(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0025826
(43) 공개일자 2012년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/28 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0087968
(22) 출원일자 2010년09월08일
심사청구일자 2010년09월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
신동훈
서울특별시 강남구 대치동 670 동부센트레빌 101-2103
최수정
서울특별시 서대문구 연희로16길 36-5, 리치빌 301호 (연희동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

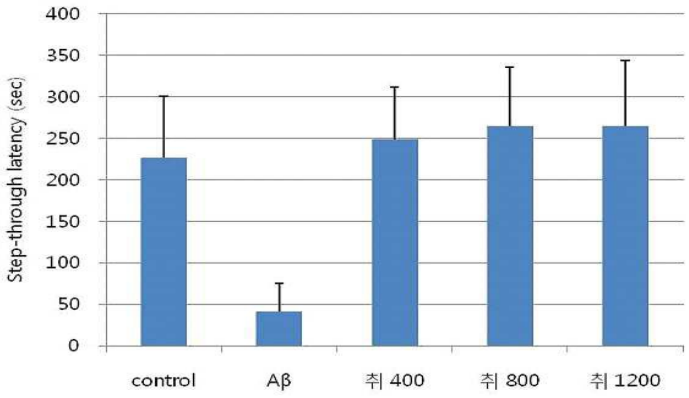
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **곰취 추출물을 포함하는 뇌신경세포 보호용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 곰취 추출물 또는 이로부터 분리된 활성성분인 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산의 뇌신경세포 보호 용도를 제공한다. 이들 성분은 우수한 산화적 스트레스 저해능 및 뇌신경세포 보호 효과를 나타낸다. 따라서, 이들을 유효성분으로 포함하는 조성물은 뇌신경 질환, 알츠하이머병, 파킨슨 병, 대뇌 아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy), 치매 및 헌팅턴병 등의 다양한 질환을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선하기 위해 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도12



(72) 발명자

김재겸

서울특별시 구로구 개봉로15길 91, 5동 102호 (개봉동, 거성아파트)

조홍연

서울특별시 성북구 정릉로 388, 103동 1002호 (돈암동, 동부센트레빌아파트)

김영준

서울특별시 강남구 도곡동 895-3 역삼한신아파트 1동 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20100015873
부처명	한국연구재단
연구사업명	(이공)일반연구자-기본
연구과제명	취나물로부터 amyloid B Pprotein에 의한 뇌세포손상을 저해하는 기능성 소재의 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

곰취(ligularia fischeri) 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 곰취 추출물은 유기용매, 물 또는 이들의 혼합용매 추출물인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 곰취 추출물은 에탄올 추출물인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 곰취 추출물은 곰취를 유기용매로 추출하고, 그 잔사를 극성이 다른 유기용매를 이용하여 분획함으로써 수득한 곰취 추출물 분획인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 곰취 추출물은 곰취를 에탄올로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하여 얻은 클로로포름 분획인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 곰취 추출물은 곰취를 에탄올로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하여 얻은 클로로포름 분획에 대해 클로로포름과 에탄올의 혼합 용매를 전개용매로 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획 중 클로로포름 : 에탄올 = 98:2 ~ 90:10의 전개용매조건에서 얻은 곰취 추출물 분획인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 곰취 추출물은 곰취를 에탄올로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하여 얻은 클로로포름 분획에 대해 클로로포름과 에탄올의 혼합 용매를 전개용매로 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획 중 클로로포름 : 에탄올 = 94:6의 전개용매조건에서 얻은 곰취 추출물 분획인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 곰취 추출물은 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산(2,5,8,11,14,17,20-heptaoxaheneicosane)을 포함하는 것인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물이 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD), 치매 (dementia), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 피질기저퇴행증 (corticobasal degeneration; CBD), 다계통위축병 (multiple system atrophy; MSA), 진행성핵상마비 (progressive supranuclear palsy; PSP), 헌팅톤병 (Huntington's disease; HD) 및 대뇌 아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 의약인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물이 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD), 치매 (dementia), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 피질기저퇴행증 (corticobasal degeneration; CBD), 다계통위축병 (multiple system atrophy; MSA), 진행성핵상마비 (progressive supranuclear palsy; PSP), 헌팅톤병 (Huntington's disease; HD) 및 대뇌 아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 질환의 개선을 위해 사용되는 식품인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 뇌신경세포 보호용 조성물을 포함하는 건강기능식품.

청구항 12

2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산(2,5,8,11,14,17,20-heptaoxaheneicosane)을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 조성물이 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD), 치매 (dementia), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 피질기저퇴행증 (corticobasal degeneration; CBD), 다계통위축병 (multiple system atrophy; MSA), 진행성핵상마비 (progressive supranuclear palsy; PSP), 헌팅톤병 (Huntington's disease; HD) 및 대뇌 아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 의약인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 조성물이 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD), 치매 (dementia), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 피질기저퇴행증 (corticobasal degeneration; CBD), 다계통위축병 (multiple system atrophy; MSA), 진행성핵상마비 (progressive supranuclear palsy; PSP), 헌팅톤병 (Huntington's disease; HD) 및 대뇌 아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 질환의 개선을 위해 사용되는 식품인 뇌신경세포 보호용 조성물.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항의 뇌신경세포 보호용 조성물을 포함하는 건강기능식품.

청구항 16

1) 곰취를 유기용매, 물 또는 이들의 혼합용매로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트을 이용하여 순차적으로 분획하여 클로로포름 분획을 얻는 단계; 및

2) 상기 단계 1로부터 얻은 클로로포름 분획에 대해 클로로포름과 에탄올의 혼합 용매를 전개용매로 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획 중 클로로포름 : 메탄올 = 98:2 ~ 90:10의 전개용매조건에서 곰취 추출물 분획을 얻는 단계를 포함하는 곰취 추출물 분획의 정제 방법.

