(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0001105
(43) 공개일자 2015년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/575 (2006.01) *A61K 31/56* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0073814
(22) 출원일자 2013년06월26일
심사청구일자 2013년06월26일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
장정희
대구 달성군 다사읍 대실역북로 55, 106동 303호 (대실역동화아이위시)
이찬
경북 구미시 원남로8길 20-1, (원평동)
(74) 대리인
특허법인태백

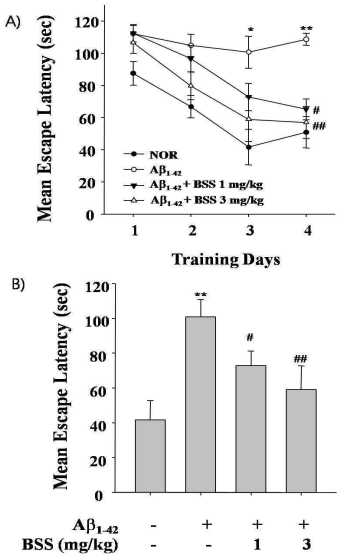
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **베타시토스테롤을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 베타시토스테롤은 치매의 대표적인 발병원인 중 하나인 베타-아밀로이드(β-amyloid, $A\beta_{1-42}$)로 기억력 손상이 유도된 마우스를 이용한 물-미로 실험(Morris water-maze test) 및 수동회피 실험(passive avoidance test)에서 기억력 증진 효과를 나타냄으로써, 기억력 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 치료를 위한 약학조성물 및 건강기능 식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



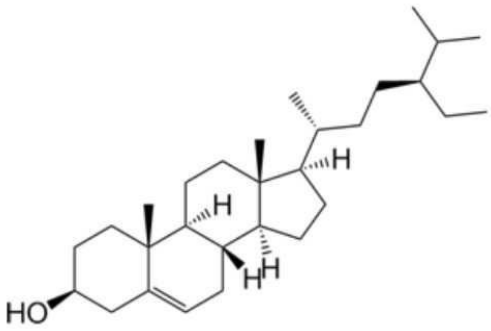
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0004959
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업-일반연구지원사업
연구과제명 BDNF 활성화 기전을 이용한 항치매 천연 소재 개발
기 여 율 1/1
주관기관 계명대학교 산학협력단
연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

< 화학식 1 >



청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 인지기능 장애 관련 질환은 건망증, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 뇌혈관성 치매증, 두부손상에 의한 치매증 및 파킨슨씨병(Parkinson's disease)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 약학조성물은 항산화 효소 헴 옥시게나아제(heme oxygenase-1; HO-1) 및 γ-글루타밀 시스테인 리가아제(γ-glutamylcysteine ligase; GCL)의 발현을 증가시키고, 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

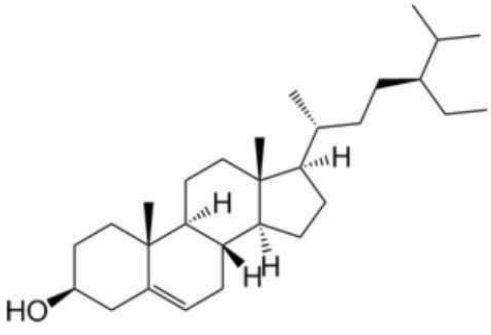
청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 베타시토스테롤(β-sitosterol)은 조성물 총 중량에 대하여 0.1~50 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

< 화학식 1 >



청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 인지기능 장애 관련 질환은 건망증, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 뇌혈관성 치매증, 두부손상에 의한 치매증 및 파킨슨씨병(Parkinson's disease)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 치매는 일반적으로 인간의 인지기능, 지적능력, 감정 및 행동변화 등에서 뚜렷한 손상을 나타내는 복합 임상 증후군으로서, 기억력, 주의력, 언어기능, 시공간 능력 등의 대뇌피질 기능장애가 발생하여 일상, 사회생활을 영위하는데 큰 어려움을 겪게 되는 상태이다. 치매라고 정의할 때는 기억력을 포함하여 다른 인지기능 중 한 가지 이상의 장애가 있는 경우를 말하며, 단순히 기억력만 떨어진 경우는 치매라고 하지 않는다.

[0003] 치매의 원인으로는 퇴행성 뇌질환인 알츠하이머병(Alzheimer's Disease)이나 파킨슨병(Parkinson's Disease)에서부터 뇌출혈, 대사성질환인 간성뇌병증, 윌슨병(Wilson's Disease), 감염성 질환인 신경매독, 후천성면역결핍증, 알코올과 같은 약물중독, 뇌외상 등 다양한 병인이 있으며, 어떤 형태로는 중추신경계에 구조적, 기능적 이상을 초래할 수 있는 질환은 치매를 유발할 수가 있다. 그 중에서도 알츠하이머병에 의한 치매가 50 ~ 60 %로 가장 많으며, 뇌혈관 질환에 의한 치매가 그 다음이다.

