



- (51) 국제특허분류:
A61K 31/05 (2006.01) C07C 49/84 (2006.01)
A61P 29/045 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/000857
- (22) 국제출원일: 2012년 2월 7일 (07.02.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0101345 2011년 10월 5일 (05.10.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 부경대학교 산학협력단 (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRYUNIVERSITY) [KR/KR]; 608-739 부산광역시 남구 용당동 산 100 번지 부경대학교 내, Busan (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김세권 (KIM, Se-Kwon) [KR/KR]; 607-786 부산광역시 동래구 사직 2 동

쌍용에가아파트 125-1402 호, Busan (KR). 에스.더블유.에이.히마야 (S.W.A., Himaya) [LK/KR]; 613-104 부산시 남구 대연 3 동 599-1 번지 부경대학교 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단, Busan (KR). 류보미 (RYU, Bo-Mi) [KR/KR]; 613-104 부산광역시 수영구 광안 4 동 광안협성엠펜파이어 아파트 101 동 2703 호, Busan (KR). 중-지첸 (ZHONG-JI, Qian) [CN/KR]; 613-104 부산시 남구 대연 3 동 599-1 번지 부경대학교 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단, Busan (KR).

(74) 대리인: 이덕록 (LEE, Duck-Rog); 135-915 서울특별시 서울시 강남구 역삼동 669-17 예일파트빌딩 예일국제특허법률사무소, Seoul (KR).

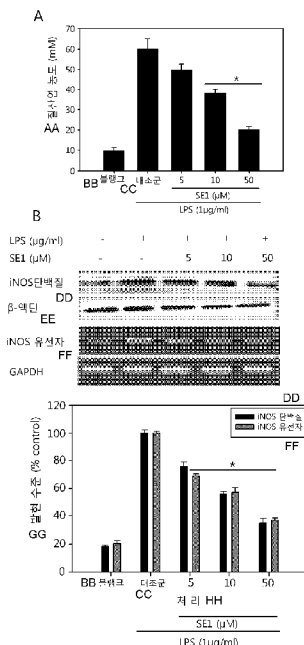
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: 1-(5-BROMO-2-HYDROXY-4-METHOXYPHENYL)ETHANONE HAVING ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME

(54) 발명의 명칭 : 항염증 효과를 갖는 1-(5-브로모-2-하이드록시-4-메톡시페닐)에탄논 및 이를 함유하는 약학 조성물

[Fig. 2]



AA ... Concentration of nitrate (mM)
BB ... Blank
CC ... Control group
DD ... iNOS protein
EE ... β-actin
FF ... iNOS gene
GG ... Expression level (% control)
HH ... Treatment

(57) Abstract: The present invention relates to 1-(5-bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone, which has anti-inflammatory effects, and to a pharmaceutical composition containing same. The pharmaceutical composition exhibits anti-inflammatory effects and preventive or treatment effects against inflammation-mediated neurodegenerative disease by a mechanism which blocks the phosphorylation of MAPK molecule and the nucleus translocation of NF-κB. In particular, since the size of the molecules constituting an SE1 compound is small, the molecules may easily pass through the barrier between the blood and the brain; thus the pharmaceutical composition exhibits the markedly superior effect of being capable of preventing or treating a neurodegenerative disease such as Alzheimer's disease.

(57) 요약서: 본 발명은 항염증 효과를 갖는 1-(5-브로모-2-하이드록시-4-메톡시페닐)에탄논 화합물 및 이를 함유하는 약학 조성물에 관한 것으로, MAPK 분자의 인산화 및 NF-κB의 핵 전위를 차단하는 메커니즘에 의해 항염증 효과 및 염증-매개된 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 효과를 가지며, 특히 SE1 화합물의 분자 크기가 작기 때문에 혈액-뇌 장벽을 쉽게 통과할 수 있어 알츠하이머와 같은 뇌 손상 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 현저히 우수한 효과를 갖는다.



PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

규칙 4.17 에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 항염증 효과를 갖는

1-(5-브로모-2-하이드록시-4-메톡시페닐)에타논 및 이를 함유하는 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 항염증 효과를 갖는 1-(5-브로모-2-하이드록시-4-메톡시페닐)에타논 화합물(SE1) 및 이를 함유하는 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 NF- κ B(nuclear factor kappa B) 및 MAPK(Mitogen-activated protein kinases) 신호화 경로를 차단하여서 알츠하이머와 같은 신경계 퇴행성 질환 등으로 예시될 수 있는 염증 관련 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 상기 SE1 화합물 및 이를 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근, 염증이 다양한 신경계 퇴행성 질환의 근본 요인이고 여러 세포 유형이 중추신경계 (central nervous system: CNS) 염증의 원인물질로 밝혀졌는데, 이 중에서 미세아교세포(microglia)는 중요한 세포 구성요소이다. 미세아교세포는 뇌에 있는 정주 선천적 면역 세포(resident innate immune cell)이며, 면역 감시(immune surveillance)를 책임진다(Block and Hong, 2005). 미세아교세포는 뇌 손상 또는 면역학적 자극에 반응하여 그 형태 및 표현형이 변화하여 쉽게 활성화된다 (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Perry et al., 2007). 미세아교세포가 장기간 비조절 활성화되면 급진적인 신경독성 결과로 이어지고, 이는 대부분의 경우에 발병보다는 질병 진행에 관련된다(Block et al., 2007; Ekdahl et al., 2009). 활성화된 미세아교세포는 활성 산소종, 전구염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokine), 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 인터루킨-1 β (IL-1 β) 및 인터루킨-6 (IL-6)과 같은 많은 신경독성 요인을 생성시키며, 이들은 뉴론(neuron)을 손상시키고 종국에는 사멸시킨다. 따라서, 미세아교세포 활성화는 이러한 염증 부반응을 피하기 위해 엄격하게 조절되어야 한다.
- [3] 미세아교세포 활성화 및 조절완화(deregulation)와 관련된 자극은 살충제 로테논(rotenone)과 같은 환경 독소로부터 뉴론 사멸 또는 손상이 발생하는 뇌 손상 또는 질환에 이르기까지 다양할 수 있다(Nimmerjahn et al., 2005). 실험 수준에서 미세아교세포 활성화는 급성 과활성화를 발생시킨 박테리아 지질다당류(lipopolysaccharide: LPS)를 이용한 모델에서 가장 효과적으로 증명되었다 (Hanisch and Kettenmann, 2007). 따라서, LPS-활성화된 미세아교세포는 미세아교세포 활성화의 결과 및 이를 억제할 수 있는 후보물질을 연구하기 위한 모델로서 광범위하게 사용되고 있다(Hanisch and Kettenmann, 2007).
- [4] 미세아교세포 비조절 활성화의 근본적인 신호화 메카니즘(signaling

mechanism)은 이를 이해함으로써 유해 활성화 조절에 대하여 이해할 수 있게 되므로 주된 관심사이다. NF- κ B 신호화 경로는 염증에 관련된 주요 신호화 메카니즘인 것으로 밝혀졌다. NF- κ B는 전구염증 매개체, 유도성 산화질소 신타아제(iNOS), 사이클로옥시게나아제-2(COX-2) 및 사이토카인의 발현을 촉진함으로써 면역 및 염증 반응을 매개하는 전사 인자이다. 또한, MAPK 신호화 경로는 미세아교세포의 염증 반응 조절에도 관련된다. 따라서, 염증 반응을 억제할 수 있는 잠재적인 후보물질을 제공할 필요성이 존재한다.

- [5] 해마(Seahorse)는 해양 경골어류로, 특수한 의약 성분으로 인해 널리 알려져 있다. 중국 해마인 히포카무스 쿠다 블릴러(*Hippocampus kuda* Bleeler)는 전통 중국 한의학에서 가장 유명한 재료중 하나로 사용되고 있으며 식욕 증진, 항산화, 항종양, 항노화, 항피로 및 Ca^{2+} 채널 차단을 비롯한 다양한 생물학적 활성화에 대하여 수 년동안 연구되어 왔다(Li et al., 2008; Ryu et al., 2010; Zhang et al., 2003).
- [6] 예컨대, 대한민국 특허출원 공개번호 제10-2009-0043656호 (공개일: 2009.05.07) '해마 추출물을 함유한 항산화용 조성물'에는 해마 추출물이 항산화 활성을 가짐을 기재하고 있고, 대한민국 특허출원 공개번호 제 10-2009-0063302호 (공개일: 2009.06.18) '해마 유래 비스(2-에틸헵틸) 프탈레이트 화합물 및 그의 제약학적 용도'에는 해마에서 유래된 상기 화합물이 항산화 및 항염증 효과를 가짐을 기재하고 있으며, 대한민국 특허출원 공개번호 제10-2011-0036415호(공개일: 2011.04.07) '관절염 치료용 해마 가수분해물 유래 펩타이드'에는 아미노산 서열 LEDPFDKDDWDNWK를 갖는 관절염 예방 또는 치료용 펩타이드가 기재되어 있다.
- [7] 그러나, 선행 기술 어디에도 1-(5-브로모-2-하이드록시-4-메톡시페닐)에타논 (1-(5-bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone: 이하, 'SE1'라 함)의 항염증 효과, 분자 형태학적 특성 및 그에 의한 약제학적 유효성분으로서의 장점에 대하여는 연구된 바가 없다.
- [8] 선행기술문헌
- [9] (특허문헌 1) 대한민국 특허출원 공개번호 제10-2009-0043656호 (공개일: 2009.05.07)
- [10] (특허문헌 2) 대한민국 특허출원 공개번호 제 10-2009-0063302호 (공개일: 2009.06.18)
- [11] (특허문헌 3) 대한민국 특허출원 공개번호 제 10-2009-0063302호 (공개일: 2009.06.18)
- 발명의 상세한 설명**
- 기술적 과제**
- [12] 본 발명에서는 *히포카무스 쿠다* 블릴러로부터 생활성 대사물질인 화합물 1-(5-브로모-2-하이드록시-4-메톡시페닐)에타논

(1-(5-bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone: 이하, 'SE1'라 함)을 분리하여 상기 화합물의 생활성 특징, 보다 구체적으로는 염증 예방 또는 치료에서의 용도를 제공하고자 한다. 한편, 상기 SE1은 죽상동맥경화증 및 감염의 치료 약물로 사용되는 한약 재료인 목단피(moutan cortex)의 주요 구성성분이기도 하므로, 목단피에서 분리 추출하여 사용할 수도 있다.

