



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0075128  
(43) 공개일자 2011년07월06일

(51) Int. Cl.

A61K 31/37 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0131480

(22) 출원일자 2009년12월28일

심사청구일자 2009년12월28일

기술이전 희망 : , 실시권하여, 기술지도

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교

(72) 발명자

전종갑

강원 춘천시 옥천동 한림대학교 화학과

서홍원

경기도 용인시 기흥구 보정동 동아솔레시티아파트  
115-1201

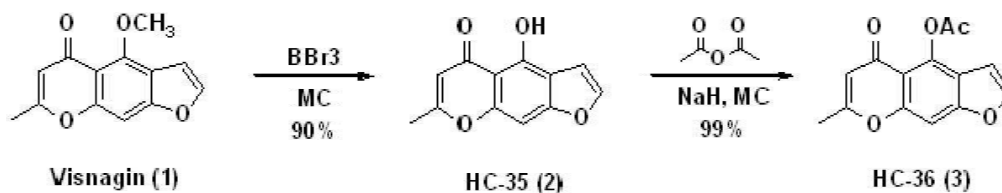
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 비스나진 유도체를 이용한 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물

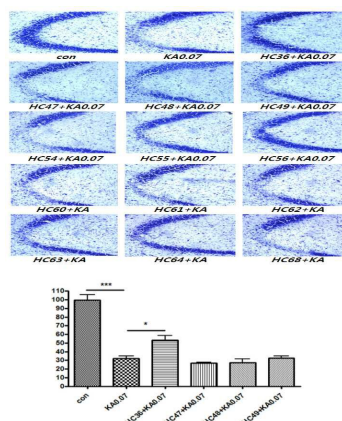
### (57) 요약

본 발명은 반응식 1로 표시되는 비스나진(visnagin)의 유도체(비스나진 화학식의 변형)물질을 가지고 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물 개발에 관한 것으로서, 본 발명의 비스나진 화학구조식의 변형물질 (HC-36)은 뇌신경세포의 손상에 보호 효과를 나타내므로 뇌손상을 치료하는 뇌세포 보호제로서 뇌졸중 등 뇌세포 사멸에 의해 발생하는 뇌질환에 대한 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

### 반응식 1



### 대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명 지식경제부

연구관리전문기관

연구사업명 지역혁신센터(RIC)사업

연구과제명 비스나진 및 이의 유도체를 이용한 신규 뇌신경세포 보호제 개발

기여율

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2008년 3월 1일 ~ 2010년 2월 28일

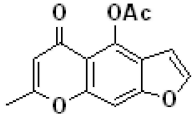
---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

화학식 3으로 표시되는 비스나진 유도체 HC-36의 뇌신경 질환 예방 또는 치료용 조성물.

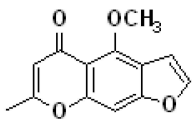
화학식 3



### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 화학식 3 (HC-36)은 비스나진 (화학식 1)의 화학적 구조를 변형시켜 구성된 조성물

화학식 1



### 청구항 3

화학식 1로 표시되는 비스나진 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 뇌신경 질환은 신경 퇴행성 질환, 허혈 또는 재관류에 의한 질환 및 척수 또는 뇌세포 손상 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물

### 청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 신경 퇴행성 질환은 치매 또는 파킨슨씨병인 것을 특징으로 하는 조성물

### 청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 허혈 또는 재관류에 의한 질환은 허혈성 뇌졸중인 것을 특징으로 하는 조성물

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 기존의 발표되었던 비스나진의 신경보호효과와 이의 화학적 구조식을 변형시킨 compound (HC-36)가 뇌세포 보호제로서 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물 개발에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 뇌신경 질환은 다양한 원인으로 인해 일어난다. 그 중 허혈성 뇌졸중은 전체 뇌졸중 환자의 80% 정도를 차지하고, 현재 우리나라 노인성 질환 중 순환기 계통에서 가장 빈도가 높게 발생하는 심각한 질환이다.

[0003] 뇌졸중은 뇌혈관이 터지거나 막혀서 결과적으로 국소 뇌조직의 기능 이상을 가져오는 뇌혈관 질환으로 흔히 중풍이라고도 하며, 우리나라에서는 사망원인 중 선두를 달리고 있다. 더욱이 산업화와 의학의 발전에 의한 평균

수명의 연장으로 인하여 그 발병률이 점차 증가하는 추세이다. 뇌졸중은 뇌의 어느 부위에서나 발생할 수 있고 따라서 신체의 거의 모든 기능에 장애를 초래할 수 있다. 의학적으로 뇌졸중은 크게 뇌의 혈관이 막혀서 특정 부위에 혈액 순환이 안되어 나타나는 '허혈성 뇌졸중'과 뇌출혈에 의한 '출혈성 뇌졸중'으로 분류할 수 있으며, 그 중 성인병의 원인으로 알려진 고혈압, 동맥경화증과 밀접한 연관성이 있는 허혈성 뇌졸중의 발생 비율이 더 높은 편이다.

[0004] 허혈성 뇌졸중은 목 부분에 있는 경동맥, 추골뇌저동맥부터 뇌 안의 가느다란 동맥에 이르기까지 어디든지 혈관이 막히면 발병하게 되며, 이로 인해 그 혈관이 지배하던 뇌 조직이 죽는 현상, 즉 '뇌경색(infarction)'이 발생하게 된다. 일단 발생한 뇌경색 부위는 그 기능을 되살릴 수 없으며, 따라서 뇌경색에 의한 중추신경계 장애는 회복되지 않고 영구적으로 남게 된다. 그러므로 뇌졸중 치료에 있어서 제일 중요한 것은 뇌졸중 발병 위험 인자로 알려진 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 등의 예방법과 더불어 뇌 허혈 자체에 대한 예방이다. 또한 뇌졸중 발병에 의해 뇌경색이 왔을 때 뇌부종을 감소시키고, 허혈 상태인 곳은 적절하게 순환되게 하여 이차적인 뇌손상을 줄이는데 그 초점을 두고 있다.

[0005] 현재 신경 세포의 보호를 위해 사용하고 있는 물질로는 흥분성 아미노산 길항제인 갱글리오사이드(ganglioside), 니모디핀(Nimodipine), GABA 항진제인 클로메치아졸(clomethiazole) 등이 있고 황산 마그네슘과 글리신 길항제는 2상 임상 연구중이며, 피라세탐(piracetam)이 현재 대규모 임상 연구가 진행중이다. 그러나 현재 시도되고 있는 신경 세포 보호제들은 허혈 진행 과정의 각기 다른 단계에 작용하는 제제들로, 이러한 여러 가지 과정에 동시에 작용하는 복합요법의 개발이 필요하지만 부작용과 약물 상호간섭의 문제를 해결해야 하는 과제를 안고 있다. 또한, 허혈성 뇌졸중의 증상은 특별한 예후 없이 급작스레 찾아오므로 뇌 허혈 발병 당시에 투여되는 약물을 통한 치료를 기대하기보다는 지속적인 허혈 예방에 대한 새로운 약품의 조제가 더욱 효과적이라 판단되고 있다.

