



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년06월25일
(11) 등록번호 10-1278273
(24) 등록일자 2013년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/56 (2006.01) A61K 31/575 (2006.01)

A61K 31/015 (2006.01) A61P 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0104871

(22) 출원일자 2012년09월21일

심사청구일자 2012년09월21일

(56) 선행기술조사문헌

Wenli Hou 외 6명. Phytotherapy Research. 2009년 5월, Vol. 23, No. 5, 제614면 내지 제618면.*

KR1020100054653 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (공동, 충남대학교)

(72) 발명자

나민균

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 406-1605

(74) 대리인

백경업

전체 청구항 수 : 총 4 항

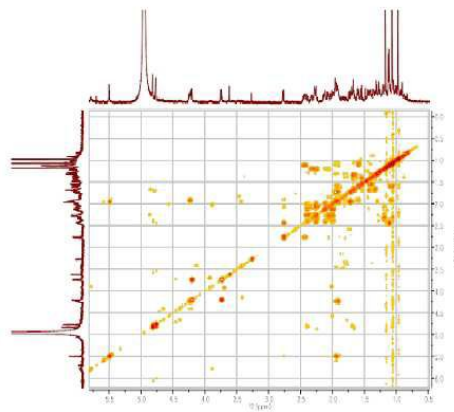
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 만병초로부터 분리된 트리테르페노이드계 화합물을 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 만병초로부터 분리된 트리테르페노이드계 화합물을 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B는 인슐린 수용체(insulin receptor) 및 인슐린 수용체 기질(insulin receptor substrates)의 탈인산화를 일으켜 인슐린의 신호전달 기전을 방해함으로써 인슐린 저항성을 야기시키고, 렙틴 수용체 및 Jak에서 일어나는 인산화를 저해함으로써 렙틴 신호전달 기전을 억제하는 역할을 하여 비만을 일으키는 작용을 한다고 알려져 있다. 이에 상기 만병초 유래의 화합물들은 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B의 억제 활성이 우수하여 당뇨병 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0024389

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 단백질 타이로신 탈인산화효소 및 지방산생합성효소 저해활성을 갖는 천연물 유래 선도화합물 발굴

주관기관 한국연구재단

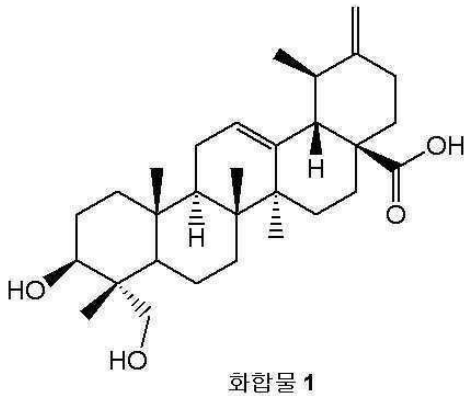
연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31

특허청구의 범위

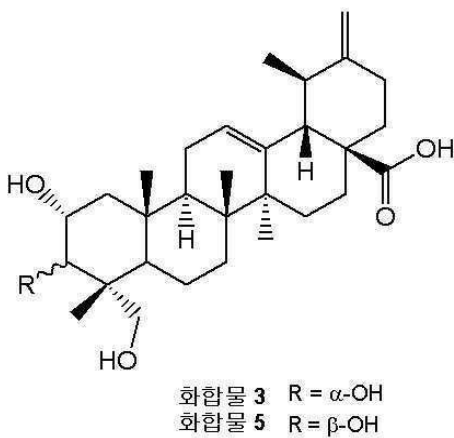
청구항 1

만병초(*Rhododendron brachycarpum*)로부터 분리된 하기 화학식 1 및 3의 로도덴트릭산 A(rhododendric acid A, 화합물 1), 2 α ,3 α ,23-트리하이드록시우르사-12,20(30)-디엔-28-오익산(2 α ,3 α ,23-trihydroxyursa-12,20(30)-dien-28-oic acid, 화합물 3) 및 악티니딕산(actinidic acid, 화합물 5)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 트리테르페노이드계 화합물(triterpenoids)을 함유하는 비만 또는 당뇨병의 예방 또는 치료용 조성물.

[화학식 1]



[화학식 3]



청구항 2

삭제

청구항 3

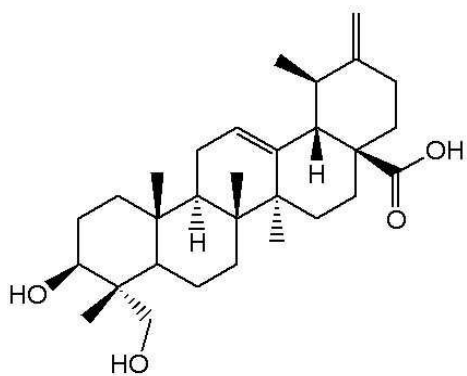
제1항에 있어서,

상기 트리테르페노이드계 화합물은 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 비만 또는 당뇨병의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1의 신규 화합물 로도덴트릭산 A(rhododendric acid A).

[화학식 1]



청구항 5

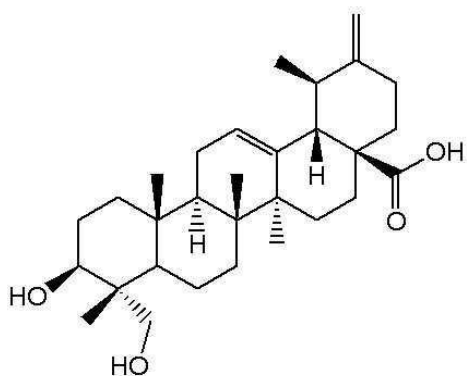
만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 잎을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 만병초 추출물을 제조하는 단계;

상기 만병초 추출물을 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트를 이용하여 순차적으로 분획하는 단계; 및,

상기 분획을 통해 얻은 클로로포름 분획물에서 크로마토그래피를 이용하여 하기 화학식 1의 화합물을 분리하는 단계;

를 포함하는 하기 화학식 1의 로도덴트릭산 A(rhododendric acid A)를 분리하는 방법.

