



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0034839
(43) 공개일자 2011년04월06일

(51) Int. Cl.

A61K 31/704 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0092297

(22) 출원일자 2009년09월29일

심사청구일자 2009년09월29일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

이자경

서울 양천구 목 6동 한신청구아파트 109동 504호

한평립

서울 양천구 목 6동 한신청구아파트 109동 504호

김승우

인천광역시 연수구 동춘동 삼성APT 1동 302호

(74) 대리인

이원희

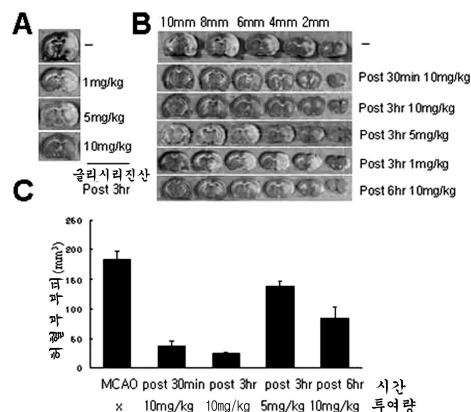
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 글리시리진산을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 글리시리진산(glycyrrhizic acid)을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 글리시리진산은 뇌허혈로 인한 뇌조직 손상, 운동능력 및 신경학적 손상을 개선하고, 호중성 백혈구의 뇌조직으로의 침투 및 미세아교세포 활성을 억제하는 효과가 있으므로 신경보호용 조성물로서 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R01-2007-000-10852-0

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 특정 기초

연구과제명 신경세포 손상 전령단백질 HMGB1의 조절을 통한 신개념의 허혈성 뇌신경 손상 제어 기술
연구

기여율

주관기관 과학재단

연구기간 2009년 03월 01일 ~ 2011년 02월 28일

특허청구의 범위

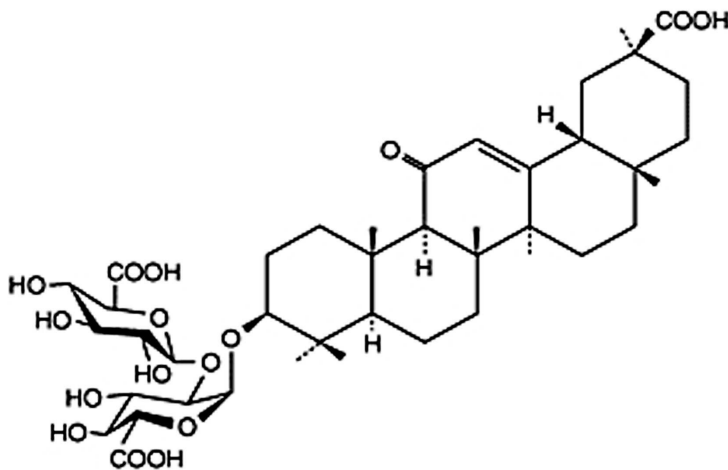
청구항 1

글리시리진산(glycyrrhizic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌신경보호용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 글리시리진산은 화학식 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 뇌신경보호용 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 뇌신경보호 조성물은 허혈성 뇌질환의 예방 및 치료에 이용되는 것을 특징으로 하는 뇌신경보호용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펠트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것을 특징으로 하는 뇌신경보호용 조성물.

청구항 5

약학적으로 유효한 양의 제 1항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌신경보호 방법.

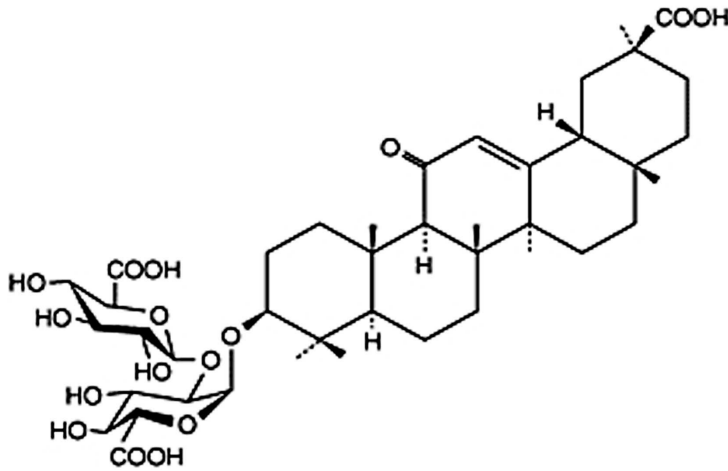
청구항 6

글리시리진산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌신경보호용 건강식품.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 글리시리진산은 화학식 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 뇌신경보호용 건강식품.

