



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0063301
(43) 공개일자 2009년06월18일

(51) Int. Cl.

C07C 69/80 (2006.01) C07C 69/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0130591

(22) 출원일자 2007년12월14일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

김세권

부산 동래구 사직2동 1017 쌍용예가 125동 1402호

정원교

부산 서구 부용동2가 87-5번지 신한빌라 202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

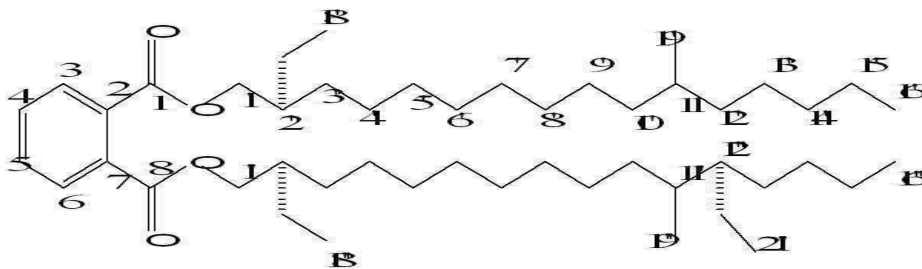
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 해마 유래 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실-2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물 및 그의 제약학적 용도

(57) 요약

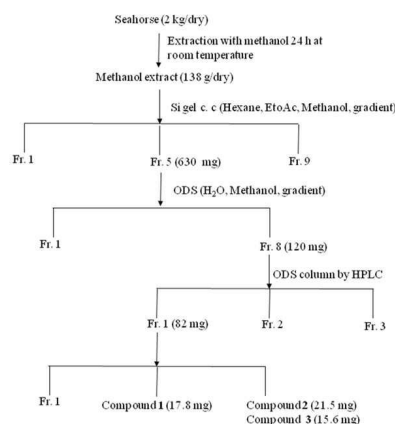
본 발명은 하기 화학식 1의 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실-2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물에 관한 것이다.

<화학식 1>



본 발명에 따른 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실-2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물은 DPPH, 하이드록시, 슈퍼옥사이드, 알킬 라디칼 및 DCF-DA 소거능이 우수하여 항산화 활성이 있으며, 베타-시크리타제 저해 활성을 가져 알츠하이머성 치매 질환 저해 효과가 있고, 티로시나제 저해 활성을 가져 고혈압 저해 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

천충길

부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 기숙사

이용

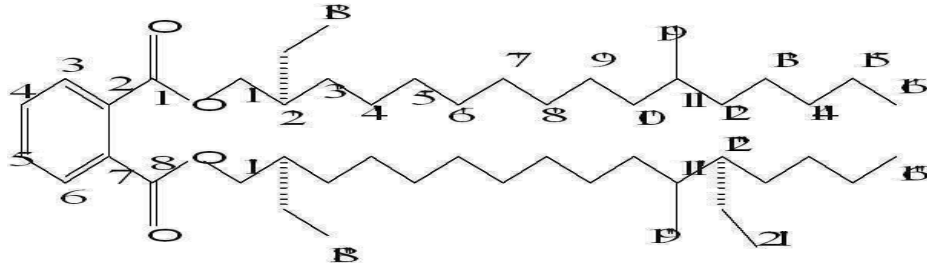
부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 외국인
기숙소405(A)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물.

<화학식 1>



청구항 2

상기 제1항의 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물.

청구항 3

상기 제1항의 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머 질환, 고혈압, 심장혈관 질환, 관상동맥 질환 또는 염증성 질환 치료 또는 예방용 조성물.

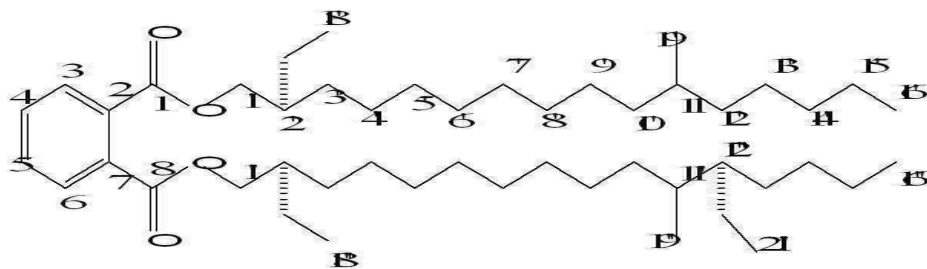
명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 하기 화학식 1의 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물에 관한 것이다.

<2> <화학식 1>



<3>

배경 기술

<4> 전통 의학은 유럽에서 서양 의학을 개발하기 한 참 전부터 존재하였다. 근래 들어 서방 과학계에서는 유기체, 특히 전통 의학에 이용되는 해양 약용 유기체 유래 천연 생성물의 의약적 가능성을 인식하기 시작하였다. 최근 들어 기초 및 임상 연구자들은 전통 의학이 오랜 동안의 임상적 실시 및 신뢰성 있는 치료 효능을 갖고 있기 때문에 그에 대해 상당한 관심을 기울이고 있다. 그러나 TCM의 성분들은 복잡 혼합물이어서, 거의 수백 또는 수 천가지 상이한 화합물로 이루어져 있으나, 단지 일부 화합물만이 제약학적 및(또는) 독성 효과를 유발시킨다. 더욱이 TCM 중의 유효 성분들은 많은 연구자들에게 커다란 도전과제였다. 생활성 성분을 찾기 위한 전통적인 과정은 유효 화합물 군을 추출하거나, 생리화학적 방법으로 TCM에서 화합물들을 정제한 후 동물 약리 실험하는 것이었다. 그러나, 이러한 방식은 TCM에서 생활성 화합물들을 직접 스크리닝하는데 많은 시간이 소요되고, 힘이 들며, 고비용이 소요되고 효율이 낮은 문제점이 있었다.

- <5> 해마는 해양 경골 어류로서 그의 특정 의약 조성물 뿐만 아니라 수컷이 수태를 하는 색다른 특성으로 잘 알려져 있다. 해마가 애완동물로서는 거의 취급되지 않음에도 불구하고, 차이니스 해마(Hippocampus kuda Bleeker)는 전통 중국 의약(traditional Chinese medicine; TCM)에서 가장 유명하고 값비싼 재료 중 하나로 이용되고 있다. 현재, 차이니스 해마의 천연 공급원은 남획으로 인해 현저하게 감소하고 있다. 따라서 이러한 귀중한 종을 효율적으로 보호하고 적절하게 이용하기 위하여 이들에 대한 생리학적 및 약리학적인 연구가 시급한 실정이다. 해마는 척추동물 문의 Steichthyes 중 실고기목(Syngnathiformes)의 실고기과(Syngnathidae)에 속한다. 실고기과 동물 대부분이 TCM 재료로 사용할 수 있고, 양조 시대(A.D. 502-557) 이래로 모든 유형의 중국 약전에 잘 기록되어 있다. TCM 서적에 기록되어 있는 인 양 이론(Yin Yang theory)에 따르면, 해마는 신장을 강화시키고 양기를 활성화시키는 효과가 있다. 전자의 작용은 본질적으로 비노생식기, 생식, 신경, 내분비 및 면역 시스템의 조절과 관련이 있고, 후자는 남성의 성적 기능의 증진을 의미한다. 최근의 약제학적 연구들은 차이니스 해마가 호르몬-유사 활성을 가져 조혈작용 기능을 증진시킬 뿐만 아니라 항-종양, 항-노화, 항-피로 및 Ca^{2+} 채널 차단 활성을 보여준다고 제시하고 있다.(Zhang et al., 2001; Hu et al., 2000).
- <6> 해마의 성분들에 대한 종래의 연구들은 다양한 의약 화학적 방법에 의해 수행되었고, 이는 지방산, 인단백질 및 스테로이드와 같은 유기 반응물 중의 주적 요소, 아미노산 및 가용성 성분들을 분석하는데 집중되고 있다. 그러나 생리학 및 약리학적 생활성 화합물인 천연 생성물 분리에 있어 해마에 대한 보고서는 적었다.
- <7> 프탈레이트는 주로 가소제로서 사용된다(Murphy, 2001; Rahman and Brazel, 2004). 이들은 또한 개인용-케어 제품(예를 들어, 향수, 로션, 화장품), 특정 의료 장비, 제약, 페인트 및 공업용 플라스틱에 사용된다(NTPCHRR, 2003; Blount et al., 2000a,b; Hauser et al., 2004). 디(2-에틸헥실) 프탈레이트[Di(2-ethylhexyl) phthalate; DEHP]가 가장 일반적으로 이용되는 가소제이다. 다른 중요한 프탈레이트는 디-n-에틸 프탈레이트(di-n-ethylphthalate; DEP), 디-n-부틸 프탈레이트(di-n-butyl phthalate; DBP), 부틸-벤질프탈레이트(butyl-benzylphthalate; BBzP), 또는 디-n-옥틸프탈레이트(di-n-octylphthalate; DOP) 등이 있다(Koch et al., 2003). 인간은 음식물 섭취, 호흡 및 피부 노출을 통해 이들 화합물에 노출되어 있다(Adibi et al., 2003; Latini et al., 2003a,b). 이들 화합물의 1일 흡입량은 체중 kg 당 DEHP 3 내지 30 μ g이다(NTP-CHRR, 2003). 음식물이 일반인구(general population)에 대한 주요 노출원이다(Huber et al., 1996). 또한 DEHP에의 노출은 특정 의료적 치료, 예를 들어, 수혈 및 혈액투석을 통해 발생한다(Huber et al., 1996; Doull et al., 1999). 프탈레이트 노출에 대한 상당한 관심은 간-발암성(hepato-carcinogenic), 발육성(developmental) 및 생식적 효과(ATSDR, 2002)인 반면, 연구들은 간 폐독시증 증식 보다 큰 인간에 대한 생식적 효과를 보여준 바 있다(Kurata et al., 1998). 몇몇 프탈레이트 및 이들의 대사 생성물들이 내분비계의 작용을 교란시킨다고 밝혀진 바 있다(Lovekamp-Swan and Davis, 2003; Sharpe, 2001). 몇몇 프탈레이트의 고환 효과를 보여주는 증거가 존재한다 (Parks et al., 2000; Akingbemi et al., 2001; Shultz et al., 2001).
- <8> 후기 임신 기간 및 초기 수유 기간 동안의 노출이 수컷 생식관에 있어 구조적 기형을 유발시킬 수 있고, 성적 성숙 기간 동안의 노출이 고환 발육 불능을 생기게 하는 경향이 있다(McKee et al., 2004; Biegel et al., 1995). 다른 프탈레이트 에스테르와 비교하여, DEHP 및 DBP는 가장 큰 생식 독성물질의 효능을 보여준다(Gray and Gangolli, 1986; Foster et al., 1980). 보다 짧은 측쇄를 갖는 프탈레이트 에스테르, 예를 들어, 디-n-메틸 프탈레이트 (DMP) 및 DEP, 및 보다 긴 측쇄를 갖는 것들, 예를 들어, DOP는 역 발육성 또는 생식 효과를 일으킨다고 보여지지 않는다(Gray and Gangolli, 1986; Foster et al., 1980). EU 독성, 생태독성 및 환경 과학위원회(European Union Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment; CSTEE)의 DEHP, DBP 및 BBzP에 대한 현재의 허용 1일 섭취량(tolerable daily intake values; TDI)은 생식 효과를 기준으로 한다(Kurata et al., 1998). 미국 환경보호국(US Environmental Protection Agency; US EPA)의 기준선량(reference dose; RfD)으로 정의된 만성 노출 수준은 일반인구에 대해서는 허용가능한 것으로 여겨지며, EU의 허용 1일 섭취량은 각각 DEHP에 대해 1일 체중 kg 당 20 μ g 및 37 μ g이다 (Koch et al., 2003; CSTEE, 1998). DBP, BBzP 및 DOP에 대한 TDI는 100 μ g/kg/day, 200 μ g/kg/day 및 370 μ g/kg/day 이다 (CSTEE, 1998).
- <9> 프탈레이트는 인간 체내에서 급속히 각각의 모노에스테르로 대사된다. 몇몇 프탈레이트는 그들의 친유성 지방족 측쇄의 산화 생성물로 추가로 대사될 수 있다(NTPCERHR, 2003). DEP 및 DBP는 단일 모노에스테르 프탈레이트로 현저하게 대사되고, 이는 소변으로 배출된다. 보다 긴 길이의 디알킬 프탈레이트, 예를 들어, DEHP는 산화 생성물로 추가로 대사된다. 인간이 DEHP를 경구 흡입(oral exposure) 후, 모노-에틸헥실 프탈레이트(mono-ethylhexyl phthalate; MEHP)는 총 소변 대사체의 약 25%를 구성한다. 다섯 개의 DEHP 대사체, MEHP, 모노(2-에틸-5-하이드록시헥실) 프탈레이트[mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate; MEHHP], 모노(2-에틸-5-옥소헥

실) 프탈레이트[mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate; MEOHP], 모노(2-에틸-5-카복시펜틸) 프탈레이트[mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate; MECPP], 및 모노[2-(카복시메틸)헥실] 프탈레이트mono[2-(carboxymethyl)hexyl] phthalate; MCMHP가 48 시간 노출내에서 DEHP 경구 투여량의 약 75%를 차지한다 (Preuss et al., 2005). 2차 산화된 DEHP 대사체가 최종적으로 형성되는 독성물질인 것으로 여겨짐에도 불구하고 (Stroheker et al., 2005), 상업적으로 유통되는 모노에스테르의 산화 대사체는 존재하지 않는다. 프탈레이트의 간단한 모노에스테르 대사체가 가장 일반적인 생체표지자(biomarker)이다.

<10> 최근 들어, 프탈레이트 유도체에 대한 많은 연구들이 독성 이외의 다수의 갖가지 신규한 생물학적 활성 및 메카니즘, 예를 들어, 항-백혈병, 항-돌연변이, 항균, 항바이러스, 항-안드로젠, 호르몬-유사 활성 등이 밝혀졌다 (Simone et al., 2007; Lee et al., 2000; Sastry and Rao, 1995; El-naggar, 1997; Marchetti et al., 2002). 더욱이, 프탈레이트 유도체는 해양 박테리아(Al-Bari et al., 2005), 식물(Lee et al., 2000), 해양 조류(Sastry and Rao, 1995; Stefanov et al., 1988), 해양 동물 등과 같은 천연 공급원으로부터 분리된 바 있다. 또한 추가의 연구를 통해 인공 생성물 중의 14C 대신에 13C 동위원소 함량으로 인하여 프탈레이트 유도체가 산출될 수 있는 확실한 증거가 제시되었다. 따라서 이러한 결과들은 더욱더 과학자들로부터 특별한 관심을 끌고 있다.

<11> 산화적 스트레스의 생화학적 중요성은 암을 포함한 광범위한 퇴행성 질환과 관련하여 입증된 바 있다 (Halliwell et al., 1994). 산화적 스트레스는 신체의 항-산화제의 유효 공급량이 다양한 형태의 자유 라디칼을 다루어 중화시키는데 부족할 때 발생한다 (Martinez et al., 1995).

<12> 또한 자유 라디칼은 반응성 산소종(reactive oxygen species; ROS)으로 알려져 있으며, 외곽 궤도에 전자가 ‘결여’된 산소 분자이다. 자유 라디칼은 이들이 접촉하는 다른 분자들로부터 전자를 취하려고 시도하고, 그에 따라 다른 분자들을 산화시켜 불안정화시킨다. 단일 산화 반응이 많은 다른 것들을 개시시킬 수 있어, 원자의 급격한 증가와 같은 일련의 자유 라디칼 형성을 가져온다. 자외선, 태양광선, X-선 또는 임의 형태의 고-에너지 이온화 방사선이 전자를 궤도 밖으로 충돌시켜 제거함으로써 자유 라디칼의 형성을 야기시킨다. 핵방사선은 다량의 자유 라디칼을 생성시키기 때문에 치명적이다. 공해, 감염, 과로, 과도한 양의 철 및 구리, 과도한 운동, 영양 악화 및 스트레스에서와 같이 음주 및 흡연은 인체 내에서 자유 라디칼 활성을 크게 증가시킨다. 자유 라디칼은 다양한 통상의 체내 대사 과정(예를 들어, 이들은 통상의 에너지 생산 과정, 간 해독 또는 박테리아 및 다른 미생물에 대한 면역 시스템 공격의 부산물임)에서 생성됨에도 불구하고, 생체 조직에서 발생하는 산화의 양이 신체의 항산화 능력(산화적 반응을 상쇄시키는 능력)을 초과하는 경우, 이는 신체 세포에 산화적 스트레스를 일으켜 손상을 끼치게 된다(Lopaczynski and Zeisel, 2001).

<13> 세포내에서, 모든 구성요소들은 자유 라디칼로부터 공격당하기 쉽다. 특히, 세포막을 구성하는 지질, 특히 불포화 이중결합을 함유한 지질이 그럴 가능성이 매우 높다. 자유 라디칼은 이러한 지질을 공격하여 유해한 과산화물, 하이드로과산화물 및 알데하이드를 형성시킨다.

<14> 또한 이온 수송 및 세포 내부의 영양 균형을 유지시키는데 관여하는 세포내의 막 단백질은 자유 라디칼 공격에 약하다. 따라서 자유 라디칼은 세포막 중 두 가지 이상의 필수 성분을 붕괴시킴으로써 세포막의 구조 및 기능을 변화시켜 막 불안정성, 막-의존성 효소의 변성 및 세포 내외의 영양소 및 유체의 비정상 비율을 초래시킨다. ROS는 세 가지 주요 라디칼 중, 수퍼옥사이드 음이온($O_2^{\cdot-}$), 과산화수소 (H_2O_2), 고도로 반응성인 하이드록실 라디칼($\cdot OH$), 및 퍼록실 라디칼($ROO\cdot$)을 포함한다. 수퍼옥사이드 음이온은 미토콘드리아성 전자 이송으로부터 전자의 누출 및 분자 산소(O_2)의 환원의 결과로서 형성된다. 과산화수소는 수퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase; SOD)의 영향하에서 수퍼옥사이드 음이온의 변이에 의해 자연적으로 생성된다. H_2O_2 의 세포내 수준은 통상적으로 100 nM 미만이고, 이 종은 세포 막을 통해 손쉽게 확산되나, H_2O_2 는 수퍼옥사이드 음이온 보다 반응성이지는 않다. 하이드록실 라디칼은 포유류 세포에서 생성된 ROS 중 가장 반응성이 크고, 이들의 생성은 펜톤 반응을 통해 H_2O_2 의 존재하에 전이 금속(예를 들어, O_2 에 의한 Fe^{3+} 의 환원을 통해 생성된 Fe^{2+} 이온)에 의해 촉진된다. 하이드록실 라디칼은 thir 생성 장소에서 고도로 반응성이다(Halliwell and Gutteridge, 1984).

<15> 항산화제는 산화성 물질과 관련하여 저농도로 존재하는 일군의 물질로서 산화 과정을 현저히 억제하거나 지연시키는 동시에 때로는 자기 자신이 산화되기도 한다(Halliwell and Gutteridge, 1984). 자유 라디칼의 산화 작용으로부터 세포를 보호하기 위하여, 자연적으로 세포들은 일군의 항산화제를 갖고 있다. 자연적으로 생성되는 고

분자량 또는 저분자량 항산화제는 그들의 조성, 물리적 및 화학적 특성 및 작용 메카니즘과 위치가 상이할 수 있다(Vaya and Aviram, 2001). 세 가지 효소가 체내에서 항산화제 방어 시스템의 기초(keystone)를 형성한다. 이들은 수퍼옥사이드 디스무타제(SOD), 카탈라제(CAT) 및 글루타치온 퍼옥사이드(GPX)이다. 이들 효소는 세포 중 산화적 스트레스가 보다 큰 장소인 시토졸, 미토콘드리아 및 퍼옥시좀에 위치할 것이다. 그들의 명칭이 지시하는 바와 같이, 수퍼옥사이드 디스무타제는 효소로서, 수퍼옥사이드 라디칼(O₂⁻)이 과산화수소로 변이되는 것을 촉진시킨다.

<16> 수퍼옥사이드 디스무타제의 산화 작용은 매우 강력하지는 않으나, 보다 반응성인 라디칼을 생성시킬 수 있다. 과산화수소를 제어하기 위해, 본 발명에서는 두 가지 효소를 이용하였다. 이들 중 하나인 카탈라제는 과산화물이 과산화수소와 물로 전환되는 것을 촉진시킨다. 또한 글루타치온 퍼옥시다제의 역할은 과산화수소 지질 과산화물을 감소시킨다. 신체에 존재하는 또다른 방어수단인 수동 해독(passive detoxication)은 자유 라디칼을 환원시킨다. 이들은 단지 촉매체로서 작용하고 다수의 라디칼을 제거할 수 있다. 이들은 크게 두가지 형태가 있다. 한 형태는 고분자량 단백질, 예를 들어, 알부민, 세룰로플라스민, 트랜스퍼링 및 합토클로빈으로 구성되고, 이들 모두는 플라스마에 존재하여 산화환원 활성 금속에 결합하고, 금속-촉매화된 자유 라디칼의 생성을 제한한다. 두 번째 형태는 저분자량 항산화제를 포함하고, 지용성 항산화제(토코페롤, 카로테노이드, 퀴닌, 빌리루빈 및 몇몇 폴리페놀) 및 수용성 항산화제(아스코르브산, 요산 및 몇몇 폴리페놀)로 구분된다. 이들은 주로 자유 라디칼 제거 특성을 통해 세포 손상을 지연시키거나 저해한다 (Halliwell and Gutteridge, 1984). 다양한 공급원으로부터 안전하고 효능있는 천연 항산화제를 찾기 위한 많은 노력이 기울어져 왔다. 예를 들어, 식물 유래 토코페롤(Liebler, 1990), 향신료 유래 펩타이드(Srinivas et al., 1992), 허브 유래 진저롤-관련 화합물 및 디아틸헵타노이드(Kikuzaki and Nakatani, 1993), 해양 조류 유래 브로모페놀(Fujimoto et al., 1985, 1986), 미생물 유래 대사 생성물(Ishikawa et al., 1985), 메일라드 반응(Maillard reaction) 생성물(Bedinghaus and Ockerman, 1995), 및 소수성 단백질(Wang et al. 1991)이 항산화작용을 갖는다고 입증된 바 있다. 최근 들어 인간 질병 발생과 산화적 스트레스와의 관련성에 대한 정보도 꾸준히 모아지고 있기 때문에 항산화제를 의학적 치료에 응용하는데 있어 관심이 증가되고 있다.

