



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0048154
(43) 공개일자 2008년06월02일

(51) Int. Cl.

A61K 31/385 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0118149

(22) 출원일자 2006년11월28일

심사청구일자 2006년11월28일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

김원기

서울시 도봉구 도봉2동 87번지 삼환아파트 4동 405호

이재철

서울시 도봉구 도봉2동 87번지 삼환아파트 2동 507호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

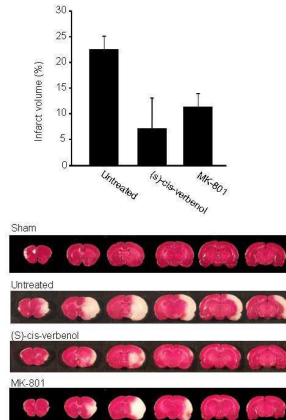
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) (S)-시스-베르베놀을 포함하는 허혈성 뇌졸중 예방 또는치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 (S)-시스-베르베놀을 포함하는 허혈성 뇌졸중 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 중대뇌동맥 폐쇄/재관류에 의한 허혈성 뇌조직 손상에 대한 뇌보호 효과를 나타내고, 자유산소기 생성을 억제하며, TNF-알파와 인터루킨 1 베타와 같은 교세포 활성화에 작용하는 사이토카인의 발현을 억제함으로써 신경세포의 사멸을 억제한다. 따라서, 본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 허혈성 뇌졸중의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있을 뿐만 아니라 뇌손상을 치료하는 뇌보호제로도 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

최인영

서울시 용산구 이촌1동 한가람아파트 218-503

전향숙

서울시 서초구 잠원동 57번지 1-1305호

장현주

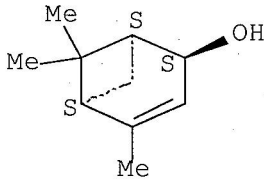
서울시 송파구 신천동 장미아파트 26동 103호

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 (S)-시스-베르베놀을 포함하는 허혈성 뇌졸중 예방 또는 치료용 약학 조성물.

<화학식 1>



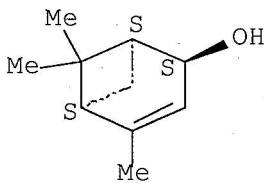
청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 (S)-시스-베르베놀은 술잎으로부터 추출·분리된 것임을 특징으로 하는 허혈성 뇌졸중 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 (S)-시스-베르베놀을 포함하는 허혈성 뇌졸중 예방에 유용한 식품 조성물.

<화학식 1>



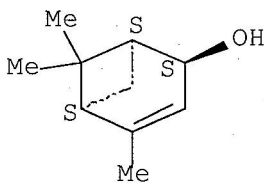
청구항 4

청구항 4에 있어서, 상기 (S)-시스-베르베놀은 술잎으로부터 추출·분리된 것임을 특징으로 하는 뇌졸중 예방에 유용한 식품 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 (S)-시스-베르베놀을 포함하는 뇌보호제.

<화학식 1>



명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<8> 본 발명은 (S)-시스-베르베놀을 포함하는 허혈성 뇌졸중 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

