(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0037768
(43) 공개일자 2017년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/44 (2006.01) *C07H 17/00* (2006.01)
C07J 17/00 (2006.01) *C12P 33/16* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/44 (2013.01)
C07H 17/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0136706
(22) 출원일자 2015년09월25일
심사청구일자 2015년09월25일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
양덕춘
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842 111동 301호 (보라동,현대모닝사이드2차아파트)
김연주
경기도 성남시 분당구 동판교로 275 107동 801호 (삼평동,풍성신미주아파트)
김염
경기도 수원시 영통구 덕영대로 1731 (영통동)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

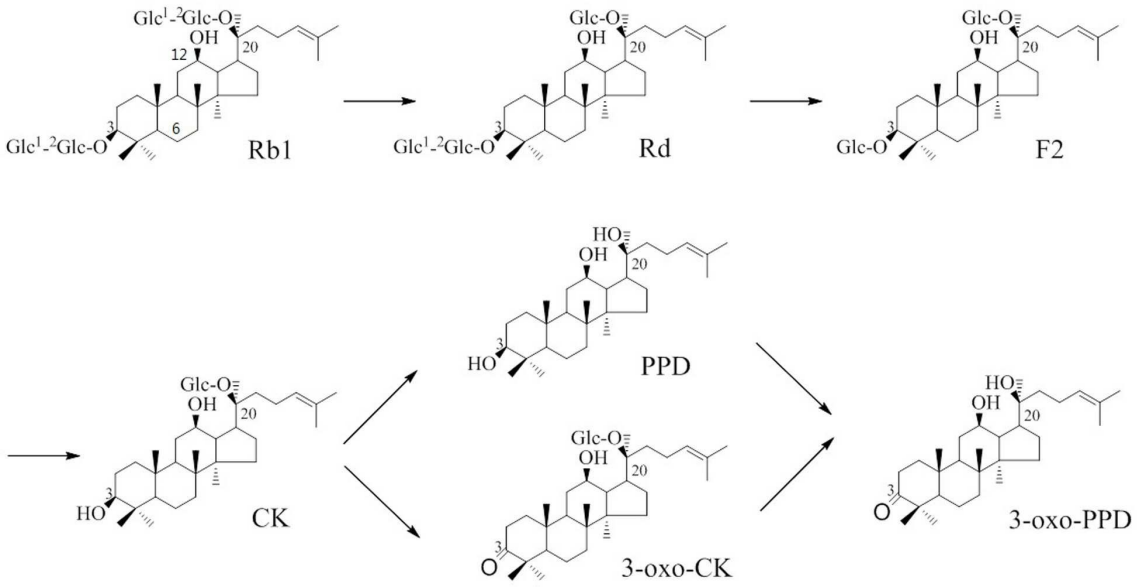
(54) 발명의 명칭 **케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물 및 이의 이용**

(57) 요 약

본 발명은 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물; 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드의 제조방법; 및 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드를 포함하는, 줄기세포의 사멸 억제를 통한 줄기세포 보호용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물 및 제조방법은 다양한 생리활성을 가진 케톤화된 진세노사이드를 화학적 방법인 아닌 인체에 안전한 생물 전환 방법으로 대량생산할 수 있으며, 다양한 진세노사이드에서 3번 탄소를 특이적으로 케톤화할 수 있는 장점이 있어, 진세노사이드와 관련된 다양한 산업에 널리 적용될 수 있다. 또한, 3번 탄소가 특이적으로 케톤화된 진세노사이드는 매우 우수한 줄기세포의 사멸 억제 효과를 가져, 줄기세포와 관련된 다양한 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C07J 17/00 (2013.01)
C12N 1/14 (2013.01)
C12P 33/16 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 313038-03-2-SB010
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 생명산업기술개발
연구과제명 한국형 토종 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교산학협력단
연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지는 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물 또는 이의 배양물은 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당을 가수분해하는 활성을 추가적으로 가져, 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소 특이적으로 당이 가수분해되고, 3번 탄소 특이적으로 케톤화되는 것인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 당은 글루코스, 자일로스, 아라비노스 또는 이들의 조합인 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물은 클라도스포리움 클라도스포리오이데스(*Cladosporium cladosporioides*)인 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드는 PPD(protopanaxadiol) 계열의 진세노사이드, PPT(protopanaxatriol) 계열의 진세노사이드 또는 이들의 조합인 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드는 Rb_1, Rb_2, Rb_3, Rc, Rd, Ra_3, Rg_3, Rh_2, Rs_1, C-O, C-Y, C-Mc1, C-Mc, F_2, CK, 지페노사이드 XVII(Gypenoside XVII), 지페노사이드 LXXV(Gypenoside LXXV), Rs_2, PPD, Re, Rg_1, Rf, F_1, Rg_2, PPT(protopanaxatriol) 및 Rh_1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 7

(i) 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지는 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물 또는 상기 미생물의 배양물 및 (ii) 진세노사이드를 반응시키는 단계를 포함하는, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 미생물 또는 이의 배양물은 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당을 가수분해하는 활성을 추가적으로 가져, 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소 특이적으로 당이 가수분해되고, 3번 탄소 특이적으로 케톤화되는 것인, 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 당은 글루코스, 자일로스, 아라비노스 또는 이들의 조합인 것인, 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 미생물은 클라도스포리움 클라도스포리오이데스(*Cladosporium cladosporioides*)인 것인, 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 진세노사이드는 PPD(protopanaxadiol) 계열의 진세노사이드, PPT(protopanaxatriol) 계열의 진세노사이드 또는 이들의 조합인 것인, 제조방법.

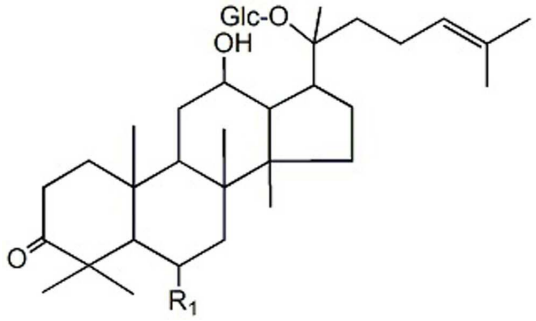
청구항 12

제7항에 있어서, 상기 진세노사이드는 Rb_1, Rb_2, Rb_3, Rc, Rd, Ra_3, Rg_3, Rh_2, Rs_1, C-O, C-Y, C-Mc1, C-Mc, F_2, CK, 지페노사이드 XVII(Gypenoside XVII), 지페노사이드 LXXV(Gypenoside LXXV), Rs_2, PPD, Re, Rg_1, Rf, F_1, Rg_2, PPT 및 Rh_1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 제조방법.