[화학식 1]



청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 뇌신경보호 건강식품은 허혈성 뇌질환의 예방 및 개선에 이용되는 것을 특징으로 하는 뇌신경보호용 건강식품.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펠트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것을 특징으로 하는 뇌신경보호용 건강식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 글리시리진산(glycyrrhizic acid)을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근에 신경계가 비면역성 기관(immune privileged organ)이라는 기존의 학설과는 달리 다발성경화증(multiple sclerosis), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 뇌졸중 및 각종 뇌손상 등의 신경 질환시에 중추신경계 내에서도 염증반응이 나타나며 이는 신경퇴행을 야기하는 주요 원인 중의 하나임이 보고되고 있다. 이러한 보고들은 신경계에서 염증반응을 억제하여 신경 보호효과를 얻을 수 있는 가능성을 시사한다.

[0003] 상기와 같은 뇌신경 질환 중 뇌졸중은 뇌조직으로 가는 혈액 공급의 감소 또는 차단으로 뇌조직의 허혈상태로 발생하는 뇌허혈(ischemic stroke)과 혈관이 터져 뇌조직에서 출혈을 일으키는 뇌출혈(hemorrhagic stroke)의 두가지로 크게 구분되며, 특히 뇌허혈은 전체 뇌졸중 환자의 약 80% 정도를 차지할 정도로 심각한 질환이다.

[0004] 뇌허혈로 인한 신경세포 손상 기전에는 미토콘드리아의 기능 장애로 인한 ATP의 생성감소, 세포막 투과성의 변화, 과다 유리된 글루타메이트(glutamate)의 작용, 세포내 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).

[0005] 뇌졸중 환자에서 혈행장애로 인해 산소의 공급이 차단 또는 감소되어 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).

[0006] 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).

[0007] 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, 1294-1299, 2001).

[0008] 한편, 뇌허혈 후의 신경 퇴행을 야기하는 염증반응은 뇌허혈 치료제의 새로운 목표가 될 것으로 보이며, 이러한 치료제는 세포 독성 물질의 유리에 관여하는 효소를 억제하거나, 호중구(neutrophil)의 침착을 억제하는 약물들로 구성될 수도 있다(Dirnagl, U. et al, *TINS*, 22: 391-397, 1999).

[0009] 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).

[0010] 글리시리진산(Glycyrrhizic acid, Glycyrrhizin, 3-O-(2-O-beta-D-Glucopyranuronosyl-alpha-D-glucopyranuronosyl)-18beta-glycyrrhetic acid)은 감초의 뿌리에서 채취되는 물질로서, 화학식은 $C_{42}H_{62}O_{16}$ 이고 분자량은 822.94인 물질이다. 두 분자의 D-글루크로닉산(D-glucuronic acid)이 β -1,4 결합한 당질부와 글리시리티닉산(glycyrrhithenic acid)과 글리코사이드(glycoside) 결합을 이루고 있는 트리테르페노이드(triterpenoid)계 사포닌(saponin)이다. 비교적 넓은 범위의 pH, 높은 온도 및 빛에 대해 큰 안정성을 갖고, 유화성과 기포성 등의 물리적 특징을 지니고 있다. 이러한 글리시리진산은 간을 보호하고, 항암성, 항알레르기성, 항레양성 및 항균성 등 각종 약리작용을 갖는 것으로 알려져 있어, 의약품, 기능성 식품 및 화장품의 원료로 이용되고 있는 실정이다. 그러나, 글리시리진산의 신경보호 작용에 관한 보고는 전무하다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 뇌허혈, 뇌손상 및 신경 염증 억제를 위한 신경보호용 물질을 찾고자 연구하던 중, 글리시리진산이 중뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 래트 모델에서 허혈이 일어난 뇌(postischemic brain)의 뇌허혈 부피를 감소시키고, 뇌허혈 후 글리시리진산의 투여로 운동기능 손상 및 신경학적 손실이 개선되었으며, 미세아교세포 활성화 및 호중성 백혈구 침투를 막아 신경 염증반응을 억제시키는 효과가 있음을 확인하였으므로, 글리시리진산은 신경보호 조성물의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 글리시리진산(glycyrrhizic acid)을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 조성물을 제공하는 것

이다.

과제 해결수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글리시리진산(glycyrrhizic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌신경보호용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌신경보호 방법을 제공한다.
- [0015] 아울러, 본 발명은 상기 글리시리진산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌신경보호용 건강식품을 제공한다.