<17> 알츠하이머 질환은 아밀로이드 단백질(아밀로이드 플라크)이 아미그달(amygdale), 해마(hippocampus) 및 신피질(neocortex)에 침착되는 것으로 임상적으로 특징지워진 신경변성 질환(neurodegenerative disorder)이다(Sisodia and Price, 1995). 알츠하이머 질환에 있어서, 아밀로이드 플라크의 주 성분은 b-아밀로이드 단백질(Aβ)로서, 이는 트랜스멤브레인 영역 및 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 세포외 영역 부분을 구성하는 3983 아미노산 펩타이드이다. APP는 a-, b- 및 g-시크리타제로 명명된 세 가지 유형의 프로테아제에 의해 분열된다. Aβ 형성을 저해시키기 위하여, b-시크리타제가 APP를 분열시켜 Aβ-서열의 Asp+1 잔기에서 Aβ의 N-말단을 형성시킨다. b-시크리타제 분열에 이어, 제2 프로테아제인 g-시크리타제의 기질 C99가 APP를 분열시켜 Aβ의 C-말단을 생성시키고, 성숙한(mature) 펩타이드가 세포로부터 분비된다(Citron, 2002). 다른 경로로는, 제3 프로테아제인 a-시크리타제가 Aβ 내부를 분열시킴으로써 Aβ의 형성을 방지한다. b-시크리타제에 의한 분열은 거대 가용성 N-말단 분획을 생성시킨다(Vassar et al., 1999). 시크리타제 중에서, BACE가 뉴런 중의 주요 b-시크리타제이며, BACE의 부재가 어떠한 중요 부작용 없이 아밀로이드 및 C99 뿌리 또는 b-CTF(C-Terminal Fragment)의 생성을 저해시킨다는 강력한 증거가 존재하기 때문에, BACE는 현재 아밀로이드 생성을 저해시키기 위한 가장 매력있는 목표이다(Sinha et al., 1999). 이 효소는 β-APP의 루미날 측에서 손쉽게 접근가능한 위치로 분열되고, 그의 활성화는 생체 내 Aβ 펩타이드 생성에 있어 속도결정단계(rate-limiting step)이다(vassar et al., 1999; Robert, 2002). β-시크리타제는 작용체로서 세포내 pH를 교란시키고 β-시크리타제의 활성을 저해시키는 산성 pH에서 가장 큰 활성을 갖는다(Haass et al., 1992; Knops et al., 1995). 더욱이, 그의 활성 위치는 산성 세포내 구획(管腔) 내에 위치한다. β-시크리타제는 고도로 서열특이적이며(Citron et al., 1995), 또한

<18> 다양한 유형의 아스파르트 프로테아제 저해제인 펩스타틴(pepstatin)에 반응하지 않는다(Sinha et al., 1999).

<19> 고혈압은 가장 통상적인 심혈관 질환 중 하나이다. 이는 전세계적인 전염성 치수(epidemic proportion)의 문제점으로서 모든 성인의 15~20%가 앓고 있다. 이는 동맥경화증, 뇌졸중, 심근경색, 및 말기 신장 질환에 대한 고위험 인자를 보유하기 때문에 가장 통상적인 심각한 만성 건강 문제점이다. 인간 체세포 엔지오텐신-전환 효소(somatic angiotensin-converting enzyme; ACE)는 I 형 막 단백질로서 조상 유전자의 복제로부터 유래한다고 여겨지며, 두 개의 상동 세포외 촉매 영역(homologous extracellular catalytic domain)을 포함하고(the N- and C-terminal domains), 이들 각각은 추정상 활성 위치(putative active site)를 함유한다(Soubrier et al., 1988; Dive et al., 1999). 체세포 ACE는, 단지 남성 정소에서만 발견되고 하나만의 활성 위치를 갖는 보다 짧

은 배아(germinal isoform) ACE와는 반대로 인간 조직 및 혈장에 편재한다.

- <20> 엔지오펜신 I 전환 효소(EC 3.4.15.1; ACE)는 혈압을 조절하는데 있어 중요한 생리학적 역할을 한다.(Skeggs et al., 1957). ACE는 아연 프로테아제 군에 속하며, 폐의 맥관 내피종 내면(vascular endothelial lining)에 위치한다. ACE는 브래디키닌(bradykinin) 및 엔지오펜신 I를 포함한 다양한 올리고펩타이드 중 C-말단 디펩타이드를 분열시킨다. 이는 브래디키닌 퇴화에 작용하여 혈관확장(vasodilation)을 증가시키는 것에 기인하여 효소 키나제 II로 여겨지거나, 엔지오펜신 I가 혈관수축(vasoconstriction) 옥타펩타이드 엔지오펜신 II로 전환되는 것을 저해시키는 것에 기인하여 엔지오펜신 I-전환 효소로 여겨진다(Erdos, 2006).
- <21> ACE 저해제는 ACE의 활성을 조절하는 일군의 약물이다. 결과적으로, 이들은 엔지오펜신 II의 혈관수축, 염-보유성 및 이상발달 특성과 브래디키닌의 혈관확장 및 나트륨 배설촉진(natriuretic) 특성 사이의 균형을 변경시킨다(Brown and Vaughan, 1998; Zisman, 1998; Dzau et al., 2002). 브래디키닌은 내피세포층에서 산화질소(NO) 및 이완 요소(relaxing factor)의 생성을 촉진시킴으로써 혈관확장을 촉진시킨다(Moncada et al., 1991; Moncada and Higgs, 1993) (표 1 참조).
- <22> ACE 억제제는 심장혈관 질환 및 신장 질환의 치료 및 관상 동맥 질환의 2차 예방에 광범위하게 이용되고 있다(Fox, 2003; Bertrand, 2004; Ferrari, 2005; Pfeffer and Frohlich, 2006; ESC, 2006). 이들 작용제는 ACE가 두 개의 촉매 영역을 갖고 있다는 발견 및 두 개의 영역상에서 브래디키닌과 엔지오펜신 I의 상대적 작용 및 친화성에 대한 이용가능한 정보가 거의 존재하기 오래 전부터 개발되었다. 뱀 독액에서 ACE 저해제의 발견으로 인해, 많은 연구들이 ACE 저해제, 예를 들어 캅토프릴, 엔알라프릴, 알라세프릴 및 리니노프릴 등을 합성하려는 시도에 직접적으로 집중되었고, 이들은 현재 인간의 본태성 고혈압(essential hypertension) 및 심장 기능부전의 치료에 광범위하게 사용되고 있다(Ondetti, 1977; Patchett et al., 1980).
- <23> 색소는 물질에 색을 부여하는 물질이며, 착색(pigmentation)은 자연계에서 가장 명료한 표현형(phenotypical) 특징 중 하나이다. 색소들 중, 멜라닌은 박테리아, 균류, 식물 및 동물에 가장 널리 분포되어 있는 것들 중 하나이다(Sanchez-Ferrer et al., 1995). 이는 질소 함유, 이중, 무정형, 불규칙 폴리페놀 유사 생체고분자이고, 그의 색상은 황색에서 검정색까지 다양할 수 있다(Prota, 1988). 공유결합 인들은 멜라닌의 기본 구조 단위를 나타낸다. 멜라닌의 전체 구조가 공지되어 있지 않다는 점이 중요함에도 불구하고, 대부분의 멜라닌 분자들은 인들을 기재로 한 혼합 중합체이지만, 합성 경로에 따라 다양한 양의 다른 프리-인들 생성물을 함유한다(Rilley, 1997). 멜라닌은 생물학적 시스템에서 그의 구조로 인하여 다양한 역할을 한다. 생물학적 시스템에 있어 멜라닌의 생물학적 중요성으로 인하여, 이들의 합성, 즉 멜라닌생성(melanogenesis)이 오랜 동안 연구되어 왔다. 멜라닌은 포유류 피부의 기저층에서 멜라노사이트(melanocytes)라고 알려진 특화된 색소-생성 세포에서 합성된다. 멜라노사이트 내에서, 이들 화합물은 소포체(endoplasmic reticulum)로부터 기포화된 상대적으로 무정형이고 구형인 액포에 의해 생성된 멜라노솜(melanosome)이라 명명된 막형성 세포 소기관(membranous organelles)에서 생합성된다. 이어서 멜라노사이트의 수지상 돌기에 위치하는 성숙 멜라노솜이 주위 케라티노사이트에 의해 포식된다(phagocytosed). 따라서, 멜라닌생성 과정은 인간 피부, 모발 및 눈동자에 다양한 색상의 원인이 된다(Sanchez-Ferrer et al., 1995).
- <24> 멀티쿠퍼 옥시게나아제(multicopper oxygenase)인 티로시나제(Tyrosinase) (EC 1.14.18.1)는 박테리아에서 포유류에 이르기 까지 계통적 규모(phylogenetic scale)로 광범위하게 분포되어 있고, 폴리페놀 옥시아제, 모노페놀 모노옥시게나제, 모노페놀 디하이드로페닐알라닌 및 디옥시전 옥시도리덕타제(polypenol oxidase, monophenol monooxygenase, monophenol dihydroxyphenylalanine and dioxygen oxidoreductase)로서 알려져 있다. 지금까지, 티로시나제가 다기능성 멜라닌의 합성에서 중추적인 역할을 하는 이유로 가장 잘 연구된 멀티쿠퍼 옥시게나아제이다. 이는 식물의 색소체 및 엽록체, 노화(senescing) 또는 익은 과일의 세포질 뿐만 아니라 곤충의 표피 및 헤모림프(heamolymph)에 존재하는 것으로 여겨진다(Marshall et al., 2000). 포유류에서 티로시나제는 멜라닌이 생성되는 멜라노솜에 집중되어 있다. 유사한 기능을 가졌을 지라도 동일한 유기체의 상이한 기관으로부터 발견된 티로시나제를 포함하여 다양한 근원 유래 티로시나제의 특성이 상이하다는 사실이 알려져 있다(Sanchez-ferrer et al., 1995). 지금까지, 몇몇 티로시나제의 성질이 잘 특징화되어 있다. 티로시나제의 완전한 결정 구조가 현재까지 알려져 있지 않음에도 불구하고, 상이한 활성 위치의 결정 구조 및 기질 또는 잠재적 저해제와의 상호작용은 잘 연구되어 있다(Soloman et al., 1996). 또한, 이러한 결과는 멜라닌생성 경로에서 티로시나제의 역할을 이해하는데 도움이 될 것이다.
- <25> 티로시나제는 다양한 생물학적 시스템에 대한 부정적인 영향으로 인해 경제적으로 중요한 효소라고 여겨진다. 따라서 수 년 동안 티로시나제를 저해하는데 사용할 수 있는 방법을 찾는 데 있어 많은 시도가 있어왔다. 특히

식품 산업에서, 표백, 냉장, 냉동, 탈수, 조사, 고압 처리가 티로시나제 조절에 사용되어 바람직하지 않은 갈변을 방지하였다. 하지만 이들 방법 중 효소적 갈변화를 조절하는데 충분하다고 밝혀진 방법은 없었다. 따라서 천연 물질 유래 효소 저해제의 탐색이 우수한 구체책으로 고려되었고, 지금까지 하이드로퀴논, 코직산(kojic acid), 레시노이드, 전자-농후 페놀, 알부틴, 비타민 C 등이 화장품 및 제약 산업에 광범위하게 사용되고 있다(Miyazawa et al., 2003). 하이드로퀴논 및 코직산과 같은 현재 이용가능한 티로시나제 저해제는 장기간 노출 시 심각한 부작용을 일으킬 수 있다(Nakagawa and Kawai, 1995; Wei et al., 1991). 식품 및 음료 산업에서 갈변을 조절하기 위해 광범위하게 사용된 방법은 환원제를 첨가하여 o-퀴논을 덜 반응성인 무색 디페놀로 화학적으로 환원시키는 것이다. 그러나 이들 화합물은 또한 건강에 역효과를 끼칠 수 있고(특히 아황산염), 상대적으로 반응성인 화합물은 식품 중의 다른 성분과 반응을 일으켜 원하지 않는 효과를 가져올 수도 있다(McEvily et al., 1992). 농작물 및 산물의 해충 공격에 기인한 손실이 품질 및 시장가치의 저하에 중요한 역할을 하기 때문에, 해충 조절 수단이 보다 중요해지고 있다. 우수한 품질의 농작물을 생산하기 위한 다른 해충 조절 방법으로 티로시나제 저해제 이용을 고려할 수 있다. 따라서 천연물로부터 천연 발생의 강력한 티로시나제 저해제를 탐색하기 위한 노력이 경주되고 있고, 이들은 제약, 화장품 및 식품 산업의 개선에 사용되고 있다.

<26> 염증이라는 용어는 물리적 또는 화학적 유해 자극 또는 미생물학적 독소와 관련된 손상에 대한 유기체의 반응으로 정의되며, 이는 다양한 병리, 예를 들어, 관절염, 천식, 대장염, 염증성 내장 질환 및 동맥경화증을 포함한다. 염증의 기본적인 신호는 통상적으로 염증 자리에서의 진통, 적열, 종기, 발열 및 기능 상실로서 정의된다(Tracy, 2006). 이들 증상의 진행에 원인이 되는 분자 메커니즘은 현재 통상적으로 생리적 항상성을 유지하는 유전자 부분(subset)의 발현이 증진되어 나타나는 것으로 이해되고 있다. 염증의 주요 진행과정은 혈관 투과성의 증가 뿐만 아니라 손상된 조직 및 이주 세포(migrating cell)로부터 지질-유래 체내 분비물(autacoids), 예를 들어, 에이코사노이드(eicosanoid) 또는 혈소판-활성화 인자(platelet-activation factor; PAF); 거대 펩타이드, 예를 들어, 인터류킨-1(IL-1); 소형 펩타이드, 예를 들어, 브래디키닌; 및 아민, 예를 들어, 히스타민 또는 5-하이드록시트립타민의 방출을 포함한다(Cerri et al., 2006). 이들은 염증 반응의 화학적 네트워크를 구성하고, 염증을 임상적 및 병리적으로 발현시킨다.

<27> 산화질소(NO)는 혈관 조절, 숙주 면역 방어, 신경전달 및 다른 시스템에서 기능하는 중요한 매개 분자이다(Ignarro, 2000). 이러한 분자는 염증 진행의 실질적인 매 단계에서 조절적 작용을 한다. 특히, NO 기능은 염증 위치로의 염증성 세포 이동의 초기 단계에서 내피세포층의 전-염증 특성의 조절에 있어 현저하다. 혈관 기능장애와 같은 질환은 NO 생산의 장애와 관련이 있는 반면, 패혈성 쇼크(septic shock), 뇌경색, 당뇨병, 신경퇴화성 질환, 류머티스성 관절염 및 다른 염증성 증상은 NO 생산과잉과 관련이 있다(Moncada et al., 1992; Tuncat et al., 1998). NO는 분자 산소 및 NADPH의 존재하에 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase; NOS)에 의한 L-아르기닌의 L-시트룰린로의 전환시에 생성된다. 결과적으로 수 초 내에 NO는 아질산염 또는 질산염으로 산화된다. 적어도 세 가지의 주요 형태의 NOS 아형이 상이한 조직에 존재한다고 보고된 바 있다(Nathan, 1992; Marletta, 1993). NOS는 혈관 내피세포층에 존재하는 NOS(eNOS) 및 중앙 및 주변 뉴론에 존재하는 NOS(nNOS)은 구성적 NOS(cNOS)이며, 이들의 활성화는 Ca^{2+} -의존적이다. cNOS에 의한 연속적 NO 방출은 맥관구조를 활성 상태로 유지시키고 적절한 신경세포 신호 전달(neuronal signal transduction)의 기능 역할을 한다. 반면에, 대식세포와 간세포 중의 NOS는 유도 NOS(iNOS)이고, 그의 활성화는 Ca^{2+} -독립적이다(Duval et al., 1996; Yuan et al., 1998). 세 가지의 NOS 이소 효소는 테트라하이드로바이오프로테인(Thetrahydrobiopterin; BH4) 및 해미(haeme)를 함유하는 황색단백질(flavoprotein)이고, 이들은 사이토크롬 p450 환원효소와 상동성이 있다. 테트라하이드로바이오프로테인(BH4)는 모든 NOS 효소에 대하여 주요 공통인자이다. BH4의 부재하에서, NOS는 산화질소 대신 수퍼옥사이드를 생성시킨다(Alp et al., 2003). 집적적으로 생성된 NO의 유익한 작용과는 반대로, 면역촉진제(immunostimulant)는 iNOS의 발현을 유발시켜 NO를 과잉생성시킨다(Gross and Wolin, 1995). 더욱이, 다양한 세포, 예를 들어, 대식세포, 쿠퍼 세포(Kupffer cell), 평활근 세포 및 간세포에서 iNOS의 발현은 감염 동안 엔도톡신 및(또는) 사이토카인에 노출된 후 촉진되었다(Moncada et al., 1992; Pedoto et al., 1998). 염증성 반응 경로 동안, iNOS에 의해 형성된 다량의 NO는 생리적 양의 NO를 억제하는데, 이는 nNOS 또는 eNOS에 의해서는 통상적이지 않다(Xie and Nathan, 1994). iNOS-유래 NO의 기능 또한 상이하다. 특히, 면역적 또는 화학적 활성화 대식세포에 의해 생성된 NO는 미생물 및 니트로사일레이트(nitrosylate) 거대분자를 죽인다. 일반적으로, 다량의 “염증성 NO”는 골수성 세포를 생성시키고, 다량의 수퍼옥사이드 음이온(O_2^-)을 생성시킨다. 이 둘은 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite; $ONOO^-$)를 형성시킬 수 있고, 이는 NO의 세포 독성 효과, 예를 들어 DNA 손상, LSL 산화, 이소프로스탄(isoprostane) 형성, 티로신 질화, 애코니타제 저해 및 미토콘드리아성 호흡을 매개한다(Ischiropoulos and al-Mehdi, 1995). 따라서, iNOS-유래 NO 과잉생성은 광범위한 염증성 증상의 편재적 매개자인 것으로 여겨지며, 염증성 과정을 계량화는

염증의 정도를 반영한다(Ikeda et al., 1998; Thiernemann and Vane, 1990; Kilbourn et al., 1992). 따라서, 이는 iNOS에 의한 과도한 NO 생성 저해가 항-염증성이될 것이라는 유력한 증거이다. eNOS 및 nNOS로부터 NO의 생성이 통상적인 생리작용에 포함되기 때문에, 염증 치료를 위해 치료적으로 사용되는 임의의 NOS 저해제가 iNOS에 대해 선택적이라는 사실이 중요하다. 이러한 저해제는 eNOS에 의해 생성된 NO에 의해 조절되는 혈압의 조절 또는 nNOS에 의해 생성된 NO에 의한 비-아드레날린 조절성 및 비-콜린성 신경세포 전송 조절에는 영향을 미치지 않고 iNOS에 의한 과도한 NO의 생성을 저해할 것이다. 몇몇 군의 NOS 저해제가 이용능함에도 불구하고, 이들은 아형 특이적이지 않다. 따라서, 현재 iNOS-특이적 저해제를 개발하기 위한 다수의 적극적인 연구 노력이 경주되고 있다.

<28> cNOS 및 iNOS와 유사하게, 집적적 사이클로옥시제나제(COX-1) 및 유도 사이클로옥시제나제(COX-2) 또한 면역 조절 및 병리적 증상에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다. 사이클로옥시제나제는 프로스타글란딘 H₂(PGH₂), 다양한 생물학적 활성 매개체의 전구체, 예를 들어 PGE₂, 프로스타사이클린 및 트롬복산 A₂로 아라키돈산의 전환을 촉진시킨다(Smith et al., 1996; Neill and Ford-Hutchinson, 1993). 정상 조건하에서, COX-2는 대부분의 조직에서 거의 검출할 수 없다. TNF- α , 인터류킨-1 β (IL-1 β) 및 LPS를 포함한 많은 전-염증성 매개체에 의한 유도에 이어 COX-2로부터 유도된 다량의 PGE₂가 패혈증 및 염증의 병인에 관련된 바 있다(Hammond et al., 1999; Futaki, 1997). 종래의 보고서에는 선택적 COX-2 저해제를 이용한 치료가 PGE₂를 억제할 뿐만 아니라 전-염증성 사이코카인 형성을 정상화시키고, 이어서 외상 후 생존율을 증가시킨다고 밝힌 바 있으며(Mark et al., 2001), 이는 COX-2 유도 및(또는) 활성 억제에 의한 PGE₂ 과잉생성 억제가 염증성 질환을 치료하기 위한 잠재적인 약리학적 목표가 될 것이라는 점을 제시한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

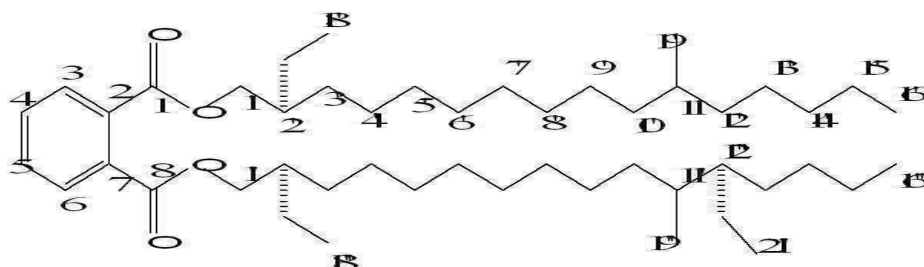
<29> 본 발명의 목적은 동양의학에서 생약제로 많이 사용되고 있는 해양 생물인 해마로부터 천연 화합물을 추출하고, 이로부터 신규한 화합물을 분리 동정하여, 이들의 항산화성, 베타-시크리타제 저해효과, 고혈압 저해효과, 티로시나제 저해효과 등의 생리활성을 밝히는데 있다.

