(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년02월06일
(11) 등록번호 10-2496450
(24) 등록일자 2023년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/82 (2006.01) *A23K 10/30* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 31/19* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/82 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2022-0081125
(22) 출원일자 2022년07월01일
심사청구일자 2022년07월01일
(56) 선행기술조사문헌
김혜수 외. 노각나무 잎과 가지 추출물의 항산화 효과. 생약학회지. 제31권제2호, 2021, pp. 229-236*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 아이두젠
서울특별시 구로구 디지털로33길 28 ,104호(구로동)
(72) 발명자
남우현
서울특별시 동작구 서달로 91 흑석한강센트레빌2차 109동 1504호
(74) 대리인
특허법인서한

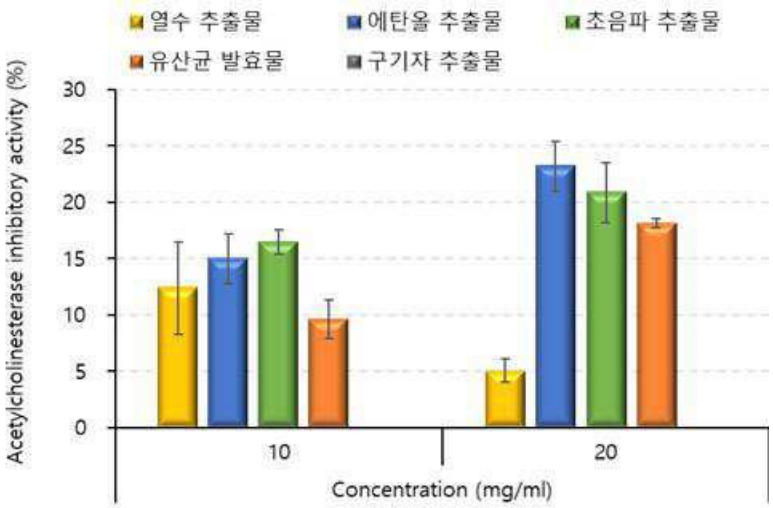
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 출원은 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 31/19 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 추출물은,

물, 유기용매 또는 초음파 추출물이거나,

물 추출물을 유산균(*Lactobacillus plantarum*)으로 발효하여 수득한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 추출물은,

우르솔릭산(Ursolic Acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 치매는,

알츠하이머형 치매증, 뇌혈관성 치매증, 뇌신경염증성 치매, 루이소체치매(Dementia with Lewy Bodies, DLB), 다발성 경색치매(Multi-Infarct Dementia, MID), 전두측두엽변성증(frontotemporal lobar degeneration, FTLD), 픽병(Pick's disease), 피질기저퇴행 (Corticobasal degeneration, CBD), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy, PSP), 대뇌 아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington disease) 또는 경도인지장애(mild cognitive impairment)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은,

아세틸콜린에스테라제 및 β-세크레타아제(β-secretase)의 활성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 조성물은,

H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포를 보호하고,

아밀로이드 β 펩타이드에 의해 유발된 뉴런 손상 또는 세포자멸사를 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 5 및 청구항 7 중 어느 한 항의 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 치매의 예방 또는 치료방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 노각나무 추출물을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 치매는 우리나라 65세 이상의 노령인구 약 8.2~10.8%에서 나타날 정도로 빈번히 발생되고 있으며, 인구의 급속한 고령화와 함께 심각한 사회문제로 대두되고 있는 대표적인 노년기 질환으로 후천적으로 지적능력을 상실하고 인지장애, 행동 및 성격의 점진적 황폐화라는 임상증상을 나타내는 퇴행성질환이다. 특히, 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)은 가장 많은 유형의 치매로 대뇌 피질(cortex)이나 해마(hippocampus)에 생기는 뇌위축과 노인반(senile plaque), 신경섬유다발(neurofibrillary tangles) 그리고 신경세포의 과립공포변성(granulovacuolar degeneration), 히라노체(Hirano body) 등의 조직학적 소견을 특징으로 하며, 베타 아밀로이드(β-amyloid, Aβ)는 노인반의 주요 구성성분으로 AD가 발생하는 중요한 원인으로 추정되고, 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 발생시켜 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인한 신경세포사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 주요 증상은 뇌세포파괴로 인한 인지기능, 기억력 감퇴로 서서히 진행되는 경우 사망에 이르게 된다. 40-65세 사이에 발병하는 경우 early-onset 또는 가족형 AD(familial AD), 65세 이상에서 발병되는 경우 late-onset 또는 산발성(sporadic AD)로 분류 된다. 가족형은 유전적 요인이 많이 작용한다. 일부 노화로 인한 신경퇴행성으로 발병하여 진행과정이 느린 경우를 노인성 치매(senile dementia)라고 하며 AD는 진행성으로 노인성 치매보다 증상의 진행속도가 빠르다.

[0004] 한편, 이와 같은 병인과 관련하여 지금까지 개발된 치매의 치료 또는 개선을 위한 약제로는 반응성 산소종에 의한 뇌 세포의 파괴를 억제하는 타크린(Tacrine), 아리셉트(Aricept) 및 엑셀론(Exelon)과 같은 아세틸콜린 분해효소 억제제가 개발되어 있다.

[0005] 그러나, 이러한 약제들은 부작용이 유발될 수 있으며, 그 효능이 우수하지 못한 단점이 있다. 또한, 현재 치매와 관련된 연구가 국내·외적으로 많이 시행되고 있지만 아직까지 뚜렷한 효능을 나타내는 새로운 치료제를 개발한 사례는 없으며, 이러한 질병예방에는 섭취식품의 영향이 가장 큰 비중을 차지함에도 불구하고 식품학적 접근을 한 연구는 미흡한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1807953호 (2017.12.12 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 출원이 해결하고자 하는 과제는 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학 조

성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 출원이 해결하고자 하는 과제는 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 출원이 해결하고자 하는 과제는 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 출원이 해결하고자 하는 과제는 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 차매의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 출원의 하나의 실시예는, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 추출물은, 물, 유기용매 또는 초음파를 이용하여 수득한 것일 수 있다.

[0013] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 추출물은, 물 추출물을 유산균(*Lactobacillus plantarum*)으로 발효하여 수득한 것일 수 있다.

[0014] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 추출물은, 노각나무의 잎 또는 줄기의 추출물일 수 있다.

[0015] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 상기 추출물은, 우르솔릭산(Ursolic Acid)을 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 치매는, 알츠하이머형 치매증, 뇌혈관성 치매증, 뇌신경염증성 치매, 루이소체치매(Dementia with Lewy Bodies, DLB), 다발성 경색치매(Multi-Infarct Dementia, MID), 전두측두엽변성증(frontotemporal lobar degeneration, FTLD), 픽병(Pick's disease), 피질기저퇴행(Corticobasal degeneration, CBD), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy, PSP), 대뇌 아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington disease) 또는 경도인지장애(mild cognitive impairment)일 수 있다.

[0017] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 조성물은, 아세틸콜린에스테라제 및 β-세크레타아제(β-secretase) 활성을 억제시키는 것일 수 있다.

[0018] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 조성물은, 항산화 활성을 갖고, 활성산소종(Reactive oxygen species)의 발생을 억제 또는 제거하는 것일 수 있다.

[0019] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 조성물은 H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포를 보호하는 것일 수 있다.

[0020] 본 출원의 하나의 실시예에서, 상기 조성물은 아밀로이드 β 펩타이드에 의해 유발된 뉴런 손상 또는 세포자멸사를 억제하는 것일 수 있다.

[0021] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 출원의 하나의 실시예는, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0022] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 출원의 하나의 실시예는, 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0023] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 본 출원의 하나의 실시예는, 노노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 치매의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 출원의 하나의 실시예에 따른 조성물은 아세틸콜린에스테라제의 활성을 억제하고 β-세크레타아제(β-secretase)의 활성을 억제하며, 항산화 활성을 갖는 효과가 있다. 또한, 상기 조성물은 활성산소종(Reactive oxygen species)의 발생을 억제 또는 제거하고, 아밀로이드 β 펩타이드에 의해 유발된 뉴런 손상 또는 세포자멸사를 억제하는 효과가 있어서 약학 조성물과 식품 조성물로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 추출물의 ABTS 라디칼 소거능과 DPPH 라디칼 소거능을 나타낸 것이다.

도 2는 추출물의 신경세포 독성 효능을 나타낸 것이다.

도 3은 추출물의 ROS 생성 저해능을 나타낸 것이다.

도 4는 추출물의 Acetylcholinesterase 저해 활성을 나타낸 것이다.

도 5는 추출물의 β-Secretase 저해 활성을 나타낸 것이다.

도 6은 추출물의 H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포 사멸 농도를 나타낸 것이다.

도 7은 추출물의 H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포 보호효과를 나타낸 것이다.

도 8은 추출물의 Amyloid β-peptide 25-35 세포독성에 대한 신경세포 사멸 농도를 나타낸 것이다.

도 9는 추출물의 Aβ 세포독성에 대한 신경세포 보호효과를 나타낸 것이다.

도 10은 시료의 Ursolic acid 함량을 나타낸 것이다.

도 11은 Ursolic acid의 ROS 생성 저해능을 나타낸 것이다.

도 12는 Ursolic acid의 H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포 보호효과를 나타낸 것이다.

도 13은 Ursolic acid의 Aβ 세포독성에 대한 신경세포 보호효과를 나타낸 것이다.

도 14는 Ursolic acid의 신경세포 독성 측정 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 출원을 보다 상세히 설명한다.

