(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0097294
(43) 공개일자 2010년09월03일

(51) Int. Cl.
A61K 36/03 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0016168
(22) 출원일자 2009년02월26일
심사청구일자 2009년02월26일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
윤나영
부산광역시 수영구 망미1동 더샵 파크리치아파트 107동 303호
이상훈
부산광역시 해운대구 반여1동 롯데낙천대아파트2차 207동 2401호
김세권
부산광역시 동래구 사직2동 쌍용예가아파트 125동 1402호
(74) 대리인
이덕록

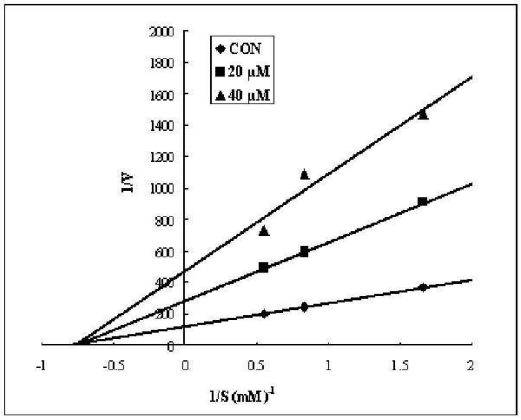
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 콜린에스테라아제 저해활성을 갖는 패 추출물

(57) 요 약

본 발명은 콜린에스테라아제 저해활성을 갖는 패 유래 플로로탄닌 화합물 6,6′-비엑콜 또는 디플로르에토하이드록시카르말롤 및 이를 유효성분으로 함유하는 알츠하이머 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것으로, 6,6′-비엑콜이 아세틸콜린에스테라아제에 대한 저해활성을 나타내었고, 디플로르에토하이드록시카르말롤이 부티릴콜린에스테라아제에 대하여 저해활성을 나타내어, 이들은 알츠하이머 질환의 치료에 있어 강력한 콜린에스테라아제 저해제로서 사용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

패 추출물을 유효성분으로 함유하여 콜린에스테라아제 (ChE) 저해활성을 갖는 알츠하이머 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

패 유래 6,6′-비엑콜 또는 디플로르에토하이드록시카르말롤 중 하나를 유효성분으로 함유하여 콜린에스테라아제 (ChE) 저해활성을 갖는 알츠하이머 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 3

패 추출물을 유효성분으로 함유하여 콜린에스테라아제 (ChE) 저해활성을 갖는 알츠하이머 질환 개선용 건강식품 조성물.

청구항 4

패 유래 6,6′-비엑콜 또는 디플로르에토하이드록시카르말롤 중 하나를 유효성분으로 함유하여 콜린에스테라아제 (ChE) 저해활성을 갖는 알츠하이머 질환 개선용 건강식품 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 콜린에스테라아제 저해활성을 갖는 패 추출물에 관한 것으로 보다 구체적으로는, 콜린에스테라아제 저해활성을 갖는 패 유래 플로로탄닌 화합물 6,6′-비엑콜 또는 디플로르에토하이드록시카르말롤 및 이를 유효성분으로 함유하는 알츠하이머 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머 질환 (Alzhimer's disease, AD)은 만성 및 진행성 신경퇴행성 질환으로, 기억력 손실, 방향감각 상실, 인식력 기능장애 및 행동장애를 포함하는 몇몇 증상으로 특정지어진다. AD는 전뇌 기저부 및 대뇌피질에서 콜린의 손실과 관련이 있다. 콜린 신경전달의 부족이 AD 환자의 학습력 및 기억력 감퇴에 결정적인 역할을 하므로 콜린에스테라아제를 저해함으로써 콜린의 기능을 활성화시키는 것이 AD의 치료에 효과적일 수 있다는 사실이 보고된 바 있다.

[0003] 아세틸콜린에스테라아제 (Acetylcholinesterase, AChE) 및 부티릴콜린에스테라아제 (Butyrylcholinesterase, BChE)와 같은 콜린에스테라아제(Cholinesterase, ChE)는 신경전달물질인 아세틸콜린을 가수분해시킴으로써 콜린 전달에 중요한 역할을 하는 효소이다.

