



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0152606
(43) 공개일자 2024년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A23K 20/121 (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2023.05)
A23K 20/121 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2023-0048823

(22) 출원일자 2023년04월13일

심사청구일자 2023년04월13일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이봄비

경기도 남양주시 화도읍 경춘보학2길 30, 102동 1501호(남양주 라온프라이빗 1단지)

(74) 대리인

특허법인정진

전체 청구항 수 : 총 10 항

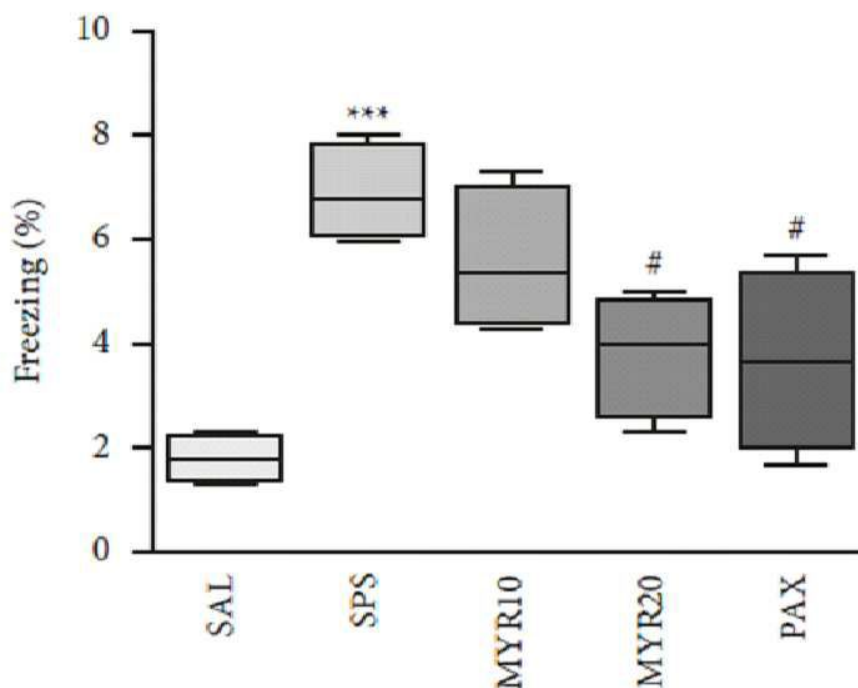
(54) 발명의 명칭 미리세틴을 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 미리세틴을 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명의 미리세틴을 외상 후 스트레스를 유발한 동물 모델에 처리한 경우, 공포 소거 회상 중 동결 반응이 유의하게 감소하였고, FST(forced swimming test)에서 부동 시간이 유의하게 감소하고 등반 시간이 증가하였다. 또한,

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3b



EPM(elevated plus maze) 시험에서 개방 구역에 진입하는 시간과 횟수를 상당히 증가시켰고, 불안 지수를 현저히 감소시켰다. 신경전달물질 변화에 측면에서, 미리세틴은 혈장 CORT 및 ACTH 수치; HIP 및 AMY에서 NE 농도를 유의하게 감소시켰고, PFC 및 HIP에서 5-HT 농도를 크게 증가시켰다. 또한, HIP에서 BDNF 반응성 신경 활성을 해마 영역에서 유의하게 증가시켰고, HIP에서 BDNF 및 TrkB mRNA 수치; 및 p-ERK 단백질 발현 수준을 유의하게 증가시켰는 바, 이는 미리세틴의 외상 후 스트레스 장애 대한 우수한 치료 효과를 확인한 것으로, 본 발명의 미리세틴을 관련 분야에 다양하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711166293

과제번호 2020R1A2C1100975

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 외상 후 스트레스 장애에 의한 불안감, 공포, 우울증에서 신경염증 및 시냅스 가소성 조절을 통한 트라우마 스트레스 제어에 대한 침자극의 효능 검증 및 작용기전 규명

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교 산학협력단

연구기간 2020.09.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

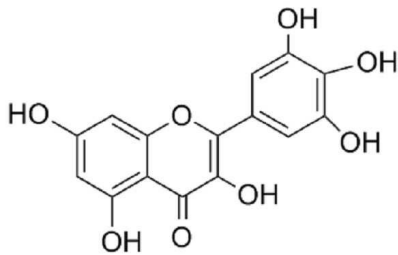
미리세틴(Myricetin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 미리세틴은 하기 화학식 1로 표시되는 것인, 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제1항에 있어서,

상기 미리세틴은 15 내지 40 mg/kg로 개체에 투여되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 미리세틴은 외상 후 스트레스 장애에 의해 증가된 혈장 CORT 및 ACTH 수치를 감소; 외상 후 스트레스 장애에 의해 증가된 NE(noradrenaline)의 농도를 감소; 또는 외상 후 스트레스 장애에 의해 감소된 5-HT(Serotonin) 농도를 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 미리세틴은 외상 후 스트레스 장애에 의해 감소된 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 및 TrkB(Tropomyosin receptor kinase B) 유전자의 발현 및 단백질의 활성을 증가; 또는 외상 후 스트레스 장애에 의해 감소된 p-ERK 단백질 발현 수준을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

미리세틴(Myricetin) 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

미리세틴(Myricetin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 9

제1항의 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 투여는 미리세틴을 15 내지 40 mg/kg로 투여하는 것인, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 미리세틴을 포함하는 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 외상 후 스트레스 장애(Post-traumatic stress disorder, PTSD)는 성폭행, 자연재해, 전쟁 등 예기치 못한 충격적인 사건을 경험하거나, 재난 관련 뉴스에 노출된 사람들에게 영향을 미치는 심각한 심리적 장애이다. 또한 전 세계 인구의 70% 이상이 일생 동안 적어도 한 번 이상의 외상성 사건에 노출되며, 17% 이상이 PTSD 진단을 받게 된다. PTSD의 증상은 과민반응(hyperalertness, hyperarousal)과 충격의 재경험(re-experience or intrusion), 감정회피(avoidance) 또는 마비(emotional numbness) 등으로 나타난다. 또한, 두통이나 소화불량, 구토, 위통, 수전증, 호르몬의 변화로 인하여 알레르기와 같은 현상이 발생할 수 있고, 이별 불안, 학교 공포, 외부인 공포 등 다양하게 나타날 수 있다. 비현실적인 감정 때문에 알코올과 약물에 의존하여 남용 및 중독으로 이어지는 경우가 있고, 자율신경계 장애가 나타나며, 때로는 환각이 보이고, 해리성 장애나 공황 발작이 같이 나타날 수 있다. 이와 관련된 심리적 및 직업적 장애를 고려할 때 PTSD는 사회적 문제로 떠오르고 있다. 선택적 세로토닌 재흡수 억제제(Selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI) 및 세로토닌 및 노르에피네프린 재흡수 억제제(serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors, SNRI)는 현재 PTSD 치료제로 사용되고 있으나, 효과가 제한적이고 금단, 진정, 의존성, 인지기능 장애 등 다양한 부작용을 유발하는 단점이 있다. 따라서 안전하고 효과적인 새로운 약물이 필요한 실정이다.

[0004] 미리세틴(Myricetin, MYR; 3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavone)은 베리류, 채소, 차, 다양한 식물의 열매에서 발견되는 천연 플라보노이드이다. MYR은 항산화, 항세포사멸, 항광노화, 항암, 항당뇨, 항염증 등 다양한 약리 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나, 미리세틴의 외상 후 스트레스 장애에 대한 예방, 개선, 또는 치료 효과는 알려진 바가 없다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 미리세틴을 외상 후 스트레스를 유발한 동물 모델에 처리하고 FCT (fear conditioning test), FST(forced swim test), EPM (elevated plus maze) 등을 사용하여 SPS(single prolonged stress)에 노출된 쥐의 외상 후 스트레스 장애, 우울증, 및 불안 유사 행동에 대한 MYR의 효과를 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허문헌 제10-2021-0135833호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 미리세틴(Myricetin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 미리세틴(Myricetin) 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 미리세틴(Myricetin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0012] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