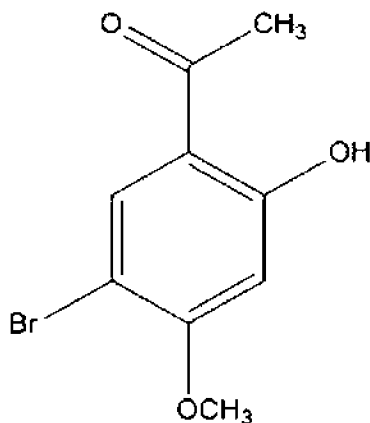
[13] 또한, 본 발명에서는 상기 SE1의 항염증 메카니즘, 보다 구체적으로는 SE1의 MAPK 및 NF- κ B 신호화 경로 차단 효과를 밝힌다.

[14] 그 밖에도, 본 발명에서는 상기 SE1이 뇌의 신경계 퇴행성 질환, 예컨대 알츠하이머 등에 효과적으로 사용될 수 있는 근거를 SE1의 분자형태적 관점에서 살펴보고자 한다.

과제 해결 수단

[15] 본 발명에서는 하기 화학식 1의 1-(5-브로모-2-하이드록시-4-메톡시페닐)에타논('SE1')의 항염증 효과를 제공한다:

[16] 화학식 1



[17] 상기 SE1 화합물은 그 유래가 특별히 한정되지는 않으나, 바람직하게는 해마 또는 목단피, 보다 바람직하게는 *히포카무스 쿠다* 블릴러로부터 유래된다.

[18] 본 발명에 따르면, SE1은 염증 마커 발현으로 이끄는 2가지 중요한 경로 MAPK 및 NF- κ B를 차단함으로써 활성화 미세아교세포에서 항-염증 반응을 매개한다.

[19] MAPK 신호화 경로 분자인 ERK, JNK 및 P38은 염증 반응 조절에 관련되며, 이들 분자의 인산화는 염증전 매개체, 특히 사이토카인의 발현을 최종적으로 신호화하는데, MAPK의 비조절 인산화는 염증 분자를 과도하게 생성시키고, 이는 역효과로 이어진다.

[20] 본 발명에 따르면, SE1은 ERK에 대한 염증 분자 조절에 크게 관련되어 있는 JNK 및 p38 MAPK의 인산화를 차단한다.

[21] NF- κ B 경로는 염증 관련 주요 신호화 경로이고, 상기 경로에서는 염증 유발자로 인해 비활성 전사 인자 NF- κ B가 활성화되고 핵에 전좌되어 광범위한 염증 분자를 발현시킨다. NF- κ B는 5개의 서브 유닛, 즉, p50 (NF- κ B1), p52

(NF- κ B2), p65 (RelA), RelB 및 c-Rel로 이루어져 있다. 가장 풍부한 것은 p50 및 p65이다. 미세아교세포에서 정상 조건에서는 NF- κ B는 I κ B에 결합되어 있고 세포질에서 휴지기 상태(resting state)로 있다. 면역 자극시에, 업스트림 신호화 분자 IKK는 유리 NF- κ B를 방출시키는 I κ B의 인산화 및 분해를 유도한다. 유리 NF- κ B는 핵내로 전좌되고 전구염증 단백질, iNOS, COX-2 및 사이토카인의 발현을 촉진시킨다. 이어서, 이들 염증 매개체는 상기 세포로부터 각각의 다운스트림 분자, 예컨대 iNOS로부터 NO의 배출을 자극시킨다. NO 및 PGE₂는 주요한 염증 매개체이고 염증 질환에서 중요한 역할을 한다. 활성화된 미세아교세포로부터 상기 분자의 장기간 비조절 생성은 CNS에서, 특히 뉴론에서 세포를 손상시키고 사멸에 이르게 한다.

- [22] 본 발명에 따른 SE1 화합물이 iNOS, COX-2 및 사이토카인의 발현을 감소시키는 NF- κ B 활성화 및 전좌를 억제함으로써 활성화 미세아교세포 모델에서 상기 과정을 조절한다. 이들 염증 유전자의 낮은 발현으로 인해, 이들 각각의 다운스트림 독성 생성물 NO, PGE₂ 및 사이토카인 생성이 낮아지고, 그 결과 염증 반응을 억제할 수 있다.
- [23] 본 발명의 염증 질환은 신경계 퇴행성 질환의 원인이 되는 염증 질환을 포함하며, 본 발명의 화합물이 적용가능한 그 구체적인 질환의 예로는 알츠하이머 질환, 파킨슨병, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 헌팅톤 무도병 또는 진행성 근이영양증 등을 들 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [24] 본 발명에 따르면, SE1은 10 내지 50 μ M 투약량 범위에서 항염증 효과를 갖는다.
- [25] 본 발명의 SE1 화합물에 존재하는 메톡시 기 및 Br 분자는 항염증 효능에 일조한다.
- [26] 본 발명의 SE1 화합물은 분자 크기가 작기 때문에, 생물학적 이용가능성이 높고 혈액-뇌 장벽을 통과하여 뇌의 미세아교세포에 도달할 가능성이 높다.
- [27] 본원에서 정의되는 '유효성분'이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능 및 효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성분을 포함하는 것을 의미한다.
- [28] 본 발명의 SE1 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 다른 담체 또는 부형제를 함유하여 정제, 환, 과립, 액상, 캡슐 등 당업자에게 자명한 형태로 제공될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물에서 SE1 화합물을 유효성분으로 함유하는 경우, 일일 투약량은 담당의 등의 처방에 따라 결정될 수 있고, 하루에 1회 또는 수회로 나누어 투약될 수 있다.
- [29] 본 발명에 따른 약학 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 상기 약학 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제,

붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 매생이 당단백질 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [30] 본 발명의 SE1 화합물은 MAPK 분자의 인산화 및 NF- κ B의 핵 전좌를 차단하는 메카니즘에 의해 항염증 효과 및 염증-매개된 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 효과를 가지며, 특히 SE1 화합물의 분자 크기가 작기 때문에 혈액-뇌 장벽을 쉽게 통과할 수 있어 알츠하이머와 같은 뇌 손상 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 현저히 우수한 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 BV-2 및 PC-12 세포의 생존도에 대한 SE1의 효과를 나타낸 그래프이다.
- [32] 도 2의 A는 BV-2 세포에서 LPS-유도된 NO 생성에 대한 SE1의 효과를 나타낸 그래프이고, 도 2의 B는 BV-2 세포에서 SE1이 LPS-유도된 iNOS 단백질 및 mRNA 발현을 억제하는 것을 나타낸 것이다.
- [33] 도 3의 A는 BV-2 세포에서 LPS-유도된 PGE₂ 생성에 대한 SE1의 효과를 나타낸 그래프이고, 도 3의 B는 BV-2 세포에서 SE1이 LPS-유도된 COX-2 단백질 및 mRNA 발현을 억제하는 것을 나타낸 것이다.
- [34] 도 4는 LPS-유도된 TNF- α (A), IL-1 β (C) 및 IL-6(E)의 생성에 대한 SE1의 효과를 나타낸 그래프 및 LPS-유도된 TNF- α (B), IL-1 β (D) 및 IL-6(F)의 유전자 발현에 대한 SE1의 효과를 나타낸 그래프이다.
- [35] 도 5는 BV-2 세포에서 LPS-유도된 MAP 키나아제 활성화에 대한 SE1 효과를 나타낸 것이다.
- [36] 도 6은 BV-2 세포에서 LPS-유도된 IKK α/β 발현, IKB α 분해 및 NF- κ B 활성화에 대한 SE1 효과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [37] 이하, 실시예에서 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것이 아님이 당업자들에게 명백히 이해될 것이다.

[38] 재료 및 방법

[39] ^1H NMR (400 MHz) 및 ^{13}C NMR (100MHz) 스펙트럼은 CDCl_3 (1D, ^1H 에서 12.75 ppm, ^{13}C NMR에서 113.9 ppm)을 이용하여 JEOL JNM-ECP 400 NMR 분광계 (JEOL, 일본) 상에 기록하였다. MS 스펙트럼은 JEOL JMS-700 분광계 (JEOL, 일본) 상에서 얻었다. 실리카 겔 60 (230 내지 400 메쉬(mesh), 머크(Merck), 독일) 및 박막 크로마토그래피 (TLC) 플레이트 (Kieselgel 60F254, 0.25 mm, 머크)를 각각 컬럼 크로마토그래피 및 분석용 TLC로 사용하였다. BV-2 마우스 미세아교세포는 대한민국 인제대학교 (Inje University)의 최일환(Il-Whan Choi) 교수로부터 제공받았다. 세포배양배지 (둘베코 변형 이글의 최소 필수 배지: Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)), 페니실린/스트렙토마이신, 소테아 혈청, 말 혈청 및 세포 배양에 필요한 다른 물질은 킵코 비알엘, 라이프 테크놀로지스 (Gibco BRL, Life Technologies, 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)에서 구입하였다. MTT 시약 (3-(4,5-다이메틸-2-일)-2,5-다이페닐 테트라졸륨 브로마이드), 그리스 시약(the Griess reagent) 및 대장균 026:B6의 LPS는 시그마 케미칼 캄파니(Sigma Chemical Co.)에서 구입하였다. 웨스턴 블롯 분석에 사용된 일차 및 이차 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지 잉크(Santa Cruz Biotechnology Inc., 미국 캘리포니아주 산타 크루즈 소재) 및 아머샴 파마시아 바이오사이언스이즈 (Amersham Pharmacia Biosciences, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)에서 구입하였다. 다른 화학약품 및 시약은 시판되는 분석용 등급이었다.

