



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월14일
(11) 등록번호 10-2755152
(24) 등록일자 2025년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/488 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/488 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0065081
(22) 출원일자 2023년05월19일
심사청구일자 2023년05월19일
(65) 공개번호 10-2024-0167267
(43) 공개일자 2024년11월26일
(56) 선행기술조사문헌
Pharmaceutical Sciences, 제29권, 제2호,
제135-143면 (2022. 5. 8.)
Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 제8
6권, 제407-414면 (2007년)
J Psychiatry Neurosci, 제27권, 제1호,
제12-27면 (2002년)

(73) 특허권자
국립호남권생물자원관
전라남도 목포시 고하도안길 99 (달동)
(72) 발명자
성수희
전라남도 무안군 삼향읍 남약3로82번가길 45, 30
3호 (남약 도휘에드가 6차 오피스텔)
김보람
경기도 군포시 오금로 43, 339동 1001호 (금정동,
율곡아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
원대규

전체 청구항 수 : 총 6 항

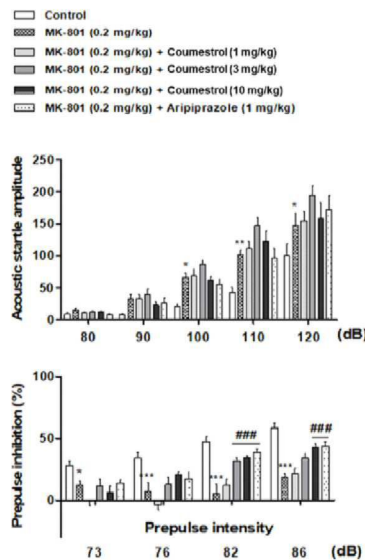
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 **취 추출물을 유효성분으로 포함하는 정신질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 취 추출물을 유효성분으로 포함하는 정신질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 천연소재인 취 잎 추출물을 유효성분으로 포함하여, 정신분열증 유사 행동인 사전자극억제 손상 및 사회적 상호작용 손상을 개선함으로써 정신병적 증상을 개선 및 예방할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2023.05)
A61K 31/7048 (2013.01)
A61P 25/18 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

김태수

전라남도 목포시 남악2로22번길 58, 107동 204호 (옥암동, 모아엘가)

김진호

전라남도 무안군 삼향읍 후광대로 330, 205호 (유담유블레스900)

서찬

전라남도 목포시 원산정로55번길 8, 104호 (산정동)

이하늘

전라남도 목포시 양을로 42, 110동 407호 (대성동, 목포대성엘에이치천년나무아파트)

한세희

전라북도 군산시 계산로 71, 106동 1002호 (지곡동, 지곡 쌍용 예가)

이원우

전라남도 목포시 남악2로22번길 58, 107동 204호 (옥암동, 모아엘가)

박정업

전라남도 목포시 양을로 42, 111동 1601호 (대성동, 목포대성엘에이치천년나무아파트)

황성민

전라남도 목포시 포미로 23, 108동 901호 (용해동, 포미타운주공1단지)

임수아

전라남도 목포시 연산백련로1번길 111, 902동 202호 (연산동, 골드클래스9차아파트)

김정은

인천광역시 남동구 앵고개로815번길 22, 302동 1402호 (논현동, 소래휴먼시아3단지)

정지민

전라남도 목포시 허사로57번길 15, 202동 202호 (달동, 신항만 뉴캐슬 오션시티2차 아파트)

정진우

부산광역시 동래구 충렬대로331번길 13-7 (안락동)

최경민

전라북도 전주시 덕진구 석소로 55, 116동 1104호 (인후동1가, 아중현대아파트)

최재수

부산광역시 남구 오륙도로 85, 101동 204호 (용호동, 오륙도 에스케이뷰 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711166827
과제번호	2020R1C1C1008331
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	우수신진연구
연구과제명	식품 속의 파이토케미컬로부터 조현병 치료 후보물질 발굴: 빅데이터 기반 표적

GPCR 예측 및 실험적 평가

기여율	4/5
과제수행기관명	국립호남권생물자원관
연구기간	2020.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	202302115
과제번호	HNIBR202302115
부처명	환경부
과제관리(전문)기관명	국립호남권생물자원관
연구사업명	도서·연안 생물자원 실용화 연구
연구과제명	도서·연안 생물 유래 천연물 확보 및 정보생산
기여율	1/5
과제수행기관명	국립호남권생물자원관
연구기간	2023.01.01 ~ 2027.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

Claims 1에서 추출된 쿠메스트롤(coumestrol)을 유효 성분으로 포함하는 정신질환 예방 또는 치료용 조성물이며, 상기 정신질환은 정신분열증, 정신분열형 장애, 분열정동 장애, 망상 장애 또는 공유 정신병 장애인 정신질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출은 물, C₁ 내지 C₆의 저급 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 추출 용매를 이용하여 추출되는 것인

정신질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 사전자극억제 손상 및 사회적 상호작용 손상을 개선할 수 있는

정신질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 우수한 인체 장 흡수율(HIA)을 나타내어, 경구 투여에 의해 복용될 수 있는

정신질환 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제1항, 제3항, 제4항 및 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 정신질환 예방용 식품 조성물이며,

상기 정신질환은 정신분열증, 정신분열형 장애, 분열정동 장애, 망상 장애 또는 공유 정신병 장애인

정신질환 예방용 식품 조성물.

