



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0141546
(43) 공개일자 2016년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/718 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/539 (2006.01) A61K 36/708 (2006.01)
A61K 36/744 (2006.01) A61K 36/756 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/718 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2015-0077375

(22) 출원일자 2015년06월01일

심사청구일자 2015년06월01일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

문상관

서울특별시 강남구 개포로110길 15, 111동 1006호 (일원동, 우성7차아파트)

조기호

서울특별시 강남구 학동로87길 9, 8동 404호 (청담동, 진흥아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 하나

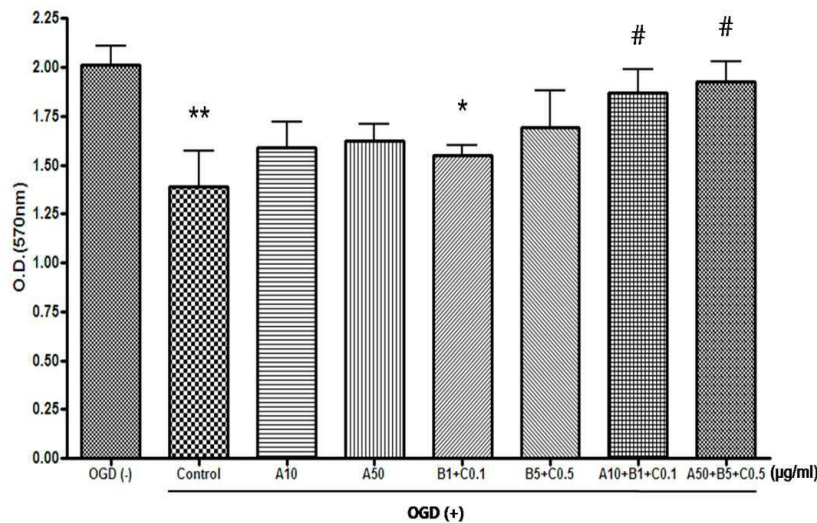
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 혼합 생약 추출물을 포함하는 신경세포 보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 혼합 생약 추출물을 포함하는 신경세포 보호용 조성물에 관한 것으로, 황련(*Coptis chinensis*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*), 치자(*Gardenia jasminoides Ellis*), 대황(*Rheum palmatum*), 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 삼칠근(*Panax notoginseng*) 혼합 추출물, 및 용뇌(*Borneolum*)를 유효성분으로 포함하는 신경세포 보호용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/539 (2013.01)

A61K 36/708 (2013.01)

A61K 36/744 (2013.01)

A61K 36/756 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

류봉하

경기도 성남시 분당구 내정로165번길 35, 529동
301호 (수내동, 양지마을한양아파트)

김남재

서울특별시 도봉구 마들로 657, 105동 802호 (방학
동, 이에스에이아파트)

최혁재

서울특별시 성동구 금호로 107, 110동 1502호 (금
호동2가, 래미안하이리버)

박대훈

부산광역시 부산진구 복지로13번길 22 (개금동, 사
랑한의원)

명세서

청구범위

청구항 1

황련(*Coptis chinensis*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*), 치자(*Gardenia jasminoides Ellis*), 대황(*Rheum palmatum*), 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 삼칠근(*Panax notoginseng*) 혼합 추출물, 및 용뇌(*Borneolum*)를 유효성분으로 포함하는 신경세포 보호용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 혼합 추출물은 황련 70 내지 90 중량부, 황금 70 내지 90 중량부, 황백 70 내지 90 중량부, 치자 70 내지 90 중량부, 대황 10 내지 30 중량부, 단삼 10 내지 30 중량부, 및 삼칠근 2 내지 8 중량부로 구성된 혼합 원료의 추출물인 신경세포 보호용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 혼합 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출한 신경세포 보호용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 알코올은 60 내지 90% 농도의 에탄올인 신경세포 보호용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 용뇌는 상기 혼합 원료 100 중량부 대비 0.1 내지 1 중량부 포함된 신경세포 보호용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 항에 따른 조성물 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루게릭병(Lou Gehrig disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 뇌졸중(stroke), 또는 치매(dementia)인 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여되는 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 혼합 생약 추출물을 포함하는 신경세포 보호용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 신경세포 손상에 대한 보호 효과로 인하여 퇴행성 신경질환, 척수손상, 또는 말초신경 손상의 예방 또는 치료에 사용될 수 있는 신경세포 보호용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 최근 생활환경과 식생활 패턴의 변화 등으로 현대인들은 생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환에 관심이 커지고 있다. 특히, 급속한 노령 인구의 증가에 따라, 뇌, 척추, 말초신경의 손상을 포함한 퇴행성 신경질환이 점차 증가하고 있는 추세이다. 퇴행성 신경질환은 허혈에 기인한 신경손상 및 활성산소에 의한 신경손상과 관련된 질환을 포함한다.
- [0004] 신경세포는 발생 및 시냅스를 재구성하는 과정에서 끊임없이 세포사멸하며, 스트레스와 세포독성 약물에 의한 세포사멸이 퇴행성 신경질환의 주요 요인이 된다. 산화적 스트레스는 퇴행성 신경질환의 유발원인과 많은 연관 관계를 가진 것으로 알려져 있으며, 최근 연구에 따르면 만성적인 스트레스 및 산화적 스트레스는 시상하부-뇌하수체-부신피질계, 해마, 선조체, 흑질 그리고 전뇌피질 부위에서 산화적 스트레스를 유발하여 세포사멸을 증가시키고 뉴런 및 성장인자를 감소시켜 퇴행성 신경질환을 초래하는 것으로 보고된 바 있다.
- [0005] 산소에서 유리되는 자유라디칼은 조직 손상의 주요 원인으로 알려져 있다. 신경독성과 관련된 산화적 라디칼은 과산화수소, 과산화수소 음이온, 수산화기 등이 있으며, 과산화수소가 중추신경계의 세포사멸 유발에 있어서 가장 중요한 물질로 손 꼽힌다.
- [0006] 뇌신경세포에서 활성산소종(Reactive Oxygen Species)은 산화적 스트레스에 의해 생성되고, 이는 미토콘드리아에서의 시토크롬 C의 유리화 카스파아제-3 활성화를 일으켜 세포사멸을 유발한다. 동시에 활성산소종은 글루타메이트, 특히 NMDA 수용체를 활성화하여 메타보트로피컬 캐스케이드(metabotropic cascade)에 의한 Ca^{2+} 이온의 증가를 야기하고, 세포내 Ca^{2+} 의 증가는 카스파아제-2를 활성화하여 DNA를 손상시킨다.
- [0007] 현재 세계적으로 고령인구의 비중은 점차 증가하고 있다. 우리나라도 2010년 기준 65세 이상 인구의 비율이 11%로 상승하였고, 2018년에는 고령사회, 2026년에는 초고령 사회로 접어들 것으로 예견되며, 고령인구의 노인성 질병의 해결이 시급한 사회적 문제로 대두되고 있다.
- [0008] 특히, 노인성 치매질환의 약 절반을 차지하는 알츠하이머병은 현재 효과적인 치료방법과 예방방법이 없으며, 고령화 사회에 있어서 시급히 해결해야 할 신경질환에 해당한다.
- [0009] 하지만, 세포 이식, 외과적 수술 등 다양한 퇴행성 신경질환 치료법은 위험요소와 부작용을 내포하며, 손상 기전의 복잡성 등으로 실질적으로 신경세포의 손상을 보호하는 치료제는 개발되지 못하고 있는 실정이다.
- [0010] 조직플라스미노겐 활성화자(tissue plasminogen activator)는 FDA 공인 시판 중인 뇌허혈 치료제로서 뇌허혈을 유발시키는 혈전을 녹여 빠른 산소 및 포도당 공급을 유도하는 혈전 용해제이다. 그러나, 조직플라스미노겐 활성화자는 직접적으로 신경세포를 보호하는 것이 아니기 때문에 신속한 사용이 요구되며, 과량의 사용이나 자주 사용 시에는 혈관벽이 얇아져 출혈성 뇌혈관질환을 유발할 수 있는 문제가 있다.

