

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2012년 4월 12일 (12.04.2012)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/046993 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/73 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/007314
- (22) 국제출원일: 2011년 10월 4일 (04.10.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0096417 2010년 10월 4일 (04.10.2010) KR
10-2011-0100670 2011년 10월 4일 (04.10.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한
국한의학연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIEN-
TAL MEDICINE) [KR/KR]; 대전시 유성구 전민동
461-24, 305-811 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 곽
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 전원경 (JEON, Won
Kyung) [KR/KR]; 서울시 도봉구 창동 주공아파트
405 동 410 호, 132-040 Seoul (KR). 한정수 (HAN,
Jung-Soo) [KR/KR]; 서울시 강동구 길동 삼익파크아

파트 508 동 106 호, 134-765 Seoul (KR). 한창현 (HAN,
Chang Hyun) [KR/KR]; 대전시 유성구 전민동 삼성푸
른아파트 112 동 307 호, 305-727 Daejeon (KR). 최교야
(CHOI, Goya) [KR/KR]; 대전시 서구 탄방동 1337 번
지 203 호, 302-861 Daejeon (KR).

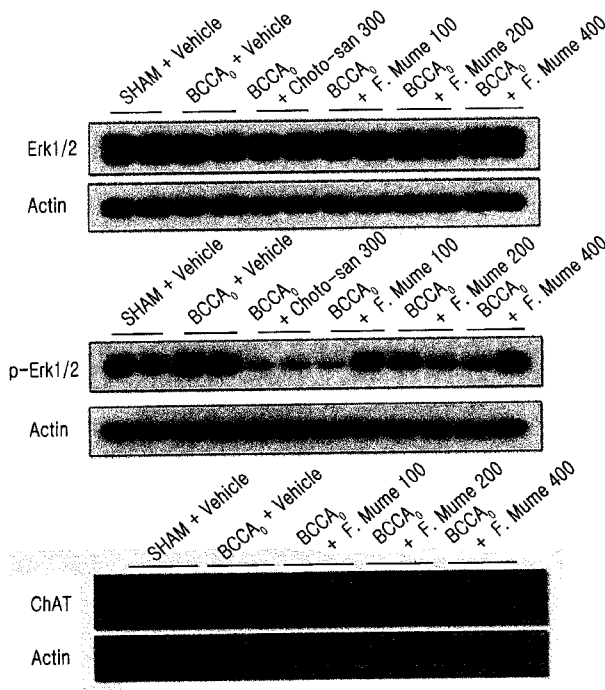
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 서울시 강남구 역삼
동 642-16 성지하이츠 2 차 8 층, 135-080 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, 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, QA, RO, RS, RU, RW, 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
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING DEMENTIA CONTAINING PRUNUS MUME EXTRACT

(54) 발명의 명칭: 오매 추출물을 함유하는 치매 예방 또는 치료용 조성물

[도 4a]



(57) Abstract: The present invention relates to a composi-
tion for preventing or treating dementia containing an ex-
tract of *Prunus mume* (*Fructus mume*), and the *Prunus*
mume extract of the present invention has outstanding ef-
fects in improving spatial recognition ability and in nor-
malising hippocampal damage (normalising ERK phospho-
rylation, increasing ChAT and normalising NF-kappa B)
induced by chronic vascular brain damage in a vascular de-
mentia animal model, and hence can be used to advantage
as a medicinal product for preventing or treating dementia
diseases and as a functional health food for preventing or
alleviating dementia diseases that accompany vascular
brain damage such as vascular dementia.

(57) 요약서: 본 발명은 오매(*Fructus Mume*)의 추출물
을 함유하는 치매의 예방 또는 치료용 조성물에 관한
것으로, 본 발명의 오매 추출물이 혈관성 치매 동물모
델에서 만성 혈관성 뇌손상에 의해 유도된 해마 손상
의 정상화(ERK 인산화 정상화, ChAT 증가, NF-kappa B
정상화) 효과 및 공간기억능력 개선 효과가 우수하므
로 혈관성 치매 등과 같이 혈관성 뇌손상으로 수반되
는 치매 질환의 예방 또는 치료를 위한 의약품, 치매
질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 유용하게
사용될 수 있다.



ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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 (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】

오매 추출물을 함유하는 치매 예방 또는 치료용 조성물

5 【기술분야】

본 발명은 오매 추출물을 함유하는 치매 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

10 치매(dementia)는 직업, 사회생활 및 대인관계에서 정상적인 일상생활에 장애를 주는 정도로 기억장애가 있으면서 언어장애, 방향감각 상실, 계산력 저하, 성격 및 감정의 변화 등 4가지 중 1가지 이상이 나타날 때 치매로 진단된다. 치매는 정상적인 노화와는 구분해야 할 병적인 증상이며, 그 원인에 따라 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease), 혈관성 치매(vascular dementia), 기타
15 알콜 중독, 외상, 파킨슨병의 후유증이 원인이 되는 치매로 구별된다. 혈관성 치매는 주로 뇌경색 또는 뇌졸중 등이 발생하는 경우로 발병 부위 주변의 뇌세포가 손상을 입어 기억력 상실 등의 증상이 유발된다고 알려져 있다. 반면, 알츠하이머성 치매는 뇌세포 파괴에 의한 퇴행성 뇌질환으로, 초기에는 기억력 감퇴, 성격의 변화 및 사고력 저하 등의 증상을 보이며 서서히 진행되지만,
20 대부분의 환자는 8~10년 내에 폐렴 등으로 사망하는 것으로 알려져 있다. 최근의 역학 연구에 의하면 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 및 심장질환 등의 뇌혈관 질환의 위험인자들이 혈관성 치매뿐만 아니라 알츠하이머성 치매의 발병률을 증가시킨다는 보고는 있었지만, 아직까지 정확한 병인이나 치료법은 알려지지 않은 실정이다.

25 이에, 상기 병변 및 원인에 따른 작용기작별 치매 치료제로는 아세틸콜린 에스터레이즈 저해제, 항산화제, 소염제, 호르몬제제, 콜레스테롤 저해제 및 베타-아밀로이드 생성 차단제 등이 있다. 상기 아세틸콜린 에스터레이즈는 손상되지

않고 남아있는 콜린성 신경계의 활성을 증가시킴으로써 손상된 인지기능을 부분적으로 회복시키고자 하는 것이다.

2008년에 치매 환자는 약 40만명으로 추산된다. 급속한 고령화로 2010년에는 46만1000명, 2020년에는 69만3000명으로 급증할 것이란 분석도 나오고 있다. 특히 치매 환자가 늘어가는 만큼 국내 치매 치료제 시장 역시 이미 약 1,300억원 규모를 넘어설 정도로 가파른 상승곡선을 그리고 있다.

한편, 오매(烏梅, *Frutus Mume*)는 매실나무(*Prunus mume*)의 익지 않은 열매를 향아리에 넣고 뚜껑을 덮은 다음, 진흙으로 봉합하여 검게 될 때까지 가열한 것으로, 오래 된 기침과 가래를 멈추게 하고, 갈증 해소에 좋으며, 신경과민으로 가슴이 답답하고 소화가 잘 안 될 때 사용하면 좋다고 알려져 있다. 또한, 상기 오매는 면역기능, 항균작용, 혈당강하 효과가 있다고 알려져 있으며, 종래 오매에 대한 효능 연구는 오매 추출물을 포함하는 헬리코박터 필로리의 우라제 활성 억제 효과(대한민국 특허 공개 제2006-0040254호), 오매 추출물에서 분리한 베타 시토스테롤-O-D-글루코오스의 진통작용(대한민국 특허공개 제1998-0043925호), 오매 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 혈행개선 조성물(대한민국 특허공개 제2010-0042414호) 등이 있다. 또한 종래 매실, 둥글레, 갈근 및 계피 추출물을 가감한 가미사군자탕이 치매의 예방 및 치료에 효능이 있다는 연구가 있으나(대한민국 특허공개 제2005-0035906호) 상기 가미사군자탕에서 매실 추출물은 소화기능 및 당질대사를 촉진하여 뇌로 가는 에너지(포도당)의 공급을 원활하게 하여 뇌활성을 증가시키는 역할을 담당하고 있으며, 특유의 신맛으로 미감을 좋게 하는 역할을 한다고 보고되어 있어 매실 추출물에 의한 치매 예방 및 치료 효능은 보고한 바 없다. 또한 아직까지 매실을 가공한 오매 추출물 자체의 해마손상회복작용에 대한 연구는 보고된 바 없다.

이에, 본 발명자들은 오매 추출물이 혈관성 치매동물모델에서 기억공간능력을 정상화시키고 해마손상을 정상화시키는데 효능이 뛰어나 치매 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본

발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

5 본 발명의 목적은 오매(Frutus Mume) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

 본 발명의 다른 목적은 오매 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

10 【기술적 해결방법】

 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 오매(Frutus Mume) 추출물을 유효 성분으로 함유하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

 또한, 본 발명은 오매(Frutus Mume) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물을 제공한다.

15 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오매 추출물을 치매에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치매 치료방법을 제공한다.

 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 오매 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치매 예방방법을 제공한다.

20 또한, 본 발명은 치매 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조를 위한 오매 추출물의 용도를 제공한다.

 아울러, 본 발명은 치매의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품의 제조를 위한 오매 추출물의 용도를 제공한다.

 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

25 본 발명은 오매 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 오매 추출물은

1) 오매를 물, 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하는 단계; 및

2) 단계 1)의 추출물을 감압농축 및 건조시켜 건조분말을 수득하는 단계를 포함하는 제조 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 상기 방법에 한정되지 않는다.

상기 제조 방법에 있어서, 단계 1)에서는 오매는 매실나무의 익지 않은 열매를 향아리에 넣고 뚜껑을 덮은 다음, 진흙으로 봉합하여 검게 될 때까지 가열한 것으로, 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.

