



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월06일

(11) 등록번호 10-2586388

(24) 등록일자 2023년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/30 (2006.01) A23K 10/30 (2016.01)

A23L 33/105 (2016.01) A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/30 (2013.01)

A23K 10/30 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2023-0098963

(22) 출원일자 2023년07월28일

심사청구일자 2023년07월28일

(56) 선행기술조사문헌

한국응용생명화학회지 제 48권 1호(98-102

페이지). 2005년 03월 31일

(73) 특허권자

재단법인 전남바이오산업진흥원

전라남도 나주시 동수농공단지길 30-5(동수동)

(72) 발명자

배동혁

광주광역시 남구 제중로 11, 108동 1206호 (양림동, 양림1단지휴먼시아)

오동리

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202, 503동 203호 (화순 부영아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 8 항

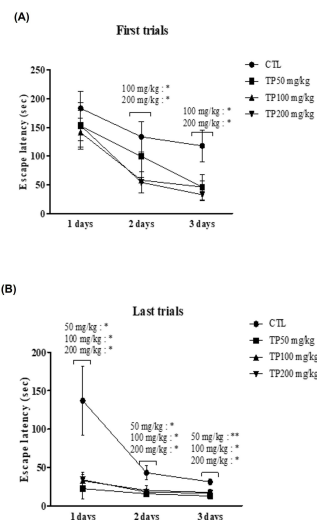
심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 **꽃마리 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 또는 기억력 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 꽃마리 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 또는 기억력 개선용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 유효성분인 꽃마리 추출물이 태아 쥐의 해마조직 신경세포에서 p-CREB 발현량을 증가시키고, 시냅스 재구성 관련 단백질 발현량을 증가시킬 뿐만 아니라, 동물모델에서 장기 기억력과 단기 기억력을 증가시키고, 시냅스 재구성 인자 및 신경 가소성 인자 단백질의 발현량을 증가시키므로, 인지기능 또는 기억력 개선을 위한 의약품, 건강기능식품 또는 사료 첨가제 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61P 25/28 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/322 (2013.01)

(72) 발명자

문보영

광주광역시 북구 서방로39번길 77 (문흥동)

김유진

전라남도 장흥군 장흥읍 건산남부길 31, 102동 403호

김영욱

전라남도 장흥군 장흥읍 동교3길 53

고해주

전라남도 해남군 해남읍 영빈로 79-18, 105동 1601호 (정하에코하임)

김문종

광주광역시 광산구 월계로 109, 211동 504호 (월계동, 첨단산업기지라인2차아파트)

오교녀

광주광역시 서구 월드컵4강로28번길 50-18, 101동 403호 (화정동, 광명아파트)

홍지애

광주광역시 동구 계림로30번길 15, 203동 402호 (계림동, 푸른길 두산위브)

이학성

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 106동 1205호 (전민동, 엑스포아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

꽃마리(*Trigonotis peduncularis*) 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인지기능 장애는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 뇌혈관성 치매, 픽(pick)병, 크루츠펠트-야콥(Creutzfeldt-jakob)병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병(Parkinson's disease) 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 꽃마리 열수 추출물 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

꽃마리(*Trigonotis peduncularis*) 열수 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 또는 기억력 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 꽃마리 열수 추출물은 꽃마리 잎, 꽃, 줄기, 지상부, 지하부 또는 전초 열수 추출물인 것을 특징으로 하는 인지기능 또는 기억력 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 인지기능 또는 기억력 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

꽃마리 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억력 개선용 사료첨가제.

청구항 9

꽃마리 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 꽃마리 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 또는 기억력 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인지기능 장애(Cognitive impairment)는 뇌질환, 뇌상해, 중독, 노령화 등으로 인한 정신적, 행동학적 장애 및 내분비계의 이상과 대사 영양학적 이상, 약물 등에 따른 정신적인 질환을 포괄하는 의미로서, 증상의 정도에 따라 일시적 단기 기억 장애로 판명되는健忘증(Amnesia) 뿐만 아니라, 판단력 장애를 유발하는 인지 기능 장애

및 치매(Dementia) 등 신경변성 질환에서도 나타나는 뇌질환의 일종이다.

