(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0018706
(43) 공개일자 2014년02월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/122 (2006.01) *A61K 36/9066* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0085262
(22) 출원일자 2012년08월03일
심사청구일자 2012년08월03일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
한국식품연구원
경기도 성남시 분당구 안양판교로1201번길 62 (백현동)
(72) 발명자
오원근
광주 동구 남문로693번길 11, 202동 1302호 (학동, 학2마을아파트)
다오트롱투완
톤 비치, 민 튜안, 부반, 남딘, 베트남
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
백경업

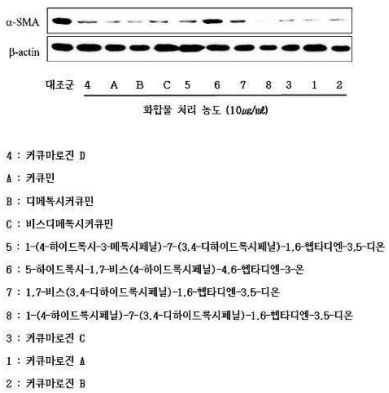
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체를 함유하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물을 함유하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 간조직 또는 간세포에서의 α-SMA와 TGF-β1의 발현을 억제하고 TNF-α의 양을 감소시키는 효과가 뛰어나 간염, 간섬유증, 간경화증 등의 간질환의 치료제 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

임성일

경기 용인시 수지구 성복2로 174, 101동 1401호 (성복동, 성동마을수지자이아파트)

이성훈

대전 유성구 지족로 362, 305동 302호 (지족동, 반석마을3단지호반베르디움아파트)

강건욱

서울 송파구 올림픽로 135, 242동 2803호 (잠실동, 리센츠아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

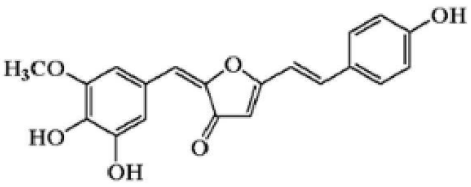
과제고유번호	610007032HD110
부처명	농림수산식품부
연구사업명	기능성식품개발 연구사업단 - 항당뇨 및 간기능개선
연구과제명	항당뇨 및 간기능 개선 후보물질의 분리 및 구조결정
기 여 율	1/1
주관기관	조선대학교
연구기간	2010.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

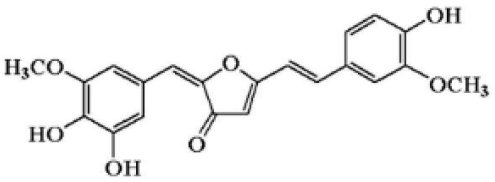
하기 화학식 1~5의 커큐마로진 A(curcumalogin A, 화합물 1), 커큐마로진 B(curcumalogin B, 화합물 2), 커큐마로진 C(curcumalogin C, 화합물 3), 커큐마로진 D(curcumalongin D, 화합물 4), 1-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 5), 5-하이드록시-1,7-비스(4-하이드록시페닐)-4,6-헵타디엔-3-온(5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one, 화합물 6), 1,7-비스(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 7) 및 1-(4-하이드록시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 8)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 커큐미노이드(curcuminoid) 유도체 화합물이 포함된 청국장 발효 울금(fermented *Curcuma longa* by natural fermented soybean) 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 간질환의 치료 또는 예방용 조성물.

[화학식 1]



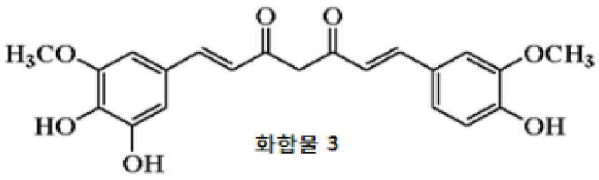
화합물 1

[화학식 2]



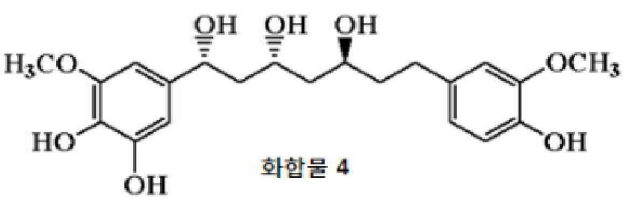
화합물 2

[화학식 3]



화합물 3

[화학식 4]

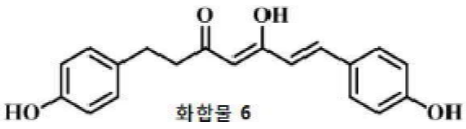


화합물 4

[화학식 5]



화합물 5 R_1=OH R_2=H R_3=OCH_3
화합물 7 R_1=R_3=OH R_2=H
화합물 8 R_1=OH R_2=R_3=H



화합물 6

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 청국장 발효 울금 추출물은, 청국장 발효 울금을 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조하는 것을 특징으로 하는 간질환의 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 청국장 발효 울금은 울금 100 중량부에 0.1~10 중량부의 청국장 분말 및 40~100 중량부의 물을 혼합한 혼합물을 발효하여 제조하는 것을 특징으로 하는 간질환의 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 4

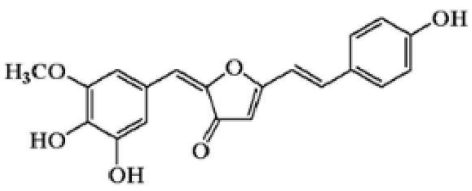
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 간질환은 간염, 간섬유증 및 간경화증으로 이루어진 군 중에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 간질환의 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 5

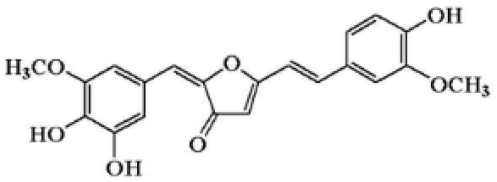
하기 화학식 1~5의 커큐마로진 A(curcumalogin A, 화합물 **1**), 커큐마로진 B(curcumalogin B, 화합물 **2**), 커큐마로진 C(curcumalogin C, 화합물 **3**), 커큐마로진 D(curcumalongin D, 화합물 **4**), 1-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **5**), 5-하이드록시-1,7-비스(4-하이드록시페닐)-4,6-헵타디엔-3-온(5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one, 화합물 **6**), 1,7-비스(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **7**) 및 1-(4-하이드록시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **8**)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 커큐미노이드(curcuminoid) 유도체 화합물이 포함된 청국장 발효 울금(fermented *Curcuma longa* by natural fermented soybean) 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[화학식 1]



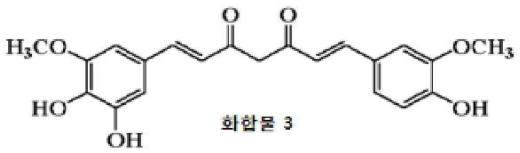
화합물 **1**

[화학식 2]



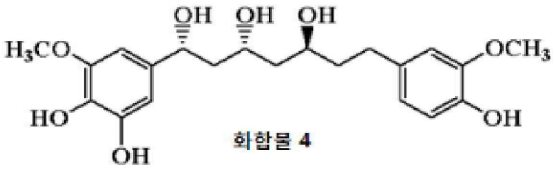
화합물 2

[화학식 3]



화합물 3

[화학식 4]



화합물 4

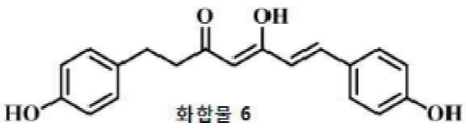
[화학식 5]



화합물 5 R_1=OH R_2=H R_3=OCH_3

화합물 7 R_1=R_3=OH R_2=H

화합물 8 R_1=OH R_2=R_3=H



화합물 6

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 발효 울금 추출물은 청국장 청국장 발효 울금을 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조하는 것을 특징으로 하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 청국장 발효 울금은 울금 100 중량부에 0.1~10 중량부의 청국장 분말 및 40~100 중량부의 물을 혼합한 혼합물을 발효하여 제조하는 것을 특징으로 하는 간질환의 치료 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

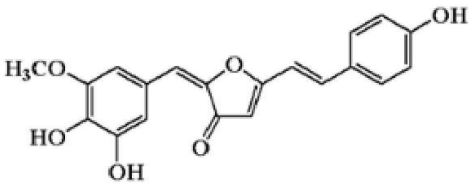
제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 간질환은 간염, 간섬유증 및 간경화증으로 이루어진 군 중에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 간질환의 치료 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

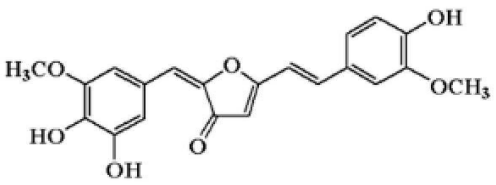
하기 화학식 1~5의 커큐마로진 A(curcumalogin A, 화합물 **1**), 커큐마로진 B(curcumalogin B, 화합물 **2**), 커큐마로진 C(curcumalogin C, 화합물 **3**), 커큐마로진 D(curcumalongin D, 화합물 **4**), 1-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **5**), 5-하이드록시-1,7-비스(4-하이드록시페닐)-4,6-헵타디엔-3-온(5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one, 화합물 **6**), 1,7-비스(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **7**) 및 1-(4-하이드록시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **8**)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 커큐미노이드(curcuminoid) 유도체 화합물을 함유하는 것을 특징으로 하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



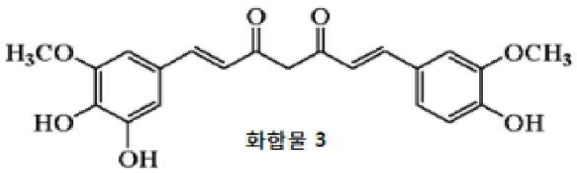
화합물 **1**

[화학식 2]



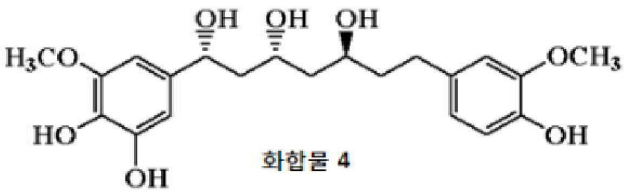
화합물 **2**

[화학식 3]



화합물 **3**

[화학식 4]



화합물 **4**

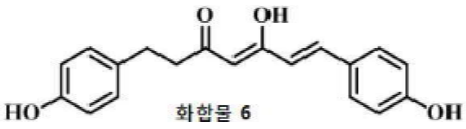
[화학식 5]



화합물 5 R_1=OH R_2=H R_3=OCH_3

화합물 7 R_1=R_3=OH R_2=H

화합물 8 R_1=OH R_2=R_3=H



화합물 6

청구항 10

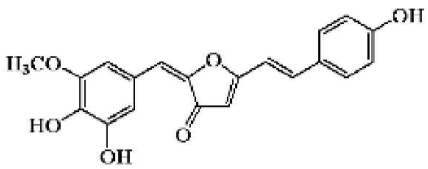
제9항에 있어서,

상기 간질환은 간염, 간섬유증 및 간경화증으로 이루어진 군 중에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 간질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 11

하기 화학식 1의 신규 화합물 커큐마로진 A(curcumalogin A).