[화학식 1]



명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 만병초 유래의 트리테르페노이드계 화합물을 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 자세하게는 본 발명은 만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 유래의 로도덴트릭산 A(rhododendric acid A, 화합물 1), 로툰딕산(rotundic acid, 화합물 2), 2 α ,3 α ,23-트리하이드록시우르사-12,20(30)-디엔-28-오익산(2 α ,3 α ,23-trihydroxyursa-12,20(30)-dien-28-oic acid, 화합물 3), 23-하이드록시우르솔릭산(23-hydroxyursolic acid, 화합물 4) 및 악티니딕산(actinidic acid, 화합물 5)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 트리테르페노이드계 화합물(triterpenoids)을 함유하는 대사성 질환의 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현대 사회에 이르러 삶의 질이 향상되고, 수명이 연장되고 있지만, 수명의 증가와 더불어 암을 비롯한 심혈관 질환, 대사성 질환의 발병도 증가하고 있는 추세이다. 최근 발표된 세계보건기구의 통계를 분석하면, 전 세계적

으로 높은 사망률을 차지하는 질환이 각종 암을 비롯하여 심혈관계질환, 대사성질환, 신경정신질환 등인 것으로 보고된 바 있다.

[0003] 상기 대사성 질환 중에서 당뇨병은 인슐린의 절대적 결핍 또는 저항성으로 인한 당대사 기능이상을 특징으로 하는 만성 소모성 질환으로 전신적인 무기력과 저항성 저하, 혈관장애, 뇌경색, 심근경색 등 기타 다양한 합병증을 유발하는 질병이다. 당뇨병은 그 발병원인과 병태양상에 따라 크게 2가지 유형으로 구분되는데, 임파구의 면역학적 기전에 의한 인슐린 분비세포인 베타세포의 파괴로 유발되는 인슐린 의존성 1형 당뇨병, 인슐린을 분비하는 베타세포의 기능저하와 말초표적장기에서 인슐린에 대한 저항성 증가로 유발되는 인슐린 비의존성인 2형 당뇨병이 있다. 현대 사회의 노령화와 생활습관의 변화로 성인형의 2형 당뇨병이 전체 환자의 90% 이상을 차지하고 있고 그 수도 꾸준히 증가하는 추세이다.

[0004] 인슐린 저항성이란 일정량의 인슐린 농도에 대한 반응이 정상보다 감소되어 있는 상태를 말하며 일반적으로 유전적, 환경적인 요인으로 발생하며 2형 당뇨병 발병의 주요 원인이며 최근 경구용 당뇨병 치료제 개발은 말초표적장기에서 인슐린 감수성을 개선시키는 것을 주 타겟으로 하고 있다.

[0005] 현행 약물치료제는 그 치료기전에 따라 몇 가지로 나눌 수 있는데, 설폰닐우레아(sulfonylurea)계는 간접적으로 인슐린 분비를 증가시키고 인슐린의 작용을 증강시키는 반면에 저혈당증유발과 인슐린 분비능 상실 등의 부작용이 있을 수 있다. 비구아나이드(biguanide)계는 간에서 당 신생을 억제하고 위장관에서 당의 흡수를 감소시키는 작용을 하지만 위장장애와 신장독성 등의 부작용이 있으며, 알파-글루코시데이스(α -glucosidase)계 저해제는 소장에서 포도당을 만드는 효소의 작용을 억제하여 혈당의 상승을 억제하여 주는 작용을 하는 반면 설사, 복통 등의 부작용이 있다.

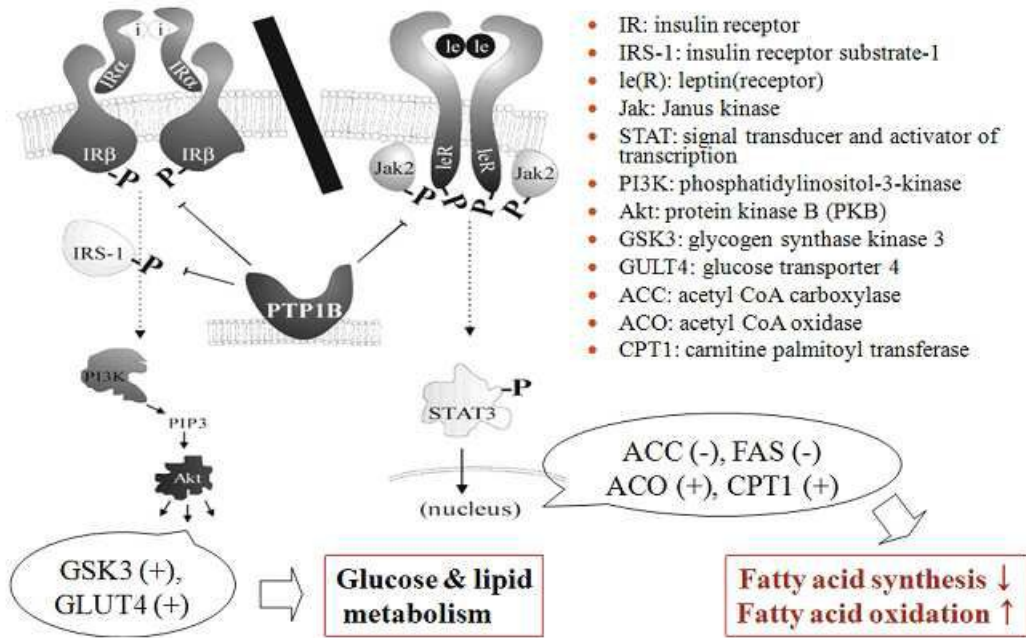
[0006] 최근에는 인슐린 작용 증가제의 개발이 본격화되고 있는데 대표적으로 PPAR- γ (peroxisome proliferator activated receptor γ)를 활성화시키는 티아졸리디네이션(thiazolidinedione, TZD) 계열의 약물들이 있다. PPAR- γ 는 핵 호르몬 수용체(nuclear hormone receptor) 중의 하나인 레티노이드 엑스 수용체(retinoid X receptor, RXR)와 결합하여 이종이량체(heterodimer)를 형성한 뒤, 전사인자(transcription factor)로 작용하여 지방세포분화, 탄수화물, 지방대사 등에 중요한 작용을 한다. 특히 피피에이알-감마(PPAR- γ)는 주로 지방세포(adipocyte)에 존재하며 지방생성(adipogenesis) 및 당흡수(glucose uptake) 작용을 하기 때문에 PPAR- γ 효능제(PPAR- γ agonist)가 2형 당뇨병 치료제로서 많이 사용되고 있다. 또한 티아졸리디네이션(thiazolidinedione, TZD) 계열의 약물도 2형 당뇨병 치료제로서 많이 많이 사용되고 있다(Diabetes, 1998, 47(4), 507~514).