[0004] AChE는 막결합 효소로 뇌, 근육 및 신경에 존재한다. 포유류의 뇌에서, 대부분의 AChE는 멤브레인 결합 G4 형태로 존재하나, 그것의 농도는 신경이 퇴화됨에 따라 점차 감소한다. AChE는 신경전달물질 아세틸콜린을 가수분해시킴으로써 몇몇 생리학적 반응을 조절하는데 중요한 역할을 한다. BChE는 신경아교에서 발현되며, 장, 간, 신장, 심장, 폐 및 혈청에서 발견된다. BChE는 에스테르기를 가지는 화합물들의 대사에 중요한 역할을 하며, AChE와 같이 아세틸콜린을 가수분해시킬 수 있고 특히, AD 환자에서는 그 농도가 감소하지 않고 오히려 증가할 수도 있다.

[0005] 통상적으로 뇌에는 AChE가 우세하지만, AD 환자의 뇌에서는 BChE의 활성이 증가하는 반면, AChE 활성은 변하지

않고 남아있거나 감소한다. 따라서 AChE 및 BChE 모두를 저해는 약물은 AD의 효과적인 치료제가 될 수 있다. 지난 수십년 동안, 타크린 (tacrine), 도네페질 (donepezil), 리바스티그민 (rivastigmine) 및 갈란타민 (galanthamine)을 포함한 합성 ChE 저해제가 AD 치료제로 사용되어 왔다. 그러나 이들 약물은 불충분한 활성, 간독성 및 위장관 장애와 같은 부작용으로 인하여 사용이 제한되고 있다. 합성 ChE 저해제의 부작용으로 인하여, 합성 약물의 대체제로서 무독성 ChE 저해제의 개발에 큰 관심을 가지게 되었고, 천연물로부터 새로운 ChE 저해제를 분리하고 있다.

[0006] 종래 AChE 저해제와 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-0225467호 “새로운 아세틸콜린에스테라제 유전자 및 이를 이용하여 대장균에서 아세틸콜린에스테라제를 제조하는 방법”에서는 신경전달 물질인 아세틸콜린에스테라제 (Acetylcholinesterase; 이하 AChE 라고 약칭함)를 대장균에서 대량생산하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 아미노산 서열에는 5'-말단의 염기 서열이 변형된 새로운 AChE 유전자, AChE를 대장균에서 생산할 수 있는 발현벡터 및 이를 이용하여 대장균에서 AChE 단백질을 대량으로 생산하는 방법이 개시되어 있으며, 대한민국 특허출원 제10-2003-0002500호 “대두 추출물을 함유하는 아세틸콜린에스터라제 저해제 그리고 이를 포함하는 약학적 제제 및 식품”에는 AD를 비롯한 노인성 치매, 중증 근무력증, 위장관 및 방광 평활근 무력증, 녹내장과 같은 체내 아세틸콜린의 농도 감소에 따라 발생하는 각종 질환을 독성이나 부작용 없이 치료 및 예방하는데 효과적으로 사용할 수 있으며, 식품 및 식품 보조제에 첨가하여 사용하는 경우, 기억력 촉진 또는 정신 집중, 치매 방지 등의 뛰어난 효과가 있는 대두 추출물 함유 AChE 저해제가 개시되어 있다.

[0007] 또한 대한민국 특허출원 제10-2003-0031035호에는 속단 추출물을 함유하는 아세틸콜린에스터라제 저해제 그리고 이를 포함하는 약학적 제제, 식품 및 사료가 개시되어 있고, 대한민국 특허출원 제10-2002-0074922호에는 녹차 추출물을 함유하는 아세틸콜린에스터라제 저해제 그리고 이를 포함하는 약학적 제제, 식품 및 사료가 개시되어 있다.