과제 해결수단

<30> 이와 같은 본 발명의 목적은 히토캄푸스 쿠다 블릴러(Hippocampus Kuda Bleeler)의 에탄올 추출물로부터 신규한 프탈레이트 유도체를 분리하고, 1D 및 2D NMR 데이터의 포괄적 해석을 통해 이 화합물의 구조를 밝히고, 약리효과 실험을 통해 그의 제약학적 용도 찾아냄으로써 달성되었다

<31> 본 발명에서는 하기 화학식 1의 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물을 제공한다.

<32> <화학식 1>



<33>

<34> 본 발명에서는 해마의 MeOH 추출물을 사용하여, 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피, HPLC 및 RP-18 겔을 사용하여 성분을 분리하고, 분리된 화합물의 구조는 IR, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC, HMQC 및 EIMS 등의 분광학적 방법을 이용하여 상기 화합물을 분리, 동정하였다.

<35> 분리한 본 발명의 화합물은 천연물질에서 처음 분리 동정된 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물이었다.

효과

<36> 본 발명에 따른 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트 화합물은 DPPH, 하이드록시, 수퍼옥사이드, 알킬 라디칼 및 DCF-DA 소거능이 우수하여 항산화 활성이 있으며, 베타-시크리타제 저해 활성을 가져 알츠하이머성 치매 질환 저해 효과가 있고, 티로시나제 저해 활성을 가져 고혈압 저해 효과가 있으며, 세포독성을 지니지 않기 때문에 제약산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<37> 이하에서는 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<38> 실시예 1 : 본 발명 화합물의 제조

<39> 본 발명에 따른 화합물 2를 제조하기 위하여 다음과 같은 재료를 사용하였다.

<40> NMR 용매: DMSO- d_6 (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 중수소 치환도 99.9%); $CDCl_3$ (Aldrich, 중수소 치환도 99.8%). 유기 용매: n-헥산, 벤젠, EtOAc, $CHCl_3$, CH_2Cl_2 , MeOH, EtOH, 아세톤 (Duksan Pure Chemical, 99.5%). 착색제: $Se(SO_4)_2$ (Sigma). 실리카 겔 60 (70-230 mesh, Merck, Germany)을 개방형 컬럼 크로마토그래피 및 박막 크로마토그래피 프리코트 키젤겔(Kieselgel) 60 F254 (Merck, Germany)에 사용하였다. 다른 화학약품 및 시약은 상업적으로 시판되는 분석 등급의 것들을 사용하였다.

<41> 1. 해마의 분리 및 추출

<42> 2006년 9월에 중국 조우-산(Zhou-Shan)에서 신선한 해마 히포캄푸스 코로나투스(*Hippocampus coronatus*)를 수집하였다. 동결건조한 H. Kuda Bleeler 2 kg을 분말로 분쇄하고 실온에서 MeOH 3 내지 5 L로 15일 동안 추출하고, 용매를 진공에서 증발시켜 조 MeOH 추출물을 수득하였다.

<43> 상기 메탄올 추출물을 실리카겔 플래쉬 크로마토그래피하고, n-헥산/EtOAc/MeOH (구배)로 용리시키고, 9 개의 주 분획을 산출시켰다. 용리된 분획물을 TLC 분석한 후, 유사한 Rf 값을 가진 분획물을 고이게(pooled)하였다. 분획 5 (630 mg, n-헥산/EtOAc, 5:1)를 MeOH/H₂O로 용리시켜 ODS상에서 크로마토그래피하여 각각 화합물 2를 수득하였다. 분리물들을 H₂O중에 MeOH 50% 내지 100% 40 분 구배 프로그램(40 min gradient program)을 이용하는 HPLC (Dionex, ODS, MeOH)로 추가 정제하여 화합물 2 (17.8 mg)을 수득하였다(도 1의 반응식 참조).

<44> 2. 박막크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography; TLC)

<45> 실리카겔 플레이트 (5 ?4 cm, Kieselgel 60 F, 0.25 mm, Merck)상에서 TLC를 수행하였다. 각 분획의 분취액을 디클로로메탄/메탄올 및 헥산/EtOAc 용매 시스템을 이용하여 실리카겔 플레이트 상에 스폿팅하였다. 상기 플레이트에 황산/에탄올(1:4) 100 mL 중의 바닐린 0.1g 용액을 분무하여 스폿들을 시각화시켰다.

<46> 3. 적외선 스펙트럼(Infrared Spectrum; IR)

<47> FT-IR 스펙트럼 ($400-4000\text{ cm}^{-1}$)을 이용하여 화합물 2를 결정하고, IFS-88 스펙트로미터 (Bruker, USA) 상에 기록하였다.

<48> 4. 자외선 및 가시광선 (UV-Vis) 분광광도법

<49> 화합물 2를 클로로포름에 용해시키고, 용해된 화합물 2의 UV-Vis 흡광도를 U-2001 분광광도계 (Hitach, Jpan)에 기록하였다.

<50> 5. 질량 분광법

<51> 각각 JMS-700 분광계(JEOL, Jpan) 및 JMS HX 110A/HX110A (JEOL, Jpan) 직렬 질량 분광계로부터 전자 충격 질량 분광(Electron Impact Mass Spectrometric; EIMS) 데이터와 HR-FABMS 데이터를 얻었다.

<52> 6. 비선허도-[α]_D

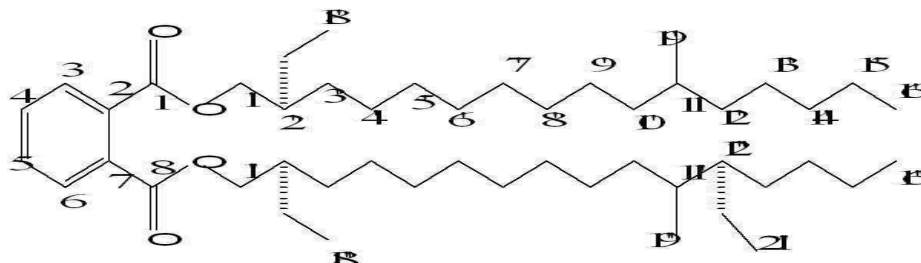
<53> 퍼킨 엘머(Pekerin Elmer) 모델 341 편광계를 이용하여 화합물 2의 비선허도를 측정하였다.

<54> 7. 핵자기공명법(Nuclear Magnetic Resonance; NMR)

<55> JNM-ECP 400 NMR 분광계 및 참조 표준으로서 클로로포름-d 피크를 이용하여 1D NMR (^1H , ^{13}C , 및 DEPT) 및 2D NMR (HMQC, HMBC) 스펙트럼을 얻었다.

<56> 상기와 같은 방법에 의하여 본 발명 화합물 2가 하기 화학식 1의 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실-프탈레이트임을 밝혀냈다.

<57> <화학식 1>



<58>

<59> 황색 오일; $[\alpha]_D^{20} +0.10$ (c 2, MeOH); IR (neat) max 2957, 2924, 2855, 1720, 1602, 1575, 1485, 1264, 1115, 1072, 1033, 965, 798, 741 cm^{-1} UV (CHCl₃) max (log ϵ) 274 (2.39) nm; ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.70 (2H, dd, $J=8.78$, 2.18 Hz, H-3, 6), 7.52 (2H, dd, $J=8.78$, 2.18 Hz, H-4, 5), 4.27, 4.21 (2H, t, $J=6.25$ Hz, H2-1'), 4.27, 4.21 (2H, t, $J=6.25$ Hz, H2-1''), 1.68 (4H, m, H-2', 2'', 11', 11''), 1.45 (1H, m, H-12''), 1.33 (2H, m, H2-15'), 1.32 (2H, m, H2-15''), 1.29 (36H, m, H2-4', 4'', 5', 5'', 6', 6'', 7', 7'', 8', 8'', 9', 9'', 13', 14', 14'', 17', 17'', 20''), 1.25 (12H, m, H2-3', 3'', 10', 10'', 12', 13''), 0.90 (21H, m, H3-16', 16'', 18', 18'', 19', 19'', 21''); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) 167.7 (s, C-1, 8), 132.3 (s, C-2, 7), 128.8 (d, C-3, 6), 130.9 (d, C-4, 5), 68.1 (t, C-1', 1''), 38.7 (d, C-2', 2''), 31.9 (t, C-3', 3''), 28.6 (t, C-4'), 30.3 (t, C-5', 5''), 29.7 (t, C-6', 6'', 7', 7'', 8', 8''), 27.0 (t, C-9'), 34.3 (t, 10'), 33.1 (d, C-11'), 36.6 (t, C-12'), 26.8 (t, C-13'), 29.2 (t, C-14'), 22.7 (t, C-15'), 14.1 (q, C-16'), 23.7 (t, C-17', 17''), 11.0 (q, C-18'), 19.6 (q, C-19'), 28.9 (t, C-4''), 27.5 (t, C-9''), 36.5 (t, C-10''), 39.4 (d, C-11''), 41.9 (d, C-12''), 32.5 (t, C-13''), 32.7 (t, C-14''), 23.4 (t, C-15''), 14.2 (q, C-16''), 11.4 (q, C-18''), 19.1 (q, C-19''), 26.1 (t, C-20''), 12.2 (q, C-21''); HREIMS m/z 726.6547 $[\text{M}]^+$ (calcd for C₄₈H₈₆O₄, 726.6526, Δ + 2.1 mnu), LREIMS m/z (rel. int.) 726 $[\text{M}]^+$ (2), 474 (2), 419 (2), 293 (17), 279 (8), 249 (2), 177 (3), 167 (21), 149 (91), 127 (9), 113 (2), 98 (10), 85 (36), 71 (44), 57 (100).

<60> 상기와 같이 화합물 2를 황색 오일로서 분리하였고, 이는 ^{13}C NMR (도 9 및 10) 및 LREIMS 데이터(도 12)로부터 분자 조성 C₄₈H₈₆O₄를 갖는 것으로 확인되었다. 분자 구조식에 의한 여섯 개의 불포화도는 두 개의 카보닐기, 세 개의 이중 결합 및 하나의 고리를 함유한 것으로 판단된다. 화합물 2의 IR 스펙트럼(도 13)은 알칸(2924 cm^{-1} , C-H stretch), 에스테르(1720 cm^{-1} , C=O), 방향족 (1602, 1575, 1485, 741 cm^{-1} , C=C) 및 에스테르 (1264, 1115, 1072, 1033 cm^{-1} , C-O) 관능기들에 대한 흡수도를 나타내었다. 화합물 2의 UV 스펙트럼은 공액된 시스템[274 nm (log ϵ = 2.39)]의 존재를 나타내었다.

<61> ^1H NMR 스펙트럼(도 8)은 δ 7.70 (2H, dt, $J=8.78$, 2.18 Hz, H-3, 6), 7.52 (2H, dt, $J=8.78$, 2.18 Hz, H-4, 5)에서 AA'BB' 시스템을 나타내었다 (표 2).

<62> 화합물 2의 ^1H , ^{13}C , DEPT (도 8-11) 및 HMQC (도 14) NMR 데이터 분석은 7개의 메틸기, 28개의 메틸렌 단위 (두 개의 O-함유 메틸렌), 네 개의 sp² 방향족 탄소, 다섯 개의 메틴, 두 개의 sp² 4급 탄소 및 2 개의 카보닐 탄소의 존재를 나타내었다. 이러한 데이터는 화합물 2가 하나의 벤젠 고리, 및 두 개의 카보닐기가 있는 측쇄를 갖도록 요구되는 바를 설명하였다. 화합물 2에 대한 NMR 데이터는 양-치환된 페닐 구조인 것을 특징으로 한다.

<63> 네 개의 방향족 양성자에 대해 관찰된 ^1H and ^{13}C NMR 화학 이동 및 J 값의 분석은 하나의 오르쏘-치환 방향족 고리의 존재를 확인시켜 주었다. 이러한 지시는 관련 HMBC(도 15) 상호관계에 의해 추가로 확인되었다. 화합물 2에 존재하는 두 개의 방향족 양성자(δ 7.70)는 각각 C-1, C-2, 및 C-4와 상호관계를 나타내고, 이는 두개의 카보닐 탄소가 방향족 sp³ 4급 탄소(C-2 및 C-7)와 직접 결합되어 있음을 지시한다. 이들 두개의 카보닐 탄소의 ^{13}C 화학 이동 및 두 개의 O-함유 메틸렌 단위의 ^1H 및 ^{13}C NMR 데이터에 기인하여, 화합물 2의 구조는 각각

H-1' 및 H-1''와 C-1 및 C-8의 HMBC 상호관계에 의해 지지되는 프탈레이트 유도체인 것으로 나타났다.

<64>

두 개의 측쇄 잔기의 결합은 완전히 HMBC (도 15) 및 COSY 상호관계에 의해 기인한 것이다. 화합물 2에 존재하는 네 개의 키랄 탄소(C-2', 2'', 11', 11'')는 대칭성이었고, 다른 키랄 탄소(C-12'')에 결합된 에틸기는 분자 비대칭을 가져오며, 이는 광학 비선 데이터($[\alpha]_D^{20} +0.30$)에 의해 지지되었다. 이들 데이터를 기준으로 하여, 화합물 2의 평면 구조를 차트 4에서 2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실 프탈레이트로서 확립하였다.

<65>

화합물 2의 HMBC & COSY 스펙트럼으로부터 구조 및 주요 상호관계를 나타내었다.

<66>

<표 1>

<67>

2,12-디에틸-11-메틸헥사데실 2-에틸-11-메틸헥사데실 프탈레이트(화합물 2)에 대한 NMR 데이터

<68>

위치	H (mult, J)	c (mult, J)	Position	H (mult, J)		
1c (mult, J)		167.7 (s)	17'	23.7 (t)1.29 (m)		
2		132.3 (s)	18'	11.0 (q)0.90 (m)		
3	7.70 (dd, 8.78, 2.18)	128.8 (d)	19'	19.6 (q)0.90 (m)		
4	7.52 (dd, 8.78, 2.18)	130.9 (d)	1"	68.1 (t)4.27, 4.21 (dt, 6.25)		
5	7.52 (dd, 8.78, 2.18)	130.9 (d)	2"	38.7 (d)1.68 (m)		
6	7.70 (dd, 8.78, 2.18)	128.8 (d)	3"	31.9 (t)1.25 (m)		
7		132.3 (s)	4"	28.9 (t)1.29 (m)		
8		167.7 (s)	5"	30.3 (t)1.29 (m)		
1'	4.27, 4.21 (dt, 6.25)	68.1 (t)	6"	29.7 (t)1.29 (m)		
2'	1.68 (m)	38.7 (d)	7"	29.7 (t)1.29 (m)		
3'	1.25 (m)	31.9 (t)	8"	29.7 (t)1.29 (m)		
4'	1.29 (m)	28.6 (t)	9"	27.5 (t)1.29 (m)		
5'	1.29 (m)	30.3 (t)	10"	36.5 (t)1.25 (m)		
6'	1.29 (m)	29.7 (t)	11"	39.4 (d)1.68 (m)		
7'	1.29 (m)	29.7 (t)	12"	41.9 (d)1.45 (m)		
8'	1.29 (m)	29.7 (t)	13"	32.5 (t)1.25 (m)		
9'	1.29 (m)	27.0 (t)	14"	32.7 (t)1.29 (m)		
10'	1.25 (m)	34.3 (t)	15"	23.4 (t)1.32 (m)		
11'	1.68 (m)	33.1(d)	16"	14.2 (q)0.90 (m)		
12'	1.25 (m)	36.6 (t)	17"	23.7 (t)1.29 (m)		
13'	1.29 (m)	26.8 (t)	18"	11.4 (q)0.90 (m)		

14'	1.29 (m)	29.2 (t)	19"	19.1 (q)0.90 (m)	
15'	1.33 (m)	22.7 (t)	20"	26.1 (t)1.29 (m)	
16'	0.90 (m)	14.1 (q)	21"	12.2 (q)0.90 (m)	
위치	H (mult, J)	c (mult, J)	Position	H (mult, J)	
1c (mult, J)		167.7 (s)	17'	23.7 (t)1.29 (m)	
2		132.3 (s)	18'	11.0 (q)0.90 (m)	
3	7.70 (dd, 8.78, 2.18)	128.8 (d)	19'	19.6 (q)0.90 (m)	
4	7.52 (dd, 8.78, 2.18)	130.9 (d)	1"	68.1 (t)4.27, 4.21 (dt, 6.25)	
5	7.52 (dd, 8.78, 2.18)	130.9 (d)	2"	38.7 (d)1.68 (m)	
6	7.70 (dd, 8.78, 2.18)	128.8 (d)	3"	31.9 (t)1.25 (m)	
7		132.3 (s)	4"	28.9 (t)1.29 (m)	
8		167.7 (s)	5"	30.3 (t)1.29 (m)	
1'	4.27, 4.21 (dt, 6.25)	68.1 (t)	6"	29.7 (t)1.29 (m)	
2'	1.68 (m)	38.7 (d)	7"	29.7 (t)1.29 (m)	
3'	1.25 (m)	31.9 (t)	8"	29.7 (t)1.29 (m)	
4'	1.29 (m)	28.6 (t)	9"	27.5 (t)1.29 (m)	
5'	1.29 (m)	30.3 (t)	10"	36.5 (t)1.25 (m)	
6'	1.29 (m)	29.7 (t)	11"	39.4 (d)1.68 (m)	
7'	1.29 (m)	29.7 (t)	12"	41.9 (d)1.45 (m)	
8'	1.29 (m)	29.7 (t)	13"	32.5 (t)1.25 (m)	
9'	1.29 (m)	27.0 (t)	14"	32.7 (t)1.29 (m)	
10'	1.25 (m)	34.3 (t)	15"	23.4 (t)1.32 (m)	
11'	1.68 (m)	33.1(d)	16"	14.2 (q)0.90 (m)	
12'	1.25 (m)	36.6 (t)	17"	23.7 (t)1.29 (m)	
13'	1.29 (m)	26.8 (t)	18"	11.4 (q)0.90 (m)	
14'	1.29 (m)	29.2 (t)	19"	19.1 (q)0.90 (m)	
15'	1.33 (m)	22.7 (t)	20"	26.1 (t)1.29 (m)	
16'	0.90 (m)	14.1 (q)	21"	12.2 (q)0.90 (m)	

<69> * 400 MHz (1H) 및 100 MHz (13C)에서 CDC13중에 기록됨

<70> 다음과 같은 재료를 사용하여 본 발명 화합물 2를 실험하였다.

<71> 쥐 백혈병 대식세포(Murine Leukemia Macrophage)(RAW264.7), 인간 태아 폐 섬유아세포(human fetal lung fibroblast)(MRC-5), 마우스 흑색종(mouse melanoma)(B16F10), 및 인간 백혈병 단핵백혈구 림프종(human leukemic monocyte lymphoma)(U937) 세포주를 ATCC(American Type of Culture Collection)(Manassas, VA, USA)에서 획득하였다. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI 1640 배지, 트립신-EDTA, 페니실린/스트렙토마이신/암포테리신(각각 10,000 U/ml, 10,000 μ g/ml, 및 2,500 μ g/ml) 및 우태아혈청(fetal bovine serum)(FBS)은 김코 BRL 라이프 테크놀로지스(Gibco BRL, Life Technologies)(USA)에서 획득하였다. 버섯 트립시나제(2034 units/mg) 및 L-티로신은 플루카(Fluka)(Switzerland)에서 구입하였다. MTT [3-(4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨브로마이드] 시약, 박테리아 리포폴리사카라이드(bacterial lipopolysaccharide)(LPS), 포로글루시놀(phoroglucinol), 5,5-디메틸-1-피르롤린-N-옥사이드(DMPO), α -(4-피리딜-1-옥사이드)-N-tert-부틸니트론(4-POBN), 2,2'-아조비스(2-아미디노프로판) 디하이드로클로라이드(AAPH), 코직산, ACE (래빗 폐 유래) 및 기질 펩타이드(Hip-His-Leu) 시약은 시그마 케미칼 사(Sigma Chemical Co.)(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 2',7'-디클로로플루오로레진 디아세테이트(DCFH-DA) 및 모노브로모 비메인은 몰리큘라 프로브스(Molecular probes) (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 웨스턴 블롯 분석에 이용된 1차 및 2차 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지사(Santa Cruz Biotechnology Inc.)(CA, USA)에서 구입하였다. 사용된 다른 화학약품 및 시약은 분석 등급으로 상업적으로 시판되는 것들을 사용하였다.

<72> 실험예 1 : 본 발명 화합물 2의 항산화 활성

<73> 1.1. 지질 과산화 저해 분석(Lipid peroxidation inhibition assay)

<74> 지질 과산화 저해를 리놀레산 모델 시스템에서 오자와 및 나미키(Osawa and Namiki) (1981)의 방법에 따라 측정하였다. 간략하게, 시료(1.3 mg)를 에탄올에 용해시키고, 리놀레산 0.13 mL와 99.5% 에탄올 10 mL의 용액에 가하였다. 이어서 교반하면서 전체 부피가 25mL가 되도록 조정하였다. 혼합물을 스크류 캡이 있는 삼각 플라스크에서 $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 로 암중에 배양하고, FTC(ferric thiocyanate) 수치를 측정하여 산화도를 계산하였다. 리놀레산 모델 시스템에서 배양된 반응 용액(100 μ L)을 75% 에탄올 4.7 mL, 30% 암모늄 티오사아네이트 0.1 mL 및 3.5% HCl 중의 2X10⁻²M 염화 제1철 용액 0.1 mL와 혼합하였다. 3 분 후, $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 에서 배양 기간 동안 상이한 간격으로 500nm에서의 흡수도를 판독한 후, FeCl₂ 및 티오사아네이트를 이용한 색 전개를 판독하여 티오사아네이트 수치를 측정하였다.

