

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 5월 27일 (27.05.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/058926 A2

(51) 국제특허분류:

A61K 36/9068 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) A61K 31/12 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2009/006664

(22) 국제출원일: 2009년 11월 13일 (13.11.2009)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2008-0114964 2008년 11월 19일 (19.11.2008) KR
10-2008-0118582 2008년 11월 27일 (27.11.2008) KR
10-2008-0118585 2008년 11월 27일 (27.11.2008) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내, 446-701 Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김

(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 김선여 (KIM, Sun-Yeou) [KR/KR]; 서울시 강남구 대치 1동 삼성아파트 113동 901호, 135-968 Seoul (KR). 하상근 (HA, Sang-Keun) [KR/KR]; 부산광역시 사상구 모라 2동 우성아

파트 106동 610호, 617-080 Busan (KR). 류중훈 (RYU, Jong-Hoon) [KR/KR]; 서울시 강남구 대치동 511 (24/3) 한보미도맨션 101동 609호, 135-280 Seoul (KR). 오명숙 (OH, Myung-Sook) [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 수내 2동 파크타운롯데아파트 133동 901호, 463-728 Gyeonggi-do (KR). 정서영 (JEONG, Seo-Young) [KR/KR]; 경기도 고양시 일산서구 주엽동 205-501, 411-370 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 오국진 (OH, Kook-Jin); 서울시 서초구 서초동 1708-6 두연빌딩 302호, 137-884 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

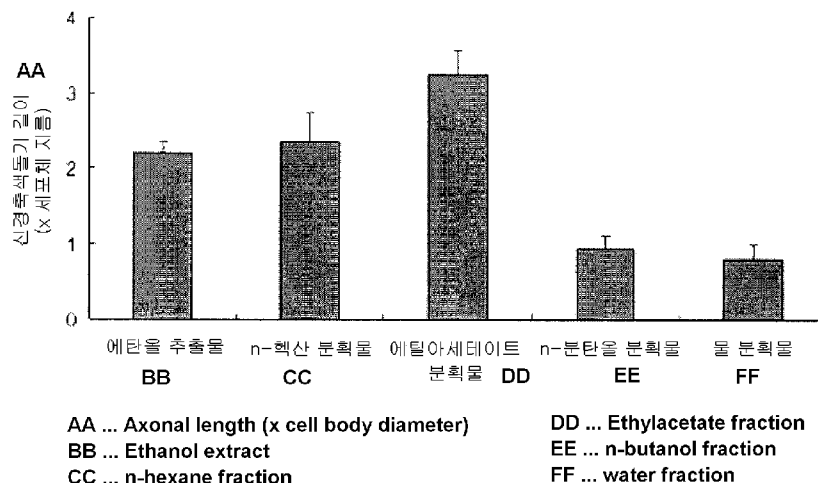
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING GINGER EXTRACT OR SHOGAOL

(54) 발명의 명칭: 생강 추출물 또는 쇼가올을 포함하는 약학 조성물

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention provides a pharmaceutical composition for preventing or treating learning disabilities, memory disorders, Parkinson's disease, or ischemic cerebrovascular disease, wherein said pharmaceutical composition contains ginger extract or shogaol and a pharmaceutically allowable carrier. Further, the present invention provides a food composition for improving or alleviating learning disabilities or memory disorders, or a food composition for improving learning ability and memory, containing ginger extract or shogaol as active ingredients.

(57) 요약서: 본 발명은 생강 추출물 또는 쇼가올; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 학습 장애, 기억력 장애, 파킨슨 질환, 또는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 생강 추출물 또는 쇼가올을 유효성분으로 포함하는, 학습 장애 또는 기억력 장애의 개선 또는 증상완화용 식품 조성물 또는 학습 또는 기억력 증진용 식품 조성물을 제공한다.

WO 2010/058926 A2



유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 생강 추출물 또는 쇼가올을 포함하는 약학 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 생강 추출물 또는 쇼가올; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 학습 장애, 기억력 장애, 파킨슨 질환, 또는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 생강 추출물 또는 쇼가올을 유효성분으로 포함하는, 학습 장애 또는 기억력 장애의 개선 또는 증상완화용 식품 조성물 또는 학습 또는 기억력 증진용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 기억이란 주위환경으로부터 얻은 새로운 정보나 학습된 경험, 지식을 습득하여 이를 뇌의 특정부위에 부호화하여 저장하고 이를 다시 회상하는 과정을 말한다(William F Ganong; Ganong's 생리학, 서울, 한우리, p289, p291-292, 1999). 기억의 과정은 습득, 부호화, 강화, 유지, 회상의 여러 단계로 구분된다. 현대사회는 복잡하고 전문화되는 추세이며 그에 따라 많은 정보량과 학습량이 요구되므로 효과적인 두뇌활동이 필요하게 된다. 또한 많은 사람들이 노화 및 질병에 의한 기억력의 감퇴로 고통받고 있으며 인간의 수명이 연장되어 감에 따라 고도의 정신활동이 요구되고 있다. 이러한 상황을 적절히 대처하기 위하여 두뇌를 맑게 하고 기억력을 증진시켜 정신활동을 필요로 하는 등의 노력이 다양하게 시도되고 있고 이러한 기능을 효과적으로 증진시킬 수 있는 의약품, 기능성 식품 등의 개발이 당업계에 요구되고 있다.
- [3] 파킨슨 질환(Parkinson's disease)은 만성 진행성 신경 질환으로서, 대표적인 난치성 질환 중 하나이다. 파킨슨 질환은 중뇌의 흑질(substantia nigra) 부위에 신경전달물질인 도파민을 만들어 내는 세포가 갑자기 퇴화되거나 그 수가 크게 감소하여 발생한다. 그 원인은 아직 구체적으로 밝혀져 있지 않으나, 뇌의 동맥경화증, 일산화탄소 중독, 약물, 부갑상선 기능저하증 등에 의한 대사성, 외상성 뇌염 후유증 등이 관여된다고 알려져 있다. 신경전달물질의 도파민이 감소함으로써 신경전달체계 전체의 균형이 무너지고, 그 결과로서 파킨슨병의 대표적인 증상인 떨림증(tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia), 자세의 불안정(postural instability) 등의 증상이 나타난다.
- [4] 파킨슨 질환의 치료를 위한 약물로서, 엘도파(l-dopa) 제제, 도파민 수용체 작용제, 항콜린 약제, 엘데프릴(Eldepryl=depreyl) 등이 알려져 있으며, 이들 약물들 대부분은 원인적인 치료가 아니라 증상을 조절하는 역할을 하는 것이며, 따라서 꾸준히 지속적인 약물의 복용을 필요로 한다. 그러나, 이러한 약물들의 장기 투여는 약물 부작용의 문제점을 야기하게 된다. 예를 들어, 항콜린 약제들은 자율신경계 이상이나 정신기능의 이상 등이 나타날 수 있어 고령의

환자들에게 지속적으로 투여하는 것에 한계가 있다. 또한, 엘도파 제제의 경우 장기간 동안의 복용에 따라 점차적으로 효과가 떨어지고, 몸이 뒤틀리고 손이나 발이 저절로 움직이는 이상운동이 생기는 등의 부작용이 발생하게 된다. 기타, 고주파를 이용한 신경자극술 즉, 고주파 파괴술 또는 심부 뇌자극술 등의 수술치료도 행해지고 있으나, 침습적인 수술을 필요로 하고 또한 많은 비용이 소요되는 문제가 있다.

- [5] 허혈성 뇌혈관 질환(ischemic cerebrovascular diseases 또는 ischemia)은 뇌에 혈류를 공급하는 혈관에 다양한 형태의 병리학적 이상이 발생되어, 국소적으로 정상적 뇌혈류의 장애를 초래하게 되는 질환을 말한다. 상기 허혈성 뇌혈관 질환은 일과성 뇌허혈발작(Transient Ischemic Attack, TIA), 가역성 허혈성 신경학적 결손(Reversible Ischemic Neurologic Deficit, RIND), 진행성 뇌졸중(progressing stroke), 완전 뇌졸중(completed stroke), 및 허혈성 혈관성 치매(ischemic vascular dementia)을 포함한다. 일과성 뇌허혈발작(Transient Ischemic Attack, TIA)은 뇌허혈에 의해 국소적인 신경장애가 발생한 후 24시간 이내에 회복되는 것을 말하며, 대부분은 10~15분 이내에 회복된다. 가역성 허혈성 신경학적 결손(Reversible Ischemic Neurologic Deficit, RIND)은 국소적 허혈증상이 24시간 이상 지속될 수 있으나 3주 내에 회복되는 것을 말하며, 신경학적 검사상 확실한 이상소견이 있기 때문에 TIA 와 구분된다. 진행성 뇌졸중(progressing stroke)은 국소적 뇌허혈증상이 수분에서 수시간에 걸쳐 악화되는 것을 말하며, 원인은 이미 연관된 부위의 뇌조직에 뇌허혈이 확장되기 때문이며 이것은 허혈성 뇌부종에 의해 신경학적 증상이 악화되는 것과는 다르다. 내경동맥영역의 뇌경색환자 중 약 20%에서 첫 48시간 이내에 진행되며, 추돌기저동맥영역(vertebrobasilar territory)에서는 약 40% 정도로 더 많이 발생한다. 완전 뇌졸중(completed stroke)은 국소적 뇌허혈증상이 발병한 후 수일~수주에 걸쳐 신경학적 변화가 없는 경우를 말한다. 허혈성 혈관성 치매(ischemic vascular dementia)는 혈관성 치매의 일종으로서, 2회 이상의 허혈성 뇌경색을 전제로 하며, 치매와의 시간적 인과관계를 꼭 요구하지는 않는다.

- [6] 한편, 생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과(*Zingiberaceae*) 식물에 속하는 진지버(*Zingiber*)속 식물로서, 동남아시아 등지에 광범위하게 분포되어 있으며 민간요법으로 이용되어 왔다. 생강의 성분으로는 전분이 전체의 40~60%를 차지하고, 방향신미성분, 수지 단백질, 섬유소, 펙토산, 무기질 등이 있으면, 생강의 매운 맛은 진저론(gingeron), 진저롤(gingerol), 쇼가올(shogaol), 디하이드로진저롤(dihydrogingerol), 방향성분은 시트랄(citral), 캄펜(camphene) 등 40여 종이 알려져 있다. 생강의 활성에 관한 연구로서는 항산화 작용(Masuda et al., Chem. Lett., 1, pp189-192, 1993; Jitoe et al., Tetrahedron Lett., 35, pp981-984, 1994), 항염증 작용(Ozaki et al., Chem. Pharm. Bull., 39, pp2353-2356, 1991; Jeenapongsa et al., J. Ethnopharmacol., 87, pp143-148, 2003), 살충작용(Nugroho et al., Phytochemistry, 41, pp129-132, 1996) 및 자궁 이완 작용 (Kanjapothi et al.,

Planta Med., 53,pp329-332, 1987)이 보고된 바 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 안전성이 확보된 천연물 추출물 또는 천연물 유래의 화합물을 대상으로 다양한 약리 활성 검색을 수행하였다. 그 결과, 놀랍게도 생강 추출물 및 생강에 함유된 성분 중 하나인 쇼가올이 우수한 학습 능력 및/또는 기억력 증진 효과를 가지며, 또한 파킨슨 질환 및 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 및/또는 치료 활성을 갖는다는 것을 발견하였다.
- [8] 따라서, 본 발명은 생강 추출물 또는 쇼가올; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 학습 장애, 기억력 장애, 파킨슨 질환, 또는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 생강 추출물 또는 쇼가올을 유효성분으로 포함하는, 학습 장애 또는 기억력 장애의 개선 또는 증상완화용 식품 조성물 또는 학습 또는 기억력 증진용 식품 조성물을 제공한다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명의 일 태양에 따라, 생강 추출물 또는 쇼가올; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 학습 장애, 기억력 장애, 파킨슨 질환, 또는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공된다.
- [11] 본 발명의 또 다른 태양에 따라, 생강 추출물 또는 쇼가올을 유효성분으로 포함하는, 학습 장애 또는 기억력 장애의 개선 또는 증상완화용 식품 조성물이 제공된다.
- [12] 본 발명의 다른 태양에 따라, 생강 추출물 또는 쇼가올을 유효성분으로 포함하는, 학습 또는 기억력 증진용 식품 조성물이 제공된다.