- <9> 뇌졸중(stroke)은 흔히 '중풍'으로 알려져 있으며, 뇌에 혈액을 공급하고 있는 혈관이 막히거나 터짐으로써 그 부분의 뇌가 손상되어 급작스런 뇌혈류 장애에 의한 의식소실, 반신마비, 언어장애 등의 국소적 신경장애 증상을 일으킨 상태를 일컫는다.
- <10> 뇌졸중은 크게 허혈성 뇌졸중(ischemic stroke)과 출혈성 뇌졸중 (hemorrhagic stroke)으로 구분된다. 허혈성 뇌졸중은 뇌조직으로 가는 혈액 공급의 감소 혹은 차단으로 뇌조직이 허혈상태가 되어 발생하며, 출혈성 뇌졸중은 혈관이 터져 뇌조직으로 출혈을 일으켜 발생한다. 즉, 원인에 따라 뇌혈관이 막혀서 생기는 뇌경색(cerebral infarction)과 반대로 뇌혈관이 터져서 발생하는 뇌출혈 (cerebral hemorrhage)로 구분되며, 뇌출혈은 다시 고혈압성 뇌내출혈 (intracerebral hemorrhage)과 뇌혈관이 파리모양의 변형을 일으켜 발생하는 뇌동맥류(cerebral aneurysm) 파열에 의한 뇌지주막하 출혈(subarachnoid hemorrhage, SAH)로 구분된다. 또한, 뇌경색은 뇌혈전증(뇌혈관에 혈전이 형성되어 혈관을 막는 것)과 뇌색전증(뇌혈관의 혈전조각이나 심장이상으로 인한 피떡이 머리 혈관으로 흘러들어가 혈관을 막는 것)으로 구분된다. 그밖에 소경색(아주 작은 뇌혈관이 막히는 것), 뇌염증 등으로 인한 혈관염, 선천성 혈관기형장애로 인한 뇌졸중 등이 있다.
- <11> 통계청에 의하면, 뇌졸중은 심장질환, 암 다음의 사인이 되며, 우리나라의 45세 이상의 남녀에게서 단일질환으로서 주된 사망원인이며, 10만명 당 75.5명으로 높은 수치를 나타내고 있다. 이 중에서 허혈성 뇌졸중은 전체 뇌졸중 환자의 약 80% 정도를 차지한다.
- <12> 뇌졸중은 뇌의 어느 부위에서나 발생할 수 있으므로 신체의 거의 모든 기능에 장애를 초래할 수 있다. 또한 발생하는 뇌손상은 손상의 정도와 위치에 따라 결정되는데, 뇌졸중에 의한 심각한 뇌손상의 경우 운동, 감각기능의 손상 및 기억, 학습, 연산, 추리 등 고차원적 기능을 저해하며, 중풍, 지능 박약, 학습 장애, 간질 등과 같은 심각한 후유증을 유발시킨다. 또한 뇌졸중에서 회복된다 하여도 대부분의 경우 후유장애를 남기기 때문에 이에 관계되는 사회적, 경제적 손실은 지대하여 연간 70억 달러에 이른다.
- <13> 현대 사회의 고령화 추세로 인해 노인 인구의 급속한 증가는 뇌졸중 발생률을 증가시키며 발생 후 환자의 생존기간 증가를 야기하므로 환자 본인과 그 가족들에게 정신적, 육체적 고통을 유발한다. 따라서 뇌졸중과 같은 퇴행성 뇌질환은 여러 가지 사회적 문제를 야기하는 주된 요인으로 대두되고 있다.
- <14> 뇌졸중 및 각종 뇌손상 등의 신경 질환 시, 중추신경계 내에서는 흥분성 아미노산 수용체의 과도한 흥분과 세포 내 칼슘의 축적, 단백질 합성의 저해, 유전자 발현 이상 및 신경 교세포의 면역반응 활성화, 세포막과 지질의 산화에 따른 다양한 자유산소기의 발생이 나타나며, 이러한 세포 내 변화는 신경세포의 사고사인 괴사(necrosis)나 자발적 세포 사멸인 아포토시스(apoptosis)를 유도하게 된다. 이러한 이유로 인하여 지난 수십 년 동안 뇌질환을 치료하고자 하는 많은 노력은 신경세포의 사멸에 대한 기전을 연구하고 이를 억제하는 방법을 찾는 데 기울어져 왔다. 하지만 아직까지 복잡한 손상 기전을 지닌 뇌신경 세포의 효과적인 보호 약물은 개발되지 못하고 있다.
- <15> 상기 다양한 세포 내 변화 중 자유산소기의 급격한 증가는 신경퇴행을 야기하는 주요 원인 중의 하나로 알려져 있고, 이들은 단백질과 지질의 산화를 이끌고 미토콘드리아의 전자 전달 체계의 억제를 통해 에너지원의 생성을 감소시키며 탈아미노화 반응(deamination) 및 닉(nick)과 같은 DNA 가닥 손상을 유발하므로, 결과적으로 세포 사멸을 이끌게 된다. 앞에서 언급한 다양한 방법으로 세포에 독성을 유발하는 자유산소기는 특히 뇌의 경우 더 유해하다. 먼저 뇌는 다른 생체 기관보다 높은 산소 소모율을 지니므로 산소의 사용에 의해 생산되는 산화독소인 자유산소기의 양 또한 증가하게 된다. 또한 뇌는 철과 아스코르브산(ascorbic acid)의 농도가 높고 불포화 지방산이 많은 조직이므로 쉽게 자유산소기를 생산하고 자발적 자유산소기의 증폭을 이끈다. 상기와 같은 이유들로 허혈성 뇌졸중에서 증가하는 자유산소기는 뇌의 신경 손상에 중요 인자로 작용한다. 따라서 자유산소기의 생성 억제와 자유산소기의 산화력 제거는 뇌신경 세포의 손상을 억제하고 보호한다는 다양한 보고가 있다(Free Radical Biology and Medicine Volume 38, Issue 4, 15 February 2005, Pages 411-425, Zhao B. Mol Neurobiol. 2005 Feb; 31(1-3):283-94, Zhang B. et al; Neuroscience Volume 126, Issue 2, 2004, Pages 433-440).
- <16> 또한, 중추신경계는 약 10%의 신경세포와 90%의 교세포로 이루어져 있고, 뇌졸중을 포함한 다양한 종류의 퇴행성 신경질환에서 교세포의 활성화가 관찰된다. 특히 뇌졸중의 경우 교세포의 활성화가 매우 빠른 시간 내에 일어나고, 허혈성 뇌졸중의 경우 발병 후 수 시간 내에 소교세포의 활성화가 관찰되며, 수십 시간 후에 정상세포의 활성화가 관찰되고, 이는 수개월간 유지되기도 한다.
- <17> 따라서, 뇌혈류를 원상 회복시킬 수 있도록, 뇌혈관의 폐색을 막을 수 있는 항응고제, 항혈소판제 또는 혈전용

