(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0135177
(43) 공개일자 2019년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 36/71* (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
*A61K 31/7048* (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
*A61P 25/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 36/71* (2013.01)
*A23L 33/10* (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0060294
(22) 출원일자 2018년05월28일
심사청구일자 2018년05월28일

(71) 출원인
**한국과학기술연구원**
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
**단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단**
충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교천안캠퍼스내(안서동)
**충남대학교산학협력단**
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
**양현옥**
강원도 강릉시 사임당로 679
**김영호**
대전광역시 유성구 봉명로 48, 801동 302호 인스빌리베라
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**손민**

전체 청구항 수 : 총 14 항

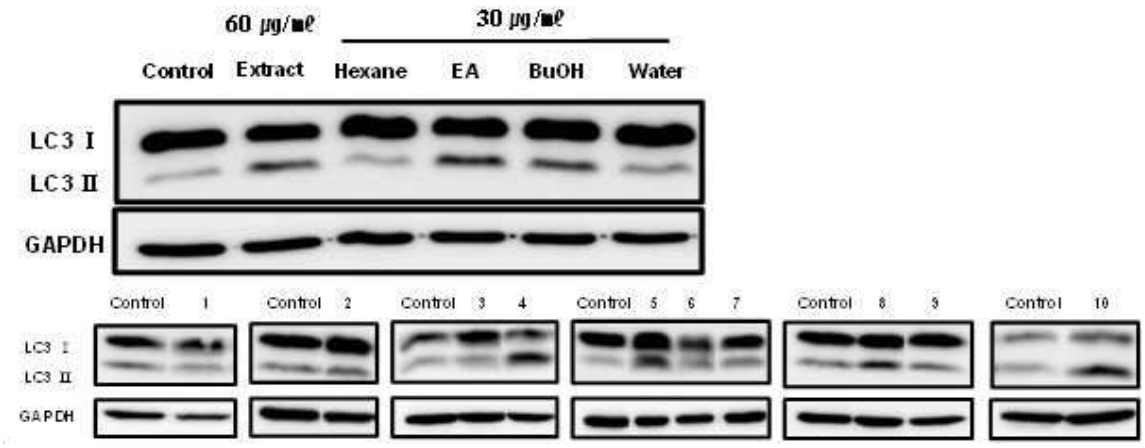
(54) 발명의 명칭 **승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마에서 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 승마 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 상기 약학 조성물을 이용한 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료 방법, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물 및 사료 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 승마 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물은 자가포식에 관여하는 단백질의 양을 단백질의 양을 특이적으로 촉진시키는 것을 특징으로 하며, 구체적으로 승마 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물은 자가포식소체의 막 단백질인 LC3 단백질의 발현을 증가시키고, 자가포식을 억제하는 mTOR의 단백질의 발현을 억제시키는 효과가 뛰어나며, 더 나아가 치매의 원인물질인 베타-아밀로이드의 생성 및 기억력 손상의 억제 효과가 우수하므로 파킨슨병, 알츠하이머병, 치매와 같은 퇴행성 뇌질환의 치료 및 인지장애 개선에 효과적으로 사용될 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***A61K 31/7048*** (2013.01)
***A61P 25/16*** (2018.01)
***A61P 25/28*** (2018.01)
*A23V 2002/00* (2013.01)
*A23V 2200/322* (2013.01)
(72) 발명자
**박소영**
서울특별시 강남구 삼성동 4-5 한솔아파트 102동 407호
**천윤선**
강원도 강릉시 사임당로 679
**장리준**
강원도 강릉시 사임당로 679
**이상빈**
강원도 강릉시 사임당로 679
**박정윤**
강원도 강릉시 사임당로 679

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711055654
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발
연구과제명 유망 자원식물의 실용화 기반 연구
기 여 율 1/1
주관기관 한국과학기술연구원
연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

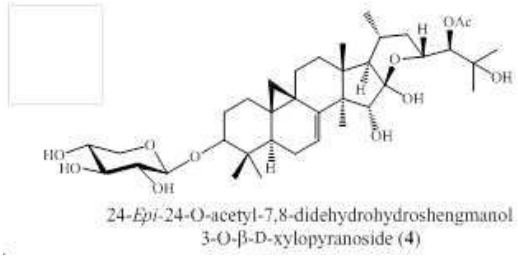
# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

승마 추출물, 이의 분획물 또는 하기의 화학식의 화합물 24-에피-24-O-아세틸-7,8-다이디하이드로하이드로셩마놀 3-O-β-D-자일로피라노사이드(24-Epi-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside)을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식]




24-*Epi*-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside (4)

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 승마로부터 유래된 것인, 약학적 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 승마 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 및 그의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 용매에 의한 추출물인 것인, 약학적 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분획물은 헥산(n-hexane), 에틸 아세테이트(EA), 부탄올(n-BUOH) 또는 물로 분획되는 것인, 약학적 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매 또는 파킨슨병인, 약학적 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 치매는 알츠하이머병, 혈관성 치매 및 노인성 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학적 조성물.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 자가포식 기능을 활성화하는 것인, 약학적 조성물.

### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 LC3 단백질의 발현을 증가시키고, mTOR 단백질의 발현을 억제하는 것인, 약학적 조성물.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 조성물은 베타-아밀로이드 생성 및 기억력 손상을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

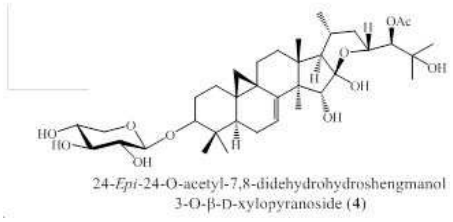
### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료방법.

**청구항 11**

승마 추출물, 이의 분획물 또는 하기의 화학식의 화합물 24-에피-24-O-아세틸-7,8-다이디하이드로하이드로셩마놀 3-O-β-D-자일로피라노사이드(24-Epi-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside)을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

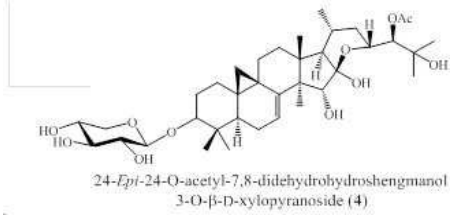
[화학식]




**청구항 12**

승마 추출물, 이의 분획물 또는 하기의 화학식의 화합물 24-에피-24-O-아세틸-7,8-다이디하이드로하이드로셩마놀 3-O-β-D-자일로피라노사이드(24-Epi-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside)을 유효성분으로 포함하는, 학습 또는 기억력 개선 또는 인지기능 개선용 식품 조성물.

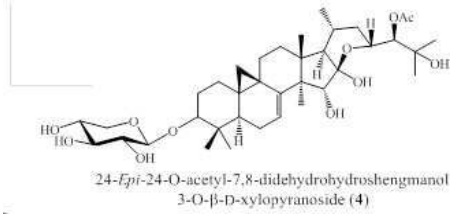
[화학식]




**청구항 13**

승마 추출물, 이의 분획물 또는 하기의 화학식의 화합물 24-에피-24-O-아세틸-7,8-다이디하이드로하이드로셩마놀 3-O-β-D-자일로피라노사이드(24-Epi-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside)을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 사료 조성물.

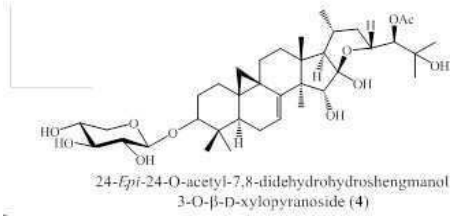
[화학식]




**청구항 14**

승마 추출물, 이의 분획물 또는 하기의 화학식의 화합물 24-에피-24-O-아세틸-7,8-다이디하이드로하이드로셩마놀 3-O-β-D-자일로피라노사이드(24-Epi-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside)을 유효성분으로 포함하는, 학습 또는 기억력 개선 또는 인지기능 개선용 사료 조성물.

[화학식]




24-*Epi*-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside (4)

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 승마(*Cimicifuga dahurica*) 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 최근 평균수명의 증가로 인한 고령화 현상이 사회적 문제로 대두됨에 따라 노인 인구의 증가와 함께 퇴행성 뇌질환(degenerative brain disease)에 대한 연구의 중요성이 강조되고 있다. 퇴행성 뇌질환은 노화에 따른 신경퇴화와 유전적 또는 환경적 요인들로 인하여 단백질이 응집되어 신경세포가 사멸하면서 야기되는 것으로 알려져 있으며, 퇴행성으로 변한 신경 때문에 운동 작용이나 기억, 인지 등에 장애가 발생한다. 퇴행성 뇌질환은 주요 증상과 침범되는 뇌 부위를 고려하여 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병 (Huntington's disease), 다발성 경화증, 루게릭병 등이 포함된다.

[0003] 가장 흔한 퇴행성 뇌질환으로 알려진 알츠하이머병은 신경세포의 손상 및 손실로 점진적인 기억력, 집중력, 사고력, 학습능력, 언어능력 및 판단력 등의 심한 장애가 진행되어 정신능력과 사회적 활동 능력의 소실에 이르게 하는 질환이다. 알츠하이머병의 주요한 신경병리 소견은 베타-아밀로이드(β-amyloid; Aβ)와 과인산화된 타우(tau) 단백질이 응집하여 침착되는 것이다. 뇌 신경세포 밖에는 베타-아밀로이드가 축적되어 엉키게 되어 노인반(senile plaque)이 형성되고 그로 인해 신경독성이 야기되며, 신경세포 안에서는 과인산화된 타우단백질로 이루어진 신경섬유농축제(neurofibrillary tangle)이 축적되면서 알츠하이머병이 발병하는 것으로 알려져 있다 (Probst et al., Brain Pathol. 1, 229-239, 1991).

[0004] 아세틸콜린(acetylcholine)계, 글루타민산(glutamic acid), 신경펩티드(neuropeptides)계 및 모노아민(monoamine)계에서의 기능저하 또한 알츠하이머병 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Coyle et al. Science, 219, 1184-1190, 1983; Gottfries et al. Psychopharmacology, 86, 245-252, 1985). 이에 따라, 시냅스에서 아세틸콜린의 제거되는 비율을 늦추면서 증상을 개선하는 아세틸콜린 분해효소(acetylcholinesterase) 활성 저해제들(타크린(tacrine), 도네페질(donepezil) 등)이 치료제로 사용되고 있으나, 간독성, 구토, 오심 설사 등 심각한 부작용의 문제점이 알려져 있다. $Ca^{2+}$에 의한 신경세포의 사멸을 억제하는 NMDA 수용체 길항제(Memantine) 또한 치료제로 사용되고 있지만 모두 증상 완화를 목적으로 사용되고 있어, 근본적인 치료 효과를 보이는 치료제 개발이 여전히절실히 요구되고 있다.

[0005] 이에 따라, 원인적인 치료가 가능한 알츠하이머병 치료제를 개발하기 위해 여러 가지 연구가 진행되고 있으며, 그 중 하나로 베타-아밀로이드의 생성을 억제할 수 있는 물질을 개발하기 위해 노력하고 있다.