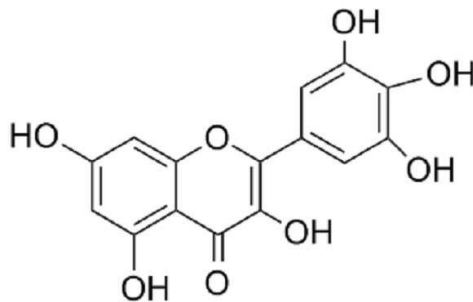
[0015] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0019] 본 발명은 미리세틴(Myricetin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명에서, 상기 미리세틴은 베리류, 채소, 차, 다양한 식물의 열매에서 발견되는 천연 플라보노이드로서, 하기 화학식 1로 표시되는 구조를 갖는 화합물일 수 있으며, 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chromen-4-one의 IUPAC 이름을 가질 수 있으며, 화학식은 $C_{15}H_{10}O_8$ 이고, 분자량은 318.3일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 미리세틴 화합물의 획득 방법은 본 발명이 속한 분야에서 공지된 방법으로 화학적으로 합성하거나, 시판되는 물질을 사용할 수 있으며, 본 발명이 속한 분야에 알려진 방법에 따라 추출, 분리하여 획득할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 본 발명에서, 상기 미리세틴은 15 내지 40 mg/kg, 15 내지 35 mg/kg, 15 내지 30 mg/kg, 15 내지 25 mg/kg, 15 내지 22 mg/kg, 16 내지 40 mg/kg, 16 내지 35 mg/kg, 16 내지 30 mg/kg, 16 내지 25 mg/kg, 16 내지 22 mg/kg, 17 내지 40 mg/kg, 17 내지 35 mg/kg, 17 내지 30 mg/kg, 17 내지 25 mg/kg, 17 내지 22 mg/kg, 18 내지 22 mg/kg, 또는 20 mg/kg로 개체에 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명에서, 상기 미리세틴은 외상 후 스트레스 장애에 의해 증가된 혈장 CORT(corticosterone) 및 ACTH(adrenocorticotrophic hormone) 수치를 감소; 외상 후 스트레스 장애에 의해 증가된 NE(noradrenaline)의 농도를 감소; 또는 외상 후 스트레스 장애에 의해 감소된 5-HT(Serotonin) 농도를 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 또한, 상기 미리세틴은 외상 후 스트레스 장애에 의해 감소된 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor) 및 TrkB(Tropomyosin receptor kinase B) 유전자의 발현 및 단백질의 활성을 증가; 또는 외상 후 스트레스 장애에 의해 감소된 p-ERK 단백질 발현 수준을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에서, 상기 CORT는 스트레스에 의해서 상승되어, 공포 반응을 증가시키며, BDNF 및 TrkB를 감소시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, PTSD 환자의 내측 전두엽(medial prefrontal cortex, PFC), 및 해마(hippocampus, HIP)에서 NE가 증가되고, 5-HT가 감소되는 것이 확인되었다. 따라서, 미리세틴에 의해서 스트레스에 의해 변화된 물질의 농도가 회복되는 것은 미리세틴이 외상 후 스트레스 장애의 예방, 개선, 또는 치료 효과가 우수함을 의미하는 것이다.

[0027] 본 발명은 또한, 미리세틴의 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.

[0028] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

- [0029] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물 내의 상기 미리세틴의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [0031] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방갑셀제, 장용갑셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0034] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0035] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트린, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜 4000, 폴리에틸렌글리콜 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민,

폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스틴산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정팅산아미드, 헥사민, 디메틸아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스펀, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 테고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0042] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 진분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0043] 경구 투여를 위한 액상제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비용, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하

는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0046] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0048] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0049] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0051] 또한, 본 발명은 미리세틴(Myricetin) 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명에 있어서, "식품"이란 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 첨가제 등을 모두 포함하는 의미이다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 "건강기능식품(functional food)"이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하며, 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 분말, 액제, 편상(flake), 페이스트, 시럽제, 젤, 젤리, 바(bar), 또는 필름 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 "기능"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0054] 본 발명의 미리세틴을 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 미리세틴은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 또는 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0055] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스킥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0056] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0058] 또한, 본 발명은 미리세틴(Myricetin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.
- [0059] 본 발명의 용어 "사료"란, 동물이 먹는 임의의 천연 또는 인공 구정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을

의미하며, 본 발명에 따른 미리세틴을 포함하는 사료첨가용 조성물은 당업계에 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 바람직하게는 농후 사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명에서 용어, "사료 조성물"은 "사료 첨가용 조성물", "사료첨가제"를 의미할 수 있으며, 이는 동물에 있어 질병 증상의 완화, 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질개선, 번식장애 예방 또는 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함한다.

[0061] 본 발명의 사료 조성물은 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 A D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 라이신 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0062] 상기 사료 중 농후사료로는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머진인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물(液狀物)을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분(肉粉), 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0063] 상기 사료 중 조사료로는 야초, 목초, 풋배기 등의 생초(生草)사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋배기작물, 곡실(穀實) 등을 사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용(種畜用) 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 특수사료에는 굴껍데기, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0064] 본 발명에 따른 상기 사료 조성물은 당업계에 공지된 다양한 사료 제조방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 미리세틴을 첨가하여 제조 가능하다.

[0065] 본 발명에 따른 사료 조성물은 외상 후 스트레스 장애 예방 또는 개선을 목적으로 하는 개체이면 제한없이 적용 가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간 동물, 조류 및 어류 등 어느 개체에도 적용이 가능하다.

[0067] 또한, 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0068] 본 발명에서, 상기 투여는 미리세틴을 15 내지 40 mg/kg, 15 내지 35 mg/kg, 15 내지 30 mg/kg, 15 내지 25 mg/kg, 15 내지 22 mg/kg, 16 내지 40 mg/kg, 16 내지 35 mg/kg, 16 내지 30 mg/kg, 16 내지 25 mg/kg, 16 내지 22 mg/kg, 17 내지 40 mg/kg, 17 내지 35 mg/kg, 17 내지 30 mg/kg, 17 내지 25 mg/kg, 17 내지 22 mg/kg, 18 내지 22 mg/kg, 또는 20 mg/kg로 인간을 제외한 개체에 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0070] 본 발명의 미리세틴을 외상 후 스트레스를 유발한 동물 모델에 처리한 경우, 공포 소거 회상 중 동결 반응이 유의하게 감소하였고, FST(forced swimming test)에서 부동 시간이 유의하게 감소하고 등반 시간이 증가하였다. 또한, EPM(elevated plus maze) 시험에서 개방 구역에 진입하는 시간과 횟수를 상당히 증가시켰고, 불안 지수를 현저히 감소시켰다. 신경전달물질 변화에 측면에서, 미리세틴은 혈장 CORT 및 ACTH 수치; HIP 및 AMY에서 NE 농도를 유의하게 감소시켰고, PFC 및 HIP에서 5-HT 농도를 크게 증가시켰다. 또한, HIP에서 BDNF 반응성 신경 활성을 해마 영역에서 유의하게 증가시켰고, HIP에서 BDNF 및 TrkB mRNA 수치; 및 p-ERK 단백질 발현 수준을 유의하게 증가시켰는 바, 이는 미리세틴의 외상 후 스트레스 장애 대한 우수한 치료 효과를 확인한 것으로, 본 발명

의 미리세틴을 관련 분야에 다양하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0072]

도 1은 쥐의 단일의 지속적 스트레스(single prolonged stress, SPS) 유발 불안 유사 행동 및 미리세틴(Myricetin, MYR) 처리에 대한 실험 프로토콜을 나타낸 것이다(각 실험 조건에 대해 서로 다른 쥐 그룹(그룹당 n=8)을 사용함).

도 2a 및 2b는 14일간 SPS를 실시한 쥐의 체중(도 2a) 및 자당 섭취량(도 2b) 분석 결과를 나타낸 것이다(**p <0.01, ***p <0.001).

도 3a 및 3b는 공포 조건화 시험에서 공포 조건화(C1-C3), 공포 소거(E1-E6), 단기 회상(R1)에 따른 동결 반응 시간에 미리세틴이 미치는 영향을 분석한 결과(도 3a); 및 단기 회상 동안에 동결 반응 시간의 백분율을 분석한 결과(도 3b)를 나타낸 것이다.