[0004] 현재 우리나라의 65세 이상 노인 중 치매 환자 수는 46만 명 정도이며, 2020년에는 70만 명, 2040년에는 200만 명에 이를 것으로 추정하고 있다(서울대학교병원. 치매 노인 유병률 조사. 보건복지가족부. p.132, 2008). 치매는 장기간의 치료를 요하는 점과 그 증상의 특성 때문에 생활 불편 정도가 암과 같은 다른 중증 질환보다도 심하며, 환자의 관리와 보호에 드는 신체적, 심리적, 경제적 부담 또한 크다. 노년인구의 급속한 증가속도와 치매 유병률 추이로 미루어 볼 때, 치매는 사회적, 국가적 해결책이 필요한 과제임이 분명하다.

[0005] 기억 인지 장애는 알츠하이머 질환자들이 처음으로 겪는 증상이며 또한 가장 흔한 증상이다. 알츠하이머병의 초기에 환자들은 최근의 대화나 일의 내용을 자세하게 기억하지 못하는 최근 기억(recent memory) 장애를 겪게 되는데, 이는 해마의 신경세포가 손상되어 최근 기억을 저장하는 기능이 떨어진 데에서 기인한다. 하지만 이 시기에는 먼 과거에 있었던 사건들에 대한 과거 기억(remote long-term memory)은 상대적으로 잘 유지된다. 그러나 병이 점차 진행됨에 따라 장기기억의 저장과 관련된 대뇌피질이 손상되면서 이러한 과거의 기억도 점차 장애를 보이게 된다.

[0006] 이러한 알츠하이머병의 증상은 베타-아밀로이드(β-amyloid)의 침착에 의한 세포독성뿐만 아니라 콜린신경계통의 시냅스 장애와도 관련이 깊다(PM et el., Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. Neurochem Int., 53 : pp. 103-111, 2008). 콜린신경계통의 기능장애는 알츠하이머 질환자의 기억과 인지 기능 장애에 기여하는 것으로 알려져 있다. 전뇌의 Meynert 기저핵(basal nucleus of Meynert) 콜린성 뉴런은 측두엽, 해마 그리고 편도체(amygdala)와 연관되어 기억과 인지 기능에 관계하게 되는데, 알츠하이머 질환자의 뇌에서는 측두엽에서 78%, 해마에서 60%, Meynert 기저핵에서는 67%까지 신경세포가 감소하는 것으로 알려져 있다. 뇌세포가 세포독성에 의해 손상을 입게 되면 어떠한 정보의 전달, 즉 신경전달물질의 대사에 장애가 있게 되며 이것이 기억인지장애를 일으키는 원인이 된다. 이미 많은 연구자들이 알츠하이머병에서 아세틸콜린(acetylcholine)과 이의 합성에 관계되는 효소(choline acetyltransferase)의 선택적인 감소를 꾸준히 보고하여 왔다. 더구나, 알츠하이머병 환자의 뇌에서는 정상적인 사람의 뇌기능에 비해 니코틴성 아세틸콜린 수용체(nicotinic acetylcholine receptor), 무스카린성 아세틸콜린 수용체(muscarinic acetylcholine receptor)의 감소뿐만 아니라 콜린의 재흡수와 아세틸콜린의 분비 기능 또한 저하되어 있다.

[0007] 이러한 콜린신경계통의 장애를 반전시키기 위해 여러 가지 콜린성 약물이 개발되었으나, 그 중 현재까지 가장 효과적이고 많이 쓰이고 있는 것은 아세틸콜린분해효소 억제제(acetylcholinesterase Inhibitor: AchEI)이다. 현재 FDA의 승인을 얻어 시판되고 있는 것은 도네페질(donepezil), 리바스티그민(rivastigmine), 갈란타민(galanthamine)이 있으며, 이들 약물은 시냅스 틈에서 아세틸콜린의 분해를 억제하여 농도를 높여 줌으로써 치

료효과를 나타낸다. 이들 약물은 초반에는 인지 기능이나 일상생활의 호전을 보이나 9개월에서 1년 정도 지나면 투여 이전 상태로 돌아간다는 점에서 병의 진행을 근본적으로 막지는 못한다. 비교적 조기에 사용해야 효과를 볼 수 있으며, 중증 치매의 경우에는 효과가 미약하다. 공통적인 부작용으로 아세틸콜린의 증가로 인한 오심, 설사, 식욕감퇴, 현기증, 근육 경련, 수면 장애 등이 나타나고, 심각한 부작용으로는 실신을 동반하는 서맥이 있다. 이외에도 신경세포의 손상을 억제하는 메만틴(memantine; NMDA 수용체 차단제), 신경세포 보호효과가 있는 은행잎 추출물 (ginko biloba), 중국 한약재에서 추출한 후페르진(huperzine A; 가역적 AChEI) 등이 있으며, 타우 단백, 베타아밀로이드 단백의 형성, 침착 억제, 항산화, 항염증효과 등 알츠하이머병의 병리기전과 연관하여 다양한 치료제 개발 연구가 이루어지고 있다.

