	70.1	70.2	69.6	67.9	70.0	69.2	70.5	70.1	70.3	69.8
3	88.8	88.8	89.4	83.7	83.9	83.3	89.2	85.4	86.5	86.4	83.9	84.0	84.4
4	48.2	48.2	48.2	42.9	42.8	56.3	48.1	48.3	48.0	48.1	42.7	42.8	56.1
5	47.6	47.6	45.9	48.3	48.4	49.6	45.8	48.6	48.0	48.1	48.5	48.5	50.1
6	19.5	19.4	20.1	18.1	18.1	20.3	19.9	19.9	19.6	19.4	18.0	18.1	20.5
7	33.5	33.6	34.0	33.5	33.4	33.7	34.0	34.2	33.8	33.6	33.3	33.5	33.7
8	40.6	40.5	41.2	40.6	40.6	40.0	41.0	41.0	40.7	40.4	40.5	40.6	40.3
9	45.0	45.0	48.8	48.0	48.0	47.2	48.6	47.7	48.0	47.7	47.9	48.0	47.6
10	38.0	38.0	38.6	37.2	37.2	37.2	38.5	38.0	37.6	37.6	37.1	37.2	37.4
11	24.1	24.1	24.7	24.2	24.2	24.4	24.6	24.8	24.2	24.2	24.1	24.2	24.4
12	123.3	123.1	123.9	123.4	123.4	122.9	123.7	123.7	123.4	123.2	123.4	123.4	123.0
13	144.7	144.4	145.0	144.4	144.4	144.2	144.8	144.9	144.4	144.3	144.4	144.4	144.4
14	42.5	42.5	43.1	42.5	42.4	42.2	42.9	43.0	42.5	42.4	42.5	42.5	42.4
15	36.2	36.1	36.7	36.2	36.2	36.2	36.5	36.7	36.2	36.1	36.1	36.2	36.1
16	73.9	74.0	73.3	74.2	74.1	73.8	73.2	74.7	74.1	73.9	74.1	74.1	74.1
17	49.7	49.7	50.4	50.1	50.0	49.5	50.2	50.3	50.1	49.7	50.1	50.1	50.1
18	41.7	41.6	42.3	41.6	41.6	41.3	42.1	42.1	41.8	41.5	41.5	41.6	41.6
19	47.2	47.2	47.8	47.2	47.2	47.1	47.7	47.0	47.2	47.1	47.1	47.2	47.2
20	31.0	31.0	31.6	30.8	30.8	30.6	31.5	31.5	30.8	30.0	30.7	30.8	30.8
21	36.1	36.1	36.7	36.2	36.2	35.9	36.6	36.6	36.1	36.2	36.1	36.2	36.1
22	32.2	32.2	32.8	31.3	31.3	31.7	32.6	32.7	31.4	32.2	31.2	31.3	31.4
23	63.7	63.5	64.3	66.8	66.8	63.5	63.8	64.1	63.9	63.9	66.7	66.8	64.5
24	67.3	67.3	67.5	14.8	14.8	181.4	67.8	65.9	66.3	66.9	14.7	14.8	175.5
25	19.2	19.2	19.8	17.8	17.8	16.1	19.6	18.8	18.2	18.4	17.7	17.8	15.8
26	17.7	17.7	18.3	17.5	17.5	17.4	18.2	18.2	17.7	17.6	17.5	17.5	17.6
27	27.1	27.1	27.7	27.3	27.3	27.0	27.6	27.7	27.3	27.1	27.3	27.4	27.2
28	176.1	176.0	176.7	175.8	175.8	175.8	176.5	176.6	175.8	176.1	175.8	175.9	175.8
29	33.3	33.4	34.0	33.1	33.1	33.3	33.8	33.9	33.1	33.3	33.1	33.1	33.1
30	24.8	24.8	25.4	25.3	25.2	24.8	25.3	25.3	25.2	24.7	25.3	25.3	25.2
24-OCH <sub>3</sub>													51.3
Glu (inner)													
1	106.1	106.1	106.6	104.9	105.2	106.0	106.6	106.2	106.0	106.3	105.1	105.2	106.3
2	74.9	74.9	74.5	74.2	75.5	74.8	75.3	74.5	75.3	75.3	75.3	75.4	75.3
3	78.5	78.4	77.1	88.7	78.5	78.2	77.0	87.6	78.6	78.8	78.4	78.5	78.5
4	72.3	72.4	72.5	70.1	72.0	71.8	71.6	70.3	72.1	72.8	72.0	72.0	72.0
5	76.6	76.5	77.1	77.7	77.9	78.2	76.5	78.7	78.2	77.8	77.8	77.9	78.1
6	70.7	70.4	70.1	62.9	63.0	61.8	69.2	62.8	63.0	63.6	63.0	63.0	63.0
Glu (center)													
1	105.0	105.0											
2	75.4	75.4											
3	78.4	78.5											
4	71.3	71.1											
5	77.2	77.2											
6	70.2	70.2											
Glu (terminal)													
1	105.6	105.7	105.5	105.5			105.5	106.1					
2	75.2	75.2	75.5	75.3			74.5	76.0					
3	78.7	78.7	79.2	78.2			79.2	81.1					
4	70.9	71.0	71.9	72.0			71.8	72.2					
5	77.7	77.7	78.5	78.2			78.4	79.2					
6	62.7	62.7	63.2	62.9			63.1	63.1					