[0008] 또한 대한민국 특허출원 제10-2005-0015011호 “(-)에피갈로카테킨 갈레이트를 포함하는 식품 및 사료”에는 (-)에피갈로카테킨 갈레이트 ((-)epigallocatechin gallate) 화합물을 함유하는 아세틸콜린에스터라제 저해제 그리고 이를 포함하는 약학적 제제, 식품 및 사료가 개시되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-0509440호에는 쥐눈이콩 추출물을 함유하는 AD를 비롯한 노인성 치매, 중증 근무력증, 위장관 및 방광 평활근의 무력증, 녹내장 치료 또는 예방제 그리고 이를 포함하는 약학적 제제가 개시되어 있다.

[0009] 패 (*Ishige okamurae* Yendo)는 식용 갈조류로서 Ishigeaeceae과에 속하는 해조류이다. 패는 대한민국의 해안에 널리 분포하며, 간조대 전역에서 발견된다.

[0010] 패와 패로부터 유래된 플로로탄닌은 항응혈, 항산화, HIV-1 역전사효소 및 박테리아 포스포리파아제 A_2 저해활성을 포함한 많은 유용한 생리활성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다.

[0011] 본 발명에서는 안전하고 효과적인 ChE 저해제를 개발하기 위하여, 패로부터 분리한 플로로탄닌의 ChE 저해활성을 조사하고 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 패로부터 유래된 플로로탄닌 화합물을 포함하는 콜린에스테라아제 저해제를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적은 패 추출물로부터 플로로탄닌 화합물을 수득하고, 패 유래 플로로탄닌 성분의 콜린에스테라아제 저해활성을 분석하여, 이들 중 6,6′-비엑콜이 효과적인 ChE 저해제임을 밝혀내고, 이러한 ChE 저해제를 함유한 패가 AD를 치료하거나 예방하는데 유용할 수 있음을 확인함으로써 달성되었다.

[0014] 본 발명은 패 추출물을 유효성분으로 함유하여 콜린에스테라아제 (ChE)의 저해 활성을 갖는 알츠하이머 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 패 유래 플로로탄닌 화합물 6,6′ -비엑콜 또는 디플로르에토하이드록시카르말롤 중 하나를 유효성분으로 함유하여 콜린에스테라아제 (ChE)의 저해활성을 갖는 알츠하이머 질환 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 있어서, “유효성분”이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능·효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군 (약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.

[0017] 본 발명의 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 약학 조성물의 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합 뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0019] 또한 본 발명은 패 추출물을 유효성분으로 함유하여 콜린에스테라아제를 저해활성을 갖는 알츠하이머 질환 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

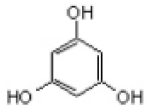
[0020] 또한 본 발명은 패 유래 플로로탄닌 화합물인 6,6′ -비엑콜 또는 디플로르에토하이드록시카르말롤 중 하나를 유효성분으로 함유하여 콜린에스테라아제 저해활성을 갖는 알츠하이머 질환 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0021] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0022] 본 발명에서는 패로부터 하기 화학식 1 내지 3의 세가지 플로로탄닌 화합물을 분리, 동정하였다.

[0023] 화합물 1 내지 3의 화학구조는 플로로글루시놀 (화합물 1), 6,6′ -비엑콜 (화합물 2) 및 디플로르에토하이드록시카르말롤 (화합물 3)로 동정하였으며, 화합물 1 내지 3의 화학식을 다음과 같다.

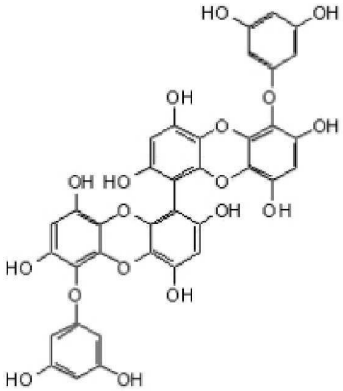
[0024] <화학식 1>



[0025]

[0026] 플로로글루시놀

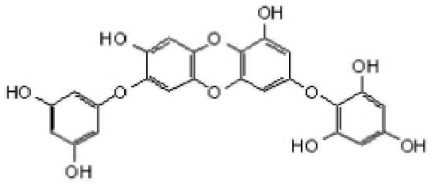
[0027] <화학식 2>



[0028]