해제 등이 뇌졸중 치료제로 사용되고 있다. 그 일 예로, 이부프로펜 등과 같은 소염제가 노용균 반점의 형성을 억제하며 치매 발병을 예방할 수 있다고 보고되어 있다[Weggen, S. 등, *Nature*, 414:212-216 (2001); Wyss-Coray, T. 및 Mucke, L., *Nat. Med.*, 6:973-974 (2000); Lim, G. P. 등, *J. Neurosci.*, 20:5709-5714 (2000)].

<18> 또한, 휴에트(Hewette) 등은 활성화된 교세포가 신경세포의 사멸에 영향을 미칠 수 있다는 것을 발견하였다 [Hewett, S.J. 등, *Neuron*, 13:487-494 (1994); Hewett, S.J. 등, *Stroke*, 27:1586-1591(1996)]. 활성화된 교세포는 세포독성을 유발할 수 있는 TNF-알파, 인터루킨 등과 같은 염증 유발 인자인 사이토카인 (cytokine)의 생성을 증가시켜 신경세포와 교세포에 대해 독성을 증가시킨다.

<19> 따라서, 신경세포의 사멸과 기능의 저하를 억제하기 위하여, 자유산소기의 생성 억제와 교세포의 활성화를 유도하는 물질의 생성을 억제하면 뇌졸중을 포함한 다양한 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료에 매우 효과적일 것이라 생각된다.

<20> 이에, 본 발명자들은 신경세포의 사멸과 기능의 저하를 억제하기 위하여 자유산소기의 생성 억제와 교세포의 활성화를 유도하는 물질의 생성을 억제할 수 있는 물질에 대해 연구하던 중, (S)-시스-베르베놀이 자유산소기의 생성을 억제하고 교세포의 활성화를 유도하는 물질인 TNF-알파 및 인터루킨-1 베타의 생성을 억제함으로써 신경세포의 사멸을 억제하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

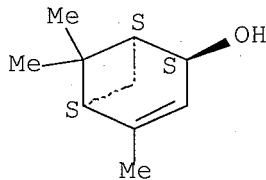
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<21> 본 발명은 (S)-시스-베르베놀을 포함하는 허혈성 뇌졸중 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

<22> 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 (S)-시스-베르베놀을 포함하는 허혈성 뇌졸중 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

화학식 1



<23>

<24> 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

<25> 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀은 술잎을 물, 알콜 또는 물과 알콜의 혼합용매에 첨가하여 실온에서 추출한다(5회 반복). 상기 추출액을 여과한 후 감압농축하고 동결 건조하여 술잎 추출물을 얻는다. 상기 물과 알콜의 혼합용매는 10 내지 100%의 메탄올 또는 10 내지 100%의 에탄올 중에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 100%의 메탄올이다.

<26> 상기 술잎 추출물에 정제수를 가하여 균일하게 현탁시킨 후, n-헥산, 에틸아세테이트, n-부탄올로 순차적으로 용매분획하여 술잎 n-헥산 분획물, 술잎 에틸아세테이트 분획물 및 술잎 n-부탄올 분획물을 각각 얻는다. 상기 술잎 분획물 중 산소-포도당 결핍 모델에서의 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과가 가장 우수한 술잎 n-헥산 분획물을 이동상 용매로 n-헥산:에틸아세테이트(3:1 ~ 0:1의 농도 구배)의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 10개의 소분획물(H1~H10)로 분리한다. 이 중 산소-포도당 결핍 모델에서의 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과를 보인 H2 소분획물을 이동상 용매로 n-헥산:에틸아세테이트(5:1)의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 5개의 소분획물 (H21~H25)로 분리한다. 이 중 산소-포도당 결핍 모델에서의 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과를 보인 H22 소분획물을 HPLC(n-헥산:에틸아세테이트=10:1)로 정제하여 활성물질인 (S)-시스-베르베놀을 얻는다.

<27> 본 발명의 조성물에서 유효성분인 (S)-시스-베르베놀은 술잎으로부터 추출·분리하여 사용하였으며, 다른 생약 재료로부터 추출·분리하거나 공지의 화학적인 합성 방법으로 제조하거나 또는 시판되고 있는 시약을 구입하여 사용할 수 있다. 또한, 미생물이나 세포를 이용하여 값싼 급원인 알파-피넨(α -pinene)으로부터 생전환에 의해 경

제적으로 생산하여 사용할 수도 있다.

