(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월05일
(11) 등록번호 10-1636210
(24) 등록일자 2016년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 319/20 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/09 (2006.01) *A61K 31/357* (2006.01)
C07C 43/263 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 319/20 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0086130
(22) 출원일자 2015년06월17일
심사청구일자 2015년06월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140128779 A*
KR1020140128781 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
백남인
경기 화성시 동탄중앙로 51, 629동 901호 (반송동, 동탄나루마을한화꿈에그린아파트)
서경화
경상남도 통영시 산양읍 영운리 이운길 525번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

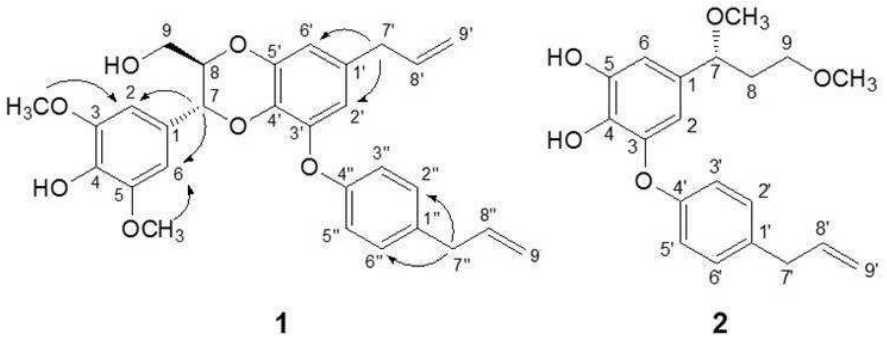
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 **세스퀴네오리그난, 네오리그난 및 이를 포함하는 항염증 또는 뇌세포 보호용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 (2*S*,3*S*)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올, (1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올, 상기 화합물을 포함하는 항염증 또는 뇌세포 보호용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명에서 황목련으로부터 유래된 상기 두 화합물은 염증반응과정에서 중요한 역할을 수행하는 산화질소의 생성을 억제할 수 있고, 신경독성물질인 글루타메이트로 유발된 신경세포 사멸을 보호할 수 있으므로, 항염증 또는 뇌세포 보호용 조성물 및 건강기능식품의 유효성분으로 사용될 수 있다

대 표 도 - 도3



1 2

(52) CPC특허분류
A61K 31/09 (2013.01)
A61K 31/357 (2013.01)
C07C 43/263 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
(72) 발명자
김윤철
대전 서구 둔산로 155, 118동 402호 (둔산동, 크로바아파트)
이동성
전북 전주시 완산구 강변로 306, 102동 702호 (중화산동2가, 광진햇빛찬아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 S2091482
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 중소기업청
연구사업명 중소기업기술혁신개발사업
연구과제명 산가요록 전통발효물의 Microbial Metabolomics를 이용한 기능성 화장품소재개발
기 여 율 1/1
주관기관 서울화장품
연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

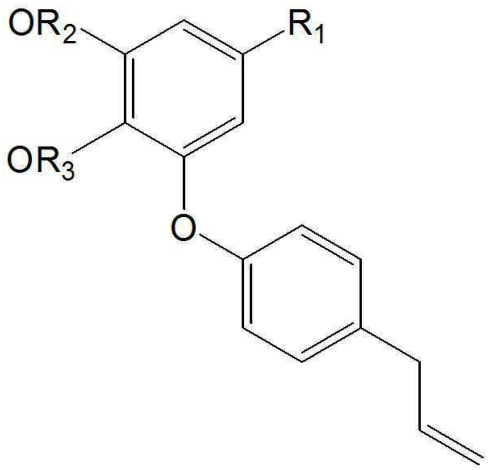
명 세 서

청구범위

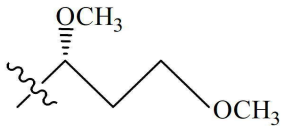
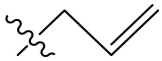
청구항 1

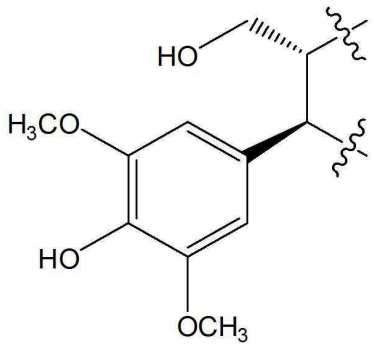
하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

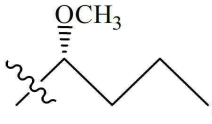
[화학식 1]



상기 식에서,

R_1은  또는  이며,

R_2와 R_3는 서로 연결되어  를 형성하거나,

R_1은  이며,

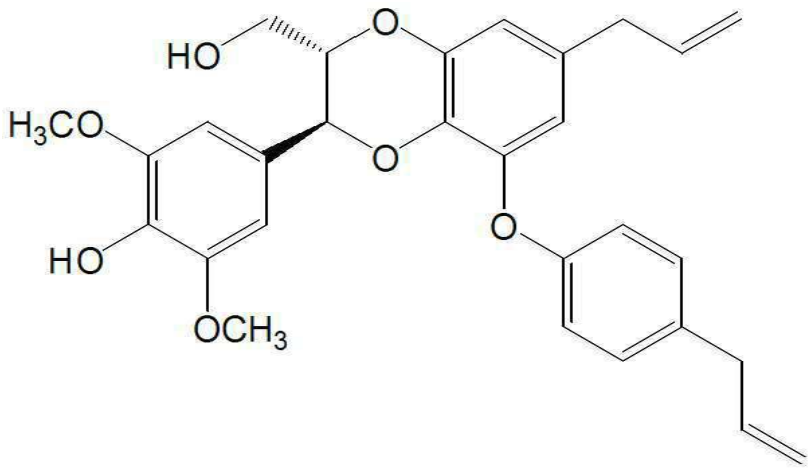
R_2와 R_3는 모두 -H이다.

청구항 2

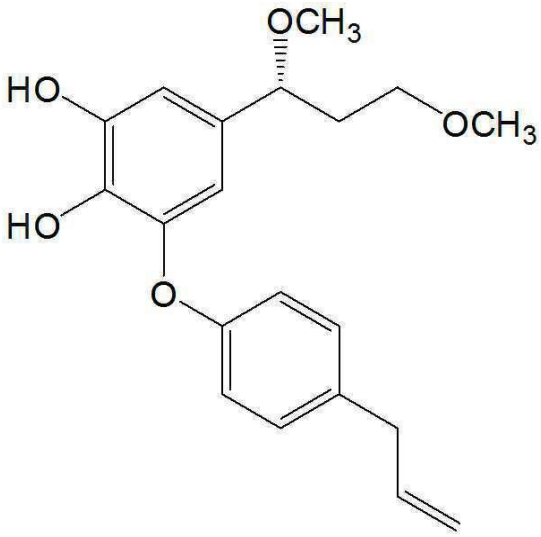
제1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 (2*S*,3*S*)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올 또는 하기 화학식 3으로 표시

되는 (1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올인 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은 황목련의 추출물 또는 분획물로부터 유래된 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

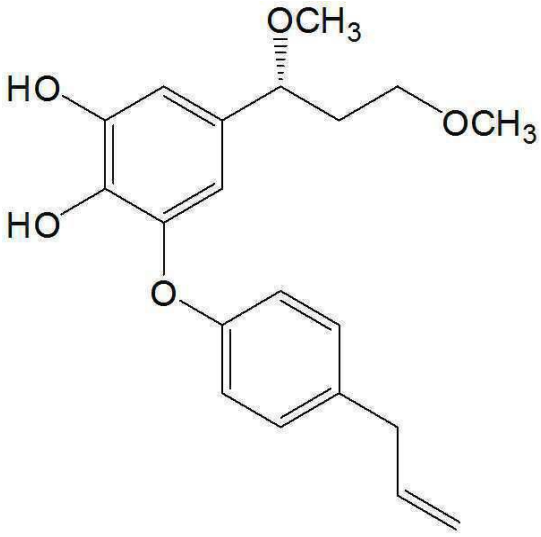
청구항 4

제3항에 있어서, 상기 추출물은 황목련을 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출된 것인, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

하기 화학식 3으로 표시되는 (1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증용 약학적 조성물.

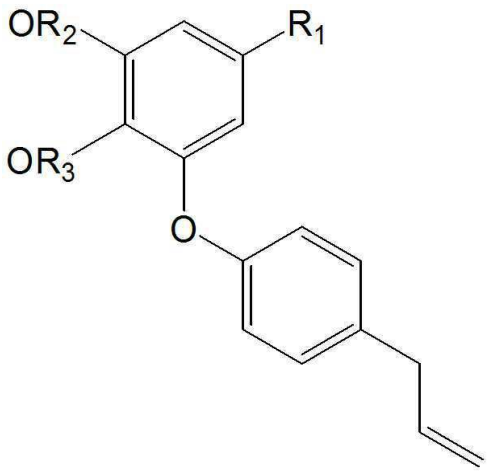
[화학식 3]



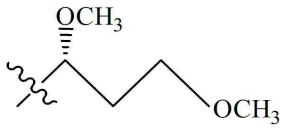
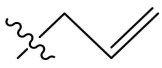
청구항 6

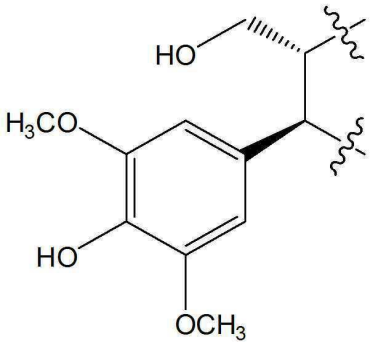
하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 뇌 신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]

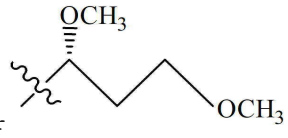


상기 식에서,

R_1은  또는  이며,



R_2와 R_3는 서로 연결되어 를 형성하거나,



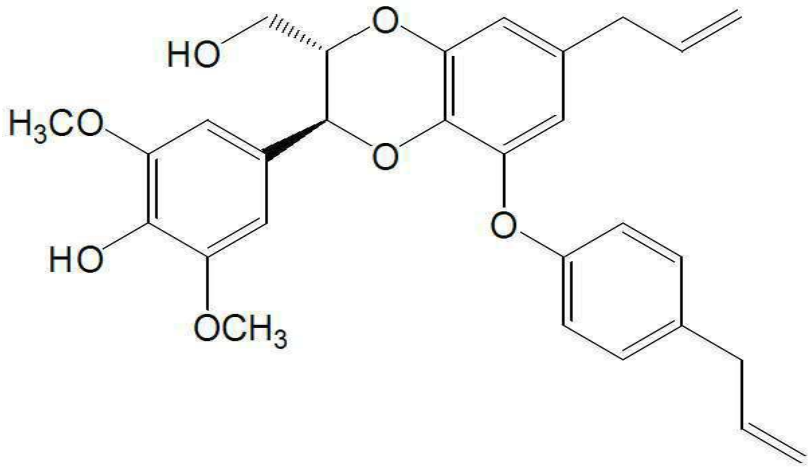
R_1은 이며,

R_2와 R_3는 모두 -H이다.

