



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0010747

(43) 공개일자 2016년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/343 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 36/22 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0090617

(22) 출원일자 2014년07월17일

심사청구일자 2014년07월17일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

백남인

경기 화성시 동탄중앙로 51, 629동 901호 (반송동, 동탄나루마을한화꿈에그린아파트)

사비나 쉬레스타

경기 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 생명과학대학 천연물화학 106호 연구실 (서천동, 경희대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 대아

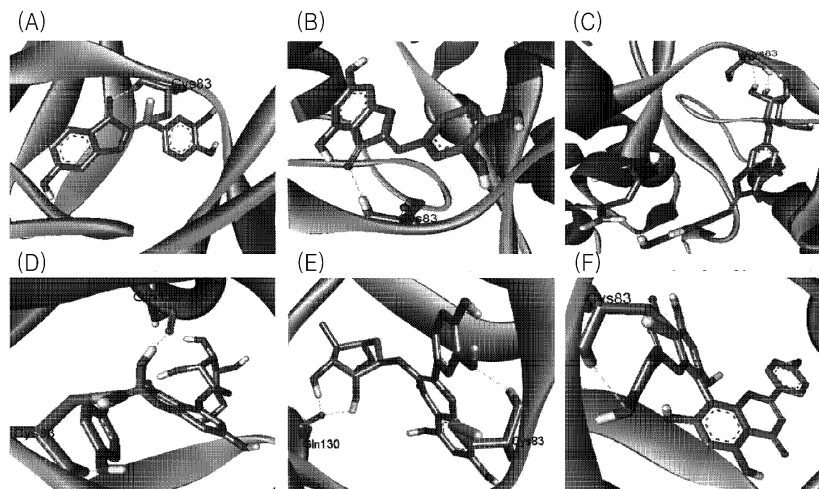
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 네팔 옷나무 유래의 플라보노이드 화합물들을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방, 치료 및 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 네팔 옷나무 유래의 플라보노이드 화합물들을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방, 치료 및/또는 개선용 식품 조성물 및 약학적 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

박지혜

전라북도 순창군 풍산면 한내리 187

사띠시쿠말 나타라잔

경기 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 애지원 한방바
이오 연구실 (서천동, 경희대학교)

양덕춘

경기 용인시 기흥구 용구대로 1842, 111동 301호
(보라동, 현대모닝사이드2차아파트)

이대영

경기 수원시 영통구 봉영로 1620, 102동 705호 (영
통동, 대우월드마크)

김윤철

대전 서구 둔산로 155, 118동 402호 (둔산동, 크로
바아파트)

이동성

전북 전주시 완산구 강변로 306, 102동 702호 (중
화산동2가, 광진햇빛찬아파트)

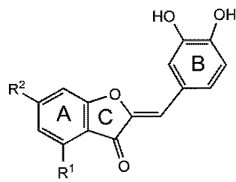
명세서

청구범위

청구항 1

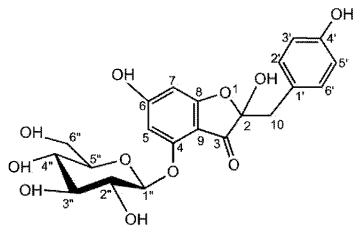
하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

<화학식 1>

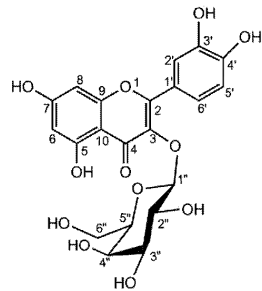


이 때, R¹은 OH이고, R²는 OH, O-β-D-Glc, 및 탄소 수 5 이하의 알콕시로 구성된 군으로부터 선택된다.

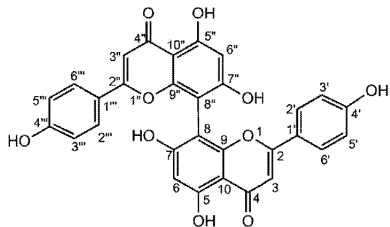
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>

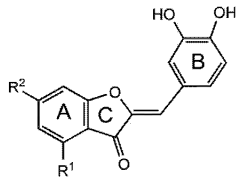


청구항 2

제 1항에 있어서,

하기 화학식 1의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

<화학식 1>



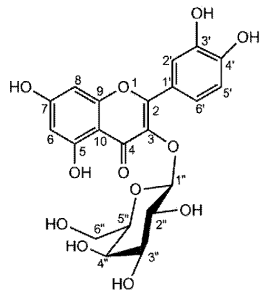
이 때, R¹은 OH이고, R²는 OH 또는 O-β-D-Glc이다.

청구항 3

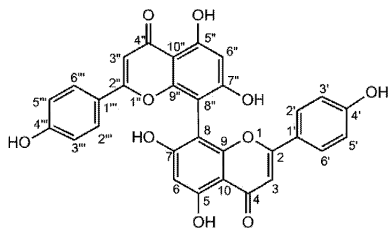
제 1항에 있어서,

하기 화학식 3 및 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

<화학식 3>



<화학식 4>



청구항 4

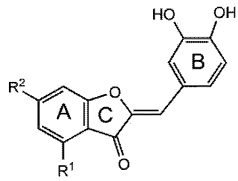
제 1항에 있어서,

상기 화합물들은 네팔 옷나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)로부터 유래하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

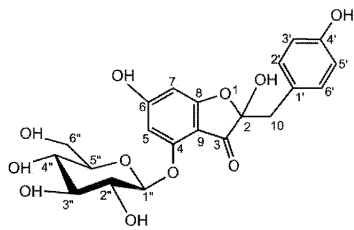
하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물.

<화학식 1>

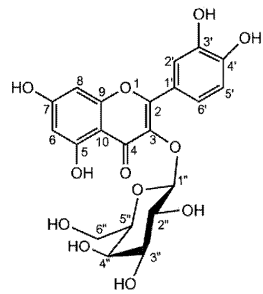


이 때, R^1 은 OH이고, R^2 는 OH, O- β -D-Glc, 및 탄소 수 5 이하의 알콕시로 구성된 군으로부터 선택된다.

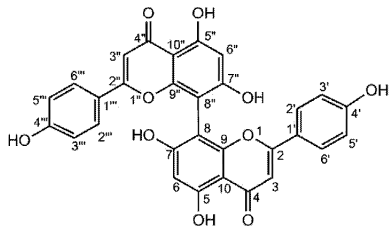
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>

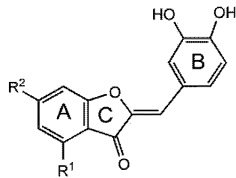


청구항 6

제 5항에 있어서,

하기 화학식 1의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물.

<화학식 1>



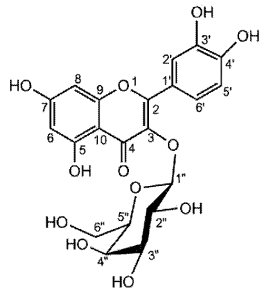
이 때, R^1 은 OH이고, R^2 는 OH 또는 O- β -D-Glc이다.

청구항 7

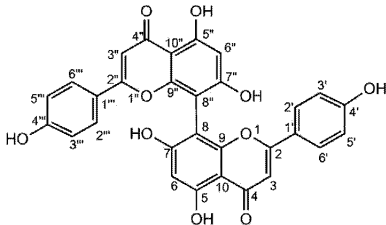
제 5항에 있어서,

하기 화학식 3 및 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물.