도 3c 내지 3e는 강제 수영 시험(forced swimming test, FST)에서 실험 동물의 부동 시간(도 3c); 등반 시간(도 3d); 및 수영 시간(도 3e)을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3f 내지 3j는 EPM(elevated plus maze) 시험에서 실험 동물이 개방 및 비개방 구역에서 소요한 시간의 백분율(도 3f 및 3g); 개방 및 비개방 구역에 진입한 횟수(도 3h 및 3i); 실험 동물의 불안 지수(도 3j)를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4a 내지 4c는 혈장 CORT(corticosterone) 수치(도 4a), 혈장 ACTH(adrenocorticotrophic hormone) 수치(도 4b), 및 혈장 CRH(corticotropin-releasing hormone corticosterone) 수치(도 4c)에 미리세틴이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다(*p <0.05 및 **p <0.01 vs SAL 실험군; #p <0.05 vs SPS 실험군)

도 4d 내지 4f는 PFC(medial prefrontal cortex, 도 4d), HIP(hippocampus, 도 4e), 및 AMY(amygdala, 도 4f)에서 NE(norepinephrine) 농도에 미리세틴이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다(*p <0.05 및 **p <0.01 vs SAL 실험군; #p <0.05 vs SPS 실험군).

도 4g 내지 4i는 PFC(medial prefrontal cortex, 도 4g), HIP(hippocampus, 도 4h), 및 AMY(amygdala, 도 4i)에서 세로토닌(serotonin, 5-HT) 농도에 미리세틴이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다(*p <0.05 및 **p <0.01 vs SAL 실험군; #p <0.05 vs SPS 실험군).

도 5는 SPS 유도 우울 및 불안 유사 행동을 가진 쥐의 해마 영역에서 BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 활성화에 미리세틴의 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다(*p <0.05 vs SAL 실험군; #p <0.05 vs. SPS 실험군)

도 6a는 SPS 유도 우울 및 불안 유사 행동을 가진 쥐의 해마 영역에서 BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 및 TrkB(tropomyosin-related kinase B)의 mRNA 발현 수준에 미리세틴이 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다(*p<0.05 및 **p<0.01 vs SAL 실험군; #p<0.05 vs SPS 실험군).

도 6b는 MYR 처리 후 해마에서 p-ERK(phosphor-extracellular signalregulated kinase)의 활성화 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다(*p<0.05 및 **p<0.01 vs SAL 실험군; #p<0.05 vs SPS 실험군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0075]

[실험방법]

[0076]

1. 동물 관리 및 미리세틴(Myricetin, MYR) 투여

[0077]

실험동물은 6~7주령의 수컷 Sprague-Dawley 쥐(200~220g; Samtaco Animal Co., Seoul, Korea)를 사용하였다. 모든 동물 관리 및 실험 절차는 국립보건연구원 실험동물 관리 및 사용 지침에 따라 수행되었고, 경희대학교 기관 동물 관리 및 사용 위원회(KHUASP(SE)-21-045)의 승인을 받았다. 실험용 쥐는 식염수 처리 정상 대조군

(SAL), SPS 단독 처리군, 10 및 20 mg/kg MYR 처리군, 양성 대조군(PAX) 총 5개의 그룹으로 나뉘었다 (n=8/group). 실험을 위해 MYR(10 및 20 mg/kg, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 파록세틴 염산염(paroxetine hydrochloride(PAX), 15 mg/kg, 양성 대조군; Sigma-Aldrich)의 표준 용량을 결정하였다. MYR과 PAX는 사용 전에 0.9% 식염수에 용해하여 14일 동안 매일 1회 복강 내 주사하였다. 실험 일정은 도 1에 나타내었다.

2. 단일의 지속적 스트레스(single prolonged stress, SPS)에 의한 PTSD 유발

실험방법 1의 쥐를 2시간 동안 고정하고 20분 동안 강제로 수영하게 한 후, 15분 동안 휴식시켰다. 휴식 후, 쥐는 이소플루란(2-3%)에 노출시켜 의식을 잃게 하였다. 그 후, 민감화(sensitization)를 위해 실험동물을 우리에게 7일 동안 홀로 두었다.

3. 행동 테스트

공포 조건화 시험(Fear Conditioning Test, FCT)을 평가하기 위해, 쥐를 공포 조건 상자(30cm X 30cm X 30cm)에 적응시켰다. 실험 1일째, 상자에서 1분 동안 조건화 시험을 실시하였다. 쥐가 상자 안에 들어가면, 조건부 자극(경보음: 30초, 85dB)을 적용하였다. 공포 자극의 경우, 조건부 자극의 마지막 2초 동안, 단일 전기 발충격(single electric footshock, 0.5mA, 2초)을 가하였다(무조건 자극으로 학습 시험을 구성함). 실험 2일째, 쥐가 난간에서 상자 안으로 들어갔을 때, 조건부 자극이나 충격을 가하지 않아 공포 소거 훈련을 구성하였다. 24시간 후, 공포 소거 회상을 위해 전기 충격 없이 같은 방에서 조건부 자극에만 쥐를 다시 노출시키고, 5분 동안 쥐의 공포 반응을 관찰하였다. 공포 반응은 호흡 이외의 움직임이 없는 상태에서 동결 반응(freezing response)의 지속 시간을 의미한다.

우울증 유사 행동(depression-like behavior)을 평가하기 위한 강제 수영 테스트(forced swimming test, FST)를 수행하기 위하여, 쥐를 25° C의 물로 30cm 깊이까지 채워진 수조(직경 20cm X 높이 50cm)에서 5분 동안 강제로 수영하게 하였다. 헤엄치지 않고 표류하는 쥐는 우울한 상태(부동 상태)로 간주하였다.

EPM(Elevated plus maze) 테스트를 위한 장치를 사용하여 불안 유사 행동을 평가하였다. 쥐를 미로 중앙에 배치하고 5분 동안 테스트하였다. 이 장치는 두 개의 개방 구역(open arms, 50cm X 10cm)과 어두운 벽(50cm X 10cm X 50cm)이 있는 두 개의 비개방 구역(closed arms)로 구성되었다. 미로는 지상에서 50cm 높이에 있었고 각 구역은 플랫폼(10 X 10cm)으로 연결되었다. 이때, 개방 구역과 비개방 구역에 머무는 시간과 진입 횟수를 측정하였다. 미로에서의 행동은 S-MART 프로그램(PanLab, Barcelona, Spain)으로 측정하였다. 또한, 자당 선택도 테스트에서는 물과 자당 용액(1%, w/v)의 섭취량을 3시간 동안 측정하였다.

4. 신경전달물질 수준의 평가를 위한 효소결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

혈장 내 CORT (Novus Biologicals, LLC., Littleton, CO, USA), ACTH (Abcam, Cambridge, UK), 및 CRH (Biocompare, South San Francisco, CA, USA)의 수준; 및 내측 전두엽(medial prefrontal cortex, PFC), 해마(hippocampus, HIP) 및 편도체(amygdala, AMY)에서의 5-HT(Serotonin; Abcam) 및 NE(noradrenaline; Novus BIOLOGICALS)의 농도를 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 이용하여 측정하였다. 각 그룹 (n=4/그룹)은 이소플루란(2%; Hanlim Pharm., Seoul, Korea) 흡입을 5-10초 동안 무작위로 흡입하여 마취시키고, 행동 실험 하루 후 희생시켰다. 복부 대동맥(n=4/그룹)을 통해 혈장을 채취한 후, 쥐의 뇌에서 PFC, HIP, 및 AMY를 빠르게 해부하였다.

5. 면역조직화학(Immunohistochemistry)

HIP에서 BDNF-면역 반응성 뉴런의 수를 평가하기 위해 면역 조직 화학을 수행하였다. 쥐(n = 4/그룹)를 펜토바르비탈 나트륨(80 mg/kg, 복강 내 주사)으로 마취하고, 생리 식염수(0.9%)로 상행 대동맥을 관류시킨 후, 0.1M 인산 완충 식염수(PBS)에 용해된 4% 파라포름알데히드 300ml를 주입하였다. 뇌를 제거하고 하룻밤 동안 고정시킨 후, 0.1M PBS에 용해된 20% 자당(sucrose)을 넣어 4°C에서 냉동 보호하였다. 크라이오스타트(cryostat, Leica CM1850; Leica Microsystems Ltd, Nussloch, Germany)를 사용하여, HIP를 통해 관상면(Coronal

sections)을 30 μm 두께로 절단하였다. 조직 절편은 rat Atlas of Paxinos and Watson (HIP; 브레그마(bregma) -2.6 및 -3.6 사이)에 따라 얻었다. 조직 절편을 1차 토끼 항-BDNF 항체(1: 200 희석, Cell Signaling, Boston, MA, USA)로 밤새 배양한 후, 2차 항체(1: 200 희석, Vector Laboratories Co., Burlingame, CA, USA)로 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 다음으로, 절편을 아비딘-비오틴-퍼옥시다제 복합체(Vector Laboratories)로 실온에서 1시간 동안 배양한 다음, 3,3'-디아미노벤지딘(diaminobenzidine, DAB; Sigma-Aldrich)과 0.03% 과산화수소가 포함된 용액에서 1분 동안 배양하였다. 이미지는 Axio-Vision 3.0 이미징 시스템(Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany)을 사용하여 캡처하고 Adobe 포토샵(Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA)을 사용하여 처리하였다. 절편을 200배 배율로 관찰하고, 실험군에 대해 맹검된 관찰자가 100 X 100mm² 격자 내의 세포 수를 세었다. 해마 영역 세포는 stereotactic Atlas of Paxinos and Watson에 따라 얻었다. 세포는 해마 영역 내에서 쥐당 세 개의 섹션으로 세었다.

