



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0118346
(43) 공개일자 2018년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/79 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/79 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0051518
(22) 출원일자 2017년04월21일
심사청구일자 2017년04월21일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
조익현
서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호 (반포동, 반포아파트)
최중희
경북 경주시 외동읍 신기앞길 59-2
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

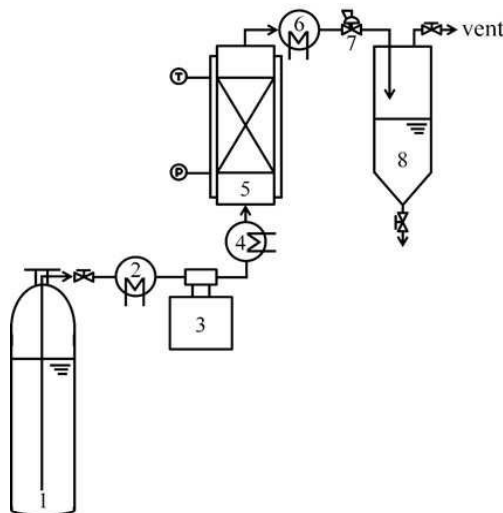
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 오미자 씨앗 추출물을 함유하는 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 오미자 씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경계 면역 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2300/44 (2013.01)
A61K 2236/37 (2013.01)

(72) 발명자

이민정

대구광역시 북구 동암로38길 19-41 (구암동)

임성규

경상북도 문경시 우지공평로 285 (공평동)

이윤우

서울특별시 관악구 낙성대로 37, 201동 401호 (봉천동, 낙성대현대아파트)

류제빈

서울특별시 관악구 남부순환로216길 18, B동 802호 (봉천동)

권동의

서울특별시 관악구 관악로 144, 601호 (봉천동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A2A1A11051240

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업

연구과제명 단핵구계열세포 특이적 JAK-STAT3 신호기전의 활성화에 의한 헌팅턴질환의 발생 및 병리기
능 연구

기 여 율 50/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016M3C7A1905074

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업/뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 신경손상 연관 뇌기능조절 microglia 타겟 발굴 및 제어 융합기술 개발

기 여 율 50/100

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

오미자 씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하고,

상기 오미자 씨앗 추출물은 100 bar 내지 600 bar의 압력 및 80 ℃ 이하 온도의 초임계 조건에서 추출된 것인 신경계 면역학적질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경계 면역학적 질환은 다발성경화증(multiple sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 길랑바레증후군(guillain-barre syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmune uveitis), 급성 파종성뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 급성 횡단척수염(acute transverse myelitis), 자가면역성뇌증(autoimmune encephalopathy) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 케모카인 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제하는 것인 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 COX-2 및 iNOS의 유전자 발현을 억제하는 것인 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 척수의 탈수초화를 억제하는 것인 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

오미자 씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하고,

상기 오미자 씨앗 추출물은 100 bar 내지 600 bar의 압력 및 80 ℃ 이하 온도의 초임계 조건에서 추출된 것인 신경계 자가면역의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 신경계 면역학적 질환은 다발성경화증(multiple sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 길랑바레증후군(guillain-barre syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmune uveitis), 급성 파종성뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 급성 횡단척수염(acute transverse myelitis), 자가면역성뇌증(autoimmune encephalopathy) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오미자 씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역(immunity)은 생체 조직으로 침입하거나 주입되는 모든 외부 고분자물질에 대한 생체의 자기보호체계의 하나이다. 면역체계의 주요한 구성성분으로 림프구(lymphocyte)가 있는데, 이는 골수(bone marrow)에서 만들어져서 혈액을 따라 림프 조직이나 기관, 주로 림프절, 비장, 편도 등으로 순환하는 백혈구다. B세포는 적절한 항원에 의해 자극되면 빠르게 증식하여, 그 항원을 중화시킬 특별한 항체(면역글로불린; immunoglobulin)를 만들어내는 클론(clone)을 형성한다. B세포가 생성하는 항체는 체액에서 순환하면서 체액성 면역(cellular immunity)을 수행한다. T세포는 흉선에서 만들어져 림프 조직으로 이동하는데, 항원을 직접 공격하는 세포매개성 면역(cellular immunity)을 담당한다.

[0003] 모든 정상 개체에 있어서 가장 중요한 특성 중의 하나는 자기(self)를 구성하고 있는 항원 물질에 대해서는 해롭게 반응하지 않는 반면, 많은 비자기(non-self) 항원에 대해서는 이를 인식하고 반응하여 제거할 수 있는 능력을 가지고 있다는 것이다. 이처럼 자기항원(self antigen)에 대한 생체의 무반응을 면역학적 무반응성(immunologic unresponsiveness) 또는 관용(tolerance)이라 한다. 이러한 자기관용을 유도하거나 계속 유지하는데 있어서 문제가 생기게 되면 자기항원에 대하여 면역반응이 일어나게 되고, 이로 인하여 자신의 조직을 공격하는 현상이 발생하면서 자가면역질환(autoimmune disease)이 생긴다.

[0004] 자가면역질환은 숙주의 면역 반응이 외래 항원을 자가 분자(자가 항원)와 구별하는데 실패하여 비정상적인 면역 반응을 유도할 때 초래된다. 자가면역 질병에서 자가 분자에 대한 면역 반응은 자가-내성의 정상적인 상태를 벗어나게 하는데, 이는 자가항원에 대해 반응할 수 있는 T 세포 및 B 세포의 파괴를 수반하며 살아있는 동안 면역계의 발육에 초기에 발생하는 사건에 의해 예방되어 왔다. 프로세싱된 펩티드를 T 세포에 결합시키고 제시하는 능력을 통해 면역 반응의 조절에서 중추적인 역할을 하는 세포표면단백질이 주조직적합 복합체(major histocompatibility complex, MHC)분자이다. MHC는 두 개의 형태는 클래스 I 또는 클래스 II로 존재하며, 둘 모두는 단일 유전자 복합체내에서 엔코딩된다. 자가면역질환은 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 유전자의 특정 대립유전자와 현저한 유전적 관련성을 갖는다.

[0005] 자가면역질환 중에는 신경계 자가면역질환(autoimmune disease in nervous system)이 있는데, 이것은 중추신경계 자가면역질환(autoimmune disease in central nervous system)으로도 불린다. 신경계 자가면역질환은 자가면역 프로세스가 뉴런의 수초(myelin sheath)의 손상에 참여하는 질환이다. 이러한 질환의 예로는 다발성경화증(multiple sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 중증근무력증(myasthenia gravis), 길랑바레증후군(guillain-barre syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmune uveitis), 급성 파종성뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 급성 횡단척수염(acute transverse myelitis), 자가면역성뇌증(autoimmune encephalopathy) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy) 등이 있다.

[0006] 자가면역질환 치료는 자기 세포에 대한 이상 반응으로 나타나는 질병이므로 주로 자기면역 기능을 억제하는 약물이 사용되고 있다. 그러나 부작용이 많아 지속적으로 사용하기 곤란하고 재발을 충분히 막지 못하여 치료에 한계가 있다. 여러 가지 면역요법들이 있으나, 아직 확실한 치료효능을 보이는 방법으로 인정된 사례는 없다. 사람 자가면역질환의 다양한 동물모델이 존재하는데, 이들은 가능 치료법을 실험하는데 사용되고 있다.

[0007] 염증반응은 척수손상 후에 나타나는 이차적 손상의 주된 요인 중 하나로서 급성, 만성 척수손상의 병리현상 조절에 중추적인 역할을 한다. 척수손상 후 염증반응은 염증과 관련한 유전자 및 단백질의 발현이나 활성이 증가되어 발생하는데, 특히 TNF- α , IL-1 β , IL-6 등의 초기 염증성사이토카인(pro-inflammatory cytokines)이나 사이클로옥시게나제(COX-2, cyclooxygenase-2), 유도형 일산화질소 합성 효소(iNOS, inducible nitric oxide synthase) 및 프로스타글란딘 합성효소(prostaglandin synthase-2) 등의 염증 매개물질이 관여한다고 알려져 있다. 이러한 물질들은 손상 후 유입된 혈액세포나 척수 내에 존재하는 미세아교세포(microglia)에서 분비되어 세포 독성을 나타내며 축삭퇴화나 탈수초화(demyelination)의 진행에도 영향을 미치게 된다. 또한, 척수손상 후에 유입되는 혈액세포 중에서 특히 호중성백혈구(neutrophil)나 대식세포(macrophage) 등이 염증반응을 유도하여

세포사멸 및 신경아교성반흔(glial scar)의 형성에 관여하고, 주위 세포의 부가적인 활성화를 야기하여 연속적인 염증 반응을 일으킨다고 알려져 있어 이들의 유입을 억제하는 것이 중요한 치료전략 중 하나로 평가되고 있다.

