(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0039071
(43) 공개일자 2025년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
A61P 39/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0121782
(22) 출원일자 2023년09월13일
심사청구일자 2023년09월13일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
조성훈
서울특별시 동대문구 경희대로 23, 한방병원 2층 신경정신과 외래 (회기동)
김윤나
서울특별시 동대문구
(74) 대리인
특허법인태백

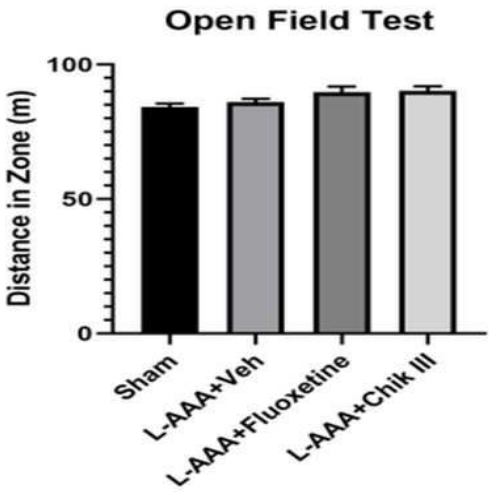
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 또는 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것에 관한 것으로, 상기 물질이 항산화, 항염증, 항우울 및 인지기능 개선 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 스트레스성 질환 또는 인지기능장애 예방, 치료 또는 개선용 조성물로써, 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 39/06 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, Chikusetsusaponin III는 인삼(*Panax ginseng*)에서 유래한 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, Chikusetsusaponin III는 항산화 또는 항염증 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 스트레스성 질환은 우울증, 수면장애, 무력증 및 불안장애로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 인지기능장애는 학습장애, 실인증, 건망증, 실어증, 실행증, 섬망, AIDS 유발 치매, 빈스 완거 병, 루이소체 치매, 전두측두엽성 치매, 경도 인지 장애, 다발성 경색성 치매, 픽병, 의미치매, 알츠하이머성 치매 및 혈관성 치매로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 또는 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 우울증은 사회적 문제로 대두되고 있다. 핵가족화, 산업화 등의 영향으로 그 심각성이 더해지며, 자살률 및 사회적 비용의 증가로 이어지고 있다. 우울증은 객관적 상황과는 관계없이 일어나는 정서적 병리현상으로, 환자의 모든 생활이 우울한 기분으로 덮여있고, 흥미가 감소하고 무쾌감증(anhedonia)이 되며 정신운동의 저하, 염세감, 절망에 사로잡히게 되고 자살의욕을 느껴 자살기도에까지 이르는 질병이며, 식욕저하, 불면, 변비, 성욕감퇴 등 다양한 신체적 증상을 보인다.

[0003] 우울증의 발생기전과 우울증의 치료제인 항우울제의 작용기전을 완벽하게 설명하는 이론은 아직 없다. 그러나 일반적으로는 중추신경계의 시냅스 내에 모노아민(monoamine)계 신경전달물질(neurotransmitter)인 세로토닌(serotonin), 노르에피네프린(norepinephrin), 도파민(dopamine) 등이 부족하게 되면 우울증이 유발된다는 것

이 가장 유력한 가설이다. 따라서 현재의 항우울제는 대부분 중추 세로토닌 또는 노르아드레날린 시냅스에서 신경전달물질의 농도를 높이는 약리작용을 가지고 있다. 항우울제는 신경전달물질의 농도를 높여주는 메카니즘에 따라 삼환계 항우울제(TCA; tricyclic antidepressants), 모노아민 옥시다제 억제제(MAOI; monoamine oxidase inhibitors), 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(SSRI; selective serotonin reuptake inhibitors) 등이 많이 사용되고 있다.

[0004] 이러한 기존의 항우울제가 비교적 효과적이기는 하나, 일부에서 심한 부작용 및 기대에 미치지 못하는 효과가 나타나는 경우가 있다. 약물 투여로 인해 시냅스 내 모노아민의 농도는 즉시 증가하나 우울감의 개선 등 증상의 호전에는 통상 2주가량의 기간이 필요하다. 또한, 항우울증 약물에 잘 반응하지 않거나, 재발률이 높으며, 심한 부작용에 의해 약물복용이 불가능한 환자들도 많다. 삼환계 항우울제(tricyclic antidepressants: TCA)인 이미프라민(imipramine), 데시프라민(desipramine) 등은 저혈압, 심장기능장애 등의 부작용이 심하게 나타난다. 가장 널리 쓰이는 플루아크서틴(fluoxetine), 서트랄린(sertraline) 등의 선택적 세로토닌 재흡수 억제제는 구역, 위장관 출혈 또는 성기능 장애 등을 유발한다. 이 중, 치료효과가 지연되어 나타나는 lag period에 의한 문제점이 매우 중요한데, 이는 응급상황인 자살 충동 등에 신속히 대처하지 못하는 문제를 야기하고, 약물 장기간 복용에 의한 부작용을 증가시킨다. 또한, 치료효과를 판정하는데 일정 기간을 요하므로 효과가 없을시 대체 약물을 사용하기까지 시간을 지연시키는 문제점이 지적된다.

