(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0138352
(43) 공개일자 2017년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/48 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/48 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0069249(분할)
(22) 출원일자 2017년06월02일
심사청구일자 2017년06월02일
(62) 원출원 특허 10-2016-0070442
원출원일자 2016년06월07일
심사청구일자 2016년06월07일

(71) 출원인
차사이어 바이오테크놀로지 코포레이션
대만 타이난 시티 744 신시 디스트릭트 난케 세컨트 로드 넘버 13 4에프.-1
(72) 발명자
추 이-훙
대만 타이난 시티 744 신시 디스트릭트 난케 세컨트 로드 넘버 13 4에프.-1
(74) 대리인
유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **대두 종자 추출물, 이의 제조 방법 및 용도**

(57) 요 약

본 발명은 대두 종자 추출물, 이의 제조 방법, 및 상처 치유 촉진, 신경 세포 증식 촉진 및/또는 뇌 질환 및/또는 신경퇴행성 질환의 치료, 유방암 치료, DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 부작용 저하 및/또는 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 약제 효과 강화에 있어서의 대두 종자 추출물의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
A61K 2300/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 대두 종자 추출물을 포함하는, 유방암을 치료하기 위한 추출 조성물:

(a) 대두 종자와 추출 용액을 제공하는 단계로서, 추출 용액이 물이거나, 또는 알코올을 90 wt% 미만의 농도로 포함하는 알코올 용액인 단계;

(b) 1 atm 미만의 기압과 60℃ 미만의 온도에서, 상기 추출 용액을 사용해 상기 대두 종자를 추출하여, 조 추출물을 수득하는 단계; 및

(c) 상기 조 추출물로부터 고형물을 제거하여, 액상분을 수득하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대두 종자 추출물의 제조 방법이 단계 (c)에서 수득되는 액상분을 농축하여, 농축된 고형분을 수득하는 단계 (d)를 더 포함하는, 추출 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 대두 종자 추출물의 제조 방법이 단계 (d)에서 수득되는 농축된 고형분을 건조하는 단계 (e)를 더 포함하는, 추출 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 대두 종자 증기 분획 (soybean seed vapor fraction)을 더 포함하는, 추출 조성물:

(i) 대두 종자를, 물이거나, 또는 알코올을 15 wt% 미만의 농도로 포함하는 알코올 용액인 제2 추출 용액에 제공하는 단계; 및

(ii) 1 atm 미만의 기압과 110℃ 미만의 온도에서 상기 대두 종자를 상기 제2 추출 용액으로 추출하고, 증기 분획을 수집하는 단계.

청구항 5

제4항에 있어서, 단계 (i)에서 알코올 용액이 알코올을 5 wt% 미만의 농도로 포함하는, 추출 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 대두 종자 추출물의 함량이 0.001 wt% - 5 wt%이고; 대두 종자 증기 분획의 함량이 95 wt% - 99.999 wt%인, 추출 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 유방암이 P53 돌연변이 타입의 유방암인, 추출 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대두 종자 추출물, 이의 제조 방법 및 상처 치유 촉진, 신경 세포 증식 촉진 및/또는 뇌 질환 및/또는 신경퇴행성 질환의 치료, 유방암 치료, DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 부작용 저하 및/또는 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 약제 효과 강화에 있어서의 대두 종자 추출물의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대두 및 검정콩을 포함하는 대두 (Glycine max (L.) Merrill)는 전세계적으로 오일과 단백질의 가장 중요한 소스 중 하나이다. 예를 들어, 대두는, 샐러드 오일로서 사용되는 식용 오일을 수득하거나, 또는 마가린 및 쇼트닝을 제조하기 위해 가공할 수 있다. 대두 오일은 또한 페인트, 리놀륨, 유포, 인쇄 잉크, 솝, 살충제 및 소독제를 제조하는데 사용할 수도 있다. 또한, 오일 공업의 부산물로부터 수득되는 레시틴 인지질은 식품, 화장품, 약제, 가죽, 페인트, 플라스틱, 솝 및 디터전트에 습윤제 및 안정화제로서 사용할 수 있다. 대두박 (soy meal)은 가축에게 단백질이 매우 풍부한 사료 제품이다. 아울러, 대두 단백질은 합성 섬유, 접착제, 직물 사이징, 방수, 소화용 폼 (fire-fighting foam) 등의 제조에도 이용될 수 있다.

[0003] 의학적인 용도로, 대두는 다수 질환들에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 대두는 장, 심장, 신장, 간 및 위의 기능을 조절하는 영양 보충제로서 사용될 수 있다. 대두 오일은 불포화 지방산을 다량 함유하고 있어, 고콜레스테롤혈당을 치료하는데 사용할 수 있다. 대두로부터 유래된 의학용 레시틴은 항-지방간 제제 (lipotropic agent)로 작용한다. 또한, 항-강직인자 (antistiffness factor)로 알려진 티그마스테롤과, 몇몇 고혈압 치료제에 디오스게닌의 대체제로서 사용되는 시토스테롤 역시 대두로부터 제조된다. 대두에서 발견되는 이소플라본과 피토-에스테로겐은 유방암, 전립선암 및 대장암을 비롯한 다양한 암에 대해 예방 효과를 가지는 것으로 시사되고 있다 (Adlercreutz, H.; Phyto-oestrogens and cancer. The Lancet Oncology, 2002, Vol. 3, p. 364-373). 다른 문헌에는, 이소플라본의 유방암 발병 예방 효과를 달성하기 위해서는, 1달 동안 1일 용량으로 100 mg 이상을 계속 섭취하여야 하는 것으로 언급되어 있으며, 고 용량으로 지속적으로 섭취하는 경우에만 이소플라본이 항-암 효과를 발휘하는 것으로 제시되어 있다 (Lu LJ, Anderson KE, Grady JJ, Nagamani M.; Effects of soya consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women: implications for breast cancer risk reduction. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996 Jan; 5(1): 6370). 피토스테롤-첨가된 마가린 섭취 역시 중년층의 고콜레스테롤혈증 개체에서 혈장내 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도를 낮추는 것으로 확인된다 (Matvienko, O. A., Lewis, D. S., Swanson, M., Aendt, B., Rainwater, D. L., Stewart, J., and Alekel, D. L.; A single daily dose of soybean phytosterols in ground beef decreases serum total cholesterol and LDL cholesterol in young, mildly hypercholesterolemic men. Am J Clin Nutr., 2002, 76, p. 57 64).

[0005] 대두로부터 유래된 일부 추출물들 역시 약학적 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 갈색 콩 품종인 아키타-자이라이 (Akita-Zairai)의 종피에 대한 70% 아세톤 수용액 추출물에서 1,1-다이페닐-2-피크릴하이드라질 (DPPH) 라디칼-포획 활성 (radical-scavenging activity)이 개시된 바 있다 (Takahata, Y., O.-Kameyama, M., Furuta, S., Takahashi, M., and Suda, I.; Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. J. Agric. Food Chem., 2001, 49, p. 5843 5847). 60℃ 미만의 온도에서 서서히 로스팅하고 3일간 아스퍼질러스 오리제를 첨가해 발효시켜 각 성분을 저분자량의 물질로 변형시킨, 배아 추출물, 대두, 쌀겨, 율무 (tear grass), 참깨, 밀, 시트론, 녹차, 녹차잎 추출물 및 쌀 누룩 (malted rice) 유래 추출물은, 항산화 효과가 있는 것으로 확인되었다 (Minamiyama, Y., Yoshikawa, T., Tanigawa, T., Takahashi, S., Naito, Y., Ichikawa, H., and Kondo, M.; Antioxidative effects of a processed grain food. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 1994, 40, p. 467 477). 검정콩의 수 추출물 역시 랫에서의 혈청 글루타메이트-옥살레이트-트랜스아미나제 (sGOT) 및 혈청 글루타메이트-피루베이트-트랜스아미나제 (sGPT) 활성 측정을 통해, 아세트아미노펜-유발성 간 손상에 대해 효능이 있는 것으로 보고되어 있다 (Wu, S.-J., Wang, J.-S. and Chang, C.-H.; Evaluation of hepatoprotective activity of legumes. Phytomedicine, 2001, Vol. 8(3), p. 213 219).

[0006] 대두로부터 유래된 몇몇 특정 추출물들은 일부 피부 질환의 치료에 있어 화장품 또는 약제로 이용되는 것으로 알려져 있다. 스핑고마이에린과 인지질을 지정된 비율로 함유하는 콩 추출물 (soya extract)을 건조한 피부를 치료하기 위한 화장품에 사용하는 것이 개시되어 있다 (미국 특허 공개번호 US2002/0009509 A1). 이 추출물은, 숙성된 콩 (ripe whole soya bean) 또는 오일-프리 콩가루를 지방족 알코올을 단독으로 사용하거나 또는 물과의 혼합물로 사용해 추출한 다음, 지방족 탄화수소를 처리하고, 지방족 케톤으로 처리함으로써, 제조한다. 즉, 이 추출물은 지용성이다.

[0007] 훼이 (whey) 및 황벽나무 (Phellodendeon amurense Ruprecht extract)로부터 선택되는 하나 이상의 식물 추출물을 포함하며, 황금 (Scutellaria baicalensis Georgi), 컴프리 (Symphytum officinale Linne) 및 대두 (Glycine max (L.) Merrill)로부터 선택되는 추가적인 하나 이상의 추출물을 함유한, 여드름 치료제, 코스메틱 생성 저해제 (cosmetic production inhibitor) 또는 화장품 조성물이, 여드름 또는 여드름으로 인한 거친 염증

성 피부 등의 피부 질환을 예방 또는 치료하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다 (JP 특허 번호 2001097842).

[0008] 또한, 미생물에 의한 대두 발효 산물 역시 활성 산소의 작용을 억제하는 조성물, 제제, 식품, 화장품 및 의약제로서 활용가능하다 (예, 일본 특허 번호 4139132).

[0009] 대두에 대한 다수의 용도들이 보고되어 있지만, 추출물의 다양한 활용도는 여전히 개발 중에 있다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 대두 종자 추출물, 이의 제조 방법 및 상처 치유 촉진, 신경 세포 증식 촉진 및/또는 뇌 질환 및/또는 신경퇴행성 질환의 치료, 유방암 치료, DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 부작용 저하 및/또는 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 약제 효과 강화에 있어서의 대두 종자 추출물의 용도에 관한 것이다

[0011] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 대두 종자 추출물을 포함하는 추출 조성물을 제공한다:

[0012] (a) 대두 종자와 추출 용액을 제공하는 단계로서, 추출 용액이 물이거나, 또는 알코올을 약 90 wt% 미만의 농도로 포함하는 알코올 용액인 단계;

[0013] (b) 약 1 atm 미만의 기압과 약 60℃ 미만의 온도에서, 추출 용액을 사용해 대두 종자를 추출하여, 조 추출물을 수득하는 단계; 및

[0014] (c) 조 추출물로부터 고형물을 제거하여, 액상분을 수득하는 단계.

[0015] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 대두 종자 추출물의 제조 방법을 포함하는 전술한 추출 조성물의 제조 방법을 제공한다:

[0016] (a) 대두 종자와 추출 용액을 제공하는 단계로서, 추출 용액이 물이거나, 또는 알코올을 약 90 wt% 미만의 농도로 포함하는 알코올 용액인 단계;

[0017] (b) 약 1 atm 미만의 기압과 약 60℃ 미만의 온도에서, 추출 용액을 사용해 대두 종자를 추출하여, 조 추출물을 수득하는 단계; 및

[0018] (c) 조 추출물로부터 고형물을 제거하여, 액상분을 수득하는 단계.

[0019] 또한, 본 발명은 상처 치유를 촉진하는 약제의 제조에 있어 전술한 추출 조성물의 용도를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 신경 세포 증식의 촉진 및/또는 뇌 질환 및/또는 신경퇴행성 질환의 치료용 약제의 제조에 있어 전술한 추출 조성물의 용도를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 유방암 치료용 약제의 제조에 있어 전술한 추출 조성물의 용도를 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 부작용을 낮추거나 및/또는 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 약제 효과를 강화하는 약제의 제조에 있어 전술한 추출 조성물의 용도를 제공한다.

[0023] 본 발명은 아래 단락들에서 보다 상세히 기술된다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 효과들은 상세한 설명과 청구항에서 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1 - 3은 본 발명에 따른 대두 종자 추출물 (GMA1)의 이온 크로마토그래피 스펙트로그램을 도시한 것이다.

도 4 - 6은 본 발명에 따른 대두 종자의 증기 분획 (GMC1)의 이온 크로마토그래피 스펙트로그램을 도시한 것이다.

도 7은 이소플라본 표준 물질의 고 성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 스펙트로그램을 도시한 것이다.

도 8은 대두 종자 증기 분획 (GMC1)의 HPLC 스펙트로그램을 도시한 것이다.

도 9는 대두 종자 추출물 (GMA1) 0.3 중량부와 대두 종자 증기 분획 (GMC1) 1 중량부를 포함하는 추출 조성물의 HPLC 스펙트로그램을 도시한 것이다.

도 10은 당뇨병성 상해 치유에 있어 GMA1과 GMC1의 효과를 나타낸 것이다. GMC1과 GMA1이 상처 봉합 개선에 효과가 있는 지를 조사하기 위해, STZ-유발성 당뇨병 랫 모델을 이용하였다. 비교를 위해, 크림 베이스와 CGS-21680을 처리한 2 그룹도 수행하였다. 그 결과, 0.3 % GMA1 및 GMC1 둘다 크림 베이스 단독에 비해 상처 봉합

에 효과적이었으며, 0.3 % GMA1 처리군이 GMC1 보다 상처 봉합에 좀더 우수한 성능을 나타내었다.

도 11은 당뇨병성 상해 치유에 있어 GMC1과 조합된 여러가지 용량의 GMA1의 효과를 나타낸 것이다. 실험은 당뇨병성 상해 치료에 GMA1과 GMC1의 최상의 조합을 조사하기 위해 수행하였다. 도 11에 나타낸 바와 같이, GMA1을 여러가지 농도, 각각 0.009%, 0.045% 및 0.09%에서 GMC1과 조합하였다. 비교를 위해, 모든 실험 연구들에서 크림 베이스와 CGS-21680을 처리한 2 그룹도 수행하였다. 그 결과, 상처 치유에 있어, 0.009%, 0.045% 및 0.09% 용량 수준의 GMA1과 GMC1의 조합 효과가 GMC1 단독 보다 우수한 것으로 나타난다. 가장 효과적인 조합 치료는 GMA1 최고 용량 (0.09%)에서 나타난다.

도 12는 HaCaT 세포 이동에 대한 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획으로 된 조합물들의 효과를 나타낸 것이다.

도 13은 GMA1으로 처리된 IMR-32 세포의 세포 생존율을 도시한 것이다. 데이타는 7개의 그룹의 평균 ± SEM으로 나타낸다. 25 mg/ml GMA1으로 처리된 IMR-32 세포와 양성 대조군의 생존율은 매우 유의하였으며, 현저하게 증가하였다 (GMA1 p=0.0008, 양성 대조군 p=0.0246). 그 결과, GMA1이 세포 증식을 촉진시키는 것으로 확인된다 (*** p<0.001).

도 14는 GMA1으로 처리된 IMR-32 세포의 세포 생존율을 도시한 것이다. 데이타는 7개의 그룹의 평균 ± SEM으로 나타낸다. 25 mg/ml GMC1으로 처리된 IMR-32 세포와 양성 대조군의 생존율은 매우 유의하였으며, 현저하게 증가하였다 (GMC1 p=0.0255, 양성 대조군 p=0.0246). 그 결과, GMC1이 세포 증식을 촉진시키는 것으로 확인된다 (* p<0.05).

도 15는 GMA1과 GMC1 (GM)을 처리한 IMR-32 세포의 세포 생존율을 도시한 것이다. 데이타는 7개의 그룹의 평균 ± SEM으로 나타낸다. 25 mg/ml GM을 처리한 IMR-32 세포와 양성 대조군의 생존율은 매우 유의하였으며, 현저하게 증가하였다 (GMC1 p=0.0059, 양성 대조군 p=0.0246). 그 결과, GM이 세포 증식을 촉진시키는 것으로 확인된다 (** p<0.01).

도 16은 방사성 미로 (radial arm maze)의 다이아그램을 도시한 것이다.

도 17은 방사성 미로에서 치매 랫의 추적 경로를 나타낸 것이다. 4일째 랫의 추적 경로에 따르면, $AlCl_3$ + N2 그룹의 랫이 훈련 후 기억으로 미끼가 있는 위치에 도달할 수 있으며, $AlCl_3$ 그룹과 $AlCl_3$ + 크림 베이스 그룹의 랫은 그렇지 않다는 것을 시사해준다.

도 18은 방사성 미로 검사에서 치매 랫의 TME (total number of error) 다이아그램을 도시한 것이다. $AlCl_3$ 그룹과 $AlCl_3$ + 크림 베이스 그룹의 TME 값에는 유의한 차이가 없으며 (p>0.05), 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물을 처리한 지 4일째의 TME 값은 $AlCl_3$ 그룹 ($AlCl_3$+N2 p=0.0128) 보다 현저하게 낮다. 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물이 랫의 치매 치료에 효과가 있는 것으로 확인된다. 데이타는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 통계 분석을 위해 스튜던트 t-검정과 반복 ANOVA를 이용한다. $AlCl_3$ 그룹과 $AlCl_3$+크림 베이스 그룹의 비교시, p<0.05는 *로 표시하고, p<0.01은 **로 표시하는데, 이는 통계학적으로 유의한 차이가 있다는 것을 의미한다.