<화학식 3>



<화학식 4>



청구항 8

제 5항에 있어서,

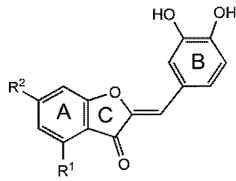
상기 화합물들은 네팔 옷나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)로부터 유래하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 9

네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물로,

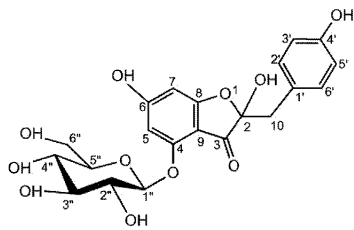
상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

<화학식 1>

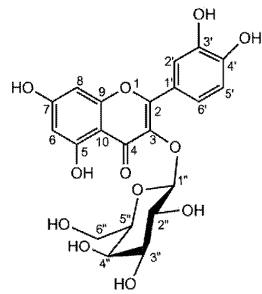


이 때, R^1 은 OH이고, R^2 는 OH, O- β -D-Glc, 및 탄소 수 5 이하의 알콕시로 구성된 군으로부터 선택된다.

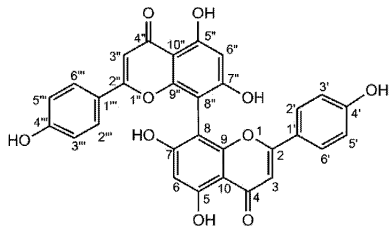
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 네팔 옷나무를 유기용매로 추출하거나 분획하여 제조하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 11

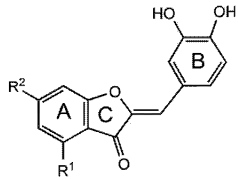
네팔 옷나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및

상기 네팔 옷나무 열매의 추출물로부터 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된

화합물을 분리하는 단계를 포함하는,

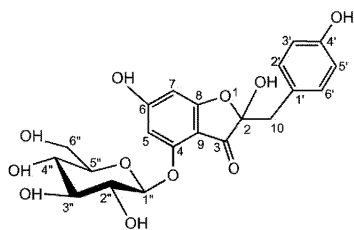
퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 제조 방법.

<화학식 1>

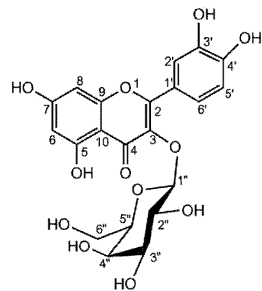


이 때, R¹은 OH이고, R²는 OH, O-β-D-Glc, 및 탄소 수 5 이하의 알콕시로 구성된 군으로부터 선택된다.

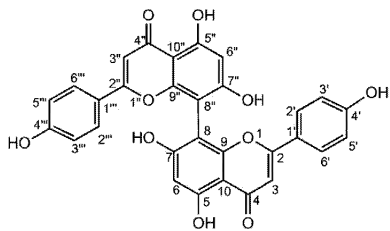
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



청구항 12

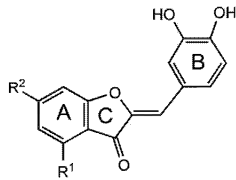
제 11항에 있어서,

상기 유기용매는 물, 탄소 수 5 이하의 저가 알코올, 에틸 아세테이트 또는 클로로포름인 것을 특징으로 하는 제조 방법.

청구항 13

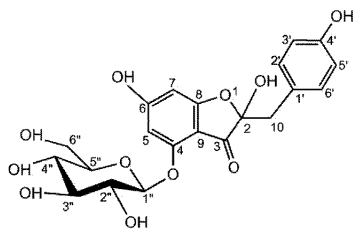
네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물로,
상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로
부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

<화학식 1>

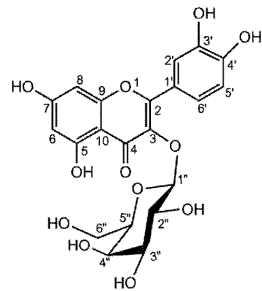


이 때, R¹은 OH이고, R²는 OH, O-β-D-Glc, 및 탄소 수 5 이하의 알콕시로 구성된 군으로부터 선택된다.

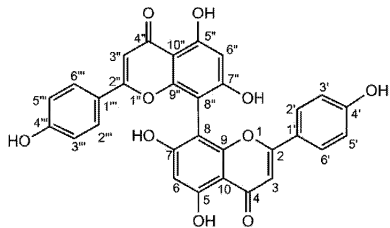
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 네팔 옷나무를 유기용매로 추출하거나 분획하여 제조하는
것을 특징으로 하는 식품 조성물.

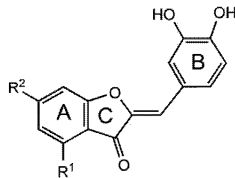
청구항 15

네팔 옷나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및

상기 네팔 옷나무 열매의 추출물로부터 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,

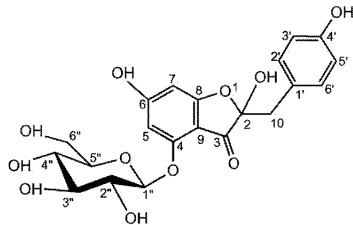
퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물의 제조 방법.

<화학식 1>

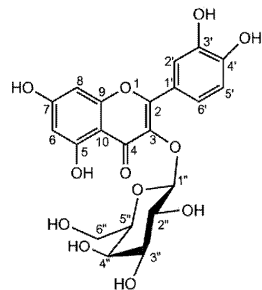


이 때, R¹은 OH이고, R²는 OH, O-β-D-Glc, 및 탄소 수 5 이하의 알콕시로 구성된 군으로부터 선택된다.

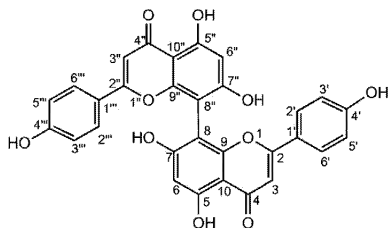
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 유기용매는 물, 탄소 수 5 이하의 저가 알코올, 에틸 아세테이트 또는 클로로포름인 것을 특징으로 하는

제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 네팔 옷나무 유래의 플라보노이드 화합물들을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방, 치료 및 개선용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 네팔 옷나무인 *Rhus parviflora Roxb.* (옷나무과)는 스리랑카어로 “Tintidikah”로 알려져 있다. 이것은 네팔, 인도, 부탄, 스리랑카의 해발 700-1100미터에서 발견된다. 네팔에서는 R. 파비플로라(R. parviflora) 열매를 식용으로 사용하기도 하며(Bajracharya, D. Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 1980, 171, 363.), 열매나 줄기 수피를 달인 즙을 이질을 치료하는데 이용하기도 한다(Bhattarai, N. K. Int. J. Pharm. 1991, 29, 284.). R. 파비플로라 열매에 있는 생물학적 활성 성분으로는 플라보노이드(flavonoid), 바이플라보노이드(biflavonoid), 페놀계 화합물 등이 있다.

