



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0107388
(43) 공개일자 2019년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/365 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)

A61P 25/00 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/365 (2013.01)

A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0028591

(22) 출원일자 2018년03월12일

심사청구일자 2018년03월12일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

조익현

서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호 (반포동, 반포아파트)

장민희

강원도 영월군 남면 들골안길 2-19

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 10 항

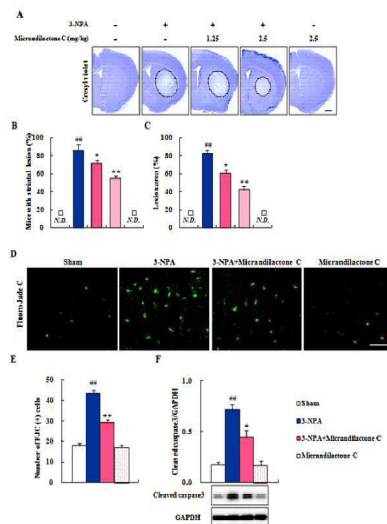
(54) 발명의 명칭 **미크란디락톤 C를 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 신경계 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)은 신경세포 사멸을 억제하고, 미세아교세포의 활성을 억제하며, 염증에 의한 신경손상 회복 효과를 보이며, 신경계 질환에 의한 운동 장애에 대한 회복 효과를 보임으로써, 신경계 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물 또는 식품 조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 25/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

(72) 발명자

장대식

서울특별시 강남구 광평로10길 50, 106동 103호 (일원동, 청솔빌리지)

김혜미

경기도 군포시 번영로 403 510동 1901호(산본동, 가야주공5단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2A2A05069493

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업/핵심(후속)

연구과제명 헌팅딘질환 동물모델에서 미세아교세포 활성화의 병리 기능 및 치료기술 연구 aaV/DJ 벡터와 shRNA 활용

기 여 율 50/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2017.09.01 ~ 2020.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016M3C7A1905074

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업/뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 신경손상 연관 뇌기능조절 microglia 타겟 발굴 및 제어 융합기술 개발

기 여 율 50/100

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

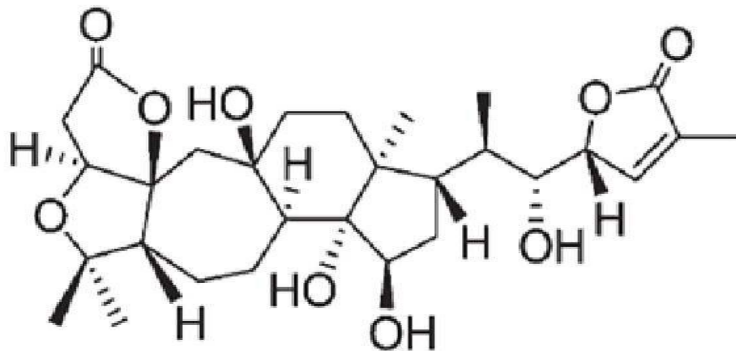
청구범위

청구항 1

미크란딜락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미크란딜락톤 C (Micrandilactone C)는 하기 화학식 I의 구조를 가지는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 :



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 신경계 질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 피크병, 크로이츠펔트-야콥병, 전두측두치매, 루이치매, 근육위축가쪽경화증, 피질기저퇴행증, 다계통위축증, 진행성핵상마비, 신경계자가면역질환, 다발성 경화증, 염증성 및 신경병증성 통증, 및 뇌혈관질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 어느 하나인 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 신경계 질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 다발성 경화증으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

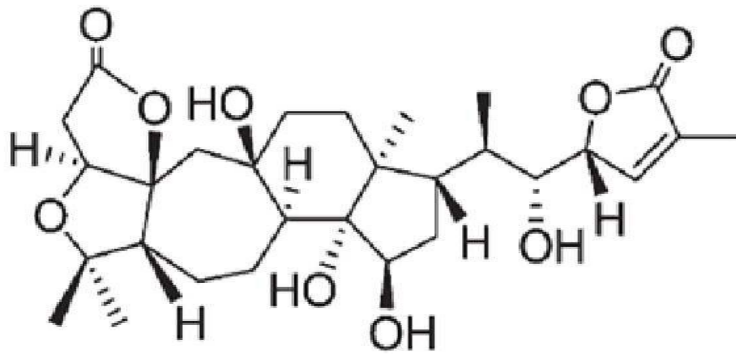
제4항에 있어서, 상기 신경계 질환은 파킨슨질환, 헌팅턴병 또는 다발성경화증인 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

미크란딜락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 미크란딜락톤 C (Micrandilactone C)는 하기 화학식 I의 구조를 가지는 신경계 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물 :



청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 신경계 질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 피크병, 크로이츠펔트-야콥병, 진두측두치매, 루이치매, 근육위축가쪽경화증, 피질기저퇴행증, 다계통위축병, 진행성핵상마비, 신경계자가면역질환, 다발성 경화증, 염증성 및 신경병증성 통증, 및 뇌혈관질환으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 어느 하나인 신경계 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 신경계 질환은 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 다발성 경화증으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 신경계 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 신경계 질환은 파킨슨질환, 헌팅턴병 또는 다발성경화증인 신경계 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경계 질환의 예방, 개선 또는 치료용, 약학적 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중추신경계(central nervous system, CNS)는 신경세포(neuron)와 신경교세포(neuroglia)로 이루어져 있다. 신경교세포는 뇌 속에 가장 많이 분포되어 있는 세포로서 전체 뇌세포의 90%, 부피로 뇌 전체의 50%를 차지하고 있다. 이 세포들은 그 자체로는 신경 충격을 생성시키지 못하지만 신경원들이 고유의 기능을 수행하는데 도움을 주며, 뇌 조직이 손상되었을 때 이를 회복시키는 데도 매우 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 상기 신경교세포는 다시 별아교세포(astrocytes), 미세아교세포(microglia) 및 희소돌기아교세포(oligodendrocytes)의 세 종류로 구성되어 있다.

[0003] 이들 중에서 미세아교세포(microglia)는 미세교세포, 또는 소교세포로도 불리며 중추신경계에 상재하는 면역세포로서 전체 뇌 세포의 5-10%를 차지한다.

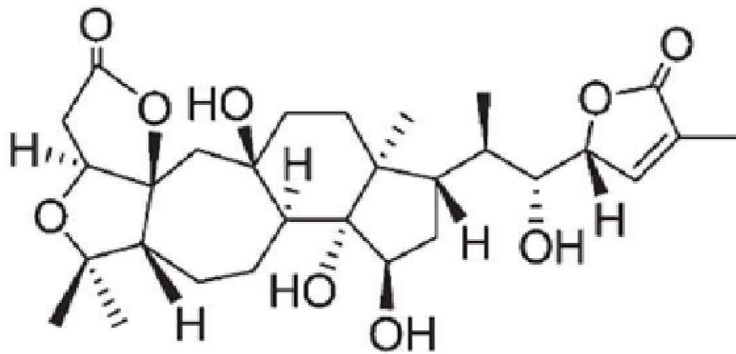
[0004] 상기 미세아교세포는 중추신경계에서 일차 방어라인으로서 기능한다. 미세아교세포는 중추신경계에서 염증 매개자의 주요 세포 내 공급원이다. 미세아교세포는 일산화질소(nitric oxide, NO), 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS), 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines) 및 프로스타글란딘(prostaglandin)을 생산함으로써 신경염증에 관여한다. 활성화된 미세아교세포는 손상된 신경조직 영역으로 이동하여 미생물 및 세포파편(cell debris)을 포식하고 파괴한다.

