



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0010748

(43) 공개일자 2016년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/353 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)

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

(21) 출원번호 10-2014-0090618

(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

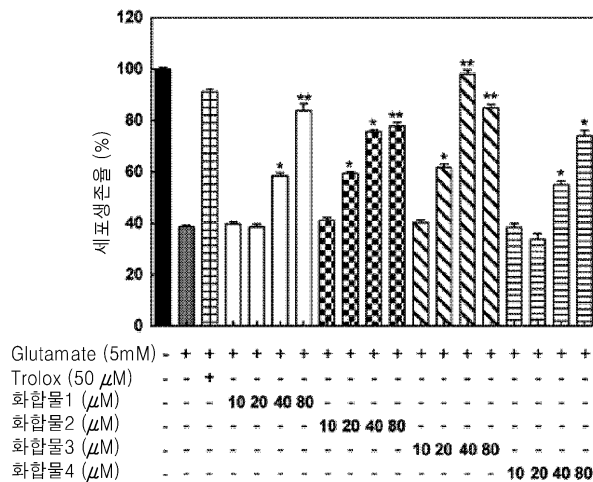
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 네팔 윗나무 유래의 플라보노이드 화합물들을 포함하는 신경 보호를 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 네팔 윗나무로부터 분리한 화합물을 포함하는 신경 보호용 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

박지혜

전라북도 순창군 풍산면 한내리 187

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, 광진햇빛칸아파트)

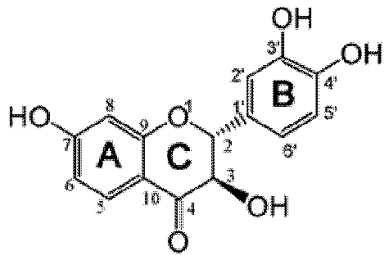
명세서

청구범위

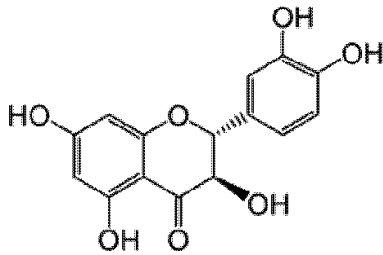
청구항 1

하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신경보호를 위한 약학적 조성물.

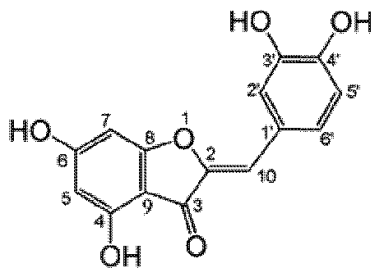
<화학식 1>



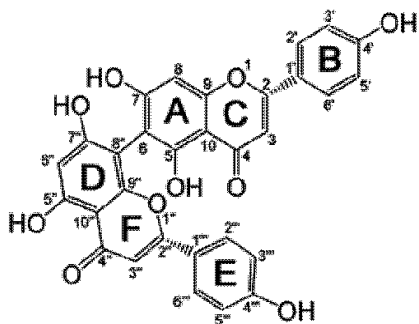
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



청구항 2

제 1항에 있어서,

산화적 세포독성으로부터 신경을 보호하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

Cdk5/p25 억제능을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

글루타메이트에 의하여 유도되는 신경 독성으로부터 신경의 보호활성을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

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

청구항 6

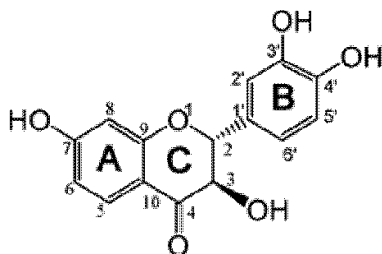
제 1항에 있어서,

퇴행성 신경질환으로 인한 신경 손상으로부터 신경 보호 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

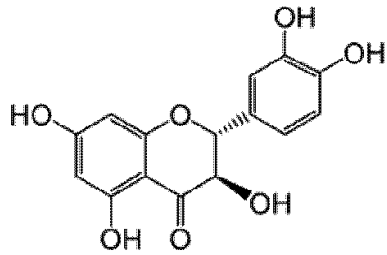
청구항 7

하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신경보호를 위한 식품 조성물.

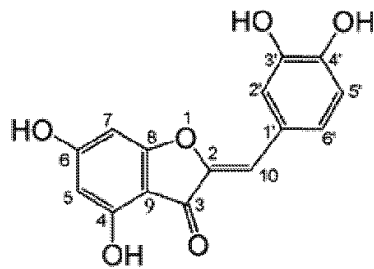
<화학식 1>



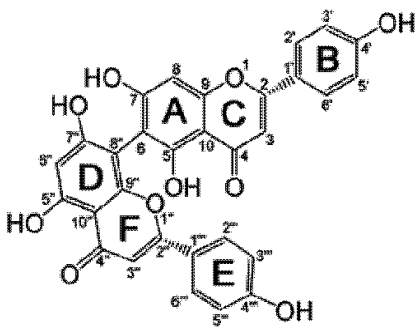
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



청구항 8

제 7항에 있어서,

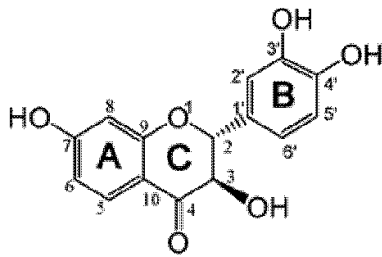
산화적 세포독성으로부터 신경을 보호하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

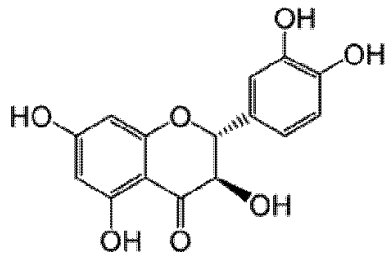
네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 신경보호를 위한 약학적 조성물로,

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.

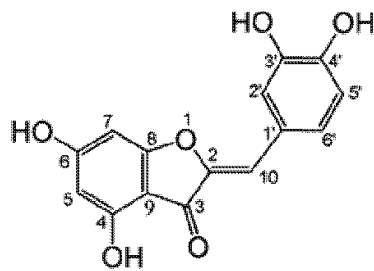
<화학식 1>



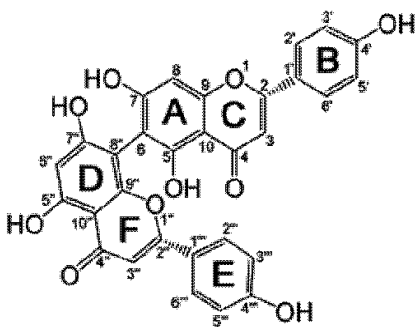
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>

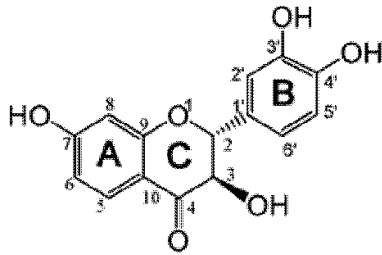


청구항 10

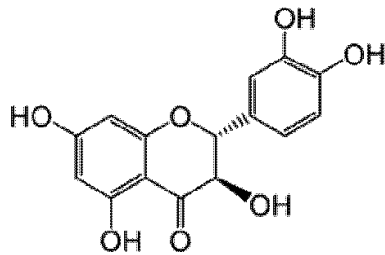
네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 신경보호를 위한 식품 조성물로,

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 식품 조성물.