6. 총 RNA 준비 및 역전사 중합효소 연쇄 반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

PTSD 동물 모델의 뇌에서 분리한 HIP에 트리졸 시약(Sigma-Aldrich)을 첨가하여 총 RNA를 수득하였다. 역전사 반응으로 RNA로부터 cDNA를 합성한 후, 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하였다. PCR 생성물을 1.2 % 아가로스 겔에서 분리하고 에티뮴 브로마이드로 염색하였다. 그 후, 각 밴드의 밀도가 이미지 분석 시스템 (i-Max™; CoreBio System Co., Seoul, Korea)에 의해 분석되었다. 상보적 DNA 발현 수준은 GAPDH에 비교한 각 BDNF와 Trp1 밴드의 상대적 밀도를 계산하여 측정하였다.

7. 웨스턴 블롯 분석

HIP에서 ERK 단백질을 검출하기 위해서, 뇌에서 총 단백질을 추출하였다. 총 단백질을 추출하기 위해, 포스파타제 억제제와 프로테아제 억제제(CyQUANT; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 함유한 용해 완충액으로 뇌 조직을 균질화하였다. 균질화된 샘플에서 단백질을 분리하기 위해, 원심분리(12,000rpm, 15분, 4℃)를 통해 상층액을 수집하였다. 단백질 농도는 비색(colorimetric) 단백질 분석 키트(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 단백질 샘플(15-20 μg)을 120V에서 10% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동을 사용하여 용해한 다음, 니트로셀룰로오스 멤브레인(Schleicher and Schuell GmbH, Dassel, Germany)으로 전기 이동하였다. 마우스 p-ERK 항체(1: 500; Cell Signaling, Danvers, MA, USA)와 인큐베이션 후, 멤브레인을 호스래디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)가 접합된 염소 항-마우스(goat anti-mouse) IgG 2차 항체(Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA)와 함께 인큐베이션하였다. 화학발광 키트(Super Signal West Pico; Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 p-ERK 단백질을 검출하였다. 단백질 함량은 향상된 화학발광 검출 시스템(enhanced chemiluminescence detection system, Santa Cruz)을 사용하여 분석하였고, 밀도는 Tina 2.1 프로그램을 사용하여 측정하였다.

8. 통계 분석

데이터는 평균 $\pm$ 표준 오차로 표시하였다. 그룹 간의 통계적 차이를 테스트하기 위해 모든 데이터는 SPSS 소프트웨어(version 23.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석하였다. 데이터 세트의 정규성 및 분산 동질성 여부는 각각 Shapiro-Wilk and Brown-Forsythe tests를 통해 확인하였다. One-way ANOVA를 수행한 후, 행동 테스트, ELISA, PCR, 웨스턴 블롯 및 면역 조직 화학 분석 등의 다중 비교를 위해서, Tukey의 사후 테스트(Tukey's post hoc test) 또는 크루스칼-월리스(Kruskal-Wallis) 테스트와 Dunn의 다중 비교 사후 테스트(Dunn's multiple comparison post hoc test)를 사용하였다. $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다.

[실시예]

실시예 1. SPS가 체중과 자당 섭취에 미치는 영향 확인

SPS에 노출된 쥐는 식염수(saline, SAL)가 처리된 정상 그룹에 비해 시간에 따른 체중 변화가 유의하게 감소한 것으로 나타났다($t=4.724$, $p < 0.01$). 체중 변화는 SPS 노출 후 3일째부터 유의한 차이를 나타내었다. 이는 도 2a에 나타내었다.

[0105] SPS에 노출된 쥐는 SAL 실험군에 비해 7일과 14일째 자당 섭취량이 유의하게 감소한 것으로 나타났다($t=869$, $p < 0.01$). 이는 도 2b에 나타내었다.

[0106] 따라서, 쥐가 SPS 노출 후 외상성 스트레스(traumatic stress)로 인한 현저한 생리적 변화와 무감각증을 보인 것을 의미한다.

[0108] 실시예 2. SPS에 의한 행동 변화에 대한 MYR의 효과 확인

[0109] FCT에서 SPS에 노출된 쥐는 공포 자극(공포 조건화 시험, C1-C3)에 대해 SAL 실험군과 유사한 패턴의 동결 반응을 보였다($t=0.254$, $p=0.808$, 도 3a). 공포 소거(fear both extinction, E1-E6) 및 공포 소거 회상(fear extinction recall, R1; 단기 회상) 동안 SPS에 노출된 쥐는 SAL 실험군에 비해 동결 반응이 유의하게 증가하였다(각각 $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$, 도 2a).

[0110] 반면에, 20 mg/kg MYR을 투여한 실험군은 공포 소거 회상 중 동결 반응이 SPS 실험군에 비해 유의하게 감소하여($p < 0.05$; 도 3b), MYR20 실험군의 동결 반응이 PAX 실험군과 유사함을 나타내었다.

[0111] FST에서 SPS에 노출된 쥐는 SAL 실험군에 비해 부동 시간이 유의하게 증가하고 등반 시간이 감소하였다($p < 0.01$; 도 3c 및 3d). 20 mg/kg MYR을 투여한 쥐는 SPS 실험군에 비해 부동 시간이 유의하게 감소하고($p < 0.05$), 등반 시간이 증가하였다($p < 0.05$). 마찬가지로 PAX 실험군의 쥐는 FST에서 부동 시간이 감소했지만 통계적으로 유의하지는 않았다($p = 0.078$, 도 3c). 또한, 모든 그룹 간에 수영 시간에는 차이가 없었다($F_{4,34} = 0.245$, $p = 0.910$, 도 3e).

[0112] EPM 테스트에서 SPS에 노출된 쥐가 개방 구역에서 보낸 시간과 진입 횟수는 SAL 그룹에 비해 현저히 감소하였다($p < 0.01$, 도 3f 및 3h). 그러나, 20 mg/kg MYR의 투여는 SPS 실험군에 비해 개방 구역에 진입하는 시간과 횟수를 상당히 증가시켰다($p < 0.05$). 즉, MYR20 실험군이 개방 구역에서 소요한 시간의 백분율이 탐색 행동(exploratory behavior)에 비해서 상당히 증가한 것이다. 마찬가지로, PAX 실험군은 미로의 개방 구역에서 소요한 시간의 백분율이 상당히 증가하였다($p < 0.05$). 모든 실험군에서, 비개방 구역에서 보낸 시간과 진입 횟수는 차이가 없었다(각각 $F_{4,34} = 0.900$, $p=0.476$ 및 $F_{4,34}=2.477$, $p=0.065$; 도 3g 및 3i). 또한, 20 mg/kg MYR 투여는 SPS 실험군에 비해 불안 지수를 현저히 감소시켜, MYR20 실험군의 불안 유사 행동이 PAX 실험군과 유사함을 나타내었다($p < 0.05$; 도 3j).

