

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 5월 3일 (03.05.2018)

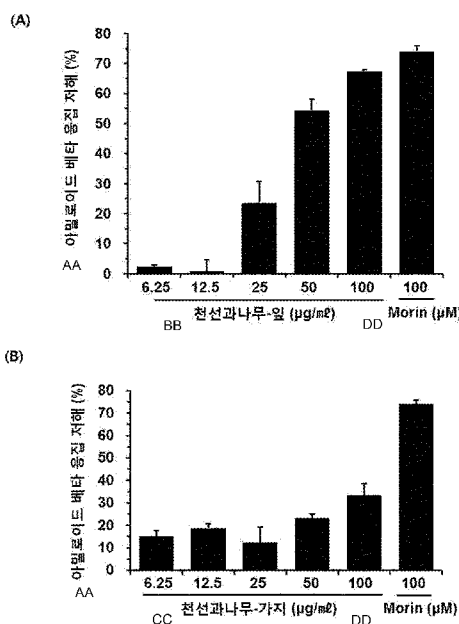


(10) 국제공개번호
WO 2018/080157 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 36/60* (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/011817
- (22) 국제출원일: 2017년 10월 25일 (25.10.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0138996 2016년 10월 25일 (25.10.2016) KR
- (71) 출원인: 한국 한의학 연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) [KR/KR]; 34054 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 정수진 (JEONG, Soo-Jin); 35201 대전시 서구 만년로 45, 108동 1204호, Daejeon (KR). 임혜선 (LIM, Hye-Sun); 35314 대전시 서구 갈마로 262, 107동 1303호, Daejeon (KR). 김유진 (KIM, Yu-Jin); 34016 대전시 유성구 테크노3로 65, 768호, Daejeon (KR). 김부여 (KIM, Bu-Yeo); 07298 서울시 영등포구 당산로4길 12, 107동 1902호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING, IMPROVING OR TREATING COGNITIVE IMPAIRMENT, CONTAINING *FICUS ERECTA* EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing, improving or treating cognitive impairment, the composition containing a *Ficus erecta* extract as an active ingredient, and more specifically, the *Ficus erecta* extract, according to the present invention, exhibits antioxidant activity, amyloid-beta aggregation inhibition activity, a nerve cell protection effect and a brain cell inflammation inhibition effect, and thus may be usefully employed as a composition for preventing, improving or treating cognitive impairment.

(57) 요약서: 본 발명은 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 발명의 천선과나무 추출물은 항산화 작용, 아밀로이드 베타 응집 저해 작용, 신경세포의 보호 효과 및 뇌세포의 염증 억제 효과를 지니므로써, 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로서 유용하게 사용할 수 있다.

AA ... Amyloid-beta aggregation inhibition
BB ... Ficus erecta-Leaf
CC ... Ficus erecta-Branch
DD ... Morin

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 천선과나무(*Ficus erecta*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인지는 인간이 살아가면서 뇌를 이용해 생각하고, 말하고, 기억하고, 판단하고 실행하는 모든 과정을 의미한다. 따라서 '인지기능'은 주의력, 지각력, 기억력, 언어능력, 집행능력 등을 포함하며, '인지기능 장애'는 뇌의 노화 현상 중 가장 두드러진 현상으로, 학습과 기억 능력의 저하, 판단력의 저하로 특징 지워지는 생리적 현상이다. 특히, 이러한 인지기능 장애는 다양하게 나타날 수 있는데, 그 중에서 치매는 기억력을 비롯한 언어 능력, 시 지각 및 시공간 구성 능력, 실행 기능 등의 인지 기능 감퇴로 대인 관계, 직업 기능 및 일상생활 기능에 현저한 지장이 초래되는 복합적인 질환으로 진단하고 있다. 노인성 치매는 주로 알츠하이머 치매가 대부분을 차지하며, 알츠하이머 치매는 흔히 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)으로 불리며 아무런 치료 노력이 없으면 서서히 죽게 되는 질병이라고 할 수 있다. 이 질병은 1906년 독일의 신경병리학자인 Alois Alzheimer에 의해 알려졌다. 우리나라는 1960년에는 전체 인구 2,500만 명 중 노인 인구가 72만 명으로 2.9%에 불과했지만 본격적인 고령화 사회가 되어 2026년 이후에는 65세 이상 고령인구가 전체 인구의 20%까지 증가할 것으로 예측되고 있다. 노인성 치매 환자의 수도 이에 비례하여 급격히 증가하는데 65세 이상의 연령대에서는 10%, 85세 이상의 경우에는 40~50% 정도가 노인성 치매에 시달리게 될 것으로 전문가들은 예측하고 있다.
- [3] 이와 같은 노인성 치매의 일종인 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)으로부터 유발되는 기억력 및 학습능력의 상실 등 인지 기능 장애는 해마와 피질에 불용성의 두 가지 단백질이 응집하여 침착되어 발병하는 것인데, 상기 두 가지 단백질의 응집은 신경세포에서 아밀로이드 베타(amyloid beta, A β)로 구성된 노인판(senile plaque)과 과인산화된 타우 단백질로 이루어진 신경섬유농축제(neurofibrillary tangle)가 축적되는 것이다. 수많은 노력에도 불구하고, 알츠하이머의 원인과 발병 기전은 아직도 완전하게 밝혀지지 않은 실정이다. 인구의 고령화가 가속되는 상황이므로 인지기능 또는 기억능력 저하 현상 개선을 위한 더욱 효과적인 제제(건강기능성 식품 소재 포함)의 개발 수요가 어느 때보다 높은 시기이다. 결국, 치매 발병에 대한 뇌신경 세포의 기작을 대상으로 새로운 다중 기능성 효과(multi-functional effect)를 갖는 소개 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