[0005] 이러한 문제점을 보완할 새로운 작용 기전을 가진 항우울제로, 글루탐산 신경계 작용 약물, 케타민 등이 제시되었다. 그러나 케타민 등의 NMDA 수용체 차단제는 해리성 마취제로 사용되고 있으며, 습관성 약물로 분류되어 그 사용이 엄격히 통제되고 있다. 유포리아(euphoria), 환각, 이상 감각 등의 증상을 유발하지만, 항우울 작용을 나타내는 용량에서는 이러한 정신병적 증상이 최소한으로 나타난다. 또한, 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 케타민과 같은 비선택적 NMDA 차단제보다는 특정 NMDA 수용체 아형에 선택적 차단효과를 가진 약물의 개발이 이루어지고 있다. NR2A(NMDA 수용체 type2-A형)에 선택적으로 작용하는 약물은 개발되어 있지 않으나 이를 유전자 조작 쥐에서 제거하면 항우울제를 투여한 것과 유사한 효과가 나타난다. 또한, NR2B 선택적 차단제 이펜프로딜(ifenprodil), 일리프로딜(eliprodil), 트렉소프로딜(traxoprodil), Ro25-6981 등의 항우울 효과가 실험을 통해 밝혀졌다. 선택적 NMDA 수용체 차단제들에 대한 독성 연구는 체계적으로 이루어져 있지 않으나 비선택적 NMDA 수용체 차단제보다 경미한 부작용을 가질 것으로 예상된다.

[0006] 이러한 약물 개발을 위해 여러 제약회사에서 연구 개발에 박차를 가하고 있다. 현재 국내에서는 신약 개발이 가져오는 경제 사회적 효과는 지대하나 그 개발 비용이 막대하여 쉽게 개발에 나서지 못하는 실정이다. 그러나 한약이나 천연물에는 여러 가지 알려져 있지 않은 성분들이 함유되어 있으며 우리 선조들이 오랫동안 사용해온 경험의 축적으로 비교적 안전성이 확보되어 있다는 장점이 있다.

[0007] 한방에서는 우울 또는 불안 및 신경과민 등을 혈허(血虛) 및 기허(氣虛) 혹은 간(肝), 심(心), 비(脾)에 열(熱)에 의한 것으로 인식하고 있으며, 이러한 원인에 의해 우울, 불안, 불면, 다몽, 공포, 경련, 광란, 번조 등이 나타난다고 알려져 있다. 또한 장조(臟躁), 기역(氣逆), 분돈기(奔豚氣), 경계(驚悸) 등의 증상이 나타나는 경우를 주로 공황장애로 분류한다. 강력한 스트레스에 대하여 현저한 정신장애가 일어난 경우에 기란(氣亂)이라고도 하여 현대 의학의 우울증 또는 불안증 범주에 포함시키고 있다. 이러한 정신 신경계 질환을 주로 안신약물(安神藥物)이라는 약물군으로 치료하는데, 이러한 약물은 우울 또는 불안을 감소시키며, 진정최면 작용 및 항경련 작용이 있다. 안신약물에 속하는 약물들은 각각 약물들 고유의 특성이 있기는 하지만 공통적으로 신경 안정의 효능을 갖는다고 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 KR 10-2015-0113434(2015.10.08. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 인지기능장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, Chikusetsusaponin III가 항산화, 항염증, 항우울 및 인지기능 개선 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 스트레스성 질환 또는 인지기능장애 예방, 치료 또는 개선용 조성물로써, 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 우울증 유도 동물모델에서 Chikusetsusaponin III(이하 Chik III라 함)의 활성 확인을 위한 실험의 전반적인 모식도이다. OFT, Open field test; NORT, Novel Object Recognition Test; TST, Tail suspension Test; FST, Forced swim test; L-AAA, L-alpha-aminoadipic acid.

도 2는 L-AAA(L-alpha-aminoadipic acid) 투여를 통한 우울증 유도 동물모델 제작에 대한 전반적인 모식도이다.

도 3은 Chik III가 운동성 및 움직임에 미치는 영향을 확인하기 위해, 일반 운동 활성 검사(Open field test; OFT)를 수행한 결과이다. 데이터는 평균±표준오차(SEM)로 나타냈다.

도 4는 Chik III의 항우울 효과를 확인하기 위해, 강제수영 검사(Forced swim test; FST)를 수행한 결과이다. 데이터는 평균±표준오차(SEM)로 나타냈다. #P<0.05, compared with 모의 대조군(Sham); *P<0.05, **P<0.01 compared with 음성대조군(L-AAA+Veh).

도 5는 Chik III의 항우울 효과를 확인하기 위해, 마우스 꼬리 매달기 검사(Tail suspension Test; TST)를 수행한 결과이다. 데이터는 평균±표준오차(SEM)로 나타냈다. ###P<0.001, compared with 모의 대조군(Sham); ****P<0.0001 compared with 음성대조군(L-AAA+Veh).

도 6은 Chik III의 항우울 및 인지기능 개선 효과를 확인하기 위해, 새로운 객체 인식 검사(Novel Object Recognition Test; NORT)를 수행한 결과이다. 데이터는 평균±표준오차(SEM)로 나타냈다. ##P<0.01 compared with 모의 대조군(Sham); **P<0.01, ***P<0.001 compared with 음성대조군(L-AAA+Veh).

도 7은 Chik III의 항염증 효과를 확인하기 위해, Real-time PCR을 수행한 결과이다. 데이터는 평균±표준오차(SEM)로 나타냈다. #P<0.05, ##P<0.01, ####P<0.0001 compared with 모의 대조군(Sham); **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001 compared with 음성대조군(L-AAA+Veh); †P<0.05 compared with 양성대조군(L-AAA+Fluoxetine).

도 8은 Chik III의 항산화 효과를 확인하기 위해, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행한 결과이다. 데이터는 평균±표준오차(SEM)로 나타냈다. ###P<0.001, ####P<0.0001 compared with 모의 대조군(Sham); **P<0.01, ***P<0.001 compared with 음성대조군(L-AAA+Veh).

도 9는 Chik III의 항염증 효과를 확인하기 위해, 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행한 결과이다. 데이터는 평균±표준오차(SEM)로 나타냈다. ##P<0.01, ####P<0.0001 compared with 모의 대조군(Sham); ***P<0.001, ****P<0.0001 compared with 음성대조군(L-AAA+Veh); ††P<0.01 compared with 양성대조군(L-

AAA+Fluoxetine).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0021] 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 Chikusetsusaponin III는 항산화 또는 항염증 효과를 나타낼 수 있다.

