



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0064316
(43) 공개일자 2012년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/22 (2006.01) A61K 31/265 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0125493

(22) 출원일자 2010년12월09일

심사청구일자 2010년12월09일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인화로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

이자경

서울특별시 양천구 목동서로2길 22, 한신청구APT 109동 504호 (목동)

김승우

인천광역시 연수구 원인재로 81, 삼성아파트 1동 302호 (동춘동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

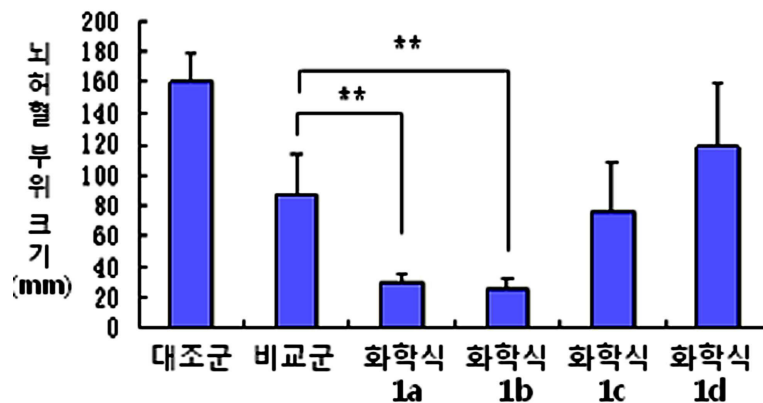
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 에틸피루베이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 에틸피루베이트 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 에틸피루베이트 유도체는 뇌허혈의 부피를 감소시키고, 운동기능 손상 및 신경학적 손실을 개선시키는 효과가 우수하므로, 신경보호용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있고, 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 개선용 건강식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김은천

인천 중구 신흥동 인하대학교 의과대학 해부학교
실

윤성화

경기도 수원시 영통구 청명로 132, 삼익 아파트
321동 602호 (영통동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 41656-1

부처명 보건산업진흥원

연구사업명 중개연구

연구과제명 복합기능 Ethyl pyruvate hybrid 화합물 PS-3의 뇌졸중 치료제 개발을 위한 기반 연구

주관기관 인하대학교 산학협력단

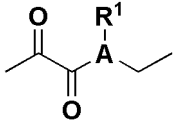
연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

A는 N, S 또는 C이고; 및

R¹은 수소 또는 에틸기이다).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은,

(1) N,N-다이에틸-2-옥소프로판아미드;

(2) N-에틸-2-옥소프로판아미드;

(3) S-에틸 2-옥소프로판티오에이트; 및

(4) 헥산-2,3-다이온;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

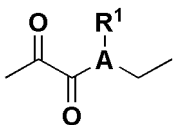
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1의 A 및 R¹은 제1항에 정의한 바와 같다).

