

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0072489
(43) 공개일자 2021년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61K 36/60 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0162846

(22) 출원일자 2019년12월09일

심사청구일자 2019년12월09일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

전북대학교산학협력단

전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1가)

(72) 발명자

최재수

부산광역시 남구 오륙도로 85, 101동 204호(용호동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)

박세은

부산광역시 남구 수영로366번길 27, 402호(대연동)

정현아

전라북도 전주시 덕진구 송천3길 55, 101동 1105호(송천동1가, 벽산 e리버파크)

(74) 대리인

위병갑

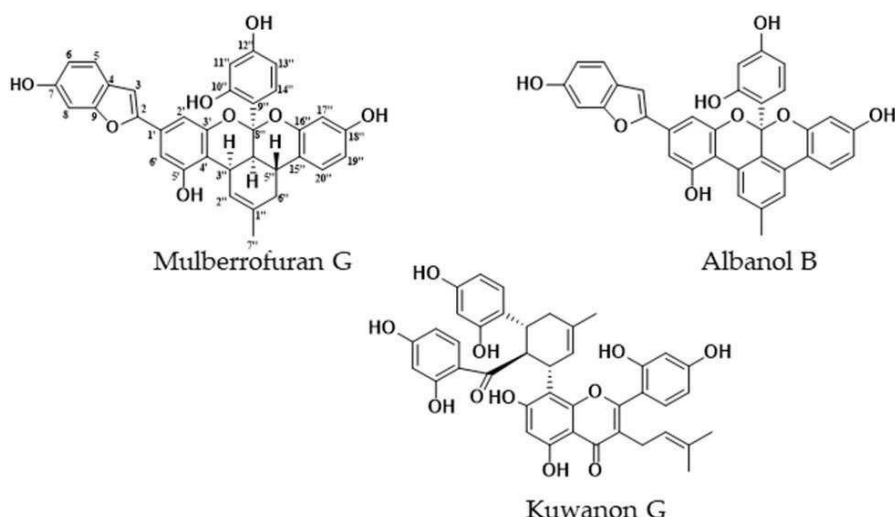
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 신경퇴행성질환에 대응하기 위한 인간 모노아민산화효소 및 도파민 수용체를 표적으로 하는 뽕나무 뿌리 껍질에서 분리된 디엘스-알더 타입의 부산물

(57) 요약

본 발명은 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 화합물은 MAO-A 또는 MAO-B에 대한 저해 활성을 가지며, 도파민 D₃ 수용체 또는 도파민 D₄ 수용체에 의한 신호전달을 촉진하고, 도파민 D₁ 수용체 또는 도파민 D_{2L} 수용체에 의한 신호전달을 저해함으로써 신경질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/353 (2013.01)

A61K 36/60 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B4005845

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 한국산 뽕나무 유래 이차대사산물의 산화 및 염증 스트레스 기전 제어를 통한 당뇨
및 알츠하이머 질환 개선 효과 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 전북대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 뽕나무(*Morus alba* Linn)의 뿌리 껍질에서 분리된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 MAO-A (monoamine oxidase A) 또는 MAO-B (monoamine oxidase B)에 대한 저해 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 도파민 D₃ 수용체 또는 도파민 D₄ 수용체의 효현제(agonist)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 도파민 D₁ 수용체 또는 도파민 D_{2L} 수용체의 길항제(antagonist)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 신경질환은 파킨슨병, 조현병, 정신분열형 장애, 주의력결핍 과잉행동장애, 인격 장애, 자폐증, 우울증 및 망상 장애로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

시험관 내(*in vitro*)에서 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 MAO-A (monoamine oxidase A) 또는 MAO-B (monoamine oxidase B)를 저해하는 방법.

청구항 9

시험관 내(*in vitro*)에서 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 도파민 D₃ 수용체 또는 도파민 D₄ 수용체에 의한 신호전달을 촉진시키는 방법.

청구항 10

시험관 내(*in vitro*)에서 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 도파민 D₁ 수용체 또는 도파민 D_{2L} 수용체에 의한 신호전달을 저해하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뽕나무의 뿌리 껍질에서 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경퇴행(Neurodegeneration)은 노화에 따라 악화되는 뉴런의 구조적 및 기능적 특성의 지속적인 손실을 말한다. 퇴행성 신경질환은 병리학적 및 임상적으로 나타나는 다양한 신경 장애의 거대한 집합으로서, 신경 손상에 의해 인지력 감퇴인 알츠하이머병(Alzheimer's disease); SNPC (substantia nigra pars compacta)에서 도파민성 신경세포의 선택적 손실에 의한 운동 장애를 특징으로 하는 파킨슨병(Parkinson's disease); 및 선조 투사 뉴런의 손실, 비정상적인 에너지 대사 및 흥분 독성을 특징으로 하는 헌팅턴병(Huntington disease)을 포함하고 있다 (IGI Global, PA, USA, 2019, pp. 1-23). 특히, 파킨슨병(Parkinson's disease)의 치료제에 대한 연구는 동물 모델에서 광범위하게 이루어졌고, 상기 치료제의 공통적 특성 중 하나는 중추신경계에 신경전달물질인 도파민(dopamine)을 향상시키는 것이다 (Evrard et al., 2002; Finberg and Rabey, 2016).

[0003] 모노아민산화효소(MAO, monoamine oxidase)는 중추신경계와 말초조직에 다양하게 분포되어 있는 효소로서, 아민 화합물의 산화적 탈아민 반응을 촉매하여 신경전달물질인 모노아민계 화합물과 장내 박테리아에 의해 유래되는 호르몬성 아민(hormonal amines)을 분해한다. 즉, 모노아민산화효소에 의해 신경전달물질이 분해됨으로써 생체 내 모노아민계 화합물이 결핍되어 신경정신장애가 발병하는 것이다.

[0004] 이러한 모노아민산화효소(MAO)는 내인성 기질로서 도파민(dopamine), 티라민(tyramine), 에피네프린(epinephrine) 또는 노르에피네프린(norepinephrine)을 주로 이용하며, 기질 특이성에 따라 세로토닌(serotonin)을 선택적으로 탈아미노화시키는 A-형(type A, MAO-A)과 페닐에틸아민(phenylethylamine)과 벤질아민(benzylamine)을 선택적으로 탈아미노화시키는 B-형(type B, MAO-B)의 두 가지 형태로 나눌 수 있다(Youdim MB et al., 2006, Nat. Rev. Neurosci., 7:295-309). 이 중 MAO-A 저해제는 중추 신경의 도파민 레벨을 증가시킴으로써 우울증에 중요한 치료제로 활용될 수 있는 반면, MAO-B 저해제는 도파민의 대사를 차단함으로써 파킨슨병을 치료하는데 이용될 수 있다 (Nature Reviews Neuroscience, 7, 295).

[0005] 카테콜아민-기반의 신경전달물질인 도파민은 동기, 감정 및 보상을 포함하는 다양한 신경학적 과정과 관련된 GPCRs(G-protein-coupled receptors) superfamily의 멤버인 도파민 수용체(dopamine receptors)를 촉진하여 작용하는 것으로 알려져 있다 (Newman et al., 2012). 도파민 수용체는 신호전달에서의 유사성을 근거로 D₁-like (D₁R, D₅R) 및 D₂-like (D₂R, D₃R, D₄R) 서브타입으로 분류된다 (Butini et al., 2016).

[0006] D₂-like D₂R, D₃R 및 D₄R 은 G_{ai/o} 를 자극하여 아데닐산 시클라아제 (adenylate cyclase) 활성화 및 cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 생산을 억제한다. 전체적 또는 부분적 D₂R 및 D₃R 의 작용제(agonist)는 파킨슨병 치료에 널리 사용되고 있고, D₂R 또는 D₃R 의 길항제(antagonist)는 조현병(schizophrenia)의 치료에 효과가 있다 (Bello et al., 2019). 해마와 전두엽 피질에서 주로 발현되는 D₄R 는 탐색 행동, 주의 및 억제 회피 작업에 영향을 준다. D₄R 의 활성화는 조현병 및 주의력 결핍 / 과다 활동 장애와 관련된 인지 장애를 치료하는데 사용될 수 있다 (Keck et al., 2019).

