



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0106255
(43) 공개일자 2007년11월01일

(51) Int. Cl.

A61K 31/352(2006.01) A61P 25/28(2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0038905

(22) 출원일자 2006년04월28일

심사청구일자 2006년04월28일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

김희선

서울 종로구 구기동 삼성운정빌라 B동 101호

김동현

서울시 강남구 압구정동 369-1 현대아파트 20-902

(74) 대리인

신동인

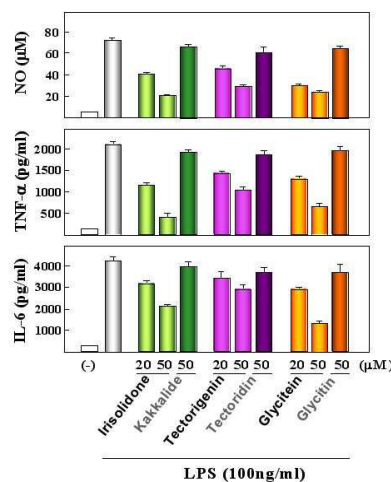
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 이소플라본계 화합물을 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 갈화 (*Pueraria thunbergiana* Flos) 추출물에서 분리된 이소플라본계 화합물인 카카라이드 (kakkalide), 텍토리딘 (tectoridine) 및 글리시틴 (glycitin) 또는 그들의 대사체인 이리솔리돈 (irisolidone), 텍토리게닌 (tectorigenin) 및 글리시테인 (glycitein)을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 이소플라본계 화합물은 탁월한 소교세포의 활성화 억제 효과를 나타내므로, 상기 조성물은 허혈성 뇌질환을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

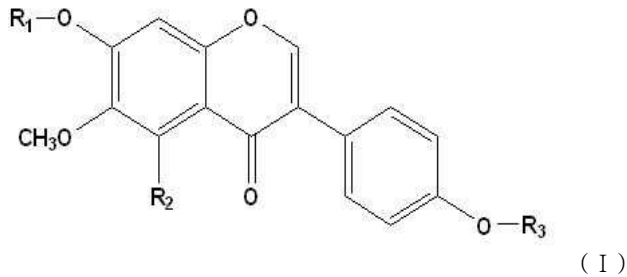
대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

하기 일반식 (I)로 표기되는 화합물을 유효성분으로 포함하고, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학조성물:



상기 식에서,

R₁은 수소원자, Glc-Xyl⁶ 또는 글루코실기로부터 선택된 치환기이고;

R₂는 수소원자 또는 히드록실기이며;

R₃는 수소원자 또는 메틸기이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 일반식 (I) 화합물은 카카라이드 (kakkalide), 텍토리딘 (tectoridin), 글리시틴 (glycitin), 이리소리돈 (irisolidone), 텍토리게닌 (tectorigenin) 또는 글리시테인 (glycitein)으로부터 선택된 화합물인 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 소교세포의 활성화 억제 효과를 나타냄을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머형 치매, 뇌혈관성 치매, 파킨슨병, 근위축성 측삭경화증, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 또는 크로이츠펬트-야콥 (Creutzfeldt-Jakob)병인 약학조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 추출물 또는 화합물은 조성물 총중량에 대하여 0.1 내지 50 중량 %로 포함됨을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 6

소교세포의 활성화 억제 효과를 나타내는 제 1항의 일반식 (I)로 표기되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제 6항에 있어서, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료의 형태인 건강기능식품.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 갈화 (*Pueraria thunbergiana* Flos) 추출물로부터 분리된 이소플라본계 화합물을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.
- <8> 치매 등의 퇴행성 뇌질환과 아울러 허혈성 뇌졸중인 급성 퇴행성 뇌질환은 뇌신경 세포가 점차 파괴되어 뇌기능을 상실하는 질환으로서, 뇌손상의 정도 및 부위에 따라 기억력 장애, 언어장애, 시공간 지각능력 장애, 판단력 장애, 성격 및 감정조절 장애 등 다양한 증상을 나타내며 뇌의 기능에 영구적 손실을 초래한다.
- <9> 퇴행성 뇌질환은 국내의 경우 노인성 치매는 65세 이상 인구의 10 %를 차지하고 있으며 파킨슨병은 약 1 % 정도를 차지하고 있다. 또한, 허혈성 뇌졸중은 암 다음으로 높은 사망원인 중의 하나이며 2001년 통계청 자료에 의하면 인구 10 만명 당 매년 74명이 뇌졸중에 의해서 사망하고 있다. 이들 뇌질환은 주로 50세 이상의 고령층에서 급격히 발생빈도가 증가하는 성인 질환이며, 심각한 사회적 경제적 부담이 되는 질환일 뿐만 아니라, 노인 연령층에서 삶의 질적 저하를 초래하는 주요 질환이다. 더구나 최근의 추세로 보면 평균수명의 연장으로 노령인구의 증가로 말미암아 퇴행성 뇌질환 환자가 증가하고 있으며 이를 해결하기 위해서는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료제의 개발이 시급한 실정이다. 뇌졸중에 의한 뇌손상을 치료하기 위한 약물요법으로는 현재 항혈소판제제 (tPA)를 뇌혈관내의 혈소판이 응집된 것을 분해하여 뇌손상을 경감하기 위하여 임상적으로 시도되고 있으나, 치료효능이 높지 않을 뿐만 아니라 출혈성 뇌졸중에는 사용 시 오히려 뇌손상을 악화시킬 수 있기 때문에 임상적 사용에 제한이 많다. 현재 세계적인 뇌졸중 치료제의 개발 경향을 보면, NMDA 길항제, 혈소판 응고방지제 등이 임상시험 단계에 있으나 효능이 약하거나 부작용 때문에 임상 2 또는 3상에서 중단되는 사례가 많다.
- <10> 퇴행성 뇌질환의 대표적인 질환인 치매의 치료제로는 콜린성 신경계 작용약물인 타크린 (tacrine), 도네페질 (donepezil) 등이 현재 시판 중에 있으며, 단기간에 인지기능 개선효과는 있으나 전반적인 치료효과가 우수하지 못한 단점이 있다. 최근에는 사노메린 (xanomeline)을 포함한 무스카린성 콜린성 신경계에 선택적으로 작용하는 약물이 치매치료제로서 임상시험 중에 있다. 베타아밀로이드 ($A\beta$)의 축적 및 신경독성을 억제하여 치매를 예방 및 치료하기 위하여 감마 세크라타제 저해제, 글라이코젠 합성효소 키나제 ($GSK3\beta$) 저해제, 싸이클린의존성 키나제-5 ($cdk5$) 저해제, 비스테로이드성 소염제 등이 전임상 시험 및 임상시험 단계에 있다. 급성 및 만성 퇴행성 뇌질환은 발병원인 및 기전은 서로 다르나 궁극적으로 신경세포의 소실을 초래하여 뇌기능이 저하된다. 이 점을 이용하여 신경세포의 사멸과정을 직접적으로 차단하는 치료제의 개발이 시도되고 있으며, 전임상 시험단계인
- <11> 물질로는 MAP 키나제(kinase) 억제제, 카스파제 억제제, 칼파인 억제제, 항염증 약물 등을 예로 들 수 있다. 정상세포에서 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)이 생성되는 것은 생물학적 항산화제나 항산화효소에 의해 조절된다. 병태생리학적 조건에서 산화제의 생성이 세포내부의 항산화능을 넘어서게 되면 단백질, 지질과 DNA에 산화적 손상을 주게 된다. 다양한 연구에서 나타나듯이 ROS는 알츠하이머병 및 파킨슨병과 같은 신경퇴행성 질환과 허혈 및 출혈성 뇌졸중에 관여하며, 베타아밀로이드, 허혈 또는 신경성장인자의 회수에 의한 신경 퇴행성 질환의 발생시 중요한 역할을 한다.
- <12> 뇌세포는 크게 신경세포 (neuron)와 교세포 (glia cell)로 나뉘어 지는데 교세포의 일부를 차지하는 소교세포 (microglia)는 뇌에서 면역작용에 관여하는 주요한 세포로서 뇌신경이 손상을 받거나 퇴화되었을 때 활성화되어 영양물질 (trophic factor)을 분비하여 신경의 생존을 돕거나 대식세포 (macrophage)처럼 염증을 유도하는 다양한 물질을 분비하여 신경의 퇴화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 대표적으로 알려진 분비물질로는 산화질소 (nitric oxide; NO), 단백질 분해효소 (protease), 프로스타글란딘류 (prostaglandins), 싸이토카인 (cytokine) 등이 알려져 있다. 소교세포의 활성화 (activation)시 수반되는 소교세포의 형태적 변화는 활성화의 중요한 지표로 알려져 있다.
- <13> 다양한 종류의 퇴행성 신경질환에서 소교세포의 활성화가 관찰되어져 왔다. 뇌졸중의 경우, 소교세포의 활성화가 매우 빠른 시간 내에 일어나며, 특히 허혈성 뇌졸중의 경우 발병 후 수시간 내에 소교세포의 활성화가 관찰되고, 수십시간 후에 정상세포의 활성화가 관찰되며 이는 수개월간 유지되기도 한다. 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)의 경우에도 노용균반점 (senile plaque)의 형성에 소교세포가 중요한 역할을 한다는 것은 매우 잘 알려져 있으며, 이브프로펜 등과 같은 소염제가 노용균반점의 형성을 억제하여 치매 발병을 예방하는 것으로 알려져 있다. 최근 말초 혈액 혹은 활성화된 교세포에서 생성되는 사이토카인류 등이 흥분성 신경전달 물질, 간질, 퇴행성 신경질환에 의한 신경세포 독성을 유발하는 인자임이 밝혀졌다 (Griffin WS., *Am. J.*