[0003] 한편, CDK5는 세린/트레오닌 사이클린-의존적 인산화 효소(키나아제)에 속한다. CDK5는 주된 약리적인 표적으로서 CDK5의 탈조절화는 허혈성뇌졸중, 루게릭병, 헌팅턴병, 진성 당뇨병, 암 뿐만 아니라 알츠하이머병, 파킨슨병, 니만피크 타입 C 병 과 같은 다양한 신경변성질환의 원인이 된다. CDK5는 신경활성의 주요 조절인자이며 이것의 억제제는 타우(tau)의 병리학적 인산화 및 신경섬유성 병리를 막는다. 나아가, 통증 과정에 있어 CDK5/p25의 관여는 그 억제제가 급성 통증의 치료에 잠재적 치료의 가치를 가진다는 것을 암시한다.

[0004] CDK5 활성화는 뉴런 특이적 활성체인 p35나 p39에 의해 조절된다. p35의 잘려진 단편인 p25의 축적은 알츠하이머병을 가진 환자의 뇌에 있는 CDK5의 탈조절로 나온 결과로 알려져 있다. 국소빈혈(ischemia), 흥분세포독성(excitotoxicity), 베타-아밀로이드 펩타이드를 포함하는 신경독성 상태는 p35에서 p25로의 전환을 야기한다. 몇몇의 합성된 복합체들이 CDK5/p25를 억제하는 것으로 보고 되었고, 그 중에서 매우 효과적으로 알려진 억제제는 푸르발라놀(purvalanol) B, 아미노푸르발라놀(aminopurvalanol), R-로스코비틴(roscovitine)이다. 우성 음성 키나아제 돌연변이체의 발현에 있어서 R-로스코비틴(roscovitine)과 플라보피로돌(flavopirodol)과 같은 CDK 억제제의 투여는 뉴런세포의 소실을 막았고, 신경보호적인 유효성은 CDK5의 억제와 관련이 있었으며 그 또한 임상시험 중이다. 망막아세포종(retinoblastoma)의 인산화에 있어 CDK5/p25가 관여하는 것이 뉴런세포사의 초기활동이라 여겨진다. 최근에, CDK5의 시스테인 83(CYS83) 위치에서의 S-나이트로실화(nitrosylation)는 그것의 키나아제 활성을 억제하는 것으로 알려졌다. 그러나 CDK5/p25를 억제하는 것으로 알려진 천연물은 부티로락톤(butyrolactone), 프로시아니딘(procyanidin) B2, 하이메니알디신(hymenialdisine), 벨리딘(bellidin) 등과 같은 몇몇 종류에 불과하다.

[0005] 이에 본 발명자들은 천연물 유래의 CDK5/p25 억제제를 연구하던 중 네팔 옷나무로부터 분리한 특정 플라보노이드계 화합물들이 CDK5/p25 억제에 효과적인 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 천연물로부터 분리한 화합물들을 이용하여 퇴행성 신경질환의 예방, 치료 및 개선용 식품 및 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 네팔 옷나무 유래의 플라보노이드 화합물들을 포함하는 퇴행성 신경질

환의 예방, 치료 및 개선용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 조성물은 신경 활성의 주요 조절인 CDK5/p25의 억제 활성을 가지며, 퇴행성 신경질환의 치료 및 개선능을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 CDK5/p25 및 활성부위인 CYS83과 GLN130의 리본 다이어그램을 나타낸다. 3차 구조도는 Discovery Studio Visualizer 3.5 프로그램으로 제작하였다.

도 2는 화합물 1 내지 6의 CDK5/p25와의 도킹된 복합체의 분자적 상호작용 히트(hits)들을 나타낸다. (A): 화합물 1, (B): 화합물 2, (C): 화합물 3, (D): 화합물 4, (E): 화합물 5, (F): 화합물 6.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다.

[0011] 또한 본 발명은 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물에 대한 것이다.

[0012] 또한 본 발명은 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물로,

[0013] 상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물에 대한 것이다.

[0014] 또한 본 발명은 네팔 옷나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및

[0015] 상기 네팔 옷나무 열매의 추출물로부터 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,

[0016] 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물의 제조 방법에 대한 것이다.

[0017] 또한 본 발명은 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물로,

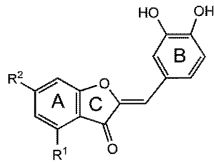
[0018] 상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물에 대한 것이다.

[0019] 또한 본 발명은 네팔 옷나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및

[0020] 상기 네팔 옷나무 열매의 추출물로부터 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,

[0021] 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물의 제조 방법에 대한 것이다.

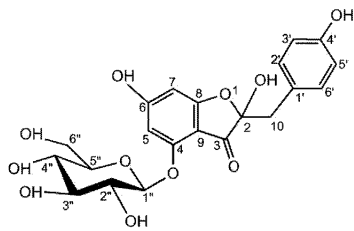
[0022] <화학식 1>



[0023]

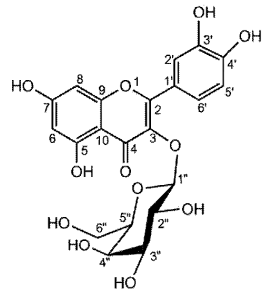
[0024] 이 때, R^1 은 OH이고, R^2 는 OH, O- β -D-Glc, 및 탄소 수 5 이하의 알콕시로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0025] <화학식 2>



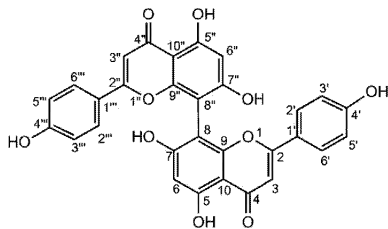
[0026]

[0027] <화학식 3>



[0028]

[0029] <화학식 4>



[0030]

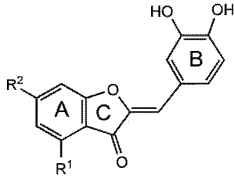
[0031] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0032] 화학식 1의 화합물

[0033] 본 발명은 화학식 1의 화합물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 화학식 1의 화합물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 바람직하게는 상기 화학식 1의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염은 네팔

옻나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)로부터 유래하는 것이다.

<화학식 1>

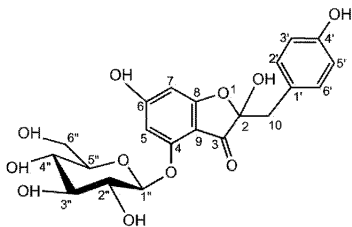


이 때, R^1 은 OH이고, R^2 는 OH, O- β -D-Glc, 및 탄소 수 5 이하의 알콕시로 구성된 군으로부터 선택된다. 탄소 수 5 이하의 알콕시는 가지달리거나 가지가 없는 알콕시일 수 있으며, 예컨대, 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 이소프로톡시, 부톡시 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 R^2 는 OH, O- β -D-Glc이다. 이 때, 상기 "Glc"는 글루코스를 가리킨다. 가장 바람직하게는 화학식 1의 화합물은 화합물 2 또는 화합물 3이다.

화학식 2의 화합물

본 발명은 화학식 2의 화합물, 화합물 4를 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 화학식 2의 화합물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 바람직하게는 상기 화학식 2의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염은 네팔 옻나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)로부터 유래하는 것이다.

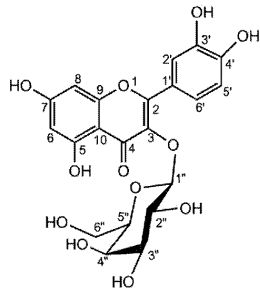
<화학식 2>



화학식 3의 화합물

본 발명은 화학식 3의 화합물, 즉 화합물 5를 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 화학식 3의 화합물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 바람직하게는 상기 화학식 3의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염은 네팔 옻나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)로부터 유래하는 것이다.