[0114] 실시예 3. HPA 축 활성화 및 SPS에 의해 유도된 신경전달물질 변화에 미치는 MYR의 효과 확인

[0115] SPS에 노출된 쥐는 SAL 실험군에 비해 혈장 CORT 수치가 유의하게 증가하였다($p < 0.01$; 도 4a). SPS에 노출된 쥐는 SAL 실험군에 비해 혈장 ACTH 수치가 유의하게 증가했지만($p < 0.01$; 도 4b), 혈장 CRH 수치에는 유의한 차이가 없었다($p = 0.995$; 도 4c). 그러나 20 mg/kg MYR을 투여한 실험군은 SPS 실험군에 비해 혈장 CORT 및 ACTH 수치가 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 마찬가지로, PAX 실험군에 노출된 쥐는 SPS 실험군에 비해 혈장 CORT 수치가 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). SPS에 노출된 쥐는 SAL 실험군에 비해 PFC, HIP 및 AMY에서 NE 농도가 유의하게 증가하였다(각각 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$, 도 4d 내지 4f). 20 mg/kg MYR을 투여한 실험군은 SPS 실험군에 비해 HIP 및 AMY에서 NE 농도가 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 마찬가지로, PAX 실험군은 SPS 실험군에 비해 AMY에서 NE 농도가 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 또한, SPS에 노출된 쥐는 SAL 실험군에 비해 PFC 및 HIP에서 5-HT 농도가 유의하게 감소했지만(각각 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$, 도 4g 및 4h), AMY에서 5-HT 농도는 유의한 차이가 없었다($p=0.427$, 도 4i). 한편, 20 mg/kg MYR을 투여하면 SPS 실험군에 비해 PFC 및 HIP에서 5-HT 농도가 크게 증가하였다($p < 0.05$). 마찬가지로, PAX 실험군은 SPS 실험군에 비해 HIP에서 5-HT 농도가 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

[0117] 실시예 4. SPS에 의한 BDNF의 면역 조직 화학적 변화에 대한 MYR의 효과 확인

[0118] HIP에서 SPS 실험군의 BDNF 면역 양성 신경 세포 수는 SAL 실험군에 비해 유의하게 감소하였다($p < 0.05$; 도 5). 한편, HIP에서 BDNF 반응성 신경 활성화는 SPS 실험군에 비해서 MYR20 실험군의 해마 영역에서 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

[0120] **실시예 5. SPS에 의한 BDNF 및 TrkB mRNA 발현에 대한 MYR의 효과 확인**

[0121] SPS 실험군은 SAL 실험군에 비해 HIP에서 BDNF mRNA 발현이 유의하게 감소하였다($p < 0.01$, 도 6a). 다만, 20 mg/kg MYR을 투여한 실험군은 SPS 그룹에 비해 HIP에서 BDNF mRNA 수치가 유의하게 증가하였다($p < 0.05$; 도 6a).

[0122] 또한, SPS 실험군은 SAL 실험군에 비해 HIP에서 TrkB mRNA 발현이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 다만, 20 mg/kg MYR을 투여한 실험군은 SPS 실험군에 비해 HIP에서 TrkB mRNA 수치가 증가하였다($p=0.196$).

[0124] **실시예 6. SPS에 의한 p-ERK 활성화에 대한 MYR의 효과 확인**

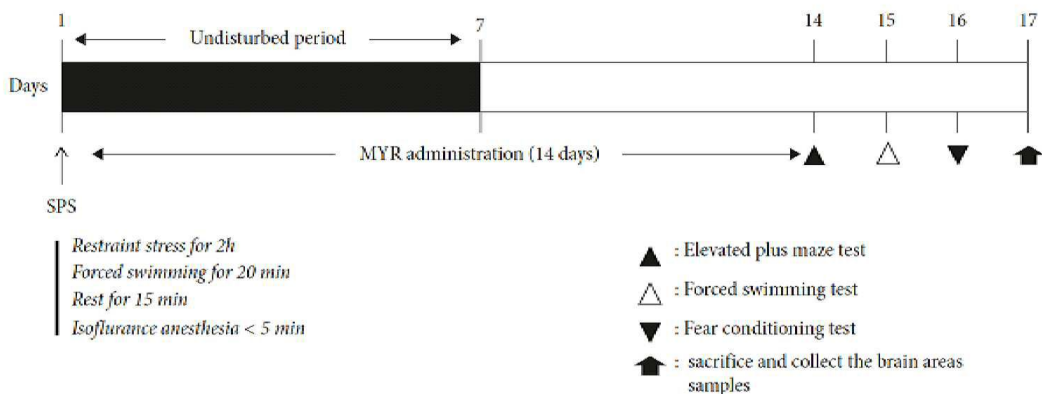
[0125] 해마 조직에서 p-ERK의 단백질 발현 수준에 대한 MYR의 효과를 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. SPS 실험군은 HIP에서 p-ERK 단백질 발현이 유의하게 감소하였다($p < 0.01$; 도 6b). 다만, 20 mg/kg MYR을 투여한 실험군은 SPS 실험군에 비해 p-ERK 단백질 발현 수준이 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

[0127] 따라서, 본 발명의 미리세틴을 외상 후 스트레스를 유발한 동물 모델에 처리한 경우, 공포 소거 회상 중 동결 반응이 유의하게 감소하였고, FST에서 부동 시간이 유의하게 감소하고, 등반 시간이 증가하였다. 또한, EPM 테스트에서 개방 구역에 진입하는 시간과 횟수를 상당히 증가시켰고, 불안 지수를 현저히 감소시켰다. 신경전달물질 변화에 측면에서, 미리세틴은 혈장 CORT 및 ACTH 수치와 HIP 및 AMY에서 NE 농도를 유의하게 감소시켰고, PFC 및 HIP에서 5-HT 농도를 크게 증가시켰다. 또한, HIP에서 BDNF 반응성 신경 활성을 해마 영역에서 유의하게 증가시켰고, HIP에서 BDNF 및 TrkB mRNA 수치; p-ERK 단백질 발현 수준을 유의하게 증가시켰는 바, 이는 미리세틴의 외상 후 스트레스 장애에 대한 우수한 치료 효과를 확인한 것으로, 미리세틴을 관련 분야에 다양하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

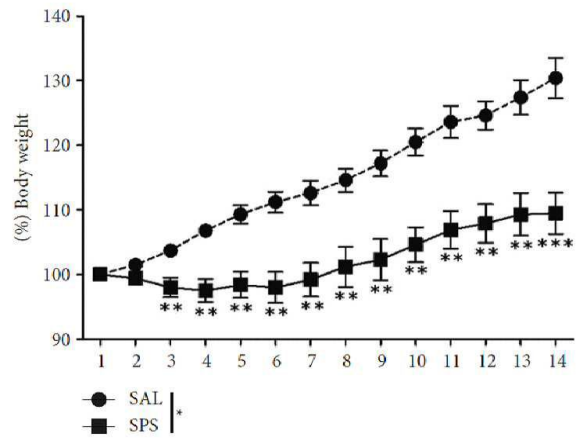
[0129] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