- <28> 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀은 중대뇌동맥 폐쇄/재관류에 의한 허혈성 뇌조직 손상 정도를 50% 이상 감소시켜 뇌보호 효과를 나타내고, 자유산소기 생성을 억제하며, TNF-알파와 인터루킨 1 베타와 같은 교세포 활성화에 작용하는 사이토카인의 발현을 억제함으로써 신경세포의 사멸을 억제한다. 따라서, 본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 허혈성 뇌졸중의 예방 또는 치료에 유용한 의약품 및 건강식품으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 뇌손상을 치료하는 뇌보호제로도 유용하게 사용될 수 있다.
- <29> 또한, 본 발명의 교세포 활성화 억제 기전을 근거하여 (S)-시스-베르베놀은 치매, 파킨슨씨병, 간질, 근위축성 측삭경화증(amyotateral sclerosis, 루게릭씨병) 등에도 뇌보호제로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.
- <30> 본 발명의 조성물은 (S)-시스-베르베놀과 함께 허혈성 뇌졸중의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- <31> 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- <32> 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 상기 (S)-시스-베르베놀의 일일 투여량은 약 2~100 mg/kg, 바람직하게는 약 2~50 mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- <33> 본 발명의 조성물은 허혈성 뇌졸중의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- <34> 본 발명의 조성물은 허혈성 뇌졸중의 개선을 목적으로 건강식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 (S)-시스-베르베놀을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 (S)-시스-베르베놀을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- <35> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- <36> 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스 및 디사카라이드, 및 텍스트린, 시클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01~0.04 g, 바람직하게는 약 0.02~0.03 g 이다.
- <37> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이

일반적이다.

<38> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

<39> **실시예 1 : 술잎으로부터 활성물질의 분리**

<40> **1. 술잎 메탄올 추출물의 제조**

<41> 술잎을 깨끗이 씻고 건조한 후, 핸드믹서(hand mixer)로 곱게 마쇄하였다. 마쇄된 술잎 5kg을 80% 메탄올 10ℓ에 가하여 실온에서 추출하였다(5회 반복). 상기 추출액을 거름종이로 여과한 후 45℃에서 감압 농축하여 용매를 제거한 뒤 동결 건조하여 술잎 메탄올 추출물을 얻었다(400g).

<42> **2. 술잎 분획물의 제조**

<43> 상기 1에서 얻은 술잎 메탄올 추출물 400g에 정제수 200ml를 가하여 균일하게 현탁시킨 후, n-헥산, 에틸아세테이트, n-부탄올로 순차적으로 용매분획하여 술잎 n-헥산 분획물 50g, 술잎 에틸아세테이트 분획물 9g 및 술잎 n-부탄올 분획물 4g을 각각 얻었다.

<44> 하기 실험예 2에 따라 각각의 술잎 분획물의 산소-포도당 결핍 모델에서의 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과를 측정한 결과, 술잎 n-헥산 분획물에서 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과가 가장 우수하게 나타났다.

<45> **3. 술잎 n-헥산 분획물로부터 활성물질의 분리**

<46> 상기 2에서 제조한 술잎 n-헥산 분획물 50g을 이동상 용매로 n-헥산:에틸아세테이트(3:1 ~ 0:1의 농도 구배)의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 10개의 소분획물(H1~H10)로 분리하였다. 이 중 산소-포도당 결핍 모델에서의 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과를 보인 H2 소분획물(약 1g)을 이동상 용매로 n-헥산:에틸아세테이트(5:1)의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 5개의 소분획물(H21~H25)로 분리하였다. 이 중 산소-포도당 결핍 모델에서의 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과를 보인 H22 소분획물(약 135mg)을 HPLC(n-헥산:에틸아세테이트=10:1)로 정제하여 활성물질(38mg)을 얻었다.

<47> 상기 분리된 활성물질을 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, COSY, HMQC 및 HMBC와 같은 NMR 스펙트럼으로 분석하여, 4,6,6-트리메틸-비시클로[3.1.1]헵트-3-엔-2-올 [(S)-시스-베르베놀, (S)-cis-verbenol]로 동정하였다.

<48> 상기 분리된 활성물질의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼은 도 1a 내지 도 1b에 나타내었다.

<49> **실험예 1 : 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 허혈성 뇌졸중 억제 효과 (in vivo)**

<50> 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 허혈성 뇌졸중 억제 효과를 알아보기 위하여, 흰쥐의 중뇌대동맥 폐색/재관류 모델을 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<51> 본 방법은 나일론 필라멘트를 내경동맥(internal carotid artery)으로 삽입하여 중뇌대동맥을 폐쇄(occlusion)시킨 후, 다시 필라멘트를 제거함으로써 재관류(reperfusion) 시키는 방법이다. 즉, Sprague-Dawley 흰쥐(오리엔트, 한국)를 이용하여 중뇌대동맥 폐색을 120분 동안 실시하고, 다시 재관류를 24시간 동안 실시하여 허혈성 뇌졸중을 유발시켰다. 이러한 조건에서 상기 실시예 1에서 제조한 (S)-시스-베르베놀(100mg/kg)을 복강 내 2번 주사하여 허혈성 뇌졸중에 대한 효과를 확인하였다. 중뇌대동맥의 재관류 후 24시간에 동물을 치사시켜 뇌를 적출하고, 뇌 매트릭스(brain matrix)를 이용하여 2mm 두께로 뇌절편(brain slice)을 만든 다음, 2,3,5-트리페닐 테트라졸륨 클로라이드(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 염색법을 이용하여 염색한 다음, 뇌경색 부위를 영상분석 시스템을 이용하여 분석하였다. 허혈에 의한 경색면적은 전체 뇌부피에 대한 비율(%)로 나타내었다.