[0027] 이하의 특정한 구조 내지 기능적 설명들은 단지 본 출원의 개념에 따른 실시예를 설명하기 위하여 예시된 것으로, 본 출원의 개념에 따른 실시예들은 다양한 형태로 실시될 수 있으며 본 명세서에 설명된 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[0028] 본 출원의 개념에 따른 실시예는 다양한 변경을 가할 수 있고 여러가지 형태를 가질 수 있으므로 특정 실시예들은 본 명세서에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 출원의 개념에 따른 실시예들을 특정한 개시 형태에 한정하려는 것이 아니며, 본 출원의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0029] 본 명세서에서 사용하는 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로 본 출원을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한 복수의 표현을 포함한다.

[0030] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 출원이 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 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 명세서에서 명백하게 정의하지 않는 한 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0031] 노각나무(*Stewartia pseudocamellia* Maxim.)는 차나무과 (Theaceae)의 낙엽교목으로 우리나라 전라남·북도, 경상남·북도에 분포하며, 주로 지리산 지역에 자라고 있고 비교적 풍부한 자원을 보유하고 있다. 본 식물은 높이 7~15 m이며 나무껍질은 검은빛이 도는 적갈색이지만 나무껍질 곳곳이 동그랗게 또는 길게 떨어져나가 붉은빛이 도는 노란색 무늬가 나타난다. 어긋나기로 달리는 잎은 타원형이며, 잎 가장자리에는 작은 톱니가 있다. 꽃은 흰색이며 6-7월 무렵 잎이 달리는 자리에 핀다. 꽃은 갈래꽃으로 꽃잎이 다섯 장이며, 수술이 많다. 10월에 익는 단단한 열매는 부드러운 털로 겉이 덮여 있다. 나무껍질에 얼룩무늬가 있어 비단나무 또는 금수목(錦繡木)이라고도 한다. 잎이 가을에 노랗게 물들고, 꽃이 마치 동백꽃처럼 생겨 흔히 정원이나 공원 등에 관상수로 심는다. 목재는 단단해서 가구용으로 많이 쓰이며 현재는 귀한 약재 및 마시는*?*차로 많은 사람들이 찾는다. 수피는 얇은 조각으로 떨어져 적갈, 회백, 회갈색의 무늬가 생겨 얼룩얼룩하고, 새 가지의 기부에서 액생하고 과실은 삭과로 5각난형이다. 본 식물은 이명인 *Stewartia koreana* Nakai 또는 *Stewartia pseudocamellia* Maxim. var. koreana (Nakai) Kim 이라 하여 꽃이 컵 모양이고 가지가 곧고 둥글다고 특산종으로 보는 견해도

있으나 현재 일본 등에도 분포하는 *Stewartia pseudocamellia* Maxim.로 주로 기록하고 있고, 또 다른 이명으로는 *Stewartia ptero-petiolata* Cheng var. *koreana* (Rehd.) Sealy가 기록되어 있다. 노각나무는 꽃이 크고 화려하여 관상용으로, 목재는 단단하고 무늬가 아름다워 가구재, 장식재 등으로 사용했으며, 나무껍질과 뿌리껍질은 모란(帽蘭)이라 하여 서근활혈(舒筋活血)의 효능이 있어 타박상으로 어혈이 진 것을 풀어주고 풍습성으로 인한 관련 활성 또한 연구되었다.

[0032] 상기 노각나무 추출물은 상기 노각나무의 천연, 잡종 또는 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 노각나무의 종자(씨앗), 뿌리, 지상부, 줄기, 잎, 꽃, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터도 추출이 가능하다. 이에 한정되는 것은 아니나, 노각나무 추출물은 노각나무의 줄기 추출물 및 노각나무 잎 추출물 중 1종 이상일 수 있다.

[0033] 본 출원에서의 용어, "추출물(extract)"이란, 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온, 저온 또는 가온 상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 희석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다.

[0034] 상기 노각나무 추출물은 당업계에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 추출방법으로는, 이에 한정되지는 않으나, 침지추출, 열수추출, 냉침추출, 환류냉각추출, 또는 초음파추출 등의 방법을 이용할 수 있다.

[0035] 이때, 사용되는 유기용매는 인지기능 장애 및 신경 염증의 예방 또는 치료 효과를 갖는 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 물, 극성용매 또는 비극성용매가 될 수 있고, 보다 구체적으로는 물, 탄소수 1 내지 6의 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등),헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 클로로포름 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매일 수 있으며, 가장 구체적으로는 에탄올 또는 이의 혼합용매일 수 있다. 또한, 상기 추출물을 수득하기 위한 방법 역시 치매의 예방 또는 치료 효과를 갖는 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 상기 노각나무의 뿌리, 줄기, 잎, 열매, 꽃, 이들의 건조물, 가공물 등을 상기 용매에 침지하고, 상온에서 추출하는 냉침추출법, 40℃ 내지 100℃ 로 가열하여 추출하는 가열추출법, 초음파를 가하여 추출하는 초음파추출법, 환류냉각기를 이용한 환류추출법 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0036] 본 출원에서의 용어, "분획물"이란, 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[0037] 본 출원에 있어서, 상기 분획물은 상기 노각나무 추출물을 다양한 분획방법에 적용하여 수득한 분획물로 해석될 수 있다. 상기 추출물의 분획물은 상기 추출물을 다양한 분획방법에 적용하여 수득할 수 있는데, 상기 분획방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 다양한 용매를 처리하여 수행하는 용매 분획법, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 수행하는 한외여과 분획법, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)를 수행하는 크로마토그래피 분획법 등이 될 수 있다.

[0038] 특히, 상기 용매 분획법에 사용되는 용매는 특별히 이에 제한되지 않으나, 극성 용매 또는 비극성 용매를 사용할 수 있고, 구체적으로는 비극성 용매를 사용할 수 있다. 상기 용매 분획법은 비극성 수준이 높은 용매로부터 낮은 용매를 사용하여 상기 추출물을 순차적으로 분획하는 방식으로 수행될 수 있는데, 예를 들어 핵산 또는 에틸아세테이트를 이용하여 상기 추출물을 순차적으로 분획하는 방법을 사용할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명에서 분획물은 물, 알코올, 헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 클로로포름 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 분획하여 수득할 수 있다.

[0040] 일반적으로 치매란 앞서 배경기술에서도 기재한 바와 같이, 성장기에는 정상적인 지적 수준을 유지하다가 후천적으로 인지기능의 손상 및 인격의 변화가 발생하는 질환을 말한다. 치매는 다양한 원인에 의해 뇌신경이 파괴됨으로써 기억력장애, 언어능력 장애, 변뇨실금, 편집증적 사고, 실어증과 같은 정신기능의 전반적인 장애가 나타나며, 진행되는 과정에서 우울증이나 인격장애, 공격성 등의 정신의학적 증세가 동반되기도 한다. 의학계에서는 노화와 유전에 의한 원인성에 주목하고 있지만, 아직 정확한 발병원인과 치료법은 규명되지 않은 상태이다.

[0041] 치매로 분류되는 질환은 이에 한정되지 아니하나 알츠하이머형 치매증, 뇌혈관성 치매증, 뇌신경염증성 치매, 루이소체치매(Dementia with Lewy Bodies, DLB), 다발성 경색치매(Multi-Infarct Dementia, MID), 전두측두엽 변성증(frontotemporal lobar degeneration, FTLD), 픽병(Pick's disease), 피질기저퇴행(Corticobasal degeneration, CBD), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy, PSP), 대뇌 아밀로이드 맥관병증

(Cerebral amyloid angiopathy), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington disease) 또는 경도인지장애(mild cognitive impairment)가 포함될 수 있고, 본 발명에서 제공하는 조성물이 치료, 예방 및 개선할 수 있는 질환으로 이러한 질환을 포함할 수 있다.

[0042] 이러한 점에서 본 기술은 노각나무 추출물이 항염 활성이 우수하고 세포에 독성을 유발시키지 않으며 아세틸콜린에스테라제의 활성을 억제하고 β-세크레타아제(β-secretase)의 활성을 억제하며, 항산화 활성을 가지며, 활성산소종(Reactive oxygen species)의 발생을 억제 또는 제거하고, 아밀로이드 β 펩타이드에 의해 유발된 뉴런 손상 또는 세포자멸사를 억제하는 효과가 우수하여 치매 치료를 위한 의약품 소재 및 기능성 건강식품 소재로 사용할 수 있다. 특히 "β-아밀로이드(Amyloid β peptide, Aβ)"란 아밀로이드 전구 단백질로부터 AD특이적 단백질 분해효소 작용에 의해 생성된 단백질로, 이는 뇌 조직에 침착되면서 뇌세포의 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0043] 본 출원은 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 약학 조성물은 노각나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함할 수 있다.

