(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0009551
(43) 공개일자 2020년01월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 43/23 (2006.01) *A61K 31/085* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 43/23 (2013.01)
A61K 31/085 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0084067
(22) 출원일자 2018년07월19일
심사청구일자 2018년07월19일

(71) 출원인
한발대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박정호
대전광역시 유성구 노은동로87번길 12-10
최원재
경기도 광명시 광덕산로 26 두산트레지움아파트 106동 3401호
(74) 대리인
특허법인 플러스

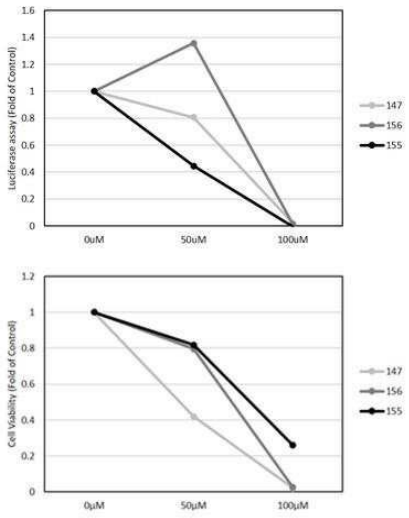
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **C형 간염 치료 및 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 C형 간염 치료 및 예방용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 2-O-메틸호노키올을 포함하는 C형 간염 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 C형 간염 치료 및 예방용 조성물은 C형 간염 바이러스에 대한 효과적인 억제 효과를 나타냄을 확인하였으며, 이를 통해 다양한 종류의 HCV 타입에 따른 C형 간염의 치료 또는 예방에 우수한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61P 31/12 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465024673
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 AhR 리가든에 의한 대사성 질환 발병 기전 연구
기 여 율 1/3
주관기관 경희대학교
연구기간 2014.12.01 ~ 2019.11.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345276118
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학 개인기초연구지원사업
연구과제명 신규 알츠하이머 병 치료제 개발을 위한 콜린분해 효소 저해 및 항염증 활성을 갖는 항산화 천연물 유도체 합성
기 여 율 1/3
주관기관 한밭대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2022.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A2B2002289
부처명 학술진흥재단
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 C형 간염바이러스 복제에 영향을 미치는 소포체 Membranous Web 메카니즘
기 여 율 1/3
주관기관 경희대학교
연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

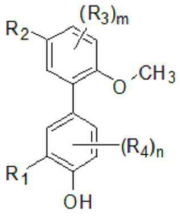
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1으로 표시되는 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R1, R2은 서로 독립적으로 수소, (C2-C7)알케닐이고;

R3, R4는 서로 독립적으로 수소 또는 할로겐이고;

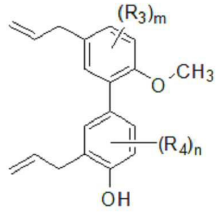
m, n은 각각 서로 독립적으로 1 내지 3의 정수이다.

청구항 2

제 1항에 있어서,

하기 화학식 2로 표시되는 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염.

[화학식 2]



상기 화학식 2에서,

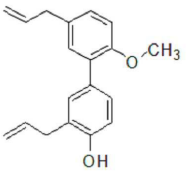
R3 및 R4는 청구항 제1항의 화학식 1에서의 정의와 동일하고;

m, n은 각각 서로 독립적으로 1 내지 2의 정수이다.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물은 하기 구조인 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염.



청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, C형 간염 바이러스에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 C형 간염 바이러스에 의해 매개되는 질환은 C형 간염인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6

제 4항의 약제학적 조성물을 포함하는 조형제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 C형 간염 치료 및 예방용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 2-O-메틸호노키올을 포함하는 C형 간염 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] C형 간염 바이러스(Hepatitis C Virus; HCV)는 전 세계 2~3%의 인구가 지닌 질병으로 현재 보고되어 있다. C형 간염 바이러스 감염은 일산화질소(nitric oxide, NO)의 형성을 촉진하여 숙주 세포의 DNA 변형과 손상을 유발하며, 미토콘드리아의 막투과 전위(transmenbrane potential)을 감소시킬 뿐만 아니라, 활성 산소종(reactive oxygen species) 형성의 원인으로 작용한다. 형성된 활성 산소종은 산화적 스트레스로 작용하여 세포 구조를 손상시킬 수 있다. HCV는 급성 간염, 만성 간염, 간경변, 간세포암종의 원인 중 하나이지만, 현재까지 효과적인 백신은 개발되어 있지 않은 실정이다.

