



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0062543
(43) 공개일자 2015년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/03 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0147313

(22) 출원일자 2013년11월29일

심사청구일자 2013년11월29일

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신천로 365 (용당동, 부경대학교)

대한민국(관리부서:국립수산물연구원)

부산광역시 기장군 기장읍 기장해안로 216

(72) 발명자

김형락

부산광역시 남구 황령대로319번길 26, 104동 210 2호(대연동, 대연경동메르빌아파트)

신태선

전라남도 여수시 신월로 561-8, 12동 502호(신월동, 금호아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

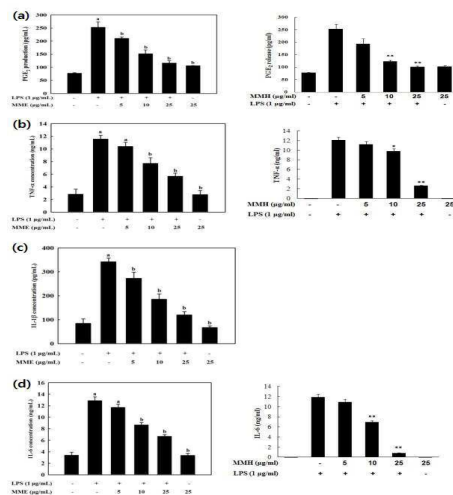
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 외톨개모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 외톨개모자반 추출물 및 외톨개모자반에서 분리된 사가크로메놀 (sargachromenol)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 외톨개모자반을 이용하여 얻은 추출물과 이로부터 분리한 사가크로메놀은 일산화질소(NO), 프로스타글란딘 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂) 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제할 뿐만 아니라 iNOS 및 COX-2이 발현을 효과적으로 억제하는 효과가 있는 바, 신경염증성 질환의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다. 특히 본 발명의 외톨개모자반은 천연물로서 세포독성 없이 안정성을 가지므로 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 인체에 부작용이 없이 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

이민섭

부산광역시 해운대구 해운대로469번가길 38, B동
203호(강남연립)

김성희

경상남도 양산시 신명로 87, 202동 1004호(봉우아
파트)

최준형

부산광역시 사하구 괴정로 222, 502호(괴정동, 괴
정맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 RP-2013-FS-031

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 국립수산물과학원

연구사업명 용역연구

연구과제명 모자반류를 이용한 건강기능성 식품소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2013.02.26 ~ 2013.12.24

명세서

청구범위

청구항 1

외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물은 상기 조성물에 0.001 ~ 200ug/ml의 양으로 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 산화질소(NO), iNOS, COX-2 및/또는 NF- κ B의 활성을 억제 또는 저해하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

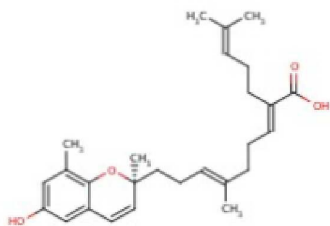
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)에서 분리된, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물;

[화학식 1]



청구항 6

제5항에 있어서,

상기 화합물은 산화질소(NO), iNOS, COX-2 및/또는 NF- κ B의 활성을 억제 또는 저해하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제5항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

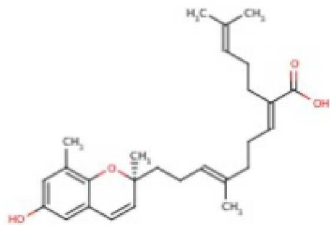
청구항 8

외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 9

외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)에서 분리된, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 건강기능식품;

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 외톨개모자반 추출물 및 외톨개모자반에서 분리된 사가크로메놀 (sargachromenol)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증 반응은 조직(세포)의 손상이나 외부감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과 체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개 물질 분비, 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종, 발열, 통증 등 외적 증상을 나타낸다. 정상인 경우 염증 반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복 작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 점막손상을 촉진하고, 그 결과 일부에서는 암 발생 등의 질환을 이끈다.

[0003] 중추 신경계 내에서 파킨슨병, 알츠하이머병, 외상 손상, 중풍, 발작에 의한 뇌손상에 대하여 신경염증 반응이 원인으로 일어난다는 많은 연구가 보고 되고 있다. (Gao 등, J Neurochem, 81, 1285-97, 2002; Nelson, PT. 등, Ann Med, 34, 491-500, 2002; Griffin, W.S. 등, J Neuroinflammation, 3, 5, 2006) 이때의 염증반응은 급성 뇌 손상의 특징으로서 뇌 조직에서 휴지기의 성상교세포의 활성화로 인하여 호중구, 단핵구, 탐식세포가 유입이 되며, 전염증성 사이토카인(cytokines) 및 접합분자 그리고 다른 염증 매개체들이 활성을 나타낸다. 신경염증은 주로 뇌의 20% 정도를 구성하고 있는 신경교세포의 활성화로 인한 매개로 발생한다. 즉 중추신경계에 존재하는 면역세포인 소신경교세포는 다양한 외인성, 내인성 물질로 인해 활성화될 수 있으며, 활성화된 소신경교세포는 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 유발한다는 것이다. 또 사멸 중인 신경세포가 방출하는 물질들이 소신경교세포의 활성을 다시 유발하게 되므로, 신경퇴행은 지속적인 악순환에 빠지게 된다. 실제로 소신경교세포의 활성이 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 크로이츠펔트야콥병(Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD), 다발성 경화증 등의 다양한 퇴행성 신경질환과 관계가 있음이 보고되었다.

- [0004] 실제로 파킨슨병환자의 뇌에서 활성화된 소신경교세포가 관찰되었고(Hunot et al., 1999; Knott et al., 2000), 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라테트라하이드로피리딘(MPTP)을 이용한 파킨슨병 동물 모델에서도 같은 현상이 확인되었으며(Kohutnicka et al., 1998; Liberatore et al., 1999; Dehmer et al., 2000; Wu et al., 2002), 파킨슨병 이외에도 헌팅턴병(Chen et al., 2000; Tomas et al., 2003; Wang et al., 2003), 알츠하이머병(Benveniste et al., 2001), 루게릭병(Kriz et al., 2002; Van Den Bosch et al., 2002; Zhu et al., 2002), 국부성 및 허혈성 뇌졸중(Yrjaeikki et al., 1998; Arvin et al., 2001) 등과 같은 많은 신경계 질환과 외상성 두부 손상(Sanches Meijia et al., 2001)에서 활성화된 소신경교세포가 관찰되고 있다.
- [0005] 소교세포의 활성화는 보통 세 가지 경로의 신호 전달과정으로부터 야기 된다. 첫째는 염증효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2) 둘째는 염증성 사이토카인으로 잘 알려진 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), 그리고 마지막으로 전사인자인 nuclear factor- κ B(NF- κ B)로 인하여 유도된다고 보고되어 있다.(Mc Geer 등, Neurology, 38, 1285-91, 1988; Minghetti, L. 등, Prog Neurobiol, 54, 99-125, 1998; Le, W. 등, J Neurosci, 21, 8447-55, 2001)
- [0006] 신경교세포에서의 염증유도는 LPS(lipopolysaccharide)에 의하여 아질산염(NO)의 생산이 수반되며, 아질산염(NO)의 증가는 뇌 손상 시 세포독성에 매우 중요하게 작용하는 병리학적 기전임이 많은 보고를 통하여 알려져 있다.(Chen 등, J Biol Chem, 273, 19424-30, 1998)
- [0007] 소신경교세포의 활성화에 관여하는 신호 전달 체계로는 MAPK, PKC, ROX, NF- κ B 등이 있다. 마이트젠 활성화 단백질(mitogen-activated protein, MAP) kinase family는 세포내의 신호 전달 매개체로서 핵심적인 단백질이며 인체에서의 다양한 염증반응, 사멸, 세포 분화, 성장 등의 세포의 신호에 반응하여 활성화되어 전사인자를 활성화시켜 필요한 유전자들의 전사를 조절한다. MAP kinase family는 ERK(extracellular signal regulated kinase), JNK(c-jun N-terminal kinase), p38 MAP kinase 등 3가지가 알려져 있다. ERK는 세포의 성장과 밀접한 관계를 보이고 있으며 많은 세포 성장 인자에 의해서 조절받는다. JNK 및 p38 MAP kinase는 대부분의 염증반응, 세포 스트레스 신호, 세포 사멸 신호 등과 밀접한 관계가 있다.
- [0008] 염증세포에서 생성되는 ROS는 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 왔으나 최근 들어서는 염증세포에서 생성되는 ROS도 다른 세포들에서와 같이 신호전달물질로 작용할 가능성이 제시되고 있다. ROS는 소신경교세포의 활성화를 매개하는 protein kinase C와 MAPK를 활성화시키는 중요한 신호전달물질로도 알려져 있다. 또한 베타아밀로이드, 트롬빈, 인터페론- γ 등에 의한 소신경교세포의 활성화가 ROS scavenger인 N-acetylcysteine에 의해 억제되기 때문에 ROS가 이들에 의한 소신경교세포의 활성화를 매개할 것으로 생각된다.
- [0009] 활성화된 소신경교세포에서 발현되는 iNOS와 TNF- α , COX-2 유전자들의 프로모터에는 공통적으로 NF- κ B가 결합하는 부분이 있으며, NF- κ B의 활성화에 의해 이들 유전자의 발현이 조절된다. 베타아밀로이드와 LPS가 소신경교 세포에서 NF- κ B를 활성화시킨다는 것이 알려져 있으며, 갱글리오사이드와 트롬빈 역시 소신경교세포에서 NF- κ B를 활성화시킨다. 이들 활성화물질에 의한 NF- κ B의 활성화는 15분 이내에 일어나 1시간 정도 지속된다. NF- κ B의 아형에는 p50, p65, c-rel 등이 있다.
- [0010] 소신경교세포의 활성화와 퇴행성 신경질환의 관계에 대해서는 아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 일반적으로 소신경교세포의 활성화가 퇴행성 신경질환의 발병과 진행에 관련되어 있다고 받아들여지고 있다. 그러므로 소신경교세포의 활성을 억제하는 것은 퇴행성 신경질환의 진행을 완화시킬 수 있는 효과적인 치료법이 될 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제0838253호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 이에 본 발명자들은 천연물을 이용한 퇴행성 신경질환 치료용 조성물을 개발하기 위하여 노력해온 결과, 외톨개