[0007] 파킨슨병은 알츠하이머병 다음으로 발병률이 높은 질환으로 만성적이고 진행성으로 나타나며 팔, 다리, 얼굴의 떨림이나 마비, 자세 불안정 등의 운동성 장애와 병이 진행되면서 통증, 우울증, 치매 등을 동반하게 된다. 발병 원인을 규명하기 위해 지난 수 십 년간 연구가 진행되어 왔으나, 정확한 원인과 기전에 대해 밝혀진 바가 없다. 다만 파킨슨병 환자에게 나타나는 병리학적 요인으로 중뇌의 흑색질(substantia nigra par compacta)이 손상되면서 신경전달물질인 도파민을 분비하는 신경세포의 비정상적인 사멸이 알려져 있다. 도파민 신경세포의 비정상적인 사멸은 유전, 노화, 환경 등의 여러 요인에 의한 미토콘드리아 기능 저하와 단백질 분해 시스템의 장애에 의해 비정상적인 단백질과 세포소기관들이 분해되지 못하고 축적되면서 발생하게 된다. 따라서, 단백질 분해 시스템의 중요성이 강조되고 있다.

[0008] 파킨슨병의 치료 약물로는 레보도파(Levodopa; L-dopa), 도파민 작용제, 항콜린제제 등이 있으며, 이 중에서 가장 강력한 효과를 보이는 약물이 레보도파이다. 이는 도파민의 전구물질인 레보도파를 직접 주입하여 혈중 도파민 농도를 증가시켜주는 치료법으로 파킨슨병 환자들에게 실질적인 증상 완화를 가져오지만, 대다수의 환자들이 투약 후 5-10년이 경과하면 운동 반응의 변동과 운동 이상과 같은 부작용을 초래하는 것으로 알려져 있다 (Rock and Peterson, J Neuroimmune Pharmacol. 1, 117-126, 2006). 따라서, 근본적인 파킨슨병의 치료를 위해 신경세포의 보호 및 사멸을 억제할 수 있는 약물의 개발이 시급하며 그 중 하나로 단백질 분해 시스템 중 하나인 자가포식작용을 표적으로 하는 치료제 연구가 진행되고 있다.

[0009] 자가포식작용, 즉 오토파지(Autophagy)는 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(ubiquitin-proteasome system)과 함께 세포 내 주요 단백질 분해 시스템으로 노화되거나 제 기능을 못하게 된 세포 소기관 및 손상된 단백질을 분해함으로써 세포의 항상성과 유전적인 안정성 유지한다. 자가포식작용은 오토파고좀의 전구체인 파고폴의 가장자리가 점점 연장되어 불필요한 단백질을 에워싸 소포체인 오토파고좀을 형성하고, 오토파고좀이 미세소관을 따라 이동하여 세포 내 라이소좀과 융합하면서 오토라이소좀을 형성하면서, 라이소좀 내부에서 분비되는 단백질분해효소에 의해 단백질을 분해하면서 이루어진다. 따라서 오토파지가 저하될 경우, 변성단백질의 축적이 야기되어 신경변성질환이 발생하는 것으로 알려져 있다 (Rubinsztein et al., Nature reviews 6, 304-312, 2007; Dehay et al., The Journal of neuroscience 30, 12535-12544, 2010).

[0010] 퇴행성 뇌질환 치료를 위해 자가포식작용을 활성화하는 연구가 진행되고 있다. 알츠하이머병 동물모델에서 자가포식 작용을 억제하는 mTOR 저해제인 라파마이신(rapamycin)에 의해 베타-아밀로이드와 타우의 생성이 감소하고 인지력이 증진되었으며 (Caccamo et al., Mol. Neurodegener. 5, 51, 2010), 파킨슨병 동물모델에서 과발현된 돌연변이 알파 시누클레인(α-synuclein) 단백질 응고체를 제거함을 확인하였다 (Webb et al., J. Biol. Chem., 278, 25009-25013, 2003). 또한 리튬에 의한 자가포식작용의 유도에 의해 파킨슨병 동물모델에서 알파 시뉴클레인 단백질 응고체가 감소되었다 (Sarkar et al., J. Cell Biol. 170, 1101-1111, 2005).

[0012] 승마(*Cimicifuga dahurica*)는 미나리아재비과(Ranunculaceae) 승마속에 속하는 식물로, 국내에는 왜승마, 눈빛승마, 개승마 등 약 10종이 자라고 있다. 숲이나 산비탈의 수풀 속에서 자라며 뿌리줄기는 굵은 마디 모양으로 길이 6~8cm, 지름 10~25cm이고 약용으로 사용한다. 승마 추출물은 인슐린 분비를 조절하며, 줄기세포 증식 또는 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 승마의 유효성분으로 알려진 비스나진(visnagin)은 혈압을 강화시키고 칼슘 유입을 억제하면서 혈관 평활근 수축을 억제하는 것으로 보고되었다. 그러나 승마 추출물이나 화합물에 의한 자가포식작용 활성화 및 알츠하이머병, 파킨슨병이나 기억력과 관련해서 구체적으로 연구된 바가 없다.

[0013] 이에 따라, 본 발명자는 도파민성 세포주와 파킨슨병 동물 모델에서 승마(*Cimicifuga dahurica*) 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물이 파킨슨병의 원인 중 하나인 자가포식에 관여하는 자가포식소체 막 단백질인 LC3-Ⅱ의 생성을 특이적으로 촉진하며 자가포식을 억제하는 mTOR의 단백질의 발현을 억제시키는 효과, 치매의 원인물질인 베타-아밀로이드의 생성 저해 효과 및 기억력 손상을 억제하는 효과를 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0015] 본 발명의 하나의 목적은 승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다

[0017] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 학습 또는 기억력 개선 또는 인지기능 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

## 과제의 해결 수단

[0021] 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0023] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 승마(*Cimicifuga dahurica*) 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 용어, "승마"는 학명이 시미시푸가 다후리카(*Cimicifuga dahurica*) 이며, 본 발명에서 상기 식물의 지상부를 추출하여 사용할 수 있고, 구체적으로는 상기 식물의 잎, 줄기를 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는 뿌리 모양을 하고 땅속으로 뻗어가는 줄기인 뿌리줄기를 사용할 수 있으나, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0025] 상기 승마는 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 용어, "추출물"은 승마를 추출 처리하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0027] 상기 승마를 추출하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비 제한적인 예로는, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 상기 승마를 추출하는데 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물, C1 내지 C4의 알코올 및 이들의 혼합 용매 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있다.

[0029] 또한, 상기 추출물은 추출 후 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있지만, 이제 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 용어, "분획물"은 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[0031] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 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, 및 이들의 조합 등이 있다. 구체적으로, 본 발명의 벌개미취를 추출하여 얻은 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 들 수 있다.

[0032] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 등의 극성 용매; 헥산(Hexan), 에틸 아세테이트(Ethyl acetate), 클로로포름(Chloroform), 디클로로메탄(Dichloromethane) 등의 비극성 용매; 또는 이들의 혼합용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 구체적으로, 헥산, 에틸 아세테이트, 부탄올(butanol) 또는 물이 단독으로 사용되거나 1종 이상 혼합하여 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

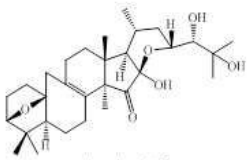
[0033] 또한, 상기 추출물 또는 분획물은 추출 후 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있지만, 이제 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 용어, "화합물"은 아세리오놀(acerionol; 화합물 1), 시미리카사이드 F(cimiricaside F; 화합물 2), 시미리카사이드 B(cimiricaside B; 화합물 3), 24-에피-24-O-아세틸-7,8-다이디하이드로하이드로셩마놀 3-O-β-

D-자일로피라노사이드(24-Epi-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside; 화합물 4), 시미시페논(cimiciphenone; 화합물 5), 시미라세마이트 A(cimiracemate A; 화합물 6), (E)-3-(3'-메틸-2'-부테닐리덴)-1-메틸-2-인돌리논((E)-3-(3'-methyl-2'-butenylidene)-1-methyl-2-indolinone; 화합물 7), (E)-3-(3'-메틸-2'-부테닐리덴)-2-인돌리논((E)-3-(3'-methyl-2'-butenylidene)-2-indolinone; 화합물 8), 3'-O-아세틸-24-에피-7,8-다이디하이드로시미제놀-3-O-β-D-자일로피라노사이드(3'-O-acetyl-24-epi-7,8-didehydrocimigenol-3-O-β-D-xylopyranoside; 화합물 9), 시미아세로사이드 B(Cimiaceroside B; 화합물 10)이고, 하기 화학식 1 내지 10으로 표시된다. 상기 화합물들은 일 예로 승마로부터 유래되어 자가포식 활성화 유도 효과를 가지며, 이를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물, 식품 조성물, 사료 조성물은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료 및 학습 또는 기억력 개선 또는 인지기능 개선 효과를 나타낸다.

*화학식 1*

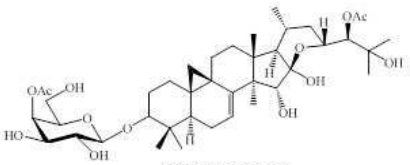
[0035]



Acerionol (**1**)

*화학식 2*

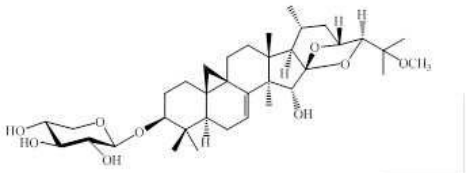
[0036]



Cimiricaside F (**2**)

*화학식 3*

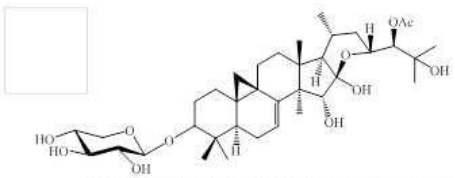
[0037]



Cimiricaside B (**3**)

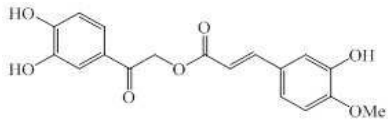
*화학식 4*

[0038]



24-*Epi*-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside (**4**)

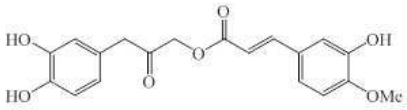
화학식 5



Cimiciphenone (**5**)

[0039]

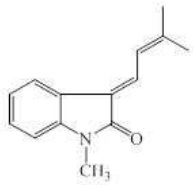
화학식 6



Cimiracemate A (**6**)

[0040]

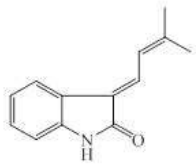
화학식 7



(*E*)-3-(3'-Methyl-2'-butenylidene)-1-methyl-2-indolinone (**7**)

[0041]

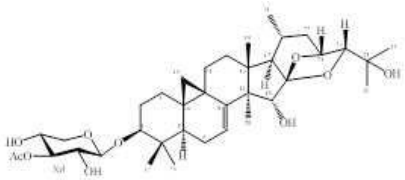
화학식 8



(*E*)-3-(3'-Methyl-2'-butenylidene)-2-indolinone (**8**)

[0042]

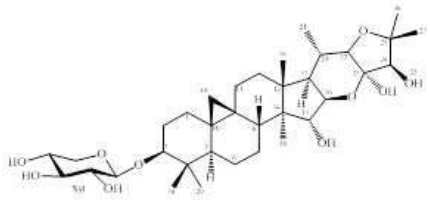
화학식 9



3'-O-acetyl-24-*epi*-7,8-didehydrocimigenol-3-O-β-D-xylopyranoside (**9**)

[0043]

*화학식 10*



Cimiaceroside B (**10**)

[0044]

[0046] 상기 화합물은 상기 화학식 1 내지 10의 구조를 가지는 화합물이며, 다른 식물체에서 유래된 것도 포함될 수 있으며, 구체적으로는 승마에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 용어, "퇴행성 뇌질환"은 나이가 들어감에 따라 발생하는 퇴행성 질환 중에서도 뇌에서 발생하는 질환을 뜻하며 주요 증상과 침범되는 뇌부위에 따라 파킨슨병, 알츠하이머병, 치매 등으로 구분할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시예에 따르면 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병 또는 알츠하미머병일 수 있다.