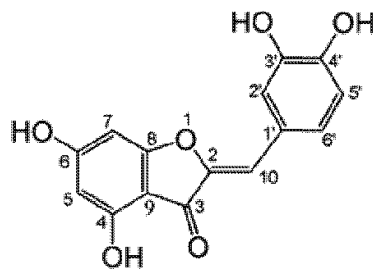
<화학식 1>



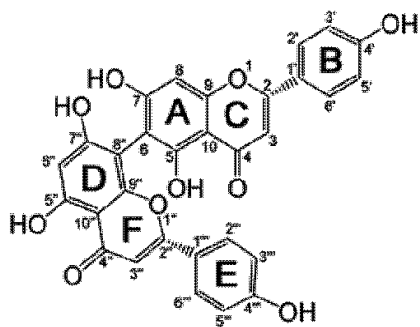
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



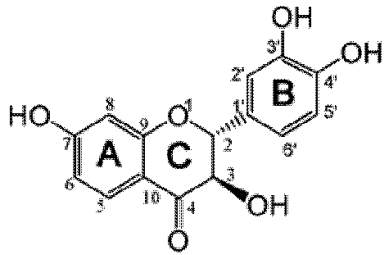
청구항 11

네팔 옷나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및

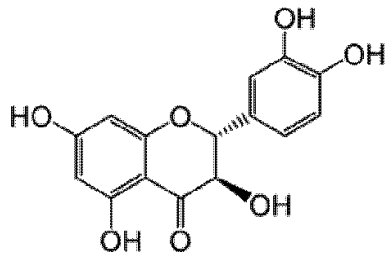
상기 네팔 옷나무 열매의 추출물로부터 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,

신경보호를 위한 약학적 조성물의 제조 방법.

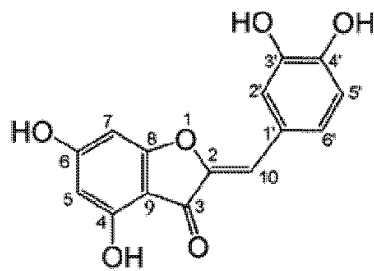
<화학식 1>



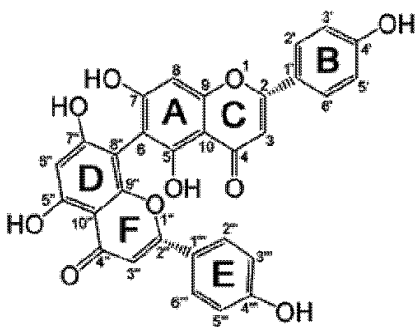
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



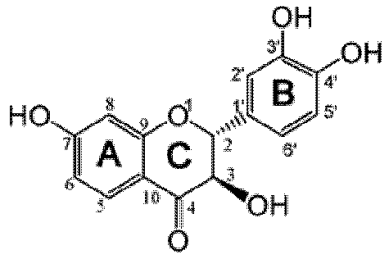
청구항 12

네팔 옷나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및

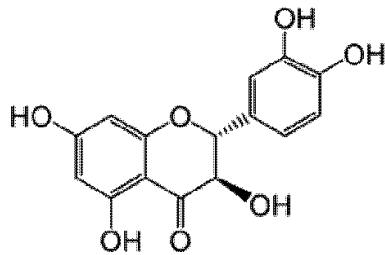
상기 네팔 옷나무 열매의 추출물로부터 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,

신경보호를 위한 식품 조성물의 제조 방법.

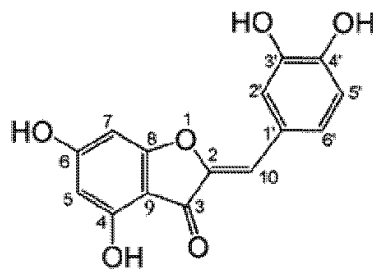
<화학식 1>



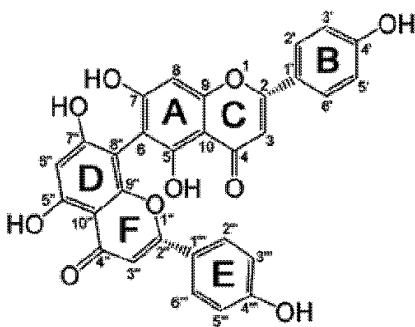
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 4>



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 네팔 옷나무 유래의 플라보노이드 화합물들을 포함하는 신경 보호를 위한 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 글루타메이트(glutamate)는 중추신경계 (CNS)에서 주요한 내생적 흥분성 신경전달물질로 뇌에서 빠른 흥분 시냅

스에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 세포외의 과도한 글루타메이트 또는 N-메틸-D-아스파테이트 (N-methyl-D-aspartate)(NMDA) 수용기의 과도한 활성화는 흥분성 아미노산 수용기를 활성화 시키게 되는데 (흥분독성) 이는 Ca^{2+} 를 대량 유입시키고, 미토콘드리아의 막전위를 변화시키며, 활성산소 (ROS)의 생성을 증가시키며, 괴사가 시작되어 궁극에는 신경 세포사에 이르게 한다.

[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] 현재 알츠하이머 등을 예방하기 위하여 과인산화된(hyperphosphorylated) 타우(tau) 단백질의 Cdk5 매개된 신경 섬유 매듭(neurofibrillary tangles)에 대하여 상당한 연구가 수행되고 있다. 글루타메이트는 Cdk5 활성화로 인한 p25 주입(transfection)에 의하여 야기된 타우(tau) 인산화의 원인이며(Jamsa A, Backstrom A, Gustafsson E, Dehvari N, Hiller G, Cowburn RF, Vasange M. Glutamate treatment and p25 transfection increase Cdk5 mediated tauphosphorylation in SH-SY5Y cells. Biochem. Bioph. Res. Co. 345: 324-331 (2006)), Cdk5의 억제는 치료적 선택으로서 제안되고 있다(Camins A, Verdaguer E, Folch J, Canudas, AM, Pallas M. The role of Cdk5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. Drug News Perspect. 19: 453-460 (2006)).

[0005] 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.

[0006] 본 발명자들은 산화적 손상, 퇴행성 신경질환으로 인한 손상 등으로부터 신경 보호를 위한 물질을 연구하던 중 네팔 옷나무로부터 분리한 물질들이 신경 보호능을 갖는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 신경 보호용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 네팔 옷나무 유래의 플라보노이드 화합물들을 포함하는 신경 보호를 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 조성물은 산화적 스트레스, 퇴행성 신경질환으로 인한 손상 등으로부터 신경을 보호하는 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 HT-22 세포들에서 화합물 1 내지 4의 세포독성을 나타낸다. 각각의 막대들은 3번의 독립적 실험들의 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. 대조군과 비교하여 *는 $p < 0.05$.

도 2는 HT22 세포들에서 글루타메이트-유도된 산화적 신경독성에 대한 화합물 1 내지 화합물 4의 보호 효과를 나타낸다. 트롤록스 50 μM 이 양성 대조군으로 이용되었다. 40% 이상의 보호 효과가 각각의 화합물에 대하여 효력있음으로 규정되었다. 각각의 막대들은 3번의 독립적 실험들의 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs. 글루타메이트.

도 3은 화합물 3에 의한 Cdk5/p25 활성의 억제를 나타낸다. 도트들은 항체 α -pRbSer780에 의하여 가시화된(visualized) 인산화된 Rb-C 융합 단백질을 나타낸다. 알스터폴론(alsterpaullone)이 양성 대조군으로 사용되었으며, 음성 대조군(DMSO)의 강도는 정량 분석에서 100%로 간주되었다. 각각의 패널은 3 번의 독립적 실험들의 표시(representation)이다.

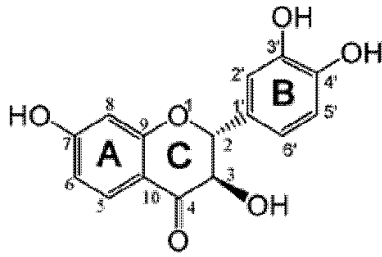
도 4는 오레우시딘(화합물 3) 및 알스터폴론(양성 대조군)에 의한 인 비트로에서의 Cdk5/p25 활성의 억제에 대한 정량화이다. 인광체(phosphor)-특이적 항체인 α -pRbSer780 상 인산화의 레벨은 도 3의 도트 블롯들의 정량화로 추정되었다.

