



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월14일
 (11) 등록번호 10-1797072
 (24) 등록일자 2017년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/82 (2006.01) **A23L 1/30** (2006.01)
 (52) CPC특허분류
A61K 36/82 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
 (21) 출원번호 10-2015-0176179
 (22) 출원일자 2015년12월10일
 심사청구일자 2015년12월10일
 (65) 공개번호 10-2017-0069357
 (43) 공개일자 2017년06월21일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020040052213 A*
 CN101301400 A*
 KR1020120107742 A
 JP2009155317 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
전남대학교산학협력단
 광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
 (72) 발명자
윤경철
 광주광역시 동구 무등로 374 109동 1304호 (계림동, 두산위브아파트)
최주희
 전라남도 순천시 삼산로 81 103동 303호 (용당동, 동아아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
정성중

전체 청구항 수 : 총 4 항

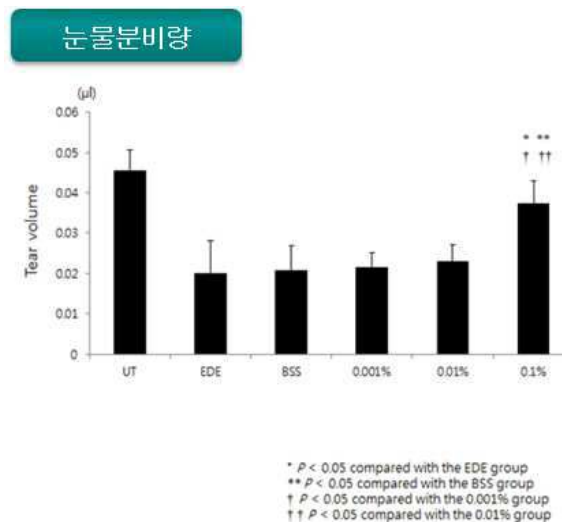
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **동백 추출물을 유효성분으로 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 예방, 치료, 또는 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 동백(*Camellia japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 예방, 치료, 또는 개선용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 유효성분인 동백 추출물은 안구 건조 동물모델에서 눈물생성을 촉진시키고, 눈물막 파괴시간을 지연시키며, 각막 상피세포의 손상을 지연시킬 뿐만 아니라 안구표면 및 눈물샘에서 염증성 사이토카인의 발현량을 감소시키고, 염증반응에 의한 대식세포의 침윤을 억제시킴으로써 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증을 예방, 치료, 또는 개선하는 효능을 가진다. 또한, 본 발명의 동백 추출물은 세포독성 및 부작용이 없어 약학적 조성물, 의약품 조성물, 또는 식품 조성물에 안전하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2300/44 (2013.01)

A61K 2236/37 (2013.01)

(72) 발명자

노종현

전라남도 나주시 공산면 갈마길 1

정지은

광주광역시 서구 내방로251번길 10 (상무1동, 광명
하이츠아파트 101-1914)

박화식

광주광역시 남구 화산로 115 301동 706호 (진월
동, 진아리채아파트)

위안진

광주광역시 남구 서문대로690번길 3(진월동, 대주
아파트 201-502)

윤제정

전라남도 장성군 남면 삼태로 147-22 407호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-1862

부처명 산림청

연구관리전문기관 산림청

연구사업명 임업기술연구개발사업

연구과제명 편백, 사시레피 및 동백나무의 눈 기능성 및 안전성 평가

기여율 1/1

주관기관 전남대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.17 ~ 2016.06.16

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

동백(*Camellia japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

동백(*Camellia japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 예방 또는 개선용 의약품 조성물.

청구항 3

동백(*Camellia japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동백 추출물은 초임계 유체 추출법을 이용하여 수득된 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 동백 추출물을 유효성분으로 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 예방, 치료 또는 개선용에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 동백 추출물을 유효성분으로 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증을 예방, 치료, 또는 개선하기 위한 약학적, 의약품 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대사회는 밤과 낮의 경계가 모호하며, 우리 주위에 존재하는 인공적인 불빛을 통해 밤이 가져오는 어둠을 몰아낸 것이 여러 가지 면에서 비약적인 발전과 장점을 가져왔다. 하지만 반대로 그에 따른 눈의 부작용을 수반하게 되었다.

