(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 5 월 23 일 (23.05.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/098699 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/357 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/216 (2006.01) *A61K 31/215* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/013990

(22) 국제출원일: 2018 년 11 월 15 일 (15.11.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0152487 2017 년 11 월 15 일 (15.11.2017) KR
10-2017-0153861 2017 년 11 월 17 일 (17.11.2017) KR

(71) 출원인: 한국생명공학연구원 (**KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY**) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125(어은동), Daejeon (KR).

(72) 발명자: 김원곤 (**KIM, Won Gon**); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 한백수 (**HAN, Baek Soo**); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 변정수 (**BYUN, Jeong Su**); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 응옌반민 (**NGUYEN, Van Minh**); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 최하영 (**CHOI, Ha Young**); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인 주원 (**B&IP-JOOWON PATENT AND LAW FIRM**); 06050 서울시 강남구 언주로 711, 건설회관 9층 (논현동), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

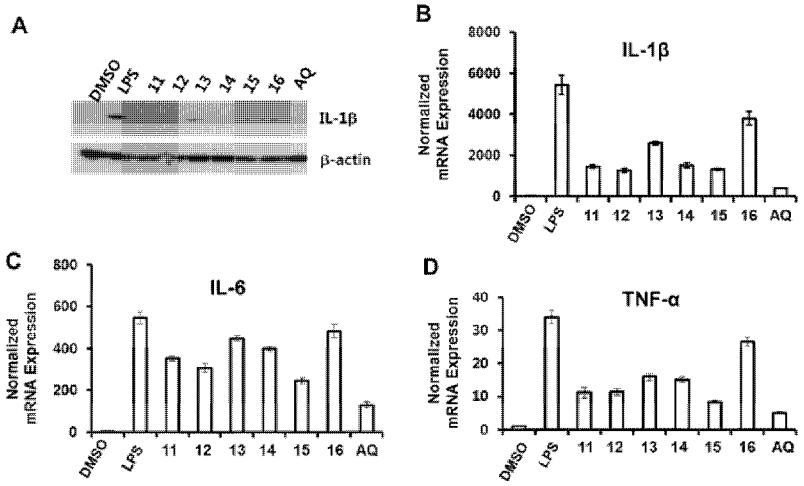
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) **Title:** COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING NEURODEGENERATIVE DISEASES, CONTAINING DITERPENE-BASED COMPOUND

(54) **발명의 명칭:** 다이터펜계 화합물을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물



(57) **Abstract:** The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating neurodegenerative diseases, containing a diterpene-based compound or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Specifically, a diterpene-based compound of the present invention activates a Nurr1 protein and inhibits an inflammatory response, thereby enabling the prevention or treatment of neurodegenerative diseases caused by the inhibition of Nurr1 protein activity.

(57) **요약서:** 본 발명은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 다이터펜계 화합물은 Nurr1 단백질을 활성화시키고, 염증반응을 억제함으로써 Nurr1 단백질의 활성 억제로 인해 유발되는 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

WO 2019/098699 A1

명세서

발명의 명칭: 다이터펜계 화합물을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[2] 또한, 본 발명은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[3] 천연물로부터 분리되는 천연 생리활성물질의 다양한 생체조절기능이 알려지면서, 천연 생리활성물질을 이용한 신약 개발, 건강기능식품 등의 분야에서의 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나, 천연물에는 매우 다양한 종류의 생리활성물질이 포함되어 있는데, 각각의 물질마다 물리적, 화학적 성질이 상이하여 동일한 천연물을 대상으로 추출하더라도 추출 용매의 종류에 따라 분리되는 생리활성물질의 종류가 상이하다. 또한, 동일한 천연물에서 분리된 생리활성물질이라고 하더라도 종류에 따라 나타내는 활성 및 그 효과가 상이한 특성이 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서, 최근에는 동일한 천연물을 대상으로 추출 용매를 달리하여 기존에 알려지지 않은 새로운 갖는 생리활성물질을 분리하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[4] 신경퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)은 신경세포가 퇴화하고, 기능을 잃고, 그리고 종종 사멸하는 경우의 증상들과 관련된다. 신경퇴행성 질환을 가진 환자들은 인지(cognitive) 또는 운동(motor) 능력에 있어서 극심한 퇴화를 겪을 수 있고, 이들 질환은 주로 진행성이기 때문에 결과적으로 그들의 삶의 질 및 삶에 대한 기대는 현저히 감소될 수 있다.

[5] 이들 질환은 파킨슨병(Parkinson's Disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전두측두엽 치매(Frontotemporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP) 및 다른 질병들을 포함한다.

[6] 한편, 상당수의 신경퇴행성 질환은 Nurr1 단백질과 상당한 관련성이 있다. 구체적으로, 미국공개특허 제2009-0226401호에서는 신경퇴행성 질환의 한 종류인 파킨슨 병은 도파민 신경세포와 관련된 질환임을 개시하면서, Nurr1이 활성화되는 경우 파킨슨 병의 치료 효과를 나타냄을 개시하고 있다. 또한, 국제특허공개공고 WO2010-04221호에서는 Nurr1이 도파민을 활성화시키는데 필수적인 역할을 하며, Nurr1을 활성화하고 도파민을 활성화하는 신경전달을 조절하여 파킨슨 병을 치료하는 방법을 개시하고 있다.

[7] 상기 Nurr1의 기능장애에 의하여 유발되는 대표적인 신경퇴행성 질환은 파킨슨병이다. 파킨슨병은 떨림, 경직, 운동 완만 및 보행 이상증 등을 주된 증상으로 하는 현대 고령화 사회에 있어서 중요한 질환 중 하나로, 뇌의 흑색질(substantia nigra)과 선조체(corpus striatum) 부위에서 도파민(dopamin)이라는 신경전달물질이 부족하게 되어 생기는 만성질환이다.

[8] 이와 같은 파킨슨병의 치료를 위한 약물로는 엘-도파(L-dopa) 제제, 도파민 수용체 작용제, 항콜린 약제, 엘데프릴(Eldepryl) 등이 알려져 있으며, 이들 약물들 대부분은 원인적인 치료가 아니라 증상을 조절하는 역할을 하는 것이므로 지속적인 약물의 복용을 필요로 한다. 지금까지 파킨슨병 치료제로 많은 약들이 만들어져 상용화되고 있으나, 파킨슨병을 완전히 치료하기 위한 본질적인 치료제는 아직 개발되지 못하고 있는 실정이다.

[9] 이에, 본 발명자는 팥꽃나무(Daphne genkwa)의 꽃, 줄기 및 뿌리로부터 다양한 추출 및 분획 용매를 사용하여 수득한 화합물들이 Nurr1을 활성화시키고, 염증 반응을 억제하는 효과를 확인하여, Nurr1 기능장애에 의해 유발되는 파킨슨병을 비롯한 다양한 신경퇴행성 질환에 대한 치료 효과가 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[10] 본 발명은 미국공개특허 제2009-0226401호 및 국제특허공개공고 WO2010-04221호의 발명 내용을 참고하였다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[13] 또한, 본 발명은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[14] 본 발명의 하나의 양태로서 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 다이터펜계 화합물은 하기 화학식 1 내지 16을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

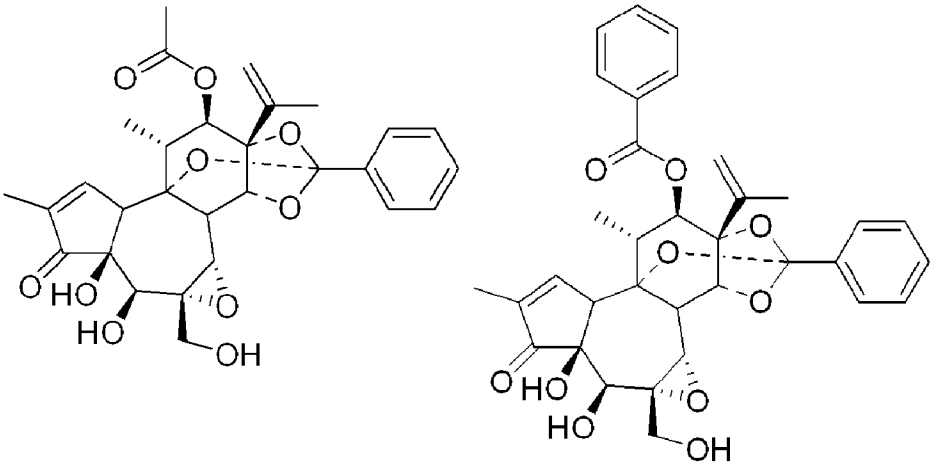
[15] 또는 본 발명은 하기 화학식 A로 표시되는 화합물을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다

[16] 본 발명의 다이터펜계 화합물은 하기 화학식 1 내지 16으로 표시되는 화합물,

구체적으로 yuanhuafine (화학식 1), genkwadaphnine (화학식 2), genkwanine H (화학식 3), genkwanine M (화학식 4), genkwanin K (화학식 5), yuanhuapine (화학식 6), genkwanin A (화학식 7), orthobenzoate 2 (화학식 8), 1, 2α-dihydrodaphnetoxin (화학식 9) 또는 genkwanin I (화학식 10), acutilonine F (화학식 11), wikstroemia factor M1 (화학식 12), prostratin Q (화학식 13), yuanhuadine (화학식 14), yuanhuatine (화학식 15) 또는 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate (화학식 16)일 수 있다.

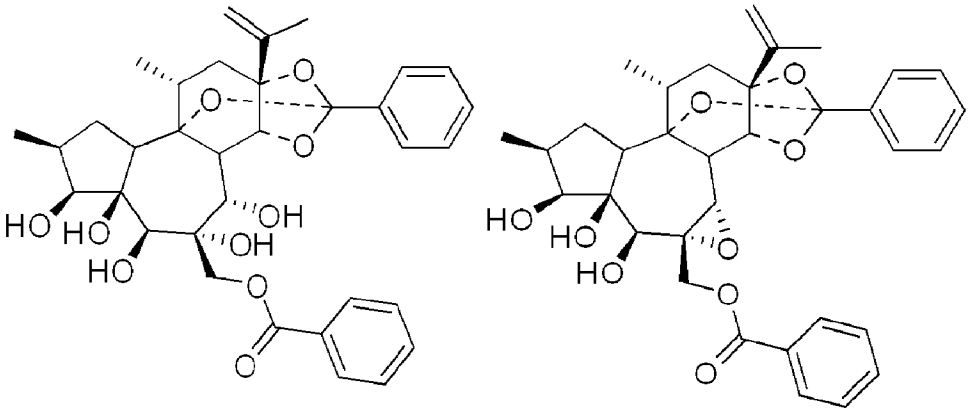
[17] [화학식 1] [화학식 2]

[18]



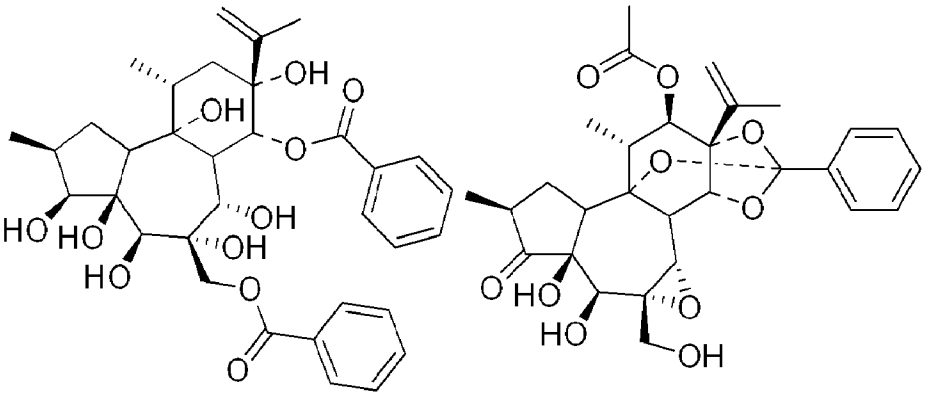
[19] [화학식 3] [화학식 4]

[20]



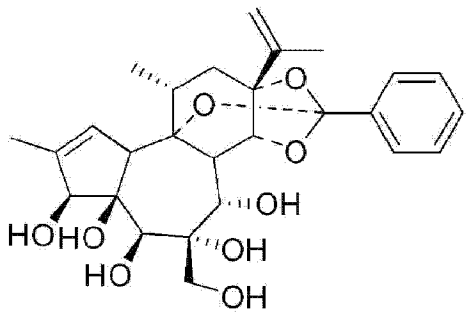
[21] [화학식 5] [화학식 6]

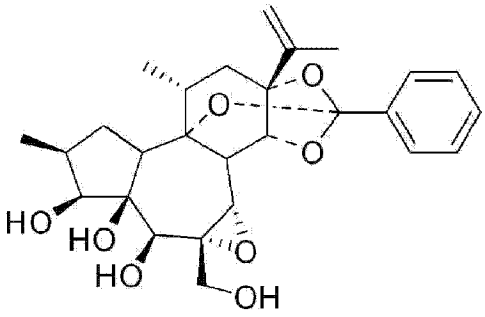
[22]



[23] [화학식 7] [화학식 8]

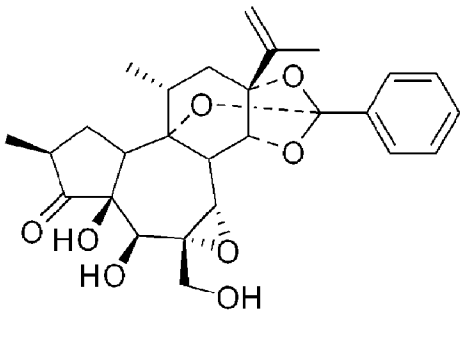
[24]

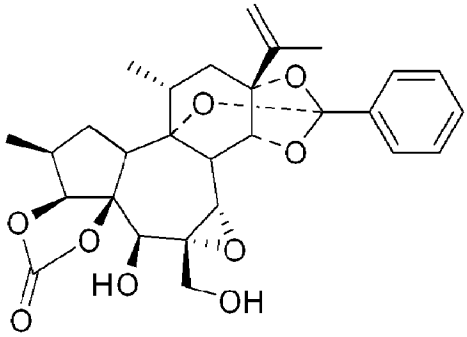




[25] [화학식 9] [화학식 10]

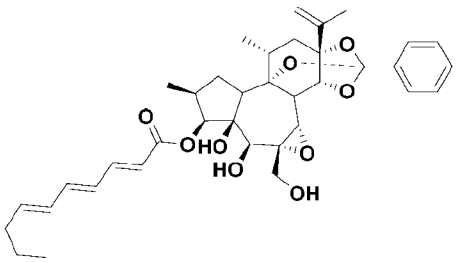
[26]

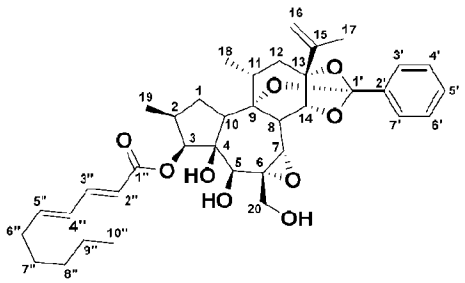




[27] [화학식 11] [화학식 12]

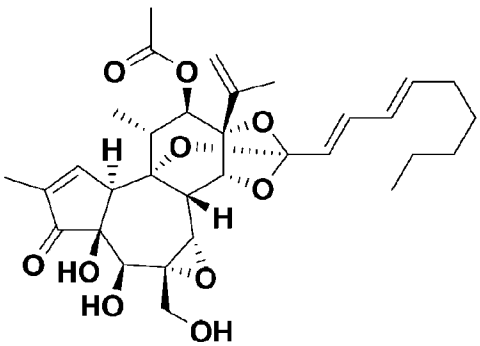
[28]

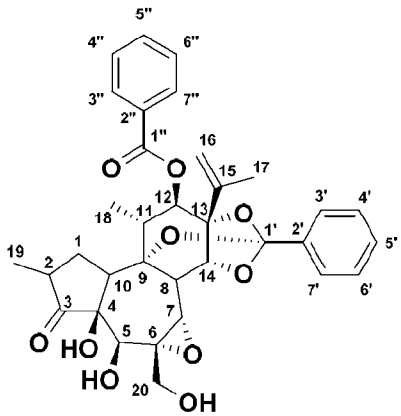




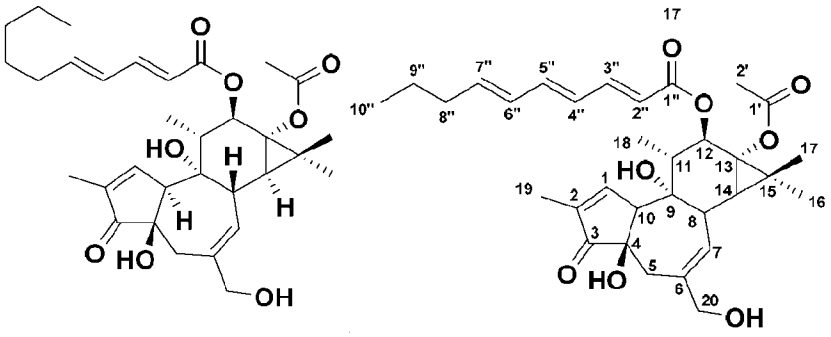
[29] [화학식 13] [화학식 14]

[30]





[31] [화학식 15] [화학식 16]

[32] 

