



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0001108

(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 10-2013-0073818

(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

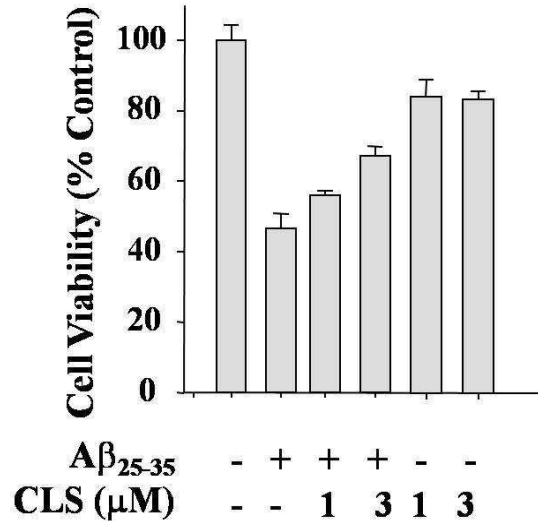
전체 청구항 수 : 총 6 항

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

(57) 요약

본 발명은 클레로스테롤(clesterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 클레로스테롤(clesterol)은 치매의 대표적인 발병 원인 중 하나인 베타-아밀로이드(β -amyloid, $A\beta_{25-35}$)로 유도된 신경세포 독성 및 사멸에서 보호 효과를 나타냄으로써, 기억력 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 치료를 위한 약학조성물 및 건강기능 식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 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

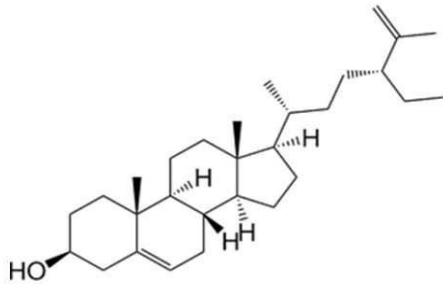
연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 클레로스테롤(clesterol, CLS)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 신경세포 사멸 및 활성산소종 생성을 억제시키고, 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물.

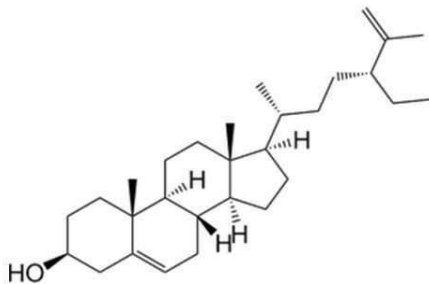
청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 클레로스테롤(clesterol)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 클레로스테롤(clesterol)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 치

매증, 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.

명세서

기술분야

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

배경기술

[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 al., 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 치료효과를 나타낸다. 이들 약물은 초반에는 인지 기능이나 일상생활의 호전을 보이나 9개월에서 1년 정도 지나면 투여 이전 상태로 돌아간다는 점에서 병의 진행을 근본적으로 막지는 못한다. 비교적 초기에 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 (ginkgo biloba), 중국 한약재에서 추출한 후페르진(huperzine A; 가역적 AChEI) 등이 있으며, 타우 단백질, 베타아밀로이드 단백질의 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 항진망제제 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 클레로스테롤(clesterol)에 대한 언급은 없다.

[0010] 따라서 본 발명자들은 클레로스테롤(clesterol)의 기억력 증진 및 인지 기능 장애 치료 및 예방을 체계적으로 검토하고자, 치매의 대표적인 원인 물질인 베타-아밀로이드(β -amyloid, $A\beta_{25-35}$)로 독성 및 사멸을 유도한 신경세포 모델을 사용하여 세포생존율, 세포사멸 형태 및 관련 분자지표, 활성산소 생성, 신경영양인자의 발현을 측정하였다. 그 결과, 클레로스테롤(clesterol)을 함유하는 조성물의 신규 활성으로 베타-아밀로이드로 유도된 신경세포 독성 및 사멸에 탁월한 보호 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