- [0011] 또한, MK-801은 초기의 세포내 칼슘 유입을 효과적으로 저해하여 글루타메이트 유도 세포독성을 억제하는 것으로 알려졌으나, 임상시험 결과 부작용이 발견되어 폐기된 바 있다.
- [0012] 한편, 국내의 경우에는 다수의 천연 물질이 뇌졸중의 예방에 효과가 있는 건강식품으로서 시판되고 있으나, 과학적인 검증을 거치지 않은 것이 다수이며, 건강식품 남용의 원인으로 손꼽히기도 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 장기간 임상에 적용되어 그 안정성 및 개선 효과가 입증된 천연 혼합 추출물을 객관적으로 검증하고, 신경세포의 손상에 대한 보호 약물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 복합 추출물을 포함하는 퇴행성 신경질환 치료용 조성물 및 퇴행성 신경질환 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 측면에 따르면, 황련(*Coptis chinensis*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*), 치자(*Gardenia jasminoides Ellis*), 대황(*Rheum palmatum*), 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 삼칠근(*Panax notoginseng*) 혼합 추출물, 및 용뇌(*Borneolum*)를 유효성분으로 포함하는 신경세포 보호용 조성물이 제공된다.
- [0018] 일 실시예에 따르면, 상기 혼합 추출물은 황련 70 내지 90 중량부, 황금 70 내지 90 중량부, 황백 70 내지 90 중량부, 치자 70 내지 90 중량부, 대황 10 내지 30 중량부, 단삼 10 내지 30 중량부, 및 삼칠근 2 내지 8 중량부로 구성된 혼합 원료의 추출물일 수 있다.
- [0019] 일 실시예에 따르면, 상기 혼합 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출할 수 있다.
- [0020] 일 실시예에 따르면, 상기 알코올은 60 내지 90% 농도의 에탄올일 수 있다.
- [0021] 일 실시예에 따르면, 상기 용뇌는 상기 혼합 원료 100 중량부 대비 0.1 내지 1 중량부 포함될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 신경세포 보호용 조성물 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물이 제공된다.
- [0023] 일 실시예에 따르면, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루게릭병(Lou Gehrig disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 뇌졸중(stroke), 또는 치매(dementia)일 수 있다.
- [0024] 일 실시예에 따르면, 상기 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 신경세포 보호용 조성물을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 및 개선용 건강기능식품이 제공된다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명에 따르면, 상기 신경세포 보호용 조성물은 천연 유래의 혼합 생약 추출물을 포함하여, 체내 독성이 낮고 신경세포 보호 및 재생 효과가 우수하여 퇴행성 신경질환 예방 및 치료에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 MTT assay를 통해 추출물의 유효 성분 비율을 달리한 경우 신경 보호 효과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 cell count법을 통해 추출물의 유효 성분 비율을 달리한 경우 신경 보호 효과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 Live/Dead Viability Cytotoxicity Kit를 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 신경세포 보호용 조성물의 신경 보호 효과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 동물 모델에서 본 발명의 일 실시예에 따른 신경세포 보호용 조성물의 뇌경색 부피 감소 효과를 확인한 것이다.
- 도 5는 동물 모델에서 본 발명의 일 실시예에 따른 신경세포 보호용 조성물의 뇌경색 부피 감소 효과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 6은 동물 모델에서 본 발명의 일 실시예에 따른 신경세포 보호용 조성물의 뇌경색 부피 감소 효과를 확인한 것이다.
- 도 7은 동물 모델에서 본 발명의 일 실시예에 따른 신경세포 보호용 조성물의 뇌경색 부피 감소 효과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 8은 동물 모델에서 비교예에 따른 신경세포 보호용 조성물의 뇌경색 부피 감소 효과를 확인한 것이다.
- 도 9는 동물 모델에서 비교예에 따른 신경세포 보호용 조성물의 뇌경색 부피 감소 효과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 10은 동물 모델에서 비교예에 따른 신경세포 보호용 조성물의 뇌경색 부피 감소 효과를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 11은 동물 모델에서 비교예에 따른 신경세포 보호용 조성물의 뇌경색 부피 감소 효과를 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0032] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0033] 이하, 본 발명의 실시예를 상세히 기술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 아니함은 자명하다.
- [0035] 본 발명의 일 측면에 따르면, 황련(*Coptis chinensis*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 황백(*Phellodendron amurense*), 치자(*Gardenia jasminoides Ellis*), 대황(*Rheum palmatum*), 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 및 삼칠근(*Panax notoginseng*) 혼합 추출물, 및 용뇌(Borneolum)를 유효성분으로 포함하는 신경세포 보호용 조성물이 제공된다.
- [0036] 상기 신경세포 보호용 조성물은 혼합 추출물, 및 용뇌(Borneolum)를 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명자들은 신경세포 보호 활성을 갖는 우수한 식물 생약을 발굴하기 위해, 임상에서의 치료 효과를 바탕으로 최적의 원료 조합을 도출하였으며, 추출 방법을 구체화함으로써 신경 세포 보호 활성이 극대화된 상기 신경 세포 보호용 조성물을 개발하였다.