[33] 상기 화학식 1의 화합물인 yuanhuafine은 (2S,3aR,3cS,4aR,5S,5aS,8bR,9R,10R,10aS)-5,5a-dihydroxy-4a-(hydroxymethyl)-7,9-dimethyl-6-oxo-2-phenyl-10a-(prop-1-en-2-yl)-3a,3b,3c,4a,5,5a,8a,9,10,10a-decahydro-6H-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-10-yl acetate, 화학식 2의 화합물인 genkwadaphnine은 (2S,3aR,3cS,4aR,5S,5aS,8bR,9R,10R,10aS)-5,5a-dihydroxy-4a-(hydroxymethyl)-7,9-dimethyl-6-oxo-2-phenyl-10a-(prop-1-en-2-yl)-3a,3b,3c,4a,5,5a,8a,9,10,10a-decahydro-6H-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-10-yl benzoate, 화학식 3의 화합물인 genkwanine H는 ((2S,3aR,4S,5S,6S,6aR,7S,8S,9bR,10R,11aR)-4,5,6,6a,7-pentahydroxy-8,10-dimethyl-2-phenyl-11a-(prop-1-en-2-yl)dodecahydro-5H-2,9b-epoxyazuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-5-yl)methyl benzoate, 화학식 4의 화합물인 genkwanine M은 ((2S,3aR,3cS,4aR,5S,5aR,6S,7S,8bR,9R,10aR)-5,5a,6-trihydroxy-7,9-dimethyl-2-phenyl-10a-(prop-1-en-2-yl)dodecahydro-4aH-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-4a-yl)methyl benzoate, 화학식 5의 화합물인 genkwanin K는 ((2S,3S,3aR,4S,5S,6S,7R,8R,10R,10aR)-7-(benzoyloxy)-3,3a,4,5,6,8,10a-heptahydroxy-2,10-dimethyl-8-(prop-1-en-2-yl)tetradecahydrobenzo[e]azulen-5-yl)methyl benzoate, 화학식 6의 화합물인 yuanhuapine은 (2S,3aR,3cS,4aR,5S,5aS,7S,8bR,9R,10R,10aS)-5,5a-dihydroxy-4a-(hydroxymethyl)-7,9-dimethyl-6-oxo-2-phenyl-10a-(prop-1-en-2-yl)dodecahydro-6H-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-10-yl acetate, 화학식 7의 화합물인 genkwanin A는 (2S,3aR,4S,5S,6S,6aR,7S,9bR,10R,11aR)-5-(hydroxymethyl)-8,10-dimethyl-2-phenyl-11a-(prop-1-en-2-yl)-3a,3b,4,5,6,7,9a,10,11,11a-decahydro-6aH-2,9b-epoxyazuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxole-4,5,6,6a,7-pentaol, 화학식 8의 화합물인 orthobenzoate 2는 (2S,3aR,3cS,4aR,5S,5aR,6S,7S,8bR,9R,10aR)-4a-(hydroxymethyl)-7,9-dimethyl-2-phenyl-10a-(prop-1-en-2-yl)dodecahydro-5aH-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxole-5,5a,6-triol 및 화학식 9의 화합물인 1,

2α-dihydrodaphnetoxin은 (2S,3aR,3cS,4aR,5S,5aS,7S,8bR,9R,10aR)-5,5a-dihydroxy-4a-(hydroxymethyl)-7,9-dimethyl-2-phenyl-10a-(prop-1-en-2-yl)dodecahydro-6H-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-6-one의 IUPAC name으로 명명된다.

[34]

[35] 상기 화학식 11의 화합물인 acutilonine F는 (2S,3aR,3cS,4aR,5S,5aS,6S,7S,8bR,9R,10aR)-5,5a-dihydroxy-4a-(hydroxymethyl)-7,9-dimethyl-2-phenyl-10a-(prop-1-en-2-yl)dodecahydro-6H-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-6-yl (2E,4E,6E)-deca-2,4,6-trienoate, 화학식 12의 화합물인 wikstroemia factor M1은 (2S,3aR,3cS,4aR,5S,5aS,6S,7S,8bR,9R,10aR)-5,5a-dihydroxy-4a-(hydroxymethyl)-7,9-dimethyl-2-phenyl-10a-(prop-1-en-2-yl)dodecahydro-6H-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-6-yl (2E,4E)-deca-2,4-dienoate, 화학식 13의 화합물인 prostratin Q는 (2S,3aR,3bS,3cS,4aR,5S,5aS,8aR,8bR,9R,10R,10aS)-5,5a-dihydroxy-4a-(hydroxymethyl)-7,9-dimethyl-2-((1E,3E)-nona-1,3-dien-1-yl)-6-oxo-10a-(prop-1-en-2-yl)-3a,3b,3c,4a,5,5a,8a,9,10,10a-decahydro-6H-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-10-yl acetate, 화학식 14의 화합물인 yuanhuadine은 (2S,3aR,3cS,4aR,5S,5aS,8bR,9R,10R,10aS)-5,5a-dihydroxy-4a-(hydroxymethyl)-7,9-dimethyl-6-oxo-2-phenyl-10a-(prop-1-en-2-yl)dodecahydro-6H-2,8b-epoxyoxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxol-10-yl benzoate , 화학식 15의 화합물인 yuanhuatine은 (1aR,1bS,4aR,7aS,7bS,8R,9R,9aS)-9a-acetoxy-4a,7b-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-1,1,6,8-tetramethyl-5-oxo-1a,1b,4,4a,5,7a,7b,8,9,9a-decahydro-1H-cyclopropa[3,4]benzo[1,2-e]azulen-9-yl (2E,4E)-deca-2,4-dienoate 및 화학식 16의 화합물인 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate는 (4aR,7bS,8R,9R,9aS)-9a-acetoxy-4a,7b-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-1,1,6,8-tetramethyl-5-oxo-1a,1b,4,4a,5,7a,7b,8,9,9a-decahydro-1H-cyclopropa[3,4]benzo[1,2-e]azulen-9-yl (2E,4E,6E)-deca-2,4,6-trienoate의 IUPAC name으로 명명된다.

[36] 상기 다이터펜계 화합물은 당업자에게 공지된 방법으로 제조될 수 있고, 상업적으로 시판되는 화합물을 구입하거나 합성하여 제조할 수 있으며, 당업계에 공지된 식물로부터 극성 또는 비극성 용매를 사용하여 분리 정제할 수 있다. 구체적으로, 상기 화합물은 팥꽃나무로부터 추출 및 분리할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 화합물은 팥꽃나무 꽃, 줄기, 뿌리의 추출물에서 분리할 수 있다.

[37] 본 발명에서 사용되는 용어, "팥꽃나무(Daphne genkwa)"는 쌍떡잎식물 도금양목 팥꽃나무과의 낙엽관목을 의미한다. 조기꽃나무, 이팥나무라고도 하며, 주로 바닷가 근처에서 성장하는 특성을 갖는다.

[38] 본 발명의 팥꽃나무 추출물은 팥꽃나무의 꽃, 줄기 및 뿌리로부터 수득한 추출물을 의미한다. 구체적으로, 상기 추출물은 팥꽃나무의 꽃, 줄기 및/또는 뿌리를 물 또는 유기용매로 추출하여 수득한 추출물일 수 있고, 보다 구체적으로 물, C1 내지 C5의 저급 알킬알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 수득한 추출물일 수 있다. 상기 알킬알코올은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%의 알킬알코올일 수 있다.

[39] 본 발명의 일 실시예에 따른 팥꽃나무 추출물은 바람직하게는 80% 에탄올로 추출한 추출물이다.

[40] 상기 팥꽃나무 추출물은 추출물의 분획물일 수 있으며, 상기 분획물은 특정 용매를 사용하여 상기 팥꽃나무 추출물로부터 본 발명의 화합물을 분획하여 얻은 활성 분획물(fraction)을 의미한다.

[41] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 수득한 팥꽃나무 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 또는 증류수 등의 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 각 용매의 분획층을 분리하여 수득하고, 크로마토그래피 등의 당업계에 공지된 분리방법을 이용하여 본 발명의 화합물을 고순도로 분리 정제하여 분획물을 제조할 수 있다.

[42] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화학식 1 내지 16의 화합물을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있다.

[43] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 상기 화합물의 원하는 생물학적 및/또는 생리학적 활성을 보유하고 있고, 원하지 않는 독물학적 효과는 최소한으로 나타내는 모든 염을 의미한다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알콜(예, 글리콜 모노메틸 에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다. 이때, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 히드로브롬산, 인산, 질산, 황산, 주석산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 메탄 술폰산, p-톨루엔 술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 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, 히드로아이오딕산 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[44] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리

금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[45] 상기 화학식 1 내지 16의 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 거의 포함한다. 예를 들어 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[46] 본 발명의 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물은 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도로 제공될 수 있다. 구체적으로, 상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭 병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 및 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[47] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 화학식 1 내지 16의 화합물은 Nurr1 단백질의 활성도를 증가시키고(표 2 및 도 2), 신경세포에서의 산화질소의 생성을 억제함을 확인하였다(표 4). 구체적으로, 화학식 2 및 8의 화합물은 보다 우수한 Nurr1 단백질의 활성 증가 효과를 나타내고, 보다 구체적으로 화학식 2는 Nurr1 단백질의 활성 증가 효과 뿐만 아니라, 보다 우수한 산화질소 생성 억제 활성을 나타낸다.

[48] 또한 화학식 11 내지 16의 화합물은 Nurr1 단백질의 활성도를 증가시키고(표 3), 신경세포에서의 산화질소의 생성을 억제하며(표 5), 신경세포에서의 전염증성 사이토카인의 생성을 억제함을 확인하였다(도 1). 구체적으로, 화학식 13, 14 및 16의 화합물은 보다 우수한 Nurr1 단백질의 활성 증가 효과를 나타내고, 보다 구체적으로 화학식 14는 Nurr1 단백질의 활성 증가 효과 뿐만 아니라, 보다 우수한 산화질소 생성 억제 활성을 나타낸다.

[49] 따라서, 본 발명의 화학식 1 내지 16의 화합물을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상의 화합물, 또는 이의 염을 포함하는 약학적 조성물은 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있고, 상기 약학적 조성물에 포함되는 화합물은 화학식 1 내지 16의 화합물 중 어느 하나 이상의 화합물일 수

있다.

[50] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 치료하고자 하는 개개인 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위해 임상적으로 개입하는 것을 지칭하고, 이는 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행할 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발을 예방하고, 증상을 완화시키며, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키며, 질병 진행 속도를 감소시키며, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키며, 차도시키거나 예후를 개선시키는 것이 포함된다. 바람직하게 본 발명에서는 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물의 투여로 신경퇴행성 질환의 경과를 호전시키는 모든 행위를 포함한다. 또한, "예방"은 본 발명에 따른 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물의 투여로 상기 신경퇴행성 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[51] 본 발명의 약학적 조성물은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 것 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[52] 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[53] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충진제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.

[54] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약학적 조성물의 전체의 중량을 기준으로 0.01 중량% 내지 90.00 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.01 중량% 내지 90.00 중량%, 보다 바람직하게는 0.1 중량% 내지 70 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 중량% 내지 50중량%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 약학적 조성물의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.

[55] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.

[56] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

[57] 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕해제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.

[58] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.

[59] 본 발명의 약학적 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[60] 본 발명의 약학적 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 약학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.

[61] 본 발명의 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.

[62] 본 발명의 약학적 조성물을 연고, 크림, 도포용 파우더, 오일, 피부 외용제 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.

[63] 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[64] 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게

결정될 수 있다.

[65] 치료를 위한 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 비율로 질환을 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다.

[66] 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 약학적으로 유효한 양은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 대하여 0.01 ㎎/day/체중㎏ 내지 100 ㎎/day/체중㎏, 구체적으로 0.1 ㎎/day/체중㎏ 내지 10 ㎎/day/체중㎏이다.

[67] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한, 특별한 제한 없이 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.

[68] 본 발명의 약학적 조성물의 비경구 투여 방법으로는, 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[69] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 사용하여도 우수한 효과를 발휘할 수 있으나, 치료 효율을 증가시키기 위하여 추가적으로 방사선 요법, 화학 요법 등의 다양한 암 치료 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[70] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 Nurr1 기능 장애에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 다이터펜계 화합물은 상기 화학식 1 내지 16을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[71] 본 발명에서 "Nurr1(nuclear receptor related 1)"은 NR4A2(nuclear receptor subfamily [0037] 4, group A, member 2)라고도 알려져 있는 핵수용체 관련 1 단백질을 의미하며, 이는 사람의 NR4A2 유전자에 의해 암호화되는 것으로 알려져 있다. 또한 상당수의 신경퇴행성 질환에는 관련된 것으로 알려져 있다. 비록, 상기 Nurr1 단백질은 고아 핵 수용체(orphan nuclear receptor)로서, 아직까지는 상기 단백질에 대한 리간드가 규명되어 있지 않지만, 상기 Nurr1은 세포 내 전사인자의 핵 수용체 패밀리에 속하는 단백질로서, 뇌에서 도파민 시스템(dopaminergic system)을 유지하는 핵심적인 역할을 수행함이 규명되었다.

상기 Nurr1 기능 장애에 의해 유발되는 질환은 이에 제한되지 않으나 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP) 등의 신경퇴행성 질환과 도파민 기능장애로 유발되는 류마티스 관절염, 정신분열증, 조울증 등의 광범위한 염증성 질환을 포함한다.

[72] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로서, 상기 다이터펜계 화합물은 상기 화학식 1 내지 16을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[73] 상기 건강기능식품은 식품의 생체 조절 기능을 강조한 식품으로 물리적, 생화학적, 생물공학적인 방법을 이용하여 특정 목적에 작용 및 발현하도록 부가가치를 부여한 식품이다. 이러한 건강기능식품의 성분은 생체 방어와 신체 리듬의 조절, 질환의 방지 및 회복에 관계하는 신체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공하게 되며, 식품으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제, 감미료 또는 기능성 원료를 함유할 수 있다.

[74] 본 발명의 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 건강기능식품(또는 건강기능 음료 첨가물)으로 사용할 경우, 상기 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 화합물의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[75] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 점증제, pH 조절제, 안정화제, 보존제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능식품은 과일 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 조성물 전체 중량당 0.001 내지 50 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[76] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 화합물을 첨가할 수 있는 식품은 소세지, 육류, 빵, 초콜릿류, 스넥류, 캔디류, 과자류, 라면, 피자, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있다. 음료수로 제형화할 경우에 신규한 유산균 이외에 첨가되는 액체 성분으로는 이에 한정되지는 않으나, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예, 포도당, 과당 등),

디사카라이드(예, 말토오스, 수크로오스 등) 및 폴리사카라이드(예, 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당), 및 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당 알코올일 수 있다.

[77] 본 발명은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행성 질환의 치료 방법을 제공한다.

[78] 본 발명에서 개체는 신경퇴행성 질환을 보유하거나 또는 발병한, 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 인간을 제외한 개체일 수 있다. 본 발명의 약학 조성물을 개체에 투여함으로써, 신경퇴행성 질환의 치료에 우수한 효과를 보인다.

[79] 본 발명은 신경퇴행성 질환의 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[80] 본 발명은 신경퇴행성 질환의 치료에 사용하기 위한 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[81]

[82]

발명의 효과

[83] 본 발명의 다이터펜 화합물은 Nurr1 단백질 활성을 향상시키고, 신경세포에서의 염증반응을 억제하는 효과를 나타냄으로써, Nurr1 단백질의 활성 억제로 인해 유발되는 파킨슨병을 비롯한 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 효율적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[84] 도 1은 신경세포인 BV-2 세포에서 본 발명의 화합물 11 내지 16이 염증 관련 인자의 발현을 억제함을 확인한 도이다; 도 1A는 IL-1b의 발현을 억제함을 웨스턴 블롯팅을 통해 확인한 도이다. 도 1B는 IL-1b의 mRNA 발현을 억제함을 PCR을 통해 확인한 그래프이다. 도 1C는 IL-6의 mRNA 발현을 억제함을 PCR을 통해 확인한 그래프이다. 도 1D는 TNF-a의 mRNA 발현을 억제함을 PCR을 통해 확인한 그래프이다.

[85] 도 2는 본 발명의 화합물 1 내지 10의 Nurr-1 활성화 효과를 확인한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[86] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[87]

[88] **실시예 1-a: 팥꽃나무 추출물의 제조**

[89] 팥꽃나무(Daphne genkwa)의 건조된 꽃 4.47 kg을 40 L 80% 에탄올에 72시간

동안 침지하고, 여과하여 액상성분을 수득하였다. 상기 수득한 액상성분을 감압하에서 농축시킨 다음, 435 g의 팥꽃나무 꽃 추출물을 제조하였다.

[90] **실시예 1-b**

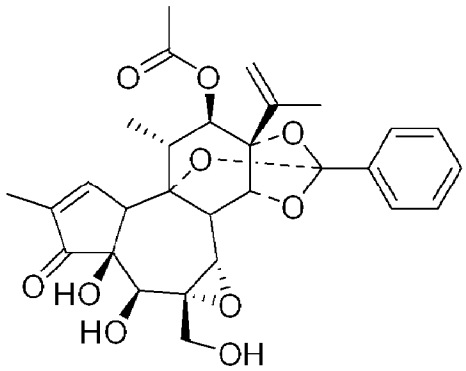
[91] 팥꽃나무(Daphne genkwa)의 줄기와 뿌리 4.47 kg을 세절한 다음, 12 L 80% 에탄올에 4시간 동안 침지하고, 여과하여 고형분과 1차 액상성분을 분리하였다. 상기 분리된 고형분을 다시 12 L 80% 에탄올에 4시간 동안 침지하고, 여과하여 2차 액상성분을 수득하였다. 상기 수득한 1차 액상성분과 2차 액상성분을 혼합하고, 상기 혼합물을 감압하에서 농축시킨 다음, 잔사를 동결건조하여 255.1 g의 팥꽃나무 추출물을 제조하였다.