[0008] 현재 우리나라의 알츠하이머병 치료제의 경우 외국계열 회사가 98%의 점유율을 차지하고 있을 정도로 수입에 의존하는 바가 크다. 더욱이 한 회사가 시장의 80%를 차지하고 있어 사실상 독점하고 있다고 볼 수 있다(한국과학기술정보연구원. 치매치료제. p.116, 2002). 이는 국가경쟁력 측면에서도 치매 치료분야의 성장이 시급함을 알 수 있다. 따라서 부작용이 적으면서 효과적인 항건망제제 및 기억력 개선제의 개발은 알츠하이머 질환자의 삶의 질 향상과 초기 병증 개선 및 치료에 상당한 도움을 줄 수 있으며, 또한 기억인지력의 장애를 겪는 건망증, 치매환자에게도 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

[0009] 한편, 한국특허등록출원 제10-1148623호 및 제10-1141355호에서는 알파-튜존 또는 알파-피넨을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지 기능 장애 치료 및 예방을 위한 조성물에 대해 개시하고 있으나, 본원 발명의 베타시토스테롤(β-sitosterol)에 대한 언급은 없다.

[0010] 따라서 본 발명자들은 베타시토스테롤(β-sitosterol)의 기억력 증진 및 인지 기능 장애 치료 및 예방을 체계적으로 검토하고자, 베타-아밀로이드(β-amyloid, $A\beta_{1-42}$)로 기억력 손상을 유도한 실험동물을 사용하여 기억력을 측정하는 행동 실험으로 물-미로 실험(Morris water-maze test) 및 수동회피 실험(passive avoidance test)을 실시하였다. 그 결과, 베타시토스테롤을 함유하는 조성물의 신규 활성으로 베타-아밀로이드로 유도된 기억력 손상에 대한 탁월한 기억력 증진 및 인지 기능 장애 치료 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

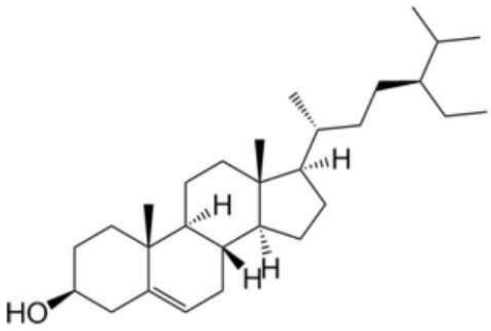
[0011] 본 발명의 목적은 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0014] < 화학식 1 >

[0015] 

[0016] 상세하게는, 상기 인지기능 장애 관련 질환은 건망증, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 뇌혈관성 치매증, 두부손상 또는 파킨슨씨병(Parkinson's disease)에 의한 치매증 등이 바람직하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 상세하게는, 상기 약학조성물은 항산화 효소 헴 옥시게나아제(heme oxygenase-1; HO-1) 및 γ-글루타밀시스테인 리가아제(γ-glutamylcysteine ligase; GCL)의 발현을 증가시키고, 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명에서 유효 성분으로 이용되는 베타시토스테롤(β-sitosterol)은 콜레스테롤과 구조가 유사한 식물에 존재하는 일종의 피토스테롤(phytosterols)로, 쌀겨, 땅콩, 콩류, 호박씨, 옥수수유, 무, 배추, 구기자 등 식물에 많이 들어 있다. 특히, 베타시토스테롤은 혈중 콜레스테롤 감소, 혈당 감소, 항암, 면역증강, 항균, 항산화, 항염증 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 최근 유럽에서는 전립선 비대증의 치료약으로 사용되고 있다.

[0019] 본 발명에 따른 베타시토스테롤(β-sitosterol)은 조성물 총 중량에 대하여 0.1~50 중량%로 포함되는 것이 바람직하다. 그러나 상기와 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태, 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 조성물은 약학 조성물 또는 건강식품 조성물 중에서 선택된 다양한 형태로 제공될 수 있다.

