(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0066726
(43) 공개일자 2016년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/03 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0171851
(22) 출원일자 2014년12월03일
심사청구일자 2014년12월03일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김형락
부산광역시 남구 황령대로319번길 26, 104동 2102호(대연동, 대연경동메르빌아파트)
오선지
부산광역시 수영구 남천바다로10번길 22, 1001호 (궁전아이브)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

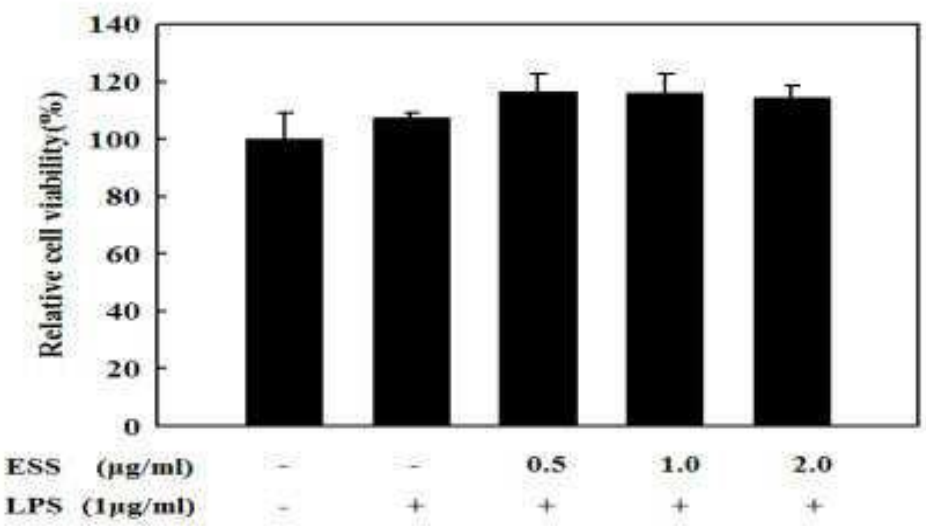
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 항치매용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 톱니모자반 추출물 및 상기 추출물로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물로서 이들 조성물은 세포에 독성을 유발시키지 않아 안정성이 있으며, 염증 관련 인자들의 유전자 및 단백질 발현을 억제할 수 있고, 치매의 원인으로 알려진 베타 아밀로이드의 생성을 억제하는 효과가 우수하여, 치매를 예방, 개선 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성식품의 소재로 활용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김재일

부산광역시 수영구 광안해변로 100, 205동 603호(남천동, 삼익비치아파트)

최준형

부산광역시 사하구 괴정로 222, 502호(괴정동, 괴정맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A1A2009588
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	일반연구자지원_기본연구개인
연구과제명	곰피로부터 분리된 phlorotannins의 항산화/제독화 신호경로에 의한 간보호 효과 연구
기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2015.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 톱니모자반 추출물은 물 또는 유기용매를 이용하여 수득한 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 추출물에는 사카크로멘올, 사가퀴노익산 또는 사가하이드로퀴노익산 화합물을 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 치매는 세포 내 베타 아밀로이드 단백질에 의해 유도된 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 톱니모자반 추출물은 물 또는 유기용매를 이용하여 수득한 추출물인 것을 특징으로 하는 건강기능성 식품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능성 식품.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 추출물에는 사카크로멘올, 사가퀴노익산 또는 사가하이드로퀴노익산 화합물을 함유하는 것을 특징으로 하는 건강기능성 식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 항치매용 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 비타민 E와 셀레질린(Selegiline)과 같은 항산화제나 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) 대한민국 공개특허 제2005-0023711호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 치매를 효과적으로 예방 및 치료할 수 있는 천연물 소재의 신규 의약품 및 기능성 식품을 연구하던 중, 톱니모자반 추출물이 치매를 효과적으로 예방 및 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 톱니모자반 추출물은 물 또는 유기용매를 이용하여 수득한 추출물일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물에는 사카크로멘올, 사가퀴노익산 또는 사가하이드로퀴노익산 화합물을 함유할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 톱니모자반 추출물은 물 또는 유기용매를 이용하여 수득한 추출물일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 추출물에는 사카크로멘올, 사가퀴노익산 또는 사가하이드로퀴노익산 화합물을 함유하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 톱니모자반 추출물 및 상기 추출물로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물로서 이들 조성물은 세포에 독성을 유발시키지 않아 안정성이 있으며, 염증 관련 인자들의 유전자 및 단백질 발현을 억제할 수 있고, 치매의 원인으로 알려진 베타 아밀로이드의 생성을 억제하는 효과가 우수하여, 치매를 예방, 개선 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성식품의 소재로 활용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 톱니모자반 추출물을 농도별로 처리한 후, 세포에 미치는 세포 독성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 톱니모자반 추출물을 농도별로 처리한 후, 산화질소의 생성 억제정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 톱니모자반 추출물을 농도별로 처리한 후, 프로그라스탄딘 E_2 (PGE_2)의 생성 억제정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 톱니모자반 추출물의 종양괴사인자인 (TNF-α) 생성 억제정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 톱니모자반 추출물의 인터루킨 6 (IL-6) 생성 억제정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 톱니모자반 추출물의 iNOS 및 COX-2의 발현 저해 정도를 웨스턴 블럿을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 톱니모자반 추출물의 iNOS 및 COX-2의 발현 저해 정도를 mRNA 수준에서 확인하기 위해 PCR 수행 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 톱니모자반 추출물의 TNF-a 및 IL-6의 발현 저해 정도를 mRNA 수준에서 확인하기 위해 PCR 수행 결과를 나타낸 것이다.

도 9 및 도 10은 톱니모자반 추출물이 처리된 세포의 세포질 및 핵 추출물을 대상으로 IkB-α의 인산화 및 NF-κB의 핵내로의 이동 억제 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 톱니모자반 추출물의 LPS에 의한 MAPKs 및 Akt활성화에 미치는 영향을 웨스턴 블럿을 통해 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 톱니모자만 추출물, Sargahydroquinoic acid(SHA), Sargaquinoic acid (SQA)및 Sargachromenol(SCM) 각각에 대한 Abeta 40 생성 억제정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 사가크로멘올(Sargachromenol) 화합물의 산화질소 생성, PGE_2 생성 및 세포 독성 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 사가크로멘올(Sargachromenol) 화합물의 iNOS 및 COX-2의 발현 저해 정도를 단백질 수준 및 mRNA 수준에서 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 사가크로멘올(Sargachromenol) 화합물의 염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6의 발현 억제 정도를 단백질 수준 및 mRNA 수준에서 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 사가크로멘올(Sargachromenol) 화합물의 IkB-α 분해 억제효과와 NF-κB의 핵내로의 이동 억제효과를 나타낸 결과이다.

도 17은 사가크로멘올(Sargachromenol) 화합물의 MAPKs와 Akt 단백질의 인산화에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 18은 사가퀴노익산(Sargaquinoic acid) 화합물의 산화질소 생성, PEG_2 생성 및 세포독성 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 19는 사가퀴노익산(Sargaquinoic acid) 화합물의 iNOS 및 COX-2의 발현 저해 정도를 웨스턴 블럿을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 톱니모자반 분획물(1번 분획물)을 대상으로 1차 분획화한 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 21은 톱니모자반 분획물(1번 분획물)을 대상으로 2차 분획화한 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 22는 컬럼크로마토그래피로 정제한 사가하이드로퀴노익산(Sargahydroquinoic acid)의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 23은 톱니모자반 분획물(2번 분획물)을 대상으로 1차 분획화한 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 24는 톱니모자반 분획물(2번 분획물)을 대상으로 2차 분획화한 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 25는 컬럼크로마토그래피로 정제한 사가크로멘올(Sargachromenol)의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 26은 톱니모자반 분획물(2번 분획물)을 대상으로 2차 분획화한 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 27은 컬럼크로마토그래피로 정제한 사가퀴노익산(Sargaquinoic acid)의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 톱니모자반 추출물이 항치매 효과가 있음을 규명한 톱니모자반 추출물의 신규 용도에 관한 것이다.

[0020] 일반적으로 치매란 앞서 종래기술에서도 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. 치매로 분류되는 질환은 이에 한정되지 아니하나 알츠하이머형 치매증, 뇌혈관성 치매증, 노인성 치매 및 두부손상에 의한 치매가 포함될 수 있고, 본 발명에서 제공하는 조성물이 치료, 예방 및 개선할 수 있는 질환으로 이러한 질환을 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명에서는 새로운 치매 치료제의 소재로서 톱니모자반 추출물에 주목하였는데, 톱니모자반은 조간대에서 점심대에 걸쳐 생육하는 식물로서 1~4m인 다년생 대형 갈조류이다. 뿌리는 지름 4~5cm로 원뿔상이고, 고무와도 같으며 나이테가 있고, 줄기는 원주상으로 짧고 다수의 중심가지로 나뉘며 편압되어 있다. 또한 줄기의 양 가장자리가 얇고, 세로로 중륵처럼 한쪽으로 융기하며, 가장자리에서 짧은 가지를 내고 있으며 줄기잎은 기부로 향하여 있고, 가장자리에 2중으로 된 톱니가 있으며, 기포는 둥근 모양에 가까우며 그 꼭대기에 관엽(冠葉) 또는 가시 모양의 돌기가 있다. 특히 우리나라의 남해안과 제주에 생육하는 것으로 알려져 있으며, 지질강하, 혈압강하, 방사성 동위원소 배출작용에 대한 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있을 뿐, 아직까지 치매와 관련된 작용에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0022] 이러한 점에서 본 기술은 톱니모자반 추출물이 항염 활성이 우수하고 세포에 독성을 유발시키지 않으며 치매의 원인으로 알려진 베타 아밀로이드 생성을 억제하는 효과가 우수하여 치매 치료를 위한 의약품 소재 및 기능성 건강식품 소재로 사용할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0023] 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. 기억 등의 기능을 담당하는 대뇌의 신경세포가 변성하여 대량으로 사멸하는 경우 Aβ가 침착한 '노인 반점', '신경원섬유 변화'라고 하는 섬유 모양의 구조가 신경 세포 내에서 보이며, 알츠하이머의 경우 신경 세포는 세포사멸 기작에 의해 사멸하는 것으로 보고되어 있다.