- [4] 한편, 천선과나무는 바닷가의 산기슭에서 자라며, 높이 2~4m이고 나무껍질은 밋밋하며 가지는 회백색이고 상처를 내면 젖 같은 즙액이 나오고, 잎은 어긋나고 달걀을 거꾸로 세운 모양의 타원형이며 가장자리가 밋밋한 것이 특징이다. 측맥은 5~6쌍이며 길이 8~17cm, 표면은 녹색이고 털이 있으며 뒷면은 연한 갈색이다. 잎자루는 길이 1~4cm이다. 꽃은 5~6월에 피고 단성화이며, 새가지의 잎겨드랑이에 1개의 꽃이삭이 달린다. 꽃줄기 끝에 둥근 열매 같은 화낭(花囊)이 달리고 바로 밑에 3개의 포가 있다. 화낭은 지름 15mm 내외이며 안에 많은 꽃이 들어 있다. 수꽃은 5~6개의 화피갈래조각과 3개 정도의 수술이 있고 암꽃은 3~5개의 화피갈래조각과 1개의 암술이 있다. 화낭이 자라서 열매로 되며 지름 15~17mm로 되고 8~9월에 흑자색으로 익으면 먹을 수 있다. 종자는 달걀 모양으로 길이 1.6mm 정도이다. 천상의 선녀들이 따 먹는 과일이라는 의미로 이름지어졌다. 한국, 일본 및 중국에 분포한다.
- [5] 천선과나무 추출물 관련 기술의 일례로는, 중국공개특허 제104998174호에 천선과나무의 뿌리 부위인 우내장근을 포함하는 한약재 조성물을 유효성분으로 포함하는 뇌 위축증 예방, 개선 또는 치료방법이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1042718호에 천선과 잎 추출물을 함유하는 피부노화방지 또는 피부미백 활성을 갖는 화장료 조성물이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제0694570호에 골다공증 반응의 주체가 되는 IL-6 및 COX-2 발현억제를 나타내는 좁은잎 천선과 추출물 및 분획물을 포함하는 골다공증의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이 개시되어 있으나, 본 발명의 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 개시된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 천선과나무 추출물의 아밀로이드 베타 응집 저해, 항산화 활성, 신경세포 보호 및 뇌세포의 염증 억제 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [9] 본 발명은 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 천선과나무 추출물이 아밀로이드 베타 응집 저해, 항산화 활성, 신경세포 보호 및 뇌세포의 염증 억제 효과가 있으므로,

인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [10] 도 1은 본 발명의 천선과나무 추출물의 아밀로이드 베타 응집 저해 효능을 확인한 것으로, (A)는 천선과나무 잎 추출물, (B)는 천선과나무 가지 추출물의 아밀로이드 베타 응집 저해 효능을 확인한 것이며, 양성대조군으로 100 μ M의 모린(Morin) 화합물을 사용하였다.
- [11] 도 2는 본 발명의 천선과나무 추출물의 항산화 활성을 확인한 것으로, (A)는 천선과나무 잎 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 확인한 결과이고, (B)는 천선과나무 잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 확인한 결과이며, (C)는 천선과나무 가지 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성을 확인한 결과이고, (D)는 천선과나무 가지 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 확인한 결과이다. 양성대조군으로 비타민 C(vit. C)를 사용하였다.
- [12] 도 3은 본 발명의 천선과나무 잎 추출물의 신경세포 보호 효능(CCK)을 확인한 것으로, (A)는 신경 해마 세포주에 대한 세포독성을 확인하기 위하여, 천선과나무 잎 추출물을 처리하고 세포생존율을 확인한 결과이고, (B)는 H₂O₂를 처리하여 신경세포 손상이 유도된 신경세포에 천선과나무 잎 추출물을 처리하여 세포보호 효능을 확인한 결과이며, (C)는 세포막 손상으로 인한 LDH 유출의 측정을 통하여 세포 생존율을 측정한 결과이다. ##, ###은 정상군에 대비하여, H₂O₂의 처리에 따른 신경세포의 손상에 의한 세포생존율 또는 LDH 방출이 통계적으로 유의하게 차이가 있다는 것으로, ##는 p<0.01이고, ###은 p<0.001임을 의미한다. *, **, ***는 H₂O₂ 처리군에 대비하여, 천선과나무 잎 추출물의 처리에 의해 신경세포의 생존율 또는 LDH 방출이 통계적으로 유의하게 차이가 있다는 것으로, *는 p<0.05이고, **는 p<0.01이며, ***는 p<0.001임을 의미한다.
- [13] 도 4는 본 발명의 천선과나무 잎 추출물의 처리에 따른 뇌세포 염증 억제 효능을 확인한 결과로, (A)는 미세아교 세포의 독성을 확인한 결과이고, (B)는 BV-2 세포에 염증을 유도한 후, 천선과나무 잎 추출물의 처리에 따른 NO 어세이 결과이며, (C)는 BV-2 세포에 염증을 유도한 후, 천선과나무 잎 추출물의 처리에 따른 PGE₂ 어세이 결과이다. ###은 정상군에 대비하여, LPS 처리에 따른 신경세포의 손상에 의해 NO(nitric oxide) 또는 PGE₂ 생성량이 통계적으로 유의하게 증가하였다는 것으로, p<0.001임을 의미한다. ***는 LPS 처리군에 대비하여, 천선과나무 추출물의 처리에 의해 NO(nitric oxide) 또는 PGE₂ 생성량이 통계적으로 유의하게 감소하였다는 것으로, ***는 p<0.001임을 의미한다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [14] 본 발명은 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