[0049] 본 발명의 용어, "치매(dementia)"는 정상적으로 생활해오던 사람이 다양한 원인에 인해 뇌기능이 손상되면서 이전에 비해 인지 기능이 지속적이고 전반적으로 저하되어 일상생활에 상당한 지장이 나타나는 질환이며, 알츠하이머병, 혈관성 치매 및 노인성 치매를 포함하는 넓은 개념이다.

[0050] 본 발명의 용어, "알츠하이머병(alzheimer's disease)"은 가장 흔한 퇴행성 뇌질환으로 매우 서서히 발병하여 점진적으로 진행되는 경과가 특징적이며 초기에는 주로 최근 일에 대한 기억력에서 문제를 보이다가 진행하면서 언어기능이나 판단력 등 다른 여러 인지기능의 이상을 동반하게 되다가 결국에는 모든 일상 생활 기능을 상실하게 되는 질환이다.

[0051] 본 발명의 용어, "혈관성 치매(vascular dementia)"는 뇌혈관 질환에 의해 뇌조직이 손상을 입어 나타나는 치매를 가리킨다. 기억력 감퇴, 언어 능력 저하, 시공간파악능력 저하, 판단력 및 일상생활 수행능력의 저하 등의 인지기능 저하, 무감동, 우울, 불안, 망상, 환각, 배회, 공격성, 자극 과민성, 이상 행동, 식이 변화, 수면 장애 등의 정신행동 이상 외에 비교적 초기 단계부터 편측운동 마비, 편측감각저하 또는 소실, 시야장애, 안면 마비, 발음 이상, 삼키기 곤란, 보행장애, 사지 경직 등 다양한 신경학적 이상 증상이 동반된다.

[0052] 본 발명의 용어, "노인성 치매(senile dementia)"는 정상적으로 생활해오던 사람이 65세 이후 다양한 원인에 의해 뇌기능이 손상되면서 이전에 비해 인지 기능이 지속적이고 전반적으로 저하되어 일상생활에 상당한 지장을 주게 되는 질환이다.

[0053] 본 발명의 용어, "파킨슨병(Parkinson's disease)"은 뇌의 흑질(substantia nigra)에 분포하는 도파민의 신경세포가 점차 소실되어 발생하며 안정떨림, 경직, 운동완만(운동느림) 및 자세 불안정성이 특징적으로 나타나는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환이다.

[0054] 본 발명의 용어, "예방"은 승마 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 본 발명의 약학적 조성물의 투여에 의해 퇴행성 뇌질환의 진행을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0055] 본 발명의 용어, "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 퇴행성 뇌질환이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0056] 본 발명의 "약학적 조성물"은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occuring carrier)를 포함할 수 있다.

[0057] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0058] 상기 "약학적으로 허용가능한"은 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[0059] 구체적으로, 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 또한, 본 발명의 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제조될 수 있다.

[0062] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0063] 이때, 상기 퇴행성 뇌질환, 예방 및 치료의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0064] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미한다.

[0065] 본 발명의 용어, "개체"는 파킨슨병이 발병하였거나, 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0066] 보다 구체적으로, 상기 “개체”는 반려동물을 포함할 수 있다. 상기 반려동물은 인간과 함께 더불어 사는 동물을 의미하며, 구체적인 종류로서 개, 고양이, 햄스터, 기니피그 등의 포유류, 앵무새, 카나리아 등의 조류 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 구체적으로, 본 발명의 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료 방법은 개체에 승마 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0068] 상기 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0069] 본 발명의 약학적 조성물은 고형분을 기준으로 1일 0.0001 내지 500 mg/체중 kg으로, 더욱 구체적으로 0.01 내지 500 mg/체중 kg으로 투여할 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0070] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0071] 본 발명의 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료방법에서, 상기 조성물을 투여하는 투여 경로 및 투여 방식은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 해당 부위에 상기 조성물을 포함하는 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 그 투여 경로의 비제한적인 예로는, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내 또는 흡입 등을 통하여 투여되는 것을 들 수 있다.

[0073] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포

함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0074] 이때, 상기 승마, 추출물, 분획물, 화합물, 퇴행성 뇌질환 및 예방의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0075] 본 발명의 용어, "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0076] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강 식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[0077] 본 발명의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 높은 파킨슨병 개선 효과를 기대할 수 있으므로, 건강 증진 목적으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0078] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 '기능(성)'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 식품의 제형은 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 천연물을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 파킨슨병 개선 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0079] 상기 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다.

[0080] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 본 발명의 추출물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

[0081] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

[0082] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크륨(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0083] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[0085] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0086] 상기 승마, 추출물, 분획물, 화합물, 예방 및 개선에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[0087] 본 발명의 승마 추출물, 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 포함하는 조성물은 가축, 또는 반려동물과 같이 인간 이외의 개체의 퇴행성 뇌질환 발병 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있으며, 기능성 사료첨가제, 또

는 사료용 조성물로 활용할 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 사료 조성물 내 승마 추출물, 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물의 함량은 적용 가축의 종류 및 연령, 적용 형태, 목적하는 효과 등에 따라서 적절하게 조절 가능하며, 예컨대 1 내지 99 중량%, 바람직하게는 10 내지 90 중량%, 더욱 바람직하게는 20 내지 80 중량%로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0089] 본 발명의 사료 조성물은 투여를 위해서 승마 추출물, 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물 이외에 추가로 구연산, 푸마르산, 아디프산, 젖산 등의 유기산; 인산칼륨, 인산나트륨, 중합 인산염 등의 인산염; 폴리페놀, 카테친, 토코페롤, 비타민 C, 녹차 추출물, 키토산, 탄니산 등의 천연 항산화제 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 또는 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0090] 또한, 본 발명의 사료 조성물은 보조성분으로 아미노산, 무기염류, 비타민, 항산화제, 항진균제, 항균제 등과 같은 각종 보조제 및 분쇄 또는 파쇄된 밀, 보리, 옥수수 등의 식물성 단백질 사료, 혈분, 육분, 생선분 등의 동물성 단백질 사료, 동물성 지방 및 식물성 지방 같은 주성분 이외에도 영양 보충제, 성장 촉진제, 소화 흡수 촉진제, 질병 예방제와 함께 사용될 수 있다.

[0091] 본 발명의 사료 조성물을 사료 첨가물로 사용할 경우, 상기 사료 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 사료 조성물의 투여 형태는 비독성 제약상 허용 가능한 담체와 조합하여 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 프로필렌 글리콜일 수 있다. 고체형 담체의 경우에는 정제, 산제, 토로키제 등의 투여 형태일 수 있으며 액체형 담체의 경우에는 시럽제, 액체 현탁액제, 에멀젼제, 용액제 등의 투여 형태일 수 있다. 또한, 투여제는 보존제, 윤화제, 용액 촉진제, 안정화제를 함유할 수 있으며 다른 염증 질환 개선제 및 바이러스 예방상 유용한 물질을 함유할 수도 있다.

[0092] 본 발명의 사료 조성물은 포유류, 가금류, 어류 및 갑각류를 포함하는 다수의 동물 식이 즉, 사료에 적용할 수 있다. 상업용으로 중요한 돼지, 소, 염소 등의 포유류, 코끼리, 낙타 등의 동물원 동물, 개, 고양이 등의 가축에게 사용할 수 있다. 상업적으로 중요한 가금류에는 닭, 오리, 거위 등이 포함되며, 송어와 새우와 같은 상업적으로 사육되는 어류 및 갑각류를 포함 할 수 있다.

[0093] 본 발명에 따른 사료 조성물은 가축사료에 건조 중량 기준으로 1 ㎏ 당 약 10 내지 500 g, 구체적으로는 10 내지 100 g의 양으로 혼합될 수 있고, 완전히 혼합한 후 매쉬로 공급하거나, 추가 가공 공정을 통하여 팰렛화, 팽창화, 압출 공정을 거치는 것이 될 수 있다.

[0095] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 학습 또는 기억력 개선, 또는 인지기능 개선용 식품 조성물 또는 사료 조성물을 제공한다.

[0096] 상기 승마, 추출물, 분획물, 화합물, 예방 및 개선, 식품 또는 사료에 대해서는 상기 설명한 바와 같다.

[0097] 본 발명의 용어, "학습 또는 기억력 개선"이란 학습 기능 저하 또는 기억력 감퇴 증세가 본 발명에 따른 승마 추출물, 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물에 의해서 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명의 용어, "인지기능 개선"이란 인지능력의 감퇴 증세가 본 발명에 따른 승마 추출물, 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물에 의해서 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0098] 본 발명의 하나의 실시예에서는 승마 추출물 및 분획물을 도파민성 세포인 SH-SY5Y 세포주에 처리한 결과, 자가포식소체의 막단백질인 LC3 단백질 발현이 증가됨을 확인하였고, 이를 통해 이로부터 분리된 화합물 4, 5, 6, 7, 8, 10에 의해 LC3 단백질 발현이 증가됨을 확인하였다(실시예 2 참조)

[0099] 본 발명의 구체적 실시예에서는 승마로부터 유래된 화합물(화합물 4)을 도파민성 세포인 SH-SY5Y 세포주에 처리한 결과, 자가포식소체의 막단백질인 LC3 단백질 발현이 증가됨을 확인하였다 (실시예 3-1 참조).

[0100] 본 발명의 다른 구체적 실시예에서는 승마로부터 유래된 화합물(화합물 4)이 mTOR 단백질 발현을 감소시키는 것을 세포실험을 통하여 웨스턴블롯팅으로 확인하였다 (실시예 3-2 참조).

[0101] 본 발명의 다른 구체적 실시예에서는 승마로부터 유래된 화합물(화합물 4)이 SH-SY5Y 세포주에서 25 μM 이상의 농도에서 세포독성을 보이는 것을 확인하였다(실시예 3-3 참조).

[0102] 본 발명의 하나의 구체적 실시예에서는 승마로부터 유래된 화합물(화합물 4)이 MPTP를 통해 파킨슨 질환이 유도된 동물 모델에 투여한 결과, 자가포식작용 유도를 통해 뇌세포 사멸을 효과적으로 억제할 수 있는 활성을 웨스턴블롯팅으로 확인하였다 (실시예 4 참조).

[0103] 본 발명의 또 다른 구체적 실시예에서는 승마 추출물 및 분획물을 아밀로이드 전구체(amyloid precursor protein, APP)가 형질감염된 HeLa 세포주에 처리한 결과, 추출물, EA 분획물, BuOH 분획물에 의해 베타-아밀로이드42 생성이 억제됨을 확인하였다. 또한 이로부터 유래한 화합물 2, 3, 4, 9, 10에 의해 베타-아밀로이드42 생성이 억제됨을 확인하였다 (실시예 5 참조).