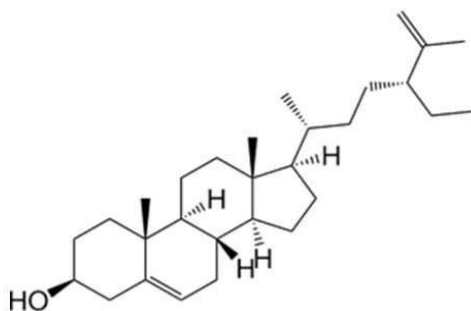
[0011] 본 발명의 목적은 클레로스테롤(clesterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 클레로스테롤(clesterol)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 클레로스테롤(clesterol)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 신경세포 사멸 및 활성산소종 생성을 억제시키고, 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명에서 유효 성분으로 이용되는 클레로스테롤(clesterol)은 콜레스테롤과 구조가 유사한 식물에 존재하는 일종의 피토스테롤(phytosterols)로, 해조류인 청각에 많이 들어 있다. 특히, 클레로스테롤을 포함하는 청각은 항부종, 항염, 항알러지, 항균 효능이 있는 것으로 보고되었다.

[0019] 본 발명에 따른 클레로스테롤(clesterol)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 클레로스테롤(clesterol)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 클레로스테롤(clesterol) 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 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 클레로스테롤(clesterol)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 단순회석제인 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 근육 내 주사에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 클레로스테롤(clesterol)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 텍스트린, 시클로텍스트린; 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 증진제(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 주스 및 과일 주스 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 클레로스테롤(clesterol)을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 클레로스테롤(clesterol)이 베타-아밀로이드(β -amyloid, $A\beta_{25-35}$)로 유도된 신경세포 독성 및 사멸에서 보호 효과를 나타냄으로써, 기억력 및 인지기능 장애 관련 질환의 예방 및 치료를 위한 약학조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 클레로스테롤(clesterol, CLS)이 베타-아밀로이드(β -amyloid, $A\beta_{25-35}$)로 유도된 세포독성에 대해 보호효과를 나타내는 MTT 환원법에 의해 측정된 세포생존율 결과이다.

도 2는 클레로스테롤(clesterol, CLS)이 베타-아밀로이드(β -amyloid, $A\beta_{25-35}$)로 유도된 세포사멸에 대해 보호효과를 나타내는 TUNEL 염색법에 의해 측정된 세포사멸 결과이다.

도 3은 클레로스테롤(clesterol, CLS)이 베타-아밀로이드(β -amyloid, $A\beta_{25-35}$)로 유도된 미토콘드리아 막전압 감소에 대해 보호효과를 나타내는 TMRE 염색 결과이다.

도 4는 클레로스테롤(clesterol, CLS)이 베타-아밀로이드(β -amyloid, $A\beta_{25-35}$)로 유도된 세포사멸에 매개 지표들에 대해 보호효과를 나타내는 웨스턴 블롯 결과이다.

도 5는 클레로스테롤(clesterol, CLS)이 베타아밀로이드로 인한 세포내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 축적을 억제함으로써 신경세포 보호효과가 있음을 나타내는 DCF-DA 염색 결과이다.

도 6은 클레로스테롤(clesterol, CLS)이 신경영양인자 BDNF 단백질 발현을 증가시킴으로써 신경세포 보호효과가 있음을 나타내는 웨스턴 블랏과 immunoassay 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.

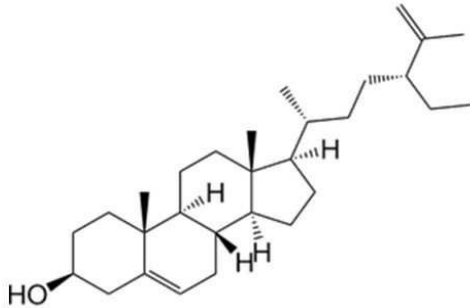
[0031] 실시예 1. 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 독성에 대한 클레로스테롤의 보호효과

[0032] 1. 클레로스테롤(clesterol, CLS)

[0033] 하기 화학식 1로 표기되는 클레로스테롤(clesterol)을 Herbstandard (CA, USA)로부터 제공받아 문헌에 개시된 물성치와 비교하여 클레로스테롤로 동정하였고, 이를 DMSO에 1 μ M 및 3 μ M의 농도로 용해시켜 실험의 시료로 사

용하였다.