[0045] 본 출원에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명의 조성물의 투여에 의해 치매를 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0046] 본 출원에서 사용된 용어 "치료"는 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법으로서, 본 발명의 목적을 위해 유익하거나 바람직한 임상적 결과를 감지 가능하거나 가능하지 않거나를 불문하고, 또한 부분적이든 전체적이든 상관없이 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 더 나빠지지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 속도감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 따라서, 치료는 치료법적 치료 및 예방적인 차원의 것들 모두를 가리키며, 치료할 필요가 있는 것들은 이미 질환을 가지고 있는 상태뿐만 아니라 질환이 예방되어야 할 상태를 포함한다. 또한, 본 발명의 약학 조성물을 개체에 투여하여 치매의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다

[0048] 본 출원에서 상기 추출물의 제조를 위해 10% 내지 95%(v/v)의 에탄올을 용매로 사용하는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 50% 내지 95%(v/v)의 에탄올, 더욱 바람직하게는 70% 내지 95%(v/v)의 에탄올을 사용하는 것이 좋다. 또한 상기와 같은 용매의 양은 추출원료의 중량 기준 1 내지 25배로 하는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 5 내지 20배로 하는 것이 좋다. 추출온도는 50℃ 내지 90℃가 바람직하며, 보다 바람직하게는 60℃ 내지 80℃가 좋다. 추출시간은 1 내지 12시간이 바람직하며, 보다 바람직하게는 5 내지 7시간이 좋다. 이러한 추출조건에 따르면 상기 원재료로부터 본 발명에서 목적으로 하는 효과를 나타내는 성분을 효율적으로 추출할 수 있다.

[0049] 상기 제조된 추출물은 이후 여과하거나 농축 또는 건조과정을 수행하여 용매를 제거할 수 있으며, 여과, 농축 및 건조를 모두 수행할 수 있다. 예컨대, 여과는 여과지를 이용하거나 감압여과기를 이용할 수 있으며, 농축은 감압 농축기, 건조는 동결건조법 등을 수행할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 출원에 따른 우르솔릭산(Ursolic Acid)은 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조할 수 있는데, 바람직하게는 노각나무 추출물, 더욱 바람직하게는 노각나무 의 주정추출물로부터 분리 및 정제된 것일 수 있다. 상기 추출물로부터 이들 화합물의 분리 및 정제는 실리카겔(silica gel)이나 활성 알루미나(alumina)등의 각종 합성수지를 충진한 컬럼 크로마토그라피(column chromatography) 및 고속액체크로마토그라피(HPLC) 등을 단독으로 혹은 병행하여 사용할 수 있다. 그러나 유효성분의 추출 및 분리정제 방법은 반드시 상기한 방법에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 또한, 본 출원에 따른 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양의 노각나무 추출물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 치매 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[0052] 본 출원에 따른 노각나무 추출물의 약학적으로 유효한 양은 0.5 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 5mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 치매 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0053] 또한, 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아

카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0054] 본 출원에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 약학적 조성물을 제제화할 경우에는 약제학적으로 허용되는 부형제, 보조제, 무통화제, 등장화제, 보존제, 및 기타 보조제와 혼합하고 약제학적으로 허용되는 제제 형태로 제제화하여 약학적 제제를 제조할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0055] 이러한 약제학적 제제 형태에 있어서, 본 출원은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비 경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있으며, 가장 바람직한 투여 경로는 경구 투여이다. 경구 투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되며, 비 경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함되지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0056] 본 출원의 조성물은 치매 환자의 운동능력 개선과 인지 기능 저하를 예방하고 회복시키며, 아울러 생활 기능을 증진시키는 약물인 콜린에스테라제(cholinesterase) 차단제인 타크린(tacrine), 도네페질(donepezil), 리바스티그민(revastigmine), 갈란타민(galantamine), MAO-B 차단제인 셀레길린(selegilin), 혈관 확장제, 뇌 영양제인 누트로픽스(nootropics) 등과 병용 투여할 수 있다. 또한 항정신병 약물인 할로페리돌(haloperidol), 비전형적 정온제로 알려진 크로자핀(clozapine) 및 리스페리돈(risperidone), 올란자핀(olanzapine), 세로토닌 재흡수를 차단시키는 프로작(prozac), 졸로푸트(zoloft), 세로작(seroxat) 등의 항우울제와 병용하면 기존 약물의 사용량을 줄일 수 있고, 기존 약물들이 가지는 문제점들을 경감시킬 수 있지만, 이제 한정되지는 않는다.

[0057] 또한, 본 출원의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0058] 본 출원에 따른 치매 증상의 예방 및 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 치매 증상의 예방 및 치료용 조성물은 치매 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 화합물들과 병행하여 투여할 수 있다.

[0059] 다른 측면에 따르면, 본 출원은 노각나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0060] 본 출원의 치매 예방 또는 개선용 식품 조성물은 노각나무 추출물 또는 이의 분획물을 포함할 수 있다.

[0061] 본 출원에서 용어, "개선"은 노각나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 예방또는 치료되는 치매의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0062] 따라서 본 출원의 치매 예방 및 치료용 조성물은 치매 증상의 예방 및 개선을 목적으로 하는 식품에 첨가할 수 있으므로, 상기 본 발명의 조성물을 치매 증상의 예방 및 개선을 위한 식품용 조성물로 사용할 수 있다.

[0063] 그러므로 본 출원의 치매 예방 및 개선을 위한 식품용 조성물은 치매 증상의 예방 및 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.

[0064] 본 출원의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 인지기능 장애, 신경 염증의 예방 또는 개선 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.

[0065] 본 출원에서 상기 “식품”이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[0066] 본 출원에 따른 치매 증상의 예방 및 개선용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 출원에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 캔디류, 쵸코렛류, 껌류,

아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0067] 또한, 상기 “기능성 식품”이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0068] 본 출원에서 용어, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공을 포함한다)한 식품을 의미하며, '기능성'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 한편, 건강식품은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품은 건강 보조 목적의 식품을 의미하는데, 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다. 본원의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하다. 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고 휴대성이 뛰어날 수 있다.

[0069] 또한, 본 출원에서 상기 “음료” 란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 치매 증상의 예방 및 개선용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0070] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본 출원의 치매 증상의 예방 및 개선용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0071] 본 출원의 치매 증상의 예방 및 개선용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 본 출원의 하나의 실시예는, 노각나무 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0073] 상기 사료용 조성물은 사료 첨가제를 포함할 수 있다. 본 출원의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다.

[0074] 본 출원에서 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.

[0075] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박 류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0076] 본 출원의 하나의 실시예는, 노각나무 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 치매의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0077] 본 출원의 용어 "개체"란 인지기능 장애 또는 신경 염증이 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 쥐, 가축, 인간 등의 모든 동물을 의미한다. 또한 본 발명에서 개체는 제외될 수 있다

[0079] 이하, 실시예, 비교예, 실험예들을 통해서 본 출원을 더욱 구체적으로 설명하기로 한다. 하기 예들은 본 출원의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 출원의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0081] **<제조예 1> 추출물의 제조**

[0082] 노각나무 잎 및 줄기를 음지에서 건조한 다음 각각 마쇄하여 분말화하였다. 추출물을 제조하기 위해 각 분말을 제조하였으며 잎+줄기 분말을 100% 사용하였다.

[0083] 증류수를 이용하여 분말과 1:20 비율로 혼합한 후 이를 100℃에서 6시간 동안 추출하여 실시예 1의 열수 추출물을 제조하였다.

[0084] 95% 에탄올을 이용하여 분말과 1:20 비율로 혼합한 후 이를 65℃에서 6시간 동안 환류 추출하여 실시예 2의 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0085] 95% 에탄올을 이용하여 분말과 1:20 비율로 혼합한 후 이를 40℃에서 30분 동안 초음파기기(POWERSONIC 610, HWASHIN TECH, Daegu, Republic of Korea)를 이용하여 추출하여 실시예 3의 초음파 추출물을 제조하였다.

[0086] 열수 추출물에 유산균(Lactobacillus plantarum) 배양하여 균주배양액 1% 접종한 후 37℃에서 48시간 동안 발효하여 실시예 4의 유산균 추출물을 제조하였다.

[0087] 구기자를 건조하고 분말화하고, 95% 에탄올을 용매로 하여 구기자 분말과 1:20 비율로 혼합한 후 65℃에서 6시간 동안 환류추출하여 비교예 1의 추출물을 제조하였다.

[0088] 상기 실시예 1 내지 4와 비교예 1의 추출물 중 에탄올 추출물과 초음파 추출물은 3㎛로 여과한 후 감압농축하였고 열수 추출물과 유산균 발효물은 3㎛로 여과한 후 모든 추출물을 동결건조하여 분말화하였다.

[0090] **<실험예 1> 항산화 활성**

[0091] **1. 추출물의 ABTS 라디칼 소거능 측정**

[0092] ABTS radical 소거 활성은 Reet al. (1999)의 방법을 변형하여 측정하였다.

[0093] 즉, 7mM ABTS 5mL와 140mM potassium persulfate 88㎕를 섞은 후 상온에서 16 시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰다. 이후 상기 용액을 414nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 PBS로 희석하였다. 조제된 희석용액과 시료를 혼합한 후 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0094] 용매별로 제조된 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성도를 알아보기 위해 수학식 1에 따라 용매만을 첨가한 대조군에 대한 추출물의 백분율로 계산하여 도 1(a)에 나타내었다.

[0095] [수학식 1]

$$ABTS\text{라디칼 소거능}(\%) = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료의 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

[0096]

[0097] 노각나무 에탄올 추출물과 초음파 추출물의 ABTS 라디칼 소거능이 70% 이상으로 가장 높았으며 그 중 노각나무 초음파 추출물이 80.0%로 가장 높은 소거능을 나타냈다. 비교예인 구기자 추출물은 12.6% ABTS 라디칼 소거능을 나타냈다.

[0099] **2. 추출물의 DPPH 라디칼 소거능 측정**

[0100] DPPH assay를 Yoshida et al. (1989)이 사용한 방법에 따라 측정하였다.