청구항 8

제1항, 제3항, 제4항 및 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는

정신질환 예방 또는 치료용 약학 조성물이며,

상기 정신질환은 정신분열증, 정신분열형 장애, 분열정동 장애, 망상 장애 또는 공유 정신병 장애인

정신질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 칩 추출물을 유효성분으로 포함하는 정신질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간이 내·외적 환경의 자극에 의해 신체적·심리적인 스트레스를 받게 되면 인체는 스트레스에 적응하기 위해 뇌에서 청반 노르에피네프린(LC-NE; locus ceruleus norepinephrine)과 부신피질 자극 호르몬 방출 인자(CRF; corticotropin releasing factor)을 분비한다.

[0003] LC-NE는 교감 신경계를 활성화시키고 부교감 신경계의 작용을 억제하여 혈압, 심박동, 호흡을 증가시키며, 기관지를 확장시킬 뿐 아니라 발한 작용을 증가시킨다. 시상하부에서 분비된 CRF는 뇌하수체 전엽으로부터 부신피질 자극 호르몬(adrenocorticotrophic hormone; ACTH)을 일반 체순환으로 방출한다. 이 ACTH가 혈액을 따라 옮겨가서 부신피질의 ACTH 수용체에 결합하게 되면, cAMP라고 불리는 2차 신호전달자를 합성하게 된다. cAMP에 의해 활성화된 단백질 인산화 효소 PKA(protein kinase A)는 미토콘드리아에 위치한 당질코르티코이드(glucocorticoid) 합성 단백질을 활성화시킨다. 그러면 당질코르티코이드 합성 단백질이 콜레스테롤을 이용하여 스트레스 호르몬들을 만들어 낸다.

[0004] CRF-ACTH-당질 코르티코이드까지 연결되는 스트레스 경로를 일반적으로 시상하부-뇌하수체-부신(Hypothalamus-Pituitary gland-Adrenal gland; HPA) 축이라고 한다.

[0005] 정신분열증은 망상, 환각, 와해된 언어(이상 양성 증상), 둔감한 정서(flat affect), 자극에 대한 행동 유발 저하(avolition), 말과 언어 부족, 사회적 위축행동(social withdrawal, 이상 음성 증상), 주의, 계획, 추상적 사고의 결함 및 단-장기 기억 결손(인식기능 장애)을 나타내는 광범위한 정신질환이다.

[0006] 현재까지, 정신분열증의 치료약은 양성 증상을 그 표적 증상으로 하여 개발되어 왔다. 그러나, 정신분열증의 만성화 및 사회복귀의 어려움에는 음성 증상 또는 인지 장애가 깊이 연관되어 있어 이러한 증상의 개선 작용을 갖는 약제가 강력히 요구되고 있다.

[0007] 따라서, 양성 증상 뿐만 아니라 음성 증상 또는 인지 장애를 개선시키는 것은 정신분열증에 대해 유용한 치료 방법이 될 것으로 여겨진다.

[0008] 최근 수년간, 양성 증상뿐만 아니라 음성 증상 또는 인지 장애에도 개선 작용을 나타내는 약제가 개발되어 왔으나 여전히 그 수가 적고 효과가 충분하지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 10-1776143 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 칩 추출물을 유효성분으로 포함하는 정신질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 천연소재인 칩 잎 추출물을 유효성분으로 포함하여, 정신분열증 유사 행동인 사전자극억제 손상 및 사회적 상호작용 손상을 개선함으로써 정신병적 증상을 개선 및 예방할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 칩 추출물을 유효성분으로 포함하는 정신질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 칩 추출물을 유효 성분으로 포함하며, 상기 칩 추출물은 칩의 지상부에서 추출될 수 있다.

