(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0165630
(43) 공개일자 2023년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 309/32 (2006.01) *A61K 31/366* (2006.01)
A61K 36/258 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 309/32 (2013.01)
A61K 31/366 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0065652
(22) 출원일자 2022년05월27일
심사청구일자 2022년05월27일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
가천대학교 산학협력단
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
(72) 발명자
장대식
서울특별시 강남구 광평로10길 50, 109동 104호(일원동, 청솔빌리지)
강기성
경기도 성남시 중원구 시민로 66, 207동 1103호(중앙동, 중앙동 힐스테이트 2차)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 8 항

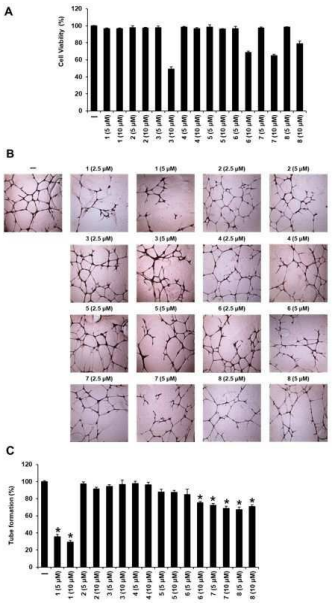
(54) 발명의 명칭 **신규한 진생락톤 화합물, 이의 제조 방법, 및 이를 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조 방법, 및 이를 함유하는 암

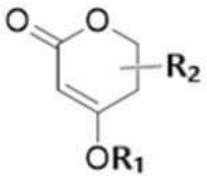
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2



예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서

R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 20의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기이다.

(52) CPC특허분류
A61K 36/258 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(72) 발명자
이다혜
경상남도 진주시 새평거로 30, 101동 1803호(평거동, 엠코타운더프라하)
김란희
서울특별시 동대문구 한천로58길 139, 106동 801호(이문동, 이문1차 푸르지오 아파트)
손소리
전라북도 전주시 덕진구 벚꽃2길 3-16(진북동)
김지영
서울특별시 도봉구 도봉로136가길 68, 105동 1104호(창동, 창동금호어울림아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711148394
과제번호	2019R1A2C1083945
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	국내에서 생산되는 몇 가지 대표적인 약용식물들에 대한 천연물 화학적 측면에서의 종합적인 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

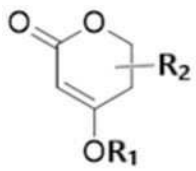
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서

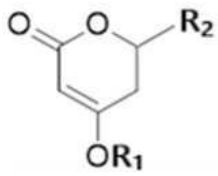
R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 20의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

하기 화학식 2 로 표시되는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 2]



상기 화학식 2에서

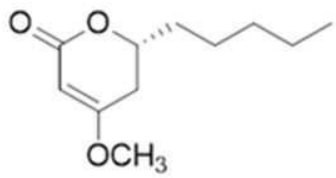
R_1 및 R_2 는 제1항에서 정의한 바와 같다.

청구항 3

제1항에 있어서,

하기 화학식 3으로 표시되는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 3]



청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 함유하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 암은 난소암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) 억제제 및/또는 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 억제제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 ERK 억제제는 U0126 이고, 상기 PI3K 억제제는 LY294002 인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

인삼 (*Panax ginseng*)으로부터 추출물을 얻는 단계 및 상기 추출물로부터 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 제1항에 기재된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제조하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 진생락톤(ginsenglactone) 화합물, 이의 제조 방법, 및 이를 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암이란 정상세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성된 세포 덩어리로서 종양이라고도 한다. 이러한 무제한의 증식을 하는 암 세포는 주위의 조직으로 침투하고 더 심각한 경우는 신체의 다른 기관으로 전이가 되어 심각한 고통을 수반하고 결국 죽음을 초래하는 난치병이다. 암의 치료를 위한 통상의 화학요법 중에서도, 암 세포에 산소와 영양분을 공급하는 새로운 혈관의 형성, 즉, 혈관 신생(angiogenesis)를 타겟으로 하여 암 세포의 성장과 전이를 늦추거나 억제하는 전략이 활용되고 있다.

[0003] 인삼 (*Panax ginseng*)은 림프계 내피형 세포(lymphatic endothelial-like cells) (SVEC4-10)에서의 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 신호전달 경로를 통해 혈관신생 억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히, 인삼 (*Panax ginseng*)에서 발견된 진세노사이드 Rg3 을 비롯한 진세노사이드류(Ginsenosides)는 인간 제대 정맥 혈관 내피 세포(HUVEC)에서 혈관신생을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 진세노사이드의 항-혈관신생(anti-angiogenic) 효과는 VEGF 및 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP) 신호전달 경로의 억제와 관련되어 있으며, 진세노사이드 Rg3는 인간 정상 난소 내피 세포 (HOSEpiC)의 이동을 저해하는 것이 발견되었다. 이와 같이 진세노사이드류가 항암 가능성이 있는 화합물로 알려져 있으나, 인삼 (*Panax ginseng*)에서 발견되는 다른 화합물이나 그 화합물의 효과에 대해서는 아직 알려진 바가 없으며 여전히 연구가 필요하다.

발명의 내용

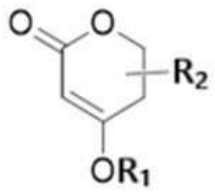
해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 암, 특히 난소암을 치료 또는 예방할 수 있는 신규한 화합물, 이의 제조 방법, 및 이를 함유하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 양상에 따르면 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 제공된다:

[0006] [화학식 1]



[0007]

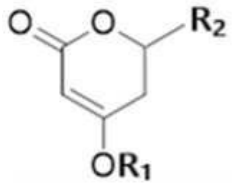
[0008] 상기 화학식 1에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 탄소수 1 내지 20의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기이다.

[0009] 본 발명에서 탄소수 1 내지 20의 알킬기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는, 탄소와 수소 원자로 이루어진 1가 선형 탄화수소 잔기를 의미한다. 탄소수 1 내지 20의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2급 부틸, 3급 부틸, 펜틸, 헥실 등을 들 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 화학식 1에서 R_1 은 탄소수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기일 수 있고, R_2 는 탄소수 3 내지 10의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 다음의 화학식 2로 표시될 수 있다:

[0012] [화학식 2]

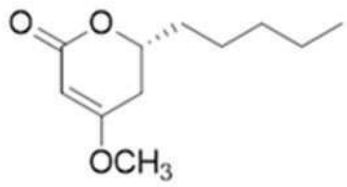


[0013]

[0014] 상기 화학식 2에서 R_1 및 R_2 는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 다음의 화학식 3으로 표시될 수 있다:

[0016] [화학식 3]



[0017]

[0019] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 이성질체, 또는 프로드러그의 형태로 존재할 수 있다.