[0021] 본 발명의 조성물이 약학 조성물인 경우, 증상 정도에 따라 투여 방법이 결정되는데, 본 발명의 추출물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한, 상기 약학적 조성물 중 유효성분의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 환자의 나이, 성별, 체중 등에 따라 달라질 수 있으며, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에 따른 베타시토스테롤(β-sitosterol)은 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있는데, 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 또한, 제제화할 경우에는 유효성분인 베타시토스테롤(β-sitosterol) 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완

충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.

[0023] 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형 제제는 베타시토스테롤(β-sitosterol)에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 또한, 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0024] 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.

[0025] 또한, 본 발명의 조성물이 건강식품 조성물인 경우, 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는 그 종류에 특별한 제한이 있는 것은 아니나, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린; 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0027] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 베타시토스테롤이 베타아밀로이드에 의해 기억력 손상이 유발된 동물모델에서 물-미로 실험(Morris water-maze test) 및 수동회피 실험(passive avoidance test)을 통하여 기억력 증진효과를 나타냄을 확인함으로써, 건망증 및 기억력 장애 관련 질환의 예방 및 치료에 유용한 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 베타-아밀로이드(β-amyloid, $A\beta_{1-42}$)에 의해 기억력 손상이 유도된 C57BL/6 마우스에서 베타시토스테롤(β-sitosterol, BSS)의 투여가 기억력 증진 효과를 나타내는 물미로 실험(Morris water-maze test) 결과이다.

도 2는 베타-아밀로이드(β-amyloid, $A\beta_{1-42}$)에 의해 기억력 손상이 유도된 C57BL/6 마우스에서 베타시토스테롤(β-sitosterol, BSS)의 투여가 기억력 증진 효과를 나타내는 수동회피 실험(passive avoidance test) 결과이다.

도 3은 베타시토스테롤(β-sitosterol, BSS)이 항산화 효소인 헴 옥시게나아제(heme oxygenase-1; HO-1) 및 γ-글루타밀시스테인 리가아제(γ-glutamylcysteine ligase; GCL)의 발현을 증가시킴으로써 기억력 회복 효과가

있음을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다.

도 4는 베타시토시테롤(β-sitosterol, BSS)이 신경영양인자 BDNF 발현 및 상위 조절 전사인자 CREB의 인산화를 통한 활성을 증가시킴으로써 기억력 회복 효과가 있음을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

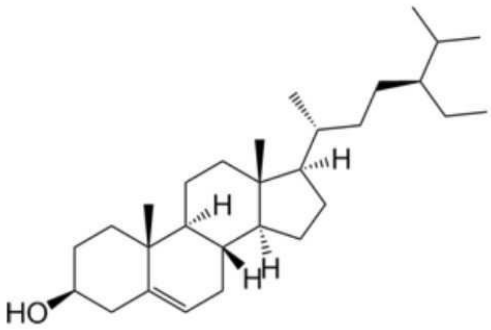
[0030] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1. 베타아밀로이드로 유도된 기억력 손상 억제 효과**

[0032] 1. 베타시토스테롤(β-sitosterol)

[0033] 하기 화학식 1로 표기되는 베타시토스테롤(β-sitosterol)을 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)로부터 제공받아 문헌에 개시된 물성치와 비교하여 베타시토스테롤로 동정하였고, 이를 corn oil에 3 mg/kg 및 10 mg/kg의 용량으로 용해시켜 실험의 시료로 사용하였다.

[0034] < 화학식 1 >

[0035] 

[0036]

[0037] 2. 실험 동물

[0038] 실험동물로는 체중 20-25 g 전후의 C57BL/6 웅성 마우스 (7주령, 효창사이언스, 대구)를 일주일간 실험환경에 적응시켜 사용하였다. 시험군과 대조군을 각각 4개의 군으로 나누었다. 적응기간 (수술 전 5일) 및 실험기간 (수술 후 7일) 동안 1 mg/kg 및 3 mg/kg의 양의 베타시토스테롤을 corn oil에 녹여 복강투여 하였다. 실험동물은 계명대학교 의과대학 동물사육실 내에서 온도는 21-26℃, 습도는 40-60%로 유지하였고 낮 12시간 밤 12시간 주기로 하였다.

[0039] 3. 물미로 실험(Morris water-maze test)

[0040] 상기에서 수득한 베타시토스테롤이 베타아밀로이드에 의해 기억력 손상이 유발된 동물모델에서 기억력 증진효과를 나타냄을 확인하기 위하여 물미로 실험(Morris water-maze test)을 실시하였다.

[0041] 체중 20-25 g 전후의 C57BL/6 웅성 마우스 (7주령, 샘타코, 경기도)의 측내실(lateral ventricle)에 베타아밀로이드($A\beta_{1-42}$)를 600 pmole/day로 0.1 μl/min의 속도로 1 μl를 infusion하여 알츠하이머형 치매동물 모델을 만든 다음, 베타시토스테롤(1 mg/kg 및 3 mg/kg)를 1주간 경구 투여하여 기억력 손상에 대한 보호효과를 물-미로 실험(Morris water-maze test)으로 측정을 하였다.

