

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2009년 12월 10일 (10.12.2009)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2009/148288 A2

- (51) 국제특허분류:
C07C 13/39 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/003024
- (22) 국제출원일: 2009년 6월 5일 (05.06.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0053194 2008년 6월 5일 (05.06.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 부산시 금정구 장전동 산 30, 609-735 Pusan (KR). 동아대학교 산학협력단 (DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) [KR/KR]; 부산시 사하구 하단 2동 840번지, 604-714 Pusan (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 최영환 (CHOI, Young Whan) [KR/KR]; 부산시 북구 화명동 롯데낙천대아파트 114동 1704호, 616-120 Pusan (KR). 윤식

(YOON, Sik) [KR/KR]; 부산시 금정구 구서동 롯데캐슬골드 804동 903호, 609-310 Pusan (KR). 배외식 (BAE, Yoe Sik) [KR/KR]; 부산시 사상구 학장동 571번지 3호 신구덕우성아파트 102동 2202호, 617-789 Pusan (KR). 심재웅 (SHIM, Jae Woong) [KR/KR]; 부산시 부산진구 범천 4동 탑패밀리 806호, 614-024 Pusan (KR). 이유진 (LEE, You Jin) [KR/KR]; 대전시 동구 가오동 가오아파트 114동 301호, 300-050 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 서울시 구로구 구로동 188-5 키콕스벤처센터 209호, 152-050 Seoul (KR).

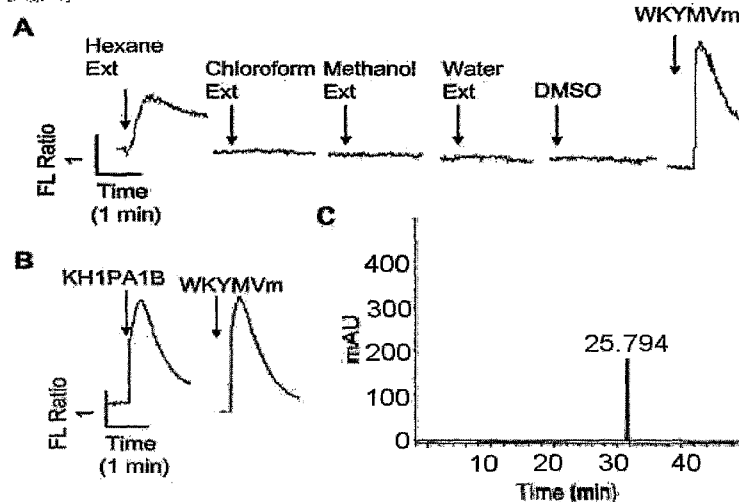
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING AND TREATING IMMUNE DISEASES CONTAINING NOVEL A-ISO-CUBEENE COMPOUND EXTRACTED FROM SCHISANDRA CHINENSIS AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 오미자로부터 추출한 신규한 α -ISO-CUBEENE 화합물을 유효성분으로 하는 면역 질환의 예방 및 치료용 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a novel α -iso-cubeene compound which is extracted from Schisandra chinensis. More specifically, the α -iso-cubeene compound strongly stimulated the generation of CXCL8 in human neutrophils. In addition, α -iso-cubeene-induced CXCL8 generation is almost completely suppressed by EGTA, a calcium chelator. As the result, the extracted novel compound can be used as an active ingredient of a composition for preventing and treating immune diseases through calcium signaling activity in the process.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ,

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 오미자로부터 추출한 신규한 α -iso-cubebene 화합물에 관한 것이다. 구체적으로, α -iso-cubebene 화합물은 인간 호중구내에서 CXCL8 생성을 강하게 자극하였으며, 또한 α -iso-cubebene-유도 CXCL8 생성은 칼슘 킬레이터, EGTA에 의해 거의 완전히 억제되며, 그 결과 상기 공정내 칼슘 시그널링의 역할을 수행함으로써, 추출된 신규한 화합물은 면역 질환에 대한 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로서 사용될 수 있다.

명세서

오미자로부터 추출한 신규한 α -ISO-CUBEENE 화합물을 유효성분으로 하는 면역 질환의 예방 및 치료용 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 오미자로부터 추출한 신규한 α -iso-cubebene 화합물을 유효성분으로 하는 면역 질환에 대한 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 인간 호중구내 세포내 칼슘 증가 및 CXCL8 생성을 증가시킴으로써 면역 질환에 대한 예방 및 치료에 대한 효과가 우수한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 오미자는 한국, 중국 및 일본 등지에서 지난 수 천년 동안 전통적인 약용식물로서 이용되어왔다. 한의학에서 오미자의 효과는 폐와 신장의 채널 및 위에 관여하고, 기침과 천식으로 숨을 헐떡이는 신장과 폐의 결합에 사용되며, 설사를 멈추게 하며, 식은 땀이 나는 것을 멈추게 하며, 건망증과 불면증에 사용하고, 정신을 온화하게 하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 오미자 추출물의 약리학 또는 화학적인 측면에서 많은 연구가 수행되었다. 그 결과 오미자로부터 추출한 디벤조시클로옥타디엔계 리그난(lignan)은 항간염(anti hepatitis)작용, 간의 재생 촉진 및 간의 암발생과 지질산화(lipid peroxidation)를 억제하는 것으로 알려져 있다. 오미자의 이러한 생리활성효과의 검토는 조추출로서도 가능할 것이나, 최종적으로는 순수물질을 분리하여 그 가치를 증대시킬 수 있어야 한다. 또한 이러한 효과가 검증되었을 때에 그 물질을 기준으로 하여서 품질을 평가할 수 있는 기준의 설정에 의한 표준화와 규격화는 무엇보다도 시급한 일이라고 할 수 있다.