[0005] 그러나 염증세포로서의 미세아교세포의 역할은 항상 유익한 것만은 아니다. 조절되지 않은 미세아교세포의 활성화와 지속적인 과도한 신경염증은 신경퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)을 포함하는 다양한 중추신경계 병리의 원인으로 여겨지고 있다. 즉, 기능적으로 활성화된 미세아교세포는 염증매개물질을 생성 및 분비하여 신경세포 사멸을 초래하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 즉, 중추신경계에 존재하는 면역세포인 미세아교세포는 다양한 외인성, 내인성 물질로 인해 활성화될 수 있으며, 활성화된 미세아교세포는 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-1 β , 일산화질소, 프로스타글란딘, 초과산화물 등의 물질을 생산, 방출한다. 이러한 물질들의 생성은 단기적으로는 면역반응을 유발하지만, 그 과도한 생산이나 지속적인 생산은 근접한 신경세포들의 사멸을 유도하여 결국 신경퇴행을 비롯한 신경계 질환을 유발한다는 것이다. 또 사멸 중인 신경세포가 방출하는 물질들이 미세아교세포의 활성을 다시 유발하게 되므로, 신경퇴행은 지속적인 악순환에 빠지게 된다. 실제로 미세아교세포의 활성이 알츠하이머병(Alzheimer's Disease, AD), 파킨슨병(Parkinson's Disease, PD), 헌팅턴병(Huntington's Disease, HD), 루게릭병(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS), 크로이츠펠트야콥병(Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD), 다발성경화증(Multiple Sclerosis, MS), 뇌졸중(Stroke), 염증성 및 신경병증성 통증(Inflammatory and Neuropathic pain) 등의 다양한 신경계 질환과 관계가 있음이 보고되었다.

[0007] 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)는 하기 화학식 1의 구조를 가지는 화합물이다.

[0008] **[화학식 I]**



[0009]

[0010] 위 미크란디락톤 C와 관련하여서는 항-HIV 효과에 대해 연구된 바가 있으나, 이외에 다른 의약 용도와 관련되어서 지금까지 연구된 바가 없다.

[0011] 본 발명자들은 신경계 질환에 효과가 있는 개별 물질들에 대한 연구개발을 수행하여, 위 미크란디락톤 C가 신경계 질환의 예방, 개선 또는 치료에 우수한 효과를 보임을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2004-0067771호
(특허문헌 0002) 미국등록특허 제7,078,064호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 목적은 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

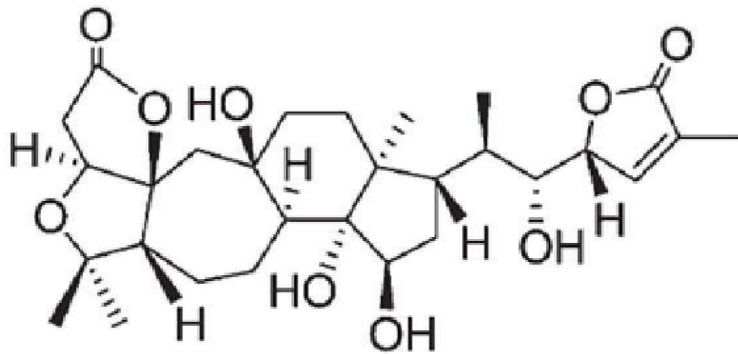
[0015] 본 발명자들은 신경계 질환의 치료에 적합한 치료 물질들에 대해 검색을 수행하던 중, 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)가 신경 염증을 감소시키고, 미세아교세포 활성을 억제하며, 뇌신경세포를 보호하며, 신경계 질환에 의한 운동 장애 등에 대한 개선 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0016] 본 발명은 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경계 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0017] 본 발명의 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)는 신경 세포 사멸을 억제하고, 미세아교세포의 활성을 억제하며, 염증에 의한 신경 손상 회복 효과를 나타내며, 신경계 질환에 의해 발생하는 운동 장애의 개선 효과를 나타냄으로써 신경계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)는 하기 화학식 I의 구조를 가지는 화합물이다 :

[0019] [화학식 I]



[0020]

[0021] 본 발명의 유효성분인 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)는 화학 합성에 의해 제조된 화합물이거나 오미자속 추출물로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, *Chem. Pharm. Bull.* **63**, 746-751 (2015)에 개시된 방법에 따라 천연물로부터 분리될 수 있다. 일 실시양태에 있어서 위 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)는 오미자 뿌리로부터 분리될 수 있다. 구체적으로, 세절한 오미자 뿌리를 물, C₁-C₄의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합물로 추출하고, 이의 분획화 및 컬럼크로마토그래피 분리를 통해 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)의 분리 및 동정이 가능하다.

[0022] 또한, 상업적으로 제조되어 판매되는 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)라면 제한없이 사용 가능하다.

[0024] 본 발명에 있어서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)는 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 존재할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서 “약제학적으로 허용 가능한 염”은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 통상적으로 금속염, 유기 염기와 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서 신경계 질환은 신경세포, 예컨대 뇌세포의 사멸 또는 퇴화가 일시적 또는 오랜 기간에 걸쳐 진행됨으로써 신경 기능의 손실이 일어나고 이에 의해 인지기능, 감각기능, 운동기능, 전신기능의 저하가 일어나는 상태 또는 증상을 의미한다.

[0027] 예를 들어, 상기 신경계 질환은 뇌졸중(stroke), 치매(dementia), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 피크병(Pick disease), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease), 전두측두치매(frontotemporal dementia), 루이치매(dementia with Lewy bodies), 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis; 루게릭병), 피질기저퇴행증(corticobasal

degeneration), 다계통위축병(multiple system atrophy), 진행성핵상마비(progressive supranuclearpalsy), 신경계 자가면역질환(neurological autoimmune disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 염증성 및 신경병증성 통증(inflammatory and neuropathic pain) 및 뇌혈관질환(neuro vascular disease)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

- [0028] 보다 바람직하게 위 신경계 질환은 신경 퇴행성 질환일 수 있으며, 예를 들어 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 다발성 경화증으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0029] 보다 바람직하게, 신경계 질환은 헌팅턴병, 파킨슨병 또는 다발성경화증일 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 언급되는 예방은 본 발명의 조성물의 투여에 의해 염증의 증상을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 치료는 본 발명의 조성물의 투여에 의해 염증에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0031] 본 발명은 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 50중량%으로 미크란딜락톤 C (Micrandilactone C)를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0033] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0034] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육 내 주사를 통하여 투여될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 다양한 경로로, 예를 들면, 경구, 복강 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 미크란딜락톤 C (Micrandilactone C)는 1일 0.01 내지 1,000 mg/kg, 바람직하게 1일 0.1 내지 500 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 신경계 질환 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0037] 또한 본 발명은 미크란딜락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 신경계 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0039] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0040] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨

제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

- [0041] 본 발명의 식품 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 0.01 내지 95 중량%, 바람직하게는 1 내지 80 중량%로 포함할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 신경계 질환의 예방 및/또는 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0043] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0044] 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질캡슐제는 통상의 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡슐제는 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0045] 환 형태의 건강기능식품은 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.
- [0046] 과립형태의 건강기능식품은 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μm), 14호 (1410 μm) 및 45호 (350 μm) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것이 전체량의 5.0 %이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하일 수 있다.
- [0047] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).
- [0048] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 음료, 껌, 비타민 복합제, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0049] 본 발명은 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 신경계 질환의 치료방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명에서 “미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염”, “신경계 질환”, 및 “투여” 등의 용어는 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0051] 상기 대상체는 동물을 말하며, 전형적으로 본 발명의 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 이용한 치료로 유의한 효과를 나타낼 수 있는 포유동물일 수 있다. 이러한 대상체의 바람직한 예로 인간과 같은 영장류가 포함될 수 있다. 또한 이와 같은 대상체들에는 신경계 질환의 증상을 갖거나 이와 같은 증상을 가질 위험이 있는 대상체들이 모두 포함될 수 있다.
- [0052] 본 발명은 또한 신경계 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 모두의 용도를 제공한다.
- [0053] 본 발명은 또한 신경계 질환의 치료에 사용하기 위한 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0054] 본 발명은 또한 신경계 질환의 치료를 위한 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0055] 본 발명의 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)은 신경세포 사멸을 억제하고, 미세아교세포의 활성을 억제하며, 염증에 의한 신경손상을 회복시키며, 신경계 질환에 의한 운동 장애등에 대해 회복 효과를 보임으로써 신경계

질환의 예방, 개선 또는 치료에 우수한 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)의 ^1H -NMR 스펙트럼 결과를 나타낸다.

도 2는 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)의 ^{13}C -NMR 스펙트럼 결과를 나타낸다.