[0104] 본 발명의 다른 하나의 실시예에서는 승마로부터 유래된 화합물을 아밀로이드 전구체(amyloid precursor protein, APP)가 형질감염된 CHO 세포주에 처리한 결과, 화합물 1, 2, 3, 4에 의해 베타-아밀로이드40, sAPPβ, β-secretase(BACE1) 생성이 억제됨을 확인하였다 (실시예 6-1 참조).

[0105] 본 발명의 다른 하나의 실시예에서는 승마로부터 유래된 화합물(화합물 4)에 의해 농도 의존적으로 베타-아밀로이드42 생성이 억제됨을 확인하였다. 또한 베타-아밀로이드40 생성이 억제됨을 확인하였다 (실시예 6-2 참조).

[0106] 본 발명의 다른 하나의 실시예에서는 승마로부터 유래된 화합물(화합물 4)에 의해 아밀로이드 전구체(amyloid precursor protein, APP)가 형질감염된 HeLa 세포주에서 세포독성을 보이지 않는 것을 확인하였다 (실시예 6-3 참조).

[0107] 본 발명의 또 다른 하나의 실시예에서는 승마로부터 유래된 화합물(화합물 4)가 치매 유도 동물 모델에서 치매의 증상 중 하나인 기억 및 인지기능 저하를 치료하는 것을 수중 미로 시험, Y자형 미로 시험, 신기물체 인식 시험 및 수동회피 시험을 통하여 확인하였다 (실시예 7 참조).

[0109] 이로서, 본 발명의 승마 추출물, 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 자가포식소체 막 단백질인 LC3-Ⅱ의 생성을 특이적으로 촉진하며 mTOR 단백질 발현을 억제하여 자가포식 작용을 유도하고, 퇴행성 뇌질환의 궁극적인 원인으로 알려진 베타-아밀로이드(beta-amyloid)의 생성 및 기억력 손상을 억제하는 효과가 매우 우수하여, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료 및 개선에 효과적으로 사용될 수 있는 조성물임을 확인하였다.

## *발명의 효과*

[0111] 본 발명의 승마 추출물, 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물은 자가포식소체의 막 단백질인 LC3 단백질의 발현을 증가시키고, 자가포식 작용을 억제하는 mTOR의 감소시키는 효과가 우수하며, 알츠하이머병의 원인 물질로 알려진 베타-아밀로이드의 생성 및 기억력 손상을 억제하는 효과가 뛰어나, 이를 포함하는 조성물은 파킨슨병, 알츠하이머병, 치매와 같은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료 및 인지장애 개선에 효과적으로 활용될 수 있다.

## *도면의 간단한 설명*

[0113] **도 1**은 SH-SY5Y 세포주에서 승마 추출물 (60 μg/ml)과 분획물 (30 μg/ml)의 자가포식소체 막단백질인 LC3의 발현량 증가효과를 웨스턴블롯으로 확인한 결과이다. 또한 승마로부터 유래한 화합물 (5 μM)의 LC3의 발현량 증가효과를 웨스턴블롯으로 확인한 결과이다.

**도 2**은 SH-SY5Y 세포주에서 화합물 4의 첨가 농도에 따른 자가포식소체 막단백질인 LC3의 발현량의 증가효과를 웨스턴블롯으로 확인한 결과이다 (Control: 대조군). **는 대조군에 대해 P<0.01인 것을 나타낸다.

**도 3**는 화합물 4의 첨가 농도에 따른 mTOR단백질 발현량의 감소효과를 웨스턴블롯으로 확인한 결과이다 (Control: 대조군). **는 대조군에 대해 P<0.01인 것을 나타낸다.

**도 4**는 화합물 4의 첨가 농도에 따른 세포독성을 SH-SY5Y 세포주에서 확인한 결과이다 (Control: 대조군). **는 대조군에 대해 P<0.01인 것을 나타낸다.

**도 5**는 MPTP 투여에 의해 파킨슨병을 유도시킨 C57BL/6 마우스의 흑질(substantia nigra)에서 화합물 4의 투여에 따른 Tyrosine hydroxylase (TH)와 mTOR 단백질 발현량의 효과를 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과이다

(Control: 대조군; MPTP: MPTP 단독 처리군; 로피니롤: 로피니롤+MPTP 처리군). ***는 대조군에 비하여 P<0.001인 것을 나타내며, ##는 MPTP 단독 처리군에 대해 P<0.01, ###는 MPTP 단독 처리군에 대해 P<0.001인 것을 나타낸다.

**도 6**은 파킨슨병 유도 동물의 흑질에서 화합물 4의 투여에 따른 Beclin1과 LC3 단백질 발현량의 증가효과를 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과이다 (Control: 대조군; MPTP: MPTP 단독 처리군; 로피니롤: 로피니롤+MPTP 처리군). ***는 대조군에 비하여 P<0.001인 것을 나타내며, #는 MPTP 단독 처리군에 대해 P<0.05, ##는 MPTP 단독 처리군에 대해 P<0.01인 것을 나타낸다.

**도 7**은 파킨슨병 유도 동물의 흑질에서 화합물 4의 투여에 따른 인산화된 ULK1 (s757) 단백질 발현량의 증가효과를 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과이다 (Control: 대조군; MPTP: MPTP 단독 처리군; 로피니롤: 로피니롤+MPTP 처리군). ##는 MPTP 단독 처리군에 대해 P<0.01, ###는 MPTP 단독 처리군에 대해 P<0.001인 것을 나타낸다.

**도 8**은 파킨슨병 유도 동물의 흑질에서 화합물 4의 투여에 따른 인산화된 AMPK와 알파-시누클레인 단백질 발현량의 증가효과를 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과이다 (Control: 대조군; MPTP: MPTP 단독 처리군; 로피니롤: 로피니롤+MPTP 처리군). *는 대조군에 비하여 P<0.05, **는 대조군에 비하여 P<0.01인 것을 나타내며, #는 MPTP 단독 처리군에 대해 P<0.05, ##는 MPTP 단독 처리군에 대해 P<0.01인 것을 나타낸다.

**도 9**는 스웨덴 돌연변이(Swedish mutation)된 APP를 과발현하는 HeLa 세포주에서 승마 추출물 (60 μg/ml)과 분획물 (30 μg/ml)의 베타-아밀로이드(Aβ42) 생성 억제 효과를 Aβ42 정량 키트로 측정한 결과이다. 또한 승마로부터 유래된 화합물 (5 μM)의 베타-아밀로이드(Aβ42) 생성 억제 효과를 확인한 결과이다 (Control: 대조군). *는 대조군에 비하여 P<0.05, ***는 대조군에 대해 P<0.001인 것을 나타낸다.

**도 10**은 APP를 과발현하는 CHO 세포주에서 화합물의 베타-아밀로이드(Aβ40)와 sAPPβ 생성 억제 효과를 확인한 결과이다. 또한 β-secretase (BACE1)의 발현량을 웨스턴블롯팅으로 확인한 결과이다 (CTR: 대조군). *는 대조군에 비하여 P<0.05, **는 대조군에 비하여 P<0.01, ***는 대조군에 대해 P<0.001인 것을 나타낸다.

**도 11**은 화합물 4의 첨가 농도에 따른 베타-아밀로이드(Aβ42, Aβ40) 생성 억제 효과를 Aβ42 및 Aβ40 정량 키트로 측정한 결과이다 (Control: 대조군). ***는 대조군에 대해 P<0.001인 것을 나타낸다.

**도 12**는 화합물 4의 첨가 농도에 따른 세포독성을 APP를 과발현하는 HeLa 세포주에서 측정한 결과이다 (Control: 대조군).

**도 13**은 치매 유도 동물의 수중 미로 시험에서 화합물 4의 기억개선 효과를 알아보기 위하여 플랫폼을 찾는 시간을 비교 측정한 획득시행(acquisition test) 결과와 플랫폼을 제거한 후 훈련 시에 플랫폼이 있었던 사분원에 머문 시간을 측정한 파지시행(retention test) 결과이다 (Escape latency: 플랫폼을 찾아가는데 걸린 시간; Time in target quadrant: 플랫폼이 있었던 사분원에 머문 시간; Scop: 스코폴라민 처리군; Don: 도네페질 처리군). **는 식염수 투여 대조군에 대해 P<0.01, ***는 식염수 투여 대조군에 대해 P<0.001인 것을 나타낸다. #은 스코폴라민 대조군에 대해 P<0.05인 것을 나타내며, ###은 스코폴라민 대조군에 대해 P<0.001인 것을 나타낸다.

**도 14**는 치매 유도 동물의 Y자형 미로 시험에서 화합물 4의 기억개선 효과를 알아보기 위하여 자발적교차행동(alternation behavior)을 비교 측정한 결과이다 (Spontaneous alteration: 교차행동량). ***는 식염수 투여 대조군에 대해 P<0.001인 것을 나타낸다. #은 스코폴라민 대조군에 대해 P<0.05인 것을 나타낸다.

**도 15**는 치매 유도 동물의 신기물체 인식 시험에서 화합물 4의 기억개선 효과를 알아보기 위하여 신기 물체에 대한 탐색 시간을 비교 측정한 결과이다. *는 식염수 투여 대조군에 대해 P<0.05인 것을 나타낸다. #은 스코폴라민 대조군에 대해 P<0.05인 것을 나타낸다.

**도 16**은 치매 유도 동물의 수동회피 시험에서 화합물 4의 기억개선 효과를 알아보기 위하여 어두운 방으로 들어가는데 걸린 시간을 측정한 결과이다 (Retention latency time: 어두운 방으로 들어가는데 걸린 시간). *는 식염수 투여 대조군에 대해 P<0.05인 것을 나타낸다. ##은 스코폴라민 대조군에 대해 P<0.01인 것을 나타낸다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0114] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0116] **실시예 1: 승마 추출물과 분획물의 제조 및 화합물의 분리**

[0117] 승마 5 kg에 60 L 에탄올을 가하고 수용액상에서 sonicator를 이용하여 4시간 초음파 추출한 다음 이를 여과하여 추출액을 얻었다. 추출하는 과정을 3회 반복하였다. 얻어진 추출액을 40℃ 이하에서 감압 농축한 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물 636.5g, 12.7%을 수득하였다. 승마 추출물을 증류수에 혼탁하여 n-헥산을 가하여 충분히 흔들어 준 후, 일정시간 분리하였다. 이 과정을 2회 이상 반복하여 얻은 헥산층을 여과한 후 감압 농축하여 최종 헥산 분획물을 얻었다. 이와 같이 에틸 아세테이트(EA), n-부탄올(BuOH), 물로 순차 분획하여 최종 분획물을 얻었다. 승마는 헥산 분획물(31.5 g, 5%), EA 분획물(182 g, 28.6%), BuOH 분획물(52 g, 8.2%), 물 분획물(293 g, 46%)을 얻었다.

[0118] EA 분획은 n-hexane-EtOAc (95:5, 80:20, 40:60, v/v)를 전개용매로 하여 실리카겔 컬럼크로마토그라피를 반복하여 7개의 분획 (B1 내지 B7)을 얻었다. 분획 B-3을 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그라피와 YMC-RP18 컬럼크로마토그라피를 반복 수행하여 아세리오놀(acerionol; **화합물 1**, 4.8 mg), 시미시페논(cimiciphenone; **화합물 5**, 6.0 mg), 시미라세마이트 A(cimiracemate A; **화합물 6**, 22.3) 화합물을 얻었다.