도 5는 HT22 세포들에서 글루타메이트 유도된 산화적 세포독성 및 ROS 발생(generation)에 대한 화합물 1 내지 화합물 4들의 효과를 나타낸다. 각각의 막대들은 3번의 독립적 실험들의 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. * $p < 0.05$ vs. 글루타메이트 처리군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

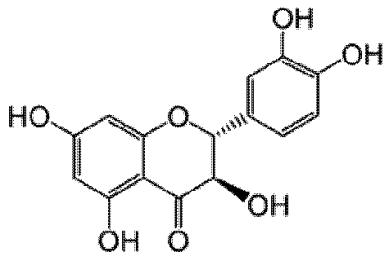
- [0011] 본 발명은 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신경보호를 위한 약학적 조성물에 대한 것이다.
- [0012] 또한 본 발명은 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신경보호를 위한 식품 조성물에 대한 것이다.
- [0013] 또한 본 발명은 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 신경보호를 위한 약학적 조성물로,
- [0014] 상기 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.
- [0015] 또한 본 발명은 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 신경보호를 위한 식품 조성물로,
- [0016] 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.
- [0017] 또한 본 발명은 네팔 옷나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및
- [0018] 상기 네팔 옷나무 열매의 추출물로부터 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,
- [0019] 신경보호를 위한 약학적 조성물의 제조 방법에 대한 것이다.
- [0020] 또한 본 발명은 네팔 옷나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및
- [0021] 상기 네팔 옷나무 열매의 추출물로부터 하기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물을 분리하는 단계를 포함하는,
- [0022] 신경보호를 위한 식품 조성물의 제조 방법에 대한 것이다.

[0023] <화학식 1>



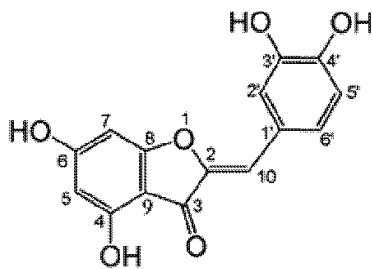
[0024]

[0025] <화학식 2>



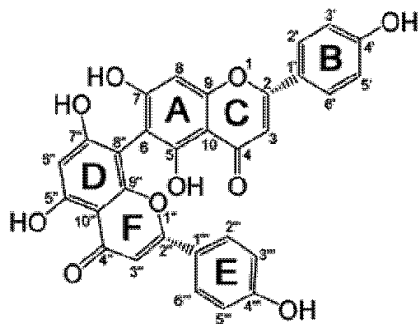
[0026]

[0027] <화학식 3>



[0028]

[0029] <화학식 4>



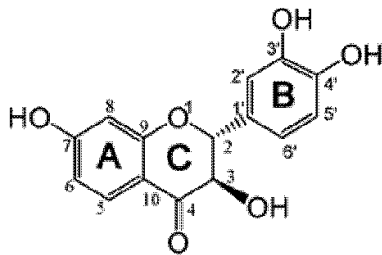
[0030]

[0031] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0032] 화학식 1의 화합물(화합물 1)

[0033] 본 발명은 화학식 1의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경 보호를 위한 약학적 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 화학식 1의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경 보호를 위한 식품 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 신경보호를 위한 약학적/식품 조성물로, 상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 하기 화학식 1의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적/식품 조성물에 대한 것이다. 바람직하게는 상기 화학식 1의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염은 네팔 옷나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)로부터 유래하는 것이다.

[0034] <화학식 1>

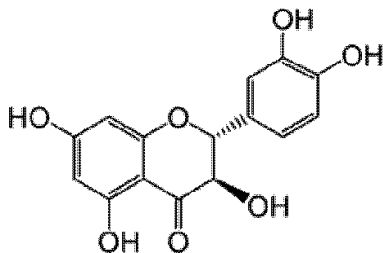


[0035]

[0036] 화학식 2의 화합물(화합물 2)

[0037] 본 발명은 화학식 2의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경 보호를 위한 약학적 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 화학식 2의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경 보호를 위한 식품 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 신경보호를 위한 약학적/식품 조성물로, 상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 하기 화학식 2의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적/식품 조성물에 대한 것이다. 바람직하게는 상기 화학식 2의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염은 네팔 옷나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)로부터 유래하는 것이다.

[0038] <화학식 2>



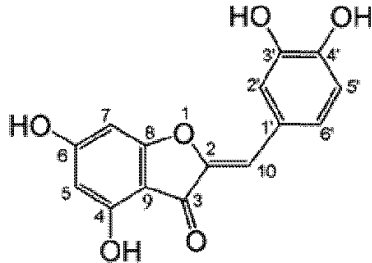
[0039]

[0040] 화학식 3의 화합물(화합물 3)

[0041] 본 발명은 화학식 3의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경 보호를 위한 약학적 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 화학식 3의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경 보호를 위한 식품 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 신경보호를 위한 약학적/식품 조성물로, 상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 하기 화학식 3의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적/식품 조성물에 대한 것이다. 바람직하게는 상기 화학식 3의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염은

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

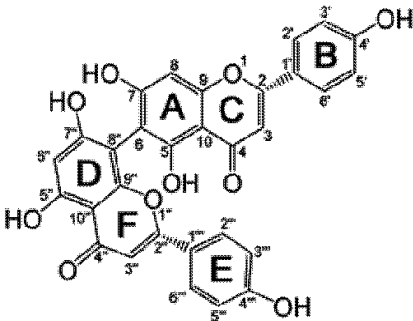
<화학식 3>



화학식 4의 화합물(화합물 4)

본 발명은 화학식 4의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경 보호를 위한 약학적 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 화학식 4의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경 보호를 위한 식품 조성물 및 그 제조 방법에 대한 것이다. 또한 본 발명은 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 신경보호를 위한 약학적/식품 조성물로, 상기 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물은 하기 화학식 4의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적/식품 조성물에 대한 것이다. 바람직하게는 상기 화학식 4의 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염은 네팔 옷나무인 루스파비플로라 록스비(*Rhus parviflora* Roxb.)로부터 유래하는 것이다.

<화학식 4>



약학적으로 허용가능한 염

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.

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.

- [0051] 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물
- [0052] 본 발명은 네팔 옷나무 추출물 또는 네팔 옷나무 분획물을 포함하는 신경보호를 위한 약학적 조성물/신경 보호를 위한 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.
- [0053] 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.
- [0054] 신경 보호용 조성물
- [0055] 본 발명의 신경 보호용 조성물은 신경 보호를 위한 식품 조성물 또는 신경 보호용 약학적 조성물이다. 본 발명의 신경 보호를 위한 식품/약학적 조성물은 산화적 세포 독성으로부터 신경을 보호한다. 또한 본 발명의 신경 보호를 위한 식품/약학적 조성물은 Cdk5/p25 억제능을 갖는다. 또한 본 발명의 신경 보호를 위한 식품/약학적 조성물은 글루타메이트에 의하여 유도되는 신경 독성으로부터 신경의 보호활성을 갖는다. 또한 본 발명의 신경 보호를 위한 식품/약학적 조성물은 퇴행성 신경질환으로 인한 신경 손상으로부터 신경 보호 활성을 갖는다.
- [0056] 상기 퇴행성 신경질환은 신경의 퇴행, 손상으로 인한 질병을 의미한다. 바람직하게는 본 발명의 퇴행성 신경질환은 cdk5/p25 활성의 비정상적인 활성화에 의하여 유발되거나, cdk5/p25 활성을 억제함으로써 병증이 악화, 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 신경 보호를 위한 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 아조반트(adjutant), 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, 토터머들, 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 적합하게 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 조제할 수 있다.