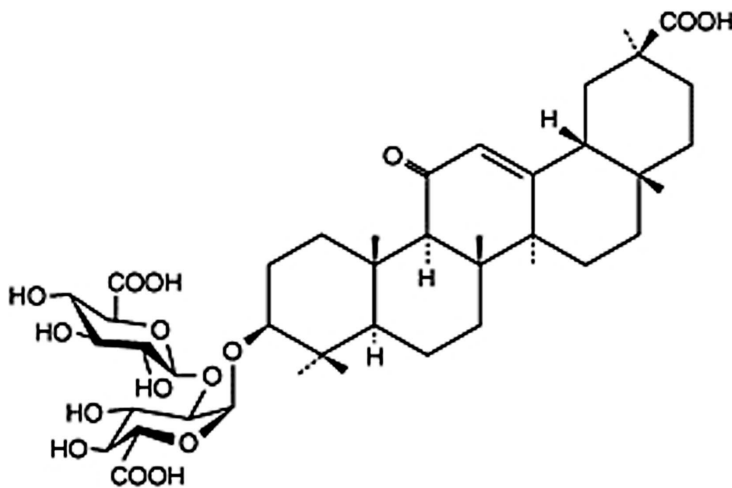
효 과

- [0016] 본 발명의 글리시리진산(glycyrrhizic acid)은 뇌허혈로 인한 뇌조직 손상, 운동능력 및 신경학적 손상을 개선시키고 뇌의 염증반응 과정을 억제시키므로, 뇌신경보호제로서 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0018] 본 발명은 글리시리진산(glycyrrhizic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌신경보호용 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 글리시리진산은 하기 [화학식 1]로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

화학식 1



- [0020]
- [0021] 상기 조성물은 허혈성 뇌질환의 예방 및 치료에 이용되는 것이 바람직하고, 상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0022] 본 발명자들은 글리시리진산이 뇌허혈 후 신경손상 방어 효과가 있는지 확인하기 위하여, 중뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO)을 실시한 후 글리시리진산을 처리하여 뇌허혈의 크기 변화를 관찰하였다. 그 결과, 글리시리진산의 투여량이 증가하고 뇌손상 후 글리시리진산의 투여시간이 빠를수록 뇌경색의 크기가

현저히 감소하는 것으로 나타났다(도 1 참조).

- [0023] 본 발명자들은 로타-로드(rota-rod) 테스트와 신경학적 걸손 테스트를 실시하여 글리시리진산의 뇌허혈 후 운동 기능 및 신경학적 손실의 개선 효과를 확인한 결과, 글리시리진산의 투여로 운동기능과 신경학적 손실 역시 개선됨을 확인하였다(도 2 참조).
- [0024] 본 발명자들은 글리시리진산이 개체의 조직 수준에서 뇌허혈 후 뇌의 염증반응 과정을 억제하는지 확인하기 위하여, MCAO를 실시한 후 글리시리진산을 처리하고 면역염색(immunostaining)을 실시하여 호중성 백혈구의 침투 및 미세아교세포 활성을 확인하였다. 그 결과, 글리시리진산의 투여에 의하여 개체 수준에서도 호중성 백혈구의 침투 및 미세아교세포의 활성이 억제되는 것을 확인하였다(도 3 및 도 4 참조).
- [0025] 따라서, 본 발명의 글리시리진산은 뇌신경보호를 위한 조성물로서 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0026] 본 발명의 신경보호용 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있고, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 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 등으로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 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.
- [0027] 본 발명의 신경보호용 조성물 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다. 특히 비경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내, 국소 또는 시각 경로에 적용)가 바람직하며, 0.0001 내지 100 mg/kg의 용량으로 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 다양하게 조절될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 글리시리진산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌신경보호 방법을 제공한다.
- [0029] 상기 조성물은 허혈성 뇌질환의 예방 및 치료에 이용되는 것이 바람직하고, 상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0030] 상기 약학적으로 유효한 양이란 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 이에 제한하지 않는다. 투여량은 특정 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 다양하게 조절될 수 있다.
- [0031] 상기 투여 방법은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0032] 상기 개체는 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 쥐, 토끼, 기니아피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.
- [0033] 본 발명의 글리시리진산은 뇌허혈로 인한 뇌조직 손상, 운동능력 및 신경학적 손상을 개선시키고 호중성 백혈구의 뇌조직 침투 및 미세아교세포의 활성을 막아서 뇌의 염증반응 과정을 억제시키므로, 뇌신경보호에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 글리시리진산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌신경보호용 건강식품을 제공한다.
- [0035] 상기 글리시리진산은 상기 [화학식 1]로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0036] 상기 건강식품은 허혈성 뇌질환의 예방 및 개선에 이용되는 것이 바람직하고, 상기 허혈성 뇌질환은 중풍, 뇌졸

중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상, 알츠하이머, 혈관성 치매, 크로이츠펔트-야콥병, 혼수 및 쇼크 뇌손상으로 이루어진 군으로부터 선택되어지는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0037] 본 발명의 글리시리진산은 뇌허혈로 인한 뇌조직 손상, 운동능력 및 신경학적 손상을 개선시키고 호중성 백혈구의 뇌조직 침투 및 미세아교세포의 활성을 막아서 뇌의 염증반응 과정을 억제시키므로, 뇌신경보호에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0038] 본 발명의 글리시리진산을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0039] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 글리시리진산을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0040] 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, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 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.

[0041] 상기 외에 본 발명의 글리시리진산은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0042]

실시예

[0043] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

[0044] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예 및 제조예에 의해 한정하는 것은 아니다.