[0119] 계속해서 분획 B7 (1.1 g)을 Sephadex쩨 LH-20 컬럼크로마토그라피를 수행하여 소분획 (B7.1 내지 B7.3)을 얻었다. 소분획 B7.1 (0.4 g)을 YMC RP-C18 컬럼크로마토그라피와 실리카겔 컬럼크로마토그라피를 반복 수행하여 (E)-3-(3'-메틸-2'-부테닐리덴)-1-메틸-2-인돌리논((E)-3-(3'-methyl-2'-butenylidene)-1-methyl-2-indolinone; **화합물 7**, 5.0mg)과 (E)-3-(3'-메틸-2'-부테닐리덴)-2-인돌리논((E)-3-(3'-methyl-2'-butenylidene)-2-indolinone; **화합물 8**, 20.3 mg)을 얻었다.

[0120] BuOH 분획은 물과 메탄올의 혼합용매(25:75, 50:50, 65:35, 75:25, 0:100)를 전개용매로 Diaion HP-20 컬럼크로마토그라피를 수행하여 4개의 분획 (W-1 에서 W-4)을 얻었다. 분획 W-2 (2.1 g) 를 CHCl3-MeOH-H2O, 6.5:1:0.1를 전개용매로 하여 실리카겔 컬럼크로마토그라피를 수행하고 계속해서 물-메탄올 (65→100%)을 전개용매로 하여 YMC RP-C18 컬럼크로마토그라피와 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그라피를 반복 수행하여 시미리카사이드 F(cimiricaside F; **화합물 2**, 7.5 mg)를 얻었다.

[0121] 분획 W-3 (1.7 g)을 H2O-MeOH (5:1, 3:1, 1:1, and 100% MeOH)을 전개용매로 YMC RP-C18 컬럼크로마토그라피를 수행하여 소분획 (W-3.1 내지 W-3.4)를 얻었다. 소분획 W-3.1 (0.42 g)을 CH2Cl2-—MeOH (10:1)을 전개용매로 실리카겔 컬럼크로마토그라피를 수행하여 3'-O-아세틸-24-에피-7,8-다이디하이드로시미제놀-3-O-β-D-자일로피라노사이드(3'-O-acetyl-24-epi-7,8-didehydrocimigenol-3-O-β-D-xylopyranoside; **화합물 9**, 5.6 mg) 를 얻었으며, 소분획 W-3.3 (0.07 g)을 물-메탄올 (1:1)의 전개용매로 YMC RP-C18 컬럼크로마토그라피와 실리카겔 컬럼크로마토그라피를 반복 수행하여 시미리카사이드 B(cimiricaside B; **화합물 3**, 5.1 mg) 를 얻었다.

[0122] 소분획 W-4 (1.3 g)를 CHCl3-EtOAc (8:1, 4:1, 및 2:1)를 전개용매로 실리카겔 컬럼크로마토그라피를 수행하여 5개의 소분획 (W-4.1 내지 W-4.5)을 얻었다. 소분획 W-4.1을 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그라피와 실리카겔 컬럼크로마토그라피를 반복 수행하여 24-에피-24-O-아세틸-7,8-다이디하이드로하이드로셩마놀 3-O-β-D-자일로피라노사이드(24-Epi-24-O-acetyl-7,8-didehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside; **화합물 4**, 6.5 mg)를 분리정제하였으며, 소분획 W-4.5을 아세톤-물(1:2)의 전개용매로 YMC RP-C18 컬럼크로마토그라피를 수행하여 시미아세로사이드 B(Cimiaceroside B; **화합물 10**, 4.56 mg) 를 얻었다.

[0124] **실시예 2: 승마 추출물 및 분획물의 자가포식 유도 효과**

[0125] 상기 실시예 1에서 수득한 승마 추출물과 분획물의 LC3 단백질 발현량 증가 효과를 측정하기 위하여, 도파민성 세포주인 SH-SY5Y 세포주를 Gibco사(Grand Island, NY, USA)의 10% heat-inactivated 소 태아 혈청 (이하 FBS라 함)과 1% 페니실린/스트렙토마이신 (이하 P/S라 함, Gibco)이 함유된 Dulbecco's modified eagle medium nutrient mixture F-12 (Ham) 1x; DMEM/F12 (Gibco) 배지에서 배양하여 사용하였다. 이 세포주는 ATCC: The Global Bioresource Center (CRL-2266쩨)(Manassas, Virgina 20108, USA)로부터 구입하였다.

[0126] 구체적으로 상기 세포주 (SH-SY5Y)에 실시예 1에서 수득한 승마 추출물 60 μg/ml과 분획물을 30 μg/ml 첨가량으로 첨가한 다음, 5% $CO_2$, 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 포집하여 13,000 rpm에서 6분간 원심분리하여 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline)로 2회 세척하였다. 얻어진 세포에 용해 용액(lysis solution; 1X 용해 버퍼, 1X 프로테아제 억제제 칵테일, 1x 페닐메틸 설포닐 플루오라이드)을 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시

키고, 그 후 동일한 4℃ 조건에서 30분간 진탕하면서 완전히 용해시킨 다음 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 단백질이 방출된 상층액을 취하였다. 취한 상층액은 Protein assay dye Reagent concentrate (Bio-Rad)를 이용하여 Bradford method로 단백질을 정량하였다. LC3, GAPDH (Cell signaling technology) 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 세포 용해액 내의 LC3, GAPDH 단백질 발현량을 측정하였다. GAPDH는 loading control로 사용하였다.

[0127] 이후 LC3Ⅰ 단백질에서 LC3Ⅱ 단백질로 전이되는 비율을 확인한 결과를 도 1에 기재하였다. 승마 추출물을 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였다. 그 결과, **도 1**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 승마 추출물, EA 분획물 및 BuOH 분획물에 의해 LC3의 단백질 발현량이 현저하게 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 이로부터 분리된 화합물 4, 5, 6, 7, 8, 10에 의해 LC3 단백질 발현이 증가됨을 확인하였다. 이를 통해, 승마 추출물 및 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물(화합물 4, 5, 6, 7, 8, 10)이 도파민성 세포주에 처리되었을 때, 자가포식소폐 막 단백질 중 하나인 LC3 단백질의 발현량을 증가시키고, 자가포식 활성을 나타내는 지표인 LC3 I에서 LC3 II로의 전이를 증가시켜, 결과적으로 자가포식 유도 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0129] **실시예 3: 승마로부터 유래된 화합물의 자가포식 유도 효과**

[0130] **실시예 3-1: 승마로부터 유래된 화합물의 LC3 단백질 발현량 증가 효과**

[0131] 상기 실시예 1에서 수득한 승마 추출물로부터 분리된 화합물(이하, 승마 화합물; 화합물 4)의 농도의존적인 LC3 단백질 발현량 증가 효과를 측정하기 위하여, 배양한 SH-SY5Y 세포주에 도 2에 기재된 승마 화합물 첨가량으로 첨가한 다음, 5% $CO_2$, 37℃에서 24시간 동안 배양하여 상시 실시예 2-1과 같은 방법으로 실험하였다. 본 실험에서 사용된 1차 항체는 LC3, GAPDH (Cell signaling technology)이 있으며, GAPDH는 로딩(loading) 대조군으로 사용하였다.

[0132] 이후 LC3Ⅰ 단백질에서 LC3Ⅱ 단백질로 전이되는 비율을 확인한 결과를 도 2에 기재하였다. 승마 화합물(화합물 4)을 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였다. 그 결과, **도 2**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조군에 비하여 승마 화합물 4의 첨가에 의해 LC3 단백질의 발현량이 농도의존적으로 현저하게 증가됨을 확인할 수 있었으며, 특히 승마 화합물(화합물 4)을 10 μM 농도로 처리하였을 때, LC3Ⅰ 단백질에서 LC3Ⅱ 단백질로 전이되는 비율이 2.55인 것으로 확인하였다. 이를 통해, 승마 화합물(화합물 4)이 도파민성 세포주에 처리되었을 때, 자가포식소폐 막 단백질 중 하나인 LC3 단백질의 발현량을 증가시키고, 자가포식 활성을 나타내는 지표인 LC3 I에서 LC3 II로의 전이를 증가시켜, 결과적으로 자가포식 유도 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0134] **실시예 3-2: 승마로부터 유래된 화합물의 mTOR 단백질 발현 억제 효과**

[0135] 승마 화합물(화합물 4)의 mTOR 단백질 발현량 억제 효과를 확인하기 위해, 배양한 SH-SY5Y 세포주에 도 3에 기재된 승마 화합물 첨가량으로 첨가한 다음, 5% $CO_2$, 37℃에서 24시간 동안 배양하여 상시 실시예 2와 같은 방법으로 실험하였다. 본 실험에서 사용된 1차 항체는 mTOR, GAPDH (Cell signaling technology)이 있으며, GAPDH는 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0136] 이후 mTOR의 상대적 밀도를 나타내는 결과를 도 3에 기재하였고, 승마 화합물을 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였다. 그 결과, **도 3**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조군에 비하여 승마 화합물에 의해 mTOR 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통해, 승마 화합물이 도파민성 세포주에 처리되었을 때, 자가포식을 억제하는 mTOR 단백질의 발현량을 감소시켜, 결과적으로 자가포식 유도 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0138] **실시예 3-3: 승마로부터 유래된 화합물의 세포 독성 확인**

[0139] 승마 화합물 4의 세포독성을 확인하기 위해, 배양한 SH-SY5Y 세포주에 도 3에 기재된 승마 화합물 첨가량으로 첨가한 다음, 5% $CO_2$, 37℃에서 24시간 동안 배양하였고, EZ-Cytox kit(DAEILLAB Co, Ltd, Republic of Korea)을 이용하여 실험하였다. EZ-Cytox 용액을 2시간 37℃에서 배양한 후 흡광도를 측정하였다.

[0140] 이후 대조군에 비하여 상대적인 세포 생존율을 나타내는 결과를 도 4에 기재하였고, 승마 화합물 4을 처리하지

않은 경우를 대조군으로 하였다. **도 4**에서 확인할 수 있는 바와 같이, SH-SY5Y 세포주에서 대조군에 비하여 25 μM 이상의 농도에서 세포독성을 보이는 것을 확인하였다. 이를 통해, 자가포식 유도 활성을 나타내는 농도(5 μM) 보다 5배 높은 농도에서(50 μM)도 세포 독성이 없으므로, 승마 화합물을 유효성분으로 포함하여 안전하게 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0142] **실시예 4: MPTP 투여에 의한 파킨슨병 동물모델에서, 승마로부터 유래된 화합물의 자가포식 작용을 통한 뇌세포 사멸에 미치는 효과**

[0143] C57BL/6 웅성 마우스(8주령)를 사용하고, 사료와 물은 자유 섭취하였다. 마우스를 각 군당 7마리씩 5군으로 나누었다. 대조군과 MPTP 단독처리군은 생리식염수를 3일간 단회 경구 투여하였고, 상기 실시예 1에서 수득한 승마 화합물(5 mg/kg 또는 15 mg/kg)군은 생리식염수에 용해시킨 뒤 3일간 단회 경구 투여하였다. 양성대조군은 로피니롤(ropinirole)을 생리식염수에 용해하여 3일간 단회 경구 투여하였다. 약물 투여 4일째부터 8일째까지는 대조군을 제외한 모든 군에 약물 투여 1시간 후에 생리식염수에 용해한 MPTP(30 mg/kg)를 단회 경구 투여하였으며, 약물 투여 9일째부터 10일째에는 대조군을 제외한 모든 군에 동일한 양의 약물을 단회 경구 투여하였다. 약물 투여 종료 후 7일째 각 군의 마우스를 치사시킨 후, 뇌 조직[흑질(substantia nigra) 및 선조체(striatum)]을 분리하였다. 뇌 조직은 포스파타아제 억제제 칵테일 세트 I (Sigma-Aldrich, MO, USA)을 보충한 PRO-PREPTM 용해 완충액(iNtRON, 경기, 한국)으로 균질화하였다. 균질액을 4℃에서 30분 동안 방치한 후, 13,000 rpm, 4℃, 30분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 상층액은 Protein assay dye Reagent concentrate (Bio-Rad)를 이용하여 Bradford method로 단백질을 정량하였다. 일정량의 SDS 로딩 버퍼와 혼합하여 99℃에서 5분간 가열한 후에 상기 실시예 2와 같은 방법으로 웨스턴블롯팅을 통해 단백질 발현을 측정하였다. 본 실험에서 사용된 1차 항체는 TH, Beclin-1, p-mTOR, mTOR, p-ULK1(s757), ULK1, p-AMPK, AMPK, LC3, 알파-시누클레인, GAPDH (Cell signaling technology)이 있으며, GAPDH는 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0144] 이후 상기 단백질들의 상대적 밀도를 나타내는 결과를 도 5 내지 8에 기재하였고, 승마 화합물 및 MPTP를 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였고, 로피니롤 및 MPTP를 투여한 경우를 양성대조군으로 하였다. 이때, MPTP는 파킨슨병 동물 모델에서 사용되는 물질으로, 도파민 길항제(dopamine antagonist)이고, 로피니롤은 파킨슨병 약물 치료에서 사용되는 물질으로, 도파민 수용체의 작용제(dopamine agonist)이다.