<75> 1.2. DPPH (2,2-디페닐-1-피크릴하이드라질) 라디칼의 흡광도

<76> 난조 등(Nanjo et al.)이 기술한 방법(1996)을 이용하여 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 화합물 2 용액(또는 대조구로서 에탄올 자체) 30 μ L를 에탄올 용액 중의 DPPH(60 μ M) 30 μ L에 가하였다. 10 초 동안 격렬하게 교반한 후, 용액을 100 μ L 수정 모세관 튜브로 옮기고, JES-FA ESR 분광계(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 DPPH 라디칼에 대한 화합물 2의 소거 활성을 측정하였다. 정확히 2 분 후 ESR 분광계에서 스핀 애딕트(spin adduct)를 측정하였다. 실험 조건은 다음과 같았다: 자기장, 336.5 ± 5 mT; 전압, 5 mW; 변조 주파수, 9.41 GHz; 진폭, 1X1000; 소인 시간(sweep time), 30 초. H 및 H₀가 각각 시료의 존재 및 부재하의 라디칼 신호의 상대 피크 높이인 공식에 따라 DPPH 라디칼 소거 활성을 계산하였다.

<77> 1.3. 하이드록실 라디칼 소거 분석

<78> 이온-촉매화된 펜톤 하버-웨이스 반응(iron-catalyzed Fenton Haber-Weiss reaction)에 의해 하이드록실 라디칼을 생성시키고, 생성된 하이드록실 라디칼을 니트론 스핀 트랩(nitrone spin trap) DMPO(Rosen and Rauckman, 1984)와 반응시켰다. 생성된 DMPO-OH 부산물을 ESR 분광계로 검출하였다. 화합물 2 용액(20 μ L)을 포스페이트 완충제 용액(pH 7.4) 중의 DMPO (0.3 M, 20 μ L), FeSO₄ (10 mM, 20 μ L) 및 H₂O₂ (10 mM, 20 μ L)와 혼합한 후, 100 μ L 수정 모세관 튜브로 옮겼다. 2.5 분 후, ESR 분광계를 이용하여 ESR 스펙트럼을 기록하였다. 사용된 실험 조건은 다음과 같다: 자기장, 336.5 ± 5 mT; 전압, 1 mW; 변조 주파수, 9.41 GHz; 진폭, 1X200; 소인 시간, 4 분. H 및 H₀가 각각 시료의 존재 및 부재하의 라디칼 신호의 상대 피크 높이인 공식에 따라 하이드록실 라디칼 소거 활성을 계산하였다.

<79> 1.4. 수퍼옥사이드 라디칼 소거 분석

<80> UV 조사 리보플라빈/EDTA 시스템에 의해 수퍼옥사이드 음이온 라디칼을 생성시켰다(Guo et al., 1999). 0.3 mM 리보플라빈(20 μ L), 1.6 mM EDTA (20 μ L), 800 mM DMPO (20 μ L) 및 지정된 농도의 화합물 2 용액(20 μ L)을 함유한

반응 혼합물에 UV 램프를 365 nm에서 1 분 간 조사하였다. 이어서, 반응 혼합물을 측정을 위하여 ESR 분광계의 100 μ L 수정 모세관 튜브로 옮겼다. 사용된 실험 조건은 다음과 같다: 자기장, 336.5 ± 5 mT; 전압, 10 mW; 변조 주파수, 9.41 GHz; 진폭, 1X1000; 소이 시간, 1 분. H 및 H0가 각각 시료의 존재 및 부재하의 라디칼 신호의 상대 피크 높이인 공식에 따라 수퍼옥사이드 라디칼 소거 활성을 계산하였다.

<81> 1.5. 퍼록실 라디칼 소거 분석

<82> 히로마토 등(Hiromato et al.)의 방법(1993)에 따라 퍼록실 라디칼을 생성시켰다. 간략하게, 20 μ L의 40 mM 2,2'-아조비스(2-아미디노프로판) 디하이드로클로라이드(AAPH)를 20 μ L의 포스페이트 완충-함수(PBS), 20 μ L의 40 mM α -(4-페리달-1-옥사이드)-N-tert-부틸니트론(4-POBN) 및 20 μ L의 화합물 2 용액과 혼합하였다. 혼합물을 와동시키고, 37 °C에서 30 분 동안 배양하였다. 이어서, 반응 혼합물을 밀봉된 모세관 튜브로 옮기고, 스핀 애덕트를 조절된 분광 조건에서 기록하였다: 변조 주파수, 100 kHz; 마이크로파 전압, 10 mW; 마이크로파 주파수, 9441 MHz; 자기장, 336.5 ± 5 mT 및 소이 시간, 30 초. H 및 H0가 각각 시료의 존재 및 부재하의 라디칼 신호의 상대 피크 높이인 공식에 따라 퍼록실 라디칼 소거 활성을 계산하였다.

<83> 1.6. 세포 배양 및 생존능 측정

<84> 10 % 우태아혈청, 2 Mm 글루타민 및 100 μ g/mL 페니실린-스트렙토마이신을 함유한 DMEM 배지에서, 5 % CO2 및 37°C 습윤 환경으로 백혈구 세포주, RAW264.7 및 MRC-5를 각각 배양하였다. 한센 등(Hansen et al. 1989)이 기술한 MTT [(3-(4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드] 방법을 이용하여 세포독성을 측정하였다. 세포를 96-웰 플레이트에서 5X103 세포/웰의 밀도로 배양하였다. 24 시간 후, 세포를 신선한 매질로 세척하고, 상이한 농도의 크루드(crud) 용매 추출물로 처리하였다. 48 시간 배양 후, 세포를 재세척하고 100 μ L의 MTT (1 mg/ml)를 가하고, 4 시간 동안 배양하였다. 최종적으로 DMSO (150 L)를 가하여 형성된 포르마잔 염을 용해시키고, GENios(상표명) 마이크로플레이트 리더(microplate reader) (Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 540 nm에서 OD를 측정함으로써 포르마잔 염의 양을 측정하였다. 포르마잔 염으로 전환된 MTT의 양에 의해 상대 세포 생존능을 측정하였다. 세포의 생존능을 대조구의 생존능과 비교하여 (처리구 세포 OD - 블랭크 OD/대조구 OD - 블랭크 OD X 100%) %로 정량화하고, 투여량 반응 곡선을 전개시켰다. 데이터를 3 회의 독립적 실험으로부터의 평균으로 표현하였고, P < 0.05 이 유의적이라 여겨졌다.

<85> 1.7. DCFH-DA 라벨링을 이용한 반응성 산소 종(ROS)의 세포내 형성의 측정

<86> 기질로서 산화 민감성 염료 2',7'-디클로로플루오로레신 디아세테이트(DCFH-DA)(Okimoto et al., 2000)를 이용하여 종래에 기술된 바와 같이 반응성 산소 종(ROS)의 세포내 형성을 분석하였다. 형광 마이크로타이터 96-웰 플레이트에서 배양된 RAW264.7 세포를 HBSS 중의 20 M DCFH-DA로 적재하고, 암 중에서 20 분 동안 배양하였다. 세포내로 자유롭게 투과하는 비형광 DCFH-DA 염료를 세포내 에스테라제에 의해 2',7'-디클로로플루오로레신(DCFH)로 가수분해시키고, 세포 내부를 타프(tarp)하였다. 이어서, 세포를 상이한 농도의 시험 화합물 2로 처리하고, 1 시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 3 회 세척한 후, HBSS에 용해되어 있는 300 μ M H₂O₂를 세포에 가하였다. 다양한 ROS의 존재하에 DCFH의 산화에 기인한 2',7'-디클로로플루오로레신(DCF)의 형성을 485 nm의 여기 파장(Ex) 및 535 nm의 방출 파장(Em)에서 GENions 형광 마이크로플레이트 리더(Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 30 분 마다 판독하였다. 처리구의 용량 의존성 및 시간 의존성 효과를 플롯팅하고, 대조구 및 블랭크구와 비교하였다.

<87> 1.8. 미엘로퍼옥시다제 활성 분석(Myeloperoxidase activity assay)

<88> HL60, 인간 프로미오플라스틱 세포(promyeloblastic cells)에 의해 방출된 미엘로퍼옥시다제(MPO)의 양을 변형된 O-디아니시딘 방법(O-dianisidine method)(Bradly et al., 1982)에 의해 측정하였다. HL60 세포를 페놀 레드 및 FBS가 없는 RPMI-1640에 현탁시키고, 96-웰 플레이트에 파종하였다. 세포를 다양한 농도의 화합물 2로 30 분 동안 예비배양한 후, TNF- α (0.05 μ g/ml)로 37°C에서 30 분 동안 촉진시켰다. 이어서, 세포에 0.1 M 포스페이트 완충제(pH 6.0) 중의 1 Mm H₂O₂ 0.05 mL 및 탈이온수 중의 0.02 M O-디아니시딘(청정 제조됨) 0.05 mL를 함유한 분석 혼합물을 가하였다. 방출된 MPO의 양을 460 nm에서 분광측색으로 측정하고, MPO 활성을 흡수도 수치로서 플롯팅하고, 미처리 블랭크구와 비교하였다.

<89> 1.9. 유전자 DNA 분리 및 하이드록실-라디칼-유도 DNA 손상에 대한 화합물 2의 보호 효과

<90> 약간 변형된 표준 페놀/프로테아제 K 공정(standard phenol/proteinase K procedure)(Sambrook and Russell, 2001)을 이용하여 유전자 고분자량 DNA를 RAW264.7 세포로부터 추출하였다. 간략하게, 10 cm 접시에서 배양한

세포를 PBS로 2 회 세척하고, 5 mM EDTA를 함유한 PBS 1 mL로 비벼뒀다. 원심분리 후, 세포를 RNase (0.5 mg/ml), 아세트산 나트륨(0.2 M), 프로테아제 K (10 mg/ml) 및 SDS (10 %)에 용해시켰다. 혼합물을 37℃에서 30 분 동안, 55℃에서 1 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 페놀:클로로포름:이소아밀알콜(25:24:1)을 1:1 비율로 가하고, 혼합물을 12,000Xg에서 4℃로 5 분 동안 원심분리하였다. 상청액을 100% 빙냉 에탄올과 1:1.5의 비율로 혼합하고, -20℃로 15 분 동안 유지하였다. 12,000Xg에서 5 분 동안 원심분리한 후, 펠렛을 TE 완충액에 용해시키고, DNA 순도를 분광측색으로 260/280 nm에서 측정하였다. 추가로, 분리된 DNA의 품질을 0.04 M 트리 스-아세테이트-0.001 M EDTA 완충제에서 1% 아가로스 겔 전기영동으로 평가하였다. 하이드록실 라디칼에 의해 유도된 DNA 손상에 대한 추출물의 보호 효과를 알아보기 위하여, 반응을 에펜도르프 튜브(Eppendorf tube)에서 50 mM 포스페이트 완충제(pH 7.4) 3 μ L 중의 DNA 0.5 μ L, 2 mM FeSO₄ 3 μ L 및 다양한 농도의 화합물 2 2 μ L를 함유하는 전체 부피 12 μ L로 수행하였다. 이어서, 30 % H₂O₂ 4 μ L를 가하고, 혼합물을 37℃에서 30 분 동안 배양하였다. 혼합물을 0.8 % 아가로스 겔 전기영동시키고, DNA 대역을 에테디움 브로마이드로 염색하였다.

<91> 상기와 같은 실험으로 다음과 결과를 얻었다.

<92> 1.10. 지질 과산화 저해 분석에 대한 화합물 2의 효과

<93> FTC(ferric thiocyanate) 방법을 이용하여 화합물 2의 지질 과산화 저해 활성을 측정하였다. FTC 방법을 이용하여 지질 산화의 초기 단계 동안 과산화물 수준을 측정하였다. 리놀레산의 과산화를 방지하는 화합물 2의 효과를 도 23에 도시하였다. 배양 기간(7일) 후, 리놀레산의 비-유용성으로 인하여 과산화물의 형성이 중단되었다. 또한, 중간체 생성물이 Fe²⁺의 산화 단계에서 생성된 안정한 최종-생성물로 전환되었다. 따라서, 보다 낮은 흡수도는 보다 높은 수준의 항산화 활성을 나타낸다. 7일 후 대조구와 비교하여 화합물 2(79.5%)가 활성을 나타내었다. 지질 과산화 저해 활성을 평가하기 위하여, 잘 알려진 PUFA, 리놀레산을 배양하여 압중의 40 $\pm$ 1℃에서 물/에탄올 에멀전중에서 자동-산화시켰다. 이 모델 시스템에서, 사전-존재하는 지질 과산화물 유래 페록실(ROO·) 및 알콕실(RO·) 라디칼을 에멀전화된 리놀레산 시스템에서 지질 과산화를 개시시키는데 직접 이용하였다. 쉹 등(Cheng et al.)(2003)은 페놀성 화합물이 지질-유래 라디칼의 소거에 의한 지질 과산화에서 그들의 보호 음이온을 제공하여 이중 지질 상에서 연쇄 반응을 중단시킨다고 보고하였다. 추출물에 존재하는 페놀성 화합물 및 다른 화학 성분들은 자유 라디칼 쉼, 전자 전달, 라디칼 첨가 또는 라디칼 재조합을 포함하는 상이한 화학 메커니즘을 통해 지질 과산화를 억제할 것이다.

<94> 1.11. 화합물 2의 자유 라디칼 소거 활성

<95> ESR 스핀 트랩핑 기술(ESR spin trapping technique)에 의해 다양한 자유 라디칼 공급원에 대한 화합물 2의 항산화 활성을 시험하였다(도 24). DPPH는 안정한 자유 라디칼로서, 전자 또는 수소 라디칼을 수용하여 안정한 반자성 분자가 된다. 따라서, DPPH는 종종 천연 항산화제의 항산화 활성을 평가하기 위한 기질로서 이용된다(Matsukawa et al., 1997). 도 25에 다양한 농도의 화합물 2로 처리하였을 때 DPPH의 ESR 스펙트럼을 나타내었다. 또한, 이들 추출물의 소거 활성은 0.125-1.25 mg/mL의 농도에서 증가하였다. 추출물 중 화합물 2가 큰 DPPH 소거 활성을 나타내었다. 많은 보고서가 DPPH 라디칼 소거 효과와 페놀성 화합물 사이의 상호관계를 강조하고 있다(Lu and Foo, 2000; Kim et al., 2002).

<96> 페데리카 등(Federica et al., 2004)은 자유 라디칼 소거 활성이 페놀성 성분의 증가에 따라 증가한다는 사실을 밝혀냈다. 페놀은 다중포화 지방산에 대하여 특히 효과적인 항산화제이며, 실제로 이들은 수소 원자를 지질 퍼놀실 라디칼로 쉽게 운반하고, 사슬 캐리어로서 작용할 수 있는 아릴옥실을 형성시키고, 다른 라디칼과 커플링됨으로써 라디칼 증식 과정을 쉼시킨다.

<97> 하이드록실 라디칼은 커다란 생물학적 손상 및 지질 과산화의 개시를 유발시키는 주요 반응성 산소종이다. 펜톤 시스템(Fe²⁺/H₂O₂)에서 생성된 하이드록실 라디칼은 DMP0에 의해 트랩되어(trapped) ESR 분광계로 검출할 수 있는 스핀 애덕트를 형성시키고, ESR 신호는 OH 스캐빈저의 존재에 의해 저해되며, 이는 OH를 위하여 DMP0와 경쟁하게 된다. 도 26에 도시한 바와 같이, 농도-의존(0.0625-0.625 mg/mL) 방식의 하이드록실 라디칼 소거 활성에 있어, 화합물 2는 가장 큰 소거 활성을 나타낸다. 이러한 결과는 하이드록실 화합물을 쉼시키고 또한 철 금속 이온을 킬레이트화시키는데 있어 화합물 2 및 화합물 2의 능력을 보여주었다. 하이드록실 라디칼은 고도로 반응성인 산소종으로, 생존 세포 중의 모든 분자를 개질시킬 수 있다. 이 라디칼은 DNA에 가닥 손상을 야기시키는 능력을 가져서 발암, 돌연변이 유발 및 세포독성을 일으킨다. 더욱이 하이드록실 라디칼은 불포화 지방산으로부터 수소 원자를 빼냄으로써 지질 과산화 과정을 빠르게 개시시킬 수 있다(Aruoma, 1998).

- <98> 또한, 수퍼옥사이드 라디칼은 리보플라빈/EDTA 용액의 UV 조사에 의해 생성되었다. 도 27에 도시한 바와 같이, 모든 추출물은 하이드록실 라디칼을 소거하였고, 소거 활성은 화합물 2의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 수퍼옥사이드 음이온 라디칼은 보다 반응성인 산소종, 예를 들어, 단일 산소 및 하이드록실 라디칼의 전구체로서 세포 성분에 매우 유해한 것으로 알려져 있고, 단일 산소는 생물학적 거대분자와 반응함으로써 조직 손상을 유도하고, 또한 노화와 관련된 산화 반응을 개시하는데 관여한다. 페록실 라디칼 스핀 애덕트는 AAPH를 37 °C에서 30 분 동안 스핀 트랩 4-POBN으로 배양할 때 관찰되며, ESR 신호의 감소는 용량 증가에 따라 관찰되었다. 화합물 2가 가장 큰 알킬 라디칼 소거 활성을 보여주었다. $R\cdot$, $RO\cdot$ 및 $ROO\cdot$ 를 나타내는 산소-중심 라디칼은 상이한 농도의 해마 유래 화합물 2에 의해 케칭될 수 있다. 이러한 결과는 화합물 2가 지질-유래 라디칼을 소거함으로써 지질 과산화를 저해한다는 사실을 밝힌 지질 과산화 저해 분석과 일치한다. 화합물 2는 전자 스핀 공명 분광계(electron spin resonance(ESR) spectrometer)에 의해 관찰된 DPPH 소거 활성에 대한 IC_{50} 수치 0.82 mM 및 하이드록실 소거 활성에 대한 IC_{50} 수치 0.38 mM, 수퍼옥사이드 소거 활성에 대한 IC_{50} 수치 0.49 mM, 및 페록실 라디칼 소거 활성에 대한 0.58 mM로 DPPH, 하이드록실, 수퍼옥사이드 및 페록실 라디칼에 대해 강력한 자유 라디칼 소거 활성을 나타내었다.
- <99> 반응성 산소종(ROS)의 주요 종을 갖는 자유 라디칼은 불안정하고, 체내의 다른 기 또는 물질과 즉시 반응하여 세포 손상 및 그에 따른 인간 질병을 일으킨다(Halliwell and Gutteridge, 1984; Roberfroid and Colderson, 1995; Braugher et al., 1986). 항산화제에 의한 지질 과산화의 저해가 자유 라디칼 소거 활성에 기인할 수 있다는 사실이 일반적으로 고려된다. 생물학적 막의 지질, 특히 고도로 산화성인 다중포화 지방산을 함유한 척추 및 뇌에 있는 것들은 특히 손상받기 쉽다(Braugher and Hall, 1989). 더욱이, 뇌는 현저한 양의 산화촉진 전이 금속 이온을 함유하고 많은 산소를 소비한다. 이러한 특성이 ROS 생성 단계 및 후속되는 급성 세포 손상을 야기시킨다. 자유 라디칼은 노화 과정 및 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 뇌허혈 재관류 손상(ischemic reperfusion injury), 관절염, 심근경색, 동맥경화증 및 암을 포함한 몇몇 질병에 관여한다(Ames et al., 1993; Piotrowski et al., 1990; Ross, 1993; Bolli, 1991; Rousseau et al., 1992). 최근의 많은 연구자들은 현재의 상업적 항산화제, 예를 들어, 비타민 C 및 α -토코페롤을 대체할 수 있는 안전성 및 효능을 갖는 임의의 천연 산화제를 찾는 데 관심을 기울이고 있다.
- <100> 본 발명에서는, 해마 추출물이 보다 큰 ROS 소거 활성 및 지질 과산화 저해 효과를 갖는다는 사실을 밝혀냈다.
- <101> 라디칼 소거 활성(%) = [(블랭크 피크 영역 - 시료 피크 영역)/블랭크 피크 영역] X 100 (%).
- <102> 1.12. RAW 264.7에서 과산화수소에 의해 생성된 세포내 반응성 산소종(ROS) 수준에 대한 화합물 2의 효과 및 세포독성 효과
- <103> 마우스 대식세포(RAW 264.7) 및 인간 피부 섬유아세포(MRC-5)에 대해 화합물 2의 세포독성 효과를 평가하고, 결과는 화합물 2는 시험 농도에서 세포독성 효과를 나타내지 않았음을 보여주었다(도 20 및 30). 화합물 2는 본 발명에서 다양한 방법으로 생성시킨 라디칼을 효과적으로 케칭시켰다. 따라서, 본 발명자들은 본 발명 화합물 2가 세포 라디칼을 소거하는 직접적 효과에 대하여 연구하였다. 이를 위하여,
- <104> RAW264.7 세포를 상기에서 언급한 바와 같이 형광 프로브 DCFH-DA로 표지하였다. 형광 프로브는 세포의 산화 활성을 모니터링하는데 널리 이용되고 있다. 표지 동안, 세포를 자유롭게 통과하는 비-형광 DCFH-DA 염료를 세포 내 에스테라제에 의해 DCFH로 가수분해시키고, 세포내에 트랩핑하였다(Veerman et al., 2004). 도 31 내지 33에 도시한 바와 같이, 200 분 까지 시간이 경과함에 따라 DCFH의 ROS-매개 산화에 따라 DCF에 의해 형광이 방출되었다. 화합물 2를 이용한 전처리로 DCF 형광은 용량-의존적 및 시간-독립적으로 감소하였다. 화합물 2는 30 분 후 100 μ g/mL 농도에서 현저한 라디칼 소거 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 이전의 연구에 따라 화합물 2가 세포를 ROS에 의한 산화적 손상으로부터 보호하였고, 따라서 이를 세포 ROS 형성을 저해하는 강력한 생-분자 후보 물질로 개발할 수 있음을 제한한다.
- <105> 1.13. 본 발명 화합물 2의 미엘로퍼옥시다제(MPO) 저해 효과
- <106> 호중성 백혈구는 수퍼옥사이드 라디칼을 생성시키고 이들을 보다 반응성인 2차 산화제 H_2O_2 로 전환시킴으로써 병원균의 침습에 대해 1차적 방어선을 제공한다(Winterbourn, 1990). 미엘로퍼옥사이드는, 호중성 백혈구에 가장 풍부한 헴(haem) 효소로서, H_2O_2 를 HOC1로 전환시키고, 이는 감염 동안 병원체에 대한 가장 강력한 산화제로서 작용한다(Kettle et al., 1995). 호중성 백혈구에 의해 세포외 매질로 방출되는 다량의 ROS는 병원체를 죽이는데 기여할 뿐만 아니라 숙주의 건강한 조직을 파괴하기도 한다. 이는 단백질 내의 티올 화합물 및 막 지질의

불포화 지방산의 산화를 야기시켜 세포 막 통합성을 불안정하게 한다. 따라서, MPO 활성의 저해가 호중성 백혈구에서 생분자의 자유 라디칼-매개 산화를 조절하는데 중요한 시도가 되고 있다. 본 발명에서, 본 발명자들은 화합물 2가 MPO 활성을 저해하고, 그에 따라 세포 생분자의 산화를 방지할 수 있는지 여부를 평가하였다. 이를 위하여, 자극에 따라 MPO고 고도로 발현된다고 보고된 인간 골수 세포주 HL60을 선택하였다. 도 34에 나타낸 바와 같이, 화합물 2는 HL60 세포에서 TNF- α -촉진 대조구와 비교하여 용량-의존적으로 MPO 활성을 억제하였다. 200 ug/mL 농도에서 화합물 2는 MPO를 43.5% 저해하였고, 이는 세포 항산화제로서 작동하는 직접적인 방식임을 나타내었다.