[0003] 최근 해외에서는 DNA 치료가 허용이 된 상황이나, 국내에서는 허용이 되지 않아 아직까지 인터페론 알파(interferon alpha; IFN-α)와 리바비린(rivavirin)을 동시에 사용하여 C형 간염을 치료하는 방법을 사용하고 있다. 그러나, 국내에서 사용되는 방법은 HCV의 모든 유전자형에 대한 치료가 불가능할 뿐만 아니라 치료 비용 및 치료 시간이 많이 소요되며, 치료시 부작용이 문제점으로 지적되고 있어 이에 대한 해결 방안의 마련이 절실한 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 국제공개특허공보 제1999-053917호.

(특허문헌 0002) 미국 등록특허공보 제7915232호.

(특허문헌 0003) 국제공개특허공보 제2013-092481호

발명의 내용

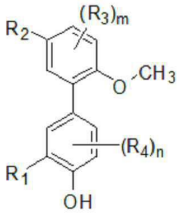
해결하려는 과제

[0005] 상기 문제점의 해결을 위해 본 발명에서는 C형 간염 바이러스(HCV)에 대한 우수한 복제 억제 효과가 있으며, 인간 세포에 대한 세포 독성이 낮은, 2-O-메틸호노키올(2-O-methylhonokiol)을 포함하는 C형 간염 치료 및 예방용 조성물을 제공하고자 하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 하기 화학식 1으로 표시되는 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염을 제공한다.

[0007] [화학식 1]

[0008] 

[0009] 상기 화학식 1에서,

[0010] R1, R2은 서로 독립적으로 수소, (C2-C7)알케닐이고;

[0011] R3, R4는 서로 독립적으로 수소 또는 할로겐이고;

[0012] m, n은 각각 서로 독립적으로 1 내지 3의 정수이다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물, 그의 프로드럭, 그의 용매화물, 그의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 C형 간염 바이러스에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물, 그의 프로드럭, 그의 용매화물, 그의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 C형 간염 바이러스에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 상기 약제학적 조성물을 포함하는 조형제를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 C형 간염 치료 및 예방용 조성물은 C형 간염 바이러스에 대한 효과적인 억제 효과를 나타냄을 확인하였으며, 이를 통해 다양한 종류의 HCV 타입에 따른 C형 간염의 치료 또는 예방에 우수한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 루시퍼라아제 시험에 의한 HCV 복제 억제 효과 측정 결과이다.

도 2는 MTS 시험에 의한 세포독성 측정 결과이다.

도 3은 HCV 복제시 생체이물(xenobiotic) 처리에 따른 기전 분석 결과이다.

(a) AhR, CYP1A1 단백질 발현, (b) siRNA 시험을 통한 mRNA 발현, (c) 화합물 155 처리 여부에 따른 CYP1A1 mRNA 발현량 변화.

도 4는 화합물 155 처리에 따른 IFN-α mRNA 발현량 변화에 관한 결과이다.

도 5는 화합물 155 및 이의 구조 이성질체인 화합물 156 처리시 HCV 복제 억제 효과 및 세포독성 측정 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 첨부한 표 또는 도면들을 참조하여 본 발명의 C형 간염 치료 및 예방용 조성물에 대해 상세히 설명한다.

[0020] 도면이 기재되어 있을 경우, 이는 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명은 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 상기

도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다.

[0021] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[0022] 본 발명에 있어 "검체", "시료" 또는 "샘플"은 분석을 위한 대상을 나타내는 것으로, 명세서에 걸쳐 동일한 의미로 사용되었다.

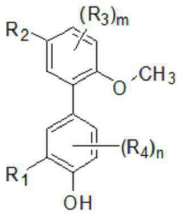
[0024] 본 발명의 용어 "알케닐"은 서로 독립적으로 동일하거나 또는 상이하게 탄소 원자수 2 내지 9의 알케닐 라디칼, 바람직하게는 탄소 원자수 2 내지 7의 직쇄 알케닐 라디칼을 나타내지만 이에 한정되지는 않는다.

[0025] 본 발명의 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드 원자를 의미한다.

[0027] 이하 본 발명의 2-O-메틸호노키올 화합물, 그의 프로드럭, 그의 용매화물, 그의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염에 대해 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명은 하기 화학식 1으로 표시되는 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염을 제공한다.