[0042] 물미로 실험은 베타시토스테롤이 실험동물의 공간지각능력 및 단기, 장기 기억력의 회복(short and long-term memory recovery)에 도움을 주는지 알아보기 위한 실험이다. 실험장비는 원형의 수조(stainless steel, 지름

120 cm, 높이 45 cm)와 도피대(platform, 지름 10 cm, 높이 30 cm)로 이루어진다. 수조의 물(온도 22±2℃) 높이는 플랫폼 위 2 cm까지로 마우스가 도피대에 앉으면 몸이 물 밖으로 나올 수 있도록 하였다. 물미로 실험은 실험동물이 수조 주변의 표지물을 이용하여 도피대를 찾아가기 때문에 주변의 환경 변화가 없도록 표지물을 실험기간 동안 일정하게 유지 하였다. 실험동물이 도피대를 찾아가 10초 이상 머무르면 찾아갈 때까지 걸린 시간을 탈출잠복기(escape latency)로 하였으며, 이를 하루 3회 실시하여 나온 평균값을 평균 탈출잠복기(mean escape latency)로 하였다. 탈출잠복기는 수조 위 천정에 카메라를 설치하여 컴퓨터 프로그램(Ethovision 3.1, Noduls, 네덜란드)을 통해 관찰하여 기록하였다. 실험은 4일 동안 매일 3회 실시하였으며, 이때 실험동물을 수조에 넣는 위치를 매회 순차적으로 달리하여 우연에 의해 도피대를 찾아가는 가능성을 최소화 하였다. 만약, 실험동물이 120초 내에 도피대를 찾지 못하면 탈출 잠복기를 120초로 하였으며, 실험동물이 도피대에 앉으면 10초간 두어 주변의 단서를 다시 기억할 수 있도록 하였다.

[0043] 실험결과, 도 1A에 나타낸 바와 같이 베타아밀로이드와 베타시토스테롤을 동시에 투여한 실험군(Aβ + BSS) 특히 3 mg/kg의 용량에서 베타아밀로이드(Aβ)만 단독으로 투여한 대조군에 비하여 평균 탈출 잠복기가 둘째 날부터 네째 날까지 유의하게 짧아져 정상군(NOR)과 유사한 수준으로 감소되었다. 정상군(NOR)과 실험군(Aβ + BSS)의 경우 셋째 날 이후 안정화된 감소 그래프를 보여 이후 실험기간 동안의 장기 기억을 형성함을 확인 할 수 있었다. 도 1B에 나타낸 바와 같이 네째 날, 대조군(Aβ)이 108.07 ± 3.81초, 실험군(Aβ + BSS 3 mg/kg)이 56.96 ± 9.98초로 통계적으로 유의성 있는 기억력 향상효과를 확인할 수 있었다(표 1).

표 1

[0044]

군 구성	평균 탈출 잠복기(sec)			
	1일	2일	3일	4일
정상군 (NOR)	91.58 ± 7.56	73.46 ± 9.01	51.46 ± 13.7	56.29 ± 10.00
대조군 ($A\beta_{1-42}$)	112.3 ± 5.15	105.00 ± 6.88	100.7 ± 9.96	108.7 ± 3.81
실험군 ($A\beta_{1-42}$+BSS 1)	112.4 ± 5.35	96.65 ± 8.22	72.82 ± 8.43	65.15 ± 6.51
실험군 ($A\beta_{1-42}$+BSS 3)	106.6 ± 6.68	79.71 ± 8.63	58.96 ± 13.8	56.96 ± 9.98

각 군당 3회 실시하여 평균 ± 표준오차 값으로 나타내었으며, 유의성평가는 각 실험군을 일원배치 분산분석(one way ANOVA)을 수행하였으며, 다중분석을 위하여 Least Significant Difference (LSD)를 사후검정으로 실시하였다. p값이 0.05 이하일 경우 유의성이 있다고 판단하였다(*p < 0.05 and **p < 0.01 : NOR vs. $A\beta_{1-42}$ group, #p < 0.05 and ##p < 0.01 : $A\beta_{1-42}$ vs. $A\beta_{1-42}$ + BSS groups).

[0045] 4. 수동회피실험(passive avoidance test)

[0046] 베타시토스테롤의 기억력에 대한 효과를 확인하기 위하여 수동회피실험을 응용하여 하기와 같은 실험을 하였다.