- [0003] 경도인지 장애란 동일한 연령대에 비하여 인지 능력이 저하된 상태를 말한다. 기억력, 언어 능력, 판단력 등의 인지 영역이 저하된 상태이다. 경도 인지 장애는 다양한 원인과 증상을 가지는 증후군이며 노화에 의한 퇴행성, 혈관성 원인에 의한 혈관성 우울이나 불안 등 정신과적 요인 및 기타 내과적 요인 등의 여러 가지 원인으로 생긴다.
- [0004] 또한, 고령화 사회로 이어지면서 노인의 인구 수가 급격하게 증가하였는데, 이러한 사회 환경에서 노인성 치매 및 파킨슨 질환이 퇴행성 중추신경계 질환으로 인정되고, 그 환자의 수가 날로 증가함에 따라 사회적 이슈가 증가하면서 이에 따른 예방, 개선 및 치료에 대한 중요성이 날로 새롭게 부각되고 있다.
- [0005] 알츠하이머 질환 환자는 콜린성, 아드레날린성, GABA성 및 글루타메이트성 신경 등 거의 모든 신경에 이상이 초래되나, 특히 콜린성 신경의 손상 및 소실이 가장 심각한 것으로 연구되어져 있다. 한편, 인지능력이 점진적으로 소실되는 질환인 노인성 치매는 중추 신경계의 콜린성 신경세포의 활성과도 관련이 있으며, 이는 뇌에서 아세틸콜린 및 콜린 아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase) 활성의 현저한 저하가 주된 원인으로 알려져 있다. 이에 따른 이상적인 콜린성 신경을 보완하고자 하는 회복 및 개선의 방향으로 치료제 개발이 활발하게 이루어지고 있다.
- [0006] 한편, 꽃마리(*Trigonotis peduncularis*)는 쌍떡잎식물 꿀풀목 지치과의 두해살이풀로, 잣냉이라고도 한다. 들, 밭둑 또는 길가에서 자라고, 줄기가 10~30cm까지 자라고, 전체에 짧은 털이 있으며 밑 부분에서 여러 개로 갈라진다. 뿌리에서 나온 잎은 긴 잎자루가 있고, 뭉쳐나며 달걀 모양 또는 타원 모양이다. 줄기에서 나온 잎은 어긋나고 긴 타원 모양 또는 긴 달걀 모양으로 가장자리가 밋밋하며 잎자루가 없다. 꽃은 4~7월에 연한 하늘색으로 피고 줄기 끝에 총상 꽃차례를 이루며 달린다. 꽃차례는 윗부분이 말려 있는데, 태엽처럼 풀리면서 아래쪽에서부터 차례로 꽃이 핀다. 꽃받침은 5개로 갈라지고 갈라진 조각은 삼각형이고 털이 있다. 화관은 지름이 2mm 정도이고 5개로 갈라진다. 수술은 5개이다. 열매는 4개의 분과로 갈라지는 분열과이고 짧은 자루가 있으며 꽃받침으로 싸여 있다. 분과는 매끄럽고 위가 뾰족하다. 어린순을 나물로 한다. 한방에서 수족의 근육 마비·야뇨증·대장염·이질·중기 등에 약으로 쓴다. 한국 전역 및 아시아의 온대와 난대에 분포한다.
- [0007] 꽃마리 관련 기술로는 한국등록특허 제2260037호에 참꽃마리 추출물을 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2023-0106452호에 참꽃마리 추출물을 유효성분으로 포함하는 항산화, 항염증, 피부미백, 또는 주름예방 및 개선용 화장품 조성물이 개시되어 있으나, 아직까지는 본 발명의 꽃마리 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 또는 기억력 개선용 조성물에 대하여 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 꽃마리 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 또는 기억력 개선용 조성물을 제공하고, 본 발명의 유효성분인 꽃마리 추출물이 태아 쥐의 해마조직 신경세포에서 p-CREB 발현량을 증가시키고, 시냅스 재구성 관련 단백질 발현량을 증가시킬 뿐만 아니라, 동물모델에서 장기 기억력과 단기 기억력을 증가시키고, 시냅스 재구성 인자 및 신경 가소성 인자 단백질의 발현량을 증가시킨다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 꽃마리(*Trigonotis peduncularis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 꽃마리(*Trigonotis peduncularis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 또는 기억력 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 꽃마리 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억력 개선용 사료첨가제를 제공한다.
- [0012] 또한, 꽃마리 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 꽃마리 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 또는 기억력 개선용 조성물에 관한 것으로, 본 발

