



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월08일

(11) 등록번호 10-2224799

(24) 등록일자 2021년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*A61K 31/121* (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)*A61P 25/00* (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)*A61P 25/28* (2006.01)

(52) CPC특허분류

*A61K 31/121* (2013.01)*A23L 33/10* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2019-0134504

(22) 출원일자 2019년10월28일

심사청구일자 2019년10월28일

(56) 선행기술조사문헌

Nutrients, 11, 1749/1-14, 2019.

W02016195355 A1

(73) 특허권자

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

유리나

울산광역시 남구 대공원로 241, 101동 1703호 (신정동, 대공원코오롱파크폴리스)

김추숙

울산광역시 남구 문수로409번길 20, 105동 801호 (신정동, 문수로아이파크1단지)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 9 항

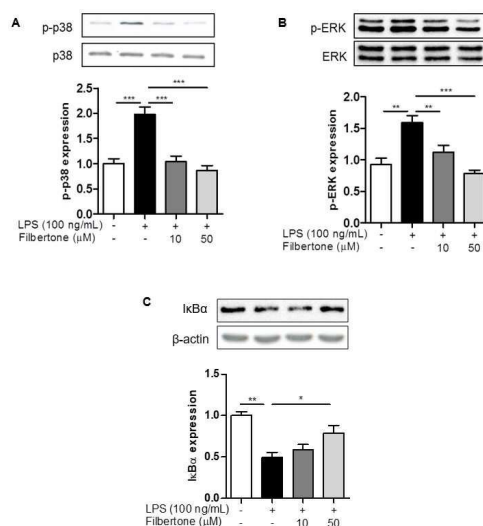
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 필버톤을 유효성분으로 함유하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 조성물

**(57) 요약**

본 발명은 필버톤을 유효성분으로 함유하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

상기 필버톤은 헤이즐넛의 고유 향을 내는 주성분의 천연 화합물로, 소교세포의 활성화를 억제함으로써 염증 반응을 억제하고, NF- $\kappa$ B 및 MAPK 신호 전달 경로 억제를 통해 염증 매개체의 생산을 차단하며, 신경염증에 의해 손상된 신경발생을 회복시킴으로써, 신경염증질환을 안전하고 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

**대표도 - 도5**

(52) CPC특허분류

*A61P 25/00* (2018.01)

*A61P 25/16* (2018.01)

*A61P 25/28* (2018.01)

*A23V 2002/00* (2013.01)

*A23V 2200/322* (2013.01)

*A23V 2250/30* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345293522

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 뇌 시상하부 비만성/대사성 염증 제어를 위한 기능성 식이성분 효능 및 기전 규명  
연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 울산대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

필버톤(filbertone)을 유효성분으로 함유하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,  
상기 신경염증질환은 알츠하이머, 혈관성 치매, 전두측두엽 치매, 알콜성 치매, 파킨슨 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,  
상기 필버톤은,  
소교세포(microglia)의 염증 반응을 억제하는 것을 특징으로 하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,  
상기 필버톤은,  
MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein 1), TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) 및 IL-1 $\beta$ (Interleukin 1 beta)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,  
상기 필버톤은,  
NO(nitric oxide)의 생성 또는 iNOS(inducible nitric oxide synthase)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,  
상기 필버톤은,  
NF- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)의 활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,  
상기 필버톤은,  
MAPK(Mitogen-activated protein kinase) 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

#### 청구항 7

제 1 항에 있어서,  
상기 필버톤은,  
뉴런 손상 마커 NSE(neuron-specific enolase)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

는 치료용 약학 조성물.

## 청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 필버톤은,

신경염증에 의해 손상된 신경발생(neurogenesis)을 회복시키는 것을 특징으로 하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

## 청구항 9

삭제

## 청구항 10

필버톤(filbertone)을 유효성분으로 함유하는 신경염증질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로서,

상기 신경염증질환은 알츠하이머, 혈관성 치매, 전두측두엽 치매, 알콜성 치매, 파킨슨 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 신경염증질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 필버톤을 유효성분으로 함유하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 중추신경계(central nervous system, CNS)에서 만성 염증은 대사 합병증(metabolic complications) 및 신경 퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)을 포함하는 다양한 병리생리학적 과정과 밀접한 관련이 있다. 활성화된 소교세포(microglia)는 비만 및/또는 고지방식이와 같은 만성 염증 환경 하에서 시상하부 및 해마와 같은 부위에서 검출되고, 활성화된 소교세포 유래 염증 매개체는 신경 손상을 야기하여 대사 장애 및 신경 퇴행성 질환에 영향을 준다. 이에 따라서, 소교세포의 활성 억제는 시상하부 및/또는 해마와 같은 중추신경계에서 비정상적 만성 염증 반응을 보호하기 위한 중요한 전략으로 고려된다.

[0003] 필버톤(Filbertone, 5-methylhept-2-en-4-one)은 헤이즐넛의 주요 향미 화합물로, 에논(enones)으로 알려진 화합물 군의 일원이다. 이것은 향 제조에 사용되고, 식품에 사용하기 위해 미국 식약청(FDA)에 의해 일반적으로 안전하다고 인정하는 물질(generally recognized as safe, GRAS)로서 승인되었다. 흥미롭게도, 최근 연구는 필버톤이 cAMP 신호의 활성화를 통해 고지방식이를 섭취한 마우스의 지방을 개선하고, 비만으로 인한 내당능장애(glucose intolerance)를 개선하여 필버톤이 비만 및 대사 질환을 치료할 가능성을 가짐을 보여준다.