[0003] 최근 몇 년 사이 시력 저하와 눈의 피로감, 이명, 난청, 과민성대장염, 건선, 아토피 그리고 그에 동반되는 두통 증상을 호소하는 사람들이 늘어난 것도 눈의 부작용중 하나라고 볼 수 있으며, 아울러 수험생의 경우 과도한 공부 및 컴퓨터 사용으로 인한 눈의 피로는 더욱 가중되고 있는 실정이다. 특히 스마트폰의 사용과 컴퓨터의 발전 및 수험생 피로과다로 인한 장기간의 눈 사용은 눈이 쉽게 피로해지고, 눈물막의 수분부족과 염증반응을 증가시키는 원인이 되고 있으며, 이는 안구 건조증의 가장 큰 원인이 되고 있다. 따라서 눈의 피로 및 염증반응을 완화시킬 뿐만 아니라 안구 건조증을 예방 또는 개선할 수 있는 소재가 연구되고 개발되어 왔으나, 최근 약물의 오용 및 남용과 화학물질에 대한 부작용이 심각한 문제로 대두되면서 천연물질로부터 유래된 새로운 대체약물의 필요성이 제기되고 있다.

[0004] 한편, 동백나무(*Camellia japonica*)는 백나무과 동백속에 속하는 활엽상록수로 교목으로, 주로 한국과 일본에서 자생한다. 우리나라에서는 남해안 도서지역과 서쪽으로는 대청도와 동쪽으로는 울릉도까지 분포하고 있으며, 특히 전남지역이 전국 식재 면적의 67%를 차지하고 있다. 동백종실은 식용유와 화장유로 사용하고, 줄기는 고급 숲의 원료로 사용되어 왔으며, 잎은 차나무가 없는 지역에서 차의 재료로 사용되어 왔다고 알려져 있다. 약

리적 효과로서 동백나무 잎은 건선, 인후통증, 화상에 효능이 있고, 가지와 열매는 머리비듬, 보혈, 비출혈, 어혈, 연골증, 월경이상, 이노 등에 사용되어져 왔으며, 동백유에서 분리된 트리테르펜 알코올류(Triterpene alcohol)는 tPA(tissue plasminogen activator)로 유도된 귀의 염증을 효과적으로 경감시킨다고 보고되었다. 그러나 눈의 피로, 눈의 염증, 안구 건조증 등과 같은 안질환에서의 동백유의 역할에 대해서는 거의 알려진 바가 없으며, 동백 추출물을 안과적 치료목적으로 눈에 적용한 결과에 대한 문헌 또한 보고된 바 없다.

[0005] 이에 본 발명자들은 눈의 피로와 염증을 완화시킬 뿐만 아니라 안구 건조증을 예방 또는 치료하는 새로운 물질을 개발하고자 연구하던 중, 동백 추출물이 안구 건조 동물모델에서 눈물생성을 촉진시키고, 눈물막 파괴시간을 지연시키며, 각막 상피세포의 손상을 지연시킬 뿐만 아니라 안구표면 및 눈물샘에서 염증성 사이토카인을 감소시키고, 염증반응에 의한 대식세포의 침윤을 억제시킴으로써 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증을 예방, 치료 또는 개선하는데 사용할 수 있다는 사실을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 동백 추출물을 유효성분으로 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 예방, 치료 또는 개선하기 위한 약학적 조성물, 의약품 조성물 또는 식품 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 동백(*Camellia japonica*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증을 예방, 치료 또는 개선하기 위한 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명에 있어서, 상기 동백 추출물은 동백나무의 줄기, 가지, 잎, 열매, 수피 및 뿌리로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상, 바람직하게는 동백나무의 줄기, 가지 또는 잎을 건조 및 분말화한 다음, 당업계에 공지된 추출방법, 예를 들어 추출용매를 이용한 직접 추출법, 수증기 증류법, 초임계 유체 추출법 또는 냉가압법 등에 따라 추출함으로써 수득할 수 있다. 본 발명의 하나의 구체적 실시에서는 초임계 유체 추출법을 사용하여 추출하였다.

[0010] 상기 동백 추출물을 추출용매를 이용하여 추출하는 경우, 상기 추출용매는 예를 들어, 물, 탄소수 1-4의 무수 또는 함유 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 또는 에틸렌글리콜), 아세트산, DMFO(dimethyl-formamide) 또는 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 포함하는 극성 용매; 또는 아세톤, 아세토나이트릴, 에틸 아세테이트, 메틸 아세테이트, 플루오로알칸, 펜탄, 헥산, 2,2,4-트리메틸펜탄, 데칸, 사이클로헥산, 사이클로펜탄, 디이소부틸렌, 1-펜텐, 1-클로로부탄, 1-클로로펜탄, *o*-자일렌, 디이소프로필 에테르, 2-클로로프로판, 톨루엔, 1-클로로프로판, 클로로벤젠, 벤젠, 디에틸 에테르, 디에틸 설파이드, 클로로포름, 디클로로메탄, 1,2-디클로로에탄, 어닐린, 디에틸아민, 에테르, 사염화탄소 및 THF를 포함하는 비극성 용매가 이용될 수 있다.