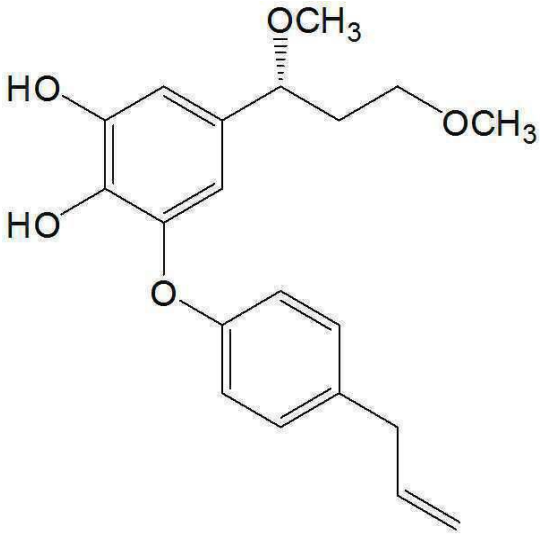
청구항 7

제6항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 (2*S*,3*S*)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올 또는 하기 화학식 3으로 표시되는 (1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올인 것인, 조성물.

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 8

제6항에 있어서, 상기 화합물은 황목련의 추출물 또는 분획물로부터 유래된 것인, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 추출물은 황목련을 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합 용매로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출된 것인, 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 산화질소의 생성을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 신경세포 손상을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 신경세포 손상은 글루타메이트에 의하여 야기되는 것인, 조성물.

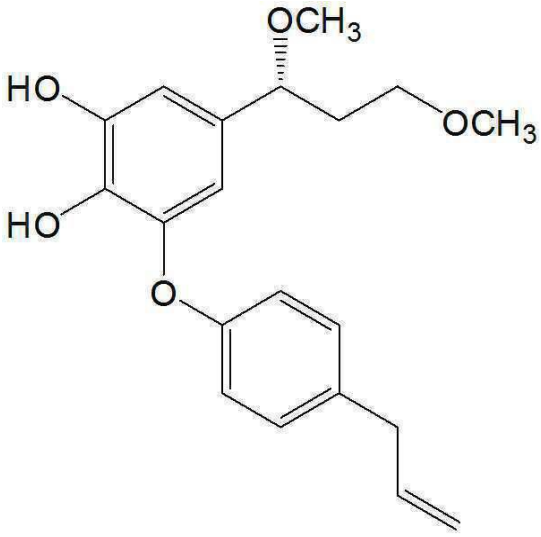
청구항 13

제6항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 14

하기 화학식 3으로 표시되는 (1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증용 건강기능식품.

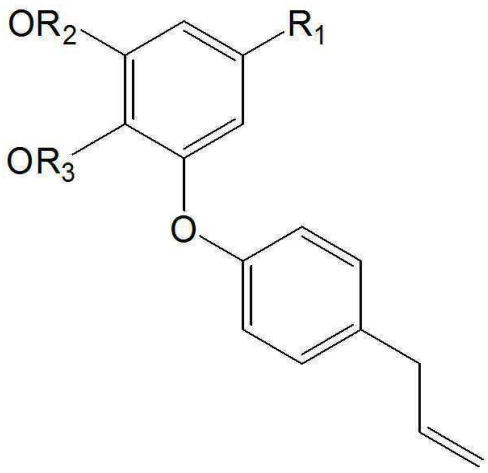
[화학식 3]



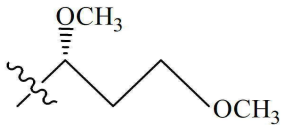
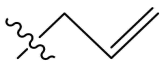
청구항 15

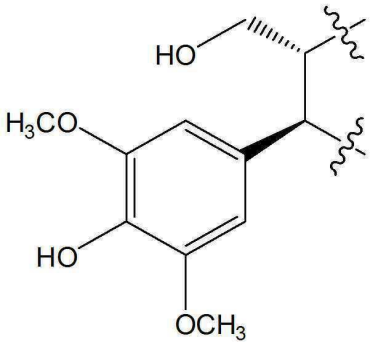
하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 뇌 신경 질환의 개선용 건강기능식품.

[화학식 1]

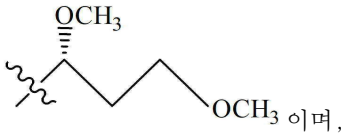


상기 식에서,

R_1은  또는  이며,



R_2와 R_3는 서로 연결되어 를 형성하거나,



R_1은 이며,

R_2와 R_3는 모두 -H이다.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 (2S,3S)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올, (1R)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올, 상기 화합물을 포함하는 항염증 또는 뇌세포 보호용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증반응은 조직의 손상, 외부의 자극 또는 다양한 감염원에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나로, 혈관과 체액 내의 각종 염증 매개 인자 및 다양한 면역 세포의 유기적 상호작용으로 인한 효소 활성화, 염증매개물질 분비, 세포 침윤 및 체액 삼출, 순환 장애, 조직의 변질 및 과증식 등 일련의 복합적인 병리 현상이다. 이러한 염증반응은 활성화된 면역세포에 의해 일어나는 일련의 면역반응이다. 세균, 바이러스 등을 포함한 미생물 및 생체의 이물질 등이 생체로 유입되면, 숙주세포는 감염을 극복하기 위해 염증반응의 원인이 되는 사이토카인 등의 인자를 분비하여 염증반응을 유발시킨다. 그리고 이러한 미생물 및 생체의 이물질 등이 면역세포에 의해 인식이 되면 면역세포가 활성화되고, 활성화된 면역세포에서도 염증반응의 원인이 되는 다양한 인자를 분비하여 염증반응을 유발한다고 알려져 있다.

[0003] 또한, 생체에 있어서 염증의 발생 원인으로서는 다양한 생화학적인 현상이 관여하고 있다. 대식세포(Macrophage)는 다양한 기능을 가진 세포로, 화학적 자극에 의하여 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 산화질소(NO)를 생성하여 염증반응에서 중요한 역할을 한다. NOS는 염증, 혈관 확장, 신경전달, 종양세포와 신체의 항상성을 조절하는 중요한 효소로 L-아르기닌(L-arginine)으로부터 NO를 생성하며, 이에 대해 여러 만성질환을 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0004] 염증반응의 유도 물질들 중에서 LPS(lipopolysaccharide)는 백혈구와 같은 면역세포와 상호작용을 하며, 단핵세포와 대식세포들에서 iNOS를 활성화시키고, 이에 의해 산화질소를 생성시켜 염증 반응에 있어서 중요한 역할을 하고 있다(Korhonen R. et al., Curr Drug Targets Inflamm Allergy., 4, pp471-79, 2005). 또한, LPS는 그람음성 세균의 외막(outer membrane)에 존재하는 엔도톡신(endotoxin)이며, TLR4(tolllike receptor 4)와의 결합은 IL-6(interleukin-6) 및 케모카인(chemokines) 등 많은 사이토카인 유전자의 활성화를 이끄는 신호전달을 개시하고, 이에 의해 염증을 유도한다. 특히 인터페론γ, TNF-α와 같은 사이토카인 자극에 의해 발현되는 유도성 질소산화물 합성효소(iNOS)는 장시간 동안 다량의 질소산화물(NO)을 생성한다.

[0005] 대부분의 염증 질환의 치료제로서 널리 사용되고 있는 제제인 비스테로이드성 소염제(non-steroidal anti-

inflammatory drugs, NSAIDS)는 시클로옥시게나제(cyclooxygenase, COX)라고 하는 아라키돈산(arachidonic acid)로부터 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생합성에 관여하는 효소 활성을 억제함으로써, 항염증 작용을 나타내는데, 주 치료작용 외에 위장관 장애, 간장애, 신장애 등의 심각한 부작용을 야기하므로 장기간의 사용에 있어서 제약이 따르는 실정이다. 따라서, 부작용이 거의 없어 장기간 사용하는데 무리가 없으면서 항염증 효능에 탁월한 새로운 소염 진통제의 개발이 널리 요구되고 있다.

[0006] 이러한 부작용이 없으면서 NO 생성을 억제할 수 있는 항염증 치료제 개발과 관련하여, 천연물로부터 유래되어 생체에 대한 안전성이 확보되면서도, NO의 생성을 억제할 수 있는 성분이 규명되었다. 예를 들어, 일본공개특허 제2000-319154호에는 다양한 천연물로부터 유래된 카페산, 클로로겐 산, 계피산, p-쿠말산, 헤스페리딘, 로스마린산 등의 페닐프로파노이드 화합물이 피부염증을 억제할 수 있음이 개시되어 있다. 그러나, 천연물로부터 유래된 성분에 대한 연구는 아직 초기단계에 불과하기 때문에, 보다 다양한 성분의 개발이 요구되고 있다.

[0007] 최근에는 신경세포독성에 대한 연구가 많이 진행되어 작용기전들이 밝혀지고 있지만 신경세포독성 저해제는 그리 많이 개발되지 못한 상태이다. 특히 뇌졸중 후유증의 신경세포독성 저해제에 대한 연구가 많이 진행되어 뇌허혈시 글루타메이트의 과량분비 및 NMDA(N-methyl-D-aspartate) 수용체 작용에 의한 세포내 칼슘의 과다 유입 및 유리기 산소발생에 의한 세포병변이 주 작용기전으로 알려져 있어, 이에 대한 NMDA 수용체 억제제 및 유리기 산소 스캐빈져에 대한 연구가 많이 진행되어 오고 있다.

[0008] 한편, 신경질환의 예인 뇌졸중(중풍, 발작)은 뇌혈류의 갑작스런 차단 혹은 외상 등에 의한 뇌동맥 부위의 출혈로 인하여 유발된 국소성의 신경장애를 일으키는 질환으로, 후속적인 뇌기능의 결손, 및 이에 따른 신경적 증상 및 정신적 증상을 수반하는 질환이다. 뇌졸중 치료에 대한 연구가 진행된 결과, 지금까지 BFGF(basic fibroblast growth factor)등과 같은 신경영양성 인자(neurotrophic factor), NMDA(N-methyl-D-aspartate) 수용체 길항제 등이 뇌졸중의 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.