[0008] 다발성경화증은 인체 내 면역계의 결손에 의해 유발되는 질환으로 뇌와 척수의 백질부분의 신경을 덮는 지방질로 된 수초(myelin sheath)를 침범하여 탈수초화(demyelination)를 산발적으로 일으키는 질환으로 수초가 손상을 받아 수초층의 두께가 감소하면 신경자극은 전달되지만, 효율성이 떨어지고 이에 정상적인 신경자극 전달이 방해받아 발병되는 질병이다. 쉽게 설명하자면, 전선을 둘러싸고 있는 절연체가 손상되면 전기의 전도가 느려지는 것과 마찬가지로 신경세포 간의 전도 속도가 느려지는 현상을 초래하여 증상을 일으킨다. 초기에는 수초가 회복되면서 완화증상이 나타나지만, 결국 악화가 반복되며 손상이 영구화된다. 이 같은 수초의 손상으로 인해 신경이 적절히 작용을 하지 못하여 시야장애나 균형감 상실 등의 증상이 야기되고 일부 환자에서는 마비가 올 수 있다.

[0009] 다발성경화증의 치료는 크게 급성기 치료와 장기적인 질병완화 치료, 그리고 증상완화 치료로 나눌 수 있다. 급성기에는 일반적으로 고용량 스테로이드(steroid)의 정맥주사 요법을 사용한다. 스테로이드는 급성기에 증상을 완화시키고 회복 기간을 줄여주지만, 장기적으로 투여할 경우에는 다양한 부작용이 나타날 수 있으므로 사용에 주의를 요한다. 여러 가지 원인에 의해 질병완화 치료를 하기 어려운 환자들은 저용량 스테로이드 유지 요법을 사용하기도 한다. 대표적인 질병완화 치료제로는 인터페론(beta-interferon)과 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate)가 있다. 이들은 재발완화형 다발성경화증(relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS)에서 재발하는 횡수를 줄이고, 재발 시에 나타나는 증상을 완화하는 효과를 가지고 있다. 그러나 이차진행형으로 전환된 환자에서는 뚜렷한 효과가 나타나지 않기 때문에 이 경우에는 환자의 장애를 예방하기 위한 조기 치료가 가장 중요하다. 다발성경화증으로 인해 나타나는 여러 증상과 신경학적 장애를 줄여주기 위한 증상완화 치료도 시행한다. 이러한 치료들은 재발율이 높으며, 재발을 확실하게 방지하는 방법은 없다.

[0010] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 신경계 면역학적 질환에 효과가 있는 천연 추출물에 관한 연구개발을 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국 공개특허공보 10-2013-0078395호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 오미자 씨앗의 초임계 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 목적은 오미자 씨앗의 초임계 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 오미자 씨앗의 초임계 추출물이 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 건강기능식품의 유효 성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[0015] 이하, 본 명세서에 대하여 더욱 상세하게 설명한다.

[0016] 본 명세서에서 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.

[0017] 본 명세서에서 상기 "예방"이란 상기 약학적 조성물의 투여로 신경계 면역학적 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 상기 "치료"란 상기 약학적 조성물의 투여로 신경계 면역학적 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

- [0018] 본 발명은 오미자 씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하고, 상기 오미자 씨앗 추출물은 100 bar 내지 600 bar의 압력 및 80 ℃ 이하 온도의 초임계 조건에서 추출된 것인 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 한편, 오미자(*Schisandra chinensis*)는 지름 약 1 cm의 짙은 붉은 빛깔을 지니는 오미자 나무의 열매로써, 시잔드린(schizandrin), 고미신(gomisin), 시트랄(citral), 사과산(malic acid), 시트르산(citric acid) 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 치료하는 데 도움이 된다고 알려져 있다. 또한, 말린 열매를 찬물에 담가 붉게 우려낸 물에 꿀·설탕을 넣어 음료로 마시거나 화재나 녹말편을 만들어 먹는 것으로 알려져 있다.
- [0020] 본 발명의 '초임계 추출'은 초임계 유체를 사용하는 추출 조작으로서, 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 오미자 씨앗의 초임계 추출물의 초임계 추출 조건은 100 bar 내지 600 bar의 압력 및 80 ℃ 이하 온도의 조건에서 추출될 수 있다. 더욱 구체적으로는 오미자 씨앗의 초임계 추출물의 초임계 추출 조건은 200 bar 내지 300 bar의 압력 및 40 ℃ 내지 50 ℃의 온도 조건에서 추출될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 초임계 추출에서 초임계 유체는 이산화탄소를 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 오미자 씨앗 초임계 추출물(supercritical extract of seed of schizandrin chinensis)은 케모카인(chemokine) 및 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)의 생성을 억제하고, COX-2 및 iNOS의 유전자 발현을 억제하는 것을 후술하는 실시예들로부터 확인할 수 있다. 또한, 본 발명의 오미자 씨앗 초임계 추출물은 혈액뇌장벽(blood-brain barrier, BBB)의 손상을 억제하고, 말초로부터 T 세포의 분화와 침윤을 억제하며, 척수의 탈수초화를 억제함을 확인할 수 있다. 이는 오미자 씨앗 초임계 추출물이 NF- κ B (nuclear factor-kappa B)와 MAPKs (nitrogen-activated protein kinases) 신호전달의 억제를 유도하기 때문이다.
- [0022] 본 발명의 오미자 씨앗 추출물은 100 bar 내지 600 bar의 압력 및 80 ℃ 이하 온도의 초임계 조건에서 추출되는 것으로서 다른 조건의 초임계 추출 조건에 비하여, 질환의 신경학적인 임상 증상 척도를 더욱 효과적으로 개선하므로, 본 발명에 따른 오미자 씨앗의 초임계 추출물은 신경계 면역학적 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 예방 또는 개선용 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 케모카인은 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) 및 RANTES를 들 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명에서 상기 염증성 사이토카인은 IL (interleukin)-1 β , IL-6 및 TNF- α (tumor necrosis factor- α)을 들 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명에서의 COX-2 및 iNOS는 주요 염증 매개 인자로서 mRNA나 단백질 발현의 억제를 통하여 자가면역질환의 예방 또는 치료의 효과를 확인할 수 있는 척도가 될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 신경계 면역학적 질환은 다발성경화증(multiple sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 중증근무력증(myasthenia gravis), 길랑바레증후군(guillain-barre syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmune uveitis), 급성 파종성뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 급성 횡단척수염(acute transverse myelitis), 자가면역성뇌증(autoimmune encephalopathy) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)으로 구성된 군으로부터 선택되며, 본 발명에 있어서 상기 신경계 면역학적 질환은 구체적으로 다발성경화증이다.
- [0027] 본 발명의 오미자 씨앗의 초임계 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 중량% 내지 90 중량%로 포함하는 것이 바람직하다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물은 약효를 증가시키지는 않으나 약학적 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 성분을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 예컨대, 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 있으나, 이를 한정하지 않는다. 추가로, 상기 약학적 조성물은 단독 사용하거나 기존에 사용된 신경계 자가면역질환에 대한 예방 또는 치료 활성을 가지는 물질을 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하고 경구 또는 비경구용의 인체 또는 수

의용으로 제형화될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물을 제제화하는 경우 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose) 및 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제를 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물 및 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직강내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 개체에 투여하여 신경계 자가면역질환을 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어, "개체"는 신경계 자가면역질환 또는 이의 직, 간접적 원인에 의해 유발된 질환을 가지고 있으며, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 투여하여 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간을 포함한 말, 양, 돼지, 염소, 개 등의 포유동물을 의미하나, 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0032] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 개체에 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미한다. 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물이 표적 세포로 이동할 수 있도록 하는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 체중, 성별, 연령, 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 1일 1회 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 본 발명은 오미자 씨앗 추출물을 유효성분으로 포함하고, 상기 오미자 씨앗 추출물은 100 bar 내지 600 bar의 압력 및 80 ℃ 이하 온도의 초임계 조건에서 추출된 것인 신경계 자가면역의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0035] 본 발명에 따른 건강기능식품은 본 발명의 오미자 씨앗 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서 상기 "기능 식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 본 명세서의 상기 "기능"이란 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적인 작용으로 보건 용도에 유용한 효과를 의미할 수 있다.
- [0037] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 오미자 씨앗의 초임계 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 오미자 씨앗의 초임계 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 100 bar 내지 600 bar의 압력 및 80 ℃ 이하 온도의 초임계 조건에서 추출된 오미자 씨앗 추출물은 신경계 자가면역질환의 신경학적인 임상증상 척도를 개선하고, 척수의 탈수초화를 억제하며, 미세아교세포의 활성화를 억제하고, 혈액뇌장벽 투과성을 억제하며, 케모카인 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제하고, COX-2 및 iNOS의 유전자 발현을 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 오미자 씨앗 초임계 추출물은 신경계 면역학적 질환의 발생을 예방하거나, 치료 또는 개선용의 약제학적 조성물 또는 건강기능식품으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 오미자 씨앗의 초임계 추출물의 제조 방법에 관한 모식도이다.

도 2는 오미자 씨앗의 추출 조건을 달리하여 RAW 264.7 세포에 처리한 후, MTT 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 다발성경화증 동물모델(EAE)에서 행동학적인 검사를 통한 오미자 씨앗 추출물의 신경 보호 효과를 확인한 도이다.