명의 유효성분인 꽃마리 추출물이 태아 쥐의 해마조직 신경세포에서 p-CREB 발현량을 증가시키고, 시냅스 재구성 관련 단백질 발현량을 증가시킬 뿐만 아니라, 동물모델에서 장기 기억력과 단기 기억력을 증가시키고, 시냅스 재구성 인자 및 신경 가소성 인자 단백질의 발현량을 증가시키는 효과가 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 유효성분인 꽃마리 추출물의 동결건조된 분말을 나타낸 사진이다.

도 2는 태아 쥐의 해마(hippocampus) 조직을 1차 배양(primary culture)한 뇌 세포에서 꽃마리 열수 추출물이 신경세포 가소성에 영향을 미치는 CREB 인산화 수준에 미치는 효과를 확인한 결과이다. ***은 대조군(CTL) 대비 양성대조군(AMPA) 또는 본 발명의 꽃마리 추출물 처리군의 p-CREB 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p < 0.001$ 이다.

도 3은 꽃마리 열수 추출물이 신경세포 NMDA 수용체(Subunits: NR2A, NR2B) 및 PSD95 단백질의 발현에 미치는 효과를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 4는 SD-랫트에서 모리스 수중 미로 실험(Morris water maze test)을 통한 꽃마리 추출물의 장기 기억력(A) 및 단기 기억력(B)에 미치는 효과를 확인한 결과이다. *, **은 대조군 대비 본 발명의 꽃마리 추출물 투여군의 장기 기억력 또는 단기 기억력이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로 *은 $p < 0.05$ 이고, **은 $p < 0.01$ 이다.

도 5는 모리스 수중 미로 실험(Morris water maze test)에서 과생된 단서 탐색 실험(Probe test) 결과로, 도피대가 있었던 분면에서의 수영시간(A) 및 도피대를 찾기 위해 이동한 거리(B)를 나타낸 것이다. *, **, ***은 대조군 대비 꽃마리 추출물 투여군(TP50, TP100 및 TP200)의, 도피대가 있었던 분면에서의 수영시간이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p < 0.05$ 이고, **은 $p < 0.01$ 이며, ***은 $p < 0.05$ 이다. 도 5B에서 화살표 S는 출발지점을 의미한다.

도 6은 SD-랫트로부터 적출한 해마 조직에서, 본 발명의 꽃마리 추출물 투여에 따른 NMDA 수용체(NR2A, NR2B), AMPA 수용체(GluA1) 및 PSD95 단백질 발현량 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

도 7은 SD-랫트로부터 적출한 해마 조직에서, 본 발명의 꽃마리 추출물 투여에 따른 ERK 및 CaMKII 단백질 발현량; 및 p-ERK 및 p-CaMKII 단백질 발현량 변화를 확인한 결과(A), BDNF 단백질 발현량을 확인한 결과(B)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은 꽃마리(*Trigonotis peduncularis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

상기 인지기능 장애는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 뇌혈관성 치매, 픽(pick)병, 크루츠펠트-야콥(Creutzfeldt-jakob)병, 두부손상에 의한 치매 및 파킨슨병(Parkinson's disease) 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

본 발명에 따른 꽃마리 추출물을 포함하는 약학 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 꽃마리 추출물 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 꽃마리 추출물을 포함하는 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 본 발명의 꽃마리 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 꽃마리 추출물을 포함하는 약학 조성물은 1일 0.0001~100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001~10mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

또한, 본 발명은 꽃마리(*Trigonotis peduncularis*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지기능 또는 기억력 개선