[0020] 상기 약학적으로 허용되는 염은 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염일 수 있다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산, 아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류 등과 같은 무독성 유기산, 아세테이트, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 약학적으로 무독한 염의 종류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 나이트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디

오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸 벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등이 포함될 수 있다.

[0021] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 적합할 수 있다.

[0022] 본 명세서에서 "이성질체"는 디아스테레오머 및 에난티오머를 비롯한 모든 가능한 입체화학적 이성질체를 포함한다. 본 발명의 화합물은 모든 가능한 입체화학적 이성질체 형태의 혼합물을 지칭하는 것으로 이해하여야 한다. 또한, 용어 "용매화물"은 용질 (예를 들어 화학식 1의 화합물)과 용매의 복합체를 가리키는 것으로서, 용매가 물인 경우 상기 용매화물은 수화물로 지칭될 수 있다. 용어 "프로드러그"는 생체내에 투여된 후에 생체 흡수 및 대사에 의하여 약효를 갖는 활성 화합물로 변환되는 화합물을 가리킨다. 상기 프로드러그는 그 자체로 비활성이거나 활성 화합물보다 활성이 덜한 화합물이며, 다만, 취급, 투여, 또는 대사에 유리한 특성을 제공할 수 있다. 상기 프로드러그는 활성 화합물의 에스테르 형태 (예를 들어, 생리학적으로 허용 가능한 대사적으로 불안정한 에스테르)이거나 당 유도체의 형태, 또는 아미노산 에스테르 유도체의 형태일 수 있다. 상기 이성질체, 용매화물 등은 당업계에 공지된 방법에 의해 화학식 1의 화합물로부터 준비될 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, (a) 인삼 (*Panax ginseng*)으로부터 추출물을 얻는 단계 및 (b) 상기 추출물로부터 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제조하는 방법이 제공된다.

[0025] 상기 (a) 단계에서 상기 인삼은 인삼 중에서도 인삼의 뿌리일 수 있다. 상기 추출은 적절한 용매를 사용하여 수행될 수 있으며 상기 용매로는 아세톤이 바람직하다. 상기 인삼으로부터 추출물을 얻은 후, 상기 추출물을 사용하여 적어도 1회의 추출을 추가로 더 수행할 수 있으며, 상기 추가의 추출시 용매는 당업계에 공지된 단일 용매 또는 혼합 용매를 사용할 수 있다.

[0026] 상기 (b) 단계에서 분리는 당업계에 공지된 임의 분리 방식, 예를 들어 칼럼 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 화합물은 혈관생성 억제와 암세포의 이동억제에 대한 효능을 가지고 있기 때문에 혈관 신생 억제제나 암, 특히 난소암의 치료 및 예방용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물의 상기 혈관신생 억제효과는 VEGF 관련 신호전달경로의 억제를 통한 것이며, 암세포 이동억제효과는 ERK 관련 신호전달경로의 억제를 통한 것이므로 본 발명의 화합물은 VEGF 신호전달 경로의 억제제 또는 ERK 신호전달 경로의 억제제로 사용되어 VEGF 신호전달 경로와 관련되거나 ERK 신호전달 경로와 관련된 질환의 예방 또는 치료에도 유용할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 화합물은 혈관 생성 억제와 암세포의 이동억제에 대한 효능을 가지고 있다. 또한, 본 발명의 화합물의 상기 혈관신생 억제효과는 VEGF 관련 신호전달경로의 억제를 통한 것이며, 암세포 이동억제효과는 ERK 관련 신호전달경로의 억제를 통한 것이다. 따라서, 본 발명의 화합물은 혈관 신생 억제제, VEGF 신호전달 경로 억제제, 및/또는 ERK 신호전달 경로 억제제로 사용될 수 있다.

[0031] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 함유하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0032] 상기 약학적 조성물은 혈관 신생과 관련된 질환, VEGF 신호전달 경로와 관련되거나 ERK 신호전달 경로와 관련된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물일 수 있다.

[0033] 또한, 상기 약학적 조성물은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"는 대상체에게 바람직한 치료 효과가 구현되는 것이며, 진행 속도의 감소, 진행 속도의 중단, 증상의 경감, 병태의 개선, 및 병태의 치유를 포함한다. 또한, 용어 "예방"은 아직 병이 발병되지 않았으나 발병 위험이 있는 대상체에 대한 사용을 의미할 수 있다.

[0035] 상기 암은 난소암, 전립선암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 식도암, 유방암, 백혈병, 갑상선암, 자궁경부암, 피부암 등의 원발성 암과 이로부터 기타 장기로 전이되어 유발되는 전이암 및 비정상적인 과다 세포 분열을 촉진하여 생성되는 종양성 세포 질환으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 암일 수 있다. 본 발명의 구체예에 따르면, 상기 암은 난소암인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0037] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) 억제제 및/또는 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 억제제를 추가로 함유할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 ERK 억제제는 종래 ERK의 활성을 억제시킬 수 있다고 알려진 예컨대, 플라본, PD98059, U0126 및 EGTA으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며 바람직하게는 U0126 이나 이에 제한되지 않는다.

[0039] 본 발명에서, PI3K 억제제는 LY294002, BYL719, 쿼세틴(Quercetin), 보르트만닌(Wortmannin), 이델라리십(Idelalisib), 및 픽틸리십(Pictilisib) 으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 LY294002, BYL719 이나 이에 제한되지 않는다.

[0040] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 ERK 억제제는 U0126 이고 상기 PI3K 억제제는 LY294002일 수 있다.

[0042] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 필요에 따라, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 이외의 약학적으로 허용 가능한 첨가제, 예를 들어, 결합제, 붕해제, 활택제, 제피제, 필름 코팅 기제, 장용성 필름 코팅 기제, 연질 캡슐 기제, 용해보조제, 유화제, 현탁화제, 안정화제, 완충제, 항산화제, 계면활성제, 감미제, 교미제, 보존제, 점증제, 방향제, 또는 착색제를 더 포함할 수도 있다.