Clin. Nutr., 83(2), pp470S-474S, 2006; Rosenberg PB., *Int. Rev. Psychiatry*, 17(6), pp503-5, 2005; Gao et al., *J. Neuroscience*, 23(4), pp1228-1236, 2003; Boje and Arora, *Brain Res.*, 587, pp250-256, 1992). 또한 활성화된 소교세포에 의해 N-메틸-D-아스파라긴산염 (N-methyl-D-aspartate; NMDA) 혹은 포도당 결핍에 의한 신경세포 독성이 증가되는데 이러한 신경세포 사멸 증가는 유도성 산화질소 합성효소 (inducible Nitric Oxide Synthase; iNOS)의 발현증가에 기인한다고 보고되고 있다. 따라서 신경세포의 사멸과 기능의 저하를 억제하기 위하여 교세포, 특히 소교세포의 활성화를 억제하는 것은 뇌졸중, 알츠하이머병 등의 퇴행성 뇌질환 치료제 개발에 매우 중요하다.

<14> 지난 10여 년간 소교세포 활성화를 억제함으로써 신경세포 사멸을 억제할 수 있는 항염증제를 개발하기 위하여 많은 연구가 이루어져 왔으며, 지금까지 보고된 약물중 소교세포 활성화를 억제함으로써 신경세포 보호 효과를 나타내거나 신경세포사멸 억제 가능성이 있는 것으로 알려진 대표적인 약물로는 (1) 비스테로이드성 소염제 (Nonsteroidal antiinflammatory drug; NSAID), (2) 프로펜토피린 (propentophylline), VIP (vasoactive intestinal polypeptide) 및 PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) 등의 cAMP-elevating agents, (3) 에스트로젠 (estrogen) 등의 스테로이드성 호르몬, (4) 아편유사제 (opoids), 엔도모핀 (endomorphin) 및 넬렉손 (naloxone) 등의 길항제, (5) 로바스타틴 (Lovastatin) 등의 메발론산 경로 억제제 (mevalonate pathway inhibitors), (6) 15d-PGJ₂, ciglitazone과 같은 PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) agonist (7) 멜라토닌 (melatonin), 카나비노이드 (cannabinoid) 등의 기타물질이 알려져 있으며, 특히 최근에 PPAR- γ agonist들은 항염증제로서 그 중요성이 부각되고 있는 바, A β fibrils에 의한 소교세포 매개 신경독성 및 사이토카인의 발현을 억제함이 보고되었으며, 또한 알츠하이머병의 치료에 쓰이고 있는 NSAID도 일종의 PPAR- γ agonist로 최근에 보고된 바 있다.

<15> 또한 소교세포의 활성화 기전을 비롯한 많은 연구에도 불구하고 소교세포의 활성화 억제 또는 저하와 관련된 기전은 아직까지 모호한 실정이며, 소교세포의 활성을 억제하는 항염증제의 개발 또한 아직까지도 국내외적으로 미흡한 상태이고, 또한 인체에 부작용이 적으면서 소교세포 (microglia) 활성을 선택적으로 억제하는 약물은 현재까지 보고된 바가 없다.

<16> 갈화 (*Pueraria thunbergiana* Flos)는 쑥 (*Pueraria thunbergiana* BENTH.)의 꽃으로 8월 상순 무렵, 꽃이 만개하기 전에 따서 경엽을 제거하고 햇볕에 말려서 생약으로 쓴다. 맛은 달고 성질은 서늘하다. 주독을 풀어 술을 깨게 하는 효능이 있으며, 상주 (傷酒)에 의한 발열, 악심, 식욕부진 및 지혈 등에 효과가 있다 (정보섭 및 신민교, 향약대사전, 영림사, pp704-705, 1998). 또한, 최근 들어서는 갈화 속의 유효성분으로 위궤양, 십이지장궤양 치료제 [국내 특허등록 제341146호], 골다공증, 관절통, 관절염 치료제 [국내 특허 공개 제2001-67023호], 그리고 구강구취 제거, 잇몸질환 치료, 체내 노폐물 제거, 간기능 강화 [국내 특허 공개 제2001-107032호] 등의 용도로 특허가 출원되어 있다.

<17> 그러나 지금까지 갈화에서 분리한 이소플라본 화합물의 소교세포 활성 억제효과는 보고된 바 없으며, 또한 이에 의한 퇴행성 뇌질환에 대한 개선효과는 보고된 바가 없다. 따라서 본 발명자는 갈화에서 이소플라본 화합물을 분리한 후 소교세포 활성 억제 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

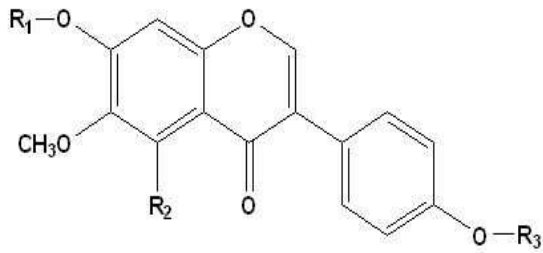
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<18> 본 발명의 목적은 탁월한 소교세포의 활성화 억제 활성을 지닌 이소플라본계 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<19> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 일반식 (I)로 표기되는 화합물을 유효성분으로 포함하고, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 함유하는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.

화학식 1



(I)

상기 식에서,

R_1 은 수소원자, 글루코실기 또는 Glc-Xyl^6 로부터 선택된 치환기이고;

R_2 는 수소원자 또는 히드록실기이며;

R_3 는 수소원자 또는 메틸기이다.

상기 일반식 (I)의 바람직한 화합물들은 하기와 같은 화합물들을 포함한다.

(1) 카카라이드 (kakkalide): $R_1=\text{Glc-Xyl}^6$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{CH}_3$

(2) 텍토리딘 (tectoridin): $R_1=\text{Glc}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$

(3) 글리시틴 (glycitin): $R_1=\text{Glc}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=\text{CH}_3$

(4) 이리소리돈 (irisolidone): $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{CH}_3$

(5) 텍토리게닌 (tectorigenin): $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{OH}$, $R_3=\text{H}$

(6) 글리시테인 (glycitein): $R_1=\text{H}$, $R_2=\text{H}$, $R_3=\text{CH}_3$

본원에서 정의되는 퇴행성 뇌질환은 허혈성 뇌졸중, 알츠하이머형 치매, 뇌혈관성 치매, 파킨슨병, 근위축성 측삭경화증, 헌팅턴병, 피크(Pick)병 또는 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeldt-Jakob)병을 포함한다.

본 발명의 화합물을 함유하는 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방을 위한 약학조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 화합물을 0.1 내지 50 중량 % 포함한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 화합물은 하기와 같이 수득될 수 있다.

본 발명의 갈화 조추출물은 갈화를 건조 후, 갈화 건조 중량의 약 1 내지 20배, 바람직하게는 약 3 내지 10배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 및 부탄올과 같은 저급 알콜 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매로, 바람직하게는 물로 20 내지 100 °C, 바람직하게는 20 내지 60 °C의 추출 온도에서 약 0.5시간 내지 2일, 바람직하게는 1시간 내지 1일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법으로 1회 내지 5회, 바람직하게는 3회 연속 추출하여 수득한 후, 추출하여 수득한 후, 감압 여과하고 여액을 진공회전농축기로 20 내지 100 °C, 바람직하게는 40 내지 70 °C에서 감압 농축하여 갈화 조추출물을 수득할 수 있다.