[0004] 더 흥미롭게도, 헤이즐넛 커널(kernel)의 보충이 신경염증에 대한 영향을 개선하여 기억력을 향상시키고, 불안감을 감소시키는 것으로 나타났으며, 이는 헤이즐넛 유래 화합물이 알츠하이머 병과 같은 신경 퇴행성 질환의 치료에 유용할 수 있음을 제시한다. 그러나 항염증제 및/또는 신경 보호 효과의 측면에서 헤이즐넛의 활성 성분인 필버톤의 유익한 영향은 잘 알려져 있지 않다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1558476호 (2015.10.12 공고)

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0006] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 필버톤을 유효성분으로 함유하는 신경염증질환 예방 또는 치

료용 조성물을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명에 따른 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 필버톤을 유효성분으로 함유할 수 있다.
- [0008] 본 발명에 따른 신경염증질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 필버톤을 유효성분으로 함유할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0009] 본 발명에 따른 필버톤은 iNOS의 높은 발현을 통해 NO를 생성하고 TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등을 포함하는 염증성 사이토카인을 분비하여 염증 반응을 촉진하는 소교세포의 활성화를 억제함으로써 염증 반응을 억제할 수 있다.
- [0010] 상기 필버톤은 다양한 염증성 사이토카인을 억제할 수 있고, NF- $\kappa$ B 및 MAPK 신호 전달 경로 억제를 통해 염증 매개체의 생산을 차단할 수 있으며, 신경염증에 따른 신경발생(neurogenesis)의 손상을 회복시키는 효과를 가지므로써, 신경염증질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 우수한 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0011] 상기 필버톤은 헤이즐넛의 고유 향을 내는 주성분의 천연 화합물로, 부작용이 적고 안전하며, 이를 이용하여 신경염증질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명의 일 실험예에 따른 세포 생존율 분석 결과 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실험예에 따른 전염증성 사이토카인의 변화를 나타낸 그래프로, 2A는 RT-PCR로 측정된 전염증성 사이토카인, MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein 1), TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), 및 IL-1 $\beta$ (Interleukin 1 beta)의 mRNA의 상대적 발현 정도를 나타내고, 2B 및 2C는 ELISA에 의해 측정된 상등액의 TNF $\alpha$  및 MCP-1의 생성 수준을 나타낸다. 대조군과 비교하여  $p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실험예에 따른 지질함유 소교세포(LL-M)에서의 염증 반응 변화를 나타낸 것으로, 3A 및 3B는 각각 RT-PCR 및 ELISA를 이용하여 측정된 MCP-1 mRNA 발현 정도 및 단백질 수준을 나타낸 그래프이고, 3C는 RT-PCR로 측정된 뉴런 손상 마커 NSE의 mRNA 발현 정도를 나타낸 그래프이다. 상기 그래프에서, Fil은 필버톤을 의미하고, 대조군과 비교하여  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실험예에 따른 아질산염 및 iNOS 측정 결과를 나타낸 것으로, 4A는 그리스 분석(Griess assay)에 의해 측정된 조절 배지의 아질산염 생성량을 나타낸 그래프이고, 4B는 RT-PCR에 의해 측정된 iNOS 전사 수준을 나타낸 그래프이다. 대조군과 비교하여  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실험예에 따른 염증 신호 분자의 활성 변화를 나타낸 것으로, 5A 내지 5C는 각각 11% SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅에 의해 분석된 p-p38, p-ERK, 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 단백질 수준을 나타낸 그래프이다. 대조군과 비교하여  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  이다.
- 도 6은 본 발명의 다른 실험예에 따른 소교세포 마커 IBA-1 및 CD11b의 mRNA 상대적 발현 변화를 나타낸 것으로, 결과값은 평균 $\pm$ SEM이며, 정상식이(regular diet, RD) 대조군(RD vs. HFD), 고지방식이(high-fat diet, HFD) 대조군(HFD vs. HFD+0.2% filbertone)과 비교하여  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  이다.
- 도 7은 본 발명의 다른 실험예에 따른 신경발생 마커 DCX의 mRNA 상대적 발현 변화를 나타낸 것으로, 결과값은 평균 $\pm$ SEM이며, RD 대조군(RD vs. HFD), HFD 대조군(HFD vs. HFD+0.2% filbertone)과 비교하여  $*p < 0.05$  이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.
- [0015] 본 발명자는 필버톤이 LPS(lipopolysaccharide) 및/또는 유리 지방산(free-fatty acid, FFA)으로 유도된 소교세포의 활성을 억제하고, 염증 신호 경로 억제를 통해 염증 매개체 방출을 차단하여 소교세포 매개 신경염증 및 신경 퇴행성 장애의 보호에 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 본 명세서에서, "예방"이란, 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물의 투여에 의해 신경염증질환, 또는 상기 질환의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

[0018] 본 명세서에서, "치료"란, 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 신경염증질환, 또는 상기 질환의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0019] 본 명세서에서, "개선"이란, 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물의 섭취에 의해 신경염증질환, 또는 상기 질환의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

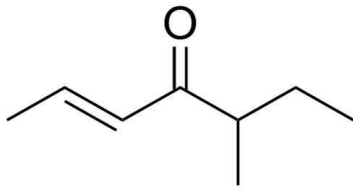
[0020] 본 명세서에서, "약학 조성물"이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물로, 본 발명의 목적상 신경염증질환, 또는 상기 질환의 적어도 하나 이상의 증상을 예방하거나 또는 치료하기 위해 투여되는 것을 의미한다.

[0021] 본 명세서에서, "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 포함하며, 영양 공급 외에도 본 발명의 목적상 신경염증질환의 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.

[0023] 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 함유하는 신경염증질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 본 명세서에서, "필버톤(filbertone)"이란, 전술한 바와 같이 헤이즐넛의 고유 향을 내는 주성분으로, 하기 화학식 1의 천연 화합물을 의미한다.

[0025] <화학식 1>



[0026]

[0027] 상기 필버톤은 식용 가능한 안전한 물질로, 이와 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있다.

[0028] 본 명세서에서, "약학적 또는 식품학적으로 허용가능한"이란, 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 것을 의미한다.

[0029] 상기 염은 약학적 또는 식품학적으로 허용가능한 염기성 염 또는 산성염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있다. 염기성염은 유기 염기염, 무기 염기염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있으며, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에칠아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0030] 바람직하게는 산성염으로, 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 이중 인산, 질산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 말산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캄페설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산, 스테아르산 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여 형성되는 염이 모두 포함될 수 있다.

[0031] 또한, 상기 필버톤은 약학적 또는 식품학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물, 용매화물, 유도체 등을 모두 포함할 수 있다. 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있고, 상기 필버톤을 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기염기를 가하거나 무기염기의 염기 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 또는 이 혼합물에서 용매나 과량의 염기를 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0032] 상기 필버톤은 헤이즐넛과 같이 이를 포함하고 있는 생물로부터 추출하거나, 공지된 제법을 이용하여 화학적으

로 합성하거나 또는 시판되는 것을 사용할 수 있다.

