(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0108267
(43) 공개일자 2018년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/286 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/286 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0037805
(22) 출원일자 2017년03월24일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
조성훈
서울특별시 송파구 도곡로62길 11-14 (잠실동)
(74) 대리인
안소영

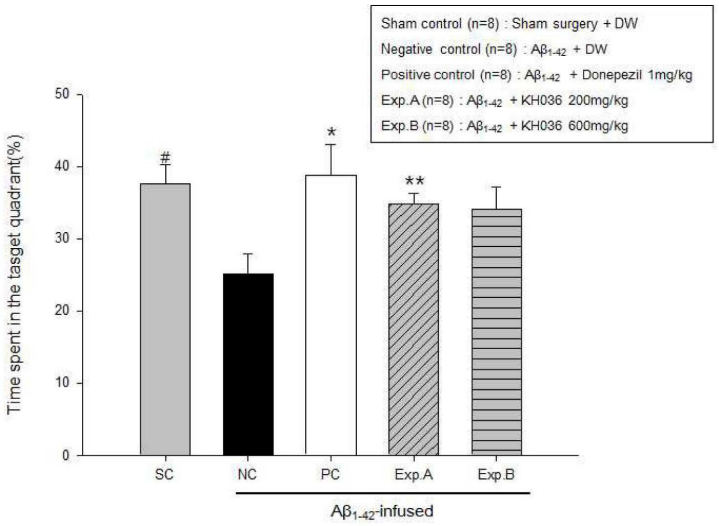
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **홍화자 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 홍화자 (*Carthamus tinctorius L_safflower* seed) 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것으로, 상기 홍화자 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 아밀로이드 베타 축적에 의해 유발되는 신경세포의 손상을 효과적으로 예방하고, 이에 의한 신경세포사를 억제할 수 있어 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있으며, 신경퇴행성 질환 환자에게서 나타나는 단기기억형태의 순간 공간 인지력을 증가시킴으로써 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A1063477
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구지원사업
연구과제명 신약개발을 위한 별아교세포의 우울증 기전탐색연구
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

홍화자(*Carthamus tinctorius L_safflower seed*) 추출물을 유효성분으로 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 홍화자 추출물은 물 또는 알코올을 추출용매로 하여 추출된, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 홍화자 추출물은 20 내지 70 % 에탄올 추출물인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's Disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전두측두엽 치매(Frontotemporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration) 및 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

홍화자(*Carthamus tinctorius L_safflower seed*) 추출물을 포함하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 홍화자 추출물은 물 또는 알코올을 추출용매로 하여 추출된, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 홍화자 추출물은 20 내지 70 % 에탄올 추출물인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병(Parkinson's Disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭

병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전두측두엽 치매(Frontotemporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration) 및 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병인, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 홍화자 (*Carthamus tinctorius L_safflower* seed) 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신경퇴행성 질환(neurodegenerative diseases)은 신경세포가 퇴화하고, 기능을 잃고, 그리고 종종 사멸하는 경우의 증상들과 관련된다. 신경퇴행성 질환을 가진 환자들은 인지(cognitive) 또는 운동(motor) 능력에 있어서 극심한 퇴화를 겪을 수 있고, 이들 질환은 주로 진행성이기 때문에 결과적으로 그들의 삶의 질 및 삶에 대한 기대는 현저히 감소될 수 있다.

[0003] 이들 질환은 파킨슨병(Parkinson's Disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전두측두엽 치매(Frontotemporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP) 및 다른 질병들을 포함한다.

[0004] 다양한 신경퇴행성 질환 중에서도 치매(dementia)는 가장 광범위한 세포 손상을 유발하는 질환으로 퇴행성 정신장애를 동반하며, 특히 기억력 장애, 판단력 상실 등의 주요증상이 잘 알려져 있다. 치매는 뇌혈관의 협착이나 폐색으로 생기는 혈관성 치매와 베타아밀로이드 단백질이 뇌 내에 축적되어 발병하는 것으로 알려진 알츠하이머성 치매, 그리고 이들 두 가지 원인이 복합적으로 작용하여 생기는 혼합형 치매로 크게 나눌 수 있다.