[0043] <화학식 3>

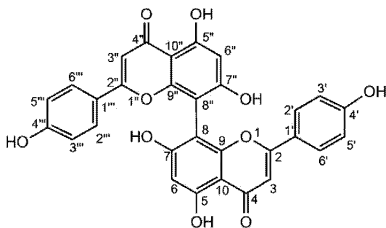


[0044]

[0045] 화학식 4의 화합물

[0046] 본 발명은 화학식 4의 화합물, 즉 화합물 6을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 화학식 4의 화합물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 바람직하게는 상기 화학식 4의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염은 네팔 옷나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)로부터 유래하는 것이다.

[0047] <화학식 4>



[0048]

[0049] 약학적으로 허용가능한 염

[0050] 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 화학식 2의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 화학식 3의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염 및/또는 화학식 4의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 식품 조성물 또는 약학적 조성물, 및 그 각각의 제조방법에 대한 것이다.

[0051] 본 발명에서 사용하는 “약학적으로 허용가능한 염”이란, 모(parent) 화합물의 바람직한 약리(pharmacological) 활성을 갖는, 화합물의 염을 가리키며, 비록 “약학적으로” 라고 기재하고는 있으나, 식품에 사용가능한 염 또한 포함한다. 이들은 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 가리키며, 상기 염으로는 당업계에 널리 알려진 염들을 사용하면 되며, 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0052] 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물

[0053] 본 발명은 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물/퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물에 대한 것으로, 상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은, 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0054] 상기 네팔 옷나무 추출물 및 분획물은 네팔 옷나무, 바람직하게는 네팔 옷나무의 열매를 용매를 이용하여 추출

및 분획함으로써 수행하며, 바람직하게는 유기 용매를 이용하여 수행한다. 상기 유기 용매는 물, 탄소 수 5 이하의 저가 알코올, 에틸 아세테이트 또는 클로로포름이며, 바람직하게는 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올, 또는 에틸 아세테이트이다.

[0055] 퇴행성 신경질환

[0056] 본 발명의 퇴행성 신경질환은 신경의 퇴행, 손상으로 인한 질병을 의미한다. 바람직하게는 본 발명의 퇴행성 신경질환은 cdk5/p25 활성의 비정상적인 활성화에 의하여 유발되거나, cdk5/p25 활성을 조절함으로써 병증이 약화, 개선될 수 있는 신경질환을 의미한다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 퇴행성 신경질환은 허혈성뇌졸중, 루게릭병, 헌팅턴병, 진성 당뇨병, 알츠하이머병, 파킨슨병, 니만피크 타입 C 병, 타우(tau) 병이다.

[0057] 식품 조성물

[0058] 본 발명의 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 이들을 포함하는 네팔 옷나무 추출물 또는 분획물 외, 약학적으로 허용가능한 아쥬반트(adjunct), 희석제(diluent) 또는 담체(carrier) 또는 이들의 선택적인 혼합물(admixture)을 추가로 포함할 수 있다. 또한 본 발명의 식품 조성물은 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을, 이성질체들, 입체이성질체들, 이형체들, 토토머들, 다형체들, 수화물들 또는 이들의 용매화합물들의 형태로 포함할 수도 있다.

[0059] 본 발명의 식품은 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 환자식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 화합물을 첨가하는 것도 포함된다.

[0060] 본 발명의 식품 조성물은, 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 이들을 포함하는 네팔 옷나무 추출물 또는 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 이들을 포함하는 네팔 옷나무 추출물 또는 분획물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량부에 대하여 0.001 내지 99.99 중량부, 바람직하게는 0.001 내지 30 중량부 첨가될 수 있다. 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 이들을 포함하는 네팔 옷나무 추출물 또는 분획물의 유효용량은 본 발명의 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 상기 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0061] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡슐제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조절할 수 있다.

[0062] 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 이들을 포함하는 네팔 옷나무 추출물 또는 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

[0063]

약학적 조성물

[0064]

본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물 100 중량부에 대하여 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 이들을 포함하는 네팔 옷나무 추출물 또는 분획물을 0.001 내지 99.99 중량부 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.001 내지 30 중량부 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 100 중량부에 대하여 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 이들을 포함하는 네팔 옷나무 추출물 또는 분획물을 0.001 내지 20 중량부 포함할 수 있다. 그러나 이는 투약자의 필요에 따라 증감할 수 있으며, 식생활, 영양 상태, 병의 진행 정도 등 상황에 따라 적절히 증감할 수 있다.

[0065]

본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제는 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제가 있으며 이들 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제 등과 같은 비경구 투여용 제제로 사용되는 것 역시 바람직하다. 또한 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을, 이성질체들, 입체이성질체들, 이형태체들, 토토머들, 다형체들, 수화물들 또는 이들의 용매화합물들의 형태로 포함할 수도 있다.

[0066]

본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 성별 및 합병증 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있지만 일반적으로는 성인 1kg 당 0.1mg 내지 10g, 바람직하게는 10 mg 내지 5g의 용량으로 투여될 수 있다. 또, 단위 제형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0067]

식품/약학적 조성물의 제조 방법

[0068]

본 발명은 네팔 옷나무, 바람직하게는 네팔 옷나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및 상기 네팔 옷나무 추출물로부터 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 분리하는 단계를 포함하는, 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물/퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 식품 조성물의 제조 방법에 대한 것이다.

[0069]

상기 용매는 유기 용매이며, 바람직하게는 물, 탄소 수 5 이하의 저가 알코올, 에틸 아세테이트 또는 클로로포름이고, 더욱 바람직하게는 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 이소프로판올, 또는 에틸 아세테이트이다.

[0070]

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0071]

<재료 및 실험 방법>

[0072]

재료

[0073] 네팔옷나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)의 열매는 본 발명의 발명자들이 네팔에서 직접 채집하여 건조한 후 한국으로 갖고 와 하기 시험들을 수행하였다.

[0074] 도킹 평가

[0075] 도킹 연구를 위하여, RCSB 단백질 데이터뱅크로부터 CDK5/p25의 3차구조를 얻었는데, 여기서 CDK5/p25는 억제제인 (R)-로스코비틴(roscovitin)과 공동 결정을 이루고 있다. 자동화된 도킹 도구인 AutoDock을 이용하여 헤테로 원자를 제거하였고, H-원자를 단백질 키나아제 구조에 붙였다. 활성부위 잔기는 CDK5/p25 복합구조에서 공동결정화된 리간드 구조에 기초하여 확인하였다. 초기에, 도킹 연구는 재생력을 확인하기 위해 공동결정화된 리간드 구조를 CDK5/p25의 활성부위로 도킹하여 입증하였다. 또한 종래 알려진 CDK5/p25 억제제인 (R)-로스코비틴(roscovitin)의 구조는 CDK 조절에 있어 중요한 부위인 글라이신이 많은 루프의 특이한 무너진 구조를 안정화하였다.

