(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0143707
(43) 공개일자 2021년11월29일

(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 10-2021-0159483(분할)
(22) 출원일자 2021년11월18일
심사청구일자 2021년11월18일
(62) 원출원 특허 10-2015-0082810
원출원일자 2015년06월11일
심사청구일자 2018년11월15일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
조익현
서울특별시 서추구 신반포로 32, 19동 509호(반포동, 반포아파트)
김은정
서울특별시 동대문구 천장산로7길 10-14(이문동)
최종희
경상북도 경주시 외동읍 입실시장길 12-3
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 6 항

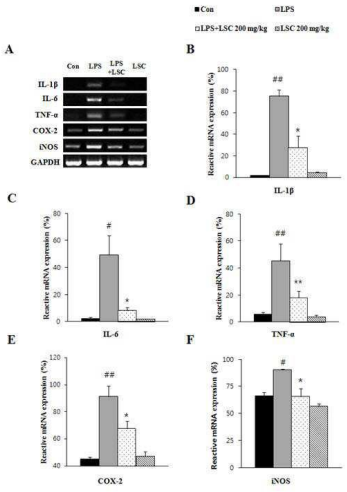
(54) 발명의 명칭 **오미자 잎 추출물을 함유하는 파킨슨 질환 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 오미자 잎을 포함하는 뇌졸중, 파킨슨 질환 및/또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

본 발명의 오미자 잎 추출물은 신경 염증을 감소시키고, 미세 아교 세포의 활성을 억제하며, 뇌 신경세포를 보호하는 효과가 우수하여, 뇌졸중, 파킨슨 질환 및/또는 퇴행성 신경질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A23V 2200/322 (2013.01)
A61K 2236/331 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465013147
과제번호 HI13C0263000013
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 한의약선도기술개발
연구과제명 자가면역성 다발성 경화증 동물모델에서 형방패독산의 신경보호효과 및 작용기전 연구
기 여 율 50/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2013.05.15 ~ 2015.05.14
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711016584
과제번호 2014R1A2A1A11051240
부처명 미래창조과학부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업/도약연구
연구과제명 단핵구계열세포 특이적 JAK-STAT3 신호기전의 활성화에 의한 헌팅턴질환의 발생 및 병리기능 연구
기 여 율 50/100
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

오미자 잎 열수 추출물을 유효성분으로 포함하고,

상기 추출물은 물을 추출용매로 하여 추출된 것이며,

상기 오미자 잎 열수 추출물은 오미자 잎 및 추출용매가 1 : 10의 중량비로 혼합되어 추출되어지는 것인,

뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환은, 미세아교세포 활성화 인자인 IBA-1의 발현이 증가되고, 미세아교세포 마커인 CD11b의 발현이 증가하며, TNF-α, IL-1β 및 IL-6로 이루어진 군에서 선택된 염증인자가 증가된 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 질환, 헌팅턴병, 피크병, 크로이펠츠-야콥병, 전두측두치매, 루이치매, 근육위축가쪽경화증, 피질기저퇴행증, 다계통위축병, 진행성핵상마비, 신경계자가면역질환, 염증성 및 신경병증성 통증, 및 뇌혈관질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 파킨슨 질환인 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

오미자 잎 열수 추출물을 유효성분으로 포함하고,

상기 추출물은 물을 추출용매로 하여 추출된 것이며,

상기 오미자 잎 열수 추출물은 오미자 잎 및 추출용매가 1 : 10의 중량비로 혼합되어 추출되어지는 것인,

뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로서,

상기 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환은, 미세아교세포 활성화 인자인 IBA-1의 발현이 증가되고, 미세아교세포 마커인 CD11b의 발현이 증가하며, TNF-α, IL-1β 및 IL-6로 이루어진 군에서 선택된 염증인자가 증가된 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 뇌졸중, 치매, 알츠하이머병, 파킨슨 질환, 헌팅턴병, 피크병, 크로이펠츠-야콥병, 전두측두치매, 루이치매, 근육위축가쪽경화증, 피질기저퇴행증, 다계통위축병, 진행성핵상마비, 신경계자가면역질환, 염증성 및 신경병증성 통증, 및 뇌혈관질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 파킨슨 질환인 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 뇌졸중, 파킨슨 질환 및/또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우리나라는 지난 2000년 65세 이상 인구가 총인구에서 차지하는 비중이 7.2%에 이르러 고령화 사회에 들어섰으며, 오는 2019년에는 이 비율이 14%를 넘어 고령사회에 진입할 것으로 전망되고 있다. 이와 같이 최근 고령화 문제가 사회적인 이슈로 대두됨에 따라 고령인구의 특성이나 주거, 보건, 문화, 여가 등 노인복지 등에 대한 국민의 관심이 높아지고, 이에 대한 통계 수요도 늘어나고 있다. 이러한 변화의 핵심은 노령화 인구의 증가로 인해서 지난 50여년 간 사망의 주된 원인이 되었던 급성 전염성 질병보다는 만성 퇴행성 질병이 더욱 큰 문제로 대두되고 있다는 점이다. 특히, 만성 퇴행성 질병 중에서 뇌혈관 질환에 의한 사망은 단일질환에 의한 사망률 중에서 2위를 기록하고 있는 매우 중요한 질환이다. 이러한 질환의 예방 및 치료를 위하여, 국내의 경우 다수의 천연물질이 뇌졸중을 비롯한 퇴행성 신경질환의 예방에 효과가 있는 건강식품으로 시판되고 있으나, 이들 대부분은 과학적인 검증을 거치지 않은 것이 많으며, 오히려 건강식품 남용의 원인이 되기도 하여 사회적인 문제가 되고 있다.

