

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷ (11) 공개번호 특2001-0023208
A61K 35/78 (43) 공개일자 2001년03월26일

(21) 출원번호 10-2000-7001837
(22) 출원일자 2000년02월22일
 번역문제출일자 2000년02월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US1998/17344 (87) 국제공개번호 W0 1999/09837
(86) 국제출원출원일자 1998년08월28일 (87) 국제공개일자 1999년03월04일
(81) 지정국 AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나
 감비아 짐바브웨
EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐
 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄
EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드
 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드
 포르투갈 스웨덴 사이프러스
OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부와르 카
 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 기네비소
국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바
 이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스
 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀
 란드 영국 가나 미국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본
 케냐 키르기즈 북한 대한민국 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레
 소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니
 아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르투갈 루마니
 아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄
 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 우즈베키
 스탄 베트남 카자흐스탄 감비아 크로아티아 인도네시아 시에라리온
 유고슬라비아 짐바브웨

(30) 우선권주장 60/056,092 1997년08월28일 미국(US)
(71) 출원인 씨브이 테크놀로지스 인코포레이티드 브루스, 제임스 에이취
 캐나다 티6지 1케이8 엘버타 에드먼턴 8625-112 스트리트 슈우트 30
(72) 발명자 팡피터케이티
 캐나다티6비1엘5엘버타에드먼턴셔우드파크2055225알알232
 산재클린제이
 캐나다티6제이6와이2엘버타에드먼턴트윈브룩스코브136
 치우캄더블유
 캐나다티6지0티9엘버타에드먼턴 11007-83에비뉴슈우트1106
(74) 대리인 박래봉

심사청구 : 없음

(54) 허브 추출물의 화학 및 약리학적 표준화

요약

본 발명은 허브 추출물의 화학 및 약리학적 표준화를 확보하기 위한 것이다.

명세서

기술분야

본 발명은 추출 과정의 재현성을 확보하기 위한 것이다. 또한, 본 발명은 생물 자원, 특히 식물 자원으로 부터 화학 성분의 약리학적 활성 혼합물을 반복적으로 추출하기 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 약리학적 활성이 높은 생물 자원으로 부터 약리학적 활성 혼합물을 얻기 위한 방법에 관한 것이다.

배경기술

허브는 요리에 흔히 사용되는 것 이외에도, 인류 문명의 초창기 이래로 허브를 이용한 치료와 약제에 사용되어 왔다. 허브는 어떤 문명권에서는 일상 활동을 향상시키기 위한 식이성 첨가제로도 사용되어 왔다. 일반적으로, 치료나 식품 첨가제로서 사용되는 허브는 침출액이나 탕제로 음복하거나 외부로부터 습포제로 붙여서 사용하였다. 이와 같은 사용 방식에서, 허브는 다수의 화학적 화합물의 혼합물 형태로 사용되는 것이 보통이다.

일반적으로, 널리 인정되고 있는 허브 치료제를 바르게 사용하면 환자에게 부작용이 일어나지 않는다. 수세기 동안 허브 치료를 이용하여 왔던 문명권에서 허브 치료의 효과가 확실하게 입증되었음에도 불구하고, 서구 과학 문헌에는 여전히 "정식으로 인정"받지 못하고 있다.

서양 약제는 단일 성분들이나, 단독으로 혹은, 보다 바람직하게는, 제약학적으로 허용되는 담체에 싸여서 투약되는 몇 안 되는 화합물의 혼합물로 사용되는 것이 보통이다. 약물로서 이들 단일 화합물을 연구 개발하는 것은 확고한 과학 및 임상적 고증에 의해 커다란 부분을 차지한다. 불행히도, 이들 약물 중 다수가 사용의 역사가 비교적 짧으며, 심각한 부작용을 일으키는 것으로 나타났다.

어느 정도의 일반화에도 불구하고, 서구의 제약학은 치료 과학으로 간주되어 온 것에 반하여, 전통적인 허브 약제는 치료 기술이라는 시각으로 바라보고 있다. 현대에는, 서구 사회에서 어느 정도 인정을 받고 있기는 하지만 아직도 몇 가지 문제에 당면하고 있다. 먼저, 고도로 훈련된 많은 의료 종사자들의 의견을 따르면, 기술 및 과학을 지향하는 우리 사회에서 허브 약제는 그 효능을 지지할 만한 충분한 과학적인 데이터가 결여되어 있다는 것이다. 두 번째로, 허브 약품의 어떤 성분이 제약학적으로 효과가 있는지에 대한 우려가 있다. 또한, 허브 약품의 제약학적으로 효과적인 성분들의 농도나 용량 비율에 대한 의문이 생긴다. 간단히 말하자면, 전통적인 의료인들은 허브 약제에 대한 정량 및 정성적 기준이 없다는 것에 우려하고 있다. 이와 같은 표준화의 결여로 인하여 조정 기관은 더 이상의 조사를 꺼리고 이와 같은 비전통적인 약제를 인정하려고 하지 않는다.

서구의 전통적인 약품 기준에는 일부 맞지 않지만, 이와 같은 허브 성분들은 거의 또는 전혀 부작용 없이 각종 질병의 치료에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다. 부분적으로, 많은 경우에 제약적 활성은 특정한 생물학적 활성 성분의 존재뿐만 아니라, 허브 혼합물에 존재하는 두 가지 이상의 화학 성분의 결합으로 인한 시너지 효과 때문이다.

허브 약제와 생물학적 강화 성분인 허브 성분으로 정의되는 허브 치료제는 식물에서 얻은 것이므로, 허브 치료제의 화학적 조성은 채취 조건과 같이 식물이 생산되는 유전적 조성이나 재배 조건, 그리고 식물의 활성 성분을 분리하는 방법을 비롯한 수많은 요소에 따라 달라진다. 따라서, 특정 식물의 생물학적 변화가 식물에서 발견되는 특정 화학 성분의 양에 큰 변화를 가져온다는 것을 예상할 수 있다. 마찬가지로, 식물이 같은 생물학적 변화를 겪는다 하더라도, 토양, 수분 및 그 밖의 재배 조건의 차이가 식물이 생산하는 특정 화학 성분의 양에 크게 영향을 줄 수 있다.

마지막으로, 식물을 처리하는 방법이 식물에서 분리한 특정 화학 성분의 상대적인 비율과 전체량에 크게 영향을 줄 수 있다. 그러므로, 채취, 보관, 분쇄, 액성분의 압착 및 추출과 같은 과정들이 모두 화학 성분의 비율과 양에 영향을 주어 분리 생성물의 제약적 활성에도 변화를 일으킨다.

허브 조성물의 성분과 제약적 활성에 영향을 미치는 많은 요소들을 고려하여, 허브 조성물의 화학적 조성과 이러한 화학적 혼합물의 제약적 활성에 대하여 허브 조성물을 표준화시킬 수 있는 방법을 이용하는 것이 바람직하다. 또한, 대규모로 재배되는 식물의 재배 조건을 표준화하는 것이 불가능할지도 모르지만, 표준화된 허브 조성물을 얻기 위해서는 처리 조건을 표준화시키는 것이 바람직하다. 또한, 생물학적 혼합물 특히, 식물과 허브 혼합물의 조성을 정확히 결정하고 비교함으로써 처리 조건을 제어하여 높은 제약적 활성을 얻을 수 있다. 이와 같은 방법을 이용하면, 의사가 허브 조성물의 소정 용량을 처방할 수 있을 뿐만 아니라, 허브 조성물 "제조자"도 혼합물의 제약적 활성을 향상시켜 품질 관리와 자원을 달리 하여 허브 혼합물을 다르게 변형시킬 수 있는 능력을 개선할 수 있게 된다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 약리학적 활성이 높은 표준화된 생물학적 조성물을 얻기 위한 방법과, 표준화된 처리 방법을 얻기 위한 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명에서는 생물학적 조성물, 특히 추출과 같은 소정의 방법으로 얻을 수 있는 약리학적 활성이 높은 허브 조성물의 분리가 가능하다. 여기서, "생물학적 조성물"이라 함은 생물 자원으로부터 얻을 수 있는 성분들의 혼합물을 말한다. 생물 자원은 동물이나 식물이 될 수 있다. 본 발명은 식물이나 식물 자원들에 가장 많이 응용될 수 있을 것으로 기대된다. 여기서, "조성물"이라 함은 성분들의 혼합물을 말한다. 그리고, "성분"이라 함은 화학적 화합물, 화합물의 염, 착물, 및 자연에서 발견되는 기타 분자와 이온 종류를 말한다. "허브"와 그의 변형물은 식용 야채나 식물성 물질 또는 식물을 이른다.

생물 자원 특히, 식물에서 얻은 화학 성분들의 약리학적 활성 혼합물을 표준화하기 위한 본 발명에 따른 방법에서, 같은 생물 자원으로부터 얻은 다수의 시료를 이용하여 여러 가지 공정을 수행하여 다수의 생성물을 얻는다. 이렇게 해서 분리한 생성물에 대하여 약리학적 시험을 수행하여, 시험에서 약리학적 활성이 가장 높게 나타난 생성물을 선택한다. 선택된 생성물을 생산하는 데에 이용된 소정의 방법을 반복 수행하여 시험 생성물을 만든다. 그런 다음, 상기 선택된 생성물과 시험 생성물에 대하여 물리 시험 및/또는 화학 시험을 수행하여 생성물의 화학 성분(들)에 관한 정성적인, 대부분의 경우에는, 정량적인 정보를 얻는다. 다수의 생성물을 가지고 처음에 수행한 약리학적 시험을 시험 생성물에 대하여 반복하여 수행한다. 상기 선택된 생성물과 시험 생성물의 정성 및 정량적인 정보, 또는 "화학적 지문"과 약리학적 활성을 비교한다. 시험 생성물의 화학 성분(들)의 양이 상기 선택된 생성물의 화학 성분(들)의 양과 약 10% 차이밖에 나지 않고, 시험 생성물의 약리학적 활성이 상기 선택된 생성물의 해당하는 약리학적 활성

과 약 10% 차이밖에 나지 않는다면, 상기 선택된 생성물을 생산하는 데에 이용한 방법을 상기 약리학적 활성 혼합물을 생산하기 위한 표준 방법으로 선택한다. 또한, 약리학적 시험(또는 "약리학적 지문")과 물리 및/또는 화학적 시험(또는 "화학적 지문")을 통하여 약리학적 활성이 가장 높은 것으로 결정되고 확인된 혼합물은 바람직한 약리학적 활성 혼합물로 선택된다.

일반적으로, 표준 방법으로 고려하고 있는 방법들은 서로 유사하거나 전체적으로 동일하다. 예를 들면, 화학 성분들의 혼합물의 자원이 허브 약제나 조성물에 사용되는 혼합물과 같이 식물 자원이면, 채취하는 방법, 저장 방법, 액상 성분을 압출하는 방법, 바람직하게는, 화학 성분들을 추출하는 방법, 가장 바람직하게는, 약리학적 활성에 기여하는 화학 성분을 추출하는 방법을 포함한다. 특정한 방법이 지정되면, 여러 가지 변형이 가능하여 한 번에 여러 가지 방법을 함께 사용할 수 있다. 추출 방법에서, 상기 선택된 생성물과 시험 생성물은 각각 소정의 선택된 식물 추출물(다수의 식물 추출물에서 얻은)과 시험 식물 추출물이 된다.

처리 생성물, 바람직하게는 식물 추출물에 대하여 수행한 약리학적 시험은 생체외 및/또는 생체내 약리학적 시험의 형태일 수 있다. 본 발명에서는, 적어도 두 가지의 생체외 약리학적 시험과 적어도 두 가지의 생체내 약리학적 시험을 수행한다. 이들 시험은 일반적으로 생체의 변화된 생물학적 상태와 상호 관련이 있다. 생물학적 상태는 생물의 변환된 상태나 환자의 건강 상태의 효과적인 처리일 수 있다. 변화된 상태의 예를 들면, 각성 상태나 진정 효과 등을 내는 자극제라고 할 수 있다.

생성물, 바람직하게는, 허브 물질의 경우에는 생물 추출물은 약리학적 활성이 높거나 가장 높은 것을 선택한다. 이것은 생물학적 상태를 가장 향상시키거나 환자의 가장 원하는 진료 상태를 제공하는 것에 해당한다.

추출법을 수행하는 경우에는 시험 추출물과 같이 시험 생성물을 얻기 위해서는, 소정의 식물 추출물과 같은 소정의 생성물을 얻기 위해 이용된 것과 같은 조건을 준다.

도면의 간단한 설명

도 15는 8-13 일 동안 매일 물(0.5 ml/일)이나 CVT-E001(0.5 ml에 200 mg/kg/일)을 공급한 쥐의 학습 곡선이다. 쥐에게 5 일 동안 풀의 중앙에 감추어진 플랫폼의 위치를 찾는 것을 학습하도록 한다. 하루에 4 회씩 시도하도록 한다. 수치는 평균 ± 35 회 또는 36 회의 시료에서 얻은 평균의 표준 오차이다. 별다른 처리 효과가 나타나지 않았다.