도 19는 방사성 미로 검사에서 치매 랫의 참조 (장기) 기억 에러 (RME) 다이아그램을 도시한 것이다. $AlCl_3$ 그룹과 $AlCl_3$+크림 베이스 그룹의 RME 값들은 유의한 차이가 없으며 (p>0.05), 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물을 처리한 지 4일째의 RME 값은 $AlCl_3$ 그룹 (p=0.0046) 보다 현저하게 낮다. 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물이 랫의 장기 기억을 복원하는 효과가 있는 것으로 확인된다. 데이타는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 통계 분석을 위해 스튜던트 t-검정과 반복 ANOVA를 이용한다. p<0.05는 *로 표시하고, p<0.01은 **로 표시하는데, 이는 통계학적으로 유의한 차이가 있다는 것을 의미한다.

도 20은 방사성 미로 검사에서 크림 베이스 (M), GMC1(M1) 및 GMC1+0.5%GMA1 (M3)으로 처리된 혈관성 치매 랫의 TME (total number of error) 다이아그램을 도시한 것이다. 양측 경동맥 결찰 (2VO) 그룹의 TME가 모의군보다 현저하게 높은 것으로 나타나며 (8일, p=0.0013), 이는 양측 경동맥 결찰에 의해 랫에서 혈관성 치매가 성공적으로 유도되었음을 의미한다. 그 결과, M1 및 M3 처리 후, TME 값이 2VO 그룹과 비교해 현저하게 개선되는 것으로 확인된다 (8일, M1 p=0.0019; M3 p=0.0355). 이는, M1 및 M3가 랫에서 혈관성 치매를 치료하는 효능을

가진다는 것을 시사한다. 데이타는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 통계 분석을 위해 스튜던트 t-검정과 반복 ANOVA를 이용한다. $p<0.05$는 *로 표시하고, $p<0.01$은 **로 표시하는데, 이는 통계학적으로 유의한 차이가 있다는 것을 의미한다.

도 21은 방사성 미로 검사에서 크림 베이스 (M), GMC1(M1) 및 GMC1+0.5%GMA1 (M3) 처리된 혈관성 치매 랫의 참조 기억 (장기 기억) 오류 (RME) 다이아그램을 도시한 것이다. 양측 경동맥 결찰 (2VO) 그룹의 RME가 모의군보다 현저하게 높은 것으로 나타나며 (8일, *p=0.0016*), 이는 양측 경동맥 결찰에 의해 랫에서 혈관성 치매가 성공적으로 유도되었음을 의미한다. 그 결과, M1 및 M3 처리 후, RME 값이 2VO 그룹과 비교해 현저하게 개선되는 것으로 확인된다 (8일, M1 p=0.0029; M3 p=0.0171). 이는, M1 및 M3가 랫에서 혈관성 치매의 RME를 치료하는 효능을 가진다는 것을 시사한. 데이타는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 통계 분석을 위해 스튜던트 t-검정과 반복 ANOVA를 이용한다. $p<0.05$는 *로 표시하고, $p<0.01$은 **로 표시하는데, 이는 통계학적으로 유의한 차이가 있다는 것을 의미한다.

도 22는 방사성 미로 검사에서 크림 베이스 (M), GMC1(M1) 및 GMC1+0.5%GMA1 (M3)으로 처리된 혈관성 치매 랫의 실행 기억 (단기 기억) 오류 (WME) 다이아그램을 도시한 것이다. 양측 경동맥 결찰 (2VO) 그룹의 WME가 모의군 보다 현저하게 높은 (8일, *p=0.0111*) 것으로 확인되며, 이는 양측 경동맥 결찰에 의해 랫에서 혈관성 치매가 성공적으로 유도되었음을 의미한다. 그 결과, M1 및 M3 처리 후, WME 값은 2VO 그룹과 비교해 현저하게 개선되는 것으로 확인된다 (8일, M1 p=0.0111; M3 p=0.0139). 이는, M1 및 M3가 랫에서 혈관성 치매의 WME를 치료하는 효능을 가진다는 것을 시사해준다. 데이타는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 통계 분석을 위해 스튜던트 t-검정과 반복 ANOVA를 이용한다. $p<0.05$는 *로 표시하고, $p<0.01$은 **로 표시하는데, 이는 통계학적으로 유의한 차이가 있다는 것을 의미한다.

도 23은 방사성 미로에서 혈관성 치매 (VD) 랫의 추적 경로를 나타낸 것이다. 8일째 VD 랫의 추적 경로는, 모의군, GMC1 (M1) 및 GMC1+0.5%GMA1 (M3) 그룹들이 훈련 후 기억에 의존해 미끼 위치에 도달할 수 있지만, 2VO와 M 그룹은 그렇지 않다는 것을 시사한다.

도 24는 혈관성 치매 랫의 뇌 손상 등급에 대한 통계학적 다이아그램을 도시한 것이다. 랫 뇌의 CT 이미지에 따른 뇌 손상 정도를 0~4 등급으로 분류한다. 그 결과, 2VO (*p=0.0000*) 그룹의 중증 뇌 손상이 GMC1 (M1) 및 GMC1+0.5%GMA1 (M3) 처리 (M1 *p=0.0030;* M3 *p=0.0238*)에 의해 현저하게 완화되는 것으로 확인된다. 데이타는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 통계 분석을 위해 스튜던트 t-검정과 반복 ANOVA를 이용한다. $p<0.05$는 *로 표시하고, $p<0.01$은 **로 표시하는데, 이는 통계학적으로 유의한 차이가 있다는 것을 의미한다.

뇌 손상의 CT 등급:

0: CT 스캔에서 명백한 이상

1: 뇌 조직에서 비정상적인 강도 영역이 일부 있음

2: 편측 뇌 조직의 25% 이상의 비정상적인 강도 영역, 또는 양측 뇌 조직에서의 적은 면적의 비정상적인 강도 영역 존재

3: 편측 뇌 조직의 50% 이상의 비정상적인 강도 영역, 정중 편위 (midline shift) 또는 양측 뇌 조직의 25% 이상에서의 비정상적인 강도 영역 존재

4: 양측 뇌 조직의 50% 이상의 비정상적인 강도 영역, 또는 명백한 정중 편위/왜곡 (midline shift/distortion) 존재.

도 25는 누드 마우스의 종양 증식율에 대한 다이아그램을 도시한 것이다. 누드 마우스에서 종양을 유도하고, 마우스를 그룹핑한 다음 종양이 지정된 체적에 도달하면 종양 영역과 전체 등 피부에 0.1 g/일의 용량으로 추출 조성물을 투여하였다. 그 결과, 추출 조성물이 종양 대조군과 비교해 종양 증식율을 낮출 수 있는 것으로 확인된다.

도 26은 누드 마우스의 종양 증식율에 대한 다이아그램을 도시한 것이다. 누드 마우스에서 종양을 유도하고, 마우스를 그룹핑한 다음 종양이 지정된 체적에 도달하면 종양 영역과 전체 등 피부에 0.1 g/일의 용량으로 추출 조성물을 투여하였다. 그 결과, 추출 조성물이 종양 대조군과 비교해 종양 증식율을 낮출 수 있는 것으로 확인된다.

도 27은 누드 마우스의 종양 증식율에 대한 다이아그램을 도시한 것이다. 누드 마우스에서 종양을 유도하고,

마우스를 그룹핑한 다음 종양이 지정된 체적에 도달하면 종양 영역과 전체 등 피부에 0.1 g/일의 용량으로 CTX를 주사하거나 GMC1 및 GMA1을 투여하였다. 그 결과, 추출 조성물이 CTX 대조군과 비교해 종양 증식율을 낮출 수 있는 것으로 확인된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 대두 종자 추출물을 포함하는 추출 조성물을 제공한다:

[0026] (a) 대두 종자와 추출 용액을 제공하는 단계로서, 추출 용액이 물이거나, 또는 알코올을 약 90 wt% 미만의 농도로 포함하는 알코올 용액인 단계;

[0027] (b) 약 1 atm 미만의 기압과 약 60℃ 미만의 온도에서, 추출 용액을 사용해 대두 종자를 추출하여, 조 추출물을 수득하는 단계; 및

[0028] (c) 조 추출물로부터 고형물을 제거하여, 액상분을 수득하는 단계.

[0029] 본 발명은 본 발명에 대한 다양한 구현예들에 대한 하기 상세한 설명, 실시예 및 화학적인 도면과 표를 관련 설명과 더불어 참조함으로써 보다 쉽게 이해할 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면 변경될 수 있음을 잘 인지하고 있기 때문에, 청구항에 명확하게 언급되지 않은 한, 본 발명은 구체적인 제조 방법, 담체 또는 제형으로, 또는 본 발명의 추출물을 국소, 경구 또는 비경구 투여용으로 의도된 제품 또는 조성물로 제형화하는 특정 방식으로 한정되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본원에서 사용되는 용어는 단순히 구체적인 구현예를 설명하기 위한 목적일 뿐 제한하고자 하는 것은 아닌 것으로 이해되어야 한다.

[0030] 본 발명에 따라 이용되는 바와 같이, 하기 용어들은 달리 언급되지 않은 한 하기 의미를 가지는 것으로 이해될 것이다.

[0031] 보통 범위는 "약" 하나의 특정 값에서 및/또는 "약" 다른 특정 값까지로 본원에서 표현된다. 이러한 범위로 표현된 경우, 구현예는 하나의 특정 값에서 및/또는 다른 특정 값까지의 범위를 포함한다. 마찬가지로, 값들이 용어 "약"을 사용해 대략치로 표현되는 경우, 특정 값이 다른 구현예를 구성하는 것으로 이해될 것이다. 범위의 양 끝값은 서로에 대해 의미가 있으며, 그리고 다른 끝값에 대해 독립적으로도 의미가 있는 것으로 추가로 이해될 것이다.

[0032] "선택적" 또는 "선택적으로"는 이후에 열거된 현상 또는 상황이 발생하거나 또는 발생하지 않을 수 있으며, 그 기재가 그러한 현상 또는 상황이 발생하는 경우와 발생하지 않는 경우를 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, "선택적으로 물질을 포함하는"이라는 의미는 이 물질이 존재하거나 또는 존재하지 않을 수 있다는 것을 의미한다.

[0033] 명세서와 첨부된 청구항에서 사용되는, 단수형 ("a," "an" 및 "the")은 문장에서 명확하게 달리 언급되지 않은 한 복수의 언급을 포함하는 것임에 유념하여야 한다. 따라서, 내용상 그렇지 않은 한, 단수의 용어는 복수를 포괄하며, 복수의 용어는 단수를 포괄한다.

[0034] 본원에서, 용어 "개체"는 모든 동물, 바람직하게는 포유류, 더 바람직하게는 인간을 의미한다. 개체의 예로는 인간, 인간을 제외한 영장류, 설치류, 기니아피그, 토끼, 양, 돼지, 염소, 소, 말, 개 및 고양이를 포함한다.

[0035] 본원에서 제공되는 활성 성분의 "유효량"이라는 용어는 원하는 기능에 대해 원하는 조절을 제공하기에 충분한 성분의 양을 의미한다. 후술한 바와 같이, 실제 필요량은 질환 상태, 개체의 신체 상태, 나이, 성별, 인종 및 체중, 조성물의 구체적인 성분 및 제형에 따라서는 개체별로 달라질 것이다. 투약 용법은 최적의 치료학적 반응을 유도하도록 조정할 수 있다. 예를 들어, 몇번 나누어 매일 투여하거나, 또는 치료 상황에 맞게 처방되는 바와 같이 용량을 비례적으로 줄일 수 있다. 즉, 실제 "유효량"을 명시하는 것은 가능하지 않다. 하지만, 적정 유효량은 당해 기술 분야의 당업자라면 단순히 일반적인 실험을 통해 결정할 수 있다.

[0036] 본원에서, 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 이 용어가 사용되는 장애, 질환 또는 병태의 반전, 완화, 진행 저해, 또는 이러한 장애, 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상의 반전, 완화, 진행 저해를 의미한다.

[0037] 용어 "담체" 또는 "부형제"는 본원에서 그 자체가 치료제는 아니지만, 치료제를 개체에게 전달하기 위해 또는 취급 또는 저장 특성을 개선하거나 또는 용량 단위 (dose unit)의 조성물을 경구 투여에 적합한 캡슐제 또는 정제와 같은 분리된 물품으로 제조할 수 있도록 또는 쉽게 제조할 수 있도록 하기 위해 제형에 첨가되는, 담체 및/또는 희석제 및/또는 보강제 또는 비히클로서 사용되는, 모든 물질을 지칭한다. 적절한 담체 또는 부형제들은 약제 제형 또는 식품 제품의 제조 분야의 당업자에게 잘 공지되어 있다. 담체 또는 부형제는, 예로서, 비제한

적으로, 완충제, 희석제, 붕해제, 결합제, 접착제, 습윤제, 폴리머, 윤활제, 유동화제, 유쾌하지 않은 맛 또는 향을 은폐 또는 상쇄하기 위해 첨가되는 물질, 향료, 색소, 향수 및 조성물의 외양 개선을 위해 첨가되는 물질을 포함할 수 있다. 허용가능한 담체 또는 부형제로는 사이트레이트 완충제, 포스페이트 완충제, 아세테이트 완충제, 바이카보네이트 완충제, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 마그네슘 옥사이드, 인산 및 황산의 소듐 및 칼슘 염, 마그네슘 카보네이트, 탈크, 젤라틴, 아카시아 검, 소듐 알기네이트, 펙틴, 덱스트린, 만니톨, 소르비톨, 락토스, 슈크로스, 전분, 젤라틴, 셀룰로스 물질 (예, 알칸산의 셀룰로스 에스테르 및 셀룰로스 알킬 에스테르), 저 융점 왁스 코코아 버터, 아미노산, 우레아, 알코올, 아스코르브산, 인지질, 단백질 (예, 혈청 알부민), 에틸렌다이아민 테트라아세트산 (EDTA), 다이메틸 설폭사이드 (DMSO), 소듐 클로라이드 또는 기타 염, 리포좀, 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 또는 분말, 폴리머 (예, 폴리비닐-피롤리돈, 폴리비닐 알코올 및 폴리에틸렌 글리콜), 및 그외 약제학적으로 허용가능한 물질을 포함한다. 담체는 치료제의 약리학적 활성을 파괴하지 않아야 하며, 물질의 치료학적 양을 전달하기에 충분한 용량으로 투여하였을 때 무독성이어야 한다.

[0038] 본 발명에 따른 추출 조성물은 대두 종자 추출물을 포함한다. 본 발명에 따르면, 종자의 종피 색에 따라서, 대두는 노란콩, 베지터블 콩 (vegetable soybean), 백색 콩, 필 빈 (peel bean), 그린 빈 (green bean), 검정콩을 지칭할 수 있으며; 바람직하게는 노란콩 또는 검정콩을 지칭할 수 있다. 본 발명에 따르면 콩과, 콩속에 속하며, 바람직하게는 대두 (Glycine max (L.) Merrill), 글리신 포르모사나 호소카와 (*Glycine formosana* Hosokawa) 또는 글리신 소야 옥트. non Sieb. & Zucc (*Glycine soja auct.* non Sieb. & Zucc)이다.

[0039] 본 발명에 따른 종자는 바람직하게는 콩 꼬투리 (pod)에서 껍질 (shell)을 제거함으로써 수득되는 종자를 의미한다. 일반적으로, 대두 열매는 털이 난 꼬투리이며, 꼬투리의 껍질이 종자를 덮고 있다. 꼬투리의 껍질은 내부 종자를 보호하기 위해 매우 딱딱하며, 방수성을 나타낸다. 대두 열매로부터 대두 종자를 수득하는 방법, 꼬투리에서 껍질을 제거하는 방법은 당해 기술 분야의 당업자들에게 알려져 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 종자는 종자 외막 (seed coat), 자엽 및 배축을 포함한다.

[0040] 본 발명에 따른 대두 종자 추출물은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다:

[0041] (a) 대두 종자와 추출 용액을 제공하는 단계로서, 추출 용액이 물이거나, 또는 알코올을 약 90 wt% 미만의 농도로 포함하는 알코올 용액인 단계;

[0042] (b) 약 1 atm 미만의 기압과 약 60℃ 미만의 온도에서, 추출 용액을 사용해 대두 종자를 추출하여, 조 추출물을 수득하는 단계; 및

[0043] (c) 조 추출물로부터 고형물을 제거하여, 액상분을 수득하는 단계.

[0044] 본 발명에 따른 대두 종자를 추출하기 위한 추출 용액은 물이거나, 또는 알코올을 약 90 wt% 미만의 농도로 포함하는 알코올 용액이다. 바람직하게는 알코올은 C1 내지 C7 알코올이다. 용어 "C1 내지 C7 알코올"은, 본원에서, 직선형 또는 분지형의, 치환 또는 비치환된, 1가 또는 다가 불포화된 알코올이며; 바람직하게는, 비치환된 일가 포화 알코올이다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, C1 내지 C7 알코올은 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, n-부탄올, iso-부탄올, sec-부탄올, tert-부탄올, 1-펜탄올, 2-펜탄올, 3-펜탄올, 2-메틸-1-부탄올, 2-메틸-2-부탄올, 3-메틸-2-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 2,2-다이메틸-1-프로판올, 1-헥사놀, 2,4-헥사다이엔-1-올, 2-메틸-사이클로펜탄올, 사이클로헥사놀, 1-헵타놀, 2-헵타놀 또는 사이클로헵틸 알코올로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더 바람직하게는, C1 - C7 알코올은 메탄올 또는 에탄올이며; 가장 바람직하게는, C1 - C7 알코올은 에탄올이다. C1 - C7 알코올은 단독으로 사용하거나 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0045] 알코올은, 본원에서, 바람직하게는 약 90% (v/v) 미만; 바람직하게는 약 5% (v/v) - 약 90% (v/v); 더 바람직하게는 약 30% (v/v) - 약 85% (v/v); 보다 더 바람직하게는 약 50% (v/v) - 약 75% (v/v)의 농도를 가진 알코올 용액이다.

