

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 9 월 27 일 (27.09.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/128576 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/37 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)
A61K 36/484 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002087
- (22) 국제출원일: 2012 년 3 월 22 일 (22.03.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0025518 2011 년 3 월 22 일 (22.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울시 관악구 신림동 산 56-1, 151-015 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김재균 (KIM, Jae Kyoon)** [KR/KR]; 서울시 서초구 방배 3 동 임광아파트 3-203, 137-063 Seoul (KR). **김지영 (KIM, Ji Young)** [KR/KR]; 서울시 강남구 논현동 212-13 월드메르디앙 501 호, 135-010 Seoul (KR). **임순성 (LIM, Soon Sung)** [KR/KR]; 강원도 춘천시 퇴계동 916-3 그린타운아파트 102-805, 200-752 Kangwon-do (KR). **이기원 (LEE, Ki Won)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 정자동 24 분당인텔리지 2 C-60, 463-010 Gyeonggi-do (KR). **이형주 (LEE, Hyong Joo)** [KR/KR]; 서울시 서초구 방배동 1008-2 래미안방배아트힐 109-1302, 137-060 Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인태동 (TAEDONG INTERNATIONAL PATENT&LAW); 서울시 구로구 구로동 97-3 대림오피스밸리 302 호, 152-841 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING LOWER OR DAMAGED COGNITIVE FUNCTION CONTAINING DEHYDROGLYASPERIN C TYPICALLY FOUND IN LICORICE

(54) 발명의 명칭 : 감초에 주로 함유되어 있는 데하이드로글리아스페린 C 를 유효성분으로 함유하는 인지 기능의 저하 또는 손상을 치료하기 위한 조성물

(57) Abstract: Provided are a pharmaceutical composition and a food composition, which can be utilized to protect brain cells and improve cognitive function, due to the confirmed activity of dehydroglyasperin C, which is one licorice ethanol extract, for suppressing neuronal apoptosis.

(57) 요약서: 감초의 에탄올 추출물 중 하나인 데하이드로글리아스페린 C 가 신경세포의 사멸을 억제하는 것으로 확인되어, 뇌세포를 보호하고 인지기능을 개선하기 위해 활용할 수 있는 조성물로서 약학 조성물 및 기능성 식품 조성물 제공한다.



WO 2012/128576 A2

명세서

발명의 명칭: 감초에 주로 함유되어 있는 테하이드로글리아스페린 C를 유효성분으로 함유하는 인지 기능의 저하 또는 손상을 치료하기 위한 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 신경세포의 사멸을 억제하고 신경보호효능을 가지는 인지 기능의 저하 또는 손상을 치료하기 위한 화합물 및 이를 함유하는 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 염증 반응에 의한 인지 기능의 저하 또는 손상은 치매와 같은 퇴행성 신경 질환에서 많이 보여지고 있다. 염증 반응은 인체가 외부 혹은 내부에서의 해로운 자극에 반응하여 그 자극을 줄여주기 위한 시스템 면역 반응이다. 하지만 과도한 스트레스, 질병 혹은 노화 등에 의해 염증 반응의 조절에 문제가 생기면 여러 질병의 원인으로 작용하기도 한다. 그 중 두뇌와 중추신경계에서의 과도한 염증반응은 많은 퇴행성 신경 질환의 원인이 되며 두뇌의 인지기능과도 밀접히 관련되어 인지 기능의 저하 또는 손상을 일으키는 것으로 보고되었다 (Raymond L. Ownby, Neuroinflammation and Cognitive Aging, Curr Psychiatry Rep, 12, pp.39-45, 2010).
- [4] 신경 염증의 대표적 현상으로서, 중추신경계 내에 존재하는 소신경교세포는 과도하게 활성화되면 다양한 염증성 독성물질들을 분비하는데, 이 염증성 독성물질들은 신경세포를 손상시키고 사멸시키며, 더 나아가 뇌조직을 손상시킨다. 한 예로, 치매 유발 단백질인 베타아밀로이드는 NF-B를 활성화시켜 human macrophages와 astrocytes에서 염증반응에 관여하는 사이토카인의 분비를 촉진한다. 알츠하이머성 치매 환자의 뇌에는 interleukin-1 α / β (IL-1 α / β , IL-6, TNF-a와 같은 사이토카인의 농도가 높아져 있음이 보고되었다 (Akiyama H., Barger S., Barnum S. et al., Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiol, Aging 21, pp.383-21, 2000).
- [5] 염증성 사이토카인인 TNF-a의 경우 특히 뇌에 존재하는 소신경교세포(microglia)의 활성화에 의해 분비되며, 알츠하이머성 치매와 파킨슨씨병 등과 같은 퇴행성신경질환에 관여한다고 보고되었다. 또한, TNF-a는 알츠하이머성 치매의 주요한 원인일 것으로 생각되는 베타아밀로이드에 의해 생성이 촉진될 뿐 아니라 반대로 TNF-a가 베타아밀로이드의 축적을 유도한다고 알려지면서 베타아밀로이드와 TNF-a의 피드백 작용은 알츠하이머성 치매의 치료와 예방에서 매우 중요한 타겟으로 알려졌다. 특히, TNF-a의 과도한 분비는 대뇌 해마와 관련한 기억능력과 인지 기능의 저하를 유도한다는 사실이

확인되었다 (Park KM et al., Tumor necrosis factor- α mediated signaling in neuronal homeostasis and dysfunction, *Cell Signal*, 22, pp.977-83, 2010).