[92] **실시예 2: 팥꽃나무 추출물로부터 다양한 용매에 의한 활성성분의 분리**

[93] 상기 실시예 1-a에서 수득한 팥꽃나무 꽃 추출물을 2 L의 증류수와 2 L의 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 각각 순차적으로 용매 분획하였다. 이중 클로로포름층을 감압농축하여 클로로포름 분획물 (17.6 g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 클로로포름과 메탄올 구배(gradient) 혼합용매(100:0, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1)로 용리시켜 총 3개의 분획 (Fr. C1, C2, C3)을 얻었다. 이중 Fr. C2 (4.5 g)을 메탄올과 물 구배(gradient) 혼합용매(60:40, 80:20, 100:0)조건으로 역상 컬럼 크로마토그래피를 (ODS silica gel chromatography)를 실시하여 5개의 소 분획물(sub-fraction) (Fr. C21, C22, C23, C24, C25)을 얻었다. Fr. C23 (300 mg)을 다시 클로로포름과 아세톤의 구배 혼합용매(99:1 - 95:5)조건으로 실리카겔(40-63 μm; 4 g flash column) MPLC를 실시하여 3개의 소 분획물(sub-fraction) (Fr. C231, C232, C233)를 얻었다. Fr. C233 (140 mg)을 최종적으로 유속 5 mL/분의 55% 아세토니트릴 용출액으로 ODS HPLC를 수행하여 yuanhuafine (25.5 mg, 화학식 1의 화합물)을 흰색 파우더 형태로 얻었다. 상기 화합물의 구조는 아래와 같은 NMR, MS, $[\alpha]^{20}_D$ 데이터를 근거로 구조를 동정하였다.

[94] [화학식 1] yuanhuafine

[95]



[96] $[\alpha]^{20}_D$ +29.3 (*c* 0.5, $CHCl_3$);

[97] ESI-MS, *m/z* 573.9 $[M+Na]^+$;

[98] ^{1}H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz): δ_H 7.68 (dd, J = 7.3, 1.8, 2H, H-3',

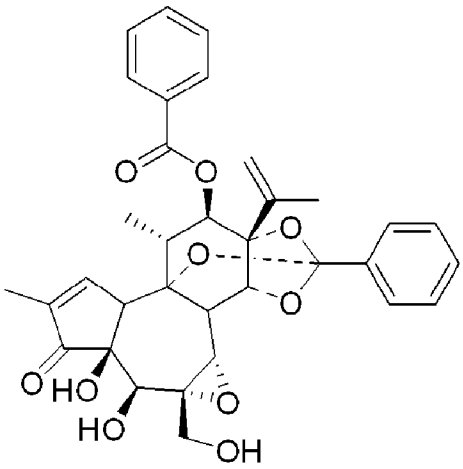
H-7'), 7.57 (s, 1H, H-1'), 7.41 - 7.37 (m, 3H, H-4', H-5', H-6'), 5.08 (br, 1H, H-12), 5.05 (s, 1H, H-16a), 5.02 (d, J = 2.4, 1H, H-16b), 4.98 (br, 1H, H-14), 4.14 (s, 1H, H-5), 4.05 (d, J = 12.3, 1H, H-20a), 3.96 (m, 1H, H-10), 3.65 (dd, J = 7.3, 4.9, 1H, H-20b), 3.59 (s, 1H, H-8), 2.54 (q, J = 7.3, 1H, H-11), 2.00 (s, 3H, H-2''), 1.86 (s, 3H, H-17), 1.76 (d, J = 1.1, 3H, H-19), 1.32 (d, J = 7.3, 3H, H-18);

[99] ^{13}C NMR values in ppm (CD_3OD, 101 Hz): δ_C 209.8 (C-3), 171.6 (C-1''), 160.0 (C-1), 145.0 (C-15), 138.3 (C-2), 137.2 (C-2'), 130.5 (C-5'), 128.9 (C-4', C-6'), 127.2 (C-3', C-7'), 119.1 (C-1'), 113.9 (C-16), 85.4 (C-13), 82.1 (C-14), 80.3 (C-9), 79.8 (C-12), 74.5 (C-4), 71.3 (C-5), 65.1 (C-20), 64.7 (C-7), 63.2 (C-6), 48.9 (C-10), 45.1 (C-11), 36.6 (C-8), 21.0 (C-2''), 19.1 (C-18), 18.7 (C-17), 10.0 (C-19).

[100] Fr. C24 (210 mg)를 다시 클로로포름과 메탄올 (1:1) 혼합용매로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 실시하고, 최종적으로 유속 5 mL/분의 65% 아세토니트릴 용출액으로 ODS HPLC를 수행하여 genkwadaphnine (25.0 mg, 화학식 2의 화합물) 을 흰색 파우더 형태로 얻었다. 상기 화합물의 구조는 아래와 같은 NMR, MS, $[\alpha]^{20}_D$ 데이터를 근거로 구조를 동정하였다.

[101] [화학식 2] genkwadaphnine

[102]



[103] $[\alpha]^{20}_D$ +56.7 (*c* 0.1, $CHCl_3$);

[104] ESI-MS, *m/z* 625.5 $[M+Na]^+$;

[105] ^{1}H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz); δ_H 7.98 (d, J = 7.5, 2H, H-3'', H-7''), 7.72 (m, 2H, H-3', H-7'), 7.61 (m, 1H, H-5''), 7.59 (s, 1H, H-1), 7.48 (t, J = 7.7, 2H, H-4'', H-6''), 7.40 (m, 3H, H-4', H-5', H-6'), 5.26 (br, 1H, H-12), 5.21 (d, J = 2.4, 1H, H-14), 5.13 (s, 1H, H-16a), 5.02 (s, 1H, H-16b), 4.13 (s, 1H, H-5), 4.06 (d, J = 12.3, 1H, H-20a), 3.99 (m, 1H, H-10), 3.76 (d, J = 2.3, 1H, H-8), 3.68 (s, 1H, H-7), 3.66 (d, J = 12.5, 1H, H-20b), 2.69 (q, J = 7.3, 1H, H-11), 1.90 (s, 3H, H-17), 1.75 (s, 3H, H-19), 1.42 (d, J = 7.3, 3H, H-18);

[106] ^{13}C NMR values in ppm (CD_3OD, 101 Hz): δ_C 209.8 (C-3), 166.9 (C-1''), 160.0 (C-1), 144.9 (C-15), 138.2 (C-2), 137.2 (C-2'), 134.5 (C-5''), 131.1 (C-2''), 130.7 (C-3'',

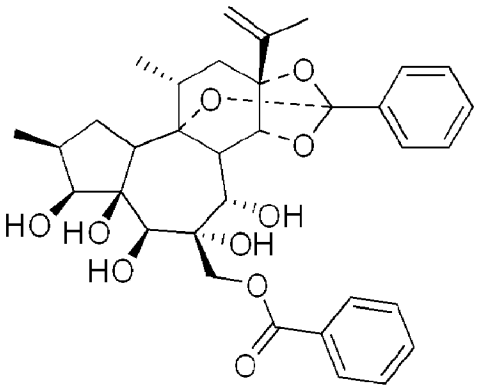
C-7''), 130.5 (C-5'), 129.7 (C-4'', C-6''), 128.9 (C-4', C-6'), 127.2 (C-3', C-7'), 119.1 (C-1'), 114.1 (C-16), 85.7 (C-13), 82.0 (C-14), 80.4 (C-9), 80.2 (C-12), 74.4 (C-4), 71.4 (C-5), 65.2 (C-20), 64.8 (C-7), 63.2 (C-6), 49.9 (C-10), 45.3 (C-11), 37.0 (C-8), 19.1 (C-17), 18.9 (C-18), 10.0 (C-19).

[107] Fr. C25 (130 mg)를 다시 클로로포름과 메탄올 (1:1) 혼합용매로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 실시하고, 최종적으로 유속 5 mL/분의 70% 아세토니트릴 용출액으로 ODS HPLC를 수행하여 genkwanine H (4.0 mg, 화학식 3의 화합물) 및 genkwanine M (4.0 mg, 화학식 4의 화합물)을 흰색 파우더 형태로 얻었다. 상기 화합물의 구조는 아래와 같은 NMR, MS, $[\alpha]^{20}_{D}$ 데이터를 근거로 구조를 동정하였다.

[108]

[109] [화학식 3] genkwanine H

[110]



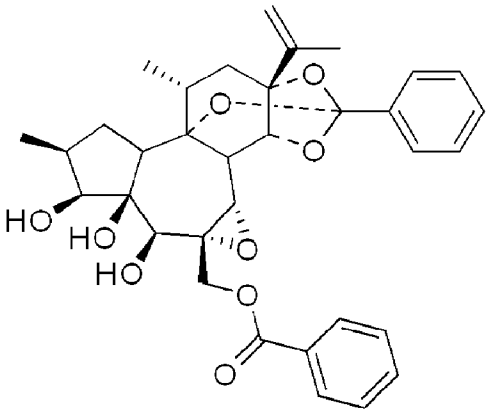
[111] $[\alpha]^{20}_{D}$ +46.2 (*c* 1.5, $CHCl_3$);

[112] ESI-MS, *m/z* 631.6 $[M+Na]^+$;

[113] ^{1}H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz): δ_H 8.09 (d, J = 7.4, 2H, H-3'', H-7''), 7.67 (d, J = 9.5, 2H, H-3', H-7'), 7.60 (t, J = 7.4, 1H, H-5''), 7.49 (t, J = 7.6, 2H, H-4'', H-6''), 7.36 (m, 3H, H-4', H-5', H-6'), 5.07 (s, 1H, H-16a), 4.91 (s, 1H, H-16b), 4.78 (d, J = 11.0, 1H, H-20a), 4.62 (d, J = 2.5, 1H, H-14), 4.61 (s, 1H, H-7), 4.51 (d, J = 11.1, 1H, H-20b), 4.16 (d, J = 4.1, 1H, H-2), 3.41 (s, 1H, H-5), 2.74 (m, 2H, H-10, H-11), 2.67 (d, J = 2.3, 1H, H-8), 2.34 (dd, J = 14.1, 8.0, 1H, H-12a), 1.84 (s, 3H, H-17), 1.81 - 1.65 (m, 4H, H-1, H-2, H-12b), 1.31 (d, J = 6.9, 3H, H-18), 1.06 (d, J = 6.0, 3H, H-19);

[114] ^{13}C NMR values in ppm (CD_3OD, 176 Hz): δ_C 168.4 (C-1''), 148.3 (C-15), 137.9 (C-2'), 134.4 (C-5''), 131.8 (C-2''), 130.8 (C-3'', C-7''), 130.5 (C-5'), 129.7 (C-3', C-7'), 129.1 (C-4'', C-6''), 127.2 (C-4', C-6'), 118.6 (C-1'), 111.5 (C-16), 86.9 (C-13), 86.6 (C-14), 85.6 (C-9), 82.7 (C-4), 78.9 (C-3), 77.6 (C-6), 77.2 (C-7), 74.8 (C-5), 68.9 (C-20), 52.9 (C-10), 38.4 (C-8), 37.5 (C-12), 37.4 (C-2), 36.5 (C-11), 36.1 (C-1), 21.5 (C-18), 19.6 (C-17), 13.8 (C-19).

[115] [화학식 4] genkwanine M

[116] 

[117] $[\alpha]^{20}_{D}$ -8.4 (*c* 0.05, MeOH);

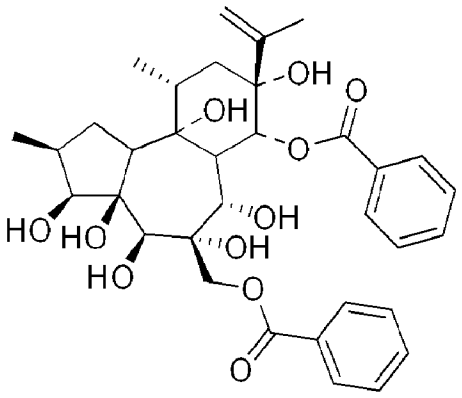
[118] ESI-MS, *m/z* 613.5 $[M+Na]^+$;

[119] ^{1}H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz): δ_H 8.07 (d, J = 7.3, 2H, H-3'', H-7''), 7.69 (d, J = 9.5, 2H, H-3', H-7'), 7.61 (t, J = 7.4, 1H, H-5''), 7.49 (t, J = 7.7, 2H, H-4'', H-6''), 7.35 (m, 3H, H-4', H-5', H-6'), 5.07 (s, 1H, H-16a), 5.06 (d, J = 12.0, 1H, H-20a), 4.91 (s, 1H, H-16b), 4.63 (d, J = 2.6, 1H, H-14), 4.05 (d, J = 11.8, 1H, H-20b), 3.83 (s, 1H, H-3), 3.78 (s, 1H, H-5), 3.53 (s, 1H, H-7), 3.18 (d, J = 2.6, 1H, H-8), 2.67 (t, J = 9.0, 1H, H-10), 2.48 (m, 1H, H-11), 2.31 (dd, J = 14.1, 8.0, 1H, H-12a), 1.84 (s, 3H, H-17), 1.79 - 1.55 (m, 4H, H-1, H-2, H-12b), 1.27 (d, J = 6.8, 3H, H-18), 1.04 (d, J = 5.2, 3H, H-19);

[120] ^{13}C NMR values in ppm (CD_3OD, 176 Hz): δ_C 168.0 (C-1''), 148.5 (C-15), 138.2 (C-2'), 134.4 (C-5''), 131.6 (C-2''), 130.8 (C-3'', C-7''), 130.3 (C-5'), 129.74 (C-4'', C-6''), 128.9 (C-3', C-7'), 127.4 (C-4', C-6'), 118.8 (C-1'), 111.4 (C-16), 86.1 (C-13), 84.0 (C-14), 82.2 (C-4), 81.1 (C-9), 78.8 (C-3), 73.4 (C-5), 69.3 (C-20), 65.8 (C-7), 62.0 (C-6), 50.3 (C-10), 38.4 (C-2), 38.0 (C-8), 37.2 (C-12), 36.6 (C-11), 36.1 (C-1), 21.6 (C-18), 19.6 (C-17), 13.7 (C-19).

[121] Fr. C3 (4.0 g)을 메탄올과 물 구배(gradient) 혼합용매(60:40, 80:20, 100:0)조건으로 역상 컬럼 크로마토그래피 (ODS silica gel chromatography)를 실시하여 4개의 소 분획물(sub-fraction) (Fr. C31, C32, C33, C34)을 얻었다. Fr. C34 (1.06 g)를 메탄올을 용출용매로 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 3개의 소 분획물(sub-fraction) (Fr. C341, C342, C343)를 얻었다. Fr. C341 (120 mg), C342 (180 mg), C343 (119 mg)을 최종적으로 유속 4.5 mL/분의 50% 아세토니트릴 용출액으로 ODS HPLC를 각각 수행하여, Fr. C341으로부터 genkwanin K (9.6 mg, 화학식 5의 화합물)를 얻었고, Fr. C342로부터 yuanhuapine (79.5 mg, 화학식 6의 화합물)을 얻었고, Fr. C343으로부터 genkwanin A (4.7 mg, 화학식 7의 화합물), orthobenzoate 2 (85.6 mg, 화학식 8의 화합물), 1, 2α-dihydrodaphnetoxin (2.9 mg, 화학식 9의 화합물) 및 genkwanin I (2.4 mg, 화학식 10의 화합물)를 흰색 파우더 형태로 얻었다. 상기 화합물의 구조는 아래와 같은 NMR, MS, $[\alpha]^{20}_{D}$ 데이터를 근거로 구조를 동정하였다.

[122] [화학식 5] genkwanin K

[123] 

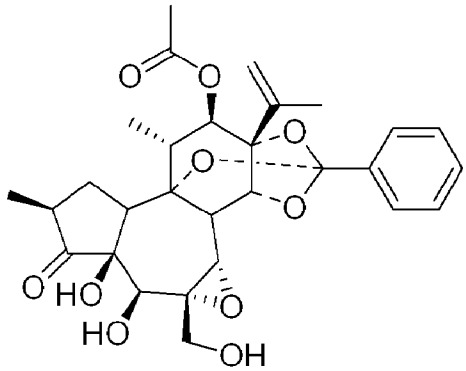
[124] $[\alpha]^{20}_{D}$ +38.5 (*c* 0.1, $CHCl_3$);

[125] ESI-MS, *m/z* 627.6 $[M+Na]^+$;

[126] ^1H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz): δ_H 7.98 (d, J = 7.5, 2H, H-3', H-7'), 7.90 (d, J = 7.5, 2H, H-3", H-7"), 7.57 (m, 2H, H-5', H-5"), 7.44 (d, J = 7.7, 2H, H-4", H-6"), 7.42 (d, J = 7.6, 2H, H-4', H-6'), 5.72 (d, J = 6.2, 1H, H-14), 5.06 (s, 1H, H-16a), 4.84 (s, 1H, H-16b), 4.62 (d, J = 13.4, 1H, H-20a), 4.42 (d, J = 3.0, 1H, H-3), 4.24 (d, J = 5.15, 1H, H-20b), 4.19, (d, J = 2.4, H-7), 3.33 (s, 1H, H-5), 3.15 (d, J = 6.2, 1H, H-8), 2.34 (m, 2H, H-10, H-11), 2.01 (m, 3H, H-2, H-1a, H-12a), 1.81 (s, 3H, H-17), 1.60 (m, 2H, H-1b, H-12b), 1.24 (d, J = 7.1, 3H, H-18), 1.08 (d, J = 6.5, 3H, H-19);

[127] ^{13}C NMR values in ppm ($CDCl_3$, 101 Hz): δ_C 168.3 (C-1"), 166.7 (C-1'), 148.1 (C-15), 133.6 (C-5"), 133.5 (C-5"), 130.2 (C-3", C-7"), 130.1 (C-3', C-7'), 129.9 (C-2"), 129.4 (C-2'), 128.7 (C-4", C-6"), 128.6 (C-4', C-6'), 111.6 (C-16), 83.8 (C-4), 77.9 (C-9), 77.4 (C-6), 77.3 (C-14), 76.0 (C-7), 75.5 (C-3), 74.5 (C-13), 73.2 (C-5), 67.4 (C-20), 54.6 (C-10), 40.6 (C-8), 37.9 (C-12), 36.6 (C-2), 34.9 (C-1), 34.4 (C-11), 19.5 (C-18), 19.0 (C-17), 13.5 (C-19).