[0046] 본 발명에 따른 방법은, (b) 약 1 atm 미만의 기압과 약 60℃ 미만의 온도에서, 추출 용액을 사용해 대두 종자를 추출하여, 조 추출물을 수득하는 단계를 포함한다. 종자의 일부를 용매로 추출하는 방식은 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 조 추출물은, 대두 종자를 분쇄, 교반, 교란, 절단 또는 세절 등과 같은 임의의 통상적인 수단으로 작은 조각으로 자르고, 이 조각들을 추출용 추출 용액에 침지함으로써, 수득할 수 있다. 당해 기술분야에서의 종자 세절 방식을 본 발명에 적용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 대두 종자는 분말로 분쇄한다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 대두 종자는 추출용 추출 용액에 침지하며, 더 바람직하게는 대두 종자는 추출 용액에 침지하고, 초음파 진동 추출 (ultrasonic vibration extraction)을 거친다.

[0047] 본 발명의 방법에서, 단계 (b)에 앞서 대두 종자는 바람직하게는 건조된다.

[0048] 본 발명에서, 대두 종자와 추출 용액의 비율 (w/v)은 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 대두 종자와 추출 용액의 비율 (w/v)은 약 1:1 - 약 1:30이고; 더 바람직하게는, 약 1:5 - 약 1:20이며; 가장 바람직하게는 약 1:10이다.

[0049] 본 발명에 따르면 단계 (b)에서 추출 온도는 약 60℃ 미만이며, 바람직하게는 약 25℃ - 약 55℃; 더 바람직하게는 약 30℃ - 약 50℃; 보다 더 바람직하게는 약 45℃이다.

[0050] 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 추출 단계 (b)는 반복할 수 있으며, 추출물은 조합 (merging)에 의해 수집한다.

[0051] 본 발명에 따른 방법은, (c) 조 추출물로부터 고형물을 제거하여, 액상분을 수득하는 단계를 포함한다. 고형물을 제거하여 액상분을 수득하는 방식은 당해 기술 분야의 당업자에게 잘 알려져 있으며, 그 예로 여과, 원심분리 또는 석출을 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0052] 바람직하게는, 본 발명에 따른 방법은, (d) 단계 (c)에서 수득되는 액상분을 농축하여, 농축된 고형분 (solid portion)을 수득하는 단계를 더 포함한다. 농축 방법은 감압 콘덴서에 의해서와 같이 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다.

[0053] 바람직하게는, 본 발명에 따른 방법은 (e) 단계 (d)에서 수득한 농축된 고형분을 건조하는 단계를 더 포함한다. 건조 방식은 공기-건조 또는 동결 건조기에 의해서와 같이, 당해 기술 분야의 당업자들에게 잘 알려져 있다.

[0054] 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 대두 종자 추출물에 대해 CarboPac PA1 Analytical (4 x 250mm) 컬럼을 이용한 이온 크로마토그래피 분석을 수행한다. 이동 상은 물 87%와 500 mM NaOH 13%이며, 내부 표준 물질은 말토스 일수화물이다. 등용매성 용출을 1.0 ml/min의 낮은 유속과 0.5초 사이클로 수행한다. 각 사이클에서, 분석은 0.00초 - 0.2초, 기준 전위 0.1 V; 0.2초 - 0.4초까지 0.1 V; 0.41초 - 0.42초에 -2.0 V; 0.43초,에 0.6 V; 0.44초 - 0.5초에 -0.1 V로 수행하며, 전체 분석 기간은 55분이다.

[0055] 수득한 스펙트로그램은 도 1-3에 나타낸다. 피크 시간은 표 1에 나타낸다.

표 1

[0056]

	피크 시간 (분)					
	피크 1	피크 2	피크 3	피크 4	피크 5	내부 표준물질
도 1	5.913	6.660	10.120	18.010	20.510	28.390
도 2	5.660	6.420	10.244	18.600	20.784	28.597
도 3	5.857	6.590	10.100	18.167	20.847	28.304

[0057] 바람직하게는, 본 발명에 따른 추출 조성물은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 대두 종자 증기 분획을 더 포함한다:

[0058] (i) 대두 종자를, 물이거나, 또는 알코올을 약 15 wt% 미만의 농도로 포함하는 알코올 용액인 제2 추출 용액에 제공하는 단계; 및

[0059] (ii) 약 1 atm 미만의 기압과 약 110℃ 미만의 온도에서 대두 종자를 제2 추출 용액으로 추출하고, 증기 분획을 수집하는 단계.

[0060] 본 발명에 따른 대두 종자 증기 분획을 제조하기 위한 제2 추출 용액은 물이거나, 또는 알코올을 약 15 wt% 미만의 농도로 포함하는 알코올 용액이며, 바람직하게는 물이다. 알코올 종류는 대두 종자 추출물의 제조용 추출 용액과 동일할 수 있으며, 본원에서 반복되지 않는다.

[0061] 제2 추출 용액인 알코올은, 농도가 약 15% (v/v) 미만, 바람직하게는 약 10% (v/v) 미만, 더 바람직하게는 약 5% (v/v) 미만인 알코올 용액이다.

[0062] 본 발명에 따른 대두 종자 증기 분획의 제조 방법은, (ii) 약 1 atm 미만의 기압과 약 110℃ 미만의 온도에서 대두 종자를 제2 추출 용액으로 추출하고, 증기 분획을 수집하는 단계를 포함한다. 추출 방식은, 대두 종자 증기 분획을 약 1 atm 미만의 기압과 약 110℃ 미만의 온도에서 증발시키는 한, 대두 종자 추출물의 제조 방식과 동일할 수 있다. 증기 분획은 증기 물질을 냉각시켜 액체 형태로 수집할 수 있다.

[0063] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 소정의 기압과 온도에서 대두 종자를 증발시키고, 증기를 냉각시켜 증기 분획을 수집하는 과정은, 증기를 냉수가 공급되는 콘덴싱 관으로 증발시킨 다음, 증기를 콘덴싱 관을 통과시켜 냉각시킴으로써 액체 형태로 증기 분획을 수집하는, 회전 증발기에서 수행할 수 있다. 이러한 조작은 간단하며, 비용이 적게 든다.

[0064] 본 발명에 따르면, 대두 종자와 제2 추출 용액의 비율 (w/v)은 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 대두 종자와 제2 추출 용액의 비율 (w/v)은 약 1:1 - 약 1:30이고; 더 바람직하게는 약 1:5 - 약 1:20이고; 가장 바람직하게는 약 1:10이다.

[0065] 본 발명에 따른 단계 (ii)에서 추출 온도는 약 110℃ 미만이며; 바람직하게는 약 60℃ - 약 110℃이다.

[0066] 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 추출 단계 (ii)는 반복할 수 있으며, 대두 종자 증기 분획은 조합 (merging)에 의해 수집한다.

[0067] 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 대두 종자 증기 분획에 대해 CarboPac PA1 Analytical (4 x 250mm) 컬럼을 이용한 이온 크로마토그래피 분석을 수행한다. 이동 상은 물 87%와 500 mM NaOH 13%이며, 내부 표준 물질은 말토스 일수화물이다. 등용매성 용출을 1.0 ml/min의 낮은 유속과 0.5초 사이클로 수행한다. 각 사이클에서, 분석은 0.00초 - 0.2초에 기준 전위 0.1 V; 0.2초 - 0.4초까지 0.1 V; 0.41초 - 0.42초에 -2.0 V; 0.43초에 0.6 V; 0.44초 - 0.5초에 -0.1 V로 수행하며, 전체 분석 기간은 55분이다.

[0068] 수득한 스펙트로그램은 도 4-6에 나타낸다. 피크 시간은 표 2에 나타낸다.

표 2

[0069]

	피크 시간
도 4	2.690
도 5	2.587
도 6	2.664

[0070] 본 발명의 일 구현예에서, 추출 조성물에 대해 대두 종자 추출물의 함량은 약 0.001% wt - 약 10% wt; 바람직하게는 약 0.01% wt - 약 5% wt; 더 바람직하게는 약 0.001% wt - 약 1.5% wt이다. 다른 측면에서, 추출 조성물에 대해 대두 종자 증기 분획의 함량은 약 0.04% wt - 약 99.999% wt; 바람직하게는 약 10% wt - 약 99.9% wt; 더 바람직하게는 약 30% wt - 약 99% wt이다.

[0071] 본 발명에 따른 추출 조성물은 바람직하게는 약학 조성물, 식품 조성물 또는 화장품 조성물이다.

[0072] 본 발명에 따른 약학 조성물은 바람직하게는 당해 기술 분야에 공지된 임의 방법에 의해 국소로 또는 전신으로 투여되며, 비제한적인 예로, 근육내, 진피내, 정맥내, 피하, 복막내, 비강내, 경구, 점막 경로나 또는 외용 경로 (external route)를 포함한다. 적절한 경로, 제형 및 투여 스케줄은 당해 기술 분야의 당업자가 결정할 수 있다. 본 발명에서, 약학 조성물은 대응되는 투여 경로에 따라, 액체 용액, 현탁제, 유제, 시럽, 정제, 환제, 캡슐제, 서방형 제형, 산제, 과립제, 앰플, 주사액, 주입액, 키트, 연고, 로션, 리니먼트제 (liniment), 크림 또는 이들의 조합 등의 다양한 방식으로 제형화할 수 있다. 필요한 경우, 살균하거나 또는 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 첨가하여 혼합할 수 있으며, 이들 다수는 당해 기술 분야의 당업자에게 공지되어 있다.

[0073] 외용 경로는, 본원에서, 국소 투여라고도 하며, 비제한적인 예로, 통기 (insufflation) 및 흡입 (inhalation)에 의한 투여를 포함한다. 국소 투여를 위한 다양한 타입의 조제물의 예로는 연고제, 로션제, 크림제, 겔제, 폼제, 경피 패치에 의한 전달용 조제물, 산제, 스프레이제, 에어로젤, 캡슐제 또는 흡입기나 취입기에 사용하기 위한 카트리지, 또는 점적제 (예, 점안제 또는 점비제), 분무용 용액제/현탁제, 좌제, 페서리제, 정체 관장제 (retention enema) 및 씹거나 또는 삼키는 정제 또는 펠렛제 또는 리포좀 또는 마이크로엔캡슐레이션 조제물을 포함한다.

[0074] 연고제, 크림제 및 겔제는, 예를 들어, 적절한 증점제, 겔화제 및/또는 용매를 첨가하여 수성 또는 오일성 베이스와 함께 제형화할 수 있다. 이들 베이스는, 따라서, 예를 들어, 물 및/또는 액체 파라핀 또는 아라키스 오일 또는 캐스터 오일과 같은 식물성 오일 등의 오일, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 용매를 포함할 수 있다. 베이스의 특성에 따라 사용될 수 있는 증점제와 겔화제로는 연질 파라핀, 알루미늄 스테아레이트, 세토스테아릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 양모지 (woolfat), 밀랍, 카르복시폴리메틸렌 유도체, 셀룰로스 유도체, 및/또는

글리세릴 모노스테아레이트 및/또는 비-이온성 유화제를 포함한다.

[0075] 로션제는 수성 또는 오일성 베이스와 함께 제형화될 수 있으며, 일반적으로 하나 이상의 유화제, 안정화제, 분산화제, 현탁화제 또는 증점제도 포함할 것이다.

[0076] 외용 산제는 임의의 적절한 분말 베이스, 예를 들어, 탈크, 락토스 또는 전분을 보조로 사용하여 제조할 수 있다. 점적제는, 하나 이상의 분산화제, 가용제, 현탁화제 또는 보존제를 또한 포함하는 수성 또는 비-수성 베이스를 사용해 제형화할 수 있다.

[0077] 스프레이 조성물은 정량 투약 흡입기와 같은 가압 팩으로부터, 적절한 액화 추진제를 사용하여 전달되는 수용액 또는 현탁제 또는 에어로졸제로서 제형화할 수 있다. 흡입용으로 적합한 에어로졸 조성물은 현탁물 또는 용액일 수 있다. 에어로졸 조성물은 선택적으로 계면활성제, 예를 들어, 올레산 또는 레시틴 및 공용매, 예를 들어 에탄올 등의 당해 기술 분야에 잘 알려진 추가적인 제형 부형제를 포함할 수 있다.

[0078] 국소 조제물은 발병 부위에 1일 1회 이상 도포함으로써 투여할 수 있으며; 피부 영역 위에 폐쇄 드레싱을 사용하는 것이 유익할 수 있다. 접착식 저장 시스템 (adhesive reservoir system)을 통해 계속적인 또는 지속적인 전달을 달성할 수 있다.

[0079] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 물로 필수적으로 구성되는 수 상 제형일 수 있으며; 또한, 물과 물-혼화성 용매 (25℃에서, 50 중량% 이상의 물에 혼화가능함)의 혼합물, 예를 들어, 에탄올 또는 이소프로판올과 같이 탄소 원자 1-5개를 함유한 저급 모노알코올, 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜 또는 다이프로필렌 글리콜과 같이 탄소 원자 2-8개를 함유한 글리콜, C3-C4 케톤과 C2-C4 알데하이드, 및 글리세린과의 물 혼합물을 포함할 수 있다. 이러한 수성 제형은, 바람직하게는 수성 겔 또는 하이드로겔 제형의 형태이다. 하이드로겔 제형은 액체 용액의 점성을 높이기 위해 증점제를 포함한다. 증점제의 예로는, 비제한적으로, 카보머, 셀룰로스 기재 물질, 검, 알긴, 아가, 펙틴, 카라기난, 젤라틴, 미네랄 또는 개질된 미네랄 증점제, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리알코올, 폴리아크릴아미드 및 그외 폴리머성 증점제를 포함한다. 바람직하게는 조성물에 안정성을 부여하고, 최적의 유동 특징을 제공하는 증점제가 사용된다.

[0080] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 유제 또는 크림 제형의 형태일 수 있다. 이 조성물은 유화성 계면활성제를 포함할 수 있다. 이러한 계면활성제는 음이온성 계면활성제와 비-이온성 계면활성제로부터 선택될 수 있다. 계면활성제의 특성과 기능 (유화)에 대한 내용은 문헌 "Encyclopedia of Chemical Technology, Kirk-Othmer", volume 22, pp. 333-432, 3rd edition, 1979, Wiley, 특히 347-377 페이지에서 음이온성 계면활성제와 비-이온성 계면활성제에 대해 참조할 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 화장품 조성물에 바람직하게 사용되는 계면활성제는, 비-이온성 계면활성제; 지방산, 지방산 알코올, 폴리에톡시화 또는 폴리글리세롤화 지방산 알코올, 예를 들어, 폴리에톡시화 스테아릴 또는 세틸스테아릴 알코올, 슈크로스의 지방산 에스테르, 알킬글루코스 에스테르, 특히 C1-C6 알킬 글루코스의 폴리옥시에틸렌화 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물; 음이온성 계면활성제; 아민, 수성 암모니아 또는 알칼리 염으로 중화된 C16-C30 지방산, 및 이의 혼합물로부터 선택된다. 수중유 또는 수중왁스 에멀젼의 제조를 가능하게 하는 계면활성제가 바람직하게는 사용된다.

[0082] 본 발명에 따른 화장품 조성물은, 부틸화 p-크레솔, 부틸화 하이드로퀴논 모노메틸 에테르 및 토코페롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 생리학적으로 허용가능한 항산화제를 유효량으로 더 포함할 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 천연 또는 개질된 아미노산, 천연 또는 개질된 스테롤 화합물, 천연 또는 개질된 콜라겐, 실크 단백질 또는 콩 단백질을 추가로 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 바람직하게는 피부, 털, 속눈썹 또는 손발톱과 같은 케라틴 물질에 국소 적용하기 위한 용도로 제형화된다. 이는, 이러한 적용 타입에 일반적으로 사용되는 모든 제시 형태, 특히 수성 또는 오일성 용액, 수중유 또는 유중수 유제, 실리콘 유제, 마이크로유제 또는 나노유제, 수성 또는 오일성 겔 또는 액체, 페이스티 또는 고형 무수 산물의 형태일 수 있다.

[0085] 본 발명에 따른 화장품 조성물은 유동성이 높거나 낮을 수 있으며, 백색 또는 유색 크림, 연고, 밀크, 로션, 세럼, 페이스트, 무스 또는 겔의 외형을 가질 수 있다. 이 조성물은, 선택적으로 에어로졸, 패치 또는 산제의 형태로 피부 위에 국소 적용할 수 있다. 이는, 또한, 고형 형태, 예를 들어 스틱 형태일 수 있다. 이는 피부 관리 제품 및/또는 메이크업 제품으로서 사용할 수 있다. 다른 예로, 이것은 샴푸 또는 컨디셔너로 제조할 수 있다.

[0086] 본 발명에 따른 화장품 조성물은, 공지 방식으로, 화장품에 일반적인 첨가제와 보강제, 예를 들어, 친수성 또는 친지성 겔화제, 보존제, 항산화제, 용매, 향제, 충진제, 색소, 향 흡착제 및 염료를 포함할 수 있다.

[0087] 추출 조성물은, 식품 조성물의 제조 공정에서 전통적인 식품 조성물 (즉, 식용 식품 또는 음료 또는 이의 전구체)에 첨가할 수 있다. 거의 모든 식품 조성물에 본 발명의 추출 조성물을 첨가할 수 있다. 본 발명의 추출 조성물이 보충될 수 있는 식품 조성물로는, 비제한적으로, 캔디, 제과제빵 제품 (baked good), 아이스크림, 유제품, 달콤하고 맛있는 스낵, 스낵 바, 식사 대체품, 패스트 식품, 스프, 파스타, 면, 캔 식품, 냉동 식품, 건조 식품, 냉장 식품, 오일 및 지방류, 유아용 식품 또는 빵에 도포되는 소프트 식품을 포함한다.