[0030] [화학식 1]

[0031] 

[0032] 상기 화학식 1에서,

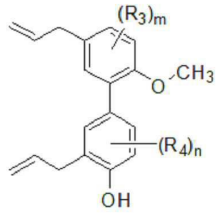
[0033] R1, R2은 서로 독립적으로 수소, (C2-C7)알케닐이고;

[0034] R3, R4는 서로 독립적으로 수소 또는 할로겐이고;

[0035] m, n은 각각 서로 독립적으로 1 내지 3의 정수이다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물은 하기 화학식 2로 표시될 수 있다.

[0038] [화학식 2]

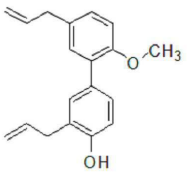
[0039] 

[0040] 상기 화학식 2에서,

[0041] R3 및 R4는 청구항 제1항의 화학식 1에서의 정의와 동일하고;

[0042] m, n은 각각 서로 독립적으로 1 내지 2의 정수이다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 따른 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물에 있어서, 상기 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물은 구체적으로 하기 구조일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 

[0047] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염을 포함하는 C형 간염 바이러스에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0048] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 C형 간염 바이러스에 의해 매개되는 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0050] 또한 본 발명은 상기 약제학적 조성물을 포함하는 조형제를 제공한다.

[0052] 상기한 바와 같이, 화학식 1의 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염은 C형 간염 바이러스에 대한 높은 복제 저해 활성을 나타내므로, 이들을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 C형 간염 바이러스에 의해 매개되는 질환, 예를 들어 C형 간염의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물은 약제학적으로 허용되는 염의 형태로 사용할 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 염은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있는 것으로, 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 황산수소나트륨, 인산, 질산, 탄산 등과 같은 무기산과의 염, 개미산, 초산, 트리플루오로아세트산, 프로피온산, 옥살산, 석신산, 벤조산, 시트르산, 말레산, 말론산, 만델산, 신남산, 스테아르산, 팔미트산, 글리콜산, 글루탐산 타르타르산, 글루콘산, 락트산, 푸마르산, 락토비온산, 아스코르브산, 살리실산, 또는 아세틸살리실산(아스피린)과 같은 유기산과의 염, 글리신, 알라닌, 바닐린, 이소루신, 세린, 시스테인, 시스틴, 아스파라진산, 글루타민, 리진, 아르기닌, 타이로신, 프롤린 등과 같은 아미노산과의 염, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산 등과 같은 설폰산과의 염, 나트륨, 칼륨 등의 알칼리금속과의 반응에 의한 금속염, 또는 암모늄 이온과의 염 등을 포함한다.

[0055] 본 발명의 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물은 용매화된 형태, 예를 들어 수화된 형태 및 비용매화 형태로 존재할 수 있으며, 본 발명에 따른 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물의 용매화물은 제약 활성을 갖는 모든 용매화된 형태를 포함하는 것이다.

[0056] 본 발명의 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물은 키랄 중심을 가질 수 있고, 라세메이트, 라세미 혼합물 및 개개의 거울상 이성질체 또는 부분 입체이성질체로서 존재할 수 있다. 이러한 이성질체는 통상의 방법에 의해 분리되거나 분해될 수 있으며 임의의 소정 이성질체는 통상의 합성법에 의해 또는 입체특이적 또는 비대칭적 합성에 의해 수득할 수 있다. 이러한 모든 이성질체 형 및 이들의 혼합물은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0057] 본 발명의 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물은 인간 또는 동물의 체내에서 분해되어 본 발명의 화합물을 제공하는 프로드럭의 형태로 투여될 수 있다. 프로드럭은 모 화합물의 물리적 및(또는) 약동학적 프로파일을 변경 또는 개선하는데 사용될 수 있고 모 화합물이 프로드럭을 형성하도록 유도될 수 있는 적합한 기 또는 치환체를 함유할 경우 형성될 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물, 그의 프로드럭, 그의 용매화물, 그의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염에 통상의 무독성 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제 등을 첨가하여 약제학적 분야에서 통상적인 제제, 예를 들면 정제, 환제, 경연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭서제(elixirs) 등의 경구투여용 제제 또는 정맥내,

피하, 설하, 근육내 투약용 멸균성 수성 또는 오일상 용제의 비경구투여용 제제로 제제화할 수 있다.