- [0034] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 필버톤은 소교세포(microglia)의 염증 반응을 억제할 수 있다.
- [0035] 본 명세서에서, "소교세포(microglia)"란, 중추신경계(CNS)의 대식세포의 일종으로, '미세 아교 세포'라고도 한다. 뇌의 10 내지 15% 정도를 차지하는 소교세포의 지속적인 과도한 염증성 활성화는 염증성 매개 분자의 분비를 증가시키고, 뇌 신경세포의 독성, 손상 또는 사멸을 야기하여 뇌 염증을 수반하는 다양한 질환의 위험성을 증가시킬 수 있다.
- [0036] 상기 필버톤은 이러한 소교세포의 염증성 활성화를 억제함으로써, 염증성 매개 분자의 분비를 감소시키고, 신경 손상 또는 퇴화를 감소시키므로써 신경염증질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 필버톤은 염증 관련 인자들의 발현을 감소시킬 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 필버톤은 MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein 1), TNF  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) 및 IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 beta)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있고, NO(nitric oxide)의 생성 또는 iNOS(inducible nitric oxide synthase)의 발현을 감소시킬 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 필버톤을 처리한 경우 MCP-1, TNF  $\alpha$ , 및 IL-1 $\beta$ 의 LPS로 유도된 mRNA 발현 수준이 농도 의존적으로 감소하였고, 이의 단백질 수준 또한 농도 의존적으로 감소하였다. 또한, 필버톤을 처리한 경우 NO 생성이 감소하였고, iNOS mRNA 발현 또한 감소하였다. NO는 iNOS 발현에 의해 생성되므로, iNOS 발현 감소를 통해 NO 생성이 감소된 것으로 확인할 수 있으며, 필버톤이 염증 반응 억제 효과를 가짐을 확인할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 필버톤은 NF- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)의 활성화를 억제할 수 있다.
- [0042] 본 명세서에서, "NF- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)"는 DNA 전사, 사이토카인 생산 및 세포 생존을 제어하는 단백질 복합체로, 이의 영향을 받은 사이토카인 등은 다시 NF- $\kappa$ B를 활성화하여 염증 반응을 더욱 가중시킨다.
- [0043] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 필버톤을 처리한 경우, LPS 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$ (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)의 분해가 억제되어 발현이 상향 조절되는 것으로 나타났다.
- [0044] 본 명세서에서, "I $\kappa$ B $\alpha$ (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha)"는 NF- $\kappa$ B 전사 인자를 억제하는 세포 단백질로, 필버톤 처리에 의해 분해가 억제된 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 작용으로 NF- $\kappa$ B의 활성화가 억제됨으로써 염증 반응이 억제될 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 필버톤은 MAPK(Mitogen-activated protein kinase) 신호 전달 경로를 억제할 수 있다.
- [0047] 본 명세서에서, "미토젠-활성화 단백질 키나아제(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)"란, 세포 내부에 존재하는 단백질 인산화 효소의 일종으로, 분열촉진인자(mitogen), 전염증성 사이토카인 등의 다양한 자극에 대한 세포의 반응을 일으켜 세포 증식, 분화, 발현 조절, 세포 사멸 등의 다양한 세포 기능을 조절하는 신호 전달에 관여한다. MAPK에는 p38, 세포외 신호조절 키나아제(extracellular signal-regulated kinase, ERK), C-준 N-말단 키나아제(C-Jun N-terminal kinase, JNK)등이 포함될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 필버톤을 처리한 경우, LPS에 의해 유도된 p38의 인산화(p-p38), ERK의 인산화(p-ERK)가 농도 의존적으로 감소되었다. 이러한 MARK 신호 전달 경로가 억제됨으로써 염증 매개체의 방출을 차단하여 결과적으로 염증 반응이 억제될 수 있다.
- [0050] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 필버톤은 뉴런 손상 마커 NSE(neuron-specific enolase)의 발현을 감소시킬 수 있다.
- [0051] 본 명세서에서, "뉴런-특이적 에놀라아제(neuron-specific enolase, NSE)"는 종양 표지자로 이용되는 물질로, 본 발명에서는 뉴런 손상 마커로 사용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 필버톤을 처리한 경우, LL-M-CM(지질 함유된 소교세포 조절 배지)에 의해 유발된 NSE mRNA 발현 수준이 감소되었다. 이를 통해, 필버톤은 소교세포-매개 염증으로부터 보호하여 뉴런 손상 방



응을 하향 조절함을 확인할 수 있다.

- [0054] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 필버톤은 신경염증에 의해 손상된 신경발생(neurogenesis)을 회복시킬 수 있다.
- [0055] 본 명세서에서, "신경발생(neurogenesis)"은 신경줄기세포(neural stem cells)로부터 신경세포(neuron)가 형성되는 증식, 분화, 성숙 등의 과정으로, 해마에서 일어나는 성체 신경발생(adult neurogenesis)을 포함할 수 있다.
- [0056] 신경염증은 해마의 신경발생을 억제하는 것으로 보고된 바와 같이, 본 발명의 다른 실험예(in vivo)에 따르면, 고지방식이(HFD)가 공급된 비만 C57BL/6 마우스의 해마에서 신경발생 마커인 더블코르틴(Doublecortin, DCX)의 발현이 감소하였으나, 필버톤을 처리한 경우, 상기 DCX의 발현이 유의적으로 상향 조절되었다. 이를 통해, 필버톤은 신경염증에 의해 손상된 신경발생을 회복시키는 효과를 가짐을 확인할 수 있다.
- [0057]
- [0058] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 신경염증질환은 알츠하이머, 혈관성 치매, 전두측두엽 치매, 알콜성 치매, 파킨슨 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 명세서에서, "신경염증질환"이란, 신경교세포에 의해 매개되는 중추신경계에서의 염증 질환들로, 바람직하게는 '뇌신경염증질환'을 의미할 수 있고, 상기 신경염증의 영향으로 발생하는 신경 퇴행성 질환(퇴행성 뇌질환), 염증성 뇌질환, 대사 합병증 등을 모두 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 붕해제, 용해제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 천연 화합물인 필버톤, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.
- [0062] 본 발명에 따른 약학 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 보다 상세하게는 통상의 방법에 따라 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있으며, 특히 향미 화합물인 필버톤의 특징을 이용하여 아로마테라피용 오일 등으로 제형화할 수 있다.
- [0063] 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0065] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0066] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 치료 효능의 증진을 위해 칼슘이나 비타민 D<sub>3</sub> 등을 더 첨가할 수 있다.
- [0068] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0069] 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.
- [0070] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내