[0101] 96well plate에 control에는 용매를 넣고, 시험군에는 시료를 각각 넣었다. 모든 well에 50㎕의 DPPH (0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)/ethanol) 용액을 가하여 혼합한다. 25℃의 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0102] 용매별로 제조된 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성도를 알아보기 위해 수학식 1에 따라 용매만을 첨가한 대조군에 대한 추출물의 백분율로 계산하여 도 1(b)에 나타내었다.

[0103] [수학식 2]

[0104] $$DPPH\text{라디칼 소거능}(\%) = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료의 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

[0105] DPPH 라디칼 소거활성은 추출방법에 따라 그 활성이 크게 차이는 없었다. 농도가 10 (mg/ml) 일 때 열수 추출물은 100%, 에탄올 추출물은 92.2%, 초음파 추출물은 90.1%, 유산균 발효물은 96.6%, 비교예인 구기자 추출물은 57.1% DPPH 라디칼 소거능을 나타냈다.

[0107] **<실험예 2> 추출물의 신경세포에서의 ROS 생성 저해능**

[0108] **1. human neuroblastoma SH-SY5Y 세포(VA 20108) 배양**

[0109] 신경세포 (human neuroblastoma SH-SY5Y)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 배지는 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, CA, USA) medium, 25mM HEPES와 25mM $NaHCO_3$을 함유한 Minimum essential medium (SH30024.01, Cytiva, USA)을 이용하였다. 세포는 습도 95%, 5% CO_2, 37℃로 조절된 배양기에서 배양하였으며, 이때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 배지용 항생제(Penicillin streptomycin, Gibco, CA, USA)를 사용하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA(PBS-EDTA, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)로 세척한 후 0.05% Trypsin-EDTA(Gibco, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)를 1 ml 처리하여 dish 바닥에 부착되어 있는 세포를 떼어내 계대배양하였다. 배지는 48~72 시간마다 교환하여 세포를 배양하였다.

[0111] **2. human neuroblastoma SH-SY5Y 세포(VA 20108) 독성**

[0112] 세포주를 96 well plate에 5×10^3 cells/well 농도로 분주 후 안정화를 위하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃에서 24시간 배양하였다. 배지제거 후 새로운 배지로 희석한 시료를 100 ㎕씩 처리하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 24시간 세포에 시료를 반응하였다.

[0113] 세포주의 생존율 측정은 MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA)시약을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 즉, 시약 1 ml에 배지(DMEM high glucose, free FBS) 9 ml을 넣어 희석한 후 well 당 100 ㎕씩 처리하였다. 37℃에서 60 분간 반응 후 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하여 도 2에 나타내었다.

[0114] ROS 생성 저해 활성 및 세포 보호효과 측정 농도는 1 - 100 ㎍/ml로 하여 세포에 처리한 결과 노각나무 추출물과 구기자 추출물은 고농도에서도 신경세포에 대한 독성은 없었다.,

[0116] **3. 신경세포에서의 ROS 생성 저해능**

[0117] Reactive Oxygen Species (ROS)의 생성은 DCF-DA를 이용한 형광물질 발생의 강도를 가지고 측정하며, Reduced 또는 Acetylated 된 형태의 2',7'-Dichlorofluorescin(DCF)은 세포 내에 있는 Esterase와 세포 내에 생성되는 ROS들의 산화작용에 의해 아세테이트 그룹이 제거되면 형광물질(FITC)을 방출하는 원리를 이용한다.

[0118] SH-SY5Y 세포를 5×10^4 cells/well의 농도로 96 well plate에 100㎕씩 분주한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 혈청이 포함되지 않은 배지를 이용하여 시료를 알맞은 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 PBS 100㎕를 넣은 후 세척하였고 이 과정을 3회 반복하여 수행하였다. DMSO에 녹아있는 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA)를 20 ㎛M (in PBS)로 희석하여 100㎕ 넣은 후 20분 배양하였다. H_2O_2 100 ㎛M (in PBS) 100㎕ 넣은 후 30분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 486nm, 535nm에서 형광의 세기를 측정하여 추출물의 ROS 생성 저해능을 도 3에 나타내었다.

[0119] 모든 시료를 1 - 100 ㎍/ml의 농도에서 측정하였고, 100 ㎍/ml 농도에서 열수 추출물은 13%, 에탄올 추출물은 70%, 초음파 추출물은 79%, 유산균 발효물은 38%의 ROS 생성 저해능을 확인하였고, 비교예인 구기자 추출물은 0%로 나타나 ROS 생성 저해능이 없었다.

[0121] **<실험예 3> 추출물의 Acetylcholinesterase 저해 활성 측정**

[0122] 노각나무 추출물의 Acetylcholinesterase 저해 활성은 abcam사의 Acetylcholinesterase Assay Kit (Colorimetric)을 사용하여 방법을 일부 변형시켜 다음과 같이 측정하였다. 96 well plate에 혼합물 (assay buffer 4.5mL+20X DTNB stock solution 250㎕L+20X Acetylcholine stock solution 250㎕L = 5mL) 50㎕L, Acetylcholinesterase (0.5 unit/mL) 50㎕L, 시료 5 ㎕L를 첨가하여 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정한다. 용매만을 첨가한 대조군에 대한 추출물의 효소 저해활성을 하기 수학식 3에 따른 백분율로 나타내어 도 4에 나타내었다.

[0123] [수학식 3]

[0124]
$$Acetylcholinesterase\ 저해\ 활성\ (\%) = \left(1 - \frac{시료의\ 흡광도 - 대조구\ 흡광도}{효소 - 기질의\ 흡광도 - 대조구\ 흡광도}\right) \times 100$$

[0125] 모든 시료를 10 ~ 20 mg/ml의 농도에서 측정하였고, 20mg/ml의 농도에서 열수 추출물은 5%, 에탄올 추출물은 23.2%, 초음파 추출물은 20.8%, 유산균 발효물은 18.1%Acetylcholinesterase 저해 활성을 나타내었고, 구기자 추출물은 0%이어서 Acetylcholinesterase 저해 활성이 나타나지 않았다.

[0127] **<실험예 4> 추출물의 β-Secretase 저해 활성**

[0128] 노각나무 추출물의 β-Secretase 저해 활성은 abcam사의 Beta-Secretase (BACE1) Activity Assay Kit (Fluorometric)을 사용하여 방법을 일부 변형시켜 다음과 같이 측정하였다. 96 well plate에 노각 추출물 5 ㎕L, BACE1 Substrate 2 ㎕L, Assay buffer 83 ㎕L, 10 ㎕M EDANS Standard 10 ㎕L를 첨가하여 25℃에서 30분 동안 반응시킨 후 Multilabel plate Reader (PerkinElmer 2030 multilabel reader, PerkinElmer, USA)를 이용하여 excitation 355 nm, emitted 460 nm에서 형광강도를 측정하였다. 용매만을 첨가한 대조군에 대한 추출물의 효소 저해활성을 하기 수학식 4에 따른 백분율로 나타내어 도 5에 표시하였다.

[0129] [수학식 4]

[0130]
$$\beta - Secretase\ 저해\ 활성\ (\%) = \left(1 - \frac{시료의\ 흡광도 - 대조구\ 흡광도}{효소 - 기질의\ 흡광도 - 대조구\ 흡광도}\right) \times 100$$

[0131] 모든 시료를 0.1 ~ 100 mg/ml의 농도에서 측정하였고, 100mg/ml의 농도에서 열수 추출물은 77.5%, 에탄올 추출물은 87.4%, 초음파 추출물은 87.9%, 유산균 발효물은 76.9%, 구기자 추출물은 100%의 β-Secretase 저해 활성이 나타났다.

[0133] **<실험예 5> 추출물의 H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포 보호 효과 측정**

[0134] **1. H_2O_2 에 대한 세포 사멸 농도 측정**

[0135] H_2O_2에 의한 신경세포 사멸 농도를 측정하기 위해 Hydrogen peroxide 30% (DAEJUNG, 4104-4405)를 구입하여 사용하였다.

[0136] 먼저 세포주를 96 well plate에 5×10^3 cells/well 농도로 분주 후 안정화를 위하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃에서 24 시간 배양하였다. 배지제거 후 새로운 배지로 희석한 H_2O_2를 농도별로 10 ㎕씩 처리하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃에서 24 시간 동안 반응시켰다.

[0137] 세포주의 생존율 측정은 MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA)시약을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 즉, 시약을 well 당 10 ㎕씩 처리하여 37℃에서 60 분간 반응 후 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 490 nm에서 흡광도를

측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하여 도 6에 나타내었다.

[0138] 사멸 농도를 측정하기 위해 H_2O_2를 10 - 100 μM 농도로 처리하였고, 50 μM 농도에서 세포생존율이 약 50%로 확인되었다.

[0140] **2. H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포 보호효과**

[0141] 세포주를 96 well plate에 5×10^3 cells/well 농도로 분주 후 안정화를 위하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃에서 24 시간 배양하였다. 배지제거 후 새로운 배지로 세포생존율이 약 50%인 50 μM H_2O_2를 처리한 후 시료를 농도별로 10 ㎕씩 처리하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃에서 24 시간 동안 반응시켰다.

[0142] 세포주의 생존율 측정은 MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA)시약을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 즉, 시약을 well 당 10 ㎕씩 처리하여 37℃에서 60 분간 반응 후 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하여 도 7에 나타내었다.

[0143] 10 μg/ml 농도 이상부터 세포 보호효과가 나타났으며 100 μg/ml 농도에서 열수 추출물은 83.3%, 에탄올 추출물은 154.1%, 초음파 추출물은 121.3%, 유산균 발효물은 70.9%, 구기자 추출물은 71.5%의 세포생존율로 세포보호 효능을 확인할 수 있었다.