[0088] 또한, 본 발명은 상처 치유 촉진 약제의 제조에 있어 전술한 추출 조성물의 용도를 제공한다.

[0089] 또한, 본 발명은, 전술한 추출 조성물을 유효량으로, 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제와 함께 상처 치유 촉진이 필요한 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 상처 치유를 촉진하는 방법을 제공한다.

[0090] 바람직하게는, 본 발명에 따른 추출 조성물은 피부 세포 이동을 촉진함으로써 상처 치유를 촉진한다. 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 추출 조성물은 각질 형성 세포의 이동을 촉진할 수 있으며, 피부 세포는 바람직하게는 각질 형성 세포이다. 다른 측면에서, 본 발명에 따른 동물 모델에서, 추출 조성물은 당뇨병 환자에서 상처 치유를 촉진할 수 있으며, 상처는 바람직하게는 당뇨병성 상해이다.

[0091] 본 발명의 일 구현예에서, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 조성물은, 크림 베이스와 비교해, 상처 봉합에 유의한 효과 ($p<0.5$)를 가지며, 대두 종자 추출물은 대두 종자 증기 분획 보다 상처 봉합에 약간 우수한 성능을 나타낸다.

[0092] 본 발명의 다른 구현예에서, 대두 종자 추출물을 다양한 용량 수준으로, 대두 종자 증기 분획과 조합하여, 당뇨병성 상처 치유에 있어 효과를 조사하기 위해 사용한다. 그 결과, 상처 치유에 있어, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획의 조합 효과가 대두 종자 증기 분획 단독 보다 우수한 것으로 확인된다. 가장 효과적인 조합 치료는 대두 종자 추출물을 최고 용량으로 사용한 경우에서 확인된다.

[0093] 본 발명의 일 구현예에서, 피부 각질 형성 세포의 이동을 촉진하는데 있어 그 효과를 분석하기 위해, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획은 단독으로 또는 조합하여 이용한다. 그 결과, 피부 각질 형성 세포의 이동을 촉진하는데 있어, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획의 조합 효과가 대두 종자 추출물 또는 대두 종자 증기 분획 단독에 비해 우수한 것으로 확인된다.

[0094] 또한, 본 발명은 신경 세포 증식의 촉진 및/또는 뇌 질환 및/또는 신경퇴행성 질환의 치료용 약제의 제조에 있어 전술한 추출 조성물의 용도를 제공한다.

[0095] 또한, 본 발명은, 유효량의 전술한 추출 조성물과 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 필요한 개체에서 신경 세포의 증식 촉진 및/또는 뇌 질환 및/또는 신경퇴행성 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0096] 바람직하게는, 신경 세포는 중추 신경계 세포이며; 더 바람직하게는, 뇌 신경 세포이며; 보다 더 바람직하게는, 신경모세포종 세포이다.

[0097] 본 발명에 따른 뇌 질환 및/또는 신경퇴행성 질환은 바람직하게는, 혈관성 치매, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 뇌 혈관 질환, 염증성 뇌 손상, 뇌 손상 주변의 염증 반응, 뇌 병변, 뇌 혈종, 뇌실 부종 (swelling ventricle) 및 뇌실 확장 (ventricular dilatation)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0098] 본 발명의 일 구현예에서, 대두 종자 추출물, 대두 종자 증기 분획, 및 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물을 사용해, 인간 신경모세포종 세포를 치료한다. 그 결과, 대두 종자 추출물, 대두 종자 증기 분획, 및 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물을 처리한 후, 세포 생존성은 현저하게 증가한다. 따라서, 대두 종자 추출물, 대두 종자 증기 분획 및 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물은 신경 세포 증식을 촉진하는 효과를 가진다.

[0099] 본 발명의 다른 구현예에서, 치매 랫 동물 모델의 방사성 미로 검사에서, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물을 처리한 이후에, 총 기억 오류와 참조 기억 오류가 무처리 군 보다 현저하게 낮았다. 이는, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물이 치매 랫을 치료하는 효과를 가짐을 보여주는 것이다.

[0100] 본 발명의 다른 구현예에서, 치매 랫 동물 모델의 방사성 미로 검사에서, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물을 처리하였을 때, 총 기억 오류와 참조 기억 오류가 무처리 군 보다 현저하게 낮았다. 이는, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물이 치매 랫을 치료하는 효과가 있다는 것을 보여주는 것이다.

[0101] 혈관성 치매 모델에서, 그 결과에 따르면, 혈관성 치매로 인한 기억 장애가 본 발명에 따른 추출 조성물의 처리 후 현저하게 개선되는 것으로 나타났다. 대두 종자 증기 분획 및 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물은 둘다 실행 기억 오류, 참조 기억 오류 및 총 기억 오류를 개선한다. 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물은, 대두 종자 증기 분획 단독과 비교해, 혈관성 치매로 인한 기억 장애를 치료하는데 보다 우수한 효과를 가진다.

[0102] 또한, 본 발명은 유방암 치료용 약제의 제조에 있어 전술한 추출 조성물의 용도를 제공한다.

[0103] 또한, 본 발명은, 유효량의 전술한 추출 조성물과 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료가 필요한 개체에서 유방암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0104] 바람직하게는, 유방암은 p53 돌연변이 타입의 유방암이다.

[0105] 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, p53 돌연변이 타입의 인간 유방암 세포주를 이용해, 마우스에서 종양 증식을 관찰하기 위한 원발성 부위에서 상황을 시뮬레이션하기 위한 동물 모델을 확립한다. 인간에서의 투여를 시뮬레이션하는 경우, 본 발명에 따른 추출 조성물을 여러가지 농도로 투여한다. 본 발명에 따른 추출 조성물은 종양을 가진 마우스에서 종양 증식율을 억제하는 효과를 가지는 것으로 확인된다.

[0106] 또한, 본 발명은 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 부작용을 낮추거나 및/또는 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 약제 효과를 강화하는 약제의 제조에 있어 전술한 추출 조성물의 용도를 제공한다.

[0107] 또한, 본 발명은, 유효량의 전술한 추출 조성물과 선택적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 부작용 저하 및/또는 약물의 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약제의 효과 강화가 필요한 개체에서, DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 부작용 저하 및/또는 약물의 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약제 효과를 강화하는 방법을 제공한다.

[0108] 용어 "DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물"은, 본원에서, 유사분열에서 필수적인 DNA 및/또는 RNA 복제 과정을 방해함으로써 종양 세포를 사멸시키는 약물을 지칭한다. 바람직하게는, DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물로는 사이클로포스파미드, 테모졸로미드, 헥사메틸멜라민, 백금 착화물, 블레오마이신 (bleomycin), 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine), 파클리탁셀, 도세탁셀 (docetaxel), 폴릭산 길항제, 퓨린 길항제 또는 피리미딘 길항제를 포함한다.

[0109] 본 발명의 바람직한 일 구현예에서, 인간 유방암 세포주를 이용해, 원발성 부위에서 상황을 시뮬레이션하기 위한 동물 모델을 확립한다. 사이클로포스파미드를 투여한 종양-보유 동물과 비교해, 본 발명에 따른 추출 조성물은, 종양-보유 마우스에서 화학요법제의 종양 증식을 저해하는 효과를 강화한다. 본 발명에 따른 추출 조성물은 종양 증식을 저해하며, 화학요법제의 종양 크기 축소 효과를 강화하며, 종양 압박을 완화함으로써 통증을 경감함으로써, 환자는 보다 나은 삶의 질을 가질 수 있다.

[0110] 아래 실시예들은 본 발명을 실시하는데 있어 당해 기술 분야의 당업자에게 도움을 제공하기 위한 것일 뿐이다.

[0111] **실시예**

[0112] *대두 종자 추출물* (GMA1)

[0113] 대두 (Glycine max (L.)Merr.)의 종자를 분말로 분쇄하고, 70 중량%의 에탄올 또는 증류수를 추출 용액으로서 이용하였으며; 대두 종자와 추출 용액의 비율 (w/v)은 약 1:10이었다. 대두 종자를 약 1 atm 기압 및 약 45℃에서 추출하여, 조 추출물을 수득하였다. 조 추출물에서 고형물을 제거하여, 액상분을 수득하였다. 액상분을 감압 콘덴서로 추가로 농축하여, 농축된 고형분을 수득하였다. 농축된 고형분을 70℃에서 추가로 건조하였다.

[0114] *대두 종자 증기 분획* (GMC1)

[0115] 대두 (Glycine max (L.)Merr.)의 종자를 분말로 분쇄하고, 2 중량%의 에탄올 또는 증류수를 제2 추출 용액으로서 이용하였으며; 대두 종자와 제2 추출 용액의 비율 (w/v)은 약 1:10이었다. 대두 종자를 약 1 atm 미만의 압력과 90℃의 온도에서 회전 증발기 (EYELA N-1000S, 1000S-W)를 사용해 증발시키고, 냉수가 공급되는 콘덴싱 관

을 통과시켜, 증기 분획을 수득하였다.

[0116] *대두 종자 추출물 (GMA1)과 대두 종자 증기 분획 (GMC1)의 분석*

[0117] 수득한 대두 종자 추출물 (GMA1)과 대두 종자 증기 분획 (GMC1)에 대해, CarboPac PA1 Analytical (4 x 250mm) 컬럼으로 이온 크로마토그래피 분석을 수행하였다. 이동상은 물 87%와 500 mM NaOH 13%였으며; 내부 표준물질은 말토스 일수화물이었다. 등용매성 용출을 1.0 ml/min의 저속으로 0.5초 사이클로 수행하였다. 각 사이클에서, 분석은 0.00초 - 0.2초에 기준 전위 0.1 V; 0.2초 - 0.4초까지 0.1 V; 0.41초 - 0.42초에 -2.0 V; 0.43초에 0.6 V; 0.44초 - 0.5초에 -0.1 V로 수행하며, 전체 분석 기간은 55분이었다.

[0118] 대두 종자 추출물 (GMA1)의 스펙트로그램은 도 1-3에 도시한다. 피크 시간은 표 1에 나타낸다.

[0119] 대두 종자 증기 분획 (GMC1)의 스펙트로그램은 도 4-6에 도시한다. 피크 시간은 표 2에 나타낸다.

[0120] *대두 종자 추출물 (GMA1)은 이소플라본을 극소량 함유하며, 대두 종자 증기* 분획 (GMC1)은 이소플라본을 함유하지 않는다.

[0121] 대두 종자 추출물 (GMA1)과 대두 종자 증기 분획 (GMC1)에 이소플라본이 함유되었는 지를 분석하기 위해, 고 성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 이용하였다.

[0122] HPLC 조건은 하기에 열거한다:

[0123] 장치: Hitachi HPLC CM5000 Series; 펌프: CM5110; 검출기: CM5430 (DAD); 자동 공급 시스템: CM5210; 컬럼 오븐: CM5310; 소프트웨어: OpenLab.

[0124] 컬럼: RP C_{18}, 4.6x250 mm 5㎛; 검출 파장: UV 254nm; 유속: 0.8 min/ml; 컬럼 오븐 온도: 30℃; 농도 구배: 표 3에 도시됨.

표 3

[0125]

시간 (분)	용매 (%)	
	용출 1	용출 2
0	95	5
10	85	15
25	77	23
35	72	28
40	20	80
45	20	80
46	95	5
55	95	5

[0126] 용출 1: 1% 포름산 + 0.01% 트리플루오로아세트산 (TFA) / 물

[0127] 용출 2: 1% 포름산 + 0.01% 트리플루오로아세트산 / 아세토니트릴

[0128] 이소플라본 표준 물질의 HPLC 스펙트로그램을 도 7에 나타내었으며, 18.853분과 24.693분 체류 시간에 피크가 확인되었다.

[0129] 대두 종자 증기 분획 (GMC1)의 HPLC는 도 8에 도시하며, 피크가 없었다.

[0130] 대두 종자 추출물 (GMA1) 0.3 중량부와 대두 종자 증기 분획 (GMC1) 1 중량부를 포함하는 연고제의 HPLC 스펙트로그람을 도 9에 나타내었는데, 체류 시간 17.307분, 19.313분, 20.267분, 20.853분, 24.307분 및 25.247분에 피크가 나타났다.

[0131] 도 7 - 9를 비교한 바, 도 8에서 대두 종자 증기 분획 (GMC1)의 HPLC 스펙트로그램에서는 피크가 없어, 대두 종자 증기 분획 (GMC1)에는 이소플라본이 함유되어 있지 않으며; 도 9에서 대두 종자 추출물 (GMA1) 0.3 중량부와 대두 종자 증기 분획 (GMC1) 1 중량부를 포함하는 추출 조성물의 HPLC 스펙트로그람에서는 이소플라본 핑거프린트 흡수 피크에 해당되는 피크가 극소량인 것으로 보인다. 전환 후, 다이진 (daidzin)의 양은 4.8 ㎍/ml이고, 게니스틴 (genistin)의 양은 8.23 ㎍/ml이었으며, 이들 내용물은 이소플로본의 약제학적 유효량과는 거리가 멀었다. 따라서, 대두 종자 추출물 (GMA1)만 극소량의 이소플라본을 함유하고 있으며, 이의 약제 효과는 극소량

의 이소플라본에 의해 발현되는 것이 아니다.

[0132] *상처 치유를 촉진하는 추출 조성물*

[0133] 재료 및 방법:

[0134] 약 8주령의 체중 250 g - 300 g인 SD 수컷 랫을 대만 국립 실험 동물 센터로부터 입수하였다. 7일간 격리한 후, 체중이 350 g 이상이 되었을 때 이동시켰다. 랫은 동물의 귀 노치 (ear notch)로 식별하였다. 각 케이지 텍에는 케이지 번호, 실험 번호, 성별 및 그룹 명을 표시하였다. 랫은 AAALAC 공인된 동물 시설에서 폴리카보네이트 케이지에 케이지 당 2마리씩 두었다.

[0135] 환경 조건은 다음과 같다: 온도 21 ± 2℃; 습도: 50 ± 20%; 광 사이클: 12시간 명, 12시간 암 조건. 실험 전 기간 동안 실험용 설치류 사료 5001 (PMI® Nutrition International, Inc., MO, USA)를 자유롭게 섭취하도록 공급하였다. 케이지에 부착된 바틀을 통해 수돗물을 자유롭게 섭취하게 공급하였다.

[0136] 실험 방법:

[0137] 샘플 (테스트 물품)은 표 4에 따라 준비하였다.

표 4

[0138]

실험 1		
그룹	동물/수/성별	테스트 물품 및 투여량
1	당뇨병 랫/5/수컷	크림 베이스
2	당뇨병 랫/5/수컷	CGS-21680 10㎍/상처
3	당뇨병 랫/5/수컷	GMC1
4	당뇨병 랫/5/수컷	0.3% GMA1
실험 2		
그룹	동물/수/성별	테스트 물품 및 투여량
1	당뇨병 랫/5/수컷	크림 베이스
2	당뇨병 랫/5/수컷	CGS-21680 6.7㎍/상처
3	당뇨병 랫/5/수컷	GMC1
4	당뇨병 랫/5/수컷	GMC1+0.009% GMA1
5	당뇨병 랫/5/수컷	GMC1+0.045% GMA1
6	당뇨병 랫/5/수컷	GMC1+0.09% GMA1

[0139] CGS-21680: 크림 베이스 248.4 g 중에 CGS-21680 1.67 mg을 첨가하여 제조한, 특이적인 아데노신 A_{2A} 서브타입 수용체 작용제.

[0140] 당뇨병 랫: 체중이 300 g 이상의 랫에 정맥내 주사를 통해 스트렙토조톡신 (streptozotocin) (STZ, 65mg/kg)을 1회 투여량으로 투여하였다. 2달간 고 혈당 (>300mg/dL)을 나타내는 STZ-유발성 랫을 상처 봉합 검사를 수행하기 위해 선별하였다.

[0141] 당뇨병 랫에 대한 외상 수술: 체중이 300 g 미만인 당뇨병 랫을 제외시키고, 랫들을 6개의 그룹으로 랜덤 추출하였다. 이후, 펜토바르티발로 랫을 마취시키고, 수술할 부위 (등 부위)를 제모하였다. 각 랫은 등쪽 중앙 영역의 피부 3곳 (2개의 견갑골 가운데에서 4, 6 및 8 cm 떨어진 곳)을 라운드 절단 블레이드를 사용해 (전층) 절개하였다.

[0142] 약물 치료 및 상처 봉합 측정: 동물의 체중을 측정하고, 상처 봉합을 평가하기 위해 상처 면적을 2일 간격으로 측정하였다. 하루에 2번 각 상처 부위에 약물을 도포하였으며, 상처는 치즈클로스 (cheesecloth)로 덮었다. 동물이 상처 부위를 긁지 않도록 하기 위해 랫의 목에 후드를 끼웠다. 상처 봉합 측정을 위해, 4, 6, 8, 10, 12 및 14일에 상처 부위에 대한 사진을 촬영하였다. 촬영시, 기준자 (standard ruler)를 상처 옆에 위치시켰다. 상처를 Image pro (Media cybernetics)로 분석하기 전에, 사진 촬영 거리 차이로 인한 오류를 방지하기 위해 사진에서 기준자를 사용해 길이를 표준화하였다.