청구항 17

1) 곰취를 유기용매, 물 또는 이들의 혼합용매로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트을 이용하여 순차적으로 분획하여 클로로포름 분획을 얻는 단계;

2) 상기 단계 1로부터 얻은 클로로포름 분획에 대해 클로로포름과 에탄올의 혼합 용매를 전개용매로 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획 중 클로로포름 : 메탄올 = 98:2 ~ 90:10의 전개용매조건에서 곰취 추출물 분획을 얻는 단계 및

3) 상기 단계 2로부터 수득한 곰취 추출물 분획에 대해 HPLC(high performance liquid chromatography)를 수행하여 뇌신경세포 보호 활성을 나타내는 곰취 추출물 분획을 정제하는 단계를 포함하는

2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산(2,5,8,11,14,17,20-heptaoxaheneicosane)의 정제 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 곰취 추출물 또는 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아밀로이드 베타(amyloid β, Aβ)는 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)의 비정상적인 절단에 의해 생성된 40-42개의 펩타이드로서, 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)을 비롯한 뇌신경질환에서 중요한 병인 물질로 여겨지고 있다. AD에서의 뇌신경세포 괴사의 원인은 아직 불분명하지만 산소 자유 라디

컬(oxygen free radical)의 생성, 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)과 같은 산화적 손상(oxidative injury)이 뇌신경세포의 파괴 및 발병기전(pathogenesis)과 관련되어 있을 것으로 추정된다. AD 환자의 뇌에서 이들 산화적 스트레스(ROS, lipid peroxidation, protein modification, mitochondrial DNA oxidation)의 증가가 증명되고 있으며 이러한 생리적 대사 이상은 아밀로이드 플라그(amyloid plaques)와 신경섬유엉킴(neurofibrillary tangles, NFT)과 같은 AD 뇌 고유의 임상적 결과를 초래한다. 또한 Aβ는 세포내 자유 라디컬 상태(intra-cellular free radical status)를 유발시키고 궁극적으로 세포괴사를 유도하므로, Aβ와 뇌신경세포 파괴는 상관성이 있는 것으로 보인다. Aβ에 의한 ROS, 자유 라디컬 등의 생성은 Aβ-유도된 자유 라디컬-매개 신경독성(Aβ-induced free radical-mediated neurotoxicity)의 추정을 가능하게 하기 때문에 이들에 대한 연구는 필수적이라 할 수 있다.

[0003] 현재까지 AD 약물개발의 주 표적은 병에서 나타나는 신경전달물질 이상으로 콜린성 뇌신경세포를 표적으로 한 콜린에스테라제 억제제들(Aricept, Exelon, Reminyl 등)과 글루타메이트 길항제이다. 하지만 이들 약물은 일시적으로 증상만 완화시킬 뿐이므로 병을 근원적으로 치료하거나 병의 진행 자체를 억제하는 약물 개발 기술이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 식용생물자원으로부터 아밀로이드 베타로 인해 유도된 산화적 스트레스로 인한 뇌신경세포의 독성을 저해할 수 있는, 즉 뇌신경세포 보호능을 나타내는 물질을 개발하여, 이를 포함하는 뇌신경세포 보호용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0005] 또한, 본 발명은 상기 뇌신경세포 보호 물질을 식용생물자원으로부터 정제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 이를 위해, 본 발명자들은 오랫동안 식품으로 이용되어 식용생물자원들을 대상으로 아밀로이드 베타-유도된 산화적 스트레스에 의한 뇌신경세포의 독성을 저해할 수 있는지 연구할 결과, 곰취 추출물이 이러한 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0007] 따라서, 본 발명은 곰취 추출물을 유효 성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호용 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 곰취 추출물의 제조시에는 건조 또는 미건조시킨 곰취 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 추출의 효율성을 위해 곰취는 잘게 부수어 사용될 수 있다. 또한, 효과적인 뇌신경세포 보호용 곰취 추출물을 얻기 위해, 곰취의 분쇄 전에 약 100℃의 높은 온도에서 약 5분간 블랜칭(blanching)을 수행하여 세포내 효소를 불활성화시키는 과정을 거칠 수 있다.

[0009] 곰취 추출물의 제조를 위해서는 곰취의 3 내지 10 배의 추출 용매를 사용하여 통상적인 추출 방법에 따라 추출할 수 있다.

[0010] 추출 용매로는 천연물 추출에서 널리 이용되고 있는 물, 유기 용매 또는 이들의 혼합 용매를 이용하여 추출될 수 있다. 상기 유기 용매로는 에탄올, 메탄올, 헥산, 클로로포름, 에탈아세테이트 등이 포함된다. 이러한 유기 용매는 물과 혼합하여 사용할 수 있으나, 활성 성분의 용이한 용출을 위해서는 물과 혼합하지 않고 사용할 수도 있다. 한 구체예에서, 상기 곰취 추출물은 에탄올 추출물일 수 있다.

[0011] 상기 곰취 추출물은 1차 추출에서 사용된 유기 용매와는 극성이 다른 유기 용매를 사용하여 추가로 분획할 수 있다. 이 경우, 상기 곰취 추출물은 곰취를 유기용매로 추출하고, 그 잔사를 극성이 다른 유기용매를 이용하여 분획함으로써 수득한 곰취 추출물 분획일 수 있다.

[0012] 또한, 상기 곰취 추출물 또는 곰취 추출물 분획에 대해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 정제함으로써 추가로 정제된

분획을 얻을 수도 있다. 본 발명에 있어서, '곰취 추출물'에는 이와 같이 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 포함한다.

[0013] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 곰취 추출물은 곰취를 에탄올로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하여 얻은 클로로포름 분획일 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 곰취 추출물은 곰취를 에탄올로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하여 얻은 클로로포름 분획에 대해 클로로포름과 에탄올의 혼합 용매를 전개용매로 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획 중 클로로포름 : 에탄올 = 98:2 ~ 90:10의 전개용매조건에서 얻은 곰취 추출물 분획일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 곰취 추출물은 곰취를 에탄올로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하여 얻은 클로로포름 분획에 대해 클로로포름과 에탄올의 혼합 용매를 전개용매로 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획 중 클로로포름 : 에탄올 = 94:6의 전개용매조건에서 얻은 곰취 추출물 분획일 수 있다.

[0016] 상기 수득한 곰취 추출물 분획에 대해 컬럼크로마토그래피를 반복적으로 수행하거나 TLC(thin layer chromatography) 또는 HPLC(high performance liquid chromatography)를 수행하여 추가로 정제된 곰취 추출물 분획을 얻을 수도 있다.

[0017] 하기 실시예에서는 이러한 추가적인 정제과정을 통해 곰취 추출물로부터 뇌신경세포 보호활성을 나타내는 활성성분이 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산(2,5,8,11,14,17,20-heptaoxaheneicosane)임을 확인하였다.