[3]

- [4] 특히, 오미자로부터 추출한 디벤조시클로옥타디엔계 리그난 및 추출물은 약용가치가 높고, 식용 가능한 식물이므로 제품개발을 위한 좋은 재료임에도 불구하고 대부분 중국으로부터 수입하고 있는데 수입상품은 품질이 낮다. 오미자에 관한 연구는 아주 많이 수행되어서 현재 약 30여종의 리그난 물질의 밝혀져 있는데, 우리나라에는 6종의 리그난계를 추출하여 NFAT(nuclear factor of activated T-cell) 전사 효과를 검증한 정도이다. 천연 자원으로부터 생리학적 반응을 조절하는 성분의 확인은 의약학적 접근에서 볼 때 중요한 문제이며, 이에 오미자의 세포질 타겟 분자 및 작용 기전의 확인은 잠재적 의약 타겟의 생성에 있어 매우 중요할 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

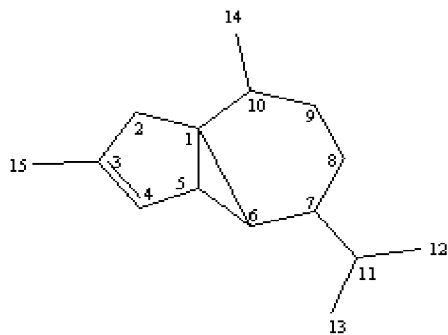
- [5] 이에 본 발명자들은 오미자로부터 일련의 추출물 분획을 인간 호중구내 세포내 칼슘($[Ca^{2+}]_i$) 시그널링을 자극할 수 있는 분자를 확인하는 관점에서

스크린하였고 구조를 동정해내었으며, 이들 화합물의 면역학적 특성을 입증하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

기술적 해결방법

- [6] 본 발명의 일 특징은 오미자(*Schisandra chinensis*)로부터 추출한 하기 화학식 1을 갖고, Chemical Formula $C_{15}H_{24}$, 분자량 204.35인 신규한 α -iso-cubebene 화합물을 유효성분으로 포함하는 면역 질환에 대한 예방 및 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

- [7] 화학식 1



- [8] 본 발명에서는 상기 면역 질환의 예방 및 치료가 감염 면역 치료 또는 면역 증강인 것을 일 특징으로 한다.

[9]

- [10] 본 발명의 일 특징은 상술한 예방 및 치료용 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하여 호중구세포에서의 세포 내 칼슘이온 유리를 증가시킴으로써 면역을 증강시키는 방법을 제공하는데 있다.

[11]

- [12] 본 발명의 일 특징은 상술한 예방 및 치료용 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하여 호중구세포에서의 IL-8의 생성을 증가시킴으로써 면역을 증강시키는 방법을 제공하는데 있다.

[13]

- [14] 본 발명의 일 특징은 상술한 예방 및 치료용 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하여 호중구 세포의 활성을 매개로 하여 면역을 조절하는 방법을 제공하는데 있다.

[15]

- [16] 본 발명의 일 특징은 오미자 분쇄물을 헥산을 이용하여 헥산 추출물을 얻는 단계; 상기 헥산 추출물을 실리카겔을 충전한 컬럼 표면에 첨가하고, 상기 컬럼에 헥산, 헥산-에틸아세트 및 클로로포름-메탄을 혼합용액을 순차적으로 첨가하여 다수개의 분획들을 얻는 단계; 상기 분획들중 첫번째 분획을 실리카겔을 충전한 컬럼에 첨가하여 CH_2Cl_2 용액을 흘려 보내면서 후속 분획을 얻는 단계; 및 얻어진 후속 분획을 실리카겔이 충전된 컬럼에 첨가하여 헥산용액을 흘려보내면서 순수분리하여 화학식 1의 Chemical Formula $C_{15}H_{24}$ 이고,

분자량 204.35인 α -iso-cubebene 화합물을 동정하는 단계; 를 포함하여 이루어지는 오미자로부터 α -iso-cubebene 화합물을 추출하는 방법을 제공하는데 있다.

[17]

[18] 이하, 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.

[19] 우선, 오미자로부터 α -iso-cubebene 화합물을 추출한다. 이때 추출은 이에 한정하는 것은 아니나, 오미자 분쇄물 2 kg을 헥산을 이용하여 헥산 추출물 308 g을 얻고, 상기 헥산 추출물 120g을 1 kg의 실리카겔을 충전한 컬럼 표면에 첨가하고, 상기 컬럼에 헥산, 헥산-에틸아세트 및 클로로포름-메탄을 혼합용액 15L, 16L, 58L 및 19L를 각각 순차적으로 첨가하여 38개의 분획을 얻고, 그중 1번 분획 3.7g을 10⁵ x 3 cm의 실리카겔을 충전한 컬럼에 첨가하여 CH₂Cl₂ 용액 2L를 흘려 보내면서 999 mg의 분획을 얻었다. 999 mg의 분획을 실리카겔이 충전된 컬럼에 첨가하여 헥산용액 1L를 흘려 보내면서 순수물질 316 mg을 얻었다. 그리고 순수분리한 물질의 구조를 밝히기 위하여 1D와 2D NMR 스펙트럼을 이용하여 Chemical Formula C₁₅H₂₄이고, 분자량 204.35인 화학식 1의 구조를 동정하는 공정을 순차적으로 수행하면 충분하다.