지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0071] 본 발명에 따른 약학 조성물은 신경염증질환이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여할 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명에 따른 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피부 도포, 피하, 호흡기내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.
- [0073] 본 발명에 따른 약학 조성물은 신경염증질환 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른 약물 치료 등과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0075] 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 함유하는 신경염증질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다. 상기 필버톤의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
- [0076] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 필버톤은 소교세포(microglia)의 염증 반응을 억제할 수 있다.
- [0077] 상기 필버톤은 염증 관련 인자, 예를 들어, MCP-1(Monocyte Chemoattractant Protein 1), TNF $\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) 및 IL-1 $\beta$ (Interleukin 1 beta)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킬 수 있고, NO(nitric oxide)의 생성 또는 iNOS(inducible nitric oxide synthase)의 발현을 감소시킬 수 있으며, NF- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)의 활성화를 억제할 수 있다.
- [0078] 또한, 상기 필버톤은 MAPK(Mitogen-activated protein kinase) 신호 전달 경로를 억제할 수 있고, 뉴런 손상 마커 NSE(neuron-specific enolase)의 발현을 감소시킬 수 있으며, 신경염증에 의해 손상된 신경발생(neurogenesis)을 회복시키는 효과를 가짐으로써, 알츠하이머, 혈관성 치매, 전두측두엽 치매, 알콜성 치매, 파킨슨 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 신경염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0080] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 건강기능식품은 신경염증질환의 예방 또는 개선 목적으로, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있다. 상기 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 상기 약학 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가될 수 있다.
- [0081] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 건강기능식품은 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과일 및 그의 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품을 모두 포함할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.
- [0083] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 식품학적으로 허용 가능한 식품 첨가제(식품 첨가물) 및 적절한 기타 보조 성분을 더 포함하여 제조될 수 있다. 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 판정할 수 있다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.
- [0084] 상기 기타 보조 성분은 예를 들어, 향미제, 천연 탄수화물, 감미제, 비타민, 전해질, 착색제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 특히, 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 사용할 수 있으며, 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0085] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 필버톤을 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.

[0086] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 상기 필버톤을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 상기 필버톤을 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.

[0087] 환 형태의 건강기능식품은 상기 필버톤과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0088] 과립 형태의 건강기능식품은 상기 필버톤과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0090] 본 발명에 따른 건강기능식품에 함유된 상기 필버톤, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 유효 용량은 신경염증질환 예방 또는 개선 등 그 사용 목적에 따라 적절하게 조절될 수 있다.

[0091] 상기 건강기능식품 조성물은 식품을 원료로 하여 일반 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 신경염증질환 예방 또는 개선을 위한 보조제로 섭취될 수 있다.

[0093] 또한, 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 함유하는 염증인자 활성 억제 시약 조성물을 제공한다. 상기 필버톤의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[0095] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

#### [0097] <실험예 1 - 실험방법> 소교세포에서의 필버톤의 영향

##### [0098] 1. 세포 배양 및 처리

[0099] BV2 소교세포는 메타-염증 기초 연구 실험실(University of Ulsan, Ulsan, Korea)로부터 획득되었다. 상기 세포는 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>에서 10%(v/v) 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco)을 포함하는 RPMI1640(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)에서 배양되었다. BV2 소교세포는 24-웰 플레이트에 2×10<sup>5</sup> cells/mL로 시드(seed)되었고, 6시간 또는 24시간 동안 필버톤(10, 50 μM) 및 LPS(100 ng/mL)로 동시에 처리되었다. 또한, BV2 소교세포는 유리 지방산(FFA)으로 48시간 동안 자극되었다. 이어서, 세포는 24시간 동안 필버톤으로 또는 필버톤 없이 후처리 되었다.

[0100] 필버톤((E)-5-methyl-hept-2-en-4-one, 98%) 및 LPS는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA)로부터 구매되었다. 필버톤은 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 용해되었고 무혈청 배지에서 희석되었다. 배지의 DMSO의 최종 농도는 0.05% 미만이었다. 유리 지방산, 팔미테이트(palmitate, 300 μM, Sigma-Aldrich)는 에탄올에 용해되었고, 사용 전에 10:1의 물 비로 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA, Fitzgerald, Acton, MA, USA, 30 μM)과 접합시켰다.

[0101] N1 시상하부 뉴런 세포(N1 hypothalamic neuron cells, mHypo E-N1)는 아산 생명 과학 연구소의 식욕 조절 실험실(Appetite Regulation Laboratory, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea)로부터 획득되었다. 상기 세포는 37℃ 및 5% CO<sub>2</sub>에서 10%(v/v) 소태아혈청(FBS, Gibco)이 보충된 돌베코 수정 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM, Gibco)에서 배양되었다.

##### [0103] 2. 지질 함유 소교세포 조절 배지의 제조(lipid-laden microglia-conditioned medium, LL-M-CM)

[0104] LL-M-CM을 제조하기 위해, 소교세포는 48시간 동안 팔미테이트로 또는 팔미테이트 없이 처리되었고, 팔미테이트 없이 24시간 동안 배양된 후, 배지를 수집하였다.

##### [0106] 3. 웨스턴 블롯(Western blot) 분석

[0107] 세포는 라이시스 버퍼(lysis buffer; 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1% IGEPAL)에 용해되었고, 0.25% 프로테아제 억제제 콕테일(protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich) 및 1% 포스파타제 억제제 콕테일(phosphatase inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich)로 보충되었다.

[0108] 용출액(lysates)의 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 시약(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)으로 결정되었다. 전체 단백질의 5-10 µg을 포함하는 시료는 총 p38(total p38, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), p-p38(Cell Signaling Technology, Inc.), IκBα(inhibitor of nuclear factor-κB alpha; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 총 p-ERK(total p-ERK, p-extracellular signal-regulated kinases; Cell Signaling Technology, Inc.), ERK(Cell Signaling Technology, Inc.) 및 β-actin(Sigma-Aldrich)에 대한 폴리클로날 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 단백질 밴드(Protein band)는 향상된 화학 발광 웨스턴 블로팅 검출 키트(enhanced chemiluminescence western blotting detection kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 검출되었다. 밴드 강도는 이미지 J 프로그램을 이용하여 정량화되었다.