[0145] **<실험예 6> 추출물의 Amyloid β-peptide 25-35 세포독성에 대한 신경세포 보호 효과 측정**

[0146] **1. Amyloid β-peptide 25-35에 대한 세포 사멸 농도 측정**

[0147] Amyloid β-peptide 25-35(Aβ)에 의한 신경세포 사멸 농도를 측정하기 위해 Amyloid β-Protein Fragment 25-35 (Sigma-Aldrich, A4559-1MG)를 구입하여 사용하였다.

[0148] Aβ의 aggregation을 위해 증류수로 용해한 후 37℃에서 5일간 150rpm에서 반응시켰다.

[0149] 먼저 세포주를 96 well plate에 5×10^3 cells/well 농도로 분주 후 안정화를 위하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃에서 24 시간 배양하였다. 배지제거 후 새로운 배지로 희석한 Aβ를 농도별로 10 ㎕씩 처리하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃에서 24 시간 동안 반응시켰다.

[0150] 세포주의 생존율 측정은 MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA)시약을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 즉, MTS시약을 well 당 10 ㎕씩 처리하여 37℃에서 60 분간 반응 후 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하여 도 8에 나타내었다.

[0151] Aβ를 1 - 20 μM 농도로 처리하였으며 20 μM 농도에서 세포생존율이 약 50%로 확인되었다.

[0153] **2. Amyloid β-peptide 25-35 세포독성에 대한 신경세포 보호효과**

[0154] 세포주를 96 well plate에 5×10^3 cells/well 농도로 분주 후 안정화를 위하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃에서 24 시간 배양하였다. 배지 제거 후 새로운 배지로 세포생존율이 약 50%인 20 μM Aβ를 처리한 후 시료를 농도별로 10㎕씩 처리하여 습도 95%, 5% CO_2, 37℃에서 24시간 동안 반응시켰다.

[0155] 세포주의 생존율 측정은 MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA) 시약을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 즉, MTS시약을 well당 10㎕씩 처리하여 37℃에서 60분간 반응 후 microplate reader (Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하여 도 9에 나타내었다.

[0156] 100 μg/ml 농도에서 에탄올 추출물은 114.2%, 초음파 추출물은 84.2%, 유산균 발효물은 81.3%, 구기자 추출물

은 93.9%의 세포 생존율을 확인하였다.

[0158] **<실험예 7> 노각나무 추출물 내의 지표물질 Ursolic acid 함량 분석**

[0159] 노각나무 추출물 중 실시예 2의 에탄올 추출물과 실시예 3의 초음파 추출물에서 Ursolic acid 함량은 0.31% 과 0.37%로 높은 함량을 확인할 수 있었다. 비교예 1의 구기자 추출물은 0.25%의 Ursolic acid 함량을 확인할 수 있었다. 시료의 Ursolic acid 함량을 도 10에 나타내었다.

[0161] **<실험예 8> Ursolic acid의 신경세포에서의 ROS 생성 저해능**

[0162] **1. human neuroblastoma SH-SY5Y 세포(VA 20108) 독성**

[0163] 신경세포에 대한 Ursolic acid의 세포독성은 측정한 결과, 10 μg/ml 이상의 농도에서부터 독성이 나타나서, ROS 생성 저해능 및 신경세포 보호효능의 측정 농도를 1 - 5 μg/ml로 설정하였다. Ursolic acid의 신경세포 독성 측정 결과를 도 11에 나타내었다.

[0165] **2. 신경세포에서의 ROS 생성 저해능**

[0166] 신경세포(SH-SY5Y)를 이용하여 ROS 생성 저해능을 측정한 결과, 0.1 - 5 μg/ml 농도의 Ursolic acid에서 유의적으로 저해 활성이 나타났다. Ursolic acid의 ROS 생성 저해능을 도 12에 나타내었다.

[0168] **<실험예 9> Ursolic acid의 H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포 보호 효과 측정**

[0169] **1. H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포 보호효과**

[0170] 50mM H_2O_2 처리에 의한 신경세포 보호효과를 실험한 결과. Ursolic acid 처리시 세포의 증식이 H_2O_2 미처리군과 비슷한 수준으로 세포 증식이 되어 높은 세포 보호 효능을 확인할 수 있었다. Ursolic acid의 H_2O_2 세포독성에 대한 신경세포 보호효과를 도 13에 나타내었다.

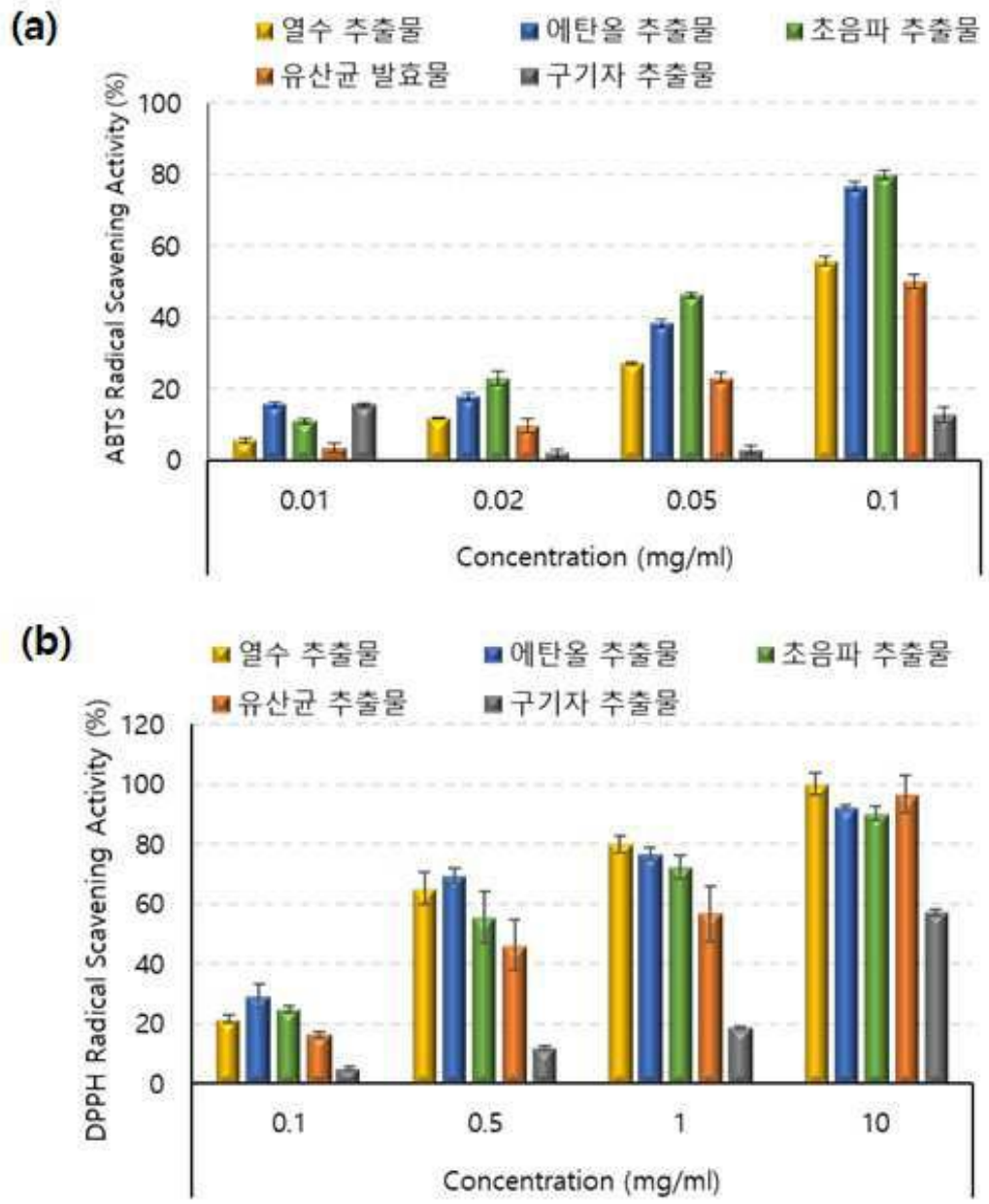
[0172] **<실험예 10> Ursolic acid의 Amyloid β-peptide 25-35 세포독성에 대한 신경세포 보호효과 측정**

[0173] 20mM Aβ 처리에 의한 신경세포 사멸 보호효과 실험 결과, Ursolic acid는 유의적인 효과가 있었다. Ursolic acid의 Aβ 세포독성에 대한 신경세포 보호효과를 도 14에 나타내었다.