[0018] 따라서, 본 발명은 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 함유하는 곰취 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한

[0020] 1) 곰취를 유기용매, 물 또는 이들의 혼합용매로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트을 이용하여 순차적으로 분획하여 클로로포름 분획을 얻는 단계;

[0021] 2) 상기 단계 1로부터 얻은 클로로포름 분획에 대해 클로로포름과 에탄올의 혼합 용매를 전개용매로 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획 중 클로로포름 : 메탄올 = 98:2 ~ 90:10의 전개용매조건에서 곰취 추출물 분획을 얻는 단계를 포함하는

[0022] 곰취 추출물 분획의 정제 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명은 또한 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 유효성분으로 포함하는 뇌신경세포 보호용 조성물을 제공한다. 비록 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산이 본 발명에 따른 곰취 추출물로부터 분리된 것이긴 하나, 이는 화학적으로 합성되거나 상업적으로 입수할 수 있으며, 또한 다른 식물로부터 분리해 낼 수 있을 것이다.

[0024] 본 발명은 또한

[0025] 1) 곰취를 유기용매, 물 또는 이들의 혼합용매로 추출하고, 그 잔사를 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트을 이용하여 순차적으로 분획하여 클로로포름 분획을 얻는 단계;

[0026] 2) 상기 단계 1로부터 얻은 클로로포름 분획에 대해 클로로포름과 에탄올의 혼합 용매를 전개용매로 사용하는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 분획 중 클로로포름 : 메탄올 = 98:2 ~ 90:10의 전개용매조건에서 곰취 추출물 분획을 얻는 단계 및

[0027] 3) 상기 단계 2로부터 수득한 곰취 추출물 분획에 대해 HPLC(high performance liquid chromatography)를 수행하여 뇌신경세포 보호 활성을 나타내는 곰취 추출물 분획을 정제하는 단계

[0028] 를 포함하는

[0029] 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산(2,5,8,11,14,17,20-heptaoxaheneicosane)의 정제 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 하기 실시예에서는, 곰취를 100% 에탄올로 추출하여 얻은 잔사를, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트의 순으로 분획하여 곰취 추출물 분획을 제조하였다. 또한, 상기 곰취 추출물 분획 중 클로로포름 분획을 추가로 분획하고 정제하였다. 이러한 과정을 통해 얻은 본 발명의 곰취 추출물, 곰취 추출물 분획, 및 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산은 우수한 산화적 스트레스 저해능 및 뇌신경세포 보호 효과를 나타낸다.

[0031] 따라서 본 발명의 곰취 추출물, 곰취 추출물 분획, 및 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산은 뇌신경세포 보호용 조성물의 유효 성분으로 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명의 뇌신경세포 보호용 조성물은 아밀로이드 베타로 인해 유도된 산화적 스트레스로 인한 뇌신경세포의 독성에 의해 야기되는 질환의 예방, 치료용 의약 조성물로서 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 뇌신경세포 보호용 조성물은 아밀로이드 베타로 인해 유도된 산화적 스트레스로 인한 뇌신경세포의 독성에 의해 야기되는 질환의 개선용 식품 조성물로서 사용될 수 있다.

[0033] 아밀로이드 베타로 인해 유도된 산화적 스트레스로 인한 뇌신경세포의 독성에 의해 야기되는 질환은 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어, 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD), 치매(dementia), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration; CBD), 다계통위축병 (multiple system atrophy; MSA), 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP), 헌팅톤병 (Huntington's disease; HD), 대뇌 아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy) 등으로 구성되는 군으로부터 선택되는 질환일 수 있다.

[0034] 상기 조성물은 본 발명의 유효성분뿐만 아니라 기존에 공지된 뇌신경세포 보호제와 함께 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 곰취 추출물 또는 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 유효 성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0036] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0037] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 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. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 곰취 추출물 또는 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 포함하는 뇌신경세포 보호용 식품 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

[0040] 본 발명은 상기 뇌신경세포 보호용 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제공한다.

[0041] 본 발명은 또한 뇌신경세포 보호용 의약 또는 식품의 제조를 위한 상기 곰취 추출물 또는 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 유효 성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 곰취 추출물 또는 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 유효 성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 뇌신경세포 보호와 관련된 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0042] 또한 본 발명은 포유동물에게 치료상 유효량의 곰취 추출물 또는 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 투여하

는 것을 포함하는 뇌신경세포 보호 방법, 또는 뇌신경세포 보호과 관련된 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0043] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0044] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 곰취 추출물 또는 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 1일 1회 내지 수회 투여시, 1mg/kg~1000mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0045] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 곰취 추출물 또는 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명은 곰취 추출물 또는 이로부터 분리된 활성성분인 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산의 뇌신경세포 보호 용도를 제공한다. 이들 성분은 우수한 산화적 스트레스 저해능 및 뇌신경세포 보호 효과를 나타낸다. 따라서, 이들을 유효성분으로 포함하는 조성물은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD), 치매(dementia), 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration; CBD), 다계통위축병 (multiple system atrophy; MSA), 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy; PSP), 헌팅톤병 (Huntington's disease; HD) 및 대뇌 아밀로이드 맥관병증(Cerebral amyloid angiopathy) 등의 다양한 질환을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선하기 위해 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 곰취 에탄올 추출물 처리군의 세포생존율을 보여주는 그래프이다.

도 2는 곰취 에탄올 추출물의 유기용매 분획 처리군의 산화적 스트레스 저해능을 보여주는 그래프이다.

도 3은 곰취 에탄올 추출물의 유기용매 분획 처리군의 세포생존율을 보여주는 그래프이다.

도 4는 곰취 클로로포름 분획(chlo3)의 1차 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 분획물 처리군의 산화적 스트레스 저해능을 보여주는 그래프이다.

도 5는 곰취 클로로포름 분획(chlo3)의 1차 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 분획물 처리군의 세포생존율을 보여주는 그래프이다.

도 6은 1차 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 얻어진 소분획($CHCl_3$: EtOH = 90:10 (v/v) 첫 번째 소분획(fraction 4))에 대해 2차 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻어진 분획물 처리군의 산화적 스트레스 저해능을 보여주는 그래프이다.

