



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월20일
(11) 등록번호 10-2649776
(24) 등록일자 2024년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/284 (2006.01) A23K 10/30 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 36/70 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/284 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2024-0006881
(22) 출원일자 2024년01월16일
심사청구일자 2024년01월16일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020050092292 A
KR1020190113725 A

(73) 특허권자
재단법인 전남바이오진흥원
전라남도 나주시 교육길 13, 디2동 210호(빛가람
동, 스마트파크 지식산업센터)
(72) 발명자
배동혁
광주광역시 남구 재중로 11, 108동 1206호 (양림
동, 양림1단지휴먼시아)
오들리
전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202, 503동 203호
(화순 부영아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 10 항

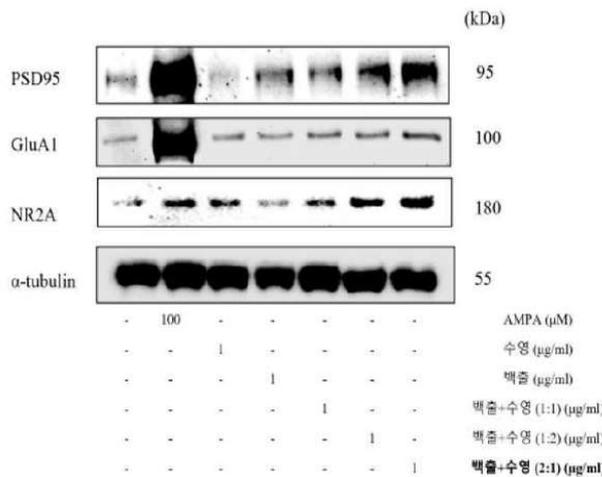
심사관 : 이동욱

(54) 발명의 명칭 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 백출 및 수영 추출물의 복합물은 해마 신경세포에서 CREB 인산화를 촉진할 뿐만 아니라, 뇌신경세포주에서 세포 보호 효과가 있으며, LTP(Long-term potentiation)가 형성될 때 나타나는 신경세포 말단의 리모델링(synapse remodeling)에 영향을 주어 시냅스 재구성 인자 및 신경 가소성 인자의 단백질 발현량을 증가시키고, 동물모델의 행동 평가에서 단기/장기 기억능력을 향상시키는 것을 확인함으로써, 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 건강기능식품, 의약품 또는 사료첨가제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 36/70 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/322 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

문보영

광주광역시 북구 서방로39번길 77 (문흥동)

고해주

전라남도 해남군 해남읍 영빈로 79-18, 105동 160
1호 (정하에코하임)

김영욱

전라남도 장흥군 장흥읍 동교3길 53

오교녀

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

홍지애

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

김유진

전라남도 화순군 화순읍 대리길 41, 106동 502호 (화순광신프로그레스)

이학성

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

명세서

청구범위

청구항 1

백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 백출 및 수영 추출물의 추출용매는 물, C₁-C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 백출 및 수영 추출물의 복합물은 백출 추출물 및 수영 추출물을 1.5~2.5:1의 중량비로 혼합한 것임을 특징으로 하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 인지기능장애는 치매(dementia), 학습장애(learning disorder), 실인증(agnosia), 건망증(amaresia), 실어증(aphasia), 실행증(apraxia) 또는 섬망(delirium), 경도인지장애(mild cognitive impairment) 및 빈스완거 병(Binswangers disease) 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 치매는 알츠하이머성 치매, 혈관성 치매, 루이소체 치매, 전두엽 치매, 의미 치매(semantic dementia) 및 다발성 경색성 치매(Multi infarct dementia) 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

청구항 10

백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방 또는 개선용 사료첨가제.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인지기능장애 (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 건망증(Amnesia)뿐만 아니라, 판단력 장애를 유발하는 인지 기능 장애 및 치매(Dementia) 등 신경변성 질환에서도 나타나는 뇌질환의 일종이다. 그 중에서, 경도 인지 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 유발되는 것으로 알려져 있다.

[0003] 한편, 고령화 사회로 이어지면서 노인인구 수가 급격하게 증가하였는데, 이러한 사회 환경에서 노인성 치매 및 파킨슨 질환이 퇴행성 중추신경계 질환으로 인정되고, 그 환자 수가 날로 증가함에 따라 사회적 이슈가 증가되면서 이에 따른 인지기능장애의 예방, 개선 및 치료에 대한 중요성이 점점 더 부각되고 있다.

[0004] 알츠하이머성 질환은 콜린성, 아드레날린성, GABA성 및 글루타메이트성 신경 등 거의 모든 신경에 이상이 초래되나, 특히 콜린성 신경의 손상 및 소실이 가장 심각한 것으로 연구되어져 있다. 인지능력이 점진적으로 소실되는 질환인 노인성 치매는 중추신경계의 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 회복 또는 개선하고자 하는 방향으로 치료제 개발이 활발하게 이루어지고 있으나, 아직까지는 미비한 실정이다.