< 화학식 1 >



2. 세포 배양

세포 모델로 SH-SY5Y neuroblastoma 세포를 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 mg/ml)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 이용하여, 5% CO₂, 37°C 배양기를 사용하여 배양하였다. 세포배양 배지는 2일마다 신선한 배지로 갈아주었고, 시약처리 1-2일 전에 실험에 적합한 밀도로 갈아주었다.

3. 세포생존율 측정 실험

SH-SY5Y 세포를 48-well plate에 5×10^4 개/well의 밀도로 칸 다음 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 90%, fetal bovine serum (FBS) 10%에서 배양하였다. 이후 베타아밀로이드와 시료를 24시간 처리한 다음 MTT solution (최종농도 1 mg/ml)을 가하여 2시간 동안 반응시켰다. 살아있는 세포 내에 생성된 반응산물 포르마잔(formazan)을 디메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)로 용해시켜 540 nm에서 광학 밀도(optical density)를 microplate reader로 측정하였다. vehicle을 처리한 대조군의 세포 생존율을 100%로 상대적인 %를 계산하였다.

실험결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 클레로스테롤(cleosteol, CLS)을 SH-SY5Y 신경세포주에 30분간 전처리 한 다음 15 μ M의 베타아밀로이드(A β ₂₅₋₃₅)를 가하여 세포독성에 미치는 보호효과를 검토한 결과, 베타아밀로이드를 첨가한 경우에는 세포생존율이 46.52%로 감소하였으며, 이는 CLS을 처리한 그룹에서 67.23%로 증가됨을 확인할 수 있었다. 한편, CLS는 실험에 사용한 범위의 농도에서는 자체 독성을 나타내지 않았다.

실시예 2. 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 사멸에 대한 클레로스테롤의 보호효과

1. 세포사멸 측정 실험

TUNEL staining (DNA fragmentation *in situ*)을 이용하여 능동적 세포사멸(apoptosis)을 측정하고자 하였다. 10% neutral buffer로 고정시킨 샘플을 PBS로 세척한 후, H₂O₂ (0.3% in methanol)로 실온에서 1시간 방치하여 endogenous peroxidase를 차단하였다. 이후, 4°C에서 0.1% Triton X-100 in sodium citrate로 2분간 처리하여 cells을 permeable하게 한 다음, TUNEL reaction mixture 50 μ l를 가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하여 표지(label)시킨 뒤, peroxidase-conjugated anti-goat antibody 50 μ l를 가하고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 DAB solution을 50-100 μ l 넣고 10분간 배양시킨 다음 50% 글리세롤로 mounting 하였다.

TUNEL staining은 세포사멸(apoptosis) 과정에서 활성화된 endonuclease에 의해 180-200 bp 단위로 단편화(fragmentation)된 DNA의 3-OH 위치에 표식된 dUTP를 결합시켜 기질을 공급하여 발색시키는 방법이다. 실험결

과, 도 2에 나타난 바와 같이 베타아밀로이드를 15 μ M의 농도로 24시간 처리한 결과 DNA 단편화(fragmentation)가 일어나 TUNEL staining에 positive한 세포의 수가 현저히 증가되었으며(도 2b), 이는 CLS를 전처리 함으로써 감소되었다(도 2c).

2. 미토콘드리아 막전압 측정

미토콘드리아 막전압(mitochondrial transmembrane potential, $\Delta\Psi$)을 측정하기 위하여 TMRE dye를 사용하였다. SH-SY5Y 세포 (5×10^4 cells/ 500 μ l)를 챔버 슬라이드(chamber slide)에 넣고 베타아밀로이드와 클레로스테롤(clesterol, CLS)을 처리한 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 덜어낸 후 PBS으로 2회 세척한 뒤 10 nM TMRE를 가하여 37°C에서 30분간 반응을 시켰다. 이후 형광의 변화를 excitation 파장 540 nm 및 emission 파장 590 nm에서 형광 현미경(fluorescence microscopy)으로 측정을 하였다. 별도의 실험에서는 정량을 위하여 PBS로 2회 세척한 다음 DMSO로 용해(lysis) 시킨 후 microplate fluorescence reader로 측정하였다.

