



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0115062
(43) 공개일자 2016년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 49/835 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 49/835 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0041766
(22) 출원일자 2015년03월25일
심사청구일자 2015년03월25일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
서은경
서울특별시 성북구 술샘로1길 9 (정릉동)
이윤실
서울특별시 서초구 신반포로 9, 76동 401호 (반포동, 반포아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

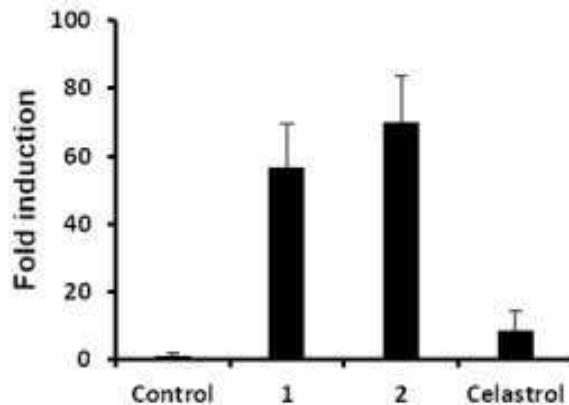
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 신선초로부터 분리된 신규 화합물 및 상기 화합물을 포함하는 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신선초로부터 분리된 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(2E,5E)-7-메톡시-3,7-디메틸-2,5-옥타디에닐]칼콘 또는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(6E)-2-하이드록시-7-메틸-3-메틸렌-6-옥테닐]칼콘, 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물, 및 이를 유효성분으로 함유하는 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/12 (2013.01)

(72) 발명자

김윤서

경기도 부천시 원미구 부흥로 237, 1317동 502호
(중동, 그린타운 한신아파트)

최슬기

강원도 원주시 복원로 1870 (무실동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A2A2A01067336

부처명 기초연구사업

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 HSF1을 이용한 천연물 유래의 세포 손상 저해제 소재 발굴 연구(Research program to discover the novel plant-derived recovery agent on damaged cells utilizing the HSF1 control system)

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.12.01 ~ 2015.11.30

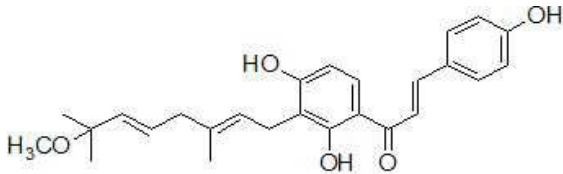
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 1로 표시되는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(2*E*,5*E*)-7-메톡시-3,7-디메틸-2,5-옥타디엔일]칼콘 (4,2',4'-trihydroxy-3'-[(2*E*,5*E*)-7-methoxy-3,7-dimethyl-2,5-octadienyl]chalcone), 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물.

[화학식 1]



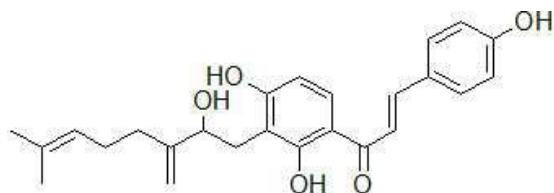
청구항 2

화학식 1로 표시되는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(2*E*,5*E*)-7-메톡시-3,7-디메틸-2,5-옥타디엔일]칼콘, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

화학식 2로 표시되는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(6*E*)-2-하이드록시-7-메틸-3-메틸렌-6-옥테닐]칼콘(4,2',4'-trihydroxy-3'-[(6*E*)-2-hydroxy-7-methyl-3-methylene-6-octenyl]chalcone) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 2]



청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 조성물은 열충격인자 1(Heat Shock Factor 1), 열충격단백질 25(Heat Shock Protein 25), 열충격단백질 27(Heat Shock Protein 27), 또는 열충격단백질 70(Heat Shock Protein 70)의 발현을 증가시키는 조성물.