[0104]



[0105] [표 3b]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Arabinose													
1	93.7	93.7	94.3	93.7	93.7	93.4	94.1	94.2	93.7	93.6	93.5	93.5	93.7
2	75.3	75.3	76.0	75.7	75.7	75.5	75.7	78.4	75.7	75.4	76.2	76.3	75.7
3	71.6	71.3	71.2	70.2	70.2	70.3	70.8	71.0	70.2	71.9	70.2	70.3	70.1
4	66.6	66.4	65.9	65.8	65.8	66.2	64.9	65.9	65.9	65.4	65.7	65.8	65.8
5	63.1	63.1	63.7	62.9	63.0	61.8	63.6	64.0	63.0	62.6	63.0	63.0	63.0
Rhamnose													
1	101.2	101.2	101.8	101.1	101.1	101.2	101.7	101.8	101.1	101.3	98.3	98.4	101.1
2	71.9	72.0	72.6	72.0	72.0	71.8	72.6	72.5	72.1	71.6	73.5	73.6	72.0
3	72.8	72.8	72.6	72.5	72.4	72.3	72.5	73.3	72.5	72.4	70.2	70.3	72.4
4	84.0	83.6	84.5	83.7	83.7	83.3	84.0	85.4	83.7	83.9	83.4	83.4	83.6
5	68.6	68.7	69.2	68.7	68.6	68.4	69.1	69.2	68.7	68.6	68.6	68.7	68.7
6	18.4	18.5	19.1	18.1	18.1	18.4	18.9	19.0	18.2	18.4	18.2	18.3	18.1
											20.7	20.7	
											170.3	170.4	
Xylose													
1	106.8	106.9	107.3	106.6	106.6	106.2	107.3	107.2	106.7	106.8	106.4	106.5	106.5
2	76.1	76.1	75.9	75.0	75.0	74.7	76.0	75.8	75.7	75.2	75.0	75.0	75.0
3	84.8	78.6	85.4	85.6	85.5	85.2	79.1	84.3	78.4	84.8	78.5	85.6	85.5
4	69.5	71.6	69.4	89.5	69.5	68.9	71.1	70.2	71.0	69.5	69.4	69.5	69.5
5	67.0	67.5	67.5	66.8	66.8	66.5	66.8	67.0	67.3	66.5	67.2	66.8	66.8
Apiose													
1	111.2		111.8	111.3	111.2	110.8		111.7		111.3		111.3	111.2
2	77.9		79.1	77.9	77.9	77.8		78.8		77.9		77.9	77.9
3	80.5		81.2	80.0	80.0	80.1		84.3		80.5		80.0	80.0
4	75.3		75.8	75.0	75.0	74.3		75.7		75.4		75.0	75.0
5	65.4		65.9	65.8	65.8	65.1		64.1		64.5		65.8	65.8

