

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 7월 29일 (29.07.2021) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2021/149902 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/537 (2006.01) *A61P 25/24* (2006.01)
A61P 15/12 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/016151
- (22) 국제출원일: 2020년 11월 17일 (17.11.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0008707 2020년 1월 22일 (22.01.2020) KR
- (71) 출원인: (주)온트바이오제약 (**UNDBIO.CO.,LTD**) [KR/KR]; 11796 경기도 의정부시 시민로434번길 11, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 강세찬 (**KANG, Se-Chan**); 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제경영대학 325호, Gyeong-

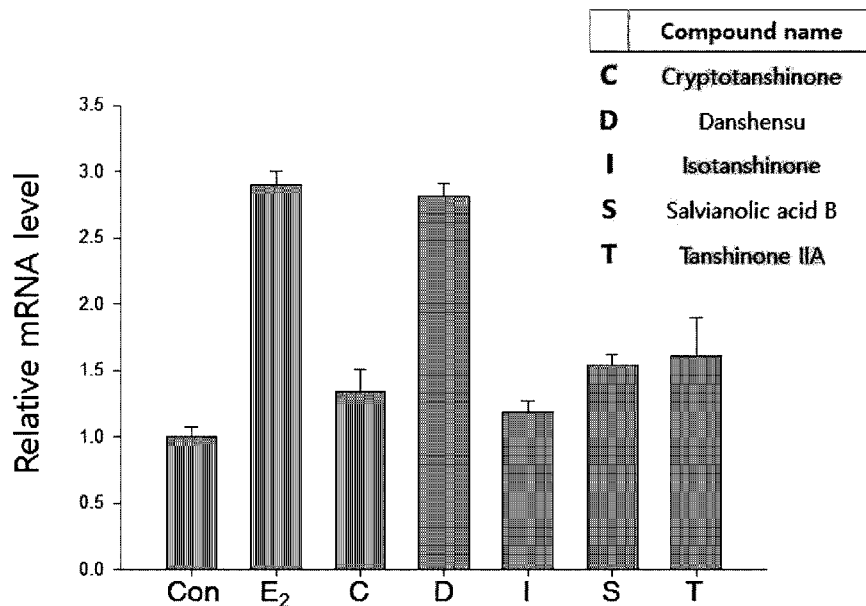
gi-do (KR). 허양미 (**HER, Yang-Mi**); 16519 경기도 수원시 영통구 중부대로448번길 28, 204동 1104호, Gyeonggi-do (KR). 서희주 (**SUH, Hee-Ju**); 16978 경기도 용인시 기흥구 강남동로 20, 502동 1301호, Gyeonggi-do (KR). 권정은 (**KWON, Jeong-Eun**); 16705 경기도 수원시 영통구 반달로 76, 204호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 위병갑 (**WIE, Byoung-Gap**); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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, IT, 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,

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING SALVIA MILTIORRHIZA EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION AND TREATMENT OF DEPRESSION IN MENOPAUSAL WOMEN

(54) 발명의 명칭: 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition comprising a Salvia miltiorrhiza extract for prevention and treatment of depression in menopausal women. The Salvia miltiorrhiza extract of the present invention is characterized by regulating the release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and increasing the release of serotonin and norepinephrine to prevent, alleviate, and treat the hormonal change and depression occurring after menopause. In addition, since the raw material is highly stable, the composition comprising a danshensu-containing Salvia miltiorrhiza extract as an active ingredient retains the efficacy during long-term storage and thus can be suitable for use as an industrial substance. Therefore, the composition comprising a Salvia miltiorrhiza extract as an active ingredient according to the present invention can control hormones in menopausal women and thus can be used as a pharmaceutical composition for prevention and treatment of depression in menopausal women or as a health functional food composition for prevention and alleviation of depression in menopausal women.



WO 2021/149902 A1

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 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), 유
럽 (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))

(57) 요약서: 본 발명은 단삼 추출물을 포함하는 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발
명의 단삼 추출물은 황체형성호르몬과 여포자극호르몬의 분비를 조절하며, 세로토닌과 노르에피네프린의 분비를 증
가시켜 폐경기 후 발생하는 호르몬 변화와 우울증을 예방, 개선 및 치료하는 것을 특징으로 한다. 또한, 원료의 안정
성 또한 뛰어나므로 단삼수를 포함하는 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 경우 장기간 보관시 효능이
지속적으로 유지되므로 산업화 소재로 이용하기에 적합하다. 따라서, 본 발명의 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하
는 조성물은 폐경기 여성의 호르몬을 조절하여 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 폐경기
여성의 우울증 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물로 적용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 단삼 (*Salvia miltiorrhiza*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 황체형성호르몬 (Luteinizing hormone; LH)과 여포자극호르몬 (Follicle-stimulating hormone; FSH)의 분비를 조절하며, 세로토닌 (serotonin)과 노르에피네프린 (norepinephrine)의 분비를 증가시켜 자연발생으로 인한 폐경기 후에 발생하는 호르몬 변화와 우울증을 예방, 개선 및 치료하는 것을 특징으로 하는, 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 일반적으로 폐경 이행기, 폐경, 폐경 이후의 시기를 모두 포함하여 갱년기라고 하며, 이 시기에는 여성호르몬이 변화하는데 특히 여성호르몬인 에스트로겐의 수준이 감소하게 되는 것이 특징이다. 폐경의 원인으로는 크게 자연폐경 (Natural Menopause)과 유도폐경 (Induced menopause)이 있다. 자연폐경은 특별한 원인 없이 무월경 상태가 1년이상 지속되는 것을 말하며, 대부분 50대 전후에 발생하고 노화현상 중에 하나이다. 유도폐경은 난소 제거 수술을 하는 수술적 폐경과 방사선 치료나 화학요법을 이용한 난소의 기능을 제거하는 의인적 제거로 인해 나타난다. 또한, 스트레스, 저체중, 염색체 이상, 자가면역질환, 유전자 돌연변이 등에 의해서도 폐경이 발생한다.
- [3] 한편, 갱년기 증상으로는 비뇨생식기 증상인 질 건조증 (vaginal dryness)이 있으며, 대표적인 혈관운동 증상인 안면 홍조 (hot flush)는 갱년기 여성이 병원을 찾는 주요한 원인이라고 알려져 있다. 또한 수면 장애, 우울, 불안 등의 정신 심리적인 증상이 나타날 뿐만 아니라, 심혈관질환 및 골다공증 등의 만성질환의 위험성이 폐경이 됨에 따라 증가하는 것으로 보고되고 있다.
- [4] 여성호르몬은 자궁 내의 근육들을 자극하여 발달시키는데 에스트로겐 (estrogen)이 부족한 폐경기 성인 여성의 경우 자궁 조직이 퇴화되기 시작하여 결국 생식 기능마저 잃게 된다. 여성의 성호르몬은 생식 활동과 주로 연관되어 월경 주기에 따라 분비가 조절되는데 여포자극호르몬 (Follicle-stimulating hormone; FSH)이 바로 조절 작용을 담당하며, 에스트로겐이 분비되면 여포자극호르몬의 분비는 감소한다. 즉, 폐경기 증상의 기전으로는 호르몬의 변화와 중추신경계에 대한 작용 등이 제시되고 있다. 폐경주변기에 에스트라디올, 여포자극호르몬, 프로게스테론, 인히빈의 농도에 변화가 오며, 생식선 스테로이드 (gonadal steroids)는 기분을 조절하는 신경전달 물질을 조절하거나, 감수성에 변화를 일으키고 또한 스테로이드 수용체는 봉선핵, 편도

및 해마에서 작용함으로써 중추신경계 활성화에 영향을 미친다. 즉, 폐경주변기에 난소의 여포는 빠른 속도로 상실되며 이는 여포자극호르몬의 증가로 이어져 에스트로겐의 감소를 발생시킨다. 또한 에스트로겐은 아세틸콜린 (acetylcholine; ACh), 세로토닌 (serotonin), 노르에피네프린 (norepinephrine), 가바 (gamma-aminobutyric acid; GABA), 내재적 아편, 도파민 (dopamine), 글루탐산염 (glutamate), 단가아민산화효소제 등 신경전달물질의 생성과 조절에 관여하며, 이는 에스트로겐에 의한 세로토닌 기능의 조절과 연관된다.