- [15] 상기 천선과나무 추출물은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:
- [16] 1) 천선과나무 식물에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [17] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및
- [18] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축하고 건조하여 추출물을 제조하는 단계.
- [19] 상기 단계 1)에서 추출용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 에탄올 추출물이고, 더욱더 바람직하게는 70%(v/v) 에탄올 초음파 추출물이지만 이에 한정하지 않는다.
- [20] 상기 제조방법에 있어서, 천선과나무의 추출은 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 당 업계에 공지된 모든 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 천선과나무 부피의 1~20배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 3~10배 첨가하는 것이다. 추출온도는 20 내지 50°C인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 0.5~10시간인 것이 바람직하며, 0.5~5시간이 더욱 바람직하고, 1시간이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무 건조 또는 동결 건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [21] 상기 천선과나무 추출물은 전초, 꽃, 잎, 가지, 뿌리 또는 종자의 추출물일 수 있으나, 바람직하게는 천선과나무의 잎 또는 가지 추출물이다.
- [22] 상기 인지기능 장애는 치매, 알츠하이머, 허혈성 뇌졸중, 외상성 뇌손상, 건망증, 파킨슨병, 픽(pick)병, 크루츠펬트-야콥병 및 경도 인지기능 장애 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [23] 본 발명에서, 경도 인지기능 장애는 기억력 및 인지 기능이 연령, 교육 수준에 비해 유의하게 저하된 상태이나 생활에 지장을 초래하지는 않는 치매 전 임상 단계로 정의한다.
- [24] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될

수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 피부 외용으로 사용한다.

[25] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량의 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[26] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 천선과나무 추출물의 양을 기준으로 0.01~2,000mg/kg이고, 바람직하게는 30~500mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50~300mg/kg이며, 하루 1~6회 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[27] 또한, 본 발명은 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 항산화 활성을 갖는 것이 특징이고, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것이 바람직하지만 이에 제한하는 것은 아니다.

[28] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 천선과나무 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는

장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합체 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

- [29] 본 발명의 조성물을 건강 음료로 사용할 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g이다. 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물은 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[30]

- [31] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[32]

[33] **1. 추출물의 제조방법**

- [34] 천선과나무 잎 및 가지는 가천대학교 생명과학과 약용식물소재은행으로부터 분양받아 사용하였다. 상기 천선과나무 잎 및 가지를 건조한 각 시료 500.0g에 대하여 70%(v/v) 에탄올 5ℓ를 가하고 초음파 추출기를 이용하여 1시간 동안 3회 초음파 추출하였다. 상기 초음파 추출액을 어드벤처 2호(Advantec No. 2, 110mm) 여과지를 이용하여 여과하여 불용성 물질을 제거한 후, 냉각 콘덴서가 장착된 농축 장치로 40℃에서 감압 농축하였다. 감압 농축된 추출물의 용매를 완전히 제거하기 위하여 정제수 500ml를 넣어 현탁시킨 후 동결건조기를 이용하여 농축하였다.

[35]

[36] **2. 아밀로이드 베타 응집 억제 효능 측정**

[37] 아밀로이드 베타 응집 억제 활성의 측정은 형광 분석법을 이용하였다. 아밀로이드 베타 ($A\beta_{1-42}$) 펩티드는 영하 80°C에서 보관하였으며, 측정 시 사용한 최종 농도는 100 μ g/ml로 사용하였다. 형광물질로 사용하는 티오플라빈 티(thioflavin T)는 어세이 버퍼(50mM Tris/150mM NaCl (pH 7.2), 20mM HEPES/150mM NaCl (pH 7.2), 10mM phosphate/150mM NaCl (pH 8.0))에 녹여 제조하여 2mM의 농도로 사용하였다. 시료는 어세이 버퍼(assay buffer)에 녹여 최종 농도 100 μ g/ml로 사용하였다. $A\beta_{1-42}$ 응집억제 정도를 측정하기 위하여 96웰 플레이트(black microplate)에 티오플라빈 티(thioflavin T) 10 μ l와 $A\beta_{1-42}$ 85 μ l를 넣은 후 일정 농도로 만든 시료 5 μ l와 혼합하여 형광 분광 분석기로 측정하였다. 이때 사용한 형광 분광 분석기의 파장 값은 440nm/484nm(흡광/발광)이며, 37°C에서 20분 간격으로 총 2시간 측정하였다. 활성 비교를 위하여 양성 대조군으로 모린(morin) 화합물을 사용하였다.