모자반을 이용하여 얻은 추출물과 이로부터 분리한 사가크로메놀이 신경 염증을 효과적으로 억제한다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)에서 분리된, 사가크로메놀(sargachromenol) 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0016] 나아가 본 발명의 목적은 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)에서 분리된, 사가크로메놀(sargachromenol) 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

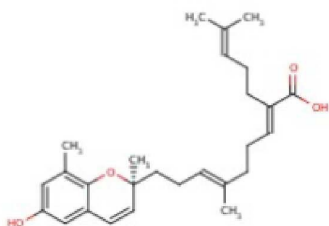
[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물은 상기 조성물에 0.001 ~ 200ug/ml의 양으로 포함되어 있을 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 산화질소(NO), iNOS, COX-2 및/또는 NF-κB의 활성을 억제 또는 저해할 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)에서 분리된, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] [화학식 1]



[0023]

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물은 산화질소(NO), iNOS, COX-2 및/또는 NF-κB의 활성을 억제 또는 저해할 수 있다.

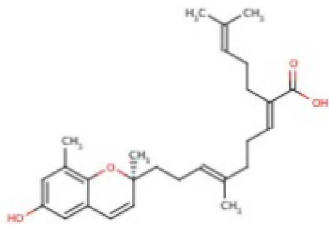
[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭 경화증, 다발성 경화증, 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0027] 나아가 본 발명은 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)에서 분리된, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

공한다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

발명의 효과

[0030] 본 발명의 외톨개모자반을 이용하여 얻은 추출물과 이로부터 분리한 사가크로메놀은 일산화질소(NO), 프로스타글란딘 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂) 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제할 뿐만 아니라 iNOS 및 COX-2이 발현을 효과적으로 억제하는 효과가 있는 바, 신경염증성 질환의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

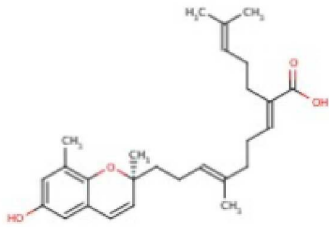
[0031] 특히 본 발명의 외톨개모자반은 천연물로서 세포독성 없이 안정성을 가지므로 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 인체에 부작용이 없이 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 외톨개모자반으로부터 추출물을 수득하는 과정을 나타낸 순서도이다.
- 도 2는 외톨개모자반으로부터 분획물을 수득하는 과정을 나타낸 순서도이다.
- 도 3은 외톨개모자반 추출물(a) 및 헥산 분획물(b)의 세포 독성을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 외톨개모자반 추출물(a) 및 헥산 분획물(b)의 일산화질소(NO) 생성 억제 효과를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 외톨개모자반 주정 추출물 및 상기 주정 추출물의 n-헥산 분획물의 (a)프로스타글란딘 E₂, (b)TNF- α , (c)IL-1 β 및 (d)IL-6 생성 억제 효과를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 6은 외톨개모자반 주정 추출물 및 상기 주정 추출물의 n-헥산 분획물의 (a)iNOS와 COX-2의 단백질 발현 및 (b)iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 억제 효과를 나타낸 결과이다.
- 도 7은 외톨개모자반 주정 추출물(a) 및 상기 주정 추출물의 n-헥산 분획물(b)의 NF- κ B 활성화 억제 효과를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 외톨개모자반 주정 추출물(a) 및 상기 주정 추출물의 n-헥산 분획물(b)의 NF- κ B 핵 이동 억제 효과를 confocal 현미경으로 관찰한 사진이다.
- 도 9는 외톨개모자반 주정 추출물(a) 및 상기 주정 추출물의 n-헥산 분획물(b)의 NF- κ B 핵 이동 관련 단백질의 발현 억제 효과를 측정한 결과를 나타내는 그림이다.
- 도 10은 외톨개모자반 주정 추출물(a) 및 상기 주정 추출물의 n-헥산 분획물(b)의 MAPKs 및 Akt 단백질의 활성화 억제 효과를 측정한 결과를 나타내는 그림이다.
- 도 11은 PD98059 (ERK 억제제)와 SP600125 (JNK 억제제)를 이용하여 NO 생성 억제 효과를 측정함으로써 외톨개모자반 주정 추출물(a) 및 상기 주정 추출물의 n-헥산 분획물(b)의 ERK 및 JNK 억제제가 신경염증 억제에 효과를 나타내는 그림이다.
- 도 12는 표준물질(사가크로메놀)(a), 외톨개모자반 주정 추출물(b) 및 상기 주정 추출물의 n-헥산 분획물(c) 내에 포함된 사가크로메놀의 함량을 측정한 결과를 나타내는 그림이다.
- 도 13은 사가크로메놀에 의한 세포독성(a), NO 생성 억제 효과(b), iNOS 및 COX-2의 단백질 발현 억제 효과를 측정한 결과를 나타내는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 본 발명은 외톨개모자반 추출물의 신규 용도에 관한 것으로서 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.
- [0034] 본 발명의 ‘외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)’은 모자반목 모자반과에 속하는 갈조류로 우리나라 남해안과 일본의 전 연안에 서식하고 있으며 주로 사료로 이용되고 있다. 지금까지 외톨개모자반에 대한 연구로는 항균 (Lee et al., 2010), 항고혈압활성(Cha et al., 2006), 간손상보호(Wong et al., 2004), 항혈액응고 (Athukorala et al., 2007)등에 효과가 있다고 알려졌으나 외톨개모자반에 신경염증 억제 효과가 있다는 문헌은 현재까지 보고된 바 없다.
- [0035] 이에 본 발명자들은 천연물을 이용한 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물을 개발하기 위하여 다양한 연구를 진행하던 중 외톨개모자반을 이용하여 얻은 추출물과 이로부터 분리한 사가크로메놀은 일산화질소(NO), 프로스타글란딘 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂) 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제할 뿐만 아니라 iNOS 및 COX-2이 발현을 효과적으로 억제시킬 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다.
- [0036] 이러한 사실은 본 발명의 일실시예를 통해 확인할 수 있는데 외톨개모자반 추출물 및 핵산 분획물에 일산화질소 생성 억제 효과가 있는지 여부를 알아보기 위하여 LPS를 처리한 다음 외톨개모자반을 농도별로 달리 하여 처리한 군 및 LPS를 처리하지 않은 대조군을 대상으로 일산화질소 생성량을 측정된 결과, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 일산화질소의 생성은 외톨개모자반 주정 추출물 및 n-핵산 분획물에 의하여 농도의존적으로 감소하였음을 알 수 있었다(도 4 참조).
- [0037] 본 발명의 다른 일실시예에서는 외톨개모자반 추출물 및 핵산 분획물에 신경염증 억제 효과를 확인하고자 PEG₂ 및 염증성 사이토카인의 생성 억제 효과를 측정된 결과, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 PEG₂, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성은 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-핵산 분획물에 의하여 농도의존적으로 감소함을 확인하였다(도 5 참조).
- [0038] 본 발명의 다른 일실시예에서는 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성 억제가 NF- κ B의 발현 억제에 의한 것인지를 확인하기 위하여, NF- κ B의 활성화에 대한 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-핵산 분획물의 영향을 루시페라제 분석(luciferase assay), 면역염색(immunostain) 및 웨스턴 블롯(western blot)으로 확인한 결과, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 NF- κ B 전사인자의 활성화가 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-핵산 분획물에 의하여 농도의존적으로 억제되었음을 알 수 있었다(도 7 참조).
- [0039] 본 발명의 다른 일실시예에서는 외톨개모자반에서 수득한 사가크로메놀의 일산화질소 생성 억제능을 측정된 결과, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 일산화질소의 생성은 사가크로메놀에 의하여 농도의존적으로 감소하였음을 알 수 있었으며, 항산화 효과가 있다고 알려진 커큐민을 처리한 대조군에 비하여도 일산화질소 생성을 더 많이 감소하였음을 알 수 있었다(도 13 참조).
- [0040] 본 발명의 다른 일실시예에서는 일산화질소(NO)의 생성 억제가 각각 iNOS 및 COX-2의 발현 억제에 의한 것인지를 확인하기 위하여, iNOS 및 COX-2 단백질에 대한 사가크로메놀의 영향을 웨스턴 블롯(western blot)을 통해 확인한 결과, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현은 사가크로메놀에 의하여 농도의존적으로 감소하였고, COX-2의 발현은 100 μ g/ml 농도의 사가크로메놀에서 유의적으로 감소하였다(도 13 참조). 상기와 같은 결과로부터 상기 사가크로메놀은 iNOS의 단백질 발현 과정에 영향을 미쳐, 상기 iNOS의 생성을 억제함으로써, 일산화질소(NO)의 생성을 억제함을 확인하였다.
- [0041] 그러므로 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 및 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)에서 분리된 사가크로메놀 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 퇴행성 신경질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 사가크로메놀은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.
- [0043] <화학식 1>