[0005] 한편, 백출(*Atractylodes macrocephala*)은 삼주 뿌리를 손질하여 말린 것으로, 산개 또는 천개라고도 한다. 매우 쓰며, 약간의 단맛이 있으며, 속이 희며 알이 찬 것이 좋고 특히 가을에 채취한 것이 효능이 좋다고 알려져 있다.

[0006] 수영(*Rumex acetosa*)을 포함하는 *Rumex* 속 식물은 마디풀과(Polygonaceae) 중 가장 큰 속(sp.)으로 전 세계, 주로 북반구 온대지역에 약 200여 종이 분포한다. 그 중 우리나라에는 수영 및 소금쟁이를 포함하여 총 10여 종이 분포되어 있으며, 전국 산야에 자라는 다년초이다. 성체는 30~80cm로 자란다. 줄기에 능이 있고 잎과 더불어 신맛이 난다. 줄기에 달린 잎은 호생하고 장타원형을 밑부분의 것은 짧은 잎자루가 있으나 위로 갈수록 없어진다. 원줄기의 가지 끝에 길이 10~30cm의 원추화서 형태이고 짧은 꽃자루가 있다. 연한 경색엽을 식용으로 하며 민간에서는 뿌리를 음약(개선충약)으로 사용한다. 수영의 잎은 유럽이나 미국에 존재하는 강한 신맛이 나는 시금치와 비슷하게 생긴 것으로 알려진 식물이다. 수영(*R. acetosa*) 추출물은 해열, 이뇨, 살충, 항균, 항암 활성 등의 효능이 있다고 알려져 있다. 또한, 수영을 달인 물은 관절염, 위염 또는 위궤양 등의 치료에 민간요법으로 쓰이는 것으로 보고되고 있다. 수영의 성분으로는 잎에 비텍신(vitexin) 및 퀘시트린(quercitrin)이 함유되어 있고, 뿌리에 크리소파놀(chrysophanol)을 비롯한 안트라퀴논(antraquinone) 및 그 배당체가 함유되어 있으며, 지상부에 오리엔틴(orientin)을 비롯한 플라보노이드류 및 그 배당체가 함유되어 있다고 알려져 있다.

[0007] 인지기능장애 또는 기억력 관련 기술로는 한국공개특허 제2023-0174777호에 육군자탕을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1753057호에 인지기능장애 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 개시되어 있으나, 아직까지는 본 발명의 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대하여 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 상기 백출 및 수영 추출물의 복합물은 해마 신경세포에서 CREB 인산화를 촉진할 뿐만 아니라, 뇌신경 세포주에서 세포 보호 효과가 있으며, LTP(Long-term potentiation)가 형성될 때 나타나는 신경세포 말단의 리모델링(synapse remodeling)에

영향을 주어 시냅스 재구성 인자 및 신경 가소성 인자의 단백질 발현량을 증가시키고, 동물모델의 행동 평가에서 단기/장기 기억능력을 향상시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방 또는 개선용 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 백출 및 수영 추출물의 복합물은 해마 신경세포에서 CREB 인산화를 촉진할 뿐만 아니라, 뇌신경 세포주에서 세포 보호 효과가 있으며, LTP(Long-term potentiation)가 형성될 때 나타나는 신경세포 말단의 리모델링(synapse remodeling)에 영향을 주어 시냅스 재구성 인자 및 신경 가소성 인자의 단백질 발현량을 증가시키고, 동물모델의 행동 평가에서 단기/장기 기억능력을 향상시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 SH-SY5Y 세포에서, 백출 추출물, 수영 추출물 및 백출+수영 복합 추출물의 세포독성을 확인한 결과이다.
- 도 2는 SH-SY5Y 세포에 스크폴라민(SCO)을 처리하여 유발된 세포사멸에 대한 백출 추출물, 수영 추출물 및 백출+수영 복합 추출물의 세포보호 효과를 확인한 결과이다. ##은 아무것도 처리하지 않은 대조군(Control) 대비 스크폴라민 처리군의 세포보호 효과가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.01$ 이고, *, **, ***은 스크폴라민 처리군 대비 백출 추출물, 수영 추출물 및 백출+수영 복합 추출물 처리군의 세포보호 효과가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p < 0.05$ 이고, **은 $p < 0.01$ 이며, ***은 $p < 0.001$ 이다.
- 도 3은 태아 쥐의 해마(hippocampus)를 1차 배양(primary culture)한 뇌 세포에 백출 추출물, 수영 추출물 및 백출+수영 복합 추출물을 처리한 후, PSD95, AMPA 수용체(subunits: GluA1) 및 NMDA 2A 수용체(NR2A) 단백질 발현량 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.
- 도 4는 태아 쥐의 해마(hippocampus)를 1차 배양(primary culture)한 뇌 세포에 2:1의 중량비로 혼합한 백출+수영 복합 추출물을 농도별로 처리한 후, PSD95, AMPA 수용체(subunits: GluA1) 및 NMDA 2A 수용체(NR2A) 단백질 발현량 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.
- 도 5는 SD-랫트에 백출 및 수영 추출물의 복합물을 투여한 후, 모리스 수중 미로 실험(Morris water maze test)으로, 장기(A) 및 단기(B) 기억력에 미치는 효과를 확인한 결과이다. *, ***은 대조군(Control) 대비 본 발명의 백출 및 수영 추출물의 복합물을 투여한 군의 장기 또는 단기 기억력이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p < 0.05$ 이고, ***은 $p < 0.001$ 이다.
- 도 6은 SD-랫트에 백출 및 수영 추출물의 복합물을 투여한 후, 모리스 수중 미로 실험(Morris water maze test)의 단서탐색실험(Probe test)으로, 장기 기억력에 미치는 효과를 확인한 결과이다. **, ***은 대조군(Control) 대비 본 발명의 백출 및 수영 추출물의 복합물을 투여한 군의 도피대가 있었던 분면에서의 수영시간이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, **은 $p < 0.01$ 이고, ***은 $p < 0.001$ 이다.
- 도 7은 SD-랫트에 백출 및 수영 추출물의 복합물을 투여한 후, 적출한 해마 조직에서, NMDA 수용체(Subunits: NR2A, NR2B), AMPA 수용체(subunits: GluA1) 및 PSD95 단백질의 발현량 변화를 확인한 결과이다. *, **, ***은 대조군 대비 백출 및 수영 추출물의 복합물 투여군의 NMDA 수용체(Subunits: NR2A, NR2B), AMPA 수용체(subunits: GluA1) 및 PSD95 단백질의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, *은 $p < 0.05$ 이고, **은 $p < 0.01$ 이며, ***은 $p < 0.001$ 이다.