[20]

[21] 도 2A에 도시한 화학식 1의 α -iso-cubebene 화합물은 하기 실시예에서 규명된 바와 같이, 면역 질환에 대하여 예방 및 치료 효과를 갖는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로는, 화학식 1을 갖는 α -iso-cubebene 화합물은 인간 호중구내에서 CXCL8 생성을 강하게 자극하였다. 또한, α -iso-cubebene-유도 CXCL8 생성은 칼슘 킬레이터, EGTA에 의해 거의 완전히 억제되며, 그 결과 상기 공정내 칼슘 시그널링의 역할을 수행하였다. 이같은 결과로부터 보건의 α -iso-cubebene은 세포내 칼슘 시그널링과 CXCL8 생성을 자극하는 신규한 천연 화합물에 해당하는 것이다.

[22]

[23] 본 명세서에 게시된 화합물은 국소 혹은 비경구 투여, 구체적으로는 용액 혹은 액상 서스펜션의 형태; 경구 투여용, 구체적으로는 정제 혹은 캡슐의 형태; 혹은 비강내 투여용, 구체적으로는 파우더, 젤, 오일상 용액, 비강 점적, 에어로졸 혹은 미스트의 형태; 로 배합될 수 있다. 비경구 투여용 배합물은 통상적인 부형제, 멸균수 혹은 멸균 염수, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 글리콜, 식물성 오일, 수소화 나프탈렌 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 화합물의 제어된 방출은 생양립성, 생분해성 락타이드 중합체 및 락타이드/글리코라이드 또는 폴리옥시에틸렌/폴리옥시프로필렌의 공중합체의 일부 사용으로 얻어질 수 있다.

[24]

부가적인 장관 전달 시스템으로는 에틸렌-비닐 아세테이트, 아세테이트 공중합체 미립자, 삼투압 펌프, 피하삽입 시스템 및 리포솜 등을 포함한다. 흡입 투여용 배합물은 락토오스, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴에테르, 글리코콜레이트

혹은 테옥시콜레이트를 포함한다. 경구 투여용 배합물은 글리코콜레이트를 포함하고; 질 투여용 배합물은 시트르산을 포함할 수 있다.

[25]

[26] 제약학적으로 수용가능한 조성물내 화합물의 농도는 투여하려는 화합물의 투여량, 사용되는 화합물의 약물동력 특성 및 투여 경로에 따라 좌우될 수 있지만 일반적으로는, 본 발명의 화합물은 장광 투여용 화합물 1-10% w/v를 포함하는 수성 생리학적 완충액내 제공될 수 있다. 전형적인 투여범위는 일단 체중 1-100 mg/kg, 바람직하게는 2-10 mg/kg으로 1-4회 분획으로 투여될 수 있다. 각 분획 투여는 본 발명의 동일 혹은 다른 화합물을 포함할 수 있다. 상기 투여량은 환자의 전체 건강 및 배합물 및 선택된 화합물의 투여 경로를 포함하여 다수의 인자에 따라 유효량이 차이날 수 있다.

[27]

[28] 또한, 본 발명의 신규 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 캐리어와 함께 배합될 수 있으며, 또한 기존 알려진 치료 약제들과 혼합하여 사용될 수도 있다.

유리한 효과

[29] 본 발명의 오미자로부터 분리된 α -iso-cubebene 화합물은 고활성 천연물질을 순수분리하였을 뿐 아니라 면역 질환에 탁월한 효과를 갖음을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[30] 도 1은 오미자 추출물이 인간 호중구내 Ca^{2+} 증가에 미치는 영향을 본 도면으로서, (A)는 인간 호중구를 다수개의 오미자 추출물 (1 mg/ml)로 처리한 도면이며, (B)는 200 μ g/ml의 KH1PA1B 혹은 100 nM의 WKYVMm로 처리한 호중구를 도시한 도면으로서, 상대적인 세포내 Ca^{2+} 농도를 형광 비(340:380 nm)로 나타낸 도면이며, (C)는 α -iso-cubebene의 HPLC 프로파일을 도시한 도면이다.

[31]

[32] 도 2는 인간 호중구를 자극하는 신규 분자로서 α -iso-cubebene의 구조를 동정한 도면으로서, (A)는 α -iso-cubebene의 구조를 도시하며, (B)는 α -iso-cubebene의 핵심 HMBC 상관관계를 도시한 도면이며, (C)는 정제된 α -iso-cubebene의 다수 농도로 처리된 호중구를 도시한 그래프로서 $[Ca^{2+}]_i$ 의 피크 레벨을 기록하고 결과를 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

[33]

[34] 도 3은 다수의 억제제가 α -iso-cubebene-유도 칼슘 증가에 있어 칼슘 채널 및 칼슘 시그널링에 대하여 미치는 효과를 살펴본 도면으로서, 인간 호중구는 SK&F (10 μ M), 니페디핀 (1 μ M), 딜티아젬 (10 μ M) 혹은 thapsigargin (10 μ M)의 존재 혹은 부재하에 미리 배양시킨 다음 α -iso-cubebene (200 μ g/ml)로 자극하였다. 상대 $[Ca^{2+}]_i$ 는 형광 비(340:380 nm)로 표시하였다.