[0024] 또한, 상기 Chikusetsusaponin III는 인삼(*Panax ginseng*)에서 유래한 것일 수 있고, 바람직하게는 인삼 추출물에서 유래한 것일 수 있다.

[0025] 상기 추출물은 추출용매로 추출하거나 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조할 수 있다. 상기 추출용매는 물 또는 유기용매일 수 있고, 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있으며, 바람직하게는 30 내지 80%의 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올 수용액, 더욱 바람직하게는 40 내지 70% 에탄올 수용액일 수 있다.

[0026] 상기 스트레스성 질환은 우울증, 수면장애, 무력증 및 불안장애로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에서 용어, “Chikusetsusaponin III”란 인삼(*Panax ginseng*)의 유효성분 중 하나이다. 인삼은 대표적인 약용식물로서 떡잎식물 사형화목 두릅나무과 여러해살이풀이다. 약용으로 많이 재배한다. 높이는 60cm에 이르고 삼대(줄기)는 해마다 1개가 곧게 자라며 그 끝에 1개의 꽃대(화경)가 이어지고, 3~6개의 잎자루가 돌려난다. 잎은 잎자루가 길고 잎몸은 3~5개로 갈라져서 장상복엽을 이룬다. 잎 앞면의 맥 위에는 털이 있다. 여름에 1개의 가는 꽃줄기가 나와서 그 끝에 4~40개의 담황록색의 작은 꽃이 산형꽃차례에 달린다. 꽃잎과 수술은 5개이며 암술은 1개로 씨방은 하위이다. 열매는 핵과로 편구형이고 성숙하면 선홍색으로 된다.

[0028] 본 발명의 Chikusetsusaponin III는 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있다. 보다 구체적으로는 불순물을 제거한 Chikusetsusaponin III에 추출용매를 가하고 추출과정을 수행하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 추출 과정은 냉침추출법, 온침추출법, 가압추출법 또는 초음파 분쇄 추출법일 수 있다. 또한, 상기 추출법으로 제조한 추출물 즉, 조추출액에 분획용매를 가한 후에, 예를 들어 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 순서로 가한 후에 층분리한 헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물을 수득하는 방법을 수행할 수 있다.

[0029] 또한, 상기 추출물은 추출 또는 분획과정을 수행한 이후, 감압 여과 과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다. 상기 수득한 인삼 추출물은 사용 시까지 급속 냉동 냉장고(deep freezer)에 보관할 수 있다.

[0030] 상기 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 Chikusetsusaponin III를 0.001 내지 99.99중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있다.

[0031] 상기 조성물은 Chikusetsusaponin III 외에 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 조성물에는 상기 성분들이 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다. 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 Chikusetsusaponin III에 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위에서 추가할 수 있다.

[0032] 상기 약학 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 생리식염수, 메틸히드록

시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜 및 리퀴드 파라핀으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 Chikusetsusaponin III에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[0033] 본 발명의 Chikusetsusaponin III로 포함하는 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 현탁제, 에멀젼, 시럽 등의 경구형 제형물로 사용될 수 있다.

[0034] 상기 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 Chikusetsusaponin III을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량%, 더욱 바람직하게는 1중량% 내지 50 중량% 포함할 수 있다. 또한, 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 Chikusetsusaponin III 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위에서 추가할 수 있다.

[0035] 또한, 상기 약학 조성물은 약제화하는 경우, 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구 모두 사용 할 수 있다.

[0036] 구체적으로 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 항균 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 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.

[0037] 또한, 본 발명의 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할수 있다. 구체적인 제형의 예로는 과립제, 산제, 시럽제, 액제, 현탁제, 전제, 침제, 정제, 좌제, 주사제, 주정제, 캅셀제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀 등일 수 있다. 더 나아가 본 발명의 치료용 조성물은 당해기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 바람직하게 제형화될 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 본원발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 치료용 조성물은 Chikusetsusaponin III의 양을 기준으로 1일 0.0001 내지 1000mg/kg으로, 보다 효과적이기 위해서는 0.01 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량과 투여횟수는 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0040] 또한, 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 스트레스성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0041] 또한, 본 발명은 Chikusetsusaponin III를 유효성분으로 포함하는 인지기능장애 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0042] 상기 인지기능장애는 학습장애, 실인증, 건망증, 실어증, 실행증, 섬망, AIDS 유발 치매, 빈스완거 병, 루이소체 치매, 전두측두엽성 치매, 경도 인지 장애, 다발성 경색성 치매, 픽병, 의미치매, 알츠하이머성 치매 및 혈관성 치매로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의도이다.

[0044] 본 발명의 식품은 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예,스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예,과실,채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상

기 식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 건강기능음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 Chikusetsusaponin III을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0047] 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100㎖ 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 쥬스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0048] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 Chikusetsusaponin III에 100 중량부 당 0 내지 20 중량부 범위에서 선택될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 건강기능음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.

[0050] 상기 건강기능음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 Chikusetsusaponin III를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0051] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖ 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g이다.

[0052] 또한, 상기 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 Chikusetsusaponin III의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 포함할 수 있으며, 음료 조성물은 100㎖를 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 포함할 수 있다.

[0054] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0056] **[실험예 1] 실험 준비**

[0057] 1-1. 인삼 추출물

[0058] 인삼(*Panax ginseng*) 추출물은 ChemFaces에서 구매하여 사용하였다.

[0060] 1-2. Chik III

[0061] 생물학적 검정 유도 분류(Bioassay-guided fractionation) 방법을 수행하여 상기 구매한 인삼 추출물로부터 Chik III(Chikusetsusaponin III)을 분리하였다.