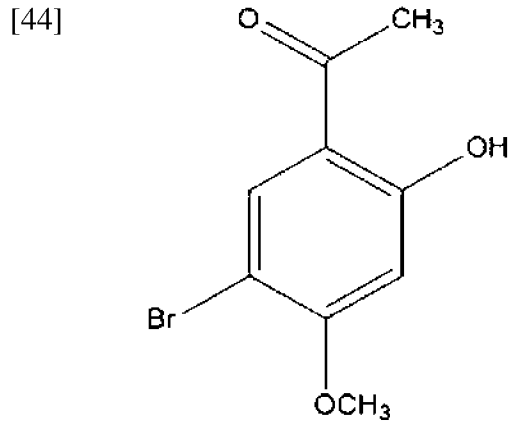
[40] 살아있는 해마 히포카무스 쿠다 블릴러 성체는 2005년 10월에 중국 저장성(Zhejiang) 주산군도(Zhoushan Island)에서 채집하고, 내부 장기를 제거한 후에 동결 건조하였다. Ming-Lu Deng 교수(중국 장춘중의학원: Changchun University of Chinese Medicine, 동물학자)가 히포카무스 쿠다 블릴러임을 확인해주었다.

[41] SE1 추출 및 확인

[42] 동결건조된 *히포카무스 쿠다* 블릴러(3 kg)를 분말 상태가 되도록 분쇄하고, MeOH (3 x 5 L)와 함께 3시간동안 환류시키고, 그 용매를 진공에서 증발시켜서 조질의 MeOH 추출물(217g)을 수득하였다. 우선, 비극성용매인 n-헥산 3L를 흘리면서 각각 50 ml씩 100 ml 삼각플라스크를 받아 주요물질이 있는지 확인후, EtOAc 3L를 연속적으로 흘려서 같은 작업을 반복 수행한다. 그리고, 순차적으로 극성용매인 MeOH을 3L 흘려서 유의적인 물질이 있는지 확인하는 방식으로 n-헥산/EtOAc/MeOH (구배)로 용출시키면서 추출물을 실리카 겔 플래시 크로마토그래피시키고, 10개의 주요 분획물을 제공하였다. 독성시험과 분리정제를 통해 실험에 적합한 물질인 분획물 6 (502 mg, EtOAc)을 실리카 겔 상에서 반복적으로 정제하였다. 성공적으로 정제하여서 화합물(16.38 mg)을 수득하였다. 종합적인 스펙트럼 분석 및 이전에 공개된 데이터(Qing et al., 2009)를 바탕으로, 수득된 화합물이 하기 화학식 1을 갖는

1-(5-브로모-2-하이드록시-4-메톡시페닐) 에타논 (SE1)으로 밝혀졌다:

[43] 화학식 1



[45] 또한, 수득된 화합물은 LREIMS, ^1H , ^{13}C 및 ^{13}C DEPT 스펙트럼 데이터로부터 $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3\text{Br}$ 로 결정되었다.

[46] SE1 화합물: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} ppm 12.70 (1H, s, HO-2), 7.86 (1H, s, H-6), 6.46 (1H, s, H-3), 3.92 (3H, s, H-9), 2.56 (3H, s, H-8); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} ppm 114.6 (C-1), 164.4 (C-2), 100.7 (C-3), 161.8 (C-4), 101.1 (C-5), 134.7 (C-6), 201.9 (C-7), 26.3 (C-8), 56.6 (C-9) (표 1 참조); LREIMS m/z 246.10 (41) $[\text{M}]^+$, 244.15 (42), 231.05 (100), 229.05 (97), 216.00 (2), 188.00 (2), 173.05 (5), 149.10 (2), 121.15 (3), 107.10 (22), 93.10 (4), 79.05 (24), 69.05 (13), 53.00 (21).

[47] 표 1

[Table 1]

SE1에 대한 ^1H 및 ^{13}C NMR 데이터

위치	SE1	
	δ_{H} (mult, J)	δ_{C} (mult)
1		114.6(s)
2		164.4(s)
3	6.46 (1H, s)	100.7(d)
4		161.8(s)
5		101.1(s)
6	7.86 (1H, s)	134.7(d)
7		201.9(s)
8	2.56 (3H, s)	26.3(q)
9	3.92 (3H, s)	56.6(q)
10		
11		
2-OH	12.70 (1H, s)	
^1H 에 대해 400 Hz에서, ^{13}C 에 대해 100 Hz에서 CDCl_3 중에서 기록됨		

[48] 세포 배양 및 세포 생존도 어세이(assay)

[49] BV-2 세포는 5% 열-불활성화된 소태아 혈청(FBS), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 스트렙토마이신 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 페니실린으로 보충된 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM)에서 95% 공기, 5% CO_2 분위기로 보관하였다. BV-2 세포는 일주일에 2회 계대배양을 유지시키고, 세포를 70 내지 80% confluence에서 실험에 이용하였다. PC-12 세포는 10% 말 혈청 및 5% FBS로 보충된 고 글루코즈 DMEM에서 동일한 분위기로 보관하였다.

[50] 배양된 BV-2 및 PC-12 세포 중에서 MTT 세포 생존도 어세이를 이용하여 SE1의 3가지 농도(5, 10 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 SE1 화합물의 세포 화합성(cell compatibility)을 테스트하였다. 세포 생존도는 Hansen 등(1989)에 기재된 바와 같은 3-(4,5-다이메틸-티아졸-2-일)-2,5-다이페닐 테트라졸륨 브로마이드(MTT) 환원 어세이에 의해 결정하였다. 이는, 살아있는 세포는 배양동안에 MTT를 가시성 포르마잔 결정으로 전환시키고 다이메틸설폭사이드 중 용해된 포르마잔 결정의 흡광도는 세포 생존도에 비례한다는 이론에 근거한 것이다.

[51] MTT는 포르마잔으로의 미토콘드리아 환원을 통해 세포 생존도 지표로 이용된다(Rajapakse et al., 2008). 세포를 웰당 1×10^4 세포 밀도로 96-웰 플레이트에서 밤새 예비배양하고, 이어서 포스페이트-완충액(PBS)으로

세척하였다. 세포를 다양한 농도 (5, 10 및 50 μ M)의 SE1으로 24시간동안 처리하고, 100 μ L MTT를 추가하고 37°C로 4시간동안 배양하였다. 배양물 상청액을 제거한 후에, 수득된 암청색 결정(crystal)을 DMSO(Dimethylsulfoxide)에 용해시켰다. 효소결합 면역흡착측정법 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay :ELISA) 마이크로플레이트 리더(테칸 오스트리아 게엠베하: Tecan Austria GmbH)로 540 nm에서 흡광도를 읽었다. 상대 세포 생존도를 비처리 대조군 대비 계산하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, SE1은 처리 24시간 후에 시험된 모든 농도에서 세포에 대하여 유의한($P < 0.05$) 세포 독성을 나타내지 않았다. 이러한 데이터는 SE1이 PC-12 세포 또는 BV-2 세포에서 세포 증식에 대해 영향을 주지 않기 때문에 추후 실험에서 안전하게 사용될 수 있음을 시사한다. 따라서, 5 내지 50 μ M/mL 범위의 비독성 농도를 추후 분석을 위해 선택하였다.

[52] 산화질소 생성 어세이

[53] 미세아교세포를 LPS 자극하면 iNOS 발현이 증가하고, 이는 NO 생성을 매개하여 최종적으로는 NO 그 자체 또는 이보다 독성이 큰 대사산물인 과산화아질산염(ONOO⁻)에 의해 시인접 뉴런 세포를 손상시킨다. NO는 쉽게 질산염(NO₂⁻)으로 전환되므로 수명이 짧은 분자이다. 따라서, 질산염 농도는 생성된 NO의 양을 나타내는 지표이며, 또한 질산염은 그리스 반응으로 분석될 때에 분광학적으로 쉽게 검출된다.

[54] 배양물 상청액 중 산화질소(NO) 농도는 문헌 [Coker and Laurent, 1998]에 기재된 바와 같이 그리스 반응(Griess reaction)에 의해 측정하였다. 즉, BV-세포는 웰당 1×10^4 세포 밀도로 페놀레드없이 DMEM을 이용하여 96-웰 플레이트에서 밤새 예비배양하고, 이어서 SE1 (5, 10 및 50 μ M)로 1시간동안 처리하였다. 이후에, 48시간동안 LPS (1 μ g/mL 최종 농도)와 함께 배양함으로써 NO 생성을 자극하였다. 이어서, 각 샘플로부터의 배양물 상청액 50 μ L을 동량의 그리스 시약 (1% 설파닐아마이드/0.1% N-(1-나프틸)-에틸렌다이아민 다이하이드로클로라이드/2.5% 인산)과 혼합하고, 15분동안 배양하였다. ELISA 마이크로플레이트 리더(테칸 오스트리아 게엠베하)로 540 nm에서 흡광도를 읽었다. 얻어진 수치값을 DMEM에 용해된 아질산나트륨의 표준 농도의 수치값과 비교하고, 샘플 처리된 세포의 조건화된 배지에서의 아질산염 농도를 계산하였다.

[55] 그 결과, LPS는 비-자극된 블랭크 군에 비해 아질산염의 비조절 생성을 유도하였다 (도 2의 A). SE1에 의한 예비 처리에 의해 모든 테스트된 농도에서 BV-2 세포 중 LPS-자극된 NO 생성이 효과적으로 감소하였고, 그 억제제는 처리량의존적이었다.