- [5] 최근 여성 갱년기 치료에서 에스트로겐 조절 대신 여포자극호르몬 조절에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 즉, 폐경 후 비정상적으로 높아지는 여포자극호르몬은 노화를 촉진시킨다는 연구결과가 있으며, 이는 골다공증 촉진, 대퇴골 양끝단 파괴, 노인성 비만을 촉진한다고 알려져 있다.
- [6] 최근에는 다른 부작용 없이 여성호르몬의 조절은 물론 여포자극호르몬의 분비를 조절할 수 있는 한약재 및 식품 등의 천연물 유래 활성성분을 이용한 대체요법 연구와 다양한 추출물 제조방법이 개발되고 있다. 그러나, 여성호르몬 대체물질 이외에 여포자극호르몬의 분비 억제 효과와 우울증 개선에 대하여 우수한 효과를 가지며, 기존의 합성 약학적 조성물보다 부작용이 적은 천연 약학적 조성물 또는 그 원료에 대한 개발은 아직까지 미비한 실정이다.
- [7] 한편, 단삼 (丹蔘; *Salvia miltiorrhiza* BUNGE; SM)은 한방에서 예로부터 널리 사용된 약재로 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 쌍떡잎식물 통화식물목의 여러해살이풀로 원산지는 중국이다. 단삼은 수염뿌리를 제거하고 햇볕에 말린 뿌리를 약용으로 하며 11월 상순부터 다음해 3월 상순까지 채취하는데 11월 상순에 캐낸 것이 가장 좋은 것으로 알려져 있다. 단삼의 뿌리에 함유된 성분으로는 크립토탄시논 (Cryptotanshinone), 단신수 (Danshensu), 이소탄시논 I (isotanshinone I), 이소탄시논 II (isotanshinone II), 탄시논 I (tanshinone I), 살비아놀산 B (Salvianolic acid B), 탄시논 IIA (tanshinone IIA), 탄시논 IIB (tanshinone IIB), 디히드로탄시논 (dihydrotanshinone), 메틸탄시논네이트 (methyl tanshinonate), 메틸렌 탄시퀴논 (methylene tanshinquinone), 베타-시토스테롤 (betasitosterol), 히드록시탄시논 (hydroxytanshinone), 네오탄시논 (neotanshinone) A · B · C, 살비올 (salviol), 이소크립토탄시논 (isocryptotanshinone), 밀티론 (miltirone), 탄시놀 I (tanshinol I), 탄시놀 II (tanshinol II) 및 비타민 E (vitamin E) 등이 보고되고 있다. 또한, 단삼은 허혈손상 보호, 관상동맥 이완작용, 죽상경화증 억제, 항고혈압, 항고지혈증, 항당뇨, 항균, 항산화, 항암, 항돌연변이, 항혈전 등의 효능이 보고되어 있다. 이러한 기능성을 이용한 단삼 추출물의 다양한 용도에 대하여 연구가 진행 중에 있으나, 폐경기 증상 중 여포자극호르몬의 분비 조절과 우울증 개선 효과에 대한 연구는 아직 없는 실정이다.
- [8] 따라서, 단삼의 이용성을 증대시키기 위해 본 발명자들은 단삼에 대한 연구를 지속적으로 거듭하였고, 그 결과 단삼 추출물이 폐경기 여성의

여포자극호르몬을 조절하고, 세로토닌과 노르에피네프린의 조절을 통해 우울증의 개선 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다. 즉, 이를 통해 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 조성물로 사용될 수 있을 것이다.

[9] [선행기술문헌]

[10] [특허문헌]

[11] (특허문헌 1) 대한민국 등록특허 제10-1513892호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명의 목적은, 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[13] 또한, 본 발명의 목적은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 여성호르몬 분비 조절용 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 아울러, 본 발명의 다른 목적은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 폐경기 여성의 우울증 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[15] 이상에서의 본 발명에서 해결하고자 하는 다양한 과제들은 이에 한정하는 것이 아니라, 후술할 실시예 및 청구범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[16] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[17] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “폐경기 여성”은 노화로 인해 자연발생된 폐경기 여성일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[18] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “추출물”은 정제수, 메탄올 (methanol), 에탄올 (ethanol), 프로판올 (propanol), 이소프로판올 (isopropanol), 부탄올 (butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤 (acetone), 에테르 (ether), 벤젠 (benzene), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트 (ethyl acetate), 메틸렌클로라이드 (methylene chloride), 헥산 (hexane) 및 시클로헥산 (cyclohexane) 중 어느 하나 이상의 용매를 이용하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[19] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “용매”는 60 내지 80 중량% 농도의 에탄올인 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[20] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “추출물”은 80 내지 90°C 에서 5 내지 6시간 동안 추출한 후 여과하여 감압 농축한 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[21] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “추출물”은 80 내지 90°C 에서 5 내지 6시간 동안 추출하는 과정을 2 내지 5회 반복하여 추출하는 것을 특징으로 할 수

있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [22] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “우울증”은 폐경기에 여성 호르몬의 분비 감소에 의하여 유발되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [23] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “조성물”은 세로토닌 및 노르에피네프린 분비를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [24] 또한, 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 여성호르몬 분비 조절용 조성물을 제공한다.
- [25] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “조성물”은 여포자극호르몬의 분비를 감소시키는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [26] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 “조성물”은 황체형성호르몬의 분비를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [27] 또한, 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 폐경기 여성의 우울증 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [28] 또한, 본 발명은 상기 단삼 추출물을 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 폐경기 여성의 우울증 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [29] 본 발명에 따르면, 단삼 추출물은 폐경기 여성에서 나타나는 주요 증상인 여포자극호르몬의 분비를 감소시키며, 우울증과 밀접하게 관련된 호르몬인 세로토닌과 노르에피네프린의 분비를 증가시킨다. 따라서, 본 발명의 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 폐경기 여성의 호르몬을 조절하여 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물에 적용될 수 있으며, 또한 폐경기 여성의 호르몬을 조절하여 우울증 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [30] 도 1은 단삼 추출물에 포함되어있는 성분들의 여성호르몬 수용체 조절효과를 나타낸 도이다.
- [31] 도 2는 단삼 추출물에 포함되어있는 다양한 성분 (총 5종)의 안정성을 시간별로 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [32] 도 3은 단삼 추출물에 포함되어있는 다양한 성분 (총 5종)의 안정성을 날짜별로 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [33] 도 4는 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에서 단삼 추출물 섭취에 따른 여포자극호르몬 (FSH)의 조절효과를 나타낸 도이다.
- [34] 도 5는 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에서 단삼 추출물 섭취에 따른 황체형성호르몬 (LH)의 조절효과를 나타낸 도이다.
- [35] 도 6은 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에서 단삼 추출물 섭취에 따른 세로토닌의 조절효과를 나타낸 도이다.

- [36] 도 7은 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에서 단삼 추출물 섭취에 따른 노르에피네프린의 조절효과를 나타낸 도이다.
- [37] 도 8은 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에서 농도가 다른 단삼 70% 주정추출물 섭취에 따른 세로토닌의 조절효과를 나타낸 도이다.
- [38] 도 9는 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에서 농도가 다른 단삼 70% 주정추출물 섭취에 따른 노르에피네프린의 조절효과를 나타낸 도이다.
- [39] 도 10은 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에서 강제 수영 측정법으로 본 발명의 단삼 70% 주정추출물의 투여량에 따른 항우울 효과를 나타낸 도이다.
- [40] 도 11은 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에서 꼬리 매달기 측정법으로 본 발명의 단삼 70% 주정추출물의 투여량에 따른 항우울 효과를 나타낸 도이다.
- 발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [41] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [42] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [43] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.
- [44] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [45] 일 측면에서, 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물에서 단삼 추출물의 추출방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [46] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여

천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 “추출물”은 적절한 용매를 이용하여 단삼으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 단삼으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올 (methanol), 에탄올 (ethanol), 프로판올 (propanol), 이소프로판올 (isopropanol), 부탄올 (butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤 (acetone), 에테르 (ether), 벤젠 (benzene), 클로로포름 (chloroform), 에틸아세테이트 (ethyl acetate), 메틸렌클로라이드 (methylene chloride), 헥산 (hexane) 및 시클로헥산 (cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.

[47] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피 (thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피 (high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분리된 화합물, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[48] 또한, 본 발명에서 정의되는 단삼 추출물은 수용성 성분 및 지용성 성분을 모두 포함하며, 바람직하게는 지용성 성분을 함유하는 것을 특징으로 한다.

[49] 상기 단삼 추출물은 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합 용매, 보다 바람직하게는 50~100% 에탄올에 가용한 단삼 추출물일 수 있고, 상기 단삼 추출물은 통상적인 추출방법에 의해 수득된 단삼 추출물을 사용할 수 있다.

[50] 구체적으로, 단삼 추출물은 건조한 단삼 중량의 약 1 내지 1000배, 바람직하게는 약 10 내지 100배 부피량 (w/v%)의 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올, 이소프로판올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매에, 1 내지 24 시간, 바람직하게는 2 내지 12 시간 동안, 10 내지 100°C, 바람직하게는 30 내지 80°C에서, 냉침추출, 열수추출,

초음파 추출, 환류냉각 추출, 또는 가열추출법 등의 추출방법으로, 바람직하게는 환류냉각 추출법으로 추출한 후 여과하고 감압 농축 및 건조과정을 통하여 조추출물을 얻는 제 1단계; 상기 조추출물 중량의 1 내지 10배, 바람직하게는 3 내지 6배 부피의 물을 넣어 현탁시켜 여과하여 수 불용성 잔사를 얻는 제 2단계; 상기 잔사에 정제수를 포함한 물, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매, 바람직하게는 물 및 에탄올 혼합용매로서 알코올 20 ~ 95%, 보다 바람직하게는 50 ~ 95%, 더 바람직하게는 70% 에탄올을 가하여, 교반, 용해 및 여과과정을 통하여 여액을 얻는 제 3단계; 상기 여액의 잔류 용매를 제거하는 단계를 포함함을 특징으로 하는 단삼 추출물을 얻을 수 있다.