[0063] 1-3. 실험동물

[0064] 7주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 (주)영바이오에서 공급받아 사용하였다. 경희의료원 동물 사육실에서 1주일 이상 사육하여 적응시켜 사용하였고, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 온도는 23±2℃, 습도는 55±10% 및 명암주기는 12시간 간격으로 자동조절 되도록 하였다. 본 동물실험은 도 1과 같이 수행하였다.

[0066] 1-4. 우울증 모델 제작

[0067] 상기 마우스에 L-AAA(L-alpha-aminoadipic acid)를 투여하여 우울증 모델을 제작하였다. 도 2와 같이, 실험 1일 차에 L-AAA를 주입하기 전에 stereotaxis를 통해 가이드 캐뉼라(guide cannula)를 삽입 고정하고, 실험 8~9일 차에 L-AAA를 케뉼라를 통해 마우스 대뇌 반구 양쪽에 하루에 1회씩 총 2회 투여하여(injection pump를 이용하여 1㎕/min rate로 대뇌 반구 양쪽에 각각 1min 투여) 우울증을 유도하였다(마우스 브레그마(정수리)를 기준으로 -2.5㎜ 앞/뒤, ±0.3㎜ 좌/우 및 -1.7㎜ 높이). 본 실험에서 사용한 실험군은 구체적으로 하기와 같다. 실험군당 9마리로 설정하였다.

[0068] 1) 모의 대조군(Sham) : Sham surgery(동물 모델에 아무것도 처리하지 않음)

[0069] 2) 음성대조군(L-AAA+Veh) : 우울증 유도군에 물(200㎕) 경구 투여

[0070] 3) 양성대조군(L-AAA+Fluoxetine) : 우울증 유도군에 플루옥세틴(1mg/kg) 경구 투여

[0071] 4) Chik III 투여군(L-AAA+Chik III) : 우울증 유도군에 Chik III(20mg/kg) 경구 투여

[0073] **[실시예 1] Chik III 활성 분석**

[0074] 1-1. 일반 운동 활성 검사

[0075] Chik III가 운동성 및 움직임에 미치는 영향을 확인하기 위해, 일반 운동 활성 검사(Open field test; OFT)를 수행하였다. 실험군당 9마리씩 배정하였다. 마우스를 50×50×50㎝의 흰색 아크릴 박스에 넣고, 영상추적시스템(video tracking system, smart v.2.5.21)을 이용하여 10분 동안 행동을 측정하였으며, 오픈 필드(Open field)를 9등분하여 가운데 영역을 central zone으로 설정하였다. 이후 각 군의 자발 운동량을 이용한 보행 활동량을 측정하였다.

[0076] 그 결과, 도 3과 같이, 모든 실험군에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. 상기 결과로부터, 약물(L-AAA, 플루옥세틴 및 Chik III)이 운동 기능(보행 활동량)에 미치는 영향이 없음을 확인하였다.

[0078] 1-2. 강제수영 검사

[0079] Chik III의 항우울 효과를 확인하기 위해, 강제수영 검사(Forced swim test; FST)를 수행하였다. 실험군당 6마리씩 배정하였다. 지름 20cm 및 깊이 35cm의 실린더에 24±1℃의 물을 20cm 채워서 마우스의 꼬리가 실린더 바닥에 닿지 않게 하였다. 그 후, 마우스에 각각 약물을 투여하고 1시간 후, 마우스를 실린더에 넣고, 6분 동안 디지털카메라를 사용하여 녹화하였다. 강제수영을 하는 마우스는 활동과 부동자세(Immobility Time)를 교대로 보이는데, 항우울제는 용량 의존적으로 부동자세를 보이는 시간(부동시간)을 감소시키므로, 부동시간을 측정하여 항우울 효과를 확인하였다. 기록된 동영상은 처음 2분간을 제외한 나머지 4분 동안을 기준으로 마우스가 머리만 물 위로 내어 놓고 움직임 없이 가만히 있는 시간을 측정하였다.

[0080] 그 결과, 도 4와 같이, 음성대조군에서 부동시간이 유의하게 증가하였고, 양성대조군 및 Chik III 투여군에서 부동시간이 유의하게 감소하였으며, 특히 Chik III 투여군이 양성대조군보다 부동시간이 낮게 나타났다. 상기 결과로부터, Chik III는 항우울 효과가 있음을 확인하였다.

[0082] 1-3. 꼬리 매달기 검사

[0083] Chik III의 항우울 효과를 확인하기 위해, 마우스 꼬리 매달기 검사(Tail suspension Test; TST)를 수행하였다. 실험군당 6마리씩 배정하였다. 높이 45cm의 모서리에 접착력이 강한 테이프를 마우스 꼬리 끝 1~2cm에 붙여서 마우스를 매달아 부동시간 측정을 통해 항우울 효과를 확인하였다. 실험군당 5마리씩 배정하였다. 마우스 각각 약물을 투여하고 1시간 후, 마우스를 매달아 6분 동안 디지털카메라를 사용하여 기록하였으며, 기록된 동영상은 6분 동안 마우스가 움직임 없이 가만히 있는 시간(부동시간)을 측정하였다.

[0084] 그 결과, 도 5와 같이, 음성대조군에서 부동시간이 유의하게 증가하였고, 양성대조군 및 Chik III 투여군에서 부동시간이 유의하게 감소하였으며, 특히 Chik III 투여군이 양성대조군보다 부동시간이 낮게 나타났다. 상기 결과로부터, Chik III는 항우울 효과가 있음을 확인하였다.