도 8은 SD-랫트에 백출 및 수영 추출물의 복합물을 투여한 후, 적출한 해마 조직에서, BDNF 단백질의 발현량 변화(A) 및 ERK, CaMKII 인산화(B)를 확인한 결과이다. **, ***은 대조군 대비 백출 및 수영 추출물의 복합물 투여군의 BDNF 단백질의 발현량 및 ERK, CaMKII 인산화가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, **은 $p < 0.01$ 이며, ***은 $p < 0.001$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0016] 상기 백출 추출물은 삼주의 뿌리 추출물인 것이 바람직하고, 수영 추출물은 수영 잎 추출물인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [0017] 상기 백출 및 수영 추출물의 복합물은 하기의 단계를 포함하는 방법에 의해 제조할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:
- [0018] (1) 건조 백출 또는 수영 각각에 대하여, 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0019] (2) 상기 단계 (1)의 백출 또는 수영 추출액을 각각 여과하는 단계;
- [0020] (3) 상기 단계 (2)의 여과한 백출 또는 수영 추출액을 건조하여 백출 추출물 및 수영 추출물을 각각 제조하는 단계; 및
- [0021] (4) 상기 단계 (3)에서 제조한 백출 추출물 및 수영 추출물을 혼합하여 백출 및 수영 추출물의 복합물을 획득하는 단계.
- [0022] 상기 단계 (1)에서 추출용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물 중에서 선택하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 물 또는 에탄올이지만 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 백출 또는 수영 중량의 10~40배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20~110℃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.
- [0023] 상기 단계 (4)에서 획득한 백출 및 수영 추출물의 복합물은 백출 추출물 및 수영 추출물을 0.5~2.5:1, 더 바람직하게는 1.5~2.5:1의 중량비, 가장 바람직하게는 2:1의 중량비로 혼합한 것이지만 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0024] 상기 인지기능장애는 치매(dementia), 학습장애(learning disorder), 실인증(agnosia), 건망증(amanesia), 실어증(aphasia), 실행증(apraxia) 또는 섬망(delirium), 경도인지장애(mild cognitive impairment) 및 빈스완거병(Binswangers disease) 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않고, 상기 치매는 알츠하이머성 치매, 혈관성 치매, 루이소체 치매, 전두엽 치매, 의미 치매(semantic dementia) 및 다발성 경색성 치매(Multi infarct dementia) 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.
- [0025] 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0026] 또한, 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 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 백출 및 수영 추출물의 복합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다. 상기 백출 및 수영 추출물의 복합물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 캐러멜, 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 검류, 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.

[0028] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있으며, 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 단당류, 말토스, 슈크로스과 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, 아스파르트마과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 인지기능장애의 예방 또는 치료용 수 의학적 조성물에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 수 의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리 톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰 로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조 에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동과라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르 베이트 60, 메칠과라벤, 프로필과라벤 및 광물유를 들 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충전제, 향 응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 따른 수의학적 조 성물은 동물에 투여된 후 유효성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방 법을 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 수의학 적 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 조성 물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 수의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 백출 및 수영 추출물의 복합물을 유효성분으로 포함하는 기억력 증진 및 인지기능장애의 예방 또는 개선용 사료 첨가제에 관한 것이다.

[0032] 본 발명의 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다. 본 발명에서 용어 '사료'는 동물이 먹고, 섭취 하며, 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 사료 를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제 약 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. 이 들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0033] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구 체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상 의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0034] **실시예 1. 백출 및 수영 추출물의 복합물 제조**

[0035] 건조된 수영 잎 300g에 9L 증류수를 첨가하여 100℃에서 3시간 동안 가열하여 열수 추출하였다. 상기 추출된 수 영 잎 열수 추출물을 감압 농축 및 동결 건조하여 동결건조물 64.45g을 얻었다.