청구항 13

3번 탄소가 케톤화된 진세노사이드인, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염을 포함하는, 줄기세포의 사멸 억제를 통한 줄기세포 보호용 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서, R1은 H 또는 OH이다.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물; 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드의 제조방법; 및 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드를 포함하는, 줄기세포의 사멸 억제를 통한 줄기세포 보호용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전통 약초로서, 인삼은 극동 지역에서 수천년 동안 사용되어 오고 있고, 과거 10년 동안에는 서양에서 큰 인기를 얻고 있다. 진세노사이드는 인삼의 주요 약학적 성분으로서, 메이져 진세노사이드 Rb_1, Rb_2, Rc, Rd, Rg_1 및 Re를 포함한 289 종의 사포닌이 11 종의 다른 *Panax* 종류 및 관련 가공 생산물로부터 분리되었다. 특히, 진세노사이드 Rb_1은 모든 진세노사이드에 가장 풍부한 PPD(protopanaxadiol) 계열의 사포닌으로서, 전체 진세노사이드 중에서 Rb_1의 함량은 23.8%이었다 (Biotechnol. Lett., 2008, 30: 713-716).

[0003] 경구적으로 섭취되는 진세노사이드는 장내 세균의 의해 탈당화되어 활성화되므로, 진세노사이드의 탈당화는 약학적 발현에 있어서 중요한 역할을 한다(J. Pharmacol. Sci., 2004, 95: 153-157). 그러나, 메이져 진세노사이드가 탈당화되어 전환되는, 마이너 진세노사이드는 큰 약학적 활성을 가지나, 인삼에서 천연으로 구하기는 어렵다. 또한, 다양한 유용한 활성을 가지는, 특정 탄소가 케톤화된 진세노사이드도 인삼에서 천연으로 구하기는 어렵다.

[0004] 메이져 진세노사이드로부터 마이너 진세노사이드로의 전환은, 산 처리, 알칼리 처리, 가열과 같은 화학적 전화 방법 및 미생물 전환 방법을 통해 달성될 수 있다. 그러나, 화학적 전환은 희귀한 진세노사이드의 비특이적 라세미 혼합물을 생성시키는 단점이 있으나, 미생물 또는 효소를 이용한 전환은 낮은 온도에서 진행할 수 있고, 조작이 간편하며, 기질특이성 때문에 부산물이 적다는 장점이 있고, 미생물의 종류에 따라 사포닌의 전환 산물 및 그 경로가 다양하여 특정사포닌을 선택적으로 생산할 수 있는 장점을 가진다.

[0006] 이러한 배경 하에 본 발명자들은, 기질특이성 및 위치특이성을 지녀 특정 진세노사이드의 케톤화에 이용할 수 있는 미생물을 개발하고자 예의 노력한 결과, 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물 또는 이의 배양물이 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지고, 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소 특이적으로 당을 가수분해하는 활성을 가져, 다양한 진세노사이드로부터 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드를 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

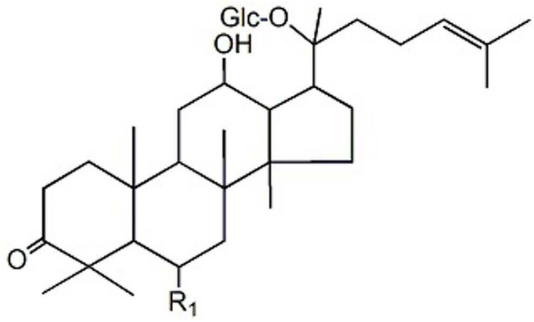
해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지는 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 (i) 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지는 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물 또는 상기 미생물의 배양물 및 (ii) 진세노사이드를 반응시키는 단계를 포함하는, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 3번 탄소가 케톤화된 진세노사이드인, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염을 포함하는, 줄기세포의 사멸 억제를 통한 줄기세포 보호용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] [화학식 1]

[0011] 

[0012] 상기 식에서, R1은 H 또는 OH이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지는 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물 또는 이의 배양물을 포함하는, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명자들은 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물 또는 이의 배양물이 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지므로, 이를 이용하여 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드를 제조할 수 있음을 최초로 규명하였다.

[0015] 또한, 본 발명자들은 상기 클라도스포리움 속 미생물 또는 이의 배양물은 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당을 가수분해하는 활성을 추가적으로 가져, 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소 특이적으로 당이 가수분해되고, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드를 제조할 수 있음을 최초로 규명하였다.

[0016] 본 발명의 상기 조성물을 이용하면 다양한 생리활성을 가진, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드를 화학적 방법인 아닌 인체에 안전한 생물 전환 방법으로 대량생산할 수 있으며, 다양한 종류의 기질을 사용하여 진세노사이드에서 원하는 위치의 탄소를 특이적으로 케톤화한 진세노사이드를 제조할 수 있어, 진세노사이드와 관련된 다양한 산업에 널리 적용될 수 있다.

[0017] 본 발명의 용어, "클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물"은 클라도스포리움 속에 포함되는 하나 이상의 미생

물을 의미하는 것으로, 진세노사이드의 3번 탄소 특이적인 케톤화 활성을 가진다.

[0018] 본 발명에서 상기 클라도스포리움(*Cladosporium*) 속 미생물은 진세노사이드의 3번 탄소 특이적인 케톤화 활성을 가지는 한 제한이 없으나, 구체적으로, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스(*Cladosporium cladosporioides*), 더욱 구체적으로, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 41011, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 41404, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43532, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43383, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43926, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 41034, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 40934, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43794, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 44029, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43384, 더더욱 구체적으로, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43926일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 또한, 본 발명에서 상기 클라도스포리움 속 미생물은 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당을 가수분해하는 활성을 추가적으로 가질 수 있다.

[0021] 상기 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당은 본 발명의 클라도스포리움 속 미생물이 가수분해할 수 있는 한 제한이 없으나, 구체적으로 글루코스, 자일로스, 아라비노스 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0023] 본 발명의 용어 "배양물"은 균주를 배양한 다음 수득한 산물을 의미한다. 상기 배양물은 균주를 포함하는 형태 및 상기 균주를 포함하는 배양액에서 원심분리 등으로 균주를 제거한 형태도 모두 포함하는 개념이다.

[0024] 상기 배양물은 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화를 유도하여 케톤화된 진세노사이드를 제조할 수 있다. 또한, 상기 배양물은 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당의 가수분해를 추가적으로 유도하여, 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소 특이적으로 당이 가수분해되고, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드를 제조할 수 있다.

[0026] 본 발명의 용어 "진세노사이드"는 인삼 유래 담마란(dammarane)계 사포닌 또는 이의 유도체를 의미하는 것으로, 다른 식물에서 발견되는 사포닌과는 다른 특이한 화학구조를 가지고 있다.