[0043] 상기 약학적 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 주사제의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구의 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비강내 투여, 폐내 투여, 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 본 발명의 약제학적 조성물은 고체 또는 액제 제형의 형태로 제형화될 수 있다. 고체 제형은 예를 들어, 정제, 캡슐제(연질 & 경질 캡슐제), 산제, 과립제, 환제, 트로키제 등일 수 있으며, 액체 제형은 예를 들어, 엘릭서, 현탁액제, 유액제, 용액제, 시럽제, 리모나아데제 등의 형태일 수 있다. 정제의 경우, 활성 성분 이외에도, 락토스, 옥수수 전분 등과 같은 담체, 마그네슘 스테아레이트 등과 같은 활택제, 메틸셀룰로오스, 미결정 셀룰로오스, 폴리비닐알코올 등과 같은 결합제, 벤토나이트, 알긴산나트륨 등과 같은 붕해제 등이 통상적으로 추가될 수 있다. 액제의 경우, 활성 성분을 정제수, 생리식염수 등과 같은 담체, 및 필요에 따라 모노스테아린산수크로스 등과 같은 용해보조제, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 안정화제 등과 함께 제제화할 수 있으며, 경구용 수성 현탁액제의 경우, 활성 성분을 현탁화제, 및 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정화제 등과 함께 제제화할 수 있다.

[0045] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 중증도, 상태, 불활성율, 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물의 적절한 유효량은 치료를 요하는 질환에 대한 생체내(in vivo) 및 시험관내(in vitro) 모델 시스템에서 해당 화합물을 실험함으로써 결정될 수 있다. 상기 유효량(therapeutically effective amount)이란, 치료를 요하는 병의 증상을 경감 또는 줄이거나 예방을 요하는 병의 임상학적 마커 또는 증상의 개시를 줄이거나 지연시키는데 유효한 활성 성분의 양을 의미할 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명에 따른 화합물은 혈관생성 억제와 암세포의 이동억제에 대한 효능을 가지고 있기 때문에 혈관 신생 억제제나 암, 특히 난소암의 치료 및 예방용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 혈관신생 억제효과는 VEGF 관련 신호전달경로의 억제를 통한 것이며, 암세포 이동억제효과는 ERK 관련 신호전달경로의 억제를 통한 것이므로 본 발명의 화합물은 VEGF 신호전달 경로의 억제제 또는 ERK 신호전달 경로의 억제제로 사용되어 VEGF 신호전달 경로와 관련되거나 ERK 신호전달 경로와 관련된 질환의 예방 또는 치료에도 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1에서 A 는 인삼 (*P. ginseng*)에서 분리한 화합물 1 내지 화합물 8 의 화학 구조식이고; B 는 진생락톤 A (ginsenglactone A) (화합물 1)의 Key ^{1}H-^{1}H COSY (━) 및 HMBC (↷) 관계이고; C 는 진생락톤 A (화합물 1)의 실험 CD 스펙트럼과 계산 ECD 스펙트럼을 비교한 것으로서, 6R의 계산된 ECD 스펙트럼 (적색 선), 6S의 계산 ECD 스펙트럼 (청색 선), 실험 CD 스펙트럼 (흑색 선)이다.

도 2는 인간 정맥 혈관 내피 세포 (HUVEC)에서의 세포 생존률 및 혈관 형성에 대한 화합물 1 내지 화합물 8의 영향을 살펴본 실험 결과이다. 여기서 HUVEC 를 24 시간 동안 화합물 1 내지 8 (5 및 10 μM) 로 처리하였다. 도 2에서 A 는 HUVEC 의 생존률을 MTT 검정에 의해 평가한 결과이고, B 는 매트리겔(matrigel) 에서 HUVEC 의 혈관 형성을 보여주는 사진이며 (200x 배율), C 는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 혈관의 상대적 길이를 정량적으로 평가한 결과이다. 상기 데이터는 대조군과 비교한, 평균 ± SEM. n = 3, * $p < 0.05$ 값이다.

도 3은 인간 제대 정맥 내피세포 (HUVEC)에서 혈관 형성 및 VEGF 신호전달 경로에 대한 진생락톤 A (화합물 1)의 영향을 보여준다. HUVEC 는 24 시간 동안 진생락톤 A (화합물 1) (0.62 및 1.25 μM), U0126 (10 μM) 및/또는 LY294002 (10 μM) 으로 처리하였다. 도 3에서 A 는 매트리겔(matrigel)에 대한 HUVEC의 혈관 형성을 보여주는 사진이고; B 는 혈관의 상대적 길이를 ImageJ 소프트웨어로 정량화한 결과이며; C 내지 E 는 혈관 내피 성장 인자(VEGF), Phospho-ERK (phospho-extracellular signal-regulated kinase), ERK, Phospho-PI3K (phospho-phosphoinositide 3-kinase), PI3K, phospho-Akt, Akt, 라파마이신의 phospho-mammalian 타겟 (Phospho-mTOR), mTOR, 및 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제 (GAPDH)의 단백질 발현 수준을 보여주며; F 내지 J 는 단백질 발현 수준을 막대 그래프로 보여준다. 상기 데이터는 대조군과 비교한, 평균 ± SEM. n = 3, * $p < 0.05$ 값을 나타낸다.

도 4는 인간 제대 정맥 내피세포 (HUVEC)의 혈관신생에 대한 진생락톤 A (화합물 1)의 잠재적 활성 메커니즘을 개략적으로 도시한다.

도 5는 인간 난소암 세포 (A2780)에서의 세포 생존률 및 이동 활성에 대한 진생락톤 A (화합물 1)의 영향을 나타낸다. A2780 세포는 진생락톤 A (화합물 1) (2.5, 5 및 10 μM) 및/또는 U0126 로 24시간 처리되었다. 도 5 에서 A 는 A2780 세포의 생존률을 MTT 검정으로 평가한 것이고; B 는 이동 활성을 상처 치료 검정(wound healing assay)로 평가한 것이고 (스크래치 너비를 퍼센트로 표시하였음); C 는 이동한 A2780 세포의 사진이고 (100x 배율); D 는 Phospho-ERK, ERK, MMP-2, MMP-9, 및 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제 (GAPDH)의 단백질 발현 수준을 보여주며; E 내지 G 는 단백질 발현 수준을 막대 그래프로 보여준다. 상기 데이터는 대조군과 비교한, 평균 ± SEM. n = 3, * $p < 0.05$ 값을 나타낸다.

