



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0043658
(43) 공개일자 2009년05월07일

(51) Int. Cl.

A61K 31/7008 (2006.01) A61K 31/722 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0109327

(22) 출원일자 2007년10월30일

심사청구일자 2007년10월30일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

김세권

부산 부산진구 연지동 353-1번지

세동한신아파트105동 304호

김문무

부산 수영구 망미2동 1136번지 수영강변3차 이편
한세상아파트301동 401호

응오 다이 응업

부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 화학과

(74) 대리인

이덕록

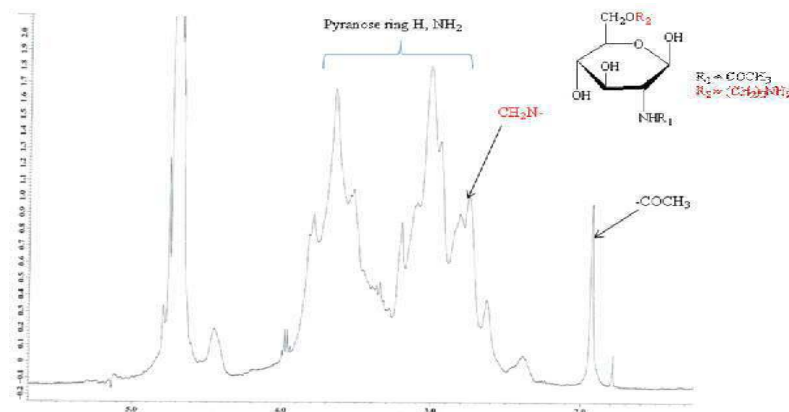
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 안지오텐신 I 변환효소 저해 활성을 갖는 아미노에틸키토올리고당 화합물

(57) 요약

본 발명은 고혈압에 효능이 있다고 알려진 키토올리고당(Chitooligosaccharide; COS)을 변형시킨 유도체 아미노에틸 키토올리고당(Aminoethyl chitooligosaccharide; AE-COS)을 합성하고, 그 ACE 저해 활성을 검토하여, 기능성 식품 및 약학분야에 유용하게 사용할 수 있는 항고혈압 천연물질에 관한 것으로, 키토올리고당에 비하여 훨씬 높은 ACE 저해 활성을 보여 천연 항고혈압 용도를 가진 천연물질을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한 본 발명은 C6 위치의 아미노기가 효소 활성 부위에 키토올리고당이 결합하는 능력을 증진시켜 ACE 저해에 있어 중요한 역할을 담당한다는 것을 밝힘으로써 키토올리고당의 ACE 저해활성을 증진시키는 방법을 제공하므로, 건강기능식품 및 약학분야에서 유용하게 이용될 수 있는 매우 뛰어난 발명이라 할 것이다.

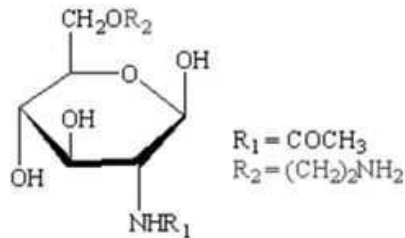
대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

안지오텐신 I 변환 효소(Angiotensin I converting enzyme; ACE) 활성 저해효과를 갖는 항고혈압용 하기 화학식 1의 아미노에틸 키토올리고당 화합물



청구항 2

제 1항의 아미노에틸 키토올리고당 화합물을 유효성분으로 함유하여 안지오텐신 변환 효소(ACE) 활성 저해효과를 갖는 항고혈압용 조성물

청구항 3

제 1 항에 있어서, 항고혈압용 조성물은 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 연고조성물, 용액제, 젤, 페이스트, 첵포제, 과립상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 항고혈압용 조성물.

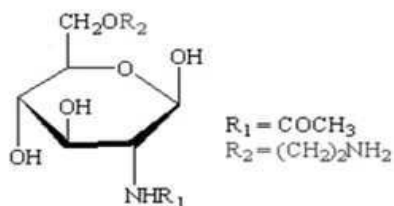
명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 안지오텐신 I 변환 효소(Angiotensin I converting enzyme; ACE) 활성 저해효과를 갖는 하기 화학식 1의 항고혈압용 아미노에틸 키토올리고당 화합물에 관한 것으로 보다 상세하게는 고혈압에 효능이 있다고 알려진 키토올리고당을 변형시킨 유도체 아미노에틸 키토올리고당을 합성하고, 그 ACE 저해 활성을 검토하여, 기능성 식품 및 약학분야에 유용하게 사용할 수 있는 항고혈압 천연물질에 관한 것이다.