<52> 양성 대조군으로 흥분성 신경독성 억제제인 NMDA 수용체 차단제 MK-801 {(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate}을 사용하였다.

<53> 결과는 도 2 및 표 1에 나타내었다.

표 1

<54> (S)-시스-베르베놀의 중뇌대동맥 폐쇄/재관류에 의한 허혈성 뇌조직 손상에 대한 뇌보호 효과

군	경색면적 (%)
음성 대조군	22.66±2.62
(S)-시스-베르베놀	7.34±5.89
양성 대조군(MK-801)	7.96±4.12

<55> 도 2에 나타난 바와 같이, 중뇌대동맥 폐쇄/재관류 손상 모델 뇌의 뇌경색 부위에서 TTC 염색에 의한 붉은색 색상이 약해졌고, 이 뇌경색 부위에 본 발명의 (S)-시스-베르베놀을 처리하였을 때 TTC 염색에 의한 붉은색 색상이 강해졌다.

<56> 또한 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 중뇌대동맥 폐쇄/재관류에 의한 허혈성 뇌조직 손상 정도를 50% 이상 감소시켜 뇌보호 효과를 나타내었으며, 양성 대조군(MK-801)과 유사하게 허혈성 뇌조직 손상을 억제함을 확인하였다.

<57> **실험예 2 : 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 산소-포도당 결핍 모델에서의 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과 (in vitro)**

<58> 본 발명의 (S)-시스-베르베놀의 산소-포도당 결핍(deprivation of oxygen and glucose, OGD) 모델에서의 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<59> 배아 17~18일된 흰쥐에서 대뇌 피질 신경세포(cerebral cortical neuron)를 분리한 뒤, 라미닌과 폴리디라이신으로 코팅된 24웰 플레이트에 웰당 50만개의 세포를 분주하였다. 7일 동안 배양한 후 교세포의 증식을 막기 위해 아라비노사이드 5 μM 을 12시간 동안 처리하였고, 1주일에 두 번 배양액을 교체해주었다. 실험은 세포 분주 후 14~16일 사이에 수행하였다. 세포 배양액은 포도당이 결핍된 실험배지로 교체하여 혐기성 소실로 이동시켜 1시간 동안 놓아둔 후, 20 mM 포도당이 첨가된 실험배지로 교체하여 호기성 배양실로 옮겼다. 상기 실험 과정 중 산소와 포도당이 없는 조건은 생체 내(in vivo)에서 중뇌대동맥 폐쇄와 같은 영향을 주고, 포도당이 첨가된 배양액에서 호기성 배양실로 옮겨지는 과정은 재관류에 해당되는 뇌세포 손상을 의미한다. 재관류 상태 돌입 후 6시간에 신경세포의 사멸은 광학적 관찰과 락테이트 디하이드로게나제(lactate dehydrogenase, LDH) 활성 분석을 통하여 세포 사멸 정도를 비교하였다 (Choi, J. J. 및 Kim, W. K., *J. Neurosci. Res.*, 54:870-875 (1998)).

<60> 결과는 도 3에 나타내었다.

<61> 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 10 μM 농도에서 LDH의 양이 30% 정도로 나타나 산소-포도당 결핍에 의한 뇌세포 사멸 정도를 현저하게 감소시킴을 확인하였다.

<62> **실험예 3 : 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 교세포 활성화 억제 효과 (in vitro)**

<63> 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 교세포 활성화 억제 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 기전연구를 수행하였다.