[128] [화학식 6] yuanhuapine

[129] 

[130] $[\alpha]^{20}_{D}$ +28.5 (*c* 0.05, $CHCl_3$);

[131] ESI-MS, *m/z* 565.5 $[M+Na]^+$;

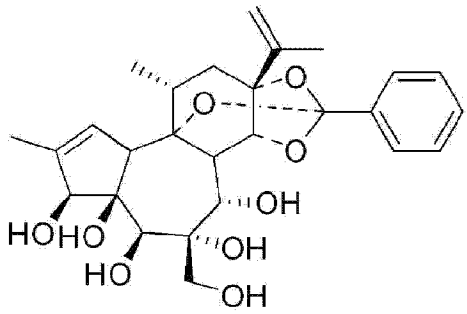
[132] ^1H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz): δ_H 7.67 (m, 2H, H-3', H-7'), 7.37 (m, 3H, H-4', H-5', H-6'), 5.07 (s, 1H, H-16a), 5.07 (d, J = 2.9, 1H, H-12), 5.04 (s, 1H,

H-16b), 4.95 (d, J = 2.7, 1H, H-14), 4.02 (s, 1H, H-5), 4.02 (d, J = 12.1, 1H, H-20a), 3.61 (d, J = 2.9, 1H, H-8), 3.60 (d, J = 10.6, 1H, H-20b), 3.54 (s, 1H, H-7), 3.18 (dd, J = 13.3, 5.8, 1H, H-10), 2.47 (q, J = 6.9, 1H, H-11), 2.38 (dt, J = 13.3, 6.8, 1H, H-1a), 2.25 (dt, J = 13.0, 6.6, 1H, H-1b), 2.01 (s, 3H, H-2"), 1.86 (s, 3H, H-17), 1.46 (d, J = 13.1, 1H, H-2), 1.37 (d, J = 7.0, 3H, H-18), 1.07 (d, J = 6.5, 3H, H-19);

[133] ^{13}C NMR values in ppm (CD_3OD, 101 Hz): δ_C 218.9 (C-3), 171.6 (C-1"), 145.0 (C-15), 137.4 (C-2'), 130.4 (C-5'), 128.8 (C-4', C-6'), 127.1 (C-3', C-5'), 119.3 (C-1'), 113.7 (C-16), 84.8 (C-13), 82.3 (C-14), 80.6 (C-9), 79.2 (C-12), 77.0 (C-4), 70.5 (C-5), 65.3 (C-20), 64.6 (C-7), 63.3 (C-6), 44.9 (C-11), 44.8 (C-10), 43.7 (C-1), 36.8 (C-8), 34.5 (C-2), 21.1 (C-2"), 19.1 (C-18), 19.0 (C-17), 12.8 (C-19).

[134] [화학식 7] genkwanin A

[135]



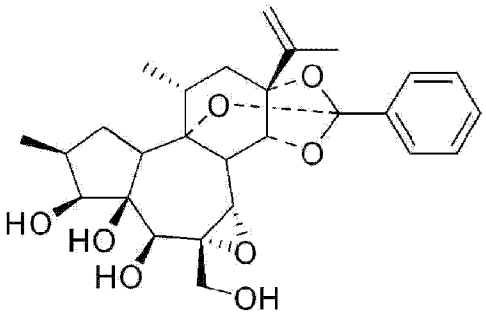
[136] $[\alpha]^{20}_D$ +47.7 (*c* 0.1, $CHCl_3$);

[137] ESI-MS, *m/z* 505.6 $[M+H]^+$ and *m/z* 527.4 $[M+Na]^+$;

[138] ^{1}H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz): δ_H 7.66 (dd, J = 6.6, 3.0, 2H, H-3', H-7'), 7.38 (m, 3H, H-4', H-5', H-6'), 5.07 (d, J = 6.5, 1H, H-16a), 4.91 (s, 1H, H-16b), 4.60 (d, J = 2.5, 1H, H-14), 4.42 (s, 1H, H-7), 4.13 (d, J = 4.6, 1H, H-3), 3.82 (q, J = 11.0, 2H, H-20), 3.38 (s, 1H, H-5), 2.71 (m, 2H, H-10, H-11), 2.62 (d, J = 2.4, 1H, H-8), 2.32 (dd, J = 14.1, 8.0, 1H, H-12a), 1.87 (m, 2H, H-1a, H-2), 1.83 (s, 3H, H-17), 1.69 (m, 1H, H-1b), 1.62 (m, 2H, H-12b), 1.30 (d, J = 6.9, 3H, H-18), 1.05 (d, J = 6.2, 3H, H-19);

[139] ^{13}C NMR values in ppm (CD_3OD, 101 Hz): δ_C 148.3 (C-15), 137.9 (C-15), 130.6 (C-5'), 129.1 (C-4', C-6'), 127.3 (C-3', C-5'), 118.6 (C-1'), 111.5 (C-16), 86.8 (C-13), 86.5 (C-14), 85.4 (C-9), 82.8 (C-4), 78.5 (C-7), 78.3 (C-6), 77.5 (C-3), 75.0 (C-5), 67.6 (C-20), 52.9 (C-10), 38.5 (C-2), 37.5 (C-8), 37.4 (C-12), 36.5 (C-11), 36.0 (C-1), 21.5 (C-17), 19.8 (C-18), 13.8 (C-19).

[140] [화학식 8] orthobenzoate 2

[141] 

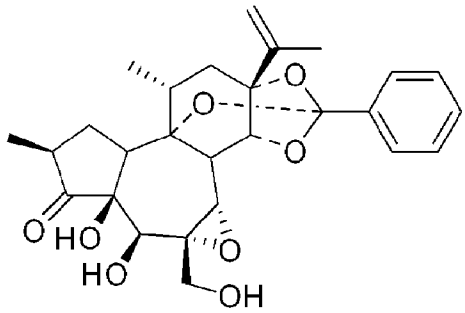
[142] $[\alpha]^{20}_{D}$ -16.6 (*c* 0.05, MeOH);

[143] ESI-MS, *m/z* 509.2 $[M+Na]^+$;

[144] ^{1}H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz): δ_H 7.69 (dd, J = 6.6, 2.9, 2H, H-3', H-7'), 7.35 (m, 3H, H-4', H-5', H-6'), 5.06 (s, 1H, H-16a), 4.90 (s, 1H, H-16b), 4.56 (d, J = 2.6, 1H, H-14), 4.02 (d, J = 12.2, 1H, H-20a), 3.76 (d, J = 2.6, 1H, H-3), 3.70 (s, 1H, H-5), 3.59 (d, J = 12.3, 1H, H-20b), 3.42 (m, 1H, H-7), 3.07 (d, J = 2.6, 1H, H-8), 2.67 (dd, J = 12.6, 5.9, 1H, H-10), 2.47 (p, J = 6.9, 1H, H-11), 2.28 (dd, J = 13.9, 7.9, 1H, H-12a), 1.82 (s, 3H, H-17), 1.69 (d, J = 14.0, 1H, H-1a), 1.64 (dd, J = 9.5, 4.8, 1H, H-2), 1.58 (m, 2H, H-1b, H-12b), 1.27 (d, J = 6.8, 3H, H-18), 1.03 (d, J = 5.3, 3H, H-19);

[145] ^{13}C NMR values in ppm (CD_3OD, 101 Hz): δC 148.3 (C-15), 138.1 (C-2'), 130.1 (C-5'), 128.7 (C-4', C-6'), 127.2 (C-3', C-7'), 118.5 (C-1'), 111.2 (C-16), 85.8 (C-13), 84.0 (C-14), 82.1 (C-9), 81.0 (C-2), 78.6 (C-4), 73.7 (C-5), 65.7 (C-20), 64.9 (C-7), 63.2 (C-6), 50.0 (C-10), 38.2 (C-2), 37.8 (C-8), 37.0 (C-12), 36.5 (C-11), 35.9 (C-1), 21.4 (C-17), 19.5 (C-18), 13.6 (C-19).

[146] [화학식 9] 1, 2α-dihydrodaphnetoxin

[147] 

[148] $[\alpha]^{20}_{D}$ +6.2 (*c* 0.001, MeOH);

[149] ESI-MS, *m/z* 507.3 $[M+Na]^+$;

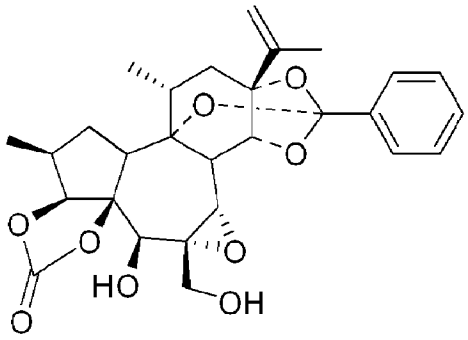
[150] ^{1}H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz): δ_H 7.72 (m, 2H, H-3', H-7'), 7.36 (m, 3H, H-4', H-5', H-6'), 5.07 (s, 1H, H-16a), 4.91 (s, 1H, H-16b), 4.60 (d, J = 2.8, 1H, H-14), 4.01 (s, 1H, H-5), 3.99 (d, J = 12.2, 1H, H-20a), 3.57 (d, J = 12.2, 1H, H-20b), 3.44 (s, 1H, H-7), 3.16 (dd, J = 13.3, 5.8, 1H, H-10), 3.01 (d, J = 2.7, 1H, H-8), 2.55 (m, 1H, H-11), 2.38 (m, 1H, H-12a), 2.29 (m, 2H, H-1), 1.83 (s, 3H, H-17), 1.73 (d, J = 14.0, 1H, H-2), 1.53 (m, 1H, H-12b), 1.30 (d, J = 6.8, 3H, H-18), 1.08 (d, J = 6.6, 3H,

H-19);

[151] ^{13}C NMR values in ppm (CD_3OD, 101 Hz): δ_C 219.3 (C-3), 148.3 (C-15), 138.1 (C-2'), 130.4 (C-5'), 128.9 (C-4', C-6'), 127.4 (C-3', C-5'), 118.8 (C-1'), 111.5 (C-16), 86.0 (C-13), 84.1 (C-14), 82.0 (C-9), 77.2 (C-4), 70.9 (C-5), 65.5 (C-20), 64.9 (C-7), 63.3 (C-6), 45.8 (C-10), 43.9 (C-8), 37.9 (C-1), 37.2 (C-2), 36.7 (C-12), 34.7 (C-11), 21.6 (C-17), 19.6 (C-18), 12.9 (C-19).

[152] [화학식 10] genkwanin I

[153]



[154] $[\alpha]^{20}_D$ -22.8 (*c* 0.005, MeOH);

[155] ESI-MS, *m/z* 513.3 $[M+H]^+$ and *m/z* 535.3 $[M+Na]^+$;

[156] ^{1}H NMR values in ppm (CD_3OD, 400 MHz): δ_H 7.69 (dd, J = 7.5, 1.9, 2H, H-3', H-7'), 7.36 (m, 3H, H-4', H-5', H-6'), 5.09 (s, 1H, H-16a), 4.93 (s, 1H, H-16b), 4.72 (d, J = 4.5, 1H, H-3), 4.64 (d, J = 2.8, 1H, H-14), 4.10 (s, 1H, H-5), 4.09 (d, J = 12.3, 1H, H-20a), 3.53 (d, J = 12.4, 1H, H-20b), 3.49 (s, 1H, H-7), 2.93 (dd, J = 13.3, 6.1, 1H, H-10), 2.78 (d, J = 2.8, 1H, H-8), 2.35 (dd, J = 14.1, 7.8, 1H, H-12a), 2.12 (m, 1H, H-11), 2.04 (dd, J = 11.7, 6.0, 1H, H-1a), 1.95 (dd, J = 12.0, 6.6, 1H, H-2), 1.84 (s, 3H, H-17), 1.82 (d, J = 14.9, 1H, H-12b), 1.58 (d, J = 12.6, 1H, H-1b), 1.31 (d, J = 6.7, 3H, H-18), 1.13 (d, J = 6.7, 3H, H-19);

[157] ^{13}C NMR values in ppm (CD_3OD, 101 Hz): δ_C 156.7 (C-21), 148.0 (C-15), 137.8 (C-2'), 130.5 (C-5'), 128.9 (C-4', C-6'), 127.4 (C-3', C-7'), 118.8 (C-1'), 111.8 (C-16), 94.1 (C-4), 90.4 (C-3), 85.8 (C-13), 84.2 (C-14), 81.4 (C-9), 71.1 (C-5), 65.0 (C-20), 64.7 (C-7), 62.8 (C-6), 50.7 (C-10), 37.9 (C-2), 37.4 (C-11), 37.3 (C-12), 37.1 (C-8), 36.2 (C-1), 21.6 (C-18), 19.5 (C-17), 12.9 (C-19).

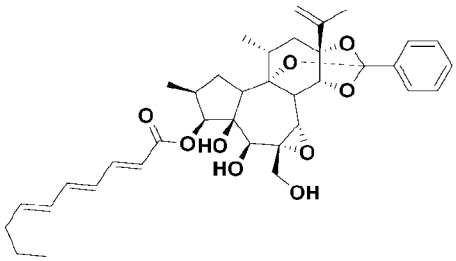
[158]

[159] **실시예 2-b: 팥꽃나무 추출물로부터 다양한 용매에 의한 활성성분의 분리**

[160] 상기 실시예 1에서 수득한 팥꽃나무 추출물을 200 mL의 증류수와 헥산의 1:1 혼합용매에 녹여 분획하여 헥산층을 얻었다. 같은 방법으로 2번 더 실시하여 얻은 헥산층을 감압농축하여 헥산 분획물을 얻었다. 이렇게 얻은 헥산 분획물(20 g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 헥산과 에틸 아세테이트의 구배(gradient) 혼합용매(10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2)로 용리시켜 총 3개의 분획 (Fr. I, II, III)을 얻었다.

[161] 이중 Fr. I (577 mg)을 75% 아세토니트릴 조건으로 역상 실리카겔 프렙 TLC(reverse phase silica gel prep TLC)를 실시하여 활성밴드를 얻었다. 이 활성밴드를 유속 3 mL/분의 83% 아세토니트릴 용출액으로 ODS HPLC를 수행하여 머무름 시간(retention time) 15.2 분과 18.5분에서 각각 acutilonine F (14.0 mg, 화학식 11의 화합물)와 wikstroemia factor M1 (7.0 mg, 화학식 12의 화합물)을 흰색 파우더 형태로 얻었다. 상기 화합물의 구조는 아래와 같은 NMR, MS, $[\alpha]^{20}_D$ 데이터를 근거로 구조를 동정하였다.

[162] [화학식 11]

[163] 

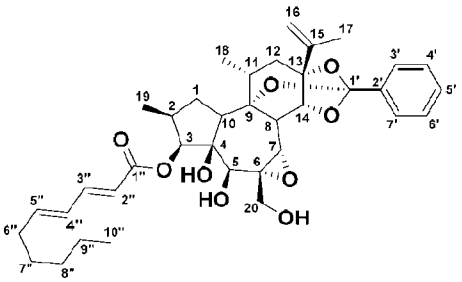
[164] $[\alpha]^{20}_D$ -32.1(*c* 1.3, MeOH);

[165] ESI-MS, *m/z* 635.6 $[M+H]^+$, 657.7 $[M+Na]^+$;

[166] ^{1}HNMR(CD_3OD,500MHz): δ_H, 7.70(2H, dd, J=7.35, 2.22Hz, H-3', H-7'), 7.37(1H, m, H-5'), 7.36(2H, m, H-4', H-6'), 7.35(1H, m, H-3''), 6.64(1H, dd, J=14.82, 10.75Hz, H-5''), 6.34(1H, dd, J=14.79, 11.40Hz, H-4''), 6.22(1H, dd, J=15.16, 10.69Hz, H-6''), 6.01(1H, m, H-7''), 6.00(1H, m, H-2''), 5.06(1H, brs, H-16a), 5.03(1H, d, J=4.52Hz, H-3), 4.90(1H, brs, H-16b), 4.56(1H, d, J=2.66Hz, H-14), 3.98(1H, d, J=12.19Hz, H-20a), 3.92(1H, s, H-5), 3.59(1H, d, J=12.20Hz, H-20b), 3.41(1H, brs, H-7), 3.07(1H, d, J=2.69Hz, H-8), 2.83(1H, dd, J=13.03, 5.32Hz, H-10), 2.59(1H, m, H-11), 2.29(2H, m, H-12), 2.15(2H, m, H-8''), 1.82(3H, s, H-17), 1.78(1H, m, H-2), 1.71(2H, m, H-1), 1.47(2H, m, H-9''), 1.31(3H, d, J=6.89Hz, H-18), 0.99(3H, d, J=5.77Hz, H-19), 0.94(3H, t, J=7.39Hz, H-10'');

[167] ^{13}CNMR values in ppm (CD_3OD, 126Hz): δ_C169.4(C, C-1''), 148.5(C, C-15), 147.2(CH, C-3''), 143.3(CH, C-5''), 141.9(CH, C-7''), 138.2(C, C-2'), 131.6(CH, C-6''), 130.3(CH, C-5'), 129.2(CH, C-4''), 128.9(CH, C-4', C-6'), 127.4(CH, C-3', C-7'), 120.7(CH, C-2''), 118.7(C, C-1'), 111.4(CH_2, C-16), 86.1(C, C-13), 84.0(CH, C-14), 82.9(C, C-4), 82.3(CH, C-3), 82.1(C, C-9), 74.1(CH, C-5), 66.1(CH_2, C-20), 65.1(CH, C-7), 63.0(C, C-6), 37.9(CH, C-8), 37.7(CH, C-2), 37.3(CH_2, C-1), 37.1(CH_2, C-12), 36.5(CH, C-11), 36.2(CH_2, C-8''), 23.4(CH_2, C-9''), 21.6(CH_3, C-18), 19.6(CH_3, C-17), 14.1(CH_3, C-10''), 13.8(CH_3, C-19).