[0003] 퇴행성 신경질환은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 운동 및 감각기능의 손상, 기억, 학습, 연산 추리 등의 고차적원인 기능의 저해와 같은 여러 가지 증상을 유발하는 질환이다. 대표적인 질환으로는 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease) 및 기억장해 등이 있다. 퇴행성 신경질환은 급격히 혹은 천천히 진행되는 괴사(necrosis)나 아폽토시스(apoptosis)에 의한 신경 세포의 사멸로 특징지어진다. 따라서 신경세포의 사멸기전에 대한 이해는 중추신경계 질환의 예방, 조절 및 치료법 개발을 위하여 반드시 이루어져야 한다.

[0004] 중추신경계는 신경세포와 신경교세포로 이루어져 있다. 신경교세포는 뇌 속에 가장 많이 분포되어 있는 세포로서 전체 뇌세포의 90%, 부피로는 뇌 전체의 50%를 차지하고 있다. 이 세포들은 그 자체로는 신경충격을 생성시키지 못하지만 신경원들이 고유의 기능을 수행하는데 도움을 주며, 뇌 조직이 손상되었을 때 이를 회복시키는데도 매우 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 상기 신경교세포는 다시 성상세포(astrocytes), 미세아교세포(microglia) 및 희소돌기아교세포(oligodendroc ytes)의 세 종류로 구성되어 있다.

[0005] 이들 중에서 미세아교세포(microglia)는 미세교세포, 또는 소교세포로도 불리며 중추신경계(central nervous system, CNS)에 상재하는 면역세포로서 전체 뇌 세포의 5-10%를 차지한다.

[0006] 상기 미세아교세포는 중추신경계에서 일차 방어라인으로서 기능한다. 미세아교세포는 중추 신경계에서 염증 매개자의 주요 세포 내공급원이다. 미세아교세포는 일산화질소(NO), 반응성 산소종(reactiveoxygen species, ROS), 전염증성 사이토카인 및 프로스타글란딘을 생산함으로써 신경염증에 관여한다. 활성화된 미세아교세포는 손상된 신경 조직 영역으로 이동하여 미생물 및 세포 파편(cell debris)을 포식하고 파괴한다.

[0007] 그러나 염증세포로서의 미세아교세포의 역할은 항상 유익한 것만은 아니다. 조절되지 않은 미세교세포의 활성화와 지속적인 과도한 신경염증은 퇴행성 신경질환(neurodegenerative diseases)을 포함하는 다양한 중추신경계 병리의 원인으로 여겨지고 있다. 즉, 기능적으로 활성화된 미세아교세포는 염증매개물질을 생성 및 분비하여 신경세포 사멸을 초래하는 것으로 알려져 있다.

[0008] 따라서 미세아교세포의 활성화는 다양한 종류의 퇴행성 신경질환과 관련이 있다. 예를 들어, 알츠하이머 질환의 경우에도 노용균반점(senile plague)의 형성에 소교세포가 중요한 역할을 한다는 것은 매우 잘 알려져 있다. 이브프로펜 등과 같은 소염제가 노용균 반점의 형성을 억제하며 치매 발병을 예방할 수 있다는 것이 중요한 예이다.

[0009] 한편, 오미자(*Schisandra chinensis*)는 지름 약 1 cm의 짙은 붉은 빛깔을 지니는 오미자 나무의 열매로써, 시잔드린, 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 치료하는 데 도움이 된다고 알려져 있다. 또한, 말린 열매를 찬물에 담가 붉게 우러난 물에 꿀·설탕을 넣어 음료로 마시거나 화채나 녹말편을 만들어 먹는 것으로 알려져 있다.