[0036] 백출(삼주 뿌리)의 건조 분말을 상기와 동일한 방법으로 추출하였다. 이후, 수영 추출물 및 백출 추출물을 표 1 에 개시한 중량비로 혼합하여 효능을 확인하였다.

표 1

백출 및 수영의 혼합비

	백출 및 수영 추출물의 건조 중량비
제조예1-1	1:1

제조예1-2	1:2
제조예1-3	2:1

[0038] **실시예 2. 태아 쥐의 해마(hippocampus) 신경세포 1차 배양(primary culture)**

[0039] 본 발명의 실시예에서 사용한 모든 세포는 1차 배양한 해마 신경세포(primary cultured Hippocampal neurons)이다. 해마 신경세포는 임신 18일에서 19일의 SD 랫트의 태아로부터 분리하였다. 분리한 해마 신경조직에 0.25% 트립신이 첨가된 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)에 넣어 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. HBSS로 수회 세척한 후 1ml 피펫을 이용하여 조심스럽게 피펫팅하여 단일세포로 분리하였다. 분리된 세포는 폴리-L-리신(poly-L-lysine, 0.5mg/ml)으로 미리 코팅해둔 배양 접시에 Neuro basal/B27 배지(0.5mM L-글루타민, 25µM 글루타메이트, 25µM 2-머캅토에탄올, 100U/ml 페니실린, 100µg/ml 스트렙토마이신)을 채워 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포배양 4일 및 11일째에 배지를 교환하였고, 배양 14일째의 세포를 실험에 사용하였다.

[0040] **실시예 3. 태아 쥐의 해마 신경세포에서 CREB 인산화 수준 확인**

[0041] 14일 동안 배양한 1차 배양 해마 신경세포는 시료 처리 1시간 전에 B-27이 없는 배지로 교환하였다. 양성대조군으로는 AMPA 수용체(α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)의 작용체인 AMPA를 100µM 사용하였으며, 백출 추출물, 수영 추출물 및 이들(백출+수영)의 복합 추출물(중량비 1:1)을 농도 1µg/ml을 10분 동안 처리한 후 빙-냉(ice-cold) PBS로 세척 후 세포를 용해하였다. 용해된 세포액은 BCA 단백질 정량 방법에 따라 정량하여 동일한 양을 인산화-CREB(Ser133) 샌드위치 ELISA 키트(Cell signaling)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.

[0042] 그 결과, 표 2에 개시한 바와 같이 1µg/ml의 백출 추출물 및 수영 추출물 각각의 단독에 대비하여, 본 발명에 따른 백출 및 수영 추출물의 복합물(중량비 1:1)에서 CREB 인산화 수준이 유의미하게 증가하였다.

표 2

백출 추출물, 수영 추출물 및 1:1의 중량비로 혼합한 백출 및 수영 추출물의 복합물의 상대적 CREB 인산화 정도

농도 중량비	1(µg/ml)		p-CREB 흡광도 (450nm)	% of Control
	백출	수영		
	무처리(Control)		0.121	0
	양성대조군(Positive control)		0.481	74.87***
	1	-	0.165	9.24*
	-	1	0.143	4.63
	1	1	0.217	20.10**

[0043]

[0044] *, **, ***은 무처리군 대비 양성대조군, 백출 추출물 처리군 및 본 발명의 백출 및 수영 추출물의 복합물 처리군의 인산화된 CREB의 함량이 유의미하게 증가하였다는 것으로, *는 p<0.05이고, **는 p<0.01이며, ***는 p<0.001이다.

[0045] 추가로 백출 및 수영 추출물의 복합물의 CREB 인산화 증가에 대한 최적 조합 비율을 확인하기 위하여, 상기 표 1에 개시한 바와 같은 다양한 혼합비의 백출 및 수영 추출물의 복합물의 CREB 인산화 증가능에 대한 실험을 실시하였다.

[0046] 그 결과, 아무것도 처리하지 않은 대조군에 대비하여 1:2의 중량비로 혼합한 백출 및 수영 추출물의 복합물을 1µg/ml 농도로 처리한 실험군은 CREB 인산화가 28.81% 증가하였고, 2:1의 중량비로 혼합한 백출 및 수영 추출물의 복합물을 1µg/ml 농도로 처리한 실험군은 CREB 인산화가 39.55% 증가하였다(표 3).

표 3

[0047]

백출 및 수영 추출물의 복합물의 혼합비에 따른 CREB 인산화 정도

농도 중량비	1($\mu\text{g}/\text{ml}$)		p-CREB 흡광도 (450nm)	% of Control
	백출	수영		
	무처리(Control)		0.121	0
	양성대조군(Positive control)		0.481	74.87***
	1	1	0.217	20.10**
	1	2	0.259	28.81**
	2	1	0.311	39.55***

[0048]

** , ***은 무처리군 대비 양성대조군, 본 발명의 백출 및 수영 추출물의 복합물 처리군의 인산화된 CREB의 함량이 유의미하게 증가하였다는 것으로, **는 $p < 0.01$ 이며, ***는 $p < 0.001$ 이다.