도 3은 lipopolysaccharid (LPS) 또는 IL-4가 처리된 미세아교세포에서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 처리에 의한 신경에서의 염증 반응 억제 효과로 iNOS 발현 억제 및 Arginase-1 발현의 증진을 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 LPS가 처리된 미세아교세포에서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 처리에 의한 염증 반응 억제의 기전 및 효과로 MAPKs (JNK, ERK 및 p38), NF- κ B 및 STAT3의 발현 감소를 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 3-propionic acid (3-NPA)에 의한 헌팅턴병 동물 모델에서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 투여에 의한 신경학적 회복 효과, 생존율 증진 및 체중 증진 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 3-NPA에 의한 헌팅턴병 동물 모델에서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 투여에 의한 신경세포 사멸 억제 효능을 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 3-NPA에 의한 헌팅턴병 동물 모델에서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 투여에 의한 미세아교세포의 활성화 억제 효과를 나타낸다.

도 8은 3-NPA에 의한 헌팅턴병 동물 모델에서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 투여에 의한 신경 염증 관련 신호 기작 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 9는 3-NPA에 의한 헌팅턴병 동물 모델에서 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 투여에 의한 염증 관련 매개인자들의 발현 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0058] <제조예> 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)의 제조

[0059] 음지에서 건조하고, 세절한 오미자(Schisandra chinensis) 뿌리 1.72 kg을 70% 수용성 에탄올(20 L)에 침지하고 2일씩 3회에 걸쳐서 반복하여 추출하였다. 추출액을 회전감압농축기(Rotary Evaporator)로 40 °C에서 농축하여 70% 에탄올 추출물 235.75 g을 얻었다(수율 13.7%). 70% 에탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후에 에틸 아세테이트(EtOAc)와 부탄올을 이용하여 순차적으로 용매분획을 실시하였다. 에틸아세테이트 분획물(48.09 g)은 n-hexane-EtOAc-MeOH-H₂O 혼합물(9:1:0:0, 4:1:0:0, 3:2:0:0, 2:3:0:0, 0:1:0:0, 0:9:1:0.1, 0:8:2:0.2, 그리고 0:7:3:0.3, 최종적으로 100% MeOH)을 용출액으로 하는 실리카겔 칼럼크로마토그래피 실시에 의해 17 개의 분획물(E1-E17)로 세분화하였다. 이중 분획물 E14 (7.73 g)에 대해 n-hexane-EtOAc-MeOH 혼합액(6:3:1)을 용출용매로 하는 실리카겔 칼럼크로마토그래피를 실시하여 8개의 소분획물(E14-1-E14-8)로 나누었다. 소분획물 E14-4 (1.04 g)에 대해 세파데스(Sephadex) LH-20 칼럼크로마토그래피를 실시하여 미크란디락톤 C (Micrandilactone C) 220 mg을 분리하였다. 분리된 미크란디락톤 C (Micrandilactone C)의 화학구조는 NMR 자료 분석과 기존에 보고된 자료[Li et al., Chem. Commun., 23, 2936-2938 (2005)]와의 비교를 통해서 동정하였다.

[0060] 그 결과를 아래 표 1, 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[표 1] 미크란딜락톤 C (Micrandilactone C)의 NMR 결과

position	NMR data (ppm, multi, J, in pyridine- <i>d</i> ₅)	
	δ_H	δ_C
1	4.32 d (4.5)	82.6
2	2.98 dd (17.5, 4.5) /	37.6
	2.76 d (17.5)	
3		176.3
4		85.6
5	2.71 dd (13.5, 3.5)	59.3
6	1.33 overlap	29.2
	1.79 ddd (14.0, 8.0, 3.5)	
7	2.23 overlap / 2.73 overlap	25.0
8	2.04 dd (12.0, 1.5)	57.2
9		72.7
10		100.3
11	1.90 ddd (14.0, 3.0) /	38.9
	1.65 ddd (14.0, 3.0)	
12	1.73 ddd (13.5)	39.5
	2.81 ddd (13.5, 3.0)	
13		46.4
14		87.3
15	4.51 d (2.0)	77.5
16	2.25 overlap /	36.7
	2.53 overlap	
17	2.53 overlap	54.9
18	1.50 s	18.9
19	2.16 d (18.5) /	48.0
	2.09 d (18.5)	
20	2.61 m	38.4
21	1.35 d (6.5)	19.1
22	4.10 dd (7.0, 2.0)	74.1
23	5.30 d (2.0)	83.3
24	7.24 overlap	149.2
25		130.7
26		175.4
27	1.84 br s	11.2
29	1.32 s	30.6
30	1.12 s	24.1

[0061]

[0062] <실시예 1> LPS 또는 IL-4 처리 면역세포 모델에서의 면역 조절 효과 확인

[0063] 면역세포 모델은 미세아교세포(microglia) 세포주인 BV2 세포주를 사용하였다. 세포주는 100 mm plates에 배양액[Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Grand Island, New York, USA), 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) 및 1% penicillin/streptomycin (P/S, Gibco)]를 첨가하여 37° C 및 5% CO₂로 유지되는 배양기(incubator)안에서 배양되었으며, 3일 간격으로 배양액을 교체하였다.

[0064] 위 BV2 세포주를 이용하여 미크란딜락톤 C의 면역 조절 효과를 확인하였다. 구체적으로, 50 ng/ml의 Lipopolysaccharides (LPS, 0127:B8; Sigma, 미국)를 4시간 동안 BV2 세포에 처리하여 세포를 자극하거나 0.1 ng/ml의 interleukin (IL)-4를 24시간 동안 BV2 세포에 처리하여 세포를 자극하였다. micrandilactone C 투여군의 경우 위와 같이 LPS 또는 IL-4로 자극하기 1시간 전에 세포독성을 나타내지 않는 적정 농도로 0.05 μ M, 0.5 μ M 또는 5 μ M를 전처리하였다. micrandilactone C는 *Chem. Pharm. Bull.* 63, 746-751 (2015)에 기재된 분리 방법에 의해 제조된 것을 사용하였다. 정상대조군에는 Phosphate-buffered saline (PBS)를 투여하였다.

[0065] 위와 같은 LPS 또는 IL-4의 신경 염증 자극에 의한 세포의 활성화 및 염증 사이토카인 발현 변화의 분석을 웨스턴 블랏을 수행하였다.

