(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 5 월 23 일 (23.05.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/098674 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/7048 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/013903

(22) 국제출원일: 2018 년 11 월 14 일 (14.11.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0151768 2017 년 11 월 14 일 (14.11.2017) KR

(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (**UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY**) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김윤희 (**KIM, Yunhee**); 06280 서울시 강남구 삼성로51길 37, 107동 1301호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (**SON, Min**); 05836 서울시 송파구 법원로 135 대명타워 6층 한얼국제특허사무소, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

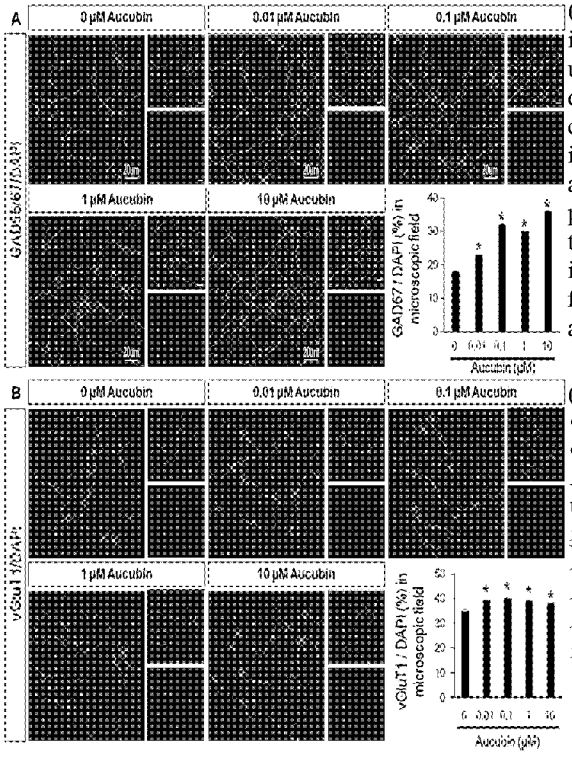
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) **Title:** COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING NEUROPSYCHOLOGICAL DISEASES COMPRISING AUCUBIN

(54) **발명의 명칭:** 어큐빈을 포함하는 신경정신 질환의 예방 또는 치료용 조성물



(57) **Abstract:** The present invention relates to a composition for preventing or treating neuropsychological diseases comprising aucubin and, particularly, to a pharmaceutical composition for preventing or treating mental diseases, a food composition, a method for treating mental diseases, and a composition for maintaining survival, promoting regeneration, or preventing the death of GABA neurons, comprising aucubin or a pharmaceutically acceptable salt thereof as an active ingredient. The aucubin according to the present invention exhibits the effect of maintaining the survival, promoting the regeneration, and preventing the death of GABA neurons and promoting the production of GABA which is a neurotransmitter, and can be usefully used in the treatment or prevention of mental diseases, such as ADHD, autism, or etc. caused by a deficiency of GABA neurons.

(57) **요약서:** 본 발명은 어큐빈(aucubin)을 포함하는 신경정신 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 어큐빈 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 정신질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물, 정신질환의 치료 방법, 및 가바성 신경세포의 생존 유지, 재생 촉진, 또는 사멸 방지용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 어큐빈(aucubin)은 가바성 신경세포의 생존을 유지시키고 재생을 촉진시키며, 사멸을 방지하고, 신경전달물질인 가바의 생성을 촉진시키는 효과를 나타내므로, 가바성 신경세포의 결핍에 의해 야기되는 ADHD 또는 자폐증 등의 정신질환의 치료 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2019/098674 A1

명세서

발명의 명칭: 어큐빈을 포함하는 신경정신 질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 어큐빈(aucubin)을 포함하는 신경정신 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 어큐빈 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 정신질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 식품 조성물, 정신질환의 치료 방법, 및 가바성 신경세포의 생존 유지, 재생 촉진, 또는 사멸 방지용 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 아동기에 주로 나타나는 정신질환으로는 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit/hyperactivity disorder; ADHD)와 자폐증(autism) 등이 있다. ADHD는 지속적으로 주의력이 부족하여 산만하고 과다활동, 충동성을 보이는 것이 특징이다. 생각하기 전에 행동하는 경향이 있으며 말이나 행동이 많고, 규율을 이해하고 알고 있는 경우에도 급하게 행동하려는 욕구를 자제하지 못하기도 한다. 또한, 자폐증은 3세 이전부터 언어 표현-이해, 어머니와의 애착 행동, 사람들과의 놀이에 대한 관심이 저조해지는 양상으로 나타난다. 대표적인 증상으로는 언어와 의사소통에 장애를 보이고, 특정 행동을 반복하는 상동증을 보이며 기분과 정서의 불안정성을 보이기도 한다. 이러한 증상들을 치료하지 않고 방치할 경우 아동기 내내 여러 방면에서 어려움이 지속되고, 일부의 경우 청소년기와 성인기가 되어서도 증상이 남게 된다. 아동에게서 발생한 ADHD 또는 자폐증은 경제 인구의 손실을 야기하며, 결국 사회적 손실을 초래하게 되므로, 치매, 알츠하이머병 등의 노화로 인한 퇴행성 뇌질환보다 그 심각성이 더욱 중요시되고 있는 실정이다.

[4] ADHD 또는 자폐증의 발병원인 및 발병기전은 명확하게 밝혀지지 않은 상태이나, 일부 보고에 의하면 억제성 신경전달물질과 흥분성 신경전달물질의 불균형에 의한 질환으로 보고 있다(Giada Cellot, 2014, Front Pediatr., 2: 70.). 이러한 불균형은 신경발생학적으로 흥분성 신경전달물질을 분비하는 흥분성 신경세포와 억제성 신경세포의 발생 분화의 불균형에 의해 야기되는 것으로서, 실제로 자폐증 환자의 뇌에서는 정상인보다 억제성 신경세포의 수가 약 70%가 적으며, 흥분성 신경세포의 수는 약 30% 정도 많은 것으로 보고되고 있다. 억제성 신호전달물질 및 이를 분비하는 억제성 신경세포의 대표적인 예로는 가바 및 가바성 신경세포가 존재하며, 최근 ADHD 또는 자폐증의 발병원인 및 발병기전이 가바 또는 가바성 신경세포와 연관이 있다고 보고되고 있다(Arch Gen Psychiatry. 2012; 69(7): 750-753; Autism Res. 2017 Apr; 10(4): 608-619;

Neurosci Biobehav Rev. 2012 Oct; 36(9): 2044-2055; Nature. 2010 November 11; 468(7321): 263-269; Int J Dev Neurosci. 2017 Nov; 62: 63-72).

[5]

[6] 따라서, 상기의 정신질환을 치료하기 위해서는 신호전달체계가 복잡한 흥분성 신경전달물질/흥분성 신경세포를 활용하는 것보다 억제성 신호전달물질/억제성 신경세포를 이용하는 것이 더욱 효율적이다. 그 중에서도 상기의 정신질환의 발병원인 및 발병기전과 특히 연관이 있다고 보고되고 있는 가바/가바성 신경세포를 이용할 경우 다른 억제성 신경전달물질/억제성 신경세포과 관련된 생리학적 기전에 영향을 미치지 않아 부작용을 최소화하면서 정신질환을 치료 또는 예방할 수 있다.

[7] 한편, 신경 줄기세포를 체내 이식하는 상기의 정신질환의 치료 방법이 알려져 있으나, 이 경우에는 이식된 줄기세포가 분화하여 신경세포를 형성하고, 형성된 신경세포는 표적세포와 시냅스를 형성해야 생존할 수 있는 등 성공 조건이 까다로움에 따라, 이식 후에 많은 줄기세포가 사멸하여 그 효과가 사라지는 문제점이 있었다.