- [51] 상기 추출하는 과정으로 얻어진 단삼 추출물은 농축, 건조 등의 과정을 더 거칠 수 있고, 건조의 과정에서 동결 건조의 방법으로 분말상의 건조물 형태로 단삼 추출물을 얻을 수 있다. 상기 건조의 과정에서 동결건조의 방법을 적용하는 경우 단삼 추출물 내의 휘발성 유기물질의 손실을 줄일 수 있다는 장점이 있다.
- [52] 일 측면에서, 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [53] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 폐경기 여성의 우울증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본 발명의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [54] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 주사 제형이 더욱 바람직하다.
- [55] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 폐경기 여성의 우울증의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [56] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 조성물의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

- [57] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [58] 본 발명에서 "개체"는 폐경기 우울증 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 인간을 포함하는 동물, 예를 들어 비-영장류 (예를 들면, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 및 마우스) 및 영장류 (예를 들면, 원숭이, 예를 들어 사이노몰구스 (*cynomolgus*) 원숭이 및 침팬지)를 비롯한 포유동물을 나타낸다. 때에 따라서는 인간 여성에 유효할 수 있고, 때에 따라서는 인간을 제외하는 개체일 수 있다.
- [59] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정 셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [60] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는

방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

- [61] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여 (예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- [62] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다.
- [63] 본 발명의 약학 조성물은 기존의 항우울제 조성물과 함께 투여함으로써, 항우울증 효과를 증가시킬 수 있다. 병용 투여는 기존의 항우울제 조성물과 동시에 또는 순차적으로 이루어질 수 있다.
- [64] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 자연노화 유도 폐경기 동물모델에서의 단삼 추출물에 대한 항우울 효능 검증실험시, 항우울제인 벤조디아제팜 투여군 (BZ) 또는 이미프라민 투여군 (I)에 대한 항우울 효과가 미비한 항우울제 불응성 동물모델을 따로 선별하여 단삼 70% 주정추출물을 투여했을시 항우울 효과를 가짐을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 단삼 추출물은, 벤조디아제팜 또는 이미프라민에 대한 내성을 갖는 환자를 대상으로 투여될 수 있고, 상기 약물의 내성을 보이는 우울증 치료에 이용될 수 있다.
- [65] 일 측면에서, 본 발명은 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 폐경기 여성의 우울증 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [66] 본 발명의 단삼 추출물을 건강기능식품 조성물로 사용하는 경우, 상기 단삼 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [67] 본 발명에서 사용되는 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 향신제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의

식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[68] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 양염증 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[69] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[70] 본 발명의 단삼 추출물의 단삼 (丹蔘; *Salvia miltiorrhiza* BUNGE; SM)은 한방에서 예로부터 널리 사용된 약재로 꿀풀과 (Labiatae)에 속하는 쌍떡잎식물 통화식물목의 여러해살이풀이므로 약학적 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 사용할 경우에 일반적인 합성 화합물에 비하여 부작용이 덜할 수 있으므로, 안전하게 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물에 포함되어 유용하게 사용될 수 있다.

[71]

[72] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[73]

[74] <실시예 1> 단삼 추출물의 제조

[75] 1-1 단삼 열수추출물의 제조

[76] 건조 상태의 단삼에 단삼 중량의 25배 부피량 (w/v%)의 증류수를 넣고 100°C에서 6시간 동안 가열하여 열수 추출하여 추출물을 얻고, 얻어진 추출물을 여과하고 50°C에서 농축 건조하여 단삼 열수추출물을 얻었다.

[77]

[78] **1-2 단삼 주정추출물의 제조**

[79] 건조 상태의 단삼에 단삼 중량의 10배 부피량 (w/v%)의 70% 주정을 넣고, 80°C에서 5시간, 1.5기압 이하에서 1차 추출을 진행한 후 여과를 진행하였다. 얻어진 추출액은 감압농축기를 이용하여 65°C 이하에서 농축하여 단삼 주정추출물을 얻었다.

[80]

[81] **1-3 단삼 증류추출물의 제조 (증류추출법에 의한 에센셜 오일)**

[82] 정유 추출장치의 증류조에 단삼을 투입하고, 증기 발생기의 보일러를 가동하여 수증기를 발생시켰다. 그 후 단삼이 들어있는 증류조에 상기 수증기를 통과시켰다. 이때 증류조 내의 온도는 110°C로 대기압 압력에서 실시하였다. 증류조를 통과하면서 정유 성분과 혼합된 수증기를 냉각 장치를 통해 응축시켜 유수 분리기를 이용하여 연한 황색의 단삼 증류추출물을 얻었다.

[83]

[84] **<실시예 2> 단삼 추출물에 포함된 성분 평가**[85] **2-1 단삼 추출물에 포함된 성분들의 여성호르몬 조절능 평가**

[86] 상기 실시예 1에서 얻어진 단삼 추출물에 포함되어있는 성분들을 확인하였고, 성분들인 크립토탄시논 (cryptotanshinone), 단신수 (danshensu), 이소탄시논 (isotanshinone), 살비아놀산 B (salvianolic acid B), 탄시논 IIA (tanshinone IIA)의 여성호르몬 조절능을 확인하였다. 본 실험에 사용된 MCF-7 BUS 세포주는 미국 Tufts 대학에서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 1% penicillin/streptomycin (Gibco, USA)가 첨가된 Dulbecco modified eagle medium (DMEM) (Gibco, USA) 배지를 사용하였고, 37°C, 5% CO₂가 유지되는 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[87] 본 실험을 통해 MCF-7 BUS 세포주를 이용하여 여성호르몬 중 하나인 에스트로겐에 대한 민감성을 측정하여 여성호르몬 조절능을 평가하고자 하였으며, 우선 MCF-7 BUS 세포주를 60mm culture dish에 1×10⁵ cells/well로 분주한 후, 37°C, 5% CO₂가 유지되는 CO₂배양기에서 배양하였다.

[88] 24시간 배양 후 각각의 성분을 10μg/mL의 농도로 처리하였으며, 양성대조군으로 17β-Estradiol (E2)을 10⁻¹⁰M로 처리하였다. 72시간 후 PureLink™ RNA mini kit (ambion, USA)를 이용하여 분리된 mRNA는 PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis kit (Takara, Japan)를 사용하여 cDNA로 변환 하였고, 증폭된 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 물질인 Syber Green (Takara, Japan)을 이용하여 RT-PCR (Real-time PCR, Stratagene, USA)을 실행하였다.

[89] 이때, 각각의 프라이머는 Takara에서 제작하였으며, ER은 Forward 프라이머: CGCTACTGTGCAGTGTGCAAT, Reverse 프라이머: CCTCACAGGACCAGACTCCATAA로 제작하였다. PCR 조건은 처음 단계

95°C에서 30초 동안 predenature 하였으며, 다음 단계로 95°C에서 30초, 60°C에서 1분으로 총 40회 반복하였다. RT-PCR을 통해 얻어진 CT값은 Δ CT로 변환하였으며, 이 Δ CT값은 대조군에 대한 실험군의 변화율을 통해 분석하여, 도 1에 나타내었다. 도 1에서 나타낸 것과 같이 단삼 추출물 내에 포함된 여러 성분 중에서, 단신수 (danshensu)가 가장 현저한 여성호르몬 수용체 조절효과를 나타내었다.

[90]

[91] **2-2 단삼 추출물에 포함된 성분들의 안정성평가**

[92] 단삼 추출물을 95°C에서 0시간, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 및 6시간 동안 보관하였을 때 상기 실시예 2-1에서 여성호르몬 조절능을 확인하였던 성분 5종의 안정성이 유지되는지 확인하기 위하여 시간별로 보관된 시료의 성분 함량을 분석하였다. 또한, 단삼 추출물을 상온에서 1일, 2일, 3일, 4일 및 5일 동안 보관하였을 때 단삼 추출물에 포함되어있는 5종의 성분의 함량분석을 통하여 성분의 안정성을 확인하였다.

[93] 그 결과, 도 2 및 도 3에서 나타낸 것과 같이 단삼 추출물에 포함된 성분 중, 단신수 (danshensu)가 장기간 보관에도 불구하고, 변성이 일어나지 않으며 안정성이 높아 그 효과를 유지할 수 있는 것으로 나타났다.

[94] 또한, 여러 가지 농도 (0, 50, 70, 100% 에탄올)의 단삼 추출물에 포함되어 있는 각 성분의 함량 및 상온 보관 5일 후의 함량을 비교한 결과를 아래 표 1에 함께 표시하였다.

[95] [표1]

함량(mg/g)	단삼 추출물 (EtOH %)				추출물 상온보관 5일 후 (EtOH %)			
	0	50	70	100	0	50	70	100
C(크립토탄시논)	0.11	0.63	3.61	3.22	0.00	0.24	0.11	0.12
D(단신수)	0.34	1.28	25.17	18.32	0.32	1.22	24.19	17.33
I(이소탄시논)	2.22	12.31	14.23	12.22	0.99	5.62	12.11	10.33
S(살비아놀산 B)	21.2	38.23	33.1	20.3	18.33	26.21	23.21	15.27
T(탄시논 IIA)	1.33	5.21	7.22	8.33	0.65	4.11	4.33	5.24
ER발현(%)	23.7	95.2	176.6	132.3	20.5	87.2	166.4	129.1

[96] (C, Cryptotanshinone; D, Danshensu; I, Isotanshinone, S, Salvianolic acid B, T, Tanshinone IIA, E2: 여성호르몬, ER: 여성호르몬수용체, E2의 ER발현 = 100%

기준)

[97] 상기의 결과들을 통해 원료의 안정성이 뛰어나 장기간 보관시 효능이 지속적으로 유지되고, 단삼 추출물에 포함되어 있는 각 성분의 함량이 가장 높은 단삼 70% 주정추출물을 이용하여 하기의 실험을 진행하였다.