- [0066] 구체적으로, 6 well plates에 1.0×10^6 개의 세포를 각각의 well에 분주하고, 위 설명된 바와 같이 시험군에 대하여 LPS 또는 IL-4로 자극하기 1시간 전에 micrandilactone C를 전처리하였고 대조군에 대해서는 LPS 또는 IL-4만을 투여하였다. LPS로 4시간과 IL-4로 24시간 각각 자극시킨 후에 세포를 각각 수집하여 단백질 용해 완충액 (protein lysis buffer; 10 mM 트리스, 0.5 mM EDTA, 0.25 M 수크로스) 50 μ l를 넣고 세포막을 터트려 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 소혈청알부민을 사용한 Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 20 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane, Gendepot, Barker, TX, USA)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 탈지유(skimmed milk, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBST로 수세한 후 1차 항체[토끼 항-inducible nitric oxide synthases (iNOS), arginase-1 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 토끼 항-phospho(p)-signal transducer and activator of transcription (STAT), nuclearfactor kappa B p65 (NF- κ B p65), p-c-JUN N-terminal kinase (JNK), p-extracellular signal-regulated kinase (ERK) 및 p-p38 (1:1,000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)]를 3% 탈지유에 희석시켜 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 그리고 TBST로 10분씩 3회 수세하고 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체(Vector Laboratories) 반응 후 TBST에 수세하고 ECL system (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)으로 단백질의 변화를 측정하였다. 단백질의 변화 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad)를 이용하였다. 각 단백질의 발현 수준은 토끼 항-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:5,000; Cell Signaling Technology)로 표준화하였다.
- [0067] 그 결과를 도 3 및 도 4에 나타내었다.
- [0068] 도 3은 본원 발명에 따른 미크란딜락톤 C 처리에 따른 면역 조절 효과를 보여준다. 구체적으로, 미크란딜락톤 C 처리는 LPS 또는 IL-4 처리 면역세포 모델 모두에서 M1형 미세아교세포의 마커인 iNOS의 발현을 현저히 억제하고(도 3A 및 C), M2형 미세아교세포의 마커인 arginase-1의 단백질 발현을 현저히 증가시킴(도 3B 및 C)을 보여 주었다.
- [0069] 도 4는 미크란딜락톤 C의 면역 기전 조절능을 보여준다. 구체적으로, LPS 처리 면역세포 모델에 APks (p-JNK(도 4의 A 및 B), p-ERK(도 4의 A 및 C) 및 p-p38(도 4의 A 및 D)), NF- κ B p65(도 4의 A 및 E) 및 p-STAT3(도 4의 A 및 F)의 염증 관련 마커의 발현이 모두 억제되는 것이 확인되었다.
- [0070] 위 결과를 통해서 본원 발명에 따른 micrandilactone C가 신경 면역 조절에 우수한 효과가 있음이 확인되었다.
- [0071] <실시예 2> 헌팅턴병 동물 모델에서의 운동 장애 개선 효과 확인
- [0072] 헌팅턴병 동물 모델에서 micrandilactone C의 신경보호 효능을 확인하기 위해, 신경독성물질인 3-NPA를 이용하여 헌팅턴병의 동물모델을 제조하였다.
- [0073] 구체적으로, C57BL/6J 계통의 수컷 생쥐(Narabiotec Co., Ltd., Seoul, Republic of Korea; weight, 20-23 g; age, 8-9 weeks; Seed mice were originated from Taconic Biosciences Inc., Cambridge, IN, USA)를 명암주기(light on 08:00 to 20:00)와 일정한 온도(23 ± 2 °C)가 유지되는 실험환경에서, 사료와 물을 자유롭게 공급하며 사육하였다. 상기 동물들은 실험 1주일 전에 실험환경에 적응시켰다.
- [0074] 동물모델은 상기 마우스에 3-NPA(3-Nitropropionic Acid) (Sigma, 미국)를 생리식염수 100 μ l에 희석하여 24시간 간격으로 5회(70 mg/kg)에 걸쳐서 복강으로 투여하였다. Sham군은 생리식염수를 투여하였으며, 3-NPA+micrandilactone C 투여군은 micrandilactone C (1.25 또는 2.5 mg/kg)를 3-NPA를 투여하기 1시간 전부터 매일 1회씩 5일간 안와정맥으로 투여하였다. Micrandilactone C 단독투여군은 생리식염수와 micrandilactone C (2.5 mg/kg)를 투여하였다.
- [0075] 3-NPA에 의해 나타나는 특이적인 신경학적인 행동변화를 매일 1회씩 관찰하였다. 행동변화의 기준은 활동성 감소, 뒷다리 움켜잡, 뒷다리 근육긴장이상, 흉추 후반 자세 및 정상자세로의 회복력으로 구분하였으며, 각각은 정도에 따라서 0, 1 및 2 단계로 나누어 측정하였다. 점수가 높을수록 신경학적 행동증상이 심함을 뜻한다. 또한, 생존율과 몸무게는 3-NPA를 마지막(5회째)으로 투여하고 24시간 후 확인하였다.
- [0076] 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0077] 도 5의 A는 신경학적 행동 변화를 확인한 결과, B는 생존율 변화를 확인한 결과, C는 체중 변화를 확인한 결과를 나타낸다. 도 5의 A에서 확인되는 바와 같이 micrandilactone C의 투여는 농도 의존적으로 신경학적 행동 변

화에 긍정적 영향을 주어 우수한 운동 장애 개선 효과를 나타내었다. 3-NPA군에서 운동장애의 정도는 Sham군에 비하여 9.0 ± 0.4 로 뚜렷하게 증가하였으나, micrandilactone C 1.25와 2.5 mg/kg 전투여군에서 각각 4.0 ± 0.4 와 4.8 ± 0.2 로 감소하였다.

- [0078] 또한, 도 5의 B 및 C에서 확인되는 바와 같이 생존율 및 체중 변화 측면에서 우수한 회복 효과를 나타내었다. 생존율은 3-NPA군에서 42.9%였으나, micrandilactone C 1.25 또는 2.5 mg/kg 전투여군에서 각각 54.1%와 71.4%로 개선되었으며, 체중은 3-NPA군에서 Sham군에 비하여 뚜렷이 감소하였으나, micrandilactone C에 의하여 유의하게 영향을 받지 않는었다.
- [0079] 위 결과를 통해서 본원 발명에 따른 micrandilactone C가 헌팅턴병을 비롯한 다양한 신경계 질환에 대해 운동 기능 장애를 개선함으로써 예방, 개선 및 치료 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [0080] <실시예 3> 헌팅턴병 동물 모델에서의 micrandilactone C의 신경세포사멸 억제 효능 확인
- [0081] 상기 실시예 2에서 제조된 동물 모델을 이용하여 조직 절편을 제작하였다. 구체적으로, 3-NPA에 의한 세포사멸 및 미세아교세포의 활성화를 micrandilactone C가 억제하는지 검증하기 위해서, 3-NPA를 마지막으로 투여하고 24 시간 후에 4% 파라포름알데하이드(PFA, paraformaldehyde)를 사용하여 관류 고정하고 뇌를 적출한 후 동일 고정액에 담가 4℃에서 하루 이상 더 고정시킨 다음 30% 수크로스(sucrose)로 바꾸어 4℃에서 3일 동안 보관하였다. 동결절편기(Leica Cryostat CM3050S, 독일)를 이용하여 줄무늬체(선조체, striatum)를 포함한 부위를 뇌의 부위를 30 μ m 두께로 관상절단(coronal section)하여 PBS나 동결보존액에 담가 냉동고에 보관하였다.
- [0082] 그리고 나서, 이의 Cresyl violet 염색 또는 Fluoro Jade C 염색을 수행하였다. Cresyl violet 염색방법은 동결 절편을 슬라이드에 올려 건조시킨 후 cresyl violet 염색용액에 5분간 담가 신경세포의 핵을 염색시킨 다음 70%, 80%, 95% 및 100% 에탄올에 순서대로 1분씩, 그리고 자일렌(xylene)에 3분간 담근 후 커버 글라스로 덮었다. 이후 세포손상 정도를 측정하기 위해서 NIH Image J 프로그램을 이용하여 정량하였다.
- [0083] 또한, Fluoro Jade C 염색 방법을 수행하였다. 구체적으로, 동결 절편을 70% 에탄올에 3분, 0.06% 과망간산칼륨 용액에 20분 및 0.001% Fluoro Jade C (Millipore, Billerica, MA, USA) 용액에 10분간 담근 후 슬라이드에 올려 건조시키고 자일렌(xylene)에 2분간 담근 후 커버 글라스로 덮어서 관찰하였다.
- [0084] 또한, 세포자멸사 기전의 주요 인자인 cleaved caspase-3의 단백질 발현을 확인하기 위하여, 위 실시예 1에서와 동일한 방법으로 분리된 뇌조직에 대해 웨스턴 블롯을 수행하여 cleaved caspase-3 단백질의 발현 변화를 확인하였다.
- [0085] 위 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0086] 3-NPA에 의한 운동기능장애가 운동기능을 담당하는 뇌의 부위인 줄무늬체(striatum)의 신경세포사멸과 연관이 있는지를 확인하기 위해서, 3-NPA를 마지막으로 투여한 후 24시간 후에 줄무늬체를 포함하는 동결절편을 사용하여 cresyl violet 염색을 수행한 결과를 도 6의 A에 나타내었다. 3-NPA군에서 줄무늬체의 신경세포사멸의 정도(염색되지 않은 부분의 면적)는 유의하게 증가하였으나, micrandilactone C를 전투여한 군에서는 농도 의존적으로 신경세포사멸의 정도가 감소하였다.
- [0087] 또한, 도 6의 B 및 C에서 확인되는 바와 같이 신경세포사멸의 정도가 뚜렷이 확인된 생쥐의 비율을 확인한 결과, 3-NPA군에서는 85.7%였으나, micrandilactone C 1.25와 2.5 mg/kg 전투여군에서는 각각 71.4% 및 55.5%로 감소하였으며, 신경세포사멸의 정도가 뚜렷이 확인된 줄무늬체의 면적을 비교한 결과 3-NPA군에서 전체 줄무늬체 면적의 82.7%였지만, micrandilactone C 1.25와 2.5 mg/kg 전투여군에서는 60.2%와 42.7%로 감소하였다.
- [0088] 또한, 도 6의 D 및 E에서 확인되는 바와 같이, 신경세포사멸의 정도를 재확인하기 위하여 Fluoro Jade C 염색을 시행하고 정량화한 결과, Fluoro Jade C에 의하여 염색된 세포의 수는 줄무늬체 조직절편 당 3-NPA군에서 약 43.6 개였으나, micrandilactone C 2.5 mg/kg 전투여군에서는 약 39.6개로 감소하였다.
- [0089] 또한, 도 6의 F에서 확인되는 바와 같이, 세포자멸사 기전의 주요 인자인 cleaved caspase-3의 단백질 발현을 확인하기 위하여 웨스턴블롯 분석을 시행한 결과, cleaved caspase-3의 단백질 발현의 정도는 3-NPA군에서 증가되었으나, micrandilactone C 투여군에서 감소되었다.
- [0090] 위 결과들에서 확인되는 바와 같이, micrandilactone C의 투여는 줄무늬체의 신경 세포 사멸을 억제함으로써 헌팅턴병을 비롯한 다양한 신경계 질환에서의 신경 손상에 대한 예방, 개선 및 치료 효과를 나타낸다.
- [0091] <실시예 4> 헌팅턴병 동물모델에서 micrandilactone C의 미세아교세포의 활성화 억제 효과 확인