[35]

- [36] 도 4는 인간 호중구로부터 α -iso-cubebene에 의한 CXCL8의 생성을 살펴본 그래프로서, (A)는 새로 분리된 인간 호중구를 일련의 기간동안 200 μ g/ml의 α -iso-cubebene로 자극한 결과를 도시한 도면이며, (B)는 200 μ g/ml의 α -iso-cubebene-자극 호중구에 의한 CXCL8의 분비를 EGTA (2 mM)의 존재 혹은 부재하에 측정한 도면이다. 상기 분비된 사이토카인 레벨은 ELISA에 의해 측정하였다(A 및 B).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 재료

- [38] 오미자로부터 생리활성물질을 추출하기 위하여 사용된 재료는 2007년 1월에 문경의 동로농협에서 열풍건조한 과실을 구입하였다.

- [39]

- [40] 실시예 1: 오미자로부터 물질추출

- [41] 문경에서 수집한 건조 오미자과실을 분쇄기로 완전히 분쇄하였다. 분쇄한 과실 2 kg을 5ℓ의 삼각플라스크에 넣고 3ℓ의 헥산으로 채우고, 2시간 동안 초음파 처리한 다음 상등액을 Whatman no. 2 여과지로 여과하였다. 헥산 추출물은 위의 방법으로 3회 반복추출하여 헥산층 308 g을 얻었다. 헥산으로 추출하고 남은 찌꺼기에 3ℓ의 CHCl_3 로 3회 반복추출하여 클로로포름층 14 g을 얻었다. 크로로포름으로 추출한 다음 남은 찌꺼기에 3ℓ의 MeOH로 3회 추출하여 1,368 g의 MeOH층을 얻었다. 추출한 물질을 각각 KH, KC 및 KM으로 분류하였으며 호중구 세포에서 세포 내 칼슘이온의 유리를 증가시킬 수 있는 활성을 측정하여 생리활성 검증 후 활성이 높았던 헥산 추출물로부터 물질을 순수분리하였다.

- [42]

- [43] 실시예 2: 헥산으로부터 물질의 순수분리

- [44] 활성이 높았던 헥산 추출물로부터 물질을 순수분리하였다. 100 × 10 cm의 컬럼에 헥산에 녹인 실리카겔 1 kg을 충전하였다. 충전한 컬럼 상층에 헥산추출물 (KH) 120g을 넣은 다음 100% 헥산, 헥산:EtOAc 및 CHCl_3 :MeOH의 용매를 순차적으로 사용하여 38개의 분획을 얻었다.

- [45] 38개의 분획을 선별하여 생리활성 검증팀에게 일정량의 물질을 보내서 활성검증을 하였으며, 활성이 높은 분획으로부터 순차적으로 물질을 순수분리하였다.

- [46]

- [47] 실시예 3: 활성분획검증에 의한 생리활성 신물질의 순수분리 및 구조 동정

- [48] 순수분리한 물질의 구조를 밝히기 위하여 1D와 2D NMR 스펙트럼을 이용하여 그 구조를 동정한 결과는 표 1과 화학식 1(도 2A)에서 보는 바와 같이 확정하였다. 참고로, 표 1은 신규 화합물의 2차원 NMR 상관관계를 정리한 결과이다. 본 연구의 활성분획검증에 의해서 순수분리하여 밝힌 구조는 신물질로 판명되었다.

[49] 표 1

Carbon No.	δ_c		δ_H	HMBC
1	39.4	C		
2	30.9	CH ₂	2.21, dd, J=5.0/2.5	142.5, 117.1, 48.3, 43.2, 39.4,
3	142.5	C		
4	117.1	CH	5.28, m	43.2, 30.9, 23.3
5	43.2	CH	2.03, d, J=6.0	142.5, 117.1, 48.3, 44.7, 39.4
6	44.7	CH	1.67, m	117.1, 48.3, 43.2, 39.4, 32.5, 30.9, 22.2
7	45.5	CH	1.52, m	45.5, 43.2, 39.4, 36.7, 32.5, 22.2
8	22.2	CH ₂	0.90, m	45.5, 32.5
9	36.7	CH ₂	1.74, t	48.3, 45.5, 39.4, 22.2, 19.1
10	48.3	CH	1.62, m	48.3, 43.2, 39.4, 36.7, 22.2
11	32.5	CH	1.52, m	45.5, 44.7, 22.2
12	19.9	CH ₃	0.891, m	45.5, 32.5, 19.3
13	19.3	CH ₃	0.890, m	45.5, 32.5, 19.9
14	19.1	CH ₃	0.79, s	48.3, 39.4, 36.7
15	23.3	CH ₃	1.68, m	142.5, 117.1, 30.9

[50] 상기 표 1에서 보듯이, GC-MS의 분자이온 시그널은 204였으며, 분자식은 ^{1}H , ^{13}C 및 Dept NMR의 데이터로부터 $C_{15}H_{24}$ 로 확정하였다. 분리한 물질은 ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) 스펙트럼으로부터 4개의 primary 카본 (δ_c 19.1, 19.3, 19.9, 23.3), 3개의 secondary 카본 (δ_c 22.2, 30.9, 36.7), 6개의 tertiary 카본 (δ_c 32.5, 43.2, 44.7, 45.5, 48.3, 117.1) 및 2개의 quaternary 카본 (δ_c 39.4, 142.5)이 있었다.

[51] 이러한 데이터로부터 하나의 2중 결합이 있다는 것을 알 수 있었다. 분자식 $C_{15}H_{24}$ 의 구성원소들을 볼 때 3개의 트리사이클링 링(tricyclic ring)과 4개의 불포화 결합 및 1개의 이중 결합이 있음을 알 수 있다.