[0086] 1-4. 새로운 객체 인식 검사

[0087] Chik III의 항우울 및 인지기능 개선 효과를 확인하기 위해, 새로운 객체 인식 검사(Novel Object Recognition Test; NORT)를 수행하였다. 실험군당 5마리씩 배정하였다. 마우스를 50×50×50cm의 흰색 아크릴 박스에 넣고, 크기는 같지만 모양이 다른 2개의 플라스틱으로 만든 물체를 상자 안에 넣었다. 마우스가 10분간 자유롭게 돌아다니도록 방치하고 각 물체에서 소비하는 시간을 측정하였다(training session). 24시간 후 training session에서 경험한 물체 1개와 새로운 물체 1개가 있는 상자 안에 마우스를 넣고 각 물체에서 소비하는 시간을 측정하였다(test session). 상기 측정한 값과 하기 수학식(수학식 1 및 2)을 이용하여 총 조사 시간(Total Investigation time) 및 차별 지수(Discrimination Index)를 계산하였다.

[0088] [수학식 1]

[0089] *총 조사 시간(Total Investigation time) = 새로운 물체에 소비한 시간/(새로운 물체에 소비한 시간 + 경험한 물체에 소비한 시간)×100*

[0090] [수학식 2]

[0091] *차별 지수 계산(Discrimination Index) = (새로운 물체에 소비한 시간 - 경험한 물체에 소비한 시간)/(새로운 물체에 소비한 시간 + 경험한 물체에 소비한 시간)*

[0092] 그 결과, 도 6과 같이, 음성대조군에서 총 조사 시간 및 차별 지수가 유의하게 감소하였고, 양성대조군 및 Chik III 투여군에서 총 조사 시간 및 차별 지수가 유의하게 증가하였다. 상기 결과로부터, Chik III는 항우울 및 인지기능 개선 효과가 있음을 확인하였다.

[0094] 1-5. Real-time PCR

[0095] Chik III의 항염증 효과를 확인하기 위해, Real-time PCR을 수행하여 염증 관련 인자 유전자 발현을 측정하였다. 구체적으로, 각각의 실험군에 사용된 마우스의 뇌조직을 이용하여 RNA의 발현량을 확인하고, 상보적 DNA(cDNA) 합성을 통해 이를 Real-time PCR 기계를 통해 소량의 합성된 cDNA를 대량으로 증폭시켰다. Real-time PCR 기계를 이용한 cDNA 증폭 과정은 하기와 같다.

[0096] 1) Initial denaturation : 94℃, 3분, 1사이클(cycle)

[0097] 2) Denaturation : 94℃, 30초, 35사이클

[0098] 3) Annealing : 58℃, 30초, 35사이클

[0099] 4) Extension : 72℃, 45초, 35사이클

[0100] 5) Hold : 4℃ Hold

[0101] 증폭된 cDNA를 이용하여 항염증 효과를 확인하기 위해, IL-1β, IL-6, TNF-α 및 리포칼린-2(Lipocalin-2)의 서열(5'-> 3')을 GenBank를 통해 확인하였으며 사용된 서열(5'-> 3')은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0102]

No	Name	Sequence (5'-> 3')	GenBank No.
1	IL-1β(F)	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	NM_008361
2	IL-1β(R)	TCCACGATTTCCCAGAGAAC	
3	TNF-α(F)	ATGGCCTCCCTCTCAGTTC	NM_013693
4	TNF-α(R)	TTGGTGGTTTGCTACGACGTG	
5	IL-6(F)	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	NM_031168
6	IL-6(R)	TCCACGATTTCCCAGAGAAC	
7	GAPDH(F)	TGGGCTACACTGAGCACCAG	NM_008084
8	GAPDH(R)	GGGTGTCGCTGTTGAAGTCA	
9	Lipocalin-2(F)	ATGTCACCTCCATCCTGGTC	AA087193
10	Lipocalin-2(R)	CACACTCACCACCCATTCAG	

[0103] 그 결과, 도 7과 같이, 음성대조군에서 IL-1β, IL-6, TNF-α 및 리포칼린-2(Lipocalin-2) 발현이 유의하게 증가하였고, 양성대조군 및 Chik III 투여군에서 상기 유전자 발현이 유의하게 감소하였다. 상기 결과로부터, Chik III는 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

[0105] 1-6. ELISA

[0106] Chik III의 항산화 효과를 확인하기 위해, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하여 MDA(malondialdehyde) 및 SOD(superoxide dismutase) 단백질 발현을 측정하였다. 구체적으로, 각각의 실험군에 사용된 마우스의 뇌조직을 이용하여 MDA 및 SOD에 특이적으로 반응하는 항체가 부착된 96 웰 플레이트에 스탠다드(Standard)를 각각의 웰에 100㎕씩 넣어주고 플레이트 실링(plate sealing)을 부착하고 인큐베이터에서 90분 및 37℃ 조건으로 배양하였다. 그 후, 실링(sealing)을 제거하고 각 웰의 내용물을 털어준 후, Wash Buffer를 100㎕씩 넣어주고 가볍게 탭(Tap)하여 각 웰을 세척하였다(2회 반복). Wash 용액을 버리고 각 웰에 Biotinylated Antibody를 100㎕씩 넣어주고 실링(sealing) 후, 인큐베이터에서 30분 및 37℃ 조건으로 배양하였다. 그 후, 실링(sealing)을 제거하고 각 웰의 내용물을 털어주고 3회 세척하였다. 효소 접합체(Enzyme Conjugate)를 각 웰에 100㎕씩 넣어주고 실링(sealing) 후 인큐베이터에서 30분 및 37℃ 조건으로 배양하였다. 그 후, 실링(sealing)을 제거하고 컬러 시약(Color Reagent)을 각 웰에 100㎕씩 넣어주고 실링(sealing) 후, 차광하여 인큐베이터에서 30분 및 37℃ 조건으로 배양하였다. 그 후, 실링(sealing)을 제거하고 각 웰에 컬러 시약을 100㎕씩 넣어주고 플레이트를 가볍게 탭(Tap)하여 잘 섞어준 후, 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0107] 그 결과, 도 8과 같이, MDA의 경우, 음성대조군에서 단백질 발현이 유의하게 증가하였고, 음성대조군 대비 양성대조군 및 Chik III 투여군에서 단백질 발현이 유의하게 감소하였다. SOD의 경우, 음성대조군에서 단백질 발현이 유의하게 감소하였고, 음성대조군 대비 양성대조군 및 Chik III 투여군에서 단백질 발현이 유의하게 증가하였다. 상기 결과로부터, Chik III는 항산화 효과가 있음을 확인하였다.