[0007] 그러나, 현행 약물치료제의 상황을 보면 당뇨병의 근본적 원인의 치료에 이르지 못하고 있는데다가, 여러 부작용 등이 보고되고 있어 인슐린 저항성을 근본적으로 해결할 수 있는 약물의 개발이 시급한 실정이다.

[0008] 한편, 비만은 단순히 과체중으로 인한 미용적인 영향 및 삶의 질이 낮아진다는 문제가 아닌 주요 사망 원인이 되며, 대사성 질환에서 큰 비중을 차지하는 질환이라는 것으로 인식이 바뀌고 있다. 세계보건기구(WHO)의 통계에 따르면 비만은 그 발병률이 증가하여 2008년 현재 세계 인구의 약 6%인 4억 명 정도가 비만으로 조사되었고 2015년에는 7억 명 이상이 될 것으로 예측하고 있다. 특히 OECD 국가의 경우, 성인 비만인구는 해마다 증가하는 추세이며 미국의 경우 3명 중 1명은 비만인 것으로 조사되었다. 우리나라도 생활환경의 변화로 비만인구가 급증하고 있으며 체질량 지수(body mass index; BMI) 25 이상인 한국 성인 비만인구는 매년 40년만 명씩 늘어 2005년 기준 10명 중 3명은 비만인 것으로 조사되었다. 질병관리본부의 자료에 따르면 1995년 비만인구가 전체 인구의 26.3%이었으나 2001년에는 전체 인구의 30.6%로, 2005년에는 전체 인구의 31.5%로 급증하였으며 지속적인 증가 추세를 보이고 있다.

[0009] 한편, 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)는 하기 참고도 1에서와 같이, 인슐린 수용체(insulin receptor) 및 인슐린 수용체 기질(insulin receptor substrates)의 탈인산화를 일으켜 인슐린의 신호전달 기전을 방해함으로써 인슐린 저항성을 야기시키는 효소로 알려져 있다. 또한, 상기 단백질 타이로신 탈인산화 효소는 렙틴의 신호전달 과정에서도 렙틴 수용체 및 Jak에서 일어나는 인산화를 저해함으로써 렙틴 신호전달 기전을 억제함(참고도 1 참조)으로써 비만을 일으키는 원인으로 알려져 있다(J. Med. Chem., 2004, 47(17), 4142~4146).

[0010] [참고도 1]

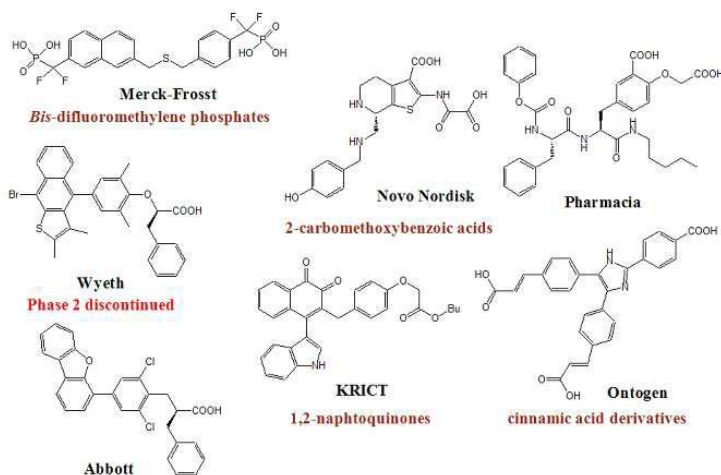


[0011]

[0012] 비록, 현재 상기 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B에 관한 연구는 상대적으로 초기 단계에 머물러 있기는 하지만, 최근 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B의 생물학적 기능 및 질환 유발 기전이 밝혀짐에 따라 새로운 약물 개발의 타겟이 되고 있다(Med. Res. Rev., 2012, 32, 459~517). 특히, 당뇨, 비만, 암 등 난치성 질환에 있어서 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B의 역할이 규명됨에 따라 이 효소 저해를 타겟으로 하는 신약 개발에 많은 투자가 이루어지고 있다. 이에 대한 예로서, 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B) 유전자를 제거한 쥐에서 인슐린 내성이 제거되어 2형 당뇨병이 유발되지 않았으며 비만이 억제되는 현상이 보고되었으며(Science, 1999, 283, 1544~1548), 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)를 억제하는 물질들이 항당뇨 효과를 보이는 현상이 관찰되고 있다(J. Med. Chem., 2000, 43(5), 995~1010).