도 7은 1차 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해 얻어진 소분획($CHCl_3$: EtOH = 90:10 (v/v) 첫 번째 소분획(fraction 4))에 대해 2차 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻어진 분획물 처리군의 세포생존율을 보여주는 그래프이다.

도 8은 2차 오픈 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로부터 분리한 활성 분획(fraction 4; chloroform:ethanol = 94:6 (v/v))의 HPLC 결과를 보여주는 그래프이다.

도 9는 실시예 1 내지 3을 통한 곰취 추출물의 정제과정을 정리한 도표이다.

도 10은 곰취 추출물의 뇌신경세포 보호 활성을 평가하기 위한 인비보 실험의 설계도이다.

도 11은 Aβ를 주사로 감소된 기억 학습 능력이 곰취 추출물을 섭취한 군에서 다시 증가됨을 보여주는 Y-미로 테스트(Y-maze test)의 결과이다.

도 12는 Aβ를 주사로 감소된 기억 학습 능력이 곰취 추출물을 섭취한 군에서 다시 증가됨을 보여주는 수동 회피 반응 테스트(Passive avoidance test)의 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0049] **[실시예]**

[0050] **실시예 1: 곰취 추출물의 제조 및 뇌신경세포 보호 활성 확인**

[0051] 곰취를 곱게 마쇄한 후 2.3 kg의 곰취를 시료의 5배 부피의 에탄올(v/v)로 24시간 동안 쉐이킹(shaking)하여 5회 추출한 후 감압 농축하여 곰취 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0052] 이렇게 제조된 곰취 에탄올 추출물이 뇌신경세포 보호활성을 나타내는지 확인하기 위해 곰취 에탄올 추출물의 신경세포 괴사 저해능을 측정하였다.

[0053] 우선, PC12 cell을 antimicotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 세포수가 10^4-10^6 cell/ml가 될 때까지 배양하였다. 대조군(control)에는 H_2O_2를 처리하는 대신 탈이온수만을 처리하였다. 음성 대조군은 200μM의 H_2O_2를 처리하여 산화적 스트레스를 유도한 것 외에는 다른 처리를 하지 않았다. 양성 대조군은 200μM의 H_2O_2를 처리하기 전에 48시간 동안 100μM Vit C을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 선배양하였다. 실험군은 200μM의 H_2O_2를 처리하기 전에 48시간 동안 1 mg/ml의 취나물 추출물을 포함하는 RPMI-1640 배지에서 선배양하였다.

[0054] DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescin diacetate) assay를 이용하여 spectrofluorometer를 통해서 산화적 손상(Oxidative injury)을 측정하였다. 그 결과, 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이 곰취 에탄올 추출물을 처리한 실험군은 곰취 에탄올 추출물을 처리하지 않은 군(negative)과 비교할 때 뇌신경세포에 대해 81.8 %의 보호효과를 나타냈다. 이를 MTT reduction assay를 통해 Cell viability를 확인한 결과이다. 도 1의 데이터는 4회의 독립적인 실험에 대한 평균 ± S.D.로 나타냈다.

[0055] **실시예 2: 곰취 추출물 분획의 제조 및 뇌신경세포 보호 활성 확인**

[0056] 실시예 1로부터 제조된 곰취 에탄올 추출물로부터 에탄올을 완전히 제거한 후 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트를 이용하여 각각 3배 부피로 환류 추출하여 각각의 분획(Hex1, Hex2, Hex3, Chlo1, Chlo2, Chlo3, Ethyl1, Ethyl2, Ethyl3)을 제조하였다.

[0057] 이렇게 제조된 곰취 에탄올 추출물의 헥산 분획, 클로로포름 분획 및 에틸아세테이트 분획이 뇌신경세포 보호활성을 나타내는지 확인하기 위해 이들 분획(**1mg/ml**)의 산화적 스트레스 저해능 및 신경세포 괴사 저해능을 측정하였다.

[0058] 신경세포 괴사 저해능은 실시예 1과 같은 방법으로 측정하였으며, 산화적 스트레스 저해능은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. **PC12 세포를 antimicotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하여 세포수가 10^4-10^6 cells/㎖가 되었을 때 활성을 측정하고자 하는 추출물을 각각 48시간 처리한 후 H_2O_2를 처리하여 산화적**

스트레스를 유도한다. 2시간 후 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescin diacetate)를 이용하여 생성된 산화적 스트레스 정도를 스펙트로플루오로미터(spectrofluorometer)를 통해서 측정하였다.

[0059] 그 결과, 도 2 및 3에서 확인할 수 있는 바와 같이 세번째 클로로포름층(Chol3)과 첫번째 에틸아세테이트층(Ethyl1)이 우수한 산화적 스트레스 저해능 및 신경세포 괴사 저해능을 나타내었다.

[0060] 가장 높은 저해 효과를 나타낸 Chol3 분획에 대해 1차 open silica gel column chromatography를 수행하여 33개의 소분획 ($CHCl_3$: EtOH = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 순으로 각각 3회)으로 분획하였다. 1차 Open silica gel column chromatography의 소분획에 대해 위와 동일한 방법으로 산화적 스트레스 저해능 및 신경세포 괴사 저해능을 확인하였다.

[0061] 그 결과, 도 4 및 5에서 확인할 수 있는 바와 같이 $CHCl_3$: EtOH = 90:10 (v/v) 조건에서 얻은 첫 번째 소분획(fraction 4)이 가장 높은 저해 활성을 나타내었다.

[0062] 상기 $CHCl_3$: EtOH = 90:10 (v/v) 첫 번째 소분획(fraction 4)에 대해 2차 open silica gel column chromatography를 이용하여 Chloroform과 ethanol (100:0, 98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10, 88:12, 86:14, 84:16, 82:18, 80:20 v/v)으로 전개하고, 이로부터 얻은 각각의 소분획을 위와 동일한 방법으로 산화적 스트레스 저해능 및 신경세포 괴사 저해능을 확인하였다. 그 결과, 도 6 및 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, $CHCl_3$: EtOH = 94:6(v/v) 조건에서 얻은 4번째 소분획(fraction 4)이 가장 높은 저해 활성을 나타내었다.

