



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0111562

(43) 공개일자 2015년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/015 (2006.01) A61K 31/01 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0034987

(22) 출원일자 2014년03월26일

심사청구일자 2014년03월26일

(71) 출원인

원광대학교산학협력단

전라북도 익산시 익산대로 460 (신동)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김윤철

대전광역시 서구 둔산로 155, 118동 402호 (둔산동, 크로바아파트)

백남인

경기도 화성시 동탄중앙로 51, 629동 901호 (반송동, 동탄나루마을한화꿈에그린아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 천지

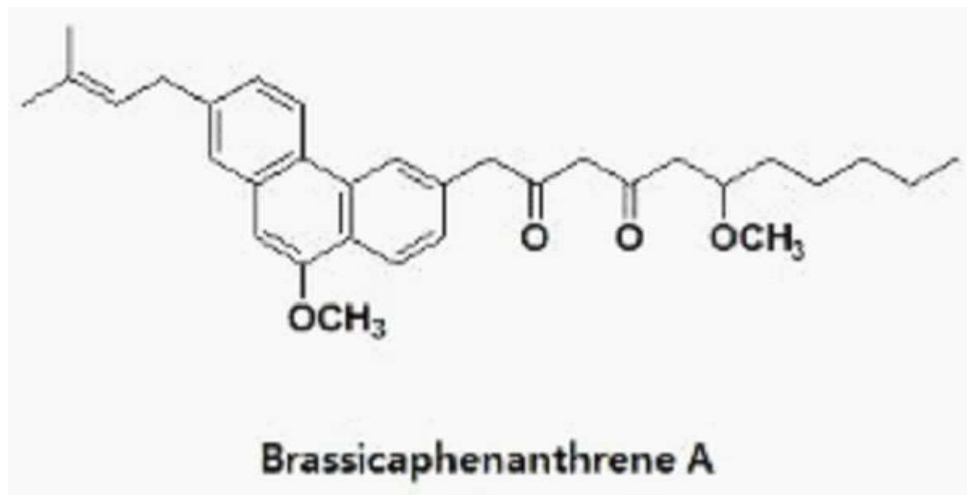
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **순무에서 분리한 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 개선, 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물에 의하는 경우 신경세포의 보호 효과, 구체적으로 글루타메이트에 의한 독성으로부터 신경세포를 보호하는 효과가 현저하므로, 노화 또는 뇌의 여러 병리적 상황에 의한 신경세포의 손상을 억제하여, 퇴행성 뇌질환을 치료, 개선 또는 예방할 수 있을 뿐만 아니라, 안정성이 인정되어 부작용 발생 가능성이 낮은 천연물 유래 물질을 이용하는 것이므로, 퇴행성 뇌질환의 치료, 개선 또는 예방을 위해 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

오현철

전라북도 익산시 고봉로24길 18, 302동 1404호 (영등동, 영등2차제일아파트)

이동성

전라북도 전주시 완산구 강변로 306, 102동 702호 (중화산동2가, 광진햇빛칸아파트)

우 치엔

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 경희대학교 생명과학대학 106호 천연물화학실험실 (서천동)

조진경

인천광역시 강화군 불은면 불은북로201번길 49

김경수

전라북도 군산시 중앙로 18-7 (대명동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-0062484

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 한방체액조절연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 원광대학교

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

브라시카페난텐 A(brassicaphenanthrene A), 약학적으로 허용되는 이의 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병(Alzheimer disease) 및 헌팅턴 병(huntington disease)으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나인 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 3

브라시카페난텐 A(brassicaphenanthrene A), 약학적으로 허용되는 이의 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 개선 또는 예방용 식품조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병(Alzheimer disease) 및 헌팅턴 병(huntington disease)으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나인 퇴행성 뇌질환 개선 또는 예방용 식품조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 식품조성물은 건강기능성 식품인 퇴행성 뇌질환 개선 또는 예방용 식품조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 퇴행성 뇌질환 치료, 개선 또는 예방용 조성물, 구체적으로 천연물 유래 성분을 유효성분으로 하는 퇴행성 뇌질환 치료, 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 우리나라 노령 인구의 비율을 살펴보면, 우리나라는 지난 2000년 65세 이상 인구가 총인구에서 차지하는 비중이 7.2 %에 이르러 고령화 사회에 들어섰으며, 오는 2019년에는 이 비율이 14 %를 넘어 고령사회에 진입할 것으로 전망되고 있다. 노령화 인구의 증가로 인해서 지난 50여 년간 사망의 주된 원인이 되었던 급성 전염성 질병보다는 만성 퇴행성 질병이 더욱 큰 문제로 대두 되고 있다. 특히 만성 퇴행성 질병 중에서 뇌혈관 질환에 의한 사망은 단일질환에 의한 사망률 중에서 2위를 기록하고 있는 매우 중요한 질환이다.

[0003] 우리나라 사망 원인에 2위를 차지하는 질환인 상기 뇌혈관 질환이란 흔히 뇌졸중이라고도 하며, 크게 2가지 형태로 분류될 수 있다. 하나는 주로 교통사고 등과 같이 외부의 충격에 의해서 뇌에 있는 혈관이 터져서 발생하는 뇌출혈과 같은 뇌질환, 구체적으로 출혈성 뇌질환 또는 허혈성 뇌질환이고, 다른 하나는 주로 노령의 사람들에서 자주 나타나는 퇴행성 질환이다.

[0004] 노화는 생명의 필수불가결한 과정으로써 유전적 요인을 포함한 생물학적, 행동적 및 환경적 요인 등 여러 인자들에 의해 복합적으로 영향을 받으며, 신체의 세포, 조직, 기관의 환경 변화에 대한 적응력 저하, 기억력 감퇴 등의 특징이 나타난다고 알려져 있고, 상기 퇴행성 뇌질환은 노화와 관련되어 뇌세포의 조기 사멸로 인해 임상적으로 인지기능 및 운동기능 등에서 병적인 소견이 발생 진행되는 병으로, 알츠하이머병 또는 치매 등이 이에

속한다.

- [0005] 포유동물의 뇌는 가장 초기에 발생하는 것으로 알려져 있다. 또한, 조직 특이 줄기세포들이 생리적 순환이나 손상에 의한 질환 때문에 감소한 세포들을 대체함으로써, 조직의 항상성(homeostasis)을 유지할 수 있는 반면, 성체 뇌의 내인성 신경줄기세포는 출생 후에는 더 이상 분열 혹은 분화되지 않고, 거의 재생되지 않는 것으로 알려져 왔다. 이로 인해 노화, 신경세포 손상 등에 의해서 뇌기능이 저하되면 다시 회복되지 않는 것으로 여겨져 왔다.
- [0006] 그러나, 최근 발표되는 연구 결과에 따르면, 성체의 뇌에서도 내인성 신경줄기세포에 의해 신경세포가 새롭게 증식하고 분화한다는 사실이 알려지기 시작했다. 즉, 노화 또는 신경세포 손상 등에 의해 신경세포의 기능이 저하되면 다시 회복되지 않는 것으로 여겨졌던 것으로 보고되고 있다.
- [0007] 구체적으로, 상기 내인성 신경줄기세포는 뇌의 외측뇌실의 아랫부분인 뇌실밑구역(subventricular zone)과 해마(hippocampus)의 치아이랑(dentate gyrus)의 과립세포(granule cell) 밑부분인 과립밑구역(subgranular zone)과 같은 뇌의 제한된 구역에서 발생 및 분화되어 위쪽으로 이동을 해서 치아이랑의 과립세포가 되는 것으로 알려져 있으며, 이렇게 생성된 과립세포는 해마의 CA3부분과 연결되어 해마와 관련된 학습과 기억 그리고 감정에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 상기 해마는 외현적 기억에 필수불가결한 부위로서, 노화 및 다양한 병리적 상황에 따라서 신경세포 손상을 가장 쉽게 받는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 따라서, 상기 해마 지역의 신경세포의 손상을 억제 또는 노화나 뇌의 다양한 병리적 상황과 관련된 퇴행성 뇌질환으로 인한 신경세포 손상을 예방하거나, 상기 해마 지역의 신경세포를 보호하여, 상기 신경세포의 손상을 예방할 수 있는 경우, 기억력 감퇴 및 인지 기능 감소 등과 같은 기능 손실의 예방뿐만 아니라 알츠하이머(alzheimer)와 같은 상기 퇴행성 뇌질환의 치료, 개선 또는 예방이 가능할 것으로 평가된다.
- [0009] 상기 퇴행성 뇌질환의 대표적인 질환인 알츠하이머(alzheimer)는 뇌의 신경세포가 퇴화되고 뇌가 축소되어, 점진적인 정신장애를 일으키는데 기억장애, 판단장애, 추상적 사고의 장애 및 인격변화 등을 포함한 지적 기능의 손실을 특징으로 한다. 알츠하이머병 환자의 경우, 베타아밀로이드 단백질이 과도하게 만들어져 뇌에 축적되며, 이 단백질이 활성산소를 만들어 뇌세포를 장기간에 걸쳐 손상시키는 것으로 알려져 있다.
- [0010] 상기 알츠하이머병 치료와 관련하여, 아세틸콜린에스테라제 억제제는 경도 및 중증도의 알츠하이머병에서 효과를 인정받고 있으나, 미국 식품의약국에서 공식적으로 효과가 인정되어 널리 사용되고 있는 성분으로는 타크린, 도네페질, 리바스티그민, 갈란타민 등 중 일부는 간 독성을 보여 현재 거의 사용되지 않는 것으로 알려져 있다.
- [0011] 따라서, 부작용을 나타내지 않는 천연물질 유래의 퇴행성 뇌세포 치료제의 개발이 요구되고 있으며, 뇌의 신경세포의 특성을 고려할 때, 부작용이 없어 지속적으로 섭취가 가능한 천연물질 유래 물질 중에서 신경세포의 재생을 효과적으로 상승시킬 수 있는 물질의 개발과, 이를 이용한 퇴행성 뇌질환의 예방 필요성이 새롭게 인식되고 있다.
- [0012] 건강식품에 대한 관심 및 수요의 증가로 최근 국내에서 다수의 천연 물질이 뇌질환의 개선 또는 예방에 효과가 있는 건강식품으로서 시판되고 있으나, 이들 대부분은 과학적인 검증을 거치지 않은 것이고, 오히려 건강식품 남용의 원인이 되기도 하여 사회적인 문제가 되고 있다. 따라서, 오랫동안 식품으로 사용되어 그 안전성이 입증된 천연자원들을 객관적으로 검증하여 퇴행성 뇌질환에 대한 치료, 개선 또는 예방효과를 갖는 천연물질을 개발하는 것이 시급히 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 10-2005-0031499A
(특허문헌 0002) 10-2011-0090155A
(특허문헌 0003) 10-0622864B
(특허문헌 0004) 10-0756357B