청구항 5

화학식 1로 표시되는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(2*E*,5*E*)-7-메톡시-3,7-디메틸-2,5-옥타디엔일]칼콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 화학식 2로 표시되는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(6*E*)-2-하이드록시-7-메틸-3-메틸렌-6-옥테닐]칼콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 신선초로부터 분리된 화합물 및 상기 화합물을 포함하는 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포

손상의 예방 또는 치료용 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 신선초(*Angelica keiskei* Koidzumi)는 미나리과에 속하는 내한성 다년생 초본으로서, 아열대 지방에서 주로 자생하고 우리나라에는 1970년대에 보급되어 녹즙 등의 원료로서 널리 재배되고 있다. 채소용으로 재배되며, 높이가 약 1미터이고 줄기는 곧게 자라서 가지가 갈라진다. 잎은 짙은 초록색으로 윤기가 있다. 가을에 연노랑의 작은 꽃이 차례로 피며, 향기가 독특하다. 줄기나 잎을 자르면 노란 즙이 나온다. 잎줄기를 따내면 다음날 새잎이 나올 정도로 생육이 왕성해서 '명일엽(明日葉)'이라는 이름으로도 불린다. 그 외 생약명으로는 도관초, 함초라고 부르며, 신훈초라고도 한다.
- [0003] 신선초에는 각종 비타민과 무기질이 풍부하고, 다양한 생리활성물질이 포함되어 있다. 특히 신선초에 포함되어 있는 생리활성물질 중 칼콘 화합물에 속하는 잔소안제롤(xanthoangelol)과 4-하이드록시테리신(4-hydroxyderricin)은 신선초의 성분 중 가장 함량이 많고 항균활성, 지방세포 분화 억제 등 유용한 약리효과를 가진 것으로 보고되어 있다.
- [0004] 열충격단백질(Heat Shock Protein, 이하 HSP)은 온도, 저산소증, 중금속, 및 이온화 방사선 등 다양한 스트레스 조건에서 유도되는 단백질을 군을 의미한다. HSP는 세포 보호 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 항암치료제 등 유독성 약물 및 방사선치료시 발생하는 정상세포 손상에 대해서도 보호 효과를 갖는 것으로 보고된 바 있다. 예를 들어, Hae-June Lee et al.(Radioprotective Effect of Heat Shock Protein 25 on Submandibular Glands of Rats, *Am J Pathol.* 2006 Nov; 169(5): 1601-1611)은 랫트의 턱밑샘(submandibular gland)에 방사선을 조사하고 상기 랫트의 턱밑샘에 HSP25 및 HSP70을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 주사하였을 때, 방사선 조사에 의한 턱밑샘 손상에 대한 보호 효과가 관찰되었다고 보고한 바 있다. Libo Li et al.(Schisandrin B attenuates acetaminophen-induced hepatic injury through heat-shock protein 27 and 70 in mice, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 29 (2014) 640-647)은 시잔드린 B가 아세트아미노펜에 의해 유발된 간 손상에 대해 갖는 보호 효과는 HSP27 및 HSP70의 발현을 증가시킨 결과라고 밝힌 바 있다. Martin Roesslein et al.(Dobutamine mediates cytoprotection by induction of heat shock protein 70 in vitro, *Life Sciences* 98 (2014) 88-95)은 도부타민이 세포독성 항암제인 스타우로스포르린(staurosporine)에 의해 유발된 간 손상에 대해 갖는 보호 효과는 HSP 70의 발현을 증가시킨 결과라고 제시하고 있다.
- [0005] 그 외에도 열충격 단백질이 갖는 세포 보호 효과에 대해서 개시하고 있는 논문들이 다수 존재한다. Oyake, J. et al.(Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. *Life Sciences* 79 (2006) 300-305)은 열충격 단백질(HSP 70)의 발현의 증가는 호중구-유도 하이포염소산이나 헬리코박터 파이로리 우레아제-유도 암모니아에 의해 발생하는 모노클로라민(NH₂Cl)에 의한 위점막 세포의 손상을 억제할 수 있어 소화성궤양 치료에 응용할 수 있다고 보고한 바 있다. 또한, Lixia, S. et al.(Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. *Mutation Research* 602 (2006) 135-142)은 열충격 단백질(HSP 70)의 발현을 증가시킴으로써 안구수정체 상피세포(human lens epithelial cells : hLEC)의 DNA 손상을 예방할 수 있다고 보고한 바 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 출원번호 10-2013-0054655호(발명의 명칭: 두층으로부터 분리된 화합물을 포함하는 열충격단백질 유도활성을 갖는 조성물)