[0045] <실시예 1> 글리시리진산의 뇌허혈 치료 효과

[0046] <1-1> 중뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 모델에 대한 글리시리진산의 처리

[0047] 뇌허혈이 일어난 뇌에 대한 글리시리진산(glycyrrhizic acid)의 뇌허혈 치료효과를 알아보기 위하여, 대뇌의 주요 동맥혈을 일시 막았다가 다시 풀어주는 뇌졸중과 같은 뇌세포 사멸 유도 방법인 중뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO)을 래트(웅성 Sprague-Dawley, 250 ~ 300 g, 대한 바이오링크)를 대상으로 1 시간 실시한 뒤 3시간 후에 1, 5 또는 10 mg/kg의 글리시리진산을 투여했다. 또한, 신경보호 효과의 효과적인 시간 범위를 알아보기 위해, 10 mg/kg의 글리시리진산을 MCAO/재관류한 뒤 30분, 3시간 또는 6시간 후에 투여했다.

[0048] <1-2> 2,3,5-트리페닐테트라졸리움클로라이드(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 염색을 통한 뇌절편에서 허혈 부위의 확인

[0049] 래트를 재관류한 뒤 이틀 후에 목을 절단하여 전체 뇌를 급속성 뇌 모형을 사용하여 2 mm 절편으로 관상 절단하였다. 이 절편을 즉시 1% TTC(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride)에 담가 염색하였다. 37℃에서 15분 동안 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 용액에 보관된 각 섹션의 뇌허혈 부위는 Quantity One 프로그램(Bio-

Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 측정, 분석하였다.

[0050] 그 결과, 글리시리진산을 투여한 경우, 글리시리진산 농도에 의존적으로 뇌허혈의 범위가 감소하였다. 5 또는 10 mg/kg의 글리시리진산을 투여하였을 때, 뇌허혈 부위의 부피는 각각 대조군의 약 74.4% 및 15.8%로 감소하여, 글리시리진산의 농도에 따라 뇌허혈의 범위가 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다. 또한, 재관류 한 뒤 30분 후에 10 mg/kg의 글리시리진산을 투여한 경우, 뇌허혈 부위의 부피가 대조군의 약 20.1%(도 1B 및 도 1C)로 감소하였고, 3시간 후에 투여한 경우에는 대조군의 약 15.8%, 6시간 후에 투여한 경우에는 대조군의 약 46.3%로 감소하였다. 뇌허혈 후 글리시리진산의 투여시간이 빠를수록 뇌허혈의 크기가 현저히 감소하는 것을 확인하였다. 이에, 글리시리진산은 뇌허혈의 상처를 광범위하게 제거함을 알 수 있었다.

[0051] <실시예 2> MCAO 모델에서의 뇌허혈 후 운동기능 및 신경학적 결손 개선 효과

[0052] <2-1> 로타-로드(Rota-rod) 테스트를 통한 운동기능 개선 효과 확인

[0053] 뇌허혈로 인한 손상 후의 운동기능 퇴화와 인지결함은 이전에 보고된 바 있다(Yamamoto M. et al., *Brain Res.* 452: 323-328, 1988; Rogers D.C. et al., *Stroke* 28: 2060-2065, 1997). MCAO로 뇌손상을 입은 래트의 운동기능을 로타-로드(rota-rod) 테스트를 이용하여 래트가 로타-로드에 머무른 시간으로 측정하였다. MCAO를 1시간 동안 실시한 뒤 3시간 후, 1, 5 또는 10 mg/kg의 글리시리진산을 투여하고 24시간 후에 각각의 래트가 5 rpm 속도의 로타-로드에 남아있는 시간을 측정하였다. 그리고나서 각각의 래트가 10 또는 15 rpm의 속도로 작동되는 로타-로드에 남아있는 시간을 1시간 간격으로 측정하였다. 이때, 각각의 점수는 반복실험을 통하여 측정하였다.

[0054] 그 결과, MCAO/재관류 하루 후, 정상 래트와 sham 수술한 대조군 간에 5 rpm 속도인 로타-로드에서 나타내는 행동에는 차이가 없었다. MCAO/재관류 1시간 후, 글리시리진산을 처리했을 때, 뇌허혈 쥐의 로타-로드 위에서의 행동은 상당히 퇴화되었는데, 시간이 지남에 따라 래트가 로타-로드에서 남아있는 시간이 짧아졌다. 글리시리진산을 MCAO/재관류 3시간 후에 처리하면 현저히 긴 시간을 로타-로드에 남아있음으로써 운동능력이 상당부분 회복되었음이 입증되었고, 글리시리진산의 농도가 증가함에 따라 로타-로드에서 남아있는 시간이 증가하였다(도 2A). 이에, 글리시리진산은 MCAO 후의 운동기능 손상을 개선시키는 것을 알 수 있었다.