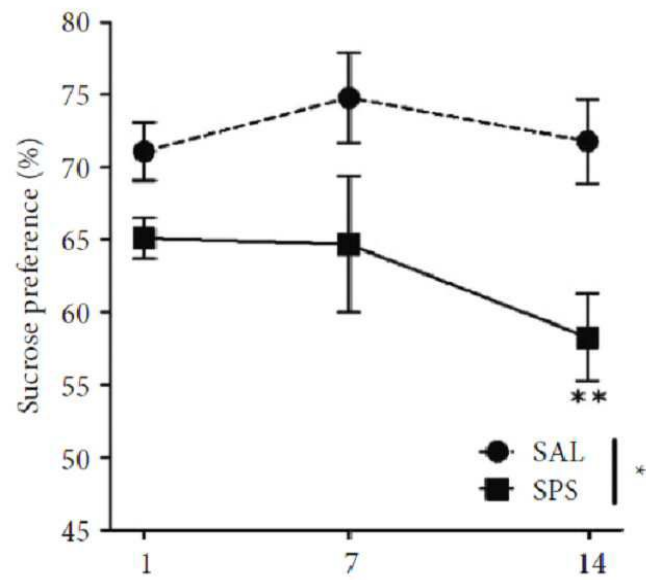
도면1



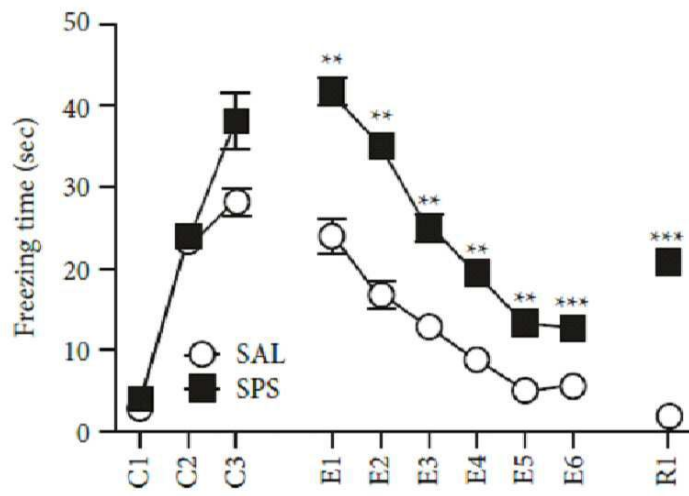
도면2a



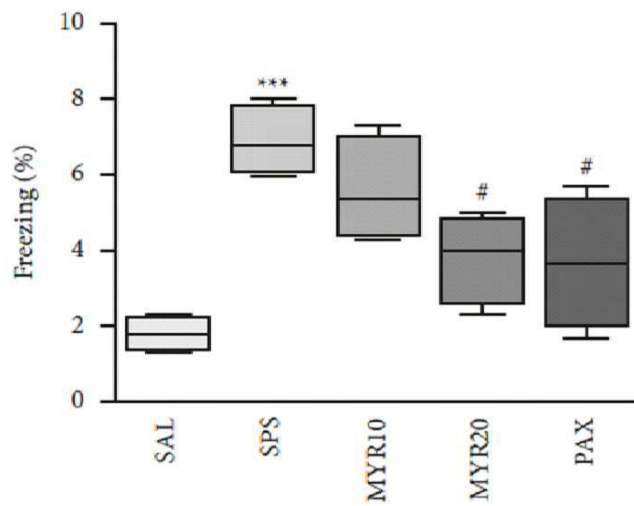
도면2b



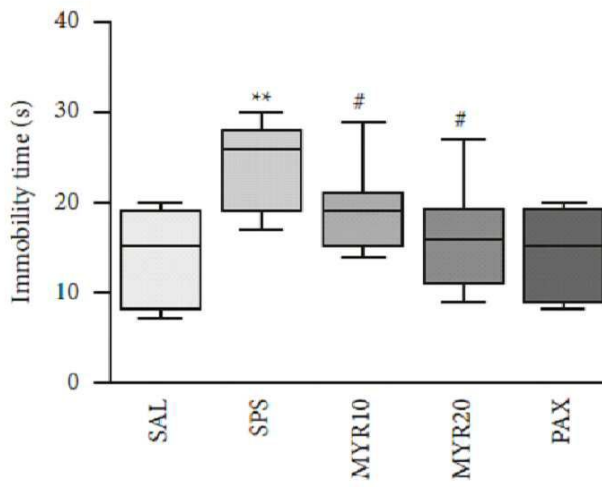
도면3a



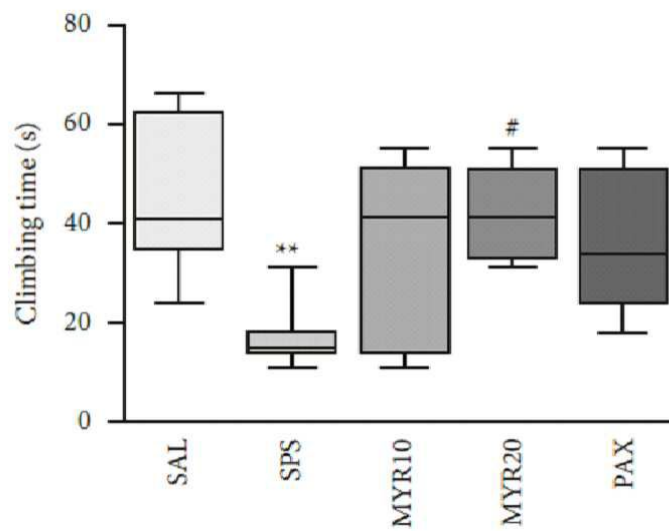
도면3b



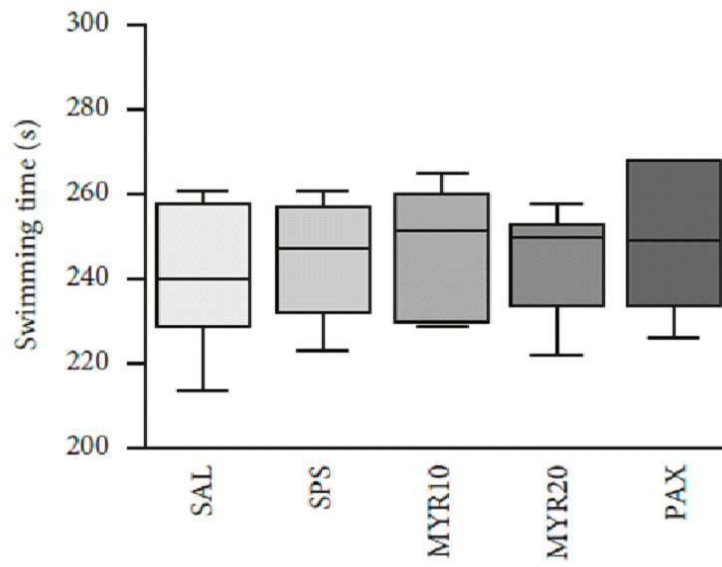
도면3c



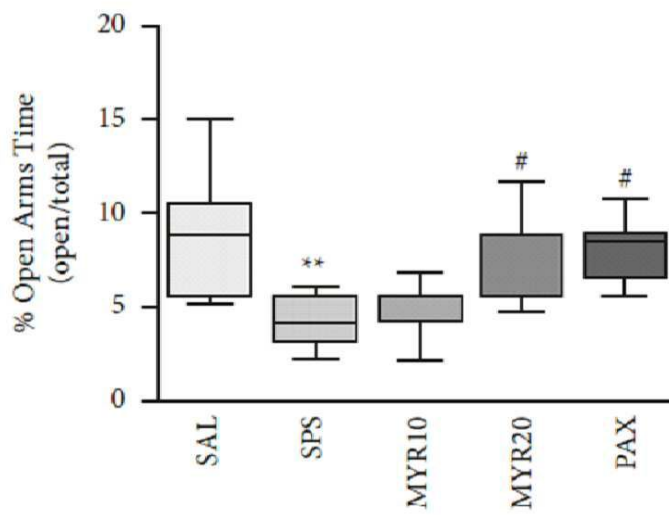
도면3d



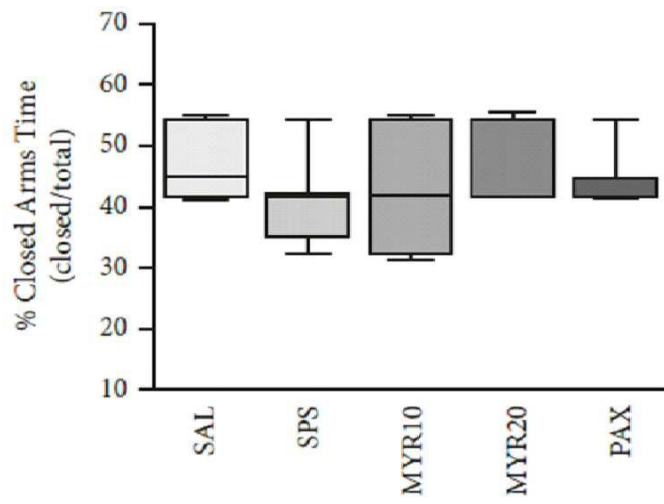