[38]

[39] **3. 항산화 활성 분석**

[40] (가) ABTS 자유 라디칼 소거능 측정

[41] ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 라디칼을 이용한 항산화 효능 측정은 ABTS+· cation decolorization assay방법을 96웰 플레이트에 맞게 수정하여 실시하였다. 7mM ABTS와 2.45mM 과황산칼륨(potassium persulfate)을 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+·를 형성시킨 후 743nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 PBS로 희석하였다. 96웰 플레이트에 ABTS+·용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, Epoch 마이크로플레이트 분광광도계(Microplate Spectrophotometer)를 사용하여 743nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 라디칼 소거활성은 용매인 PBS를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타냈다. 활성 비교를 위하여 양성 대조군으로 비타민 C(vit. C)를 사용하였다.

[42]

[43] (나) DPPH 자유 라디칼 소거능 측정

[44] DPPH(1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼을 이용한 항산화 효능 측정은 96웰 플레이트를 이용하여 실시하였다. 96웰 플레이트에 0.15mM의 DPPH 용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 처리 추출물의 항산화능은 용매인 DMSO를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다. 활성비교를 위하여 양성 대조군으로 비타민 C(vit. C)를 사용하였다.

[45]

[46] **4. 신경세포 보호 효능 측정**

[47] (가) 신경 해마 세포주에 대한 세포 독성 측정

[48] 시료의 세포 독성을 알아보기 위해 Cell Counting Kit-8(CCK-8)을 제조사의

사용법에 따라 사용하였다. 96웰 플레이트에 분주한 HT22 세포주(5×10^3 세포/웰)에 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. CCK-8 용액 $10 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 450nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포생존율(% of control)을 계산하였다.

[49]

[50] (나) 신경 세포 보호 효능 측정

[51] 신경 세포 손상을 유도하기 위하여 HT22 세포에 $250 \mu\text{M}$ 과산화수소(H_2O_2)를 6시간 처리하였다. CCK 어세이를 통하여 H_2O_2 단독 처리군과 시료와 H_2O_2 를 동시 처리군의 세포 생존율 변화를 비교하여 세포 보호 효능을 판단하였다. 양성 대조군으로 카베딜롤(carvedilol)을 사용하였다.

[52]

[53] (다) LDH 어세이

[54] 세포막 손상으로 인한 LDH 유출의 측정을 통하여 세포 생존율을 측정하였다. 신경 세포 손상을 유도하기 위하여 HT22 세포에 $250 \mu\text{M}$ 의 과산화수소(H_2O_2)를 6시간 처리하였다. 배양 상등액을 수거한 후 LDH 기질 용액과 동량 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 1N의 HCl을 가하여 반응을 정지시켜, 490nm에서 흡광도를 측정하였다(experimental LDH release).

[55] 상등액을 제거한 후, 남은 세포에 용해(lysis) 용액을 가하여 37°C 에서 45분간 반응시킨 후, 250g에서 4분간 원심분리 하였다. 상등액을 수거하여 위와 같은 방법으로 LDH 반응을 실시하여 490nm에서의 흡광도를 측정하였다(Maximum LDH release). 하기 식 (1)에 의하여 세포 생존율을 계산하였다.

[56] 식 (1)

[57] 세포생존률(%) = $\{[\text{experimental LDH release}(\text{OD}_{490})]/[\text{Maximum LDH release}(\text{OD}_{490})]\} \times 100$

[58]

[59] 5. 뇌세포 염증 억제 효능 측정

[60] (가) 미세아교세포 독성 측정

[61] 96웰 플레이트에 분주한 BV-2 세포주(1×10^4 세포/웰)에 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. CCK-8 용액 $10 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 4시간 동안 배양한 후 450nm에서 흡광도를 측정하고 대조군과의 비교를 통해 상대적인 세포생존율(% of control)을 계산하였다.

[62]

[63] (나) NO (nitric oxide) 어세이

[64] BV-2 세포에 시료를 2시간 전처리한 후, 염증 반응을 유도하기 위하여 LPS(lipopolysaccharide, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하고 24시간 배양한 후, 상등액을 회수하였다. 상등액과 Griess 시약(sulfanilamide:*N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride=1:1)를 동량 혼합하여 5-10분 반응시킨 후, 540nm에서 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 기준으로 NO(nitric oxide) 양을 계산하였다. 양성

대조군으로 이부프로펜(ibuprofen)을 사용하였다.