[0143] 데이타 분석 및 통계: 랫의 등쪽에 위치한 상처 3곳을 Image pro로 분석하였다. 오리지날 상처 면적은 0일째의 면적이었다. 오리지날 상처 면적에서 각 시간대의 상처 면적을 제한 다음 오리지날 상처 면적으로 나누어, 상처 봉합율을 구하였다. 각 랫의 상처 3곳의 봉합율 평균으로 각 랫의 상처 봉합을 나타낸다. 데이타는 평균

± 표준 오차 (SEM)로 표시하였다. 검사 결과에 대한 p-값은, 통계 소프트웨어 (SYSTAT, Systat software Inc)로 t-검정을 수행함으로써 계산하였다. P<0.05는 유의한 차이가 있다는 것을 의미하며, 이를 *로 표시하였다. P<0.01은 상당한 유의한 차이가 있다는 것을 의미하며, 이를 **로 표시하였다. P<0.001은 매우 상당한 유의한 차이가 있다는 것을 의미하며, 이를 ***로 표시하였다.

[0144] 결과:

[0145] 약물 치료 후, 상처 면적을 여러 시간대에 측정하고, 상처 봉합율을 통계 소프트웨어로 분석하여 표 5와 도 10에 나타내었다. 4일째, 각 그룹, 크림 베이스, CGS-21680, GMC1 및 0.3% GMA1의 상처 봉합율은 각각 -83.33 ± 6.60 (%), 21.87 ± 5.61 (%), -11.44 ± 4.34 (%) 및 -7.09 ± 3.65 (%)이었다. 치료군 모두 크림 베이스 그룹과는 실험 전기간 동안 유의한 차이를 나타내었다. 8일에서 10일까지, 상처 봉합율은 대부분 GMC1 그룹과 3% GMA1 그룹에서 각각 -4.10 ± 3.04 (%)에서 40.15 ±6.47 (%)로, 그리고 21.21 ± 5.52 (%)에서 62.19 ± 3.85 (%)로 증가하였다. 14일째, GMC1 및 0.3% GMA1 그룹의 상처 봉합율은 크림 베이스가 58.92 ± 13.14 (%)인데 비교해, 각각 86.20 ± 1.88 (%) 및 91.21 ± 2.23(%)로 현저하게 높아졌다.

[0146] 표 5: GMC1 및 0.3% GMA1으로 처치된 당뇨병 랫의 상처 봉합율 비교

표 5

[0147]

Day	크림 베이스	CGS-21680	GMC1	0.3% GMA1
	평균 ± SEM	평균 ± SEM	평균 ± SEM	평균 ± SEM
4	-83.33±6.60	21.87±5.61 ***	-11.44±4.34 ***	-7.09±3.65 ***
6	-65.84±11.19	25.45±4.46 ***	6.74±4.86 ***	4.15±3.19 ***
8	-63.32±23.22	45.88±4.28 ***	4.10±3.04 *	21.21±5.52 **
10	-10.08±16.87	93.80±2.79 ***	40.15±6.47 *	62.19±3.85 **
12	30.85±20.08	91.15±2.72 **	74.36±2.04 *	82.71±2.82 *
14	58.92±13.14	98.74±0.60 **	86.20±1.88 *	91.21±2.23 *

[0148] 주석: 각 수치는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 2개의 그룹 간의 비교 값은 스튜던트의 t 검정에 의해 **p<0.01 및 ***p<0.001에서 유의한 차이가 존재한다.

[0149] 이들 결과는, 0.3% GMA1과 GMC1 둘다 크림 베이스 단독에 비해 상처 봉합에 효과적이며, 0.3% GMA1 처치 그룹이 GMC1 보다 약간 더 우수한 상처 봉합 성과를 나타낸다는 것을 보여주었다.

[0150] 당뇨병성 상처 봉합을 촉진하는데 있어, GMA1과 GMC1의 최상의 조합을 조사하였다. GMA1을 여러가지 투여량 수준으로 즉 0.009%, 0.045% 및 0.09%로 사용해 GMC1과 조합하였다. 비교를 위해, 크림 베이스와 CGS-21680 그룹들도 참여시켰다.

[0151] 약물 치료 후, 상처 면적을 여러 시간대에 측정하고, 상처 봉합율을 통계 소프트웨어로 분석하여 표 6과 도 11에 나타내었다. 표 6과 도 11에 도시된 바와 같이, 크림 베이스 그룹과 비교해 보면, 조합 약물 그룹에서 GMA1의 투여량 수준 증가에 따라, 즉, 0.009%, 0.045% 및 0.09%에 따라 통계학적 유의성 증가가 관찰된다. 이 결과는, 상처 치유에 있어, GMA1의 여러가지 투여량 수준 0.009%, 0.045% 및 0.09%와 GMC1의 조합 효과가 GMC1 단독 보다 효과적이라는 것을 보여준다. 가장 효과적인 조합 치료는 GMA1의 최고 투여량 (0.09%)에서 확인된다.

[0152] 표 6: GMA1 0.009% ~ 0.09%와 GMC1의 조합 처치한 당뇨병 랫에서의 상처 봉합율 비교

표 6

[0153]

Days	Cream base 2	CGS-21680	GMC1	GMC1+0.009%GMA1	GMC1+0.045%GMA1	GMC1+0.09%GMA1
	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM
4	-4.45±7.92	40.02±5.03 **	-4.47±8.88	3.66±7.39	9.15±11.71	18.90±4.66 *
6	-4.3±4.42	63.09±2.58 ***	13.59±5.05 *	21.97±4.69 *	28.33±4.50 ***	32.99±5.40 ***
8	40.85±6.00	77.21±2.44 ***	28.61±7.35	46.52±4.08	30.25±10.69	50.11±5.00
10	46.51±4.55	80.93±2.08 ***	51.35±4.86	73.57±4.18 *	71.09±5.62 *	86.68±0.93 ***
12	76.05±2.30	96.91±1.08 ***	76.84±5.98	85.78±2.38 **	84.23±2.55 **	90.49±1.27 ***
14	91.39±1.23	99.17±0.54 ***	82.58±3.01 *	93.61±2.39	88.57±2.44	95.02±0.65 *

[0154] 주석: 각 수치는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 2개의 그룹 간의 비교 값은 스튜던트의 t 검정에 의해 **p<0.01 및 ***p<0.001에서 유의한 차이를 보인다.

[0155] *피부 세포의 이동을 촉진하는 추출 조성물*

[0156] HaCaT 세포 (인간 피부 각질 형성 세포)를, 피부 세포 이동 촉진에 대한 추출 조성물의 효과를 분석하기 위해 사용하였다.

[0157] 세포 이동 분석용 샘플은 다음과 같다:

[0158] A1-0.3: GMA1 0.3 ㎍/mL 함유

[0159] A1-0.3-CSTC-2500X: 2500배 희석된 GMC1과 GMA1 0.3 ㎍/mL 함유

[0160] 세포주: HaCaT

[0161] 배지: 10% 소 태아 혈청이 첨가된 DMEM

[0162] 양성 대조군: CGS-21680

[0163] 세포 배양: HaCaT 세포는 10% 소 태아 혈청이 첨가된 DMEM에서 37℃ 및 5% CO_2 조건 하에 배양하였고, 주당 2회 서브배양하였다.

[0164] 상처 치유 분석: Oris 세포 이동 분석 키트를 사용하였다. 세포를 스토퍼가 장착된 96웰 플레이트 ($4x10^4$ cells/well)에 접종하여, 이산화탄소 인큐베이터에서 배양하였다. 밤새 배양한 후, 스토퍼를 떼어내 상처를 만들고, 새 배지나 테스트 물품 또는 CGS-21680 (양성 대조군)이 함유된 배지를 첨가하였다. 0, 16 및 24시간 동안 처치한 후, 세포를 100배 배율에서 광학 현미경으로 관찰하고, 상처 치유 모니터링을 위해 사진 촬영하였다.

[0165] 분석: image j 소프트웨어를 활용해 상처 치유 면적을 정량하였다. 0시간대의 면적을 상처 오리지날 크기로 하였다. 일정 기간 경과 후, 상처 면적이 점차적으로 줄어들었으며, 상처 치유 정도를 0시간대의 오리지날 면적 대비 상처 면적을 계산함으로써 (치유율 = T0과 T16 또는 T24 시간대의 면적 차이 / T0 면적) 정량하여, HaCaT 세포 이동 활성에 대한 약물의 효과를 평가하였다.

[0166] 통계: 각 그룹을 4회 이상 반복하였다. 데이타는 평균 ± 표준 편차 (SEM)로 나타내었다. 검사 결과의 유의성은 t-검사로 계산하였다.

[0167] 결과:

[0168] 상처 치유 촉진에 있어 GMC1과 GMA1의 효과를 비교하기 위해 HaCaT 세포 이동 분석을 이용하였다. 2500배 희석한 GMC1과 0.3 ㎍/mL의 GMA1 (A1-0.3-CSTC-2500X)의 조합 효과가, A1-0.3 단독에 비해 HaCaT 세포 이동 촉진 효과가 더 우수하였다 (도 12).

[0169] *신경 세포의 증식을 촉진하는 추출 조성물*

[0170] 재료 및 방법:

[0171] 세포주: 인간 신경모세포종 세포 IMR-32 (대만 Industry Research and Development Institute에서 구입함)

[0172] 시약: HyClone™ DMEM/High 글루코스 배지 (Thermo Scientific), 소 태아 혈청 (FBS, Gibco®), HyClone® 포스페이트 완충화된 염수 (PBS, Thermo Scientific), 항생 항진균성 용액 (Pen/Strep/Fungizone 100x; Thermo Scientific), 트립판 블루, 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐 테트라졸륨 브로마이드 (MTT), 및 다이메틸 설폭사이드 (DMSO, Sigma).

[0173] 장비: Laminar Flow (VERTICAL HF-4BH).

[0174] 세포 배양: IMR-32 세포를, 10% 소 태아 혈청이 첨가된 DMEM/고 글루코스 배지 (HyClone™)에서 37℃, 습윤 공기 및 5% CO_2 조건 하에 배양하였다.

[0175] IMR-32 세포를 96웰 플레이트에 5 x 10^4 밀도로 접종하고 10% FBS가 첨가된 배양 배지 100 ㎕에서 24시간 배양하였다. 도징 (dosing) 후, 배양 배지를 5% FBS가 첨가된 배지 100 ㎕로 교체한 다음, 각 그룹에 대해 25 mg/mL GMC1, 25 mg/mL GMA1, GMC1+0.3% GMA1 (GM) 또는 PBS (대조군) 및 10% FBS (양성 대조군)가 첨가된 배지 100 ㎕로 조제하였다. 각 그룹을 96웰 플레이트에서 7회 이상 반복하였으며, MTT 분석을 위해 72시간 인큐베이션하였다.

[0176] MTT 분석: 인큐베이터에서 배양 디쉬를 꺼내 층류 후드로 이동시켰다. 각 웰에서 배지를 0.5 mg/ml MTT 시약이 첨가된 무혈청 배지 100 ㎕로 대체하여, 30-60분간 배양하였다. 각 웰에 동일 부피의 DMSO를 첨가하여 5분간 흔들었다. ELISA 판독기에서 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0177] 데이타 분석 및 통계: 결과는 GraphPad Prism 6로 분석하고, T-검정으로 통계 분석하였다. 데이타는 세포 생존율 ± SEM으로 나타내었다.

[0178] 결과:

[0179] 세포 생존율을 표 7-9 및 도 13-15에 나타낸다. 세포 생존율은, 25 mg/mL GMA1 (표 7 및 도 13), 25 mg/mL GMC1 (표 8 및 도 14) 또는 GMC1+0.3% GMA1(GM, 표 9 및 도 15) 처리 후, PBS 대조군과 비교해, 현저하게 증가하였다.

표 7

[0180]

GMA1 그룹	대조군	25 mg/mL	양성 대조군
	평균 ± SEM	평균 ± SEM	평균 ± SEM
1	99.2 ± 17.2	106.7 ± 8.3	137.9 ± 9.8
2	110.1 ± 6.9	119.7 ± 6.7	128.7 ± 13.8
3	86.3 ± 5.6	123.2 ± 6.3 **	94.5 ± 2.8
4	98.3 ± 1.8	130.2 ± 7.8 **	119.0 ± 7.7 *
5	88.6 ± 2.6	114.2 ± 5.8 **	90.7 ± 1.6
6	94.8 ± 1.9	111.4 ± 6.1 *	105.7 ± 3.1 *
7	92.1 ± 5.7	105.7 ± 10.2	128.2 ± 2.9 ***
평균	95.6 ± 3.0	115.9 ± 3.4 ***	115.0 ± 6.9 *

표 8

[0181]

GMC1 그룹	대조군	25 mg/mL	양성 대조군
	평균 ± SEM	평균 ± SEM	평균 ± SEM
1	99.2 ± 17.2	94.1 ± 3.3	137.9 ± 9.8
2	110.1 ± 6.9	144.1 ± 8.2 *	128.7 ± 13.8
3	86.3 ± 5.6	120.0 ± 11.0 *	94.5 ± 2.8
4	98.3 ± 1.8	149.2 ± 6.4 ***	119.0 ± 7.7 *
5	88.6 ± 2.6	106.4 ± 7.2	90.7 ± 1.6
6	94.8 ± 1.9	101.5 ± 3.1	105.7 ± 3.1 *
7	92.1 ± 5.7	107.8 ± 6.3	128.2 ± 2.9 ***
평균	95.6 ± 3.0	117.6 ± 8.1 *	115.0 ± 6.9 *

표 9

[0182]

GM 그룹	대조군	25 mg/mL	양성 대조군
	평균 ± SEM	평균 ± SEM	평균 ± SEM
1	99.2 ± 17.2	117.2 ± 11.6	137.9 ± 9.8
2	110.1 ± 6.9	115.1 ± 12.5	128.7 ± 13.8
3	86.3 ± 5.6	103.0 ± 6.0	94.5 ± 2.8
4	98.3 ± 1.8	118.2 ± 10.1	119.0 ± 7.7 *
5	88.6 ± 2.6	106.1 ± 5.5 *	90.7 ± 1.6
6	94.8 ± 1.9	99.9 ± 2.0	105.7 ± 3.1 *
7	92.1 ± 5.7	105.7 ± 1.6 *	128.2 ± 2.9 ***
평균	95.6 ± 3.0	109.3 ± 2.8 **	115.0 ± 6.9 *

[0183] 표 7 - 9의 주석: 각 수치는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 2개의 그룹의 서로 다른 투여량 간의 비교는 T-검정을 이용해 통계적으로 분석하였다. $p<0.05$는 유의한 차이가 있다는 것을 의미하며 *로 표시된다. $p<0.01$은 상당한 유의한 차이가 있다는 것을 의미하며, **로 표시된다. $p<0.001$은 매우 상당한 유의한 차이가 있다는 것을 의미하며, ***로 표시된다.

[0184] *뇌 질환 및/또는 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 추출 조성물*

[0185] (I) 치매 유발:

[0186] 재료 및 방법:

[0187] 약 6주령의 체중 250 g - 300 g인 수컷 랫을 대만 BioLASCO 사로부터 입수하였다. 7일간 격리한 후, 체중이 300 g 이상이 되었을 때 이동시켰다. 랫은 꼬리 타투로 식별하였다. 각 케이지 텍에는 케이지 번호, 실험 번호, 성별 및 그룹 명을 표시하였다. 랫은 동물 시설에서 폴리카보네이트 케이지에 케이지 당 2마리씩 두었다.

[0188] 환경 조건은 다음과 같다: 온도 25 ± 1℃; 습도: 60 ± 5%; 광 사이클: 12시간 명, 12시간 암 조건. 실험 전 기간 동안 Altromin 1324 FORTI (Germany)를 자유롭게 섭취하도록 공급하였다. 케이지에 부착된 바틀을 통해 수돗물을 자유롭게 섭취하게 공급하였다.

[0189] 그룹들을 표 10에 나타내었다.

표 10

[0190]

그룹	치매 유도	테스트 물품
정상	안함	없음
$AlCl_3$	$AlCl_3$	$AlCl_3$ 대조군
$AlCl_3$ + 크림 베이스	$AlCl_3$	크림 베이스
$AlCl_3$+N2	$AlCl_3$	0.5% GMA1+GMC1

[0191] 치매 유도:

[0192] 8주령의 랫에 15 mg/mL $AlCl_3$ 용액을 11주간 100 mg/kg의 투여량으로 매일 경구 투여하여, 치매 모방 증상을 유도하였다. 랫을 표 10에 나타낸 그룹들로 분할하고, 테스트 물품을 두경부 영역에 30초간 마사지하면서 국소 도포하고, 5주에서 11주까지 코 점막에 국소 도포하였다. 11주에 훈련을 시작하고, 11주에 방사성 미로로 기억력을 평가하였다. 치료 기간 동안 랫에 $AlCl_3$를 지속적으로 공급하였다.

[0193] 방사성 미로: 방사성 미로는 랫에서 공간 학습과 기억을 측정하는 가장 일반적인 방법들 중 한가지이다. 방사성 미로는 70년대에 Olton에 의해 설계되었다. 배고픈 랫이 각 통로의 끝 지점에서 사료를 체크하는 원동력에 기반하며, 일정 기간 동안 미로에서 사료 위치를 기억하도록 훈련시킨다. 이는 동시에 랫의 실행 기억 (단기 기억이라 함) 및 참조 기억 (장기 기억이라 함)을 측정할 수 있다. 방사성 미로를 도 16에 나타낸다. 크기: (A) 122 cm; (B) 47 cm; (C) 30 cm; (D) 10 cm; (E) 20 cm.