발명의 효과

- [13] 본 발명에 의해, 생강 추출물 또는 쇼가올이 학습 장애, 기억력 장애, 파킨슨 질환, 또는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 및/또는 치료 활성을 갖는다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에 약학 조성물은 학습 장애, 기억력 장애, 파킨슨 질환, 또는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 적용될 수 있다. 또한, 생강 추출물 또는 쇼가올을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 학습 장애 또는 기억력 장애의 개선 또는 증상완화 및/또는 학습 또는 기억력 증진에 유용하게 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 C6 세포에서 생강의 에탄올 추출물, n-헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 및 물 분획물을 처리하여 얻은 조건배지를 PC12 세포에 처리한 후, 신경축색돌기의 성장길이를 관찰한 결과로서, 생강 추출물의 신경돌기 성장(neurite outgrowth) 효과를 평가한 결과를 나타낸다.
- [15] 도 2는 C6 세포에서 쇼가올을 0.1, 1, 5, 10, 그리고 20 μ M 농도로 처리하여 얻은

- 조건배지(conditioned media)를 이용하여 신경성장인자를 정량분석한 결과로서, 쇼가울의 신경성장인자의 분비 유도 효과를 평가한 결과를 나타낸다.
- [16] 도 3은 C6 세포에서 쇼가울을 처리하여 얻은 조건배지를 PC12 세포에 처리한 후, 신경축색돌기의 성장을 관찰한 결과로서, 쇼가울의 신경성장인자 분비 유도 효과를 평가한 결과를 나타낸다.
- [17] 도 4는 ICR mice에서 쇼가울을 5mg/kg을 투여한 후 인지능력 향상을 측정하기 위한 수동 회피 실험(passive avoidance task)의 결과로서, 쇼가울의 인지능력 향상효과를 평가한 결과이다.
- [18] 도 5는 ICR mice에서 생강 추출물을 50mg/kg을 투여한 후 인지능력 향상을 측정하기 위한 수동 회피 실험(passive avoidance task)의 결과로서, 생강 추출물의 인지능력 향상효과를 평가한 결과이다.
- [19] 도 6은 MPP+의 신경독성에 대한 흰쥐태아중뇌세포에서 쇼가울의 도파민세포 보호효과를 측정한 결과를 나타낸다.
- [20] 도 7은 6-OHDA의 신경독성에 대한 흰쥐태아중뇌세포에서 쇼가울의 도파민세포 보호효과를 측정한 결과를 나타낸다.
- [21] 도 8은 MPP+의 신경독성에 대한 흰쥐태아중뇌세포에서 생강 추출물의 도파민세포 보호효과를 측정한 결과를 나타낸다.
- [22] 도 9는 6-OHDA의 신경독성에 대한 흰쥐태아중뇌세포에서 생강 추출물의 도파민세포 보호효과를 측정한 결과를 나타낸다.
- [23] 도 10은 MPTP 투여에 의해 파킨슨 병을 유도시킨 C57BL/6 마우스에 대한 쇼가울의 행동시험(pole test) 결과를 나타낸다.
- [24] 도 11은 MPTP 투여에 의해 파킨슨 병을 유도시킨 C57BL/6 마우스에서 선조체(striatum)의 광학밀도(optical density) 감소에 대한 쇼가울의 억제활성을 측정한 결과를 나타낸다.
- [25] 도 12는 MPTP 투여에 의해 파킨슨 병을 유도시킨 C57BL/6 마우스에서 흑질(substantia nigra)의 도파민 양성 세포 (tyrosine hydroxylase positive cell) 감소에 대한 쇼가울의 억제활성을 측정한 결과를 나타낸다.
- [26] 도 13은 MPTP 투여에 의해 파킨슨 병을 유도시킨 C57BL/6 마우스에 대한 생강추출물의 행동시험(pole test) 결과를 나타낸다.
- [27] 도 14는 MPTP 투여에 의해 파킨슨 병을 유도시킨 C57BL/6 마우스에서 선조체의 광학밀도 감소에 대한 생강추출물의 억제활성을 측정한 결과를 나타낸다.
- [28] 도 15는 MPTP 투여에 의해 파킨슨 병을 유도시킨 C57BL/6 마우스에서 흑질의 도파민 양성 세포 감소에 대한 생강추출물의 억제활성을 측정한 결과를 나타낸다.
- [29] 도 16은 2-vessel occlusion 뇌허혈 모델에서 허혈에 의해 유도된 해마부분의 신경세포 사멸에 대한 생강 추출물의 효능을 평가한 결과를 나타낸다.
- [30] 도 17은 2-vessel occlusion 뇌허혈 모델에서 해마 중 신경세포 사멸이 일어난

CA1의 중간부분을 확대하여 나타낸 결과이다.

- [31] 도 18은 생강 추출물과 분획물들의 CA1에서의 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸다.
- [32] 도 19는 2-vessel occlusion 뇌허혈 모델에서 허혈에 의해 유도된 해마부분의 신경세포 사멸에 대한 쇼가올의 효능을 평가한 결과를 나타낸다.
- [33] 도 20은 2-vessel occlusion 뇌허혈 모델에서 해마 중 신경세포 사멸이 일어난 CA1의 중간부분을 확대하여 나타낸 결과이다.
- [34] 도 21은 쇼가올의 CA1에서의 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 본 명세서에서, "학습(learning)"이라 함은 자신의 행동을 지각하고 변화시킬 수 있는 능력 또는 행동을 말하며, 공간지각력, 인지력, 집중력 등을 포함한다.
- [36] "학습 장애(learning disorder 혹은 learning disability)"라 함은 지능 지수와 관계없이 다양한 원인, 예를 들어 우울증, 불안증, 강박증, 사회환경적 요인(가정불화, 빈곤, 결손가정, 스트레스) 등에 의해 "학습" 능력이 정상인에 비해 낮아진 상태를 말하며, 공간지각력 저하, 인지력 저하, 집중력 저하, 아동 등의 학업 성취도 저하 등을 포함한다.
- [37] "기억" 또는 "기억력"이라 함은 주위 환경으로부터 얻은 새로운 정보나 학습된 경험, 지식을 습득하여 뇌의 특정부위에 부호화하여 저장하고 이를 다시 회상할 수 있는 능력을 말한다.
- [38] "기억력 장애(memory disorder 혹은 memory deficiency)"라 함은 외상, 주의력 결핍, 노화, 질병 등의 다양한 원인에 의하여 상기 "기억력"이 정상인에 비해 낮아진 상태를 말하며, 건망증(amnesia), 집중력 장애, 공간지각력 손실, 학습능력의 둔화, 인지력 상실 등을 포함한다.
- [39] "허혈성 뇌혈관 질환(Ischemic Cerebrovascular Diseases 또는 Ischemia)"이라 함은 뇌에 혈류를 공급하는 혈관에 다양한 형태의 병리학적 이상이 발생되어, 국소적으로 정상적 뇌혈류의 장애를 초래하게 되는 질환을 말한다. 상기 허혈성 뇌혈관 질환은 일과성 뇌허혈발작(Transient Ischemic Attack, TIA), 가역성 허혈성 신경학적 결손(Reversible Ischemic Neurologic Deficit, RIND), 진행성 뇌졸중(progressing stroke), 완전 뇌졸중(completed stroke), 및 허혈성 혈관성 치매(ischemic vascular dementia)을 포함한다. 특히, 본 명세서에서 "허혈성 뇌혈관 질환"은 진행성 및/또는 완전 뇌졸중을 포함한다.
- [40] 본 발명에 의해, 생강 추출물 또는 쇼가올이 학습 장애 또는 기억력 장애를 예방 또는 치료할 수 있으며, 또한 학습 또는 기억력을 증진시키는 것이 새롭게 발견되었다. 3일간 생강 추출물 또는 쇼가올을 투여 후 수동 회피 시험을 수행한 결과, 생강 추출물 또는 쇼가올을 투여한 경우 현저히 증가된 학습 및/또는 기억력을 나타내었다.
- [41] 또한, 본 발명에 의해 생강 추출물 또는 쇼가올이 파킨슨 질환을 예방 또는

치료할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 1-메틸-4-페닐피리디니움(1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP+) 및 6-하이드록시도파민(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)로 도파민신경세포 독성을 야기한 후, 도파민신경세포의 보호활성을 시험을 수행한 결과 쇼가울의 도파민 세포 보호활성을 나타내었다. 또한 N-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘(N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)로 마우스에 파킨슨 병을 유발시킨 후, 행동시험(pole test) 및 도파민 세포(dopaminergic neuron) 보호 활성 시험을 수행한 결과, 생강추출물 또는 쇼가울을 투여한 경우 MPTP에 의해 야기되는 서동(bradykinesia)을 복원시켰으며 또한 선조체(striatum)와 흑질(substantia nigra)에서 우수한 도파민 세포(dopaminergic neuron)의 보호활성을 나타내었다.

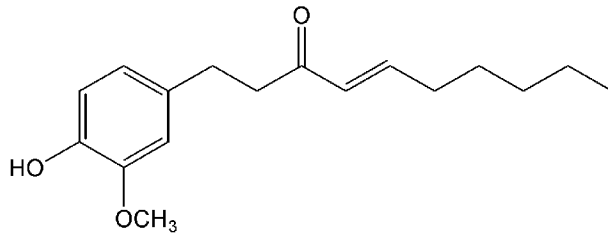
- [42] 또한, 본 발명에 의해 생강 추출물 또는 쇼가울이 허혈성 뇌혈관 질환을 예방 또는 치료할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 2-vessel occlusion 뇌허혈 모델에서 생강 추출물 및 쇼가울이 우수한 신경세포 사멸 억제 활성을 나타내었다.
- [43] 본 발명은 생강 추출물 또는 쇼가울; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 학습 장애, 기억력 장애, 파킨슨 질환, 또는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [44] 상기 생강 추출물은 생강을 C₁~C₄의 알콜, n-헥산, 에틸 아세테이트, n-부탄올, 클로로포름, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매로 추출하는 단계를 포함하는 추출공정을 수행하여 얻어질 수 있다. 더욱 바람직하게는 상기 생강 추출물은 생강을 에탄올로 추출하여 얻어진 에탄올-추출물일 수 있다. 상기 추출용매의 사용량은 크게 제한되는 것은 아니며, 예를 들어 생강의 분말 시료 1 중량에 대하여 약 1 내지 10배 부피, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 비율로 사용될 수 있다. 또한, 상기 추출은 약 7일 내지 20일, 바람직하게는 약 7일 내지 10일 동안, 냉침 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 환류 냉각 추출 등의 추출방법으로 수행될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출은 실온(약 25 °C)에서 냉침 추출법에 의해 수행될 수 있으며, 또한 상기 추출과정은 단회 또는 복수회 수행할 수 있고, 바람직하게는 약 3회 정도 반복 수행할 수 있다. 얻어진 추출액은 필요에 따라 통상의 방법, 예를 들어 약 20 내지 100 °C, 바람직하게는 약 30 내지 70°C에서, 감압 농축하거나 감압 건조함으로써, 액상 또는 분말 형태로 생강 추출물을 얻을 수 있다.
- [45] 상기 생강 추출물은 유효성분의 함량을 높이기 위하여 추가의 추출공정을 수행하여 얻어질 수 있다. 즉, (a) 생강을 C₁~C₄의 알콜로 추출하는 단계; 및 (b) 단계(a)에서 얻어진 추출물에 물 및 n-헥산을 가하여 추출하고, 얻어지는 n-헥산층을 분리하는 단계를 포함하는 추출공정(및 필요에 따라 추가의 크로마토그래피 분획공정)을 행함으로써 유효성분의 함량이 높은 생강 추출물을 얻을 수 있다. 또한, 선택적으로 (a) 생강을 C₁~C₄의 알콜로 추출하는 단계; (b') 단계(a)에서 얻어진 추출물에 물 및 n-헥산을 가하여 추출하고, 얻어지는 수층을 분리하는 단계; 및 (c) 단계(b')에서 얻어진 수층에 에틸

아세테이트를 가하여 추출하고, 얻어지는 에틸 아세테이트층을 분리하는 단계를 포함하는 추출공정(및 필요에 따라 추가의 크로마토그래피 분획공정)을 수행하거나, 혹은 (a) 생강을 C₁~C₄의 알콜로 추출하는 단계; (b') 단계(a)에서 얻어진 추출물에 물 및 n-헥산을 가하여 추출하고, 얻어지는 수층을 분리하는 단계; (c') 단계(b')에서 얻어진 수층에 에틸 아세테이트를 가하여 추출하고, 얻어지는 수층을 분리하는 단계; 및 (d) 단계(c')에서 얻어진 수층에 n-부탄올을 가하여 추출하고, 얻어지는 n-부탄올층 또는 수층을 분리하는 단계를 포함하는 추출공정(및 필요에 따라 추가의 크로마토그래피 분획공정)을 수행함으로써 유효성분의 함량이 높은 생강 추출물을 얻을 수 있다. 바람직하게는 상기한 바와 같이 에틸 아세테이트층을 분리하는 단계를 포함하는 추출공정 즉, 에틸 아세테이트 분획을 사용할 수 있다.