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매,

크로이즈펠트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌 질환 예방 및 개선용 건강식품 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 에틸피루베이트 유도체 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 뇌졸중은 뇌조직으로 가는 혈액 공급의 감소 또는 차단으로 뇌조직의 허혈상태로 발생하는 뇌허혈(ischemic stroke)과 혈관이 터져 뇌조직에서 출혈을 일으키는 뇌출혈(hemorrhagic stroke)의 두 가지로 크게 구분되며, 특히 뇌허혈은 전체 뇌졸중 환자의 약 80% 정도를 차지할 정도로 심각한 질환이다.
- [0003] 뇌허혈로 인한 신경세포 손상 기전에는 미토콘드리아의 기능 장애로 인한 ATP의 생성감소, 세포막 투과성의 변화, 과다 유리된 글루타메이트(glutamate)의 작용, 세포 내 Ca^{2+} 의 증가, Ca^{2+} 의존성 단백질 분해효소의 활성화, 유리 라디칼(free radical)의 생성, 단백질 합성장애 또는 인지질 대사에 의한 면역 염증반응 등이 복잡하게 관여하는 것으로 알려져 있다(Lipton P et al., *Physiol Rev* 79: 1431-1568, 1999).
- [0004] 뇌졸중 환자의 혈행장애로 인해 산소의 공급이 차단 또는 감소 야기된 뇌허혈의 중앙 부위(core region)의 세포들은 수초 내지 수분 내에 기능장애가 시작되어 결국은 비가역성 손상을 입게 되는 반면에, 뇌허혈의 주변(penumbra region)의 세포들은 대사 기능에 장애를 받기는 하지만 빠른 시기에 적절한 치료를 받는 경우 비가역적 세포손상을 차단할 수 있다(Choi D.W. et al., *Excitotoxic cell death. J. Neurobiol.* 23: 1261-1276, 1992 ; Lipton P. et al., *Physiol Rev* 79: 1431-1568, 1998).
- [0005] 현재 임상에서 사용되고 있는 뇌졸중 치료제로는 조직 플라스미노겐 액티베이터(TPA) 또는 유로키나제(urokinase)와 같은 혈전 용해제와 혈소판 억제제, 항응고제, 뇌혈관 확장제, Ca^{2+} 채널(channel) 차단제 및 뇌부종 억제제 등 다양한 기전의 약제들이 있다(Sandercock P. et al., *Br. J. Hosp. Med.* 47: 731-736, 1992). 그러나 상기 약제들은 치료시기가 지연된 경우 그 효과가 미약하고, 급성 뇌허혈로 인한 뇌허혈의 진행을 효과적으로 차단하지 못하며 비특이적 출혈, 피브리노겐 용해 및 급성재폐색 등의 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Scheinberg P. et al., *Stroke* 25: 1290-1295, 1994).
- [0006] 또한, 뇌허혈에서 시클로옥시게나아제-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)의 억제제는 프로스타글란딘 E(prostaglandin E, PGE2)의 생성 억제 및 이로 인한 글루타메이트의 유리를 억제시킴으로써 뇌신경 세포를 보호하는데, 관절염이나 통증을 호소하는 많은 사람들이 이미 COX-2 억제제들을 복용하고 있으므로 상기 환자들의 뇌졸중 발병률에 대한 역학적 조사가 이루어진다면 향후 뇌졸중의 예방 및 치료제의 개발에 새로운 목표가 될 수 있을 것으로 보고되었다(Iadecola, C. et al., *PNAS*: 30, 1294-12).
- [0007] 아울러, 뇌조직으로 침투된 호중구에서 산화질소(NO)를 유리할 수 있는 iNOS(inducible nitric oxide synthase)가 유도되며, 유도된 iNOS로부터 NO가 유리되어 뇌세포 손상을 초래한다고 알려져 있으며, 글루타메이트에 의한 NMDA 수용체의 활성화에 의한 신경독성 또한 NO를 경유한 것이라고 보고되어 있어 iNOS 발현 억제 등과 관련된 뇌신경 보호제의 개발이 기대되고 있다(Vaughan C.J. et al., *Stroke* 30:1969-73, 1999).
- [0008] 한편, 피루베이트(CH_3COCOO^-)는 글루코스의 산화적 또는 혐기적 대사의 중요한 중간체로서, 강력한 활성 산소 종 제거제(Reactive oxygen species(ROS) Scavenger)이지만, 용액 내에서 매우 불안정하여 치료제로서 사용될 수가 없었다. 따라서, 상기 문제점을 해결하기 위하여 알킬피루베이트(alkylpyruvate)에 대한 연구가 진행되었는데, 에틸피루베이트($CH_3COCOOC_2H_5$)는 피루베이트(pyruvate)보다 안정되고 소수성인 물질로 그것이 칼슘 및 인산을 포함한 균형잡힌 염 용액내에 존재할 때 래트에서 일어나는 장간막의 국소허혈/재관류(reperfusion), 장 점막의 구조적 또는 기능적 손상을 개선하는 것으로 알려져 있다(Carrie A. Sims et al., *Crit. Care Med* 2001, Vol 29, No. 8, p1513-1518). 뒤이어 국소허혈/재관류와 출혈성 쇼크와 관련된 다양한 조직의 상처에서 보호효과가 증명되었고, 치사패혈증을 가진 쥐에 에틸피루베이트를 투여하면(delayed administration, 12

시간이나 그 이후에 즉 발병 후 일정시간이 지난 후에 투여했다는 뜻임) 치사와 전신의 염증을 막고 생존율을 증가시킨다는 것이 보고되었다(Luis Ulloa et al., PNAS, Sep 17, 2002, Vol. 99, No. 19, pp12351-12356).

[0009] 또한, 유사한 화합물인 메틸피루베이트(methylpyruvate)를 사용한 연구에서도 알킬피루베이트가 피루베이트보다 지용성이 높아서 세포막을 잘 투과한다고 보고되었다(Mertz RJ et al, J. Biol. Chem 1996; 271: pp4838-4845).