[0013] 한편, 현재까지 임상에 들어간 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B를 비롯한 각종 타이로신 탈인산화효소의 저해제는 하기 참고도 2와 같은데, 대부분 합성 화합물로서, 낮은 생체이용률, 독성 및 다른 부작용으로 인해 임상 시험에서 탈락된 경우가 많다. 따라서 안전성이 높은 천연물 유래 저해제 개발이 요구되고 있다(Nat. Rev. Drug Discov., 2002, 1, 696~709).

[0014] [참고도 2]



[0015]

[0016] 이에 본 발명자들은 숙은노루오줌(*Astilbe koreana*)(Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, 16, 3273~3276), 섬오가피(*Acanthopanax koreanum*)(Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 3061~3064), 에리스리나 밀드브래디(*Erythrina mildbraedii*)(J. Nat. Prod., 2006, 69, 1572~1576 ; Chem. Pharm. Bull., 2008, 56, 85~88) 등으로부터 분리한 화합물이 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B의 저해활성이 있음을 확인한 바 있다.

[0017] 또한, 본 발명자는 상기와 같은 연구를 거듭하던 중, 만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 유래의 트리테르페노이드계 화합물(triterpenoids) 또한 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B의 저해활성이 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성할 수 있었다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0018] (비특허문헌 0001) Spiegelman, B.M., PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor., Diabetes, 1998, 47(4), 507~514.
- (비특허문헌 0002) Hooft van Huijsduijnen, R. et al. Prospects for inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B as antidiabetic drugs., J. Med. Chem., 2004, 47(17), 4142~4146.
- (비특허문헌 0003) Elchebly, M. et al., Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene., Science, 1999, 283(5407), 1544~1548.
- (비특허문헌 0004) Malamas, M.S. et al., New azolidinediones as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B with antihyperglycemic properties., J. Med. Chem., 2000, 43(5), 995~1010.
- (비특허문헌 0005) Thareja, S. et al., Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: a molecular level legitimate approach for the management of diabetes mellitus., Med. Res. Revi., 2012, 32, 459~517.
- (비특허문헌 0006) Johnson, T.O. et al., Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes., Nat. Rev. Drug Discov., 2002, 1, 696~709.
- (비특허문헌 0007) Na, M. et al., Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activity of triterpenes isolated from *Astilbe koreana*., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, 16, 3273~3276.
- (비특허문헌 0008) Na, M. et al., Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by diterpenoids isolated from *Acanthopanax koreanum*., Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 3061~3064.
- (비특허문헌 0009) Na, M. et al., Protein tyrosine phosphatase-1B inhibitory activity of isoprenylated flavonoids isolated from *Erythrina mildbraedii*., J. Nat. Prod., 2006, 69, 1572~1576.
- (비특허문헌 0010) Jang, J. et al., Prenylated flavonoids with PTP1B inhibitory activity from the root bark of *Erythrina mildbraedii*., Chem. Pharm. Bull., 2008, 56, 85~88.
- (비특허문헌 0011) Cui, L. et al., Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Morus* root bark. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 1426.

발명의 내용

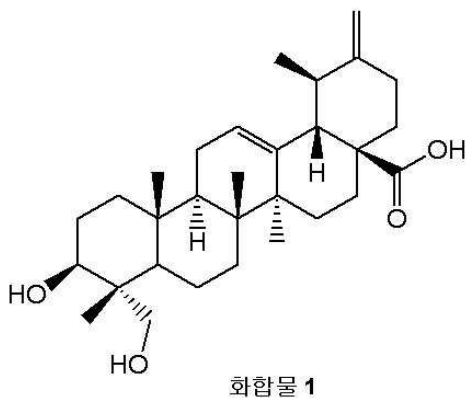
해결하려는 과제

- [0019] 본 발명의 목적은 만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 유래의 트리테르페노이드계 화합물을 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다. 보다 자세하게는 본 발명의 목적은 만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 유래의 로도덴트릭산 A(rhododendric acid A, 화합물 1), 로툰딕산(rotundic acid, 화합물 2), 2 α ,3 α ,23-트리하이드록시우르사-12,20(30)-디엔-28-오익산(2 α ,3 α ,23-trihydroxyursa-12,20(30)-dien-28-oic acid, 화합물 3), 23-하이드록시우르솔릭산(23-hydroxyursolic acid, 화합물 4) 및 악티니딕산(actinidic acid, 화합물 5)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 트리테르페노이드계 화합물(triterpenoids)을 함유하는 대사성 질환의 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

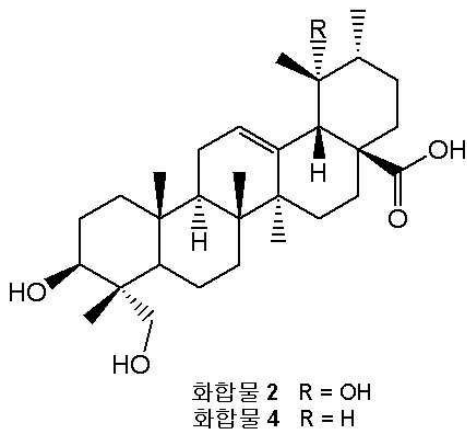
[0020] 본 발명은 만병초 유래의 트리테르페노이드계 화합물을 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 보다 자세하게는, 본 발명은 하기 화학식 1 내지 3의 로도덴트릭산 A(rhododendric acid A, 화합물 1), 로툰딕산(rotundic acid, 화합물 2), 2 α ,3 α ,23-트리하이드록시우르사-12,20(30)-디엔-28-오익산(2 α ,3 α ,23-trihydroxyursa-12,20(30)-dien-28-oic acid, 화합물 3), 23-하이드록시우르솔릭산(23-hydroxyursolic acid, 화합물 4) 및 악티니딕산(actinidic acid, 화합물 5)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상의 트리테르페노이드계 화합물(triterpenoids)을 함유하는 대사성 질환의 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0021] [화학식 1]