도 16은 (제 14 일) 쥐가 위치를 바꾼 플랫폼의 일차 위치를 학습하는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 결과를 나타낸다. 쥐를 모두 네 집단으로 나눈다. 집단 1(C/Scop)에는 시험 전에 식이 보충물로서 물만을 공급하고 15 분간 스코폴라민(2 mg/kg)을 주사한다. 집단 2(HT/Scop)에는 시험 전에 식이 보충물로서 CVT-E001(200 mg/kg/일)을 공급하고 15 분간 스코폴라민(2 mg/kg)을 주사한다. 집단 3(C/Sal)에는 시험 전에 식이 보충물로서 물을 공급하고 15 분간 살린(0.2 ml)을 주사한다. 집단 4(HT/Sal)에는 시험 전에 식이 보충물로서 CVT-E001을 공급하고 15 분간 살린(0.2 ml)을 주사한다. *C/Scop와 크게 차이 난다($p < 0.05$).

도 17은 (제 14 일) 쥐가 플랫폼의 일차 변경 위치를 학습하는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 데이터를 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ± 33 회 또는 36 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. 별다른 효과는 나타나지 않는다.

도 18은 (제 15 일) 쥐가 플랫폼의 일차 변경 위치를 기억해 내는 데에 걸린 지연 시간을 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ± 11 회 또는 12 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop와 크게 차이 난다($p < 0.05$). **C/Scop와 크게 차이 난다($p < 0.01$).

도 19는 (제 15 일) 쥐가 플랫폼의 일차 변경 위치를 기억해 내는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 데이터를 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ± 33 회 또는 36 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop와 크게 차이 난다($p < 0.05$). **C/Scop와 크게 차이 난다($p < 0.01$). ***C/Scop 및 HT/Scop와 크게 차이 난다(각각, $P < 0.01$, $p < 0.05$).

도 20은 (제 16 일) 쥐가 플랫폼의 이차 변경 위치를 학습하는 데에 걸린 지연 시간을 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ± 11 회 또는 12 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop 및 HT/Scop와 크게 차이 난다($P < 0.01$).

도 21은 (제 16 일) 쥐가 플랫폼의 이차 변경 위치를 학습하는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 데이터를 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ± 33 회 또는 36 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. 별다른 효과는 나타나지 않는다.

도 22는 (제 17 일) 쥐가 플랫폼의 이차 변경 위치를 기억해 내는 데에 걸린 지연 시간을 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ± 11 회 또는 12 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop와 크게 차이 난다($p < 0.05$).

도 23은 (제 17 일) 쥐가 플랫폼의 이차 변경 위치를 기억해 내는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 데이터를 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ± 33 회 또는 36 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop와 크게 차이 난다($p < 0.01$).

실시예

본 발명에 따른 방법은 허브 처리 기술 특히, 식물 자원으로부터 제약적 활성 혼합물의 추출 기술을 분화하고 개선하고 재현하고 표준화시켜서, 제약적 활성이 높은 식물성 추출물을 얻는 데에 가장 널리 응용될 것으로 기대된다. 본 발명의 재현성과 표준화 방법은 보통 추출 단계에서 얻어지는 분리 생성물의

제약 및 화학적 지문 과정을 혼용한다.

화학적 지문법

화학적 지문법은 단일 화합물 또는 허브의 제약 혼합물과 같은 화합물의 혼합물을 시험하여 이에 포함된 화학적 성분(들)의 특성인 정량적 및 정성적인 정보를 얻는 과정이다. 소정의 정량으로 이들 성분들이 존재함으로써 성분(들)의 약리학적 성질과 관련된 화학적인 특유성을 부여한다. 화학적 지문법의 준비 단계 또는 전반적인 단계는 시료, 흔히 식물 자원에서 얻은 물질을 지문할 때의 추출물을 크로마토그래피법이나 전기전동법을 이용하여 분리한 후, 분리 과정에서 용출된 화학 성분을 분석하는 것이다. 용출된 화학 성분의 실제 화학적 지문 형성에는 수많은 검출 방법을 이용할 수 있다. 허브 제약 조성물에서 얻은 화학 성분을 분리하는 가장 적합한 방법은 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)법이고, 용출된 화학 성분의 특성화는 자외선 흡수 검출법과 전기분무 질량분석법을 연속으로 하여 수행한다. 이 분석 방법은 허브 제약 조제물에서 발견되는 것과 같은 화학 성분들의 혼성 혼합물의 가장 결정적인 특성을 제공한다. 이와 같은 지문법으로 얻은 데이터는 허브 제약 조제물의 화학 성분의 화학적 성질에 관한 정보뿐만 아니라, 시료 조성물의 신빙성, 순도 및 농도에 관한 정보도 제공한다.

허브 제약 생성물과 같은 혼성 화학 혼합물의 화학적 지문에서, 화학 혼합물의 성분을 용해시키고, 흔히 허브 제약 생성물을 가용 추출한다. 그런 다음, 용액이나 추출물을 분리 단계로 보내서 혼합물을 성분별로, 바람직하게는, 개별 성분으로 분리한다. 이와 같은 분리 방법을 화학 분석법과 혼용하면 생성물의 특성을 이루는 중요한 화학 성분들을 결정적으로 확인할 수 있다.

분리법으로는 고속 액체 크로마토그래피(HPLC), 전기전동법(겔 또는 모세관), 박막 크로마토그래피(TLC) 및 기체 크로마토그래피(GC)와 같은 크로마토그래피법이 바람직하다. 이후에 약리학적으로 분석할 수 있는 시료를 얻기 위하여, HPLC법을 이용하는 것이 바람직하다. HPLC의 경우 바람직한 검출 시스템은 흡수 및 발광 분석법, 굴절률 및 화학전기법, 증발 광산란법, 전기분무 질량분석법 또는 이들 방법을 혼용한 것을 포함한다. GC의 경우, 전자 포획 검출기, 나트륨-인 검출기 또는 질량 분석 검출기를 흔히 사용한다. TLC와 전기전동 분리법에는, 각종 비색 및/또는 질량 분석 검출법을 이용한다. 허브 제약 생성물을 분리하는 경우, HPLC법을 자외선 흡수 검출법과 전기분무 질량 분석법을 혼용하여 사용하면 흡광도 지문을 얻을 수 있고, 많은 흡수 성분의 분자량을 결정할 수 있다. 칼럼에서 얻은 용출 프로파일과 흡광도 특성상과 분자량 특성을 결합시키면 허브 생성물의 개별 화학 성분들을 정량 및 정성적으로 확인할 수 있다.

화학적 지문법은 HPLC를 흡광도 및 전기분무 질량 분석 검출과 혼용하여 수행하는 것이 일반적이다. 다음은, CVT-E001의 지문을 설명하기로 한다.

간단히 말하자면, 소정의 허브 생성물을 적당한 용매, 흔히 물, 알콜, 아세토니트릴, 에틸 아세테이트 또는 이들 용매의 혼합물에서 추출한다(부가적인 처리를 하지 않고도 소량의 첨가물을 분석할 수 있다. 그런 다음, 추출물을 여과하여 미립자를 제거하고 건조하여 불필요한 용매를 제거한다. 추출물은 분석을 수행할 때까지 동결 보관할 수 있다. 분석을 수행하고자 할 때에는, 추출물을 적당한 용매에 녹인다. 보통은 0.05% 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유하는 20% 아세토니트릴을 이용하지만, 분석할 추출물의 용해도에 따라 달라질 수 있다. 그런 다음, 추출물의 소정량을 HPLC 장치에 가한다(보통, 용매 100 ml에 1 mg 이하에 상응하는 양이 분석된다). HPLC 장치는 등용매 시스템도 사용할 수 있지만, 분당 0.01 ml 내지 5 ml 이상의 유속을 갖고 용매 그레디언트를 제공할 수 있는 각종 모델 중의 하나일 수도 있다. 일반적으로, 허브 생성물의 화학 성분은 물, 아세토니트릴 및 TFA의 성분 용리를 이용하여 분리시킬 수 있다. 용매 A는 물이나 소량의 아세토니트릴(2%-5%)과 0.05% TFA를 함유하는 물로 이루어진다. 용매 B는 0.05% TFA를 함유한 고농도의 아세토니트릴(70%-95%)로 이루어진다. 유속은 분당 1 ml가 보통이다(분당 0.5 ml 내지 1.5 ml 또는 다른 값이 될 수도 있다). 소량의 용매 A로부터 다량의 용매 B로 증가하는 그레디언트가 이용된다. 소정의 화학 성분들을 분리시키기 위해서는 이 그레디언트를 바꿀 수 있다. 그레디언트의 예를 들면 다음과 같다: 용매 A(5% 아세토니트릴, 0.05% TFA), 용매 B(70% 아세토니트릴, 0.05% TFA); 유속 1 ml/분; 시간이 0 분일 때에는 이동상이 100% 용매 A이고, 30 분이 되면 이동상이 100% 용매 B이다. 0 분에서 30 분 사이에는 그레디언트 변화가 선형이다. 30 분과 35 분 사이에 이동상은 100% 용매 B로 되어 있다. 35 분과 40 분 사이에는 이동상이 100% 용매 A가 되고, 다음 시료를 분석하기 전에 분리 시스템이 다시 평형을 이룬다.

HPLC가 화학적 지문의 바람직한 시험법이지만, TLC, 단백질 결정법, 탄화수소물 결정법, 유기 추출법 또는 그 밖의 화학 분석법을 이용할 수 있음은 자명하다.

성분 분리는 다른 크기의 칼럼을 이용할 수도 있지만(예: 내경 1 mm, 길이 25 cm), 분석 고속 액체 크로마토그래피 칼럼(보통, 내경이 4.6 mm이고 길이가 25 cm) 위에서 수행된다. 칼럼은 화학 성분을 분리하는 데에 사용되는 다수의 충전물(역상 물질, 실리카, 친수성 반응 물질 등) 중에서 임의의 것을 함유한다. 보통, C₈ 역상 물질을 함유하는 역상 칼럼을 사용한다.

소정의 화학 성분 검출에서는 앞서 언급한 적당한 검출기들을 사용한다. 보통, 자외선 흡수 및 전기분무 질량 분석법을 이용한다. HPLC 칼럼에서 용리되자마자, 소정의 성분을 함유하는 용매를 자외선 흡수 검출기를 통과시키고 흡광도를 기록하여 흡광도 프로파일을 얻는다(소정 화학 성분의 흡광도 특성에 따라 다수 파장을 모니터링할 수 있다). 자외선 흡수 검출기를 통과하자마자, 소정의 화학 성분을 함유하는 용매는 계속 전기분무 질량 분석 검출기로 흐른다. 분석 칼럼인 경우, 전기분무 장치가 용매를 소량(최대 50-100 ml/분)만 수용할 수 있으므로 소정량의 용매가 갈라져 나간다. 소형 칼럼의 경우, 모든 이동상이 전기분무 장치로 유입되도록 하고 있다. 분석 칼럼에서, 유체의 10% 이하가 전기분무 장치로 유입되고 나머지 90% 이상은 이후 약리학적 평가를 위한 소정의 화학 성분을 함유하는 분율로서 회수된다. 전기분무 질량 분석기로 유입되는 화학 성분들이 양성자를 가지면(예: 특정 아민, 스테로이드 또는 플라본) 포지티브 모드 분석을 위하여 양전하를 띠게 된다. 이와 같은 화학 성분들은 자신들의 정확한 화학 질량에 대한 정보를 제공할 수 있으며, 토막내기 패턴을 이용하여 화학적 확인을 가능케 한다. 전하를

따지 않고 염기성 환경에서 양성자를 잃는 화학 성분들(예: 당, 일부 패널 및 카르복실산)은 약간 다른 방법으로 조사해야 한다. 전하를 띠지 않는 화학 성분의 경우, 칼럼에서 용리되어 적당한 검출기(예: 자외선 흡수 또는 굴절률 검출기)를 통과한 후, 각 분자들이 회수된다. 각 분물을 건조시키고 적당한 용매(예: 10% 수산화암모늄과 섞은 물에 녹인 50% 아세토니트릴)에서 재구성한 후, 네거티브 모드에서 동작하고 있는 전기분무 장치로 직접 주입한다. 다시, 정확한 화학 질량과 화학적 확인에 관한 정보가 토막내기 방식에 의해 제공된다.

그러므로, 용리 방식, 자외선 흡수 특성 및 화학 질량, 토막내기 방식이 취합되어 허브 생성물에서 발견되는 개별 화학 성분들의 확인과 관련한 정보를 얻을 수 있다. 이 정보는 시료가 특정한 화학적 성질에 부합하는지를 알려주고, 소정량의 특정 화학 성분들을 함유하는 기준 시료와 비교하여 소정 화학 성분들의 양을 정량 평가할 수 있다. 분석에서 관련 없는 화학 성분이 발견되면 불순의 가능성이 있음을 알리는 정보를 제공하는 것이다. 제공된 정보로부터, 허브 생성물이 목적하는 성분을 함유하고 있는지의 여부와, 함유량(즉, 품질 관리)과, 가능하면, 불순의 가능성도 알 수 있다. 이로써, 원료에 관한 정보를 미리 알고 구입할 수 있으며, 생산하여 소비자에게 판매되고 있는 물질의 품질을 증명할 수 있다.

허브 추출물에 대한 화학적 지문의 적용예

CVT-E001은 미국산 인삼(*Panax quinquefolium* L.)의 특정 추출물이다. 이 물질은 다수의 특정 사포닌과 지방산에 많이 함유된 것으로 알려져 있다. 표 1은 *Panax quinquefolium*과 다른 *Panax* 종의 특성을 나타내는 사포닌의 수를 나타낸 것이다. CVT-E001은 동물 모델에서 콜린 흡수를 자극하고 학습 능력과 기억력을 향상시키는 효과를 비롯한 성질을 갖는다고 보고되었다. 두 개의 CVT-E001 로트를 조사하고, 고속액체 크로마토그래피(HPLC)를 자외선 흡수 검출 및 전기분무 질량 분석법과 결합시켜 화학적 지문을 얻었다.