[0027] 본 발명에서 진세노사이드는 본 발명의 클라도스포리움 속 미생물이 3번 탄소를 케톤화할 수 있는 한 제한이 없으나, 구체적으로, PPD(protopanaxadiol) 계열의 진세노사이드, PPT(protopanaxatriol) 계열의 진세노사이드 또는 이들의 조합일 수 있으며, 더욱 구체적으로, Rb_1, Rb_2, Rb_3, Rc, Rd, Ra_3, Rg_3, Rh_2, Rs_1, C-O, C-Y, C-Mc1, C-Mc, F_2, CK, 지페노사이드 XVII(Gypenoside XVII), 지페노사이드 LXXV(Gypenoside LXXV), Rs_2, PPD, Re, Rg_1, Rf, F_1, Rg_2, PPT 및 Rh_1으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 상기 "PPD 계열의 진세노사이드"는 담마란계 사포닌으로, 3번, 12번 및 20번 탄소 위치에 -OH기를 가지고 있는 PPD 또는 상기 PPD의 상기 -OH기가 하나 이상 글리코실화된 진세노사이드를 말한다. 이의 예로 Rb_1, Rb_2, Rb_3, Rc, Rd, Ra_3, Rg_3, Rh_2, Rs_1, C-O, C-Y, C-Mc1, C-Mc, F_2, CK, 지페노사이드 XVII(Gypenoside XVII), 지페노사이드 LXXV(Gypenoside LXXV) 또는 Rs_2가 있다.

[0029] 상기 "PPT 계열의 진세노사이드"는 담마란계 사포닌으로, 3번, 6번, 12번 및 20번 탄소 위치에 -OH기를 가지고 있는 PPT 또는 상기 PPT의 상기 -OH기가 글리코실화된 진세노사이드를 말한다. 이의 예로 진세노사이드 Re, Rg_1, Rf, F_1, Rg_2, PPT 또는 Rh_1이 있다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 진세노사이드의 탄소 번호는 도 6에 표시된 진세노사이드의 화학구조식 안에 나타내었다.

[0032] 또한, 상기 진세노사이드는 분리 및 정제된 형태의 진세노사이드를 이용할 수도 있고, 또는 식물, 예컨대 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물에 포함되어 있는 진세노사이드를 이용할 수도 있다. 즉, 사포닌을 포함하는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물을 직접 진세노사이드로 이용하여 본 발명의 방법을 실시할 수도 있다. 또한, 화학적으로 합성된 진세노사이드를 이용할 수도 있다. 본 발명에서 이용될 수 있는 인삼으로는, 공지된 다양한 인삼을 사용할 수 있으며, 고려삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*P. quiquefolius*), 전칠삼(*P. notoginseng*), 죽절삼

(*P. japonicus*), 삼엽삼(*P. trifolium*), 히말라야삼(*P. pseudoginseng*) 및 베트남삼(*P. vietnamensis*)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에서는 전체 진세노사이드의 함량은 80 % (w/w) 이상인, 미국 인삼 추출물을 실리카 겔 칼럼 및 semi-preparative HPLC로 정제하여, 순도는 98% 이상의 Rb_1를 수득하였다.

[0035] 본 발명의 용어 "3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드"는 상기 진세노사이드의 3번 탄소가 케톤화된 진세노사이드를 의미하며, 구체적으로, 3번 탄소의 하이드록시기가 탈수소화되어 케톤화된 진세노사이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드는 케톤화되기 전의 진세노사이드보다 뛰어난 생리활성을 가져 다양한 분야에 널리 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에서는 클라도스포리움 클라도스포리오이데스에 의해 Rb_1이 생전환되어, 6종류의 대사물이 제조되었고, 상기 대사물은 각각 Rd (대사물 1), F2 (대사물 2), CK (대사물 3), PPD (대사물 4), 12β-하이드록시다마르-3-온-20(*S*)-*O*-β-D-글루코피라노사이드 (12β-hydroxydammar-3-one-20(*S*)-*O*-β-D-glucopyranoside, 3-oxo-CK, 대사물 5) 및 다마르-24-엔-12β,20(*S*)-디올-3-온(dammar-24-en-12β,20(*S*)-diol-3-one, 3-oxo-PPD, 대사물 6)로 확인되었다(실시예 2-3 및 2-4).

[0038] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43926에 의해 Rb_1이 케톤화되는 경로를 분석한 결과, Rb_1의 20번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어, Rb_1는 Rd로 전환되었다. 그 후 Rd의 3번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어, Rd는 F2로 전환되었다. 그 후 F2의 3번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어 F2는 CK로 전환되었다. 그 후 CK는 20번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어 PPD로 전환되거나, 또는 3번 탄소가 케톤화되어 3-oxo-CK로 전환되었다. 마지막으로, PPD의 3번 탄소가 케톤화되어 PPD는 3-oxo-PPD로 전환되었고, 3-oxo-CK의 20번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어 3-oxo-CK는 3-oxo-PPD로 전환됨을 확인하였다(도 6).

[0039] 이를 통해, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스가 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지며, 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당을 가수분해하는 활성을 가짐을 확인한바, 클라도스포리움 속 미생물 또는 이의 배양물을 이용하면 3번 탄소 특이적으로 케톤화된, 다양한 진세노사이드를 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

[0040] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 균주 KACC 41011, KACC 41404, KACC 43532, KACC 43383, KACC 43926, KACC 41034, KACC 40934, KACC 43794, KACC 44029, KACC 43384의 케톤화 활성을 비교한 결과, 다양한 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 균주 중 KACC 43926 균주가 가장 높은 케톤화 활성을 가짐을 알 수 있었다(도 7).

[0042] 다른 하나의 양태로서 본 발명은 (i) 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지는 클라도스포리움 속 미생물 또는 상기 미생물의 배양물 및 (ii) 진세노사이드를 반응시키는 단계를 포함하는, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드의 제조방법을 제공한다.

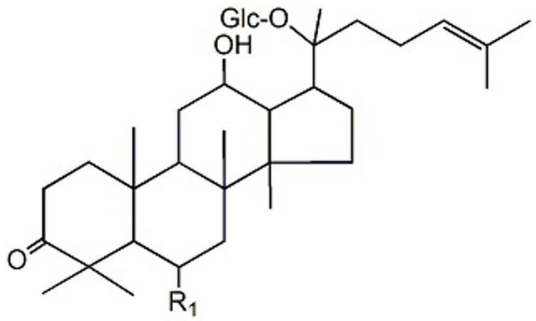
[0043] 또한, 본 발명의 제조방법은 상기 클라도스포리움 속 미생물 또는 이의 배양물이 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당을 가수분해하는 활성을 추가적으로 가져, 3번 또는 20번 탄소 특이적으로 당이 가수분해되고, 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드를 제조할 수 있다.