<64> **1. (S)-시스-베르베놀의 교세포 활성화 상태에서 발생하는 자유산소기 생성 억제 효과**

<65> 교세포 활성화를 유도하기 위하여 대뇌 교세포 배양 후, 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide, LPS)와 인터페론-감마(interferon-gamma)를 처리하여 임의적인 면역 촉진 반응을 유도한 후, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<66> 태어난 후 1일 짜인 흰쥐에서 대뇌 피질 교세포(mixed glia)를 분리하여 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 폴리디라이신으로 코팅된 75 cm^2 의 플라스틱 병에서 일주일 동안 배양한 후, 트립신을 처리하여 교세포를 분리하고, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 폴리디라이신으로 코팅된 24웰 플레이트에 웰당 1만개의 세포를 분주하였다. 1주일에 두 번 배양액을 교체해주고, 실험은 세포 분주 후 7~9일에 수행하였다. 인터페론 감마(100 Unit/ ml)와 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 1일 동안 세포에 처리하여 교세포를 활성화시켰고, 상기 실시예 1에서 제조한 (S)-시스-베르베놀을 활성화 전 30분에 처리하여 활성화 동안 유지시켰다. 그 후 PBS에 녹여진 30 μM 디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트(dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCF-DA)를 각 웰에 처리한 후 실온에서 10분 놓아두고 생성된 자유산소기에 의해 형광을 나타내는 DCF-DA를 형광 마이크로플레이트 리더를 이용하여 측정하였다. 사용한 형광 염색 물질(DCF-DA)은 세포 내 유입이 가능한 물질로서, 세포 내의 산화 과정을 통해 생성된 자유산소기에 의해 아세테이트 그룹이 유리된 후 발광하는 특성을 지니므로 세포 내에 생성된 자유산소기의 정도를 측정하는 방법으로

사용된다.

<67> 결과는 도 4에 나타내었다.

<68> 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 10 μ M 농도에서 자유산소기 생성을 억제하였다.

<69> 2. 활성화된 교세포에서 (S)-시스-베르베놀에 의한 다양한 사이토카인의 유전자 발현 정도

<70> 상기 1에 기재된 과정에 따라 교세포 활성화를 유도한 후, 트라이 졸 용액을 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 각 조건에 맞추어 추출된 RNA 동량(1 μ g)과 올리고 dT 프로브, 역전사 효소를 사용하여 mRNA를 cDNA화 하였고, 그 후 다양한 프로사이토카인(염증 유발 인자로서 교세포 활성화에 작용)과 안티사이토카인(항염증 인자)의 유전자 특이성 프라이머를 제작하여 사이토카인들의 유전자 발현 정도를 비교하였다.

<71> 결과는 도 5에 나타내었다.

<72> 도 5에 나타난 바와 같이, 인터페론 감마와 LPS로 처리하여 활성화된 교세포에서 증가된 프로사이토카인의 유전자 중 특히 TNF-알파와 인터루킨 1 베타가 본 발명의 (S)-시스-베르베놀 10 μ M 처리에 의해 유전자의 발현 정도를 현저히 감소하였다. 반면, 안티사이토카인 유전자인 TGF 베타와 인터루킨 10의 경우 유전자 발현 정도가 다소 증가하거나 변화가 나타나지 않았다.

<73> 3. TNF-알파와 인터루킨 1 베타의 단백질의 발현량 측정

<74> 상기 2에서 역전사 효소 연쇄 반응 실험(reverse transcription polymerase chain reaction)을 통해 (S)-시스-베르베놀이 교세포 활성화 유발인자로 알려진 TNF-알파와 인터루킨 1 베타의 유전자 발현 억제 효과가 있음을 확인하였다.

<75> 따라서 유전자 발현의 최종산물로서 실질적인 교세포 활성화 반응을 유도하는 단백질의 양적인 변화를 확인할 필요가 있으므로, 병소 감염 진단 테스트 (enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하였다.

<76> 결과는 도 6에 나타내었다.

<77> 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 10 μ M 농도에서 TNF-알파와 인터루킨 1 베타와 같은 사이토카인의 단백질 발현량을 현저하게 감소시켰다.

<78> 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

<79> 제제예 1 : 약학적 제제의 제조

<80> 1. 산제의 제조

<81> (S)-시스-베르베놀 2 g

<82> 유당 1 g

<83> 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<84> 2. 정제의 제조

<85> (S)-시스-베르베놀 100 mg

<86> 옥수수전분 100 mg

<87> 유 당 100 mg

<88> 스테아린산 마그네슘 2 mg

<89> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<90> 3. 캡슐제의 제조

<91> (S)-시스-베르베놀 100 mg

<92> 옥수수전분 100 mg

<93> 유 당 100 mg

<94> 스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

제제예 2 : 식품의 제조

본 발명의 (S)-시스-베르베놀을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

1. 조리용 양념의 제조

(S)-시스-베르베놀 20~95 중량%로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

2. 토마토 케찹 및 소스의 제조

(S)-시스-베르베놀 0.2~1.0 중량%를 토마토 케찹 또는 소스에 첨가하여 건강 증진용 토마토 케찹 또는 소스를 제조하였다.

3. 밀가루 식품의 제조

(S)-시스-베르베놀 0.5~5.0 중량%를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

4. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

(S)-시스-베르베놀 0.1~5.0 중량%를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

5. 그라운드 비프(ground beef)의 제조

(S)-시스-베르베놀 10 중량%를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

6. 유제품(dairy products)의 제조

(S)-시스-베르베놀 5~10 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

제제예 3 : 음료의 제조

1. 탄산음료의 제조

설탕 5~10%, 구연산 0.05~0.3%, 카라멜 0.005~0.02%, 비타민 C 0.1~1%의 첨가물을 혼합하고, 여기에 79~94%의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 85~98℃에서 20~180 초간 살균하여 냉각수와 1:4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5~0.82%를 주입하여 본 발명의 (S)-시스-베르베놀을 함유하는 탄산음료를 제조하였다.