[0010] 그러나, 오미자는 오미자 열매와 관련된 약효 및 효능에 관한 연구만이 진행되고 있을 뿐이며, 오미자 잎, 오미자 줄기 등의 다른 약용 부위에 관한 연구 개발은 이루어진 적이 없다. 특히, 열매와 잎 또는 줄기가 가지는 생리 활성 물질 등이 매우 상이하고, 일반적으로 오미자가 열매로써만 이용되고 있음을 고려할 때 오미자의 타 부

위 추출물에 관한 연구 개발이 이루어질 필요성이 있다.

[0011] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 퇴행성 신경질환에 효과가 있는 천연 추출물에 관한 연구개발을 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 한국특허출원 제10-2004-0067771호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 오미자 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 또한, 본 발명의 목적은 오미자 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 오미자의 잎 추출물의 효과에 대하여 연구하던 중 오미자 잎 추출물이 신경 염증을 감소시키고, 미세아교세포 활성을 억제하며, 뇌 신경세포를 보호함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0016] 본 발명은 오미자(*Schisandra chinensis*) 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0017] 본 발명의 오미자 잎 추출물은 신경 염증에 의한 신경 손상 회복에 현저한 효과를 보이며 뇌신경 세포 보호 효과가 뛰어나므로 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용할 수 있다. 특히, 오미자 잎 추출물은 오미자 열매와 같은 타 부위와 대비하여 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료에 현저한 효과를 가지며, 지금까지 약용 또는 건강 기능 식품으로 사용되지 않았던 약용 부위인 잎의 추출물을 사용함으로써 경제적으로도 높은 효용성을 지닌다.

[0018] 상기 오미자 잎 추출물은 물, 알코올 또는 이들의 혼합용매를 추출용매로 하여 추출된 추출물일 수 있으며, 상기 알코올은 바람직하게는 C_1 내지 C_4의 저급 알코올일 수 있다. 바람직하게 본 발명의 오미자 잎 추출물은 오미자 잎 열수 추출물이다.

[0019] 상기 퇴행성 신경질환은 뇌졸중(stroke), 치매(dimentia), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease; 무도병), 피크병(Pick disease), 크로이펠츠-야콥병(Creutzfeld-Jacob disease), 전두측두치매(frontotemporal dementia), 루이치매 (dementia with Lewy bodies), 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis; 루게릭병), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration), 다계통위축병(multiple system atrophy), 진행성핵상마비 (progressive supranuclear palsy), 신경계자가면역질환(autoimmune disease), 염증성 및 신경병증성 통증(inflammatory and neuropathic pain), 뇌혈관질환(neurovascular disease) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다. 바람직하게, 퇴행성 신경 질환은 파킨슨 질환일 수 있다.

[0020] 오미자 잎 추출물의 제조에 있어서, 추출은 진탕 추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출 방법을 이용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 추출온도는 40 내지 100 ℃인 것이 바람직하다. 또한, 추출시간은 0.5 내지 24시간인 것이 바람직하며, 추출회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하다.

[0021] 상기 추출에서 사용되는 추출용매로는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 알코올은 C_1~C_4의 저급 알코올을 사용하는 것이 바람직하며, 메탄올 또는 에탄올을 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 추출 용매는 물 추출이 가장 바람직하다. 또한, 준비된 오미자 잎의 5 내지 15배 중량 또는 부피의 추출용매를 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 10배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다.

[0022] 상기 추출물은 감압농축될 수 있으며, 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하며, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조 방법을 이용하는 것이 바람직하다. 다만, 이에 한정되지 않는다.

[0023] 본 발명의 오미자 잎 추출물 유효성분으로 함유하는 조성물의 총 중량에 대하여 0.1 내지 50 중량%로 복합 추출물을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0024] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0025] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이드, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다.

[0026] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0027] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필레글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통하여 투여될 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 추출물은 1일 0.1 내지 1000mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 조성물은 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0030] 또한 본 발명은 오미자 잎 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌졸중 또는 퇴행성 신경질환 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0031] 본 발명의 건강기능식품은 오미자 잎 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 복합추출물은 식품의 총중량에 대하여 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있다.