[0009] 이 중, 흥분성 아미노산 수용체인 NMDA는 허혈성 뇌졸중, 지연성 발작, 저혈당 또는 저산소 유발성 허혈 및 급성 뇌외상 등으로 인하여 야기된 뇌신경 세포의 손상과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 뇌졸중과 같은 뇌질환에서 나타나는 뇌신경세포의 사멸은 신경전달 물질인 글루타민산염(glutamate)에 의하여 유발된다. 정상상태에서는 적정 농도로 분비되는 글루타민산염이 신경 전달 물질로서의 기능을 수행하지만 비정상적인 상태, 즉 뇌허혈 상태에서는 과잉 발현되어 신경세포의 사멸을 유발하는 흥분독성(excitotoxicity)을 일으켜 결국 뇌졸중과 같은 병적인 상태를 유발한다. 즉, 뇌졸중으로 인하여 뇌신경세포는 글루타민산염을 과다 분비하고 이는 NMDA 수용체 및 non-NMDA 수용체와 연계된 이온채널을 활성화시켜 세포밖의 Ca^{2+}을 세포 내로 유입시킴으로써, 신경세포를 죽음에 이르게 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 이러한 신경세포의 손상 또는 괴사는 뇌졸중, 알츠하이머병, 파킨슨 병에 이르는 여러 가지 신경계 질환의 주원인으로 알려져 있기 때문에 신경세포 독성에 관한 연구가 절실한 실정이다.

[0010] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 천연물로부터 유래된 우수한 항염증 및 신경세포 보호효과를 갖는 신규 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 황목련으로부터 유래된 2종의 신규화합물을 분리 및 규명하였고 상기 화합물의 항염증 및 신경세포 보호 효과를 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

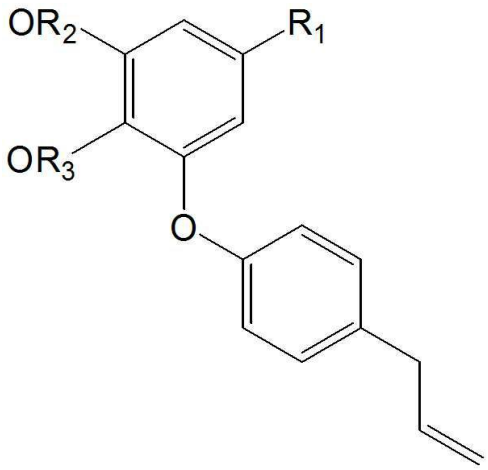
[0012] 본 발명의 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증 또는 뇌세포 보호용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증 또는 뇌세포 보호용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

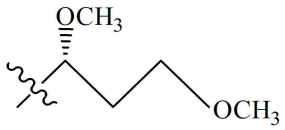
과제의 해결 수단

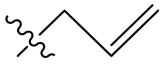
[0014] 상기 과제를 해결하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0015] [화학식 1]

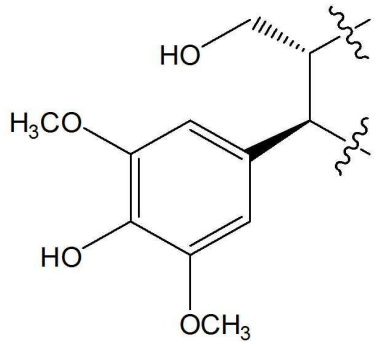
[0016] 

[0017] 상기 식에서,

[0018] R_1은 

또는  이며,

[0019] R_2와 R_3는 모두 -H이거나,

[0020] 또는 R_2와 R_3는 서로 연결되어 

를 형성한다.

[0021] 본 발명에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 세스퀴네오리그난 계열의 화합물로, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 화학식 2로 표시되는 (2S,3S)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올((2S,3S)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-7-(2-propen-1-yl)-5-[4-(2-propen-1-yl)phenoxy]-1,4-benzodioxin-2-methanol)일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 네오리그난 계열의 화합물로, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로 화학식 3으로 표시되는 (1R)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올((1R)-5-(1,3-dimethoxypropyl)-3-[4-(2-propen-1-yl)phenoxy]-1,2-benzenediol)일 수 있다.

[0023] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 황목련의 추출물 또는 분획물로부터 유래된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 추출물은 황목련 열매를 대상으로 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트 및 이들의 혼합용매

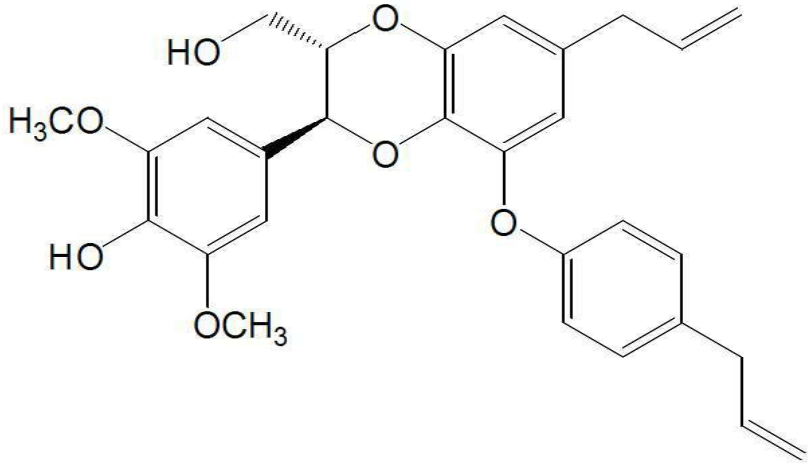
로 구성된 군으로부터 선택되는 용매로 추출될 수 있다. 이에 제한되지 않지만, 보다 구체적으로, 메탄올을 용매로 사용하여 추출하여 수득한 결과물일 수 있으며, 상기 결과물은 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물 등을 포함한다.

[0024] 본 발명의 용어 "분획물"이란 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 본 발명에서는 구체적으로 상기 황목련의 추출물을 용매 분획법, 한외여과 분획법, 크로마토그래피 분획법 등의 다양한 방법으로 분획한 결과물이 될 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 황목련 열매의 메탄올 추출물을 수득한 후, 이의 에틸아세테이트 분획물을 수득한 다음, 상기 분획물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피(TLC), ODS 칼럼 크로마토그래피 등을 조합한 방법에 적용하여 2개의 활성성분(화합물 1 및 화합물 2)을 수득하였다(실시예 2 및 실시예 3). 상기 수득한 각 활성성분을 다양한 분석방법에 적용하여 동정한 결과, 화합물 1은 (2S,3S)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올, 화합물 2는 (1R)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올로 동정되었고, 각각은 오보바타리그난 A(obovatalignan A), 오보바타리그난 B(obovatalignan B)로 명명하였다(실시예 3).

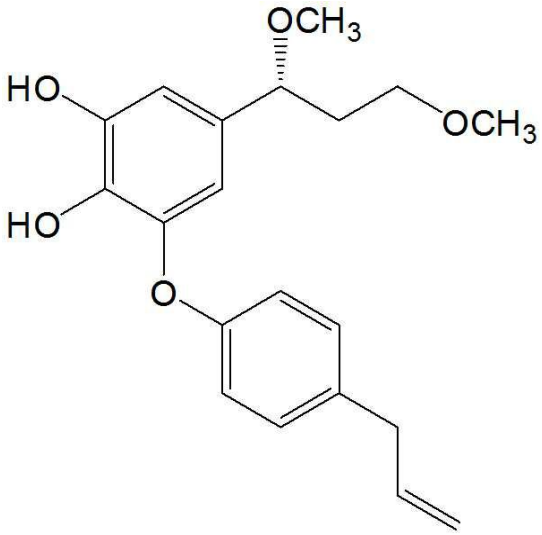
[0026] 본 발명의 용어 "(2*S*,3*S*)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올"이란, 황목련으로부터 유래되고 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 의미한다. 상기 화합물은 황목련과 같은 천연 공급원으로부터 분리할 수 있으나 이에 한정되지 않고 당업계에 공지된 방법으로 화학적으로 합성하거나, 시판되는 물질을 사용할 수 있다.

[0027] [화학식 2]

[0028] 

[0029] 본 발명의 용어 "(1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올"이란, 황목련으로부터 유래되고, 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 의미한다. 상기 화합물은 황목련과 같은 천연 공급원으로부터 분리할 수 있으나 이에 한정되지 않고, 당업계에 공지된 방법으로 화학적으로 합성하거나, 시판되는 물질을 사용할 수 있다.

[0030] [화학식 3]

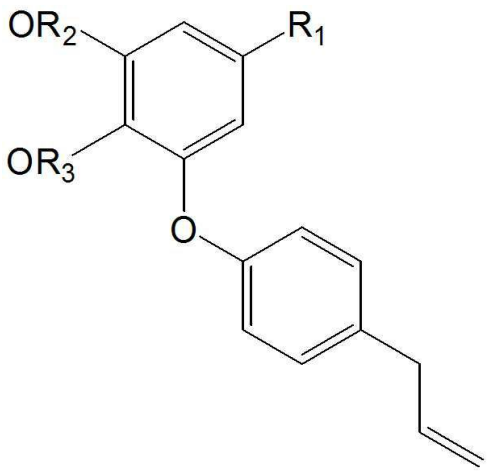


[0031]

[0032] 본 발명의 용어 “약학적으로 허용가능한 염”이란, 양이온과 음이온이 정전기적인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 통상적으로 금속염, 유기 염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와의 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.

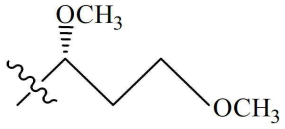
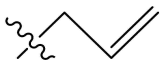
[0033] 다른 양태로서 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증 또는 뇌세포 보호용 약학적 조성물을 제공한다.

[0034] [화학식 1]

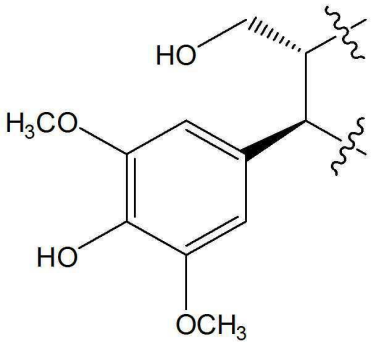


[0035]

[0036] 상기 식에서,

[0037] R_1은  또는  이며,

[0038] R_2와 R_3는 모두 -H이거나,

[0039] 또는 R_2와 R_3는 서로 연결되어  를 형성한다.

[0040] 본 발명에서 상기 항염증 조성물은 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 일 수 있다. 구체적으로 산화질소의 생성을 억제함으로써 염증성 질환을 예방 및 치료하는 것일 수 있다.

[0041] 상기 염증성 질환은 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미로서, 이에 제한되지는 않으나, 알러지성 천식, 알러지성 비염, 알러지성 점막염, 두드러기 및 아나필락스(anaphylax)를 포함하는 알러지성 질환, 경피증(systemic sclerosis), 피부근염(dermatomyositis) 및 포함체 근육염(inclusion body myositis)을 포함하는 근병증, 관절염, 아토피성 피부염, 건선, 천식, 다발성 경화증, ssRNA 및 dsRNA 바이러스 감염증, 패혈증, 다발성 연골염, 경피증, 습진, 통풍, 치주질환, 베체트 증후군, 부종, 맥관염, 가와사키병, 당뇨병성 망막염, 자가 면역 췌장염, 혈관염, 사구체 신염, 급성 및 만성 기관지염, 및 인플루엔자 감염증 일 수 있다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물 2((1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올)가 마우스 유래 대식세포의 일종인 RAW 264.7 세포에서의 산화질소 생성을 양성대조군과 유사한 수준으로 억제하는 것을 확인하였다(실시예 5).