도 4는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 LFB염색(A-D)과 H&E염색(E-H)을 통해 탈수초화와 면역세포의 침윤 정도를 확인한 도이다.

도 5는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 RT-PCR 분석(A와 B; CD11b), 웨스턴블롯 분석(C와 D; CD11b) 및 면역조직화학적 염색(E-H; Iba-1)을 시행하여 미세아교세포 활성도를 검사하고 정량화를 한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 RT-PCR 분석을 시행하여 염증매개인자의 활성도를 검사하고 정량화를 한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 웨스턴블롯 분석(A-C, E 및 G), RT-PCR 분석(D와 F), 면역조직화학적 염색(H-K) 및 실시간 PCR 분석(L-O)을 시행하여 혈액뇌장벽의 변화를 조사하고 정량화한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 RT-PCR 분석(A와 B), 면역조직화학적 염색(C-F) 및 실시간 PCR 분석(G-I)을 시행하여 T 세포의 활성도를 조사하고 정량화한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 웨스턴 블롯 분석을 통해 NF-kB와 MAPKs 신호기전의 활성화 정도를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니며, 이는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 해석되어야 할 것이다.

[0041] **실시예 1. 오미자씨앗의 초임계추출물(SESCLS) 준비**

[0042] 초임계 추출은 40-60 ℃의 온도 범위에서 100-400 bar로 진행되었다. 충전한 오미자 씨앗의 무게는 50 g이었으며, 추출조의 부피는 300 ml였다. 펌프의 유량은 30 ml/min이었고, 추출은 한 시간 동안 진행하였다. 표 1 및 2는 추출 조건에 따른 오미자 추출물의 양을 기재하였다.

[0043] 도 1은 오미자 씨앗의 초임계 추출물의 제조하는 공정에 관한 모식도이다. 구체적으로, 원료인 오미자 씨앗은 분쇄하여 추출기(7)에 충전하고, 액체 이산화탄소(1)는 냉각열교환기(2)를 지나 펌프(3)로 들어간다. 펌프를 지난 액체 이산화탄소는 가열열교환기(4)를 지나가면서 초임계 이산화탄소가 되고, 원하는 온도로 맞춰진 추출조(5)를 지나가며 유효성분이 풍부한 오미자 기름을 추출하게 된다. 이 때, 추출 압력은 가열열교환기(6)로 온도를 조절한 역압조절기(7)를 사용하여 조절하게 된다. 추출이 끝나면 밸브를 열어 분리기(8)에 모인 오미자씨앗의 초임계추출물을 수득한다.

[0044] [표 1]

[0045] 50 ℃ 에서 압력에 따른 오미자추출물의 양

	100 bar	200 bar	300 bar	400 bar
오미자 씨앗(g)	49.99	49.98	49.98	50.01
추출량(g)	0.82	6.70	8.30	13.67

[0046]

[0047] [표 2]

[0048] 표 300 bar 에서 온도에 따른 오미자추출물의 양

	40 ℃	50 ℃	60 ℃
오미자 씨앗(g)	50.00	49.98	50.04
추출량(g)	11.50	8.30	13.08

[0049]

[0050] 이하, 오미자 씨앗의 초임계 추출물은 'SESCS'로 칭한다.

[0052] 실시예 2. RAW 264.7 세포주 배양과 MTT 분석

[0053] RAW 264.7 세포주(큰포식세포; macrophage)는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, NY, USA) + 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO) + 1% penicillin으로 구성된 배양액으로 5% CO₂ 배양기(37℃)에서 배양하였다. 세포의 생존력에 대한 SESCO의 영향을 조사하기 위하여 MTT colorimetric assay를 사용하였다. 요약하면, 96 well plate에 RAW 264.7 세포의 현탁액(1×10^4 cells)을 넣고 SESCO (0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1,000 µg/mL)를 첨가한 다음에 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL)을 각각의 well에 첨가하고, 4시간 동안 반응시킨 다음에 상층액을 제거하고, 불용성의 물질인 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹였다. Optical density (O.D.)의 평균값은 효소결합면역흡착검사법(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)을 사용하여 540 nm의 흡광도에서 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포에서 O.D. 평균값은 100%였다.

[0054] 도 2는 오미자 씨앗의 추출 조건을 달리하여 RAW 264.7 세포에 처리한 후, MTT 분석한 결과를 나타낸 도이다. 구체적으로 3 가지의 추출조건에서 분리된 SESCO를 배양된 RAW 264.7 세포에 처리한 후, MTT 분석을 시행하였다. 3 가지의 추출 조건은 하기와 같다.

[0055] A: 300 bar/40℃

[0056] B: 200 bar/50℃

[0057] C: 300 bar/50℃

[0058] 도 2의 결과에 따르면, 2가지의 추출조건에서 분리된 SESCO의 농도를 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 및 1,000 µg/mL로 구분하여 RAW264.7 세포에 24시간 동안 처리한 다음에, MTT 분석을 통하여 세포생존에 안전한 농도를 확인한 결과, A 조건, B 조건 및 C조건에서 추출된 SESCO는 대략적으로 5 µg/mL까지 임을 확인할 수 있었다.

[0060] 실시예 3. 배양된 RAW 264.7 세포에서 SESCO의 항염증 및 항산화 효능 검증

[0061] 2×10^5 개의 RAW 264.7 세포에 SESCO를 농도별(MTT 분석으로부터 얻어진 안전한 농도; 0.1-5.0 µg/mL)로 1시간 동안 처리한 후 100 ng의 lipopolysaccharides (LPS; Escherichia coli 0111:B4; St.Louis, MO, USA)로 5시간 동안 자극하고, 세포로부터 RNA를 분리하고, cDNA를 합성하였다. Real-time polymerase chain reaction (실시간 중합효소연쇄반응; 실시간 PCR 분석)은 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 수행되었으며, 염증성 사이토카인(IL-6, TNF-α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) 및 hem oxygenase-1 (HO-1)에 대한 mRNA의 발현을 측정하였으며, 실시간 유전 증폭 분석을 위한 프라이머의 염기서열은 하기 표 3과 같다.

[0062] [표 3]

Marker	Primer	Forward Sequence (5'→3')	Reverse Sequence (5'→3')
Cytokine	TNF- α	AGC AAA CCA CCA AGT GGA GGA	GCT GGC ACC ACT AGT TGG TTG T
	IL-6	TCC ATC CAG TTG CCT TCT TGG	CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G
Inflammation	iNOS	GGC AAA CCC AAG GTC TAC GTT	TCG CTC AAG TTC AGC TTG GT
Cell apoptosis	HO-1	CCT GGA GCA GGA CAT GGC	AAT CAT CCC TTG CAC GCC
	Nrf2	TCT CCT CGC TGG AAA AAG AA	AAT GTG CTG GCT GTG CTT TA
Quantitation	GAPDH	AGG TCA TCC CAG AGC TGA ACG	CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA T

[0063]

[0064] 본 발명의 SESCOs가 배양된 RAW 264.7 세포에 대한 항염증 및 항산화 효능을 가지는지를 확인하기 위하여, 다음과 같은 실험군으로 구분하였다.

[0065] - Nor군 : LPS와 SESCOs를 투여하지 않은 정상 대조군

[0066] - LPS군 : LPS로 배양된 RAW 264.7 세포를 자극한 군

[0067] - LPS + SESCOs군 : LPS로 배양된 RAW 264.7 세포를 자극하고 하고, SESCOs (0.1-5.0 μ g/mL)을 처리한 군

[0068] 배양된 RAW 264.7 세포에 SESCOs (0.1, 0.5, 1.0 또는 5.0 μ g/mL)를 전처리하고, LPS (100 ng)로 자극한 다음에 세포를 취하고, 실시간 PCR 분석을 통하여, 항염증(IL-6, TNF- α 및 iNOS) 및 항산화 효능(Nrf-2와 HO-1)을 검증한 결과를 표 4에 나타내었다.