[0062] 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염, 이들을 포함하는 네팔 윌나무 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 윌나무 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 윌나무 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 캡슐제, 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 윌나무, 바람직하게는 네팔 윌나무의 열매를 용매로 추출하는 단계; 및 상기 네팔 윌나무 추출물로부터 상기 화학식 1 내지 4로 표시된 화합물들로 구성된 군으로부터 선택된 화합물 또는 그 약학적으로 허용가능한 염을 분리하는 단계를 포함하는, 신경 보호용 약학적 조성물/신경 보호용 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 방법>
- [0072] 식물 재료
- [0073] 네팔 옷나무(Nepales sumac) 열매는 2010년 2월 네팔의 Salyan (28° 22'31'', 82° 9'42''E) 에서 수집되었고, 네팔 Tribhuvan 대학교, 환경과학(environmental science) 학부의 Damodar Prasad Joshi 교수가 확인하였다.
- [0074] 기구 및 시약
- [0075] 녹는점(melting points)은 Fisher-John's apparatus (Fisher Scientific, Chicago, IL, USA)로 결정되었고, 측정되지 않았다. 선광도(optical rotation)는 P-1010 digital polarimeter (Jasco ,tokyo, Japan)로 측정하였다. 적외선 분광분석 (IR spectra)은 Spectrum One FT-IR spectrometer(Perkin Elmer, Buckinghamshire, UK)를 이용하였고, FAB-MS는 JMSAX-700(Jeol)상에 기록되었다. H-NMR(400 MHz)와 C-NMR(100 MHz) 스펙트럼들은 Unity Inova AS-400 FT-NMR spectrometer (Varian, Palo Alth, CA, USA) 상에 기록되었다. 칼럼 크로마토그래피에 이용된 Silica gel (SiO₂)와 octadecyl silica gel (ODS) 수지(resin)는 각각 Kiesel gel 60 (Merck, Damstadt, Germany) 와 LiChroprep RP-18(Merck) 이다. TLC 분석은 Kiesel gel 60 F254 와 RP-18, F254S (Merck) 이며 Sectroline model ENF-240 C/F UV lamp (Spectronics Corporation, Westbury, NY, USA)와 10% H₂SO₄ 용액을 이용하여 감지하였다.
- [0076] 중수소 용매(deuterium solvents)는 Merck사에서 구매하였다. DMEM, FBS, 그리고 다른 조직 배양용액은 BD사에서 구매하였다. Cdk5/p25, 키나제 버퍼(kinase buffer), Rb-c 융합 단백질, ATP, α-pRbSer780은 Cell signaling Technology(Danvers, MA, USA)사에서 구매하였다. 그 외 모든 화학약품과 분석등급 시약은 Sigma-Aldrich사로부터 확보하였다.
- [0077] 통계분석
- [0078] 데이터는 최소 3회의 독립적인 실험에 있어서의 평균±표준편차(SD) 로 표현하였다. 3개 또는 그 이상의 그룹과 비교하기 위해, 데이터는 (ANOVA)를 이용하여 통계적 유의성을 비교하였고, 만약 유의 하다면 그 그룹의 평균은 Newman-Keuls post hoc test에 의하여 비교하였다. 통계분석은 GraphPad Prism software, 5.01버전 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)으로 수행하였다.
- [0079] <실험예 1>
- [0080] <1-1>네팔 옷나무 열매의 추출 및 화합물의 분리
- [0081] 건조되어 분말화된 6kg 네팔 옷나무(Nepalese sumac) 열매를 80% 메탄올(25L x 3) 로 실온에서 추출한 다음 농축하여, 노르스름한 갈색의 농축된 추출물을 얻었다. 상기 메탄올 추출물을 H₂O (6L)에 희석하고, 에틸아세테이트(EtOAc)(6L x 3)와 n-부탄올(BuOH)(6L x 3)을 이용하여 성공적으로 분할(partition)하였는데, 상기 농축 추

출물의 수율 및 분획은 EtOAc(RPE, 48g), n-BuOH (RPB), H₂O (RPH, 1,219g) 분획이다.

[0082]

농축된 EtOAc 분획 (RPE, 48g)을 SiO₂ c.c (φ 14x12 cm)에 주입하였고, n-헥산(hexane)-EtOAc[(10:1→3:1→1:1, 각각 20L)과 CHCl₃-MeOH (6:1→1:1, 각각 10L)]로 분리하여 22개 분획 (RPE-1 내지 RPE-22)을 얻었다. 이 중 RPE-13 분획 [2.41 g, 분리부피/전체부피 (Ve/Vt) 0.59-0.80]을 세파덱스(Sephadex) LH-20 c.c (φ 2.5x45cm)에 넣고 MeOH-H₂O(2:1, 500mL→2:1, 1.5L)로 분리하여 18 개 분획(RPE-13-1 내지 RPE-13-18)의 수율을 얻었다. 그리고, 그 중 RPE-13-16 [15.5mg, Ve/Vt 0.02-0.04, TLC (RP-18 F254S) Rf 0.87, in MeOH-H₂O(3:1)]에서 화합물 1을 분리하였고, RPE-13-7[30.0 mg, Ve/Vt 0.04-0.07, TLC (RP-18 F254S) Rf 0.85, in MeOH-H₂O(3:1)]에서 화합물 2를 분리하였다. 한편, RPE-15 분획 (2.33g, Ve/Vt 0.52-0.54)를 ODS c.c (φ 4x5 cm)에 주입하여, MeOH-H₂O(2:1, 4L→1:1, 1L)로 분리하였고 13개 분획 (RPE-15-1 to RPE-15-13)을 얻었다. RPE-15-3 분획은(326.0mg, Ve/Vt 0.01-0.09) 세파덱스(Sephadex) LH-20 c.c (φ 2x45 cm)을 수행한 뒤 MeOH-H₂O(2:1, 4L→1:1, 4.5L)로 분리하였고, 13개 분획 (RPE-15-3-1 내지 RPE 15-3-13)을 얻어 그 중 RPE-15-3-11[18.4mg, Ve/Vt 0.02-0.04, TLC (RP-18 F254S) Rf 0.5, in MeOH-H₂O(2:1)]에서 화합물 3를 분리하였다. RPE-15-5 분획은 (461.6mg, Ve/Vt 0.32-0.45) 세파덱스 LH-20 c.c (φ 2.5x45 cm)을 수행한 뒤 MeOH-H₂O(2:1, 6L)로 분리하였고, 13개 분획 (RPE-15-5-1 to RPE 15-5-13)을 얻었다. 그 중 RPE-15-5-12 분획(71.4mg, Ve/Vt 0.83-0.96)을 ODS c.c (φ 1.2x4cm)에 넣었고, MeOH-H₂O(1:2, 200mL)로 분리하여, 3개 분획 (RPE-15-5-12-1 to RPE 15-5-12-3)을 얻었다. 이 중 최종적으로 RPE-15-5-12-3[60mg, Ve/Vt 0.24-1.0, TLC (RP-18 F254S) Rf 0.30, in MeOH-H₂O(2:1)]에서 화합물 4를 얻었다.

[0083]

화합물 1 (푸스틴(fustin)): 노르스름한 분말 (MeOH); m.p. 228-229 °C; negative FAB/MS m/z: 287 [M-H]⁻; [α]_D²⁵28.3° (c 0.9, 80% 아세톤); IR ν (KBr, 1/cm) 3,400, 1,630, 1,605, 1,520, 1,500; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δH) 7.71 (d, J=8.6 Hz, H-5), 6.97 (d, J=2.0 Hz, H-2'), 6.85 (dd, J=8.0, 2.0 Hz, H-6'), 6.79 (d, J=8.0 Hz, H-5'), 6.52 (dd, J=8.6, 2.2 Hz, H-6), 6.30 (d, J=2.2 Hz, H-8), 4.93 (d, J=11.6 Hz, H-2), 4.47 (d, J=11.6 Hz, H-3). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δC) 194.25 (C-4), 166.63 (C-7), 164.86 (C-9), 146.92 (C-3'), 146.86 (C-4'), 129.96 (C-1'), 129.91 (C-5), 120.82 (C-6'), 115.94 (C-5'), 115.77 (C-2'), 113.29 (C-10), 111.98 (C-6), 103.59 (C-8), 85.55 (C-2), 74.50 (C-3).

[0084]

화합물 2 (탁시폴린(taxifolin)): 노란색 분말 (MeOH); m.p. 231-232°C; negative FAB/MS m/z: 303 [M-H]⁻; [α]_D²⁵23.0° (c 1.0, MeOH); IR ν (CaF₂ plate, 1/cm) 3,420, 1,620, 1,520, 1,470, 1,360, 1,265; ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δH) 6.96 (1H, d, J=2.0 Hz, H-2'), 6.84 (1H, dd, J=2.0, 8.0 Hz, H-6'), 6.79 (1H, d, J=8.0 Hz, H-5'), 5.91 (1H, d, J=2.0 Hz, H-6), 5.87 (1H, d, J=2.0 Hz, H-8), 4.90 (1H, d, J=11.6 Hz, H-2), 4.49 (1H, d, J=11.6 Hz, H-3). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD, δC) 197.02 (C-4), 167.37 (C-7), 163.96 (C-5), 163.18 (C-9), 145.84 (C-3'), 145.00 (C-4'), 128.60 (C-1'), 119.72 (C-6'), 114.89 (C-5'), 114.68 (C-2'), 100.63 (C-10), 96.15 (C-6), 95.12 (C-8), 83.90 (C-2), 72.49 (C-3).