[168] [화학식 12]

[169] 

[170] $[\alpha]^{20}_{D}$ +18.9 (*c* 1.0, MeOH);

[171] ESI-MS, *m/z* 637.6 $[M+H]^+$, 659.4 $[M+Na]^+$, 635.2 $[M-H]^-$;

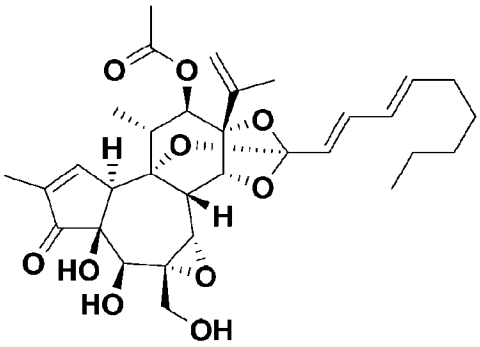
[172] ^{1}HNMR($CDCl_3$, 500MHz): δ_H7.75(2H, m, H-3', H-7'), 7.36(3H, m, H-4', H-5', H-6'), 7.34(1H, dd, J=15.4 and 10.2, H-3''), 6.21(1H, dd, J=14.8 and 10.4, H-4''), 5.90(1H, d, J=15.2, H-2''), 5.05(1H, brs, H-16a), 4.92(1H, brs, H-16b), 4.69(1H, d, J=5.19, H-3), 4.51(1H, d, J=2.76, H-14), 4.06(1H, s, H-5), 3.88(1H, d, J=12.2, H-20a), 3.77(1H, d, J=12.2, H-20b), 3.44(1H, s, H-7), 2.96(1H, d, J=2.8, H-8), 2.82(1H, dd, J=13.2, 5.5, H-10), 2.48(1H, m, H-11), 2.20(2H, overlapped, H-6''), 2.20(1H, overlapped, H-12a), 1.93(1H, m, H-1a), 1.83(3H, s, H-17), 1.78(1H, m, H-12b), 1.73(1H, m, H-1b), 1.71(1H, m, H-2), 1.45(2H, m, H-7''), 1.33(3H, d, J=6.9, H-18), 1.32(2H, overlapped, H-9''), 1.31(2H, overlapped, H-8''), 1.06(3H, d, J=6.5, H-19), 0.91(3H, t, J=6.9, H-10'');

[173] ^{13}CNMR($CDCl_3$, 126Hz): δ_C169.6(C, C-1''), 147.4(CH, C-3''), 146.8(CH, C-5''), 146.7(C, C-15), 136.4(C, C-2'), 129.4(CH, C-5'), 128.4(CH, C-4''), 128.2(CH, C-4', C-6'), 126.3(CH, C-3', C-7'), 118.0(CH, C-2''), 117.6(C, C-1'), 111.4(CH_2, C-16), 84.5(C, C-13), 82.7(CH, C-14), 82.2(CH, C-3), 81.7(C, C-4), 80.5(C, C-9), 75.0(CH, C-5), 66.3(CH_2, C-20), 64.2(CH, C-7), 60.6(C, C-6), 48.9(CH, C-10), 36.6(CH, C-8), 36.4(CH, C-2), 36.3(CH_2, C-12), 36.0(CH_2, C-1), 35.5(CH, C-11), 33.3(CH_2, C-6''), 31.6(CH_2, C-8''), 28.5(CH_2, C-7''), 22.7(CH_2, C-9''), 21.1(CH_3, C-18), 19.4(CH_3, C-17), 14.2(CH_3, C-10''), 13.3(CH_3, C-19).

[174] 또한, Fr. III (400 mg)을 75% 아세토니트릴 조건으로 역상 실리카겔 프렙 TLC(reverse phase silica gel prep TLC)를 실시하여 활성밴드를 얻었다. 이 활성밴드를 CHCl3-MeOH(50:1) 조건으로 순상 실리카겔 프렙 TLC(silica gel prep TLC)를 실시하여 Rf 0.4 과 0.25 에서 두 개의 소 분획물(sub-fraction)로 각각 Fr.III-1 과 Fr.III-2 를 얻었다. Fr.III-1을 유속 3 mL/분의 65% 아세토니트릴 용출액으로 ODS HPLC를 수행하여 머무름 시간(retention time) 17.2 분과 23.4 분에서 각각 prostratin Q (2.1 mg, 화학식 13의 화합물) 와 yuanhuadine (4.0 mg, 화학식 14의 화합물)을 흰색 파우더 형태로 얻었다. Fr.III-2는 Fr.III-1과 같은 방법으로 ODS HPLC를 수행하여 머무름 시간(retention time) 19.0 분과 21.4 분에서 각각 yuanhuatine (4.4 mg, 화학식 15의 화합물) 과 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate (1.8 mg, 화학식 16의 화합물)를 흰색 파우더 형태로 얻었다. 상기 화합물의 구조는 아래와 같은 NMR, MS, $[\alpha]^{20}_{D}$

데이터를 근거로 구조를 동정하였다.

[175] [화학식 13]

[176] 

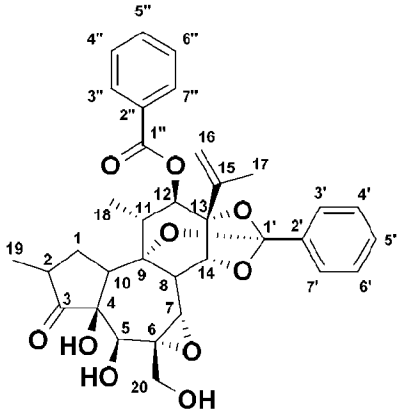
[177] $[\alpha]^{20}_{D}$+14.1 (*c* 0.03, MeOH);

[178] ESI-MS, *m/z* 579.5 $[M+Na]^+$;

[179] ^{1}HNM($CDCl_3$, 500MHz): δ_H7.60(1H, s, H-1), 7.24(1H, m, H-3''), 6.19(1H, m, H-4''), 6.15(1H, m, H-5''), 5.79(1H, d, J=15.41Hz, H-2''), 5.70(1H, d, J=4.71Hz, H-7), 5.47(1H, d, J=10.27Hz, H-12), 4.03(2H, q, J=13.04Hz, H-20), 3.26(2H, overlapped, H-8, H-10), 2.53(2H, m, H-5), 2.17(2H, overlapped, H-6''), 2.17(1H, overlapped, H-11), 2.11(3H, s, H-2'), 1.78(3H, s, H-19), 1.44(2H, m, H-7''), 1.32(2H, m, H-9''), 1.31(2H, m, H-8''), 1.27(3H, s, H-16), 1.22(3H, s, H-17), 1.10(1H, d, J=5.20Hz, H-14), 0.91(3H, d, J=6.93Hz, H-18), 0.90(3H, t, J=7.06Hz, H-10'');

[180] ^{13}CNMR values in ppm($CDCl_3$, 126Hz):δ_C209.1(C, C-3), 174.1(C, C-1'), 167.3(C, C-1''), 161.0(CH, C-1), 145.8(CH, C-3''), 145.5(CH, C-5''), 140.7(C, C-6), 133.1(C, C-2), 129.5(CH, C-7), 128.5(CH, C-4''), 119.1(CH, C-2''), 78.4(C, C-9), 74.0(C, C-4), 68.2(CH_2, C-20), 65.9(C, C-13), 56.4(CH, C-10), 43.4(CH, C-11), 39.3(CH, C-8), 38.9(CH_2, C-5), 36.6(CH, C-14), 33.2(CH_2, C-6''), 31.6(CH_2, C-8''), 28.6(CH_2, C-7''), 25.9(C, C-15), 24.0(CH_3, C-17), 22.7(CH_2, C-9''), 21.3(CH_3, C-2'), 17.0(CH_3, C-16), 14.2(CH_3, C-10''), 10.3(CH_3, C-19).

[181] [화학식 14]

[182] 

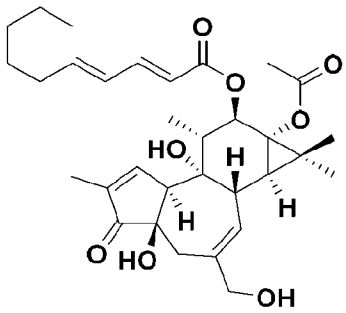
[183] $[\alpha]^{20}_{D}$+7.5 (*c* 1.3, CH_2Cl_2);

[184] ESI-MS, *m/z* 587.6 $[M+H]^+$ and 609.5 $[M+Na]^+$;

[185] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500MHz): δ_H7.58(1H, s, H-1), 6.67(1H, dd, J=15.45, 10.66Hz, H-3'), 6.05(1H, dd ,J=15.14, 10.71Hz, H-4'), 5.86(1H, m, H-5'), 5.65(1H, d, J=15.46Hz, H-2'), 5.02(1H, brs, H-16a), 4.99(1H, brs, H-12), 4.96(1H, brs, H-16b), 4.76(1H, d, J=2.47Hz, H-14), 4.26(1H, brs, H-7), 3.94(1H, dd, J=12.34, 5.86Hz, H-20a), 3.82(1H, m, H-10), 3.80(1H, m, H-20b), 3.56(1H, s, H-5), 3.52(1H, d, J=2.45Hz, H-8), 2.38(1H, q, J=7.22Hz, H-11), 2.10(2H, q, J=7.20Hz, H-6'), 2.00(3H, s, H-2''), 1.84(3H, s, H-17), 1.80(3H, d, J=1.31Hz, H-19), 1.39(2H, dt, J=14.26, 7.28Hz, H-7'), 1.30(2H, m, H-9'), 1.27(2H, m, H-8'), 0.89(3H, t, J=6.93Hz, H-10');

[186] ^{13}CNMR values in ppm($CDCl_3$, 126Hz): δ_C209.7(C, C-3), 169.9(C, C-1''), 160.6(CH, C-1), 143.3(C, C-15), 139.6(CH, C-5'), 137.1(C, C-2), 135.3(CH, C-3'), 128.8(CH, C-4'), 122.5(CH, C-2'), 117.2(C, C-1'), 113.5(CH_2, C-16), 83.9(C, C-13), 80.7(CH, C-14), 78.5(CH, C-12), 78.3(C, C-9), 72.5(C, C-4), 72.2(CH, C-5), 65.3(CH_2, C-20), 64.5(C-7), 60.7(C-6), 47.7(CH, C-10), 44.3(CH, C-11), 35.6(CH, C-8), 32.9(CH_2, C-6'), 31.5(CH_2, C-8'), 28.9(CH_2, C-7'), 22.7(CH_2, C-9'), 21.4(CH_3, C-2''), 18.9(CH_3, C-17), 18.5(CH_3, C-18), 14.2(CH_3, C-10'), 10.1(CH_3, C-19).

[187] [화학식 15]

[188] 

[189] $[\alpha]^{20}_{D}$ +52.8 (*c* 0.5, MeOH);

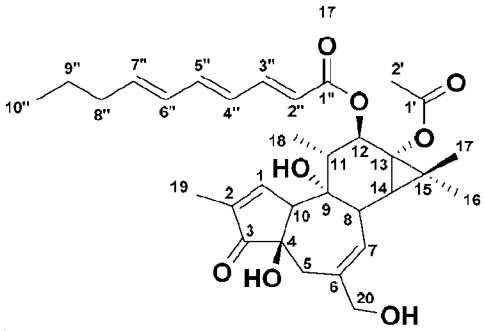
[190] ESI-MS, *m/z* 605.5 $[M+H]^+$, 627.4 $[M+Na]^+$, 603.3 $[M-H]^-$;

[191] ^{1}HNMR($CDCl_3$, 500MHz): δ_H7.94(2H, m, H-3'', H-7''), 7.75(2H, m, H-3', H-7'), 7.60(1H, t, J=7.4, H-5''), 7.48(2H, m, H-4'', H-6''), 7.40(3H, m, H-4', H-5', H-6'), 5.42(1H, brs, H-12), 5.07(1H, brs, H-16a), 5.03(1H, brs, H-16b), 4.99(1H, d, J=2.8, H-14), 4.10(1H, s, H-5), 3.90(1H, d, J=12.4, H-20a), 3.85(1H, d, J=12.3, H-20b), 3.69(1H, d, J=2.8, H-8), 3.67(1H, brs, H-7), 3.06(1H, dd, J=13.3 and 5.9, H-10), 2.59(1H, q, J=6.9, H-11), 2.40(1H, m, H-1a), 2.28(1H, m, H-2), 1.92(3H, s, H-17), 1.63(1H, m, H-1b), 1.51(3H, d, J=6.9, H-18), 1.12(3H, d, J=6.6, H-19);

[192] ^{13}CNMR($CDCl_3$, 126Hz): δ_C220.4(C, C-3), 165.8(C, C-1''), 143.2(C, C-15), 135.7(C, C-2'), 133.5(CH, C-5''), 130.0(CH, C-5'), 129.8(C, C-2''), 129.7(CH, C-3'', C-7''), 128.9(CH, C-4'', C-6''), 128.3(CH, C-4', C-6'), 126.2(CH, C-3', C-7'), 118.4(C, C-1'), 113.8(CH_2, C-16), 83.9(C, C-13), 81.4(CH, C-14), 79.3(C, C-9), 78.7(CH, C-12), 75.2(C, C-4), 71.5(CH, C-5), 65.3(CH_2, C-20), 64.5(CH, C-7), 61.0(C, C-6), 44.3(CH, C-11), 44.2(CH, C-10), 43.1(CH, C-2), 36.3(CH, C-8), 33.6(CH_2, C-1), 19.0(CH_3,

C-17, C-18), 12.6(CH_3, C-19).

[193] [화학식 16]

[194] 

[195] $[\alpha]^{20}_D$ -15.1 (*c* 0.2, $CHCl_3$);

[196] ESI-MS, *m/z* 577.5 $[M+Na]^+$, 553.4 $[M-H]^-$;

[197] ^{1}HNMR ($CDCl_3$, 500MHz): δ_H7.61(1H, s, H-1), 7.28(1H, dd, J=15.3 and 11.22, H-3''), 6.54(1H, dd, J=14.9 and 10.7, H-5''), 6.23(1H, dd, J=14.8 and 11.4, H-4''), 6.15(1H, dd, J=15.1 and 10.8, H-6''), 5.95(1H, m, H-7''), 5.84(1H, d, J=15.3, H-2''), 5.70(1H, d, J=4.8, H-7), 5.47(1H, d, J=10.3, H-12), 4.05(1H, d, J=12.9, H-20a), 4.00(1H, d, J=12.9, H-20b), 3.26(1H, overlapped, H-10), 3.26(1H, overlapped, H-8), 2.52(2H, m, H-5), 2.17(1H, m, H-11), 2.13(2H, overlapped, H-8''), 2.11(3H, s, H-2'), 1.78(3H, d, J=1.5, H-19), 1.45(2H, dq, J=14.6 and 7.3, H-9''), 1.27(3H, s, H-16), 1.22(3H, s, H-17), 1.10(1H, d, J=5.1, H-14), 0.93(3H, t, J=7.3, H-10''), 0.91(3H, d, J=6.4, H-18);

[198] ^{13}CNMR($CDCl_3$, 126Hz): δ_C209.2(C, C-3), 174.1(C, C-1'), 167.2(C, C-1''), 161.0(CH, C-1), 145.6(CH, C-3''), 141.8(CH, C-5''), 141.0(CH, C-7''), 140.7(C, C-6), 133.1(C, C-2), 130.2(CH, C-6''), 129.5(CH, C-7), 127.9(CH, C-4''), 119.9(CH, C-2''), 78.5(C, C-9), 76.9(CH, C-12), 74.0(C, C-4), 68.2(CH_2, C-20), 65.9(C, C-13), 56.4(CH, C-10), 43.4(CH, C-11), 39.3(CH, C-8), 38.8(CH_2, C-5), 36.6(CH, C-14), 35.5(CH_2, C-8''), 26.0(C, C-15), 24.0(CH_3, C-17), 22.4(CH_2, C-9''), 21.3(CH_3, C-2'), 17.0(CH_3, C-16), 14.6(CH_3, C-18), 13.9(CH_3, C-10''), 10.3(CH_3, C-19).