[0005] 치매 환자 중 가장 많은 비율을 차지하는 유형은 알츠하이머성 치매이며, 최근 연구에 따르면 2050년에는 85명 중 1명의 비율로 이 질환을 가질 것이고, 이중 43 %는 특별한 관리를 받아야한다는 보고가 있다. (Prabhulkar S, Piatyszek R, et al. J Neurochem., 2012, 122, 374-381)

[0006] 신경퇴행성 질환 중 알츠하이머병은 크게 유전성 알츠하이머병 (familiar Alzheimer's disease)과 산발성 알츠하이머병 (sporadic Alzheimer's disease, SAD)으로 분류된다. 유전성 알츠하이머병은 전체 알츠하이머 병 환자의 5~10 % 정도를 차지하며, 원인 유전인자로 알려진 프레세닐린 1 (presenilin 1; PS1), 아밀로이드 전구단백질 (amyloid precursor protein; APP) 및 프레세닐린 2 (presenilin2; PS2)에 돌연변이가 일어났을 경우, 100 % 알츠하이머병으로 발병하게 된다. 산발성 알츠하이머병은 알츠하이머병 환자의 대부분을 차지하며, 아포지단백질E (apolipoprotein E; ApoE) 또는 알파-2 마크로글로불린 (α-2 macroglobulin; A2M)에 돌연변이가 일어났을 때 알츠하이머병으로 진전할 확률이 높아지는 위험인자로 밝혀져 있으나, 현재까지 발병의 정확한 원인은 알려진 것이 없다.

[0007] 알츠하이머병의 병리학적 특징으로는 신경세포의 외부에 축적되어지는 노인반점 (senile plaques), 신경세포의 세포체 내에 엉켜진 실뭉치처럼 보이는 신경섬유 덩어리 (neurofibrilary tangles) 및 신경세포의 손실 (neuronal loss) 등을 들 수 있다. 이러한 병리학적 특징은 유전성 알츠하이머병 및 산발성 알츠하이머병 모두에 나타나며, 이 중 노인반점의 주요 구성 요소로는 응집된 아밀로이드 베타 펩티드 (amyloid β peptide; Aβ)라는 독성단백질이 밝혀져 있다. 아밀로이드 베타 펩티드는 아밀로이드 전구단백질의 비정상적인 절단으로부터 생성된 40 내지 42개의 아미노산으로 이루어진 불용성 펩티드이다. 또한, 아밀로이드 베타 펩티드의 과다 축적은 유전성 알츠하이머병 및 산발성 알츠하이머병 모두에 공통적 현상으로 나타난다고 보고되어 있다. 따라서 아밀로이드 베타 펩티드는 알츠하이머병의 주요 병원성 물질 (pathogenic material)로 간주되고 있다. 알츠하이머병의 전반적인 발병과정은 프레세닐린 1, 2 유전자 (PS 1, 2)의 돌연변이가 발생하면 베타-세크레타제(β-

secretase)에 의해 아밀로이드 전구단백질이 비정상적으로 절단되고 아밀로이드 베타 펩티드가 생성된다. 생성된 아밀로이드 베타 펩티드에 의해 뇌신경세포의 괴사가 일어나며, 이로 인해 알츠하이머병이 발병하게 된다고 알려져 있다.

[0008] 현재까지 치매의 원인과 병인론 그리고 그 치료법에 대한 광범위하고 다양한 연구가 진행되었지만, 원인규명이 미비하고 효과적인 치료법의 개발 또한 미진하다. 비록 FDA에서 알츠하이머 치매의 치료제로 tacrine, rivastigmine, galantamine, donepezil, memantine를 인가하였음에도, 현재 사용되는 치매 치료제는 대부분 퇴행성 치매의 증상을 완화시키는 정신퇴행 완화 물질에 불과하며, 이들 중 대부분은 소염작용을 주로 하는 약물로 간독성과 소화기관의 점막을 손상시키는 등 부작용이 상당하며, 궁극적인 원인치료라기 보다는 대증적인 요법에 국한되어 있다는 한계가 있다.