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Hae-June Lee et al.(Radioprotective Effect of Heat Shock Protein 25 on Submandibular Glands of Rats, *Am J Pathol.* 2006 Nov; 169(5): 1601-1611)
- (비특허문헌 0002) Libo Li et al.(Schisandrin B attenuates acetaminophen-induced hepatic injury through heat-shock protein 27 and 70 in mice, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 29 (2014)

640-647)

(비특허문헌 0003) Martin Roesslein et al.(Dobutamine mediates cytoprotection by induction of heat shock protein 70 in vitro, Life Sciences 98 (2014) 88-95)

(비특허문헌 0004) Oyake, J. et al., Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. Life Sciences 79 (2006) 300-305

(비특허문헌 0005) Lixia, S. et al., Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. Mutation Research 602 (2006) 135-142

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 열충격단백질 유도 활성을 가짐으로써 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료 효과가 있는 물질을 천연물로부터 분리하기 위해 연구한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 본 발명의 목적은 신선초로부터 분리된 열충격단백질 유도 활성을 갖는 신규 화합물을 제공하는 것이다.

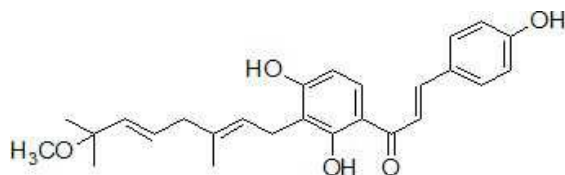
[0010] 본 발명의 다른 목적은 신선초로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 신선초로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(2E,5E)-7-메톡시-3,7-디메틸-2,5-옥타디에닐]칼콘 (4,2',4'-trihydroxy-3'-[(2E,5E)-7-methoxy-3,7-dimethyl-2,5-octadienyl]chalcone), 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물을 제공한다.

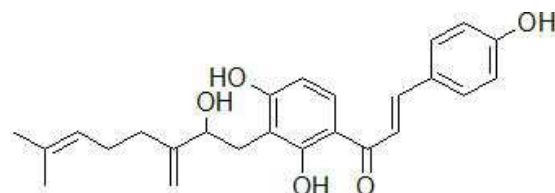
[0013] [화학식 1]



[0014] 본 발명은 또한 상기 화학식 1의 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(6E)-2-하이드록시-7-메틸-3-메틸렌-6-옥테닐]칼콘 (4,2',4'-trihydroxy-3'-[(6E)-2-hydroxy-7-methyl-3-methylene-6-octenyl]chalcone) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] [화학식 2]



[0018]

- [0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 열충격인자 1(Heat Shock Factor 1), 열충격단백질 25(Heat Shock Protein 25), 열충격단백질 27(Heat Shock Protein 27), 또는 열충격단백질 70(Heat Shock Protein 70)의 발현을 증가시킨다.
- [0020] 본 발명에 있어, 상기 약제학적으로 허용 가능한 염은 의약업계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 칼슘, 칼륨, 나트륨 및 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염, 염산, 질산, 인산, 브롬산, 요오드산, 과염소산, 주석산 및 황산 등으로 제조된 무기산염, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산, 숙신산 등으로 제조된 유기산염, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산, 캄포르설폰산, 또는 나프탈렌설폰산 등으로 제조된 설폰산염, 글리신, 아르기닌, 라이신 등으로 제조된 아미노산염 및 트리메틸아민, 트리에틸아민, 암모니아, 피리딘, 피콜린 등으로 제조된 아민염 등이 있으나, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 상기 약제학적으로 허용 가능한 염은 무기산으로서 염산, 유기산으로서 메탄설폰산일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 화합물은 또는 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염의 수화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 물을 포함할 수 있다. 상기 수화물은 1당량 이상, 바람직하게는, 1 당량 내지 5 당량의 물을 함유할 수 있다. 이러한 수화물은 물 또는 물을 함유하는 용매로부터 본 발명의 화합물 또는 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염을 결정화시켜 제조될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 화합물, 또는 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염들의 용매화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 용매를 포함할 수 있다. 상기 용매로 바람직한 것은 비휘발성, 비독성 또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들을 들 수 있으며, 예를 들면, 에탄올, 프로판올 등이 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물은, 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 의한 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 제제화할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제, 분산액, 에멀전, 분말, 크림, 로션, 연고, 젤, 패취, 분무제, 반창고 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 조성물 또는 유효성분은 목적에 따라 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로 등을 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 근육내, 경피 또는 피내로 투여될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물에 있어서, 유효성분의 투여량은 체중 60 kg 성인기준으로 0.1 mg/kg-500 mg/kg의 범위 내에서 조절할 수 있다. 다만, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물에 있어서 유효성분의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.001~20 중량 % 의 양으로 함유될 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(2*E*,5*E*)-7-메톡시-3,7-디메틸-2,5-옥타디에닐]칼콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 화학식 2로 표시되는 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(6*E*)-2-하이드록시-7-메틸-3-메틸렌-6-옥테닐]칼콘 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 건강기능식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 건강기능식품을 포함한 식품 형태로 제조 가능하다.
- [0031] 본 발명의 건강기능식품 내에서 유효성분의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.001~20 중량 % 의 양으로 함유될 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.