[0049]

상기 실험 결과로부터, 백출 및 수영 단독 추출물보다 복합 추출물이 CREB 인산화를 증진시키는 시너지 효과가 있으며, 특히 다른 중량비로 혼합한 경우보다 2:1의 중량비로 혼합한 백출 및 수영 추출물의 복합물의 CREB 인산화 효과가 현저하다는 것을 알 수 있었다.

[0050]

실시예 4. 뇌 신경세포주(SH-SY5Y)에서 스코폴라민으로 유도한 세포사멸에 대한 세포보호 효과 확인

[0051]

SH-SY5Y 세포(neuroblastoma, human dopaminergic neuronal cell)를 1% antimycotics/antibiotics와 10% FBS를 함유한 MEM 배지에서 배양하고 96 웰 플레이트에 세포 수가 1×10^5 세포/ml가 되도록 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 신경세포에 미치는 세포독성을 확인하기 위하여 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 백출 추출물, 수영 추출물 및 백출+수영 복합 추출물을 24시간 동안 처리한 후, MTT 어세이를 이용하여 세포생존율을 확인하였다.

[0052]

그 결과, 백출 추출물, 수영 추출물 및 백출+수영 복합 추출물은 뇌 신경세포주에 대한 세포독성이 나타나지 않았다는 것을 확인하였다(도 1).

[0053]

한편, 스코폴라민(Scopolamine, SCO)에 의한 기억력 손상으로 유발되는 세포사멸에 미치는 효과를 확인하기 위하여 SCO를 처리하기 3시간 전에, 30 및 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 백출 및 수영 단독 추출물과 이들의 복합 추출물을 처리한 후, 5mM SCO를 처리하고, 24시간이 지난 후 세포 생존율을 측정하였다.

[0054]

그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 1:1 중량비로 혼합된 백출 및 수영 추출물의 복합물의 농도 30 및 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 처리군에서, 각각 $82.84 \pm 0.59\%$ 및 $97.47 \pm 0.54\%$ 의 세포보호 효과가 있었으며, 백출 및 수영 1:2 중량비로 혼합된 복합 추출물에서는 농도 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $98.92 \pm 0.57\%$ 의 세포보호 효과가 확인되었고, 백출 및 수영의 2:1 중량비로 혼합된 복합 추출물에서는 농도 30 및 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 $90.65 \pm 0.52\%$ 및 $109.38 \pm 0.62\%$ 으로 가장 우수한 세포보호 효과가 있다는 것을 확인하였다.

[0055]

실시예 5. 태아 쥐의 해마 신경세포에서 시냅스 재구성(synapse remodeling) 관여 인자 확인

[0056]

14일 동안 배양한 1차 배양 해마 신경세포에 백출 및 수영 단독 추출물과 이들의 복합 추출물 농도 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 1분 동안 처리한 후 ice-cold PBS로 세척 후 Syn-PER™ 시냅스 단백질 추출 시약(Synaptic protein Extraction reagent)을 이용해 세포를 용해하여 웨스턴 블랏을 실시하여 시냅스 재구성 관여 인자인 PSD-95(Post Synaptic Density 95 kDa), AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) 수용체 (subunits: GluA1) 및 NMDA(N-methyl-D-aspartate) 2A 수용체의 단백질 발현량을 비교하였다.

[0057]

그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 백출 및 수영 단독 추출물 농도 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 경우에 비해 백출 및 수영 추출물의 복합물에서 PSD95, AMPA 수용체 (subunits: GluA1) 및 NMDA 2A 수용체의 단백질 발현이 증가된 것을 확인하였으며, 특히, 2:1 중량비로 혼합된 백출 및 수영 추출물의 복합물에서 단백질 발현량이 가장 증가된 것을 확인하였다.

[0058]

또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, 가장 높은 활성을 보였던 2:1 중량비로 혼합된 백출 및 수영 추출물의 복합물을 농도별(1, 3 및 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)로 1분 동안 처리하여 이들의 PSD95, AMPA 수용체(subunits: GluA1) 및 NMDA 2A 수용체의 단백질 발현량 변화를 확인한 결과, 1, 3 및 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 실험군 모두에서 PSD95, AMPA 수용체 및 NMDA 2A 수용체 단백질 발현량이 현저하게 증가되었다는 것을 확인하였다.

[0059]

실시예 6. 모리스 수중 미로 실험 (Morris water maze test)

[0060] [실험동물 및 사육]

[0061] 생후 6주령의 수컷 SD-랫트를 (주)샘타코(SAMTACO, Korea)에서 구입하여 일정한 조건(온도: 22±2℃, 습도: 50±5%, 명암: 12시간 명암 주기)을 유지하는 동물 사육실에서 일주일 동안 적응시킨 후 사용하였다.

