



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0115846
(43) 공개일자 2012년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07H 7/02 (2006.01) C08B 37/08 (2006.01)

A61K 31/702 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0033412

(22) 출원일자 2011년04월11일

심사청구일자 2011년04월11일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

김세권

부산광역시 동래구 사직로 80, 쌍용예가아파트
125동 1402호 (사직동)

엄태길

부산광역시 해운대구 우동1로 111, 103동 702호
(우동, 협성그린파크)

(74) 대리인

이덕록

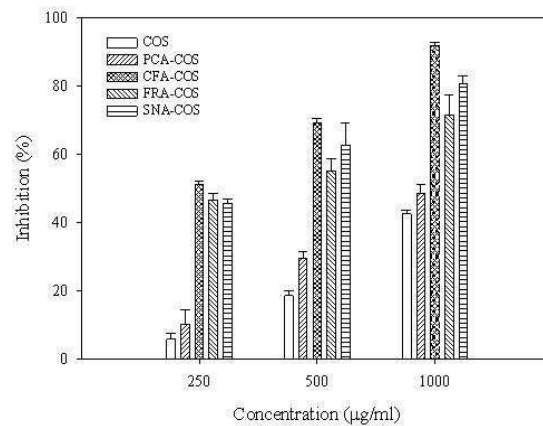
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 B A C E 억제 활성을 갖는 키토올리고당 유도체

(57) 요약

본 발명은 페놀산기를 갖는 키토올리고당 유도체 및 이를 함유하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 페놀산기를 갖는 키토올리고당 유도체는 우수한 BACE 저해 활성을 나타내고 있어 알츠하이머병의 예방 또는 치료에 효과적인 물질이다.

대 표 도 - 도5

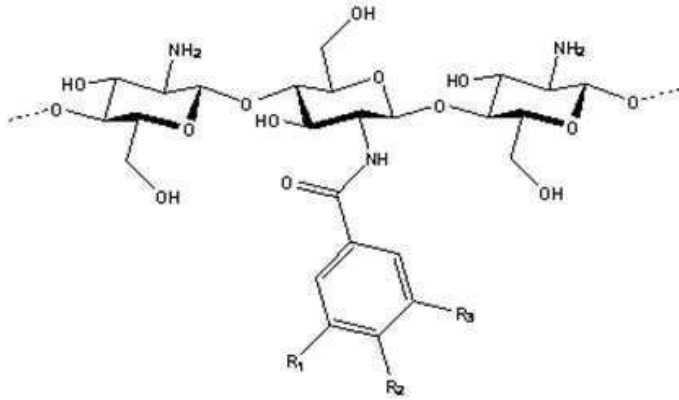


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 페놀산을 갖는 키토올리고당 유도체:

<화학식 1>

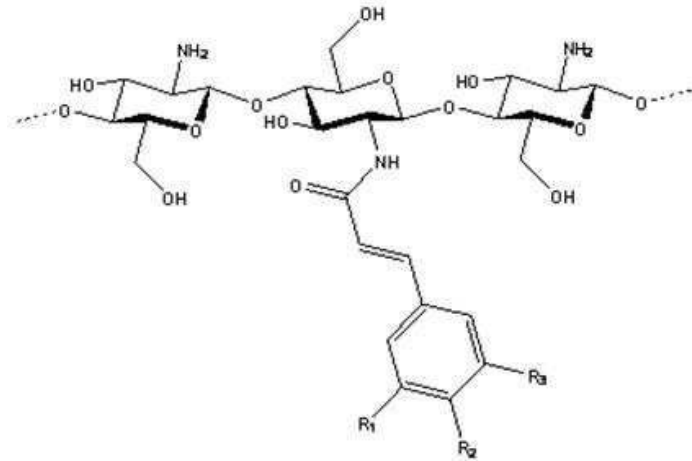


상기 식에서, R_1 은 H 또는 OCH_3 이고, R_2 는 OH이며, R_3 는 H, OH 또는 OCH_3 이다.

청구항 2

하기 화학식 2의 페놀산을 갖는 키토올리고당 유도체:

