

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0081766 (43) 공개일자 2014년07월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/7048 (2006.01) A61K 31/7042 (2006.01) C07H 15/20 (2006.01) A61K 36/46 (2006.01) (21) 출원번호 10-2014-0053124(분할) (22) 출원일자 2014년05월01일 심사청구일자 없음 (62) 원출원 특허 10-2013-0054655 원출원일자 2013년05월14일 심사청구일자 2013년05월14일 (30) 우선권주장 1020120051170 2012년05월14일 대한민국(KR)	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교) (72) 발명자 서은경 서울 성북구 솔샘로1길 9 이윤실 서울 노원구 중계로 184, 108동 1101호 (중계동, 라이프청구신동아아파트) (뒷면에 계속) (74) 대리인 손민	

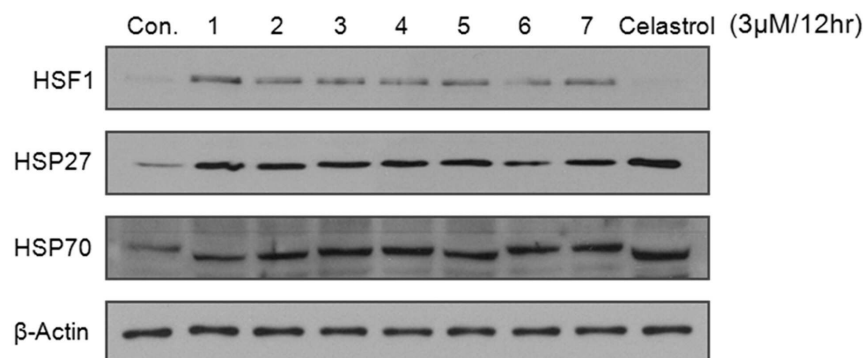
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **두충으로부터 분리된 화합물을 포함하는 열충격단백질 유도 활성을 갖는 조성물**

(57) 요약

본 발명은 열충격단백질 유도 활성을 갖는 두충으로부터 분리된 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 두충으로부터 분리된 화합물은 열충격단백질 유도 활성을 갖고 있으며 특히, HSF 1, HSP 27 및/또는 HSP 70의 발현을 조절할 수 있다. 이에 따라서 열충격단백질의 유도를 통해서 세포의 보호 및 재생 효과가 있으며 신경질환, 소화기질환, 장질환, 신질환, 안질환, 심혈관질환 또는 피부질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 손상된 피부 세포 재생용 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

남주원

서울특별시 강서구 화곡동 347번지 11호 401호

김서영

경기 고양시 일산서구 원일로21번길 22, 113동
1701호 (일산동, 휴먼빌1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0027323

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업/ 일반연구자지원사업/ 기본연구(협동연구)

연구과제명 천연물 유래 열충격 단백질 27(HSP27) 저해제 및 기전 연구를 통한 항암 후보물질 도출

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

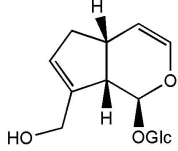
연구기간 2009.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

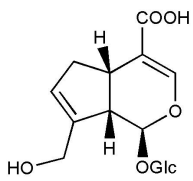
청구항 1

하기 화학식 2 내지 7의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 열충격단백질 유도 활성을 갖는 조성물:

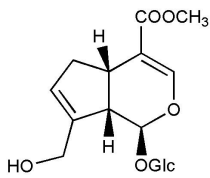
[화학식 2]



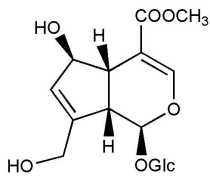
[화학식 3]



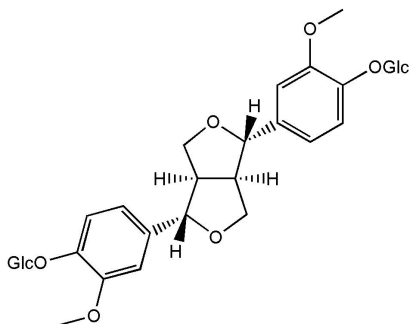
[화학식 4]



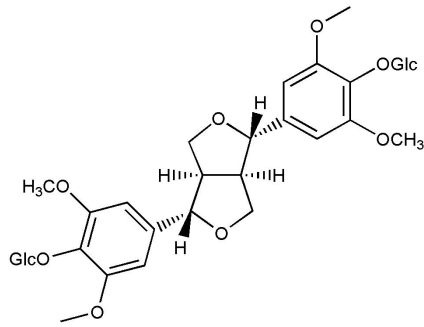
[화학식 5]



[화학식 6]



[화학식 7]



상기 식에서, Glc는 D-글루코피라노실옥시기(D-glucopyranosyloxy)이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 2 내지 7의 화합물은 두충(*Eucommia ulmoides*) 메탄올 추출물의 부탄올 분획물로부터 분리한 것을 특징으로 하는 열충격단백질 유도 활성을 갖는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 열충격 단백질 유도 활성은 HSF 1, HSP 27 및 HSP 70의 발현을 증가시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는 열충격단백질 유도 활성을 갖는 조성물.

청구항 4

제1항에 따른 조성물을 함유하는 신경질환, 소화기질환, 장질환, 신질환, 안질환, 심혈관질환 또는 피부질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 신경질환은 퇴행성 뇌질환으로서 파킨슨 병인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 소화기질환은 소화성궤양으로서 위궤양 또는 십이지장 궤양인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 장질환은 염증성 장질환으로서 결장염인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 신질환은 허혈성 신질환인 것으로 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 안질환은 녹내장, 백내장 또는 결막염인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

제4항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 허혈성 심질환 또는 심근경색인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

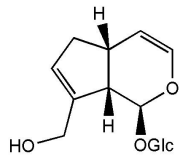
청구항 11

제1항에 따른 조성물을 함유하는 손상된 피부 세포 재생용 화장품 조성물.

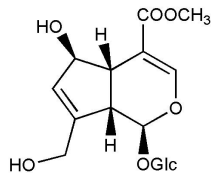
청구항 12

두충(*Eucommia ulmoides*)을 메탄올로 추출하여 두충 추출물을 얻는 단계; 상기 두충 추출물을 부탄올로 분획하여 두충 분획물을 얻는 단계; 및 상기 두충 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 하기 화학식 2 또는 5로 표시되는 화합물을 얻는 단계를 포함하는 화학식 2 또는 5로 표시되는 화합물의 제조방법:

[화학식 2]



[화학식 5]



상기 식에서, Glc는 D-글루코피라노실옥시기(D-glucopyranosyloxy)이다.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 두충으로부터 분리된 화합물을 포함하는 열충격단백질 유도 활성을 갖는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 두충 *Eucommia ulmoides* Oliv (두충과 *Eucommiaceae*)는 1속 1종의 식물로서, 두충과 식물인 두충(*Eucommia ulmoides*)의 껍질은 한국, 중국 및 일본에서 강장제로 사용되고 있다. 그리고 두충의 잎을 차로 우려 마시면 저혈압에 치료 효과가 있고 이뇨효과가 있다고 알려져 있다(Okada, Shirata, Niwano, Koshino, & Uramoto, 1994; Tomoda, Gonda, Shimizu, & Kanari, 1990). 종래연구에 의해서 두충으로부터 다양한 리그난, 플라보노이드, 이리도이드 및 테르페노이드가 분리될 수 있다고 보고된바 있다 (Ho et al., 2005; Hua, Yin, Li, Hu, & Pei, 2002; Kim, Moon, Lee, & Choi, 2004; Tanaka, Nakamura, Nakazawa, & Nohara, 1997). 상기 두충으로부터 분리된 화합물 중 일부는 산화방지제, 저혈압제, 항-염증제, 골아세포 증식 및 항혈전증의 효과를 나타내는 것으로 보고된바 있다 (Ho et al., 2005; Hua, Yin, Li, Hu, & Pei, 2002; Kim, Moon, Lee, & Choi, 2004; Tanaka, Nakamura, Nakazawa, & Nohara, 1997).