[98]

[99] <실시예 3> 단삼 추출물의 호르몬 분비 조절 효과

[100] 3-1 자연노화 유도 폐경기 동물모델에서 여성 호르몬의 분비 조절

[101] 단삼 70% 주정추출물을 50, 100mg/kg 용량으로 52주령의 암컷 B6 마우스에 10주간 경구 투여하였다. 이때, 대조군으로 단삼 주정추출물을 비치리한 5주령 및 52주령의 암컷 B6 마우스를 이용하였다. 또한, 양성대조군으로는 0.1mg/kg 17 β -Estradiol (E2) 복강투여 하였으며, 투여 종료 후 혈액을 채취한 후, 원심분리하여 혈청을 획득하였다. 각 실험군의 여포자극호르몬 (Follicle-stimulating hormone; FSH) 및 황체형성호르몬 (Luteinizing hormone; LH)의 분비량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

[102] 그 결과, 도 4에서 나타낸 것과 같이 단삼 70% 주정추출물 50mg/kg 투여군은 5주령 암컷 마우스군과 비슷한 수준의 여포자극호르몬 (FSH)을 분비하였으며 대조군과 비교하여 여포자극호르몬 분비량을 유의하게 감소시켰으며, 단삼 추출물 100mg/kg 투여군은 여포자극호르몬의 분비를 효과적으로 감소시켰다. 또한 도 5에서 나타낸 것과 같이 단삼 70% 주정추출물 100mg/kg 투여군은 대조군과 비교하여 5주령 암컷 마우스군과 비슷한 수준으로 황체형성호르몬 (LH)의 분비량을 증가시켰다.

[103]

[104] 3-2 자연노화 유도 폐경기 동물모델에서 세로토닌 및 노르에피네프린 분비 조절

[105] 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에 상기 실시예에서 얻어진 단삼 열수추출물, 단삼 70% 주정추출물, 단삼 증류추출물을 경구 투여하여 폐경기 여성에서의 우울증 관련 호르몬인 세로토닌과 노르에피네프린의 분비량을 조사하였다.

[106] 본 실시예는 대조군으로 단삼 추출물을 비치리한 52주령 암컷 마우스를 이용하였으며, 각각의 단삼 추출물을 100mg/kg의 용량으로 10주간 경구 투여하였다. 또한, 양성대조군으로는 17beta-estradiol (E2)를 복강투여 하였다. 호르몬 분비량은 실험동물로부터 혈청을 분리하여 ELISA KIT를 이용하여 측정하였다.

[107] 그 결과, 도 6에서 나타낸 것과 같이 단삼 열수추출물과 단삼 증류추출물은 세로토닌의 분비를 감소시켰으나, 단삼 70% 주정추출물은 세로토닌의 분비를 증가시켰다. 또한, 도 7에서 나타낸 것과 같이 단삼 열수추출물과 단삼 증류추출물의 경우 노르에피네프린의 분비가 감소되었으나, 단삼 70% 주정추출물에 의해 노르에피네프린의 분비가 증가되었다. 이러한 결과는 단삼

70% 주정추출물이 우울증과 밀접한 관련이 있는 호르몬인 세로토닌과 노르에피네프린의 분비량을 증가시켜 우울증을 개선하고 치료하는 효과가 있다는 것을 의미한다.

[108]

[109] **3-3 자연노화 유도 폐경기 동물모델에서 단삼 70% 주정추출물의 농도에 따른 세로토닌 및 노르에피네프린 분비 조절**

[110] 상기 실시예의 결과에 따라 단삼 70% 주정추출물의 농도 (50, 100mg/kg)에 따른 세로토닌 및 노르에피네프린 분비 조절 효과에 대해 조사하였다.

[111] 대조군으로 단삼 70% 주정추출물을 비치리한 5주령, 52주령의 암컷 B6 마우스를 이용하였으며, 단삼 70% 주정추출물을 50mg/kg 및 100mg/kg 용량으로 52주령의 암컷 B6 마우스에 10주간 경구 투여하였다. 양성대조군으로는 0.1 mg/kg 17 β -Estradiol (E2) 복강투여 하였으며, 투여 종료 후 혈액을 채취한 후, 원심분리하여 혈청을 획득하였다. 각 실험군의 세로토닌 및 노르에피네프린의 분비량은 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

[112] 그 결과, 도 8에서 나타낸 것과 같이 세로토닌의 분비량은 단삼 70% 주정추출물 50 mg/kg 및 단삼 70% 주정추출물 100 mg/kg 투여군 모두 폐경기 동물모델인 52주령의 암컷 B5 마우스 대조군에 비해 증가되었으며, 폐경기 전 동물모델인 5주령의 암컷 B6 마우스 대조군과 비슷한 수준으로 세로토닌의 분비량이 회복되었음을 확인하였다. 또한, 도 9에서 나타낸 것과 같이 노르에피네프린의 분비량의 경우, 단삼 70% 주정추출물 50 mg/kg 투여군에서는 폐경기 동물모델인 52주령의 암컷 B5 마우스는 대조군과 큰 차이가 없었지만, 단삼 70% 주정추출물 100 mg/kg 투여군에서 폐경기 전 동물모델인 5주령의 암컷 B6 마우스 대조군보다 더 높은 수준으로 노르에피네프린의 분비량이 증가되었음을 확인하였다. 이러한 결과는 단삼 70% 주정추출물 50 mg/kg 투여시 보다 100 mg/kg 투여시 우울증과 밀접한 관련이 있는 호르몬인 세로토닌과 노르에피네프린의 분비량을 증가시켜 우울증을 개선하고 치료하는데에 더 큰 효과가 있다는 것을 의미한다.

[113]

[114] 상기 실시예들에 의해 본 발명은 자연노화에 의해 유도된 폐경기 동물모델에서 단삼 추출물이 여포자극호르몬의 분비를 효과적으로 감소시키고, 황체형성호르몬 (LH)의 분비량을 증가시킴을 확인하였으며, 또한 단삼 추출물이 우울증과 밀접한 관련이 있는 호르몬인 세로토닌과 노르에피네프린의 분비량을 증가시킴을 확인하였다. 이는 단삼 추출물이 노화로 자연발생한 폐경기로 인한 우울증을 개선하고 치료시킬 수 있음을 의미한다. 따라서, 단삼 추출물은 폐경기 여성의 우울증 예방, 개선 및 치료용 조성물로 사용될 수 있을 것이다.

[115]

발명의 실시를 위한 형태

[116] <실시예 4> 자연노화 유도 폐경기 동물모델에서 단삼 추출물의 항우울 효능 검증

[117] 4-1 강제 수영 측정법에 의한 단삼 추출물의 항우울 효과

[118] 강제 수영 측정법은 실험동물의 운동 활성 및 우울 정도를 검사하는 동물실험법 중 하나로서, 폐경기 동물모델인 52주령의 암컷 B5 마우스를 지름 13cm, 깊이 30cm 의 실린더에 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 물을 20cm 채워서 마우스의 꼬리가 실린더 바닥에 닿지 않게 하였다. 마우스에 실시예 1에서 얻은 단삼 70% 주정추출물 50mg/kg, 100mg/kg를 각각 투여하고, 1시간 후 마우스를 실린더에 넣은 후, 6분 동안 관찰하였다. 대조군으로는 생리 식염수를 투여한 것을 제외하고는 상기와 동일하게 처리하였다. 관찰할 때 처음 2분간을 제외한 나머지 4분 동안을 기준으로 마우스가 머리만 물위로 내어 놓고 움직임 없이 가만히 있는 상태 (immobility time)의 시간을 우울증을 보인 시간으로 측정하였다.

[119] 그 결과 도 10에서 나타난 바와같이, 강제 수영 측정법에서 단삼 70% 주정추출물 50mg/kg, 100mg/kg을 투여한 실험군은 대조군에 비하여 각각 23.7%, 34.2%정도 항우울 효과가 개선됨을 나타냈다. 상기와 같은 결과는 본 발명의 단삼 70% 주정추출물의 투여가 항우울 활성을 지닌다는 것을 나타내는 것이다.

[120]

[121] 4-2 꼬리 매달기 측정법에 의한 단삼 추출물의 항우울 효과

[122] 폐경기 동물모델인 52주령의 암컷 B5 마우스의 꼬리 매달기 측정법은 높이 80cm의 모서리에 접착력이 강한 테이프를 마우스 꼬리 끝 1~2cm를 붙여서 마우스를 매달아 시행하였다. 마우스에 상기 실시예 1에서 얻은 단삼 70% 주정추출물 50mg/kg, 100mg/kg 또는 생리 식염수를 각각 경구 투여하고, 항우울제인 이미프라민 (imipramine; I) 10mg/kg을 복강 투여하여 1시간 후 마우스를 매달아 6분 동안 관찰하였다. 관찰하는 동안 처음 1분간을 제외한 나머지 5분 동안을 기준으로 마우스가 움직임 없이 가만히 있는 시간을 측정하였다.