[52] 본 물질의 1H NMR로부터 1개의 메틸 singlet (δ_H 0.79, 14-H), 2개의 메틸 doublet (δ_H 0.890-0.891, 12-H and 13H)와 다운 필드로 이동한 1개의 메틸 multiplet (δ_H 1.68, H-15)이 있다. 또한 1개의 올레핀 프로톤 (δ_H 5.28, H-3)이 관찰되었다. 두 개의 시클로프로판 프로톤이 δ_H 1.67 (H-6)과 δ_H 2.03 (H-5)에 관측되었다. 2개의 비정상적인 메틸렌기가 δ_H 0.90 (H-8)과 δ_H 1.74 (H-9)에 나타났다. 이 두개의 하이 필드 프로톤은 시클로프로판 고리 시스템의 이방성 영역에 있음을 증명한다. 이 두 개의 메틸렌 프로톤은 서로 인접해 있다는 것을 gCOSY 데이터로서 확인할 수 있었다.

[53] 본 물질의 이러한 구조 결정은 HMBC로서 확정하였는데, 그 결과를 도 2B에 정리하였다.

[54] 도 2B에서 보듯이, C-11은 H-12와 H-13에 커플링되어 있었고, C-7은 H-12, H-13, H-5, H-8 및 H-9에 커플링되어 있다. H-9는 메틴 프로톤 H-10와 메틸 더블릿인 H-14에 연결되어 있다. 쿼터너리 카본인 C-1은 H-2, H-3, H-6, H-9, H-10과 H-14에 연결되어 있으며, 이러한 구조는 전형적인 cubebene sesquiterpene 골격에 해당한다.

- [55] 결과적으로, 1D 또는 2D NMR을 종합하면 본 실험에서 순수분리하여 추출한 물질의 구조는 도 2A에 도시한 화학식 1과 같으며, Chemical Formula: $C_{15}H_{24}$ 이고, 분자량: 204.35이었다. 상기 정제된 화합물, α -iso-cubebene은 농도-의존 방식으로 세포내 칼슘 증가를 자극하였으며, 최대 활성은 대략 $200 \mu g/ml$ 이었다(도 2C 참조).

발명의 실시를 위한 형태

[56] 실시예 4: 면역 예방 및 치료 효과

- [57] 면역 세포의 활성화에는 일반적으로 세포 내 다양한 신호전달 분자들의 활성화가 수반된다. 그중에서 특히 세포 내 칼슘이온의 증가는 면역 세포의 활성화와 밀접한 관계가 있다. 본 실험에서 오미자를 다양한 용매로 추출한 추출물을 호중구에 처리하여 세포내 칼슘이온의 변화를 측정하였다. 그 결과, 오미자 핵산 추출물에 의해 호중구 내 칼슘이온의 증가가 유도되었다.

[58]

[59] 실시예 4-1: 인간 호중구의 분리

- [60] 말초혈액 백혈구를 젊고 건강한 증여자로부터 수득하였다. 인간 호중구는 표준 텍스트란 침강, 적혈구의 저장성 용해, 및 림프구 분리 매질 구매를 사용하여 분리하였다. 분리된 인간 호중구는 신속하게 사용하였다.

[61]

[62] $[Ca^{2+}]_i$ 의 측정

- [63] 화학적으로 유도된 $[Ca^{2+}]_i$ 증가량은 fura-2/AM을 사용하여 측정하였다. 새로 준비된 인간 호중구를 연속 교반하면서 $37^\circ C$ 에서 30분간 $3 \mu M$ 의 fura-2/AM를 갖는 혈청 프리 RPMI 1640 배지내에서 배양하였다.

[64]

- [65] 혈청 프리 RPMI 1640 배지를 수세한 다음, 세포를 염료 누수를 방지하기 위하여 $250 \mu M$ 의 술핀피라존 함유 혈청 프리 RPMI내에 부유시켰다. 약 2×10^6 세포를 각 측정에 대하여 Locke'용액 ($158.4 mM NaCl$, $5.6 mM KCl$, $1.2 mM MgCl_2$, $5 mM Hepes$ pH 7.3, $10 mM$ 글루코오스, $0.2 mM CaCl_2$, 및 EGTA)내에 부유시켰다. 형광비내 변화는 이중 여기 파장 $340nm$ 및 $380nm$ 에 대하여 $500nm$ 의 방출 파장에서 측정하였다. 형광비 : $[Ca^{2+}]_i$ 의 계산은 Grynkiewicz 등에 의해 기술된 바에 따라 수행되었다 [Y.S. Bae, H.J. Yi, H.Y. Lee, E.J. Jo, J.I. Kim, T.G. Lee, R.D. Ye, J.Y. Kwak, S.H. Ryu, Differential activation of formyl peptide receptor-like 1 by peptide ligands, J.Immunol. 171 (2003) 6807-6813 참조].

[66]

[67] <활성 화합물의 구조 측정>

- [68] α -iso-cubebene의 화학 구조는 LC-MS (Bruker BioApex FT 질량 스펙트로미터) 및 NMR 분석 (Varian Inova 500 스펙트로미터)에 의해 검정하였다. 광학 로테이션은 JAS-CO DIP-370 디지털 편광계상에서 기록하였다. IR 스펙트럼은

AATI Mattson Genesis Series FTIR 상에서 기록하였다. NMR 스펙트럼(^1H , ^{13}C)은 프로톤에 대하여 500 MHz 그리고 C-13에 대하여 125MHz에서 Varian Inova 스펙트로미터상에서 내부 규준으로서 구배를 작동하고 잔류 용매 피크를 사용하여 CDCl_3 내에서 기록하였다. 고해상도 질량 스펙트럼은 Bruker BioApex FT 질량 스펙트로미터상에서 기록하였다.