[0009] 현재까지 연구된 약물들은 글루타민산 수용체 길항제, 항산화제, 칼슘 혹은 나트륨, 등의 이온채널 차단제 등을 이용한 것이 대부분이며, 효과적인 약물이 개발되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 획기적인 아이디어 전환과 새로운 신개념의 치료제 타겟 발굴이 요구되고 있는 실정이다.

[0010] 식물을 이용한 새로운 특용 작물 발굴 노력에 힘입어 그 생산량은 해마다 증가하고 있으나, 현재로써는 착유 공정 등 단순 가공처리만을 거쳐 일반 첨가 소재로 사용되고 있거나, 일부 한방 의약품에 추출물 형태로 첨가되고 있어 그 활용도가 낮은 실정이다. 그러나 식물에는 알츠하이머 치매 예방 활성이 있을 것이라고 기대되는 활성 물질의 존재 가능성이 높고, 이를 건강기능식품 소재로 개발할 경우 식물의 부가가치가 증가될 것으로 사료된다. 따라서 국내산 식물로부터 알츠하이머 치매를 예방할 수 있는 식품선도소재를 탐색하고 동물실험에서 효과를 검증한 다음 기능성 식품으로 응용할 수 있는 기술을 개발함으로써 향후 효과에 대해 health-claim이 가능한 건강기능성식품 개발에 이르는 체계적인 연구의 수행이 필요하다.

[0011] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 퇴행성 신경질환에 효과가 있는 천연 추출물에 관한 연구개발을 수행하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 홍화자 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 목적은 홍화자 추출물을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 홍화자 (*Carthamus tinctorius L_safflower* seed) 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명에서 사용된 용어 '홍화자 (*Carthamus tinctorius L_safflower* seed)'는 쌍떡잎식물 초롱꽃목 국화과의 두해살이풀인 홍화의 씨를 말하며, 이명으로 홍람화자, 백평자라고도 하며, 라틴명으로 '*Carthami Semen*' 이라고 불린다.

[0017] 본 발명에서 사용된 용어 '홍화자 추출물'은 홍화자로부터 수득한 추출물을 의미하며, 바람직하게는 홍화자를 물 또는 유기용매로 추출하여 수득한 추출물을 의미하고, 구체적으로는 홍화자를 물, C_1 내지 C_5의 저급 알킬알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 수득한 추출물을 의미한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따른 홍화자 추출물은 바람직하게는 10 내지 80 %의 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올 수용액, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 % 에탄올로 추출한 추출물일 수 있다.

[0019] 본 발명의 홍화자 추출물은 상술한 추출 용매에 의한 추출물뿐만 아니라 통상적인 정제과정을 거친 추출물도 제한 없이 포함될 수 있다.

[0020] 본 발명자들은 홍화자 추출물을 알츠하이머를 유발한 동물모델에 투여한 경우, 학습 및 기억력 감소를 완화시켜

신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료효과가 있음을 확인하였다 (도 2 및 도 3).

[0021] 본 발명에서 사용된 용어, "신경퇴행성 질환"이란 신경세포가 퇴화하고, 기능을 잃고, 그리고 사멸하는 경우 나타나는 증상들과 관련된 질환을 의미하며, 파킨슨병(Parkinson's Disease; PD), 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease; HD), 전두측두엽 치매(Frontotemporal Dementia), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico Basal Degeneration), 진행성 핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP)를 포함한다. 바람직하게 본 발명에 따른 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병이다.

[0022] 본 발명의 약학 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들어 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양, 즉 의학적 예방 또는 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다. 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명의 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 홍화자 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물의 투여량 또는 복용량은 환자의 나이, 신체적 조건, 몸무게 등에 의해 다양화될 수 있지만, 일반적으로 0.01 ~ 1,000 mg/kg(몸무게)/1일 범위 내에서 투여하는 것이 바람직하다. 그리고, 1일 유효 투입량 범위 내에서 하루에 한 번 또는 하루에 여러 번 나누어 투입할 수 있다.

