



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0115916
(43) 공개일자 2018년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0048390
(22) 출원일자 2017년04월14일
심사청구일자 2017년04월14일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
이준식
광주광역시 서구 풍암1로 53, 제105동 206호(풍암동, 현대삼환아파트)
김미은
부산광역시 부산진구 백양관문로 7, 210동 605호(개금동, 개금주공아파트)
조순효
광주광역시 서구 금화로 25, 102동 1202호(금호동, 금호동 쌍용예가 만호마을)
(74) 대리인
특허법인아이엠

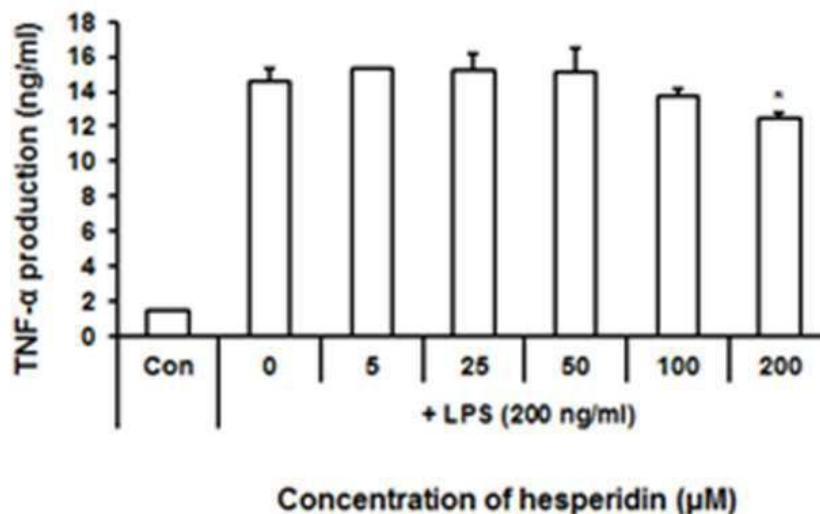
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 Hesperetin을 유효성분으로 포함하는 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 hesperetin을 유효성분으로 포함하는 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

대표도 - 도4b



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525006134

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명자원확보및활용기반구축

연구과제명 해양바이오 지역특화 선도기술 개발(해조류 유래 식/의약 소재 개발)

기 여 율 1/2

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2016.08.01 ~ 2017.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711036851

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (구)신진연구지원사업

연구과제명 FoxO6에 의한 수지상세포 분화 및 T 세포 활성화조절 기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

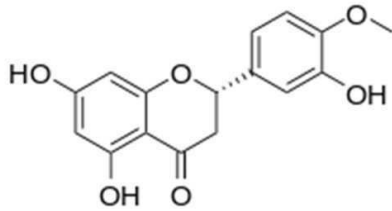
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 hesperetin 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 hesperetin이 신경미세아교세포에서 염증 반응에 관여하는 iNOS, COX-2, TNF- α 및 IL-6유전자로 구성된 그룹에서 선택되는 하나 이상의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

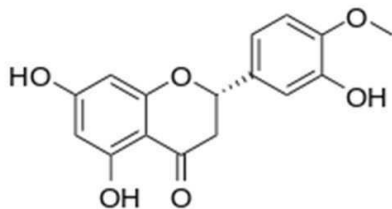
제 1 항에 있어서,

상기 퇴행성신경질환은 다발성경화증, 알레르기성 척수염, 파킨슨병, 알츠하이머 및 헌팅턴병을 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 hesperetin 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성신경질환 예방 및 개선 효과를 갖는 건강기능식품.

[화학식 1]



청구항 5

제 4 항에 있어서,

분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 것을 특징으로 하는 퇴행성신경질환 예방 및 개선 효과를 갖는 건강기능식품.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 퇴행성신경질환은 다발성경화증, 파킨슨병, 알츠하이머 및 헌팅턴병을 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 퇴행성신경질환 예방 및 개선 효과를 갖는 건강기능식품.

청구항 7

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성신경질환 치료방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 퇴행성신경질환은 다발성경화증, 알레르기성 척수염, 파킨슨병, 알츠하이머 및 헌팅턴병을 포함하는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 퇴행성신경질환 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 hesperetin을 유효성분으로 포함하는 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성 신경질환(Neurodegenerative Disease)은 신경세포의 기능 감소 또는 소실에 의해 운동조절능력, 인지기능, 지각기능, 감각기능 및 자율신경의 기능 이상을 나타내는 질병이다.

[0003] 최근 노인성 치매를 비롯한 퇴행성 뇌신경 질환이 사회적인 문제로 크게 대두되고 있다. 이 중 알츠하이머형 치매 및 뇌졸중 또는 뇌동맥경화에 의한 광범위한 뇌병변으로 인한 뇌혈관성 치매증은 전체 치매 질환의 약 90%를 차지하고 있다. 그 밖의 뇌신경 질환으로는 파킨슨병, 크로이츠펠트-야콥병, 두부손상에 의한 치매, 파킨슨병 등이 있다.

