(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0045746
(43) 공개일자 2011년05월04일

(51) Int. Cl.
A61K 36/03 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0102442
(22) 출원일자 2009년10월27일
심사청구일자 2009년10월27일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
(72) 발명자
강일준
강원도 춘천시 퇴계동 주공2차아파트 209-403
김민주
강원도 춘천시 후평2동 포스코더샵아파트 104-706
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 구멍쇠미역(Agarum clathratum) 추출물을 포함하는 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

(57) 요 약

본 발명은 알츠하이머질병(Alzheimer's Disease)의 예방, 치료 및 인지능 개선을 목적으로, 상기 추출물은 아세틸콜린에스테라제의 활성을 저해함으로써 아세틸콜린의 농도를 증가시켜, 콜린성 신경기능 퇴화로 인한 알츠하이머병의 예방 및 치료에 효과적이다. 또한 베타아밀로이드 펩타이드의 생성과정에 관여하는 효소의 하나인 β-세크레타제(β-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme, BACE)의 활성을 특이적으로 저해하는 구멍쇠미역 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1

Sample	Concentration (μg/mL)	Inhibition (%)	IC_{50} (μg/mL)[1]
구멍쇠미역 에탄올 추출물	20	20.4±0.9	-
구멍쇠미역 에틸아세테이트 분획물	2 5 20	46.4±1.4 57.4±4.2 66.4±5.5	2.65
구멍쇠미역 물 분획물	20	47.7±0.63	-
Galanatamine	0.02 0.1 0.2	35.3±5.9 47.7±0.8 57.4±0.7	0.134

(72) 발명자

유상권

강원도 강릉시 입암동 대우이안아파트 107-1404

임순성

강원도 춘천시 퇴계동 그린타운아파트 102-401

원무호

강원도 춘천시 신북읍 용산리 147-2

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 F20811208H140000110

부처명 국토해양부

연구관리전문기관

연구사업명 2008년도 미래해양기술개발사업

연구과제명 해양생물로부터 인지기능 개선효과를 갖는 기능성 소재 및 제품개발

기여율

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2008년 11월 12일 ~ 2009년 11월 11일

특허청구의 범위

청구항 1

구멍쇠미역(Agarum clathratum)추출물을 포함하는 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

청구항 2

청구1항에 있어서, 상기 구멍쇠미역 추출물을 0.1 내지 99 중량%로 함유하는 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 치매질환은 알츠하이머형 치매증, 뇌혈관성 치매증, 픽병, 크루츠펠트-야곱병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 추출물은 물 또는 50 내지 100% 농도의 탄소수 1 내지 4의 저가알코올로 추출된 구멍쇠미역 추출물인 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 0.01 내지 15 중량% 포함하는 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물

청구항 6

구멍쇠미역(Agarum clathratum)추출물을 포함하고, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 치매 질환 치료 및 예방을 위한 약학 조성물

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 최근 국민생활 수준의 향상과 의학기술의 발달로 평균수명이 증가하면서 사회적으로 인구의 고령화 현상이 문제되고 있으며, 노인건강에 대한 관심이 높아지고 있다. 오늘날 알츠하이머병은 암, 심장실환, 뇌졸중에 이어 노인사망의 네번째 원인이 되었으며, 85세 이상 인구의 약 47%가 알츠하이머병 증상을 나타내고 있고, 국내환자수는 약 28 만 명인 것으로 알려져 있다.

[0002] 흔히 알츠하이머병이라고 일컫고 있는 대부분의 노인성치매(senile dementia)는 그 발병원인에 대해서는 자세히 밝혀진 바 없으나 약 5%만이 유전적이며, 95%는 환경 및 복합적인 원인으로 발병하는 것으로 알려져있다. 원인으로는 신경 조직 및 혈관에서 플라크 (plaque)의 축적, 신경섬유 얽힘, 아밀로이드 침착, 시냅스 손상 및 신경세포 사멸을 병리학적 특징으로 한다. AD는 다양한 유발인자가 관여한다고 알려져 있는데, 이중 AD의 기전에 대한 대표적인 가설은 preseniline 유전자들의 돌연변이와 amyloid precursor proteins(APP)의 과다생성으로 인해 β-amyloid peptide(Aβ)가 과량으로 만들어지게 되고, 이 Aβ의 침착으로 생기는 노인반의 신경독성으로 인해 신경세포의 파괴가 일어난다는 것이다