용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

- [0019] 상기 꽃마리 추출물은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:
- [0020] (1) 건조 꽃마리에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0021] (2) 단계 (1)의 추출액을 여과하는 단계; 및
- [0022] (3) 단계 (2)의 여과한 추출액을 건조하여 추출물을 제조하는 단계.
- [0023] 상기 단계 (1)에서 추출용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물 중에서 선택하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 물 또는 에탄올이고, 더욱더 바람직하게는 물이지만 이에 한정하지 않는다. 상기 제조방법에 있어서, 추출방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 당 업계에 공지된 모든 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 꽃마리 중량의 5~40배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20~100℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 1~5시간인 것이 바람직하며, 2~4시간이 더욱 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 단계 (3)에서, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 동결건조이나 이에 한정하지 않는다.
- [0024] 상기 꽃마리 추출물은 꽃마리 잎, 꽃, 줄기, 지상부, 지하부 또는 전조 추출물인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 꽃마리 잎 추출물인 것이지만 이에 한정하지 않는다.
- [0025] 상기 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 꽃마리 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다. 상기 꽃마리 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 캐러멜, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다. 즉, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한, 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 상기의 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있으며, 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 단당류, 말토스, 슈크로스 및 같은 이당류, 텍스트린, 사이클로 텍스트린과 같은 다당류, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올이다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 크게 중요하지 않지만, 본 발명의 조성물 100g에 대하여, 0.01~0.04g인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 0.02~0.03g을 포함하는 것이지만 이에 한정하지 않는다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 꽃마리 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억력 개선용 사료첨가제에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다. 본 발명에서 용어 '사료'는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다. 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 꽃마리 추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰

로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 에탄올, 스테아릴알콜, 유동과라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메칠과라벤, 프로필과라벤 및 광물유를 들 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물의 유효한 양은 동물의 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강상태 또는 성별에 따른 본 발명의 유효성분에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 수의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0031] 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.

[0032] **실시예 1. 꽃마리 열수 추출물의 제조**

[0033] 건조된 꽃마리 잎 500g에 15ℓ의 증류수를 첨가하여 100℃에서 3시간 동안 가열하여 열수 추출하였다. 상기 추출된 꽃마리 열수 추출물은 감압 농축 및 동결 건조하여 꽃마리 열수 동결건조물 59.2g을 획득하였다.

[0034] **실시예 2. 태아 쥐의 해마(hippocampus) 신경세포 1차 배양(primary culture)**

[0035] 본 발명의 실시예 3 및 4에서 사용된 세포는 1차 배양 해마 신경세포(primary cultured Hippocampal neurons)로서, 임신 18~19일째 SD 랫트의 태아로부터 분리하였다. 분리한 해마 신경조직에 0.25% 트립신이 첨가된 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)에 넣어 37℃에서 10분 동안 반응시켰다. HBSS로 수회 세척한 후 1ml 피펫을 이용하여 조심스럽게 단일세포로 분리하였다. 이후, 폴리-L-리신(poly-L-lysine; 0.5mg/ml)으로 미리 코팅해둔 배양 접시에 분리된 세포를 로딩하고, 0.5mM L-글루타민, 25μM 글루타메이트, 25μM 2-메르kaptoethanol(2-mercaptoethanol), 100U/ml 페니실린 및 100μg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 Neuro basal/B27 배지를 채워 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포배양 4일, 11일에 배지를 교환하였고, 배양 14일째의 세포를 이용하여 실험에 사용하였다.

[0036] **실시예 3. 태아 쥐의 해마 신경세포에서 CREB(cAMP-response element binding proein) 인산화 수준 확인**

[0037] 꽃마리 추출물을 처리하기 1시간 전에, 상기 실시예 2에서, 14일 동안 배양한 1차 배양 해마 신경세포의 배지를 Neuro basal/B27이 없는 배지로 교환하였다. 양성대조군으로는 AMPA 수용체(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)의 작용제인 AMPA를 100μM 사용하였으며, 3, 10 및 30μg/ml의 꽃마리 열수 추출물을 각각 10분 동안 처리하고, ice-cold PBS로 세척한 후 세포를 용해하였다. 용해된 세포액은 BCA 단백질 정량방법에 따라 정량하여 동일한 양을 phospho-CREB (Ser133) sandwich ELISA Kit (Cell signaling)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

[0038] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 대조군 대비 3, 10 및 30μg/ml의 꽃마리 추출물을 처리한 실험군 및 양성대조군의 CREB 인산화 수준이 통계적으로 유의미하게 증가하였다.