[0106]

[0107] 실시예 6. 도라지 조 사포닌의 가수분해

[0108] 제조예 1: 조사포닌의 산 가수분해

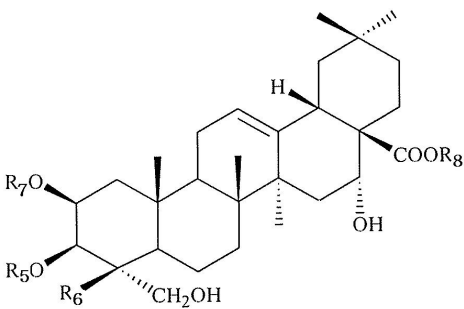
[0109] 상기 실시예 2에서 얻어진 조사포닌 5 g에 5% 황산 ( $H_2SO_4$ ) 수용액 20 ml를 가하고 2시간 동안 환류시킨 후 상온으로 냉각시키고 1N  $NaHCO_3$  수용액으로 중화한 후 에틸아세테이트 50 ml로 3회 추출하였다. 추출한 에틸아세테이트 용액을 감압농축하고 이를 RP-18 컬럼 크로마토그래피 (용리제 : 60-80% 메탄올 수용액)로 분리 정제하여 화합물 14 (250 mg), 15 (120mg), 16 (375mg) 및 17 (164mg)을 각각 얻었으며 분광학적 자료를 통하여 화학구조를 규명하였다.

[0110] 제조예 2 : 조사포닌의 알카리 가수분해

[0111] 상기 실시예 1에서 얻어진 조사포닌 5 g을 2N  $NaOH$  수용액 10 ml와 50% 메탄올 수용액 10 ml에 녹인 후 5시간 동안 환류시키고 상온으로 냉각시켜 1N  $HCl$  수용액으로 중화시킨 후 에틸아세테이트 50 ml로 3회 추출하였다. 추출한 에틸아세테이트 용액을 감압농축하고 이를 RP-18 컬럼 크로마토그래피 (용리제: 60-80% 메탄올 수용액)로 분리 정제하여 화합물 18 (120 mg) 및 19 (164 mg)를 각각 얻었으며 스펙트럼 데이터를 통하여 화학 구조를 규명하였다.

[0112] 상기에서 얻은 화합물 14~19의 구조를 하기 화학식 2 및 표 4에 나타내었다.

[0113] [화학식 2]



[0114]

[0115] 상기 화학식 2에서, 화합물 14~19의 R<sub>5</sub>~R<sub>8</sub>은 하기 표 4와 같다.

[0116] [표 4]

화합물번호	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
14	H	CH <sub>2</sub> OH	H	H
15	H	CH <sub>3</sub>	H	H
16	H	└─CO─┐		H
17	글루코실	└─CO─┐		H
18	글루코실	CH <sub>2</sub> OH	H	CH <sub>3</sub>
19	라미나리비오실	CH <sub>2</sub> OH	H	CH <sub>3</sub>

[0117]

[0118] 또한, 표 5에 상기 화합물 14~19의 <sup>13</sup>C-NMR 화학적 이동값 (δ)을 나타냈다 (용매: DMSO-*d*<sub>6</sub>).