도 6 은 인간 난소암 세포 (A2780)의 이동에 대한 진생락톤 A (화합물 1)의 잠재적 활성 메커니즘을 개략적으로 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] **[제조예] 진생락톤 A의 추출 및 분리**

[0051] 인삼 (Panax ginseng C.A. Mayer (Araliaceae))의 뿌리를 얇게 썰고 이와 같이 얇게 썬 원료 (40.53 kg)를 실온에서 2주 동안 70% 아세톤으로 2회 추출한 후 용매는 40℃ 에서 증발시켰다. 70% 아세톤 추출물 (857.66 g)

을 H_2O (6.4 L)에 현탁시킨 후 EtOAc (6.4 L)으로 추출하여 EtOAc-용해 분획 (85.59 g)과 물-용해 분획 (772.07 g)을 각각 얻었다. EtOAC-용해 추출물 (83.59 g)은, *n*-헥산-EtOAc (95:5 내지 80:20, v/v; 최종 단계, *n*-헥산-EtOAc-MeOH 60:36:4, v/v)을 사용한 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (70-230 mesh; ↗6.5 × 48.0 cm)에 가하여 24개의 분획물 (E1 내지 E24)를 얻었다.

[0052] E3 (4.08 g)은 100% 메틸렌 클로라이드 (MC)를 사용하여 Sephadex LH-20 (*ϕ* 4.5 x 55.8 cm)로 크로마토그래피하여 9개 추가 분획물 (E3-1 ~ E3-9)을 얻었다. E3~4는 Redi Sep-C18 카트리지 (26 g, 아세토니트릴-H_2O = 75:25 내지 90:10, v/v)를 사용하여 플래쉬 칼럼 크로마토그래피에 가하였고 spathulenol (**5**, 1.8 mg)을 얻었다.

[0053] E12 (436.6 mg)은 Sephadex LH-20 CC (*ϕ* 2.5 x 71.0 cm, MC-MeOH = 70:30, v/v)으로 분획화하여 7개의 추가 분획물 (E12-1 ~ E12-7)을 얻었다. E12-3 을 Redi Sep-C18 카트리지 (26 g, MeOH-H_2O = 60:40 내지 80:20, v/v)으로 플래쉬 칼럼 크로마토그래피하여 정제함으로써 진생락톤 A (ginsenglactone A) (**1**, 4.6 mg)를 얻었다.

[0054] E14 (8.27 g) 은, MC-MeOH (1:1)을 사용하여 Sephadex LH-20 CC (*ϕ* 4.8 x 64.6 cm)에 가함으로써 4개의 추가 분획물 (E14-1 ~ E14-4)로 분리하였다. E14-3 을, *n*-헥산-EtOAc (3:2)을 사용하여 실리카 칼럼 크로마토그래피 (*ϕ* 5.0 x 34.5 cm)하여 7개의 추가 분획물 (E14-3-1 ~ E14-3-7)을 얻었다. E14-3-7 을, Redi Sep-Silica 카트리지 (24 g, MC-아세톤 = 80:20 내지 60:40, v/v)을 사용한 플래쉬 크로마토그래피에 가하여 (-)-4*β*,10*α*-아로마덴드란디올 (**6**, 18.1 mg), 디히드록시마알리안(dihydroxymaaliane) (**7**, 3.6 mg), 및 알로로마뎀드란(alloromademdrane)-4*β*,10*α*-디올(diol) (**8**, 17.5 mg) 을 얻었다.

[0055] E18 (7.87 g) 은, Sephadex LH-20 CC (*ϕ* 5.5 x 65.3 cm, MC-MeOH = 50:50, v/v)에 가하여 8개의 추가 분획물 (E18-1 ~ E18-8)을 얻었다. E18-3 을 오픈(open) 칼럼 크로마토그래피 (ODS-A 12 nm S-150 *μ*m, *ϕ* 4.0 x 43.0 cm, 아세톤-H_2O = 75:25 내지 100:0, v/v)에 가하여 파낙세롤(panaxcerol) D (**2**, 714.2 mg) 및 파낙세롤 C (**3**, 50.2 mg) 을 얻었다.

[0056] E20 (2.38 g) 은, Sephadex LH-20 (*ϕ* 3.5 x 69.0 cm, MC-MeOH = 50:50, v/v)로 크로마토그래피하여 5개의 추가 분획물 (E20-1 ~ E20-5)을 얻었다.

[0057] E20-5를, Redi Sep-C18 카트리지 (13 g, 아세톤-H_2O = 60:40 내지 70:3,0 v/v)을 사용한 플래쉬 칼럼 크로마토그래피에 가하여 (2*S*)-1-*O*-(9*Z*,12*Z*-옥타데카디에노일)-3-*O*-*β*-갈락토피라노실글리세롤(Galactopyranosylglycerol) (**4**, 20.0 mg)을 얻었다.

[0058] 진생락톤 A (도 1의 화합물 1)은 무색 오일로 분리되었다. 실시간 질량 분광계 (HR-DART-MS, m/z 199.13165 $[M + H]^+$, calcd for $C_{11}H_{19}O_3$, 199.13342)를 사용하여 고해상도 직접 분석을 한 결과, 화학식은 $C_{11}H_{18}O_3$ 이었다. IR 스펙트럼은 1737 및 1660 cm^{-1} 에서 흡수 밴드를 나타내었으며 이는 화합물 1이 *α*,*β*-불포화 *δ*-락톤 부분을 포함한다는 것을 의미한다. 화합물 1의 평면 구조는 도 1의 A와 B에 나타내었다. 도 1의 C 에서 보이듯이, 화합물 1의 실험적 CD 스펙트럼은 6*R* 배열을 가졌다는 것을 보여준다. 화합물 1은 (*R*)-4-메톡시-6-펜틸-5,6-디히드로-2H-피란-2-온((*R*)-4-methoxy-6-pentyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one)이고 진생락톤 A (ginsenglactone A)로 명명하였다.

[0059] [진생락톤 A (화합물 1)] 무색 오일; $[\alpha]_D^{22}$ -28.08 (클로로포름, *c* 0.01); UV (아세토니트릴) λ_{max} (log ε) 210 nm (2.07), 249 nm (3.05); IR (neat) ν_{max} 2980, 2932, 1737, 1660, 1375, 1245 cm^{-1}; HR-DART-MS *m/z* 199.13165 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{11}H_{19}O_3$, 199.13342); ^{1}H-NMR (500MHz, chloroform-*d*): 5.11 (1H, d, *J*=1.5, H-3), 4.35 (1H, m, H-6), 3.72 (3H, s, 4-OC<u>H</u>$_3$), 3.72 (3H, s, 4-OC<u>H</u>$_3$), 2.45 (1H, ddd, *J*=17.0, 12.0, 1.5, H-5b), 2.29 (1H, dd, *J*=17.0, 4.0, H-5a), 1.77 (1H, m, H-7b), 1.61 (1H, m, H-7a), 1.49 (1H, m, H-8b), 1.38 (1H, m, H-8a), 1.24-1.33 (4H, m, H-9, 10), 0.87 (3H, t, *J*=7.0, H-11); ^{13}C-NMR (125MHz, chloroform-*d*): 173.1 (C-4), 167.8 (C-2), 90.6 (C-3), 76.2 (C-6), 56.2 (4-O<u>C</u>H$_3$), 34.8 (C-7), 33.2 (C-5), 31.5 (C-9), 24.7 (C-8), 22.7 (C-10), 14.2 (C-11)