[0110] 4. 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)

[0111] 배양된 세포로부터 추출된 전체 RNA는 M-MLV 역전사 효소(Promega, Madison, WI, USA)를 갖는 cDNA를 생성하기 위해 역전사 되었다. cDNA의 RT PCR 증폭(amplification)은 써모 사이클 다이스(Thermal Cycler Dice, TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)를 이용하는 SYBR Premix Ex Taq kit(TaKaRa Bio Inc., Foster, CA, USA)로 수행되었다.

[0112] 모든 반응은 하기 조건에 따라 수행되었다 : 95℃에서 10초 동안 초기 변성, 이어서 95℃에서 5초 및 60℃에서 30초 동안 40 사이클. 결과는 실시간 시스템 TP800 소프트웨어(TaKaRa Bio Inc.)를 이용하여 분석되었고, 모든 값은 하우스 키핑 유전자(housekeeping gene), β-actin의 수준으로 정규화 되었다.

[0114] 하기 표 1은 분석에 사용된 프라이머 리스트이다.

표 1

| Gene    | Forward Primer(5' →3' )   | Reverse Primer(3' →5' )   |
|---------|---------------------------|---------------------------|
| NSE     | GAGGACACGTCATTGCTGAT      | GGTTGTACTTCGCCAGACGTT     |
| Iba-1   | AGCTGCCTGTCTTAACCTGCATC   | TTCTGGGACCGTTCTCAGACTTC   |
| IL-1β   | TCCAGGATGAGGACATGAGCAC    | GAACGTCACACACCAGCAGGTTA   |
| iNOS    | CAAGCTGAACCTGAGCGAGGA     | TTTACTCAGTGCCAGAAGCTGGA   |
| MCP-1   | TCAGCCAGATGCAGTTAACGC     | TGGATGCATTAGCTTCAGATTTACG |
| TNF α   | AAGCCTGTAGCCACGTCGTA      | GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG   |
| β-actin | CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC | ATGGAGCCACCGATCCACA       |

[0116] (\*Iba-1, ionized calcium-binding adapter molecule-1; IL-1β, interleukin-1 beta; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; NSE, neuron-specific enolase; 및 TNF α, tumor necrosis factor alpha)

[0118] 5. 산화 질소(Nitric oxide, NO) 분석

[0119] BV2 소교세포( $2 \times 10^5$  cells/mL)는 96-웰 평면 플레이트에 시드되었고, 24시간 동안 LPS(100 ng/mL) 및 필버톤(10, 50 µM)으로 동시에 처리되었다. 상등액(supernatants)을 모아 그리스 반응(Griess reaction)에 의해 아질산염의 양을 측정하였다. 간략하게, 100 µL의 배지는 동량의 그리스 시약(Griess reagent)과 혼합된 뒤, 실온에서 10분 동안 배양하였다. 570 nm에서의 흡광도는 효소-결합 면역침강 분석(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA) 리더기를 이용하여 측정되었고, 아질산염 농도는 NaNO<sub>2</sub> 표준 곡선으로부터 계산되었다.

[0121] 6. 사이토카인(cytokine) 수준(level) 측정

[0122] 배양 상등액에서의 사이토카인 수준은 ELISA에 의해 측정되었다. 분석은 제조사의 지시에 따라, OptEIA 마우스 TNF α 및 마우스 MCP-1 세트(BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행되었다.

[0124] 7. 세포 생존율(Cell viability) 분석

[0125] 세포 생존율은 3-(4,5-디메틸-2-치아졸일)-2,5-디페닐-2H-테트라졸리움 브로마이드(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT, Sigma-Aldrich)를 이용하여 분석되었다. 분석을 위해, BV2 소교세포  $2 \times 10^5$  cells/mL이 96-웰 평면 플레이트에 시드되었다. 세포는 24시간 동안 LPS(100 ng/mL) 및 필버톤(10, 50 µM) 없이 처리되거나 또는 동시에 처리되었고, 각 웰당 MTT 용액 10 µL가 추가되어 4시간 동안 배

양되었다. 그 후 상등액은 제거되었고 포르마잔(formazan) 유색 결정은 200  $\mu$ L의 용해 용액으로 용해되었다. 광학 밀도(optical density, OD)는 570nm에서 멀티웰 스캐닝 분광 광도계(multiwell scanning spectrophotometer, ELISA reader)에서 판독되었다.

## 8. 통계적 분석

결과는 평균±평균의 표준오차(standard errors of the mean, SEM)로 나타내었다. 통계적 비교는 그래프패드 프리즘 5(GraphPad Prism 5, San Diego, CA, USA)를 이용한 뉴만-쿨스 검증(Newman-Keuls' s test)과 스튜던트 t 검정(Student' s t test) 및/또는 일원분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 이용하여 수행되었다. 차이는  $p < 0.05$ 에서 유의한 것으로 간주되었다.

## <실험예 1- 실험결과>

### 1. LPS-유도된 BV2 소교세포의 세포 생존율(cell viability)에 대한 필버톤의 영향

필버톤의 세포 독성을 평가하기 위해, BV2 소교세포는 필버톤에 노출되었고 동시에 24시간 동안 LPS로 또는 LPS 없이 처리되었다. BV2 소교세포의 생존율은 MTT 분석에 의해 측정되었다. 데이터는 세 번의 독립적 실험을 수행하여 평균±표준오차(SEM) 값으로 나타내었고, 이는 이하 후술될 실험에서 동일하게 적용된다.

도 1은 본 발명의 일 실험예에 따른 세포 생존율 분석 결과 그래프로, 이를 참조하면, 필버톤을 10 및 100  $\mu$ M 단일 처리하거나 LPS(100 ng/mL)의 존재하는 경우 모두 배양된 BV2 소교세포에 대해 어떠한 독성도 나타내지 않았다.

따라서 이 결과에 기초하여, 범위 내의 농도 10 및 50  $\mu$ M의 필버톤을 후속 실험에 사용하였다.