<화학식 2>



상기 식에서, R_1 은 H 또는 OCH_3 이고, R_2 는 OH이며, R_3 는 H, OH 또는 OCH_3 이다.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 페놀산을 갖는 키토올리고당을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 페놀산을 갖는 키토올리고당을 함유하는 알츠하이머병 개선용 건강기능식품 약학적 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 페놀산기를 갖는 키토올리고당 유도체 및 이를 함유하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머병(AD)은 아밀로이드 플라크라고 불리는, 뇌의 특정 부위에서 세포의 축적물에 의해 발병된다. 이 플라크는 APP의 39-43개 아미노산 잔기로 이루어진 아밀로이드- β ($A\beta$)라고 불리는 작은 펩티드의 집합체로 구성되어 있다. $A\beta$ 펩티드는 α -, β - 및 γ -세크레타아제로 명명된 효소 또는 효소 복합체 그룹에 의해 APP를 세포내 단백질분해(endoproteolysis)하여 생산된다. β -세크레타아제는 아스파틱 프로테아제(aspartic protease)로, BACE(β -site APP-cleaving enzyme)로도 알려져 있는데, 이 효소는 APP의 루미날 사이드(luminal side)에서 용이하게 접근가능한 부위를 절단하며, 이의 활성은 생체내에서 $A\beta$ 펩티드 생산의 속도 제한 단계(rate limiting step)이다. 게다가 BACE 활동은 신체 대부분의 세포 및 조직에서 이루어지며 최대 활성은 신경 조직 및 신경 세포주에서 관찰된다. BACE는 $A\beta$ 의 N-말단면에서 신경 세포 내의 APP의 약 10%를 절단하여 C-말단 단편을 생산하며, 이 C-말단 단편은 β -세크레타아제에 의해 절단되어 90%의 $A\beta$ 40 잔기 및 약 10%의 $A\beta$ 42를 생산한다. BACE 또는 β -세크레타아제 활성의 녹다운은 $A\beta$ 펩티드의 생산을 저해할 수 있다. 그러므로, 세크레타아제 활성을 차단하는 단백질 또는 화합물의 확인이 AD 연구에서 중요한 목표이다.

[0003] 키틴 및 키토산은 항균, 항-고콜레스테롤증 및 항고혈압 활성과 같은 다양한 생물학적 활성을 갖고 있어 새로운 생리학적 생체활성 재료로서 개발되고 있다. 최근 연구에서는 키토산을 올리고머로 변환시키는데 많은 관심이 집중되고 있다. 키토올리고당(Chitooligosaccharides; COS)은 키토산 유도체(주로 글루코사민 유닛을 포함하는 다가양이온 중합체)이며 키토산의 화학 또는 효소 가수분해에 의해 생산할 수 있다. COS는 낮은 점성 및 상대적으로 적은 분자량 크기를 가지고 있어 수용성을 가지도록 하며 소장에서 쉽게 흡수될 수 있도록 한다. 또한 항종양, 항-염증, 항균, 항산화, 항-암전이, 항-비만 및 항-고혈압 효과와 같은 부가적인 기능적 특성을 갖고 있다. 이전 연구에서, 다양한 분자량 및 탈 아세틸화 정도를 갖는 키틴, 키토산 유도체 및 COS 유도체가 BACE 활성을 억제한다고 보고되었다. 본 발명자는 이러한 데이터를 근거로 하여 COS 유도체의 BACE-저해 활성에 초점을 맞추었다.

[0004] 최근, 알츠하이머병 예방 및 치료를 위한 COS의 연구가 진행되고 있는데, 예컨대, 대한민국 공개특허 제10-2010-0121047호에서 ChE3 억제 활성을 갖는 신규한 키토올리고당 유도체 및 이를 함유하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 조성물에 대해 기재하고 있고, 대한민국 공개특허 제10-2003-0005097호에서는 10 kDa 미만의 분자량을 갖는 키토올리고당을 BACE 촉매 활성 억제제로 사용하는 방법에 대해 기재하고 있으나, 페놀산기를 갖는 COS 유도체의 BACE 저해 활성에 대하여는 아직까지 보고된 바가 없다. 이에 본 발명은 다양한 페놀산기를 갖는 신규한 COS 유도체를 합성하고 이의 BACE 저해 활성을 평가하여 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

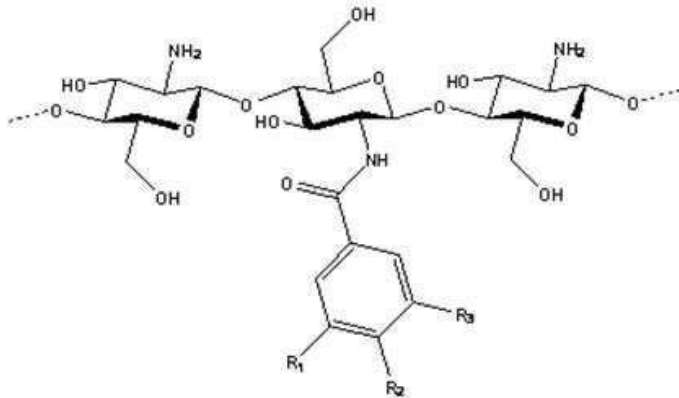
[0005] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출된 것으로, 페놀산기를 갖는 키토올리고당 유도체 및 이를 함유하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능성식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 상기 목적은 페놀산기를 갖는 신규한 키토올리고당을 합성하고, 분광기를 이용하여 구조를 분석하고, 형광 검정을 통해 BACE 저해 활성을 측정함으로써 달성하였다.

[0007] 본 발명은 하기 화학식 1의 페놀산을 갖는 키토올리고당 유도체를 제공한다.