- [6] 한편, 예부터 한방 의학에서 많이 쓰이던 약재 중 하나인 감초는 플라보노이드를 비롯한 다양한 생리활성 물질들을 다량 함유하고 있으며, 항염증, 항산화, 항암 효과를 비롯하여, 폐양성 질환에 대한 보호 효과 역시 뛰어난 것으로 보고되었다 (Wang ZY, Nixon DW., *Licorice and cancer*, *Nutr Cancer*, 39, pp.1-11, 2001). 이에 따라 감초에 대한 많은 연구가 진행되었고 감초를 구성하고 있는 대표성분의 의약학적 연구가 진행되고 있으나, 감초 성분의 뇌 혹은 신경 관련 질환에 대한 효능 연구는 아직 시작 단계라고 할 수 있다.
- [7] 테하이드로글리아스페린 C는 감초의 에탄올 추출물로 시험관 내(in vitro) 세포 배양모델에서 Nrf2를 활성화시켜 항산화 효소인 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소(NQO1)의 발현을 증가시켜 세포 내 해독화 체계를 강화시키는 것으로 보고되었다 (Seo JY et al., *Dehydroglyasperin C isolated from licorice caused Nrf2-mediated induction of detoxifying enzymes*, *J Agric Food Chem*, 58, pp.1603-8, 2010).
- [8] 또한, 감초 및 테하이드로글리아스페린 C와 관련한 종래 특허 기술은 테하이드로글리아스페린 유도체를 유효성분으로 포함하는 NAD(P)H:퀴논 산화환원효소 유도용 조성물 및 그 용도 (특허실용 출원 번호 1020080109834), 감초 추출물을 포함하는 항산화 조성물 (특허실용 출원 번호 1020080001352), 구운 감초 추출물 또는 이로부터 분리한 화합물을 포함하는 혈당 강하용 조성물 (특허실용 출원 번호 1020060126305), 감초 폴리페놀 함유 수중유형 유화 조성물 (특허실용 출원 번호 1020087023255) 등이 있으나, 기억력 증진과는 관련이 없는 것들이다. 즉, 국내외를 막론하고 감초 및 테하이드로글리아스페린 C를 이용한 인지기능향상에 대한 건강 기능성 식품, 또는 약학적 조성물을 만드는 기술은 찾아볼 수 없었다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 이에 본 발명의 목적은 감초에 주로 함유되어 있는 테하이드로글리아스페린 C가 신경세포의 사멸을 억제하고 신경보호효능을 가짐을 확인하고, 인지 기능의 저하 또는 손상을 치료하기 위한 약품 조성물 또는 예방(개선)하기 위한 건강식품 조성물 형태로 개발하여 제공함에 있다.

[11]

과제 해결 수단

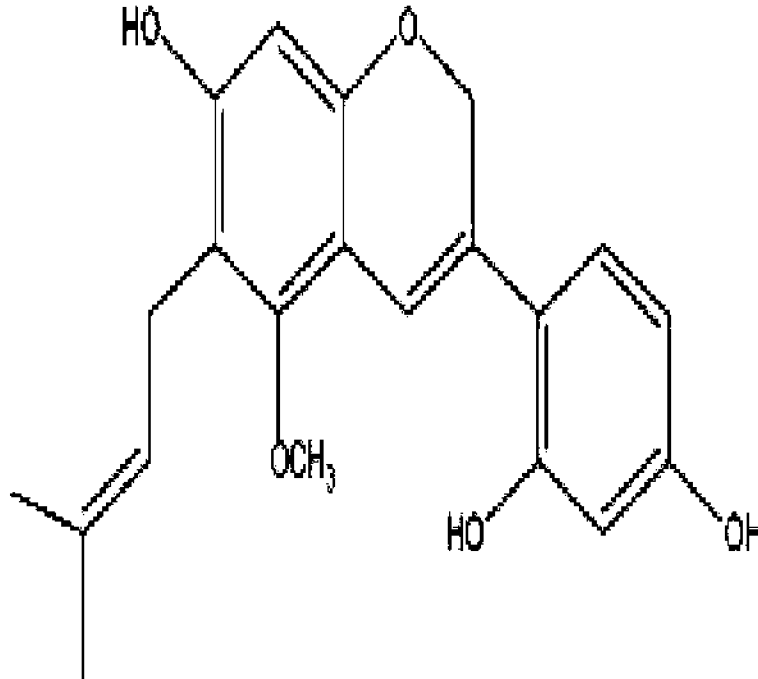
- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 감초의 에탄올 추출물 중 하나인 테하이드로글리아스페린 C가 신경세포의 사멸을 억제하는 것으로 확인하고,

뇌세포를 보호하고 인지기능을 개선하기 위해 활용할 수 있는 유효성분으로 테하이드로글리아스페린 C를 제시한다.