[0011] 또한, 상기 동백 추출물은 상기 추출용매를 이용하여 추출하는 방법 이외에 통상적인 정제과정을 거쳐서도 수득할 수 있다. 예컨대, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획을 통하여서도 동백 추출물을 수득할 수 있다.

[0012] 본 발명에 있어서, 동백 추출물은 추출 또는 정제(분리, 분획)의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물일 수 있다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기한 방법에 의하여 얻어진 동백 추출물은 안구 건조 동물모델에서 눈물생성을 촉진시키고, 눈물막 파괴시간을 지연시키며, 각막 상피세포의 손상을 지연시킬 뿐만 아니라 안구표면 및 눈물샘에서 염증성 사이토카인의 발현량을 감소시키고, 염증반응에 의한 대식세포의 침윤을 억제시키는 효과를 나타낸다.

[0014] 따라서, 본 발명의 동백 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증을 예방, 치료 또는 개선하기 위한 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

- [0015] 본 발명의 조성물에 유효성분으로 포함되는 동백 추출물은 천연식물재료인 동백으로부터 추출한 것으로서 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 동백 추출물이 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 바람직한 구현예로서, 본 발명의 약학적 조성물에 유효성분으로 포함되는 동백 추출물은 전체 조성물의 총 중량을 기준으로 0.01 내지 10 중량%, 바람직하게는 0.05 내지 5중량%의 함량으로 포함될 수 있다.
- [0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효성분으로 포함하는"이란 상술한 동백 추출물의 효능 또는 활성을 달성하는데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다.
- [0018] 본 발명의 조성물은 유효성분으로서 상기 동백 추출물 이외에 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 예방, 치료 또는 개선에 유용한 성분, 예를 들어 항산화제, 스테로이드계 또는 비스테로이드계 소염성 약물 등을 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 항산화제로는 아스코르브산 및 그 에스테르, 중아황산 나트륨, 부틸화 히드록시톨루엔, 부틸화 히드록시아니솔, 토코페롤 또는 이들의 조합이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 상기 소염성 약물로는 텍사메타손, 플루오로메톨론, 프레드니솔론, 브롬페낙, 디클로페낙, 프루비프로펜, 케토락, 또는 그의 염을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 하나의 구체적인 용도로서, 본 발명의 조성물은 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물로서 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 사용되는 경우, 유효성분으로 상기 동백 추출물 이외에 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증의 치료제 제제시 통상적으로 사용되는 완충제, 점도 조정제, 계면활성제, 안정화제, 킬레이트제 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상, 또는 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 완충제로는 MES(2-(N-모르폴리노)에탄술폰산 헤미나트륨 염), HEPES(N-(히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄술폰산)), BES(N,N-비스(2-히드록시에틸)2-아미노에탄술폰산), MOPS(3-(N-모르폴리노)프로판술폰산), BIS-TRIS (비스(2-히드록시에틸)아미노-트리스(히드록시메틸)메탄), 시트레이트 완충제, 말레이트 완충제, 숙시네이트 완충제, 말레이트 완충제, 붕산/붕산나트륨 완충제 또는 이들의 조합이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 점도 조정제로는 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈, 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필메틸 셀룰로오스, 히드록시에틸 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 셀룰로오스, 또는 이들의 조합이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 계면활성제로는 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알코올, 폴리에틸렌글리콜, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 폴리소르베이트(예:Tween 80, Tween 60, Tween 20), 폴록사머(예: Pluronic F127, Pluronic F108), 폴록사민(예: Tetronic 1508, Tetronic 908), 브리즈(Brij), 미르즈(Myrij), 탄소수 12 이상인 장쇄 지방 알코올(예: 올레일 알코올, 스테아릴 알코올, 미리스틸 알코올 및 도코소헥사노일 알코올 등) 또는 이들의 조합이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 약학적으로 허용되는 담체는 제제시 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구 투여, 보다 바람직하게는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여, 점막 투여 및 점안 투여 등으로 투여, 보다 더 바람직하게는 점안 투여 방식으로 적용된다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발

명의 약학적 조성물의 투여량은 성인 기준으로 0.01 내지 80 mg/kg(체중)이며, 바람직하게는 0.1 내지 60 mg/kg(체중) 범위 내이다. 또한, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다. 특히, 점안 투여의 경우에는 0.001 내지 3%(w/v, 이하 동일), 바람직하게는 0.01 내지 1% 정도의 제제를 1일 1회 내지 수회 점안하는 것이 좋다.

- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제, 에멀전, 리포솜, 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제, 연고제, 겔제, 서방형제제, 점안제(eye drop), 콘택트렌즈 세정제 또는 콘택트렌즈 윤활제이고, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 하나의 구체적 용도로서, 본 발명의 조성물은 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증을 예방 또는 개선하기 위한 의약품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물이 의약품 조성물로 사용되는 경우, 상기 동백 추출물을 그대로 사용하거나, 다른 의약품 또는 의약품 성분과 함께 사용하는 등의 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.
- [0033] 상기 의약품 조성물은 특별히 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 소독청결제, 샤워폼, 안구 세정액, 멀티슈, 핸드워시, 가습기 세정제, 연고제 및 필터 세정제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제품의 형태로 제조되어 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 하나의 구체적 용도로서, 본 발명의 조성물은 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증을 예방 또는 개선하기 위한 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 사용되는 경우, 상기 동백 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우 디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)]를 사용할 수 있다.
- [0036] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 상기 동백 추출물을 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, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0037] 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 동백 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 식품 조성물은 상술한 성분 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0039] 한편, 본 발명의 동백 추출물은 천연소재인 동백으로부터 추출된 것으로 인체에 무해하며, 독성 및 부작용이 거의 없으므로 장기간 사용시에도 안심하고 사용할 수 있어 상기한 바와 같은 약학적 조성물, 의약품 조성물, 또는 식품 조성물에 안전하게 적용할 수 있다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명에서 유효성분으로 이용되는 동백 추출물은 안구 건조 동물모델에서 눈물생성을 촉진시키고, 눈물막 파괴시간을 지연시키며, 각막 상피세포의 손상을 지연시킬 뿐만 아니라 안구표면 및 눈물샘에서 염증성 사이토카인의 발현량을 감소시키고, 염증반응에 의한 대식세포의 침윤을 억제시킴으로써 눈의 피로, 눈의 염증, 또는 안구 건조증을 예방, 치료, 또는 개선하는 효능을 가진다. 또한, 본 발명의 동백 추출물은 세포독성 및 부작용이 없어 약학적 조성물, 의약품 조성물, 또는 식품 조성물에 안전하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 동백 추출물의 안구 건조 동물 모델(DED)에 대한 눈물 생성 촉진 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 동백 추출물의 안구 건조 동물 모델(DED)에 대한 눈물막 파괴 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 동백 추출물의 안구 건조 동물 모델(DED)에 대한 각막 상피세포 손상 억제효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 동백 추출물의 안구 건조 동물 모델(DED)에 대한 대식세포의 침윤을 억제하는 효과를 나타낸 그림이다.
- 도 5는 동백 추출물의 안구 건조 동물 모델(DED)에 대한 염증성 사이토카인 분비 억제효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0043] **실시예 1: 동백 추출물의 제조**

[0044] 동백나무를 냉풍 건조한 후 상기 동백나무 건조물을 0.2 mm 내지 2 mm의 입자 크기로 분쇄하여 동백나무 분말을 제조하였고, 추출용매인 이산화탄소는 -20℃의 냉각기에 주입하여 액화시켜 준비하였다.

[0045] 그 다음 상기 동백나무 분말을 40~50℃의 온도 및 100~200bar의 압력 하에서 초임계 이산화탄소로 1차 추출한 후, 상기 동백나무의 1차 초임계 추출물을 45~55℃의 온도 및 100~200bar의 압력 하에서 초임계 이산화탄소로 2차 추출하여 동백나무로부터 특히 트리테르펜, 토코페롤, 플라보노이드 등의 기능성 성분이 다량 함유되어 있는 에센셜 오일을 고효율로 추출하였다.

[0046] **실시예 2: 동백 추출물을 이용한 안구 건조증 예방 또는 치료 효과에 대한 실험**

[0047] **2-1. 재료 및 방법**

[0048] 안구 건조증 마우스 모델(Experimental dry eye, EDE) 및 실험과정

[0049] 8주령 C57BL/6 쥐를 1일 18시간 동안 통풍장치에 노출시킨 상태에서 0.5mg/0.2ml 스코폴라민 브롬화수소산염 (scopolamine hydrobromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 하루 3회(9시, 13시 30분 및 18시) 피하 주사하여 건성안을 유도하였다. 이때 실험공간은 30% 습도 및 25℃의 온도로 유지시켰다.