도면3e



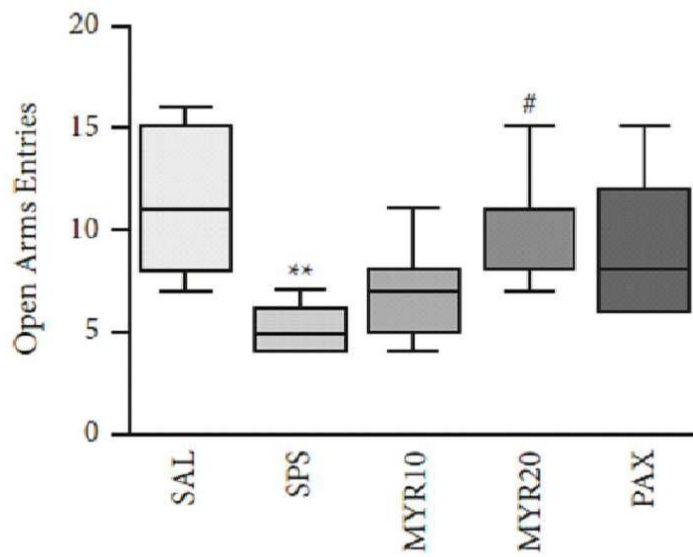
도면3f



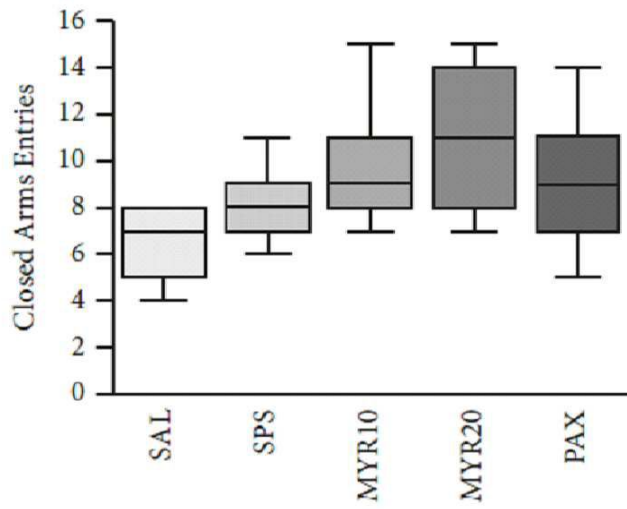
도면3g



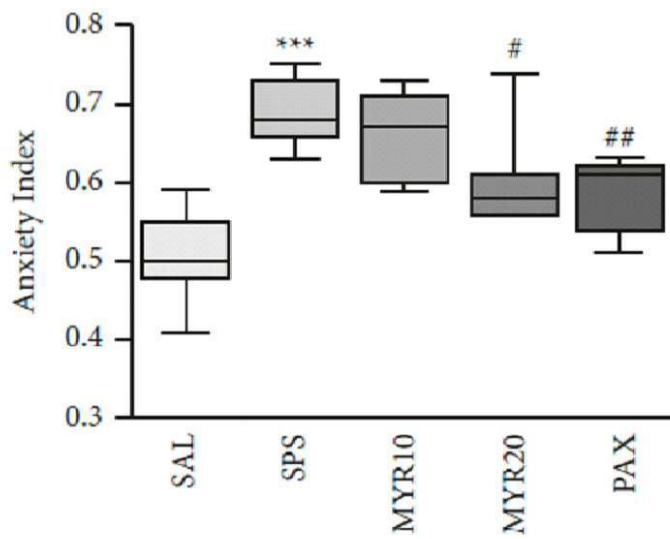
도면3h



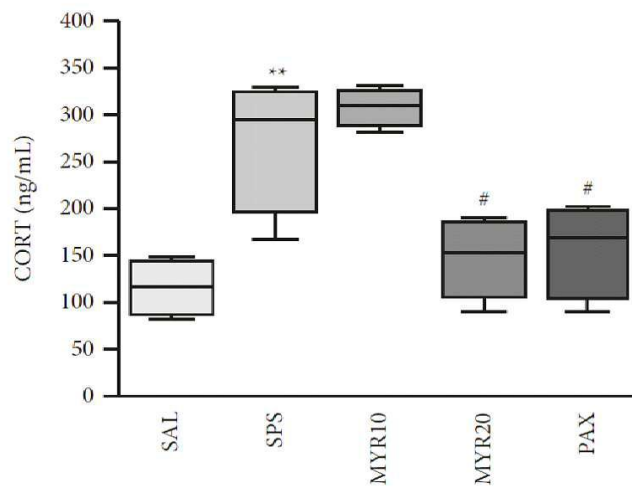
도면3i



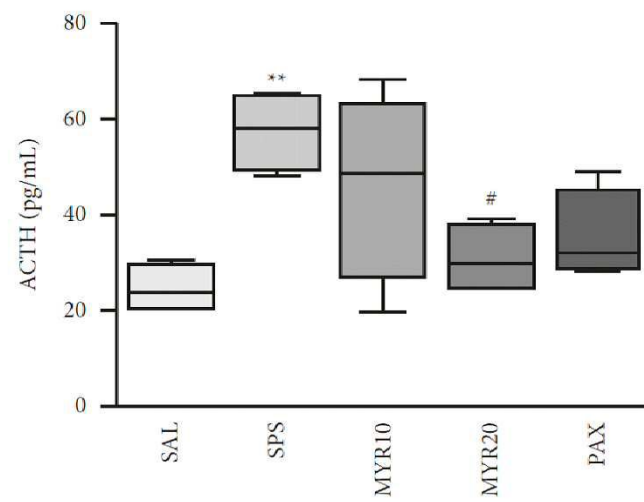
도면3j



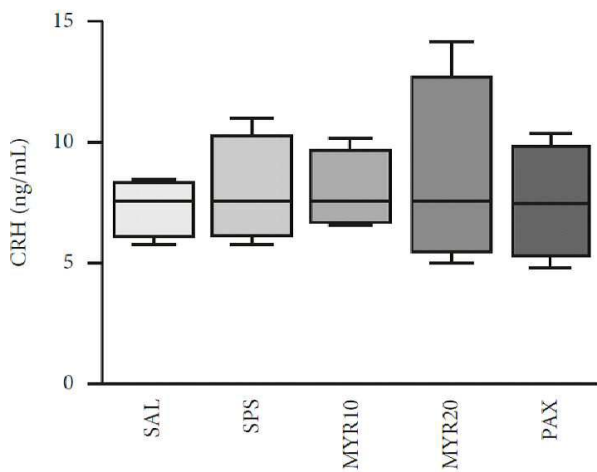
도면4a



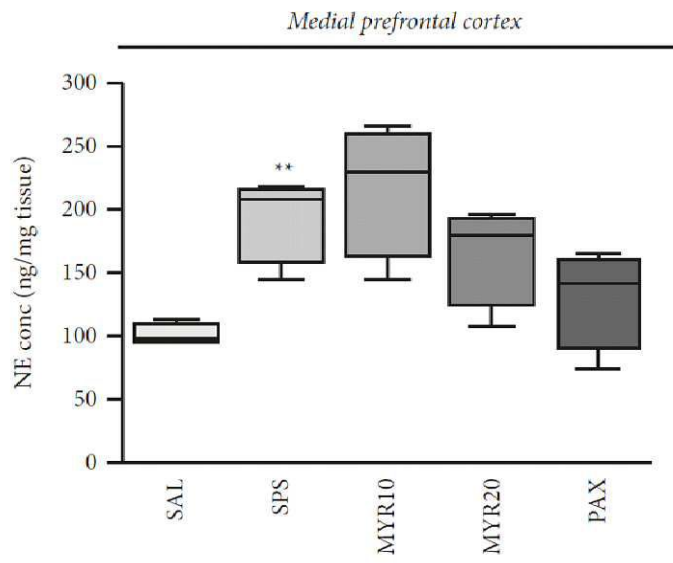
도면4b