[0006] 신경 퇴행성 질환의 일종인 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)은 운동 및 인지 장애를 일으키는 퇴행성 뇌신경 질환으로 1817년 제임스 파킨슨에 의해 처음으로 보고되었다. 이 질환의 발병률은 미국에서 인구 10만 명 당 100~150명 정도로 약 75만~100만 명의 환자가 보고되고 있으며, 매년 6만여 명이 새로이 진단되는 추세로, 국내에서도 인구의 노령화에 따라 그 발병률 및 유병률이 계속 증가할 것으로 예상된다. 조직병리학적으로는 흑색질(substantia nigra)에 위치하는 도파민 신경세포의 소실이 특징적으로 나타나며, 그 신경 섬유질의 투사 부위인 미상핵(caudate nucleus)과 조가비핵(putamen)의 도파민이 감소하여 특징적인 진전(tremor), 운동지연(bradykinesia), 경직(rigidity), 자세의 장애(disturbance of posture) 등 운동 및 인지 기능 장애가 나타난다.

[0007] 파킨슨병에 사용되는 주된 치료 약물은 뇌에서 부족해진 도파민의 기능을 보충해 주는 약제 또는 그 외 신경 세포의 파괴를 예방 혹은 지연시키고자 하는 목적이나 기타 우울증 등의 부수적인 증상을 조절하기 위한 약물 치료 등이 있다. 대표적인 약물로 도파민 전구 물질인 레보도파(levodopa, L-dopa) 성분의 마도파(Madopar), 도파민 수용체 효현제(agonist) 성분의 브로미딘(bromidine), 리슈라이드(lisuride), 그리고 항 아세틸콜린성 약물인 알탄(artane), 코젠틴(cogentin) 등의 다양한 신경약리학적 보상성 치료법이 개발되어 있다. 이중 도파민의 전구체인 레보도파는 부족한 뇌 내 도파민의 농도를 보충시킴으로써 파킨슨병의 증상을 개선시키는데 가장 효과적으로 사용되고 있으나, 3~5년 이상 장기간 투여하면 약물효과 시간이 점점 짧아지거나(wearing-off), 약물의 효과에 대한 운동조절 기능의 변동이 심해지는 현상(on-off 현상), 이상운동증(dyskinesia) 등의 부작용이 나타난다(Freed et. al., N. Engl. J. Med. 327:1549-55(1992)). 그밖에도 파킨슨병의 외과적 치료법으로 시상절단술(thalamotomy)과 담창구절단술(pallidotomy), 심부 뇌자극술(deep brain stimulation), 신경세포 이식술(Neuronal cell transplantation)등이 시행되고 있다. 그러나 치료효과의 지속 기간이 환자에 따라 큰 차이를 나타내며, 드물게 수술에 따른 발성부전(hypophonia), 구음장애(dysarthria; 말더듬증), 기억력 감퇴 등의 부작용을 동반한다(Ondo et. al., Neurology 50:266-270 (1998); Shannon et. al., Neurology 50:434-438(1998)).

[0008] 또 다른 뇌신경 질환인 알츠하이머병에 대한 최근 치료 기조는 대뇌피질(cerebral cortex)과 해마(hippocampus)에서 기능 손상된 콜린성 시그널링 및 전달(cholinergic signaling and transmission)에 의해 알츠하이머병이 유래된다는 가능성에 중점을 두고 있다(Bartus et al., Science. 217(4558): 408-14(1982)); 및 Coyle et al., Science. 219(4589):1184-90(1983)). 이런 뇌의 영역은 기억 및 지능과 연결되어 있으므로, 뇌의 이들

부분의 기능적인 결함은 기억 및 판단에 대한 확실한 손상을 주고 지적 능력을 상실케 한다. 신경 신호전달(neuronal signaling)에 손상이 이루어지는 정확한 과정이 논쟁 대상이 되고는 있지만, 감각성 플라크(senile plaque) 및 신경원 섬유 농축체(neurofibrillary tangle: NFT)가 신경 손상의 주 원인으로 여겨진다. 아밀로이드 베타( $A\beta$ )의 축적으로 인한 감각성 플라크는 이병의 가장 큰 특징으로, 알츠하이머병은 사후 부검으로 확진이 가능하다(Khachaturian, Arch. Neurol. 42(11):1097-105(1985)).

[0009] 알츠하이머병의 경우, 콜린성 시그널링의 손상을 억제할 수 있도록 아세틸콜린의 양을 증가시키거나, 아세틸콜린이 장기간 존재할 수 있도록 하거나 또는 신경세포의 전달에 아세틸콜린이 더욱 효과적으로 작용하도록 하는 약물과 치료법이 제시되고 있어서, 알츠하이머병 환자들의 아세틸콜린 활성도를 높이는 많은 화합물들이 사용되고 있다. 현재 가장 효과적인 접근 방법은 시냅스에서 아세틸콜린을 빠르게 분해하여 신경 신호 전달을 막는 아세틸콜린에스테라아제의 활성을 억제하는 방법이다. 실제로 이런 저해제(예: tacrine, donepezil 및 rivastigmine)들은 현재 미국 FDA에서 인정한 알츠하이머병 치료약물로 시장에서 유통되고 있다. 많은 경우 상기 약물들은 병의 파괴적인 진행을 막는데 유효하나, 신경계의 병 이전 상태로의 회복에는 잘 적용되지 않고 있다.

[0010] 어떤 화합물들은 신경의 일반적인 건강 상태를 개선하여 나이가 들어감에 따른 세포의 기능을 정상적으로 유지하는데 목적을 두고 있다. 예를 들어, NGF와 에스트로겐 같은 몇몇 약물들은 신경의 퇴화를 늦추어 주는 신경 보호 역할을 하며, 항산화제와 같은 다른 약물들은 세포의 산화를 감소시켜 정상적인 노화의 결과로 나타나는 해로운 세포의 손상의 증가를 감소시킨다. 아밀로이드 베타 펩타이드가 축적되는 정도가 많으면 알츠하이머병이 심각해지는데, 신경염 공간(neuritic space)에 아밀로이드 베타의 축적을 낮추어 주면 알츠하이머병의 진행을 늦추게 될 것으로 생각되고 있다. 아밀로이드 전구체 단백질(Amyloid precursor protein: APP)이  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -세크레타아제들과 같은 세포내의 단백질 분해효소들과 조합으로 많은 다양한 형태들로 진행되는 것으로 생각된다. 하지만, 아밀로이드 베타의 형성 과정이 실제 과학적으로 완전히 규명되지 않았기 때문에, 아밀로이드 베타의 형성을 조절하는 것은 아직은 가능하지 않다.

[0011] 아밀로이드 베타의 축적이 신경신호 전달에 이상을 주는 과정은 명확하지 않다. APP가 이상하게 절단되어 아밀로이드 베타가 많이 생성되어 신경염에 축적되게 되면 플라크 형성이 유발된다. 따라서 이런 절단 반응에 관여하는 많은 다른 요인들(예: 염증반응 등)은 타우(tau) 단백질의 인산화를 증가시키고, NFT들과 쌍나선형 필라멘트(paired helical filament: PHF)들의 축적을 증가시켜서 결국 신경의 손상을 증가시킨다. 이런 요인들 모두 신경의 기능 장애를 유발하고 궁극적으로 알츠하이머 형태의 치매로 진행을 가속시킨다.

[0012] 비록 알츠하이머 병의 영향을 줄이기 위한 치료 방법에 대한 개발이 많이 진행되고 있으나, 현재로써는 일시적인 증상의 개선을 제공하는 것이다. 결론적으로 현재 알츠하이머병 치료는 병의 진행 과정을 되돌리는 것이 아니라 병의 증상을 개선하는데 초점을 두고 있다. 병의 생물학적인 지식에 대해서는 보다 많이 알고 있으나, 임상으로의 적용 결과는 아직 성공적이지는 않다.