- [13] 이에 본 발명은 하기 화학식 1의 구조식으로 표기되는 테하이드로글리아스페린 C (dehydroglyasperin C)를 유효성분으로 함유하는 인지 기능의 저하 또는 손상을 치료하기 위한 조성물을 제공한다.

[14] [화학식 1]

[15]



- [16] 상기 인지 기능의 저하 또는 손상은 뇌졸중 및 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 픽(Pick)병, 및 크로이츠펔트 야콥병 중 선택되는 어느 하나에 의한 것을 포함한다.
- [17] 본 발명의 테하이드로글리아스페린 C (dehydroglyasperin C)는 신경 염증 반응을 매개하는 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 분비를 억제함으로써 효과적으로 신경 세포의 사멸을 억제하여 인지 기능 손상의 치료에 유용하다.
- [18] 본 발명의 테하이드로글리아스페린 C는 하기 실시예 1의 공지된 방법을 이용하여 감초로부터 분리, 수득할 수 있다.
- [19] 본 발명의 테하이드로글리아스페린 C는 소신경교세포인 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 염증반응인 TNF- α 의 분비를 억제함이 확인되었다.
- [20] 본 발명의 테하이드로글리아스페린 C는 소신경교세포인 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2에서 염증성 사이토카인 TNF- α 의 분비를 억제하고, 신경 세포의 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [21] 본 발명에서는 리포폴리사카라이드만 단독 처리한 소신경교세포의 배양액은 신경세포에 독성을 나타내었지만, 테하이드로글리아스페린 C를 처리한 소신경교세포 배양액 테하이드로글리아스페린 C의 농도 의존적으로

신경세포에 대한 독성으로부터 보호작용을 보임으로써
 테하이드로글리아스페린 C가 신경 세포에 직접 작용하지 않더라도
 소신경교세포를 통해 신경 세포를 보호할 수 있음이 확인되었다 (실험예 3,
 실험예 4 과 도 3, 도 4 참조).

- [22] 본 발명의 테하이드로글리아스페린 C는 소신경교세포에서 TNF- α 의 분비를 억제함에 있어, NF- κ B의 활성화 억제 기작을 통합이 확인되었다 (실험예 5 와 도 5 참조).
- [23] 본 발명에 따른 테하이드로글리아스페린 C의 유효 농도는 5, 10 μ M인데, 섭취 대상의 상태, 연령, 건강상태 등의 다양한 요인을 고려하여 가감될 수 있다.
- [24] 한편, 본 발명의 약학 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 테하이드로글리아스페린 C를 0.1 내지 50 % 중량으로 포함하는 즉, 테하이드로글리아스페린 C를 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공한다.
- [25] 본 발명의 테하이드로글리아스페린 C를 포함하는 약학 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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.
- [26] 본 발명의 테하이드로글리아스페린 C를 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 더욱 상세하게는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose), 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 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 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [27] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어 테하이드로글리아스페린 C 화합물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 0.01 내지 500 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 이때, 테하이드로글리아스페린 C 화합물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [28] 본 발명의 약학 조성물은 랫트, 마우스, 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. 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [29]
- [30] 한편, 본 발명은 테하이드로글리아스페린 C 화합물을 유효성분으로 함유하는 치매 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 본 발명의 화합물 테하이드로글리아스페린 C를 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은, 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물의 경우 100 mL를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물 중 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한 점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린; 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 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. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [31] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게

중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[32]

발명의 효과

[33] 본 발명에서는 데하이드로글리아스페린 C (dehydroglyasperin C)이 신경세포의 손상 및 사멸을 억제하는 신경보호효과를 나타내고, 기억력증진 및 인지기능장애 개선에 대해 탁월한 효과를 보이는 것을 확인하였는데, 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

[34]

도면의 간단한 설명

[35] 도 1은 데하이드로글리아스페린 C (DGC)가 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2에 있어 독성을 나타낸 것으로 데하이드로글리아스페린 C가 신경세포에 대하여 10 μ M 이하의 농도 범위에서 세포독성이 거의 없음을 나타낸 도이며,