[0044]

[0045]

본 발명에 따른 화학식1로 표시되는 화합물은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

[0046]

본 발명에 따른 화학식1로 표시되는 사가크로메놀은 시중에서 판매되는 것을 사용할 수도 있으며, 또는 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것을 사용할 수 있다.

[0047]

본 발명의 조성물은 상기 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는사가크로메놀을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물로서 이러한 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0048]

상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0049]

상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제,좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0050]

본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀은 조성물에 0.001 ~ 200ug/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0051]

본 발명의 약제학적 조성물이 치료효과를 나타낼 수 있는 퇴행성 신경질환으로는, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 질환, 헌팅톤 질환, 근위축성 측삭경화증, 다발성 경화증, 면역계 이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성뇌질환, 니만-픽병, 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052]

또한, 본 발명은 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 퇴행성 신경

질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

- [0053] 또한, 본 발명은 포유동물에게 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀을 투여하는 것을 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0054] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0055] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분대 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01mg/kg ~ 250mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0056] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀을 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0057] 또한, 본 발명은 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 건강기능식품은 퇴행성 신경질환의 예방 및 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0060] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0061] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0062] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 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 수도 있다.
- [0063] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의유효성분인 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.
- [0064] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0065] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*) 추출물 또는 사가크로메놀과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0066] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0067] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0068] <실시예 1>

[0069] 외톨개모자반(Myagropsis myagroides) 추출물의 제조

[0070] 본 발명자들은 외톨개모자반 추출물을 제조하기 위하여 부산광역시 기장군 및 전라남도 완도군에서 채집한 외톨개모자반을 사용하였으며, 채집한 외톨개모자반(Myagropsis myagroides)을 자연건조한 후, 분쇄하여 분말화하였다. 상기 외톨개모자반의 건조 분말 2 kg을 각각 10 ℓ의 95% 발효주정에 침지하여 교반한 다음, 70 ℃에서 1 시간 내지 5 시간 동안 3회 환류냉각 추출한 후, 여과지(와트만사, 미국)로 감압여과하였다. 상기 감압여과된 여과물을 40 ℃에서 진공회전농축기로 감압농축하여 용매를 제거한 후, 남은 잔사를 외톨개모자반 추출물로서 수득하였다(도 1 참조). 그 결과, 본 발명자들은 외톨개모자반의 주정 추출물 364.2 g을 수득할 수 있었다.

[0071] <실시예 2>

[0072] 외톨개모자반(Myagropsis myagroides) 추출물의 분획물 제조

[0073] 본 발명자들은 실시예 1에서 수득한 외톨개모자반(Myagropsis myagroides) 추출물로부터 도 2와 같은 방법으로 외톨개모자반(Myagropsis myagroides) 추출물의 분획물을 제조하였다.

[0074] <2-1> n-헥산 분획물의 제조

[0075] 상기 실시예 1에서 제조한 외톨개모자반의 주정 추출물 100 g에 n-헥산(n-hexane), 주정, 물이 10 : 9 : 1의 비율로 혼합된 혼합용매 4 ℓ를 가하고, 물층과 n-헥산층이 분리되도록 정치하였다. 충분한 시간이 경과한 후, 상기 혼합물은 2 ℓ의 물층과 2 ℓ의 n-헥산층으로 분리되었다. 상기와 같이 분리된 2 ℓ의 물층에 다시 2 ℓ의 n-헥산을 가하고 정치하여, 2 ℓ의 n-헥산층을 분리해 내는 과정을 3회 반복하였다. 그 결과, 최종적으로 총 8 ℓ의 n-헥산층과 2 ℓ의 물층을 수득하였다. 상기와 같이 분리수득한 8 ℓ의 n-헥산층을 40 ℃에서 진공회전농축기로 감압농축하여 용매를 제거한 후, 남은 잔사 151.1 g을 n-헥산 분획물로서 수득하였다.

[0076] <2-2> 디클로로메탄 분획물의 제조

[0077] 상기 실시예 <2-1>에서 최종적으로 수득한 2 ℓ의 물층에 2 ℓ의 디클로로메탄(dichloromethane)을 가하고 정치하여, 2 ℓ의 디클로로메탄층을 분리해 내는 과정을 3회 반복하였다. 그 결과, 최종적으로 총 6 ℓ의 디클로로메탄층과 2 ℓ의 물층을 수득하였다. 상기와 같이 분리수득한 6 ℓ의 디클로로메탄층을 40 ℃에서 진공회전농축기로 감압농축하여 용매를 제거한 후, 남은 잔사 0.8 g을 디클로로메탄 분획물로서 수득하였다.