상기 조추출물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (Silica gel column chromatography)에 적용할 수 있으며, 전개용매로서 클로로포름, 메탄올의 혼합용매, 바람직하게는 클로로포름:메탄올 = 10: 1의 혼합용매를 적용하여 분획물을 수득하여 각각 상기 (1), (2) 및 (3)의 화합물들을 수득할 수 있으며,

또한, 상기 조추출물에 미생물 균주 또는 사람의 분변 현탁액, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스 (Bacillus subtilis K-200211, KCTC1022), 박테로이드 프라질리스 JY-6 (Bacteroides fragilis JY-6 K-199808, KCTC3688), 박테로이드 스테리코리스 (Bacteroides stercoris ATCC43183) 또는 사람의 분변 현탁액을

접종하여 수일간 배양한 후 비극성 용매, 바람직하게는 에틸아세테이트를 분획하여 에틸아세테이트 가용성 분획물을 수득할 수 있으며, 상기 에틸아세테이트 가용성 분획물을 농축하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에 적용할 수 있으며, 전개용매로서 클로로포름, 메탄올의 혼합용매, 바람직하게는 클로로포름:메탄올 = 20: 1의 혼합용매를 적용하여 분획물을 수득하여 각각 상기 (4), (5) 및 (6)의 화합물들을 수득할 수 있다.

- <40> 본 발명은 갈화 조추출물로부터 분리되는 플라보노이드류의 화합물을 분리, 정제하는 방법을 제공한다.
- <41> 지질다당 (LPS)으로 활성화를 유도한 일차배양 마우스의 소교세포 및 BV2 소교세포주에 상기와 같은 공정으로 수득된 본원 발명의 이소플라본계 화합물을 처리하여 소교세포의 활성화 억제 효과를 측정한 결과, 소교세포의 활성화에 의해 생성되는 신경독성물질인 산화질소 (NO), 종양괴사인자-알파 (TNF- α), 인터루킨-6 (IL-6)의 유리를 억제하고, 유도성 산화질소 합성효소 (inducible Nitric Oxide Synthase; iNOS), 종양괴사인자-알파 (TNF- α), 인터루킨-1베타 (IL-1 β)의 전사를 억제하였으며, 이들 염증물질 발현의 중요한 전사조절인자인 NF- κ B 및 AP-1의 활성을 억제하였다. 따라서 본원 발명의 이소플라본계 화합물은 소교세포 활성화로 인한 염증 및 신경독성 반응에 의해 유도되는 퇴행성 뇌질환 예방 및 치료용 조성물에 유용하게 이용할 수 있다.
- <42> 따라서, 본 발명은 상기와 같은 방법으로 수득한 화합물을 유효성분으로 포함하고, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 함유하는 퇴행성 뇌질환에 대한 예방 및 치료용 약학조성물을 제공한다.
- <43> 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- <44> 본 발명의 화합물을 포함하는 약학조성물의 적용량 및 적용방법은 제형 및 사용목적에 따라 다를 수 있다.
- <45> 또한, 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- <46> 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- <47> 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- <48> 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- <49> 본 발명의 화합물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 화합물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <50> 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- <51> 또한 본원 발명은, 소교세포의 활성화 억제 효과를 나타내는 본 발명의 화합물을 유효성분으로 함유하

는 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

<52> 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

<53> 본 발명의 퇴행성 뇌질환 예방 및 개선을 위한 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함한다.

<54> 또한, 퇴행성 뇌질환 개선 및 예방을 위한 목적으로 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.

<55> 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 적당한 방법으로 과립상으로 한 다음 활택제 등을 넣어 압축성형하여 조제하거나 정제 형태의 건강기능식품을 그대로 또는 부형제, 결합제, 붕해제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 것을 직접 압축성형하여 만들거나 또는 미리 만든 과립에 건강기능식품을 그대로 혹은 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 다음 압축성형하여 조제하거나 건강기능식품에 부형제, 결합제 또는 다른 적당한 첨가제를 넣어 고르게 섞은 분말을 용매로 습윤시키고, 습윤된 분말을 저압으로 틀에 넣어서 성형한 후, 적당한 방법으로 건조하여 조제한다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품에 필요에 따라 교미제 등을 넣을 수 있으며, 적당한 제피제로 제피 가능하다.

<56> 상기 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 보통 캡셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 고르게 섞은 것 또는 적당한 방법으로 입상으로 한 것 또는 입상으로 한 것에 적당한 제피제로 제피한 것을 그대로 또는 가볍게 성형하여 충전하여 조제하며, 연질캡셀제는 보통 캡셀에 건강기능식품 또는 건강기능식품에 적당한 부형제 등을 넣은 것을 젤라틴 등 적당한 캡셀기체에 글리세린 또는 소르비톨 등을 넣어 소성을 높인 캡셀기체로 피포하여 일정한 형상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 상기 캡셀기체에 착색료 보존료 등을 첨가할 수 있다.

<57> 환형태의 건강기능식품은 보통 건강기능식품에 부형제, 결합제, 붕해제 등을 고르게 섞은 다음 적당한 방법으로 구상으로 성형하여 조제하며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 전분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

<58> 과립형태의 건강기능식품은 보통 건강기능식품을 그대로 또는 건강기능식품에 부형제, 결합제, 붕해제 등을 넣어 고르게 섞은 다음 적당한 방법으로 입상으로 만들고 될 수 있는 대로 입자를 고르게 한 것이며, 필요에 따라 착향료, 교미제 등을 넣을 수 있다. 과립형태의 건강기능식품은 12호 (1680 μ m), 14호 (1410 μ m) 및 45호 (350 μ m) 체를 써서 다음 입도시험을 할 때에 12호체를 전량 통과하고 14호체에 남는 것은 전체량의 5.0 % 이하이고 또 45호체를 통과하는 것은 전체량의 15.0 %이하이어야 한다.

<59> 본원 발명의 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향료 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).

<60> 이하, 본 발명을 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<61> 단, 하기 실시예, 참고예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예, 참고예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<62> 실시예 1. 갈화 조추출물의 제조

<63> 본 발명에 사용한 갈화는 서울 경동시장 조화약업사에서 구입하여 사용하였다. 건조한 갈화 1 kg에 정제수 5 l를 넣어 수욕중에 침지하여 2시간 추출하고 여과지 (와트만사, 미국)를 사용하여 감압여과한 후 다시 잔사에 물을 5 l 넣어 침지하여 2시간 추출한 후 여과지 (와트만사, 미국)를 사용하여 감압여과한 후 먼저 수득한 여액과 합한 것을 진공회전농축기에 적용하여 총 부피 2 l 까지 감압농축하여 갈화 조추출물 180 g을 수득하였다.

<64> 실시예 2. 이소플라본계 화합물의 분리

<65> 상기 실시예 1의 갈화 조추출물로부터 카카라이드, 텍토리딘, 글리시틴의 분리는 이미 알려진 방법

(Yamaki K et al., *Planta Med.*, 68(2), pp97-100, 2002)에 의하여 실시하였다. 갈화 조추출물 30 g을 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피에 적용하였으며, 이 때 전개용매로서 클로로포름:메탄올 = 10: 1의 혼합용매를 사용하였고, 고정상으로는 키에셀 겔 60 (Kiesel gel 60, 230-400 mesh, Merck, Germany)을 사용하여 분획당 50 ml씩 분리하였으며, 정제한 3개의 화합물인 화합물 1 (0.1 g, 분획번호 25-35), 화합물 2 (0.2 g, 분획번호 40-49), 화합물 3 (1.2 g, 분획번호 67-80)을 각각 분리하였으며, 수득한 각각의 화합물을 NMR 분석기기로 분석한 결과는 하기와 같다 (도 1, 표 1 및 표 2 참조).

(1) 화합물 1 : 카카라이드 (kakkalide)

물질의 성상: 흰색의 분말

mp 252-253 °C ;

IR (KBr, cm^{-1}): 3472, 1635, 1515, 1498, 1433, 1274, 1218, 1100 - 1000

(2) 화합물 2: 텍토리딘 (tectoridin)

물질의 성상: 무색의 침상

mp >300 °C ;

IR (KBr, cm^{-1}): 3472, 1635, 1517, 1498, 1469, 1433, 1100 - 1000.

(3) 화합물 3: 글리시틴 (glycitin)

물질의 성상: 흰색의 분말

mp 210 °C ;

IR (KBr, cm^{-1}): 3472, 1635, 1516, 1498, 1433, 1274, 1218, 1100 - 1000.