<107> 1.15. 화합물 2의 DNA 산화 저해 잠재력

<108> 백혈구에서의 DNA 손상은 감염에 따른 펜톤 반응을 통해 OH를 생성하는 세포 방어 시스템의 통상적인 성분인 H₂O₂의 독성 효과에 기인하여 일어난다고 예상할 수 있다. 이는, 대식세포가 식균 작용 동안 병원체를 파괴할 때 보다 많은 양의 OH를 생성시킨다고 잘 알려져 있기 때문이다. 따라서, 본 발명자들은 화합물 2가 OH에 의해 기인한 대식세포 DNA 손상을 보호할 수 있는지 여부를 평가하였다. 이를 위하여, RAW264.7에서 분리한 유전자 DNA를 FeSO₄-H₂O₂ 시스템에서 생성된 OH에 노출시켰다. 도 35 내지 37에 도시한 바와 같이, DNA 전기영동을 1% 아가로스 겔에서 수행한 후, 20 분 동안 배양하여 대조구에서 유전자 DNA가 명확히 파괴되었다. 이와는 반대로, 반응 혼합물에 화합물 2의 첨가함으로써 DNA 손상이 방지되었다. 모든 농도의 화합물 2에서 블랭크 구와 비교하여 겔 중의 동일한 위치에서 DNA 손상이 저해되었다. 몇몇 DNA 산화 저해제가 착물 형성을 통해 DNA 분자를 보호할 수 있다고 알려진 바 있다. 그러나, 이는 DNA 산화의 보호를 위한 필요조건이 아니다. DNA가 ROS-매개 산화적 손상의 또다른 주요한 민감한 생-목표(bio-target)이기 때문에, 이러한 결과는 산화적 손상에 대한 화합물 2의 보호 효과를 설명해 준다. 따라서, DNA 산화 연구는 화합물 2에 의한 효과적인 OH 소거 가능성을 불러일으키고, 이는 그들의 단백질 및 지질 산화 저해 효과에서 관찰된 바와 궤를 같이한다.

<109> 1.16. 화합물 2의 구조적-항산화 활성 관계

<110> 1H 및 13C에 따르면, 화합물 2는 일곱 개의 메틸기, 28개의 메틸렌 단위(두 개의 O-함유 메틸렌), 네 개의 방향족 탄소, 다섯 개의 메틴, 두 개의 4급 탄소 및 두 개의 카보닐 탄소를 갖는 것으로 나타났다.

<111> 이들 화합물 2에 대한 라디칼 소거 메커니즘을 밝히기 위해, 본 발명자들은 종래 보고된 비교 프탈레이트 유도체에 대해 조사하였다. 결과는 프탈레이트 유도체의 4-하이드록실화 유도체로의 페닐 고리 하이드록실화가 정상 환경 조건하에서 가능할 것이고, 프탈레이트(DEP 및 DBP)의 하이드록실화 유도체는 에스트로겐 수용체(ER) 결합 분석으로 에스트로겐 활성을 나타냈다는 사실을 보여주었다. 프탈레이트-4OH의 이러한 에스트로겐 활성은 구조적-활성 관계 연구에 의해 지지되었고, 이는 ER 리간드가 그들의 구조내에 통상적으로 페놀성 고리를 함유한다는 사실을 보여준다(Fang et al., 2001). 최근의 많은 보고로부터 그들의 구조 내의 페놀성 고리는 항산화 활성 및 자유 라디칼 소거 활성을 갖는다. 본 발명에서, 화합물 2는 높은 항산화 활성 및 자유 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 이는 불안정한 측장쇄(일곱 개의 메틸기, 28개의 메틸렌 단위(두 개의 O-함유 메틸렌), 네 개의 방향족 탄소, 다섯 개의 메틴 및 두 개의 카보닐 탄소)가 하이드록실화를 보다 손쉽게 하기 때문이다. 이는 항산화 활성과 자유 라디칼 소거 활성에 대한 구조적-활성 관계를 보여주는 최초의 보고이다.

<112> 실험예 2: 본 발명 화합물 2의 베타-시크리타제 저해 활성

<113> 2.1. 베타-시크리타제 저해 분석

<114> 변형된 공급 방법에 따라 분석을 수행하였다. 간략하게,

<115> The assay was carried out according to the supplied manual with modifications. Briefly, the mixture of 10 l of

<116> 10 % DMSO에 용해된 분석 완충제(50 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5) 10 L, BACE1 (1.0 U/ml) 10 L, 기질(50 mM 중탄산 암모늄 중의 750 nM Rh-EVNLDAEFK-Quencher) 10 L, 및 시료 10 L의 혼합물을 실온에서 60 분 동안 배양하였다. 혼합물을 530 nm에서 여기시키고, 590 nm에서의 방출광을 수집하였다. 하기 식에 따라 저해율을 얻었다:

<117>
$$\text{저해율(\%)} = [1 - (S - S_0) / (C - C_0)] \times 100\%,$$

<118> 여기서, C는 60 분 배양 후 대조구(효소, 10% DMSO, 및 기질)의 형광도이고, C₀는 시작시의 형광도이고, S는 60 분 배양 후 시험 시료(효소, 시료 용액 및 기질)의 형광도이고, S₀ 시험 시료의 시작시의 형광도이다. 모든

데이터는 중복 실험의 평균이다.

<119> 2.2. 화합물 2의 저해 패턴 측정

<120> 상이한 농도의 ACE 저해 화합물을 각각의 반응 혼합물에 가하였다. 상이한 농도의 기질로 효소 활성을 측정하였다. 저해제의 존재하에 베타-시크리타제 저해 패턴을 라인위버-버크 플롯(Lineweaver-Burk plots)에 의해 측정하였다.

<121> 상기의 실험으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

<122> 2.3. 화합물 2의 베타-시크리타제 저해 활성

<123> 노년층 치매의 가장 통상적인 원인인 알츠하이머 질환(AD)은 매년 2,000 명 이상이되고 있고, 이러한 숫자는 모집단의 연령에 따라 다음 수십년내에 증가할 것으로 여겨진다. AD는 아밀로이드 A β -펩타이드(A β)로 구성된 노화 플라크의 존재로 병인적으로 특징지워진 진행성 신경퇴화 질환이다. AD의 진전에 필수적인 단백질인 A β 의 생성은 아밀로이드 전구체 단백질(APP)의 분열에서 시작된다. 아밀로이드 가설을 기준으로 하여, 신경퇴화 과정은 APP의 비정상 진행에 의해 촉진된 일련의 사건을 포함한다고 말할 수 있고(Hardy et al., 1992), APP의 아밀로이드성 진행을 매개하는 β - 및 γ -시크리타제 효소는 Met670/Asp671에서 APP 중의 주요 약물 타겟으로 여겨지고 있는 반면, γ -시크리타제는 길이 중의 산 잔기에 의해 펩타이드의 C-말단을 분열시킨다(Dorrel, 2000). A β 42 펩타이드는 가장 흔하고 풍부하고, AD의 유도에 중요한 역할을 한다(Zohar et al., 2003).

<124> 베타-시크리타제는 아스파르트릭 프로테아제(aspartic protease)로서, BACE1 (β -위치 APP-분열 효소)로도 알려져 있다. 이 효소는 β -APP의 러미날 측에서 손쉽게 접근가능한 위치를 분열시키고, 그의 활성은 in vivo A β 펩타이드 생성에서 속도-제한적 단계이다(Vassar et al., 1999). 베타-시크리타제 활성은 신체의 세포 및 조직의 대부분에 존재한다(Haass et al., 1992). 최대 활성은 신경 조직 및 세포주에서 발견된다(Seubert et al., 1993; Zhao et al., 1996). 베타-시크리타제는 다양한 조직 및 세포주에 광범위하게 발현되나, 뇌 신경에서 보다 높은 수준으로 발현된다.

<125> BACE1 (β -시크리타제)는 AD의 세포외 아밀로이드 플라크에서 발견되는 아밀로이드 β -펩타이드 생성에 관여하는 주요 효소이다. 이것 및 다른 유전성 및 병인성 증거가 치료적 접근을 이끌고, 이는 BACE1 저해에 초점이 맞춰져 있다.

<126> 최근 들어, ~1.6nM의 IC₅₀을 갖는 b-시크리타제, OM99-1 및 OM99-2의 두 가지 전이-상태 상사 저해제를 포함하여 많은 합성 BACE1 저해제가 보고된 바 있다(Ghosh et al., 2001). 이들은 스웨디쉬 돌연변이의 b-시크리타제의 분열 위치에 대한 모델을 기준으로 하여 합성되었다. 그러나, 천연 발생 b-시크리타제 저해제에 대하여는 단지 몇가지 문헌만이 보고된 바 있다(Jeon et al., 2003; Park et al., 2004; Kwak et al., 2005). 본 발명의 화합물 2가 BACE1을 용량-의존적으로 저해하였으며, 라인위버-버크 플롯에서 기질과 비-길항적이었다. 저해 IC₅₀ 수치는 0.722, 0.392, and 1.12 mM이었다.

<127> 이러한 결과는 고리 4-하이드록실화 유도체로 프탈레이트 유도체의 페닐 고리 하이드록실화가 정상 환경 조건하에서 가능하고, 하이드록실화된 프탈레이트 유도체가 에스트로젠 수용체(ER) 결합 분석에 대해 에스트로젠성 활성을 나타냄을 지시한다. 프탈레이트-4OH의 이러한 에스트로젠성 활성은 구조적-활성 관계연구에 의해 지지되며, 이는 ER 리간드가 통상적으로 그들의 구조내에 페놀성 고리를 함유함을 보여준다(Fang et al., 2001). 그들 구조내의 친수성 페놀 하이드록실기는 최근의 많은 연구에서 BACE1-저해 활성을 갖는다.

<128> 면역 반응은 AD에서 매우 활성이며, 질환에 다소 기여할 것이다. 뇌 면역 세포는 플라크와 트랭글에 반응하고, 해결하기 어려운 시도이다(Jeon et al., 2003). 물질 라디칼을 소화시키기 위한 노력 과정에서, 이는 2차 손상을 야기시킨다(Qin et al., 2002). 본 발명의 화합물 2는 BACE1을 저해시킬 뿐만 아니라 반응성 산소종을 억제한다. 이들 유도체는 예방에 사용가능하고, 비-펩타이드성 저해제의 개발에 유용할 것이다.

<129> 실험예 3: 본 발명 화합물 2의 항고혈압 효과

<130> 3.1. ACE 저해 활성 측정

<131> 약간 변형된 쿠쉬먼 앤드 쉐웅(Cushman and Cheung) (1971)의 방법의 개선 버전을 이용하여 ACE 저해 활성 분성을 수행하였다. 반응 혼합물은 기질로서 5 mM Hip-His-Leu, 0.3 M NaCl 및 50 mM 붕산 나트륨 완충제(pH 8.3) 중의 5 μ L ACE를 함유하였다. 시료(50 μ L)를 상기의 반응 혼합물(50 μ L)에 가하고, 0.5 M NaCl를 함유한 8.3 mM Hip-His-Leu (150 μ)와 혼합하였다. 37°C에서 60 분 동안 배양한 후, 0.1 N HCl (250 μ L)를 가하여 추

가의 반응을 정지시켰다. 생성된 마뇨산(hippuric acid)을 아세트산 나트륨 1.5 mL를 가하여 추출하였다. 원심분리(800 Xg, 15 분) 후, 상부층 1 mL를 유리 튜브에 옮기고, 실온에서 2 시간 동안 진공으로 증발시켰다. 마뇨산을 증류수 30 mL에 재용해시키고, 분광측색계(Model U-3210, Hitachi Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 228 nm에서 흡수도를 측정하였다. IC₅₀ 수치를 50% ACE 저해 활성을 나타내는데 필요한 저해제의 농도로서 정의하였다

<132>

3.2. ACE 저해 패턴 측정

<133>

약간 변형된 김 등(Kim et al)의 방법(2001)에 따라 상이한 농도의 ACE 저해 화합물 2를 각각의 반응 혼합물에 가하였다. 상이한 농도의 기질을 이용하여 효소 활성을 측정하였다. 저해제 존재하의 ACE I 저해 패턴을 라인 위버-버크 플롯에 의해 측정하였다.

<134>

상기의 실험으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

<135>

3.4. 본 발명 화합물 2의 항고혈압 효과

<136>

펩타이드의 ACE-저해 활성 측정을 효소 공급원인 래빗 폐 아세톤 분말을 이용하여 수행하였다 이 제제는 고가의 정제 ACE를 대체하고, 유사한 결과를 나타낸다고 보고된 바 있다. 원래 기재된 방법에는 래빗 폐 분말을 질산 칼륨 완충제에서 추출하였다.

<137>

고혈압은 가장 흔한 심혈관 질환 중 하나이다. 이는 모든 성인의 15-20%에 나타나는 유행성 비율의 세계적인 문제점이다. 이는 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색 및 말기 신장 질환에 있어 고 위험 인자를 보유하기 때문에 가장 일반적인 심각한 만성 건강 질병이다.

<138>

엔지오텐신 I 전환 효소(ACE, EC 3. 4. 15. 1)는 혈압을 조절하는데 있어 중요한 생리학적 역할을 한다(Skeggs et al., 1957). ACE는 일군의 아연 프로테아제에 속하고, 폐의 혈관 내비 라이닝에 위치한다. 이는 다양한 올리고펩타이드의 C-말단으로부터 디펩타이드를 분열시키는 펩타이드 분해효소로서 작용하고(Curtiss et al., 1978; Yang et al., 1971), 엔지오텐신 I의 가수분해를 촉진시켜 강력한 혈관수축제인 엔지오텐신 II를 생성시키고, 혈압강하 작용을 갖는 브래디키닌을 불활성화시킨다. 카프로프릴의 발견에 따라, 수백가지의 강력한 ACE 저해제가 합성된 바 있고, 36 가지 이상이 임상적으로 시험된 바 있다. 12 가지 이상의 ACE 저해제가 인간의 본태성 고혈압 및 심장 기증장어의 치료에 널리 사용되고 있으며, 이들은 알라세프릴, 베나제프릴, 캅토프릴, 실라자프릴, 에날라프릴, 포시노프릴, 리시노프릴, 모엑시프릴, 페린도프릴, 퀴나프릴, 라미프릴, 탄돌라프릴 및 조페노프릴을 포함한다(Ondetti et al., 1977; Patchett et al., 1980).

<139>

천연 공급원에 있어서, 효소 가수분해에 의한 식품 단백질 유래 다양한 펩타이드가 광범위하게 연구되고 있다. 고혈압이 명백하게 식품 성분과 관련이 있기 때문에, 고혈압을 조절하는 항고혈압 펩타이드는 항고혈압 펩타이드 모티프의 존재와 연관이 있을 것이다. 그러나, ACE 저해제를 기재로한 천연 생성물에 대한 정보는 적은 실정이다.

<140>

ACE는 상이한 생리적 기능을 갖는 두 개의 효소적으로 활성인 (N- 및 C-) 영역으로 구성되어 있다. 현 세대의 ACE 저해제와 관련된 좋지않은 약리 효과는 부적절한 영역-선택성으로부터 일어나는 것으로 여겨진다. 다양한 저해제의 복합체 중 ACE의 X-선 구조 결정은 개선된 제약학적 프로파일을 갖는 많은 영역-선택적 저해제의 단백질 구조-기준 디자인에 대한 길을 닦아 놓았다.

<141>

본 발명의 주요한 발견은 ACE 저해제가 브래디키닌 대 인간 ACE의 엔지오텐신 I 결합 위치에 대한 상이한 선택성을 갖는다는 점이다. 본 발명에서는 ACE 저해제의 in vivo에서 ACE 결합 위치에 대한 선택성을 최초로 비교하였다. 연구된 ACE 저해제 중, 페린도프릴라트가 브래디키닌 결합 위치 대 엔지오텐신 I 결합 위치에 대한 가장 큰 친화력을 가진다. ACE는 난드 C-말단으로 알려진 두 가지 기능적 활성 영역을 가져서 직렬의 유전자 복제를 가져온다(Wei et al., 1991, 1992). 이들 두 가지 영역이 in vitro에서 비교적 넓은 기질 특이성, 예를 들어 엔지오텐신 I 및 브래디키닌을 분열시키는 능력을 나타냄에도 불구하고, 두 가지 활성 위치 사이를 차별화시키는 생화학적 특징이 존재하는데, 예를 들어, 혈액조절 펩타이드 N-아세틴-세틸아스파르트릴-리실-프롤린(AcSDKP) 및 엔지오텐신 1-7이 N-말단 영역에서 선택적으로 분열된다(Dive et al., 1999).

<142>

본 발명에서는, 본 발명의 화합물 2를 분리하고, ACE 저해 효과를 조사하였다. 본 발명 화합물 2는 우수한 ACE 효소 저해 활성을 나타내었다.

<143>

3.5. ACE 저해 패턴의 측정

- <144> 본 발명 화합물 2의 ACE 저해 패턴을 라인위버-버크 플롯에 의해 조사하였고, 길항적임을 밝혀냈다. 기질과 ACE 활성 위치 사이의 상호작용을 위한 결합 모델은 온데티와 쿠쉬만(Ondetti and Cushman)(1982)에 의해 제안되었다. C-말단 트리펩타이드 잔기는 ACE 활성 위치에서 세 개의 기질과 상호작용할 것이다. ACE는 바람직한 기질 이거나 C-말단의 세 위치에서 소수성 아미노산 잔기를 함유하는 길항적 저해제이다(Maruyama et al., 1987). 길항적 저해제는 종종 구조적 유사성으로 인해 반응이 저해되는 기질과 어떤 면에서 밀접하게 유사하며, 이들은 효소에 대해 동일한 결합-위치에 대해 길항적이다. 효소-결합 저해제는 적절한 반응기가 결여되어 있거나, 효소의 촉매적-위치 또는 일어나는 반응에 대한 다른 잠재적인 기질과 관련하여 부적절한 위치에 유지된다. 각각의 경우, 데드-엔드 복합체가 형성되고, 저해제는 효소로부터 분리되어 특정 효소 분자에서 반응이 일어나기 전에 기질 분자로 대체되어야 한다.
- <145> 본 발명에 있어서, 본 발명의 화합물 2는 하나의 페닐 고리와 두 개의 O-함유 메틸렌을 함유하기 때문에, His-Leu 기질 결합에 작용하는 능력이 증가되었다. 이러한 ACE 활성 위치와의 구조적 상호작용은 본 발명의 화합물 2가 경쟁력있는 저해제라는 사실을 제시한다. 경쟁력있는 저해제의 효과는 저해 농도, 기질 농도, 기질의 상대 친화도 및 효소에 대한 저해제에 의존한다.
- <146> 실험예 4: 본 발명 화합물 2의 티로시나제 저해 효과
- <147> 4.1. 티로시나제 효소 저해 분석
- <148> 450 nm에서 도파크롬 형성물을 분광측색 측정함으로써 버섯 티로시나제의 저해 효과를 측정하였다.
- <149> 티로시나제 저해 분석에 L-티로신을 기질로 사용하고, 변형된 고바야시 등(Kobayashi et al.)(1995)의 방법에 따라 티로시나제 저해 활성을 측정하였다. 간략하게, 질산 나트륨 완충제 용액(pH 6.8) 0.5 mL, 질산 나트륨 완충제(0.3 mg/mL)에 용해된 L-티로신 0.5 mL 및 시료 용액(10% DMSO/DW에 용해됨) 0.45 mL를 완전하게 혼합하고, 30°C에서 10 분 동안 예비배양하였다. 이어서, 1000 units/ml 의 버섯 티로시나제 0.05 mL를 가하고, 10 분 동안 배양하였다. 최종적으로, 1 M 나트륨 아지드 0.1 mL를 가하여 반응을 중지시키고, 배리안 UV-가시광선 리딩 분광측색계(Varian UV-Visible recording spectrophotometer)(Cary 1C, Australia)를 이용하여 475 nm에서 흡수도를 측정하였다. 10 % DMSO 용액으로 대조 시험을 수행하고, 시험에서 코직산을 양성 대조구로 이용하였다. 저해 효과를 하기 식에 따라 계산하였다:
- <150> 티로시나제 저해 활성 (%) = $[C-(S-CC)]/C \times 100 \%$
- <151> 여기서, C는 475 nm에서의 흡수도이고, CC는 475 nm에서 색 조절 흡수도이며, S는 동일한 파장에서 시료의 흡수도이다.
- <152> 4.2. 저해 패턴의 측정
- <153> 상기에 기재한 티로시나제 저해 분석에 따라 티로시나제에 대한 분리된 화합물 2의 저해 메커니즘을 분석하였다. 동력학 분석 동안 두 개의 상이한 농도의 저해제 및 상이한 농도의 티로시나제(0.75, 1.5, 및 3.0 mM)를 이용하였다. 티로시나제의 미카엘리스 상수(Michaelis constant; K_m) 및 최대 속도(V_{max})를 라인위버-버크 플롯에 의해 측정하였다.
- <154> 4.3. 세포 생존능 분석
- <155> MTT 분석을 이용하여 세포 생존능을 측정하였다. 세포를 웰 당 2.5×10^3 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 파종하였다. 24 시간 배양한 후, 배양 배지를 제거하고, 시험 물질을 함유한 신규 배지를 각 웰에 5배의 양으로 가하고, 세포 생존능을 MTT 용액을 이용하여 분석하였다. 대조구(100 %) 중의 생존 세포의 광학 밀도(OD) 수치에 대응하여 각 웰의 생존 세포 %를 계산하였다.
- <156> 4.4. 멜라닌 측정
- <157> 세포를 웰 당 2.5×10^3 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 파종하였다. 24 시간 배양한 후, 배지를 다양한 농도의 화합물 2를 함유한 신선 배지로 교환하였다. 48 시간 배양한 후, 부착 세포를 포스페이트 완충 함수(PBS)로 세척하고, 0.05% 트립신-EDTA를 이용하여 플레이트에서 떼어냈다. 세포를 시험 튜브에 수집하고, PBS로 2 회 세척하고, 트립탄 블루를 이용하여 세포수를 측정하였다. 이어서, 1 N NaOH: 10% DMSO 혼합물을 이용하여 80°C에서 1 시간 동안 2.5×10^3 세포로부터 멜라닌을 추출하였다. 멜라닌 gkafiddf ELISA를 이용하여 475 nm에서 측정하였다.