[0055] <2-2> 신경학적 결손 개선 효과 확인

[0056] 신경학적 결손 평가는 MCAO/재관류 3시간 후, 1, 5 또는 10 mg/kg의 글리시리진산을 투여하고, 2일 후에 수행하였다. 변형된 신경학적 결손 테스트(Chen J. et al., *Stroke* 32:1005-1011)는 반사 능력 테스트, 균형감각 테스트, 걸음걸이 테스트, 시각·촉각 테스트 및 자리수용 테스트를 통하여 운동기능을 평가하였고, 18점수 체계로 측정되었다. 반사 능력 테스트는 이개반사, 각막반사, 놀람반사, 발작·경련, 앞다리 반사, 뒷다리 반사 및 머리 위치 반사로 구성되어, 정상 기능 0, 비정상 기능 1을 부여하였다. 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 부여하였다. 시각·촉각 테스트 및 자리수용 테스트는 정상 기능 0, 비정상 기능 1을 부여하였다. 이러한 각 테스트에 대한 점수를 각각의 래트에 대해 합산하였다.

[0057] 그 결과, 글리시리진산을 처리한 그룹에서 대조군에 비해 신경학적 결함은 감소한 것으로 나타났고, 글리시리진산의 농도가 증가함에 따라 신경학적 결함의 점수가 현저히 감소하였다(도 2B). 이에 글리시리진산이 MCAO에 따르는 신경학적 결함을 개선시키는 것을 확인하였다.

[0058] <실시예 3> 염증반응 개선 효과

[0059] <3-1> 면역조직화학염색을 통한 미세아교세포 활성화 및 호중성 백혈구의 침투 억제 확인

[0060] 뇌허혈이 일어난 뇌에서 일어나는 염증반응 과정에서 글리시리진산의 효과를 알아보기 위하여, 고유한 미세아교세포 표지(marker)인 이바-1(Iba-1), 활성화된 미세아교세포 표지인 맥-2(Mac-2), 미세아교세포의 활성화 호중성 백혈구의 표지인 엠피오-1(MPO-1)을 이용하여 호중성 백혈구의 뇌조직으로의 침투를 검사하였다. 비브라툼(Vibratom) 섹션은 이전 문헌(Streit W. J., *J. Histochem. Cytochem.* 38:1683-1686, 1990)에 기술된 것에 따

라 처리하였다. 섹션의 내재성 과산화물을 제거하기 위하여 3% 과산화수소에 상온에서 30분 동안 방치하고, 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 3회 세척한 뒤 다중클론 항토끼 이바-1 일차항체(Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) 또는 앰피오-1 일차항체(DakoCytomation, Denmark)로 염색할 섹션은 5% 염소혈청으로, 단일클론 항토끼 맥-2 일차항체(ABcam, Cambridge, UK)로 염색할 섹션은 5% 말혈청으로 30분간 반응시켰다. 다중클론 항토끼 이바-1 일차항체는 1:500으로 PBS에 희석하였고, 다중클론 항토끼 앰피오-1 일차항체 및 단일클론 항토끼 맥-2 일차항체는 각각 1:250으로 PBS에 희석하였으며, 섹션을 담가 12시간 이상 반응시키고 PBS로 3회 세척하였다. 일차항체와 반응이 끝난 섹션을 호올스래디쉬 페록시다아제(Horse Radish Peroxidase)가 연결된 이차항체(Santa Cruz, CA)를 1:200으로 PBS에 희석하여 1시간 동안 반응시키고 PBS로 3회 세척하였다. 항체 결합 부위는 HRP/3,3-다이아미노벤지딘(diaminobenzidine, DAB)을 사용하여 검출하였다. 이러한 과정을 거친 섹션을 젤라틴 처리된 슬라이드에 올리고 탈수시킨 뒤 자일렌(xylene)에 세척하고 커버 슬립을 덮었다.

[0061] 그 결과, sham 수술(sham-operated)한 래트의 이바-1 섹션 전체에 가지친 건강한 미세아교세포의 모습이 나타났고, MCAO/재관류 2일 후의 섹션에서는 식세포 작용을 하는 활성화된 미세아교세포를 관찰할 수 있었다. 한편, 글리시리진산 10 mg/kg을 투여한 래트는 sham 수술한 래트와 유사한 가지친 미세아교세포를 관찰할 수 있었다. 또한, sham 수술한 래트의 Mac-2 섹션에서 Mac-2 양성인 세포는 거의 발견되지 않았으나, MCAO/재관류 2일 후의 섹션에는 식세포 작용을 하는 원형의 미세아교세포를 관찰할 수 있었고, 글리시리진산 10 mg/kg을 투여한 래트는 sham 수술한 래트와 유사하게 활성화된 미세아교세포를 관찰할 수 없었다. 또한, sham 수술한 래트의 MPO-1 섹션에서 MPO-1 양성인 세포는 발견되지 않았으나 MCAO/재관류 2일 후의 섹션에는 뇌조직으로 침투한 호중성 백혈구를 나타내는 MPO-1 양성 세포가 현저히 많이 관찰되었다. 글리시리진산 10 mg/kg을 투여한 래트는 sham 수술한 래트와 유사하게 MPO-1 양성 세포가 발견되지 않았다. 이때, MCAO/재관류 2일 후의 섹션에서 매우 활성화된 미세아교세포는 대뇌피질 및 줄무늬체(striatum)의 반음영 부분에 존재하는 것으로 나타났다(도 3). 이에, 글리시리진산은 미세아교세포 활성화 및 호중성 백혈구의 침투를 막아 뇌의 염증반응 과정을 억제함을 확인하였다.