[0043] 이처럼 상기 황목련으로부터 유래된 화학식 3으로 표시되는 화합물 2((1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올)는 염증반응과정에서 중요한 역할을 수행하는 산화질소의 생성을 억제할 수 있으므로, 항염증 치료제로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0044] 본 발명에서 상기 뇌세포 보호용 조성물은 뇌 신경 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물 일 수 있다. 상기 뇌 신경 질환은 내인성 또는 외인성 독성물질에 의하여 야기되는 뇌세포 손상과 관련된 질환일 수 있으며, 상기 뇌세포 손상이 수반된 질환일 수 있고, 퇴행성 뇌 신경 질환일 수 있다. 구체적으로 신경세포의 손상을 억제함으로써 뇌 신경 질환을 예방 및 치료하는 것일 수 있다.

[0045] 상기 뇌 신경 질환은 뇌졸중, 알츠하이머, 헌팅턴병, 파킨슨병, 치매, 중풍, 근위축성측색경화증, 치매(루이소체 치매, 전두측두엽성 치매, 진행성핵상마비), 크로이츠펠트-야곱병(Creutzfeldt-Jakob disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 길랑-바레 증후군 (Guillain-Barre syndrome) 등 일 수 있다.

[0046] 상기 독성물질은 글루타메이트(glutamate), 베타 아밀로이드 플라크 등이 될 수 있다.

[0047] 상기 글루타메이트(glutamate)는 아미노산으로, 중추신경계에서 주요한 흥분성 신경전달물질이다. 과도한 글루타메이트의 농도는 N-아세틸 시스테인(N-acetyl cystein)의 흡수를 억제하여 산화적 스트레스를 유발시킨다. 생쥐의 해마 유래 세포주인 HT22 세포주는 글루타메이트 수용체가 없는 세포주로서 글루타메이트로 처리 시 신경흥분 독성이 아닌 산화적 스트레스로 인하여 세포가 손상을 받으며, 산화적 스트레스로 인한 퇴행성 뇌질환 연

구에 있어서 유용한 실험 모델 중의 하나로 알려져 있다.

[0048] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 마우스의 해마 세포의 일종인 HT22 세포에서 글루타메이트로 유발된 세포사멸에 대하여 화학식 2로 표시되는 화합물 1((2S,3S)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올) 및 화학식 3으로 표시되는 화합물 2((1R)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올)가 양성대조군보다 높은 수준의 세포보호 효과를 가짐을 확인하였다(실시예 4).

[0049] 이처럼 상기 황목련으로부터 유래된 화합물 1((2*S*,3*S*)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올) 및 화합물 2((1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올)는 신경독성물질인 글루타메이트로 유발된 신경세포사멸을 보호할 수 있으므로, 뇌세포 보호용 치료제로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0050] 상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 항염증 또는 뇌세포 보호용 약학적 조성물의 형태로 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 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 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

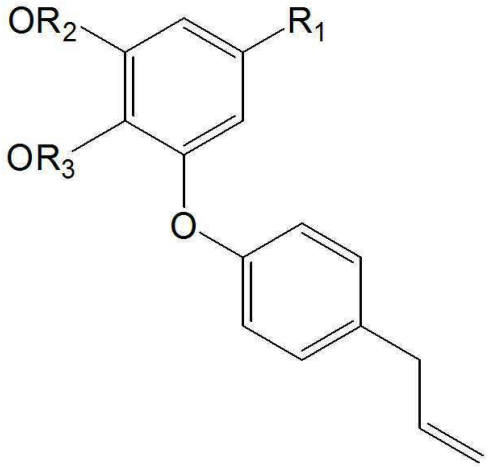
[0051] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0052] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0053] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령,체중, 성별, 기왕력 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 구체적으로, 1일 0.01 mg/kg 내지 1000 mg/kg, 보다 구체적으로 10 mg/kg 내지 500 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

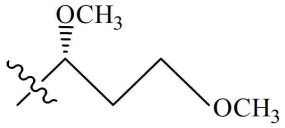
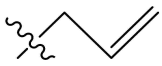
[0054] 다른 양태로서 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 항염증 또는 뇌세포 보호용 건강기능식품을 제공한다.

[0055] [화학식 1]

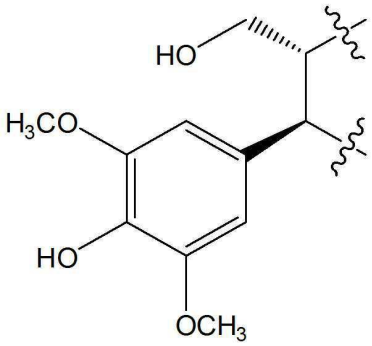


[0056]

[0057] 상기 식에서,

[0058] R_1은  또는  이며,

[0059] R_2와 R_3는 모두 -H이거나,



[0060] 또는 R_2와 R_3는 서로 연결되어 를 형성한다.

[0061] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 항염증 또는 뇌세포 보호 효과를 갖기 때문에 건강기능식품 조성물에 첨가할 수 있다.

[0062] 상기 건강기능식품 조성물은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 위생)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0063] 또한, 상기 건강기능식품의 형태 및 종류에는 특별한 제한은 없으며, 건강기능식품의 형태는 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등일 수 있고, 건강기능식품의 종류는 버터, 요구르트, 치즈를 포함한 유제품, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 유산균 제제, 발효유, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있다.

[0064] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 건강기능식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0065] 상기한 것 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

발명의 효과

[0066] 본 발명에서 황목련으로부터 유래된 (2S,3S)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올 및 (1R)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올은 염증반응과정에서 중요한 역할을 수행하는 산화질소의 생성을 억제할 수 있고, 신경독성물질인 글루타메이트(glutamate)로 유발된 신경세포 사멸을 보호할 수 있으므로, 항염증 또는 뇌세포 보호용 조성물 및 건강기능식품의 유효성분으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1a은 화합물 1(오보바타리그난 A)의 ^{1}H NMR의 분석 결과를 나타낸 그래프이고, 도 1b는 화합물 1(오보바타리그난 A)의 ^{13}C NMR의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2a은 화합물 2(오보바타리그난 B)의 ^{1}H NMR의 분석 결과를 나타낸 그래프이고, 도 2b는 화합물 2(오보바타리그난 B)의 ^{13}C NMR의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 황목련으로부터 분리된 화합물 1, 2 및 화합물 1에서의 NOESY 상관관계(→)를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0069] **실시예 1. 재료, 기기 및 시약**

[0070] **1-1. 재료**

[0071] 본 실시예에서 사용한 황목련(*Magnolia obovata*)의 열매는 2010년 5월에 한국 용인에 있는 경희대학교에서 수집하였고, 경희대의 원예생명공학과(Department of Horticultural Biotechnology) 이승우 교수를 통해 이를 동정하였다. 표본시료 (KHU-NPCL-201009)는 경희대학교의 천연물 화학 실험실에 보관하였다.

[0072] **1-2. 기기 및 시약**

[0073] CD 스펙트럼은 circular dichoism detector를 가진 Applied Photophysics Chirascan를 이용하여 결과를 얻었다. 선광성(optical rotations)은 JASCO P-1010 디지털 편광계를 이용하여 측정하였다. ^{1}H-NMR (400 MHz)과 ^{13}C-NMR (100 MHz)의 스펙트럼은 arian Unity Inova AS-400 FT-NMR 분광기에 기록하였고 화학적인 시프트는 내부표준으로써 테트라메틸실란(tetramethylsilane, TMS)에 근거한 δ(PPM)으로 표시하였다. IR 스펙트럼은 Perkin Elmer Spectrum One FT-IR 분광계를 사용하였다. HR-EIMS는 JEOL JMSAX-700에서 수행하였다. 칼럼 크로마토그래피에서 사용된 수지는 실리카겔(Kiesel gel 60, 230-400 mesh, Merck)와 ODS(LiChroprep RP-18, 40-63 μm, Merck)를 사용하였고 박층 크로마토그래피(TLC) 분석은 Kiesel gel 60 F_{254}과 RP-18 F_{254}s(Merck) 플레이트를 사용하여 수행하였다. 화합물은 UV lamp Spectroline Model ENF-240 C/F(Spectronics Corporation)를 사용

하여 확인하였고 점(spot)은 10 % 황산 수용액을 뿌려주어 열을 가하여 눈으로 볼 수 있도록 하였다.

[0074] 소태아혈청(FBS)은 Hyclone Laboratories로부터 수득하였으며, L-글루타메이트(glutamate), Trolox, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), 및 DMSO는 Sigma Chemical Co에서 구입하였다. RPMI 배지 1640, Dulbecco's modified Eagle's 배지, 및 페니실린, 스트렙토마이신은 GIBCO에서 구입하였다.

[0075] **실시예 2. 황목련 열매의 용매 추출 및 분획**

[0076] 말린 열매(11 kg)에 80 % 메탄올(40 L × 4)을 이용하여 실온에서 24시간 동안 추출하였고 진공상태에서 여과 및 농축시켰다. 메탄올 추출물(740 g)은 물(3.5 L)에 현탁시켰고 그 후, 에틸아세테이트(3.5 L × 4)로 추출하였고 뒤이어 에틸아세테이트 분획물(3.5 L × 4)을 얻기 위해 농축하였다.

[0077] **실시예 3. 황목련 열매 분획물로부터 화합물의 분리 및 동정**

[0078] **3-1. 황목련 열매 분획물로부터 화합물의 분리**

[0079] 상기 에틸아세테이트 분획물 MOE(238 g)은 15개의 분획물(MOE1에서 MOE15)을 n-헥세인-에틸아세테이트(5:1 → 2:1 → 1:2, 각각 2.8 L) → 클로로포름-메탄올-물(6:4:1, 3 L)의 구배로 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(12 × 15 cm)에 적용시켰다. 분획물 MOE5[5.3 g, elution volume/total volume (Ve/Vt) 0.195-0.286]은 실리카겔 칼럼 크로마토그래피[5.0 × 13.5 cm, $CHCl_3$-MeOH (40:1, 4.1 L)]에 적용시켰고 7개의 분획물(MOE5-1에서 MOE5-7)을 수득하였다. 분획물 MOE5-3(3.6 g, Ve/Vt 0.105-0.297)은 실리카겔 칼럼 크로마토그래피[5.0 × 14 cm, n-헥세인-에틸아세테이트 (5:1, 21 L)]에 적용시켰고, 16개의 분획물(MOE5-3-1에서 MOE5-3-16)을 수득하였다.