- <158> 상기의 실험으로 다음과 같은 결과를 얻었다.
- <159> 4.5. 본 발명 화합물 2의 티로시나제 저해 활성
- <160> 본 발명 화합물 2의 생물학적 정량은 본 발명 화합물 2가 L-티로신의 산화에 대해 강력한 버섯 저해 활성 및 용량 의존적 효과를 나타내었음을 보여주었다. 도 24는 본 발명의 해마 유래 화합물 2와 티로시나제 저해 활성에 대한 강력한 티로시나제 저해제인 코직산의 용량-의존적 반응을 예시한다. 최종 농도 0.0225, 0.1125, 0.225, and 0.45의 본 발명 화합물 2의 효소 저해 활성을 시험하여, IC₅₀ 0.624, 0.382 and 1.15 mM 로 티로시나제를 저해할 수 있음을 밝혀냈다. 이러한 결과는 본 발명 화합물 2가 티로시나제 활성을 나타냄을 보여준다. 코직산과의 비교를 통해 본 발명 화합물 2가 보다 큰 저해 활성을 가짐을 알 수 있다.
- <161> 따라서, 본 발명자들은 본 발명 화합물 2가 단백질의 구조를 변경시켜 효소를 저해할 수 있다는 사실을 밝혀냈다. 이로 인하여, 분자내 수소 결합을 형성시키기 위하여 본 발명 화합물 2를 효소와 손쉽게 반응시킬 수 있다. 티로시나제 억제제의 메카니즘이 설명되지 않았음에도 불구하고, 4-하이드록실화 프탈레이트 유도체인 본 발명 화합물 2는 많은 비-반응성 티로시나제 억제제(Nguyen et al., 2007)인 것이 밝혀졌다. 본 발명에서는, 본 발명 화합물 2의 티로시나제 억제 활성을 나타내었다.
- <162> 4.6. 세포 생존능 및 멜라닌 함량
- <163> B16F10 흑색종 세포에서 멜라닌 생성에 대한 본 발명 화합물 2의 효과를 배양 48 시간 후 평가하였다. 10 ug/ml 이상의 농도에서 멜라닌 합성이 현저하게 저해되었고, 조 추출물과 관련된 독성이 80ug/ml 이상의 농도에서 발견되었다. 이 결과는 본 발명의 화합물 2가 80 ug/ml 농도에서 멜라닌 활성 소거를 나타낼 수 있을 보여주었다. 인간 피부, 눈 및 모발의 색상의 원인이 되는 생물학적 색소의 편재하는 군인 멜라닌은 특정된 색소 세포에 의해 생성되어 멜라노좀이라 불리는 이산된 막-결합 유기 세포내에 침착된다(Riley, 2003). 멜라닌 생성은 티로신이 DOPA로 하이드록실화됨으로써 시작되고, DOPA는 도파퀴논으로 산화된다. 이러한 멜라닌 형성의 최초 및 속도-의존성 단계는 멜라닌 생성에 필요한 필수 효소인 티로시나제에 의해 매개된다(Iozumi et al., 1993; Pawelek and Korner, 1982). 이어서, 도파퀴논은 추가의 다단계 과정을 거쳐 두 가지 형태로 멜라닌 색소, 흑갈색 유멜라닌 및 황색 내지 적색 페오멜라닌이 생성된다. 인간 피부 색상은 멜라노좀의 크기, 모양 및 분포와 더불어 멜라닌 성분의 화학적 본질에 의존한다(Ito, 2003; Kushimoto et al., 2003; Ortonne, 2002). 멜라닌이 광 손상으로부터 피부를 보호하는 역할을 할지라고, 피부에 멜라닌의 생성의 및 축적의 증가는 후천 색소침착, 예를 들어 기미, 후염증성 흑피증 및 태양 반점을 포함한 많은 피부 질환을 야기시킨다(Urabe et al., 1998). 따라서, 다양한 피부-미백제가 멜라닌 생성을 조절하기 위해 개발된 바 있다. 멜라닌 생합성은 UV 노출을 피하고, 멜라노사이트 대사를 저해하고, 멜라노겐성 효소 또는 감수성 멜라노사이트 중의 멜라노좀의 흡수 및 분포를 조절하여 저해시킬 수 있다(Briganti et al., 2003; Kim et al., 2006; No et al., 2006; Seiberg et al., 2000).
- <164> 많은 멜라닌 생성 저해제가 보고된 바 있고, 화장품 첨가제로서 사용되고 있다. 그러나, 많은 것들이 효능에 제한이 있고, 배합 사용에 어려움이 있었다. 따라서, 화장품에 천연 생성물을 이용하는데 관심이 집중되고 있다(Baek et al., 2006; Kim et al., 2005; Lim et al., 2006). 따라서, 장기간 안정성 기록을 바탕으로 하여, 피부 색소 형성 이상의 치료와 관련한 해양 천연 의약의 평가 신규하고 보다 효과적인 치료를 위해 유익할 것이다. 따라서, 본 발명에서는 배양된 B16F10 흑색종 세포를 이용하여 멜라닌 생성에 대한 해마 유래 화합물 2의 효과를 시험하였다.
- <165> 실험예 5: 화합물 2의 항-염증성 효과
- <166> 5.1. 세포 NO 생성 분석
- <167> RAW264.7 세포를 페놀 레드 없는 DMEM을 이용하여 96-웰 플레이트에 배양하고, 1 시간 동안 전처리한 후, 시험 물질을 시험하였다. 1 ug/mL 최종 농도의 LPS를 가하여 세포 NO 생성을 유도하고, 48 시간 동안 배양하였다. 배양 후, NO²⁻(NO의 제1 안정 산화 생성물)를 함유한 50 uL의 조절 배지를 동일 부피의 그리스(Griess) 시약과 혼합하고, 15 분 동안 배양하였다(Green et al., 1982). 550 nm에서 혼합물의 흡수도를 ELISA 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하여 측정하였다
- <168> 5.2. 웨스턴 블롯팅
- <169> 표준 과정을 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. RAW264.7 세포를 4 °C에서 30 분 동안 50 mM Tris-HCl (pH

7.5), 0.4 % 노니데트(Nonidet) P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 2 mM 페닐메틸설포닐 플로오라이드, 80 g/mL 류페틴, 3 mM NaF 및 1 mM DTT를 함유한 용리 완충제에 용리시켰다. 핵 및 세포질 단백질을 분리 추출하기 위하여, 제조자의 지시에 따라 셀리틱(CellLytic)(상표명) NuCLEAR™ 추출 키트(Sigma-Aldrich Co., MO, USA)를 이용하였다. 세포 용리물(총 단백질 중 약 10 ug)을 4-20% 노벡스(Novex)(상표명) 그라디언트 겔(Invitrogen, USA)에 용해시키고, 니트로셀룰로오스 막으로 전기이동시키고, 10% 탈지 우유로 블로킹하였다. 제조자의 지시에 따라 화학발광(chemiluminescent) ECL 분석 키트(Amersham Pharmacia Biosciences, NJ, USA)로, 다양한 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA)를 이용하여 각각의 단백질을 검출하였다. LAS3000 형광 이미지 분석기를 이용하여 웨스턴 블롯 밴드를 시각화하고, 단백질 발현을 멀티 게이지(Multi Gauge) V3.0 소프트웨어(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)를 이용하여 정량화하였다.

<170> 상기와 같은 실험으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

<171> 5.3. 본 발명 화합물 2의 항-염증성 효과

<172> 우선, 본 발명의 화합물 2를 이들의 출발 물질과 더불어 마우스 대식세포인 RAW264.7에 대한 세포독성을 시험하였다. 결과를 기준으로 하여, 비-독성 농도를 추가의 세포-기반 연구에 이용하였다. 본 발명의 화합물 2로 처리한 RAW264.7 세포는 NO 합성의 감소를 보여주었다. 도 52에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화합물 2는 LPS-유도 NO 생성에 대해 용량-의존적 저해를 보여주었다. 더욱이, NO 저해에 대한 분명한 저해 효과가 있었다. 이는 새로운 화합물 $C_6H_4-(OOC-CH_2)_2$ 의 도입이 마우스 대식세포에서 LPS-유도 NO 생성을 저해하는데 긍정적 영향을 끼쳤음을 명백하게 제안하였다. 특히, NO 기능은 또한 내피의 전-염증 특성의 조절 및 염증의 위치로 염증성 세포 이주의 초기 단계에서 현저하다. 혈관 기능장애와 같은 질환은 손상된 NO 생성과 연관이 있는 반면, 폐혈성 쇼크, 뇌경색, 진성 당뇨병, 신경퇴화성 질환, 류마티스성 관절염 및 다른 염증성 증상은 NO 과잉생성과 연관이 있다. 따라서, 다음에서 본 발명의 화합물 2를 항염증성 연구에 이용하였다.

<173> 통상적으로 사용되는 COX 저해제 또는 NSAIDs는 비선택성이고, 이점에서 이들은 염증성 통증에 관여하여 팽윤되는 프로스타글란딘을 감소시킬 뿐만 아니라 위장관내 통합성을 유지시키는데 특히 필요한 생리학적 프로스타글란딘 형성을 저해한다(Lichtenberger et al., 2006). 다수의 선택적 COX-2 저해제가 다양한 동물 모델에서 항-염증성이라고 기재되어 있지만, 비선택적 COX 저해제와는 다르게, 이들은 위장관내 병리를 생성시키지 않는다. 선택적 COX-2 저해제는 다른 NSAIDs 보다 역효과가 적은 유효한 항-염증 약물인 것으로 입증된 바 있다. 최근 들어 COX-2는 선종성 용종(adenomatous polyposis), 전암증상 유전적 질환 및 결장암과 관련이 있다고 보여지고 있다(Grosch et al., 2006). 선택적 COX-2 저해제는 마우스 및 래트에서 실험적 선종성 용종 및 결장 암을 억제할 뿐만 아니라 무작위적인 치료적 시도에서 인간 선종성 용종을 감소시킨다(Eisinger et al., 2006). COX-2는 몇몇 가능한 메커니즘에 의해 암 성장을 야기시킨다. 암 덩어리 내의 기질 세포에서 COX 과잉발현은 새로운 혈관 형성(혈관신생)을 유도하고, 이는 종양 세포 성장을 위한 영양을 제공한다(Onguru et al., 2006). 또한, COX-2 과잉발현은 메탈로프로테이나제의 합성을 증가시키고, 이는 암 세포 전이를 촉진시킨다(Larkins et al., 2006). 또한, COX-2가 세포 증식을 촉진시킨다고 보고된 바 있다. 더욱이, iNOS 및 COX-2와 대립되는 본 발명의 화합물 2는 일반적으로 iNOS 및 COX-2를 유도하는데 필요한 전사인자인(Chan et al., 1997) NF- κ B 활성화의 강력한 저해제로서 작용하고(Bremner et al., 2002), a transcription factor required for the induction

<174> iNOS 및 COX-2에 대한 본 발명 화합물 2의 저해 효과를 추가로 확인하기 위하여, 웨스턴 실험에서 적절한 항체를 이용하여 LPS-처리 RAW264.7 세포의 단백질 수준을 분석하였다. 도 53, 55 및 57에 도시한 바와 같이, 각각 iNOS 및 COX-2 단백질 수준에서 세포 환원은 iNOS 및 COX-2의 발현이 염증 동안 LPS에 부가하여 다양한 자극제에 의해 조절된다는 점을 보여준다. iNOS 및 COX-2를 저해하는 본 발명의 화합물 2는 그들의 대응 집적적 아형, NOS-1 및 COX-2 또한 저해할 수 있다. 그러나, NOS-1 및 COX-2의 저해는 이들 효소가 정상 신체 조절에 불가결한 것이기 때문에 많은 부작용을 나타낸다. 대부분의 항-염증성 약물은 스테로이드성 호르몬 카테고리에 속하고, 최근의 NSAIDs는 염증성 질환의 치료에 있어 iNOS 및 COX-2 특이적 NSAIDs를 저해하지 못할 수 있다. 본 발명의 화합물 2가 그들의 집적적 아형을 저해시킬 수 있는지 여부를 시험하기 위해, 단백질 발현 수준을 평가하였다. 본 발명의 화합물 2는 비선택적 저해 효과를 나타내는 NOS-1 및 COX-2의 단백질 발현 수준을 저해하였다.

<175> 실험예 6: 통계적 분석

<176> 독립적 실험으로 모든 통계적 분석을 수행하고, 데이터를 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. P 수치 < 0.05가 유의적인 것으로 여겨졌다.

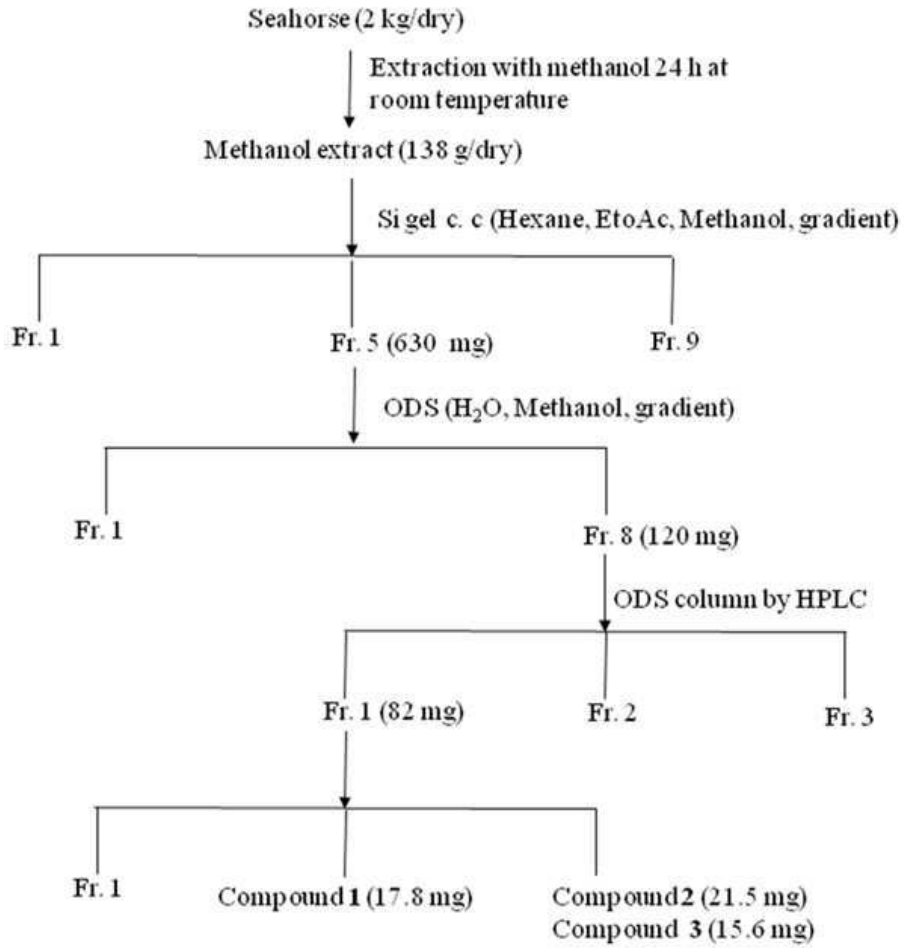
도면의 간단한 설명

- <177> 도 1은 본 발명 화합물 2의 제조 공정도이다.
- <178> 도 2는 CDCl_3 중 400 MHz에서 본 발명 화합물 2의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <179> 도 3은 CDCl_3 중 100 MHz에서 본 발명 화합물 2의 ^{13}C NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <180> 도 4는 본 발명 화합물 2의 DEPT 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <181> 도 5는 본 발명 화합물 2의 LREMIS 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <182> 도 6는 본 발명 화합물 2의 IR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <183> 도 7는 본 발명 화합물 2의 HMQC 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <184> 도 8는 본 발명 화합물 2의 HMBC 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <185> 도 9는 본 발명 화합물 2의 키 HMBS와 COSY 상호관계를 나타낸 도이다
- <186> 도 10은 FT 방법에 의해 측정된 리놀레산 에멀전 시스템에서 본 발명 화합물 2의 항산화 활성을 나타낸 도이다.
- <187> 도 11은 A: DPPH, B: 하이드록실, C:스퍼옥사이드 및 D:페록실 라디칼의 전형적인 ESR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <188> 도 12는 다양한 농도에서 본 발명 화합물 2의 DPPH 라디칼 소거 효과를 나타낸 도이다.
- <189> 도 13은 다양한 농도에서 본 발명 화합물 2의 하이드록실 라디칼 소거 효과를 나타낸 도이다.
- <190> 도 14는 다양한 농도에서 본 발명 화합물 2의 수퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거 효과를 나타낸 도이다.
- <191> 도 15는 다양한 농도에서 본 발명 화합물 2의 페록실 라디칼 소거 효과를 나타낸 도이다.
- <192> 도 16은 RWA 264.7 세포에 대한 본 발명 화합물 2의 세포양립성(cytocompatible) 효과를 나타낸 도이다.
- <193> 도 17은 MRC-5 세포에 대한 본 발명 화합물 2의 세포양립성(cytocompatible) 효과를 나타낸 도이다.
- <194> 도 18은 본 발명 화합물 2의 세포 라디칼 소거 활성을 나타내는 도이다.
- <195> 도 19는 산화-유도 HL60 세포에 대한 본 발명 화합물 2의 MPO 활성 분석을 나타낸 도이다.
- <196> 도 20은 DNA 산화에 대한 본 발명 화합물 2의 저해 잠재력을 나타낸 도이다.
- <197> 도 21은 본 발명 화합물 2에 의한 BACE1의 농도-의존성 저해를 나타낸 도이다.
- <198> 도 22는 라인위버-버크 플롯을 이용한 BACE1에 대한 본 발명 화합물 2의 저해 패턴 측정 결과를 나타낸 도로서, 화합물 2 농도는 0.48 mM (▼), 0.24 mM (○) 및 0 mM (●)이다.
- <199> 도 23은 다양한 농도에서 본 발명 화합물 2의 ACE 저해 활성을 나타낸 도이다.
- <200> 도 24는 라인위버-버크 플롯을 이용한 ACE에 대한 본 발명 화합물 2의 저해 패턴 측정 결과를 나타낸 도로서, 화합물 2 농도는 4.48 μM (▼), 24.2 μM (○) 및 0 μM (●)이다.
- <201> 도 25는 본 발명 화합물 2에 의한 티로시나제의 농도-의존성 저해를 나타낸 도이다.
- <202> 도 26은 라인위버-버크 플롯을 이용한 L-티로시나제에 대한 본 발명 화합물 2의 저해 패턴 측정 결과를 나타낸 도로서, 화합물 2 농도는 0.624 mM (▼), 0.312 mM (○) 및 0 mM (●)이다.
- <203> 도 27은 B16F10 세포에 대한 본 발명 화합물 2의 세포양립성 효과를 나타낸 도이다.
- <204> 도 28은 B16F10 흑색종 세포에서 배양된 멜라닌 합성에 대한 본 발명 화합물 2의 효과를 나타낸 도이다.
- <205> 도 29는 RAW264.7에서 NO 생성 저해에 대한 상이하게 치환된 본 발명 화합물 2의 효과를 나타낸 도이다.
- <206> 도 30은 본 발명 화합물 2에 의한 iNOS 및 COX-1 단백질 발현의 저해를 나타낸 도이다.

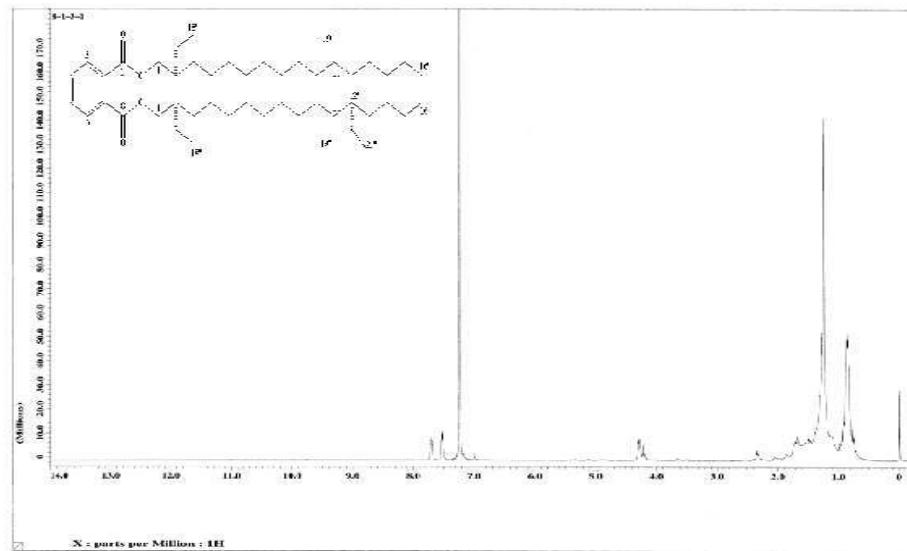
<207> 도 31은 본 발명 화합물 2에 의한 NOS-1 및 COX-2 단백질 발현의 저해를 나타낸 도이다.