- [0013] 상기 껍 추출물은 껍 잎 추출물일 수 있다.
- [0014] 상기 껍 추출물은 물, C1 내지 C6의 저급 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 추출 용매를 이용하여 추출될 수 있다.
- [0015] 상기 껍 추출물은 사전자극억제 손상 및 사회적 상호작용 손상을 개선할 수 있다.
- [0016] 상기 껍 추출물은 퀘르세틴-3-O-로비노바이오사이드(Quercetin-3-O-robinobioside), 루틴(Rutin), 캄페롤-3-O-로비노바이오사이드(Kaempferol-3-O-robinobioside), 니코티플로린(Nicotiflorin), 다이드제인(Daidzein), 제니스테인(Genistein), 다이드진(Daidzin), 제니스틴(Genistin) 및 쿠메스트롤(Coumestrol)을 포함할 수 있다.
- [0017] 상기 껍 추출물은 우수한 인체 장 흡수율(HIA)을 나타내어, 경구 투여에 의해 복용될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 정신질환 예방 또는 치료용 식품 조성물은 상기 조성물을 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 일 실시예에 따른 정신질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상기 조성물을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 천연소재인 껍 잎 추출물을 유효성분으로 포함하여, 정신분열증 유사 행동인 사전자극억제 손상 및 사회적 상호작용 손상을 개선함으로써 정신병적 증상을 개선 및 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 조성물에 대한, MK-801로 유도한 사전자극 억제 손상 동물 모델에 대한 사전자극 억제능에 대한 실험 결과이다.
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 본 발명의 조성물에 대한, MK-801로 유도한 사회인지능 손상 동물 모델에 대한 사회인지능 회복에 대한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0023] 본 명세서에서 "추출물(extract)"이란 생약을 적절한 침출액으로 짜내고 침출액을 증발시켜 농축한 제제를 의미하는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 이들의 조정제물 또는 정제물일 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.
- [0025] 본 명세서에서 정의되는 "정신질환"으로는, 보다 상세하게는 정신분열증, 정신분열형 장애, 분열정동 장애, 망상 장애, 단기 정신병 장애, 공유 정신병 장애, 사회적 고립, 바람직하게는 정신 분열증을 포함할 수 있다.
- [0026] 정신분열증은 일반인의 1% 미만에게서 발병하는 정신 장애 질환으로, 병에 걸린 사람들의 사고, 지각 및 행동에서 변화를 수반한 광범위한 내인성 질환이다.
- [0027] 상기 정신분열증의 증상은 자발적 행동의 결여, 심각한 부적응, 단조로운 감정, 대인관계의 결여 및 비정상적 사고를 특징으로 하는 음성증상과, 정신운동 흥분, 망상, 환청 및 환각 등의 양성증상 및 인지 장애로 분류된다.
- [0028] 상기 정신 분열증의 원인은 뇌 속의 신경전달물질인 도파민의 불균형 및 전 두엽의 손상등과 관련되어 있으며, 유전적 원인, 태아기의 환경, 사회적 원인 또는 약물 남용의 결과라고 알려져 있다.
- [0029] 상기 정신분열증의 치료는 정신심리적인 치료요법과는 별도로 신경안정제를 중심으로 한 약물치료를 하게 되는데 기존의 전형적인 항정신병제는 환각, 망상 및 착란 등의 양성 증상을 치료하는데 중점 되었다.
- [0030] 이 약물 들은 도파민 길항 약물이 유용한 것으로 알려져 있으며, 대부분은 1년여에 걸쳐 이들 약물의 장기투여가 불가결하며, 구체적으로는 할로페리돌 (haloperidol), 클로르프로마진(chlorpromazine) 및 플루페나진

(fluphenazine) 등이 사용되고 있다.