[0059] 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및/또는 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 부형제로는 감미제, 결합제, 용해제, 용해보조제, 습윤제, 유화제, 등장화제, 흡착제, 붕해제, 산화방지제, 방부제, 활택제, 충진제, 방향제 등이 있으며, 이러한 부형제의 비율 및 성질은 선택된 정제의 용해도 및 화학적 특성, 선택된 투여경로 및 표준 약제 실무에 의해 결정될 수 있다. 부형제의 예로는 락토스, 덱스트로스, 슈크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스, 글라이신, 실리카, 탈크, 스테아린산, 스테린, 마그네슘 스테아린산염, 마그네슘 알루미늄 규산염, 녹말, 젤라틴, 트라가칸트 고무, 알지닌산, 소디움 알진산염, 메틸셀룰로오스, 소디움 카르복실메틸셀룰로오스, 아가, 물, 에탄올, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 염화나트륨, 염화칼슘, 오렌지 엣센스, 딸기 엣센스, 바닐라 향 등을 들 수 있다.

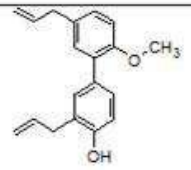
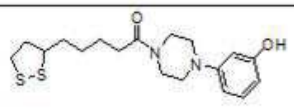
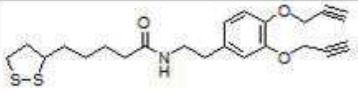
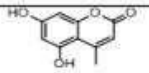
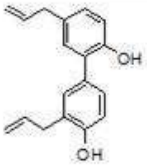
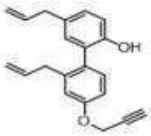
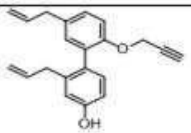
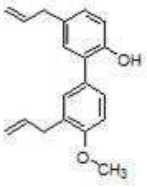
[0061] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여 형태로 제형화될 수도 있는데, 이러한 경우 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이 때, 상기 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 상기 약제학적 조성물은 유효 성분, 즉, 화학식 1의 2-O-메틸 호노키올 유도체 화합물, 그의 프로드럭, 그의 용매화물, 그의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염이 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합되어 용액 또는 현탁액으로 제조되고, 이러한 용액 또는 현탁액이 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조될 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 멸균되거나, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제를 더 포함할 수도 있고, 기타 치료적으로 유용한 물질을 더 포함할 수도 있으며, 혼합, 과립화 또는 코팅의 통상적인 방법에 따라 제제화될 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명에 따른 약제학적 조성물에서 유효성분인 화학식 1로 표시되는 2-O-메틸호노키올 유도체 화합물, 그의 프로드럭, 그의 용매화물, 그의 입체이성질체 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염은 사람을 포함하는 포유류에 대한 투여용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질병정도에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로 하루에 0.001 내지 500 ㎎/㎏(체중), 바람직하게는 0.01 내지 100 ㎎/㎏(체중)의 유효량으로 상기 약제학적 조성물에 포함될 수 있고, 이러한 약제학적 조성물은 1 일 1 회 또는 2 회 이상 분할되어 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여될 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0065] 이하, 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0067] [실험재료]

화합물	화합물 구조
155	
97	
230	
399	
147	
614	
615	
156	

[0068]

[0069] [측정방법]

[0070] 1. 바이러스 성장 억제 실험 방법 - RNA 합성 억제: 루시퍼라아제 시험(luciferase assay)

[0071] C형 간염 바이러스 복제단위 세포(HCV replicon cells)는 C형 간염 바이러스 유전자형 1b 복제단위 유전체로 구성된 subgenomic-selectable-APP203 CON1/SG-Neo(1)을 이용하였다.

[0072] 루시퍼라제 리포터 플라스미드가 포함이 되어 있는 Con I 세포에 측정하고자 하는 물질을농도별로 각 well에 첨가하였다. 이후, 시험물질이 충분히 노출될 수 있도록 24시간 동안 37℃, 5%, CO_2 환경에서 배양한 후에 리포터 유전자를 분석하였다.

[0073] 분석 결과는 레닐라 루시퍼라제 활성에 대한 상대적인 파이어플라이 루시퍼라제 활성을 표준화하여 나타냈다. 리포터 및 레닐라 플라스미드만 발현하는 세포의 프로모터 활성을 대조군 (Con)으로서 측정하였다.

[0075] 2. 세포독성 측정: MTS 시험(MTS assay) - Promega cell Proliferation assay manual

[0076] 24 웰 플레이트(well plate)에 각 웰당 5 × 10^4 세포/웰로 세포를 분주한 후, 측정하고자 하는 물질을 농도별로 각 well에 첨가하였다. 이후, 시험물질이 충분히 노출될 수 있도록 24시간 동안 37℃, 5%, CO_2 환경에서 배양하였다.