[36] 도 2는 데하이드로글리아스페린 C (DGC)가 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 TNF- α 분비 감소 효과를 나타낸 도이고,

[37] 도 3은 데하이드로글리아스페린 C (DGC)를 처리한 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2에서 추출된 배지는 데하이드로글리아스페린 C 농도 의존적으로 신경세포에 대한 독성으로부터 보호작용을 나타낸 도이고,

[38] 도 4는 데하이드로글리아스페린 C (DGC)를 처리한 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2에서 추출된 배지는 신경세포에 대한 독성으로부터 보호작용을 나타냄을 신경세포 형광 염색을 통해 확인한 도이고,

[39] 도 5는 데하이드로글리아스페린 C (DGC)가 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 NF-B 활성화를 저해하는 효과를 나타낸 도이다.

[40]

발명의 실시를 위한 형태

[41] 이하, 본 발명을 하기 참고예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 참고예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 의해 한정되는 것은 아니다.

[42]

[43] **참고예 1. 실험 준비 및 시약**

[44] **1-1. 세포 배양**

[45] 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2 세포주는 김선영 교수님 (서울대학교)에게서 제공받았고, 10% 페탈 보바인 시럼(Fetal

Bovine Serum; FBS)과 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco)가 혼합된 'Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)' 배양액에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였으며, 이틀에 한번 10:1 비율로 계대 배양하였다.

[46]

[47] 1-2. 신경세포 초대배양 (Primary neuronal culture)

[48] ICR 계통의 임신 쥐(오리엔트 바이오)에서 14일령 배아를 꺼내고 그 뇌에서 신경조직을 분리하여 0.05% 트립신이 혼합된 'Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)'에서 37°C, 8분간 처리하였다. 이 후 폴리-D-라이신 (PDL)이 코팅된 플레이트에 2% B27, 1% L-글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 혼합된 'Neurobasal' 배양액(Gibco)에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 분리된 신경세포를 배양하였으며, 배지는 이틀에 한번 교체하였다.

[49]

[50] 1-3. 시약 준비

[51] 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide: Sigma, 미국)을 증류수에 녹여 1 mg/ml로 만들어 -80°C에서 보관하였고, 사용 시마다 최종 100 ng/ml의 농도로 DMEM 배지에 희석하였다.

[52] 데하이드로글리아스페린 C는 n-헥산/에탄올 의 9:1 비율 혼합물을 이용하여 감초로부터 추출되어 40 mM 용액으로 만들고 DMEM 배지에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. 세포들은 다양한 농도의 데하이드로글리아스페린 C를 12시간 동안 배양한 다음 리포폴리사카라이드를 첨가한 뒤 37°C에서 24시간 더 배양하였다.

[53]

[54] **실시예 1. 데하이드로글리아스페린 C (Dehydroglyasperin C)의 분리 및 정제**

[55]

[56] 감초(Glycyrrhiza uralensis Fisch)의 뿌리 3 kg을 세절한 후, 상온 20-30°C에서 노르말-헥산:주정(에탄올)=9:1(부피비) 20 L로 20시간 동안 추출하였다. 얻어진 추출액을 여과지를 사용한 깔대기로 여과한 후 76 cmHg에서 감압, 농축하여 감초 추출물 270g을 얻었다. 상기 추출물 10g을 실리카겔 컬럼(50x800 mm, 300 g, 70-230 mesh, Merck, Germany)에, 노르말-헥산-에틸아세테이트를 10:0에서 5:5 부피비율이 되도록 전개를 시작한 후, 총 20개의 분획을 수득하였다. 각 분획을 감압 농축하였다. 이 중 12번 분획 50 mg을 에틸아세테이트로 재결정하여 데하이드로글리아스페린 C를 26 mg을 분리 확보하였으며, 이를 질량 분석, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR을 통해 확인하였다. (Seo JY et al., Dehydroglyasperin C isolated from licorice caused Nrf2-mediated induction of detoxifying enzymes, J Agric Food Chem, 58, pp.1603-8, 2010)

[57]