<2> <화학식 1>



<3>

배경 기술

<4> 고혈압은 심혈관계 질병, 뇌졸중 및 말기신장병의 전개에 있어 주요 위험인자 중 하나이다.

<5> 본태성(本態性) 고혈압이 전체 고혈압의 약 90%를 차지하며 혈액 내의 안지오텐신(Angiotensin) I 이 안지오텐신 I 변환효소(Angiotensin I converting enzyme; ACE)에 의하여 안지오텐신 II로 바뀌게 되고 이 안지오텐신 II가 혈압상승을 일으켜 본태성 고혈압이 발생하는 것으로 알려져 있다.

<6> 안지오텐신 I 변환효소(Angiotensin I converting enzyme)는 효소적 활성화를 위하여 아연과 염화물을 필요로 하는 아연 단백질분해효소 계열에 속한다. 상기 효소는 10개의 펩타이드로 구성된 비활성형태의 안지오텐신 I을 8개의 펩타이드로 된 잠재적 혈관수축물질인 안지오텐신 II로 변환시킴으로써 그리고 혈관을 확장시켜 혈압을

강하시키는 작용을 하는 브래디키닌의 촉매작용을 비활성화시킴으로써 혈압을 조절하는 생리학적 중요한 역할을 한다. 따라서 ACE를 저해시키는 것이 고혈압을 조절하는 중요한 치료적 접근이라 사료된다.

- <7> 최근 ACE의 촉매구조의 모델 발전과 함께, 효소활성부위에 결합할 수 있는 특이 저해제가 개발되고 있다. 몇몇 합성 저해제가 항고혈압 약품으로 매우 효과적임에도 불구하고 그것들은 종종 부정적 부작용을 일으킨다. 그리하여 수많은 천연 ACE 저해제가 기능성 식품 및 천연 바이오자원에서 분리되고 있다.
- <8> 그 중 N-아세틸글루코사민(키틴)에서 부분적으로 탈아세틸화된 중합체인 키토산은 키틴의 알칼리 탈아세틸과정으로 제조되며, 자연에서 널리 발견되는 다당류이다. 키토산은 항종양 효과, 면역증강 효과, 항균활성, 항산화 효과 및 항고혈압 효과와 같은 수많은 생물학적 기능을 가지고 있다.
- <9> 키토산이 부분적으로 가수분해된 물질인 키토올리고당(chitooligosaccharide; COS)는 비독성 및 높은 가용성으로 인해 제약 및 약용적용에 있어 상당한 주목을 받고 있다. 또한, 키토산 및 그 유도체의 구조와 특성이 점점 더 명확히 이해되고 있다. 이런 점이 화학적 변형에 의하여 특정 적용을 하기 위한 키토산의 구조적 특성을 개선시키는데 도움이 되었다.
- <10> 그러나 COS 유도체 및 이들의 생물학적 활성의 확인에 관한 종래 문헌들은 거의 보고된 것이 없다. 따라서, 본 발명에서 발명자들은 개선된 ACE 저해 활성을 갖는 새로운 COS 유도체를 개발하고, 그 저해 메커니즘을 규명하였다.

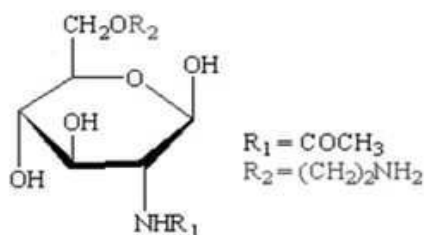
발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <11> 따라서, 본 발명의 목적은 키토올리고당을 변형시킨 아미노에틸 키토올리고당(AE-COS)을 제조하고, 상기 물질의 안지오텐신 I 변환효소의 활성 저해 여부를 검토함으로써, 키토올리고당보다 저해활성이 뛰어난 기능성 식품에 사용될 수 있는 인체에 무해한 천연 항산화물질을 제공하는 것이다. 또한 고혈압에 효능이 있다고 알려진 키토올리고당의 ACE 저해 메커니즘을 밝혀 보다 개선된 키토올리고당 유도체를 개발할 수 있는 방법을 제시하는 것이다.

