



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0166497
(43) 공개일자 2022년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01) A23L 19/00 (2022.01)
A23L 33/15 (2016.01) A61K 36/79 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A23L 19/00 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0075314

(22) 출원일자 2021년06월10일

심사청구일자 2021년06월10일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

조익현

서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호(반포동, 반포아파트)

최종희

경상북도 경주시 외동읍 입실시장길 12-3

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

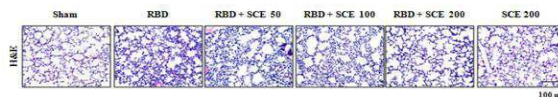
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 COVID-19의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은, 오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 오미자 추출물은, SARS-CoV-2의 스파이크를 구성하는 단백질인 수용체 결합 도메인(receptor-binding domain, RBD)으로 유도된 호흡기 질환 마우스에서, 폐포 내의 염증세포의 침윤을 억제하고, RBD 수용체인 ACE2, 염증관련 인자인 p-STAT3 및 IL-6의 발현을 감소시키며, 염증 신호 전달 경로의 JNK, ERK, p38, IκB 및 NFκB의 인산화를 억제하며, 항산화인자인 Nrf2 및 NQO-1의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/15 (2016.08)

A61K 36/79 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

(72) 발명자

이영현

서울시 동대문구 경희대로 3길 30(회기동)

권태우

서울시 강남구 영동대로 112길 24 (삼성동, 동구싼 타빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2021112010

과제번호 NRF2021R1H1A201005511

부처명 한국과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 재도약연구(중견연구)

연구과제명 다발성경화증에서 Yap/Taz 신호기전의 분자기능 규명과 치료제 개발을 위한 기반 구

축

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경희대학교

연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 오미자 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, C1 내지 C4의 저급 알코올 수용액, 핵산, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 코로나바이러스는, SARS-Cov-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)인 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 추출물은, 폐포 내 염증세포 침윤을 억제시키는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 염증세포는, 대식세포인 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 염증 관련 인자인 ACE2(Angiotensin-converting enzyme 2), STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3) 및 IL-6(interleukin 6)로 이루어진 군에서 선택된 인자의 발현 또는 인산화를 감소시키는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 염증 신호 전달 관련 인자인, ERK(Extracellular Signal Regulated Kinase), JNK(c-Jun N-terminal kinases), p38(p38 mitogen-activated protein kinases), IκB(IκB kinase) 및 NFκB(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)로 이루어진 군에서 선택된 인자의 인산화를 억제시키는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 항산화 인자인 Nrf2(Nuclear factor erythroid-2-related factor 2) 및 NQO-1(NAD(P)H quinone dehydrogenase 1)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 개선용 식품

조성물.

청구항 9

오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 COVID-19의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코로나바이러스는 사람, 조류, 설치류, 및 포유류 등 숙주범위가 넓은 RNA 바이러스로서 유전체의 크기가 약 30kb에 이르며, 모든 RNA 바이러스 중에서 가장 큰 바이러스이다. 바이러스 표면의 단백질 돌기가 태양광환(colona) 혹은 왕관(crown) 모양과 비슷해 코로나바이러스라고 명명되었다.

[0003] 사람에게 감염되어 질병을 유발하는 코로나바이러스는 7종이 알려져 있으며, 이중 4종(HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HKU1)은 지역사회 감염 호흡기 사람코로나바이러스(communitary-acquired respiratory HCoV, CAR HCoV)라고도 하는데, 전 세계 어디에서나 온도 및 기후 측면에서 종종 여름, 가을보다 겨울, 봄에 빈번하게 발생하고 성인의 상기도 감염의 10~30%의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 이외에, 2003년 유행했던 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) 및 2012년 유행했던 중동호흡기증후군(Middle East Respiratory Syndrome, MERS)을 유발한 코로나바이러스(SARS-CoV 및 MERS-CoV)는 동물에서 사람으로 전파된 것으로 하기도 감염을 통해 심각한 호흡기 증후군을 유발하는 것으로 알려져 있다. 최근 2019년 12월에 중국 후베이성 우한시에서 발생한 폐렴환자에서 신종 코로나바이러스가 확인되어 처음에 2019년 신종 코로나바이러스(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)로 불렸고 이후 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)라는 정식명칭으로 명명되었으며, 이 군주가 유발한 감염증은 세계보건기구(WHO)에 의해 Coronavirus disease 2019(COVID-19)로 명명되었다(한국에서는 한글명칭 ‘코로나바이러스감염증-19’ 과 그 약칭 ‘코로나-19’ 로 명명됨).