- [0032] 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0033] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 상기 화합물과 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0034] 본 발명의 용도, 조성물, 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.
- [0035] 본 발명은 또한 동물에게 치료학적으로 유효한 양의 화학식 1의 화합물 또는 화학식 2의 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물을 투여하여 열충격인자 1(Heat Shock Factor 1, HSF1), 열충격단백질 25(Heat Shock Protein 25, HSP 25), 열충격단백질 27(Heat Shock Protein 27, HSP 27), 또는 열충격단백질 70(Heat Shock Protein 70, HSP 70)의 발현을 증가시킴으로써 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0036] 여기에서 사용된 "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.
- [0037] 본 발명은 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상을 예방, 개선 또는 치료용 의약의 제조를 위한, 화학식 1의 화합물 또는 화학식 2의 화합물, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 또는 이들의 수화물 또는 용매화물의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0038] 본 발명의 신선초로부터 분리된 화합물은 유독성 약물 또는 방사선 조사에 의한 세포 손상을 예방, 개선 또는 치료하며, 세포 독성이 없어 안전하다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 본 발명의 화학식 1의 화합물 및 화학식 2의 화합물의 HSP25 프로모터 활성 증가 효과를 루시퍼라제 어세이로 확인한 도이다.
- 도 2는 본 발명의 화학식 2의 화합물의 HSF1, HSP70, HSP27 발현 증가 효과를 RT-PCR로 확인한 도이다.
- 도 3은 본 발명의 화학식 2의 화합물의 HSF1, HSP70, HSP27 발현 증가 효과를 웨스턴 블롯으로 확인한 도이다.
- 도 4는 본 발명의 화학식 2의 화합물의 세포독성을 MTT 어세이로 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 제시한다. 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 실시예 1의 컬럼크로마토그래피에 사용된 용매는 덕산약품공업주식회사에서 구입하였으며, HPLC에 사용하는 고순도용매는 J.T.Baker으로부터 구입하였고, NMR용 중수소치환용매는 Sigma-Aldrich Korea로부터 구입하였다.
- [0042] [실시예]
- [0043] 실시예 1. 화합물의 분리
- [0044] 1-1. 실험 기구
- [0045] 광학 활성은 P-1010 polarimeter를 사용하여 측정하였다. UV 스펙트럼은 U-3000 spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 1D 및 2D NMR 스펙트럼은 UNITY INOVA 400 MHz FT-NMR 장치를 사용하고 테트라메틸실란(tetramethylsilane, TMS)를 내부 표준으로 하여 측정하였다. 질량 스펙트럼은 Micromass Q-ToF Micro mass spectrometer 및 Agilent 6220 Accurate-Mass TOF LC/MS system에 결합된 Waters ACQUITY UPLC system로 측정하였다.
- [0046] 실험에 사용한 실리카겔 컬럼크로마토그래피는 230-400 mesh이고, 독일 Merck사에서 제조한 것이다.