- [46] 상기 추가의 추출공정[즉, 단계(b), (b'), (c), (c'), 및 (d)]는 실온(약 25 °C)에서 냉침 추출법에 의해 수행될 수 있으며, 또한 상기 추출과정은 단회 또는 복수회 수행할 수 있고, 바람직하게는 약 3회 정도 반복 수행할 수 있다. 얻어진 추출액은 필요에 따라 통상의 방법, 예를 들어 약 20 내지 100 °C, 바람직하게는 약 30 내지 70°C에서, 감압 농축하거나, 필요에 따라 동결건조함으로써, 액상 또는 분말 형태로 생강 추출물을 얻을 수 있다.
- [47] 또한, 상기 추가의 추출공정을 수행한 이후, 필요에 따라 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 이용한 분획공정을 수행할 수도 있다. 상기 분획은 헥산과 에틸아세테이트 혼합용매 (Hexane : EtOAc = 30:1 → 1:11)와 에틸아세테이트와 메탄올 혼합용매(EtOAc : MeOH = 25:1 → 1:2)를 단계적으로 극성을 높여가는 용출용매 시스템으로 용출시키는 과정을 수회 반복함으로써, 수행될 수도 있다.
- [48] 상기 생강 추출물은 또한 초임계 추출법을 이용하여 얻을 수 있다. 초임계 추출은 60~350 bar, 더욱 바람직하게는 약 300 bar의 압력에서, 5 분 ~ 24 시간 동안, 더욱 바람직하게는 약 6 시간 동안, 30~80 °C에서, 더욱 바람직하게는 약 50 °C에서 수행될 수 있다. 또한, 이산화탄소의 유속은 10~50 g/분, 더욱 바람직하게는 약 30 g/분으로 유지시킬 수 있으나, 크게 제한되는 것은 아니다. 상기 초임계 추출은 단회 혹은 복수회(예를 들어, 2~4 회) 수행할 수 있다. 생강 추출물을 포함하는 이산화탄소는 분리기의 중간부에 도입되어 압력이 약 50-60 bar로 강하되어 용해도가 급격히 떨어지게 되며, 분리는 상단과 하단에 약 40 °C의 히팅자켓과 약 5 °C 이하의 냉각자켓에 의해 감싸여 하단의 추출물과 액체 이산화탄소와 상단의 기체 이산화탄소로 분리된다. 상단의 기체 이산화탄소는 차콜 필터 등의 필터를 걸쳐 냉각기에 의해 액화되어 다시 펌프를 통해 추출기로 순환된다.
- [49] 또한, 본 발명의 일 구현예에서, 쇼가올을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 상기 쇼가올은 6-쇼가올로도 칭해지며, 그 화학명이 (E)-1-(4-히드록시-3-메톡시페닐)덱-4-엔-3-온[(E)-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)dec

-4-en-3-one]으로서, 하기 화학식 1의 구조를 갖는다.

[50] 화학식 1



[51] 상기 쇼가올은 생강으로부터 분리될 수 있으며, 예를 들어, 유럽특허 제EP1506958호 등을 비롯한 다양한 합성방법이 공지되어 있다.

[52] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하여 다양한 형태, 예를 들어 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구용 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있다. 특히 바람직하게는 경구용 제형으로 제제화될 수 있다.

[53] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한다. 또한, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다. 경구용 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로즈(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 포함할 수 있으며, 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등을 포함할 수 있다. 경구용 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 포함하며, 물, 리퀴드 파라핀 등의 희석제, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다. 비경구용 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제를 포함하며, 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르류 등을 포함한다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[54] 본 발명의 약학조성물에 함유되는 생강 추출물 또는 쇼가올의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 쇼가올은 1일 0.01 내지 500 mg/kg, 바람직하게는 10 내지 200 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 생강 추출물은 1일 0.01 내지 500 mg/kg, 바람직하게는 10 내지 200 mg/kg의 용량으로 투여할 수

있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 쇼가올 또는 생강 추출물을 0.001 내지 50 % 중량백분율로 포함할 수 있다.

- [55] 본 발명은 생강 추출물 또는 쇼가올을 유효성분으로 포함하는, 학습 장애 또는 기억력 장애의 개선 또는 증상완화용 식품 조성물을 포함한다. 또한, 본 발명은 쇼가올을 유효성분으로 포함하는, 학습 또는 기억력 증진용 식품 조성물을 포함한다. 상기 식품 조성물에 있어서, 생강 추출물은 상기에서 설명한 바에 따라 얻을 수 있다.
- [56] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [57] 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [58] 상기 "식품 첨가물 공전"에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.
- [59] 본 발명의 식품 조성물은 학습 장애 또는 기억력 장애의 개선 또는 증상완화를 목적으로 또는 학습 또는 기억력 증진을 목적으로, 조성물 총 중량에 대하여 생강 추출물 또는 쇼가올을 0.01 내지 95 %, 바람직하게는 1 내지 80 % 중량백분율로 포함할 수 있다. 또한, 학습 장애 또는 기억력 장애의 개선 또는 증상완화를 목적으로 또는 학습 또는 기억력 증진을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.
- [60] 예를 들어, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 생강 추출물 또는 쇼가올, 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [61] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질캡셀제는 통상의 경질캡셀에 생강 추출물 또는 쇼가올; 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물 또는 그의 입상물 또는 제피한 입상물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질캡셀제는 생강 추출물 또는 쇼가올; 및 부형제 등의 첨가제와의 혼합물을 젤라틴 등 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제,

착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[62] 환 형태의 건강기능식품은 생강 추출물 또는 쇼가올, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 적당한 제피제로 제피를, 또는 진분, 탈크 또는 적당한 물질로 환의를 입힐 수도 있다.

[63] 과립형태의 건강기능식품은 상기 생강 추출물 또는 쇼가올, 부형제, 결합제, 붕해제 등의 혼합물을 적당한 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[64] 본원 발명의 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다 (대한약전 해설편, 문성사, 한국약학대학협의회, 제 5 개정판, p33-48, 1989).

[65] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[66]

[67] 실시예 1. 생강 추출물의 제조

[68] 생강 1 kg을 갈아서 5 리터의 에탄올을 넣고 초음파 추출을 1시간 동안 수행한 후, 여과하여 여액을 분리하였다. 상기 여과에 의해 얻어진 고형물을 다시 에탄올에 넣고 초음파 추출을 1시간 동안 수행한 후, 여과하여 다시 여액을 분리하였다. 상기 과정을 2회 더 반복하였다. 얻어진 여액을 모두 합하여 감압 농축하여 용매를 제거한 뒤 동결건조를 통해 수분을 완전히 제거하여 생강 추출물 200 g을 얻었다.

[69] 상기에서 얻어진 에탄올-추출물 200 g을 증류수 1000 ml를 가하여 균일하게 잘 현탁한 후 n-헥산 1000 ml를 가하고, 분획 과정을 거쳐 n-헥산층을 분리하였다. 얻어진 n-헥산층을 감압농축하여 헥산을 제거하고 동결건조를 통해 건조하였다. 이 과정을 3회 반복 수행하여 헥산 분획물 60 g을 얻었다. 또한, 남은 수층에 에틸 아세테이트 1000 ml를 가하여 에틸 아세테이트층을 분리하였다. 얻어진 에틸 아세테이트층을 감압 농축하여 용매를 제거한 뒤 동결건조를 통해 수분을 완전히 제거하였다. 이 과정을 3회 반복 수행하여 에틸 아세테이트 분획물 50 g을 얻었다. 또한, 남은 수층에 n-부탄올 1000 ml를 가하여 n-부탄올층을 분리하였다. 얻어진 n-부탄올층을 감압 농축하여 용매를 제거한 뒤 동결건조를 통해 수분을 완전히 제거하였다. 이 과정을 3회 반복 수행하여 n-부탄올 분획물 18 g을 얻었다. 또한 남은 수층을 감압 농축하여 용매를 제거한 뒤 동결건조하여 물 분획물 43 g을 얻었다.

[70]

[71] 실시예 2. 생강 추출물의 제조

[72] 초임계 추출법을 이용하여 생강 추출물을 제조하였다. 생강을 갈아, 건조시킨

시료 200g을 초임계 추출기 내부에 충전시키고 300 bar 및 50 °C의 조건에서 6 시간씩 2회 추출하였다. 이때 이산화탄소의 유속은 30 g/분으로 유지시켰고, 분리기의 중간부 압력은 50-60 bar로 설정하였고, 상단의 히팅자켓의 온도는 40 °C로 설정하였으며, 하단의 냉각자켓의 온도는 5 °C 이하로 설정하였다. 분리기 상단의 기체 이산화탄소는 차콜필터를 걸쳐 냉각기에 의해 액화되어 다시 펌프를 통해 추출기로 순환시켰다. 상기와 같이 초임계 추출을 수행하여 생강 추출물 4.32 g을 얻었다.

[73]

[74] **시험예 1.**

[75] 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)를 분비한다고 알려져 있는 쥐의 신경교종세포(glioma) C6 세포주와, 신경성장인자에 대하여 신경세포(neuron)와 유사하게 신경축색돌기(neurite)를 성장시키는 것으로 알려져 있는 쥐의 크롬친화성세포종(pheochromocytoma) PC12 세포주를 이용하였다. C6 세포와 PC12 세포는 모두 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다(각각 KCLB No. 10107 및 21721). C6 세포는 3.4 g/L의 탄산수소나트륨(NaHCO_3 , sodium bicarbonate), 10% 소태아혈청(fetal bovine serum) 및 페니실린-스트렙토마이신 항생제(10000 U/ml) 1%가 보충된 DMEM 배지(Gibco BRL, 미국)를 사용하여 배양하였으며, PC12 세포는 2.0 g/L의 탄산수소나트륨, 10% 말혈청(horse serum), 5% 우태혈청 및 페니실린-스트렙토마이신 항생제(10000 U/ml) 1%가 보충된 RPMI1640 배지(Gibco BRL, 미국)를 사용하여 배양하였다. 사용한 소태아혈청 및 말혈청은 사용하기 전 55°C에서 30분간 비활성시켜 사용하였고, 양 세포 모두 70%의 습도와 37°C의 온도가 유지되고, 5%의 이산화탄소가 공급되는 세포배양기에서 배양하였다. PC12 세포의 경우, 폴리-D-라이신(Poly-D-lysine, Sigma)을 PBS 완충용액(pH 7.2)에 50 µg/ml의 농도로 희석한 다음, 1시간 동안 표면을 코팅한 후 PBS 완충용액으로 세 번 세척한 배양용기에서 배양하였다. 쇼가울은 WAKO사 (일본)에서 구입하여 사용하였다.

[76] **(1) C6 세포에서 생강 추출물의 신경성장인자 분비유도에 미치는 효과**

[77] 0.25% 트립신(Trypsin)-EDTA(Gibco BRL, 미국)를 처리하여 100 mm 배양용기에 부착된 C6 세포를 이탈시킨 후, 10 ml의 신선한 배지를 첨가하여 세포현탁액을 만든 후, 세포수 측정기를 이용하여 살아있는 세포수를 측정 및 계산하였다. 계산한 값을 바탕으로 100 mm 배양접시에 2×10^6 개의 세포가 포함되도록 분주하였다. 24시간 배양 후, 기존의 배지를 제거하고 실시예 1에서 얻어진 에탄올 추출물, n-헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, n-부탄올 분획물, 및 물 분획물을 각각 100 µg/ml의 농도로 첨가한 2% 우태혈청의 DMEM 배지 10 ml로 교환해주었으며, 다시 24시간 동안 배양한 후 배지를 각각 얻었다. 얻은 배지를 1500 rpm에 10분간 원심분리한 후, 상층액만을 다시 모았으며, 이 배지(조건배지, conditioned media)를 PC12 세포 처리에 사용하였다.

[78] PC12 세포는 6 well 배양접시에 well 당 10^5 개의 세포가 포함되도록 분주하였다.

배양한지 24시간 후, PBS 완충용액에 희석한 2 ng/ml 의 신경성장인자와 C6 세포에서 얻은 조건배지를 함께 처리하였고, 2일에 한번 씩 새로운 신경성장인자와 조건배지로 교환해주었으며, 6일 동안 배양하면서 현미경으로 관찰하였다. 조건배지를 4일간 처리한 후, 웰당 10개의 세포를 무작위로 선정하여 현미경 사진을 찍고, 세포에서 신경축색돌기가 보이지 않으면 0으로, 신경축색돌기의 길이가 세포체의 지름과 같으면 1로, 그리고 세포체 지름의 2배 길이로 성장하면 2로 하는 형식으로 세포체의 지름에 대한 신경축색돌기 길이의 값을 수치화하였다. 상기 시험을 3회 반복하여 그 결과를 평균±오차로 나타낸 결과는 도 1과 같다.

- [79] 도 1의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 에탄올 추출물을 처리하였을 때, 세포체의 길이에 대하여 2.21 ± 0.13 배, n-헥산 분획물을 처리하였을 때 2.35 ± 0.38 배, 에틸아세테이트 분획물을 처리하였을 때 3.24 ± 0.34 배, n-부탄올 분획물을 처리하였을 때 0.93 ± 0.17 배, 그리고 물 분획물을 처리하였을 때 0.81 ± 0.19 배의 신경축색돌기의 성장을 나타내었다. 상기 결과로부터 생강 추출물이 성장인자 분비 활성을 가짐을 알 수 있으며, 특히 에틸아세테이트 분획물이 가장 큰 효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

[80] **(2) C6 세포에서 쇼가울의 신경성장인자 분비유도에 미치는 효과**

- [81] 실험에 1-1과 동일한 방법으로 C6 세포를 분주한 후, 0.1, 1, 5, 10, 및 20 μM 의 쇼가울을 처리하여 조건배지를 만들었다.