과제 해결수단

- <12> 본 발명의 상기 목적은 아미노에틸 키토올리고당을 합성하고, 안지오텐신 I 변환효소에 대한 저해활성을 분석함으로써 달성하였다.
- <13> 본 발명은 안지오텐신 I 변환 효소(Angiotensin I converting enzyme; ACE) 활성 저해효과를 갖는 하기 화학식 1의 항고혈압용 아미노에틸 키토올리고당 화합물을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- <14> <화학식 1>



- <15>
- <16> 상기에서 아미노에틸 키토올리고당(AE-COS)은 키토올리고당(COS)에 2-클로로에틸아미노 염산을 첨가하여 합성할 수 있다. 아미노에틸 키토올리고당의 특성규명은 수소핵자기공명분광법($^1\text{H NMR}$)을 이용하여 수행할 수 있으며, ACE 저해분석은 UV-분광계를 이용하여 228nm에서 흡광도를 측정하여 IC_{50} 값으로써 평가할 수 있다.
- <17> 또한 본 발명은 아미노에틸 키토올리고당 화합물을 유효성분으로 함유하여 안지오텐신 변환 효소(ACE) 활성 저해효과를 갖는 항고혈압용 식품조성물을 제공하는 것을 특징으로 한다. 상기 식품조성물은 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 통상 식품에 사용하는 부원료 및 첨가제를 사용할 수 있다.

효 과

<18> 본 발명은 안지오텐신 I 변환 효소(Angiotensin I converting enzyme; ACE) 활성 저해효과를 갖는 항고혈압용 아미노에틸 키토올리고당 화합물에 관한 것으로, 상기 물질은 키토올리고당에 비하여 훨씬 높은 ACE 저해 활성을 보여 천연 항고혈압 용도를 가진 천연물질을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한 본 발명은 C6 위치의 아미노기가 효소 활성 부위에 키토올리고당이 결합하는 능력을 증진시켜 ACE 저해에 있어 중요한 역할을 담당한다는 것을 밝힘으로써 키토올리고당의 ACE 저해활성을 증진시키는 방법을 제공하므로, 건강기능식품 및 약학분야에서 매우 뛰어난 발명이라 할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<19> 이하 본 발명이 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<20> 게 껍질로부터 제조되는 키토올리고당(분자량 800 내지 3,000Da, 탈아세틸화 90%)은 대한민국 서울에 있는 키토라이프 회사에서 제공하였다. 토끼 폐에서 얻은 ACE, ACE의 기질 펩타이드(히푸릴-히스티딜-류신, hippuryl-histidyl-leucine) 및 2-클로르에틸아미노 염산은 시그마 케미컬 회사에서 구입하였다 (St. Louis, MO). 그 외 모든 시약들은 상업적으로 이용가능한 최상급이었다.

<21> 실시예 1 : 아미노에틸 키토올리고당(AE-COS)의 합성

<22> 키토산의 가수분해 산물인 키토올리고당은 아세틸화 정도에 따라 C-2 자리에 아미노기(amino-group) 또는 아세트아미드기(acetamide group)를 가지고 있으며, 이러한 기능기에 주로 근거하여, 키토올리고당은 항균활성, 항진균활성, 항종양활성, 면역증강효과, 감염예방효과 및 효소저해와 같은 수많은 생물학적 활성을 나타낸다.

<23> 본 발명에서, ACE 저해 잠재능을 개선시키기 위하여 COS에 아미노에틸 기능성을 접목하여 AE-COS를 합성하였다. AE-COS는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

<24> 요약하면, 수용성 3.0M의 2-클로르에틸아미노 염산 20mL를 COS 0.40g과 40 °C에서 교반하면서 섞어주었다. 3M의 수산화나트륨 20mL를 반응혼합물에 한방울씩 첨가하고, 48시간 동안 계속 교반하였다. 반응 후 상기 용액을 여과종이를 이용하여 여과하였다. 그리고나서 반응혼합물을 0.1N의 염산으로 산성화하고 물로 이틀간 투석하였으며, 투석한 물질을 동결건조하여 0.334g의 AE-COS를 수득하였다.

<25> 합성된 AE-COS는 C-6 상의 하이드록실기를 성공적으로 아미노에틸기로 대체하였으며, COS 구조는 그대로 유지되었으며, 본 물질은 물에 완전 용해되었다.

<26> 실시예 2 : AE-COS의 확인

<27> 수소핵자기공명분광법(¹HNMR)을 이용하여 AE-COS임을 확인하였다..