[0063] **실시예 3: 곰취 추출물 분획의 활성물질 확인**

[0064] μ-bondapak™ C_{18} column을 이용한 HPLC를 통하여 상기 2차 open column chromatography로부터 분리한 활성 분획(fraction 4; chloroform:ethanol = 94:6 v/v)이 어떠한 물질인지 확인하고자 하였다. 0-100%의 에탄올과 물의 직선농도 구배로 변화를 주어 95분간 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는 분당 0.5 mℓ로 하였으며 한번에 10 μℓ씩 시료 주입을 하였다. 사용 용매는 특급 ethanol과 3차 증류수를 사용하였다. 도 8의 HPLC 결과, 이 활성분획은 분자량 280.14 m/z를 갖는 2,5,8,11,14,17,20-헵타옥사헤네코산(2,5,8,11,14,17,20-heptaoxaheneicosane)임을 확인하였다.

[0065] 실시예 1 내지 3을 통한 곰취 추출물의 정제 과정을 정리하면 도 9와 같다.

[0066] **실시예 4: 곰취 추출물의 뇌신경세포 보호 활성에 대한 인비보 실험**

[0067] 도 10에 나타낸 바와 같이 곰취 추출물의 뇌신경세포 보호 활성을 평가하기 위한 인비보 실험을 설계하였다. 먼저, ICR 수컷 마우스에 곰취 에탄올 추출물 시료를 섞은 물을 농도별로 (400, 800, 1200 mg/kg,day) 약 3주간 ad lib의 상태로 공급하였다. 식이 시작 후 21일째에 치매 유발성 물질인 아밀로이드 베타 펩타이드 (Aβ)를 ICV (intracerebroventricular) 주사하고, 24일째에 Y-미로 테스트, 28일째에 수동 회피 반응 테스트를 수행하였다.

[0068] 길바꿈 행동(alternation behavior)을 측정하기 위해, 각각 ⓐ, ⓑ, ⓒ 세 개의 arm를 갖는 Y-미로에서 행동실험을 실시한다. Y-미로는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록했다. 마우스를 미로에 넣고 아무런 자극 없이 8분 동안 자유롭게 움직이도록 둔다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.

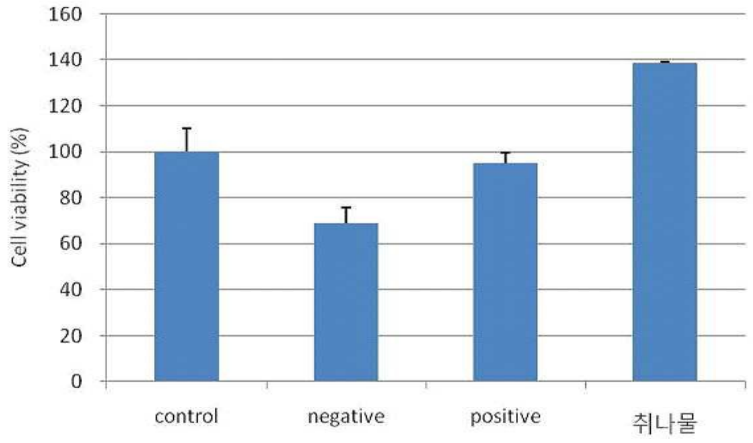
[0069] 수동 회피 반응 테스트(Passive avoidance test)를 수행하여 혐오자극(전기쇼크)이 제시되었던 상자를 기억하여 동일한 상자로 다시 들어가는데 걸리는 시간(step-through latency)를 측정하였다. 이 실험은 실제 실험에 들어가기 전날에 기억상자와 같은 장소에서 훈련을 시킨 다음 행동실험을 실시한다. 모든 마우스를 실험 전날 실험상자에서 적응 훈련(명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1마리당 300sec 동안 실험하였다.

[0070] 실험 결과, 도 11 및 도 12에서 확인할 수 있는 바와 같이 Aβ를 주사로 감소된 기억 학습 능력 (alternation

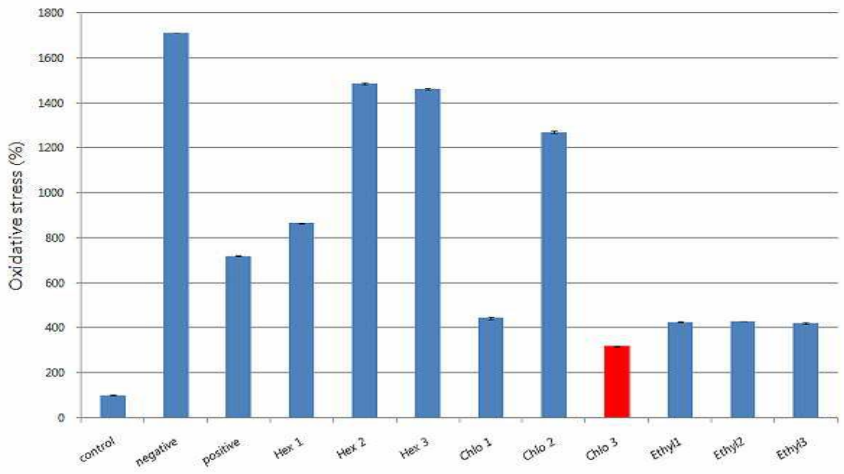
behavior, step-through latency)이 곰취 추출물을 섭취한 군에서 다시 증가되는 것을 확인하였다.