[0080] 상기 분획물 MOE5-3-12(220 mg, Ve/Vt 0.214-0.257)은 ODS 칼럼 크로마토그래피[3.0 × 5.0 cm, 메탄올-물 (3:2, 5 L)]에 적용시켰고, 29개의 분획물(MOE5-3-12-1에서 MOE5-3-12-29)을 수득하였으며, 이 중 화합물 1[MOE5-3-12-7, 5.0 mg, Ve/Vt 0.060-0.070, TLC (RP-18 F_{254}s) R_f 0.52, 메탄올-물 (7:1)]을 정제하였다.

[0081] 상기 에틸아세테이트 분획물 MOE6(7.6 g, Ve/Vt 0.287-0.450)은 실리카겔 칼럼 크로마토그래피[6.0 × 13 cm, n-hexane-CHC13-MeOH (40:10:1, 21.8 L)]에 적용시켰고, 8개의 분획물(MOE6-1에서 MOE6-8)을 수득하였다.

[0082] 상기 분획물 MOE6-1(452 mg, Ve/Vt 0.000-0.152)은 ODS 칼럼 크로마토그래피[3.5 × 5.5 cm, MeOH-water (5:2 → 3:1 → 4:1 → 6:1, 각각 0.75 L)]에 적용시켰고, 15개의 분획물(MOE6-1-1에서 MOE6-1-15)을 얻었으며 이 중 화합물 2[MOE6-1-9, 10.7 mg, Ve/Vt 0.257-0.300, TLC (RP-18 F_{254}s) R_f 0.66, acetone-MeOH-water (2:13:1)]를 정제하였다.

[0083] **3-2. 분리된 화합물의 동정**

[0084] 황목련 열매로부터 분리 및 정제된 2종의 화합물(화합물 1, 화합물 2)을 NMR, MS, IR 등을 통해 구조를 동정하였다.

[0085] 화합물 1은 HR-EIMS에서 분자 이온 피크 m/z 490.1991을 통해 $C_{29}H_{30}O_7$의 분자식을 가짐을 확인하였다(calc. $C_{29}H_{30}O_7$, 490.1992). 선광성(optical rotation)은 $[\alpha]_D$= + 6.5 (c = 0.11)의 우회전 특징을 보여주었다. 화합물 1의 IR 스펙트럼은 3357, 2921, 1591, 및 1504 cm^{-1}에서 밴드의 존재를 확인하였고 이를 통해 히드록실기,

방향고리 작용기가 존재함을 알 수 있었다. 화합물 1은 마그놀리아닌(magnolianin)과 유사한 ^{1}H와 ^{13}C NMR 스펙트럼을 나타내었고 이를 통해 하나의 오보바톨(obovatol)과 하나의 마그노롤(magnolol) 일종(moiety)으로 이루어진 세스퀴네오리그난(sesquineolignan)임 알 수 있었다. ^{1}H-NMR 스펙트럼(표 1)에서는 사-치환된(tetra-substituted) 벤젠 고리에 의하여 두 개의 메타-커플된(meta-coupled) 방향족 양성자 신호(δ_H 6.64, 1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'; δ_H 6.48, 1H, d, J = 2.0 Hz, H-6'), 하나의 파라-이치환된(para-disubstituted) 벤젠고리에 의하여 4개의 방향족 양성자 신호(δ_H 7.11, 2H, d, J = 8.4 Hz, H-2'', 6''; δ_H 6.92, 2H, d, J = 8.4 Hz, H-3'', 5'') 세트를 확인하였다. 또한, 두 개의 겹치는 올레핀 메틴 양성자 신호(δ_H 5.97, 1H, m, H-8'; δ_H 5.93, 1H, m, H-8''), 두 개의 비닐 메틸렌 양성자 신호(δ_H 5.07, 2H, m, H-9'; δ_H 5.02, 2H, m, H-9'')를 관찰하였다. 고자장 영역의 경우, 두 개의 알릴 메틸렌 양성자 신호(δ_H 3.34, 2H, d, J = 6.4 Hz, H-7''; δ_H 3.24, 2H, d, J = 6.8 Hz, H-7')를 관찰하였다. 종합하여 판단해보면, 상기 데이터는 화합물 1이 오보바톨(obovatol)의 한 분자를 포함하고 있음을 의미한다.

[0086] 대칭적으로 사-치환된(tetra-substituted) 벤젠 고리에 의하여 두 개의 방향족 양성자 신호(δ_H 6.62, 2H, s, H-2, 6), 두 개의 산화된 메틴 양성자 신호(δ_H 4.88, 1H, d, J = 8.4 Hz, H-7; δ_H 3.95, 1H, ddd, J = 8.4, 4.0, 2.4 Hz, H-8), 하나의 산화된 메틸렌 양성자 신호(δ_H 3.65, 1H, dd, J = 12.4, 2.4 Hz, H-9a; δ_H 3.43, 1H, dd, J = 12.4, 4.0 Hz, H-9b), 및 두 개의 메톡시 양성자 신호 (δ_H 3.88, 6H, s)를 관찰하였다. 벗겨진(deshielded) 더블릿 벤질릭(doublet benzylic) 산화된 메틴 양성자 신호(δ_H 4.88, H-7), 더블릿 더블릿(doublet doublet) 산화된 메틴 양성자 신호(δ_H 3.95, H-8)의 더블릿(doublet)은 1,4-디옥세인 고리를 통해 두 페닐프로파노이드 유닛을 연결하였다. 종합하여 생각해보면, 상기 데이터는 화합물 1은 오보바톨(obovatol)과 시린질글리세롤(syringylglycerol) 유닛으로 이루어진 벤조디옥세인-타입의 세스퀴네오리그난(sesquineolignan)임을 보여주었다.

[0087] ^{13}C-NMR 스펙트럼은(표 1) 두 개의 메톡시 신호[δ_C 56.4, (3, 5-OCH_3)]를 포함하는 29개의 탄소 신호를 확인하였고 이를 통해 화합물 1이 세스퀴네오리그난(sesquineolignan)인 것을 확인하였다. 저자장 영역의 경우, 7개의 산화된 올레핀 4차 탄소 신호(δ_C 156.2, C-4''; δ_C 147.3, C-3, 5; δ_C 144.9, C-3'; δ_C 144.5, C-5'; δ_C 135.4, C-4; δ_C 133.6, C-4'), 3개의 올레핀 4차 탄소 신호(δ_C 134.3, C-1''; δ_C 133.0, C-1'; δ_C 127.0, C-1), 10개의 올레핀 메틴 탄소 신호(δ_C 137.5, C-8''; δ_C 136.9, C-8'; δ_C 129.5, C-2'', 6''; δ_C 117.1, C-3'', 5''; δ_C 113.6, C-2'; δ_C 112.7, C-6'; δ_C 104.2, C-2, 6), 및 두 개의 비닐 메틸렌 탄소 신호(δ_C 116.0, C-9'; δ_C 115.7, C-9'')를 관찰하였다. 두 개의 산화된 메틴 탄소 신호(δ_C 78.2, C-8; δ_C 76.5, C-7), 하나의 산화된 메틸렌 탄소 신호(δ_C 61.3, C-9), 두 개의 알릴 메틸렌 탄소 신호(δ_C 39.5, C-7'; δ_C 39.3, C-7'') 또한 관찰하였다. 따라서 상기 데이터는 화합물 1이 에테르 산소 분자(ether oxygen atoms)에 의하여 연결된 세 개의 C_6C_3의 유닛인 것을 보여주었다.

[0088] 또한, gCOSY의 스펙트럼은 δ_H H-7/H-8과 H-8/H-9의 상관관계를 보여주었다. gHMBC 스펙트럼에서 H-2 및 H-6/C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, 및 C-7간의 상관성 피크와 H-7/C-1, C-2, C-6, C-8간의 상관성 피크를 통해 시린질글리세롤 유닛(syringylglycerol unit)이 존재함을 예측하였다. 두 개의 메톡시 그룹의 양성자는 H-2 및 H-6와 함께 NOESY(nuclear overhauser effect spectroscopy) 상관관계를 보여주었고, 그렇기 때문에 두 개의 메톡시 그룹이 C-3과 C-5에 위치함을 알 수 있었다(도 3). 양성자 H-7 및 H-8은 그들의 큰 커플링 상수(J = 8.4 Hz)때문에 디옥세인 고리에서 키랄 중심의 *threo* 배열을 가졌다. 238 nm에서 positive CD Cotton effect에 근거하여 화합물 1은 완전한 7S, 8S 배열을 가지는 것을 알 수 있었다.

[0089] 그러므로, 화합물 1은 (2*S*,3*S*)-2,3-디하이드로-3-(4-히드록시-3,5-디메톡시페닐)-7-(2-프로펜-1-일)-5-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,4-벤조디옥신-2-메탄올 ((2*S*,3*S*)-2,3-dihydro-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-7-(2-propen-1-yl)-5-[4-(2-propen-1-yl)phenoxy]-1,4-benzodioxin-2-methanol)로 동정하였고 새로운 화합물로써 오보바타리그난 A(obovatalignan A)로 명명하였다.

[0090] 화합물 1(*obovatolignan A*) 무정형의 파우더(amorphous powder). $[\alpha]_D^{18}$ = +6.5 (*c* = 0.11, MeOH). IR (CaF_2): 3357, 2921, 1591, 1504 cm^{-1}. ^1H- 및 ^{13}C-NMR: *표 1.* HR-EIMS: 490.1991 ($[M]^+$, $C_{29}H_{30}O_7$; calc. 490.1992).