[8] 이와 관련하여, 다양한 추출물 또는 화합물 등이 ADHD 또는 자폐증의 치료를 위해 개발되었으며, 그 예로는 홍삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 자폐증 및 신경발달 장애 억제용 조성물(한국 등록특허공보 제10-1414133호), 자폐증의 치료에 사용하기 위한 mGlu2/3 음성 알로스테릭 조절제인 화합물(한국 공개특허공보 제10-2015-0070187호) 등이 있다. 그러나, 어큐빈 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 가바 또는 가바성신경세포에 대한 효과를 활용한 ADHD 또는 자폐증의 치료용 조성물은 개발된 바 없었다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명자들은 ADHD 또는 자폐증 등의 정신질환의 치료제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 어큐빈은 가바성 신경세포의 생존을 유지시키거나 재생을 촉진시키고, 신경전달물질인 가바의 합성을 촉진시킴을 확인하여, 가바 또는 가바성 신경세포의 결핍에 의해 야기되는 정신 질환을 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 하나의 목적은 어큐빈(aucubin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 정신질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 약학적 조성물을 정신질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 정신질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 하나의 목적은 어큐빈 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 정신질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 다른 하나의 목적은 어큐빈을 포함하는 가바성 신경세포의 생존 유지, 재생 촉진, 또는 사멸 방지용 조성물을 제공하는 것이다.

[16]

발명의 효과

[17] 본 발명에 따른 어큐빈(aucubin)은 가바성 신경세포의 생존을 유지시키고 재생을 촉진시키며, 사멸을 방지하고, 신경전달물질인 가바의 생성을 촉진시키는 효과를 나타내므로, 가바성 신경세포의 결핍에 의해 야기되는 ADHD 또는 자폐증 등의 정신질환의 치료 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[18]

도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 성숙한 가바성 신경세포(GABAergic neurons) 또는 글루타메이트성 신경세포(glutamatergic neurons)에서 어큐빈(aucubin)의 세포 생존 유지 효과를 보여주는 면역형광 염색 이미지 및 상기 이미지의 가바성 및 글루타메이트성 신경세포의 숫자를 계수하여 생존율을 정량화한 그래프이다. A는 GAD65/67 마커를 발현하는 가바성 신경세포 숫자를 계수한 후 전체 세포 숫자에 대한 생존율을 정량화하여 나타내었고, B는 vGluT1 마커를 발현하는 글루타메이트성 신경세포의 숫자를 계수하여 생존율을 정량화하여 나타내었다. 각 값은 5개 측정값의 평균±SD로 나타내었다. 값의 통계적 유의성은 일원분산분석(ANOVA)을 통해 확인하였으며, *는 어큐빈을 처리하지 않은 대조군(0 μM)에 대하여 $p<0.05$임을 의미한다.

[20] 도 2a는 ChAT-GFP를 발현하는 형질전환 쥐 뇌에서 배양한 성숙한 신경세포에서, 어큐빈이 GFP를 발현하는 콜린성 신경세포와 GAD를 발현하는 가바성 신경세포에 미치는 생존 증진 효과를 비교한 면역형광 염색 이미지이며, 도 2b는 상기 이미지의 가바성 및 콜린성 신경세포의 숫자를 계수하여 생존율을 정량화한 그래프이다. 도 2a는 가바 합성효소인 GAD65/67 마커를 발현하는 가바성 신경세포와 아세틸콜린 합성효소인 ChAT(choline acethyltransferase) promoter 조절하에 GFP를 발현하는 콜린성 신경세포를 면역형광염색하고 세포핵을 염색하는 DAPI를 형광염색하여 그 각 이미지 및 합친(merged) 이미지를 보여주는 콘포칼 레이저 현미경 스캔 이미지이다. 도 2b는 GAD65/67 마커를 발현하는 가바성 신경세포와 GFP를 발현하는 콜린성 신경세포 숫자를 계수한 후 DAPI 염색된 전체 세포 숫자에 대한 생존율을 정량화하여 비교한 그래프이다.

[21] 각 값은 5개 측정값의 평균±SD로 나타내었다. 값의 통계적 유의성은

일원분산분석(ANOVA)을 통해 확인하였으며, *는 어큐빈을 처리하지 않은 대조군(0 μM)에 대하여 가바성 신경세포 증가율의 유의성이 $p<0.05$임을 의미한다.

[22] 도 3는 성숙한 신경세포, 가바성 신경세포 또는 글루타메이트성 신경세포에 대한 어큐빈의 생존 유지 효과를 보여주는 면역블롯 이미지 및 상기 이미지의 신호 강도를 정량화한 그래프이다. A는 GAD65/67, NeuN, VGluT1, β-액틴(β-actin)의 발현량을 각각 탐지한 것이고, B는 β-액틴에 대한 NeuN의 발현량, 즉 성숙한 신경세포 마커의 발현양, C는 β-액틴에 대한 GAD65/67의 발현량, 즉 가바성 신경세포 마커의 발현양, 및 D는 β-액틴에 대한 VGluT1의 발현량, 즉 글루타메이트성 신경세포 마커의 발현 양을 정량적으로 보여준다. 각 값은 3개 측정값의 평균±SD로 나타내었다. 값의 통계적 유의성은 일원분산분석(ANOVA)을 통해 확인하였으며, *는 어큐빈을 처리하지 않은 대조군(0 μM)에 대하여 $p<0.05$, #는 낮은 농도(0.1 μM)의 어큐빈을 처리한 실험군에 대하여 $p<0.05$임을 의미한다.

[23] 도 4는 Pax6-GFP를 발현하는 신경전구세포에서, 어큐빈의 가바 생성양 증가 효과를 보여주는 면역형광염색 이미지 및 가바성 세포의 수를 정량화한 그래프이다. A는 어큐빈 처리에 따른 PAX6-GFP를 발현하는 전구세포와 가바를 생성하는 가바성 세포의 세포 생존율의 증가를 보여주며, B는 PAX6 마커를 발현하는 세포의 수, 및 C는 PAX6 마커를 발현하는 세포의 수에 비해 GABA 신경전달물질을 합성하는 세포의 수 비율이 증가하였음을 보여준다. *는 어큐빈을 처리하지 않은 대조군(0 μM)에 대하여 $p<0.05$임을 의미하며, 스케일바(Scale bar)는 20 ㎛를 나타낸다.

[24]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

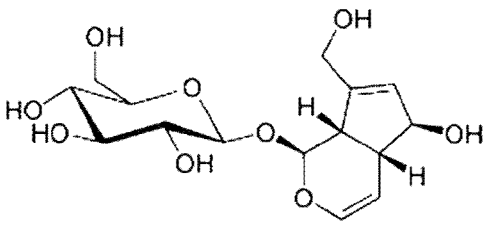
[25] 본 발명의 하나의 양태는 어큐빈(aucubin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 정신질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[26] 본 발명에서는, 어큐빈이 가바성 신경세포의 수를 증가시키고, 가바의 생성을 촉진할 수 있음을 확인한바, 이에 따라 어큐빈을 포함하는 본 발명의 조성물은 가바성 신경세포와 가바의 결핍에 의해 야기되는 정신질환의 예방 및 치료에 매우 유용하게 활용될 수 있다.

[27] 본 발명의 용어, "어큐빈(aucubin)"은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물을 의미한다. 어큐빈은 질경이(*Plantago asiatica*), 식나무(*Aucuba japonica*), 두충(*Eucommia ulmoides*), 지황(*Rehmannia glutinosa*), 꽃며느리밥풀(*Melampyrum roseum*) 등의 다양한 식물에 포함되어 있으며, 혈압 강하, 간 보호, 항염증제, 항균제, 진통제 및 항암제와 같은 다양한 생물학적 활성을 가지고 있음이 알려져 있다(Chang IM, 1983, Drug Chem Toxicol, 6:443-453; Davini MD, 1986, Minerva

Chir 41:1531-1535). 상기 어큐빈은 공지된 합성 방법으로 합성하여 사용할 수 있고, 식물에서 분리 및 정제하여 사용할 수 있으며, 또는 상업적으로 판매되는 것을 입수하여 사용할 수도 있다.