<28> 400MHz의 일정 자기장 하에서 JEOL JNM ECP-400 NMR 분광기로 ¹HNMR을 수행하였고 화학적 이동 수치(chemical shift values)는 y축에 (ppm) 나타내었다. 아미노에틸키토올리고당(AE-COS)의 분자량은 2,5-디하이드록시벤조산 (2, 5-dihydroxybenzoic acid)을 기반으로 이용하는 보야저 질량 분석기(Voyager mass spectrometer, Applied Biosystems, USA) 로 MALDI-TOF 질량분석법 (Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy) 에 의하여 결정하였다.

<29> ¹H NMR을 이용하여 대체된 아미노에틸기의 존재여부를 확인하였다.

<30> 도 1에서 나타낸 바와 같이, AE-COS 스펙트럼 중 2.8ppm에서 나타난 새로운 화학적 이동은 CH₂N의 양자에 의한 것이었다. 2.0ppm에서의 피크는 잔존 아세틸의 피크였고, 피라노스 단위의 양자들의 피크는 아미노에틸기의 NH₂ 피크와 중첩되었다(2.9-3.6 ppm).

<31> 실시예 3 : ACE 저해 활성 분석

<32> ACE 저해 활성을 쿠시만 및 층(Cushman and Cheung)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.

<33> 요약하면, 샘플용액 50 μL를 ACE 용액(25 mU/mL) 50 μL와 섞은 후 37°C에서 10분간 전배양하였고, 상기 혼합물을 150 μL의 기질(pH 8.3에서 0.5M의 염화나트륨을 포함한 50mM의 나트륨붕산염 하의 4.15 mM Hip-His-Leu)

과 혼합한 후 동일 온도에서 30분간 더 배양하였다. 마지막으로 1.0M의 염산 250 μ L을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 0.5mL의 에틸아세테이트로 추출하여 결과적으로 히푸르산을 얻었다. 그리고 나서 2,000g 로 10분간 원심 분리한 후 상층액 200 μ L를 테스트튜브에 옮긴 후 2시간 동안 실온에서 진공증발시켰다. 상기 히푸르산을 1.0mL의 증류수에 녹인 후, UV-분광광도계를 이용하여 228nm에서 흡광도를 측정하였다(Tecan Austria GmbH, Austria). IC₅₀ 값은 ACE 활성을 50% 억제하는 데 필요한 억제제의 농도로 정의하였다.

<34> 도 2에 나타난 바와 같이 AE-COS는 2.5 μ g/mL 의 농도에서 89.3%의 ACE 저해활성을 나타내었고, IC₅₀값은 0.8017 μ g/mL 였다. COS는 동일농도에서 18.6%의 ACE 저해 활성을 나타내었으며 AE-COS가 COS에 비하여 개선된 ACE 저해활성을 가진다는 것을 알 수 있었다.

<35> 현재, 천연 ACE 저해제 대부분은 미역, 카세인, 발효 대두유, 치즈유청, 대두, 옥수수 글루텐, 각시가자미, 가다랑어 고기, 알래스카 대구, 짧은목 조개, 진주조개 및 소 혈장단백질과 같은 다양한 단백질 가수분해물서 분리해낸 펩타이드며, 반면에 펩타이드가 아닌 ACE 저해제는 매우 적다.

<36> 홍(Hong et al.) 등은 COS의 ACE 저해활성을 측정하였고, 모든 COS가 ACE 저해활성을 보인다는 것을 인식하였다. 특히 삼량체 (三量體)가 다른 분자량의COS 보다 IC₅₀값이 0.9 μ M로 더 낮았다

<37> 박(Park et al.) 등은 또한 한외여과 막 생물반응장치 시스템 (ultrafiltration membrane bioreactor system)을 이용하여 생산한 다른 분자량의 COS의 ACE 저해 활성을 조사하였다.

<38> 그 결과 50% 탈아세틸화된 중 분자량(1-5 kDa) 을 가진 COS는 고 분자량(5- 10 kDa) 의 COS 및 저분자량(1 kDa 이하)의 COS와 비교하여 볼 때, 가장 높은 ACE 저해 활성(1.22 mg/mL)을 나타내었다. 또한 키토산으로부터90%, 75% 및 50% 탈아세틸화 정도를 가진 상이한 COS의 ACE 저해 효과를 비교한 결과 탈아세틸화정도가 ACE 저해활성에 영향을 준다고 결론지었다.

<39> 이런 결과는 분자량 및 COS의 탈아세틸화 정도가 ACE 저해에 있어 중요한 인자라는 것을 보여주었다. 더 나아가, 후양(Huang et al.) 은 음전하를 띠고 캡토프릴과 비슷한 구조를 가진 카르복실 COS를 합성하였다.