상기 제조 방법에 있어서, 단계 1)의 물은 증류수를 이용하는 것을 특징으로 하고, 알코올은 C₁ 내지 C₄의 저급 알코올을 이용하는 것을 특징으로 하며, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 한다. 추가적으로 유기물질은 100% 알코올에서 용출이 더 잘 되고 배당체는 알코올 수용액에서 용출이 더 잘되므로 필요에 따라 알코올 또는 알코올 수용액으로 선택하여 사용할 수 있다. 추출시 용매는 오매 분량의 2 내지 10 배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 3 내지 4배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 추출방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 여과 또는 초음파 추출 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용하며, 초음파 또는 열수 추출하는 것이 바람직하며, 초음파열병합 추출이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 추출시 용매의 온도는 20 °C ~ 100 °C인 것이 바람직하며, 95 °C인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출시간은 1 시간 내지 24 시간이 바람직하며, 2 시간이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 아울러, 추출 회수는 1 내지 5 회인 것이 바람직하며, 3 회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 제조 방법에 있어서, 단계 2)의 감압농축 및 건조과정은 당 업계에서 사용되는 통상의 방법에 의해 수행될 수 있다.

상기 치매는 혈관성 치매 또는 알츠하이머성 치매일 수 있으며, 바람직하게는 혈관성 치매인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 건조된 오매(2 kg)를

초음파열병합추출기(OM30-EP, SONIMEDI사)에 넣고 증류수 8 ℓ를 가하여 95 °C로 120 분간 추출하여 추출된 추출액을 탕약건조기(EXDRYER, SONIMEDI사)로 건조하여 오매 추출물을 제조하였다(수율 16.225 %).

또한 본 발명의 구체적인 실시예에서, 혈관성 치매 동물모델을 제작하기 위해 실험동물은 휘스터 래트이고, 만성 대뇌혈류 저하(Chronic cerebral hypoperfusion)는 양측 총경동맥 영구결찰(Bilateral common carotid artery occlusion, 2VO, 이하 "뇌손상(BCCAO)"로 명명함)로 유도하였다(Wakita *et al.*, 1994). 상기 제작된 동물 모델의 약물 경구 투여에 있어서 발명에 따른 오매 추출물 경구투여 농도는 저농도(100 mg/kg), 중농도(200 mg/kg)와 고농도(400 mg/kg)로 정하였고 조등산(釣藤散, Chotosan) (300 mg/kg) 대조약물 투여군, 모의시술군과 실험군으로 총 6 그룹을 적용하여 실험을 설계하였다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 오매 추출물의 혈관성 치매 동물 모델에서 행동검사를 통해 효과를 알아보기 위하여 혈관성 치매 동물 모델에 오매 추출물을 3 주간 투여하며 훈련 시도(training trial, 물에 입수하여 표식통을 찾아가는 능력)을 시행하였다. 수중미로에서 쥐의 공간기억 수행 결과 뇌손상군(BCCAO)에 비교하여 오매 추출물 투여군은 해마 의존적 학습의 습득 장애를 보였다(도 1). 모의시술군은 뇌손상군(BCCAO)에 비해 수중 공간기억 과제를 잘 수행하였다. 실시예 1의 오매 추출물을 처리한 오매 추출물 투여군의 경우 실시예 1의 추출물 200 mg/kg 투여군이 거의 대조군 수준의 좋은 수행을 보이는 것으로 나타났다. 통계검증 결과, 집단 간 차이는 있었고 ($F(5,53) = 8.26$, $p = 0.000$) 훈련 시행이 증가함에 따라서 숨겨진 플랫폼을 찾아 가는 속도는 빨라졌다($F(3,159) = 98.48$, $p = 0.000$). 집단 간에 차이를 알기 위한 사후 분석(post hoc)에 의하면, BCCAO 집단과 비교하여, 오매 200 mg/kg을 투여받은 동물은 현저하게 공간기억 학습을 잘하였다($p = 0.027$). 따라서 본 발명에 따른 오매 추출물은 기억공간능력을 효과적으로 정상화할 수 있으므로 치매 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 두 번의 시험 시행(probe trial)은 결과에서도 뇌손상군(BCCAO)은 모의 시술군에 비해서 현저하게 플랫폼의 위치를 잘 기억하지

못하였다($F(5,53) = 7.05, p = 0.000$)(도 2). 4 일과 8 일 훈련 후에 시행한 시험시행에서 뇌손상(BCCAO) 및 오매 추출물 200 mg/kg 투여군은 모의시술군에 비해서 플랫폼의 크기의 5 배 정도에 영역에서 수영을 현저하게 적게 하였다($p=0.014$, first probe trial). 따라서, 본 발명에 따른 오매 추출물은 기억 능력을 증진시킴을 나타낸다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 신경생물학적 지표검사(*in vivo*)를 실시하였다. 도 4a는 웨스턴 블로팅 결과이고 도 4b는 상기 웨스턴 블로팅 결과를 나타내는 그래프로서 본 발명에 따른 오매 추출물의 해마 손상의 정상화(ERK(Extracellular signal-regulated kinase; ERK) 인산화 정상화, ChAT 증가) 효과를 나타내는 그래프이다. 도 4c는 웨스턴 블로팅 결과이고 도 4d는 상기 웨스턴 블로팅 결과를 나타내는 그래프로서 본 발명에 따른 오매 추출물의 해마 손상의 정상화(NF-kappa B의 수준이 정상화) 효과를 나타내는 그래프이다. 뇌손상군(BCCAO)은 모의 시술군과 비교하여 ERK의 수준에 차이는 없으나, ERK 인산화가 상당히 높았다. 오매 추출물 처리에 의하여 ERK 인산화 정도가 유의하게 감소되었다 ($p<0.05$). 뇌손상군 (BCCAO)의 해마의 ChAT(choline acetyltransferase, 아세틸콜린의 생성에 사용되는 효소)는 모의 시술군에 비하여 감소하였고 감소된 ChAT의 수준은 오매 추출물의 투여에 의하여 정상화되었다. 오매 추출물 처리에 의하여 NF-kappa B의 수준이 정상화되었다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 조직학적 지표검사(*in vivo*)를 실시하였다. 해마의 마이크로글리아 세포를 탐지하기 위하여 단일클론항체 Iba-1(ionized calcium-binding adaptor molecule)를 사용하였다. 이 Iba-1은 마이크로글리아 세포와 마이크로페이즈(microphases)에 발현한다. 도 5는 오매 추출물 처리에 따른 해마 내의 마이크로글리아 세포수의 변화를 나타낸다. 도 5a는 조직면역염색의 결과이고, 도 5b는 상기 조직면역염색 결과를 나타내는 그래프이다. 뇌손상군 (BCCAO)은 모의 시술군과 비교하여 마이크로글리아 세포수가 상당히 높았다. 오매 추출물 200mg/kg 처리에 의하여 마이크로글리아세포 발현 정도가 유의하게 감소되었다 ($p < 0.05$).

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 오매 추출물의 독성 여부를 알아보기 위해 체중변화를 실험기간 동안 측정하였다. 뇌손상(BCCAO)에 의한 체중이 모의 시술군만큼 증가하지 않았지만, 전반적으로 오매 추출물의 투여는 체중 변화에 영향을 주지 않았다(도 6). 따라서 본 발명에 따른 추출물은 독성을 나타내지 않았으므로 치매 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

따라서, 본 발명에 따른 오매 추출물은 손상된 해마를 효과적으로 정상화할 수 있고, 독성이 없으므로 치매 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

상기 예방 또는 치료용 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연질캡셀제, 환 등이 포함된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제로는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 멸균된 수용액, 액제, 비수성용제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사제제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용 약학적 조성물을 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 예방 또는 치료용 조성물은 통상적으로 사용되는 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 활택제, 향미제 및 희석제등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 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 광물유를 들 수 있다. 상기 봉해제로는 전분글리콜산나트륨, 크로스포비돈, 크로스카멜로스나트륨, 알긴산, 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 카르복시 메틸셀룰로오스 나트륨, 키토산, 구아검, 저치환도히드록시프로필셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 폴라크릴린 칼륨 등이 있다.

또한, 본 발명에 따른 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨, 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용가능한 첨가제는 상기 약학적 조성물에 대해 0.1~90 중량부 포함되는 것이 바람직하다.

본 발명의 예방 또는 치료용 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 오매 추출물을 0.0001 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 포함한다.

또한, 본 발명의 예방 또는 치료용 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 오매 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

상기 오매 추출물은 치매 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분인 오매

추출물과 같은 방법으로 제조할 수 있다.

상기 치매는 혈관성 치매 또는 알츠하이머성 치매일 수 있으며, 바람직하게는 혈관성 치매인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 상기 오매 추출물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는
5 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 조성물이 원료에 대하여 0.2 내지 20 중량%, 바람직하게는 0.24 내지 10 중량%로 첨가한다. 그러나
10 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.

본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은
15 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 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 건강식품 100 중량부당 0.01~0.04 중량부,
바람직하게는 약 0.02~0.03 중량부 범위에서 선택하는 것이 바람직하다.

20 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.

25 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서
5 선택되는 것이 일반적이다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 오매 추출물을 치매에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 치매 치료 방법을 제공한다.

아울러, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 오매 추출물을 개체에
10 투여하는 단계를 포함하는 치매 예방 방법을 제공한다.

상기 치매는 혈관성 치매 또는 알츠하이머성 치매일 수 있다.

상기 개체는 인간을 포함한 모든 동물이 가능하다.