[0004] 퇴행성 뇌신경 질환을 유발하는 주요 기전 중 하나로 염증반응이 있다. 뇌의 중추신경계에는 고유의 면역반응과 세균 침입 및 상처에 대한 방어라인을 형성하는 미세아교세포가 상재한다. 미세아교세포(microglia)는 중추신경계에 있는 대식세포의 한 형태로서 신경 염증에 중요한 역할을 하는데, 다양한 외인성, 내인성 물질로 인해 활성화될 수 있으며, 활성화된 미세아교세포는 염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-1 일산화질소, 프로스타글란딘, 초과산화물 등의 다양한 전염증성 매개자 물질을 생산, 방출한다. 이러한 물질들의 생성은 단기적으로는 면역반응을 유발하지만, 그 과도한 생산이나 지속적인 생산은 근접한 신경세포들의 사멸을 유도하여 결국 신경퇴행을 유발한다는 것이다. 한편, 이러한 염증성 매개자 물질은 mitogen-activated protein kinases (MAPK)에 의해 조절되는데, MAPK는 스트레스, 유사분열 촉진인자 또는 전염증성 사이토카인과 같은 자극에 관한 세포성 반응뿐만 아니라 유전자 발현, 분화, 증식을 포함한 세포성 기능들을 조절하는 연관이 있다. 또한, MAPK는 p38, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK)으로 구성된 주요 3개의 신호 단계로 되어있으며, p38 MAPK는 염증이 일어난 중추신경계에서 높은 사이토카인의 생산을 유도한다고 알려져 있다.

[0005] 이와 같이 미세아교세포는 중추신경계(central nervous system, CNS)와 뇌에 존재하며 일차적인 신경세포들의 보호 및 회복에 관여하지만 활성화된 미세아교세포는 신경염증반응을 유도하고, 신경염증 반응이 다양한 신경변성질환의 원인으로 이끈다는 많은 연구가 보고되고 있다. 뇌 손상이나 여러 신경독소 등에 의하여 미세아교세포가 활성화되며, 활성화된 미세아교세포는 일산화질소(NO), 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS), 염증효소인 iNOS(inducible nitric oxide synthase)와 COX-2(cyclooxygenase-2) 그리고 전염증성 사이토카인(cytokine)인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 다양한 염증성 매개자물질의 활성을 유도한다(Graeber and Streit, 2010). 또 사멸 중인 신경세포가 방출하는 물질들이 미세아교세포의 활성을 다시 유발하게 되므로, 신경퇴행은 지속적인

악순환에 빠지게 된다. 실제로 미세아교세포의 활성이 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 크로이츠펠트야콥병, 다발성 경화증 등의 다양한 퇴행성 신경질환과 관계가 있음이 보고되었다(Wood PL, et al., 17 Neurol. Res. 242, 1995).

[0006] 현재 미세아교세포의 활성화를 억제하는 벤즈이미다졸이 신경염증성 환자(AIDS, 치매, 근위축성 측삭 경화증, 크로이츠펠트-야콥병, 다운증후군, 미만성 루이소체병, 헌팅턴병, 백색질뇌염, 다발성 경화증, 파킨슨병, 픽병, 알츠하이머병, 뇌졸중성 발작, 측두엽간질 및 종양)의 치료에 사용된다는 것이 알려져 있다. 미세아교세포의 활성화와 퇴행성 신경질환의 관계에 대해서는 아직 완전히 밝혀지지 않았으나, 일반적으로 미세아교세포의 활성이 퇴행성 신경질환의 발병과 진행에 관련되어 있다고 여겨지고 있다. 그러므로 미세아교세포의 염증반응 억제는 퇴행성 신경질환의 진행을 완화시킬 수 있는 효과적인 치료법이 될 것으로 제시되고 있다.

[0007] 따라서 이러한 신경염증의 조절이 퇴행성신경변성질환의 예방에 중요한 역할을 할 것이라고 기대되는 이상, 신경세포 보호 효능 또는 신경염증 저해 효능을 갖는 물질의 검색 및 연구가 필요하다고 할 수 있다.

[0008] 한편, Hesperetin은 레몬, 귤과 같은 귤속의 *citrus*의 과피에 많이 존재하는 플라보노이드계 색소 중의 플라바논(flavanone) 배당체 Hesperidin으로 함유되며, hesperidin의 glucose가 분리가 되어 형성되는 물질이다. 기존에 알려진 연구에 의하면 Hesperetin의 항신경염증 활성 및 그 기전에 대한 보고는 이루어진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 레몬, 귤과 같은 귤속의 *citrus*의 과피에 함유된 배당체 Hesperidin으로부터 유래된 hesperetin의 새로운 용도를 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

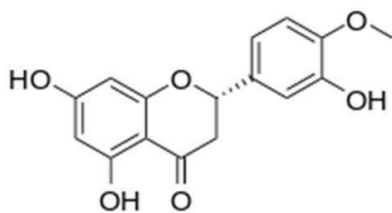
[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 hesperetin 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하여 다양한 신경염증성 질환 특히 퇴행성신경질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 hesperetin 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0013] [화학식 1]



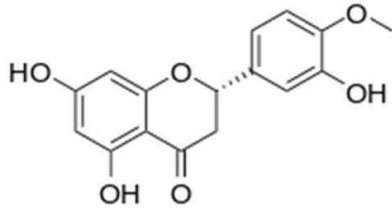
[0014]

[0015] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 hesperetin이 신경미세아교세포에서 염증 반응에 관여하는 iNOS, COX-2, TNF- α 및 IL-6 유전자로 구성된 그룹에서 선택되는 하나 이상의 발현을 억제한다.

