



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0139771
(43) 공개일자 2013년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/435 (2006.01) A61K 31/495 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01) A61K 31/045 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0064291
(22) 출원일자 2013년06월04일
심사청구일자 2013년06월04일
(30) 우선권주장
1020120060314 2012년06월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김원기
서울특별시 강남구 압구정로 113, 2동 905 (압구정동, 미성아파트)
최용석
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 45, 409동 1604호 (식사동, 위시티일산자이4단지아파트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

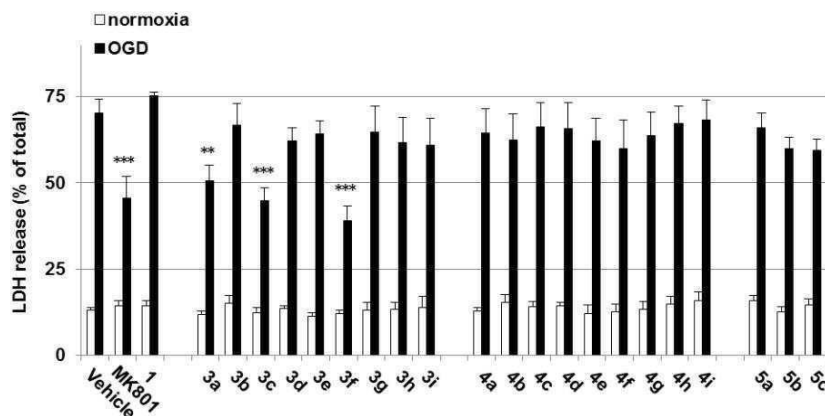
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 베르베논 유도체를 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 베르베논 유도체 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료용 약학 조성물 또는 건강 기능 식품에 관한 것으로서, 상세하게는 본 발명의 베르베논 유도체는 신경세포사 및 산화적 스트레스를 감소시키고 래트에서의 뇌허혈성 손상 및 염증성 세포의 이주에 대하여 저해능이 탁월하므로 퇴행성 뇌질환 치료에 유용한 약학 조성물 또는 건강 기능 식품을 제공한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A10076611020000100

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 S-시스-베르베놀 및 유도체의 허혈성 뇌손상 억제작용: 약물개발의 가치 평가

기 여 율 1/1

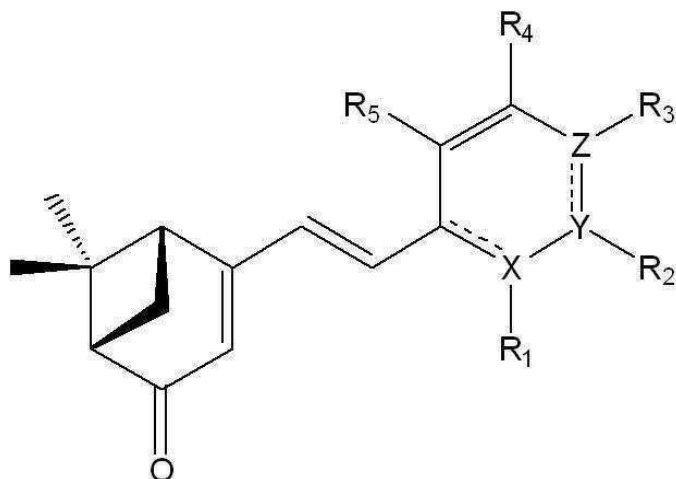
주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 (I)을 갖는 베르베논 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약학조성물:



(I)

상기 식에서,

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, C_1 내지 C_3 저급알킬기, C_1 내지 C_3 저급알콕시기, 아미노기, C_1 내지 C_3 저급알킬아민기, C_1 내지 C_3 저급알킬디아민기, 탄소수 5 내지 8의 방향환, 탄소수 5 내지 8의 시클릭환, 및 탄소수 5 내지 8의 헤테로방향환으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며,

X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N, O 또는 S원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자이며;

() 은 이중결합 또는 단일결합을 의미한다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시기, 에톡시기, 아미노기, 탄소수 5 내지 6의 방향환, 탄소수 5 내지 6의 시클릭환, 탄소수 5 내지 6의 헤테로방향환으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 화합물군인 약학조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 메틸기, 메톡시기, 페닐기, 피롤기, 피리딘기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 화합물군인 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N, O 또는 S원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자인 화합물군인 약학조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 원자인 화합물군인 약학조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

(1S,5R)-4-(4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3a);

(1S,5R)-4-(4-히드록시-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3b);

(1S,5R)-4-(3,4-디히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3c);

(1S,5R)-4-(3-브로모-4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3d);

(1S,5R)-4-(4-히드록시-2,6-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3e);

(1S,5R)-4-(3,4-디히드록시-5-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3f);

(1S,5R)-4-(3-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3g);

(1S,5R)-4-(2-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3h);

(1S,5R)-4-(2-히드록시-4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3i);

(1S,5R)-6,6-디메틸-4-스티릴비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4a);

(1S,5R)-4-(4-플루오로스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4b);

(1S,5R)-4-(4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4c);

(1S,5R)-4-(2-(비페닐-4-일)비닐)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4d);

(1S,5R)-4-(4-(1H-피롤-1-일)스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4e);

(1S,5R)-4-(3,4-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4f);

(1S,5R)-4-(3,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4g);

(1S,5R)-4-(2,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4h);

(1S,5R)-4-(5-브로모-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4i);

(1S,5R)-6,6-디메틸-4-((E)-2-(피리딘-2-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (5a);

(1S,5R)-6,6-디메틸-4-((E)-2-(피리딘-3-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (5b);

(1S,5R)-6,6-디메틸-4-((E)-2-(피리딘-4-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (5c)으로부터 선택된 화합물인 약학조성물.

청구항 7

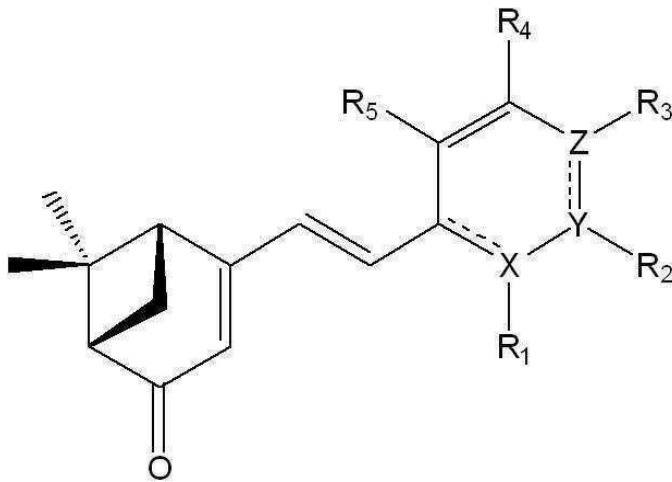
제 1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 또는 헌팅턴 질환인 약학조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중인 약학조성물.

청구항 9

하기 화학식 (I)을 갖는 베르베논 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품:



(I)

상기 식에서,

R₁, R₂, R₃, R₄, 및 R₅는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로젠 원자, 히드록시기, C₁ 내지 C₃ 저급알킬기, C₁ 내지 C₃ 저급알콕시기, 아미노기, C₁ 내지 C₃ 저급알킬아민기, C₁ 내지 C₃ 저급알킬디아민기, 탄소수 5 내지 8의 방향환, 탄소수 5 내지 8의 시클릭환, 및 탄소수 5 내지 8의 헤테로방향환으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며,

X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N, O 또는 S원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자이다.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 R₁, R₂, R₃, R₄, 및 R₅는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시기, 에톡시기, 아미노기, 탄소수 5 내지 6의 방향환, 탄소수 5 내지 6의 시클릭환, 탄소수 5 내지 6의 헤테로방향환으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 화합물군인 건강기능식품.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 R₁, R₂, R₃, R₄, 및 R₅는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 메톡시기, 페닐기, 피롤기, 피리딘기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 화합물군인 건강기능식품.

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N, O 또는 S원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자인 화합물군인 건강기능식품.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 원자인 화합물군인 건강기능식품.

청구항 14

제 9항에 있어서,

(1S,5R)-4-(4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3a);

(1S,5R)-4-(4-히드록시-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3b);

(1S,5R)-4-(3,4-디히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3c);

(1S,5R)-4-(3-브로모-4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3d);

(1S,5R)-4-(4-히드록시-2,6-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3e);

(1S,5R)-4-(3,4-디히드록시-5-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3f);

(1S,5R)-4-(3-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3g);

(1S,5R)-4-(2-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3h);

(1S,5R)-4-(2-히드록시-4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3i);

(1S,5R)-6,6-디메틸-4-스티릴비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4a);

(1S,5R)-4-(4-플루오로스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4b);

(1S,5R)-4-(4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4c);

(1S,5R)-4-(2-(비페닐-4-일)비닐)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4d);

(1S,5R)-4-(4-(1H-피롤-1-일)스티릴)-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4e);

(1S,5R)-4-(3,4-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4f);

(1S,5R)-4-(3,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4g);

(1S,5R)-4-(2,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4h);

(1S,5R)-4-(5-브로모-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4i);

(1S,5R)-6,6-디메틸-4-((E)-2-(피리딘-2-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (5a);

(1S,5R)-6,6-디메틸-4-((E)-2-(피리딘-3-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (5b);

(1S,5R)-6,6-디메틸-4-((E)-2-(피리딘-4-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (5c) 으로부터 선택된 화합물인 건강기능식품.

청구항 15

제 9항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 또는 헌팅턴 질환인 건강기능식품.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중인 건강기능식품.

청구항 17

퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선 효과를 갖는 제 1항의 화학식 (I)을 갖는 베르베논 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 식품.

청구항 18

퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선 효과를 갖는 제 1항의 화학식 (I)을 갖는 베르베논 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 식품첨가제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 베르베논 유도체의 새로운 용도인 퇴행성 뇌질환 치료용 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 흥분 세포독성에 의한 신경세포 사멸 억제, 산화적 스트레스 억제 및 혈관 내 염증성세포(대식세포(macrophages)와 호중구(neutrophil)) 등의 뇌손상 부위로의 이주(이동, migration 혹은 infiltration)에 대한 억제 활성을 갖는 베르베논 유도체 또는 그의 염을 함유하는 조성물로, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 상기 조성물을 이용한 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 퇴행성 뇌질환(degenerative brain disease)은 뇌신경세포가 제 기능을 하지 못하게 되면서 생기는 노화와 관계되는 질병이며, 노령화 인구의 급속한 증가와 더불어 퇴행성 뇌질환에 대한 사회적 관심이 커지고 있다. 퇴행성 뇌질환은 임상적으로 나타나는 주요 증상과 침범되는 뇌부위를 고려하여 구분되며, 알츠하이머 증후군(Alzheimer's disease), 파킨슨 증후군(Parkinson's disease), 헌팅턴 증후군(Huntington's disease), 다발성 경화증 및 근위측성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 등이 포함된다.

[0003] 퇴행성 뇌질환은 뇌신경계의 정보 전달에 가장 중요한 뇌신경세포의 사멸, 뇌신경세포와 뇌신경세포 사이의 정보를 전달하는 시냅스의 형성이나 기능상의 문제, 뇌신경의 전기적 활동성의 이상적 증상이나 감소로 인한 것으로 알려져 있으나, 아직도 근원적인 치료가 어렵고 발병원인도 명확하지 않은 상태이다.

[0004] 최근 세포분자학적 기술 수준의 향상으로 퇴행성 뇌질환의 원인 규명 및 치료제 개발이 활발하게 진행 중이며, 퇴행성 뇌질환 치료제 개발연구는 ① 콜린작용의 억제, ② NMDA (N-methyl-D-aspartate) 수용체 길항 기전, ③ β -amyloid 또는 타우(Tau) 단백질 대사 과정의 분자·세포생물학적 연구, β -amyloid의 원인 단백질을 항원으로 한 백신개발과 치료항체 개발, ④ 신경영양인자(neurotrophic factor)의 발현 유도, ⑤ 원인단백질에 의한 신경세포의 산화적 손상을 억제할 수 있는 항산화제 개발 및 ⑥ 염증세포의 과도한 유입 및 활성으로 인한 염증 반응을 억제할 수 있는 항염증제 개발 등 다각도의 기전으로 연구되고 있다(Sonkusare et al., Pharmacological Research, 51(1), 1-17, 2005; Stanaione et al., Ann Ist Super Sanita, 47(1), 49-54, 2011; Halperin et al., Neurotherapeutics, 6(1), 128-140, 2009).

[0005] 콜린작용의 억제제인 AChE 억제제는 ACh의 분해를 억제하여 콜린성 신경전달물질의 활성을 회복시키는 것으로, 현재 타크린(tarcrien), 도네페질(donepezil), 리바스티그민(rivastigmine), 갈란타민(galanthamine)이 FDA 승인을 받아 시판 중에 있다.