상기 오매 추출물은 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

15 상기 투여는 경구 투여, 또는 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통한 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

상기 투여 단위는, 개별 투여량의 1, 2, 3 또는 4 배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4 배를 함유할 수 있다. 개별 투여량은 바람직하기로는 유효 약물이 1 회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4
20 배에 해당한다. 유효용량은 0.0001 ~ 10 g/kg이고, 바람직하기로는 0.0001 g ~ 5 g/kg이며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다.

【유리한 효과】

본 발명에 따른 오매 추출물은 혈관성 치매 동물모델에서 만성 혈관성
25 뇌손상에 의해 유도된 해마 손상의 정상화 (ERK 인산화 정상화, ChAT 증가, NF-kappa B 정상화) 효과 및 공간기억능력 개선 효과가 우수하므로 혈관성 치매 등과 같이 혈관성 뇌손상으로 수반되는 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수

있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 수행 횟수(Sessions)에 따라 도피에 소요되는 거리(Search Error)로 나타내는 그래프로서 본 발명에 따른 오매 추출물의 공간기억능력 정상화 효과를 나타낸 그래프이다.

SHAM + Vehicle; 모의 시술군

BCCA₀ + Vehicle; 뇌손상군

BCCA₀ + Choto-san 300; 뇌손상군에 조등산(Choto-san) 300 mg/kg을 처리한

10 군

BCCA₀ + F. Mume 100; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 100 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 200; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 200 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 400; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 400 mg/kg을 처리한 군

도 2는 두 번의 시험 시행(probe trial)에서 시험플랫폼 영역에서 머무른 정도(% Time in Target Counter)로 나타내는 그래프로서 본 발명에 따른 오매 추출물의 공간기억능력 정상화 효과를 나타내는 그래프이다.

SHAM + Vehicle; 모의 시술군

BCCA₀ + Vehicle; 뇌손상군

BCCA₀ + Choto-san 300; 뇌손상군에 조등산(Choto-san) 300 mg/kg을 처리한

20 군

BCCA₀ + F. Mume 100; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 100 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 200; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 200 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 400; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 400 mg/kg을 처리한 군

도 3은 수행 횟수(Sessions)에 따른 평균수영속도(swimming speed; m/sec)를 나타낸 그래프로서 뇌손상으로 인한 운동 장애가 없음을 나타내는 그래프이다.

SHAM + Vehicle; 모의 시술군

BCCA₀ + Vehicle; 뇌손상군

BCCA₀ + Choto-san 300; 뇌손상군에 조등산(Choto-san) 300 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 100; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 100 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 200; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 200 mg/kg을 처리한 군

5 BCCA₀ + F. Mume 400; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 400 mg/kg을 처리한 군

도 4a는 웨스턴 블로팅 결과이고 도 4b는 상기 웨스턴 블로팅 결과를 나타내는 그래프로서 본 발명에 따른 오매 추출물의 해마 손상의 정상화(ERK(Extracellular signal-regulated kinase; ERK) 인산화 정상화, ChAT 증가) 효과를 나타내는 그래프이다.

10 SHAM + Vehicle; 모의 시술군

BCCA₀ + Vehicle; 뇌손상군

BCCA₀ + Choto-san 300; 뇌손상군에 조등산(Choto-san) 300 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 100; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 100 mg/kg을 처리한 군

15 BCCA₀ + F. Mume 200; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 200 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 400; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 400 mg/kg을 처리한 군

도 4c는 웨스턴 블로팅 결과이고 도 4d는 상기 웨스턴 블로팅 결과를 나타내는 그래프로서 본 발명에 따른 오매 추출물의 해마 손상의 정상화(NF-kappa B의 수준이 정상화) 효과를 나타내는 그래프이다.

20 SHAM + Vehicle; 모의 시술군

BCCA₀ + Vehicle; 뇌손상군

BCCA₀ + Choto-san 300; 뇌손상군에 조등산(Choto-san) 300 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 200; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 200 mg/kg을 처리한 군

25 도 5a는 면역조직염색 결과이고 도 5b는 상기 면역조직염색 결과를 나타내는 그래프로서 본 발명에 따른 오매 추출물의 해마 손상의 정상화 (마이크로글리아 발현 억제) 효과를 나타내는 그래프이다.

CA 1; 해마의 암몬각(Cornus Ammonis) 1

CA 3; 해마의 암몬각(Cornus Ammonis) 3

DG; 해마의 치상회(dentate gyrus)

SHAM + Vehicle; 모의 시술군

5 BCCA₀ + Vehicle; 뇌손상군

BCCA₀ + Choto-san 300; 뇌손상군에 조등산(Choto-san) 300 mg/kg을 처리한

군

BCCA₀ + F. Mume 200; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 200 mg/kg을 처리한 군

도 6은 오매 추출물의 처리에 의한 체중 변화를 나타내는 그래프이다.

10 SHAM + Vehicle; 모의 시술군

BCCA₀ + Vehicle; 뇌손상군

BCCA₀ + Choto-san 300; 뇌손상군에 조등산(Choto-san) 300 mg/kg을 처리한

군

BCCA₀ + F. Mume 100; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 100 mg/kg을 처리한 군

15 BCCA₀ + F. Mume 200; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 200 mg/kg을 처리한 군

BCCA₀ + F. Mume 400; 뇌손상군에 오매(F. Mume) 400 mg/kg을 처리한 군

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세히 설명한다.

20 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 한정되는 것은 아니다.

【실시예 1】

오매 추출물의 제조

25 본 실험에 사용한 오매는 광명당(울산소재)에서 구입하여 한국한의학연구원 한약품질검사팀에서 외부형태를 비교 검사하여 확인한 후 실험에 사용하였다. 건조된 오매(2 kg)를 초음파열병합추출기(OM30-EP, SONIMEDI사)에 넣고 증류수 8 ℓ

를 가하여 95 °C로 120 분간 추출하였다. 상기 추출액을 탕약건조기(EXDRYER, SONIMEDI사)에 넣고 -95 kPa 이하, 80 °C로 48 시간 건조하여 오매 추출물을 제조하였다(수율 16.225 %).

5 【실시예 2】

혈관성 치매 동물모델 제작 및 약물 경구 투여(*in vivo*)

<2-1> 혈관성 치매 동물모델 제작

본 발명의 오매 추출물의 혈관성 치매 진행 억제 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 본 실험에 사용한 실험동물은 12 주령의 350-400 g의 휘스터 래트(Wister rat)를 사용하였다. 실험동물 입수 후 외관을 육안으로 검사한 다음 7 일간의 순화 기간 동안 일반 증상을 관찰하여 건강한 동물을 선발하여 체중 범위에 따른 무작위법에 의하여 군 분리를 실시한 후 실험을 수행하였다. 순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수는 시간당 12~16 회, 조명은 12 시간 명암주기 (점등 7:00, 소등 19:00), 조도는 150 ~300 Lx로 조정하여 시험 전 기간 동안 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 소독된 기구를 사용하여 실험을 실시하였다. 물과 고형사료 (PMI nutrition, USA)는 24 시간 동안 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 혈관성 치매 동물모델을 제작하기 위해 만성 대뇌혈류 저하(Chronic cerebral hypoperfusion)는 양측 총경동맥 영구결찰(Bilateral common carotid artery occlusion; 2VO, 이하 "뇌손상(BCCAO)"로 명명함)로 유도하였다(Wakita *et al.*, 1994). 간단히 요약하면, 흰쥐를 4 % 이소플루란(isoflurane)으로 마취를 유도하고, 수술하는 동안에는 1.5 % 이소플루란(isoflurane)으로 마취를 유지하였다. 경중부를 절개하고 미주 신경이 손상 받지 않도록 주의하여 양쪽 총경동맥 노출시키고 3번 실크로 두 번 결찰시켰다.

25 <2-2> 혈관성 치매 동물모델에 약물 경구 투여

약물 투여 실험군은 휘스터 래트(Wistar rat)에 오매 추출물을 BCCAO를 시술한 후 20 일이 경과한 다음부터 경구 투여하였다. 총 6 군의 집단을 가지며 각 군

별 16 마리로 실험하였다. 예비실험의 결과에 의하면 약 40 %의 쥐가 시각 장애를 가지므로 행동검사 즉 수중미로 검사 1 주일 전에 셔틀박스(shuttle Box)를 사용하여 블라인드 그룹(Blind group)과 비-블라인드 그룹(non-Blind group)으로 분류하였다. 블라인드 그룹의 쥐는 42 일 동안 경구 투여하였고, 기억 검사를 한 비-블라인드 그룹의 쥐는 42 일 동안 경구 투여하였다.

【표 1】

그룹	인지기능 검증 (마리)	몸무게 변화 및 신경생물학적 검증 (마리)
모의 시술군	8	16
뇌손상군(BCCAO)	8	16
뇌손상군(BCCAO) + 조등산(Chotosan) 300 mg/kg	8	15
뇌손상군(BCCAO) + 오매 100 mg/kg	8	14
뇌손상군(BCCAO) + 오매 200 mg/kg	7	14
뇌손상군(BCCAO) + 오매 400 mg/kg	8	15

표 1은 인지기능 검증을 나타낸 것이다. 본 발명에 따른 오매 추출물 경구 투여 농도는 저농도(100 mg/kg), 중농도(200 mg/kg)와 고농도(400 mg/kg)로 정하였고 조등산(Chotosan) (300 mg/kg) 대조약물 투여군, 모의시술군과 실험군으로 총 6 그룹을 적용하여 실험을 설계하였다.