[0061] **[실험예 1] HUVEC 에서의 혈관 형성 저해 능력 평가**

[0062] 인간 난소암 세포 A2780 (ATCC에서 구입) 및 인간 제대 정맥 내피세포 (HUVEC) (ATCC 에서 구입)를 함유하는 용액을 96-웰 배양 플레이트에 씨딩하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 각 웰에 다양한 농도의 화합물 1 내지 화합물 8을 첨가하고 24 시간 동안 배양한 후, Ez-Cytox 시약 (Daeil Lab Service Co., Seoul, Korea) 을 첨가하고 24 시간 동안 인큐베이팅하였다. 세포 생존률을 정량화하기 위해 PowerWave XS microplate reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA)을 사용하여 490 nm 에서의 흡광도를 기록하였다. 10 μM (-)-4β,10α-아로마덴드란디올 (화합물 3), 10 μM 파낙스세롤 D (화합물 6), 10 μM 파낙스세롤 C (화합물 7), 및 10 μM (2*S*)-1-*O*-(9*Z*,12*Z*-옥타데카디에노일)-3-*O*-β-갈락토피라노실글리세롤 (화합물 8)로 처리한 군은 세포 생존률이 감소하였다 (도 2의 A).

[0063] 이에, 모든 화합물을 2.5 μM 및 5 μM 농도로 처리하여 내피 세포에 의한 혈관 형성에 대한 영향을 비교하였다. 혈관 형성 감소가 다음과 같이 관찰되었다: 진생락톤 A (화합물 1) - 35.75 ± 2.37 % (2.5 μM) 및 29.41 ± 1.83 % (5 μM); 파낙스세롤 D (화합물 6) - 75.13 ± 1.61 % (5 μM); 파낙스세롤 C (화합물 7) - 72.21± 2.21 % (2.5 μM) 및 68.64 ± 2.63 % (5 μM); (2*S*)-1-*O*-(9*Z*,12*Z*-옥타데카디에노일)-3-*O*-β-갈락토피라노실글리세롤 (화합물 **8**) - 67.36 ± 2.91% (2.5 μM) 및 70.72 ± 2.06% (5 μM) (도 2의 B 및 C 참조). 이에 따라 진생락톤 A (화합물 1)을 선택하여 후속 분석에 사용하였다.

[0065] **[실험예 2] VEGF 신호전달 경로 억제에 의한 HUVEC 의 혈관 형성 저해**

[0066] HUVEC를 진생락톤 A (화합물 1)과 함께 배양하였을 때, 1.25 μM 수준에서 혈관 형성이 61.95 ± 3.62 % 로 감소하였다. 이 효과는 U0126 또는 LY294002 와 함께 처리하였을 때 더 향상되었다. U0126 는 미토겐(mitogen)-활성화된 단백질 키나아제 (mitogen-activated protein kinase, MEK)/세포외 신호 조절 키나아제(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 저해제이다. HUVEC 를 1.25 μM 진생락톤 A (화합물 1) 및 10 μM U0126와 함께 배양하였을 때 혈관 형성은 35.01 ± 2.61 % 로 감소하였다. 이와 유사하게, HUVEC 를 1.25 μM 진생락톤 A (화합물 1) 및 10 μM LY294002 (포스파티딜이노시톨 3-키나아제 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)) 로 처리한 후, 혈관 형성은 35.81 ± 2.19 % 로 감소하였다 (도 3에서 A 및 B). HUVEC의 혈관 형성에 대한 진생락톤 A (화합물 1)의 잠재적 분자 메커니즘을 평가하기 위해 웨스톤 블롯 분석하였다. 1.25 μM 진생락톤 A (화합물 1)로 처리하였을 때 혈관 내피 성장 인자(VEGF)가 감소하였다 (도 3의 C 및 F). 추가로, 1.25 μM 진생락톤 A (화합물 1)로 처리하였을 때 ERK 의 인산화가 감소하였다. 10 μM U0126 와 함께 처리하였을 때 효과가 증가하였다 (도 3의 D 및 G). 1.25 μM 진생락톤 A (화합물 1)로 처리하였을 때 포스포이노시티드 3-키나아제 (PI3K), Akt, 및 라파마이신의 포유동물 타겟 (mTOR)의 인산화가 감소하였다. 10 μM LY294002 와 함께 처리하였을 때 효과가 증가하였다 (도 3의 E, H, I, 및 J). HUVEC 의 혈관신생에 대한 진생락톤 A (화합물 1)의 활성 메커니즘을 지지한다 (도 4).