- [0031] 하지만 이러한 약물들은 운동장애, 비자발적 근연축, 감정둔화, 피로, 추진력 결여 및 체중 증가 등과 같은 많은 부작용을 가지고 있을 뿐만 아니라, 음성증상 및 인식능력의 장애를 치료할 수 없다는 한계를 가지고 있다.
- [0032] 최근의 비전형적인 항정신병제는 대뇌변연계를 표적으로 하여 도파민 D2 수용체를 차단하는 방법으로 기존의 전형적인 항정신병제에 비하여 부작용이 적고 양성 및 음성 증상을 모두 치료한다.
- [0033] 이러한 비전형적인 항정신병제의 예로는 클로파진(clozapine), 리스페리돈(risperidone), 아세나핀(asenapine), 올란자핀(olanzapine) 및 일로페리돈(iloperidone)을 들 수 있다(Kay et al., 1987; Lieberman et al., 2005; Molteni et al., 2009; Howes and Kapur, 2009).
- [0034] 다만, 상기 올라자핀의 경우, 최근 부작용으로 당뇨병을 일으키는 경우도 있다. 이는 올라자핀이 소포체 속에서 프로인슐린의 구조 이상을 일으킴으로써 비전형적인 당뇨병을 유발할 수 있음을 확인하였다.
- [0035] 상기와 같이, 비전형적인 항정신병제는, 기존 전형적인 항정신병제에 비하여 부작용이 적은 것으로 알려져 있기는 하나, 부작용이 아예 없는 것은 아닌 점에서 지속적인 복용이 문제될 수 있다.
- [0036] 이에 본 발명에서는, 천연 소재를 이용하여 장시간 지속적인 복용 시에도 부작용의 문제가 발생하지 않는 정신 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0037] 구체적으로, 상기 정신질환의 예방 또는 치료용 조성물은 쑥 추출물을 유효 성분으로 포함하며, 상기 쑥 추출물은 쑥의 지상부에서 추출될 수 있다.
- [0038] 쑥(Pueraria lobata (Willd.) Ohwi)은 콩과에 속하며 한국, 중국, 일본 등 여러 나라에서 식용 또는 전통 약재로 사용되어 온 덩굴식물 중 하나이다.
- [0039] 상기 쑥의 뿌리와 잎의 대표적인 성분은 각각 푸에라린(puerarin, daidzein-8-C-glucoside) 및 로비닌(robinin, kaempferol 3-O-robinoside-7-O-rhamnoside)이다.
- [0040] 또한, 쑥에는 이소플라본(isoflavones), 플라보노이드(flavonoids), 트리테르페노이드(triterpenoids) 및 쿠메스탄(coumestan) 유도체가 많이 함유되어 있다. 특히, 쑥에는 여성 갱년기 증상 완화에 도움이 되는 이소플라본이 풍부하게 함유되어 있어 여성들에게 널리 이용되고 있다. 상기 이소플라본이 풍부한 쑥의 분획은 신경전달물질의 대사를 증진시켜 신경 보호 효과를 발휘하고, 푸에라린은 도파민 신경세포를 보호하여 항 PD 효과를 발휘할 수 있다.
- [0041] 또한, 쑥 뿌리의 에탄올 추출물은 뇌허혈 재관류 마우스 모델에서 항우울 활성을 나타냈다.
- [0042] 그러나 쑥 잎과 상기 쑥 잎의 성분에 대한, 정신질환의 예방 또는 치료 효과, 보다 구체적으로 정신분열증에 대한 예방 또는 치료 효과를 실험적으로 확인한 바는 없다.
- [0043] 따라서 식품으로 쉽게 섭취할 수 있는 쑥의 활성 성분을 발견하는 것은 영양학적으로나 산업적으로 매우 중요한 의미를 갖는다. 따라서 본 발명에서는 후술하는 바와 같이, 분석 기법인 HPLC-Q-TOF-MS, 시험관 내 효소 억제 및 단백질 응집 분석 및 인실리코 전산화적 접근법을 이용하여 쑥 잎의 활성 성분을 확인하였으며, NMDA 수용체 길항제가 처리된 동물 모델에서 사전자극억제 손상 및 사회적 상호작용 손상에 대해 효과가 있는지 여부를 확인하였다.
- [0044] 상기 쑥의 지상부는 줄기 또는 잎을 의미하는 것이며, 보다 구체적으로 상기 쑥 추출물은 쑥 잎 추출물일 수 있다.
- [0045] 상기 쑥 추출물은 물, C₁ 내지 C₆의 저급 알코올 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 추출 용매를 이용하여 추출될 수 있다.
- [0046] 구체적으로, 쑥 추출물을 제조하기 위해서는 쑥 잎을 세척하는 단계; 세척 후 건조시키는 단계; 건조 후 쑥 잎을 분쇄하는 단계; 유기 용매를 사용하여 상기 분쇄물을 침출시키는 단계; 시료를 침출 후 건조시키는 단계; 에탄올을 이용하여 침출시키는 단계; 및 침출하는 단계를 포함하여, 쑥 추출물을 획득할 수 있다.
- [0047] 상기 유기 용매를 사용하여 추출한 추출물은 유기 용매를 사용하여 분획을 실시하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 상기 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 침출법 및 환류 추출법 등 당업계의 통상적인 추출 방법일 수 있다.