[0010] 본 발명자들은 중뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 래트 모델을 이용한 연구를 통하여 허혈이 일어난 뇌(postischemic brain)에서 에틸피루베이트(EP)의 신경보호효과를 발견하고 에틸피루베이트가 유용한 신경보호제임을 확인하였다. 알킬피루베이트가 미세아교세포의 활성화 및 염증반응을 일으키는 사이토카인의 분비를 억제하고, 허혈로 손상된 허혈부위, 운동능력 및 신경학적 손상을 개선하는 효과가 있음을 확인하여 이미 보고한 바 있다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 에틸피루베이트의 산소기를 S, NH, N, C로 치환한 4개의 치환체를 통해 뇌허혈 후 뇌경색 형성 및 뇌손상 억제효과를 조사하던 중, NH 또는 N으로 치환한 치환체가 중뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 래트 모델에서 허혈이 일어난 뇌(postischemic brain)의 뇌허혈 부피를 감소시키고, 운동기능 손상 및 신경학적 손실을 개선시키는 효과가 있음을 확인하였으므로, 에틸피루베이트의 산소기를 S, NH, N, C로 치환한 4개의 치환체는 허혈성 뇌질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

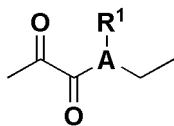
[0012] 본 발명의 목적은 에틸피루베이트 유도체를 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 에틸피루베이트 유도체를 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0015] [화학식 1]



[0016]

[0017] (상기 화학식 1의 A 및 R¹은 본 명세서 내에서 제공한 바와 같다).

[0018] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 에틸피루베이트 유도체는 뇌허혈의 부피를 감소시키고, 운동기능 손상 및 신경학적 손실을 개선시키는 효과가 우수하므로, 뇌신경을 보호함으로써, 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 개선용 건강식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

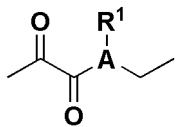
도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 약물의 투여에 따른 뇌허혈 부위의 부피의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 약물의 투여에 따른 뇌허혈 부위의 부피의 변화를 나타낸 뇌절편 도면이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 약물의 시간별 투여에 따른 뇌허혈 부피의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 약물의 시간별 투여에 따른 뇌허혈 부피의 변화를 나타낸 도면이다.
- 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 래트의 로타-로드 테스트 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 래트의 신경학적 결손 테스트 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

화학식 1



- [0023]
- [0024] 상기 화학식 1에서,
- [0025] A는 N, S 또는 C이고; 및
- [0026] R¹은 수소 또는 에틸기이다.
- [0027] 바람직하게, 상기 화학식 1의 유도체는,
- [0028] (1) N,N-다이에틸-2-옥소프로판아미드;
- [0029] (2) N-에틸-2-옥소프로판아미드;
- [0030] (3) S-에틸 2-옥소프로판티오에이트; 및
- [0031] (4) 헥산-2,3-다이온;으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.
- [0032] 구체적으로,

표 1

	구조
화학식 1a	

화학식 1b	
화학식 1c	
화학식 1d	

[0034] 본 발명의 화학식 1의 유도체는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 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 설폰산류와 같은 무독성 유기산, 아세트산, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설폰산, 4-톨루엔설폰산, 주석산, 푸마르산과 같은 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, 부틴-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, 화학식 1의 유도체를 유기용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조하여 제조되거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조하거나 유기용매 하에서 결정화시켜서 제조할 수 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, 금속 염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0037] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 에틸피루베이트 유도체 및 이의 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 입체이성질체 등을 모두 포함한다.

[0038] 상기 화학식 1로 표시되는 에틸피루베이트 유도체의 뇌허혈이 일어난 뇌에 대한 뇌허혈 치료 효과를 알아보기 위한 실험을 수행한 결과, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 에틸피루베이트 유도체는 뇌허혈 부위의 크기를 감소시키고(표 2 및 도 1, 2 참조), 뇌허혈의 손상을 광범위하게 억제시키고 오래 지속시키는 것으로 나타났다(표 3 및 도 3, 4 참조).

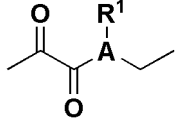
[0039] 또한, 본 발명의 에틸피루베이트 유도체의 뇌허혈로 인한 손상 후의 운동기능 퇴화와 인지 결함에 대한 영향을 측정한 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 에틸피루베이트 유도체는 MCAO로 뇌손상을 입은 래트의 운동기능

손상 및 언어장애, 운동실조, 마비 등의 신경학적 결손증상들을 효과적으로 개선 시키는 것을 확인하였다(표 4~5 및 도 5~6 참조).

- [0040] 따라서, 본 발명의 에틸피루베이트 유도체는 뇌허혈의 부피를 감소시키고, 뇌허혈손상을 광범위하게 억제하고, 억제활성효과를 오래 지속시키며 운동기능 손상 및 신경학적 손실을 개선시키는 효과가 우수하므로, 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0041] 상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 조성물의 투여로 허혈성 뇌질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에 있어서, "치료"란 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0043] 본 발명에 있어서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 조성물은 활성물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 조성물은 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.
- [0045] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명으로 표시되는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0046] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0047] 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0049] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 50 mg, 바람직하게는 1 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0050] 나아가, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함

유하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다:

[화학식 1]



(상기 화학식 1의 A 및 R¹은 명세서 내에서 정의한 바와 같다).