### 2. LPS-유도된 BV2 소교세포의 염증 반응에 대한 필버톤의 영향

필버톤이 LPS-유도된 BV2 소교세포에서의 염증 반응을 조절하는지 평가하였다. 전-염증성 사이토카인의 LPS-유도된 mRNA 발현 및 단백질 수준에서 필버톤의 영향을 결정하기 위해, BV2 소교세포는 각각 6시간 및 24시간 동안 LPS 및 필버톤으로 동시에 처리되었다.

도 2는 본 발명의 일 실험예에 따른 전염증성 사이토카인의 변화를 나타낸 그래프로, 도 2A를 참조하면, 필버톤 처리 6시간 후, MCP-1, TNF  $\alpha$ , 및 IL-1 $\beta$ 의 LPS-유도된 mRNA 발현이 미처리된 대조군과 비교하여 약화된 것으로 나타났다.

도 2B 및 도 2C를 참조하면, mRNA 데이터와 일치하게, ELISA에 의해 측정된 단백질 수준 또한, 필버톤의 24시간 처리로 BV2 소교세포에서 농도 의존적으로 MCP-1 및 TNF  $\alpha$ 의 LPS-유도 생성이 상당히 억제되는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 필버톤의 처리가 BV2 소교세포에서 LPS-유도된 염증 반응을 억제할 수 있음을 보여준다.

### 3. 유리지방산(FFA)-유도된 BV2 소교세포의 염증 반응에 대한 필버톤의 영향

LPS와 유사하게, 유리지방산(FFA)의 자극은 염증 매개체의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이에, 소교세포의 활성을 유도하고 비만 상태를 모방하는 LL-M(lipid-laden microglia)을 만들기 위해 FFA를 이용하였다.

도 3은 본 발명의 일 실험예에 따른 지질함유 소교세포(LL-M)에서의 염증 반응 변화를 나타낸 것으로, 도 3A 및 3B를 참조하면, BV2 소교세포를 48시간 동안 FFA(300  $\mu$ M)로 자극시킨 뒤, 24시간 동안 필버톤(10, 50  $\mu$ M)으로 또는 필버톤 없이 후처리한 결과, LL-M에서의 MCP-1 유전자 및 단백질 발현이 상당히 감소되었다.

도 3C를 참조하면, N1 시상하부 뉴런 세포(mHypo E-N1)를 48시간 동안 지질 함유 소교세포 조절 배지(LL-M CM) 및 필버톤(10, 50  $\mu$ M)으로 동시에 처리하거나 또는 LL-M CM 및 필버톤 없이 처리한 결과, 동시 처리시 NSE mRNA 발현 수준이 감소되는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 필버톤 후처리가 지질 함유 조건의 BV2 소교세포의 염증 반응을 약화시킬 수 있음을 보여준다.

### 4. LPS-유도된 BV2 소교세포의 NO 생성 및 iNOS 발현에 대한 필버톤의 영향

LPS에 의해 유도된 NO 생성 조절에 대한 필버톤의 능력을 평가하기 위해, LPS-유도된 BV2 소교세포에서 그리스 반응(Griess reaction)을 이용하여 아질산염(nitrite) 생성 수준을 측정하였다.

도 4는 본 발명의 일 실험예에 따른 아질산염 및 iNOS 측정 결과를 나타낸 것으로, 도 4A를 참조하면, 24시간



동안 필버톤을 처리한 결과, BV2 소교세포에서 LPS-유도된 NO 생성이 상당히 감소되는 것으로 나타났다.

[0155] NO 생성은 iNOS 발현에 의해 생성되는 것으로 알려져 있기에, BV2 소교세포에서 iNOS의 전사 수준을 측정한 결과, 도 4B와 같이 필버톤은 LPS-매개 iNOS mRNA 발현의 상향 조절을 현저히 억제하는 것으로 나타났다.

[0156] 이를 통해, 필버톤은 LPS-유도된 BV2 소교세포에서 iNOS 발현 감소를 통해 NO 생성을 효과적으로 약화시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0158] **5. LPS-유도된 BV2 소교세포의 염증 신호 전달에 대한 필버톤의 영향**

[0159] LPS-유도된 BV2 소교세포에서 필버톤에 의해 조절되는 염증 신호에 대해 확인하기 위해, BV2 소교세포에 24시간 동안 LPS 및 필버톤을 동시에 처리하여 TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 생성에 관여하는 세포 내 신호 전달로 널리 알려진 미토젠-활성화 단백질 키나아제(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)의 인산화 상태를 더 실험하였다. p38 및 ERK의 단백질 수준을 분석하기 위해 웨스턴 블로팅을 수행하였다.

[0161] 도 5는 본 발명의 일 실험예에 따른 염증 신호 분자의 활성 변화를 나타낸 것으로, 도 5A 및 도 5B를 참조하면, 상기 두 분자의 인산화 수준은 LPS 자극에 대해 반응하여 급격히 증가되었으나, LPS-유도된 BV2 소교세포에 의해 유도된 p38 MAPK 및 ERK의 인산화는 필버톤 처리로 상당히 감소되었다.

[0162] 게다가, NF- $\kappa$ B의 활성화는 BV2 소교세포에서 iNOS, TNF  $\alpha$ , 및 IL-1 $\beta$ 를 포함하는 주요 염증 매개체의 조절과 현저하게 관련되어 있기에, 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 BV2 소교세포에서 NF- $\kappa$ B의 LPS-유도된 활성화에 필버톤이 영향을 미치는지 여부를 조사한 결과, 도 5C와 같이, 필버톤 처리에 의해 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 LPS-유도 분해가 억제되는 것으로 나타났다.

[0163] 이러한 결과를 통해, 필버톤은 MARK 신호 전달 경로의 억제를 통해 염증 매개체의 방출을 차단하고, NF- $\kappa$ B 활성을 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0165] **6. LL-M-CM(지질 함유 소교세포 조절 배지)에 의해 유발된 신경 손상에 대한 필버톤의 영향**

[0166] 이전 연구에서 LL-M-CM이 mHypo E-N1 세포의 생존율을 감소시킴을 확인하였고, 이어서 mHypo E-N1 세포에서 뉴런 기능 장애를 유발하기 위해 LL-M-CM을 이용하였다.

[0167] 상기 도 3C와 같이, mHypo E-N1 세포에 필버톤 처리는 신경 손상의 마커로 알려진 NSE mRNA 발현 수준을 감소시켰다. 이것은 또한 필버톤이 보충된 고지방식이 비만 마우스의 시상하부에서 NSE mRNA의 억제를 동반한다.