- [0006] 산화적 스트레스는 알츠하이머 증후군, 파킨슨 증후군, 헌팅턴 증후군과 같은 중추신경계의 퇴행성 뇌 질환의 중요한 요인으로 밝혀졌다(Jin DQ et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 331, 1264-1269, 2005; Lim CS et al, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29, 1212-1216, 2006).
- [0007] 허혈성 혈관질환 환자(심근경색, 뇌졸중, 혈전증)는 세계적으로 2007년에 2,500만명이었으며 2017년에는 2,800만명으로 꾸준히 증가할 것으로 예측되고 (DataMonitor, 2007) 대부분의 OECD 회원국에서 허혈성 혈관질환 (10만명당 226.6명, 2004년)으로 인한 사망원이 가장 많았으며 암질환 (165.6명)이 뒤를 이었다. 뇌졸중은 뇌의 혈관 파열로 인한 뇌조직 손상이 특징되는 출혈성 뇌졸중과, 뇌로 공급되는 혈류의 흐름이 차단되어 뇌경색이 유발되는 허혈성 뇌졸중으로 구별되며. 뇌졸중은 연도에 따라 암과 함께 국내 사망원인 1, 2위를 다투는 매우 발병 빈도가 높은 질환이며(통계청 2002부터 2008년까지의 자료) 뇌졸중으로 인한 국내 사망률은 OECD 국가 중 2위에 달하고 있다. 2008년 미국심장학회(AHA)의 보고에 따르면 이들 허혈성 혈관질환의 치료 및 관리를 위하여 뇌졸중에 연간 655억불의 막대한 비용이 지출되고 있으나, 뇌졸중 치료제 시장은 13억불에 불과한 실정이다. 따라서 수 년 내에 효과가 입증된 뇌졸중 치료 약물들이 시판될 경우에 220억불 이상의 잠재 시장 가치를 지니고 있는 허혈성 뇌졸중 치료제의 연구 개발 노력이 활발히 이루어지고 있다.
- [0008] 우리나라의 경우에 뇌졸중은 단일 질환으로써 사망원인 제1위를 차지함으로써 미국, 캐나다, 호주 등의 선진국에 비해서 높은 것으로 나타나 있으며 뇌졸중은 운동, 감각기능의 손상 및 기억, 학습, 연산, 추리 등 고차원적 기능의 저해를 야기하여 삶의 질을 파괴하며 환자가 사망에 이를 때까지 본인과 그 가족에게 많은 정신적, 육체적 고통을 야기하고 또한 현대 사회의 노령화 추세로 노인 인구의 급속한 증가가 이루어지고 있는 최근의 경향에 비추어 볼 때 뇌졸중 발생과 발생 후 생존 기간의 증가는 큰 사회적 문제로 대두되고 있다. 따라서 뇌졸중에 대한 증상 경감 및 치료약물의 개발이 필요하다.
- [0009] 그러나, 앞에서 언급한 바와 같이 뇌졸중의 임상적인 중요성과 큰 시장 등에도 불구하고 뇌졸중에 대한 치료제 개발은 여전히 미진한 수준에 불과하며 임상적으로 허용된 뇌졸중의 치료제는 tissue plasminogen activator (t-PA)를 제외하고는 없는 실정이다. 뇌졸중은 다양한 원인에 의해서 발생하며 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하 출혈 등 원인 질환이 각기 다른 다양한 질환을 포괄한다. 또한, 뇌졸중은 동맥경화, 아밀로이드 뇌혈관 병증, 동맥 박리 등의 다양한 뇌혈관 질환에 의해서 유발될 수 있으며 부정맥이나 관상동맥 질환으로 인해서 심인성 색전증에 의해서도 뇌졸중이 발생한다. 이렇게 원인은 다양하나 세포생물학적으로는 혈액공급의 저하와 이로 인한 세포사멸의 유발이라는 동일한 기전으로 여겨지고 있기 때문에 허혈에 의한 뇌세포의 사멸기전에 대한 이해는 뇌졸중의 예방, 조절 및 치료법 개발의 기반이 되는 핵심기술이다.
- [0010] 국내외적으로 많은 연구진들이 이러한 신경세포의 사멸에 대한 기전을 연구함으로써 뇌질환을 막고자 하는 노력을 기울여 왔다. 뇌졸중의 경우에 현재 뚜렷한 치료제가 개발되어 있지 못하고 임상적으로는 뇌혈관에 생성된 혈전을 용해하기 위하여 사용되고 있는 유일한 치료제인 t-PA도 많은 임상 의사들이 뇌출혈 등의 부작용을 우려하여 사용을 꺼리고 있다. 지금까지 많은 연구진들이 흥분성신경전달물질인 글루타민산 수용체에 대한 길항제나 항산화제를 허혈성 뇌졸중 치료제로 개발하고자 하였으나 약효가 미미하거나 약물의 독성으로 인하여 모두 실패로 끝났다.
- [0011] 환자가 뇌졸중 발생 후 병원 응급실에 도착하기까지 수시간이 지나는 것이 보통이며 뇌졸중의 발생후 수분에서 수시간 내에 신경세포는 과도한 글루타민산의 유리로 인한 흥분성신경독성에 의하여 일차 손상을 받게 되며 시간이 지나면서 산소 및 질소라디칼의 과도한 생성에 노출되어 이차적 손상을 받게 된다. 수습 시간이 지나면 염증반응으로 인하여 지속적이고 심한 손상을 받게 되고 따라서 흥분성신경독성 차단 물질의 사용은 현실적인 어렵기 때문에 임상적으로 무의미하다.
- [0012] 앞에서 언급한 바와 같이 뇌졸중은 단일 원인으로 야기되는 질환이 아니며 다양한 세포사멸의 경로와 기전에 따라 뇌손상을 일으키는 질환이다. 최근 서로 상이한 기전을 가지는 약물의 복합 처방에 의한 뇌졸중 치료 상승작용을 얻고자 하는 시도들이 되어 왔다. 예로는, 아스피린과 dipyridamole을 함께 투여하는 경우에 아스피린 단독 투여에 비하여 뇌졸중 치료의 예후를 좋게 하였으며(Chaturvedi S., Clin Therap, 30(7), 1196-205, 2008) 또한 17 β -Estradiol 과 tPA의 복합 처방은 17 β -Estradiol 이 tPA 투여로 인한 urokinase, MMP2, and MMP9의 발현증가로 생기는 뇌출혈의 부작용을 줄여줌으로써 허혈성 뇌졸중 환자에서 치료 시간대를 늘릴 수 있는 효과를 보여준 바 있다(Liu R. et al., J Pharmacol Exp Ther, 332(3), 1006-12, 2010). NMDA 수용체 차단물질인 메만틴(Memantine)과 베타아드레날린 beta 2 수용체 효현제인 Clenbuterol 의 복합투여는 영구적 국소허혈모델에서 허혈성 뇌손상을 억제하는 효과를 상승적으로 보여주었고(Culmsee C. et al., Stroke, 35(5), 1197-202, 2004) 또한 memantine과 칼슘이온 차단물질인 Topiramate의 복합투여는 신생쥐에서 저산소증에 의한 뇌손상을

상승적으로 억제하였다(Lie C. et al., Brain Res, 1282, 173-82, 2009). 그러나 이러한 연구결과들은 증상을 완화시키는 목적이 대부분이며 뇌조직 보호기전에 근거한 상승적 효과를 얻지는 못하였다.

[0013] 허혈에 의한 뇌조직의 손상을 이해하고 이를 억제하기 위한 약물을 개발하기 위해서는 허혈 후 뇌조직의 손상 기전과 경로를 이해해야한다. 일반적으로 허혈 후 뇌세포의 손상이나 사멸은 매우 다양한 원인에 의하여 야기된다. 예를 들면, 흥분세포독성(excitotoxicity), 주변-경색 탈분극, 산화적 스트레스, 및 염증 등이 허혈에 의한 뇌 손상의 진행과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Dirnagl et al., Trends Neurosci., 22, 391-397, 1999). 따라서 허혈성 뇌손상의 복잡한 요인들의 매우 다양하고 일시적인 양상(예를 들어, 발병 및 질환 정도)을 이해하고 병리생태학적 캐스케이드(cascade)를 적절하게 차단하는 것이 필요하다.

[0014] 흥분성 세포독성에 의한 신경세포사멸은 글루타메이트 수용체 길항제에 의해 억제될 수 있으며, 글루타메이트가 작용하는 이온성 수용체는 AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-iso-oxazolepropionic acid), kainate, NMDA(N-methyl-D-aspartate)의 수용체이며, 특히 NMDA 수용체 활성화에 대한 세포사멸이 많이 연구되었다(Standridge J.B., Clin. Ther., 26(5), 615-630, 2004). 하지만 이러한 노력에 비하여 NMDA 수용체 차단제는 약효가 미미하거나 독성이 있어 임상시험에 성공한 사례가 없다. NMDA 수용체 차단제인 MK-801은 허혈성 뇌손상을 현저하게 감소시켰으나 치료창(therapeutic time window)이 매우 좁다는 큰 단점이 있으며, MK-801은 래트 및 제르빌(gerbils)에서 유발된 국소적 허혈증의 발병 후 1시간 이내에 투여하여야만 신경세포 보호 효과를 보였다(Margail et al., J Cereb Blood Flow Metab, 16, 107-113, 1996; Hatfield RH et al., Eur J Pharmacol, 216, 1-7, 1992). 또한, MK-801은 허혈증 이후 신경세포사를 지연시켰으나 치료 수주 후 신경 회복 또는 최종 생존율을 개선시키지는 못했다(Valtysson J. et al., Acta Neurochir (Wien), 129, 58-63, 1994; Von Lubitz DK et al., Eur J Pharmacol, 233, 95-100, 1993). 흥분성신경전달물질인 글루타민산의 수용체 중에는 NMDA 수용체와 함께 AMPA 수용체가 있는데 이 AMPA 수용체에 대한 길항제들도 MCAO 28일후에 신경학적 결손의 유의적인 보호효과를 나타내지는 않았다(Colbourne F et al., Stroke, 30, 662-668, 1999). NMDA 또는 AMPA 수용체 길항제들의 짧은 치료학적 범위 및 단기간 치료효과는 이러한 수용체들이 단지 초기 허혈증 캐스케이드에서 일시적 역할만 수행함을 의미하고 길항제에 영향을 받지 않는 다른 병태생리학적 과정들이 후기 뇌허혈 손상에 기여할 것으로 간주된다.

[0015] 다른 다양한 퇴행성질환에서와 마찬가지로 허혈성 뇌졸중에서 산화적스트레스는 세포의 사멸이나 기능상실에 매우 큰 영향을 미친다. 따라서 항산화제를 이용한 허혈성 뇌졸중에 대한 치료 효과에 대한 연구들이 활발하게 이뤄지고 있다(Salama M. et al., Co-Enzyme Q10 to Treat Neurological Disorders:Basic Mechanisms, Clinical Outcomes, and Future Research Direction. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013 ; Rodrigo R. et al., Oxidative Stress and Pathophysiology of Ischemic Stroke: Novel Therapeutic Opportunities. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013). 일본의 경우 뇌졸중 치료제로 항산화효과를 주 기전으로 하는 Edaravone이 시판되고 있다(Firuzi O et al., Curr Med Chem., 18(25), 3871-88, 2011; Yoshida H. et al., CNS Drug Rev., 12(1), 9-20, 2006)

[0016] 허혈 후 흥분성 세포독성 이 시작된 후 수 시간이 지나면 뇌손상부위에서 염증반응이 시작되며 이는 수일~수주간 지속되어 뇌손상을 더욱 악화시키게 된다. 따라서 최근에는 항염증제를 이용한 허혈성 뇌졸중에 대한 치료시도는 매우 활발하게 이뤄지고 있다(Price CJ et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, 74, 1476-1484, 2003; Salama M, Co-Enzyme Q10 to Treat Neurological Disorders:Basic Mechanisms, Clinical Outcomes, and Future Research Direction. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013; Rodrigo R. et al., Oxidative Stress and Pathophysiology of Ischemic Stroke: Novel Therapeutic Opportunities. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013). 또한 최근에는 혈관으로부터 유입되어 들어온 염증세포가 허혈성 뇌졸중에서 뇌손상의 증대에 주요한 역할을 한다고 보고되어 있다 (Kang GH et al., J Neurol Sci., 15, 318(1-2), 25-30, 2012; Choi IY et al., Am J Pathol, 179(4), 2042-52, 2012; Choi YK et al., Free Radic Res., 44(8), 925-35, 2010; Choi IY et al., Free Radic Res., 44(5), 541-51, 2010; Lee JC et al., Glia, 50(2), 168-81, 2005). 또한 cannabinoid B2수용체를 통한 항염증반응이 허혈성 뇌조직의 손상을 억제한다고 보고 된 바도 있다(Choi IY et al., Am J Pathol, 182(3), 928-39, 2013).

[0017] 따라서 다양한 세포보호작용을 가지는 약물의 개발은 뇌졸중의 완전한 치료를 위하여 필수라 할 수 있다. 이러한 목적을 달성하기 위하여, 즉 다양한 세포보호기전을 가지는 물질(pleiotrophic therapeutic drug)의 개발을 위하여 본 발명자는 (1S)-(-)-베르베논(verbenone)의 유도체를 개발하였다. (1S)-(-)-베르베논(verbenone)은 나무쫂미에 의하여 숙주 나무 수지 전구체인 α -피넨(pinene)으로부터 생성되는 천연 항-응집 페로몬(anti-aggregation pheromone)이다. (1S)-(-)-베르베논을 함유한 정유들은 항균작용, 구충작용 등과 같은 생물학적

활성을 나타내는 것을 보고된 바 있다. (Bernarde WA, Z Naturforsch C, 65, 588-93, 2010; Martinez-Velazquez M., J Med Entomol, 48, 822-827, 2011) 또한 WO 2000/63159에는 베르베논[(1S, 5S)-4,6,6-trimethylbicyclo[3.3.3] hept-3-en-2one)] 및 이의 유도체가 기도의 항염증효과가 있다는 것이 개시되어 있다.

[0018] 그러나 상기문헌의 어디에도 베르베논 유도체들의 신경세포사멸 및 산화적 스트레스의 감소, 뇌허혈성 손상 저해 효과 및 염증성세포의 이주에 대한 저해 효과에 대한 것이 전혀 개시되거나 암시되어 있지 않다.

[0019] 이에 본 발명자들은 신경세포사멸 및 산화적 스트레스의 감소, 뇌허혈성 손상 및 염증 반응에 미치는 베르베논 유도체의 효과를 알기 위해 저산소성-허혈성 래트 모델을 사용하여 NMDA-유도 흥분세포독성 및 세포사를 측정하였으며 항산화 활성에 대한 실험을 수행하여 베르베논 유도체가 퇴행성 뇌질환 치료 효과가 있음을 최초로 확인하였다. 보다 상세하게는 본 발명의 베르베논 유도체가 신경세포사 및 산화적 스트레스 감소하였으며, 아울러 in vivo 실험결과, 우수한 뇌허혈성 손상 및 염증 반응에 대한 저해 효과를 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명의 목적은 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료 효과를 갖는 베르베논 유도체의 신규용도를 제공하는데 있다.

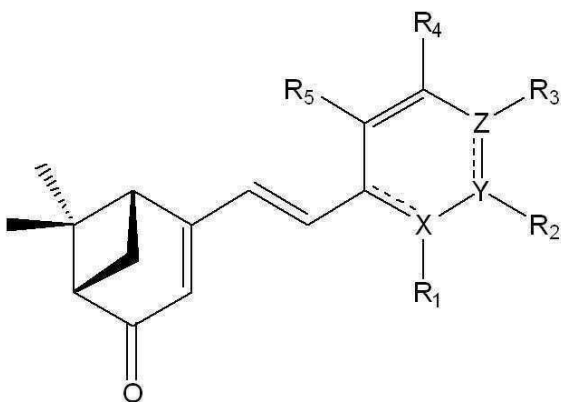
과제의 해결 수단

[0021] 상기 목적을 해결하기 위해 본 발명은 하기 화학식 (I)을 갖는 베르베논 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 하기 화학식 (I)을 갖는 베르베논 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선 효과를 갖는 하기 화학식 (I)을 갖는 베르베논 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 식품첨가제를 제공한다.

화학식 1



[0024]

[0025] (I)

[0026] 상기 식에서,

[0027] R₁, R₂, R₃, R₄, 및 R₅는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기,

C₁ 내지 C₃ 저급알킬기, C₁ 내지 C₃ 저급알콕시기, 아미노기, C₁ 내지 C₃ 저급알킬아민기, C₁ 내지 C₃ 저급알킬디아민기, 탄소수 5 내지 8의 방향환, 탄소수 5 내지 8의 시클릭환, 및 탄소수 5 내지 8의 헤테로방향환으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며,

[0028] X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N, O 또는 S원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자이며,

[0029] () 은 이중결합 또는 단일결합을 의미한다.