[0003] 알츠하이머성 치매질환자들에 공통적으로 나타나는 노인반점(senile plaques)의 주요 요소인 베타 아밀로이드(β-amyloid, Aβ) 펩타이드는 그 전구 대사 단백질인 아밀로이드전구체단백질(APP) 695, 751, 770으로부터 유래한다. 이 아밀로이드전구체단백질은 대부분의 경우 α-세크레타제(α-secretase)와 γ-세크레타제(γ-secretase)라고 불리우는 프로테아제(proteases)에 의하여 절단되어 P3 펩타이드와 세포의 바깥쪽으로 sAPPα라

는 수용성 단백질을 방출하게 된다. 특이적으로 알츠하이머성 치매 질환자에서는 베타 세크레타제와 감마 세크레타제가 활성화되어 베타아밀로이드 펩타이드(Aβ)와 sAPPβ(secreted form of β-secretase derived APP)라는 단백질이 세포 밖으로 방출된다. 알츠하이머성 치매 질환자들중에서 베타아밀로이드 전구체 단백질(APP) 유전인자의 돌연변이의 경우를 보면 대부분이 α, β, γ-세크레타제(α, β, γ-secretase)들의 인지부분에 돌연변이가 생긴 경우로 이러한 돌연변이가 단백질의 구조를 변화시켜서 β와 γ-세크레타제(β와 γ-secretase)에 노출이 더 잘 되어 정상인의 경우보다 많은 양의 베타아밀로이드 펩타이드가 생성되는 것으로 밝혀져 있다. 베타아밀로이드 펩타이드는 42개의 아미노산 잔기로 이루어진 녹지 않는 성질을 가지며, 기억 및 인식과 관련된 뇌 영역에 침착되어 뇌세포의 아폽토시스(apoptosis)를 유발하는 것으로 알려져 있다. 최근 보고에 의하면 베타아밀로이드전구체 단백질(APP) 유전인자의 돌연변이가 카스파제6(caspase-6)과 카스파제3(caspase-3)이라는 아폽토틱 프로테아제(apoptotic protease)의 기질로 작용하여 절단이 되며, 이렇게 절단되어진 베타아밀로이드전구체 단백질(APP)은 β-,γ-세크레타제(β-, γ-secretase)에 의하여 보다 용이하게 베타아밀로이드를 형성하게 된다고 알려져 있다. 이와 같이 알츠하이머성 치매질환의 원인 규명과 치료 방법의 개발에는 많은 연구가 이루어지고 있으나 현재까지 뚜렷한 효과가 확립된 치료소재 개발은 다소 미흡한 실정이다.

[0004] 아직까지 AD나 다른 퇴행성 뇌질환에 의해 생기는 노인성 치매를 근본적으로 치료할 수는없으나 acetylcholinesterase(AChE) 억제제와 항산화제 등이 처방되고 있다. Acetylcholine은 기억력과 학습활동에 있어서 중요한 역할을 하므로 AChE 억제제는 뇌의 아세틸콜린 농도를 증가시켜 인지기능을 향상시키기 위하여 사용된다. 치매 환자의 뇌내 아세틸콜린(acetylcholine; ACh)의 농도는 정상인에

[0005] 비해 50%의 손실을 보인다. 대뇌의 ACh은 choline과 acetyl coenzyme A에서 합성되며 이 때 choline acetyltransferase (ChAT)라고 하는 효소가 관계된다. Choline 흡수가 낮아지면 ACh 합성 시 신경세포 구성물질 중의 하나인 phosphatidyl choline (PC)을 choline으로 사용하게 된다. 이 경우 콜린성 뉴런이 파괴되어 치매와 같은 퇴행성 질병을 일으키게 된다.

[0006] 많은 동물실험 및 임상연구의 결과를 토대로 뇌중 acetylcholine량의 결핍과 β-secretase에 의해 생성되는 β-amyloid 단백질에 의한 독성이 알쯔하이머병의 주요 병리 현상임으로 이에 대한 연구가 활발하다. 현재까지 미국 식품의약품안전청으로부터 알츠하이머병 치료제로 승인받아 임상에서 사용되는 의약품은 모두 아세틸콜린 억제제로 tacrine (CognexTM), donepezil (AriceptTM), rivastigmine (ExelonTM) 등과 천연물 추출 성분인 galanthamine (ReminylTM)이 있다. 그러나 이들의 경우 어느 정도 약효는 인정되고 있으나, 장기간 고용량 투여시, 근육통, 위장 장애로 인한 메스꺼움, 구토, 설사 및 식욕 부진과 함께, 간 독성 등의 부작용이 커서 치료를 중단해야 하는 경우가 자주 발생하는 등의 문제점이 지적되고 있다.