- [0003] 열 충격 인자 1 (HSF 1)은 염증, 국소빈혈, 산화 스트레스, 기아 및 바이러스 감염과 같은 스트레스성 조건에서 열 충격 단백질 (HSP) 유전자 발현의 주요 조절제이다 (Lee et al., 2006). 스트레스성 조건에서 HSF 1은 샤페론 복합체로부터 방출되고 HSP 25, HSP 27, HSP 70, HSP 72 및 HSP 90과 같은 열충격단백질의 발현을 유도한다. 열충격단백질 (HSP)의 발현의 증가는 세포의 손상을 억제할 수 있고 세포 재생을 촉진할 수 있다고 보고된바 있다.
- [0004] 구체적으로 파킨슨 병과 같은 신경장애의 치료 효과가 있다고 보고된바 있으며 (Luo, G.-R. et al., Are heat shock proteins therapeutic target for Parkinson's disease® Int J Biol Sci 3 (2007) 20-26), HSP 25의 발현의 증가는 손상된 턱밑샘 세포의 손상을 보호한다고 보고된바 있다 (Lee, H.-J. et al., (2006). Radioprotective effect of heat shock protein 25 on submandibular glands of rats. Am. J. Pathol. 169(5), 1601-1611). 또한, 열충격 단백질(HSP 70)의 발현의 증가는 호중구-유도 하이포염소산이나 헬리코박터 파이로리 우레아제-유도 암모니아에 의해 발생하는 모노클로라민 (NH₂Cl)에 의한 위점막 세포의 손상을 억제할 수 있어 소화성궤양 치료에 응용할 수 있다고 보고된바 있다 (Oyake, J. et al., Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. Life Sciences 79 (2006) 300-305). 또한, 열충격 단백질(HSP 90)의 발현증가로 인한 HSP 90의 분자 샤페론 기능에 의해서 소장점막세포의 손상을 억제할 수 있으며 이를 통해 비스테로이드성 항염제(NSAID)에 의한 장점막 손상 및 염증성 장질환 치료에 응용할 수 있다고 보고된바 있다 (Tamaki, K. et al., Evidence for Enhanced Cytoprotective Function of HSP 90-Overexpressing Small Intestinal Epithelial Cells. Dig Dis Sci 56 (2011) 1954-1961). 또한, 열충격 단백질 (HSP 70)의 유도 효과에 의해서 급성신장 손상에 의한 허혈성 신장 손상을 방지할 수 있다고 보고된바 있다(Wang, Z. et al., Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. Kidney International 79 (2011), 861-870). 또한, 열충격 단백질(HSP 70)의 발현 증가에 의해서 안구수정체 상피세포(human lens epithelial cells : hLEC)의 DNA 손상을 예방할 수 있다고 보고된바 있다(Lixia, S. et al., Effects of 1.8 GHz radiofrequency field on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. Mutation Research 602 (2006) 135-142). 또한, HSP 27 및 HSP 72의 발현 증가에 의해서 결장염과 같은 장질환의 치료제로서 응용될 수 있다고 보고된바 있다 (Ohkawara, T. et al., Polaprezinc protects human colon cells from oxidative injury induced by hydrogen peroxide: Relevant to cytoprotective heat shock proteins. World J Gastroenterol 12(38), (2006) 6178-6181). 또한, HSP 27의 발현 증가에 의해서 손상된 신경세포에 대한 보호효과가 있다고 보고된바 있다 (Toth, M. E. et al., Neuroprotective effect of small heat shock protein, HSP 27, after acute and chronic alcohol administration. Cell Stress and Chaperones 15 (2010) 807-817). 또한, HSP 70의 유도 효과에 의해서 손상된 심근세포에 대한 보호효과가 있다고 보고된바 있다 (Morris, S. D. et al, Specic Induction of the 70-kD Heat Stress Proteins by the Tyrosine Kinase Inhibitor Herbimycin-A Protects Rat Neonatal Cardiomyocytes. J. Clin. Invest. 97(3), (1996) 706-712). 또한, 손상된 피부세포 재생에 효과가 있다고 보고된바 있다 (Zhou, X. et al., Heat Shock Transcription Factor-1 Regulates Heat Shock Protein-72 Expression in Human Keratinocytes Exposed to Ultraviolet B Light. THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, 111(2), (1998) 194-198). 또한 HSF 1, HSP 27 및 HSP 70의 발현의 향상을 유도하면 허혈성심질환의 예방 및 치료에 효과가 있다고 보고된바 있다 (a) Dillmann, W. H., Small heat shock proteins and protection against injury. Ann. N. Y. Acad. Sci., 874 (Heart in Stress), 66-68, 1999; b) Bluhm, W.F. et al., Specific heat shock proteins protect microtubules during simulated ischemia in cardiac myocytes. Am. J. Physiol. 275 (Heart Circ. Physiol.): H2243-H2249, 1998).
- [0005] 이에 본 발명자들은 자연 물질로부터 HSP-발현 조절제를 발견하기 위해 연구하던 중, 두충(Eucommia ulmoides)의 껍질로부터 분리한 화합물이 열충격단백질 유도 활성을 갖는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

비특허문헌

[0006]

- (비특허문헌 0001) Bava, S. V., Puliappadamba, V. T., Deepti, A., Nair, A., Karunagaran, D., & Anto, R. J. (2005). Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor-kB and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6301-6308.
- (비특허문헌 0002) Ha, H., Ho, J., Shin, S., Kim, H., Koo, S., Kim, I., & Kim, C. (2003). Effects of eucommiae cortex on osteoblast-like cell proliferation and osteoclast inhibition. *Archives of Pharmacal Research*, 26(11), 929-936.
- (비특허문헌 0003) Ho, J. N., Cho, H. Y., Lim, E. J., & Kim, H. K. (2009). Effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* on UVB-induced oxidative stress in human keratinocytes HaCaT. *Food Science and Biotechnology*, 18(2), 475-480.
- (비특허문헌 0004) Ho, J. N., Lee, Y. H., Park, J. S., Jun, W. J., Kim, H. K., Hong, B. S., Shin, D. H., & Cho, H. Y. (2005). Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(7), 1244-1248.
- (비특허문헌 0005) Hua, H.-M., Yin, H.-Q., Li, B.-Q., Hu, B., & Pei, Y.-H. (2002). A new monoterpene from the bark of *Eucommia ulmoides*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 4(3), 201-204.
- (비특허문헌 0006) Kim, H. Y., Moon, B. H., Lee, H. J., & Choi, D. H. (2004). Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* O. with glycation inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2-3), 227-230.
- (비특허문헌 0007) Kobayashi, H., Karasawa, H., Miyase, T., & Fukushima, S. (1985). Studies on the constituents of *Cistanche Herba*. VI. Isolation and structure of a new iridoid glycoside, 6-deoxycatalpol. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 33(9), 3645-3650.
- (비특허문헌 0008) Lami, N., Kadota, S., Kikuchi, T., & Momose, Y. (1991). Constituents of the roots of *Boerhaavia diffusa* L. III. Identification of calcium channel antagonistic compound from the methanol extract. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 39(6), 1551-1555.
- (비특허문헌 0009) Lee, H.-J., Lee, Y.-J., Kwon, H.-C., Bae, S., Kim, S.-H., Min, J.-J., Cho, C.-K., & Lee, Y.-S. (2006). Radioprotective effect of heat shock protein 25 on submandibular glands of rats. *American Journal of Pathology*, 169(5), 1601-1611.
- (비특허문헌 0010) Lee, Y.-J., Kim, E.-H., Lee, J. S., Jeoung, D., Bae, S., Kwon, S. H., & Lee, Y.-S. (2008). HSF 1 as a mitotic regulator: phosphorylation of HSF 1 by Plk1 is essential for mitotic progression. *Cancer Research*, 68(18), 7550-7560.
- (비특허문헌 0011) Miyagoshi, M., Amagaya, S., & Ogihara, Y. (1987). The structural transformation of gardenoside and its related iridoid compounds by acid and glucosidase. *Planta Medica*, 53(5), 462-464.
- (비특허문헌 0012) Okada, N., Shirata, K., Niwano, M., Koshino, H., & Uramoto, M. (1994). Immunosuppressive activity of a monoterpene from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry*, 37(1), 281-282.
- (비특허문헌 0013) Ono, M., Ueno, M., Masuoka, C., Ikeda, T., & Nohara, T. (2005). Iridoid glucosides from the fruit of *Genipa americana*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53(10), 1342-1344.
- (비특허문헌 0014) Schumacher, B., Scholle, S., Hoelzl, J., Khudeir, N., Hess, S., & Mueller, C. E. (2002). Lignans isolated from Valerian: Identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A1 adenosine receptors. *Journal of Natural Products*, 65(10), 1479-1485.
- (비특허문헌 0015) Seo, H. R., Chung, D. Y., Lee, Y. J., Lee, D. H., Kim, J. I., Bae, S., Chung, H. Y., Lee, S. J., Jeoung, D., & Lee, Y. S. (2006). Heat shock protein 25 or inducible heat shock protein