- [82] 쇼가울에 의해 C6 세포에서 분비된 신경성장인자는 신경성장인자 측정 kit(DY556, R&D system, 미국)에 조건배지를 처리하여 정량하였다. 쇼가울이 신경성장인자 분비 유도에 미치는 영향을 알아보기 위해, C6 세포에 쇼가울을 처리한 후 배양하여 얻은 조건배지에서 신경성장인자를 정량분석하였으며, 그 결과는 도 2와 같다.

- [83] 도 2의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 대조군(control) 과 비교하여 쇼가울을 0.1 μM 처리하였을 때 $105.46 \pm 7.27\%$, 1 μM 처리하였을 때 $112.72 \pm 3.67\%$, 5 μM 을 처리하였을 때 $112.97 \pm 4.97\%$, 10 μM 을 처리하였을 때 $119.44 \pm 5.18\%$, 그리고 20 μM 을 처리하였을 때는 $124.81 \pm 5.61\%$ 의 신경성장인자 분비를 보였다. 쇼가울의 농도를 증가시킬수록 신경성장인자의 분비량도 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 20 μM 에서 가장 다량을 분비함을 알 수 있다. 위의 결과는 세 번의 반복실험 결과를 평균±오차로 나타낸 것이다.

[84] **(3) PC12 세포에서 쇼가울의 신경축색돌기 성장에 미치는 효과**

- [85] PC12 세포는 실험에 1-1과 동일한 방법으로 분주 및 배양하였으며, 배양한지 24시간 후, 역시 위와 동일한 방법으로 신경성장인자 및 조건배지를 PC12 세포에 처리하였다. 처리 후 4일 째에 현미경으로 PC12 세포를 관찰한 결과는 도 3과 같다. 도 3의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 쇼가울을 20 μM 처리하였을 때, PC12 세포의 신경축색돌기의 성장이 증가하였으며, 이는 쇼가울이 우수한 신경성장인자 분비 활성을 가짐을 나타낸다.

[86]

[87] **시험예 2.**

[88] 수컷 ICR 마우스 25-28g를 분양받아 경희대학교 동서의학대학원의 동물 사육실에서 7일 간 사육하여 적응시켜 사용하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 온도 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), 습도 ($53\pm 3\%$) 및 명암주기 (12 시간)는 자동적으로 조절되도록 하였다. 쇼가올은 WAKO사 (일본)에서 구입하여 사용하였다.

[89] **(1) 쇼가올의 인지능력 향상 효과**

[90] 마우스를 각 군당 10 마리씩 2 군으로 나누었다. 제1군(대조군)은 10% 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide)를 마우스 체중 kg당 5mL로 3일간 경구 투여하였고, 제2군은 10% 디메틸 설펍사이드에 녹인 쇼가올을 5 mg/kg의 양으로 3일간 경구투여 하였다. 1일 1회로 3일간 경구투여하고 마지막 경구투여 1 시간 후 수동 회피 시험(passive avoidance task)을 다음과 같이 수행하였다.

[91] 수동 회피 시험은 내부구조가 두 개의 동일한 공간으로 구분되어 있는 시험 장치에서 첫째 날 가운데에 문을 사이에 두고 한쪽은 불을 켜놓고 다른 한쪽은 어두운 상태에서 밝은 쪽에서 먼저 10초간 머무르게 한 후 사의의 문을 열어주고 시험동물이 어두운 공간으로 이동할 때 발바닥에 0.25 mA의 전기 자극을 주었다. 24 시간 후 같은 방법으로 수동 회피 시험을 진행하고 이때 밝은 곳에 머무르는 시간을 측정하였다. 그 결과는 도 4와 같다.

[92] 대조군은 165.50 ± 23.39 초를 나타내어 전기충격으로 인한 기억력이 유지되었고 쇼가올 5 mg/kg 투여군은 240.63 ± 24.14 초를 나타내어 체류시간을 유의성 있게 증가시켰다($p<0.05$).

[93] **(2) 생강 추출물의 인지능력 개선 효과**

[94] 마우스를 각 군당 10 마리씩 2 군으로 나누었다. 제1군(대조군)은 10% 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide)를 마우스 체중 kg당 5mL로 3일간 경구 투여하였고, 제2군은 10% 디메틸 설펍사이드에 녹인 생강추출물(실시에 2에서 제조한 생강 추출물)을 50 mg/kg의 양으로 3일간 경구투여 하였다. 1일 1회로 3일간 경구투여하고 마지막 경구투여 1 시간 후 수동 회피 시험(passive avoidance task)을 시험예 2-1과 동일한 방법으로 수행하였다. 그 결과는 도 5와 같다.

[95] 대조군은 165.50 ± 23.39 초를 나타내어 전기충격으로 인한 기억력이 유지되었고 생강추출물 50 mg/kg 투여군은 237.43 ± 17.35 초를 나타내어 체류시간을 유의성 있게 증가시켰다($p<0.05$).

[96]

[97] **시험예 3. MPP+(1-methyl-4-phenylpyridinium) 및 6-OHDA(6-hydroxy-dopamine)의 신경독성에 의한 흰쥐 태아중뇌세포에서의 쇼가올 및 생강 추출물의 보호 효과 평가**

[98] 암컷 Sprague-Dawley 랫트(2주령)을 분양받아 사용하였고 쇼가올은 WAKO사 (일본)에서 구입하여 사용하였다.

- [99] Sprague-Dawley 랫트(2주령) 태아의 중뇌 조직을 박리하여, 포셉을 이용하여 기계적으로 분리(dissociation)하였다. 조직에 트립신을 처리하여 세포 숫자를 세고 폴리-엘-라이신(poly-L-Lysine, PLL)로 미리 코팅한 커버슬립에 시딩(seeding)한 후 5% CO₂, 95% air의 37 °C 배양기에서 5 일 동안 증식시켰다. 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 없는 배지에 쇼가울 0.01μM, 0.1μM을 희석하여 처리하거나 생강 추출물(실시에 1에서 얻어진 에탄올 추출물, 헥산분획물, 에틸아세테이트분획물, 부탄올분획물, 물분획물)을 희석하여 처리하였고, MPP+는 쇼가울 처리 1시간 후 10μM을 23시간 동안, 6-OHDA는 쇼가울 처리 6시간 후 10μM를 18 시간 동안 처리하였다. 4% 파라포름알데히드(PFA)로 고정하고 인산 완충 식염수(PBS)로 세척하였다.
- [100] (1) 쇼가울의 보호 활성 평가 - 면역조직화학법(Immunohistochemistry)
- [101] 4% PFA로 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 15분간 1% 과산화수소로 탈수과정을 거친 후 PBS와 3% 트리톤 X-100, normal goat serum이 포함된 Tyrosine hydroxylase(TH, millipore, rabbit origin 1:2000)을 세포와 하룻밤 동안 반응시켰다. 일정 시간이 지난 뒤 2차 항체로 biotinylated anti-rabbit(vector, goat origin)을 반응시키고, ABC 반응(ABC kit, vector)을 거쳐 디아미노벤지딘(Diaminobenzidine, DAB)을 이용하여 발색시켰다 DAB에 발색시킨 후 슬라이드에 커버슬립을 떼어 gel mount를 이용하여 mounting한 후 세포수를 측정하였다. 그 결과는 도 6 및 도 7과 같다.
- [102] 도 6은 MPP+에 의한 신경독성에 대한 쇼가울의 도파민세포보호 효과를 나타낸다. MPP+군은 도파민 양성세포수가 대조군(control)에 비하여 44.25±7.61%을 나타내어 도파민 세포의 수를 유의적으로 감소시켰고(p<0.01) 쇼가울을 처리한 경우 0.01μM농도에서 91.50±3.38%로 유의적으로 도파민세포 보호효과를 나타내었다 (p<0.05).
- [103] 도 7은 6-OHDA에 의한 신경독성에 대한 쇼가울의 도파민세포보호 효과를 나타낸다. 6-OHDA군은 도파민 양성세포수가 대조군(control)에 비하여 34.00±5.77%을 나타내어 도파민세포의 수를 유의적으로 감소시켰고(p<0.001) 쇼가울을 처리한 군은 0.01μM농도에서 57.25±5.65%로 도파민 양성세포수가 6-OHDA군에 비해 증가되는 경향을 나타내었다.
- [104] (2) 생강 추출물의 보호 활성 평가 - 면역조직화학법(Immunohistochemistry)
- [105] 상기 (1)과 동일한 방법으로 면역조직화학법으로 발색시킨 후, 세포수를 측정한 결과는 도 8 및 도 9와 같다.
- [106] 도 8은 MPP+에 의한 신경독성에 대한 생강 추출물의 도파민세포보호 효과를 나타낸다. MPP+군은 도파민 양성세포수가 대조군(control)에 비하여 44.25±7.61%을 나타내어 도파민세포의 수를 유의적으로 감소시켰고(p<0.01), 생강 추출물(에탄올 추출물), 헥산분획물, 에틸아세테이트분획물, 부탄올분획물, 물분획물을 100 ug/ml로 처리한 경우 각각 65.20±3.45%, 71.41±6.32%, 76.60±6.15%, 58.32±7.22%, 57.17±5.33%로 도파민 양성세포수가 MPP+군에 비해

증가되는 경향을 나타내었다.

- [107] 도 9는 6-OHDA에 의한 신경독성에 대한 생강분획물의 도파민세포보호 효과를 나타낸다. 6-OHDA군은 도파민 양성세포수가 대조군(control)에 비하여 $34.00 \pm 5.77\%$ 을 나타내어 도파민세포의 수를 유의적으로 감소시켰고($p < 0.001$) 생강 추출물(에탄올 추출물), 헥산분획물, 에틸아세테이트분획물, 부탄올분획물, 물분획물을 100 ug/ml로 처리한 경우 각각 $54.20 \pm 4.31\%$, $62.50 \pm 6.94\%$, $64.54 \pm 4.67\%$, $49.61 \pm 5.64\%$, $45.11 \pm 5.21\%$ 로 도파민 양성세포수가 6-OHDA군에 비해 증가되는 경향을 나타내었다.

[108]

- [109] 시험예 4. MPTP(N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 투여에 의해 파킨슨 병(Parkinson's disease)을 유도시킨 C57BL/6 마우스에서의 생강추출물 및 쇼가올의 보호 효과 평가

- [110] 7주령의 C57BL/6계 수컷 마우스(19-22 g)를 분양받아 경희대학교 동서의학대학원의 동물 사육실에서 1 주일 이상 사육하여 적응시켜 사용하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 온도($22 \pm 2^\circ\text{C}$), 습도($53 \pm 3\%$) 및 명암주기(12 시간)는 자동적으로 조절되도록 하였다. 쇼가올은 WAKO사(일본)에서 구입하여 사용하였다.

- [111] (1) MPTP 투여에 의한 파킨슨병 모델에서 쇼가올의 보호효과

- [112] 마우스를 각 군당 6마리씩 3 군으로 나누었다. 제1군(대조군) 및 제2(MPTP군)은 10% 디메틸 설폭사이드를 마우스 체중 kg당 5mL로 5일간 1일 1회 경구 투여하였고, 제3군(쇼가올 투여군)은 10% 디메틸 설폭사이드에 용해시킨 쇼가올을 10 mg/kg의 양으로 5일 동안 1일 1회 경구 투여하였다. 경구투여 2시간 후 제1군(대조군)은 생리식염수를 마우스 체중 kg당 5mL로 5일간 복강 투여하였으며, 제2군 및 제 3군은 MPTP 30mg/kg 체중의 농도로 생리식염수에 용해시켜 5일간 복강 투여하였다.

- [113] (1-1) 행동시험 (pole test)

- [114] 상기 5일간의 투여 종료 다음 날, 높이 50cm, 지름 1cm의 막대에서 행동시험(pole test)을 수행하였다. 막대 위에 C57bl/6 마우스를 머리가 위로 향하게 놓고, 마우스가 꼭대기를 180° 돌아서 네 다리가 땅에 닿을 때 까지 내려오는 시간을 측정하였다. 각 마우스를 3회씩 연습시킨 후 5번 본 실험을 행하였으며, 그 결과는 도 10과 같다.

- [115] 도 10에서 알 수 있는 바와 같이, 쇼가올을 투여한 경우 T-1a [대조군 대비 %(% of control)]가 99.10 ± 8.11 초로서, MPTP가 투여되지 않은 대조군 수준과 비슷한 수준이며, 쇼가올은 MPTP에 의해 야기되는 서동(bradykinesia)을 거의 정상 수준으로 회복시킴을 확인할 수 있다. ($p < 0.05$)

- [116] (1-2) 도파민 세포의 보호 활성 평가

- [117] 상기 행동시험(pole test)이 완료된 각군의 마우스를 치사시킨 후, 뇌 조직[선조체(striatum) 및 흑질(substantia nigra)]을 분리하였다. 분리된 뇌 조직을

과산화수소로 탈수한 후 1차 항체로 Tyrosine hydroxylase(TH, millipore, rabbit origin 1:2000)을 하룻밤 반응시킨 후 2차 항체로 biotinylated anti-rabbit(vector, goat origin)을 사용하고, ABC 반응(ABC kit, vector)을 거쳐 디아미노벤지딘(Diaminobenzidine)을 이용하여 발색시켰다. 도파민 세포 보호효과는 선조체에서 광학밀도(optical density)를 측정하고 흑질에서 TH 양성 세포 숫자를 세어 확인하였다. 그 결과는 도 11 및 도 12와 같다.