본 발명의 에틸피루베이트 유도체는 뇌허혈의 부피를 감소시키고, 뇌허혈손상을 광범위하게 억제하고, 억제활성효과를 오래 지속시키며 운동기능 손상 및 신경학적 손실을 개선시키는 효과가 우수하므로, 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선에 유용하게 이용될 수 있다.

상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

본 발명에 따른 조성물은 허혈성 뇌질환 예방 및 개선을 목적으로 상기 에틸피루베이트 유도체를 식품, 음료 등의 건강보조 식품에 첨가할 수 있다.

상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 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 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

상기 외에 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 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, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 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 닥나무로부터 분리된 화학식 1로 표시되는 화합물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0062] 이하 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

[0063] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] <실시예 1> 에틸피루베이트 유도체의 뇌허혈 치료 효과

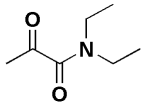
[0065] 단계 1: 중뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 모델에 대한 에틸피루베이트 유도체의 처리

[0066] 하기 화학식 1a 내지 1d의 에틸피루베이트 유도체의 뇌허혈이 일어난 뇌에 대한 뇌허혈 치료 효과를 알아보기 위하여 하기 방법으로 실험을 수행하였다.

[0067] 대뇌의 주요 동맥혈을 일시 막았다가 다시 풀어주는 뇌졸중과 같은 뇌세포 사멸 유도 방법인 중뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO)을 래트(용성 Sprague-Dawley, 250 ~ 300 g, 대한 바이오링크)를 대상으로 1시간 수행하였다.

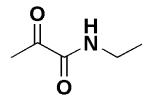
[0068] 6시간 후, 5 mg/kg의 하기 화학식 1a 내지 1d로 표시되는 에틸피루베이트 유도체 및 비교군으로 에틸피루베이트를 상기 MCAO상태의 래트에 투여하였다.

[0069] [화학식 1a]

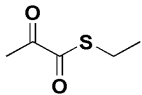


[0070]

[화학식 1b]

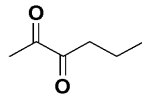


[0071] [화학식 1c]



[0072]

[화학식 1d]



[0073] 단계 2: 2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 염색을 통한 뇌절편에서 허혈 부위의 확인

[0074] 상기 단계 1의 래트의 뇌를 재관류한 다음, 이를 후, 래트의 목을 절단하여 전체 뇌를 금속성 뇌 모형을 사용하여 2 mm 절편으로 관상 절단하였다. 상기 절편을 즉시 1% TTC(2,3,5-트리페닐테트라졸륨 클로라이드)에 담가 염색하였다.

[0075] 37 ℃에서 15분 동안 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 용액에 보관된 각 색전의 뇌허혈 부위는 Quantity One 프로그램(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정하고, 분석하였다.

[0076] 그 결과를 하기 표 2, 도 1 및 2에 나타내었다.

표 2

[0077]

구분	뇌허혈 부위의 크기(mm)
화학식 1a	161.2
화학식 1b	88.2
화학식 1c	29.8
화학식 1d	25.4
비교군	77.1
대조군	118.9

[0078] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 에틸피루베이트 유도체 중 화학식 1a 내지 1c로 표시되는 화합물을 처리한 경우, 뇌허혈 부위의 크기를 감소시키는 것으로 나타났고, 이중, 화학식 1a 및 1b로 표시되는 화합물을 처리한 경우, 대조군에 비해, 각각 18.6% 및 15.8%로 감소하는 것을 확인하였고, 화학식 1c로 표시되는 화합물을 처리한 경우, 47.8%로 감소함으로써, 비교군인 에틸피루베이트를 처리한 경우(54.7%) 보다 뇌허혈 부위의 부피의 감소 효과가 더 우수한 것으로 나타났다(도 1 및 2 참조).

[0079] 따라서, 본 발명의 에틸피루베이트 유도체는 뇌허혈 부위의 크기를 감소시키는 효과가 있으므로 허혈성 뇌질환 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0080] <실시예 2> 투여 시간에 따른 에틸피루베이트의 뇌허혈 치료 효과

[0081] 상기 실시예 1에서 효과가 우수한 것으로 나타난 화학식 1b로 표시되는 에틸피루베이트 유도체의 신경보호 효과의 효과적인 시간 범위를 알아보기 위해, 5 mg/kg의 화학식 1b로 표시되는 에틸피루베이트 유도체를 MCAO/재관류한 다음, 3, 6, 9, 12시간 후로 나누어 투여하였다.

[0082] 투여 후, 상기 실시예 1의 단계 2와 동일한 방법으로 수행하여 뇌허혈 부위의 부피 변화를 측정하고, 분석하여 하기 표 3 및 도 3, 4에 나타내었다.