[0008] <화학식 1>

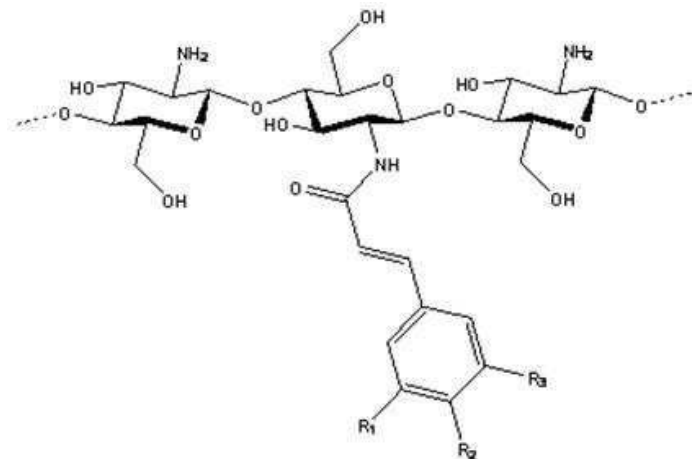


[0009]

[0010] 상기 식에서, R₁은 H 또는 OCH₃이고, R₂는 OH이며, R₃는 H, OH 또는 OCH₃이다.

[0011] 본 발명은 하기 화학식 2의 페놀산을 갖는 키토올리고당 유도체를 제공한다.

[0012] <화학식 2>



[0013]

[0014] 상기 식에서, R₁은 H 또는 OCH₃이고, R₂는 OH이며, R₃는 H, OH 또는 OCH₃이다.

[0015] 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2의 페놀산을 갖는 키토올리고당 유도체를 함유하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2의 페놀산을 갖는 키토올리고당 유도체를 함유하는 알츠하이머병 개선용 건강 보조식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 우수한 BACE 저해 활성을 가지고 있어 알츠하이머병의 예방 및 치료에 효과적인 신규한 페놀산기를 갖는 키토올리고당 및 이를 함유하는 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 페놀산-접합-COS의 FT-IR 흡광 스펙트럼을 나타낸 것이다. A: 히드록실 벤조산 유도체, B: 히드록실 신남산 유도체.

도 2는 히드록시 벤조산 접합 COS의 ¹H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 3은 히드록시 신남산 접합 COS의 ¹H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4는 히드록시 벤조산 접합 COS의 BACE 저해 활성을 나타낸 것이다. 결과는 3회의 독립적인 실험의 평균 ±

SE로 나타냈다.

도 5는 히드록시 신남산 접합 COS의 BACE 저해 활성을 나타낸 것이다. 결과는 3회의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SE로 나타냈다.

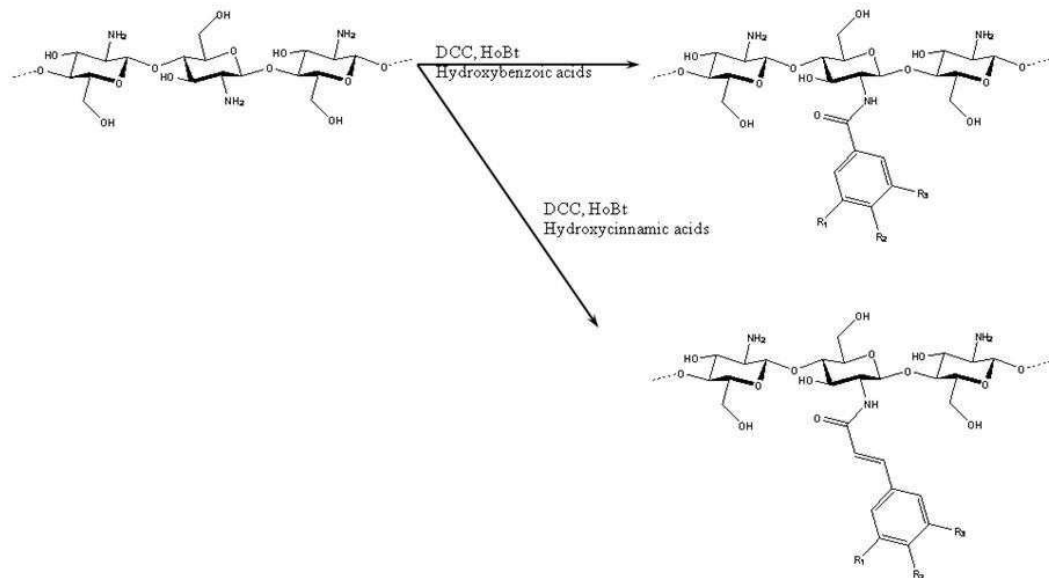
도 6은 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 BACE에 대한 CFA-COS의 저해 패턴을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예를 들어 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 이므로, 본 발명을 이에 한정하는 것으로 해석해서는 안 된다.