2. 건강음료의 제조

액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 (S)-시스-베르베놀을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

3. 야채주스의 제조

(S)-시스-베르베놀 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

4. 과일주스의 제조

(S)-시스-베르베놀 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

발명의 효과

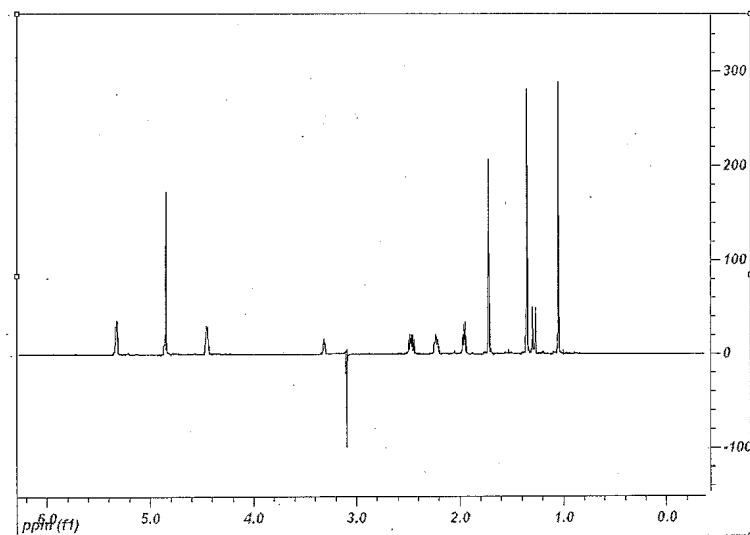
본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 중대뇌대동맥 폐쇄/재관류에 의한 허혈성 뇌조직 손상에 대한 뇌보호 효과를 나타내고, 자유산소기 생성을 억제하며, TNF-알파와 인터루킨 1 베타와 같은 교세포 활성화에 작용하는 사이토카인의 발현을 억제함으로써 신경세포의 사멸을 억제한다. 따라서, 본 발명의 (S)-시스-베르베놀은 허혈성 뇌졸중의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있을 뿐만 아니라 뇌손상을 치료하는 뇌보호제로도 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

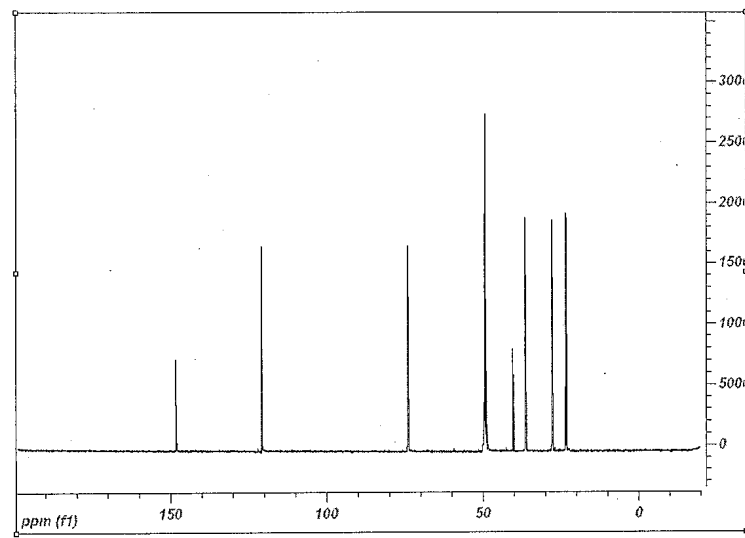
- <1> 도 1a는 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <2> 도 1b는 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- <3> 도 2는 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 중대뇌동맥 폐쇄/재관류에 의한 허혈성 뇌조직 손상에 대한 뇌보호 효과를 나타낸 도이다.
- <4> 도 3은 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 산소-포도당 결핍(deprivation of oxygen and glucose, OGD)에 의한 대뇌 피질 신경세포 사멸 억제 효과를 나타낸 도이다.
- <5> 도 4는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)와 인터페론-감마 (interferon-gamma)로 처리한 대뇌 피질 교세포 활성화 모델에서 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀의 자유산소기 생성 억제 효과를 나타낸 도이다.
- <6> 도 5는 리포폴리사카라이드와 인터페론-감마로 처리한 대뇌 피질 교세포 활성화 모델에서 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀에 의한 다양한 사이토카인의 유전자 발현 정도를 나타낸 도이다.
- <7> 도 6은 리포폴리사카라이드와 인터페론-감마로 처리한 대뇌 피질 교세포 활성화 모델에서 본 발명에 따른 (S)-시스-베르베놀에 의한 TNF-알파와 인터루킨 1 베타 사이토카인의 단백질 발현량을 나타낸 도이다.