[65]

[66] (다) PGE₂ (Prostaglandin E₂) 어세이

[67] BV-2 세포에 시료를 2시간 전처리한 후, 염증 반응을 유도하기 위하여 LPS(lipopolysaccharide, 1 μ g/ml)를 처리하고 24시간 배양한 다음 상등액을 회수하였다. 세포 배양액 내의 PGE₂의 양을 측정하기 위해 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트를 이용하여 실험을 수행하였다. 상등액을 goat anti-mouse IgG로 코팅된 96웰 플레이트에 각각 50 μ l씩 첨가하고, 여기에 1차 항체 용액 50 μ l와 PGE₂ 컨쥬게이트 50 μ l씩 첨가하여 4°C에서 18시간 반응시켰다. 세척 완충용액으로 5회 세척하고 기질 용액을 200 μ l씩 처리하여 90분간 반응시킨 후, 412nm에서 흡광도를 측정하였다.

[68]

[69] 실시예 1. 천선과나무 추출물의 아밀로이드 베타 응집 저해 효능 확인

[70] 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 μ g/ml의 천선과나무 잎 및 가지 추출물을 처리하여 아밀로이드 베타의 응집억제 정도를 확인하였다. 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 천선과나무 잎 추출물은 농도 의존적으로, 아밀로이드 베타 응집을 저해하였고, 50 μ g/ml의 천선과나무 잎 추출물을 처리한 경우, 아밀로이드 베타 응집 저해가 약 60%이고, 100 μ g/ml의 천선과나무 잎 추출물을 처리한 경우, 아밀로이드 베타 응집 저해가 약 60% 이상임을 확인하였다. 한편, 100 μ g/ml의 천선과나무 가지 추출물은 35~40%의 아밀로이드 베타 응집 저해를 나타냈다.

[71]

[72] 실시예 2. 천선과나무 추출물의 항산화 활성 확인

[73] 본 실시예 2에서는 천선과나무 잎 및 가지 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여 ABTS 라디칼 소거활성과 DPPH 라디칼 소거활성을 확인하였으며, 도 2에 개시한 바와 같이, 천선과나무 잎 추출물은 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거활성 및 DPPH 라디칼 소거 활성이 나타났고, 천선과나무 가지 추출물은 ABTS 라디칼 소거활성은 천선과나무 잎 추출물과 유사한 정도의 효과를 나타냈으나, DPPH 라디칼 소거 활성은 거의 나타나지 않았다.

[74]

[75] 실시예 3. 천선과나무 추출물의 신경세포 보호 효능 확인

[76] 본 실시예 3에서는 천선과나무 추출물이 정상적인 신경 세포에 대한 세포 독성이 거의 없다는 것을 확인하였고(도 3(A)), H₂O₂에 의한 신경세포의 손상으로, 세포 생존률이 감소하였으며, H₂O₂에 의한 신경세포의 손상을 천선과나무 잎 추출물을 처리함으로써, 세포 생존률이 감소하는 것을 억제하는 효과가 있다는 것을 확인하였다(도 3(B)).

[77] 또한, H₂O₂에 의한 신경세포의 세포막이 손상되어 LDH 방출이 증가하였으나, 천선과나무 잎 추출물을 처리함으로써, LDH 방출의 증가를 완화하는 효과를 확인하였다(도 3(C)).

[78]

[79] 실시예 4. 뇌세포 염증 억제 효능 확인

[80] 본 실시예 4에서는 뇌세포 염증 억제 효능을 확인하였으며, 그 결과 도 4에 개시한 바와 같이, 본 발명의 천선과나무 잎 추출물은 뇌세포에 대한 독성이 거의 없어 세포생존률이 100% 수준을 유지하였다. LPS를 처리하여 뇌세포에 염증을 유도함으로써, NO(nitric oxide) 생성량이 증가하였으나, 본원 발명의 천선과나무 잎 추출물을 처리한 경우, 현저하게 NO(nitric oxide) 생성량이 줄어들었으며, 특히, 100 μ g/ml의 천선과나무 잎 추출물을 처리한 경우 NO(nitric oxide) 생성량이 거의 생성되지 않았다.