70 activates heat shock factor 1: dephosphorylation on serine 307 through inhibition of ERK1/2 phosphorylation. J Biol Chem, 281(25), 17220-17227.

(비특허문헌 0016) Steeves, V., Forster, H., Pommer, U., & Savidge, R. (2001). Coniferyl alcohol metabolism in conifers - I. Glucosidic turnover of cinnamyl aldehydes by UDPG: coniferyl alcohol glucosyltransferase from pine cambium. Phytochemistry, 57(7), 1085-1093.

(비특허문헌 0017) Takeda, T., Narukawa, Y., & Hada, N. (1999). Studies on the constituents of Leonotis nepetaefolia. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 47(2), 284-286.

(비특허문헌 0018) Tanaka, C., Nakamura, T., Nakazawa, Y., & Nohara, T. (1997). A new triterpenoid from the leaves of Eucommia ulmoides Oliv. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 45(8), 1379-1380.

(비특허문헌 0019) Tomoda, M., Gonda, R., Shimizu, N., & Kanari, M. (1990). A reticuloendothelial system-activating glycan from the barks of Eucommia ulmoides. Phytochemistry, 29(10), 3091-3094.

(비특허문헌 0020) Walcott, S. E., & Heikkila, J. J. (2010). Celastrol can inhibit proteasome activity and upregulate the expression of heat shock protein genes, hsp 30 and HSP 70, in Xenopus laevis A6 cells. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 156A(2), 285-293.

(비특허문헌 0021) Oyake, J. et al., Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. Life Sciences 79 (2006) 300-305.

(비특허문헌 0022) Tamaki, K. et al., Evidence for Enhanced Cytoprotective Function of HSP 90-Overexpressing Small Intestinal Epithelial Cells. Dig Dis Sci 56 (2011) 1954-1961.

(비특허문헌 0023) Wang, Z. et al., Induction of heat shock protein 70 inhibits ischemic renal injury. Kidney International 79 (2011), 861-870.

(비특허문헌 0024) Lixia, S. et al., Effects of 1.8 GHz radiofrequency eld on DNA damage and expression of heat shock protein 70 in human lens epithelial cells. Mutation Research 602 (2006) 135-142.

(비특허문헌 0025) Ohkawara, T. et al., Polaprezinc protects human colon cells from oxidative injury induced by hydrogen peroxide: Relevant to cytoprotective heat shock proteins. World J Gastroenterol 12(38), (2006) 6178-6181.

(비특허문헌 0026) Toth, M. E. et al., Neuroprotective effect of small heat shock protein, HSP 27, after acute and chronic alcohol administration. Cell Stress and Chaperones 15 (2010) 807-817.

(비특허문헌 0027) Morris, S. D. et al, Specic Induction of the 70-kD Heat Stress Proteins by the Tyrosine Kinase Inhibitor Herbimycin-A Protects Rat Neonatal Cardiomyocytes. J. Clin. Invest. 97(3), (1996) 706-712.

(비특허문헌 0028) Luo, G.-R. et al., Are heat shock proteins therapeutic target for Parkinson's disease? Int J Biol Sci 3 (2007) 20-26.

(비특허문헌 0029) Zhou, X. et al., Heat Shock Transcription Factor-1 Regulates Heat Shock Protein-72 Expression in Human Keratinocytes Exposed to Ultraviolet B Light. THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, 111(2), (1998) 194-198.

발명의 내용

해결하려는 과제

본 발명은 두층으로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 열충격단백질 유도 활성을 갖는 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0007]

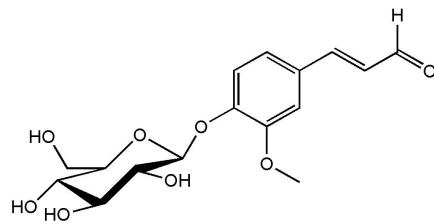
[0008] 또한, 본 발명은 열충격단백질 유도 활성을 갖는 두충으로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 신경질환, 소화기질환, 장질환, 신질환, 안질환, 심혈관질환 또는 피부질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 열충격단백질 유도 활성을 갖는 두충으로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 손상된 피부 세포 재생용 화장품 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

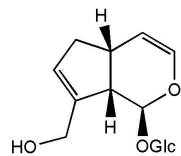
[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1 내지 7의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 열충격단백질 유도 활성을 갖는 조성물을 제공한다.

[0011] [화학식 1]



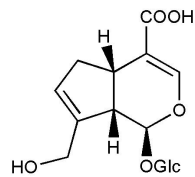
[0012]

[0013] [화학식 2]



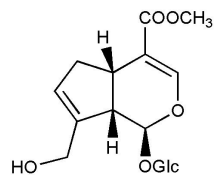
[0014]

[0015] [화학식 3]



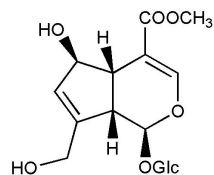
[0016]

[0017] [화학식 4]



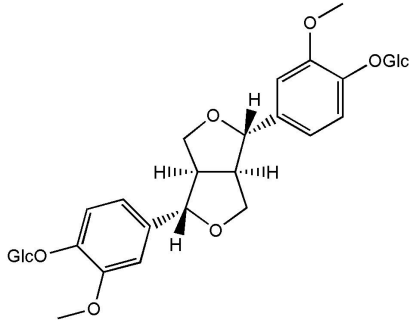
[0018]

[0019] [화학식 5]



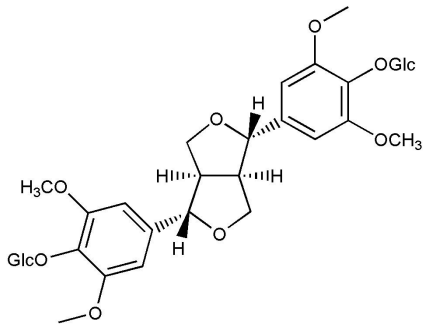
[0020]

[0021] [화학식 6]



[0022]

[0023] [화학식 7]



[0024]

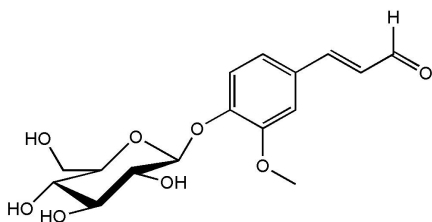
[0025] 상기 식에서, Glc는 D-글루코피라노실옥시기(D-glucopyranosyloxy)이다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "두충(*Eucommia ulmoides*)"은 낙엽교목으로서, 중국에 주로 분포하는 식물이다. 두충의 나무껍질을 건조시킨 것을 주로 사용하며 강장제 및 관절염, 류머티즘 진통제로 주로 사용된다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출"은 두충(*Eucommia ulmoides*)을 액체의 용매를 사용하여 분리하는 것으로서 상기 용매로는 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올과 같은 C₁-C₆의 알콜, 에틸아세테이트, 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다. 본 발명에서는 두충의 껍질 부위를 사용하여 메탄올로 추출하는 것이 바람직하다. 또한 본 발명에서는 상기 두충의 메탄올 추출물을 부탄올로 분획하여 상기 1 내지 7의 화합물을 분리할 수 있다.