[0069] [표 4]

			IL-6	TNF- α	iNOS	Nrf-2	HO-1
Nor			1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
LPS (100 ng)			86.3 $\pm$ 4.3##	111.8 $\pm$ 19.8##	24.5 $\pm$ 2.7##	1.1 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.7
LPS+SCSCE (μ g/ml)	300 bar 40°C	0.5	86.9 $\pm$ 3.7	124.3 $\pm$ 21.4	24.8 $\pm$ 3.7	7.4 $\pm$ 2.2	2.6 $\pm$ 1.4
		1	69.9 $\pm$ 7.0	59.6 $\pm$ 3.8 *	9.6 $\pm$ 0.3 **	14.8 $\pm$ 2.0 *	7.6 $\pm$ 2.7 *
		5	46.4 $\pm$ 4.5 **	5.7 $\pm$ 1.7 **	7.4 $\pm$ 1.6 **	36.2 $\pm$ 12.8 **	11.7 $\pm$ 4.3 **
	200 bar 50°C	0.5	54.4 $\pm$ 13.9 **	34.9 $\pm$ 3.8 **	10.4 $\pm$ 3.1 **	7.5 $\pm$ 2.8	1.7 $\pm$ 0.1
		1	44.0 $\pm$ 14.4 **	12.3 $\pm$ 0.1 **	9.2 $\pm$ 2.8 **	21.2 $\pm$ 10.5 **	3.3 $\pm$ 0.6
		5	29.0 $\pm$ 25.9 **	7.9 $\pm$ 5.4 **	7.8 $\pm$ 0.2 **	30.1 $\pm$ 7.6 **	13.8 $\pm$ 1.6 **
	300 bar 50°C	0.5	62.2 $\pm$ 7.5 **	48.9 $\pm$ 22.1 **	9.2 $\pm$ 6.5 **	1.6 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 2.3
		1	49.9 $\pm$ 1.1 **	41.8 $\pm$ 8.3 **	5.6 $\pm$ 2.0 **	18.9 $\pm$ 2.0 **	4.1 $\pm$ 0.8
		5	27.5 $\pm$ 3.7 **	32.0 $\pm$ 11.8 **	4.4 $\pm$ 0.9 **	27.3 $\pm$ 5.3 **	9.5 $\pm$ 2.8 **

[0070]

[0071] ANOVA test; # $p < 0.05$ 와 ## $p < 0.01$ versus 정상군; * $p < 0.05$ 와 ** $p < 0.01$ versus EAE군.

[0072] 표 4의 결과를 보면, 300 bar/40°C, 200 bar/50°C 및 300 bar/50°C의 조건에서 추출된 SESCOs는 LPS에 의하여 증가된 IL-6, TNF- α 및 iNOS의 mRNA의 발현을 유의하게 억제하였으나, Nrf-2와 HO-1의 mRNA 발현을 더 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 발명의 초임계 추출 조건에 따라 추출된 SESCOs는 강력한 항염증 및 항산화 작용을 한다는 것을 확인할 수 있다.

[0074] 실시예 4. 다발성경화증 동물모델(EAE) 유도

[0075] (1) 다발성경화증 동물모델(EAE) 유도

[0076] 수초 희소돌기아교세포 당단백질(MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein)의 펩타이드를 사용하여 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 동물 모델을 유도하였다. 구체적으로, 출생 후 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스((주)나라바이오테크, 대한민국)를 준비하여 일주일 동안 안정시켰다. 마우스에 MOG 펩타이드 35-55 (Sigma-Aldrich, 미국) 200 μ g이 포함된 에멀전(emulsion)과 결핵균(mycobacterium tuberculosis; Difco, 미국) 400 μ g이 포함된 complete Freund's adjuvant (CFA; Difco, 미국)를 혼합하여, 0.1 ml의 에멀전을 EAE군의 양쪽 허리부위의 피하로 주사하였고, 동시에 백일해독소(PTX, pertussis toxin; List Biologic, 미국) 200 ng을 복강으로 주사하였다. 48시간 후에 동일한 양의 백일해독소를 복강으로 다시 주사하였다.

[0077] MOG 펩타이드에 의해 유도된 EAE 동물모델의 임상 증상의 척도를 8가지로 구분하여 확인하였다. 즉, 반응이 없음(0 단계), 꼬리 끝이 처짐(1 단계), 꼬리 전체가 처짐(2 단계), 한쪽 뒷다리의 약한 마비(3 단계), 양쪽 뒷다리의 마비(4 단계), 한쪽 앞 다리까지 마비(5 단계), 앞쪽 양쪽 다리까지 마비(6 단계) 및 죽음(7 단계)으로 구

분하였다.

[0078] (2) 다발성경화증 동물모델을 이용한 실험의 실험군 분류

[0079] 본 발명의 SESCO의 다발성경화증 동물모델에 대한 신경보호 효능을 확인하기 위해, 다음과 같은 실험군으로 구분하였다.

[0080] - Nor군 : MOG 펩타이드와 SESCO를 투여하지 않은 정상 대조군

[0081] - EAE군 : MOG 펩타이드로 EAE를 유도한 군

[0082] - EAE + SESCO군 : MOG 펩타이드로 EAE를 유도하고 SESCO (150, 300 및 600 mg/kg)를 구강으로 투여한 군

[0083] - SESCO군 : MOG 펩타이드로 EAE를 유도하지 않은 정상 마우스에 SESCO (300 mg/kg)를 구강으로 투여한 군

[0084] (3) 오미자씨앗의 초임계 추출물(SESCO)의 투여

[0085] 본 발명의 SESCO (200 bar/50℃; 150, 300 및 600 mg/kg)를 EAE를 유도한 다음 임상증상이 나타나기 시작하는 시점(7-8일째)부터 30일째까지 매일 1회씩 구강으로 투여하였다(onset treatment, 온셋투여). SESCO를 생리식염수에 희석하였으며 개체 당 투여량이 100 μ l가 되도록 하였다.

[0087] 실시예 5. 다발성경화증 동물모델(EAE)에서 행동학적인 검사를 통한 SESCO의 신경보호 효과

[0088] 도 3은 다발성경화증 동물모델(EAE)에서 행동학적인 검사를 통한 오미자 씨앗 추출물의 신경 보호 효과를 확인한 도이다. 구체적으로, 도 3에서 A, 날짜별 행동학적인 변화; B, 누적된 행동학적인 변화. ANOVA test; ##p<0.01 versus 정상군; *p<0.05와 **p<0.01 versus EAE군

[0089] 본 발명의 SESCO(200 bar/50℃; 150, 300 및 600 mg/kg)를 EAE 유도 후, 임상증상이 나타나기 시작하는 시점(7-8일째)부터 30일째까지, 매일 1회씩 구강으로 투여하며, 매일 상기의 임상 증상의 척도를 사용하여 행동학적인 변화에 대한 SESCO의 효능을 확인하였다. EAE군의 행동학적인 증상은 EAE 유도 후, 7일째에서 8일째 사이에 나타나기 시작하여 16일째에서 18일째 사이에 최고조(2.8 $\pm$ 0.18)에 도달하였으며, 그 이후에도 지속되었다. EAE 유도 후 8일째부터 30일째까지의 스코어의 합은 45.4 $\pm$ 5.2였다. 그러나 EAE + SESCO군에서의 행동학적인 증상은 EAE군에 비하여 감소하는 경향이있으며, 모든 EAE + SESCO군에서는 유의한 감소를 보였다. EAE 유도 후 8일째부터 30일째까지의 스코어의 합은 SESCO 150 mg/kg 투여군에서 28.7 $\pm$ 5.1, 300 mg/kg 투여군에서 22.0 $\pm$ 0.0 및 600 mg/kg 투여군에서 24.7 $\pm$ 2.3으로 300 mg/kg 투여군에서 가장 낮았다.

[0091] 실시예 6. 조직병리학적 분석

[0092] (1) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SESCO의 탈수초화 및 염증세포의 침윤 억제 효과 확인

[0093] SESCO (300 mg/kg)를 EAE를 유도한 후에 온셋투여(유도 후 7-8일)로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 16일 내지 18일 사이에 마우스를 에틸에테르(ethyl ether)로 흡입마취하고, 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)를 심장으로 관류하여 고정하고, 허리부위의 척수(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였다. 적출한 척수는 4% PFA에 담가 4℃에서 하루 정도 더 고정시킨 다음에, 30% 수크로스(sucrose)로 바꾸어 4℃에서 3일 이상 기간 동안 보관하여 동결손상을 방지하였다. SESCO의 EAE 동물모델에서의 탈수초화(demyelination) 현상의 억제 효과를 확인하기 위하여 수초(myelin)의 주성분인 인지질을 염색하는 룩솔 페스트 블루(luxol fast blue; LFB) 염색을 통해 탈수초화 정도를 비교하고, H&E (hematoxyline and eosin) 염색을 통해 면역세포의 침윤 정도를 비교하였다. 동결절편기를 이용하여 척수를 30 μ m 두께로 잘라 유리슬라이드에 붙여서 건조시키고, phosphate buffered saline (PBS)에 5분간 담근 후 95% 에탄올에 5분 동안 담갔다. 그 후 95% 에탄올에 녹아있는 0.1% 룩솔 페스트 블루 용액에 조직을 담가 56℃에서 14시간 동안 방치한 다음 0.5% 리튬 카보네이트(lithium carbonate) 용액과 70% 에탄올 및 증류수에 순서대로 각각 30초씩 담그는 과정을 5-6회 반복하여 색을 조절한 뒤 95%와 100% 에탄올에 각각 5분씩 담가 탈수한 후 자일렌(xylene)에 담근 뒤 커버 그라스를 덮었다. 척수 바깥 부분의 백질(white matter)에는 축삭(axon)이 존재하기 때문에 정상 조직을 염색한 경우에는 척수 백질이 진한 파란색으로 나타나지만, 탈수초화 현상으로 인하여 수초가 소실되게 되면 듬성듬성 염색이 되며 흐린 파란색을 띤다. 또한, 염증 세포(inflammatory cells)의 침윤(infiltration) 정도를 확인하기 위하여 H&E 염색을 수행하였다. 구체적으로, 상기와 동일한 방법으로 준비한 척수조직 슬라이드를 헤마톡실린(hematoxyline) 용

액에서 3분간 염색하고, 증류수로 1분씩 세 번 세척하였다. 연속하여, 에오진(eosin) 용액에서 10분간 염색하고 증류수로 1분씩 세 번 세척하였으며, 70%, 90%, 95%, 100% 에탄올에서 순서대로 2분간 탈수한 후 자일렌(xylene)에 담근 뒤 커버 글라스를 덮었다.