비특허문헌

- [0014] (비특허문헌 0001) Mosmann T, Journal of immunological methods 65, pp.55-63(1983)
- (비특허문헌 0002) Jeong GS et al, Natural Product Sciences, 13, pp.268-272(2007)
- (비특허문헌 0003) Royall J and H Ischiropoulos, Archives of biochemistry and biophysics, 302, 348-355(1993)
- (비특허문헌 0004) Li B et al, European Journal of Pharmacology 614, pp.58-65(2009)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 상기 종래의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명의 목적은 해마지역의 신경세포를 보호하여 노화 또는 뇌 병변에 의한 퇴행성 뇌질환 치료 또는 개선에 효과가 있는 천연물 유래 성분을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료, 개선 또는 예방용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 순무 유래 성분, 구체적으로 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*), 약학적으로 허용되는 이의 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 퇴행성 뇌질환은 치매 및 알츠하이머병(Alzheimer disease)으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*), 약학적으로 허용되는 이의 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 퇴행성 뇌질환은 치매 및 알츠하이머병(Alzheimer disease)으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 기능성 식품 조성물 또는 건강기능식품일 수 있다.
- [0018] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0019] 본 발명의 발명자는 알츠하이머나 치매와 같은 퇴행성 뇌질환의 치료, 개선 또는 예방 효과가 있는 천연 물질에 대하여 연구하던 중, 천연물로 오랜기간 동안 식품으로 사용된 순무로부터 분리된 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*)가 마우스의 해마세포 유래 세포주인 HT22 세포에서 글루타메이트에 의한 세포 독성을 억제하는 효과를 확인하였으며, 추가적으로 상기 브라시카페난텐 A가 마우스 해마세포 유래 세포주인 HT22 세포에서 글루타메이트에 의한 세포 독성을 억제하는 효과를 갖는 것으로 알려진 헤마틴 산화효소-1(Heme Oxygenase-1, HO-1)의 발현 및 활성을 증가시키며, 활성산소종 억제 효과도 우수할 뿐만 아니라, 사람 치수 세포를 이용하여 실험한 결과 세포손상을 억제하는 세포보호효과도 우수하다는 것을 확인하였을 뿐만 아니라 세포 독성을 통해 확인한 결과 부작용도 문제되지 않음을 확인하여 본 발명을 완성 하였다.
- [0020] 본 명세서에 있어서, "약학적으로 허용되는 염"이란 통상적인 방법으로 제조한 염을 의미하며, 당업자에게 공지되어 있는 방법에 의해 제조 또는 응용될 수 있는 것을 포함하는 개념이다. 상기 "약학적으로 허용되는 염"은 약리학 또는 생리학적으로 허용되는 무기산과 유기산 및 염기로부터 유도된 염을 포함하지만 이것으로 한정되지는 않는다. 상기 약리학 또는 생리학적으로 허용되는 무기산과 유기산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등이 있다. 또한, 상기 약리학 또는 생리학적으로 허용되는 염기로부터 유도된 염은 알칼리 금속, 예를 들어, 나트륨, 알칼리금속, 예를 들어, 마그네슘, 암모늄 등일 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, "유효성분"이란 조성물, 구체적으로 약학조성물 또는 식품조성물에 있어서 퇴행성 뇌질환의 치료, 개선 또는 예방 효과, 구체적으로 신경세포의 보호 효과를 제공하는 성분을 의미한다.
- [0022] 본 명세서에 있어서, "치료"란 본 발명에 따른 브라시카페난텐 A 또는 약학적으로 허용되는 이의 염을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

- [0023] 본 명세서에 있어서, "예방"이란 본 발명에 따른 브라시카페난텐 A 또는 약학적으로 허용되는 이의 염을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0024] 본 명세서에 있어서, "담체"란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체, 부형제, 또는 희석제를 의미한다.
- [0025] 본 발명은 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*), 약학적으로 허용되는 이의 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병(Alzheimer disease), 치매 또는 헌팅턴 병(huntington disease)일 수 있고, 바람직하게는 알츠하이머병 또는 치매일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 실시예에 따른 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*), 약학적으로 허용되는 이의 염 및 이들의 조합으로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함한다.
- [0027] 상기 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*)는 순무로부터 분리한 식물성 화합물로서, 이에 대한 약리효과는 거의 알려져 있지 않으며, 특히 퇴행성 뇌질환과 관련된 효과는 전혀 보고되어 있지 않은 물질이다. 상기 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*)은 도 3에 기재된 화학식과 같은 화학구조를 갖는 물질일 수 있다.
- [0028] 상기 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*)는 순무로부터 천연적으로 얻거나 또는 당업계에 알려진 방법에 의해 인공적으로 합성할 수 있으며, 일 예로, 상기 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*)는 순무 추출물로부터 분리된 것 일 수 있다.
- [0029] 상기 순무(*Brassica rapa*)는 쌍떡잎식물 양귀비목 겨자과의 한해살이풀 또는 두해살이풀로, 유럽이 원산지이며, 현재에는 세계 각국에서 20여 종의 다양한 품종의 순무가 재배 및 이용되고 있으며, 우리나라의 경우 중국을 거쳐 유입되어 현재 농가에서 재배되고 있는 식물이다. 상기 순무의 뿌리는 대개 팽이 모양의 둥근형이고, 빛깔도 대부분 흰색이지만, 겉에만 자줏빛을 띤 붉은색이고, 맛은 감미롭고 고소함 겨자향의 인삼맛이 난다. 식용으로 사용되기도 하고, 대형 품종은 가축 사료로 사용된다.
- [0030] 상기 순무 추출물은 본 발명이 속하는 분야에서 통상적인 추출방법으로 추출하여 제조될 수 있고, 상기 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*)은 본 발명이 속하는 분야에서 통상적인 분리방법으로 순무 추출물로부터 분리될 수 있다.
- [0031] 상기 순무 추출물은 순무 또는 순무의 특정 부위를 추출용매로 추출하거나 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조할 수 있다.
- [0032] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 일 수 있다. 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 벤젠, 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매 일 수 있다. 상기 추출용매는 물, 탄소수 1 내지 5의 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 50% 내지 99%의 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올 수용액, 더욱 바람직하게는 50% 내지 99%의 에탄올 수용액 일 수 있다.
- [0033] 상기 본 발명의 순무 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 불순물을 제거한 순무에 추출용매를 가하고 추출과정을 수행하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 추출과정은 냉침추출법, 온침추출법, 가압추출법 또는 초음파 분쇄 추출법일 수 있다.
- [0034] 상기 분획용매는 물, 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 분획물은 상기 추출법으로 제조한 추출물, 구체적으로 조추출액에 분획과정을 더욱 실시한 분획물일 수 있다. 상기 분획용매는 에틸아세테이트, 에테르, 클로로포름, 벤젠, 헥산, 메틸렌클로라이드 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군에서 선택된 용매, 바람직하게는 에틸아세테이트일 수 있다. 상기 분획과정은 구체적으로 상기 조추출액에 헥산, 플로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물을 순서로 가한 후에, 층 분리한 헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물을 순차적으로 수득하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0035] 상기 추출물 또는 분획물은 추출 또는 분획과정을 수행한 이후, 감압 여과 과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다. 상기 수득한 추출물은 사용시까지 급속 냉동 냉장고(deep freezer)에 보관할 수 있다.