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Prashamsa Koirala et al., Structure-Activity Relationship of the Tyrosinase Inhibitors Kuwanon G, Mulberrofuran G, and Albanol B from Morus Species: A Kinetics and Molecular Docking Study. Molecules 2018, 23, 1413.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 시험관 내(*in vitro*)에서 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 MAO-A (monoamine oxidase A) 또는 MAO-B (monoamine oxidase B)를 저해하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 시험관 내(*in vitro*)에서 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 도파민 D₃ 수용체 또는 도파민 D₄ 수용체에 의한 신호전달을 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 시험관 내(*in vitro*)에서 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 도파민 D₁ 수용체 또는 도파민 D_{2L} 수용체에 의한 신호전달을 저해하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예 있어서, 상기 화합물은 뽕나무(*Morus alba* Linn)의 뿌리 껍질에서 분리된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 당업계에서 공지된 방법으로 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질을 사용할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예 있어서, 상기 화합물은 MAO-A (monoamine oxidase A) 또는 MAO-B (monoamine oxidase B)에 대한 저해 활성을 가지는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예 있어서, 상기 화합물은 도파민 D₃ 수용체 또는 도파민 D₄ 수용체의 효현제(agonist)인 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예 있어서, 상기 화합물은 도파민 D₁ 수용체 또는 도파민 D_{2L} 수용체의 길항제(antagonist)인 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예 있어서, 상기 신경질환은 파킨슨병, 조현병, 정신분열형 장애, 주의력결핍 과잉행동장애, 인격 장애, 자폐증, 우울증 및 망상 장애로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 시험관 내(*in vitro*)에서 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 MAO-A

(monoamine oxidase A) 또는 MAO-B (monoamine oxidase B)를 저해하는 방법을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 시험관 내(*in vitro*)에서 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 도파민 D₃ 수용체 또는 도파민 D₄ 수용체에 의한 신호전달을 촉진시키는 방법을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 시험관 내(*in vitro*)에서 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 시료에 처리하는 단계를 포함하는 도파민 D₁ 수용체 또는 도파민 D_{2L} 수용체에 의한 신호전달을 저해하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 화합물인 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 또는 알바놀 B (albanol B)는 MAO-A 또는 MAO-B에 대한 저해 활성을 가지며, 도파민 D₃ 수용체 또는 도파민 D₄ 수용체에 의한 신호전달을 촉진하고, 도파민 D₁ 수용체 또는 도파민 D_{2L} 수용체에 의한 신호전달을 저해함으로써 신경질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 멀베로푸란 G, 알바놀 B 및 쿠와논 G의 화학 구조식을 나타낸 것이다.

도 2는 멀베로푸란 G (A, D), 쿠와논 G (B, E), 알바놀 B (C, F)의 인간 MAO-A에 대한 Dixon plot (A 내지 C) 및 Lineweaver-Burk plot (D 내지 F) 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 멀베로푸란 G (A, D), 쿠와논 G (B, E), 알바놀 B (C, F)의 인간 MAO-B에 대한 Dixon plot (A 내지 C) 및 Lineweaver-Burk plot (D 내지 F) 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 인간 MAO-A에 도킹된 멀베로푸란 G (A, D), 쿠와논 G (B, E), 알바놀 B (C, F)의 결합 양상을 나타낸 것이다 (FAD, 초록색 막대).

도 5는 인간 MAO-B의 도킹된 멀베로푸란 G (A, D), 쿠와논 G (B, E), 알바놀 B (C, F)의 결합 양상을 나타낸 것이다 (FAD, 초록색 막대).

도 6는 인간 MAO-A (A, C) 및 인간 MAO-B (B, D)에 도킹된 디프레닐 HCl의 결합 양상을 나타낸 것이다 (FAD, 초록색 막대).

도 7은 인간 도파민 D₁ 수용체의 활성 부위에 도킹된 멀베로푸란 G (A, D), 쿠와논 G (B, E), 알바놀 B (C, F)의 결합 양상을 나타낸 것이다.

도 8은 인간 도파민 D_{2L} 수용체의 활성 부위에 도킹된 멀베로푸란 G (A, D), 쿠와논 G (B, E), 알바놀 B (C, F)의 결합 양상을 나타낸 것이다.

도 9는 인간 도파민 D₃ 수용체의 활성 부위에 도킹된 멀베로푸란 G (A, D), 쿠와논 G (B, E), 알바놀 B (C, F)의 결합 양상을 나타낸 것이다.

도 10은 인간 도파민 D₄ 수용체의 활성 부위에 도킹된 멀베로푸란 G (A, D), 쿠와논 G (B, E), 알바놀 B (C, F)의 결합 양상을 나타낸 것이다.

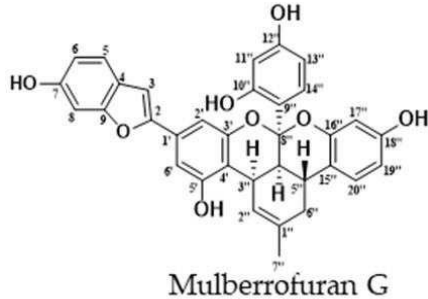
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명은 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 화합물인 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G) 및 알바놀 B (albanol B)는 각각

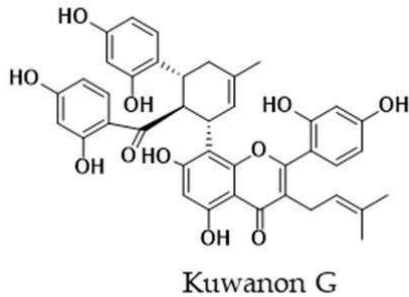
하기 화학식 1 내지 3으로 표시되는 화합물을 의미한다. 본 발명의 화합물은 뽕나무의 뿌리 껍질에서 분리된 디엘스-알더 타입(Diels-Alder type)의 부산물(adduct)로서, 이와 같은 천연 공급원으로부터 분리할 수 있으나, 이에 한정되지 않고, 당업계에 공지된 방법으로 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질을 사용할 수 있다.

[0032] [화학식 1]



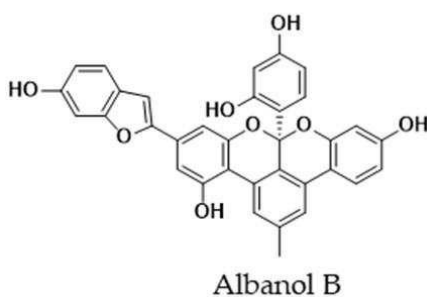
[0033]

[0035] [화학식 2]



[0036]

[0038] [화학식 3]



[0039]

[0041] 본 발명의 화합물은 인간 MAO-A (human monoamine oxidase A) 또는 인간 MAO-B (human monoamine oxidase B)에 대한 저해 활성을 가지는 저해제인 것일 수 있다. 인간 MAO-A의 저해제는 중추 신경의 도파민 수준을 증가시켜 우울증의 치료에 이용될 수 있고, 인간 MAO-B의 저해제는 도파민의 대사를 차단하여 파킨슨병의 치료에 이용될 수 있다 (Nature Reviews Neuroscience, 7, 295).

[0042] 본 발명의 용어, "효현제(agonist, 작용제)"는 수용체에 결합하여 생물학적 반응을 생산하기 위하여 수용체를 활성화시키는 물질이고, "길항제(antagonist)"는 상기 효현제와 같이 수용체에 결합하지만, 효현제와 반대로 생물학적 반응을 저해하기 위하여 수용체를 억제시키는 물질이다.