[0078] <2-3> 에틸아세테이트 분획물의 제조

[0079] 상기 실시예 <2-2>에서 최종적으로 수득한 2 ℓ의 물층에 2 ℓ의 디에틸아세테이트(ethyl acetate)을 가하고 정치하여, 2 ℓ의 에틸아세테이트층을 분리해 내는 과정을 3회 반복하였다. 그 결과, 최종적으로 총 6 ℓ의 에틸아세테이트층과 2 ℓ의 물층을 수득하였다. 상기와 같이 분리수득한 6 ℓ의 에틸아세테이트층을 40 ℃에서 진공회전농축기로 감압농축하여 용매를 제거한 후, 남은 잔사 0.8 g을 에틸아세테이트 분획물로서 수득하였다.

[0080] <2-4> n-부탄올 분획물의 제조

[0081] 상기 실시예 <2-3>에서 최종적으로 수득한 2 ℓ의 물층에 2 ℓ의 n-부탄올(n-butanol)을 가하고 정치하여, 2 ℓ의 n-부탄올층을 분리해 내는 과정을 3회 반복하였다. 그 결과, 최종적으로 총 6 ℓ의 n-부탄올층과 2 ℓ의 물층을 수득하였다. 상기와 같이 분리수득한 6 ℓ의 n-부탄올층을 40 ℃에서 진공회전농축기로 감압농축하여 용매를 제거한 후, 남은 잔사 0.5 g을 n-부탄올 분획물로서 수득하였다.

[0082] <실시예 3>

[0083] 외톨개모자반 분획물의 세포독성 확인 및 일산화질소(NO) 생성 억제 효과

[0084] <3-1> 세포배양

[0085] 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 입수한 마우스 소신경세포(microglia) BV-2를 10% 우태아혈청(FBS), 100 units/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지로 37° C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다.

[0086] 상기와 같이 배양된 BV-2 세포를 20 웰 플레이트에 5×10^4 개/웰 또는 1×10^5 개/웰의 농도로 분주한 후, 서로 다른 농도(0-50 µg/ml)의 시료들(상기 실시예 1에서 수득한 외톨개모자반의 주정 추출물 및 실시예 2에서 수득한 외톨개모자반 주정 추출물의 헥산 분획물)이 각각 함유된 DMEM 배지로 1시간 동안 배양한 다음, 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

[0087] <3-2> 외톨개모자반 분획물의 세포독성 효과

[0088] 본 발명자들은 외톨개모자반 분획물의 안전성을 확인하기 위하여 MTS 분석에 의한 세포독성 실험을 수행하였다.

[0089] 상기 실시예 <3-1>에서와 같이 외톨개모자반 추출물의 분획물들이 처리된 BV2 세포 배양물에서 100 µl의 배지를 취하여 5 µl의 MTS 용액과 함께 96 웰 플레이트에 각각 분주하여 1시간 동안 반응시킨 다음, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 3회 반복 실험의 평균값으로 결정하였고, 상기와 같이 결정된 측정치를 대조군과 비교를 통해 상대적인 세포 생존율(% of control)을 계산하였다.

[0090] 그 결과, 외톨개모자반 주정 추출물 및 n-헥산 분획물은 모두 25 µg/ml의 농도까지 세포 독성이 없음을 알 수 있었다(도 3 참조).

[0091] <3-3> 외톨개모자반 분획물의 일산화질소(NO) 생성 억제 효과

[0092] 상기 실시예 <1> 내지 <2-1>에서 각각 수득한 외톨개모자반 추출물 및 헥산 분획물의 일산화질소 생성 억제 효과를 확인하고자, Green LC 등(Anal Biochem.(1982) 126:131-138)의 문헌에 보고된 구체적인 일산화질소 생성량 측정 방법에 따라 실험을 수행하였다.

[0093] 상기 실시예 <3-1>에서와 같이 외톨개모자반 추출물들이 처리된 BV-2 세포 배양물에서 100 µl의 배지를 취하여 96 웰 플레이트에 각각 분주하고, 100 µl의 Griess 시약을 각각의 웰에 처리하여 10분 동안 반응시킨 다음, ELISA 리더를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 질산나트륨(sodium nitrite, NaNO₂)을 연속 희석하여 얻었다.

[0094] 그 결과, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 일산화질소의 생성은 외톨개모자반 주정 추출물 및 n-헥산 분획물에 의하여 농도의존적으로 감소하였음을 알 수 있었다(도 4 참조).

[0095] <실시예 4>

[0096] 외톨개모자반(Myagropsis myagroides) 주정 추출물 및 주정 추출물의 n-헥산 분획물의 인 비트로(in vitro)에서의 신경염증 억제 효과 확인

[0097] **<4-1> 외톨개모자반 주정 추출물 및 주정 추출물의 n-헥산 분획물의 처리**

[0098] 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 입수한 마우스 소신경세포(microglia) BV-2를 10% 우태아혈청(FBS), 100 units/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지로 37° C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다.

[0099] 상기와 같이 배양된 BV-2 세포를 24 웰 플레이트에 1×10^5 개/웰의 농도로 분주한 후, 서로 다른 농도(0, 5, 10, 25 µg/ml)의 시료들(상기 실시예 <1>에서 수득한 외톨개모자반의 주정 추출물 및 실시예 <2-1>에서 수득한 외톨개모자반 주정 추출물의 헥산 분획물)이 각각 함유된 DMEM 배지로 1시간 동안 배양한 다음, 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

[0100] **<4-2> 염증성 사이토카인 및 케모카인의 생성 억제 효과 확인**

[0101] 상기 실시예 <1>에서 수득한 외톨개모자반의 주정 추출물 및 실시예 <2-1>에서 수득한 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물의 신경염증 억제 효과를 확인하고자 PEG₂ 및 염증성 사이토카인의 생성 억제 효과를 확인하였다.

[0102] 상기 실시예 <4-1>에서와 같이 외톨개모자반 추출물 또는 분획물이 처리된 BV-2 세포 배양물에서 100 µl의 배지를 취하여 ELISA 키트(BD Biosciences, 미국)로 상기 배지에 분비된 염증성 사이토카인(cytokine) 및 케모카인(chemokine)인 프로스타글란딘 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂), 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor-α, TNF-α), 인터루킨-1β(interleukin-1β, IL-1β) 및 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6)의 생성량을 각각 측정하였다.

[0103] 그 결과, 도 5의 (a) 내지 (d)에 도시된 바와 같이, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 PEG₂, TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 생성은 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물에 의하여 농도의존적으로 감소함을 확인하였다(도 5 참조).

[0104] **<4-3> iNOS 및 COX-2의 단백질 생성 억제 효과 확인**

[0105] 일산화질소(NO) 및 프로스타글란딘 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)의 생성 억제가 각각 iNOS 및 COX-2의 발현 억제에 의한 것인지를 확인하기 위하여, iNOS 및 COX-2 단백질에 대한 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물의 영향을 웨스턴 블롯(western blot) 및 RT-PCR을 통해 확인하였다.

[0106] 그 결과, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현은 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물에 의하여 농도의존적으로 감소하였고, COX-2의 발현은 100 µg/ml 농도의 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물에서 유의적으로 감소하였다(도 6 참조).

[0107] 상기와 같은 결과로부터 상기 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물은 iNOS의 단백질 발현 과정에 영향을 미쳐, 상기 iNOS의 생성을 억제함으로써, 일산화질소(NO)의 생성을 억제함을 확인하였다.

[0108] 반면에, 상기 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물은 상대적으로 높은 농도에서만 COX-2의 단백질 발현을 억제한다. 이는 상기 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물이 COX-2 단백질의 발현 과정 보다는 COX-2 단백질의 활성화 과정에 영향을 미치기 때문인 것으로 판단된다.