[0145] 그 결과, **도 5**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 자가포식 작용을 억제하는 인산화된 mTOR 단백질의 발현을 확인한 결과, 승마 화합물 15 mg/kg을 투여한 군에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한, MPTP 단독처리군의 도파민의 전구체(L-DOPA)를 조절하는 효소인 TH 발현이 대조군에 비해 감소된 반면에, 승마 화합물을 투여한 군에서는 TH 단백질 발현이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

[0146] 그 결과, **도 6**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 자가포식 작용을 유도하는 대표적인 단백질인 Beclin-1 단백질의 경우, MPTP 단독처리군의 경우 대조군에 비해 감소된 반면에, 승마 화합물 15 mg/kg을 투여한 군에서는 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 자가포식소체 막 단백질인 LC3 단백질의 경우, 승마 화합물을 투여한 군에서는 대조군에 비해 LC3 단백질 발현이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

[0147] 그 결과, **도 7**에서 확인할 수 있는 바와 같이, MPTP 단독 처리군에서 자가포식을 유도하는 인산화된 ULK1 단백질의 발현이 대조군에 비해 감소된 반면에, 승마 화합물을 투여한 군에서는 인산화된 ULK1 단백질의 발현이 증가함을 확인할 수 있다.

[0148] 그 결과, **도 8**에서 확인할 수 있는 바와 같이, MPTP 단독처리군의 경우 자가포식 작용을 유도하는 인산화된 AMPK 단백질의 발현이 대조군에 비해 감소된 반면에, 승마 화합물 15 mg/kg을 투여한 군에서는 유의적으로 증가함을 확인 할 수 있었다. 또한, MPTP 단독처리군의 경우 파킨슨병의 원인 단백질로 알려져 있는 알파-시누클레인(α-synuclein) 단백질의 비정상적인 응집이 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 반면에, 승마 화합물을 투여한 군에서는 알파-시누클레인 단백질 발현이 감소함을 확인할 수 있다.

[0150] 이상의 결과에서, 승마 화합물은 MPTP 독성물질로 파킨슨병을 유도한 동물 모델에서 뇌세포의 자가포식 작용의 유도 효과를 통해, 유의적으로 농도의존적으로 파킨슨병의 치료 및 개선에 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0152] **실시예 5: 승마 추출물 및 분획물의 알츠하이머병 치료 및 개선 효과**

[0153] 상기 실시예 1에서 수득한 승마 추출물과 분획물의 Aβ42 생성 억제 효과를 측정하기 위하여, 인간에서 유래된 아밀로이드 전구체(amyloid precursor protein, APP)의 Swedish mutants가 형질감염 (transfection)된 HeLa 세포주를 DMEM 배양액 (Gibco), 10% FBS, 1% P/S, 260 μg/ml Zeocin과 400 μg/ml G418에서 배양하여 사용하였다. 이 세포주는 김태완 교수 (Prof. Tae-Wan Kim, Department of Pathology, Columbia University Medical Center, New York, NY10032, USA)로부터 제공받았다.

[0154] 구체적으로 상기 세포주 (swAPP HeLa cell)에 실시예 1에서 수득한 승마 추출물 60 μg/ml 과 분획물을 30 μg/ml 첨가량으로 첨가한 다음, 5% CO2, 37℃에서 8시간 동안 배양하고, 배양액으로 분비된 Aβ42를 인간 베타-아밀로이드 [1-42](Aβ42) Colorimetric ELISA 키트(Thermo Fisher scientific)를 사용하여 측정하였다.

[0155] 상기 Aβ42의 양을 측정한 결과를 도 9에 기재하였고, 승마 추출물을 첨가하지 않은 경우를 대조군으로 하였다. 그 결과, **도 9**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 승마 추출물, EA 분획물, BuOH 분획물에 의해 Aβ42의 생성이 유의하게 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 이로부터 분리된 화합물 2, 3, 4, 9, 10에 의해 베타-아밀로이드42 생성이 억제됨을 확인하였다. 이를 통해, 승마 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리된 화합물이 처리되었을 때, 알츠하이머병의 발생 원인으로 알려진 베타-아밀로이드 단백질의 생성을 감소시켜, 유의적으로 알츠하이머병의 치료 및 개선에 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0157] **실시예 6: 승마로부터 유래된 화합물의 알츠하이머병 치료 및 개선 효과**

[0158] **실시예 6-1: 승마로부터 유래된 화합물의 sAPPβ, β-secretase 생성 억제 효과**

[0159] 상기 실시예 1에서 수득한 승마 화합물의 Aβ40 생성 억제 효과를 측정하기 위하여, 인간에서 유래된 아밀로이드 전구체(amyloid precursor protein, APP)가 형질감염 (transfection)된 CHO 세포주를 사용하였다.

[0160] 구체적으로 상기 세포주 (APP CHO cell)에 상기 실시예 1에서 수득한 승마 화합물을 2.5, 5, 10 uM이 되도록 처리 후 24시간 동안 5% CO2, 37℃에서 배양하고, 배양액으로 분비된 Aβ40를 인간 베타-아밀로이드 [1-40](Aβ40) Colorimetric ELISA 키트(Thermo Fisher scientific)를 사용하여 측정하였다. 또한 MTT assay를 이용하여 세포독성을 확인하여 IC50를 계산하였고, 이후 IC50을 측정한 결과를 도 10A에 기재하였다. 베타-아밀로이드40의 생성이 15 uM 이하의 농도에서 50% 저해되었다.

[0161] 배양액으로 분비된 sAPPβ는 수용성 베타 아밀로이드 전구체 단백질 (sAPPβ) (IBL) 항체를 사용하여 웨스턴블롯팅으로 확인하였다. β-secretase(BACE1)의 발현량은 승마 화합물을 24시간 동안 배양하여 상시 실시예 2와 같은 방법으로 확인하였다. 본 실험에서 사용된 primary 항체는 β-secretase (Cell signaling technology)이 있으며, β-tubulin는 loading control로 사용하였다.

[0162] 이후 sAPPβ 및 BACE1의 발현량을 측정한 결과를 도 10B에 기재하였고, 승마 화합물을 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였다. 그 결과, **도 10**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 대조군에 비하여 승마 화합물 1-4에 의해 sAPPβ 생성과 β-secretase(BACE1) 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 승마 화합물은 치매 원인 물질로 알려진 베타-아밀로이드의 수용성 전구체 단백질(sAPPβ)의 생성 및 베타-아밀로이드를 만드는 효소인 BACE1의 발현을 감소시켜, 알츠하이머병의 치료 및 개선 활성을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0164] **실시예 6-2: 승마로부터 유래된 화합물의 베타-아밀로이드 (Aβ) 생성 억제 효과**

[0165] 상기 실시예 1에서 수득한 승마 화합물(화합물 4)의 Aβ42 생성 억제 효과를 측정하기 위하여, 인간에서 유래된 아밀로이드 전구체(amyloid precursor protein, APP)의 Swedish mutants가 형질감염 (transfection)된 HeLa 세포주를 DMEM 배양액 (Gibco), 10% FBS, 1% P/S, 260 μg/ml Zeocin과 400 μg/ml G418에서 배양하여 사용하였다. 이 세포주는 김태완 교수 (Prof. Tae-Wan Kim, Department of Pathology, Columbia University Medical Center, New York, NY10032, USA)로부터 제공받았다.

[0166] 구체적으로 상기 세포주 (swAPP HeLa cell)에 실시예 1에서 수득한 승마 화합물(화합물 4)을 도 11에 기재된 첨가량으로 첨가한 다음, 5% $CO_2$, 37℃에서 8시간 동안 배양하고, 배양액으로 분비된 Aβ42를 인간 베타-아밀로이

드[1-42](Aβ42) Colorimetric ELISA 키트(Thermo Fisher scientific)를 사용하여 측정하였다. Aβ40를 정량하기 위하여, 인간 베타-아밀로이드[1-40](Aβ40) Colorimetric ELISA 키트(Thermo Fisher scientific)를 사용하였다.

[0167] 이후 Aβ42 및 Aβ40의 대조군에 대한 상대적인 양을 측정한 결과를 도 11에 기재하였고, 승마 화합물을 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였다. 그 결과, **도 11**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 승마 화합물에 의해 Aβ42와 Aβ40의 생성이 농도 의존적으로 억제되며, 구체적으로 승마 화합물 각각 2.5 μM 및 5 μM 포함한 배지에서 분비된 Aβ42의 생성이 69% 및 77%로 감소함을 확인할 수 있었다. 또한, 승마 화합물 각각 2.5 μM 및 5 μM 포함한 배지에서 분비된 Aβ40의 생성이 52% 및 60%로 감소함을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 승마 화합물이 처리되었을 때, 알츠하이머병의 발생 원인으로 알려진 베타-아밀로이드 단백질의 생성을 감소시켜, 결과적으로 승마 화합물은 유의적으로 농도의존적으로 알츠하이머병의 치료 및 개선에 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0169] **실시예 6-3: 승마로부터 유래된 화합물의 세포 독성 확인**

[0170] 상기 실시예 1에서 수득한 승마 화합물 4의 세포독성을 확인하기 위하여, 상기 세포주 (swAPP HeLa cell)에 실시예 1에서 수득한 승마 화합물을 도 11에 기재된 첨가량으로 첨가한 다음, 5% $CO_2$, 37℃에서 8시간 동안 배양하였고, EZ-Cytox 용액을 1시간 37℃에서 배양한 후 흡광도를 측정하였다.