표 3

시간	뇌허혈 부피(mm ³)
3 시간	101.9
6 시간	66.4
9 시간	33.8
12 시간	23.2
대조군 (샴 수술)	142.1

[0084] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화학식 1b로 표시되는 화합물은 뇌허혈 후, 약물의 투여시간이 빠를수록 뇌허혈 부위의 크기가 현저히 감소하는 것으로 나타났고, 뇌허혈 억제 효과는 12 시간 후처치까지 효과가 나타나는 것으로 확인되었다(도 3 및 4 참조).

[0085] 따라서, 본 발명에 따른 에틸피루베이트 유도체는 뇌허혈 후, 뇌허혈의 손상을 광범위하게 억제함을 알 수 있으며, 이에 따라 허혈성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0086] <실시예 3> 중뇌동맥폐쇄 래트의 로타-로드(Rota-rod) 테스트를 통한 운동기능 개선 측정

[0087] 뇌허혈로 인한 손상 후의 운동기능 퇴화와 인지 결함은 종래에 보고된바 있다(Yamamoto M. et al., *Brain Res.* 452: 323-328, 1988; Rogers D.C. et al., *Stroke* 28: 2060-2065, 1997).

[0088] 이에, MCAO로 뇌손상을 입은 래트의 운동기능의 개선 효과를 측정하기 위하여 로타-로드(rota-rod) 테스트를 통해 일정한 속도로 회전하는 로타-로드 위에 MCAO 래트를 올려놓고 떨어질 때까지 머무른 시간을 측정하였다.

[0089] MCAO를 1시간 동안 실시한 후, 6시간 경과 후, 5 mg/kg의 화학식 1 내지 4로 표시되는 에틸피루베이트 유도체 및 비교군으로 에틸피루베이트를 투여하고, 24시간 후에 각각의 래트가 5 rpm 속도의 로타-로드에 남아있는 시간을 측정하였다. 그런 다음, 각각의 래트가 10 또는 15 rpm의 속도로 작동되는 로타-로드에 남아있는 시간을 1시간 간격으로 측정하였다. 이때, 각각의 점수는 3회 반복실험을 수행하여 측정하였다. 그 결과를 하기 표 4 및 도 5에 나타내었다.

표 4

구분	로타로드에 머무른 시간(분)		
	5 rpm	10 rpm	15 rpm
화학식 1a	173.2	64.8	22.3
화학식 1b	173.3	48.6	15.8
화학식 1c	151.6	63.9	15.8
화학식 1d	33.9	16.3	3.9
비교군	109	41.9	10.6
비처리군	19.8	8.2	1.9
대조군 (삼 수술)	180	148.7	59.6

표 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 에틸피루베이트 유도체는 로타로드 위에서 뇌허혈 래트의 행동을 증진시키는 것으로 나타났고, 5 rpm 속도의 로타로드에 남아 있는 시간이 화학식 1a 내지 1c로 표시되는 화합물을 투여한 래트 경우, 151.6~173.3분으로 에틸피루베이트를 투여한 래트보다 우수한 효과를 나타냈고, 이중, 화학식 1a 및 1b로 표시되는 화합물을 투여한 래트의 경우, 삼 수술을 수행한 대조군과 유사하게 나타나 운동능력이 대부분 회복이 되었음을 확인하였다.

따라서, 본 발명에 따른 에틸피루베이트 유도체는 뇌허혈 후, 운동기능 손상을 개선 시키는 효과가 우수하므로 허혈성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

<실시예 4> 중뇌동맥폐쇄 래트의 신경학적 결손 개선 측정

본 발명의 에틸피루베이트 유도체를 투여한 중뇌동맥폐쇄 래트의 언어장애, 운동실조, 마비 등의 신경학적 결손 개선효과를 측정하기 위하여 변형된 신경학적 결손 테스트(Chen J. et al., *Stroke* 32:1005-1011)를 수행하였다.

상기 신경학적 결손 테스트는 반사 능력 테스트, 균형감각 테스트, 걸음걸이 테스트, 시각촉각 테스트 및 자리수용 테스트를 수행하고, 운동기능을 평가하여 18점수 체계로 측정하였다.

MCAO/재관류 3시간 후, 5 mg/kg의 화학식 1a 내지 1d로 표시되는 화합물 및 비교군으로 에틸피루베이트를 투여하고, 2일 후에 신경학적 결손 평가를 수행하였다.

반사 능력 테스트는 이개반사, 각막반사, 놀람반사, 발작경련, 앞다리 반사, 뒷다리 반사 및 머리 위치 반사로 구성되어, 정상 기능 0점, 비정상 기능 1점을 부여하였고, 균형감각 테스트는 막대 위에 래트를 올려놓고 막대 위에서의 안정적인 자리 잡음 정도와 체류 시간에 따라 0 ~ 6점을 부여하였다.