[0039] **실시예 4. 태아 쥐의 해마 신경세포에서 시냅스 재구성(synapse remodeling) 관여 인자의 발현량 확인**

[0040] 상기 실시예 2에서, 14일 동안 배양한 1차 배양 해마 신경세포에 3, 10 및 30μg/ml의 꽃마리 추출물을 각각 1분 동안 처리하고, ice-cold PBS로 세척 후 Syn-PERTM 시냅스 단백질 추출 시약으로, 세포를 용해하여 웨스턴 블랏을 실시하였다.

[0041] 그 결과, 도 3에 개시한 바와 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군 대비 본 발명의 3, 10 및 30μg/ml의 꽃마리 추출물을 처리한 실험군의 NMDA(N-methyl-D-aspartate) 수용체(NR2A 및 NR2B) 및 PSD95(postsynaptic density protein 95) 단백질 발현량이 증가하였다.

[0042] **실시예 5. 모리스 수중 미로 실험(Morris water maze test)**

[0043] (1) 동물모델

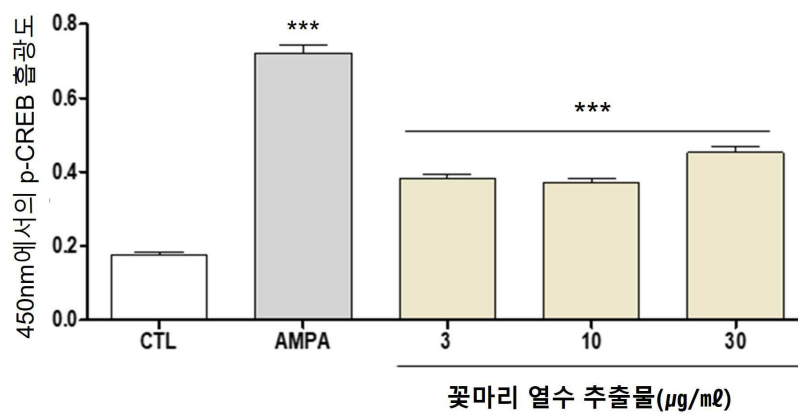
- [0044] 동물모델로 이용된 생후 6주령 된 수컷 SD-랫트는 ㈜샘타코(SAMTACO, Korea)부터 구입하였으며, 구입 후 동물사육실에서 일정한 조건(온도: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도: 50%, 명암: 12시간 명암주기)으로 일주일 동안 적응시킨 후 실험에 사용하였다.
- [0045] (2) 탈출지연시간(escape latency) 분석
- [0046] 실험동물의 행동평가를 위한 수컷 SD-랫트에 본 발명의 꽃마리 추출물(50, 100 및 200mg/kg B.W.)을 21일 동안 1일 1회 경구투여하였으며, 대조군(Control)으로는 꽃마리 추출물을 투여하지 않은 무처리군을 사용하였다.
- [0047] 모리스 수중 미로 실험은 원형풀(직경:180cm, 높이: 75cm)에 물을 $25 \pm 1\text{cm}$ 로 채우고, 탈출 플랫폼(24cm)을 수면 1cm 아래에 숨겼다. 위치를 확인할 수 있게 벽의 4면에 공간단서를 설치하고, 탈지분유를 물에 풀어 도피대를 육안으로 확인할 수 없게 하였다. 실험 하루 전에 모든 실험군을 도피대가 없는 수영장에서 1분 동안 자유롭게 수영하게 하여 수영에 적응시켰다.
- [0048] 본 실험에 들어가 첫 번째 실험일에는 도피대가 놓인 사분면을 제외한 3곳 중 2곳에서 임의의 순서로 동물을 출발시켜 60초 동안 도피대를 찾도록 하였다. 도피대를 찾으면 그로부터 20초 동안 그 위에 머무르게 하고, 45초 안에 도피대를 찾지 못하면 실험자가 손으로 동물을 도피대까지 유도하여 20초 동안 머물도록 하였다. 20초 동안의 위치 학습이 끝나면 바로 임의의 분면에서 동물을 출발시켜 도피대까지 찾아가는 시간과 이동거리를 측정하였다. 도피대를 찾아 올라가면 20초의 시간을 주고 연속적으로 하루에 총 3번, 3일 동안 실시하였다. 각 실험일에서 첫 번째 시도(First trials)는 장기 기억력을 나타내는 지표이며, 실험일별 세 번째 수영인 마지막 시도(Last trials)는 단기 기억력을 나타내는 지표이다.