[0062] 실험동물 행동평가를 위한 수컷 SD-랫트에 본 발명의 백출 및 수영 복합추출물(10, 50 및 100mg/kg)을 21일 동안 1일 1회 경구투여하였으며, 대조군(Control)으로는 시료를 투여하지 않은 무처리군을 사용하였다. 모리스 수중 미로 시험은 원형풀(직경: 180cm, 높이: 75cm)에 물을 25±1cm의 높이까지 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. 본 실험에 들어가 첫 번째 실험일에는 도피대가 놓인 사분면을 제외한 3곳 중 2곳에서 임의의 순서로 동물을 출발시켜 60초 동안 도피대를 찾으려 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 동안을 시행하였다. 단, 2일, 3일째에서는 전날 습득된 장기기억을 평가하고자 도피대까지 유도하는 초기 학습을 생략하였다. 모든 데이터는 수영장 위에 설치된 카메라로 촬영되어 비디오 추적 장치(Panlab, Barcelona, Spain)로 분석하였다.

[0063] 그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, 각 실험일의 첫 번째 시도(First trials)는 장기기억을 나타내는 지표인데, 백출 및 수영 추출물의 복합물 10, 50 및 100mg/kg 투여군의 첫 번째 시도에서 도피대를 탐색하는 시간이 대조군(CTL)의 첫 번째 시도에 비해 유의미하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0064] 또한, 도 5B에 개시한 바, 각 실험일의 마지막 시도(Last trials)는 단기기억을 나타내는 지표인데, 백출 및 수영 복합추출물 10, 50, 및 100mg/kg 투여군의 마지막 시도에서 도피대를 탐색하는 시간이 대조군(CTL)의 마지막 시도에 비해 유의미하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0065] 한편, 3일 동안의 실험이 끝난 24시간 후인 4일째에 프로브 테스트(probe test)를 실시하였다. 도피대 없이 90초 동안 자유수영을 하게 하여 이전 도피대의 위치에 대한 기억(4분면 중, 도피대가 있었던 분면 수영시간)을 보유하고 있는지 에 대한 검사를 실시하였다.

[0066] 그 결과, 도 6에 개시한 바와 같이 대조군(CTL)에 대비하여, 백출 및 수영 추출물의 복합물 투여군의 도피대가 있었던 분면에서의 수영시간이 유의미하게 증가하였다.

[0067] 실시예 7. SD-랫트에서 적출한 해마에서 시냅스 재구성 인자 및 신경가소성인자 단백질 발현량 변화 확인

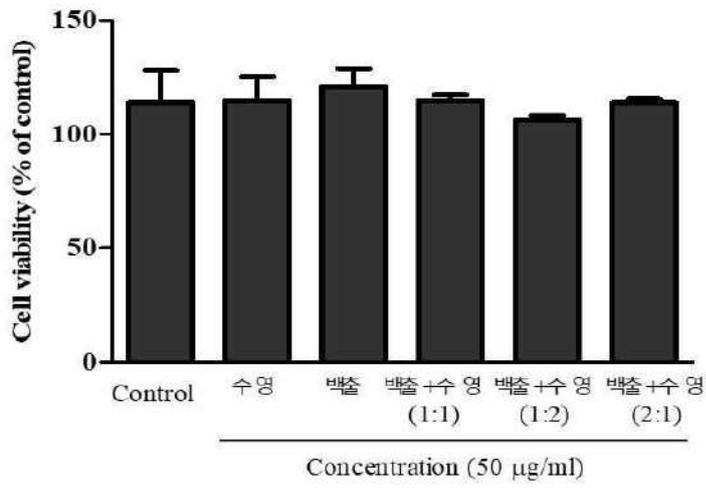
[0068] 모든 행동평가가 끝난 날에 SD-랫트에서 해마를 적출하여 시냅스 재구성 인자인 NMDA(N-methyl-D-aspartate) 수용체(Subunits: NR2A, NR2B), AMPA 수용체(subunits: GluA1) 및 PSD95 단백질 발현량과 신경가소성 인자인 ERK, CaMKII 및 BDNF 단백질 발현량 변화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다.

[0069] 그 결과, 도 7에 개시한 바와 같이 대조군(Control)에 비해 백출 및 수영 복합추출물(10, 50 및 100mg/kg) 투여군에서 NR2A, NR2B, GluA1 및 PSD95의 단백질 발현량이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

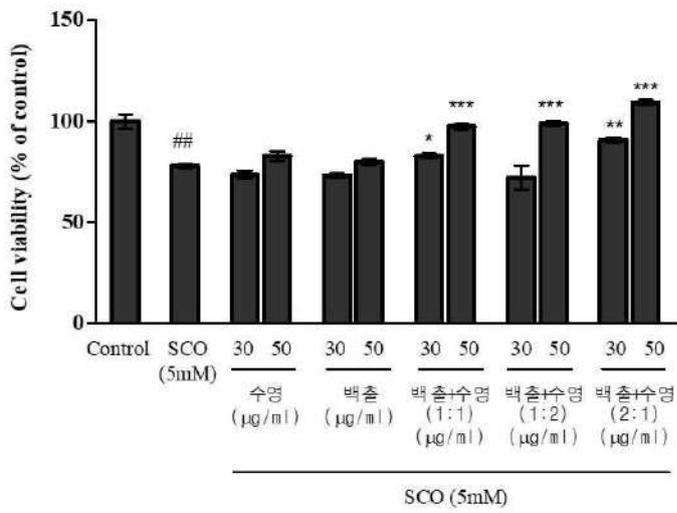
[0070] 또한, 도 8A에 개시한 바, 대조군(Control)에 비해 백출 및 수영 복합추출물 (10, 50 및 100mg/kg)투여군에서 시냅스 형성에 관여하는 뇌유래신경성장인자 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 단백질 발현량이 유의미하게 증가되었고, 도 8B에 개시한 바와 같이 백출 및 수영 복합추출물(10, 50 및 100 mg/kg) 투여군에서 시냅스 가소성 조절에 관여하는 신호전달경로 ERK 및 CaMKII 인산화 발현이 유의적으로 증가된 것을 확인하였다.