표 1

<78>

1H-NMR Spectra Data (DMSO-d ₆)			
탄소	카카라이드	텍토리딘	글리시틴
2	8.37(s)	8.36(s)	8.32(s)
5	-	-	7.48(s)
8	7.32(s)	6.93(s)	7.39(s)
2 ' ,6'	7.41 (d, J=8.6)	7.39 (d, J=7.2)	7.41 (d, J=8.4)
3 ' ,5'	6.82 (d, J=8.6)	6.82 (d, J=7.2)	6.82 (d, J=8.4)
Glc-1	5.17 (d, J=7.4)	5.02 (d, J=7.2)	5.11 (d, J=6.9)
-2	3.30(m)	3.33(m)	3.36(m)
-3	3.30(m)	3.32(m)	3.32(m)
-4	3.17(m)	3.20(m)	3.20(m)
-5	3.46(m)	3.63(m)	3.63(m)
-6a	3.43(m)	3.63(m)	3.63(m)
-6b	3.70(m)	3.93(m)	3.93(m)
Xyl-1	4.19 (d, J=7.2)	4.19 (d, J=7.2)	4.18 (d, J=7.2)
-2	3.00(m)	3.00(m)	3.01(m)
-3	3.08(m)	3.08(m)	3.09(m)
-4	3.28(m)	3.28(m)	3.31(m)
-5a	2.96(m)	2.96(m)	2.98(m)
-5b	3.70(m)	3.70(m)	3.71(m)
6-OCH ₃	3.78(m)	3.76(m)	3.78(m)
4 '-OCH ₃	3.88(m)	-	-

표 2

<79>

13H-NMR Spectra Data (DMSO-d ₆)			
탄소	카카라이드	텍토리딘	글리시틴
2	153.2	154.5	152.9
3	123.3	122.1	123.1
4	180.6	180.7	174.4
5	153.0	153.1	104.8
6	134.7	132.6	147.4
7	152.7	156.4	151.4
8	103.0	93.9	103.6
9	151.7	152.6	151.3
10	118.0	106.7	117.9
1'	122.8	121.1	122.6
2',6'	130.3	130.1	130.0
3',5'	115.2	115.1	115.0
4'	157.6	157.5	157.2
Glc-1	99.8	100.8	99.7
-2	73.2	73.1	73.0
-3	76.9	76.6	76.7
-4	69.8	69.8	69.7
-5	77.4	75.8	75.7
-6	60.8	68.6	68.7
Xyl-1	99.1	104.1	104.2
-2	73.4	73.4	73.4
-3	76.5	76.5	76.5
-4	69.3	69.4	69.4
-5	65.6	65.6	65.6
6-OCH ₃	56.7	60.2	60.8
4'-OCH ₃	55.8	-	-

<80>

실시예 3. 이소플라본계 화합물의 대사체 분리

<81>

상기 실시예 2에서 수득한 이소플라본계 화합물의 대사체 (비당체; aglycone)를 수득하기 위해, 상기 실시예 1에서 수득한 갈화 조추출물 2 ℓ에 된장으로부터 분리하여 경희대 약대 미생물학교 보관한 균주인 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*, K-200211, KCTC1022), 사람의 장내세균총으로부터 분리하여 경희대 약대 미생물학교실 보관 균주인 박테로이드 프라질리스 JY-6 (*Bacteroides fragilis* JY-6, K-199808, KCTC3688) 또는 사람의 장내세균 총으로부터 분리하여 경희대 약대 미생물학교실 보관한 균주인 박테로이드 스테리코리스 (*Bacteroides stericoris*, ATCC43183)를 트립틱 소이 배지 (tryptic soy media, DIFCO, USA)에서 배양하여 수득한 균체 10 g (습중량) 또는 사람의 분변 현탁액 (분변 10 g을 생리식염수 500 ml에 현탁하여 5분간 방치한 후 수득한 상등액)을 접종하여 37 °C에서 5일간 배양한 후, 에틸아세테이트를 2 ℓ씩 가하여 혼합한 후 분획함을 5번 반복하여 수득한 에틸아세테이트 가용성 분획물 10 ℓ를 얻은 후, 이 에틸아세테이트 가용성 분획물을 농축하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에 적용하였으며, 이 때 전개용매로서 클로로포름:메탄올 = 20: 1의 혼합용매를 사용하였고, 고정상으로는 키에셀 겔 60 (Kiesel gel 60, 230-400 mesh, Merck, Germany)을 사용하여 분획당 40 ml씩 분리하였으며, 정제한 3개의 화합물인 4 (0.31 g, 분획번호 11-13), 5 (0.11 g, 분획번호 16-17), 6 (0.09 g, 분획번호 19-20)을 분리하였다 (도 1 참조). 각각의 화합물을 융점, IR spectra 및 NMR 분석 기기로 분석한 결과는 하기와 같다.

<82>

(4) 화합물 4: 이리소리돈 (irisolidone)

<83> 물질의 성상: 옅은 미색의 분말;

<84> mp 188-190 °C ;

<85> IR (KBr, cm^{-1}): 3445, 2911, 1658, 1033.

<86> (5) 화합물 5: 텍토리게닌 (tectorigenin)

<87> 물질의 성상: 옅은 노란색의 분말;

<88> mp 230-233 °C ;

<89> IR (KBr, cm^{-1}): 3447, 2921, 1648, 1023.

<90> (6) 화합물 6: 글리시테인 (glycitein)

<91> 물질의 성상: 옅은 노란색의 분말;

<92> mp 170-180 °C ;

<93> IR (KBr, cm^{-1}): 3472(OH), 1635, 1520, 1419, 1373, 1232, 1207, 1178.

표 3

1H-NMR Spectra Data (DMSO-d ₆)			
탄소	이리소리돈	텍토리게닌	글리시테인
2	7.89(s)	8.29(s)	8.19(s)
5	-	-	7.42(s)
8	6.54(s)	6.49(s)	6.91(s)
2',6'	7.41 (d, $J=8.4$)	7.38 (d, $J=8.3$)	7.37 (d, $J=8.7$)
3',5'	6.82 (d, $J=8.4$)	6.82 (d, $J=8.3$)	6.79 (d, $J=8.7$)
6-OCH ₃	3.88(s)	3.88(s)	3.76(s)
4'-OCH ₃	4.06(s)	-	-

표 4

13H-NMR Spectra Data (DMSO-d ₆)			
탄소	이리소리돈	텍토리게닌	글리시테인
2	152.9(CH)	153.9(CH)	152.1(CH)
3	123.1(C)	123.8(C)	123.0(C)
4	174.4(C)	180.5(C)	174.3(C)
5	104.8(CH)	152.7(C)	104.7(CH)
6	147.4(C)	131.4(C)	146.8(C)
7	151.4(C)	153.2(C)	152.8(C)
8	103.6(CH)	93.8(CH)	102.7(CH)
9	151.3(C)	157.5(C)	151.7(C)
10	117.9(C)	104.8(C)	116.2(C)
1'	122.6(C)	121.0(C)	122.7(C)
2',6'	130.0(CH)	130.1(C)	130.0(CH)
3',5'	115.0(CH)	115.0(CH)	115.0(CH)
4'	157.2(C)	157.4(C)	157.0(C)
6-OCH ₃	60.9(CH ₃)	59.9(CH ₃)	59.7(CH ₃)
4'-OCH ₃	55.4(CH ₃)	-	-

참고예 1. 소교세포 (microglia)의 일차배양 (primary culture)

랫트의 소교세포 (microglia)는 하기와 같은 방법으로 1령 스프라그 돌리 (Spargue Dawley, SD) 랫트 (대한바이오링크, 대한민국)의 대뇌에서 분리하였다. 멸균상태에서 뇌조직을 최소필수배지 (Minimum Essential Medium; MEM, Gibco BRL, USA)가 담긴 배양접시에 담그고, 해마 (hippocampus), 연수 (medulla oblongata), 소뇌 (cerebellum) 및 피막 등은 모두 핀셋으로 제거하고 대뇌만을 수득하였다. 이렇게 수득한 대뇌를 최소필수배지에 넣어 10 ml 1회용 피펫으로 현탁한 후, 2500 rpm에서 3분간 원심분리하여 상층액과 혈액을 제거해준다. 대뇌 조직 침전물에 최소필수배지를 넣고 파스퇴르 피펫을 이용해 현탁한 후, 약 3분간 정치한 후 상층액만 따로 모으기를 세 번 반복하여 수득한 상층액을 10 % 우태아혈청 (Fetal Bovine Serum, FBS, Hyclone, USA)을 함유한 최소필수배지에 현탁하여 37 °C 항온수조에 10분간 정치한 후 상층액만 모으는 과정을 두 번 반복하여 단일 분리된 세포만을 수집하였다. 단일세포는 10 % 우태아혈청을 함유한 최소필수배지가 담긴 배양플라스크 (T75 cm², Falcon, USA)에 대뇌 반구 절반/플라스크의 농도로 대뇌세포를 분주 후, 37°C의 CO₂ 세포배양기에서 배양하였으며, 2주 후 혼합기를 이용하여 37 °C에서 250rpm으로 5분간 배양플라스크를 흔들어 소교세포만을 분리해 이를 실험에 사용하였다. 분리된 일차 소교세포의 배양을 위해서는 10 % 우태아혈청 (Fetal Bovine Serum, FBS, Hyclone, USA), 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin, Gibco BRL, USA)을 포함하는 최소필수배지 (MEM, Gibco BRL, USA)을 사용하였으며 5 % CO₂를 포함하는 배양기에서 37 °C 조건으로 배양하였다.