[0094] (2) 면역조직화학염색법

[0095] SESCO(300 mg/kg)를 EAE를 유도한 후에 온셋투여(유도 후 7-8일)로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 16일 내지 18일 사이에 마우스를 마취하고, 상기 조직병리학적 분석과 동일한 방법으로 동결 절편을 제작하였다. 염색 방법은 절편을 블로킹 솔루션 [200 μ g 소혈청알부민(BSA, Bovin serum albumin, sigma, 미국), 500 μ l FBS (Fetal bovine serum, Gibco, 독일), 500 μ l NGS (Normal goat serum, Vector, 미국) 및 10 μ l Triton X-100 (Sigma, 미국)을 PBS에 넣어 10 ml을 만듦]을 넣은 플레이트에 담가 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 수세한 후 1차 항체[Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1, 미세아교세포의 마커), GFAP (glial fibrillary acidic protein, 별아교세포의 마커) 및 CD3 (T cell의 마커)]를 블로킹 솔루션에 희석한 용액으로 교체하고 12시간 이상 반응시켰다. PBS로 수세한 후 2차 항체를 PBS에 1:200으로 희석한 용액으로 교체하고 1시간 반응한 후 PBS로 수세하였다. 그리고 아비딘-바이오틴화 겨자무과산화효소(avidin-biotin horseradish peroxidase)-복합체 (1:200; Vector Laboratories) 및 3,3'-diamino-benzidine를 이용하여 단백질의 발현을 확인하였다.

[0096] (3) 웨스턴블롯 분석

[0097] MOG 펩타이드로 유도한 동물 모델에서 탈수초화, 신경아교세포의 활성화, 염증성사이토카인의 분비 및 염증기작의 활성화에 대해 SESCO의 억제 효과를 확인하기 위해 다양한 마커들의 발현을 웨스턴 블롯을 이용해서 확인하였다. EAE를 유도한 후에 SESCO(300 mg/kg)를 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 18일 사이에 마우스를 마취하여 안락사시킨 뒤 허리부위의 척수(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였고, 이를 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 25 μ g은 10% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인 (membrane, Gendepot, 영국)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 탈지유 (skimmed milk, BD, 미국)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBST (mixture of Tris-Buffered Saline and Tween 20)로 씻은 후 1차 항체[CD11b(단핵구 마커), glial fibrillary acidic protein (GFAP; 별아교세포 마커), platelet and endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1과 fibronectin (혈액내장벽의 마커), phospho-nuclear factor kappa B (p-NF-kB), phospho-I-kappa-B (p-IkB), phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2(p-ERK), phospho-c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) 및 phospho-p38 (p-p38) 및 GAPDH]를 3% 탈지유에 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 하루 동안 반응시킨 후 TBST로 10분씩 3회 씻고, 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST에 씻은 뒤 ECL system (Santacruz, 미국)으로 밴드를 확인하였다. 단백질의 확인 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad)를 이용하였다.

[0098] (4) 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction)

[0099] MOG 펩타이드로 유도한 EAE 동물모델에서 염증성사이토카인의 분비 및 염증기작의 활성화에 대한 SESCO의 억제 효과를 확인하기 위하여 실시간 PCR 분석을 이용하여 mRNA 발현을 확인하였다. SESCO(300 mg/kg)를 EAE를 유도한 후에 온셋투여로 투여한 후 임상증상이 가장 심한 시기인 14일 내지 18일 사이에 마우스를 마취하여 안락사한 뒤 허리부위의 척수(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였다. 척수조직에 트리졸(Trizol, Invitrogen, 미국) 1 ml을 넣고 분쇄기로 갈고, 원심분리하여 RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위해 0.5 μ g의 Oligo dT, 0.5 mM dNTP mix, 5x first-strand buffer, RNase out, 5 mM dithiothreitol (DTT), 및 M-MLV 역전사효소를 포함하는 반응혼합물(reaction mixture) 중에서 1 μ g의 총 RNA를 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. RT-PCR 분석은 RT-PCR kit의 제조사의 메뉴얼에 따라 수행되었다(Roche, Germany). PCR용 프라이머의 염기서열은 아래의 표 5와 같다. PCR 증폭을 위해, 특정 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍은 6 μ l of PCR Master Mix (Lucigen, WI, USA) 중에서 1 μ l의 cDNA 및 0.6 U의 Econo TaqDNA 중합효소를 반응시켰다. 결과물의 5-7 μ l를 2% 아가로스 젤에서 전기영동하고 트랜스일루미네이터에서 브롬화 에티듐(ethidium bromide)으로 염색한 후에 확인하였다. 각 유전자의 발현 수준은 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)로 표준화하였다.

[0100] [표 5]

타겟 유전자	프라이머			
	명칭	서열	방향	서열번호
CD11b	CD11b_F	TGC TTA CCT GGG TTA TGC TTC TG	정방향	서열번호 : 1
	CD11b_R	CCG AGG TGC TCC TAA AAC CA	역방향	서열번호 : 2
CD3	CD3_F	CTC TGG GCT TGC TGA TGG	정방향	서열번호 : 3
	CD3_R	GGT TGG GAA CAG GTG GTG	역방향	서열번호 : 4
Claudin-3	Claudin-3_F	CTG GGA GGG CCT GTG GAT GAA CT	정방향	서열번호 : 5
	Claudin-3_R	TCG CGG CGC AGA ATA GAG GAT	역방향	서열번호 : 6
COX-2	COX-2_F	CAG TAT CAG AAC CGC ATT GCC	정방향	서열번호 : 7
	COX-2_R	GAG CAA GTC CGT GTT CAA GGA	역방향	서열번호 : 8
GAPDH	GAPDH_F	AGG TCA TCC CAG AGC TGA ACG	정방향	서열번호 : 9
	GAPDH_R	CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA T	역방향	서열번호 : 10
GFAP	GFAP_F	CGA GTC CCT AGA GCG GCA AAT G	정방향	서열번호 : 11
	GFAP_R	CGG ATCT GGA GGT TGG AGA AAG TC	역방향	서열번호 : 12
ICAM-1	ICAM1_F	TGC GTT TTG GAG CTA GCG GAC CA	정방향	서열번호 : 13
	ICAM1_R	CGA GGA CCA TAC AGC ACG TGC AG	역방향	서열번호 : 14
IFN- γ	IFN- γ _F	ACA ATG AAC GCT ACA CAC TGC AT	정방향	서열번호 : 15
	IFN- γ _R	TGG CAG TAA CAG CCA GAA ACA	역방향	서열번호 : 16
IL-1 β	IL1b_F	TTG TGG CTG TGG AGA AGC TGT	정방향	서열번호 : 17
	IL1b_R	AAC GTC ACA CAC CAG CAG GTT	역방향	서열번호 : 18
IL-17	IL-17_F	GTG TCT CTG ATG CTG TTG	정방향	서열번호 : 19
	IL-17_R	AAC GGT TGA GGT AGT CTG	역방향	서열번호 : 20
IL-4	IL-4_F	CGA AGA ACA CCA CAG AGA GTG AGC T	정방향	서열번호 : 21
	IL-4_R	GAC TCA TTC ATG GTG CAG CTT ATC G	역방향	서열번호 : 22
IL-6	IL6_F	TCC ATC CAG TTG CCT TCT TGG	정방향	서열번호 : 23
	IL6_R	CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G	역방향	서열번호 : 24
iNOS	iNOS_F	GGC AAA CCC AAG GTC TAC GTT	정방향	서열번호 : 25
	iNOS_R	TCG CTC AAG TTC AGC TTG GT	역방향	서열번호 : 26
MCP-1	MCP-1_F	CTT CTG GGC CTG CTG TTC A	정방향	서열번호 : 27
	MCP-1_R	CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA	역방향	서열번호 : 28
MIP-1 α	MIP-1 α _F	CAG CCA GGT GTC ATT TTC CT	정방향	서열번호 : 29
	MIP-1 α _R	AGG CAT TCA GTT CCA GGT CA	역방향	서열번호 : 30
RANTES	RANTES_F	ACA CCA CTC CCT GCT GCT TT	정방향	서열번호 : 31
	RANTES_R	GAC TGC AAG ATT GGA GCA CTT G	역방향	서열번호 : 32
TNF- α	TNF α _F	AGC AAA CCA CCA AGT GGA GGA	정방향	서열번호 : 33
	TNF α _R	GCT GGC ACC ACT AGT TGG TTG T	역방향	서열번호 : 34
VCAM-1	VCAM-1_F	CCT CAC TTG CAG CAC TAC GGG CT	정방향	서열번호 : 35
	VCAM-1_R	TTT TCC AAT ATC CTC AAT GAC GGG	역방향	서열번호 : 36
ZO-1	ZO-1_F	AAG GCA ATT CCG TAT CGT TG	정방향	서열번호 : 37
	ZO-1_R	CCA CAG CTG AAG GAC TCA CA	역방향	서열번호 : 38

[0101]

[0102] (5) 통계처리

[0103] 모든 결과는 SPSS 21.0 package (SPSS Inc, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였으며, 실험결과는 mean $\pm$ standard deviation(평균 $\pm$ 표준편차) 값으로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 ANOVA(일원배치 분산분석)를 이용하여 분석 후 Tukey post hoc로 사후분석하였고, 유의확률값(p-value)은 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 미만인 경우에만 인정하였다.