[56] iNOS 효소 및 mRNA의 LPS-유도된 발현에 대한 SE1의 효과를 연구하기 위해서, BV-2 세포를 상이한 농도(5, 10 및 50 μ M)의 SE1으로 1시간동안 처리한 후에 LPS (1 μ g)로 18시간동안 처리하고, 각각 웨스턴 블롯 및 RT-PCR로

테스트하였다. 비자극 세포는 단백질 및 mRNA 수준 둘다에서 LPS-유도된 iNOS 과발현에 비해 매우 낮은 수준의 iNOS 발현을 나타내었다(도 2의 B). 이러한 과발현은 농도 의존적인 방식으로 SE1 처리에 의해 유의하게 억제되었다. 이 결과는 SE1-매개된 NO 억제와 잘 일치하였으며, 따라서 SE1이 iNOS의 비조절 전사 및 해독을 억제함으로써 NO 생성을 억제함을 시사한다.

[57] PGE₂의 효소 면역 어세이

[58] 유도성 사이클로옥시게나아제 COX-2는 전구염증 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂)을 생성시켜서 염증을 발병시킨다. PGE₂ 생성 억제에 대한 SE1 효능을 결정하기 위해서, 조건화된 배지를 이용하여 항-PGE₂-피복된 ELISA 플레이트를 이용하여 PGE₂ 방출량을 측정한다.

[59] PGE₂ 합성 측정은 시판되는 PGE₂ 효소 면역계측(immune-metric) 어세이 키트(아머삼 파마시아 바이오사이언스이즈: Amersham Pharmacia Biosciences, 미국 뉴저지주 소재)를 사용하여 선행 추출 또는 정제없이 효소 면역 어세이에 의해 실시하였다. BV-2 세포는 상이한 농도(5, 10 및 50 μ M)의 SE1으로 1시간동안 처리하고, LPS (1 μ g/mL)로 18시간동안 자극하였다. 조건화된 배지를 수거하여 제조업체 지시에 따라 PGE₂ 효소 면역계측 어세이(PGE₂-EIA)를 실시하였다. PGE₂ 농도는 EIA 키트와 함께 제공된 PGE₂ 표준 용액을 사용하여 표준 곡선 작성에서 얻어진 식에 따라 계산하였다.

[60] 그 결과, 비자극 군에 비해 LPS 자극의 결과로서 BV-2 세포에서 PEG₂ 생성이 현저하게 증가하였다. 그러나, SE1 처리군은 처리량 의존적인 방식으로 모든 테스트된 농도 (5, 10 및 50 μ g/mL)에서 PGE₂의 농도 증가를 유의하게 억제하였다(도 3의 A).

[61] PGE₂ 생성의 SE1-매개 억제의 근본 메커니즘을 연구하기 위해서, COX-2 단백질 및 COX-2 mRNA 수준의 발현은 SE1(5, 10 및 50 μ M)으로 1시간동안 처리한 후에 LPS (1 μ g)로 18시간동안 자극한 BV-2 세포에서 수거된 단백질 및 RNA를 이용하여 각각 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 분석하였다.

[62] 그 결과, COX-2 효소 및 mRNA의 LPS-유도된 과발현은 단백질 및 유전자 수준 둘다에서 SE1 처리량 의존적으로 명확히 억제되었으며(도 3의 B), 이는 PGE₂와 유사한 억제 효과이다.

[63] TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 효소 면역 어세이

[64] CNS에서, 전구염증 사이토카인은 활성화된 미세아교세포로부터 일차적으로 생성되고, 뇌 염증의 발병 및/또는 악화에 관련된다.

[65] 전구염증 사이토카인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 생성에 대한 SE1의 억제 효과는 효소결합 면역흡착 측정법(ELISA)에 의해 결정하였다. 세포를 상이한 농도(5, 10 및 50 μ M)의 SE1로 1시간동안 처리한 후에 LPS (1 μ g/mL)로 18시간동안 처리하였다. 조건화된 배지를 마우스 사이토카인-특이적 Biotral(상표명) ELISA 키트 (아머삼 파마시아 바이오사이언스이즈, 미국 뉴저지주)를 사용하여 제조업체 지시에 따라 분석하였다. TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 농도는 ELISA 키트와

- 함께 제공된 제조합 사이토카인 각각을 이용하여 표준 곡선에 의해 계산하였다.
- [66] 그 결과, 비자극 세포에 비해, 사이토카인 농도는 LPS-자극된 BV-2 세포의 배양 배지에서 증가하였으며, SE1 처리에 의해 처리량 의존적으로 감소하였다 (도 4의 A, C, E).
- [67] 역전사 (RT)-PCR 분석
- [68] SE1이 전사 수준에서 사이토카인에 영향을 주는지 확인하기 위해서, SE1(5, 10 및 50 μ M)으로 1시간동안 전처리되고 LPS (1 μ g)에 의해 18시간동안 자극된 BV-2로부터 분리된 RNA를 이용하여 RT-PCR을 실시하였다.
- [69] iNOS, COX-2 및 사이토카인(TNF- α , IL-1 β 및 IL-6) mRNA 발현 검출을 위해 RT-PCR을 실시하였다. 상이한 농도(5, 10 및 50 μ M)의 SE1으로 1시간동안 처리하고, 이어서 LPS (1 μ g/mL)로 18시간동안 처리한 후에 전체 RNA를 BV-2 세포로부터 추출하였다. 세포를 트리졸(Trizol: 등록상표)로 용해(lysis)하고 12,000 rpm에서 15분동안 25°C로 원심분리한 후에 클로로포름을 추가하였다. 상층액을 분리하고, 이소프로판올을 1:1 비로 첨가하였다. 10,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여서 RNA 펠릿을 수득하였다. 에탄올로 세척한 후에, 추출된 RNA를 다이에틸 파이로카보네이트-처리된 RNase-비함유 물에 용해시키고, GENios(등록상표) 마이크로플레이트 리더(테칸 오스트리아 게엠베하)를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 양을 정량하였다. 수득된 RNA(1 μ g)를 1 x 역전사효소 (RT) 완충액, 1 mM dNTPs, 올리고 (dT)15 프라이머 500 ng, 설치류 몰로니 백혈병 바이러스 (MMLV) 역전사효소 140 U 및 RNase 억제제 40 U를 함유하는 마스터-믹스 중에서 cDNA 내에 45분동안 42°C로 역전사시켰다. 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR)을 자동 와트만 써모사이클러(automatic Whatman thermocycler)(바이오메트라: Biometra, 영국 쉐튼)에서 실시하여서 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 및 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로게나아제(GAPDH) mRNA를 증폭시켰다. 각각의 전사는 제조업체(프로메가: Promega, 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 지시에 따라 특정 순방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 확인하였다. GAPDH 발현은 내부 하우스키핑 유전자(internal housekeeping gene) 대조군으로 포함되었다. 목적하는 cDNA를 증폭하는데 사용된 프라이머 서열은 다음과 같았다.
- [70] iNOS 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-CCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC-3' 및 5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3';
- [71] COX-2 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-GGGGTACCTTC CAGCTGTCAAATCTC-3' 및 5'-GAAGATCTCGCCAGGTACTCACCTG-3';
- [72] TNF- α 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3' 및 5'-TACA GGCTTGTCACCTCGAATT-3';
- [73] IL-1 β 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-ATGGCAACTGTTCTGAAGTCAACT-3' 및

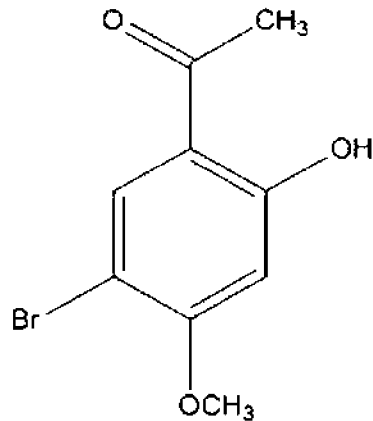
- 5'-TTTCCTTTCTTAGATATGGACAGGAC-3';
- [74] IL-6 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3' 및 5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'; 및
- [75] G3PDH 정방향 및 역방향 프라이머: 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGGC-3' 및 5'-CA TGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3'.
- [76] 증폭 사이클 조건은 95°C 30초, 55°C 30초 및 72°C 1분의 35회 사이클이었다. 이어서, 100 V에서 30분동안 1 x TAE 완충액중 1.5% 아가로스 겔 상에서 전기영동된 PCR 반응 생성물은 AlphaEase(등록상표) 겔 이미지-분석 소프트웨어(알파 이노테크: Alpha Innotech, 미국 캘리포니아주 샌 린드로 소재)를 사용하여 에티뉼 브로마이드로 시각화하였다.
- [77] 그 결과, 사이토카인 발현은 LPS 처리에 의해 유의하게 조절되었고, 시험된 모든 3가지 사이토카인에서 SE1 처리에 의해 유의하게 억제되었다(도 4의 B, D, F). 이는 SE1이 mRNA 발현을 하향 조절하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6을 억제함을 의미한다.
- [78] 웨스턴 블롯 분석
- [79] 비조절 염증을 초래하는 LPS-유도된 미세아교세포 활성화의 SE1 억제 메커니즘을 더 연구하기 위해서, MAPK 신호화 경로에 대한 SE1 효과를 연구하였다. BV-2 세포를 SE1으로 1시간동안 처리하고 LPS로 30분동안 처리하였다. 세포의 신호-조절된 키나아제(ERK), c-jun-N-말단 키나아제 (JNK) 및 P38 MAPK의 인산화에 대한 SE1 효과를 연구하기 위해서 웨스턴 블롯 분석을 실시하였다.
- [80] 웨스턴 블롯은 표준 절차를 이용하였다. 즉, 상이한 농도(5, 10 및 50 μ M)의 SE1로 처리하고, 이어서 LPS(1 μ g/mL)로 18시간동안 처리한 BV-2 세포를 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.4% Nonidet P-40, 120 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 80 μ g/mL 류펩틴, 3 mM NaF 및 1 mM DTT를 함유하는 용해(lysis) 완충액 중에서 4°C에서 30분동안 용해시켰다. 원심분리하여 세포 찌꺼기(cell debris)를 제거하고, 추출 단백질을 함유한 상청액을 사용시까지 -80°C로 유지하였다. BV-2 세포의 핵 추출물을 얻기 위해서 CellLytic(상표명) NuCLEAR(상표명) 추출 키트(시그마-알드리치 캄파니: Sigma-Aldrich Co., 미국 미주리주 소재)를 제조업체 지시에 따라 사용하였다. 세포 용해물의 단백질 농도는 로우리 방법을 이용하여 결정하였다. 동량의 단백질(총 단백질 약 20 μ g)을 함유하는 세포 용해물을 SDS-PAGE 겔 전기영동에 의해 분리하고, 니트로셀룰로오즈 멤브레인에서 electro-blotting하였다. 상기 멤브레인을 5% BSA로 블로킹하고, 이어서 목적하는 항체(산타 크루즈 바이오테크놀로지 잉크.: Santa Cruz Biotechnology Inc.)와 함께 배양하여서 화학발광 ECL 어세이 키트를 사용하여 제조업체 지시에 따라 각각의 단백질을 검출하였다. LAS3000(등록상표) 발광 이미지 분석기(Luminescent image analyzer)를 사용하여

웨스턴 블롯을 시각화하였고, Multi Gauge V3.0 소프트웨어(후지필름 라이프 사이언스: Fujifilm Life Science, 일본 동경 소재)를 이용하여 단백질 발현을 정량화하였다.