- [0036] 본 발명에 있어서, 퇴행성 뇌질환(degenerative brain disease)은 나이가 들어감에 따라 발생하는 퇴행성 질환 중 뇌에 발생하는 질환으로, 신경세포의 손상 또는 사멸에 의해, 신경세포 수가 정상수준 이하로 줄어들거나, 신경세포의 분화 또는 증식이 정상수준 이하로 진행되어 발생하는 질환을 의미한다.
- [0037] 구체적으로, 상기 퇴행성 뇌질환은 뇌와 척수의 특정 뇌세포군, 구체적으로 뇌신경세포의 사멸에 비하여 증식이 감소되어, 뇌신경세포의 수가 감소하는 문제와 관련된 모든 질환을 의미한다. 상기 뇌신경세포의 기능 상실은 일 예로 뇌신경세포와 뇌신경세포 사이의 정보를 전달하는 시냅스의 형성이나 기능상의 문제 또는 뇌신경의 전기적 활동성의 이상적 증상이나 감소로 야기되는 뇌신경세포의 기능상실 등이 있다.
- [0038] 상기 퇴행성 뇌질환은 구체적으로, 알츠하이머병(Alzheimer disease), 치매 또는 헌팅턴 병(huntington disease)일 수 있고, 바람직하게는 알츠하이머병 또는 치매일 수 있다.
- [0039] 상기 브라시카페난텐 A는 헤마틴 산화효소-1(Heme Oxygenase-1, HO-1)의 발현 및 활성 증가를 통해 신경세포의 보호효과, 구체적으로 글루타메이트에 의한 신경세포 손상을 억제할 수 있고, 활성산소종을 억제할 수 있어, 최종적으로 신경세포를 보호할 수 있음이 실험적으로 확인되었다. 상기 브라시카페난텐 A는 천연식물로부터 분리된 천연물 유래 성분 또는 이와 동일하게 제조한 합성물로서 식품의 식재료로 오랫동안 사용되어 순무로부터 유래된 것이므로, 안정성이 문제되지 않으며, 실험결과 신경세포의 보호능이 우수하여, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방 효과가 뛰어남을 확인 하였다.
- [0040] 상기 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다.
- [0041] 상기 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물은 상기 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 단독으로 포함하거나 상기 브라시카페난텐 A에 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방 효과가 있는 물질을 유효성분으로 더욱 포함할 수 있고, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 추가성분 즉, 약제학적으로 허용되거나 영양학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0042] 보다 상세하게는 상기 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물은 상기 유효성분 외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 담체, 부형제 또는 희석제는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아키시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 상기 성분들은 상기 유효성분 즉, 브라시카페난텐 A에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0044] 상기 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물은 상기 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분, 구체적으로 상기 브라시카페난텐 A를 0.00001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.0001 중량% 내지 99 중량%, 더욱 바람직하게는 0.001 중량% 내지 50 중량%, 더더욱 바람직하게는 0.1 중량% 내지 25 중량%로 포함할 수 있다. 또한, 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물 총 중량에 대하여 0.1 중량% 내지 20 중량% 범위에서 추가할 수 있다. 그러나, 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류와 진행 정도에 따라 적절하게 조절될 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물을 약제화하는 경우, 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구 모두 사용 할 수 있다.
- [0046] 구체적으로 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 유효성분 즉, 브라시카페난텐 A에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다.
- [0047] 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로

는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0048] 상기 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 구체적인 제형의 예로는 과립제, 산제, 시럽제, 액제, 현탁제, 정제, 주사제, 주정제, 카타플라스마제(cataplasma), 캡셀제, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 등이 있다.

[0049] 더 나아가, 상기 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 바람직하게 제형화 될 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 일 예로, 본 발명의 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물은 상기 유효성분을 기준으로 할 때, 0.0001 mg/kg 내지 1000 mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해서는 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg, 더더욱 효과적으로는 30 mg/kg 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0051] 또한, 본 발명의 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 조성물은, 상기 유효성분 이외에 공지된 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방 효과를 갖는 화합물 또는 천연물에 대한 추출물을 더욱 포함할 수 있으며, 상기 유효성분 100 중량부에 대하여 각각 5 중량부 내지 200 중량부로 포함될 수 있다.

[0052] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 퇴행성 뇌질환 개선 또는 예방용 조성물은 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함한다.

[0053] 또한, 본 발명은 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 개선 또는 예방용 식품조성물에 관한 것이다. 본 발명의 뇌질환 개선 또는 예방용 식품조성물의 유효성분인 브라시카페난텐 A는 오랜 시간동안 식품으로 사용하던 것으로, 독성 및 부작용이 거의 없어서, 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 성분이며, 신경세포에 대한 보호능이 우수하므로, 다양한 식품 및 음료 등에 이용될 수 있다.

[0054] 상기 식품이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제 등을 모두 포함하는 의도이다.

[0055] 상기 식품은 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0056] 상기 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적, 구체적으로 신경세포의 보호능이 우수할 수 있도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 신경세포의 보호능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.

[0057] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 회석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0058] 상기 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 건강기능음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0059] 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르

비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 5 내지 12 g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0060] 상기 외에 본 발명의 식품조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 브라시카페난텐 A 100 중량부 당 0 내지 2,000 중량부 범위에서 선택될 수 있다.

[0061] 상기 건강기능음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.

[0062] 상기 건강기능음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 브라시카페난텐 A를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0063] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 g 내지 20 g, 바람직하게는 5 g 내지 12 g이다.

[0064] 또한, 브라시카페난텐 A를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 개선 또는 예방용 식품조성물에 있어서, 상기 유효성분은 전체 식품 중량의 0.01 중량% 내지 15 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 g 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 g 내지 1 g의 비율로 포함될 수 있다.

[0065] 본 발명의 브라시카페난텐 A는 퇴행성 뇌질환의 개선 또는 예방 효과, 구체적으로 신경세포의 보호능에 의한 신경세포 보호 및 신경세포 사멸의 방지를 통한 신경세포 보호 효과를 통해서 퇴행성 뇌질환을 개선, 치료 또는 예방하는 효과가 우수함이 실험적으로 확인되었다.

발명의 효과

[0066] 본 발명의 브라시카페난텐 A는 뇌세포 또는 신경세포의 사멸을 억제하고, 보호를 유도하여 퇴행성 뇌질환을 개선, 치료 또는 예방하는 효과가 뛰어나고, 종래의 퇴행성 뇌질환에 대한 치료제와 달리 장기간 식품의 원료로 사용되어 안정성이 뛰어난 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 순무로부터 브라시카페난텐 A(*Brassicaphenanthrene A*)를 분리하는 방법을 나타낸 순서도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 순무로부터 분리한 물질에 관한 자료로, 도 2a는 순무로부터 분리한 물질의 ¹H-NMR(A) 분석 결과, 도 2b는 순무로부터 분리한 물질의 ¹³C-NMR(B) 분석 결과 및 도 2c는 순무로부터 분리한 물질의 HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Coherence)를 나타내는 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 순무로부터 분리한 물질로 확인된 물질의 구조, 즉 브라시카페난텐 A의 구조를 나타낸 화학식이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 브라시카페난텐 A의 세포독성을 알아보기 위해 세포사멸효과(Viability)를 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 구체적으로, 브라시카페난텐 A의 농도별 사용량(가로축, μ M)에 따라 브라시카페난텐 A를 처리하지 않은 대조군(-)의 세포수(세포생존율)를 기준으로 세포수를 상대적으로 표시한(세로축, %) 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 브라시카페난텐 A(Brassicaphenanthrene A)의 마우스 유래 해마세포(HT 22)의 보호효과, 구체적으로 퇴행성 뇌질환에 대한 예방효과를 나타낸 그래프로, 도 5a는 브라시카페난텐 A의 농도별 사용량(가로축, μM)에 따른 HT 22 세포주의 생존율(세로축, %)을 글루타메이트(glutamate, 5 mM) 및 브라시카페난텐 A를 처리하지 않은 음성대조군(-)의 세포수(세포생존율)를 기준으로 나타낸 그래프로, Trolox를 양성대조군으로 사용한 것이고, 도 5b는 브라시카페난텐 A의 농도별 사용량(가로축, μM)에 따른 활성산소종 생성 또는 억제여부(세로축, %)를 글루타메이트(glutamate, 5 mM) 및 브라시카페난텐 A를 처리하지 않은 음성대조군(-)의 활성산소종 함량을 나타내는 형광광도를 기준으로 나타낸 그래프로, 상기 Trolox를 양성대조군으로 사용한 것이며, +는 물질을 처리한 경우를 의미하고, -는 처리하지 않은 경우를 의미한다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 브라시카페난텐 A의 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 발현 유도 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 도 6a는 브라시카페난텐 A의 농도별 사용량(가로축, μM) 또는 코발트 프로토포포르피린(Cobalt protophorphyrin, CoPP, 양성대조군) 사용 여부에 따른 헤마틴 산화효소-1(HO-1)의 발현 유도 효과를 브라시카페난텐 A를 처리하지 않은 대조군(-)에서의 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 발현정도를 기준으로 표시한(세로축, 배수(Fold)) 그래프이고, 상기 도 6b는 브라시카페난텐 A를 20 μM 씩 처리한 시간(가로축, hour(h))에 따라 헤마틴 산화효소-1(HO-1)의 발현 유도 효과를 브라시카페난텐 A를 처리하지 않은 대조군(-)에서의 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 발현 정도를 기준으로 표시한(세로축, 배수(Fold)) 그래프이며, +는 물질을 처리한 경우를 의미하며, -는 처리하지 않은 경우를 의미한다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 브라시카페난텐 A의 Nrf2 전사인자의 전사 유도 효과를 확인한 결과를 나타낸 사진으로, 도 7은 핵과 세포질 내의 Nrf2 전사인자의 함량과 이를 비교하기 위한 Lamin B 또는 Actin의 함량을 확인하기 위한 형광 정도를 확인한 사진이며, 브라시카페난텐 A를 처리하지 않은 대조군(Control)과 브라시카페난텐 A를 처리한 후 경과한 시간(숫자, Hour(h))에 따른 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 브라시카페난텐 A의 미토겐 활성화 단백질 키나아제(MAPKs, mitogen activated protein kinase)와 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 발현 유도 효과를 확인한 결과를 나타낸 그래프로, 도 8a 내지 8c는 브라시카페난텐 A를 20 μM 씩 처리한 시간(가로축, hour(h))에 따라 p-p38, p-JNK 및 p-ERK의 생성량을 p38, JNK 및 ERK와 비교하여 나타낸 사진이고, 도 8d는 브라시카페난텐 A 및 따라 p-p38, p-JNK 및 p-ERK의 억제제 투여에 따른 헤마틴 산화효소-1(HO-1)의 발현 유도 효과를 브라시카페난텐 A를 처리하지 않은 대조군(-) 및 Actin의 함량과 비교하여 나타낸 것으로, +는 물질을 처리한 경우를 의미하며, -는 처리하지 않은 경우를 의미한다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 브라시카페난텐 A(Brassicaphenanthrene A)의 신경세포주인 HT 22 보호효과, 구체적으로 퇴행성 뇌질환에 대한 치료 또는 개선 효과를 나타낸 그래프로, 도 9a는 글루타메이트를 5 mM 처리한 후, 브라시카페난텐 A의 농도별 사용량(가로축, μM) 또는 트로록스(Trolox, 양성대조군, 50 μM) 및 틴 프로토포포르피린(Tin protophorphyrin, SnPP, 비교군, 50 μM)의 처리여부에 따른 세포 보호 효과를 아무런 시료를 처리하지 않은 음성대조군(-)의 세포수(세포생존율)를 기준으로 HT 22세포주의 생존율(세로축, %)을 나타낸 그래프이고, 도 9b는 글루타메이트를 5 mM 처리한 후, 브라시카페난텐 A의 농도별 사용량(가로축, μM) 또는 트로록스(Trolox, 양성대조군, 50 μM) 및 틴 프로토포포르피린(Tin protophorphyrin, SnPP, 비교군, 50 μM)의 처리여부에 따른 활성산소종 생성 억제 효과를 아무런 시료를 처리하지 않은 음성대조군(-)의 활성산소종 생성 억제 효과를 나타내는 형광광도를 기준으로 활성산소종 생성 또는 억제여부(세로축, %)를 나타낸 그래프이며, +는 물질을 처리한 경우를 의미하며, -는 처리하지 않은 경우를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068]