[0016] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 퇴행성신경질환은 다발성경화증, 알레르기성 척수염, 파킨슨병, 알츠하이머 및 헌팅턴병을 포함하는 군에서 선택된다.

[0017] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 hesperetin 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성신경질환 예방 및 개선 효과를 갖는 건강기능식품을 제공한다.

[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 건강기능식품의 제형은 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료이다.

[0021] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 퇴행성신경질환은 다발성경화증, 파킨슨병, 알츠하이머 및 헌팅턴병을 포함하는 군에서 선택된다.

[0022] 또한, 본 발명은 상술된 어느 하나의 약학적 조성물을 인간을 제외한 포유류에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성신경질환 치료방법을 제공한다.

[0023] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 퇴행성신경질환은 다발성경화증, 알레르기성 척수염, 파킨슨병, 알츠하이머 및 헌팅턴병을 포함하는 군에서 선택된다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 hesperetin 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 미세아교세포에서 NF- κ B 신호와 함께 p38 신호의 억제를 통해서 i-NOS와 COX-2의 mRNA 발현뿐만 아니라 i-NOS와 COX-2의 단백질 발현을 감소시켜 신경염증을 조절하는 효능을 가지므로, 이를 이용하여 다양한 퇴행성신경질환을 예방, 완화 또는 치료하기 위한 약학조성물 및 기능성 식품소재로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1에서 A는 hesperetin의 구조식이고, B는 hesperetin이 처리된 마우스 BV-2세포의 MTT assay 상 세포생존성 결과 그래프이다.

도 2는 hesperetin이 처리된 마우스 BV-2세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 생산 억제효과를 나타낸 결과그래프이다.

도 3은 hesperetin이 처리된 마우스 BV-2세포에서 LPS에 의해 유도된 전염증성 유전자 mRNA의 발현 억제효과를 나타낸 결과사진이다.

도 4a 및 도 4b는 hesperetin이 처리된 마우스 BV-2세포에서 LPS에 의해 유도된 사이토카인의 생산 억제효과를 나타낸 결과그래프이다.

도 5는 hesperetin이 처리된 마우스 BV-2세포에서 LPS에 의해 유도된 ERK의 인산화 억제효과를 나타낸 결과사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어는 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어를 선택하였으나, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있는데 이 경우에는 단순한 용어의 명칭이 아닌 발명의 상세한 설명 부분에 기재되거나 사용된 의미를 고려하여 그 의미가 파악되어야 할 것이다.

[0027] 이하, 첨부한 도면 및 바람직한 실시예들을 참조하여 본 발명의 기술적 구성을 상세하게 설명한다.

[0028] 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 동일한 참조번호는 동일한 구성요소를 나타낸다.

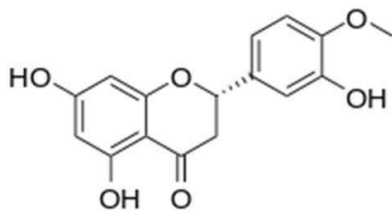
[0029] 본 발명의 기술적 특징은 hesperetin이 LPS에 의해 활성화된 BV-2 미세 아교 세포에서 활성산소인 NO를 생성하는 효소인 i-NOS의 발현과 COX-2의 발현을 억제하고, TNF- α 및 IL-6의 발현을 억제하였으며, JNK, ERK, p38를 포함한 MAPK와 NF- κ B의 활성화를 억제하여 NO와 전염증성 사이토카인의 발현을 감소시키는 효능을 갖는다는 점에서 착안된 것으로 hesperetin의 새로운 용도를 이용하여 신경염증성 질환 특히 퇴행성신경질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 약학조성물 및 건강기능식품을 제공하는

것이다.

[0030] 여기서, 헤스페레틴(hesperetin)은 헤스페리딘으로부터 얻어지는데, 헤스페리딘은 분자식이 $C_{18}H_{34}O_{15}$ 이고 분자량은 610.57이며 이당류(disaccharide) 루티노스(rutinose)와 결합된 플라바논 배당체(glycoside) 형태로 오렌지와 레몬과 같은 감귤류 식물에 존재한다. 헤스페리딘이 체내에서 당 분해 효소에 의해 가수분해되면 아글리콘(aglycone) 형태인 헤스페레틴(hesperetin)으로 분해되며, 헤스페레틴의 분자식은 $C_{16}H_{14}O_6$ 이고 분자량은 302.27이다. 헤스페레틴은 체내에서 위, 장으로 흡수된 후 생체 내에서 생리활성을 나타내며 혈액 및 간장 등의 조직 내에서 헤스페레틴 형태로 검출되고 있다. 그러나, 헤스페레틴이 본 발명에서 최초로 밝혀진 바와 같이 퇴행성 신경질환의 개선에 유용함은 아직 보고되어 있지 않다. 활성화된 미세 아교 세포에 의한 신경 염증의 억제가 신경퇴화 질환의 완화로 보여지는데, 후술하는 바와 같이 본 발명에서는 LPS로 자극시킨 BV-2 미세아교세포에서 발생하는 신경염증을 hesperetin이 억제하는 것을 확인하였기 때문이다.