- [118] 도 11 및 도 12로부터 알 수 있는 바와 같이, 쇼가올을 투여한 경우 선조체에서 광학밀도가 control 대비 %가 $80.11 \pm 1.97\%$ 로서, MPTP 투여군보다 유의적으로 도파민 세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었고($p < 0.05$), 흑질에서 TH 양성세포 수가 쇼가올을 투여한 경우 control 대비 %가 $70.30 \pm 4.86\%$ 로 MPTP 투여군보다 TH 양성 세포수를 유의적으로 증가시켰다($p < 0.05$). 이 결과로서 쇼가올은 선조체(striatum) 및 흑질(substantia nigra)에서 우수한 도파민 세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있다.

[119] **(2) MPTP 투여에 의한 파킨슨병 모델에서 생강추출물의 보호효과**

- [120] 마우스를 각 군당 10마리씩 3 군으로 나누었다. 제1군(대조군) 및 제2(MPTP군)은 10% 디메틸 설폭사이드를 마우스 체중 kg당 5mL로 5일간 1일 1회 경구 투여하였고, 제3군(쇼가올 투여군)은 10% 디메틸 설폭사이드에 용해시킨 생강추출물(실시예 2에서 제조한 추출물)을 50 mg/kg의 양으로 5일 동안 1일 1회 경구 투여하였다. 경구투여 2시간 후 제1군(대조군)은 생리식염수를 마우스 체중 kg당 5mL로 5일간 복강 투여하였으며, 제2군 및 제3군은 MPTP 30mg/kg 체중의 농도로 생리식염수에 용해시켜 5일간 복강 투여하였다.

[121] **(2-1) 행동시험 (pole test)**

- [122] 상기 5일간의 투여 종료 다음 날, 행동시험을 상기 (1-1)과 동일한 방법으로 수행하였으며, 그 결과는 도 13과 같다. 도 13에서 알 수 있는 바와 같이, 생강추출물을 투여한 경우 T-1a 가 107.48 ± 7.32 초로서, 생강추출물은 MPTP에 의해 야기되는 서동(bradykinesia)을 회복시킴을 확인할 수 있다.

[123] **(2-2) 도파민 세포의 보호 활성 평가**

- [124] 상기 행동시험(pole test)이 완료된 각군의 마우스를 치사시킨 후, 뇌 조직[선조체(striatum) 및 흑질(substantia nigra)]을 분리하였다. 분리된 뇌 조직에 대하여 상기 (1-2)와 동일한 방법으로 활성을 평가하였으며, 그 결과는 도 14 및 도 15와 같다. 도 14 및 도 15로부터 알 수 있는 바와 같이, 생강추출물을 투여한 경우 선조체에서 광학밀도가 control 대비 %가 $84.21 \pm 1.48\%$ 로서, MPTP 투여군보다 유의적으로 도파민 세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있었고($p < 0.01$), 흑질에서 TH 양성세포 수가 생강추출물을 투여한 경우 control 대비 %가 $62.20 \pm 3.67\%$ 로 MPTP 투여군보다 TH 양성 세포수를 유의적으로 증가시켰다($p < 0.05$). 이 결과로서 생강추출물은 선조체(striatum) 및 흑질(substantia nigra)에서 도파민 세포의 보호활성을 나타냄을 확인할 수 있다.

[125]

[126] 시험예 5. **2-vessel occlusion** 뇌허혈 모델에서의 생강 추출물의 활성 평가

[127] 7주령의 C57BL/6계 수컷 마우스(20-25 g)를 분양받아 경희대학교 동서의학대학원의 동물 사육실에서 1 주일 이상 사육하여 적응시켜 사용하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 온도 ($22\pm 2^\circ\text{C}$), 습도 ($53\pm 3\%$) 및 명암주기 (12 시간)는 자동적으로 조절되도록 하였다.

[128] 마우스를 각 군당 10 마리씩 3 군으로 나누었다. 마취가스 (O_2 : 30%, N_2O : 70%, 이소플루란(Isoflurane): 2.0%) 챔버에서 마취를 유도한 다음, 각군의 마우스를 수술대에 등이 바닥에 닿게 위치시켰다. 상지와 중앙선이 만나는 지점부터 위로 약 1.5 cm 피부를 절개한 뒤 조직이 상하지 않도록 양측 총경동맥을 노출시켰다. 경동맥에 붙어있는 조직 및 신경을 분리하고 aneurism clip으로 25분간 결찰하였다. 이때, 직장 체온계로 마우스의 체온을 측정하고 $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지시켰다.

[129] Sham control군은 위와 같이 실험하되 총경동맥을 결찰하지 않은 군을 말한다. 약물 투여는 2VO 시술이 끝난 즉시 이루어지며, 이후 1일 1회 총 3일 동안 투여를 실시하였다. Sham 군과 2VO 시술 군은 10% tween 80을 투여하였고 생강추출물과 각 분획물(실시에 1에서 얻어짐)은 10% tween 80에 녹여서 25mg/kg으로 투여하였다. 수술 7일 후에 동물을 페노바비탈 소듐(pentobarbital sodium) (60 mg/kg, i.p.)로 마취시킨다음 4% 파라포름알데히드로 관류시켰다. 뇌를 적출한 다음 4% 파라포름알데히드로 고정하고 30% 수크로오스 용액에 하루 동안 담궈두었다. 이 후 뇌를 얼린 다음에 30 μm 크기로 수직방향으로 잘라주었다. 잘라진 조직은 젤라틴 코팅된 슬라이드에 옮기고 0.5% 크레실 바이올렛(cresyl violet)으로 염색하였다. 해마 중 CA1 부분 중 가장 자연성 신경원세포 사멸에 손상받기 쉬운 부분인 중간대의 부분에서 신경세포 수를 관찰하였다. 세포수의 관찰은 고배율($\times 400$)에서 염색된 세포의 수를 세어서 측정하였다.

[130] 각군의 마우스로부터 얻은 해마를 염색한 결과는 도 16과 같다. 도 16에서 알 수 있는 바와 같이, 2VO 시술을 한 해마는 CA1 부분에 세포사멸이 일어난 것을 확인할 수 있으며, 생강추출물에 의해 CA1 부분의 세포사멸이 억제된 것을 확인할 수 있다. 또한, 상기 해마의 CA1의 중간 부분을 확대한 결과는 도 17과 같으며, CA1 에서의 세포 생존율을 측정한 결과는 도 18과 같다. 도 18에서 알 수 있는 바와 같이, 생강 추출물(에탄올 추출물)과 n-헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 및 물 분획물을 처리 군은 CA1 부분의 신경세포 사멸을 억제하는 것을 확인할 수 있다. 생강 추출물과 n-헥산 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물, 및 물 분획물은 각각 2VO 시술군에 비해 $24.6\pm 13.1\%$, $30.2\pm 11.5\%$, $37.5\pm 8.5\%$, $15.6\pm 5.3\%$, $12.5\pm 4.7\%$ 의 신경세포 사멸 억제효능을 보여주었다.

[131]

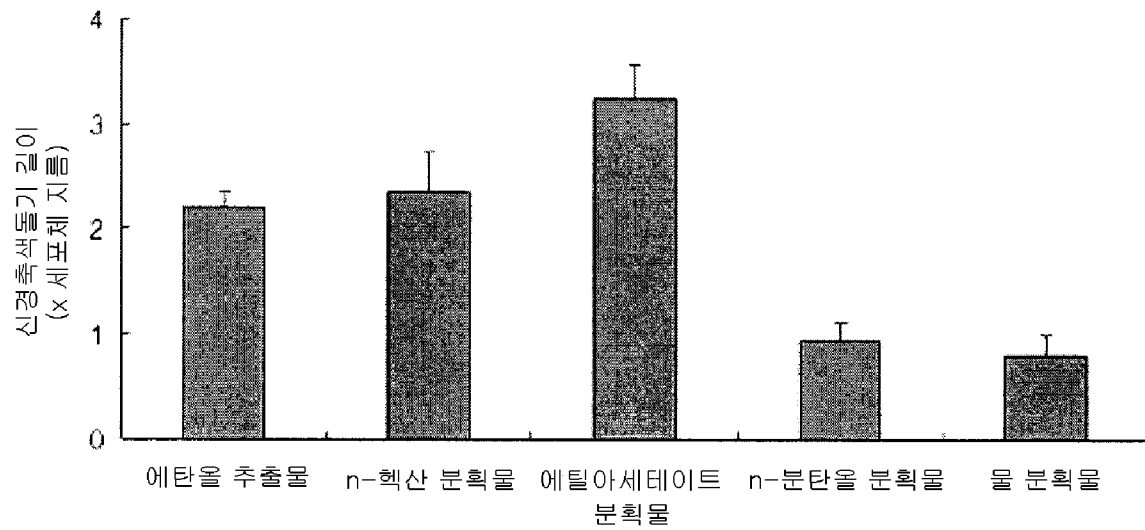
- [132] 시험예 6. 2-vessel occlusion 뇌허혈 모델에서의 쇼가울의 활성 평가
- [133] 마우스를 각 군당 10 마리씩 3 군으로 나누었다. 2VO 시술은 시험예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. Sham control군은 위와 같이 실험하되 총경동맥을 결찰하지 않은 군을 말한다. 약물 투여는 2VO 시술이 끝난 즉시 이루어졌으며, 이후 1일 1회 총 3일 동안 투여를 실시하였다. Sham 군과 2VO 시술 군은 10% 트윈 80을 투여하였고 쇼가울은 10% 트윈 80에 녹여서 1, 3, 10 mg/kg으로 투여하였다. 쇼가울은 2VO 시술군에 비해 10 mg/kg의 농도에서 $29.5 \pm 15.4\%$ 의 신경세포 사멸 억제효능을 보여주었다 (도 19, 도 20, 및 도 21 참조).
- [134]
- [135] 시험예 7. 독성시험
- [136] (1) 급성독성시험
- [137] 실시예 1 및 2에서 얻어진 생강 추출물 및 쇼가울을 0.1 mg/10ml/kg부터 5000mg/10ml/kg의 용량으로 SD 랫트(각각 암: 3 마리, 수: 3 마리)에 순차적으로 투여한 후, 2주간 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 관찰하였다. 그 결과, 시험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다. 일반증상에 있어서 시험물질에 의한 이상증상은 관찰되지 않았으며, 체중변화 또한 시험물질에 의한 변화도 관찰되지 않았다. 또한, 육안적 부검소견에 있어서도, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서, 생강 추출물 및 쇼가울 모두 적어도 5g/kg의 용량에서 안전성을 가지는 것으로 판단된다.
- [138] (2) 복귀돌연변 시험
- [139] 세균에서의 유전독성 평가를 위해, 살모넬라 타이피머리움(*Salmonella typhimurium*)의 히스티딘 요구성 균주(TA 100, TA 1535, TA 98, 및 TA 1537)와 대장균주(*E. coli* WP2 uvrA)를 이용하여 복귀돌연변 시험을 실시하였다. 그 결과, 양성대조군에서는 음성대조군에 비하여 집락수가 현저히 증가한 반면, 모든 균주의 시험물질 처리군(즉, 실시예 1 및 2의 추출물 및 쇼가울 처리군)에서는 집락수의 증가는 나타나지 않았다. 따라서, 생강 추출물 및 쇼가울 모두 유전독성시험에서 안전성을 갖는 것으로 사료된다.