[199] **실시예 3: Nurr1 단백질 활성에 대한 화합물의 효과**

[200] 상기 실시예 2와 같이 팥꽃나무 추출물에서 분리한 다이터펜계 화합물의 농도에 따른 Nurr1 단백질 활성도를 루시퍼라제 분석을 통하여 확인하였다.

[201] 구체적으로, GLA4 유전자가 결합할 수 있는 염기서열(5'-CTCGGAGGACAGTACTCCG-3', 서열번호 1)이 8회 반복된 유전자를 리포터 유전자인 루시퍼라제에 결합시킨 벡터를 합성한 후, Nurr1-LBD를 포함한 DNA와 베타-갈락토시다제(β-galactosidase)를 가진 DNA 등 3종의 플라스미드 DNA를 BE(2)C 세포에 주입(transfection)하였다. 6시간 후, 상기 실시예 2에서 분리한 화합물 1 내지 10을 하기 표 1의 농도별로 처리하였다. 이렇게 처리한 세포를 20시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양한 후,

루시퍼라제 분석을 수행하였다. 대조군으로는 0.1% DMSO를 사용하였고, 이때의 활성에 배수로 활성도의 증가를 나타내었으며, 양성대조군으로 Amodiaquine을 사용하였다.

[202] [표1]

화합물	최종 처리 농도(μM)		
	저	중	고
AQ (Amodiaquine)	5	20	-
화학식 1	0.01	0.1	1
화학식 2	0.01	0.1	1
화학식 3	0.1	1	10
화학식 4	0.1	1	10
화학식 5	0.1	1	10
화학식 6	0.01	0.1	1
화학식 7	0.1	1	10
화학식 8	0.1	1	10
화학식 9	0.1	1	10
화학식 10	1	10	100
DGH-2 (control)	0.01	0.1	1

[203] 분석 결과, 하기 표 2 및 도 1과 같이, 화학식 1 내지 10의 모든 화합물이 Nurr1을 활성화시켰다. 구체적으로, 모든 화학식 1 내지 10의 화합물은 1 μM의 농도로 처리하는 경우 Nurr1을 활성화시켰고, 특히 화학식 2의 화합물은 0.01 μM의 저농도에서도 Nurr1의 활성화 효과가 우수함을 확인하였다. 이를 통해, 팥꽃나무 꽃 추출물에서 분리된 화합물들이 Nurr1을 활성화시킴과 동시에, 화합물의 구조에 따라 활성이 상이할 수 있음을 알 수 있었다.

[204] [표2]

농도	DMSO	AQ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	DGII-2
저	1.0	0.9	1.0	2.1	1.2	1.0	0.9	1.0	1.2	1.7	1.7	1.8	1.1
중	–	1.8	1.5	2.2	1.4	1.4	1.2	1.8	2.6	2.0	2.4	1.9	2.6
고	–	–	1.7	1.9	1.4	1.7	1.9	2.4	2.0	1.6	1.5	1.1	2.2

[205] 분석 결과, 하기 표 1과 같이, 화합물 13 및 14의 prostratin Q 및 yuanhuadine은 0.003 μM의 저농도에서도 Nurr1을 활성화시켰으며, 상기 화합물 13 및 14와 더불어 화합물 16의 12-O-n-deca-2,4,6-trienoyl-phorbol-(13)-acetate은 0.03 μM에서 유의적으로 Nurr1를 활성화함을 확인하였다. 또한, 화합물 11의 acutilonine F, 화합물 12의 wikstroemia factor M1 및 화합물 15의 yuanhuatine은 각각 1, 0.2 및 0.3 μM에서 유의적으로 Nurr1를 활성화시킴을 확인하였다. 이를 통해, 팥꽃나무 추출물에서 분리된 화합물들이 Nurr1을 활성화시킴과 동시에, 화합물의 구조에 따라 활성이 상이할 수 있음을 알 수 있었다.

[206]

[207] [표3]

농도(μM)	양성대조군	화합물11	화합물12	화합물13	화합물14	화합물15	화합물16
0.003	-	-	-	1.23±0.09	1.03±0.15	-	-
0.01	-	-	-	1.35±0.28	0.94±0.04	-	-
0.03	-	1.28±0.18	1.4±0.18	*1.47±0.17	*1.63±0.18	1.17±0.22	*1.42±0.15
0.1	-	1.16±0.16	**1.29±0.04	*1.42±0.14	**1.68±0.11	1.28±0.35	*1.68±0.43
0.3	-	1.32±0.13	*1.33±0.06	*1.65±0.2	**1.62±0.11	**1.59±0.08	*1.82±0.51
1	0.8±0.03	*1.76±0.08	*1.62±0.21	**1.47±0.02	*1.67±0.32	*2.12±0.37	**1.53±0.07
5	1.1±0.15	-	-	-	-	-	-
10	**1.6±0.03	-	-	-	-	-	-
20	**2.7±0.37	-	-	-	-	-	-

[208] (*P < 0.05, **P < 0.01 대조군 처리 대비)

[209]

[210] **실시예 4: 마이크로글리아 BV-2 세포에서 산화질소 생성 억제활성**

[211] 마이크로글리아 세포(microglia cell)에서 염증반응에 의한 뇌신경세포의 사멸은 치매, 파킨슨 병과 같은 퇴행성 뇌질환의 주요한 원인중의 하나로 보고되어 있다(Sarkar S et al., Neurotoxicology, 44, 250-262 (2014); Bower JH et al., Neurology, 67, 494-496 (2006)). 따라서, 마이크로글리아에서 상기 실시예 2에서 분리한 화합물들을 대상으로 대표적인 염증인자인 산화 질소(nitric oxide, NO)의 생성억제 활성을 조사하였다. 구체적으로, 마이크로글리아 BV-2 세포를 96 웰 플레이트에 5×10^4 세포/웰로 넣고, 2일 배양한 다음, LPS (1 mg/mL)를 상기 실시예 2에서 분리한 화합물과 함께 24시간 배양하였다. 배양 상등액을 Griess 시약을 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 아질산염(nitrite)를 정량함으로서 산화질소의 생성량을 조사하였다. 양성대조군으로는 Minocyline을 사용하였다.

[212] 조사 결과, 하기 표 3과 같이, 모든 화합물들이 낮은 농도에서 산화질소의

생성을 저해함을 확인하였다. 특히, 화합물 2의 genkwadaphnine은 0.06±0.02의 매우 낮은 농도에서 산화질소 생성의 저해 활성을 나타냄을 확인하였고 화합물 14의 yuanhuadine은 1.03 μM의 매우 낮은 농도에서 산화질소 생성의 저해 활성을 나타냄을 확인하였다.

[213] [표4]

화합물	IC50(μM)
Minocycline	21.28±0.48
화학식 1 (yuanhuafine)	0.37±0.15
화학식 2 (genkwadaphnine)	0.06±0.02
화학식 3 (genkwanine H)	1.06±0.12
화학식 4 (genkwanine M)	0.18±0.04
화학식 5 (genkwanin K)	4.67±3.10
화학식 6 (yuanhuapine)	0.25±0.06
화학식 7 (genkwanin A)	3.41±0.99
화학식 8 (orthobenzoate 2)	1.22±0.13
화학식 9 (1, 2α-dihydrodaphnetoxin)	1.60±0.37
화학식 10 (genkwanin I)	7.79±0.91

[214]

[215] [표5]

	양성대조군	화합물11	화합물12	화합물13	화합물14	화합물15	화합물16
IC_{50} (μM)	29.9	3.49	2.3	1.8	1.03	3.73	1.78

[216] **실시예 5: 마이크로글리아 BV-2 세포에서 전염증성 사이토카인 생성 억제활성**

[217] 마이크로글리아에서의 대표적인 염증인자인 IL-1b, IL-6 및 TNFa에 대한 화합물의 생성억제활성을 조사하였다. 마이크로글리아 BV-2 세포를 96 웰 플레이트에 1×10^5 세포/웰로 넣고, LPS (1 mg/mL)를 화합물과 함께 5시간 배양하였다. 각 웰에서 세포를 회수하여 웨스턴 블롯팅과 real-time PCR 을 실시하였다.

[218] 구체적으로, IL-1b 단백질의 발현량을 웨스턴 블롯팅으로 조사하였다. 1차 항체로 rabbit anti-IL-1b [Cell Signaling (Danvers, MA, USA); 1:1000])를 사용하였고, control로 mouse anti-actin (Sigma 1:5000)을 사용하였다. 2차 항체로 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse 또는 anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibody (Amersham, Piscataway, NY, USA)를 사용하였고, enhanced-chemiluminescent substrate (Amersham)로 발색하여 관찰하였다.

[219] 또한, IL-1b, IL-6, TNF-a 의 mRNA 발현량을 Real-time quantatitive PCR 로 분석하였다. 모든 쥐의 사이토카인과 GAPDH의 프라이머는 Invitrogen에서 구입하였고, 사이토카인 mRNA 발현량을 GAPDH mRNA 발현량으로 정규화(normalized)하여 구하였다.

[220] 웨스턴 블롯팅 및 PCR 수행 결과, 도 1A 및 1B와 같이, 모든 화합물의 투여군에서 IL-1b의 발현량이 감소함을 확인하였다. 또한, PCR 수행 결과, 도 1C 및 1D와 같이, 모든 화합물의 투여군에서 IL-6 및 TNF-a의 발현량 역시 감소함을 확인하였다.

[221] 본 명세서는 본 발명의 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 내용은 그 상세한 기재를 생략하였으며, 본 명세서에 기재된 구체적인 예시들 이외에 본 발명의 기술적 사상이나 필수적 구성을 변경하지 않는 범위 내에서 보다 다양한 변형이 가능하다. 따라서 본 발명은 본 명세서에서 구체적으로 설명하고 예시한 것과 다른 방식으로도 실시될 수 있으며, 이는 본 발명의 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자이면 이해할 수 있는 사항이다.

산업상 이용가능성

[222] 상술한 바와 같이, 본 발명은 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 신경세포에서의 염증반응을 억제하는 효과를 나타냄으로써, Nurr1 단백질의 활성 억제로 인해 유발되는 파킨슨병을 비롯한 신경퇴행성 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[223]

서열목록 Free Text

[224] 서열번호 1

[225] DNA

[226] Artificial Sequence

[227] GLA4 binding gene

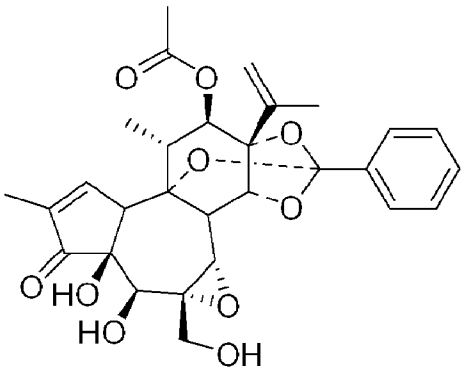
[228] ctcggaggac agtactccg

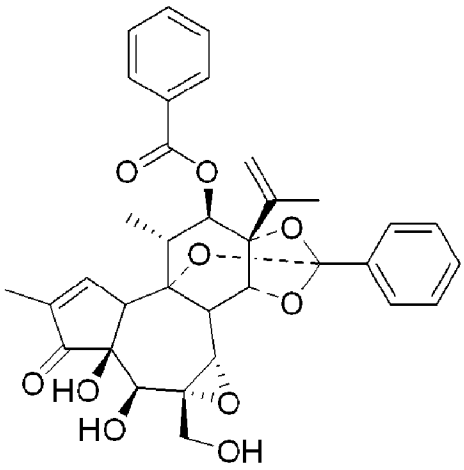
[229]

청구범위

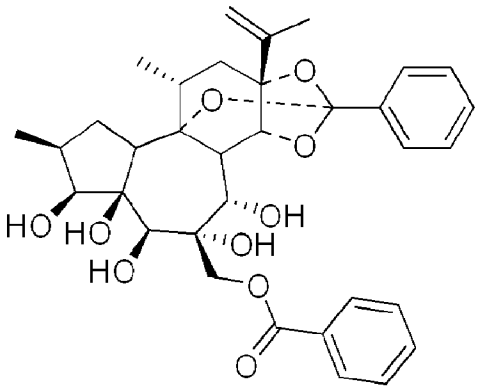
[청구항 1] 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 다이터펜계 화합물은 하기 화학식 1 내지 16을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

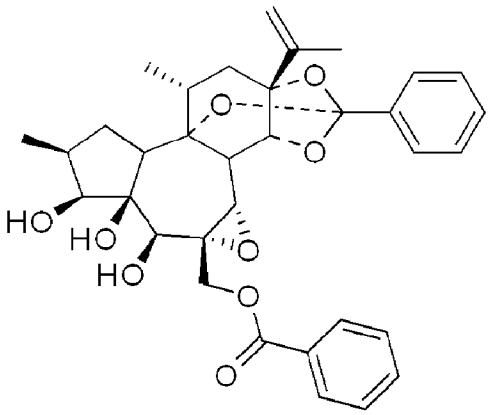
[화학식 1] [화학식 2]



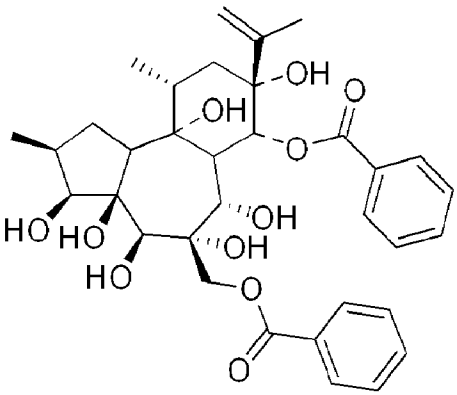


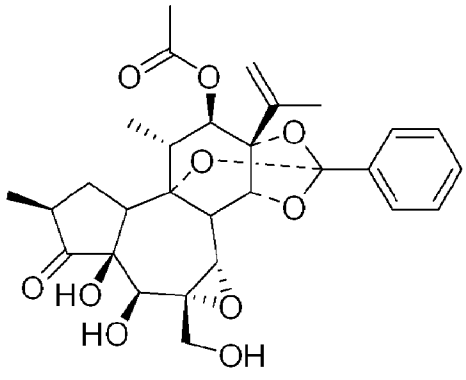
[화학식 3] [화학식 4]



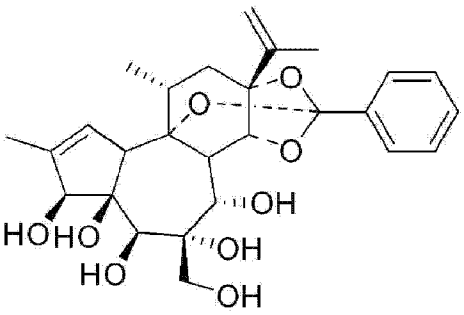


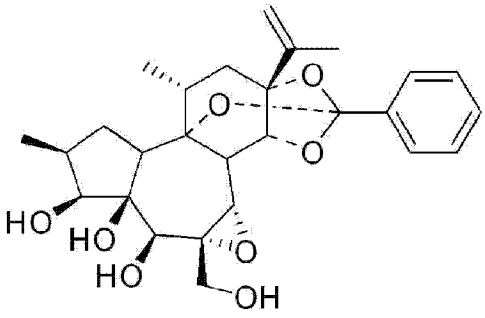
[화학식 5] [화학식 6]



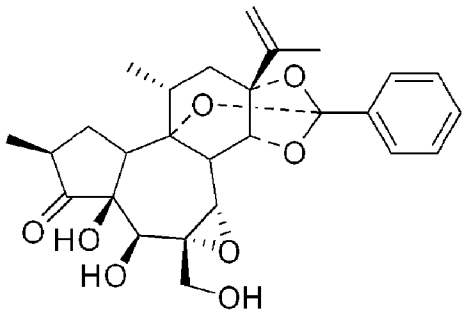


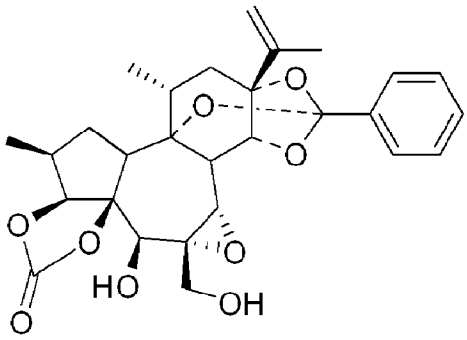
[화학식 7] [화학식 8]



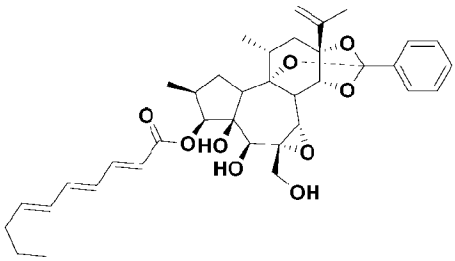


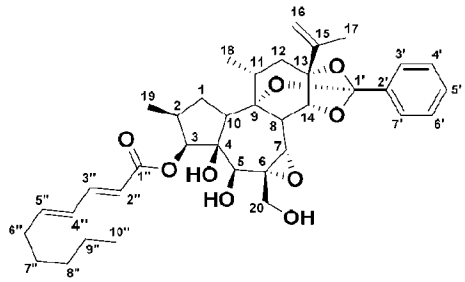
[화학식 9] [화학식 10]