[0013] 이러한 다양한 원인으로 인한 뇌 손상의 현저한 특징은 신경세포의 사멸이다. 그럼으로 이와 같은 특징을 유사하게 재현하는 실험 방법이 몇 가지 제안되고 있는데 그 중 하나가 KA에 의한 뇌손상유발이다. 자세히 말하자면 뇌 세포의 흥분성 아미노산(kainic acid, NMDA, quisqualate, AMPA, glutamate 등)들에 의한 흥분독성은 신경세포죽음을 초래하고 뇌 기능의 장애를 유발하여 경련, 뇌졸중, 알츠하이머씨 병, 파킨슨씨병, 척수손상 등과 같은 여러 가지 뇌 질환을 일으키는 중요한 인자라는 사실에 착안하여, 흥분성 아미노산인 카인산을 뇌실내로 직접 주입하는 방법이다. 카인산을 전신 혹은 중추신경계로 투여하면 간질발작이 증가하고 오피오이드 펩타이드(opioid peptide)를 합성시키는 프로디노르핀(prodynorphin) 또는 프로엔케팔린(proenkephalin) mRNA의 농도가 해마(hippocampus)에서 증가된다. 상기 카인산은 해마조직에서 c-fos와 c-jun 전사조절 인자의 발현을 증가시키며(Kaminska, B. et al., Acta Biochim Pol., 44, pp781-789, 1997), 또한 IL-1과 같은 사이토카인 유전자와 염증반응에 관여하는 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 및 시클로옥시게나아제-2(COX-2) 유전자의 발현을 증가시킨다고 보고되었다(Kunz, T. and Oliw, EH., Eur J Neurosci., 13, pp569-575, 2001).

[0014] 흰쥐를 이용한 카인산에 의한 MAPK 신호전달의 연구에서 ERK1/2, p38, JNK 단백질의 인산화가 해마조직에서 증가됨이 보고되었는데, 카인산 유도 MAPK의 발현은 세포 생존이나 사멸에 있어서 하위 경로에 있는 많은 유전자 발현을 유도하는 중요한 지표가 된다(Mielke, K et al., Neuroscience, 91, pp471-483, 1999).

[0015] 한편, 비스나진은 진경 작용이 있는 것으로 알려져 있다(생약학, 생약학교재편찬위원회, 동명사, 서울, 2000. 승마 참조). 또한 혈압을 강하시키고 칼슘의 유입을 억제함으로써 혈관 평활근 수축을 억제하는 것으로 알려져 있기도 하다(생약학, 생약학교재편찬위원회, 동명사, 서울, 2000. Ito M et al., Chem Pharm Bull., 24(4), pp580-583, 1976; Duarte, J. et al., Eur J Pharmacol., 286(2), pp115-122, 1995). 그러나, 상기 문헌들에는 비스나진의 뇌신경세포 보호 효과의 가능성만 제시되어 있을 뿐 비스나진의 화학식을 변형시킨 유도체의 신경세포 보호효과에 대한 가능성을 제시하는 내용은 개시되어 있지 않다.

## 발명의 내용

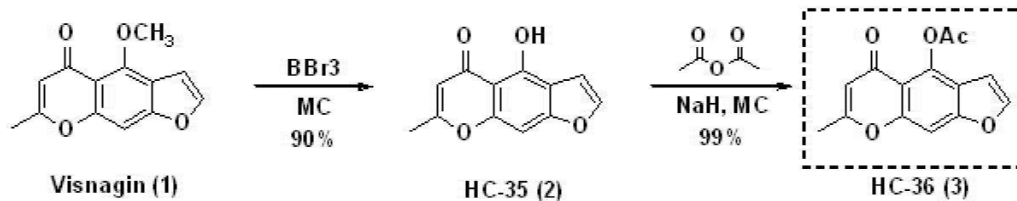
### 해결 하고자하는 과제

[0016] 따라서, 본 발명은 비스나진 유도체 (HC-36)가 뇌신경세포 보호 효과가 있음을 확인하고, 이를 유효성분으로 함유하는 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제 해결수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 반응식 1로 표시되는 비스나진(4-methoxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-one)의 화학적 변형을 통한 새로운 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0018] 반응식 1



[0019]

## 효과

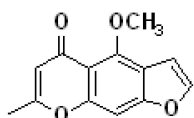
[0020] 본 발명 조성물의 뇌세포 보호 예방 또는 치료 효과는 이미 시험법이 확립되어 있는 뇌실내 카인산 투여 방법을 이용하여 비스나진 유도체 보호효과를 통해 확인할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 카인산을 뇌실내로 투여하여 유발시킨 해마의 세포 사멸현상이 비스나진 유도체의 경구 투여에 의해 현저하게 감소되었다(도 1 및 도 2 참조). 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 이러한 세포사멸 억제 현상은 pERK의 발현 억제(도 5 참조) 및 아스트로사이트의 발현억제를 통해 이루어지는 것으로 추정된다(도6 참조). 따라서 본 발명의 비스나진 유도체 특히 HC-36은 뇌신경세포의 손상에 보호 효과를 나타내므로 뇌손상을 치료하는 뇌보호제로서 뇌졸중 등의 질병에 대한 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0021] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명에서 출발물질로 사용되는 비스나진 (visnagin)은 화학식 1로 표시된다.

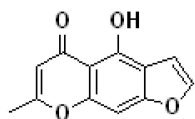
### 화학식 1



[0023]

[0024] 상기 식에서, 비스나진은 알드리치등의 시약회사에서 쉽게 구입할 수 있으며 methylene chloride 용매에 녹여서 사용한다.

### 화학식 2

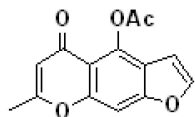


[0025]

[0026]

상기식에서 HC-35 (4-hydroxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-one)은 출발물질 비스나진으로부터 BBr<sub>3</sub>를 이용한 demethylation 반응으로 얻어진다.

### 화학식 3



[0027]

[0028]

상기식에서 HC-36 (4-acetoxy-7-methyl-5H-furo[3,2-g][1]benzopyran-5-one)은 화학식 2와 acetic anhydride와의 acetylation반응으로 얻어진다.

[0029]

이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0030]

### 실시예

[0031]

실시예 1

[0032]

비스나진 (화학식 1)으로부터 화학식 2 (HC-35)의 합성방법

[0033]