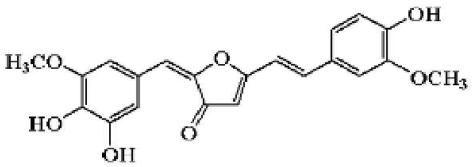
[화학식 1]



청구항 12

하기 화학식 2의 신규 화합물 커큐마로진 B(curcumalogin B).

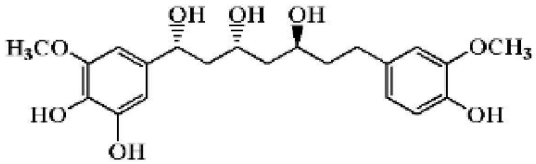
[화학식 2]



청구항 13

하기 화학식 4의 신규 화합물 커큐마로진 D(curcumalogin D).

[화학식 4]



명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체를 함유하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 간은 체외에서 들어온 물질 및 체내의 물질대사에서 중추적인 역할을 담당하며 지속적으로 효소반응 및 에너지 대사가 일어나는 생체기관이다. 현재 국내의 만성적 질병 중에서 간염, 간섬유증, 간경화증 및 간암이 차지하는 비중은 순환기계 질환과 함께 가장 높은 것으로 나타나고 있으며, 질병으로 인한 사망원인의 큰 비중을 차지하는 실정이다. 특히 선진국에 비하여 음주인구가 상대적으로 높고 폭음에 의한 간 손상 발생 원인이 높은만큼 이에 대한 관심도 지대한 편이다. 바이러스 감염이나 음주에 의한 지속적인 간조직의 손상은 간염으로 진행되며, 간염에서 간섬유증, 간섬유증에서 간경화증이나 간암으로 발전되는 질환의 특징을 가진다. 간조직의 생리적 특성 및 중요성을 고려할 때 간질환의 치료 또는 예방은 대단히 중요하며 간 조직 손상을 줄이고 궁극적으로 치료에 응용할 수 있는 치료 또는 예방용 조성물의 개발이 요구된다.

[0003] 간섬유증은 간염 등 만성 간질환에 수반되는 생체 적응반응의 일부로서 손상된 간 조직이 정상적인 간세포로 복구되는 것이 아니라 콜라겐과 같은 섬유조직으로 변형되는 상태를 칭한다. 간섬유증으로 인해 ECM(extracellular matrix, 세포외 기질)의 생성은 증가되지만 이에 대한 분해는 상대적으로 줄어드는 현상이 발생하고 심해지면 간경화증, 간부전이나 간암으로 진행된다. 간경화증은 만성적인 염증으로 인해 정상적인 간조직이 재생결절(regenerative nodules:작은 덩어리가 만들어지는 현상) 등의 섬유화 조직으로 바뀌어 간의 기능이 저하되는 것을 의미한다.

[0004] 간섬유증은 조직손상의 복구과정에서 발생하는 생체적응 반응이지만 생체 내 물질의 대사 및 담즙분비 등의 간의 고유기능을 전혀 수행할 수 없는 섬유조직으로 간이 대체된다는 점에서 간 기능의 저하가 필연적으로 나타난다. 그러나 현재까지는 간섬유증의 기전 자체가 명확하게 밝혀져 있지 않으므로 적당한 치료약물이 개발되지 않은 실정이다. 간섬유증이나 간경화증에서의 ECM의 과다생성은 간내 대식세포인 쿠퍼세포(Kupffer cell)가 활성화됨으로써 분비되는 활성산소종(reactive oxygen species), 성장인자(growth factors), 전섬유화 사이토카인(profibrogenic cytokines) 등에 의해 간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)의 활성화가 촉진되어 상기 활성화된 간성상세포에서 결합조직의 생성이 증가됨으로써 야기되는 것으로 알려져 있다.

[0005] 간성상세포는 1876년 쿠퍼(Kupffer)에 의해 발견되었고, 이토(Ito)에 의해 기술되었으며, 1971년 웨이크(Wake)에 의해 정립되었다. 간성상세포는 동모양혈관 내피세포와 간세포사이의 딧세강(space of Disse)에 위치한 세포로서 별 모양을 하고 있고, 이토 세포(Ito cell)라고도 하였다. 또한 비타민 A를 함유하고 있는 지방소적(lipid droplet)을 갖고 있어서 비타민 A 저장세포(vitamin A storing cell), 지방 저장세포(fat storing cell) 또는 동양구조유사 간 지질세포(perisinusoidal hepatic lipocyte) 등으로 여러 가지로 명명되었으나 1990년대 말에 공식용어로 간성상세포(hepatic stellate cell, HSC)라 결정되어 현재까지 사용되고 있다. 쿠퍼세포(대식세포)는 여러 독성물질에 의해 손상된 간세포를 식작용(phagocytosis)함으로써 활성화되거나 또는 독성물질에 의해 직접 활성화되어 TGF-β(transforming growth factor-β), PDGF(platelet-derived growth factor) 등의 사이토카인을 분비하며, 이들 사이토카인에 의해 쿠퍼세포 자기자신이 다시 활성화(autocrine)된다. 또한, 쿠퍼세포가 분비한 사이토카인들에 의해 간조직내 동모양혈관 내피세포(sinusoidal endothelial cell) 및 간성상세포가 활성화된다. 활성화된 간성상세포에 의해 분비되는 4형 콜라겐나아제(collagenase type IV)와 증가된 콜라겐 생산에 의해 ECM(extracellular matrix)의 정상구성비율이 깨지면서 기저막 ECM(basement membrane-like matrix, 예를 들어 4형 콜라겐)은 분해된다. 이 때, 세포간 ECM(interstitial type matrix, 예를 들어 1형 및 3형 콜라겐)은 서로 꼬여 소섬유상 콜라겐(fibril-forming collagen)을 형성한 후 딧세강(space of Disse)에 축적되며, 분해된 기저막 ECM 및 축적된 세포간 ECM에 의해서 간성상세포가 활성화된다. 활성화된 간성상세포는 콜라겐분해효소(Metalloproteinase:MMP)의 활성 억제물질인 마크로글로불린(macroglobulin) 및 TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinases) 등의 생성을 촉진시켜, 과도하게 생성되는 세포간 ECM의 분해도 억제한다. 딧세강에 축적된 세포간 ECM에 의해 혈액과 간세포간의 물질교환이 저해됨으로써, 간세포는 영양물질의 공급 및 독성물질의 배출이 어렵게 되고, 간세포 역시 지속적으로 손상된다. 이러한 일련의 반응이 반복되면서 간조직 중에 결합조직이 축적되면서, 간섬유화 내지 간경화증이 유발된다(J. Clin. Invest., 2005, 115 (2), 209-218 ; Gastroenterology, 2008, 134(6), 1655-1669 ; Arch. Pathol. Lab. Med., 2007, 131(11), 1728-1734 ; Hepatology, 2009, 50 (4), 1294-1306 ; J. Gastroenterol., 2000, 35, (9), 665-672).

[0006] 최근 간조직 내의 대식세포와 간성상세포에서 유리되는 사이토카인(cytokine)인 TGF-β(transforming growth factor-β)가 간섬유화의 중요 매개물로 밝혀졌다. 또한, TGF-β의 항체, 안티센스 RNA(antisense RNA), 세포

TGF-β 수용체 변형을 통하여 TGF-β의 작용을 차단하였을 때에는 간섬유화 과정이 현저하게 억제한다고 보고된 바 있다. 그러나 이러한 연구는 실험적 차원에서 수행된 것일 뿐이며 현재까지 실제로 임상적으로 활용되는 약물은 없는 실정이다.

[0007] 바이러스성 간질환의 원인 중 하나인 B형 간염은 예방백신의 개발로 보균자 및 발병자의 수는 줄고 있는 추세이나 아직까지도 제1종 전염병으로 분류되어 있을 만큼 감염이 빈번하게 발생한다. 더욱이, A형 및 C형 간염의 경우 적당한 치료제나 백신의 개발이 이루어지지 않아 상대적으로 발병이 증가하는 추세이다. 간염의 위험성은 간염 자체보다는 적절한 휴식과 치료가 병행되지 않을 경우, 간섬유증, 간경화증 및 간암으로 발전할 가능성이 크다는 점에 있으며, 이는 간염의 치료 또는 예방의 중요성을 시사한다. 하지만 이런 위험성에도 불구하고 적절한 간염 치료제는 현재까지 거의 없는 상태이다.

[0008] 울금(*Curcuma longa*)은 인도원산으로 인도로부터 동남아시아를 중심으로 열대 및 아열대 지방에서 넓게 재배되고 있는 다년생 초본이다. 울금은 강황이라고도 불리우며, 최근 우리나라의 남쪽 지역에서 재배되고 있는 식물로 카레 등의 원료로 사용되고 있다. 울금에는 방향성 정유가 1~5% 포함되어 있으며, 황색색소인 커큐민(curcumine) 등을 0.3% 정도 함유하고 있어 방향성 건위제로 간장염, 담도염, 담석증, 카타르성 황달 등에 사용되었다. 울금을 간질환에 사용된 사례로서, D-갈락토사민(D-galactosamine, 400㎎/㎏)으로 유도된 간염 쥐에 울금의 추출물을 투여했을 때, 방사능물질로 레이블된 Tc-메브로페닌(Tc-mebrofenin)(울금 추출물이 간의 해독기전에 작용하는 효과지표를 확인하기 위함)의 배설에 효과가 있다는 것이 보고된 바 있다(Indian J. Physiol. Pharmacol.., 2003, 47, 332~336). 또한, 간염의 원인으로 알려진 B형 바이러스의 복제를 저해하며, HBV 관련 X 단백질(HBx)을 과발현시킨 쥐에서 울금 추출물이 간독성을 예방하는 것으로 보고된 바 있다(Intergr. Cancer Ther., 2011, 10, 168~177).

[0009] 한편, 간염, 간섬유증 또는 간경화증을 저해하는 울금 유래 화합물에 관한 대부분의 연구는 울금 중에 주요 화합물로 들어 있는 커큐민(curcumin)(Br. J. Pharmacol., 2010, 161, 1137~1149 ; J. Nat. Med., 2009, 63, 415~420 ; Antioxid. Redox Signal, 2008, 10, 511~545), 비스디메톡시커큐민(bis-demethoxy curcumin), 디메톡시커큐민(demethoxy curcumin)에 대한 것이 대부분이며, 상기 화합물들을 제외한 다른 울금 유래의 화합물이 간염, 간섬유증 또는 간경화증을 억제하는 효과가 있다는 연구는 거의 수행되지 않은 것으로 확인된다.