- [0038] 상기 “추출물”은 용매와 추출재료를 특정 조건하에서 접촉시킴으로써 추출재료에 함유된 유효성분이 전이된 용매를 지칭하는 것으로, 상기 혼합 추출물은 황련, 황금, 황백, 치자, 대황, 단삼 및 삼칠근의 혼합 원료에 대한 추출 공정을 통해 각 원료의 유효 성분을 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 “황련(*Coptis chinensis*)”은 중국 원산으로 한국·일본·중국 등지에서 생약용으로 재배되며, 산지의 수림 그늘의 습진 땅에서 자란다. 줄기와 땅속줄기의 단면이 짙은 황색인 데서 명명되었다. 한방에서는 11월 경에 재식 5~6년 된 황련·왜황련의 뿌리를 채취하여 햇볕에 말린 것을 황련(黃連)이라고 칭하며, 건위·진정·소염·항균 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다.
- [0040] 상기 “황금(*Scutellaria baicalensis*)”은 꿀풀과에 속하는 여러해살이 초본식물인 황금(*Scutellaria baicalensis* GEORGE)의 뿌리로 만든 약재를 지칭한다. 상기 황금은 일반적으로 산지의 풀밭에서 자라고 여러 대가 나와 포기로 자라고 털이 있으며 가지가 갈라진다. 원뿌리는 원뿔형이고 살이 황색이다. 한방에서 뿌리는 해열·이뇨·지사·이담 및 소염제로 사용된다. 한편, 상기 황금에 함유된 플라보노이드의 일종인 바이칼린은 항산화, 항암, 항염증의 효과를 가진다고 알려져 있다.
- [0041] 상기 “황백(*Phellodendron amurense*)”은 약재로 사용되는 황벽나무의 껍질을 지칭하는 것으로, 황경피라고도 불리운다. 낙엽활엽 교목으로 높이 10m 정도로 자라는데, 껍질에는 코르크가 발달했으며 속껍질은 황색이다. 우리나라에서는 제주·전남 지역을 제외한 전지역에 고르게 분포하고, 잡목 숲 또는 산속의 계곡에서 자란다. 상기 황백은 하지 전후에 나무줄기에서 껍질을 벗겨내어 조피(粗皮:거친 껍질)를 제거하거나 썰어서 햇볕에 말려 약재로 사용된다. 상기 황백은 혈당저하 작용을 하며, 폐렴쌍구균, 인형결핵균, 포도상구균 등의 발육 및 증양세포의 번식을 저지시키고, 살균작용을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0042] 상기 “치자(*Gardenia jasminoides Ellis*)”는 꼭두서니과의 상록관목인 치자나무의 열매를 지칭한다. 한방에서는 불면증과 황달의 치료에 사용되고 소염, 지혈 및 이뇨의 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 상기 열매는 9월에 황홍색으로 익으면 채집하여 햇볕에 말린 후 약재로 사용하며, 볶거나 별도의 가공 없이 사용되기도 한다. 상기 치자는 상처의 열을 내리는 작용을 하며, 이 외에도 이뇨 및 지혈 효과가 있어 관격, 소갈, 황달, 코피, 소변이나 대변에 피가 섞여 나오는 증상에 대해 개선효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- [0043] 상기 “대황(*Rheum palmatum*)”은 마디풀과(여뀌과)의 여러해살이 식물인 대황의 줄기로 황근, 금문대황, 황량 등으로 지칭된다. 늦가을이나 이른봄에 채취하여 외피를 제거하고 잘라서 그늘에서 말려 약재로 사용한다. 상기 대황은 장관 내에 축적된 노폐물을 배출시키고 열을 내려주며 월경이상, 열병, 각기, 종창, 화상 등에 사용된다.
- [0044] 상기 “단삼(*Salvia miltiorrhiza*)”은 꿀풀과에 속한 다년생 초본으로, 인삼과 형태가 유사하고 붉은 빛을 나타내어 명명되었다. 특히, 상기 단삼은 항암작용과 항균 및 항염증 작용, 심혈관계 질환에 대해 개선 효과가 있는 것으로 보고되었다.
- [0045] 상기 “삼칠근(*Panax notoginseng*)”은 드릅나무과의 다년생 초본으로, 인삼보다 작고 쪽잎이 7 개이며 뿌리는 작은 실북모양의 형태를 가진다. 상기 삼칠근은 주로 중국 남부 운남 사천 등지에서 재배되고, 조선인삼과 모양이 유사하여 삼칠인삼으로도 불리운다. 뿌리는 지혈작용 및 강심작용이 있으며, 심장동맥의 혈류량을 늘리고 심근의 산소 소비량을 줄여 혈액내의 지질과 콜레스테롤 함량을 줄이는 효과가 있는 것으로 보고되었다. 또한, 상기 삼칠근은 소염, 진통, 지혈작용이 있어 간염을 비롯한 염증질환에 효과적이며, 외상 또는 절상으로 생긴 출혈과 내출혈에도 효과적이다.
- [0046] 상기 “용뇌(Borneolum)”는 다마르 가공에 의해, 디프테로아르파세아(*dipteroarpaceae*)과 식물 수지로부터 수득된 결정 산물을 지칭한다. 컴포지트(*Composite*)과 식물인 귀오줌풀(*Blumea balsamifera* Dc)의 잎으로부터 증기 증류에 의해 수득한 결정을 조제 블루메 폴리(*Praeparatio Blumeae Folii*)라고 한다. 화학적 방법을 통해 캄포(*camphor*), 테르벤텐(*terebenthene*) 등으로부터 합성 및 가공된 산물은 합성 용뇌(*Borneolum Syntheticum*)라고 한다. 용 뇌는 향기가 있어, 감각 기관을 강하게 자극하며 축적된 열을 방출할 수 있다. 상기 용뇌는 심근 허혈에 효과적이며 관상 동맥의 혈류를 현저히 증가시킬 수 있는 것으로 보고 되었다.
- [0047] 일 실시예에 따르면, 상기 혼합 추출물은 황련 70 내지 90 중량부, 황금 70 내지 90 중량부, 황백 70 내지 90 중량부, 치자 70 내지 90 중량부, 대황 10 내지 30 중량부, 단삼 10 내지 30 중량부, 및 삼칠근 2 내지 8 중량부로 구성된 혼합 원료의 추출물일 수 있다.
- [0048] 일 실시예에 따르면, 상기 용뇌는 상기 혼합 원료 100 중량부 대비 0.1 내지 1 중량부 포함될 수 있다.

- [0049] 상기 혼합 추출물은 원료 혼합 비율의 편차가 큰 경우 각 추출물의 유효성분에서 유래한 신경 보호 효과가 적절하게 구현되지 않을 수 있으므로, 작업 환경 및 최종 산물의 품질을 고려하여 혼합비율을 적절하게 제어할 수 있다. 본 발명자들은 수천례의 임상의 결과를 토대로 상기 원료의 최적 혼합 비율을 도출하였으며, 상기 혼합 추출물의 신경 보호 효과는 극대화될 수 있다.
- [0050] 상기 추출 공정에 있어서 용매의 종류는 특별히 한정되지 않으며, 필요에 따라 다양한 용매를 사용할 수 있다. 또한, 상기 추출은 상기 용매를 사용하여 냉침, 온침, 가열 등 당해 기술 분야의 통상적인 방법이 사용될 수 있다.
- [0051] 일 실시예에 따르면, 상기 혼합 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출될 수 있으나, 바람직하게는 60 내지 90% 농도의 에탄올을 사용할 수 있다.
- [0052] 즉, 상기 원료에 포함된 유효 성분은 용매의 극성에 따라 추출 비율이 상이해질 수 있으며, 상기 에탄올은 생약재의 생리 활성 물질의 추출에 있어서 선택성이 뛰어나므로 상기 에탄올 추출에 의해 최적의 신경 보호 효과가 구현될 수 있다.
- [0053] 특히, 물과 에탄올은 극성이 상이하어, 각 극성에 따라 추출되는 유효성분이 상이할 수 있으므로 최적의 신경 보호 효과가 구현될 수 있도록 상기 에탄올의 농도를 적절히 제어할 수 있다. 다만, 상기 에탄올은 농도가 90% 초과이면 적절한 수율이 구현되지 않을 수 있고, 농도가 60% 미만이면 신경 보호 효과를 나타내는 유효 성분이 충분하게 추출되지 않을 수 있으므로 상기 알코올의 농도를 상기 범위 내에서 적절히 조정할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 신경세포 보호용 조성물 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물이 제공된다.
- [0055] 상기 “퇴행성 신경질환”은 신경세포의 점진적인 구조적, 기능적인 손실로 인해 운동 및 감각기능의 손상, 기억, 학습, 연산 처리 등의 고차원적인 기능이 저해 또는 손실되는 포괄적인 병태를 지칭한다. 상기 퇴행성 신경질환은 신경계의 특정부위를 주로 침범하여 치매, 추체외로 이상, 소뇌 이상, 감각 장애, 운동 장애 등의 증상을 동반하며, 동시에 여러 부위가 침범되어 복합적으로 나타날 수 있다.
- [0056] 일 실시예에 따르면, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루게릭병(Lou Gehrig disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 뇌졸중(stroke), 또는 치매(dementia)일 수 있다.
- [0057] 상기 신경세포 보호용 조성물은 당해 기술 분야의 통상적인 방법에 따라 건조, 농축 가공과 함께 약제학적으로 허용되는 산 부가염을 형성할 수 있다. 상기 유기산은 유기산 및 무기산이 사용될 수 있다. 예컨대, 상기 무기산은 염산, 브롬산, 황산, 또는 인산 일 수 있으며, 상기 유기산은 구연산 (Citric acid), 초산, 젖산, 주석산 (Tartaric acid), 말레인산, 푸마르산 (Fumaric acid), 포름산, 프로피온산 (Propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콜산, 숙신산 (Succinic acid), 4-톨루엔설폰산, 벤젠설폰산, 살리실산, 니코틴산, 이소니코틴산, 피롤린산, 글루탐산 또는 아스파르트산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 상기 “예방”은 동물의 병리학적 세포의 발생 또는 세포의 손상, 손실의 정도의 감소를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 병리학적 세포의 발생 또는 신경세포의 사멸이나 손실 등이 상기 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물을 사용 하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다. 또한, 상기 “치료”는 퇴행성 신경질환의 하나 이상의 증상을 개선하거나, 증상의 진행을 저지하는 것을 의미하며, 통상적으로 사용되는 치료의 의미를 포괄할 수 있다.
- [0059] 일 실시예에 따르면, 상기 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다.
- [0060] 상기 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물은 전신 또는 국소 투여할 수 있으며, 상기 투여는 경구 투여 및 비경구 투여를 포함할 수 있다. 상기 상기 신경세포 보호용 조성물이 치료제로서 투여되는 경우, 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화될 수 있다.
- [0061] 따라서, 상기 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 조성물은 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0062] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티

톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.

[0064] 상기 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 적소두 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 또한, 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[0065] 상기 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0066] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.

[0067] 한편, 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 신경세포 보호용 조성물을 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 및 개선용 건강기능식품이 제공된다. 상기 건강보조식품은 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강보조식품의 제형으로 제제화될 수 있다.

[0068] 상기 건강보조식품은 예를 들어 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 액제, 엑스제, 차, 젤리, 엑스, 또는 음료 등으로 제조될 수 있다. 상기 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제는 당해 기술분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다. 상기 건강기능식품은 신경세포 보호 작용에 의해 퇴행성 뇌질환, 척수 손상, 및 말초신경 손상을 포함한 각종질환의 예방 및 개선에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 다양한 형태로 가공되어 복용이 용이하고 쉽고 제품화가 용이하다.

[0069] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0071] 제조예

[0072] 본 신경세포 보호용 조성물의 신경 보호 효과를 검증하고자 혼합 추출물을 제조하였다. 다만, 각 원료의 혼합 원료 또는 혼합 비율에 따른 신경 보호 효과를 확인하기 위해 A, B, C 시료로 구분하여 개별적으로 시료를 제조하였다.

[0073] 황련 80g, 황금 80g, 황백 80g, 치자 80g, 대황 20g이 혼합된 생약 원료를 80% 에탄올 2L로 2시간씩 2회 환류 추출하였으며, 상기 추출액을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료 A를 수득하였다.

[0074] 또한, 단삼 262.5g, 삼칠근 52.5g이 혼합된 생약 원료를 80% 에탄올 2L로 2시간씩 2회 환류 추출하였으며, 상기 추출액을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료 B를 수득하였다.

[0075] 마지막으로, 상기 시료 C는 용제로 하였다.

[0077] <실험예 1> OGD 모델에서 신경 보호 효과 검증(In vitro)

[0078] 각 시료의 신경 보호 효능을 확인하기 위해, OGD(Oxygen/glucose deprivation) 실험법을 수행하였다. 상기 OGD 실험법은 Wang 등(Wang C, Nguyen HN, Maguire JL, Perry DC: Role of intracellular calcium stores in cell death from oxygen-glucose deprivation in a neuronal cell line. J Cereb Blood Flow Metab 2002; 22:206-214.)의 방법 및 Kim등(Kim YT, Moon SK, Maruyama T, Narumiya S, Dore S: Prostaglandin fp receptor inhibitor reduces ischemic brain damage and neurotoxicity. Neurobiol Dis 2012; 48:58-65.)의 방법을 응용하였고, SH-SY5Y 세포주를 배양하여 사용하였다. 상기 OGD방법은 GD방법에 저산소 노출을 결합한 것으로, GD 방법에 비하여 OGD방법은 in vivo 뇌경색 실험과 유사점이 있어 많은 연구에서 활용된다.

[0079] OGD 처리를 위해 anaerobic chamber를 이용하여 산소가 포함되지 않은 95% N2/5% CO2 가스를 chamber에 주입하

여 산소결핍(anoxia) 상태를 유발하였고, glucose가 포함되지 않은 DMEM(Life Technologies, U.S.A)를 사용하였다. Wang 등의 실험법에 따라 16시간 동안 OGD 처리를 하였으며, OGD 처리 후 glucose가 포함된 정상 배양액(DMEM)으로 교환하였으며, OGD 처리를 시작한 시점으로부터 48시간이 되었을 때 MTT assay, Cell Count, Live/Dead Viability Cytotoxicity Kit를 이용하여 세포 생존능을 확인하였다.

1-1. MTT assay

세포 생존능을 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다. MTT assay는 Carmichael의 방법(Zhen G, Kim YT, Li RC, Yocum J, Kapoor N, Langer J, Dobrowolski P, Maruyama T, Narumiya S, Dore S: Pge2 ep1 receptor exacerbated neurotoxicity in a mouse model of cerebral ischemia and alzheimer's disease. Neurobiol Aging 2012;33:2215-2219.)을 응용하여, 2.0×10^5 cells/mL 농도로 96 well plate에 well 당 100 μ L씩 분주하고 배양하였다.

상기 배양액으로만 세포 배양한 시험군은 대조군으로 하고, sample 군은 총 7 그룹으로서 대조군, 10A, 50A, 1B+0.1C, 5B+0.5C, 10A+1B+0.1C, 50A+5B+0.5C로 분류하였다.

분석당일 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, M5655, Sigma, U.S.A) solution(stock solution 5mg/mL)의 최종농도가 0.5 mg/mL이 되도록 well 당 10 μ L씩 적용시킨 후 2시간 동안 배양하고 배양액을 제거한 후 dimethylsulfoxide(DMSO)를 100 μ L씩 넣어 5분간 방치하면서 MTT formazan을 용해하였으며, 10분 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다.

MTT assay를 수행하기 위하여 SH-SY5Y 세포주를 배양하였다. 상기 SH-SY5Y 세포주는 human derived neuroblastoma cell line으로서 배양액에 serum이 존재할 경우 증식(proliferation)할 수 있으며, serum free 상태에서는 증식을 멈추고 분화(differentiation)를 하는 특성을 가진다.

상기 SH-SY5Y 세포주는 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco[®], Life Technologies, U.S.A)에 10 % FBS(fetal bovine serum, Gibco[®], Life Technologies, U.S.A), 1% antibiotics가 포함된 배양액, 및 75 cm² cultures flasks를 이용하여 37 ° C humidified 5% CO₂ 농도의 incubator에서 배양하였다.