[0029] 6,6′ -비엑콜

[0030] <화학식 3>



[0031]

[0032] 디플로르에토하이드록시카르말롤

[0033] 이어서 상기 화학식 1 내지 3의 화합물을 이용하여 아세틸콜린 (Acetylcholine, ACh) 및 부티릴콜린 (Butyrylcholine, BCh)을 기질로 사용하여 각각 AChE 및 BChE의 저해도를 분석하였다.

[0034] 그 결과 상기 화합물 중, 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)은 강력한 AChE 저해활성을 나타내었으나, 현저한 BChE 저해활성은 나타나지 않았다. 그러나 디플로르에토하이드록시카르말롤 (화합물 3)은 BChE에 다소 낮은 저해활성을 나타내었다.

[0035] 이러한 결과는 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)이 AD 치료에 있어 AChE 저해제로서 유용하게 이용될 수 있고, 강력한 ChE 저해제를 함유한 패가 AD를 치료하거나 예방하는데 유익할 수 있음을 제시하는 것이다.

효 과

[0036] 본 발명에 따른 패 유래 플로로탄닌 화합물 중 6,6′ -비엑콜이 AChE에 대한 저해활성을 나타내었고, 디플로르에토하이드록시카르말롤이 BChE에 대하여 저해활성을 나타내어, 이들은 AD의 치료에 있어 강력한 ChE 저해제로서 사용할 수 있으므로, 본 발명은 AD의 치료 및 예방을 위한 제약 산업에서 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0037] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

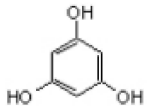
[0038] **실시예 1 : 패로부터 생리활성 성분의 분리**

[0039] 본 실시예에서 사용한 패는 2007년 10월 대한민국 부산 청사포에 채집하였다. 패 시료를 담수로 세척하고, 그늘에서 건조하였다. 실온에서 패 분말 (500 g)을 메탄올 (MeOH) 2 L로 3회 추출하였다. 추출액을 농축한 후, 추출물 (96 g)을 H_2O에 현탁시키고, *n*-헥산, 디클로로메탄 (CH_2Cl_2), 에틸 아세테이트 (EtOAc) 및 *n*-부탄올 (*n*-BuOH)로 극성 순서대로 분획하였다.

[0040] EtOAc 가용성 분획물 (22 g)을 실리카겔을 이용한 컬럼 크로마토그래피에서 *n*-헥산, *n*-헥산과 EtOAc 혼합물 (20:1→1:1), CH_2Cl_2 및 MeOH (10:1→1:1)로 연속적으로 용리시키고, TLC 분석을 통해 29개의 하부 분획물 (Fr.1-Fr.29)을 수득하였다. 분획물 17 (Fr.17)을 실리카겔 및 세파덱스 LH-20를 이용하여 추가로 크로마토그래피하여 화합물 1 (142 mg)을 수득하였다. 화합물 2 (5 mg)는 분획물 25 (Fr.25)를 실리카겔 및 세파덱스 LH-20 상에서 추가로 정제하여 수득하였다. 분획물 20 (Fr.20)을 실리카겔 상에서 클로로포름:MeOH:H_2O (6:1:0.1 v/v/v)로 용리시켜 다섯 개의 하위 분획물 (Fr.20.A-Fr.20.E)을 수득하였다. 분획물 20.C (Fr.20.C)를 세파덱스 LH-20 상에서 추가로 정제하여 화합물 3 (24 mg)을 수득하였다. 이들 화합물의 구조는 1D (^{1}H, ^{13}C-NMR) 및 2D (HMQC, HMBC) NMR의 분광학적 분석과 발표된 문헌과의 비교를 통해 동정하였다.