표 1: *Panax quinquefolium*과 다른 *Panax* 종의 사포닌 특성.

사포닌	화학식	분자량
Rb1	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1109.3
Rc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1079.3
Rg1	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	801.0
Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	947.2
Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	947.2
퀸쿠에노시드 R1	C ₅₆ H ₉₄ O ₂₄	1151.3

CVT-E001 생성물의 로트 3과 로트 4를 10 mg씩 개별 바이알에서 0.05% 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유하는 물에 녹인 5% 아세토니트릴 1.0 mL에 녹인다.

원료 1 mg을 나타내는 이들 원료 100 mL를 각각 HPLC 장치에 넣는다. 크로마토그래피 시스템은 자동 주입기와 자외선 흡수 검출기를 장착한 휴렛팩커드 1050 그라디언트 HPLC 시스템으로 구성된다. 칼럼은 Zorbax 300SB-C8 역상 칼럼(4.6 mm × 25 cm)이다.

분리법은 물, 아세토니트릴 및 TFA로 구성된 그라디언트 용리액을 이용하여 수행한다. 이동상 A는 반대 이온으로서 0.05% 트리플루오로아세트산을 함유한 물에 녹인 5% 아세토니트릴이다. 이동상 B는 반대 이온으로서 0.05% 트리플루오로아세트산을 함유한 물에 녹인 70% 아세토니트릴이다. 유속은 1.0 mL/분이다. 시간이 0 분일 때에는 이동상이 100% 용매 A이고, 30 분이 되면 이동상이 100% 용매 B이다. 0 분에서 30 분 사이에는 그라디언트가 선형으로 변화한다. 30 분과 35 분 사이에 이동상은 100% 용매 B로 되어 있다. 35 분과 40 분 사이에는 이동상이 100% 용매 A가 되고, 다른 시료를 주입하기 전에 최소 10 분 동안 100% 용매 A로 세척한다. 자외선 흡수는 203 nm에서 측정된다.

전기분무 질량 분석법은 Fisons Instruments VG Quatro 장비를 이용하여 수행한다. 자외선 흡수 검출기로부터 용리된 후에, HPLC 장치로부터 흘러나오는 유체가 갈라져서 2%(20 mL/분)가 전기분무 장비로 유입된다. HPLC 장비에서 용리되고 있는 화학 물질들을 분자량 200 내지 1200의 질량에 대하여 포지티브 모드에서 측정한다. 많은 화학 물질들로부터 이 생성물의 특징을 나타내는 질량 스펙트럼을 얻었다.

도 24와 도 25는 로트 3과 로트 4에 대한 각각의 자외선 흡수 특성(UV ANOLOG)과 전체 이온 카운트(TIC)를 보여 준다.

두 개의 로트는 거의 같은 자외선 흡수 크로마토그램을 나타냈으며, 13.7-13.9 분에 한 개의 피크, 17.6-19.4 분에 5 개의 피크, 31.7분에 1개의 피크, 그리고 33.6 분에 피크 하나가 나타났다. 그 보다 작은 수많은 피크도 나타나 있다. 가장 우세한 일곱 개의 피크를 1 내지 7로 번호를 매겨 놓았다.

이동상이 한 검출기에서 다른 검출기로 이동함에 따라 자외선 신호를 기록하는 시간과 질량 스펙트럼 신호를 기록하는 시간 사이에 대략 1 분간의 지연이 발생한다. 그 결과, 14.90 분에서 전체 이온 카운트 사건은 13.71 분에서의 자외선 흡수 사건에 해당한다. 다음 도면(도 3 내지 13)은 다수의 이온 카운트 사건에 대하여 얻은 질량 스펙트럼을 나타낸 것으로서 CVT-E001에서 발견되는 화학 물질의 특성을 나타낸다. 각 이온 사건은 스펙트럼의 상부 왼쪽 모서리에 있는 숫자로 확인된다. 예를 들면, 도 2에서 나타난 바와 같이, D791 175 (14.900) Cm (170:179)는 크로마토그램 이동 번호 D791을 말하는 것으로서, 스펙트럼이 14.900 분에서 스캔 번호 175 위에 집중되고 스캔 170 내지 179의 결합으로부터 도출된 것이다.

다음은 일곱 개의 주요 피크 각각에 해당하는 질량 목록이다. M+H는 분자량 플러스 양성자 한 개를 말한

다.

피크 1 M+H 801, 프래그먼트 423, 440, 587, 767. 진세노사이드 Rg1 MW = 800으로 확인됨. 진세노사이드 Re M+H 948 MW = 947도 존재함. 이들 화합물은 공동으로 색층 분석되어 결합 스펙트럼을 나타낸다.

피크 2 M+H 1110, 프래그먼트 767, 486, 667, 947. 진세노사이드 Rb1 MW = 1109로 확인됨.

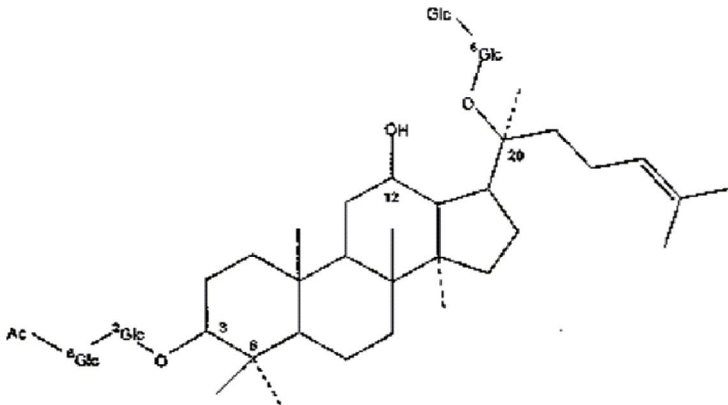
피크 3 M+H 1180, 프래그먼트 899, 456, 637. 진세노사이드 Rc MW = 1079로 확인됨.

피크 4 신호로서 미정의 질량이 다른 성분들에 의해 가려져 있다.

피크 5 신호로서 미정의 질량이 다른 성분들에 의해 가려져 있다.

피크 6 M+H 1151, 프래그먼트 767, 424, 529, 323. 퀴쿠에노시드 R1로 확인됨. 이 성분은 *Panax quinquefolium*에서 발견되는 Rb1의 아세틸화 형태로서 다른 *Panax* 종에서는 보고된 바 없다. 이 물질의 구조를 설명하면 다음과 같다.

Panax quinquefolium 추출물의 특징인 퀴쿠에노시드 R1의 화학 구조



퀴쿠에노시드 R1

피크 7 M+H 266. 미확인.

33.6 분에서의 작은 피크는 리놀렌산으로 확인되었다.

CVT-E001 시료(도 14 및 도 15)에서 얻은 스펙트럼과 각각 비교하기 위하여 순수한 진세노사이드 Rb1과 Rg1의 스펙트럼도 나타내었다.

CVT-E001의 로드 3과 로드 4는 각각 앞서 설명한 방법으로 분리되었을 때 특유의 자외선 흡수 크로마토그램을 나타낸다. 전기분무 질량 분석법도 HPLC법에 의해 분리되고 CVT-E001의 특징을 나타내는 다수의 화학 물질을 결정적으로 확인해 준다. 두 개의 시료는 *Panax quinquefolium*에서 얻은 것으로서 화학적으로 비교된다.

약리학적 지문법

약리학적 지문법은 화학 성분(들)의 시료를 시험하여 질에 고유한 약리학적 활성이 있는지를 결정하는 것이다. 시료의 약리학적 성질 또는 약리학적 활성은 사용된 특성의 생물 모델 또는 약리적 모델에 따라 다를 수 있다. 모델은 환자의 생물학적 상태의 향상이나 질병 상태의 효과적인 치료를 적당하게 시험할 수 있어야 한다. 환자는 사람인 것이 바람직하지만, 개, 고양이, 말 등과 같은 다른 동물일 수도 있다. 따라서, 약리학적 시험법 또는 지문법은 생체내 및/또는 생체외 생물 모델을 이용한다. 일반적으로, 시험되는 시료는 적당한 약리학적 담체, 및/또는 용매 내에 순수한 성분(들)으로 존재한다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 시료는 허브 추출물이나 허브 추출물의 크로마토그래피 분획물이다.

본 발명에서 이용되는 바람직한 약리학적 지문법은 분리시킨 소정의 화학종(들)을 함유하는 화학적 지문법에서 설명한 크로마토그래피법으로 얻은 소정의 크로마토그래피 분획물과 원래의 추출물을 모두 취하여 이들 분획물에서 발견되는 화학종(들)을 약리학적으로 평가한다. 수많은 여러 가지 약리학적 평가가 가능하겠지만, 일반적으로 평가되고 있는 화학 성분(들)이나 허브 물질의 소정 효과를 입증하는 과정들을 나타내는 것으로 제한된다. 본 발명에서는, 적어도 두 개의 생체내 생물 모델과 두 개의 생체외 생물 모델을 평가하여 시료나 추출물의 생물학적 활성을 결정한다. 또한, 생체외 실험에서는 적어도 세 분량의 추출물과 한 개의 용매 대조군이 포함되는 것이 바람직하다. 적어도 두 개의 모델에서, 시료 용액 또는 추출물은 대조군과는 크게 다른 약리학적 활성을 증명할 수 있어야 한다.

여기서 사용된 생물 모델 또는 약리적 모델은 추출물의 성분에 따라 크게 다를 수 있다. 예를 들면, 올리고당을 함유하는 인삼 추출물의 분획물을 면역 체계를 자극하는 능력에 대하여 평가할 수 있다. 두 개의 생체외 모델은 마우스나 쥐의 비장을 이용하는 전체 림프구 생성 및 항체 생성을 포함한다. 두 개의 생체내 모델은 혈청 전체 항체와 면역글로불린 G의 레벨을 포함한다. 항우울증 활성을 갖도록 한 생성물은 마우스 강제 수영 시험이나 로코모터 활동 시험과 같은 행동 시험에서 생체외 모노아민 산화효소 A와 B 억제 능력과 항우울증 활성에 대하여 평가된다. 항고혈압 모델은 해당 추출물을 정맥에 주사 또는 주입한 쥐의 생체외 혈압 측정과 생체내 혈관 및 심장 수축 분석 등을 이용하여 평가하는 반면, 신경증 예방제는 산화 스트레스와 신경증 예방 분석에 관련된 생체외 및 생체내 효소와 기질로 평가하고, 항우울증제는 쥐의 강제 수영 및 흑백 상자 시험에서 모노아민 산화효소 억제 활성의 정도, 뇌내 노르아드레

날린 및 세로토닌의 증가, 뇌내 5-히드록시인돌아세트산의 감소, 항우울증 및 불안증 치료 효과에 의해 평가된다.

어떤 모델에서는, 추출물의 활성을 추출물에서 유도한 한 가지 이상의 순수 성분들과 비교한다. 그 결과를 분석하여 추출물 내 혼합 성분의 시너지 효과를 입증한다. 이 방법은 효능의 증가와 부작용 감소에 있어서 한 가지 단일 성분보다 우세한 추출물 이용의 장점을 갖는다.

허브 추출물 CVT-E001에 대한 약리학적 지문의 적용에

상기와 같은 화학적 지문 특성을 갖는 화학적으로 표준화된 허브 추출물, CVT-E001은 기억 향상에 있어서 약리학적 성질을 평가한다. 생물 모델은 다음의 연구 결과를 근거로 하여 선택하였다: (a) 알츠하이머병(AD)은 중앙 신경계에서 콜린 작동 시스템에 결함에 의한 것이다. (b) 나이든 쥐와 치매 환자에서 모노아민 산화효소 B(MAO_B) 활성이 증가한다. 생물 모델에서의 다음과 같은 실험을 수행하였으며, 그 결과는 CVT-E001의 약리학적 지문을 형성한다. 각 실험에서 나타난 양성 결과는 CVT-E001이 알츠하이머 병과 같은 지각 및 기억 감퇴 증세의 치료제로서 유용함을 나타낸다.

(1) 쥐에서 분리시킨 뇌의 시냅토솜의 콜린 흡수에 미치는 CVT-E001의 효과.

근 거

진세노사이드 Rb₁은 콜린 흡수를 증가시키는 것으로 밝혀졌다(Benishin, 1992). 뇌전달물질 아세틸콜린의 생성 감소는 기억 상실증과 알츠하이머병과 관련되어 있다. Rb₁은 신경으로 콜린의 흡수를 증가시키고 아세틸콜린 생성을 증가시켜 기억 감퇴를 완화시키는 것으로 밝혀졌다. CVT-E001이 기억력 감퇴를 완화시키는 성질을 가지고 있음을 적당하게 입증하기 위해서는 CVT-E001이 신경 조직에서 콜린 흡수를 증가시킨다는 사실을 증명해야 한다.

콜린 흡수는 Rb₁, CVT-E001 및 HC3의 존재하에 전체 뇌와 해마회에서 얻은 시냅토솜 제제로 검사하였다. Rb₁은 시냅토솜으로 콜린 흡수를 증가시키는 것으로 밝혀진 양성 대조군이고, HC3은 콜린 흡수를 억제하는 것으로 알려진 음성 대조군이다.