이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0069]

[제조예1: 브라시카페난텐 A의 분리]

[0070]

브라시카페난텐 A의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0071]

우선, 시장에서 구입한 순무를 유수에서 세척하고, 건조하여 순무 건조물을 제조하고, 상기 순무 건조물 77.7 kg에 95% 에탄올 수용액을 첨가하고, 상온, 구체적으로 15℃ 내지 20℃로 24시간 동안 추출하는 방법으로 수행

하였다. 상기 과정을 3회 반복하여 추출한 후, 추출된 추출액을 Whatman No. 1(Whatman Ltd, 영국) 여과지를 이용하여 여과한 후, 회전진공농축기(EYELA, SN-1100, 일본)를 사용하여 50℃에서 감압농축 하였다. 상기 농축된 추출액은 동결건조기(PVTFA 10AT, ILSIN, 대한민국)을 이용하여 -55℃에서 급속동결과정을 거쳐 분말 상태로 준비하여 순무 95% 에탄올 수용액 추출물 295 g을 수득하였다.

[0072] 상기 순무 95% 에탄올 수용액 추출물을 물에 녹인 후, 분별깔때기에 노르말-헥산(n-헥산), 에틸아세테이트 및 물을 순차적으로 첨가하여, 용액-용액 분배법(partition)으로 각 용매별 분획을 제조하였으며, 상기 제조된 분획액에 대해 여과 및 감압농축과정을 수행하고, 건조를 통해 분획용매를 제거하여 각 용매분획물을 제조하였다. 상기 제조된 용매분획물 중 에틸아세테이트 분획액을 Whatman No. 1(Whatman Ltd, 영국) 여과지를 이용하여 여과한 후, 회전진공농축기(EYELA, SN-1100, 일본)를 사용하여 50℃에서 감압농축 하고, 동결건조기(PVTFA 10AT, ILSIN, 대한민국)을 이용하여 -55℃에서 급속동결과정을 거쳐 분말 상태로 준비하여 순무 에틸아세테이트 분획물 39 g을 수득하였다.

[0073] 상기 에틸아세테이트 분획물에 대해 부피비를 기준으로 혼합비가 상이한 헥산 에틸아세테이트 혼합 용매(15 : 1, 12 : 1, 9 : 1 및 7 : 1, (헥산: 에틸아세테이트) 각 15 L를 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silicagel C.C., 6.5×60 cm, 200 내지 300 mesh, Merck, USA)를 이용하여 분획을 수행하여, 총 4개의 분획을 수득하였다.

[0074] 상기 4개의 분획 중 2번째 분획(13 mg)에 대해 부피비를 기준으로 혼합비가 상이한 클로로포름 메탄올 혼합 용매(14 : 1, 12 : 1, 9 : 1, 7 : 1, 5 : 1, 3 : 1 및 1 : 1 (클로로포름 : 메탄올) 각 12 L를 사용한 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silicagel C.C., 6.5×60 cm, 200 내지 300 mesh, Merck, USA)를 이용하여 분획을 수행하여 총 3개의 분획을 수득하였다.

[0075] 상기 3개의 분획 중 2번째 분획(583 mg)에 대해 메탄올 수용액 혼합 용매(2 : 3, 1 : 1, 3 : 2 및 3 : 4 (메탄올 : 물)) 각 0.6 L를 사용하여 역상의 중압 액체 크로마토그래피(MPLC, ODS-S-50 B, 120 Å, 50μm)를 수행하여 총 3개의 분획을 수득하였다. 그 중, 2번째 분획(70 mg)에 대해 메탄올 수용액 혼합 용매(2 : 1 (메탄올 : 물)) 0.6 L를 사용하여 역상의 중압 액체 크로마토그래피(MPLC, ODS-S-50 B, 120 Å, 50μm)를 수행하여 단일물질이 포함된 분획을 수득하였다.

[0076] 상기 단일물질이 포함된 분획의 단일물질(38 mg)을 확인하기 위하여 구조 동정을 수행하였다.

[0077] 보다 구체적으로, 상기 단일물질에 대한 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 및 HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Coherence)를 수행하여 구조 동정을 하였으며, 측정된 결과 도 2a 내지 도 2c에 나타내었다. 상기 도 2a 내지 도 2c에 의한 결과는 하기와 같다.

[0078] Yellow powder (MeOH). pleasant perfume; [α]_D +13.4° (c 0.92, MeOH); positive FAB-MS: m/z 489 [M+H]⁺, positive HRFAB-MS: m/z 489.3002 (Calcd. 489.3006 for C₃₂H₄₁O₄); UV (MeOH) $\lambda_{\max}$ 332, 280 nm; IR (CaF₂, v, cm⁻¹) 2966, 1700, 1645

[0079] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.77 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-6), 7.22 (1H, s, H-8), 6.74 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-4), 6.67 (1H, s, H-9), 6.66 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-1), 6.59 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-2), 6.12 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-5), 5.30 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-2"), 3.80 (3H, s, 10-OCH₃), 3.62 (1H, m, H-6'), 3.30 (2H, d, J = 7.6 Hz, H-1"), 3.24 (3H, s, 6' -OCH₃), 2.74 (4H, s, H-1', H-3'), 2.63 (1H, dd, J = 16.0, 7.2 Hz, H-5' a), 2.44 (1H, dd, J = 16.0, 5.0 Hz, H-5' b), 1.73 (3H, s, H-4"), 1.69 (3H, s, H-5"), 1.36 (2H, dt, J = 6.8, 4.4 Hz, H-7'), 1.30-1.25 (6H, m, H-8', H-9', H-10'), 0.87 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-11').

[0080] ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 211.2 (x2, C-2', C-4'), 163.7 (C-4a), 160.6 (C-8a), 155.2 (C-4b), 148.6 (C-10), 146.0 (C-6), 145.5 (C-10a), 133.8 (x2, C-3", C-3), 129.2 (C-8), 127.7 (C-7), 122.8 (C-2"), 121.5 (C-2), 115.9 (C-9), 112.9 (C-4), 111.8 (C-5), 102.4 (C-1), 78.5 (C-6'), 57.0 (6' -OCH₃), 56.2 (10-OCH₃), 48.2 (C-5'), 46.3 (C-3'), 34.7 (C-7'), 33.0 (C-10'), 30.2 (C-1'), 28.6 (C-1"), 26.0 (C-4"), 25.8 (C-8'), 23.6 (C-9'), 17.8 (C-5"), 14.4 (C-11').