실시예 1. 페놀산 접합 COS 유도체의 합성

8가지 종류의 페놀산과 접합된 COS를 Panasaphan 등의 문헌(W. Panasaphan, S. Chirachanchai, *Carbohydr. Polym.* **2008**, 72, 169)에 기재된 방법을 변형시켜 합성하였다. 1g의 COS, (Hydroxybenzotriazole) DCC(N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide)를 20% MeOH (100.0 mL)에 용해시킨 후, 히드록시벤조산 또는 히드록시신남산과 같은 페놀산 (글루코사민 유닛의 1 eq molar)을 첨가하고 실온에서 밤새 교반하였다. 결과적으로 생성된 용액을 아세톤에 침전시키고 아세톤으로 반복하여 세척한 후, 40 °C의 진공에서 24시간 동안 건조하여 페놀산 접합 COS 유도체를 합성하였다. 합성 방법은 하기 반응식 1과 같다.



상기 반응식에서 페놀산 접합 COS의 합성시 히드록시벤조산을 첨가했을 경우 R₁, R₂ 및 R₃는 하기 표 1과 같다.

표 1

Benzoic acid derivative				
	p-Hydroxy (HBA-COS)	Protocatechuic (PTA-COS)	Vanillic (VNA-COS)	Syringic (SRA-COS)
R ₁	H	H	H	OCH ₃
R ₂	OH	OH	OH	OH
R ₃	H	OH	OCH ₃	OCH ₃

상기 반응식에서 페놀산 접합 COS의 합성시 히드록시신남산을 첨가했을 경우 R₁, R₂ 및 R₃는 하기 표 2과 같다.

표 2

Cinnamic acid derivative				
	p-Coumaric (PCA-COS)	Caffeic (CFA-COS)	Ferulic (FRA-COS)	Sinapinic (SNA-COS)
R ₁	H	H	H	OCH ₃
R ₂	OH	OH	OH	OH
R ₃	H	OH	OCH ₃	OCH ₃

[0026]

[0027]

실시예 2. 페놀산 접합 COS 유도체의 구조 분석

[0028]

페놀산 접합 COS의 구조 분석을 FT-IR 분광기(Perkin Elmer, Massachusetts, USA) 및 NMR 분광기 (Jeol, Tokyo, Japan)을 사용하여 실시하였다. COS 유도체의 두 FT-IR 스펙트럼 모두 COS의 특정 흡광 밴드를 나타냈다. 페놀산 접합 COS는 1650-1700 cm⁻¹ (아미드 카르복시기) 및 1250 cm⁻¹ (페놀성 히드록시기) 주위에 새로운 피크의 흡광도가 나타났다 (도 2). 게다가 ¹H-NMR 스펙트럼은 방향족 유도체 양성자에 대하여 6.7-7.7 ppm에서 피크를 나타냈다. 이러한 결과는 페놀산 접합 COS가 수득되었음을 나타내는 것이다 (도 3 및 도 4).

[0029]

실시예 3. 페놀산 접합 COS 유도체의 BACE 활성 측정

[0030]

BACE 활성을 Je 등의 문헌 (J. Y. Je, S. K. Kim, Bioorg. Med. Chem. 2005, 13, 6551-6555)의 형광 방법에 따라 측정하였다. 10 μL의 분석용 완충용액 (50 mM 아세트산나트륨, pH 4.5), 10 μL의 BACE1 (1.0 U/mL), 10 μL의 기질 (50 mM 탄산수소암모늄 내의 750 nM Rh-EVNLDAEFK-Quencher), 및 분석용 완충용액에 용해된 10 μL의 시료의 혼합물을 실온에서 60분 동안 항온시켰다. 혼합물을 530 nm에서 여기시키고 590 nm에서 발산된 빛을 수집하였다. 저해율을 다음 방정식에 따라 계산하여 수득하였다: 저해율 (%) = $[1 - \{(S - S_0)/(C - C_0)\}] \times 100$, 상기 방정식에서 C는 60분간의 항온 후의 대조군(효소, 분석용 완충용액 및 기질)의 형광도이고, C₀는 0시의 대조군의 형광도이며, S는 60분간의 항온 후의 실험 시료(효소, 시료용액 및 기질)의 형광도이고, S₀는 0시에서의 실험 시료의 형광도이다. 모든 데이터는 이중 실험의 평균이다. Lineweaver-Burk and Dixon plots을 작성하여 COS의 BACE 저해 유형을 평가하였다. COS의 저해상수(K_i)를 Lineweaver-Burk plots의 이차 플롯으로부터 수득하고 Dixon plot으로부터 직접적으로 계산하였다. 수평축 상의 인터셉트는 K_i의 수치이다.