상기 배양액은 2~3일 간격으로 교체해 주었으며, 배양된 세포가 dish의 70~80% 정도가 되었을 경우 10:1로 계대 배양을 실시하였다. 배양된 세포는 OGD 실험을 위해 96 well culture plates와 petri-dishes에서 2.0×10^5 cells/mL 농도로 계대 배양 되었으며, OGD 실험 24시간 전에 FBS가 없는 배양액을 교환하였다.

시료의 처리는 OGD 처리와 동시에 시행하고 48시간 경과 후 MTT assay를 수행하였다.

표 1에 나타난 바와 같이, OGD 처리후 OGD를 처리하지 않은 그룹과 할 때 O.D 값이 통계적으로 유의하게 감소하였다. OGD 처리 대조군과 실험약 처리시 결과를 보면, 시료 A의 경우 50 μ g/ml 농도로 처리시 대조군에 비해 O.D 값이 증가하였으며, 시료 B+C의 경우 B 5 μ g/ml + C 0.5 μ g/ml 농도로 처리시 증가되는 경향을 보였으나 각각 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

그러나, 본 발명에 따른 A+B+C 혼합 시료는 A10+B1+C0.1(μ g/ml)와 A50+B5+C0.5(μ g/ml)의 배합비로 농도를 달리하여 처리했을 때, 양자 모두 대조군과 비교하여 O.D 값이 유의하게 증가하였다(도 1).

표 1

구분	OGD 미처리	OGD + 시료(μ g/ml)							P
		Control	A10	A50	B1+C0.1	B5+C0.5	A10 +B1+C0.1	A50 +B5+C0.5	
평균 (O.D)	2.01	1.39	1.59	1.62	1.55	1.69	1.87	1.92	0.0001
표준 편차	0.10	0.18	0.13	0.08	0.05	0.19	0.12	0.10	

1-2. Cell count 결과

- [0094] 각 시료의 조합에 따른 신경 보호 효능을 확인하기 위해 OGD 처리 실험을 수행하였다. 세포 생존능을 확인하기 위해 MTT assay 이외에 trypan blue (Sigma, U.S.A)를 이용한 cell count법을 이용하였다. OGD 처리 48시간 후에 세포를 PBS를 이용하여 세척한 후 trypan blue가 포함된 PBS 용액을 처리하여 live cell과 dead cell을 구분하여 cell count를 하였다. 세포 생존능은 전체세포 수에서 살아있는 세포 (white cells)의 비율(%)로 표시하였다.
- [0095] 각 시료는 OGD 처리와 동시에 배양액에 포함하여 처리하였다. 상기 OGD 처리 48시간 경과 후 trypan blue를 이용하여 cell count 실험을 통해 세포 생존능을 확인한 결과, 살아있는 세포의 수는 OGD를 처리하지 않은 그룹에 비해 유의하게 감소하였다.
- [0096] 표 2에 나타난 바와 같이 OGD 처리 대조군과 각 시료의 처리에 따른 결과를 비교하면, 시료 A를 50 µg/ml 농도로 처리한 경우, 및 시료 B+C를 B5+C0.5(µg/ml) 농도로 처리한 경우 OGD 처리 대조군에 비해 세포 생존능이 증가하였으나, 통계적 유의성은 나타나지 않았다.
- [0097] 그러나, 본 발명에 따라 시료 A+B+C를 A50+B5+C0.5(µg/ml) 농도로 처리한 경우 대조군 대비 세포 생존율이 현저하게 증가하였다(도 2).

표 2

구분	OGD 미처리	OGD + 시료(µg/ml)							P
		Control	A10	A50	B1+C0.1	B5+C0.5	A10 +B1+C0.1	A50 +B5+C0.5	
평균 (%)	84.8	25.5	40.*	51.4	43.5	58.2	71.8	79.5	<0.0001
표준 편차	7.1	16.5	10.5	10.2	8.1	11.4	6.7	6.3	

[0100] 1-3. Live/Dead Viability Cytotoxicity Kit 실험 결과

- [0101] OGD 처리에 의한 세포 사멸에서 각 시료의 조합에 따른 신경 보호 효과를 확인하기 위해 Live/Dead Viability Cytotoxicity Kit(Molecular Probes, U.S.A)를 이용하였다. 상기 Live/Dead Viability Cytotoxicity Kit는 세포투과성을 가지는 calcein AM과 EthD-1(ethidium homodimer)이 포함된 kit로서 살아있는 세포는 녹색 형광(ex/em ~495 nm/~515nm)을 나타내며, 세포 전체의 morphology를 확인할 수 있다. 상기 EthD-1은 세포막을 투과할 수 없으므로 살아있는 세포는 calcein AM에 의해 녹색으로 염색되고, 세포막이 손상된 죽은 세포는 EthD-1에 의해 세포의 핵 부분이 밝은 적색(ex/em ~495nm/~635nm)으로 염색된다.
- [0102] 상기 OGD 처리 48시간 경과 후에 세포를 PBS를 이용하여 세척한 후 2 µM calcein AM과 4 µM EthD-1이 포함된 PBS 용액을 약 30분간 처리하여 정상 incubator에서 보관한 후 PBS 세척 후 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)와 CCD camera(Hamamatsu, Japan)을 이용하여 형광 이미지를 확보하였다.
- [0103] 본 실험은 OGD 미처리 대조군, OGD처리 대조군, OGD+A10+B1+C0.1(µg/ml) 처리군, OGD+A50+B5+C0.5(µg/ml) 처리군 4개의 그룹에 대해 진행되었다.
- [0104] 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 OGD 처리에 의해 세포 사멸이 관찰되었으나, 본 발명에 따른 혼합 시료 처리 후 OGD로 유발된 SH-SY5Y 세포사멸이 현저히 감소하였다.

[0106] <실험예 2> pMCAO 모델에서 신경 보호 효과 검증(In vivo)

- [0107] In vivo 실험을 진행하고자, 멸균상태로 관리되어 온 생후 5주된 ICR 수컷 실험쥐(20g)를 샘타코(서울, 대한민국)에서 구입하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 충분히 공급되었다. 실험동물을 온도(23±1℃)와 습도(60±10%)가 일정하게 유지되는 사육실에서 7일간 충분히 적응시킨 후 실험을 진행하였다.
- [0108] pMCAO 국소 뇌허혈의 protocol은 Majid 등(Majid A, He YY, Gidday JM, Kaplan SS, Gonzales ER, Park TS, Fenstermacher JD, Wei L, Choi DW, Hsu CY: Differences in vulnerability to permanent focal cerebral ischemia among 3 common mouse strains. Stroke 2000;31:2707-2714.)의 방법을 응용하였다. 25-30g 체중의

ICR 실험쥐를 70% N₂O와 30% O₂가 섞인 혼합가스에 2%의 isoflourane으로 마취한 후 마우스의 우측 눈과 귀 사이 피부를 1.0 cm 절개하고 측두근(temporal muscle)을 벌려 측두골(temporal bone)을 노출시켰다.