<40> 종래 연구에서, 발명자들은 ACE 저해를 위한 아미노에틸 키틴을 합성하였다. 합성된 물질 대부분은 합성전의 출발물질보다 높은 ACE 저해 활성을 나타내었다. 또한 본 발명에서도, AE-COS의 ACE 저해활성은 COS보다 증가하였다.

<41> 표 2에 나타난 바와 같이, 2.5 μ g/mL의 농도에서 COS와 AE-COS는 각각 18.6% 및 89.3%의 ACE 저해 활성을 나타내었다. 또한 투여량에 현저히 비례하는 저해 효과가 COS와 AE-COS 처리군 모두에서 관찰되었으며, 이는 종래 보고와 일치하였다.

<42> 실시예 4 : AE-COS의 ACE 저해 패턴 규명

<43> ACE에 대한 AE-COS의 저해 메커니즘을 규명하기 위하여, 상기한 공정에 따라, 2개의 상이한 농도의 저해제와 3개의 상이한 농도의 ACE 기질(4.15, 2.075, and 1.0375 mM)을 가지고 배양시간을 달리하여 라인위버-버크 플롯 (Lineweaver-Burk plot) 을 도시하였다. 리네위버-버크 플롯은 저해제 농도에 대한 1/V(min/OD at 228)로 도시하였다. 모든 분석은 세번 반복 수행하였고, 결과는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

<44> AE-COS의 ACE 저해패턴을 라인위버-버트 플롯을 이용하여 조사하였으며, 표 3에 나타난 바와 같이 경쟁적인 것으로 밝혀졌다. 이것은 AE-COS가 ACE의 활성부위에 결합하는 기질과 경쟁한다는 것을 의미한다.

<45> 종래 보고된 ACE 저해 활성을 가지는 천연펩타이드 중에서 가장 강력한 펩타이드들은 독사의 독에서 분리한 펩타이드와 비슷한 구조를 가지고 있었다. 기질과 ACE 활성부위 간의 상호작용 모델이 온데티와 쿠쉬만(Ondetti and Cushman)에 의하여 제시되었다. 이 모델에 따르면, C-말단의 3개 펩타이드가 ACE 활성부위에서 3개의 보조부위 또는 포켓과 상호작용할 수 있다.

<46> ACE는 C 말단의 3개 위치에 소수성 아미노산을 포함하고 있는 기질 또는 경쟁적 저해제들을 더 선호하는 것으로 보인다. 일반적으로, ACE 저해제는 아연 결합 리간드(하이드록삼산, 티올, 포스포닐기, 카르복실기, 케톤), 수소결합공여체 및 카르복실 중결기와 같은 하나 이상의 기능성 기를 함유하고 있다.

<47> 합성 ACE 저해제인 리시노프릴은 촉매 영역에서 여러 결합부위에 대한 효소의 천연 기질과 경쟁하고, 카르복실기 및 중심 카르보닐 및 아미노 기에 의한 수소결합에 의하여 아연 이온과 직접 상호작용하여 활성부위에 묻힌다. COS의 경우에, 이온 킬레이트 능력을 가질 수 있으며, 활성 부위의 아연 이온과 쉽게 반응할 수 있다. 또한

OH기 및 NH₂기는 수소결합을 통하여 효소결합부위의 수소와 상호작용할지 모른다.

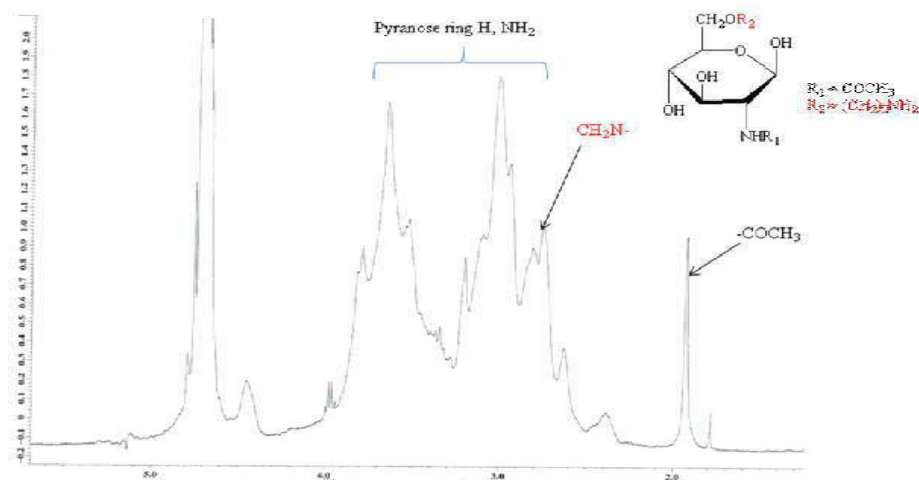
- <48> 본 발명에서, AE-COS는 90%의 아미노기와 10%의 아세틸기를 함유하는 피라노스 잔기를 가지고 있으며 이것이 아마도 ACE 활성부위에서 수소결합 및 아연의 킬레이팅을 통하여 상호작용하는 것일 수 있다
- <49> 또한 AE-COS는 C-6 위치의 수소원자를 대체한 아미노에틸기 내에 하나의 아미노기를 가지고 있다. 이 구조는 ACE 활성부위의 S₁ pocket과 상호작용하고 ACE 저해 활성의 주요한 결정인자로 작용하는 것일 수도 있다.
- <50> 따라서, AE-COS가 COS 보다 더 높은 ACE 저해 효과를 가지고, 그 경쟁적 구조가 ACE 활성부위와 상호작용을 한다는 것을 추정할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