[0077] 상층액을 제거한 후, 세포 배양액 100uL에 MTS 20uL 용액을 혼합하고, 혼합물을 각 웰당 100 uL씩 분주하였다. 이후, 2시간 내외(0.5~4 시간)로 37℃, 5%, CO_2에서 배양한 후, 플레이트를 충분히 흔들어준 후, OD 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0079] 3. 활성산소종 증가 억제 효과 측정: 유세포 분석(Flow cytometry)

[0080] 세포에 50 μM의 155(2-O-메틸호노키올)와 PCTC를 각각 24 시간 동안 처리하고, 활성산소를 측정하기 위해 50μM DCF-DA를 사용하여 37℃에서 30분간 염색한 후, 세포를 PBS로 3번 세척하였다.

[0081] DCF-DA는 자유롭게 세포막을 통과하고 세포내의 에스터레이즈에 의해 DCF로 분해된다. 따라서, DCF 형광값은 세포 내 활성산소종(ROS)의 레벨을 의미한다. DCF의 축적은 흡광도 490nm와 참고 흡광도 690nm로 리더기로 측정하였다. 유세포 분석은 Beckman Cytomics FC500유세포 분석기로 관찰 및 분석하였다.

[0083] 4. 단백질 발현량 측정: western blot 측정방법

[0084] 세포에 시약 또는 siRNA를 농도별, 시간별로 처리한 후, 단백질 분해 버퍼(50mM Tris-Cl, 150nM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% NP40, protease inhibitor)를 이용해 세포를 모은 뒤, 14000rpm의 속도로 20분간 원심분리한다. 그 후 상층액을 이용해서 SDS-PAGE를 시행하고, nitrocellulose membrane에 단백질을 옮겨 western blot시행을 한다. 그리고 단백질 특정 항체(AhR, CYP1A1, Actin)를 이용하여 관찰하였다.

[0086] 5. 세포 내 mRNA 변화 측정 - 유전자증폭기(realtime-PCR)

[0087] 세포에 50 μM의 155(2-O-메틸호노키올)을 처리하여, 24시간 동안 37℃, 5%, CO_2 환경에서 배양하였다. 세포를 PBS로 세척한 후, Trizol을 이용하여 RNA를 추출하였다. 1.0ug RNA의 양으로 cDNA Synthesis kit을 이용하여 cDNA 합성하였다. Real time PCR primer는 다음과 같다. IFN-α, forward : TTTCTCCTGCCTGAAGGACAG 와 reverse :GCTCATGATTTCTGCTCTGACA, ACTIN, forward : CATCGAGCACGGCATCGTCA 와 reverse : TCGAAGTCCAGGGCGACATA, CYP1A1, forward : CACTGCCAACACCTCTGTCTT 와 reverse : CAAGGAGCTCCATGGACTCT 를 이용하였다. 각 primer는 1uL씩 첨가하였고, Power SYBR®Green PCR Master Mix는 12.5uL, 주형 DNA는 2uL를 첨가하여 총 반응액이 25uL가 되도록 멸균증류수를 첨가하였다. 유전자 증폭기(Realtime PCR)은 7500 Real-Time PCR system을 사용하였으며, 95℃에서 40초, 55℃에서 40초, 70℃에서 1분 주기를 40회 반복하였다.

[0089] 6. siRNA 활용 한 mRNA 및 단백질 변화량 측정방법

[0090] Small interfering RNA(siRNA)를 세포에 100nM의 농도로 형질전환 한 후, 위에서 설명한 단백질 발현량 측정 방법과 세포 내 mRNA의 변화 측정하는 실험을 하였다.

[0092] [실시예 1] 루시퍼라아제 활성 측정

[0093] 항산화제(antioxidant)로 예측되는 화합물 4종에 대하여, HCV 복제 억제를 측정하기 위해, 화합물 97, 155, 230 및 399번의 각 화합물을 0, 25, 50, 100 uM의 농도로 준비한 후, 상기 방법에 따라 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

[0094] 그 결과를 도 1에 도시하였다.

[0095] 이로부터, 화합물 155가 25 uM 이상 처치하는 경우 루시퍼라아제 활성이 현저히 감소하여, 100 uM 농도로 처치

시에는 루시퍼라아제 활성이 거의 나타나지 않아, HCV 복제가 거의 억제된 것을 확인하였다.

[0096] 반면 화합물 97, 230 및 399에 대해서는 처치 농도에 따라 루시퍼라아제 활성이 증가하거나, 50 uM 이상 처치시에도 미처치시 대비 활성 감소는 나타나지 않아 HCV 복제에 대한 억제 효과가 없음을 확인하였다.