[0024] 한편, 본원발명의 톱니모자반 추출물은 이러한 Aβ 단백질이 뇌세포에서 생성 및 발현되는 것을 감소시키는 효과가 있음을 확인하였고, 다른 종류의 모자반에 비해 톱니모자반 추출물이 그 효과가 더 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0025] 그러므로 본 발명은 톱니모자반 추출물을 유효성분으로 포함하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0026] 상기 톱니모자반 추출물은 물 또는 유기용매를 이용하여 추출할 수 있으며, 이때 사용할 수 있는 상기 유기용매로는 이에 제한되지는 않으나, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 헥산 및 시클로헥산으로 이루어진 군 중에서 선택되는 용매를 사용할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 추출물에는 사카크로멘올, 사가퀴노익산 또는 사가하이드로퀴노익산 화합물이 함유되어 있으며, 이들 화합물 역시 항염활성이 우수하며 항치매 효과를 가지고 있다는 것을 실험을 통해 확인할 수 있었다.

[0028] 그러므로 본 발명은 사카크로멘올, 사가퀴노익산 또는 사가하이드로퀴노익산 화합물을 유효성분으로 함유하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 상기 사카크로멘올, 사가퀴노익산 또는 사가하이드로퀴노익산 화합물은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.

[0030] 본 발명에 따른 사카크로멘올, 사가퀴노익산 또는 사가하이드로퀴노익산 화합물은 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조할 수 있는데, 바람직하게는 톱니모자반 추출물, 더욱 바람직하게는 톱니모자반의 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.

[0031] 또한, 본 발명에 따른 상기 조성물은 약학적으로 유효한 양의 톱니모자반 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.

[0032] 본 발명에 따른 톱니모자반 추출물의 약학적으로 유효한 양은 0.5 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 5 mg/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.

[0033] 또한, 상기에서 약학적으로 허용되는이란 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, 아카시아 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.

[0034] 또한, 본 발명의 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.

[0035] 본 발명에 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.

[0036] 나아가 본 발명에 따른 톱니모자반 추출물은 세포에 처리시, 세포 독성을 유발시키지 않아 안정성이 있음을 확인하였고, 치매 증상을 효과적으로 예방, 치료 및 개선할 수 있으므로, 본 발명의 조성물은 체내에 대해 매우 안정한 특징이 있다.

[0037] 따라서 본 발명의 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.

[0038] 그러므로 본 발명의 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.

[0039] 본원에서 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.

[0040] 본원발명에 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, 본원발명에서 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.

[0041] 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.

[0042] 또한, 본원발명에서 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.

[0043] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 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.

[0044] 본원발명의 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.

[0045] 나아가 본 발명의 조성물이 적용할 수 있는 질환인 치매는 퇴행성 뇌신경질환으로서, 사람의 정신(지적) 능력과 사회적 활동을 할 수 있는 능력의 소실을 말하며, 어떤 사람의 일상생활의 장애를 가져올 정도로 충분히 심할 때 이를 치매라고 한다. 즉 치매는 그 자체가 어떤 활동을 이야기하는 진단명이 아니라 단지 특정한 증상들이 나타나서 어떤 기준을 만족시키는 경우를 지칭하는 하나의 증후군이다. 치매는 여러가지 질환들에 의해 나타나는 병적 증상으로, 미만성 루이소체 치매, 두부 외상성 치매 등 매우 다양한 질환들에 의해서 치매가 나타날 수

있는데, 알쯔하이머병, 혈관성 치매, 미만성 루이소체 치매들은 치매의 증상으로만 나타날 수 있으며, 어떤 치매의 원인 질환들은 여러가지 나타나는 증상들 중 한 가지로 치매가 나타나기 때문에 이런 경우는 치매 이외의 다른 증상들을 살펴보면 쉽게 진단을 내릴 수 있는 경우도 많다.

[0046] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0047] **<실시예 1>**

[0048] **톱니모자반의 주정 추출물 제조**

[0049] 본 발명에 사용한 톱니모자반은 부산시 기장군에서 채집하여 사용하였고, 톱니모자반은 음지 또는 양지에서 자연건조 후 마쇄하여 얻은 분말 2 kg과 주정(95% 에탄올)을 각각 8 L씩 넣고 70℃에서 3시간 동안 3회 반복하여 환류냉각기가 장착된 추출기로 추출한 후 여지 (와트만사, 미국) 또는 마이크로필터로 감압 여과하고, 여과된 추출물을 진공회전농축기로 40℃에서 용매를 제거한 다음 추출된 잔사로서 톱니모자반조추출물을 수득하였으며, 이 중 일부를 취하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0050] **<실험예 1>**

[0051] **톱니모자반 주정 추출물의 세포독성 분석**

[0052] 상기 실시 예 1에서 얻은 본 발명의 톱니모자반 주정추출물을 마우스 뇌세포인 BV-2 microglia 세포에 처리하여 본 발명의 추출물에 대한 세포독성을 측정하였다. 이를 위해 BV2 microglia 세포 (1×10^4 cells/well)를 DMEM 배지에서 배양하고, 여기에 톱니모자반 주정추출물을 농도별(0, 0.4, 1.0, 2.0ug/ml)로 처리한 다음 2시간 배양하고 LPS (1 ug/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 96 well plate에 배지 100㎕와 MTS 용액 5㎕를 넣고 1시간 정도 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포 독성 정도를 분석하였다. 측정치는 3회 반복 실험의 평균값으로 하여, 그 결과를 하기 도 1에 나타내었다.

[0053] 분석 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, BV-2 microglia 세포에 대한 톱니모자반 주정 추출물의 세포 독성은 2.0 μg/ml의 농도까지는 나타나지 않는 것으로 나타났다(도 1 참조).

[0054] **<실험예 2>**

[0055] **LPS로 유발되는 NO 생성에 대한 톱니모자반 주정 추출물의 영향분석**

[0056] BV-2 microglia 세포 (5.0×10^4 cells/well)를 DMEM 배지를 이용하여 96 well plate에 접종하고, 상기 실시예 1에서 얻은 톱니모자반 주정추출물을 표시된 농도별로 처리하고 2시간 뒤 LPS (1 μg/ml)를 함유한 새로운 배지를 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO^{2-}의 형태로 측정하였다. 세포배양 상등액 100 ㎕와 Griess시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphtyl-ethylenediamine in 5% phosphoric acid) 100 ㎕를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도 곡선은 sodium nitrite ($NaNO_2$)를 serial dilution (연속 희석)하여 얻었고, 그 결과는 하기 도 2에 나타내었다.

[0057] 분석 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물을 처리하지 않고, LPS만을 처리한 군의 경우 대조군에 비해 산화질소의 생성이 급증한 것으로 나타난 반면, 톱니모자반 주정추출물을 처리한 군의 경우, LPS로 유도된 NO의 생성량이 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다(도 2 참조).

[0058] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명의 톱니모자반 주정추출물은 LPS로 유도된 NO의 생성을 효과적으로 억제할 수 있어 LPS에 의한 염증 반응을 제어할 수 있는 작용이 있음을 알 수 있었다.

[0059] **<실험예 3>**

[0060] **LPS에 의한 PGE_2 생성에 있어서 톱니모자반 주정추출물의 영향분석**

[0061] BV-2 microglia 세포 (3.0×10^5 cells/ml)를 DMEM 배지를 이용하여 96 well plate에 접종하고, 톱니모자반 주정추출물을 농도별(0, 0.5, 1.0, 2.0ug/ml)로 처리하고 2시간 뒤 LPS (1 μg/ml)를 함유한 새로운 배지를 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 LPS에 의해 생성된 PGE_2의 양을 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

[0062] 분석 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 톱니모자반 주정추출물은 BV-2 microglia 세포에서 LPS로 유도된 PGE_2의 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 나타났다.