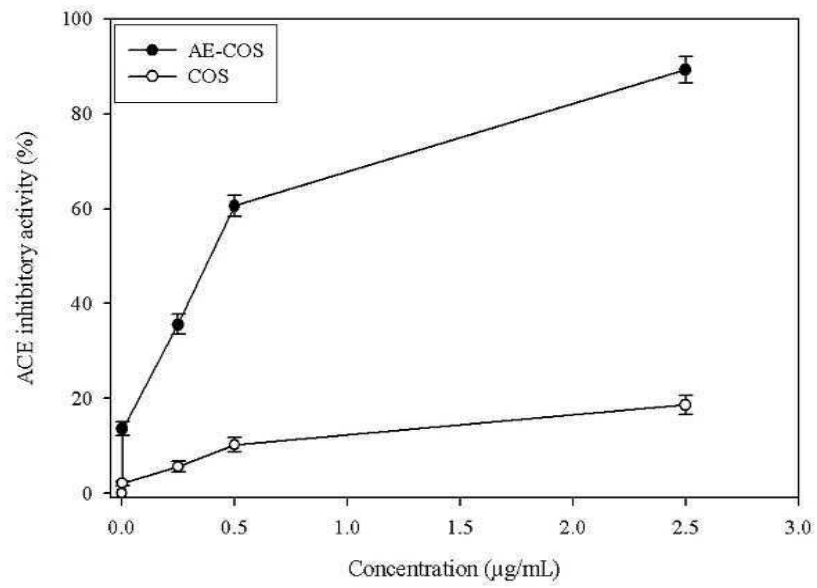
- <51> 도 1 은 도 1은 AE-COS의 ¹HNMR 스펙트럼을 도시한 것이다.
- <52> 도 2는 상이한 농도의 AE-COS와 COS의 ACE 저해활성을 나타낸 것이다.
- <53> 도 3은 ACE-COS에 의한 ACE 저해 모드를 결정하기 위한 라인위버-버크 플롯을 도시한 것이다.
- <54> 도 4는 AE-COS와 ACE의 필요부위간의 상호작용을 도시한 것이다.

도면

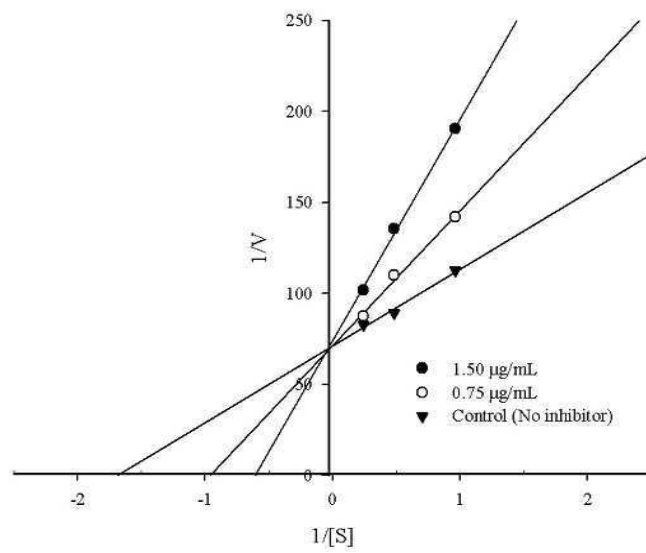
도면1



도면2



도면3



도면4