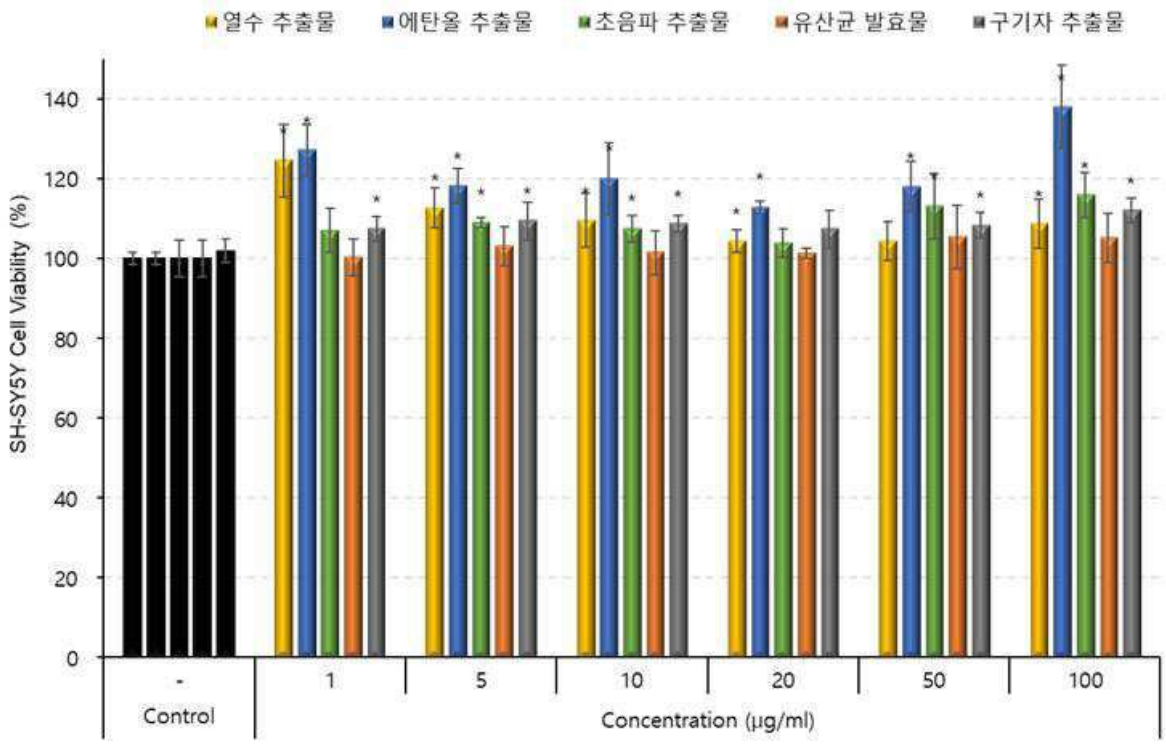
[0175] 이상으로 본 출원의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 출원의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 출원의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

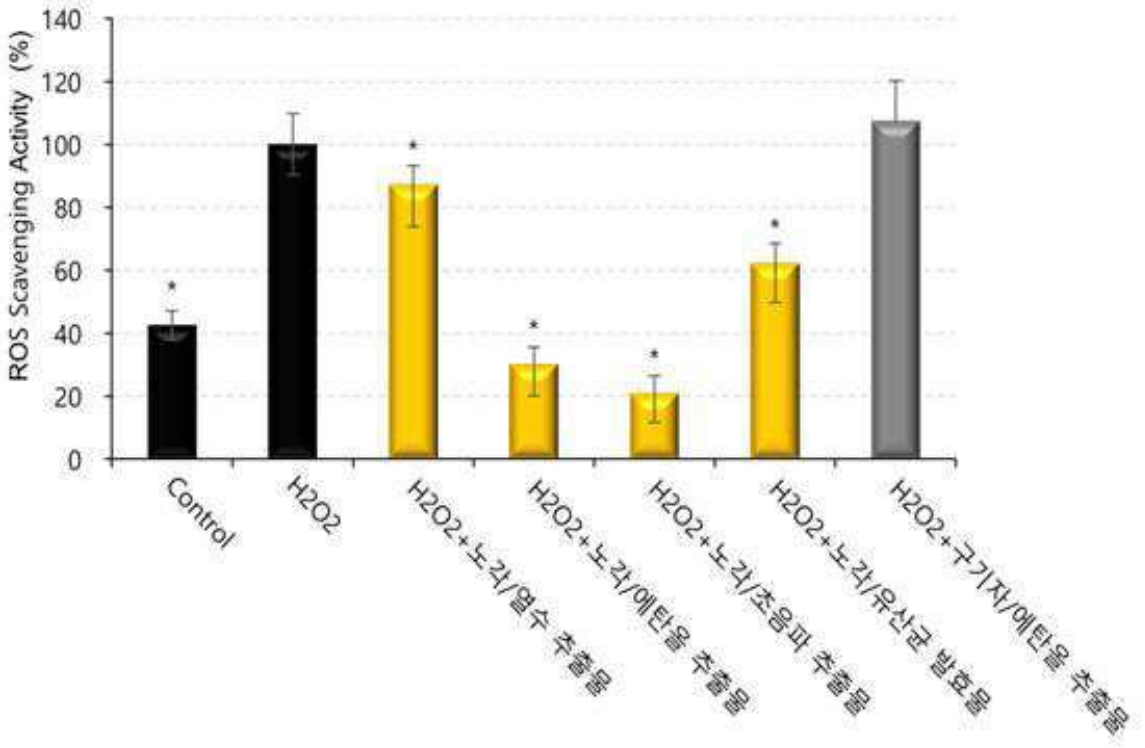
도면1


(a)
열수 추출물
에탄올 추출물
초음파 추출물
유산균 발효물
구기자 추출물
ABTS Radical Scavening Activity (%)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.02
0.05
0.1
Concentration (mg/ml)
(b)
열수 추출물
에탄올 추출물
초음파 추출물
유산균 추출물
구기자 추출물
DPPH Radical Scavening Activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
0.1
0.5
1
10
Concentration (mg/ml)

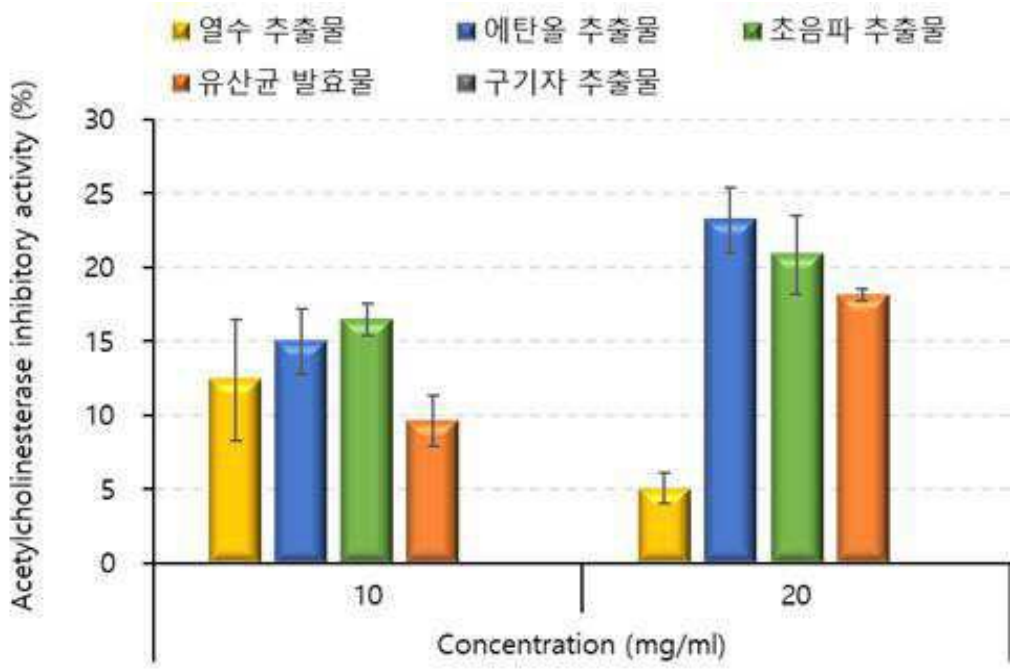
도면2


열수 추출물
에탄올 추출물
초음파 추출물
유산균 발효물
구기자 추출물
SH-SY5Y Cell Viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
-
Control
1
5
10
20
50
100
Concentration (μg/ml)

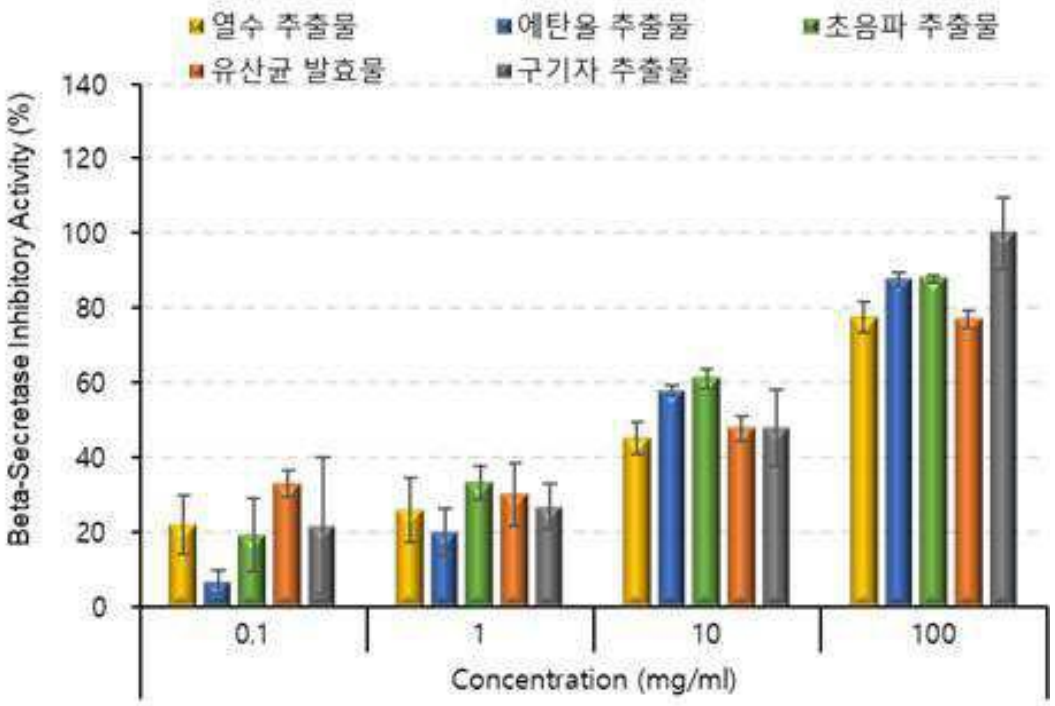
도면3


ROS Scavenging Activity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
H2O2
H2O2+노라/열수 추출물
H2O2+노라/에탄올 추출물
H2O2+노라/초음파 추출물
H2O2+노라/유산균 발효물
H2O2+구기자/에탄올 추출물