[0043] 본 발명의 화합물은 도파민 D₃ 수용체 또는 도파민 D₄ 수용체의 효현제(agonist)인 것일 수 있고, 도파민 D₃ 수

용체 또는 도파민 D₄ 수용체에 의한 신호전달을 촉진시키는 효과가 있어 신경질환, 특히, 파킨슨병, 조현병 또는 우울증의 치료에 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 도파민 D₁ 수용체 또는 도파민 D_{2L} 수용체의 길항제(antagonist)인 것일 수 있고, 도파민 D₁ 수용체 또는 도파민 D_{2L} 수용체에 의한 신호전달을 저해하는 효과가 있어, 신경질환, 특히, 조현병의 치료에 이용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 나아가, 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 젤제 또는 젤의 형태의 피부 외용제의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0047] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 싸이코트리아 루브라 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 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 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에 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 한정되지는 않는다.

[0049] 상기 용어, "개체"란 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0050] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0052] 본 발명의 식품 조성물은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있으며, 기능성 식품, 건강기능식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다.

[0053] 본 발명의 용어, "기능성 식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

- [0054] 본 발명의 용어, "건강기능식품"은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정 성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체 리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 조성물은 당업자의 선택에 따라 식품에 포함될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물 및 이의 분획물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명에 적용될 수 있는 식품에는 예컨대, 특수영양식품(예: 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예: 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예: 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예: 스낵류), 유가공품(예: 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예: 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등) 등 모든 식품을 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 건강기능식품 조성물이 음료의 형태로 사용될 경우에는 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제, 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0059] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] **실시예 1. 실험방법**
- [0062] **1.1. 실험재료 및 시료**
- [0063] 멀베로푸란 G (mulberrofuran G), 쿠와논 G (kuwanon G), 알바놀 B (albamol B)는 기존 연구에 기재된 바와 같이 뽕나무(*Morus alba* Linn)의 뿌리 껍질에서 분리하여 동정하였고 (Archives of Pharmacal Research, 40, 338-349), 각 화합물의 구조는 도 1과 같다. 화합물의 순도는 분광 데이터로부터 98% 이상인 것으로 확인하였다. MAO-GloTM 분석 키트는 Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA)에서 구매하였고, 형질감염된 CHO(chinese hamster ovary) 세포 및 Ba/F3 세포는 Eurofins Scientific (Le Bois l'Eveque, France)에서 수득하였다. HBSS (Hank's balanced salt solution), DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 및 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) buffer는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)로부터 구매하였다. 인간 MAO-A, 인간 MAO-B, 보고된 약물인 디프레닐 HCl, 도파민(dopamine), 세로토닌(serotonin), 부타클라몰(butacclamol, SCH-23390(halobenzazepine), 클로자핀(clozapine) 및 (S)-WAY-100635 는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.
- [0065] **1.2. 인간 MAO-A (human monoamine oxidase A) 및 인간 MAO-B (human monoamine oxidase B)의 저해 활성 및 효소 키네틱 실험**
- [0066] 인간 MAO-A 및 인간 MAO-B에 대한 저해활성은 MAO-GloTM assay kit (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하였고, 구체적인 절차는 기존에 보고된 바와 같이 수행하였다 (ACS Omega, 4, 11621-11630; 및 ACS Omega, 4, 16139-16152). 각 화합물은 6, 30 및 120 μ M의 농도에서 측정하였고, 디프레닐 HCl을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0067] 각 화합물의 인간 MAO-A 및 인간 MAO-B에 대한 억제 메커니즘의 결정은 여러 농도의 멀베로푸란 G (인간 MAO-A: 20 ~ 60 μ M; 및 인간 MAO-B: 10 ~ 30 μ M), 쿠와논 G (인간 MAO-A: 30 ~ 60 μ M; 및 인간 MAO-B: 20 ~ 70 μ M) 또는 알바놀 B (인간 MAO-A: 10 ~ 120 μ M; 및 인간 MAO-B: 30 ~ 100 μ M)에서 여러 농도의 기질 하에 효소학적 반응을 Dixon plot과 Lineweaver-Burk plot을 통해 나타내었다. 인간 MAO-A에 대한 키네틱 실험에서는 40, 80, 160 μ M 농도의 기질을 사용하였고, 인간 MAO-B에 대한 키네틱 실험에서는 4, 8, 16 μ M 농도의 기질을 사용하였다. 키네틱 파라미터는 SigmaPlot (v12.0, SPP Inc., Chicago, IL, USA)으로 분석하였다.

[0069] 1.3. 세포 기반 기능성 GPCR(G-protein-coupled receptor) 분석

[0070] 세포 기반 기능성 GPCR 분석은 GPCR 유전자가 포함된 플라스미드로 형질전환된 CHO 세포 및 Ba/F3 세포에서 수행되었다. 화합물의 효현제 또는 길항제 활성은 수용체의 종류에 따라 cAMP 조절 또는 Ca^{2+} 이온의 이동 능력을 측정하였다. 모든 분석은 기존 연구에 기재된 바와 같이 Eurofins Cerep (Le Bois l'Eveque, France)에서 이용하는 프로토콜을 따라 수행되었다 (Chemico-Biological Interactions, 310, 108757).

[0072] 1.4. cAMP 수준의 측정

[0073] 각 화합물의 도파민 D_1 , D_{2L} , D_3 또는 D_4 수용체(D_1R , D_3R 또는 D_4R)에서의 기능 활성은 cAMP 조절 효과로 분석되었다. 간단히, D_1R , $D_{2L}R$, D_3R 또는 D_4R 으로 형질감염된 CHO 세포 (CHO- D_1R , CHO- D_3R 또는 CHO- D_4R)는 20 mM HEPES buffer 및 500 μ M IBMX HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 포함된 HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 고정되고, 마이크로플레이트(5×10^3 cells/well)에 분주되었다. 이후, 각 화합물의 무처리(대조군), 처리(25, 50, 100 μ M) 또는 양성 대조군(도파민)의 존재 하에 실온에서 30 분 동안 배양하였다. 아데닐릴 사이클레이스 활성화제(adenylyl cyclase activator)인 NKH 477은 1.5 μ M 및 0.7 μ M의 농도로 추가되었고, 각각 30 분 및 10 분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 이후, 세포는 분리하고, 형광 어셉터(D_2 -labeled cAMP) 및 형광 도너(fluorescence donor, europium cryptate가 있는 anti-cAMP antibody)를 첨가하였다. 실온에서 1 시간 동안 배양한 후, EnvisionTM microplate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 $\lambda_{ex}=337$ nm 및 $\lambda_{em}=620$ 및 665 nm에서 형광 전이(fluorescence transfer)를 측정하였다. 효현제(agonist) 효과는 D_1R 의 10 μ M 도파민과 D_3R/D_4R 의 300 nM 도파민에 반응하는 대조군 대비 퍼센트(%)로 나타내었고, 길항제(antagonist) 효과도 D_1R 의 300 nM, D_3R 의 10 nM 및 D_4R 의 100 nM 도파민에 반응하는 대조군 대비 퍼센트(%)로 나타내었다.

[0075] 1.5. 분자 도킹 시뮬레이션

[0076] 자동화된 싱글 도킹 시뮬레이션은 AutoDock 4.2 (Journal of Molecular Recognition, 9, 1-5)로 수행되었다. 인간 MAO-A (PDB ID: 2bxr), 인간 MAO-B (PDB ID: 2v60), 인간 $D_{2L}R$ (PDB ID: 6cm4), 인간 D_3R (PDB ID: 3pbl), 및 인간 D_4R (PDB ID: 5wiv)의 X-ray 결정 구조는 RCSB Protein Data Bank (PDB)에서 획득하였다. 멀베로푸란 G (NCBI, CIDs 196583), 쿠와논 G (NCBI, CIDs 5281667) 및 알바놀 B (NCBI, CIDs 480819)의 3D 화학 구조는 PubChem Compound 에서 획득하였다. 물과 리간드 분자는 지웠고, 인간 MAO의 경우 보조인자인 FAD (flavin adenine dinucleotide)는 유지시켰다. AutoDock 4.2의 Lamarckian 유전 알고리즘이 이용되었다. 도킹 계산을 위해 Gasteiger charges를 디폴트로 추가하고 모든 torsion은 회전이 가능하도록 설정하였다. Grid map은 Autogrid로 생성하였으며, 도킹 프로토콜은 10 개의 독립적인 유전 알고리즘이 포함하였고, 다른 파라미터는 AutoDock Tools에서 디폴트로 세팅하였다. 도킹 결과는 Discovery Studio (v17.2, Accelrys, San Diego, CA, USA)로 시각화하였다.