[0031] 따라서, 본 발명의 퇴행성신경질환 예방, 개선 또는 치료용 약학조성물은 하기 화학식 1로 표시되는 hesperetin 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함한다.

[0032] [화학식 1]



[0033]

[0034] 본 발명의 헤스페레틴은 상술된 바와 같이 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰 산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0035] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 헤스페레틴을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동량의 헤스페레틴 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0036] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음 염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0037] 또한, 본 발명의 헤스페레틴은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0038] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 헤스페레틴을 수혼화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을

가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0039] 상술된 바와 같이 hesperetin 및/또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 BV-2 미세 아교 세포에서 활성산소인 NO를 생성하는 효소인 i-NOS의 발현과 COX-2의 발현을 억제하고, IL-6 및 TNF- α 의 발현을 억제하였으며, JNK, ERK, p38를 포함한 MAPK와 NF- κ B의 활성화를 억제하여 NO와 전염증성 사이토카인의 발현을 감소시키기 때문이다. 그 결과 본 발명의 약학조성물을 경구 또는 비경구적으로 투여하여 인간을 포함한 포유류의 퇴행성신경질환을 예방, 개선 또는 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학조성물은 hesperetin 및/또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 더 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 유효성분인 hesperetin 및/또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 약학조성물에 0.01 내지 99 중량%로 포함될 수 있다.

[0041] 담체 또는 부형제로는 물, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수, 텍스트로스, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이들은 1종이상 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체 및 부형제는 모두 사용가능하다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로글, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0042] 또한 본 발명의 약학조성물을 약제화하는 경우, 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0043] 개별 투약 형태에서 이의 유효성분인 hesperetin 및/또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 1회에 투여되는 양으로, 예컨대 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배일 수 있다. 본 발명의 약학조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 병용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋으며, 예컨대 1회 유효성분을 기준으로 하였을 때 10 μ g/ml 이하의 농도로, 1일 1 내지 5회 투여할 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 60 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 mg/일이며, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0044] 다음으로, 본 발명의 퇴행성신경질환 예방 및 개선용 건강기능성식품은 상술된 약학조성물에 포함되는 hesperetin 및/또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함함으로써 활성화된 미세 아교 세포에 의한 신경 염증에 대한 억제활성을 갖게 되므로 다양한 퇴행성신경질환의 증상을 예방 및 개선하기 위한 목적으로 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 '건강기능성식품'이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 건강기능성식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명의 hesperetin 및/또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 첨가할 수 있는 건강 기능성 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다. 추가로, 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 건강보조식품, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상술된 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

- [0047] 본 발명의 건강 기능성 식품은 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, 보호성콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 물, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0048] 이와 같이 본 발명의 건강기능성식품은 상술된 바와 같이 다양한 제형을 갖는데, 특히 분말, 과립, 정제, 캡슐 및 음료 중 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0049] 일 구현예로서, 본 발명의 건강기능성식품을 음료로 구현하는 경우 필수 성분으로서 본 발명의 hesperetin 및/또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 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 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0050] 또한, 퇴행성신경질환의 예방 및 개선을 목적으로 하는 건강기능성식품에서도 유효성분인 hesperetin 및/또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 퇴행성신경질환 치료방법은 상술된 약학조성물을 인간을 제외한 포유류의 퇴행성신경질환을 치료하기 위해 경구 또는 비경구적으로 투여하는 단계를 포함하여 퇴행성신경질환을 치료할 수 있다. 여기서, 퇴행성신경질환은 다발성경화증, 알레르기성 척수염, 파킨슨병, 알츠하이머 및 헌팅턴병을 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0052] 후술하는 실험예들에서 데이터는 일원배치 분산분석 (one-way-ANOVA)에 의해 분석되었으며, LSD post-hoc test를 사용하여 사후 검정하였으며 SPSS (IBM; Armonk, NY, USA)로 분석하였다. 분석한 결과값은 Mean(평균)±S.D(표준편차)로 나타낸다. 실험결과의 유의성은 p value <0.05 수준에서 비교하였다.
- [0053] 실험예 1
- [0054] 1. 세포배양
- [0055] 마우스의 미세아교세포인 BV-2 는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구매했다. 세포 배양에 사용된 배지는 37℃, 이산화탄소 5%의 조건에서 10% FBS, 200IU/ml penicillin, 200g/ml streptomycin을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) 이용하여 배양한다. Hesperetin은 농도 100mM으로 환원되고, DMEM에 용해했다(최종 DMSO 농도 0.2%). Hesperetin을 처리하지 않은 대조군은 DMSO 용매를 사용했다.
- [0056] 2. 세포독성능 평가
- [0057] 세포독성은 MTT 비색실험으로 측정했다. BV-2 미세 아교 세포 주 (1×10^4 cells/well)를 96-well 세포배양용 플레이트에 배양한 후 농도별로 hesperetin (0~200 μ M)를 처리한 뒤, 37℃에서 24시간 동안 배양했다. 배양 후 배지에 포함된 hesperetin을 제거하고, 0.5mg/ml의 MTT 용액을 넣어준다. 37℃에서 4시간 동안 배양 후 MTT 용액을 제거한 뒤 formazan이 생성된 것을 확인 후 DMSO와 에탄올을 1:1로 섞은 것을 이용하여 생성된 formazan을 녹인다. formazan 용액의 흡광도를 ELISA microplate reader를 이용해 570nm에서 측정한다. 실험 결과는 대조군(0.2% DMSO)에 대한 살아있는 세포의 수를 퍼센트로 비교하여 분석한 결과값은 Mean(평균)±S.D(표준편차)로 나타낸다. 실험결과의 유의성은 p value <0.05 수준에서 비교하였다.
- [0058] 이와 같이 MTT assay를 이용하여 BV-2 세포에 대한 hesperetin의 세포독성을 측정한 결과, 도 1b에 도시된 바와 같이 200 μ M까지 세포에 대한 독성을 가지지 않는 것으로 확인되었다.
- [0059] 실험예 2
- [0060] hesperetin이 염증 매개 인자인 NO의 생산을 조절하는지 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 hesperetin을 처리한 후 NO 생성수준을 LPS에 의해 자극된 BV-2 미세아교세포 주에서 측정했고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