[69]

[70] <싸이토카인 검정>

[71] 싸이토카인 측정은 문헌[H.Y.Lee, S.D. Kim, J.W. Shim, S.Y. Lee, H. Lee, K.H. Cho, J. Yun, Y.S. Bae, Serumamyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes, J. Immunol. 181 (2008) 4332-4339.]내에서 기술한 바와 같이 수행하였다. 즉, 호중구 (3×10^6 세포/ 0.3 ml)를 24웰 플레이트내 5% FBS를 함유하는 RPMI 1640내에 재치하고 5% CO_2 가습기하에 37°C 로 유지시켰다. 자극후, 세포-프리 상청액을 수집하고, 원심분리하고 제조업체의 지시에 따라 효소-결합된 면역흡광 검정 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)에 의해 CXCL8을 측정하였다. 얻어진 결과들은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었으며, $P > 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것이다.

[72]

[73] 실시예 4-1: 인간 호중구내 세포내 칼슘 증가를 강하게 자극하는 화합물의 확인

[74] 본 발명자들은 인간 호중구내 세포내 칼슘 시그널링을 자극할 수 있는 분자를 발견할 의도로 오미자로부터의 다수 추출물(헥산, 클로로포름, 메탄올 및 물 추출물)의 영향을 측정하였다. 도 1A에서 보듯이, 헥산 추출물 (1 mg/ml)이 인간 호중구내에서 세포내 칼슘내 증가를 자극한데 반하여 다른 추출물은 그렇지 않았다.

[75] 나아가, 본 발명자들은 활성 헥산 추출물을 38개의 다른 분획으로 분리하고, 칼슘 시그널링 관점에서 효과를 측정하였다. 이들중, 헥산 추출물의 제1 분획 (KH1PA1B)만이 세포내 칼슘 증가를 자극하는 능력 관점에서 잠재성이 있었다 (도 1B 참조(데이터는 미도시함)). 본 발명자들은 또한 활성 분획은 HPLC 분석에 대하여 거의 순수 ($>99\%$)한 화합물을 포함하고 있음을 확인하였다(도 1C 참조).

[76]

[77] 실시예 4-2: α -iso-cubebene-자극 칼슘 증가는 thapsigargin-민감 경로를 매개로 한다.

[78] α -iso-cubebene가 인간 호중구내 세포내 칼슘 증가를 자극하기 때문에, 본 발명자들은 화합물중 어떤 공급원이 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 를 증가시키는지 조사하였다.

[79] 일반적으로, 세포내 칼슘내 증가는 2가지 다른 공급원으로부터 유도되게 된다; 소포체로부터의 칼슘 방출 및 세포외 매질로부터의 칼슘 유입 [M.J. Berridge, Inositol trisphosphate and calcium signaling, Nature 361 (1993)315-325.참조].

[80] 도 3에서 보듯이, $200 \mu\text{g/ml}$ 의 α -iso-cubebene은 세포외 칼슘내 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 상승을 유발하였다. α -iso-cubebene은 세포외 칼슘 부재시에는 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 상승을

자극하는 데는 실패하였으므로(테이터 미도시), 이는 상기 화합물이 인간 호중구내 플라즈마 멤브레인을 통과하여 Ca^{2+} 유입을 유도하는 것을 제시하는 것이다. 포스포리파제 C 억제제 (U73122)로 전처리시, α -iso-cubebene-유도 [Ca^{2+}]i 증가에는 영향을 미치지 못하였으며 (도 3 참조), 이는 포스포리파제 C-매개 반응의 가능한 역할을 수행하는 것이라 할 것이다. 다른 Ca^{2+} 채널을 통하여 Ca^{2+} 유입 증가가 세포외 칼슘 농도에 대한 세포 반응에 대한 잠재적인 메카니즘으로서 제시되게 되므로, 본 발명자들은 α -iso-cubebene가 [Ca^{2+}]i 대 칼슘 채널의 비 증가에 있어 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 상기 α -iso-cubebene-유도된 [Ca^{2+}]i의 증가는 전압-민감성 L-타입 칼슘 채널 억제제 (1 μM nifedipine, 10 μM diltiazem, 혹은 10 μM SK&F)로 미리 배양시 억제되지 않았다 (도 3 참조). 그러나, α -iso-cubebene 이전에 thapsigargin의 전처리는 인간 호중구내 α -iso-cubebene-유도 [Ca^{2+}]i 증가를 완벽하게 억제하였다 (도 3 참조). 이같은 결과는 상기 α -iso-cubebene 화합물이 thapsigargin-민감성 시그널링 경로를 매개로 하여 Ca^{2+} 유입을 증가시키지만, 인간 호중구내 칼슘-의존성 경로에 의한 것은 아님을 강하게 입증하는 것이다.

[81]

[82] 실시예 4-3: 인간 호중구의 α -iso-cubebene로의 자극은 CXCL8 생성을 유도한다

[83]

인간 호중구내 일차 사이토카인에 있어 α -iso-cubebene이 미치는 영향을 조사하기 위하여, 새로 분리된 인간 호중구를 일련의 시간동안 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 α -iso-cubebene로 자극하였다. α -iso-cubebene-유도 CXCL8 생성은 2시간 자극후 명백하였으며, 자극의 24시간까지 증가하였다 (도 4A 참조). 이는 Ca^{2+} 이동이 사이토카인을 포함한 다수의 분자의 분비에 필요한 것임을 입증하는 것이다. α -iso-cubebene에 의한 CXCL8 분비와 관련된 시그널링 경로를 특징짓기 위하여, 본 발명자들은 the role of on by EGTA, 세포내 Ca^{2+} 킬레이트제를 α -iso-cubebene를 첨가하기에 앞서 인간 호중구에 미리 배양시킴으로써 α -iso-cubebene-유도 CXCL8 생성이 Ca^{2+} 이동에 미치는 영향을 조사하였다. 도 4B에서 보듯이, EGTA는 완벽하게 α -iso-cubebene-유도 CXCL8 생성을 억제하였으며, 이는 CXCL8 분비에 Ca^{2+} 이동이 중요한 역할을 수행함을 제시하는 것이다.