[0119] [표 5]

Carbon No.	사포게닌			프로사포게닌		
	14	15	16	17	18	19
1	44.6	45.8	42.0	41.4	44.0	43.9
2	71.7	72.5	84.6	83.5	68.5	68.6
3	75.1	75.6	81.8	89.5	85.4	85.4
4	47.1	43.3	55.2	54.5	45.8	45.8
5	47.9	49.1	52.1	52.2	46.5	46.5
6	18.9	19.2	20.1	19.7	18.1	18.1
7	33.7	34.2	34.0	33.8	32.5	32.5
8	40.0	40.9	38.2	40.6	39.1	39.0
9	48.7	48.5	49.1	48.5	47.0	47.0
10	37.1	38.1	36.9	38.0	36.4	36.3
11	24.1	24.9	25.2	25.0	23.1	23.1
12	122.4	123.4	121.3	122.2	121.9	122.0
13	145.0	146.0	147.3	146.2	143.3	143.4
14	42.1	43.1	43.1	42.7	41.1	41.1
15	35.9	36.9	36.7	36.9	34.9	34.9
16	74.6	73.9	75.9	75.0	73.3	73.3
17	49.6	49.7	50.8	49.3	48.0	48.0
18	41.3	42.3	40.9	41.9	40.4	40.4
19	46.5	48.1	48.1	47.7	45.4	45.6
20	30.9	31.9	28.3	30.3	29.8	29.8
21	36.1	37.0	34.2	36.8	34.9	34.9
22	32.8	33.7	31.5	31.5	31.5	31.5
23	63.9	68.5	58.3	57.5	62.5	62.5
24	64.5	15.4	179.5	178.6	64.1	64.1
25	17.5	18.4	18.3	17.7	17.2	17.1

26	17.5	18.2	19.1	18.4	16.2	16.2
27	27.1	28.1	26.9	27.7	26.1	26.1
28	180.0	180.9	185.0	180.4	176.8	176.8
29	33.2	34.2	31.7	33.3	32.2	32.2
30	24.6	25.6	25.7	25.2	23.5	23.5
24-OCH <sub>3</sub>					50.8	50.8
Glucose(inner)						
1				105.7	105.3	104.6
2				75.7	74.2	73.0
3				79.2	77.7	87.5
4				71.8	70.5	68.6
5				78.8	77.6	77.1
6				63.0	61.5	61.1
Glucose(terminal)						
1						104.7
2						74.5
3						77.7
4						70.5
5						77.3
6						61.4

[0121] <실험예 1> HCV 레플리콘 (subgenomic RNA replicon) 세포주에서 HCV RNA 복제 저해 활성 조사

[0122] 본 발명의 도라지 사포닌과 도라지 추출물 및 도라지 사포닌 함유 조성물, 그리고 사포게닌 및 프로사포게닌들의 HCV 레플리콘에 대한 저해 활성을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

[0123] HCV 레플리콘 세포주 배양

[0124] HCV 복제를 저해하는 화합물의 탐색은 HCV 레플리콘을 지니고 있는 세포주에 각 화합물을 가한 후 배양하고 이 때 발현된 HCV RNA의 발현 정도를 정량적으로 측정하여 그 저해 활성을 계산하였다. 본 발명에 사용된 HCV 레플리콘은 HCV-1b형 C형 간염바이러스 유전자를 이용하였고, HCV IRES, 네오마이신 저항 유전자, EMCV (encephalomyocarditis virus)의 IRES를 가지는 바이시스트로닉 레플리콘이며, HCV 비구조 단백질은 NS3에서 NS5B, 그리고 HCV 3' 말단을 포함하는 서열로 구성되어 있다. 이러한 HCV 레플리콘을 포함하는 발현 벡터를 시험관내 전사 (*in vitro* transcription)하여 얻어진 HCV 레플리콘을 간암 세포주 Huh-7 내로 일렉트로포레이션 (electroporation) 방법으로 형질전환 (transfection) 하였고, Huh-7 세포주 중에서 HCV 레플리콘을 가지는 세포주만을 선별하기 위하여 항생제 G418 (500  $\mu$ g/ml)이 첨가된 배지에서 배양하였다. 선별된 세포주는 10% FBS와 비필수 아미노산 (nonessential amino acids), 500  $\mu$ g/ml G418이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagles's media) 배지에서 배양하였다.