[0098] [실시예 2] 세포 독성 측정

[0099] 상기 실시예 1에서 루시퍼라아제 활성이 현저히 감소하여, HCV 복제 억제 효과가 현저한 것으로 밝혀진 화합물 155(2-O-메틸호노키올), HCV 복제 억제 효과가 있는 양성대조군 호노키올(화합물 147) 및 그 유도체인 화합물 614 및 615에 대하여, 세포 독성을 상기 MTS 시험방법에 따라 측정하였다.

[0100] 그 결과를 도 2에 도시하였다.

[0101] 이로부터, Con I 세포에 화합물 155를 고농도로 처리한 경우를 제외하면 높은 세포생존을 나타낸 반면, 화합물 147, 614 및 615의 경우 50 uM 이상의 농도로 처리시 세포 생존 비율이 급격히 감소하여 100 uM에서는 거의 생존하지 못해 세포에 대한 강한 독성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0102] 이로부터, 화합물 155는 HCV 복제 억제를 위한 약제학적 물질로 활용이 가능성이 있음을 확인하였다.

[0104] [실시예 3] 활성산소종 감소 효과 측정

[0105] HCV 감염시에 증가하는 활성산소종(ROS)에 대한 억제 효과 측정을 위해 상기 유세포 분석 방법을 이용하였다. 실험군은 화합물 155를 50 uM의 농도를 처리하였고, 대조군으로는 HCV 복제 효과가 있는 것으로 알려진 피롤리딘 디티오카바메이트(lyrolidine dithiocarbamate, PDTC)을 0.3 uM의 농도로 처리하여 그 결과를 비교하였다. 음성대조군으로는 아무런 시약도 처리하지 않은 샘플을 사용하였다.

[0106] 그 결과, 화합물 155는 양성 대조군인 PDTC 대비 현저히 우수한 활성 산소종 제거 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0108] [실시예 4] HCV 복제 억제 기전

[0109] 화합물 155 처리시 CYP1A1 효소 단백질 발현의 AhR 의존성

[0110] 화합물 155의 HCV 억제 기전 확인을 위해 Con I 세포에 화합물 155를 처리하여 AhR(aryl hydrocarbon receptor) 단백질 및 AhR 유전자의 타겟 유전자인 CYP1A1(Cytochrome P450 1A1) 효소의 발현량을 SDS-PAGE를 통해 분석하였다.

[0111] 그 결과를 도 3에 도시하였다.

[0112] 이로부터, 화합물 155 처리 후 AhR 단백질의 발현량이 현저히 감소하는 것을 확인하였으며, 이로부터 화합물 155가 세포에 독성을 일으키지 않는 물질인 것을 다시 확인하였다.

[0113] 반면, AhR 발현에 따라 유도되는 CYP1A1 단백질의 양은 증가하는 것으로 나타났는데, 이로부터 CYP1A1의 유도 원인이 AhR 유전자의 발현에 의한 것인지 확인을 위해 siRNA 분석을 수행하였다.

[0114] siAhR 처리 후 CYP1A1의 mRNA 발현을 측정한 결과, 화합물 155 처리 시 CYP1A1의 유도는 AhR 유전자에 비의존적(independent)임을 확인하였다(도 3b, 도 3c)

[0116] 화합물 155 처리시 IFN-α 발현의 AhR 의존성

[0117] 화합물 155의 처리와 IFN-α 발현에 있어 AhR의 의존성 확인을 위해 Con I 세포에 화합물 155를 처리하여 IFN-α mRNA 발현량을 측정하였다.

[0118] 그 결과를 도 4에 도시하였다.

[0119] 이로부터, 화합물 155 처리 후 IFN-α 유전자의 발현량이 7배 이상 현저히 증가하는 것을 확인하였으며, 상기 화합물의 처리 후 세포 내에서 AhR 신호를 억제하여 IFN-α 발현을 증가시킴으로써, HCV 복제를 억제하는 것을

새롭게 확인하였다.

[0121] [실시예 5] 화합물 155의 구조 이성질체의 HCV 복제 억제 활성 비교

[0122] 상기 2-O-메틸호노키올와 구조 이성질체인 4-O-메틸호노키올과(화합물 156)의 HCV 복제 억제 활성 비교를 위해 화합물 155, 화합물 156 및 화합물 147(호노키올)을 각각 0, 50, 및 100 uM씩 처리한 후, 상기 실시예 1 및 2과 같은 방법으로 루시퍼라아제 시험 및 세포독성을 측정하였다.