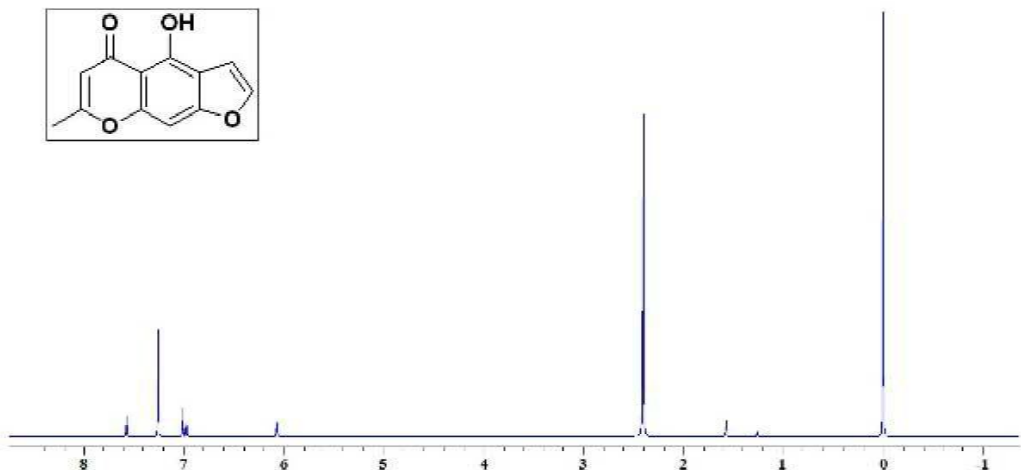
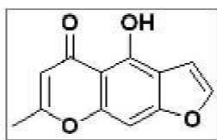
비스나진 (0.10g, 0.43mmol)을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10mL)에 녹인 후 -50℃로 냉각시킨다. 여기에 BBr<sub>3</sub> (0.86mL, 1.0M in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)를 넣어주고 -50℃에서 2시간 동안 질소 기류 하에 교반시킨다. 반응 종결 후 실온에서 포화 NaHCO<sub>3</sub> 수용액을 넣어주고 EtOAc로 추출한다. 추출한 유기층을 물과 brine으로 씻어준다. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시킨 후 감압 증류하여 남은 물질을 컬럼크로마토그래피 (EtOAc:Hexane=2:1)로 분리하여 노란 고체인 목적 화합물 2 (0.081g, 90%)를 합성하였다.

[0034]

R<sub>f</sub> 0.83 (EtOAc:Hexane=5:1); mp 153-155℃; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.37 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 6.03(1H, s, C3-H), 6.94(2H, s, C8-H, C12-H), 7.54(1H, d, J=0.9Hz, C9-H). <sup>13</sup>C NMR(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 21.01 (CH<sub>3</sub>), 90.74 (C12), 104.49 (C8), 105.63 (C7), 107.99 (C3), 113.11 (C5), 144.82 (C9), 154.50 (C13), 155.30 (C6), 158.89 (C11), 167.65 (C2), 184.20 (C=O).

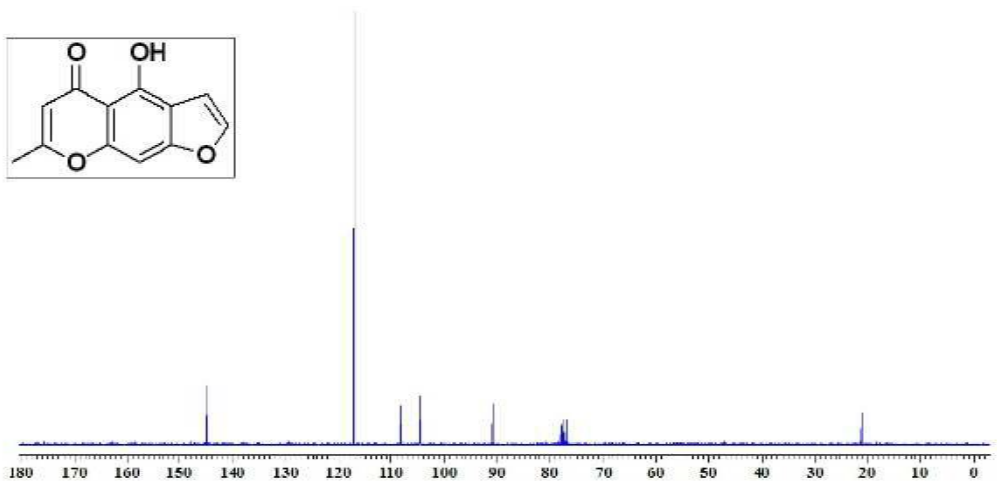
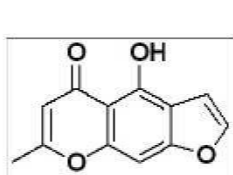
[0035]

<sup>1</sup>H NMR



[0036]

[0037] <sup>13</sup>C NMR



[0038]

[0039] 실시예 2

[0040] 화학식 2로부터 화학식 3 (HC-36)의 합성방법

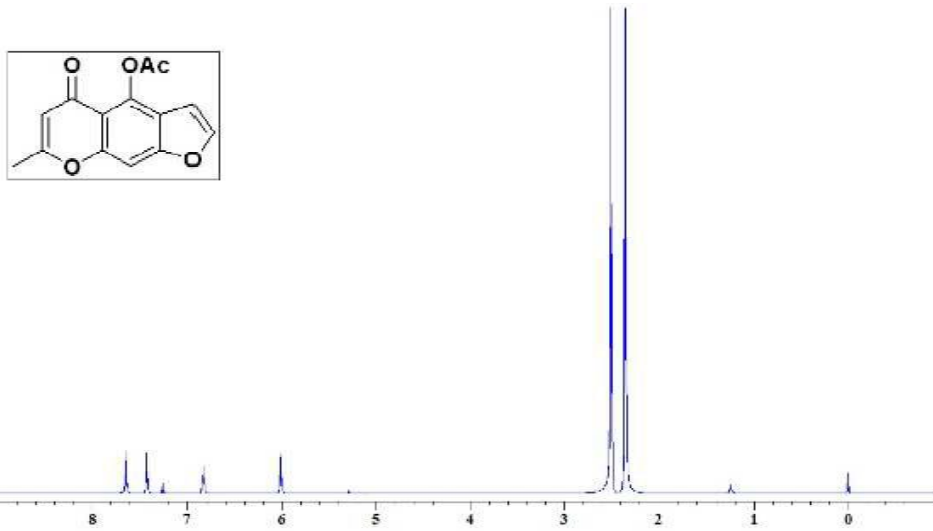
[0041]

[0042] 화학식 2의 화합물 (0.03g, 0.1388mmol)과 60% NaH (0.022g, 0.5551mmol)를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10mL)에 녹인 후, 질소 기류 하에 acetic anhydride (0.062mL, 0.5551mmol)를 넣어주고 실온에서 20분 동안 교반한다. 반응 후 4% HCl을 조금 넣어주고 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 추출한다. 추출 후 유기층을 brine으로 씻어주고 MgSO<sub>4</sub>로 건조 시킨 후 감압 증류하여 남은 물질을 컬럼크로마토그래피 (EtOAc:Hexane=1:1)로 분리하여 acetylation시킨 하얀 고체의 목적 화합물 3 (0.03g, 99%)을 얻었다.

[0043] *R*<sub>f</sub> 0.68 (EtOAc:Hexane=5:1); mp 192-194°C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.35 (3H, d, *J*=1.5 Hz, CH<sub>3</sub>), 2.50 (3H, d, *J*=1.65Hz, CH<sub>3</sub>), 6.01 (1H, s, C3-H), 6.83 (1H, s, C8-H), 7.41 (1H, s, C12-H), 7.64 (1H, d, *J*=1.2Hz, C9-H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 20.60 (CH<sub>3</sub>), 21.55 (CH<sub>3</sub>), 98.42 (C12), 104.20 (C8), 110.69 (C3), 120.31 (C7), 142.13 (C5), 147.03 (C9), 155.32 (C6), 157.30 (C13), 165.22 (C11), 169.52 (C2), 177.73 (C=O),

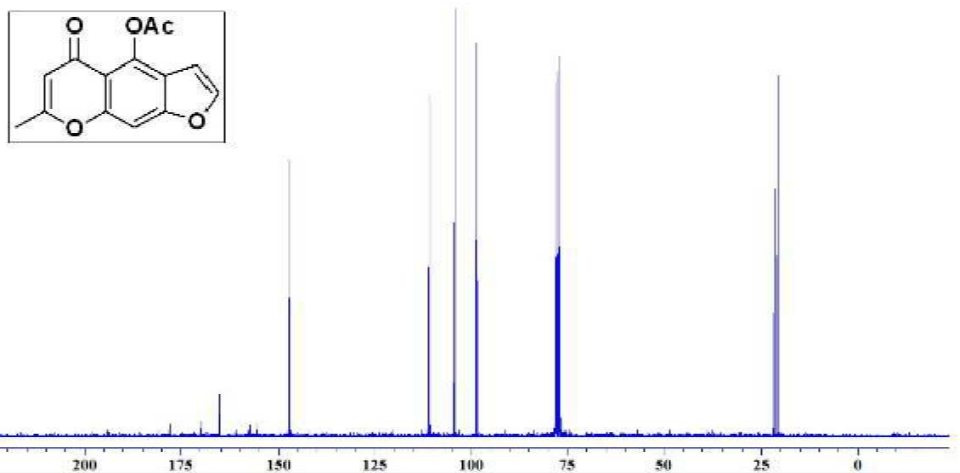
C15).