[0194] 랫을 1주간 환경에 적응시켰다. 각 랫의 체중을 측정하고, 24시간 금식시켰다. 실험하기 전까지, 랫의 체중을

오리지날 체중의 80~85%로 유지시켰으며; 정상 식이의 60%를 매일 훈련 후 (1일 2회) 제공하였다. 1일과 2일에 미끼를 각 통로 팔과 중앙 플랫폼에 뿌려두었다. 랫 4마리를 동시에 중앙 플랫폼에 놓고, 10분간 미끼를 탐색하게 하였다. 3일과 4일에는, 미끼를 각 통로 팔의 끝 지점에 두었다. 각 랫을 중앙 플랫폼에 분리하여 놓고, 사료를 찾을 때까지 미로를 탐색하게 하였다. 랫이 10분내에 사료를 찾지 못하면, 훈련을 정지하였다. 5~14일에, 미끼를 4개의 고정 팔 끝 지점에 두었다. 각 랫을 중앙 플랫폼에 놓고, 4개의 팔에 있는 미끼를 모두 찾을 때까지 미로를 탐색하게 하였다. 랫이 10분내에 사료를 다 찾지 못하면, 훈련을 정지하였다. 미로의 팔에 들어간 경로 기록하였고, 자동 분석하였다. 각각의 랫은 하루에 2회 훈련하였으며, 훈련은 1시간 간격을 두고 수행하였다.

[0195] 아래 3가지 지표를 분석하였다:

[0196] a. 실행 기억 (단기 기억) 오류 (WME): 미끼가 있는 팔에 재진입한 횟수.

[0197] b. 참조 기억 (장기 기억) 오류 (RME): 미끼가 없는 팔에 재진입한 횟수.

[0198] c. 총 기억 오류 (TME): WME+RME

[0199] 이들 3가지 지표는 랫의 학습 및 기억 능력을 나타내며, 뇌 손상 수준에 따라 현저하게 증가할 것이다.

[0200] 데이타 분석 및 통계: 스튜던트 t-검정 및 반복 ANOVA를 통계 분석에 사용하였다. 데이타는 각 그룹의 평균 결과 ± SEM으로 나타내었다. $AlCl_3$ 그룹의 데이타를 정상 그룹과 비교하여, 통계학적 유의성을 계산하였다. 또한, $AlCl_3$ 그룹의 데이타를 $AlCl_3$+N2 그룹과 비교하여, 통계학적 유의성을 계산하였다. $p<0.05$이면, *로 표시된다. $p<0.01$이면, **로 표시된다.

[0201] 결과:

[0202] 중금속-유발성 치매가 알츠하이머 질환과 유사하다는 것은 보고되어 있다. 이 둘다 아밀로이드 전구체 단백질의 형성을 유도하며, 노인반과 신경섬유 매듭을 발생시킨다. 따라서, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물의 알츠하이머-유사 질환에 대한 효과를 이해하기 위해, 동물 모델로서 중금속-유발성 치매를 채택하였다. 결과들을 도 17 - 19에 나타낸다. 도 17에서, 4일째 랫의 추적 경로에 따르면, $AlCl_3$ + N2 그룹의 랫은 훈련 후 기억으로 미끼 위치에 도달할 수 있으며, $AlCl_3$ 그룹과 $AlCl_3$+크림 베이스 그룹의 랫은 그렇지 않았다. 도 18에 따르면, $AlCl_3$ 그룹과 $AlCl_3$+크림 베이스 그룹의 TME 값들은 유의한 차이가 없으며 ($p>0.05$), 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물을 처리한 후 4일째 TME 값은 $AlCl_3$ 그룹 ($AlCl_3$+N2 $p=0.0128$) 보다 현저하게 낮았다. 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물은 치매 랫을 치료하는 효과가 있는 것으로 보인다. 도 19에 따르면, $AlCl_3$ 그룹과 $AlCl_3$+크림 베이스 그룹의 RME 값에는 유의한 차이가 없으며 ($p>0.05$), 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물을 처리한 후 4일째 RME 값이 $AlCl_3$ 그룹 보다 현저하게 낮았다 ($p=0.0046$). 이는 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물이 랫의 장기 기억 복원에 효과가 있다는 것을 의미한다. 결과들에 따르면, 방사성 미로 테스트에서 $AlCl_3$ 그룹의 오류가 대조군 보다 현저하게 높게 나타나는데, 이는 랫에서 $AlCl_3$에 의한 치매가 성공적으로 유도되었음을 의미한다. 참조 기억과 관련된 기억 장애 역시 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물의 처리 후 현저하게 개선되었다. 이는, 대두 종자 추출물과 대두 종자 증기 분획을 포함하는 추출 조성물이 치매 치료 효능이 있다는 것을 의미한다.

[0203] (I) 혈관성 치매

[0204] 재료 및 방법:

[0205] 그룹들을 표 11에 나타내었다.

표 11

[0206]

그룹	치매 유도	테스트 물품
모의	안함	모의
2VO	양쪽 경동맥 결찰	양쪽 경동맥 결찰 대조군
M	양쪽 경동맥 결찰	크림 베이스
M1	양쪽 경동맥 결찰	GMC1

M3	양쪽 경동맥 결찰	GMC1+0.5% GMA1

[0207] 랫과 동물 시설은 (I)의 치매 유발 실험과 동일하다.

[0208] 랫을 1:1.5의 케타민-롬푼 혼합물 (0.1 mL/100g, i.p.)을 사용해 마취시키고, 수술대 위에 고정하였다. 등쪽 목 영역에 정중선 목 절개하여 경동맥 양쪽을 노출시키고, 실크 봉합사로 이중 봉합하였다. 상처를 봉합하고, 랫을 회복될 때까지 따뜻한 조명 (warm light) 아래에 두었다.

[0209] 크림 베이스 (M), GMC1 (M1) 및 GMC1+0.5%GMA1 (M3)을 30초간 마사지하면서 두경부 영역에, 그리고 코 점막에 국소 도포 (2g/랫)하였다. 4주간 처치를 지속하였고, 마지막 2주간 방사성 미로에서 랫의 기억을 측정하였다. 방사성 미로 검사는 (I) 치매 유발에 기술된 바와 동일하게 수행하였다.

[0210] 데이타 분석 및 통계: unpaired Student t-검정과 2원식 ANOVA를 통계학적 분석에 사용하였다. 데이타는 각 그룹의 평균 결과 ± SEM이다. 모의 그룹의 데이타는 2VO 그룹과 비교하여 통계학적 유의성을 계산하였다. 약물 처리 그룹들은 2VO 그룹들과 비교하여 통계학적 유의성을 계산하였다. $p<0.05$는 유의한 차이가 있다는 것을 의미하며, *로 표시된다. $p<0.01$은 매우 유의한 차이가 있다는 것을 의미하며, **로 표시된다.

[0211] 결과:

[0212] 2VO 그룹의 오류 횟수가 모의 그룹 보다 현저하게 높은데 (도 20 - 23), 이는 양쪽 경동맥 결찰에 의해 혈관성 치매가 랫에서 성공적으로 유도되었다는 것을 의미하며, 혈관성 치매로 인한 기억 장애는 M1 및 M3를 2주간 처리한 후 현저하게 개선되었다. VD 랫 뇌에 대한 전산화 단층 촬영 결과에 따르면, 양쪽 경동맥 (2VO)의 양측 폐쇄로 인해 뇌 조직이 붓고, 연화되고, 조직 분해되거나, 또는 심지어 응혈이 발생하였으며, 즉 치매가 유도되었다. 뇌 손상은 M1과 M3 처리 후 현저하게 감소된다.

[0213] *유방암을 치료하고 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 부작용을 낮추*거나, 및/또는 DNA 및/또는 RNA 복제를 간섭하는 약물의 약제 효능을 강화하는, 추출 조성물

[0214] 재료:

[0215] 세포주 및 시료: MDA-MB-231 (대만, Food Industry Research and Development Institute에서 구입); 페니실린-스트렙토마이신-네오마이신 혼합물 (100x), 소 태아 혈청 (FBS) 및 둘베코의 변형된 이글스 배지 (DMEM)는 Gibco®사에서 구입함; 사이클로포스파미드 (사이클로포스파미드) (CTX, Endoxan®).

[0216] 동물 시설: 대략 6 - 8주령의 BALB/cAnN.Cg-Foxn1^{nu}/CrlNarl 암컷 마우스를 대만 국립 실험 동물 센터로부터 입수하였다. 환경 조건은 다음과 같다: 온도 25 ± 1℃; 습도: 60 ± 5%; 독립적인 공기 컨디션; 조절되는 광 사이클. 실험 전 기간 동안 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 공급하였다. 마우스는 실험 동물 위원회의 표준 절차에 따라 사육하였다.

[0217] 종양을 가진 마우스 유도: MDA-MB-231 세포 (인간 유방암 세포)를 암컷 누드 마우스에 주사하는데 필요한 5 x 10^6개가 될 때까지 배양하고, 트립신을 처리하여 수집한 다음, 종양 유도를 위해 PBS 용액에 재현탁하였다. 누드 마우스에 세포 용액 100 ㎕를 피하 주사함으로써, 종양을 유도하였고, 다시 케이지로 보내 정상 사료를 제공하였다. 종양이 약 300 ㎣에 도달하면, 추출 조성물을 여러가지 투여량으로 국소 투여하고, CTX 그룹과 비-CTX 그룹으로 그룹핑하였다. 추출 조성물의 효능을 보기 위해, 체중, 식욕, 혈당 및 종양 크기 성장을 매주 관찰하여, 누드 마우스의 정상적인 생리 상태 발현을 분석하였다.

[0218] 종양-보유 마우스 및 처치 그룹핑: 종양이 약 300 ㎣가 되면, 마우스를 표 12에 나타낸 바와 같이 그룹핑하였다. 추출 조성물과 더불어 화학치료제 (주당 1회 주사)를 투여하였다. 치료군은 종양 부위, 종양 주위 피부에 국소 적용하였고, 등쪽 피부 전체에는 투여량 0.1 g/일로 적용하였다. 5주간 치료한 후, 누드 마우스의 체중, 식욕, 혈당 및 종양 크기 성장을 관찰하였다.

표 12

[0219]

그룹	종양 유도	화학치료제	테스트 물품
정상	안함	무처리	무처리
종양	MDA-MB-231 유도	무처리	무처리
J1	MDA-MB-231 유도	무처리	GMC1

J2	MDA-MB-231 유도	무처리	0.3%GMA1
NO CTX+ L5	MDA-MB-231 유도	무처리	GMC1+0.5%GMA1
CTX	MDA-MB-231 유도	CTX/4회 주사	무처리
CTX+ L1	MDA-MB-231 유도	CTX/4회 주사	크림 베이스
CTX+ L5	MDA-MB-231 유도	CTX/4회 주사	GMC1+0.5%GMA1

[0220] 종양-보유 마우스의 임상 평가: 종양-보유 마우스의 체중, 식욕, 혈당 및 종양 크기 등의 생리학적 상태와 종양 크기를 평가하였다. 종양의 크기는 종양 체적 (mm^3) = $ab^2/2$로 계산하여, 종양 증식율을 평가하였다.

[0221] 결과:

[0222] 인간 유방암 세포 MDA-MB-231에 의해 유도된 종양-보유 누드 마우스 모델에서, 처리 후, 추출 조성물 J1과 J2는 누드 마우스에서의 종양 증식을 억제하는 효과를 나타내었다 (표 13 및 도 25). 생리학적 상태에 대한 평가에서, 추출 조성물 그룹이 보다 나은 식욕과 혈당 수치를 나타내었다.

표 13

[0223]

	종양 크기 (mm^3)			
	0주	1주	2주	3주
J1	0.0	63.40	126.23	369.51
J2	0.0	-2.02	26.83	182.19
종양	0.00	72.69	380.71	696.90

[0224] GMC1+0.5%GMA1 (NO CTX+ L5) 그룹에서, 추출 조성물이 누드 마우스에서 종양 증식을 저해하는 것으로 나타났다 (도 26).

[0225] 정상 그룹과 비교해, 종양 + 화학치료제 그룹 (CTX 그룹), 추출 조성물 + 화학치료제 그룹 (CTX+L1 그룹과 CTX+L5 그룹)의 생리학적 상태와 종양 증식을 평가하였다. 표 14와 도 26 및 27을 참조하면, CTX+L1 그룹과 CTX+L5 그룹의 결과는, 화학치료제를 투여받은 종양-보유 마우스에서 종양을 축소하는 화학치료제의 효능을 강화하는데, 체중에는 영향을 미치지 않고, 평균적인 사료 섭취율과 평균적인 혈당을 보이는 것으로 나타났다 (표 15 - 17)

[0226] 표 14: 종양 크기 감소 (mm^3)

표 14

[0227]

	4/28	5/2	5/5	5/9	5/12	5/16	5/19	5/23	5/26	5/30
정상	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
종양	0.00	108.05	364.31	428.36	627.45	874.62	1295.63	1961.51	2727.56	2938.30
CTX	0.00	99.61	78.95	-19.52	-45.11	-157.57	-176.41	-264.85	-293.68	-391.42
CTX+L1	0.00	89.22	113.36	21.27	-46.75	-138.97	-179.55	-224.38	-294.03	-384.43
CTX+L5	0.00	149.85	173.28	48.54	-56.91	-170.01	-220.34	-274.15	-338.79	-510.04

[0228] 표 15: 평균 체중 (g)

표 15

[0229]

	4/28	5/2	5/5	5/9	5/12	5/16	5/19	5/23	5/26	5/30
정상	20.61	21.34	20.91	21.16	20.31	21.13	20.41	21.90	21.63	21.96
종양	19.64	19.11	20.03	18.75	18.57	20.22	20.48	21.36	21.74	22.67
CTX	19.64	20.04	18.46	19.00	19.51	20.99	20.42	21.16	20.21	22.18
CTX+L1	20.05	20.59	18.72	19.34	18.79	19.23	19.98	20.08	19.94	21.31
CTX+L5	19.12	19.51	18.45	19.09	19.23	19.61	19.93	19.69	19.03	20.52

[0230] 표 16: 평균 사료 섭취 (g)

표 16

[0231]

	5/5~5/9	5/9~5/12	5/12~5/16	5/16~5/19	5/19~5/23	5/23~5/26	5/26~5/30
정상	4.95	4.75	5.18	4.69	4.52	4.37	4.50
종양	4.94	4.48	4.56	4.75	4.25	4.65	4.20
CTX	4.89	5.61	5.38	5.21	4.70	4.76	5.22
CTX+L1	4.45	4.58	4.88	4.64	4.08	4.01	4.46
CTX+L5	4.60	5.12	4.47	5.09	4.36	4.21	4.62

[0232] 표 17: 평균 혈당 (dL)

표 17

[0233]

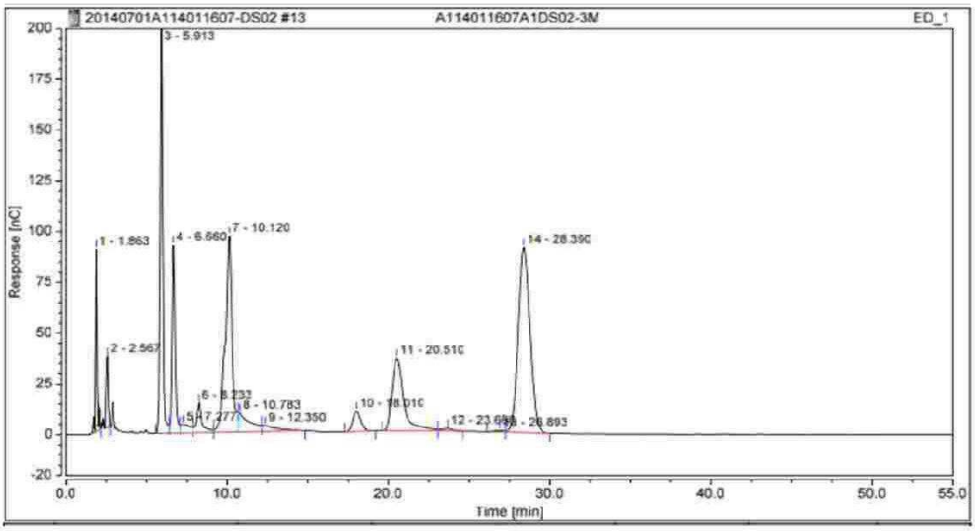
	5/2	5/9	5/16	5/23	5/30
정상	110	84	99	97	98
종양	60	66	82	89	74
CTX	113	93	109	122	108
CTX+L1	110	93	92	99	101
CTX+L5	110	109	104	106	102

[0234] 임상적으로, 암 치료를 포기하는 주된 이유 중 하나가 암으로 인한 암 통증이다. 암 통증은 종양에 의해, 주로 염증으로 인해, 그리고 종양이 내부 장기, 말초 신경 및 뼈로 침습함으로써 야기되는 신경 압박으로 인해, 일부 야기되는 것으로 알려져 있다. 추출 조성물은 종양의 증식을 효과적으로 저해할 수 있으며, 또한 일부 암으로 인한 암 통증을 억제하고, 치료에 도움이 될 수 있다.