【실시예 3】

혈관성 치매 동물 모델에서 공간기억수행검사(*in vivo*)

본 발명에 따른 오매 추출물의 혈관성 치매 동물 모델에서 행동검사를 통해 효과를 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 행동검사는 수중미로시험을 통하여 수행하였다. 빛이 물에 비치지 않게 사방에 칸막이를 설치하고 원형 물탱크 (지름 183 cm, 높이 58 cm)에 온도 26 ± 2 °C의 물을 표식통

위 2 cm 정도까지 채우고 색소를 넣어 바닥이 비치지 않게 만든다. 또한 칸막이의 특정위치에 표식을 부착하여 래트가 표식통을 찾아가기 위한 단서를 제공한다. 물탱크의 특정한 곳에 표식통(지름 12 cm, 높이 33.5 cm)을 위치시키고, 래트를 입수시켜 살아남기 위해 헤엄쳐 표식통을 찾아가게 고안되었다. 래트가 입수 후

5 표식통을 찾아 갈 때까지 소요되는 시간, 거리, 속도를 측정하여 기억의 지표(marker)로 삼았다. 실시예 1의 오매 추출물을 3 주간 투여하며 훈련 시도(training trial, 물에 입수하여 표식통을 찾아가는 능력)를 시행하였다. 훈련 이후 측정하는 것이 아니라, 훈련하는 것과 동시에 래트의 움직임을 추적하여 시간과 거리 등을 측정하므로, 그룹 별로 날마다 단축되는 시간과 거리 등을

10 비교한다. 즉, 시간과 거리가 빠르게, 많이 단축될수록 더욱 학습이 잘되었다고 추측할 수 있다. 훈련 시도는 총 8 일간 오전 시간을 이용하여 (오전 9시부터) 1 일 1 회씩 총 8 회 시행하였다. 실시예 1의 오매 추출물의 장기간 경구투여에 따른 공간기억 능력 평가를 실시하였는데, 인지 능력 평가 (공간기억 능력)는 하루에 4 번 훈련을 시켰고 총 8 일에 걸쳐서 훈련이 있었고 시험 시행이 4 일과 8

15 일 마지막 시행 후에 실시하였다. 또한 일주일 후에 단서 훈련(cued training)을 실시(하루에 6 번 시행)하였다.

수중미로에서 쥐의 공간기억 수행 결과 뇌손상군(BCCAO)에 비교하여 오매추출물 투여군은 해마 의존적 학습의 습득 장애를 보였다(도 1). 모의시술군은 뇌손상군(BCCAO)에 비해 수중 공간기억 과제를 잘 수행하였다.

20 실시예 1의 오매 추출물을 처리한 오매추출물 투여군의 경우 실시예 1의 추출물 200 mg/kg 투여군이 거의 대조군 수준의 좋은 수행을 보이는 것으로 나타났다. 통계검증 결과, 집단 간 차이는 있었고 ($F(5,53) = 8.26$, $p = 0.000$) 훈련 시행이 증가함에 따라서 숨겨진 플랫폼을 찾아 가는 속도는 빨라졌다($F(3,159) = 98.48$, $p = 0.000$). 집단 간에 차이를 알기 위한 사후 분석(post hoc)에 의하면, BCCAO

25 집단과 비교하여, 오매 200 mg/kg을 투여받은 동물은 현저하게 공간기억 학습을 잘하였다($p = 0.027$). 따라서 본 발명에 따른 오매 추출물은 기억공간능력을 효과적으로 정상화할 수 있으므로 치매 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

두 번의 시험 시행(probe trial)은 결과에서도 뇌손상군(BCCAO)은 모의 시술군에 비해서 현저하게 플랫폼의 위치를 잘 기억하지 못하였다($F(5,53) = 7.05$, $p = 0.000$)(도 2). 4 일과 8 일 훈련 후에 시행한 시험시행에서 뇌손상(BCCAO) 및 오매 추출물 200 mg/kg 투여군은 모의시술군에 비해서 플랫폼의 크기의 5 배 정도에 영역에서 수영을 현저하게 적게 하였다($p=0.014$, first probe trial). 따라서, 본 발명에 따른 오매 추출물은 기억 능력을 증진시킴을 나타낸다.

수중미로 훈련기간 중에 평균 수영속도는 집단 간에 차이를 보이지 않았다(도 3). 이는 모든 집단에서 운동 장애가 없음을 나타낸다.

【표 2】

그룹	지체(sec)
모의 시술군	10.80
뇌손상군(BCCAO)	16.13
뇌손상군(BCCAO) + 조등산(Chotosan) 300 mg/kg	26.15
뇌손상군(BCCAO) + 오매 100 mg/kg	21.66
뇌손상군(BCCAO) + 오매 200 mg/kg	9.84
뇌손상군(BCCAO) + 오매 400 mg/kg	21.50

표 2는 단서 훈련(cued training)의 결과이다. 플랫폼의 색깔을 검게 하고 수면 위에 있게 함으로서 래트가 플랫폼을 쉽게 볼 수 있다. 이 과제에 장애가 있는 개체는 운동능력 또는 단순 운동학습(striatum) 습득 장애를 보였다고 할 수 있다. 6 번의 단서 훈련(cued training)에서는 집단 간 차이가 있었다. 오매 200 mg/kg을 투여받은 투여군은 거의 모의 시술군과 유사한 정도의 수행 수준을 보였다.

【실시예 4】

혈관성 치매 동물 모델에서 신경생물학적 지표검사(*in vivo*)

실험을 종료 한 다음 뇌 해마 조직(Hippocampus)을 급속 냉동한 후 초저온 냉장고 (-80°C)에 보관 사용하였다. 급속 냉동 보관된 쥐의 뇌 조직을 얼음 위에서 녹인 후 차가운 단백질 추출 완충액(1 M Tris[pH7.5], 0.5 M EDTA, 1 M KCl,

Glycerol 100 %, 100 nM Dithiothreitol, proteinase inhibitor)를 첨가하여 8 분간 균질화하였다. 조직을 1 시간 동안 초원심분리 (14,000 rpm, 4 °C, vacuum) 시킨 후 시험관 상층부의 액체를 수집하였다. 브래드포드 방법(Bradford method)으로 각 단백질 양을 분석한 후에 시료 완충액(sample buffer)로 단백질을 안정화시켰다. 각각의 단백질 샘플을 SDS-폴리아크릴아마이드 겔을 통해 100 V에서 전기영동시켜 얻어진 단백질 밴드를 100 V, 400 mA에서 이동 장치(Transfer unit)을 이용하여 1시간 동안 PVDF(polyvinylidene fluoride) 막으로 단백질을 이동시켰다. 그 후 TBST로 1 회 세척하고 5 % 탈지 우유로 블로킹(1 시간, 상온)하였다. 다시 TBST로 3 회 세척(10 분/회)하고 각각 ERK 1차 항체(p44/42 mapkinase antibody (cell signaling, #9102)), pERK 1차 항체(phospho-p44/42 MAPK antibody (cell signaling, #9101S)), ChAT 1차 항체 (Chemicon, lot0512017589), NF-kappa B p65 1차 항체(Upstate Biotechnology), I κ B α 1차 항체, β -actin 1차 항체(sigma)를 5 % 탈지 우유에 1:1000으로 희석하여 사용하였고 4 °C에서 밤새 두었다. 다음날 TBST로 3회 세척(10분/회)한 후 Anti-rabbit IgG 2차 항체(Amersham)를 5 % 탈지 우유에 1:5000으로 희석하여 1 시간 동안 상온에서 처리하였다. 마지막으로 TBST 3 회 세척(10 분/회)한 후 ECL 용액으로 반응시킨 뒤, 필름에 현상하였다.

도 4는 오매 추출물 처리에 따른 ERK(Extracellular signal-regulated kinase; ERK) 인산화, ChAT(choline acetyltransferase; ChAT), I κ B(Inhibitor of κ B), NF-kappa B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NF-kappa B)의 변화를 나타낸다. 도 4a는 웨스턴 블로팅 결과이고 도 4b는 상기 웨스턴 블로팅 결과를 나타내는 그래프로서 본 발명에 따른 오매 추출물의 해마 손상의 정상화(ERK(Extracellular signal-regulated kinase; ERK) 인산화 정상화, ChAT 증가) 효과를 나타내는 그래프이다. 도 4c는 웨스턴 블로팅 결과이고 도 4d는 상기 웨스턴 블로팅 결과를 나타내는 그래프로서 본 발명에 따른 오매 추출물의 해마 손상의 정상화(NF-kappa B의 수준이 정상화) 효과를 나타내는 그래프이다. 뇌손상군(BCCAO)은 모의 시술군과 비교하여 ERK의 수준에 차이는

없으나, ERK 인산화가 상당히 높았다. 오매 추출물 처리에 의하여 ERK 인산화 정도가 유의하게 감소되었다 ($p < 0.05$). 뇌손상군 (BCCAO)의 해마의 ChAT(choline acetyltransferase, 아세틸콜린의 생성에 사용되는 효소)는 모의 시술군에 비하여 감소하였고 감소된 ChAT의 수준은 오매 추출물의 투여에 의하여 정상화되었다.

5 오매 추출물 처리에 의하여 NF-kappa B의 수준이 정상화 되었다.