[0030] 상기 화학식 (I)에 속하는 화합물군 중에 바람직하기로는 R₁, R₂, R₃, R₄, 및 R₅는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시기, 에톡시기, 아미노기, 탄소수 5 내지 6의 방향환, 탄소수 5 내지 6의 시클릭환, 탄소수 5 내지 6의 헤테로 방향환으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기, 보다 바람직하게는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로젠 원자, 히드록시기, 메틸기, 메톡시기, 페닐기, 피롤기, 피리딘기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 화합물군이며; X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N, O 또는 S원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자, 보다 바람직하게는 탄소원자 또는 N원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 원자인 화합물 군이다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 화학식 (I) 화합물은 신경세포사 및 산화적 스트레스를 감소시키고 뇌허혈성 손상을 억제하며 염증성 세포의 이주에 대하여 탁월한 저해능을 나타내는 것을 확인하였다. 본 발명에 따른 베르베논 유도체를 유효성분으로 함유하는 약학조성물은 기존의 약학조성물에 비해 뛰어난 신경세포 보호작용, NMDA-유도 흥분세포독성 억제 효과, 세포내 산화적 스트레스 억제효과 및 염증성 세포의 이주 억제 효과를 보여 퇴행성 뇌질환, 보다 구체적으로는 뇌허혈성손상을 치료하는 효과가 있으며, 기능성 식품 등에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 화합물 유도체들에 의한 래트 피질 신경세포 보호작용을 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 화합물 유도체들에 의한 NMDA-유도 흥분성독성에 대한 효과를 나타낸 도이다.
- 도 3는 본 발명의 화합물 유도체들에 의한 세포내 산화적 스트레스 억제효과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 화합물 유도체들에 의한 생체내 국소 뇌허혈증 모델에서의 허혈성 손상 감소효과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 본 발명의 화합물 유도체들에 의한 생체내 국소 뇌허혈증 모델에서의 허혈성 손상 뇌조직에서의 항산화활성 증가 효과를 나타낸 도이다.
- 도 6는 본 발명의 화합물 유도체들에 의한 생체내 국소 뇌허혈증 모델에서의 허혈성 손상 뇌조직에서의 염증성세포의 이주 및 침윤 억제 효과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 본 발명의 화합물 유도체들에 의한 체내 국소 뇌허혈증 모델에서의 허혈성 손상 뇌조직에서의 cytokine 발현 억제 효과를 나타낸 도이다.
- 도 8은 본 발명의 화합물 유도체들에 의한 체내 국소 뇌허혈증 모델에서의 허혈성 손상 뇌조직 주변 혈-뇌장벽 투과성 증가 억제효과를 나타낸 도이다.
- 도 9는 본 발명의 화합물 유도체들에 의한 체내 국소 뇌허혈증 모델에서의 허혈성 손상을 입은 쥐의 장기 생존률 및 신경학적 결손 회복률 증진 효과를 나타낸 도이다.
- 도 10은 본 발명의 화합물 유도체들이 체내 출혈성 뇌졸중 모델에서의 자가 혈액에 의해 유도된 혈중에 대한 유

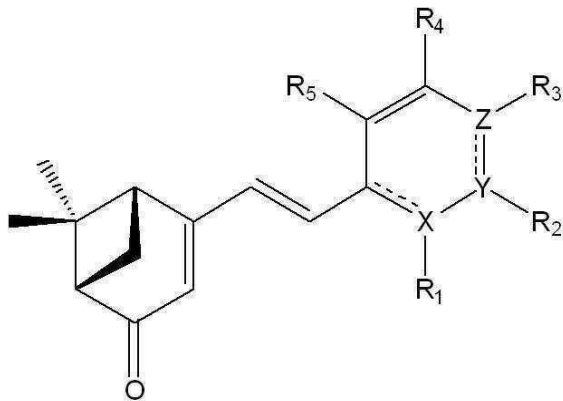
의적 증가가 보이지 않는 다는 것을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0034] 본 발명은 일관점에서, 화학식 1의 구조를 가지는 베르베논 유도체의 신규한 용도에 관한 것이다:

[0035] [화학식 1]



[0036]

[0037] (I)

[0038] 상기 식에서,

[0039] R₁, R₂, R₃, R₄, 및 R₅는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, C₁ 내지 C₃ 저급알킬기, C₁ 내지 C₃ 저급알콕시기, 아미노기, C₁ 내지 C₃ 저급알킬아민기, C₁ 내지 C₃ 저급알킬디아민기, 탄소수 5 내지 8의 방향환, 탄소수 5 내지 8의 시클릭환, 및 탄소수 5 내지 8의 헤테로방향환으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기이며,

[0040] X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N, O 또는 S원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자이며,

[0041] () 은 이중결합 또는 단일결합을 의미한다.

[0042] 상기 화학식 (I)에 속하는 화합물군 중에 바람직하기로는 R₁, R₂, R₃, R₄, 및 R₅는 각각 독립적으로 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 메틸기, 에틸기, 메톡시기, 에톡시기, 아미노기, 탄소수 5 내지 6의 방향환, 탄소수 5 내지 6의 시클릭환, 탄소수 5 내지 6의 헤테로 방향환으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기, 보다 바람직하게는 수소원자, F, Cl, Br 또는 I로부터 선택된 할로겐 원자, 히드록시기, 메틸기, 메톡시기, 페닐기, 피롤기, 피리딘기로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기인 화합물군이며; X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 탄소원자 또는 N, O 또는 S원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 이종원자, 보다 바람직하게는 탄소원자 또는 N원자로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 원자인 화합물 군이다.

[0043] 상기 화학식 (I)에 속하는 화합물군 중에 가장 바람직한 화합물로서,

[0044] (1S,5R)-4-(4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3a);

[0045] (1S,5R)-4-(4-히드록시-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3b);

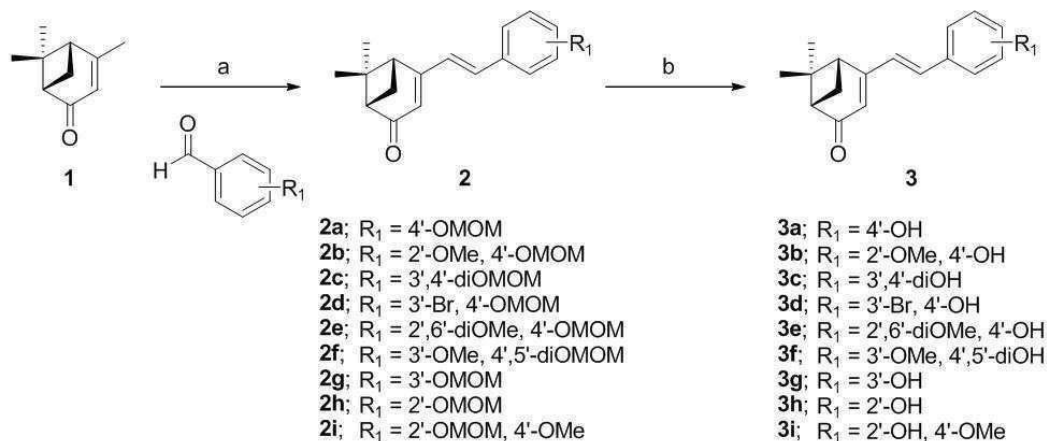
[0046] (1S,5R)-4-(3,4-디히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3c);

- [0047] (1S,5R)-4-(3-브로모-4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3d);
- [0048] (1S,5R)-4-(4-히드록시-2,6-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3e);
- [0049] (1S,5R)-4-(3,4-디히드록시-5-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3f);
- [0050] (1S,5R)-4-(3-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3g);
- [0051] (1S,5R)-4-(2-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3h);
- [0052] (1S,5R)-4-(2-히드록시-4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3i);
- [0053] (1S,5R)-6,6-디메틸-4-스티릴비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4a);
- [0054] (1S,5R)-4-(4-플루오로스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4b);
- [0055] (1S,5R)-4-(4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4c);
- [0056] (1S,5R)-4-(2-(비페닐-4-일)비닐)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4d);
- [0057] (1S,5R)-4-(4-(1H-피롤-1-일)스티릴)-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4e);
- [0058] (1S,5R)-4-(3,4-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4f);
- [0059] (1S,5R)-4-(3,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4g);
- [0060] (1S,5R)-4-(2,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4h);
- [0061] (1S,5R)-4-(5-브로모-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4i);
- [0062] (1S,5R)-6,6-디메틸-4-((E)-2-(피리딘-2-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (5a);
- [0063] (1S,5R)-6,6-디메틸-4-((E)-2-(피리딘-3-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (5b);
- [0064] (1S,5R)-6,6-디메틸-4-((E)-2-(피리딘-4-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (5c) 들 수 있다.
- [0065] 상기 화학식 (I)로 표시되는 본 발명의 화합물들은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.
- [0066] 약학적으로 허용가능한 염은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가 염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.
- [0067] 이 때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.
- [0068] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이 때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0069] 상기의 화학식 (I)의 구조를 갖는 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식 (I)의 구조를 갖는 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔설포네이트

(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0070] 본 발명의 다른 목적은 상기 일반식 (I) 화합물의 제조방법을 제공하는 것으로, 당업계에 공지된 합성방법으로 제조가능하며, 하기의 반응식들에 도시된 방법에 의해 화학적으로 합성될 수 있지만, 이들 예로만 한정되는 것은 아니다.

[0071] [반응식 1]

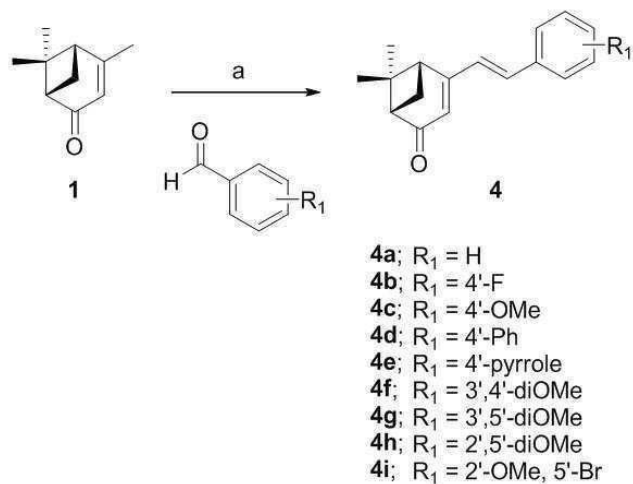


^a Reaction and condition: a) KOH, MeOH, 60 °C, 6 h; b) 10% HCl, MeOH, rt, 24 h.

[0072]

[0073] 상용으로 구입가능한 사용가능한 (1S)-(-)-베르베논 (1)을 염기 조건하에 하이드록실-스티릴기를 갖는 벤즈알데히드 유도체들과 축합반응을 수행한 후에 (2a-i) 산으로 탈보호화 반응을 수행하여 알콜시 또는 브로모 치환기 또는 페놀성 기능기를 갖는 다양한 베르베논 유도체 (3a-i)들을 제조가능하다.

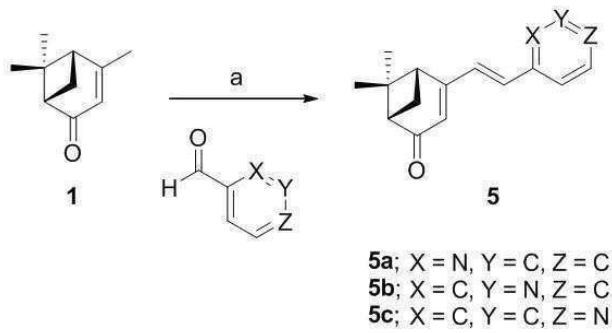
[0074] [반응식 2]



^a Reaction and condition: a) KOH, MeOH, 60 °C, 6 h.

[0075]

[0076] [반응식 3]



^a Reaction and condition: a) NaOMe, MeOH, 60 °C, 6 h.

[0077]

[0078] 또 다른 유도체들의 합성법으로서, 상용으로 구입가능한 사용가능한 (1S)-(-)-베르베논 (1)을 상기 반응식 1과 유사한 방법을 수행하여 다양한 기능기를 갖는 유도체들에 스티릴기(styryl)를 도입하여 방향환을 갖는 다양한 베르베논 유도체(4a-i, 5a-c)들을 제조가능하다.

[0079] 본 발명에서는 베르베논 유도체의 신규한 효능인 퇴행성 뇌질환 치료 효과를 분석하기 위하여, NMDA-유도 흥분 세포독성 및 세포내 산화적 스트레스를 억제하고, 항산화활성을 증가시키고, 염증성 세포의 이주 및 침윤을 억제하며 사이토카인의 발현을 억제하는 것을 확인하였다. 상기 확인 결과를 아래 실시예 등에 상세히 설명하였다.

[0080] 본 발명은 다른 관점에서, 화학식 1의 구조를 가지는 베르베논 유도체 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염의 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료를 위한 용도에 관한 것이다.

[0081] 본 발명은 화학식 1의 구조를 가지는 베르베논 유도체 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이고, 상기 화학식 1의 구조를 가지는 베르베논 유도체 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 이용하여 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 일 구현예로, 상기 화학식 1의 구조를 가지는 베르베논 유도체 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 대상에 처리(투여)하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 여기서, 상기 처리 또는 투여는 in vivo 또는 in vitro로 수행될 수 있다.

[0082] 본 발명에 있어서, 퇴행성 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 헌팅턴 질환(Huntington's disease), 다발성경화증 및 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 등이 포함되며, 뇌질환은 뇌신경계의 정보 전달에 가장 중요한 뇌신경세포의 사멸, 뇌신경세포와 뇌신경세포 사이의 정보를 전달하는 시냅스의 형성이나 기능상의 문제, 뇌신경의 전기적 활동성의 이상적 증상이나 감소로 인한 질환을 의미한다.

[0083] 본 발명에 있어서, 퇴행성 뇌질환은, 보다 바람직하게는 뇌졸중, 보다 더 바람직하게는 허혈성 뇌졸중 질환을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0084] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투여가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피아, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0085] 본 발명의 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 캡슐, 정제 및 수성 현탁액 및 용액을 포함하여 경구적으로 허용되는 어떠한 용량형으로도 경구 투여될 수 있다. 경구용 정제의 경우, 흔히 사용되는 담체로는 락토즈 및 옥수수 전분이 포함된다. 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제가 또한 전형적으로 첨가된다. 캡슐형으로 경구 투여하는 경우 유용한 희석제로는 락토즈 및 건조된 옥수수전분이 포함된다. 수성 현탁액이 경구 투여될 때 활성 성분은 유화제 및 현탁화제와 배합된다. 필요한 경우, 감미제 및/또는 풍미제 및/또는 착색제가 첨가될 수 있다.

[0086] 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여

경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증상을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

[0087] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 칼슘채널 차단제, 항산화제, 글루타메이트 길항제, 항응고제, 항고혈압제, 항혈전제, 항히스타민제, 소염진통제, 항암제 및 항생제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용할 수 있다.

[0088] 또 다른 관점에서, 본 발명은 화학식 1의 구조를 가지는 베르베논 유도체 또는 약학적으로 허용 가능한 그의 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 투여하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[0089] 본 발명의 약학 조성물 및 예방 또는 치료방법은 신경세포사 및 산화적 스트레스 감소 활성이 뛰어나고, 독성 및 부작용이 적은 천연물 유래의 베르베논 유도체를 이용한 것이므로, 유용하게 사용될 수 있다.

[0090] 또 다른 관점에서, 본 발명은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선 효과를 갖는 화학식 1을 갖는 베르베논 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 식품 또는 식품첨가제에 관한 것이다.

[0091] 본 발명의 기능성 식품은 염증 예방을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은, 예를 들어, 각종 식품류, 캔디, 초콜릿, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0092] 본 발명의 기능성 식품에 유효성분으로 함유된 베르베논 유도체는 아래 기재한 생물학적 메커니즘을 분석한 결과에 의해 신경세포 보호작용, 산화적 스트레스 억제 및 사이토카인 발현 억제 활성이 뛰어난 것이 분명하므로, 식품에 사용할 경우 뛰어난 효능을 나타내는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0093] 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 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 있으며, 이에 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, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 적어도 면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 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, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0094] 본 발명의 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 화합물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러므로 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0095] 또한 본 발명은 화학식 1을 갖는 베르베논 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0096] 본 발명의 화합물을 포함하는 건강기능식품은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 첨가 가능한 식품형태는 캔디류의 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 또는 건강보조 식품류인 식품 등을 포함한다.