도면

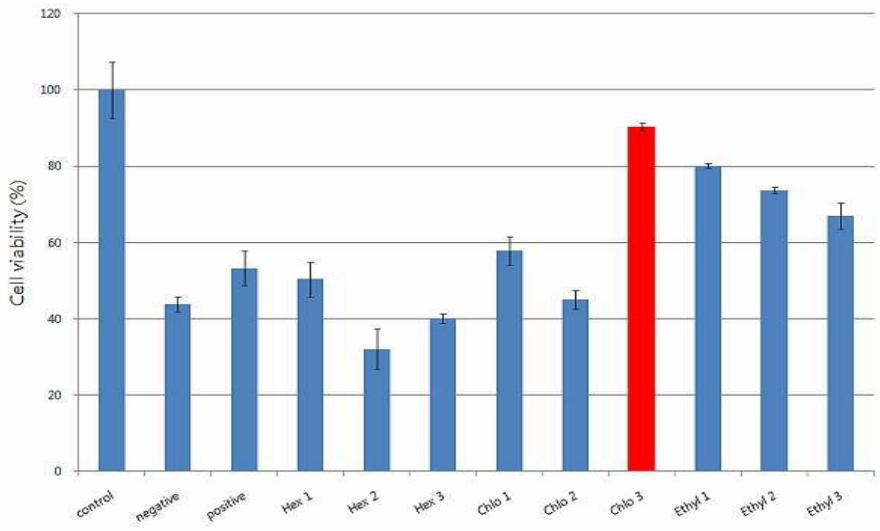
도면1



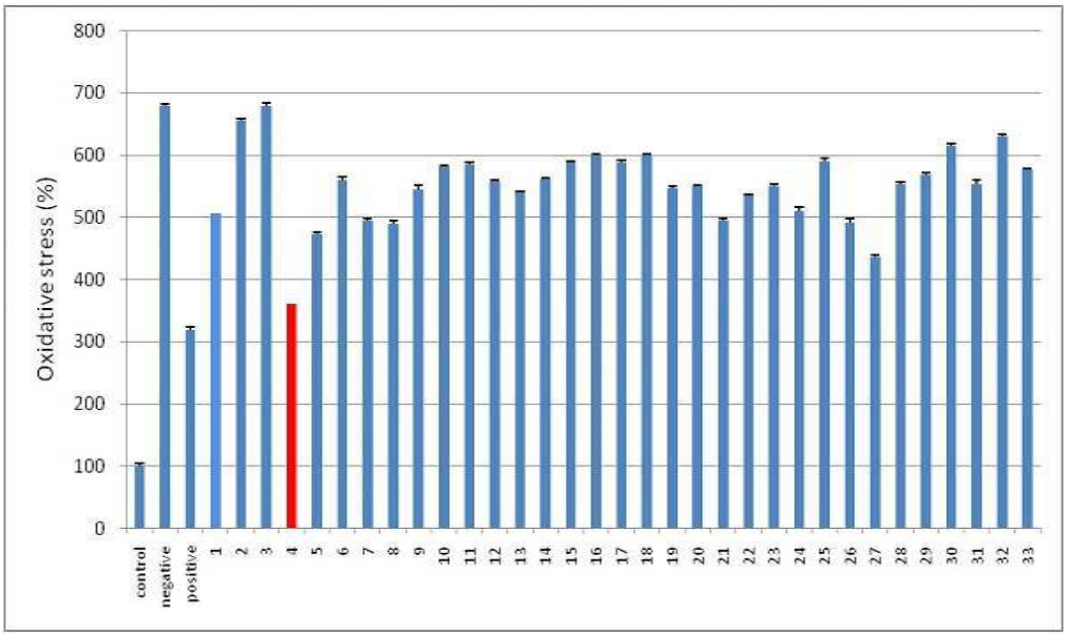
도면2



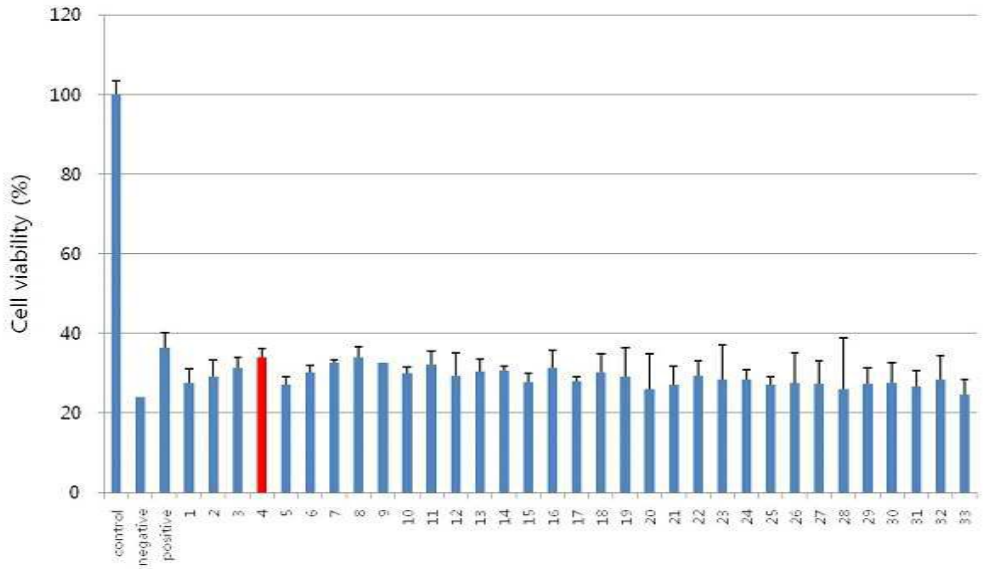
도면3


Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
control
negative
positive
Hex 1
Hex 2
Hex 3
Chlo 1
Chlo 2
Chlo 3
Ethyl 1
Ethyl 2
Ethyl 3

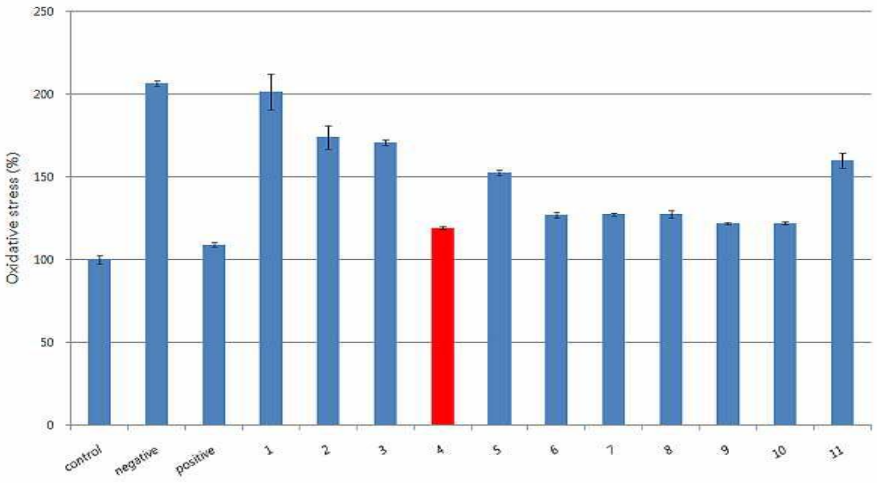
도면4


Oxidative stress (%)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
control
negative
positive
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