[0085]

화합물 3 (오레우스딘(aureusidin)): 적갈색 분말(MeOH), m.p. 265-268°C; IR ν (CaF₂ plate, 1/cm) 3,350, 1,630, 1,605, 1,520, 1,500; negative FAB/MS m/z: 285 [MH]⁻; 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). 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).

[0086]

화합물 4 (아가티스플라본(agathisflavone)): 노란색 분말 (MeOH), m.p. 240-242°C; IR ν (KBr, 1/cm) 3,350, 1,650, 1,605, 1,520, 1,500; negative FAB-MS m/z 537 [M-H]⁻; ¹H-NMR (400 MHz, 피리딘(pyridine)-d₅, δH)

7.94 (2H, br.d, J=8.8 Hz, H-2', 6'), 7.83 (2H, br.d, J=8.8 Hz, H-2''', 6'''), 7.19 (2H, br.d, J=8.8 Hz, H-3', 5'), 7.12 (2H, br.d, J=8.8 Hz, H-3''', 5'''), 7.05 (1H, s, H-8), 6.90 (1H, s, H-6'), 6.85 (1H, s, H-3''), 6.81 (1H, s, H-3). ¹³C-NMR (100 MHz, 피리딘-d₅, δC) 183.05 (C-4), 182.68 (C-4'), 165.30 (C-2), 165.06 (C-2'), 164.60 (C-7), 164.18 (C-7'), 162.55 (C-4''), 162.50 (C-4'''), 162.44 (C-5''), 161.62 (C-5), 157.99 (C-9), 156.50 (C-9'), 128.76 (C-2', 6'), 128.71 (C-2''', 6'''), 122.72 (C-1'''), 122.18 (C-1'), 116.80 (C-3''', 5'''), 116.70 (C-3', C-5'), 105.35 (C-10), 105.21 (C-10'), 104.78 (C-6), 103.70 (C-3), 103.56 (C-3'), 100.88 (C-8'), 100.18 (C-6'), 94.73 (C-8).

[0087] <1-2> 세포배양

[0088] HT4 해마회 유래 세포주의 서브클론(subclone)인 생쥐의 해마회 유래 HT22 세포는 한국, 서울의 서울대학교 목인회 교수로부터 공급받았다. 상기 HT22 세포들을 10% 열-불활성화된 FBS, 페니실린(penicillin) G(100 unints/mL), 스트렙토마이신(streptomycin)(100mg/mL), L-글루타민(glutamine)(5mM)가 추가된 DMEM 배지 내에서 5x10⁵ 세포/mL 로 유지하였고, 5% CO₂, 95% 공기(air)를 포함하는 가습 공기 내에서 37℃로 배양하였다.

[0089] <1-3> 세포보호활성 평가

[0090] 하기와 같이 세포보호활성(Cytoprotective activity)을 측정하였다. 세포보호 평가(cytoprotective assessment)를 위하여 세포를 105 세포/mL 농도로 96 웰 플레이트에 심었다. 24시간 후 세포들을 화합물들 또는 양성 대조군 트롤록스(Trolox)로 4시간 동안 전처리하였다. 세포들을 12시간 동안 글루타메이트(glutamate) (5mM)에 노출시켰다. 각각의 화합물들을 10,20,40,80mM 농도로 테스트 하였고 각 실험을 3회 반복 수행하였다.

[0091] 세포 생존력은 MTT 분석으로 평가하였다. 즉, 세포를 MTT(0.5mg/mL)와 함께 37℃에서 4시간동안 배양하고, 배지를 버린 후, 산성(acidic) 이소프로판올(isopropanol)(0.04N HCL)을 가하고, 30분간 배양 한 후에, microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)의 590nm에서 흡광도를 측정하였다. 반수 최대 유효 농도(half maximal effective concentration, EC₅₀)는 대조군 대비 생존능의 퍼센트로 표현하였다. 데이터들 역시 매개물 처리된 대조군 배양(control culture)에 대한 상대적인 보호 퍼센트로 하기 식 1에 따라 표현하였다. 한편, 트롤록스 (Trolox) (50 μM) 처리군은 양성 대조군으로 이용하였다.

[0092] <식 1>

[0093] 세포 생존력(%) = [(글루타메이트 및 시료 처리된 배양액의 흡광도 (optical density, OD) - 글루타메이트 처리된 배양액의 OD)/(대조군 배양액의 OD- 글루타메이트 처리된 배양액의 OD)] × 100.

[0094] <1-4> ROS 측정

[0095] HT22 세포들 (24 웰 플레이트 내 2.5 × 10⁴ 세포들/mL)를 화합물 1 내지 4의 유무 또는 트롤록스(Trolox)(양성 대조군) 상에서 5mM 글루타메이트로 처리하고, 24시간 배양하였다. PBS(Phosphate-buffered saline)로 세척한 후, 세포를 Hanks' balanced salt solution에 녹아 있는 10 μM 2', 7'-디클로로플루오레스세인(dichlorofluorescein) 디아세테이트(diacetate)(DCFDA)로 어두운 곳에서 30분간 염색하였다. 세포를 PBS로 2회 세척 후 1% Triton X-100이 포함된 PBS로 37℃에서 10분간 추출하였다. 형광은 Spectramax Gemini XS (Molecular Devies, Sunnyvale, CA, USA)기를 이용하여 490nm 의 여기(excitation) 파장(wavelength) 및 525nm 방출(emission) 파장에서 측정하였다.

[0096] <1-5> 인 비트로 Cdk5/p25 키나제(kinase) 분석

[0097] 효소를 기반으로 한 측정은 CDK5/p25 키나제(kinase)(Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)의 억제를 측정하기 위하여, Dot-Blot apparatus Bio-Dot (Bio-Rad)을 이용하여 0.02와 100mM 사이의 농도범위에서 수행

되었다. 구체적으로, 키나제 희석 버퍼(buffer)는 1x 키나제 버퍼[5mM Tris-HCl(pH 7.4), 0.5mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.1mM 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(EGTA), 0.1m 디티오프레이놀(dithiothreitol)(DTT)]에 2ng의 CDK5/p25를 희석하여 만든 후 37℃에서 10분간 전처리하여 만들었다. 여기에, 10 μM ATP와 0.25 μg Rb-C 융합(fusion) 단백질을 첨가하고, 상기 혼합물을 37℃에서 30분간 유지시켰다. 상기 반응 혼합물을 8% SDS-PAGE 겔을 수행하여 분리한 뒤 PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인에 옮기고, 인산화-의존성 항체(α-pRbSer780)와 함께 배양하였다. 알스터폴론(Alsterpaullone)(Sigma-Aldrich)를 양성대조군으로 사용하였고, 음성대조군인 DMSO의 강도는 정량분석을 위해 100% 로 간주되었다. 화학발광 정도는 ChemiDoc™ XRS plus system(Bio-Rad)으로 영상화하였고 ImageLab™ 소프트웨어(Bio-Rad)로 정량화하였다.

[0098]

<실험예 2> 결과

[0099]

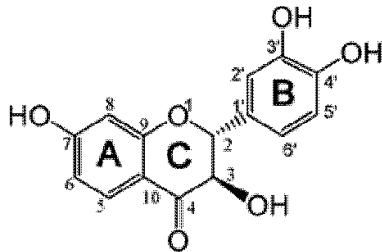
화합물 1-4의 구조 결정

[0100]

상기 실험예 1의 <1-1>에서 네 팔 열매로부터 분리된 화합물 1-4의 화학구조는 각각 화학식 1 내지 4로 확인되었다.