[0041] 화합물 1 내지 3의 화학구조는 플로로글루시놀 (화합물 1), 6,6′ -비엑콜 (화합물 2) 및 디플로르에토하이드록시카르말롤 (화합물 3)로 동정하였으며, 화합물 1 내지 3은 다음과 같이 화학식 1 내지 3으로 나타났다.

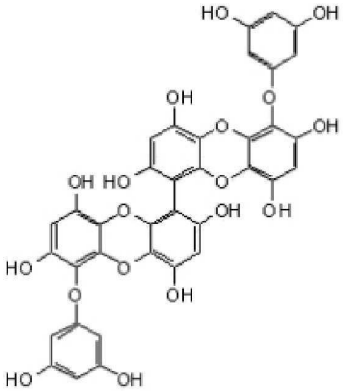
[0042] <화학식 1>



[0043]

[0044] 플로로글루시놀

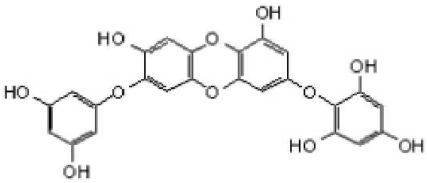
[0045] <화학식 2>



[0046]

[0047] 6,6′ -비엑콜

[0048] <화학식 3>



[0049]

[0050] 디플로르에토하이드록시카르말롤

[0051] **실험예 1 : ChE 저해활성 측정**

[0052] ChE 저해활성은 엘만 등 (Ellman *et al*)이 개발한 방법에 따라 수행하였다. 아세틸콜린 (ACh) 및 부티릴콜린 (BCh)을 기질로 사용하여 AChE 및 BChE의 각각의 저해도를 측정하였다. 반응 혼합물은 100 mM 인산나트륨 완충액 (pH 8.0) 140 μL, 시료용액 20 μL 및 AChE 또는 BChE 용액 (0.36U/ml) 20 μL를 함유하였고, 이들을 혼합하여 실온에서 15분간 예비배양 하였다. 이어서 DTNB 10 μL와 ACh 또는 BCh 10 μL를 각각 가하였다. 412 nm에서 15분 동안 흡광도를 측정한다. 기질인 ACh 또는 BCh는 효소반응에 의해 콜린과 아세테이트로 분해된다. 분해물인 콜린은 DTNB과 반응하여 황색의 5-티오-2-니트로벤조에이트를 생성한다. 생성정도 따라 AChE 또는 BChE의 저해도를 평가할 수 있다. 시료 및 양성 대조군으로 사용한 에세린 (eserine)은 각각 10% 에탄올에 용해시켜 사용하였다. 모든 반응은 GENios마이크로플레이트 리더기 (Tecan Austria GmbH, Austria)를 이용하였다.

[0053] 저해율 % = [{1 (E S) / E} × 100],

[0054] 상기 식에서, E 및 S는 각각 시험 시료 미포함 및 포함한 효소활성이다.

[0055] 시료의 효소 저해 패턴 (enzyme kinetic) 연구는 ACh 혹은 BCh (0.6 내지 1.8 mM)를 세개의 상이한 농도로 제조된 반응 혼합물을 이용하였으며, 다양한 농도의 각 시료를 각각 반응 혼합물에 가하였다. 미카엘리스 상수 (Michaelis constant; K_m) 및 효소반응 최대속도 (V_{max})를 기질을 이용한 라인위버-버크 (Lineweaver-Burk) 플롯

으로 계산하였다.

[0056] ChE에 대한 화합물들의 저해활성을 하기 표 1에 나타내었다.

[0057] <표 1>

[0058] 패에서 분리한 플로로탄닌의 콜린에스테라아제 저해 활성

[0059]

	C_{50} (μM) ±SD[c]	
화합물	AChE[a]	BChE[b]
플로로글루시놀 (화합물 1)	> 200	> 200
6,6′ -비엑콜 (화합물 2)	46.42 ±1.19	> 200
디플로르에토하이드록시카르말롤 (화합물 3)	> 200	110.83 ±1.15
에세린[d]	0.0018 ±0.005	0.158 ±0.029

[0060] [a]AChE : 아세틸콜린에스테라아제, [b]BChE : 부티릴콜린에스테라아제

[0061] [c]각 값은 3회 실험의 평균 ± 표준편차로 나타냄.