[0063] **<실험예 4>**

[0064] **LPS에 의한 전구염증성 사이토카인의 생성에 대한 톱니모자반 주정추출물의 영향분석**

[0065] 앞서 실험예를 통해 확인한 바와 같이, 본 발명의 톱니모자반 주정추출물은 염증매개인자인 NO와 PGE_2의 생성을 농도 의존적으로 저해함을 확인할 수 있었다. 이에 본 발명자들은 본 발명의 추출물이 전구염증성 사이토카인인 TNF-α 및 IL-6의 생성도 억제시킬 수 있는지 다음과 같은 실험을 통해 분석하였다. 상기 실험예 3에서 수행한 세포의 배양액을 수집하고 배양액 내의 TNF-α 및 IL-6 농도를 측정하였는데, 측정은 BD Biosciences (San Jose, USA)사의 ELISA kit를 사용하였다. 보다 구체적으로, BV-2 microglia 세포 (3.0×10^5 cells/ml)에 톱니모자반 주정추출물을 농도별로 2시간 처리한 후, 1 μg/ml의 LPS가 함유된 배지를 처리한 다음 24시간 후 세포 배양액을 원심분리하여 상층액에 분비된 전구염증성 사이토카인의 양을 ELISA kit로 분석하였다.

[0066] 분석결과, 도 4 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 톱니모자반 주정추출물은 BV-2 microglia 세포에서 LPS로 유도된 TNF-α 및 IL-6의 생성을 농도 의존적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0067] **<실험예 5>**

[0068] **LPS에 의한 iNOS와 COX-2의 단백질 발현에 대한 톱니모자반 주정추출물의 효과분석**

[0069] NO와 PGs는 NOS와 COX에 의해 $_L$-arginine 및 인지질로부터 합성된다. 병리적인 조건 하에서 NO와 PGE_2의 상당한 증가는 염증 과정을 자극하고 다른 염증 매개체와 함께 상승효과를 나타내는 iNOS와 COX-2에 의해 합성되는 것으로 알려져 있다.또한, iNOS와 COX-2는 염증성 사이토카인과 박테리아성 endotoxin에 노출되었을 때 강하게 발현되는 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명자들은 LPS로 유도된 BV-2 microglia 세포에서 iNOS와 COX-2의 단백질 발현에 있어서 톱니모자반 주정추출물의 효과를 iNOS와 COX-2에 대한 각각의 항체를 이용한 웨스턴블럿을 통해 확인하였다.

[0070] 분석 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, BV-2 microglia 세포에서 iNOS와 COX-2의 단백질 발현은 톱니모자반 주정추출물의 처리에 의해 억제되는 것으로 나타났다.

[0071] **<실험예 6>**

[0072] **LPS에 의한 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현에 대한 톱니모자반 주정추출물의 효과분석**

[0073] 상기 실험예 5에서 톱니모자반 주정추출물이 LPS에 의한 iNOS와 COX-2 단백질 발현을 억제하는 것을 확인하였고, 나아가 본 발명자들은 본 발명의 추출물이 이들 유전자의 mRNA 발현 수준에서도 억제하는지 확인하기 아래와 같이 기재된 위해 iNOS와 COX-2 유전자에 대한 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR (reverse-transcriptase PCR)을 통해 분석하였다.

[0074] <프라이머 서열>

[0075] 5'-CCATGATGGTCACATTCTGC-3'(iNOS에 대한 센스 프라이머)

[0076] 5'-TCTTCGAAATCCCACCTGAC-3'(iNOS에 대한 안티센스 프라이머)

[0077] 5'-TGGGCAAAGAATGCAAACAT-3'(COX-2에 대한 센스 프라이머)

[0078] 5'-CAGCAAATCCTTGCTGTTCC-3'(COX-2에 대한 안티센스 프라이머)

[0080] 분석 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 톱니모자반 주정 추출물은 iNOS와 COX-2을 단백질 수준뿐만 아니라 mRNA 발현 수준에서도 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] **<실험예 7>**

[0082] **LPS에 의한 전구염증성 사이토카인의 mRNA 발현에 대한 톱니모자반주정추출물의 효과분석**

[0083] 상기 실험예 4에서 톱니모자반 주정추출물이 LPS에 의한 TNF-α 및 IL-6 생성억제 효과를 단백질 수준에서 확인하였기에 mRNA 발현 수준에서도 억제하는지 확인하기 위해 아래에 기재된 프라이머 서열을 이용하여 RT-PCR (reverse-transcriptase PCR)로 분석하였다.

[0084] <프라이머 서열>

[0085] 5'-TAGCCCACGTCGTAGCAAAC-3' (TNF-α에 대한 센스 프라이머)

[0086] 5'-ACAAGGTACAACCCATCGGC-3' (TNF-α에 대한 안티센스 프라이머)

[0087] 5'-CCTCTCTGCAAGAGACTTCCAT-3' (IL-6에 대한 센스 프라이머)

[0088] 5'-ACAGGTCTGTTGGGAGTGGT-3' (IL-6에 대한 안티센스 프라이머)

[0090] 분석결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 톱니모자반 주정추출물은 LPS에 의한 TNF-α 및 IL-6 생성 억제를 mRNA 발현 수준에서도 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0091] **<실험예 8>**

[0092] **톱니모자반 주정추출물의 NF-κB 전사인자 핵이동 억제 효과**

[0093] NF-κB는 일반적인 상태에서는 IκB-α(inhibitory of κB-α)와 함께 결합하여 세포질에 불활성화 상태로 존재한다. 하지만 LPS와 같은 외부자극에 의해 자극을 받으면 IκB-α가 인산화되어 유비퀴틴에 의해 분해되며 유리형의 NF-κB (p65)는 핵으로 이동함으로써 cytokine, cytokine receptor, cell adhesion molecule, growth factor 등의 발현에 관여하는 유전자의 promoter나 enhancer의 κB site에 결합함으로써 이들 유전자의 전사를 유도한다.

[0094] 이에 본 발명자들은 톱니모자반 주정추출물이 NF-κB가 핵으로 이동하는 것에 대한 영향을 줄 수 있는지 확인하기 위해, LPS로 유도된 BV-2 microglia 세포에서 톱니모자반 주정추출물에 의한 IκB-α의 인산화와 NF-κB의 핵이동을 Western blot으로 관찰하였다.

[0095] 분석결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 세포질에서 LPS에 의한 IκB-a의 인산화와 NF-κB의 감소는 톱니모자반 주정추출물의 처리 농도에 의존적으로 억제되는 것으로 나타났고, 도 10에 나타낸 바와 같이, LPS에 의해 증가하는 NF-κB의 핵 내로의 이동은 톱니모자반 주정추출물 처리에 의해 감소하는 것으로 나타났다.

[0096] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 톱니모자반 주정추출물이 LPS에 의한 IκB-α의 인산화 및 분해를 억제할 수 있고 NF-κB의 유리화를 감소시킴으로써 NF-κB가 핵으로 이동하여 염증성 사이토카인과 같은 염증 인자들의 전사인자로써 작용하는 것을 차단할 수 있음을 알 수 있었다.

[0097] **<실험예 9>**

[0098] **LPS에 의한 MAPKs 와 Akt 활성화에 대한 톱니모자반 주정추출물의 효과**

[0099] 다양한 외부자극에 의한 NF-κB 전사인자의 활성화를 통해 iNOS나 COX-2 또는 전구염증성 사이토카인의 발현을 유도하는 과정에 있어서, 이들 분자를 조절하는 신호전달기전은 주요 MAPK superfamily에 속하는 세 가지 효소들, 즉 extracellular-regulated protein kinase (ERK), c-Jun NH2-protein kinase (JNK), p38 MAPK와 PI3K/Akt을 들 수 있다. 이에 본 발명자들은 이들 3가지 세포내 단백질의 인산화에 관한 톱니모자반 주정추출물의 효과를 알아보기 위하여 Western blot을 수행하였다.

[0100] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, LPS에 의해 유도된 ERK, JNK, p38 MAPK의 인산화는 물론 PI3K의 하위 신호전달 effector인 Akt의 인산화도 저해하는 것으로 나타났다. 따라서 LPS에 의해 유도된 BV-2 microglia 세포의 염증 반응에서 톱니모자반 주정추출물은 다양한 세포내 신호 단백질 경로를 차단함으로써 염증 반응을 효과적으로 저해할 수 있음을 알 수 있었다.

[0101] **<실험예 10>**

[0102] **β-amyloid 과발현 세포에서 톱니모자반 주정추출물 및 유효성분들에 대한 β-amyloid 생성억제효과 분석**

[0103] 알츠하이머 질병의 특징 중 하나는 뇌 안에 있어서 신경세포(nerve cell, neuron)들 사이에 amyloid plaques의 축적을 들 수 있다. 여기서 amyloid는 신체에서 일반적으로 만들어내는 단백질 조각에 대한 일반적인 용어이며, Beta(β)-amyloid는 amyloid precursor protein (APP)라고 불리는 단백질로부터 잘려진 단백질 단편이다. 정상 뇌에서는 이러한 단편 단백질들이 계속 분해되어 제거되지만, 알츠하이머 병, 치매를 앓고 있는 뇌에서는 그 단백질들이 딱딱한 불용성 plaques (hard, insoluble plaques)을 형성하면서 축적되게 된다.

[0104] 알츠하이머 질병의 진단에 사용되는 바이오마커로 Amyloid beta 1-40(Abeta 40)이 많이 이용되고 있으므로, 본 실험에서는 Abeta 40을 과발현하는 CHO-APP751 세포를 이용하여 톱니모자반 주정추출물 및 이의 유효성분인 sargahrdroquinoic acid, sargachromenol 및 sargaquinoic acid에 의한 Abeta 40 축적저해 효과를 분석하였다. 이를 위해, CHO-APP751 세포를 100 mm dish에 2 x 10^6 농도로 깔고 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 24시간 동안 세포를 배양한 후 새로운 배양액 10 ml에 각각의 화합물 및 추출물을 농도별로 30시간 동안 처리하였다. 이후 세포를 PBS로 두번 세척 후 세포를 용해시킨 다음 원심분리(14,000g, 10min)하여 상층액을 취하였다. 상층액을 대상으로 단백질 농도를 측정한 후 동일한 양의 단백질을 Abeta 40 ELISA kit를 이용하여 Abeta 40의 양을 분석하였다.