[28] [화학식 1]

[29] 

[30] 본 발명에서, 상기 어큐빈은 가바성 신경세포의 생존을 유지시키는 것일 수 있고, 사멸을 방지하는 것일 수 있으며, 가바성 세포를 손상으로부터 보호하여 가바성 세포의 수를 증가시키는 것일 수 있고, 가바 합성효소의 발현을 촉진시키는 것일 수 있으며, 가바의 생성을 촉진시키는 것일 수 있다. 어큐빈이 신경세포의 축색 재생을 촉진시켜 외상의 치료에 적용할 수 있음은 공지된바 있으나, 가바성 신경세포의 생존을 유지시키고 가바 생성을 촉진시켜 정신질환 치료 효과를 나타낼 수 있음은 지금까지 전혀 알려진 바 없으며, 본 발명자에 의해 최초로 규명되었다.

[31] 본 발명의 용어, "가바성 신경세포"(GABAergic neurons)는 "가바"로 명명되는 감마아미노부티르산(γ- aminobutyric acid; GABA)을 분비하는 억제성 신경세포를 의미한다. 상기 가바는 포유류의 뇌 속에만 존재하는 특이한 아미노산으로서, 신경계의 억제성 신경전달물질로 알려져 있다.

[32] 또한, 본 발명의 용어, "가바 합성효소"는 상기 가바를 합성하는 GAD(Glutamate decarboxylase)를 의미하며, 구체적인 예로 GAD65 또는 GAD67일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[33] 이때, 상기 용어 "억제성 신경전달물질"은 시냅스후 세포(postsynaptic cell)의 시냅스후 막(postsynaptic membrane)에 작용하여 억제성 시냅스후 전위(inhibitory postsynaptic potential)를 발생시켜 시냅스후 세포의 활동전위 발생을 억제하는 물질을 의미하며, 상기 용어 "억제성 신경세포"는 억제성 신경전달물질을 분비하는 신경세포를 의미한다.

[34] 본 발명의 용어, "정신질환"(mental illness)은 정신병 또는 정신장애로도 명명되며, 넓은 뜻으로는 정신기능에 이상을 나타내어 사회생활에 적응하지 못하고 일상생활에 지장을 초래하는 병적 상태를 나타내는 질환, 좁은 뜻으로는 선천성인 정신이상, 즉 정신지체나 인격의 변질을 일으킨 정신병질이나 심인반응(心因反應, 노이로제) 등을 제외한 나머지의 병적 정신상태를 나타내는 질환을 의미한다. 구체적으로, 상기 정신질환은 억제성 신경세포 또는 억제성 신경전달물질의 결핍에 의해 야기되는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD) 또는 자폐증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 정신질환은 신경정신질환일 수 있다. 이때, 상기 용어

"신경정신질환"은 병인과 치료를 신경학적으로 설명가능한 정신질환을 의미한다.

[35] ADHD 또는 자폐증의 발병원인 및 발병기전은 억제성 신경전달물질과 흥분성 신경전달물질의 불균형에 의한 것이며, 이러한 불균형은 신경발생학적으로 흥분성 신경전달물질을 분비하는 흥분성 신경세포와 억제성 신경세포의 발생 분화의 불균형에 의해 야기되는 것으로 알려져 있으며, 최근 ADHD 또는 자폐증의 발병원인 또는 발병기전이 억제성 신경전달물질 또는 억제성 신경세포 중에서도 가바 또는 가바성 신경세포와 연관된다고 보고되고 있다. 따라서, 상기의 정신질환을 치료하기 위해서는 억제성 신호전달물질 및 이를 분비하는 억제성 신경세포, 특히 가바 및 가바성 신경세포를 이용하는 것이 더욱 효율적이다. 이에, 어큐빈 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물이 정신질환, 즉 ADHD 또는 자폐증의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 것임은 자명하다.

[36] 본 발명의 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여에 의해 정신질환의 발병을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[37] 본 발명의 용어, "치료"는 본 발명의 조성물의 투여에 의해 정신질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 상기 정신 질환 의심 및 발병 개체는 인간을 제외한 개체일 수 있다.

[38] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 어큐빈이 가바성 신경세포의 생존을 유지시키고 가바 합성효소(GAD)의 단백질 발현을 증가시키며(도 1 및 2), 신경세포의 생존을 유지시키고 가바성 신경세포의 신경전달물질인 가바의 합성을 촉진시킴을 확인하였다(도 4). 이는, 어큐빈이 신경세포와 가바성 신경세포의 세포사멸을 억제하고 생존을 유지시켜 그 숫자를 증가시키며 가바성 신경세포가 분비하는 가바의 합성과 그 합성효소의 양적 증가를 촉진시키므로, 상기 어큐빈은 가바성 신경세포 또는 가바의 결핍에 의해 야기되는 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD) 또는 자폐증 등의 정신 질환의 치료에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[39] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용가능한"은 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[40] 본 발명의 용어, "약학적으로 허용가능한 염"은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미한다. 구체적으로, 통상적인 금속염, 유기 염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있고, 더욱 구체적으로, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와의 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산,

브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[41] 본 발명의 약학적 조성물은 어큐빈의 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함하고, 가능한 모든 입체이성체도 포함할 수 있다. 이때, 상기 어큐빈의 용매화물, 수화물 및 입체이성체는 통상적인 방법들을 사용하여 제조할 수 있다.

[42] 또한, 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occuring carrier)를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 구체적인 예로는 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 또는 광물유 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[43] 또한, 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 사용될 수 있으며, 상기 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제 등이 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 또는 좌제 등이 사용될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지,

라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[44] 다른 하나의 양태는 상기 약학적 조성물을 신경정신 질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 정신질환의 치료 방법을 제공한다.

[45] 이때, 상기 용어 "정실질환" 및 "치료"의 정의는 전술한 바와 같다.

[46] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 어큐빈 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물을 도입하는 것을 의미한다.

[47] 본 발명의 용어, "개체"는 신경정신 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[48] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.

[49] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 이때, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[50] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여할 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 또한, 단일 또는 다중 투여할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[51] 또한, 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적인 예로, 상기 약학적 조성물은 일반적으로 0.001 내지 100 mg/kg, 더욱 구체적으로 0.05 내지 20 mg/kg, 가장 구체적으로 0.1 내지 10 mg/kg의 양을 1일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있으나, 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[52] 또 다른 하나의 양태는 어큐빈 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 정신질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[53] 본 발명의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 우수한 정신질환 개선 효과를 기대할 수 있으며, 일반 약품과는 달리 천연물을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있으므로, 정신질환의 예방 또는 개선 목적으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[54] 본 발명의 용어, "생리학적으로 허용 가능한 염"은 생리학적으로 허용되고 생물체에게 투여될 때, 통상적으로 위장장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않으면서, 투여되는 화합물이 목적하는 효과를 발휘할 수 있는 통상적으로 사용되는 것을 의미한다.

[55] 본 발명의 용어, "개선"은 상기 조성물의 투여로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[56] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[57] 상기 건강기능(성)식품(health functional food)은 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 '기능(성)'은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 호용될 수 있다.

[58] 구체적으로, 상기 건강기능식품은 본 발명의 어큐빈을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

[59] 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 식품 조성물은 식품으로 인정되는 제형이면 다양한 형태의 제형으로 제한 없이 제조될 수 있다.

[60] 또한, 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

[61] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예들 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크륨(Cr) 등의 미네랄; 및 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

[62] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신,

사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별하고 적절한 양으로 사용할 수 있다.

[63] 다른 하나의 양태는 어큐빈을 포함하는 가바성 신경세포의 생존 유지, 재생 촉진, 또는 사멸 방지용 조성물을 제공한다.

[64] 이때, 상기 "어큐빈", 및 "가바성 신경세포"의 정의는 전술한 바와 같다.

[65] 본 발명의 용어, "생존"은 신경세포가 신경손상 또는 세포사멸로부터 보호되어 생존함으로써 기능하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 조성물에 의하여 가바성 신경세포의 생존이 유지되어 가바성 신경세포의 수가 증가할 수 있다.