[0007] 세계 8대 해양국의 하나인 우리나라는 3면이 바다로 둘러싸여 있어 비교적 해양생물 자원이 풍부하여 예로부터 해양생물은 국민생활상 중요한 물질이었다. 해조류에는 녹조류, 홍조류, 그리고 황색조류의 일부인 갈조류가 있으며 이들은 얕은 바다의 서식지를 풍요롭게 하고 있다. 해조류는 예로부터 아시아 지역에서 널리 섭취해 왔으며, 영양학적으로 열량은 매우 낮으면서 비타민과 무기질, 식이섬유소가 풍부하고, 육지식물에는 없는 비소화성의 점질성 다당류를 다량 함유하고 있으며, 채소류와 비교해서 필수 아미노산과 불포화 지방산이 많다는 것이 특징이다. 해양에 서식하는 해양생물은 육상생물과 구별되는 여러 가지 화합물을 함유하는 것으로 밝혀져 왔으며, 최근 해면, 갯지렁이 및 해조류의 추출물이 생리활성을 나타냄으로써 해양생물은 신약개발의 원료로서 주목받고 있다. 현재까지 해양생물 추출물에서 생리활성을 보이는 대표적인 화합물을 탄닌(tannins), 테르펜(terpene), 페놀(phenol), 할로겐(halogen) 및 카테킨(catechins)으로 알려져 있다. 이와같이 해조류로부터 다양한 생리활성물질들이 알려지면서 새로운 생리활성물질들의 개발 자원으로서 생체량이 풍부한 해조류들의 잠재성이 재인식 되어지고 있다. 많은 해조류들이 전 세계 다양한 지역에서 소량이나마 전통약재, 식품, 건강 보조품 등으로 사용 되어져 왔다. 특히, 우리나라, 일본, 중국 등지에서는 식품으로서 뿐만 아니라 전통 약제로서도 많이 사용 되어져 왔으며, 서양에서는 최근에 주로 식품 및 의약품에 사용할 다당류 (agar, alginate, carrageenan, 등)의 원료로 사용되었다.

[0008] 본 발명은 여러가지 해조류중에서 갈조류인 구멍쇠미역을 추출한 후, 치매의 원인들 중에서 신경전달물질인

acetylcholine의 감소 및 β-amyloid 생성효소인 β-secretase 저해활성에 초점을 맞추어 우수한 치매 예방 및 치료 또는 인지능 개선 효과를 나타내는 구멍쇠미역 추출물을 포함하는 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0009] 본 발명의 구멍쇠미역(Agarum clathratum)은 일본의 홋카이도오, 쿠릴열도, 아메리카 태평양연안, 베링해에 분포하고 우리 나라에서는 동해안 중부 이북지방에 분포한다. 점심대의 깊은 곳에 나며 뿌리는 가는 섬유상이며 줄기는 원주상 내지 편원이고 길이는 약 2~3cm, 지름은 3~4mm, 엽상부는 타원형이며 길이는 30~60mm 쯤이고 폭은 20~30cm 기부는 심장형이며 파상으로 주름이 생긴다. 엽면에는 대소의 구멍이 있는데 중륵에 가까운 곳에 있는 것은 크고 가장자리 가까운 곳의 것과 하부의 것은 작다. 중륵은 다소 두껍고 잎의 양면에 명백히 융기한다. 엷은 혁질이고 갈색인데 건조하면 흑색으로 되고 대지에 붙지 않는다. 주요성분으로는 단백질, 당질, 지방, Ca, 비타민 A, B_1, B_2, 니코틴산, 칼슘, 요오드, 알긴산, fucoxanthin, violaxanthin, lutein, β-carotene이 함유되어 있다. 현재 구멍쇠미역의 멜라닌 합성 저해, 아질산염 분해효과등이 뛰어나다고 보고되었으나 구멍쇠미역 추출물의 치매 예방 또는 치료에 대한 연구가 보고 된 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 구멍쇠미역 추출물 혹은 이를 포함하는 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선용 약학적 조성물 또는 기능성 식품 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0011] 구멍쇠미역 추출물을 이용한 아세틸콜린에스테라제 활성저해효과, β-세크레타제의 활성저해효과를 통하여 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선 효과를 측정 규명한다.