[0010] 한편, 울금을 의약품 및 기능성식품으로 개발하는 것이 쉽지는 않은데, 이는 울금의 주요 화합물들인 커큐미노이드 계열의 커큐민, 비스디메톡시커큐민, 디메톡시커큐민 등이 경구투여에 의한 장관 내 흡수, 분포, 대사 및 분비(ADME)가 어렵기 때문이다. 특히, 커큐민은 물에 거의 용해되지 않는 성질을 나타내기에, 물에는 잘 추출되지 않는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 커큐미노이드의 용해도를 증가시키기 위한 다양한 시도들이 행해지고 있다(J. Med. Chem., 2007, 50, 6284~6288 ; Biochem. Pharmacol., 2006, 72, 928~940).

[0011] 따라서, 상기 울금 유래 화합물이 갖는 흡수, 분포, 대사 및 분비(ADME)에 대한 문제점들을 극복하기 위해, 본 발명자들은 울금에 청국장을 첨가하여 발효함으로써 청국장 발효 울금을 제조하고, 상기 청국장 발효 울금의 추출물에서 상기 커큐민, 비스디메톡시커큐민, 디메톡시커큐민 등이 인체 내로 흡수되기 용이한 다른 종류의 커큐미노이드 화합물로 변환되는 것을 확인하였다. 즉, 커큐미노이드 계열의 화합물이 인체내 흡수된 후 간에서 흡수 및 대사되는 과정을 미생물을 통하여 진행하게 되므로 생체 이용률이 개선될 가능성이 있다(Biochem. Pharmacol., 2006, 72, 928~940; Biotechnol Lett., 2005, 27(18), 1411~1425). 또한 발효를 하면 커큐민의 지방족 체인기에 수산화기가 증가하거나 수산기에 당이 붙는 형태로 대사가 되어 비발효물에 비하여 커큐민, 비스디메톡시커큐민, 디메톡시커큐민 등의 함량이 감소되는 것으로 확인된다.

[0012] 한편, 본 발명자들은 상기 청국장 발효 울금의 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 화합물들이 간염, 간섬유증 또는 간경화증의 치료 효과가 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

[0013] 울금이나 발효 울금의 추출물에 관한 선행문헌으로는, "발효 울금 추출물을 함유하는 알코올성 간질환의 치료 및 예방용 조성물, 한국등록특허 제1117301호", "숙취해소 및 간기능 개선용 식품 조성물, 한국등록특허 제574097호", "간질환 예방 및 치료용 생약조성물, 한국등록특허 제743861호", "간섬유화 예방 및 치료용 한약 추출물, 한국등록특허 제682045호" 등이 있으나 이는 울금 이외에도 여러 식물을 혼합하여 추출 및 제조한 조성물이거나, 상기 혼합물을 발효하여 추출 및 제조한 조성물이거나 적용 용도가 다른 조성물이기에, 본 발명과는 그 기술구성이 다르다고 할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1117301호 (발효 울금 추출물을 함유하는 알코올성 간질환의 치료 및 예방용 조성물, 2012.02.09. 등록)

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제574097호 (숙취해소 및 간기능 개선용 식품 조성물, 2006.04.19. 등록)

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제743861호 (간질환 예방 및 치료용 생약조성물, 2007.07.24. 등록)

(특허문헌 0004) 한국등록특허 제682045호 (간섬유화 예방 및 치료용 한약 추출물, 2007.02.06. 등록)

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) Bataller, R., Brenner, D. A., Liver fibrosis., J. Clin. Invest., 2005, 115(2), 209-218.

(비특허문헌 0002) Friedman, S. L., Mechanisms of hepatic fibrogenesis., Gastroenterology, 2008, 134(6), 1655-1669.

(비특허문헌 0003) Moreira, R. K., Hepatic stellate cells and liver fibrosis., Arch. Pathol. Lab. Med., 2007, 131(11), 1728-1734.

(비특허문헌 0004) Popov, Y., Schuppan, D., Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies., Hepatology, 2009, 50 (4), 1294-1306.

(비특허문헌 0005) Deshpande, U.R. et al., Hepatobiliary clearance of labelled mebrofenin in normal and D-galactosamine HCl-induced hepatitis rats and the protective effect of turmeric extract., Indian J. Physiol. Pharmacol.., 2003, 47, 332~336.

(비특허문헌 0006) Stoker., J. et al., Prospective comparative study of spiral computer tomography and magnetic resonance imaging for detection of hepatocellular carcinoma., J. Ethanopharmacol., 2009, 124, 189~196.

(비특허문헌 0007) Kim, J. et al., Chemopreventive effect of Curcuma longa Linn on liver pathology in HBx transgenic mice., Intergr. Cancer Ther., 2011, 10, 168~177.

(비특허문헌 0008) R Vijayakumar, G., Divakar, S., Synthesis of guaiacol-alpha-D: -glucoside and curcumin-bis-alpha-D: -glucoside by an amyloglucosidase from Rhizopus. Biotechnol Lett., 2005, 27(18), 1411~1415.

(비특허문헌 0009) Tang, Y., Chen, A., Curcumin prevents leptin raising glucose levels in hepatic stellate cells by blocking translocation of glucose transporter-4 and increasing glucokinase., Br. J. Pharmacol., 2010, 161, 1137~1149.

(비특허문헌 0010) Shu, J.C., Curcumin prevents liver fibrosis by inducing apoptosis and suppressing activation of hepatic stellate cells., J. Nat. Med., 2009, 63, 415~420.

(비특허문헌 0011) Strimpakos, A.S., Sharma, R.A., Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials., Antioxid. Redox Signal, 2008, 10, 511~545.

(비특허문헌 0012) Safavy, A., Design and development of water-soluble curcumin conjugates as potential anticancer agents., J. Med. Chem., 2007, 50, 6284~6288.

(비특허문헌 0013) Weber, W.M., TPA-induced up-regulation of activator protein-1 can be inhibited or enhanced by analogs of the natural product curcumin., Biochem. Pharmacol., 2006, 72, 928~940.

발명의 내용

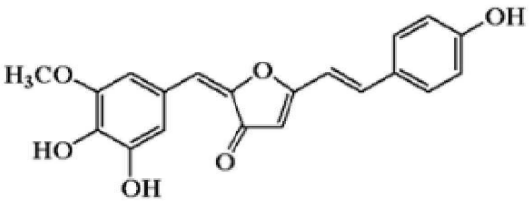
해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체를 함유하는 간질환의 치료 또는 예방용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 하기 화학식 1~5의 커큐마로진 A(curcumalogin A, 화합물 **1**), 커큐마로진 B(curcumalogin B, 화합물 **2**), 커큐마로진 C(curcumalogin C, 화합물 **3**), 커큐마로진 D(curcumalongin D, 화합물 **4**), 1-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **5**), 5-하이드록시-1,7-비스(4-하이드록시페닐)-4,6-헵타디엔-3-온(5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one, 화합물 **6**), 1,7-비스(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **7**) 및 1-(4-하이드록시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **8**)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 커큐미노이드(curcuminoid) 유도체 화합물이 포함된 청국장 발효 울금(fermented *Curcuma longa* by natural fermented soybean) 추출물을 함유하는 간질환의 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

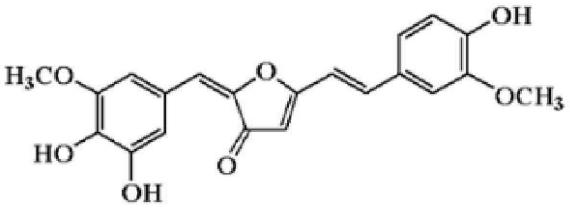
[0018] [화학식 1]



화합물 **1**

[0019]

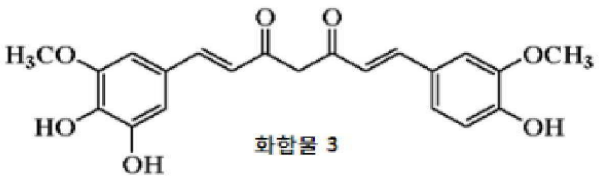
[0020] [화학식 2]



화합물 **2**

[0021]

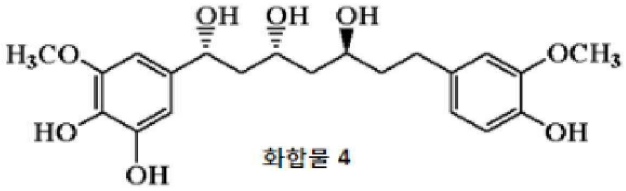
[0022] [화학식 3]



화합물 **3**

[0023]

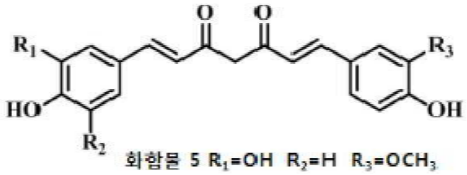
[0024] [화학식 4]



화합물 4

[0025]

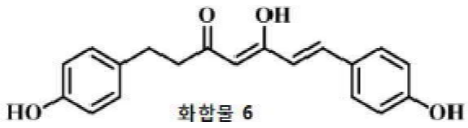
[0026] [화학식 5]



화합물 5 R_1=OH R_2=H R_3=OCH_3

화합물 7 R_1=R_3=OH R_2=H

화합물 8 R_1=OH R_2=R_3=H



화합물 6

[0027]

[0028] 상기 청국장 발효 울금 추출물은 청국장 발효 울금을 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 제조한 추출물일 수 있다.

[0029] 상기 청국장 발효 울금은 울금의 청국장 발효물일 수 있다. 바람직하게는 상기 발효울금은 울금 100 중량부에 0.1~10 중량부의 청국장 분말 및 40~100 중량부의 물을 혼합한 혼합물을 발효한 것일 수 있다.

[0030] 상기 간질환은 간염, 간섬유증 및 간경화증으로 이루어진 군 중에서 선택되는 질환일 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 화학식 1~5의 커큐마로진 A(curcumalogin A, 화합물 **1**), 커큐마로진 B(curcumalogin B, 화합물 **2**), 커큐마로진 C(curcumalogin C, 화합물 **3**), 커큐마로진 D(curcumalongin D, 화합물 **4**), 1-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **5**), 5-하이드록시-1,7-비스(4-하이드록시페닐)-4,6-헵타디엔-3-온(5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one , 화합물 **6**), 1,7-비스(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **7**) 및 1-(4-하이드록시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **8**)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 커큐미노이드 유도체 화합물이 포함된 청국장 발효 울금 추출물을 함유하는 간질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

[0032] 본 발명은, 또한, 화학식 1~5의 커큐마로진 A(curcumalogin A, 화합물 **1**), 커큐마로진 B(curcumalogin B, 화합물 **2**), 커큐마로진 C(curcumalogin C, 화합물 **3**), 커큐마로진 D(curcumalongin D, 화합물 **4**), 1-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **5**), 5-하이드록시-1,7-비스(4-하이드록시페닐)-4,6-헵타디엔-3-온(5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one , 화합물 **6**), 1,7-비스(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **7**) 및 1-(4-하이드록시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온(1-(4-hydroxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 **8**)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 커큐미노이드 유도체 화합물을 함유하는 간질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0033] 이하 본 발명을 자세하게 설명한다.