[0109] **<4-4> NF-κB의 활성화 억제 효과 확인**

- [0110] 본 발명자들은 iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성 억제에 NF- κ B의 발현 억제에 의한 것인지를 확인하기 위하여, NF- κ B의 활성화에 대한 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물의 영향을 루시퍼라제 분석(luciferase assay), 면역염색(immunostain) 및 웨스턴 블롯(western blot)으로 확인하였다.
- [0111] 먼저, 루시퍼라제 분석(luciferase assay)은 NF- κ B의 프로모터 사이트에 루시퍼라제(luciferase)가 재조합된 재조합 유전자를 상기 실시예 <4-1>과 같이 배양된 BV-2 세포에 형질도입하고 안정화시킨 다음, 상기과 같이 안정화된 세포에 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물을 처리 및 배양하여, 세포패쇄액으로부터 인광(luminescence)을 측정함으로써 수행되었다.
- [0112] 그 결과, 도 7에 도시된 바와 같이, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 NF- κ B 전사인자의 활성화가 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물에 의하여 농도의존적으로 억제되었음을 알 수 있었다(도 7 참조).
- [0113] 다음으로, NF- κ B가 핵으로 이동함에 있어서, 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물이 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <4-1>에서와 같이 10% 우태아혈청(FBS), 100 units/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지로 37° C, 5% CO₂ 환경에서 배양한 BV-2 세포에 시료들(상기 실시예 <1>에서 수득한 외톨개모자반의 주정 추출물 및 실시예 <2-1>에서 수득한 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물)이 포함된 DMEM 배지로 1시간 동안 배양한 다음, 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 1시간 동안 배양하였다. 상기과 같이 배양된 RAW 264.7 세포를 NF- κ B 항체와 DAPI로 면역염색(immunostain)한 다음, 콘포칼(confocal) 현미경으로 NF- κ B의 세포내 위치를 관찰하였다.
- [0114] 그 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 NF- κ B의 핵으로의 이동은 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물에 의하여 억제됨을 확인하였다(도 8 참조).
- [0115] 마지막으로, I κ B- α 의 인산화 및 NF- κ B의 핵으로의 이동에 있어서, 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물이 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <4-1>에서와 같이 10% 우태아혈청(FBS), 100 units/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지로 37° C, 5% CO₂ 환경에서 배양한 BV-2 세포에 시료들(상기 실시예 <1>에서 수득한 외톨개모자반의 주정 추출물 및 실시예 <2-1>에서 수득한 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물)이 포함된 DMEM 배지로 1시간 동안 배양한 다음, 1 μ g/ml의 LPS를 처리하여 30분 동안 배양하였다. 상기과 같이 배양된 BV-2 세포로부터 세포 용해물(cell lysate)을 회수하고, pI κ B- α , I κ B- α 및 NF- κ B 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.
- [0116] 그 결과, 도 9에 도시된 바와 같이, 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물에 의하여 세포질에서의 I κ B- α 의 인산화 및 NF- κ B의 핵으로의 이동, 및 핵 내의 NF- κ B의 양이 농도의존적으로 억제되었다(도 9 참조).
- [0117] 상기과 같은 결과로부터, 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물이 LPS에 의해 유도되는 I κ B- α 의 인산화 및 분해를 농도의존적으로 억제하고, 순차적으로 NF- κ B의 유리화 및 핵으로의 이동을 감소시켜 전사 인자로서의 NF- κ B의 기능을 차단한다는 점을 알 수 있다.
- [0118] **<4-5> MAPKs/Akt 경로의 억제 효과 확인**
- [0119] NF- κ B의 전사 인자 활성화로 인하여 활성화되는 ERK(extracellular-regulated protein kinase), JNK(c-Jun NH2-protein kinase) 및 p38 MAPK 및 PI3K/Akt에 대한 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물의 영향을 웨스턴 블롯(western blot)으로 확인하였다.
- [0120] 그 결과, 도 10에 도시된 바와 같이, 본 발명의 외톨개모자반의 주정 추출물 및 외톨개모자반 주정 추출물의 n-헥산 분획물은 LPS에 의해 BV-2 세포에서 유도된 ERK 및 JNK의 인산화를 농도의존적으로 억제하였음을 알 수 있었다(도 10 참조).

[0121] **<실시예 5>**

- [0122] 외톨개모자반(Myagropsis myagroides) 주정 추출물 및 주정 추출물의 n-헥산 분획물로부터 사가크로메놀(sargachromenol) 분리
- [0123] 상기 실시예 <1>과 <2-1>에서 각각 수득한 외톨개모자반 주정추출물과 외톨개모자반 n-헥산 분획물로부터 저분자 생리활성물질을 분리하기 위하여, Shimadzu HPLC 시스템(Kyoto, Japan)으로 HPLC(High performance liquid chromatography)를 수행하였다. 상기 Shimadzu HPLC 시스템(Kyoto, Japan)은 펌프(Shimadzu LC-20AD), 포토다이오드 광선(photodiode array) 검출기(Shimadzu SPD-M20A), 자동시료주입기(SIL-20A), 시스템 컨트롤러(CBM-20A) 및 Shimadzu LCsolution(ver.1.22sp) 데이터 분석 프로그램으로 구성되어 있다.
- [0124] 본 발명자들은 외톨개모자반 n-헥산 분획물 50 g을 디클로로메탄으로 용해시켜 실리카겔에 흡착시킨 후 실리카겔 컬럼을 이용하여 활성성분을 1차 분리하였다. 용매는 메탄올:디클로로메탄(0:100~100:0)을 이용하였다. 1차 실리카 겔 크로마토그래피(silica gel chromatography)에서 수득한 획분 중 2% 메탄올 (메탄올:디클로로메탄=2:98)로 수득한 획분에서 (17 g) 가장 우수한 항신경염증 활성을 확인하였으며, 이 중 일부 (10 g)을 취하여 2차 실리카 겔 크로마토그래피(silica gel chromatography)와 반복적인 HPLC (Shimadzu HPLC 시스템)을 통하여 순수한 저분자 생리활성 물질을 분리하였다. 본 화합물의 구조는 NMR 분석을 통하여 사가크로메놀(sargachromenol)로 확인되었다.
- [0125] 외톨개모자반 주정추출물 및 n-헥산 분획물의 HPLC 크로마토그램을 통하여 추출물내 함유된 사가크로메놀(sargachromenol)을 다시 한번 확인하였다. 도 12의 (a)에 도시된 바와 같이 사가크로메놀은 23분경 분리되었으며 도 12의 (b) 및 도 12의 (c)에 각각 도시된 바와 같이 외톨개모자반 주정추출물 및 외톨개모자반 n-헥산 분획물에서도 23분경 사가크로메놀에 해당하는 피크를 확인할 수 있었다.
- [0126] 상기와 같은 결과로부터, 상기 실시예 <1>과 <2-1>에서 각각 수득한 외톨개모자반 주정추출물과 외톨개모자반 n-헥산 분획물에 사가크로메놀이 다량 함유되어 있다는 것을 확인할 수 있었으며 사가크로메놀을 외톨개모자반 추출물의 지표 물질 후보로 선정하였다.
- [0127] <실시예 6>
- [0128] 사가크로메놀(sargachromenol)의 인 비트로(in vitro)에서의 신경염증 억제 효과 확인
- [0129] <6-1> 사가크로메놀의 처리
- [0130] 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 입수한 마우스 소신경세포(microglia) BV-2를 10% 우태아혈청(FBS), 100 units/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 DMEM 배지로 37° C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다.
- [0131] 상기와 같이 배양된 BV-2 세포를 24 웰 플레이트에 1×10^5 개/웰의 농도로 분주한 후, 서로 다른 농도(0, 1, 2.5, 5 µg/ml)의 사가크로메놀을(상기 실시예 <5>에서 수득한 화합물)이 각각 함유된 DMEM 배지로 1시간 동안 배양한 다음, 1 µg/ml의 LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다.
- [0132] <6-2> 외톨개모자반 추출물의 분획물의 세포독성 효과
- [0133] 상기 실시예 <5>에서 각각 수득한 사가크로메놀의 안전성을 확인하고자 MTS 분석에 의한 세포독성 실험을 수행하였다.
- [0134] 상기 실시예 <6-1>에서와 같이 외톨개모자반 추출물의 분획물들이 처리된 BV-2 세포 배양물에서 100 µl의 배지를 취하여 5 µl의 MTS 용액과 함께 96 웰 플레이트에 각각 분주하여 1시간 동안 반응시킨 다음, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정치는 3회 반복 실험의 평균값으로 결정하였고, 상기와 같이 결정된 측정치를 대조군과 비교를 통해 상대적인 세포 생존율(% of control)을 계산하였다.
- [0135] 그 결과, 도 13 (a)에 도시된 바와 같이, 사가크로메놀은 모두 5 µg/ml의 농도까지 세포 독성이 나타나지 않았다(도 13 참조).