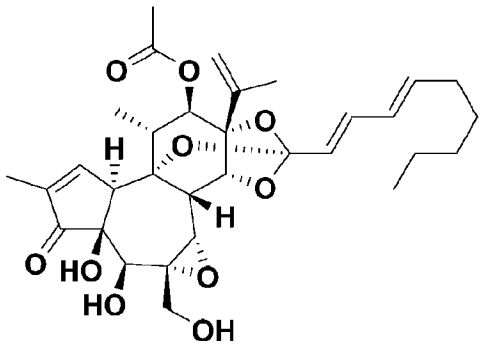


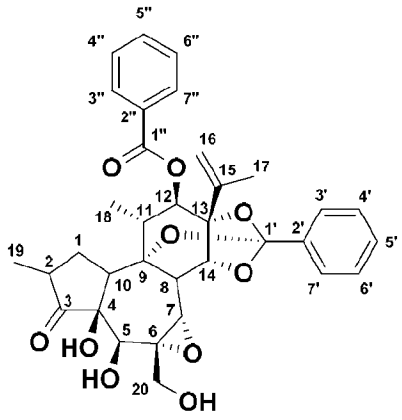
[화학식 11] [화학식 12]



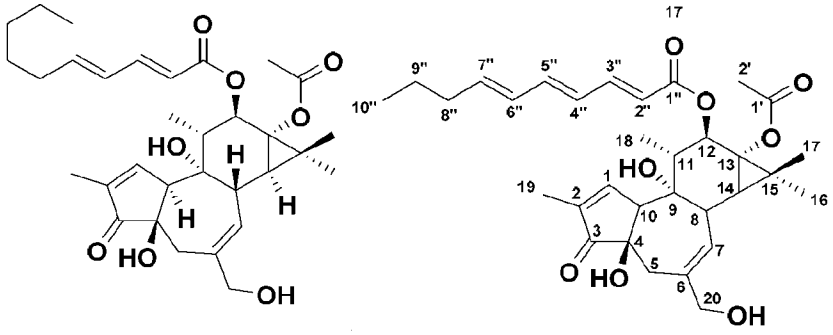


[화학식 13] [화학식 14]





[화학식 15] [화학식 16]



[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 다이터펜계 화합물은 화학식 2 , 8, 13, 14 또는 16의 화합물인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 다이터펜계 화합물은 화학식 2의 화합물인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 다이터펜계 화합물은 화학식 14의 화합물인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

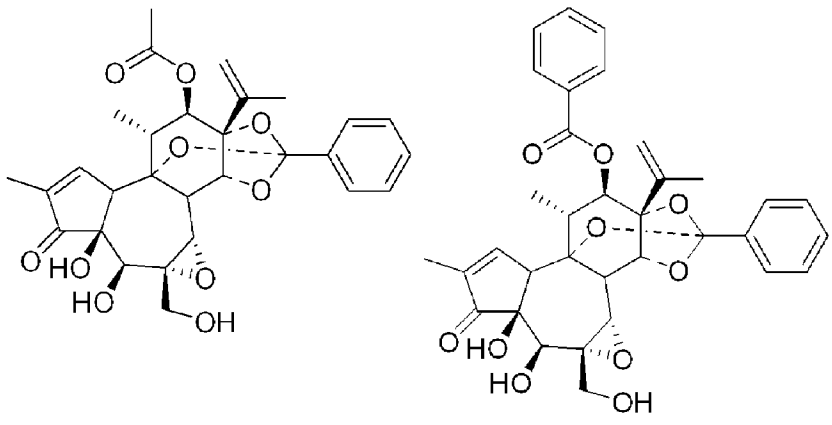
[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭 병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 및 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD)인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

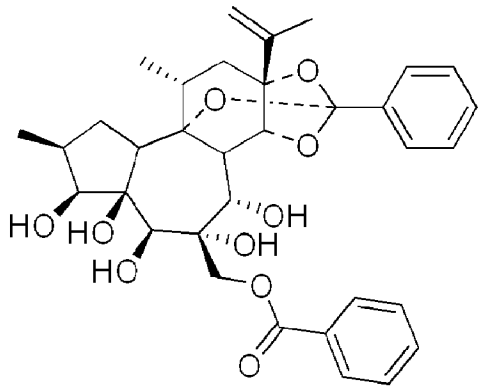
[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 다이터펜계 화합물은 팥꽃나무 꽃 추출물로부터 분리된 화합물인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

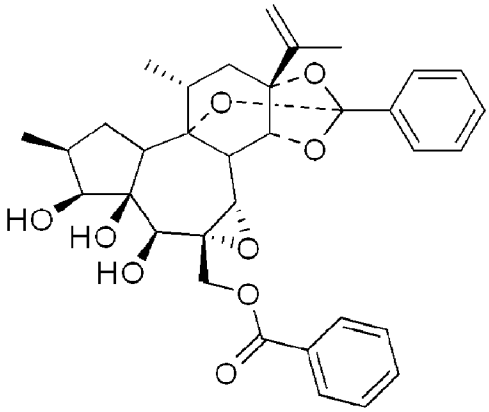
[청구항 8] 다이터펜계 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로서, 상기 다이터펜계 화합물은 하기 화학식 1 내지 16을 포함하는 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[화학식 1] [화학식 2]

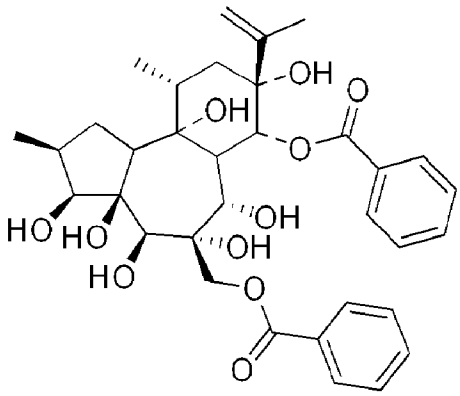


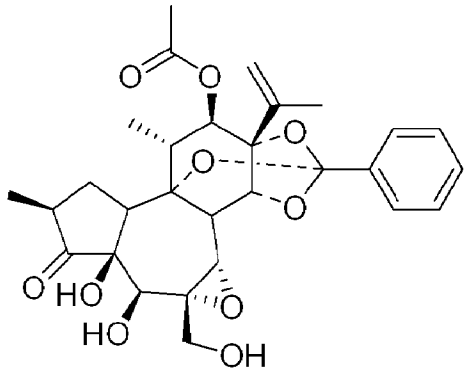
[화학식 3] [화학식 4]



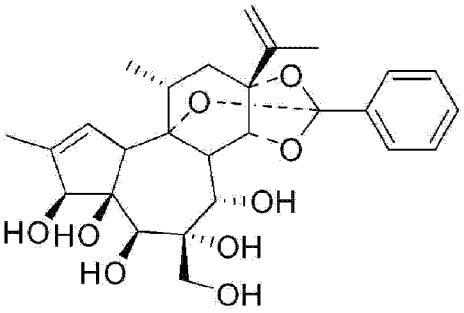


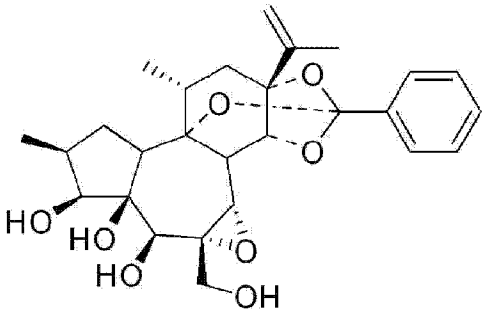
[화학식 5] [화학식 6]



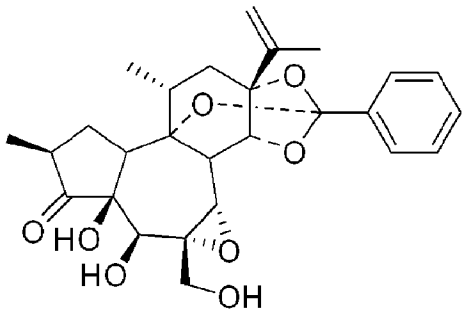


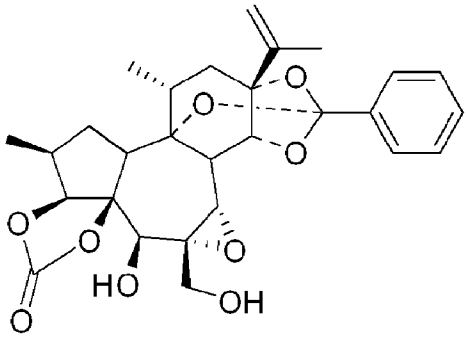
[화학식 7] [화학식 8]



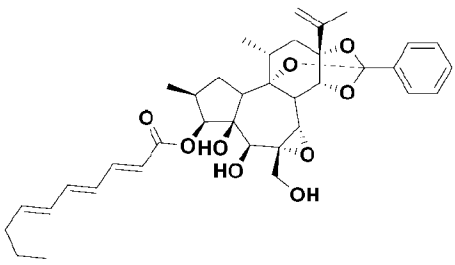


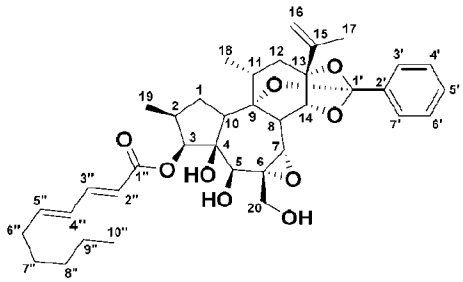
[화학식 9] [화학식 10]



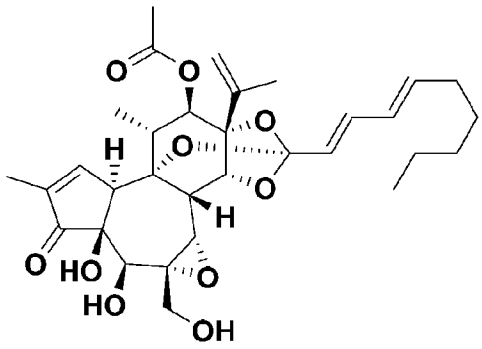


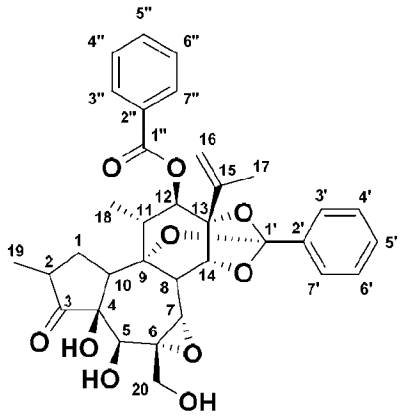
[화학식 11] [화학식 12]



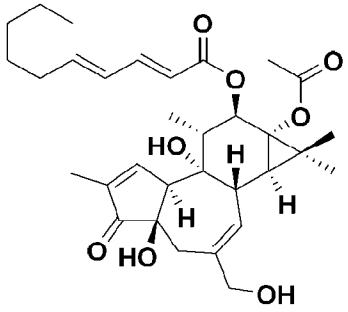


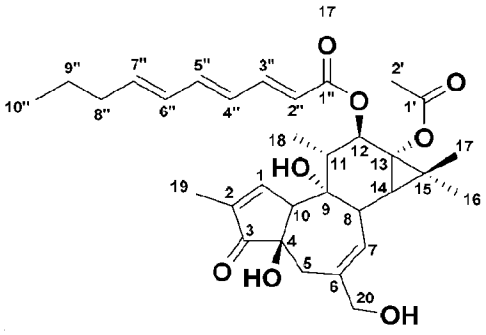
[화학식 13] [화학식 14]





[화학식 15] [화학식 16]



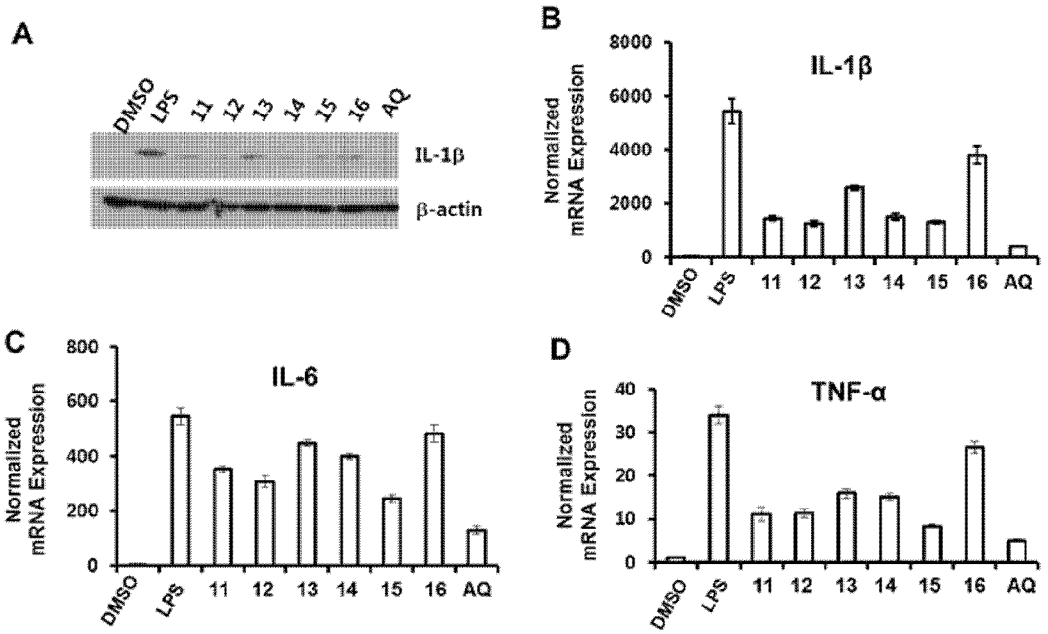


[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭 병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전측두엽 치매(Fronto-Temporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 및 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

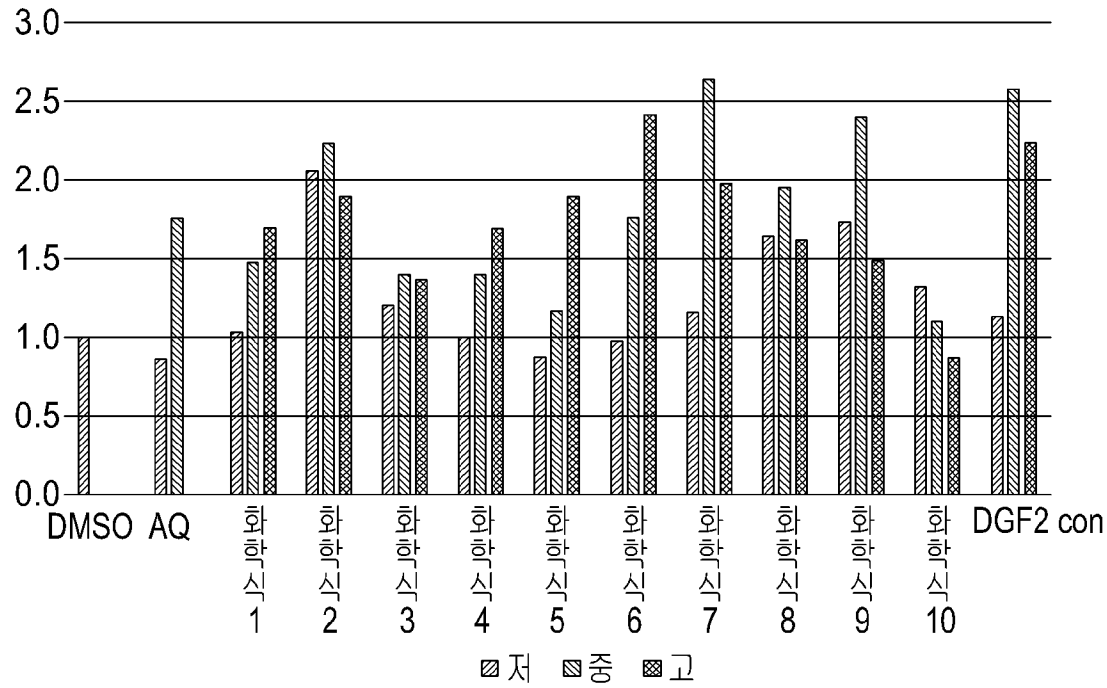
[청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's disease; PD)인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

WO 2019/098699 PCT/KR2018/013990

[도1]



[도2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/013990

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/357(2006.01)i, A61K 31/216(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61K 31/215(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/357; A61K 31/00; A61K 31/22; A61K 31/222; A61K 36/83; A61P 25/28; C07C 69/03; A61K 31/216; A23L 33/10; A61K 31/215

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & Keywords: tetradecahydrobenzo[e]azulene, tetradecahydroazuleno[5',4':3,4] benzo[1,2-d][1,3]dioxole, tetradecahydrooxireno[2",3":6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxole, tetradecahydro-1H-cyclopropa[3,4] benzo[1,2-e]azulene, diterpenes based compound, neurodegenerative diseases, Parkinson's disease, Daphne genkwa extract, Daphne genkwa

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2014-0117564 A (BIOSUCCESS BIOTECH CO., LTD.) 07 October 2014 See claims 96, 99.	1-10
X	EP 0457295 A2 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 21 November 1991 See claims 1, 4.	1-10
X	JACOBSEN, J. S., et al., "The Release of Alzheimer's Disease β Amyloid Peptide Is Reduced by Phorbol Treatment", The Journal of Biological Chemistry, 1994, vol. 269, no. 11, pages 8376-8382 See page 8376.	1-10
A	WO 2012-138034 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 11 October 2012 See claims 1, 2.	1-10
A	HAN, B.-S. et al., "Daphnane Diterpenes from Daphne Genkwa Activate Nurr1 and Have a Neuroprotective Effect in an Animal Model of Parkinson's Disease", Journal of Natural Product, 2016, vol. 79, no. 6, pages 1604-1609 See the entire document.	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 FEBRUARY 2019 (22.02.2019)	**22 FEBRUARY 2019 (22.02.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/013990