[0032] 또한, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명의 복합추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 음료, 껌, 비타민 복합제, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0033] 본 발명의 건강기능식품은 건강기능음료일 수 있으며, 상기 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트릴톨 등의 당알콜이다. 또한, 상술한 것 이외의 향미제(사카린, 아스파르탐 등)을 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명의 건강기능식품은 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, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 오미자 잎 추출물은 신경 염증을 감소시키고, 미세 아교 세포의 활성을 억제하며, 뇌 신경세포를 보

호하는 효과가 우수하여, 뇌졸중, 파킨슨 질환 및/또는 퇴행성 신경질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 신경 염증 동물 모델에 오미자 잎 추출물 처리에 따른 체중 감소 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 신경 염증 동물 모델에 오미자 잎 추출물 처리에 따른 미세아교세포 활성 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 신경 염증 동물 모델에 오미자 잎 추출물 처리에 따른 mRNA 수준에서 미세아교세포의 마커 CD11b 발현 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 4은 신경 염증 동물 모델에 오미자 잎 추출물 처리에 따른 단백질 수준에서미세아교세포의 마커 CD11b와 IBA-1발현 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 신경 염증 동물 모델에 오미자 잎 추출물 처리에 따른 mRNA 수준에서 염증 인자 발현 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

도 6는 신경 염증 동물 모델에 오미자 잎 추출물 처리에 따른 단백질 수준에서 염증 인자 발현 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 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.

[0038] **실시예 1. 오미자 잎(Leaves of *Schisandra chinensis*)의 열수추출물의 제조**

[0039] 건조한 오미자 잎(경상북도 문경시 동로면) 200 g을 환류추출기에 증류수 2.0 L와 함께 넣고 1.5시간동안 방치한 다음에, 가열하여 탕액이 끓기 시작하는 시점부터 1.5시간 동안 더 가열하였다. 상기 추출액을 여과지로 감압여과한 후에, 진공감압농축기를 사용하여 여과액을 농축하고 동결건조기를 이용하여 분말시료로 제조하였다.

[0040] **실시예 2. LPS (lipopolysaccharide)을 이용한 신경염증 동물모델 유도**

[0041] 오미자 잎 추출물의 항염증효과를 알아보기 위하여 LPS를 투여하여 실험적 신경염증 동물모델을 제조하였다. 출생 후 8-9주령의 수컷 C57BL/6 생쥐(20-22g)((주) 나라바이오텍, 평택)를 준비하여 일주일동안 안정시킨 다음에, CON 군(LPS와 추출물을 투여하지 않은 대조군), LPS군(LPS 10 mg/kg을 복강으로 투여한 군), LPS+추출물군(LPS 10 mg/kg을 복강으로 투여하고, 추출물 50 mg/kg 또는 200 mg/kg을 구강으로 투여한 군), 추출물군(추출물 200 mg/kg을 구강으로 투여한 군)으로 나누었다. LPS를 복강으로 투여하기 1시간 전에 CON군과 LPS군에는 생리식염수 100㎕를, LPS+추출물군과 추출물군에는 식염수 100㎕에 추출물을 희석하여 복강으로 투여하였다.

[0042] **실시예 3. LPS에 의한 신경 염증 모델에서 체중 감소 억제 효과 확인**

[0043] 상기 실시예 2에서 제조된 동물 모델을 이용하여 LPS 투여 전과 투여 24시간 후에 체중변화를 측정하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0044] 도 1에 나타낸 바와 같이, LPS군에 비하여 LPS+추출물군(LPS+LSC)에서 체중감소가 억제되는 것이 확인되었다.

[0045] **실시예 4. LPS에 의한 신경 염증 모델에서 미세아교세포 활성화 억제 효과 확인**

[0046] LPS 투여 24시간 후에, 생쥐를 에테르로 흡입마취하고, 4% paraformaldehyde (PFA) 용액으로 관류고정을 시행한 다음에, 뇌를 적출하여 동일한 고정액에서 24시간 동안 고정하였다. 뇌를 PBS (phosphate buffered solution)로 수세한 다음에 30% 수크로스(sucrose)액에서 2일 이상 보관하여 동결손상을 방지하였다. 동결절편기를 이용하여 대뇌를 30 μm 두께로 잘라 PBS에 보관하였다.

[0047] 뇌에서 미세아교세포의 활성화의 정도(염증반응의 정도를 나타냄)를 단백질 수준에서 확인하기 위하여 IBA-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1)에 대한 항체를 이용하여 면역염색을 수행하였다. 30 μm 두께로 자른 뇌 조직을 3 % 과산화수소를 포함한 PBS에 20분 동안 담구어 내재성 퍼옥시다아제(endogenous peroxidase) 활성을 제거하고, PBS로 수세하였다. 이를 블로킹 용액에 담구어 2시간 동안 반응시킨 후, 미세아교세포의 마커인 IBA-1 항체(1:2,000, WAKO, 일본)와 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 PBS로 씻고 2차 항체와 함

께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 세척하고 탈수시킨 후, 퍼마운트(permount)로 봉입한 후 현미경으로 관찰하였다.

[0048] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0049] 도 2에서 확인되는 바와 같이, LPS+추출물군(LPS+LSC)은 LPS군과 대비하여 IBA-1 면역양성 미세아교세포의 활성화 정도가 크게 감소함을 보여주었다.