[0076] CDK5/p25의 결정구조는 선택적인 CDK 억제제의 확인 및 최적화를 위한 의미있는 도구로 간주되었다. 플라보노이드(flavonoid) 유도체 복합체인 화합물 1 내지 6의 구조는 NCBI의 Pubchem 복합체 데이터베이스에서 검색하였다(PubChem IDs 화합물 1: 5281295, 화합물 2: 5281220, 화합물 3: 5321164, 화합물 4: 42607791, 화합물 5: 5281643, 화합물 6: 5281609), 종래 알려진 CDK5/p25 억제제인 R-로스코비틴(Roscovitin)(PubChem ID 160355), 알스테르파울론(Alsterpaullone)(PubChem ID 5005498), 스타우로스포르린(Staurosporine)(PubChem ID 44259)을 대조군으로 사용하였다. 화합물들의 2차구조를 Discovery Studio Visualizer 3.5를 이용하여 3차 구조로 전환하였고 최적화 단계는 이전의 연구 방법(Sathishkumar, N.; Karpagam, V.; Sathiyamoorthy, S.; Woo, M. J.; Kim, Y. J.; Yang, D. C. *Comput. Biol. Med.* 2013, 43, 786)을 따라 수행하였다. 이렇게 최적화된 화합물 1 내지 6을 이용하여 도킹 연구를 통한 CDK5/p25 활성부위에 대한 적당한 결합 방향을 확인하였다.

[0077] 도킹연구는 자동화된 도킹도구인 AutoDock 4.2.3을 이용하여 CDK5/p25와 플라보노이드 유도체를 가지고 수행하였다. 도구는 Larmakian genetic algorithm을 이용하여 작동한다(Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* 1998, 19, 1639.). 활성부위를 기반으로, 플라보노이드들의 크기에 따라 격자무늬 파라미터 사이즈 변화를 가지고 격자무늬 파라미터파일이 만들어졌다. AutoDock 그리드는 CDK5/p25 활성부위인 CYS83과 GLN130 잔기를 기반으로 한 큐브 내에서 0.375Å 간격을 가진 규칙적으로 공간화된 점들에 의해 계산되었다(Mapelli, M.; Massimiliano, L.; Crovace, C.; Seeliger, M. A.; Tsai, L. H.; Meijer, L.; Musacchio, A. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 671.). 도킹 과정에 관한 자세한 설명은 이전에 발표한 연구에 언급되어 있다(Natrajan, S.; Subramaniam, S.; Mathiyalagan, R.; Yang, D. U.; Lee, H. N.; Yang, D. C. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2012, 27, 685.). 도킹 연구는 인텔(R) 2.93 GHz Xenon(R) CPU 5670 서버를 이용해 수행하였다.

[0078] <실험예 1> 네팔옷나무로부터 화합물의 분리

[0079] 네팔옷나무의 열매 건조 분말 6 kg 을 실온에서 70 %(v/v) 에탄올로 추출하였다. 추출물을 농축한 후, 얻어진 농축물 1440 g 을 6 리터 물에 현탁시킨 후, 에칠아세테이트 (6 L x 3), n-BuOH (6 L x 3) 로 추출, 농축하여 EtOAc (RPE, 48 g), n-BuOH (RPB, 173 g), and H₂O (RPW, 1219 g) 분획을 얻었다. EtOAc 분획 (RPE, 48 g) 을 silica gel column chromatography (c.c.) (Φ 14×12 cm) 하였으며, n-hexane-EtOAc (10:1 → 3:1 → 1:1, 각 20 L) 와 CHCl₃-MeOH (6:1 → 1:1, 각 10 L each)로 용출하여 22 개의 분획 (RPE-1 에서 RPE-22)을 얻었다. RPE-15 분획 [2.33 g, elution volume/total volume (Ve/Vt) 0.52-0.54]을 다시 ODS c.c. (Φ 4×5 cm, 용출액 MeOH-H₂O 2:1, 4 L → 1:1, 1 L) 하여 13 개의 분획 (RPE-15-1 에서 RPE-15-13)을 얻었다. RPE-15-3 분획 (326 mg, Ve/Vt 0.01-0.09)을 Sephadex LH-20 c.c. (Φ 2×45 cm, 용출액 MeOH-H₂O 1:1, 4.5 L)하여 13 개의 분획 (RPE-15-3-1 에서 RPE-15-3-13) 및 화합물 2 [RPE-15-3-11, 18.4 mg, Ve/Vt 0.65-0.83, TLC (RP-18 F₂₅₄s) R_f 0.50 MeOH-H₂O (2:1)]를 분리하였다. RPE-15-4 분획 (349.5 mg, Ve/Vt 0.09-0.32) 을 SiO₂ c.c. (Φ 3×12 cm, CHCl₃-MeOH 14:1, 2.7 L)하여 9개의 분획 fractions (RPE-15-4-1 에서 RPE-15-4-9)을 얻었다. RPE 15-4-3 분획(88.7 mg, Ve/Vt 0.02-0.04)을 Sephadex LH-20 c.c. (Φ 2.5×35 cm, MeOH-H₂O 2:1, 1200 ml)하

여 3개의 분획 (RPE-15-4-3-1 에서 RPE-15-4-3-6) 및 화합물 1 [RPE-15-4-13-3, 5.6 mg, Ve/Vt 0.25-0.41, TLC (RP-18 F₂₅₄s) Rf 0.45 MeOH-H₂O (2:1)]을 분리하였다. 분획 RPE-15-6 (708 mg, Ve/Vt 0.45-0.87) 을 Sephadex LH-20 c.c. (Φ 2.5×45 cm, MeOH-H₂O 2:1, 5 L)하여 10개의 분획 (RPE-15-6 -1 에서 RPE-15-6-10) 및 화합물 6 [RPE-15-6-6, 19 mg, Ve/Vt 0.30-0.36, TLC (RP-18 F₂₅₄s) Rf 0.30 MeOH-H₂O (3:1)]을 분리하였다. 분획 RPE-18 (2 g, Ve/Vt 0.60-0.61)를 Sephadex LH-20 c.c. (Φ 2.5×45 cm, MeOH-H₂O 1:1, 2 L) 하여 16 개의 분획 (RPE-18-1 에서 RPE-18-16)을 얻었다. 분획 RPE-18-10 (510 mg, Ve/Vt 0.24-0.39) 을 Sephadex LH-20 c.c. (Φ 2.5×40 cm, MeOH-H₂O 1:3, 15 L)하여 18 개의 분획 (RPE-18-10-1 에서 RPE-18-10-18)과 화합물 5 [RPE-18-10-4, 45.7 mg, Ve/Vt 0.17-0.19, TLC (RP-18 F₂₅₄s) Rf 0.55 MeOH-H₂O (2:1)]를 분리하였다. 분획 RPE-18-11 (75 mg, Ve/Vt 0.39-0.42)을 Sephadex LH-20 c.c. (Φ 2.5×35 cm, MeOH-H₂O 1:3, 3.8 L)하여 10개의 분획 (RPE-18-11-1 에서 RPE-18-11-13) 및 화합물 3 [RPE-18-11-10, 13 mg, Ve/Vt 0.59-0.70, TLC (RP-18 F₂₅₄s) Rf 0.75 MeOH-H₂O (2:1)]을 분리하였다. n-BuOH 분획 (RPB, 173 g) 을 SiO₂ c.c. (Φ 15×13 cm, n-hexane-EtOAc 4:1, 500 mL → 2:1, 2 L, CHCl₃-MeOH 17:1, 10L → 15:1, 2L → 10:1, 6L → 9:3:1, 2L → 7:3:1, 2 L → MeOH, 4L)하여 20개의 분획 (RPB-1 에서 RPE-20)를 얻었다. 분획 RPB-11 (12 g, Ve/Vt 0.54-0.76)을 SiO₂ c.c. (Φ 6.5×13 cm, CHCl₃-MeOH-H₂O 12:3:1, 1.5 L → 9:3:1, 4 L) 하여 15개의 분획 (RPB-11-1 에서 RPB-11-15)을 얻었다. 분획 RPB-11-14 (561 mg, Ve/Vt 0.88-0.91)를 Sephadex LH-20 c.c. (Φ 2×50 cm, H₂O 및 MeOH 100% H₂O, 400 ml, 33% MeOH, 500 ml → MeOH, 2 L)하여 14 개의 분획 (RPB-11-14-1 에서 RPB-11-14-14)과 화합물 4 [RPB-11-14-11, 7 mg, Ve/Vt 0.32-0.41, TLC (RP-18 F₂₅₄s) Rf 0.83 MeOH-H₂O (2:1)]를 분리하였다. 분리한 6종 화합물의 물리화학적 및 스펙트럼 데이터는 아래와 같다.