[0097] 본 발명의 화합물은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품

또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0098] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물의 혼합물을 함유하는 것 외에 액체 성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 화합물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0099] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0100] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.01 내지 99% 중량으로 포함한다. 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.

[0101] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0102] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아닌 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0103] 실시예 1 : 베르베논 유도체의 제조방법

[0104] 시약 및 기기

[0105] 시약급(1S)-(-)-베르베논(verbenone), 알데히드(aldehydes), 메틸클로로메틸에테르(methylchloromethylether; MOM-Cl), 디이소프로필에틸아민(diisopropylethylamine; DIPEA), 수산화 칼륨(potassiumhydroxide; KOH), 및 소듐 메톡시드(sodium methoxide; NaOCH₃)을 시중 구입하고 모든 시약 및 용매는 고순도로 구입사용하였고 수산화 칼슘으로 증류한 디클로메탄을 제외하고 추가 정제과정없이 바로 사용하였으며, 별다른 언급이 없는 한, 반응은 진공-처리된 건조 유리용기(vacuum-flame dried glassware)에서 건조 질소 대기하에서 수행되었다. 박층 크로마토그래피법(Thin-layer chromatography; TLC)은 UV로 시각화하는 실리카겔(Merck silica gel 60 F₂₅)을 사용하고 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔(E.Merck silica gel, 70-230, 230-400mesh)을 사용하였다. ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼은 기기(Varian)으로 500 MHz에서 측정하였고 화학적 이동(Chemical shift)은 내부 표준시약(s are reported in ppm from (TMS) as an internal standard (CDCl₃: δ 7.26ppm)로서 사용한 TMS(tetramethylsilane)로부터 이동을 ppm으로 기록하고 결합상수(coupling constant)를 헤르츠(hertz)로 기록하였다. 다중도(Multiplicity)는 하기와 같은 약어를 사용하였다:singlet(s), doublet(d), doublet of doublet(dd), doublet of doublet of doublet(ddd), triplet(t), triplet of doublet(td), doublet of triplet(dt), quartet(q), multiplet(m) 및 broad(br). 우태아 혈청(Fetal bovine serum; FBS)은 회사(Hyclone, Logan, UT)에서 구입하여 사용하고 배양액 (neurobasal medium, NBM) 및 보충제(B27 supplement)는 회사(Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 구입하여 사용하였다. 모든 화학물질 및 시약은 회사(SigmaAldrich, St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다.

[0106] **실시예 1-1. (1S,5R)-4-(4-(메톡시메톡시)스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(2a)화합물의 제조**

[0107] 알돌 축합반응(aldol condensation)으로 (1S)-(-)-베르베논(verbenone)으로부터 디엔체(diene)를 얻기 위하여, (1S)-(-)-베르베논(verbenone 1, 200mg, 1.33mmol)을 4-(메톡시메톡시)벤즈알데히드 (332 mg, 2.00 mmol)와 MeOH (7 mL)에서 교반하고 KOH (149 mg, 2.66 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 6시간동안 60℃에서 교반하고 실온으로 냉각시켰다. 소량의 물을 첨가하고 혼합물을 24시간 동안 실온에서 방치하였다. 상기 혼합물을 감압농축하여 황색 산물을 얻고 이를 실리카겔 컬럼 크로마토그리피로 정제하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1S,5R)-4-(4-(메톡시메톡시)스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(2a)[(1S,5R)-4-(4-(methoxymethoxy)styryl)-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one(2a)]을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다.(353 mg, 수율 89%).

[0108] mp 88-90 °C;

[0109] $[\alpha]_D^{20}$ -211.6° (c1.0, MeOH);

[0110] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz): δ 7.45(d, J = 8.80 Hz, 2 H), 7.04 (d, J = 8.80 Hz, 2 H), 6.81-6.92 (m, 2 H), 5.90 (s, 1 H), 5.20 (s, 2 H), 3.48 (s, 3 H), 3.03-3.17 (m, 1 H), 2.91 (dt, J = 9.48, 5.53 Hz, 1 H), 2.72 (t, J = 5.62 Hz, 1 H), 2.12 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 1.58 (s, 3 H), 1.01 (s, 3 H);

[0111] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz); δ 204.25, 164.57, 158.00, 134.51, 129.75, 128.73, 125.62, 121.83, 116.44, 94.17, 58.09, 56.09, 52.78, 43.59, 39.98, 26.72, 22.10

[0112] HRMS: 계산치 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_2$ (M-H) 253.1229, 측정치 253.1221

[0113] HPLC 분석결과: (방법 1) 100.0% (t_R = 3.67분).

[0114] **실시예 1-2. (1S,5R)-4-(3-메톡시-4,5-비스(메톡시메톡시)스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(2f)화합물의 제조**

[0115] 2a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 (1S,5R)-4-(3-메톡시-4,5-비스(메톡시메톡시)스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(2f)[(1S,5R)-4-(3-methoxy-4,5-bis(methoxymethoxy)styryl)-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one(2f)]을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 90%).

[0116] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz); δ 6.94(d, J =1.96Hz, 1H), 6.84(s, 2H), 6.78(d, J =1.71Hz, 1H), 5.92(s, 1H), 5.22(s, 2H), 5.15(s, 2H), 3.89(s, 3H), 3.60(s, 3H), 3.52(s, 3H), 3.09(t, J =5.75Hz, 1H), 2.90(dt, J =9.48, 5.53Hz, 1H), 2.72(td, J =5.75, 1.47Hz, 1H), 2.10(d, J =9.29Hz, 1H), 1.57(s, 3H), 1.00(s, 3H);

[0117] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz); δ 203.92, 164.02, 153.63, 151.19, 136.64, 134.76, 132.10, 126.91, 122.43, 108.91, 104.88, 98.37, 95.33, 58.19, 57.11, 56.07, 52.70, 43.78, 39.93, 26.70, 22.11.

[0118] **실시예 1-3. (1S,5R)-4-(4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3a) 화합물의 제조**

[0119] MeOH(3mL)중 2a 화합물(200mg, 0.67mmol) 교반되는 용액에, 알돌 축합반응(aldol condensation)으로 (1S)-(-)-베르베논(verbenone)으로부터 디엔체(diene)를 얻기 위하여, 10%HCl을 적가하고 반응 혼합물을 반응이 종결될 때까지 하룻밤동안 방치하였다. 포화 NaHCO_3 을 첨가하고 상기 반응 혼합물을 에틸아세테이트로 추출하고 무수 MgSO_4 로 건조하였다. 최종 화합물을 컬럼 크로마토그리피로 정제 및 분리하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1S,5R)-4-(4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(3a).[(1S,5R)-4-(4-hydroxystyryl)-6,6-dimethylbicyclo [3.1.1] hept-3-en-2-one(3a).]을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용

하였다.(162 mg, 수율 95%)

[0120] mp 88-90 °C.

[0121] $[\alpha]_D^{20}$ -211.6° (c1.0, MeOH);

[0122] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz) δ 7.40 (d, J = 8.56 Hz, 2 H), 6.78-6.92 (m, 4 H), 6.45 (br. s., 1 H), 5.91 (s, 1 H), 3.12 (t, J = 5.75 Hz, 1 H), 2.88-2.95 (m, 1 H), 2.74 (t, J = 5.62 Hz, 1 H), 2.13 (d, J = 9.29 Hz, 1 H), 1.58 (s, 3 H), 1.02 (s, 3 H).

[0123] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) δ 205.14, 165.56, 157.32, 135.24, 129.13, 128.51, 124.89, 121.29, 116.00, 58.10, 53.22, 43.86, 40.23, 26.79, 22.15.

[0124] HRMS 계산치 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_2(\text{M-H})$ 253.1229, 측정치 253.1221;

[0125] HPLC 분석결과: (방법 1) 100.0% (t_R =3.67분).

[0126] 실시예 1-4. (1*S*,5*R*)-4-(4-히드록시-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3b) 화합물의 제조;

[0127] 3a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(4-히드록시-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3b)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 97%)

[0128] mp 78-80 °C;

[0129] $[\alpha]_D^{20}$ -140.0° (c1.0, MeOH);

[0130] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz); δ 7.45 (d, J = 8.07 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 16.63 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 16.38 Hz, 1H), 6.42-6.48 (m, 2H), 5.88 (s, 1H), 3.86 (s, 3H) 5.64 (br. s., 1H), 3.16 (t, J = 5.75 Hz, 1H), 2.91 (dt, J = 9.35, 5.59 Hz, 1H), 2.72 (td, J = 5.60 Hz, 1H), 2.12 (d, J = 9.29 Hz, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.02 (s, 3H);

[0131] $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) ; δ 205.53, 166.76, 159.17, 158.94, 130.48, 128.48, 124.75, 120.62, 117.50, 108.19, 99.19, 58.10, 55.53, 53.25, 43.87, 40.33, 26.80, 22.16;

[0132] HRMS 계산치 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3(\text{M+H})$ 285.1491, 측정치 285.1480;

[0133] HPLC 분석결과: (방법 1) 99.4% (t_R =3.80분).

[0134] 실시예 1-5. (1*S*,5*R*)-4-(3,4-디히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3c) 화합물의 제조;

[0135] 3a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(3,4-디히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3c)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 84%)

[0136] mp 68-70 °C;

[0137] $[\alpha]_D^{20}$ -208.6° (c1.0, MeOH);

[0138] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500MHz); δ 7.13 (s, 1H), 6.70-6.96 (m, 4H), 5.92 (s, 1H), 3.12 (t, J =5.50Hz, 1H), 2.86-2.95

(m, 1H), 2.71-2.81 (m, 1H), 2.14 (d, $J=9.54\text{Hz}$, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.00 (s, 3H);

[0139] ^{13}C -NMR (CDCl₃, 75MHz) ; δ 206.39, 166.93, 146.23, 144.51, 136.47, 128.75, 124.62, 121.91, 120.72, 115.38, 113.17, 60.55, 58.04, 53.84, 44.01, 40.55, 26.78, 22.12;

[0140] HRMS 계산치 C₁₇H₁₈O₃(M-H)269.1178, 측정치 269.1169;

[0141] HPLC 분석결과:(방법 1) 100% ($t_R=3.47$ 분).

[0142] 실시예 1-6. (1*S*,5*R*)-4-(3-브로모-4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3d) 화합물의 제조;

[0143] 3a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(3-브로모-4-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3d)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 95%)

[0144] mp 238-240 °C ;

[0145] $[\alpha]_D^{20}$ -181.4 ° (c1.0, MeOH);

[0146] ^1H -NMR(CD₃OD, 500MHz); δ 7.75 (d, $J=2.20\text{Hz}$, 1H), 7.45(dd, $J=1.96$, 8.56Hz, 1H), 7.02 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 6.97 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 6.92 (d, $J=8.56\text{Hz}$, 1H), 5.90 (s, 1H), 3.24 (t, $J=5.99\text{Hz}$, 1H), 2.97 (td, $J=5.59$, 9.35Hz, 1H), 2.62 (dt, $J=1.50$, 6.00Hz, 1H), 2.05 (d, $J=9.54\text{Hz}$, 1H), 1.60 (s, 3H), 0.98 (s, 3H);

[0147] ^{13}C -NMR(CD₃OD, 75MHz): δ 203.02, 165.13, 155.42, 134.47, 132.29, 129.42, 128.79, 125.75, 121.59, 117.11, 110.36, 58.16, 52.33, 43.30, 26.83, 22.43;

[0148] HRMS 계산치 C₁₇H₁₇BrO₂(M+H)333.0490, 측정치 333.0479;

[0149] HPLC 분석결과:(방법 1)98.9% ($t_R=3.91$ 분).

[0150] 실시예 1-7. (1*S*,5*R*)-4-(4-히드록시-2,6-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3e) 화합물의 제조;

[0151] 3a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(4-히드록시-2,6-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3e)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 94%)

[0152] mp 216-218 °C ;

[0153] $[\alpha]_D^{20}$ -175.4 ° (c1.0, MeOH);

[0154] ^1H -NMR(DMSO-*d*₆, 500MHz); δ 7.28 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 7.23 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 6.12 (s, 2H), 5.73 (s, 1H), 3.80 (s, 6H), 3.10 (t, $J=5.38\text{Hz}$, 1H), 2.89 (td, $J=5.50$, 9.05Hz, 1H), 2.53 (t, $J=5.50\text{Hz}$, 1H), 1.93 (d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 1.53 (s, 3H), 0.91 (s, 3H);

[0155] ^{13}C -NMR(DMSO-*d*₆, 75MHz); δ 202.56, 166.66, 160.48, 160.27, 126.68, 126.11, 119.22, 104.67, 92.17, 57.50, 55.71, 55.67, 51.67, 42.59, 26.42, 21.96;

[0156] HRMS 계산치 C₁₉H₂₂O₄(M+H)315.1596, 측정치 315.1583; HPLC 분석결과:(방법 1)99.3% ($t_R=3.70$ 분).

- [0157] 실시예 1-8. (1*S*,5*R*)-4-(3,4-디히드록시-5-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(3f)화합물의 제조
- [0158] 3a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(3,4-디히드록시-5-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(3f)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 92%):
- [0159] mp 168-170 °C ;
- [0160] $[\alpha]_D^{20}$ -158.8000 ° (c1.0, MeOH);
- [0161] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$ δ 6.78-6.82(m, 3H), 6.64(d, $J=1.47\text{Hz}$, 1H), 5.82-6.01(m, 3H), 3.92(s, 3H), 3.10(t, $J=5.62\text{Hz}$, 1H), 2.91(dt, $J=9.35, 5.59\text{Hz}$, 1H), 2.74(td, $J=5.69, 1.59\text{Hz}$, 1H), 2.12(d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 2.04(s, 2H), 1.58(s, 3H), 1.01(s, 3H);
- [0162] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz})$; δ 204.92, 165.07, 147.23, 144.24, 135.54, 134.13, 128.07, 125.50, 121.62, 108.63, 58.08, 56.25, 53.12, 43.75, 40.18, 26.78, 22.16;
- [0163] HRMS 계산치 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_4(\text{M}+\text{H})$ 301.1440, 측정치 301.1453;
- [0164] HPLC 분석결과:(방법 1)100%($t_R=3.46$ 분).
- [0165] 실시예 1-9. (1*S*,5*R*)-4-(3-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3g) 화합물의 제조;
- [0166] 3a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(3-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(3g)[(1*S*,5*R*)-4-(3-hydroxystyryl)-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one(3g)]을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 98%)
- [0167] mp 106-108 °C ;
- [0168] $[\alpha]_D^{20}$ -176.6 ° (c1.0, MeOH);
- [0169] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$; δ 7.21-7.26 (m, 1H), 7.01-7.05 (m, 2H), 6.92 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 6.88 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 6.83-6.86 (m, 1H), 6.46 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 3.11 (t, $J=5.75\text{Hz}$, 1H), 2.93 (td, $J=5.53, 9.48\text{Hz}$, 1H), 2.77 (dt, $J=1.59, 5.69\text{Hz}$, 1H), 2.14 (d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.01 (s, 3H);
- [0170] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz})$; δ 205.19, 165.18, 156.53, 137.42, 135.36, 130.03, 127.44, 122.37, 120.19, 116.68, 113.65, 58.17, 53.39, 43.89, 40.28, 26.77, 22.14;
- [0171] HRMS 계산치 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_2(\text{M}-\text{H})$ 253.1229, 측정치 253.1228;
- [0172] HPLC 분석결과:(방법 2)99.3%($t_R=3.73$ 분).
- [0173] 실시예 1-10. (1*S*,5*R*)-4-(2-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3h) 화합물의 제조;
- [0174] 3a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(2-히드록시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3h)[(1*S*,5*R*)-4-(2-hydroxystyryl)-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one (3h)] 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 100%)
- [0175] mp 140-142 °C ;
- [0176] $[\alpha]_D^{20}$ -296.6 ° (c1.0, MeOH);