[0105] 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 톱니모자반의 주정추출물, sargahrdroquinoic acid, sargachromenol 및 sargaquinoic acid은 농도 의존적으로 Abeta 40 단백질의 축적을 억제하는 것으로 나타났으며, 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 추출물이 amyloid plaque의 축적을 효과적으로 저해하여 알츠하이머 질병을 예방 및 치료할 수 있다고 알 수 있었다.

[0106] **<실시예 2>**

[0107] **톱니모자반 주정추출물로부터 유효성분인 사가하이드로퀴노익산, 사가크로멘올 및 사가퀴노익산의 분리**

[0109] <2-1> Sargahydroquinoic acid의 분리

[0110] 톱니모자반 주정추출물을 100 g을 물:에탄올 (9:1, v/v)의 혼합용매 1 리터에 녹인 후 분액깔때기에 넣고 동량의 n-hexane을 넣어 평형화시킨 후 위층의 n-hexane 가용부를 모아 무수황산나트륨으로 탈수한 다음 농축하여 n-hexane 분획물을 분리하였다. 분리된 n-hexane 분획물 12.2g을 120 mL methanol에 녹여 membrane filter로 여과 후 200 uL을 주입하여 Phenomenex C18(2) (15μm, 21.2 mm × 250 mm) 칼럼이 장착된 HPLC로 4개의 획분으로 분리하였다(도 20 참조). 크로마토그래피의 이동상으로는 메탄올 (A)과 물 (B)의 혼합용매를 사용하였으며 유속은 7 mL로 설정하였다. 크로마토그래피 조건은 처음 A/B(90/10) ~ A/B(94/6) 농도로 33분간, A/B(94/6) ~ A/B(100/0) 농도로 2 분간, A/B(100/0)로 10 분간 씻어준 후에 A/B(90:10) 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 크로마토그래피는 Autosampler로 자동으로 시료를 주입하는 방식으로 50-100회 실시하여 대량의 1번 분획물의 1차 획분을 얻었다. 대량으로 얻은 1차 획분의 순도를 높이기 위하여 동일한 기기와 칼럼을 사용하였다. 크로마토그래피 조건은 처음 A/B(85/15) ~ A/B(87/13) 농도로 26분간, A/B(87/13) ~ A/B(100/0) 농도로 2 분간, A/B(100/0)로 6 분간 씻어준 후에 A/B(87:13) 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 크로마토그래피는 Autosampler로 자동으로 시료를 주입하는 방식으로 실시하여 보다 순도가 높은 1번 분획물의 2차 획분을 얻었다 (도 21 참조).

[0111] 이후 1번 분획물의 2차 획분 중 1번을 동일한 조건으로 재크로마토그래피하여 정제하였으며 (523 mg), 분석용칼럼 (Phenomenex C18(2), 3 μm, 3 mm × 150 mm)으로 분석한 결과 단일물질로 판명되었으며, 이를 NMR로 분석한 결과 sargahydroquinoic acid로 판명되었다(도 22 참조).

[0112] <2-2> Sargachromenol의 분리

[0113] 상기 도면 20의 2번 분획물을 1번 분획물과 동일한 HPLC 장치와 칼럼을 사용하여 재크로마토그래피하였다. 크로마토그래피 조건은 처음 A/B(91.5/8.5) ~ A/B(92.2/7.8) 농도로 26분간, A/B(92.2/7.8) ~ A/B(100/0) 농도로 2 분간, A/B(100/0)로 6 분간 씻어준 후에 A/B(91.5:8.5) 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 크로마토그래피는 Autosampler로 자동으로 시료를 주입하는 방식으로 50회 실시하여 대량의 2번 분획물의 2차 획분을 얻었다. 도 23에 나타난바와 같이 2번 분획물은 3개의 피크를 나타내었으며, 이중 2번 피크 (Frc2-2)를 다시 정제하여 도 24와 같은 크로마토그램을 얻었으며(126 mg), 분리물을 NMR로 분석한 결과 sargachromenol로 판명되었다.

[0114] <2-3> Sargaquinoic acid의 분리

[0115] 도면 20의 3번 분획물을 1번 분획물과 동일한 HPLC 장치와 칼럼을 사용하여 재크로마토그래피하였다. 크로마토그래피 조건은 처음 A/B(93.4/6.6) ~ A/B(93.8/6.2) 농도로 20분간, A/B(93.8/6.2) ~ A/B(100/0) 농도로 2 분간, A/B(100/0)로 6 분간 씻어준 후에 A/B(93.8/6.2) 농도로 10분간 칼럼을 평형화하였다. 크로마토그래피는 Autosampler로 자동으로 시료를 주입하는 방식으로 50-100회 실시하여 대량의 3번 분획물의 2차 획분을 얻었다. 도 25에 나타난 바와 같이 3번 분획물은 4개의 피크를 나타내었으며, 이중 4번 피크 (Frc3-4)를 다시 정제하여 도 26과 같은 크로마토그램을 얻었고(171 mg), 분리물을 NMR로 분석한 결과 sargaquinoic acid로 판명되었다.

[0116] **<실험예 11>**

[0117] **사가크로멘올에 대한 NO와 PGE_2생성량 및 세포 독성 시험분석**

[0118] 본 발명자들은 상기 화합물들을 BV-2 세포에 2시간 전처리 후, LPS (0.1 mg/mL)를 24시간 처리하였다. NO의 농도는 배지 (100 mL)와 Griess 시약 (0.1% naphtylethylene diamine dihydrochloride + 1% sulfanilamide + 5% phosphoric acid)을 동일한 비율로 반응시켜 microplate reader로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 세포 독성 확인을 위해, BV-2 세포들을 96-well plate 에 $5x10^4$cells/well로 분주하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 농도별로 희석된 DMEM 배지로 교체하여 2시간 배양하였고, LPS가 함유한 DMEM 배지에 다시

24시간 배양한 다음, MTS 시험 키트를 사용하여 세포 생존율을 확인하였다. MTS 용액은 FBS-free DMEM에 5%(v/v)농도로 섞어 100 ml씩 처리하였다. 1시간 후에 microplate reader를 사용하여 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0119] 분석 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화합물을 처리한 군에서는 NO와 PGE_2 생성량이 sargachromenol 화합물에 의하여 농도 의존적으로 감소하는 것으로 나타났고(도 13a 및 13b 참조), 화합물의 처리에 의해 세포 독성은 유발되지 않는 것으로 나타나 본 발명의 화합물은 세포에 대해 안정성을 나타냄을 알 수 있었다(도 13c 참조).

[0121] **<실험예 12>**

[0122] **사가크로멘올의 iNOS 및 COX-2 의 mRNA와 단백질 발현에 미치는 영향분석**BV-2 cell ($1*10^6$cells/well)을 sargachromenol로 농도별로 처리한 후, LPS (0.1 mg/mL)를 4시간 또는 16시간 동안 자극하였다. iNOS와 COX-2의 mRNA 발현은 real-time PCR로 측정하였고, 단백질 발현은 western blot으로 확인하였다.

[0123] 분석결과, Sargachromenol의 처리 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2의 mRNA 발현과 단백질 발현이 모두 감소되는 것으로 나타났다(도 14a ~ 14c 참조).

[0124] **<실험예 13>**

[0125] **사가크로멘올의 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 영향분석**

[0126] 상기 실험예 4의 방법에서 톱니모자반 주정추출물 대신 사가크로멘올을 처리한 것을 제외하고는 동일한 방법으로 세포의 배지 중에서 IL-6, TNF-a의 양은 enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였고, 이들 cytokine들의 mRNA 발현은 real-time PCR을 이용하여 확인하였다.

[0127] 분석결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, 사가크로메놀 화합물은 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF-a의 단백질 및 mRNA의 발현을 모두 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다.

[0128] **<실험예 14>**

[0129] **사가크로멘올의 IkB 분해 억제효과와 NF-kB의 핵내로의 이동 억제효과 분석**

[0130] NF-kB의 활성화에 미치는 사가크로멘올 화합물의 활성을 분석하기 위해, 사가크로멘올 화합물을 처리한 BV-2 세포들로부터 세포질 및 핵 단백질을 각각 추출한 후, NF-kB 및 IkB의 인산화 정도를 western blot 방법으로 분석하였다. 또한 NF-kB의 nuclear translocation은 immunofluorescence를 이용하여 confocal 현미경으로 관찰하였다.

[0131] 분석결과, 도 16에 나타낸 바와 같이, 사가크로멘올 화합물을 처리한 군은 처리 농도에 의존적으로 IkB-a의 인산화를 억제하는 것으로 나타났고, NF-kB의 핵내로의 이동을 억제하는 것으로 나타났다.