[0047] 실험은 동일한 구조의 밝은 구획과 어두운 구획 (가로 11 cm, 세로 16 cm, 높이 10 cm)이 길로틴 문으로 연결되어 있는 장치에서 수동회피실험을 수행하였다. 밝은 구획은 전구가 설치되어 있으며 어두운 구획은 전기자극을 줄 수 있도록 바닥에 2 mm 두께의 스테인레스 봉이 1 cm 간격으로 설치되어 있다. 조건회피반응은 총 3일 동안 진행되었다. 첫째 날에는 밝은 구획에 마우스를 넣고 20초간 적응 시키고 조명을 켠 다음 칸막이 문을 열어주었다. 일반적으로 마우스는 조명이 없는 어두운 구획으로 들어가게 되는데, 이때 자동적으로 칸막이 문이 닫히도록 하였다. 이러한 훈련은 마우스가 20초 안에 조명이 없는 방으로 들어갈 때 까지 반복하였다. 두 번째 날 밝은 구획에 마우스를 넣고 20초간 적응 시키고 조명을 킨 다음 동일한 방법으로 칸막이 문을 열어주었다. 마우스가 조명이 없는 어두운 구획으로 들어가게 되면 자동적으로 칸막이 문이 닫히고 불이 꺼진 상태에서 바닥의 망을 통해 0.5 mA의 전류를 5초 동안 흘러주어 전기적 충격을 받게 하였다(training trial). 실험 셋째 날(24시간 후), 마우스를 밝은 구획에 다시 넣어주면 마우스는 조명이 들어와도 어두운 구획에 들어가기를 꺼려하게 되며, 이때 마우스가 어두운 구획으로 들어갈 때까지의 소요되는 시간 즉 step-through latency를 측정하였다(retention trial). 한편, 마우스가 어두운 구획으로 들어가지 않는 경우 cut-off 시간을 300초로 하였다.

[0048] 실험결과, 도 2에 나타내는 바와 같이 step-through latency time에서 정상군(NOR)의 경우에 281.59 ± 18.41

초를 기록하였고, 대조군($A\beta_{1-42}$)은 109.12 ± 27.16초를 기록하여 172.47초의 차이를 나타내어 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었다($p<0.01$). 이로보아 대조군에서 기억력 손상을 확실히 유발한 것으로 판단된다. 실험군(Aβ + BSS 3 mg/kg)의 경우 step-through latency time에서 263.76 ± 34.82초를 기록하여 대조군의 109.12 ± 27.16와 154.64초의 차이를 보여주어 베타시토스테롤의 투여가 손상된 기억력의 회복에 통계적으로 유의한 효과가 있음을 보여주었다($p<0.01$). (도 2, **$p<0.01$: NOR group vs. $A\beta_{1-42}$ group, #$p<0.05$ and ##$p<0.01$: $A\beta_{1-42}$ group vs. $A\beta_{1-42}$ + BSS group).

[0049] **실시예 2. 베타시토스테롤에 의한 항산화 효소 및 신경영양인자 발현 증가 효과**

[0050] 상기 수득한 베타시토스테롤의 인지기억력 향상 효과의 기전을 검토하기 위하여, 상세하게는 신경세포 손상 보호와 신경 재생에 중심적인 역할을 담당하는 단백질인 항산화 효소와 신경영양인자의 발현을 검토하기 위하여 하기와 같은 방법으로 실험을 실시하였다.

[0051] 웨스턴 블랏(Western blot)은 항산화 효소 헴 옥시게나아제(heme oxygenase-1; HO-1) 및 γ-글루타밀시스테인 리가아제(γ-glutamylcysteine ligase; GCL)와 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 단백질 발현을 측정하기 위하여 시행하였다.

[0052] 상기 실시예 1에서 행동실험이 끝난 실험동물의 뇌에서 대뇌피질 부분을 분리하여, ice-cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_4, protease inhibitor cocktail)로 균질화(homogenation)하였다. 이후 4℃에서 20분간 용해(lysis)시킨 후, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hanil, 대한민국)하여 상등액 600 μl를 취하였다. 단백질 함량을 BCA(Bicinchonic Acid; Pierce, 미국)으로 정량한 뒤, 30 μg을 12% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. 전개시킨 겔을 PVDF membrane (Pall Corporation, 미국)에 transfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20; AMRESCO, 미국)로 블로킹시켰다. 3% fat-free dry milk-PBS에 일차항체(AB1582, Chemicon, 미국)를 overnight으로 붙이고, PBST용액(Sigma, 미국)으로 10분간 3회 세척한 뒤, 이차항체(HRP-Rabbit Anti-Goat IgG Conjugate, 81-1620, ZYMED Laboratories, 미국)를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간 동안 붙인 다음, PBST용액으로 다시 10분간 3회 세척하였다. 이후 화학발광 용액(ECL; enhanced chemiluminescence; Amersham Pharmacia Biotech., IL, 미국)을 사용하여 1분간 반응시킨 뒤, 화학발광 면역블로팅 영상(Chemiluminescent Immunoblotting Imaging; UVP, CA, 미국) 장비를 이용하여 촬영하였다.