따라서, 본 발명에 따른 오매 추출물은 손상된 해마를 효과적으로 정상화할 수 있으므로 치매예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

【실시예 5】

10 혈관성 치매 동물 모델에서 조직학적 지표검사(*in vivo*)

조직학적 지표검사에 사용된 쥐는 케타민(ketamin) HCl (30 mg/kg)과 자일라진(xylazine) (2.5 mg/kg)의 혼합제로 마취된 후 0.01 M의 PBS가 섞인 4 %의 파라포름알데히드(paraformaldehyde; PFA)에 의해 관류되었다. 뇌는 4 %의 PFA(2 일)에서 제거 및 후고정(postfix)되었고, 30 %의 자당(sucrose)(48 시간)을 포함하는 PBS에서 냉동보존(cryoprotect; 추위에서 조직을 보호)되며, 가루 드라이아이스에서 얼려 실험 전까지 -70°C 에서 보관되었다. 관류된 뇌조직들은 마이크로톰(microtome)으로 $40\ \mu\text{m}$ 의 두께로 절개되어 4°C PBS에서 저장되었다. 해마의 마이크로글리아 세포를 탐지하기 위하여 단일클론항체 Iba-1(ionized calcium-binding adaptor molecule)를 사용하였다. 이 Iba-1은 마이크로글리아 세포와 마이크로페이즈(microphases)에 발현한다. Iba-1 면역반응성을 위하여 자유부동(free floating) 섹션의 내성 퍼옥시다아제는 3 % H_2O_2 / 10 % MeOH인 PBS에서 30 분의 인큐베이션을 통하여 억제(quench)되었다. 그 다음 조직들은 10 % 혈청을 포함한 0.3 % Triton-X 100(PBS-T-S) PBS에서 상온으로 한 시간 동안 인큐베이션되었다. 그 후 조직들은 약 12 시간 동안 4°C 3 % PBS-T-S solution(용액)에서 Iba-1 항체와 함께 인큐베이션되었다. 그리고 나서 조직들은 말(horse) 항-마우스 항체(Vector; 1:200)와 엑스트라아비딘 퍼옥시다제 컨쥬게이트(ExtrAvidin peroxidase conjugate) (Sigma Aldrich; 1:1000)에서 각각

15

20

25

한 시간 동안 인큐베이션되었다. 마지막으로 이 조직들은 Vector SG substrate kit(Sigma Aldrich) for peroxidase와 반응하였고 합성수지로 코팅된 슬라이드에 올려 일주일간 건조되었다. 슬라이드 위의 건조된 조직들은 퍼마운트(permount) 시약에 의해 슬라이드 커버와 합쳐진다. 반응된 마이크로글리아를 통계분석을
5 통해 수량화 함으로서, 한 마리의 동물당 여섯개의 두뇌부분 중 해마에 마이크로글리아가 포함되었음을 Iba-1 항체를 통해 발견했다.

도 5는 오매 추출물 처리에 따른 해마 내의 마이크로글리아 세포수의 변화를 나타낸다. 도 5a는 조직면역염색의 결과이고, 도 5b는 상기 조직면역염색 결과를 나타내는 그래프이다. 뇌손상군 (BCCAO)은 모의 시술군과 비교하여
10 마이크로글리아 세포수가 상당히 높았다. 오매 추출물 200mg/kg 처리에 의하여 마이크로글리아세포 발현 정도가 유의하게 감소되었다 ($p < 0.05$).

따라서, 본 발명에 따른 오매 추출물은 손상된 해마를 효과적으로 정상화할 수 있으므로 치매예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

15 【실시에 6】

오매 추출물의 독성평가

본 발명에 따른 오매 추출물의 독성 여부를 알아보기 위해 체중변화를 실험기간 동안 측정하였다.

도 6은 오매 추출물의 처리에 의한 체중변화를 나타낸다. 뇌손상(BCCAO)에
20 의한 체중이 모의 시술군만큼 증가하지 않았지만, 전반적으로 오매 추출물의 투여는 체중 변화에 영향을 주지 않았다. 따라서 본 발명에 따른 추출물은 독성을 나타내지 않았으므로 치매 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

25

<제조예 1> 약학적 제제의 제조

1. 산제의 제조

오매(Fructus mume) 초음파열병합 추출물 2 g
 유당 1 g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

5 2. 정제의 제조

오매(Fructus mume) 초음파열병합 추출물 100 mg
 옥수수 전분 100 mg
 유당 100 mg
 스테아린산 마그네슘 2 mg

10 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

3. 캡슐제의 제조

오매(Fructus mume) 초음파열병합 추출물 100 mg
 15 옥수수 전분 100 mg
 유당 100 mg
 스테아린산 마그네슘 2 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

20

4. 환의 제조

오매(Fructus mume) 초음파열병합 추출물 1 g
 유당 1.5 g
 글리세린 1 g
 25 자일리톨 0.5 g

상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

5. 과립의 제조

오매(Fructus mume) 초음파열병합 추출물	150 mg
대두 추출물	50 mg
포도당	200 mg
전분	600 mg

상기의 성분을 혼합한 후, 30 % 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 °C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

10 <제조예 2> 식품의 제조

1. 밀가루 식품의 제조

본 발명의 오매(Fructus mume)의 초음파열병합 추출물을 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

15

2. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

본 발명의 오매의 초음파열병합 추출물을 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

20 3. 그라운드 비프(ground beef)의 제조

본 발명의 오매의 초음파열병합 추출물을 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

4. 유제품(dairy products)의 제조

본 발명의 오매의 초음파열병합 추출물을 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

25

5. 선택의 제조

현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후
5 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

본 발명의 오매의 초음파열병합 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 오매의 초음파열병합 추출물의
10 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

곡물류(현미 30 중량부, 울무 15 중량부, 보리 20 중량부),
종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
오매의 초음파열병합 추출물(3 중량부),
영지(0.5 중량부),
15 지황(0.5 중량부)

<제조예 3> 음료의 제조

1. 건강음료의 제조

액상 과당(0.5 중량%), 올리고당(2 중량%), 설탕(2 중량%), 식염(0.5 중량%),
20 물(75 중량%)과 같은 부재료와 본 발명의 오매의 초음파열병합 추출물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

2. 야채주스의 제조

25 본 발명의 오매의 초음파열병합 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

3. 과일주스의 제조

본 발명의 오매의 초음파열병합 추출물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다. 분획물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

오매(Fructus mume) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

5

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 것을 특징으로 하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

10 **【청구항 3】**

제 2항에 있어서, 상기 알코올은 C₁ 내지 C₄ 저급 알코올인 것을 특징으로 하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 4】

15 제 3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 5】

20 제 1항에 있어서, 상기 추출물은 초음파열병합 추출하는 것을 특징으로 하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

【청구항 6】

제 1항에 있어서, 상기 치매는 혈관성 치매 또는 알츠하이머성 치매인 것을 특징으로 하는 치매의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

25

【청구항 7】

오매(Fructus mume) 추출물을 유효성분으로 함유하는 치매의 예방 또는

개선용 건강기능식품.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 상기 추출물은 물, 에탄올 또는 이들의 혼합물을 용매로
5 하여 추출되는 것을 특징으로 하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

【청구항 9】

제 7항에 있어서, 상기 치매는 혈관성 치매 또는 알츠하이머성 치매인 것을
특징으로 하는 치매의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

10

【청구항 10】

약학적으로 유효한 양의 오매 추출물을 치매에 걸린 개체에 투여하는 단계
를 포함하는 치매 치료방법.

15

【청구항 11】

약학적으로 유효한 양의 오매 추출물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는
치매 예방 방법.

【청구항 12】

20

치매 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조를 위한 오매 추출물의 용도.

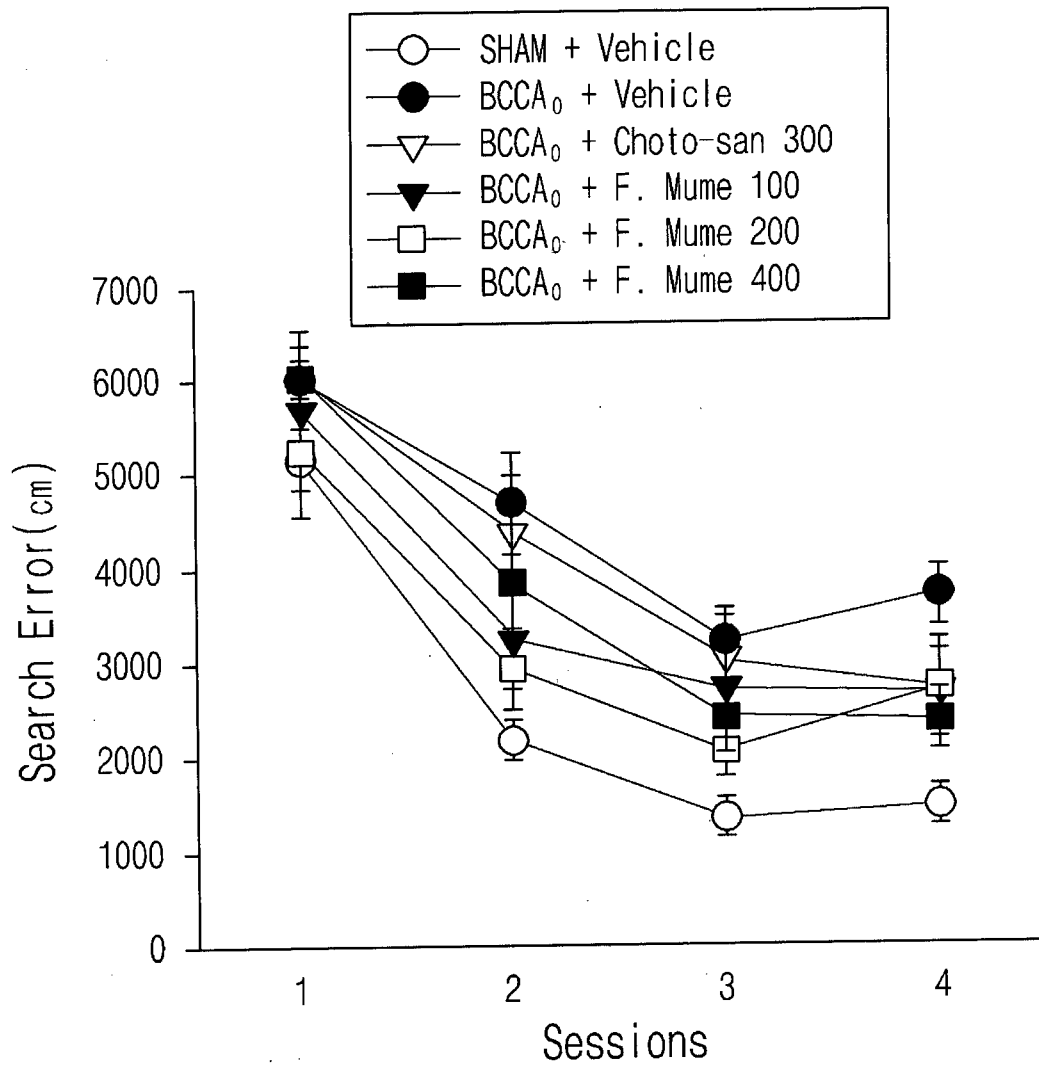
【청구항 13】

치매의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품의 제조를 위한 오매 추출물의
용도.