[0101]

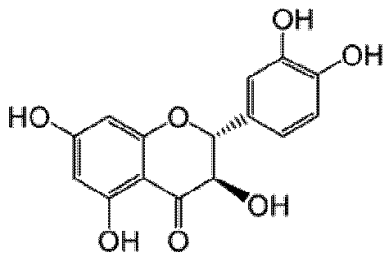
<화학식 1> 화합물 1



[0102]

[0103]

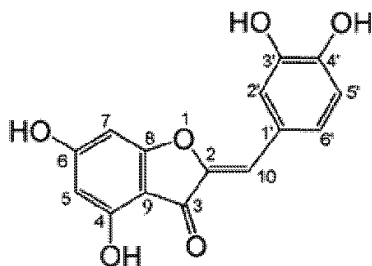
<화학식 2> 화합물 2



[0104]

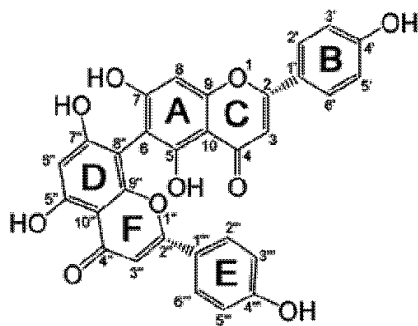
[0105]

<화학식 3> 화합물 3



[0106]

[0107] <화학식 4> 화합물 4



[0108]

[0109] 화합물 1, 화합물 2 및 화합물 3은 1,2,4-삼치환된 카테콜(catechol) B-고리들을 가지고 있다. 화합물 1과 화합물 2는 모두 2-산소화된(oxygenated) 메틴(methine) 시그널(signals)들을 (H-2 및 H-3)을 갖고 큰 결합상수로 서로 결합하였는데($J=11.6$ Hz), 이는 메틴(methane) 시그널이 2,3-트랜스(trans) 형태(configured)라는 것으로, 이는 디하이드로플라보놀(dihydroflavonol)의 특징적인 모습이다.

[0110] 화합물 1에서, 근접한 긴 범위의 커플링을 갖는 더블릿(doublet) 더블릿(doublet)으로서 H-6의 존재는 H-5와 H-6에 올레핀(olefin) 메틴(methines)들의 존재를 가리킨다. DEPT(distortionless enhancement by polarization transfer) 실험은 또한 올레핀 메틴 탄소들로서의 δC 129.9 (C5) 및 δC 111.98 (C6) 위치에서 탄소의 다양성(multiplicity)를 보였다. gHMBC (gradient 1H-detected heteronuclear multiple bond connectivity) 실험에서, J3 연관된(correlated) 크로스 피크(peak)가 존재하였는데, C-10과 C8을 가지는 올레핀 메틴 프로톤(proton) H-6 뿐만 아니라 C-4, C7, C9를 갖는 H-5가 그것으로, 이는 1,2,4-삼치환된 고리 A로 확인되었다. 그러므로 화합물 1은 문헌상에서 유효한 스펙트럼 데이터와의 비교를 통하여 푸스틴(fustin)으로 확인되었다(Kim JS, Kwon YS, Chun WJ, Kim TY, Sun J, Yu CY, Kim MJ. *Rhus verniciflua* Stokes flavonoid extracts have anti-oxidant antimicrobial and α -glucosidase inhibitory effect. *Food Chem.* 120: 539-543 (2010)).

[0111] 화합물 2에서는, 작은 커플링 상수 2.0 Hz를 갖는 고리 A의 방향족 전형적인(typical) 메타(meta)-커플링 더블릿 [δH 5.91 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-6), δH 5.87 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-8) 에 의한 2개의 메틴 시그널의 존재가 1,2,3,5-사치환을 갖는 플로로글루시놀(phloroglucinol) 고리 A라는 것을 나타내었다.

[0112] ^{13}C -NMR 스펙트럼(핵자기공명)과 DEPT 실험을 통하여, δc 163.96 (C-5)와 δH 96.15 (C-6)에서의 탄소가 각각 산소화된 올레핀 4차 탄소 및 올레핀 메틴 탄소에 밝혀졌다. gHMBC 실험에서 C-7과 C-9를 갖는 올레핀 메틴 프로톤(proton) H-8로서의 J2 연관된 크로스 피크뿐 아니라 C-10과 C-6을 갖는 J3 연관된 크로스 피크도 존재하였다. 더욱이, gHMBC 실험에서 C-7과 C-5를 갖는 올레핀 메틴 프로톤 H-6로서의 J2 연관된 크로스 피크뿐 아니라 C-10과 C-8을 갖는 J3 연관된 크로스 피크가 존재하였는데, 이는 나아가 1,2,3,5-사치환된 고리 A라는 것을 확인하였다. 결국, 화합물 2는 문헌상에서 유효한 스펙트럼 데이터와의 비교를 통하여 택시폴린(taxifolin)으로 확인되었다(Nifant'ev EE, Koroteev MP, Kaziev GZ, Uminskii AA, Grachev AA, Men'shov VM, Tsvetkov YE, Nifant'ev NE, Ski VKB, Stash AI. On the problem of identification of dihydroquercetin flavonoid. *Russ. J. Gen. Chem.* 76: 161-163 (2006)).

[0113] 화합물 3 역시 메타-커플링된 올레핀 메틴 시그널을 갖고 있었고 [δH 6.16 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-6, H-5), δH 6.05 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-7) 1,2,3,5-사치환을 가진 고리 A로 나타났다. 더욱이, δH 6.42 (1H, s, H-10)에 단일 메틴 시그널이 존재하였는데 이는 C-3, C-2' C-6'를 갖는 J3 연관된 크로스 피크로 나타났는데 이는 C-3 (δc 179.12)에서 카보닐 기(function)를 가진 오론(aurone)의 특징적인 모습을 나타내는 gHMBC 스펙트럼 상에서 그러하였다. 시그널들은 매우 잘 알려진 오론인 설푸레틴(sulfuretin)과는 다른데, 이는 1,2,4-삼치환된 고리 A의 프로톤 시그널 대신 메타-커플링된 프로톤 H7 (δH 6.16) 및 H-5 (δH 6.05)의 존재 때문이다. 뿐만 아니라, 산소화된 올레핀 4차 탄소 C6 (δc 167.60)와 C4 (δc 167.20)의 낮은 자기이동 또한 화합물 3이 상대적으로 희

귀한 타입의 플라보노이드 중 하나인 오론인 오레우스딘(aureusidin)이라는 것을 가리켰는데, 이는 문헌에서 확인되는 물리적, 스펙트럼 데이터와의 비교로 확인되었다(Geiger H, Markham KR. Campylopusaurone, an auronoflavanone biflavonoid from the mosses Campylopus clavatus and Campylopus holomitrium. Phytochemistry 31: 4325-4328 (1992)).

[0114] 화합물 4는 파라(para)-분포된(disubstituted) 고리 B 및 고리 E, 그리고 C-C 결합(linkage)을 갖는 오치환된(pentasubstituted) 고리 A 및 고리 D를 갖고 있다. ¹³C-NMR 스펙트럼(핵자기공명)에서 30 탄소 시그널들의 존재는 이것이 바이플라보노이드(biflavonoid)라는 것을 암시하였다. ¹H-NMR 스펙트럼에서 이중시그널 및 단일선 시그널 δH 7.05 (H-8), 6.90 (H-6''), 6.85 (H-3''), 6.81 (H-3)의 존재는 아피게닌(apigenin) 모노머들 및 비대칭의 플라보노이드간(interflavonoid) 결합(linkage) C6-C8''을 포함하는 위쪽 및 끝 쪽 유닛(unit)을 가리켰다. C6-C8'' 결합은 gHMBBC 스펙트럼상에서 C-10''(δH 105.21)과 C-8''(δH 100.89)를 갖는 H-6''(δH 6.90)뿐 아니라 C-10(δc 105.35), C-6(δc 103.70)를 갖는 H-8(δH 7.5) 위치에서 메틴에 대한 연관된 크로스 피크의 존재를 기초로 배치되었다. 화합물 4는 문헌상에서 유효한 스펙트럼데이터와의 비교를 통하여 아가티스플라본(agathisflavone)으로 확인되었다(Chari VM, Ilyas M, Wagner H, Neszmelyi Y, Chen FC, Chen LK, Lin YC, Lin YM. ¹³C-NMR spectroscopy of biflavonoids. Phytochemistry 16: 1273-1278 (1977)).

