

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2015년 8월 27일 (27.08.2015)



(10) 국제공개번호  
WO 2015/126129 A2

- (51) 국제특허분류:  
C07D 307/80 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)  
A61K 31/343 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/001577
- (22) 국제출원일: 2015년 2월 16일 (16.02.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2014-0018552 2014년 2월 18일 (18.02.2014) KR
- (71) 출원인: 동국대학교 산학협력단 (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 100-715 서울시 중구 필동로 1길 30, Seoul (KR). 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 137-701 서울시 서초구 반포대로 222, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이충호 (LEE, Choong Ho); 410-762 경기도 고양시 일산동구 위시티 4로 46, 215 동 1905 호 (식사동, 위시티일산자이 2 단지아파트), Gyeonggi-do (KR). 윤기동 (YOON, Kee Dong); 420-743 경기도 부천시 원미구 지봉로 43, 약학대학 405 호(역곡동), Gyeonggi-do (KR). 허태희 (HEO, Tae-Hwe); 420-743 경기도 부천시 원미

구 지봉로 43, 약학대학 NP512 호(역곡동), Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 135-846 서울특별시 강남구 영동대로 85길 28, 6층 명진국제특허법률사무소, Seoul (KR).

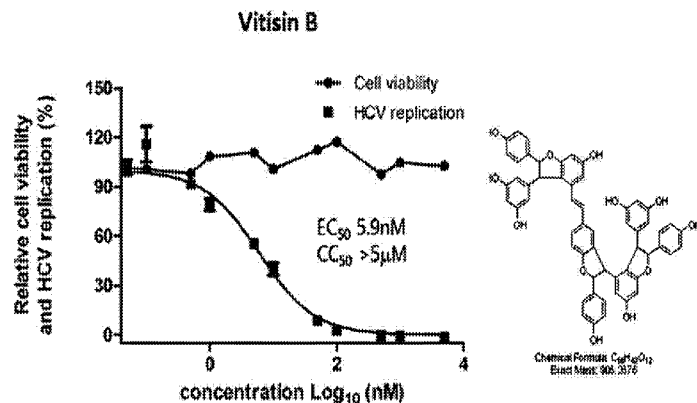
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: RESVERATROL MULTIMER HAVING SELECTIVE INHIBITORY ACTIVITY FOR HEPATITIS C VIRUS GENOME REPLICATION, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤 다량체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a resveratrol multimer having a selective inhibitory activity for hepatitis C virus genome replication, and a use thereof, and more particularly, to a resveratrol multimer having a selective inhibitory activity for hepatitis C virus genome replication, and a pharmaceutical composition for preventing or treating hepatitis C, containing the same. The resveratrol multimer according to the present invention has very low hepatotoxicity and a remarkable effect of selectively inhibiting hepatitis C virus genome replication, and thus is expected to be useful as an active ingredient of a pharmaceutical composition or a nutraceutical composition for preventing, alleviating or treating hepatitis C.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를  
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체 및 이를 포함하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 레스베라트롤(resveratrol) 다량체는 간세포에 대한 독성이 매우 낮으면서도, C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 선택적으로 저해하는 우수한 효과를 가지고 있어, C형 간염을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물의 활성성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 명세서

### 발명의 명칭: C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤 다량체 및 이의 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체 및 이를 포함하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 간염과 간 질환은 뇌혈관 질환, 심장 질환 및 호흡기 질환과 더불어 한국인 인구 10만 명당 사망자 수가 가장 높은 4대 질환 중 하나로, 간염과 간 질환의 원인은 B형 및 C형 간염 바이러스에 의한 바이러스성 간염이 전체의 83%를 차지한다. 그 중에서도 C형 간염 바이러스는 전 세계적으로 약 1억 7천만 명의 감염자를 가지고 있는 의학적으로 매우 중요한 병원균이다. C형 간염은 1980년대 중반까지 비 A형 비 B형 수혈 후 연관간염 (non-A non-B post-transfusion associated hepatitis, NANB)으로 구분되다가, 1989년도에 비로소 전혀 새로운 종류의 바이러스에 의한 감염에 의해 생기는 질병임이 밝혀지게 되었고, 그 후 이에 대한 활발한 연구와 개발이 진행되어 왔다.
- [3] C형 간염 바이러스에 의한 간세포의 감염은 대부분의 경우 만성간염으로 진행되고, 15년에서 20년 정도의 장기간에 걸쳐 간경화와 간암과 같은 만성간 질환으로 발전하기 때문에 치명적이며, C형 간염 바이러스 (HCV, Hepatitis C Virus)에 의한 만성 간염, 간경화 및 간암으로 매년 미국에서만 8,000명 내지 10,000명 정도가 사망하고 있는 것으로 보고되었다. 특히 대부분의 말기 C형 간염 환자들의 경우 간 이식 수술을 기다리다 간 이식을 받지 못해 사망하는 경우가 대부분이며, 통계적으로 한국의 경우 전 인구 중 1.5% 정도가 C형 간염 바이러스에 감염되어 있다고 알려져 있다.
- [4] C형 간염 바이러스 (Hepatitis C Virus, HCV)는 플라비비리데 (flaviviridae) 군 중 헤파시바이러스 (hepacivirus)속으로 분류되는 유일한 바이러스로, 약 9600개의 핵산으로 이루어진 단일 가닥의 RNA를 바이러스 게놈으로 가지고 있다. 상기 RNA는 간세포 내에서 약 3000개의 아미노산으로 이루어진 다단백질(polyprotein)로 번역되고, 번역된 다단백질 (polyprotein)은 간세포의 소포체에 존재하는 신호 펩티다제 (signal peptidase)와 바이러스의 비구조 단백질 중 하나인 NS3 단백질분해효소 (protease)에 의해 10가지의 다른 바이러스 단백질로 발현된다. 발현된 바이러스 단백질 중 외피 당단백질 (envelope glycoprotein)인 E1, E2, 그리고 캡시드 (capsid) 단백질인 코어 (core)와 같은 구조

단백질들 (structural proteins)은 바이러스의 입자 (particle)를 만드는데 쓰이고, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, 그리고 NS5B와 같은 비구조 단백질들(non-structural proteins)은 바이러스의 게놈을 복제하는데 필요한 바이러스 게놈 복제 복합체 (virus genome replication complex)를 만드는데 쓰인다. HCV는 소포체(endoplasmic reticulum)에서 발생한 막피 (membrane)에서 바이러스 게놈 복제 복합체를 만들어서 바이러스의 RNA 게놈을 복제한다. 바이러스 게놈 복제 복합체는 막피에 쌓여 움푹 들어간 형태 (invaginated)를 유지함으로써 외부 환경에서 분리된 독립적인 구조를 만들고 이 구조 속에 바이러스의 비구조 단백질들을 발현시키고 발현된 비구조 단백질들이 바이러스의 RNA 중합효소인 NS5B 단백질과 함께 바이러스의 게놈복제공장의 역할을 한다. 하지만 이 바이러스게놈 복제 복합체가 어떻게 만들어지고 유지되는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 바이러스의 비구조 단백질들 중 특히 NS4B 단백질은 간세포 내에서 바이러스의 게놈복제에 꼭 필요한 다소포 구조 (multi-vesicular structure)인 세포막 거미줄 (membranous web)을 만드는데 가장 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 이 NS4B에 의해서 만들어진 세포막 거미줄이라는 구조는 바이러스게놈 복제 복합체를 만드는데 필요한 물리적인 구조를 제공한다고 믿어진다. 또한, NS5A 단백질은 바이러스게놈 복제 복합체를 다른 바이러스의 비구조 단백질들을 이용하여 조립하고, 만들어진 바이러스게놈을 지방 물방울 (lipid droplet)이라는 구조로 옮기고, 여기서 바이러스의 코어 단백질을 바이러스 게놈과 결합시킴으로써 실제적인 바이러스입자를 만드는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 바이러스의 비구조 단백질 간의 단백질 상호작용 (protein-protein interaction)은 바이러스 게놈 복제 복합체를 만드는데 결정적인 역할을 한다고 알려져 있지만 정확하게 분자 수준에서 어떤 역할을 하는지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않은 상태이다.

- [5] 바이러스성 질환을 치료할 수 있는 항바이러스제의 종류로는 항바이러스제의 작용 메커니즘에 따라 바이러스를 간접적으로 공격하는 항바이러스제(indirect-acting antivirals, IAAs)와 바이러스를 직접적으로 공격하는 항바이러스제 (direct-acting antivirals, DAAs)가 있다. 바이러스와 같은 병원성 외부 미생물이 체내 침투 시 체내에서 분비되는 인터페론 알파는 바이러스를 간접적으로 공격하는 대표적인 항바이러스성 내재면역 증강물질로서, 바이러스 자체를 공격하기보다는 바이러스가 기생하고 있는 숙주세포의 면역저항성을 높임으로써 바이러스 세포 내 증식을 차단하기 때문에, 여러 가지 다른 종류의 바이러스성 질환에 효과가 있고 바이러스가 기생하고 있는 숙주세포의 단백질의 기능을 조절하여 항바이러스 활성을 나타내므로, 내성과 저항성을 가지고 있는 돌연변이 바이러스가 생길 확률이 비교적 적다. 그러나 특정한 바이러스에 대해서만 항바이러스 활성을 나타낼 수 있는 항바이러스 특이성 (antiviral specificity)이 현저하게 떨어지기 때문에, 이를 극복하기 위해서 생체 내에서 자연스럽게 분비되는 인터페론의 양보다 훨씬 더 많은 양의 인터페론을

치료 목적으로 투여하게 되고, 따라서 자살충동, 우울증, 빈혈 등과 같은 심각한 부작용 및 독성이 나타나게 된다.

- [6] 한편, 바이러스를 직접적으로 공격하는 항바이러스제의 경우, 인터페론과 달리 바이러스의 생활사에서 꼭 필요한 바이러스 단백질들의 특수한 기능만을 선택적으로 저해함으로써 상대적으로 낮은 농도에서도 높은 항바이러스 활성을 나타낸다. 또한 바이러스를 간접적으로 공격하는 항바이러스제에 비해, 독성이 적고 안전성이 높은 것이 특징이다. 인간 면역 결핍 바이러스 (human immunodeficiency virus, HIV)의 역전사 효소 저해제 (reverse transcriptase inhibitor)와 단백질 분해 효소 저해제 (protease inhibitor)는 바이러스를 직접적으로 공격하는 대표적인 항바이러스제로서, 각각 바이러스의 생활사에서 필수적인 효소인 역전사 효소, 단백질 분해 효소를 저해하여 바이러스의 세포 내 증식을 억제한다. 그러나 바이러스가 돌연변이를 통해 항바이러스제의 타겟이 된 바이러스 단백질의 아미노산 서열을 변화시킴으로써 기존 항바이러스제에 대한 저항성 및 내성을 나타낼 수 있는 가능성이 상대적으로 크며, 특히 C형 간염 바이러스의 RNA 중합효소 (polymerase)는 RNA 게놈의 복제 시 잘못 들어간 핵산을 교정하는 기능을 하는 5'-3' 엔도뉴클레아제 (endonuclease) 활성이 없으므로, C형 간염 바이러스 게놈인 RNA가 복제되는 과정에서 쉽게 돌연변이 바이러스가 생기게 되어 바이러스를 직접적으로 공격하는 항바이러스제에 대해 저항성과 내성을 갖기가 쉽다.

- [7] 현재 C형 간염 치료제로 일반적으로 사용되고 있는 인터페론 알파 (interferon-alpha)와 리바비린 (ribavirin)은 각각 내재 면역 증진과 핵산 생합성 저해를 통해 바이러스를 간접적으로 공격하는 항바이러스제 (indirect-actingantivirals, IAAs)로서, 두 약물을 함께 병용하여도 52주 간의 정맥 주사 및 경구 투여를 통한 약물 투여 후 치료 성공률 (sustained virologic response, SVR)이 바이러스의 게놈형 (genotype)에 따라서는 50%에도 미치지 못하여 약효가 매우 낮을 뿐만 아니라, 자살 충동, 우울증, 빈혈과 같은 심각한 부작용 및 독성을 가지고 있어 많은 C형 간염 환자들이 중도에 치료를 포기하고 있는 실정이다. 따라서 상기와 같은 기존 C형 간염 바이러스에 대한 항바이러스 약물들을 대체할 수 있는 보다 효과적이면서도 안전한 약물 개발이 절실히 요구된다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 이량체를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 삼량체를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제의 선택적 저해

활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 사량체를 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 레스베라트롤(resveratrol) 다량체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

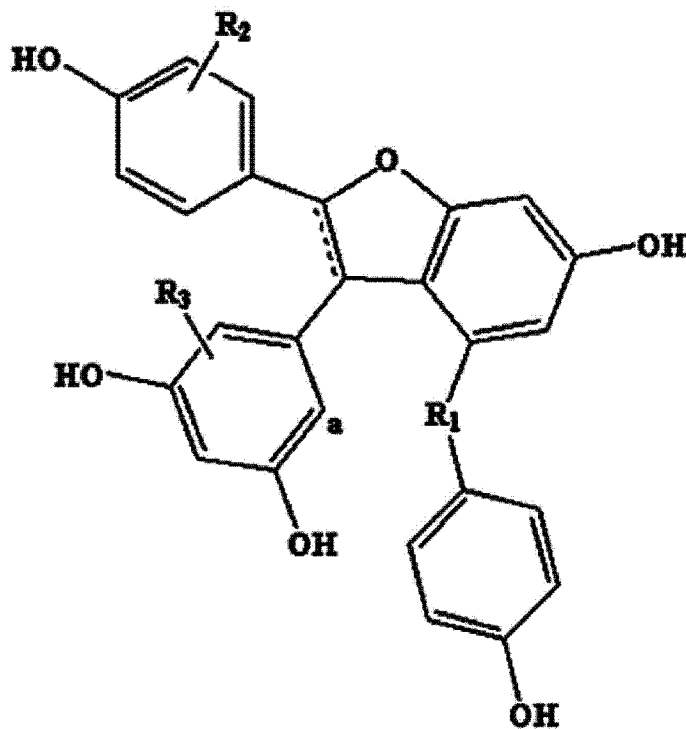
[12] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

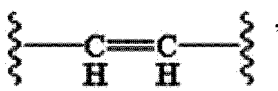
### 과제 해결 수단

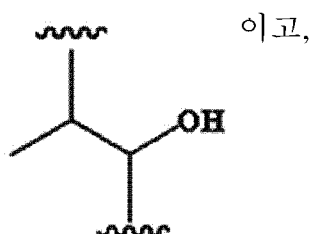
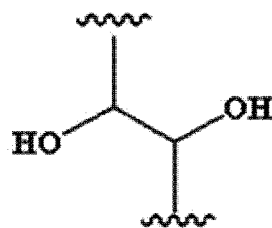
[13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 이량체를 제공한다.

[14] [화학식 1]

[15]



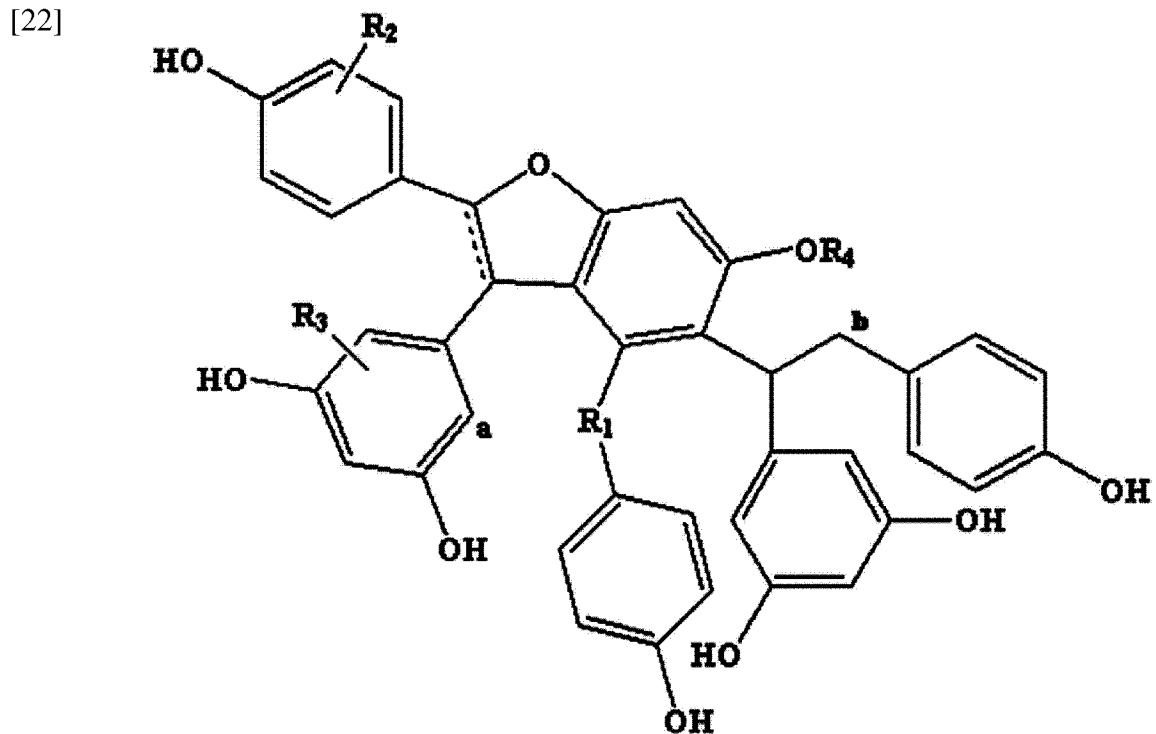
[16] 상기 식에서, R<sub>1</sub>은 , 또는

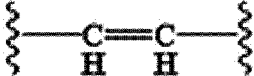


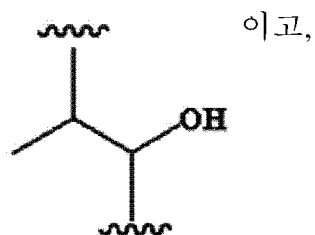
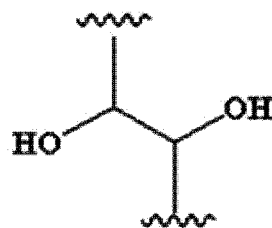
- [17]  $R_2, R_3$ 은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,  
 [18]  $R_1$ 의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,  
 [19] 는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

- [20] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 삼량체를 제공한다.

- [21] [화학식 2]



- [23] 상기 식에서,  $R_1$ 은 , 또는

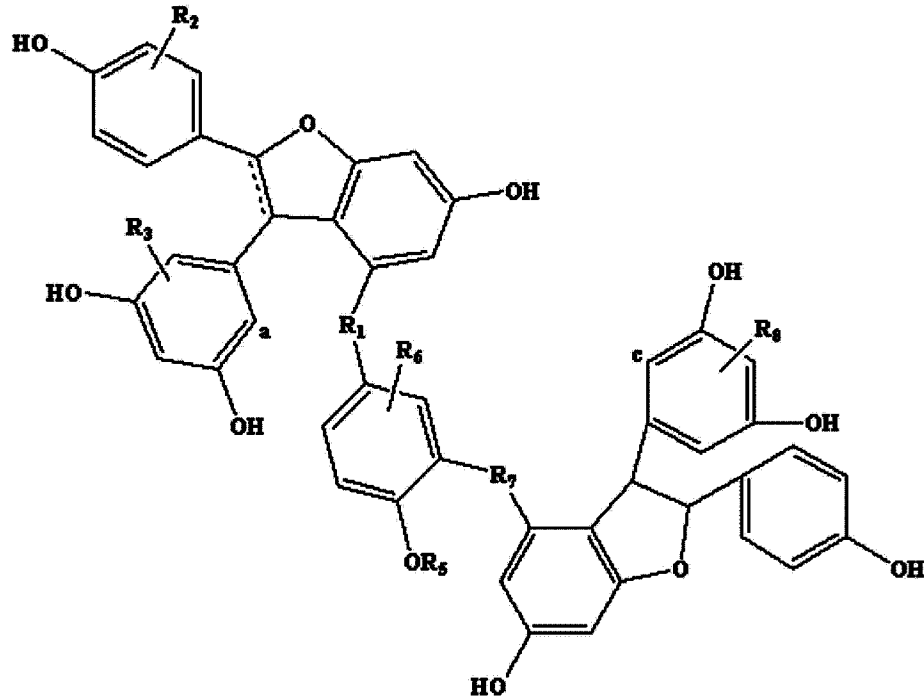


- [24]  $R_2, R_3$ 은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,  
 [25]  $R_4$ 는 H이며,  
 [26]  $R_1$ 의 탄소는 a 위치 및/또는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,

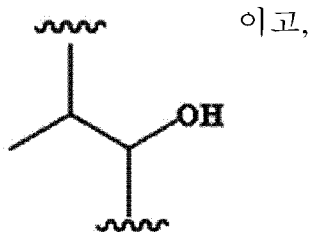
- [27]  $OR_4$ 는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,  
 [28] 는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.



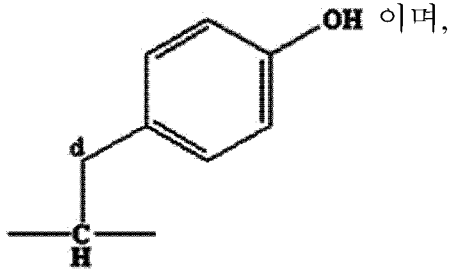
- [29] 더욱이, 본 발명은 하기 화학식 3으로 표시되는 C형 간염 바이러스의 게놈  
 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 사량체를 제공한다.  
 [30] [화학식 3]  
 [31]



- [32] 상기 식에서,  $R_1$ 은  $\begin{array}{c} \text{---} \text{C}=\text{C} \text{---} \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ , 또는  $\begin{array}{c} \text{---} \\ | \\ \text{HO} \text{---} \text{C} \text{---} \text{C} \text{---} \text{OH} \\ | \\ \text{---} \end{array}$



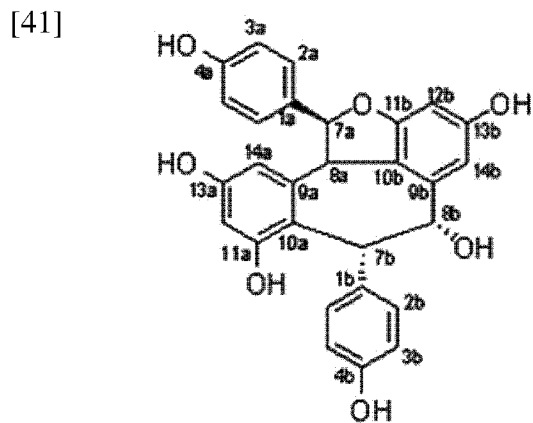
- [33]  $R_2, R_3, R_6, R_8$ 은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이며,  
 [34]  $R_5$ 는 H이고,  
 [35]



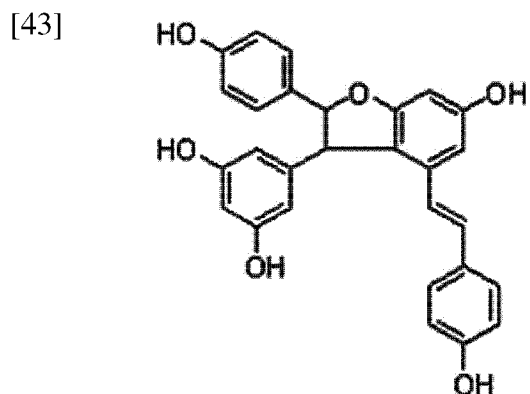
- [36]  $R_1$ 의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,  
 [37]  $R_7$ 의 d 위치의 탄소는  $OR_5$ 와 결합하여 5원환을 형성하거나, c 위치의 탄소와 결합하여 7원환을 형성할 수 있으며,  
 [38] 는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

- [39] 본 발명의 일 구현예로, 상기 레스베라트롤(resveratrol) 이량체는 하기 화학식 4 내지 화학식 10으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[40] [화학식 4]

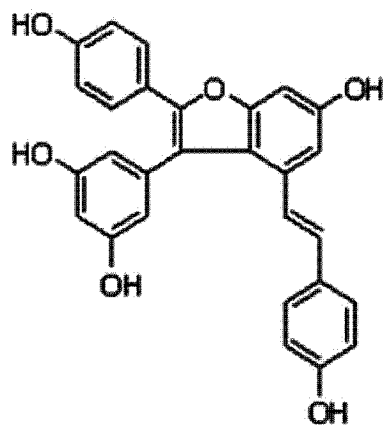


[42] [화학식 5]



[44] [화학식 6]

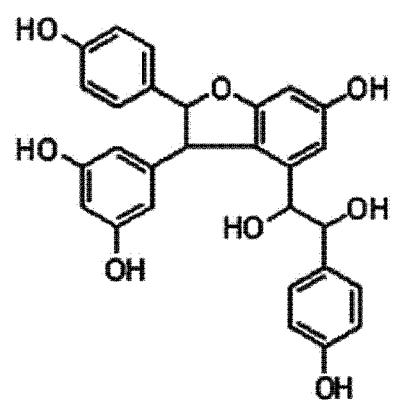
[45]



[46]

[화학식 7]

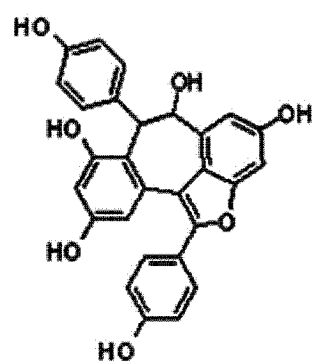
[47]



[48]

[화학식 8]

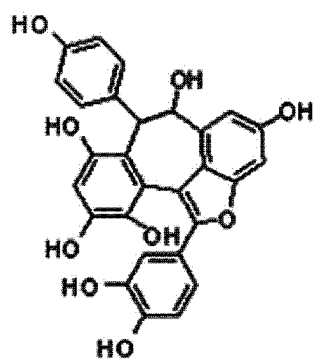
[49]



[50]

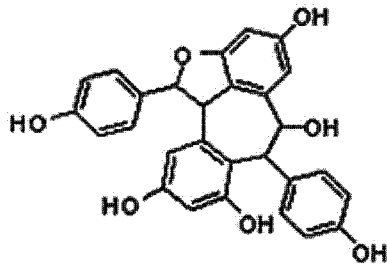
[화학식 9]

[51]



[52] [화학식 10]

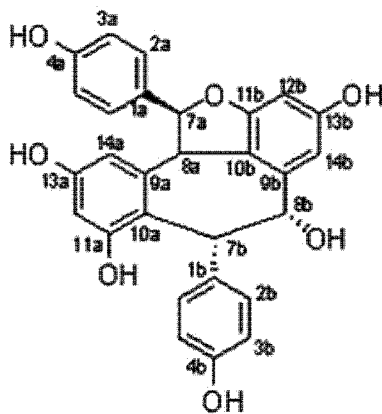
[53]



[54] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 레스베라트롤(resveratrol) 이량체는 하기 화학식 4 또는 화학식 5로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 한다.

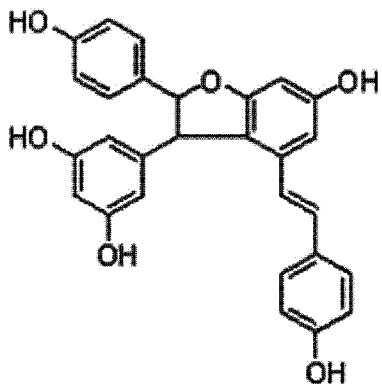
[55] [화학식 4]

[56]



[57] [화학식 5]

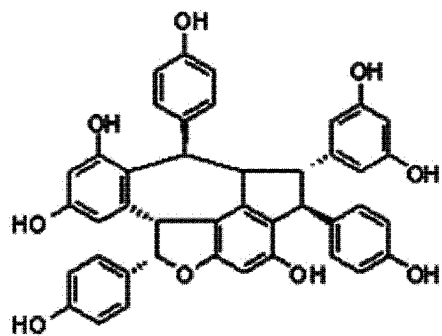
[58]



[59] 본 발명의 일 구현예로, 상기 레스베라트롤(resveratrol) 삼량체는 하기 화학식 11 내지 화학식 17로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[60] [화학식 11]

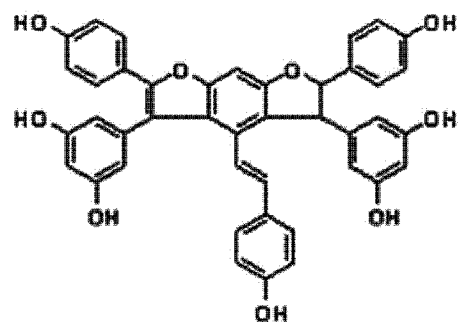
[61]



[62]

[화학식 12]

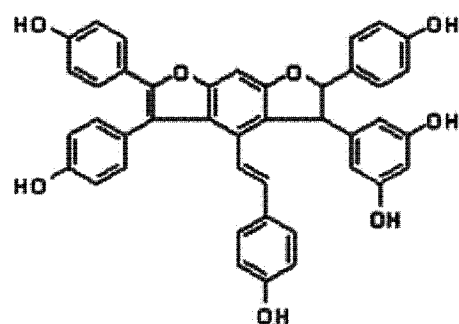
[63]



[64]

[화학식 13]

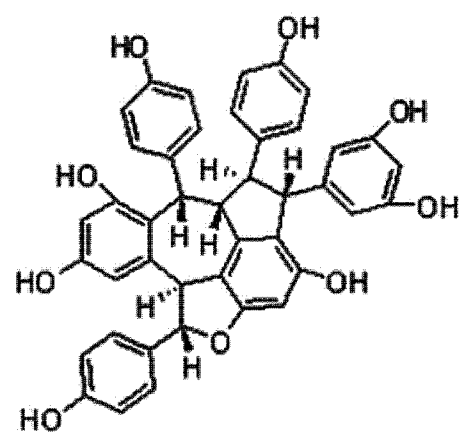
[65]



[66]

[화학식 14]

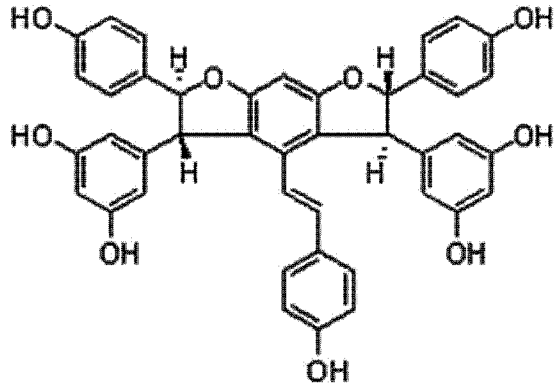
[67]



[68]

[화학식 15]

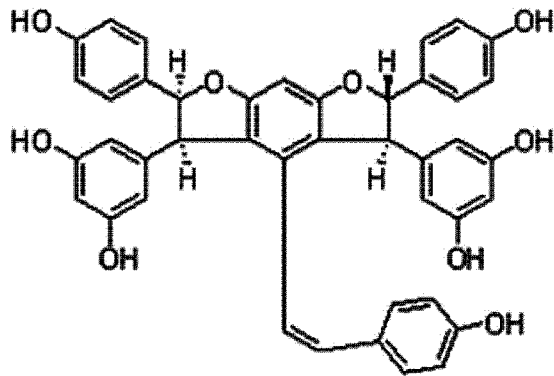
[69]



[70]

[화학식 16]

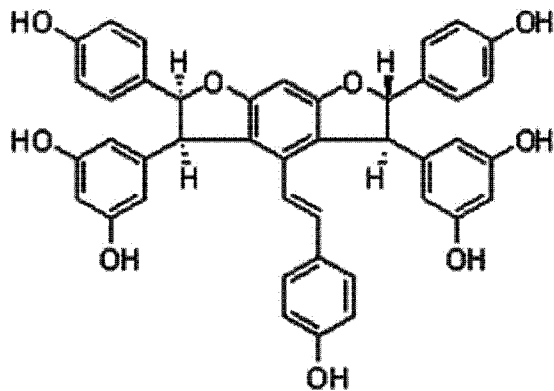
[71]



[72]

[화학식 17]

[73]



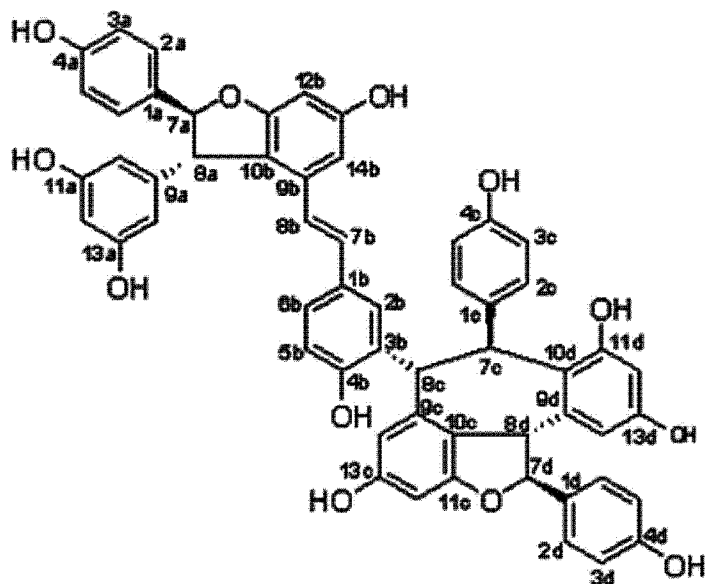
[74]

본 발명의 일 구현예로, 상기 레스베라트롤(resveratrol) 사량체는 하기 화학식 18 내지 화학식 26으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[75]

[화학식 18]

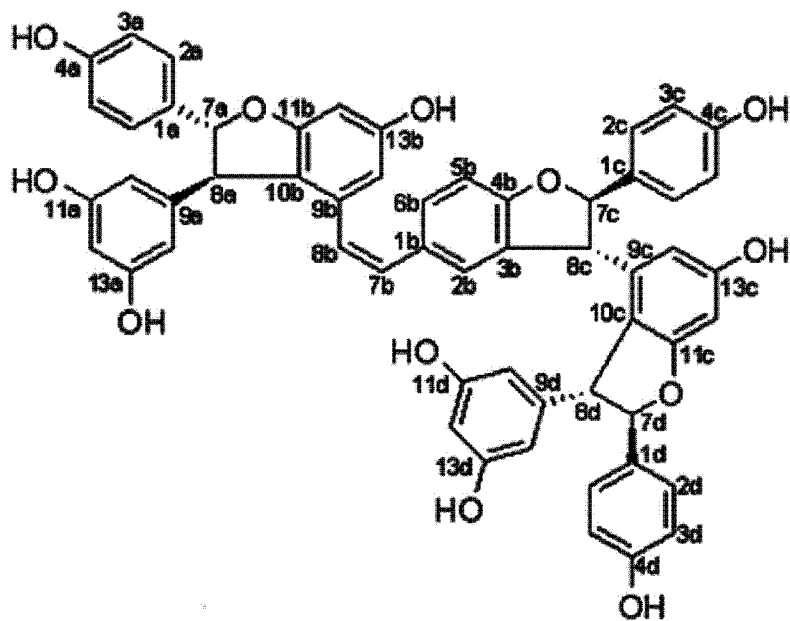
[76]