[0027] 상기 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 홍화자 추출물을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0028] 본 발명에서 사용된 용어, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0029] 본 발명의 홍화자 추출물을 식품 첨가물로 사용하는 경우, 식품 또는 음료에 상기 추출물을 그대로 첨가하거나 또는 다른 식품 첨가물과 함께 조합하여 사용할 수 있다. 본 발명의 홍화자 추출물을 식품 또는 음료의 제조 시에 첨가할 경우, 이의 첨가량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종적인 식품의 중량에 대하여 1 내지 5 중량%, 바람직하게는 1 내지 3 중량%의 첨가량으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에 첨가량은 상기 범위 이하일 수 있으나, 안전성 면에서 문제가 없는 경우 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0030] 아울러, 상기 식품 또는 음료의 종류는 특별히 이에 제한되지 않으나, 통상적인 의미에서의 식품 또는 음료를 모두 포함하고, 바람직하게는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 포함한다.

[0031] 본 발명의 홍화자 추출물을 식품에 첨가할 경우에는, 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등의 보조성분과 함께 첨가될 수 있다.

[0032] 본 발명의 홍화자 추출물을 음료에 첨가할 경우에는, 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 포함할 수 있다. 이때, 상기 감미제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 타우마린, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있고, 상기 천연 탄수화물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 단당류(예를 들어, 포도당, 과당 등), 이당류(예를 들어, 말토오스, 수크로오스 등), 다당류(예를 들어, 덱스트린, 사이클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예를 들어, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등) 등을 사용할 수 있다.

[0033] 본 발명의 홍화자 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 알츠하이머 치매 모델로 만든 수컷 C57BL/6 Mice의 대뇌피질 및 선조체 영역의 신경세포사를 현저히 억제하는 우수한 신경세포 보호 효능을 가지고 있으며, Y자형 미로, 모리스 수중미로 행동검사에서 유의한 결과를 가진다. 또한, 홍화자 추출물을 투여한 동물에서 현저하게 행동력이 증가하는 효과를 확인하였다.

발명의 효과

[0034] 본 발명의 홍화자 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 아밀로이드 베타 축적에 의해 유발되는 신경세포의 손상을 효과적으로 예방하고, 이에 의한 신경세포사를 억제할 수 있어 알츠하이머병을 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있고, 상기의 조성물은 신경퇴행성 질환 환자에게서 나타나는 단기기억형태의 순간 공간 인지력을 증가시킴으로써 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 본원발명의 홍화자 추출물 투여에 따른 마우스의 일반 운동 활성검사를 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 알츠하이머 마우스 모델을 이용한 Y자 미로형 검사 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 알츠하이머 마우스 모델을 이용한 모리스 수중 미로 검사 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1. 홍화자 추출물의 제조**

[0038] **1.1. 추출용매로서 물을 이용한 홍화자의 열수추출물의 제조**

[0039] 홍화자를 건조시켜 실험에 사용하였다. 분쇄한 상태의 홍화자 100 g을 1 L의 증류수에 가하여 교반한 후, 90 내지 95 ℃를 유지하는 추출온도에서 3시간 동안 환류 추출한 후 여액을 분리하였다. 그 다음, 55 ~ 65 ℃로 생약추출물을 감압농축한 후, 동결 건조시켜 생약조성물 분말 엑스 21.2 g을 수득하였다.

[0040] **1.2. 추출용매로서 물-알콜 혼합용매를 이용한 홍화자의 열수추출물의 제조**

[0041] 분쇄한 홍화자 100 g에 1 L의 30 % 에탄올을 첨가하여 교반한 다음, 열을 가해 80 내지 90 ℃를 유지하는 추출온도에서 3시간 동안 환류 추출하였다. 그 다음, 추출 여액을 분리하고 55 ~ 65 ℃에서 생약추출물을 감압농축한 후, 동결 건조시켜 생약조성물 분말 엑스 19.5 g을 수득하였다.