[0044]  $^1\text{H}$  NMR



[0045]

[0046]  $^{13}\text{C}$  NMR



[0047]

[0048] <실시예 3>

[0049] 화학식 3으로부터 비스나진유도체 용액의 제조

[0050] 화학식 3 (HC-36)을 가지고 에탄올 0.5 mL와 PEG400 (polyethylglycol 400) <시그마> 0.5 mL에 습윤시킨 후 적당한 시간동안 녹였다. 습윤되지 않은 덩어리가 존재할 경우에는 스패츨라(spatula) 등의 적당한 도구로 덩어리를 잘게 으깨어 주었다. 이와는 별도로 증류수 혹은 탈이온수 9 mL에 Na-CMC (sodium-carboxymethylcellulose) 100 mg을 잘 용해시킨 후, 이들을 서로 혼합하여 실험용액으로 사용하였다.

[0051] <실험예 1> 카인산의 뇌실내 주사로 인한 해마(CA3 지역)의 세포사멸유도 실험 (1)

[0052] 실시예 2에서 제조한 visnagin유도체(HC-36,47,48,49,54,55,56,60,61,62,63, 64,68)등을 마우스(MJ, 한국)의

구강내로 10mg/kg 농도로 투여하고, 30분 후에 마우스의 뇌실내로 카인산 0.07  $\mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ 를 투여하였다. 카인산은 헤밀턴 주사기(50  $\mu\text{l}$ , 26-gauge Hamilton syringe)를 사용하여 마우스 브레그마(bregma)에 2.4 mm의 깊이로 약물을 주사하여 투여하였다(Laursen, SE. and Belknap, JK., Journal of Pharmacological Methods, 16, pp355-357, 1986). 이때, 대조군으로는 비스나진 유도체 대신 생리식염수를 사용하였다(con). 24 시간 후에 마우스 복강 내로 나트륨 펜토바비탈(sodium pentobarbital, 100 mg/kg, Hanlim Pharm. 한국)을 주입시켜 마취시킨 후, 관류법을 이용해 뇌의 혈액을 제거하고 고정하였다. 이렇게 얻어진 뇌를 마이크로 톰(Microtome)을 이용하여 46  $\mu\text{m}$  두께의 뇌 절편을 얻었다. 그 후 크레실 바이올렛(cresyl violet) 염색법으로 염색시킨 후 해마를 관찰하였다.

[0053] 도 1에 상기 실험에 1의 관찰결과를 나타내었다. 사진 con은 생리 식염수를 입으로 투여한 마우스군, 사진 KA0.07은 비스나진 유도체를 투여하지 않고 0.1M PBS와 카인산만을 뇌실내로 투여한 마우스군, 사진 HC series을 10mg/kg의 농도로 투여한 후 카인산을 뇌실내로 투여한 마우스군의 해마 CA3 지역 사진이다. 도 1에서 볼 수 있듯이, 카인산을 뇌실내로 투여하면 해마의 CA3 지역에서 세포가 사멸하는 것이 관찰되었으며, 이러한 세포 사멸 현상은 특히 비스나진 유도체들 중(HC-36)을 10mg/mg 농도로 투여할 때 현저하게 감소하였다.

[0054] <실험에 2> 카인산의 뇌실내 주사로 인한 해마(CA3 지역)의 세포사멸유도 실험과 농도별의 차이

[0055] 실시예 2에서 제조한 visnagin유도체 HC-36을 마우스(MJ, 한국)의 구강내로 농도별(1,5,10,20,40mg/kg)로 투여하고, 30분 후에 마우스의 뇌실내로 카인산 0.07  $\mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ 를 투여하였다. 이때, 대조군으로는 비스나진 유도체 대신 생리 식염수를 사용하였다. 24 시간 후에 마우스 복강 내로 나트륨 펜토바비탈(sodium pentobarbital, 100 mg/kg, Hanlim Pharm. 한국)을 주입시켜 마취시킨 후, 관류법을 이용해 뇌의 혈액을 제거하고 고정하였다. 이렇게 얻어진 뇌를 마이크로 톰(Microtome)을 이용하여 46  $\mu\text{m}$  두께의 뇌 절편을 얻었다. 그 후 크레실 바이올렛(cresyl violet) 염색법으로 염색시킨 후 해마를 관찰하였다.

[0056] 도 2에 상기 실험에 2의 관찰결과를 나타내었다. 사진 (A)은 비스나진 유도체를 투여하지 않고 카인산만을 뇌실내로 (0.07  $\mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ ) 투여한 마우스군, 사진 (B)는 HC-36(DH-V2)을 10,20,40mg/kg의 농도로 투여한 후 카인산을 뇌실내로 투여한 마우스군의 해마 CA3 지역 사진이다. 도 2에서 볼 수 있듯이, 카인산을 뇌실내로 투여하면 해마의 CA3 지역에서 세포가 사멸하는 것이 관찰되었으며, 이러한 세포 사멸 현상은 비스나진 유도체(HC-36)을 40mg/mg 농도로 투여할 때 농도의존적으로 감소하였다.

[0057] <실험에 3> 해마(CA3 지역)의 p-CaMKII 발현에 미치는 비스나진 유도체의 효과실험

[0058] 뇌실내로 카인산을 투여한 후, 30분 후에 마우스의 해마를 실험에 1에 개시된 방식으로 면역염색 화학법을 통해 살펴보았다. 구체적으로, 고정시켜서 얻어진 뇌 절편에 p-CaMKII에 특징적으로 결합하는 항체를 붙이고, 이차 항체를 다시 결합시킨 후, ABC 염색방법을 이용한 면역화학 염색법으로 뇌 절편의 해마에서의 pCaMKII 발현 여부 및 부위를 직접적으로 탐색하였다.

[0059] 도 3에 상기 실험결과를 나타내었다. 사진 (A)은 생리식염수 구강내로 투여한 마우스군, 사진 (B)는 생리식염수 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 카인산을 투여한 마우스군, 사진 (C)는 HC-36 10mg/kg을 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 KA를 투여한 마우스군의 해마 CA3 지역 사진이다. 도 3에서 알 수 있듯이, 해마의 CA3에서 세포 사멸과 연관이 있는 것으로 알려진  $\text{Ca}^{2+}$ 의 증가로 인해 조직세포내의 p-CaMKII가 증가하는 확인하였다(Suh h w et al., Neuroscience letter.,pp223-227, 2005.)