효 과

[0012] 본 발명은 구멍쇠미역 추출물을 이용한 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선 효과를 얻는 것을 그 특징으로 하며 이는 천연물에서 유래한 치매 예방 또는 치료 및 인지능 개선 조성물이라는 측면에서 그 의의가 있으며 이를 적극적으로 활용할 경우 다양한 질병에 대한 조성물로서 널리 활용될 수 있으며 나아가 국민 건강에 기여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0013] **시료제조예1**: 본 발명의 구멍쇠미역 추출물은, 건조된 구멍쇠미역 무게 1000 g의 10배의 에탄올을 가하고 수용액상에서 65℃에서 3시간 추출한 다음 이를 여과하여 추출액을 얻는다. 추출하는 과정을 3회 반복한다. 얻어진 추출액을 40℃ 이하에서 감압 농축한 후 이를 동결 건조하여 분말상의 추출물 50 g, 5%을 얻는다.

[0014] **시료제조예2**: 상기 시료제조예1에서 얻은 구멍쇠미역 추출물 50 g에 증류수 250 L를 가하여 현탁하고 에틸아세테이트 250 L를 가하여 혼합한 후 에틸아세테이트 가용성 분획부 및 수가용성 분획부로 분리하였다. 동일과정을 3회 반복하여 에틸아세테이트 가용성 분획부만을 모은 후 이를 감압건조하여 에틸아세테이트 가용추출물 분말 2.4 g, 4.8%을 얻었다. 또한 수가용성 분획부도 따로 모아 이를 감압건조하여 수가용추출물 분말 6 g, 12%을 얻었다.

[0015] **실시예 1**: 구멍쇠미역 추출물과 분획물의 아세틸콜린에스테라제 활성 저해 효과

[0016] 시료제조예1 내지 2에서 얻어진 구멍쇠미역 추출물들에 대하여 아세틸콜린에스테라제 활성저해효과를 측정하였다.

[0017] AChE 활성측정법은 acetylthiocholine을 기질로 사용하는 Ellman 방법을 변형하여 분석하였다. 96 well micropalte에 0.1M phosphate buffer(pH 8.0) 50 μL에 sample 10 μL, enzyme 10 μL 첨가하고, substrate solution 70 μL(500 μM Acetylthiocholine iodide, 1 mM dithiobisnitrobenzoic acid(DTNB)를 첨가 한 후

405nm에서 ELISA reader로 측정하였다.

[0018] 아세틸콜린에스테라제 저해능은 다음의 수학식 1에 의해 계산되었다.

[0019] 수학식 1

[0020] 억제율(%)=((SC-SR)/(EC-ER))x100

[0021] EC: enzyme control

[0022] ER: enzyme reaction

[0023] SC: sample control

[0024] SR: sample reaction

[0025] 도 1에서 보듯이, 구멍쇠미역 추출물은 우수한 아세틸콜린에스테라제 저해활성을 나타내었다. 구멍쇠미역 에틸아세테이트 분획물은 농도의존적인 저해활성을 보였고 IC_{50}값은 2.65 μg/mL 임을 확인할 수 있었다.

[0026] **실시예 2**: 구멍쇠미역 분획물의 β-세크레타제의 활성저해효과

[0027] 가. APP Stable cell 만들기

[0028] Human APP(amyloid precursor protein) swedish mutants (K670N, M671L)를 발현하는 plasmid를 HEK293T cells에 transection한다. 약 12 시간 후에 600 ㎍/ml 의 G418이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) media로 교환하여 배양한다. Colony를 형성한 cell만을 48-well plate 각 well에 옮겨 배양하며, 성장된 cell은 12-well plate에 옮겨 600 ㎍/ml 농도의 G418이 첨가된 DMEM media에서 선별 배양한다. 다시 60 mm dish를 거쳐 100 mm dish로 계대 배양 하면서 media내 G418의 농도를 200 ㎍/ml로 낮추어 선별 배양하였다. 이를 통하여 만들어진 stable colony는 western-blotting을 통해 swAPP 단백질을 발현 여부와 배양액에서의 amyloid-beta 1-40/1-42의 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; Biosource, USA)를 통하여 확인하였다.