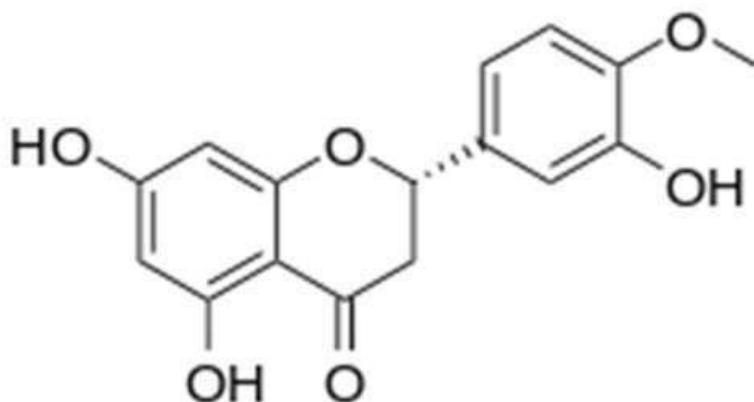
- [0061] BV-2 미세 아교 세포 주 (2×10^4 cells/well)를 96-well plate에 배양하여 다양한 농도의 hesperetin(0~200 μ M)을 2시간동안 전처리한 후, LPS를 처리하거나 처리하지 않은 샘플을 22시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한다. 배양 후, 배지와 동량의 Greiss 시약을 1:1로 혼합하여 실온에서 15분간 배양한다. 15분후 흡광도를 ELISA microplate reader를 이용하여 540nm에서 측정한다. (**p<0.01 vs LPS 단독 처리군)
- [0062] 도 2에 도시된 바와 같이 LPS는 대조군과 비교하여 NO의 생산이 증가한 반면, hesperetin을 농도별로(0~200 μ M) 처리하였을 때 5, 25, 50, 100, 200 μ M에서 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하였다(p<0.05). 따라서 Hesperetin의 독성이 없는 농도(5~200 μ M)에서 LPS에 의해 자극된 미세아교세포로부터 생산된 NO를 억제한다는 것을 알 수 있다.
- [0063] 실험예 3
- [0064] hesperetin이 NO를 생성하는 효소인 i-NOS의 발현과 COX-2의 발현을 억제하는지 여부를 확인하기 위해, 하기와 같이 역전사 중합 연쇄반응을 수행했고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0065] BV-2 미세 아교 세포 주 (5×10^5 cells/well)를 6-well plate에 배양한다. 배양된 세포를 농도별로(0~200 μ M) 2 시간동안 처리 후, LPS를 처리한 다음 6시간동안 배양한다. Trizol 시약을 이용하여 제품 실험방법을 따라 세포로부터 전체 RNA를 분리한다. cDNA를 합성하기 위하여, 0.1 μ g 전체 RNA, oligo dT, M-MLV RTase, dNTP 그리고 반응완충용액과 함께 혼합하여 합성한다. IL-1 β 와 TNF- α 그리고 IL-6등을 포함한 염증성 사이토카인의 mRNA량을 측정하기 위하여, 표적 유전자에 대한 primer를 제작하여 사용하였고, e-Taq DNA 중합효소 키트와 primer를 사용해 Gene Atlas G02 gradient thermal cycler system(Astec Fukuoka, Japan)기기를 이용해 cDNA를 증폭시켰다. PCR 반응물은 형광염색제와 UV transilluminator로 확인했다.
- [0066] 도 3에 도시된 바와 같이 역전사중합연쇄반응으로 염증성 유전자 mRNA의 발현을 본 결과, hesperetin이 LPS에 의해서 증가된 i-NOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 mRNA 발현을 감소시켰다. LPS에 의해 자극된 BV-2 세포에서 i-NOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 발현이 증가하였으며, hesperetin는 증가한 i-NOS, COX-2, TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다.
- [0067] 실험예 4
- [0068] hesperetin이 신경 염증반응에서 미세 아교 세포에 의해 분비되는 사이토카인으로 알려진 IL-6, TNF- α , IL-1 β 과 같은 염증성 cytokine의 생산을 감소시키는지 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 hesperetin을 전 처리한 후 LPS에 의해 자극된 BV-2세포주에서 사이토카인 생성량을 측정했고 그 결과를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.
- [0069] BV-2 세포를 96-well plate에 배양한 후 hesperetin을 농도별로(0~200 μ M) 2시간동안 전처리한 후, 200ng/ml의 LPS로 BV-2 세포를 22시간동안 자극하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한다. 이 후 배양액을 회수하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 사이토카인 생성량을 ELISA 마이크로 microplate reader로 450nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.
- [0070] LPS에 의해 자극된 BV-2세포로부터 생산된 IL-1 β 의 유전자는 hesperetin의 전 처리에 의한 억제효과가 관찰되지 않았다. 반면, 도 4a 및 도 4b에 도시된 바와 같이, IL-6 및 TNF- α 의 유전자 발현은 hesperetin의 전 처리에 의해 유의성 있게 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 hesperetin은 LPS에 의해 자극된 BV-2세포로부터 생산된 inflammatory cytokine인 IL-1 β 의 생산을 억제하는 효과가 없는 반면, IL-6 및 TNF- α 의 생성은 hesperetin에 의해 억제되어 항신경염증 활성을 유도하는 것을 알 수 있다.
- [0071] 실험예 5
- [0072] p38, JNK, ERK 같은 MAPK는 세포의 성장, 분열, 스트레스 그리고 사이토카인에 의한 세포반응의 조절 등에 중요한 역할을 하며, 전사요소의 활성을 통하여 염증 매개자를 조절하는 신호전달 경로에 관여한다. 신경세포에서 염증 매개자에 대한 hesperetin의 억제 효과의 분자기전을 확인하기 위하여, BV-2세포에서 LPS에 유도된 MAPK 인산화 수준을 다음과 같이 단백질 검출 분석을 통해 확인하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0073] BV-2 세포를 100mm dish plate에 배양하고 4시간 동안 starvation을 시킨 후, Hesperetin을 2시간 전처리한다. 그 다음 MAPK 활성을 보기위해 세포에 LPS (200ng/ml)를 15분, 30분, 45분 동안 반응한다. 동량의 세포단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 PVDF 막에 옮긴 후, ERK, p-ERK 항체를 이용하여 표지한 후 확인하였다.
- [0074] 도 5에 도시된 바와 같이, 10분, 20분, 30분 동안 LPS에 의해 자극된 BV-2 세포에서 p38의 인산화가 증가된 반