[0062] <3-2> 미세아교세포의 활성화 억제 확인

[0063] 글리시리진산의 항염증 효과를 확인하기 위하여, BV2 미세아교세포주에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS) 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하여 염증을 유도한 후, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 또는 2.5 mM의 글리시리진산을 처리하였다.

[0064] 그 결과, LPS를 처리한 경우, BV2 미세아교세포주에 약 55 μM 의 아질산염(nitrite)이 분비되어 미세아교세포가 활성화된 것을 확인하였다. 한편, 글리시리진산을 0.1 내지 2.5 mM로 처리한 결과, 글리시리진산의 농도에 비례하여 아질산염의 분비가 억제되었다. 2.5 mM의 글리시리진산을 처리했을 때, 아질산염 분비가 거의 기저수준으로 억제되어, 글리시리진산이 신경계의 대표적인 염증세포인 미세아교세포의 활성을 억제함을 확인하였다(도 4).

[0065] <제조예 1> 약학적 제제의 제조

[0066] <1-1> 산제의 제조

[0067] 글리시리진산 2 g

[0068] 유당 1 g

[0069] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0070] <1-2> 정제의 제조

[0071] 글리시리진산 100 mg

[0072] 옥수수전분 100 mg

[0073] 유당 100 mg

[0074] 스테아린산 마그네 2 mg

[0075] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0076] <1-3> 캡슐제의 제조

[0077] 글리시리진산 100 mg

[0078] 옥수수전분 100 mg

[0079] 유 당 100 mg

[0080] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0081] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0082] <1-4> 환의 제조

[0083] 글리시리진산 1 g

[0084] 유당 1.5 g

[0085] 글리세린 1 g

[0086] 자일리톨 0.5 g

[0087] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0088] <1-5> 과립의 제조

[0089] 글리시리진산 150 mg

[0090] 대두추출물 50 mg

[0091] 포도당 200 mg

[0092] 진분 600 mg

[0093] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섞씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[0094] <제조예 2> 식품의 제조

[0095] 본 발명의 글리시리진산을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0096] <2-1> 밀가루 식품의 제조

[0097] 본 발명의 글리시리진산 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0098] <2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0099] 본 발명의 글리시리진산 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0100] <2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0101] 본 발명의 글리시리진산 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0102] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조

[0103] 본 발명의 글리시리진산 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0104] <2-5> 선식의 제조

[0105] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0106] 감정콩, 감정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0107] 본 발명의 글리시리진산을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0108] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 글리시리진산을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0109] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0110] 종실류(들깨 7 중량부, 감정콩 8 중량부, 감정깨 7 중량부),

[0111] 글리시리진산(3 중량부),

[0112] 영지(0.5 중량부),

[0113] 지황(0.5 중량부)

[0114] <제조예 3> 음료의 제조

[0115] <3-1> 건강음료의 제조

[0116] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 글리시리진산 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0117] <3-2> 야채 주스의 제조

[0118] 본 발명의 글리시리진산 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0119] <3-3> 과일 주스의 제조

[0120] 본 발명의 글리시리진산 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

산업이용 가능성

[0121] 상기와 같이, 본 발명의 글리시리진산은 뇌허혈로 인한 뇌조직 손상, 운동능력 및 신경학적 손상을 개선시키고 뇌의 염증반응 과정을 억제시키므로, 뇌신경보호제, 뇌신경보호용 건강식품 및 사료첨가제 등의 제품 개발 및 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0122] 도 1은 중뇌동맥폐색(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 후 글리시리진산을 투여하여 TTC 염색을 통해 뇌절편의 허혈을 나타낸 그림(A), 글리시리진산의 시간별 투여에 따른 뇌절편의 허혈을 나타낸 그림(B) 및 글리

시리진산의 시간별 투여에 따른 전체 허혈의 부피를 나타낸 그래프(C)이다.