[0080]

Sulfuretin (화합물 1)

[0081]

노란색 분말 (MeOH), mp 280-281°C; (IR_v KBr, cm⁻¹) 3250, 1625, 1600, 1528, 1520; negative MS (FAB) m/z: 269 [M-H]⁻; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD-d₄, δH) 7.60 (d, J=6.4 Hz, H-4), 7.51 (d, J=1.6 Hz, H-2'), 7.22 (dd, 8.4, 1.6, H-6'), 6.83 (d, J=8.4 Hz, H-5'), 6.70 (br. s, H-7), 6.69 (br. d, J=6.4 Hz, H-5), 6.68 (s, H-10). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD-d₄, δc) 184.45 (C-3), 169.40 (C-8), 167.96 (C-6), 146.35 (C-4'), 140.78 (C-2), 139.41 (C-3'), 126.08 (C-4), 125.96 (C-6'), 125.58 (C-1'), 118.59 (C-5'), 115.57 (C-5), 114.39 (C-9), 114.29 (C-10), 113.78 (C-2'), 97.81 (C-7).

[0082]

Aureusidin (화합물 2)

[0083]

고동색 분말 (MeOH), mp 265-268°C; IR_v (CaF₂ plate, cm⁻¹) 3350, 1630, 1605, 1520, 1500; negative MS (FAB) m/z: 285 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, δH) 7.37 (d, J=2.0 Hz, H-2'), 7.16 (dd, J=8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.80 (d, J=8.4 Hz, H-5'), 6.42 (s, H-10), 6.16 (d, J=1.6 Hz, H-5), 6.05 (d, J=1.6 Hz, H=7). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, δc) 179.12 (C-3), 167.60 (C-6), 167.20 (C-4), 158.39 (C-8), 147.51 (C-4'), 146.07 (C-2), 145.5 (C-3'), 123.94 (C-6'), 123.80 (C-1'), 117.69 (C-2'), 116.08 (C-5'), 109.51 (C-10), 102.98 (C-9), 97.81 (C-7), 90.34 (C-5).

[0084]

Aureusidin-6-O-glucopyranoside (화합물 3)

[0085]

고동색 분말 (MeOH), mp 265-268°C; IR_v (CaF₂ plate, cm⁻¹) 3350, 1630, 1605, 1520, 1500; negative MS (FAB) m/z: 447 [M-H]⁻; ¹H NMR (400 MHz, pyridine-d₅, δH) 8.05 (br. s, H-2'), 7.46 (dd, J=8.0, 1.2 Hz, H-6'), 7.26 (d, J=8.0 Hz, H-5'), 7.08 (s, H-10), 6.94 (br. s, H-7), 6.53 (br. s, H-5), 5.76 (d, J=7.2 Hz, H-1'), 4.41-4.25 (overlapped, H-2''-6''). ¹³C NMR (100 MHz, pyridine-d₅, δc) 180.29 (C-3), 168.99 (C-8), 168.63 (C-4), 158.02 (C-6), 147.35 (C-4', 2), 147.10 (C-2), 145.5 (C-3'), 124.83 (C-1'), 124.68 (C-6'), 118.51 (C-5'), 116.77 (C-2'), 111.96 (C-10), 104.89 (C-9), 101.76 (C-1'), 98.44 (C-7), 93.25 (C-5).

[0086] Hovetrichoside C (화합물 4)

[0087] 갈색 분말(MeOH), mp 180-182°C; $[\alpha]_D^{25} -35.0^\circ$ (c 1.0, MeOH); IR_v (KBr, cm⁻¹) 3330, 1690, 1600, 1520, 1500; MS (FAB) m/z: 449 [M-1]⁻; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD-d₄, δH) 6.97 (d, J=8.4 Hz, H-2', 6'), 6.54 (d, J=8.4 Hz, H-3', 5'), 6.03 (br. s, H-5), 5.92 (br. s, H-7), 4.85 (d, J=3.6 Hz, H-1'), 3.05 (br. s, H-10), 3.65-3.29 (overlapped, H-2''-6''). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD-d₄, δC) 196.56 (C-3), 174.58 (C-8), 171.48 (C-6), 159.17 (C-4), 157.27 (C-4'), 132.51 (C-2', 6'), 125.53 (C-1'), 115.78 (C-3', 5'), 107.44 (C-2), 103.42 (C-9), 101.64 (C-1'), 97.12 (C-5), 93.21 (C-7), 78.39 (C-5'), 77.35 (C-3'), 74.02 (C-2''), 71.14 (C-4''), 62.29 (C-6''), 41.93 (C-10).

[0088] Quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside (화합물 5)

[0089] 노란색 분말(MeOH), m.p. 235-236°C; $[\alpha]_D^{25} -17^\circ$ (c 0.25, MeOH); IR_v (KBr, cm⁻¹) 3300, 1650; negative MS (FAB) m/z: 463 [M-1]⁻; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD-d₄, δH) 7.84 (1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 7.56 (1H, dd, J=2.0, 8.6 Hz, H-6'), 6.85 (1H, d, J=8.6 Hz, H-5'), 6.36 (1H, br. s, H-8), 6.17 (1H, br. s, H-6), 5.22 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1'), 4.78-4.102 (m, H-2''-6''). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD-d₄, δC) 179.21 (C-4), 165.79 (C-7), 162.72 (C-5), 158.32 (C-9), 158.18 (C-2), 149.76 (C-4'), 145.65 (C-3'), 135.50 (C-3), 123.08 (C-1'), 122.92 (C-6'), 118.29 (C-5'), 115.87 (C-2'), 105.34 (C-10), 104.26 (C-1'), 99.80 (C-6), 94.65 (C-8), 78.14 (C-3''), 78.01 (C-5''), 75.63 (C-2''), 71.12 (C-4''), 62.10 (C-6'').

[0090] Cupressuflavone (화합물 6)

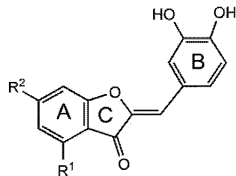
[0091] 노란색 분말(MeOH), mp 275-277°C; IR_v (KBr, cm⁻¹) 3460, 1655, 1600, 1470, 1175, 1120; negative MS (FAB) m/z: 537 [M-1]⁻, ¹H NMR (400 MHz, pyridine-d₅, δH) 7.89 (4H, br. d, J=8.4 Hz, H-2', 6', 2''', 6'''), 7.12 (4H, br. d, J=8.4 Hz, H-3', 5', 3''', 5'''), 6.99 (2H, s, H-6, 6'), 6.88 (2H, s, H-3, 3'). ¹³C NMR (100 MHz, pyridine-d₅, δC) 183.02 (C-4, 4'), 164.67 (C-2, 2'), 162.76 (C-7, 7'), 162.56 (C-5, 5'), 156.45 (C-9, 9'), 128.75 (C-2', 6', C-2''', 6'''), 122.51 (C-1', 1'''), 116.90 (C-3', 5', 3''', 5'''), 105.34 (C-10, 10'), 103.70 (C-3, 3'), 100.16 (C-8, 8'), 99.86 (C-6, 6').