- [0081] 상기 도 2 a 내지 도 2c의 결과를 통해 확인한 결과로 상기 단일물질의 구조식을 도출하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 상기 도 3에서 나타낸 바와 같이, 상기 단일물질의 구조가 브라시카페난텐 A(brassicaphenanthrene A)와 동일하여, 상기 단일물질이 브라시카페난텐 A(brassicaphenanthrene A)인 것으로 확인되었다.
- [0082] **[실험예1. 마우스유래 해마세포(HT 22)에서 세포독성 측정]**
- [0083] 상기 제조예에서 순무로부터 수득한 브라시카페난텐 A의 세포주에 대한 세포독성 측정을 위한 세포 생존율의 확인은 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 하였다(Mosmann T, Journal of immunological methods 65, p55 - p63(1983)). 구체적으로 실험방법은 다음과 같다.
- [0084] 상기 제조예에서 순무로부터 수득한 브라시카페난텐 A의 세포주에 대한 세포독성 측정을 위한 세포 생존율의 확인은 문헌에 개시된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험을 하였다(Mosmann T, Journal of immunological methods 65, p55 - p63(1983)). 구체적으로 실험방법은 다음과 같다.
- [0085] 우선, 상기 제조예에서 얻은 브라시카페난텐 A의 세포에 대한 세포독성을 측정하기 위해 마우스 유래 해마세포(HT 22)(2×10^5 cells/well)를 10% heat-inactivated FBS 및 penicillin G(100 IU/ml, 15240062, Gibco co, USA)와 streptomycin(100 μ g/ml, 15240062, Gibco co, USA)을 함유한 DMEM 배지에 분주하고, 5% CO₂ 배양기(Sanyo, MC0175)를 이용하여, 37℃에서 24시간 배양하였다. 이 후, 브라시카페난텐 A를 농도 별로 2.5, 5, 10, 20 및 25 μ M씩 처리하고, 추가로 5% CO₂ 배양기 내에서 24시간 동안 더 배양하였다. 상기 배양 후, 세포 생존율을 MTT 법을 활용하여 측정하였다. 상기 실험을 각각 3회 반복 수행한 후, 상기 측정 결과의 평균값을 아무런 처리를 수행하지 않은 대조군에 대한 상대적 수치로 도 4에 나타내었다.
- [0086] 상기 도 4에 나타낸 바와 같이, 20 μ M 농도의 이하 브라시카페난텐 A 처리 하였을 때는 브라시카페난텐 A 농도와 상관없이 세포 생존율이 아무런 시료를 처리하지 않은 음성 대조군과 유사한 정도를 나타내었으나, 25 μ M 농도 처리에서는 음성대조군에 비하여 세포 생존율이 낮게 나타나 20 μ M 농도까지는 안전한 것으로 확인되었다.
- [0087] 상기 도 4에서 확인된 바에 따라, 이하의 상기 브라시카페난텐 A의 마우스 유래 해마세포(HT 22)와 관련된 실험에서는 상기 브라시카페난텐 A를 25 μ M 미만, 구체적으로 20 μ M 이하의 농도로 처리하여 실험을 수행하였다.
- [0088] **[실험예2. 브라시카페난텐 A(brassicaphenanthrene A)의 뇌신경세포 보호 효과 확인]**
- [0089] 상기 제조예에서 얻어진 브라시카페난텐 A의 마우스 유래 해마세포(HT 22) 보호 효과 및 활성산소종 억제 효과를 확인하기 위하여, 구체적으로 뇌신경세포 보호를 통한 퇴행성 뇌질환 관련 예방 효과를 마우스 유래 해마세포(HT 22)(HDP)를 활용하여 실험을 수행하였다.
- [0090] 상기 신경세포 보호에 의한 퇴행성 뇌질환 예방 효과 즉, 해마세포 보호 효과는 문헌(Jeong GS *et al*, Natural Product Sciences, 13, pp.268-272(2007))에 기재된 방법을 응용하여 MTT 실험법으로 확인하였고, 활성산소종에 대한 억제 효과는 문헌(Royall J and H Ischiropoulos, Archives of biochemistry and biophysics, 302, 348-355(1993))에 기재된 방법을 응용하여 활성산소종(ROS) 생성 억제정도 형광측정법을 이용하여 확인하였다.
- [0091] 구체적으로, 상기 해마세포 보호 효과를 확인하기 위한 실험은 상기 실험예 1의 마우스 유래 해마세포주(HT 22)에 상기 제조예에서 얻어진 브라시카페난텐 A를 2.5, 5, 10 및 20 μ M의 함량으로 각각 처리한 후, 글루타메이트(glutamate)를 처리하여 독성을 유발하고, 12시간 동안 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 양성 대조군으로는 트로록스(trolox)를 50 μ M 사용하였다. 상기 배양 후, MTT 실험법을 통하여 세포 생존율을 확인하였다.
- [0092] 보다 구체적으로, 상기 MTT 실험법을 통하여 세포 생존율을 확인한 실험은 96 웰 플레이트에 2×10^4 세포/웰 농도로 HT 22 세포주를 24시간 배양시키고, 브라시카페난텐 A를 2.5, 5, 10 및 20 μ M의 함량으로 각각 처리한 후, 글루타메이트를 5 mM 함량으로 처리하고 12시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 유지하여 세포독성을 유발시켰다. 이후, 0.5 mg/ml 농도로 MTT(Sigma, M2128) 시약을 넣고, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 배양액의 상등액을 버리고 DMSO(Junsei, 35535-0350) 150 μ l를 첨가한 후, 30분간 흔들어주고, ELISA

reader(Bio-Rad, Microplate reader model 680)를 사용하여 파장 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 상기 동일한 실험을 각각 3회 반복한 후, 상기 각각의 실험결과를 상기 글루타메이트 및 브라시카페난텐 A를 모두 처리하지 않은 음성대조군의 세포수(세포생존율 또는 세포보호율)를 기준으로 계산한 후, 상기 3회 반복 실험결과와의 평균치를 도 5a로 표시하였다.

[0093] 상기 도 5a에 나타난 바와 같이, 브라시카페난텐 A의 처리 함량이 증가됨에 따라, 인간유래 마우스 유래 해마세포(HT 22)주(HDP)의 생존율이 증가된 것이 확인되었고, 특히, 20 μ M 처리한 실시예에서는 세포 생존율이 양성대조군인 Trolox를 처리한 경우의 세포생존율과 거의 유사한 정도로 증가된 것이 확인되었다.

[0094] 또한, 상기 형광측정법으로 상기 활성산소종(ROS) 생성 억제정도를 확인하기 위한 실험은 구체적으로 상기 HT 22 세포주를 PBS로 세척한 후, 10 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFDA, 35845, Fluka)를 포함하는 Hank's balanced salt 용액과 30분 동안 암실에서 반응시켰다. 상기 반응시킨 후, 세포의 형광광도(SpectramaxGemini XS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 측정하였다(excitation wavelength : 490nm; emission wavelength : 525nm). 상기 동일한 실험을 각각 3회 반복한 후, 상기 각각의 실험결과를 상기 글루타메이트 및 브라시카페난텐 A를 모두 처리하지 않은 음성대조군의 세포수(세포생존율 또는 세포보호율)를 기준으로 계산한 후, 상기 3회 반복 실험결과와의 평균치를 도 5b로 표시하였다.

[0095] 상기 도 5b에 나타난 바와 같이, 브라시카페난텐 A의 처리 함량이 증가됨에 따라, 마우스 유래 해마세포주(HT 22)의 활성산소종 생성 정도가 감소된 것이 확인되었고, 특히, 브라시카페난텐 A를 20 μ M 처리한 실시예에서는 양성대조군인 Trolox를 처리한 경우의 경우에 준하는 활성산소종 생성량이 확인되어, 활성산소종 생성 억제능 또는 활성산소종 제거능이 더 우수한 것으로 확인되었다.

[0096] 상기 결과로부터 상기 브라시카페난텐 A는 해마세포주(HT 22)의 세포 보호 활성 및 활성산소종 생성 억제능이 확인되어, 상기 브라시카페난텐 A는 해마세포 즉, 신경세포 보호 효과에 의한 퇴행성 뇌질환에 대한 치료, 개선 또는 예방 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0097] **[실험예3. 브라시카페난텐 A의 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 발현 유도에 따른 퇴행성 뇌질환 치료 또는 개선 효과 확인]**

[0098] 상기 제조예에서 얻어진 브라시카페난텐 A의 퇴행성 뇌질환 관련 치료 또는 개선 효과와 관련하여, 마우스 유래 해마세포주(HT 22)를 이용하여 웨스턴블롯팅(Western blotting)을 통해 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 발현 유도 여부를 확인하였다.

[0099] 상기 브라시카페난텐 A의 HT 22 세포주에서의 헤마틴 산화효소-1(Heme Oxygenase-1, HO-1)의 발현 유도 정도를 측정하기 위해 문헌(Li B *et al*, European Journal of Pharmacology 614, p58 - p65(2009))에 기재된 방법을 응용하여 웨스턴블롯팅(Western blot analysis)을 수행하였다.

[0100] 구체적으로, 상기 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 발현 정도를 측정하기 위한 웨스턴블롯팅은 상기 실험예1의 HT 22 세포주에 상기 제조예에서 얻어진 브라시카페난텐 A를 2.5, 5, 10 및 20 μ M 농도로 12시간 처리를 하고, 웨스턴블롯팅(Western blot analysis)을 수행하였으며, 헤마틴 산화효소-1를 발현 촉진하는 코발트 프로토포르피린(Cobalt protophorphyrin, CoPP, 20 μ M)을 양성대조군으로 사용하였다(도 6a). 또한, 상기 HT 22 세포주에 브라시카페난텐 A를 20 μ M 농도로 처리하고, 3, 6, 12, 18 및 24시간 유지한 후, 웨스턴블롯팅(Western blot analysis)을 수행하였다(도 6b).