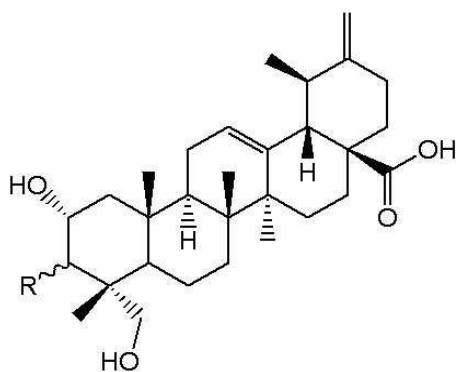
[0022]

[0023] [화학식 2]



[0024]

[0025] [화학식 3]



화합물 3 R = α -OH
화합물 5 R = β -OH

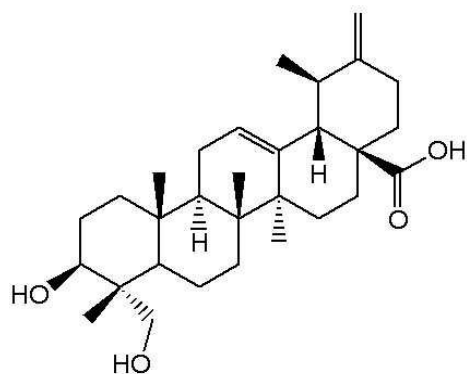
[0026]

[0027] 상기 대사성 질환은 비만 또는 당뇨병 중에서 선택되는 질환일 수 있다.

[0028] 또한, 상기 트리테르페노이드계 화합물은 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B(protein tyrosine phosphatase 1B, PTP1B)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0029] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 하기 화학식 1의 신규 화합물 로도덴트릭산 A(rhododendric acid A)를 제공하며, 만병초(*Rhododendron brachycarpum*)의 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매의 추출물로부터 하기 화학식 1의 로도덴트릭산 A(rhododendric acid A)를 분리하는 방법을 제공할 수 있다.

[0030] [화학식 1]



[0031]

[0032] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0033] 상기 트리테르페노이드계 화합물은 만병초(*Rhododendron brachycarpum*)의 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매의 추출물로부터 분리될 수 있다. 또한, 상기 트리테르페노이드계 화합물은 만병초의 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매의 추출물을 크로마토그래피로 분획하여 얻을 수 있다.

[0034] 따라서, 바람직하게는 상기 트리테르페노이드계 화합물은 만병초 잎을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 만병초 추출물을 제조하는 단계; 상기 만병초 추출물을 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트를 이용하여 순차적으로 분획하는 단계; 및, 상기 각 분획물을 크로마토그래피를 이용하여 화합물을 분리하는 단계;를 통해 얻을 수 있다.

[0035] 상기 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 중압 액체 크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography), 박층 크로마토그래피(TLC; thin layer chromatography), 실리카겔 진공 액체 크로마토그래피(silica gel vacuum liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 중에서 선택될 수 있다.

- [0036] 한편, 본 발명의 트리테르페노이드계 화합물은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 합성될 수 있으며, 약학적으로 허용 가능한 염으로 제조될 수도 있다. 바람직하게는 본 발명의 화합물들은 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0037] 또한, 본 발명은 트리테르페노이드계 화합물을 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 트리테르페노이드계 화합물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 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. 제제화할 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 본 발명의 트리테르페노이드계 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, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로스테라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 트리테르페노이드계 화합물을 함유하는 약학 조성물의 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 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 트리테르페노이드계 화합물을 함유하는 약학 조성물은 쥐, 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 뇌척수관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명은 만병초로부터 분리된 트리테르페노이드계 화합물을 함유하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B는 인슐린 수용체(insulin receptor) 및 인슐린 수용체 기질(insulin receptor substrates)의 탈인산화를 일으켜 인슐린의 신호전달 기전을 방해함으로써 인슐린 저항성을 야기시키고, 렙틴 수용체 및 Jak에서 일어나는 인산화를 저해함으로써 렙틴 신호전달 기전을 억제하는 역할을 하여 비만을 일으키는 작용을 한다고 알려져 있다. 이에 상기 만병초 유래의 화합물들은 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B의 억제 활성이 우수하여 당뇨병 또는 비만의 예방 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 로도텐트릭산 A(화합물 1)의 ^1H - ^1H COSY 스펙트럼을 나타내는 그림이다(CDC1₃, 600 MHz).
- 도 2는 로도텐트릭산 A(화합물 1)의 HMBC 스펙트럼 결과를 나타내는 그림이다.
- 도 3은 로도텐트릭산 A(화합물 1)의 NOESY 스펙트럼을 나타내는 그림이다(irradiation at H-3, 500MHz).