[0105] 실시예 7. 조직병리학적 분석 결과

[0106] (1) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SESCO의 탈수초화 및 염증세포의 침윤 억제 효과

[0107] SESCO의 탈수초화 현상의 억제 효과를 확인하기 위하여, EAE를 유도한 후, 16-18일째에 척수의 조직절편을 제작하여, 수초의 주성분인 인지질을 염색하는 룩솔 페스트 블루(LFB) 염색을 시행하였고, 면역세포의 침윤 정도를 비교하기 위하여 H&E염색을 시행하였다.

[0108] 도 4는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 LFB염색(A-D)과 H&E염색(E-H)을 통해 탈수초화와 면역세포의 침윤 정도를 확인한 도이다. (A와 E, 정상군; B와 F, EAE군; C와 G, EAE + SESCO (300 mg/kg)군; D와 H, EAE + SESCO (600 mg/kg)군; I, 탈수초화 정도의 정량적 결과; J, 면역세포의 침윤 정도의 정량적 결과. Bar = 100 μ m. ANOVA test; ## $p < 0.01$ versus 정상군; * $p < 0.05$ 와 ** $p < 0.01$ versus EAE군.)

[0109] 도 4의 결과를 보면, EAE군은 정상군에 비하여 탈수초화와 면역세포의 침윤 정도가 증가되었으며, SESCO 투여군은 EAE군에 비하여 탈수초화 정도와 염증세포의 침윤 정도가 감소된 것을 확인할 수 있다.

[0110] (2) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SESCO의 미세아교세포 활성화 억제 효과

[0111] SESCO의 미세아교세포의 활성화 억제 효과를 확인하기 위하여, EAE를 유도한 후, 16-18일째에 척수를 채취하여, CD11b에 대한 분자학적 검사(웨스턴블롯과 RT-PCR 분석)와 Iba-1에 대한 면역염색을 수행하였다.

[0112] 도 5는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 RT-PCR 분석(A와 B; CD11b), 웨스턴블롯 분석(C와 D; CD11b)

및 면역조직화학적 염색(E-H; Iba-1)을 시행하여 미세아교세포 활성도를 검사하고 정량화를 한 결과를 나타낸 도이다. (Bar = 100 μ m. B와 D는 A와 C의 정량적인 결과. ANOVA test; #p < 0.05와 ##p<0.01 versus 정상군; *p<0.05 versus EAE군.)

[0113] 도 5를 보면, 그 결과, 척수에서 CD11b의 mRNA와 단백질의 발현은 EAE군에서 증가되었으나, EAE + SESCO군에서는 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한, 활성화된 Iba-1(+) 미세아교세포가 EAE군에서 증가되었으나, EAE + SESCO군에서는 감소된 것을 확인할 수 있다.

[0114] (3) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SESCO의 염증매개인자의 발현 억제 효과

[0115] SESCO의 염증매개인자의 발현을 억제하는 기능을 확인하기 위하여 EAE를 유도한 후, 16-18일째에 척수를 채취하여, 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석을 하였다.

[0116] 도 6은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 RT-PCR 분석을 시행하여 염증매개인자의 활성도를 검사하고 정량화를 한 결과를 나타낸 도이다. (A, MCP-1; B, MIP-1 α ; C, RANTES; D, IL-1 β ; E, IL-6; F, TNF- α ; G, COX-2; H, iNOS. ANOVA test; #p < 0.05와 ##p<0.01 versus 정상군; *p<0.05와 **p<0.01 versus EAE군.)

[0117] 도 6에 나타낸 바와 같이, 대표적인 케모카인(MCP-1, MCP-1 α 및 RANTES), 전염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α), COX-2 및 iNOS에 대한 mRNA 발현이 EAE군에서 증가되었으나, EAE + SESCO군에서는 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0118] (4) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SESCO의 혈액뇌장벽 투과성 억제 효과

[0119] EAE 동물 모델의 척수에서 SESCO의 혈액뇌장벽 투과성 조절효과를 검증하였다. 대표적인 혈액뇌장벽의 마커인 PECAM-1과 fibronectin의 단백질 발현 정도를 확인한 결과를 도 7에 나타내었다.

[0120] 도 7은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 웨스턴블롯 분석(A-C, E 및 G), RT-PCR 분석(D와 F), 면역조직화학적 염색(H-K) 및 실시간 PCR 분석(L-O)을 시행하여 혈액뇌장벽의 변화를 조사하고 정량화한 결과를 나타낸 도이다. 구체적으로, 혈액뇌장벽의 마커(PECAM-1, fibronectin), 별아교세포의 마커(GFAP), 세포부착분자(ICAM-1, VCAM-1) 및 연결분자(ZO-1, claudin-3)의 mRNA나 단백질 발현의 정도를 검사하였다. (ANOVA test; #p < 0.05와 ##p<0.01 versus 정상군; *p<0.05와 **p<0.01 versus EAE군.)

[0121] 도 7의 결과를 보면, 두 단백질의 발현은 EAE군에서 증가되었으나, EAE + SESCO군에서는 감소되었다(도 7A-7C). 혈액뇌장벽의 주요 구성성분의 하나인 GFAP의 발현을 확인한 결과, GFAP의 mRNA와 단백질 발현 정도와 GFAP 면역양성 별아교세포의 활성화의 정도는 EAE군에서 증가하였으나, EAE + SESCO군에서 감소하였다(도 7D-7K). 또한, 세포접착물질(ICAM-1과 VCAM-1)과 연결물질(Zona occluden-1과 claudin-3)에 대한 mRNA의 발현 정도도 EAE군에서 증가하였으나, EAE + SESCO군에서 감소하였다(도 7L-7O).

[0122] (5) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SESCO의 T 세포 분화 및 침윤 억제 효과

[0123] SESCO의 T 세포의 분화/침윤에 대한 조절 효과를 확인하기 위하여 EAE를 유도한 후, 16-18일째에 척수를 채취하여, T세포의 마커인 CD3에 대한 프라이머를 사용하여 RT-PCR 분석과 CD3에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학적 염색을 수행한 결과를 도 8에 나타내었다.

[0124] 도 8은 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 RT-PCR 분석(A와 B), 면역조직화학적 염색(C-F) 및 실시간 PCR 분석(G-I)을 시행하여 T 세포의 활성도를 조사하고 정량화한 결과를 나타낸 도이다. (CD3, T 세포의 마커; INF-r, Th1 세포의 분비물; IL-4, Th2 세포의 분비물; IL-17, Th17 세포의 분비물.)

[0125] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, CD3의 mRNA 발현과 CD3에 대한 면역양성반응은 EAE군의 척수에서 증가하였으나, EAE + SESCO군의 척수에서는 감소하였다(도 8A-8F). 또한, INF-r (Th1 세포의 분비물)와 IL-17(Th17 세포의 분비물)의 mRNA 발현도 EAE군의 척수에서 증가하였으나, EAE + SESCO군의 척수에서는 감소하였다(도 8G와 8I). 그러나 IL-4의 mRNA 발현은 EAE 유도와 SESCO 투여에 의하여 유의하게 영향을 받지 않음을 확인할 수 있었다(도 8H).

[0126] (6) 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 SESCO의 NF- κ B와 MAPKs 신호기전 억제 효과

[0127] EAE 동물모델의 척수에서 SESCO가 염증반응을 억제하는지를 확인하기 위하여, EAE를 유도한 후, 16-18일째에 척수를 채취하고, 웨스턴 블롯 분석을 시행하여 NF- κ B와 MAPKs 신호기전의 활성화 정도를 검증한 결과를 도 9에 나타내었다.

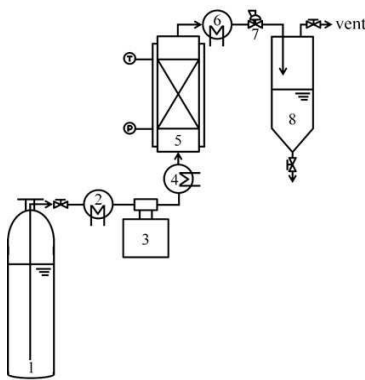
[0128] 도 9는 다발성경화증 동물모델(EAE)의 척수에서 웨스턴 블롯 분석을 통해 NF- κ B와 MAPKs 신호기전의 활성화 정도를 나타낸 도이다. (A, p-NF- κ B; B, p-I κ B; C, p-ERK, D, p-JNK; E, p-p38. ANOVA test; #p < 0.05 versus 정상군; *p<0.05 versus EAE군.)