[0091] 화합물 2는 HR-EIMS의 분자적 이온 피크 m/z 344.1623로부터 $C_{20}H_{24}O_5$의 분자식을 가지는 것을 확인하였다 (calcd. for $C_{20}H_{24}O_5$, 344.1624). 화합물 2는 IR 스펙트럼을 통해 3357, 2928, 1600, 및 1504 cm^{-1} 에서 밴드의 존재를 확인하였다. 상기 결과는 각각 히드록실기, 방향족 고리 작용기를 존재를 보여주었다. ^1H-NMR 스펙트럼(표 1)에서 파라-이치환된(para-disubstituted) 벤젠 고리에 의하여 4개의 방향족 양성자 신호(δ_H 7.14, 2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-2', 6'; δ_H 6.93, 2H, d, *J* = 8.4 Hz, H-3', 5'), 비대칭 사-치환된(tetra-substituted) 벤젠 고리에 의하여 두 개의 메타-커플된(*meta*-coupled) 방향족 양성자 신호(δ_H 6.65, 1H, br. s, H-2; δ_H 6.38, 1H, br. s, H-6), 하나의 겹쳐진 올레핀 메틴 양성자 신호(δ_H 5.97, 1H, m, H-8'), 하나의 비닐 메틸렌 양성자 신호(δ_H 5.09, 2H, m, H-9')를 관찰하였다. 뿐만 아니라, 하나의 산화된 메틸렌 양성자 신호(δ_H 4.07, 1H, br. dd, *J* = 6.4, 6.0 Hz, H-7), 하나의 산화된 메틸렌 양성자 신호(δ_H 3.46, 1H, overlapped, H-9a; δ_H 3.35, 1H, overlapped, H-9b), 두개의 메톡시 양성자 신호(δ_H 3.25, 3H, s, 7-OCH_3; δ_H 3.13, 3H, s, 9-OCH_3)를 관찰하였다. 고자장 영역의 경우, 하나의 알릴 메틸렌 양성자 신호(δ_H 3.43, 2H, d, *J* = 6.8 Hz, H-7')와 하나의 메틸렌 양성자 신호(δ_H 2.00, 1H, dd, *J* = 13.6, 6.4 Hz, H-8a; δ_H 1.75, 2H, dd, *J* = 13.6, 6.0 Hz, H-8b)를 관찰하였다. 이는 화합물 2가 두 개의 프로필 벤젠 유닛을 포함하고 있음을 의미한다. ^{13}C-NMR 스펙트럼(표 1)은 두 개의 메톡시 그룹을 포함하는 20개의 탄소 신호[δ_C 58.6, (9-OCH_3); 56.4, (7-OCH_3)]를 보여 주었고 이를 통해 화합물 2는 네오리그난(neolignan)인 것을 알 수 있었다. 저자장 영역의 경우, 4개의 산화된 올레핀 4차 탄소 신호(δ_C 154.7, C-4'; δ_C 144.8, C-3; δ_C 144.0, C-5; δ_C 134.1, C-4), 2개의 올레핀 4차 탄소 신호(δ_C 135.5, C-1'; δ_C 134.3, C-1), 7개의 올레핀 메틴 탄소 신호(δ_C 137.2, C-8'; δ_C 129.9, C-2', 6'; δ_C 118.1, C-3', 5'; δ_C 109.0, C-2; δ_C 108.5, C-6), 하나의 비닐 메틸렌 탄소 신호(δ_C 115.9, C-9')를 관찰하였다. 하나의 산화된 메틴 탄소 신호(δ_C 80.2, C-7), 하나의 산화된 메틸렌 탄소 신호(δ_C 69.1, C-9), 하나의 알릴 메틸렌 탄소 신호(δ_C 39.4, C-7'), 하나의 메틸렌 탄소 신호(δ_C 37.9, C-8)를 또한 관찰하였다. 따라서, 상기 데이터는 화합물 2가 에테르 산소 분자에 의해 연결된 두 개의 C_6C_3 유닛임을 보여주었다.

[0092] 또한, 화합물 2의 gCOSY 스펙트럼은 δ_H H-7/H-8 및 H-8/H-9사이의 상관관계를 보여주었다. gHMBC 스펙트럼에서 H-7/C-2, C-6사이의 상관성 피크, H-8/C-7, C-9사이의 상관성 피크, 및 두 개의 -OCH_3/C-7, C-9 사이의 상관성 피크를 통해서 CH(OCH_3)-CH_2-CH_2OCH_3 유닛이 존재함을 예측하였다. C-7의 키랄 중심의 스테레오구조는 $[\alpha]_D$= +10.6 (*c* = 0.26)의 우회전성에 근거한 R로 규명하였다. 화합물 2는 (1*R*)-5-(1,3-디메톡시프로필)-3-[4-(2-프로펜-1-일)페녹시]-1,2-벤제네디올((1*R*)-5-(1,3-dimethoxypropyl)-3-[4-(2-propen-1-yl)phenoxy]-1,2-benzenediol)로 동정하였고, 새로운 화합물 오보바타리그난 B(obovatalignan B)로 명명하였다.

[0093] 화합물 2(*obovatolignan B*) 무정형의 파우더(amorphous powder). $[\alpha]_D^{18}$ = +10.6 (*c* = 0.26, MeOH). IR (CaF_2): 3357, 2928, 1600, 1504 cm^{-1}. ^1H- 및 ^{13}C-NMR: *표 1.* HR-EIMS: 344.1623 ($[M]^+$, $C_{20}H_{24}O_5$; calc. 344.1624).

표 1

[0094]

	1				2	
No.	δ_H	δ_C		No.	δ_H	δ_C
1		127.0		1		134.3
2	6.62 (s)	104.2		2	6.61 (br. s)	109.0
3		147.3		3		144.8
4		135.4		4		134.1
5		147.3		5		144.0
6	6.62 (s)	104.2		6	6.38 (br. s)	108.5
7	4.88 (d, 8.4)	76.5		7	4.07 (dd, 6.4, 6.0)	80.2
8	3.95 (ddd, 8.4, 4.0, 2.4)	78.2		8a	2.00 (dd, 13.6, 6.4)	37.9
				8b	1.75 (dd, 13.6, 6.0)	
9a	3.65 (dd, 12.4, 2.4)	61.3		9a	3.46 (overlapped)	69.1
9b	3.43 (dd, 12.4, 4.0)			9b	3.35 (overlapped)	
1'		133.0		1'		135.5
2'	6.64 (d, 2.0)	113.6		2'	7.14 (d, 8.4)	129.9
3'		144.9		3'	6.93 (d, 8.4)	118.1
4'		133.6		4'		154.7
5'		144.5		5'	6.93 (d, 8.4)	118.1
6'	6.48 (d, 2.0)	112.7		6'	7.14 (d, 8.4)	129.9
7'	3.24 (d, 6.8)	39.5		7'	3.43 (d, 6.8)	39.4
8'	5.97 (m)	136.9		8'	5.97 (m)	137.2
9'	5.07 (m)	116.0		9'	5.09 (m)	115.9
1''		134.3		7-OCH_3	3.25 (s)	56.4
2''	7.11 (d, 8.4)	129.5		9-OCH_3	3.13 (s)	58.6
3''	6.92 (d, 8.4)	117.1				
4''		156.2				
5''	6.92 (d, 8.4)	117.1				
6''	7.11 (d, 8.4)	129.5				
7''	3.34 (d, 6.4)	39.3				
8''	5.93 (m)	137.5				
9''	5.02 (m)	115.7				
3,5-OCH_3	3.88 (s)	56.4				

[0095] **실시예 4. 뇌세포 보호 활성**

[0096] **4-1. 해마 세포배양**

[0097] HT4 해마 세포주의 서브클론(subclone)인 마우스의 해마 HT22 세포는 묵인희 교수님(한국, 서울, 서울대학교)으로부터 얻었다. 세포들은 10 % 비활성화된(heat-inactivated) FBS, 페니실린 G(100 units/mL), 스트렙토마이신(100 mg/mL), and L-글루타민(5 mM)를 첨가한 DMEM 배지에서 5 × 10^4 cells/mL로 배양하였고, 5% 이산화탄소와 95 % air 조건하에, 37 ℃에서 배양하였다.

[0098] **4-2. 뇌세포 보호 활성 분석**

[0099] 뇌세포 보호 활성을 확인하기 위해, MTT시약을 처리하여 이에 나타나는 흡광도를 측정하였다.

[0100] 뇌세포 보호 활성 분석은 10^5 cells/mL의 밀도로 96-웰 플레이트에서 HT22 세포들을 시딩(seeding)하여 수행하였다. 24 시간 후, 세포들은 상기 화합물 또는 양성 대조군인 Trolox로 4시간 동안 미리 처리하였다. 이후, 세포들은 12시간 동안 글루타메이트(5 mM)에 노출시켰다. 각 화합물들은 10, 20 및 40 mM의 농도로 시험하였고 각 실험은 3번씩(in triplicate) 수행하였다. 분석에 사용된 화합물 1과 화합물 2의 순도는 99 % 이상으로 높았다. 세포 생존능력은 MTT 분석을 사용하여 평가하였다. 간단하게, 세포들은 37 ℃로 4시간 동안 MTT(0.5 mg/mL)와 함께 배양하였고 배지는 버리고 산성의 이소프로판올(0.04 N HCl)을 추가하였다. 그리고 30분 동안 배양시킨 후, microplate reader(*Bio-Rad Laboratories*)를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. EC_{50}(half maximal effective concentration)는 화합물의 최대효과의 50 %를 관찰한 화합물의 농도를 말한다. 데이터는 다음과 같은 대조군 그룹에 대한 보호 효과를 퍼센트로 표현하였다 : 100 × [글루타메이트 및 화합물 처리된 그룹의 OD - 글루타메이트 처리된 그룹의 OD] / (대조군 그룹의 OD - 글루타메이트 처리된 그룹의 OD)

[0101] **4-3. 통계적 분석**

[0102] 데이터는 최소한 3번의 독립 실험의 ± SD 방법으로 표현하였다. 변화량에 대해 one-way ANOVA를 사용하였고 다음에 각 그룹을 비교하기 위해 Newman-Keuls 분석을 수행하였다. 통계적인 분석은 *GraphPad Prism* 소프트웨어 버전 3.03을 사용하여 수행하였다.

[0103] **4-4. 뇌세포 보호 활성 분석 결과**

[0104] 화합물 1과 화합물 2의 뇌세포 보호 효과를 확인하기 위해, 글루타메이트로 유발된 HT-22 세포에서 세포 사멸에 대한 보호효과를 분석하였다.

[0105] 실험에서 Trolox®50 μM)를 양성대조군으로 사용하였고 화합물 1과 화합물 2의 EC_{50} 값은 각각 18.1 ± 1.23 및 7.1 ± 0.78 μM였다. 이는, 화합물 1과 화합물 2이 양성대조군(EC_{50} 79.32 ± 0.78 μM) (*Sigma-Aldrich Co.*) 보다 현저히 높은 수준의 보호효과를 가짐을 의미한다.

표 2

[0106]

화합물	HT22 세포 보호효과 (EC_{50})
Trolox(트롤록스, 양성대조군)	79.32 ± 0.78 μM
화합물 1	18.1 ± 1.23 μM
화합물 2	7.1 ± 0.78 μM

[0107] 결론적으로, 화합물 1과 화합물 2는 HT22 세포에서 글루타메이트로 유발된 산화적 손상에 대해 보호 활성을 보여주었다. 그러므로 상기 결과는 이들 화합물이 신경보호 효과를 가지는 물질로써의 사용 가능성을 보여주었다.

[0108] **실시예 5. 항염증 활성 평가**

[0109] **5-1. 세포배양**

[0110] RAW 264.7 세포(1 × 10^4 cells/well)들을 96-웰 플레이트에서 12-18시간 동안 배양하였고 혈청이 없는 배지에

서 희석한 다양한 농도의 화합물 1과 화합물 2의 유무상태에 LPS(1 ㎍/mL)를 24시간 동안 처리하였다. 그리고 MTT시약을 웰에 추가하였고 4시간 동안 배양시켰다.

[0111] **5-2. 세포 생존력 평가 방법**

[0112] 세포 생존능력을 시험하기 위해, MTT시약을 처리하여 이에 나타나는 흡광도를 측정하였다.

[0113] 세포펠렛에서 형성된 포르마잔은 DMSO(*Sigma-Aldrich Co.*) 100 μL 을 추가하여 용해시켰고 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존률은 cell viability(%) = [OD(compound) - OD(Blank) / OD(Control) - OD(Blank)] × 100의 식으로 살아있는 세포들을 계산하였다.