도 4는 로도덴트릭산 A(화합물 1)의 HMBC ($H \rightarrow C$)와 $^1H-^1H$ COSY (—) 상관 관계(도 4A) 및 NOE ($\leftrightarrow$) 상관관계(도 4B)를 나타내는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 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 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0043] <실시예 1. 만병초로부터 트리테르페노이드계 화합물의 분리>

[0044] 만병초(*Rhododendron brachycarpum*) 잎은 2011년에 한국 공주시에 있는 만병초 재배농장에서 구입하였다. 상기 만병초 잎 25kg을 메탄올 250 ℓ 로 실온에서 1주일씩 2회 추출한 후 여과하였다. 여과된 메탄올 추출액을 농축하여 6kg의 메탄올 추출물을 얻었다. 상기 메탄올 추출물(3kg)을 10 ℓ 의 물에 현탁하고, n-헥산(10 ℓ ×3), $CHCl_3$ (10 ℓ ×3) 및 에틸아세테이트(10 ℓ ×3)를 순차적으로 가해 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물(각각 438g, 140g, 450g)을 얻었고, 마지막으로 물층 잔사를 포함하는 분획물을 얻었다. 이 후 상기 4가지 분획물에서 단백질을 타이로신 탈인산화효소 1B에 대해 상대적으로 강한 저해 활성을 갖는 클로로포름 분획물($30\mu g/ml$ 농도에서 88% 저해효과)에서 본 발명의 트리테르페노이드계 화합물을 분리하였다.

[0045] 상기 클로로포름 분획물(140g)은 실리카겔 컬럼 VLC 및 n-헥산-에틸아세테이트(gradient from 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, to 0:1)를 이용하여 9개의 소분획물(Fr. C1-C9)을 얻었다. 이 중 Fr. C9 소분획물(30g)은 실리카겔 컬럼 및 n-헥산-에틸아세테이트(gradient from 8:2 to 0:1)를 이용하여 3개의 소분획물을 얻었다(Fr. C91-C93).

[0046] Fr. C92 소분획물(2.47g)은 다시 MPLC[C18 SNAP Cartridge KP-C18-HS column] 및 $MeOH:H_2O$ (80:20)의 등용매조건을 이용하여 5개의 소분획물로 분획하였다. 이 중 Fr. C922(330mg) 소분획물을 HPLC(Luna C18(2) column: $250 \times 21.2mm$, mobile phase: 80% MeOH, flow rate: $6ml/min$)를 이용하여 화합물 1(3.7mg, t_R 54.6min), 화합물 2(4.4mg, t_R 23.5min), 화합물 3(39.2mg, t_R 32.7 min) 및 화합물 4(5.8mg, t_R 66.3min)를 분리하였다.

[0047] 또한, Fr. C93(8.82g) 소분획물을 RP-C18 MPLC 및 메탄올-물(from 4:6 to 0:1) 조건으로 분리하여 7개의 소분획물을 얻었으며(Fr. C931-C937), 화합물 5(18.0mg, t_R 30.2min)는 Fr. C932 소분획물(1.56g)을 HPLC(Luna C18(2) column: $250 \times 21.2mm$, mobile phase: 80% MeOH, flow rate: $6ml/min$)를 이용하여 분리하였다.

[0048] <실시예 2. 만병초 유래 화합물의 물리화학적 구조 확인>

[0049] 실시예 2-1. 로도덴트릭산 A(화합물 1)

[0050] rhododendric acid A;

[0051] white amorphous powder;

[0052] $[a]_D^{20}$: +70.4 (c 0.03, MeOH);

[0053] UV λ_{max} (MeOH) 207 nm;

[0054] HRFABMS m/z 471.3476 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{30}H_{47}O_4$ 471.3474);

[0055] 1H -NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz) : δ_H 5.50 (1H, br t, J =3.1 Hz, H-12), 4.82 (1H, s, H-30a), 4.77 (1H, s, H-30b), 4.24 (1H, dd, J = 5.6, 10.9 Hz, H-3), 4.20 (1H, d, J =10.6 Hz, H-23a), 3.74 (1H, d, J = 10.6 Hz, H-23b), 2.77 (1H, d, J = 11.3 Hz, H-18), 1.17 (3H, s, H-27), 1.12 (3H, d, H-29), 1.07 (6H, s, H-24, H-26), 0.98 (3H, s, H-25);

[0056] ^{13}C -NMR (pyridine- d_5 , 150MHz): δ_C 179.7 (C-28), 154.2 (C-20), 139.4 (C-13), 126.4 (C-12), 105.5 (C-30), 73.8 (C-3), 68.3 (C-23), 56.1 (C-18), 49.0 (C-5), 48.5 (C-9), 48.7 (C-17), 43.3 (C-4), 43.0 (C-14), 40.4 (C-8, C-22), 39.3 (C-1), 38.1 (C-19), 37.6 (C-10), 33.6 (C-7), 33.2 (C-21), 29.1 (C-15), 28.1 (C-

2), 25.3 (C-16), 24.1 (C-11, C-27), 19.0 (C-6), 17.9 (C-26), 17.0 (C-29), 16.5 (C-25), 13.6 (C-24);

[0057] 실시예 2-2. 로툰딕산 (화합물 2)

[0058] rotundic acid;

[0059] white amorphous powder;

[0060] $[\alpha]_D^{20}$: +34.1 ($c = 0.05$, MeOH);

[0061] FAB-MS m/z : 489 $[M + H]^+$;

[0062] $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5 , 600 MHz): δ_{H} 5.62 (1H, br t, $J = 3.1$ Hz, H-12), 4.21 (1H, dd, $J = 4.6, 11.3$ Hz, H-3), 4.18 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-24b), 3.72 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-24a), 3.06 (1H, s, H-18), 1.69 (3H, s, H-27), 1.45 (3H, s, H-29), 1.13 (3H, s, H-25), 1.12 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-30), 1.06 (3H, s, H-23), 0.99 (3H, s, H-26);

[0063] 실시예 2-3. 2a,3a,23-트리하이드록시우르사-12,20(30)-디엔-28-오익산 (화합물 3)

[0064] 2a,3a,23-trihydroxyursa-12,20(30)-dien-28-oic acid ;

[0065] white amorphous powder;

[0066] $[\alpha]_D^{20}$: +62.4 ($c = 0.05$, MeOH);

[0067] FAB-MS m/z : 487 $[M + H]^+$;