[0044] 본 발명의 제조방법은, 다양한 생리활성을 가진 케톤화된 진세노사이드를 화학적 방법인 아닌 인체에 안전한 생물 전환 방법으로 대량생산할 수 있으며, 다양한 진세노사이드에서 3번 탄소 특이적으로 케톤화할 수 있는 장점이 있으므로, 진세노사이드와 관련된 다양한 산업에 널리 적용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에서는 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43926 균주를 Rb_1을 포함하는 배지에서 배양한 결과, 3번 탄소가 케톤화된 3-oxo-CK 및 3-oxo-PPD가 제조됨을 확인하였으며, Rb_1으로부터 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당이 가수분해되어 Rd, F2, CK, PPD도 제조됨을 확인하였다(도 1).

[0047] 다른 하나의 양태로서 본 발명은 3번 탄소가 케톤화된 진세노사이드인, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 생리학적으로 허용되는 염을 포함하는, 줄기세포의 사멸 억제를 통한 줄기세포 보호용 조성물을 제공한다.

[0048] [화학식 1]



[0049]

[0050] 상기 식에서, R1은 H 또는 OH이다.

[0052] 본 발명자들은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 줄기세포의 사멸 억제를 통한 줄기세포 보호 활성을 가짐을 최초로 규명하였다. 본 발명의 줄기세포 보호용 조성물은, 매우 우수한 줄기세포의 사멸 억제 효과를 가지므로, 줄기세포와 관련된 다양한 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명에서 상기 줄기세포는 골수 유래 줄기세포(Bone marrow stromal cell,BMSC)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 골수 유래 줄기세포는 생체내 환경에 따라 다양한 growth factor을 분비하며 여러 가지 조직으로 분화되므로, 세포 이식을 통해 수술한 조직 부위의 빠른 재생을 촉진하는바, 다양한 활성을 가지면서도 골수 유래 줄기세포에 독성이 적은 진세노사이드가 요구된다.

[0056] 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 3-oxo-CK 및 3-oxo-F1(6α,12β-디히드록시다마르-3-온-20(S)-O-b-D-글루코피라노사이드, 6α,12β-dihydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside)일 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에서는 순수 분리된 진세노사이드 CK, 3-oxo-CK, F1, 및 3-oxo-F1를 골수 유래 줄기세포에 처리하여 MTT assay를 수행한 결과, 3-oxo-CK 및 3-oxo-F1는 CK 및 F1보다 줄기세포의 사멸 억제를 통한 줄기세포 보호 활성이 높음을 확인하여(도 8), 줄기세포와 관련된 다양한 분야에 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

발명의 효과

[0058] 본 발명의 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드 제조용 조성물 및 3번 탄소 특이적으로 케톤화된 진세노사이드의 제조방법은 다양한 생리활성을 가진 케톤화된 진세노사이드를 화학적 방법인 아닌 인체에 안전한 생물전환 방법으로 대량생산할 수 있으며, 다양한 진세노사이드에서 3번 탄소를 특이적으로 케톤화할 수 있는 장점이 있어, 진세노사이드와 관련된 다양한 산업에 널리 적용될 수 있다. 또한, 3번 탄소가 특이적으로 케톤화된 진세노사이드는 매우 우수한 줄기세포의 사멸 억제 효과를 가져, 줄기세포와 관련된 다양한 분야에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 클라도스포리움 클라도스포리오이데스(*Cladosporium cladosporioides*) KACC 43926에 의해 전환된 Rb_1의 대사물의 TLC 분석 결과를 나타낸 도이다(C: 진세노사이드 Rb1 대조군, S: 진세노사이드 표준, 1 내지 5: 미생물과 Rb_1의 배양일 수).

도 2는 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43926에 의해 전환된 진세노사이드 Rb_1의 대사물의 HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다(kotonized C-K: 3-oxo-CK, kotonized PPD: 3-oxo-PPD

도 3은 3-oxo-CK의 HMBC NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 4는 3-oxo-CK의 HSQC NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 5는 3-oxo-PPD의 HMBC NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 6은 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43926에 의한 Rb_1의 전환 경로를 나타낸 도이다.

도 7은 10 종류의 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 균주의 케톤화 활성을 비교한 도이다. 화살표는 3-oxo-CK를 나타낸다.

도 8은 3-oxo-CK 및 3-oxo-F1의 골수 유래 줄기세포(Bone marrow stromal cell, BMSC)에 대한 세포 독성을 비교한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 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.

[0063] **실시예 1. 재료, 미생물 및 진세노사이드 Rb_1**

[0065] **실시예 1-1. 재료 및 미생물**

[0067] 효모 곰팡이(YM)를 Difco (USA)로부터 구입하였다. 실리카 겔 60 F_{254} 플레이트 및 실리카 겔 60 (독일, Merck)을 TLC 및 칼럼 크로마토그래피에 사용하였다. 모든 화합물 및 용매는 분석용 또는 HPLC 등급이었다.

[0068] 클라도스포리움 클라도스포리오이데스(*Cladosporium cladosporioides*) KACC 43926, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 41011, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 41404, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43532, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43383, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 41034, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 40934, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43794, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 44029 및 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43384 균주를 대한민국, 수원 소재의 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 구입하였다.

[0070] **실시예 1-2. 진세노사이드 Rb_1의 제조**

[0072] 미국 인삼 추출물을 Jiuhui Co. Ltd. (중국, 후난, 창사)로부터 구입하였고, 전체 진세노사이드의 함량은 80 % (w/w) 이상이었다. 상기 미정제 추출물을 실리카 겔 칼럼에 적용하고, $CHCl_3$-MeOH-H_2O (5:1:3-65:35:5, v/v/v)로 용리시켰다. 이어서, 상기 용리물을 semi-preparative HPLC에 의해 정제하여, 순수한 Rb_1을 수득하였다. HPLC 분석에 의해, Rb_1의 순도는 98% 이상이었다.

[0074] **실시예 2. 케톤화된 진세노사이드의 제조 및 분석**

[0076] **실시예 2-1. 케톤화된 진세노사이드의 제조 방법**

[0078] 진세노사이드의 3번 탄소를 케톤화하기 위해, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43926 균주를 28℃에서 교반하면서, 탄소 공급원으로서 0.4 mg/mL Rb_1을 포함하는 YM 브로스에서 배양하였다. 배양 10일 후, 상기 반응 혼합물을 물-포화 부탄올로 3회 추출한 다음, 진공에서 증발시키고, TLC 및 HPLC로 분석하였다.