[0042] **실시예 2. 알츠하이머 치매 모델의 제작**

[0043] 아밀로이드 베타 펩티드 주입 동물모델 (Amyloid beta1-42 infused mouse model) : C57BL/6 마우스를 졸레틸과 럼푼이 2:1으로 혼합된 마취약으로 마취 한 후, 마우스 뇌의 해마 CA1 지역에 아밀로이드 베타$_{1-42}$ 펩티드를 주입

하여 (coordinates: - 2.3 mm anterior/posterior, ± 1.8 mm medial/lateral 및 - 1.75 mm dorsal/ventral from Bregma) 알츠하이머를 유발시켰다.

[0044] **실시예 3. 일반 운동 활성 검사 (Open field test)**

[0045] 일반 운동 활성검사를 수행하여 마우스의 기본적인 운동성 및 움직임을 관찰하였다. 먼저, 마우스를 50 X 50 X 50 cm의 흰색 아크릴 박스에 넣고 영상추적시스템 (video tracking system, smart v.2.5.21)을 이용하여 10분 동안 행동을 측정하였으며, Open field를 9 등분하여 가운데 영역을 central zone으로 설정하였다.

[0046] 상기 실시예 2의 알츠하이머 유도 마우스에 도페네질 (Donepezil) 1 mg/kg, 30 % 에탄올로 추출한 홍화자 추출물 (KH036) 200 ㎎/㎏ 또는 600 ㎎/㎏ 및 대조군인 증류수를 각각 투여한 후, 자발운동량을 이용한 보행활동량을 측정하였으며, 결과를 도 1에 나타내었다.

[0047] 그 결과, 알츠하이머를 유발한 후 증류수를 투여한 군의 경우, 알츠하이머를 유발하지 않은 군과 비교하였을 때, 유의미한 차이가 있음이 나타나지 않았으며, 따라서 약물투여로 인한 마우스의 보행활동량에는 변화가 없음을 알 수 있었다 (도 1). 이러한 결과를 통하여, 홍화자 추출물이 보행활동량에는 영향을 미치지 않았음을 확인함으로써, 하기 마우스 동물모델의 기억형태의 공간 인지력 실험결과의 신빙성을 확인할 수 있다.

[0048] **실시예 4. Y자 미로형 검사**

[0049] 단기기억형태의 순간 공간 인지력을 평가하기 위해 Y자 미로형 검사를 수행하였다. Y-maze test에 이용되는 기구는 세 개의 팔(arm)로 구성되어 있으며, 각 팔의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고, 세 팔이 접하는 각도는 120° 이다. 모든 실험 장치는 검정색의 폴리비닐 플라스틱으로 구성되어 있으며, 각 가지를 A, B, C로 정한 후, 한쪽 가지에 마우스를 조심스럽게 놓고 8 분 동안 자유롭게 움직이게 한 다음 마우스가 들어간 가지를 기록하였다. 이 때, 꼬리까지 완전히 들어갔을 경우에 한하며, 갔던 가지에 다시 들어간 경우에도 기록하였다. 세 개의 서로 다른 가지에 차례로 들어간 경우 (ABC,CAB,BCA; 실제 변경, actualalternation) 1점씩을 부여하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0050] 변경 행동력 (alternation behavior)은 3가지 모두에 차례로 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학식에 의해 계산하였다.

[0051] *변경 행동력 (%)*

[0052] *=실제변경 (actualalternation)/최고변경 (maximum alternation) X 100*

[0053] *(최고변경 :총 입장횟수 -2)*

[0054] 도 2에서 확인되는 바와 같이, 본원발명의 홍화자 추출물 (KH036)을 처리한 군은 200 ㎎/㎏ 또는 600 ㎎/㎏ 투여군 모두에서 음성 대조군과 비교하여 현저히 향상된 변경 행동력을 보였으며, 특히 200 ㎎/㎏의 홍화자 추출물 투여군은 양성 대조군인 도페네질 보다 향상된 변경 행동력을 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과를 통하여, 본원발명의 홍화자 추출물은 알츠하이머 치매의 개선 및 치료 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0055] **실시예 5. 모리스 수중 미로 검사**

[0056] 설치류의 공간학습 및 기억력(spatial learning and memory)을 측정하는 방법으로서 수많은 연구자들이 학습 및 기억력 측정을 위하여 널리 이용하고 있는 수동 회피 검사를 통하여, 홍화자 추출물의 효과를 확인하고자 하였다.