[123] 그 결과 도 11에 나타난 것과 같이, 꼬리 매달기 측정법에서는 대조군에 비하여 단삼 70% 주정추출물 50mg/kg, 100mg/kg을 투여한 군에서 이미프라민 (I)을 투여한 군과 거의 비슷한 수준인 38.3%, 66.1%의 항우울 효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 따라서 상기와 같은 결과는 본 발명의 단삼 70% 주정추출물의 투여가 항우울 활성을 지닌다는 것을 나타내는 것이다.

[124]

[125] <실시예 5> 급성독성연구

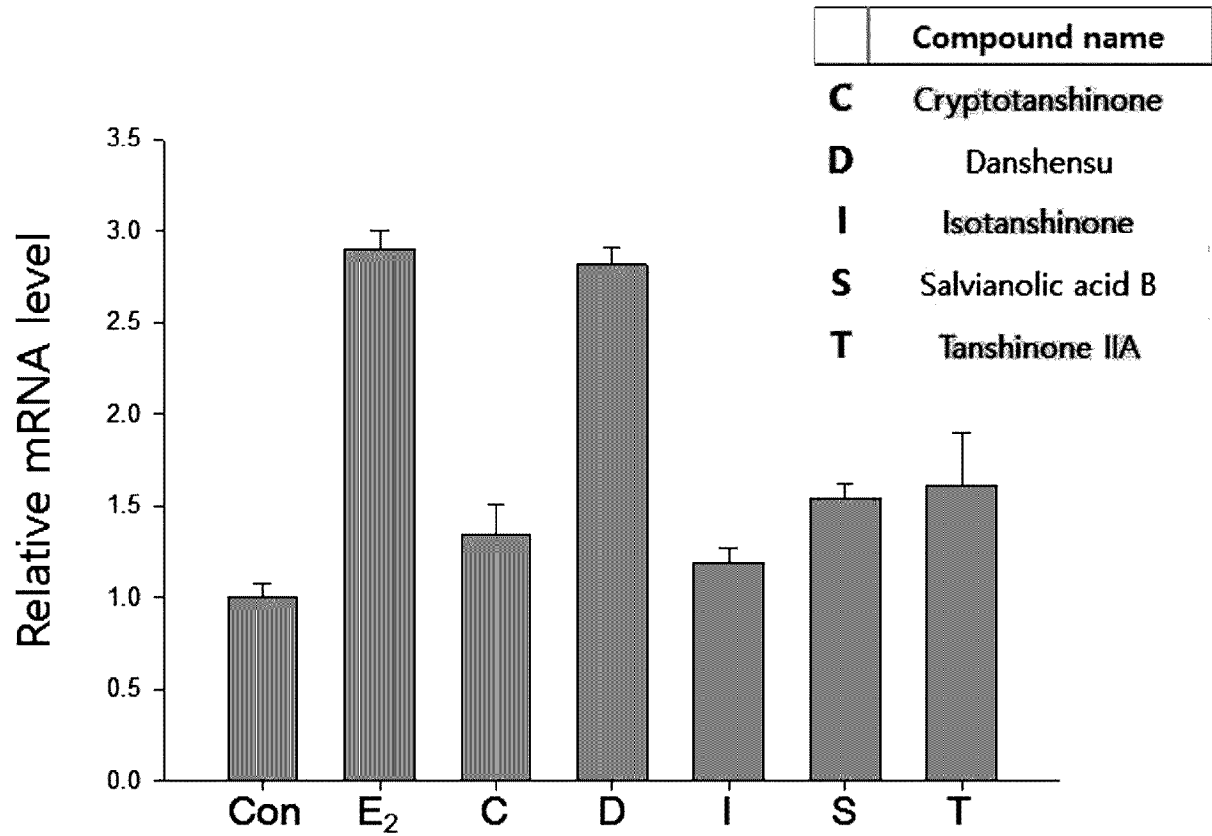
[126] $25 \pm 5\text{g}$ 의 ICR 계 마우스와 $230 \pm 10\text{g}$ 의 특정병원부재 (SPF) 스프라그-도울리 (Sprague Dawley, Biogenomics사) 랫트를 각각 5마리씩 4군으로 나누어 본 발명의

실시에 1의 단삼 70% 주정추출물을 각각 50mg/kg 및 100 mg/kg의 용량으로 복강투여한 후 24시간 동안 독성여부를 관찰하였다. 실험 결과, 4군 모두에서 사망한 예를 전혀 관찰할 수 없었고, 체중 증가, 사료 섭취량 등에서 외견상 대조군과 별다른 증상을 찾아볼 수 없었다. 따라서 본 발명의 단삼 추출물이 안전한 약물임을 확인할 수 있었다.

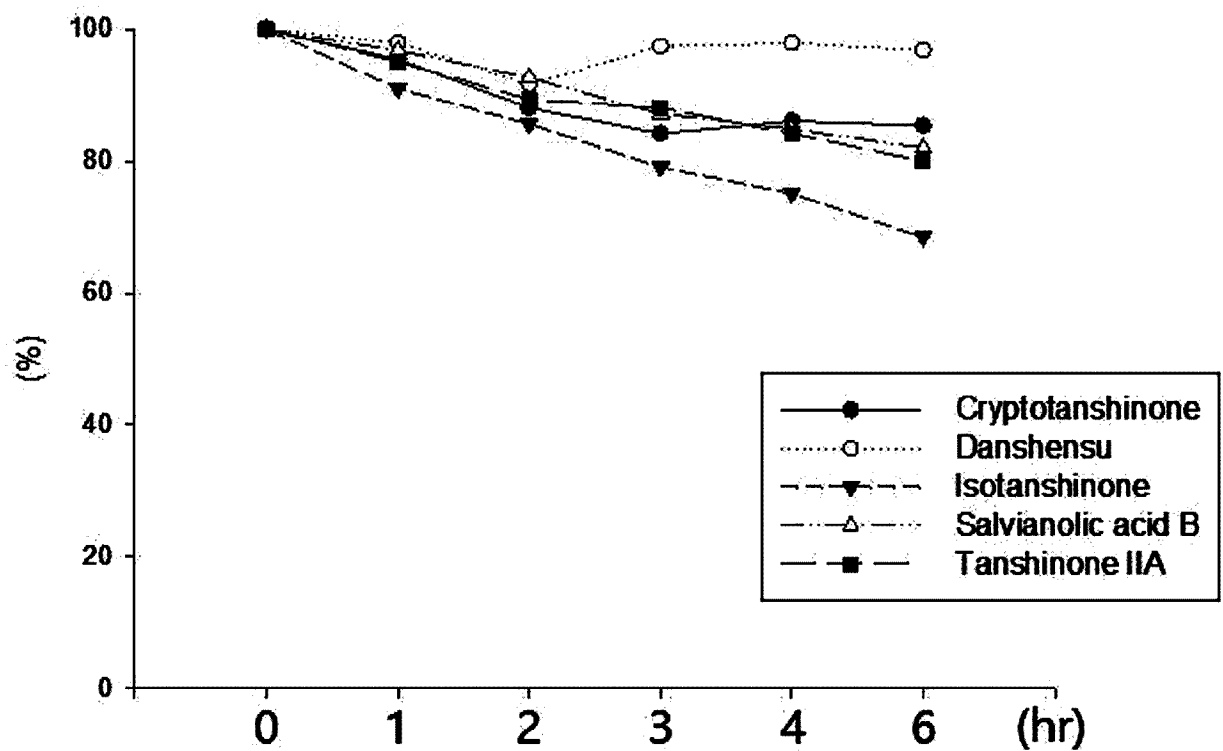
청구범위

- [청구항 1] 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 자연발생된 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물에서, 상기 단삼 추출물은 60 내지 80 중량% 농도의 에탄올을 사용하여 추출한 것이고, 상기 조성물은 세로토닌 및 노르에피네프린 분비를 증가시키는 것인, 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 80 내지 90°C 에서 5 내지 6시간 동안 추출한 후 여과하여 감압 농축한 것을 특징으로 하는, 자연발생된 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 추출물은 80 내지 90°C 에서 5 내지 6시간 동안 추출하는 과정을 2 내지 5회 반복하여 추출하는 것을 특징으로 하는, 자연발생된 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 자연발생된 폐경기 여성의 우울증은 폐경기에 세로토닌 및 노르에피네프린 분비 감소에 의하여 유발되는 것을 특징으로 하는, 자연발생된 폐경기 여성의 우울증 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 단삼 추출물을 유효성분으로 포함하는, 자연발생된 폐경기 여성의 우울증 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물에서, 상기 단삼 추출물은 60 내지 80 중량% 농도의 에탄올을 사용하여 추출한 것이고, 상기 조성물은 세로토닌 및 노르에피네프린 분비를 증가시키는 것인, 조성물.
- [청구항 6] 제1항 내지 제4항 중에 어느 한 항의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계;
를 포함하는, 자연발생된 폐경기 여성의 우울증 치료 방법.