[0080] **실시예 2-2. TLC 및 HPLC를 이용한 진세노사이드의 분석 방법**

[0082] TLC 분석을 위해, 실리카 겔 60 플레이트를 사용하였고, 전개 용매로 $CHCl_3$-CH_3OH-H_2O (65:35:10, v/v/v, lower phase)을 사용하였다. 10% (v/v) H_2SO_4을 분무하고, 110℃에서 10분 동안 가열하여, TLC 플레이트 상의 스팟을 검출하였다.

[0084] Agilent 1260 시스템 (Agilent)을 사용하여, HPLC를 수행하였다. 0-7, 7-11, 11-14, 14-25, 25-28, 28-30, 30-31.5, 31.5-34, 34-34.5, 및 34.5-40분의 전개 시간 및 81:19, 81:19, 71:29, 71:29, 60:40, 44:56, 30:70, 10:90, 10:90, 81:19, 및 81:19의 A/B 비율(A: 아세토니트릴, B: H_2O)을 가진 용매를 사용하여, C18 칼럼 (50×4.6 mm, ID 2.6 ㎛)에서 분리를 수행하였다. 유속은 0.6 mL min^{-1}이고, 검출 파장은 203 nm이었다.

[0086] **실시예 2-3. TLC 및 HPLC를 이용한 진세노사이드의 분석 결과**

[0088] 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43926은 진세노사이드 Rb_1을 다양한 생성물로 전환시킬 수 있음을 상기 TLC 및 HPLC 분석으로 확인하였다(도 1 및 2). 반응 생성물을 실리카 겔 크로마토그래피에서 분리하였다. 그 결과, 6 종의 대사물이 수득되었고, 각각 진세노사이드 Rd (대사물 1), F2 (대사물 2), CK (대사물 3) 및 PPD (대사물 4)로 확인되었다. 대사물 1, 2는 중간 대사물이고, 대사물 3, 4, 5, 6은 최종 생성물이었다.

[0090] **실시예 2-4. 케톤화된 진세노사이드의 구조 분석 결과**

[0092] 실시예 2-1의 반응 추출물을 용매 $CHCl_3$-CH_3OH (13:1)를 사용하여, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에서 분리한 결과, 분획 A-C가 수득되었다. 그 후 분획 A를 용매 CH_2Cl_2-EtOH (50:1-1:1)로 분리하여 분획 D-E를 수득하였다. 수집된 분획을 semi-preparative HPLC를 사용하여 추가로 정제하여, 대사물 5 및 6을 수득하였다. 상기 대사물을 피리딘-d_5에 용해시키고, FT-NMR 분광기(400 MHz; Varian Inova AS 400, Varian, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 ^{1}H, ^{13}C, 및 2D NMR로 분석하였다. 내부 표준인 테트라메틸실란 (TMS)에 토대로, 화학 이동 (chemical shift)을 δ(ppm)로 나타내었다.

[0094] 대사물 5 및 6의 ^{13}C-NMR 스펙트럼 분석 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0095]

대사물 5				대사물 6	
Aglycone moiety		Sugar moiety		Aglycone moiety	
No.	ppm	No.	ppm	No.	ppm
C-1	39.7	C-1'	98.2	C-1	39.6
C-2	34.2	C-2'	75.1	C-2	34.1
C-3	216.3	C-3'	79.2	C-3	215.9
C-4	47.3	C-4'	71.7	C-4	47.0
C-5	55.3	C-5'	78.2	C-5	55.0
C-6	19.9	C-6'	62.9	C-6	20.8
C-7	36.1			C-7	35.6
C-8	39.9			C-8	39.4
C-9	49.9			C-9	49.4
C-10	36.9			C-10	36.6
C-11	30.7			C-11	31.0
C-12	70.0			C-12	70.5
C-13	49.6			C-13	48.5
C-14	51.4			C-14	51.4
C-15	30.7			C-15	31.0
C-16	26.6			C-16	26.8
C-17	51.6			C-17	51.3
C-18	17.2			C-18	16.6
C-19	17.7			C-19	17.4
C-20	83.3			C-20	72.7
C-21	22.3			C-21	20.8
C-22	36.1			C-22	35.6
C-23	23.15			C-23	22.7
C-24	126.0			C-24	126.0
C-25	130.9			C-25	130.5
C-26	25.7			C-26	25.5
C-27	17.7			C-27	17.4
C-28	26.7			C-28	26.5
C-29	15.6			C-29	15.2
C-30	15.8			C-30	15.7

[0097] 대사물 5 및 6의 ^{1}H-NMR 스펙트럼 분석 결과는 하기와 같았다.

[0099] 대사물 5 :

[0100] ^{1}H-NMR (400 MHz, pyridine-d_5, δ_H) 5.25 (1H, dd, J=6.8, 6.4 Hz, H-24), 5.16 (1H, d, J=7.6 Hz, H-1'), 4.46 - 3.89 (sugar moieties), 1.60 (9H, s, H-28, 21, 29), 1.11 (3H, H-26), 1.03 (3H, s, H-27), 0.96 (3H, s, H-18), 0.91 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-30).

[0102] 대사물 6 :

[0103] ^{1}H-NMR (400 MHz, pyridine-d_5, δ_H) 5.47 (1H, dd, J=6.4, 5.6 Hz, H-24), 3.89 (1H, m, H-12), 1.69 (3H, s, H-28), 1.66 (3H, s, H-21), 1.40 (3H, s, H-29), 1.13 (3H, H-26), 1.04 (3H, s, H-27), 0.99 (3H, s, H-18), 0.92 (3H, s, H-19), 0.87 (3H, s, H-30)

[0105] 상기 ^{1}H 및 ^{13}C NMR과 함께 HMBC NMR과 HSQC NMR 분석을 통하여(도 3 내지 5), 대사물 5는 12β-하이드록시다마르-3-온-20(S)-O-β-D-글루코피라노사이드 (12β-hydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside, 3-oxo-CK)로 동정되었고, 대사물 6은 다마르-24-엔-12β,20(S)-디올-3-온(dammar-24-en-12β,20(S)-diol-3-one, 3-oxo-PPD)으로 동정되었다.

[0107] **실시예 2-5. Rb_1의 케톤화 경로 분석**

[0109] 상기 실시예 2-3 및 2-4의 결과를 통해 확인한, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 KACC 43926에 의해 Rb_1이 케톤화되는 경로를 도 6에 나타내었다. 도 6에서 알 수 있듯이, Rb_1의 20번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어, Rb_1는 Rd로 전환되었다. 그 후 Rd의 3번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어, Rd는 F2로 전환되었다. 그 후 F2의 3번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어 F2는 CK로 전환되었다. 그 후 CK는 20번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어 PPD로 전환되거나, 또는 3번 탄소가 케톤화되어 3-oxo-CK로 전환되었다. 마지막으로, PPD의 3번 탄소가 케톤화되어 PPD는 3-oxo-PPD로 전환되었고, 3-oxo-CK의 20번 탄소에 결합된 글루코스가 가수분해되어 3-oxo-CK는 3-oxo-PPD로 전환되었다.