참고예 2. 소교세포 (microglia)의 배양

생쥐 유래 소교세포주인 BV2 세포는 미국 코넬 의과대학의 Dr. Tong H. Joh로부터 그 스톡 (stock)을 제공받았으며, 질소탱크에 얼려두었다가 실험하기 전에 녹여서 계대배양 후 사용하였다. BV2 세포의 배양을 위하여 10 % 우태아혈청 (Fetal Bovine Serum, Hyclone, USA), 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (penicillin/streptomycin, Gibco BRL, USA)을 포함하는 돌베코 개량 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, USA)을 사용하였으며 5% CO₂를 포함하는 배양기에서 37 °C 조건으로 배양하였다.

참고예 3. 소교세포 (microglia)의 활성화

참고예 1 및 2의 방법으로 준비한 일차배양 소교세포 및 마우스 유래의 BV2 소교세포 (microglia, Weil Medical College of Cornell University, White Plains, NY, USA)를 24-웰 (24-well) 플레이트에 1.0×10^5 세포수/ml의 농도로 분주한 후, 실험군의 웰에 본원 발명의 화합물 (1) 내지 (6) [배당체 (glycoside) 형태는 50 μM, 비당체 (aglycone) 형태는 20 및 50 μM]을 전처리하고, 1시간 후 지질다당 (Lipopolysaccharide; LPS) 1 μg/ml을 처리하여 소교세포를 활성화를 유발한 후 6시간 또는 24시간 배양하였다. 이 배양배지 상등액을 수집하여, 실험을 위해 -70 °C에 보관하였다. 또한, 정상세포 및 활성화된 세포를 수합하여 -70 °C에 보관하였다.

참고예 4. 임시 트랜스펙션 (transient transfection) 및 루시페라제 어세이 (luciferase assay)

상기 참고예 1 및 2에서 준비한 소교세포에 NF-κB, AP-1의 리포터 플라스미드 (reporter plasmid, (kB)3-luc or AP1-luc, Clontech, USA)를 트랜스펙션 용액 (GeneporterTM2 transfection reagent, Gene Therapy Co., USA)을 이용하여 하기와 같은 방법으로 트랜스펙션하였다. 12웰 플레이트 (12-well plate)의 각 웰에 1×10^5 개의 소교세포를 분주하여 하룻밤 배양한 후 1 μg의 리포터 플라스미드와 진포터 (Geneporter)를 섞어 세포에 트랜스펙션하고, 약 24-48시간 배양하고 세포를 용해 완충액 (lysis buffer, 1% Triton-X 100, 10 mM DTT, 25 mM (pH7.8), glycyl glycine, 15 mM MgSO₄, 4 mM EGTA)을 이용하여 분해하여 세포 분해액을 얻고 여기에 완전 완충액 (complete buffer; ATP, DTT 함유)을 넣고 잘 섞은 후 어세이 직전에 기질 (substrate)인 루시페린 (luciferin)을 가한 후 루미노미터 (luminometer, TD-20/20, Turner Designs, Sunnyvale, USA)를 이용하여 루시페라제의 활성을 측정하였다.

실험예 1. 이소플라본 화합물의 소교세포 활성화 억제 효과 측정

1-1. 배지 중 산화질소 및 사이토카인 농도 측정

본 발명의 이소플라본계 화합물의 소교세포 활성화 억제 효과를 측정하기 위해 활성화된 소교세포의 염

증성 또는 항염증성 물질의 배지내 유리 정도를 알아보는 하기와 같은 실험을 실시하였다.

<108> 상기 참고예 1의 방법으로 수득한 마우스의 일차 배양한 소교세포의 배양 상등액 내 산화질소의 농도는 그리스 (Griess) 반응법을 사용하여 측정하였으며 (Woo et al., *Mol. Brain Res.*, 113, pp86-96, 2003), 종양 괴사인자-알파 (TNF- α) 및 인터루킨-6 (IL-6)의 농도는 각 사이토카인의 효소면역측정 키트 (Pharmingen사, San Diego, USA)를 이용하여 샌드위치 효소면역측정법 (sandwich ELISA)을 이용하여 측정하였다 (Kim et al., *Neuropharmacology*, 47, pp243-252, 2004).

<109> 실험결과, 하기 도 2 및 표 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 이소플라본계 화합물이 지질다당으로 활성화된 BV2 소교세포로부터 유리되는 산화질소 및 종양괴사인자-알파 및 인터루킨-6의 생성을 탁월히 억제함을 확인할 수 있었고, 특히 당을 가진 배당체 (glycoside)보다는 비당체 (aglycone) 형태의 이소플라본인 장내세균 대사체들의 항염증 효과가 훨씬 탁월함을 확인하였다. 상기의 결과는 일차배양한 소교세포에서도 동일하게 나타나 (도 3 및 표 6 참조), 본원 발명의 이소플라본계 화합물은 탁월한 소교세포 활성화 억제 효과를 나타내었다.

표 5

<110>

이소플라본	IC ₅₀ (μ M)		
	NO 유리	TNF- α 유리	IL-6 유리
이리소리돈 (irisolidone)	24	20	50
텍토리게닌 (tectorigenin)	43	35	>100
글리시테인 (glycitein)	15	26	35

표 6

<111>

이소플라본	IC ₅₀ (μ M)	
	NO 유리	TNF- α 유리
이리소리돈 (irisolidone)	30	15
텍토리게닌 (tectorigenin)	55	20
글리시테인 (glycitein)	17	18

<112> 1-2. 활성화된 소교세포 내 유도성 산화질소 합성효소 및 사이토카인 발현 측정

<113> 본 발명의 이소플라본계 화합물의 소교세포 활성화 억제 효과를 측정하기 위해 활성화된 소교세포의 염증성 또는 항염증성 물질의 발현을 전사단계에서 조절하는지를 알아보기 위하여 RNA 분해효소 보호 실험 (RNase protection assay)을 이용하여 유도성 산화질소 합성효소 (inducible Nitric Oxide Synthase; iNOS), 종양괴사인자-알파 (TNF- α) 및 인터루킨-1베타 (IL-1 β)의 mRNA 발현 양상을 조사하였다 (Kim et al., *Neuropharmacology*, 47, pp243-252, 2004; Woo et al., *Mol. Brain Res.*, 113, pp86-96, 2003).

<114> 상기 참고예 1-2에서 수집한 정상세포 및 활성화된 소교세포로부터 총 RNA를 트리졸 용액 (Trizol reagent, Sigma, USA)를 이용하여 통상적인 방법으로 분리한 후, 각 샘플당 약 10 μ g 정도의 RNA를 취하고 약 8 종류의 사이토카인 유전자(iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-Ra, TGF- β , IL-8, IL-12)의 α -S³⁵-UTP로 표지된 탐침 (α -S³⁵-UTP labeled probe, Pharmingen, USA)들과 혼성화 (hybridization)를 실시하였다. RNA 분해효소 (RNase)를 처리하여 탐침과 결합하지 않은 RNA를 제거한 후 6 % 요소-아크릴아미드 겔 (urea-acrylamide gel)을 이용하여 보호된 밴드 (protected band)를 전기영동한 후 자기방사법 (autoradiography)을 실시하였다 (도 4 참조).