- [81] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, LPS 처리는 LPS 비처리군에 비해 3가지 모든 MAPK 분자의 인산화를 유도하였다. JNK 및 P38 인산화 둘다는 SE1 처리량의존적으로 억제된 반면, ERK 인산화에 대하여는 유의한 효과가 없었다.
- [82] SE1의 NF- κ B 핵 전사 억제
- [83] 전사 인자 NF- κ B의 활성화 및 핵 전좌(translocation)는 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6와 같은 염증 유전자의 발현을 촉진한다. 이러한 현상은 IKK (IB kinase) 및 I κ B(Inhibitor of B)와 같은 업스트림(upstream) 신호화 분자에 의해 엄격하게 조절된다. 따라서, 염증 반응의 SE1-매개 억제가 LPS 처리된 BV-2 세포에서 NF- κ B 활성화 및 전좌의 억제를 통해 조절되는지 여부를 연구하였다.
- [84] 세포를 SE1 (5, 10 및 50 μ M)으로 1시간동안 처리한 후에 LPS(1 μ g/mL)로 자극하였다. 상기 세포를 1시간 후에 수거하여서 세포질 및 핵 추출물을 준비하여 IKK α/β , I κ B α , NF- κ B p65 및 NF- κ B를 웨스턴 블롯으로 검출하였다. 단백질 발현 수준은 LPS 단독 처리된 대조군 대비 밀도로 측정하였다.
- [85] 그 결과, LPS 단독 처리군에 비해 SE1 처리군에서 IKK의 세포질 농도가 감소되고 I κ B 농도는 증가하였다 (도 6). 이와 동시에, LPS 처리에 의한 NF- κ B p65 및 NF- κ B p50의 증가된 핵 농도는 SE1 처리시에 감소하였다. 이는 SE1이 업스트림 신호화 분자 IKK 및 I κ B를 조절함으로써 NF- κ B 핵 전좌를 억제함을 나타낸다.
- [86] 통계 분석
- [87] 모든 데이터는 달리 표기되지 않는 한, 3회의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ S.D.로 기재하였다. 상이한 처리 간의 통계적 비교는 SPSS 프로그램(버전 12.0)을 이용하는 스튜던트 뉴만 쿨(Student Newman Keul)의 사후검정 테스트로 일원배치분산분석(one way ANOVA)하여 행하였다. $P < 0.05$ 값을 갖는 차이를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

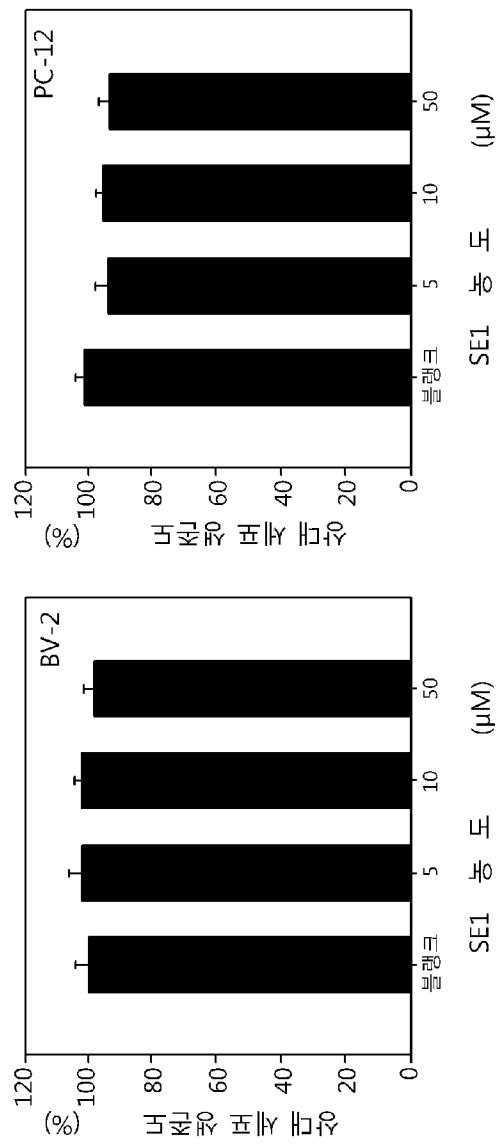
청구범위

- [청구항 1] 항염증 효과를 가짐을 특징으로 하는 하기 화학식 1의 1-(5-브로모-2-하이드록시-4-메톡시페닐)에타논 화합물(SE1):
화학식 1

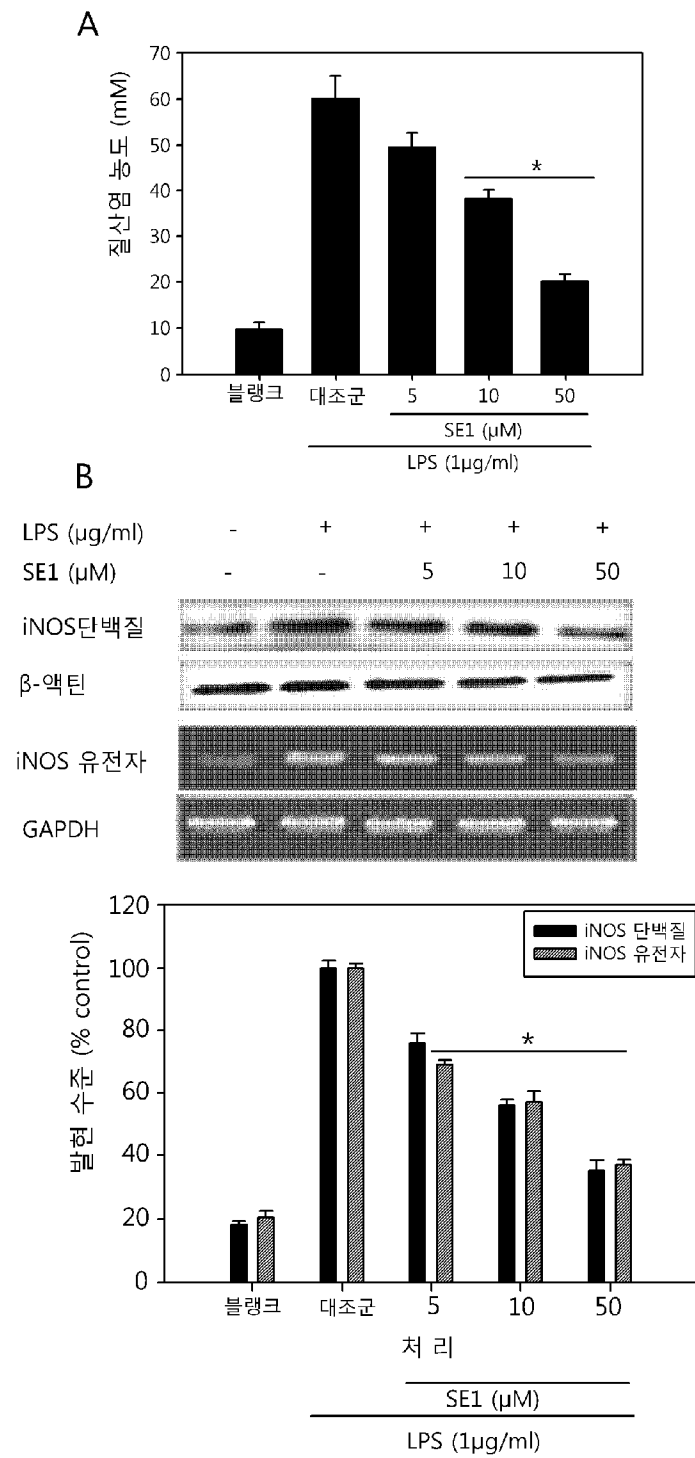


- [청구항 2] NF- κ B(nuclear factor kappa B) 및 MAPK(Mitogen-activated protein kinases) 신호화 경로를 차단하여서 항염증 효과를 가짐을 특징으로 하는 SE1 화합물.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,
알츠하이머 질환, 파킨슨병, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 헌팅톤 무도병 또는 진행성 근이영양증의 예방 또는 치료용 SE1 화합물.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서,
목단피 또는 해마로부터 유래된 것을 특징으로 하는 SE1 화합물.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항의 SE1 화합물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항염증용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
알츠하이머 질환, 파킨슨병, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 헌팅톤 무도병 또는 진행성 근이영양증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