[0109] 1-7. 웨스턴 블롯

[0110] Chik III의 항염증 효과를 확인하기 위해, 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하여 IBA-1(ionized calcium-binding adapter molecule 1) 및 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 단백질 발현을 측정하였다. 구체적으로, 각각의 실험군에 사용된 마우스의 뇌조직을 이용하여 상기 단백질을 추출하였다. 1X RIPA Buffer를 통해 마우스의 뇌조직을 녹여주고 추가적으로 초음파 파쇄기(Sonicator)를 이용하여 잘게 파쇄하였다. 파쇄된 뇌조직을 원심분리기에서 13,000rpm 및 10분 조건으로 분리하고, 무거운 뇌조직의 구조체 및 다른 물질들이 원심분리를 통해 바닥에 가라앉아 펠렛(pellet)을 형성하면 상층액만을 옮겨 담았다. 상층액에 담긴 단백질을 정량하기 위해 BCA(Bicinchoninic Acid) assay를 수행하여 뇌조직의 단백질을 정량하고, 정량된 단백질을 SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동을 통해 사이즈별로 분류하였다. 전기영동이 완료된 SDS-PAGE gel에 있는 단백질을 바로 측정하기 어렵기 때문에 PVDF 막(membrane)에 옮겨주기 위해, 한번 더 전기영동을 진행하여 PVDF 막에 단백질을 옮

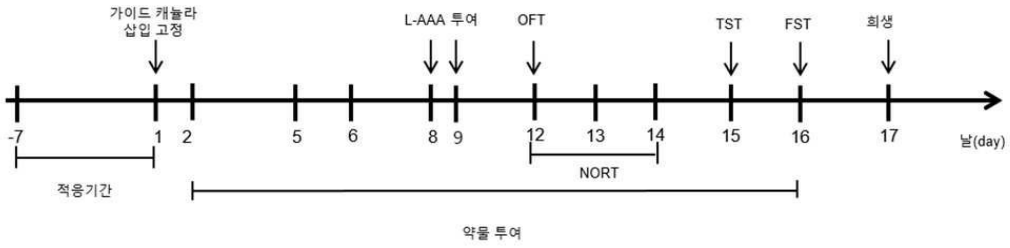
기고, 막에 측정하고자 하는 GFAP[Glial fibrillary acidic protein, 1:1000 in 1% BSA(Bovine Serum Albumin)] 항체 및 IBA-1(1:1000 in 1% BSA) 항체를 넣어주어 측정하였다.

[0111] 그 결과, 도 9와 같이, GFAP의 경우, 음성대조군에서 발현이 유의하게 감소하였고, 양성대조군 및 Chik III 투여군에서 발현이 유의하게 증가하였으며, 특히 Chik III 투여군이 양성대조군보다 GFAP 발현이 높게 나타났다. IBA-1의 경우, 음성대조군에서 발현이 유의하게 증가하였고, 양성대조군 및 Chik III 투여군에서 발현이 유의하게 감소하였으며, 특히 Chik III 투여군이 양성대조군보다 IBA-1 발현이 낮게 나타났다. 상기 결과로부터, Chik III는 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

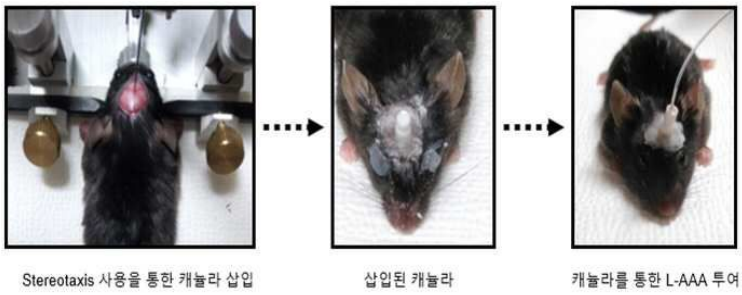
[0113] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