[0034] 본 발명의 청국장 발효 울금 추출물은, 청국장 발효 울금에 상기 청국장 발효 울금 중량의 2~50배(w/v)의 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매를 가하고 추출함으로써 제조할 수 있다. 상기 저급 알코올은 에탄올, 메탄올, 프로판올, 이소프로판올 및 부탄올 중에서 선택될 수 있다.

[0035] 상기 청국장 발효 울금은 바람직하게는 울금 100 중량부에 0.1~10 중량부의 청국장 분말 및 40~100 중량부의 물을 혼합한 혼합물을 발효한 것일 수 있다. 상기 울금, 청국장 분말 및 물의 혼합물은 20~30℃의 온도에서 30~45일 동안 발효할 수 있다. 상기 발효 조건은 상대습도 35~65% 조건에서 수행될 수 있다. 또한, 상기 울금, 청국

장 분말 및 물의 혼합물은 발효 전에 70~90℃의 온도에서 1~5시간 동안 전발효하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 울금, 청국장 분말 및 물의 혼합물은 발효 이후 70~90℃의 온도에서 1~5시간 동안 후발효할 수 있다.

[0036] 한편, 상기 청국장은 통상적인 방법으로 제조된 청국장을 건조한 후 분말로 제조하여 이용할 수 있다.

[0037] 바람직하게는 상기 청국장은 삶은 콩을 짚 또는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주를 이용하여 발효하여 제조할 수 있다.

[0038] 상기 발효 온도는 바람직하게는 20~37℃가 좋다. 또한, 상기 발효 시간은 바람직하게는 12시간~10일간이 좋다.

[0039] 따라서, 바람직하게는 상기 청국장은 삶은 콩을 짚 또는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주를 이용하여 20~37℃에서 12시간~10일간 발효하여 제조할 수 있다.

[0040] 상기 청국장 제조용 콩류는 어떤 종류의 콩을 사용해도 좋지만, 바람직하게는 대두 또는 검은콩 중에서 선택되는 1종 이상의 콩이 사용될 수 있다.

[0041] 상기 청국장은, 삶은 콩을 100 중량부로 할 때, 0.01~10 중량부의 짚을, 상기 삶은 콩 위에 올려 발효할 수 있다. 이 때, 짚에 포함된 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주를 이용하여 청국장이 발효될 수 있다.

[0042] 또한, 상기 청국장은, 삶은 콩을 100 중량부로 할 때, 0.001~1 중량부의 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주를 삶은 콩과 혼합한 후 발효함으로써 제조할 수 있다. 상기 바실러스 속 균주로는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 사용하는 것이 바람직하다.

[0043] 또한, 삶은 콩과 상기 바실러스 속 균주를 혼합할 때, 삶은 콩을 100 중량부로 할 때, 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.) 균주 및 효모(yeast) 중에서 선택되는 1종 이상의 균주 0.001~1 중량부가 혼합될 수 있다.

[0044] 상기 아스퍼질러스 속 균주로는 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 소제(*Aspergillus* sojae), 아스퍼질러스 니거(*Aspergillus* niger) 등이 사용될 수 있으며, 효모 중에서는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 바야누스(S*accharomyces bayanus*), 짜이고사카로마이세스 룩시(*Zygosaccharomyces rouxii*) 등이 사용될 수 있다.

[0045] 따라서, 본 발명의 청국장 발효 울금 추출물은, 바람직하게는,

[0046] 울금 100 중량부에 0.1~10 중량부의 청국장 분말 및 40~100 중량부의 물을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;

[0047] 상기 혼합물을 20~30℃의 온도에서 30~45일 동안 발효하여 청국장 발효 울금을 제조하는 단계; 및,

[0048] 상기 청국장 발효 울금에 상기 청국장 발효 울금 중량의 2~50배(w/v)의 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매를 가하고 추출하는 단계;를 포함하여 제조될 수 있다.

[0049] 본 발명의 청국장 발효 울금 추출물로부터 분리된 화합물들은, 상기 청국장 발효 울금 추출물을 유기용매(알코올, 알코올 수용액, 아세톤, 클로로포름 등)에 의한 추출, 헥산·에틸아세테이트·부탄올에 대한 순차적 분획, 디아이온 HP-20 레진과 같은 흡착수지 사용방법, 칼럼크로마토그래피에 의한 방법 등 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지된 방법을 단독 또는 적합하게 조합하여 본 발명의 활성 화합물을 용이하게 얻을 수가 있다.

[0050] 바람직하게는, 상기 청국장 발효 울금 추출물에 상기 추출물 중량의 2~50배(w/v)의 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 등을 순차적으로 가하여 이를 정제 분획한 뒤, 크로마토그래피 등을 이용하여 본 발명의 활성 화합물들을 분리할 수 있다.

[0051] 본 발명에서 사용하는 크로마토그래피에는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 칼럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등이 이용될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명의 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물의 활성 측정은, 울금을 청국장을 이용하여 발효하는 단계; 상기 청국장 발효 울금을 물, 탄소수 1 내지 4개의 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름 또는 이들의 혼합용매로 추출한 후 헥산 및 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하는 단계; 커큐미노이드 유도체 화합물을 크로마토그래피를 이용하여 순수 분리 정제하는 단계; 분리된 활성 화합물의 화학구조를 통해 커큐미노이드 유도체 화합물을 확인하는 단계; 및, 상기 커큐미노이드 유도체 화합물

의 TNF-α, TGF-β 및 α-SMA에 대한 저해활성을 측정하는 단계;를 통해 확인할 수 있다.

[0053] 또한, 본 발명은 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0054] 상기 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물은 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0055] 또한, 본 발명은 상기 청국장 발효 울금 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제가 포함된 간질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

발명의 효과

[0056] 본 발명은 청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체 화합물을 함유하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 간조직 또는 간세포에서의 α-SMA와 TGF-β1의 발현을 억제하고, TNF-α의 양을 감소시키는 효과가 뛰어나 간염, 간섬유증, 간경화증 등의 간질환의 치료제 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 울금의 발효 전과 발효 후의 화합물 함량 변화를 보여주는 HPLC(high performance liquid chromatography) 스펙트럼 결과이다.

도 2는 청국장 발효 울금 추출물의 화합물 함량 변화를 발효 날짜 별로 TLC(thin layer chromatography)를 통하여 확인한 결과이다.

도 3은 청국장 발효 울금 추출물로부터 분리된 화합물 **1~4**의 구조를 HMBC와 NOESY를 통해 확인한 결과를 나타내는 그림이다.

도 4는 MEF 세포에 본 발명의 화합물들을 처리 후 웨스턴 블롯(Western blotting)을 이용하여 α-SMA(α-smooth muscle actin)의 활성을 확인한 결과를 나타내는 그림이다.

도 5는 MEF 세포에서 화합물을 처리하지 않은 대조군에 비하여 커큐마로진 A를 처리하였을 경우의 TGF-β1 mRNA 발현 및 전사활성을 각각 리얼타임 PCR(real-time PCR, 도 6A)과 리포터 유전자 어세이(reporter gene assay, 도 6B)로 평가하여 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지도록, 그리고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0059] **<실시예 1 : 청국장 발효 울금의 제조>**

[0060] 울금(한국, 서울, 일신상회에서 구입) 1kg을 건조하고, 분말로 제조한 후, 상기 울금 분말에 청국장분말(상품번호 157, ㈜빈맥스코리아, 무안)을 10g 첨가하고 총 중량의 400g의 정제수를 공급한 후 82.5±2.5℃에서 4시간 동안 전 발효하였다. 이후 온도 25℃, 습도 60% 조건에서 40일 동안 본 발효를 진행하였다. 82.5±2.5℃에서 2시간 1차 건조한 후, 87.5±2.5℃에서 2시간 열풍 건조하여 수분 3% 이하의 울금 발효물을 제조하였다.

[0061] **<실시예 2 : 청국장 발효 울금으로부터 활성물질의 용매 추출조건 확인>**

[0062] 상기 실시예 1에서 제조한 청국장 발효 울금의 추출조건 및 활성물질의 용매 추출정도를 비교하기 위하여, 증류수, 30~100% 에탄올 수용액, 메탄올, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름 등의 용매를 사용하여 활성성분의 α-SMA에 대한 저해활성을 확인하였다. 이를 위해, 하기 표 1의 조건으로 울금 또는 청국장 발효 울금 100g씩을 해당용매 300㎖을 사용하여 4시간 동안 3회에 걸쳐 환류냉각기를 이용하여 가열 추출한 후 추출액을 감압 농축하였다. 이 후, 각 추출물(50㎍/㎖)의 α-SMA에 대한 저해활성을 실시예 5에 개시된 방법을 이용해 확인하였다.

[0063] 표 1을 참고하면, 각 용매의 추출물 중에서 30% 에탄올 수용액으로 추출된 청국장 발효 울금 추출물이 α-SMA에 대한 저해활성이 상대적으로 높은 것으로 확인되었다. 알코올의 함량을 높이면 ADME가 상대적으로 낮으며 세포독성이 높은 커큐민의 추출량이 높아지므로 커큐민의 추출함량이 상대적으로 적은 조건을 고려하여 발효 후 30% 에탄올 수용액 추출물을 최적 추출조건으로 설정하였다. 또한, 비발효 상태의 울금을 30% 에탄올 수용액으로 추출한 추출물보다는 본 발명의 청국장 발효 울금 추출물이 α-SMA에 대한 저해활성이 현저하게 높은 것도 확인할 수 있었다.

[0064] 이 후, 상기 30% 에탄올 수용액으로 추출된 청국장 발효 울금의 추출물을 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올로 순차적으로 분획하여 농축한 분획물을 제조한 후, 동일한 방법을 통해 각각의 α-SMA에 대한 저해활성을 측정한 바, α-SMA에 대한 저해활성은 청국장 발효 울금의 에틸아세테이트와 부탄올 분획물에서 비슷하게 강한 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다(표 2 참조).