도면

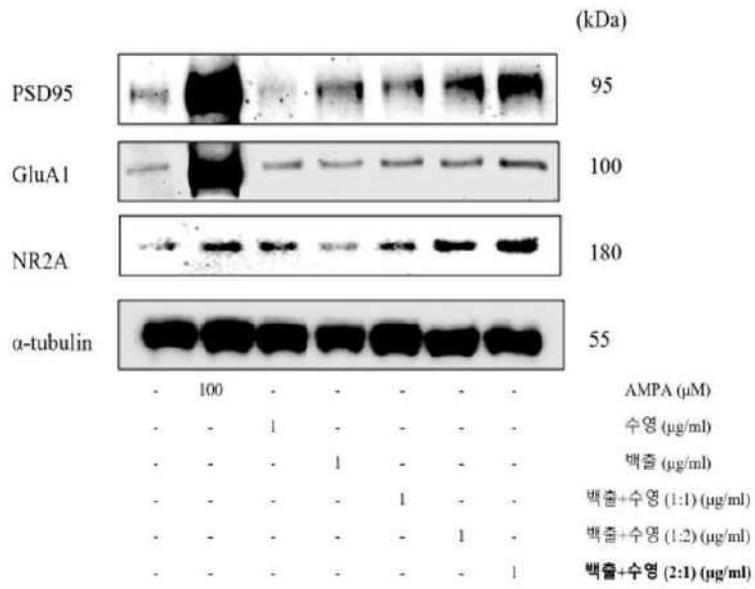
도면1



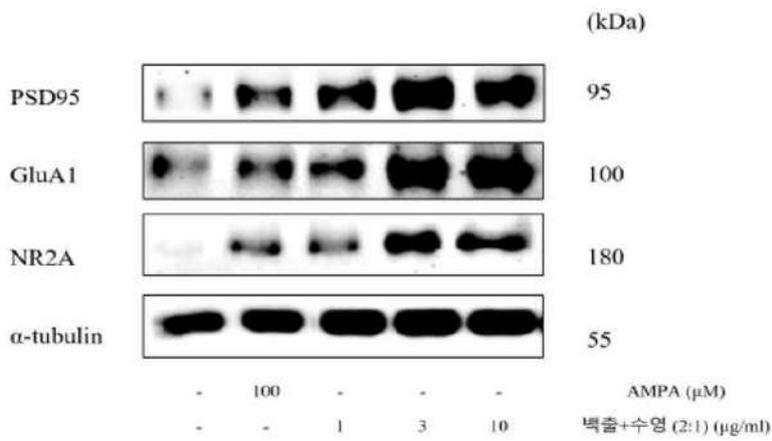
도면2



도면3

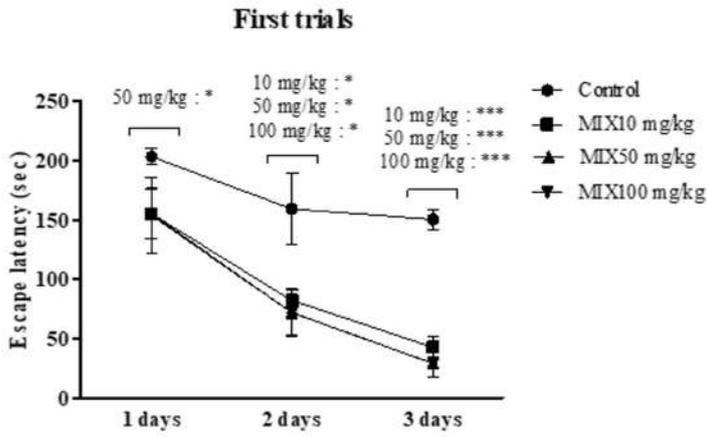


도면4

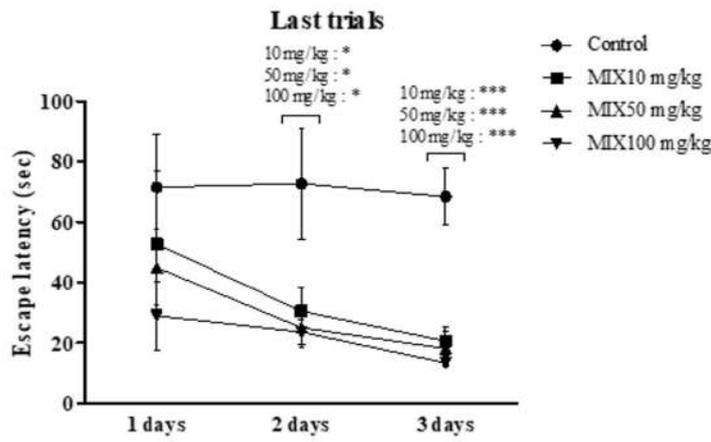