- [0049] 단, 2일, 3일째는 전날 습득된 장기 기억을 평가하고자 도피대까지 유도하는 초기 학습을 생략하였다. 모든 데이터는 수영장 위에 설치된 카메라로 촬영되어 비디오 추적 시스템(Panlab, Barcelona, Spain)으로 분석하였다.
- [0050] 그 결과, 도 4A에 개시한 바와 같이 장기 기억 지표인 첫 번째 시도에서 대조군(CTL) 대비 꽃마리 추출물 투여군(TP50mg/kg, TP100mg/kg 및 TP200mg/kg)의 탈출지연시간(escape latency)이 통계적으로 유의미하게 감소하였고, 도 4B에 개시한 바와 같이 매일 세 번째 수영인 마지막 시도(Last trials)에서도 대조군(CTL) 대비 꽃마리 추출물 투여군(TP50mg/kg, TP100mg/kg 및 TP200mg/kg)의 탈출지연시간(escape latency)이 통계적으로 유의미하게 감소하였다.
- [0051] (3) 단서 탐색 시험(Probe test)
- [0052] 3일 동안의 탈출지연 시간 시험을 마친 24시간 후인 4일째에 단서 탐색 시험(Probe test)을 실시하였다. 도피대 없이 90초 동안 자유 수영을 실시하여 이전 도피대의 위치에 대한 기억을 보유하고 있는지(4분면 중, 도피대가 있었던 분면에서의 수영시간)에 대한 검사를 실시한 것이다.
- [0053] 그 결과, 도 5에 개시한 바와 같이 대조군 대비 꽃마리 추출물 투여군의 도피대가 있었던 분면에서의 수영시간(A) 및 도피대를 찾기 위해 이동한 거리(B)가 증가하였다.
- [0054] **실시예 6. SD-랫트에서 적출한 해마 조직에서 시냅스 재구성(synapse remodeling) 인자 및 신경 가소성 인자 단백질의 발현량 확인**
- [0055] 모든 행동평가가 끝난 날에 SD-랫트(각 군당 n=3마리)에서 해마 조직을 적출하여 시냅스 재구성 인자인 AMPA 수용체(GluA1), NMDA 수용체(NR2A 및 NR2B) 및 PSD95 단백질의 발현량 변화 및 신경가소성인자인 ERK, CaMKII 및 BDNF 단백질의 발현량 변화를 웨스턴 블랏기법으로 확인하였다.
- [0056] 그 결과, 도 6에 개시한 바 대조군 대비 본 발명의 꽃마리 추출물 투여군의 해마조직에서 발현된 시냅스 재구성 인자인 NMDA 수용체(NR2A 및 NR2B), AMPA 수용체(GluA1) 및 PSD95의 단백질의 발현량이 현저하게 증가하였다.
- [0057] 또한, 도 7에 개시한 바, 시냅스가소성 조절에 관여하는 신호전달경로 ERK 및 CaMKII의 활성화인 인산화 ERK 및 CaMKII의 발현량이 대조군 대비 본 발명의 꽃마리 추출물 투여군에 현저하게 증가하였으며(도 7A), 시냅스 형성에 관여하는 뇌유래 신경 성장인자 BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 단백질의 발현량이 증가하였다(도 7B).