도 1은 쥐의 뇌내 시냅토솜에 의한 콜린 흡수에 미치는 Rb₁과 HC3의 여러 가지 분량의 효과를 나타낸다. 이 연구는 Rb₁이 콜린 흡수를 늘리고 HC3이 콜린 흡수를 억제하는 것을 밝힌다. 이와 같은 효과의 정도는 이전 연구의 결과와 일치한다.

Rb₁과 CVT-E001을 모두 사용한 실험에서, 두 가지 물질이 모두 쥐의 해마회에서 추출한 시냅토솜으로 콜린 흡수를 증가시킨다는 사실을 나타낸다(표 2). 대략 1×10^{-6} M인 사포닌(분자량은 900으로 결정됨) 농도에서 CVT-E001은 항상 콜린 흡수를 증가시키는 효과가 있다. 이 보다 높은 용량(1×10^{-5} M)에서는 항상 효과적이지 않다. 많은 약리학적 성분들이 적정 용량의 범위를 가지고 있으며 이보다 적거나 많으면 생물학적 활성이 감소하기 때문에 상기와 같은 현상은 예상된 것이다.

표 2: 쥐의 해마회에서 추출한 시냅토솜의 콜린 흡수에 미치는 Rb₁과 CVT-E001의 효과.

실험 번호	CVT-E001 1×10^{-6} M% 대조군	Rb ₁ 1×10^{-6} M% 대조군
1	123*	126*
2	113*	111*
3	121*	125*

수치는 방사성 콜린의 흡수 증가량의 평균 백분율로 나타낸 것이다.

* 대조군과 크게 차이가 난다. $p < 0.05$ (ANOVA, 스튜던트/뉴만/쿨스).

표 3은 쥐의 뇌내 시냅토솜의 콜린 흡수에 미치는 CVT-E001과 전체 진세노사이드(TS) 및 Rb₁의 효과를 증명한 것이다. CVT-E001은 8.1% Rb₁, 32.4% TS를 함유하므로, CVT-E001의 효과는 Rb₁이나 TS보다 훨씬 크다.

표 3: 쥐의 뇌내 시냅토솜(% 대조군)의 콜린 흡수에 미치는 Rb₁, 100% 전체 진세노사이드(사포닌, TS) 및 CVT-3001의 효과 비교

Rb₁: 미국산 인삼에서 분리한 진세노사이드의 일종. 순도 98% 미만.

Rb₁-52, Rb₁-53 및 Rb₁-54는 Rb₁의 세 개의 배치를 나타낸다.

TS: 25% Rb₁, 19.4% Rg₁ 및 21.6% Rg₁ + Rg₂를 함유하는 미국산 인삼에서 분리한 전체 진세노사이드의 추출물.

CVT-E001: 8.1% Rb1, 32.4% 전체 진세노사이드를 함유하는 미국산 인삼에서 분리한 추출물.

	0.0011	0.011	0.11	1.1	11
Rb1-52	108±5.7	108±4.4	108±5.8	109±5.4*	111±3.7*
Rb1-53	106±1.3	109±3.6	108±3.8	112±4.8*	114±2.5**
Rb1-54	108±3	110±3.4	110±2.6*	112±1.2*	111±2.6**
	0.0009	0.009	0.09	0.9	9
TS	101±1.7	104±2.8	104±3.2	106±4.5	115±5.9*
CVT-E001	106±2.6	109±5.8	113±3.7	121±1**	124±2.6**

수치는 평균값 ±SE이다. n=4, * P < 0.05, ** P < 0.01. 대조군과 비교한 스튜덴트 T 검정.

효능: CVT-E001 > TS > Rb1

실험 결과는 CVT-E001과 Rb1이 모두 콜린 흡수를 크게 향상시키는 것을 나타낸다. 그러나, 8.1%의 Rb1을 함유하는 CVT-E001은 중량비로 환산한 농도가 이보다 작았을 때보다 효능이 훨씬 크다. 이는, CVT-E001에서 Rb1에 대한 다른 성분들의 시너지 효과를 나타낸다.

(2) 생체외 쥐의 뇌에서 MAO-A와 MAO-B에 미치는 CVT-E001의 세 개 배치의 효과.

표 4: 생체외 모노아민 산화효소 A(MAO-A)와 모노아민 산화효소 B(MAO-B) 활성에 미치는 몇 가지 인삼 추출물의 효과.

추출물명	농도	MAO-A% 억제	MAO-B% 억제
CVT-E001 로트#1	1mg/ml	3.6±2.1	5.5±2.2
CVT-E001 로트#1	10mg/ml	38.4±3.1	24.0±4.2
CVT-E001 로트#3	1mg/ml	16.9±3.1	18.4±1.3
CVT-E001 로트#3	10mg/ml	66.9±1.5	40.2±2.2
CVT-E001 로트#4	1mg/ml	14.1±2.5	22.3±0.5
CVT-E001 로트#4	10mg/ml	68.2±0.9	46.2±1.8
GLP	1mg/ml	15.0±1.0	28.6±3.0
GLP	10mg/ml	51.2±2.4	50.1±1.2

수치는 평균값 ±측정치 5(MAO-A)와 측정치 4(MAO-B)에 대한 표준 오차. 모든 경우, 유효 용량별 효과를 결정하였다.

GLP = 전체 필수 오일, HPLC-UV 흡광도에서 24분과 35분 사이에 성분을 함유하는 CVT-E001의 부분.

(3) 모리스 워터 미로와 스코폴라민 유도성 기억 상실 모델을 이용한 학습 능력에 미치는 CVT-E001의 효과.

근 거

Rb1과 Rg1을 포함하는 진세노사이드는 학습 능력과 기억력을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. CVT-E001은 진세노사이드의 혼합물이므로 순수한 사포닌과 같은 성질을 갖지는 않을 것이다. CVT-E001이 학습 능력과 기억력을 향상시킨다는 사실을 입증하기 위해서는, 이 물질이 과학적으로 인정되는 학습 패러다임에서 과업 능력 및/또는 기억력을 증가시키는 것을 측정 가능하게 나타낼 수 있음을 증명해야 한다. 모리스 워터 미로는 공간 학습 능력과 기억력을 시험할 수 있는 과학적으로 입증된 방법이다. 쥐에게 시야를 어렵게 한 수영장에 은폐시킨 플랫폼의 위치를 학습시켜야 한다. CVT-E001로 처리한 쥐가 CVT-E001로 처리하지 않은 쥐보다 감춘 플랫폼의 위치를 더 빠른 시간 내에 학습하였다면, CVT-E001이 학습 능력을 향상시키는 것을 입증한다. 기억력에 대한 CVT-E001의 효과도 스코폴라민으로 유도한 기억 상실증에 대하여 검사할 수 있다(스코폴라민은 콜린 흡수에 의한 신경전달계를 방해하여 학습 능력과 기억력을 감퇴시킨다). CVT-E001이 학습 능력 및/또는 기억력을 향상시킨다면, 과업 성취도를 높이고 그리고/또는 스코폴라민으로 처리한 동물에서 기억 상실을 억제해야 한다.

실험 구상

이 연구는 시험 화합물로서 CVT-E001을 가지고 모리스 워터 미로와 스코폴라민으로 유도한 기억 상실을 이용하여 공간 학습 능력과 기억력을 조사하기 위한 것이다. 이 실험의 목적은 스코폴라민에 의한 기억 상실에 있는 상태에서 CVT-E001이 새 과업의 수행과/이나 기억력에 영향을 미치는지를 시험하기 위한 것이다. 처음에 쥐들(S/D종 수컷, 200-250 g, 생후 약 8 주)을 두 개의 집단으로 나누고, 실험 기간 동안에 물(0.5 ml)이나 CVT-E001(튜브를 통한 섭취: 0.5 ml 물에 첨가시킨 하루 섭취량 200 mg/kg/일)을 공급한다. CVT-E001 투여를 시작한 지 8 일 후, 쥐에게 시야를 어렵게 한 물 속에 감추어진 플랫폼의 위치를 찾도록 하는 과업을 준다. 쥐들을 5 일 동안 매일 네 번씩 풀에 넣고 플랫폼을 찾는 데에 걸린 시간

을 기록한다(최대 허용 시간 5 분). 쥐가 과업을 학습함에 따라 소요 시간이 줄어든다. 14 일째 되는 날에, 두 집단의 쥐들을 다시 네 집단으로 나눈다. 새로운 위치로 옮긴 플랫폼을 찾도록(3 회 시도, 살린 주사나 스코폴라민 주사를 맞힌 후 30 분 이내에, 최대 소요 시간 3 분) 하기 전에, 처음 두 집단의 각 각에서 차출한 여섯 마리의 쥐들에게는 살린을 주사하고, 처음의 각 집단에서 차출한 나머지 여섯 마리의 쥐들에게는 스코폴라민을 주사한다. 15 일째 되는 날에는, 플랫폼을 전날에 지정한 위치에 그대로 두고 14 일째 되는 날에 수행한 것과 같은 방법을 반복한다. 17 일째 되는 날, 플랫폼을 16 일째 되는 날에 지정한 위치에 그대로 두고 14 일째 되는 날에 수행한 것과 같은 방법을 반복한다. 그리고, 각각의 경우에 플랫폼을 찾는 데에 걸린 시간을 기록한다.

이 실험은 매 회마다 24 마리의 쥐를 가지고 두 번씩 반복한다. 두 번의 실험에서 얻은 데이터를 취합한다. CVT-E001로 처리한 쥐 한 마리가 CVT-E001을 허파에 잘못 투여하여 사망하였다. 한 마리의 대조군 쥐는 학습 곡선의 마지막 다섯 번 시도에서 플랫폼을 찾는 데에 실패하였다. 이 데이터는 결과에 크게 영향을 주지 않기 때문에 삭제하였다. CVT-E001을 공급하고 스코폴라민을 주사한 쥐 한 마리는 마지막 날에 플랫폼을 찾는 데에 실패하였고, 이를 열외로서 제외시켰다.

로그 변환 데이터의 변이도를 분석함으로써 통계 분석을 실시한다. 뉴만-쿠스 검정을 이용하여 유의성을 사후 검증한다.

개별 시도와 물질의 혼용으로부터 얻은 데이터도 얻는다.

결과와 논의

쥐들이 플랫폼을 찾는 데에 첫 번째 시도에서는 약 200 초가 소요되었으나 스무 번째의 시도에서는 약 8 초가 소요되어 과업을 쉽게 학습하는 것을 알 수 있다(도 15). 쥐들이 모두 과업을 학습하였을 때에는 곡선이 평평하게 나타난다. 5 번째, 9 번째, 그리고 13 번째(2일, 3일 및 4일의 첫 번째) 시도에서는 반동 효과가 나타나, 밤새 동안 기억시킨 정보를 잃어버렸음을 알 수 있다.

쥐들에게 스코폴라민과 CVT-E001을 투여하거나 투여하지 않은 상태에서 플랫폼의 변경 위치를 학습하도록 하였을 때(도 16), 처음에는 모든 쥐들이 플랫폼을 찾는 데에 같은 시간이 걸린다(도 16, 처음 두 번째 시도). 이는, 처음으로 경험하는 과업이기 때문에 별 차이를 나타내지 않는 것이다. 세 번째 시도에서, CVT-3001과 살린을 투약한 쥐들은 CVT-E001을 투약하지 않고 스코폴라민만을 투약한 쥐를 능가하는 유일한 쥐들이다. 이 날에 얻은 데이터를 취합하면, 치료 효과의 증거가 전혀 나타나지 않는다(도 17). 이와 같은 상황에서(스코폴라민을 이용한 적당한 기억력 감퇴로 인한 초기의 단기적인 정보 습득) CVT-E001이 정보 습득에는 별 효과를 주지 않음을 알 수 있다.

다음 날에 쥐에게 같은 일을 수행하도록 하였을 때(즉, 쥐들이 전날에 한 일을 기억하고 있는지를 알아보기 위하여 시험한다), CVT-E001을 투여하지 않고 스코폴라민만을 투여한 쥐들은 모든 시도에서 실패한다(도 18). 시도 2에서, 모든 처리군들이 CVT-E001을 투여하지 않고 스코폴라민만을 투여한 쥐들보다 과업을 성공적으로 수행하였다. 이 날 얻은 시험 데이터를 취합하면(도 19), CVT-E001을 투약하지 않고 스코폴라민만을 투여한 쥐들은 CVT-E001을 투약하여 스코폴라민으로 인한 기억 상실이 상쇄된 것을 나타내는 다른 집단들보다 지연 시간이 훨씬 많이 걸린다. 이 시험은 전날에 습득한 기억을 되살리는 것과 관련된 것으로서, CVT-E001이 단시간 정보 습득보다는 장시간 축적된 기억력의 부족을 예방하는 것을 나타낸다.

쥐에게 다시 플랫폼의 변경 위치를 학습시켰을 때, 처리군들 사이에는 처음에 차이가 나타나지 않는다(도 20, 시도 1). 그러나, 시도 3에서는 스코폴라민으로 처리한 쥐들이 스포폴라민에 의한 학습 능력 부족을 나타낸다. 이 날의 시험에서 얻은 데이터를 취합하면, 처리군들 사이에는 큰 차이가 나타나지 않는 것으로 보아(도 21), CVT-E001과 적당하게 스코폴라민으로 유도한 기억 상실이 단기간 내에 효과를 내지 않는 것을 알 수 있다.