[66] 본 발명의 용어, "재생"은 신경세포가 신경손상 또는 세포사멸로부터 재생되어 생존함으로써 기능하는 것을 의미하며, 본 발명에 따른 조성물에 의하여 가바성 신경세포의 재생이 촉진되어 가바성 신경세포의 수가 증가할 수 있다.

[67] 본 발명의 용어, "사멸"은 신경세포가 신경손상 등으로부터 죽는 것을 의미하며, 세포의 사멸을 방지하는 경우 세포가 생존하게 된다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물에 의하여 가바성 신경세포의 사멸이 방지되면 가바성 신경세포의 수가 증가할 수 있다.

[68] 또한, 상기 가바성 신경세포의 생존 유지, 재생 촉진, 또는 사멸 방지는 가바 합성효소의 발현 증가로 이어지고, 이는 신경전달억제물질인 가바의 생성 증가로 이어지므로, 본 발명에서 상기 조성물은 어큐빈을 포함하는 가바 생성 촉진용 조성물일 수 있다.

[69] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 어큐빈이 가바성 신경세포의 생존을 유지시키고 가바 합성효소(GAD)의 단백질 발현을 증가시키며(도 1 및 2), NeuN을 발현하는 성숙한 신경세포의 생존을 유지시키고 가바성 신경세포의 신경전달물질인 가바의 합성을 촉진시킴을 확인하였다(도 4). 이는, 어큐빈이 신경세포와 가바성 신경세포의 사멸을 억제하고 생존을 유지시켜 그 숫자를 증가시키며 가바성 신경세포가 분비하는 신경전달물질인 가바의 합성과 그 합성효소의 양적 증가를 촉진시키는 것을 의미하므로, 어큐빈을 포함하는 본 발명의 조성물은 가바성 신경세포의 생존 유지, 재생 촉진, 사멸 방지, 또는 가바 생성 촉진 용도로 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[70]

발명의 실시를 위한 형태

[71] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[72]

[73] **실험예 1. 1차 조직 배양: 세포의 분리 및 배양 방법**

[74] 신경세포의 배양을 위해 공지된 방법에 따라 E16 래트(rat) 배아의 뇌에서 세포를 얻었다(Lim et al., 2007; Jo et al., 2007). 구체적으로, E16 래트(rat) 배아의 전뇌(forebrain)에서 해마 기질(hippocampal eminence)을 분리하였고, 수득한 해마 기질 조직을 Ca^{2+}/Mg^{2+}-free HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution, Invitrogen)에서 세포를 기계적으로 분리하였다. Pax6-GFP 발현 신경전구세포(Neuronal precursor cells; NPCs)는 Pax6-GFP 형질전환 마우스의 뇌실하대(sub ventricular zone)에서 분리하였다.

[75] 세포의 배양은 10 또는 20 ng/ml의 bFGF(basic fibroblast growth factor, Invitrogen)를 보충하고, 혈청이 없는 N2 배지에서 3일 동안 수행하였고, 3-4일간 배양하여 70-80% confluency가 되면 passage하여 실험용도에 따라 세포를 나누어 심고 FGF를 제거한 N2 배지에서 7일 동안 배양하여 신경세포가 충분히 분화하도록 하였다. 어큐빈(aucubin, Sigma)의 처리는 bFGF가 없는 N2 배지에 농도별(0, 0.01, 0.1, 1 또는 10 μM)로 세포에 첨가하였다.

[76] ChAT-GFP 발현 신경전구세포(Neuronal precursor cells; NPCs)는 아세틸콜린 합성효소인 ChAT(choline acethyltransferase) promoter 조절 하에 분화된 콜린성 신경세포에서 GFP를 발현하는 CHAT-GFP 형질전환 마우스의 뇌실하대(sub ventricular zone)에서 분리하였다.

[77]

[78] **실험예 2. 면역형광 염색(Immunofluorescence Staining) 방법**

[79] 1차 배양한 성숙한 신경세포의 생존율을 확인하기 위하여 면역형광 염색을 수행하였다.

[80] 구체적으로, 12mm 유리 커버슬립(Bellco, USA) 위에 올려둔 세포를 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 30분 동안 고정하였고, PBS로 세척하였다. 이후, 다음과 같은 각각의 1차 항체로 배양하였다: 항-L-글루타메이트(anti-L glutamate, 1:100, abcam), 항-eGFP(anti-eGFP, 1:500, Millipore), 항-감마-아미노부티르산(anti-gamma-aminobutyric acid; anti-GABA, 1:1000, abcam), 항-글루타메이트 탈수소효소(anti-glutamic acid dehydrogenase 65/67; anti-GAD65/67, 1:500, Chemicon) 또는 항-소낭성 글루타메이트 수송체1(anti-vesicular glutamate transporter1; vGluT1, 1:500, Chemicon). 이후, Alexa fluor가 접합된 2차 항체(1:200, Molecular Probes, Eugene, OR)로 배양하였으며, DAPI(4,6-di-amidine-2-phenylindole dihydrochloride, 1 ㎍/㎖, Sigma)를 대비염색제로 사용하였다. 음성 대조군은 1차 항체에서 배양하는 단계를 생략하였다.

[81] 염색한 세포는 공초점 레이저 스캐닝 생물 현미경(LSM 510, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. 실험 그룹당 평균 5개의 슬라이드를 선택하여, 각 슬라이드당 임의의 최소 5곳(배율 200x)을 촬영하였고, 신경 분화 마커에 대하여 양성 반응을 나타내는 세포의 수를 세었다.

[82] GFP 형광염색에는 항GFP (rabbit anti-GFP antibody, 1:500, Merck, Germany) 1차

항체를 사용하였다. 통계분석은 실험예 4와 같은 방법으로 분석하였다.

[83]

[84] **실험예 3. 면역블롯 분석(Immunoblot analysis) 방법**

[85] 신경세포의 종류를 신경표지자로 확인하기 위하여, 면역블롯(웨스턴 블롯)을 통해 단백질 마커의 상대적인 발현량을 비교하였다.

[86] 구체적으로, 15 ㎍/㎖의 폴리-L-오르니틴(poly-L-ornithine, Sigma-Aldrich, USA) 및 1 ㎍/㎖의 피브로넥틴(fibronectin, Sigma-Aldrich, USA)으로 코팅된 60mm 페트리 디쉬에서 배양한 세포(30,000 세포/cm^2)를 사용하였다. 상기 세포를 단백질 가수분해효소 저해제가 포함된 차가운 RIPA 버퍼 80 ㎕를 이용하여 용해하였고, 원심분리(13,000×g, 10분) 후에 단백질이 포함된 상층액을 수득하였다. 단백질 정량은 브래드포드 단백질 어세이 키트(Bradford protein assay kits, Bio-Rad, Hercules, California, USA)를 사용하여 수행하였다.

[87] 이후, 20 ㎍의 단백질과 로딩버퍼(loading buffer, Biosesang Co., Seoul, Korea)의 혼합물을 10분간 100℃에서 가열하여 단백질을 변성시켰다. 상기 단백질을 10% 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel) 전기영동을 이용하여 분리하였고, 니트로셀룰로스 멤브레인(nitrocellulose membrane)으로 전달하였다. 멤브레인을 다음과 같은 각각의 1차 항체에서 배양하였다: 항-VGluT1(1:400, Chemicon), 항-D65/67(1:500, Chemicon), 항-NeuN(1:5000, abcam) 또는 항-β-액틴(1:1,000, SantaCruz, Delaware, California, USA). 이후, 2차 항체에서 배양한 뒤 신호를 탐지하였다.