또한, 걸음걸이 테스트는 래트가 걷는 모양을 관찰하여 정상 걸음 0, 비정상 걸음 1, 회전 2, 걷지 못함 4를 부여하였고, 시각촉각 테스트 및 자리수용 테스트는 정상 기능 0, 비정상 기능 1을 부여하였다.

이후, 이러한 각 테스트에 대한 점수를 각각의 래트에 대해 합산하였다.

이때, 상기 테스트에 대한 점수는 낮을수록 우수한 효과를 나타내는 것으로, 그 결과는 하기 표 5 및 도 6에 나타내었다.

표 5

	신경학적 결손 테스트(점)				
	반사능력	균형감각	걸음걸이	시각?촉각	총점(점)
화학식 1a	0	2.75	2.5	1.25	6
화학식 1b	0	2.3	2.7	1.3	6
화학식 1c	0	2.3	2.7	1	6
화학식 1d	0.3	4.4	3	2	10
비교군	0	3.65	2.65	2	8

무처리군	0.6	5.7	3	2.7	12
대조군 (삽 수술)	0	0	0	0	0

[0102] 표 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화학식 1a 내지 1c로 표시되는 화합물을 처리한 래트의 경우, 반사 능력 점수가 0 ~ 0.6점으로 나타났고, 균형감각 점수는 2.3~2.75점으로 나타났으며, 걸음걸이 테스트 결과, 2.5~2.7점으로 나타났고, 시각 및 촉각 테스트 결과, 1~2.7점으로 나타났다. 이는 뇌허혈 래트(무처리군)가 각각 0.6, 5.7, 3.2, 2.7점인 것보다 신경학적 결손증상을 우수하게 개선 시키는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0103] 따라서, 본 발명의 에틸피루베이트 유도체는 뇌허혈 후, 신경학적 결손 증상들을 개선 시키는 효과가 우수하므로 허혈성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0104] 한편, 본 발명에 따른 상기 화학식 1a 내지 1d로 표시되는 에틸피루베이트 유도체는 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 상기 화학식 1a 내지 1d로 표시되는 화합물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0105] <제조예 1> 산제의 제조

[0106] 에틸피루베이트 유도체 500 ng

[0107] 유당 1 g

[0108] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0109] <제조예 2> 정제의 제조

[0110] 에틸피루베이트 유도체 500 ng

[0111] 옥수수전분 100 mg

[0112] 유당 100 mg

[0113] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0114] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0115] <제조예 3> 캡슐제의 제조

[0116] 에틸피루베이트 유도체 500 ng

[0117] 옥수수전분 100 mg

[0118] 유당 100 mg

[0119] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0120] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0121] <제조예 4> 주사제의 제조

[0122] 에틸피루베이트 유도체 500 ng

[0123] 만니톨 180 mg

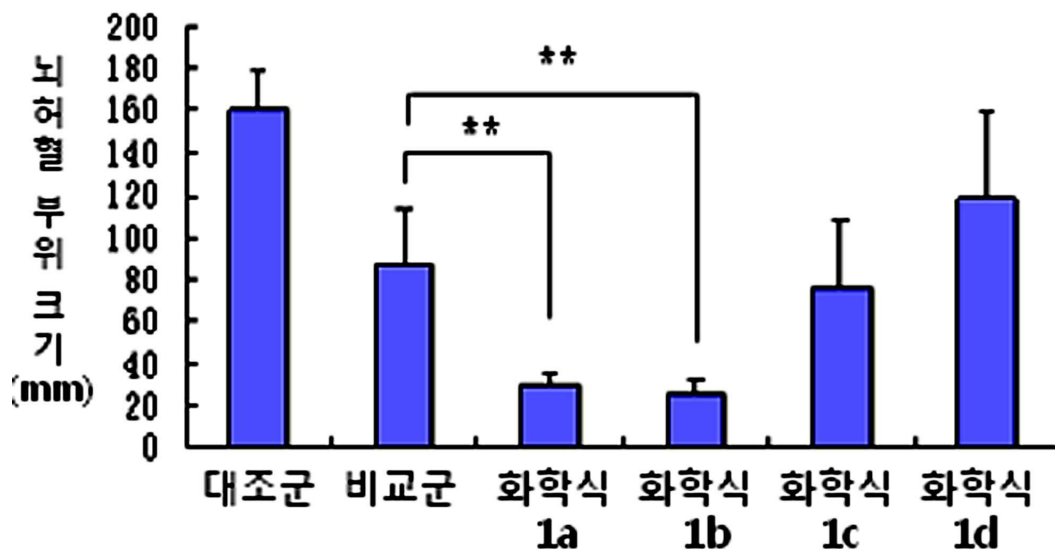
[0124]	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	26 mg
[0125]	증류수	2974 mg
[0126]	통상적인 주사제의 제조방법에 따라, 상기 성분들을 제시된 함량으로 함유시켜 주사제를 제조하였다.	
[0127]	<제조예 5> 환제의 제조	
[0128]	에틸피루베이트 유도체	500 ng
[0129]	유당	1.5 g
[0130]	글리세린	1.0 g
[0131]	자일리톨	0.5 g
[0132]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.	
[0133]	<제조예 6> 과립의 제조	
[0134]	에틸피루베이트 유도체	500 ng
[0135]	대두추출물	50 mg
[0136]	포도당	200 mg
[0137]	전분	600 mg
[0138]	상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.	
[0139]	<제조예 7> 액제의 제조	
[0140]	에틸피루베이트 유도체	500 ng
[0141]	이성화당	10 g
[0142]	만니톨	5 g
[0143]	정제수	적량
[0144]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬 향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색 병에 충전하여 멸균시켜 액체를 제조한다.	
[0145]	<제조예 8> 건강식품의 제조	
[0146]	에틸피루베이트 유도체	500 ng
[0147]	비타민 혼합물	적량
[0148]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0149]	비타민 E	1.0 mg
[0150]	비타민	0.13 mg
[0151]	비타민 B2	0.15 mg
[0152]	비타민 B6	0.5 mg
[0153]	비타민 B12	0.2 μg