그런 다음에, 실험 마지막 날에 쥐들에게 플랫폼의 최종 위치를 기억하도록 하였을 때, 스코폴라민에 의한 기억 상실이 즉시 나타났다(도 22). 첫 번째 시도에서, CVT-E001을 투약하지 않고 스코폴라민만을 투여한 쥐들은 기억력이 크게 떨어져서 장기간의 기억을 잃은 것을 알 수 있다. 이와 같은 기억 상실은 CVT-E001과 스코폴라민을 함께 투여한 쥐들에게는 전혀 나타나지 않고, 이 쥐들은 스코폴라민을 투여하지 않은 쥐들과 마찬가지로 과업을 수행한다. 이 날의 데이터를 모두 취합하면(도 23), CVT-E001로 전처리하지 않고 스코폴라민을 투약한 쥐들은 학습 능력이 부족한 것으로 입증된다. CVT-E001과 스코폴라민을 함께 투여한 쥐들은 대조군들과 차이를 나타내지 않았으므로, CVT-E001이 스코폴라민에 의해 떨어진 학습 능력을 회복시키는 것을 알 수 있다. 스코폴라민으로 처리하지 않고 CVT-E001만을 투여한 쥐들은 스코폴라민이나 CVT-E001을 모두 투여하지 않은 쥐보다 월등하지 않았다.

CVT-E001은 식이 보충제로서 쥐에게 공급하였을 때 스코폴라민으로 인한 기억 상실을 예방하는 진세노사이드의 혼합물이다. 기억 상실이 없는 쥐들에게서는 CVT-E001이 학습 능력과 기억력을 향상시키지 않았으므로, 상기 효과는 기억이 감퇴된 쥐에게만 나타난다. 학습 후 24 시간이 지난 시간에 쥐들에게 학습한 일을 상기하도록 하였을 때에 가장 큰 효과를 보이는 것으로 보아, CVT-E001의 효과는 정보 습득과 단기간의 기억보다는 장기간의 정보 축적과 관계가 있는 것으로 보아, 스코폴라민은 콜린 흡수 시스템을 약화시키는 것으로 알려진 것과 대조적으로, 콜린 흡수 시스템이 저하되어 공간적 기억 감퇴를 초래하는 알츠하이머병과 같은 증세에 CVT-E001이 효과적인 것을 알 수 있다.

(4) 사람에 대한 CVT-E001(Remember-FX)의 기억력 테스트.

방법:

다섯 가지의 기억 지수(Memory Quotient) 측정 테이블을 사용한다.

테스트 A: 지시 기억. 24 단어를 읽어 준 다음, 피검자에게 분류별(예: 야채)로 나눈 단어들을 반복하도록

록 한다.

테스트 B: 연상 기억. 12 쌍의 단어를 피검자에 읽어 주고 각 단어쌍의 첫 번째 단어를 다시 읽어 준 다음, 피검자에게 나머지 단어를 말하도록 한다. 어떤 단어쌍은 "위-아래"와 "해-달"과 같이 서로 연관되어 있으나, 어떤 단어쌍은 "말-램프"와 같이 서로 연관되지 않은 단어로 이루어진다.

테스트 C: 그림의 자유 연상. 15 가지 그림을 보여준 후, 피검자에게 그림이 연상하는 것을 기억하도록 한다.

테스트 D: 무의미한 그림의 인식. 의미 없는 곡선으로 된 20 가지 그림을 피검자에게 먼저 보여준 후, 또 다른 20 가지 그림을 보여준다. 나중에 보여준 그림 중에서 절반은 처음에 보여준 그림과 같다. 그런 다음, 피검자로 하여금 이전에 본 그림들을 지적하도록 한다.

테스트 E: 얼굴 사진의 연결 회상. 각각 서명, 직업, 취미가 적혀 있는 6 장의 얼굴 사진을 피검자에게 보여준다(예: 성은 "장"이고, 교사이며, 취미는 TV 시청). 잠시 후, 순서를 달리하여 사진들을 다시 보여준다. 이 때, 피검자가 각 사진을 회상하도록 한다.

각각의 시험에 점수를 매기고, 각 피검자의 점수를 합산하여 MQ를 결정한다. Remember-FX나 콘트롤 다이어트를 갖기 전에, 모든 피검자들이 두 번씩 시험한다. 각 피검자는 Remember-FX나 콘트롤 다이어트 전후에 각각 한 번씩 신체 검사를 한다. 신체 검사는 Remember-FX를 투여하여도 부작용이 없음을 확인하기 위해서이다.

청년 시험 집단: 다섯 명의 남자와 다섯 명의 여자로 이루어진 20세에서 24세의 열 명의 대학생들로 하여금 13 일 동안 매일 두 알(200mg/알)의 Remember-FX를 복용하도록 한다. 청년 대조 집단은 남자 아홉 명과 여자 세 명의 총 열두 명으로 구성된다.

중년 시험 집단: 46세에서 64세에 해당하는 중년 집단은 14 일 동안 매일 두 알(200mg/알)의 Remember-FX를 복용하도록 한다. 중년 대조 집단은 나이가 40세에서 65세 사이의 남자 세 명과 여자 두 명으로 이루어진 총 다섯 명으로 구성된다.

통 계:

대조 집단과 시험 집단의 차이를 비교하기 위하여 집단 T 검정을 하였다.

결과:

각각의 테스트에 점수를 매기고, 각 피검자의 점수를 합산하여 기억 지수를 결정한다. 각 피검자는 Remember-FX나 콘트롤 다이어트 전후에 각각 한 번씩, 전체 두 번 시험을 한다.

표 5: Remember-FX를 복용하기 전후에 청년 시험 집단과 중년 시험 집단의 MQS.

	청년 집단		중년 집단	
	복용 전	복용 후	복용 전	복용 후
1	113.5	138	91	98
2	130	138	105	103.5
3	127	135	97.5	129
4	124	131	93	113
5	118	131.5	96	90
6	119	135	95	109
7	116	130	107	115
8	118	133	105	130
9	106	124	123	136
10	114	127	114	109

MQ는 피검자의 점수에서 소정의 식에 따라 계산된 것으로 7 개의 등급으로 나뉜다. 1급, MQ > 130 (매우 우수함); 2급, MQ 129-120 (우수함); 3급, MQ 119-110 (양호); 4급, MQ 109-90 (중간); 5급, MQ 89-80, 보통; 6급, MQ 79-70, 나쁨; 7급, MQ 69-60, 매우 나쁨.

표 6: 청년 집단의 MQ 차이.

	대조군	Remember-FX
인원수 테스트A 테스트B 테스트C 테스트D 테스트E	12인 3.8±3.21.9±4.73.2 ±5.5-3.0±5.6-0.7±4.1	10인 3.9±3.14.2±3.83.8 ±5.13.2±3.3**1.7±2.9
합계MQ	5.3±11.43.7±8.1	18.8±7.4**13.7±5.3**

평균 SD; 대조군과 비교하였을 때 * P < 0.05, ** P < 0.01.

테스트 A-E의 수치는 Remember-FX를 복용하기 전후의 점수 차이를 나타낸다.

표 7: 중년 집단의 MQ 차이.

	대조군	Remember-FX
인원수	26	26
테스트 A	2.6±2.4	6.4±5.05
테스트 B	0.3±2.1	5.2±3.6**
테스트 C	2.8±2.4	-1.3±5.03
테스트 D	7.3±4.9	3.7**
테스트 E	4.8±6.4	-2.2±5.9
합계MQ	-6.6±9.7	15.3*10.5±12.8*

평균 SD; 대조군과 비교하였을 때 * P < 0.05, ** P < 0.01.

테스트 A-E의 수치는 Remember-FX를 복용하기 전후의 점수 차이를 나타낸다.

결론:

(1) 표 5는 두 번째 피검자를 제외하고는 아홉 명의 청년 피검자의 MQ가 향상된 것을 보여 준다. 다섯 번째 피검자는 2 등급이나 향상되었다. 중년 집단에서는, 다섯 명(3, 4, 7, 8, 9 번째)이 등급이 향상되었다. 이들 중 한 명(8 번째 피검자)은 두 등급이 올랐다. 한 명(10 번째 피검자)이 한 등급 떨어진 것에 반하여, 다른 네 명(1, 2, 5, 6 번째)은 등급이 그대로 유지되었다(시력 차가 있을 수도 있다).

(2) 표 6과 표 7에서는 청년 집단과 중년 집단의 해당 대조 집단간에 MQ 차이가 크게 나타난다. 청년 집단은 테스트 D에서 차이를 보였고, 중년 집단은 테스트 B와 테스트 D에서 차이를 보였다. 테스트 B는 대뇌의 왼쪽이 지배하는 언어 능력에 관한 테스트이고, 테스트 D는 대뇌의 오른쪽이 지배하는 비언어(그림) 테스트이다. 결과를 보면, Remember-FX는 대뇌의 왼쪽(좌뇌)에 주로 영향을 주는 반면에, 중년 집단에서는 뇌 전체에 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

테스트 A와 테스트 B는 대뇌의 언어(왼쪽) 영역에 관한 것이고, 테스트 D는 비언어 영역에 관한 것이다. 테스트 C와 테스트 E는 양쪽 영역을 모두 포함한다.

도면의 설명

도 15는 8-13 일 동안 매일 물(0.5 ml/일)이나 CVT-E001(0.5 ml에 200 mg/kg/일)을 공급한 쥐의 학습 곡선이다. 쥐에게 5 일 동안 풀의 중앙에 감추어진 플랫폼의 위치를 찾는 것을 학습하도록 한다. 하루에 4 회씩 시도하도록 한다. 수치는 평균 ±35 회 또는 36 회의 시료에서 얻은 평균의 표준 오차이다. 별다른 처리 효과가 나타나지 않았다.

도 16은 (제 14 일) 쥐가 위치를 바꾼 플랫폼의 일차 위치를 학습하는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 결과를 나타낸다. 쥐를 모두 네 집단으로 나눈다. 집단 1(C/Scop)에는 시험 전에 식이 보충물로서 물만을 공급하고 15 분간 스키폴라민(2 mg/kg)을 주사한다. 집단 2(HT/Scop)에는 시험 전에 식이 보충물로서 CVT-E001(200 mg/kg/일)을 공급하고 15 분간 스키폴라민(2 mg/kg)을 주사한다. 집단 3(C/Sal)에는 시험 전에 식이 보충물로서 물을 공급하고 15 분간 살린(0.2 ml)을 주사한다. 집단 4(HT/Sal)에는 시험 전에 식이 보충물로서 CVT-E001을 공급하고 15 분간 살린(0.2 ml)을 주사한다. *C/Scop와 크게 차이 난다(p < 0.05).

도 17은 (제 14 일) 쥐가 플랫폼의 일차 변경 위치를 학습하는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 데이터를 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ±33 회 또는 36 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. 별다른 효과는 나타나지 않는다.

도 18은 (제 15 일) 쥐가 플랫폼의 일차 변경 위치를 기억해 내는 데에 걸린 지연 시간을 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ± 11 회 또는 12 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop와 크게 차이 난다(p < 0.05). **C/Scop와 크게 차이 난다(p < 0.01).

도 19는 (제 15 일) 쥐가 플랫폼의 일차 변경 위치를 기억해 내는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 데이터를 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ±33 회 또는 36 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop와 크게 차이 난다(p < 0.05). **C/Scop와 크게 차이 난다(p < 0.01). ***C/Scop 및 HT/Scop와 크게 차이 난다(각각, P < 0.01, p < 0.05).

도 20은 (제 16 일) 쥐가 플랫폼의 이차 변경 위치를 학습하는 데에 걸린 지연 시간을 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ±11 회 또는 12 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop 및 HT/Scop와 크게 차이 난다(P < 0.01).

도 21은 (제 16 일) 쥐가 플랫폼의 이차 변경 위치를 학습하는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 데이터를 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ±33 회 또는 36 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. 별다른 효과는 나타나지 않는다.

도 22는 (제 17 일) 쥐가 플랫폼의 이차 변경 위치를 기억해 내는 데에 걸린 지연 시간을 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ±11 회 또는 12 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop와 크게 차이 난다(p < 0.05).

도 23은 (제 17 일) 쥐가 플랫폼의 이차 변경 위치를 기억해 내는 데에 걸린 지연 시간과 세 번 시도하여 얻은 데이터를 보여 준다. 처리 방법은 도 16에서와 같다. 수치는 평균 ±33 회 또는 36 회 시도하여 얻은 평균의 표준 오차이다. *C/Scop와 크게 차이 난다(p < 0.01).

PC12 및 신경모세포종 N1E-115 세포계의 HT-1001 생체외 배양에 의한 신경돌기 회복의 시뮬레이션:

HT-1001 작용의 새로운 메커니즘을 발견하였는데, 이는 PC12(크롬친화세포종) 세포계에서 신경돌기 생육의 모의 실험에 해당한다. 그 결과, HT-1001은 증상을 악화시킬 뿐만 아니라, 신경퇴행성 질환의 진행 흐름을 바꾸어 준다. HT-1001의 이로운 효과(예방/치료)는 정기 치매증, 파킨슨씨병, 다중경색 치매증

등과 같은 퇴행성 질환에 이용할 수 있다.