[88]

[89] **실험예 4. 통계 분석**

[90] 모든 정량적인 값은 '평균±표준편차(SD)'로 나타내었다. 본페로니(Bonferroni) 테스트를 사용한 일원분산분석(ANOVA)을 통해 유의한 값의 차이를 확인하였다. ANOVA의 가정은 분산의 동질성에 대한 레빈(Levene's) 테스트를 만족시키며, 정규성에 대한 테스트를 통과하는 것을 확인하였다. $p<0.05$의 값은 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

[91]

[92] **실시예 1. 어큐빈의 신경세포 생존율에 대한 효과 확인**

[93] **실시예 1-1. 면역형광 염색을 통한 가바성 신경세포의 생존율 증진 효과 확인**

[94] 배양한 가바성 신경세포와 글루타메이트성 신경세포에서 어큐빈이 세포 생존 유지 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 상기 세포에 어큐빈을 처리한 이후, 가바성 신경세포 특이적 마커(GAD67/65)를 발현하는 세포를 면역형광 염색 후 계수하고 생존율 그래프로 나타내었다.

[95] 구체적으로, 상기 실시예 1에 따른 방법으로, 배양 중인 세포에 각각 0, 0.01, 0.1, 1 및 10 μM 농도의 어큐빈을 처리하였다. GAD65/67 마커를 발현하는 가바성 신경세포와 vGluT1 마커를 발현하는 글루타메이트성 신경세포 숫자를 전체 세포 수에 대한 생존율로 그래프에 나타내었다.

[96] 그 결과, 도 1의 A에서 볼 수 있듯이, 어큐빈을 처리하면 가바성 신경세포 특이적 마커인 GAD67/65를 발현하는 가바성 신경세포의 생존율이 어큐빈을 처리하지 않은 세포에 비하여 최대 2배 가까이 증가함을 확인하였다.

[97] 한편, 도 1의 B에서 볼 수 있듯이, 글루타메이트성 신경세포 특이적 마커인 vGluT1을 발현하는 흥분성 신경세포는 어큐빈을 처리하지 않은 세포에 비하여 유의적으로 증가하기는 하지만, 그 세포 생존율의 증가는 GAD67/65를 발현하는 가바성 세포 생존율 증가에 비하여 현저히 낮음을 확인하였다.

[98] 상기 결과를 통해, 본 발명의 어큐빈은 흥분성 신경세포인 글루타메이트성 신경세포보다는, 억제성 신경세포인 가바성 신경세포의 숫자를 증가시킴을 알 수 있었다. 이는 가바성 신경세포가 배양 중에 사멸하는 것을 어큐빈이 억제하여 생존이 유지됨으로써 생존율이 증가하는 것을 의미하므로, 어큐빈은 가바성 신경세포 또는 가바의 결핍에 의해 야기되는 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD) 또는 자폐증 등의 정신질환의 치료에 활용될 수 있을 것임을 알 수 있었다.

[99]

[100] **실시예 1-2. 면역형광 염색을 통한 콜린성 신경세포의 생존율 증진효과 확인**

[101] 배양한 가바성 신경세포와 콜린성 신경세포에서 어큐빈이 세포 생존 유지 효과를 나타내는지 확인하기 위하여, 상기 세포에 어큐빈을 처리한 이후, 콜린선 신경세포 특이적 마커(ChAT-GFP)를 발현하는 세포를 면역염색하고 가바성 신경세포 특이적 마커(GAD67/65)를 발현하는 세포와 비교하여 계수하고 생존율을 그래프로 나타냈다.

[102]

[103] 구체적으로, 상기 실시예 1에 따른 방법으로, 배양 중인 세포에 각각 0, 0.01, 0.1, 1 및 10 μM 농도의 어큐빈을 처리하였다. GAD65/67 마커를 발현하는 가바성 신경세포와 ChAT-GFP마커를 발현하는 콜린성 신경세포 숫자를 DAPI 형광염색된 전체 세포 수에 대한 생존율로 그래프에 나타내었다.

[104] 그 결과, 도 2b에서 볼 수 있듯이, 어큐빈을 처리하면 가바성 신경세포 특이적 마커인 GAD67/65를 발현하는 가바성 신경세포의 생존율은 어큐빈을 처리하지 않은 세포에 비하여 2배 가까이 증가하였으나, ChAT-GFP 마커를 발현하는 콜린성 세포는 다소 증가하는 경향성을 나타내나 그 증가율이 유의하지 않음을 확인하였다. 이는 어큐빈이 글루타메이트성 신경세포와 유사하게 콜린성 신경세포의 생존율도 가바성 신경세포에 비교하면 크게 증가시키지 않음을 보여준다.

[105]

[106] **실시예 2. 면역블롯을 통한 가바 합성효소의 발현 촉진 효과 확인**

[107] 어큐빈의 가바성 및 글루타메이트성 신경세포에 대한 생존율 증진 효과를 검증하기 위하여 상기 세포에 어큐빈을 처리한 이후, 각 세포종류 마커의 발현 양을 면역 블롯 방법으로 정량화하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1에 따른 방법으로, 상기 세포의 배양액에 각각 0, 0.01, 0.1, 1 및 10 μM 농도의 어큐빈을

처리하였다.

[108] 그 결과, 도 3의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, 어큐빈을 처리한 세포는 성숙한 신경세포 특이적 마커인 NeuN의 발현이 어큐빈을 처리하지 않은 세포에 비하여 유의하게 증가함을 확인하였다.

[109] 특히, 도 3의 A 및 C에서 볼 수 있듯이, 어큐빈을 처리한 세포는 가바성 신경세포 특이적 마커인 GAD67/65의 발현이 어큐빈을 처리하지 않은 세포에 비하여 최대 5배 가까이 증가함을 확인하였다.

[110] 한편, 도 3의 A 및 D에서 볼 수 있듯이, 이러한 세포에서, 글루타메이트성 신경세포 특이적 마커인 vGluT1의 발현은 어큐빈을 처리하지 않은 세포에 비하여 유의적으로 증가하기는 하지만, 그 발현량은 GAD67/65의 발현량에 비하여 현저히 낮음을 확인하였다.

[111] 상기 결과를 통해, 본 발명의 어큐빈은 신경세포의 생존을 유지시켜 생존율을 증가시키며 특히 흥분성 신경세포인 글루타메이트성 신경세포보다는, 억제성 신경세포인 가바성 신경세포의 생존을 유지시켜며 가바 합성효소인 GAD의 발현을 증가시키므로 GABA의 생성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[112] 따라서, 어큐빈은 가바성 신경세포 또는 가바의 결핍에 의해 야기되는 ADHD 또는 자폐증 등의 정신질환의 치료에도 유용하게 활용될 가능성이 있음을 알 수 있었다.

[113]

[114] **실시예 3. 어큐빈의 억제성 신경전달물질인 가바의 생성 촉진 효과 확인**

[115] 어큐빈이 가바성 신경세포의 생존율뿐만 아니라 가바 합성효소의 발현을 증가시킴에 따라, 실제로 GABA 생성이 증가하는지 확인하고자 하였다. 상기 세포에 어큐빈을 처리한 이후, GABA를 합성하는 세포의 비율을 면역형광 염색을 통해 확인하였다.

[116] 구체적으로, 상기 실시예 1에 따른 방법으로, Pax6-GFP 형질전환 마우스에서 분리한 신경전구세포에 각각 0, 0.01, 0.1, 1 및 10 μM 농도의 어큐빈을 처리하였다.

[117] 그 결과, 도 4의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, Pax6를 발현하는 신경전구세포를 GFP 항체로 면역염색한 결과, 어큐빈을 처리한 세포는 pax6-GFP를 발현하는 세포의 수를 약 2배 증가시켰으며, Pax6-GFP를 발현하는 세포 중에서도 GABA를 합성하는 세포의 비율은 어큐빈을 처리하지 않은 세포에 비하여 1.5배 이상 증가함을 확인하였다.

[118] 상기 결과를 통해, 본 발명의 어큐빈은 가바성 신경세포의 사멸을 억제하고 생존율을 증가시키며 가바 합성효소의 발현을 증가시키고 신경전달물질인 GABA의 생성을 촉진시킴을 확인하였다. 또한, 어큐빈은 신경전구세포의 생존율과 성숙한 신경세포의 생존율도 증가시키지만 글루타메이트성 신경세포의 생존율은 비교적 크게 증가시키지 않음을 알 수 있었다.