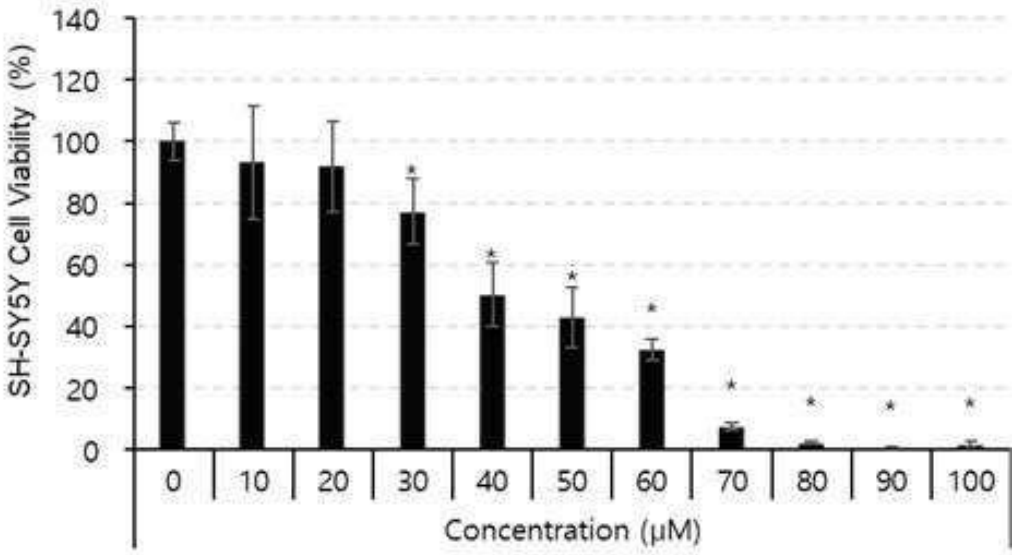
도면4


열수 추출물
에탄올 추출물
초음파 추출물
유산균 발효물
구기자 추출물
Acetylcholinesterase inhibitory activity (%)
30
25
20
15
10
5
0
10
20
Concentration (mg/ml)

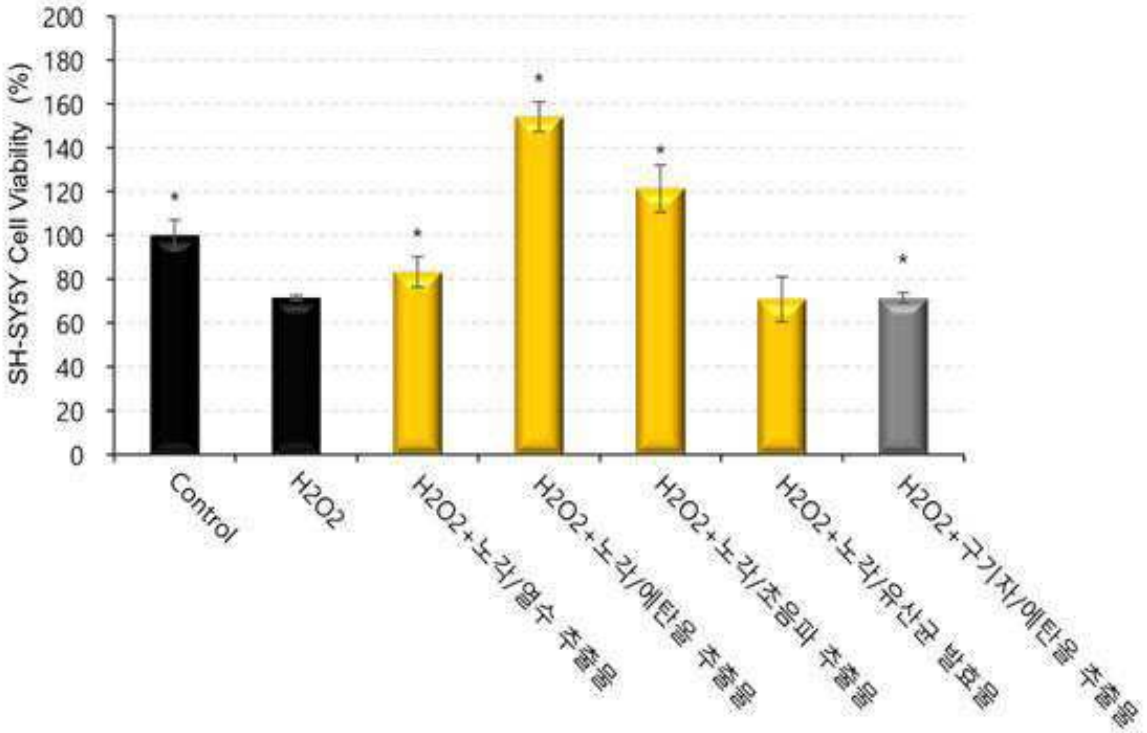
도면5


열수 추출물
에탄올 추출물
초음파 추출물
유산균 발효물
구기자 추출물
Beta-Secretase Inhibitory Activity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
Concentration (mg/ml)

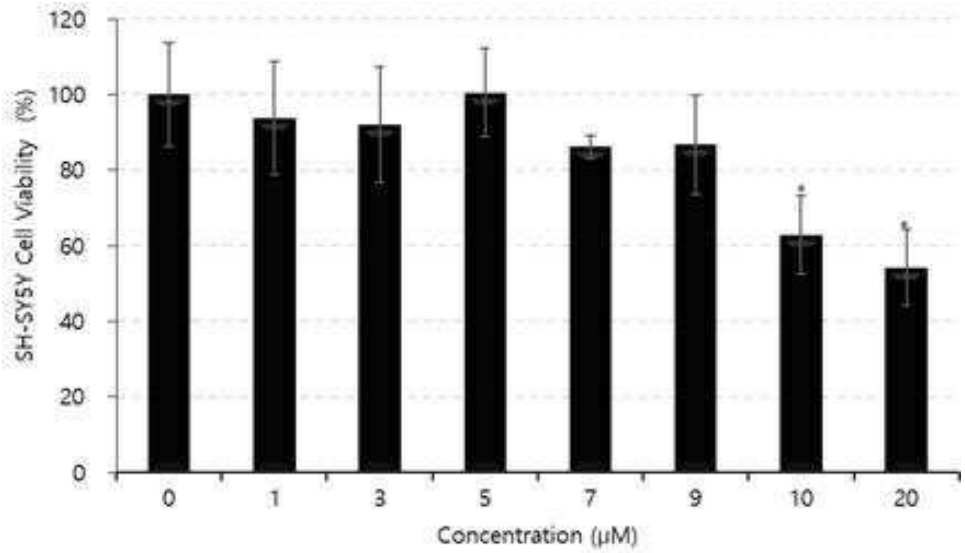
도면6


SH-SY5Y Cell Viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Concentration (μM)

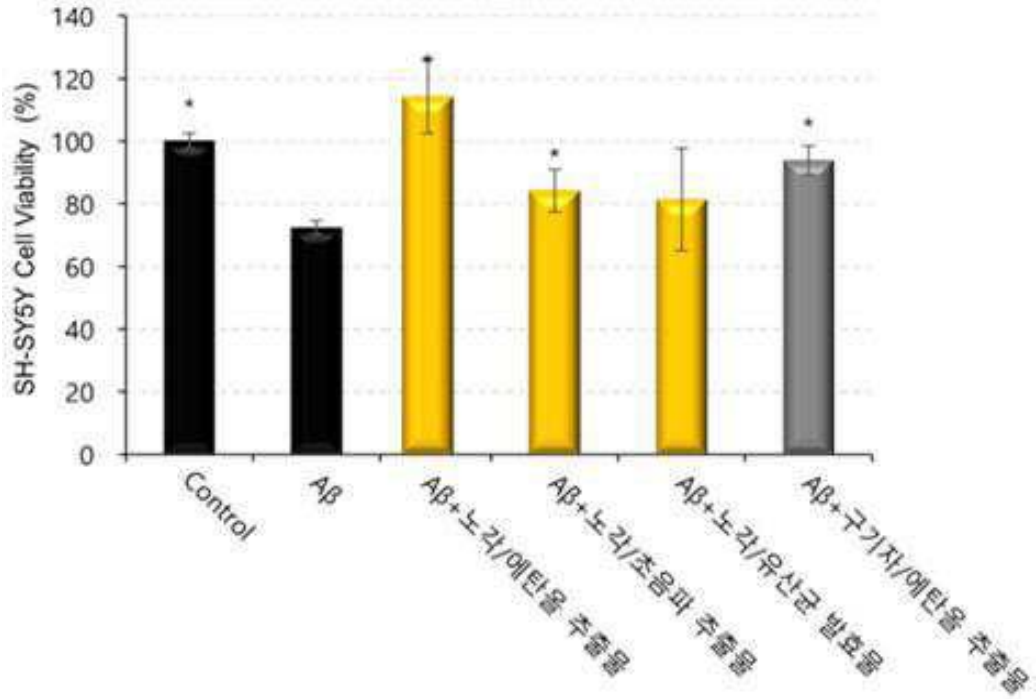
도면7


SH-SY5Y Cell Viability (%)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
H2O2
H2O2+노각/열수 추출물
H2O2+노각/에탄올 추출물
H2O2+노각/초음파 추출물
H2O2+노각/유산균 발효물
H2O2+구기자/에탄올 추출물