[77]

[화학식 19]

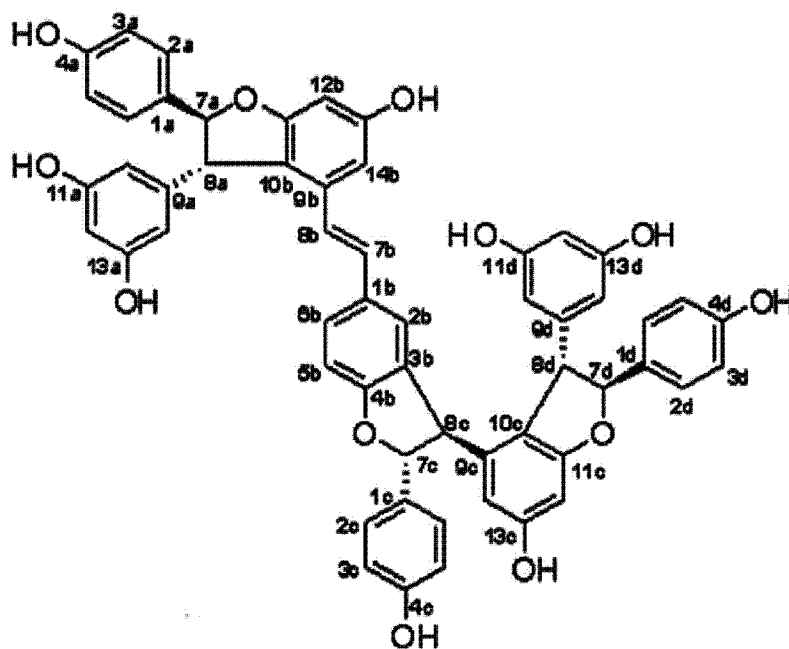
[78]



[79]

[화학식 20]

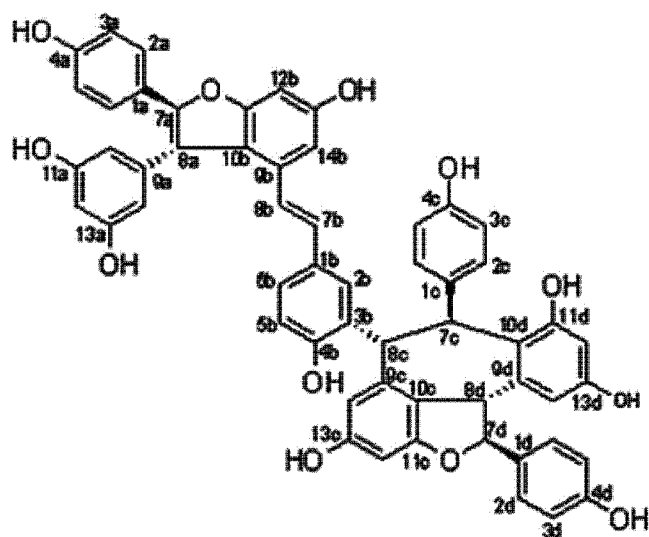
[80]



[81]

[화학식 21]

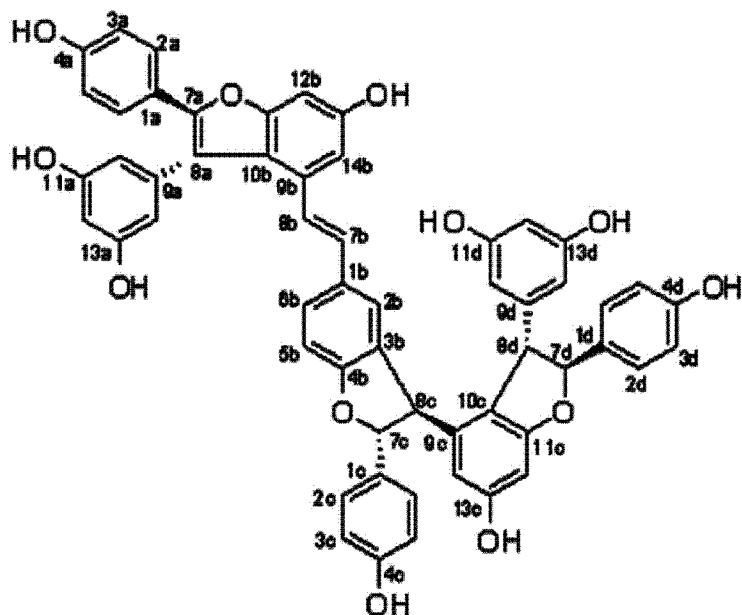
[82]



[83]

[화학식 22]

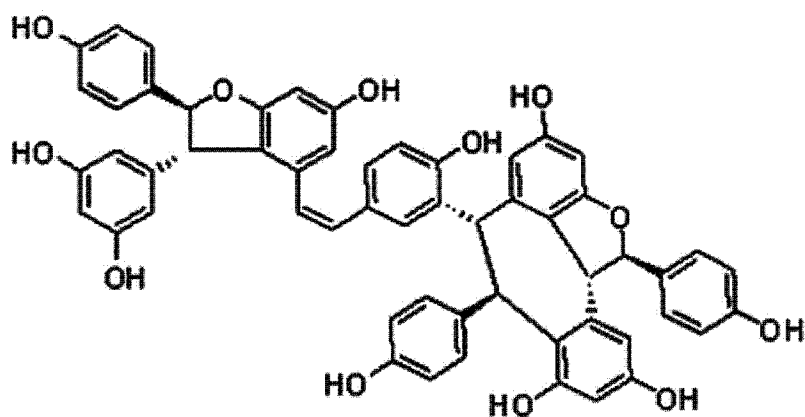
[84]



[85]

[화학식 23]

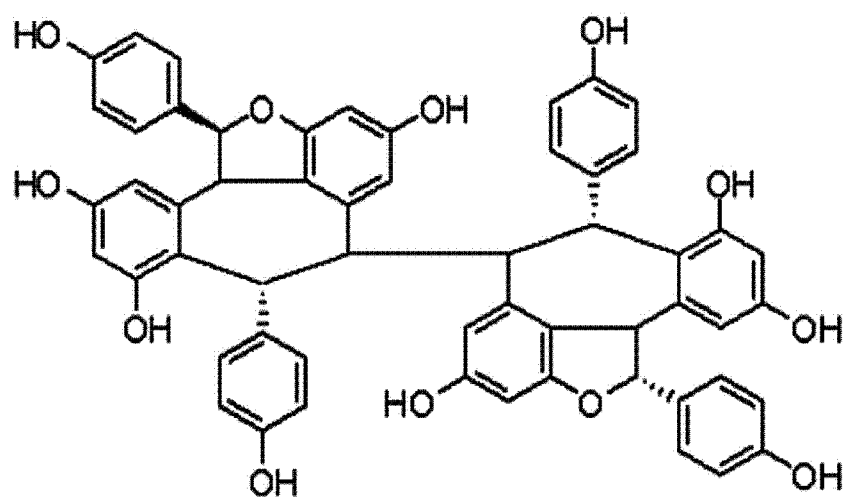
[86]



[87]

[화학식 24]

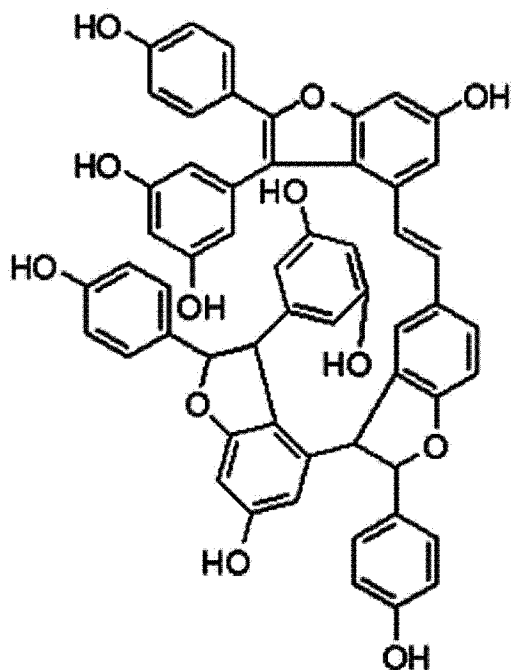
[88]



[89]

[화학식 25]

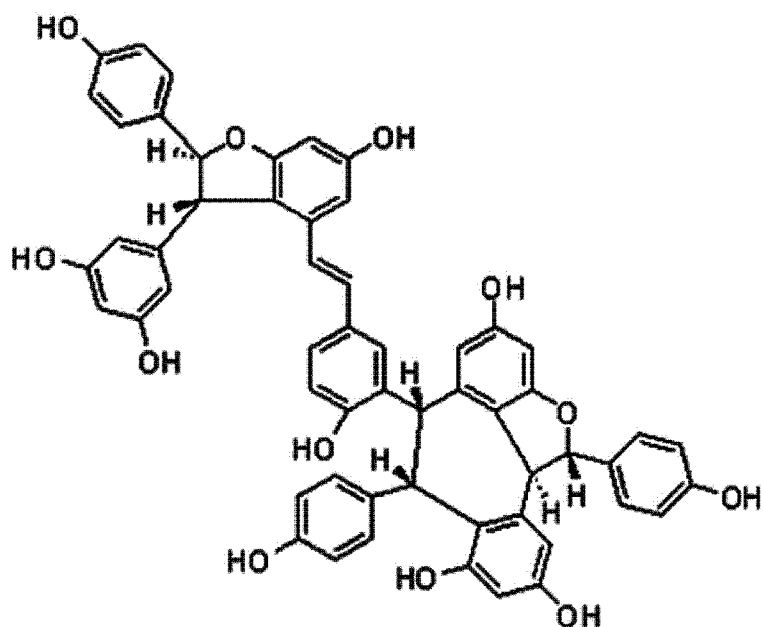
[90]



[91]

[화학식 26]

[92]



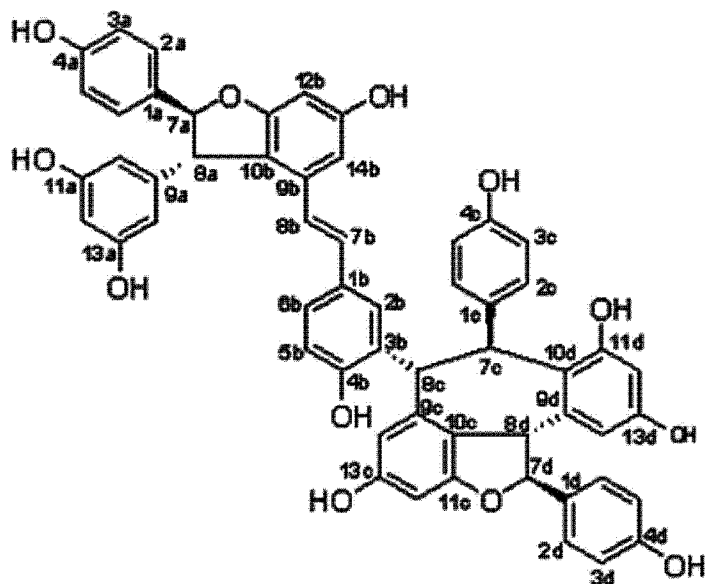
[93]

본 발명의 다른 구현예로, 상기 레스베라트롤(resveratrol) 사량체는 하기 화학식 18 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

[94]

[화학식 18]

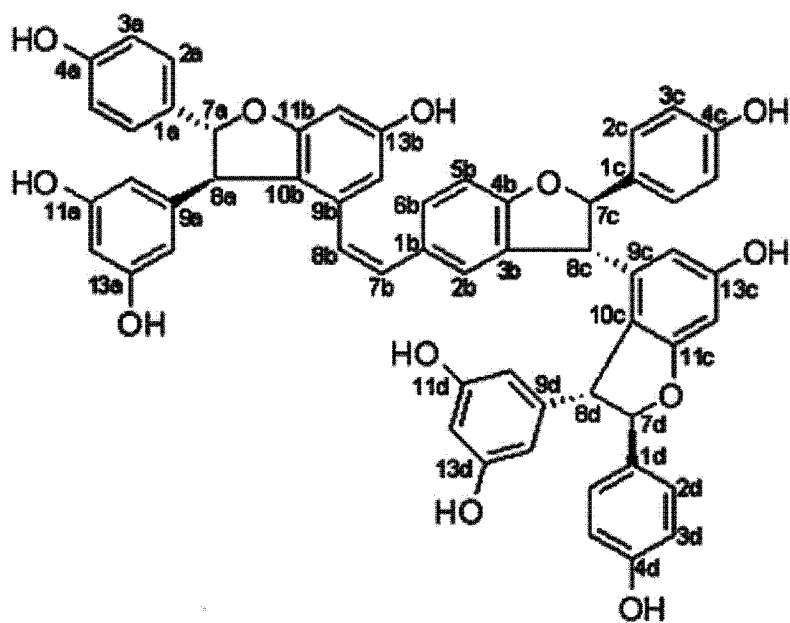
[95]



[96]

[화학식 19]

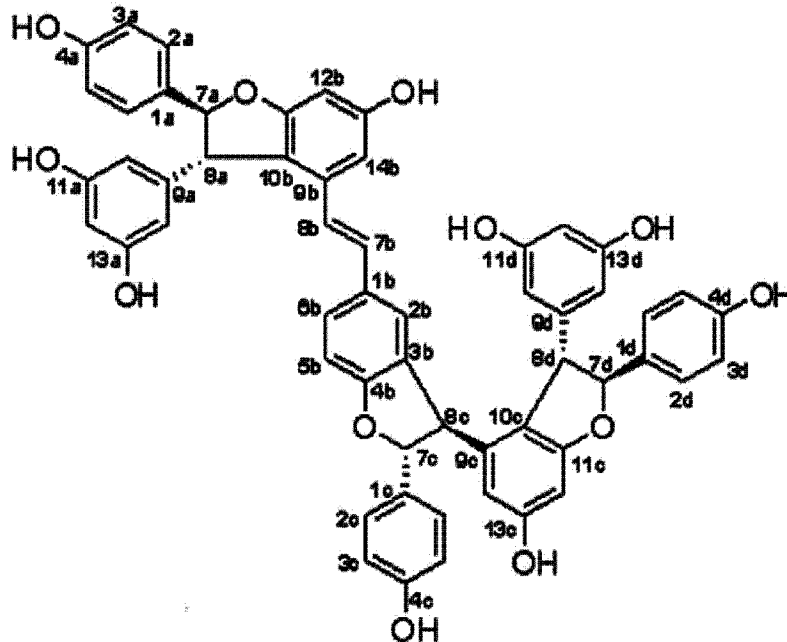
[97]



[98]

[화학식 20]

[99]



- [100] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [101] 본 발명의 일 구현예로, 상기 레스베라트롤(resveratrol) 다량체는 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [102] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 C형 간염 치료방법을 제공한다.
- [103] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 C형 간염의 예방 또는 치료에 이용하는 방법을 제공한다.
- [104] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 C형 간염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [105] 본 발명에 따른 레스베라트롤(resveratrol) 다량체는 간세포에 대한 독성이 매우 낮으면서도, C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 선택적으로 저해하는 우수한 효과를 가지고 있어, C형 간염을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물의 활성성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

- [106] 도 1은 Ampelopsin A의 <sup>1</sup>H-NMR 결과를 나타낸 도이다.
- [107] 도 2는 Ampelopsin A의 <sup>13</sup>C-NMR 결과를 나타낸 도이다.

- [108] 도 3은 (+)- $\epsilon$ -viniferin의  $^1\text{H}$ -NMR 결과를 나타낸 도이다.
- [109] 도 4는 (+)- $\epsilon$ -viniferin의  $^{13}\text{C}$ -NMR 결과를 나타낸 도이다.
- [110] 도 5는 vitisin A의  $^1\text{H}$ -NMR 결과를 나타낸 도이다.
- [111] 도 6은 vitisin A의  $^{13}\text{C}$ -NMR 결과를 나타낸 도이다.
- [112] 도 7은 wilsonol C의  $^1\text{H}$ -NMR 결과를 나타낸 도이다.
- [113] 도 8은 wilsonol C의  $^{13}\text{C}$ -NMR 결과를 나타낸 도이다.
- [114] 도 9는 vitisin B의  $^1\text{H}$ -NMR 결과를 나타낸 도이다.
- [115] 도 10은 vitisin B의  $^{13}\text{C}$ -NMR 결과를 나타낸 도이다.
- [116] 도 11은 실시예 1에서 분리 동정된 화합물 1 내지 화합물 5의 구조를 나타낸 도이다.
- [117] 도 12는 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 측정하기 위해 사용된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스의 게놈 구조와 바이러스 게놈 복제 저해제 발견의 원리를 설명한 도이다.
- [118] 도 13은 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 350개의 생약 추출물 라이브러리를 스크리닝한 결과 HCV 바이러스의 게놈 복제를 선택적으로 저해하면서 간세포에 독성을 나타내지 않는 포도근 추출물을 발견한 결과를 나타낸 도이다.
- [119] 도 14는 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 ethyl acetate, butanol, ethanol, hexane, 그리고 물로 추출한 추출 분획의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정한 결과를 나타낸 도이다(원형: 세포생존율, 사각형: HCV 게놈복제율,  $\text{EC}_{50}$ : half maximal effective concentration).
- [120] 도 15는 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 ethyl acetate (EA) 추출물을 분획하여 얻은 EA-A, EA-B, EA-C, EA-D, EA-E, EA-F의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 0.1, 1, 그리고 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 측정한 결과를 나타낸 도이다(파란색: 세포생존율, 빨간색: HCV 게놈복제율).
- [121] 도 16은 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 ethyl acetate (EA) 추출물을 분획하여 얻은 EA-B와 EA-C의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정한 결과를 나타낸 도이다(파란색: 세포생존율, 빨간색: HCV 게놈복제율,  $\text{EC}_{50}$ : half maximal effective concentration).
- [122] 도 17은 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 EA-B 추출물을 분획하여 얻은 EA-Ba, EA-Bb, EA-Bc, EA-Bd, EA-Be, EA-Bf, EA-Bg, EA-Bh의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 측정한 결과를 나타낸 도이다(파란색: 세포생존율, 빨간색: HCV 게놈복제율).
- [123] 도 18은 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터

바이러스를 이용해 포도근의 EA-B 추출물을 분획하여 얻은 EA-Bd, EA-Be, EA-Bg, EA-Bh의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정한 결과를 나타낸 도이다(파란색: 세포생존율, 빨간색: HCV 게놈복제율, EC<sub>50</sub>: half maximal effective concentration).

- [124] 도 19는 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Ampelopsin A의 구조와 Ampelopsin A의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정한 결과를 나타낸 도이다(원형: 세포생존율, 사각형: HCV 게놈복제율, EC<sub>50</sub>: half maximal effective concentration, CC<sub>50</sub>: half maximal cytotoxic concentration 50).
- [125] 도 20은 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물  $\epsilon$ -viniferin의 구조와  $\epsilon$ -viniferin의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정한 결과를 나타낸 도이다(원형: 세포생존율, 사각형: HCV 게놈복제율, EC<sub>50</sub>: half maximal effective concentration, CC<sub>50</sub>: half maximal cytotoxic concentration 50).
- [126] 도 21은 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Wilsonol C의 구조와 Wilsonol C의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정한 결과를 나타낸 도이다(원형: 세포생존율, 사각형: HCV 게놈복제율, EC<sub>50</sub>: half maximal effective concentration, CC<sub>50</sub>: half maximal cytotoxic concentration 50).
- [127] 도 22는 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin A의 구조와 Vitisin A의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정한 결과를 나타낸 도이다(원형: 세포생존율, 사각형: HCV 게놈복제율, EC<sub>50</sub>: half maximal effective concentration, CC<sub>50</sub>: half maximal cytotoxic concentration 50).
- [128] 도 23은 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B의 구조와 Vitisin B의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정한 결과를 나타낸 도이다(원형: 세포생존율, 사각형: HCV 게놈복제율, EC<sub>50</sub>: half maximal effective concentration, CC<sub>50</sub>: half maximal cytotoxic concentration 50).
- [129] 도 24는 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 이용해 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 500 nM의 농도에서 72시간 동안 측정한 결과를

나타낸 도이다(원형: 세포생존율, 사각형: HCV 게놈복제율,  $EC_{50}$ : half maximal effective concentration,  $CC_{50}$ : half maximal cytotoxic concentration 50)(동그라미: 세포생존율, 네모: HCV 게놈복제율,  $T_{1/2}$ : 바이러스의 RNA양이 반으로 떨어지는데 걸리는 시간).

- [130] 도 25는 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 발현을 측정하기 위해 사용된 HCV 서브지노믹 레플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I (genotype 1b)의 게놈 구조를 나타낸 도이다.
- [131] 도 26은 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 발현을 측정하기 위해 사용된 HCV 풀지노믹 레플리콘 (full genomic replicon) J6/JFH1 (genotype 2a)의 게놈 구조를 나타낸 도이다.
- [132] 도 27은 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B의 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제에 미치는 영향을 HCV 서브지노믹 리플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I의 게놈의 real time PCR 정량법을 사용하여 나타낸 도이다( $EC_{50}$ : half maximal effective concentration).
- [133] 도 28은 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B이 처리 시간이 경과함에 따라 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제에 미치는 영향을 HCV 서브지노믹 리플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I의 게놈의 real time PCR 정량법을 사용하여 나타낸 도이다( $T_{1/2}$ : 바이러스의 RNA양이 반으로 떨어지는데 걸리는 시간).
- [134] 도 29는 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B이 약물의 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제에 미치는 영향을 HCV 풀지노믹 리플리콘 (full genomic replicon) J6/JFH1 (genotype 2a)의 real time PCR 정량법을 사용하여 나타낸 도이다( $EC_{50}$ : half maximal effective concentration).
- [135] 도 30은 C형 간염 바이러스의 단백질 발현을 측정하기 위해 사용된 서브지노믹 리플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I-NS5A-GFP HCV (genotype 1b) 리포터 바이러스의 게놈 구조를 나타낸 도이다.
- [136] 도 31은 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B가 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 29에서 설명한 GFP가 tagging된 서브지노믹 리플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I-NS5A-GFP이 들어간 간세포에서 발현하는 녹색 형광의 양을 FACS (fluorescence assorted cell sorter)를 사용해서 측정한 결과를 나타낸 도이다( $EC_{50}$ : half maximal effective concentration).
- [137] 도 32는 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B가 500 nM에서 처리한

시간이 경과함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 29에서 설명한 GFP가 tagging된 서브지노믹 리플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I-NS5A-GFP이 들어간 간세포에서 발현하는 녹색 형광의 양을 FACS (fluorescence assorted cell sorter)를 사용해서 측정한 결과를 나타낸 도이다( $T_{1/2}$ : 바이러스의 RNA양이 반으로 떨어지는데 걸리는 시간).

[138] 도 33은 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B의 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 18에서 설명한 HCV 서브지노믹 리플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I의 게놈에서 발현되는 NS5A 단백질의 양과 간세포의 control 단백질인 beta actin 단백질을 western blot을 사용해서 측정한 결과를 나타낸 도이다( $EC_{50}$ : half maximal effective concentration).

[139] 도 34는 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B를 500 nM의 농도에서 처리한 시간이 경과함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 18에서 설명한 HCV 서브지노믹 리플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I의 게놈에서 발현되는 NS5A 단백질의 양과 간세포의 control 단백질인 beta actin 단백질을 western blot을 사용해서 측정한 결과를 나타낸 도이다( $T_{1/2}$ : 바이러스의 RNA양이 반으로 떨어지는데 걸리는 시간).

[140] 도 35는 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B의 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 25에서 설명한 HCV 풀지노믹 리플리콘 (full genomic replicon) J6/JFH1 (genotype 2a) 게놈에서 발현되는 core 단백질의 양과 간세포의 control 단백질인 beta actin 단백질을 western blot을 사용해서 측정한 결과를 나타낸 도이다( $EC_{50}$ : half maximal effective concentration).

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[141] 본 발명자들은, 신규한 C형 간염 치료제를 개발하기 위한 노력을 계속한 결과, 천연물 추출물 라이브러리에서 포도근 추출물이 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 선택적으로 저해하는 우수한 효과가 있음을 확인하고 이 포도근 추출물에서 동정한 일련의 레스베라트롤(resveratrol) 중합체인 올리고스틸벤 화합물들이 C형 간염 바이러스의 게놈복제를 매우 낮은 농도에서 선택적으로 저해하는 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[142]

[143] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

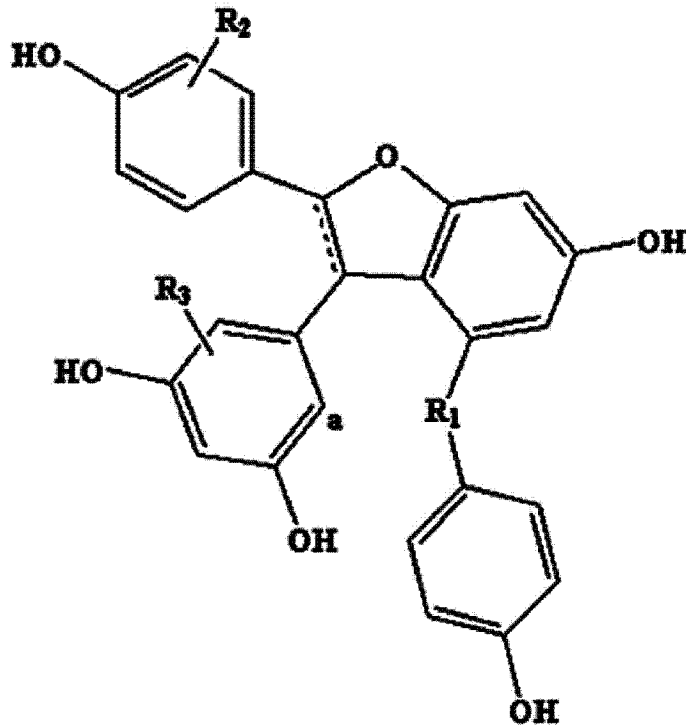
[144]

[145] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제의

선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 이량체를 제공한다.

[146] [화학식 1]

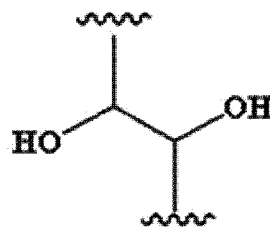
[147]



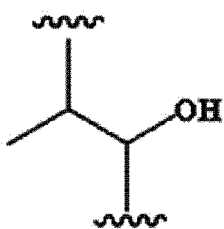
[148] 상기 식에서, R<sub>1</sub>은



또는



이고,



[149] R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,

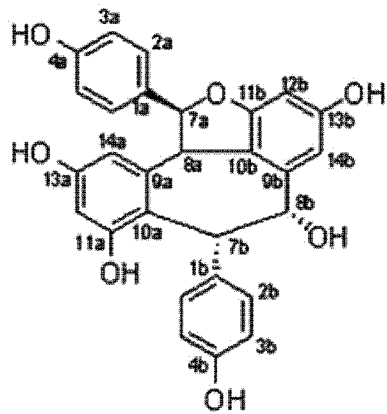
[150] R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,

[151]       는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

[152] 본 발명의 레스베라트롤(resveratrol) 이량체의 바람직한 구현예로는 이에 제한되지는 않으나, 하기 화학식 4 내지 화학식 10으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 화학식 4 또는 화학식 5로 표시되는 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

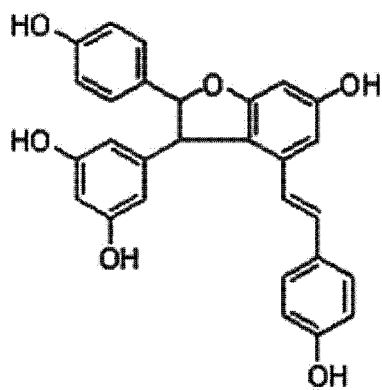
[153] [화학식 4]

[154]



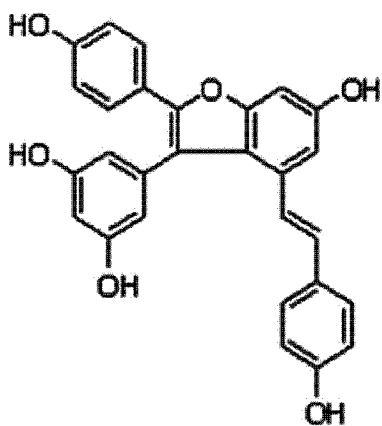
[155] [화학식 5]

[156]



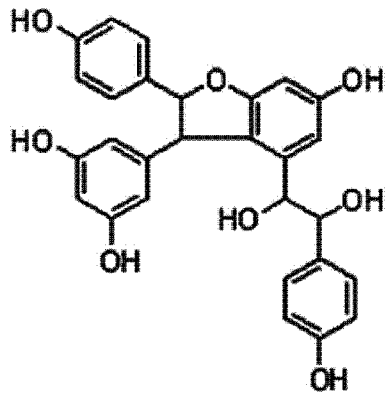
[157] [화학식 6]

[158]



[159] [화학식 7]

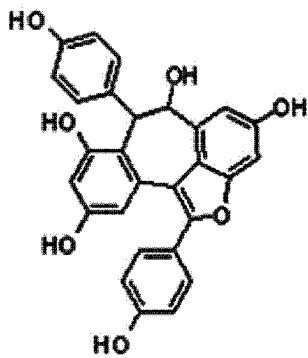
[160]



[161]

[화학식 8]

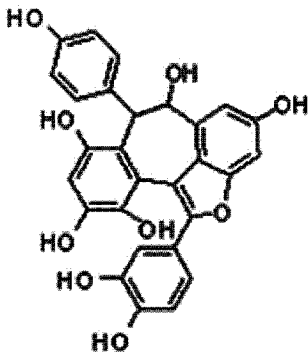
[162]



[163]

[화학식 9]

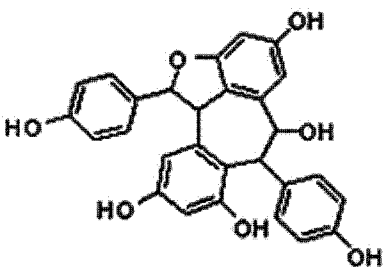
[164]



[165]

[화학식 10]

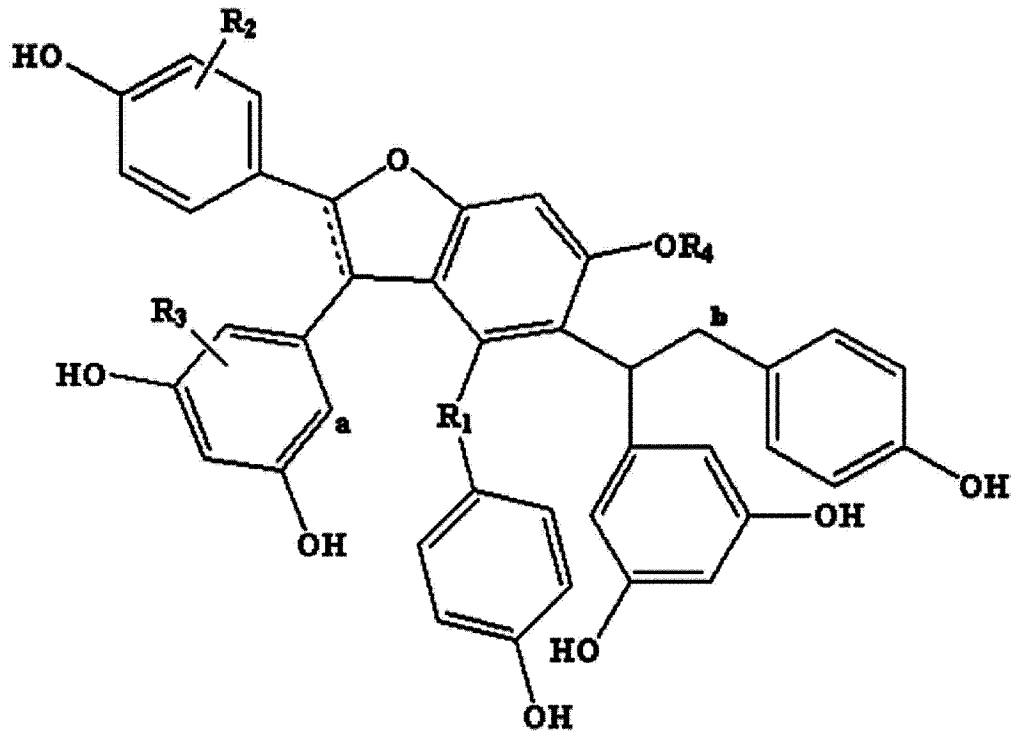
[166]



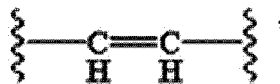
[167] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 삼량체를 제공한다.