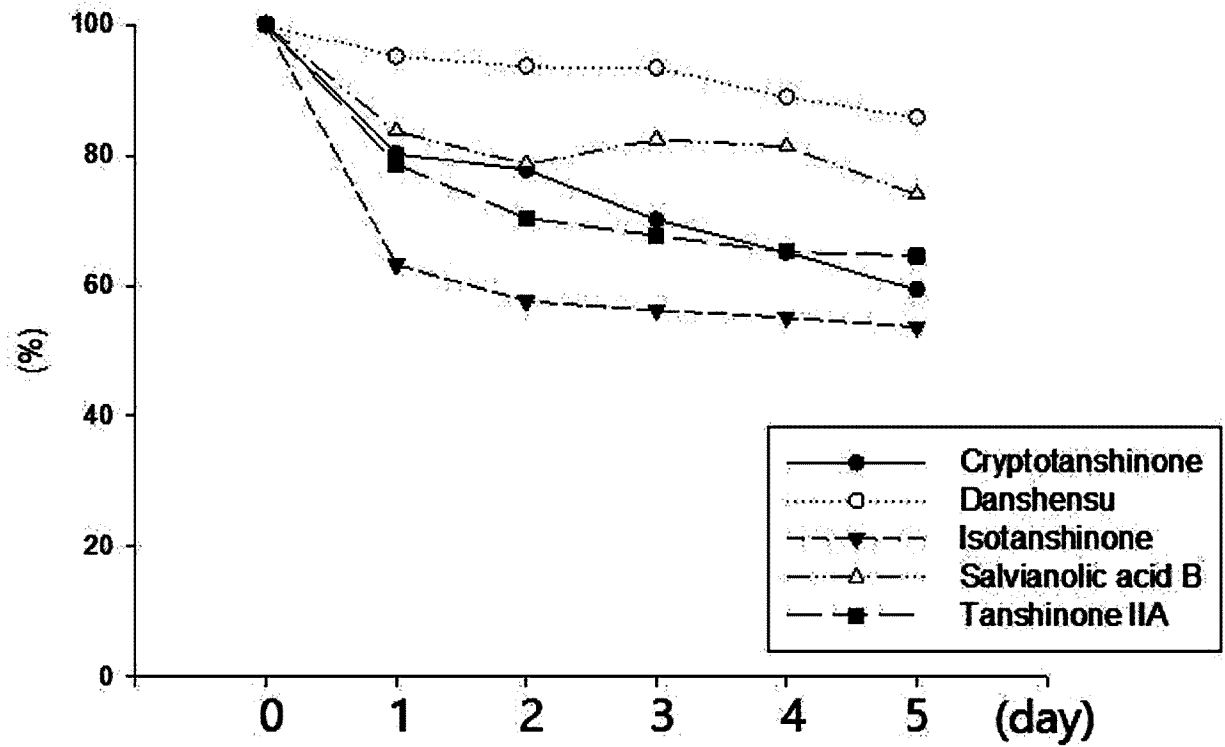
[도1]



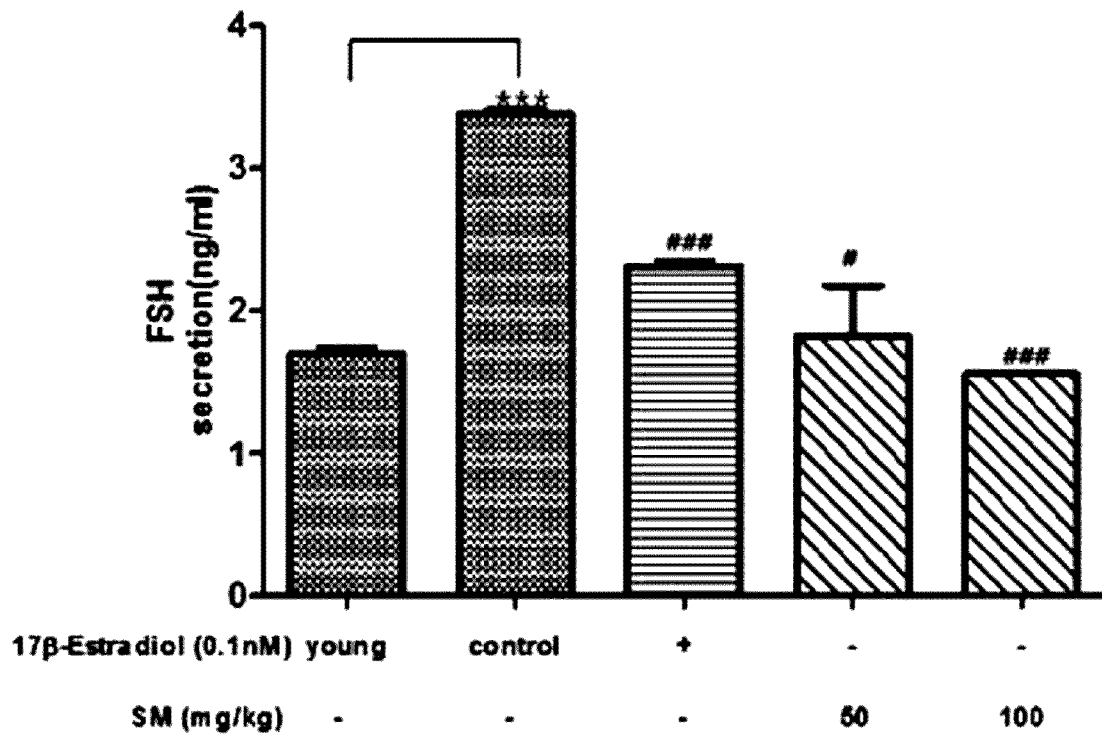
[도2]



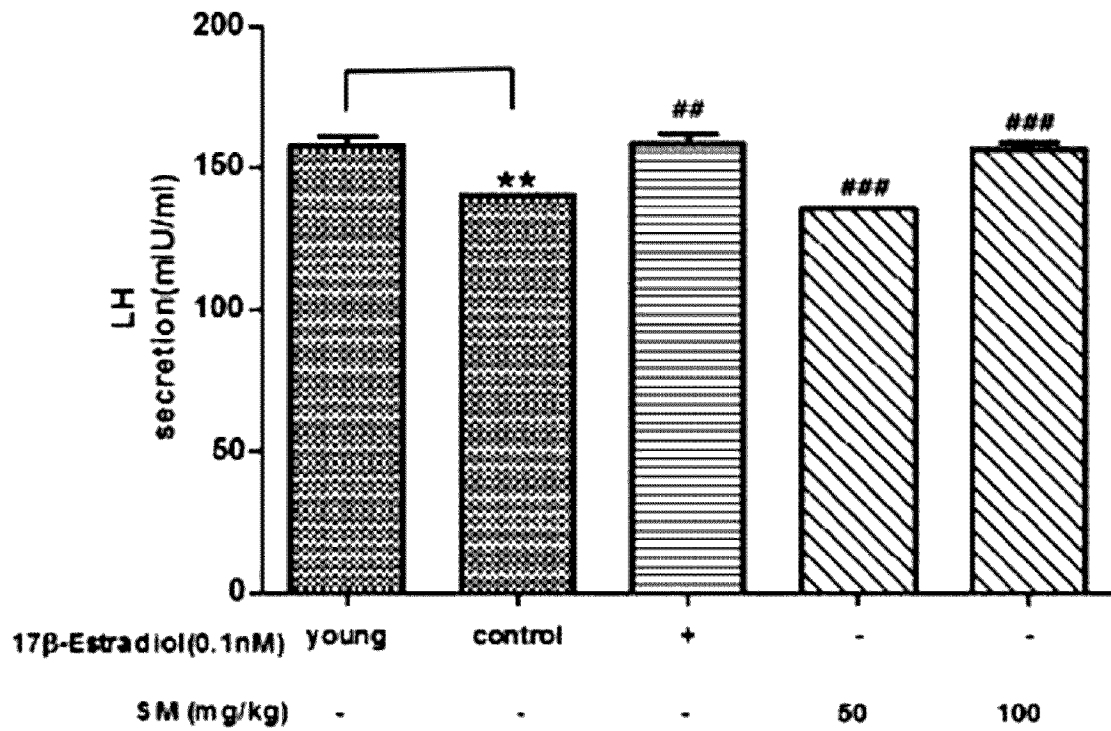
[도3]



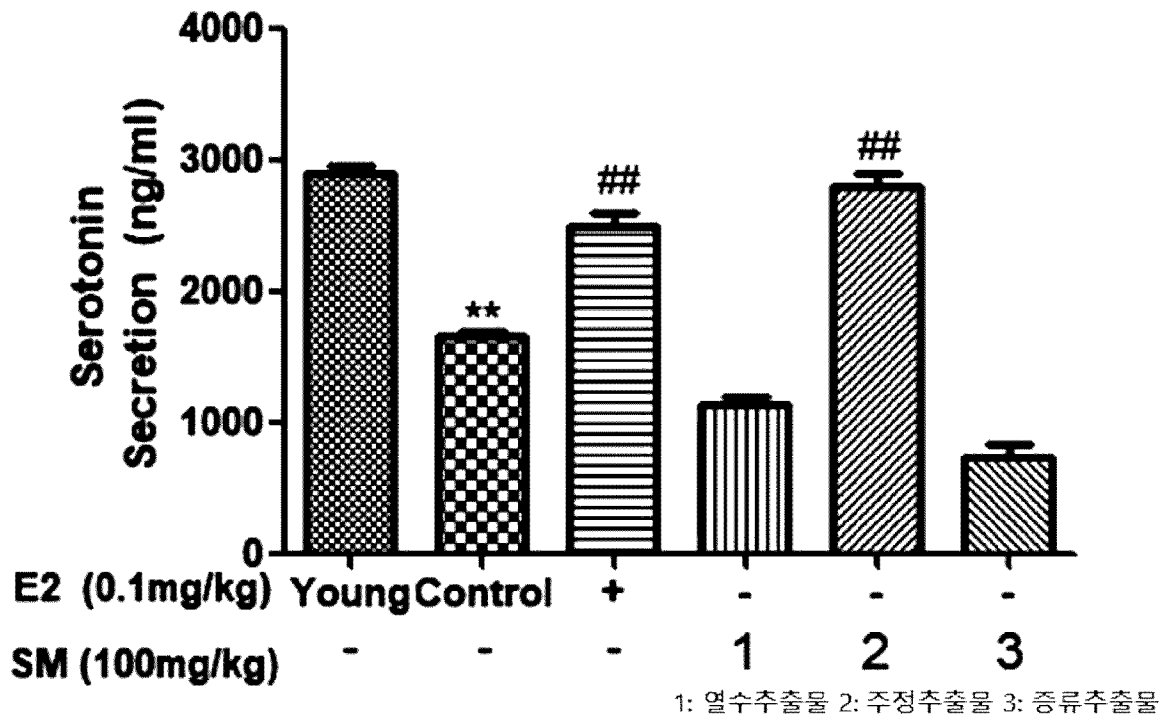
[도4]