[58] **실험예 1. 데하이드로글리아스페린 C의 세포 독성 실험**

[59] 상기 참고예 1-3의 데하이드로글리아스페린 C의 세포 독성을 확인하기 위하여

- 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [60] 세포 독성은 세포의 생존을 측정함으로써 시약의 세포 독성을 결정하는 MTT 어세이를 이용하였다. MTT 어세이는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)가 살아있는 세포에서 물에 녹지 않는 포르마잔(formazan)으로 환원되는 현상을 이용한 세포 생존 측정법이다 (Tim Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods, 65, pp.55-63, 1983).
- [61] 먼저 24-웰 마이크로티터 플레이트(24-well microtiter plate)에 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2를 농도 1×10^5 cells/500 μ L 로 10% FBS가 혼합된 DMEM 배양액에서 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양한 후, 데하이드로글리아스페린 C를 1, 5, 10, 20, 40 μ M의 농도로 시럼 프리(serum free) DMEM에 처리하였다. 이 후 24시간 동안 동일 조건에서 배양하고 50 μ L의 MTT 용액을 첨가하여 20분간 반응시켜 포르마잔을 형성시킨 후, 상등액을 제거하고 DMSO 500 μ L/웰을 가하여 20 여분 간 포르마잔을 녹였다. ELISA reader (Emax, Molecular device, 미국)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.
- [62] 세포독성을 분석한 결과, 도 1에서 나타내는 바와 같이 데하이드로글리아스페린 C는 10 μ M 농도까지는 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2에서 세포독성을 나타내지 않았다.(도 1 참조).
- [63]
- [64] **실험예 2. 데하이드로글리아스페린 C의 리포폴리사카라이드(LPS)에 의해 유도된 TNF-a 분비 억제 효과**
- [65] 상기 참고예 1-3의 데하이드로글리아스페린 C의 상기 참고예 1-2의 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 TNF-a 분비 억제 효과를 확인하기 위하여 하기과 같은 실험을 하였다.
- [66] 상기 참고예 1-2의 신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2를 상기 실험예 1에서와 같은 조건으로 분주한 후 12시간 배양한 세포에 데하이드로글리아스페린 C를 각각 5, 10 μ M이 혼합된 10% FBS DMEM 배양액에서 12시간 전처리하고, 리포폴리사카라이드가 100 ng/ml 혼합되어있는 시럼 프리(serum free) DMEM 배양액으로 갈아준 후 다시 24시간을 배양하였다. 배양 조건은 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하였다. 이 후 배양액만을 모아 원심분리기를 이용하여 10000 g, 4°C, 3분간 원심분리 후 상층액을 모아 TNF-a 분비량을 확인하였다. TNF-a 분비량은 ELISA (Thermo Scientific Mouse TNF-a ELISA kit, product #:EMTNFA5)를 이용하여 측정하였다.
- [67] 실험결과, 도 2에 나타내는 바와 같이 데하이드로글리아스페린 C 5, 10 μ M을

처리한 결과 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 TNF- α 의 분비를 농도 의존적으로 감소시킴을 확인하였다 (도 2 참조).

[68]

[69] 실험예 3. 데하이드로글리아스페린 C처리에 의한 소신경교세포의 신경세포 보호 효과

[70] 상기 참고예 1-3의 데하이드로글리아스페린 C의 처리로 상기 참고예 1-1의 소신경교세포에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 TNF- α 분비 억제 효과의 보임으로 인해 상기 참고예 1-2의 초대 배양된 신경세포가 보호될 수 있음을 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 하였다.

[71]

[72] 상기 참고예 1-2의 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2를 상기 실험예 1에서와 같은 조건으로 분주한 후 12시간 배양한 세포에 데하이드로글리아스페린 C를 각각 5, 10 μ M 혼합된 10% FBS DMEM 배양액에서 12시간 전처리하고, 리포폴리사카라이드가 100 ng/ml 혼합되어있는 시럼 프리(serum free) DMEM 배양액으로 갈아준 후 다시 24시간을 배양하였다. 이 후 배양액을 모아 원심분리기를 이용하여 10000 g, 4°C, 3분간 원심분리 후 상층액을 추출하였다. 상기 참고예 1-2의 초대 배양된 신경세포를 폴리-D-라이신 (PDL)이 코팅된 48-웰 플레이트에 2% B27, 1% L-gln, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 혼합된 'Neurobasal' 배양액에서 4×10^5 cells/500 μ L의 세포농도로 5일간 배양하였다. 신경세포의 'Neurobasal' 배지를 모아둔 소신경교세포 배양액 상층액으로 갈아주어 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 배지양은 500 μ L로 동일하였다. 배양 후 50 μ L의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 첨가하고 20분간 반응시켜 포르마잔 (formazan)을 형성시킨 후, 상층액을 제거하고 DMSO 500 μ L/웰을 가하여 포르마잔을 녹인 다음 ELISA reader (Emax, Molecular device, 미국)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[73] 실험 결과, 도 3에서 나타내는 바와 같이 리포폴리사카라이드만 단독 처리된 소신경교세포에서 추출한 배양액은 신경세포에 독성을 나타내었지만, 데하이드로글리아스페린 C를 전처리한 소신경교세포에서 추출된 배지는 데하이드로글리아스페린 C 농도 의존적으로 신경세포에 대한 독성으로부터 보호작용을 보임을 확인하였다 (도 3 참조).