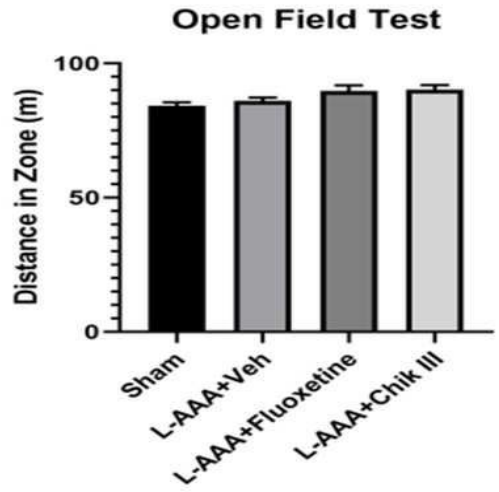
도면1



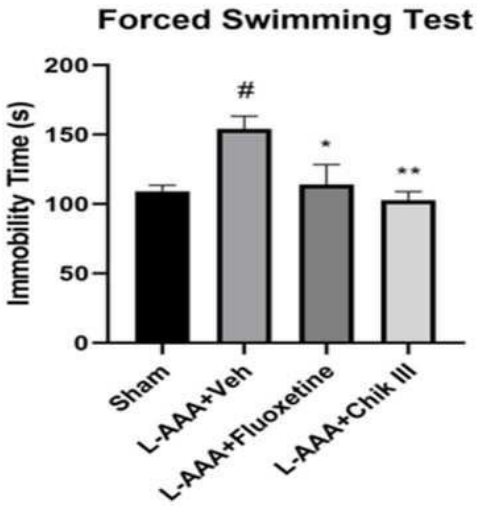
도면2



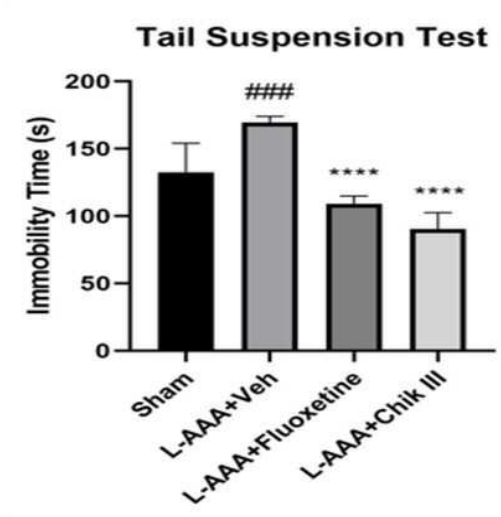
도면3


Open Field Test
Distance in Zone (m)
100
50
0
Sham
L-AAA+Veh
L-AAA+Fluoxetine
L-AAA+Chik III

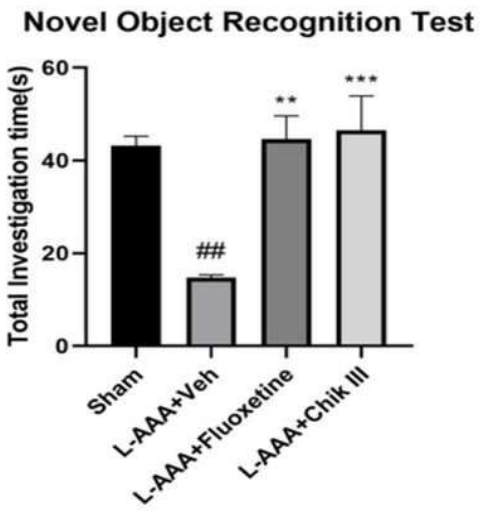
도면4

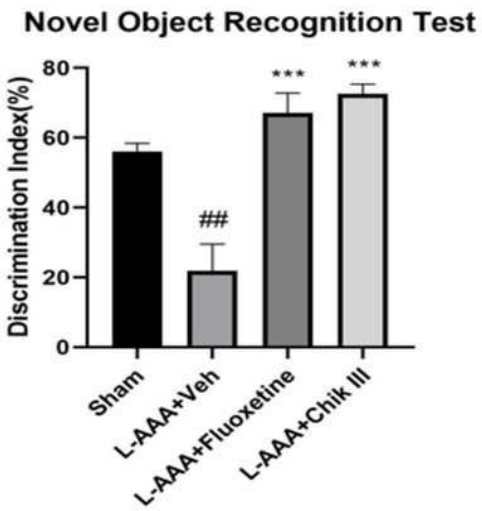

Forced Swimming Test
Immobility Time (s)
200
150
100
50
0
#
*
**
Sham
L-AAA+Veh
L-AAA+Fluoxetine
L-AAA+Chik III

도면5

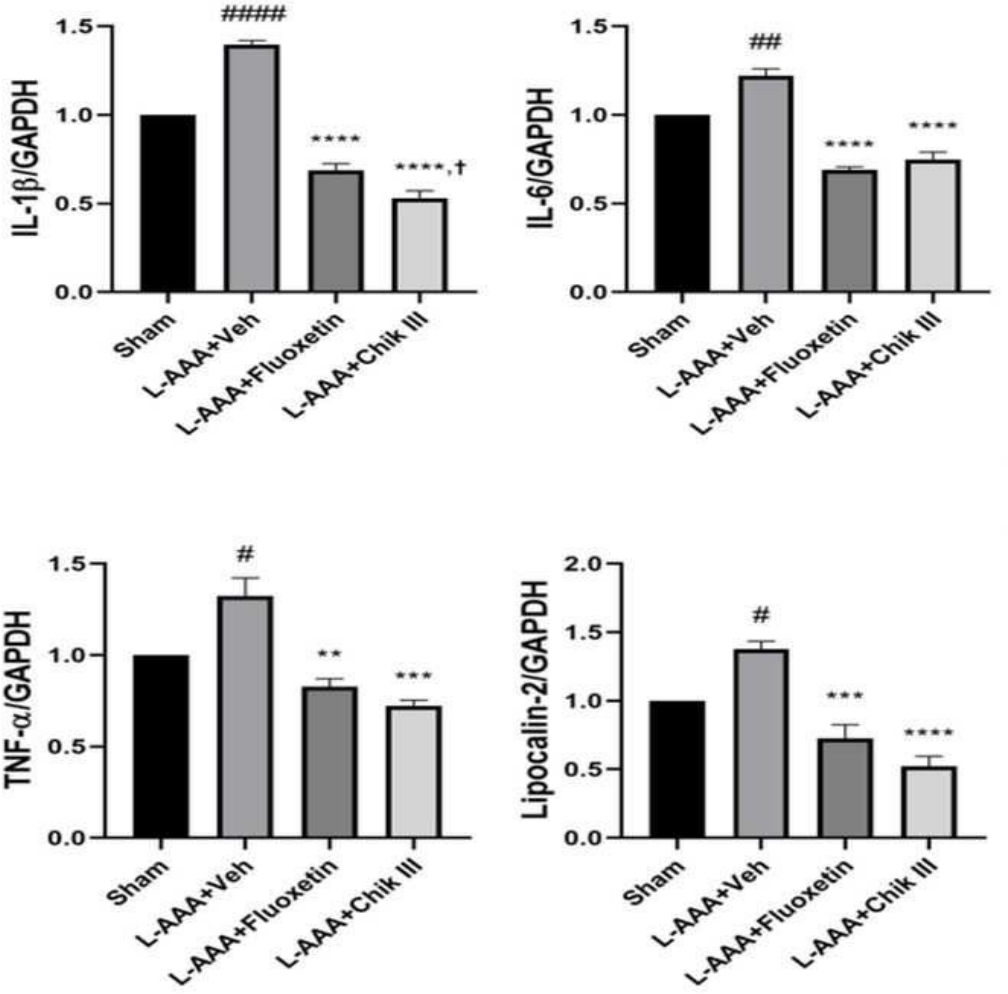

Tail Suspension Test
Immobility Time (s)
200
150
100
50
0
###
****
****
Sham
L-AAA+Veh
L-AAA+Fluoxetine
L-AAA+Chik III