[0168] 따라서 필버톤은 소교세포-매개 염증으로부터 보호하여 뉴런 손상 반응의 하향 조절을 초래할 수 있다.

[0170] **<실험예 2> - in vivo 에서 필버톤의 영향**

[0171] **1. 해마(hippocampus)의 소교세포 마커에 대한 필버톤의 영향**

[0172] 정상식이(regular diet, RD), 고지방식이(high-fat diet, HFD) 및 고지방식이+0.2% 필버톤(HFD+0.2%Fil)을 10주 동안 공급한 C57BL/6 마우스로부터 해마를 분리한 뒤, 소교세포 마커(IBA-1, CD11b)의 발현을 실시간 PCR(real-time PCR)로 확인하였다.

[0174] 도 6은 본 발명의 다른 실험예에 따른 소교세포 마커 IBA-1 및 CD11b의 mRNA 상대적 발현 변화를 나타낸 것으로, 도 6을 참조하면, HFD를 공급한 비만 마우스를 이용하여 실험한 결과, 필버톤 보충이 HFD를 공급한 비만 마우스의 해마에서 IBA-1 및 CD11b의 소교세포 마커의 전사 수준이 감소하였고, 이러한 감소는 염증성 사이토카인 IL-1b, TNF $\alpha$ , MCP-1의 하향 조절을 동반함을 확인하였다.

[0175] 이를 통해, 필버톤은 비만 조건에서 해마 소교세포-매개 염증 반응을 억제함으로써, 필버톤이 신경염증 및 신경퇴행성 질환을 포함하는 소교세포-매개 신경염증의 예방에 도움이 될 수 있음을 확인할 수 있다.

[0177] **2. 해마(hippocampus)의 신경발생 마커에 대한 필버톤의 영향**

[0178] 정상식이(regular diet, RD), 고지방식이(high-fat diet, HFD) 및 고지방식이+0.2% 필버톤(HFD+0.2%Fil)을 10주 동안 공급한 C57BL/6 마우스로부터 해마를 분리한 뒤, 신경발생 마커인 더블코르틴(Doublecortin, DCX)의 발현을 실시간 PCR(real-time PCR)로 확인하였다.

[0180] 도 7은 본 발명의 다른 실험예에 따른 신경발생 마커 DCX의 mRNA 상대적 발현 변화를 나타낸 것으로, 도 7을 참조하면, 신경염증은 해마의 신경발생(neurogenesis)을 억제하는 것으로 보고된 바, HFD 공급된 비만 마우스의 해마에서 필버톤의 보충에 의해 성체 신경발생의 변화를 반영하는 신경발생 마커 DCX의 전사 수준이 유의적으로

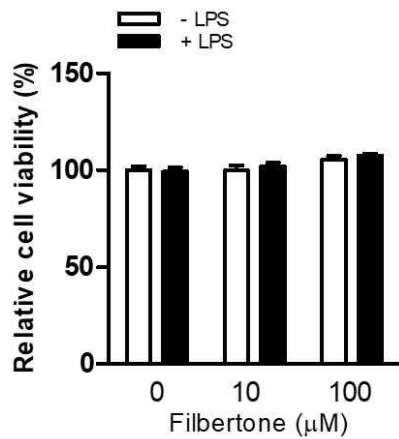
상향 조절되는 것으로 나타났다. 이는 필버톤이 비만 조건에서 염증에 의한 해마의 신경발생의 억제를 회복시킬 수 있음을 나타낸다.

[0182]

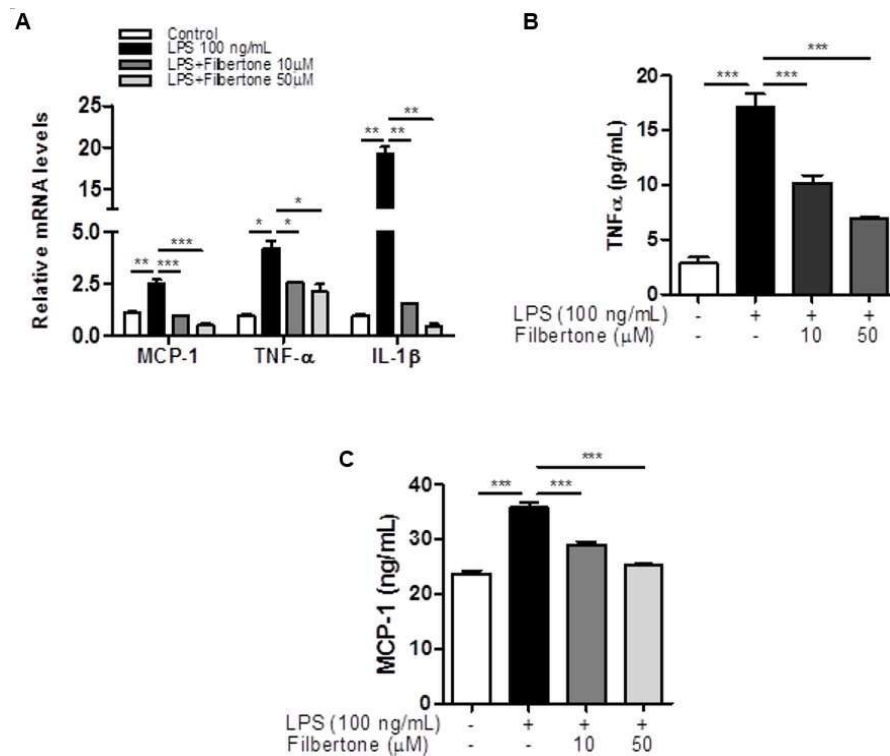
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