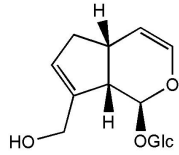
[0028] 또한, 본 발명은 두충(*Eucommia ulmoides*)을 메탄올로 추출하여 두충 추출물을 얻는 단계; 상기 두충 추출물을 부탄올로 분획하여 두충 분획물을 얻는 단계; 및 상기 두충 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 하기 1, 2 또는 5로 표시되는 화합물을 얻는 단계를 포함하는 1, 2 또는 5로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0029] [화학식 1]



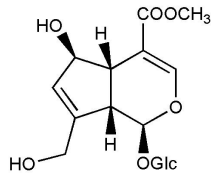
[0030]

[0031] [화학식 2]



[0032]

[0033] [화학식 5]



[0034]

[0035] 상기 식에서, Glc는 D-글루코피라노실옥시기(D-glucopyranosyloxy)이다.

[0036] 상기 1, 2 또는 5로 표시되는 화합물을 두층으로부터 분리할 수 있다는 사실에 대해서는 종래에는 알려져 있지 않았으며, 본 발명에서는 상기 1, 2 또는 5로 표시되는 화합물을 두층 계통 식물로부터 분리할 수 있다는 것을 처음으로 밝혔다. 본 발명의 실시예에 의하면 각각의 화합물의 구조는 ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY와 같은 1D와 2D NMR을 이용하여 분석하였다.

[0037] 상기 화학식 1 내지 7의 화합물을 각각 화합물 1 내지 7로 간략하게 기재하기로 한다. 7개의 화합물은 각각 화합물 1 (coniferaldehydeglucoside) (Steeves, Forster, Pommer, & Savidge, 2001), 화합물 2 (bartsioside) (Kobayashi, Karasawa, Miyase, & Fukushima, 1985), 화합물 3 (geniposidic acid) (Takeda, Narukawa, & Hada, 1999), 화합물 4 (geniposide) (Ono, Ueno, Masuoka, Ikeda, & Nohara, 2005), 화합물 5 (feretoside) (Miyagoshi, Amagaya, & Ogihara, 1987), 화합물 6 (pinoresinoldiglucoside) (Schumacher, Scholle, Hoelzl, Khudeir, Hess, & Mueller, 2002), 화합물 7 (liriodendrin) (Lami, Kadota, Kikuchi, & Momose, 1991)이다.

[0038] 두층 추출물을 부탄올 용액으로 분획하여 얻은 분획물은 상기 화합물 1 내지 7을 다량으로 포함하는바, 열충격 단백질 유도 활성을 갖을 수 있다.

[0039] 본 발명에서 사용되는 용어 "열충격단백질 유도 활성"이란, 열 충격 단백질의 발현을 유도하는 조절 인자(HSF 1)를 활성화 하여 열충격단백질이 유도되도록 활성화 하거나 열충격단백질 (Heat shock protein, HSP)의 발현 증가를 유도하는 것을 의미한다. 열충격인자 1 (HSF 1)은 세포의 열충격반응(heat-shock response)을 조절하는 전사인자이고, 열충격 단백질은 세포, 조직 또는 개체가 생리적 온도보다 5 °C 내지 10 °C 높은 온도가 될 때 합성이 유도되는 단백질이다.

[0040] 열충격, 알코올, 중금속과 산화성 장애를 포함한 여러 가지 환경 장애에 세포의 노출은 통상적으로 열충격 단백질(HSP)로서 알려져 있는 많은 샤프론의 세포 축적을 가져온다. HSP의 유도는 초기 장애 손상에 대하여 세포를 보호하고 장애 내성 상태의 유지 회복과 유도를 강화한다. 또한, 어떠한 HSP는 중요한 세포 단백질의 성장 리스트의 정확한 접힘, 분해, 집적과 기능을 조절하여 정상적인 장애-유리 조건 하에 주요 분자 샤프론 역할도 할 수 있다.

[0041] 이들은 예를 들어 HSP 25, HSP 27, HSP 70, HSP 72 및 HSP 90과 같이 분자량에 따라서 분류된다. 사람의 몇 가지 질병은 잘못 접힌 단백질의 결과에 따라서 얻을 수 있다. HSP는 세포내에서 단백질의 변성을 방지하거나 변성된 단백질을 재생하는 데 관여하므로 특히 조직손상과 같은 신체 기관의 염증성 질환의 치료에 유용하게 활용

될 수 있다.

[0042] 따라서, HSP의 발현을 유도함으로서 특히 세포의 재생과 관련된 질환의 치료가 가능하다. 본 발명의 일 실시예에서는 HSF 1 단백질 발현 및 이의 전사 타겟, HSP 27 및 HSP 70에 미치는 영향에 대해서 측정하였으며, 화합물 1 및 7은 3 μ M에서 HSF 1의 발현을 각각 1.214 및 1.167 배 증가시켰다. 화합물 1, 5 및 7에 의해서 HSP 27의 발현은 각각 1.316, 1.357 및 1.333 배가 되었다. 화합물 2는 1.162 배로 HSP 70의 발현의 향상을 유도하는 효과를 보여주었다. 또한, 화합물 1은 50 μ M에서 HSP 25 (1.47 배) 및 HSP 70 (1.09 배)의 루시퍼라제 프로모터를 활성화시켰다. 이에 따라, 두층의 겹질로부터 추출된 화합물 1 내지 7이 HSF 1, HSP 27 및 HSP 70의 유도 활성이 있다는 것을 알 수 있었다.

[0043] 즉, 본 발명의 상기 화합물 1 내지 7은 HSF 1의 발현을 조절할 수 있으며, HSP 27 및/또는 HSP 70의 발현을 유도할 수 있다. 특히 본 발명의 상기 화합물 1 내지 7은 HSF 1, HSP 27 및 HSP 70을 모두 유도할 수 있는바, HSP 유도 능력이 우수하다.

[0044] 본 발명은 상기 화합물 1 내지 7로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 열충격단백질 유도 활성을 갖는 조성물을 함유하는 신경질환, 소화기질환, 장질환, 신질환, 안질환, 심혈관질환 또는 피부질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 있어서 상기 신경질환은 퇴행성 뇌질환으로서 파킨슨 병인 것이 바람직하다. 또한 상기 소화기질환은 소화성궤양으로서 위궤양 또는 십이지장 궤양인 것이 바람직하다. 또한 상기 장질환은 염증성 장질환으로서 결장염인 것이 바람직하다. 또한 상기 신질환은 허혈성 신질환인 것이 바람직하다. 또한 상기 안질환은 녹내장, 백내장 또는 결막염인 것이 바람직하다. 또한 상기 심혈관계 질환은 허혈성 심질환 또는 심근경색인 것이 바람직하다.