[0068] $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5 , 600 MHz): δ_{H} 5.46 (1H, br s, H-12), 4.80 (1H, s, H-30a), 4.75 (1H, s, H-30b), 4.28 (1H, br d, $J = 10.5$ Hz, H-2), 4.16 (1H, s, H-3), 3.93 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-23a), 3.77 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-23b), 2.74 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-18), 1.12 (3H, s, H-27), 1.08 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-29), 1.04 (3H, s, H-26), 1.00 (3H, s, H-25), 0.87 (3H, s, H-24);

[0069] 실시예 2-4. 23-하이드록시우르솔릭산 (화합물 4)

[0070] 23-hydroxyursolic acid;

[0071] white amorphous powder;

[0072] $[\alpha]_D^{20}$: +60.0 ($c = 0.30$, MeOH);

[0073] FAB-MS m/z : 495 $[M + \text{Na}]^+$;

[0074] $^1\text{H-NMR}$ (pyridine- d_5 , 600 MHz): δ_{H} 5.52 (1H, br s, H-12), 4.23 (1H, dd, $J = 5.1, 11.2$ Hz, H-3), 4.20 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-23a), 3.74 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-23b), 2.65 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-18), 1.20 (3H, s, H-27), 1.10 (3H, s, H-24), 1.08 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-29), 0.99 (3H, s, H-25), 0.95 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-30);

[0075] 실시예 2-5. 악티니딕산 (화합물 5)

[0076] actinidic acid;

[0077] white amorphous powder;

[0078] $[\alpha]_D^{20}$: +75.5 ($c = 0.1$, MeOH);

[0079] FAB-MS m/z : 487 $[M + H]^+$;

[0080] $^1\text{H-NMR}$ (methanol- d_4 , 250 MHz): δ_{H} 5.23 (1H, br s, H-12), 4.64 (1H, s, H-30a), 4.59 (1H, s, H-30b), 3.67

(1H, m, H-2), 3.45 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-23a), 3.32 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3), 3.23 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-23b), 2.22 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-18), 1.15 (3H, s, H-27), 1.01 (3H, s, H-25), 0.97 (3H, d, $J = 6.1$ Hz, H-29), 0.81 (3H, s, H-26), 0.66 (3H, s, H-24);

[0081] 하기 표 1은 화합물 1~5의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 결과를 나타낸다.

표 1

[0082]

position	화합물 1	화합물 2	화합물 3	화합물 4	화합물 5
1	39.3	39.2	43.0	39.3	40.7
2	28.1	28.0	66.6	28.1	69.7
3	73.8	73.9	79.3	73.8	78.1
4	43.3	43.2	42.3	43.3	44.1
5	49.0	49.0	43.9	49.0	48.8
6	19.0	18.1	18.7	19.0	19.1
7	33.6	33.6	33.5	33.7	33.3
8	40.4	40.7	40.5	40.4	40.4
9	48.5	48.2	48.4	48.5	49.2
10	37.6	37.6	38.8	37.5	48.2
11	24.1	24.4	24.1	24.1	24.5
12	126.4	128.4	126.2	126.0	127.0
13	139.4	140.3	139.4	139.7	139.6
14	43.0	42.5	43.2	42.9	43.5
15	29.1	29.7	29.0	29.1	29.2
16	25.3	26.8	25.3	25.3	25.3
17	48.7	48.7	48.7	48.5	49.4
18	56.1	55.0	56.0	54.0	56.6
19	38.1	73.0	38.1	39.9	39.0
20	154.2	42.7	154.2	39.8	154.5
21	33.2	27.3	33.1	31.5	33.6
22	40.4	38.9	40.1	37.9	38.5
23	68.3	68.3	71.6	68.3	66.3
24	13.6	13.4	18.2	13.5	13.9
25	16.5	17.6	17.9	16.5	17.7
26	17.9	17.1	17.5	17.9	17.8
27	24.1	25.0	24.1	24.3	24.1
28	179.7	181.1	179.8	180.4	181.0
29	17.0	27.5	16.9	17.9	16.8
30	105.5	16.3	105.4	21.8	105.3
화합물 1 ~ 4 : Measured at 150 MHz & in pyridine-d ₅					
화합물 5 : Measured at 63 MHz & in methanol-d ₄					

[0083] <실시예 3. 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B의 활성 측정>

[0084] 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B에 의해 기질인 p-nitrophenyl phosphate(p-NPP)가 p-nitrophenol(p-NP)로 변화되면 노란색을 나타내므로 405nm에서 흡광도의 변화를 측정함으로써 효소활성을 측정하였다(Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006, 16, 1426~1429).

[0085] 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B(PTP1B, human, recombinant)는 BIOMOL International LP(Plymouth Meeting, PA)에서 구입하였다. 96웰 플레이트(96 wells in a microtiter plate)에 2mM p-NPP와 0.05~0.1 μg 의 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B를 넣었으며 각 실험군에는 화합물 1~5를 함께 처리하였다. 이 때 96웰 플레이트 안의 p-NPP, 단백질 타이로신 탈인산화효소 1B 및 화합물 1~5가 처리된 버퍼의 조성은 50mM citrate(pH 6.0), 0.1M NaCl, 1mM EDTA 및 1mM dithiothreitol(DTT)로 구성되어 있으며, 최종 부피는 100 μl 가 되게 하였다. 이 후, 상기 혼합 처리물을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에 30분간 둔 후, 10M 수산화나트륨(10MNaOH) 50 μl 를 처리하여 반응을 중단시켰으며, 최종 남아있는 p-NPP의 양을 405nm에서 확인하였다. 각 화합물의 활성은 IC₅₀(the half maximal inhibitory concentration)으로 나타내었다. 대조군으로는 타이로신 탈인산화효소의 억제제 중 하나인 RK-682(3-

hexadecanoyl-5-hydroxymethyl-tetronic acid)를 사용하였다.