실험결과, 도 3에 나타난 바와 같이 베타아밀로이드(15 μ M)만 처리한 경우에는 MMP가 감소된 것에 비하여(도 3A-b), CLS를 처리한 세포에서는 대조군과 유사한 수준으로 MMP가 회복되었으며(도 3A-c), 이는 별도의 실험에서 정량적으로 확인하였다(도 3B).

3. 세포사멸(apoptosis) 매개 단백질 활성 및 발현 변화 측정(웨스턴 블랏 분석-PARP, JNK, Bcl-2 family proteins 등)

RIPA bufer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 및 complete protease inhibitor cocktail tablet)를 가하여 0°C에서 20분간 용해(lysis) 시킨 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 단백질 함량을 bradford reagent로 정량을 한 뒤, 단백질 샘플 30 μ g을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동 하였다. 전개시킨 겔을 PVDF membrane에 옮긴 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 비특이적 항체 결합을 blocking 시켰다. 3% fat-free dry milk-PBS에 anti-BDNF 1차 항체를 37°C에서 3시간 붙이고, PBST용액으로 10분간 3회 세척(washing) 한 후, horseradish peroxidase가 붙어있는 2차 항체를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간 동안 붙였다. PBST용액으로 다시 10분간 3회 세척(washing) 한 다음 enhanced chemi-luminescence (ECL) Western blotting detection reagent를 사용하여 1분간 반응시킨 뒤 현상하였다.

생화학적으로는 세포사멸(apoptosis) 과정 중에 활성화된 caspase에 의하여 actin, poly(ADP-ribose) polymerase, fordin과 laminin 등의 세포내 기질이 잘려지는 현상이 보인다. caspase에 의해 절단된 PARP은 DNA 상해회복경로(repair machinery)에 역으로 영향을 줌으로써 DNA 파괴를 촉진하며 세포사멸(apoptosis)의 신호로 작용할 것으로 추정된다. 그러므로, 세포사멸(apoptosis) 과정 중에 나타나는 형태학적 또는 생화학적 변화를 이용하여 세포사멸(apoptosis)의 여부를 측정 할 수 있다. 이 외에도 미토콘드리아로부터 분비되는 apoptosis-inducing molecule (AIF, cytochrome c)에 이르기까지 다양한 변화가 동반된다. 이러한 세포사멸(apoptosis)을 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 중에서 제일 먼저 발견된 것이 Bcl-2이며, 이러한 Bcl-2 gene family는 크게 기능적인 면에서 두 가지로 나뉘며, 그 상대적인 비가 세포의 생존과 사멸을 결정짓는데 중요한 역할을 한다. 즉, Bcl-2와 Bcl-XL은 anti-apoptotic한 기능을 가지며, Bax를 비롯한 Bad, Bak, Bik, Bcl-XS등은 오히려 pro-apoptotic한 기능을 가져, 상대적으로 Bcl-2 또는 Bcl-XL의 비가 증가되는 경우 세포는 생존으로 진행을 하게 된다. 또한, 세포사멸(apoptosis)을 조절하는 대표적인 상위 인산화 효소로는 c-Jun N-terminal kinase (JNK)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

실험결과, 도 4에 나타난 바와 같이 베타아밀로이드(15 μ M)를 SH-SY5Y 세포에 처리함으로써 JNK가 인산화를 통하여 활성화 되고(도 4A), proapoptotic Bax/ anti-apoptotic Bcl-2의 비가 증가되며(도 4B), PARP cleavage가 일어나는 것(도 4C)을 확인할 수 있었다. 한편, 이들은 클레로스테롤(clesterol, CLS)을 전처리함으로써 현저히 감소되었다(도 4).