[0045] 본 발명의 발명 이전에 HSP의 발현유도에 의해서 파킨슨 병과 같은 신경장애의 치료 효과가 있다고 보고된바 있으며 HSP 25의 발현의 증가는 손상된 턱밑샘 세포의 손상을 보호한다고 보고된바 있다. 또한, 열충격 단백질(HSP 70)의 발현의 증가는 호중구-유도 하이포염소산이나 헬리코박터 파이로리 우레아제-유도 암모니아에 의해 발생하는 모노클로라민(NH_2Cl)에 의한 위점막 세포의 손상을 억제할 수 있어 소화성궤양 치료에 응용할 수 있다고 보고된바 있다. 또한, 열충격 단백질(HSP 90)의 발현증가로 인한 HSP 90의 분자 샤페론 기능에 의해서 소장 점막세포의 손상을 억제할 수 있으며 이를 통해 비스테로이드성 항염제(NSAID)에 의한 장점막 손상 및 염증성 장질환 치료에 응용할 수 있다고 보고된바 있다. 또한, 열충격 단백질(HSP 70)의 유도 효과에 의해서 급성신장 손상에 의한 허혈성 신장 손상을 방지할 수 있다고 보고된바 있다. 또한, 열충격 단백질(HSP 70)의 발현 증가에 의해서 안구수정체 상피세포(human lens epithelial cells : hLEC)의 DNA 손상을 예방할 수 있다고 보고된바 있다. 또한, HSP 27 및 HSP 72의 발현 증가에 의해서 결장염과 같은 장질환의 치료제로서 응용될 수 있다고 보고된바 있다. 또한, HSP 27의 발현 증가에 의해서 손상된 신경세포에 대한 보호효과가 있다고 보고된바 있다. 또한, HSP 70의 유도 효과에 의해서 손상된 심근세포에 대한 보호효과가 있다고 보고된바 있다. 또한, 손상된 피부세포 재생에 효과가 있다고 보고된바 있다. 또한 HSF 1, HSP 27 및 HSP 70의 발현의 향상을 유도하면 허혈성 심질환의 예방 및 치료에 효과가 있다고 보고된바 있다.

[0046] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 화합물 1 내지 7의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 신경질환, 소화기질환, 장질환, 신질환, 안질환, 심혈관질환 또는 피부질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 화합물 1 내지 7의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0047] 본 발명의 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨,

만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0048] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위캡슐, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 상기 조성물의 일일 투여량은 바람직하게는 1 mg/kg 내지 500 mg/kg이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 7의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 열충격단백질 유도 활성을 갖는 조성물을 함유하는 손상된 피부 세포 재생용 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 화장료 조성물에는 pH 조절제, 향료, 유화제, 방부제 등을 필요에 따라 부가하여 통상의 화장료 제조 방법으로 화장수, 젤, 수용성 파우더, 지용성 파우더, 수용성 리퀴드, 크림 또는 에센스 등으로 제형화할 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명에 따른 두층으로부터 분리된 화합물은 열충격단백질 유도 활성을 갖고 있으며 특히, HSF 1, HSP 27 및/또는 HSP 70의 발현을 조절할 수 있다. 이에 따라서 열충격단백질의 유도를 통해서 세포의 보호 및 재생 효과가 있으며 신경질환, 소화기질환, 장질환, 신질환, 안질환, 심혈관질환 또는 피부질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 손상된 피부 세포 재생용 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0052]

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은, 본 발명의 일실시예에 따른 *Eucommia ulmoides* 껍질로부터 분리한 화합물을 L132 세포에 처리한 후, HSF 1, HSP 27 및 HSP 70의 발현을 Western blotting 에 의해서 측정된 결과를 나타낸 것이다. β -Actin을 내부 대조군으로 사용하였고, L132 세포는 12 h 동안 3 μ M 화합물로 처리하였다.

도 2는, 본 발명의 일실시예에 따른 두층의 껍질로부터 분리한 화합물 1을 NCI-H460 세포에 처리한 후의 HSP 25 또는 HSP 70 프로모터 활성을 나타낸 것이다. 이때 각각의 값은 세 개의 독립 실험군의 평균 $\pm$ SD이다. 또한 * p <0.05 vs. CON group, ** p <0.01 vs. CON group 이다.

도 3은, 본 발명의 일실시예에 따른 두층의 껍질로부터 추출한 화합물 1 내지 7로 처리한 L132 세포의 생존 능력 및 대조군으로서 탁솔[®]의 세포 생존 능력을 MTT로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4의 A는 웨스턴블롯팅으로 세포사를 유도한 후, 절단 caspase 3 및 절단 PARP-1을 관찰하여 화합물 1이 방사선 및 탁솔[®]에 의한 세포사를 감소시킨다는 결과를 나타낸 것이다. B는 화합물 1에 대한 IR 처리 후의 세포 생존률(%)을 나타낸 것이다. C는 화합물 1에 대한 탁솔[®] 처리 후의 세포 생존률(%)을 나타낸 것이다.

도 5는, 마우스에 치사량의 방사선을 전신으로 조사한 후 화합물 1에 의해 방사선에 의한 치사율이 감소한다는 것을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0055] 실시예 1: 재료 및 방법

[0056] 25 °C에서 광학 회전을 P-1010 편광계(JASCO, Japan)로 측정하였다. UV 및 IR 스펙트럼은 U-3000 분광광도계(Hitachi, Japan) 및 FTS 135 FT-IR 분광계 (Bio-Rad, CA)로 각각 기록하였다. 1D 및 2D NMR 실험은 테트라메틸실란 (TMS)을 내부 표준으로 하여 UNITY INOVA 400 MHz FT-NMR 장치 (Varian, CA)로 수행하였다. 질량분석은 Micromass Q-ToF 마이크로 질량 분석계 및 Agilent 6220 Accurate-Mass TOF LC/MS system 과 결합된 Waters ACQUITY UPLC system 으로 수행하였다. 컬럼크로마토그래피는 실리카 겔(230-400 mesh, Merck, Germany), RP-18 (YMC gel ODS-A, 12 nm, S-150 μm), Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech), 및 Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Co.)으로 수행하였다. TLC는 Kieselgel 60 F 254 (silica gel, 0.25-mm 층 두께, Merck, Germany) 및 RP-18 F 254s(Merck, Germany) 플레이트로 수행하고 UV light (254 nm 및 365 nm) 및 10% (v/v) H₂SO₄ 스프레이로 가시화하였고 120 °C에서 5 분간 열을 가하였다.

[0057] 실시예 2: 두충 (*Eucommia ulmoides*) 메탄올 추출물 제조

[0058] 두충 20 kg을 100% 메탄올 18 L 에 넣고 상온에서 24 시간씩 3회 추출하여, 감압 농축하여 메탄올 추출물 1.4 kg을 얻었다.

[0059] 실시예 3: 두충 (*Eucommia ulmoides*)의 용매 분획물 제조

[0060] 상기 실시예 2의 메탄올 추출물 1.4 kg 에 증류수 2 L를 넣고 현탁 시킨 후, 헥산 (2 L x 8회)을 첨가하여 용해한 다음 헥산층에 용해되는 성분만 분리하여 진공 건조하여 헥산 분획물 210 g을 수득하였다. 남은 수층에 에틸아세테이트 (2 L x 4회)를 첨가하여 용해한 다음 에틸아세테이트층에 용해되는 성분만 분리해서 진공건조하여 에틸아세테이트 분획물 200 g을 수득하였다. 상기과 동일한 과정으로 수행하여 n-부탄올 분획물 450 g (2 L x 5 회) 및 수층 474 g를 수득하였다.