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU, F. et al., "Nitric Oxide Inhibitory Daphnane Diterpenoids as Potential Antineuroinflammatory Agents for AD from the Twigs of Trigonostemon Thyrsoideus", Bioorganic Chemistry, 07 September 2017, vol. 75, pages 149-156 See abstract; and figure 1.	1-10
PX	WO 2018-089561 A1 (RICH PHARMACEUTICALS, INC.) 17 May 2018 See claims 13, 15, 16.	1-10
PX	HAN, B.-S. et al., "Daphnane and Phorbol Diterpenes, Anti-neuroinflammatory Compounds with Nurr1 Activation from the Roots and Stems of Daphne Genkwa", Biological and Pharmaceutical Bulletin, 01 December 2017, vol. 40, no. 12, pages 2205-2211 See abstract; pages 2205-2210; and figures 1-3.	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/013990

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0117564 A	07/10/2014	AU 2008-211081 A1	07/08/2008
		AU 2013-209524 A1	14/08/2014
		AU 2013-287280 A1	14/08/2014
		AU 2013-287280 B2	30/06/2016
		AU 2016-203714 A1	23/06/2016
		AU 2016-203714 B2	04/01/2018
		AU 2016-234887 A1	20/10/2016
		AU 2016-234887 B2	04/10/2018
		AU 2017-276345 A1	18/01/2018
		BR PI0806863 A2	29/04/2014
		CA 2676551 A1	07/08/2008
		CA 2676551 C	22/12/2015
		CA 2861459 A1	25/07/2013
		CA 2862301 A1	16/01/2014
		CN 101677542 A	24/03/2010
		CN 101677542 B	25/05/2016
		CN 104168957 A	26/11/2014
		CN 104507466 A	08/04/2015
		CN 108969514 A	11/12/2018
		CY 1117938 T1	17/05/2017
		EP 2170053 A1	07/04/2010
		EP 2368555 A1	28/09/2011
		EP 2368555 B1	20/04/2016
		EP 2804601 A2	26/11/2014
		EP 2804669 A1	26/11/2014
		ES 2584327 T3	27/09/2016
		HK 1204447 A1	20/11/2015
		HK 1204461 A1	20/11/2015
		HR P20160902 T1	23/09/2016
		HU E029954 T2	28/04/2017
		JP 2010-516813 A	20/05/2010
		JP 2013-216697 A	24/10/2013
		JP 2015-504096 A	05/02/2015
		JP 2015-513315 A	07/05/2015
		JP 2016-056192 A	21/04/2016
		JP 2018-076336 A	17/05/2018
		JP 2018-109014 A	12/07/2018
		JP 2018-203754 A	27/12/2018
		JP 5923068 B2	24/05/2016
		JP 6336914 B2	06/06/2018
		KR 10-1187859 B1	08/10/2012
		KR 10-2009-0130169 A	18/12/2009
		KR 10-2012-0091267 A	17/08/2012
		KR 10-2014-0129000 A	06/11/2014
		LT 2368555 T	26/09/2016
		MX 2009008179 A	08/12/2009
		MX 2014008773 A	10/04/2015
		MX 2014008776 A	20/08/2015
		NZ 628294 A	24/11/2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/013990

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		NZ 628296 A	24/02/2017
		PH 12014501656 A1	13/10/2014
		PH 12014501661 A1	20/10/2014
		PL 2368555 T3	28/02/2017
		PT 2368555 T	25/07/2016
		RS 54988 B1	30/11/2016
		RU 2009132345 A	10/03/2011
		RU 2014133516 A	10/03/2016
		RU 2014133517 A	10/03/2016
		RU 2472511 C2	20/01/2013
		RU 2650963 C2	18/04/2018
		RU 2659684 C2	03/07/2018
		SG 11201404211P A	26/09/2014
		SG 11201404212Y A	30/10/2014
		SI 2368555 T1	28/10/2016
		TW 201350110 A	16/12/2013
		TW 201350111 A	16/12/2013
		TW 201442704 A	16/11/2014
		TW 201444554 A	01/12/2014
		TW 201804991 A	16/02/2018
		TW 201817421 A	16/05/2018
		TW I619494 B	01/04/2018
		TW I630909 B	01/08/2018
		US 10010519 B2	03/07/2018
		US 10099996 B2	16/10/2018
		US 10143672 B2	04/12/2018
		US 2008-0226589 A1	18/09/2008
		US 2014-0011873 A1	09/01/2014
		US 2014-0017194 A1	16/01/2014
		US 2014-0017196 A1	16/01/2014
		US 2014-0018329 A1	16/01/2014
		US 2014-0106005 A1	17/04/2014
		US 2014-0140979 A1	22/05/2014
		US 2014-0206762 A1	24/07/2014
		US 2015-0071874 A1	12/03/2015
		US 2015-0071908 A1	12/03/2015
		US 2015-0072960 A1	12/03/2015
		US 2015-0197478 A1	16/07/2015
		US 2015-0202177 A1	23/07/2015
		US 2015-0202178 A1	23/07/2015
		US 2015-0342918 A1	03/12/2015
		US 2015-0374648 A1	31/12/2015
		US 2015-0374656 A1	31/12/2015
		US 2015-0376109 A1	31/12/2015
		US 2016-0106698 A9	21/04/2016
		US 2016-0237020 A9	18/08/2016
		US 2016-0250173 A1	01/09/2016
		US 2016-0332955 A9	17/11/2016
		US 2017-0071892 A1	16/03/2017
		US 2017-0087112 A1	30/03/2017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2017-0096386 A1	06/04/2017
		US 2017-0151205 A1	01/06/2017
		US 2017-0319533 A1	09/11/2017
		US 2018-0214409 A1	02/08/2018
		US 2018-0256529 A9	13/09/2018
		US 2018-0271822 A1	27/09/2018
		US 2019-0002390 A1	03/01/2019
		US 9132113 B2	15/09/2015
		US 9533938 B2	03/01/2017
		US 9550722 B2	24/01/2017
		US 9603825 B2	28/03/2017
		US 9636317 B2	02/05/2017
		US 9750713 B2	05/09/2017
		US 9907775 B2	06/03/2018
		US 9974764 B2	22/05/2018
		WO 2008-094657 A1	07/08/2008
		WO 2013-110006 A2	25/07/2013
		WO 2013-110006 A3	05/02/2015
		WO 2014-011209 A1	16/01/2014
		ZA 200905273 B	28/04/2010
		ZA 201405564 B	24/02/2016
EP 0457295 A2	21/11/1991	AT 151287 T	15/04/1997
		AT 249215 T	15/09/2003
		AU 4035793 A	19/07/1993
		AU 678159 B2	22/05/1997
		CA 2042668 A1	17/11/1991
		CA 2042668 C	03/12/2002
		CA 2126083 A1	24/06/1993
		CA 2126083 C	15/06/2004
		DE 69125523 T2	14/08/1997
		DE 69233195 T2	01/04/2004
		DK 0457295 T3	28/04/1997
		EP 0457295 A3	05/08/1992
		EP 0457295 B1	09/04/1997
		EP 0617619 A1	29/01/2003
		EP 0617619 B1	10/09/2003
		ES 2102986 T3	16/08/1997
		GR 3024032 T3	31/10/1997
		JP 07-025786 A	27/01/1995
		JP 07-501554 A	16/02/1995
		US 5242932 A	07/09/1993
		US 5348963 A	20/09/1994
		US 5385915 A	31/01/1995
		US 5538983 A	23/07/1996
		WO 93-11762 A1	24/06/1993
WO 2012-138034 A1	11/10/2012	KR 10-1426307 B1	05/08/2014
		KR 10-1631589 B1	17/06/2016
		KR 10-2012-0113924 A	16/10/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/013990

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		KR 10-2013-0057878 A	03/06/2013
		US 2014-0142173 A1	22/05/2014
		US 9034916 B2	19/05/2015
WO 2018-089561 A1	17/05/2018	NONE	

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/013990

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/357(2006.01)i, A61K 31/216(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A61K 31/215(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 31/357; A61K 31/00; A61K 31/22; A61K 31/222; A61K 36/83; A61P 25/28; C07C 69/03; A61K 31/216; A23L 33/10; A61K 31/215

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드:tetradecahydrobenzo[e]azulene, tetradecahydroazuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxole, tetradecahydrooxireno[2'',3'':6',7']azuleno[5',4':3,4]benzo[1,2-d][1,3]dioxole, tetradecahydro-1H-cyclopropa[3,4]benzo[1,2-e]azulene, 다이터펜계 화합물, 신경퇴행성 질환, 파킨슨병, 팥꽃나무 꽃 추출물, Daphne genkwa

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2014-0117564 A (바이오석세스 바이오텍 컴퍼니 리미티드) 2014.10.07 청구항 96, 99 참조.	1-10
X	EP 0457295 A2 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 1991.11.21 청구항 1, 4 참조.	1-10
X	JACOBSEN, J. S., 등, "The release of Alzheimer's disease β amyloid peptide is reduced by phorbol treatment", The Journal of Biological Chemistry, 1994, 제269권, 제11호, 페이지 8376-8382 페이지 8376 참조.	1-10
A	WO 2012-138034 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 2012.10.11 청구항 1, 2 참조.	1-10
A	HAN, B.-S. 등, "Daphnane diterpenes from daphne genkwa activate nurr1 and have a neuroprotective effect in an animal model of Parkinson's disease", Journal of Natural Product, 2016, 제79권 , 제6호, 페이지 1604-1609 전체 문헌 참조.	1-10

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 02월 22일 (22.02.2019)	2019년 02월 22일 (22.02.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이기철
전화번호 +82-42-481-3353

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/013990

C(계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LIU, F. 등, "Nitric oxide inhibitory daphnane diterpenoids as potential antineuroinflammatory agents for AD from the twigs of Trigonostemon thyrsoideus", Bioorganic Chemistry, 2017.09.07, 제75권, 페이지 149-156 초록; 및 도면 1 참조.	1-10
PX	WO 2018-089561 A1 (RICH PHARMACEUTICALS, INC.) 2018.05.17 청구항 13, 15, 16 참조.	1-10
PX	HAN, B.-S. 등, "Daphnane and phorbol diterpenes, anti-neuroinflammatory compounds with nurr1 activation from the roots and stems of Daphne genkwa", Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2017.12.01, 제40권, 제12호, 페이지 2205-2211 초록; 페이지 2205-2210; 및 도면 1-3 참조.	1-10

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/013990

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0117564 A	2014/10/07	AU 2008-211081 A1	2008/08/07
		AU 2013-209524 A1	2014/08/14
		AU 2013-287280 A1	2014/08/14
		AU 2013-287280 B2	2016/06/30
		AU 2016-203714 A1	2016/06/23
		AU 2016-203714 B2	2018/01/04
		AU 2016-234887 A1	2016/10/20
		AU 2016-234887 B2	2018/10/04
		AU 2017-276345 A1	2018/01/18
		BR PI0806863 A2	2014/04/29
		CA 2676551 A1	2008/08/07
		CA 2676551 C	2015/12/22
		CA 2861459 A1	2013/07/25
		CA 2862301 A1	2014/01/16
		CN 101677542 A	2010/03/24
		CN 101677542 B	2016/05/25
		CN 104168957 A	2014/11/26
		CN 104507466 A	2015/04/08
		CN 108969514 A	2018/12/11
		CY 1117938 T1	2017/05/17
		EP 2170053 A1	2010/04/07
		EP 2368555 A1	2011/09/28
		EP 2368555 B1	2016/04/20
		EP 2804601 A2	2014/11/26
		EP 2804669 A1	2014/11/26
		ES 2584327 T3	2016/09/27
		HK 1204447 A1	2015/11/20
		HK 1204461 A1	2015/11/20
		HR P20160902 T1	2016/09/23
		HU E029954 T2	2017/04/28
		JP 2010-516813 A	2010/05/20
		JP 2013-216697 A	2013/10/24
		JP 2015-504096 A	2015/02/05
		JP 2015-513315 A	2015/05/07
		JP 2016-056192 A	2016/04/21
		JP 2018-076336 A	2018/05/17
		JP 2018-109014 A	2018/07/12
		JP 2018-203754 A	2018/12/27
		JP 5923068 B2	2016/05/24
		JP 6336914 B2	2018/06/06
		KR 10-1187859 B1	2012/10/08
		KR 10-2009-0130169 A	2009/12/18
		KR 10-2012-0091267 A	2012/08/17
		KR 10-2014-0129000 A	2014/11/06
		LT 2368555 T	2016/09/26
		MX 2009008179 A	2009/12/08
		MX 2014008773 A	2015/04/10
		MX 2014008776 A	2015/08/20
		NZ 628294 A	2017/11/24

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/013990

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		NZ 628296 A	2017/02/24
		PH 12014501656 A1	2014/10/13
		PH 12014501661 A1	2014/10/20
		PL 2368555 T3	2017/02/28
		PT 2368555 T	2016/07/25
		RS 54988 B1	2016/11/30
		RU 2009132345 A	2011/03/10
		RU 2014133516 A	2016/03/10
		RU 2014133517 A	2016/03/10
		RU 2472511 C2	2013/01/20
		RU 2650963 C2	2018/04/18
		RU 2659684 C2	2018/07/03
		SG 11201404211P A	2014/09/26
		SG 11201404212Y A	2014/10/30
		SI 2368555 T1	2016/10/28
		TW 201350110 A	2013/12/16
		TW 201350111 A	2013/12/16
		TW 201442704 A	2014/11/16
		TW 201444554 A	2014/12/01
		TW 201804991 A	2018/02/16
		TW 201817421 A	2018/05/16
		TW I619494 B	2018/04/01
		TW I630909 B	2018/08/01
		US 10010519 B2	2018/07/03
		US 10099996 B2	2018/10/16
		US 10143672 B2	2018/12/04
		US 2008-0226589 A1	2008/09/18
		US 2014-0011873 A1	2014/01/09
		US 2014-0017194 A1	2014/01/16
		US 2014-0017196 A1	2014/01/16
		US 2014-0018329 A1	2014/01/16
		US 2014-0106005 A1	2014/04/17
		US 2014-0140979 A1	2014/05/22
		US 2014-0206762 A1	2014/07/24
		US 2015-0071874 A1	2015/03/12
		US 2015-0071908 A1	2015/03/12
		US 2015-0072960 A1	2015/03/12
		US 2015-0197478 A1	2015/07/16
		US 2015-0202177 A1	2015/07/23
		US 2015-0202178 A1	2015/07/23
		US 2015-0342918 A1	2015/12/03
		US 2015-0374648 A1	2015/12/31
		US 2015-0374656 A1	2015/12/31
		US 2015-0376109 A1	2015/12/31
		US 2016-0106698 A9	2016/04/21
		US 2016-0237020 A9	2016/08/18
		US 2016-0250173 A1	2016/09/01
		US 2016-0332955 A9	2016/11/17
		US 2017-0071892 A1	2017/03/16
		US 2017-0087112 A1	2017/03/30

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2017-0096386 A1	2017/04/06
		US 2017-0151205 A1	2017/06/01
		US 2017-0319533 A1	2017/11/09
		US 2018-0214409 A1	2018/08/02
		US 2018-0256529 A9	2018/09/13
		US 2018-0271822 A1	2018/09/27
		US 2019-0002390 A1	2019/01/03
		US 9132113 B2	2015/09/15
		US 9533938 B2	2017/01/03
		US 9550722 B2	2017/01/24
		US 9603825 B2	2017/03/28
		US 9636317 B2	2017/05/02
		US 9750713 B2	2017/09/05
		US 9907775 B2	2018/03/06
		US 9974764 B2	2018/05/22
		WO 2008-094657 A1	2008/08/07
		WO 2013-110006 A2	2013/07/25
		WO 2013-110006 A3	2015/02/05
		WO 2014-011209 A1	2014/01/16
		ZA 200905273 B	2010/04/28
		ZA 201405564 B	2016/02/24
EP 0457295 A2	1991/11/21	AT 151287 T	1997/04/15
		AT 249215 T	2003/09/15
		AU 4035793 A	1993/07/19
		AU 678159 B2	1997/05/22
		CA 2042668 A1	1991/11/17
		CA 2042668 C	2002/12/03
		CA 2126083 A1	1993/06/24
		CA 2126083 C	2004/06/15
		DE 69125523 T2	1997/08/14
		DE 69233195 T2	2004/04/01
		DK 0457295 T3	1997/04/28
		EP 0457295 A3	1992/08/05
		EP 0457295 B1	1997/04/09
		EP 0617619 A1	2003/01/29
		EP 0617619 B1	2003/09/10
		ES 2102986 T3	1997/08/16
		GR 3024032 T3	1997/10/31
		JP 07-025786 A	1995/01/27
		JP 07-501554 A	1995/02/16
		US 5242932 A	1993/09/07
		US 5348963 A	1994/09/20
		US 5385915 A	1995/01/31
		US 5538983 A	1996/07/23
		WO 93-11762 A1	1993/06/24
WO 2012-138034 A1	2012/10/11	KR 10-1426307 B1	2014/08/05
		KR 10-1631589 B1	2016/06/17
		KR 10-2012-0113924 A	2012/10/16

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/013990

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-2013-0057878 A	2013/06/03
		US 2014-0142173 A1	2014/05/22
		US 9034916 B2	2015/05/19
WO 2018-089561 A1	2018/05/17	없음	