도면5

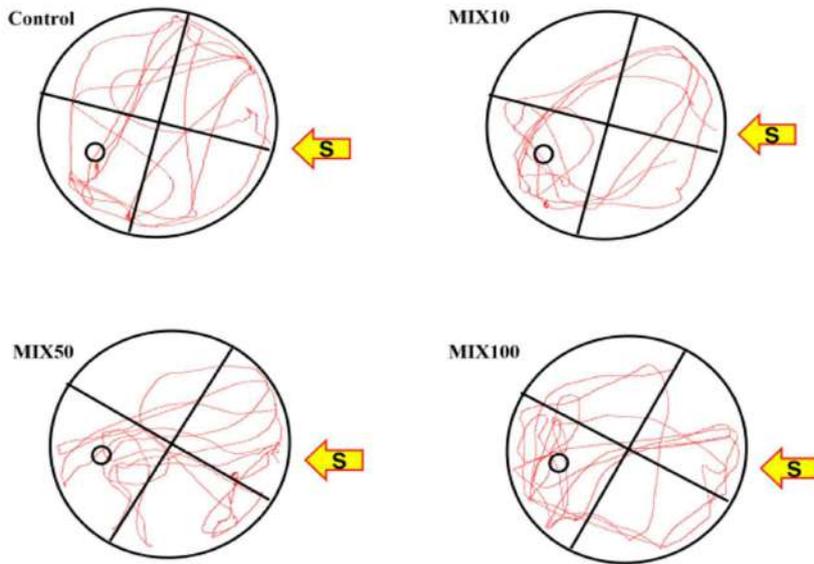
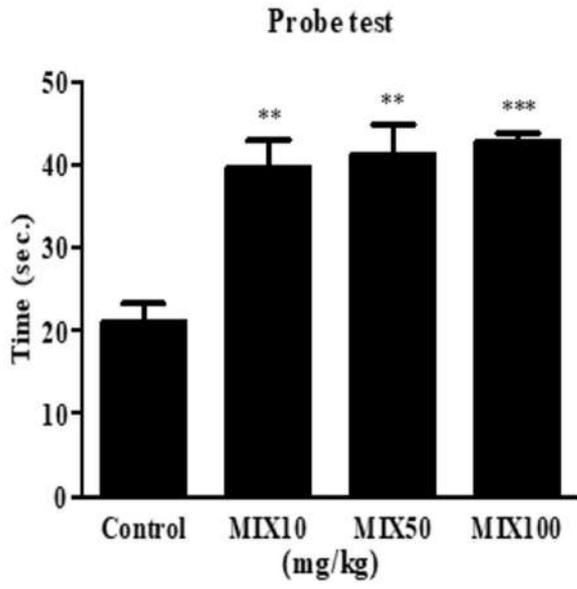
(A)



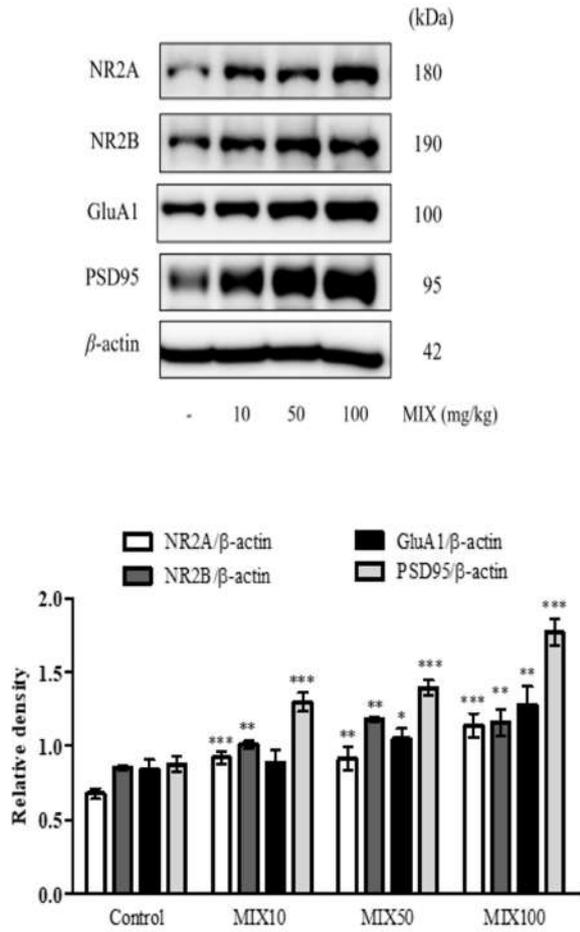
(B)



도면6



도면7



도면8