[0101] 구체적으로, 상기 브라시카페난텐의 함량 및 처리시간에 따른 헤마틴 산화효소-1 발현 촉진 효과를 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯 분석법(western blot analysis)을 수행한 실험 방법은 다음과 같다.

[0102] 우선, 60 mm 디쉬에 3×10^6 cells/ml 농도로 HT 22 세포주를 24시간 배양한 후, 헤마틴 산화효소-1 유도제인 코발트 프로토포르피린(Cobalt protophorphyrin, CoPP) 20 μ M 또는 브라시카페난텐 A를 농도별로 처리하고, 12 시간 동안 배양하거나 상기 브라시카페난텐 A 20 μ M 을 주입한 후, 각 시간별로 배양하였다. 상기 배양 후, RIPA 완충액(RIPA buffer, 89900, Thermo)를 첨가하고, 4℃ 및 14,000 X g의 조건에서 25분 동안 원심분리한 후, 상등액을 분리하였다. 상기 분리된 상등액에서 단백질 정량은 BSA 단백질 실험 키트(Pierce Biotechnology)를 이용하여 수행하였다.

[0103] 구체적으로, 상기 상등액을 12.5% SDS-폴리아크릴아마이드겔(polyacrylamide gel)를 이용하여 2시간 동안 전기

영동한 후, 나이트로셀룰로스 멤브레인(Nitrocellulose membrane, NC membrane)를 이용하여 상기 폴리아크릴아마이드겔로부터 나이트로셀룰로스 멤브레인으로 전사하였다. 상기 전사된 나이트로셀룰로스 멤브레인을 5% 무지방유가 포함된 신선한 블로킹 버퍼(blocking buffer, 0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)에서 1시간 동안 반응을 정지시켰다. 상기 반응 정지 후, 상기 멤브레인을 PBST(PBS, 0.1% Tween 20)로 10분에 1회씩 3회 세척한 후에, 헤마틴 산화효소-1의 항체(HO-1 Ab, 374087, Calbiochem)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응을 수행하였다. 상기 반응 후, 상기 PBST로 10분에 1회씩 3회 세척하고, 2차 항체(Anti-mouse IgG, NA934, Amersham Pharmacia Biotech)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응을 수행하였다.

[0104] 상기 반응 후, PBST로 10분에 1회씩 3회 세척한 다음, ECL(Amersham Pharmacia Biotech) 용액을 1:1로 잘 섞어서 나이트로셀룰로스 멤브레인 위에 부어서 발광시키고, 암실에서 X선 필름에 감광한 후 현상하였다. 동일한 방법으로 Actin에 대한 항체(SC1616, Santacruz biotechnology, USA)를 이용하여 Actin의 함량을 측정하였다.

[0105] 상기 감광한 후 현상한 사진 및 이로부터 측정된 단백질 함량을 도 6a 및 도 6b에 나타내었다.

[0106] 상기 도 6a에 나타난 바와 같이, 브라시카페난텐 A를 처리한 경우 다른 단백질(Actin)의 발현량에는 영향을 미치지 아니하였으나, 헤마틴 산화효소-1의 발현량은 현저하게 상승하였고, 상기 발현량의 증가는 브라시카페난텐 A의 투여량에 비례하였으며, 상기 브라시카페난텐 A를 20 μ M 함량으로 처리한 경우에는 양성대조군인 코발트 프로토포르피린(CoPP)를 20 μ M 투여한 경우와 거의 유사한 정도의 헤마틴 산화효소-1의 발현량이 확인되었다.

[0107] 또한, 상기 도 6b에 나타난 바와 같이, 브라시카페난텐 A의 처리시간은 다른 단백질(Actin)의 발현량에는 영향을 미치지 아니하였으나, 상기 헤마틴 산화효소-1의 발현량은 처리 시간이 증가함에 따라 전반적으로 증가하는 것이 확인되었으며, 18시간 처리한 경우에 24시간 처리한 경우와 거의 유사한 정도의 증가량이 확인되었다.

[0108] **[실험예4. 브라시카페난텐 A의 Nrf2 전사인자의 세포 핵 내 전사 유도에 따른 퇴행성 뇌질환 치료 또는 개선 효과 확인]**

[0109] 상기 제조예에서 얻어진 브라시카페난텐 A의 퇴행성 뇌질환 관련 치료 또는 개선 효과와 관련하여, 마우스 유래 해마 세포주(HT 22)를 이용하여 웨스턴블롯팅(Western blotting)을 통해 nuclear factor-E2-related factor 2(Nrf2)의 세포 핵 내 전사 유도 여부를 확인하였다.

[0110] 상기 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 단백질의 발현에 대한 메커니즘 중 전사인자인 nuclear factor-E2-related factor 2(Nrf2)의 세포 핵 내 전사가 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 단백질의 발현과 가장 직접적인 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 상기 Nrf2는 전사인자로서 헤마틴 산화효소-1과 같은 항산화 단백질의 유전자에 존재하는 ARE(Antioxidant Response Element)에 결합하여 이들 유전자의 발현을 조절하고 단백질 발현을 항진시킴으로써 산화스트레스에 대한 생체방어기구에 중심적 역할을 담당하고 있다. 따라서, 상기 해마 세포주에서의 Nrf2의 전사 유도 여부는 신경세포의 보호와 밀접한 관련이 있는 것으로 받아들여진다.

[0111] 상기 브라시카페난텐 A의 HT 22 세포주에서의 Nrf2 전사인자의 세포 핵 내 전사 유도 여부를 측정하기 위해 문헌(Li B *et al*, European Journal of Pharmacology 614, p58 - p65(2009))에 기재된 방법을 응용하여 웨스턴블롯팅(Western blot analysis)을 수행하였다.

[0112] 구체적으로, 상기 Nrf2 전사인자의 전사 유도 여부를 측정하기 위한 웨스턴블롯팅은 상기 실험예1의 HT 22 세포주에 상기 제조예에서 얻어진 브라시카페난텐 A를 20 μ M 농도로 처리한 후, 시간이 경과함에 따른 Nrf2 전사인자 함량을 측정하기 위해 웨스턴블롯팅(Western blot analysis)을 수행하였다.

[0113] 구체적으로, 상기 브라시카페난텐의 처리시간에 따른 Nrf2 전사인자의 세포 핵 내 함량을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯 분석법(western blot analysis)을 수행한 실험 방법은 다음과 같다.

[0114] 우선, 60 mm 디쉬에 3×10^6 cells/ml 농도로 HT 22 세포주를 24시간 배양한 후, 상기 브라시카페난텐 A 20 μ M 을 주입한 후, 30분, 1시간 및 1시간 30분 동안 각각 배양하였다.

[0115] 상기 각각의 시간으로 배양한 HT 22 세포주에 protease inhibitor cocktail I과 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)를 첨가한 PER-Mammalian Protein Extraction buffer를 첨가하여 균질화하고 4℃에서 15,000×g 의 조건으로 10분 동안 원심분리하였다. 상기 원심분리 후, 상등액을 분리한 후, 세포질 분획으로 사용하기 위하여 -80℃ 에서 저장하였다. 상기 상등액을 분리한 후, 나머지 침사물은 PBS로 세척한후, RIPA 완충액(RIPA buffer, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 50 mM

glycerophosphate, 20mM NaF, 20mM ethylene glycol tetraacetic acid(EGTA), 1 mM dithiothreitol(DTT), 1 mM Na₃VO₄, protease inhibitors)를 첨가하고 4℃에서 15분간 혼합한 후, 4℃ 및 16,000×g의 조건에서 15분간 원심분리한 후, 세포 내 분획으로 이용하기 위하여 상등액을 분리하였다.

[0116] 상기 세포 내 분획 및 세포질 분획을 각각 12.5% SDS-폴리아크릴아마이드겔(polyacrylamide gel)를 이용하여 2 시간 동안 전기영동한 후, 나이트로셀룰로스 멤브레인(Nitrocellulose membrane, NC membrane)을 이용하여 상기 폴리아크릴아마이드겔로부터 나이트로셀룰로스 멤브레인으로 전사하였다. 상기 전사된 나이트로셀룰로스 멤브레인을 5% 무지방유가 포함된 신선한 블로킹 버퍼(blocking buffer, 0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)에서 1시간 동안 반응을 정지시켰다. 상기 반응 정지 후, 상기 멤브레인을 PBST(PBS, 0.1% Tween 20)로 10분에 1회씩 3회 세척한 후에, Nrf2 전사인자를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응을 수행하였다. 상기 반응 후, 상기 PBST로 10분에 1회씩 3회 세척하고, 2차 항체를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응을 수행하였다.

[0117] 상기 반응 후, PBST로 10분에 1회씩 3회 세척한 다음, ECL(Amersham Pharmacia Biotech) 용액을 1:1로 잘 섞어서 나이트로셀룰로스 멤브레인 위에 부어서 발광시키고, 암실에서 X선 필름에 감광한 후 현상하였다. 동일한 방법으로 Actin 또는 Lamin B에 대한 항체(SC1616, Santacruz biotechnology, USA)를 이용하여 Actin 또는 Lamin B의 함량을 측정하였다.