청구범위

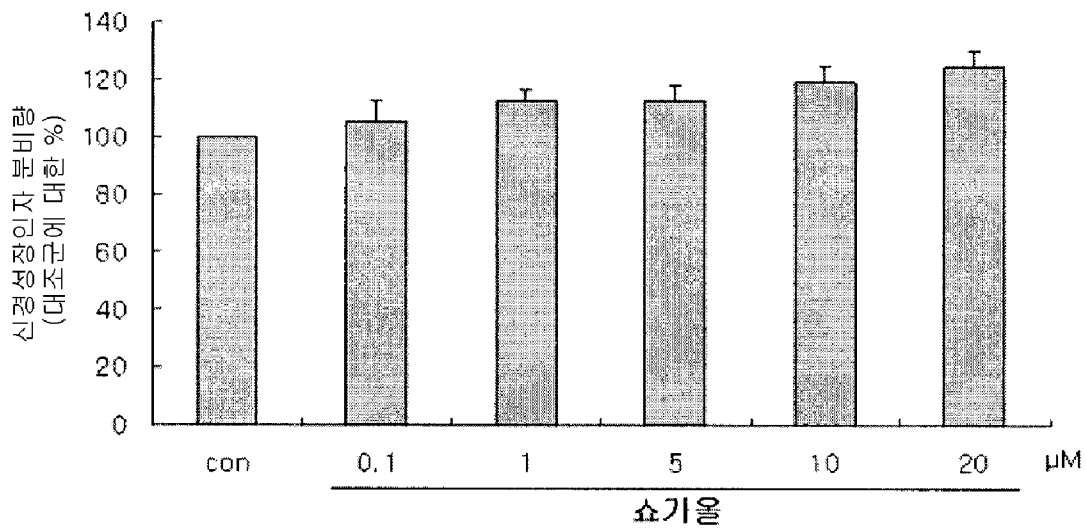
- [청구항 1] 유효성분으로서 생강 추출물 또는 쇼가올; 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 학습 장애, 기억력 장애, 파킨슨 질환, 또는 허혈성 뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 유효성분이 쇼가올인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 유효성분이 생강 추출물인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 생강 추출물이 생강을 $C_1 \sim C_4$ 의 알콜, n-헥산, 에틸 아세테이트, n-부탄올, 클로로포름, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매로 추출하는 단계를 포함하는 추출공정을 수행하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 생강 추출물이 생강을 에탄올로 추출하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서, 상기 생강 추출물이 (a) 생강을 $C_1 \sim C_4$ 의 알콜로 추출하는 단계; 및 (b) 단계(a)에서 얻어진 추출물에 물 및 n-헥산을 가하여 추출하고, 얻어지는 n-헥산층을 분리하는 단계를 포함하는 추출공정을 수행하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 7] 제3항에 있어서, 상기 생강 추출물이 (a) 생강을 $C_1 \sim C_4$ 의 알콜로 추출하는 단계; (b') 단계(a)에서 얻어진 추출물에 물 및 n-헥산을 가하여 추출하고, 얻어지는 수층을 분리하는 단계; 및 (c) 단계(b')에서 얻어진 수층에 에틸 아세테이트를 가하여 추출하고, 얻어지는 에틸 아세테이트층을 분리하는 단계를 포함하는 추출공정을 수행하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 8] 제3항에 있어서, 상기 생강 추출물이 (a) 생강을 $C_1 \sim C_4$ 의 알콜로 추출하는 단계; (b') 단계(a)에서 얻어진 추출물에 물 및 n-헥산을 가하여 추출하고, 얻어지는 수층을 분리하는 단계; (c') 단계(b')에서 얻어진 수층에 에틸 아세테이트를 가하여 추출하고, 얻어지는 수층을 분리하는 단계; 및 (d) 단계(c')에서 얻어진 수층에 n-부탄올을 가하여 추출하고, 얻어지는 n-부탄올층 또는 수층을 분리하는 단계를 포함하는 추출공정을 수행하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 9] 제3항에 있어서, 상기 생강 추출물이 60~350 bar의 압력에서 5분 ~ 24 시간 동안 30~80 °C에서 초임계 추출을 통하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 생강 추출물이 약 300 bar의 압력 및 약 50

- °C에서 약 6 시간씩 2~4 회 초임계 추출을 통하여 얻어진 것임을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 11] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 허혈성 뇌혈관 질환이 일과성 뇌허혈발작(Transient Ischemic Attack), 가역성 허혈성 신경학적 결손(Reversible Ischemic Neurologic Deficit), 진행성 뇌졸중(progressing stroke), 완전 뇌졸중(completed stroke), 또는 허혈성 혈관성 치매(ischemic vascular dementia)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 12] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물의 제형(dosage form)이 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 및 시럽으로 이루어진 군으로부터 선택된 경구용 제형인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.
- [청구항 13] 생강 추출물 또는 쇼가올을 유효성분으로 포함하는, 학습 장애 또는 기억력 장애의 개선 또는 증상완화용 식품 조성물.
- [청구항 14] 생강 추출물 또는 쇼가올을 유효성분으로 포함하는, 학습 또는 기억력 증진용 식품 조성물.

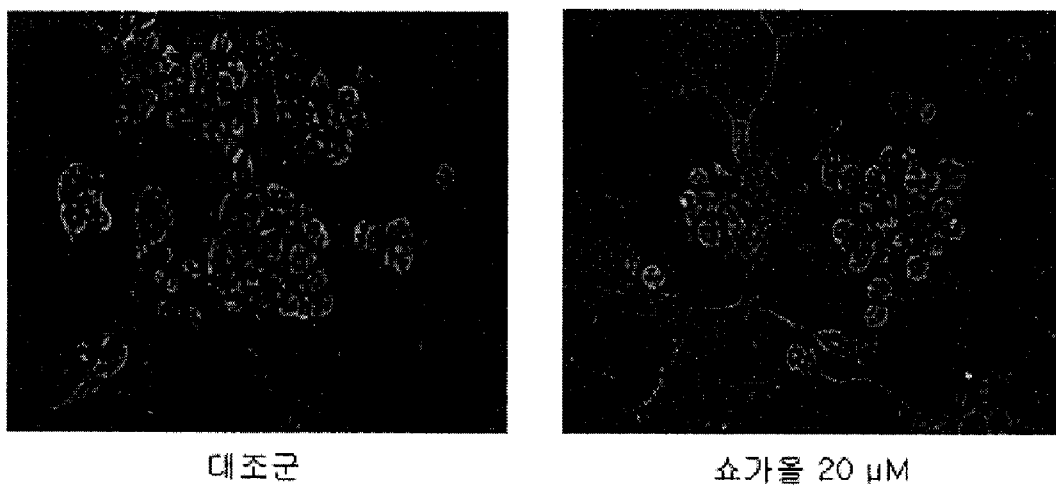
[Fig. 1]



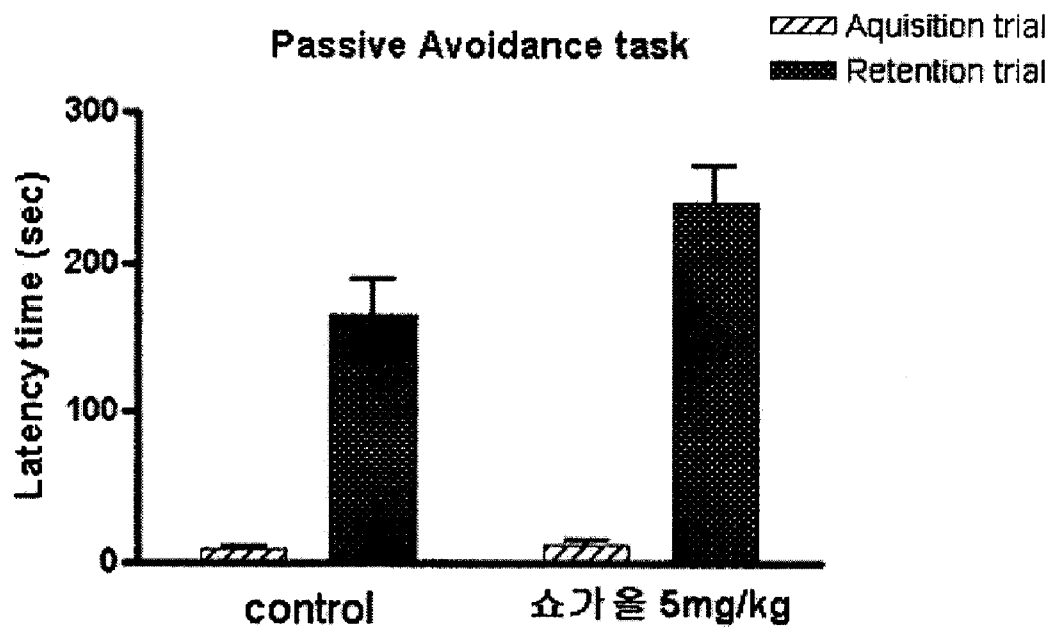
[Fig. 2]



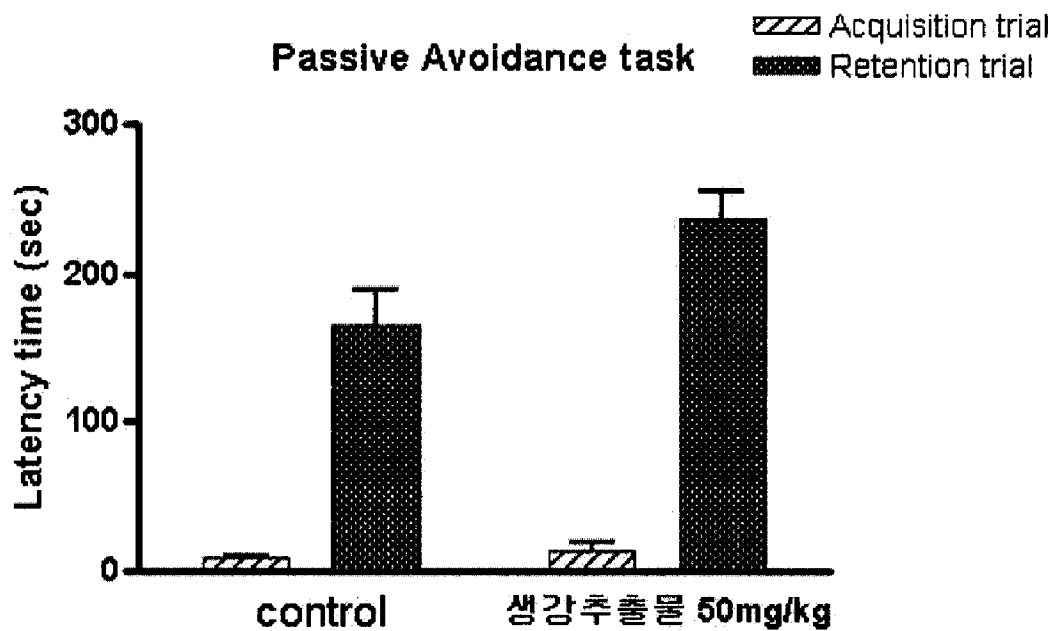
[Fig. 3]



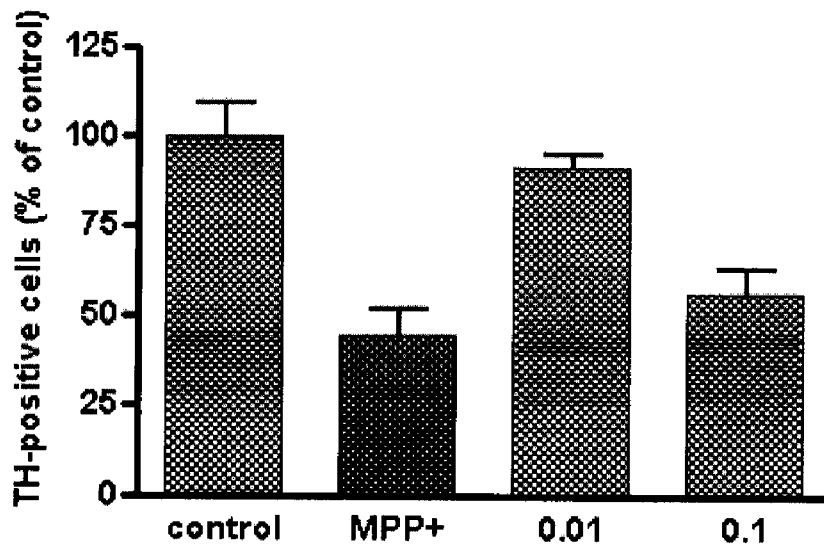
[Fig. 4]



[Fig. 5]

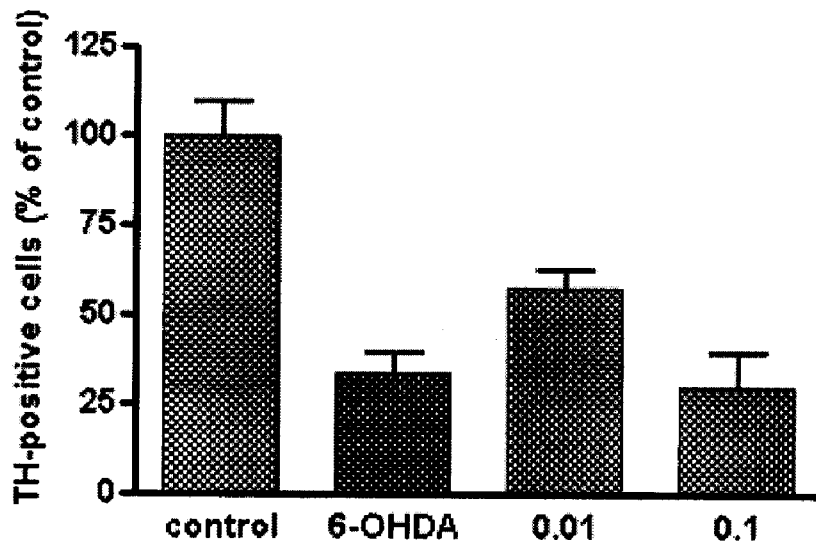


[Fig. 6]