표 2

화합물	IC ₅₀ (μ M)
화합물 1	6.3 ± 0.6
화합물 2	20.1 ± 1.4
화합물 3	17.4 ± 1.0
화합물 4	7.4 ± 0.6
화합물 5	18.0 ± 0.9
RK-682	4.0 ± 0.3

상기 표 2의 결과를 참고하면, 본 발명의 트리테르페노이드계 화합물들이 RK-682와 유사하게 타이로신 탈인산화 효소에 대한 현저한 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

<실시예 4. 독성실험>

실시예 4-1. 급성독성

본 발명의 화합물을 단기간에 과량을 섭취하였을 때의 급성적(24시간 이내)으로 동물 체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스를 20마리를 준비하였고, 각 군별로 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 30% PEG-400만을 투여하고, 실험군은 대표적으로 본 발명의 로도텐트릭산 A(화합물 1)를 1.0g/kg의 농도로 각각 경구 투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 상기 화합물 1을 투여한 실험군에서는 모두 생존하였다.

실시예 4-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험

장기 독성 실험은 C57BL/6J 생쥐를 대상으로 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 발명의 로도텐트릭산 A(화합물 1)를 1.0g/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 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 특이한 이상이 관찰되지 않았다.

<사용예 1 : 약학적 제제예>

1-1. 정제의 제조

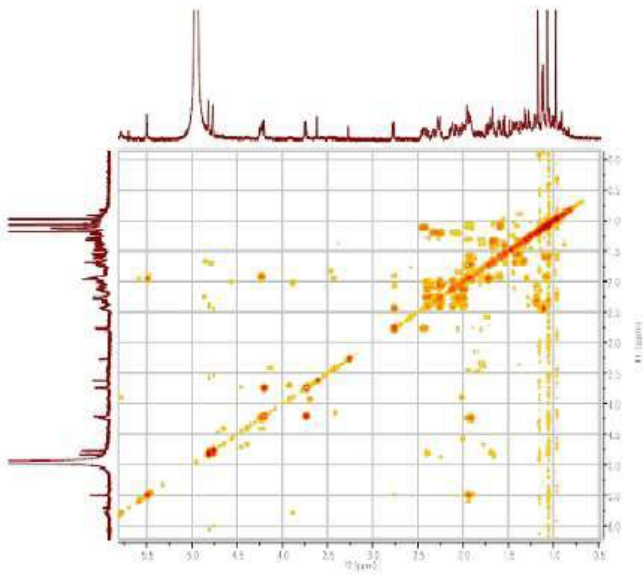
본 발명의 로도텐트릭산 A(화합물 1) 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

1-2. 주사액제의 제조

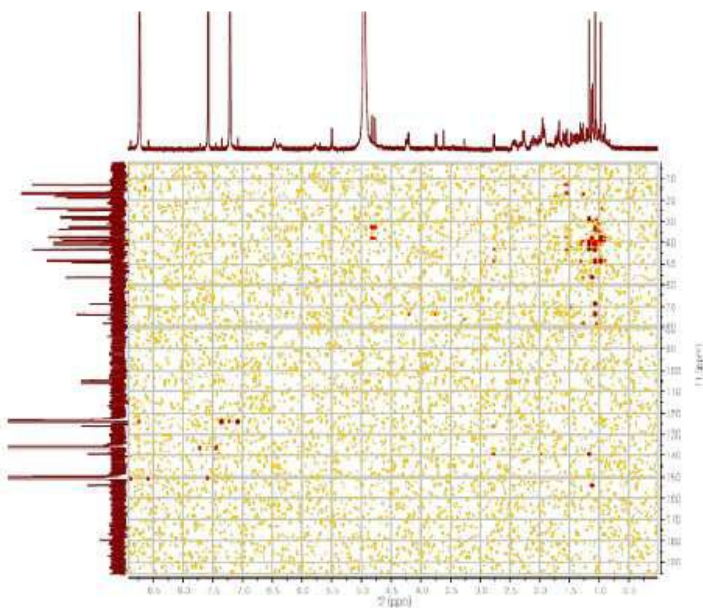
본 발명의 로도텐트릭산 A(화합물 1) 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

도면

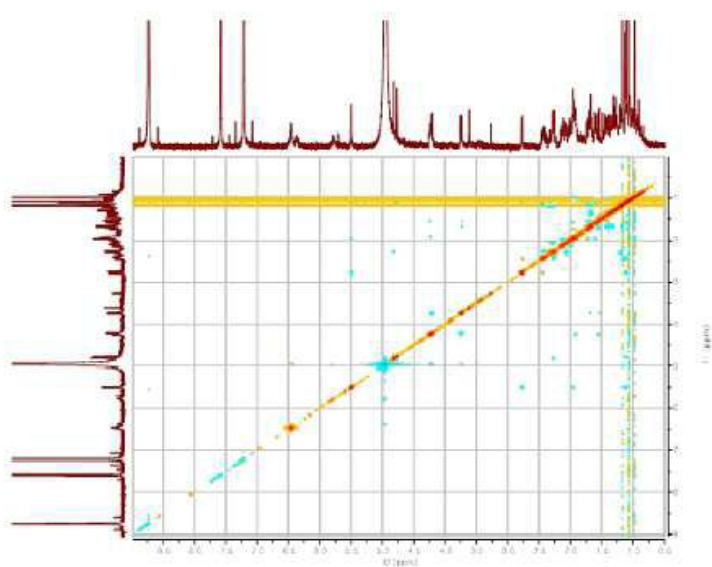
도면1



도면2



도면3



도면4