[0053] **실시예 3. 베타아밀로이드로 유도된 활성산소종 생성에 대한 클레로스테롤의 보호효과**

[0054] 상기에서 수득한 베타아밀로이드에 의해 세포사멸이 유발된 신경세포 모델에서 DCF-DA 형광 색소법을 이용하여 세포내 활성산소종의 생성을 측정하였다.

[0055] 지용성의 DCF-DA 세포내에 들어가 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되며, DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광을 나타내는 DCF가 된다. 베타아밀로이드 및 시약을 가하고 배양한 세포를 Krebs-Ringer solution으로 2회 세척(washing)한 뒤, 10 μ M DCF-DA를 가하여 37℃에서 15분간 반응을 시켰다. 형광의 변화를 excitation 파장 485 nm 및 emission 파장 530 nm에서 형광 현미경(fluorescence microscopy)으로 측정하였다. 별도의 실험에서는 정량을 위하여 Krebs-Ringer solution로 2회 세척한 다음 DMSO로 용해(lysis) 시킨 후 microplate fluorescence reader로 측정하였다.

[0056] 실험결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 베타아밀로이드(15 μ M)를 6시간 처리한 결과 세포 내 강한 형광을 나타내는 세포의 수가 증가 된 것, 즉, 세포내 활성산소종이 축적됨을 확인할 수 있었으며, 이는 클레로스테롤(clesterol, CLS)을 전처리 함으로써 감소되었다(도 5).

[0057] **실시예 4. 클레로스테롤에 의한 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor) 강화 효과**

[0058] 상기에서 수득한 베타아밀로이드에 의해 세포사멸이 유발된 신경세포 모델에서 클레로스테롤(clesterol, CLS)에 의한 신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 증가 효과를 검토하기 위하여, 신경영양인자 단백질량을 측정하였다.

[0059] 클레로스테롤에 의한 신경영양인자 생성을 측정하기 위하여 웨스턴 블롯과 BDNF immunoassay 기법을 활용하였다. BDNF immunoassay는 Emax ImmunoAssay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 지시한 방법에 따라 BDNF량을 측정하였다. 96-well plate에 anti-BDNF mAb를 가하여 4℃에서 overnight으로 코팅한 다음, 200 μ l blocking-sample buffer를 가하여 상온에서 1시간 배양한 뒤, 100 μ l 샘플을 넣고 상온에서 2시간 반응시켰다. 이후 3회 세척(washing)한 다음, 희석된 anti-BDNF mAb를 100 μ l를 넣고 상온에서 2시간 진탕 배양하였다. anti-IgY HRP conjugate를 100 μ l 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 다음, 100 μ l TMB substrate를 가한 후 상온의 암소에서 10분 동안 진탕 배양시킨 뒤, 100 μ l 1N HCl stop solution을 가하여 반응을 종결시켰다. ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 값은 농도를 알고 있는 BDNF를 가지고 standard curve를 구한 후 단백질 정량한 값으로 환산하여 pg/mg protein 값으로 표기하였다.

[0060] 실험결과, 도 6에 나타난 바와 같이, CLS는 베타아밀로이드로 인하여 감소된 BDNF의 단백질 발현 (도 6A) 및 세포 배양액 내 유출(도 6B)을 효과적으로 회복시켰으며, CLS 단독으로 처리 시 대조군 보다 더 높은 BDNF 수치를 나타내었다.