- [0092] 상기 실시예 3에서 제조된 조직을 이용하여 면역 조직화학적 염색을 수행하였다.
- [0093] 구체적으로, 미세아교세포의 마커인 Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1)에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학적 염색을 시행하였다. 동결 절편을 블로킹 솔루션[10 ml의 PBS에 200 μ g 소혈청알부민(BSA, Bovin serum albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 500 μ l Fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, New York, USA), 500 μ l Normal goat serum (NGS, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) 및 10 μ l Triton X-100 (Sigma-Aldrich)을 넣었다.]을 넣은 플레이트에 담가 1시간 동안 반응시켰다. 그 다음 PBS로 수세한 후 1차 항체[토끼 항-Iba-1 (1:1,000, WAKO, Osaka, Japan)]를 블로킹 솔루션에 희석한 용액으로 교체하고 12시간 반응시켰다. 그리고 PBS로 수세한 후 2차 면역혈청으로 바이오틴화 토끼 IgG 항체 (1:200; Vector Laboratories), 아비딘-바이오틴화 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)-복합체(1:200; Vector Laboratories) 및 3,3'-diamino-benzidine (Sigma-Aldrich)을 이용하였다.
- [0094] 또한, 실시예 1에서와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 통해 Iba-1의 발현 변화를 확인하였다.
- [0095] 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0096] 도 7의 A는 면역조직화학적 염색 결과를 나타낸다. 신경세포사멸은 미세아교세포(microglia)의 활성화를 동반하는데 micrandilactone C의 투여는 Iba-1의 면역반응성을 크게 감소하였다.
- [0097] 또한, 도 7의 B에서 확인되는 바와 같이, 웨스턴 블랏을 통해 확인한 결과에서도 동일한 결과가 확인됨을 알 수 있었다.
- [0098] 위 결과들에서 확인되는 바와 같이, micrandilactone C의 투여는 미세아교세포의 활성화를 억제함으로써 헌팅턴 병을 비롯한 다양한 신경계 질환에서의 신경 손상에 대한 예방, 개선 및 치료 효과를 나타낸다.
- [0099] <실시예 5> 헌팅턴병 동물모델에서 micrandilactone C의 염증관련 신호기전 억제 효과 확인
- [0100] 위 실시예 1에서와 동일한 방법으로 분리된 뇌조직에 대해 웨스턴 블랏을 수행하여 염증 관련 신호 기전의 억제 효과를 확인하였다.
- [0101] 또한, 실시예 4의 면역조직화학적 염색과 동일한 방법으로, pSTAT3⁺ 및 CD11b⁺에 대해서 면역조직화학적 염색을 수행하였다.
- [0102] 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0103] 도 8의 A 내지 E는 염증 관련 인자로 p-STAT3와 p-JNK, p-EKR 및 p-p38의 단백질 발현을 확인한 결과를 나타낸다. 그 결과, 3-NPA군에서 증가(각각 0.7, 0.7, 0.7 및 0.8)하였으나 micrandilactone C 전투여군에서 감소하였다(각각 0.4, 0.5, 0.4 및 0.5).
- [0104] 위 인자들 중 가장 뚜렷한 차이를 보였던 p-STAT3의 발현과 미세아교세포의 활성화를 확인하기 위하여 면역조직화학적 염색을 수행한 결과를 도 8의 F 내지 H에 나타내었다. 그 결과, 3-NPA군에서 p-STAT3의 발현이 CD11b⁺ 세포에서 증가되었으며, micrandilactone C 전투여군에는 감소되는 것이 확인되었다.
- [0105] 위 결과들에서 확인되는 바와 같이, micrandilactone C의 투여는 염증 관련 신호 기전을 억제함으로써 헌팅턴 병을 비롯한 다양한 신경계 질환에서의 신경 손상에 대한 예방, 개선 및 치료 효과를 나타낸다.
- [0106] <실시예 6> 헌팅턴병 동물모델에서 micrandilactone C의 염증관련 매개인자의 발현 억제 효과 확인
- [0107] 3-NPA에 의한 염증성 매개인자의 분비 및 염증기작의 활성화를 micrandilactone C가 억제하는지 검증하기 위하여 실시간 PCR 분석을 이용하여 유전자의 발현을 확인하였다. 조직은 3-NPA를 마지막으로 투여하고 12시간 후에 뇌를 적출한 후 줄무늬체(striatum)를 분리하여 동결 보관하였다. 분리한 조직은 트리졸(Trizol, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1 ml을 넣고 분쇄기로 조직을 으갠 후 공지된 메뉴얼에 따라 추출하였다(Bioline, London, UK). cDNA를 합성하기 위해 0.5 μ g의 Oligo dT, 0.5 mM dNTP mix, 5x first-strand buffer, RNase out, 5 mM dithiothreitol (DTT), 및 M-MLV 역전사효소를 포함하는 반응 혼합물(reaction mixture) 중에서 1 μ g의 총 RNA를 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Real time-PCR 분석은 제조사의 메뉴얼에 따라 수행되었다(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR 프라이머 서열은 하기 표 2와 같다. cDNA 4 μ l와 하기 표 2에 기재된 염증성 매개인자인 IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1, COX-2 및 iNOS에 대한 프라이머를 각각 1 μ l 및 2x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 5 μ l를 섞어 실시간 PCR 장비(Applied Biosystems 7500)를 이용

하여 분석하였다. 계산은 Fold-induction은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 이용하였으며, PCR 증폭은 적어도 세 번 수행하였다. 위 분석에 사용된 서열을 아래 표 2에 나타내었다.

[표 2]

목적 유전자	primer			
	명칭	서열	방향	서열번호
IL-1 β	IL-1 β _F	TTG TGG CTG TGG AGA AGC TGT	정방향	서열번호 : 1
	IL-1 β _R	AAC GTC ACA CAC CAG CAG GTT	역방향	서열번호 : 2
IL-6	IL-6_F	TCC ATC CAG TTG CCT TCT TGG	정방향	서열번호 : 3
	IL-6_R	CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G	역방향	서열번호 : 4
TNF- α	TNF- α _F	AGC AAA CCA CCA AGT GGA GGA	정방향	서열번호 : 5
	TNF- α _R	GCT GGC ACC ACT AGT TGG TTG T	역방향	서열번호 : 6
MCP-1	MCP-1_F	CTT CTG GGC CTG CTG TTC A	정방향	서열번호 : 7
	MCP-1_R	CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA	역방향	서열번호 : 8
COX-2	COX-2_F	CAG TAT CAG AAC CGC ATT GCC	정방향	서열번호 : 9
	COX-2_R	GAG CAA GTC CGT GTT CAA GGA	역방향	서열번호 : 10
iNOS	iNOS_F	GGC AAA CCC AAG GTC TAC GTT	정방향	서열번호 : 11
	iNOS_R	TCG CTC AAG TTC AGC TTG GT	역방향	서열번호 : 12
GAPDH	GAPDH_F	AGG TCA TCC CAG AGC TGA ACG	정방향	서열번호 : 13
	GAPDH_R	CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA T	역방향	서열번호 : 14

위 RT-PCR 분석 결과를 도 9에 나타내었다.