[0004] SARS-CoV-2는 SARS 및 MERS 코로나바이러스와 같이 박쥐에서 기원한 베타코로나바이러스계통이며, 해당 바이러스의 유전자 염기서열분석결과, 박쥐 유래 유사 코로나바이러스와 가장 높은 상동성(89.1%)을 갖는 것으로 확인되었다. COVID-19는 주로 호흡기를 통해 감염되며 증상이 거의 없는 감염 초기에 전염성이 강한 특징을 보이며, 감염 후에는 인후통, 고열, 기침, 호흡곤란 등의 증상을 거쳐 폐렴으로 발전한다. COVID-19가 전세계적으로 확산하자 세계보건기구(WHO)는 2020년 3월 11일에 이 질환에 대해 범유행(팬데믹)을 선언하였고, 2020년 5월 기준 전세계적으로 COVID-19 환자수 약 470만명, 사망자수 약 30만명에 달하여 COVID-19가 급속도로 확산하고 있어, COVID-19를 치료 또는 예방할 수 있는 치료제 또는 백신의 개발이 시급한 실정이다.

[0005] 한편, 오미자(*Schisandra chinensis*)는 지름 약 1 cm의 짙은 붉은 빛깔을 지니는 오미자 나무의 열매로써, 시간드린, 고미신, 시트럴, 사과산, 시트르산 등의 성분이 들어 있어 심장을 강하게 하고 혈압을 내리며 면역력을 높여 주어 강장제로 쓴다. 폐 기능을 강하게 하고 진해·거담 작용이 있어서 기침이나 갈증 등을 치료하는데 도움이 된다고 알려져 있다. 또한, 말린 열매를 찬물에 담가 붉게 우려낸 물에 꿀·설탕을 넣어 음료로 마시거나 화채나 녹말편을 만들어 먹는 것으로 알려져 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)의 예방 또는 개선용 식품 조성물 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)의 예방 또는 개선용 식품 조성물 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 오미자 추출물은, SARS-CoV-2의 스파이크를 구성하는 단백질인 수용체 결합 도메인(receptor-binding domain, RBD)으로 유도된 호흡기 질환 마우스에서, 폐포 내의 염증세포의 침윤을 억제하고, RBD 수용체인 ACE2, 염증관련 인자인 p-STAT3 및 IL-6의 발현을 감소시키며, 염증 신호 전달 경로의 JNK, ERK, p38, I κ B 및 NF κ B의 인산화를 억제하며, 항산화인자인 Nrf2 및 NQO-1의 발현을 증가시키는 것을 확인하여, 관련 산업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 오미자 추출물의 처리에 따른 COVID-19가 유도된 마우스의 허파 조직에서 조직학적 변화를 H&E 염색으로 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 오미자 추출물의 처리에 따른 COVID-19가 유도된 마우스의 허파 조직에서 대식세포 마커인 CD68을 면역형광염색으로 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 오미자 추출물의 처리에 따른 COVID-19가 유도된 마우스의 허파 조직에서 대식세포 마커인 Iba-1을 면역형광염색으로 확인한 도이다.

도 4는 본 발명의 오미자 추출물의 처리에 따른 COVID-19가 유도된 마우스의 허파 조직에서 대식세포 마커의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 도이다(A: CD68 웨스턴 블랏 결과 및 정량화, B: Iba-1 웨스턴 블랏 결과 및 정량화, C: CD11b 웨스턴 블랏 결과 및 정량화).

도 5는 본 발명의 오미자 추출물의 처리에 따른 COVID-19가 유도된 마우스의 허파 조직에서 염증 관련 인자의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 도이다(A: ACE2 웨스턴 블랏 결과 및 정량화, B: p-STAT3 웨스턴 블랏 결과 및 정량화, C: IL-6 웨스턴 블랏 결과 및 정량화).

도 6은 본 발명의 오미자 추출물의 처리에 따른 COVID-19가 유도된 마우스의 허파 조직에서 염증 신호 전달 인자의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 도이다(A: p-ERK 웨스턴 블랏 결과 및 정량화, B: p-JNK 웨스턴 블랏 결과 및 정량화, C: p-p38 웨스턴 블랏 결과 및 정량화, D: p-I κ B 웨스턴 블랏 결과 및 정량화, E: p-NF κ B 웨스턴 블랏 결과 및 정량화).