- [0047] RP-18 컬럼크로마토그래피는 YMC gel ODS-A, 12 nm, S-150 μm 이고, 일본 YMC Co.사에서 제조한 것이다.
- [0048] 박층 크로마토그래피(Thin-layer chromatography, TLC)는 Kieselgel 60 F 254 (silica gel, 0.25-mm 층 두께, Merck, Germany) 플레이트 및 RP-18 F254s (Merck, Germany) 플레이트로 수행하고, UV 광 (254 nm 및 365 nm) 및 10% (v/v) H_2SO_4 스프레이로 120 $^\circ\text{C}$ 에서 5 분간 열을 가하여 가시화하였다.
- [0049] prep. HPLC(preparative HPLC, 분취 HPLC)는 Acme 9000 시스템 (Young Lin, South Korea)에서 YMC-Pack Pro C18 칼럼 (5 μm , 250mm $\times$ 20mm i.d.)을 사용하여 수행하였다.
- [0050] **1-2. 시료의 준비**
- [0051] 대한민국 서울에 위치한 초담채로부터 신선초의 지상부(The aerial part of *Angelica keiskei*)를 구입하고, 전문가의 감정을 받은 후 실험에 사용하였다. 바우처 표본(voucher specimen)을 이화여자대학교 약학대학 천연물 화학 연구소에 보관하였다(No. EA327).
- [0052] **1-3. 신선초 조추출물의 제조**
- [0053] 신선초 지상부 8 kg을 100% 메탄올 12 ℓ 로 2회 실온에서 추출하였다. 추출된 원액에서 용매를 감압 조건에서 증발시켜 신선초 조추출물 2.5 kg을 수득하였다.
- [0054] **1-4. 신선초 분획물의 제조**
- [0055] 상기 1-3에서 얻은 신선초 조추출물을 메탄올-물 혼합용매(19:1) 4 ℓ 에 현탁시키고, 헥산 4 ℓ 를 첨가하여 용해한 다음 헥산층을 분리하여 진공 건조하여 헥산에 용해된 분획물을 수득하였다. 상기 과정을 5회 반복하였다.
- [0056] 헥산 분획 후 남은 분획층을 농축하였다. 농축된 분획물을 증류수에 현탁한 후 에틸 아세테이트 4 ℓ 를 첨가하여 분리하여 진공 건조하여 에틸 아세테이트에 용해된 분획물을 수득하였다. 상기 과정을 5회 반복하고, 에틸 아세테이트 분획물을 농축하였다. 수득한 에틸 아세테이트 분획물은 총 142 g이었다.
- [0057] **1-5. 컬럼 크로마토그래피를 통한 화합물 분리**
- [0058] 상기 1-4에서 얻은 에틸 아세테이트 분획물 142 g을 헥산-에틸 아세테이트 혼합용매 (99:1 $\rightarrow$ 1:1, v/v) 및 에틸 아세테이트-메탄올 혼합용매(1:0 $\rightarrow$ 0:1, v/v)를 이동상으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 용리하여 16개의 분획(F01-F16)을 수득하였다.
- [0059] **(1) F11 분획으로부터 화합물 분리**
- [0060] 그 중 F11 분획(13.8 g)을 클로로포름-메탄올 혼합용매(199:1 $\rightarrow$ 4:1, v/v)를 이동상으로 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 용리하여 16개의 하위분획(F11.01-F11.16)을 수득하였다.
- [0061] 그 중 F11.12 분획(9.0 g)을 메탄올-물 혼합용매(2:3 $\rightarrow$ 9:1, v/v)를 이동상으로 사용하여 RP-18 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 22개의 하위분획(F11.12.01-F11.12.22)을 수득하였다.
- [0062] 그 중에서 F11.12.18 분획(1.2 g)을 메탄올-물 혼합용매(4:1, v/v)를 이동상으로 사용하는 RP-18 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 5개의 하위분획(F11.12.18.01-11.12.18.05)을 수득하였다. 그 중 F11.12.18.03 분획(73.5 mg)의 일부(19.6 mg)를 메탄올-물 혼합용매(9:1, v/v, 2 ml/min, running time 47.8 min)로 preparative HPLC로 정제하여 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(6E)-2-하이드록시-7-메틸-3-메틸렌-6-옥테닐]칼콘(4,2',4'-trihydroxy-3'-[(6E)-2-hydroxy-7-methyl-3-methylene-6-octenyl]chalcone) (이하 화학식 2)(13.9 mg, t_R 47.8 min)을 수득하였다.
- [0063] **(2) F13 분획으로부터 화합물 분리**
- [0064] 상기 F1-F16 분획 중 F13 분획(3.3 g)을 클로로포름-아세톤 혼합용매(49:1 $\rightarrow$ 4:1, v/v)를 이동상으로 사용하는 실리카겔 크로마토그래피로 분리하여 21개의 하위분획(F13.01-F13.21)을 수득하였다.
- [0065] 그 중 F13.18 분획(64.3 mg)을 메탄올-물 혼합용매(3:2, 7:3, 4:1, v/v)를 이동상으로 사용하여 RP-18 크로마토그래피로 정제하여 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(2E,5E)-7-메톡시-3,7-디메틸-2,5-옥타디에닐]칼콘(4,2',4'-trihydroxy-3'-[(2E,5E)-7-methoxy-3,7-dimethyl-2,5-octadienyl]chalcone)(이하 화학식 1)(2.0 mg)을 수득하였다.
- [0066] **1-6. 각 화합물의 분광학적 데이터**