<115> 실험결과 하기 도 4에 나타난 바와 같이, LPS에 의해 유도된 iNOS, TNF- α , IL-1 β mRNA의 발현이 50

μM 의 이리소리돈, 텍토리게닌, 글리시테인에 의하여 현저하게 감소됨을 확인할 수 있었으며, 이로써 상기 이소플라본 대사체들이 적어도 iNOS, TNF- α , IL-1 β 의 발현을 전사단계에서 조절함을 알 수 있었다.

<116> 1-3. 활성화된 소교세포 내 전사조절인자 활성 측정

<117> 본 발명의 이소플라본계 화합물이 소교세포 활성화를 조절하는데 중요한 역할을 하는 전사인자(transcription factor)인 NF- κ B, AP-1에 대하여 억제 효과를 나타내는지 여부를 측정 위하여 겔 지연 어세이(Electrophoretic Mobility Shift Assay; EMSA) 및 임시 트랜스펙션 어세이(transient transfection assay)를 실시하였다(Park et al., *J. Neuroimmunol.*, 168, pp56-64, 2005).

<118> 1-3-1. 활성화된 소교세포 내 NF- κ B 활성 측정

<119> 지질다당(LPS, 100 ng/ml)만을 6시간동안 단독으로 처리한 BV2 소교세포 및 지질다당 처리 30분 전 이리소리돈을 처리한 BV2 소교세포로부터 핵추출물(nuclear extract)를 분리하였다(Woo et al., *Mol. Brain Res.*, 113, pp86-96, 2003). 세포(1.0×10^5 세포수)에 1 ml의 용해완충액[lysis buffer; 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 % NP-40]을 첨가한 후 얼음에서 4 분간 방치하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 침전물에 50 μl 의 추출완충액[extraction buffer; 20 mM HEPES (pH7.9), 20 % glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1mM PMSF]을 가하고 얼음에서 30분간 방치하였다. 이후 14,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 얻어진 상등액이 핵추출물로서, -70 $^{\circ}\text{C}$ 에 얼려 보관하며 실험에 이용하였다. 핵추출물의 단백질 양은 바이오라드사(Bio-Rad, 국가)의 단백질 정량 키트를 이용하여 측정하였다. 5 μg 의 핵추출물을 γ -P³²-ATP로 표지된 NF- κ B 올리고뉴클레오티드 탐침(oligonucleotide probe: 5' -AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')과 섞어 얼음위에서 30분간 방치하여 DNA-단백질 복합체(DNA-protein complex)를 생성하였다. 생성된 DNA-단백질 복합체를 확인하기 위하여 5 % 아크릴아미드 겔을 이용하여 전기영동한 후 자기방사법(autoradiography)을 실시하여 하기 도 5A에 나타내었다.

<120> 올리고뉴클레오티드와 결합한 NF- κ B 의 서브유닛을 알아보기 위하여 NF- κ B의 주요한 구성 단백질인 p65 및 p50 서브유닛에 대한 항체(Santa Cruz, USA)를 이용하여 항체 슈퍼시프트 어세이(antibody supershift assay)를 실시하였다. 핵추출물을 미리 p65 및 p50 서브유닛에 대한 항체와 섞고 얼음에서 30분간 방치한 후에, 여기에 상기 NF- κ B 올리고뉴클레오티드 탐침을 섞은 후 얼음에서 30분간 더 방치한 후 상기와 동일한 방법으로 DNA-단백질 복합체를 확인하였다.

<121> 또한, NF- κ B-매개 전사(NF- κ B-mediated transcription)에 이리소리돈이 미치는 영향을 측정하기 위해서 3번 반복된 NF- κ B 결합 부위를 갖는 (κ B)³-luc (개괄도는 도 5C 참조)를 BV2 세포에 참고예 4의 방법으로 트랜스펙션한 후, 수합하기 6시간 전에 지질다당 또는 지질다당+이리소리돈을 처리하고 얻어진 세포 용해물을 이용하여 루시페라제 어세이를 실시하였다.

<122> 실험 결과 도 5A에 나타난 바와 같이, 지질다당에 의하여 증가된 NF- κ B 복합체의 형성이 이리소리돈에 의하여 현저히 감소됨을 알 수 있었으며, 도5B에 나타난 바와 같이 p65 및 p50 서브유닛에 대한 항체에 의해서 슈퍼시프트(supershift) 복합체가 생기는 것을 통해 DNA-단백질 복합체에 NF- κ B의 p65, p50 서브유닛이 포함되어 있음을 알 수 있었다. 또한 도 5C에 나타난 바와 같이, 지질다당에 의하여 (κ B)³-luc의 활성이 대조군에 비하여 8배 정도 증가하였고, 이리소리돈에 의하여 그 활성이 농도 의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 상기 실험결과를 종합해 볼 때, 이리소리돈은 NF- κ B의 DNA 결합 활성 및 전사 활성을 감소시켜 항염 효과를 나타내고, 이로 인해 소교세포의 활성을 억제함을 알 수 있었다.

<123> 1-3-2. 활성화된 소교세포 내 AP-1 활성 측정

<124> 지질다당(LPS, 100 ng/ml)만을 6시간동안 단독으로 처리한 BV2 소교세포 및 지질다당 처리 30분 전 이리소리돈을 처리한 BV2 소교세포로부터 핵추출물(nuclear extract)를 분리하였으며(Woo et al., *Mol. Brain Res.*, 113, pp86-96, 2003), 이를 γ -P³²-ATP로 표지된 AP-1 올리고뉴클레오티드 탐침(oligonucleotide probe: 5' -CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3')과 섞어 얼음위에서 30분간 방치하여 DNA-단백질 복합체(DNA-protein complex)를 생성하였다. 생성된 DNA-단백질 복합체를 확인하기 위하여 5 % 아크릴아미드 겔을 이용하여 전기영동한 후 자기방사법(autoradiography)을 실시하여 하기 도 6A에 나타내었다.

<125> 또한, 생성된 DNA-단백질 복합체가 AP-1 올리고뉴클레오티드의 염기서열에 특이적인 지를 알아보기 위하여 동위원소로 표지되지 않은(cold) 과량의 올리고뉴클레오티드(AP-1 or IRE)를 핵추출물과 AP-1 올리고뉴

클레오티드 탐침을 섞기직 전에 넣고 경쟁 어세이 (competition assay)를 실시하여 하기 도 6B에 나타내었다.

<126> 실험 결과 도 6A에 나타난 바와 같이, 지질다당에 의하여 증가된 AP-1 복합체의 형성이 이리소리돈에 의하여 현저히 감소됨을 알 수 있었으며 (도 6A 참조), 도 6B에 나타난 바와 같이 동위원소로 표지되지 않은 (cold) 과량의 AP-1 올리고뉴클레오티드에 의해서 DNA-단백질 복합체가 감소하지만 비특이적인 IRE 올리고뉴클레오티드에 의해 DNA-단백질 복합체의 양이 불변하는 것을 통하여, DNA-단백질 복합체가 AP-1에 특이적임을 알 수 있었다 (도 6B 참조).

<127>

<128> 하기에 상기 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

<129> **제제예 1. 산제의 제조**

<130> 실시예 3의 이리소리돈 20 mg

<131> 유당 100 mg

<132> 탈크 10 mg

<133> 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

<134> **제제예 2. 정제의 제조**

<135> 실시예 3의 이리소리돈 10 mg

<136> 옥수수전분 100 mg

<137> 유당 100 mg

<138> 스테아린산 마그네슘 2 mg

<139> 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

<140> **제제예 3. 캡슐제의 제조**

<141> 실시예 3의 이리소리돈 10 mg

<142> 결정성 셀룰로오스 3 mg

<143> 락토오스 14.8 mg

<144> 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

<145> 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

<146> **제제예 4. 주사제의 제조**

<147> 실시예 3의 이리소리돈 10 mg

<148> 만니톨 180 mg

<149> 주사용 멸균 증류수 2974 mg

<150> Na₂HPO₄·12H₂O 26 mg

<151> 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

<152> **제제예 5. 액제의 제조**

<153> 실시예 3의 이리소리돈 20 mg

<154> 이성화당 10 g

<155> 만니톨 5 g

<156> 정제수 적량

<157> 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

<158> **제제예 6. 건강 식품의 제조**

<159>	실시에 3의 이리소리돈	1000 mg
<160>	비타민 혼합물	적량
<161>	비타민 A 아세테이트	70 μ g
<162>	비타민 E	1.0 mg
<163>	비타민 B1	0.13 mg
<164>	비타민 B2	0.15 mg
<165>	비타민 B6	0.5 mg
<166>	비타민 B12	0.2 μ g
<167>	비타민 C	10 mg
<168>	비오틴	10 μ g
<169>	니코틴산아미드	1.7 mg
<170>	엽산	50 μ g
<171>	판토텐산 칼슘	0.5 mg
<172>	무기질 혼합물	적량
<173>	황산제1철	1.75 mg
<174>	산화아연	0.82 mg
<175>	탄산마그네슘	25.3 mg
<176>	제1인산칼륨	15 mg
<177>	제2인산칼슘	55 mg
<178>	구연산칼륨	90 mg
<179>	탄산칼슘	100 mg
<180>	염화마그네슘	24.8 mg

<181> 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

<182> **제제예 7. 건강 음료의 제조**

<183>	실시에 3의 이리소리돈	1000 mg
<184>	구연산	1000 mg
<185>	올리고당	100 g
<186>	매실농축액	2 g
<187>	타우린	1 g
<188>	정제수를 가하여	전체 900 ml

<189> 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물

제조에 사용한다.