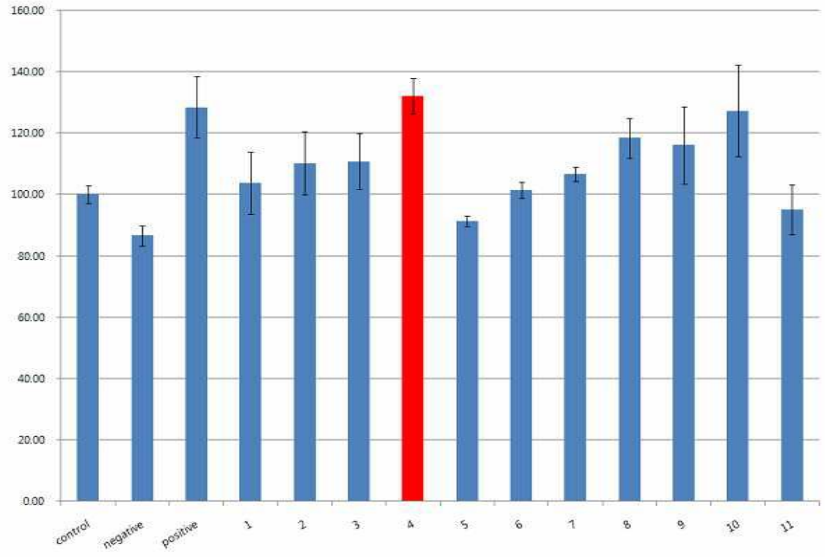
도면5


Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
control
negative
positive
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

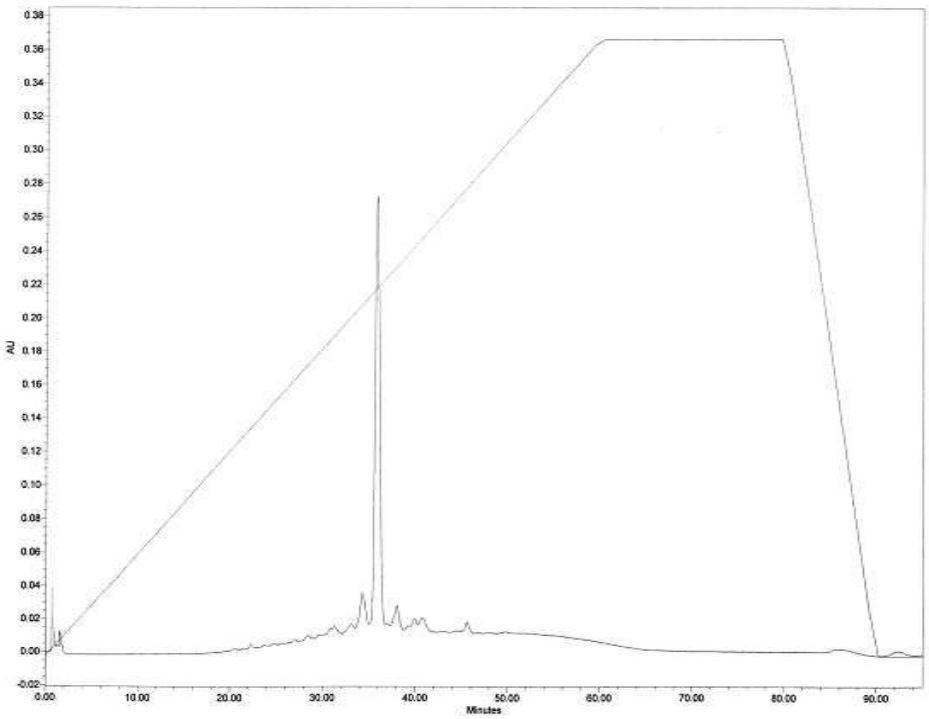
도면6


Oxidative stress (%)
250
200
150
100
50
0
control
negative
positive
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