[0061] 이에, 하기에 화합물을 이용한 제제 예를 예시하나 이는 본 발명을 이에 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0062] **제제예 1. 산제의 제조**

[0063]	클레로스테롤	300 mg
[0064]	유당	100 mg
[0065]	탈크	10 mg

[0066] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0067] **제제예 2. 정제의 제조**

[0068]	클레로스테롤	300 mg
[0069]	옥수수전분	100 mg
[0070]	유당	100 mg
[0071]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0072] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0073] **제제예 3. 캡슐제의 제조**

[0074]	클레로스테롤	150 mg
[0075]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0076]	락토오스	14.8 mg
[0077]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

[0078] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0079] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0080]	클레로스테롤	150 mg
[0081]	만니톨	180 mg
[0082]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0083]	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	26 mg

[0084] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0085] **제제예 5. 액제의 제조**

[0086]	클레로스테롤	150 mg
[0087]	이성화당	10 g
[0088]	만니톨	5 g
[0089]	정제수	적량

[0090] 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 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0091] **제제예 6. 건강 식품의 제조**

[0092]	클레로스테롤	1000 mg
[0093]	비타민 혼합물	적량

[0094]	비타민 A 아세테이트	70 μ g
[0095]	비타민 E	1.0 mg
[0096]	비타민 B1	0.13 mg
[0097]	비타민 B2	0.15 mg
[0098]	비타민 B6	0.5 mg
[0099]	비타민 B12	0.2 μ g
[0100]	비타민 C	10 mg
[0101]	비오틴	10 μ g
[0102]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0103]	엽산	50 μ g
[0104]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0105]	무기질 혼합물	적량
[0106]	황산제1철	1.75 mg
[0107]	산화아연	0.82 mg
[0108]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0109]	제1인산칼륨	15 mg
[0110]	제2인산칼슘	55 mg
[0111]	구연산칼륨	90 mg
[0112]	탄산칼슘	100 mg
[0113]	염화마그네슘	24.8 mg

[0114] 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.

[0115] **제제예 7. 건강 음료의 제조**

[0116]	클레로스테롤	150 mg
[0117]	비타민 C	15 g
[0118]	비타민 E(분말)	100 g
[0119]	젖산철	19.75 g
[0120]	산화아연	3.5 g
[0121]	니코틴산아미드	3.5 g
[0122]	비타민 A	0.2 g
[0123]	비타민 B1	0.25 g
[0124]	비타민 B2	0.3g

[0125]

물

정량

[0126]

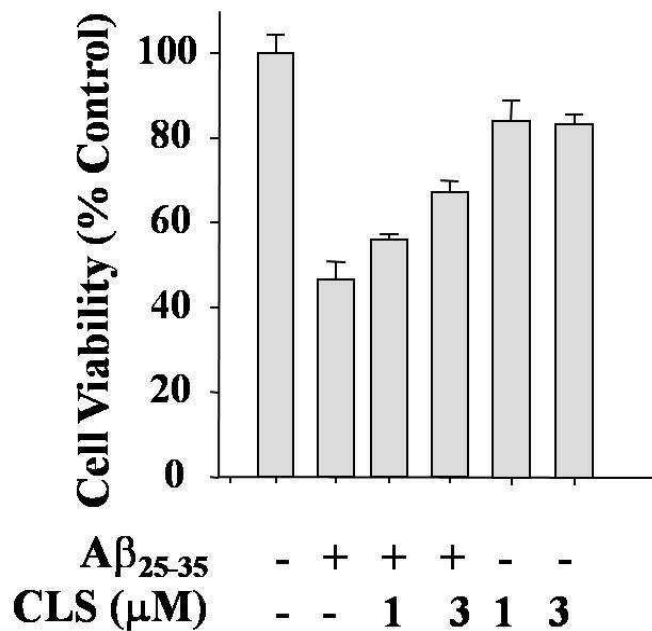
통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85° C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0127]

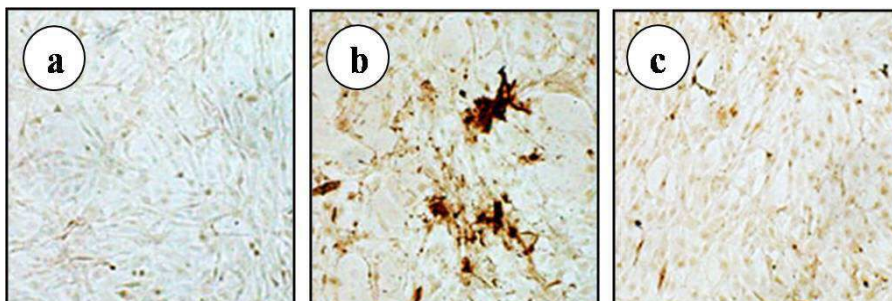
상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