[0125] HCV 레플리콘에 대한 화합물의 저해 활성 측정

[0126] HCV 서브게노믹 RNA 레플리콘을 포함하는 간암 세포주 Huh-7을 6웰 플레이트에 약  $3 \times 10^5$  세포의 농도로 5% CO<sub>2</sub> 배양기 (incubator)에서 37℃로 24시간 동안 배양하여 플레이트 바닥에 세포를 고정하였다. 각각의 웰을 2% FBS와 비필수 아미노산, 500  $\mu$ g/ml G418이 첨가된 DMEM 배지로 갈아준 다음 DMSO로 녹인 실험 화합물을 정해진 농도에 따라 각 웰에 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37℃로 72시간 동안 배양하였고, 동시에 대조군으로서 동일한 농도의 DMSO (negative control)와 인터페론- $\alpha$  (positive control)를 첨가하여 비교하였다. 배양이 끝나면 각 웰의 배지를 제거하고 1 ml의 PBS로 세척한 다음 250  $\mu$ l의 트립신/EDTA를 첨가하여 플레이트로부터 세포를 분리하고 다시 PBS로 세척하여 배지 성분을 제거한 세포를 회수하였다. 여기서 얻어진 세포로부터 SV total RNA isolation system (Promega corporation)을 이용하여 총 RNA를 분리하였고 GeneQuant pro (Amersham bioscience)를 이용하여 RNA를 정량하였다. 각 화합물들의 HCV 레플리콘에 대한 EC<sub>50</sub>은 RT-PCR 방

법을 사용하여 대조군과의 비교를 통해 측정하였다. HCV 1b의 NS5B 부분을 타겟으로 하는 프라이머를 사용하였으며 AccessQuick™ RT-PCR 시스템 (Promega corporation)을 이용한 RT-PCR 방법으로 측정하였다. RT-PCR과 함께 보다 정확하고 정량적인 EC<sub>50</sub>의 계산을 위하여 정량적 실시간 (quantitative real-time) PCR 방법을 사용하였다. 분리된 RNA로부터 역전사 시스템 (Reverse transcription system, Promega corporation)을 이용하여 cDNA를 얻어낸 다음 iQ SYBR Green Supermix (Bio-rad)를 사용하여 정량적 실시간 PCR 반응을 실시하였다. 동시에 Taqman probe를 사용한 한 단계 실시간 (one-step real time) RT-PCR 반응을 실시하여 각 화합물의 저해활성을 결정하였다. HCV 5'-UTR 부분을 타겟으로 하는 프라이머를 사용하였고 대조 유전자 (reference gene)로는 GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 유전자를 이용하여 보정하였다. 실시간 RT-PCR 반응 및 측정은 iCycler iQ5 시스템 (Bio-rad)를 사용하였고 iCycler iQ5 광학 시스템 소프트웨어 (Bio-rad) 프로그램을 이용하여 EC<sub>50</sub> 값을 계산하여 저해 활성을 결정하였다. 본 발명의 도라지 사포닌과 도라지 추출물 및 도라지 사포닌 함유 조성물, 그리고 사포게닌 및 프로사포게닌들의 HCV 레플리콘에 대한 저해 활성은 하기 표 6 및 표 7에 나타내었다.