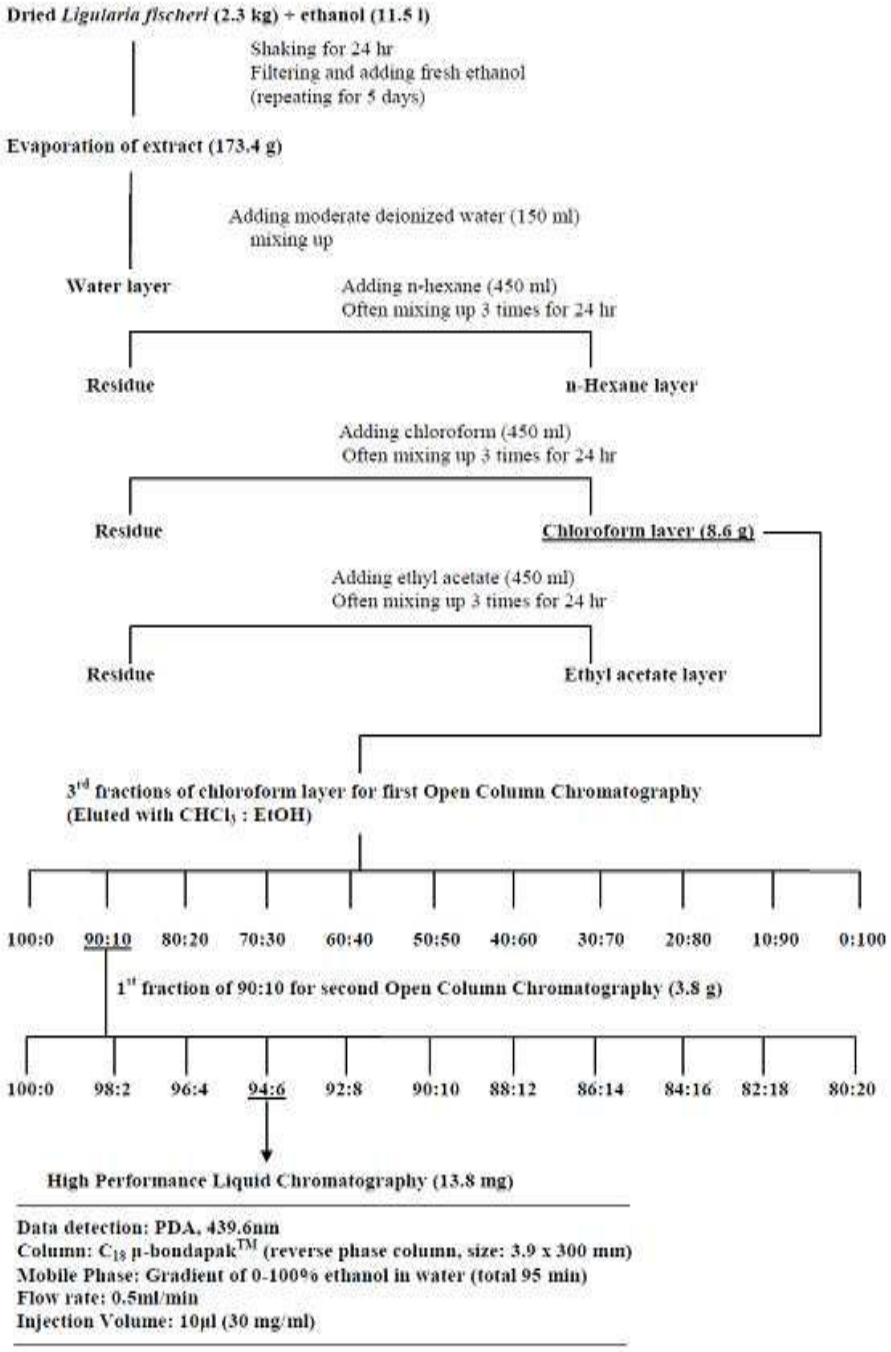
도면7


160.00
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
control
negative
positive
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

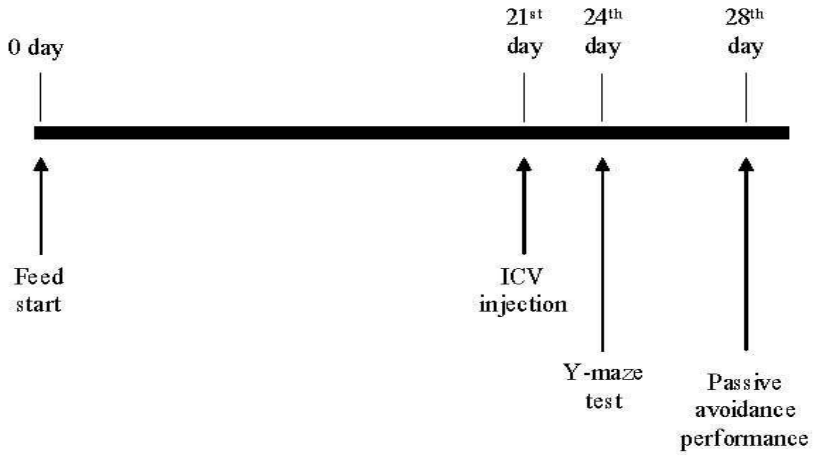
도면8


AU
Minutes
0.00
10.00
20.00
30.00
40.00
50.00
60.00
70.00
80.00
90.00

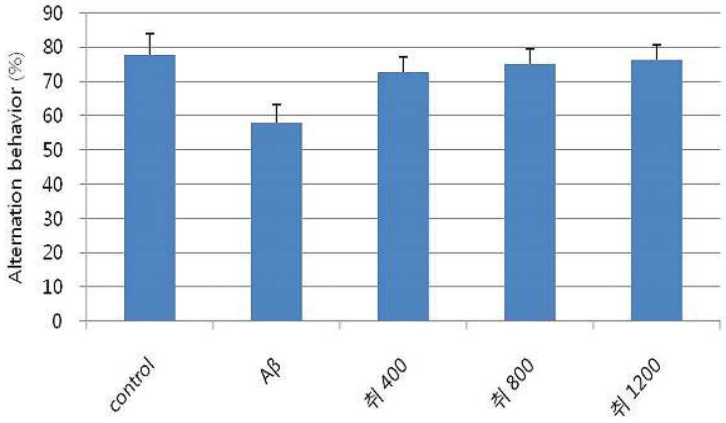
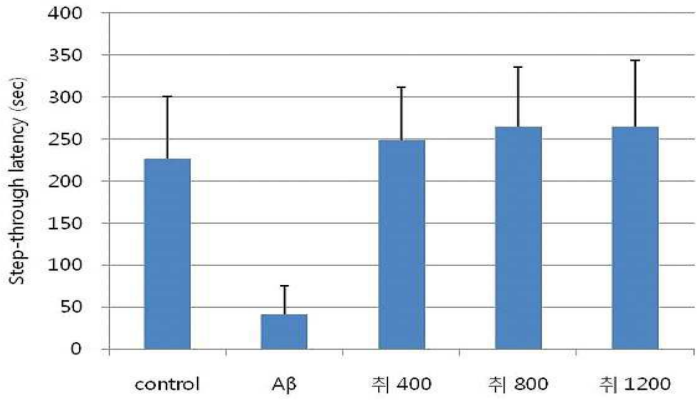
도면9


Dried Ligularia fischeri (2.3 kg) + ethanol (11.5 l)
Shaking for 24 hr
Filtering and adding fresh ethanol
(repeating for 5 days)
Evaporation of extract (173.4 g)
Adding moderate deionized water (150 ml)
mixing up
Water layer
Adding n-hexane (450 ml)
Often mixing up 3 times for 24 hr
Residue
n-Hexane layer
Adding chloroform (450 ml)
Often mixing up 3 times for 24 hr
Residue
Chloroform layer (8.6 g)
Adding ethyl acetate (450 ml)
Often mixing up 3 times for 24 hr
Residue
Ethyl acetate layer
3rd fractions of chloroform layer for first Open Column Chromatography
(Eluted with CHCl3 : EtOH)
100:0
90:10
80:20
70:30
60:40
50:50
40:60
30:70
20:80
10:90
0:100
1st fraction of 90:10 for second Open Column Chromatography (3.8 g)
100:0
98:2
96:4
94:6
92:8
90:10
88:12
86:14
84:16
82:18
80:20
High Performance Liquid Chromatography (13.8 mg)
Data detection: PDA, 439.6nm
Column: C18 μ-bondapak™ (reverse phase column, size: 3.9 x 300 mm)
Mobile Phase: Gradient of 0-100% ethanol in water (total 95 min)
Flow rate: 0.5ml/min
Injection Volume: 10μl (30 mg/ml)

도면10



도면11



도면12