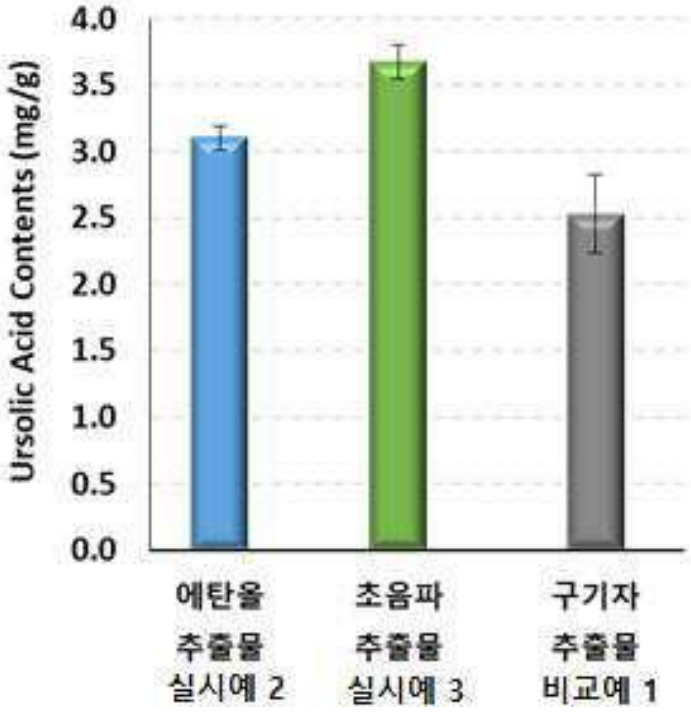
도면8


SH-SY5Y Cell Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1
3
5
7
9
10
20
Concentration (μM)

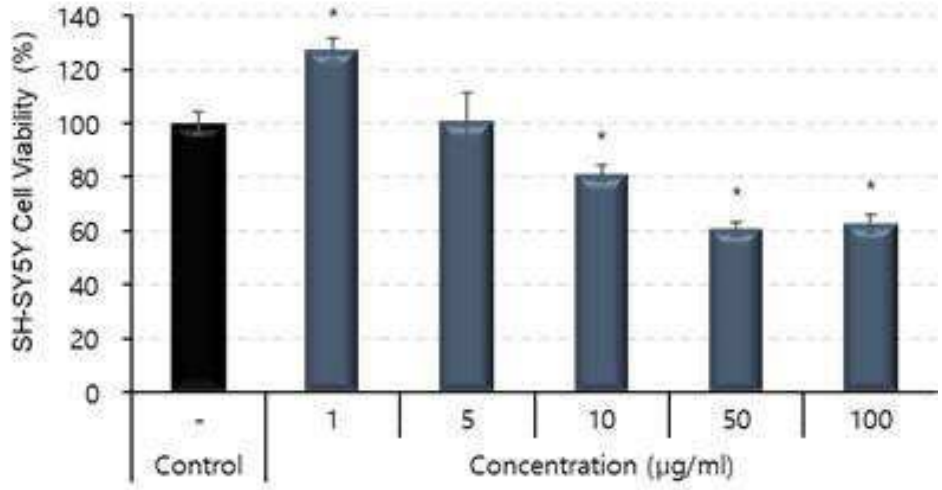
도면9


SH-SY5Y Cell Viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
Aβ
Aβ+노각/에탄올 추출물
Aβ+노각/초음파 추출물
Aβ+노각/유산균 발효물
Aβ+구기자/에탄올 추출물

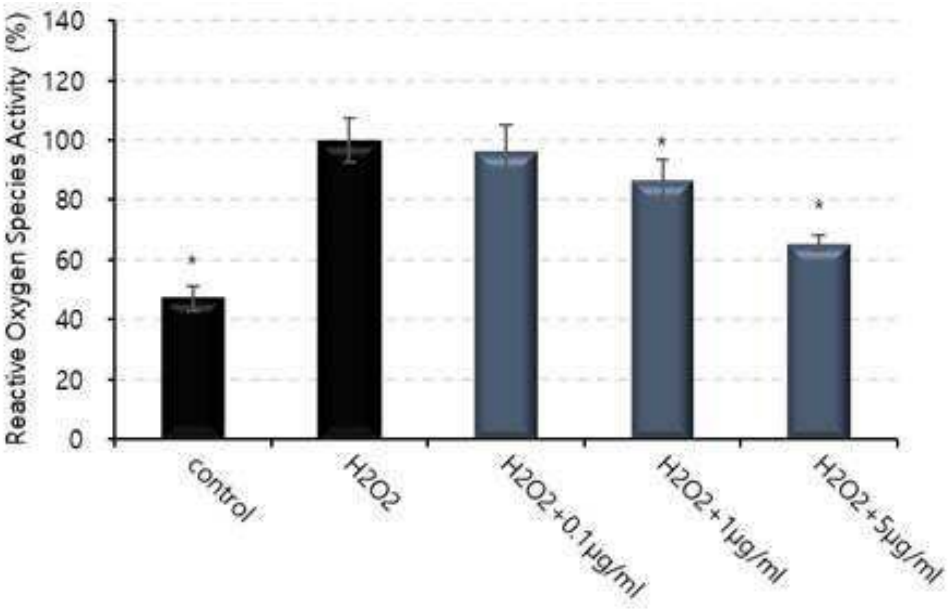
도면10


Ursolic Acid Contents (mg/g)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
에탄올 추출물 실시예 2
초음파 추출물 실시예 3
구기자 추출물 비교예 1

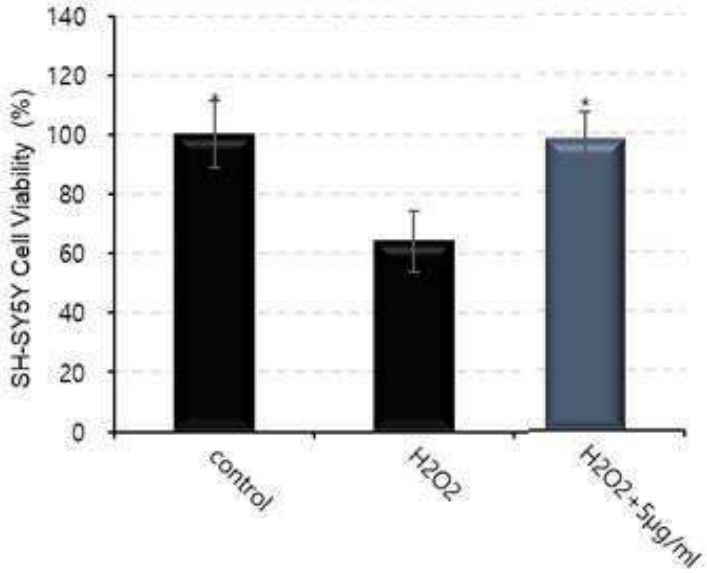
도면11


SH-SY5Y Cell Viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
-
Control
1
5
10
50
100
Concentration (μg/ml)

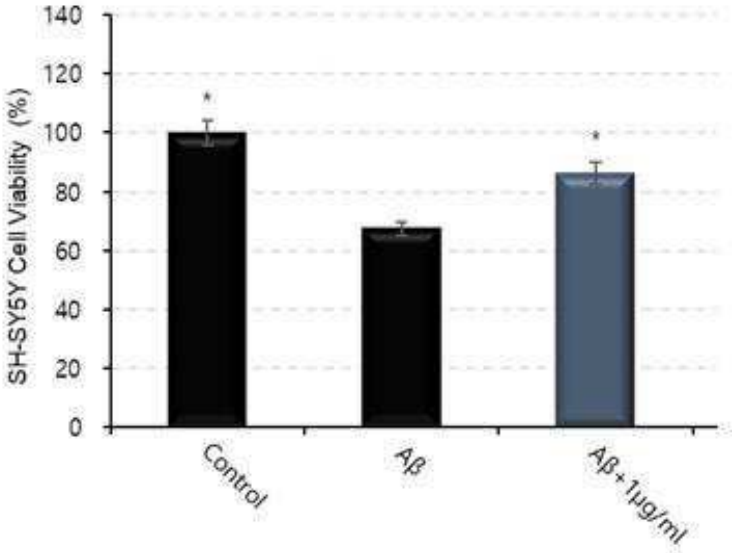
도면12


Reactive Oxygen Species Activity (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
control
H2O2
H2O2+0.1μg/ml
H2O2+1μg/ml
H2O2+5μg/ml

도면13


SH-SY5Y Cell Viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
control
H2O2
H2O2+5μg/ml

도면14


SH-SY5Y Cell Viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
Aβ
Aβ+1μg/ml