[0109] 수술용 현미경으로 중대뇌동맥을 확인한 후 측두골에 드릴을 이용하여 2.0-mm burr hole을 형성하였다. 이어서, 경막을 제거한 후 bipolar coagulator를 이용하여 중대뇌동맥 말단부의 main trunk를 소작하였으며 micro-scissor로 소작부위를 절단하여 혈류를 차단하였다. 피부절개부위를 봉합한 후 회복기 동안 체온이 38±1℃이하로 떨어지지 않도록 체온유지장치(Harvard apparatus, Holliston, MA, USA)를 사용하였다. 수술 중 heating pad를 이용하여 직장체온을 36.5 내지 37.5℃로 유지하였다. 수술직후 마비 측으로 선회하지 않거나 지주막하출혈이 발생한 실험쥐는 분석에서 제외하였다.

[0110] 실험 그룹은 시료 A, 시료 B+C, 복합시료 A+B+C로 분류하고 농도를 달리하였으며, 투여군마다 8 내지 10마리의 실험쥐를 배정하였다.

[0111] 수술 24시간 경과 후 실험쥐의 경추를 탈골시키고 목을 절단한 후, 론저를 사용하여 좌우 반구 중심의 sulcus를 중심으로 두개골을 제거하였다. 적출된 뇌는 Brain matrix를 이용하여 3번째 칸부터 2mm 간격으로 5개의 면도칼로 자르며, 스펙틀라를 이용한다. well당 slice 하나씩 놓은 후, 1% 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Sigma, USA) 용액으로 30℃, 30분간 염색한 후 10% neutral-buffered formalin(Sigma, USA)에 담구어 고정하였다. 염색 및 고정된 slice를 디지털 카메라로 촬영하고 ImageJ 프로그램(1.47 ver)을 이용하여 뇌경색 면적을 측정하였다. 뇌경색 부피(mm³)는 각 slice의 뇌경색 면적을 더한 후 slice 간 거리를 곱하여 계산하였다.

[0113] 2-1. 시료 A+B+C의 신경 보호 효과 (실시에 1 / 시료 A 고정)

[0114] 본 발명에 따른 A+B+C 복합 시료의 상승 효과를 확인하기 위하여 pMCAO 모델에서 수술직후, 및 2시간 경과 후 시료 A+B+C 혼합 시료의 배합비를 달리하여(시료 A 고정) 각각 15:2.5:1.2, 15:7.5:1.2, 15:22.5:1.2(mg/Kg) 비율로 경구 투여하였다.

[0115] 표 3에 나타난 바와 같이, 상기 대조군은 각각 Vehicle 및 아스피린 30mg/Kg를 경구 투여하였다. 수술 24시간 경과 후 실험쥐의 뇌경색 부피를 측정한 결과 본 발명에 따른 각 혼합 시료는 뇌경색 부피를 감소시켰으나, 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 상기 결과는 도 4 및 도 5에 의해 더욱 명확해진다.

표 3

구분	Vehicle	시료(µg/ml)					P
		Aspirin 30	A 15	A 15+B 2.5 +C 1.2	A 15+B 7.5 +C 1.2	A 15+B 22.5 +C 1.2	
평균 (mm ³)	30.66	29.09	29.74	25.74	25.68	26.63	0.081
표준 편차	5.30	3.78	4.55	5.55	3.37	6.50	

[0118] 2-2. 시료 A+B+C의 신경 보호 효과 (실시에 2 / 시료 B+C 고정)

[0119] 본 발명에 따라 A+B+C 시료의 복합 투여에 따른 상승 효과를 확인하기 위하여 pMCAO 모델에서 수술직후, 및 2시간 경과 후 시료 A+B+C 혼합 시료의 배합비를 달리하여(시료 B+C 고정) 각각 15:7.5:1.2, 45:7.5:1.2, 85:7.5:1.2(mg/Kg) 비율로 경구 투여하였으며, 대조군은 각각 Vehicle 및 아스피린 30mg/Kg를 경구 투여하였다.

[0120] 표 4에 나타난 바와 같이, 수술 24시간 경과 후 실험쥐의 뇌경색 부피를 측정한 결과 본 발명에 따른 각 혼합 시료는 뇌경색 부피를 현저히 감소시켰으며, 특히, 배합비를 45:7.5:1.2(mg/Kg)로 한 혼합 시료는 vehicle 대조군 및 아스피린 30 mg/Kg 투여군에 비해 현저한 효과를 나타냈다. 상기 결과는 도 6 및 도 7에 의해 더욱 명확해진다.

표 4

구분	Vehicle	시료($\mu\text{g/ml}$)					P
		Aspirin 30	B 7.5 +C 1.2	A 15 + B 7.5+C 1.2	A 45 + B 7.5+C 1.2	A 85 + B 7.5+C 1.2	
평균 (mm ³)	30.66	29.09	26.94	25.68	22.21	25.69	0.003
표준 편차	5.301	3.783	5.287	3.365	4.561	7.454	

2-3. 시료 A의 신경 보호 효과(비교예 1)

본 발명에 따른 A+B+C 혼합 시료와 달리, 시료 A의 개별적인 신경 보호 효과를 확인하고자, pMCAO 모델에서 수술직후, 및 2시간 경과 후 시료 A를 농도별로 경구 투여하고, 대조군은 각각 Vehicle 및 아스피린 30mg/Kg를 경구 투여하였다.

표 5에 나타난 바와 같이, 수술 24시간 경과 후 실험쥐의 뇌경색 부피를 측정된 결과, 시료 A 45mg/Kg 투여에 의해 뇌경색 부피가 다소 감소하였으나, 본 발명에 따른 A+B+C 혼합 시료를 투여했을 때와 비교하여 감소율은 현저히 낮았다. 상기 결과는 도 8 및 도 9에 의해 더욱 명확해진다.

표 5

구분	Vehicle	시료($\mu\text{g/ml}$)				P
		Aspirin 30	A 15	A 45	A 85	
평균 (mm ³)	30.66	29.09	29.74	25.58	28.25	0.152
표준 편차	5.301	3.78	4.55	3.55	5.55	

2-4. 시료 B+C의 신경 보호 효과(비교예 2)

본 발명에 따른 A+B+C 혼합 시료와 달리, 시료 B+C 투여에 따른 신경 보호 효과를 확인하고자, pMCAO 모델에서 수술직후, 및 2시간 경과 후 B+C 혼합 시료의 배합비를 달리하여 경구 투여하고 대조군은 각각 Vehicle 및 아스피린 30mg/Kg를 경구 투여하였다.

표 6에 나타난 바와 같이, 수술 24시간 경과 후 실험쥐의 뇌경색 부피를 측정된 결과, 시료 B+C(배합비 22.5:1.2mg/Kg)의 투여에 의해 뇌경색 부피가 다소 감소하였으나, 본 발명에 따른 A+B+C 혼합 시료를 투여했을 때와 비교하여 감소율은 현저히 낮았다. 상기 결과는 도 10 및 도 11에 의해 더욱 명확해진다.

표 6

구분	Vehicle	시료($\mu\text{g/ml}$)				P
		Aspirin 30	B 2.5+C 1.2	B 7.5+C 1.2	B 22.5+C 1.2	
평균 (mm ³)	30.66	29.09	26.94	26.94	24.49	0.030
표준 편차	5.30	3.78	4.89	5.29	4.41	

상기 실험에 의해 명확해진 바와 같이, 본 발명에 따른 A+B+C 혼합 시료는 현저한 신경 보호 효과를 나타냈으나, 시료 A를 개별적으로 처리하거나, 시료 B+C를 혼합하여 처리한 경우 유의한 결과가 나타나지 않았

다. 또한, 본 발명에 따른 A+B+C 혼합 시료는 pMCAO 모델에서 뇌경색 부피를 유의적으로 감소시켰으며, 시료의 혼합에 따른 상승 효과는 현저한 것으로 확인되었다. 즉, A+B+C 혼합 시료는 *in vitro* 및 *in vivo* 실험 양자에 서, 우수한 신경 보호 효과를 나타내었으며, 각 시료의 혼합에 따른 상승 효과는 현저한 것으로 확인되었다.