- [0067] 상기 1-5의 분리방법에 의해서 화합물 1, 화합물 2를 분리하였으며, ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY와 같은 1D와 2D NMR을 이용하여 구조를 하기와 같이 분석하였다. 화합물 1은 신규물질이며, 화합물 2는 신선초에서 분리보고된 적이 있는 물질로 기존 문헌(Ji Eun Shin et al., Chalcones Isolated from *Angelica keiskei* and Their Inhibition of IL-6 Production in TNF- α -stimulated MG-63 Cell, *Arch Pharm Res Vol 34, No 3, 437-442, 2011*)과 비교하여 구조를 동정하였다.
- [0068] **화학식 1**
- [0069] 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(2E,5E)-7-메톡시-3,7-디메틸-2,5-옥타디엔일]칼콘 (4,2',4'-trihydroxy-3'-[(2E,5E)-7-methoxy-3,7-dimethyl-2,5-octadienyl] chalcone)
- [0070] 황색, 무정형 분말;
- [0071] UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 368 (4.58) nm;
- [0072] ^1H -NMR (CDCl_3 , 400MHz): δ 13.86 (1H, s, OH-2'), 7.84 (1H, d, J = 15.6 Hz, H- β), 7.73 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6'), 7.57 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2 and H-6), 7.46 (1H, d, J = 15.6 Hz, H- α), 6.88 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3 and H-5), 6.42 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-5'), 5.54 (1H, dt, J = 15.7, 6.1 Hz, H-5''), 5.64 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-6''), 5.35 (1H, br t, J = 7.0 Hz, H-2''), 3.50 (2H, d, J = 7.0 Hz, H₂-1''), 3.14(3H, s, OCH₃-7''), 2.77 (2H, d, J = 6.1 Hz, H₂-4''), 1.82(3H, brs, H₃-10''), 1.26 (6H, s, H₃-8'' and H₃-9'');
- [0073] ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100MHz): δ 192.2 (C, C=O), 163.9 (C, C-2'), 161.4 (C, C-4'), 157.9 (C, C-4), 144.0 (CH, C- β), 137.7 (C, C-3''), 137.3 (CH, C-6''), 130.6 (CH, C-2 and C-6), 129.2 (CH, C-6'), 127.8 (C, C-1), 127.7 (CH, C-5''), 122.1 (CH, C-2''), 118.1 (CH, C- α), 116.0 (CH, C-3 and C-5), 114.12 (C, C-3', interchangeable with C-1'), 114.07 (C, C-1', interchangeable with C-3'), 107.7 (CH, C-5'), 74.9 (C, C-7''), 50.3 (CH₃, OCH₃-7''), 42.7 (CH₂, C-4''), 25.8 (CH₃, C-8'' and C-9''), 21.8 (CH₂, C-1''), 16.3(CH₃, C-10'');
- [0074] HRESIMS m/z 445.1986 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₆H₃₀O₅Na, 445.1985).
- [0075] **화학식 2**
- [0076] 4,2',4'-트리하이드록시-3'-[(6E)-2-하이드록시-7-메틸-3-메틸렌-6-옥테닐]칼콘(4,2',4'-trihydroxy-3'-[(6E)-2-hydroxy-7-methyl-3-methylene- 6-octenyl]chalcone)
- [0077] 황색, 무정형 분말;
- [0078] $[\alpha]_{\text{D}}^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH);
- [0079] HRESIMS m/z 409.2012 [M + H]⁺ (calcd for C₂₅H₂₉O₅, 409.2010).
- [0080] **실시예 2. HSP25 프로모터 어세이**
- [0081] 인간 폐암 세포주인 NCI-H460 세포를 1×10^5 개가 되도록 12 웰 플레이트에 분주하고 24시간 동안 배양하였다.
- [0082] HSP25(인간 HSP27의 설치류 형(murine form)) 프로모터 유전자를 루시퍼라제 리포터 벡터에 삽입하여 구축물(construct)을 준비하고, 이를 상기 배양된 NCL-H460 세포에 형질감염시켰다. 그 후 화학식 1의 화합물, 화학식 2의 화합물, 및 HSP 유도 활성이 있는 것으로 알려진 셀라스트롤(celastrol)(양성 대조군)을 각각 10 μM 씩 세포에 처리하고 5시간 후 세포를 수확하였다. 한편 음성 대조군(control) 세포에는 아무런 처리도 하지 않고 배양 후 수확하였다.
- [0083] 수확된 세포를 용해하고, 용해된 세포(cell lysate)의 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 측정된 루시퍼라제 활성은 β -갈락토시다제 발현(Promega)으로 정규화하였다. 상기 실험을 3회 실시하여, 결과를 평균 $\pm$ SD로 나타내