[0115] 화합물 1 내지 4의 신경 보호 효과

[0116] 글루타메이트-유도된 독성과 CDK5/p25 억제에 있어서 화합물 1 내지 4의 신경 보호능을 평가하였다. 글루타메이트(glutamate)는 중추신경계에서 내재하는 흥분성 신경전달물질인데, 이것이 고농도일 경우 신경독이 되며 파킨슨병과 알츠하이머와 같은 퇴행성 신경 질환의 전개에 관여하는 것으로 여겨진다. 무한증식하는 생쥐 해마회유래 세포주인 HT22는 표현형적으로 뉴런전구세포와 닮았으나 기능적인 통로형글루탐산수용체가 없어 글루타메이트가 촉발하는 세포사의 원인으로서의 신경흥분독성(excitotoxicity)을 배제한다. 그러므로, HT22 세포는 산화적(oxidative) 글루타메이트에 의한 신경세포독성을 연구하기 위한 인 비트로(in vitro) 모델로 널리 이용된다.

[0117] 글루타메이트가 없을 때의 상기 화합물들의 세포독성 시험은, 화합물 1, 화합물 2 및 화합물 4는 10-80 μM 농도 범위에서 96-100%의 세포생존능을 나타내었고, 화합물 3의 경우 60 μM 이상의 농도에서 88.5% 생존능으로 독성 작용을 보였다(도 1). 또한 화합물 1 내지 화합물 4들은 50 μM의 트롤록스(Trolox)와 비교 시 40 및 80 μM에서의 글루타메이트-유도된 독성에 대하여, 세포 생존능(91.05%) 및 보호능(85.4%)로 주목할만한 세포 생존능(도 2) 및 보호 효능(표 1)을 보였다. 화합물 1, 화합물 2, 화합물 3 및 화합물 4의 EC50 값들은 각각 22.43, 13.09, 11.90, 27.78 μM 이었다. 이 중에서 화합물 3은 40 μM 농도에서 가장 두드러지는 보호능인 96.8±2.7%를 보였다. 또한 주목 해야 할 것은 비록 화합물 2와 4가 20 μM까지의 더 낮은 농도에서 효과적이지 않았으나, 40-80 μM의 더 높은 농도에서는 어느 정도 신경보호능을 나타내었다는 것이다. 낮은 농도에서 화합물 2와 4가 효과가 없는 것은 세포독성 때문이 아니며(도 2), 글루타메이트에 의하여 유도된 신경세포독성을 극복하기 위한 신경의 방어 메커니즘을 증가시키기에는 농도의 역치(threshold)가 충분하지 않았기 때문일 수 있다. 화합물 1 내지 화합물 3은 고리 B 에서, 3', 4' -디하이드록시 카테콜(dihydroxy catechol) 구조와 마찬가지로 구조적 특징을 가지고 있다.

[0118] 화합물 1 및 화합물 2는 모두 C-3 에 하이드록시기를 가지고 있는데 이는 이들의 신경보호활동에 있어 중요한 요인일 수 있다. 바이플라보노이드(Biflavonoid)인 화합물 4는 EC50 27.78 μM의 신경보호효과를 나타내었다. 한편, 네팔 옷나무로부터 분리된 다른 종류의 바이플라보노이드(biflavonoids)들인 메수아페론(mesuaferone) B, 루스플라본(rhusflavanone), 루스플라본(rhusflavone), 쿠프레스플라본(cupressuflavone) 역시 테스트 하였으나 40 μM 농도에서 4% 보다도 훨씬 적은 보호효과가 나타났다. 화합물 4의 경우에, C 고리 내에 4 위치에서 옥소(oxo) 작용기를 갖는 2,3 불포화가 존재하는 것이 그 활성에 대한 이유가 될 것이다. 화합물 1 내지 화합물 4들은 40 μM 농도까지는 H0-1 단백질 발현을 유도하지도 않으며, H0 활성화에 영향을 주지 않았다. 화합물 1, 화합물 2 및 화합물 4는 또한 어떠한 주목할만한 Cdk5 억제력 (IC50 값 > 20 μM)도 나타내지 않았으며 그것들의 적절한 세포보호는 다른 항산화능에 의한 것일 수도 있다. 하지만 화합물 3은 주목할 만큼 투여량에 의존적으로 Cdk5를 억제하였다(도 3). ROS 레벨은 글루타메이트의 자극 하에서 Cdk5에 의해 증가되고, Cdk5 억제제는 ROS

축적을 줄이는데 중요한 역할을 한다(Sun KH, de Pablo Y, Vincent F, Shah K. Deregulated Cdk5 promotes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. J. Neurochem. 107: 265-278 (2008)).

[0119]

11.9 μM 의 EC50 값으로 신경보호를 보여준 화합물 3은 25.8 μM 의 EC50 값을 갖는 R(-)-5-O-메틸아티폴린(methylatifolin)보다 더 효과적이었고, 또한 15.8 μM 의 EC50 값인 트롤록스(Trolox)와 비교할 만 하다. 화합물 3의 효과적인 자유라디칼 소거능(free radical scavenging capacity) 덕분에, 작은 차이를 갖는 기체 및 액체상의 서로 다른 라디칼에 대하여, 결합분해엔탈피를 갖는 수소원자 공여체(donor)로서 그 효율을 가지며, 평면 구조(conformation)는 낮은 이온화 전위 값(ionization potential values)들을 갖는 인접한 고리들 사이의 전기적 비편재화로 확장된다.

[0120]

유사한 치환을 갖는 플라바노놀(flavanonol)인 화합물 2와 비교할 때, 화합물 3의 주목할 만한 활성은 특히 C-고리인 오론(aurone) 구조 때문일 수 있는데, 이는 아데닌(adenine)의 5-멤버(memebre) 고리와 유사하다. 뉴클레오타이드 ATP의 아데닌 모이어티(moiety)가 닮은 것 외에도, 퀘르세틴(quercetin) (5,7,3',4'-테트라하이드로플라보놀(tetrahydroflavonol))의 A/C 고리들과 화합물 3이 닮은 것은 억제에 있어 결정적 역할을 해왔을 수 있다. 또한 전자 공여에 중요한 역할을 할 것으로 생각되는 A 고리 상에서의 치환기(substituents)로 인해 AAPH에 의해 유도되는 과산화지방질(lipid peroxidation) (77.8%)을 억제할 수 있는 것으로서 화합물 3는 좋은 항산화물질이다.

[0121]

화합물 3는 IC50 값 3.5 μM 로 Cdk5/p25를 억제하였다(도 3 및 도 4). 양성대조군인 알스터폴론(alsterpaullone)는 IC50 값이 0.33 μM 로 나타났고 이는 문헌상에서의 IC50 0.04 μM 와 비교할 만하다(Leost M, Schultz C, Link A, Wu YZ, Biernat J, Mandelkow EM, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Zaharevitz DW, Gussio R, Senderowicz AM, Sausville EA, Kunick C, Meijer L. Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclindependent kinase 5/p25. Eur. J. Biochem. 267: 5983-5994 (2000)). 특히, 그 억제는 또한 잘 알려진 Cdk5/p25 억제제인 로스코비틴(roscovitine)이 IC50 값 0.16 μM , 플라보피리돌(flavopiridol)이 IC50 0.17 μM , 올로무신(olomoucine)이 IC50 값 3.0 μM , 프로시아니딘(procyanidin) B2가 IC50 값 0.26 μM 인 것과 비교하여 주목할 만 하다. Cdk5/p25형성이 calpain 활성화에 따른 세포내 칼슘 증가로 발생하는 것으로 생각될 때, Ca²⁺-calpain-p25/Cdk5 경로의 억제는 HT22세포에서 글루타메이트에 의하여 유도된 산화적 독성에 대한 화합물 3의 보호 역할의 원인일 수 있다. 글루타메이트에 의하여 유도된 독성에서 ROS형성은 병리학적 세포사에 있어 주요 역할을 한다. 화합물 1 내지 화합물 4들 중에서, 특히 화합물 3은 40 μM 의 농도에서 ROS의 상대적으로 효과적인 억제를 보였는데, 이는 양성대조군인 트롤록스(Trolox)의 50 μM 농도에서의 그것과 매우 비교되었다(도 5C).