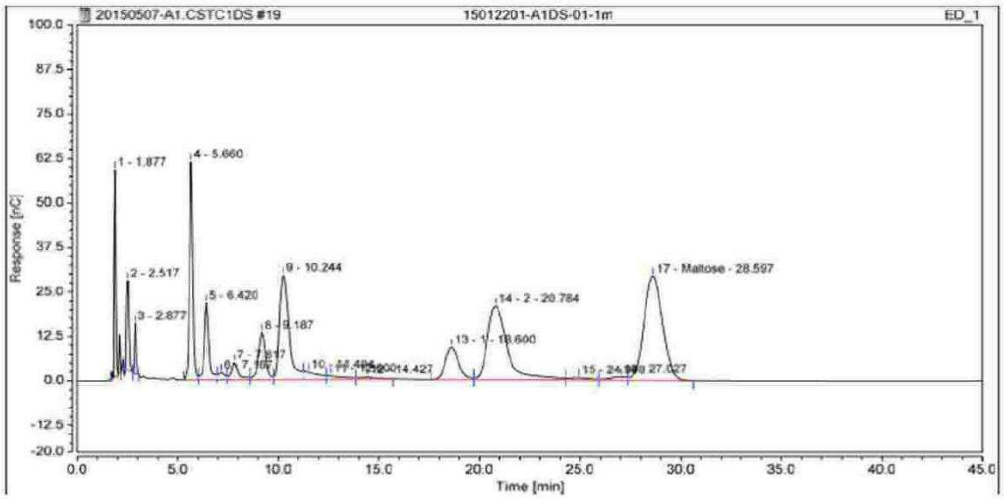
[0235] 본 발명은 전술한 구체적인 구현예를 들어 기술되어 있지만, 당해 기술 분야의 당업자라면 이에 대한 여러가지 대안 및 변형과 수정이 자명할 것이다. 이러한 대안, 변형 및 수정들 모두 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 간주된다.

도면

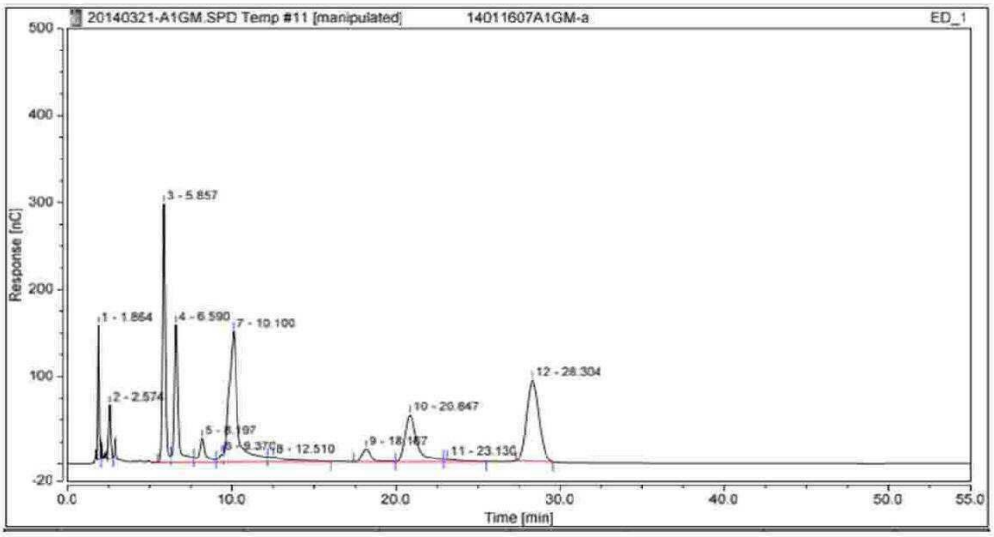
도면1



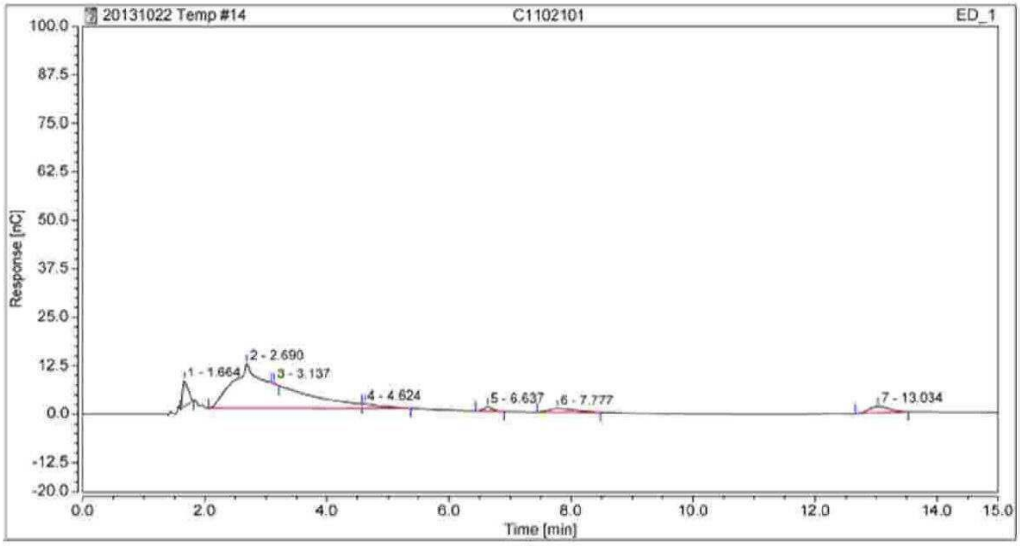
도면2


20150507-A1.CSTC1DS #19
15012201-A1DS-01-1m
ED_1
Response [nC]
Time [min]
1 - 1.877
2 - 2.517
3 - 2.877
4 - 5.660
5 - 6.420
9 - 10.244
14 - 2 - 20.784
17 - Maltose - 28.597

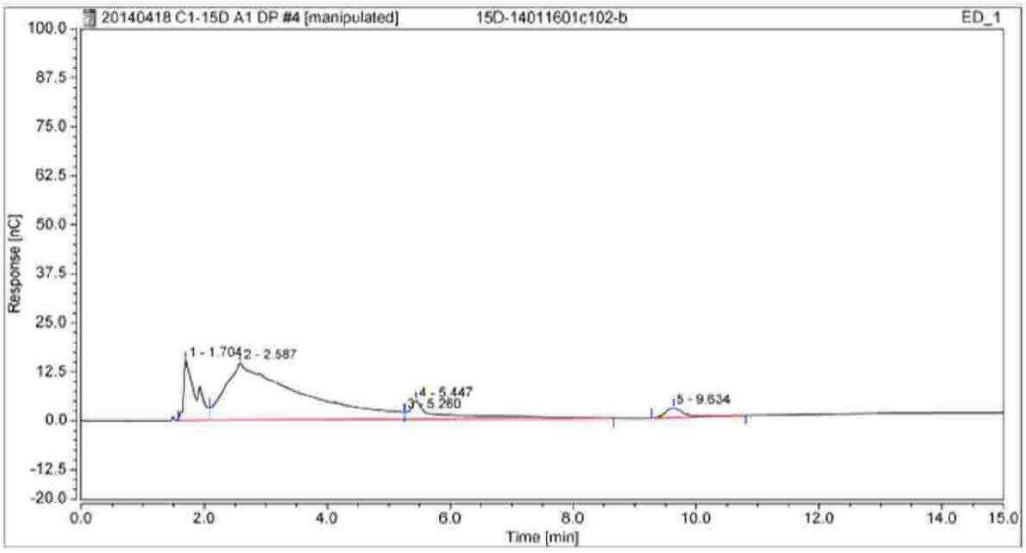
도면3


20140321-A1GM.SPD Temp #11 [manipulated]
14011607A1GM-a
ED_1
Response [nC]
Time [min]
1 - 1.864
2 - 2.574
3 - 5.857
4 - 6.590
7 - 10.100
10 - 20.647
12 - 28.304

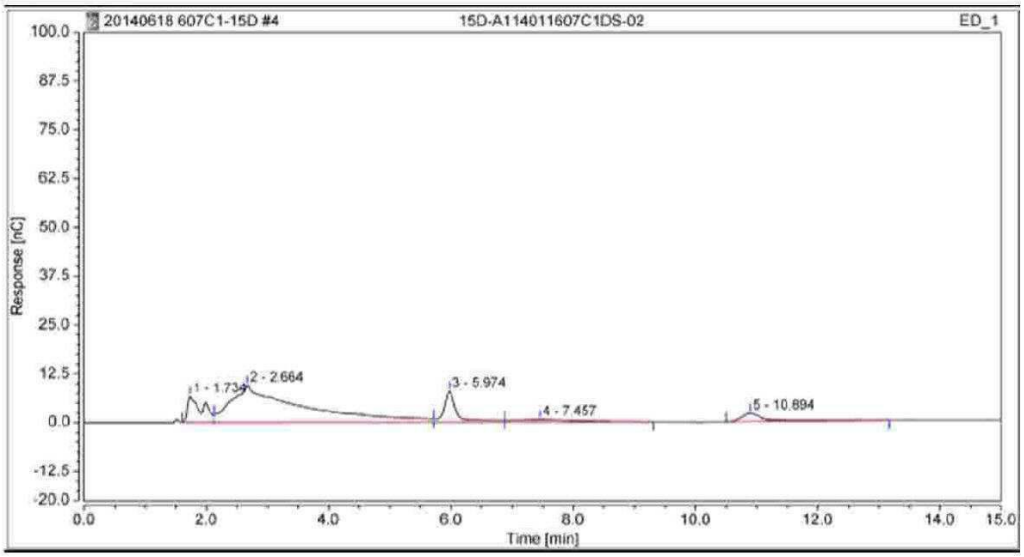
도면4


20131022 Temp #14
C1102101
ED_1
Response [nC]
Time [min]
1 - 1.664
2 - 2.690
3 - 3.137
4 - 4.624
5 - 6.637
6 - 7.777
7 - 13.034

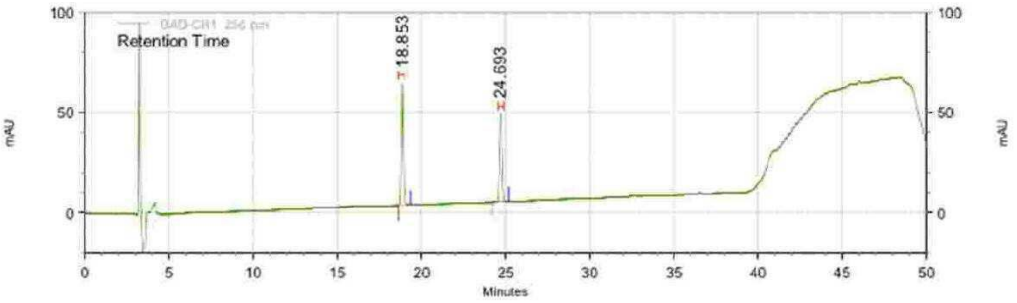
도면5


20140418 C1-15D A1 DP #4 [manipulated]
15D-14011601c102-b
ED_1
Response [nC]
Time [min]
1 - 1.704
2 - 2.587
4 - 5.447
5 - 9.634

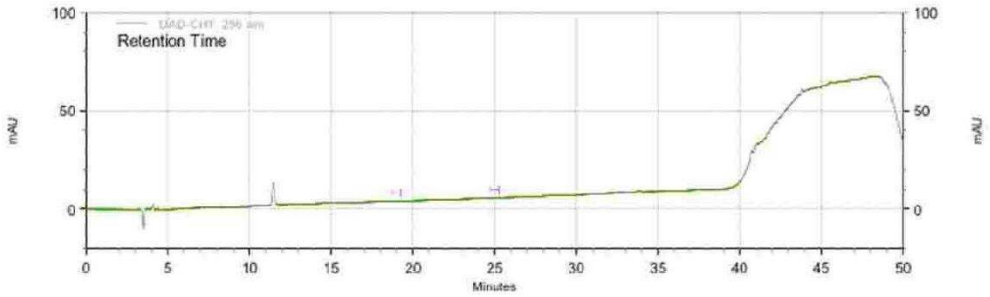
도면6


20140618 607C1-15D #4
15D-A114011607C1DS-02
ED_1
Response [nC]
Time [min]
1 - 1.734
2 - 2.664
3 - 5.974
4 - 7.457
5 - 10.894