[0031]

8가지 페놀산 접합 COS의 BACE 저해 효과를 형광 검정을 사용하여 측정하고 그 결과를 도 1 및 도 2에 도시하였다. HBA-COS, PTA-COS, VNA-COS, SRA-COS와 같은 히드록시 벤조산 유도체 COS 및 COS는 투여량-의존 방식에 따라 다른 BACE 저해 효과를 나타냈으며, 저해율은 500 μg/ml 농도에서 각각 24.1%, 45.3%, 38.9%, 36.2% 및 18.6%이었다. 반면에, PCA-COS, CFA-COS, FRA-COS 및 SNA-COS와 같은 히드록시 신남산 유도체 접합 COS는 히드록시 벤조산 접합 COS의 저해 활성보다 더 높은 BACE 저해 활성을 나타냈다. 500 μg/ml 농도에서, CFA-COS, FRA-COS 및 SNA-COS는 50% 이상의 BACE 저해 활성을 나타냈으나 PCA-COS는 50% 이하의 BACE 저해 활성을 나타냈다. 모든 COS 유도체는 COS보다 높은 BACE 저해 활성을 보였다. 이러한 결과는 페놀산의 3,4-디히드록시기 및 신남산 유도체의 이중 결합이 BACE 저해 활성에서 중요한 역할을 함을 제시해주는 것이다. 이에 따르면, 페놀산 접합 COS의 BACE 저해 활성에 영향을 미치는 중요 인자가 페놀산의 히드록시기의 치환 위치인 것으로 볼 수 있을 것이다. 페놀산 접합 COS의 IC₅₀ 수치를 비-선형 회귀 방법(non-linear regression method)으로 계산하고 그 결과를 표 1에 나타냈다. CFA-COS가 BACE 저해 활성에 있어서 가장 높은 효능을 나타냄을 확인할 수 있다.

표 3

인간 재조합체 BACE에 대한 페닐산 접합 COS 유도체의 IC₅₀ 수치

Sample	IC ₅₀ value (μg/ml)	Sample	IC ₅₀ value (μg/ml)
HBA-COS	998 ± 55	PCA-COS	1001 ± 53
PTA-COS	619 ± 63	CFA-COS	191 ± 13
VNA-COS	754 ± 54	FRA-COS	349 ± 65
SRA-COS	667 ± 16	SNA-COS	295 ± 60
COS	1080 ± 127	COS	1080 ± 127

[0032]

[0033]

대부분의 BACE 저해제는 펩티드 또는 펩티드 유사 화합물로서, 많은 연구에서 합성 프로테아제 저해제, 펩티드 및 펩티드 유사 화합물의 고속-대량 스크리닝(high-throughput screening)을 사용하여 BACE 저해제를 확인하는데 초점을 맞추고 있다. Byun 등의 문헌(H.G. Byun, Y. T. Kim, P. J. Park, W. K Jung, S. K. Kim, *Carbohydr. Polym.* 2005, 61, 1624)에서는 COS 및 이의 황산화 COS의 BACE 저해 활성을 평가하여 90% 탈아세틸화 COS가 BACE 저해 활성을 나타냄을 보고하였다. 그러나 이러한 황산염 유도체는 COS에 비해 낮은 저해 활성을 나타낸다. Je 등의 문헌에서는 C-2 위치를 변형시킨 키토산 유도체의 BACE 저해 활성을 연구하여 90% 탈아세틸화 키토산으로부터 제조된 아미노에틸-키토산이 다른 유도체에 비해 높은 BACE 저해 활성을 보이며 저해 패턴이 비-경쟁적 저해인 것을 보고하였다.

[0034]

가장 효과적인 페닐산 접합 COS인 CFA-COS와 함께 인간 재조합 BACE로 측매화된 형광 기질의 동역학적 행동을 연구하였다. 저해 유형을 결정하기 위해서는 효소 활동 메커니즘 및 저해제-결합 부위를 이해하는 것이 중요하다. CFA-COS의 BACE 저해 패턴을 CFA-COS 유무에 따라 Lineweaver-Burk로 분석하였다. Lineweaver-Burk 플롯에 의해 분석된 저해 동역학은 CFA-COS가 비-경쟁적 저해제인 것을 나타내며, 이는 CFA-COS가 β-세크레타아제의 다른 조절 부위 또는 활성부위(subsite)에 결합할 수 있음을 의미한다. (도 6). 게다가, 250, 500 및 1000 μg/ml 각각에서 CFA-COS의 K_i 수치는 419.13 μg/ml이었으며, 175.89 nM의 동일한 K_m 수치 및 24.35 nM, 14.63 nM 및 12.56 nM의 V_{max} 수치를 나타냈다 (표 2). 그러므로, CFA-COS 저해제는 효소의 구조에 변형을 유도하고 변형된 효소는 더 이상 기질에 정확하게 결합할 수 없게 된다.