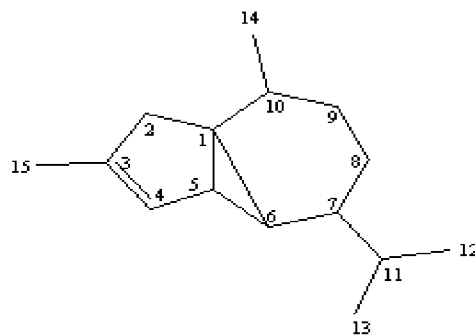
산업상 이용가능성

[84]

본 발명에 따르면, 오미자로부터 고활성 천연물질로써 α -iso-cubebene계 화합물을 순수 분리하였을 뿐 아니라 면역 질환의 예방 및 치료에 탁월한 효과를 갖음을 확인할 수 있다.

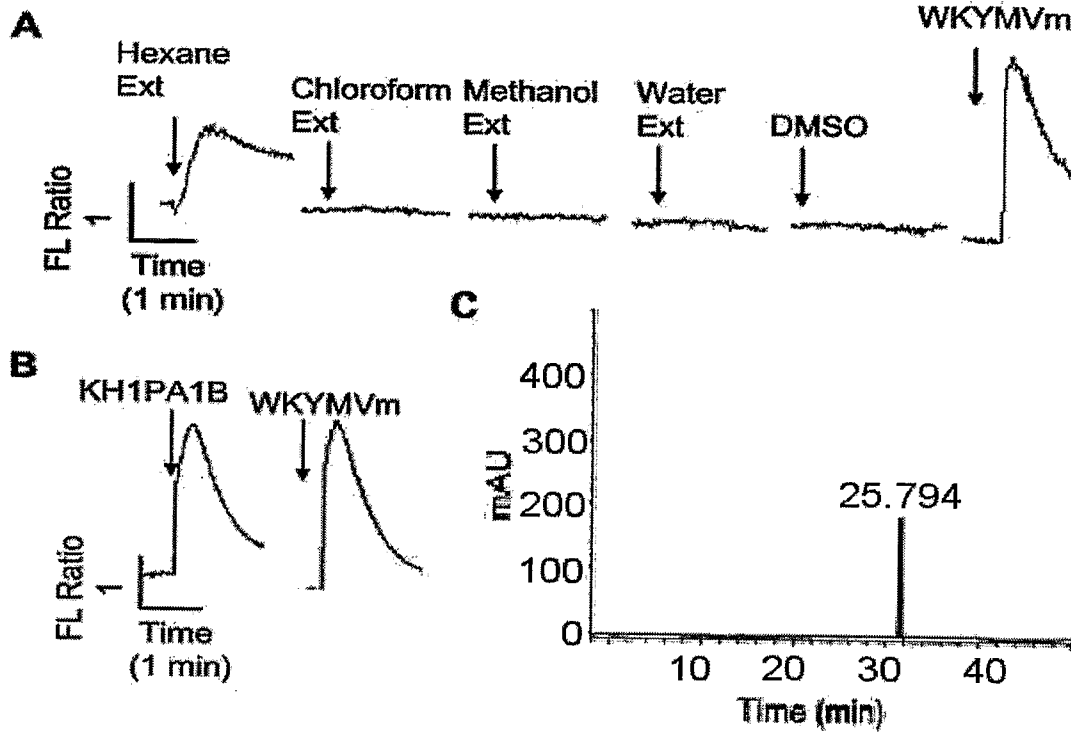
청구범위

- [1] 오미자(*Schisandra chinensis*)로부터 추출한 하기 화학식 1을 갖고, Chemical Formula $C_{15}H_{24}$, 분자량 204.35인 신규한 α -iso-cubebene 화합물을 유효성분으로 포함하는 면역 질환의 예방 및 치료용 조성물.
[화학식 1]