[0078] 실시예 2. 인간 MAO-A 및 인간 MAO-B에 대한 저해 활성 효과 및 효소 키네틱 분석 결과

[0079] 본 발명자들은 디프레닐 HCl을 양성 대조군으로 하여 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B의 MAO-A 및 MAO-B에 대한 저해 효과를 측정하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, 멀베로푸란 G의 인간 MAO-A

에 대한 IC_{50} 값은 $54.79 \pm 0.03 \mu M$ 로서 가장 높은 저해율을 보였고, 쿠와논 G 및 알바놀 B의 인간 MAO-A에 대한 IC_{50} 값은 각각 $70.16 \pm 2.60 \mu M$ 및 $114.31 \pm 2.30 \mu M$ 으로 나타났다. 또한, 멀베로푸란 G의 인간 MAO-B에 대한 IC_{50} 값은 $18.14 \pm 1.06 \mu M$ 로서 인간 MAO-A 보다 높은 저해 활성을 보였고, 쿠와논 G 및 알바놀 B의 인간 MAO-B에 대한 IC_{50} 값은 각각 $57.71 \pm 2.12 \mu M$ 및 $90.59 \pm 1.72 \mu M$ 으로 나타났다. 양성 대조군인 디프레닐 HCl의 경우에는 인간 MAO-A 및 인간 MAO-B에 대한 IC_{50} 값이 각각 $12.51 \pm 1.11 \mu M$ 및 $0.30 \pm 0.01 \mu M$ 로 나타났다.

표 1

Compounds	Human monoamine oxidase A (hMAO-A)		
	IC_{50} (μM , Mean $\pm$ S D) ^a	K_i value ^b	Inhibition type ^c
Mulberrofuran G	54.79 ± 0.03	26.96	Competitive
Kuwanon G	70.16 ± 2.60	28.29	Competitive
Albanol B	114.31 ± 2.30	46.93	Competitive
Deprenyl HCl ^d	12.51 ± 1.11	NT	NT
Compounds	Human monoamine oxidase B (hMAO-B)		
	IC_{50} (μM , Mean $\pm$ S D) ^a	K_i value ^b	Inhibition type ^c
Mulberrofuran G	18.14 ± 1.06	17.01	Non-Competitive
Kuwanon G	57.71 ± 2.12	52.09	Non-Competitive
Albanol B	90.59 ± 1.72	94.32	Mixed
Deprenyl HCl ^d	0.30 ± 0.01	NT	NT

NT: Not tested

^a The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values (μM) were calculated from a log dose-inhibition curve and expressed as mean $\pm$ SD of triplicate experiments.

^b hMAO inhibition constants (K_i) was determined using a Dixon plot.

^c hMAO inhibition type was determined using Lineweaver-Burk plots and Dixon plot.

^d Reference inhibitor.

[0081]

[0083]

또한, 본 발명자들은 인간 MAO-A 및 인간 MAO-B의 저해 메커니즘을 이해하기 위해서 Dixon plot 및 Lineweaver-Burk plot을 통해서 효소 키네틱 실험을 수행하였다. 그 결과, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B의 인간 MAO-A에 대한 저해 상수(K_i)는 각각 $29.96 \mu M$, $28.29 \mu M$ 및 $46.93 \mu M$ 로 확인되었다 (표 1). 또한, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B의 인간 MAO-A에 대한 Lineweaver-Burk plot에서 화합물의 농도가 증가하더라도 y축 교차점 ($1/V_{max}$)의 위치는 일정하게 유지되는 것으로 확인되었다 (도 2). 이로써, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 모두 인간 MAO-A에 대한 경쟁적 저해제로 확인되었다.

[0084]

또한, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B의 인간 MAO-B에 대한 저해 상수(K_i)는 각각 $17.01 \mu M$, $52.09 \mu M$ 및 $94.32 \mu M$ 로 확인되었다 (표 1). 또한, 멀베로푸란 G 및 쿠와논 G의 인간 MAO-B에 대한 Lineweaver-Burk plot에서 화합물의 농도가 높아질수록 x축 교차점이 일정하게 유지되고, y축 교차점 ($1/V_{max}$)의 위치가 높아지는 것으로 확인됨으로써, 멀베로푸란 G 및 쿠와논 G는 비경쟁적 저해제로 확인되었다 (도 3). 다만, 알바놀 B의 인간 MAO-B에 대한 Lineweaver-Burk plot에서는 화합물의 농도가 높아질수록 x축 교차점이 짧아지는 것으로 확인됨으로써, 알바놀 B는 혼합형 저해제인 것으로 확인되었다 (도 3).

[0085]

상기 결과로부터, 본 발명자들은 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 인간 MAO-A 및 인간 MAO-B에 대한 저해 활성이 있음을 확인하였고, 인간 MAO-B에 대한 저해 활성이 인간 MAO-A에 대한 저해 활성 보다 높은 것으로 확인하였다. 또한, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 인간 MAO-A의 경쟁적 저해제인 것을 확인하였고, 멀베로푸란 G 및 쿠와논 G는 인간 MAO-B의 비경쟁적 저해제인 것을 확인하였으며, 알바놀 B는 인간 MAO-B의 혼합형 저해제인 것을 확인하였다.

[0087]

실시예 3. 인간 MAO에 대한 도킹 시뮬레이션 결과

[0088] 본 발명자들은 화합물에 의한 인간 MAO-A 및 인간 MAO-B의 저해 메커니즘을 증명하기 위하여 도킹 시뮬레이션을 수행하였다. 그 결과, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B의 인간 MAO-A에 대한 결합 에너지(binding energy)는 각각 -9.54 kcal/mol, -6.74 kcal/mol 및 -8.62 kcal/mol로서 모두 음의 결합 에너지를 가지는 것으로 나타났다. 특히, 양성 대조군인 디프레닐 HCl (-6.18 kcal/mol)보다 더 낮은 결합 에너지를 갖는 것으로 확인되었다(표 2). 각 화합물의 결합 양상을 살펴보면, 멀베로푸란 G는 인간 MAO-A의 활성 부위에서 Phe208 및 Ile335와 소수성 상호작용을 형성하였고, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 인간 MAO-A의 활성 부위에서 공통적으로 Met300 및 Gly404과 수소결합을 형성하였다(도 4).

표 2

Compounds	Binding energy (kcal/mol) ^a	Number of H-bond ^b	H-bond interacting residues ^b	Hydrophobic interacting residues ^b	Electrostatic interacting residues ^b
Mulberrofuran G	-9.54	5	Gly110, Thr336, Ile207, Gly214, Ser209	Val210(Pi-Sigma, Pi-Alkyl), Ile325(Pi-Sigma), Phe208(Pi-Pi Stacked, Pi-Pi T-Shaped), Ile358(Alkyl), Leu337(Alkyl), Ile335(Alkyl), Met350(Alkyl), Val93(Pi-Alkyl)	
Kuwanon G	-6.74	9	Met300, Leu298, Asp359, Gly404, Cys398, Trp397, Cys400	Ala302(Pi-Alkyl, Alkyl)	
Albanol B	-8.62	7	Gln296, Ile295, Gly404, Tyr410, Met300, Thr183, Ser184	Pro299, Ala279, Ala302(Pi-Alkyl)	Glu188(Pi-Anion)
Deprenyl HCl	-6.18	0		Pro72(Pi-Sigma), Phe208(Pi-Alkyl), Tyr444(Pi-Alkyl), Arg206(Pi-Alkyl)	

^a Estimated binding free energy of the ligand-receptor complex.