[168] [화학식 2]

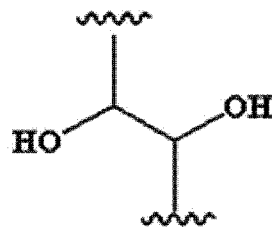
[169]



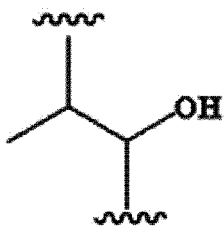
[170]

상기 식에서, R<sub>1</sub>은

또는



이고,



[171]

R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,

[172]

R<sub>4</sub>는 H이며,

[173]

R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치 및/또는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,

[174]

OR<sub>4</sub>는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,

[175]



는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

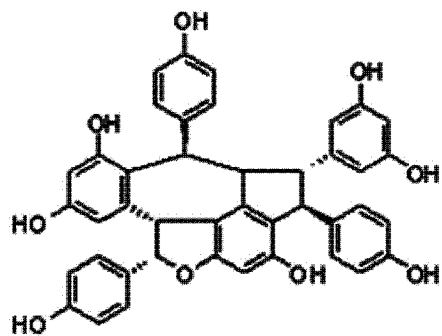
[176]

본 발명의 레스베라트롤(resveratrol) 삼량체의 바람직한 구현예로는 이에 제한되지는 않으나, 하기 화학식 11 내지 화학식 17로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[177]

[화학식 11]

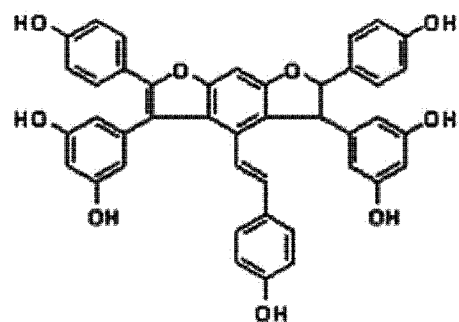
[178]



[179]

[화학식 12]

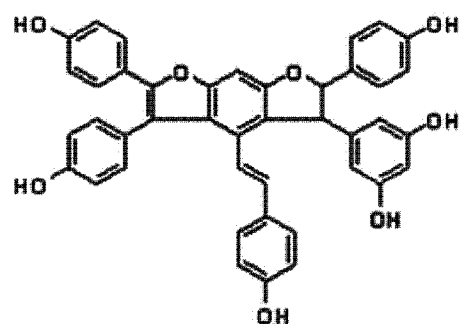
[180]



[181]

[화학식 13]

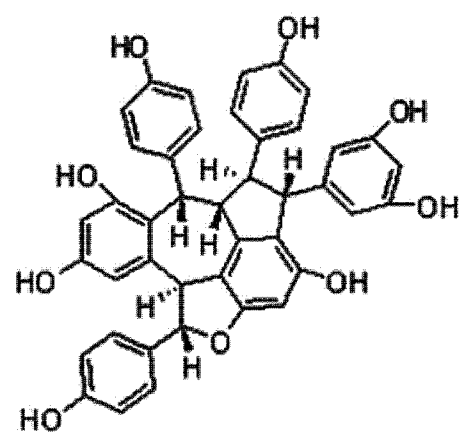
[182]



[183]

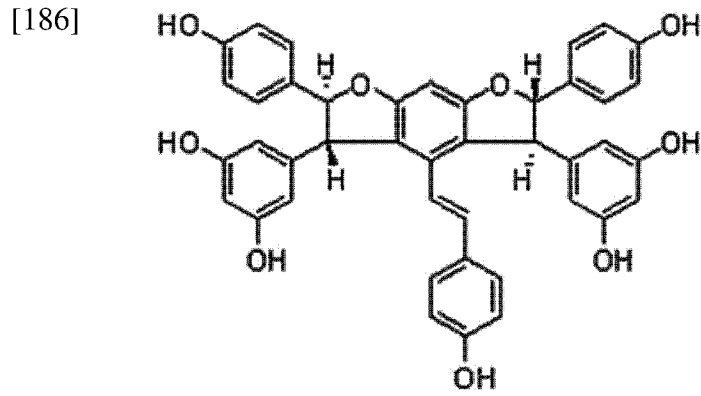
[화학식 14]

[184]

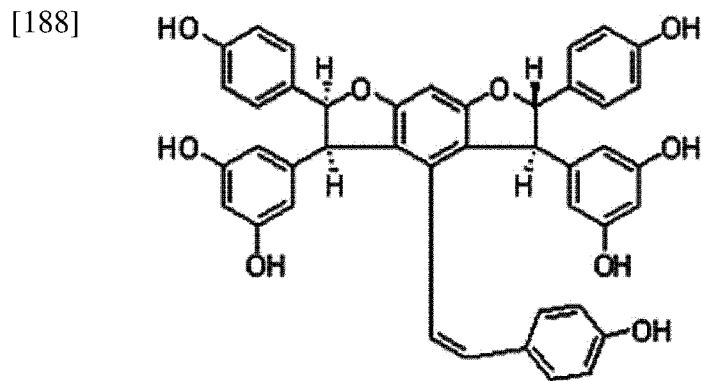


[185]

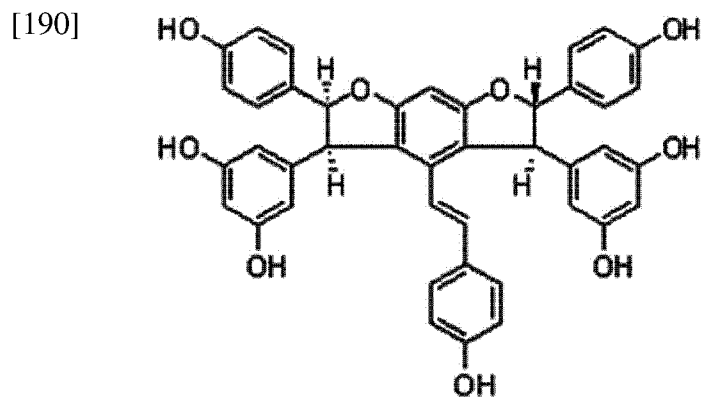
[화학식 15]



[187] [화학식 16]



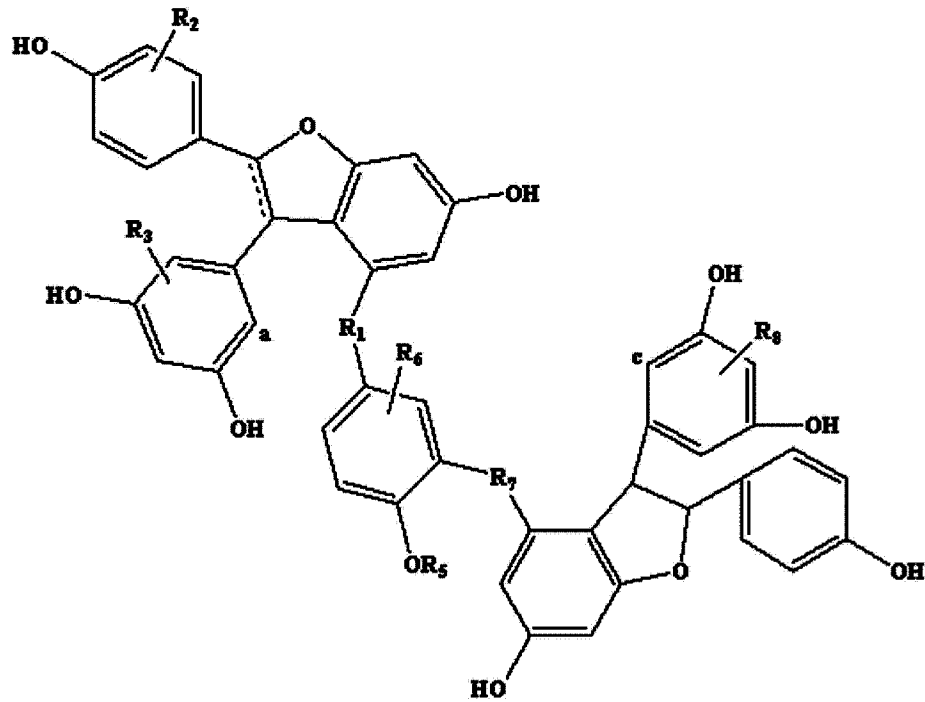
[189] [화학식 17]



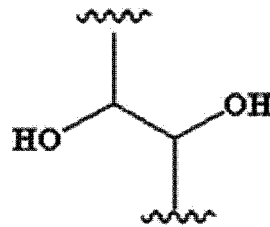
[191] 더욱이, 본 발명은 하기 화학식 3으로 표시되는 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 사량체를 제공한다.

[192] [화학식 3]

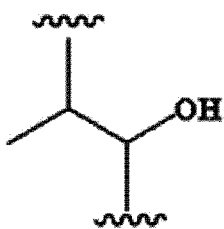
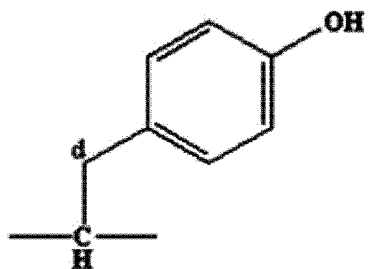
[193]

[194] 상기 식에서, R<sub>1</sub>은

또는



이고,

[195] R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이며,[196] R<sub>5</sub>는 H이고,[197] R<sub>7</sub>은[198] R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,[199] R<sub>7</sub>의 d 위치의 탄소는 OR<sub>5</sub>와 결합하여 5원환을 형성하거나, c 위치의 탄소와

결합하여 7원환을 형성할 수 있으며,

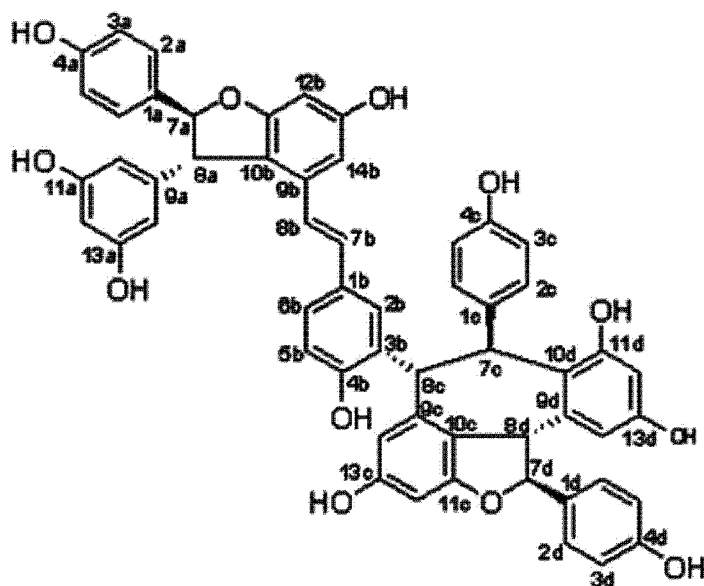
[200] 는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.



[201] 본 발명의 레스베라트롤(resveratrol) 사량체의 바람직한 구현예로는 이에 제한되지는 않으나, 하기 화학식 18 내지 화학식 26으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 화학식 18 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[202] [화학식 18]

[203]



The chemical structure is a complex polycyclic molecule featuring several fused and linked rings, including benzene and furan rings. It is heavily substituted with hydroxyl (-OH) groups. The atoms are numbered with lowercase letters (a, b, c, d) to indicate specific positions. Key features include:

- A central furan ring system with multiple hydroxyl groups (e.g., 12b, 14b, 13a, 13c, 14c).
- Several phenyl rings attached via ether linkages (e.g., 1a, 11a, 11d, 13d, 1c, 4c).
- Multiple hydroxyl groups are present, some at ortho positions (e.g., 3a, 4a, 11a, 13a, 11d, 13d, 4c, 14c) and others at para positions (e.g., 12b, 14b, 13c, 14c).
- The structure is highly symmetrical in some parts, with repeating units indicated by the numbering scheme.

[화학식 22]

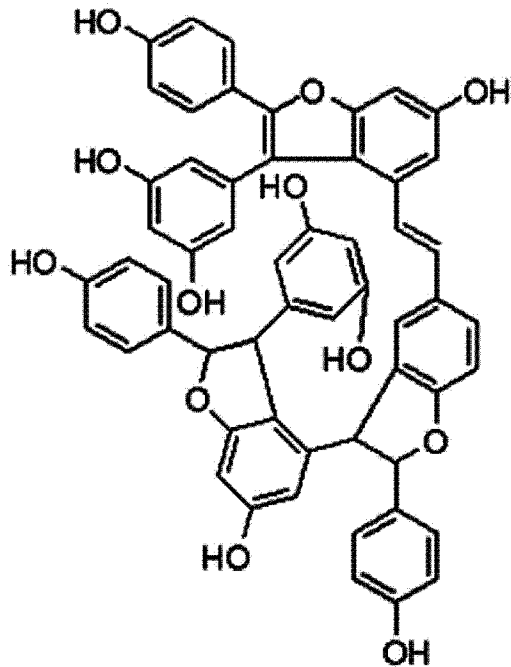
The chemical structure is a complex polycyclic molecule featuring several fused and linked rings, including benzene, furan, and pyran. It is heavily substituted with hydroxyl (-OH) groups. The atoms are labeled with letters and numbers (e.g., 1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a, 9a, 10a, 11a, 12a, 13a, 14a, 15a, 16a, 17a, 18a, 19a, 20a, 21a, 22a, 23a, 24a, 25a, 26a, 27a, 28a, 29a, 30a, 31a, 32a, 33a, 34a, 35a, 36a, 37a, 38a, 39a, 40a, 41a, 42a, 43a, 44a, 45a, 46a, 47a, 48a, 49a, 50a, 51a, 52a, 53a, 54a, 55a, 56a, 57a, 58a, 59a, 60a, 61a, 62a, 63a, 64a, 65a, 66a, 67a, 68a, 69a, 70a, 71a, 72a, 73a, 74a, 75a, 76a, 77a, 78a, 79a, 80a, 81a, 82a, 83a, 84a, 85a, 86a, 87a, 88a, 89a, 90a, 91a, 92a, 93a, 94a, 95a, 96a, 97a, 98a, 99a, 100a, 101a, 102a, 103a, 104a, 105a, 106a, 107a, 108a, 109a, 110a, 111a, 112a, 113a, 114a, 115a, 116a, 117a, 118a, 119a, 120a, 121a, 122a, 123a, 124a, 125a, 126a, 127a, 128a, 129a, 130a, 131a, 132a, 133a, 134a, 135a, 136a, 137a, 138a, 139a, 140a, 141a, 142a, 143a, 144a, 145a, 146a, 147a, 148a, 149a, 150a, 151a, 152a, 153a, 154a, 155a, 156a, 157a, 158a, 159a, 160a, 161a, 162a, 163a, 164a, 165a, 166a, 167a, 168a, 169a, 170a, 171a, 172a, 173a, 174a, 175a, 176a, 177a, 178a, 179a, 180a, 181a, 182a, 183a, 184a, 185a, 186a, 187a, 188a, 189a, 190a, 191a, 192a, 193a, 194a, 195a, 196a, 197a, 198a, 199a, 200a, 201a, 202a, 203a, 204a, 205a, 206a, 207a, 208a, 209a, 210a, 211a, 212a, 213a, 214a, 215a, 216a, 217a, 218a, 219a, 220a, 221a, 222a, 223a, 224a, 225a, 226a, 227a, 228a, 229a, 230a, 231a, 232a, 233a, 234a, 235a, 236a, 237a, 238a, 239a, 240a, 241a, 242a, 243a, 244a, 245a, 246a, 247a, 248a, 249a, 250a, 251a, 252a, 253a, 254a, 255a, 256a, 257a, 258a, 259a, 260a, 261a, 262a, 263a, 264a, 265a, 266a, 267a, 268a, 269a, 270a, 271a, 272a, 273a, 274a, 275a, 276a, 277a, 278a, 279a, 280a, 281a, 282a, 283a, 284a, 285a, 286a, 287a, 288a, 289a, 290a, 291a, 292a, 293a, 294a, 295a, 296a, 297a, 298a, 299a, 300a, 301a, 302a, 303a, 304a, 305a, 306a, 307a, 308a, 309a, 310a, 311a, 312a, 313a, 314a, 315a, 316a, 317a, 318a, 319a, 320a, 321a, 322a, 323a, 324a, 325a, 326a, 327a, 328a, 329a, 330a, 331a, 332a, 333a, 334a, 335a, 336a, 337a, 338a, 339a, 340a, 341a, 342a, 343a, 344a, 345a, 346a, 347a, 348a, 349a, 350a, 351a, 352a, 353a, 354a, 355a, 356a, 357a, 358a, 359a, 360a, 361a, 362a, 363a, 364a, 365a, 366a, 367a, 368a, 369a, 370a, 371a, 372a, 373a, 374a, 375a, 376a, 377a, 378a, 379a, 380a, 381a, 382a, 383a, 384a, 385a, 386a, 387a, 388a, 389a, 390a, 391a, 392a, 393a, 394a, 395a, 396a, 397a, 398a, 399a, 400a, 401a, 402a, 403a, 404a, 405a, 406a, 407a, 408a, 409a, 410a, 411a, 412a, 413a, 414a, 415a, 416a, 417a, 418a, 419a, 420a, 421a, 422a, 423a, 424a, 425a, 426a, 427a, 428a, 429a, 430a, 431a, 432a, 433a, 434a, 435a, 436a, 437a, 438a, 439a, 440a, 441a, 442a, 443a, 444a, 445a, 446a, 447a, 448a, 449a, 450a, 451a, 452a, 453a, 454a, 455a, 456a, 457a, 458a, 459a, 460a, 461a, 462a, 463a, 464a, 465a, 466a, 467a, 468a, 469a, 470a, 471a, 472a, 473a, 474a, 475a, 476a, 477a, 478a, 479a, 480a, 481a, 482a, 483a, 484a, 485a, 486a, 487a, 488a, 489a, 490a, 491a, 492a, 493a, 494a, 495a, 496a, 497a, 498a, 499a, 500a, 501a, 502a, 503a, 504a, 505a, 506a, 507a, 508a, 509a, 510a, 511a, 512a, 513a, 514a, 515a, 516a, 517a, 518a, 519a, 520a, 521a, 522a, 523a, 524a, 525a, 526a, 527a, 528a, 529a, 530a, 531a, 532a, 533a, 534a, 535a, 536a, 537a, 538a, 539a, 540a, 541a, 542a, 543a, 544a, 545a, 546a, 547a, 548a, 549a, 550a, 551a, 552a, 553a, 554a, 555a, 556a, 557a, 558a, 559a, 560a, 561a, 562a, 563a, 564a, 565a, 566a, 567a, 568a, 569a, 570a, 571a, 572a, 573a, 574a, 575a, 576a, 577a, 578a, 579a, 580a, 581a, 582a, 583a, 584a, 585a, 586a, 587a, 588a, 589a, 590a, 591a, 592a, 593a, 594a, 595a, 596a, 597a, 598a, 599a, 600a, 601a, 602a, 603a, 604a, 605a, 606a, 607a, 608a, 609a, 610a, 611a, 612a, 613a, 614a, 615a, 616a, 617a, 618a, 619a, 620a, 621a, 622a, 623a, 624a, 625a, 626a, 627a, 628a, 629a, 630a, 631a, 632a, 633a, 634a, 635a, 636a, 637a, 638a, 639a, 640a, 641a, 642a, 643a, 644a, 645a, 646a, 647a, 648a, 649a, 650a, 651a, 652a, 653a, 654a, 655a, 656a, 657a, 658a, 659a, 660a, 661a, 662a, 663a, 664a, 665a, 666a, 667a, 668a, 669a, 670a, 671a, 672a, 673a, 674a, 675a, 676a, 677a, 678a, 679a, 680a, 681a, 682a, 683a, 684a, 685a, 686a, 687a, 68

The chemical structure shows a complex polyphenolic molecule. It features a central ether linkage (a five-membered ring with an oxygen atom) connecting two aromatic systems. One side of the ether is a benzene ring with a hydroxyl group at the 4-position and a side chain containing a methylene group and a phenyl ring with a hydroxyl group at the 3-position. The other side of the ether is a benzene ring with a hydroxyl group at the 4-position and a side chain containing a methylene group and a phenyl ring with a hydroxyl group at the 3-position. The molecule also includes several other hydroxyl groups on various aromatic rings, suggesting a highly polar and potentially reactive compound.

The chemical structure shows a complex dimeric flavonoid, specifically a bisflavanone. It consists of two chromane-like units linked by a central carbon-carbon bond. Each unit features a chromane core with multiple hydroxyl groups and a p-hydroxyphenyl substituent. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.

[216] [화학식 25]

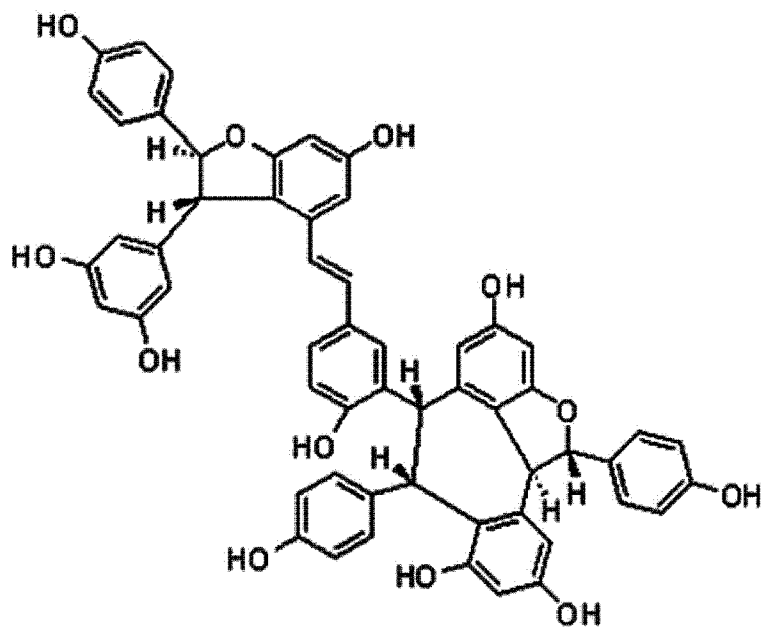
[217]



[218]

[화학식 26]

[219]



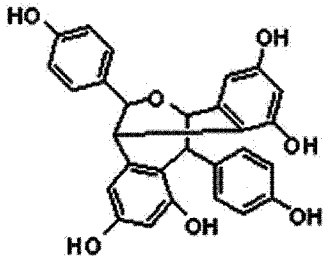
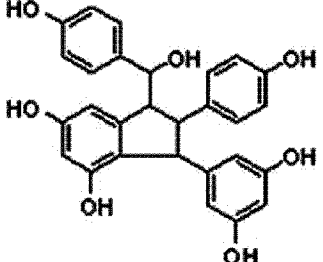
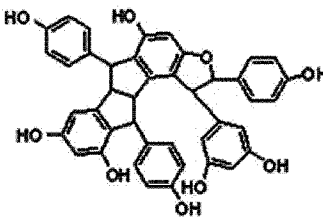
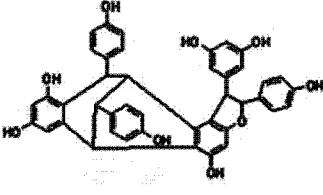
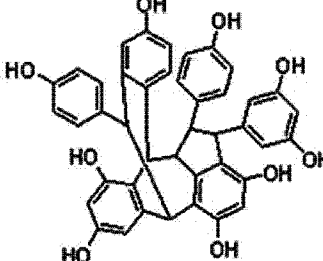
[220]

한편, 상기 화학식 1, 화학식 2 및 화학식 3으로 표시되는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체와 구조적으로 유사한 레스베라트롤(resveratrol) 다량체도 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 가질 수 있을 것으로 기대되며, 구체적인 예는 하기 표1 내지 표 3에 나타내었다.

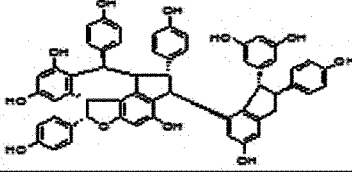
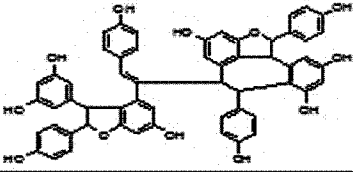
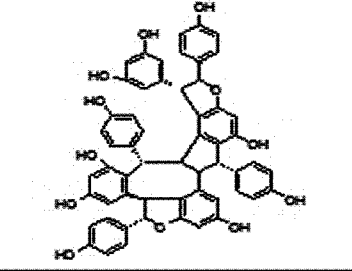
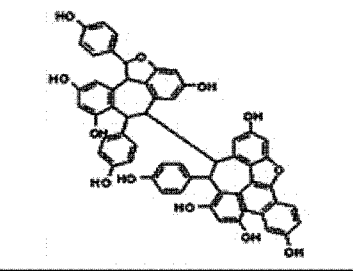
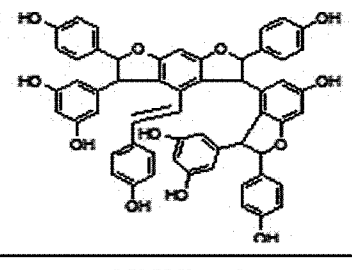
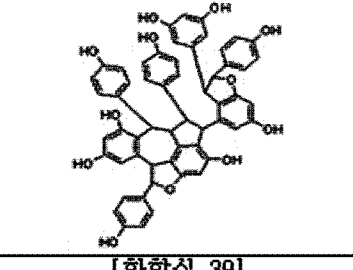
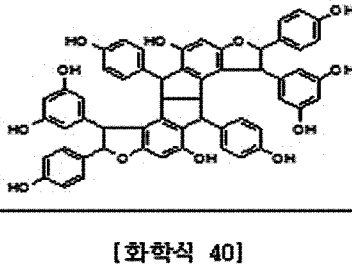
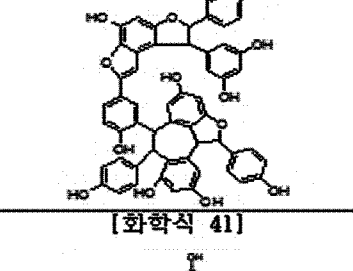
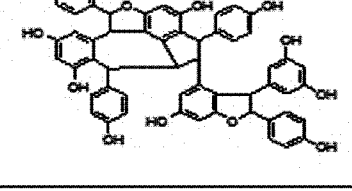
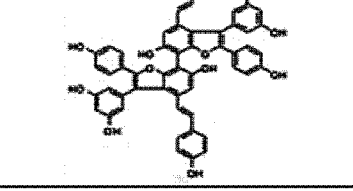
[221]

표 1

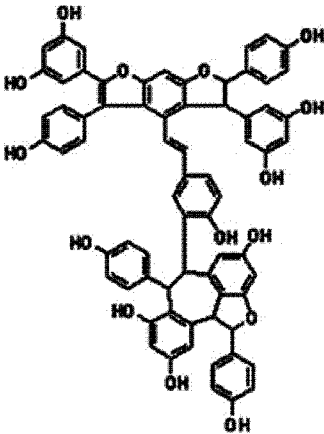
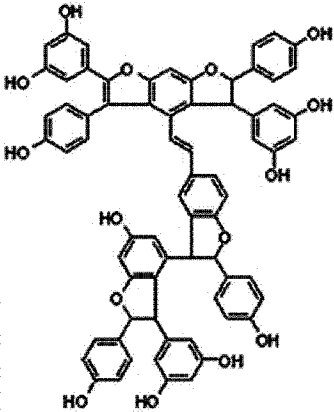
[표 1]

| 구분     | 화합물                                                                                                                              |                                                                                                                                 |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dimer  | <p data-bbox="550 302 703 336">[화학식 27]</p>     | <p data-bbox="997 302 1150 336">[화학식 28]</p>  |
|        | <p data-bbox="550 667 703 701">[화학식 29]</p>     | <p data-bbox="997 678 1150 712">[화학식 30]</p>  |
| Trimer | <p data-bbox="550 974 703 1008">[화학식 31]</p>  |                                                                                                                                 |

[표 2]

| 구분       | 화합물                                                                                                 |                                                                                                      |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tetramer | <p>[화학식 32]</p>    | <p>[화학식 33]</p>    |
|          | <p>[화학식 34]</p>    | <p>[화학식 35]</p>    |
|          | <p>[화학식 36]</p>   | <p>[화학식 37]</p>   |
|          | <p>[화학식 38]</p>  | <p>[화학식 39]</p>  |
|          | <p>[화학식 40]</p>  | <p>[화학식 41]</p>  |

[표3]

| 구분       | 화합물                                                                                                                           |                                                                                                                                  |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pentamer | <p data-bbox="571 304 724 333">[화학식 42]</p>  | <p data-bbox="1007 315 1160 344">[화학식 43]</p>  |

- [224] 본 발명의 레스베라트롤(resveratrol) 다량체는 천연물, 예를 들어 포도근(*Vitidis Viniferae Radix*)으로부터 추출된 것을 사용할 수 있으나, 화학적으로 합성된 것도 추출된 것과 동일한 효과를 나타낸다는 것은 당업자에게 자명하다.
- [225] 본 발명에 따른 레스베라트롤(resveratrol) 다량체는 간세포에 대한 독성이 매우 낮으면서도, C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 선택적으로 저해하는 우수한 효과를 가지며, C형 간염의 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있다.
- [226] 본 발명의 일 실시예에서는 350개의 생약 추출물 라이브러리를 스크리닝하여 포도근 추출물이 HCV 바이러스의 게놈 복제를 선택적으로 저해하면서 간세포에 독성을 나타내지 않음을 확인하고, 이로부터 레스베라트롤(resveratrol) 다량체인 ampelopsin A, (+)-ε-viniferin, vitisin A, wilsonol C 및 vitisin B를 분리하여 그 구조를 동정하였다(실시예 1 참조).
- [227] 본 발명의 다른 실시예에서는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체인 ampelopsin A, (+)-ε-viniferin, vitisin A, wilsonol C 및 vitisin B의 C형 간염 바이러스의 게놈 복제 저해 활성을 측정한 결과, 본 발명의 레스베라트롤(resveratrol) 다량체가 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [228] 이에, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 C형 간염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [229] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 C형 간염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [230] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에

의해 C형 간염에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

- [231] 본 발명의 조성물은 상기 레스베라트롤(resveratrol) 다량체와 함께 C형 간염의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [232] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [233] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [234] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [235] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [236] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 레스베라트롤(resveratrol) 중합체인 올리고스틸벤 화합물들은 1일 0.1 mg/kg 내지 1000 mg/kg으로,

바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 또는 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

- [237] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [238] 본 발명의 조성물은 C형 간염의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [239] 이에, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 C형 간염 치료방법을 제공한다. 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [240] 더욱이, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 레스베라트롤(resveratrol) 다량체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 C형 간염 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물을 제공한다.
- [241] 본 발명에서 사용되는 용어 "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 이때 상기 기능성 식품 조성물은 C형 간염 예방 또는 개선을 위하여 해당 질환의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.
- [242] 본 발명에서, 건강기능식품이란 질병의 예방 또는 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다. 본 발명의 포도근 추출물은 C형 간염의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 레스베라트롤(resveratrol) 중합체인 올리고스틸벤 화합물들을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 레스베라트롤(resveratrol) 중합체인 올리고스틸벤 화합물들을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 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. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 포도근 추출물은 원료에 대하여 15 중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [243] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두

포함한다.

[244] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1g 이다.

[245] 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, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[246]

[247] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[248]

[249] [실시예]

[250] 실시예 1. 레스베라트롤(resveratrol) 다량체 분리 동정

[251] 건조한 포도근 600g을 분쇄기로 세절하여 메탄올 (4.5 L)로 3시간 초음파 추출하여 총메탄올 추출물 45g을 얻었다. 총메탄올 추출물을 헥산, 에틸아세테이트(EA), 부탄올로 유기용매분획한 후 에틸아세테이트 가용 분획 15.3g을 얻었다. 에틸아세테이트 가용 분획을 순상컬럼크로마토그래피를 이용하여 분획을 나누었으며 항 HCV 활성 검색을 통해 활성이 가장 우수한 EA-B (6.3g)를 얻었다. EA-B 분획을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 단일물질 분리를 시도하였다. HPCCC의 two-phase solvent system은 헥산-에틸아세테이트-메탄올-중류수 (4:8:4:10 v/v)를 제조하여 상층을 고정상, 하층을 이동상으로 하여 사용하였다. 펌프의 유속은 gradient flow rate를 이용하여 0분-75분에는 4 ml/min으로 75분-250분에는 8 mL/min의 조건을 사용하였으며 HPCCC의 속도는 1600 rpm 로 지정하였다. 이의 조건을 이용하여 oligostilbene 함유 분획물 150 mg을 주입하고 자동수집기로 분취하였으며 UV chromatogram을 통하여 개별 올리고스틸벤을 모았으며 분리된 올리고스틸벤은 NMR 및 MS spectrometer를 이용하여 구조를 결정하였다.

[252] 즉, 상기 HPLC 방법을 이용하여 포도근의 올리고스틸벤 함유 분획물 (150 mg)에서 5 종의 화합물을 분리하였으며 이는 각각 ampelopsin A ('화합물 1', 12.1 mg), (+)- $\epsilon$ -viniferin ('화합물 2', 10.4 mg), vitisin A ('화합물 3', 2.8 mg), wilsonol C ('화합물 4', 3.2 mg) 및 vitisin B ('화합물 5', 37 mg)이었고, 순도는 모두 95% 이상이었다. 분리된 화합물은 Q-TOF MS를 통해 얻은 분자량 정보와  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 이용하여 구조를 규명하였고, 그 결과를 각각 도 1 내지 도 10에 나타내었다. 또한, 상기 결과에 의해, 실시예 1에서 얻은 화합물 1 내지 화합물 5의 구조를 도 11에 나타내었다.

[253]

[254] 실시예 2. 생약 추출물들과 생약 추출물에서 동정한 화합물들의 세포 생존률 측정

[255] 생약 추출물들과 생약 추출물에서 동정한 화합물들이 세포의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 종래 공지된 방법인 EZ-Cytox 세포 생존 어쎈이 (EZ-Cytox cell viability assay, Daeil Lab Service)를 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[256] 먼저, 96 웰-플레이트에 웰 당  $1.7 \times 10^4$  내지  $2.0 \times 10^4$  개의 Huh 7.5 인간 간암 세포를 첨가하고 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 세포에 다양한 농도의 생약 추출물들 또는 생약 추출물에서 동정한 화합물들을 처리한 후 72시간 동안 배양하였다. 보다 구체적으로, 측정된 농도는 생약 추출물의 경우 0, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ 이고 동정한 화합물의 경우 0, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ 이었다. 대조군으로는 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 처리하였다. 이후 배양액을 버리고, PBS로 세척한 후, 수용성 테트라졸리움염 (tetrazolium salt)이 포함된 EZ-Cytox 시약에 세포 배양액을 첨가하여 제조한 1/10 (v/v) 희석액을 100  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하고 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후 분광광도계를 이용하여 450 nm의 파장으로 세포의 흡광도를 측정하였다. DMSO 처리 시의 흡광도를 100으로 기준하여, 포도근 메탄올 추출물 처리 시의 상대적인 흡광도를 계산하였고, 그 결과를 도 14 내지 도 24에 나타내었다.