도 7은 본 발명의 오미자 추출물의 처리에 따른 COVID-19가 유도된 마우스의 허파 조직에서 항산화 인자의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 도이다(A: Nrf2 웨스턴 블랏 결과 및 정량화, B: NQO-1 웨스턴 블랏 결과 및 정량화).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 용어 “개선”은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0015] 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 유효성분을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0016] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어

레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조 식품류 등이 있다.

[0017] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0018] 본 발명의 기능성 식품 조성물은 코로나바이러스 감염증-19의 예방 또는 치료 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률 제672호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 오미자 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, C1 내지 C4의 저급 알코올 수용액, 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 물이나, 이에 제한되지는 않는다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 코로나바이러스는 SARS-Cov-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)인 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 추출물은 SARS-Cov-2로 유도된 폐포 내 염증세포 침윤을 억제시키는 것일 수 있으며, 바람직하게는 대식세포이나 이에 제한되지는 않는다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 추출물은 염증 관련 인자인 ACE2, STAT3 및 IL-6로 이루어진 군에서 선택된 인자의 발현 또는 인산화를 감소시키는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 따르면, 염증 신호 전달 관련 인자인, ERK, JNK, p38, I κ B 및 NF κ B로 이루어진 군에서 선택된 인자의 인산화를 억제시키는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 추출물은 항산화 인자인 Nrf2 및 NQO-1의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 오미자 추출물을 유효성분으로 포함하는 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 제공한다.

- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0028] 본 발명에서 “약제학적으로 허용가능한”이란 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 활성 물질의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 것을 의미한다.
- [0029] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjutant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 효과를 증가시킬 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0032] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학 조성물에 0.01 ~ 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.
- [0036] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0038] <실시예 1> 오미자 추출물의 제조
- [0039] 본 발명의 오미자 추출물(*Schizandra Chinensis* Extract, SCE)을 제조하기 위하여, 건조한 오미자 열매(*Schizandra Chinensis*) 200 g을 환류추출기에 증류수 2 L와 함께 넣고, 1시간 30분간 방치한 후 가열 하였으며, 탕액이 끓기 시작하는 시점부터 1시간 30분간 추가로 가열하였다. 가열 후 추출된 추출액을 여과지를 이용하여, 감압 여과한 후, 진공 감압 농축기(EYELA N-1200A; EYELA, Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 여과액을 농축하고, 동결건조기를 이용하여 분말시료를 제조하였으며, 수득된 SCE의 수득율은 23.2%였다.
- [0041] <실시예 2> COVID-19 유도 동물모델 및 오미자 추출물 투여

[0042] 본 발명의 SCE가 코로나바이러스 감염증-19(corona virus disease 19, COVID-19)에 대한 개선 효과를 확인하기 위하여, COVID-19가 유도된 동물모델을 제작하였다. COVID-19를 유도하기 위하여, COVID-19의 원인 바이러스인 SARS-Cov-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)의 스파이크를 구성하는 단백질인 수용체-결합도메인(receptor-binding domain, RBD)으로 COVID-19를 유도하고자 하였다. 구체적으로는, C57BL/6 계통의 수컷 마우스(7 주령; 23-25 g)를 (주)나라바이오텍(경기도 평택)으로 구입하여 실험환경에 1주일 동안 적응시키고, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 그 후 마우스를 6개의 군으로 분류하였으며, 각 군은 1) 정상 대조군인 Sham군, 2) RBD만 처리하여 COVID-19를 유도한 RBD 군, 3) RBD와 SCE 50 mg/kg을 처리한 RBD + SCE50 군, 4) RBD와 SCE 100 mg/kg을 처리한 RBD + SCE100 군, 5) RBD와 SCE 200 mg/kg을 처리한 RBD + SCE 200 군 및 6) SCE만 200 mg/kg으로 처리한 SCE200 군으로 분류 하였다. RBD를 투여하기 5일 전부터 매일 1회씩 구강으로 SCE를 투여하였으며, RBD는 생리식염수에 희석하여 200 µg/ml의 농도로 정맥 주사하여 호흡기 염증을 유도하였고, SCE를 투여하는 군에서는 호흡기 염증 유도 후 3일 동안 매일 1회씩 SCE를 구강으로 투여하였다.