^b The number of hydrogen bonds and all amino acid residues from the enzyme-inhibitor complex were determined with the AutoDock 4.2 program.

[0090]

[0092] 또한, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B의 인간 MAO-B에 대한 결합 에너지(binding energy)는 각각 -9.45 kcal/mol, -6.24 kcal/mol 및 -8.01 kcal/mol로서 모두 음의 결합 에너지를 가지는 것으로 나타났고, 특히, 양성 대조군인 디프레닐 HCl (-6.77 kcal/mol)보다 더 낮은 결합 에너지를 가지는 것으로 확인되었으며, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 인간 MAO-B의 활성 부위에서 각각 2 개, 7 개 및 6 개의 수소결합을 형성함으로써 강한 결합력을 가진 것으로 확인되었다(표 3). 특히, 멀베로푸란 G는 인간 MAO-B의 활성 부위에서 Phe103 및 Val106과 수소결합을 형성하였고, 쿠와논 G는 Glu475, Asn203, Pro476, Thr478, Thr196, Thr202 및 Arg100과 수소결합을 형성하였으며, 알바놀 B는 Thr202, Gln475, Thr478, Asn116, His115와 수소결합을 형성하였다(도 5).

[0093] 반면, 양성 대조군인 디프레닐 HCl은 인간 MAO-A 및 인간 MAO-B의 활성 부위에서 어떠한 수소 결합도 형성하지 않았음을 확인하였다(도 6).

표 3

Compounds	Binding energy (kcal/mol) ^a	Number of H-bond ^b	H-bond interacting residues ^b	Hydrophobic interacting residues ^b	Electrostatic interacting residues ^b
Mulberrofuran G	-9.45	2	Phe103, Val106	Phe103(Pi-Pi Stacked, Pi-Pi T-shaped), Tyr112(Pi-Pi T-shaped), Pro105(Alkyl), Pro102(Pi-Alkyl)	Glu183(Pi-Anion)
Kuwanon G	-6.24	7	Gln475, Asn203, Pro476, Thr478, Thr196, Thr202, Arg100	Ile477(Pi-Alkyl), Pro102(Pi-Alkyl, Pi-Sigma)	
Albanol B	-8.01	6	Thr202, Gln475, Thr478, Asn116, His115	Thr196(Pi-Sigma), Phe103(Pi-Pi Stacked), Pro102, Ile477(Pi-Alkyl)	Glu483(Pi-Anion)
Deprenyl HCl	-6.77	0		Tyr398(Pi-Pi Stacked), Tyr435(Pi-Pi Stacked), Leu171(Alkyl), Cys172(Alkyl), Phe168(Pi-Alkyl), Tyr326(Pi-Alkyl)	

^a Estimated binding free energy of the ligand-receptor complex.

^b The number of hydrogen bonds and all amino acid residues from the enzyme-inhibitor complex were determined with the AutoDock 4.2 program.

[0095]

[0097]

상기 결과로부터, 본 발명자들은 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B가 인간 MAO-A 및 인간 MAO-B의 활성 부위에서 강한 결합에 의한 저해 활성을 가지는 것을 확인하였다. 이로써, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B가 신경질환의 치료제, 특히, 우울증 또는 파킨슨병의 치료제로서 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0099]

실시예 4. 세포 기반 기능성 GPCR 분석 결과

[0100]

본 발명자들은 시험관 내의 세포 기반 기능성 검정 분석을 통해 도파민 D₁, D_{2L}, D₃ 및 D₄ 수용체 (D_{1R}, D_{2LR}, D_{3R} 및 D_{4R}) 및 세로토닌 1A 수용체 (serotonin 1A receptor, 5HT_{1A})에 대한 화합물의 효과를 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 25 μ M 농도에서 D_{1R}에 대한 도파민의 반응을 각각 92.31%, 91.09% 및 66.82%로 저해하는 효과를 보였고, D_{2LR}에 대하여 각각 97.16%, 33.69% 및 81.11%로 저해하는 효과를 보였다. 또한, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 25 μ M 농도에서 D_{3R}에 대하여 각각 71.93%, 64.99% 및 94.93%의 효현제 효과를 보였고, D_{4R}에 대하여 각각 63.00%, 58.66% 및 44.85%의 효현제 효과를 보였다 (표 4).

표 4

Receptors	MG	KG	AB	Reference Drugs
	% Stimulation ^a (% Inhibition ^b)	% Stimulation ^a (% Inhibition ^b)	% Stimulation ^a (% Inhibition ^b)	EC ₅₀ ^c (IC ₅₀ ^d)
D ₁ (h)	12.8 ± 6.22 (87.65 ± 1.20)	0.5 ± 0.42 (98.85 ± 4.17)	31.85 ± 14.21 (67.8 ± 16.12)	28 (2.8)
D _{2L} (h)	17.05 ± 14.07 (101.3 ± 0.14)	197.9 ± 9.33 (99.15 ± 0.78)	3.0 ± 1.56 (78.55 ± 3.60)	12 (28)
D ₃ (h)	119.9 ± 4.24 (-17.8 ± 15.41)	124.3 ± 0.57 (-32.2 ± 6.78)	102.8 ± 0.56 (-12.0 ± 1.97)	4.1 (20)
D ₄ (h)	86.3 ± 0.98 (-15.7 ± 14.14)	90.45 ± 1.48 (-28.1 ± 5.09)	44.85 ± 1.77 (21.8 ± 1.83)	21 (150)
5-HT _{1A} (h)	-0.2 ± 0.99 (31.95 ± 11.81)	27.85 ± 3.32 (62.75 ± 13.36)	5.0 ± 0.28 (37.05 ± 15.76)	2.7 (4.4)

^{a, b} % Stimulation and % inhibition of control agonist response at 100 μM of test compounds, respectively.

^c EC₅₀ (nM) values of standard agonists (D₁, D_{2L}, D₃, and D₄; dopamine, 5-HT_{1A}; serotonin).

^d IC₅₀ (nM) values of standard antagonists (D₁: SCH-23390, D_{2L}: butaclamol, D₃: (+)-butaclamol, D₄: clozapine, 5-HT_{1A}: (S)-WAY-100635.

[0102]

[0104]

상기 결과로부터, 본 발명자들은 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B가 도파민 D₁ 수용체(D₁R) 및 도파민 D_{2L} 수용체(D_{2L}R)에 대하여 완전한 길항제인 것을 확인하였고, 도파민 D₃ 수용체(D₃R) 및 도파민 D₄ 수용체(D₄R)에 대하여 완전한 효현제인 것을 확인하였다.

[0106]

실시예 6. 도파민 수용체에 대한 도킹 시뮬레이션 결과

[0107]

본 발명자들은 화합물의 도파민 수용체와의 상호작용을 도킹 시뮬레이션을 통해 확인하였다. 그 결과, D₁R의 경우 표 5 및 도 7에 나타난 바와 같이, 멀베로푸란 G는 D₁R의 Trp90, Asn185 및 Ile183와 강한 수소결합을 형성하였고, -9.22 kcal/mol의 낮은 결합 에너지를 나타냈다. 쿠와논 G는 D₁R의 Lys81 및 Ser188과 수소결합을 형성하였고, -7.1 kcal/mol의 결합 에너지를 나타냈으며, Ser188을 수소결합을 형성하는 양성 대조군(길항제)인 SCH-23390과 유사한 경향을 보였다. 알바놀 B는 D₁R의 Ser188 및 Asp187과 수소결합을 형성하였고, -9.2 kcal/mol의 낮은 결합 에너지를 나타냈으며, Asp187, Leu295, Phe306, Pro171, Ala192, Ala195, Trp386 및 Val115와 소수성 상호작용을 형성하였다.