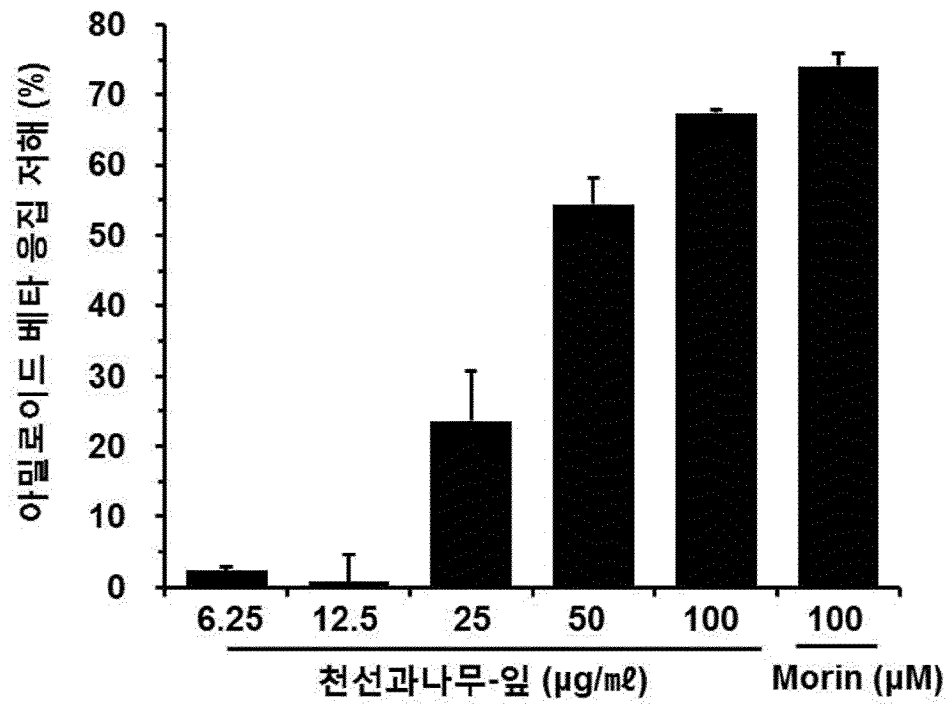
[81] 또한, 세포 배양액 내의 PGE₂ 양을 측정한 결과, 염증이 유도된 경우 PGE₂의 양이 증가한 반면에, 천선과나무 잎 추출물의 처리군은 LPS 처리군에 비해 PGE₂ 양이 감소한 것을 확인하였다.

청구범위

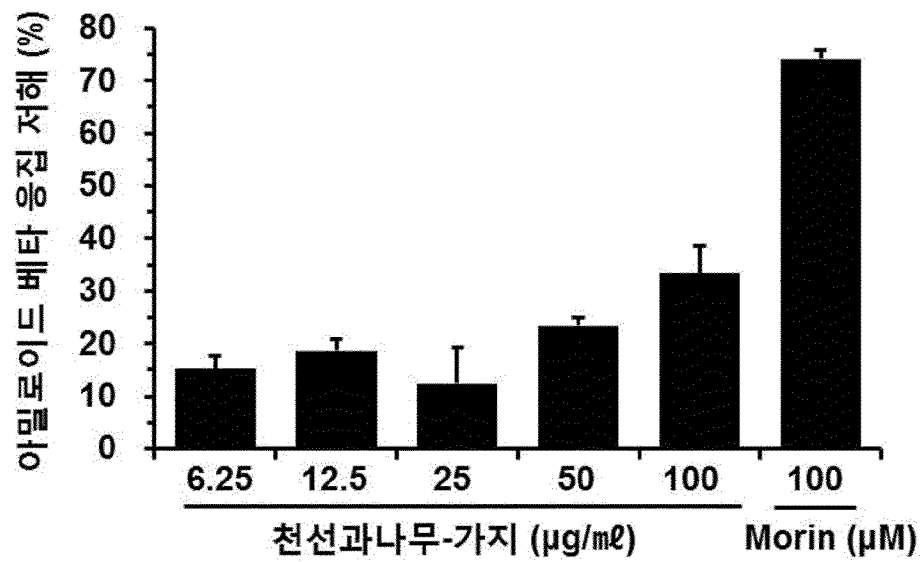
- [청구항 1] 천선과나무(*Ficus erecta*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 천선과나무 추출물은 천선과나무의 잎 또는 가지 추출물인 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 천선과나무 추출물의 용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 인지기능 장애는 치매, 알츠하이머, 허혈성 뇌졸중, 외상성 뇌손상, 건망증, 파킨슨병, 픽(pick)병, 크루츠펔트-야콥병 및 경도 인지기능 장애 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 천선과나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 천선과나무 추출물의 용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 조성물은 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[도1]

(A)

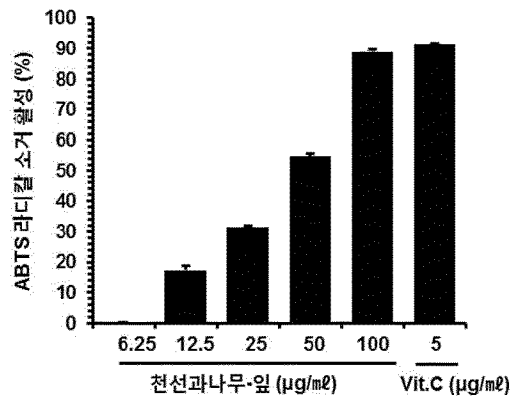


(B)