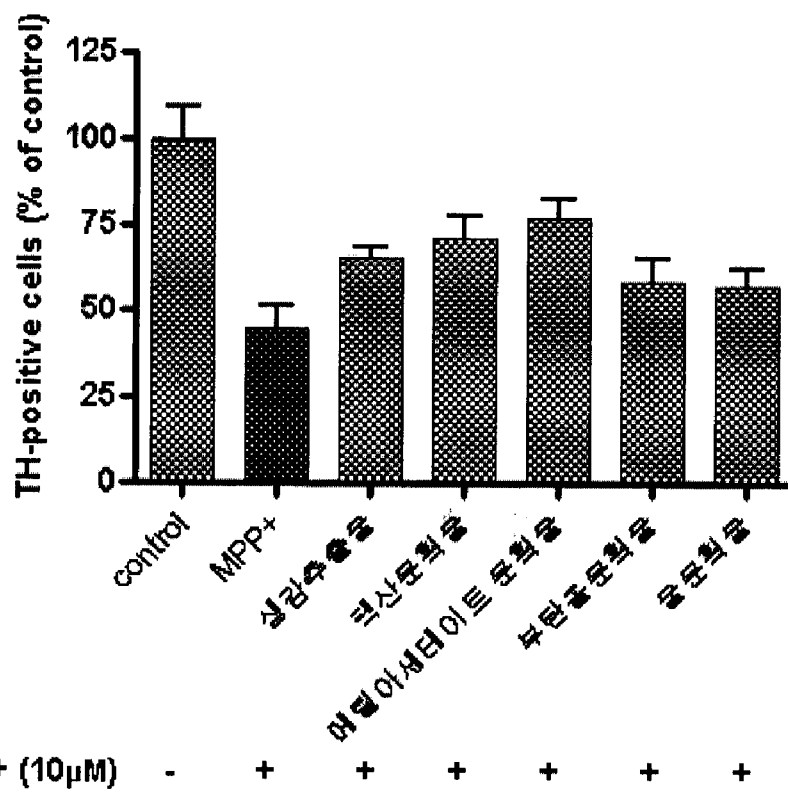
쇼가올 (μM)	-	-	+	+
MPP+ (10μM)	-	+	+	+

[Fig. 7]

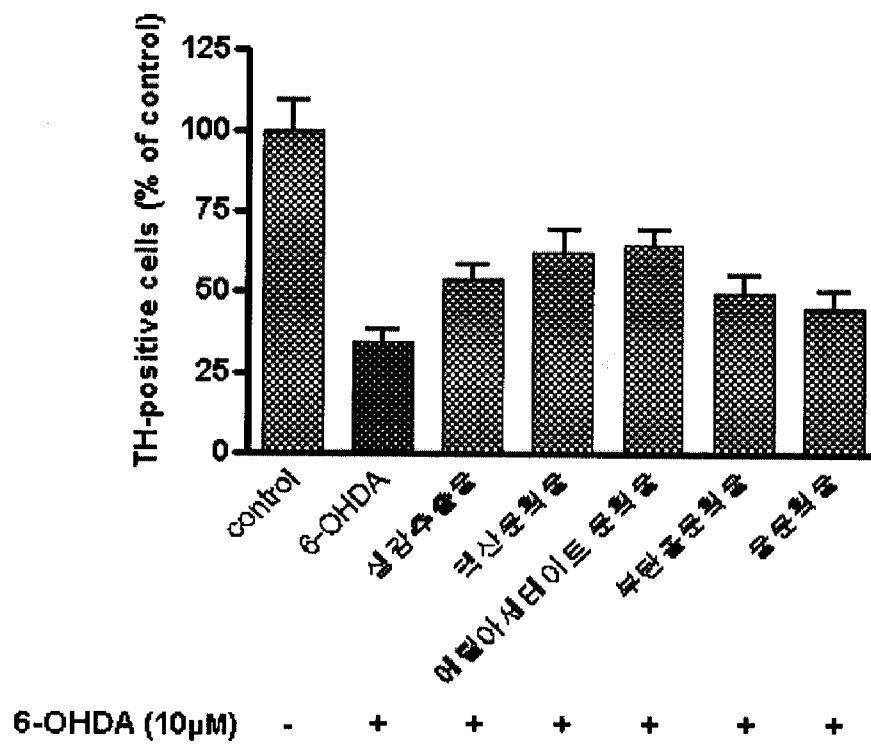


쇼가올 (μM)	-	-	+	+
6-OHDA (10μM)	-	+	+	+

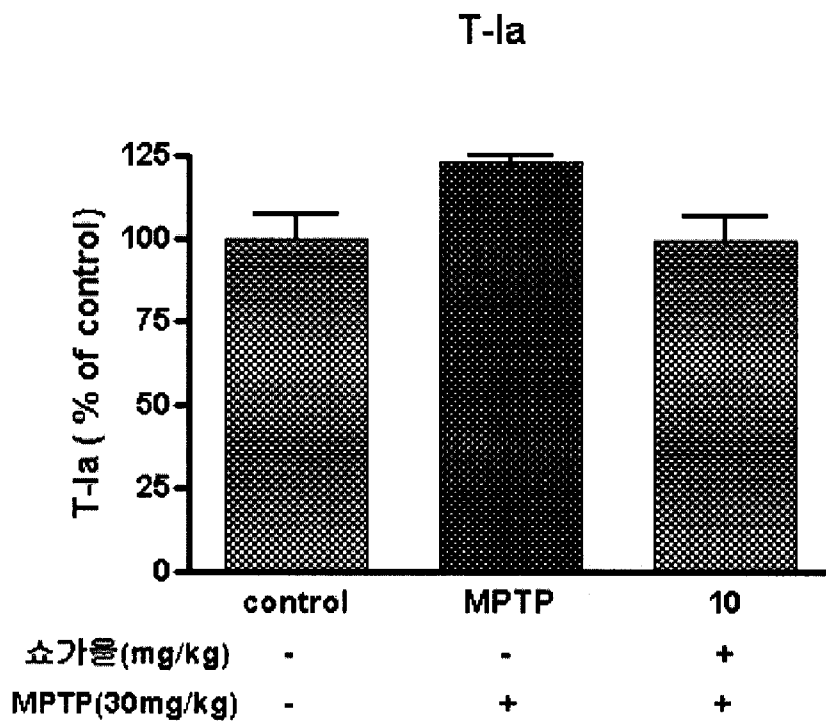
[Fig. 8]



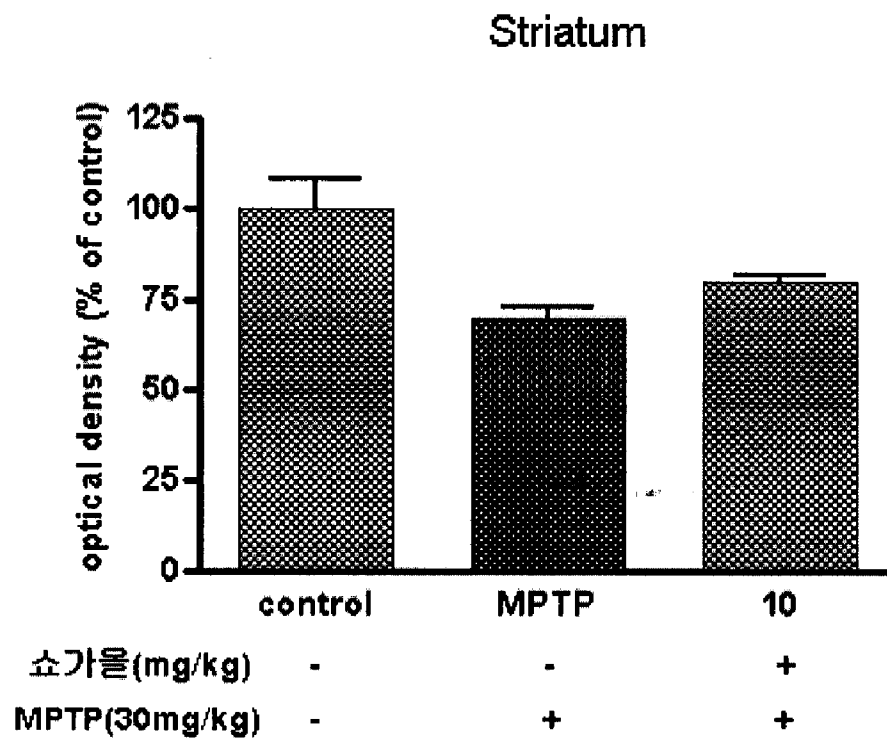
[Fig. 9]



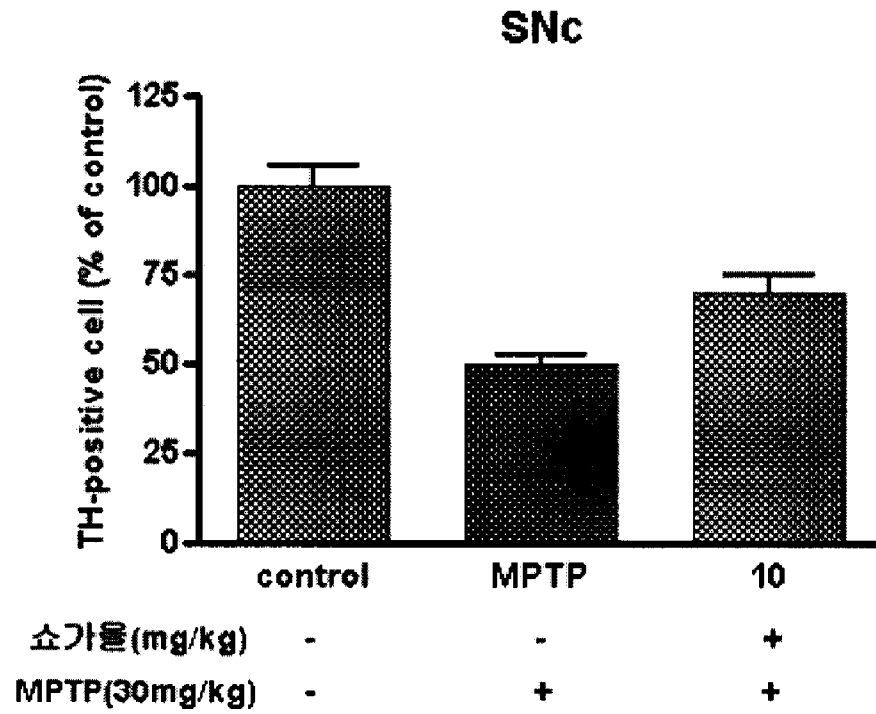
[Fig. 10]



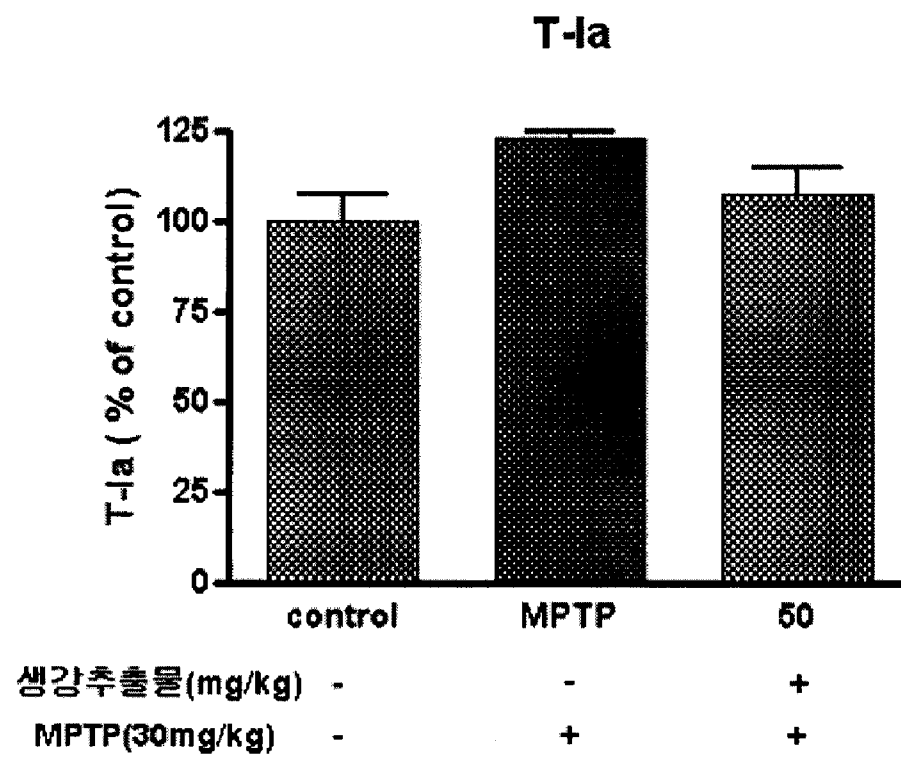
[Fig. 11]