[0092] 상기 분리된 화합물 1-6은 물리화학적 데이터와 스펙트럼 데이터를 해석하고, 또한 각 데이터를 문헌에 나오는 값과 비교하여 각각 sulfuretin (화합물 1, Zhao X, Mei W, Gong M, Zuo W, Bai H, Dai H. Antibacterial activity of the flavonoids from Dalbergia odorifera on Ralstonia solanacearum. Molecules 2011;16:9775-9782), aureusidin (화합물 2, Detsi A, Majdalani M, Kontogioris CA, Hadjipavlou-Litina D, Keflas P. Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soyabean lipoxygenase inhibitory activity. Bioorg Med Chem 2009;17:8073-8085), aureusidin-6-O-β-D-glucopyranoside (화합물 3, Wang LB, Wang JW, Gan CL, Wu LJ, Liu FZ. The chemical constituents in the fraction of lipid-lowering of Helichrysi arenarii. J Shenyang Pharm Univ 2011;28:868-870), hovetrichoside C (화합물 4, Wu SB, Wen Y, Li XW, Zho Z, Hu JF. Chemical constituents from the fruits of Sonneratia caseolaris and Sonneratia ovata (Sonneratiaceae). Biochem Syst Ecol 2009;37:1-5), quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside (화합물 5, Cui EJ, Song NY, Shrestha S, Chung IS, Kim JY, Jeong TS, Baek NI. Flavonoid glycosides from cowpea seeds (Vigna sinensis K.) inhibit LDL Oxidation. Food Sci Biotechnol 2012;21:619-624), cupressuflavone (화합물 6, Krauze-Baranowska M, Mardarowicz M, Wiwart M. The chemical composition of Microbiota decussata. Z Naturforsch 2002;57: 998-1003)로 구조를 결정하였다.

[0093] 이 때, 상기 화합물 1 내지 6 외에도, 나린게닌(naringenin), 택시폴린(taxifolin), 푸스틴(fustin), 루스플라

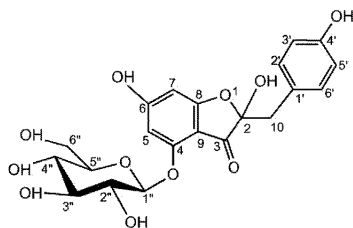
본(rhusflavone), 루스플라보논(rhusflavanone), 메수아페론(mesuaferone) B, 아가티스플라본(agathisflavone), 크리소에리올(chrysoeriol)-7-O- β -D-글루코피라노사이드(glucopyranoside), 루테올린(luteolin)-7-O- β -D-글루코피라노사이드(glucopyranoside), 퀘르세틴(quercetin)-3-O- β -D-글루코피라노사이드(glucopyranoside), 및 퀘르세틴(quercetin)-3-O- α -L-람노피라노사이드(rhamnopyranoside)가 분리되었다. 상기 분리된 화합물에 대하여 NMR 및 IR 분석을 수행하였으며, 그 분석된 결과를 기존의 논문들의 기재와 비교함으로써 각각의 화합물들을 확인하였다.

[0094] <화학식 1>



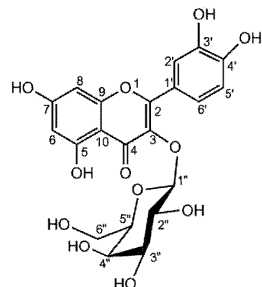
	R ¹	R ²	명칭
화합물 1	H	OH	설파레틴(sulfuretin)
화합물 2	OH	OH	오레우시딘(aureusidin)
화합물 3	OH	O- β -D-Glc	오레우시딘-6-O- β -D-글루코피라노사이드(aureusidin-6-O- β -D-glucopyranoside)

[0097] <화학식 2>



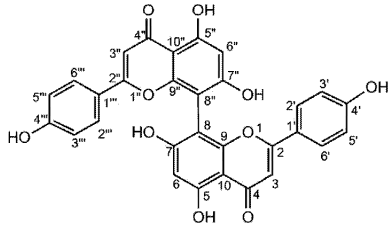
	명칭
화합물 4	호베티리코사이드 C(hovetrichoside C)

[0100] <화학식 3>



	명칭
화합물 5	퀘르세틴-3-O-β-D-갈락토피라노사이드(querctin-3-O-β-D-galactopyranoside)

<화학식 4>



	명칭
화합물 6	쿠프레스실라본(cupressuflavone)

<실험예 2> 퇴행성 신경질환에 대한 활성 평가

<2-1> CDK5/p25 억제활성의 비방사정량적 평가

상기 실험예 1에서 분리, 확인한 화합물들의 CDK5/p25 억제활성을 in vitro에서 평가하였다.

먼저 화합물 1 내지 3에 대하여 시험한 결과, IC₅₀ 값이 각각 37.03 μM, 3.50 μM 및 22.32 μM으로 나타났다. 그러므로 R₁이 OH기인 화학식 1의 화합물이 R₁이 H인 화학식 1의 화합물보다 CDK5/p25 억제활성이 유의하게 낮은 것으로 판단되었다(표 1).

한편, 화합물 4 내지 6에 대하여도 CDK5/p25 억제활성을 시험하였다(각각 10.28 μM 및 9.29 μM). 그 결과, 화합물 5 및 6은 CDK5/p25 억제활성이 상당히 높은 것으로 확인되었다. 화합물 4는 IC₅₀ 값이 44.44 μM으로, 화합물 1의 37.03 μM보다 약간 더 높았다(표 1).

그러나 나린게닌(naringenin), 택시폴린(taxifolin), 푸스틴(fustin), 루스플라본(rhusflavone), 루스플라보논(rhusflavanone), 메수아페론(mesuaferone) B, 아가티스플라본(agathisflavone), 크리소에리올(chrysoeriol)-7-O-β-D-글루코피라노사이드(glucopyranoside), 루테올린(luteolin)-7-O-β-D-글루코피라노사이드(glucopyranoside), 퀘르세틴(querctin)-3-O-β-D-글루코피라노사이드(glucopyranoside), 및 퀘르세틴(querctin)-3-O-α-L-람노피라노사이드(rhamnopyranoside)는 상기 인 비트로 시험 결과, 이 중 어느 것도 유의한 수준으로 CDK5/p25 억제 활성을 보이지 않았다(이들의 결과는 하기 표 1에 기재하지 않음).

그러므로 루스파비플로라 록스비의 열매로부터 분리된 화합물들 중 화합물 1 내지 6는 모두 CDK5/p25 억제활성이 있으며, 그 중에서도 특히 화합물 2 및 3, 화합물 5 및 6의 CDK5/p25 억제활성이 상당히 높은 것으로 확인되었다.

<2-2> CDK5/p25 억제활성의 방사정량적 평가

상기 <2-1>에서 상당한 CDK5/p25 억제 활성을 보인 화합물 2에 대하여, 그것과 비슷한 구조를 가진 화합물 3 및 4와 함께 방사정량법 프로파일링을 수행하여, 이들의 CDK5/p25 저해 활성을 다시 한 번 확인하였다.