[0060] 한편, HC-36을 10 mg/kg의 농도로 30분 전에 구강내로 투여한 후 뇌실내로 카인산을 투여한 마우스군에서는 해마의 CA3에서 KA에 의해 활성화된 p-CaMKII 발현이 억제되었다. 따라서, 비스나진유도체의 세포 보호 기전 중 하나는 p-CaMKII발현 억제임을 알 수 있다.

[0061] <실험에 4> 해마(CA3 지역)의 c-Fos 발현에 미치는 비스나진 유도체의 효과실험

[0062] 뇌실내로 카인산을 투여한 후, 30분 후에 마우스의 해마를 실험에 1에 개시된 방식으로 면역염색 화학법을 통해 살펴보았다. 구체적으로, 고정시켜서 얻어진 뇌 절편에 c-Fos에 특징적으로 결합하는 항체를 붙이고, 이차 항체를 다시 결합시킨 후, ABC 염색방법을 이용한 면역화학 염색법으로 뇌 절편의 해마에서의 c-Fos 발현 여부 및

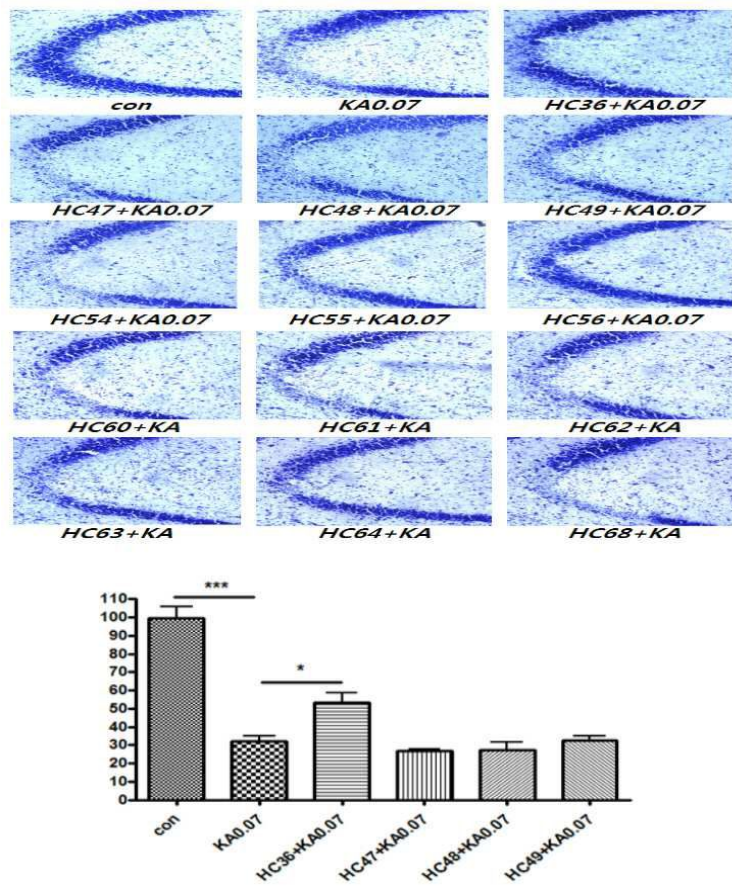
부위를 직접적으로 탐색하였다.

- [0063] 한편, c-Fos는 외부에서의 자극이나 스트레스를 받았을 때 체내의 항상성을 이루기 위해 발현하는 물질로써 신경세포의 사멸과 밀접한 관련이 있다.
- [0064] 도 4에 상기 실험결과를 나타내었다. 사진 (A)은 생리식염수 구강내로 투여한 마우스군, 사진 (B)는 생리식염수 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 카인산을 투여한 마우스군, 사진 (C)는 HC-36 10mg/kg을 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 KA를 투여한 마우스군의 해마 CA3 지역 사진이다. 도 3에서 알 수 있듯이, 해마 조직세포내 특히 CA3 지역에서의 c-Fos가 증가하는 확인하였다(Kitayama et al., 1999; Won et al., 2000).
- [0065] 한편, HC-36을 10 mg/kg의 농도로 30분 전에 구강내로 투여한 후 뇌실내로 카인산을 투여한 마우스군에서는 해마의 CA3에서 KA에 의해 활성화된 c-Fos발현이 억제되었다. 따라서, 비스나진유도체의 세포 보호 기전 중 하나는 c-Fos발현 억제임을 알 수 있다.
- [0066] <실험예 5> 해마(CA3 지역)에서의 pERK 발현에 미치는 HC-36 compound의 효과 실험
- [0067] 뇌실내로 카인산을 투여한 후, 30분 후에 마우스의 해마를 실험예 1에 개시된 방식으로 면역염색 화학법을 통해 살펴보았다. 구체적으로, 고정시켜서 얻어진 뇌 절편에 pERK에 특징적으로 결합하는 항체를 붙이고, 이차 항체를 다시 결합시킨 후, ABC 염색방법을 이용한 면역화학 염색법으로 뇌 절편의 해마에서의 pERK 발현 여부 및 부위를 직접적으로 탐색하였다.
- [0068] p-ERK는 MAPK family 중 하나로 KA유도 MAPK의 발현은 세포 survival과 death에 있어 하위 경로에 있는 많은 유전자 발현을 유도하는 중요한 지표가 된다.
- [0069] 한편, 도 5에 상기 실험결과를 나타내었다. 사진 (A)은 생리식염수 구강내로 투여한 마우스군, 사진(B)은 생리식염수를 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 카인산을 투여한 마우스군, 사진(C)는 HC-36 10mg/kg을 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 KA를 투여한 마우스군의 hippocampus지역 사진이다.
- [0070] 도 5에서 알 수 있듯이, KA에 의해 해마CA3지역에서 세포 사멸과 관련이 있는 신호 전달 물질의 하나인 pERK가 증가하였다.
- [0071] 한편, 비스나진유도체인 HC-36 10mg/kg을 30분 전에 구강내로 투여하고, 뇌실내로 카인산을 투여한 군에서는 해마, 특히 CA3지역에서 pERK의 발현이 HC-36에 의해 억제되는 것을 발견하였다. 따라서, 비스나진유도체(HC-36)의 세포 보호 기전 중 하나는 pERK의 발현 억제임을 확인하였다.
- [0072] <실험예 6> 카인산의 뇌실내 주사로 인한 해마(CA3 지역)의 GFAP발현에 미치는 비스나진 유도체의 효과 실험
- [0073] 실시예 2에서 제조한 비스나진 유도체(HC-36)을 마우스(명진, 한국)의 구강내로 10mg/kg 투여하고, 30분 후에 마우스의 뇌실내로 카인산 0.07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 투여하였다. 이때, 대조군으로는 HC-36 대신 생리 식염수를 사용하였다. 이후, 고정시켜서 얻어진 뇌 절편에 마이크로글리아의 astroglia에 특징적으로 결합하는 항체를 붙이고, 이차 항체를 다시 결합시킨 후, ABC 염색방법을 이용한 면역화학 염색법으로 직접적으로 뇌에서의 GFAP 발현 여부 및 부위를 관찰하였다. GFAP는 세포 사멸과 연관이 있는 것으로 알려진 활성화된 astroglia의 표지자이다.
- [0074] 도 6에 상기 실험결과를 나타내었다. 사진(A)는 컨트롤로서 뇌실내로 생리식염수를 주입한 마우스군, 사진 (B)은 생리 식염수를 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 카인산을 투여한 마우스군, 사진(C)는 HC-36을 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 KA를 투여한 마우스군,
- [0075] 도 6에서 볼 수 있듯이, 카인산에 의해서 hippocampus지역에서 유도되는 GFAP가 HC-36 10mg/kg에 의해 감소되는 것을 알 수 있었다.
- [0076] <실험예 7> 카인산으로 유도된 여러 proinflammation cytokine들의 시간별 발현 차이 실험
- [0077] 최근 연구에 따르면 신경보호효과를 보여주기 위해 KA에 유도된 여러 pro-inflammation cytokine level을 Real-time PCR을 이용하여 측정 효과를 보고하였다.(cho i h et al., journal of neuroscience research 84:1505-1511(2006))