[0068] **[실험예 3] A2780 세포의 이동 저해에 대한 평가**

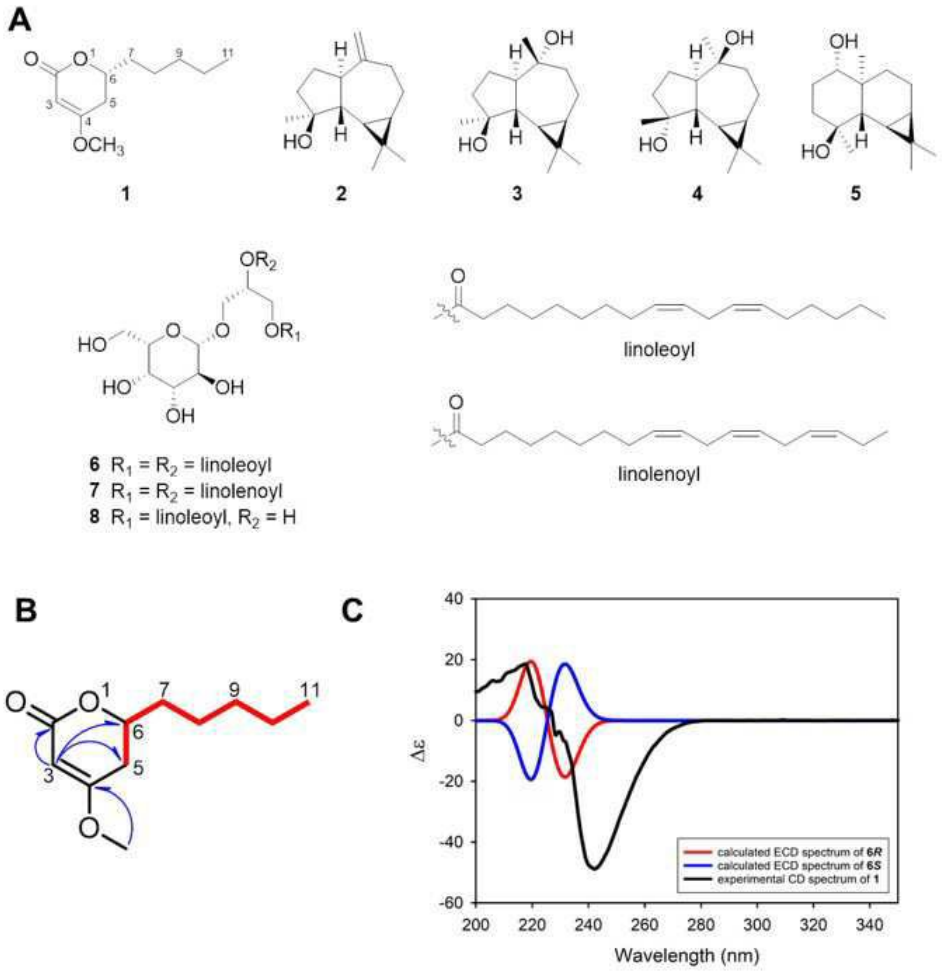
[0069] A2780 세포에서 진생락톤 A (화합물 1)의 독성 농도를 알아보기 위해 세포 생존률 검정을 실시하였다. 10 μM 진생락톤 A (화합물 1)로의 처리는 세포 생존력이 42.52 ± 4.78 %로 감소하였다 (도 5의 A). 이에, 진생락톤 A (화합물 1)을 2.5 μM 및 5 μM 농도로 처리하여 진생락톤 A (화합물 1)의 이동 활성을 평가하였다. 24 시간 동안 진생락톤 A (화합물 1)로 처리하였을 때, 대조군과 비교하여 A2780 세포의 스크래치 면적 커버 능력이 감소하였다. 10 μM U0126 로 함께 처리하였을 때 그 효과가 증가하였다 (도 5의 B 및 C). A2780 세포의 이동에 대한 진생락톤 A (화합물 1)의 잠재적 분자 메커니즘을 평가하기 위해 웨스턴 블롯 분석으로 단백질 발현 수준을 분석하였다. 1.25 μM 진생락톤 A (화합물 1)로 처리하였을 때 ERK, 매트릭스 메탈로프로테이나제-2 (MMP-2), 및 MMP-9 의 인산화가 감소하였다. 이 효과는 10 μM U0126 와 함께 처리하였을 때 증가하였다 (도 5의 D 내지 G). 상기 결과는 A2780 세포의 이동에 대한 진생락톤 A (화합물 1)의 활성 메커니즘을 지지한다 (도 6).

[0071] 전술한 실험예들로부터 본 발명의 화합물은 혈관내피세포의 맥관 형성을 억제하고, 결절 개수를 유의적으로 감소시키는 것을 알 수 있으며, vascular endothelial growth factor (VEGF)와 extracellular signal-regulated

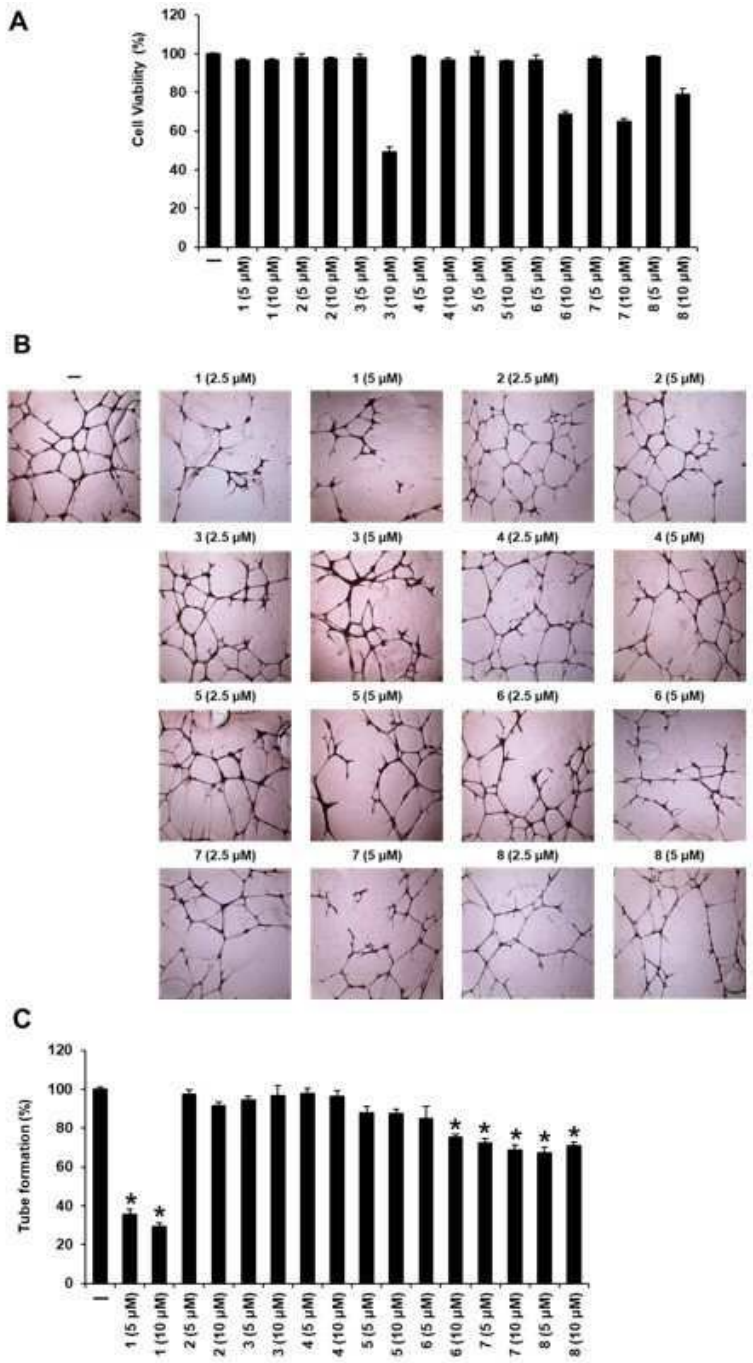
kinase (ERK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Akt, 및 mammalian target of rapamycin (mTOR)의 인산화를 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다. 상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 혈관신생 억제효과는 VEGF 관련 신호전달경로의 억제를 통한 것임을 알 수 있다. 또한 인간 난소암세포 (A2780)를 활용한 스크래치 분석(scratch assay)상의 세포의 이동을 억제함을 알 수 있으며, ERK의 인산화, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 및 MMP-9의 발현을 유의적으로 억제하는 것을 확인하였다. 상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 난소암세포 이동억제효과는 ERK 관련 신호전달경로의 억제를 통한 것임을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 화합물은 혈관생성 억제와 난소암세포의 이동억제 효과가 있음을 알 수 있다.