- [0048] 구체적으로 세척 및 건조로 이물질이 제거된 펠린조 추출물을 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 상기 용매들을 순차적으로 시료에 적용하여 추출한 추출물일 수 있다.
- [0049] 상기 환류 추출법은 물, 탄소수 1 내지 6의 알코올 100 mL 기준으로, 천연물의 분쇄물 10 내지 30g, 환류 시간 1 내지 3시간 및 50 내지 100%의 탄소수 1 내지 6의 알코올 또는 물에 의한 것이다. 보다 구체적으로, 탄소수 1 내지 6의 알코올 100 mL 또는 물 100 mL 기준으로, 천연물의 분쇄물 10 내지 20g, 환류 시간 1 내지 2시간 및 70 내지 90%의 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 물에 의한 것이다.
- [0050] 상기 침출법은 15 내지 30℃, 24 내지 72시간 동안 진행하며, 추출 용매로 물 또는 50 내지 100%의 탄소수 1 내지 6의 알코올을 이용한다. 보다 구체적으로는 20 내지 25℃, 30 내지 54시간 동안 진행하며, 추출 용매는 물 또는 70 내지 80%의 탄소수 1 내지 6의 알코올에 의한 것이다. 상기 추출 용매는 보다 구체적으로 에탄올 일 수 있으나, 상기 예시에 국한되지 않고, 긴장완화 또는 항우울에 우수한 효과를 나타낼 수 있는 침 추출물로 제조할 수 있는 것은 모두 사용 가능하다.
- [0051] 상기 초음파 추출법은 30 내지 50℃, 0.5 내지 2.5시간 동안 반응을 진행하며, 추출용매는 물 또는 50 내지 100%의 탄소수 1 내지 6의 알코올에 의한 것이다. 구체적으로는 40 내지 50℃, 1 내지 2.5시간 동안 추출하며, 추출용매로 물 또는 70 내지 80%의 탄소수 1 내지 6의 알코올에 의한 것이다.
- [0052] 상기 추출 용매는 시료의 중량 기준으로 2 내지 50배를 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는 2 내지 20배이다. 추출을 위해 시료는 추출 용매에서 추출을 위해 1 내지 72시간 동안 방치될 수 있으며, 보다 구체적으로 24 내지 48시간 동안 방치될 수 있다.
- [0053] 추출 후, 추출물은 새로운 분획 용매를 순차적으로 적용하여 분획할 수 있다. 분획 시 사용하는 분획 용매는 상기 용매는 물, 헥산, 부탄올, 에틸아세트산, 에틸 아세테이트, 메틸렌클로라이드 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상이며, 바람직하게는 에틸아세테이트 또는 메틸렌클로라이드이다. 추출물 또는 분획물을 얻은 후에는 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 사용할 수 있다.
- [0054] 상기 침 추출물은 퀘르세틴-3-O-로비노바이오사이드(Quercetin-3-O-robinobioside), 루틴(Rutin), 캄페롤-3-O-로비노바이오사이드(Kaempferol-3-O-robinobioside), 니코티플로린(Nicotiflorin), 다이드제인(Daidzein), 제니스테인(Genistein), 다이드진(Daidzin), 제니스틴(Genistin) 및 쿠메스트롤(Coumestrol)을 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 침 추출물의 유효 성분 중, 쿠메스트롤은, NMDA 수용체 길항제가 처리된 동물 모델에서 우수한 사전자극억제 손상 및 사회적 상호작용 손상에 대해 효과를 확인하였다.
- [0056] 실험예
- [0057] 식물 공급원
- [0058] 침 잎은 2021년 8월에 거금도(전라남도 고흥군)에서 채집하였다. 상기 침 잎은 국립호남권생물자원관(바우처 번호 shan2021-142)의 한 박사(S. Han)에 의해 인증되었다. 열수 추출물(PL-L-W) 및 70% 에탄올 추출물(PL-L-70E)은 대한민국 국립생물자원관 섬과 연안 생물자원은행(BOBIC, 등록번호 HNIBR NP375 및 HNIBR NP374)에서 얻었다.
- [0059] HPLC-ESI-Q-TOF-MS 분석
- [0060] PL-L-W 및 PL-L-70E는 성분 분석을 위해 Chromeleon Software 7.3(ThermoScientific, 피츠버그, PA, 미국)이 장착된 Hypersil GOLD[®] C18 컬럼(Cat. 25005-254630)을 사용하여 Ultimate[®] 3000 UHPLC 시스템에서 분리하였다. 이동상은 0.1% HCOOH(A)의 구배 및 0.1% HCOOH(B)를 포함하는 아세트니트릴로 구성되었다: 0-60분, B 10%~45%; 60-60.1분, B 45%~100%; 60.1-65분, B 100%. 시료 주입량은 2.5 μ L, 컬럼 온도는 25℃, 유속은 0.5mL/min이었다. MS 분석은 MassLynx v10(미국 매사추세츠주 밀포드 소재 Waters Corporation) 및 Xevo G2-XS Q-TOF-MS를 사용하여 수행하였다. 네거티브 모드에서 저해상도 및 고해상도 스펙트럼 데이터를 얻기 위해 ESI-MSe 모드를 사용하였다. MS 조건은 다음과 같다: 획득 질량 범위, 50~1500 Da, 스캔 시간 0.5초; 콘 전압, 40.0 V; 소스 및 용해 온도, 각각 100 ℃ 및 350 ℃. 질량 보정은 0.5mM 포름산나트륨을 사용하여 수행하였다. 질량은 200 pg/mL 류신 엔케팔린(leucine enkephalin)을 사용하여 수집하는 동안 보정하였다.
- [0061] 약동학 파라미터 예측
- [0062] 쿠메스트롤의 약동학 특성은 Marvin Sketch(v17.1.30)와 PreADMET 서버 v1.0(<https://preadmet.bmdrc.kr/>),

2022년 6월 1일에 액세스)을 사용하여 계산하였다.