[0044] <실시예 3> 파라핀 조직절편 제작

[0045] 상기 실시예 2의 각 군의 마우스를, RBD로 호흡기 염증을 유도한 후 3일째에 다이에틸 에테르(diethyl ether, 삼전화학, 대한민국)로 과잉마취하고, 개흉하여, 왼쪽 허파를 적출하였다. 적출된 허파조직을 4% paraformaldehyde액에 침지시켜 24시간 동안 고정하고, 0.1 M PBS (phosphate buffered saline; pH 7.2)로 여러 차례(4-6회) 교체하여 수세하였다. 자동조직처리장치(TP1020, Automatic Tissue Processor, Leica, 독일)를 활용하여 허파조직을 70%, 80%, 90%, 95%, 100%-1, 100%-2, 및 100%-3 에탄올에 1시간씩 담가서 탈수(dehydration)하고, 100% 에탄올과 자일렌(xylene)의 비율을 2:1, 1:1, 1:2 및 100% 자일렌으로 교체하면서 투명화(clearing)하고, 자일렌과 파라핀(paraffin)의 비율을 2:1, 1:1, 1:2 및 100% 파라핀으로 교체하면서 파라핀을 완전히 침투시켰다. 연속하여, 조직포매장치(EG1150, Tissue Embedding Center, Leica, 독일)를 활용하여 파라핀 블록을 제작하고, 조직절편기(RM2155, rotary microtome, Leica, 독일)를 활용하여 5 µm 두께의 절편을 제작하여, 38℃의 따뜻한 물에 띄어서 젤라틴으로 코팅된 유리슬라이드 위에 얹어서 건조시켰다.

[0047] <실시예 4> 조직병리학적 염색(H&E 염색)

[0048] 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 준비된 허파 조직을 H&E 염색을 위하여, 헤마톡실린(hematoxyline) 용액을 처리하고 3 ~ 5분간 반응시킨 후 증류수로 세척하였다. 세척된 허파 조직에 에오신(eosin) 용액을 처리하고 1분간 반응시킨 후 증류수로 세척하였으며, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%-1, 100%-2, 100%-3 에탄올에 차례로 각각 2분간 처리하여 탈수한 후 자일렌(xylene)에 담근 뒤 커버 글라스를 덮어 준비하였으며, 조직병리학적으로 관찰하였다.

[0049] 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이, Sham군과 비교하여, RBD군의 허파에서는 폐포벽이 두꺼워 지고, 염증세포의 침윤이 증가하는 것을 확인하였으며, SCE를 투여한 군에서는 농도 의존적으로, 증가된 폐포벽의 두께가 감소하고, 염증세포의 침윤이 감소하는 것을 확인하였다.

[0051] <실시예 5> 면역형광염색

[0052] 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 준비된 허파 조직을 자일렌과 에탄올을 이용하여 파라핀을 제거(deparaffinization)하고, 재함수(rehydration)하였다. 조직절편은 200 µg 소혈청알부민(BSA, Bovin serum albumin, sigma, 미국), 500 µl FBS (Fetal bovine serum, Gibco, 독일), 500 µl NGS (Normal goat serum, Vector, 미국) 및 10 µl Triton X-100 (Sigma, 미국)을 PBS에 넣어 혼합(total volume: 10ml)하여 제조된 블로킹 용액으로, 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 1차 면역혈청(antiserum)인 대식세포(macrophage)의 마커인 CD68 (1:500; AbD Serotec, California, 미국) 및 Iba-1 (1:1,000; Wako, Osaka, 일본)을 블로킹 용액에 희석하여 12시간 이상 반응시켰다. 반응 후 조직을 PBS로 수세한 후 FITC/Cy3-가 결합된 rat/rabbit IgG 2차 항체(1:200; Vector Laboratories, 미국)로 실온에서 2시간 동안 반응시키고, 수세하여 커버글라스로 덮었다. 염색된 파라핀 조직 슬라이드는 컨포칼이미징시스템(confocal imaging system; LSM 5 PASCAL; Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰 및 캡처하였다.

[0053] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, Sham군과 비교하여, RBD군의 허파에서는 대식세포마커인 CD68 및

Iba-1에 대한 면역양성반응이 증가하는 것을 확인하였으며, SCE를 처리하면, 농도 의존적으로 CD68 및 Iba-1에 대한 면역양성반응이 감소하는 것을 확인하였다.