[0062] [d]에세린은 양성 대조군으로 사용되었음.

[0063] 화합물들 중, 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)은 AChE 저해활성에서 IC_{50}값이 46.42 ± 1.19 μM로 나타났다. BChE 억제활성에서는, 디플로르에토하이드록시카르말롤 (화합물 3)은 IC_{50}값이 110.83 ± 1.15 μM로 나타났다. 그러나 플로로글루시놀 (화합물 1)은 ChE에 대하여 어떠한 저해활성도 나타나지 않았다.

[0064] 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)의 AChE의 저해 패턴 (kinetic)을 라인위버-버크 플롯으로 분석하였다 (도 1 참조). 두 개의 다른 농도의 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)로 얻은 라인이 x축 상에서 교차한다. 또한 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)의 K_i 값은 20 μM에서 8.8 μM, 40 μM에서 10.3 μM로 나타났고, 각각 20 및 40 μM에서 K_m값은 1.3×10^{-3} M이었으며, V_{max}값은 각각 2.1×10^{-3} M과 3.5×10^{-3} M로 나타났다 (표 2 참조).

[0065] <표 2>

[0066] 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)의 존재하에 아세틸콜린에스테라아제의 kinetic parameters

[0067]

화합물	K_m (M)	V_{max} (M)	K_i (μM)
6,6′ -비엑콜 (2)	1.3 ± 10^{-3}		
20 (μM)		2.1 ± 10^{-3}	8.8
40 (μM)		3.5 ± 10^{-3}	10.3

[0068] 따라서 상기의 결과는 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)이 AChE에 대한 아세틸콜린과의 반응에 비경쟁적 저해제로 작용하는 것으로 나타났다.

[0069] 종래의 연구에서는 플로로글루시놀을 포함한 다양한 플로로탄닌 성분들의 ChE 저해활성에 대해 연구된 바 있다. 그러나 본 발명은 ChE 저해활성에 대한 6,6′ -비엑콜 (화합물 2) 및 디플로르에토하이드록시카르말롤 (화합물 3)의 결과는 처음 보고하는 것이다.

[0070] ChE 저해제는 임상 연구에서 가장 유력한 AD의 치료제로서 잘 알려져 있다. 특히, AChE 저해제는 알츠하이머형 치매 환자의 뇌에서 아세틸콜린 및 콜린성 신경전달량을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

[0071] 양성 대조군로 사용된 에세린 (eserine)은 (-)-피소스티그민으로 알려져 있으며, 칼라바 콩 (Calabar bean)에서 분리된 부교감신경 흥분제이며, 가역적인 콜린에스테라아제 저해제로서 AD의 치료에 이용되고 있다. 하지만, 과다복용 또는 부작용으로 우울증 및 콜린성 증후군을 야기시킬 수 있다.

[0072] 결론적으로, 플로로글루시놀 (화합물 1), 6,6′ -비엑콜 (화합물 2) 및 디플로르에토하이드록시카르말롤 (화합물 3)을 포함한 세개의 플로로탄닌 화합물을 갈조류인 패에서 분리하였다. 이들 분리된 화합물 중, 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)은 강력한 AChE 저해활성이 나타났으나, 현저한 BChE 저해활성은 나타내지 않았다. 그러나 디플로르에토하이드록시카르말롤 (화합물 3)은 BChE에 대해 다소 낮은 저해활성을 나타내었다.

[0073] 이러한 결과는 6,6′ -비엑콜 (화합물 2)은 AChE 저해제로서 AD 치료에 있어 유용하게 이용할 수 있으며, 강력한 ChE 저해제를 함유한 패가 AD를 예방하거나 치료하는데 유익할 수 있음을 제시하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1은 6,6′ -비엑콜의 존재하에 아세틸콜린에스테라아제의 라인위버-버크 플롯을 나타낸 도이다.

도면

도면1