[74]

[75] 실험예 4. 데하이드로글리아스페린 C 처리에 의한 소신경교세포의 신경세포 보호 효과 세포 염색을 통한 확인

[76] 상기 참고예 1-3의 데하이드로글리아스페린 C의 처리로 상기 참고예 1-1의 소신경교세포에서 리포폴리사카라이드에 의해 유도된 TNF- α 분비 억제 효과의 보임으로 인해 상기 참고예 1-2의 초대 배양된 신경세포가 보호될 수 있음을 신경 세포 형광 염색을 통해 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 하였다.

- [77] 상기 실험에 3과 같은 조건으로 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2 배양액만을 추출하였다. 상기 참고예 1-2의 초대 배양된 신경세포를 폴리-D-라이신 (PDL)이 코팅된 커버 슬립(cover slip)에 24-웰 플레이트에 2% B27, 1% L-gln, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 혼합된 'Neurobasal' 배양액에서 5×10^5 cells/1ml의 세포농도로 5일간 배양하였다. 신경세포의 'Neurobasal' 배지를 모아둔 소신경교세포 배양액 상층액으로 갈아주어 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 배지량은 1ml로 동일하였다. 배양 후 세포를 세포 형광 염색법을 이용하여 신경세포 보호 효과를 확인하였다. 선택적인 항체는 'mouse-anti-microtubule-associated protein 2 (MAP-2, Chemicon/ Millipore, Billerica, MA, USA)'와 'Fluorescein-conjugated anti-mouse IgG (Vector Labs, Burlingame, CA, USA)'가 사용되었다. 형광 염색된 신경세포는 콘포컬 현미경 LSM 700 CLSM (Carl Zeiss, Jena, Germany)를 통해 관찰하였고 Zen 2009 software (Carl Zeiss, Jena, Germany)를 통해 분석하였다.
- [78] 실험 결과, 도 4에서 나타내는 바와 같이 리포폴리사카라이드만 단독 처리된 소신경교세포에서 추출한 배양액은 신경세포에 독성을 나타내었지만, 테하이드로글리아스페린 C를 전처리한 소신경교세포에서 추출된 배지는 신경세포에 대한 독성으로부터 보호작용을 보임을 신경 세포 형광 염색을 통해 확인하였다 (도 4 참조).
- [79]
- [80] 실험예 5. 테하이드로글리아스페린 C처리에 의한 NF-B 활성화 저해 효과 측정
- [81] 상기 참고예 1-3의 테하이드로글리아스페린 C의 처리로 상기 참고예 1-1의 소신경교세포가 과도하게 활성화 되었을때 나타나는 NF-B 활성화가 억제되는지를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [82] NF-B는 활성화 신호에 의해 IB가 인산화되어 분해되고 p65가 인산화되어 핵안으로 이동하여 유전자 전사를 일으킨다 (Karin M., How NF-B is activated: the role of the IB kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 18, pp.6867-6874, 1999). 상기 참고예 1-2의 소신경교세포 무라인 마이크로글리알(murine microglial) BV-2를 상기 실험예 1에서와 같은 조건으로 분주한 후 12시간 배양한 세포에 테하이드로글리아스페린 C가 각각 5, 10 μ M이 혼합된 10% FBS DMEM 배양액으로 12시간 전처리하고, 리포폴리사카라이드가 100 ng/ml 혼합되어있는 시럼 프리(serum free) DMEM 배양액으로 갈아준 후 다시 2시간 배양한 후 단백질을 추출하였다. IB와 p65의 인산화는 선택적인 항체[Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA]를 이용한 반응을 이용하여 웨스턴 블랏팅 분석법을 통해 확인하였다.
- [83] 도 5는 테하이드로글리아스페린 C의 IB와 p65 인산화 저해 효과를 나타낸 것으로, 레인 1은 무처리 대조군이고 레인2는 리포폴리사카라이드 조사군, 레인 3은 LPS와 테하이드로글리아스페린 C 5 μ M 처리군, 레인 4는 리포폴리사카라이드와 테하이드로글리아스페린 C 10 μ M 처리군, 레인 5는

데하이드로글리아스페린 C 10 μ M 처리한 처리 대조군이다. 실험 결과, 리포폴리사카라이드에 의해 인산화된 형태인 p-IB와 p-p65의 밴드가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. β -액틴(actin) 밴드는 동일한 양의 세포로 실험했음을 증명한다. 따라서, 데하이드로글리아스페린 C는 리포폴리사카라이드에 의한 과도한 NF-B 활성화를 농도 의존적으로 감소시킴을 알 수 있었다. (도 5 참조)

[84]

[85] 한편, 하기에 화합물을 이용한 제제예를 예시하나 이는 본 발명을 이에 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[86]

[87] 제제예 1: 신제의 제조

[88]

[89] 데하이드로글리아스페린 C 300 mg

[90] 유당 100 mg

[91] 탈크 10 mg

[92] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[93]

[94] 제제예 2: 정제의 제조

[95] 데하이드로글리아스페린 C 300 mg

[96] 옥수수전분 100 mg

[97] 유당 100 mg

[98] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[99] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[100]

[101] 제제예 3: 캡셀제의 제조

[102] 데하이드로글리아스페린 C 300 mg

[103] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[104] 락토오스 14.8 mg

[105] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[106] 통상의 캡셀제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡셀에 충전하여 캡셀제를 제조한다.