었다. 대조군과 실험군 사이의 차이의 통계적 유의성은 스튜던트 T 검정으로 확인하였다.

[0084] 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1에서 화학식 1 및 2의 화합물이 대조군과 비교하여 HSP25 프로모터 유전자 활성을 크게 증가시켰음을 확인할 수 있다.

[0085] **실시예 3. HSF1, HSP27 및 HSP70에 대한 RT-PCR**

[0086] L132 인간 폐 섬유아세포를 준비한 후, 화합물 2를 상기 세포에 2 μ M 처리하였다.

[0087] 상기 세포를 0, 3, 6 시간 배양한 후 TRIzol (Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 추출하고, ReverTra Ace RT-PCR 키트(Toyobo, Osaka, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하고, HSF1, HSP70, HSP27, 및 β -actin 전사물 수준을 역전사중합효소연쇄반응(RT-PCR)(GenDEPOT, Barker, TX, USA)으로 측정하였다. GAPDH를 내부 대조군 유전자로서 사용하여, NIH ImageJ program로 상대적 유전자 발현 수준을 GAPDH mRNA 수준에 대해 정규화하였다. 상기 실험을 3회 실시하여, 결과를 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 차이의 통계적 유의성은 스튜던트 T 검정으로 확인하였다.

[0088] RT-PCR 결과는 도 2 좌측 도에 나타내었고, 이를 도 2 우측 도에 그래프로 나타내었다. 도 2에서 화학식 2의 화합물이 3시간 후에 HSP27과 HSP70의 발현을 각각 1.5배 및 5.0배 증가시켰음을 알 수 있다.

[0089] **실시예 4. 웨스턴 블롯 분석**

[0090] L132 인간 폐 섬유아세포를 준비한 후, 화학식 2의 화합물을 상기 세포에 2 μ M 처리하였다.

[0091] 상기 세포를 각각 0, 3, 6 시간 배양한 후, 세포를 용해시키고 총 단백질을 추출하여 SDS-PAGE로 분리하고 니트로셀룰로오스 막(GE Healthcare, Little Chalfont, UK)으로 옮긴 후, HSF1, HSP70, HSP27, 및 β -actin에 각각 특이적인 항체(모두 Santa Cruz Biotechnology(Danvers, MA, USA)로부터 구입)로 블롯팅하였다. 그리고 ECL 검출 시스템(Thermo Scientific, Rochford, IL, USA)으로 확인하였다. 상기 실험을 3회 실시하여, 결과를 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 차이의 통계적 유의성은 스튜던트 T 검정으로 확인하였다.

[0092] 결과는 도 3 좌측 도에 나타내었고, 도 3 우측 도에 이를 그래프로 나타내었다. 도 3에서 화학식 2의 화합물이 HSF1, HSP70 및 HSP27의 발현을 유의하게 증가시켰음을 알 수 있다. 시간이 지날수록 발현 정도가 증가했다. 6시간 경과 후 HSF1은 4.3배, HSP70은 1.5배, HSP27은 4.6배 발현을 증가시켰다.