표 4

CFA-COS의 존재시 BACE의 동역학적 파라미터

Sample	K _m (nM)	V _{max} (FU/min)	K _i (μg/ml)
CFA-COS	175.89±8.84	43.27	419.13
250 μg/ml		24.35	
500 μg/ml		14.63	
1000 μg/ml		12.56	

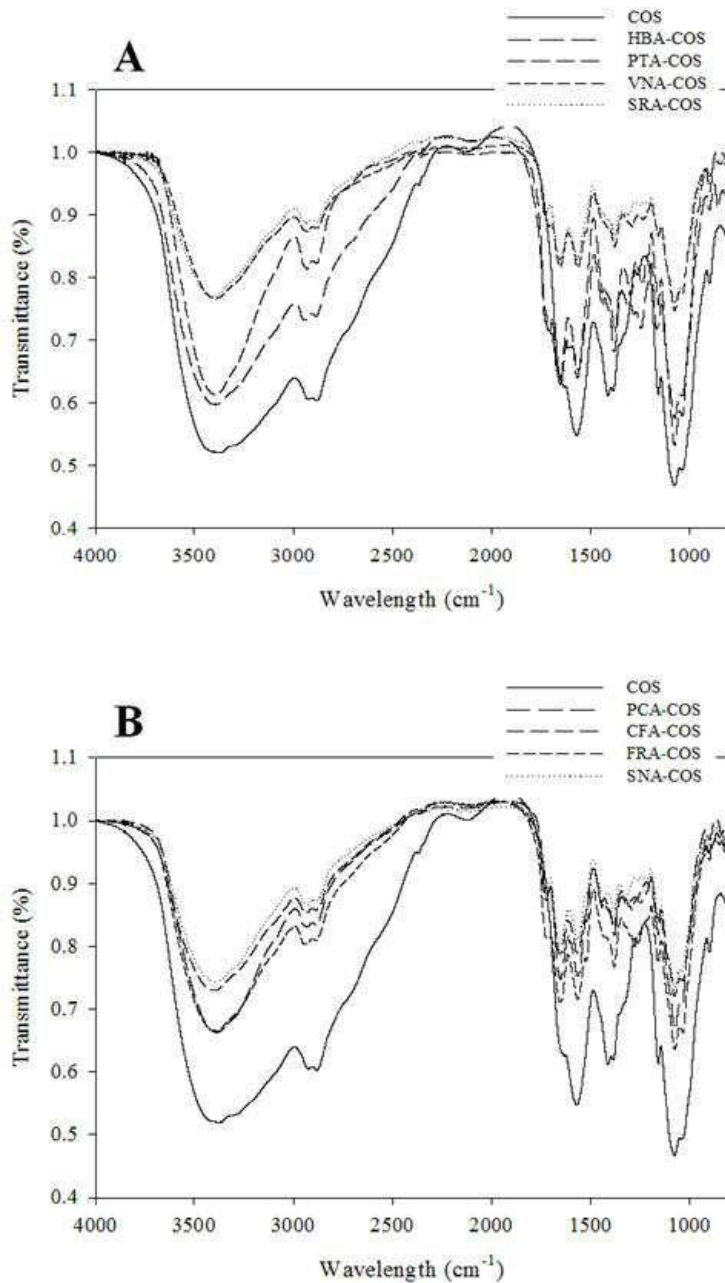
[0035]

[0036]