[257]

[258] 실시예 3. C형 간염 바이러스 게놈 복제 저해 활성 측정

[259] 3-1. C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 측정하기 위한 리포터 바이러스의 준비

[260] 생약 추출물들과 생약 추출물에서 동정한 화합물들이 C형 간염 바이러스의 게놈 복제에 미치는 영향을 측정하기 위해 유전형(genotype) 2a에 속하는 FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUBi HCV replicon을 리포터 바이러스로 사용하였다. 상기 리포터 바이러스의 게놈 구조도를 도 12에 나타내었다.

[261] 도 12에 나타낸 바와 같이, 상기 리포터 바이러스는 유전형 2a에 속하는 C형 간염 바이러스의 전체 게놈이 cDNA 상태로 포함되어 있고, 바이러스의 내부 리보솜 진입 위치 (IRES, internal ribosome entry site)와 바이러스의 코어 (core)

단백질 사이에 레닐라 루시페라제와 스스로 절단하는 (self-cleaving) 구족병 바이러스 (foot and mouth disease virus) 2A 단백질의 Ubi 시퀀스 (sequence)가 부착되어 있어, 상기 FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi 플라스미드를 T7 RNA 중합효소(polymerase)를 사용하여 시험관 상 (in-vitro)에서 전사 (transcription)하여 얻은 HCV RNA를 간암 세포주인 Huh7.5 세포에 주입 (transfection)하면, 주입된 바이러스의 RNA가 내부 리보솜 진입 위치(IRES)를 사용한 번역을 통해서 다중단백질(polyprotein)을 생산한다. 이때 생산된 다중단백질 중 레닐라 루시페라제는 스스로 잘려나가는 구족병 바이러스 2A 단백질의 Ubi 시퀀스의 도움을 받아 바이러스 비구조 단백질들과 분리되고, 분리된 레닐라 루시페라제의 활성을 측정함으로써 간접적으로 간세포 내의 바이러스 RNA 게놈 복제를 측정할 수 있게 된다.

[262]

[263] **3-2. C형 간염 바이러스의 게놈 복제 저해 활성 측정 방법**

[264] Huh7.5 인간 간암 세포를 트립신화하여 PBS 용액으로  $1.5 \times 10^7$  개/ml의 세포 밀도를 갖도록 재현탁시켰다. 총 5  $\mu$ g의 시험관 내 (in vitro) 전사된 FLJ6/JFH-5 C19Rluc2AUbi RNA를 Huh 7.5 인간 간암 세포가 포함된 400 $\mu$ l의 PBS 완충액과 혼합한 후 2-mm-gap cuvette (BTX)에 넣었다. 여기에 BTX-830 전기천공기를 이용하여 0.82kV로 99 ms 동안 5회 펄스를 가하여 상기 FL-J6/JFH-5 C19Rluc2AUbi RNA를 Huh7.5 인간 간암 세포 내로 트랜스펙션하였다. 상기 전기천공을 실시한 지 6시간 경과 후, 다양한 농도 (1 pM - 10  $\mu$ M)의 생약 추출물들 또는 생약 추출물에서 동정한 화합물들을 상기 세포에 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 DMSO를 이용하였다. 상기 물질들을 처리한 세포의 배양액을 버리고 PBS로 세포가 부착되어 있는 웰을 세척한 다음, 20 $\mu$ l의 세포용해 완충액 (cell lysis buffer)을 넣고 얼음 내에서 20분간 방치하였다.

[265] 이후, 레닐라 루시페라제 기질을 레닐라 루시페라제 완충액으로 100배 희석한 희석액을 준비하고, 상기 희석액 100  $\mu$ l를 각 웰에 넣어주었다. 인테그레이션 타이머를 10초로 하여 레닐라 루시페라제의 발광도를 측정하였다. DMSO 처리 시의 발광도를 100으로 기준하여, 생약 추출물들 또는 생약 추출물에서 동정한 화합물들을 처리 시의 상대적인 발광도를 계산하였다.

[266]

[267] **3-3. 생약 추출물의 C형 간염 바이러스의 게놈 복제 저해 활성 측정**

[268] 생약 추출물의 C형 간염 바이러스의 게놈 복제 저해 활성 측정 실험을 하기와 같이 진행하였다.

[269]

[270] 먼저, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon (FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 350개의 생약 추출물 라이브러리를 스크리닝하였고, 그 결과를 도 13에 나타내었다. 도 13에 나타낸 바와 같이, 생약 추출물 중 포도근 추출물이 HCV 바이러스의 게놈 복제를

선택적을 저해하면서 간세포에 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

[271]

[272] 다음으로, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해 포도근의 ethyl acetate, butanol, ethanol, hexane, 그리고 물로 추출한 추출 분획의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정하였고, 그 결과를 도 14에 나타내었다. 도 14에 나타낸 바와 같이, ethyl acetate 분획에서 가장 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[273]

[274] 다음으로, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해 포도근의 ethyl acetate (EA) 추출물을 순상컬럼크로마토그래피를 이용하여 분획을 진행하여 얻은 EA-A (1.2 g), EA-B (6.3 g), EA-C (2.6 g), EA-D (1.7 g), EA-E (1.1 g), EA-F (0.9 g)의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 0.1, 1, 그리고 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 측정하였고, 그 결과를 도 15에 나타내었다. 도 15에 나타낸 바와 같이, EA-B와 EA-C 분획에서 가장 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[275]

[276] 다음으로, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해 포도근의 ethyl acetate (EA) 추출물을 분획하여 얻은 EA-B와 EA-C의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정하였고, 그 결과를 도 16에 나타내었다. 도 16에 나타낸 바와 같이, EA-B 분획에서 가장 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[277]

[278] 다음으로, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해 포도근의 EA-B 추출물을 순상컬럼크로마토그래피를 이용하여 분획하여 얻은 EA-Ba (0.9 g), EA-Bb (0.7 g), EA-Bc (1.5 g), EA-Bd (0.8 g), EA-Be (0.8 g), EA-Bf (0.5 g), EA-Bg (0.4 g), EA-Bh (0.2 g)의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 측정하였고, 그 결과를 도 17에 나타내었다. 도 17에 나타낸 바와 같이, EA-Bd, EA-Be, EA-Bf, EA-Bg, 그리고 EA-Bh 분획에서 가장 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[279]

[280] 다음으로, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해 포도근의 EA-B 추출물을 분획하여 얻은 EA-Bd, EA-Be, EA-Bf, EA-Bg, EA-Bh의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정하였고, 그 결과를 도 18에 나타내었다. 도 18에 나타낸 바와 같이, 모든 분획에서 가장 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[281]

[282] **3-4. 레스베라트롤(resveratrol) 다량체의 C형 간염 바이러스의 게놈 복제 저해 활성 측정**

[283] 상기 실시예 1에서 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Ampelopsin A의 구조를 동정하였고, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해 Ampelopsin A의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정하였고, 그 결과를 도 19에 나타내었다. 도 19에 나타낸 바와 같이, Ampelopsin A가 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[284]

[285] 다음으로, 실시예 1에서 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물  $\epsilon$ -viniferin의 구조를 동정하였고, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해  $\epsilon$ -viniferin의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정하였고, 그 결과를 도 20에 나타내었다. 도 20에 나타낸 바와 같이,  $\epsilon$ -viniferin가 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[286]

[287] 다음으로, 실시예 1에서 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Wilsonol C의 구조를 동정하였고, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해 Wilsonol C의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정하였고, 그 결과를 도 21에 나타내었다. 도 21에 나타낸 바와 같이, Wilsonol C가 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[288]

[289] 다음으로, 실시예 1에서 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance

countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin A의 구조를 동정하였고, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해 Vitisin A의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정하였고, 그 결과 도 22에 나타내었다. 도 22에 나타낸 바와 같이, Vitisin A가 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[290]

[291] 다음으로, 실시예 1에서 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B의 구조를 동정하였고, 상기 3-1에 의해 준비된 HCV 레플리콘 (HCV replicon FL-J6/JFH-5C19Rluc2AUbi) 리포터 바이러스를 사용하여 상기 3-2의 방법을 통해 Vitisin B의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 측정하였고, 그 결과 도 23에 나타내었다. 도 23에 나타낸 바와 같이, Vitisin B가 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[292] 추가적으로, Vitisin B의 바이러스의 게놈 복제율과 간세포의 생존률을 500 nM의 농도에서 72시간 동안 측정하였고, 그 결과를 도 24에 나타내었다. 도 24에 나타낸 바와 같이, Vitisin B가 효율적으로 세포의 생존률에는 영향을 주지 않는 동시에 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[293]

[294] **3-5. C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 측정하기 위한 리플리콘 바이러스의 준비**

[295] C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 측정하기 위해 유전형 (genotype 1b)에 속하는 서브지노믹 레플리콘 (subgenomic HCV replicon, Bart79I)와 유전형(genotype) 2a에 속하는 풀지노믹 레플리콘 (full genomic HCV replicon, J6/JFH1)을 사용하였다. 상기 리플리콘 바이러스의 게놈 구조도는 각각 도 25 및 도 26에 나타내었다.

[296] 도 25 및 도 26에 나타낸 바와 같이, 상기 리플리콘 바이러스는 C형 간염 바이러스의 부분 혹은 전체 게놈이 cDNA 상태로 포함되어 있다. 상기 리플리콘 플라스미드를 T7 RNA 중합효소(polymerase)를 사용하여 시험관 상 (in-vitro)에서 전사 (transcription)하여 얻은 HCV RNA를 간암 세포주인 Huh7.5 세포에 주입 (transfection)하면, 주입된 바이러스의 RNA가 내부 리보솜 진입 위치(IRES)를 사용한 번역을 통해서 다중단백질(polyprotein)을 생산한다. 이때 생산된 다중단백질이 비구조 단백질로 분리되고 발현된 비구조 단백질들이 바이러스의 게놈을 복제함으로써 간세포내에서 바이러스가 복제되는 리플리콘 세포를 만들 수 있다.

[297]

[298] **3-6. Real time PCR을 통한 C형 간염 바이러스 게놈 복제 저해 활성 측정**[299] 3 X 10<sup>5</sup> 세포(Huh7.5-J6/JFH1 or Bart79I)를 6-well plate에 분획한 후 다양한 농도 (1 pM - 10 μM)의 Vitisin B를 상기 HCV 리플리콘 세포에 처리하고 72시간 동안 배양하였다.

[300] 상기 Vitisin B를 처리한 세포의 배양액을 버리고 PBS로 세포가 부착되어 있는 웰을 세척한 다음 total RNA isolation kit를 사용하여 세포 내 total RNA를 분리한 후 reverse transcriptase를 사용해서 cDNA를 합성한 후 합성된 cDNA를 HCV 바이러스에 특이적인 프라이머를 사용해서 real time으로 PCR했을 때 얻어지는 Ct 값을 계산하여 바이러스 RNA를 정량할 수 있었다. 이때 사용한 프라이머는 하기 표 4에 나타내었다.

[301] 표 4

[표4]

| primer  | sequence(5' - 3')          |                               |
|---------|----------------------------|-------------------------------|
|         | FW                         | RV                            |
| J6/JFH1 | CTCCGCCATGAATCACTC(서열번호 1) | ACGACACTCATACTAACGC(서열번호 2)   |
| Bart79I | AGAGCCATAGTGGTCT(서열번호 3)   | CCAAATCTCCAGGCATTGAGC(서열번호 4) |
| GAPDH   | TGGTCTCCTCTGACTTCA(서열번호 5) | CGTTGTCATACCAGGAAATG(서열번호 6)  |

[302] 시간 반응 곡선의 경우 10 mM의 화합물을 처리한 후 24, 48, 72 시간 후 남아 있는 HCV의 양을 real time PCR로 측정하였다.

[303] 즉, 실시예 1에서 포도근의 EA-B 추출물을 high-performance countercurrent chromatography를 통해 분리한 단일 화합물 Vitisin B의 농도별 및 처리시간에 따른 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제에 미치는 영향을 HCV 서브지놈릭 리플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I의 게놈의 real time PCR 정량법을 사용하여 확인하였고, 그 결과를 도 27 및 도 28에 나타내었다. 도 27 및 도 28에 나타낸 바와 같이, Vitisin B의 농도가 증가하거나 처리시간이 경과함에 따라 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[304] 추가적으로, Vitisin B이 약물의 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 RNA 게놈 복제에 미치는 영향을 HCV 풀지놈릭 리플리콘 (full genomic replicon) J6/JFH1 (genotype 2a)의 real time PCR을 통해 정량하였고, 그 결과를 도 29에 나타내었다. 도 29에 나타낸 바와 같이, Vitisin B가 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[305]

[306] **3-7. FACS를 통한 C형 간염 바이러스 게놈 복제 저해 활성 측정**

[307] 상기 실험에서 확인한 생약 추출물들과 생약 추출물에서 동정한 화합물들의 C형 간염 바이러스 게놈 복제 저해 활성이 C형 간염 바이러스의 단백질 발현 저해로 나타나는지의 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[308] 먼저, 도 30에 나타낸 유전형 1b C형 간염 바이러스의 서브지노믹 레플리콘(subgenomic replicon)인 Bart79I에 GFP가 삽입되어 있는 HCV 서브지노믹 리플리콘을 사용하여, 생약 추출물들 또는 생약 추출물에서 동정한 화합물들을 투여 시 C형 간염 바이러스의 단백질 발현 정도를 확인하기 위하여, 바이러스의 게놈에서 발현되는 GFP(녹색형광단백질)의 형광의 양을 FACS(형광세포분석기)를 통해 측정하였다.

[309] 보다 구체적으로, Vitisin B가 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 30에서 설명한 GFP가 tagging된 서브지노믹 리플리콘(subgenomic replicon) Bart79I-NS5A-GFP이 들어간 간세포에서 발현하는 녹색 형광의 양을 FACS (fluorescence assorted cell sorter)를 사용해서 측정하였고, 그 결과를 도 31에 나타내었다. 도 31에 나타낸 바와 같이, Vitisin B가 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 게놈 복제를 효과적으로 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

[310] 추가적으로, Vitisin B가 500 nM에서 처리한 시간이 경과함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 30에서 설명한 GFP가 tagging된 서브지노믹 리플리콘(subgenomic replicon) Bart79I-NS5A-GFP이 들어간 간세포에서 발현하는 녹색 형광의 양을 FACS (fluorescence assorted cell sorter)를 사용해서 측정하였고, 그 결과를 도 32에 나타내었다. 도 32에 나타낸 바와 같이, Vitisin B 처리시간에 따라 C형 간염 바이러스의 게놈 복제가 효과적으로 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

[311]

[312] **3-8. Western blot을 통한 C형 간염 바이러스 게놈 복제 저해 활성 측정**

[313]  $1.5 \times 10^5$  세포(Huh7.5-J6/JFH1 or Bart79I)를 6-well plate (Costar 3610) 에 배양한 후 DMSO 또는 추출물에서 분리된 화합물들과 함께 배양했다. 배양 5일 후 whole-cell extracts을 RIPA buffer (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % deoxycholic acid sodium salt, 0.1 % sodium dodecyl sulfate, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA; genDEPOT, protease inhibitors)을 이용해 추출하고 Bradford assay로 정량했다. 같은 양의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 후 polyvinylidene difluoride membrane에 transfer했다. NS5A와 core에 대한 일차 항체를 붙인 후 Horseradish peroxidase가 붙어 있는 이차 항체를 이용해 단백질의 양을 상대적으로 정량했다.

[314] 보다 구체적으로, Vitisin B가 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 19에서 설명한 HCV 서브지노믹 리플리콘(subgenomic replicon) Bart79I의 게놈에서 발현되는 NS5A 단백질의 양과

간세포의 control 단백질인 beta actin 단백질을 western blot을 사용해서 측정하였고, 그 결과를 도 33에 나타내었다. 도 33에 나타낸 바와 같이, vitisin B의 농도 의존적으로 바이러스 NS5A 단백질이 효과적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

[315] 또한, Vitisin B를 500 nM의 농도에서 처리한 시간이 경과함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 19에서 설명한 HCV 서브지놈릭 리플리콘 (subgenomic replicon) Bart79I의 게놈에서 발현되는 NS5A 단백질의 양과 간세포의 control 단백질인 beta actin 단백질을 western blot을 사용해서 측정하였고, 그 결과를 도 34에 나타내었다. 도 34에 나타낸 바와 같이, 시간이 지남에 따라서 바이러스 NS5A 단백질이 효과적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

[316] 추가적으로, Vitisin B가 농도가 증가함에 따라 C형 간염 바이러스의 단백질 발현에 미치는 영향을 도 26에서 설명한 HCV 풀지놈릭 리플리콘 (full genomic replicon) J6/JFH1 (genotype 2a) 게놈에서 발현되는 core 단백질의 양과 간세포의 control 단백질인 beta actin 단백질을 western blot을 사용해서 측정하였고, 그 결과를 도 35에 나타내었다. 도 35에 나타낸 바와 같이, 농도의존적으로 바이러스 core 단백질이 효과적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

[317]

[318] 하기에 본 발명의 추출물을 포함하는 약학적 조성물의 제조예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[319]

[320] 제제예 1. 약학적 조성물의 제조

[321] 1-1. 산제의 제조

[322] 올리고스틸벤 화합물 20 mg

[323] 유당 100 mg

[324] 탈크 10 mg

[325] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[326]

[327] 1-2. 정제의 제조

[328] 올리고스틸벤 화합물 10 mg

[329] 옥수수전분 100 mg

[330] 유당 100 mg

[331] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[332] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[333]

[334] 1-3. 캡슐제의 제조

[335] 올리고스틸벤 화합물 10 mg

- [336] 결정성 셀룰로오스 3 mg
- [337] 락토오스 14.8 mg
- [338] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg
- [339] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [340]
- [341] 1-4. 주사제의 제조
- [342] 올리고스틸벤 화합물 10 mg
- [343] 만니톨 180 mg
- [344] 주사용 멸균 증류수 2974 mg
- [345]  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  26 mg
- [346] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [347]
- [348] 1-5. 액제의 제조
- [349] 올리고스틸벤 화합물 20 mg
- [350] 이성화당 10 g
- [351] 만니톨 5 g
- [352] 정제수 적량
- [353] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.
- [354]
- [355] 제제예 2. 식품 조성물의 제조
- [356] 2-1. 건강식품의 제조
- [357] 올리고스틸벤 화합물 100 mg
- [358] 비타민 혼합물 적량
- [359] 비타민 A 아세테이트 70  $\mu\text{g}$
- [360] 비타민 E 1.0 mg
- [361] 비타민 B1 0.13 mg
- [362] 비타민 B2 0.15 mg
- [363] 비타민 B6 0.5 mg
- [364] 비타민 B12 0.2  $\mu\text{g}$
- [365] 비타민 C 10 mg
- [366] 비오틴 10  $\mu\text{g}$
- [367] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [368] 엽산 50  $\mu\text{g}$

- [369] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [370] 무기질 혼합물 적량
- [371] 황산제1철 1.75 mg
- [372] 산화아연 0.82 mg
- [373] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [374] 제1인산칼륨 15 mg
- [375] 제2인산칼슘 55 mg
- [376] 구연산칼륨 90 mg
- [377] 탄산칼슘 100 mg
- [378] 염화마그네슘 24.8 mg
- [379] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[380]

[381] 2-2. 건강음료의 제조

[382] 올리고스틸벤 화합물 100 mg

[383] 비타민 C 15 g

[384] 비타민 E(분말) 100 g

[385] 젖산철 19.75 g

[386] 산화아연 3.5 g

[387] 니코틴산아미드 3.5 g

[388] 비타민 A 0.2 g

[389] 비타민 B1 0.25 g

[390] 비타민 B2 0.3 g

[391] 물 정량

[392] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 21 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[393] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[394]

[395] 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.

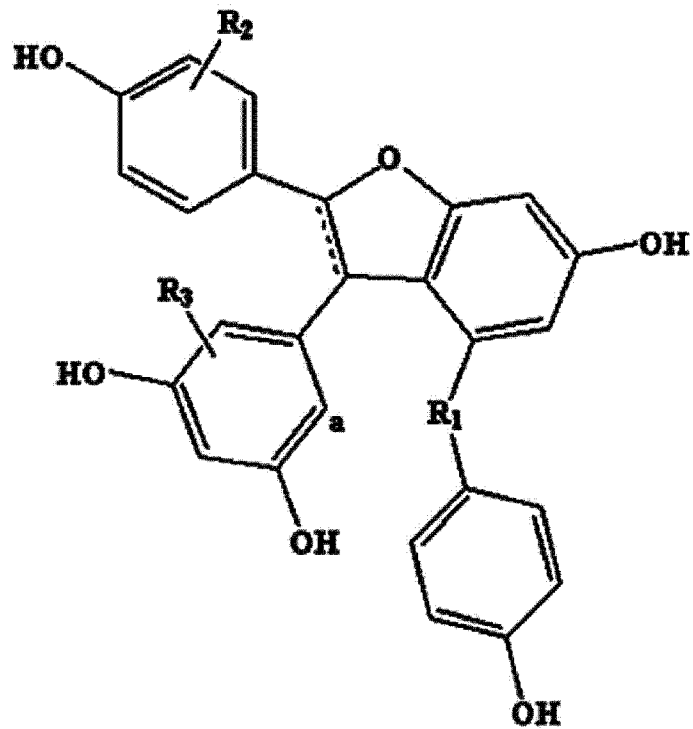
### 산업상 이용가능성

- [396] 본 발명에 따른 레스베라트롤(resveratrol) 다량체는 C형 간염을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물의 활성성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

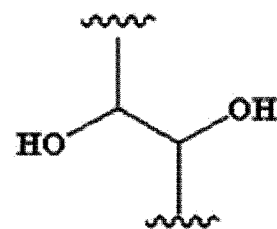
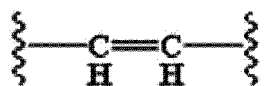
## 청구범위

[청구항 1]

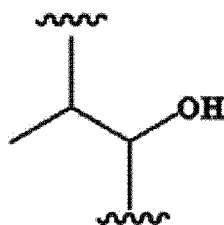
하기 화학식 1로 표시되는 C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 이량체.  
[화학식 1]



상기 식에서, R<sub>1</sub>은



또는 이고,



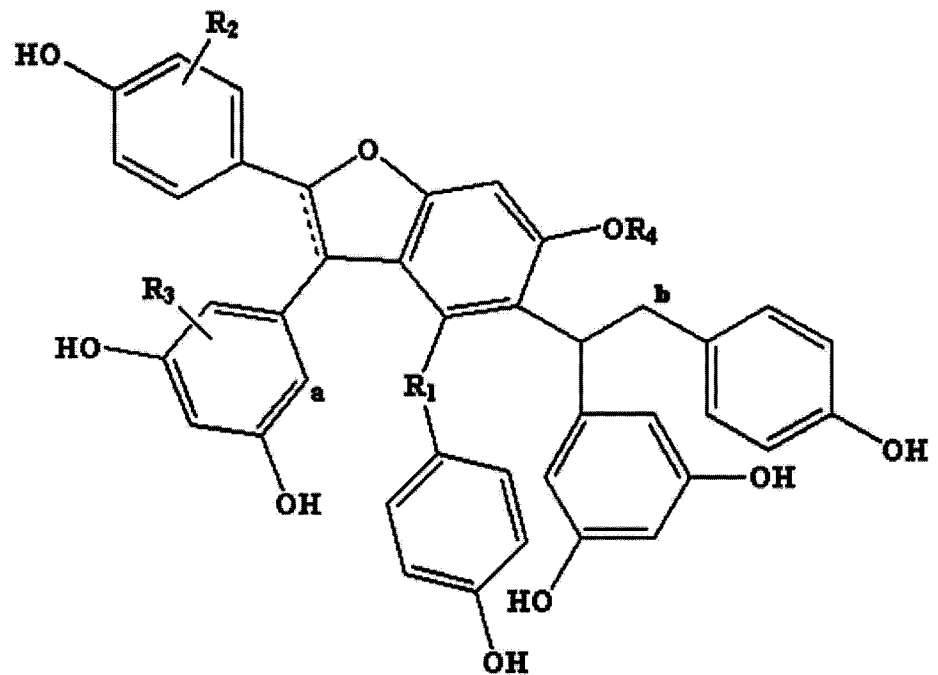
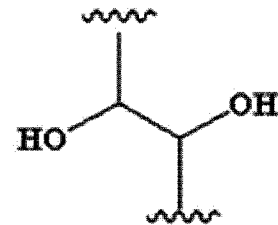
R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,  
R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,  
는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.



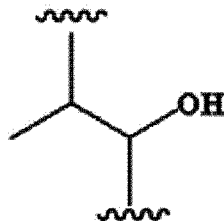
[청구항 2]

하기 화학식 2로 표시되는 C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 삼량체.

[화학식 2]

상기 식에서, R<sub>1</sub>은

또는 이고,

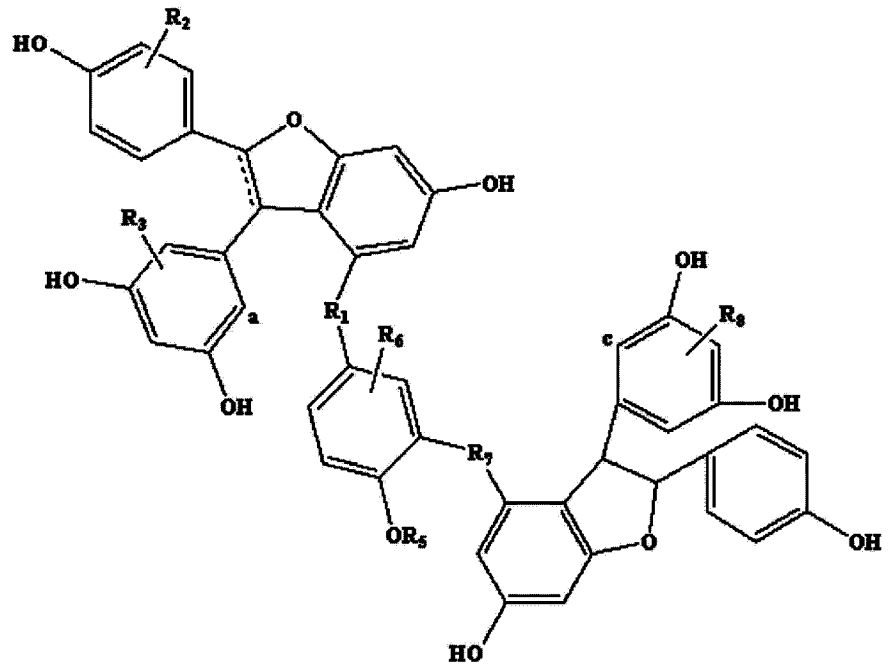
R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,R<sub>4</sub>는 H이며,R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치 및/또는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,OR<sub>4</sub>는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,

는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

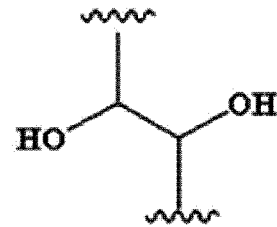
[청구항 3]

하기 화학식 3으로 표시되는 C형 간염 바이러스의 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 레스베라트롤(resveratrol) 사량체.

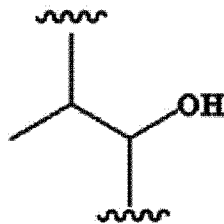
[화학식 3]



상기 식에서, R<sub>1</sub>은



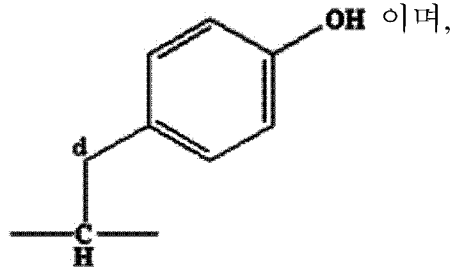
또는 이고,



R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이며,

R<sub>5</sub>는 H이고,

R<sub>7</sub>은



R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,

R<sub>7</sub>의 d 위치의 탄소는 OR<sub>5</sub>와 결합하여 5원환을 형성하거나,

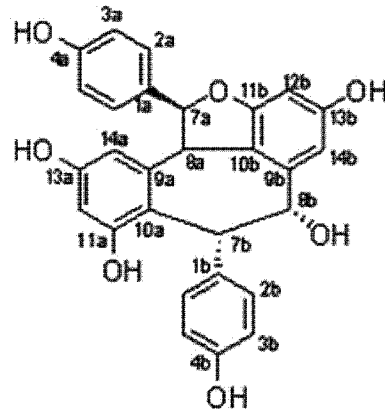
c 위치의 탄소와 결합하여 7원환을 형성할 수 있으며,

는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

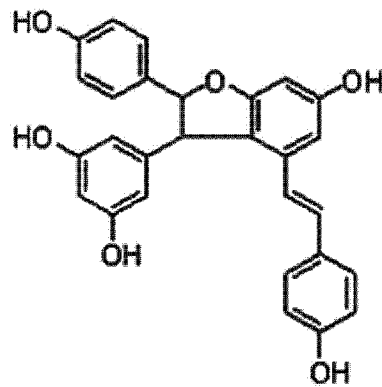
[청구항 4]

제1항에 있어서,  
상기 레스베라트롤(resveratrol) 이량체는 하기 화학식 4 내지  
화학식 10으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는  
것을 특징으로 하는, 레스베라트롤(resveratrol) 이량체.

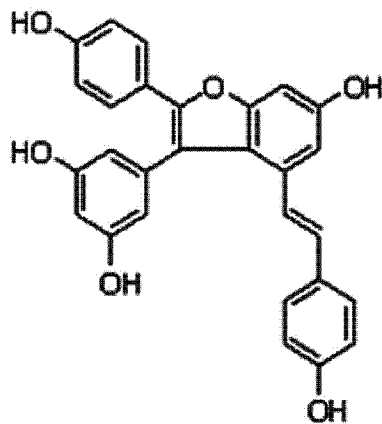
[화학식 4]



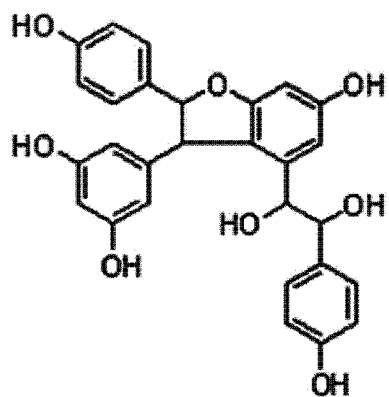
[화학식 5]



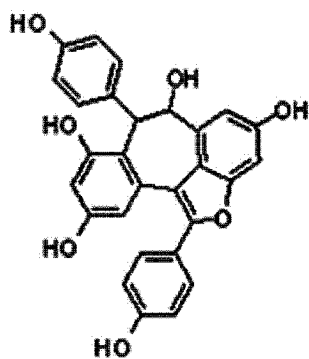
[화학식 6]



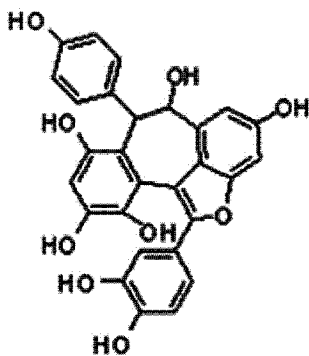
[화학식 7]



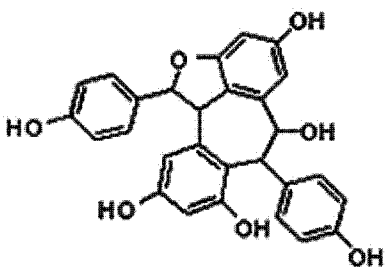
[화학식 8]



[화학식 9]



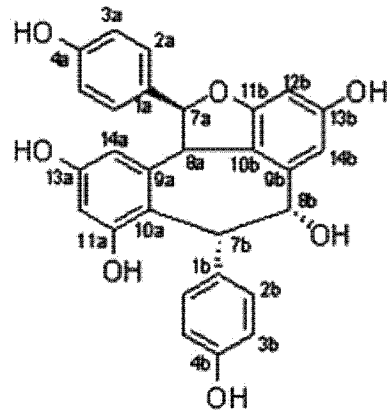
[화학식 10]



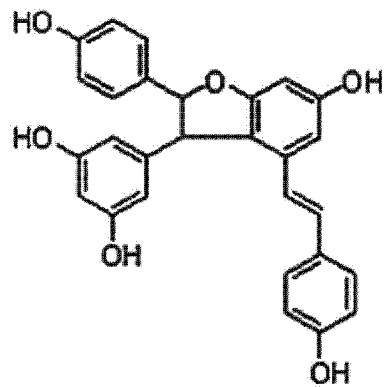
[청구항 5]

제4항에 있어서,  
 상기 레스베라트롤(resveratrol) 이량체는 하기 화학식 4 또는  
 화학식 5로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는,  
 레스베라트롤(resveratrol) 이량체.

[화학식 4]



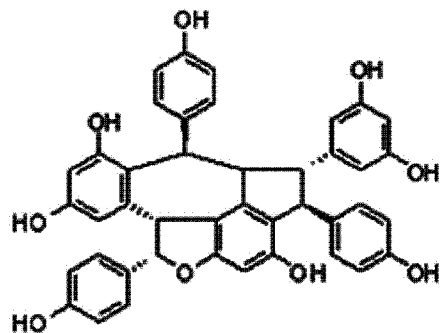
[화학식 5]



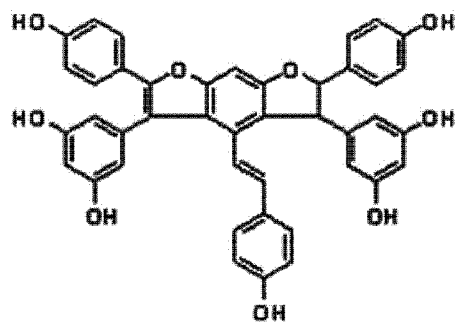
[청구항 6]

제2항에 있어서,  
 상기 레스베라트롤(resveratrol) 삼량체는 하기 화학식 11 내지  
 화학식 17로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는  
 것을 특징으로 하는, 레스베라트롤(resveratrol) 삼량체.