[0050] 또한, 미세아교세포의 활성화의 정도를 mRNA 수준에서 확인하기 위하여 미세아교세포의 마커인 CD11b에 대한 mRNA 발현 양상을 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction)을 통하여 분석하였다. LPS를 투여한 24시간 후에 생쥐를 에테르로 흡입마취하고, 대뇌피질을 적출하여 트리졸(Trizol, Invitrogen, 미국) 1 ml을 넣고 분쇄기로 조직을 갈고, 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 RT-PCR kit (Invitrogen, 미국)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 cDNA 4 ul와 미세아교세포 마커인 CD11b 프라이머(Bionics, 미국)를 각각 1 ul와 2x SYBR GREEN (ABI) 5 ul를 이용하여 50℃ 2분 1회, 95℃ 10분 1회, 95℃ 15초, 60℃ 1분 40회의 조건으로 ABI PRIAM 7500 기기를 통하여 실시간 RT-PCR 분석법을 사용하여 측정하여 확인하였다.

[0051] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0052] 도 3에 나타낸 바와 같이, LPS+추출물군(LPS+LSC)은 LPS군에 비하여 LPS에 의하여 증가된 CD11b의 mRNA 발현 정도를 현저히 감소시키는 것이 확인되었다.

[0053] 또한, 추출물이 미세아교세포의 마커인 CD11b와 IBA-1의 단백질 발현을 억제하는지를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 실험을 수행하였다. LPS를 투여한 후 24시간 후에 생쥐를 에테르로 흡입마취한 후에 대뇌피질을 적출하여 단백질 용해 완충액(protein lysis buffer; 50 mM Tris-cl, pH 7.5, 150 mM Nacl, 1 % Triton X-100, 10 % glycerol 및 단백질 분해효소 저해제 혼합물)을 넣고 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)를 사용한 Bradford (Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 단백질 30 ug은 10 % SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5 % 탈지유(nonfat dry milk)가 포함된 TBS-T (Tris-buffered saline, 20 mM Tris, pH 7.4, 0.1 % Tween 20 및 150 mM Nacl)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBS-T로 씻은 후 1차 항체 CD11b와 Iba-1 (Millipore, 미국)를 1:1,000으로 희석시켜 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 TBS-T로 10분씩 3회 씻고 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBS-T에 씻은 뒤 ECL system (Amersham Pharmacia Biotechnology, 미국)로 밴드를 확인하였다.

[0054] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0055] 도 4에서 확인되는 바와 같이, LPS+추출물군(LPS+LSC)은 LPS군에 비하여 LPS에 의하여 증가된 CD11b와 IBA-1의 단백질 발현이 현저히 감소되는 것이 확인되었다.

[0056] **실시예 5. LPS에 의한 신경 염증 모델에서 염증매개인자 발현 억제 효과 확인**

[0057] 추출물이 염증매개인자의 mRNA 발현을 억제하는지를 확인하기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction) 실험을 수행하였다. LPS를 투여한 후 24시간 후에 생쥐를 에테르로 흡입마취한 후에 대뇌피질을 적출하여 트리졸(Trizol, Invitrogen, 미국) 1 ml을 넣고 분쇄기로 조직을 갈고, 원심분리하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 RT-PCR 키트(Invitrogen, 미국)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 cDNA 4 ul와 미세아교세포 마커인 CD11b 프라이머(Bionics, 미국)를 각각 1 ul와 2x SYBR GREEN (ABI) 5 ul를 이용하여 50℃ 2분 1회, 95℃ 10분 1회, 95℃ 15초, 60℃ 1분 40회의 조건으로 ABI PRIAM 7500 기기를 통하여 실시간 RT-PCR 분석법을 사용하여 측정하여 확인하였다.

[0058] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0059] 도 5에서 확인되는 바와 같이, LPS+추출물군(LPS+LSC)은 LPS군에 비하여 LPS에 의하여 증가된 염증성사이토카인(TNF-α, IL-1β, IL-6), iNOS 및 COX2의 mRNA 발현정도를 현저히 감소시키는 것이 확인되었다.