[0136] <6-3> 사가크로메놀의 일산화질소(NO) 생성 억제 효과

[0137] 상기 실시예 <5>에서 수득한 사가크로메놀의 일산화질소 생성 억제 효과를 확인하고자, Green LC 등(Anal Biochem.(1982) 126:131-138)의 문헌에 보고된 구체적인 일산화질소 생성량 측정 방법에 따라 실험을 수행하였다.

[0138] 상기 실시예 <6-1>에서와 같이 사가크로메놀이 처리된 BV-2 세포 배양물에서 100 μ l의 배지를 취하여 96 웰 플레이트에 각각 분주하고, 100 μ l의 Griess 시약을 각각의 웰에 처리하여 10분 동안 반응시킨 다음, ELISA 리더를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 질산나트륨(sodium nitrite, NaNO_2)을 연속 희석하여 얻었다.

[0139] 그 결과, 도 13 (b)에 도시된 바와 같이, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 일산화질소의 생성은 사가크로메놀에 의하여 농도의존적으로 감소하였음을 알 수 있었으며, 항산화 효과가 있다고 알려진 커큐민을 처리한 대조군에 비하여도 일산화질소 생성을 더 많이 감소하였음을 알 수 있었다(도 13 참조).

[0140] <6-4> iNOS 및 COX-2의 단백질 생성 억제 효과 확인

[0141] 일산화질소(NO)의 생성 억제제가 각각 iNOS 및 COX-2의 발현 억제에 의한 것인지를 확인하기 위하여, iNOS 및 COX-2 단백질에 대한 사가크로메놀의 영향을 웨스턴 블롯(western blot)을 통해 확인하였다.

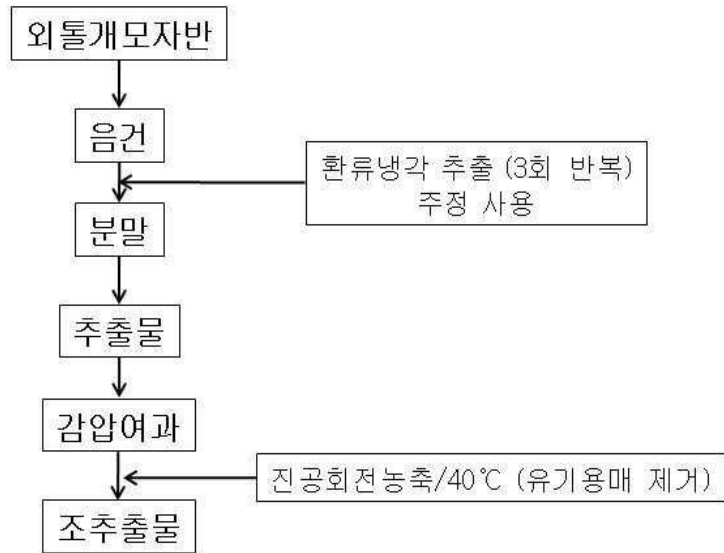
[0142] 그 결과, 도 13의 (c)에 도시된 바와 같이, BV-2 세포에서 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현은 사가크로메놀에 의하여 농도의존적으로 감소하였고, COX-2의 발현은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 사가크로메놀에서 유의적으로 감소하였다(도 13 참조).

[0143] 상기과 같은 결과로부터 상기 사가크로메놀은 iNOS의 단백질 발현 과정에 영향을 미쳐, 상기 iNOS의 생성을 억제함으로써, 일산화질소(NO)의 생성을 억제함을 확인하였다.

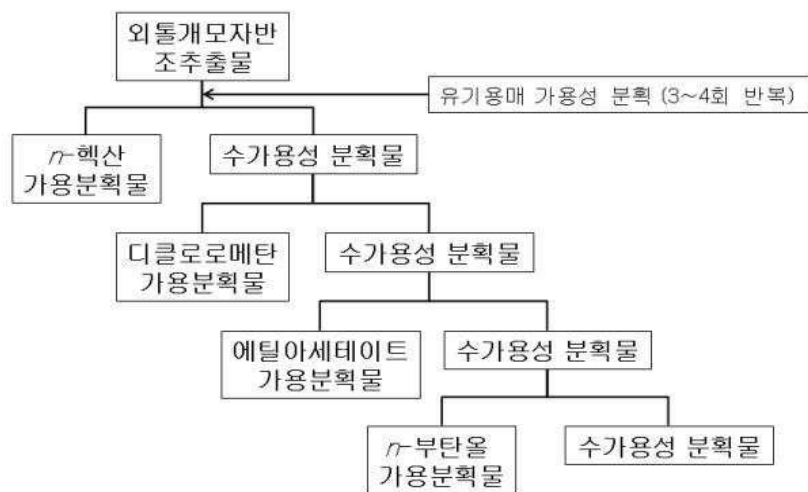
[0144] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