## 도면

### 도면1

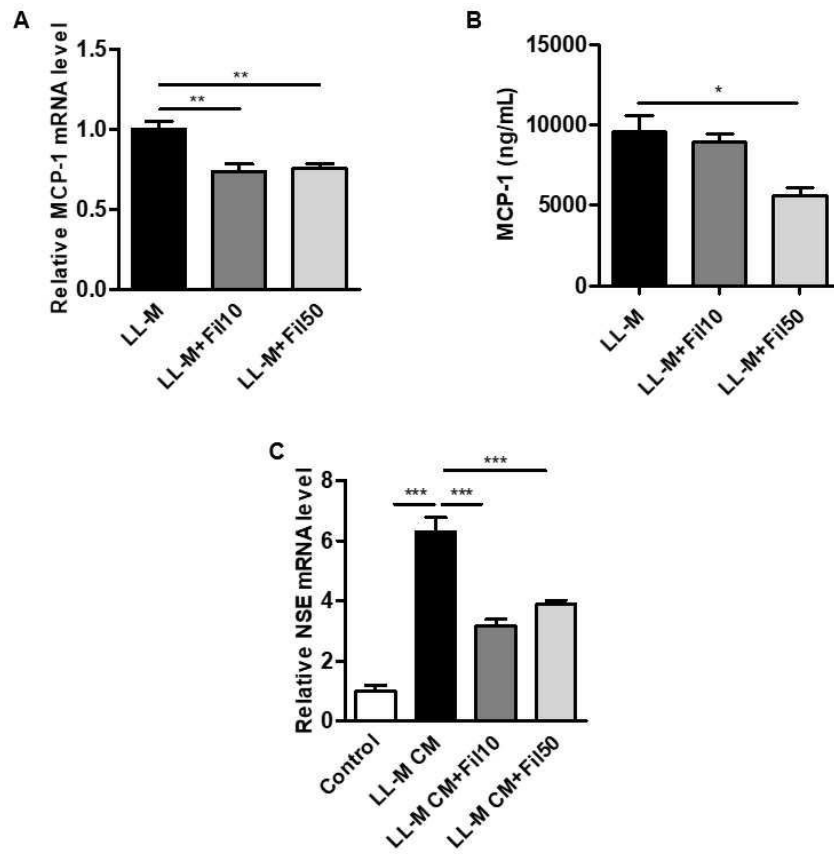


### 도면2

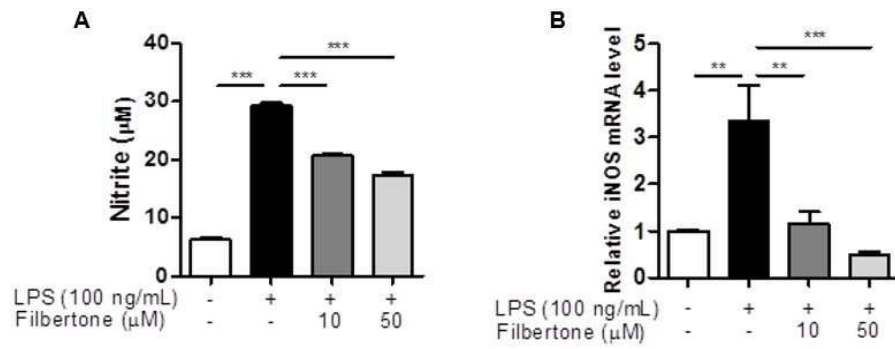




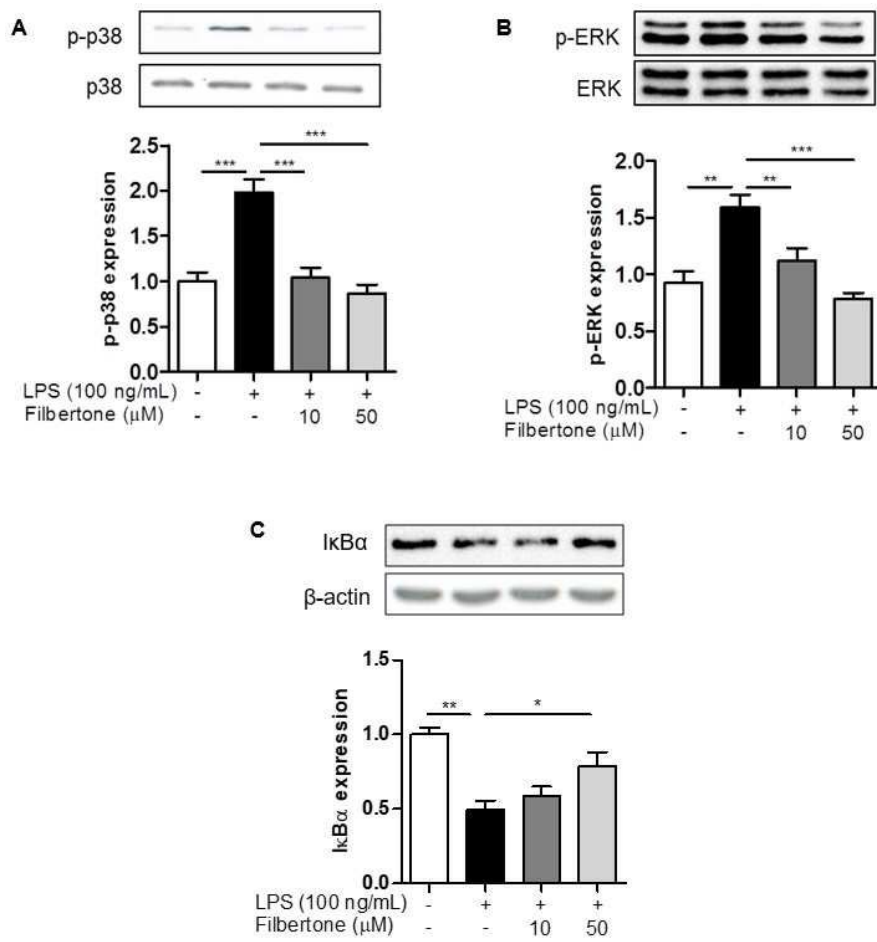
도면3



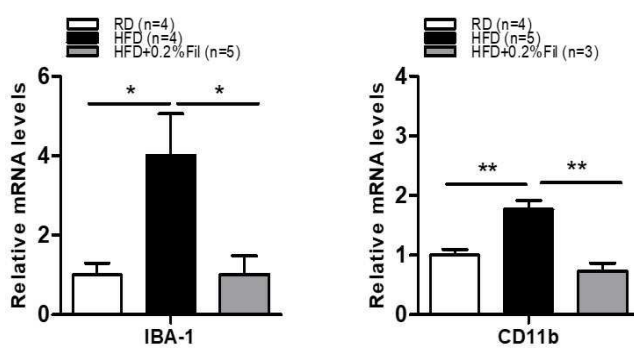
도면4



도면5



도면6



도면7