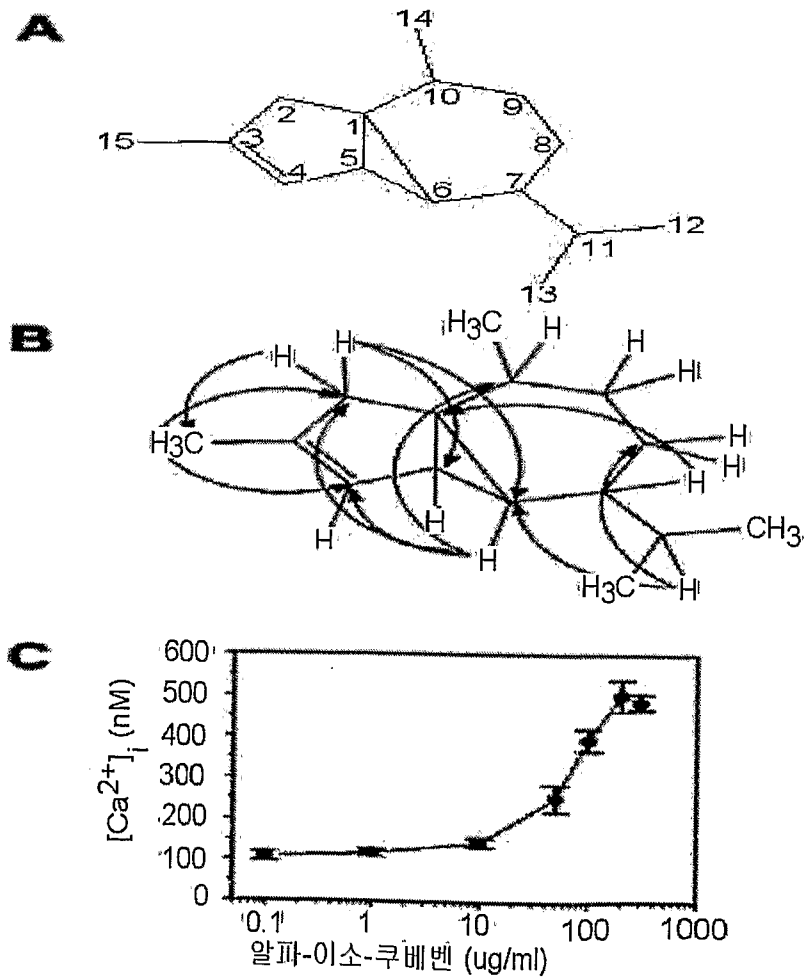


- [2] 제1항에 있어서, 상기 면역 질환의 예방 및 치료는 감염 면역의 치료 또는 면역 증강인 것을 특징으로 하는 예방 및 치료용 조성물.
- [3] 제1항의 예방 및 치료용 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하여 호중구세포에서의 세포 내 칼슘이온 유리를 증가시킴으로써 면역을 증강시키는 방법.
- [4] 제1항의 예방 및 치료용 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하여 호중구세포에서의 IL-8의 생성을 증가시킴으로써 면역을 증강시키는 방법.
- [5] 제1항의 예방 및 치료용 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하여 호중구세포의 활성을 매개로 하여 면역을 조절하는 방법.
- [6] 오미자 분쇄물을 헥산을 이용하여 헥산 추출물을 얻는 단계;
상기 헥산 추출물을 실리카겔을 충전한 컬럼 표면에 첨가하고, 상기 컬럼에 헥산, 헥산-에틸아세트 및 클로로포름-메탄올 혼합용액을 순차적으로 첨가하여 다수개의 분획들을 얻는 단계;
상기 분획들중 첫번째 분획을 실리카겔을 충전한 컬럼에 첨가하여 CH_2Cl_2 용액을 흘려 보내면서 후속 분획을 얻는 단계; 및
얻어진 후속 분획을 실리카겔이 충전된 컬럼에 첨가하여 헥산용액을 흘려보내면서 순수분리하여 Chemical Formula $C_{15}H_{24}$ 이고, 분자량 204.35인 α -iso-cubebene 화합물을 동정하는 단계; 를 포함하여 이루어지는 오미자로부터 α -iso-cubebene 화합물을 추출하는 방법.

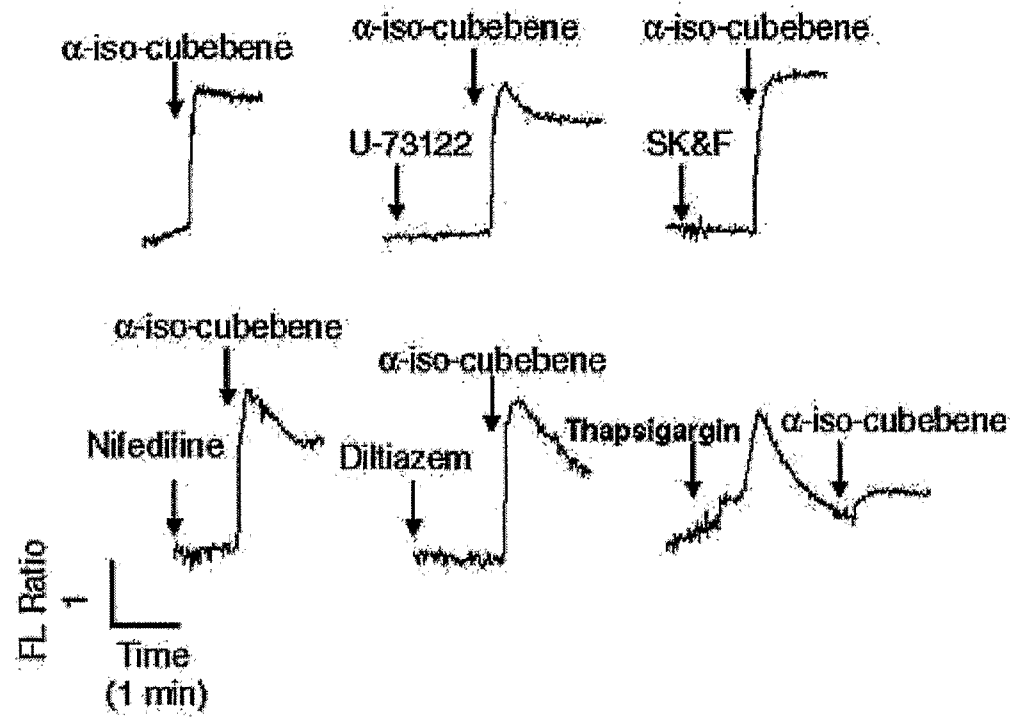
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]