도면

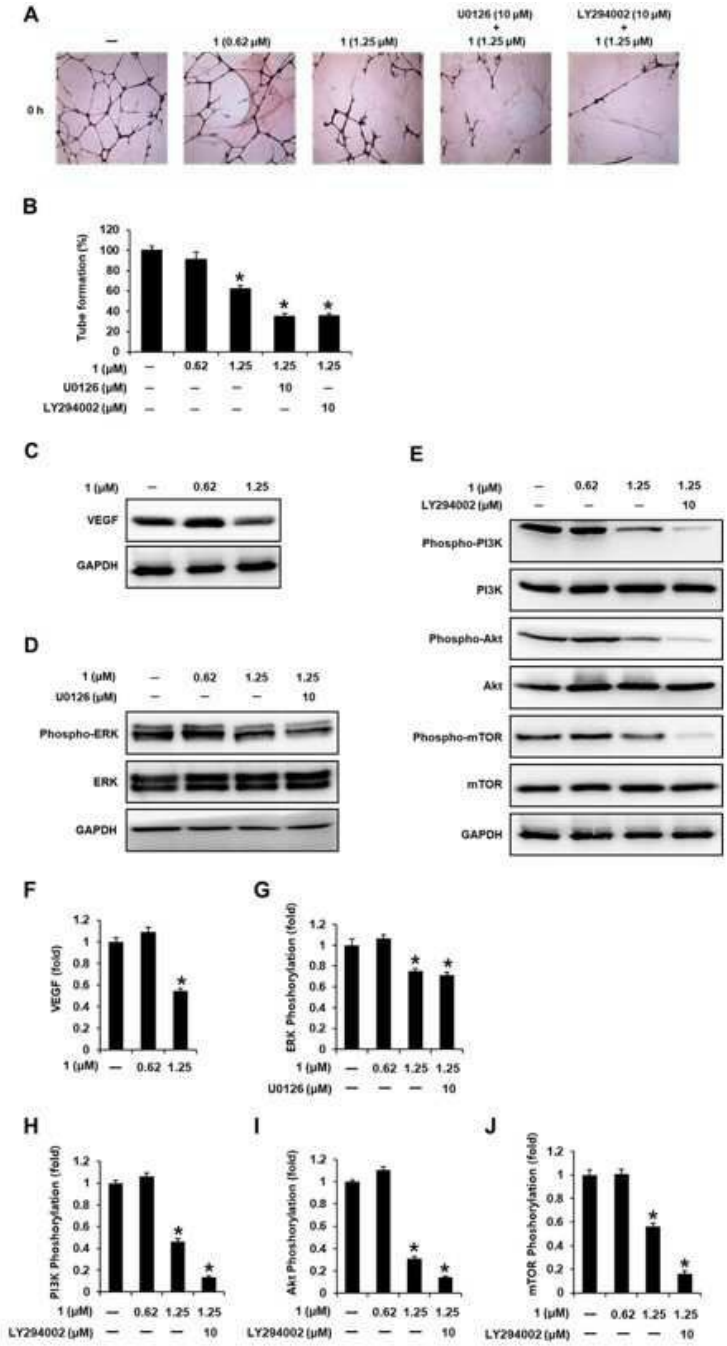
도면1



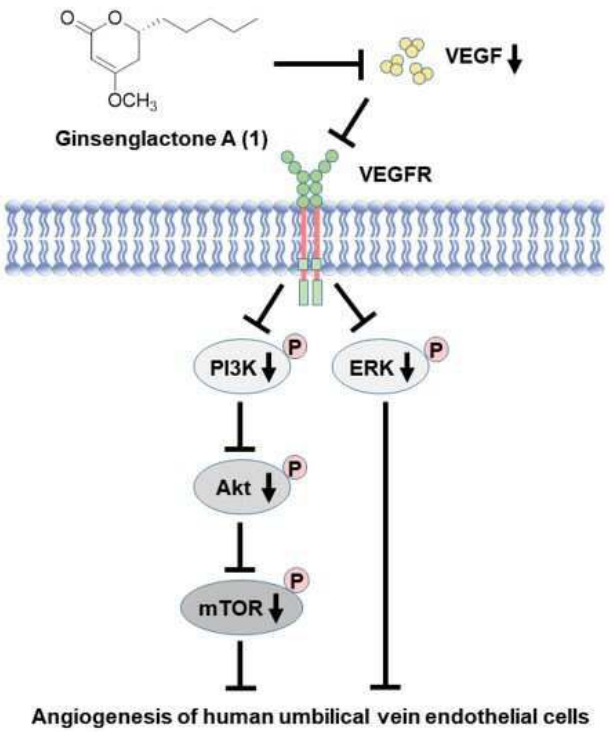
도면2


A
Cell Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
I
1 (5 μM)
1 (10 μM)
2 (5 μM)
2 (10 μM)
3 (5 μM)
3 (10 μM)
4 (5 μM)
4 (10 μM)
5 (5 μM)
5 (10 μM)
6 (5 μM)
6 (10 μM)
7 (5 μM)
7 (10 μM)
8 (5 μM)
8 (10 μM)
B
I
1 (2.5 μM)
1 (5 μM)
2 (2.5 μM)
2 (5 μM)
3 (2.5 μM)
3 (5 μM)
4 (2.5 μM)
4 (5 μM)
5 (2.5 μM)
5 (5 μM)
6 (2.5 μM)
6 (5 μM)
7 (2.5 μM)
7 (5 μM)
8 (2.5 μM)
8 (5 μM)
C
Tube formation (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
I
1 (5 μM)
1 (10 μM)
2 (5 μM)
2 (10 μM)
3 (5 μM)
3 (10 μM)
4 (5 μM)
4 (10 μM)
5 (5 μM)
5 (10 μM)
6 (5 μM)
6 (10 μM)
7 (5 μM)
7 (10 μM)
8 (5 μM)
8 (10 μM)