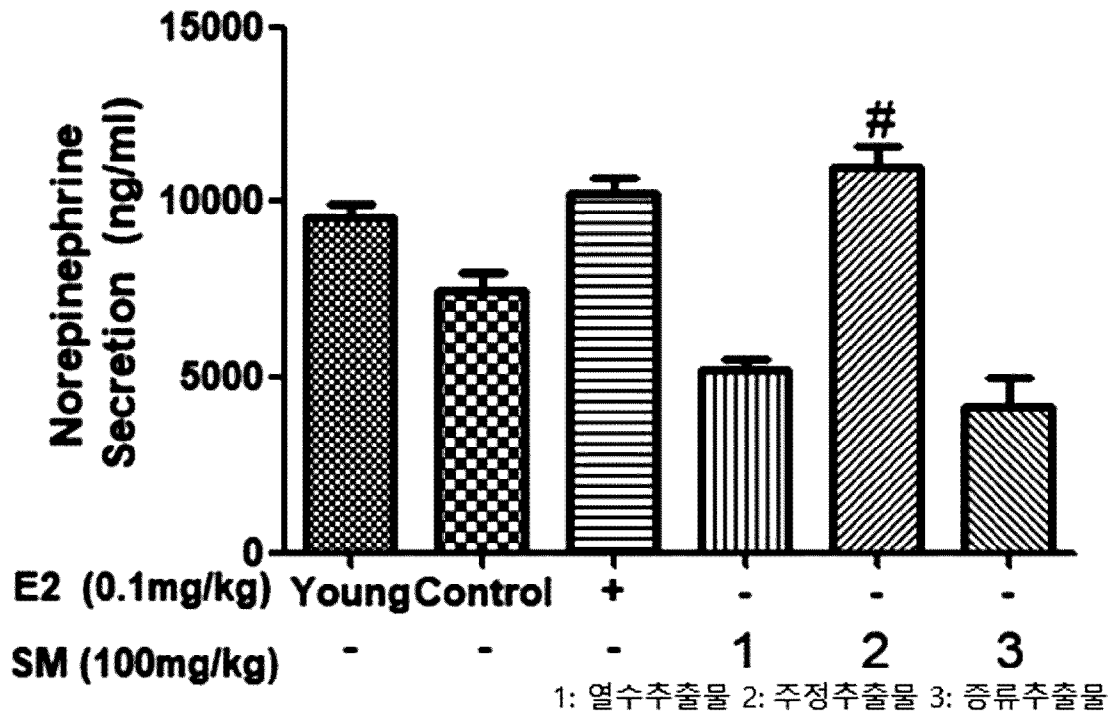
[도5]



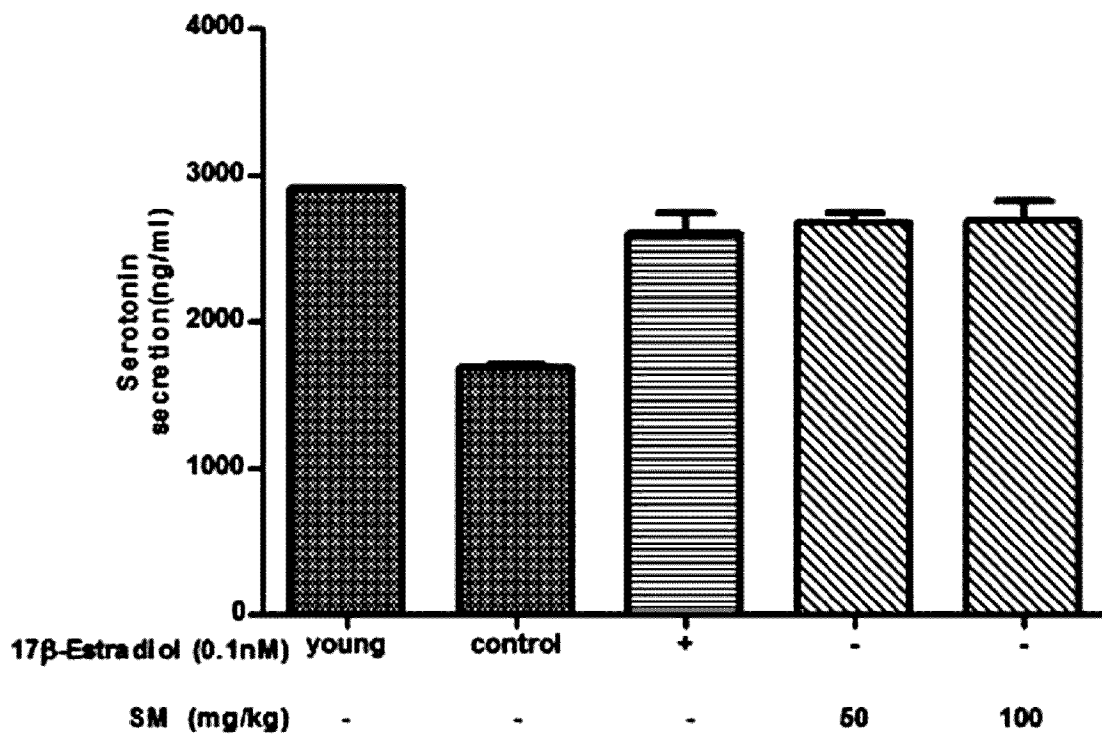
[도6]



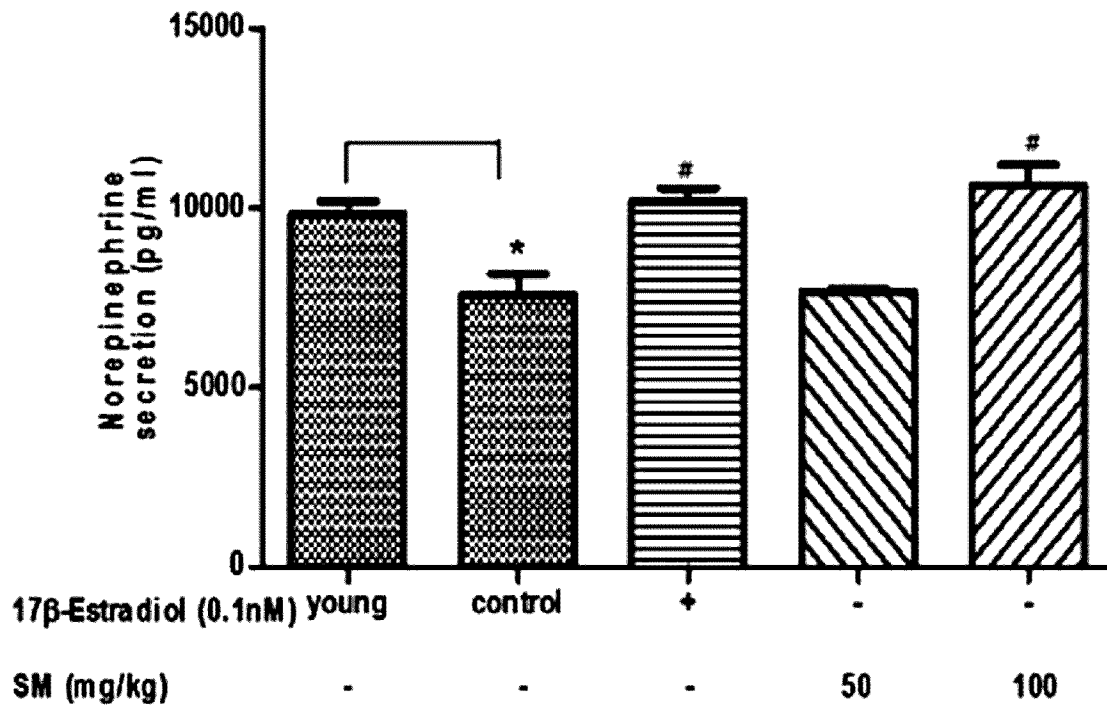
[도7]