[0057] 실험은 기존의 모리스 (Morris)의 방법을 응용하여 시행하였다. 먼저, 실험 시작 1 시간 전에 마우스를 행동 관찰실로 옮기고 안정시켰다.

[0058] 미로의 제원은 지름 90 cm, 높이 32.5 cm 이며, 플랫폼 (white platform)의 지름은 5 cm로 구성되어 있다. 수중미로의 주변은 비디오카메라와 연결된 컴퓨터 시스템과 수온조절용 장치 등 공간단서들을 항상 일정하게 유지시켰다. 실험방법으로는 미로에 물을 채우고 마우스가 플랫폼을 볼 수 없도록 물 높이의 1 cm 밑에 설치하였다. 미로에는 4 개의 마커를 사용하여 4 분원이 되도록 나누어서 북동 (NE), 북서 (NW), 남동 (SE), 남서 (SW)로 구분하였고, 미로의 한 4 분원에 플랫폼을 설치하였다.

[0059] 모리스 수중미로 시험을 6일 동안 진행하였으며, 첫째 날에는 각 마우스들이 물에 대하여 적응을 할 수 있도록 1 분간 미로 안에서 자유로이 수영하도록 하고, 이때 플랫폼은 설치하지 않았다. 두 번째 날부터 5 일 째 되는 날까지는 하루에 각각의 마우스가 1 일 4 회씩 10 분 간격으로 1 분 동안 미로에서 수영하도록 하였다. 두 번째

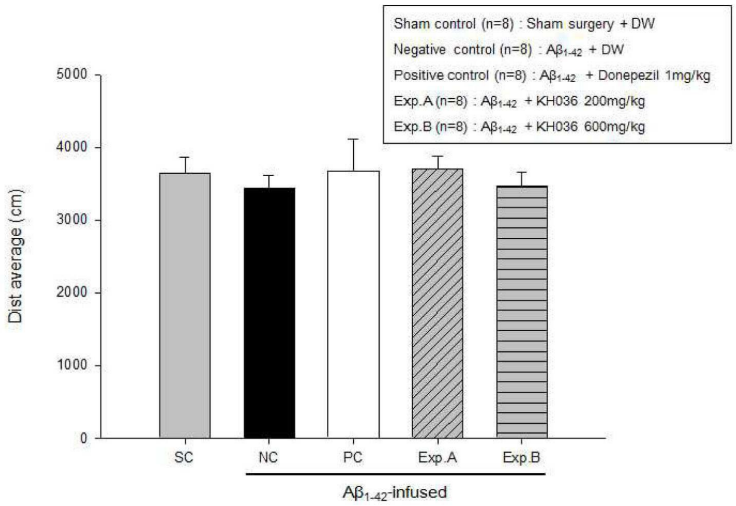
되는 날부터 5일 째가 되는 4 일간 1 회의 실험방법은 이미 미로 안에 설치한 플랫폼에 1 분 이내에 10 초간 올라가 있는 마우스는 실험을 마치고, 1 분 이내에 플랫폼을 찾지 못하거나 플랫폼에 10 초간 올라가 있지 않은 마우스는 실험종료 후 인위적으로 10 초간 플랫폼에 올려둔 후 실험을 종료하였다. 이때 플랫폼의 위치는 같은 자리에 고정시켰다. 6 일 째 되는 날에는 플랫폼을 미로에서 제거한 후 플랫폼이 있던 분원에 마우스가 머문 시간을 측정하였다.

[0060] 모리스 수중미로 학습에서 마지막 날인 제 5 일째 기억검사를 시행하기 위해, 플랫폼을 제거한 후 60 초간 자유수영을 실시하고 이를 Smart program을 통하여 총시간 중 플랫폼에 있었던 4 분원에 머무는 시간을 %로 측정하고, 결과를 도 3에 나타내었다.