[0061] 실시예 4: 두충 (*Eucommia ulmoides*) 부탄올 분획물로부터 화합물의 분리

[0062] 상기 실시예 3의 부탄올 분획 450 g을 메탄올-물 혼합용매 농도구배 (물 100%→메탄올 100%)로 Diaion HP-20 컬럼을 실시하여 6개의 분획 (F01-F06)으로 나누었다. 이 중 F05 분획물로부터 화합물 3 (2.3g, 0.0115% w/w)이 침전으로 얻어졌다. F02 분획 3.2g을 클로로포름:메탄올 혼합용매 (24:1→19:1)로 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 진행하여 화합물 4 (200mg, 0.001% w/w)를 얻었다. 또한, F03 분획 124.0g에 대하여 클로로포름:메탄올:물 혼합용매 (9:1:0.1→7:3:0.5) 로 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 진행하여 13개의 세분획 (F03.01-F03.13)을 얻었다. 세분획 F03.06과 F03.07로부터 각각 화합물 7 (36mg, 0.00018% w/w)과 화합물 6 (270mg, 0.00135% w/w) 이 메탄올을 이용한 재결정으로 얻어졌다. 다음으로 세분획 F03.08 2.4g 을 메탄올:물 혼합용매 (6:4→9:1) 로 역상컬럼크로마토그래피 (YMC gel ODS-A, 12 nm, S-150 μm)를 진행하여 4개의 세분획 (F03.08.01- F03.08.04)을 얻었다. 메탄올 100% 용매로 세파덱스 LH-20 컬럼 (Amersham Pharmacia Biotech)을 진행하여 분획F 03.08.02와 F03.08.03으로부터 화합물 2 (5mg, 0.000025% w/w)와 화합물 5 (5mg, 0.000025% w/w)가 각각 얻어졌다. 또한, 분획 F05 (35g)에 대하여 클로로포름:메탄올:물 혼합용매 (9:1:0.1→7:3:0.5) 로 실리카겔 컬럼크

로마토그래피를 진행하여 10 개의 세분획 (F05.01-F05.10)을 얻었다. 이 중 F05.01 12g에 대하여 메탄올:물 혼합용매 (9:1) 로 역상컬럼크로마토그래피 (YMC gel ODS-A, 12 nm, S-150 μ m)를 진행하여 4개의 세분획 (F05.01.01-F05.01.04)을 얻었으며 그 중 두 번째 분획 (F05.01.02) 을 메탄올 100% 용매로 세파텍스 LH-20 컬럼 (Amersham Pharmacia Biotech)을 진행하여 화합물 1 (10mg, 0.00005% w/w)을 얻었다.

[0063] 상기의 분리방법에 의해서 두층 계통 식물로부터 화합물 1, 화합물 2, 화합물 5를 분리할 수 있다는 것을 처음으로 밝혔다. 따라서, 화합물 1, 화합물 2, 화합물 5에 대해서는 ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY와 같은 1D와 2D NMR을 이용하여 구조를 하기와 같이 분석하였다.

[0064] 화합물 1 (Coniferaldehydeglicoside)의 NMR 데이터

[0065] 흰색 고체; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -48.0 (c 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 300(4.2), 327 (4.7) nm; IR (KBr) ν_{max} 3385, 1717, 1650, 1541 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 9.61 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-9), 7.62 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 7.32 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-2), 7.26 (1H, dd, J = 8.4, 1.8 Hz, H-6), 7.21 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 6.72 (1H, dd, J = 15.6, 7.6 Hz, H-8), 5.00 (1H, d, J = 7.6 Hz, Glc-1'), 3.91 (3H, s, OCH_3 -3), 3.88 (1H, dd, J = 11.8, 2 Hz, Glc-6'b), 3.69 (1H, dd, J = 11.8, 5.2 Hz, Glc-6'a), 3.48 (4H, m, Glc-2', 3', 4', 5'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 130.5 (C, C-1), 128.4 (CH, C-8), 124.5 (CH, C-6), 117.4 (CH, C-5), 112.9 (CH, C-2), 102.2 (CH, Glc-1'), 78.5 (CH, Glc-3'), 78.0 (CH, Glc-5'), 74.9 (CH, Glc-2'), 71.4 (CH, Glc-4'), 62.6 (CH_2 , Glc-6'), 56.9 (CH_3 , OCH_3 -3); HR-ESIMS m/z 363.1056 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{Na}$, 363.1050).

[0066] 화합물 2 (Bartsioside)의 NMR 데이터

[0067] 노란색 오일; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -94.5 (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 218 (3.2) nm; IR (KBr) ν_{max} 3318, 1710 cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 6.26 (1H, dd, J = 6, 2 Hz, H-3), 5.72 (1H, brs, H-7), 5.13 (1H, d, J = 6 Hz, H-1), 4.88 (1H, dd, J = 6, 3.6 Hz, H-4), 4.68 (1H, d, J = 7.6 Hz, Glc-1'), 4.28 (1H, brd, J = 14.2 Hz, H-10a), 4.16 (1H, brd, J = 14.2 Hz, H-10b), 3.84 (1H, m, Glc-6'a), 3.66 (1H, m, Glc-6'b), 3.19 - 3.45 (4H, m, Glc-2', 3', 4', 5'), 2.91 (1H, m, H-5), 2.77 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-9), 2.61 (1H, m, H-6b), 2.06 (1H, m, H-6a); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 145.1 (C, C-8), 141.0 (CH, C-3), 127.9 (CH, C-7), 108.4 (CH, C-4), 100.0 (CH, Glc-1'), 96.5 (CH, C-1), 78.4 (CH, Glc-3'), 78.1 (CH, Glc-5'), 75.1 (CH, Glc-2'), 71.8 (CH, Glc-4'), 62.9 (CH_2 , Glc-6'), 61.6 (CH_2 , C-10), 48.9 (CH, C-9), 40.0 (CH_2 , C-6), 35.8 (CH, C-5); HR-ESIMS m/z 353.1212 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{Na}$, 353.1207).

[0068] 화합물 5 (Feretoside)의 NMR 데이터

[0069] 옅은 노란색 고체; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -62.0 (c 0.2, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 232 (3.6) nm; IR (KBr) ν_{max} 3316, 1698 cm^{-1} ; ^1H NMR(CD_3OD , 400 MHz) δ 7.51 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-3), 5.80 (1H, t, J = 1.4 Hz, H-7), 5.19 (1H, d, J = 6 Hz, H-1), 4.67 (1H, d, J = 8 Hz, Glc-1'), 4.54 (1H, m, H-6), 4.34 (1H, brd, J = 16 Hz, H-10b), 4.18 (1H, brd, J = 16 Hz, H-10a), 3.86 (1H, dd, J = 12, 2 Hz, Glc-6'b), 3.75 (3H, s COOCH_3 -4), 3.63 (1H, m, Glc-6'a), 3.28 (4H, m, Glc-2', 3', 4', 5'), 3.03 (1H, m, H-9), 2.99 (1H, ddd, J = 7.6, 4.4, 1.2 Hz, H-5); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ 170.8 (C, C-11), 154.4 (CH, C-3), 148.1 (C, C-8), 130.6

(CH, C-7), 111.3 (C, C-4), 100.8 (CH, Glc-1'), 98.8 (CH, C-1), 82.8 (CH, C-6), 78.9 (CH, Glc-3'), 78.4 (CH, Glc-5'), 75.3 (CH, Glc-2'), 72.0 (CH, Glc-4'), 63.2 (CH₂, Glc-6'), 61.5 (CH₂, C-10), 52.6 (CH₃, COOCH₃-4), 47.6 (CH, C-9), 46.1 (CH, C-5); HR-ESIMS m/z 427.1204 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₇H₂₄O₁₁Na, 427.1211).

[0070] **실시예 5: Western blot 분석**

[0071] 두층으로부터 분리된 화합물의 HSF 1 및 HSPs 발현을 측정하기 위해 성립된 프로토콜(Lee et al., 2008)에 의해서 측정하였다. 용해물에서 단백질은 SDS-PAGE에 의해서 분리되었고, 나이트로셀룰로오스 점막 (GE Healthcare, UK)에 electro-transfer 되었고, 특정 항체로 블랏하였다. 그리고 ECL 검측 시스템 (Thermo Scientific, USA) 으로 가시화하였다. 항-HSF 1, 항-HSP 27, 항-HSP 70 및 항 b-actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)로부터 구매하였다.