[0154]	비타민 C	10 mg
[0155]	비오틴	10 μ g
[0156]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0157]	엽산	50 mg
[0158]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0159]	무기질 혼합물	적량
[0160]	황산제1철	1.75 mg
[0161]	산화아연	0.82 mg
[0162]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0163]	제1인산칼륨	15 mg
[0164]	제2인산칼슘	55 mg
[0165]	구연산칼륨	90 mg
[0166]	탄산칼슘	100 mg
[0167]	염화마그네슘	24.8 mg
[0168]	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.	
[0169]	<제조예 9> 건강 음료의 제조	
[0170]	에틸피루베이트 유도체	500 ng
[0171]	구연산	1000 mg
[0172]	올리고당	100 g
[0173]	매실농축액	2 g
[0174]	타우린	1 g
[0175]	정제수를 가하여 전체	900 ml
[0176]	통상의 건강 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 21 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강 음료 조성물 제조에 사용하였다.	
[0177]	상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호 도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	
[0178]	<제조예 10> 기타 건강식품의 제조	
[0179]	10-1. 음료의 제조	
[0180]	꿀	522 mg
[0181]	치옥토산아미드	5 mg
[0182]	니코틴산아미드	10 mg
[0183]	엽산리보플라빈나트륨	3 mg

[0184]	염산피리독신	2 mg
[0185]	이노시톨	30 mg
[0186]	오르트산	50 mg
[0187]	에틸피루베이트 유도체	500 ng
[0188]	물	200 ml
[0189]	상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 음료를 제조하였다.	
[0190]	10-2. 밀가루 식품의 제조	
[0191]	에틸피루베이트 유도체 0.5 내지 5 중량부를 밀가루 100 중량부에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.	
[0192]	10-3. 유제품(dairy products)의 제조	
[0193]	에틸피루베이트 유도체 5 내지 10 중량부를 우유 100 중량부에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.	
[0194]	10-4. 전식의 제조	
[0195]	현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화 시켜서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시의 분말로 제조하였다. 검은콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 썬서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시의 분말로 제조하였다. 상기에서 제조한 곡물류 및 종실류와 본 발명의 에틸피루베이트 유도체를 다음과 같은 비율로 배합하여 제조하였다.	
[0196]	현미	30 %
[0197]	율무	15 %
[0198]	보리	20 %
[0199]	들깨	7 %
[0200]	검정콩	7 %
[0201]	검은깨	7 %
[0202]	에틸피루베이트 유도체	500 ng
[0203]	영지	0.5 %
[0204]	지황	0.5 %

도면

도면1



도면2

대조군(삼수술)