[107]

[108] 제제예 4: 주사제의 제조

[109] 데하이드로글리아스페린 C 300 mg

[110] 만니톨 180 mg

[111] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[112] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[113] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[114]

[115] 제제예 5: 액제의 제조

[116] 데하이드로글리아스페린 C 300 mg

[117] 이성화당 10 g

[118] 만니톨 5 g

[119] 정제수 적량

[120] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색 병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[121]

[122] 제제예 6: 건강 식품의 제조

[123] 데하이드로글리아스페린 C 300 mg

[124] 비타민 혼합물 적량

[125] 비타민 A 아세테이트 70 μ g

[126] 비타민 E 1.0 mg

[127] 비타민 B₁ 0.13 mg

[128] 비타민 B₂ 0.15 mg

[129] 비타민 B₆ 0.5 mg

[130] 비타민 B₁₂ 0.2 μ g

[131] 비타민 C 10 mg

[132] 비오틴 10 μ g

[133] 니코틴산아미드 1.7 mg

[134] 엽산 50 μ g

[135] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[136] 무기질 혼합물 적량

[137] 황산제1철 1.75 mg

[138] 산화아연 0.82 mg

[139] 탄산마그네슘 25.3 mg

[140] 제1인산칼륨 15 mg

[141] 제2인산칼슘 55 mg

[142] 구연산칼륨 90 mg

[143] 탄산칼슘 100 mg

[144] 염화마그네슘 24.8 mg

[145] 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.

[146]

[147] 제제예 7: 건강 음료의 제조

[148] 테하이드로글리아스페린 C 300 mg

[149] 비타민 C 15 g

[150] 비타민 E(분말) 100 g

[151] 젖산철 19.75 g

[152] 산화아연 3.5 g

[153] 니코틴산아미드 3.5 g

[154] 비타민 A 0.2 g

[155] 비타민 B1 0.25 g

[156] 비타민 B2 0.3g

[157] 물 정량

[158] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

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

[160]

산업상 이용가능성

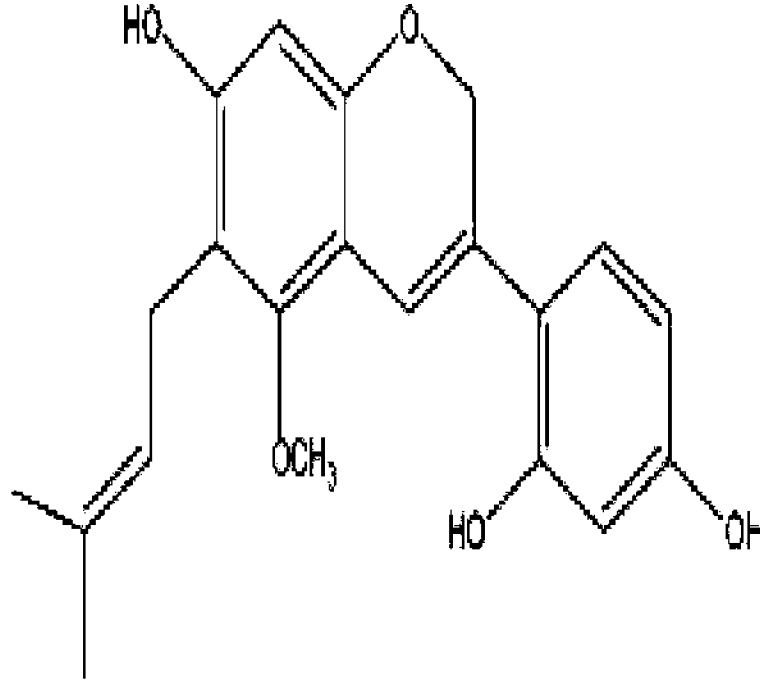
[161] 본 발명은 기억력증진 및 인지기능장애 개선에 대해 탁월한 효과를 보이는 약학조성물 및 건강기능식품에 이용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1]

하기 화학식 1에 기재된 구조식을 갖는 데하이드로글리아스페린 C를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 인지 기능의 저하를 치료하기 위한 약학 조성물.

[화학식 1]



[청구항 2]

제1항에 있어서,
상기 인지기능의 저하는,
뇌졸중 및 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 픽(Pick)병, 및 크로이츠펔트 야콥병 중 선택되는 어느 하나로 말미암은 것을
특징으로 하는 인지 기능의 저하를 치료하기 위한 약학 조성물.