[0114] **5-3. 아질산염 측정**

[0115] 산화질소의 생성에 대한 화합물의 억제효과를 시험하기 위해, 산화질소는 안정된 산화된 생성물인 아질산염의 양을 측정하여 확인하였다.

[0116] RAW 264.7 세포(1×10^4 cells/well)들을 12-18 시간 동안 96-웰 세포 배양 플레이트에서 배양하였고 이후 다양한 농도의 화합물(15 및 30 μM)을 포함하는 혈청이 없는 배지에서 1 ㎍/mL LPS를 24시간 동안 처리하였다. 다음으로, 세포 배양 상등액의 100 μL를 새로운 96-웰 플레이트에서 그리스 시약(Griess reagent (*Sigma-Aldrich Co.*) 100 ml과 함께 섞었고 흡광도는 분광 광도계를 이용하여 550 nm에서 측정하였다.

[0117] 아질산염의 농도는 아질산 나트륨 기본 곡선과 비교하여 규명하였다. 부테인은 양성대조군으로써 사용하였다. IC_{50}(half maximal inhibitory concentration)은 체외에서 생물학적 과정의 50 %의 억제효과를 얻을 때 필요한 화합물의 농도를 의미한다.

[0118] **5-4. 통계적 분석**

[0119] 데이터는 최소한 3번의 독립 실험의 ±SD 방법으로 표현하였다. 변화량에 대해 one-way ANOVA를 사용하였고 다음에 각 그룹을 비교하기 위해 Newman-Keuls 분석을 수행하였다. 통계적인 분석은 *GraphPad Prism* 소프트웨어 버전 3.03을 사용하여 수행하였다.

[0120] **5-5. 항염증 활성 효과 분석 결과**

[0121] 화합물 1과 화합물 2의 항염증 활성 효과를 확인하기 위해, 각각 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포에서 산화질소 생성에 대한 억제효과를 분석하였다.

[0122] 화합물 1과 화합물 2는 LPS로 유발되는 RAW 264.7 세포에서 산화질소 생성에 대한 억제효과를 나타내었다. 화합물 1과 화합물 2의 IC_{50} 값은 각각 >30 및 8.22 ± 2.01 μM 였다. 부테인은 양성대조군으로써 사용하였으며, 상기 화합물 1은 부테인(IC_{50} 7.70 ± 2.25)보다 낮은 수준의 보호효과를 나타내었으며, 화합물 2는 양성대조군과 유사한 활성을 나타내었다.

표 3

[0123]

화합물	RAW264.7 산화질소 억제효과(IC_{50})
부테인(양성대조군)	7.7 ± 2.55 μM

화합물 1	>30 μM
화합물 2	8.22 ± 2.01 μM

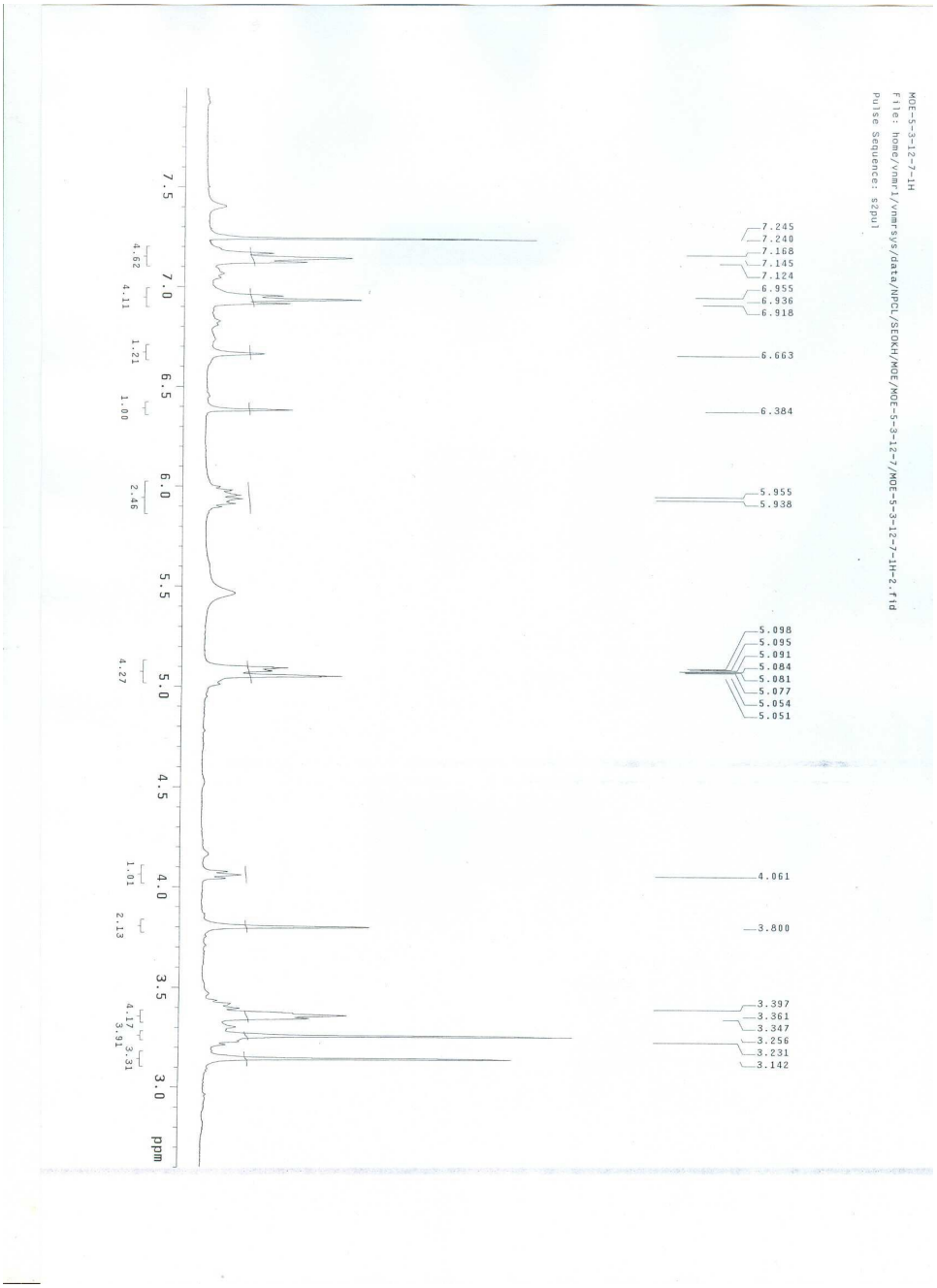
[0124]

[0125] 결론적으로, 화합물 2는 LPS로 유발되는 RAW 264.7 세포에서 산화질소에 대한 억제 활성을 보여주었다. 그러므로 상기 결과를 통해 화합물 2가 항염증 활성 효과를 가지는 물질로써의 사용 가능성을 보여주었다.

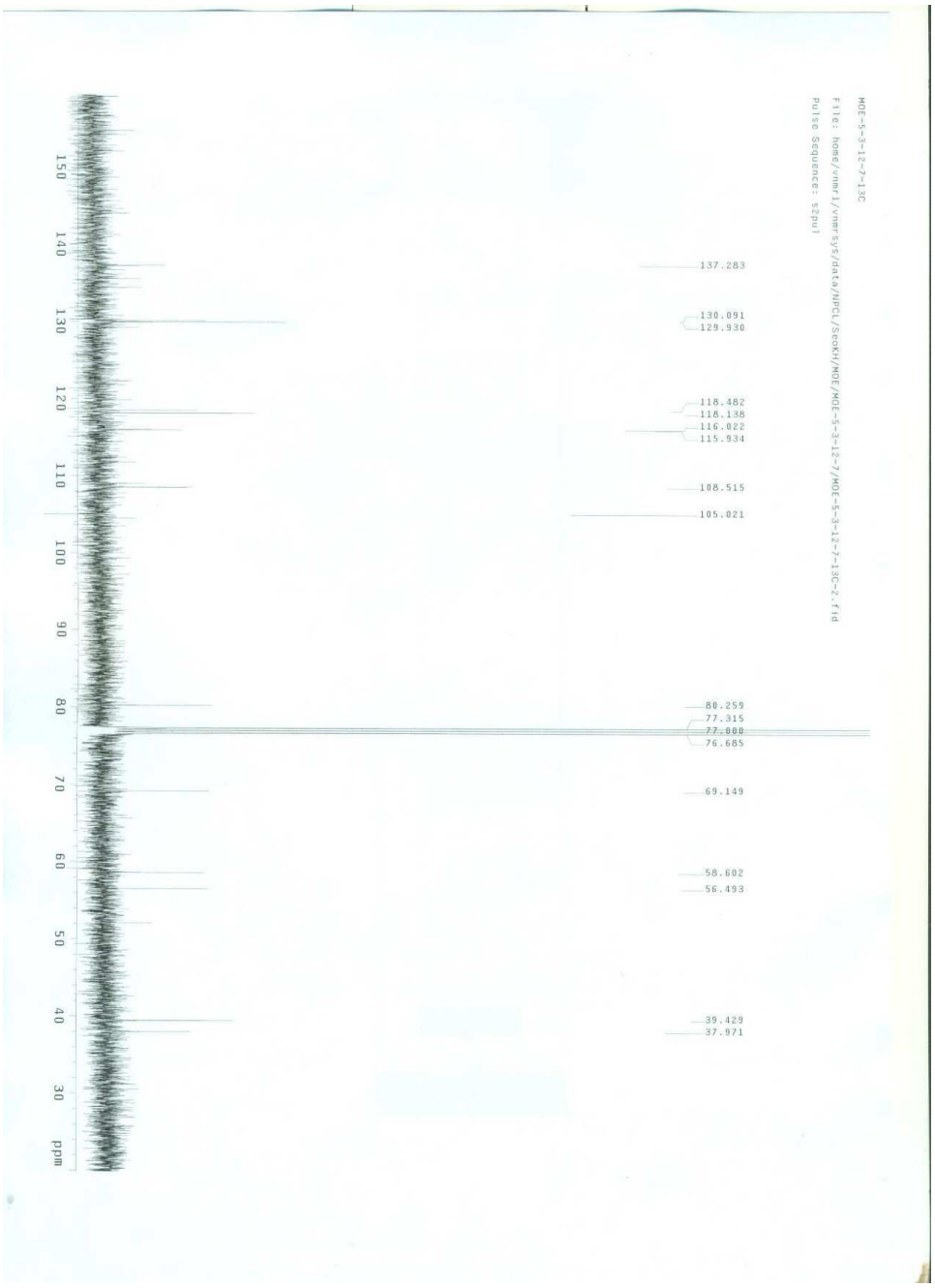
[0126] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