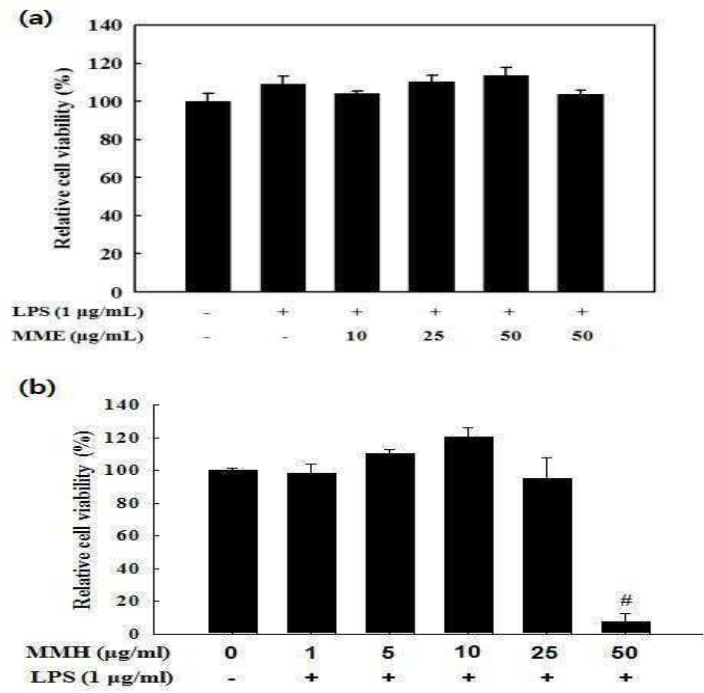
도면1



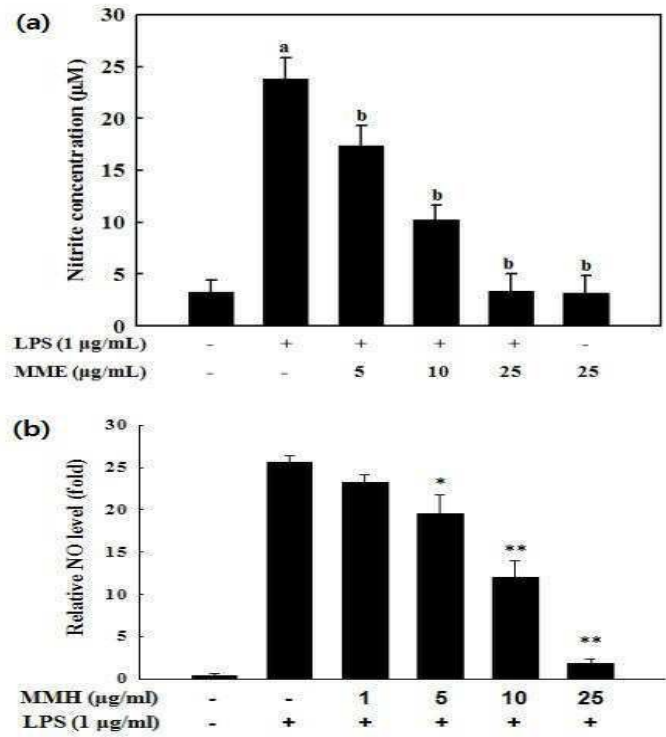
도면2



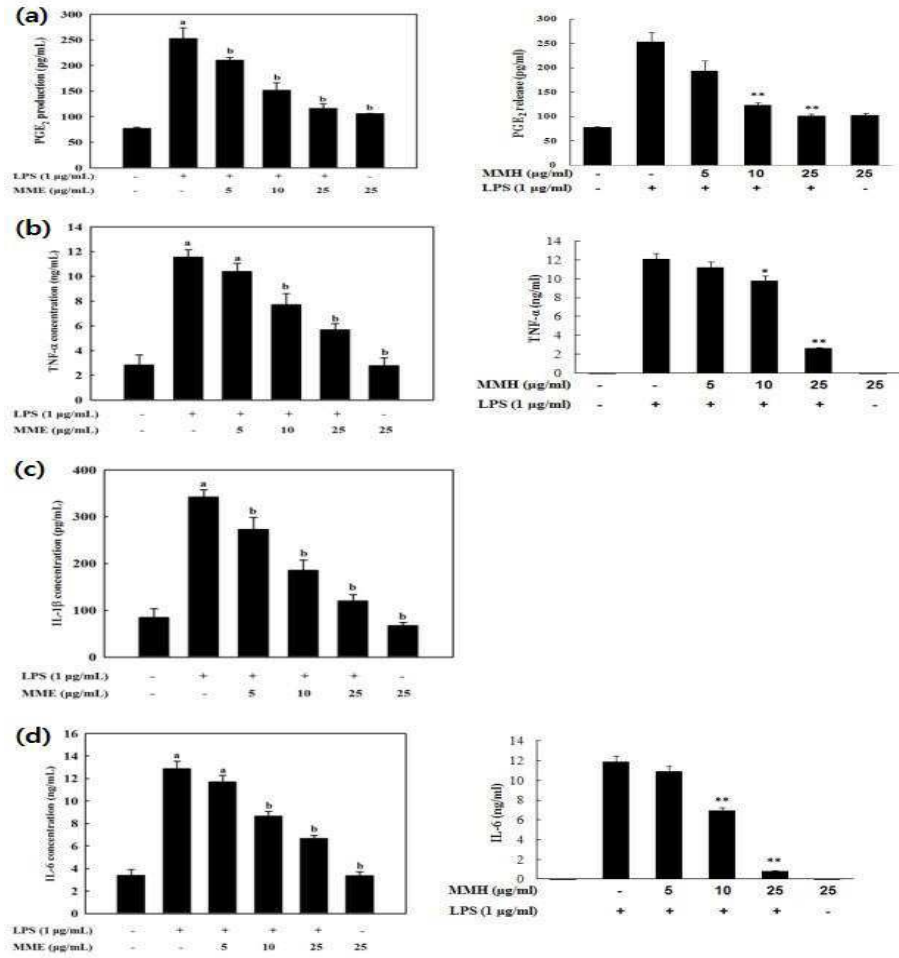
도면3



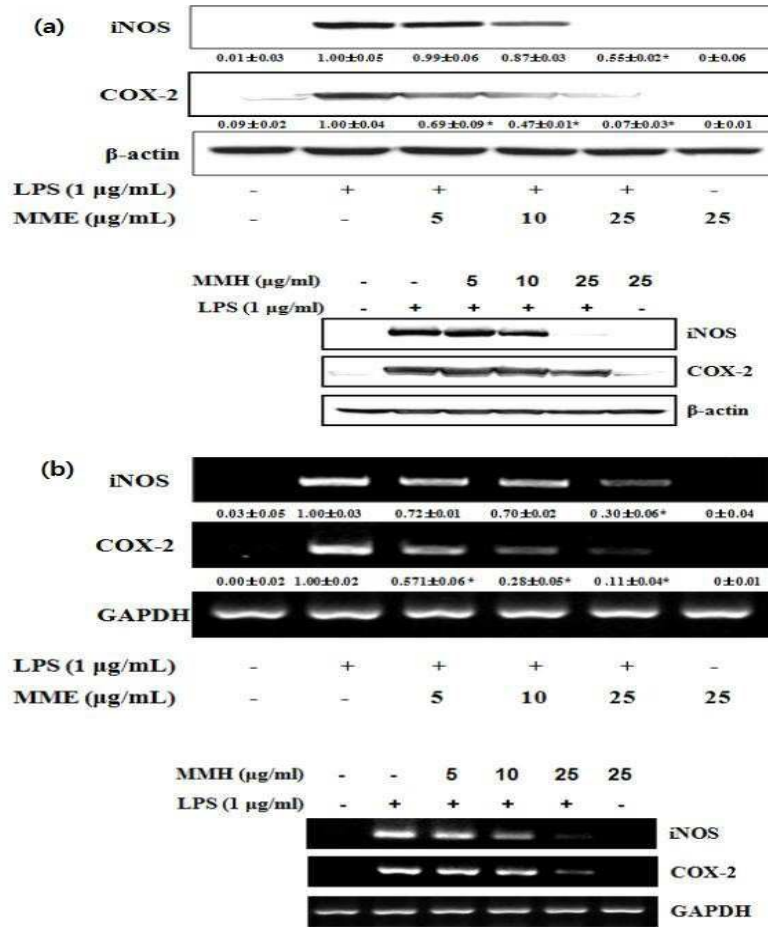
도면4



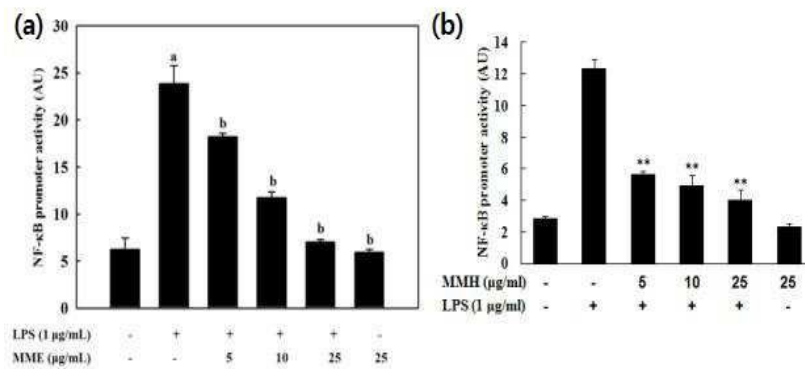
도면5



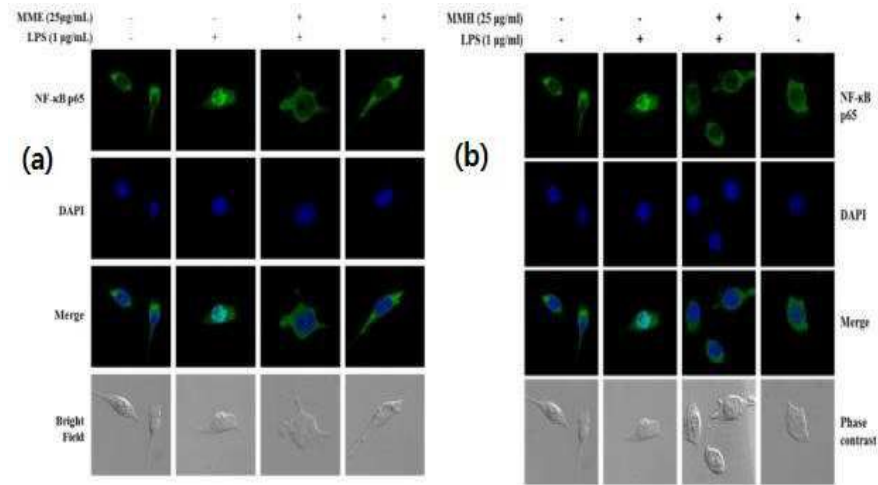