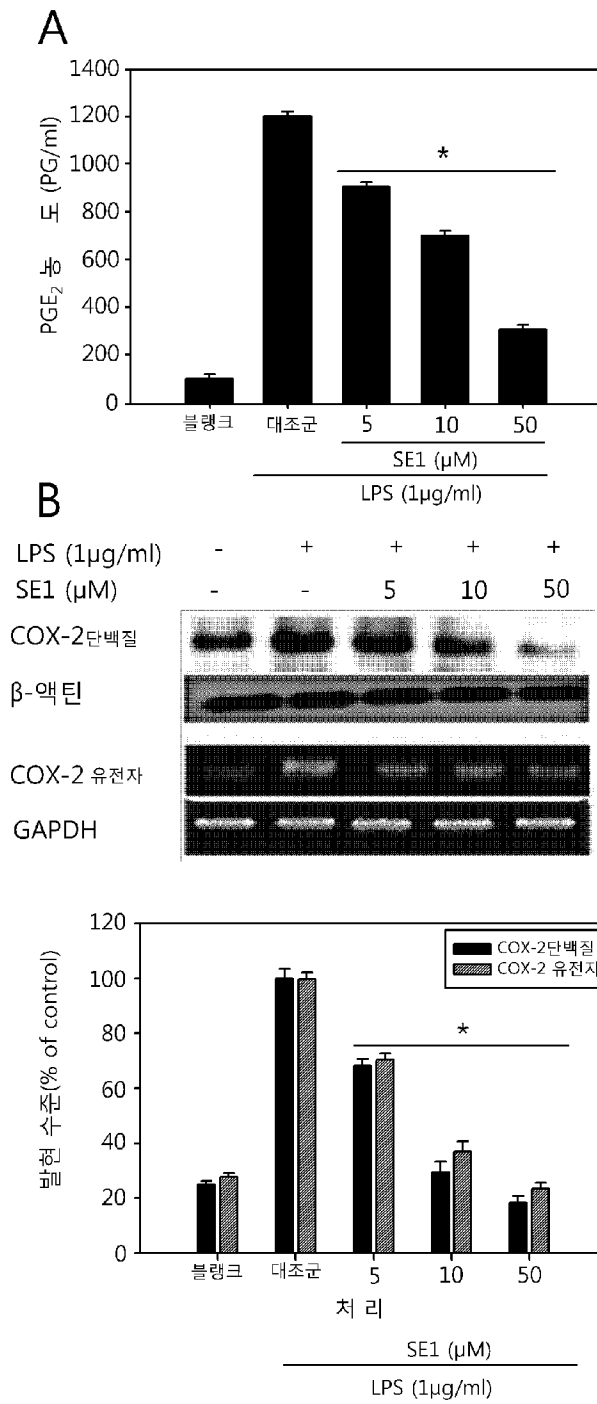
[Fig. 1]



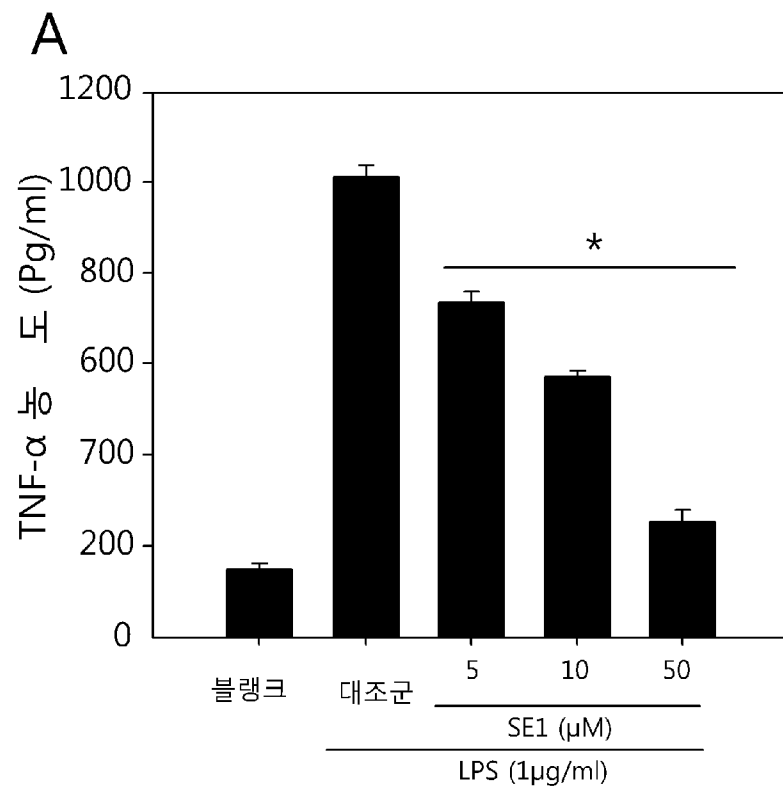
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4a]

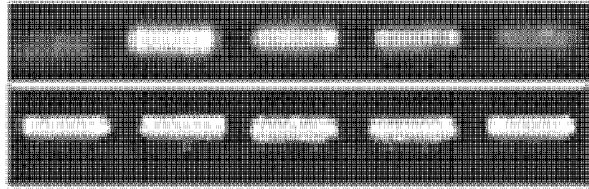


[Fig. 4b]