[0118] 상기 감광한 후 현상한 사진 및 이로부터 측정된 단백질 함량을 도 7에 나타내었다.

[0119] 상기 도 7에 나타난 바와 같이, 브라시카페난텐 A를 처리한 경우 다른 단백질(Lamin B, Actin)의 함량에는 영향을 미치지 아니하였으나, 헤마틴 산화효소-1의 발현을 유도하는 전사인자인 Nrf2 전사인자의 핵 내 함량은 증가하고, 세포질 내 함량은 오히려 감소하여, 평상시에 세포질 내에 유지되는 Nrf2 전사인자의 핵 내 이동에 의해 세포 핵 내 함량이 증가되는 것이 확인되었으며, 이로 인하여 헤마틴 산화효소-1를 포함한 항산화 작용과 관련된 효소의 발현이 유도될 수 있을 것으로 예상되었다. 따라서, 브라시카페난텐 A는 신경세포 즉, 해마세포에서 전사인자인 Nrf2 전사인자의 핵 내 이동으로 인해 헤마틴 산화효소-1의 발현을 유도하여 활성산소종 등으로부터 보호할 수 있는 것으로 확인되어, 상기 브라시카페난텐 A는 신경세포 보호에 의한 퇴행성 뇌질환의 치료, 예방 또는 개선 효과가 있을 것으로 평가되었다.

[0120] [실험예5. 브라시카페난텐 A의 퇴행성 뇌질환 치료 또는 개선 효과 확인]

[0121] 상기 제조예에서 얻어진 브라시카페난텐 A의 퇴행성 뇌질환 관련 치료 또는 개선 효과를 우선 글루타메이트를 5 mM 함량으로 처리하여 독성을 유발한 후, 브라시카페난텐 A를 2.5, 5, 10 및 20 μM의 함량으로 각각 처리하고, 이후 12시간 동안 5% CO₂ 배양기에서 유지하였다. 이후, 상기 실험예2와 같이, MTT법을 이용하여 신경세포주인 HT 22 세포주의 세포량을 측정하였고, 실험예2와 같이 형광측정법을 이용하여 활성산소종(ROS) 생성 정도를 측정하였다.

[0122] 상기 MTT 실험법을 통하여 세포 생존율을 확인한 후, 상기 글루타메이트 및 브라시카페난텐 A를 모두 처리하지 않은 음성대조군의 세포수(세포생존율 또는 세포보호율)를 기준으로 계산한 후, 상기 3회 반복 실험결과의 평균치를 도 9a로 표시하였다. 또한, 상기 형광측정법을 통하여 활성산소종 생성 억제능 또는 활성산소종 제거능을 확인한 후, 상기 측정된 형광정도를 글루타메이트 및 브라시카페난텐 A를 모두 처리하지 않은 음성대조군의 형광정도를 기준으로 계산한 후, 상기 3회 반복 실험결과의 평균치를 도 9b로 표시하였다.

[0123] 상기 도 9a에 나타난 바와 같이, 브라시카페난텐 A의 처리 함량이 증가됨에 따라, 신경세포주 즉, 해마세포주(HT 22)의 생존율이 증가된 것이 확인되었고, 특히, 20 μM 처리한 실시예에서는 양성대조군인 Trolox를 처리한 경우 세포 생존율이 양성대조군과 거의 유사한 정도로 증가된 것이 확인되었다. 또한, 틴 프로토포르피린(Tin protophorphyrin, porphyrin products, SnPP)을 처리한 경우에는 오히려 세포 생존율이 감소되었으며, 이로부터 헤마틴 산화효소-1(Heme Oxygenase-1, HO-1)의 억제제인 틴 프로토포르피린(Tin protophorphyrin, porphyrin products, SnPP)의 투여에 의한 감소효과에 의해, 브라시카페난텐 A의 신경세포주 보호효과 즉, 퇴행성 뇌질환의 치료효과는 헤마틴 산화효소-1(Heme Oxygenase-1, HO-1)의 발현 또는 활성화와 밀접하게 관련이 있는 것으로 예상되었다.

[0124] 상기 도 9b에 나타난 바와 같이, 브라시카페난텐 A의 처리 함량이 증가됨에 따라, 신경세포주 즉, 해마세포주(HT 22) 내의 활성산소종 제거 효과 또는 생성 억제 효과가 증가된 것이 확인되었다. 또한, 틴 프로토포르피린

(Tin protoporphyrin, porphyrin products, SnPP)을 처리한 경우에는 오히려 활성산소종 함량이 증가되었으며, 이로부터 헤마틴 산화효소-1의 억제제인 틴 프로토포포르피린의 투여에 의한 활성산소종 생성 억제 감소 효과에 의해, 브라시카페난텐 A의 신경세포주 보호효과 즉, 퇴행성 뇌질환의 치료효과는 헤마틴 산화효소-1(Heme Oxygenase-1, HO-1)의 발현 또는 활성화와 밀접하게 관련이 있는 것으로 예상되었다.

[실험예6. 브라시카페난텐 A의 미토겐 활성화 단백질 키나아제 발현 유도에 따른 퇴행성 뇌질환 치료 또는 개선 효과 확인]

상기 제조예에서 얻어진 브라시카페난텐 A의 퇴행성 뇌질환 관련 치료 또는 개선 효과와 관련하여, 해마세포주 (HT 22)를 이용하여 웨스턴블롯팅(Western blotting)을 통해 미토겐 활성화 단백질 키나아제(MAPKs, mitogen activated protein kinase)의 발현에 대한 효과를 측정하기 위하여 구체적으로 p-ERK, p-JNK 및 p-p38의 함량 여부 및 헤마틴 산화효소-1(HO-1) 발현 유도 여부를 확인하였다.

상기 브라시카페난텐 A의 HT 22 세포주에서의 미토겐 활성화 단백질 키나아제와 헤마틴 산화효소-1의 발현 유도 정도는 상기 실험예 3과 같이 문헌(Li B *et al*, European Journal of Pharmacology 614, p58 - p65(2009))에 기재된 방법을 응용하여 웨스턴블롯팅(Western blot analysis)을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실험예1의 HT 22 세포주에 상기 제조예에서 얻어진 브라시카페난텐 A를 20 μ M 농도로 처리하고, 15분, 30분, 45분 및 60분 동안 처리를 하고, 웨스턴블롯팅(Western blot analysis)을 수행하였으며, 각각의 단백질에 대한 측정 결과를 확인할 수 있는 사진들 도 8a 내지 도 8d에 나타내었다.

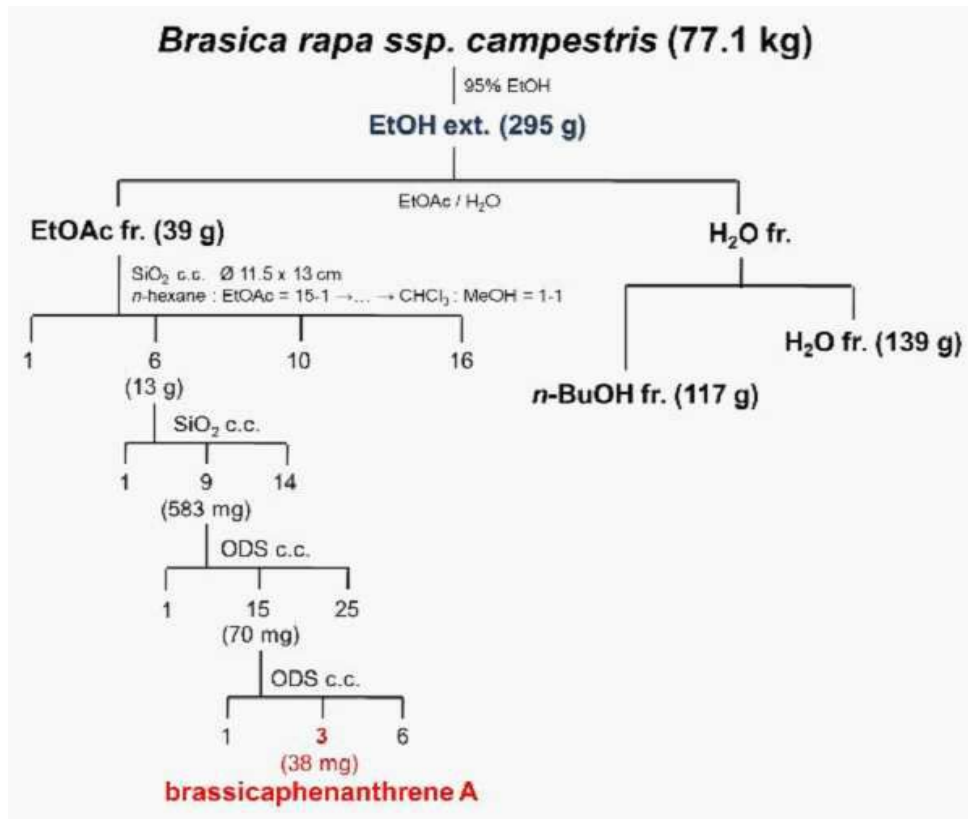
상기 도 8a 내지 8c에 나타난 바와 같이, 브라시카페난텐 A를 처리한 경우, p-ERK 및 p-38의 함량에는 변화가 없었으나, p-JNK의 경우, 함량이 증가하는 것이 확인되어, 브라시카페난텐 A는 p-JNK의 증가 즉, JNK의 인산화(Phosphorylation)과 밀접한 관련이 있는 것으로 확인되었으며, 도 8d에서와 같이 p-ERK의 억제제인 SB203580 및 p-38의 억제제인 PD98059를 첨가한 경우와 달리 p-JNK의 억제제인 SP600125를 처리한 경우에 헤마틴 산화효소-1의 발현이 억제되는 것이 확인되어, 상기 브라시카페난텐 A는 p-JNK와 관련된 신호전달경로(signal transduction pathway)를 통한 헤마틴 산화효소-1의 발현 유도를 통해 신경세포를 보호하여, 퇴행성 뇌질환의 치료, 개선 또는 예방이 가능한 것으로 평가되었다.