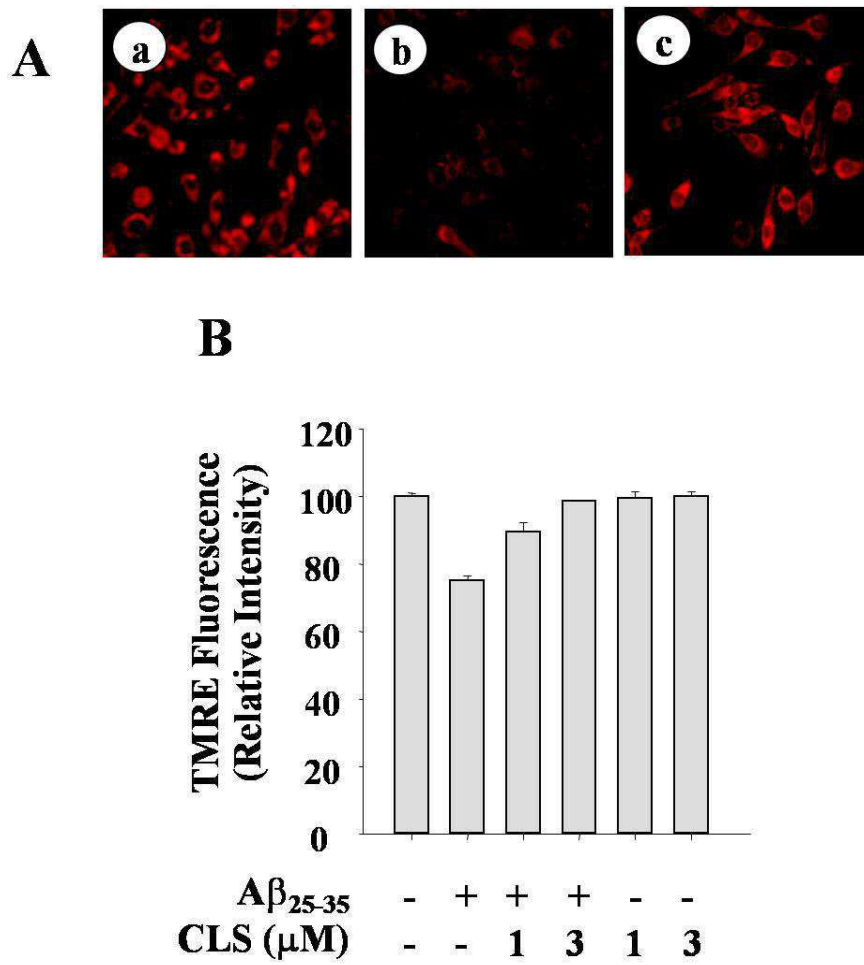
도면1



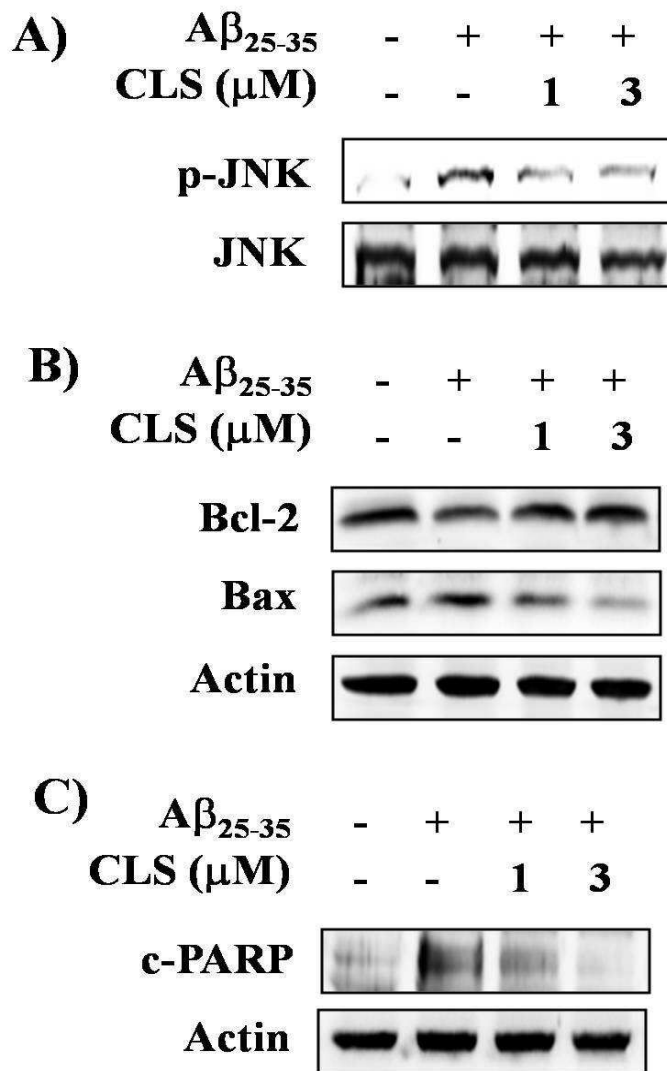