[0110] 이를 통해, 클라도스포리움 클라도스포리오이데스가 진세노사이드의 3번 탄소 특이적으로 케톤화 활성을 가지며, 진세노사이드의 3번 또는 20번 탄소에 위치한 당을 가수분해하는 활성을 가짐을 확인한바, 클라도스포리움 속 미생물 또는 이의 배양물을 이용하면 3번 탄소 특이적으로 케톤화된, 다양한 진세노사이드를 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

[0112] **실시예 3. 다양한 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 균주의 케톤화 활성 비교**

[0114] 다양한 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 균주의 케톤화 활성을 비교하기 위하여, 10 종류의 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 균주 KACC 41011, KACC 41404, KACC 43532, KACC 43383, KACC 43926, KACC 41034, KACC 40934, KACC 43794, KACC 44029, KACC 43384의 케톤화 활성을 분석하였다.

[0115] 상기 10 종류의 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 균주를 28℃에서 교반하면서, 탄소 공급원으로서 0.4 mg/mL Rb_1을 포함하는 YM 브로스에서 배양하였다. 배양 10일 후, 상기 반응 혼합물을 물-포화 부탄올로 3회 추출한 다음, 진공에서 증발시키고, TLC로 분석하였다.

[0116] 그 결과, 도 7에서 알 수 있듯이, 다양한 클라도스포리움 클라도스포리오이데스 균주 중 KACC 43926 균주가 가장 높은 케톤화 활성을 가짐을 알 수 있었다.

[0118] **실시예 4. 케톤화된 진세노사이드의 줄기세포 사멸억제 효과 확인**

[0120] 골수 유래 줄기세포(Bone marrow stromal cell,BMSC)는 생체내 환경에 따라 다양한 growth factor을 분비하며 여러 가지 조직으로 분화되므로, 세포 이식을 통해 수술한 조직 부위의 빠른 재생을 촉진하는바, 다양한 활성을 가지면서도 골수 유래 줄기세포에 독성이 적은 진세노사이드가 요구된다.

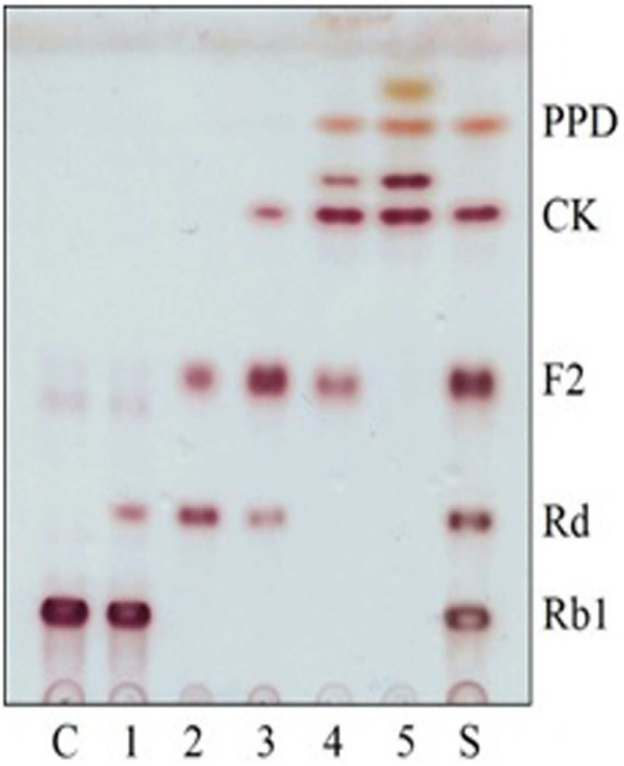
[0121] 이에, 케톤화된 진세노사이드의 세포 독성을 확인하기 위하여, 순수 분리된 진세노사이드 CK, 3-oxo-CK, F1, 및 3-oxo-F1를 각각 0, 10, 50, 100㎛M 농도별로 골수 유래 줄기세포에 처리하여 MTT assay를 수행하였다.

[0122] 그 결과 도 8에서 알 수 있듯이, 3-oxo-CK 및 3-oxo-F1는 CK 및 F1보다 줄기세포의 사멸 억제를 통한 줄기세포 보호 활성이 높으므로, 줄기세포와 관련된 다양한 분야에 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

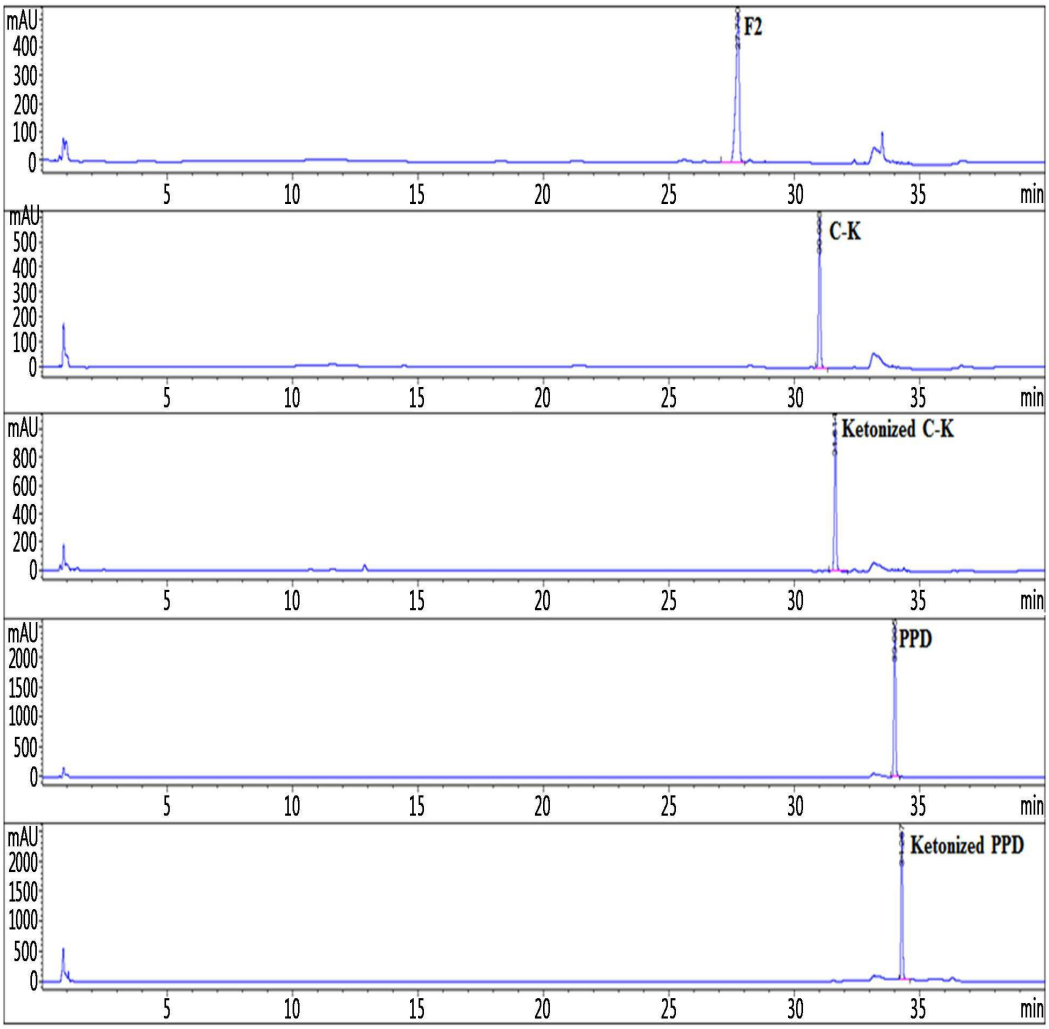
[0124] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예 및 실험예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