- [0063] 시험동물 선정
- [0064] 수컷의 ICR mouse 5주령(26-28 g)을 주식회사 오리엔트(경기도 성남시 중원구 상대원동)에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 1주일간 적응시켰으며 적응기간 동안 동물실의 온도는 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $60\pm 10\%$ 내외, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지하였다. 실험동물은 적응기간 동안 사료와 물을 제한 없이 공급받았으며, 동물실험 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committees, IACUC)로부터 동물 승인(승인번호: KHUASP-22-530)을 받아 본 실험을 수행하였다.
- [0065] MK-801 유도 모델 및 투약
- [0066] MK-801은 비경쟁적 NMDA 수용체 길항제이며(Foster and Fagg, 1987; Huettner and Bean, 1988) GABAergic 인터뉴런에 작용하며, NMDA 수용체에 대한 작용 및 특이성으로 인해 실험 동물에서 과민성 운동 활동, 사회적 상호작용 감소 및 인지 유연성, 잠재 학습, 장기 공간 기억, 작업 기억 및 감각 운동 게이팅의 장애를 유도할 수 있다(Rung et al., 2005; Avecawa et al., 2007; Manahan-Vaughan et al., 2008; Zou et al., 2008; Wiescholleck and Manahan-Vaughan, 2012). 상기 선행연구 결과로부터 MK-801 0.2 mg/kg 용량으로 행동시험 시작 30분 전에 복강투여 하였으며, 국립호남권생물자원관으로부터 제공받은 시료 1 내지 4(시료 1 내지 3은 쿠메스트롤 1mg/kg, 3mg/kg, 10mg/kg이며, 시료 4는 아리피프라졸 1mg/kg)는 행동시험 1시간 전에 경구 투여하였다.
- [0067] 사전 자극 억제 시험(Acoustic startle response test, ASR)
- [0068] 소리놀람반응 시험은 NMDA 수용체 길항제인 MK-801을 투여한 조현병 유사 동물 모델에서 사전자극 억제(prepulse inhibition, PPI)가 이루어지지 않는다는 사실이 알려져 있다.
- [0069] 이러한 사실을 바탕으로 놀람 상자(startle box)에서 실험동물에게 소리 자극을 준 뒤, 그 반응을 측정하여 시험약물이 조현병 동물 모델에게서 효과가 있는지를 판단할 수 있다.
- [0070] 놀람 상자는 쥐를 가볍게 구금할 수 있는 상자, 소리 자극을 일정하게 낼 수 있는 시스템, 동물의 움직임을 측정할 수 있는 장비, 측정된 자극을 디지털화 시킬 수 있는 프로그램, 소리를 제공할 수 있는 소스와 스피커로 구성되어 있고, 각 검사를 위해 쥐를 startle box에서 5분간 적응 시키고, 80, 90, 100, 110 또는 120 dB의 소리 자극을 주어 각 자극에 대한 동물의 반응을 측정하였다.
- [0071] 그 후 사전자극 억제 시험에서 73, 76, 82 또는 86 dB의 사전자극 [3, 6, 12 또는 16 dB의 자극과 백색 잡음(70 dB)]을 20 ms 동안 준 뒤, 80 ms 후 40 ms 동안 120 dB의 소리자극을 주었다. 각각의 자극에 대한 동물의 놀람 반응을 측정한 뒤, 120 dB만 자극된 상황(SS)과 사전 자극 후 120 dB가 자극된 상황 간(PP)의 반응 비율을 측정하여 사전자극 억제 정도(PPI)를 계산하였으며, 계산식은 하기와 같다:
- [0072] % 사전자극 억제(PPI) = $(SS - PP)/SS \times 100$
- [0073] 양성 대조군으로 정신질환 즉, 정신분열증에 효과가 있다고 알려진 아리피프라졸(Aripiprazole)을 1mg/kg 투여하였다.
- [0074] 사회성 시험(Sociability test, SI)
- [0075] 3개의 챔버(chamber)를 이용하는 social interaction test는 일반적인 사회성(sociability)과 사회인지능(social novelty)을 측정하는 대표적인 행동실험으로, 설치류는 혼자 고립되어 있는 것보다는 다른 동물과 지내는 것보다 더 새로운 동물과 지내는 것을 선호하는 습성에 기반하며, 3-chamber로 구성된 공간에 5분 동안 자유롭게 탐색하도록 하였다.
- [0076] 이후 한 공간에 낯선 쥐를 넣고 낯선 쥐를 탐색하는 시간을 측정하고, 10분간 반대쪽 빈 공간에 새로운 쥐를 넣어 사회적 상호작용(social interaction, 이하 SI)을 평가하였다.
- [0077] 양성 대조군으로 정신질환 즉, 정신분열증에 효과가 있다고 알려진 아리피프라졸(Aripiprazole)을 1mg/kg 투여하였다.
- [0078] 통계 분석
- [0079] 용량-억제 곡선으로부터 계산된 50% 억제 농도(IC50)는 세 가지 독립적인 실험의 평균_표준편차(SD)로 표시하였다. Aβ25-35 자가 응집 분석에 대한 대조군 대비 시험 화합물로 처리한 그룹의 통계적 유의성은 Student's t-