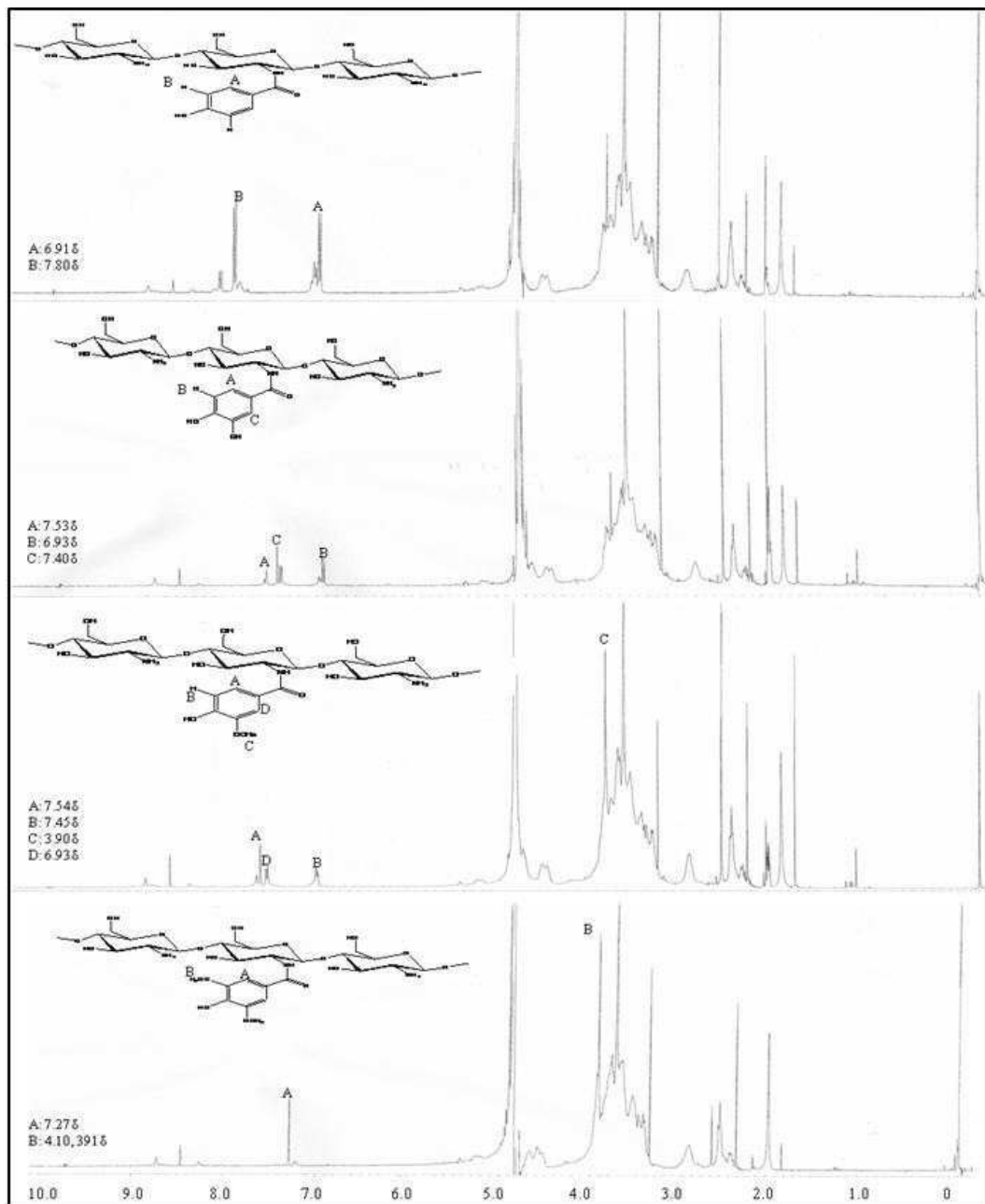
본 발명의 결과에 따르면 효능은 3,4-디히드록시 (PTA 및 CFA) > 3-히드록시-4,5-디메톡시 (SRA 및 SNA) > 3-히드록시-4-메톡시 (VNA 및 FRA) > p-히드록시(HBA 및 PCA)의 순서이다. 게다가, 이는 폴리-페놀 및 페놀산의 활성은 방향족 고리에서 히드록시기에 관련된 것임을 제시하는 것이다. 이러한 기들은 생물학적 활성에 있어서 중요하다. 본 발명으로부터, PTA-COS 및 CFA-COS는 방향족 고리에 산화가능한 3-4 디히드록시기를 쉽게 포함하고 있어 모든 반응성 퀴논을 형성할 것으로 예상할 수 있다. 이러한 퀴논은 BACE의 친핵성 아미노산과 반응한다. 그러므로, PTA-COS 및 CFA-COS 활성은 8개 페놀산 접합 COS 중에서 가장 높음을 알 수 있다. 그러므로 이러한 유도체들은 신규한 비-펩티드성 저해제의 개발에 유용한 것으로 여겨진다.