도면6

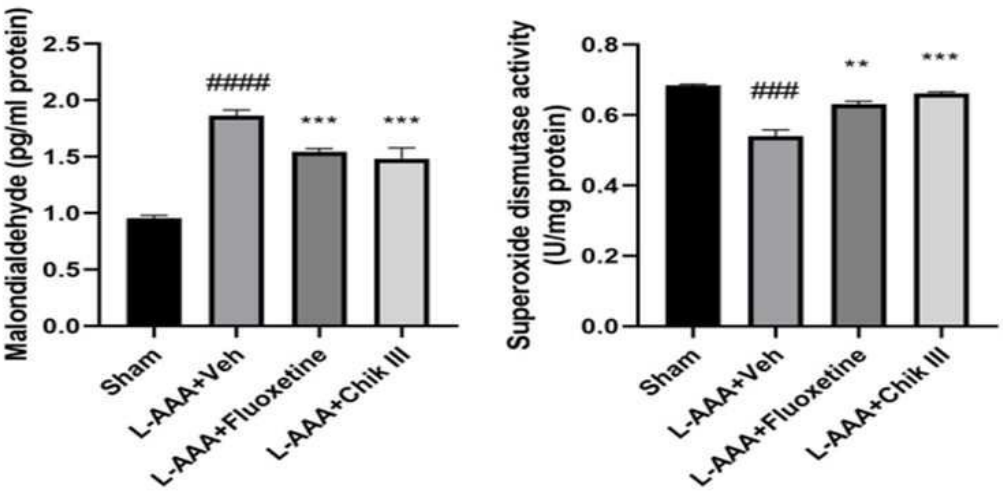

Novel Object Recognition Test
Total Investigation time(s)
60
40
20
0
##
**
***
Sham
L-AAA+Veh
L-AAA+Fluoxetine
L-AAA+Chik III


Novel Object Recognition Test
Discrimination Index(%)
80
60
40
20
0
##
***
***
Sham
L-AAA+Veh
L-AAA+Fluoxetine
L-AAA+Chik III

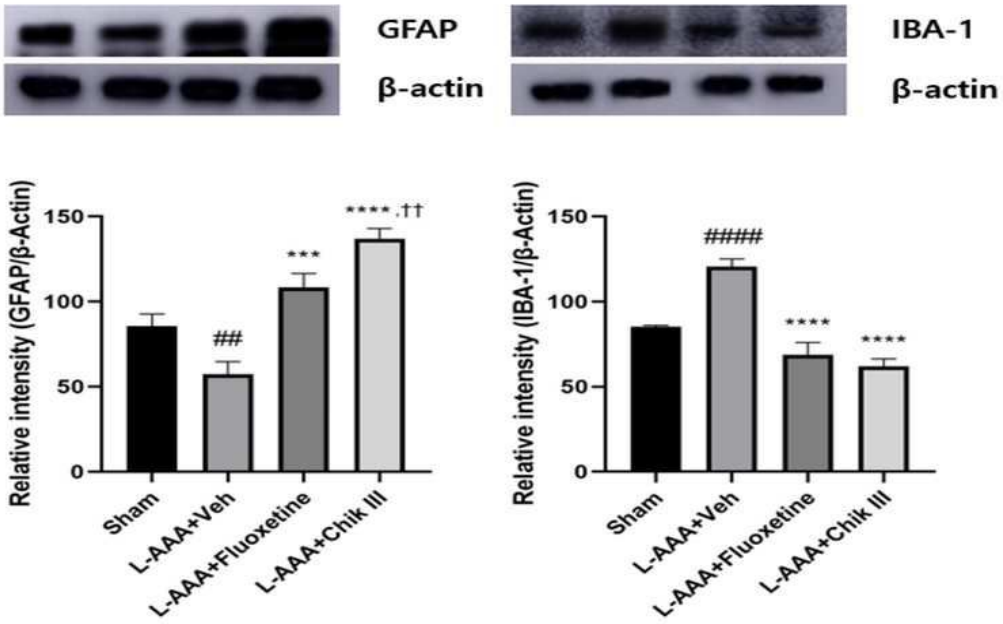
도면7


IL-1β/GAPDH
#####
****
****,†
IL-6/GAPDH
##
****
****
TNF-α/GAPDH
#
**
***
Lipocalin-2/GAPDH
#
***
****
Sham
L-AAA+Veh
L-AAA+Fluoxetin
L-AAA+Chik III

도면8


Malondialdehyde (pg/ml protein)
#####
***
***
Superoxide dismutase activity (U/mg protein)
###
**
***
Sham
L-AAA+Veh
L-AAA+Fluoxetine
L-AAA+Chik III

도면9


GFAP
β-actin
IBA-1
β-actin
Relative intensity (GFAP/β-Actin)
150
100
50
0
##
***
****,††
Sham
L-AAA+Veh
L-AAA+Fluoxetine
L-AAA+Chik III
Relative intensity (IBA-1/β-Actin)
150
100
50
0
#####
****
****
Sham
L-AAA+Veh
L-AAA+Fluoxetine
L-AAA+Chik III