[0123] 그 결과를 도 5에 도시하였다.

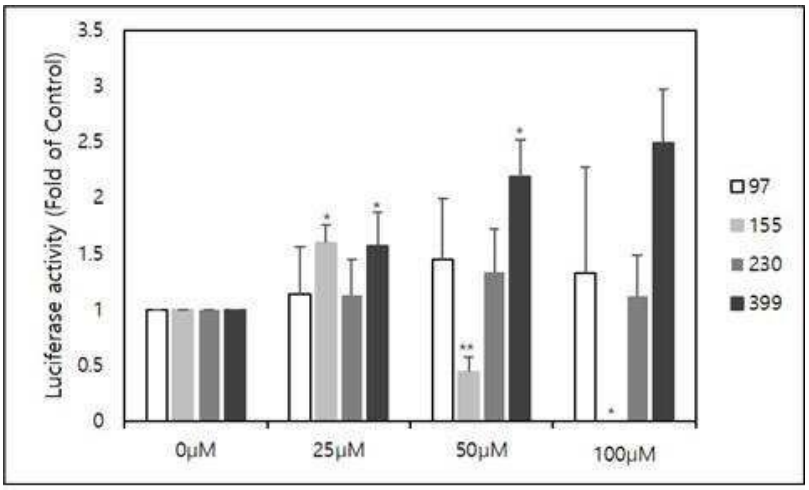
[0124] 이로부터, 본 발명의 화합물 155를 50 uM로 처리시, 구조 이성질체인 화합물 156에 비해 3배 이상 효율이 높아 유의한 효과의 차이가 있음을 확인하였다.

[0125] HCV 복제 억제 효과를 확인할 수 있었던 50 uM에서 세포의 생존은 두 이성질체가 유사한 생존 비율을 나타내었으나, 50 uM 이상 고농도로 처리할 경우, 본 발명의 화합물 155의 세포 생존 비율이 화합물 156 대비 현저히 증가함을 확인하였다.

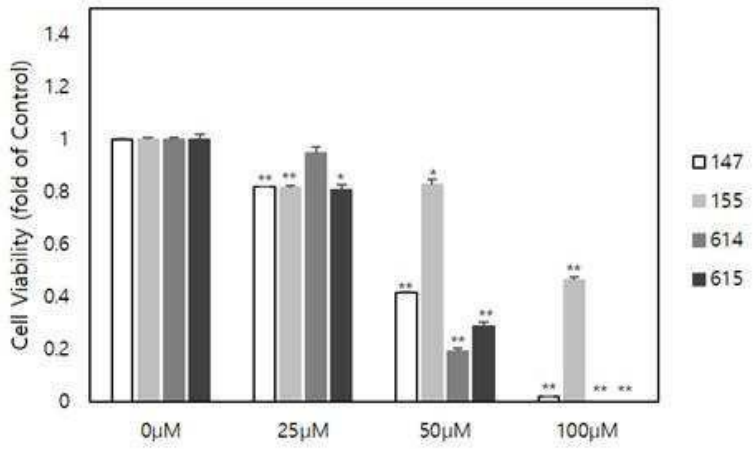
[0126] 상기 결과로부터, 동일한 화학식을 갖는 구조 이성질체이더라도, 본 발명의 화합물 155가 화합물 156 대비 현저히 우수한 HCV 억제 효과와 함께, 낮은 세포 독성을 갖는다는 새로운 결과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