- [0177] $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, 500\text{MHz})$; δ 7.56 (dd, $J=1.59$, 7.70Hz, 1H), 7.42 (d, $J=16.14\text{Hz}$, 1H), 7.15(dd, $J=1.59$, 15.53Hz, 1H), 7.13 (d, $J=16.38\text{Hz}$, 1H), 6.80-6.87 (m, 2H), 5.89 (s, 1H), 3.25 (t, $J=5.87\text{Hz}$, 1H), 2.99 (dt, $J=5.53$, 9.48Hz, 1H), 2.65(td, $J=1.71$, 5.75Hz, 1H), 2.08 (d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 1.61 (s, 3H), 1.01 (s, 3H);
- [0178] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, 75\text{MHz})$; δ 207.46, 169.09, 157.56, 133.10, 131.67, 128.67, 127.63, 124.55, 122.03, 121.07, 117.05, 59.62, 54.52, 45.29, 41.45, 27.19, 22.58;
- [0179] HRMS 계산치 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_2(\text{M-H})$ 253.1229, 분석치 253.1218;
- [0180] HPLC 분석결과: (방법 1) 99.4% ($t_R=3.80$ 분).
- [0181] 실시예 1-11. (1*S*,5*R*)-4-(2-히드록시-4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3i) 화합물의 제조;
- [0182] 3a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 겔상의 (1*S*,5*R*)-4-(2-히드록시-4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (3i) 을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다 (수율 96%)
- [0183] $[\alpha]_D^{20} -91.8^\circ$ (c1.0, MeOH);
- [0184] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$; δ 8.46 (br.s., 1H), 7.37 (d, $J=8.56\text{Hz}$, 1H), 7.23 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 7.17 (d, $J=16.00\text{Hz}$, 1H), 6.42-6.55 (m, 2H), 6.04 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.20 (t, $J=5.38\text{Hz}$, 1H), 2.88-2.98 (m, 1H), 2.76 (t, $J=5.14\text{Hz}$, 1H), 2.17 (d, $J=9.54\text{Hz}$, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.05 (s, 3H);
- [0185] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz})$; δ 206.56, 167.94, 161.72, 156.99, 132.26, 130.09, 125.37, 119.93, 116.29, 106.90, 101.73, 57.96, 55.28, 53.74, 43.85, 40.60, 26.76, 22.13;
- [0186] HRMS 계산치 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3(\text{M+H})$ 285.1491, 측정치 285.1494;
- [0187] HPLC 분석결과: (방법 1) 99.2% ($t_R=3.75$ 분).
- [0188] 실시예 1-12. (1*S*,5*R*)-6,6-디메틸-4-스티릴비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4a) 화합물의 제조;
- [0189] 2a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 겔상의 (1*S*,5*R*)-6,6-디메틸-4-스티릴비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4a) 을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다 (수율 92%)
- [0190] $[\alpha]_D^{20} -91.8^\circ$ (c1.0, MeOH);
- [0191] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$; δ 7.50(d, $J=7.09\text{Hz}$, 2H), 7.35-7.40 (m, 2H), 7.33 (d, $J=7.34\text{Hz}$, 1H), 6.97 (d, $J=16.00\text{Hz}$, 1H), 6.92 (d, $J=16.00\text{Hz}$, 1H), 5.94 (s, 1H), 3.12 (td, $J=1.47$, 5.87Hz, 1H), 2.93 (dt, $J=5.62$, 9.54Hz, 1H), 2.74 (td, $J=1.71$, 5.75Hz, 1H), 2.13 (d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.02 (s, 3H);
- [0192] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz})$; δ 204.13, 164.23, 135.99, 134.96, 129.15, 128.88, 127.42, 127.35, 122.66, 58.23, 52.87, 43.76, 40.03, 26.78, 22.16;
- [0193] HRMS 계산치 $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}(\text{M+H})$ 239.1436, 측정치 239.1426;
- [0194] HPLC 분석결과: (방법 1) 95.0% ($t_R=4.82$ 분).
- [0195] 실시예 1-13. (1*S*,5*R*)-4-(4-플루오로스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4b) 화합물의 제조;

- [0196] **2a** 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 겔상의 (1*S*,5*R*)-4-(4-플루오로스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4b**)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 92%)
- [0197] $[\alpha]_D^{20}$ -33.2 ° (c1.0, MeOH);
- [0198] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$; δ 7.46-7.51 (m, 2H), 7.04-7.09 (m, 2H), 6.90 (d, $J=17.00\text{Hz}$, 1H), 6.86 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 5.93 (s, 1H), 3.10 (td, $J=1.35, 5.81\text{Hz}$, 1H), 2.92 (dt, $J=5.62, 9.29\text{Hz}$, 1H), 2.74 (td, $J=1.71, 5.75\text{Hz}$, 1H), 2.12 (d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.02 (s, 3H);
- [0199] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz})$; δ 204.04, 164.03, 162.13, 133.62, 132.21, 129.04, 127.15, 122.61, 116.02, 58.17, 52.83, 43.72, 39.99, 26.73, 22.12;
- [0200] HRMS 계산치 $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FO}(\text{M}+\text{H})$ 257.1342, 측정치 257.1343;
- [0201] HPLC 분석결과:(방법 1)90.6%(t_R =4.52분).
- [0202] **실시예 1-14. (1*S*,5*R*)-4-(4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4c**) 화합물의 제조;**
- [0203] **2a** 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(4-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4c**)[(1*S*,5*R*)-4-(4-methoxystyryl)-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one(**4c**)]을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 90%)
- [0204] mp 138-140 °C;
- [0205] $[\alpha]_D^{20}$ -172.0 ° (c1.0, MeOH);
- [0206] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$; δ 7.46 (d, $J=8.80\text{Hz}$, 2H), 6.91 (d, $J=9.05\text{Hz}$, 2H), 6.90(d, $J=15.90\text{Hz}$, 1H), 6.84 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 5.90 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.12 (td, $J=1.35, 5.81\text{Hz}$, 1H), 2.92 (dt, $J=5.53, 9.48\text{Hz}$, 1H), 2.73 (td, $J=1.71, 5.75\text{Hz}$, 1H), 2.13 (d, $J=9.54\text{Hz}$, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.03 (s, 3H);
- [0207] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz})$; δ 204.17, 164.63, 160.50, 134.64, 128.83, 128.78, 125.25, 121.66, 114.35, 58.17, 55.34, 52.74, 43.76, 39.99, 26.76, 22.15;
- [0208] HRMS 계산치 $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_2(\text{M}+\text{H})$ 269.1542, 측정치 269.1549;
- [0209] HPLC 분석결과:(방법 1)100%(t_R =4.58분).
- [0210] **실시예 1-15. (1*S*,5*R*)-4-(2-(비페닐-4-일)비닐)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4d**) 화합물의 제조;**
- [0211] **2a** 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(2-(비페닐-4-일)비닐)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4d**)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 92%)
- [0212] mp 148-150 °C;
- [0213] $[\alpha]_D^{20}$ -152.4 ° (c1.0, MeOH);
- [0214] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$; δ 7.55-7.65 (m, 6H), 7.45 (t, $J=7.58\text{Hz}$, 2H), 7.34-7.39 (m, 1H), 7.01 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 6.96 (d, $J=16.50\text{Hz}$, 1H), 5.95 (s, 1H), 3.14 (t, $J=5.75\text{Hz}$, 1H), 2.94 (dt, $J=5.50, 9.54\text{Hz}$, 1H), 2.75 (t, $J=5.62\text{Hz}$, 1H), 2.14 (d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 1.60 (s, 3H), 1.03 (s, 3H);

- [0215] ^{13}C -NMR(CDCl_3 , 75MHz); δ 204.12, 164.23, 141.86, 140.23, 134.99, 134.50, 128.87, 127.84, 127.69, 127.51, 127.38, 126.94, 122.65, 58.24, 52.86, 43.77, 40.02, 26.79, 22.18;
- [0216] HRMS 계산치 $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}(\text{M}+\text{H})$ 315.1749, 측정치 315.1737;
- [0217] HPLC 분석결과:(방법 1)100%(t_R =6.35분).
- [0218] 실시예 1-16. (1*S*,5*R*)-4-(4-(1*H*-피롤-1-일)스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4e) 화합물의 제조;
- [0219] 2a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-4-(4-(1*H*-피롤-1-일)스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4e)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 41%)
- [0220] mp 146-148 °C;
- [0221] $[\alpha]_D^{20}$ -142.4 ° (c 1.0, MeOH);
- [0222] ^1H -NMR(CDCl_3 , 500MHz); δ 7.55(d, J =8.56Hz, 2H), 7.39 (d, J =8.56Hz, 2H), 7.12 (t, J =2.20Hz, 2H), 6.95(d, J =16.00Hz, 1H), 6.91 (d, J =16.00Hz, 1H), 6.36 (t, J =2.20Hz, 2H), 5.94 (s, 1H), 3.12 (t, J =5.75Hz, 1H), 2.93 (td, J =5.59, 9.35Hz, 1H), 2.74 (dt, J =1.71, 5.75Hz, 1H), 2.13(d, J =9.29Hz, 1H), 1.59 (s, 3H), 1.03 (s, 3H);
- [0223] ^{13}C -NMR(CDCl_3 , 75MHz); δ 203.97, 164.03, 140.92, 133.78, 133.21, 128.57, 127.14, 122.61, 120.25, 118.95, 110.94, 58.19, 25.79, 43.72, 39.97, 26.75, 22.14;
- [0224] HRMS 계산치 $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{NO}(\text{M}+\text{H})$ 304.1701, 측정치 304.1691;
- [0225] HPLC 분석결과:(방법 1)94.7%(t_R =5.10분).
- [0226] 실시예 1-17. (1*S*,5*R*)-4-(3,4-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4f) 화합물의 제조;
- [0227] 2a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 겔상의 (1*S*,5*R*)-4-(3,4-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4f)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 92%)
- [0228] $[\alpha]_D^{20}$ -111.2 ° (c 1.0, MeOH);
- [0229] ^1H -NMR(CDCl_3 , 500MHz); δ 7.02-7.09 (m, 2H), 6.89 (d, J =16.00Hz, 1H), 6.86 (d, J =7.00Hz, 1H), 6.83 (d, J =16.50Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.11 (t, J =5.75Hz, 1H), 2.91 (dtd, J =1.47, 5.56, 9.41Hz, 1H), 2.72 (tt, J =1.74, 5.72Hz, 1H), 2.11 (d, J =9.29Hz, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.02 (s, 3H);
- [0230] ^{13}C -NMR(CDCl_3 , 75MHz); δ 204.03, 164.46, 150.28, 149.30, 134.89, 129.10, 125.42, 121.75, 111.24, 109.29, 58.19, 55.94, 52.69, 43.82, 39.96, 26.76, 22.15;
- [0231] HRMS 계산치 $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3(\text{M}+\text{H})$ 299.1647, 측정치 299.1657;
- [0232] HPLC 분석결과:(방법 2)97.9%(t_R =9.19분).
- [0233] 실시예 1-18. (1*S*,5*R*)-4-(3,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (4g) 화합물의 제조;

- [0234] **2a** 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 겔상의 (1*S*,5*R*)-4-(3,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4g**)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 90%)
- [0235] $[\alpha]_D^{20} -94.2^\circ$ (c1.0, MeOH);
- [0236] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$; δ 6.93 (d, $J=16.00\text{Hz}$, 1H), 6.85 (d, $J=16.00\text{Hz}$, 1H), 6.65 (d, $J=2.20\text{Hz}$, 2H), 6.45 (t, $J=2.20\text{Hz}$, 1H), 5.94 (s, 1H), 3.82 (s, 6H), 3.10 (t, $J=5.75\text{Hz}$, 1H), 2.92 (dt, $J=5.62, 9.54\text{Hz}$, 1H), 2.74 (td, $J=1.59, 5.69\text{Hz}$, 1H), 2.12 (d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.02 (s, 3H);
- [0237] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz})$; δ 204.04, 163.03, 161.03, 137.88, 134.93, 127.83, 122.81, 105.32, 101.51, 58.19, 55.40, 52.82, 43.73, 39.99, 26.73, 22.12;
- [0238] HRMS 계산치 $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3(\text{M}+\text{H})$ 299.1647, 측정치 299.1662;
- [0239] HPLC 분석방법: (방법 1) 100% ($t_R=4.58$ 분).
- [0240] **실시예 1-19. (1*S*,5*R*)-4-(2,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4h**) 화합물의 제조;**
- [0241] **2a** 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 겔상의 (1*S*,5*R*)-4-(2,5-디메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4h**)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 93%)
- [0242] $[\alpha]_D^{20} -94.8^\circ$ (c1.0, MeOH);
- [0243] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$; δ 7.29 (d, $J=16.38\text{Hz}$, 1H), 7.11 (d, $J=2.69\text{Hz}$, 1H), 6.95 (d, $J=16.14\text{Hz}$, 1H), 6.81-6.88 (m, 2H), 5.92 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.16 (dt, $J=1.50, 6.00\text{Hz}$, 1H), 2.91 (td, $J=5.62, 9.29\text{Hz}$, 1H), 2.72 (dt, $J=1.71, 5.75\text{Hz}$, 1H), 2.11 (d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.02 (s, 3H);
- [0244] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz})$; δ 204.16, 164.83, 153.74, 152.04, 129.50, 127.74, 125.62, 122.37, 115.85, 112.34, 111.85, 58.24, 56.13, 52.76, 43.76, 40.03, 26.76, 22.15;
- [0245] HRMS 계산치 $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3(\text{M}+\text{H})$ 299.1647, 측정치 299.1650;
- [0246] HPLC 분석결과: (방법 1) 96.4% ($t_R=4.69$ 분).
- [0247] **실시예 1-20. (1*S*,5*R*)-4-(5-브로모-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4i**) 화합물의 제조;**
- [0248] **2a** 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 겔상의 (1*S*,5*R*)-4-(5-브로모-2-메톡시스티릴)-6,6-디메틸비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온 (**4i**)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 97%)
- [0249] $[\alpha]_D^{20} -71.6^\circ$ (c1.0, MeOH);
- [0250] $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, 500\text{MHz})$; δ 7.66 (s, 1H), 7.36 (dd, $J=2.45, 8.80\text{Hz}$, 1H), 7.20 (d, $J=16.38\text{Hz}$, 1H), 6.95 (d, $J=16.14\text{Hz}$, 1H), 6.77 (d, $J=8.80\text{Hz}$, 1H), 5.93 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.12 (t, $J=5.62\text{Hz}$, 1H), 2.91 (dt, $J=5.35, 9.60\text{Hz}$, 1H), 2.73 (t, $J=5.14\text{Hz}$, 1H), 2.11 (d, $J=9.29\text{Hz}$, 1H), 1.58 (s, 3H), 1.01 (s, 3H);
- [0251] $^{13}\text{C-NMR}(\text{CDCl}_3, 75\text{MHz})$; δ 203.97, 164.31, 156.40, 132.53, 129.53, 128.69, 128.09, 127.04, 122.89, 113.28,

112.75, 58.22, 55.77, 52.76, 43.71, 39.98, 26.73, 22.11;

[0252] HRMS 계산치 $C_{18}H_{19}BrO_2(M+H)$ 347.0647, 측정치 347.0651;

[0253] HPLC 분석결과: (방법 1) 99.0% (t_R =6.23분).