도면2



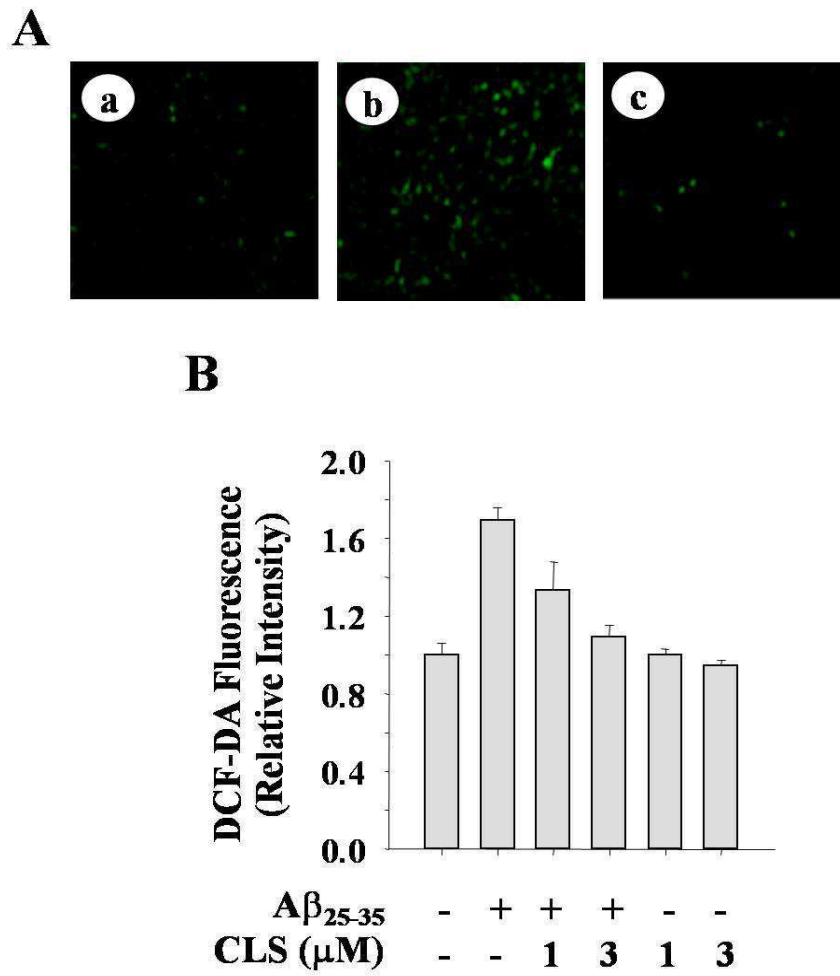
도면3



도면4



도면5



도면6