[0072]

[0073] 추출물이 HSF 1 및 이의 전사 타겟, HSP 27 및 HSP 70에 유도효과를 가지고 있는지 여부를 측정하기 위하여 상기 화합물로 정상 폐 섬유아세포, L132 세포를 처리한 후에 Western blot을 12 시간 동안 수행하였다. HSF 1 발현은 화합물 1 내지 7의 처리에 의해서 증가한다는 결과를 보여주었다. 특히, 통계학적으로 화합물 1 및 화합물 7에서 높은 발현증가가 관찰되었다. HSP 27 및 HSP 70의 경우에는, 모든 화합물이 이들의 단백질 발현의 향상을 유도하였다. 특히, 통계학적으로 미처리 대조군과 비교하였을 때 HSP 27에 대해서는 화합물 1, 5 및 7에서 높은 발현의 향상이 관찰되었고 HSP 70에 대해서는 화합물 2에서 높은 발현의 향상이 관찰되었다(도 1 및 표 1).

[0074] Celastrol, HSP 발현측정을 위한 양성 대조군 (Walcott & Heikkila, 2010)은 HSF 1 단백질의 발현 증가 없이 HSP 27 및 HSP 70의 발현을 증가시켰다. 이것은 celastrol 과 두층 분리 화합물이 다른 메커니즘으로 작용한다는 것을 보여준다. HSF 1의 가장 효과적인 증가는 화합물 1에서 나타났다.

[0075] **실시예 6: MTT assay**

[0076] 세포는 성립된 프로토콜 (Bava, Puliappadamba, Deepti, Nair, Karunagaran, & Anto, 2005)에 따라서 3-(4,5-다이메틸싸이아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움브로마이드 (MTT; Sigma) 테스트로 이들의 세포독성을 측정하였다.

[0077] 두층의 겹질로부터 분리된 화합물은 L132 cells (IC₅₀ 값 >5 uM)에서 어떠한 세포독성도 나타내지 않은 반면, 항암제 탁솔[®]은 12.3 uM의 IC₅₀ 값을 갖고 세포독성을 나타내었다 (도 3).

[0078] **실시예 7: HSP 프로모터 분석**

[0079] HSP 25 또는 HSP 70 의 프로모터 활성은 성립된 프로토콜(Seo et al., 2006)에 따라 루시페라제 리포터구조를 사용하여 측정하였다. 인간 폐 암 NCI-H460 세포는 35-mm dishes 에 1×10⁵ 세포로 분주하였고 400 ng 루시페라제 리포터 구조 및 400 ng β-갈락토시다제(β-galactosidase) 발현 벡터로 공동-트랜스펙션 하였다. 24 시간 인큐베이션 후에, 세포는 화학적으로 처리되었고 그 후 12 h 후에 수확하였다. 루시페라제 활성을 측정하였고, β-갈락토시다제 발현(Promega)으로 정상화하였다. 모든 결과는 세 개의 독립 실험군의 평균±SD 로 나타내었다. 통계학적 중요성 (p 값)은 처리하지 않은 대조군과의 Student's t-test 로 결정하였다.

[0080]

[0081] 상기 실시예 8에서 HSF 1의 가장 효과적인 발현 증가를 보여주는 화합물 1을 이용하여 HSP 25 (HSP 27의 murine 형태) 및 HSP 70에 대한 분석을 수행하였다. 화합물 1은 복용량에 의존하여 HSP 25 및 HSP 70의 루시페라제 프로모터 활성을 활성화시켰다. 특히, 도 2에 나타난 바와 같이, 화합물 1은 50 uM 에서 HSP 25 1.47 배 및 HSP 70 1.09 배의 프로모터 활성을 증가시켰다.

[0082] β -Actin signal로 정상화한 후의 L132 (human embryonic lung tissue cells)에서의 HSF 1, HSP 27 및 HSP 70 의 정량적인 면역블랏의 결과를 하기 표 1에 요약하였다.

표 1

[0083]

항상정도 (배수)				
화합물	HSF1	HSP27	HSP70	IC ₅₀ (uM)
1	1.214 ± 0.013*	1.316 ± 0.067*	1.102 ± 0.057	> 5uM
2	1.144 ± 0.066	1.270 ± 0.085	1.162 ± 0.048*	> 5uM
3	1.159 ± 0.108	1.331 ± 0.115	1.205 ± 0.063	> 5uM
4	1.114 ± 0.054	1.295 ± 0.109	1.157 ± 0.077	> 5uM
5	1.153 ± 0.052	1.357 ± 0.082*	1.129 ± 0.043	> 5uM
6	1.041 ± 0.086	1.179 ± 0.073	1.158 ± 0.057	> 5uM
7	1.167 ± 0.046*	1.333 ± 0.093*	1.152 ± 0.091	> 5uM
Celastrol	1.019 ± 0.003	1.193 ± 0.038*	1.319 ± 0.040*	> 5uM
Taxol [®]	ND	ND	ND	12.3

[0084] 데이터 값은 처리 후 12시간 후의 세 개의 실험 군의 평균± SD이다. 처리 및 비처리군 사이의 HSP 70, HSP 27 또는 HSF 1 레벨 양의 비교를 통한 통계학적인 중요한 차이를 *p<0.05 로 나타내었다. IC₅₀값은 L132 cells의 성장을 50% 저해하는데 필요한 농도(uM)이다. Celastrol은 HSP 발현을 위한 대조군으로 사용되었다. 그리고 탁솔[®]은 세포독성을 위한 대조군으로 사용되었다.

[0085] 결론적으로, 화합물 1 및 7은 3 uM에서 HSF 1의 발현을 각각 1.214 및 1.167 배 증가시켰다. 화합물 1, 5 및 7에 의해서 HSP 27의 발현은 각각 1.316, 1.357 및 1.333 배가 되었다. 화합물 2는 1.162 배로 HSP 70의 발현의 항상을 유도하는 효과를 보여주었다. 또한, 화합물 1은 50 uM 에서 HSP 25 (1.47 배) 및 HSP 70 (1.09 배)의 루시퍼라제 프로모터를 활성화시켰다. 이러한 사실은 화합물 1은 현재 시스템상에서 가장 효과적인 화합물이라는 것을 나타낸다. 이것은 두층의 껍질로부터 추출된 화합물 1 내지 7의 HSF 1, HSP 27 및 HSP 70의 유도 활성을 최초로 보고한 것이다.

[0086] 실시예 8: 세포 생존능력 분석

[0087] 세포에 탁솔(Taxol)과 IR(방사선)같은 세포생존에 손상을 줄 수 있는 유독성 화합물을 처리하거나 또는 전리 방사선에 피폭시켜 생존률 약 50%되는 조건에서 화합물 1 (coniferaldehyde glucoside 와 coniferaldehyde의 HSF1과 HSP 생성능이 동일하다는 것을 확인하여, 일정량의 화합물로 처리하기 위해서 본 발명의 화합식 1의 화합물인 glucoside형태를 대신하여 coniferaldehyde 화합물을 구매하여 실험을 진행 하였다)을 동시처리하고 일정 시간 후에 세포를 트립판 블루(trypan blue)로 염색하여 혈구계산기(Hematocytometer)로 세포수를 측정한 후 생존능력을 Western blot 방법으로 분석하였다.

[0088] 화합물 1의 세포사에 미치는 영향을 측정하기 위해 절단 caspase-3 및 절단 PARP1 단백질 발현을 측정하였다. 용해물에서 단백질은 SDS-PAGE에 의해서 분리되었고, 나이트로셀룰로오스 점막 (GE Healthcare, UK)에 전자-전달(electro-transfer) 되었고, 특정 항체로 블랏하였다. 그리고 ECL 검측 시스템 (Thermo Scientific, USA)으로 가시화하였다. 항-cleaved caspase 3, 항-cleaved PARP1, 및 항 β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA)로부터 구매하였다.