[0108]

또한, D_{2L}R의 경우 표 5 및 도 8에 나타난 바와 같이, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 D_{2L}R와 각각 -8.11 kcal/mol, -8.23 kcal/mol 및 -10.45 kcal/mol의 결합 에너지를 가지는 것으로 확인되었다. D_{2L}R에 대한 길항제로 알려진 할로페리돌(haloperidol)은 Trp413과 수소결합을 형성하고, -10.18 kcal/mol의 결합 에너지를 갖는 것으로 나타났다. 할로페리돌(haloperidol)에 비해 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 D_{2L}R와 더 많은 수소결합을 형성하였고, 특히, 멀베로푸란 G 및 알바놀 B는 D_{2L}R의 Asp114와 수소결합 및 정전기적(electrostatic) 상호작용을 형성하였으며, 쿠와논 G는 두 번째 세포의 루프에 위치한 Ile184과 π -alkyl 상호작용을 형성하였다. 또한, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 길항제와의 결합에서 중요한 잔기인 Phe189 및 Val190과 소수성 상호작용을 형성하였다.

[0109]

또한, D₃R의 경우 표 6 및 도 9에 나타난 바와 같이, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 D₃R와 각각 -5.89 kcal/mol, -7.45 kcal/mol 및 -10.41 kcal/mol의 결합 에너지를 가지는 것으로 확인되어, 알바놀 B가 가장 강한 친화력을 보였다. 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 모두 D₃R의 transmembrane III에 위치한 주요 잔기인 Asp110과 정전기적 상호작용을 형성하였고, Phe345 및 Tyr365와 같은 중요 잔기와도 π - π 소수성 상호작용을 형성하였다. 멀베로푸란 G 및 알바놀 B는 Helix III에 위치한 Val111 잔기와 π -alkyl 결합을 형성하였다. 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B는 모두 His349, Ile183, Thr369, Val186, Cys114와 같은 잔기들과 상호작용

용을 형성하였다.

[0110]

또한, D₄R의 경우 표 6 및 도 10에 나타난 바와 같이, 멀베로푸란 G, 쿠와는 G 및 알바놀 B는 D₄R와 각각 -9.67 kcal/mol, -10.34 kcal/mol 및 -12.42 kcal/mol의 결합 에너지를 가지는 것으로 확인되어, 화합물 모두 강한 친화력을 형성하였다. D₄R의 효현제로 알려진 도파민 (-6.51 kcal/mol)과 D₄R의 길항제로 알려진 CHEMBL33215 (-9.01 kcal/mol)을 양성 대조군으로 사용하였다. 멀베로푸란 G, 쿠와는 G 및 알바놀 B는 모두 D₄R에서 가장 중요한 잔기 중 하나인 Asp115와 π -anion 형태로 정전기적 상호작용을 형성하였고, 멀베로푸란 G 및 알바놀 B만이 Ser197과 상호작용을 형성하였다. 특히, 알바놀 B는 Asp115와 수소결합을 형성함으로써 가장 낮은 결합 에너지를 갖는 것과 일치된 결과를 보였다. 멀베로푸란 G, 쿠와는 G 및 알바놀 B는 공통적으로 Val116, His414, Leu187과 소수성 상호작용을 형성하였고, et112, Thr434, Arg186, Phe410, Cys119, Val193와도 소수성 상호작용을 형성하였다.

표 5

Target	Compunds	Binding Energy (kcal/mol)	No. of H-bonds	H-bond Interaction Residues	Hydrophobic Interacting Residues	Electrostatic
hD ₁ R	Dopamine ^a	-6.21	4	Asp103, Asn323, Asp70	Trp285(Pi-Pi T-shaped), Val73(Pi-Alkyl), Val106(Pi-Alkyl)	
	SCH23390 ^a	-6.94	1	Ser188	Leu190(Pi-Sigma), Phe288(Pi-Pi T-shaped, Pi-Alkyl), Ala195(Pi-Alkyl)	Asp103(Pi-Anion)
	Mulberrofuran G	-9.22	3	Trp90, Asn185, Ile183	Phe89(Pi-Pi T-shaped), Ile183(Alkyl, Pi-Alkyl), Pro171(Pi-Alkyl), Ala84(Pi-Alkyl)	Asp187(Pi-Anion)
	Kuwanon G	-7.1	3	Lys81, Ser188	Phe306(Pi-Pi T-shaped, Pi-Alkyl), Leu190(Alkyl), Leu195(Alkyl), Phe513(Pi-Alkyl), Pro171(Pi-Alkyl)	Asp187(Pi-Anion)
	Albanol B	-9.2	2	Asp187, Ser188	Asp187(Pi-Sigma), Leu295(Pi-Sigma, Pi-Alkyl), Phe306(Pi-Pi T-shaped), Pro171(Pi-Alkyl), Arg192(Pi-Alkyl), Ala195(Pi-Alkyl)	
hD ₂ R	Dopamine ^b	-6.98	6	Asp114, Tyr416, Val115, Thr119	Trp386(Pi-Pi T-shaped), Val115(Pi-Alkyl)	
	Haloperidol ^b	-10.18	1	Trp413	Leu94(Pi-Sigma), Trp100(Pi-Pi T-shaped), Trp386(Pi-Pi T-shaped), Phe390(Pi-Pi T-shaped), Tyr416(Pi-Pi T-shaped), Ala122(Alkyl), Phe198(Pi-Alkyl), Phe382(Pi-Alkyl), Val91(Pi-Alkyl), Cys118(Pi-Alkyl)	
	Mulberrofuran G	-8.11	3	Ser197, Asp114, Thr412,	Thr412(Pi-Sigma), Phe110(Pi-Sigma), Trp110(Pi-Pi T-shaped, Pi-Alkyl), Trp386(Pi-Pi T-shaped), Tyr416(Pi-Pi T-shaped), Val111(Alkyl), Ile184(Alkyl),	Asp114(Pi-Anion)
	Kuwanon G	-8.23	4	Asn396, Tyr408, Ile184	Tyr408(Pi-Pi Stacked), Tyr100(Pi-Pi T-shaped), Phe389(Pi-Alkyl), Tyr416(Pi-Alkyl), Ile184(Pi-Alkyl), Val190(Pi-Alkyl)	
	Albanol B	-10.45	4	Trp100, Cys118, Ser193, Asp114	Ile184(Pi-Sigma, Alkyl), Trp100(Pi-Pi T-shaped), Trp386(Pi-Pi T-shaped), Val190(Alkyl), Phe189(Pi-Alkyl), Val115(Pi-Alkyl)	Asp114(Pi-Anion)

^a Reference ligand for hD₁R; ^b Reference ligand for hD₂R

[0112]