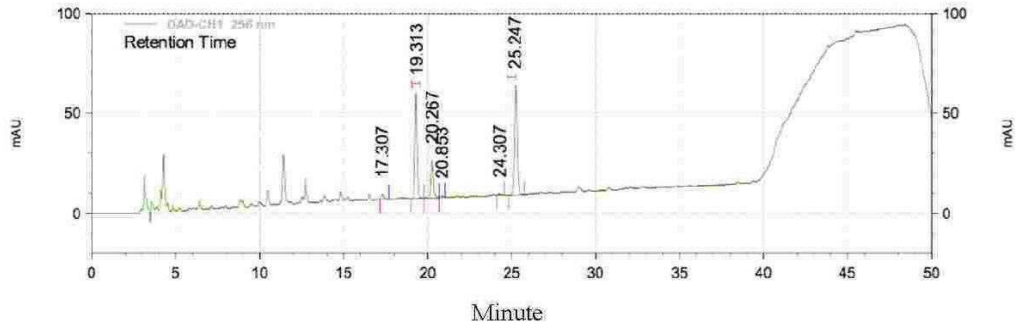
도면7


Retention Time
18.853
24.693
mAU
Minutes

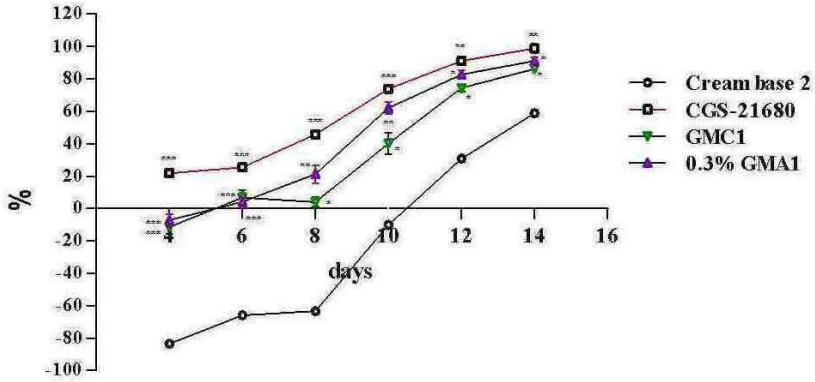
도면8


Retention Time
mAU
Minutes

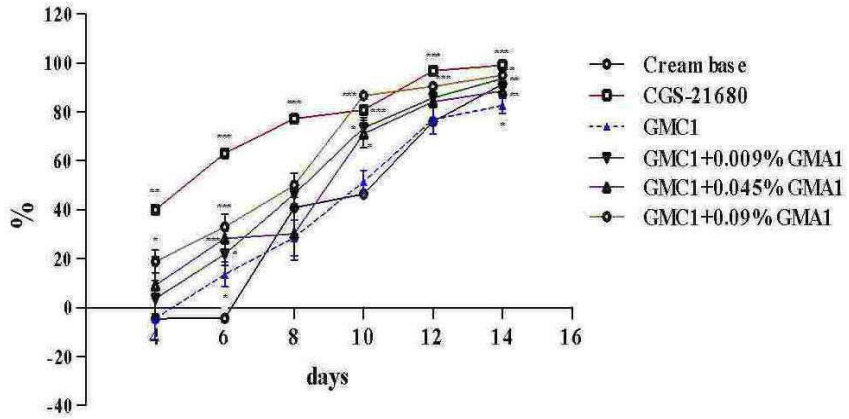
도면9



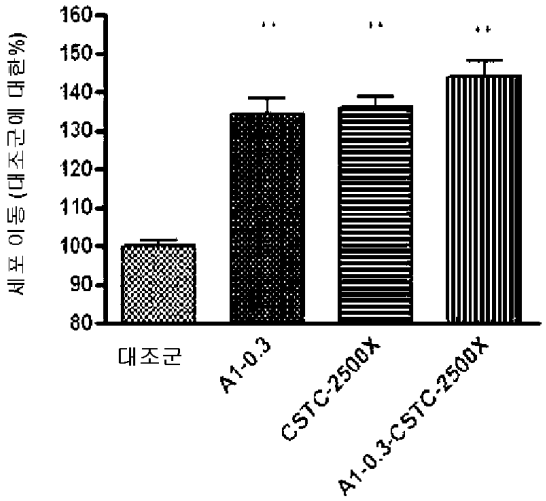
도면10



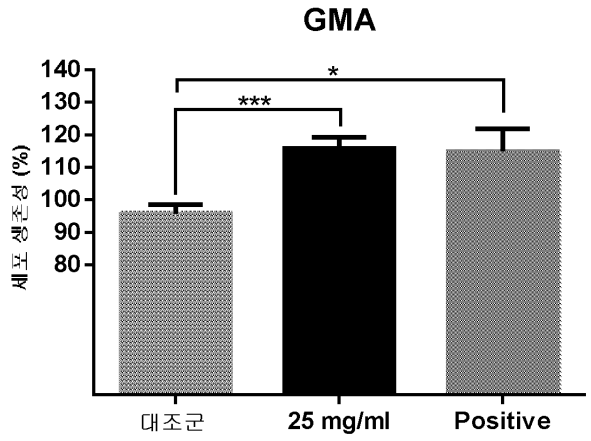
도면11



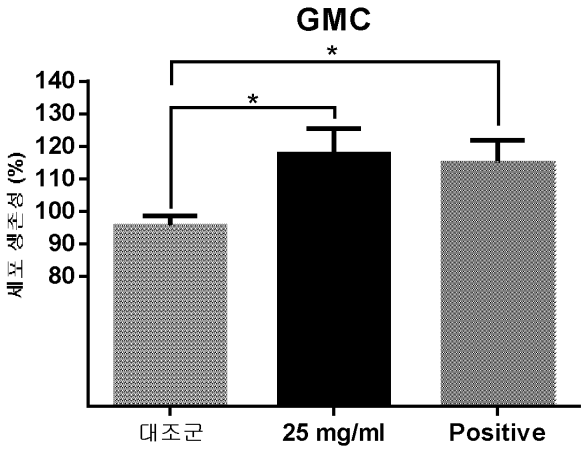
도면12



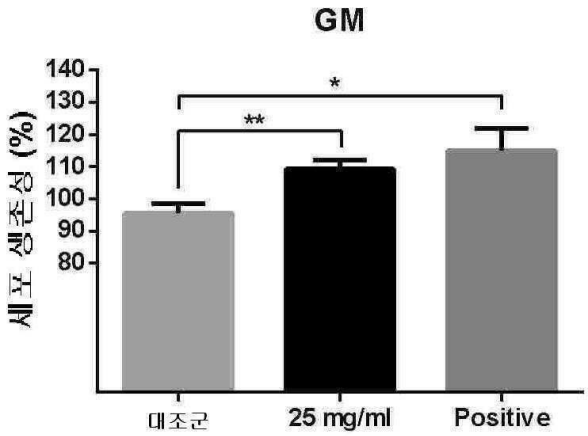
도면13



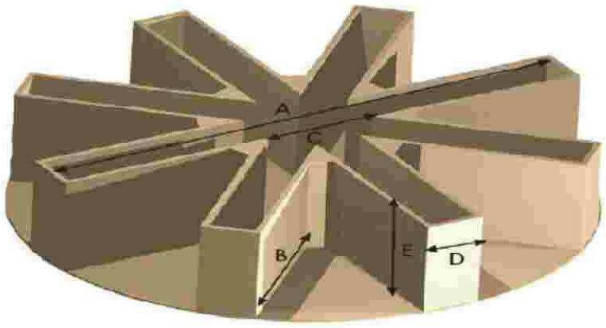
도면14



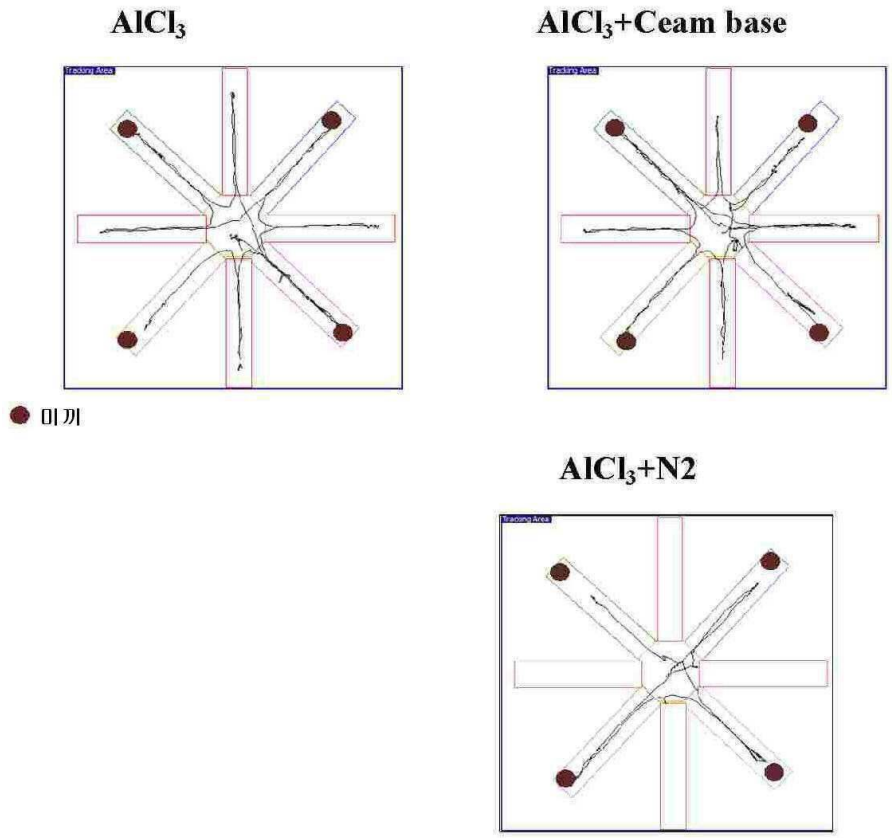
도면15



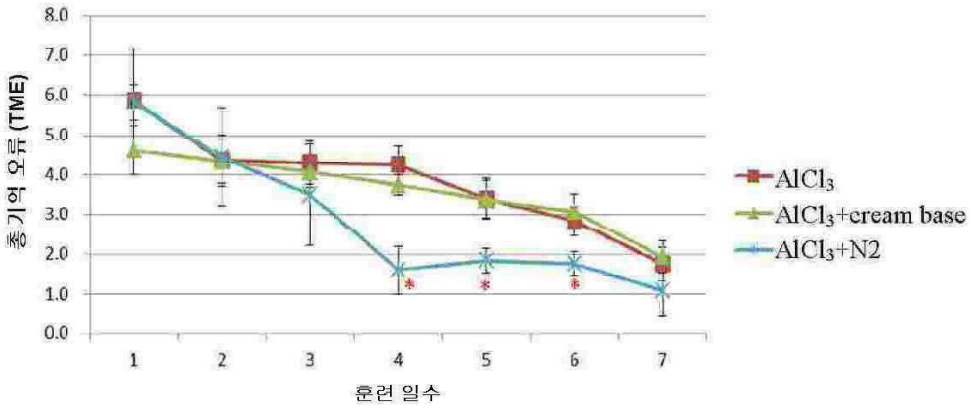
도면16



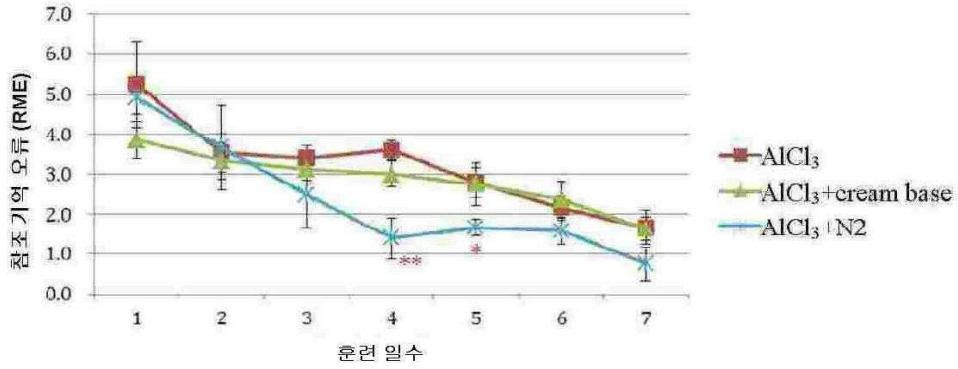
도면17


AlCl3
AlCl3+Ceam base
AlCl3+N2
미끼

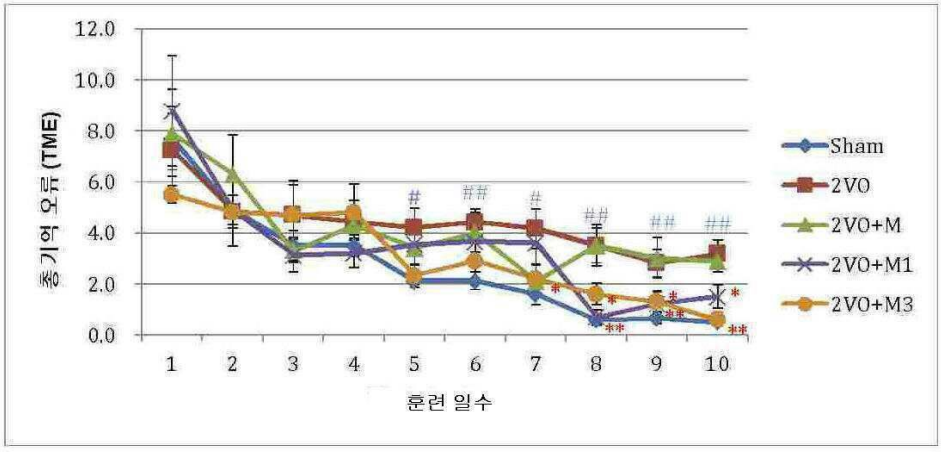
도면18


8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
총기억 오류 (TME)
1
2
3
4
5
6
7
훈련 일수
AlCl3
AlCl3+cream base
AlCl3+N2

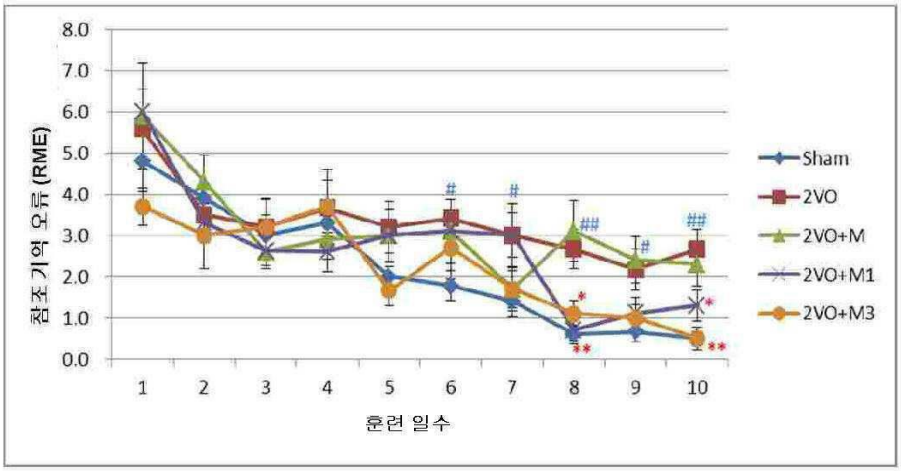
도면19



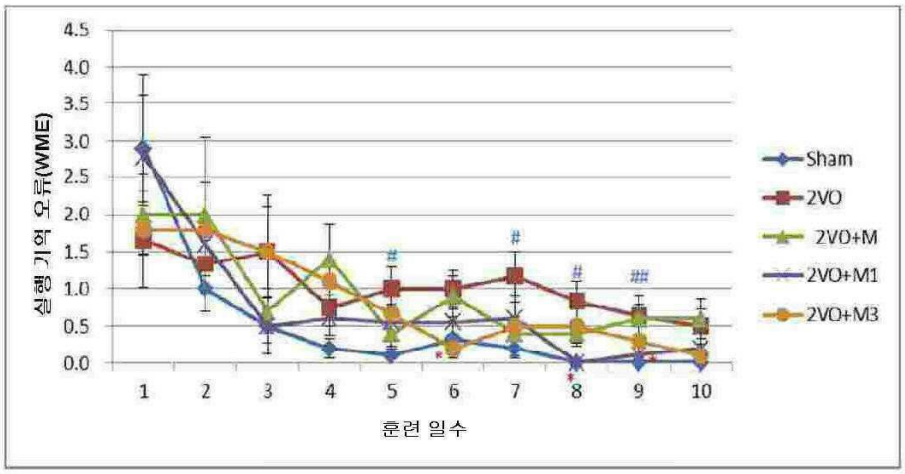
도면20



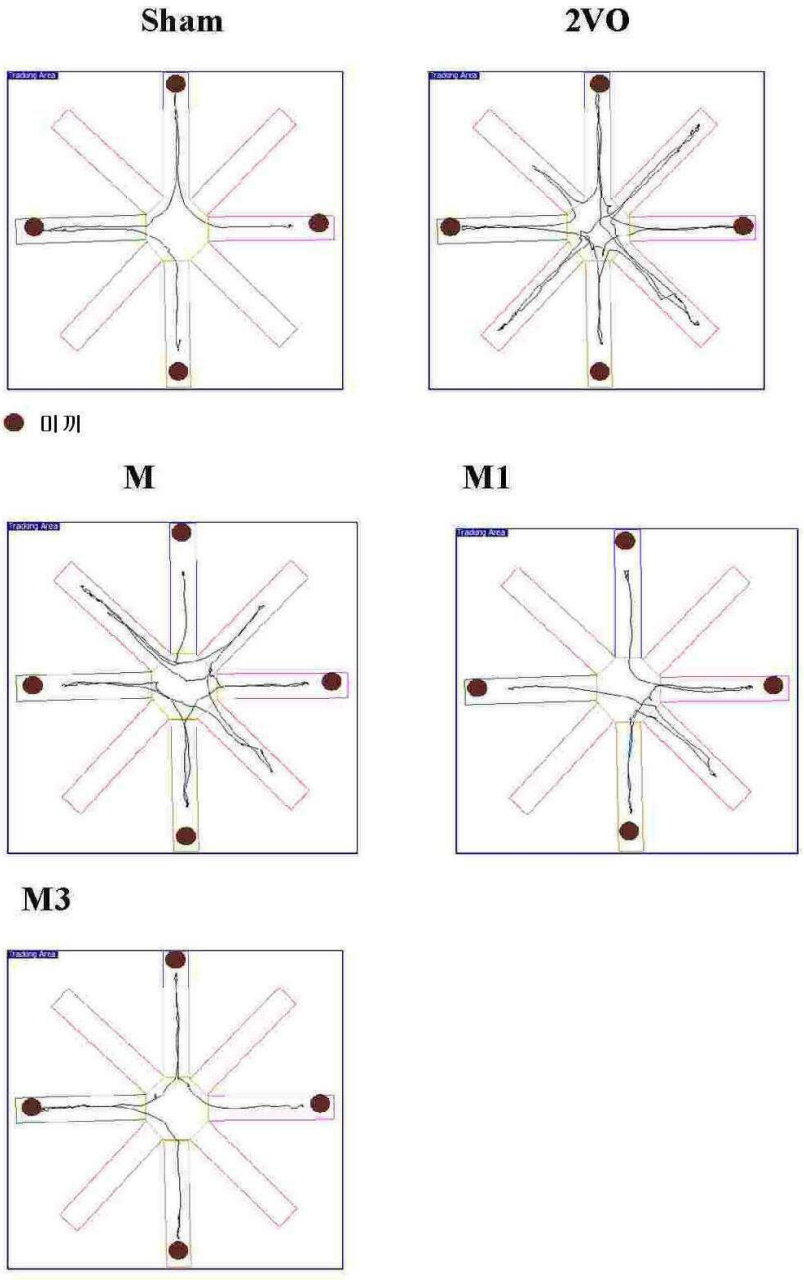
도면21



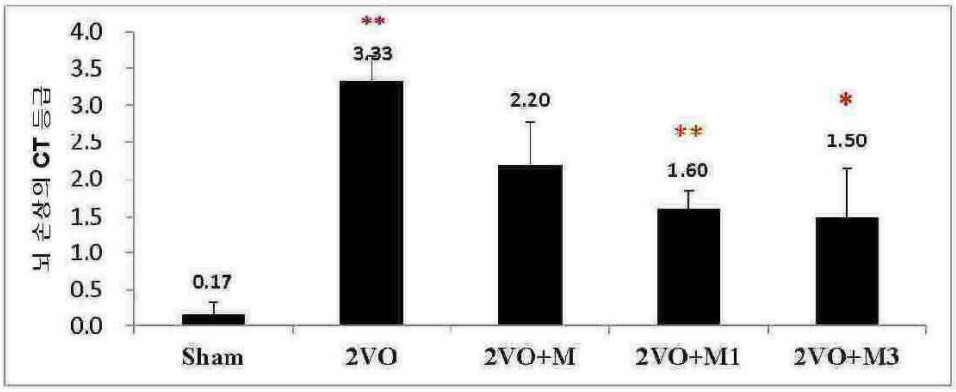
도면22


4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
실행 기억 오류(WME)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
훈련 일수
Sham
2VO
2VO+M
2VO+M1
2VO+M3

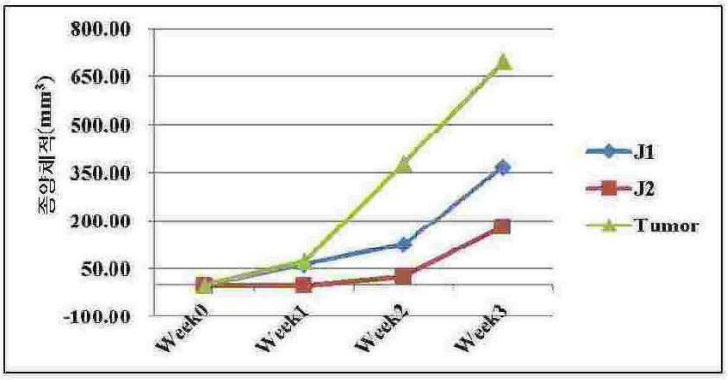
도면23


Sham
2VO
미끼
M
M1
M3

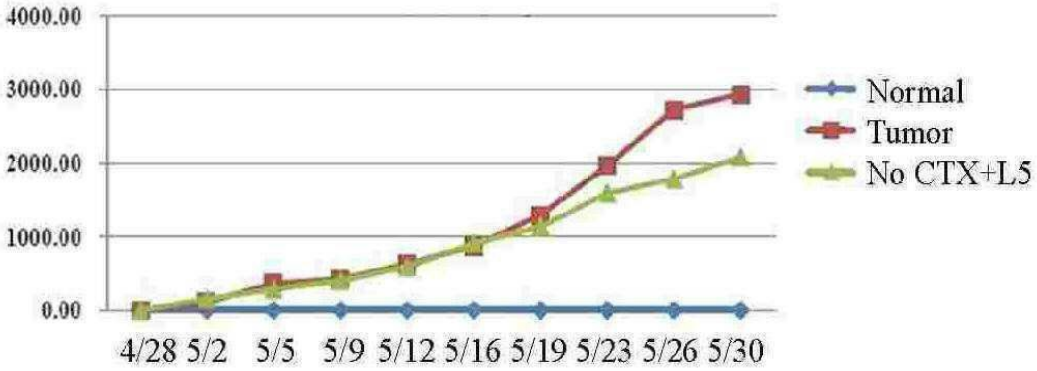
도면24


뇌 손상의 CT 등급
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0.17
3.33
2.20
1.60
1.50
**
**
*
Sham
2VO
2VO+M
2VO+M1
2VO+M3

도면25



도면26



도면27