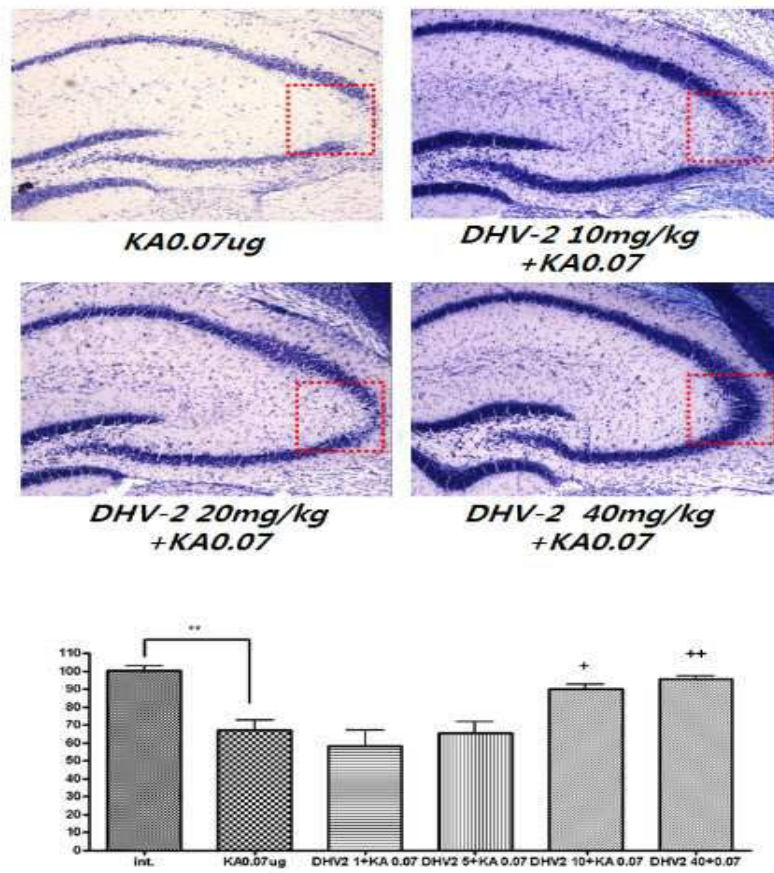
- [0078] Real-time의 원리는 한쌍의 primer가 붙는 지역 가운데에 형광물질을 붙여놓은 probe를 위치 시키면 양쪽 primer로 부터 점점 합성이 되어오던 가닥이 Probe를 밀어내게 되고, 이때 떨어져 나가던 Probe에 붙어 있는 형광물질이 특정 파장의 빛 또는 laser에 맞아 발광하게 되고 이 발광하는 빛을 센서가 감지하여 그 양을 측정한다. 이렇게 PCR 한 사이클이 돌면 Laser를 tube에 쏘게 되고 이때 새로이 떨어져 나온 Probe에서 laser에 여기된 파장이 방출되고 이것을 센서가 잡아 몇 가닥이 반응에 쓰였는가를 측정하게 되고 이 값으로 생성된 DNA량을 계산하여 KA에 유도된 cytokine을 시간별로 측정하여 나타내었다
- [0079] 도 7을 보면 IL-1beta는 KA를 뇌실내로 투여한후 1hr의 mRNA이 최고조를 이루었고 COX-2,TNF-alpha는 KA를 뇌실내로 투여한 후 3hr 지난 후 최고조를 이루었다.이 결과를 통해 도8의 실험을 디자인 하였다.
- [0080] <실험예 8> 카인산으로 유도된 여러 proinflammation cytokine들과 HC-36의 발현 억제 실험
- [0081] 실시예 2에서 제조한 비스나진 유도체(HC-36)을 마우스(명진, 한국)의 구강내로 10mg/kg 투여하고, 30분 후에 마우스의 뇌실내로 카인산 0.07  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 를 투여하였다. 이때, 대조군으로는 HC-36 대신 0.1M PBS를 사용하였다 RNA을 isolation시킨 후 cDNA로 만든 후, Real-time을 이용하여 한쌍의 primer가 붙는 지역 가운데에 형광물질을 붙여놓은 probe를 위치 시키면 양쪽 primer로 부터 점점 합성이 되어오던 가닥이 Probe를 밀어내게 되고, 이때 떨어져 나가던 Probe에 붙어 있는 형광물질이 특정 파장의 빛 또는 laser에 맞아 발광하게 되고 이 발광하는 빛을 센서가 감지하여 그 양을 측정한다. 이렇게 PCR 한 사이클이 돌면 Laser를 tube에 쏘게 되고 이때 새로이 떨어져 나온 Probe에서 laser에 여기된 파장이 방출되고 이것을 센서가 잡아 몇 가닥이 반응에 쓰였는가를 측정하게 되고 이 값으로 생성된 DNA량을 계산하였다.
- [0082] 도 8에 상기 실험결과를 나타내었다. PBS+PBS는 컨트롤로서 PBS를 구강내로 삽입하고 30분후에 뇌실내로 생리 식염수를 주입한 마우스군, PBS+KA는 0.1M PBS를 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 카인산을 투여한 마우스군, 사진HC36+PBS는 HC-36을 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 0.1M PBS를 투여한 마우스군, 사진 HC36+KA는 HC-36을 구강내로 투여한 후 30분 후에 뇌실내로 KA를 투여한 마우스군
- [0083] 도8에서 볼 수 있듯이, 카인산에 의해서 유도되는 TNF-alpha,IL-1beta,cox-2 등과 같은 cytokine의 mRNA level이 HC-36 10mg/kg에 의해 감소되는 것을 알 수 있었다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0084] 도 1은 카인산(kainic acid)을 마우스의 뇌실내로 투여하여 유도된 해마에서의 세포 사멸을 여러 비스나진유도체들 가운데 HC-36(3)compound가 억제하는 효능이 있음을 보여주는 실험결과와 사진이다.
- [0085] 도 2는 카인산(kainic acid)을 마우스의 뇌실내로 투여하여 유도된 해마에서의 세포 사멸을 HC-36 의 농도별로 실험한 결과와 사진이다.
- [0086] 도 3은 카인산(kainic acid)에 의해 유도된 p-CaMKII의 발현증가를 HC-36 10mg/kg가 감소시켜 준다는 결과의 사진이다.
- [0087] 도 4는 카인산(kainic acid)에 의해 유도된 c-Fos의 발현증가를 HC-36 10mg/kg가 감소시켜 준다는 결과의 사진이다.
- [0088] 도 5는 카인산(kainic acid)에 의해 유도된 p-ERK의 발현증가를 HC-36 10mg/kg가 감소시켜 준다는 결과의 사진이다.
- [0089] 도 6은 카인산(kainic acid)에 의해 유도된 astrocyte의 발현증가를 anti-GFAP을 이용하여 HC-36 10mg/kg가 억제시켜 준다는 결과의 사진이다.
- [0090] 도 7은 카인산(kainic acid)에 의해 유도된 pro-inflammation cytokines의 mRNA발현레벨을 시간별도 도식화한 그림이다.
- [0091] 도 8은 카인산(kainic acid)에 의해 유도된 pro-inflammation cytokines
- [0092] (COX-2,IL-1beta,TNF-alpha)의 mRNA expression을 HC-36 10mg/kg가 억제 시켜준다는 결과를 보여준 그림이다.