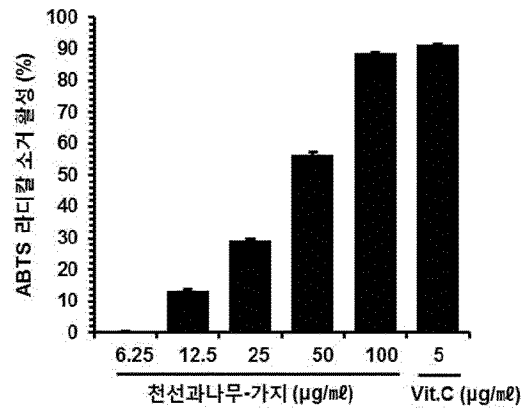


[도2]

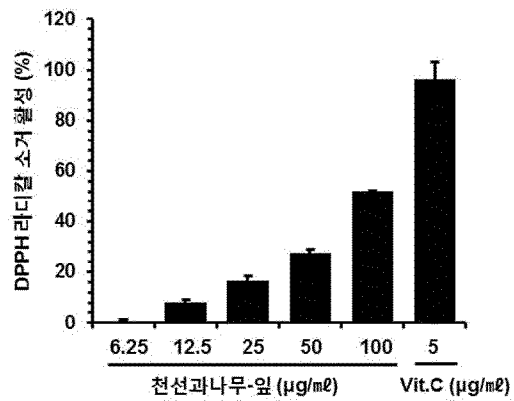
(A)



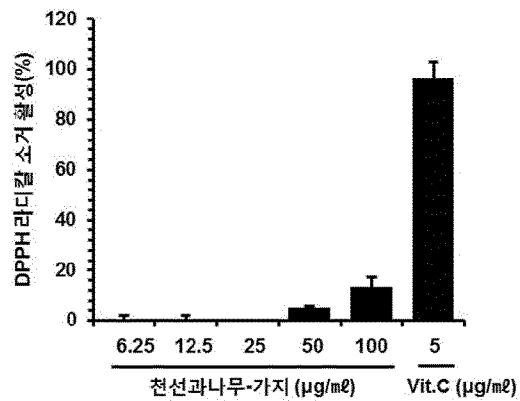
(C)



(B)

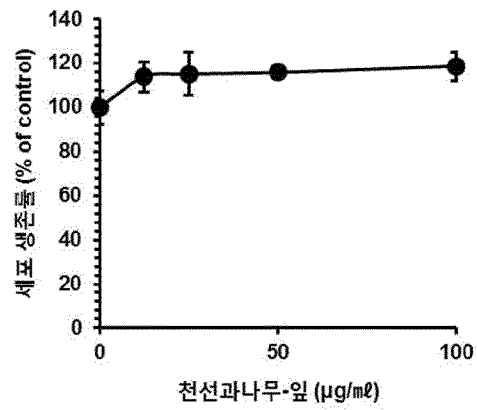


(D)

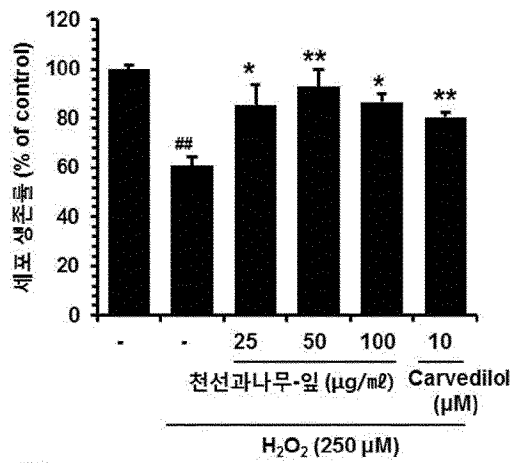


[도3]

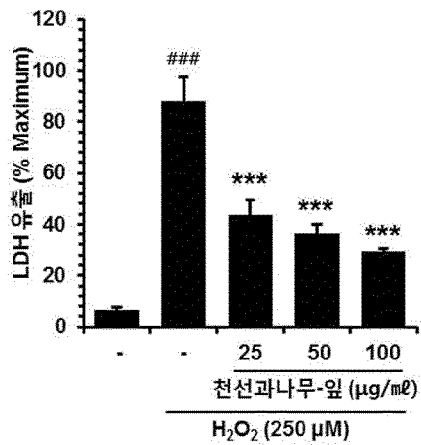
(A)