[0089] 또한, 사람유래 태아 폐세포(human embryonic lung cell)인 L132 세포에 IR과 탁솔[®] 손상에 대한 방호효과를

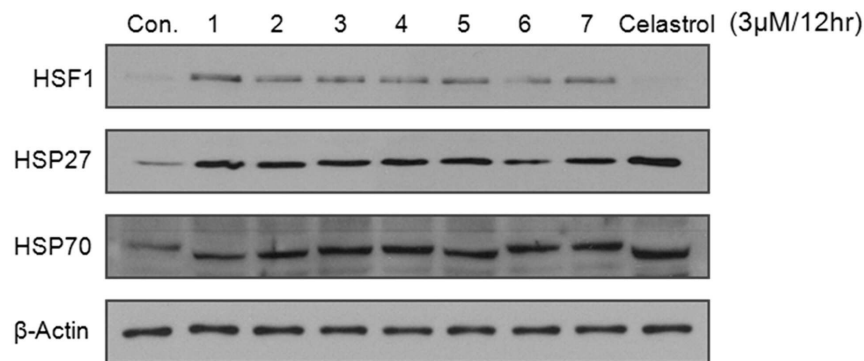
확인하기 위해 apoptosis 마커인 Cleaved PARP와 Cleaved caspage3을 확인 해 본 결과 화합물 1(3 μ M)을 병용 처리한 군에서 손상에 대한 보호효과를 나타내었고 세포 생존률을 알아본 결과 손상에 따른 생존능력의 증가를 확인 할 수 있었다 (도 4).

[0090] 실시예 9: 동물 생존능력 분석

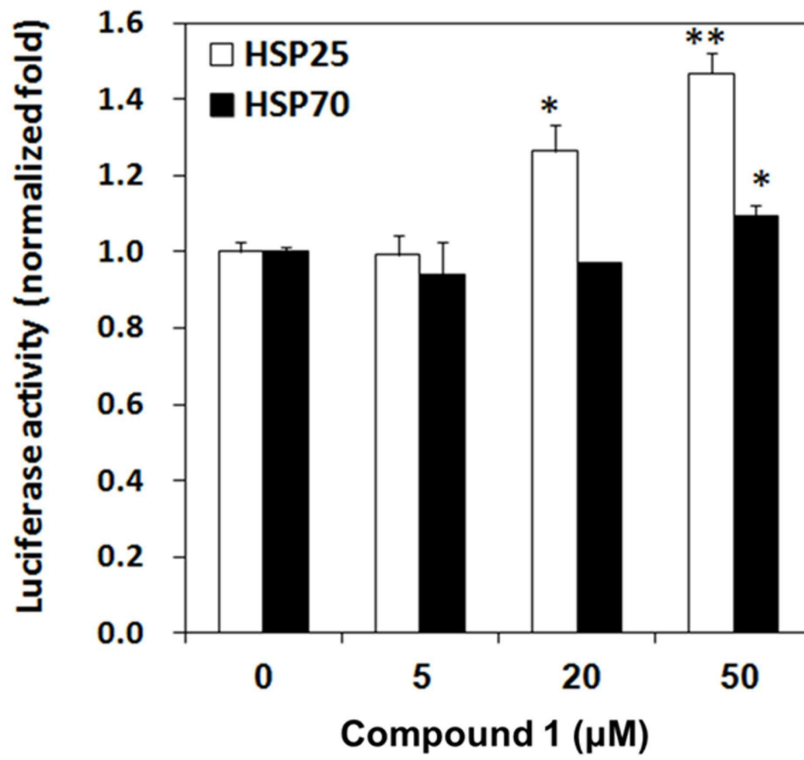
[0091] 마우스에 방사선 7Gy를 피폭시켜 화합물 1에 대한 생존능력을 확인하였다. 방사선 처리 하루 전 화합물 1(coniferaldehyde)을 복강투여하고 (5mg/kg, 10mg/kg) 다음날 방사선(whole body exposure)을 동물에게 피폭시킨 후 3일 동안 추가적인 약물의 복강투여를 실시하였다. 이 후 동물이 모두 사멸하는 날 까지 생존일을 관찰하여 방사선 방호효과를 확인해본 결과 평균 5mg/kg 투여 군에서 3.7일, 평균 10mg/kg 투여 군에서 3.9일 생존능력이 증가하는 것을 확인 하였다 (도 5).

도면

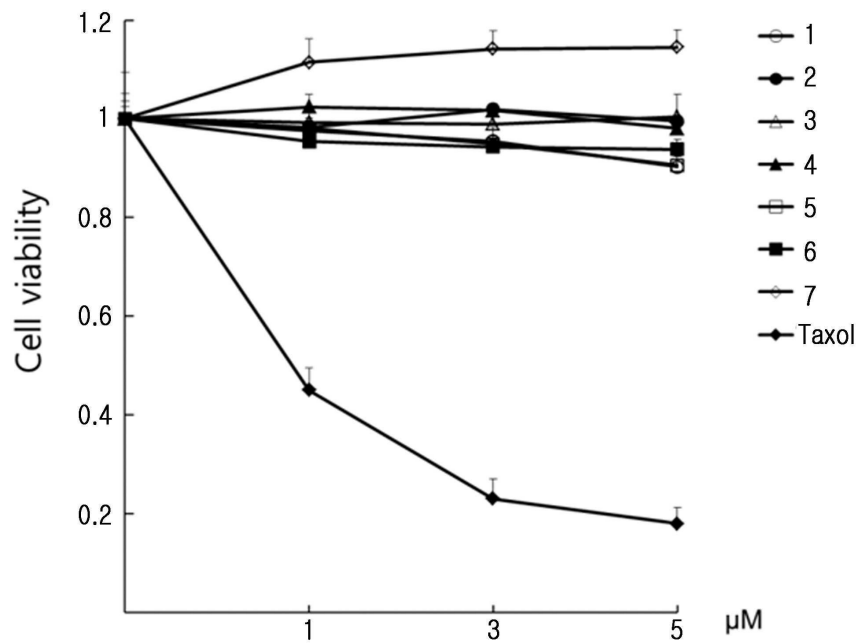
도면1



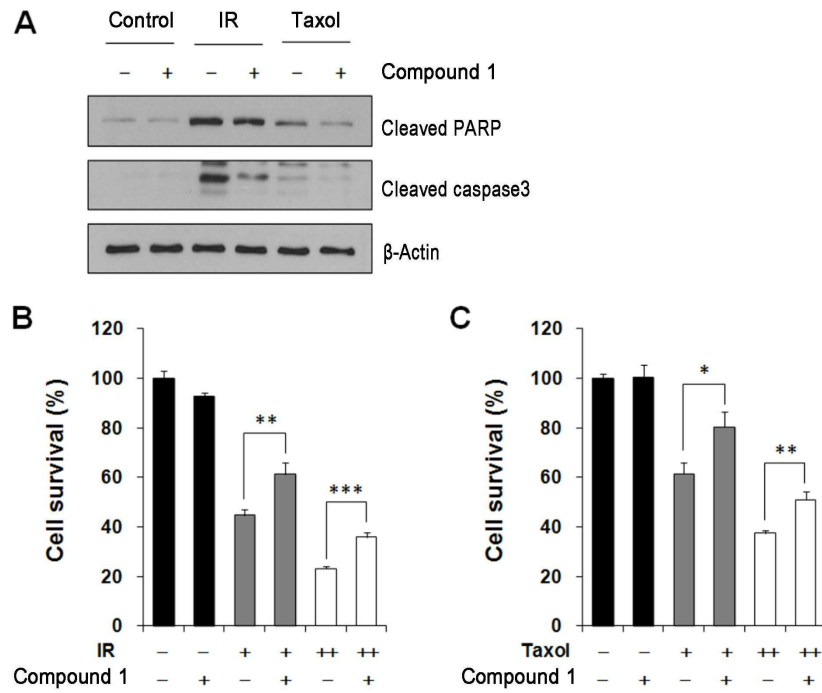
도면2



도면3



도면4



도면5