비교군



화학식 1a



화학식 1b



화학식 1c

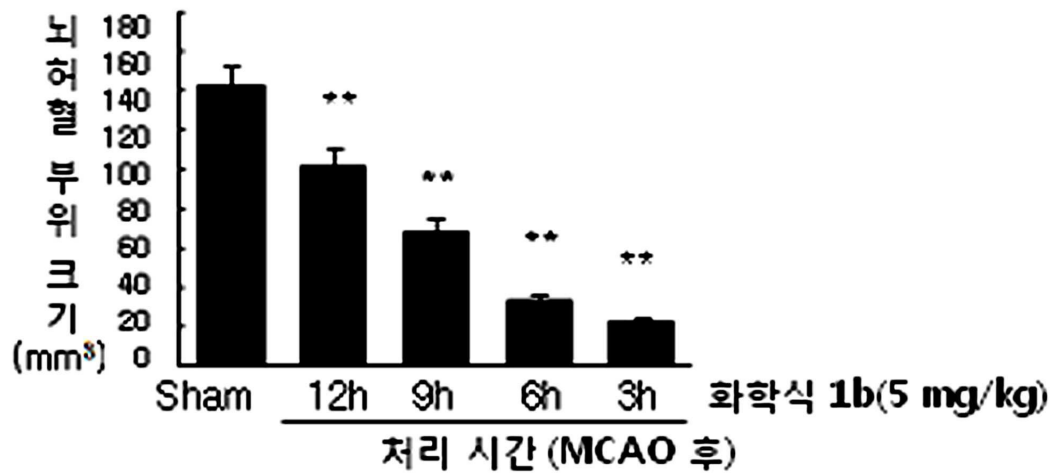


화학식 1d

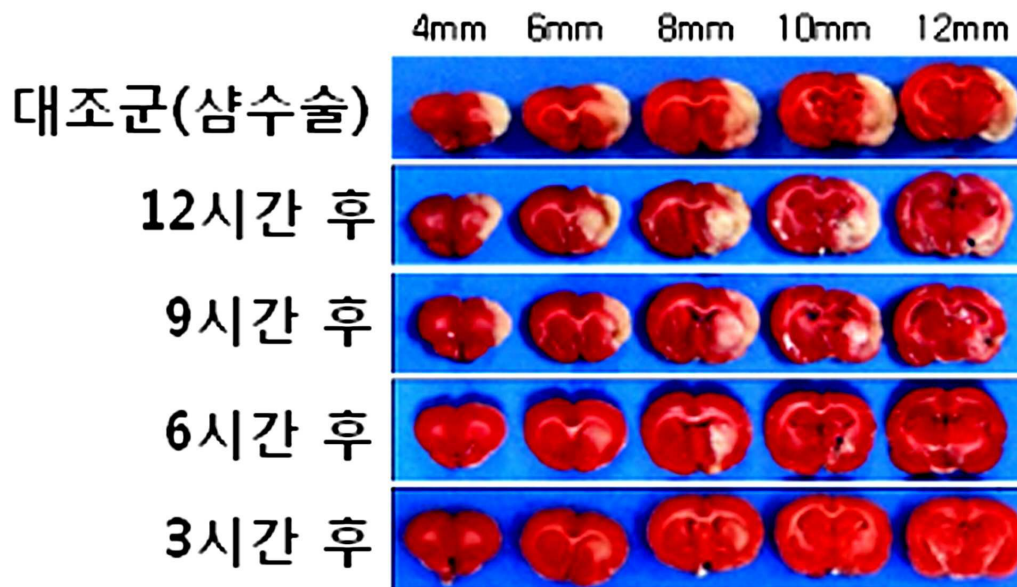


TTC 염색

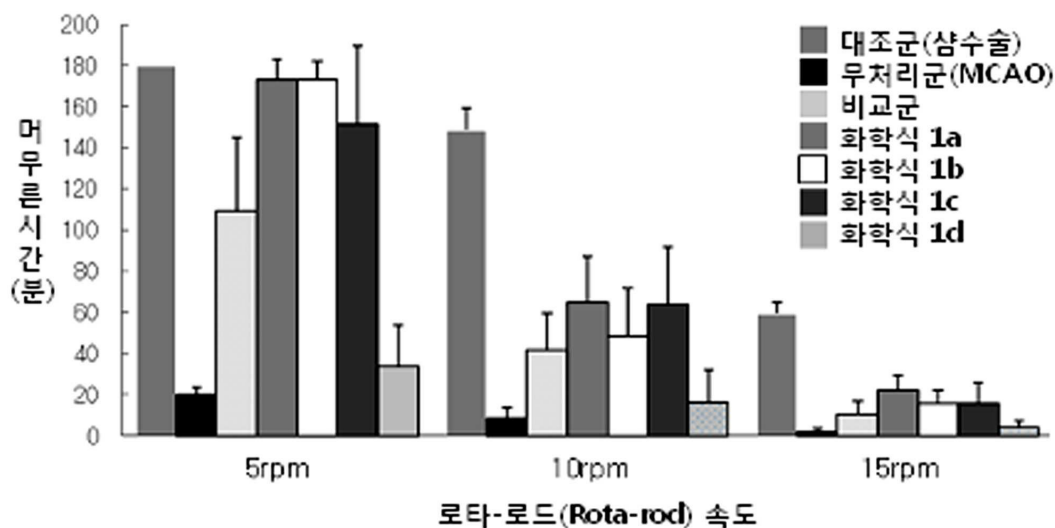
도면3



도면4



도면5



도면6