표 6

Target	Compunds	Binding Energy (kcal/mol)	No. of H-bonds	H-bond Interaction Residues	Hydrophobic Interacting Residues	Electrostatic
hD ₃ R	Dopamine ^c	-5.97	5	Asp110, Trp373, Ser192	Val111(Pi-Alkyl), Cys114(Pi-Alkyl)	
	Eticlopride ^c	-6.99	2	Asp110, Tyr365	Ile183(Pi-Sigma), Phe345(Pi-Sigma), Phe346(Pi-Pi T-shaped), His349(Pi-Pi T-shaped), Val107(Alkyl), Val189(Alkyl), Phe106(Pi-Alkyl), Val111(Pi-Alkyl)	
	Mulberrofuran G	-5.89	4	Tyr365, Cys181, Ser366, Thr369	Ile183(Pi-Sigma), Phe345(Pi-Pi T-shaped), His349(Pi-Pi T-shaped), Tyr365(Pi-Pi T-shaped), Val86(Alkyl, Pi-Alkyl), Leu89(Alkyl), Phe106(Pi-Alkyl), Val107(Pi-Alkyl), Val111(Pi-Alkyl)	Asp110(Pi-Anion)
	Kuwanon G	-7.45	4	Tyr365, Thr369, Cys181,	Thr369(Pi-Sigma), Phe345(Pi-Pi Stacked, Pi-Alkyl), Phe106(Pi-Pi T-shaped), Tyr365(Pi-Pi T-shaped), Val86(Alkyl), Leu89(Alkyl), Phe346(Pi-Alkyl), Val107(Pi-Alkyl)	Asp110(Pi-Anion)
	Albanol B	-10.41	4	Ile183, Val110, Thr115	Leu89(Pi-Sigma), Thr359(Pi-Sigma), Phe345(Pi-Pi Stacked), Tyr365(Pi-Pi T-shaped), Val86(Alkyl, Pi-Alkyl), Tyr36(Pi-Alkyl), Val111(Pi-Alkyl), Cys114(Pi-Alkyl)	Asp110(Pi-Anion)
hD ₄ R	Dopamine ^d	-6.51	4	Asp115, Ser441, Asn440	Trp407(Pi-Pi T-shaped), Leu83(Pi-Alkyl), Cys119(Pi-Alkyl)	Asp80(Pi-Anion)
	CHEMBL332154 ^d	-9.04	3	Thr120, Asp115	Leu111(Pi-Sigma), Val116(Pi-Sigma), Leu187(Pi-Sigma), Phe410(Pi-Pi T-shaped), His414(Pi-Pi T-shaped), Val87(Pi-Alkyl), Cys119(Pi-Alkyl)	
	Mulberrofuran G	-9.67	4	Ser196, Leu187, Val430, Thr434	Val116(Pi-Sigma, Pi-Alkyl), Leu187(Pi-Sigma), Thr434(Pi-Sigma), Phe411(Pi-Pi T-shaped), His414(Pi-Pi T-shaped), Phe410(Pi-Pi T-shaped), Met112(Alkyl), Cys185(Alkyl), Cys119(Alkyl, Pi-Alkyl), Arg186(Pi-Alkyl)	Asp115(Pi-Anion)
	Kuwanon G	-10.34	5	Ser197, Thr434, Asp115, Tyr438	Val193(Pi-Sigma), His414(Pi-Pi Stacked, Pi-Pi T-shaped), Met112(Alkyl), Leu187(Alkyl, Pi-Alkyl), Phe91(Pi-Alkyl), Arg186(Pi-Alkyl), Val116(Pi-Alkyl)	Asp115(Pi-Anion)
	Albanol B	-12.42	3	Leu187, Asp115, Ser196	Leu187(Pi-Sigma, Alkyl, Pi-Alkyl), Phe410(Pi-Pi T-shaped), His414(Pi-Pi T-shaped, Pi-Alkyl), Val193(Alkyl, Pi-Alkyl), Val116(Pi-Alkyl)	Asp115(Pi-Anion)

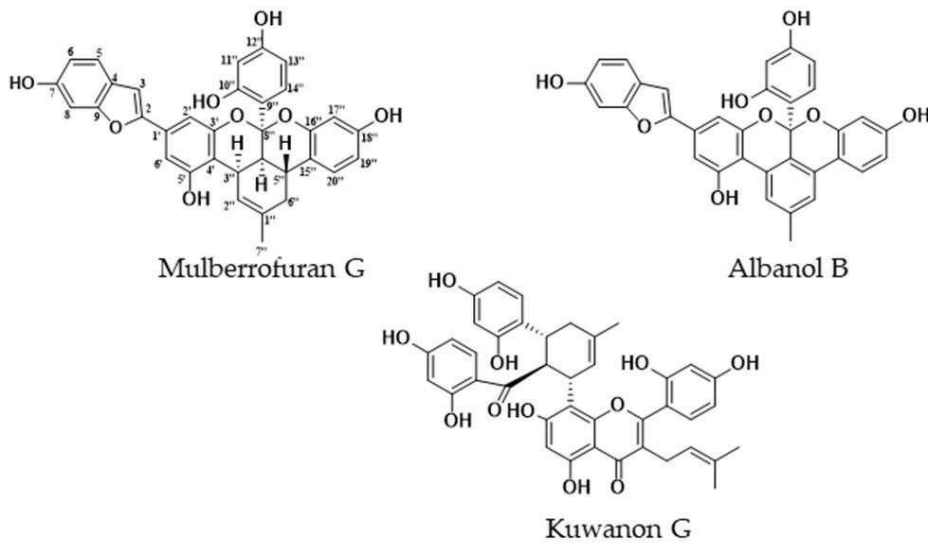
^c Reference ligand for hD₃R; ^d Reference ligand for hD₄R

[0114]

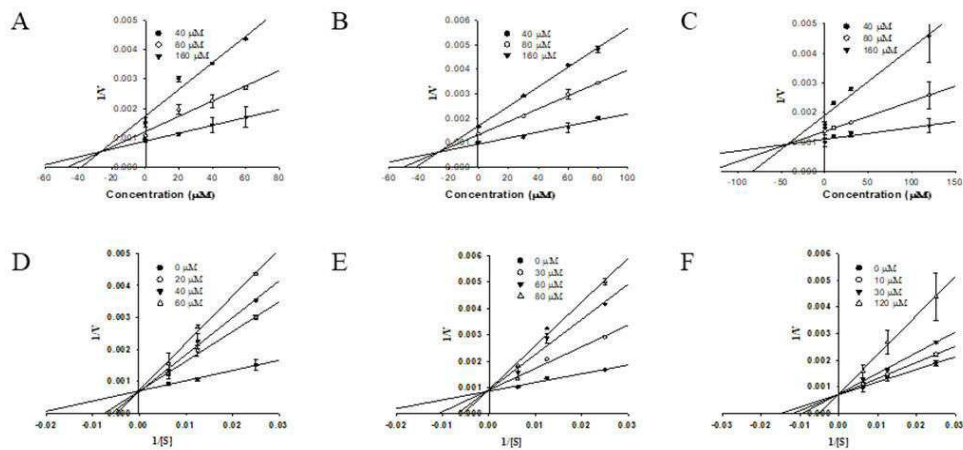
[0116] 상기 결과로부터, 본 발명자들은 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B가 도파민 D₁ 수용체(D₁R) 및 도파민 D_{2L} 수용체(D_{2L}R)에 대하여 길항제 효과가 있음을 확인하였고, 도파민 D₃ 수용체(D₃R) 및 도파민 D₄ 수용체(D₄R)에 대하여 효현제 효과가 있음을 확인하였다. 이로써, 멀베로푸란 G, 쿠와논 G 및 알바놀 B가 신경질환의 치료제, 특히, 파킨슨병, 조현병 또는 우울증의 치료제로서 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