[119] 따라서, 어큐빈은 가바성 신경세포 또는 가바의 결핍에 의해 야기되는 ADHD

또는 자폐증 등의 정신질환의 치료에도 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[120] 상기 실시예 1-1, 1-2, 2, 및 3의 결과를 통해, 어큐빈은 글루타메이트성 신경세포 및 콜린성 신경세포의 생존에 비교하여 가바성 신경세포의 생존을 증가시키고, 가바 합성효소의 발현 및 가바의 생성을 촉진하므로 가바성 신경세포의 결핍에 의해 야기되는 ADHD 또는 자폐증 등의 정신질환의 치료에 유용하게 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[121]

[122] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 어큐빈(aucubin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 정신질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 어큐빈은 가바성 신경세포의 생존을 유지시키거나 사멸을 방지하는 것인, 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 어큐빈은 가바 합성효소의 발현을 촉진하는 것인, 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 어큐빈은 가바의 생성을 촉진하는 것인, 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 정신질환은 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD) 또는 자폐증인 것인, 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 어큐빈을 총 조성물의 중량 대비 0.001 내지 80 중량%로 포함하는 것인, 조성물.

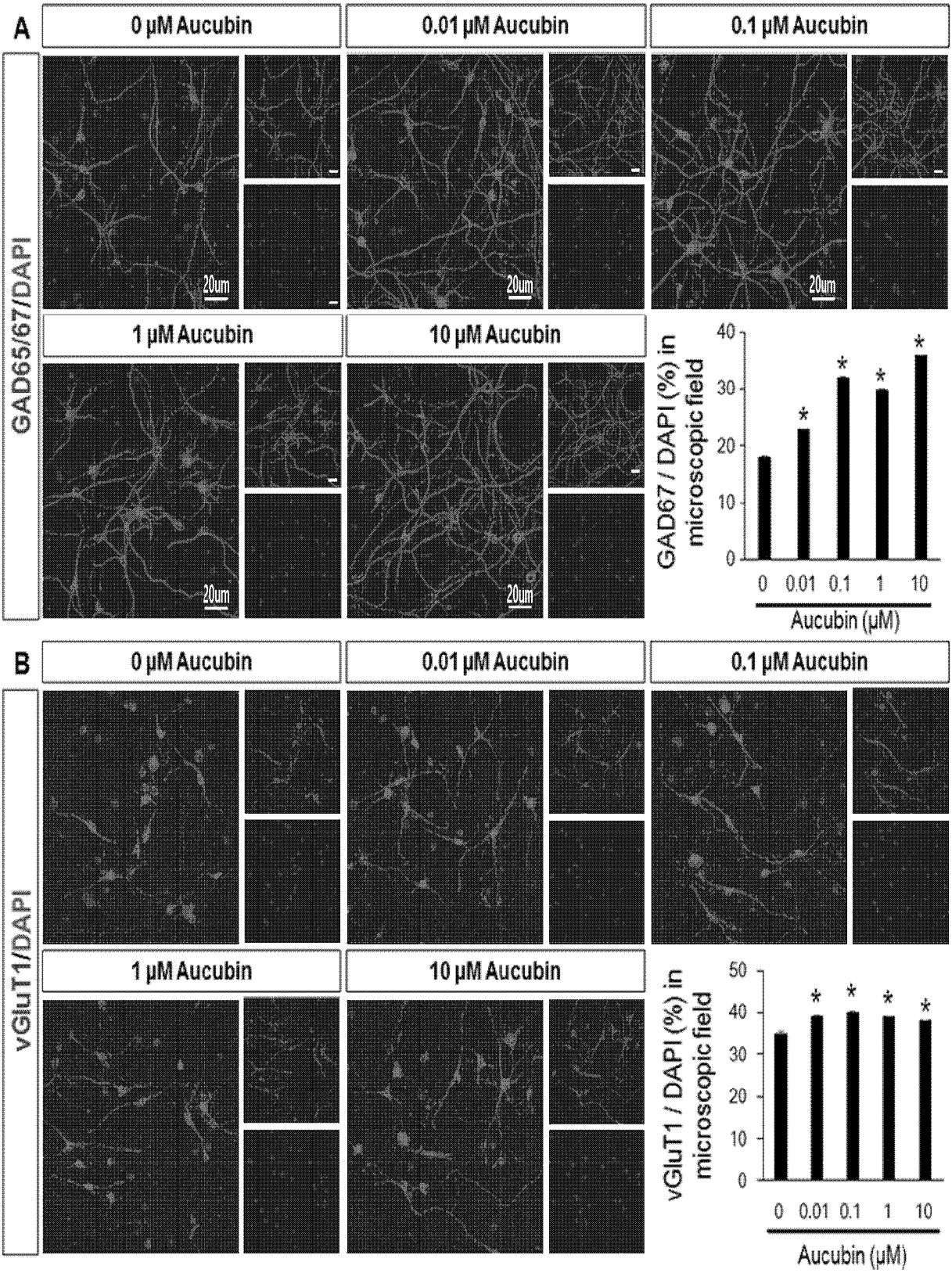
[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

[청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 조성물을 정신질환 의심 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 정신질환의 치료 방법.

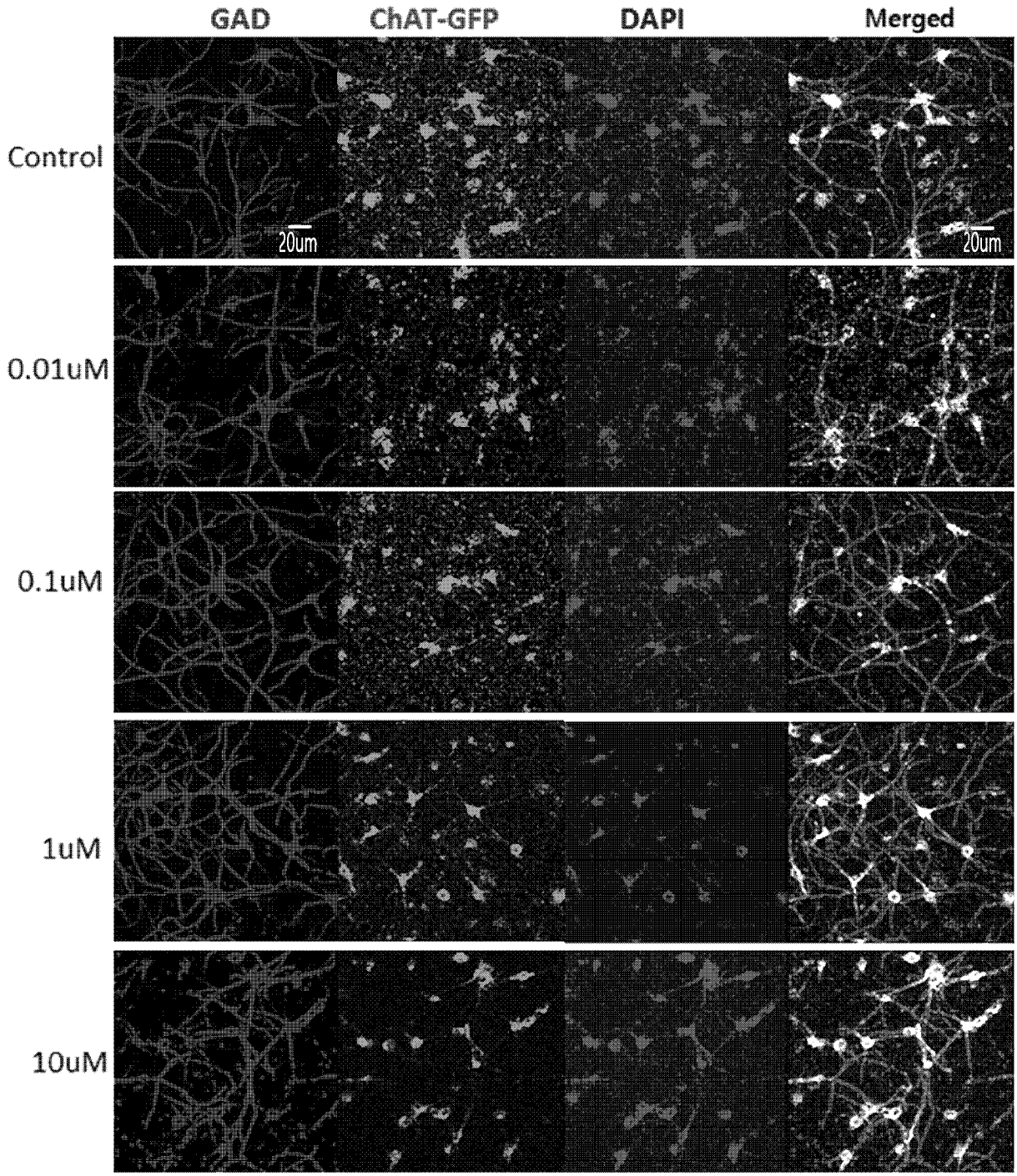
[청구항 9] 어큐빈 또는 이의 생리학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 정신질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[청구항 10] 어큐빈(aucubin)을 포함하는 가바성 신경세포의 생존 유지, 재생 촉진, 또는 사멸 방지용 조성물.