표 1

[0065]

용매 조건		α-SMA에 대한 저해활성(%)
청국장 발효 울금의 추출물 (50㎍/㎖)	30% 에탄올 수용액	34.3
	50% 에탄올 수용액	35.3
	70% 에탄올 수용액	39.3
	90% 에탄올 수용액	39.7
	100% 에탄올	45.8
	100% 메탄올	46.2
	100% 아세톤	29.9
	100% 에틸아세테이트	32.7
	100% 클로로포름	28.3
	증류수	18.02
비발효 울금의 추출물 (50㎍/㎖)	30% 에탄올 수용액	10.2

표 2

[0066]

용매 조건		α-SMA에 대한 저해활성(%)
청국장 발효 울금의 추출물 (50㎍/㎖)	30% 에탄올 수용액의 헥산 분획물	15.3
	30% 에탄올 수용액의 에틸아세테이트 분획물	42.4
	30% 에탄올 수용액의 부탄올 분획물	45.8

[0067] **<실시예 3 : 청국장 발효 울금 추출물의 제조 및 디아릴헵타노이드계 화합물의 분리 및 정제>**

[0068] 실시예 1의 청국장 발효 울금 3kg을 30% 에탄올 수용액 15ℓ를 사용하여 4시간 동안 3회에 걸쳐 환류 냉각기를 이용하여 가열 추출하였다. 상기 30% 에탄올 수용액 추출물(이하, 'A 분획'이라 칭함)을 감압 농축한 결과 182g의 추출물을 확인할 수 있었다. 농축한 추출물을 취하여 물(5ℓ)로 현탁한 후 n-헥산(5ℓ) 추출물, 에틸 아세테이트(5ℓ) 추출물, 부탄올(2ℓ) 추출물로 순차적으로 용매분획한 다음 각각의 용매분획에 대하여 α-SMA 저해활성을 측정한 결과, 에틸 아세테이트 분획물 및 부탄올 분획물에서 강한 활성을 확인할 수 있었다. 이후, 실험의 진행은 상기 에틸아세테이트 분획물과 부탄올 분획물을 합하여 사용하였다.

[0069] 에틸아세테이트와 부탄올 합친 분획물(130g)을 클로로포름-아세톤(19:1 → 1:19)의 용매구배 조건으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피(10×30cm ; 63~200㎛ particle size)를 실시하여 TLC 패턴에 따라 나뉘어진 7개의 분획물을 얻었다(F1: 17.6g ; F2:8.5g ; F3:5.6g ; F4:9.8g; F5:10.5g ; F6:12.6g ; F7:22.4mg). 분획물 F3을 헥산-에틸아세테이트 용매에서의 재결정을 통하여 순수한 커큐민(curcumine, 4.2g)을 얻을 수 있었다. 분획 F4의 클로로포름-아세토니트릴(9:1 → 1:9)의 용매구배 조건으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피(5×40cm ; 40~63㎛ particle size)를 실시하여 5개의 소분획물을 얻었다(F4.1-F4.5). 소분획물 F4.1과 F4.2를 클로로포름 용매를 이용한 재결정은 디메톡시커큐민(demethoxycurcumin, 1.3g) 및 비스디케톡시커큐민(bisdemethoxycurmin, 2.5g)을 각각 얻을 수 있었다. 소분획물 F4.4(90mg)를 아세토니트릴(MeCN)-물(0-40min : 45% 아세토니트릴, 40-45min : 100% 아세토니트릴, 45-55min : 100% 아세토니트릴)을 사용하여 HPLC[Optima Pak C_{18} column 10×250mm ; 10㎛M 입자 크기 2㎖/min ; UV detection : 205, 254nm]를 실시하여 화합물 **5**(t_R=30.0min, 5.5mg)와 화합물 **6**(t_R=34.0min, 7.0mg)을 얻었다.

[0070] 분획 F5는 메탄올을 전개용매로하여 세파덱스 엘에취-20 컬럼크로마토그래피(7×40cm)를 실시하여 3개의 소분획물을 얻었다(F5.1-F5.3). 소분획물 F5.2(3.1g)는 클로로포름-아세토니트릴(9:1 → 1:9)의 용매구배 조건으로 실리카겔 컬럼크로마토그래피(5×40cm ; 40~63㎛ particle size)를 실시하여 5개의 소분획물을 얻었다(F5.2.1F5.5.5). 소분획물 F5.2.3(110mg)은 아세토니트릴-물(065 min: 57% 아세토니트릴, 6570 min: 100% 아세토니트릴)을 사용하여 HPLC[Optima Pak C_{18} column 10×250mm ; 10㎛M 입자 크기 2㎖/min ; UV detection : 205, 254nm]를 실시하여 화합물 **7**(t_R=42.0min, 13.5mg), 화합물 **8**(t_R=58.0min, 7.5mg)과 화합물 **3**(t_R=61.0min, 8.0mg)을 얻었다. 소분획물 F5.2.4(95mg)를 HPLC(060 min: 35% 아세토니트릴, 6065min : 100% 아세토니트릴)을 상기와 동일한 칼럼의 조건을 사용하여 화합물 **1**(t_R=46.0min, 4.5mg)과 화합물 **2**(t_R=48.5min, 3.5mg)를 얻었다. 최종적으로 화합물 **4**(t_R=31.0min, 11.5mg)는 소분획물 F5.2.5(150mg)을 HPLC(035min : 32% 아세토니트릴, 40min: 100% 아세토니트릴)하여 획득하였다.

[0071] 또한, 각각 30% 에탄올 수용액으로 추출한 청국장 발효 울금의 추출물(40일 발효)과 비발효 울금 추출물과의 유효 화합물을 HPLC를 이용해 비교 분석한 결과, 종래에 간염, 간섬유증 또는 간경화증의 치료 효과가 있다고 알려진 커큐민, 디메톡시커큐민 및 비스디메톡시커큐민의 함량이 감소되고, 본 발명의 화합물 **1~8**이 증가되는 것을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

[0072] 마찬가지로, 본 발명의 청국장 발효 울금이 발효되는 기간 동안의 중간 발효물 추출물(0, 10, 20, 30일째의 발효물) 및 발효가 완성된 청국장 발효 울금 추출물(40일째의 발효물)에 대해 TLC를 수행하여 비교 분석한 결과(도 2 참조)를 확인할 때, 역시 동량의 각각의 추출물에서 화합물의 분포가 달라지는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 커큐민, 디메톡시커큐민 및 비스디메톡시커큐민의 함량이 감소되고, 본 발명의 화합물 **1~8**이 상대적으로 증가되는 것으로 예상되었다.

[0073] 따라서, 울금 추출물에 다량으로 함유되어 있지만 장관 내 흡수, 분포, 대사 및 분비(ADME)가 용이하지 않던 커

큐민, 디메톡시커큐민 및 비스디메톡시커큐민이 발효를 통해 본 발명의 화합물들로 변환되면서, 본 발명의 청국장 발효 울금 추출물은 상기 울금 추출물보다 장관 내 흡수, 분포, 대사 및 분비(ADME)가 개선될 것으로 추정하였다.

[0074] **<실시예 4 : 커큐미노이드 유도체 화합물의 물리화학적 특성 및 화학구조 분석>**

[0075] **실시예 4-1 : 커큐마로진 A (화합물 1)**

[0076] Curcumalongin A

[0077] Yellow amorphous powder

[0078] UV(MeOH) λ_{max} nm(log ε) 295(3.53), 398(4.06)

[0079] IR(KBr) ν_{max} 3415(OH), 1665(C=O), 1598, 1547, 1511, 1489, 1273cm^{-1}

[0080] ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (표 3과 4 참조)

[0081] EIMS *m/z*(rel.int.): 352([M]$^{+}$, 100), 322(59), 278(22), 267(20), 191(52), 180(28), 150(27)

[0082] HRFABMS *m/z* 353.1022[M+H]$^{+}$(calcd for $C_{20}H_{17}O_6$, 353.1025)

[0083] 화합물 **1**은 노란 분말로 얻어졌다. 화합물 **1**의 ^{1}H NMR spectrum은 3,4,5-tetra substituted benzene ring을 [δ_H 7.23 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2')와 7.21 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-6')]에서, A_2B_2 방향족 수소를 [δ_H 7.63 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2", H-6")와 6.94 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3", H-5")], *trans*-olefinic 수소를 [δ_H 7.67 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-7")와 7.08 (1H, d, *J* = 15.6 Hz, H-8")]에서, 메톡시 그룹을 [δ_H 3.99 (3H, s, 3'-OCH_3)]에서 다른 olefinic 수소를 [δ_H 6.52 (1H, s, H-7')]에서 확인하였으며, 또한, δ_H 5.92 (1H, s, H-4)에서 *β*-diketone 수소를 확인하였다. 이러한 ^{1}H NMR 결과와 일치하는 결과를 ^{13}C NMR spectrum으로부터 얻을 수 있었다. 메톡시 그룹을 δ_C 56.5에서, 4개의 olefinic 탄소들을 δ_C 146.7, 139.3, 113.3과 112.2에서, conjugated ketone 탄소를 δ_C 186.6에서, 수산화기가 붙어있는 탄소를 δ_C 176.1에서, *β*-diketone 형태의 탄소를 δ_C 105.4에서 확인하였으며 12개의 방향족 탄소를 확인할 수 있었다.

[0084] 탄소의 숫자를 확인하기 위하여 추가적으로 HSQC 실험을 수행하였다. 최종적으로 탄소수가 20개로 결정하였다. 2개의 다른 olefinic 탄소보다 벗겨진 (deshielding) 탄소인 δ_C 146.7 (C-2)와 176.1 (C-5)은 수산기가 치환된 탄소로 결정하였다. 이러한 관찰은 특징적인 IR에서의 흡수밴드(1665, 1598cm^{-1})와 UV (398, 295 nm) 스펙트럼에서 확인하였으며, 이러한 결과로부터 화합물 **1**은 3(2*H*)-furanone 골격을 갖는 (-C=CH-CO-CH=C(OH)-CH=CH-) 형태로 추정하였다. 화합물 **1**의 정확한 연결을 확인하기 위하여 HMBC 실험이 행하여졌다. H-4로부터 C-2, C-3, C-5으로의 연결, H-7'로부터 C-2, C-3, C-2', C-6' 및 H-2'와 H-6'/C-7의 연결은 1,3,4,5-tetrasubstituted 방향족 환이 olefinic 탄소 C-7'를 통하여 furanone ring의 C-2에 연결됨을 확인하였다. 이러한 결과는 두 방향족 환의 C-7'와 C-7"로의 HSQC와 HMBC correlations의 추가적인 확인을 통하여 확인되었다. 따라서 화합물 **1**은 2-(4,5-dihydroxy-3-methoxyphenyl)methenyl-5-(4-hydroxyphenyl)ethenyl-3(2*H*)-furanone으로서, curcumalongin A로 명명하였다.