[표 6]

도라지 추출물의 C형 간염 바이러스 증식 억제 활성

샘플 종류 (분자량)	물 추출물		에탄올 추출물		메탄올 추출물	
	샘플 번호	EC <sub>50</sub> μg/ml	샘플 번호	EC <sub>50</sub> μg/ml	샘플번호	EC <sub>50</sub> μg/ml
총추출물	DrJ-1	3 - 7	DrJ-2	3 - 8	DrJ-3	3 - 7
조사포닌	DrJ-9	0.1 - 0.2	DrJ-10	0.3	DrJ-11	0.1-0.3
100,000 이하	DrJ-12	2 - 3	DrJ-16	2	DrJ-20	4
5,000 이하	DrJ-13	2 - 5	DrJ-17	2 - 3	DrJ-21	2 - 3
5,000 ~ 1,000	DrJ-14	0.1 - 0.3	DrJ-18	0.2	DrJ-22	0.2 - 0.3
100,000 ~ 1,000	DrJ-15	0.7 - 1	DrJ-19	0.7	DrJ-23	0.8
5,000 ~ 500	DrJ-24	0.1 - 0.2	DrJ-25	0.1 - 0.2	DrJ-26	0.1 - 0.2

[표 7]

도라지 사포닌류의 C형 간염 바이러스 증식 억제 활성

화합물 번호	화합물 명	억제 활성 EC <sub>50</sub> (μg/ml)
1	데아피오플라티코사이드 E	> 10
2	플라티코사이드 E	0.7
3	플라티코딘 D <sub>3</sub>	0.2
4	폴리갈라신 D <sub>2</sub>	> 10
5	폴리갈라신 D	0.8
6	플라티콘산 A	0.2
7	데아피오플라티코딘 D <sub>2</sub>	0.2
8	플라티코딘 D <sub>2</sub>	0.1
9	데아피오플라티코딘 D	0.2
10	플라티코딘 D	0.1
11	2"-O-아세틸-데아피오플리갈라신 D <sub>2</sub>	> 10
12	2"-O-아세틸-폴리갈라신 D <sub>2</sub>	1
13	플라티콘산 A 메틸 에스테르	5
14	플라티코디게닌	> 10
15	폴리갈라신산	2
16	플라티코게닌산 A 락톤	0.4
17	플라티코게닌산 A 락톤 3-O-글루코피라노사이드	2

18	플라티코디게닌 3-O-글루코피라노사이드 28-메틸 에스테르	> 10
19	플라티코디게닌 3-O-라미나리비오사이드 28-메틸 에스테르	> 10

[0133] <실험예 2> 인터페론과 도라지 추출물 및 도라지 사포닌류의 병용요법 (Combination therapies)에서의 HCV RNA 복제 저해활성 조사

[0134] 본 발명의 도라지 사포닌과 도라지 추출물 및 도라지 사포닌 함유 조성물 등과 인터페론을 함께 사용하였을 때의 HCV 복제 저해에 대한 상호작용을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

[0135] 실험예 1과 동일한 HCV 서브게노믹 레플리콘 세포주를 사용하였고, 인터페론은 인간 인터페론  $\alpha$ -A (PBL Biomedical Laboratories)를 사용하였다. 먼저, 실험에 사용된 도라지 추출물과 인터페론에 대한  $EC_{50}$  값을 구하기 위하여 다양한 농도로 HCV 레플리콘 세포에 단독 투여한 다음 실험예 1의 방법에 따라 각각의  $EC_{50}$  값을 계산하였다. 병용요법에 따른 상호작용을 확인하기 위하여 도라지 추출물과 인터페론을 HCV 레플리콘 세포에 정해진 농도로 단독처리 혹은 병용 처리하고 5%  $CO_2$  배양기에서 37℃로 3일 내지 3주 동안 배양한 다음 HCV 복제 저해 활성을 측정하였다. 병용처리에 따른 상호작용의 정도는 정해진 농도범위에서의 단독처리시 저해활성에 대한 병용처리시 저해활성의 증가를 비교하여 Chou의 방법 (참고문헌: Chou, T. C., 2006, Theoretical basis, experimental design, and simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacological Reviews. 58:621-681)에 따라 결정하였으며, 상호작용의 정도에 따라 상승작용 (synergic effect), 상가적효과 (additive effect), 길항작용 (antagonism) 등으로 표기하였다. 본 발명의 도라지 사포닌과 도라지 추출물 및 도라지 사포닌 함유 조성물과 인터페론과의 HCV 복제 저해에 대한 상호작용의 결과는 하기 표 8, 9와 10에 나타내었다. Biosoft사의 CalcuSyn 프로그램을 이용하여 상호작용의 조합지수 (CI 값, combination index)를 계산하였고, CI 값이 1보다 낮은 경우 상승작용을 나타내며, CI 값이 약 1인 경우 상가적효과를, 1보다 큰 경우에는 길항작용을 나타낸다. 도라지 추출물 DrJ-14와 DrJ-24, 그리고 도라지 조사포닌 DrJ-9를 0.94 $\mu$ g/ml, 1.88 $\mu$ g/ml, 3.75 $\mu$ g/ml, 7.50 $\mu$ g/ml, 15 $\mu$ g/ml, 30 $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 인터페론을 0.47U/ml, 0.94U/ml, 1.88U/ml, 3.75U/ml, 7.5U/ml, 15U/ml의 농도로 병용처리 하여 실험하였다. 도라지 추출물 DrJ-14와 DrJ-24, 도라지 조사포닌 DrJ-9를 사용한 인터페론과의 병용요법 실험에서 모두 1보다 낮은 CI 값을 보여 병용처리 시 상승작용의 효과가 있는 것으로 나타났다.