진세노사이드는 중앙 신경계에 수많은 작용을 하는 것으로 보고되었다. 그와 같은 작용에는 CNS 자극 또는 억제, 경련 억제, 항정신증 작용, 무통 작용, 피로 억제 및 스트레스 방지 작용, 및 각종 기억의 향상 등이 있다(Takagi K. et al., Japan J. Pharmacol. 22:339 (1972); Satio H. and Nabata H., Japan J. Pharmacol. 22:245 (1972); Saito H. et al., Japan J. Pharmacol. 23:43 (1973); Takagi et al., Japan J. Pharmacol. 24:41 (1974); Saito et al., Japan J. Pharmacol. 24:119 (1974); Saito H., Japan J. Pharmacol. 27:509 (1977); Hong S.A., Korean J. Pharmacol. 10:1 (1974)). 순수한 진세노사이드 Rb1 및 Rg1은 실험 동물에서 기억을 향상시킬 수 있는 것으로 알려져 있고(Saito H., *Advances in Chinese Medicinal Materials Research* ed.; Chang H.M. et al., World Sci. Publ. Singapore, 1985, p. 509; Saito H., in *Recent Advances in Ginseng Studies*, ed.; Shibata S. Hirokawa Publ. Col. Tokyo, 1990, p.99; Benishin C.G. et al., *Pharmacology*, 42:223 (1991)), 뇌에서 콜린작용성 신경전달에 미치는 메커니즘이 잘 정의되어 있다. Rb1과 Rg1에 대하여 앞서 설명한 행동 작용 이외에도, 진세노사이드 Rb1과 Rd(다른 진세노사이드)는 신경 성장 인자(NGF)에 의한 배면 중추와 교감신경 중추의 신경 성장을 증가시키는 것으로 밝혀졌다(Saito H., in *Advances in Chinese Medicinal Materials Research* ed; Chang H.M. et al., World Sci. Publ., Singapore, 1985, p.509). 그러나, 그 자체에는 아무 영향을 주지 않는다. 이제까지는, 이와 같은 향상 작용의 세포 기작에 대한 정보가 별로 없었다. 그리고, Rb1이나 그 밖의 진세노사이드가 신경돌기의 생육에 미치는 영향에 대한 문헌이 존재하지 않는다. 최근의 한 보고서는 인삼의 "치지질성" 추출물도 향신경성 작용을 한다고 밝히고 있으나(Mohri T. et al., *Planta Med*, 58:321 (1992)), 이 추출물의 활성 성분에 대해서는 아직도 확인된 바 없다.

NGF는 1950년대에 처음으로 발견된 것으로, 프로토타입 뉴로트로핀이다. NGF는 발육 중에 뉴런 경로의 발생 및 유지와 관련된 많은 작용을 한다. 또한, 생물 작용도 조사된 바 있다(Levi-Montalcini R. *Science*, 237:1154 (1987); Levi A. and Alesa S., *Ann. Rev. Pharmacol, Toxicol*, 31:205 (1991)). 말초 신경 NGF는 발육 중에 부신 교감신경과 일차 감각 뉴런의 생존에 필수적이다. NGF는 발육 중에(Hefti F. et al., *Neurobiol, Aging*, 10:75 (1989)), 그리고 성인이 상처를 입은 후에(Raivich G and Krentzberg G.W., *Int. J. Devel. Neurosci.*, 11:311, (1993)) 감각 섬유의 회복과 신경 회로에 영향을 준다. 뇌에서, NGF는 기부 전뇌의 콜린성 뉴런의 생존을 증가시키고(Martin et al., *J. Cell Bio.*, 106:829 (1988); Mobley W.C. et al., *Mol. Brain Res.* 1:53 (1986)), 뉴런이 손상되면 같은 뉴런의 손실을 막는다(Hagg T. et al., *Brain Res.* 505:29 (1989); Tuszynski M.H. et al., *Ann Neurol.* 30:625 (1991)). NGF는 또한 신경 전구체 세포의 차별화를 향상시키는 것으로 보고되었다(Hartikka J. and Hefti F.J., *Neurosci. Res.* 21:352 (1988)). PC12 세포는 다른 특성 외에도 신경 돌기 생육과 전기적 여기로 NGF 처리에 반응한다(Greene L.A. et al., *Adv. Cell. Neurobiol.* 3:373 (1982)). 오늘날, 각종 우울증의 치료를 위한 신경증 인자를 설계하고 개발하는 추세이다(Hefti F.J., *Neurobiol.* 25:1418 (1994); onnaer JADM and Dekker AJAM, In *Anti-Dementia Agents Academic Press*, 1994, p.139).

알츠하이머병(AD)은 대뇌 기저 전뇌로부터 피질과 해마피로 뻗어나온 돌기를 포함한 콜린성 신경로의 퇴화와 관련되어 있다. PC12 세포계(Greene I.A. and Tischler A.S., *Adv. Cell. Neural.*, 3:373 (1982))은 이들 신경 경로의 작용을 연구하기 위한 모형 중의 하나이다. 세포계는 표현형이 크롬친화 세포계이지만 아드레날린성 지표(Greene I.A. and Tischler A.S., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 73:2424 (1976); Aloe L and Levi-Montalcini R., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 76:1246 (1979))와 콜린성 지표(Greene I.A. and Relin G., *Brain Res.* 138:521 (1977); Ritchie A.K., *J. Physiol. (Lond.)* 286:541 (1979); Schubert D. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 74:2579 (1977); Jumblatt J.E. and Tischler A.S., *Nature* 297:152 (1982))를 발현하도록 유도할 수 있다. 이 모형은 불멸의 세포계이고(Shibata S. et al., *Economic and Medicinal Plant res.* 1:217 (1985)); 생존을 위해서는 NGF에 의존적이지는 않지만 이에 민감하고(Saito H. in *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*, ed., Chang H.M. et al., World Sci. Publ., Singapore, 1985, p.509); 대뇌 기저 전뇌의 중앙 콜린성 뉴런과 공통적인 성질을 많이 갖는다(Saito H. in *Recent Advances in Ginseng Studies*, ed., Shibata S. Hirokawa Publ. Co., Tokyo, 1990, p.99)는 장점이 있다. 아직까지는, PC12 세포가 중앙 콜린성 뉴런이 반응하는 모든 영양 인자에 민감하지 않는 반면에, 중앙 콜린성 뉴런은 PC12 세포가 반응하는 모든 영양 인자에 반응한다는 사실에 주목하지 않았다. 따라서, PC12 세포계를 잘못된 양성 결과를 내놓지 않고 음성 결과를 주는(즉, 중앙 콜린성 뉴런에 작용하는 영양 인자를 놓치지 않는) 이상적인 모형 시스템으로 볼 수 있다.

PC12 세포는 이에 제한적이지는 않으나, 을 포함하여 다양한 방법으로 NGF에 반응하는 것으로 보고되었다: 막의 여기, 합성, 세포 골격의 조립과 안정화, 셀 정착 향상, 비대, 동화 작용 증대, DNA 합성 감소, 세포 증식(Werback-Perez K. et al., *Prog. Brain Res.* 86:183 (1990); 산화방지제(예: 카탈라아제)와 에너지 대사 효소의 선택적인 유도(perex-Polo J. R. and Werback-Perex K. in *Recent Achievements in Restorative Neurology*, 30:321 (1985); Perez-Polo J. R. and Werback-Perez K. in *Neural Development and Regeneration*, Sringer-Verlag, Heidelberg, p.339 (1987); Perez-Polo J.R. and Werback-Perez K, *Nervous System regeneration*, Alan Liss, New York, p.201 (1988)); 콜린성 신경전달 계 대사(예: CHAT 활성)의 자극(Greene L.A. and Rein G., *Brain Res.* 138:521 (1977); Ritchie A.K. *J. Physiol. (Lond.)* 286:541 (1979); Schubert D. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74:2579 (1977); Jumblatt J.F. and Tischier A.S., *Nature* 297:152 (1982)); 변형 유전자 발현(Szebereni J. and Erhardt P., *Biochim. Biophys. Acta* 1222:187 (1994)); 신경돌기 회복 증대(Greene L.A. and Tischler A.S., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73:2424 (1976)); 표층막 수용체의 발현 증가(Greene L.A. and Tischler AS. *Adv. Cell Neurol* 1:173 (1982)); APP-695(알츠하이머병의 병인학적으로 중요)의 발현 증가(Schubert D. et al., *Neuron* 3:689 (1987)); 오메가-CgTx 민감성 Ca²⁺ 채널의 발현 증가(Usowicz M.M. et al., *J. Physiol. (Lond.)* 426:95 (1990)); 제타-PKC의 발현 증가; 및 신경돌기의 생육을 향상시키는 PKC의 다른 이형태의 하향 조절(Coleman E.S. and Wooten M.W., *J. Mol. Neurosci.*, 5:39 (1994)). PC12 세포는 다양한 방법으로 NGF에 반응하기 때문에, 다른 물질의 NGF와 유사한 성질을 연구하기 위한 물질이 된다. 그러므로, 이들 세포는 대뇌 기저 전뇌의 중앙 콜린성 뉴런에 대한 좋은 모델이다.

재료와 방법:

PC12 세포를 선택하여 95% 공기와 5% CO₂의 수분으로 포화 상태인 대기하에 37 °C의 100 cm² 조직 배양 접시에서 1% 항생제, 10% 가열 비활성 말혈청 및 5% 소의 태아 혈청을 함유하는 RPMI 1640에서 보관한다. N1E-115 세포는 플라스크에서 10% FBS와 항생제 PNS(페니실린, 네오마이신, 스트렙토마이신)을 함유하는 90% DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 보관한다. 배양판은 95% 실내 공기와 5% CO₂로 이루어진 온도 조절된(37 °C) 습한 대기중에 둔다. 파스퇴르 피펫을 통하여 배지를 세계 흡인하여 세포를 기계적으로 꺼내어, 1×10⁴ 세포수/ml의 밀도로 2.0 ml의 완전 배지를 담은 35 mm 콜라겐 피막이 형성된 조직 배양 접시에 둔다. 배지를 일주일에 세 번씩 바꾸어 준다.

PC12 세포에 프로세스를 함유하는 세포의 개수를 세어서 신경 성장 인자(NGF)와 시료에 대한 세포 반응을 결정한다. 처리 후 7 일과 14 일째 되는 날에 세포의 사진을 찍어 둔다. 필름을 현상하고 인화하기 전에 각 접시에 두 개의 필드를 선택한다.

세포와 신경 돌기는 다음과 같이 카운트한다.

원형 또는 구형의 모양을 가진 세포와 신경돌기 회복을 보이지 않은 세포는 0(S0)점으로 처리한다;

길이가 늘어난 세포와 짧은 신경돌기 회복을 보인 세포는 S1 점으로 처리한다;

신경세포체에 두 개 이상의 작은 신경돌기가 있는 세포는 S2 점으로 처리한다;

신경세포체보다 길이가 적어도 두 배가 되는 신경돌기가 두 개 있는 세포는 S3 점으로 처리한다;

두 개의 긴 신경돌기를 갖는 세포는 S4 점으로 처리한다.

신경돌기 지표는 하기와 같이 계산한다.

신경돌기 지표(In) = 전체 신경돌기 점수(∑S)/세포의 전체 개수(∑N)

∑S = S1*N + S2*N + S3*N + S4*N; 여기서, N은 각 세포 필드에 있는 세포 개수이다.

실험 결과:

1. 처리 후 7 일째 되는 날에 NGF는 처리 용량에 의존적으로 PC12에서 신경돌기 회복을 증가시켰다(도 26).
2. 처리 후 7 일째 되는 날에 HT-1001은 처리 용량에 의존적으로 PC12에서 신경돌기 회복을 증가시켰다(도 27).
3. 처리 후 7 일째 되는 날에 HT-1001은 처리 용량에 의존적으로 PC12에서 신경돌기 회복을 증가시켰다(도 28). 도 29와 도 30은 각각 콘트롤 세포와 처리 세포의 원래 사진이다. 처리 세포에는 신경돌기가 많이 발견되지만, 대조군에는 신경세포 회복이 조금 또는 거의 보이지 않는다.