25

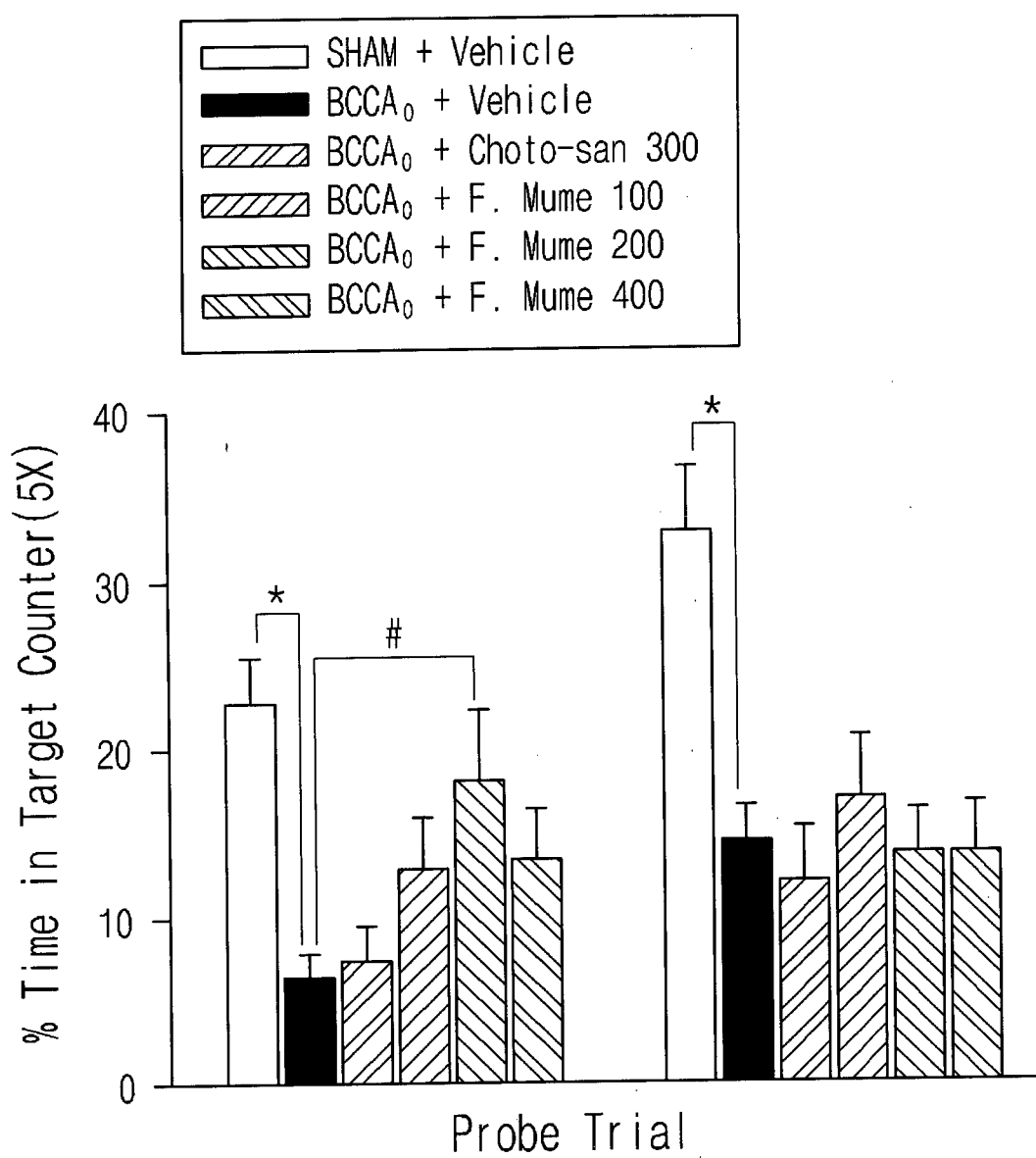
1/10

[도 1]



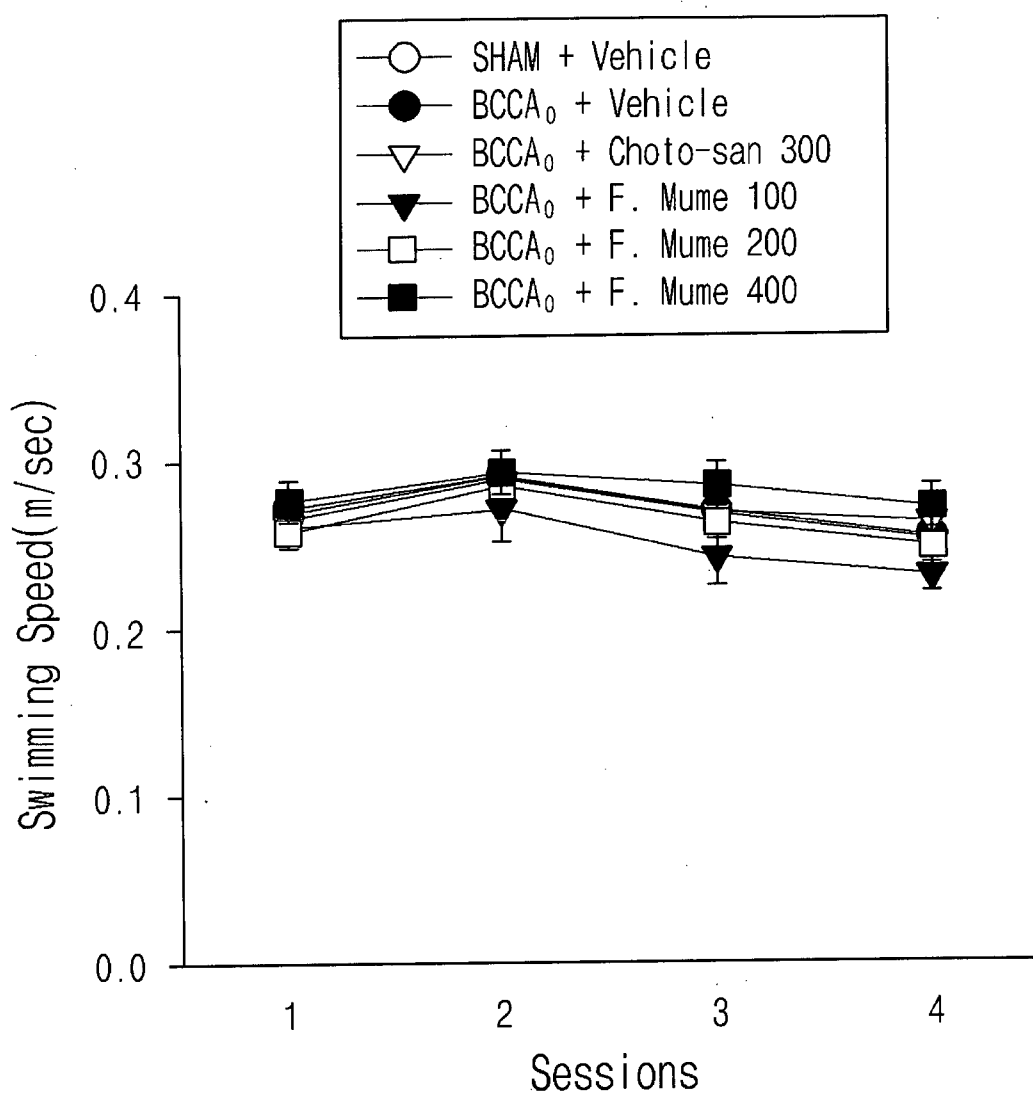
2/10

[도 2]