[0132] **<실험예 15>**

[0133] **사가크로멘올의 MAPKs 와 Akt 단백질 인산화에 미치는 영향분석**

[0134] BV-2 세포에 사카크로멘올 화합물과 LPS를 처리한 후 세포 용해물 전체를 수득하였고, 이를 이용한 western blot 분석을 통해 MAPKs와 Akt의 인산화 정도를 확인하였다. 또한, Wortmannin (Akt 억제제) 또는

sargachromenol을 각각 2 시간 전처리 후, LPS를 24시간 자극한 다음 NO 생성량을 griess 시약으로 반응시켜 측정하였다.

[0135] 분석결과, 본 발명의 Sargachromenol은 Akt의 인산화를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났고(도 17a 참조), 나아가 Wortmannin (Akt 억제제) 또는 sargachromenol을 각각 2 시간 전처리 후, LPS를 24시간 결과, NO 생성량도 억제되는 것으로 나타났다(도 17b 참조).

[0136] **<실험예 16>**

[0137] **사가퀴노익산의 NO와 PGE_2 생성량 억제 및 세포 독성 시험**

[0138] 사가퀴노익산 화합물을 BV-2 세포에 2시간 전처리 후, LPS (0.1 mg/mL)를 24시간 처리하였다. NO의 농도는 배지(100 mL)와 Griess 시약 (0.1% naphtylethylene diamine dihydrochloride + 1% sulfanilamide + 5% phosphoric acid)을 동일한 비율로 반응시켜 microplate reader로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 세포독성 여부의 확인을 위해 BV-2 cell을 96-well plate 에 $5*10^4$cells/well로 분주하고 37도에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 농도별로 희석된 DMEM 배지로 교체하여 2시간 배양하였고, LPS가 든 DMEM 배지에 다시 24시간 배양하였다. MTS 시험 키트를 사용하여 세포 생존율을 확인하였다. MTS 용액은 FBS-free DMEM에 5%(v/v)농도로 섞어 100 ml씩 처리하였다. 1시간 후에 microplate reader를 사용하여 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0139] 분석결과, 도 18에 나타낸 바와 같이, 사가퀴노익산 화합물은 농도 의존적으로 NO와 PGE_2 생성량을 억제하는 것으로 나타났고, 반면 세포에는 독성을 유발시키지 않는 것으로 나타났다.

[0140] **<실험예 17>**

[0141] **사가퀴노익산의 iNOS 및 COX-2의 mRNA와 단백질 발현에 미치는 영향분석**BV-2 ($1*10^6$cells/well) 세포에 사가퀴노익산을 농도별로 처리한 후, LPS (0.1 mg/mL)를 4시간 또는 16시간 동안 처리하여 세포를 자극하였다. 이후 iNOS와 COX-2의 단백질 발현은 western blot으로 확인하였다.

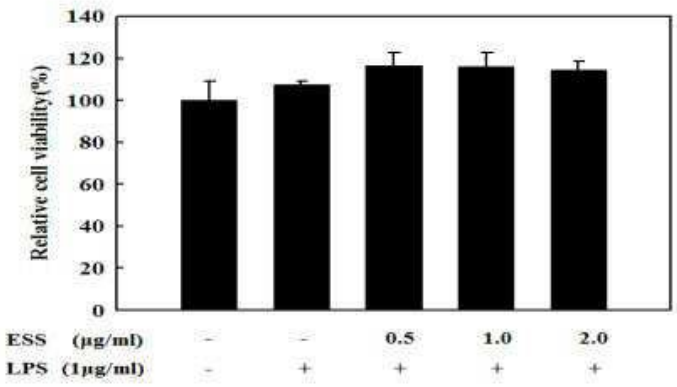
[0142] 분석결과, 도 19에 나타낸 바와 같이, 사가퀴노익산 처리 농도 의존적으로 iNOS 및 COX-2의 단백질 양이 감소되는 것으로 나타났다.

[0143] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 궁극적으로 톱니모자반의 주정추출물과 상기 추출물로부터 분리된 화합물인 사카크로멘올, 사가퀴노익산 및 사가하이드로퀴노익산이 모두 항염활성이 우수하고 치매치료를 위한 의약 및 기능성 식품 소재로 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

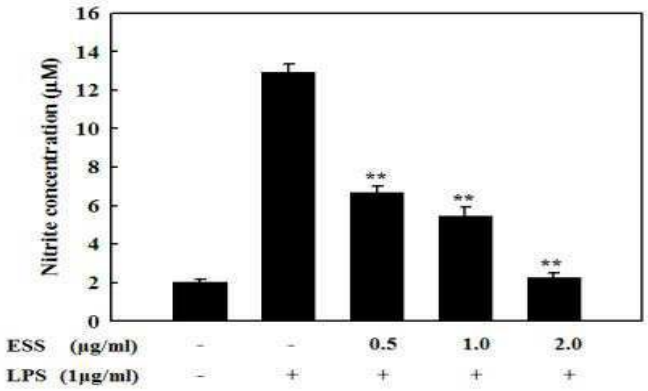
[0144] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

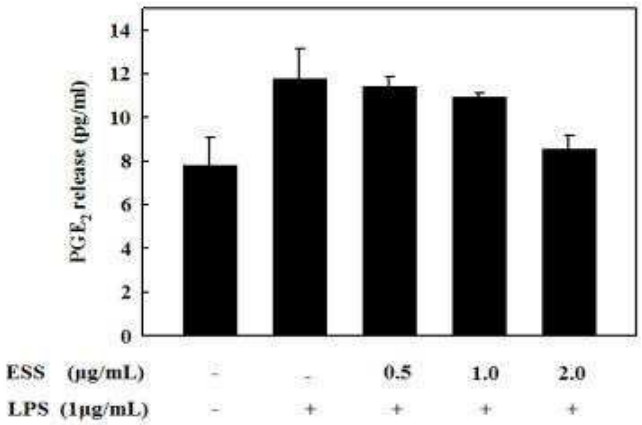
도면1



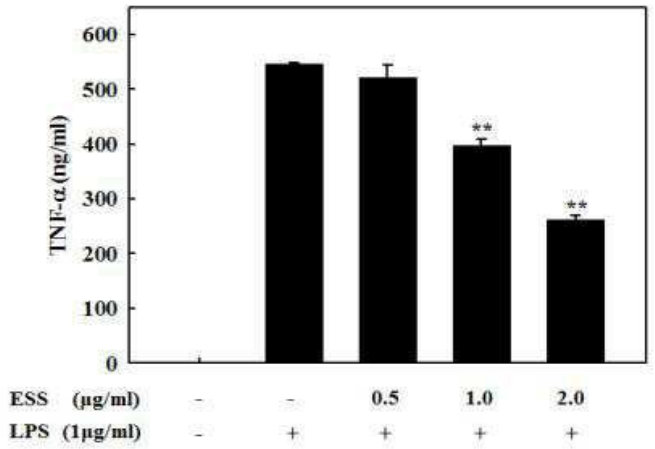
도면2



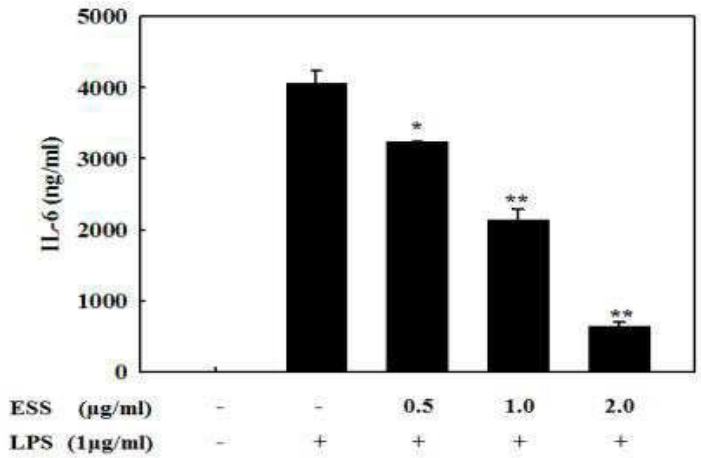
도면3



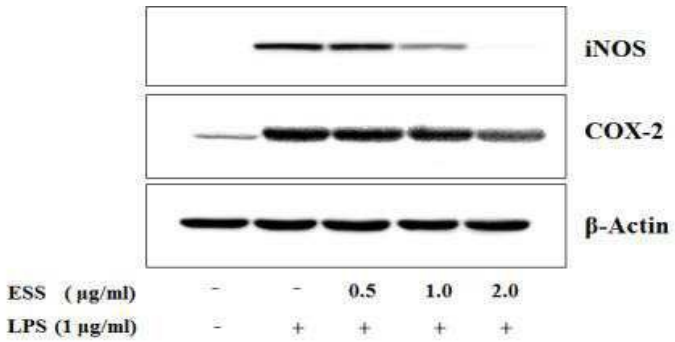
도면4


600
500
400
300
200
100
0
TNF-α (ng/ml)
**
**
ESS (μg/ml) - - 0.5 1.0 2.0
LPS (1μg/ml) - + + + +