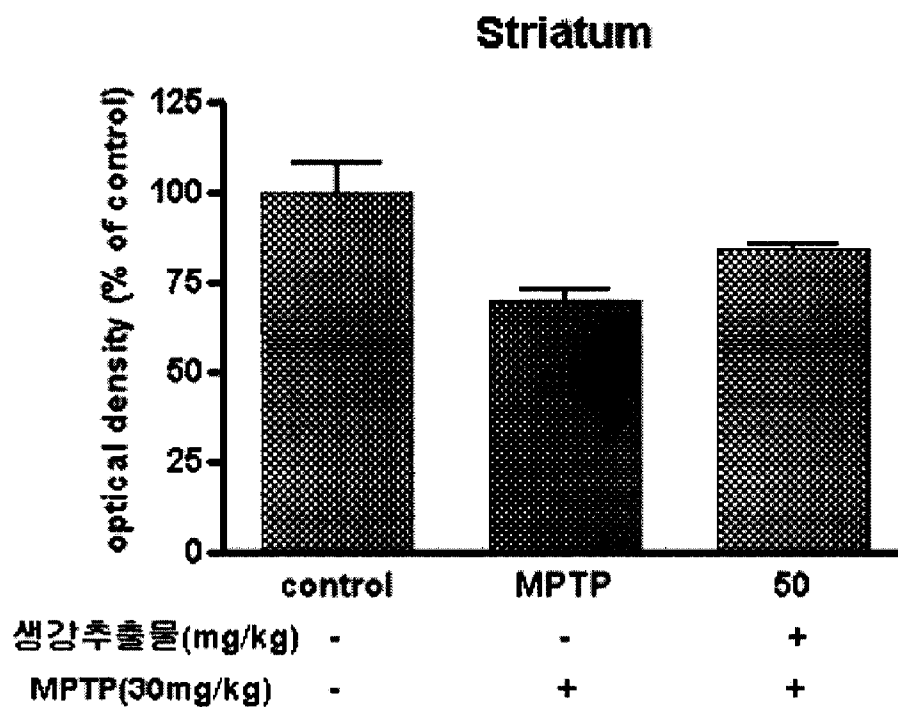
[Fig. 12]



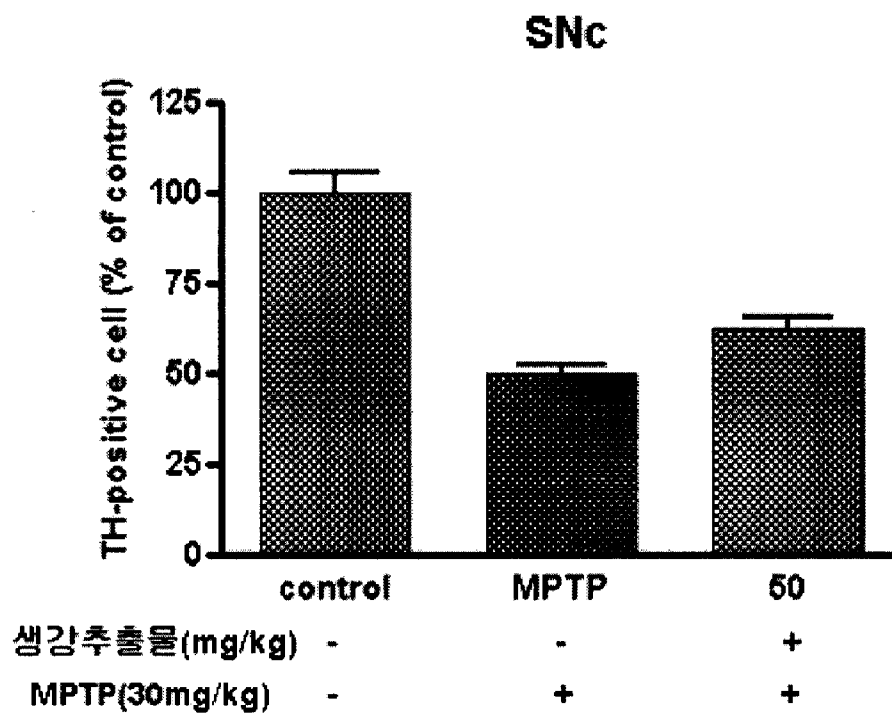
[Fig. 13]



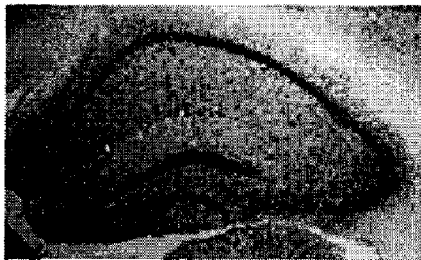
[Fig. 14]



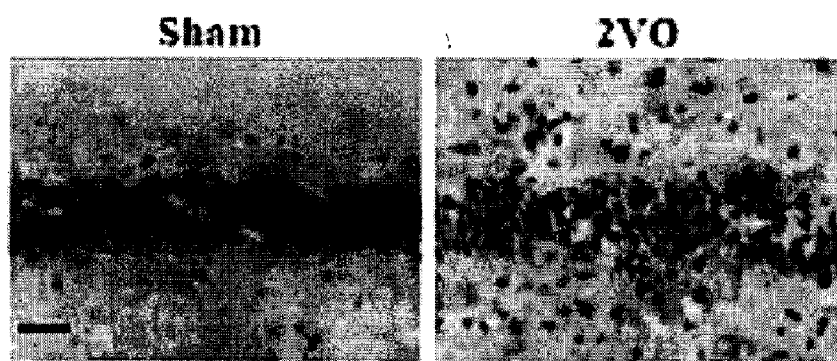
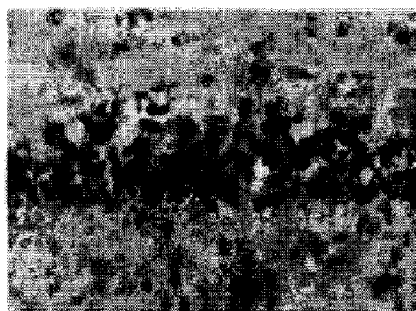
[Fig. 15]



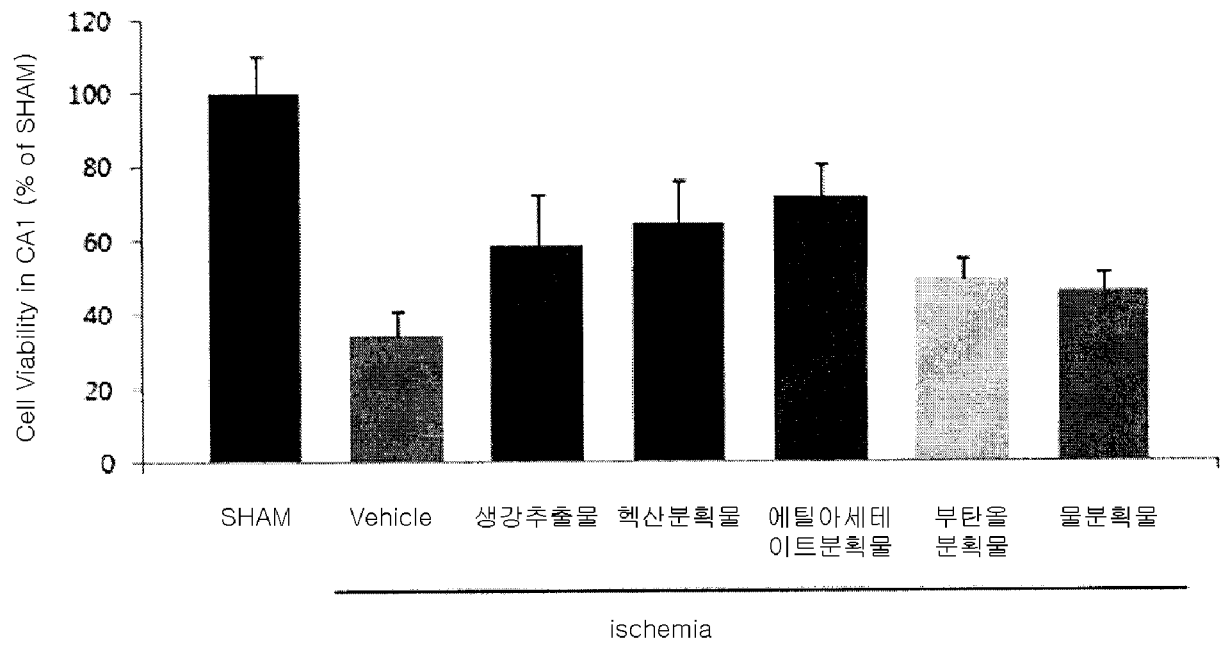
[Fig. 16]

**2VO + 생강 (25 mg/kg)**

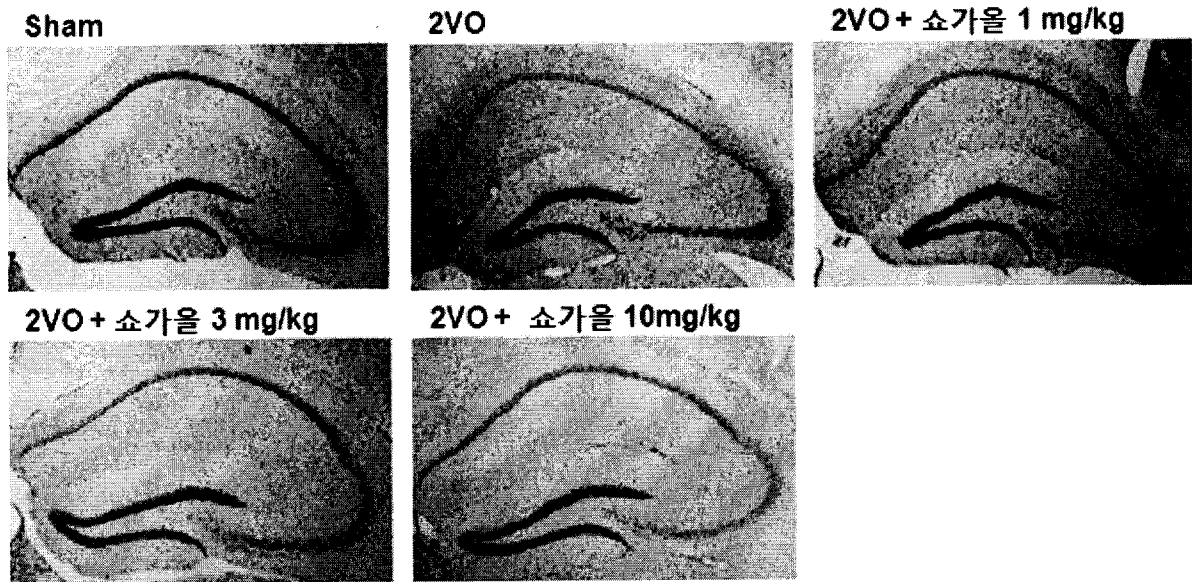
[Fig. 17]

**2VO + 생강 (25 mg/kg)**

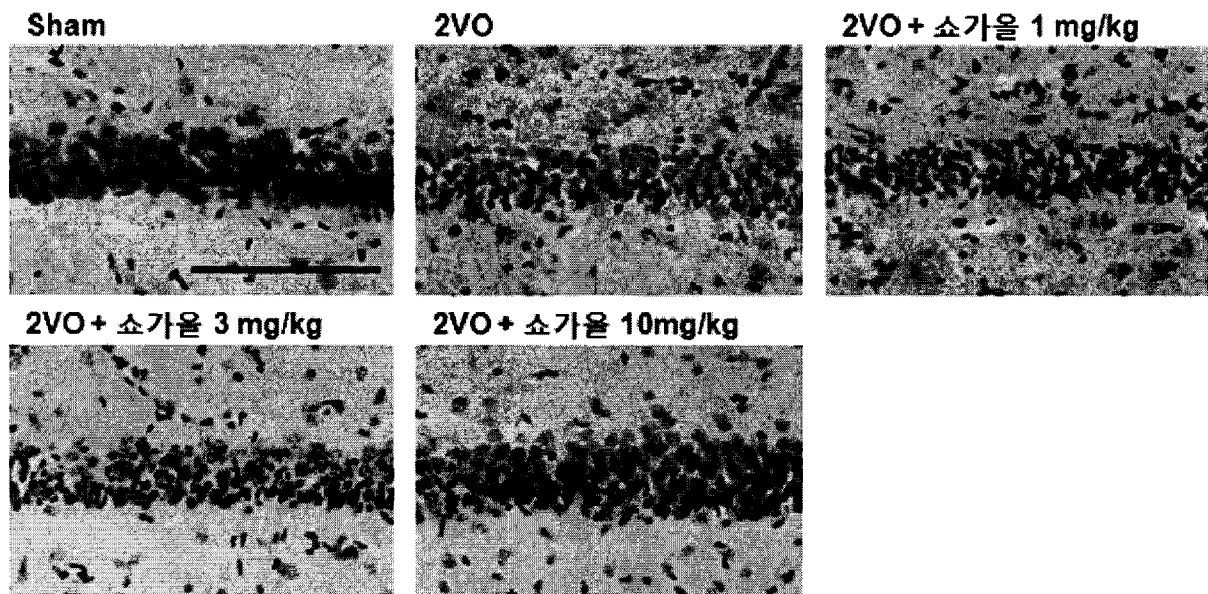
[Fig. 18]



[Fig. 19]



[Fig. 20]



[Fig. 21]