[0093] **실시예 5. 세포 생존율(cell viability) 어세이**

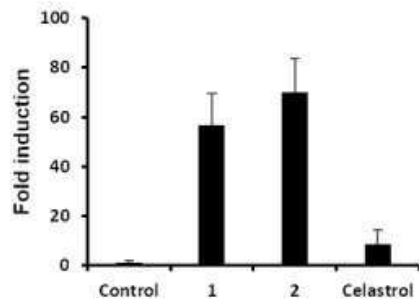
[0094] 셀라스트롤은 HSP 유도 활성이 있지만 세포독성이 강한 것으로 알려져 있다.

[0095] L132 인간 폐 섬유아세포를 배양한 후, 화학식 2의 화합물 및 셀라스트롤을 각각 1, 2, 4, 8 μ M 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 MTT 시약(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)을 0.5 mg/mL 포함하는 PBS로 배지를 교체하였다. 그 후 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 배양한 후, 100 μ L의 DMSO를 첨가하여 포르마잔 결정을 용해하고, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선을 사용하여 흡광도를 생존 세포 수로 변환하고, 음성 대조군(DMSO)에 대한 상대적 비율로서 세포 생존율을 계산하였다. 상기 실험을 3회 실시하여, 결과를 평균 $\pm$ SD로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 차이의 통계적 유의성은 스튜던트 T 검정으로 확인하였다.

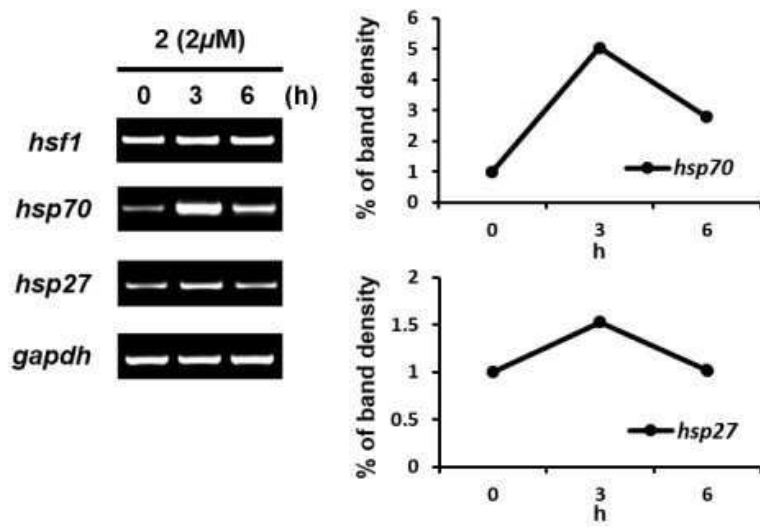
[0096] 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에서 셀라스트롤과 비교하여 본 발명의 화학식 2의 화합물이 세포 생존율을 감소시키는 정도가 현저히 낮음을 알 수 있었다.

도면

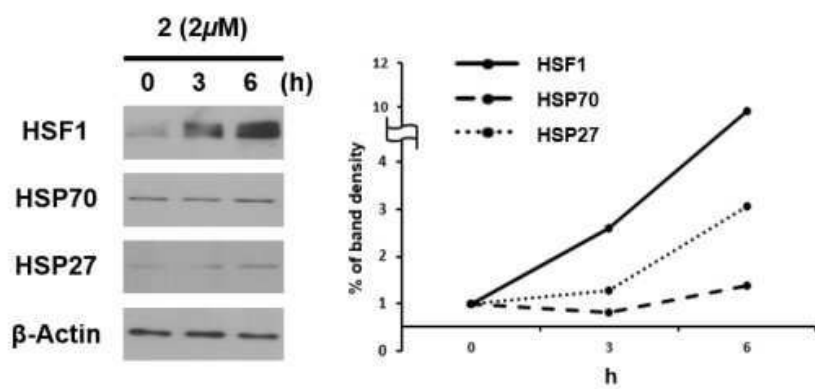
도면1



도면2



도면3



도면4