[0129] 그 결과 도 9에 나타낸 바와 같이, p-NF- κ B, p-I κ B, p-ERK, p-JNK 및 p-p38의 단백질 발현은 EAE군의 척수에서 증가하였으나, EAE + SESCO군의 척수에서는 감소한 것을 확인할 수 있었다.

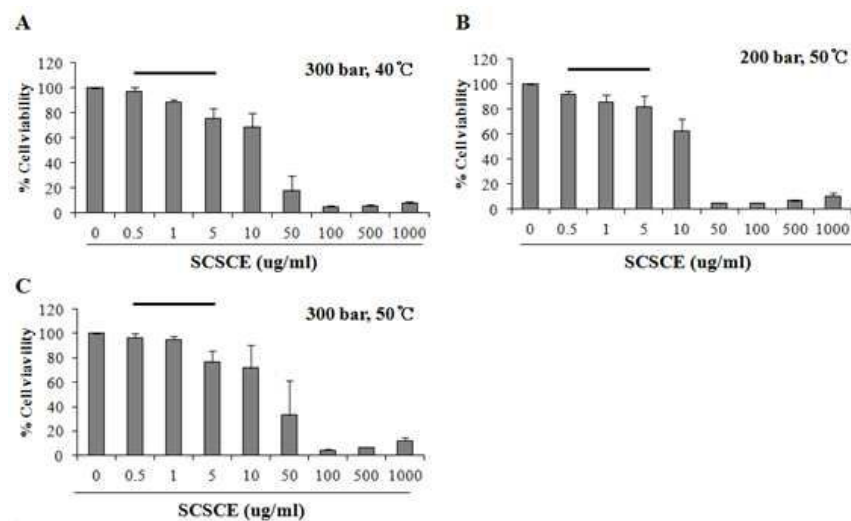
[0130] 상기 실시예들의 결과로 보아, 본 발명에 따른 초임계 조건에서 추출된 오미자 씨앗 추출물은 신경계 자가면역 질환의 신경학적인 임상증상 척도를 개선하고, 척수의 탈수초화를 억제하며, 미세아교세포의 활성화를 억제하고, 혈액뇌장벽 투과성을 억제하며, 케모카인 및 염증성 사이토카인의 생성을 억제하고, COX-2 및 iNOS의 유전자 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 오미자 씨앗 초임계 추출물은 신경계 면역학적 질환의 발생을 예방하거나, 치료 또는 개선용의 약제학적 조성물 또는 건강기능식품으로 유용하다.