[0134] 구체적으로 상기 시료 A 및 B+C의 동시 투여에 따른 상승 효과를 평가하기 위한 MTT assay를 결과는 cell count 실험을 통해 세포 생존능을 확인한 결과와 일치하였다. 즉, 시료 A와 시료 B+C를 각각 단독으로 처리한 군은 OGD 처리 대조군과 비교하여 유의한 차이가 나타나지 않았으나, 시료 A+B+C 복합 처리군은 세포 생존능이 현저 하게 증가하였다. 상기 결과에 따라, OGD 모델에서 시료 A+B+C 복합 처리군은 각 시료 단독 처리군과 비교하여 신경 보호의 상승 효과가 있음이 확인되었다.

[0135] pMCAO 모델에서 시료 A 및 B+C 복합 투여에 따른 상승 효과를 평가하기 위하여 단독 투여시 신경 보호 효과가 상대적으로 미흡하였던 시료 A(15mg/Kg)의 농도를 고정하고 시료 B+C를 농도별로 투여한 결과 시료 A+B+C 복합 투여군은 대조군에 비하여 뇌경색 부피감소 효과가 현저하였으나 농도에 따른 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

[0136] 그러나 단독 투여시 신경 보호 효과가 상대적으로 미흡하였던 B+C(7.55mg/Kg+1.2mg/Kg)의 농도를 고정하고 시료 A를 농도별로 투여한 결과 시료 A(45mg/Kg)와 시료 B+C(7.5mg/Kg+1.2mg/Kg)를 복합 투여 했을 때 음성 대조군 (Vehicle 투여) 및 양성 대조군(아스피린 투여)고 비교하여 유의한 뇌경색 부피감소를 나타내었다.

[0137] 즉, 시료 A(45mg/Kg) 단독 투여군 및 시료 B+C(7.5mg/Kg+1.2mg/Kg) 단독 투여 군이 각각 유의한 뇌경색 감소 효과를 나타내지 않은 점을 고려할 때 시료 A+B+C 복합 투여 군에서 뇌경색 후 신경 보호 효과의 상승 효과가 있는 것으로 평가할 수 있다.

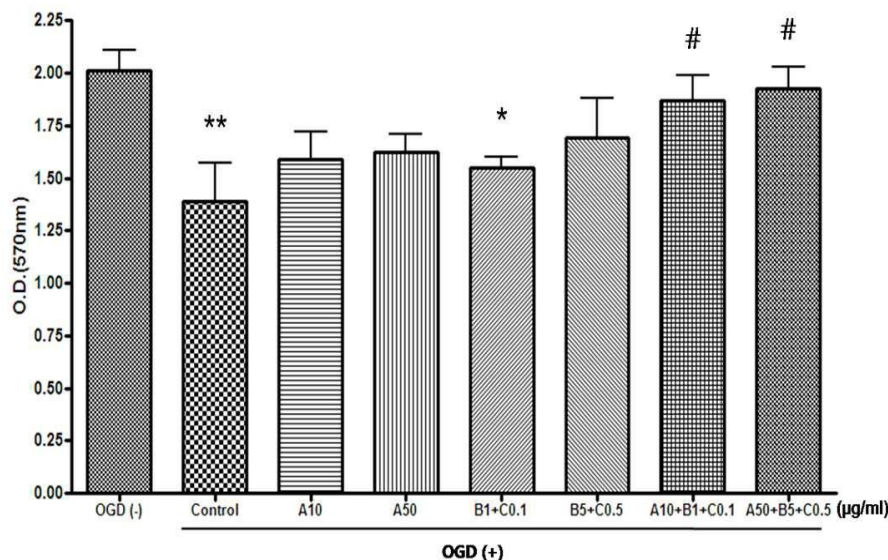
[0138] 또한, 상기 상승 효과는 본 발명에 따른 각 원료의 특정한 배합비에서 나타났으므로, 효과를 극대화하기 위하여 각 원료의 비율을 적절히 조절할 수 있다.

[0140] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명 의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해 할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

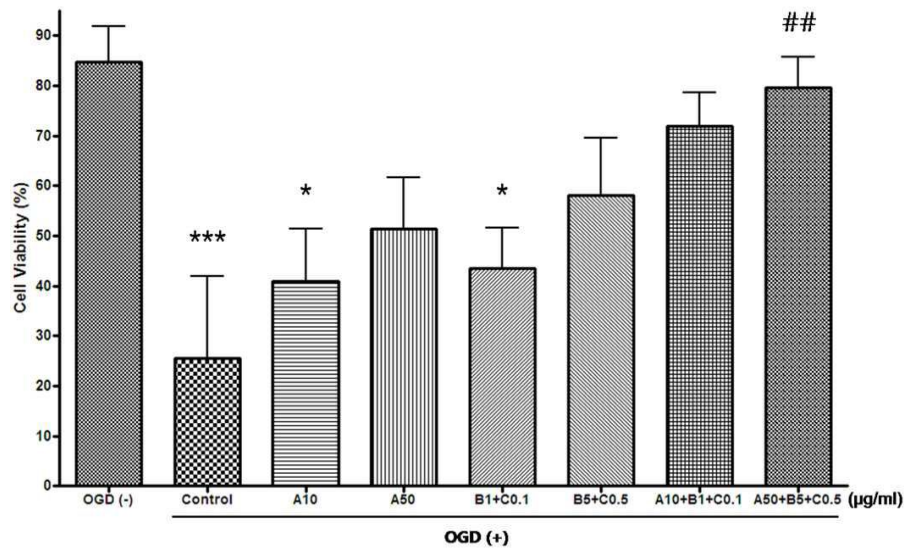
[0141] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