[0053] 실험결과, 도 3에 나타내는 바와 같이 정상군과 비교하여 베타아밀로이드를 단독으로 투여한 대조군에서 항산화 효소 HO-1과 GCL의 발현이 감소하였지만, 베타시토스테롤을 투여한 실험군에서 현저히 증가함을 확인할 수 있었다.

[0054] 동일한 실험 조건에서 도 4에서 나타내는 바와 같이 정상군과 비교하여 베타아밀로이드를 단독으로 투여한 대조군에서 신경영양인자(BDNF)의 단백질 발현 또한 감소하였지만, 베타시토스테롤을 투여한 실험군에서 현저히 회복됨을 관찰할 수 있었으며, 이는 상위 조절 전사인자인 cAMP response element-binding protein (CREB)의 인산화를 통한 활성 증가에 의해 매개됨을 웨스턴 블랏으로 확인할 수 있었다.

[0055] 이에, 하기에 화합물을 이용한 제제 예를 예시하나 이는 본 발명을 이에 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0056] **제제예 1. 산제의 제조**

[0057]	베타시토스테롤	300 mg
[0058]	유당	100 mg
[0059]	탈크	10 mg

[0060] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0061] **제제예 2. 정제의 제조**

[0062] 베타시토스테롤	300 mg
[0063] 옥수수전분	100 mg
[0064] 유당	100 mg
[0065] 스테아린산 마그네슘	2 mg

[0066] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0067] **제제예 3. 캅셀제의 제조**

[0068] 베타시토스테롤	150 mg
[0069] 결정성 셀룰로오스	3 mg
[0070] 락토오스	14.8 mg
[0071] 마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

[0072] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0073] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0074] 베타시토스테롤	150 mg
[0075] 만니톨	180 mg
[0076] 주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0077] $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	26 mg

[0078] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0079] **제제예 5. 액제의 제조**

[0080] 베타시토스테롤	150 mg
[0081] 이성화당	10 g
[0082] 만니톨	5 g
[0083] 정제수	적량

[0084] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색 병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0085] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

[0086]	베타시토스테롤	1000 mg
[0087]	비타민 혼합물	적량
[0088]	비타민 A 아세테이트	70 ㎍
[0089]	비타민 E	1.0 mg
[0090]	비타민 B1	0.13 mg
[0091]	비타민 B2	0.15 mg
[0092]	비타민 B6	0.5 mg
[0093]	비타민 B12	0.2 ㎍
[0094]	비타민 C	10 mg
[0095]	비오틴	10 ㎍
[0096]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0097]	엽산	50 ㎍
[0098]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0099]	무기질 혼합물	적량
[0100]	황산제1철	1.75 mg
[0101]	산화아연	0.82 mg
[0102]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0103]	제1인산칼륨	15 mg
[0104]	제2인산칼슘	55 mg
[0105]	구연산칼륨	90 mg
[0106]	탄산칼슘	100 mg
[0107]	염화마그네슘	24.8 mg

[0108] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0109] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0110]	베타시토스테롤	150 mg
[0111]	비타민 C	15 g
[0112]	비타민 E(분말)	100 g
[0113]	젖산철	19.75 g
[0114]	산화아연	3.5 g
[0115]	니코틴산아미드	3.5 g
[0116]	비타민 A	0.2 g
[0117]	비타민 B1	0.25 g