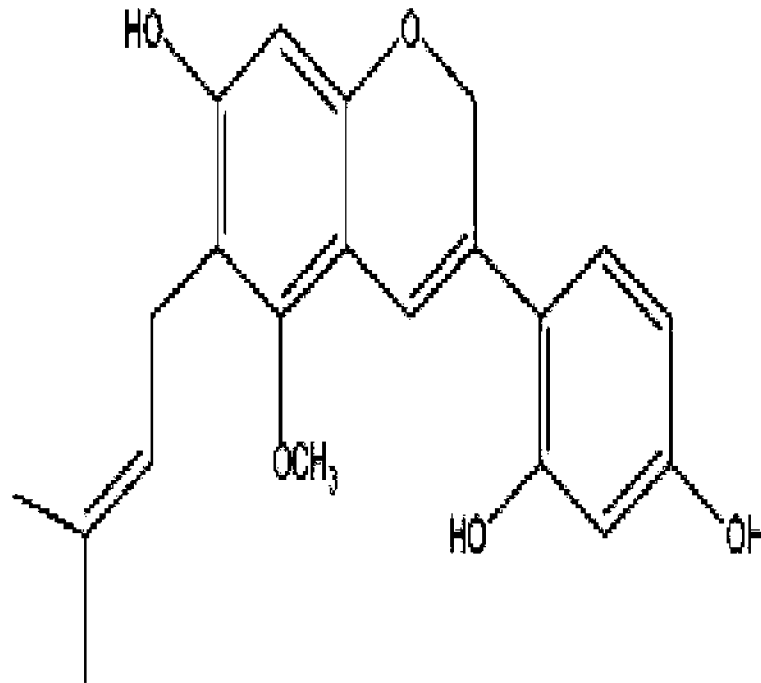
[청구항 3]

제1항에 있어서,
상기 화학식 1을 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 % 중량으로
포함하는 것을 특징으로 하는 인지 기능의 저하를 치료하기 위한
약학 조성물.

[청구항 4]

하기 화학식 1에 기재된 구조식을 갖는 데하이드로글리아스페린 C를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 인지 기능의 저하 및 손상 개선용 건강기능식품.

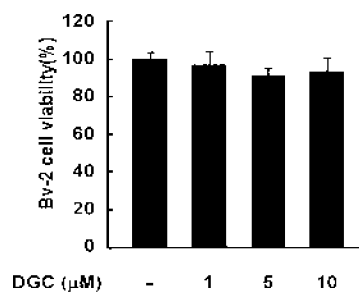
[화학식 1]



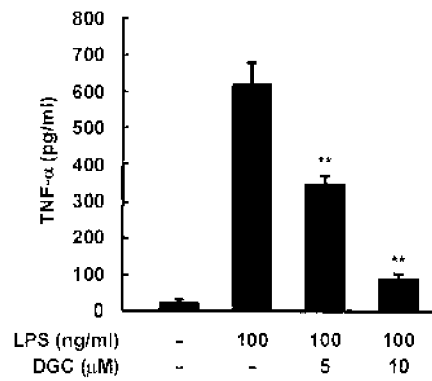
[청구항 5]

제4항에 있어서,
 상기 건강기능식품은,
 정제, 캡슐제, 환제 또는 액체인 것을 특징으로 하는 인지 기능의
 저하 및 손상 개선용 건강기능식품.

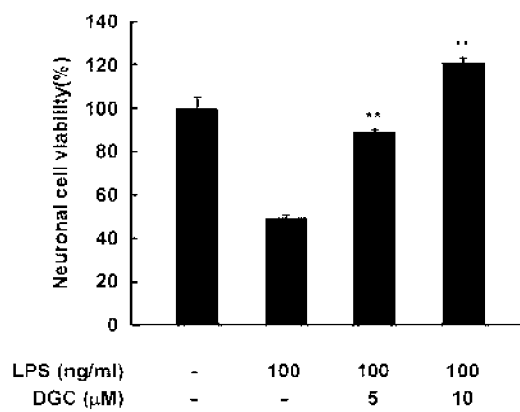
[Fig. 1]



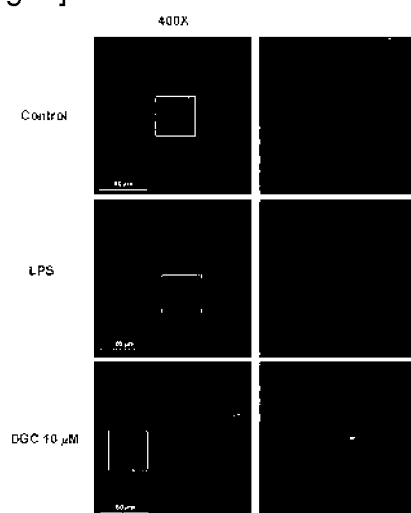
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]