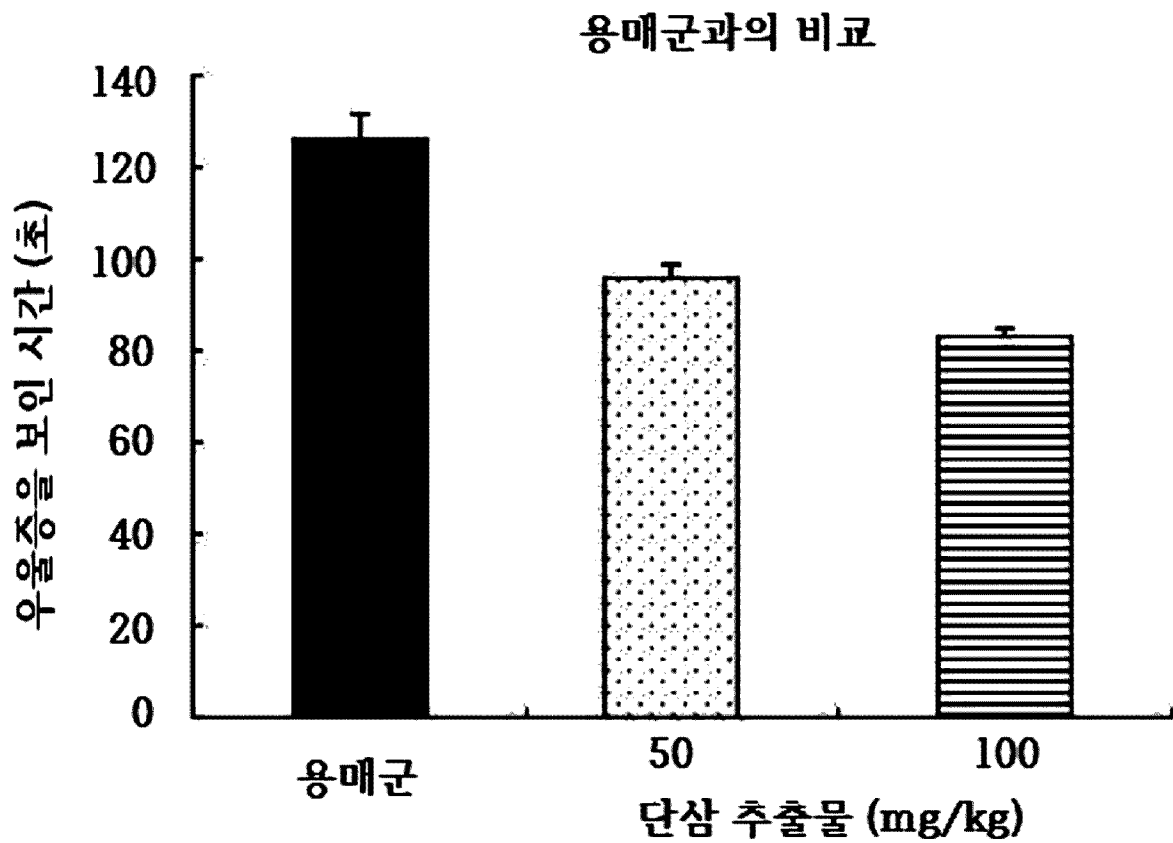
[도8]



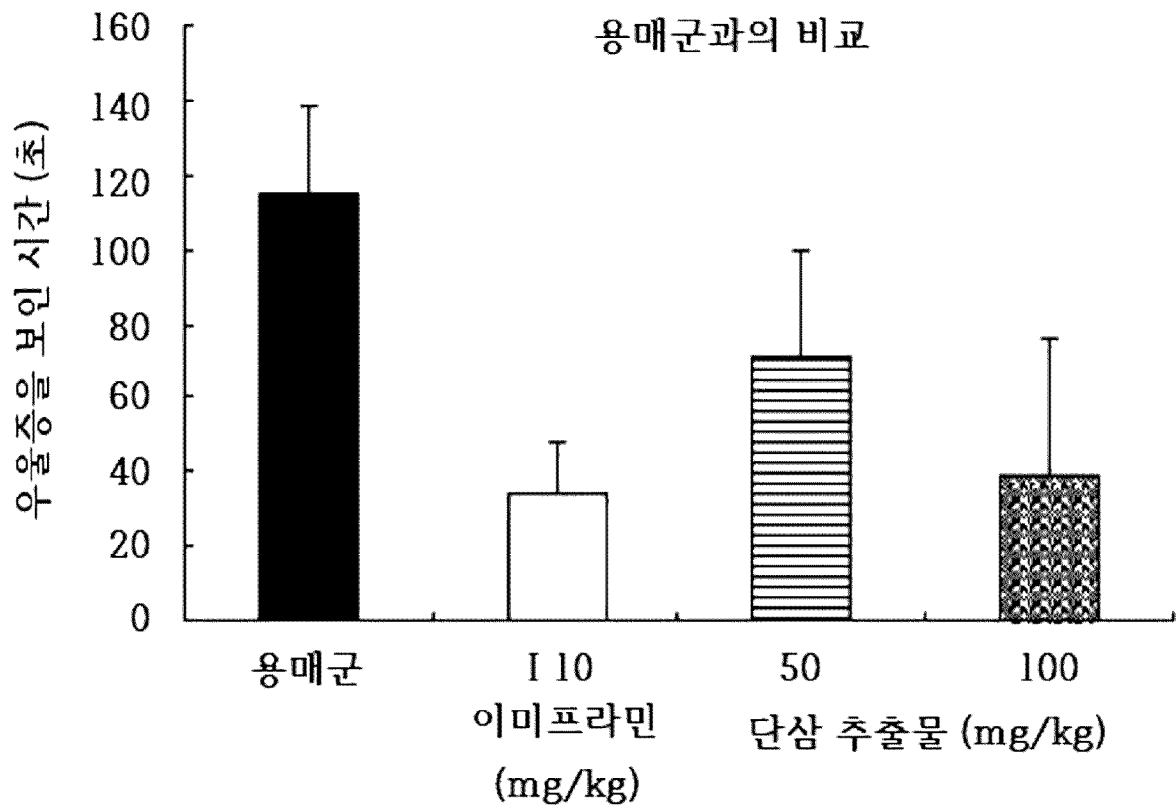
[도9]



[도10]



[도11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016151

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 36/537(2006.01)i; A61P 15/12(2006.01)i; A61P 25/24(2006.01)i; A23L 33/105(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 36/537(2006.01); A23L 33/105(2016.01)

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: 단삼(Salvia miltiorrhiza), 에탄올(ethanol), 추출(extract), 자연발생(naturally-occurring), 폐경기(menopause), 우울증(depression), 세로토닌(serotonin), 노르에피네프린(norepinephrine)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JUHUA, Pan et al. New exploration on the antidepressant effect of Salvia miltiorrhiza. Global Chinese Medicine. 2014, no. 6. See abstract.	1-5
A	XU, Ying et al. Salvia miltiorrhiza bunge increases estrogen level without side effects on reproductive tissues in immature/ovariectomized mice. Aging. 2017(published on 20 December 2016), vol. 9, no. 1, pp. 156-172. See entire document.	1-5
A	신명곤. 丹參과 丹參合四物湯이 更年期障礙에 미치는 影響. 경산대학교 대학원, 석사학위논문. 1996 (SHIN, Myung-Gon. The effect of Radix salviae miltiorrhizae and Radix salviae miltiorrhizae plus Samultang on climacteric hindrance. Master's thesis, Graduate School of Daegu Haany University).	1-5
A	GU, Simeng et al. Danshen-Honghua ameliorates stress-induced menopausal depression in rats. Neural plasticity. 2018, vol. 2018, 6589608. See entire document.	1-5



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

22 February 2021

Date of mailing of the international search report

23 February 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016151

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KR 10-2149518 B1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 28 August 2020 (2020-08-28) See entire document.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/016151

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.: **6**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 6 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/016151

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR	10-2149518	B1	28 August 2020	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 36/537(2006.01)i; A61P 15/12(2006.01)i; A61P 25/24(2006.01)i; A23L 33/105(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 36/537(2006.01); A23L 33/105(2016.01) 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: 단삼(Salvia miltiorrhiza), 에탄올(ethanol), 추출(extract), 자연발생(naturally-occurring), 폐경기(menopause), 우울증(depression), 세로토닌(serotonin), 노르에피네프린(norepinephrine)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JUHUA, PAN 등, "New exploration on the antidepressant effect of Salvia miltiorrhiza." Global Chinese Medicine, 2014, 6호 요약 참조.	1-5
A	XU, YING 등, "Salvia miltiorrhiza bunge increases estrogen level without side effects on reproductive tissues in immature/ovariectomized mice." Aging, 2017(2016.12.20 공개), 9권, 1호, 페이지 156-172 전체 문헌 참조.	1-5
A	신명곤, "丹參과 丹參合四物湯이 更年期障礙에 미치는 影響." 경산대학교 대학원, 석사학위논문, 1996 전체 문헌 참조.	1-5
A	GU, SIMENG 등, "Danshen-Honghua ameliorates stress-induced menopausal depression in rats." Neural plasticity, 2018, 2018권, 6589608 전체 문헌 참조.	1-5
PX	KR 10-2149518 B1 (경희대학교 산학협력단) 2020.08.28 전체 문헌 참조.	1-5
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 2021년02월22일(22.02.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년02월23일(23.02.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

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: 6
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 6은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
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.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2149518 B1

2020/08/28

없음