[0118] 비타민 B2 0.3g

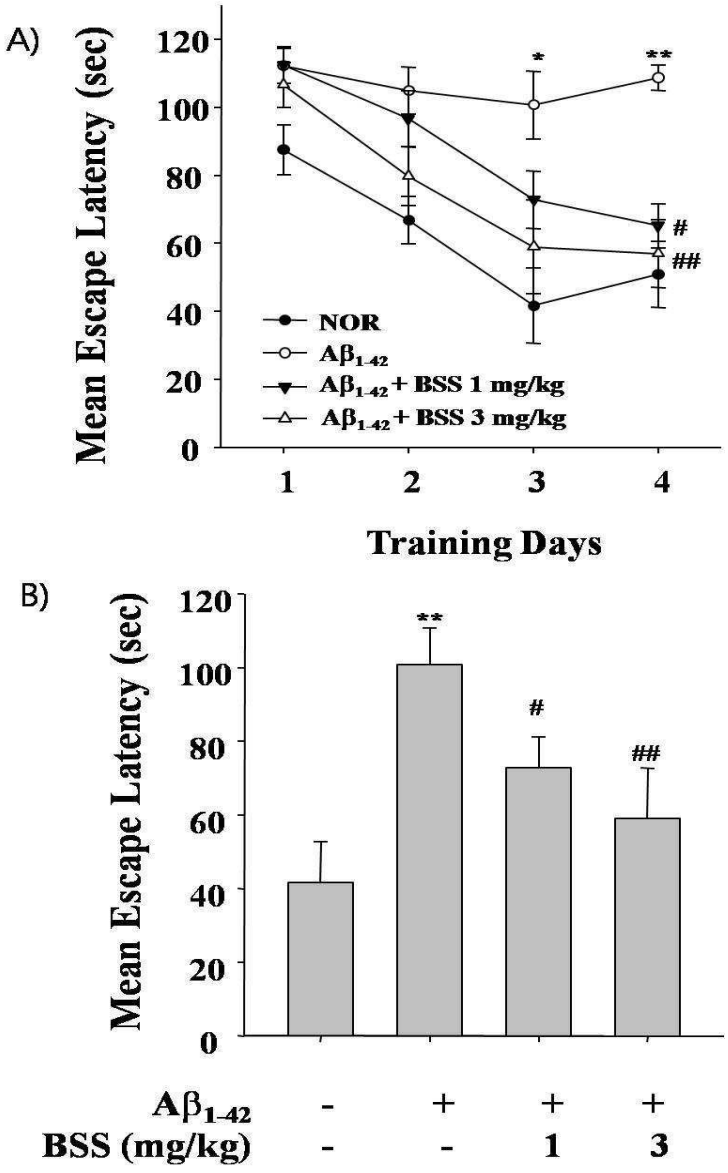
[0119] 물 정량

[0120] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85° C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

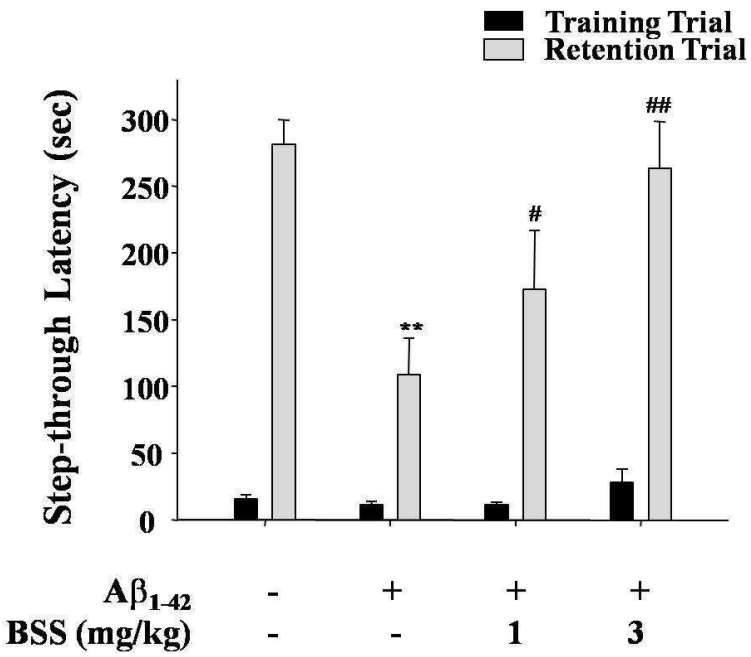
[0121] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

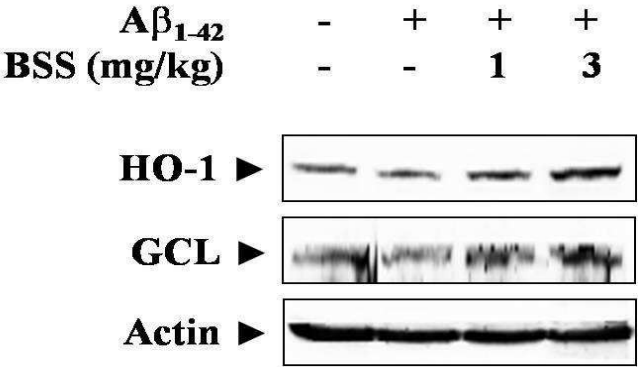
도면1



도면2


Training Trial
Retention Trial
Step-through Latency (sec)
300
250
200
150
100
50
0
**
#
##
Aβ1-42 - + + +
BSS (mg/kg) - - 1 3

도면3


Aβ1-42 - + + +
BSS (mg/kg) - - 1 3
HO-1 ▶
GCL ▶
Actin ▶

도면4