미세아교세포가 활성화되고 염증기전이 활성화되면, 염증과 관련한 매개인자의 발현도 증가하게 된다. 도 9의 A 내지 F에서 확인되는 바와 같이, 이러한 염증 매개 인자로 대표적인 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α), 케모카인MCP-1, COX-2 및 iNOS의 mRNA의 발현은 micrandilactone C 투여에 의하여 현저히 감소됨이 확인되었다.

위 결과들에서 확인되는 바와 같이, micrandilactone C의 투여는 염증 매개 인자들의 발현을 억제함으로써 헌팅턴병을 비롯한 다양한 신경계 질환에서의 신경 손상에 대한 예방, 개선 및 치료 효과를 나타낸다.

제제예 1. 의약품의 제조

1.1 산제의 제조

상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

미크란디락톤 C (Micrandilactone C)	100 mg
유당	100 mg
탈크	10 mg

1.2 정제의 제조

미크란디락톤 C (Micrandilactone C)	100 mg
옥수수전분	100 mg
유당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

1.3 캡슐제의 제조

미크란디락톤 C (Micrandilactone C)	100 mg
옥수수전분	100 mg
유당	100 mg
스테아린산 마그네슘	2 mg

[0121] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 정제를 제조한다.

[0122] 1.4 액제의 제조

미크란디락톤 C (Micrandilactone C)	100 mg
설탕	20 g
이성화당	20 g
레몬향	적량

[0123]

[0124] 정제수를 가하여 전체 1,00 ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0125] 제제예 2. 건강기능식품의 제조

미크란디락톤 C (Micrandilactone C)	100 mg
비타민 혼합물	적량
비타민 A 아세테이트	70 µg
비타민 E	1.0 mg
비타민 B1	0.13 mg
비타민 C	10 mg
비오틴	10 µg
니코틴산아미드	1.7 mg
엽산	50 µg
무기질 혼합물	적량
산화아연	0.82 mg
탄산칼슘	24.8 mg

[0126]

[0127] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조(예, 영양캔디 등)에 사용할 수 있다.

[0128] 제제예 3. 건강기능성 음료의 제조

미크란디락톤 C (Micrandilactone C)	100 mg
구연산	1000 mg
올리고당	100 g
매실농축액	2 g
타우린	1 g
정제수를 가하여 전체	900 ml

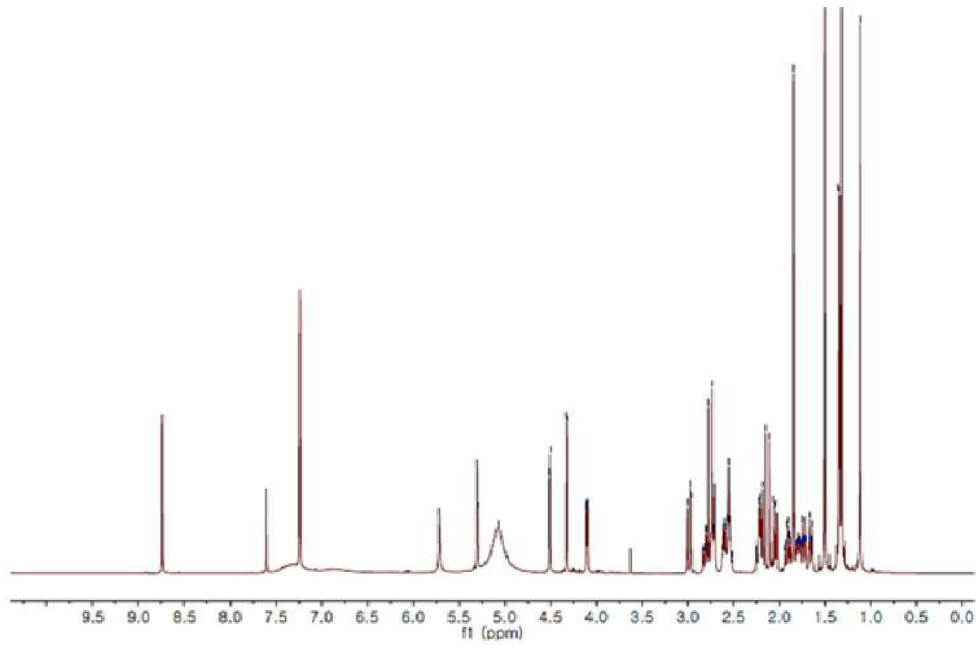
[0129]

[0130] 통상의 건강기능성 음료 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 건강기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.

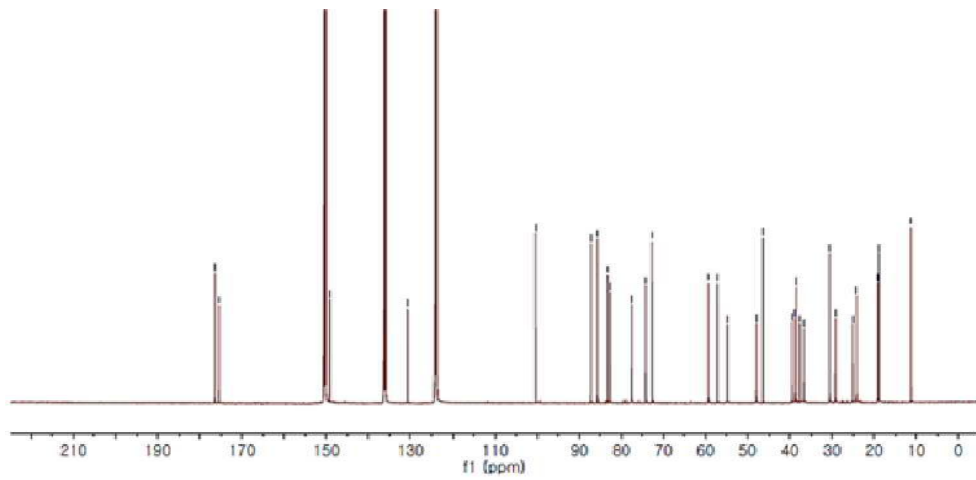
[0131] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