[0171] 이후 대조군에 비하여 상대적인 세포 생존율을 나타내는 결과를 도 12에 기재하였고, 승마 화합물 4을 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였다. 그 결과, **도 12**에서 확인할 수 있는 바와 같이, APP를 과발현하는 HeLa 세포주에서 대조군에 비하여 승마 화합물 4에 의한 세포독성을 보이지 않는 것을 확인하였다. 이를 통해, 베타-아밀로이드 생성 억제 활성을 나타내는 농도(5 μM) 보다 10배 높은 농도에서(50 μM)도 세포 독성이 없으므로, 승마 화합물을 유효성분으로 포함하여 알츠하이머병의 치료 또는 개선을 위해 안전하게 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0173] **실시예 7: 승마로부터 유래된 화합물의 기억력 및 인지기능 개선 효과**

[0174] ICR 웅성 마우스 (8주령)를 사용하고, 사료와 물은 자유 섭취하였다. 승마 화합물을 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg 또는 5 mg/kg로 일주일간 단회 경구 투여하였다. 양성대조군은 도네페질(donepezil) 4 mg/kg을 경구 투여하였고 대조군에는 식염수를 경구 투여하였다. 또한, 시험 실시 30분 전에 스코폴라민(scopolamine) 1 mg/kg을 피하 투여하여 마우스에 뇌기능 기억 및 인지 장애를 유발한 후, 수중 미로 시험, Y자형 미로 시험, 신기물체 인식 시험, 수동회피실험을 실시하여 스코폴라민 대조군과 비교하여 기억 개선 효과가 있는지 분석하였다.

[0176] **실시예 7-1: 수중 미로 시험**

[0177] 수중 미로 시험의 획득시행은 5일 동안 매일 3회 30분 간격으로 물에 잠겨 있는 플랫폼을 찾을 때까지의 시간(escape latency, 단위: 초)을 측정하는 방법으로 수행하였다. 최대 허용 시간은 90초로 제한하였으며 플랫폼에 올라가면 적어도 5초간 머무르게 하였다.

[0178] 파지시행은 획득시행시험이 종료되고 24시간 후 플랫폼을 치운 수조에서 자유롭게 수영하게 하여 플랫폼이 있던 사분원에 머무르는 시간(Time in target quadrant, 단위: 초)을 측정하는 방법으로 수행하였다.

[0179] 이후 수중미로 시험의 획득시행 시험 결과 및 파지시행 시험 결과를 도 13에 기재하였고, 스코폴라민 투여에 의해 인지기능 장애가 유발된 실험군을 대조군으로 하였다. 그 결과, **도 13**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 승마 화합물 2.5 mg/kg 또는 5 mg/kg 투여군은 시험 4일 차부터 대조군보다 플랫폼을 빠른 시간에 찾았으며 유의성 있는 차이를 보였다. 또한, 파지시행 시험 결과 승마 화합물 투여군의 플랫폼이 있던 사분원에 머무른 시간이 대조군보다 증가하는 경향을 보였다. 이를 통해, 승마 화합물이 처리되었을 때, 인지기능 개선 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0181] **실시예 7-2: Y자형 미로 시험**

[0182] 3개의 통로(arm)가 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 통로의 길이 30 cm, 높이 12 cm, 폭 5 cm 이고 각각 120

도의 각도로 접속된 Y자형 미로 측정장치를 이용하여 수행하였다. 미로의 한 통로 끝에 마우스를 두고 5분에 걸쳐 자유롭게 통로를 탐색시키고, 마우스의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것(arm entry)으로 인정하여 움직임을 교차횟수(alternation)로 기록하였다. 연속하여 상이한 3개의 통로를 통과하였을 때를 실제 교차횟수로 하여 1점을 부여하였고 실제 교차 횟수는 최대 가능한 교차횟수(총 교차 횟수에서 2를 뺀 값)의 비율로 자발적인 교차행동량(spontaneous alteration, %)을 구하였다.

[0183] 이후 Y자형 미로 시험의 자발적인 교차행동량 결과를 도 14에 기재하였고, 스코폴라민 투여군을 대조군으로 하였다. 그 결과, **도 14**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 승마 화합물 5 mg/kg 투여군의 자발적 교차행동량은 61.8 ± 3%이고 스코폴라민 대조군 50.1 ± 2.6%으로, 승마 화합물의 투여에 의해 유의적으로 23.4%의 기억 개선효과를 보이는 것을 확인하였다. 이를 통해, 승마 화합물이 처리되었을 때, 기억력 개선 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0185] **실시예 7-3: 신기물체 인식 시험**

[0186] 신기물체 인식 시험은 50 cm X 50 cm X 50 cm의 상자를 실험 장치로 사용하였으며 2일 동안 매일 1회 5분 동안 자유롭게 실험 장치 속 환경에 적응시켰다. 다음날 획득시행 (acquisition phase)을 위해 실험 장치 내에 2개의 물체(A와 B)를 설치한 후 마우스가 각 물체에 대해 1 cm 이내에 접근하여 탐색한 시간을 5분 동안 측정하였다. 4일째 되는 날 파지 시행 (retention phase)을 위해 2개의 물체 중 하나를 새로운 물체(신기 물체) (A와 C)로 바꾸고, 마우스가 각 물체에 대해 1 cm 이내에 접근하여 탐색한 시간을 5분간 측정하였다. 각 물체에 대한 탐색 시간의 비율(Novel Objecting Exploring Index)을 구하였다.

[0187] 이후 신기물체 인식 시험의 물체에 대한 탐색 시간 비율의 결과를 도 15에 기재하였고, 스코폴라민 투여군을 대조군으로 하였다. 그 결과 **도 15**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 승마 화합물 5 mg/kg 투여군의 신기물체 탐색 시간 비율은 68 ± 2.4%이고 스코폴라민 대조군의 60.1 ± 2.1%로, 승마 화합물의 투여에 의해 유의적으로 증가하였다. 이를 통해, 승마 화합물이 처리되었을 때, 인지능력 개선 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0189] **실시예 7-4: 수동회피 시험**

[0190] 수동회피 시험은 칸막이 문에 의해 2개의 구획으로 구분된 셔틀박스(shuttle box)를 실험장치로 사용하였다. 한쪽 구획은 조명을 비추어 밝게 하고 다른 구획은 조명이 없고 검은 천으로 어둡게 하였다. 첫날 마우스를 밝은 방에 30초간 머무르게 하여 탐색하게 한 후 칸막이 문을 열어 어두운 방으로 들어갈 수 있게 하였다. 어두운 방으로 들어갈 때까지의 시간(acquisition latency time)을 측정하고 어두운 방에 들어가는 즉시 칸막이 문을 닫고 격자 바닥을 통해 0.3 mA의 전기 충격을 3초간 가해 주어 마우스가 전기 자극을 기억하게 하였다. 24시간 후 마우스를 밝은 방에 두고 칸막이 문을 열어 어두운 방으로 마우스의 모든 발이 들어가는데 걸리는 시간(retention latency time)을 측정하였고 최대 시간을 180초로 제한하였다. Retention latency time이 클수록 수동회피에 대한 기억이 잘 유지되는 것으로 판단하였다.

[0191] 이후 수동회피 시험의 Retention latency time 결과를 도 16에 기재하였다. 그 결과, **도 16**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 승마 화합물 2.5 mg/kg 및 5 mg/kg 투여군이 전기 자극 학습 후 어두운 방으로 들어가는 시간이 각각 28.8 ± 4.3초 및 46.9 ± 11.4초이고, 스코폴라민 대조군의 10.8 ± 4.1초로, 승마 화합물의 투여에 의해 수동회피에 대한 기억을 유의적으로 개선 시킴을 확인하였다. 이를 통해, 승마 화합물이 처리되었을 때, 기억력 개선 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0193] 이상의 결과에서, 본 발명의 승마 추출물 또는 이로부터 분리된 화합물이 치매에 대한 기억력 및 인지기능 개선에 탁월한 효과가 있음을 확인하였다.

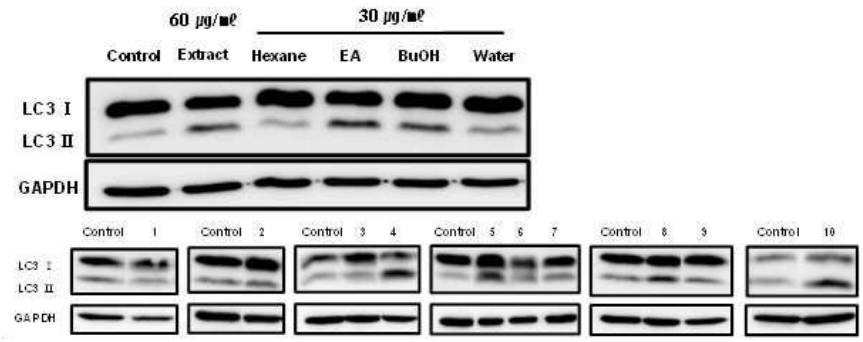
[0195] 이상의 결과에서, 승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물의 처리는 자가포식소폐 막 단백질 LC3의 발현을 증가시키고(도 1, 2), 자가포식을 억제하는 m-TOR의 발현을 감소시켜(도 3) 자가포식 유도 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, MPTP 독성물질로 파킨슨병을 유도한 동물 모델에서 승마로부터 유래된 화합물의 처리는 도파민의 전구체(L-DOPA)를 조절하는 효소인 TH의 양을 촉진시키고, 자가포식을 억제하는 p-mTOR

단백질의 발현을 감소시키고, 자가포식을 유도하는 p-AMPK, p-ULK1, Beclin-1 단백질의 발현을 증가시켜(도 5-8) 파킨슨병의 치료 및 개선에 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 승마 추출물. 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물의 처리는 알츠하이머병의 원인 단백질인 베타-아밀로이드(Aβ42 및 Aβ40)의 발현을 억제하여(도 9-11) 알츠하이머병의 치료 및 개선에 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한, 승마로부터 유래된 화합물의 처리는 수중미로 시험, Y자형 미로 시험 등 다양한 인지능력 및 기억력 시험에서 개선효과를 나타냄(도 13-16)을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 본 발명의 승마 추출물, 이의 분획물 또는 승마로부터 유래된 화합물이 퇴행성 뇌질환의 치료 및 예방, 기억력 및 인지기능 개선에 탁월한 효과가 있음을 확인할 수 있다.