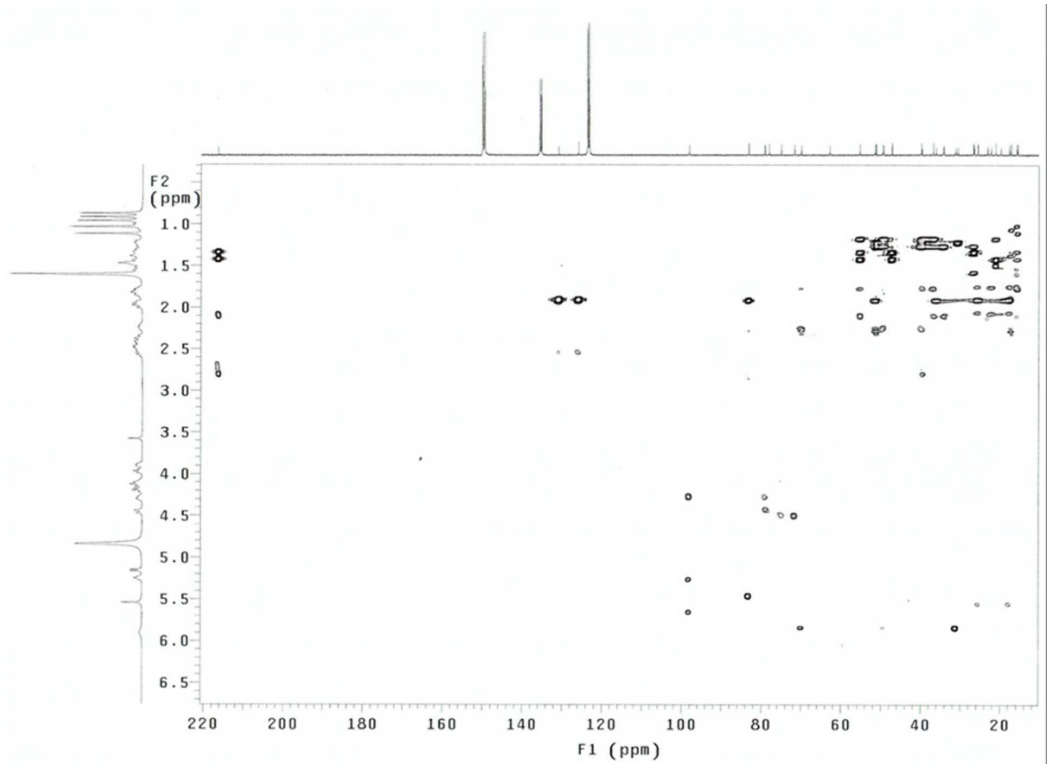
도면1



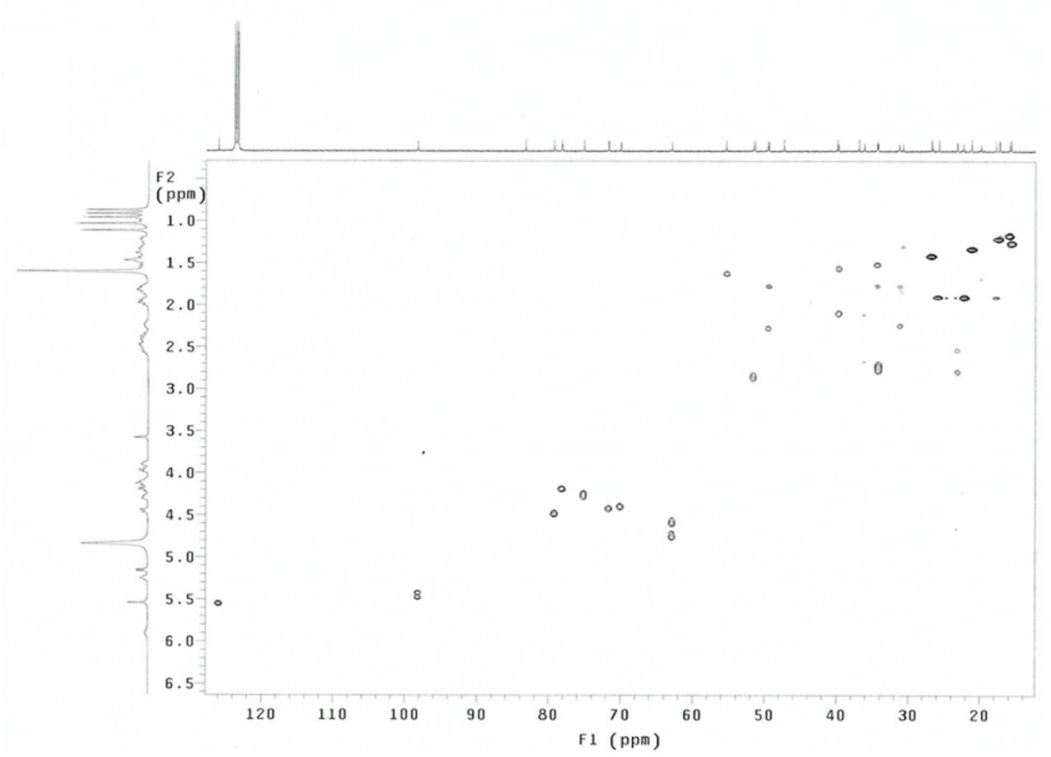
도면2



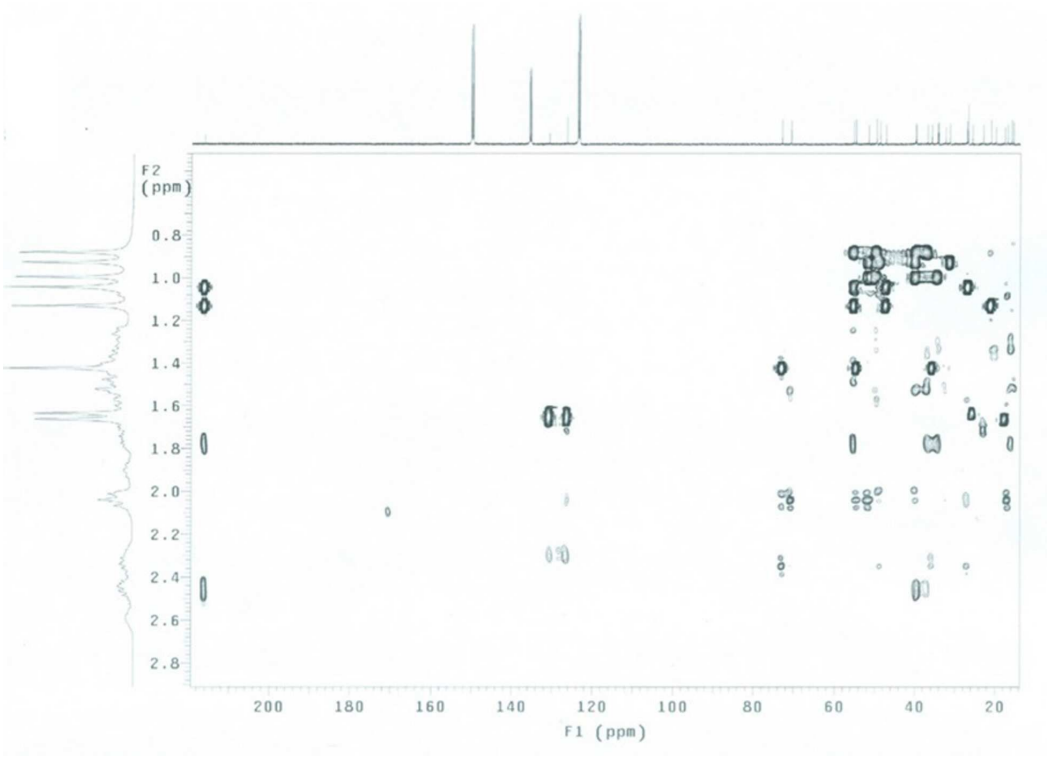
도면3


F2
(ppm)
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
F1 (ppm)

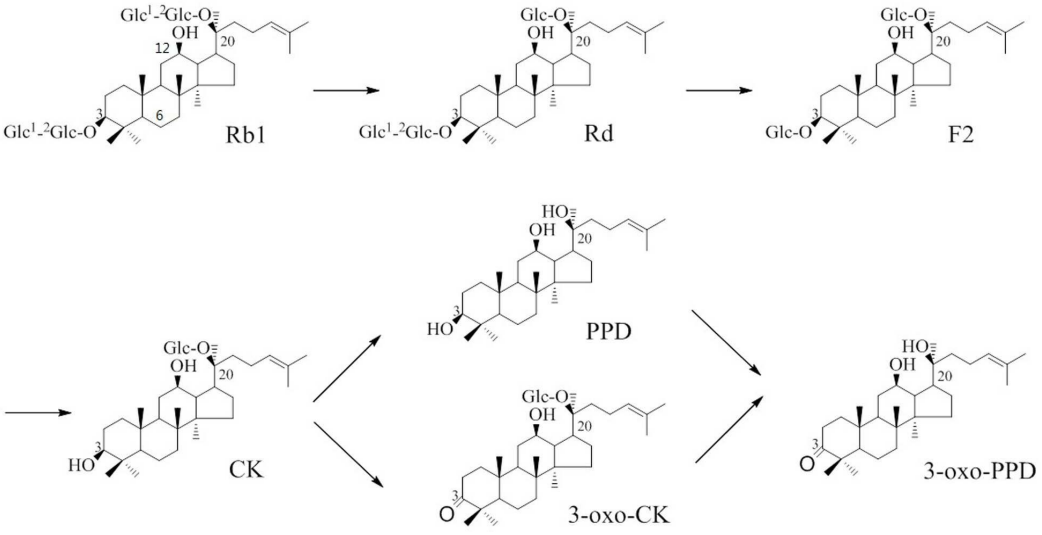
도면4


F2
(ppm)
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
F1 (ppm)

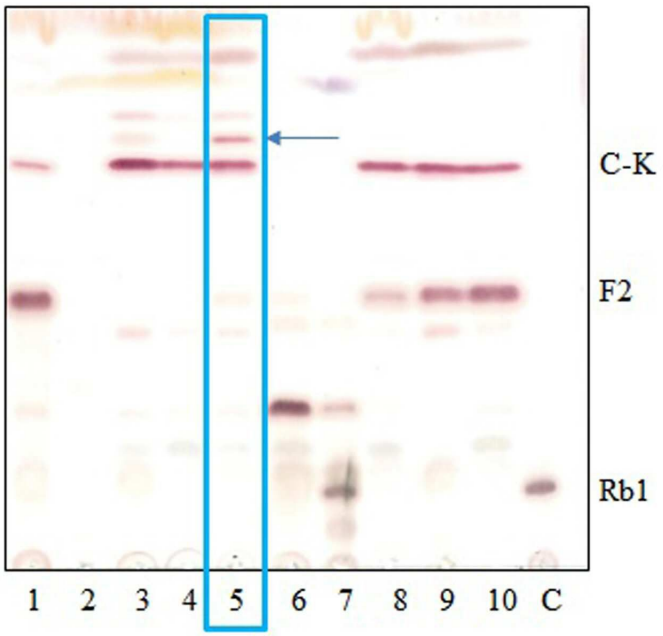
도면5


F2
(ppm)
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
F1 (ppm)

도면6


Glc1-2Glc-O
OH
12
20
3
6
Rb1
Glc-O
Rd
F2
HO
PPD
CK
3-oxo-CK
3-oxo-PPD

도면7



C, control; 1, KACC 41011; 2, KACC 41404; 3, KACC 43532; 4, KACC 43383; 5, KACC 43926; 6, KACC 41034; 7, KACC 40934; 8, KACC 43794; 9, KACC 44029; 10, KACC 43384. The arrow indicates the ketonized CK

도면8