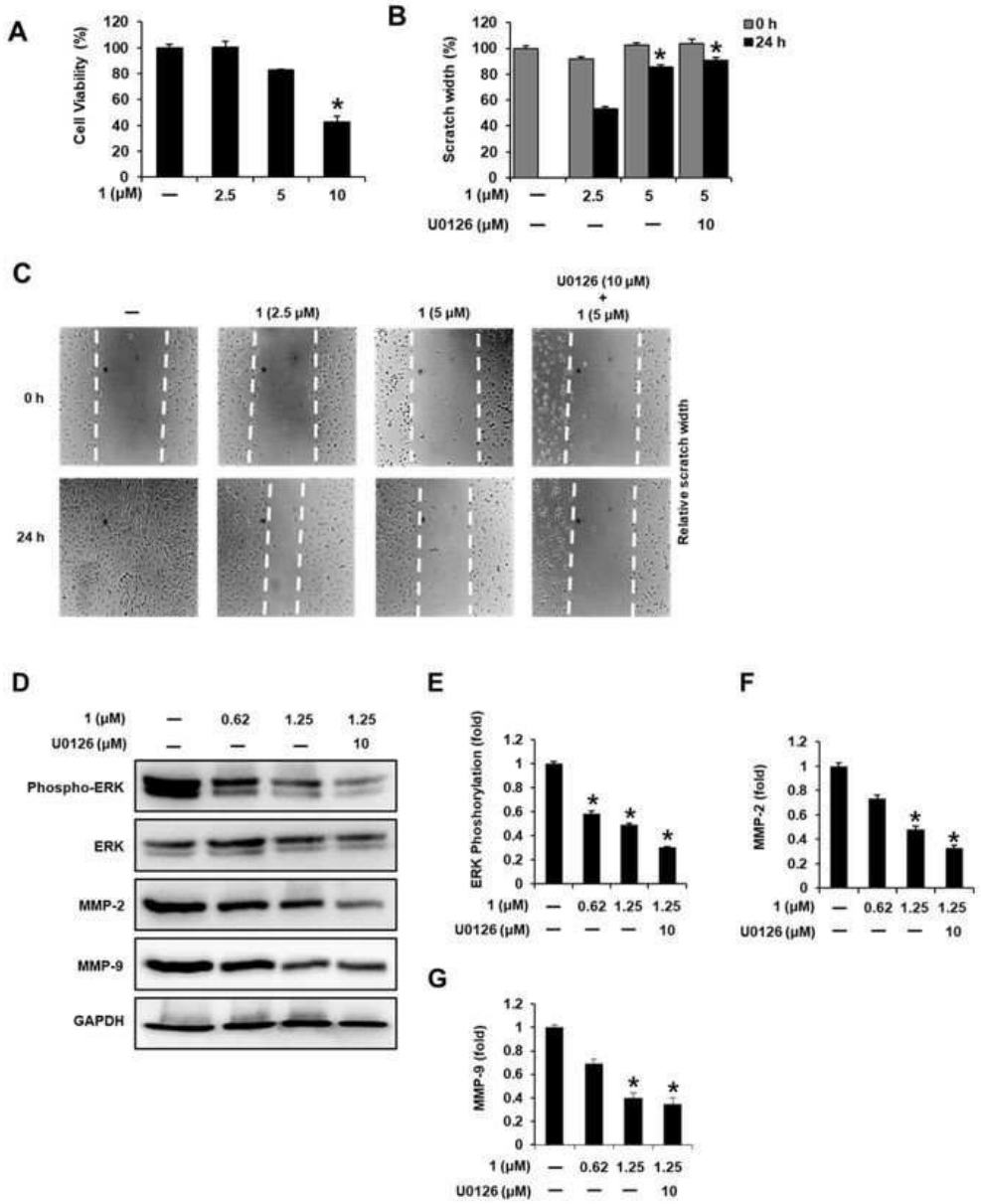
도면3


A
—
1 (0.62 μM)
1 (1.25 μM)
U0126 (10 μM) + 1 (1.25 μM)
LY294002 (10 μM) + 1 (1.25 μM)
0 h
B
Tube formation (%)
1 (μM)
U0126 (μM)
LY294002 (μM)
C
VEGF
GAPDH
D
Phospho-ERK
ERK
GAPDH
E
Phospho-PI3K
PI3K
Phospho-Akt
Akt
Phospho-mTOR
mTOR
GAPDH
F
VEGF (fold)
G
ERK Phosphorylation (fold)
H
PI3K Phosphorylation (fold)
I
Akt Phosphorylation (fold)
J
mTOR Phosphorylation (fold)

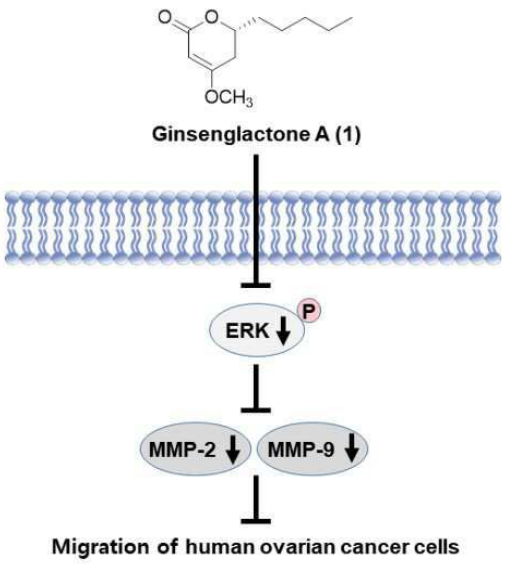
도면4


OCH3
Ginsenglactone A (1)
VEGF
VEGFR
PI3K
P
ERK
P
Akt
P
mTOR
P
Angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells

도면5


A
Cell Viability (%)
1 (μM)
B
Scratch width (%)
0 h
24 h
1 (μM)
U0126 (μM)
C
U0126 (10 μM) + 1 (5 μM)
1 (2.5 μM)
1 (5 μM)
0 h
24 h
Relative scratch width
D
1 (μM)
U0126 (μM)
Phospho-ERK
ERK
MMP-2
MMP-9
GAPDH
E
ERK Phoshorylation (fold)
F
MMP-2 (fold)
G
MMP-9 (fold)

도면6


OCH3
Ginsenglactone A (1)
ERK
P
MMP-2
MMP-9
Migration of human ovarian cancer cells