[0254] **실시예 1-21. (1*S*,5*R*)-6,6-디메틸-4-((*E*)-2-(피리딘-2-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(5a) 화합물의 제조**

[0255] 알돌 축합반응(alldolcondensation)으로 (1*S*)-(-)-베르베논(verbenone)으로부터 디엔체(diene)를 얻기 위하여, (1*S*)-(-)-베르베논(verbenone 1, 200mg, 1.33mmol)을 2-피리딘카르복스알데히드 (171mg, 1.60mmol)와 MeOH (7 mL)에서 교반하고 $NaOCH_3$ (MeOH중 25wt.%용액, 108mg, 2.00mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 6시간동안 60℃에서 교반하고 실온으로 냉각시켰다. 소량의 물을 첨가하고 혼합물을 24시간 동안 실온에서 방치하였다. 상기 혼합물을 감압농축하여 갈색 산물을 얻고 이를 실리카겔 컬럼 크로마토그리피로 정제하여 하기 물성치를 나타내는 황색 시럽상의 (1*S*,5*R*)-6,6-디메틸-4-((*E*)-2-(피리딘-2-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(5a). [(1*S*,5*R*)-6,6-dimethyl-4-((*E*)-2-(pyridin-2-yl)vinyl)bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one(5a)]을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다 (258 mg, 수율 81%)

[0256] $[a]_D^{20}$ -102.0000° (c 1.0, MeOH);

[0257] 1H -NMR($CDCl_3$, 500MHz); δ 8.60(dd, J =4.77, 0.61Hz, 1H), 7.67(td, J =7.70, 1.71Hz, 1H), 7.45(d, J =15.90Hz, 1H), 7.39(d, J =7.83Hz, 1H), 7.19(ddd, J =7.52, 4.83, 0.86Hz, 1H), 6.96(d, J =15.89Hz, 1H), 6.02(s, 1H), 3.08-3.14(m, 1H), 2.87-2.95(m, 1H), 2.73(td, J =5.69, 1.59Hz, 1H), 2.11(d, J =9.29Hz, 1H), 1.57(s, 3H), 1.00(s, 3H);

[0258] ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75MHz); δ 203.92, 163.51, 154.33, 149.96, 136.65, 133.90, 131.15, 124.29, 123.13, 58.27, 52.90, 43.86, 39.97, 26.71, 22.12;

[0259] HRMS 계산치 $C_{16}H_{17}NO(M+H)$ 240.1388, 측정치 240.1392;

[0260] HPLC 분석결과: (방법 1) 98.4% (t_R =4.28 분).

[0261] **실시예 1-22. (1*S*,5*R*)-6,6-디메틸-4-((*E*)-2-(피리딘-3-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(5b) 화합물의 제조;**

[0262] 5a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 고체상의 (1*S*,5*R*)-6,6-디메틸-4-((*E*)-2-(피리딘-3-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(5b)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다 (수율 77%)

[0263] mp 102-104 °C;

[0264] $[a]_D^{20}$ -204.0° (c 1.0, MeOH);

[0265] 1H -NMR($CDCl_3$, 500MHz); δ 8.70 (d, J =1.96Hz, 1H), 8.54 (dd, J =1.22, 4.65Hz, 1H), 7.85 (td, J =1.86, 8.01Hz, 1H), 7.31 (dd, J =4.77, 7.95Hz, 1H), 7.02 (d, J =16.00Hz, 1H), 6.91 (d, J =16.00Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 3.12 (dt, J =1.10, 5.81Hz, 1H), 2.94 (td, J =5.62, 9.54Hz, 1H), 2.76 (dt, J =1.71, 5.75Hz, 1H), 2.13 (d, J =9.54Hz, 1H), 1.60 (s, 3H), 1.03 (s, 3H);

[0266] ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 75MHz); δ 203.72, 163.28, 149.82, 149.35, 133.12, 131.73, 130.98, 129.34, 123.61, 58.23, 52.84, 43.64, 39.96, 26.72, 22.13;

- [0267] HRMS 계산치 $C_{16}H_{17}NO(M+H)240.1388$, 측정치 240.1397;
- [0268] HPLC 분석결과:(방법 1)98.7%($t_R=3.89$ 분).
- [0269] 실시예 1-23. (1*S*,5*R*)-6,6-디메틸-4-((*E*)-2-(피리딘-4-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(5c) 화합물의 제조;
- [0270] 5a 화합물의 제조방법과 유사한 방법을 이용하여 하기 물성치를 나타내는 황색 겔상의 (1*S*,5*R*)-6,6-디메틸-4-((*E*)-2-(피리딘-4-일)비닐)비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-온(5c)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용하였다(수율 80%)
- [0271] $[\alpha]_D^{20}-152.0^\circ$ ($c1.0$, MeOH);
- [0272] 1H -NMR($CDCl_3$, 500MHz); δ 8.62 (d, $J=5.87$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J=5.87$ Hz, 2H), 7.13 (d, $J=16.14$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J=16.14$ Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 3.10 (t, $J=5.87$ Hz, 1H), 2.95 (td, $J=5.62$, 9.54Hz, 1H), 2.77 (dt, $J=1.59$, 5.69Hz, 1H), 2.13 (d, $J=9.54$ Hz, 1H), 1.60 (s, 3H), 1.02 (s, 3H);
- [0273] ^{13}C -NMR($CDCl_3$, 75MHz); δ 203.57, 162.78, 150.42, 143.12, 131.89, 131.57, 124.62, 121.23, 58.24, 52.90, 43.68, 39.95, 26.70, 22.11;
- [0274] HRMS 계산치 $C_{16}H_{17}NO(M+H)240.1338$, 측정치 240.1378;
- [0275] HPLC 분석결과:(방법 1)98.4%($t_R=4.29$ 분).
- [0276] 실시예 2. 홍분세포독성, 항산화활성 및 국소뇌허혈증에 대한 베르베린 유도체의 효과
- [0277] 실험동물의 준비
- [0278] SD 래트 (260-270g 수컷)를 회사 (Charles River Laboratories, Seoul, Korea, 한국)에서 공급받아 12시간 명암/순환 주기를 유지하며 식수에 자유롭게 접근가능하게 하고 실험전 환경에 순화시켜 사용하였고 NIH 기준 (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) 및 위원회(Korea University Institutional Animal Care & Use Committee) 승인 하에 수행되었다.
- [0279] 통계처리
- [0280] Data는 means $\pm$ S.E.M. 으로 처리하고 one-way analysis of variance (ANOVA)를 수행하여 통계적 유의성을 검정하고, 다중 비교법으로 post-hoc bonferroni test로 판정하고 P 값 <0.05 을 유의적으로 판단하고 ANOVA 분석 전에 분산의 동질성(Equality of Variances)에 대한 시험법(Levene'sTest)의 P 값을 확인하였다($P>0.05$). 필요 시에는 상기 데이터를 Kruskal-Wallis test 후 Mann-Whitney test를 수행하여 재분석하였다.
- [0281] 실시예 2-1. 홍분세포독성에 미치는 베르베린 유도체의 효과
- [0282] 상기 실시예에서 수득한 시료의 홍분세포독성에 미치는 효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Ju C. et al., BBRC, 431(3), 484-489, 2013).
- [0283] (1) 피질 신경세포 배양
- [0284] 피질 신경세포(neuron)(5×10^5 cells/ml)는 태아 16~17일 SD 래트로부터 수득하였다. 즉, 뇌 피질을 절단하고 완충액(Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS)에서 피펫(Pasteur pipette)을 이용하여 반복된 적정

(trituration)으로 세포를 분리시켰다. 세포 현탁액(1.8×10^3 cells/mm²)을 플레이트(poly-D-lysine(100mg/ml)/laminin (4 mg/ml)-에비처치 플레이트) 상에 분주한다. 세포를 초기에 10% FBS-첨가 NBM 배지에 위치하고 37° C에서 가습된 96% 공기/5% CO₂ 대기하에서 유지시켰다. 시험은 상기 배양물의 배양 후 15~16 일에 수행하였다.

[0285] (2) OGD(Oxygen-Glucose Deprivation)후 재산소화

[0286] 시험관 저산소성-허혈성 증상을 유도하기 위하여, 배양된 세포들을 혐기성 챔버(산소부분압<2mmHg)에서 위치시키고 상기 배양물을 잔존산소를 제거하기 위하여 30분간 혐기성 가스 혼합물 (95%N₂,5%CO₂)로 버블링(bubbling)하는 포도당-제거 배지(glucose-free DMEM)로 갈아서 배양하고 산소 결핍(oxygen deprivation)을 위하여 90분간 37° C에서 배양하였다. 90분 후 상기 노출 용액을 산소화 25 mmol/L 포도당 함유 DMEM 배지로 갈아 OGD 반응을 중단시키고 세포를 정상산소 조건으로 회복시켰다. OGD에 노출하지 않은 대조 세포를 호기성 혼합가스(95% air, 5% CO₂)를 제공하는 포도당 (25 mmol/L)-함유 DMEM배지에서 유지시켰다. OGD/재산소화(re-oxygenation) 30분 전부터 세포를 시료로 처리하여 전 실험기간동안 유지하였다.

[0287]

[0288] (3) NMDA (N-methyl-D-aspartate)-유도 흥분세포독성 측정

[0289] 플레이트에 15-18일간 정치한 후에, 피질 신경세포들을 용액 (Mg²⁺-제거 Earle's balanced salt solution (EBSS); 1.8 mM CaCl₂ 및 10mM glycine 함유)에서 10분간 NMDA (100 mM)에 노출시켰다. 상기 노출 후에, 세포들을 MgSO₄ 함유 EBSS 용액으로 세척하고 37° C에서 5% CO₂ 조건 하에 배양기에서 25 mmol/L 글루코스 함유 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포를 NMDA 처리 30분 전부터 시료(10 mM)로 처리하였다.

[0290] (4) 세포 손상 또는 세포사의 측정

[0291] 세포 손상 또는 세포 사멸은 배지로 분비되는 LDH 양을 세포생존률 측정 키트(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 이용하여 측정하였고, 세포 생존율은 냉동되고 실험 후에 녹인 자매 배양물(sister cultures)에서 측정된, 전체 세포 LDH 수준에 대한 LDH의 백분율로 표시하였다.

[0292]

[0293] 흥분세포독성은 허혈증-유도 신경세포사, 특히 초기 단계 뇌 허혈증에서 주요한 인자중 하나이다. OGD는 배양된 피질 신경세포를 이용하여 허혈증에서의 혈류 공급 및 에너지 소비의 급격한 파괴 현상을 모방한 실험 모델로서, OGD에 의해 세포손상을 유도하고 LDH와 같은 단백질의 배양액으로의 분비를 촉진시키고 이를 측정하여 세포막 손상 및 신경세포 손상을 측정할 수 있다. 시험 결과, 화합물들(3a, 3c 및 3f)이 이미 잘 알려진 NMDA 수용체 길항제인 MK801과 상응하는 정도로 신경세포손상을 유의적으로 감소시킴을 확인하였고 세포독성은 나타나지 않았음을 확인하였다 (도 1).

[0294] NMDA 수용체의 과도한 자극에 기인한 흥분성독성(Excitotoxicity)은 OGD/R 동안의 신경 손상 및 유리 라디칼 및 이어지는 산화적 스트레스의 동시다발적 발생에 따른 뇌 허혈성 손상에 관여하는 주요한 인자이다. 본 실험 결과, 본 발명의 화합물들(3a, 3c, 3f, 3i, 및 5a)이 MK-801에 상응하는 항-흥분세포독성 활성(anti-excitotoxic activities)정도는 아니지만, 배양된 피질 신경세포에서의 NMDA-유발 신경 손상을 유의적으로 감소시켰다. (도 2) 이는 본 발명의 화합물들이 NMDA-유발 신경 흥분세포독성의 저해가 항-허혈 활성에 기여함을 의미한다.

[0295] **실시예 2-2. 베르베는 유도체의 항산화 활성 효과**

[0296] 상기 실시예에서 수득한 시료의 직접적인 항산화 활성을 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Ju c. et al., BBRC, 431(3), 484-489, 2013 ; Huang D. et al., J. Agric. Food Chem.,53, 1841-1856, 2005.)

[0297] (1) 반응성 산소종(ROS)의 세포내 수준측정(DCF 형광도)

[0298] 시료들의 직접적 라디칼 소거 활성을 확인하기 위하여, 재산소화(reoxygenation) 1시간 후에 세포내 산화력 스트레스를 측정하는 데 광범위하게 이용되는 H₂DCF-DA(2,7-dihydrochlorofluorescein diacetate) 형광지시자로 염색하고, 2시간 후 세포를 25 mM Glucose, 1.8 mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄ 및 2.5mM probenecid(pH7.4) 함유 EBSS 완충액에서 세척하고 DCF의 형광도를 판독 기기(fluorescence microplate reader, SpectraMax GeminiEM; Ex = 485 nm, Em = 530 nm) 또는 디지털 카메라(DFC420C, Leica, Wetzlar Germany) 장착 현미경(fluorescence microscope; DM IL HC Fluo, Leica, Wetzlar, Germany)으로 측정하였다. 형광 강도는 자동형광도로 보정(즉, H₂DCF-DA로 적재되지 않은 세포의 형광도)하였다.

[0299] 본 실험 결과, 화합물 3c 및 3f 는 OGD-유도 세포내 산화적 스트레스를 감소시킴을 확인하였다 (도 3).

[0300] (2) 질소라디칼 제거 능력 측정 (DPPH 어세이법)

[0301] 시료들을 DPPH (23.6 µg/ml, in ethanol)로 혼합하고 37° C, 암소에서 30분간 배양하였다. 시료에 의해 감소하는 DPPH 흡광도를 517nm에서 측정하였다. 비타민 C (Vit.C; SigmaAldrich, St. Louis, MO)를 대조군으로 사용하고 DPPH % 저해율(inhibition value)는 하기 수학적 식 1에 의하여 계산하였다.