면, hesperetin은 LPS에 의해 유도된 p38의 인산화를 억제하였음을 알 수 있다.

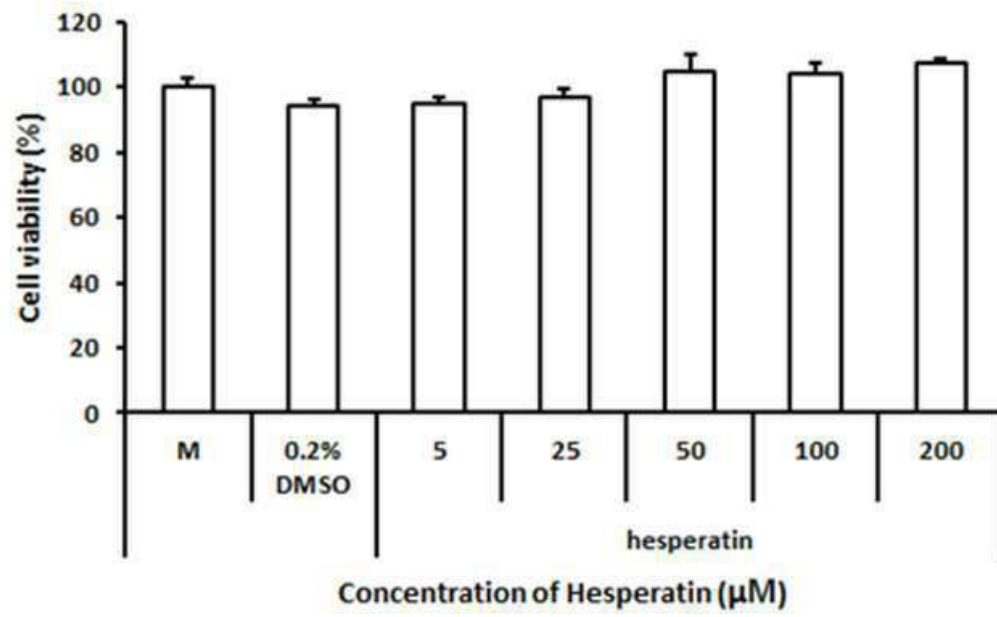
- [0075] 이상의 실험결과들을 통해 본 발명에서는 hesperetin이 NF- κ B 신호와 함께 p38 신호의 억제를 통해서 i-NOS와 COX-2의 mRNA 발현뿐만 아니라 i-NOS와 COX-2의 단백질 발현을 감소시켰으며, i-NOS에 의해서 합성된 NO 또한, 농도 의존적으로 감소시켰고 IL-6 및 TNF- α 의 생산을 억제함을 증명하였다.
- [0076] 또한, 현재까지 알려진 연구에서 p38, JNK, ERK를 포함한 MAPK는 LPS로 자극된 미세 아교 세포의 IL-6 및 TNF- α 의 생산에 필수적인 역할을 한다고 보고되었으며, 여러 연구들에서 p38의 활성이 IL-6 및 TNF- α 의 생산에 중요하다고 보여주었다.
- [0077] 한편, 중추 신경계에서의 신경 염증은 미세 아교 세포나 성상교세포에서 생산하는 사이토카인(IL-1 β , IL-6, TNF- α), 케모카인(CCL2, CCL5, CXCL1), 이차 전달물질(NO and PGE₂)에 의해서 매개되는 염증성 반응을 의미하고, 뉴런과 신경 아교 세포(성상교세포, 미세 아교 세포)는 뇌 손상 동안 NF- κ B를 활성화시킨다. 뉴런에서의 활성화된 NF- κ B는 항 세포사멸의 유전자 산물이나 단백질을 유발시키며, 시냅스 가소성을 조절하는 데에 연관이 있다. 신경 아교 세포의 NF- κ B 활성화는 신경독, 뉴런에게 독이 되는 활성산소, 전염증성 사이토카인들을 생산한다.
- [0078] 따라서, 본 발명을 통해 LPS로 유도된 NF- κ B의 인산화는 hesperetin에 의해서 감소되었고, hesperetin은 NF- κ B 신호와 함께 p38 신호를 통해서 전염증성 매개자들을 감소시킨다는 것이 증명된 이상, hesperetin이 퇴행성 신경질환에서 신경 염증을 조절하여 퇴행성 신경질환의 예방 및 증상 개선을 위한 새로운 약학조성물은 물론 기능성 식품 소재로 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0079] 본 발명은 이상에서 살펴본 바와 같이 바람직한 실시 예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시 예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능할 것이다.