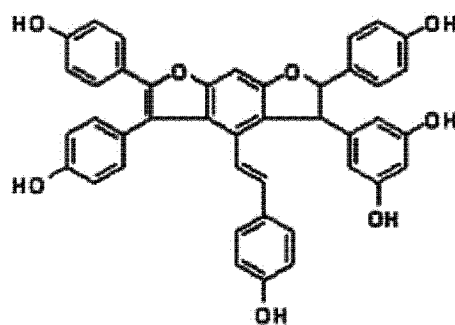
[화학식 11]



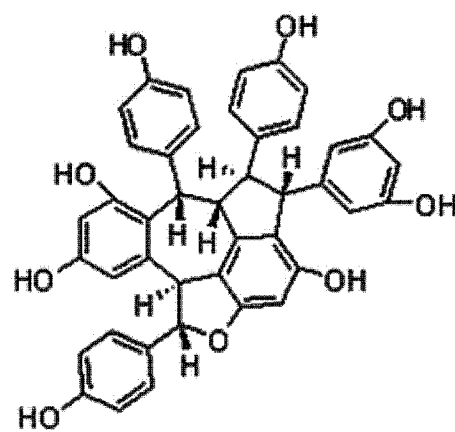
[화학식 12]



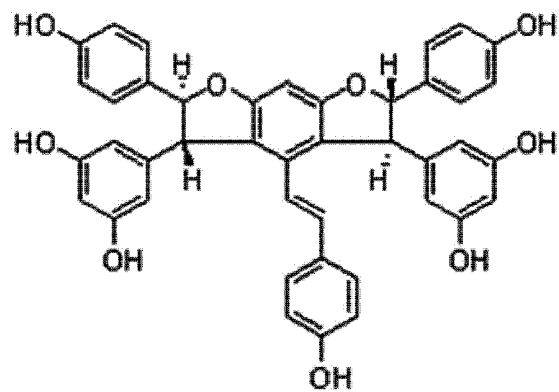
[화학식 13]



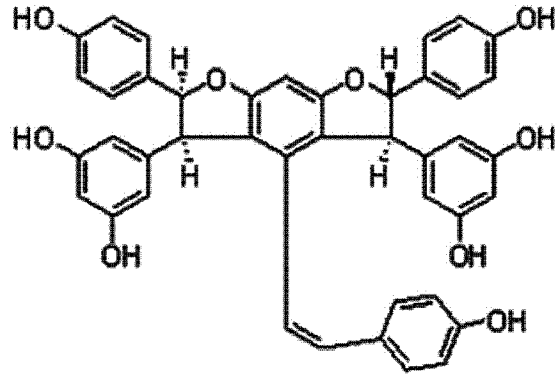
[화학식 14]



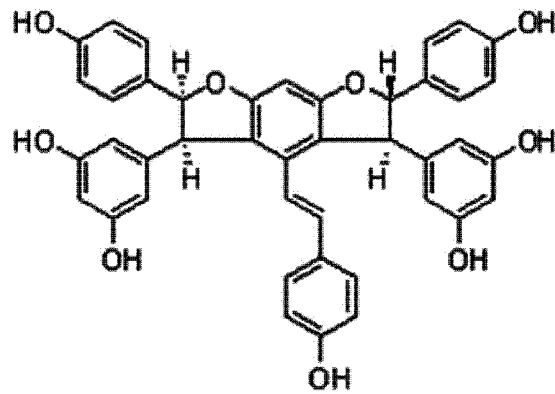
[화학식 15]



[화학식 16]



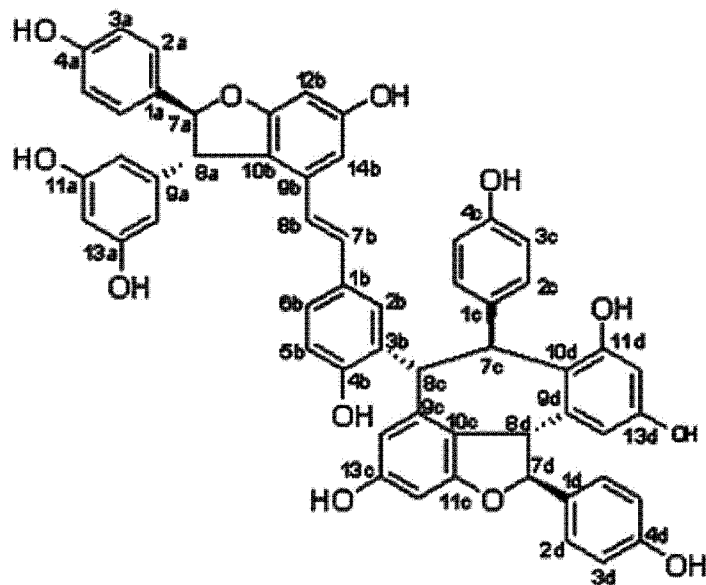
[화학식 17]



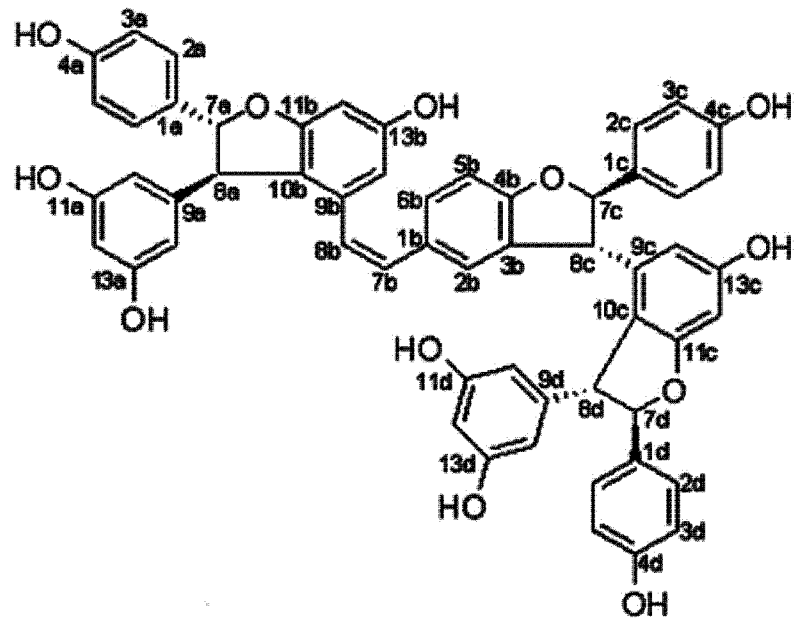
[청구항 7]

제3항에 있어서,  
 상기 레스베라트롤(resveratrol) 사량체는 하기 화학식 18 내지  
 화학식 26으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는  
 것을 특징으로 하는, 레스베라트롤(resveratrol) 사량체.

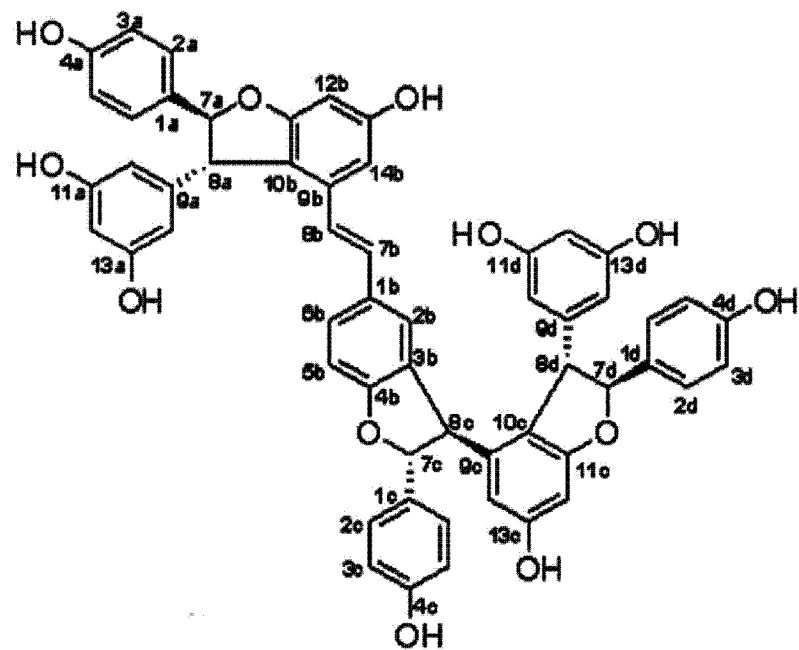
[화학식 18]



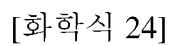
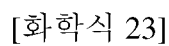
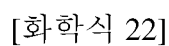
[화학식 19]

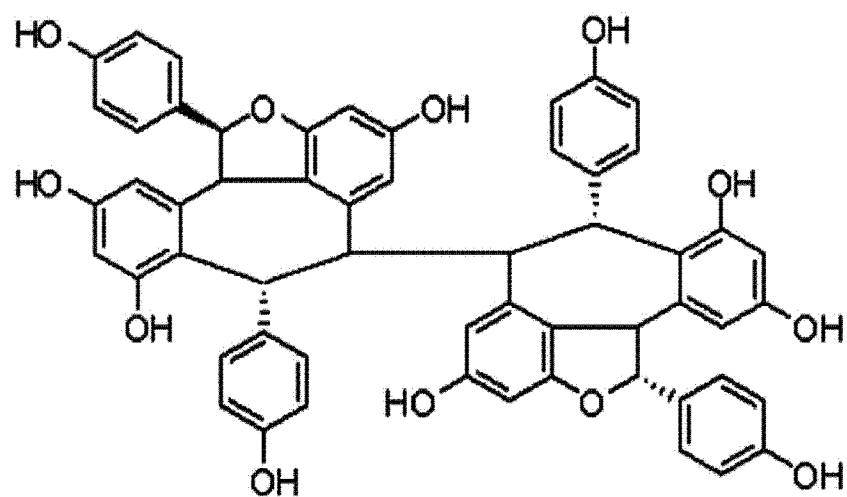


[화학식 20]

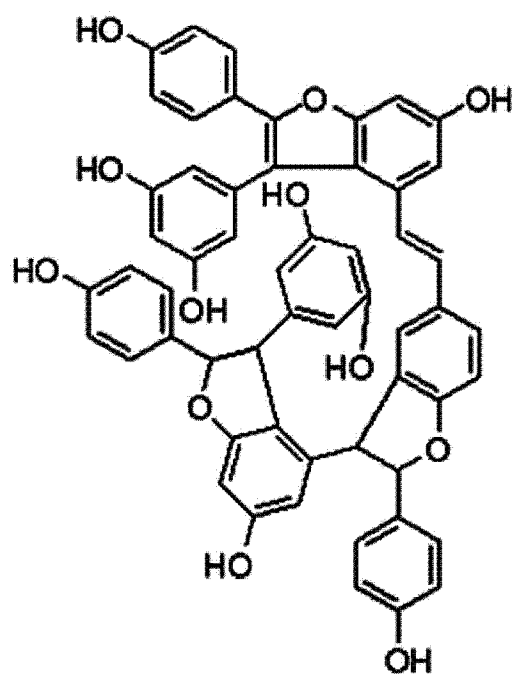


[화학식 21]

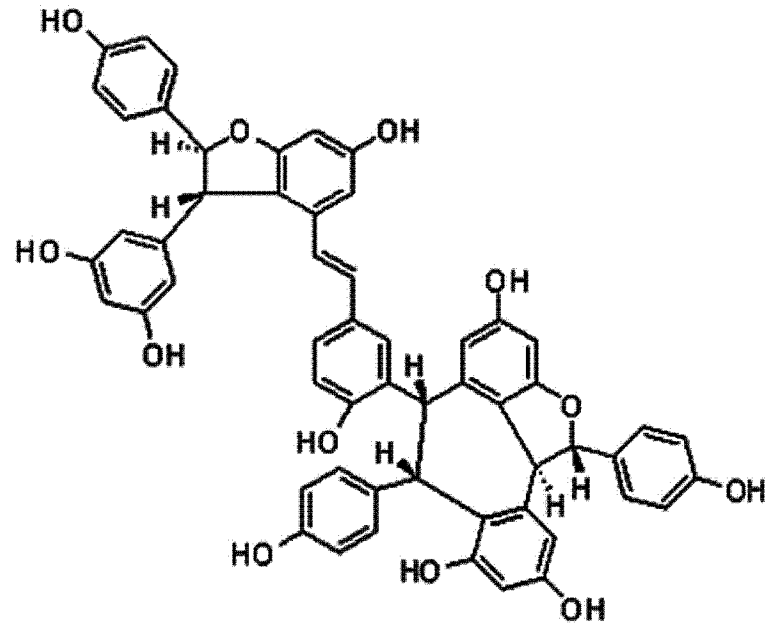




[화학식 25]



[화학식 26]

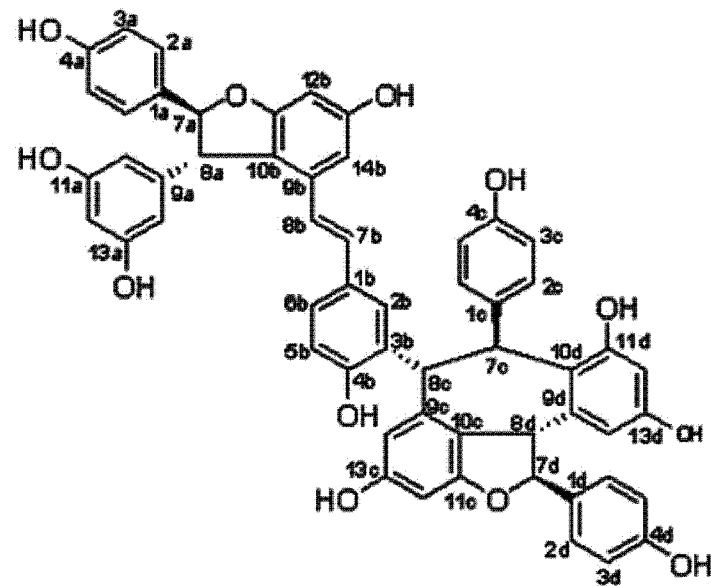


[청구항 8]

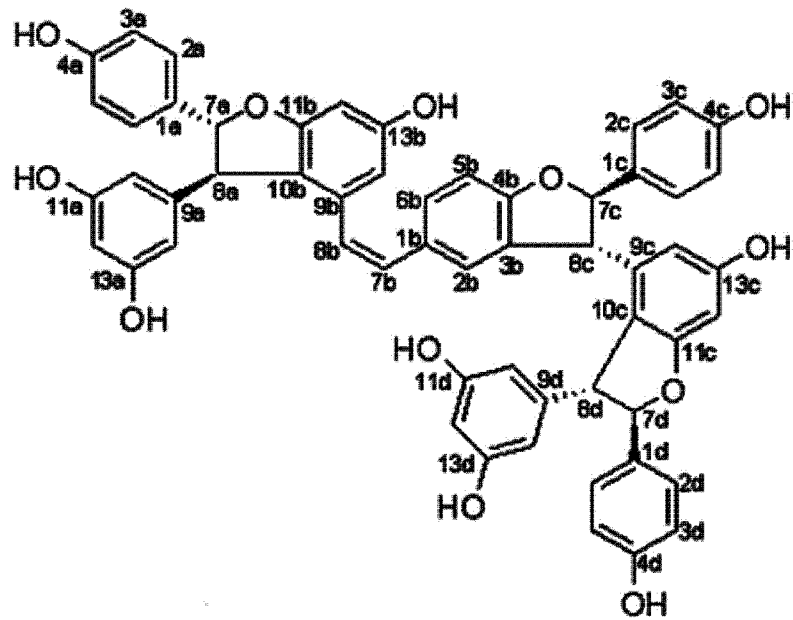
제7항에 있어서,

상기 레스베라트롤(resveratrol) 사량체는 하기 화학식 18 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 레스베라트롤(resveratrol) 사량체.

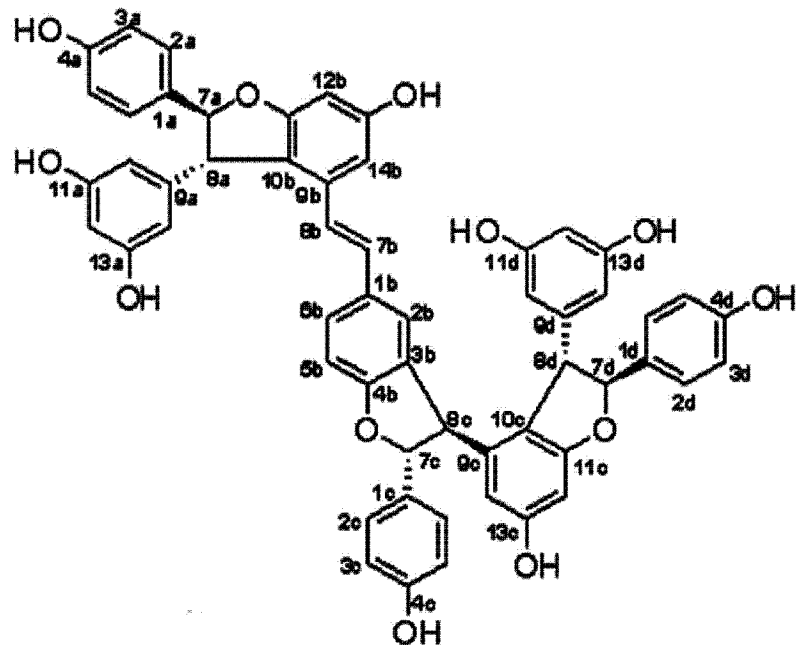
[화학식 18]



[화학식 19]



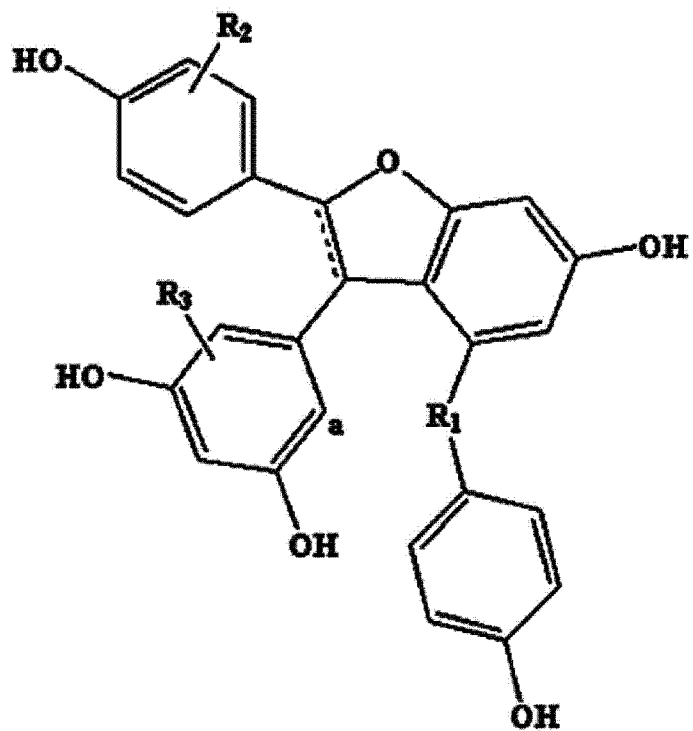
[화학식 20]



[청구항 9]

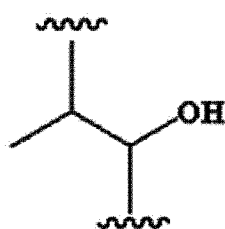
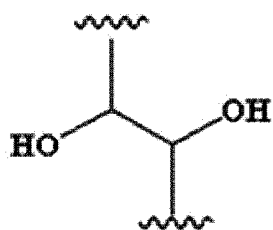
하기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는  
레스베라트롤(resveratrol) 다량체로 구성된 군으로부터 선택되는  
하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 C형 간염의 예방  
또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



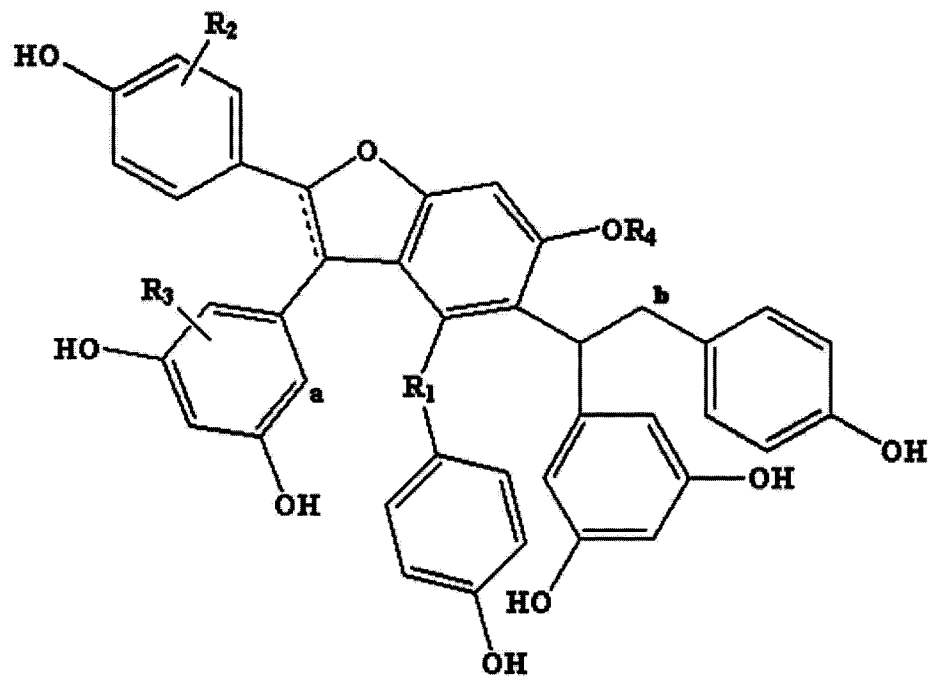
상기 화학식 1에서, R<sub>1</sub>은  $\begin{array}{c} \text{---} \text{C} = \text{C} \text{---} \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ ,

또는  $\begin{array}{c} \text{---} \text{C} \text{---} \\ \text{H} \end{array}$  이고,

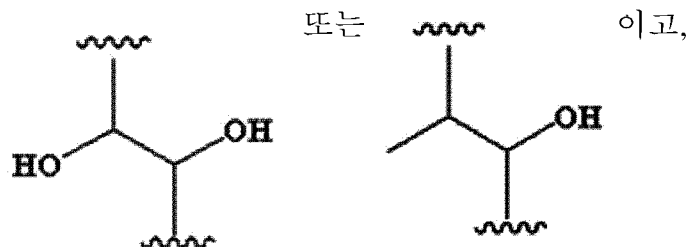


R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,  
R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,  
          는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

[화학식 2]



상기 화학식 2에서,  $R_1$ 은  $\text{---C(H)=C(H)---}$ ,



$R_2, R_3$ 은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,

$R_4$ 는 H이며,

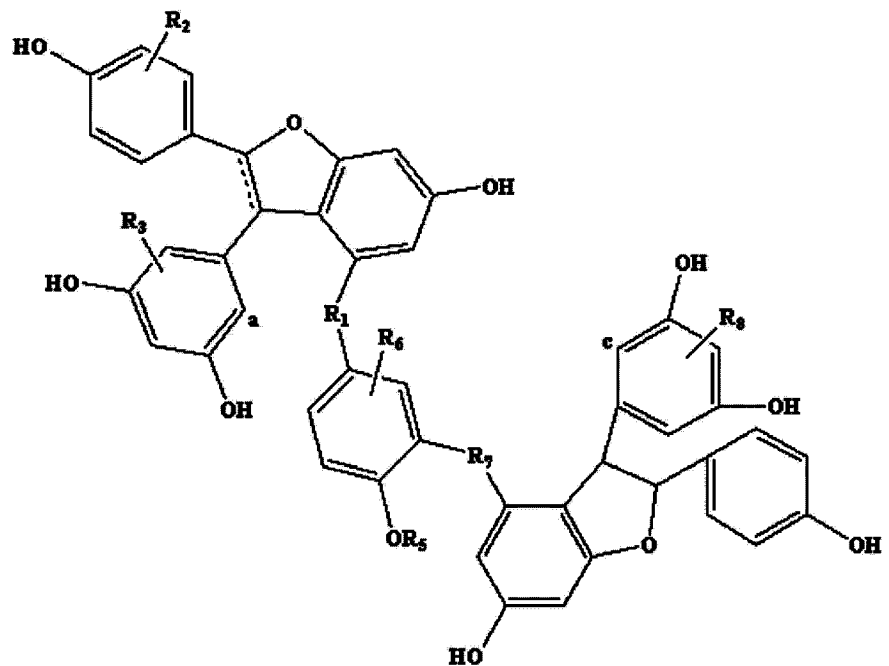
$R_1$ 의 탄소는 a 위치 및/또는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,

$OR_4$ 는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,

는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

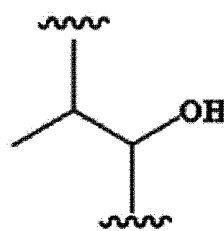
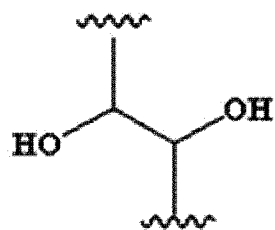


[화학식 3]

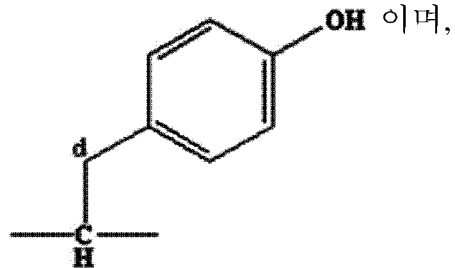


상기 화학식 3에서, R<sub>1</sub>은 ,

또는 이고,



R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이며,  
R<sub>5</sub>는 H이고,  
R<sub>7</sub>은



R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,  
R<sub>7</sub>의 d위치의 탄소는 OR<sub>5</sub>와 결합하여 5원환을 형성하거나,  
c위치의 탄소와 결합하여 7원환을 형성할 수 있으며,  
 는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

[청구항 10]

제9항에 있어서, 상기 레스베라트롤(resveratrol) 다량체는 C형

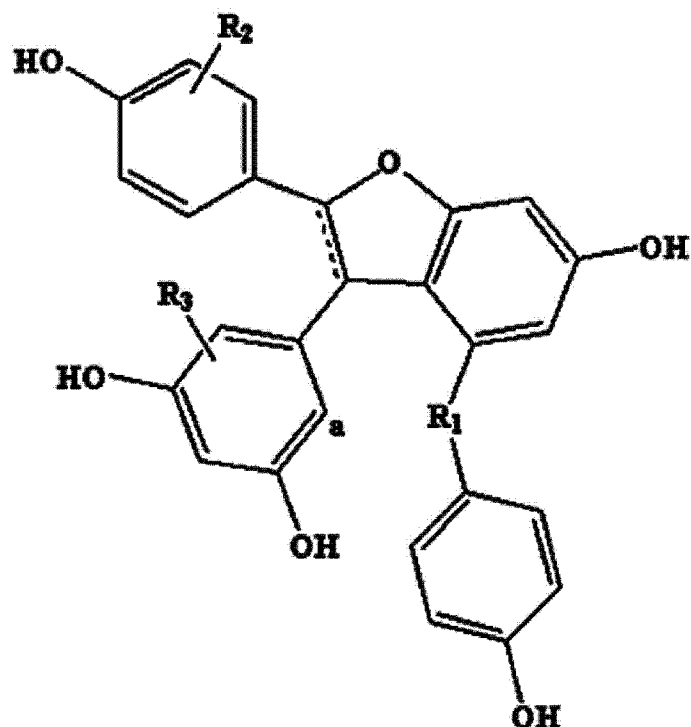
간염 바이러스의 RNA 게놈 복제의 선택적 저해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

[청구항 11]

하기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는

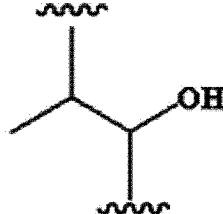
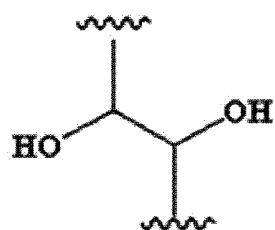
레스베라트롤(resveratrol) 다량체로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 C형 간염의 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물.

[화학식 1]



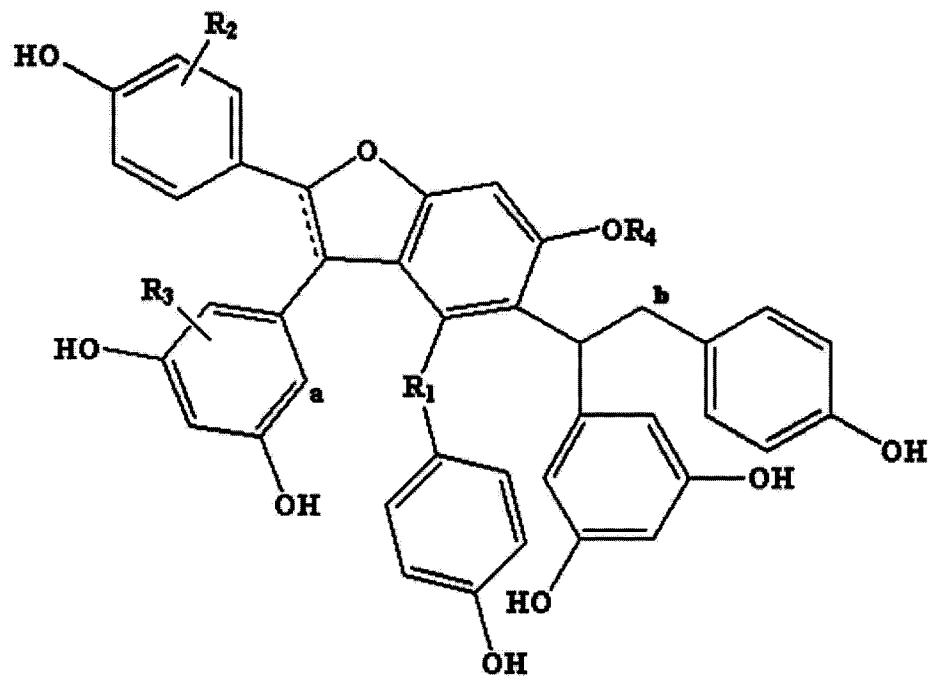
상기 화학식 1에서, R<sub>1</sub>은  $\begin{array}{c} \text{---} \text{C}=\text{C} \text{---} \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$ ,

또는 이고,



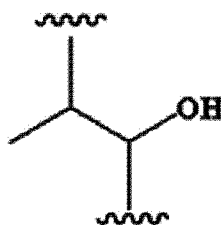
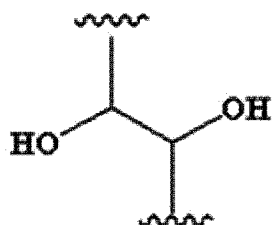
R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,  
R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,  
        는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

[화학식 2]



상기 화학식 2에서,  $R_1$ 은  $\text{---}\text{C}=\text{C}\text{---}$ ,  
 $\text{H}$     $\text{H}$

또는  $\text{---}\text{C}(\text{OH})\text{---}$  이고,



$R_2, R_3$ 은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이고,

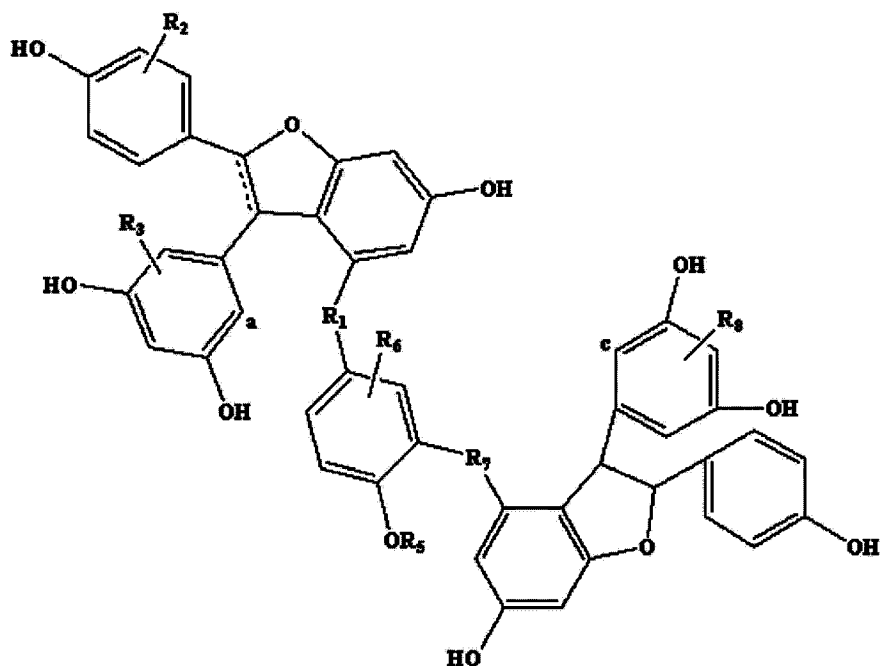
$R_4$ 는 H이며,

$R_1$ 의 탄소는 a 위치 및/또는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,

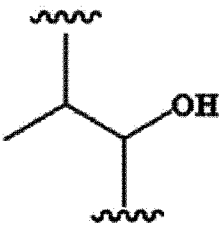
$OR_4$ 는 b 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있으며,

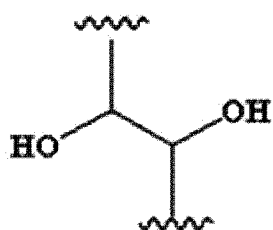
          는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

[화학식 3]

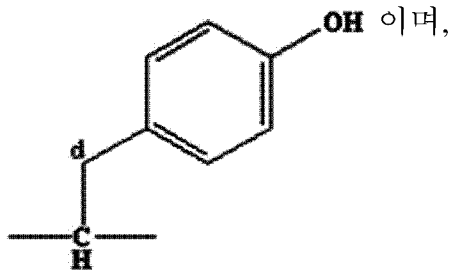


상기 화학식 3에서, R<sub>1</sub>은 ,

또는  이고,



R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>8</sub>은 서로 같거나 다른 것으로, H 또는 OH이며,  
R<sub>5</sub>는 H이고,  
R<sub>7</sub>은



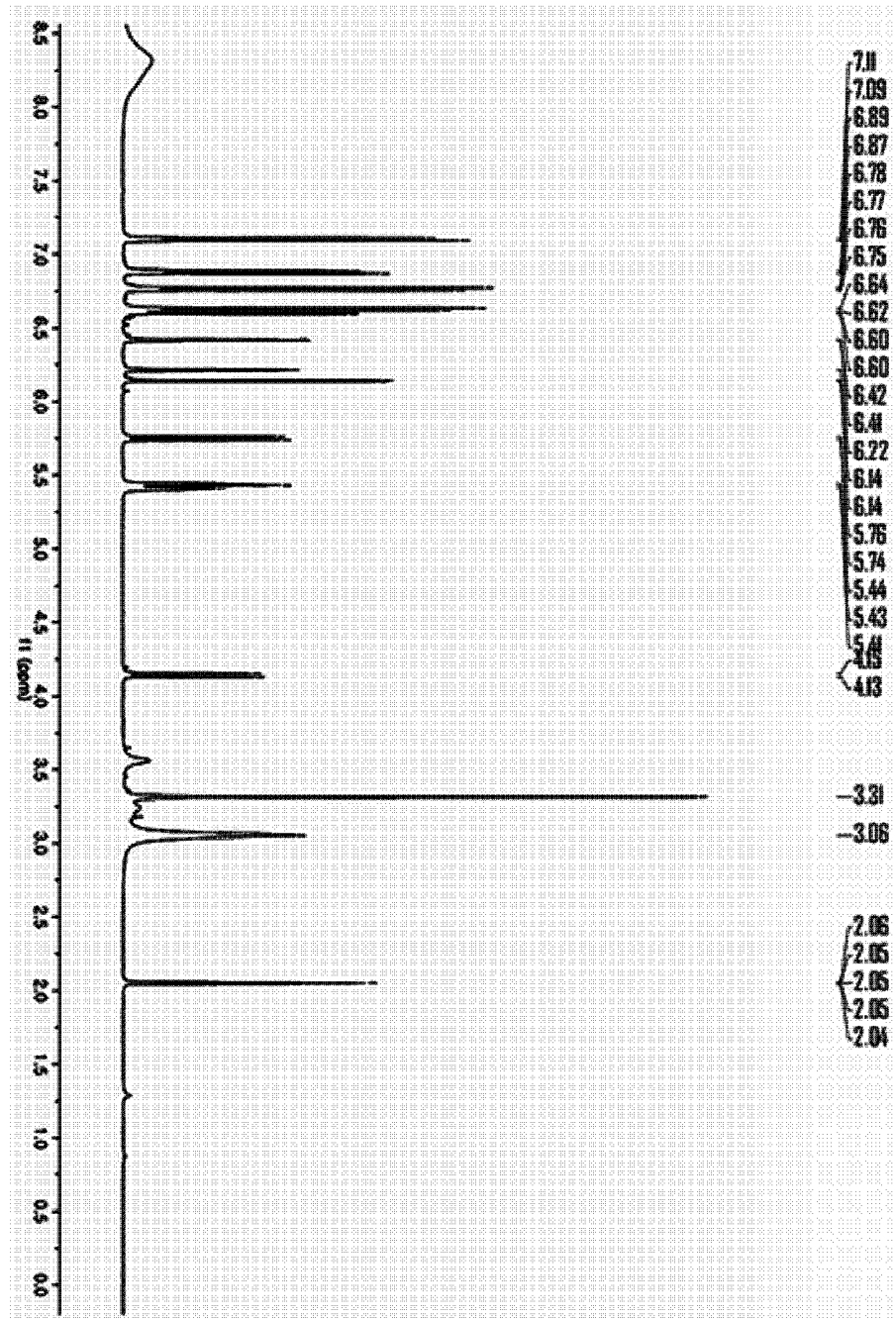
R<sub>1</sub>의 탄소는 a 위치의 탄소와 결합하여 환을 형성할 수 있고,  
R<sub>7</sub>의 d 위치의 탄소는 OR<sub>5</sub>와 결합하여 5원환을 형성하거나,  
c 위치의 탄소와 결합하여 7원환을 형성할 수 있으며,  
 는 단일 또는 이중 결합을 나타낸다.