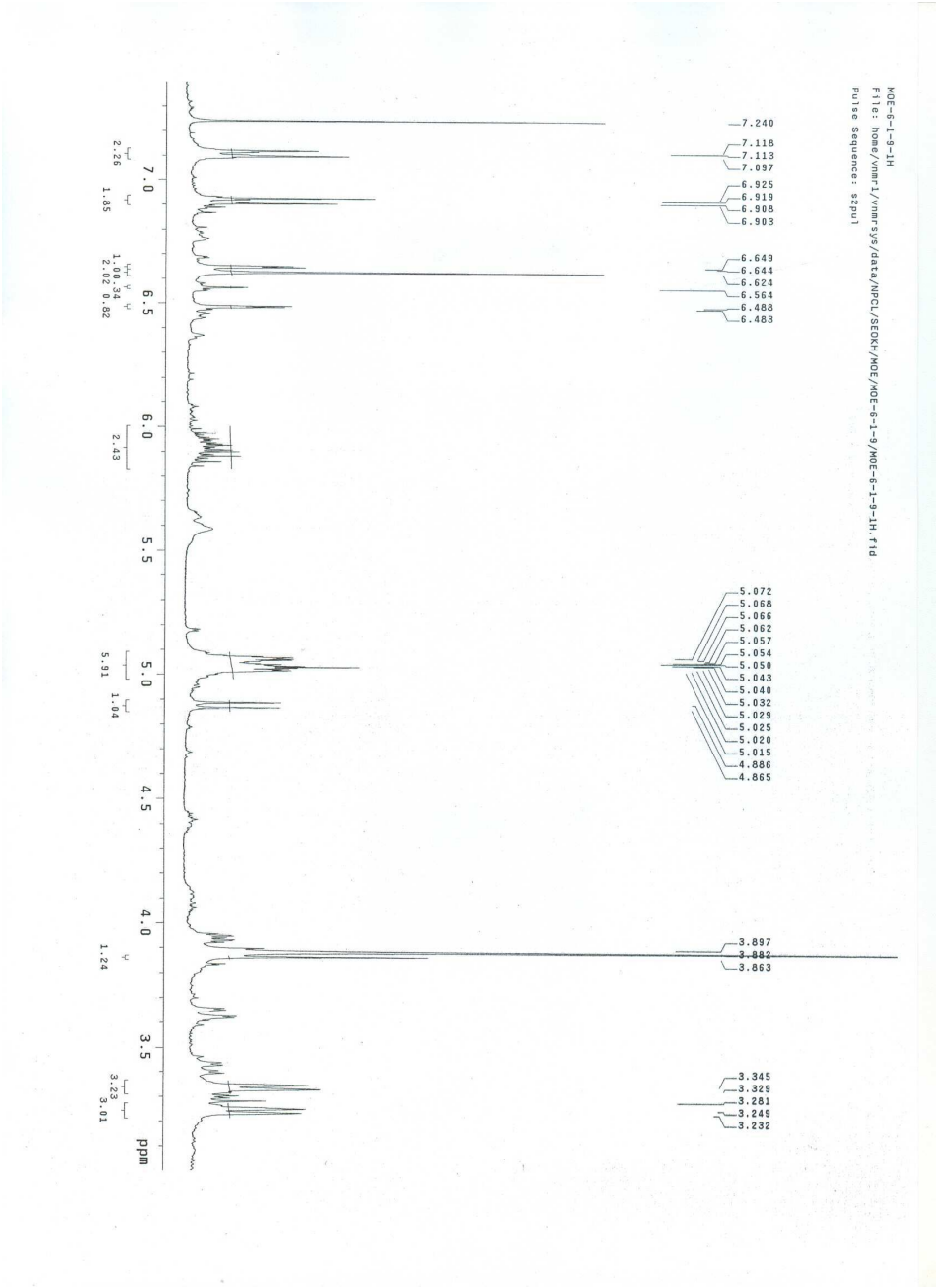
도면1a


MOE-S-3-12-7-1H
File: home/vnmrj/vnmrsys/data/NPCL/SEOKH/MOE/MOE-S-3-12-7/MOE-S-3-12-7-1H-2.fid
Pulse Sequence: s2pul
7.245
7.240
7.168
7.145
7.124
6.955
6.936
6.918
6.663
6.384
5.955
5.938
5.098
5.095
5.091
5.084
5.081
5.077
5.054
5.051
4.061
3.800
3.397
3.361
3.347
3.256
3.231
3.142
4.62
4.11
1.21
1.00
2.46
4.27
1.01
2.13
4.17
3.91
3.31
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
ppm

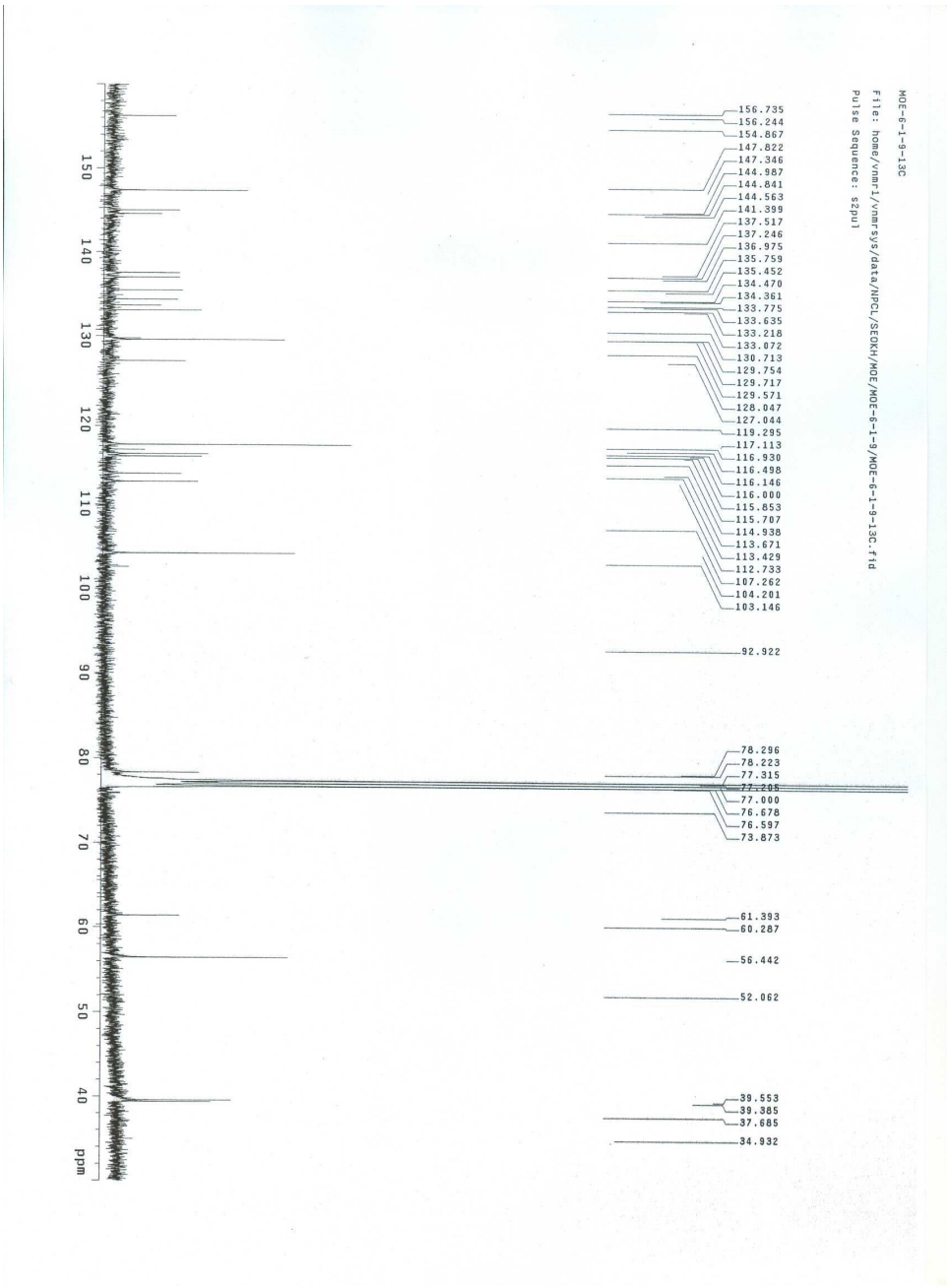
도면1b


MOE-5-3-12-7-13C
File: home/vnmrj/vnmrsys/data/NPCL/SeoKH/MOE/MOE-5-3-12-7/MOE-5-3-12-7-13C-2.fid
Pulse Sequence: s2pul
137.283
130.091
129.930
118.482
118.138
116.022
115.934
108.515
105.021
80.259
77.315
77.000
76.685
69.149
58.602
56.493
39.429
37.971
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
ppm

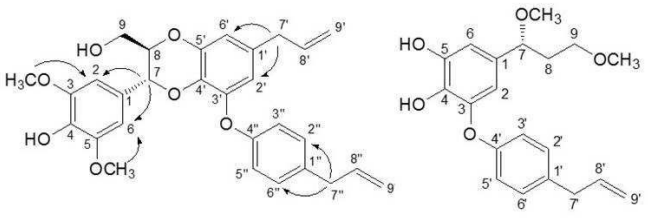
도면2a


MOE-6-1-9-1H
File: home/vnmr1/vnmrsys/data/NPCL/SEOKH/MOE/MOE-6-1-9/MOE-6-1-9-1H.fid
Pulse Sequence: s2pul
7.240
7.118
7.113
7.097
6.925
6.919
6.908
6.903
6.649
6.644
6.624
6.564
6.486
6.483
5.072
5.068
5.066
5.062
5.057
5.054
5.050
5.043
5.040
5.032
5.029
5.025
5.020
5.015
4.886
4.865
3.897
3.882
3.863
3.345
3.329
3.281
3.249
3.232
2.26
1.85
1.00
0.34
2.02
0.62
2.43
5.91
1.04
1.24
3.23
3.01
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
ppm

도면2b


MOE-6-1-9-13C
File: home/vnmr1/vnmrsys/data/NPCL/SEOKH/MOE/MOE-6-1-9/MOE-6-1-9-13C.fid
Pulse Sequence: s2pul
156.735
156.244
154.867
147.822
147.346
144.987
144.841
144.563
141.399
137.517
137.246
136.975
135.759
135.452
134.470
134.361
133.775
133.635
133.218
133.072
130.713
129.754
129.717
129.571
128.047
127.044
119.295
117.113
116.930
116.498
116.146
116.000
115.853
115.707
114.938
113.671
113.429
112.733
107.262
104.201
103.146
92.922
78.296
78.223
77.315
77.205
77.000
76.678
76.597
73.873
61.393
60.287
56.442
52.062
39.553
39.385
37.685
34.932
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
ppm

도면3


HO
H3CO
HO
OCH3
O
O
O
OCH3
HO
HO
OCH3
O

1 2