도면

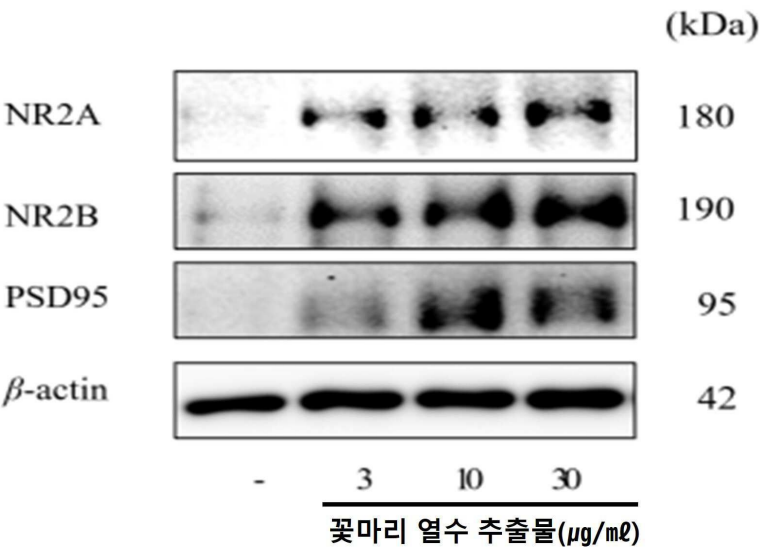
도면1



도면2



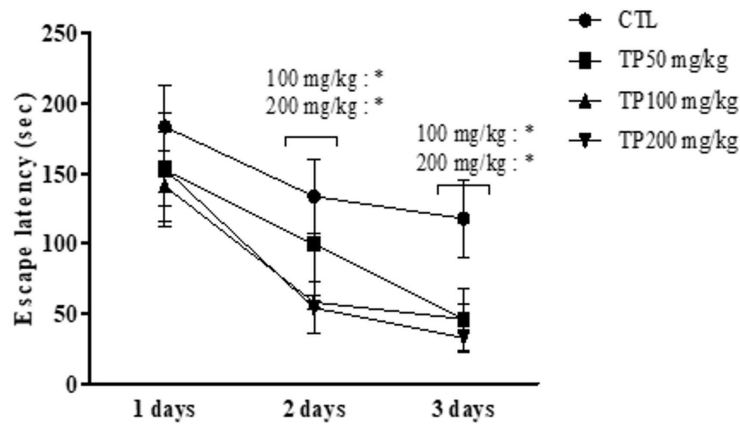
도면3



도면4

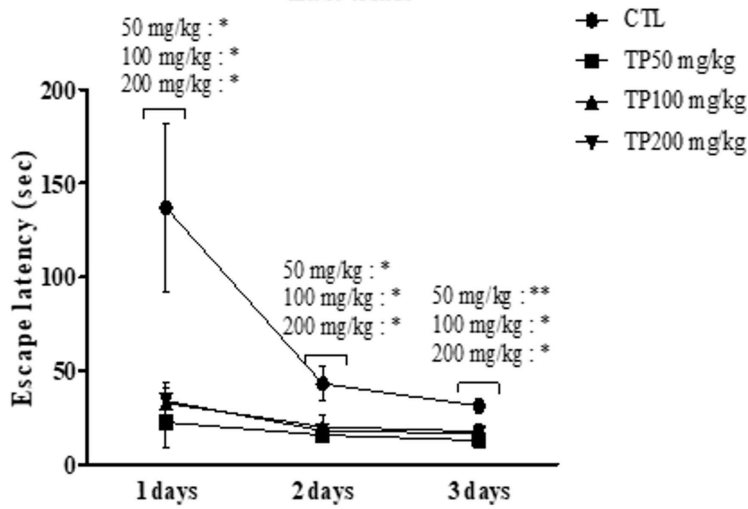
(A)