[0085] **실시예 4-2 : 커큐마로진 B (화합물 2)**

[0086] Curcumalongin B

[0087] Yellow amorphous powder

[0088] UV(MeOH) λ_{max} nm(log ε) 290(3.76), 410(4.12)

[0089] IR(KBr) ν_{max} 3416(OH), 1665(C=O), 1588, 1547, 1512, 1490, 1284cm^{-1}

[0090] ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (표 3과 4 참조)

[0091] EIMS *m/z*(rel.int.): 382([M]$^+$, 100), 352(20), 322(8), 308(10), 278(6), 267(9), 245(12), 191(10), 180(24)

[0092] HREIMS *m/z* 382.1051[M]$^+$(calcd for $C_{21}H_{18}O_7$, 382.1053)

[0093] 화합물 **2**는 노란 분말로 얻어졌으며, 화합물 **2**의 분자식은 m/z 382.1051 [M]$^+$의 분자이온 피크를 관찰함으로서 $C_{21}H_{18}O_7$로 결정되었다. 화합물 **2**의 IR spectrum으로부터 수산기를 3416cm^{-1}, 공유화된 카보닐기를 1665cm^{-1}에서 방향족 환에 기인한 기능기를 1588, 1547, 1512, 와 1490cm^{-1}에서 각각 확인하였다. 화합물 **2**의 ^{1}H NMR과 ^{13}C NMR spectrum이 화합물 **1**과 비슷하였으나 추가적인 메톡시 피크를 δ_H 3.99 (3H, s, 3"-OCH_3)에서 확인하였다. 이러한 결과는 화합물 **1**에 존재하는 A_2B_2 방향족 치환형식에 비하여 ABX spin system[δ_H 7.43 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2"), 7.20 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz, H-6")과 6.91 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5")]를 확인함으로서 추가적으로 확인할 수 있었다. 화합물 **2**는 화합물 **1**에서 메톡시가 추가된 형태의 화합물이었다. HMBC를 통하여, 메톡시 프로톤과 H-2"와 5"에 존재하는 프로톤 피크로부터 C-3"(δ_C 149.2)으로의 연결로 메톡시 그룹이 C-3"에 존재함을 최종적으로 확인할 수 있었다. 따라서 화합물 **2**는 2-(4,5-dihydroxy-3-methoxyphenyl)methenyl-5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl-3(2*H*)-furanone으로서, curcumalongin B로 명명하였다.

[0094] **실시예 4-3 : 커큐마로진 D (화합물 3)**

[0095] Curcumalongin D

[0096] Yellow amorphous powder

[0097] UV(MeOH) λ_{max} nm(log ε) 290(3.76), 418(4.12)

[0098] IR(KBr) ν_{max} 3416(OH), 1588, 1547, 1512, 1490, 1284cm^{1}

[0099] ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR (표 3과 4 참조)

[0100] HREIMS *m/z* 408.1782[M]$^+$(calcd for $C_{21}H_{28}O_8$, 408.1784)

[0101] 화합물 **4**는 노란 분말로 얻어졌으며, 그것의 IR spectrum으로부터 수산기를 3315 cm^{-1}에서 확인하였다. 화합물 **3**의 ^{1}H NMR spectrum은 1,3,4-trisubstituted benzene ring을 [δ_H 6.77 (1H, d,J = 2.0 Hz, H-2"), 6.67 (1H, d, J = 8.5 Hz, H-5") 및 6.62 (1H, dd, J = 8.5, 2.0 Hz, H-6"]에서, 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene ring을 [δ_H 6.54 (1H, s, H-6')과 6.50 (1H, s, H-2')]와 2개의 메톡시 그룹을 [δ_H 3.77 (3H, s, 3'-OCH_3)와 3.75 (3H, s, 3"-OCH_3)]에서 각각 확인할 수 있었다. 이러한 관찰과 EIMS에서의 *m/z* 137과 153 피크의 관찰은 4-hydroxy-3-methoxyphenyl과 4,5-dihydroxy-3-methoxy phenyl 기가 존재함을 제안한다. 4개의 메틸렌 그룹에 기인한 피크를 [δ_H 2.63 (1H, m, H-7a)/2.56 (1H, m, H-7b), 1.81 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-2a)/1.61(1H, m, H-2b), 1.74 (1H, m, H-6a)/1.60 (1H, m, H-6b)와 1.64 (1H, m,H-4a)/1.46(1H,m,H-4b)]와 3개의 oxymethine기를 [δ_H 4.66 (1H, d, J = 10.5 Hz, H-1), 4.19 (1H, m, H-5), 3.87 (1H, m, H-3)]에서 확인 하였다. HMQC와 ^{13}C NMR 결과로부터, 분자내에 (-CH(OH)-CH_2-CH(OH)-CH_2-CH(OH)-CH_2-CH_2-) 골격이 있음을 확인하였다. 화합물 **3**의 ^{1}H NMR과 ^{13}C NMR spectrum은 2개의 추가적인 수산기가 C-5'에 있는 것을 제외하고 화합물 (3*S*,5*S*)-3,5-dihydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) heptane과 유사함을 알았다. 이러한 결과는 또한, m/z 408.1782에서 [M]$^+$의 분자이온 피크를 관찰함으로서 $C_{21}H2_8O_8$로(계산치 $C_{21}H_{28}O_8$, 408.1784결정되었다. 신규 화합물 **3**의 정확한 구조를 확인하기 위하여 HMBC실험이 행하여졌다. H-2", H-5" 및 H-6"/C-4"로의 연결, H-2"과 H-5"/C-3", H-2'/C-3'과 C-4', H-6'/C-4'와 C-5', 3'-OCH_3/C-3' 그리고 3"-OCH_3/C-3"의 관찰을 확인하였다. 이러한 결과로부터 화합물 **3**은 (1*R*,3*R*,5*S*)-trihydroxy-1-(4,5-dihydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)heptane으로서, curcumalongin D로 명명하였다.

[0102] **실시예 4-4 : 커큐마로진 C (화합물 4)**

[0103] Curcumalongin C

[0104] Yellow amorphous powder

[0105] UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε) 264(3.74), 422(4.27) IR (KBr) ν_{max} 3415(OH), 2917, 1737(C=O), 1626, 1599, 1513, 1467, 1272 cm^{-1}

[0106] ^{1}H NMR과 ^{13}C NMR (표 3과 4 참조)

[0107] EIMS *m/z* (rel. int.): 384 ($[M]^{+}$, 100), 366(47), 284(51), 267(55), 208(32), 192(53), 177(97) HREIMS *m/z* 384.1213 $[M]^{+}$ (calcd for $C_{21}H_{20}O_7$, 384.1209)

[0108] 한편, 하기 표 3은 상기 본 발명의 화합물 **1~4**의 ^{1}H NMR(600MHz) 및 표 4는 ^{13}C NMR(150MHz) 데이터를 나타낸다.

표 3

[0109]

^{1}H NMR				
위치	화합물 1	화합물 2	화합물 3	화합물 4
	δ_H mult. (*J* in Hz)	δ_H mult. (*J* in Hz)	δ_H mult. (*J* in Hz)	δ_H mult. (*J* in Hz)
1			7.53 d (15.6)	4.66 d (10.5)
2			6.67 d (15.6)	1.81 d (10.5) 1.61 m
3				3.87 m
4	5.92 s	5.91 s	5.98 s	1.64 m 1.46 m
5				4.19 m
6			6.72 d (15.6)	1.74 m 1.60 m
7			7.60 d (15.6)	2.63 m 2.56 m
1'				
2'	7.23 d (1.8)	7.23 d (1.8)	6.90 s	6.50 s
3'				
4'				
5'				
6'	7.21 d (1.8)	7.21 d (1.8)	6.87 s	6.54 s
7'	6.52 s	6.52 s		
1"				
2"	7.63 d (8.4)	7.43 d (1.8)	7.34 s	6.77 d
3"	6.94 d (8.4)			
4"				
5"	6.94 d (8.4)	6.91 d (8.4)	6.88 d (8.4)	6.67 d (8.5)
6"	7.63 d (8.4)	7.20 dd (8.4, 1.8)	7.18 d (8.4)	6.62 dd (8.5, 2.0)
7"	7.67 d (15.6)	7.67 d (15.6)		
8"	7.08 d (15.6)	7.14 d (15.6)		
3'-OCH_3	3.99 s	3.94 s	3.89 s	3.77 s
3"-OCH_3		3.99 s	3.90 s	3.75 s

표 4

[0110]

^{13}C NMR				
위치	화합물 1	화합물 2	화합물 3	화합물 4
	δ_C	δ_C	δ_C	δ_C
1			141.8	74.6
2	146.7	146.7	122.5	41.9
3	186.6	186.6	184.4	71.6
4	105.4	105.3	101.8	39.5
5	176.1	176.1	184.4	64.8
6			122.4	39.4
7			141.5	32.0
1'	124.4	124.4	127.3	133.5
2'	107.9	107.9	104.7	102.1
3'	149.2	149.0	149.2	148.7
4'	137.5	137.4	137.5	136.0
5'	146.5	146.5	146.5	146.0
6'	113.6	113.6	110.3	107.4
7'	112.2	112.2		
1"	127.7	128.2	128.2	134.7
2"	131.2	111.0	111.5	112.9
3"	117.0	149.2	148.8	148.1
4"	160.8	150.4	150.0	145.4
5"	117.0	116.4	116.3	115.6
6"	131.2	124.6	123.9	121.6
7"	139.3	139.7		
8"	113.3	113.5		
3'-OCH_3	56.5	56.4	56.6	56.1
3"-OCH_3		56.5	56.3	56.4

[0111] **실시예 4-5 : 1-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온 (화합물 5)**

[0112] 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione

[0113] Yellow needle

[0114] EI-MS *m/z* : 354 $[M]^+$

[0115] ^{1}H-NMR (500 MHz, acetone-d_6) : 7.59 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-7), 7.54 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-1), 7.18 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-6', 6"), 7.07 (1H, s, H-2'), 7.05 (1H, s, H-2"), 6.88 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5', 5"), 6.72 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-6), 6.60 (1H, d, *J* = 16.0 Hz, H-2), 5.97 (2H, s, H-4), 3.92 (3H, s, 3"-OCH_3)

[0116] ^{13}C-NMR (125 MHz, acetone-d_6) : 184.9 (C-3, 5), 150.0 (C-4"), 148.8 (C-4', 3"), 146.3 (C-3'), 141.7 (C-7), 141.4 (C-1), 128.5 (C-1'), 128.3 (C-1"), 123.9 (C-6"), 122.7 (C-6'), 122.3 (C-6), 122.2 (C-2), 116.2 (C-5'), 115.2 (C-3'), 111.4 (C-2"), 101.8 (C-4), 56.0 (3"-OCH_3)

[0117] **실시예 4-6 : 5-하이드록시-1,7-비스(4-하이드록시페닐)-4,6-헵타디엔-3-온 (화합물 6)**

[0118] 5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one

[0119] Yellow needle

[0120] EI-MS *m/z* : 310 $[M]^+$

[0121] ^{1}H-NMR (500 MHz, acetone-d_6) : 7.54 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.53 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2", 6"), 7.07 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2', 6'), 6.88 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3", 5"), 6.74 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3', 5'), 6.53 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-6), 5.79 (1H, s, H-4), 2.68 (2H, m, H-2), 2.66 (2H, m, H-1)

[0122] ^{13}C-NMR (125 MHz, acetone-d_6) 200.4 (C-3), 168.0 (C-5), 160.4 (C-4"), 156.6 (C-4'), 140.5 (C-7), 132.7 (C-1'), 130.8 (C-2", 6"), 130.2 (C-2', 6'), 127.8 (C-1"), 120.7 (C-6), 116.8 (C-3", 5"), 116.1 (C-3', 5'), 101.0 (C-4), 42.7 (C-2), 31.2 (C-1)