도면

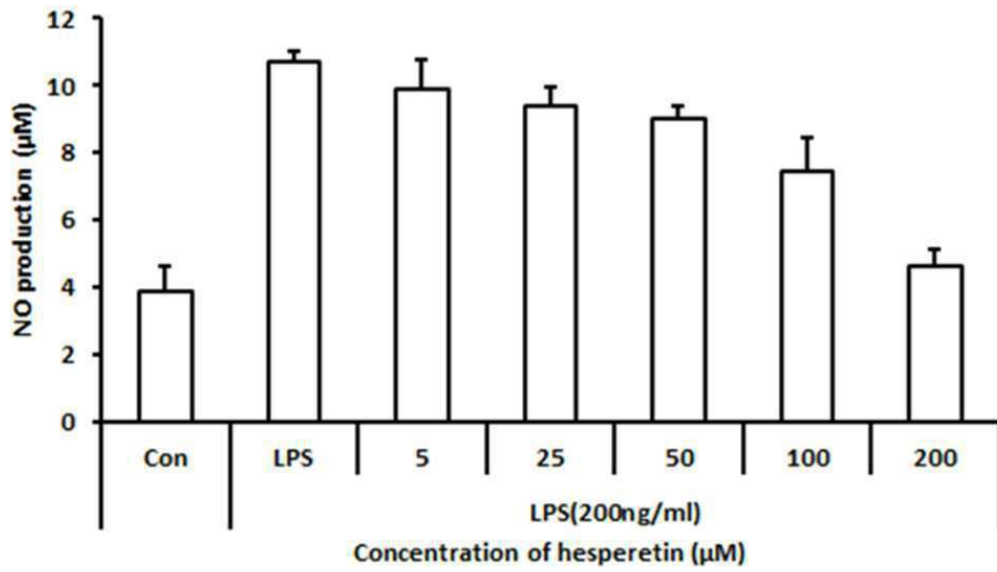
도면1a



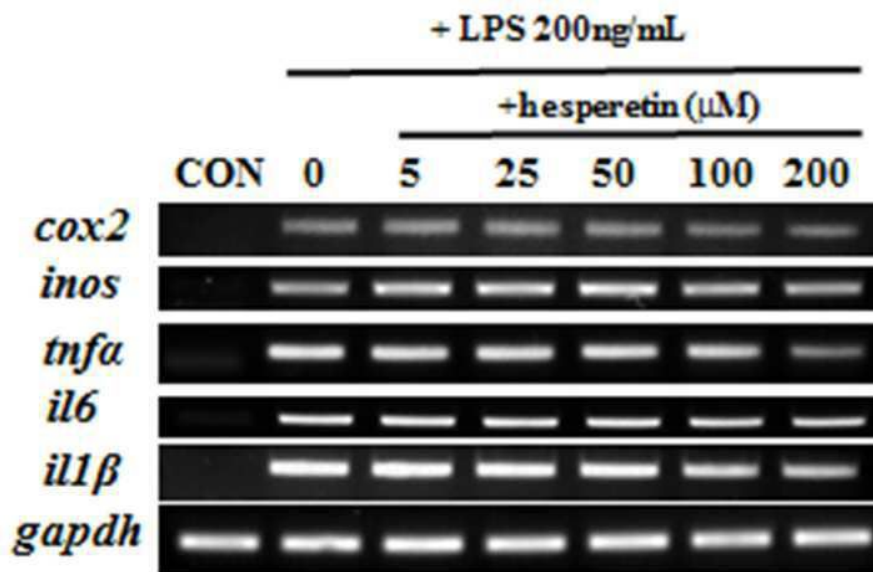
도면1b