First trials

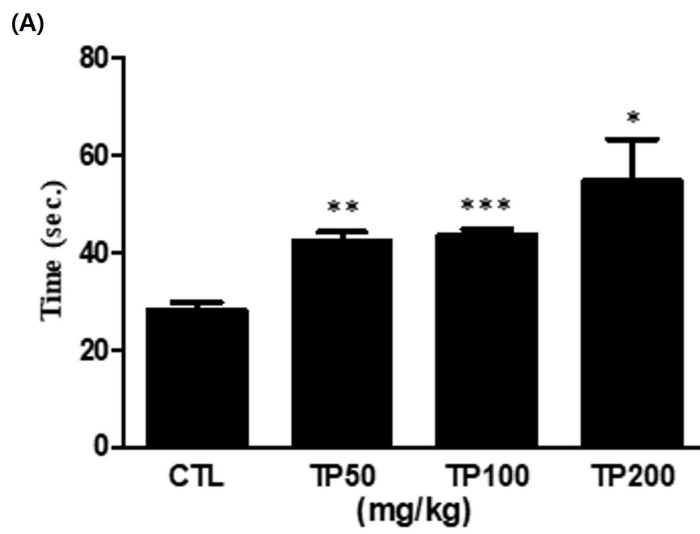


(B)

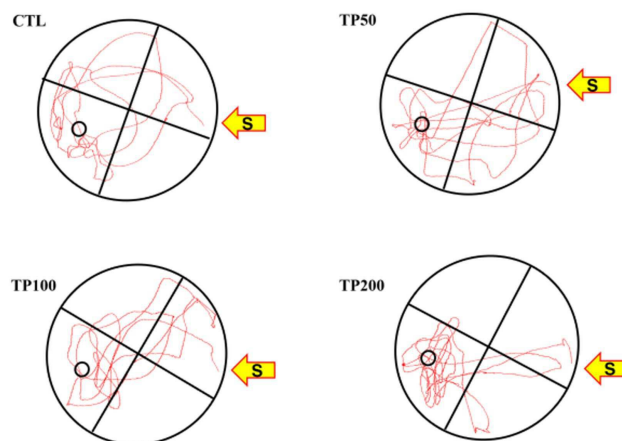
Last trials



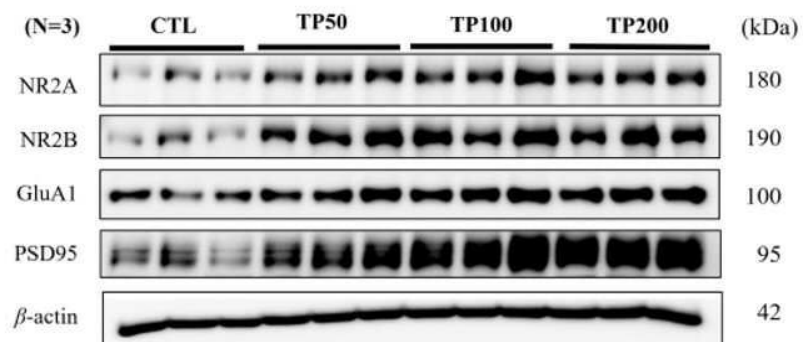
도면5



(B)

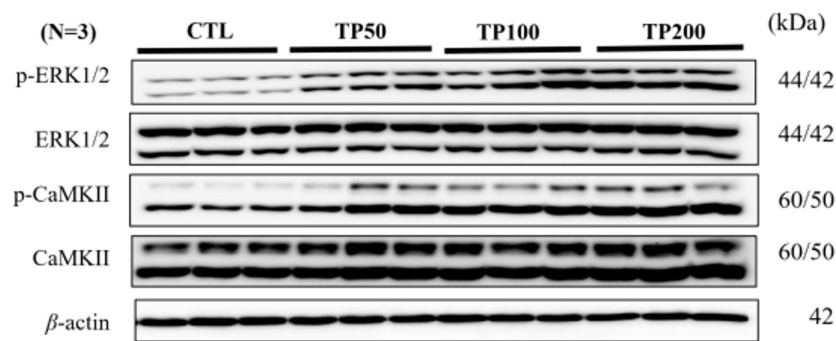


도면6



도면7

(A)



(B)