<190>

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

발명의 효과

<191>

상기에서 설명한 바와 같이, 본 발명의 이소플라본계 화합물은 탁월한 소교세포의 활성화 억제 효과를 가지므로, 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1>

도 1은 본원 발명에서 분리한 이소플라본계 화합물의 일반식을 나타낸 도이고,

<2>

도 2는 지질다당으로 활성화시킨 BV2 소교세포에 본원 발명의 이소플라본계 화합물을 농도별로 처리하였을 때, 배양액 내 산화질소 (NO), 종양괴사인자-알파 (TNF- α) 및 인터루킨-6 (IL-6) 유리의 정도 변화를 나타낸 도이며,

<3>

도 3은 지질다당으로 활성화시킨 랫트유래의 일차배양한 소교세포에 본원 발명의 이소플라본계 화합물을 농도별로 처리하였을 때, 배양액 내 산화질소 (NO) 및 종양괴사인자-알파 (TNF- α) 유리의 정도 변화를 나타낸 도이며,

<4>

도 4는 지질다당으로 활성화시킨 BV2 소교세포에 본원 발명의 이소플라본계 화합물 (대사체)을 처리하였을 때, 유도성 산화질소 합성효소 (inducible Nitric Oxide Synthase; iNOS), 종양괴사인자-알파 (TNF- α) 및 인터루킨-1베타 (IL-1 β)의 mRNA 발현 정도 변화를 나타낸 도이며,

<5>

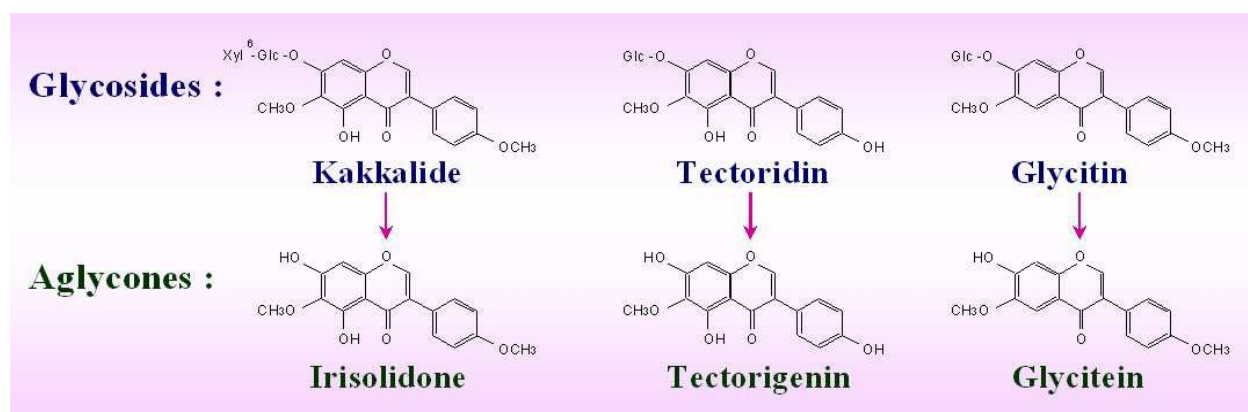
도 5는 지질다당으로 활성화시킨 BV2 소교세포에 본원 발명의 이리소리돈 화합물을 처리하였을 때, NF- κ B DNA 결합 정도의 변화 (A), NF- κ B의 p65 및 p50 서브유닛의 DNA-단백질 복합체 내 함유 여부 (B) 및 (κ B)³-luc의 전사 활성 변화를 나타내는 도이고,

<6>

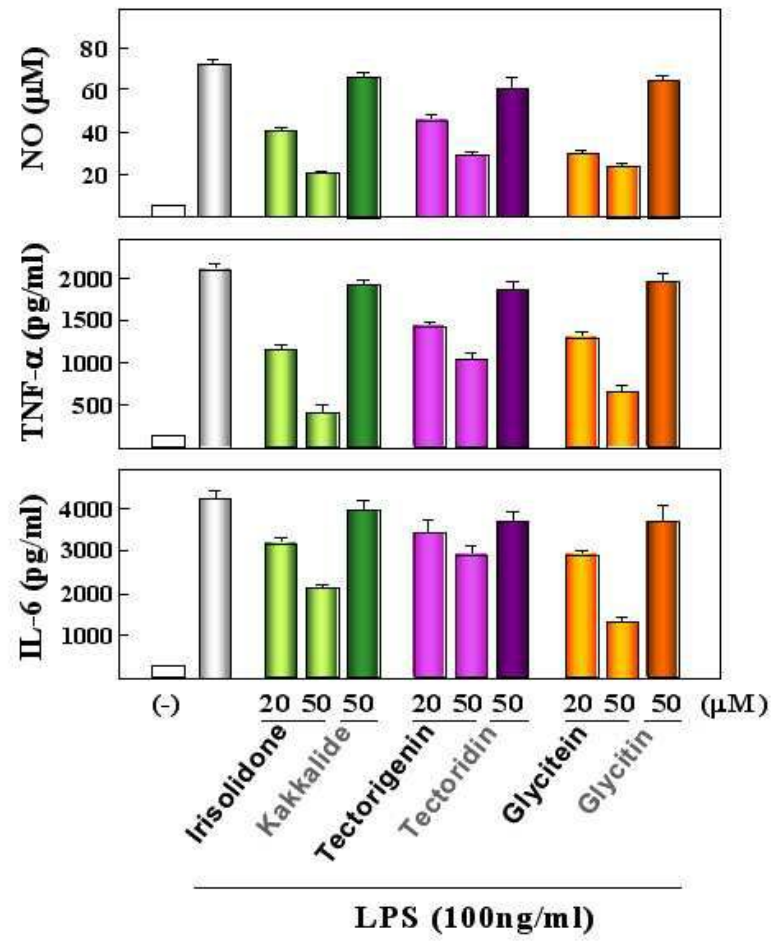
도 6은 지질다당으로 활성화시킨 BV2 소교세포에 본원 발명의 이리소리돈 화합물을 처리하였을 때, AP-1 DNA 결합 정도의 변화 (A) 및 DNA-단백질 복합체에 대한 AP-1의 특이성 여부 (B)를 나타내는 도이다.