[청구항 12]

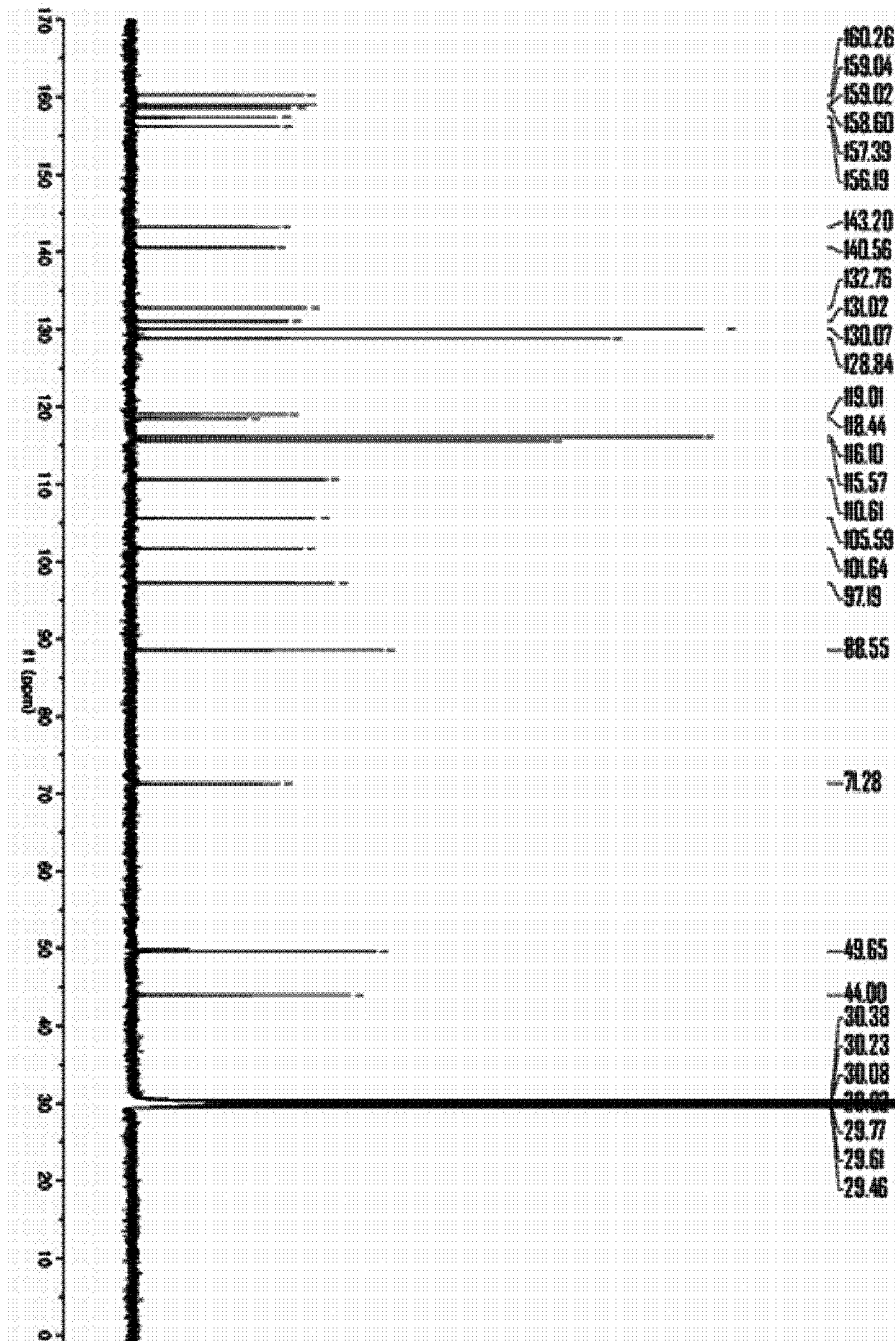
제9항에 따른 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는

C형 간염의 예방 또는 치료 방법.  
[청구항 13] 제9항에 따른 약학적 조성물의 C형 간염의 예방 또는 치료 용도.

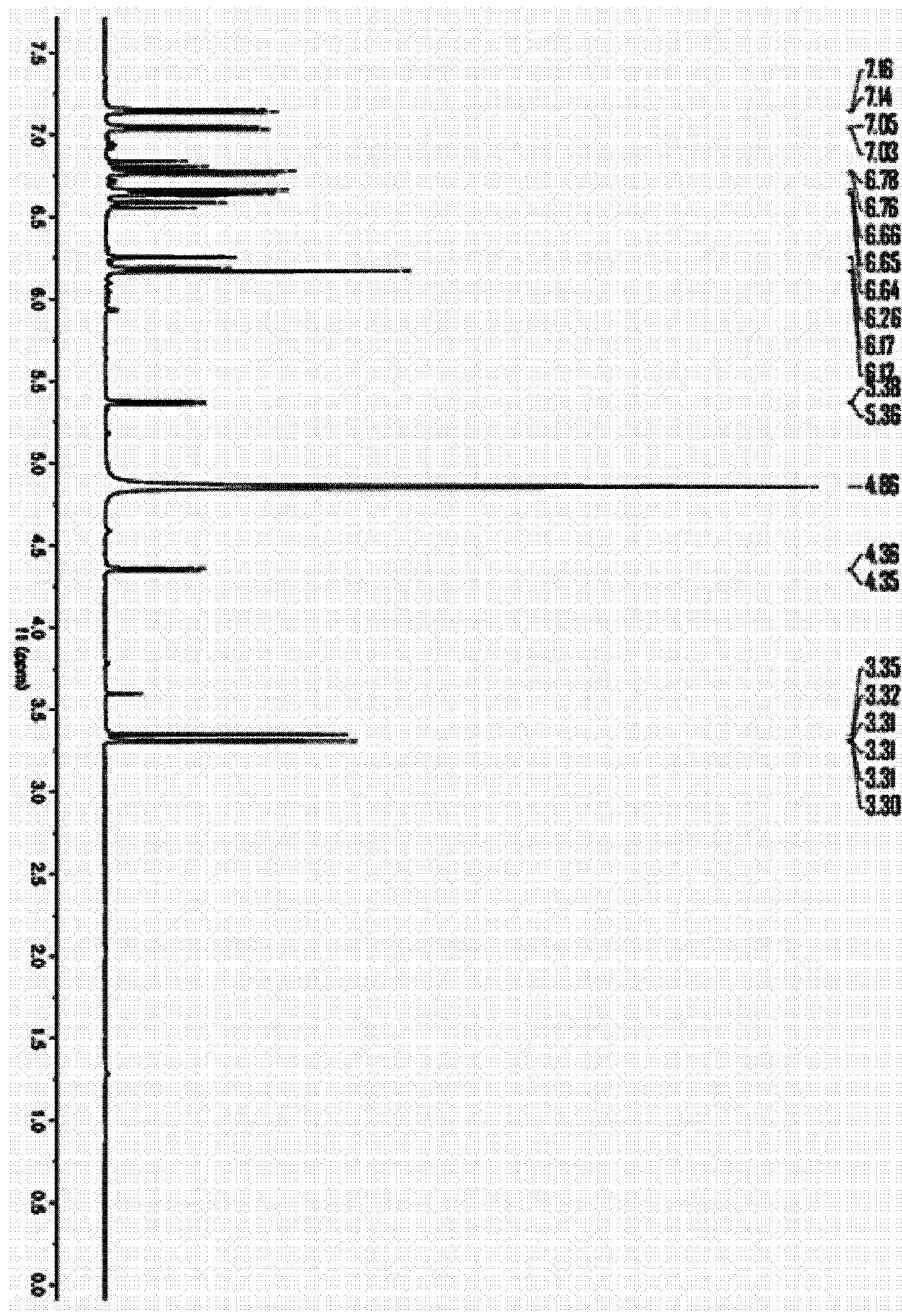
[도1]



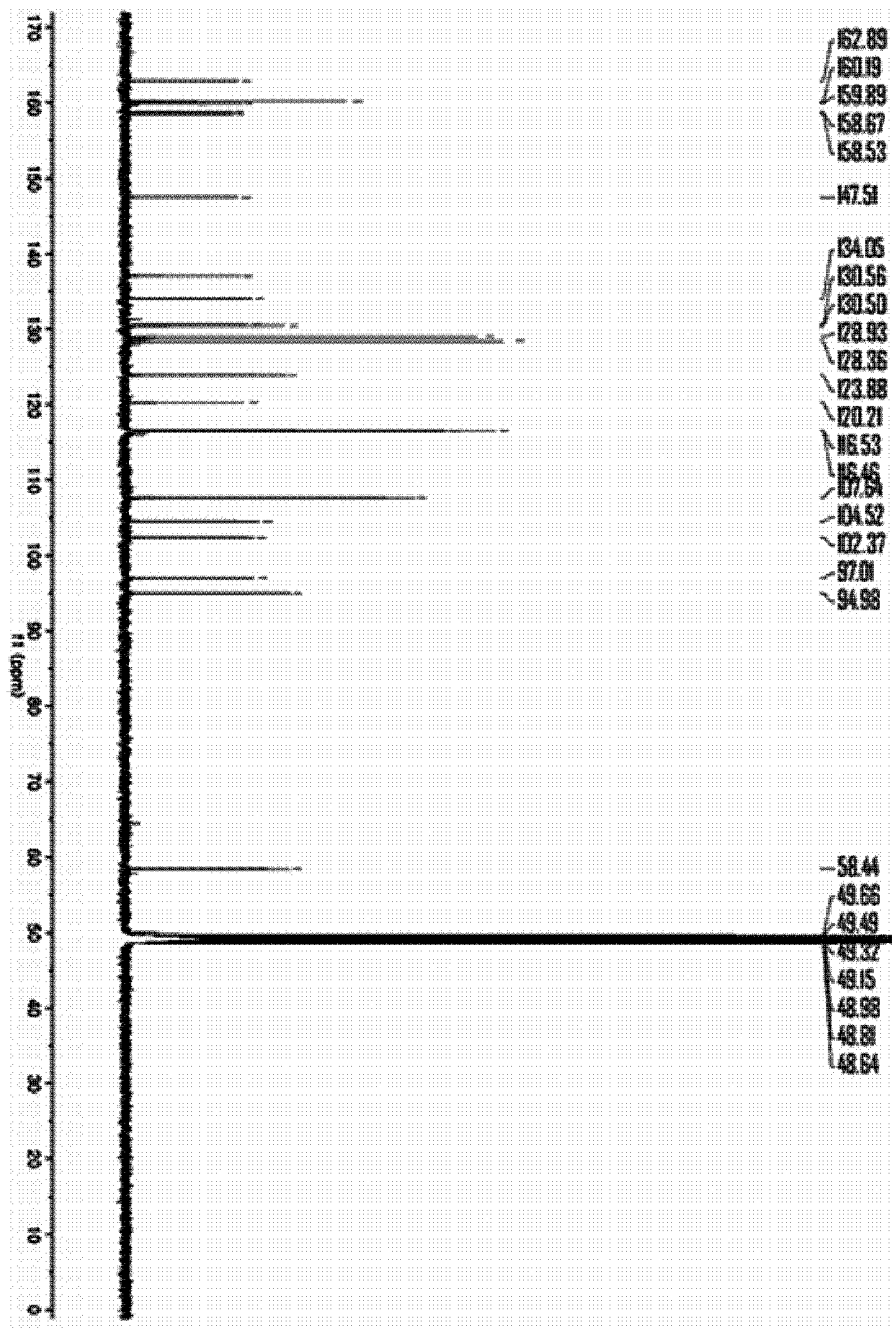
[도2]



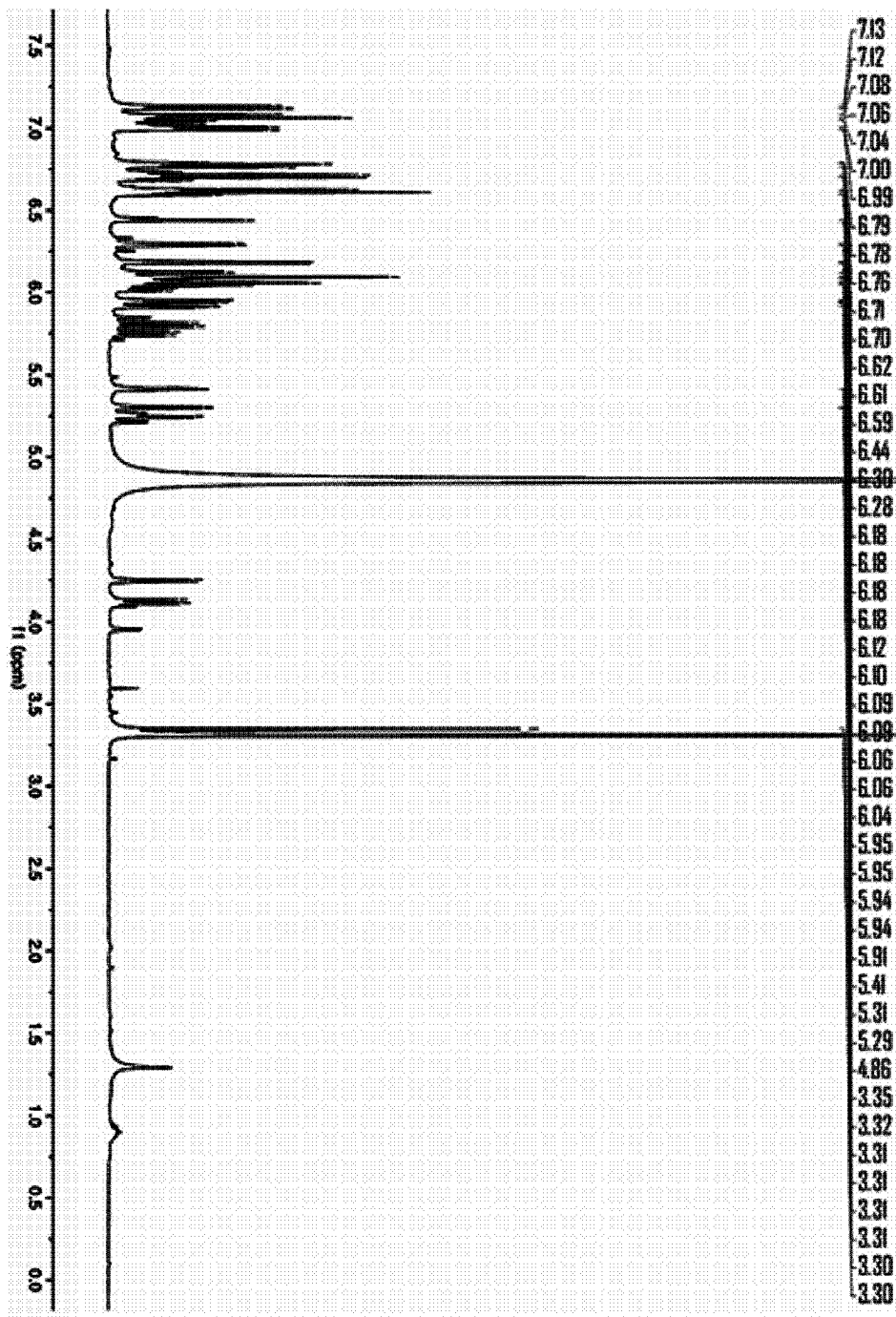
[도3]



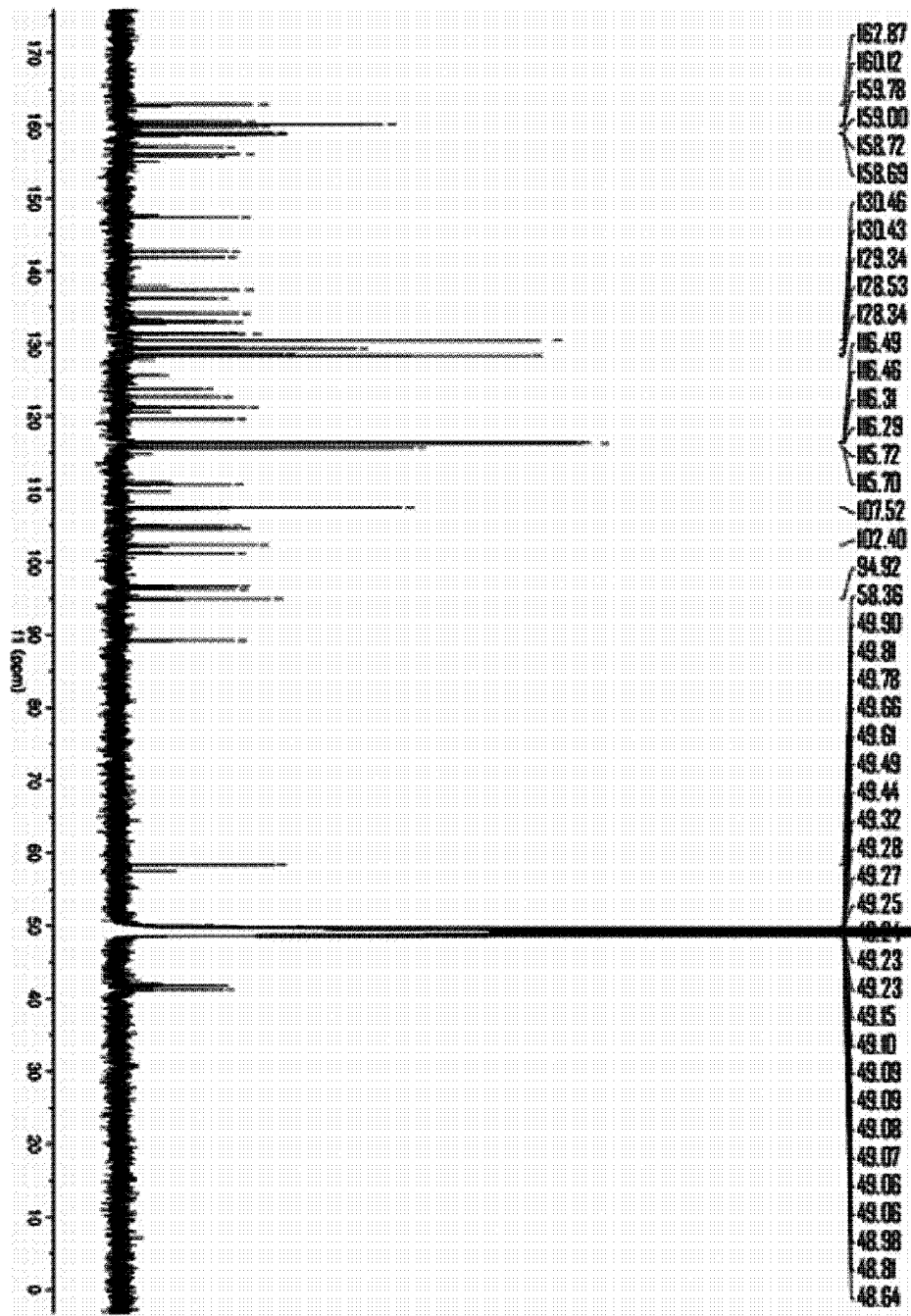
[도4]



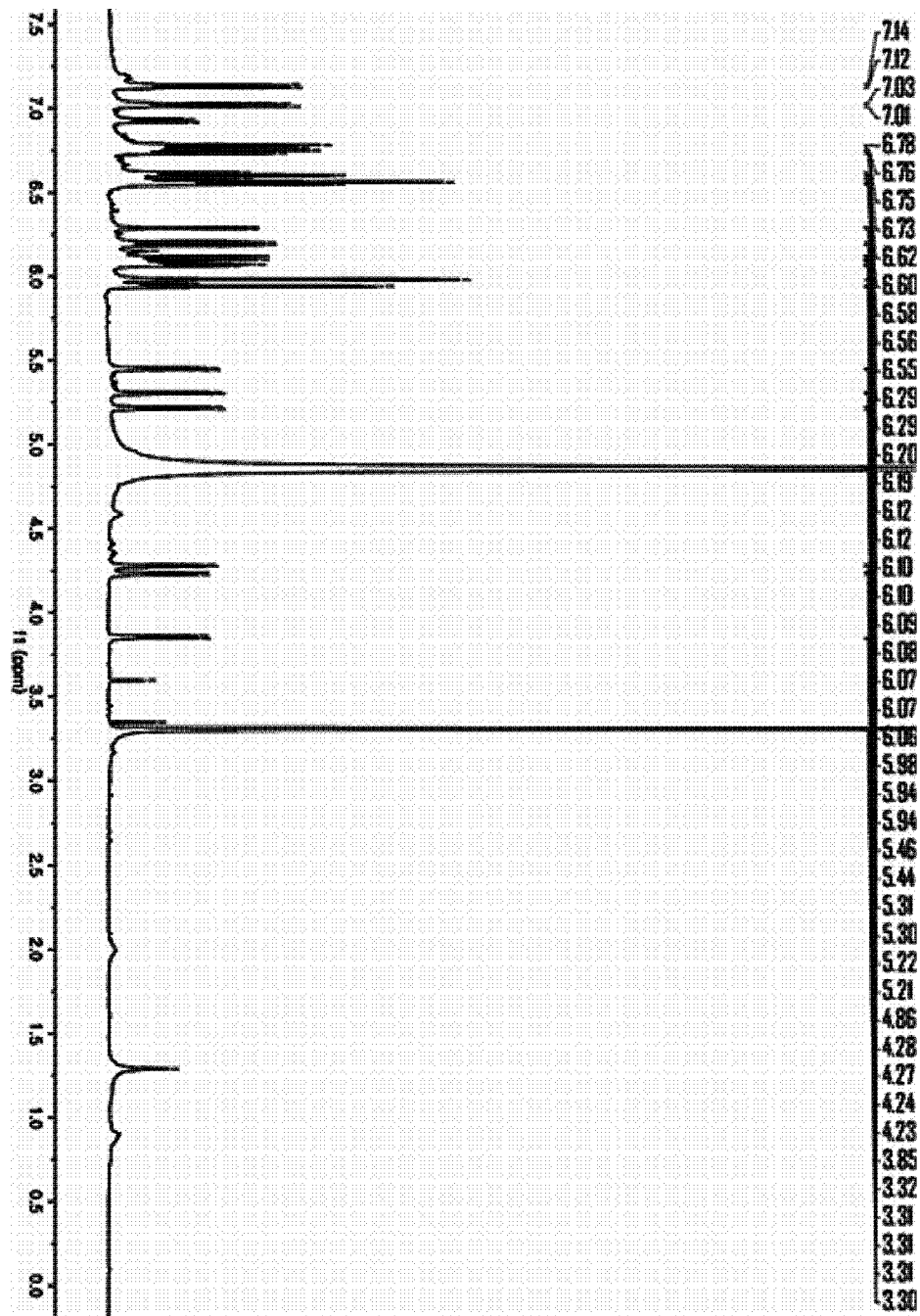
[도5]



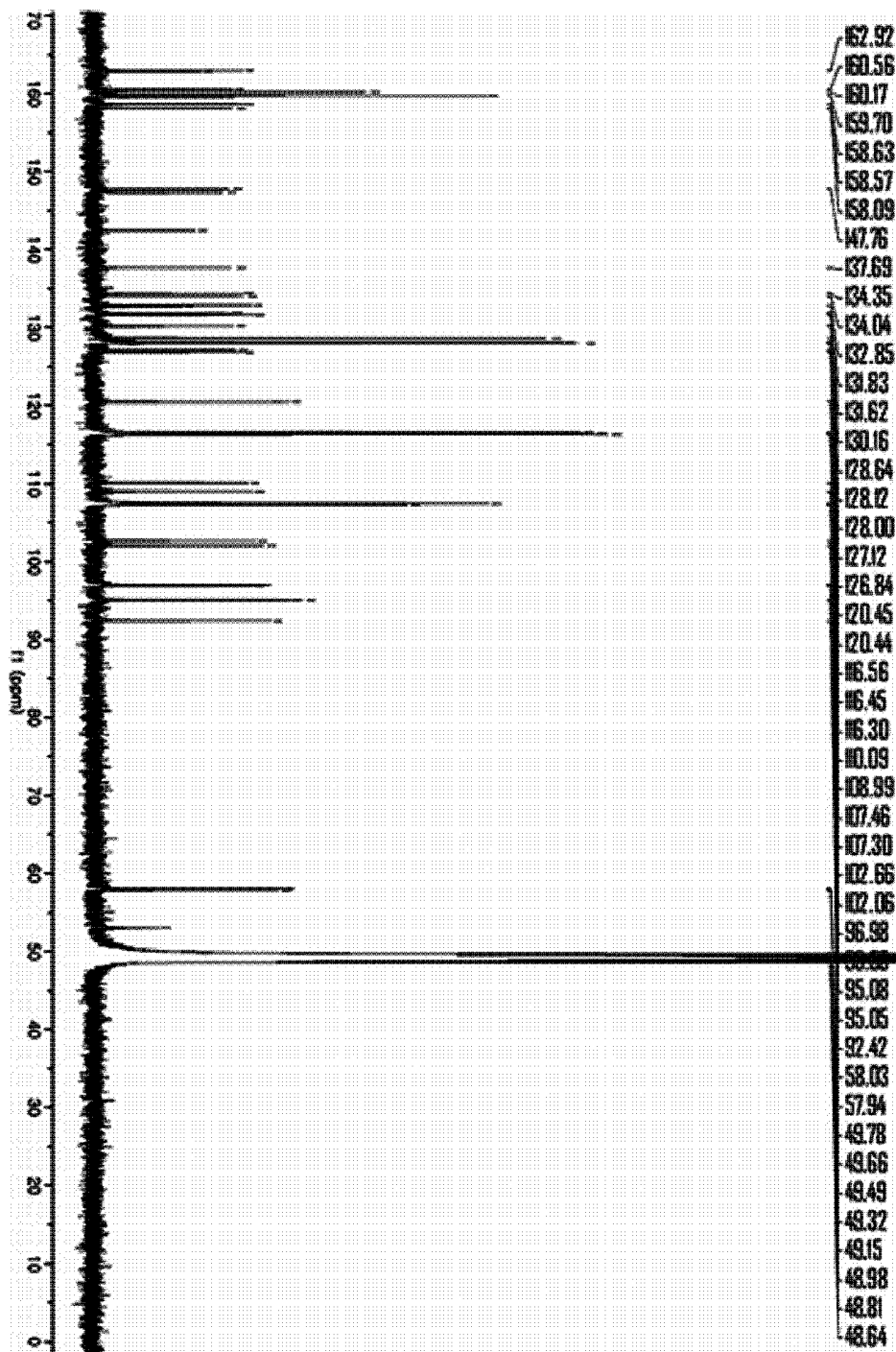
[도6]



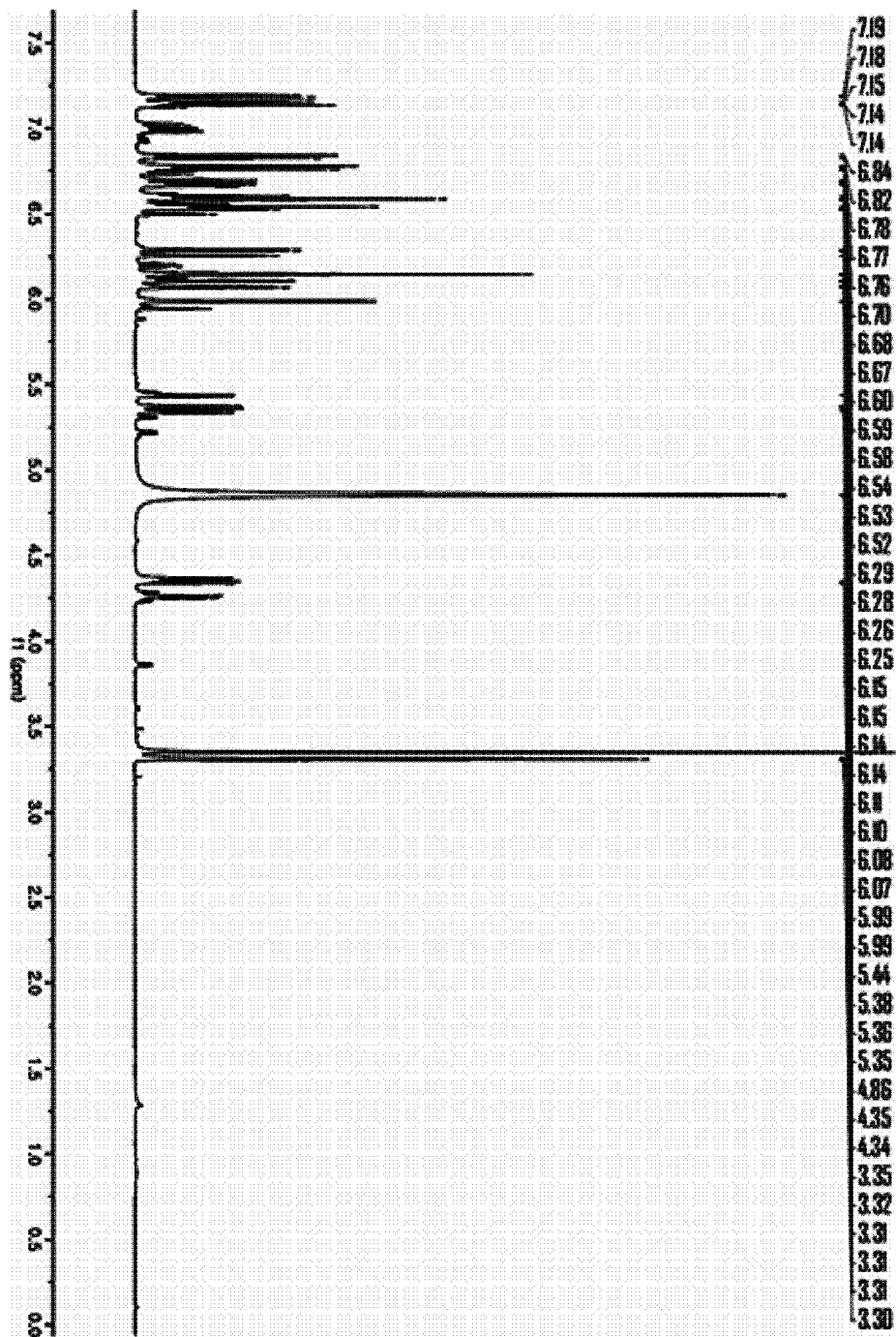
[도7]