[0055] <실시예 5> 웨스턴 블랏

[0056] 상기 실시예 2에서 적출된 허파 조직의 일부를, 단백질 용해 완충액(protein lysis buffer; 10 mM 트리스, 0.5 mM EDTA, 0.25 M 수크로스) 200 μ l를 넣고 분쇄기를 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)을 사용한 Bradford(Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 단백질 30 μ g은 10% SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane, Gendepot, 영국)으로 이동시켰으며, PVDF 멤브레인은 5% 탈지유(skimmed milk, BD, 미국)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. 블로킹 후 TBST로 세척하여 1차 항체인 rat anti-CD68 (1:500, AbD Serotec), rabbit anti-Iba-1 (1:1,000; Wako), rat anti-CD11b (AbD Serotec), rabbit anti-ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2; 1:1,000; Abcam, Cambridge, United Kingdom), mouse anti-phospho (p)-STAT3 (1:500; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), rabbit anti-STAT3 (1:1,000; Cell Signaling Technology), mouse anti-IL-6 (1:1,000; Cell Signaling Technology), rabbit anti-p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38, p-NF- κ B p65, NF- κ B p65, p-I κ B, I κ B (1:1,000; Cell Signaling Technology), mouse anti-Nrf2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), NQO1 (1:1,000; Cell Signaling Technology) 및 rabbit anti-GAPDH (Cell Signaling Technology)를 3% 탈지유에 희석시켜 4°C에서 12시간 동안 반응시킨 후 TBST로 10분씩 3회 세척하고 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST에 세척한 뒤 ECL system(Santacruz, 미국)로 단백질 밴드를 확인하였고, 단백질양의 확인 및 정량적인 분석은 이미지 분석 장비(ChemiDoc XRS+, Bio-Rad)를 이용하여 수행하였다.

[0057] 그 결과, 대식세포의 마커인 CD68, Iba-1 및 CD11b의 발현은 Sham군과 비교하여, RBD 군의 허파에서 각각 1.8배, 4.6배 및 1.8배가 증가하였으나, SCE를 처리하면 RBD 군과 비교하여 CD68(15% 감소), Iba-1(21% 감소) 및 CD11b(21% 감소)가 각각 감소하는 것을 확인하였다(도 4A 내지 도 4C).

[0058] 또한, Sham군과 비교하여, RBD군의 허파에서는 RBD의 수용체로 작용하는 ACE2(angiotensin-converting enzyme 2), 주요 염증 기전에 관여하는 p-STAT3 및 주요 사이토카인인 IL-6의 발현이 증가하였으나, SCE를 투여하면, RBD군과 비교하여, ACE2, p-STAT3 및 IL-6의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 5A 내지 도 5C).

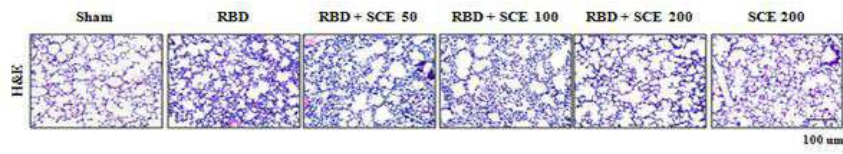
[0059] 또한, 주요 염증 신호 전달과 관련된 인자인 p-JNK, p-ERK, p-p38, p-I κ B 및 p-NF κ B의 발현도 Sham군과 비교하여, RBD군에서 증가한 것을 확인하였으며, SCE를 처리하면, RBD군과 비교하여, p-JNK, p-ERK, p-p38, p-I κ B 및 p-NF κ B의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 6A 내지 도 6E).

[0060] 추가적으로, Sham군과 비교하여, RBD군의 허파에서는 항산화 작용의 핵심 기전인 Nrf2 및 상기 기전의 대표적인 생성물인 NQO-1의 발현이 증가하는 경향을 나타내는 것을 확인하였으나, SCE를 처리하면 RBD군과 비교하여, 상기 Nrf2 및 NQO-1의 발현이 더욱 증가한 것을 확인하였다(도 7A 및 도 7B).

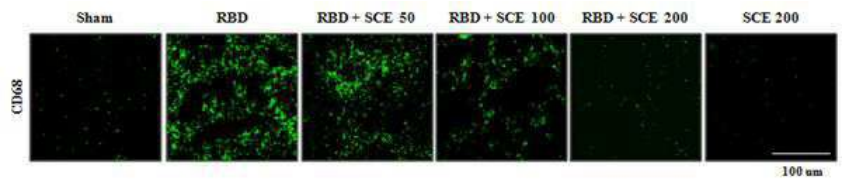
[0062] 따라서, 본 발명의 오미자 추출물은, SARS-CoV-2의 스파이크를 구성하는 단백질인 수용체 결합 도메인(receptor-binding domain, RBD)으로 유도된 호흡기 질환 마우스에서, 폐포 내의 염증세포의 침윤을 억제하고, RBD 수용체인 ACE2, 염증관련 인자인 p-STAT3 및 IL-6의 발현을 감소시키며, 염증 신호 전달 경로의 JNK, ERK, p38, I κ B 및 NF κ B의 인산화를 억제하며, 항산화인자인 Nrf2 및 NQO-1의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다.