수학적 식 1

$$\text{소거활성(\%)} = \frac{[\text{Abs}_{\text{max}}(\text{Vit.C}) - \text{Abs}_{\text{sample}}]}{[\text{Abs}_{\text{max}}(\text{Vit.C}) - \text{Abs}_{\text{min}}(\text{Vit.C})]} \times 100$$

[0302]

[0303] (3) 산소 라디칼 흡수력(ORAC; oxygen radical absorbance capacity)측정

[0304] ORAC 어세이법을 문헌에 개시된 바대로 실험을 하기와 같이 수행하였다.(Huang, D. et al., J. Agric. Food Chem., 53,1841-56, 2005)

[0305] AAPH(60mM) 및 fluorescein(50nM)을 완충액(75mM phosphate buffer, pH7.4)에서 시료 또는 표준액(Trolox) 없이 준비하였다. 상기 시료 및 표준액은 50% 아세톤에 용해된 7% RMCD(randomly methylated beta-cyclodextrin)로 현탁하여 준비하였다. RMCD는 지용성 시료의 용해도를 증진시키기 위하여 준비하였다. 형광 용액(Fluorescein solution, 66nM, 190 µl)을 시료와 5초간 진탕하여 충분히 혼합하였다. 37° C에서 10분간 배양 후에, AAPH (500 mM, 30 µl)를 신속하게 첨가하고 형광도의 감소수준을 판독기(fluorescence microplate reader, Ex = 485 nm, Em = 530 nm; SpectraMax GeminiEM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 37° C에서 9시간 동안 매 5분 마다 측정하였다. 퍼옥시 라디칼(peroxyl radical)의 소거작용 정량화를 위하여, 소거활성은 AUC(area-under-the-curve)를 하기 수학적 식 2에 따라 계산하고 순수(net) AUC는 수학적 식 3에 따라 계산하고 시료의 트롤록스 균등치(TE; trolox equivalents)는 트롤록스 농도증가에 따른 순수 AUC의 표준 곡선(standard curve)를 만들어 하기 수학적 식 4에 따라 계산하였다.

수학적 식 2

$$\text{AUC} = (0.5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_{n-2}/f_0 + f_{n-1}/f_0 + f_n/f_0) \times 5$$

[0306]

[0307] (여기에서, f_0 은 0분 및 시간(time) I , 에서의 최초 형광도임.

수학식 3

$$\text{네트(net) AUC} = \text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{blank}}$$

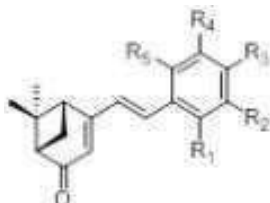
수학식 4

$$\text{시료의 트롤록스 균등치(TE; troloxequivalents)} = \frac{[\text{netAUC}_{\text{sample at } 25 \mu\text{M}}]}{[\text{net AUC}_{\text{trolox at } 25 \mu\text{M}}]}$$

본 발명의 베르베논 유도체들의 항산화 활성은 2개의 상이한 형태의 화학반응, 먼저, (1) 단일 전자 이동-기반 어세이법(single electron transfer-based assay), 즉, 자유 라디칼 생성자 및 종결 지지자로서 작용하는 DPPH의 감소를 측정하는 DPPH 어세이법(2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl [DPPH] assay) 및 (2) 수소 원자 이동 어세이법(hydrogen atom transfer assay), 즉, (AAPH(2,2'-azobis-(2-methylpropionamide)-dihydrochloride)의 산화성 프르브(oxidizable fluorescent probe, fluorescein)로의 경쟁적 반응역학에 대한 항산화제 및 퍼옥시 라디칼 생산자(peroxyl radical generator) 간의 작용을 측정하는 산소 라디칼 흡수 능력 어세이법(oxygen radical absorbance capacity [ORAC] assay)을 수행하였다.

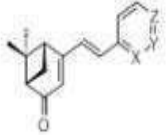
본 실험 결과, DPPH어세이법에서 대부분의 페놀기를 갖는 스티릴 유도체들(3a-f, 3h-i)은 DPPH로부터 유기 질소 자유 라디칼(organic nitrogen free radicals)로의 변환에 대한 강력하고 직접적인 소거활성을 나타냄을 확인하였다(표 1 참조). 이중 화합물 3c 및 3f은 동일 농도에서 비타민 C보다 강력한 소거활성을 나타냈으며, ORAC 어세이법에서는, 피롤기를 갖는 유도체(4e) 및 페놀기를 갖는 모든 화합물들(3a-i)이 트롤록스(trolox)보다 강력한 퍼옥시 라디칼 소거활성을 나타냄을 확인하였다 (표 1 및 표 2). 페닐기의 메타(meta) 및 파라(para) 위치의 히드록시기의 도입은 유리 라디칼 소거활성을 증진시킴을 확인하였다.

표 1

						DPPH assay	ORAC assay	
code	product					% inhibition ^a	Net AUC ^b	TE ₂₅ ^b
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅			
3a	H	H	OH	H	H	19.11 ± 0.67	153.98 ± 1.68	3.43 ± 0.04
3b	OCH ₃	H	OH	H	H	38.13 ± 5.62	106.48 ± 1.89	2.37 ± 0.04
3c	H	OH	OH	H	H	91.62 ± 3.27	131.29 ± 11.97	3.11 ± 0.11
3d	H	Br	OH	H	H	29.45 ± 2.41	168.12 ± 5.24	3.74 ± 0.12
3e	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	55.80 ± 7.52	166.26 ± 6.05	3.70 ± 0.13
3f	H	OH	OH	OCH ₃	H	83.64 ± 6.19	99.06 ± 37.80	2.83 ± 0.22
3g	H	OH	H	H	H	ND	73.74 ± 3.86	1.64 ± 0.09
3h	OH	H	H	H	H	4.64 ± 0.60	98.77 ± 2.53	2.20 ± 0.06
3i	OH	H	OCH ₃	H	H	51.21 ± 3.83	136.87 ± 3.24	3.05 ± 0.07
4a	H	H	H	H	H	ND	27.73 ± 0.74	0.61 ± 0.01
4b	H	H	F	H	H	ND	26.15 ± 1.26	0.62 ± 0.02

4c	H	H	OCH ₃	H	H	ND	38.06 ± 2.00	0.79 ± 0.01
4d	H	H	Ph	H	H	ND	26.75 ± 1.27	0.56 ± 0.01
4e	H	H	Pyrrol	H	H	ND	98.31 ± 0.48	2.19 ± 0.01
4f	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	ND	39.35 ± 1.67	0.88 ± 0.04
4g	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	ND	45.28 ± 0.62	1.01 ± 0.01
4h	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	ND	32.44 ± 1.54	0.72 ± 0.03
4i	OCH ₃	H	H	Br	H	ND	32.96 ± 1.03	0.73 ± 0.02

표 2

						DPPH assay	ORAC assay	
code	product					% inhibition ^a	Net AUC ^b	TE ₂₅ ^b
		X	Y	Z				
5a		N	C	C		ND	23.51 ± 0.79	0.52 ± 0.02
5b		C	N	C		ND	22.93 ± 0.61	0.51 ± 0.01
5c		C	C	N		ND	22.51 ± 0.34	0.50 ± 0.01

실시예 2-3. 국소 뇌허혈증 실험 모델

상기 실시예에서 취득한 시료들의 국소 뇌허혈증 실험에서의 효과를 확인하기 위하여 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다 (Belayev L, et al., Stroke, 27:1616-1622, 1996; discussion 1623).

(1) 국소 뇌허혈증 실험 모델

랫트를 마스크를 이용하여 N₂O 및 O₂ (70:30v/v) 혼합물중 3.0% 이소플루란(isoflurane)으로 시작하여 2% 이소플루란을 유지시켜 마취하였다. 전체 실험 기간 동안 마취에서 충분하게 회복되기까지 수술 후 기간까지 체온은 직장용 온도계 및 온열 패드를 이용하여 37° C ± 0.3° C으로 조절 및 유지시켰다. 국소 뇌 허혈증은 우측 혈관 내 MCA으로 유도하였다. 요약하면, 3-0 heat-blunted 단섬유성 나일론 봉합사(monofilament nylon suture; Ethicon, Johnson-Johnson, Brussels, Belgium)를 MCA 소공을 폐색시키고자 우측 외부 경동맥 절개 부분 내강에 삽입하고 내측 경동맥으로 17.5 mm로 진입시켰다. 상기 봉합을 동물 회복하도록 1시간 반 후에 제거하였다. 수술-대조군을 MCAO를 제외하고 동일한 수술법으로 수행하였다. 생리학적인 수치는 MCAO 15분 전 및 재관류 15분 후에 측정하고 평균 혈압은 혈압기 (MicroMed, Louisville, KY)로 5분간 측정하였다. 혈중pH, PaO₂, PaCO₂ 및 혈당 수치는 분석기(Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA)로 측정하였다. DMSO로 용해시키고 10% 클레모포(cremophore) 및 멸균 식염수로 희석한 (5%) 시료(3f 유도체들)는 MCAO 유도후 2시간부터 래트에 복강내로 투여하였다(100 mg/kg).

(2) 경색 부피의 측정

재관류후 래트를 클로랄 히드레이트(3.5% chloral hydrate, 5 ml/kg, 복강주사)로 마취시킨 후에, 경추탈골시켰다. 매트릭스(rat brain matrix, Ted Pella, Redding, CA)를 이용하여 절단한 뇌 동맥 절편 (2 mm)을 시약으로 (2% 트리페닐테트라졸리움 염산, 시그마-알드리히, St. Louis, MO) 30분간 37°C에서 염색하고 1일간 0.1 M 인산완충액 (PB)중 었다. 4% 파라포름알데히드 (pH 7.4)로 고정하고 연속적으로 2일간 30% sucrose at 4°C에서 30% 수크로스(sucrose)를 함유한 PB에서 동결보호시켰다. 브레그마의 +4mm(전방) 및-6mm(후방) 사이의 경색 절단부

분프로그램(OPTIMAS5.1image analysis program, BioScanInc.Edmonds,WA)으로 측정하였다. 뇌경색 크기는 경색 영역 외부 둘레로 수동으로 측정하였다. 전체 경색 부피는 문헌(Yang Y et al., J Neurosci Methods, 84:9-16, 1998; Swanson RA et al., J Cereb Blood Flow Metab, 10:290-293, 1990)에 개시된 바대로 하기 수학적 5에 따라 뇌부종으로 보정하여 계산하였다. 뇌부종은 하기 수학적 6과 같이 동측/반측성 뇌반구 영역 (ipsilateral(V_1)/contralateral hemisphere area(V_c))의 백분율 증가율로 계산한다. 모두 이중맹검법을 측정하였다.

수학적 5

$$\text{전체 뇌경색 부피(mm}^3\text{)} = \text{직접측정법에 의한 동측성 부피(Ivd)} \times \left[\frac{(\text{반측성 부피}(V_c))}{(\text{반측성 부피}(V_c))} \right]$$

수학적 6

$$\text{부종 부피(edema volume)(\%)} = \left[\frac{(\text{동측성 부피}(V_1) - \text{반측성 부피}(V_c))}{\text{반측성 부피}(V_c)} \right] \times 100$$

이후에 조직을 냉동시키고 절단기(Leica 3050; Leica, Nussloch, Germany)로 10 또는 30 mm 경동맥 절편으로 절단하고 -20° C에서 저장하였다.

(3) 신경학적 결손의 측정

신경학적 결손은 허혈후 24시간 후에 측정하며, 문헌 (Stroke, 17, 472-476, 1986)에 개시된 대로, 4점 스케일로 측정한다 (0: 신경학적 결손 없음, 1: 앞발을 구부림, 2: 앞발 구부림 및 측면을 미는 힘에 대한 감소된 저항성, 회전하지 않음, 3: 2와 같으나 회전함).

(4) 뇌조직 면역조직학적 염색

상기한 방법으로 준비한 뇌조직 절편을 비특이적 항체결합을 억제시키기 위해 5% 혈청이 함유된 완충액으로 1 시간동안 상온에서 처리한다. 적정한 농도로 희석한 1차 항체 (MPO 항체 및 ED-1-항체, 각각 1:100; Nitrotyrosine 항체, 1:50; IL-1a, IL-1b, TNF- α 항체 각각 1:100)를 가해 4° C에서 하룻밤동안 염색한다. 결합되지 않은 1차 항체를 세척으로 제거한 후 형광표지자가 중합된 2차 항체로 상온에서 1시간동안 염색한다. 결합되지 않은 2차 항체를 세척으로 제거한 후 Hoechst 33258 염색액으로 20분간 핵을 염색하고 세척하여 유리 슬라이드에 장착한 후 공초점 형광 현미경 (Zeiss LSM510; Zeiss, Oberkochen, 독일)을 사용하여 관찰하였다.

(5) 혈-뇌 장벽 투과성 실험

염색액 (에반스 블루 염색액, 2%)은 정맥내 주사 시 혈청 내 알부민에 즉시 결합하여 정상 혈뇌장벽을 투과할 수 없는 고분자 물질로 변환되나, 뇌허혈증을 유도한 쥐 뇌조직에서는 혈-뇌 장벽이 손상되어 에반스 블루의 투과성이 증가되어 염색량이 증가된다. 상기한 방법대로 국소 뇌허혈증을 유발한 쥐를 200 ml의 생리식염수로 심장관류 시킨다. 뇌조직을 적출하여 무게를 잰 후 시약 (트리클로로초산, 60%)에 담가 4° C에서 24시간 처리한다. 조직을 분쇄한 후 10,000rpm에서 15분간 원심분리시켜 분리된 상등액을 취하여 뇌조직내 잔존한 에반스 블루 염색액의 흡광도를 610 nm에서 측정하여 정량하고 그래프 조직당 염색액 량으로 산출한다.

(6) 장기 생존률 실험

[0331] 상기한 방법대로 국소뇌허혈증을 유발한 쥐를 수술 전과 동일한 조건에서 수술 후 3주에 걸쳐 생존률 및 신경학적 결손을 측정한다.

[0332] (7) 색전성 허혈 뇌졸중 동물 모델

[0333] 쥐(몸무게 270-300g 사이)를 70% N₂O와 30% O₂ (v/v) 혼합가스에 혼합된 3% isoflurane가스를 사용하여 흡입마취시킨 후 3% isoflurane을 이용하여 유지한다. 직장 온도계를 삽입하고, 이와 연결된 자동 히팅 패드를 사용하여 수술기간동안 쥐의 체온을 37.0?37.9° C로 유지시킨다. 목에 정중선을 절개한 후 우측 온목동맥 (common carotid artery: CCA)과 우측 바깥목동맥 (external carotid artery: ECA) 과 우측 내경동맥 (internal carotid artery: ICA)을 분리하여 바깥목동맥과 온목동맥을 묶는다. 굵은 미세혈관 클립을 사용하여 내경동맥을 일시적으로 조인다. 외경동맥과 내경동맥의 분지가 시작되는 부분을 작게 절개하여 혈관주입이 용이하도록 주입구가 외경 0.3 mm로 줄인 외경 0.58 mm의 PE-50 카테터를 이용하여 생리식염수가 담긴 100 ul 해밀톤 주사기로 35 mm 색전을 내경동맥내로 주입한다. 미세혈관 클립을 제거하고, 카테터를 조심스럽게 내경동맥 내로 16-17 mm 까지 전진시켜 중뇌대동맥의 시작점에서 약 2 mm까지 이동시킨다. 카테터의 색전을 내경동맥으로 주입한다 (10 ul). 색전 주입 5분 후, 카테터를 제거한다. 내경동맥 분지점에서 묶어주고, 절개부위를 봉합한후 쥐가 마취에서 깨도록 둔다. 실험에 사용될 색전은 도너 쥐에서 취한 대뇌동맥혈을 신속히 PE-50 튜브에 주입하여 상온에서 2시간, 4° C에서 22시간 방치하여 혈전을 생성시킨다. 실험전에 튜브를 잘라 생리식염수를 담은 23G 주사바늘이 부착된 1ml 주사기를 사용하여 PE-10 튜브를 통해 변형된 PE-50 카테터로 옮긴다.