도면

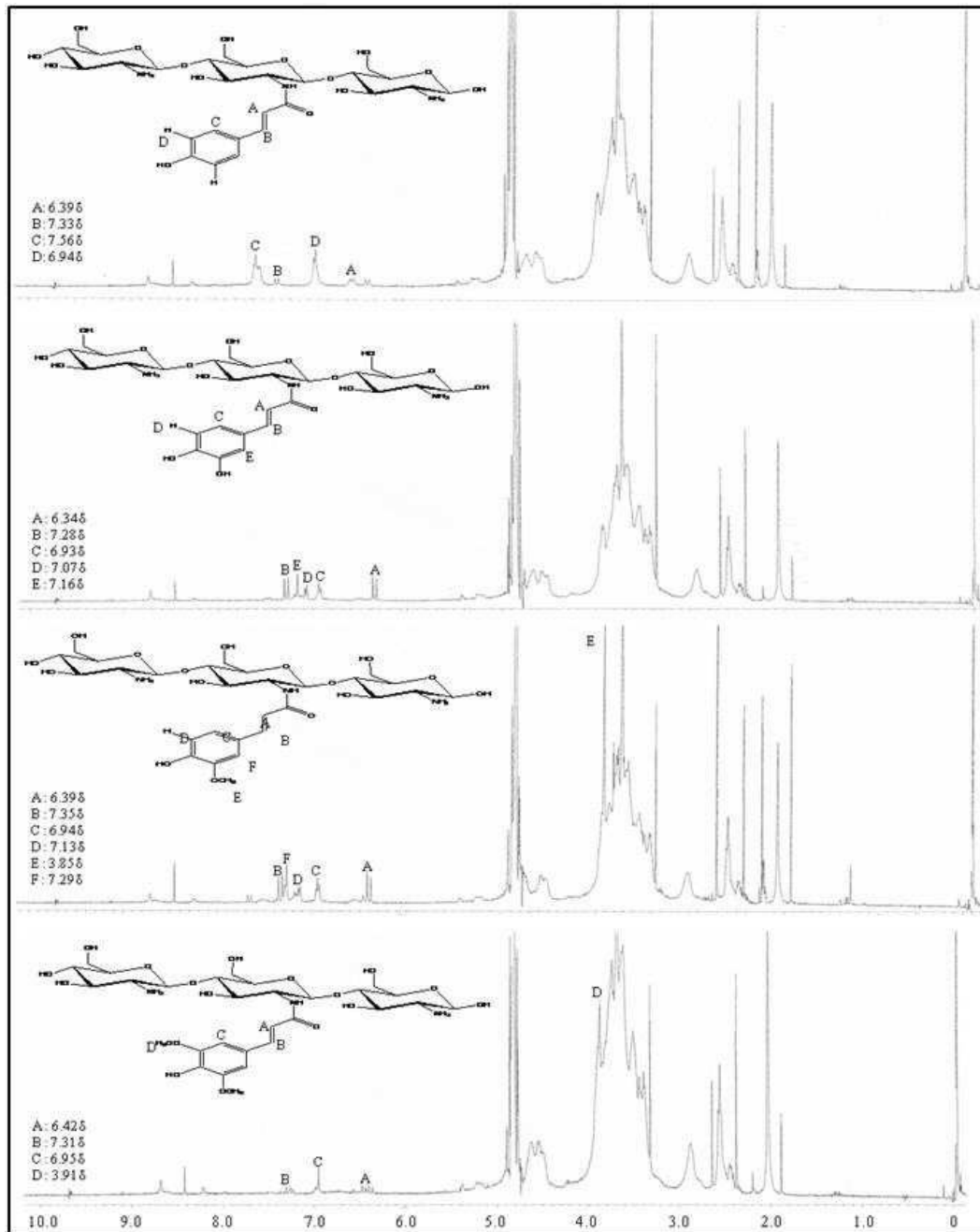
도면1



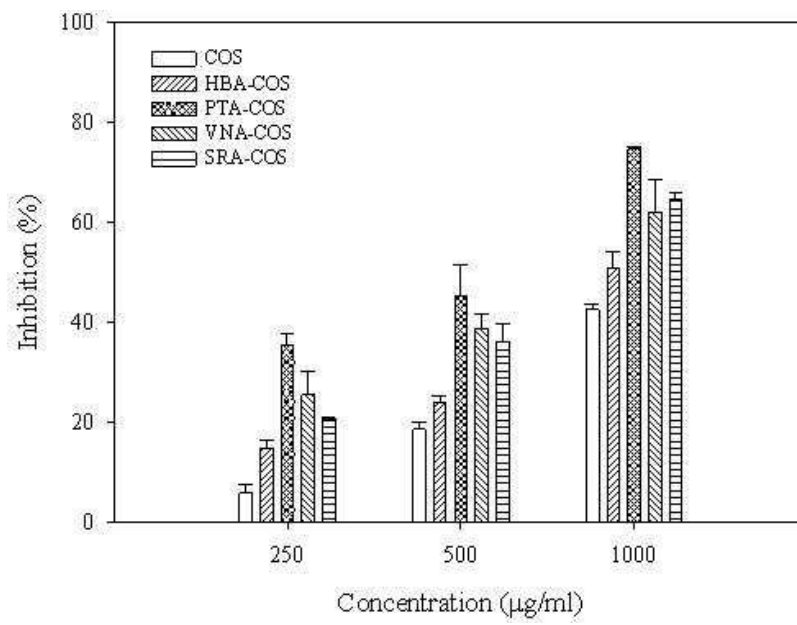
도면2



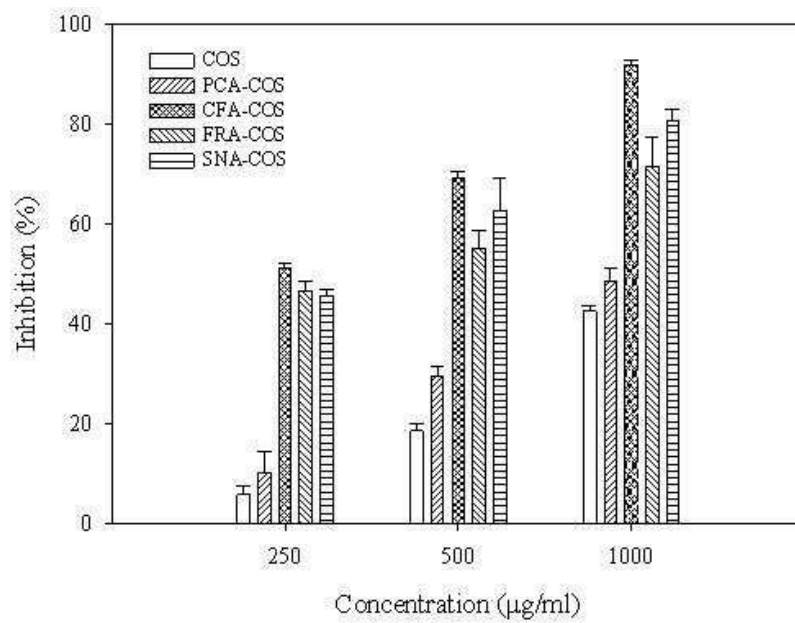
도면3



도면4



도면5



도면6