도면

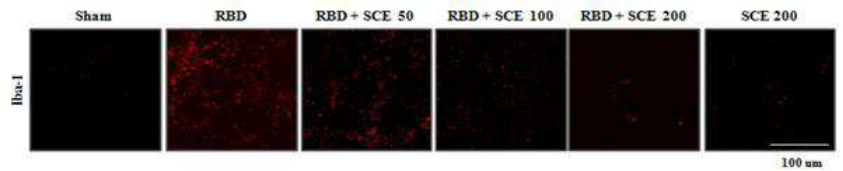
도면1



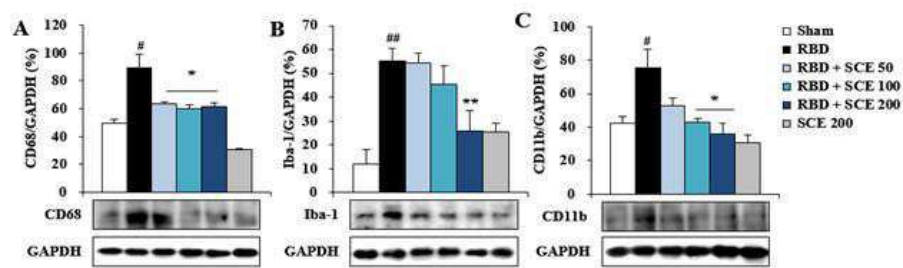
도면2



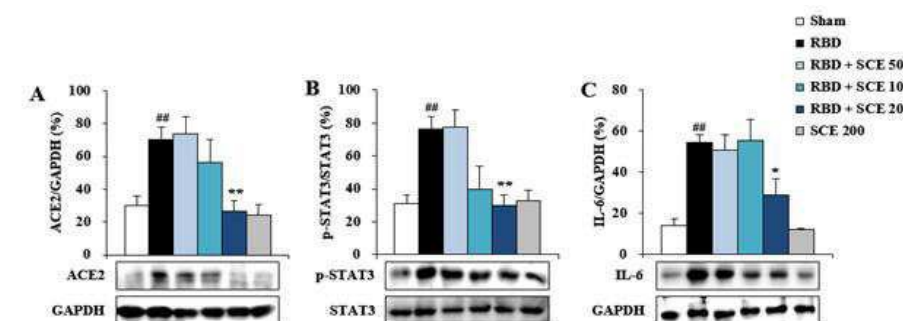
도면3



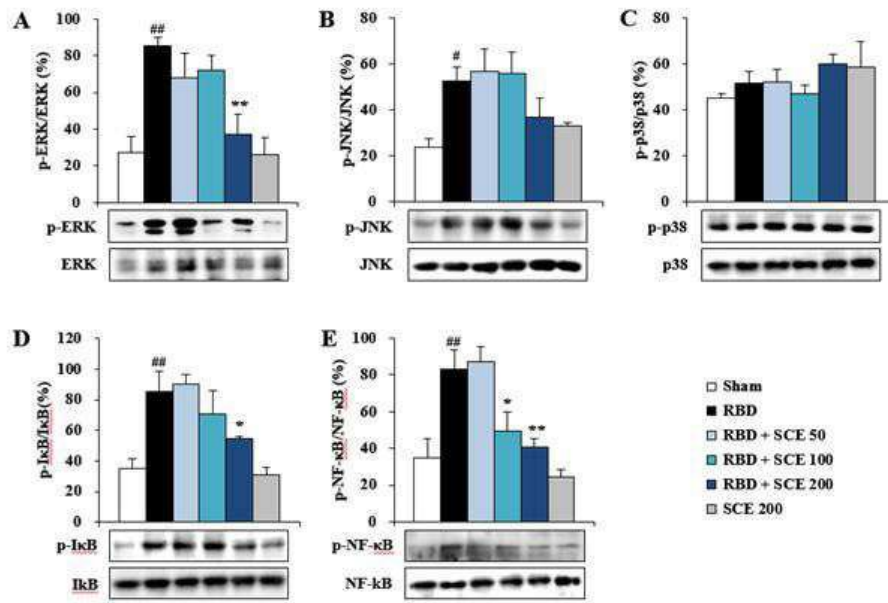
도면4



도면5



도면6



도면7