표 1

화합물	세포 생존능 (%) ¹⁾			
	10 μM	20 μM	40 μM	80 μM
1	1.6 $\pm$ 1.3	-0.2 $\pm$ 1.9	32.2 $\pm$ 2.0	73.4 $\pm$ 4.8**
2	5.6 $\pm$ 2.0	33.7 $\pm$ 1.0	60.1 $\pm$ 1.4*	64.0 $\pm$ 2.3**
3	2.6 $\pm$ 1.7	37.7 $\pm$ 2.2	96.8 $\pm$ 2.7**	75.4 $\pm$ 2.4**
4	-0.5 $\pm$ 2.8	-7.9 $\pm$ 2.1	26.6 $\pm$ 0.2	57.8 $\pm$ 3.7*

[0122]

[0123]

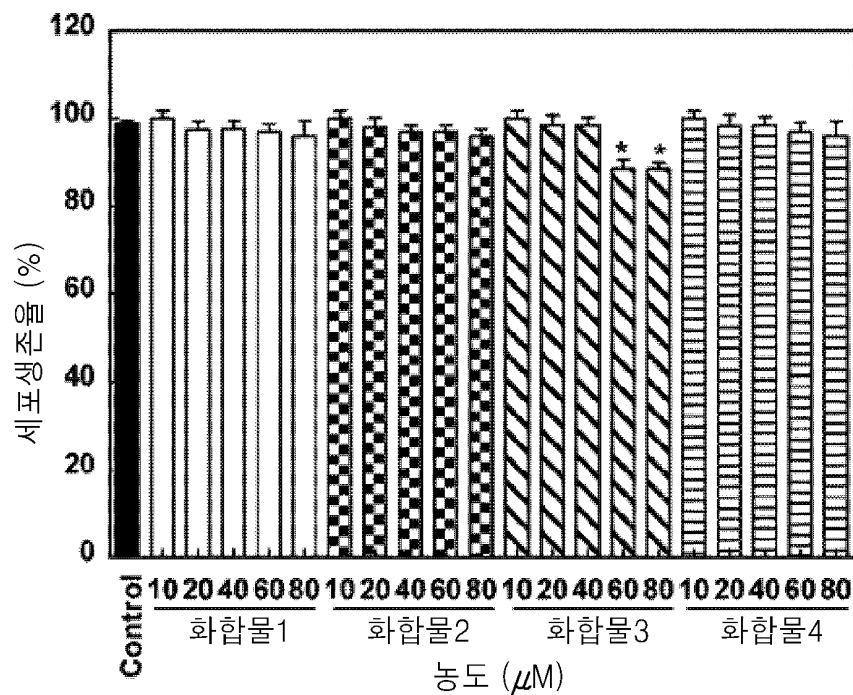
¹⁾ 5 μM 농도에서 글루타메이트-손상의 존재 하, 세포 생존능은 38.69 $\pm$ 0.83%였다. 양성 대조군으로 사용된 트롤록스(50 μM)는 85.4 $\pm$ 2.2%의 보호능을 보였다. 모든 값들은 3회 독립된 실험의 평균 $\pm$ SD이다; *p<0.01, **p<0.001 vs. 글루타메이트.

[0124]

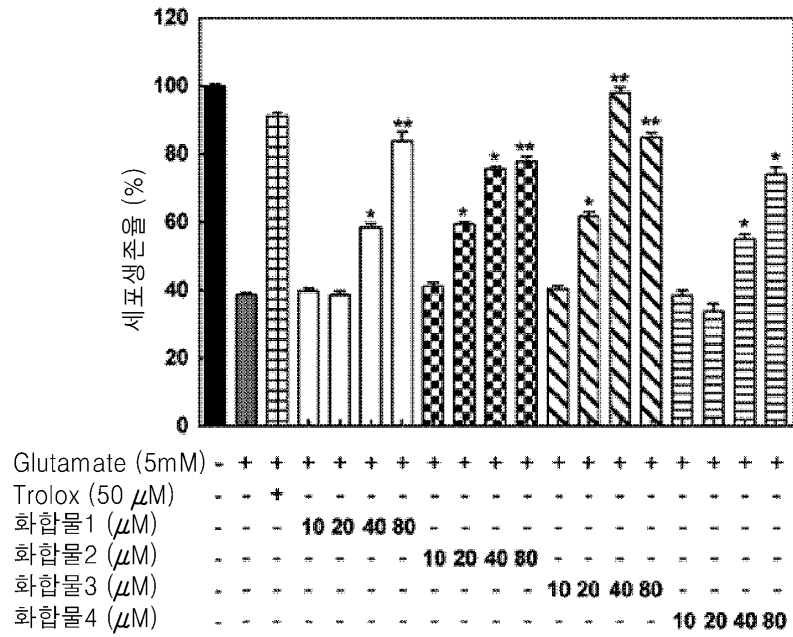
상기 무한증식하는 생쥐 해마회 유래 세포를 이용한 인 비트로 CDK5/p25 분석을 통하여, 화합물 1 내지 4들은 글루타메이트에 의하여 유래된 산화적 손상에 대하여 신경보호능을 갖는 것으로 확인되었다. 그러므로 상기 실험 결과로부터, 화합물 1 내지 화합물 4들 모두 산화세포 독성에 대하여 잠재적인 신경 보호능을 갖는 것을 알 수 있었다. 특히 화합물 3인 오레우스딘(aureusidin)의 항산화능, ROS 억제, 및 세포보호능 때문에, 오레우스딘의 글루타메이트-산화 스트레스를 수반한 병리학들(pathologies)에서의 유용성을 알 수 있었다.

도면

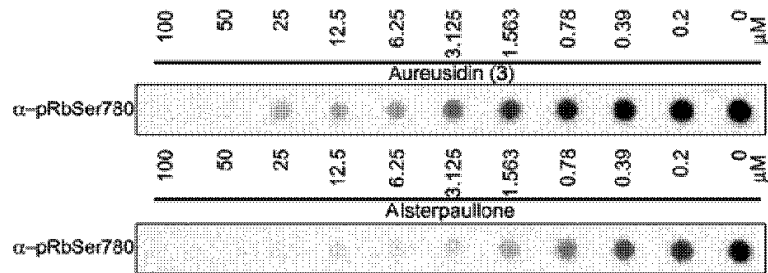
도면1



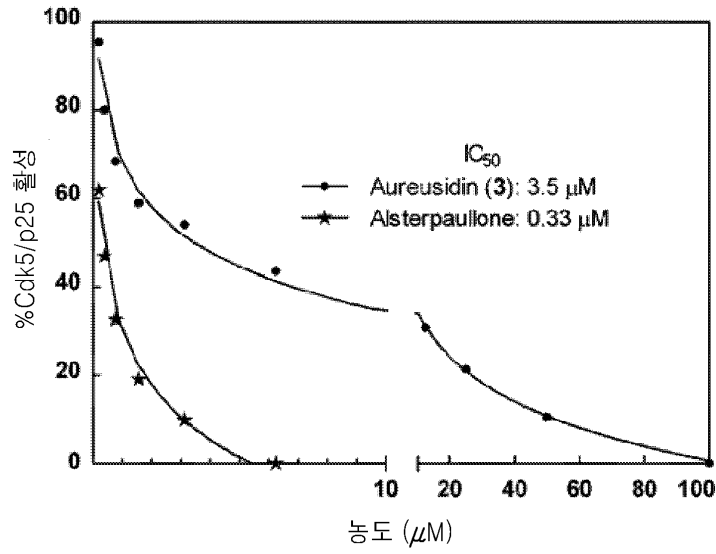
도면2



도면3



도면4



도면5