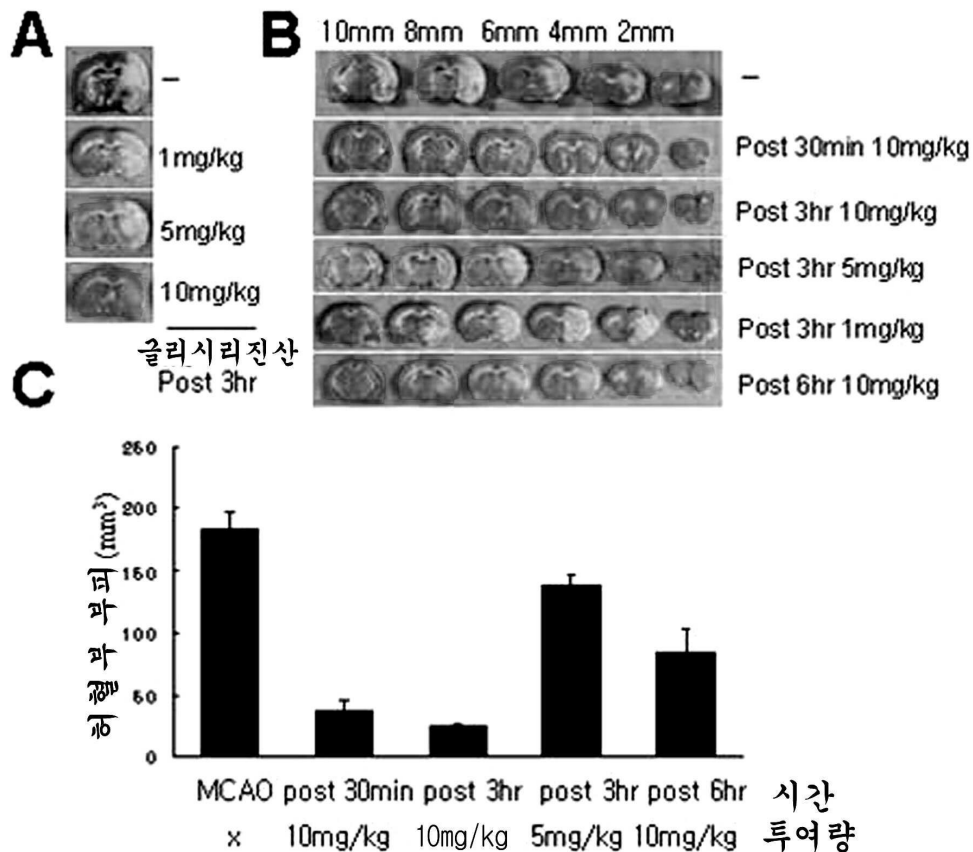
[0123] 도 2는 MCAO 후 글리시리진산을 투여한 뒤, 로타-로드 테스트를 실시하여 래트가 로타-로드에 남아있는 시간을 나타낸 그래프(A) 및 변형된 신경학적 결손 테스트를 실시하여 0 ~ 18점으로 측정된 점수를 합산한 그래프(B)이다.

[0124] 도 3은 sham 수술(sham-operated) 대조군, MCAO를 유도한 뇌허혈 반구, MCAO 후 글리시리진산을 투여한 후 2일 뒤의 뇌허혈 반구에서 각각 이바-1(Iba-1), 맥-2(Mac-2) 또는 엠피오-1(MPO-1)으로 면역염색(immunostaining)하여 미세아교세포와 호중성 백혈구의 모양을 나타낸 그림이다.