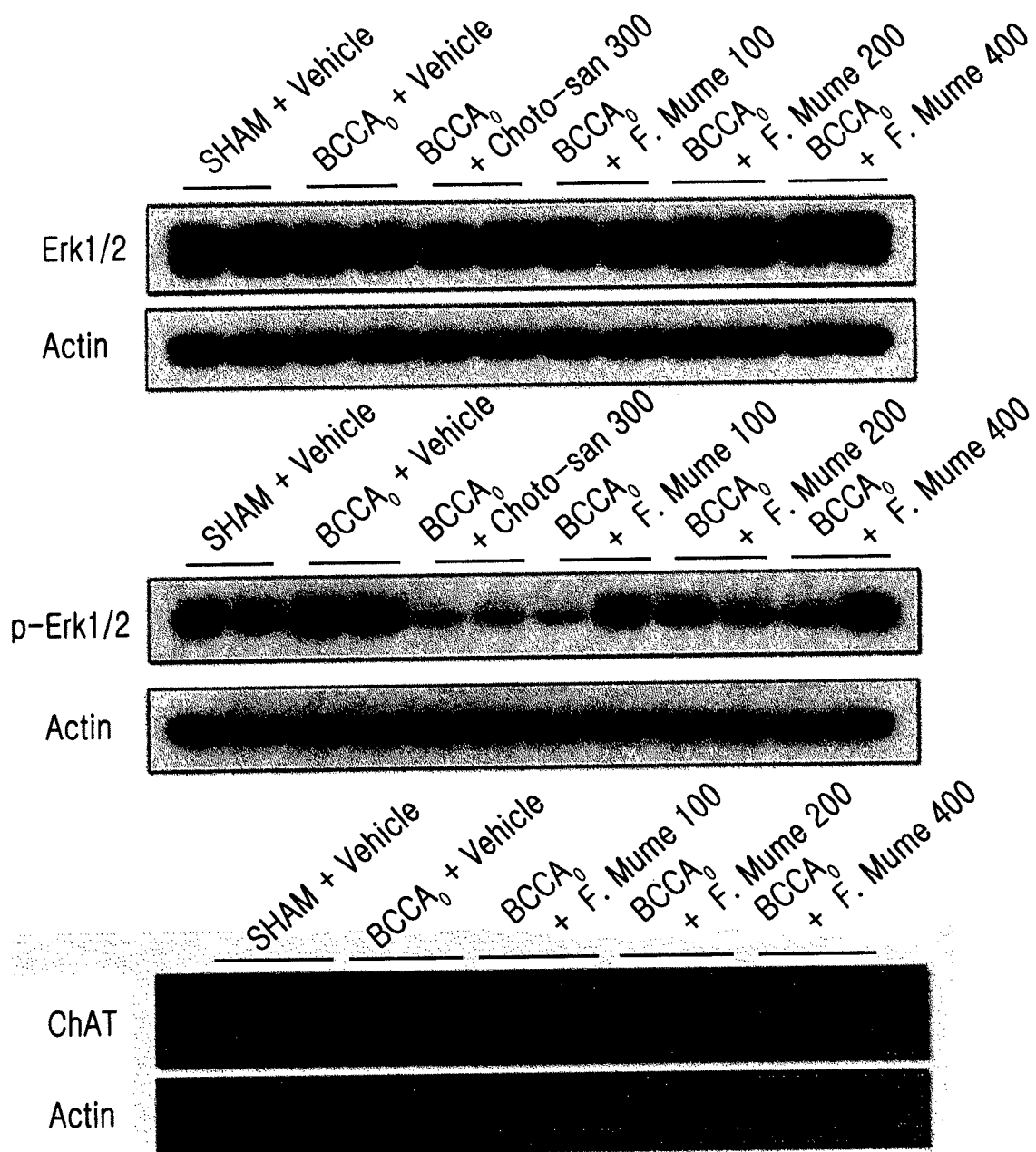


3/10

[도 3]

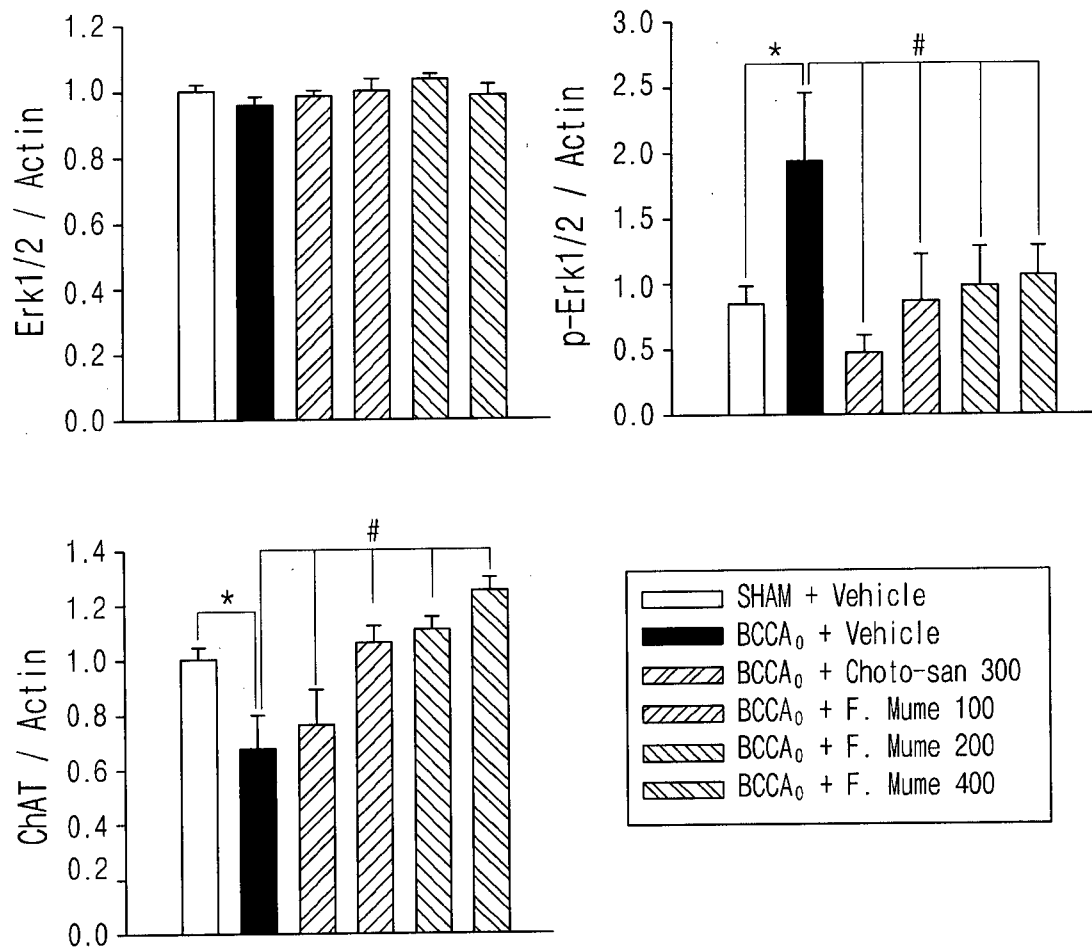


[도 4a]



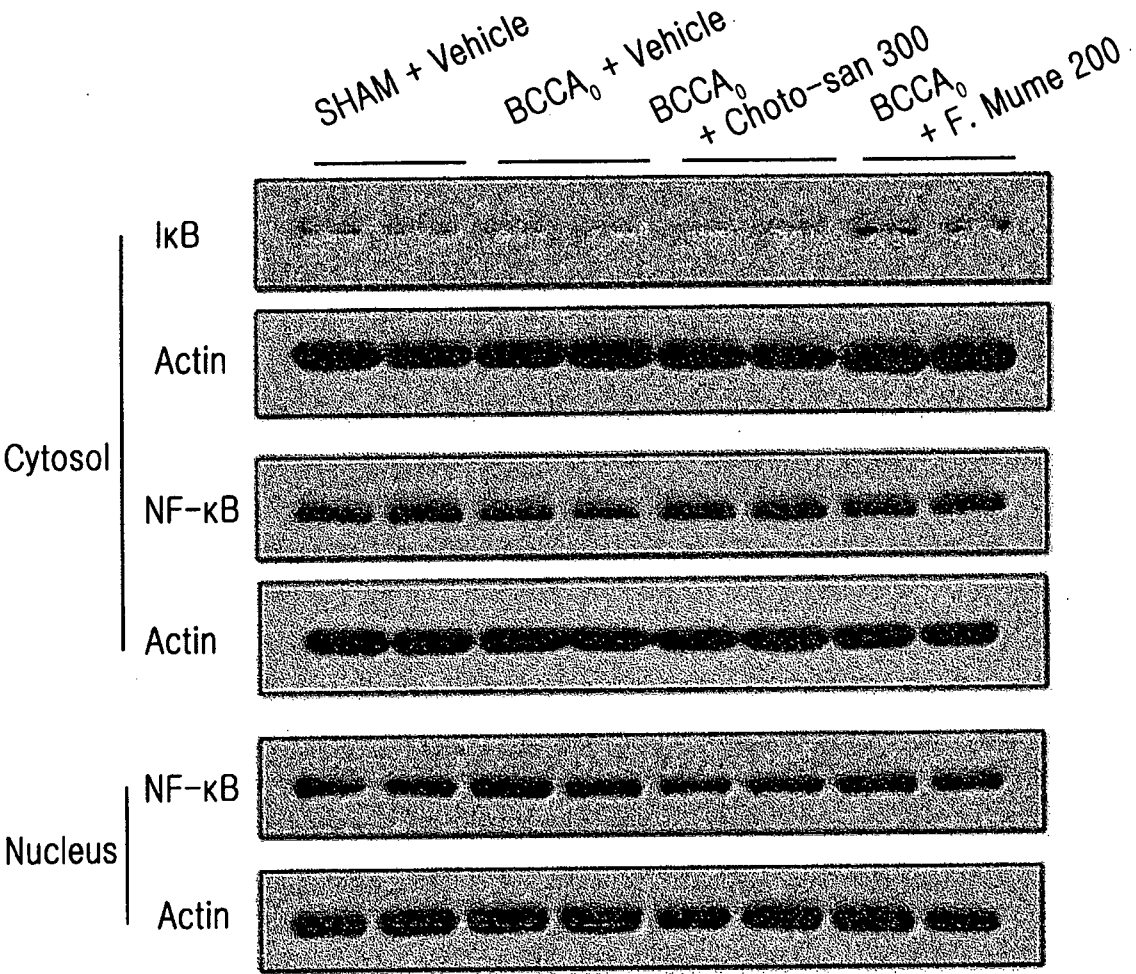
5/10

[도 4b]