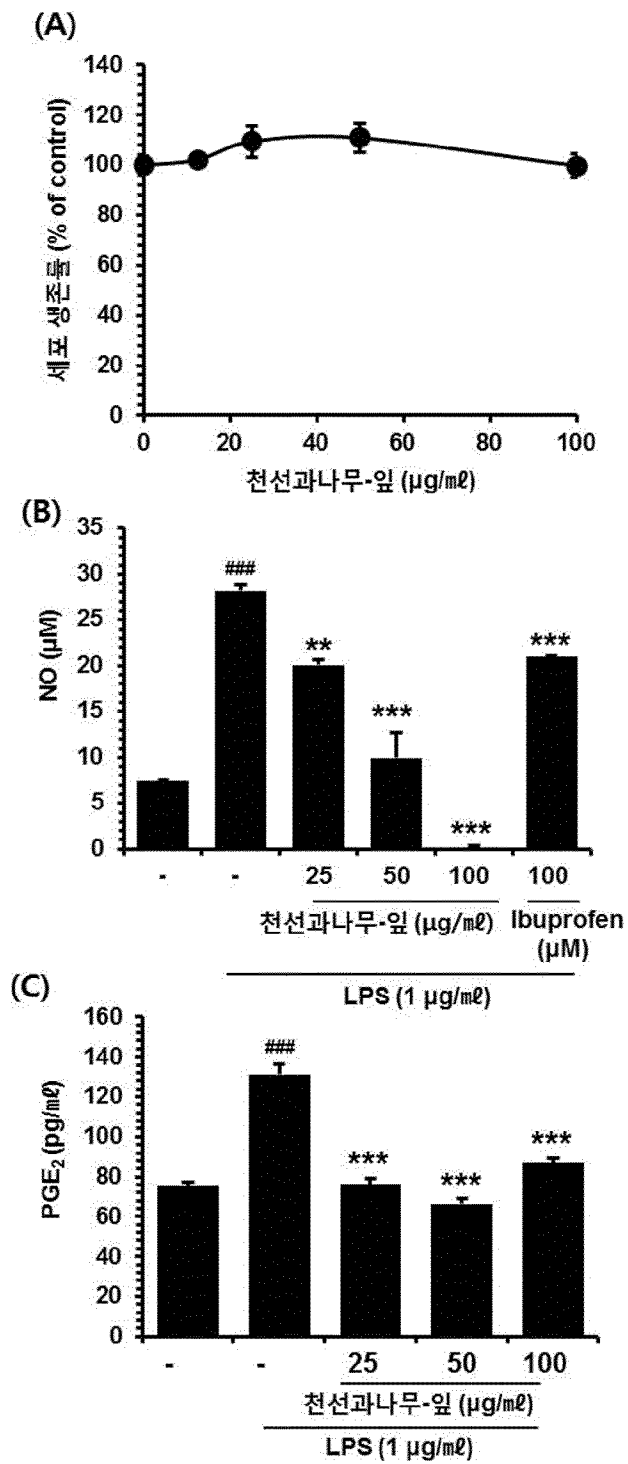
(B)



(C)



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/011817**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 36/60(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 36/60; A61P 29/00; A61Q 19/08; A61K 8/97; A61P 19/10; A23L 33/105

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Ficus erecta, Ficus erecta, extract, cognitive impairments, dementia, alzheimer's disease, pharmaceutical composition, health functional food, antioxidation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SONG, Sang-Mok et al., "Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Ficus Erecta in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells", 2015 KFN International Symposium and Annual Meeting, 2015, page 425 See page 425.	1-10
Y	HENEKA, M. T. et al., "Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease", Journal of Neuroimmunology, 2007, vol. 184, pages 69-91 See pages 71-82; page 87, right column.	1-10
A	KR 10-2011-0056684 A (JEJU TECHNOPARK) 31 May 2011 See paragraph [0006]; and claim 1.	1-10
A	KR 10-0694570 B1 (JEJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13 March 2007 See claim 1.	1-10
A	KR 10-2009-0130743 A (BIOLAND LTD.) 24 December 2009 See claim 1.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 FEBRUARY 2018 (05.02.2018)

Date of mailing of the international search report

05 FEBRUARY 2018 (05.02.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/011817

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0056684 A	31/05/2011	KR 10-1583591 B1	12/01/2016
KR 10-0694570 B1	13/03/2007	NONE	
KR 10-2009-0130743 A	24/12/2009	KR 10-1042718 B1	20/06/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 36/60(2006.01)i, A23L 33/105(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 36/60; A61P 29/00; A61Q 19/08; A61K 8/97; A61P 19/10; A23L 33/105

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 천선과나무, Ficus erecta, 추출물, 인지기능장애, 치매, 알츠하이머, 약학 조성물, 건강기능식품, 향산화

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	송상목 등, "Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Ficus erecta in Murine Macrophage RAW 264.7 cells", 한국식품영양과학회 학술대회발표집, 2015, 페이지 425 페이지 425 참조.	1-10
Y	Heneka, M. T. 등, "Inflammatory processes in Alzheimer`s disease", Journal of Neuroimmunology, 2007, 184권, 페이지 69-91 페이지 71-82; 페이지 87, 우측 칼럼 참조.	1-10
A	KR 10-2011-0056684 A (재단법인 제주테크노파크) 2011.05.31 단락 [0006]; 및 청구항 1 참조.	1-10
A	KR 10-0694570 B1 (제주대학교 산학협력단) 2007.03.13 청구항 1 참조.	1-10
A	KR 10-2009-0130743 A (주식회사 바이오랜드) 2009.12.24 청구항 1 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 02월 05일 (05.02.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 02월 05일 (05.02.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

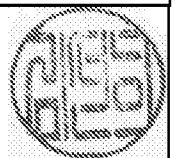
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0056684 A	2011/05/31	KR 10-1583591 B1	2016/01/12
KR 10-0694570 B1	2007/03/13	없음	
KR 10-2009-0130743 A	2009/12/24	KR 10-1042718 B1	2011/06/20