[0060] 또한, 추출물이 염증매개인자의 단백질 발현을 억제하는지를 확인하기 위하여 웨스턴 블롯 실험을 수행하였다. LPS를 투여한 후 24시간 후에 생쥐를 에테르로 흡입마취한 후에 대뇌피질을 적출하여 단백질 용해 완충액(protein lysis buffer; 50 mM Tris-cl, pH 7.5, 150 mM Nacl, 1 % Triton X-100, 10 % glycerol 및 단백질

분해효소 저해제 혼합물)을 넣고 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)를 사용한 Bradford (Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 단백질 30 ug은 10 % SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5 % 탈지유(nonfat dry milk)가 포함된 TBS-T (Tris-buffered saline, 20 mM Tris, pH 7.4, 0.1 % Tween 20 및150 mM Nacl)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBS-T로 씻은 후 1차 항체 iNOS와 COX-2 (Millipore, 미국)를 1:1,000으로 희석시켜 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 TBS-T로 10분씩 3회 씻고 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBS-T에 씻은 뒤 ECL system (Amersham Pharmacia Biotechnology, 미국)로 밴드를 확인하였다.

[0061] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0062] 도 6에서 확인되는 바와 같이, LPS+추출물군(LPS+LSC)은 LPS군에 비하여 LPS에 의하여 증가된 COX-2와 iNOS의 발현이 현저히 감소되는 것이 확인되었다.

[0063] **제제예 1. 의약품의 제조**

[0064] **1.1 산제의 제조**

[0065]

오미자 잎 추출물	100mg
유당	100mg
탈	10mg

[0066] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0067] **1.2 정제의 제조**

[0068]

오미자 잎 추출물	100mg
옥수수전분	100mg
유당	100mg
스테아린산 마그네슘	2mg

[0069] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0070] **1.3 캡슐제의 제조**

[0071]

오미자 잎 추출물	100mg
옥수수전분	100mg
유당	100mg
스테아린산 마그네슘	2mg

[0072] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 정제를 제조한다.

[0073] **1.4 액제의 제조**

[0074]

오미자 잎 추출물	100mg
설탕	20g
이성화당	20g
레몬향	적량

[0075] 정제수를 가하여 전체 1,00ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0076] **제제예 2. 건강기능식품의 제조**

[0077]

오미자 잎 추출물	100mg
비타민 혼합물	적량
비타민 A 아세테이트	70 ㎍
비타민 E	1.0 ㎎
비타민 B1	0.13 ㎎
비타민 C	10 ㎎
비오틴	10 ㎍
니코틴산아미드	1.7 ㎎
엽산	50 ㎍
무기질 혼합물	적량
산화아연	0.82 ㎎
탄산칼슘	24.8 ㎎

[0078] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조(예, 영양캔디 등)에 사용할 수 있다.

[0079] **제제예 3. 건강기능성 음료의 제조**

[0080]

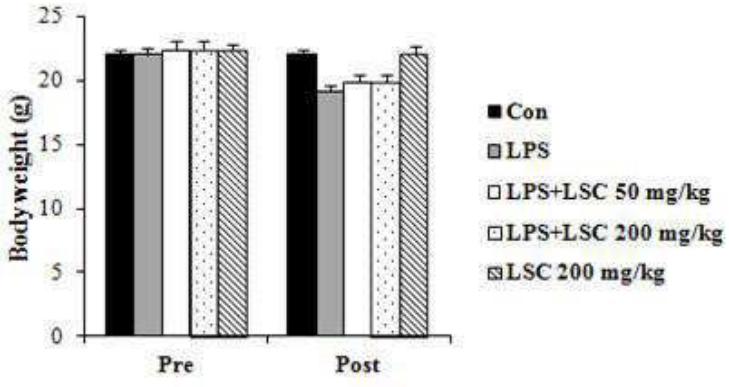
오미자 잎 추출물	100mg
구연산	1000 ㎎
올리고당	100 g
매실농축액	2 g
타우린	1 g
정제수를 가하여 전체	900 ㎖

[0081] 통상의 건강기능성 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.

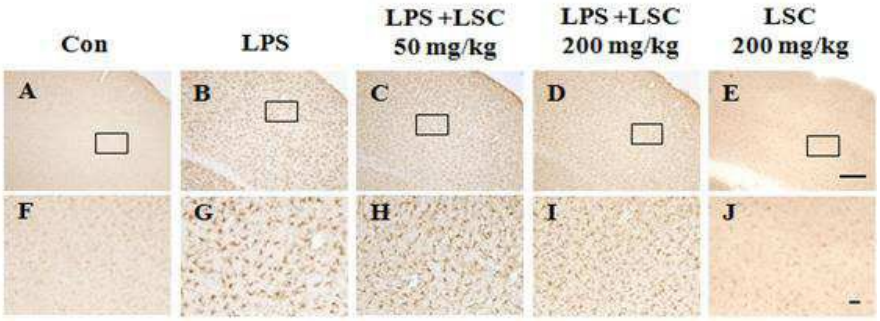
[0082] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