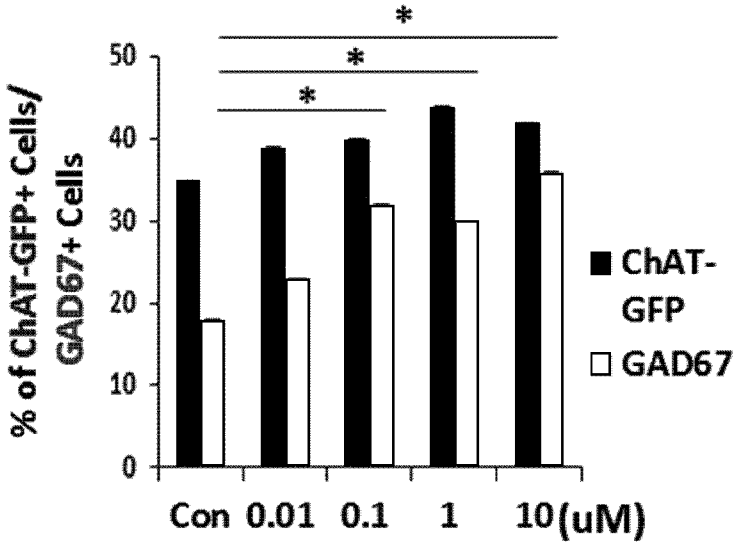
[도1]


A
0 μM Aucubin
0.01 μM Aucubin
0.1 μM Aucubin
1 μM Aucubin
10 μM Aucubin
GAD65/67/DAPI
20um
GAD67 / DAPI (%) in microscopic field
0 0.01 0.1 1 10
Aucubin (μM)
B
0 μM Aucubin
0.01 μM Aucubin
0.1 μM Aucubin
1 μM Aucubin
10 μM Aucubin
vGluT1/DAPI
vGluT1 / DAPI (%) in microscopic field
0 0.01 0.1 1 10
Aucubin (μM)

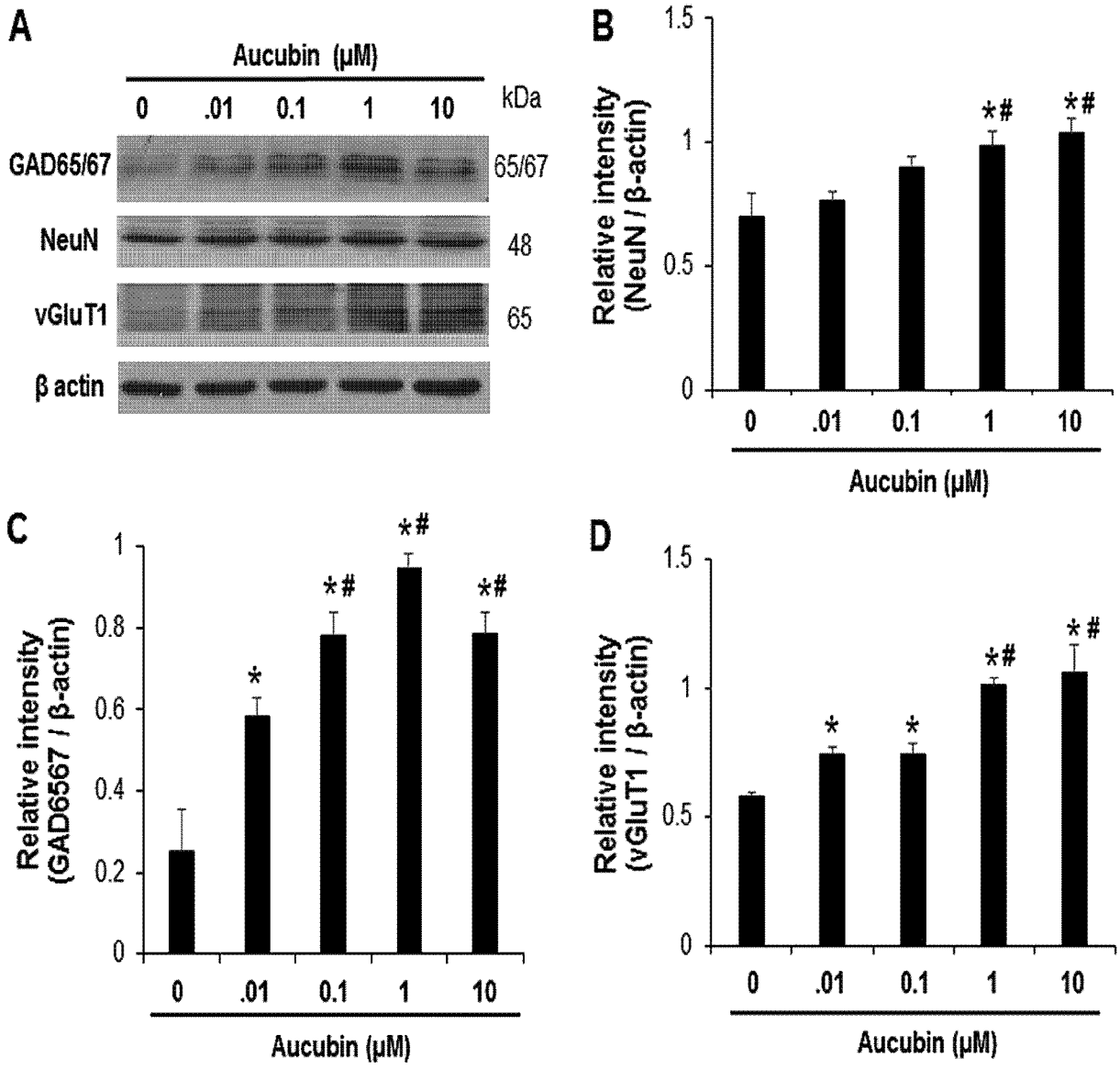
[도2a]