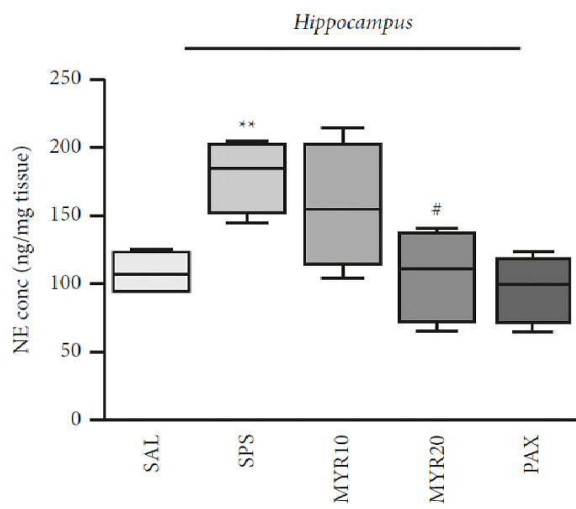
도면4c



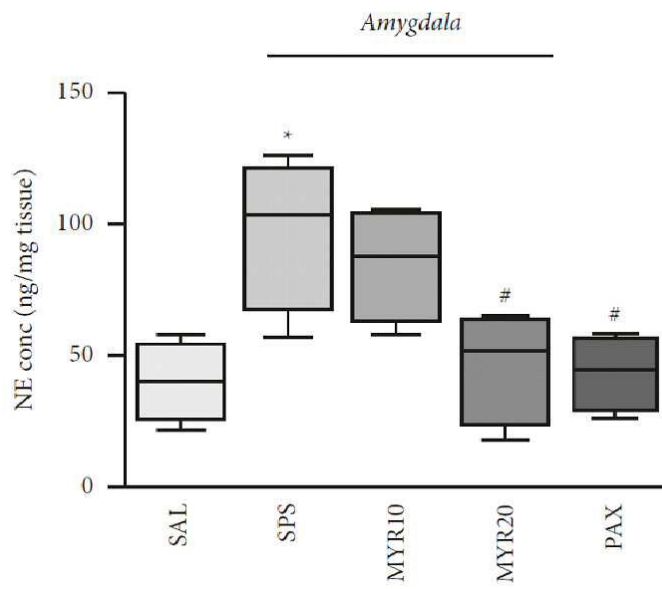
도면4d



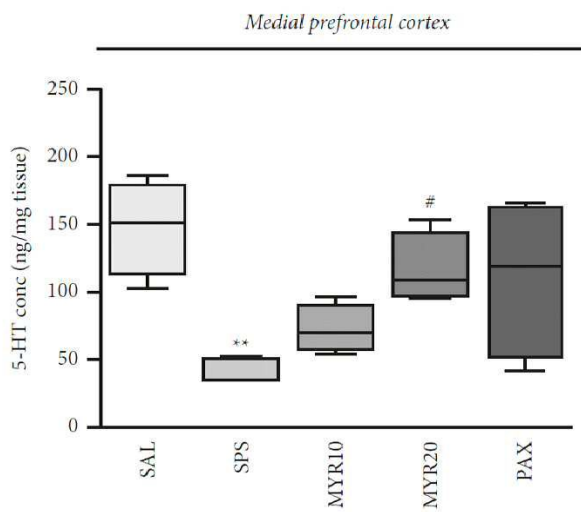
도면4e



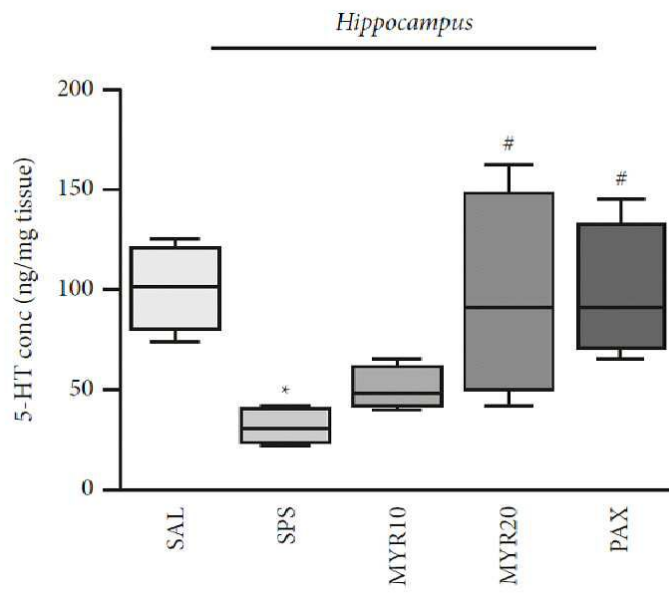
도면4f



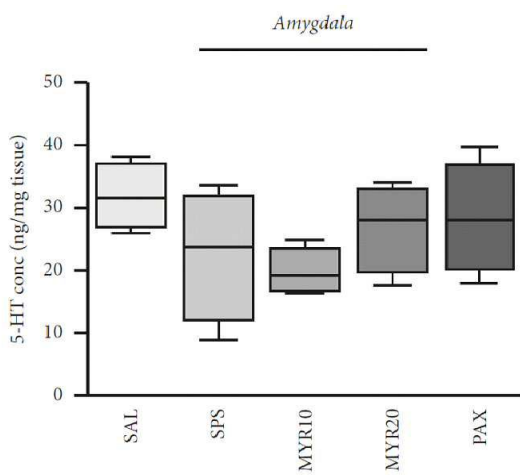
도면4g



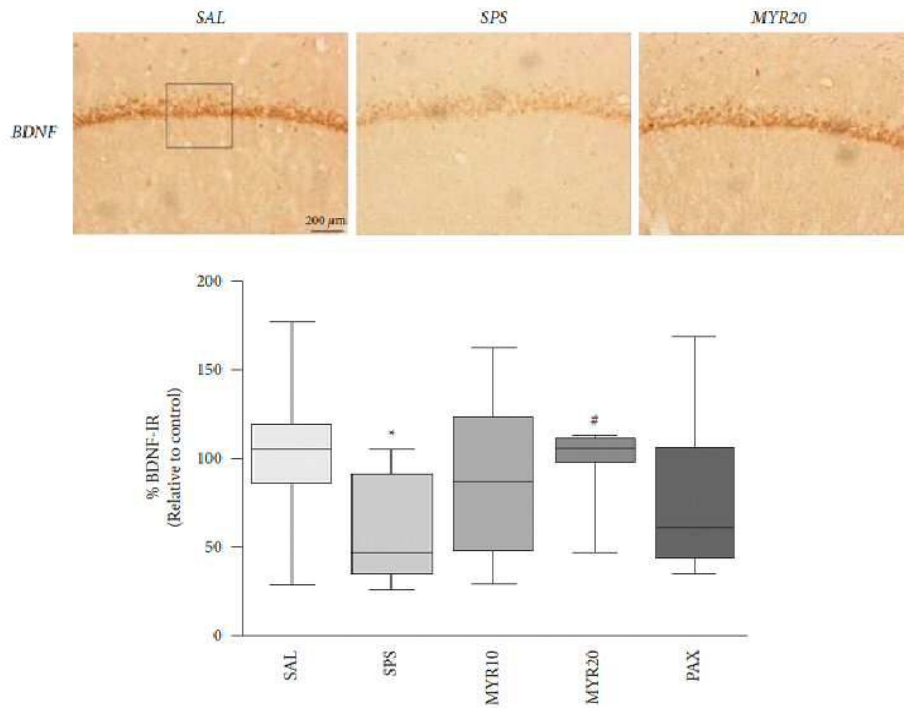
도면4h



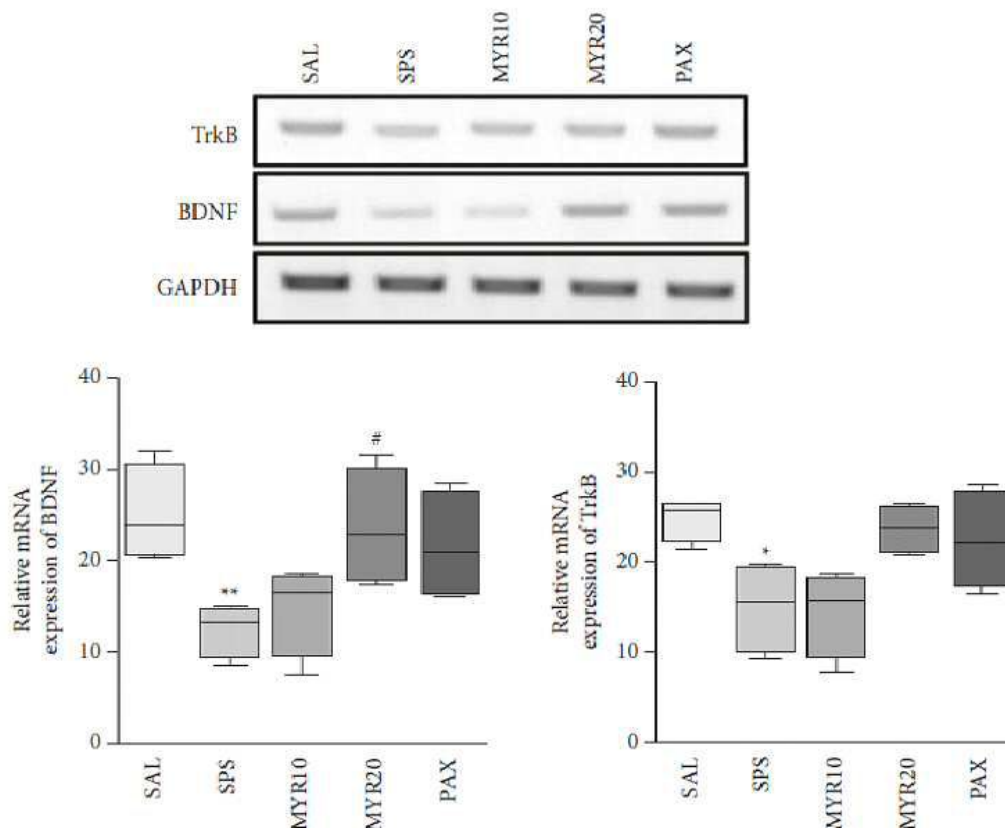
도면4i



도면5



도면6a



도면6b