test(Microsoft Excel 2019, Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA)를 통해 계산하였다.

[0080] 실험 결과

[0081] PL-L-W 및 PL-L-70E에 존재하는 화합물의 추출 이온 크로마토그램(EIC)

[0082] PL-L-W 및 PL-L-70E의 화학 성분은 HPLC-Q-TOF-MSe를 사용하여 분석하였다(도 1, 도 2 하기 표 1 및 표 2 참조). 표준 화합물과의 체류 시간(RT)을 비교하고 단편화 패턴을 분석하여 퀘르세틴과 캄페롤의 다양한 배당체가 칩 앞에 존재한다는 것을 확인하였다. 특히 로비닌이 가장 풍부한 성분으로 확인되었다. 또한 플라반-3-올(퀘르세틴-3-O-로비노바이오사이드, 루틴, 캄페롤-3-O-로비노바이오사이드, 니코티플로린), 이소플라본(다이드제인, 제니스테인, 다이드진, 제니스틴), 쿠메스탄 유도체인 쿠메스트롤도 PL-L-70E에 존재하였다.

표 1

Compounds	RT (min)	Measured Mass	Molecular Formula	Error (ppm)	Fragment Ions (m/z) *
Robinin	21.12	739.2080 [M-H] ⁻	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	-8.0	593.1519
Quercetin-3-O-robinobioside	24.38	609.1437 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-3.1	301.0340, 300.0283
Rutin	24.74	609.1437 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-3.1	301.0340, 300.0283
Kaempferol-3-O-robinobioside	26.94	593.1519 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	2.2	285.0408, 284.0315, 269.0437
Nicotiflorin	28.35	593.1519 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	2.2	285.0408
Daidzin	21.32	461.1108 [M + HCOOH-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	5.2	415.1031 [M-H] ⁻ , 253.0523
Genistin	28.30	477.1048 [M + HCOOH-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	3.1	431.0973 [M-H] ⁻ , 269.0474
Daidzein	39.57	253.0523 [M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	8.7	225.0543, 224.0486, 209.0623, 197.0588, 91.0185
Genistein	49.61	269.0474 [M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-4.8	241.0490, 225.0543, 224.0486, 201.0550, 159.0453, 133.0300
Coumestrol	49.76	267.0286 [M-H] ⁻	C ₁₅ H ₈ O ₅	-2.6	167.0480

[0083]

[0084] a. MS^c 방법의 고에너지 함수에 의해 결정되었다.

표 2

Compounds	RT (min)	Measured mass	Molecular formula	Error (ppm)
Robinin	21.18	739.2119	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	4.5
Quercetin-3-O-robinobioside	24.34	609.1445	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-1.8
Rutin	24.75	609.1445	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-1.8
Kaempferol-3-O-robinobioside	26.87	593.1495	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-1.9
Nicotiflorin	28.36	593.1495	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-1.9
Daidzin	21.33	461.1079	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	-1.1
Genistin	28.31	477.1052	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	4.0
Daidzein	39.49	253.0503	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	0.8
Genistein	49.52	269.0450	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	0.0
Coumestrol	49.67	267.0295	C ₁₅ H ₈ O ₅	0.7

[0085]

[0086] 쿠메스트롤의 약동학 파라미터

[0087] 쿠메스트롤의 화학 구조를 기반으로 약동학 파라미터를 예측하였다. 상기 쿠메스트롤의 약동학 분석 결과, 쿠메스트롤의 혈액-뇌장벽(BBB) 투과성 점수는 0.76으로 쿠메스트롤이 BBB를 통과하여 CNS에 적당히 흡수될 수 있음을 확인하였다.

[0088] 또한 쿠메스트롤은 93.51%의 인체 장 흡수율(HIA)을 보였는데, 이는 쿠메스트롤이 사람의 장에 쉽게 흡수될 수 있고 경구 전달에 적합하다는 것을 의미한다.