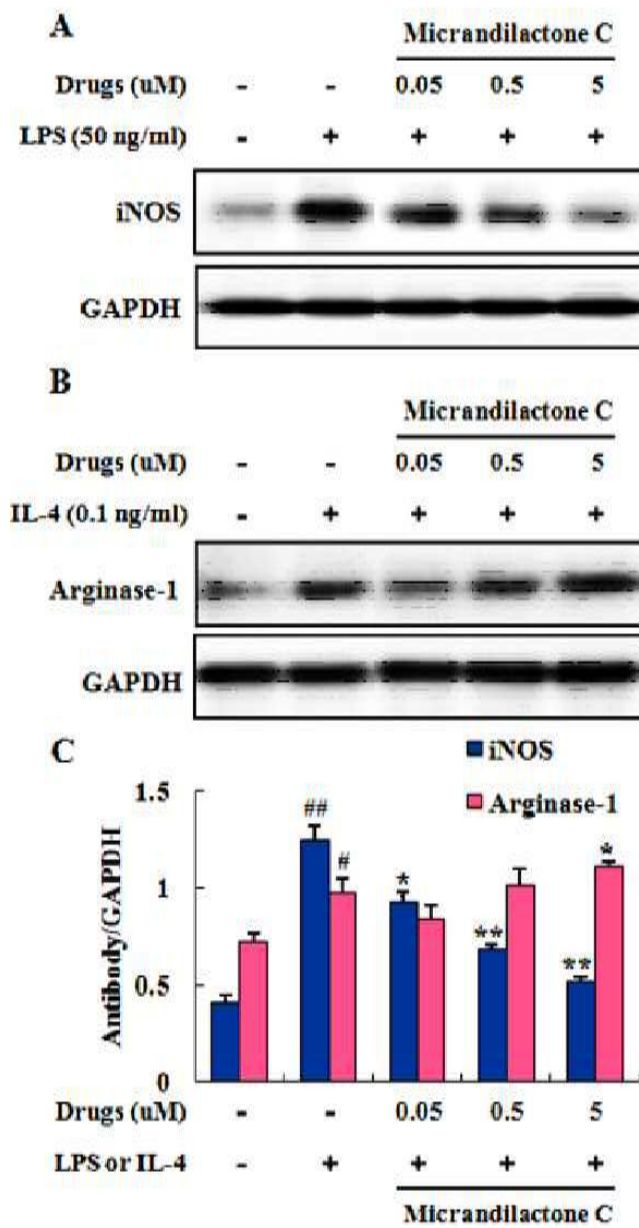
도면1



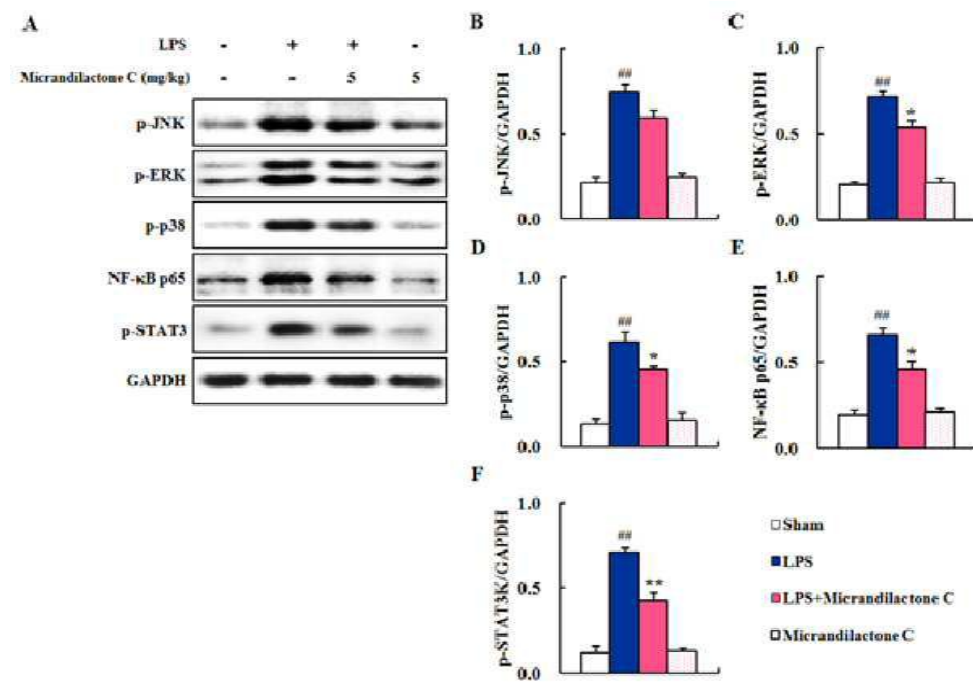
도면2



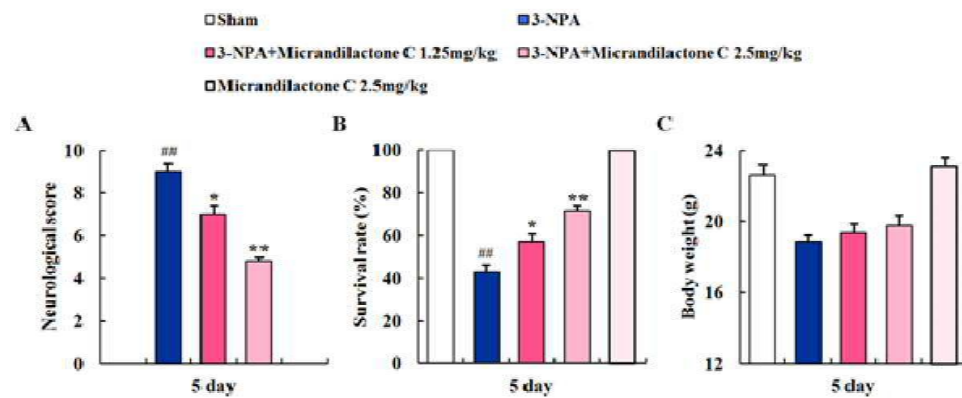
도면3



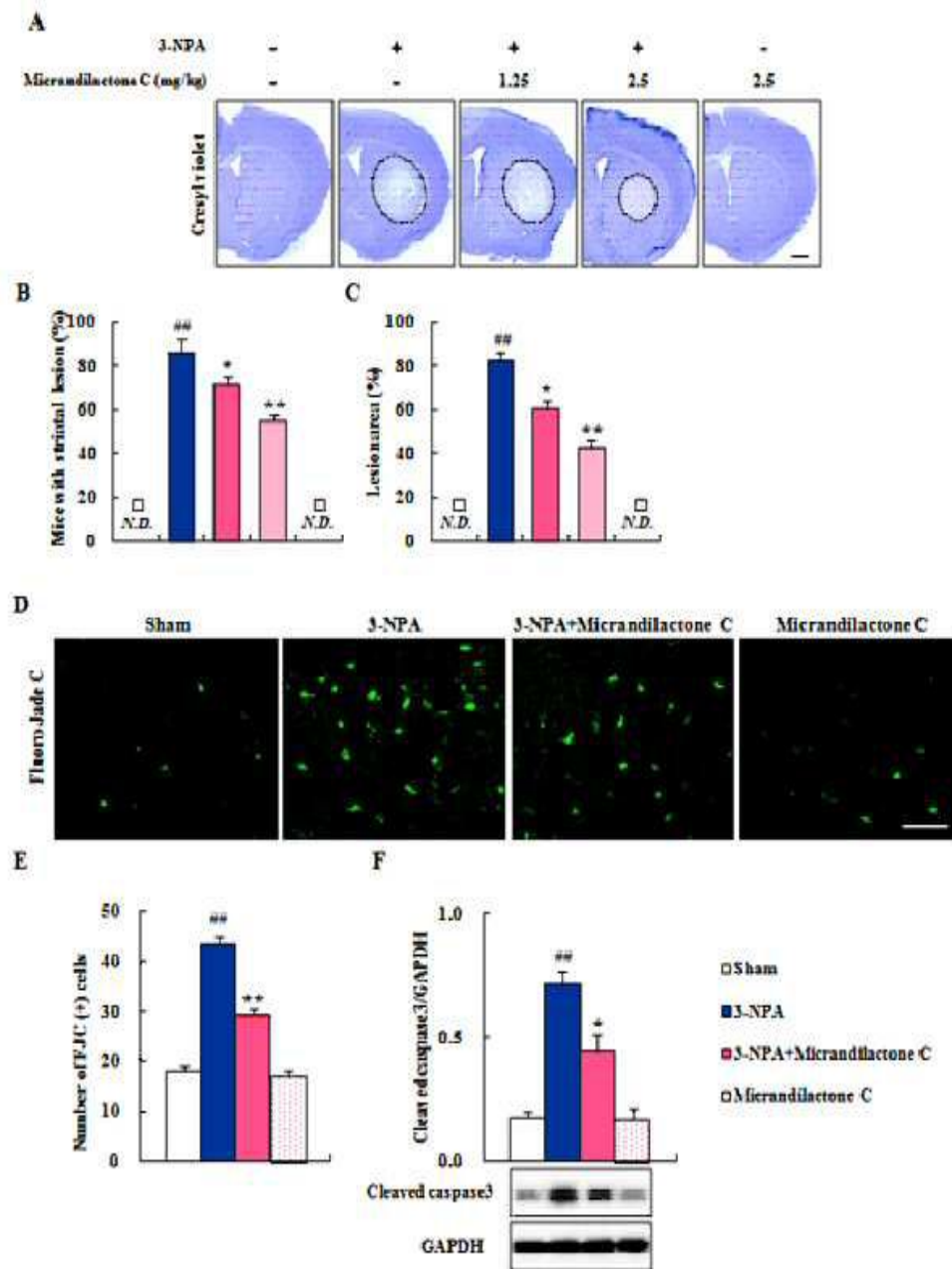
도면4



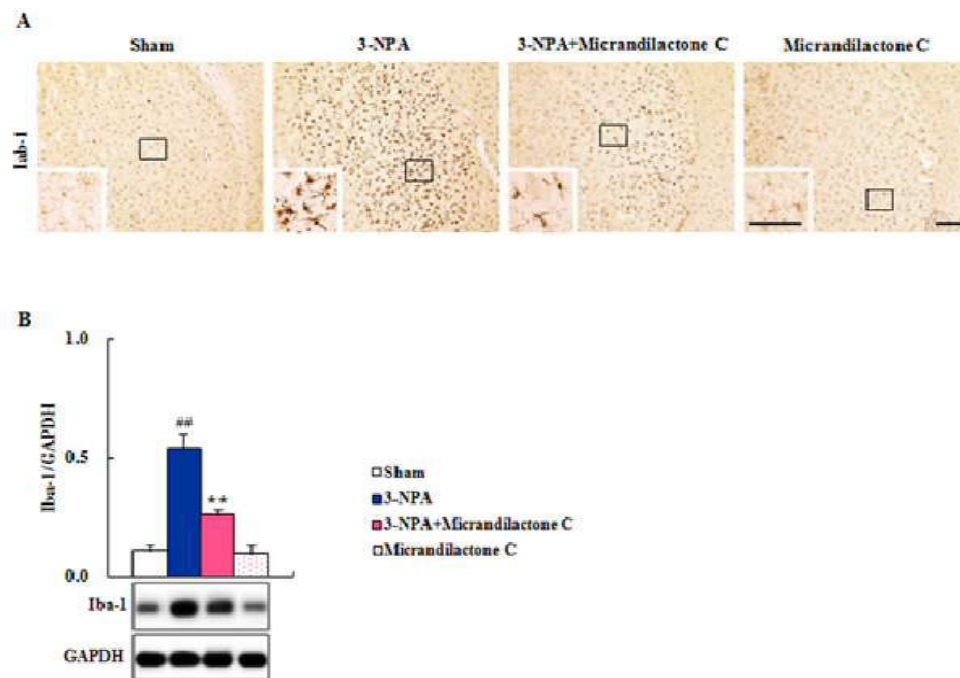
도면5



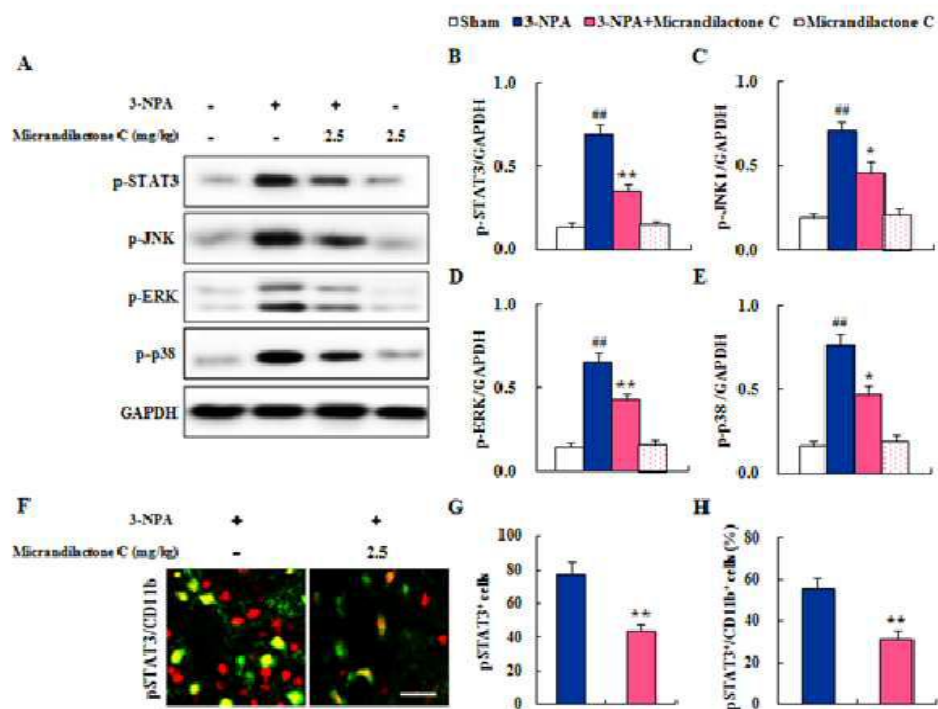
도면6



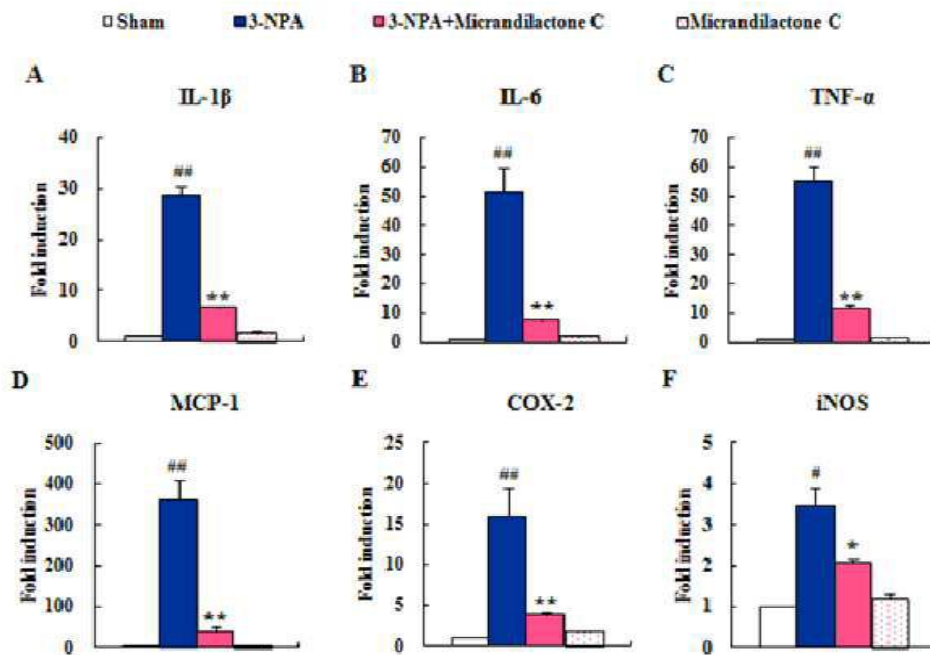
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> A composition comprising Micrandilactone C for preventing or treating neurological disease

<130> P17-109-KHU

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1 beta Forward primer

<400> 1

ttgtggctgt ggagaagctg t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1 beta Reverse primer

<400>	2	
aacgtcacac accagcaggt t		21
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-6 Forward primer	
<400>	3	
tccatccagt tgccttcttg g		21
<210>	4	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-6 Reverse primer	
<400>	4	
ccacgatttc ccagagaaca tg		22
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNF-alpha Forward primer	
<400>	5	
agcaaaccac caagtggagg a		21
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNF-alpha Reverse primer	
<400>	6	
gctggcacca ctagttggtt gt		22
<210>	7	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> MCP-1 Forward primer

<400> 7

cttctgggcc tgetgttca 19

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP-1 Reverse primer

<400> 8

ccagcctact cattgggatc a 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 Forward primer

<400> 9

cagtatcaga accgcattgc c 21

<210> 10

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 Reverse primer

<400> 10

gagcaagtcc gtgttcaagg a 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> iNOS Forward primer

<400> 11

ggcaaaccga aggtctacgt t 21

<210> 12

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> iNOS Reverse primer
 <400> 12

tcgctcaagt tcagcttggt 20

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH Forward primer
 <400> 13

aggtcatccc agagctgaac g 21

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH Reverse primer
 <400> 14

caccctgttg ctgtagccgt at 22