도면

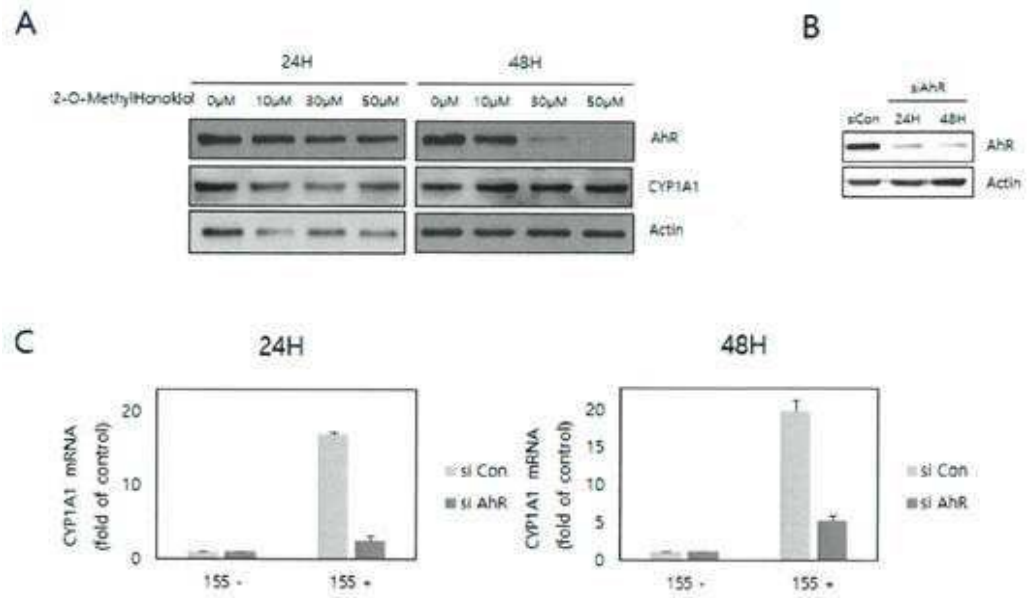
도면1



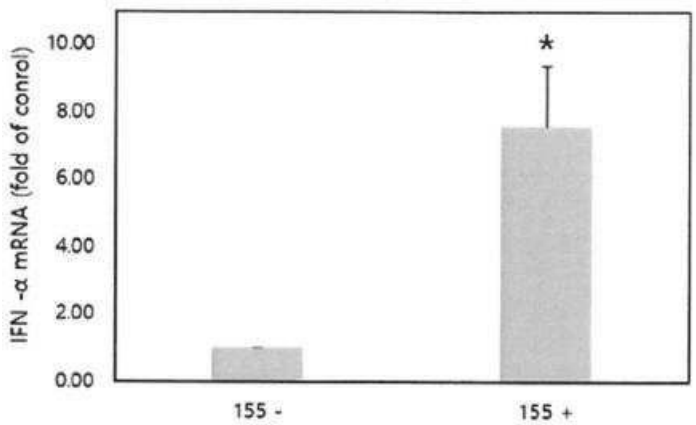
도면2


Cell Viability (fold of Control)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0μM
25μM
50μM
100μM
147
155
614
615

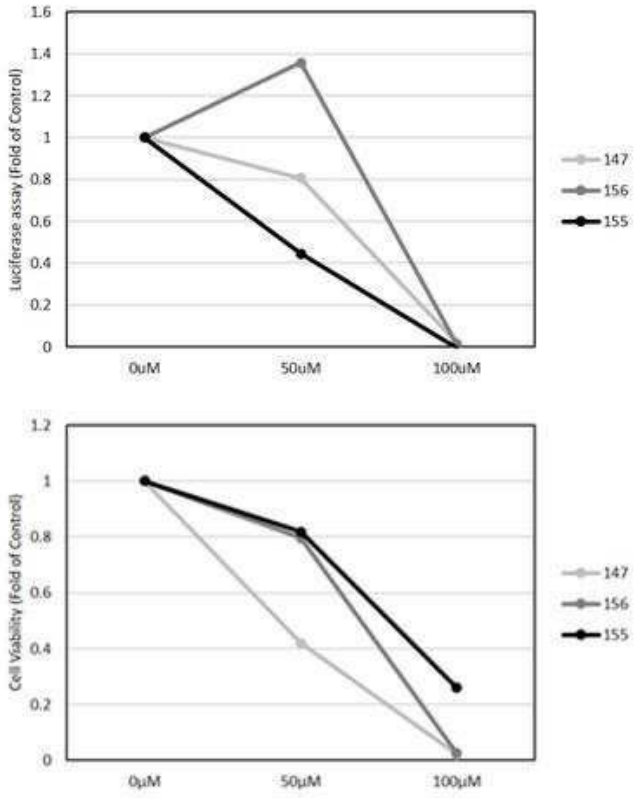
도면3


A
24H
48H
2-O-MethylHonokiol
0μM
10μM
30μM
50μM
AhR
CYP1A1
Actin
B
siAhR
siCon
24H
48H
AhR
Actin
C
24H
48H
CYP1A1 mRNA (fold of control)
si Con
si AhR
155 -
155 +

도면4


IFN -α mRNA (fold of conrol)
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
155 -
155 +

도면5


Luciferase assay (Fold of Control)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0uM
50uM
100uM
147
156
155
Cell Viability (Fold of Control)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0μM
50μM
100μM
147
156
155