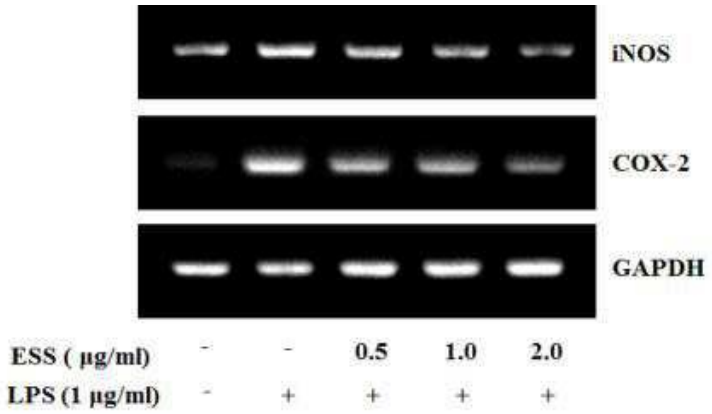
도면5


5000
4000
3000
2000
1000
0
IL-6 (ng/ml)
*
**
**
ESS (μg/ml) - - 0.5 1.0 2.0
LPS (1μg/ml) - + + + +

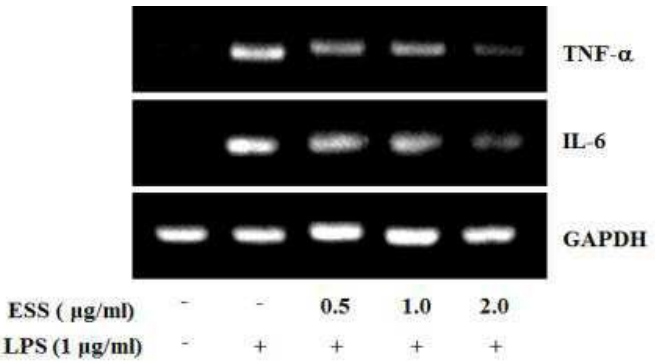
도면6


iNOS
COX-2
β-Actin
ESS (μg/ml) - - 0.5 1.0 2.0
LPS (1 μg/ml) - + + + +

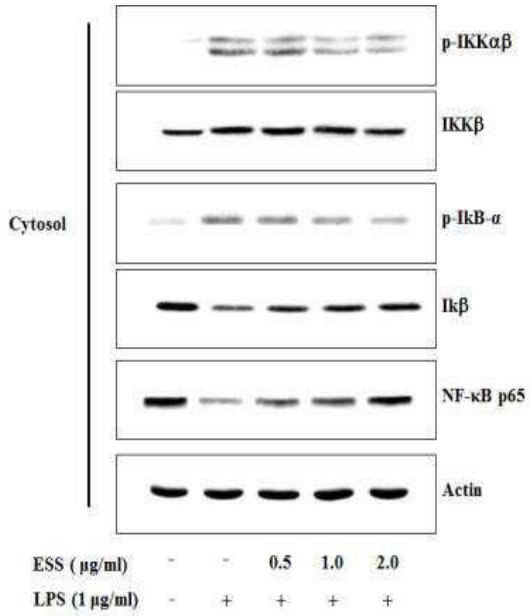
도면7


iNOS
COX-2
GAPDH
ESS (μg/ml) - - 0.5 1.0 2.0
LPS (1 μg/ml) - + + + +

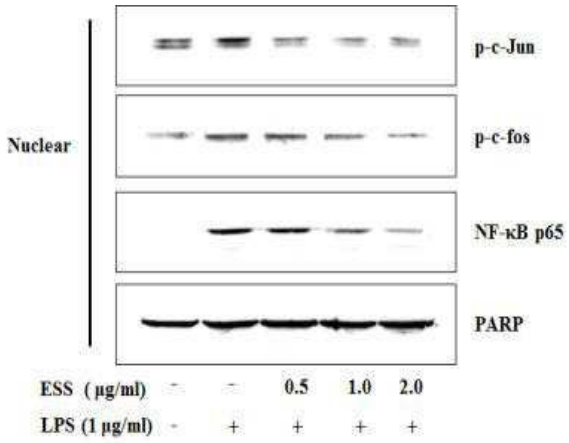
도면8


TNF-α
IL-6
GAPDH
ESS (μg/ml) - - 0.5 1.0 2.0
LPS (1 μg/ml) - + + + +

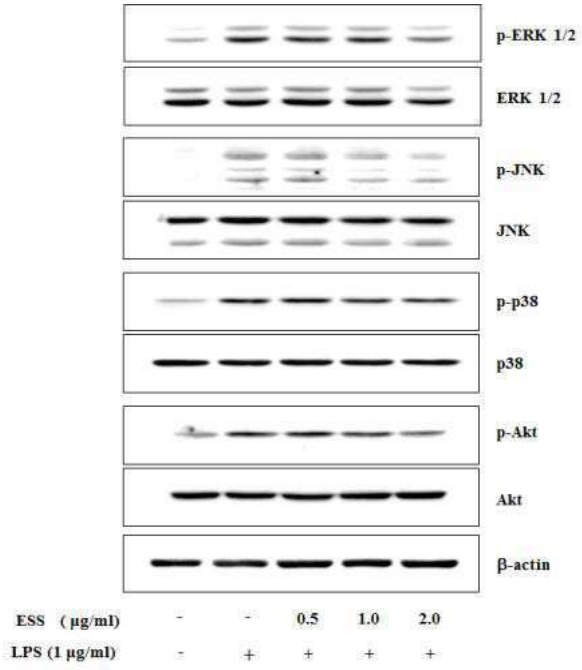
도면9


Cytosol
p-IKKαβ
IKKβ
p-IkB-α
Ikβ
NF-κB p65
Actin
ESS (μg/ml) - - 0.5 1.0 2.0
LPS (1 μg/ml) - + + + +

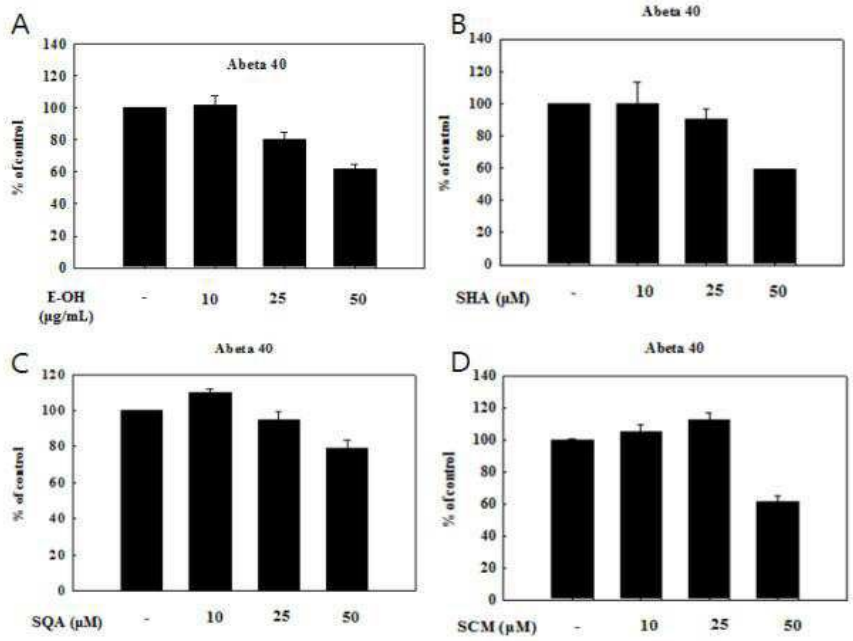
도면10


Nuclear
p-c-Jun
p-c-fos
NF-κB p65
PARP
ESS (μg/ml) - - 0.5 1.0 2.0
LPS (1 μg/ml) - + + + +

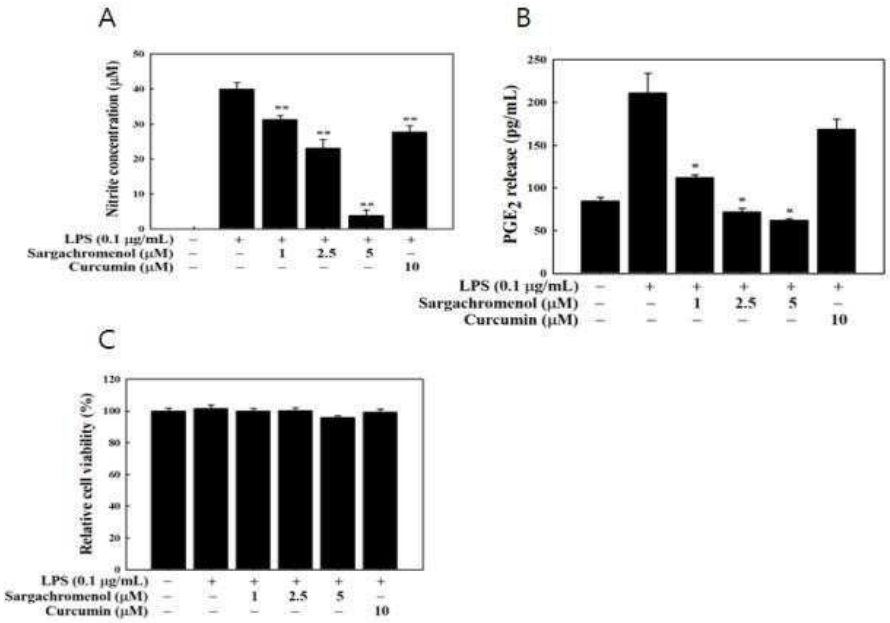
도면11


p-ERK 1/2
ERK 1/2
p-JNK
JNK
p-p38
p38
p-Akt
Akt
β-actin
ESS (μg/ml) - - 0.5 1.0 2.0
LPS (1 μg/ml) - + + + +