[0123] **실시예 4-7 : 1,7-비스(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온 (화합물 7)**

[0124] 1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione

[0125] Yellow needle

[0126] EI-MS m/z : 340 $[M]^{+}$

[0127] ^{1}H-NMR (500 MHz, acetone-d_6) : 7.50 (2H, d, J = 16.0 Hz, H-1,7), 7.03 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-6', 6"), 7.15 (2H, s, H-2', 2"), 6.85 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-5', 5"), 6.54 (2H, d, J = 16.0 Hz, H-2,6), 5.92 (2H, s, H-4)

[0128] ^{13}C-NMR(125 MHz, acetone-d_6) 184.3 (C-3, 5), 148.5 (C-4', 4"), 146.6 (C-3', 3"), 141.3 (C-1, 7), 128.3 (C-1', 1"), 122.6 (C-6', 6"), 122.0 (C-2, 6), 116.4 (C-5', 5"), 115.2 (C-2', 2"), 101.8 (C-4)

[0129] **실시예 4-8 : 1-(4-하이드록시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온 (화합물 8)**

[0130] 1-(4-hydroxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione

[0131] Yellow needle

[0132] EI-MS m/z : 324 $[M]^{+}$

[0133] ^{1}H-NMR (500 MHz, acetone-d_6) : 7.59 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 7.58 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-1), 7.54 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-2", 6"), 7.20 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 7.07 (1H, s, H-2'), 6.93 (2H, d, J = 8.0 Hz, H-3", 5"), 6.90 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.67 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-6), 6.66 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-2), 5.95 (2H, s, H-4)

[0134] ^{13}C-NMR(125 MHz, acetone-d_6) 183.9 (C-3, 5), 160.4 (C-4"), 148.7 (C-4'), 146.4 (C-3'), 141.4 (C-7), 140.9 (C-1), 131.0 (C-2", 6"), 128.4 (C-1"), 127.5 (C-1'), 122.7 (C-6'), 122.2 (C-6), 122.1 (C-2), 116.8 (C-3", 5"), 116.5 (C-5'), 115.3 (C-2'), 101.7 (C-4)

[0135] **<실시예 5 : 항섬유화 작용 측정>**

[0136] 본 발명의 화합물들의 항섬유화 작용을 확인하기 위해, 웨스턴 블롯을 이용하여 간세포의 조직 손상에 의한 섬유화가 일어날 때 증가되는 대표적인 단백질인 α-SMA의 발현량을 확인하였다.

[0137] α-SMA 웨스턴 블롯을 수행하기 위하여, 활성화된 간성상세포와 성질이 유사한 MEF 세포에 본 발명의 화합물 1~8(10㎍/㎖)을 처리하였다. 이후 세포를 파쇄하여 단백질을 추출한 후, 이를 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하고, 나이트로셀룰로오즈 멤브레인(nitrocellurose membrane)으로 이동시켰다. 이후 α-SMA 1차 항체와 반응시키고 다시 2차 항체와 반응시켰으며 이에 대한 결과는 전용키트(ECL chemiluminescence kit)를 이용하여 확인하였고 상기 결과는 도 4에 나타내었다. 대조군으로는 약물 처치가 없는 군이며, 상기 추출물 또는 화합물의 용매를 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 최소량 사용하였다.

[0138] 도 4를 참고하면, 본 발명의 화합물 1~8이 α-SMA의 발현을 강하게 억제하고 있는 것을 알 수 있어, 상기 화합물들이 간섬유증이나 간경화증의 치료제로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 상기 화합물 1~8의 효과가 커큐민, 비스디메톡시커큐민, 디메톡시커큐민 등과 유사하면서도, 장관 내 흡수, 분포, 대사 및 분비

(ADME)가 더 좋은 화합물인 것으로 판단되기에, 상기 화합물 1~8 또는 상기 화합물들이 함유된 청국장 발효 울금 추출물이 간질환 치료제로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 예상되었다.

[0139] **<실시예 6 : 커큐미노이드 유도체의 TGF-β1 mRNA 발현 및 전사활성 억제>**

[0140] TGF-β1은 조직손상에 의한 섬유화시 증가되는 대표적인 사이토카인이다. 이를 위해, 활성화된 간성상세포와 성질이 유사한 MEF 세포에서 TGF-β1 mRNA 발현 및 전사활성을 각각 리얼타임 PCR(real-time PCR)법과 리포터 유전자 어세이(reporter gene assay)로 평가하였다. 또한 항섬유화 활성이 강했던 비스디메톡시커큐민과 화합물 1인 커큐마로진 A의 TGF-beta1 mRNA 발현 억제효능을 리얼타임 PCR로 평가하였다. 실험에 이용한 프라이머(primer)는 다음과 같다(PCR 결과물은 163bp 예상됨).

[0141] TGF-beta1 mRNA F: 5′ -TGA ACC AAG GAG ACG GAA TAC AGG-3′

[0142] TGF-beta1 mRNA R: 5′ -GCC ATG AGG AGC AGG AAG GG-3′

[0143] 또한, PCR 조건은 98℃ 30초, 60℃ 1분, 72℃ 1분을 1싸이클(cycle)로 하여 총 40싸이클을 반응시켰다. 그 결과, 커큐마로진 A가 TGF-β1 mRNA 발현 억제 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다(도 5A 참조).

[0144] 마찬가지로, 인간 TGF-beta1 유전자 프로모터의 활성을 확인하기 위해 48웰-플레이트에 MEF 세포를 배양한 후, FBS(fetal bovine serum)와 항생제가 포함되지 않는 세포배양배지를 6시간 동안 반응시켰다. 이 후, 야생형(wild type) 프로모터 WT-TGF-beta1(1㎍, control vector: pGL3 vector)를 포함하는 루시퍼라아제 리포터 벡터(luciferase reporter vector)를 MEF 세포에 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000, invitrogen)을 이용하여 트랜스펙션(transfection)하고, 24시간 후 각 프로모터의 활성을 확인하였다. 유전자 주입 효율을 보정하기 위하여 β-갈락토시다제(pCMV-β-gal 0.5㎍ 사용함)의 활성을 측정(luminometer 이용, Luminoscan Ascent; Thermo Electron Co.)하여 TGF-beta1의 프로모터 활성을 보정하였으며 상기 결과는 도 6B에 나타내었다. 루시퍼라아제 어세이 시스템은 트랜스펙션 24시간 후에 특정하였으며 Promega에서 제조한 키트를 이용하였다(dual-luciferase reporter assay system, Promega, Madison, WI, USA).

[0145] 상기 도 5B 그래프를 참고하면, 인간 TGF-beta1 유전자 프로모터(promoter, 1100 bp)와 루시퍼레이즈 리포터(luciferase reporter) 유전자를 갖는 TGF-beta1 리포터 활용 전사활성 평가에서도 커큐마로진 A의 TGF-beta1 유전자 전사억제 효능이 관찰되어, 청국장 발효 울금 추출물 유래 화합물들의 간 섬유화 억제능을 입증할 수 있었다.

[0146] **<실시예 7 : 사염화탄소를 투여하여 유도된 간조직 손상모델에 대한 청국장 발효 울금 추출물 투여에 의한 간지표 분석>**

[0147] 이 실험은 한국식품연구원에서 시행되었다. 실험동물은 중앙실험동물(주)로부터 생후 5주 된 수컷 ICR mouse(27±1g)를 공급받아 온도 23±1℃, 상대습도 55±15%, 12시간 간격으로 명암주기(12h light/dark cycle)가 조정되는 동물 사육실을 사용하였다. 1주의 순화기간을 거쳐 체중합계로 실험군을 분리하였으며 사료와 물은 자유롭게 급식시켰다. 사염화탄소는 옥수수 오일에 20% 농도로 용해하여 일주일에 2회씩 1㎖/kg(몸무게 대비)용량으로 경구 투여하였다. 정상군(normal control)은 옥수수 오일만을 일주일에 2회 경구 투여하고, 음성 대조군(negative control)은 사염화탄소를 투여한 뒤 일반사료를 섭취하였다. 양성 대조군(positive control, 표고버섯균사체 추출물을 원료로 하는 건강기능식품 시판제품[간섬유증 개선효과가 좋다고 알려짐]을 고형사료 중량대비 0.4% 농도로 첨가하여 제조)과 시험군인 비발효 울금 추출물, 청국장 발효 울금 추출물은 사염화탄소 투여 뒤 각각의 성분이 함유된 사료를 섭취하였다. 8주간 사염화탄소를 투여한 후 1일 금식시킨 뒤 희생하였다. 채혈한 후 혈청을 분리하고 간 조직은 차가운 생리식염수에 세척한 뒤 액체질소에 동결시켜 보관하였다.

[0148] 혈청 중 지표로 알라닌 아미노트랜스퍼레이즈(alanine aminotransferase, ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼레이즈(aspartate aminotransferase, AST), 알카라인 포스파타제(alkaline phosphatase, ALP), 콜레스테롤과 트리글리세리드는 분석 시약(Bayer, USA)을 이용하여 ADIVA 1650(Bayer, Japan)으로 측정하였다. 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH)는 분석 시약(Siemens, USA)을 이용하여 ADIVA 1650/2400(Siemens, USA)으로 측정하였으며, 이에 대한 결과들을 사염화탄소 투여군(CCl_4 control)을 기준으로 각 실험군의 효소 수치를 %율로 전환하여 표 5에 표기하였다.

표 5

[0149]

처리	ALT	AST	ALP	LDH	TC	TG
정상군	-	-	-	-	-	-
CCl_4 대조군	100	100	100	100	100	100
양성대조군	78	71	76	81	98	81
비발효 울금 추출물 (0.4%)+CCl_4	72	83	99	93	92	87
청국장 발효 울금 추출물 (0.4%)+CCl_4	51	42	68	61	72	76

[0150] 간 손상의 지표로 알려진 아미노산 전이효소인 알라닌 아미노트랜스퍼레이즈(alanine aminotransferase, ALT)와 아스파르테이트 아미노트랜스퍼레이즈(aspartate aminotransferase, AST)는 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 혈중으로 유리되어 높은 활성을 나타낸다고 알려져 있다. 특히 ALT는 간에 많이 존재하며 AST는 심장 간, 골격근에 많아 그 특이성이 인정된다.

[0151] 따라서 상기 표 5를 참고하면, 사염화탄소 투여군은 정상군에 비해 유의적으로 높은 효소활성을 보임으로써 간 손상이 유도된 것으로 나타났다. 한편, 청국장 발효 울금 추출물이 투여된 군은 사염화탄소 투여군보다 ALT의 효소수치가 49%가 감소된 51%로 나타났는데 이는 양성 대조군 78%보다 27%가 더 감소한 것이다. 이에 비해 비발효 울금 추출물이 투여된 군의 감소량은 72%로 나타났다.