도면

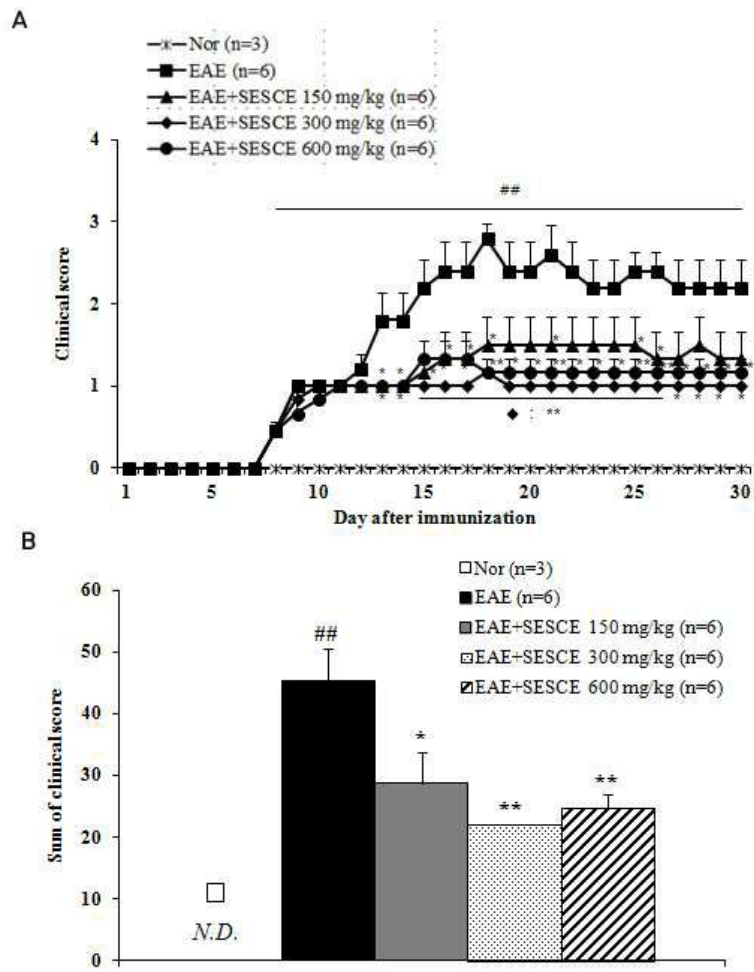
도면1



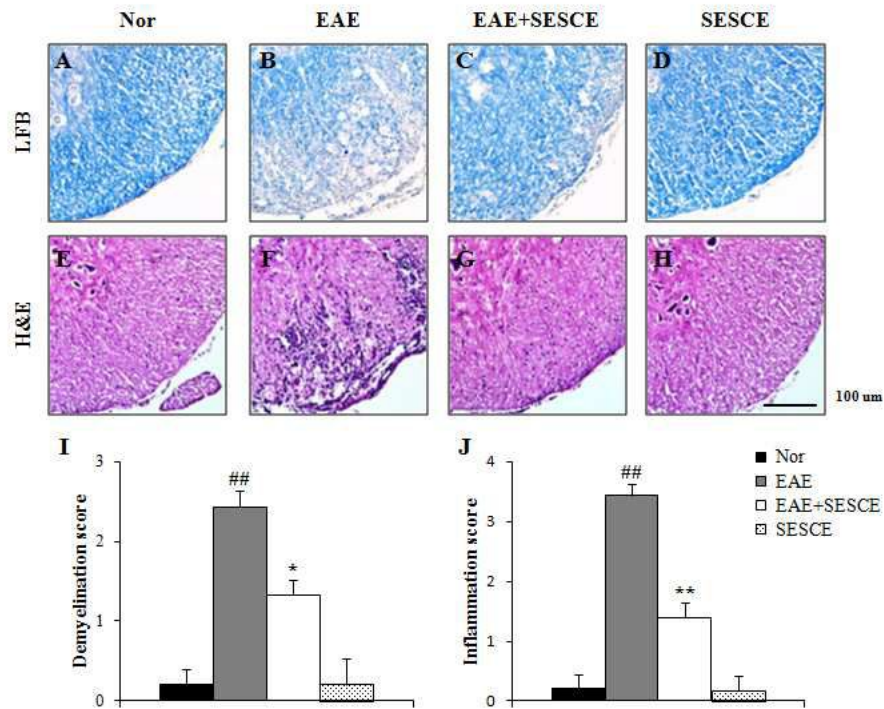
도면2



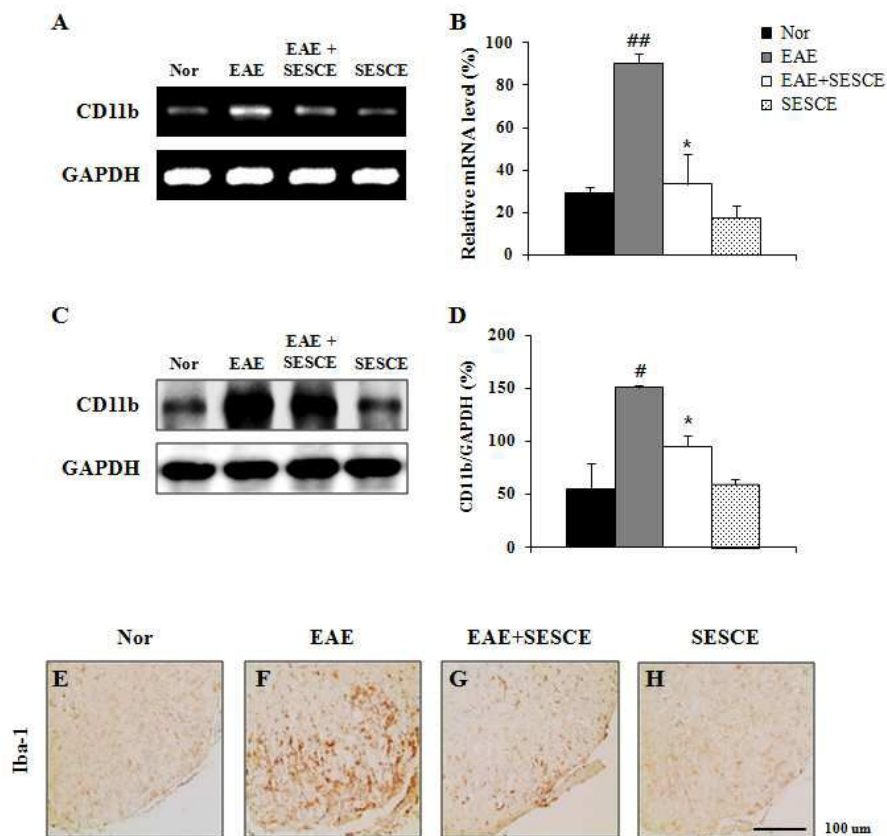
도면3



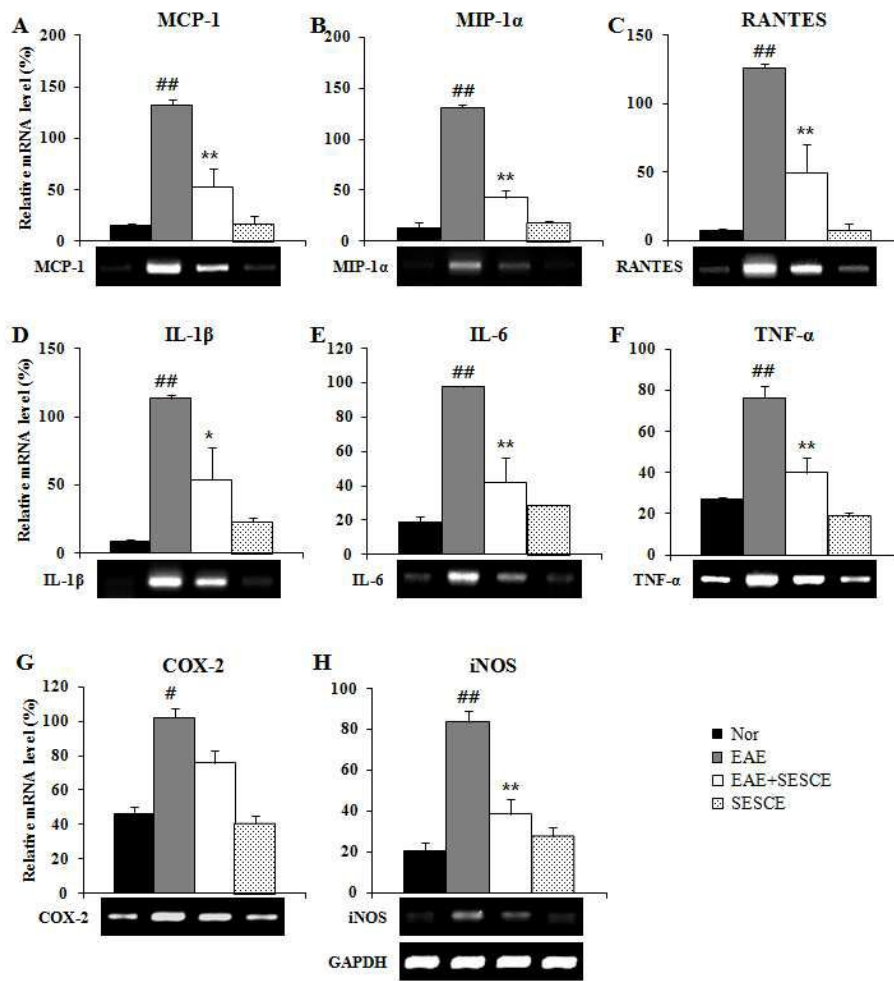
도면4



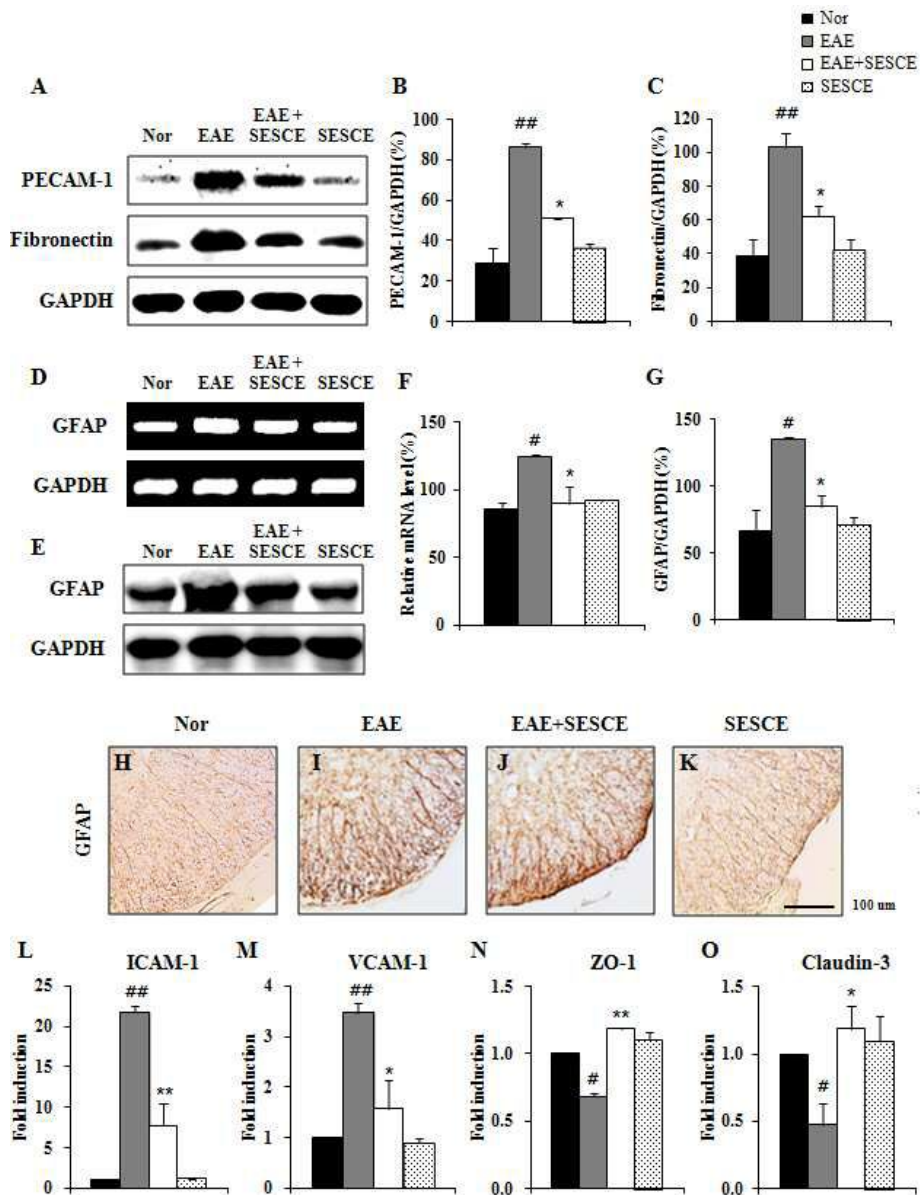
도면5



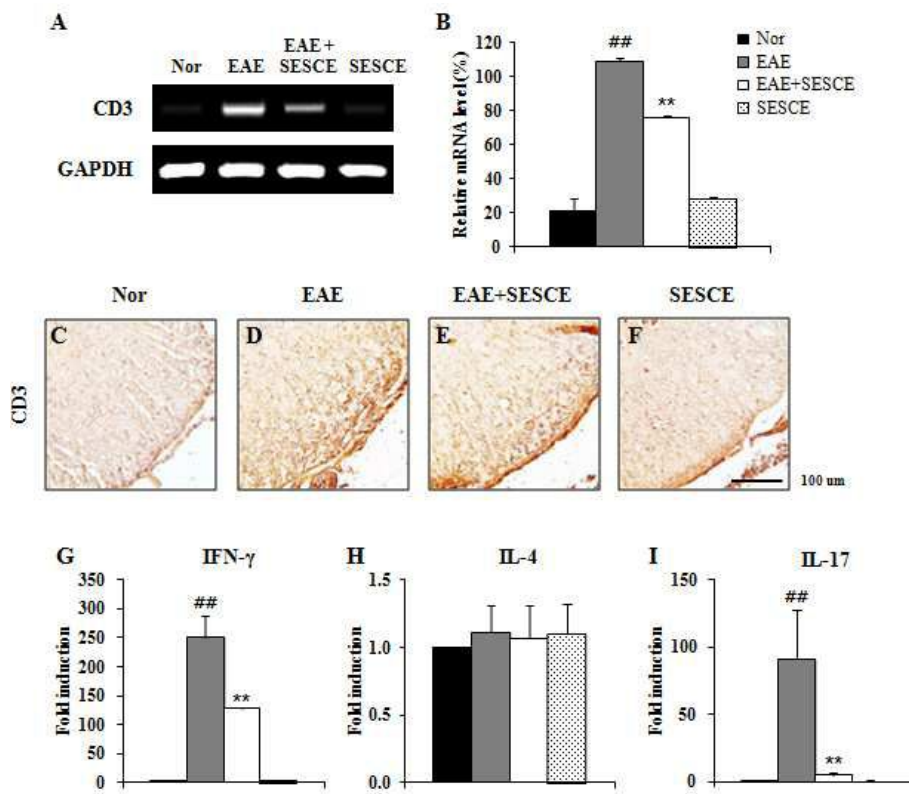
도면6



도면7



도면8



도면9