GAD
ChAT-GFP
DAPI
Merged
Control
0.01uM
0.1uM
1uM
10uM
20um
20um

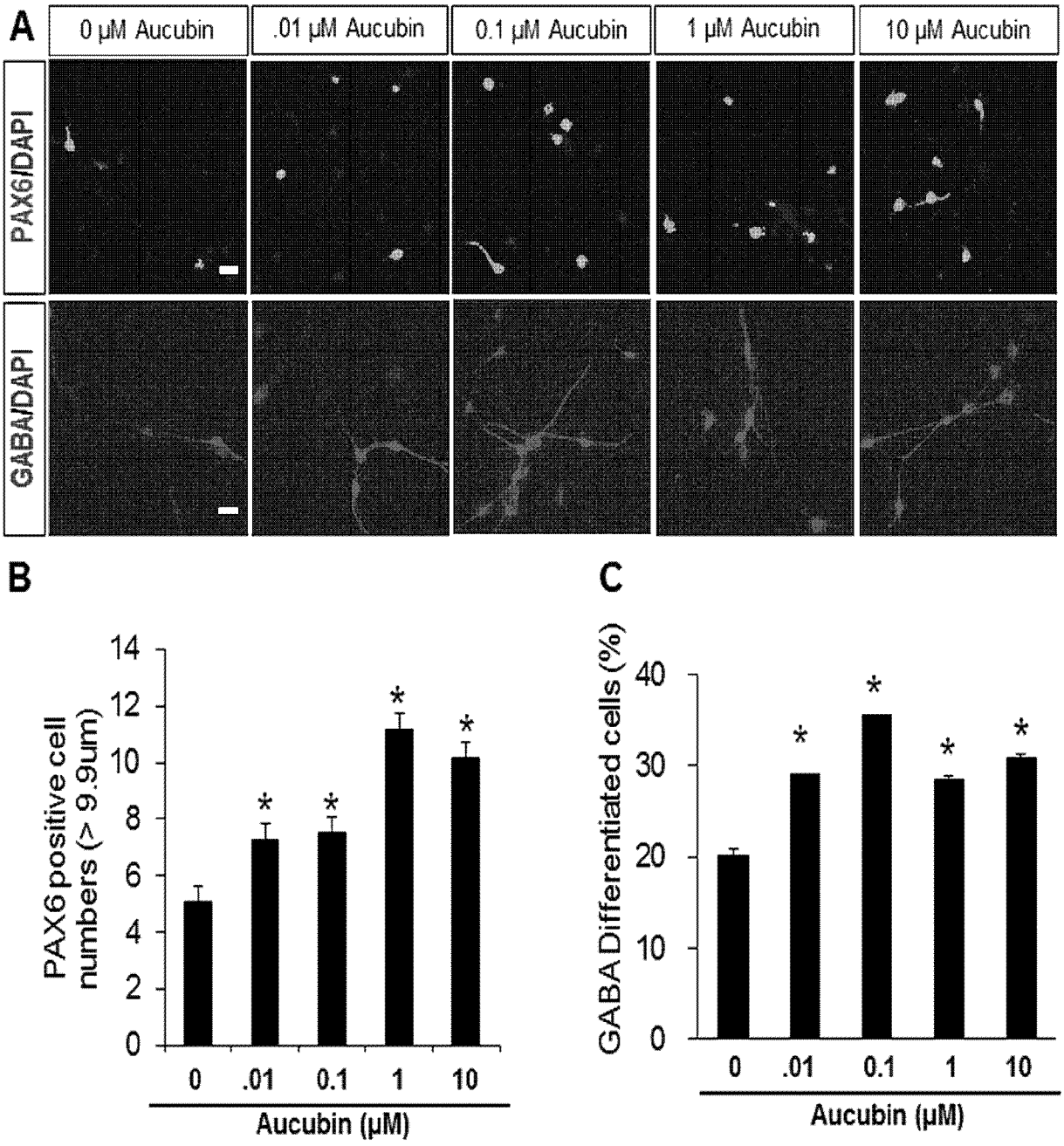
[도2b]


*
*
*
50
40
30
20
10
0
% of ChAT-GFP+ Cells/ GAD67+ Cells
ChAT-GFP
GAD67
Con 0.01 0.1 1 10(uM)

[도3]


A
Aucubin (μM)
0 .01 0.1 1 10
kDa
GAD65/67
65/67
NeuN
48
vGluT1
65
β actin
B
Relative intensity (NeuN / β-actin)
1.5
1
0.5
0
*#
*#
0 .01 0.1 1 10
Aucubin (μM)
C
Relative intensity (GAD6567 / β-actin)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
*#
*#
*#
0 .01 0.1 1 10
Aucubin (μM)
D
Relative intensity (vGluT1 / β-actin)
1.5
1
0.5
0
*
*
*#
*#
0 .01 0.1 1 10
Aucubin (μM)

[도4]


A
0 μM Aucubin
.01 μM Aucubin
0.1 μM Aucubin
1 μM Aucubin
10 μM Aucubin
PAX6/DAPI
GABA/DAPI
B
PAX6 positive cell numbers (> 9.9um)
14
12
10
8
6
4
2
0
0
.01
0.1
1
10
Aucubin (μM)
C
GABA Differentiated cells (%)
40
30
20
10
0
0
.01
0.1
1
10
Aucubin (μM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/013903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/7048(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/125(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/7048; A23L 1/30; A23L 33/10; A23L 33/125; A61K 36/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: aucubin, mental disease, GABAA, autism, attention deficit/hyperactivity disorder

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2015-0123152 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 03 November 2015 See claims 1-3; paragraph [0043].	1-4,6,7,9,10
A		5
A	KIM, Y. M. et al., "Aucubin Promotes Neurite Outgrowth in Neural Stem Cells and Axonal Regeneration in Sciatic Nerves", Experimental Neurobiology, 2014, vol. 23, no. 3, pages 238-245 See abstract; figures 1-3.	1-7,9,10
A	CN 105596357 A (HU, K.) 25 May 2016 See the entire document.	1-7,9,10
A	KANG, Z. et al., "Research Advances in Pharmacology of Aucubin and Aucubigenin", Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2007, vol. 32, no. 24, pages 2585-2587 See the entire document.	1-7,9,10
A	EGHORN, L. F. et al., "Positive Allosteric Modulation of the GHB High-affinity Binding Site by the GABAA Receptor Modulator Monastrol and the Flavonoid Catechin", European Journal of Pharmacology, 2014, vol. 740, pages 570-577 See the entire document.	1-7,9,10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 MARCH 2019 (04.03.2019)	**04 MARCH 2019 (04.03.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea
Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/013903

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 8 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/013903

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KR 10-1912544 B1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 26 October 2018 See claims 1-4, 6-9.	1-7,9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/013903

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0123152 A	03/11/2015	KR 10-1508095 B1	08/04/2015
CN 105596357 A	25/05/2016	CN 105596357 B	12/06/2018
KR 10-1912544 B1	26/10/2018	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/013903

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/7048(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/125(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/7048; A23L 1/30; A23L 33/10; A23L 33/125; A61K 36/46

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 어류빈, 정신질환, 가바, 자폐증, 주의력결핍 과잉행동장애(ADHD)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2015-0123152 A (경희대학교 산학협력단) 2015.11.03 청구항 1-3; 단락 [0043] 참조.	1-4,6,7,9,10
A		5
A	KIM, Y. M. 등, `Aucubin promotes neurite outgrowth in neural stem cells and axonal regeneration in sciatic nerves`, Experimental Neurobiology, 2014, 23권, 3호, 페이지 238-245 초록; 도면 1-3 참조.	1-7,9,10
A	CN 105596357 A (HU, K.) 2016.05.25 전체 문헌 참조.	1-7,9,10
A	KANG, Z. 등, `Research advances in pharmacology of aucubin and aucubigenin`, Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2007, 32권, 24호, 페이지 2585-2587 전체 문헌 참조.	1-7,9,10
A	EGHORN, L. F. 등, `Positive allosteric modulation of the GHB high-affinity binding site by the GABAA receptor modulator monastrol and the flavonoid catechin`, European Journal of Pharmacology, 2014, 740권, 페이지 570-577 전체 문헌 참조.	1-7,9,10

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 03월 04일 (04.03.2019)	2019년 03월 04일 (04.03.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이기철
전화번호 +82-42-481-3353

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/013903

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-1912544 B1 (경희대학교 산학협력단) 2018.10.26 청구항 1-4, 6-9 참조.	1-7,9,10

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/013903

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 8은 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/013903

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0123152 A	2015/11/03	KR 10-1508095 B1	2015/04/08
CN 105596357 A	2016/05/25	CN 105596357 B	2018/06/12
KR 10-1912544 B1	2018/10/26	없음	