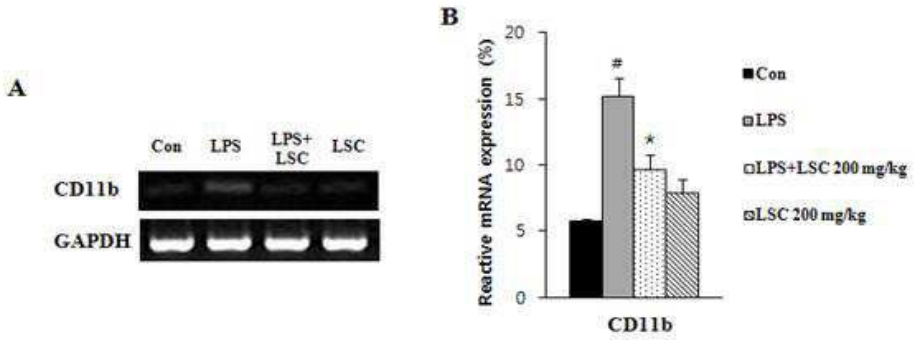
도면1



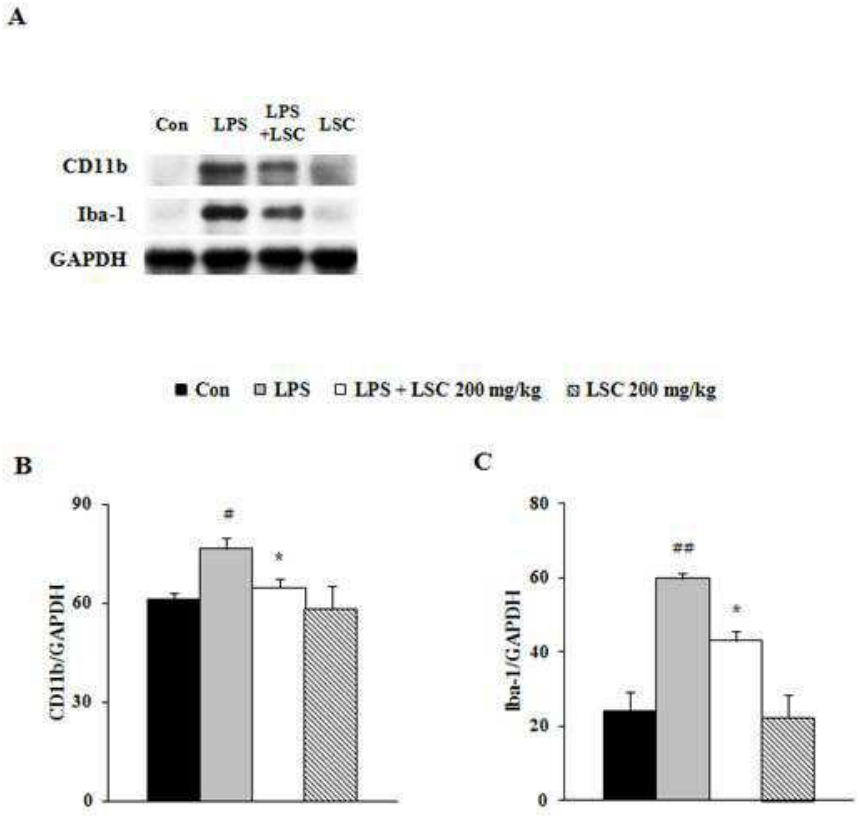
도면2


Con
LPS
LPS +LSC
50 mg/kg
LPS +LSC
200 mg/kg
LSC
200 mg/kg
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J