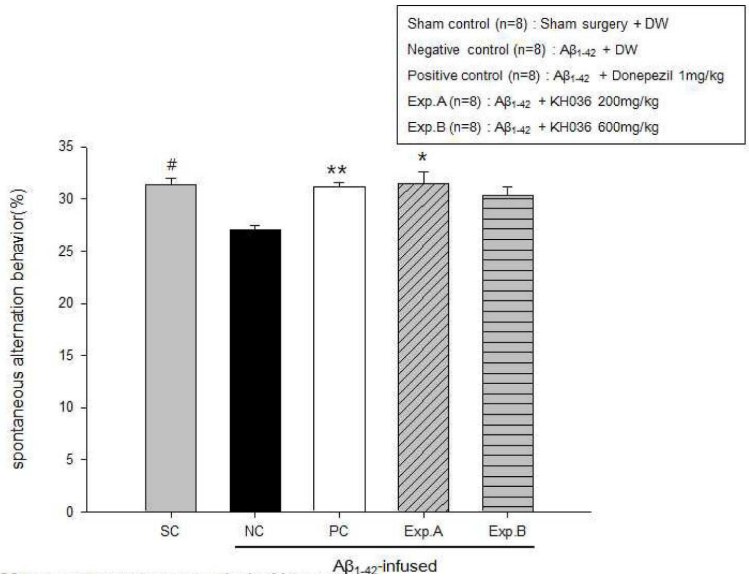
[0061] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 각 군의 기억력 측정결과는 집단간 유의성($P < 0.05$)이 있는 차이를 보였으며, 본원발명의 홍화자 추출물 (KH036)을 처리한 군은 200 mg/kg 또는 600 mg/kg 투여군 모두에서 음성 대조군과 비교하여 향상된 학습기억 효과를 보였다. 이러한 결과를 통하여, 알츠하이머 치매가 유발되는 경우 발생할 수 있는 학습 및 기억력의 감소를 홍화자 추출물이 증가시켜 완화시킬 수 있음을 확인하였으며, 이를 통해 홍화자 추출물이 치매의 개선 및 치료 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

도면

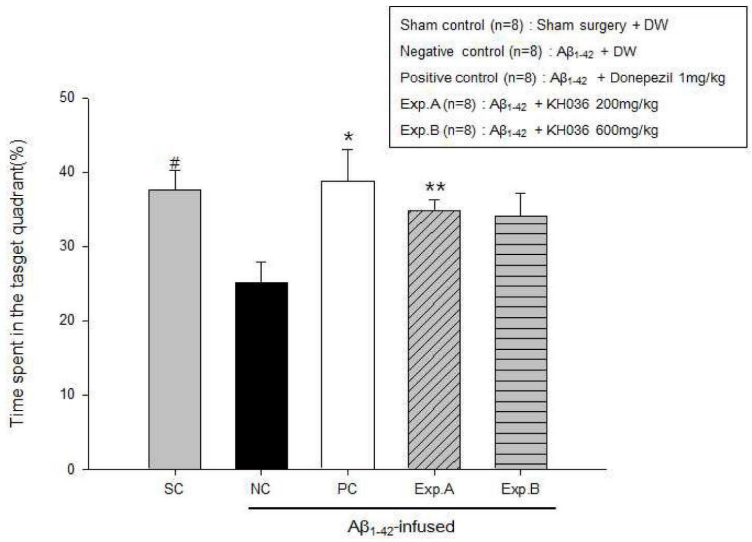
도면1



도면2



도면3


Sham control (n=8) : Sham surgery + DW
Negative control (n=8) : Aβ1-42 + DW
Positive control (n=8) : Aβ1-42 + Donepezil 1mg/kg
Exp.A (n=8) : Aβ1-42 + KH036 200mg/kg
Exp.B (n=8) : Aβ1-42 + KH036 600mg/kg
Time spent in the tasget quadrant(%)
50
40
30
20
10
0
#
*
**
SC
NC
PC
Exp.A
Exp.B
Aβ1-42-infused