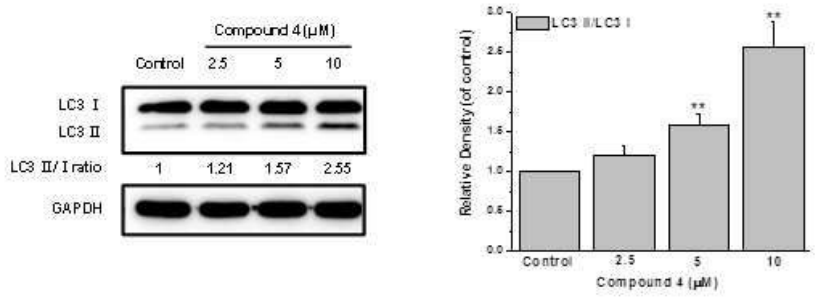
[0197] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

## 도면

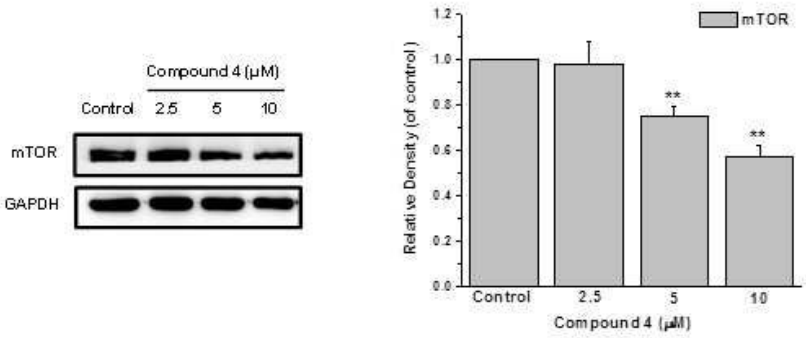
### 도면1



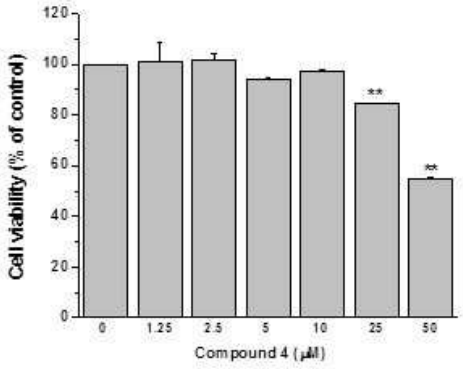

### 도면2



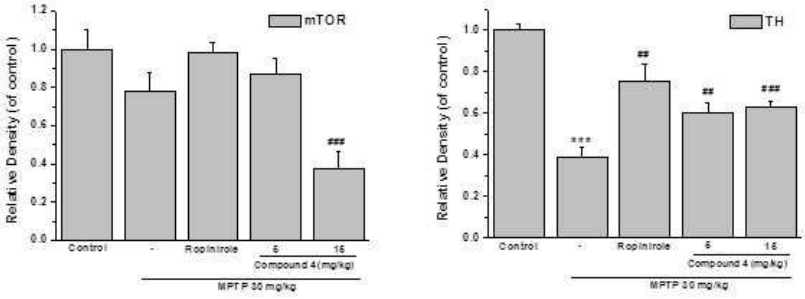
도면3



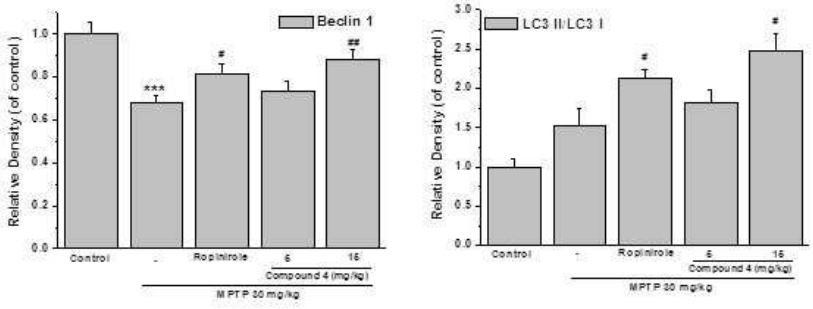

도면4



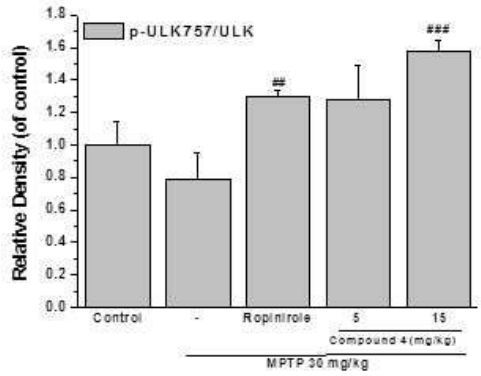

도면5



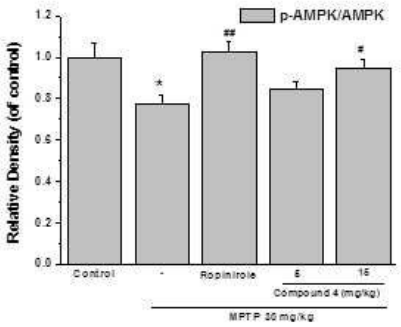

도면6

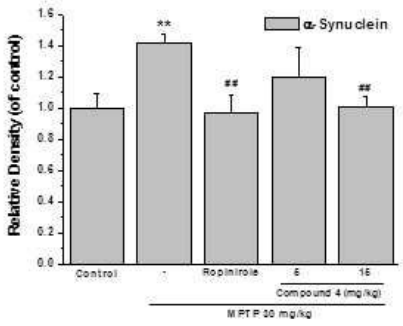


도면7

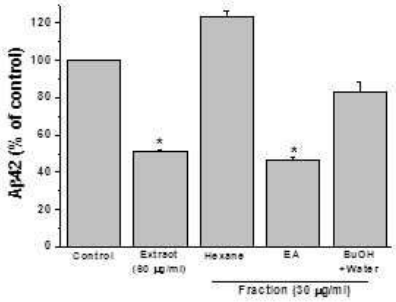

p-ULK757/ULK
Relative Density (of control)
Control
-
Ropinirole
5
15
Compound 4 (mg/kg)
MPTP 30 mg/kg

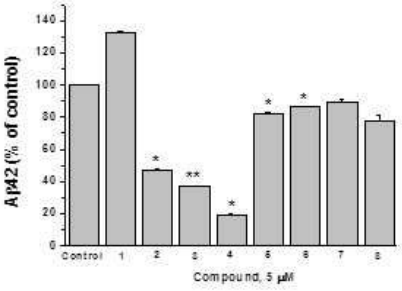
도면8


p-AMPK/AMPK
Relative Density (of control)
Control
-
Ropinirole
5
15
Compound 4 (mg/kg)
MPTP 30 mg/kg


α-Synuclein
Relative Density (of control)
Control
-
Ropinirole
5
15
Compound 4 (mg/kg)
MPTP 30 mg/kg

도면9


Aβ42 (% of control)
Control
Extract
(50 μg/ml)
Hexane
EA
BuOH
+Water
Fraction (30 μg/ml)

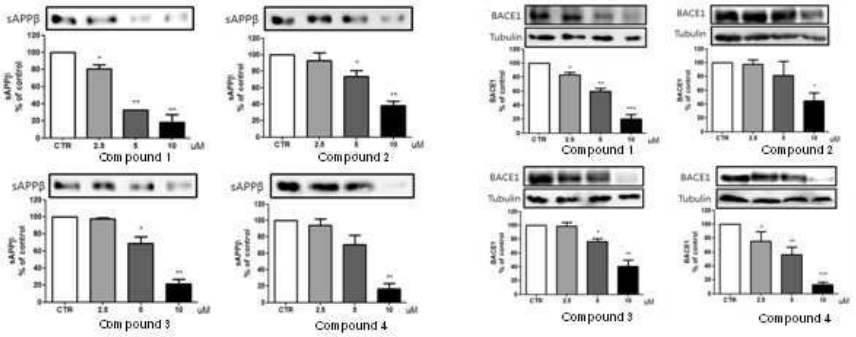

Aβ42 (% of control)
Control
1
2
3
4
5
6
7
8
Compound, 5 μM

도면10

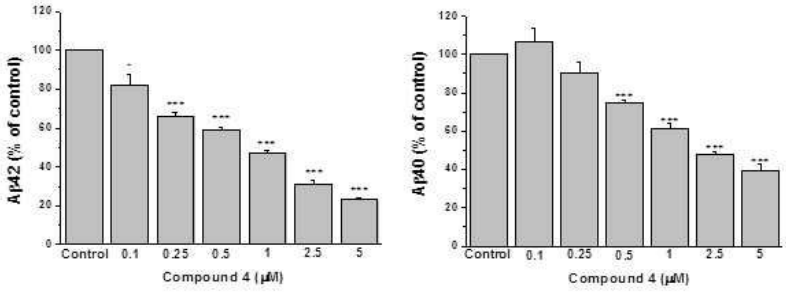
A

| Compounds | $IC_{50}$ values (μM) |
|---|---|
| Acerionol (1) | 6.2 ± 1.1 |
| Cimiricaside F (2) | 14.4 ± 1.9 |
| Cimiricaside B (3) | 10.1 ± 0.9 |
| 24-*Epi*-24-O-acetyl-7,8-idehydrohydroshengmanol 3-O-β-D-xylopyranoside (4) | 8.7 ± 1.8 |

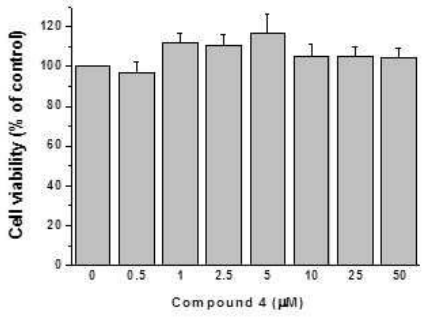
B



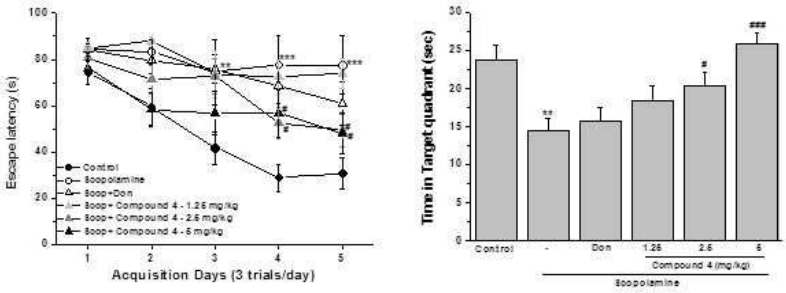

도면11



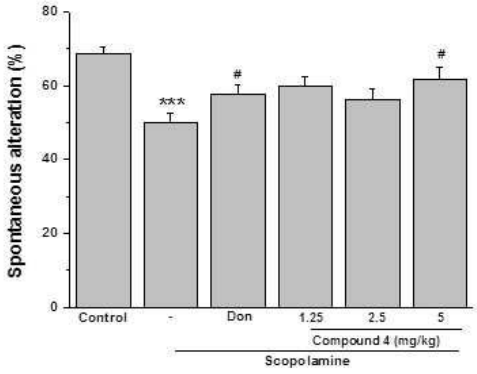

도면12



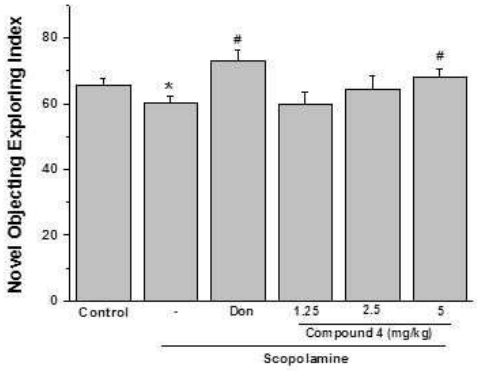
도면13



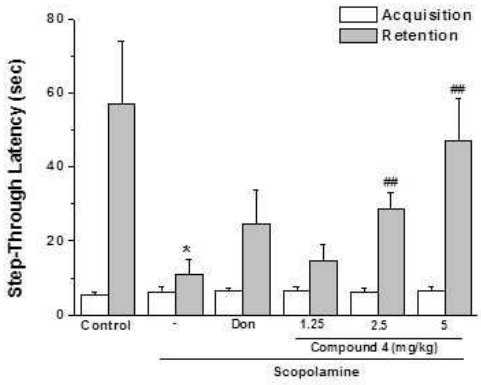

도면14




도면15



도면16


Acquisition
Retention
Step-Through Latency (sec)
80
60
40
20
0
*
##
##
Control
-
Don
1.25
2.5
5
Compound 4 (mg/kg)
Scopolamine