도면

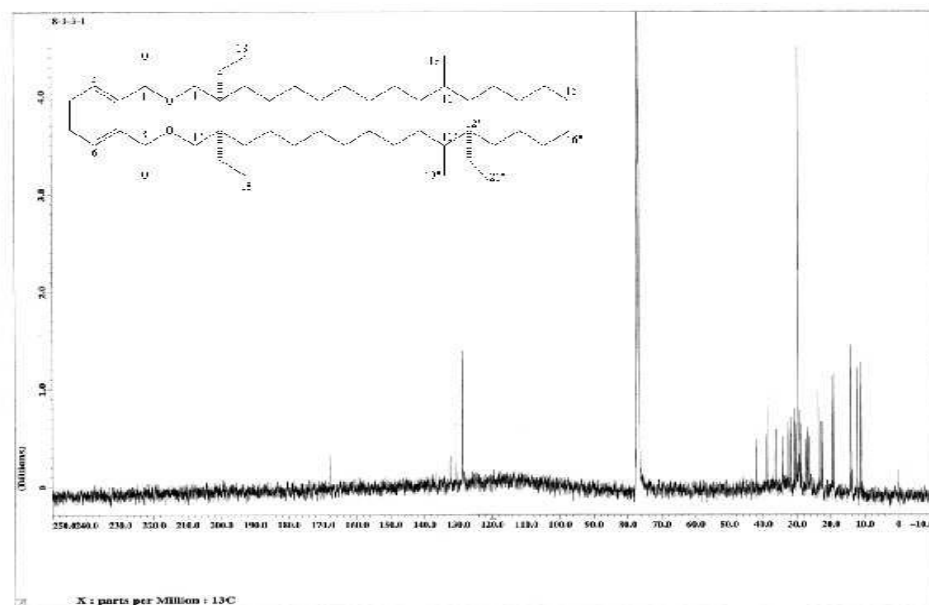
도면1



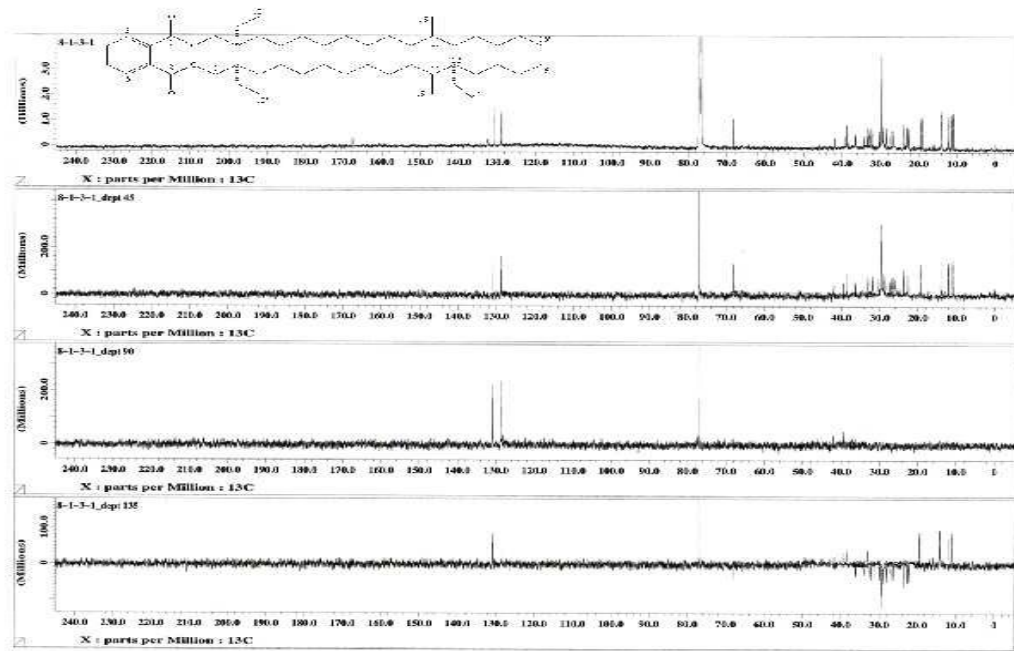
도면2



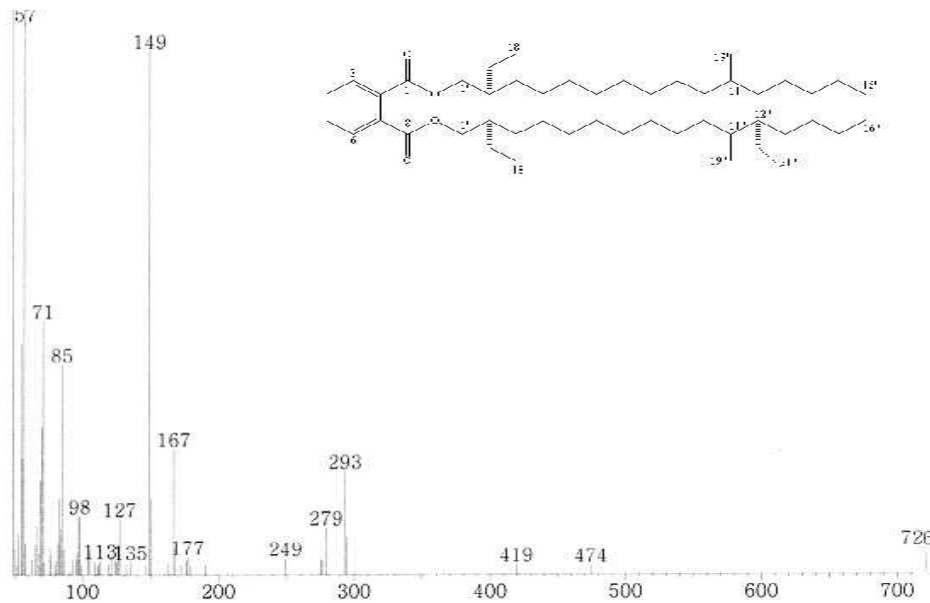
도면3



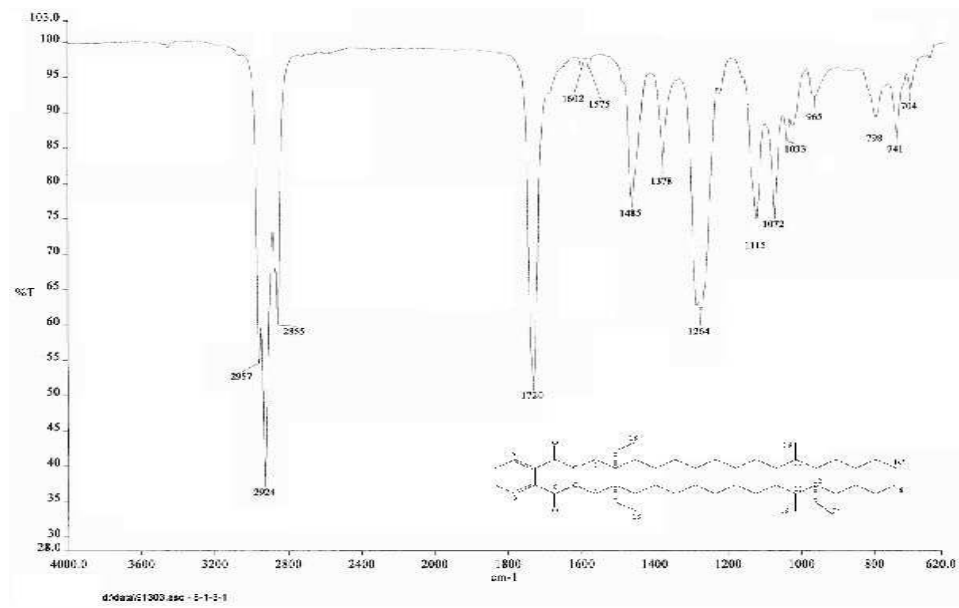
도면4



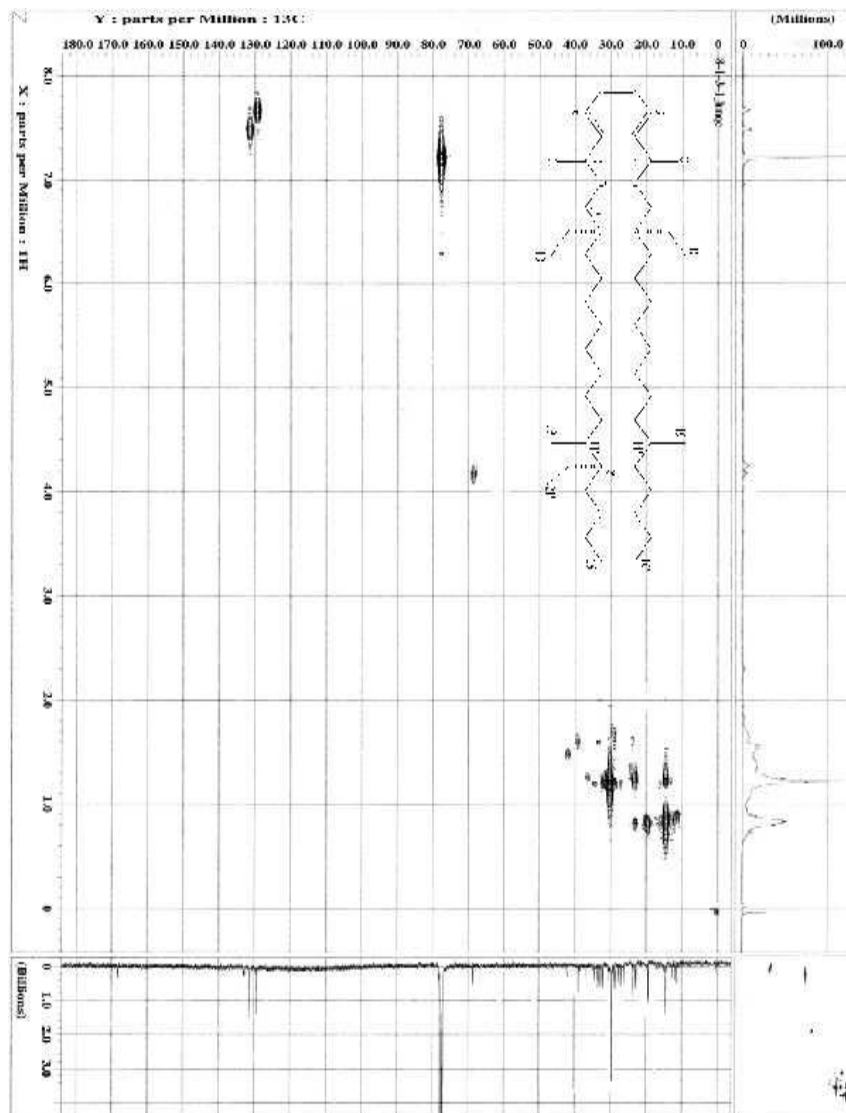
도면5



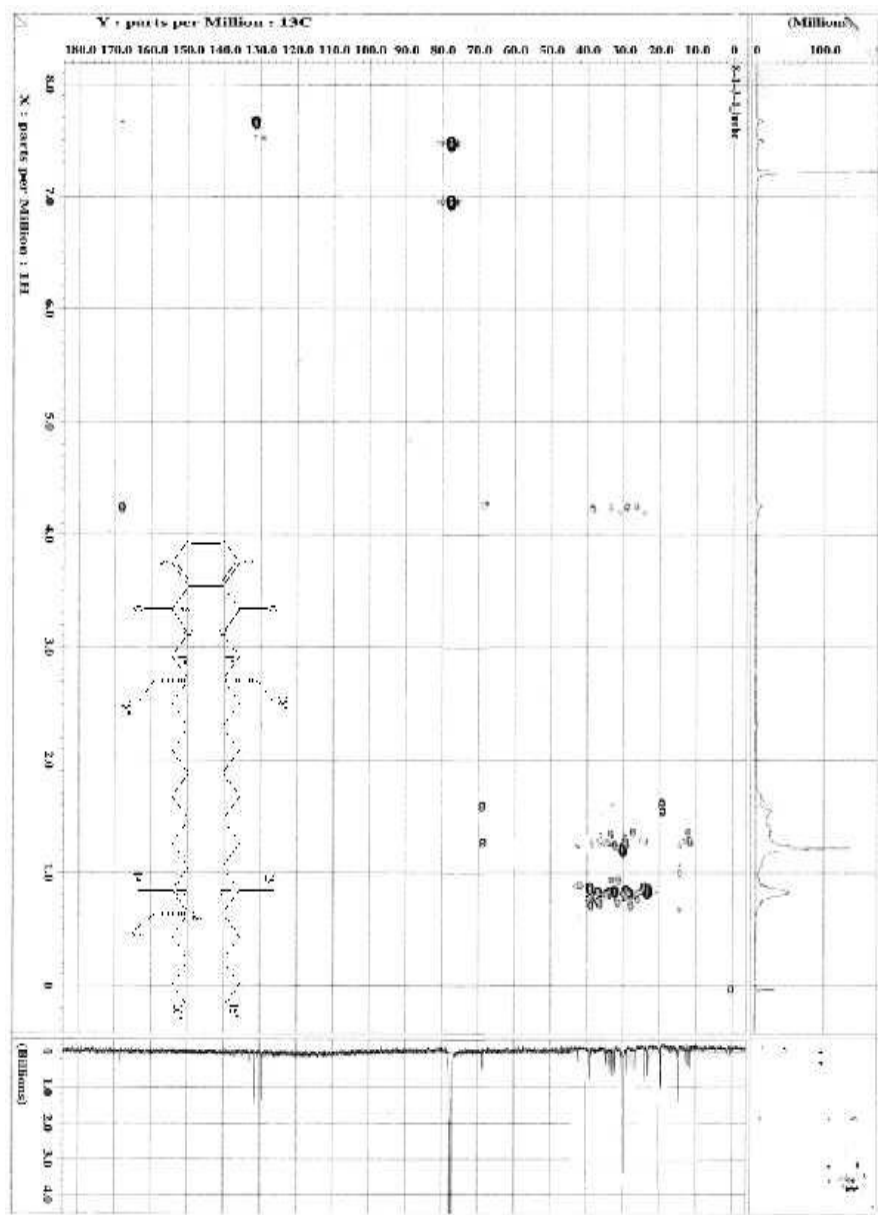
도면6



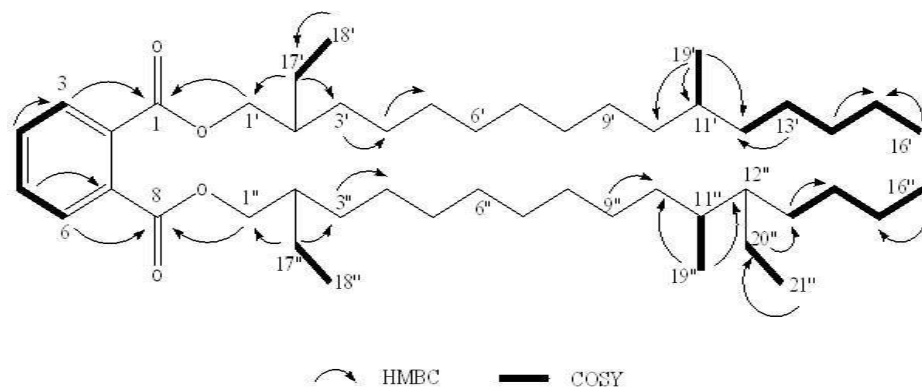
도면7



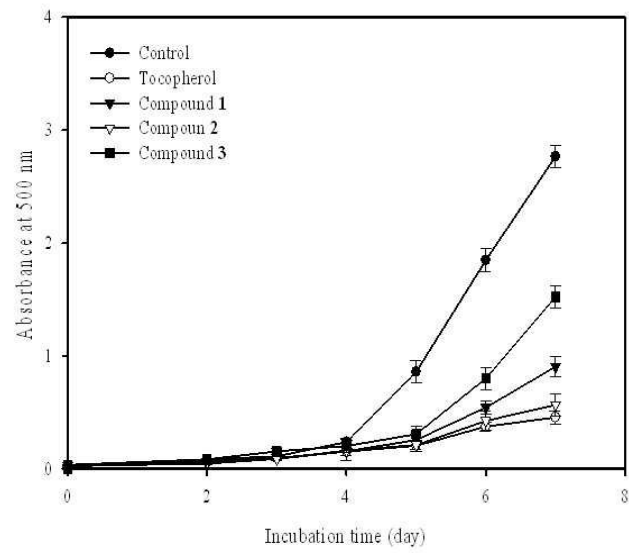
도면8



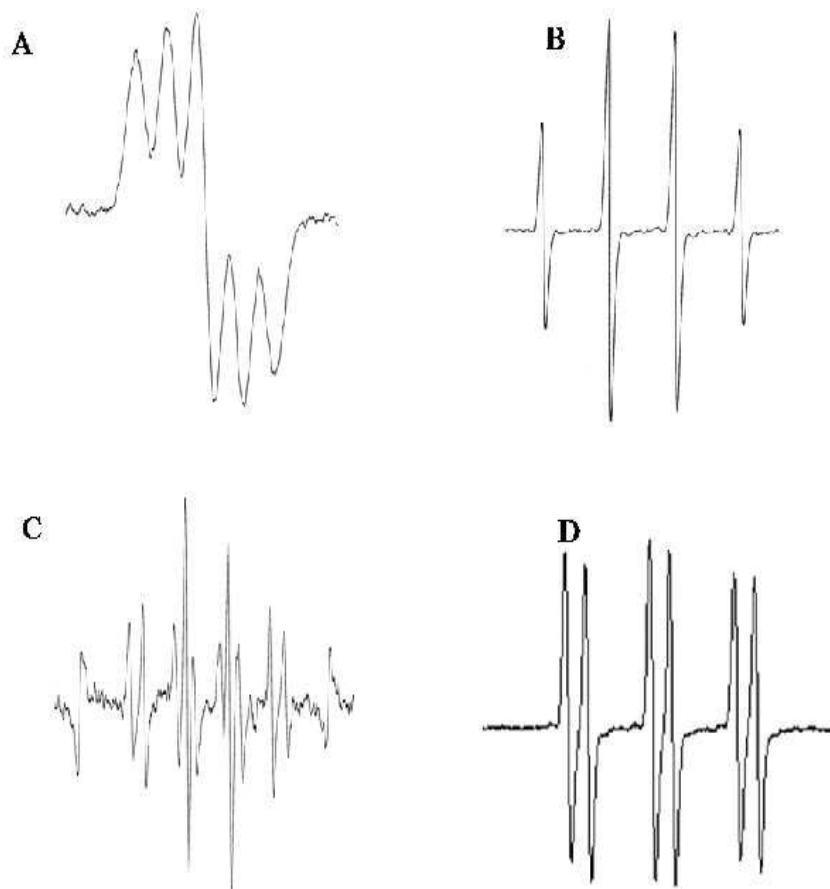
도면9



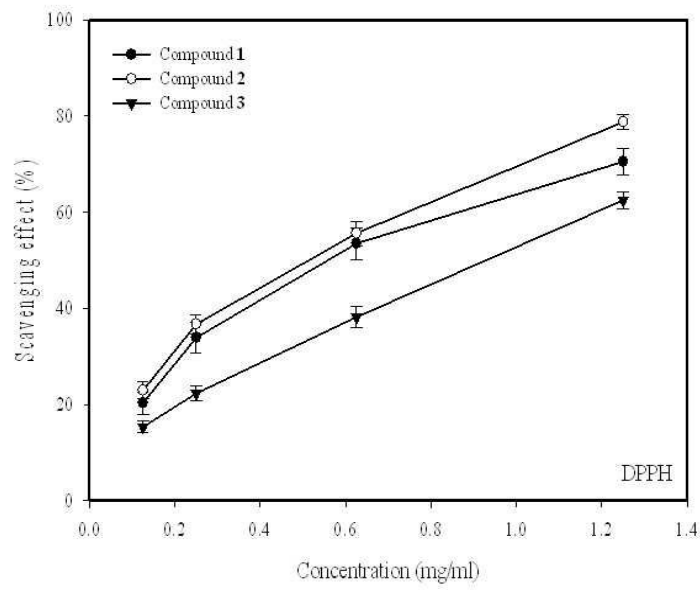
도면10



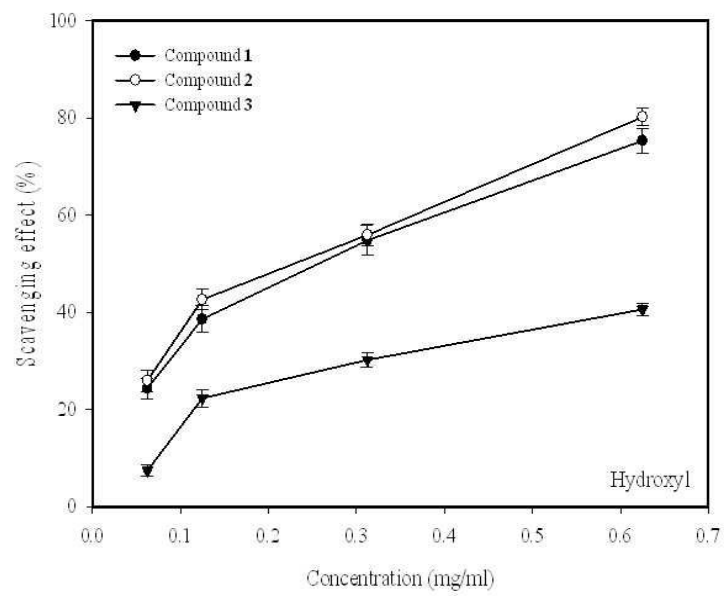
도면11



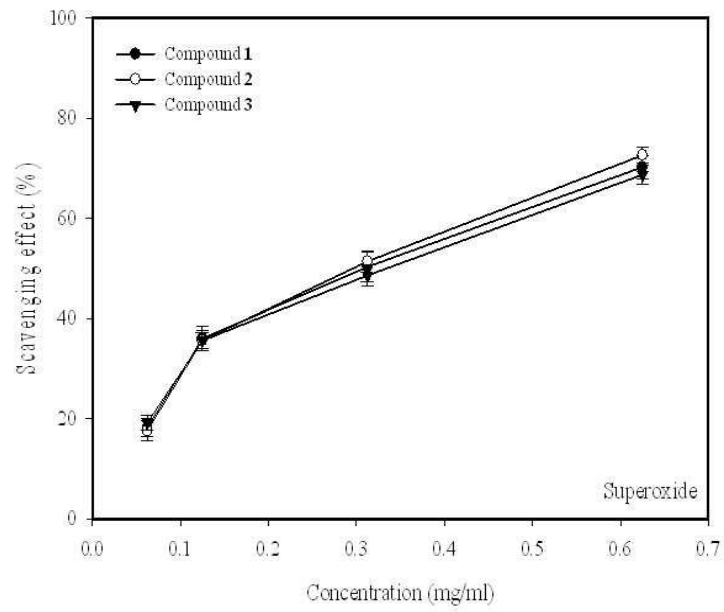
도면12



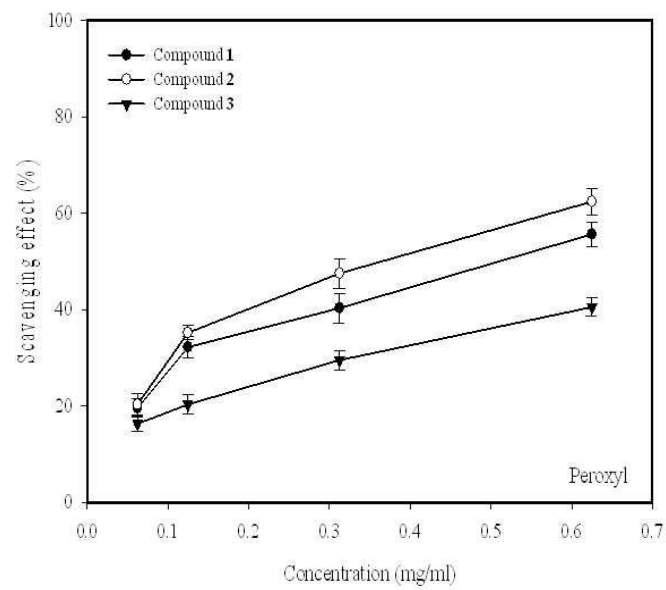
도면13



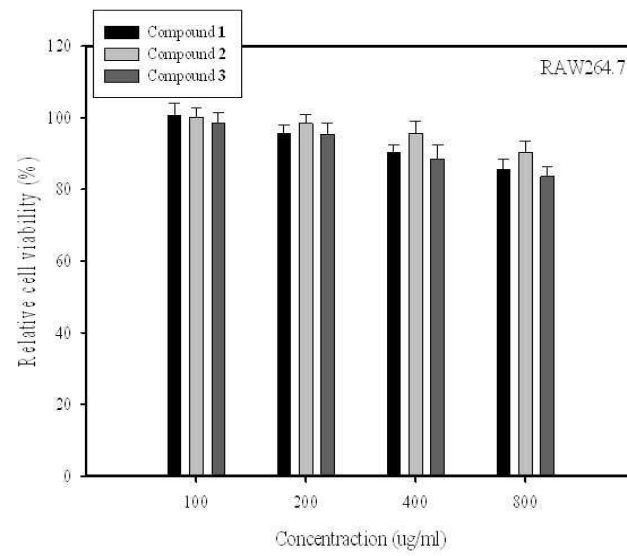
도면14