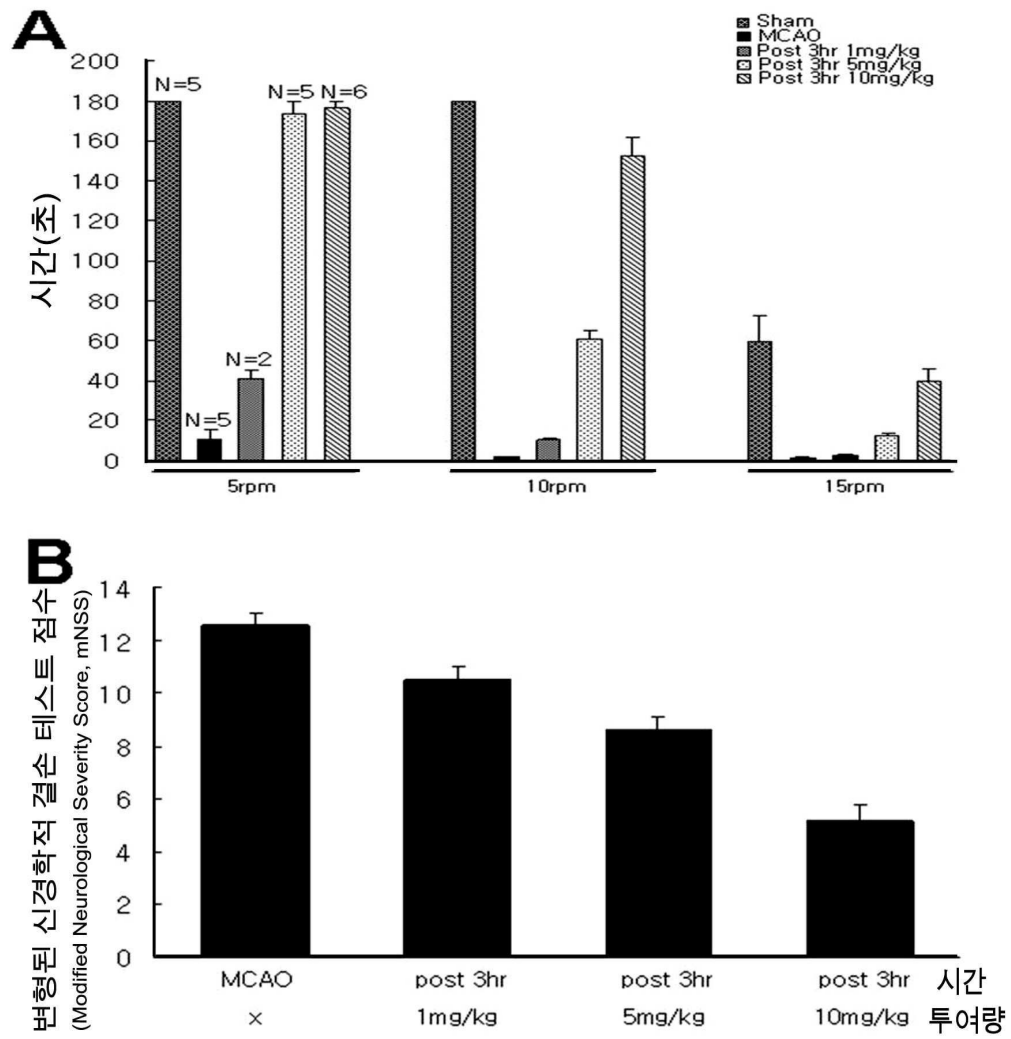
[0125] 도 4는 미세아교세포주에 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS)를 처리하여 염증을 유도한 후, 0.1 내지 2.5 mM의 글리시리진산을 처리하여 글리시리진산의 농도에 따른 아질산염(nitrite)의 분비량을 나타낸 그래프이다.

도면

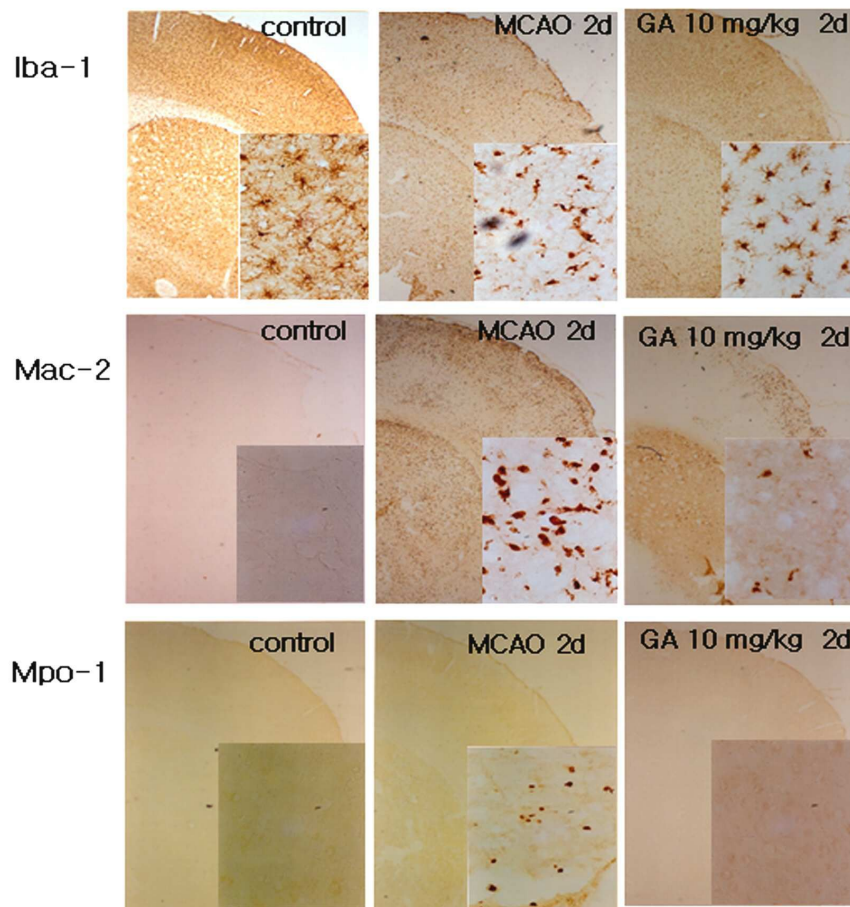
도면1



도면2



도면3



도면4