그 결과, CDK5/p25 타겟에 대한 방사정량법에서, 화합물 2 및 화합물 3의 IC₅₀ value는 각각 4.81 μM과 24.33 μM로 나타났다. 그러나 화합물 4는 CDK5/p25 타겟에 매우 약한 억제력을 나타냈는데(IC₅₀ 값>50 μM), 화합물

4의 농도를 증가시키고도 정확한 IC50 값을 알아낼 수가 없었다(표 1).

표 1

	화합물	IC ₅₀ ^a (μM)
비-방사정량	1	37.03
	2	3.50
	3	22.32
	4	44.44
	5	10.28
	6	9.29
	R-Roscovitrine^b	0.93
	Alsterpauillone^b	0.33
방사정량	2	4.81
	3	24.33
	4	>50
	Staurosporine^b	100 nM

<2-3> 분자 수준에서의 상호작용 평가

분자 수준에서 화합물 1 내지 6의 상호작용을 조사하기 위하여, 화합물 1 내지 6에 대하여 CDK5/p25 효소로 도킹 분석을 수행하였다. 글라이신이 많은 루프는 CDK 조절 부위로 선택적인 CDK 억제제의 확인 및 조절을 위해 중요하다(도 1). 도킹 결과는 CDK5/p25의 활성 부위인 CYS83 및 GLN130과 화합물 1 내지 6의 상호작용을 기반으로 분석되었다(도 2). 그리고 정확한 결과는 수용체 활성 부위에서 플라보노이드(flavonoid) 화합물에 대한 결합 방식에 관여하는 가장 낮은 결합자유에너지와 수소결합력을 이용하여 확인하였다.

그 결과, 플라보노이드 화합물들인 화합물 1 내지 6들은 수소결합형성을 통해 CDK5/p25 효소에 결합 친화력을 갖는 것으로 나타났다. 이를 기존의 억제제들과 비교하여 보면, 화합물 1 내지 6은 종래 알려진 억제제인 R-로스코비틴(roscovitine)과 동일한 활성부위에 도킹되는 것으로 확인되었다. 또한 화합물 1 내지 6과, 종래 알려진 억제제인 R-로스코비틴(Roscovitine), 알스테르파울론(Alsterpauillone), 스타우로스포르린(Staurosporine) 사이에서 결합 위치에 관여한 CDK5/p25의 활성부위 잔기는 기존 방식의 것들과 유사한 결과를 보여주었는데 이는 AutoDock이 도킹연구에 있어 적합하였음을 나타낸다.

화합물 1 내지 6은 종래 알려진 억제제들(이들을 대조군들로 사용함)의 활성부위포켓에 적당한 결합 친화력으로 상호작용하였다. 나아가 화합물 1 내지 6 각각과 CDK/p25 복합체(complex)의 도킹 에너지를 X-score 프로그램을 이용하여 재평가하였다.

그 결과, 화합물 1 내지 6은 주목할만한 도킹 에너지, 즉 예상되는 결합에너지를 보였는데, 그 범위는 -8.47 내지 -9.89 kcal/mol이었으며 화합물 1 내지 6의 수소결합 상호 잔기는 도 3과 같았다. 화합물 1 내지 6의 도킹 에너지들은 대조군 화합물인 R-로스코비틴(Roscovitine)(-8.44 kcal/mol), 알스테르파울론(Alsterpauillone)(-8.66 kcal/mol), 스타우로스포르린(Staurosporine) (-9.89kcal/mol)과 매우 비슷한 수치인바, 화합물 1 내지 6은 CDK/p25와 상당한 결합 친화력을 갖는 것으로 확인되었다(표 2).

화합물 2의 아우레우스이딘(aureusidin)의 주목할 만한 활성은 아우론(aurone) 형성, 특히 C-고리(ring) 형성에 의한 것일 수 있는데 이는 아데닌(adenine)의 5개-멤버(50membered) 고리와 유사하며, 그것이 화합물 2를 아데닌과 더 비슷한 구조로 만든다. 아우론스(aurones) 화합물인 화합물 4는 컴퓨터모의 실험 결과, 다른 화합물들과 비교하여 좋은 친화력(-8.47 kcal/mol)을 보여주었는데, 그 인 비트로(in vitro) 분석에 있어 그 약한 억제 활성은 C-10에서 올레핀(olefin) 메탄(methane) 대신 메틸렌(methylene)이 존재하는 것뿐 아니라 고리 B에서 파라(para) 대체가 원인으로 보인다.

표 2

화합물	수소결합의 수	예상되는 결합 에너지 ^a (kcal/mol)	수소결합 donor	수소결합 acceptor	수소결합 길이(A)
Sulfuretin (1)	1	-8.77	CYS83:HN	O:LG	2.07
Aureusidin (2)	1	-8.73	CYS83:HN	O:LG	1.89
Aureusidin-6-O-β-D-glucopyranoside (3)	5	-8.65	CYS83:HN	O:LG	1.78
			CYS83:HN	O:LG	2.20
			LG:H	O:CYS83	2.36
			LG:H	O:CYS83	2.27
			GLY130:HE21	O:LG	2.17
Hovetrichoside(4)	2	-8.47	CYS83:HN	O:LG	2.10
			LG:H	O:GLY130	1.72
Quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside (5)	3	-9.09	CYS83:HN	O:LG	1.87
			LG:H	O:GLY130	2.13
			LG:H	O:GLY130	1.94
Cupressuflavone (6)	1	-9.60	CYS83:HN	O:LG	2.19
R-Roscovitine (control)	2	-8.44	LG:HN	O:CYS83	2.06
			LG:H	O:CYS83	2.26
Alsterpaullone (control)	1	-8.66	CYS83:HN	O:LG	1.77
Staurosporine (control)	2	-9.89	CYS83:HN	O:LG	2.13
			LG:H	O:CYS83	2.11

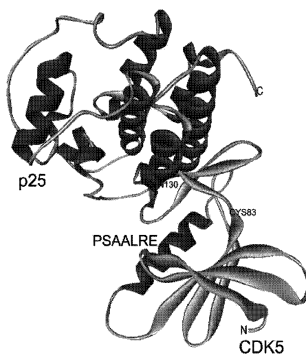
^a: X-SCORE 프로그램에 의하여 계산됨

상기 실험예 <1-1> 내지 <1-3>의 결과로부터, 인 비트로 분석에서 CDK5/p25의 억제에 더하여, 도킹연구를 통해 화합물 1 내지 6은 CDK5/p25 단백질의 결정적인 활성부위 잔기에 결합한다는 것이 밝혀졌다. 알츠하이머병이나 신경질환의 처리에 있어 선택적인 CDK5/p25 억제제가 선호되며, 화합물 1 내지 6은 천연물로부터 분리한 작은 원자이므로 화합물 1 내지 6은 신경 치료 및 개선제로서 유리할 것으로 판단된다. 특히 화합물 2 및 3을 화합물 1 및 4와 인 비트로 상 억제 활성을 비교실험한 결과는 C-4에서의 하이드록시 기의 존재 및 C-10에서의 외향 고리(exocyclic) 올레핀 메틴의 존재가 CDK5/p25 단백질의 억제에 중요한 역할을 하는 것을 보여주었다.

이를 종합하여 보면, 화합물 1 내지 6은 모두 CDK5/p25 억제 활성을 가지며, 그 중에서도 특히 화합물 2, 3, 5 및 6의 활성이 우수한 것으로 확인되었다.

도면

도면1



도면2