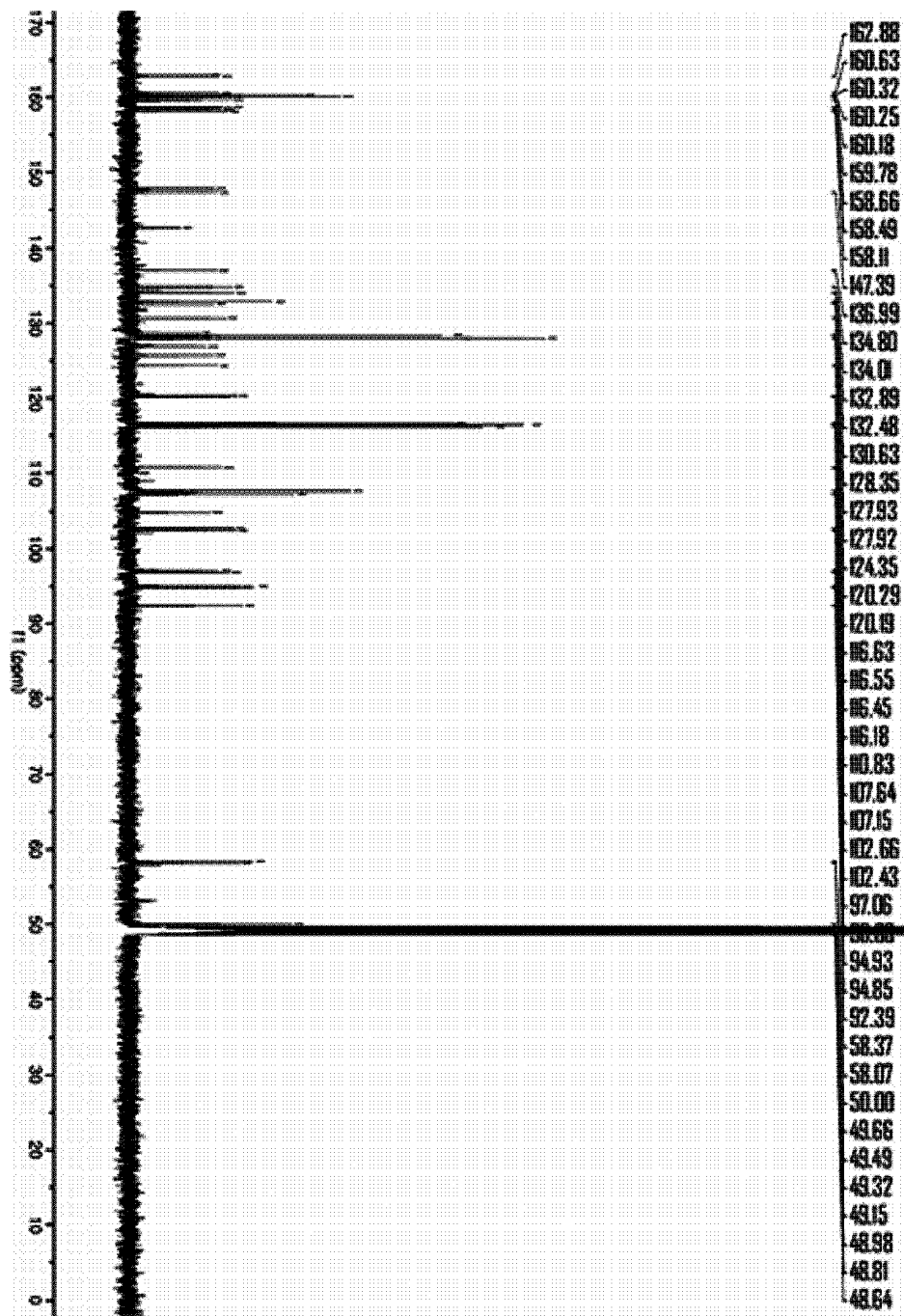
[도8]



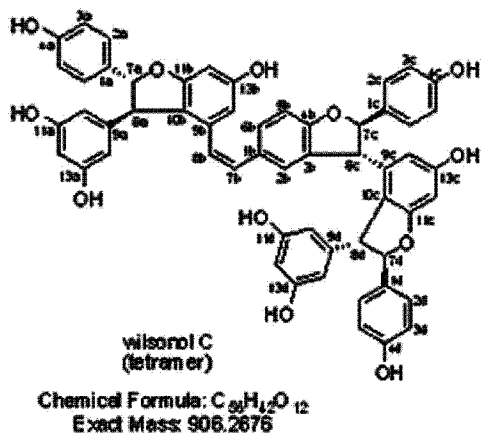
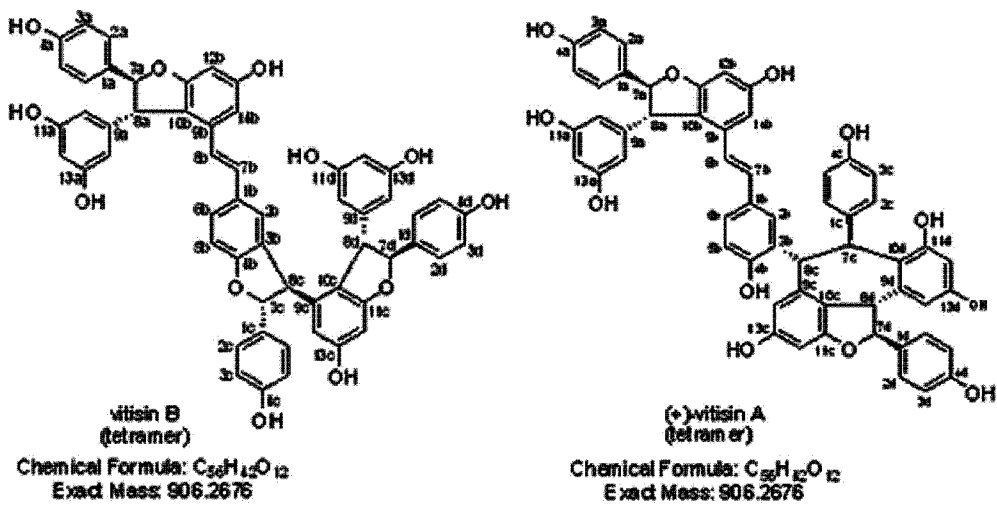
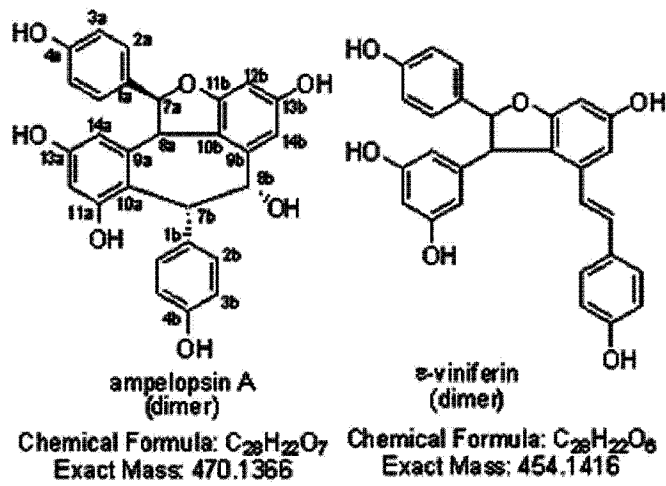
[도9]



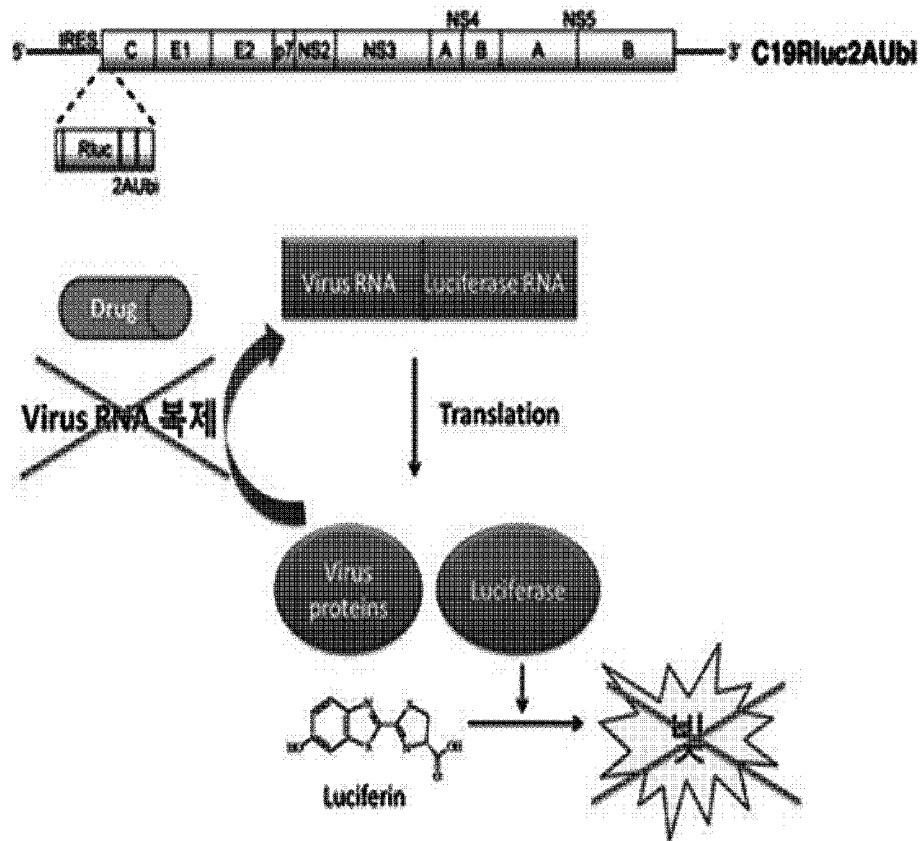
[도10]



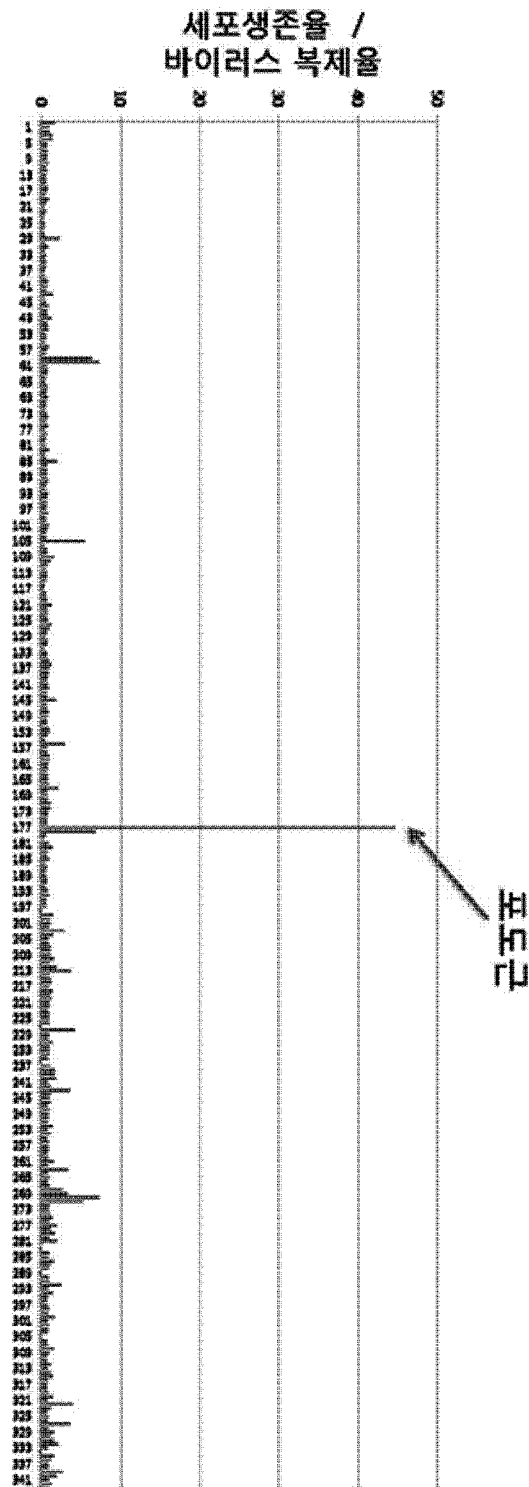
[도11]



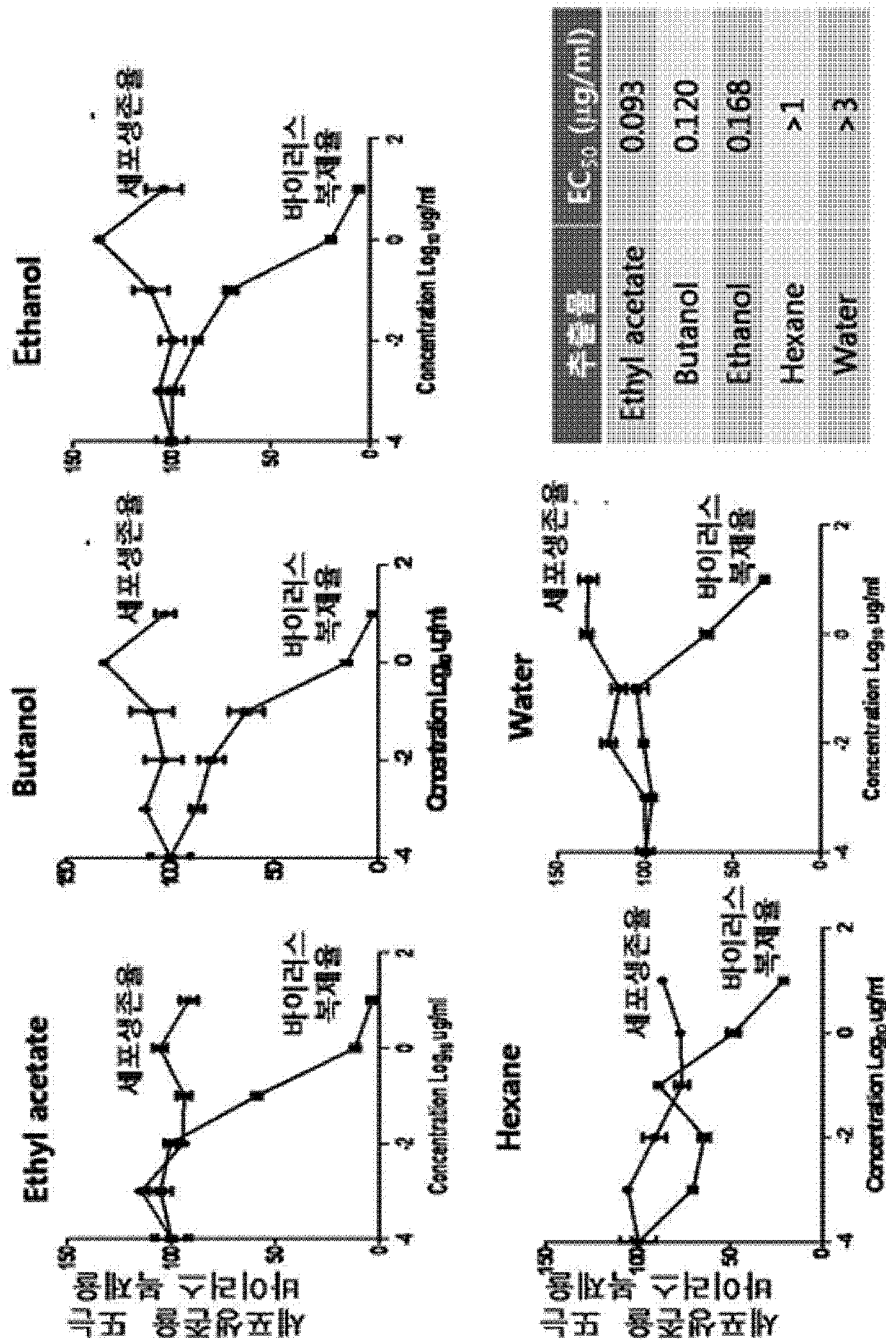
[도12]



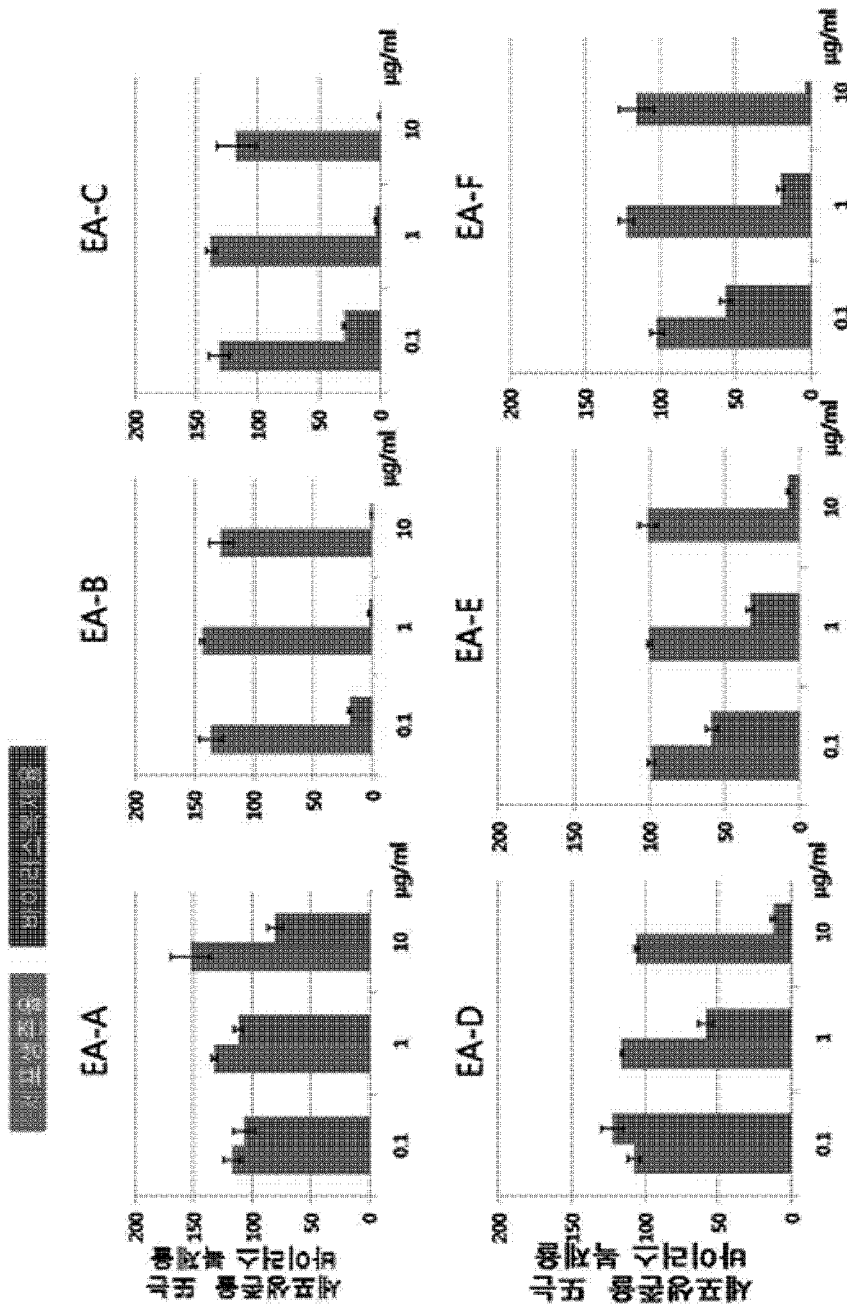
[도13]



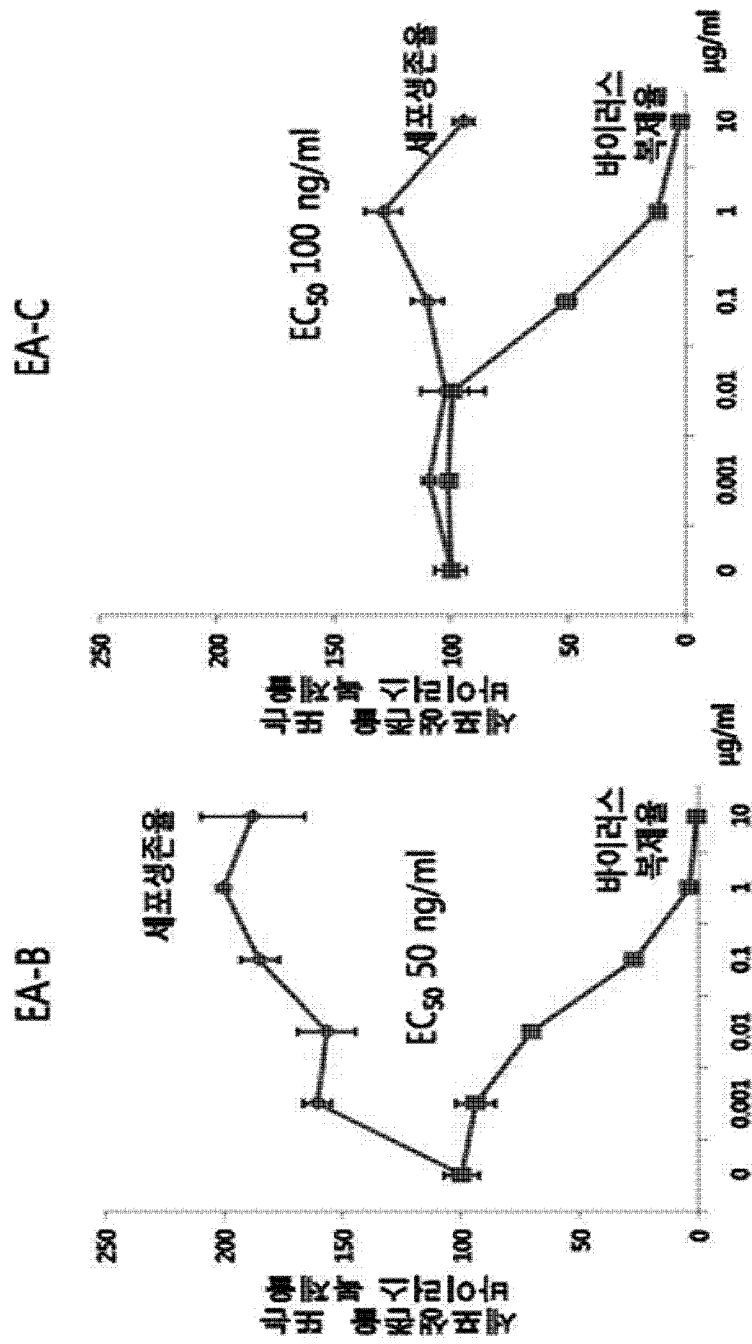
[도14]



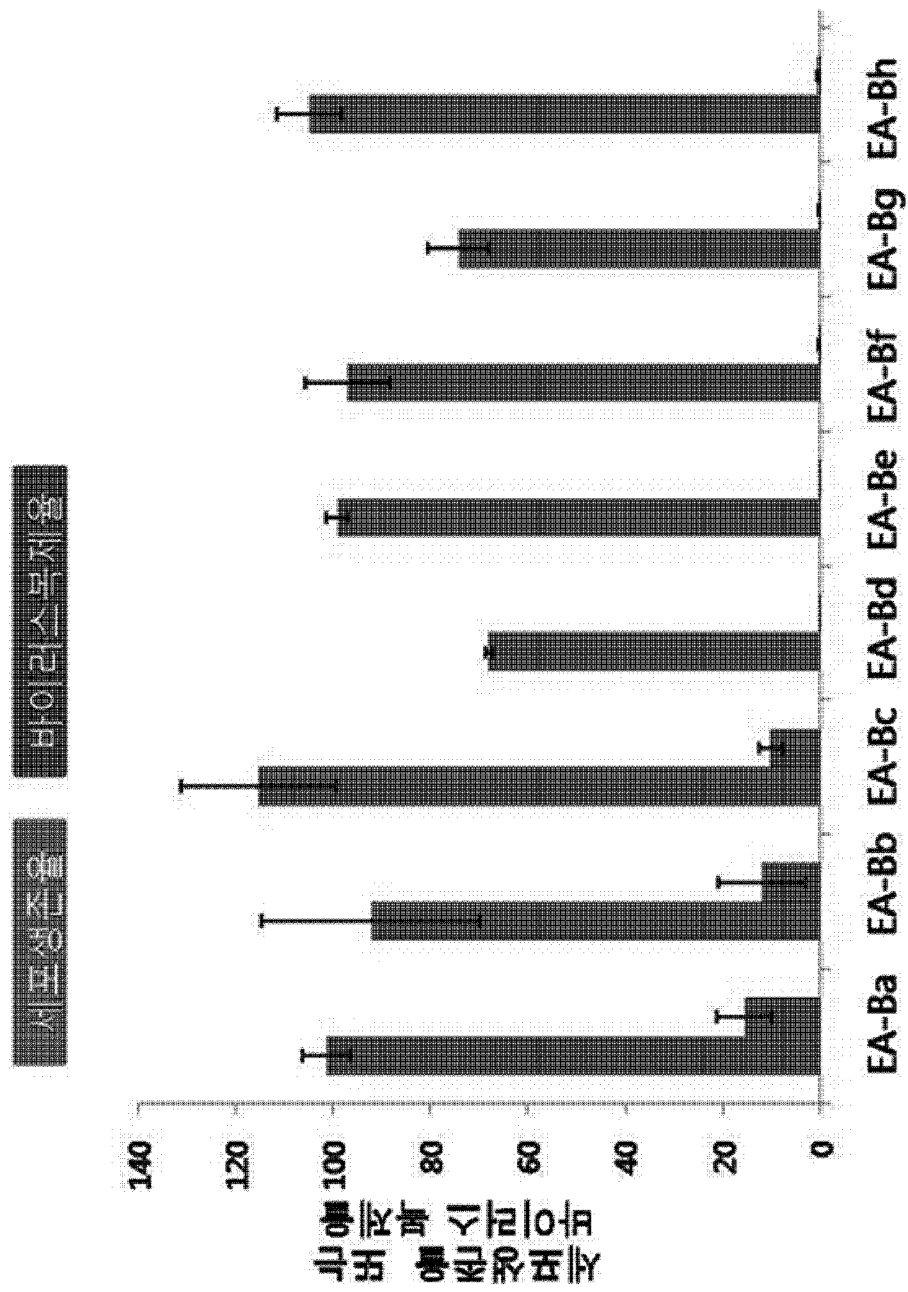
[도15]



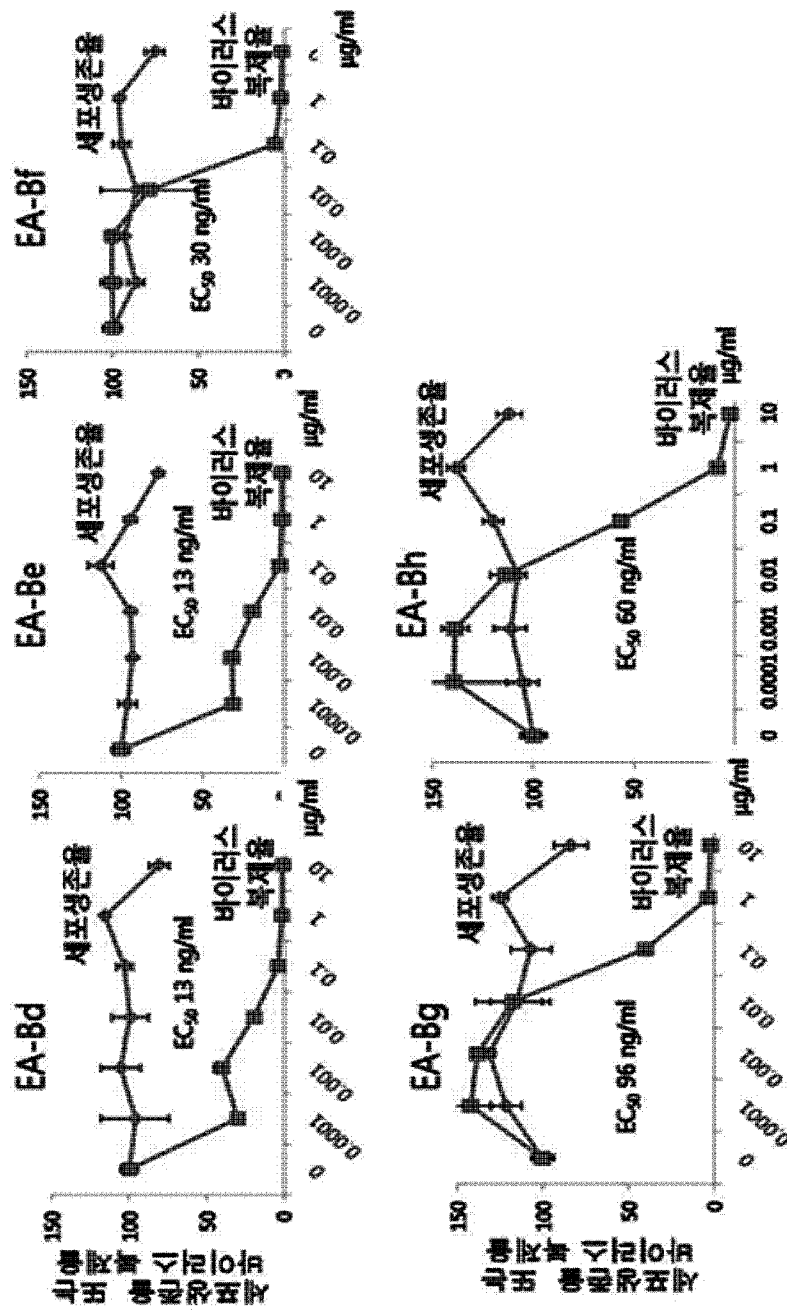
[도16]



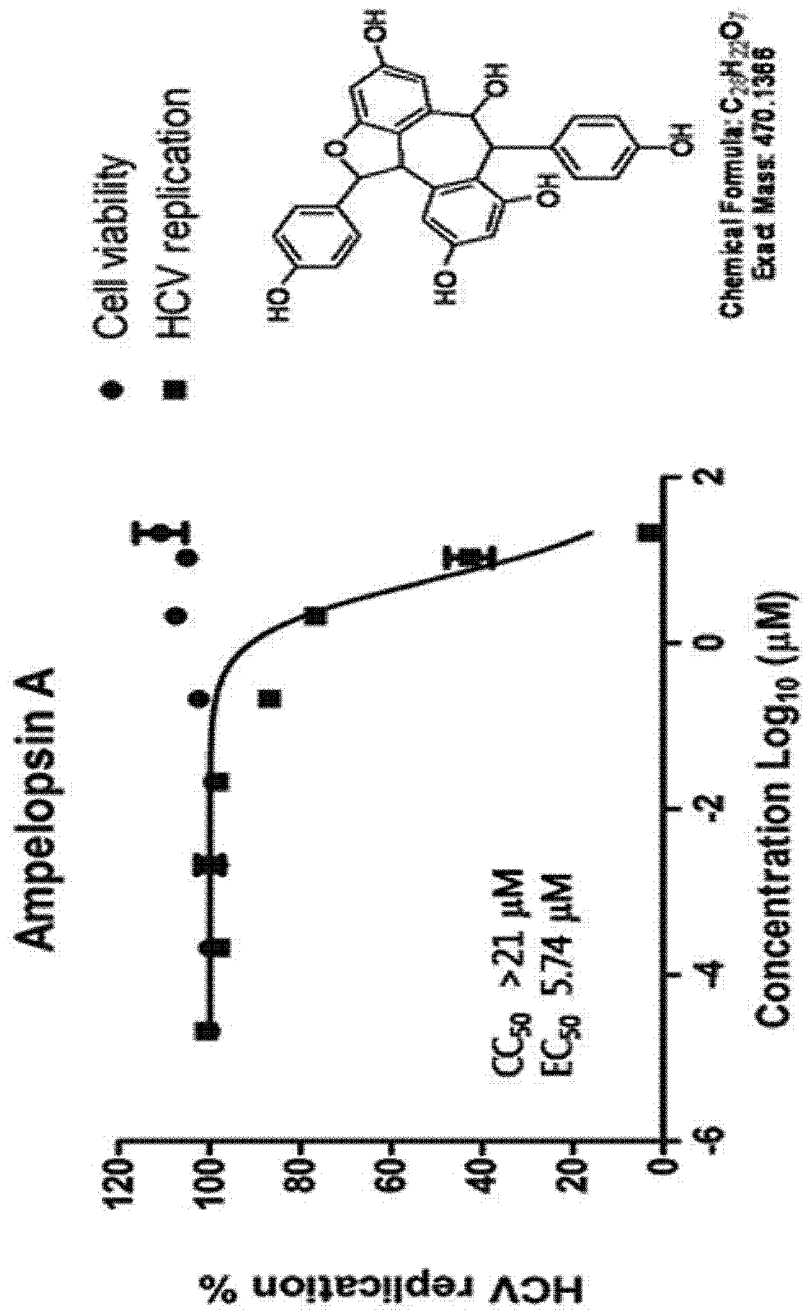
[도17]



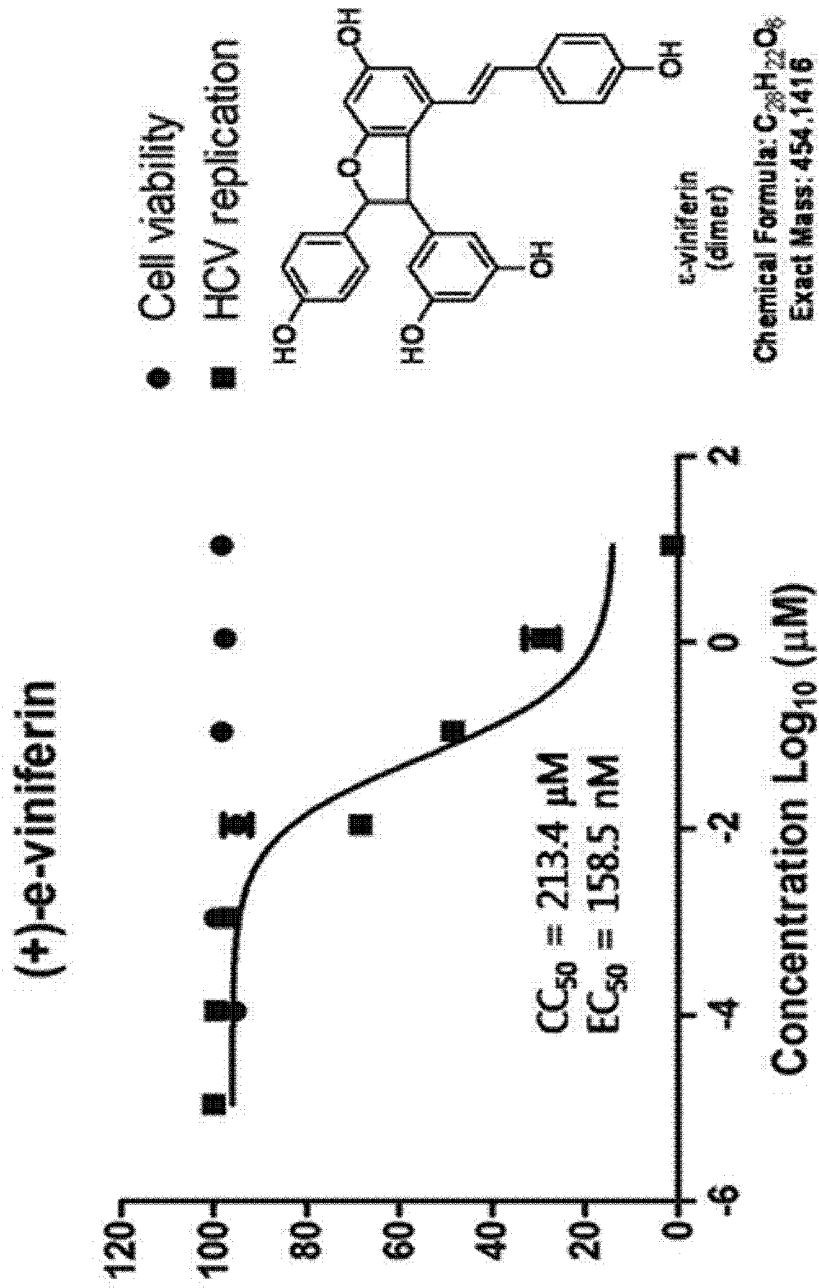
[도18]