결 론:

HT-1001은 PC12 세포계와 N1E-115 세포계에서 모두 신경돌기 회복을 자극하는 NGF와 같은 효과를 나타낸다. 이는, 신경퇴화성 질병을 치료하고 예방하는 데에 유용한 효과를 가져다 줄 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

(a) 여러 가지 추출법을 이용하여 식물로부터 화학 성분들로 이루어진 다수의 약리학적 활성 혼합물을 추출하여 다수의 추출물을 얻는 단계;

(b) 각 추출물에 대하여 적어도 두 가지의 생체외 약리학적 시험과 적어도 한 가지의 생체내 약리학적 시험을 수행하여 단계 (a)에서 추출한 각 추출물의 약리학적 활성의 생물학적 지문을 얻고, 상기 시험이 각각 환자의 건강 상태의 효과적인 처리와 상관 관계에 있는 단계;

(c) 단계 (b)에서 최상의 약리학적 활성을 나타내는 하나의 추출물을 선택하는 단계;

(d) 단계 (c)에서 선택된 추출물의 생산에 이용되는 추출법을 적어도 한 번 반복하여 적어도 한 가지 시험 추출물을 얻는 단계;

(e) (1) 각 추출물의 약리학적 활성 혼합물에 포함된 화학 성분을 확인하고 상대적인 양을 결정하여, 상기 선택된 추출물과 상기 적어도 한 가지 시험 추출물의 화학적 지문을 얻고, 그리고

(2) 상기 적어도 한 가지 시험 추출물을 이용하여 생물학적 지문을 얻는 단계 (b)를 반복하는 단계; 및

(f) 상기 선택된 추출물과 상기 적어도 한 가지 시험 추출물의 화학적 지문과 생물학적 지문을 비교하는 단계를 포함하고,

상기 적어도 한 가지 시험 추출물의 화학 성분의 양이 상기 선택된 추출물의 동일한 화학 성분의 양보다 최대한 10% 많거나 적게 존재하는 경우와,

상기 적어도 한 가지 시험 추출물의 약리학적 시험 결과가 각각 이에 해당하는 상기 선택된 추출물의 약리학적 시험 결과보다 최대한 10% 크거나 작은 경우에는,

상기 선택된 추출물을 생산하는 데에 사용된 추출법이 식물로부터 화학 성분들의 약리학적 활성 혼합물을 추출하기 위한 표준 방법으로 선택되는 것을 특징으로 하는, 식물에서 얻은 화학 성분들의 약리학적 활성 혼합물을 추출하는 표준 방법으로 이용하기 위한 재현성 있는 추출 공정을 수행하는 방법.

청구항 2

- (a) 같은 식물 자원으로부터 얻은 다수의 시료에 대하여 여러 가지 추출법을 수행하여 다수의 식물 추출물을 얻는 단계;
- (b) 각 식물 추출물에 대하여 생체의 변화된 생물학적 상태와 상호 관련이 있는 적어도 한 가지의 약리학적 시험을 수행하는 단계;
- (c) 단계 (b)에서 최고의 약리학적 활성을 나타내는 식물 추출물을 선택하는 단계;
- (d) 단계 (c)에서 선택된 추출물을 생산하는 데에 이용된 추출법을 반복하여 시험 추출물을 얻는 단계;
- (e) 상기 선택된 추출물과 함께 상기 시험 추출물의 화학 성분들에 관하여 적어도 정성적인 정보를 제공하는 화학적 지문을 얻는 단계;
- (f) 상기 시험 추출물에 대하여 단계 (b)의 약리학적 시험을 반복하는 단계; 및
- (g) 상기 선택된 추출물과 상기 시험 추출물의 화학적 지문과 약리학적 활성을 비교하여, 상기 시험 추출물의 화학 성분(들)이 상기 선택된 추출물의 해당 약리학적 활성을 갖는 화학 성분(들)보다 약 10% 많거나 적게 존재하면, 상기 선택된 추출물을 생산하는 데에 이용된 추출법이 식물 자원으로부터 화학 성분들의 약리학적 활성 혼합물을 추출하기 위한 표준 방법으로 선택되는 단계를 포함하는, 식물 자원에서 유도한 화학 성분들의 약리학적 활성 혼합물로부터 재현 가능하고 높은 약리학적 활성을 얻는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 적어도 한 가지의 약리학적 시험이 적어도 한 가지의 생체외 약리학적 시험과 한 가지의 생체내 약리학적 시험인 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 적어도 한 가지의 약리학적 시험이 적어도 두 가지의 생체외 약리학적 시험과 적어도 두 가지의 생체내 약리학적 시험인 방법.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 생체의 변화된 생물학적 상태가 환자의 질병 상태의 효과적인 처리인 방법.

청구항 6

제 2 항에 있어서, 상기 적어도 정성적인 정보가 정성 정보와 정량 정보인 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 환자가 사람인 방법.

청구항 8

- (a) 같은 식물 자원으로부터 얻은 다수의 시료에 대하여 여러 가지 추출법을 수행하여 다수의 식물 추출물을 얻는 단계;
- (b) 각 식물 추출물에 대하여 환자의 질병 상태의 효과적인 처리와 관련이 있는 것으로 인지되는 적어도 두 가지의 생체외 약리학적 시험과 적어도 두 가지의 생체내 약리학적 시험을 수행하는 단계;
- (c) 단계 (b)에서 최고의 약리학적 활성을 나타내는 식물 추출물을 선택하는 단계;
- (d) 단계 (c)에서 선택된 추출물을 생산하는 데에 이용된 추출법을 반복하여 시험 추출물을 얻는 단계;
- (e) 상기 선택된 추출물과 함께 상기 시험 추출물의 화학 성분들에 관하여 적어도 한 가지의 정성 및 정량적인 정보를 제공하는 화학적 지문을 얻는 단계;
- (f) 상기 시험 추출물에 대하여 단계 (b)의 약리학적 시험을 반복하는 단계; 및
- (g) 상기 선택된 추출물과 상기 시험 추출물의 화학적 지문과 생물학적 활성을 비교하여, 상기 시험 추출물의 화학 성분(들)이 상기 선택된 추출물의 해당 약리학적 활성을 갖는 화학 성분(들)보다 약 10% 많거나 적게 존재하면, 상기 선택된 추출물을 생산하는 데에 이용된 추출법이 재현성 있고 높은 약리학적 활성을 갖는 화학 성분들의 약리학적 활성 혼합물을 추출하기 위한 표준 방법으로 선택되는 단계를 포함하는, 식물 자원에서 유도한 재현성 있고 높은 약리학적 활성을 갖는 화학 성분들의 약리학적 활성 혼합물을 얻기 위한 방법.

청구항 9

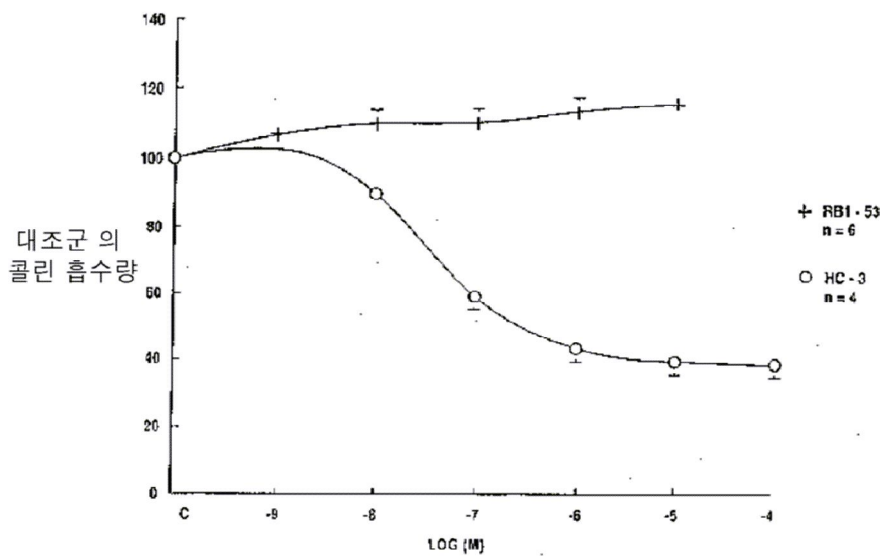
(a) 같은 식물 자원으로부터 얻은 다수의 시료에 대하여 여러 가지 추출법을 수행하여 다수의 식물 추출물을 얻는 단계;

- (b) 각 식물 추출물에 대하여 생체의 변화된 생물학적 상태와 상호 관련이 있는 적어도 한 가지의 약리학적 시험을 수행하는 단계;
- (c) 단계 (b)에서 최고의 약리학적 활성을 나타내는 식물 추출물을 선택하는 단계;
- (d) 단계 (c)에서 선택된 추출물을 생산하는 데에 이용된 추출법을 반복하여 시험 추출물을 얻는 단계;
- (e) 상기 선택된 추출물과 함께 상기 시험 추출물의 화학 성분들에 관하여 적어도 정성적인 정보를 제공하는 화학적 지문을 얻는 단계;
- (f) 상기 시험 추출물에 대하여 단계 (b)의 약리학적 시험을 반복하는 단계; 및
- (g) 상기 선택된 추출물과 상기 시험 추출물의 화학적 지문과 약리학적 활성을 비교하여,

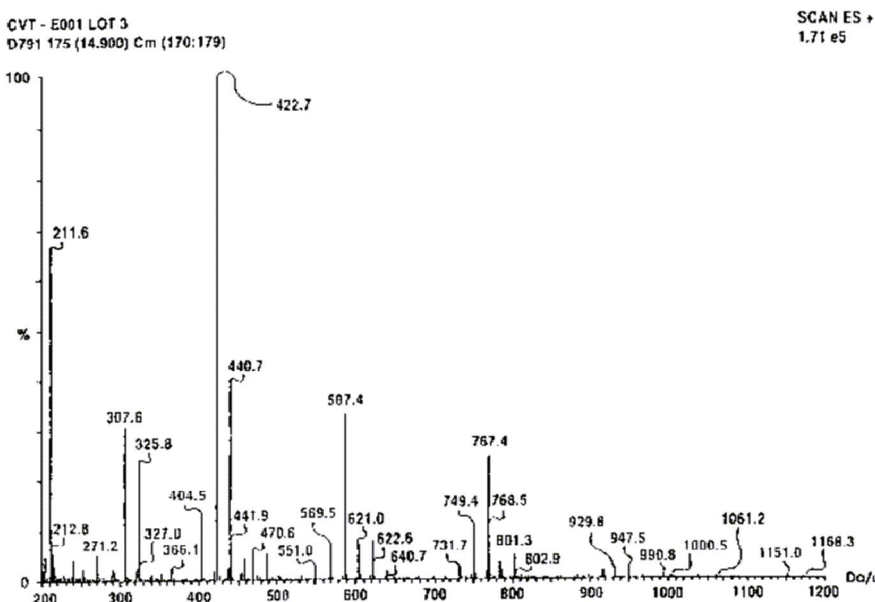
상기 시험 추출물의 화학 성분(들)이 상기 선택된 추출물의 해당 약리학적 활성을 갖는 화학 성분(들)보다 약 10% 많거나 적게 존재하면, 상기 선택된 추출물을 생산하는 데에 이용된 추출법이 식물 자원으로 부터 화학 성분들의 약리학적 활성 혼합물을 추출하기 위한 표준 방법으로 선택되는 단계를 포함하는 과정에 의해 얻은 재현성 있고 높은 약리학적 활성을 갖는, 식물 자원에서 유도된 화학 성분들의 약리학적 활성 혼합물.

도면

도면1



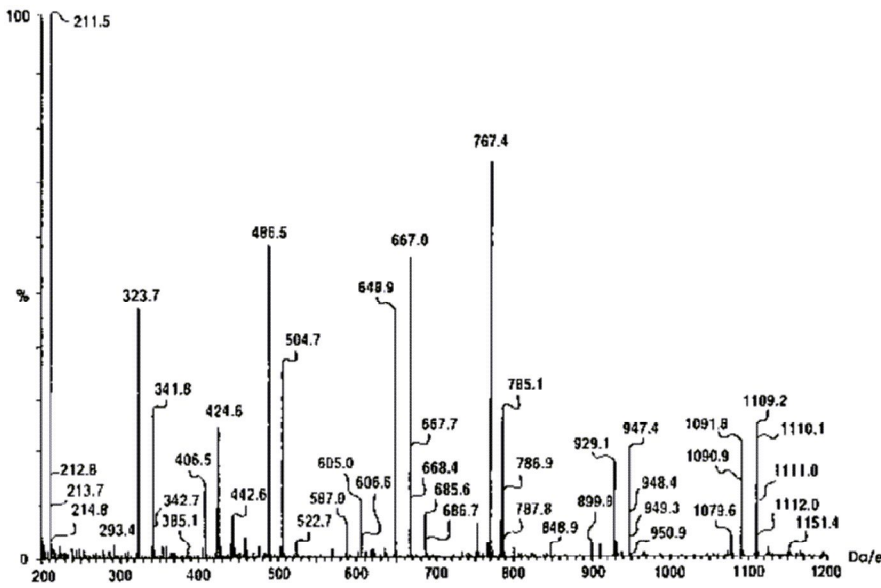
도면2



도면3

CVT-E001 LOT 3
D791 218 (18.555) Cm (214:221)