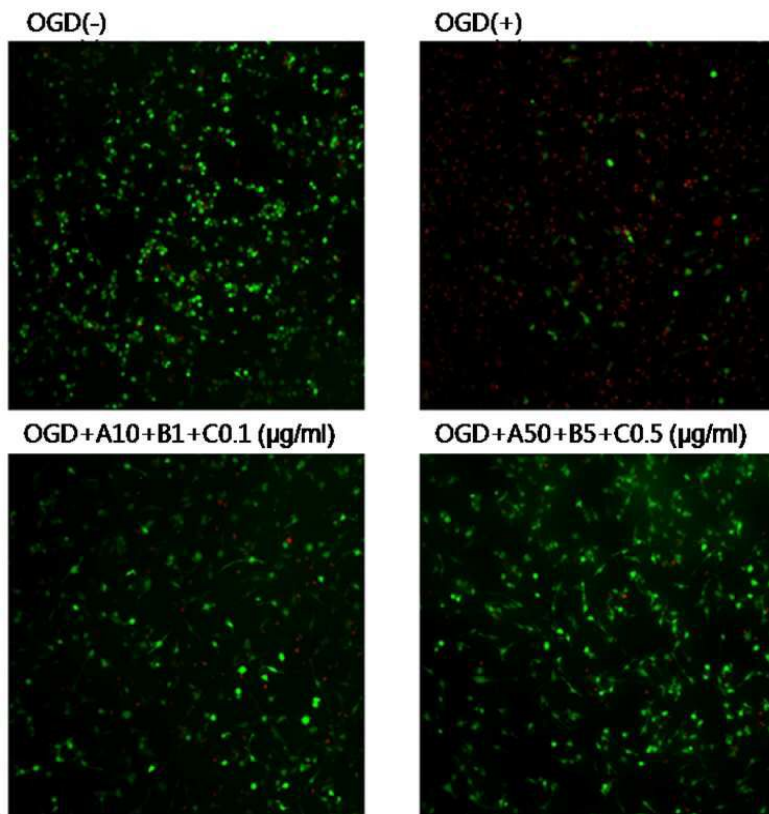
도면1



도면2



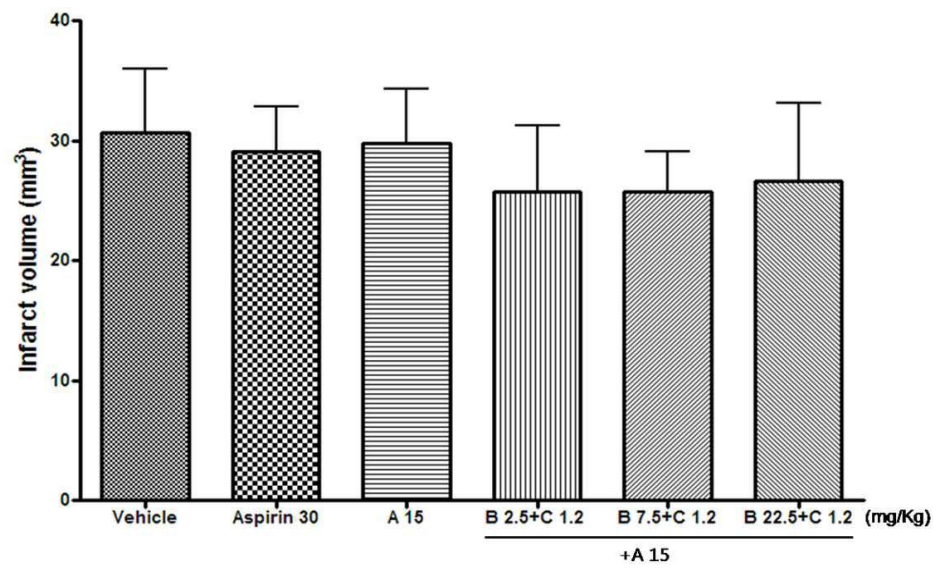
도면3



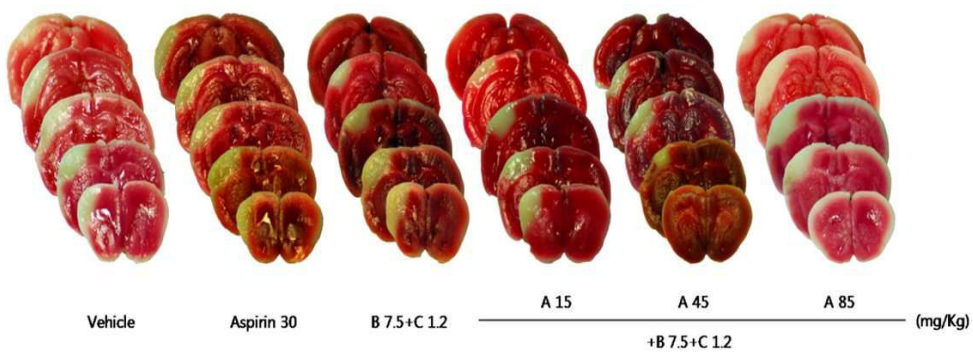
도면4



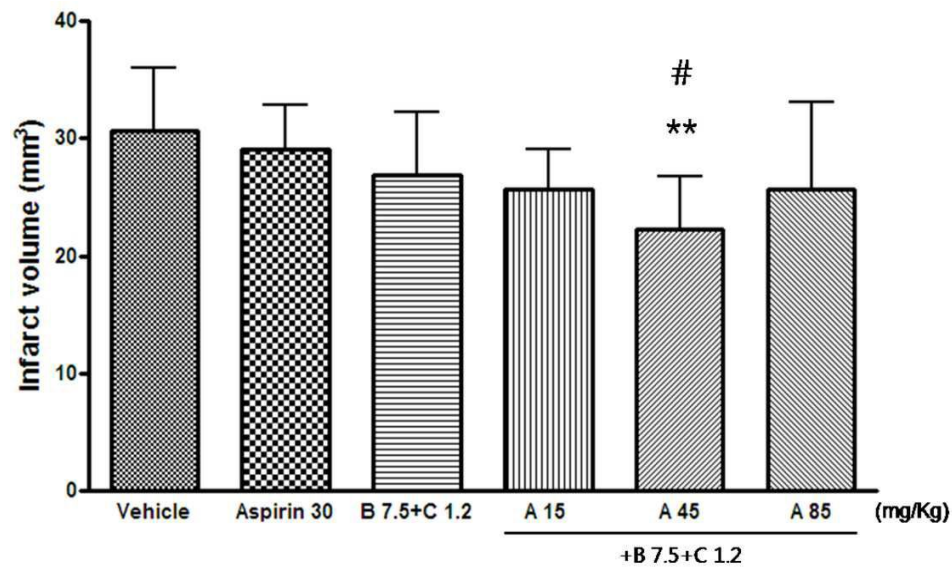
도면5



도면6



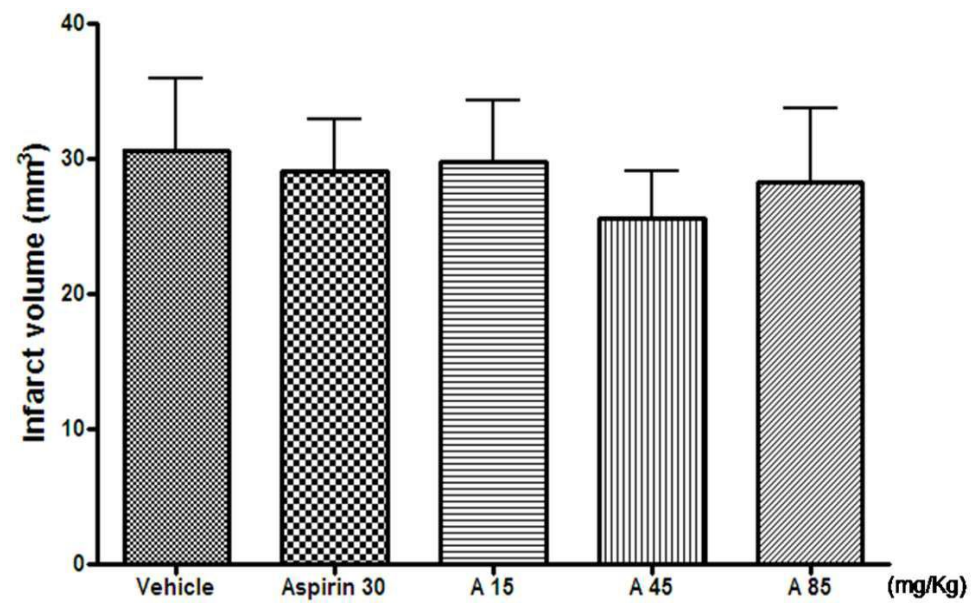
도면7



도면8



도면9



도면10



도면11