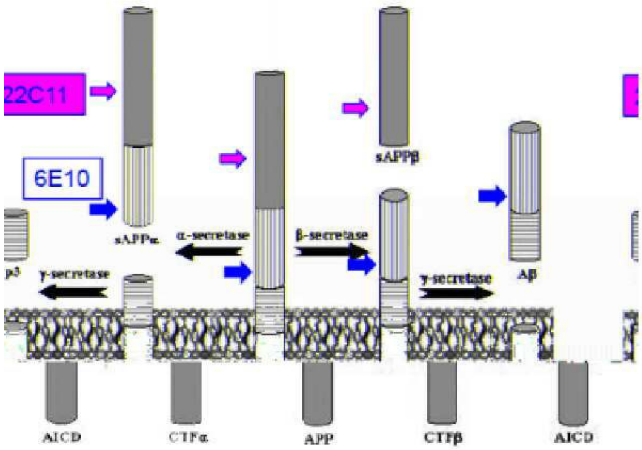
[0029] 나. Cell culture 및 구멍쇠미역 추출물의 처리

[0030] swAPP HEK293T stable cell을 10% FBS (Fetal bovine serum) 와 antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM media에 넣어 배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 배양한다. 12-well plate에 70-80% confluent 하게 cell을 깔아준 후, 다음날 DPBS로 한번 씻어준 후, 1% FBS를 넣은 DMEM media를 각 well에 1 ml씩 넣어준다. 구멍쇠미역 추출물을 10 ㎍/ml (1/10), 1 ㎍/ml (1/100) 의 농도가 되도록 1% FBS를 첨가한 DMEM media 에 dilution 하여 각 well에 처리한다. 12 시간 후, media를 수거하여 western-blotting 하였다.

[0031] 다. Gel electrophoresis and western blotting

[0032]

[0033] 구멍쇠미역 추출물을 처리한 media (20 ㎕)를 8% Tris-glycine gel에 loading한다. 100V에서 약 2시간 전기영동 한 후, gel을 PVDF membrane 에 100V 에서 1 시간 transfer 한 후 5% skim milk로 1시간 동안 상온에서 blocking한다. TBS-T(Tris buffered salin with Tween20)으로 3회 씻어준 후, membrane은 primary antibody (22C11 or 6E10)와 over-night 반응시킨다. TBST로 3회 씻어준 후, secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated Ig anti-mouse antibody)로 상온에서 1시간 반응 시킨 다음 TBST로 3회 씻어준다. Detection은 ECL (Enhanced chemiluminescence)과 Agfa CP-Bu film을 이용하여 확인하였다. detection한 필름은 Image J software (NIH, USA)를 이용하여 정량화 하였다. Western blot에 사용한 항체는 22C11 (for total soluble APP)와 6E10 (for soluble APP alpha form)이며, 그 원리는 다음 그림과 같다.



[0034]

[0035] 그림 1. APP (amyloid precursor protein)의 processing과 그 확인 방법. 위쪽의 sAPP (soluble APP)는 extracellular space로 secretion된다. 이는 22C11 항체를 통해서는 total sAPP (sAPP alpha + sAPP beta)를 검출할 수 있으며, 6E10 항체는 sAPP alpha만 검출할 수 있다. 따라서 beta-secretase가 저해된다면, sAPP alpha / sAPP beta의 비율이 증가하게 된다.

[0036] β-세크레타제 활성 저해능은 다음의 수학식 2에 의해 계산되었다.

[0037] 수학식 2

[0038] sAPP cleavage pattern=sAPPα/total sAPPs

[0039] sAPPα: 6E10 antibody

[0040] total sAPPs: 22C11 antibody

[0041] 도 2는 구멍쇠미역 분획물들의 농도에 따른 sAPP cleavage pattern을 분석한 그래프이다. sAPP total (22C11)과 sAPPalpha(6E10)의 ratio를 기준으로 sAPP cleavage pattern을 분석하였으며 Total sAPP는 alpha-와 beta-form으로 이루어지므로 alpha-form의 증가는 beta-form의 감소를 나타낸다. Control group(CTL)의 alpha/total을 1로 보았을 때, 각각의 ratio를 통해 분석해 본 결과 구멍쇠미역 에틸아세테이트 분획물이 우수한 저해 효과를 나타내었다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 구멍쇠미역 추출물 및 분획물의 아세틸콜린에스테라제 활성저해효과를 나타낸 도이다.