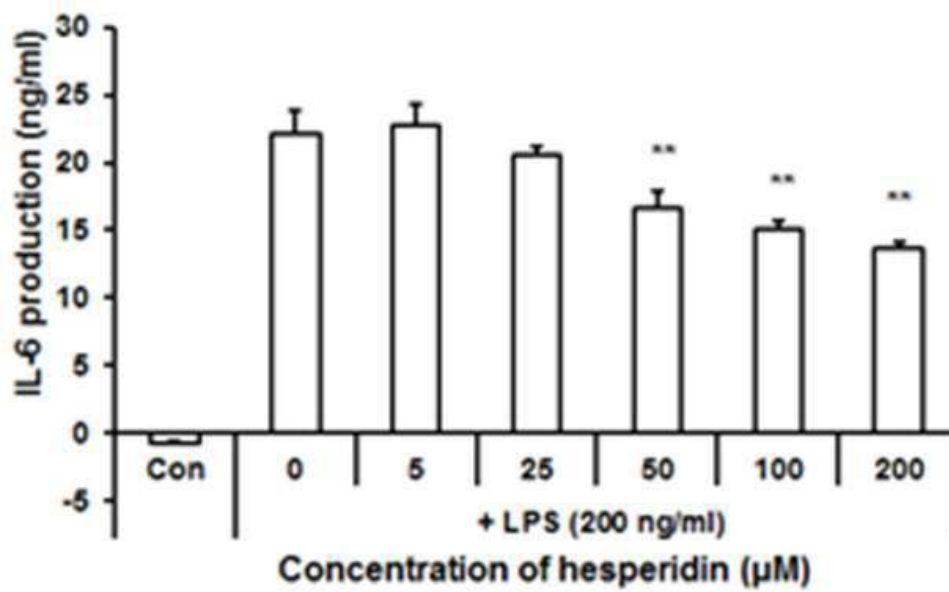
도면2



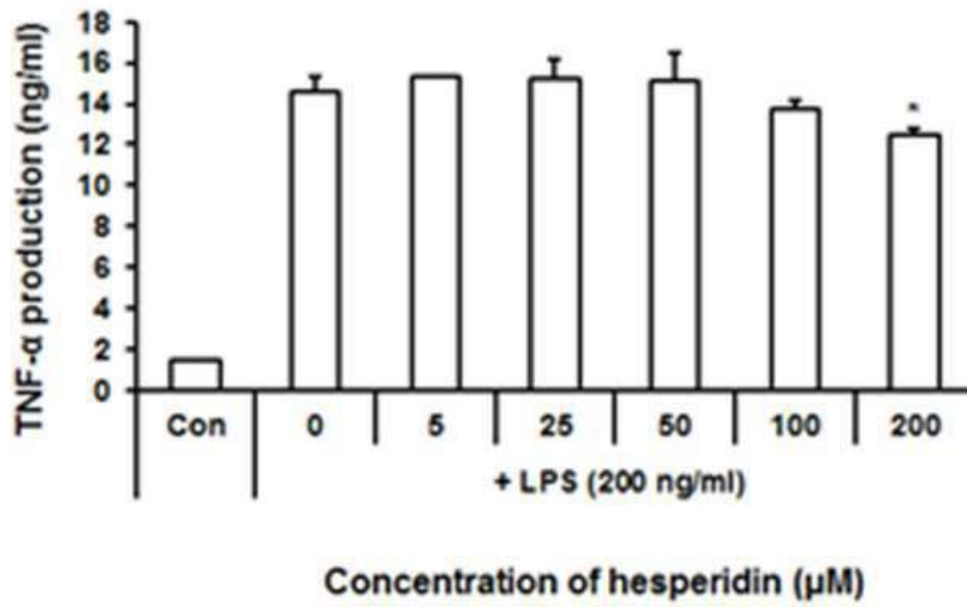
도면3



도면4a



도면4b



도면5