도면

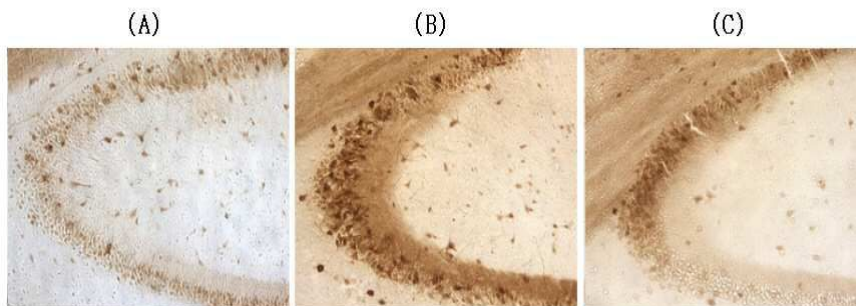
도면1



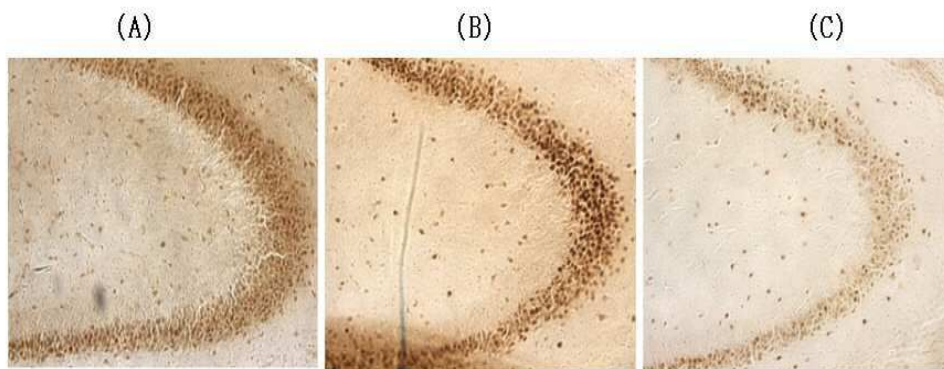
도면2



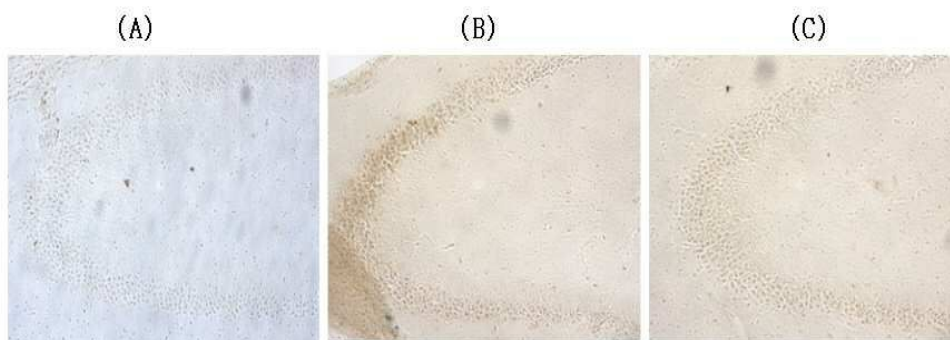
도면3



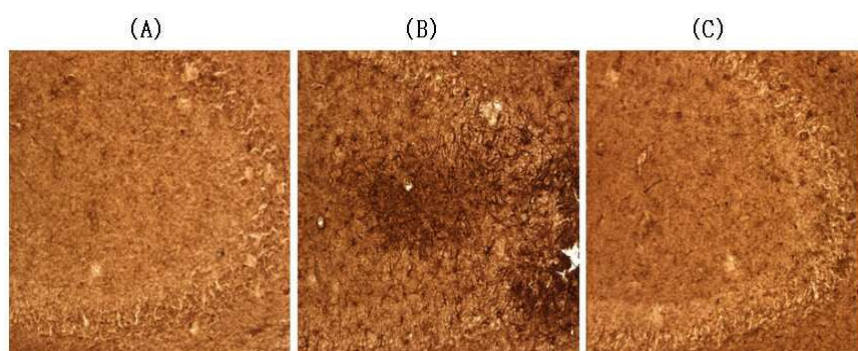
도면4



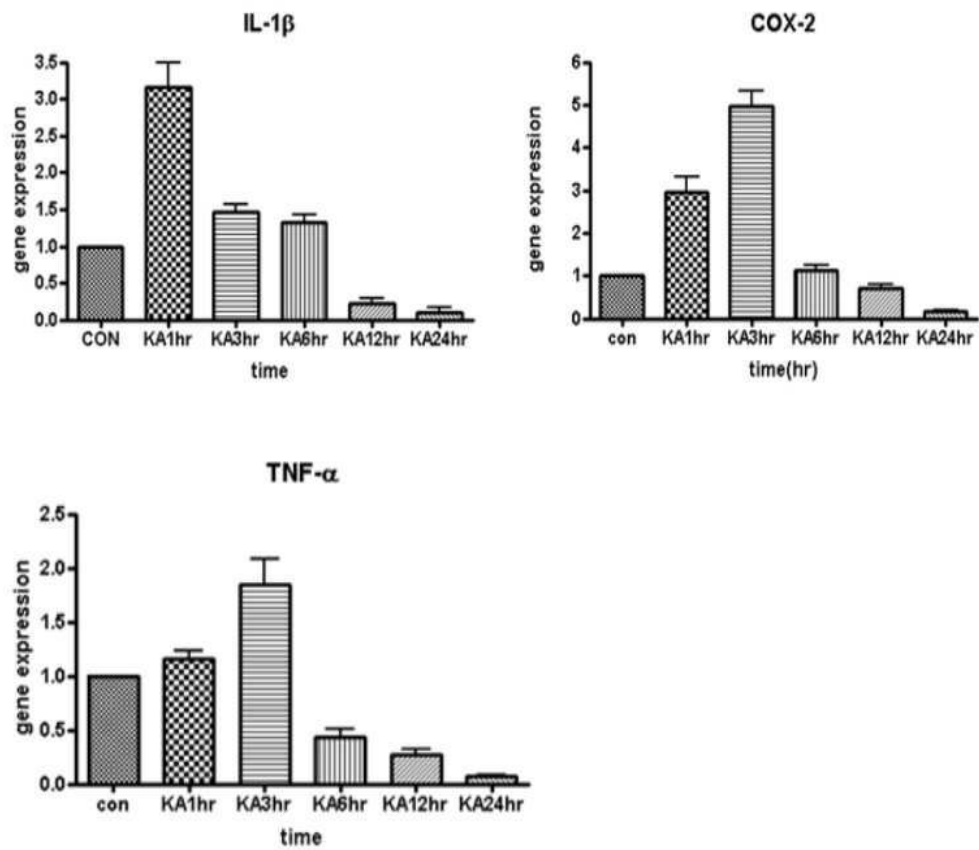
도면5



도면6



도면7



도면8