[0136] [표 8]

[0137] 도라지 추출물 DrJ-14와 인터페론- $\alpha$ 와의 HCV RNA 복제 저해에 대한 상승작용

[0138]

Dr J-14( $\mu$ g/ml)/IFN- $\alpha$ ( $\mu$ g/ml) 비율	HCV 저해에 대한 CI (Combination Index)		
	$EC_{50}$	$EC_{75}$	$EC_{90}$
2:1	0.77	0.36	0.24
4:1	0.90	0.40	0.24
8:1	0.90	0.52	0.37
16:1	0.99	0.65	0.48

[0139] [표 9]

[0140] 도라지 추출물 DrJ-24와 인터페론- $\alpha$ 와의 HCV RNA 복제 저해에 대한 상승작용

[0141]

Dr J-24( $\mu$ g/ml)/IFN- $\alpha$ ( $\mu$ g/ml) 비율	HCV 저해에 대한 CI (Combination Index)		
	$EC_{50}$	$EC_{75}$	$EC_{90}$
2:1	0.70	0.31	0.22
4:1	0.80	0.34	0.21
8:1	0.80	0.43	0.30
16:1	0.88	0.53	0.38

[0142] [표 10]

[0143] 도라지 조사포닌 DrJ-9와 인터페론-α와의 HCV RNA 복제 저해에 대한 상승작용

[0144]

DrJ-9( $\mu\text{g/ml}$ )/IFN- $\alpha$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) 비율	HCV 저해에 대한 CI (Combination Index)		
	EC <sub>50</sub>	EC <sub>75</sub>	EC <sub>90</sub>
2:1	0.61	0.42	0.32
4:1	0.73	0.48	0.34
8:1	0.96	0.60	0.39
16:1	1.26	0.70	0.40

[0145] <실험예 3> 세포독성 실험

[0146] 본 발명의 도라지 사포닌과 도라지 추출물 및 도라지 사포닌 함유 조성물, 그리고 사포닌 유사체들의 세포독성 (Cytotoxicity)을 확인하기 위하여, HepG2 세포를 이용하여 일반적으로 널리 알려진 MTT 분석방법으로 시험관내 (*in vitro*) 실험을 실시한 결과, 실험에 사용된 도라지 사포닌과 도라지 추출물 및 도라지 사포닌 함유 조성물, 그리고 사포닌 유사체들은 모두 CC<sub>50</sub> 값이 100  $\mu\text{g/ml}$  이상으로, 세포에 대한 독성이 매우 적은 물질인 것으로 확인되었다.