[0089] 약물의 친유성 지수인 CMC 유사 규칙에 따르면 신경계 약물의 로그 P는 1.3에서 4.1 사이여야 한다. 하기 표 4에서 볼 수 있듯이 쿠메스트롤의 Log P_{o/w} 값은 2.94이다. 또한 상기 쿠메스트롤은 p 당단백질의 비역제제로 예

측되었다. 돌연변이 유발 특성 분석 결과, 쿠메스트롤은 쥐와 생쥐에게 발암성이 없는 것으로 예측되었다.

[0090] 하기 표 3은 쿠메스트롤의 약동학적 특성이다:

표 3

[0091]	예측 값(predicted values)
Log P _{o/w} ^a	2.94
BBB penetration ^b	0.76
HIA ^c	93.51
P-glycoprotein	Non-inhibition
Carcino-rat/mouse	Negative

[0092] a. 용매 분배 계수의 로그에서 물에 대한 1-옥탄올의 비율. b. 흡수 수준이 0.1 미만이면 낮음, 0.1~2.0이면 보통, 2.0 이상이면 좋음으로 간주된다.

[0093] c. 0~20%의 흡수 수준은 낮음, 20~70%는 보통, 70~100%는 양호로 간주된다.

[0094] 쿠메스트롤의 정신질환 유도 동물 모델에서의 사전자극 억제 손상 개선 효능

[0095] MK-801(0.2 mg/kg)로 유도한 사전자극 억제 손상 동물모델을 실험에 이용하였으며, 소리자극에 의한 놀람반응시험(acoustic startle response test)을 실시하여 사전자극 억제(prepulse inhibition) 정도를 평가하였다.

[0096] 실험결과는 도 1과 같다.

[0097] 상기 도 1에 의하면, MK-801로 유도한 사전자극 억제 손상 동물모델에서 대조군 대비 유의적인 사전자극 억제(P<0.001)가 저하되었음을 확인하였으며, 쿠메스트롤의 10 mg/kg 용량 투여군에서 결핍된 사전자극 억제능이 유의적으로 개선됨을 확인하였으며 그 정도는 양성 대조군과 유사하였다.

[0098] 쿠메스트롤의 정신질환 유도 동물 모델에서의 사회적 상호작용 개선 효능

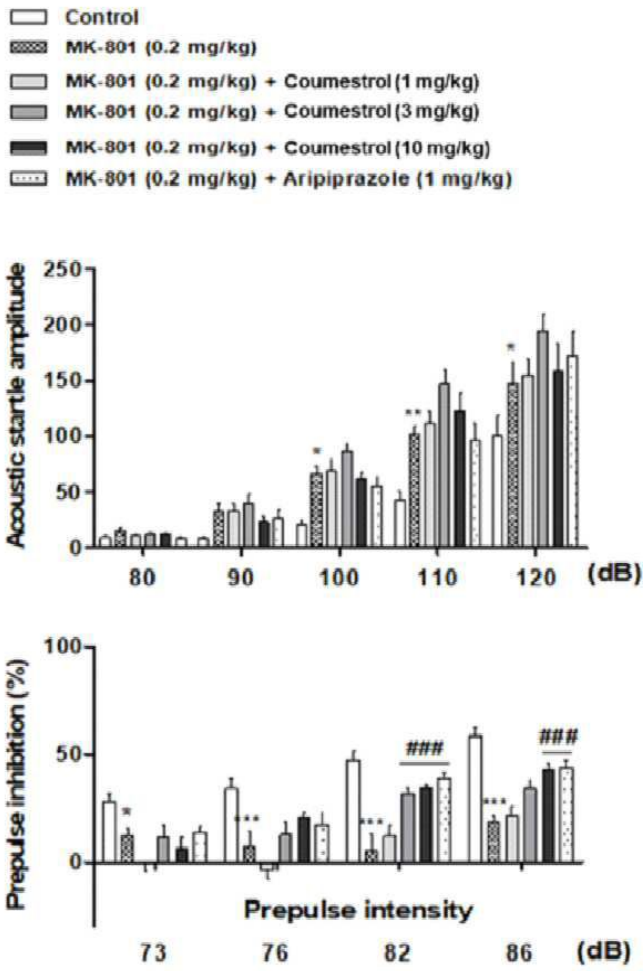
[0099] 도 2는 MK-801로 유도한 사회인지능 손상 동물모델에서 쿠메스트롤의 사회적 상호작용 개선 효능에 대한 실험 결과로, 상기 실험 결과에 의하면, 일반적인 사회성(sociability)은 정상군과 투여군 모두에서 사회적 상호작용을 하는 것으로 확인하였다.

[0100] 사회인지능(social novelty)에서는 대조군 대비 MK-801 단독 투여군에서 낯선 쥐에 대한 선호도가 감소하였음을 확인하였으며, 쿠메스트롤의 투여로 인해 모든 용량에서 사회인지능이 정상수준으로 회복됨을 확인하였으며 그 정도는 양성대조군과 유사하였다.

[0101] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

도면1



도면2