도면

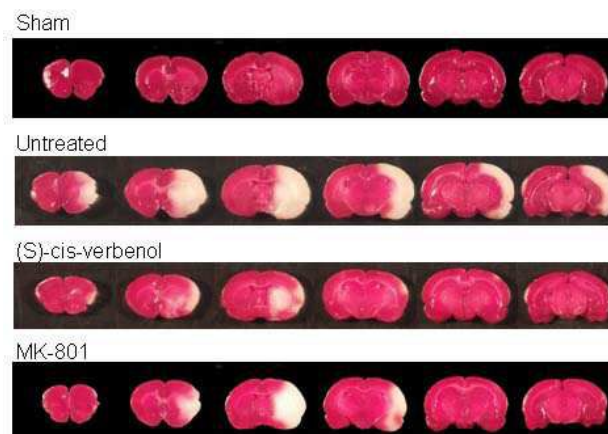
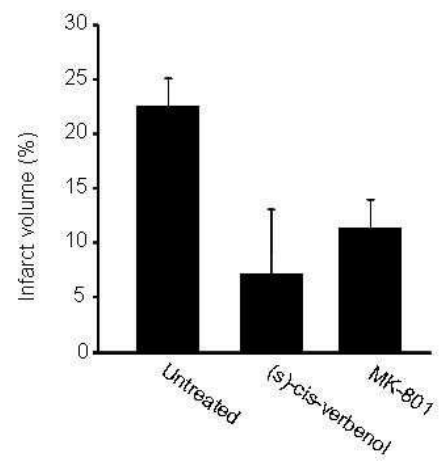
도면1a



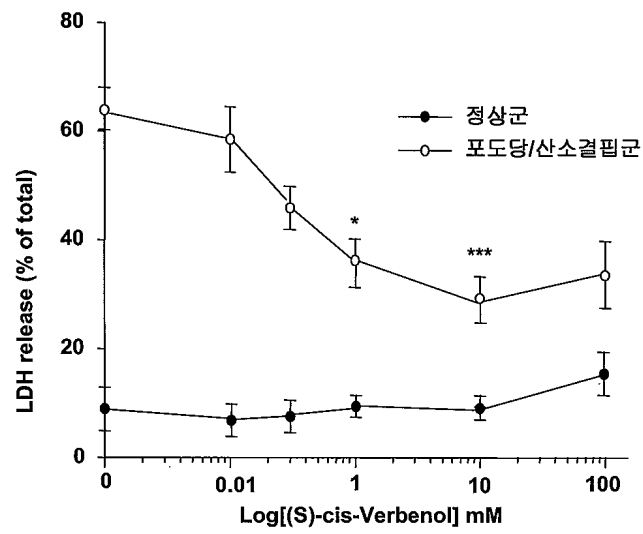
도면1b



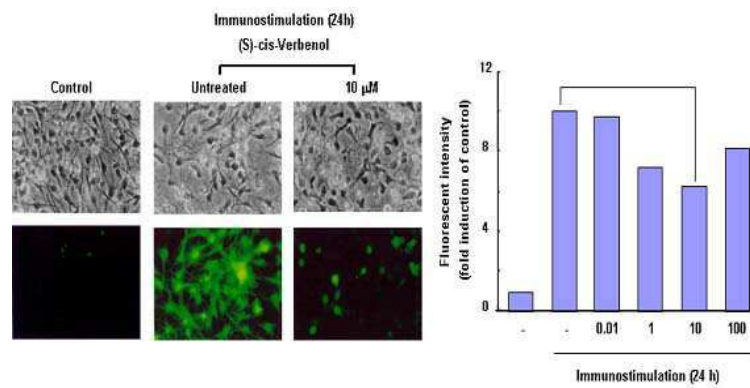
도면2



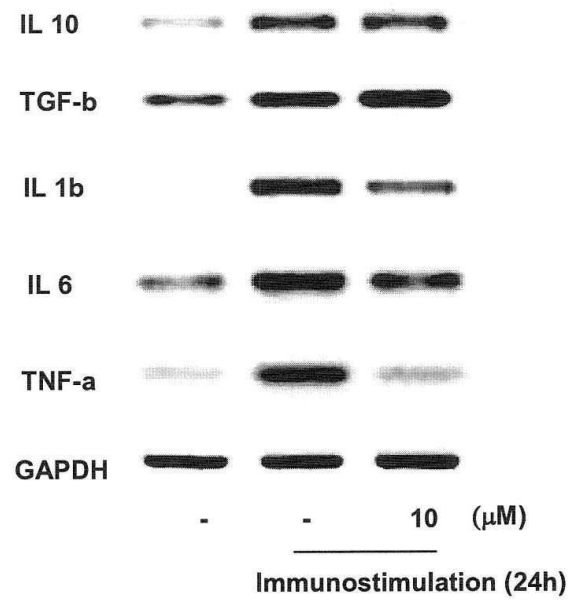
도면3



도면4



도면5



도면6