따라서, 상기 결과로부터 브라시카페난텐 A의 처리량 또는 처리시간이 증가됨에 따라 마우스 유래 해마세포주 (HT 22)의 세포보호효과, 구체적으로 글루타메이트(glutamate) 처리에 따른 해마세포주(HT 22)의 사멸 방지 및 활성산소종 생성 억제 효과가 개선될 뿐만 아니라, 상기 브라시카페난텐 A의 처리량 또는 처리시간이 증가됨에 따라 신경세포주인 HT 22 내의 JNK의 인산화를 통하여 p-JNK 신호전달경로를 통해 Nrf2 전사인자에 의한 헤마틴 산화효소-1의 발현량 증가를 유도하여, 해마세포 즉, 신경세포의 사멸을 억제하고, 이의 원인이 되는 활성산소종의 생성을 억제할 수 있을 것으로 확인되었으므로, 상기 브라시카페난텐 A는 퇴행성 뇌질환의 치료, 개선 또는 예방에 매우 효과적일 것으로 검토되었다.

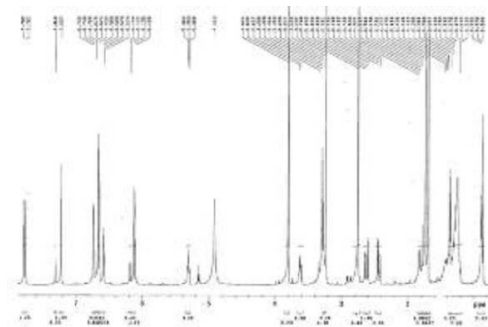
이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

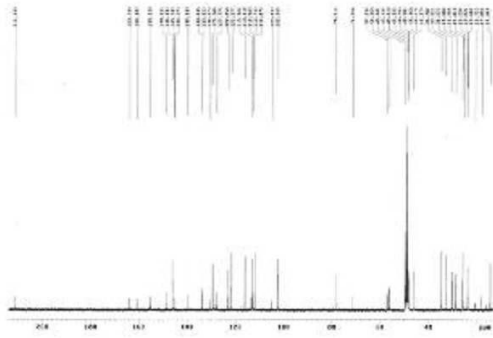
도면1



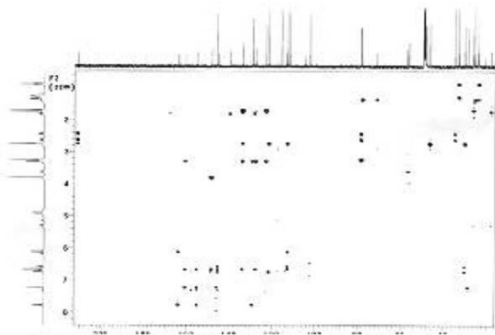
도면2a



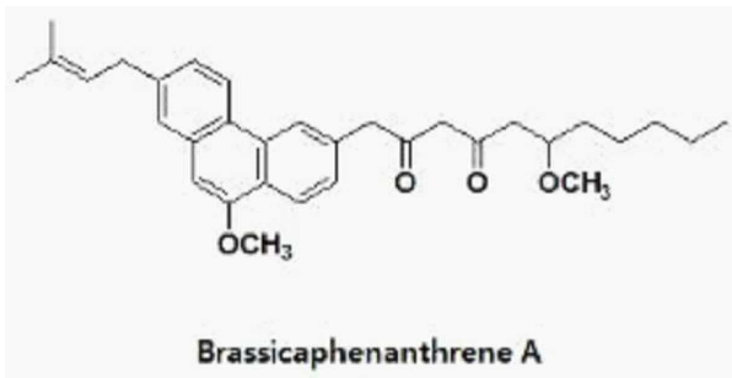
도면2b



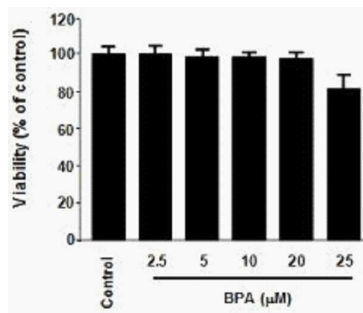
도면2c



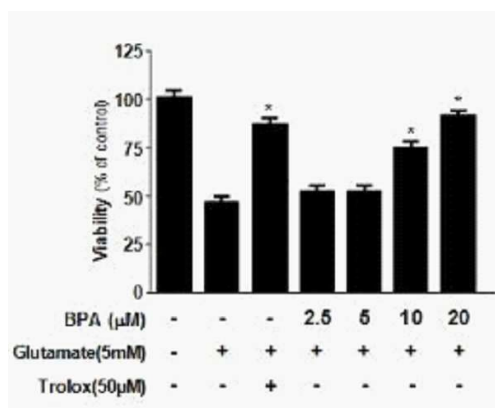
도면3



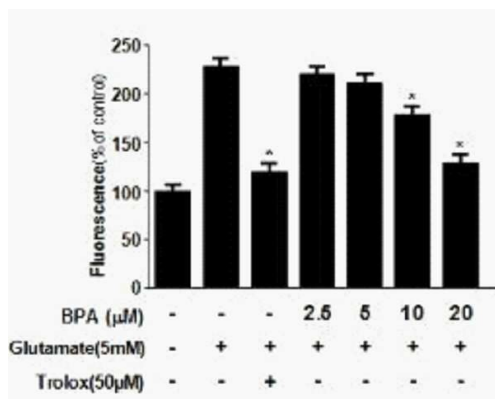
도면4



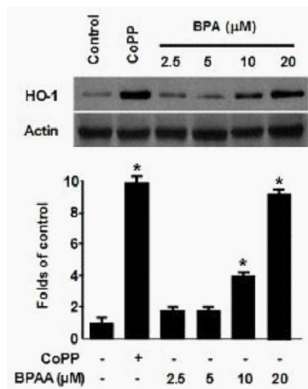
도면5a



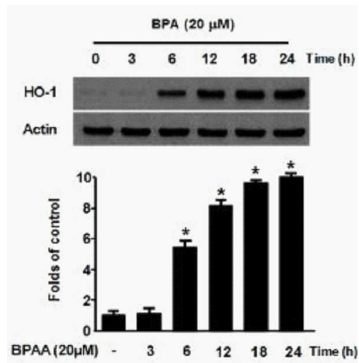
도면5b



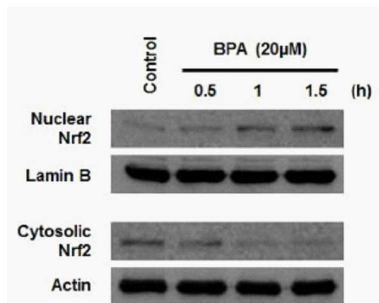
도면6a



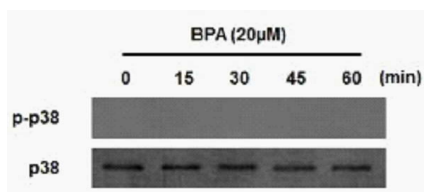
도면6b



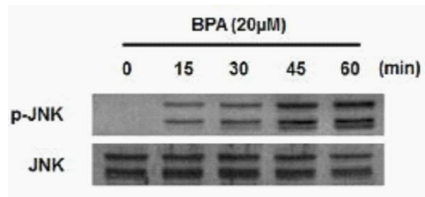
도면7



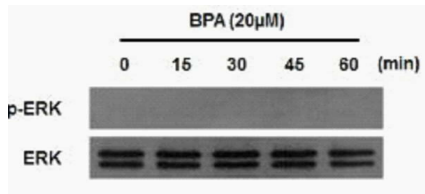
도면8a



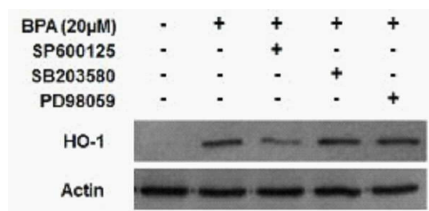
도면8b



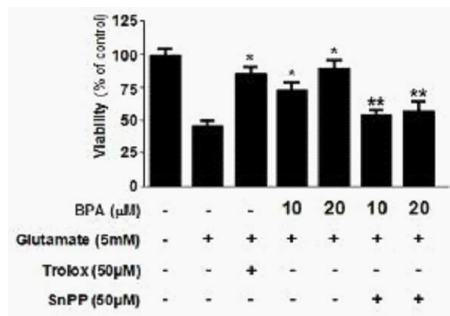
도면8c



도면8d



도면9a



도면9b