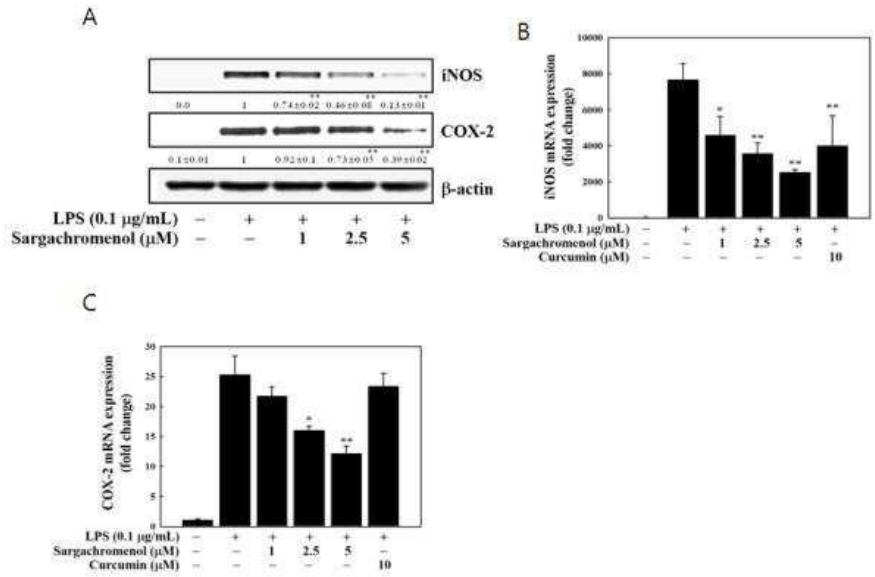
도면12


A
Abeta 40
% of control
E-OH (μg/mL)
B
Abeta 40
% of control
SHA (μM)
C
Abeta 40
% of control
SQA (μM)
D
Abeta 40
% of control
SCM (μM)

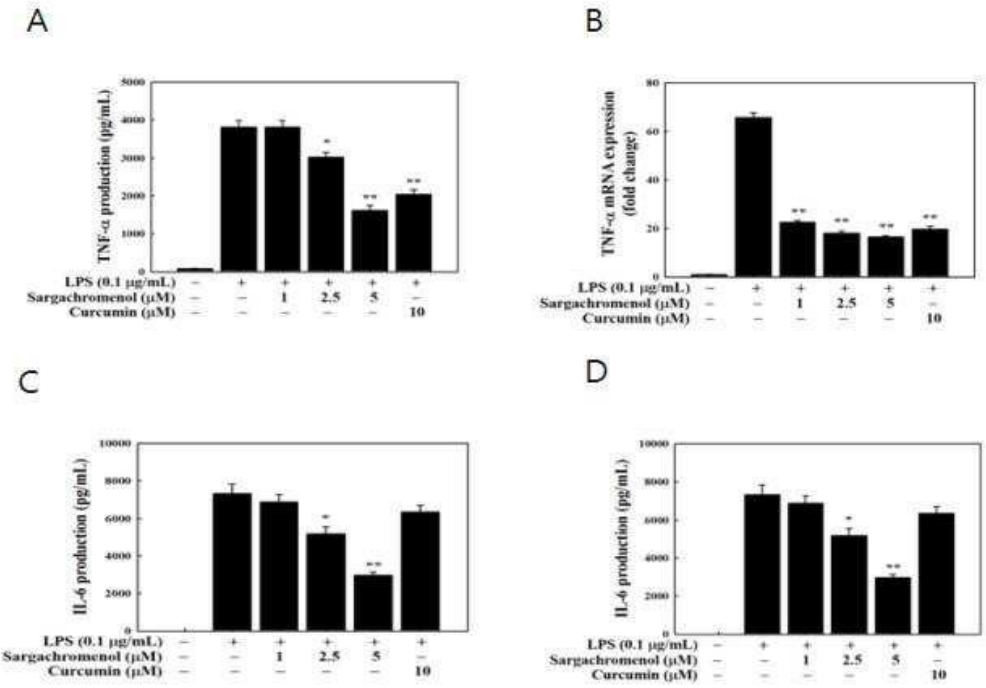
도면13


A
Nitrite concentration (μM)
LPS (0.1 μg/mL)
Sargachromenol (μM)
Curcumin (μM)
B
PGE2 release (pg/mL)
LPS (0.1 μg/mL)
Sargachromenol (μM)
Curcumin (μM)
C
Relative cell viability (%)
LPS (0.1 μg/mL)
Sargachromenol (μM)
Curcumin (μM)

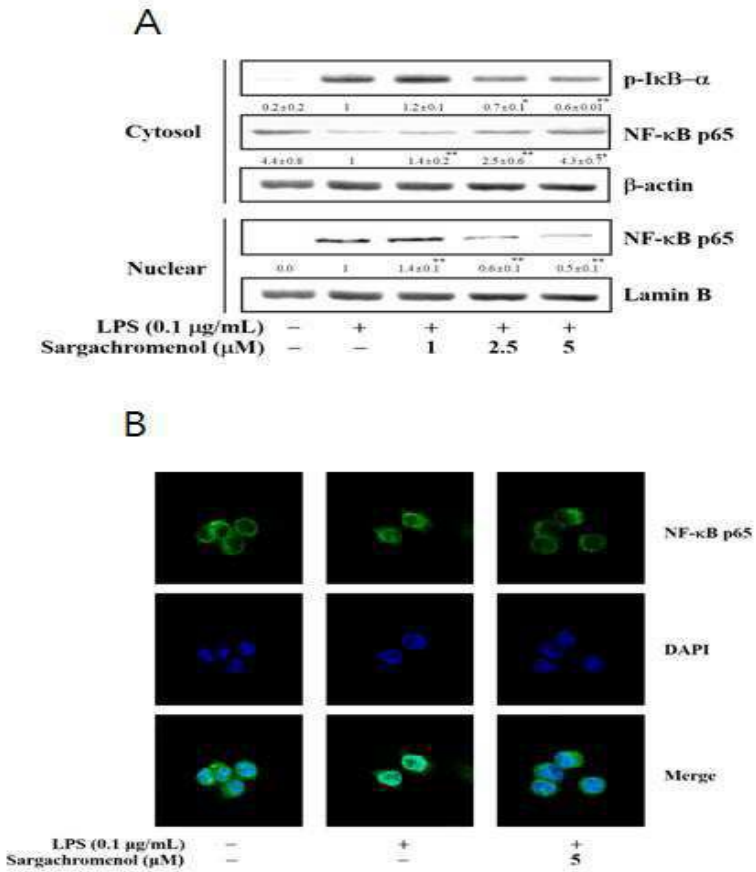
도면14


A
iNOS
COX-2
β-actin
LPS (0.1 μg/mL)
Sargachromenol (μM)
B
iNOS mRNA expression (fold change)
Curcumin (μM)
C
COX-2 mRNA expression (fold change)

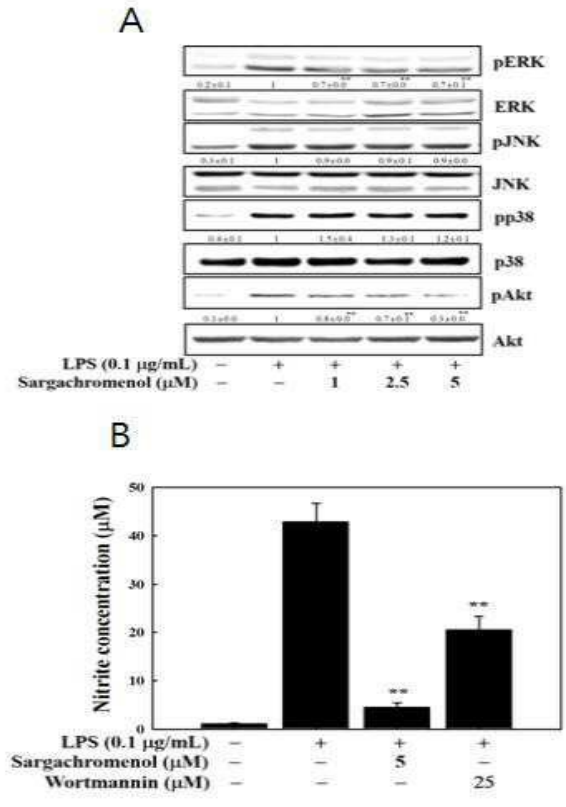
도면15


A
TNF-α production (pg/mL)
B
TNF-α mRNA expression (fold change)
C
IL-6 production (pg/mL)
D
IL-6 production (pg/mL)
LPS (0.1 μg/mL)
Sargachromenol (μM)
Curcumin (μM)