도면6



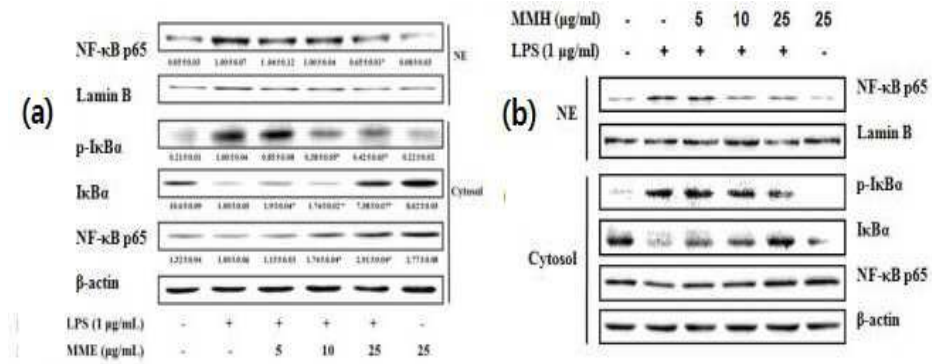
도면7



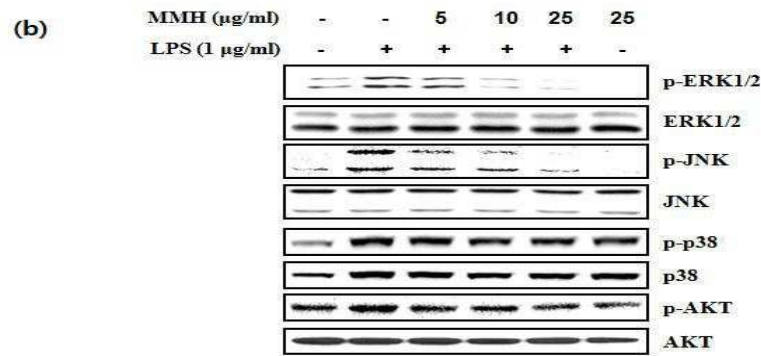
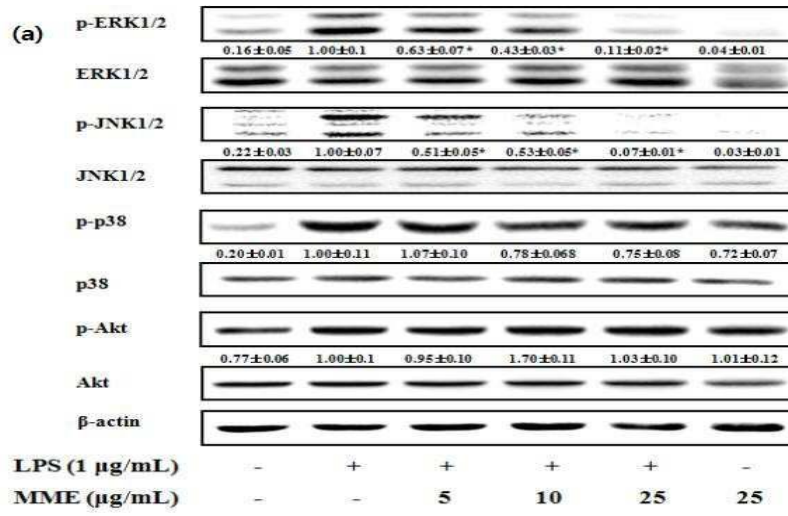
도면8



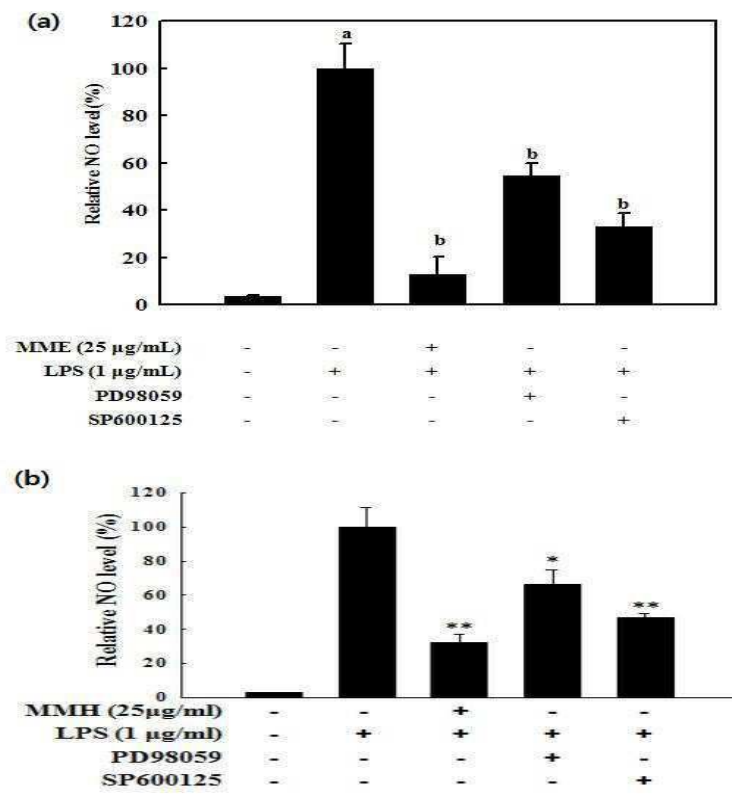
도면9



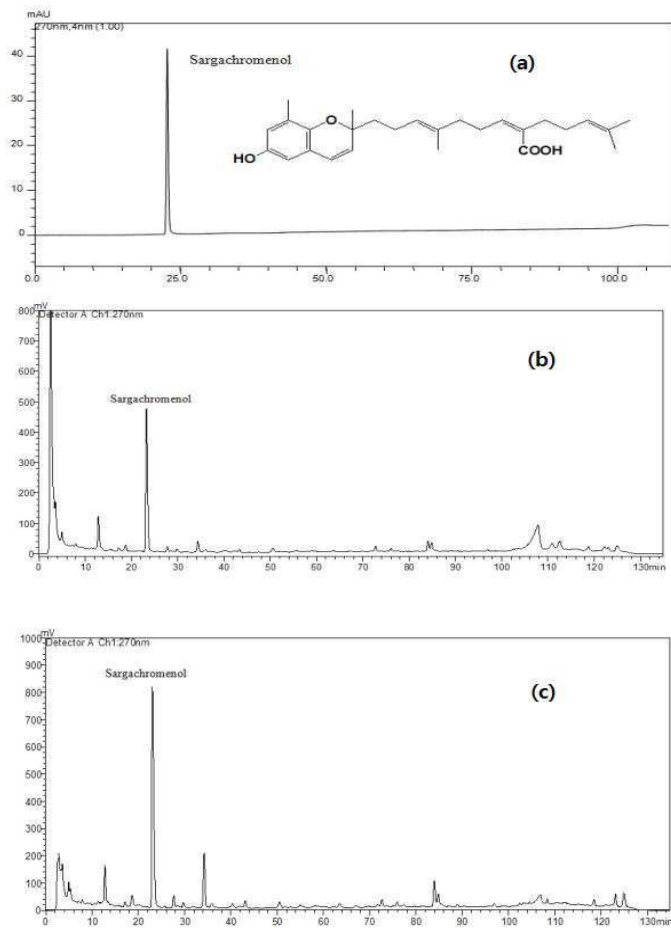
도면10



도면11



도면12



도면13