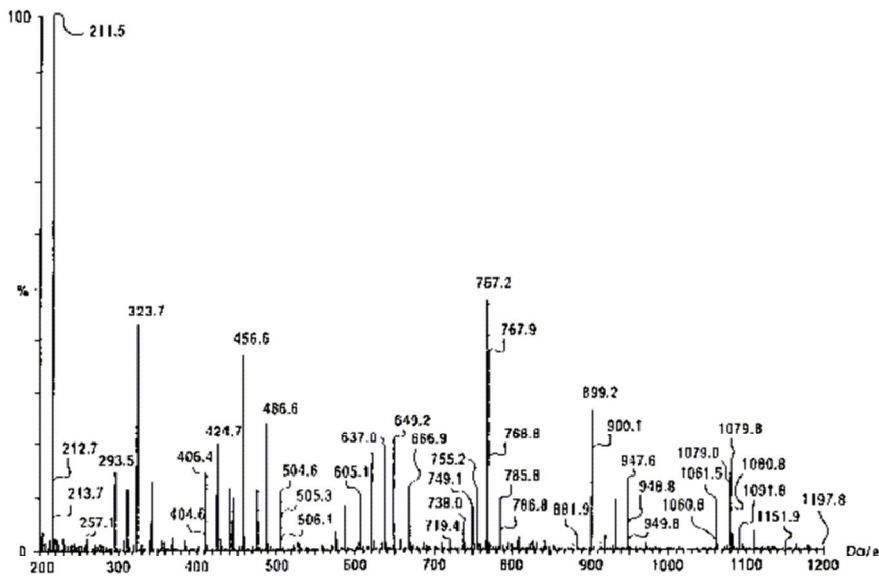
SCAN ES +
1.07 e5



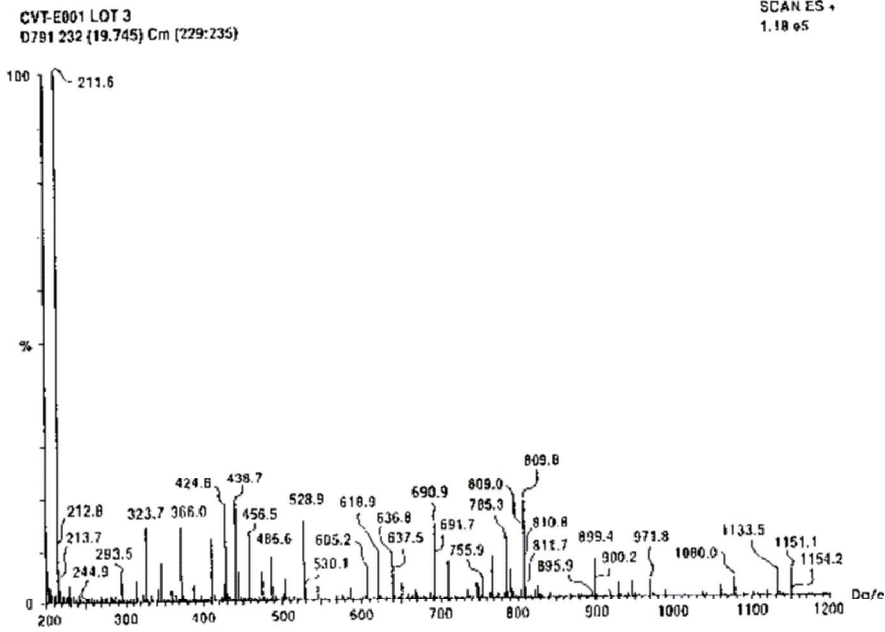
도면4

CVT-E001 LOT 3
D791 222 (18.895) Cm (222:228)

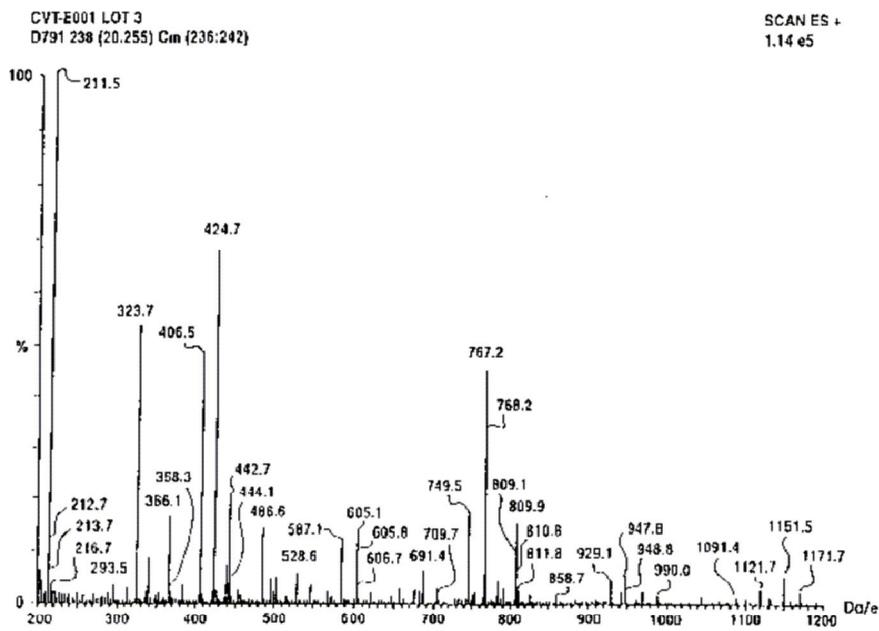
SCAN ES +
1.12 e5



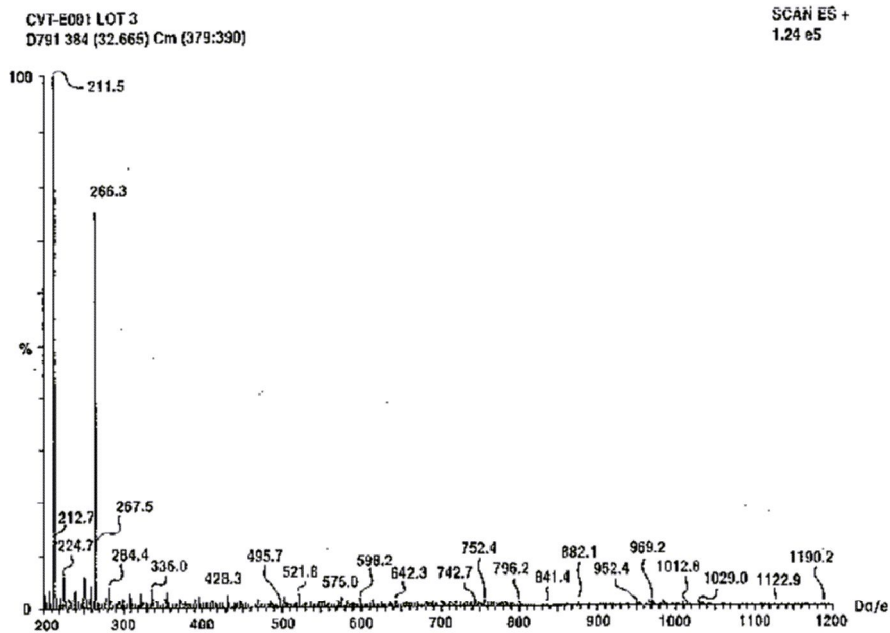
도면5



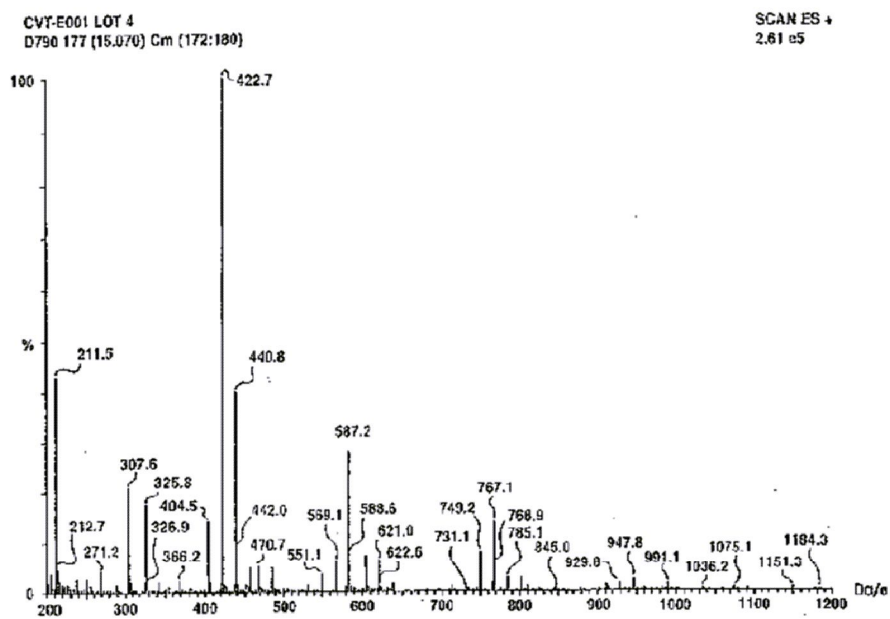
도면6



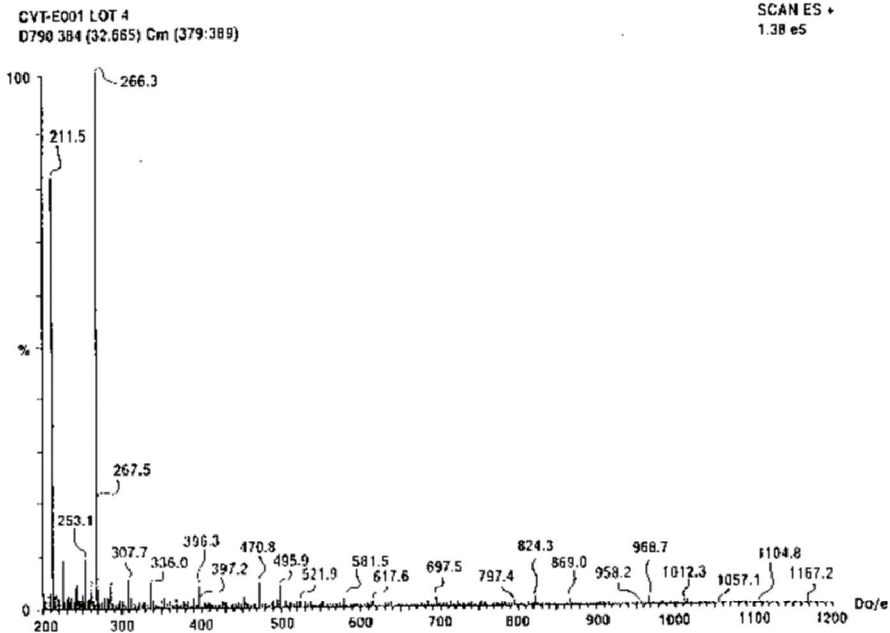
도면7



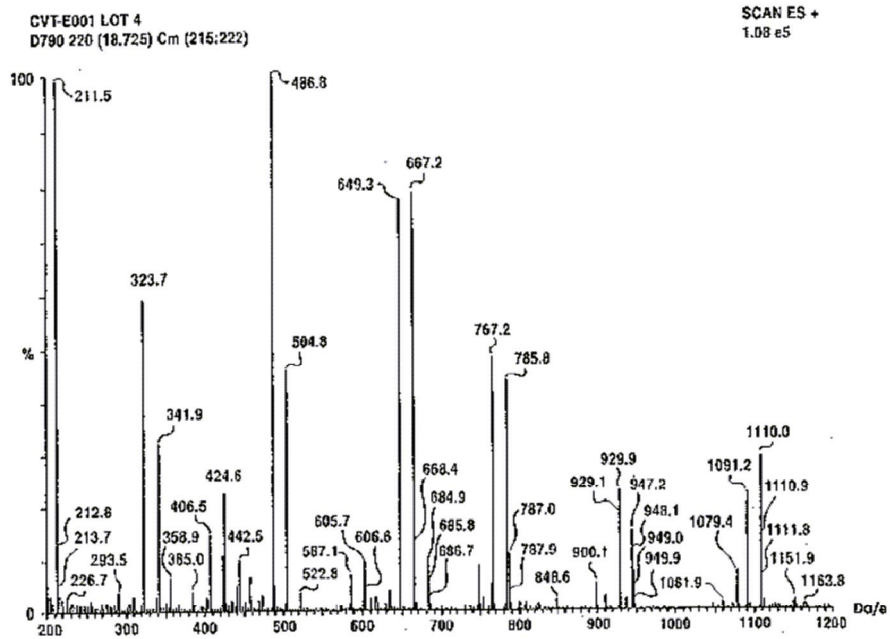
도면8



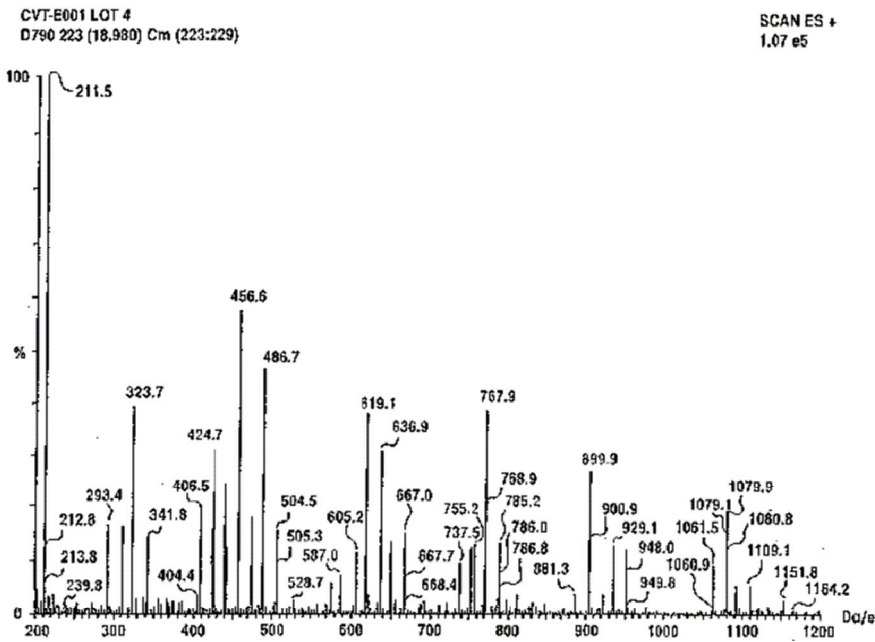
도면9



도면10



도면11



도면12