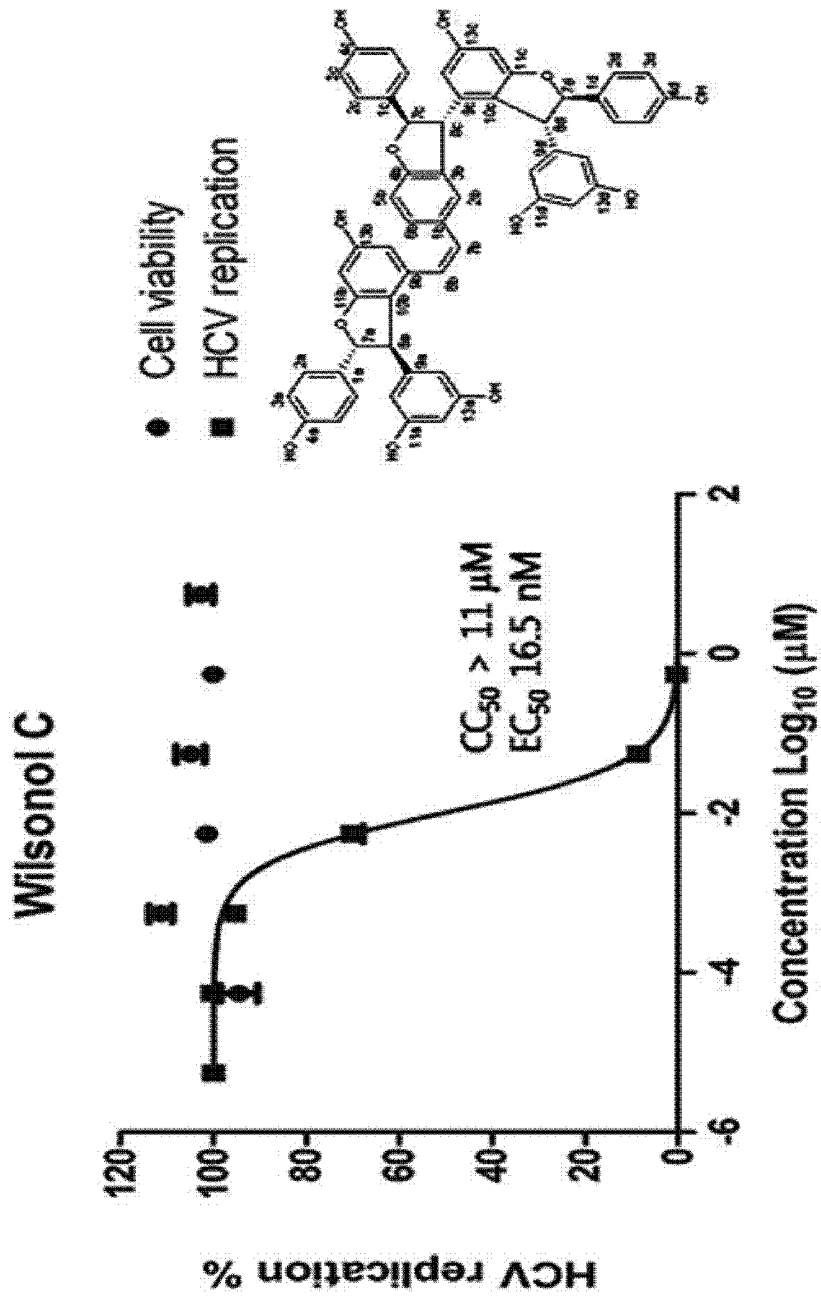
[도19]



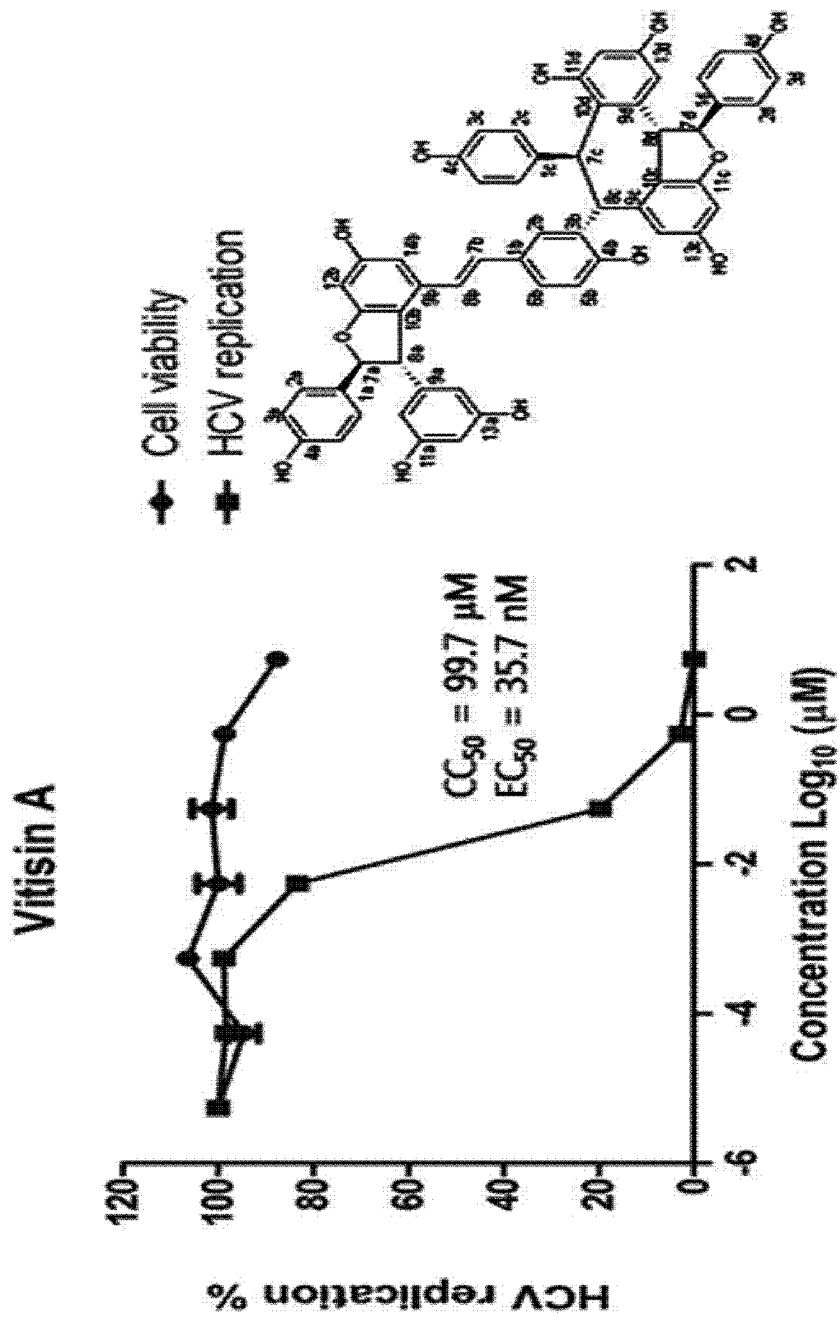
[도20]



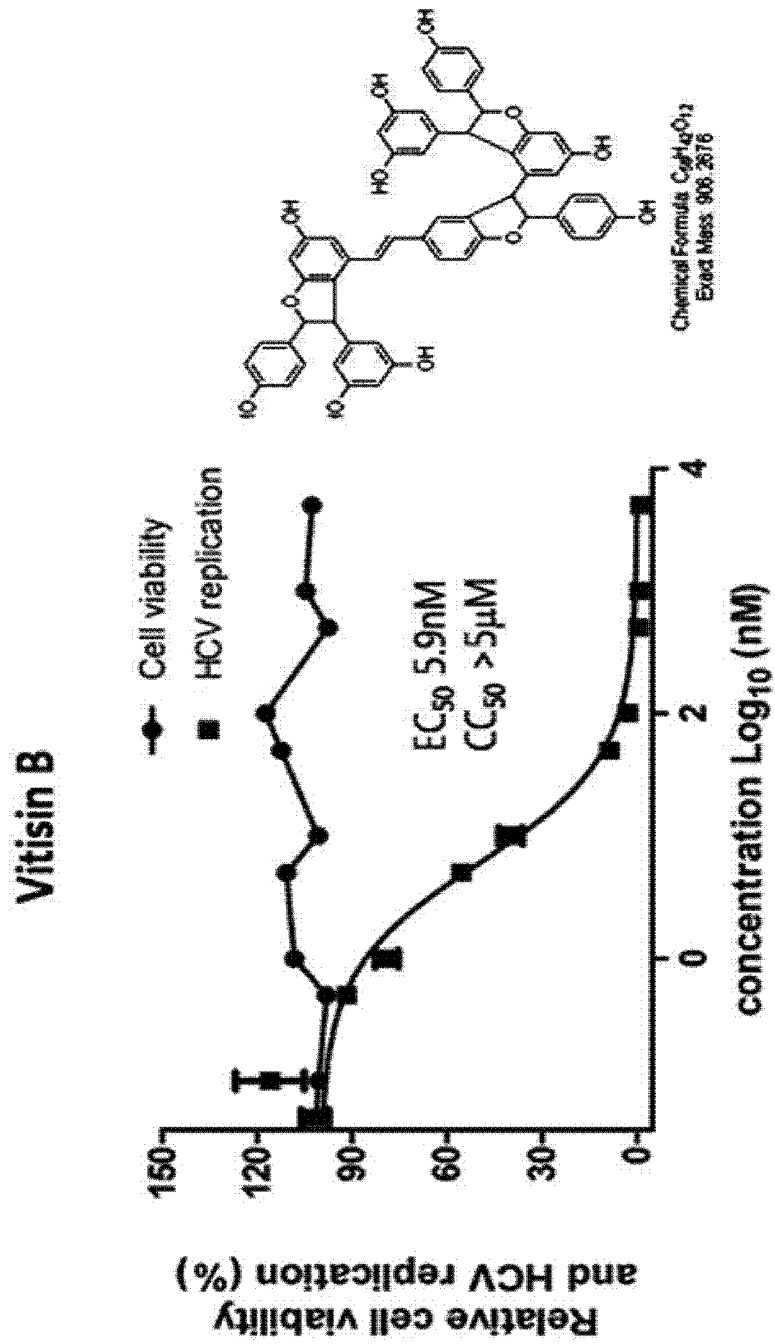
[도21]



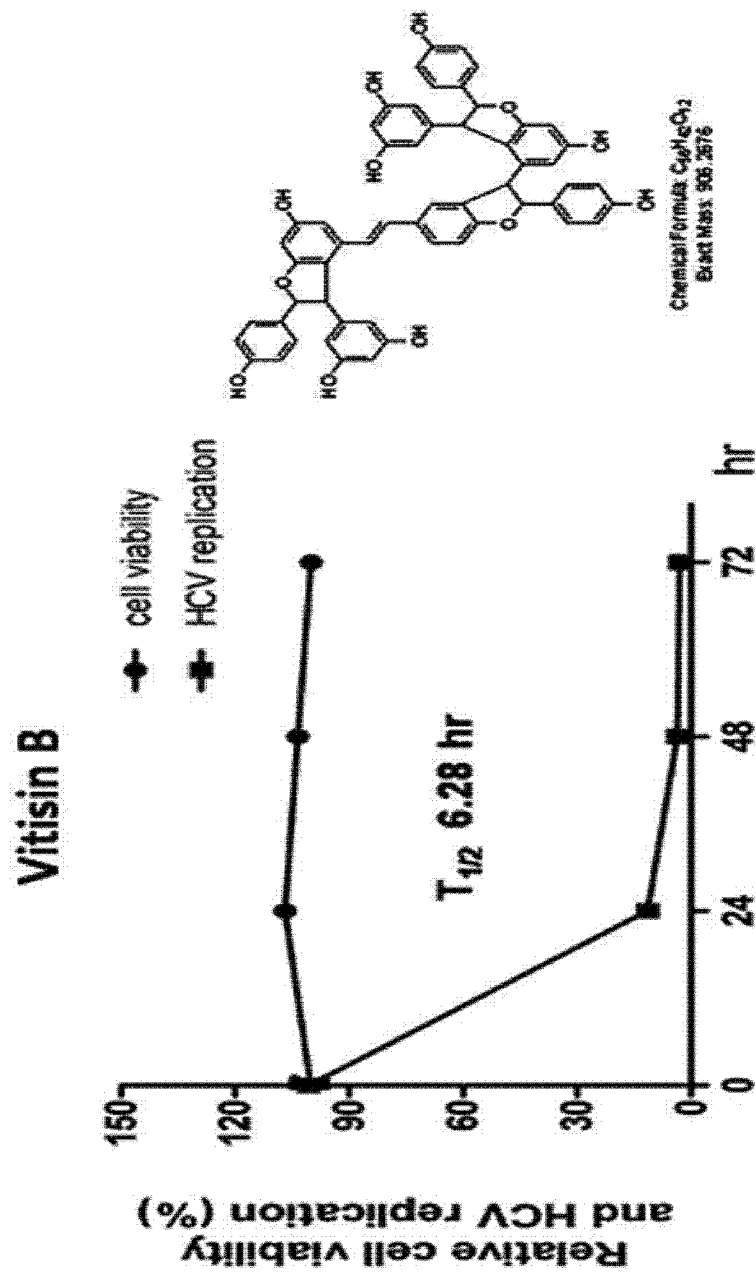
[도22]



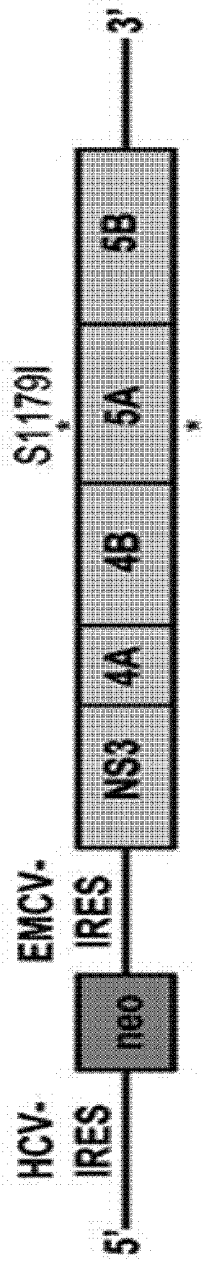
[도23]



[도24]



[도25]



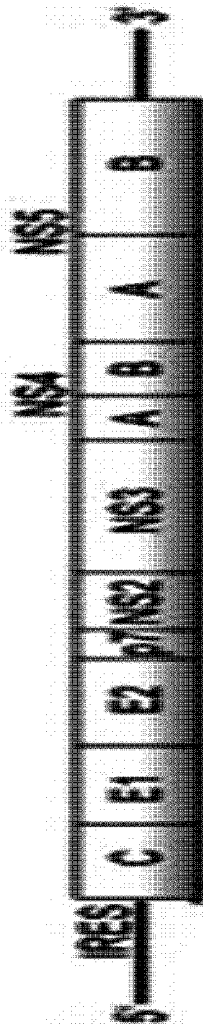
HCV – hepatitis C virus

EMCV – encephalomyocarditis virus

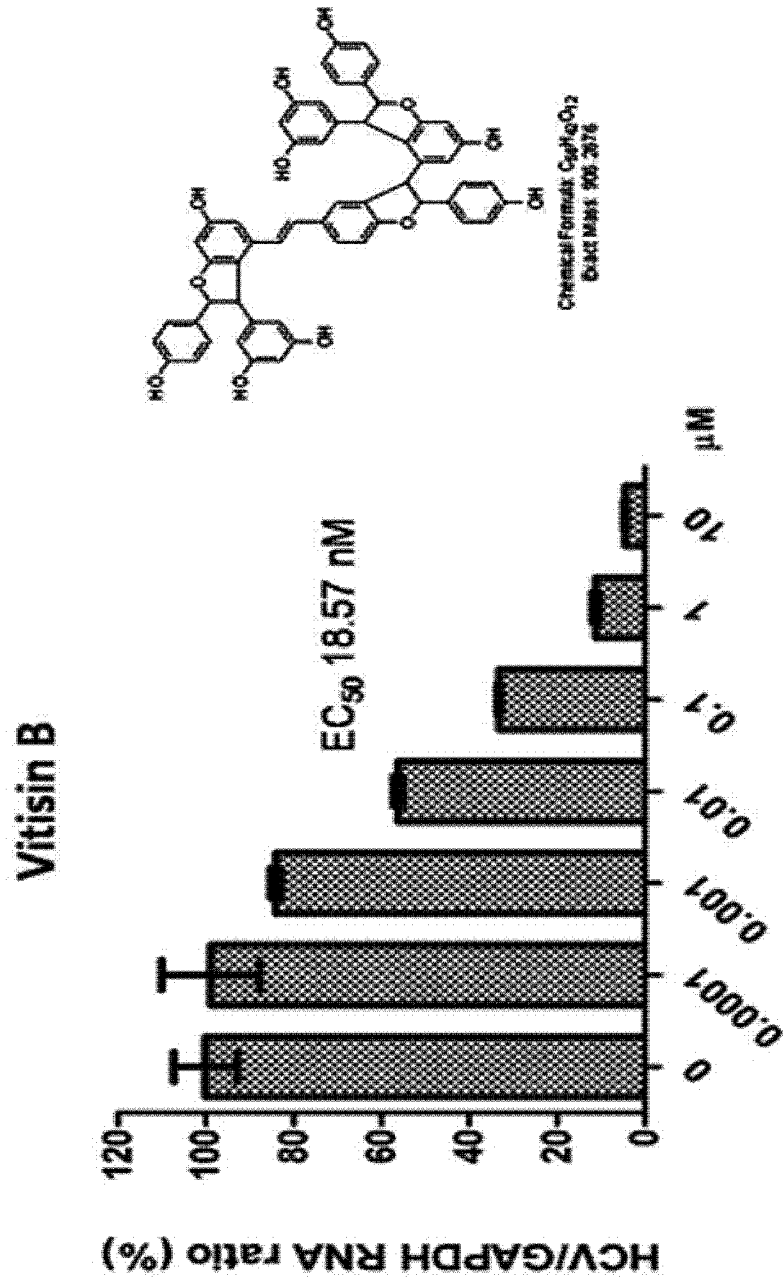
IRES – internal ribosome entry site

Neo – neomycin phosphotransferase

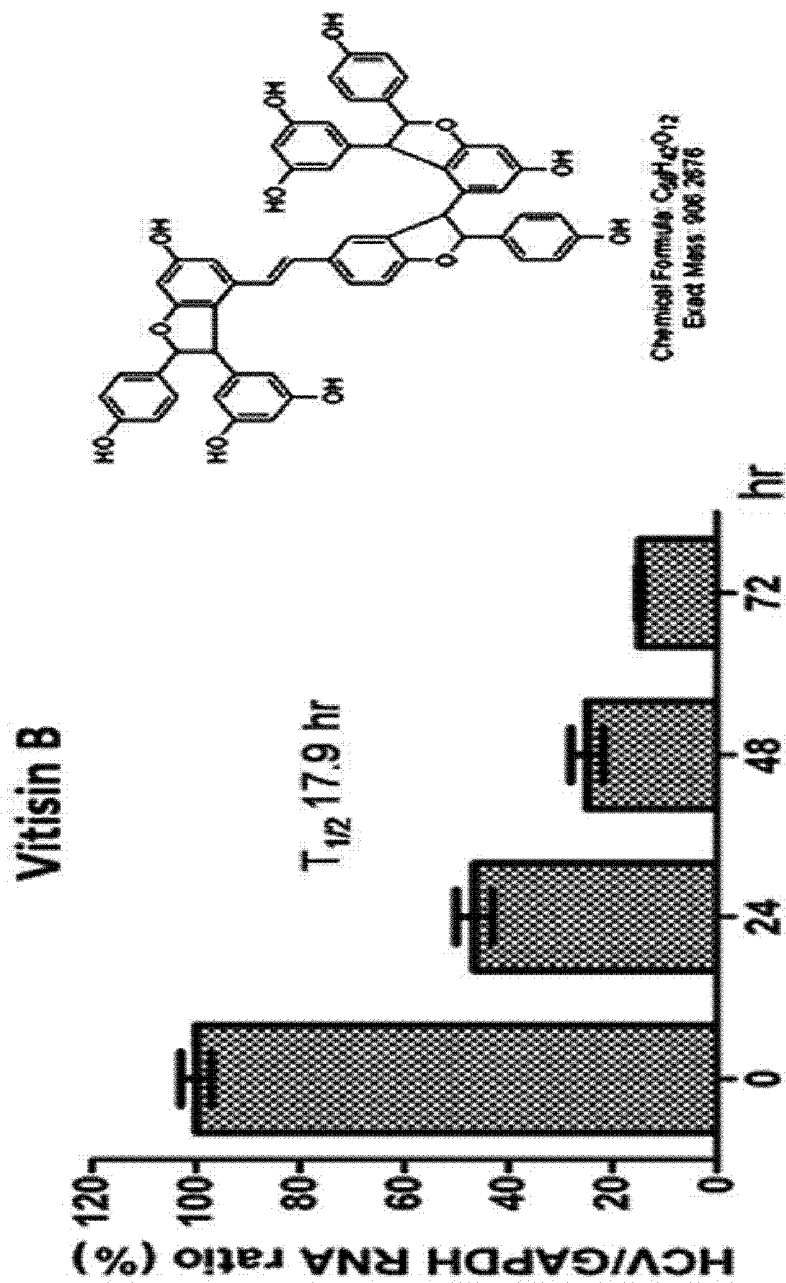
[도26]



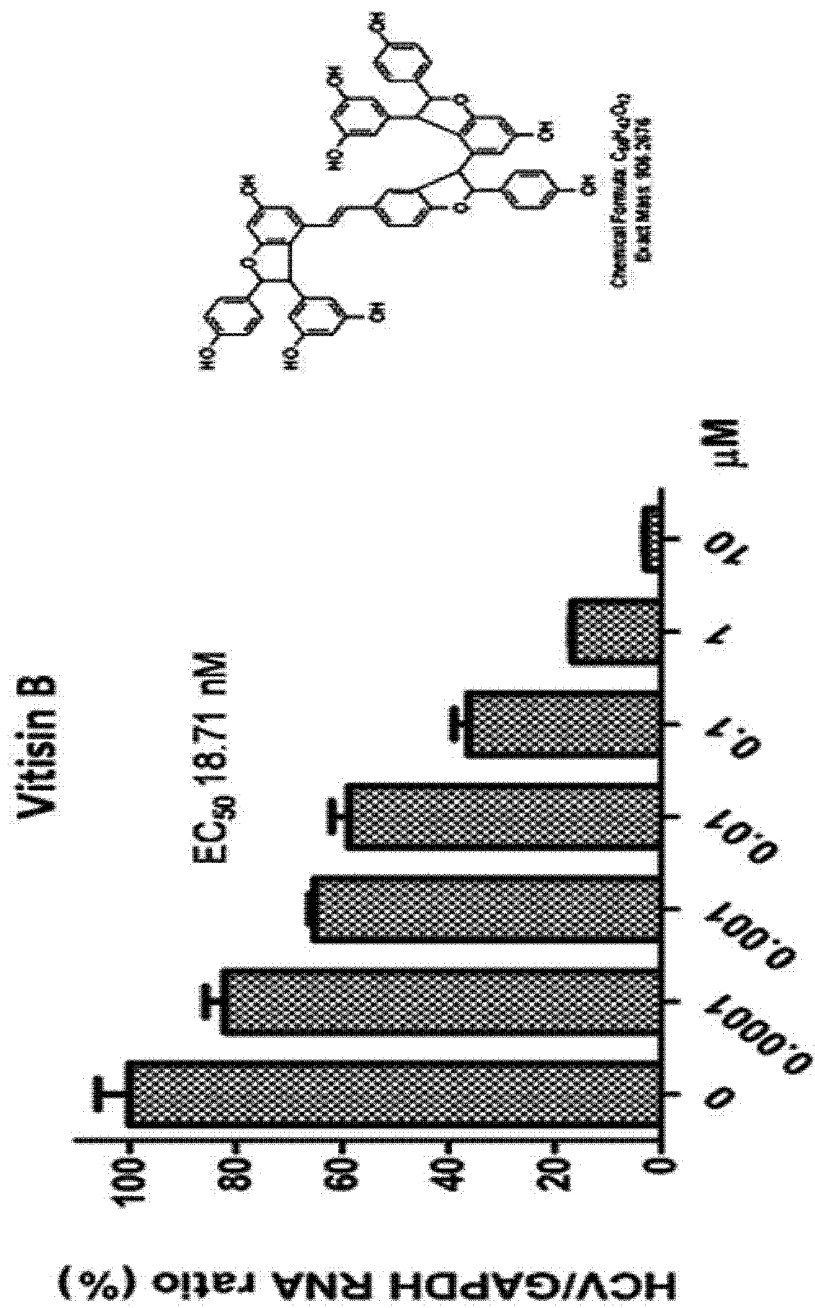
[도27]



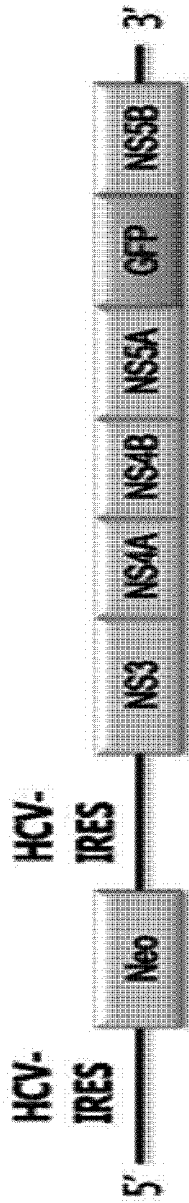
[도28]



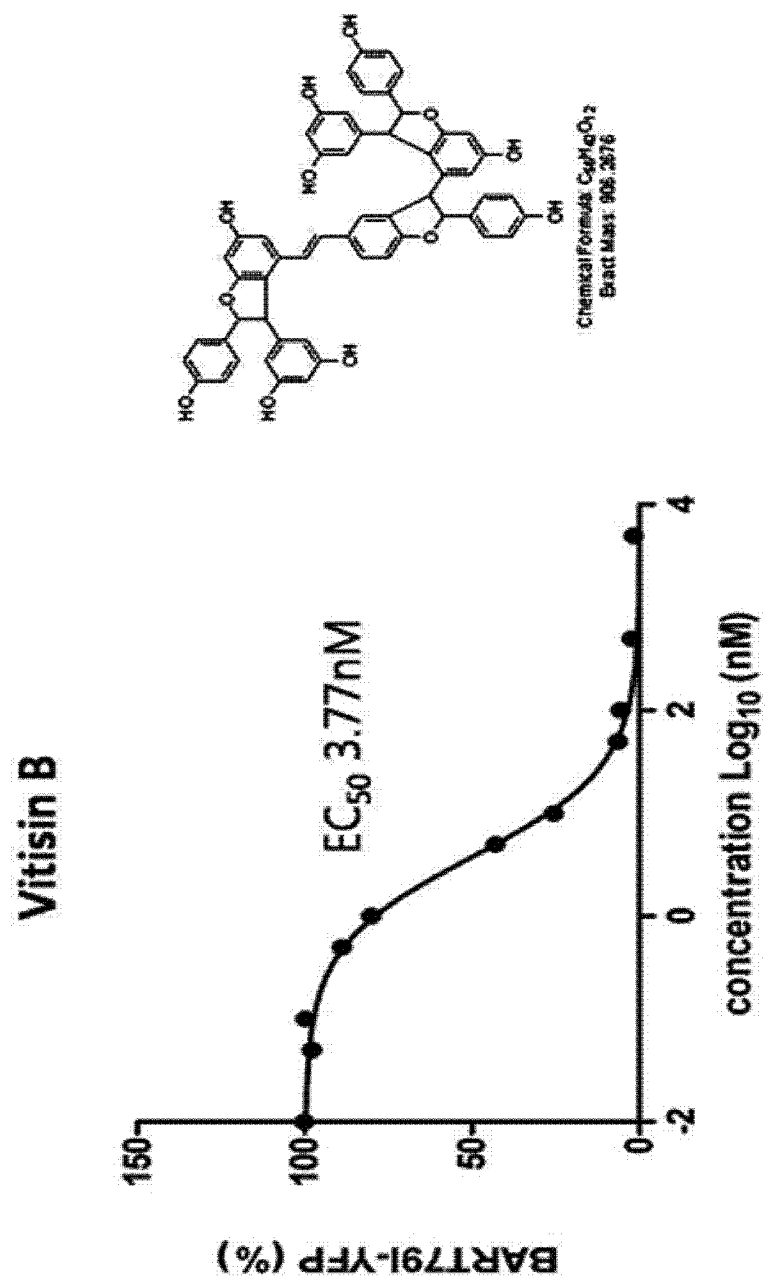
[도29]



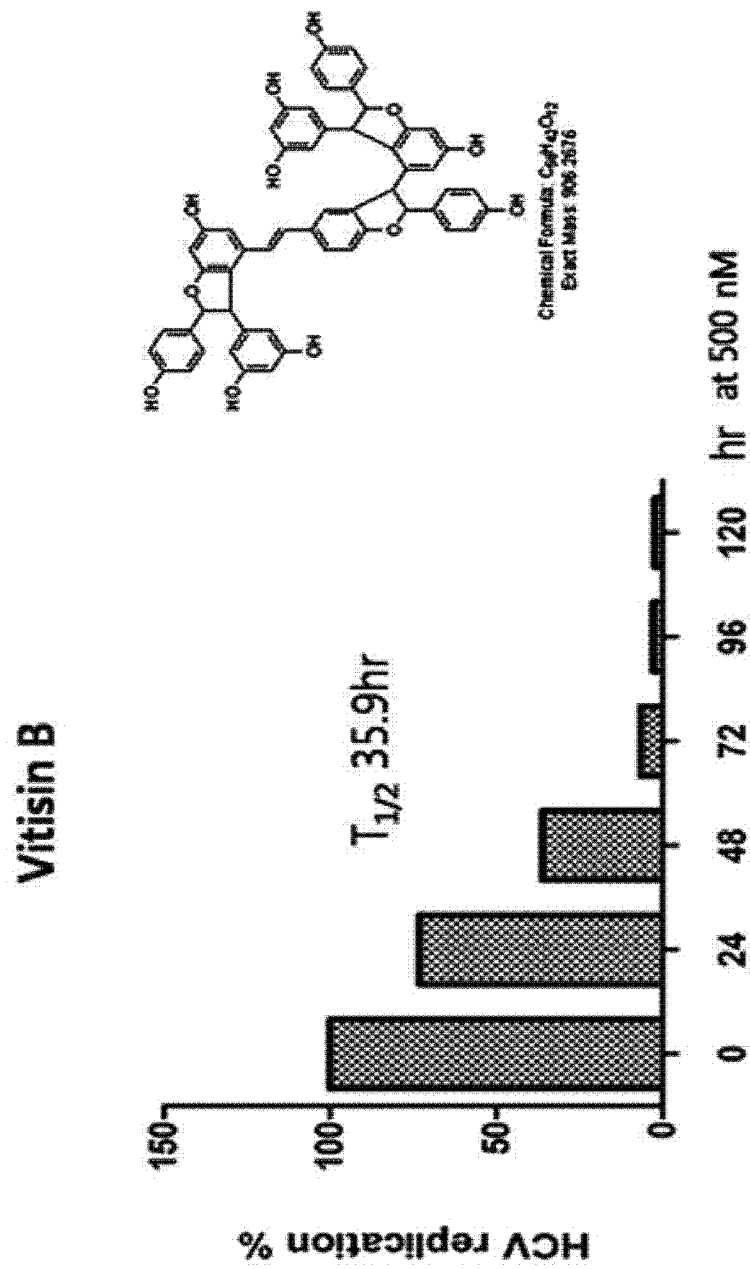
[도30]



[도31]



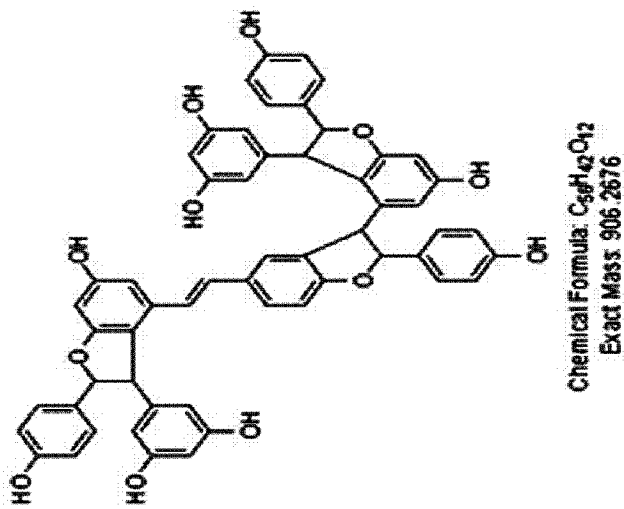
[도32]



[도33]



[도34]

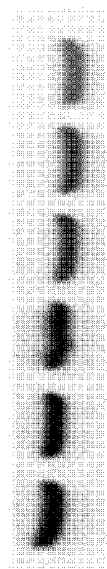


## Vitisin B

0hr 24hr 48hr 72hr 96hr 120hr



NS5A



$\beta$  - Actin

100.0 54.8 4.9 5.8 5.3 4.5

$T_{1/2}$  12.4 hr

[도35]