도면

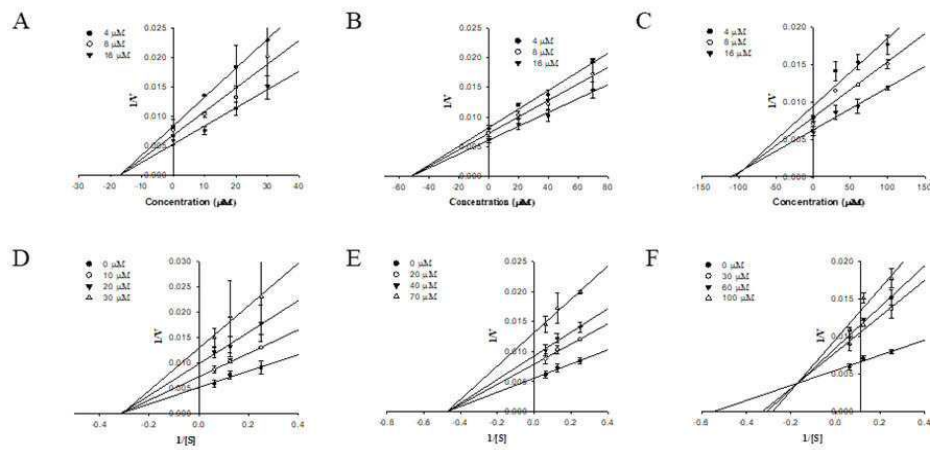
도면1



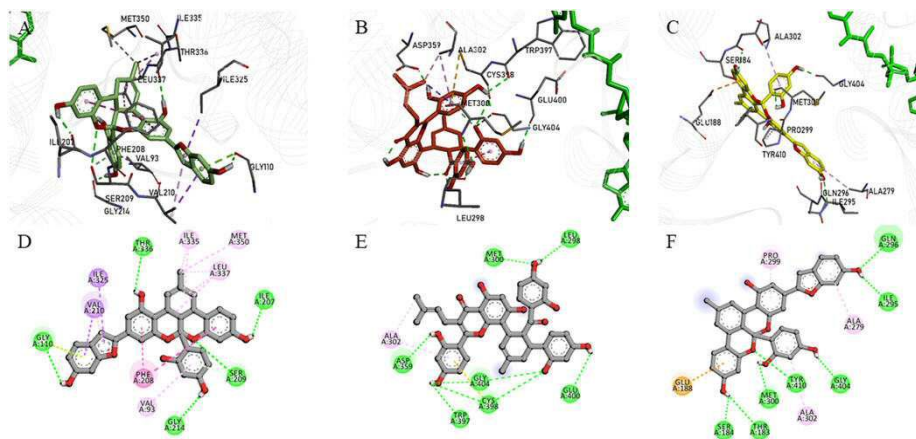
도면2



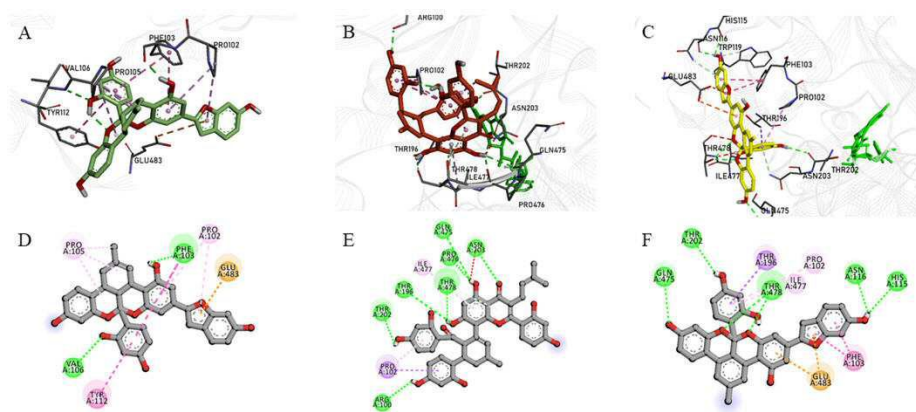
도면3



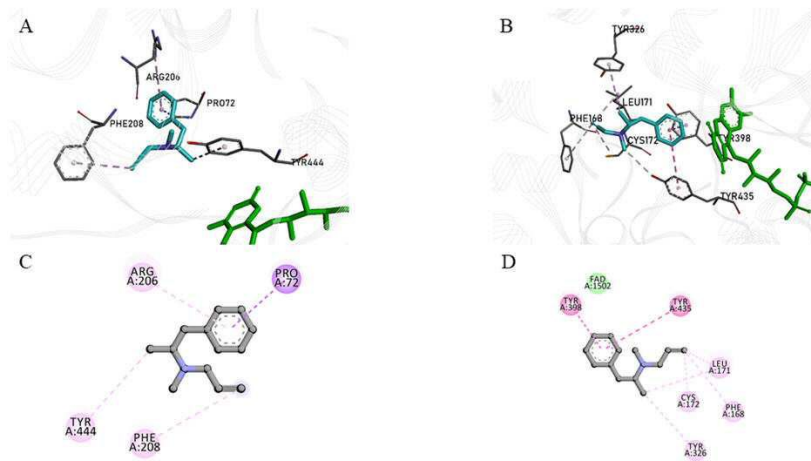
도면4



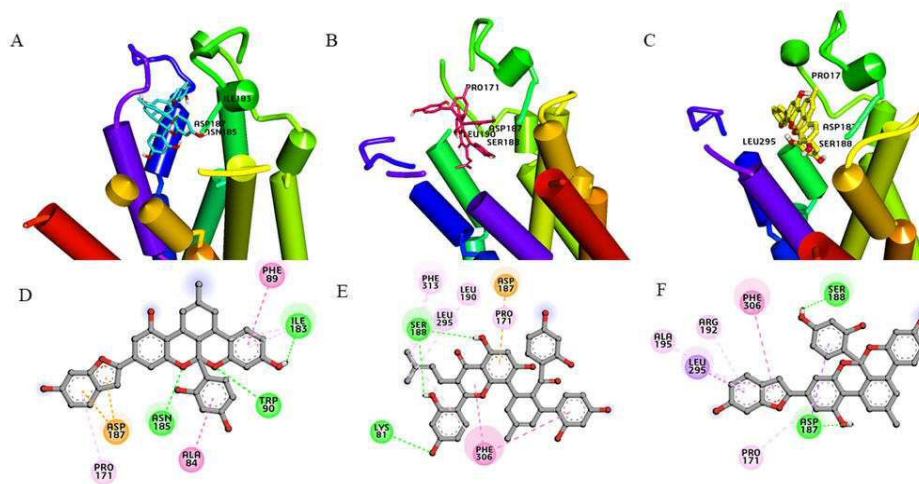
도면5



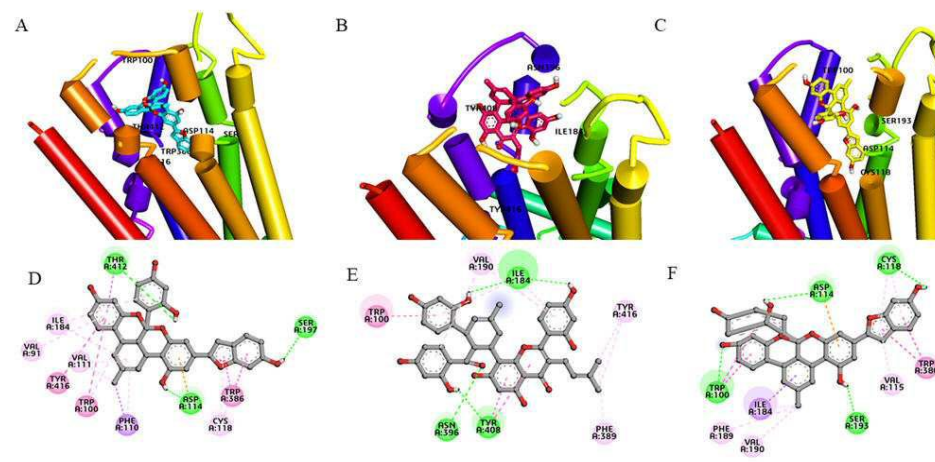
도면6



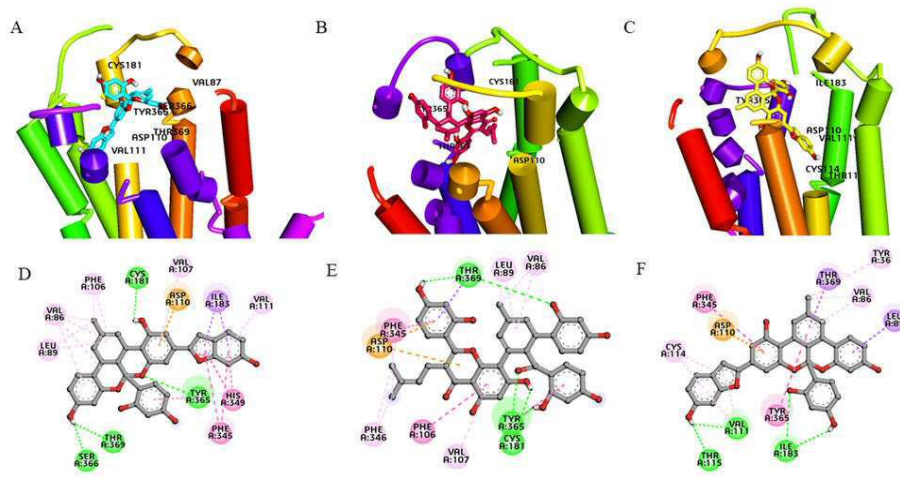
도면7



도면8



도면9



도면10