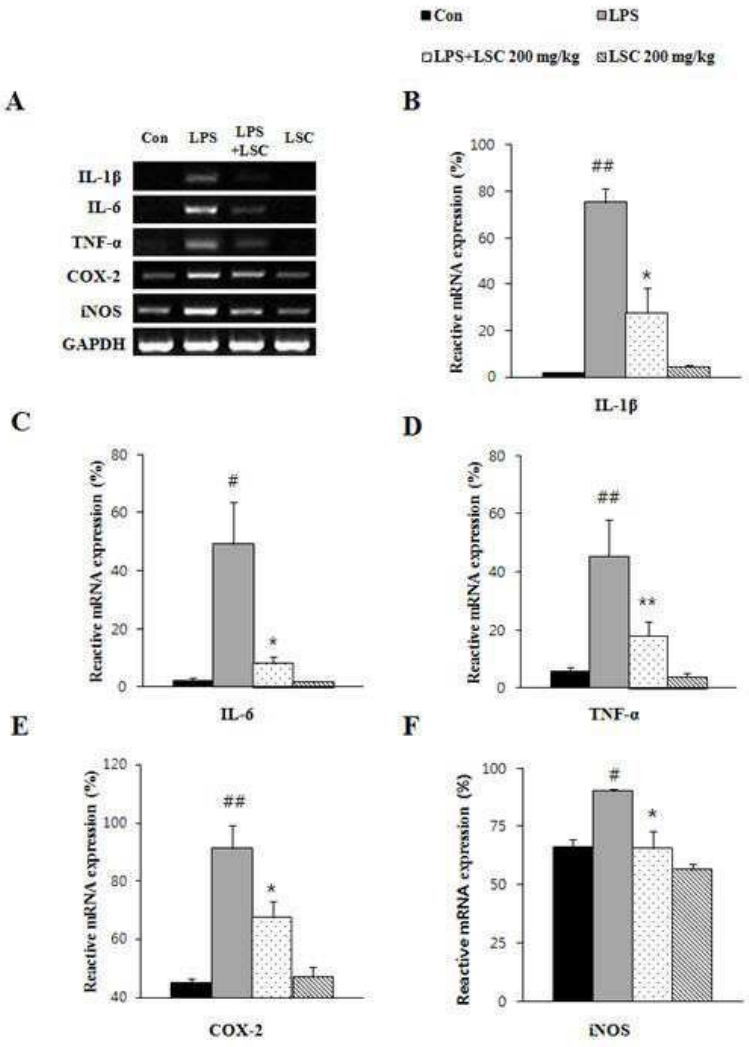
도면3


A
Con
LPS
LPS+
LSC
LSC
CD11b
GAPDH
B
Reactive mRNA expression (%)
20
15
10
5
0
#
*
CD11b
Con
LPS
LPS+LSC 200 mg/kg
LSC 200 mg/kg

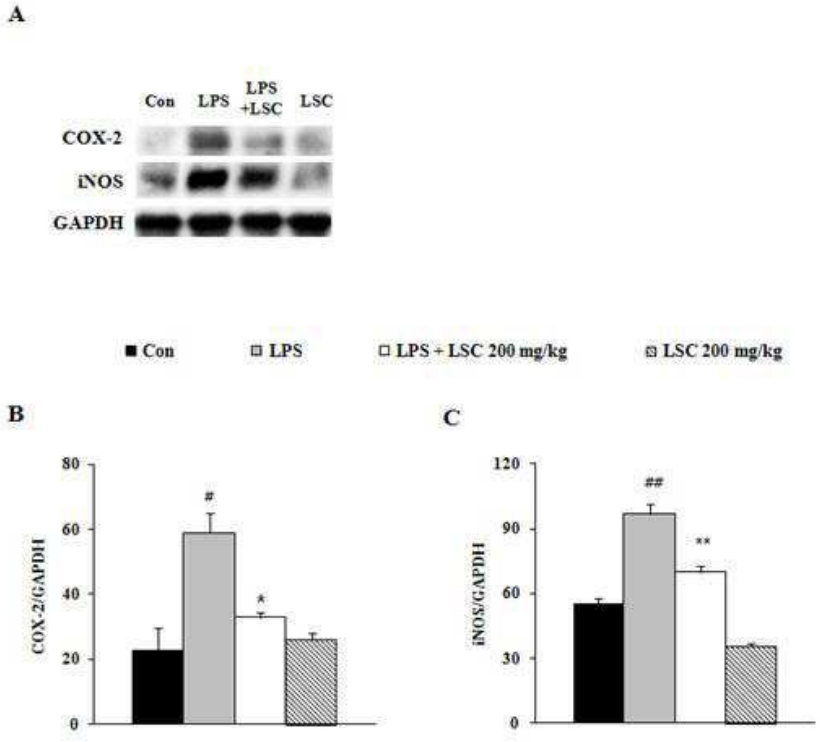
도면4


A
Con
LPS
LPS +LSC
LSC
CD11b
Iba-1
GAPDH
Con
LPS
LPS + LSC 200 mg/kg
LSC 200 mg/kg
B
CD11b/GAPDH
90
60
30
0
#
*
C
Iba-1/GAPDH
80
60
40
20
0
##
*

도면5


Con
LPS
LPS+LSC 200 mg/kg
LSC 200 mg/kg
A
Con
LPS
LPS +LSC
LSC
IL-1β
IL-6
TNF-α
COX-2
iNOS
GAPDH
B
Reactive mRNA expression (%)
IL-1β
C
IL-6
D
TNF-α
E
COX-2
F
iNOS

도면6


A
Con
LPS
LPS +LSC
LSC
COX-2
iNOS
GAPDH
■ Con
▨ LPS
□ LPS + LSC 200 mg/kg
▧ LSC 200 mg/kg
B
COX-2/GAPDH
80
60
40
20
0
#
*
C
iNOS/GAPDH
120
90
60
30
0
##
**