[0152] 그리고, 알카라인 포스파타제(Alkalinate phosphatase, ALP)는 담즙이 간세포에서 배출이 잘 안되거나 담도가 막혔을 경우수치가 증가하는 것으로 알려져 있는데, 상기 표 5를 참고하면, 청국장 발효 울금 추출물의 투여군은 사염화탄소 투여군(CCl_4 control)보다 효소활성이 32%나 감소함을 확인할 수 있었다. 또한, 젖산 탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH) 역시 효소를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 흘러나와 효소 수치가 상승하게 되는데, 사염화탄소 투여군(CCl_4 control)에 비해 비발효 울금 추출물을 투여한 군이 7% 정도 감소한 반면, 청국장 발효 울금 추출물을 투여한 군은 39% 정도 감소하는 것으로 나타났다.

[0153] 또한, 총 콜레스테롤(Total cholesterol, TC)과 트리글리세리드(Triglyceride, TG)는 정상적인 간 세포내에서의 함량은 합성과 이용의 균형을 이루지만 사염화탄소에 의해 간 손상을 받으면 반응성이 높은 ·CCl3기가 생성되어 간세포 기능을 저하시켜 콜레스테롤과 글리세리드의 함량이 증가된다고 보고되어 있다.

[0154] 이에 상기 표 5를 참고하면, 총 콜레스테롤(TC)은 정상군에 비교했을 때 사염화탄소(CCl_4 control)로부터 큰 영향을 받지 못한 것으로 나타났지만 청국장 발효 울금 추출물을 투여한 군의 경우, 사염화탄소 투여군보다 수치가 약 28% 정도 감소하는 것으로 나타났다.

[0155] 또한, 트리글리세리드(TG)의 경우, 청국장 발효 울금 추출물군이 사염화탄소(CCl_4 control)군보다 24% 정도 수치가 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0156] 따라서, 상기 결과들을 통해 본 발명의 청국장 발효 울금 추출물이 비발효 울금 추출물에 비해 간 보호 효과가 뛰어날 것으로 예상되었다.

[0157] **<실시예 8 : 독성실험>**

[0158] **실시예 8-1. 급성독성**

[0159] 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물을 단기간에 과량을 섭취하였을 때의 급성적(24시간 이내)으로 동물 체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스를 30마리를 준비하였고, 각 군별로 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 30% PEG-400만을 투여하고, 실험군은 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물 및 화합물 **1**을 2.0g/kg의 농도로 각각 경구 투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 2.0g/kg 농도의 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물 및 화합물 **1**을 투여한 실험군에서는 모두 생존하였다.

[0160] **실시예 8-2 : 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험**

[0161] 장기 독성 실험은 C57BL/6J 생쥐를 대상으로 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물 및 화합물 1을 2.0g/kg의 농도로 투여한 실험군과 용매만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(Blood Urea Nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학 현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0162] **<사용예 1 : 약학적 제제예>**

[0163] **1-1. 정제의 제조**

[0164] 본 발명의 화합물 1(커큐마로진 A) 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0165] **1-2. 주사액제의 제조**

[0166] 본 발명의 화합물 1(커큐마로진 A) 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0167] **<사용예 2 : 식품 제조예>**

[0168] **2-1. 조리용 양념의 제조**

[0169] 본 발명의 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물을 0.2~10 중량%로 조리용 양념에 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0170] **2-2. 밀가루 식품의 제조**

[0171] 본 발명의 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물을 0.1~5.0 중량%로 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0172] **2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0173] 본 발명의 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물을 0.1~1.0 중량%로 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 스프 및 육즙을 제조하였다.

[0174] **2-4. 유제품(dairy products)의 제조**

[0175] 본 발명의 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물을 0.1~1.0 중량%로 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0176] **<사용예 3 : 음료 제조예>**

[0177] **3-1. 야채주스 제조**

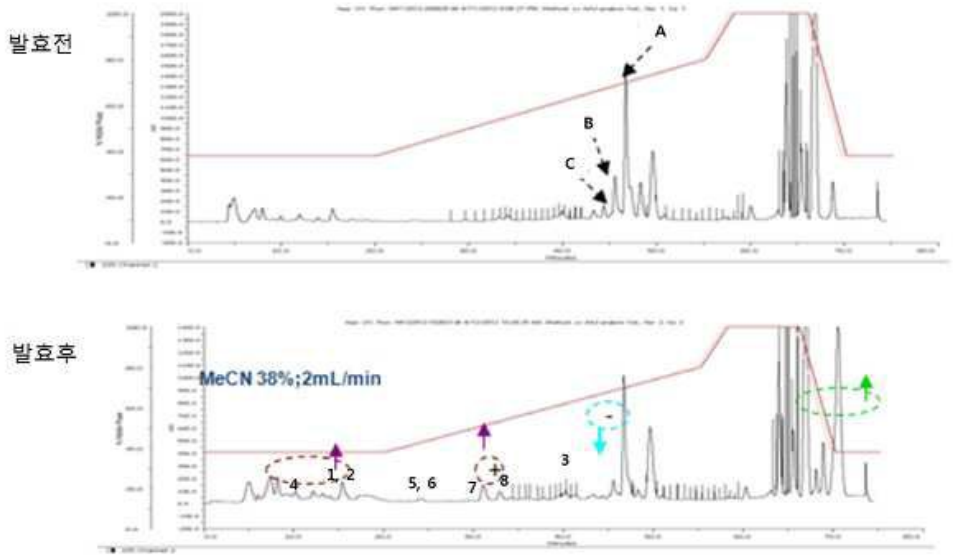
[0178] 본 발명의 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물 0.5g을 토마토 또는 당근 주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0179] **3-2. 과일주스 제조**

[0180] 본 발명의 실시예 3의 청국장 발효 울금 추출물 0.1g을 사과 또는 포도 주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

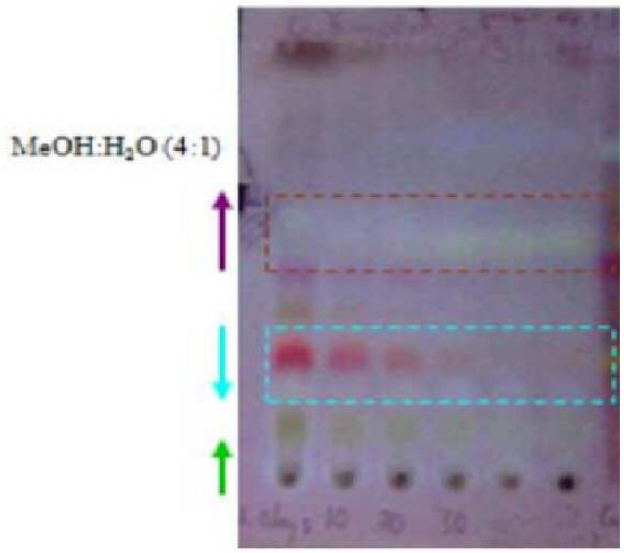
도면

도면1



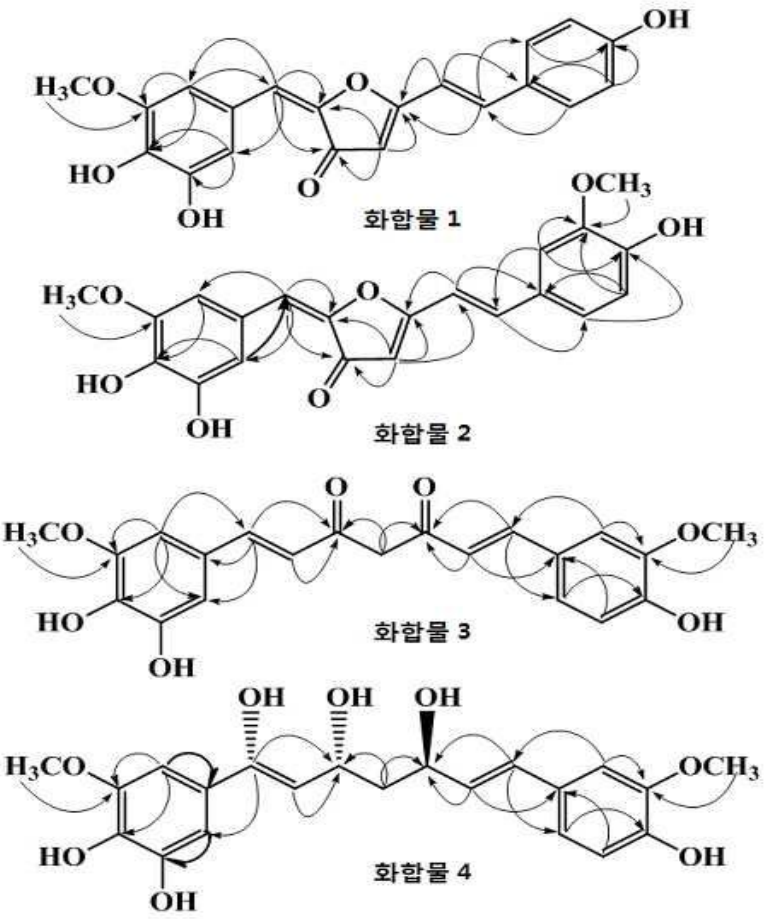
A : 커큐민　　B : 디메톡시커큐민　　C : 비스디메톡시커큐민
1 : 커큐마로진 A　　2 : 커큐마로진 B　　3 : 커큐마로진 C
4 : 커큐마로진 D　　5 : 1-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온
6 : 5-하이드록시-1,7-비스(4-하이드록시페닐)-4,6-헵타디엔-3-온
7 : 1,7-비스(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온
8 : 1-(4-하이드록시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온

도면2

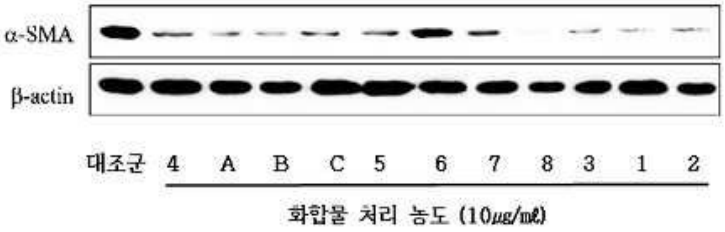


발효시간 (일)　0일 10일 20일 30일 40일 40일 (1차)(2차)

도면3


OH
H3CO
O
HO
OH
O
화합물 1
OCH3
OH
H3CO
O
HO
OH
O
화합물 2
O
O
H3CO
OCH3
HO
OH
화합물 3
OH
OH
OH
H3CO
OCH3
HO
OH
화합물 4

도면4



4 : 커큐마로진 D

A : 커큐민

B : 디메톡시커큐민

C : 비스디메톡시커큐민

5 : 1-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온

6 : 5-하이드록시-1,7-비스(4-하이드록시페닐)-4,6-헵타디엔-3-온

7 : 1,7-비스(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온

8 : 1-(4-하이드록시페닐)-7-(3,4-디하이드록시페닐)-1,6-헵타디엔-3,5-디온

3 : 커큐마로진 C

1 : 커큐마로진 A

2 : 커큐마로진 B

도면5