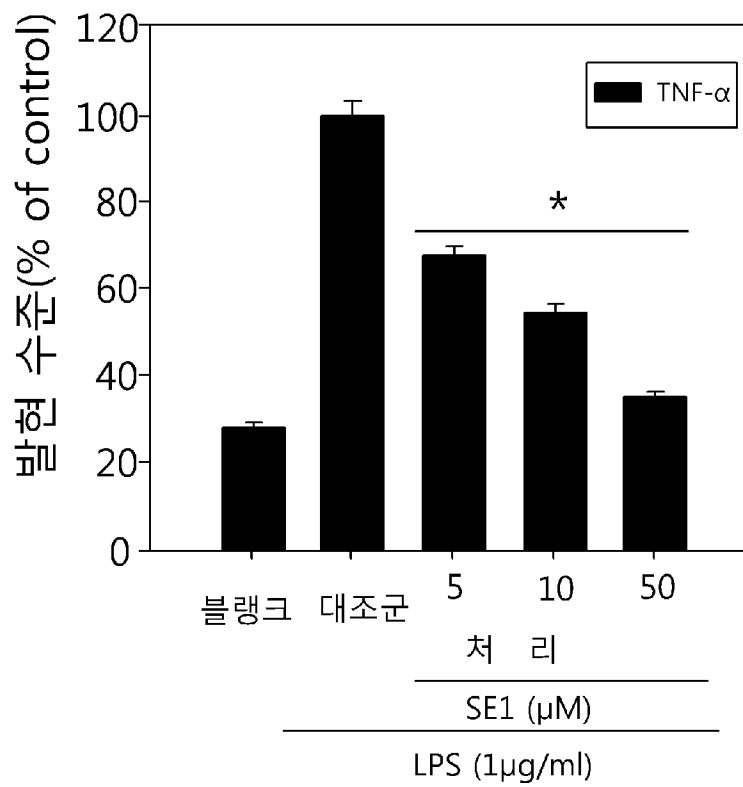
B

LPS(1μg/ml)	-	+	+	+	+
SE1 (μM)	-	-	5	10	50

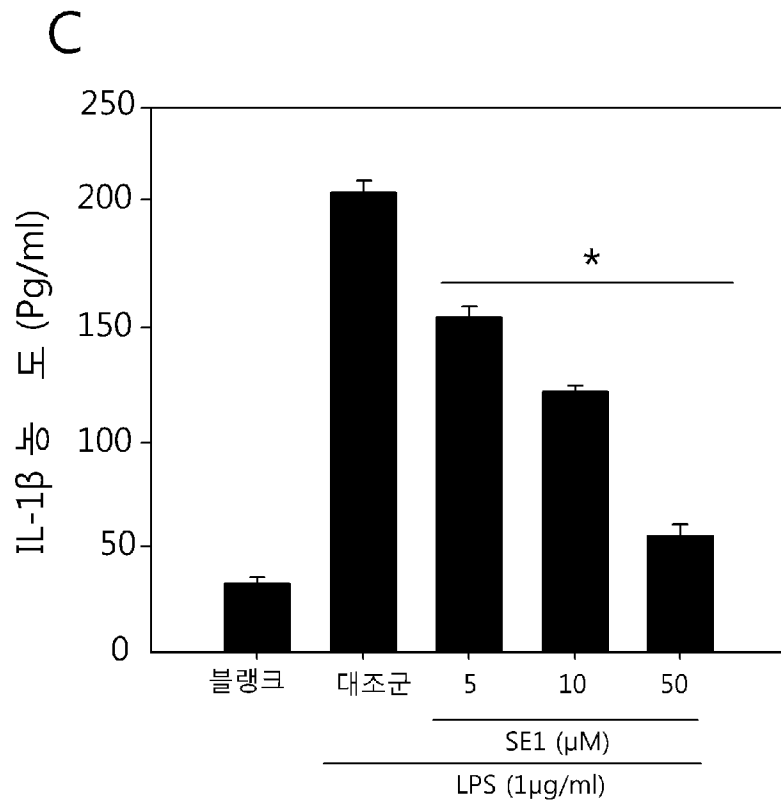
TNF-α Gene



GAPDH



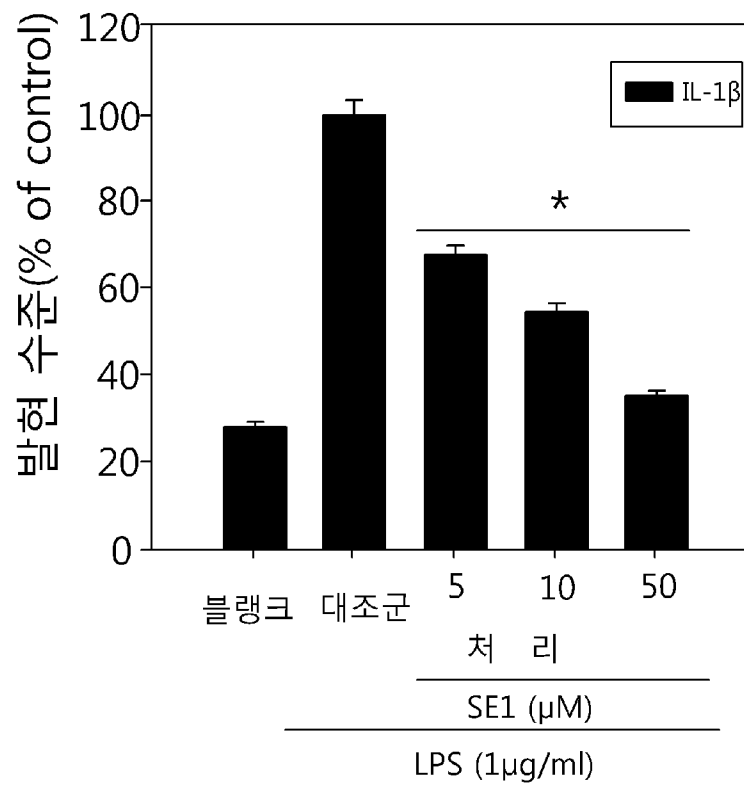
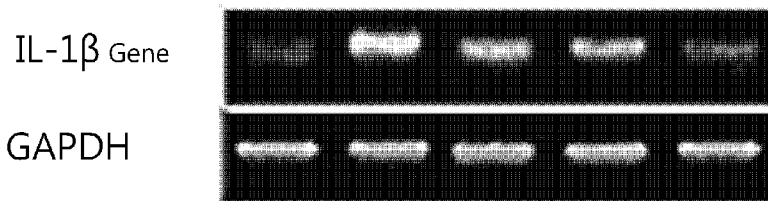
[Fig. 4c]



[Fig. 4d]

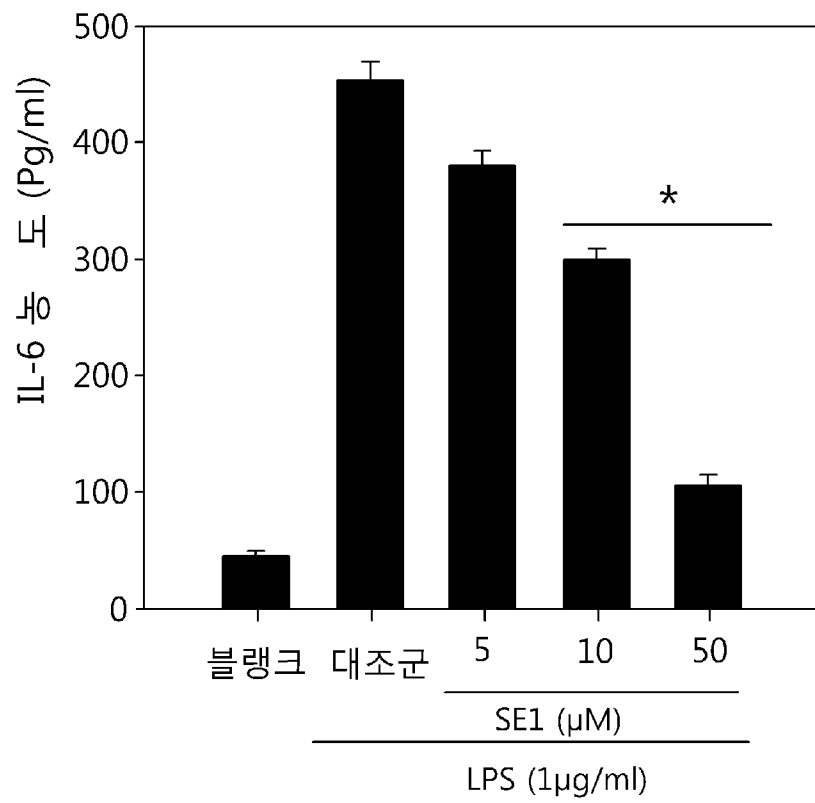
D

LPS(1 μ g/ml)	-	+	+	+	+
SE1 (μ M)	-	-	5	10	50



[Fig. 4e]

E

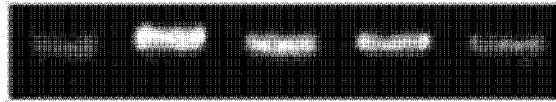


[Fig. 4f]

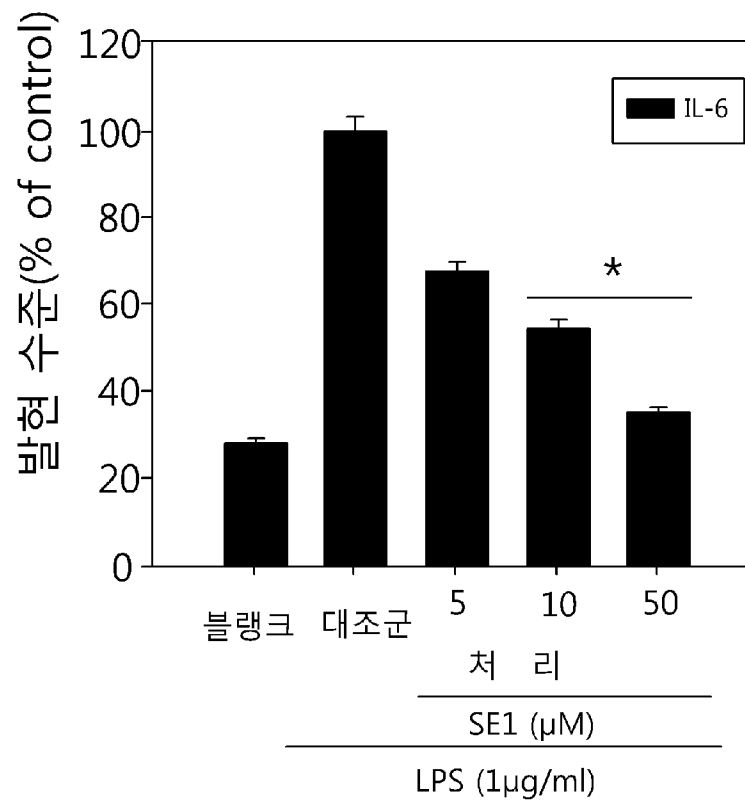
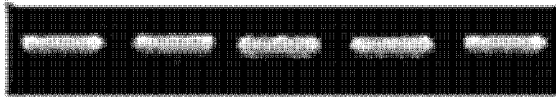
F