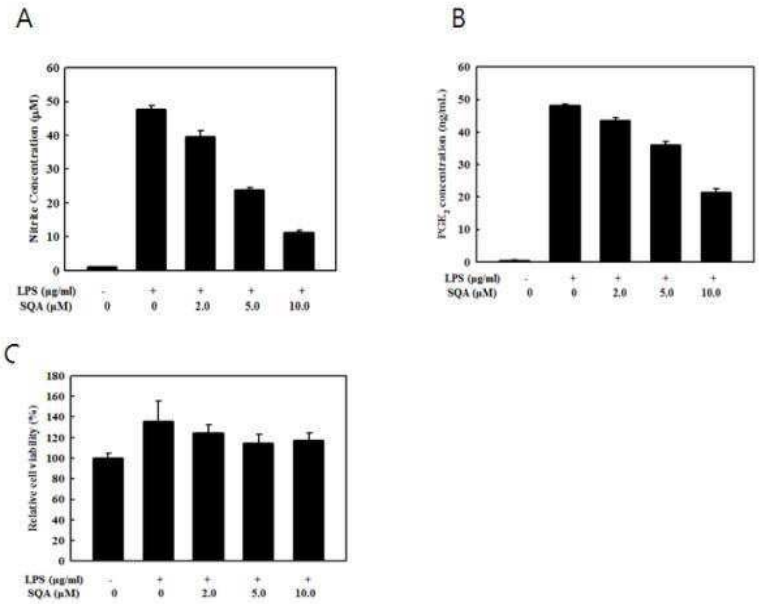
도면16


A
Cytosol
Nuclear
p-IκB-α
NF-κB p65
β-actin
NF-κB p65
Lamin B
LPS (0.1 μg/mL) – + + + +
Sargachromenol (μM) – – 1 2.5 5
B
NF-κB p65
DAPI
Merge
LPS (0.1 μg/mL) – + +
Sargachromenol (μM) – – 5

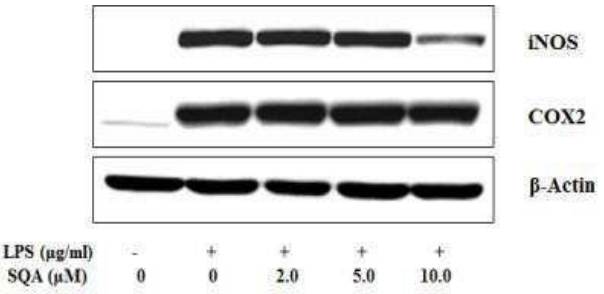
도면17


A
pERK
ERK
pJNK
JNK
pp38
p38
pAkt
Akt
LPS (0.1 μg/mL) – + + + +
Sargachromenol (μM) – – 1 2.5 5
B
Nitrite concentration (μM)
50
40
30
20
10
0
**
**
LPS (0.1 μg/mL) – + + +
Sargachromenol (μM) – – 5 –
Wortmannin (μM) – – – 25

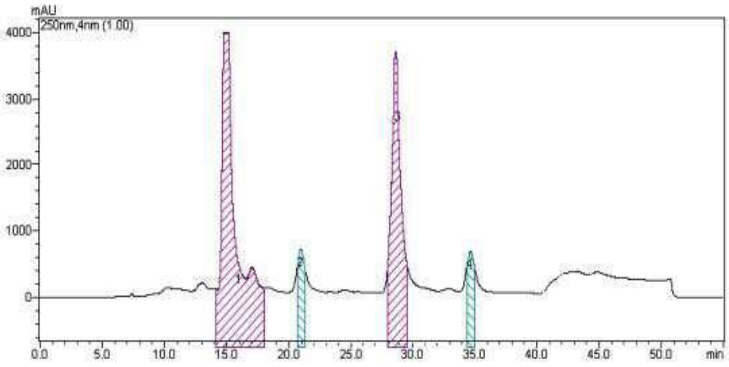
도면18



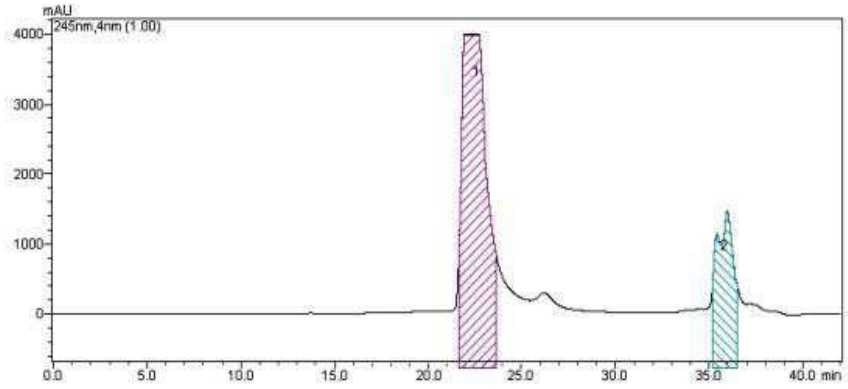
도면19



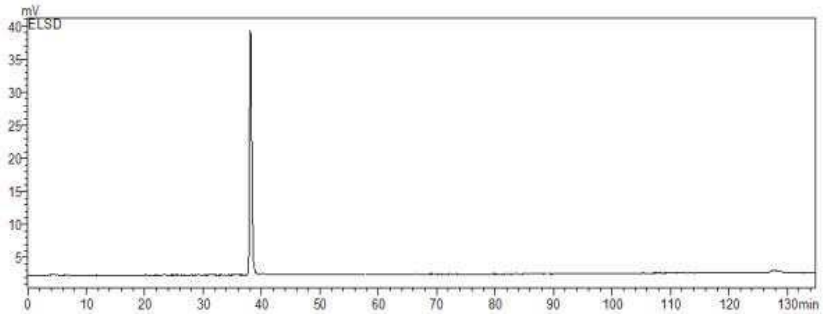
도면20



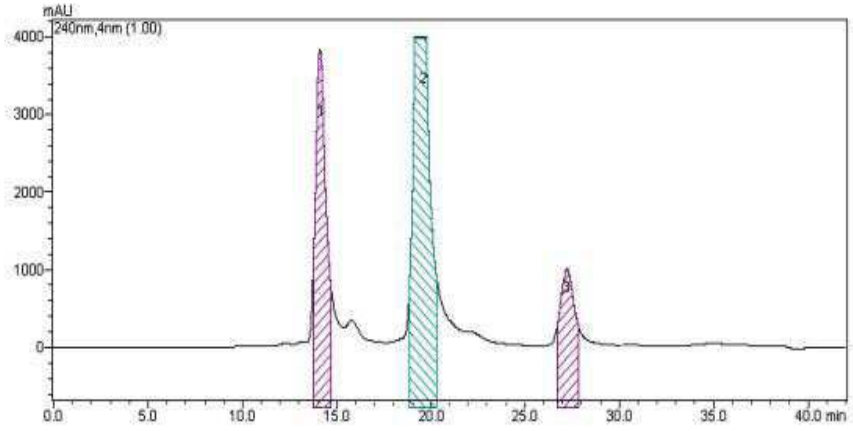
도면21



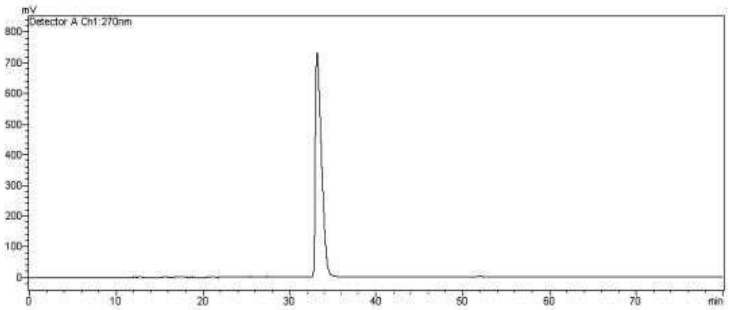
도면22



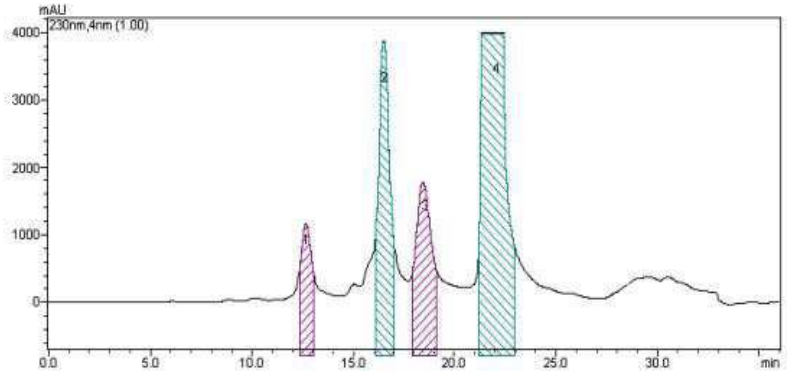
도면23



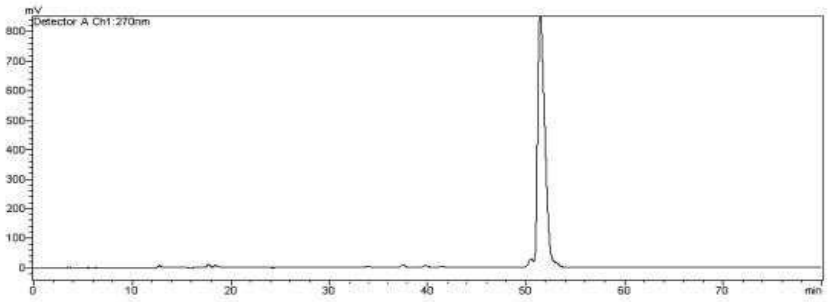
도면24



도면25


mAU
230nm,4nm (1.00)
4000
3000
2000
1000
0
1
2
3
4
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
min

도면26


mV
Detector A Ch1 270nm
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
70
min