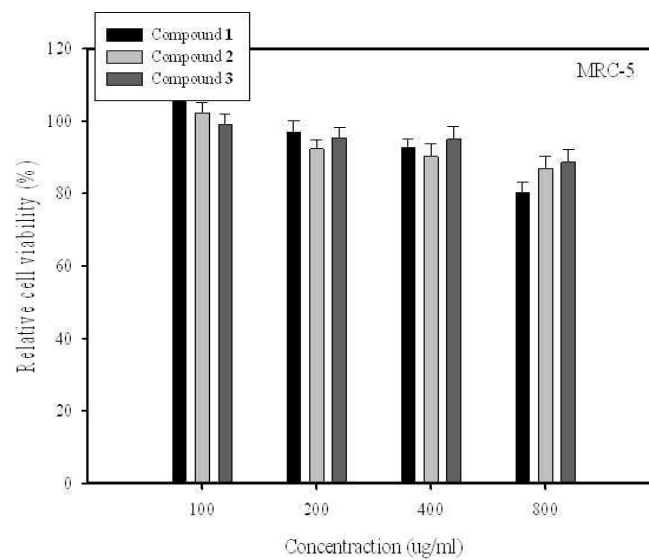
도면15



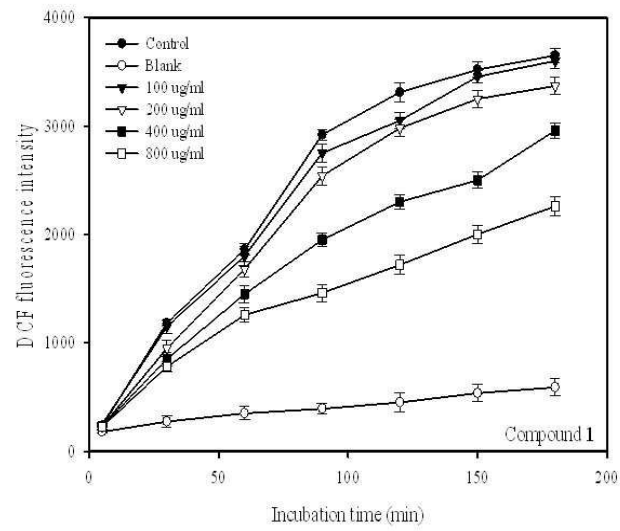
도면16



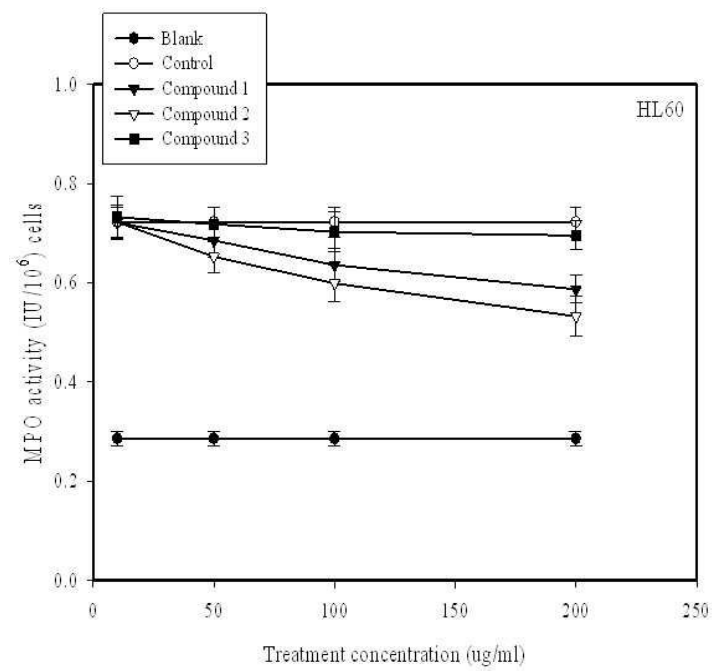
도면17



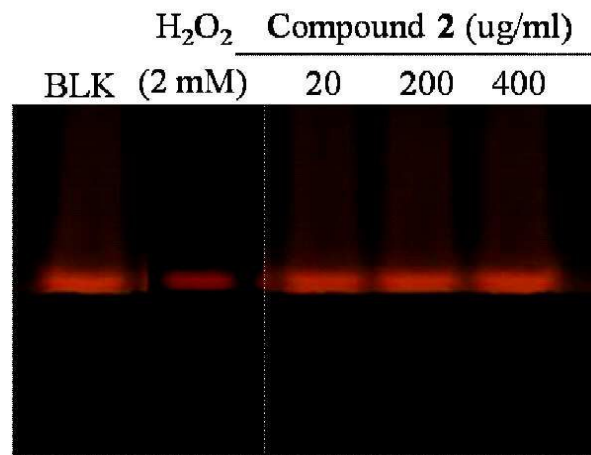
도면18



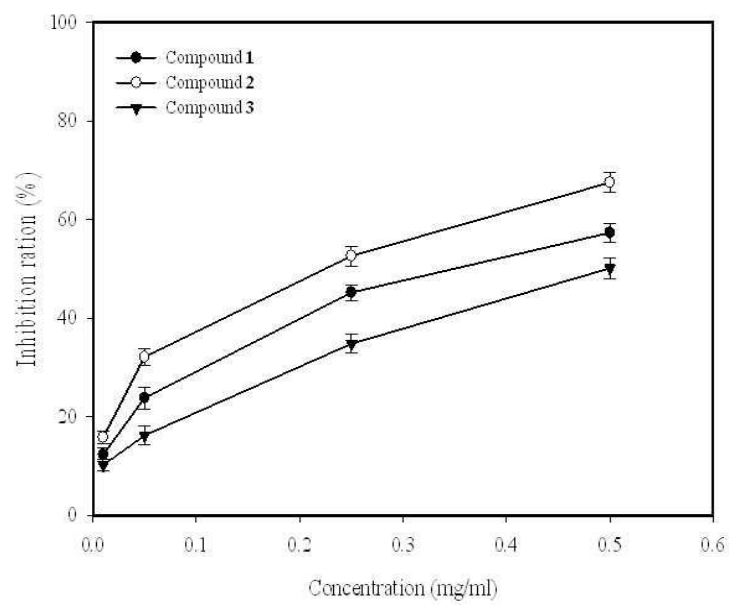
도면19



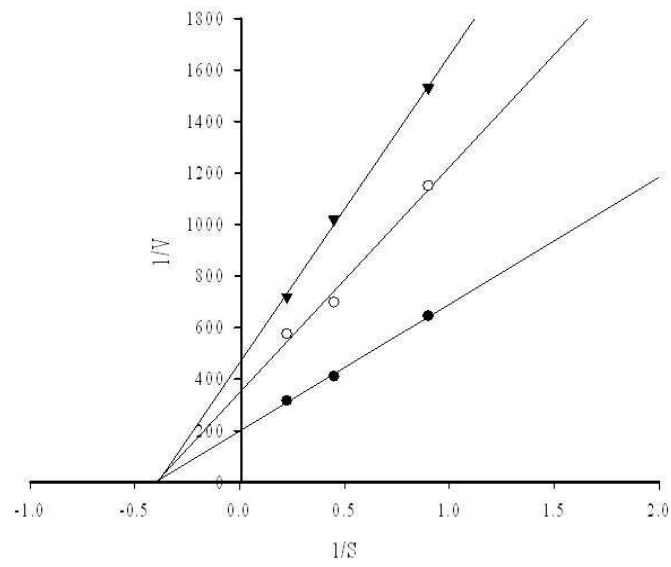
도면20



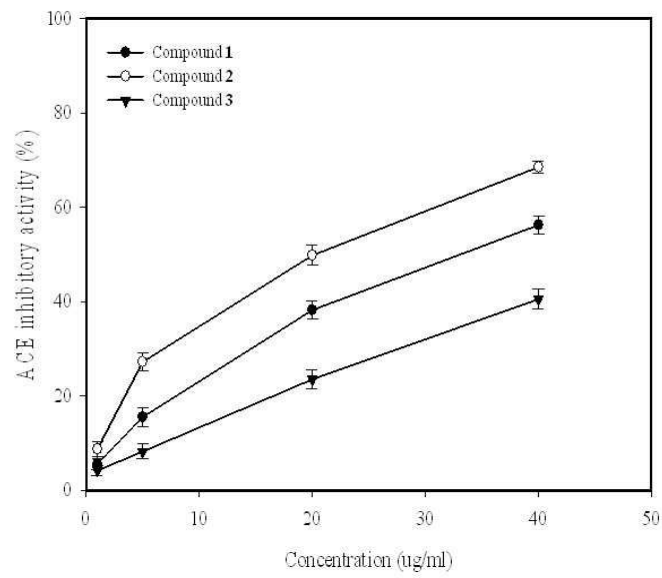
도면21



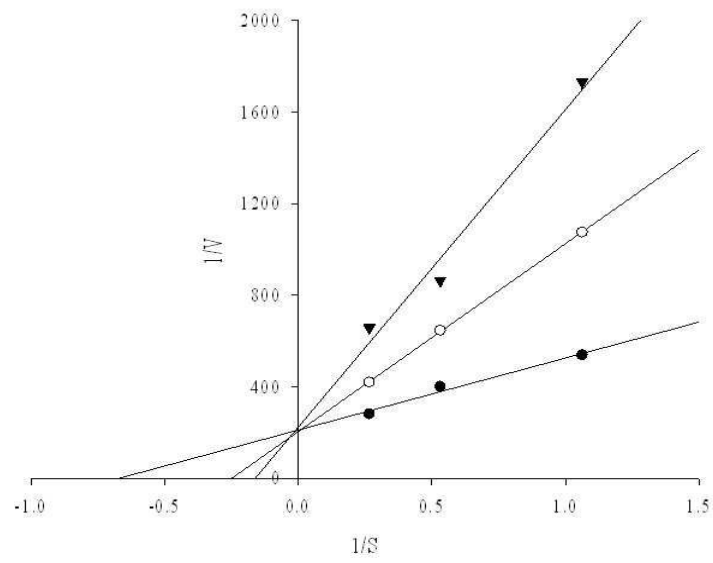
도면22



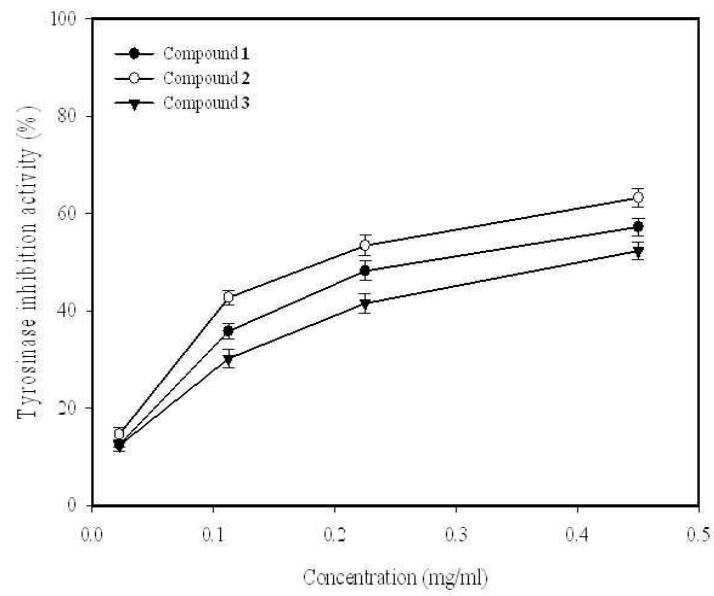
도면23



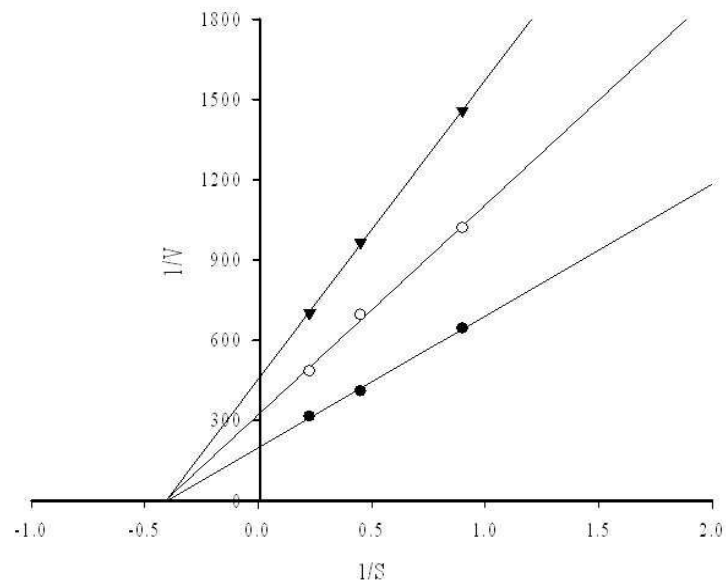
도면24



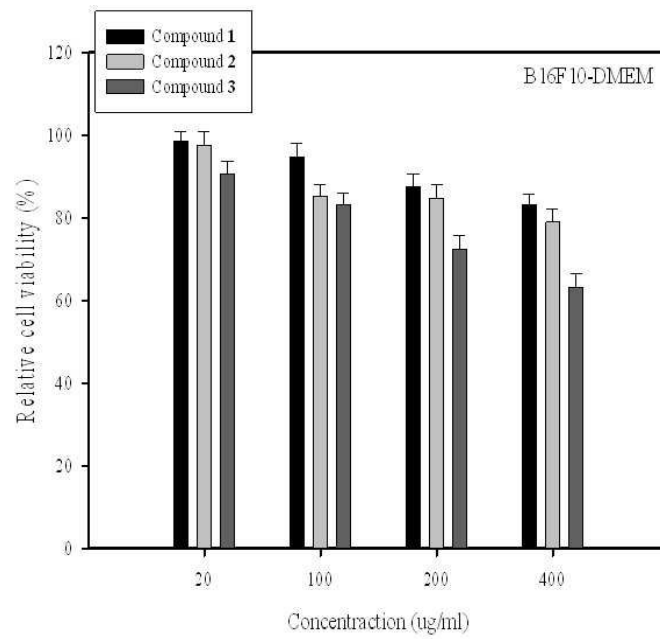
도면25



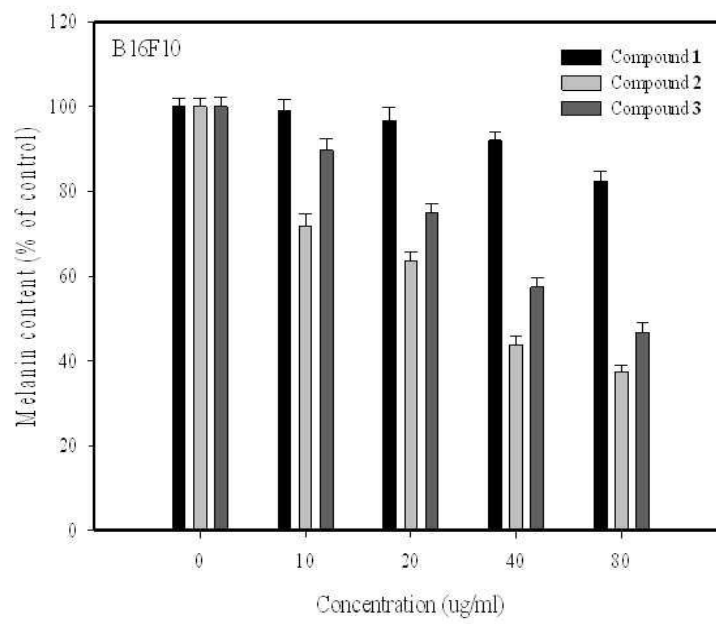
도면26



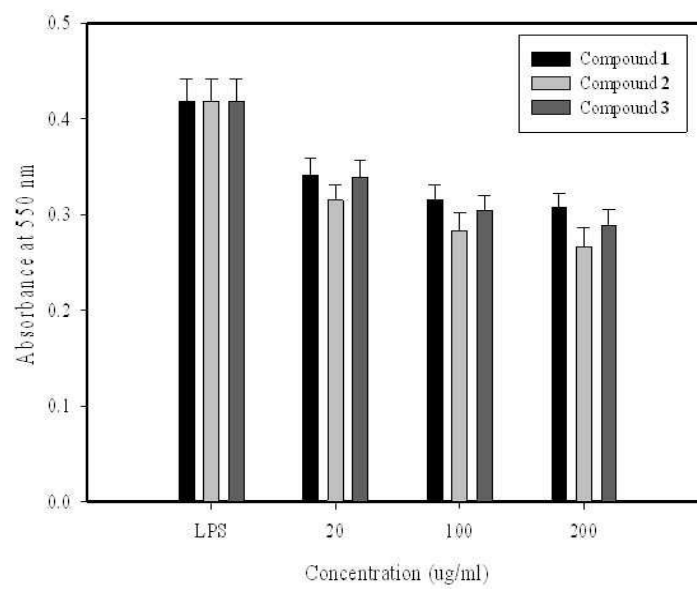
도면27



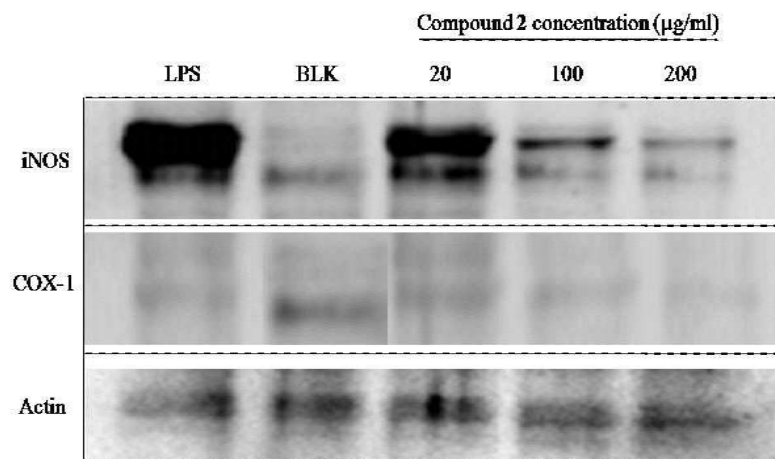
도면28



도면29



도면30



도면31