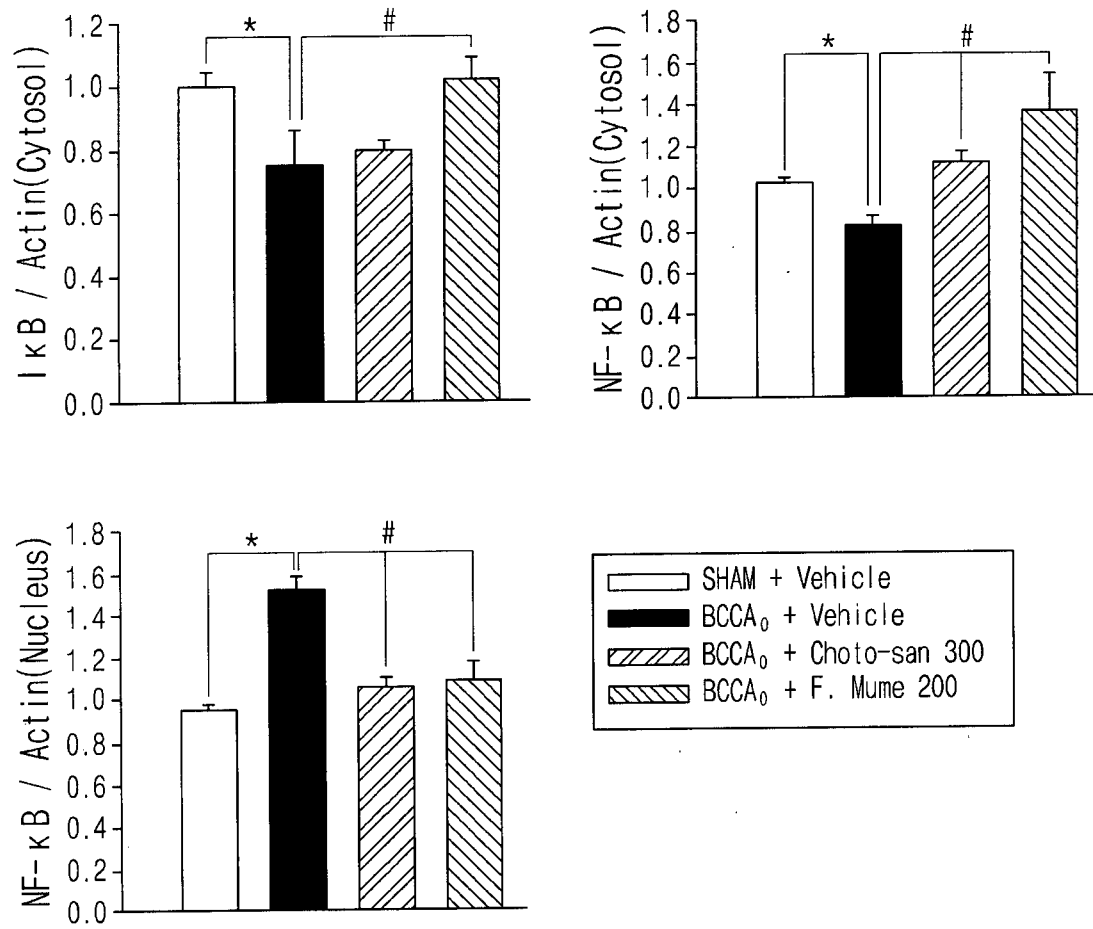
6/10

[도 4c]



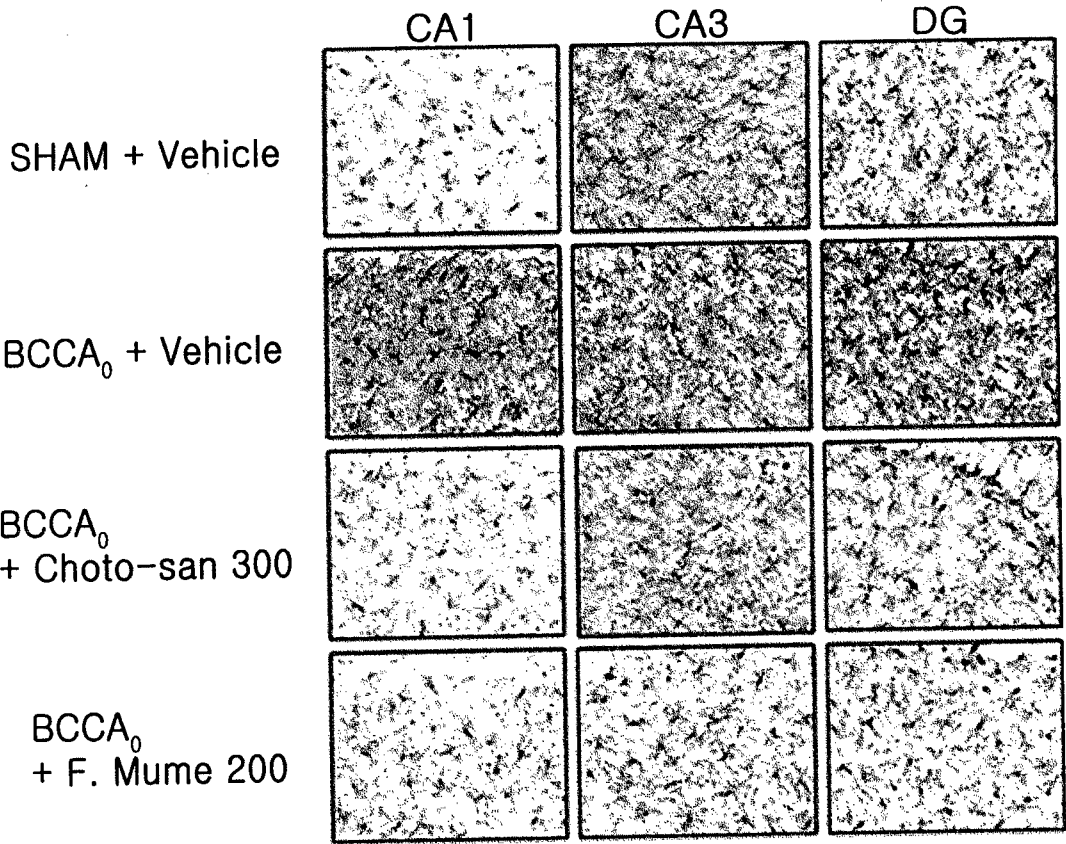
7/10

[도 4d]



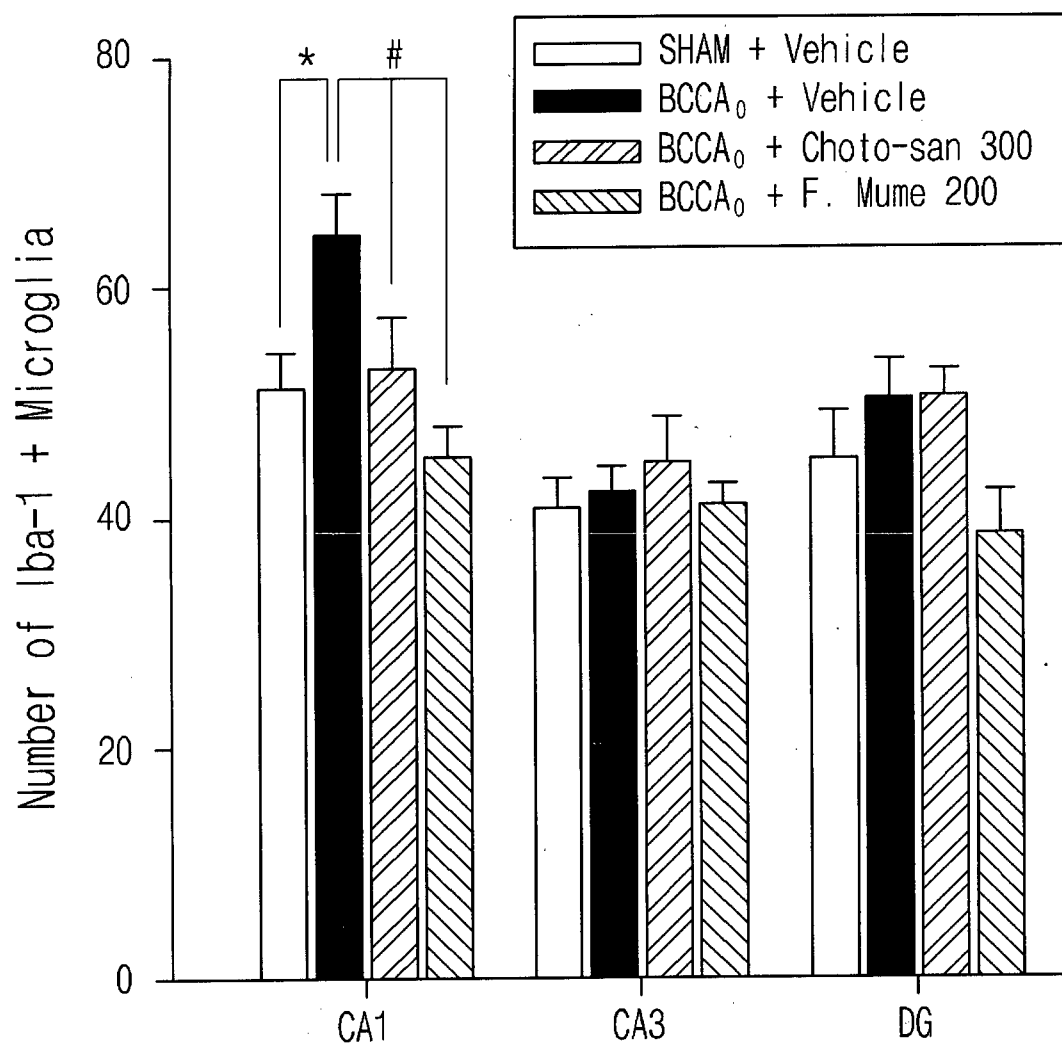
8/10

[도 5a]



9/10

[도 5b]



10/10

[도 6]