도면

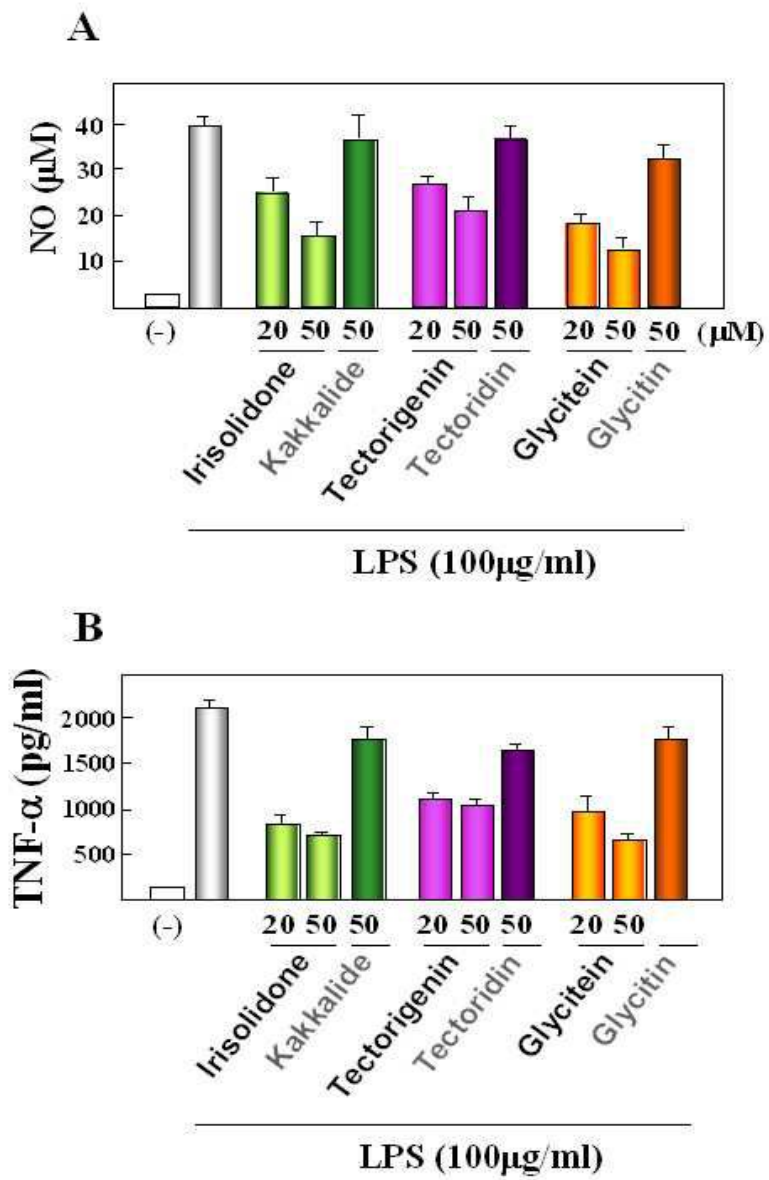
도면1



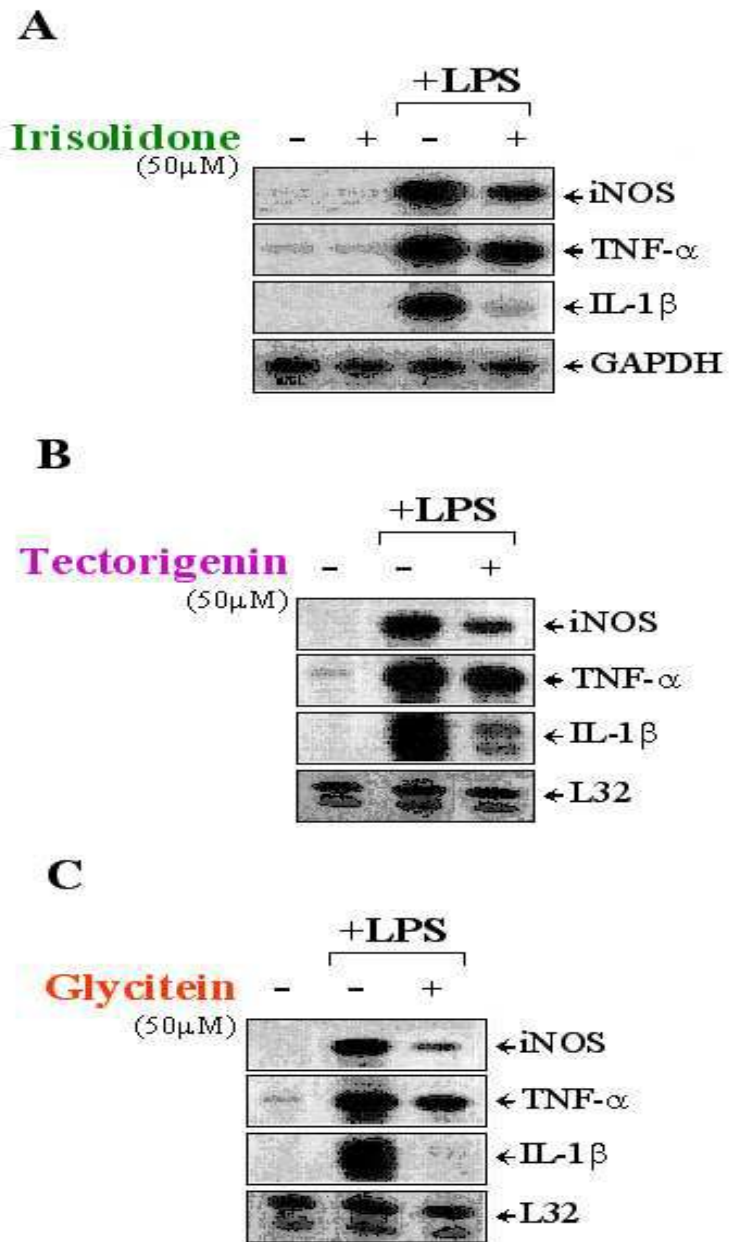
도면2



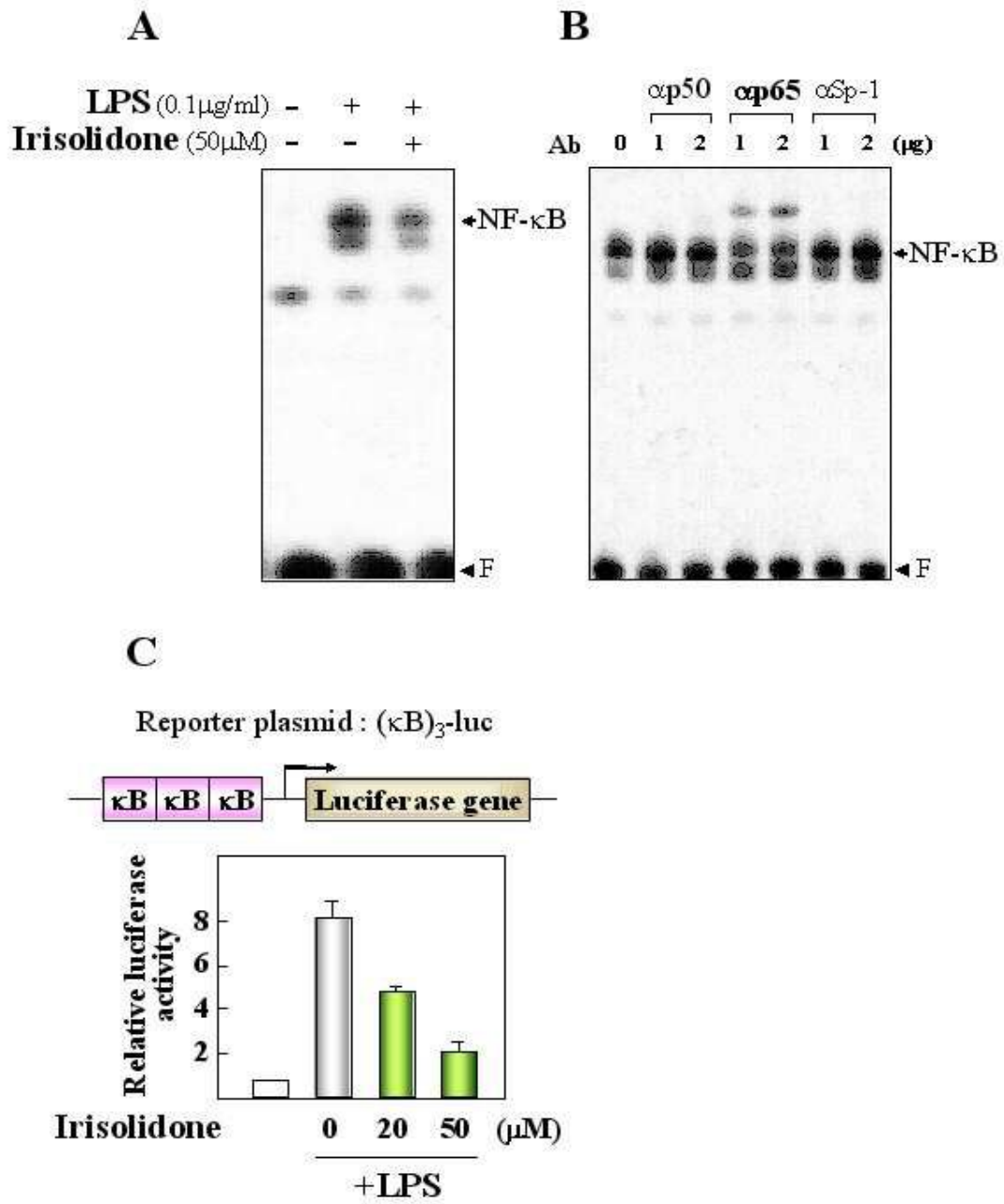
도면3



도면4



도면5



도면6