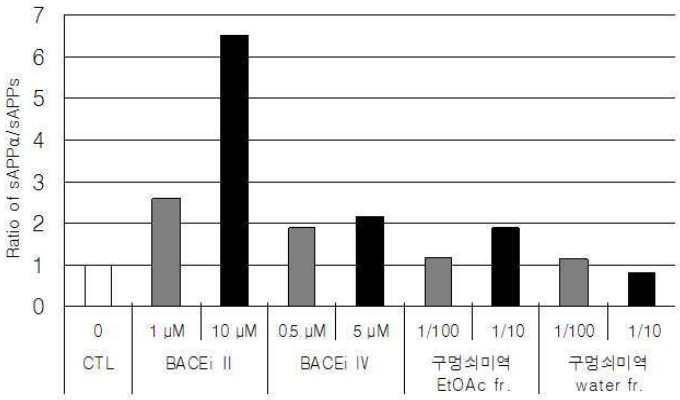
[0043] 도 2,3은 구멍쇠미역 추출물 처리 후의 BACE inhibition 정도의 측정을 한 도이다.

도면

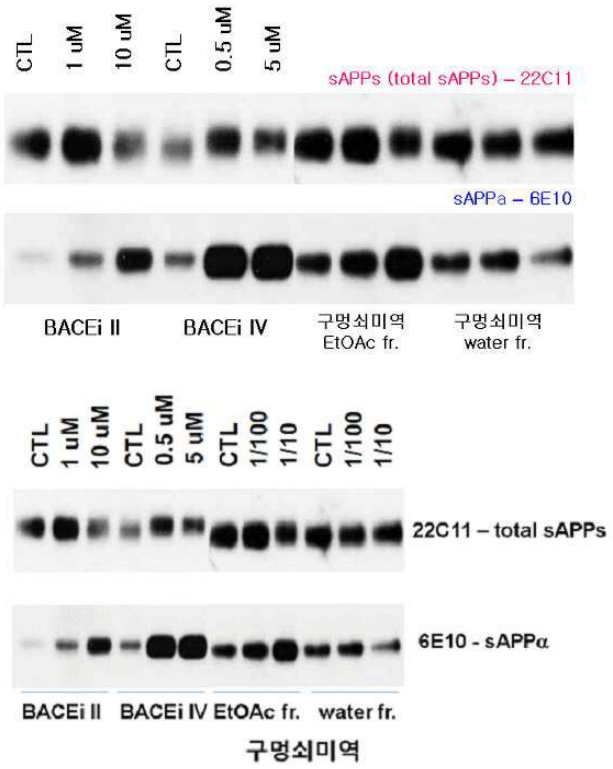
도면1

Sample	Concentration (μg/mL)	Inhibition (%)	IC_{50} (μg/mL)[1)]
구멍쇠미역 에탄올 추출물	20	20.4±0.9	-
구멍쇠미역 에틸아세테이트 분획물	2 5 20	46.4±1.4 57.4±4.2 66.4±5.5	2.65
구멍쇠미역 물 분획물	20	47.7±0.63	-
Galanatamine	0.02 0.1 0.2	35.3±5.9 47.7±0.8 57.4±0.7	0.134

도면2


Ratio of sAPPα/sAPPs
7
6
5
4
3
2
1
0
0
CTL
1 μM
10 μM
BACEi II
0.5 μM
5 μM
BACEi IV
1/100
1/10
구멍쇠미역
EtOAc fr.
1/100
1/10
구멍쇠미역
water fr.

도면3


CTL
1 uM
10 uM
CTL
0.5 uM
5 uM
sAPPs (total sAPPs) – 22C11
sAPPa – 6E10
BACEi II
BACEi IV
구멍쇠미역
EtOAc fr.
구멍쇠미역
water fr.
CTL
1 uM
10 uM
CTL
0.5 uM
5 uM
CTL
1/100
1/10
CTL
1/100
1/10
22C11 – total sAPPs
6E10 - sAPPα
BACEi II
BACEi IV
EtOAc fr.
water fr.
구멍쇠미역