LPS(1μg/ml)	-	+	+	+	+
SE1 (μM)	-	-	5	10	50

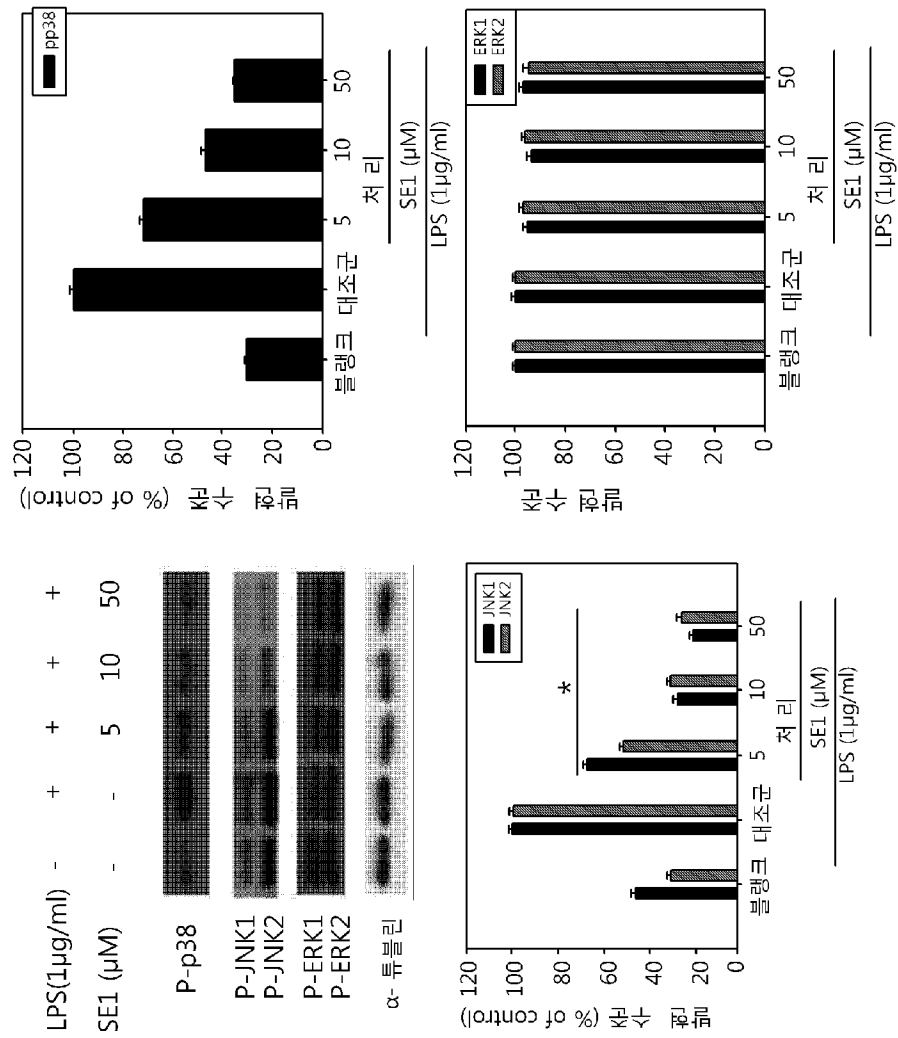
IL-6 Gene



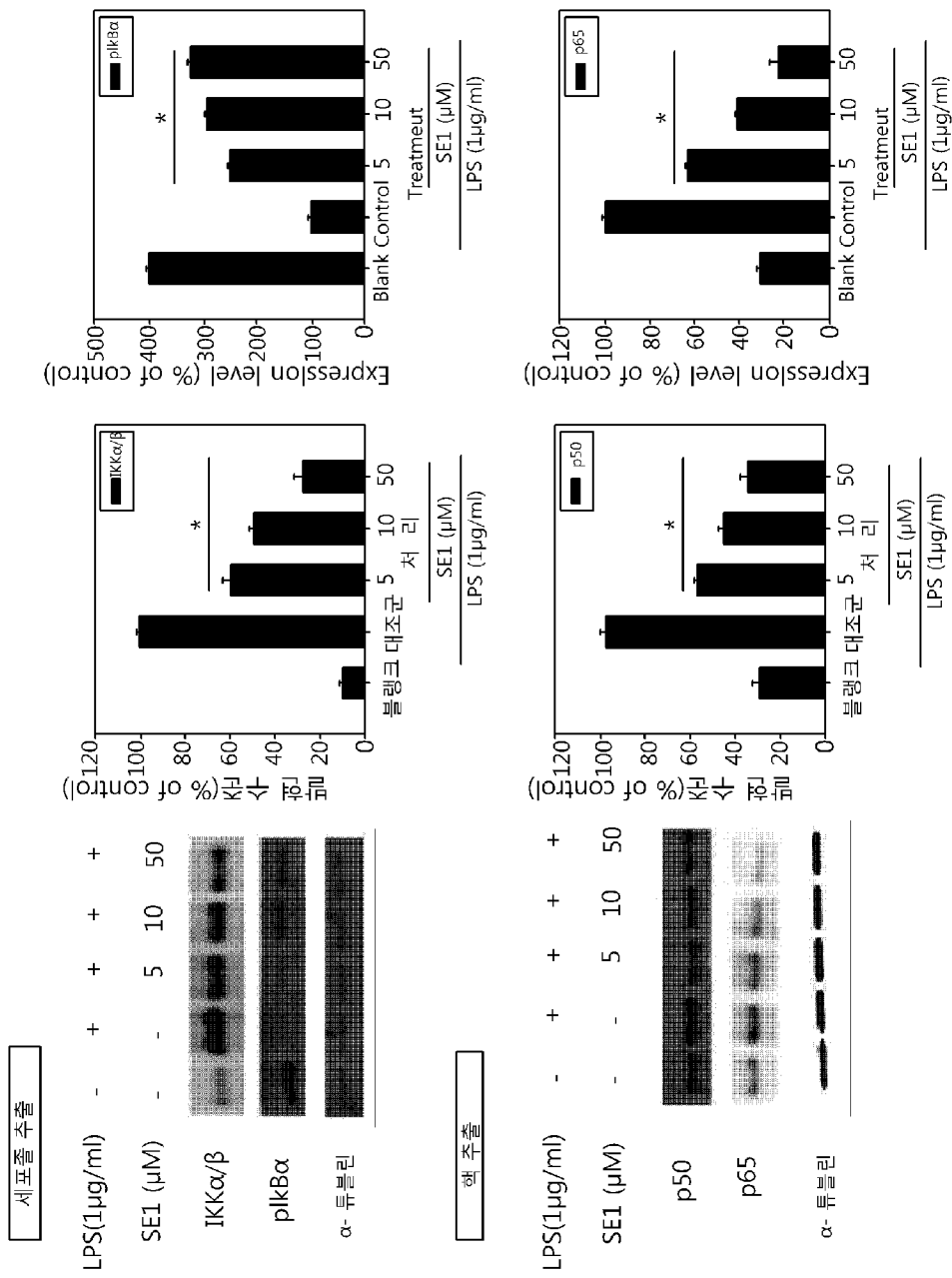
GAPDH



[Fig. 5]



[Fig. 6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/000857**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A61K 31/05(2006.01)i, A61K 31/045(2006.01)i, C07C 49/84(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/05; A61P 39/06; A61K 35/60; C07C 69/80

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), Pubmed, Google.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIYAMA, S.W.A. et al., [PB-292] "Anti-inflammatory effects and methanism of Hippocampus Kuda Bleeler derived compounds SE-1 and SE-2 on activated murine macrophages and microglial cells." Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition, Industrial Symposium Journal. 2010, page 375. See the entire document.	1-6
X	HIYAMA, E.W.A. et al., 1-(5-bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone [SE1] suppresses pro-inflammatory responses by blocking NF-κB and MAPK signaling pathways in activated microglia. European Journal of Pharmacology. Epub. September 2011, Vol. 670, pages 608-616. See abstract, Extraction and Isolation, figure 1.	1-6
X	QING, WEI-XIA et al., 1-(5-Bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone. Acta Crystallographica Section E. 2009, E65, page o2004. See the entire document.	1-4
A	See the entire document.	5,6
A	KR 10-2009-0043656 A (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 07 May 2009 See abstract, the claims.	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 OCTOBER 2012 (31.10.2012)

Date of mailing of the international search report

31 OCTOBER 2012 (31.10.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/000857

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2009-0063302 A (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 18 June 2009 See abstract, the claims.	1-6
A	RYU, BOMI et al., SHP-1, a novel peptide isolated from seahorse inhibits collagen release through the suppression of collagenases 1 and 3, nitric oxide products regulated by NF-kB/p38 kinase. Peptides. 2010, Vol. 31, pages 79-87. See abstract.	1-6
A	LI YONG et al., Cathepsin B inhibitory activities of three new phthalate derivatives isolated from seahorse, Hippocampus Kuda Bleeler. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008, Vol. 18, pages 6130-6134. See abstract.	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/000857

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0043656 A	07.05.2009	NONE	
KR 10-2009-0063302 A	18.06.2009	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/05(2006.01)i, A61K 31/045(2006.01)i, C07C 49/84(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/05; A61P 39/06; A61K 35/60; C07C 69/80 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), Pubmed, Google.																				
C. 관련 문헌 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">카테고리*</th> <th style="width: 70%;">인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th style="width: 20%;">관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>HIYAMA, S.W.A. 외 4명, [PB-292] 'Anti-inflammatory effects and methanism of Hippocampus Kuda Bleeler derived compounds SE-1 and SE-2 on activated murine macrophages and microglial cells.' 한국식품영양과학회 산업심포지움발표집. 2010, 375 페이지. 문서 전체 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>HIYAMA, E.W.A. 외 4명, 1-(5-bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone [SE1] suppresses pro-inflammatory responses by blocking NF-κB and MAPK signaling pathways in activated microglia. European Journal of Pharmacology. Epub. 2011.09, 670권, 608-616 페이지. 초록, Extraction and Isolation, 그림 1 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>QING, WEI-XIA 외 2명, 1-(5-Bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone. Acta Crystallographica Section E. 2009, E65, o2004 페이지. 문서 전체 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>문서 전체 참조.</td> <td style="text-align: center;">5,6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>KR 10-2009-0043656 A (부경대학교 산학협력단) 2009.05.07. 초록, 청구범위 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-6</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	HIYAMA, S.W.A. 외 4명, [PB-292] 'Anti-inflammatory effects and methanism of Hippocampus Kuda Bleeler derived compounds SE-1 and SE-2 on activated murine macrophages and microglial cells.' 한국식품영양과학회 산업심포지움발표집. 2010, 375 페이지. 문서 전체 참조.	1-6	X	HIYAMA, E.W.A. 외 4명, 1-(5-bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone [SE1] suppresses pro-inflammatory responses by blocking NF-κB and MAPK signaling pathways in activated microglia. European Journal of Pharmacology. Epub. 2011.09, 670권, 608-616 페이지. 초록, Extraction and Isolation, 그림 1 참조.	1-6	X	QING, WEI-XIA 외 2명, 1-(5-Bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone. Acta Crystallographica Section E. 2009, E65, o2004 페이지. 문서 전체 참조.	1-4	A	문서 전체 참조.	5,6	A	KR 10-2009-0043656 A (부경대학교 산학협력단) 2009.05.07. 초록, 청구범위 참조.	1-6
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	HIYAMA, S.W.A. 외 4명, [PB-292] 'Anti-inflammatory effects and methanism of Hippocampus Kuda Bleeler derived compounds SE-1 and SE-2 on activated murine macrophages and microglial cells.' 한국식품영양과학회 산업심포지움발표집. 2010, 375 페이지. 문서 전체 참조.	1-6																		
X	HIYAMA, E.W.A. 외 4명, 1-(5-bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone [SE1] suppresses pro-inflammatory responses by blocking NF-κB and MAPK signaling pathways in activated microglia. European Journal of Pharmacology. Epub. 2011.09, 670권, 608-616 페이지. 초록, Extraction and Isolation, 그림 1 참조.	1-6																		
X	QING, WEI-XIA 외 2명, 1-(5-Bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone. Acta Crystallographica Section E. 2009, E65, o2004 페이지. 문서 전체 참조.	1-4																		
A	문서 전체 참조.	5,6																		
A	KR 10-2009-0043656 A (부경대학교 산학협력단) 2009.05.07. 초록, 청구범위 참조.	1-6																		
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2012년 10월 31일 (31.10.2012)	국제조사보고서 발송일 2012년 10월 31일 (31.10.2012)																			
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 이정아 전화번호 82-42-481-8738 																			

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2009-0063302 A (부경대학교 산학협력단) 2009.06.18. 초록, 청구범위 참조.	1-6
A	RYU, BOMI 외 2명, SHP-1, a novel peptide isolated from seahorse inhibits collagen release through the suppression of collagenases 1 and 3, nitric oxide products regulated by NF-kB/p38 kinase. Peptides. 2010, 31권, 79-87 페이지. 초록 참조.	1-6
A	LI YONG 외 2명, Cathepsin B inhibitory activities of three new phthalate derivatives isolated from seahorse, Hippocampus Kuda Bleeler. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008, 18권, 6130-6134 페이지. 초록 참조.	1-6

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2009-0043656 A	2009.05.07	없음	
KR 10-2009-0063302 A	2009.06.18	없음	