[0334] 상기 실험 결과, 일시적 허혈 유도 래트모델 시험에서, 시료(3f, 50 mg/kg)의 허혈 후 처치(Post-ischemic Treatment; 복강주사; 뇌경색후 2시간 및 7시간에 총 2회 투여시)로 허혈성 손상, 뇌부종 및 신경학적 결손을 유의적으로 감소시킴을 확인하였다(도 4). 또한, 시료를 투여한 쥐에서 얻은 뇌조직 절편에서의 니트로타이로신에 대한 면역조직화학적 염색을 통해 조직 내 항산화활성을 측정한 결과 시료투여군에서 뇌조직내 항산화 활성이 유의적으로 증가되었음을 확인하였다 (도 5).

[0335] 한편, 면역학적 염색을 통해 뇌경색 부위 및 반음영 부위로의 염증성 세포의 침윤을 관찰한 결과, MPO 항체에 의해 염색되는 중성구/단핵구와 ED-1 항체로 염색되는 활성화된 소교세포/대식세포의 이주가 유의적으로 억제됨을 확인하였다 (도 6). 뿐 만 아니라, IL-1 alpha, IL-1 beta, TNF-alpha와 같이 허혈성 손상에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 사이토카인의 조직 내 발현량이 시료투여군에서 유의적으로 감소되었음을 확인하였다 (도 7). 또한 허혈성 손상에 의해 증가된 혈-뇌장벽 투과성도 유의적으로 감소시킴을 확인하였다 (도 8). 일시적 허혈을 유도한 쥐 모델에 시료를 투약한 후 3주간 장기생존률과 신경학적 결손 회복률에 미치는 영향을 관찰한 결과, 시료가 투여한 쥐의 장기생존률 및 신경학적 결손 회복률이 유의적으로 증진됨을 확인하였다 (도 9). 허혈성 뇌졸중의 경우 약물에 의해 출혈이 증가되는 경우 (예, tPA)가 종종 있으며 이는 임상적으로 환자의 부작용(예, 사망이나 예후의 악화)을 증가시킬 수 있으므로 주의를 요한다. 그러나, 본 시료는 자가혈액 주입으로 색전성 뇌졸중을 유도한 체내 동물모델에서 뇌손상크기에 유의적인 영향을 주지 않아 이러한 부작용 가능성이 적을 것으로 보인다 (도 10).

[0336] 하기에 본 발명의 화합물을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0337] 제제예 1. 산제의 제조

[0338]	화합물 3f	200 mg
[0339]	유당	100 mg
[0340]	탈크	10 mg
[0341]	상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.	

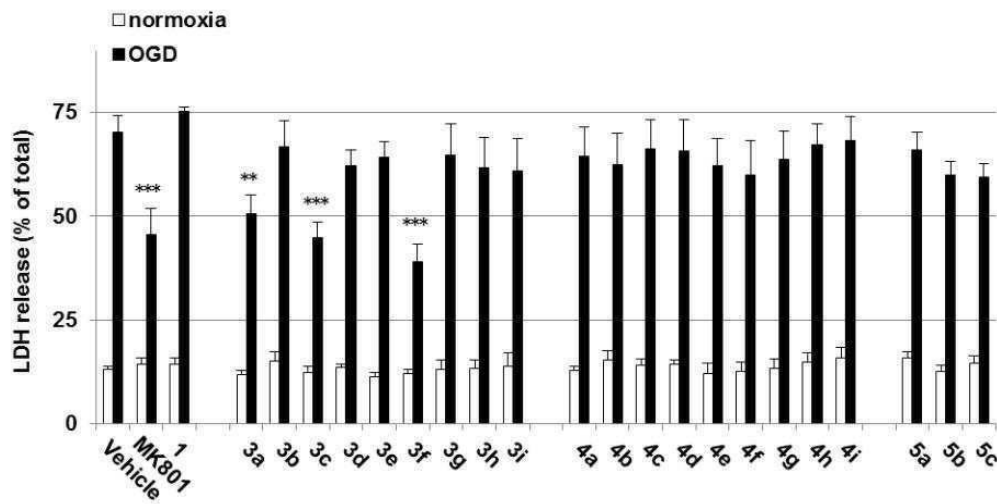
[0342] 제제예 2. 정제의 제조

[0343]	화합물 3c	200 mg
[0344]	옥수수전분	100 mg
[0345]	유당	100 mg
[0346]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0347]	상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.	
[0348]	제제예 3. 캡셀제의 제조	
[0349]	RW	200 mg
[0350]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0351]	락토오스	14.8 mg
[0352]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0353]	통상의 캡셀제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡셀제를 제조한다.	
[0354]	제제예 4. 주사제의 제조	
[0355]	화합물 4e	200 mg
[0356]	*만니톨	180 mg
[0357]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0358]	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	26 mg
[0359]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0360]	제제예 5. 액제의 제조	
[0361]	화합물 5a	200 mg
[0362]	이성화당	10 g
[0363]	만니톨	5 g
[0364]	정제수	적량
[0365]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0366]	제제예 6. 건강 식품의 제조	
[0367]	화합물 3a	1000 mg
[0368]	비타민 혼합물	적량
[0369]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0370]	비타민 E	1.0 mg
[0371]	비타민 B1	0.13 mg

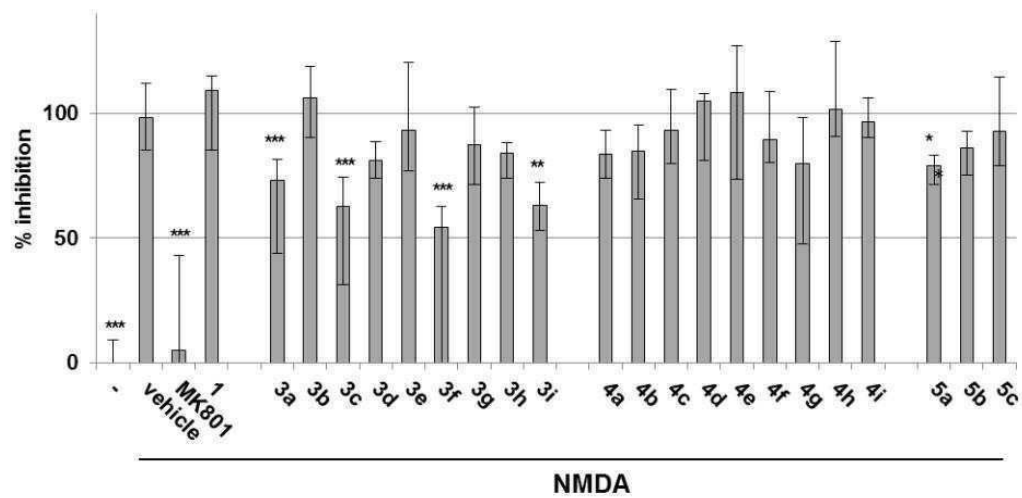
[0372]	비타민 B2	0.15 mg
[0373]	비타민 B6	0.5 mg
[0374]	비타민 B12	0.2 μ g
[0375]	비타민 C	10 mg
[0376]	비오틴	10 μ g
[0377]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0378]	엽산	50 μ g
[0379]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0380]	무기질 혼합물	적량
[0381]	황산제1철	1.75 mg
[0382]	산화아연	0.82 mg
[0383]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0384]	제1인산칼륨	15 mg
[0385]	제2인산칼슘	55 mg
[0386]	구연산칼륨	90 mg
[0387]	탄산칼슘	100 mg
[0388]	염화마그네슘	24.8 mg
[0389]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0390]	제제예 7. 건강 음료의 제조	
[0391]	화합물 3f	1000 mg
[0392]	구연산	1000 mg
[0393]	올리고당	100 g
[0394]	매실농축액	2 g
[0395]	타우린	1 g
[0396]	정제수를 가하여	전체 900 ml
[0397]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0398]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시할 수 있다.	

도면

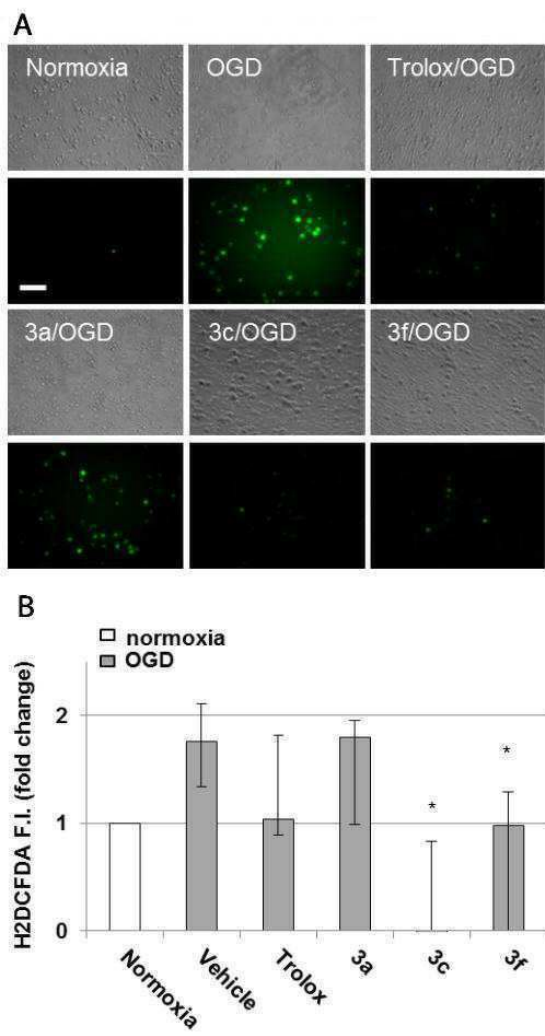
도면1



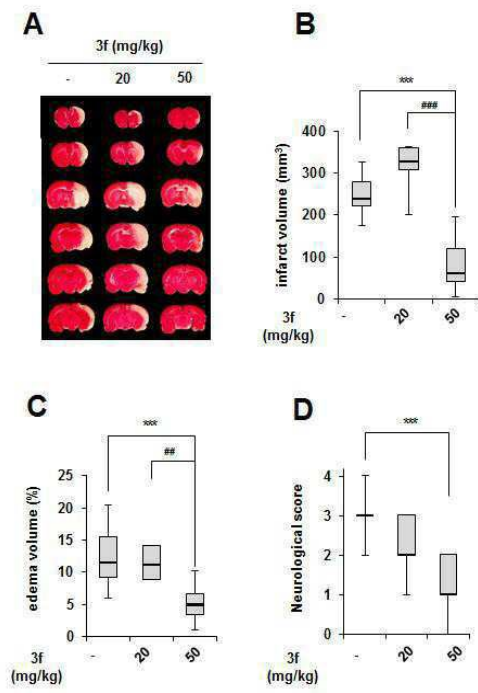
도면2



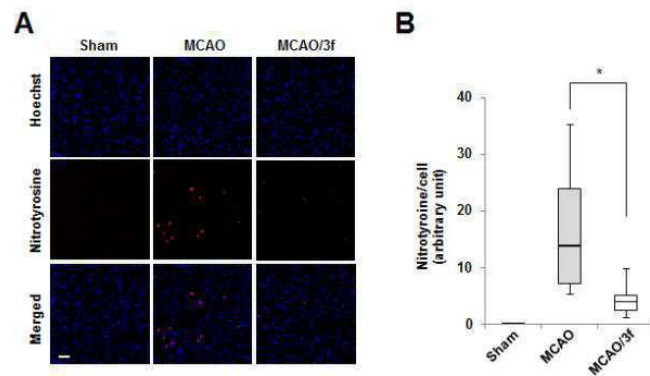
도면3



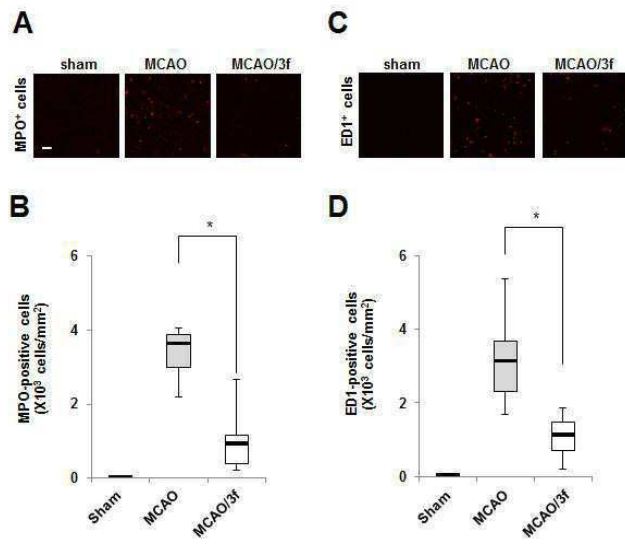
도면4



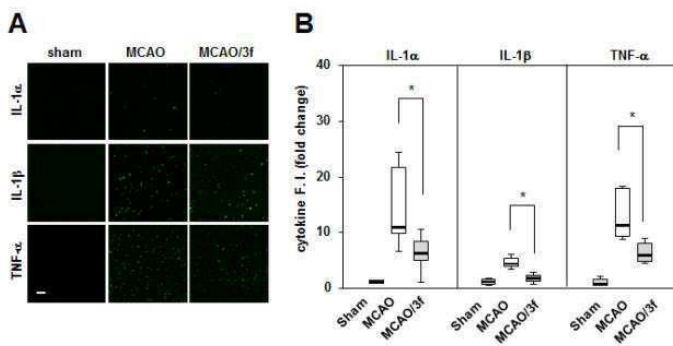
도면5



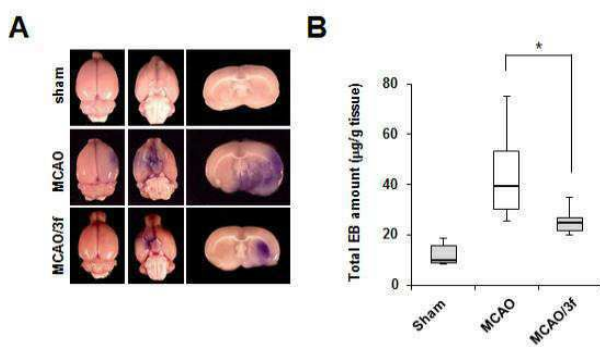
도면6



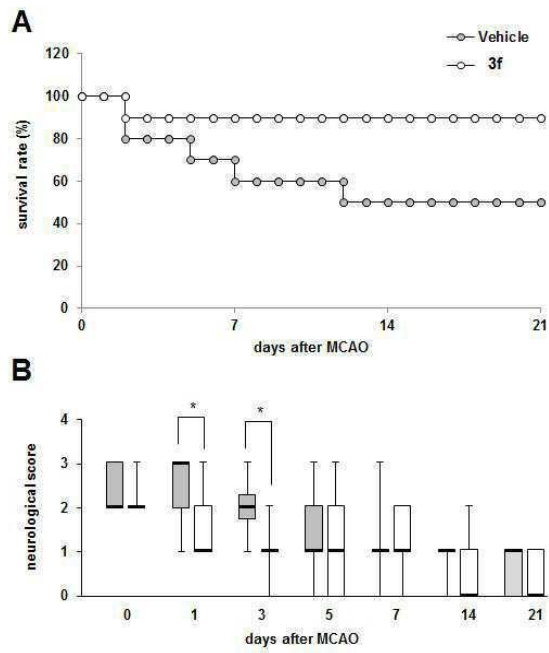
도면7



도면8



도면9



도면10