[0050] 실험기간 동안에 동물의 행동, 음식 및 물 섭취는 제한되지 않았다. 마우스는 다음 6개 그룹으로 분배하였다: 미처리 대조군(untreated, UT); EDE 대조군(점안액 미투여군); 평형염(BSS, balanced salt solution; Alcon, Forth worth, TX) 처리군; 0.001% 동백 추출물 처리군; 0.01% 동백 추출물 처리군; 0.1% 동백 추출물 처리군. 이때, 동백 추출물이 포함된 점안액은 BSS에 희석하여 제조된 것을 사용하였다.

[0051] 그 다음 안구 건조증을 유도시킨 마우스에 하루 4차례 2μl의 동백 추출물이 포함된 점안액 또는 평형염을 처리하였다.

[0052] 눈물 생성량 분석

[0053] 안구 건조증을 유도한 후 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 마우스의 외안각쪽 결막낭에 페놀-레드 함침 면사(Phenol-red impregnated cotton thread, Zone-quick, Oasis, Glendora, CA)를 20초 동안 접촉시켰다. 그 다음 눈물에 의해 적색으로 변한 면사의 길이를 현미경(SMZ 1500; Nikon, Melville, NY)을 이용하여 측정한다 다음, standard curve에 대입하여 부피로 변환하였다.

[0054] 눈물막 파괴시간 분석

[0055] 안구 건조증에 있어 가장 중요한 임상 인자인 눈물막의 안정성(tear film stability)을 판단하는 인자인 눈물막 파괴시간의 검사를 위해, 안구 건조증을 유도한 후 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 마우스의 결막낭에 1% 형광염색액(Fluorescein) 1μl를 점안한 후 눈을 3회 정도의 눈을 감았다가 뜨게 하고 부드럽게 벌린 다음, 코발트 블루 필터(Cobalt blue filter)가 장착된 세극등 현미경을 통해 염색된 눈물막에 첫 번째 결손이 생길 때까지의 시간(초)을 측정하였다.

- [0056] 각막표면의 손상정도 분석
- [0057] 안구 건조증을 유도한 후 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 마우스의 결막낭에 1% 형광염색액 (Fluorescein) 1 μ l를 점안한 후 식염수로 세척한 다음, 쥐의 각막을 세극등 현미경으로 관찰하여 상피손상 정도 (형광염색이 묻어나는 정도)를 점수화하여 평가하였다. 이를 위해 각막을 4등분한 다음, 각 등분을 아래와 같이 0-4점까지 평가한 후 합산하였다(총 0-16점).
- ① 0: Absent
 - ② 1: Slightly punctuate staining < 30 spots
 - ③ 2: Punctate staining > 30 spots, but not diffuse
 - ④ 3: Severe diffuse staining but no positive plaque
 - ⑤ 4: Severe diffuse staining with positive fluorescein plaque
- [0058]
- [0059] 염증매개 사이토카인 농도 분석
- [0060] 안구 건조증을 유도한 후 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 마우스의 결막을 수술을 통해 채취하여 단백질을 분리 후 웨스턴 블롯 분석을 통해 염증을 일으킨다고 알려진 사이토카인의 수치를 정량화 하였다.
- [0061] 구체적으로, 안구 건조증을 유도한 후 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 마우스의 결막조직을 PBS 용액으로 2회 세척한 후 용해 완충액(PRO-PREP protein extraction solution, 인트론바이오테크놀로지, 한국)을 넣고 4℃에서 10분 동안 용해시켜 수득하였다. 그 다음 상기 수득한 세포는 17,000 rpm, 4℃에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 회수하였다. 그 다음 각 상층액 30 μ g를 취하여 SDS 로딩 완충액(60 mM Tris, 25 % 글리세롤, 2 % SDS, 0.5 % 2-머캅토에탄올, 0.1 % 브로모페놀 블루)과 혼합한 후 10 % SDS 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에 로딩(loading)하여 전기영동하고 NCM(nitrocellulose membrane)에 전이시켰다. 이후 상기 NCM은 5 % 무지분유가 첨가된 TBS(10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1 % tween 20) 용액을 넣고 상온에서 1시간 동안 블로킹(blocking) 시켰다. TTBS 용액으로 10분 동안 3회 세척한 후 1차 항체(Prx2, Prx4, Prx5 각 1:1000 희석)로 2시간 동안 반응시킨 다음에 TTBS 용액으로 3회 세척하였다. 그 다음 퍼옥시다제(oxidase)가 포함된 2차 항체(goat-anti mouse 1:10,000, goat-anti rabbit 1:10,000)로 1시간 동안 반응시켰고, 항체의 검출은 Amersham ECLTM Western Blotting Detection Reagents(GE Healthcare, UK)를 이용하여 LAS(GEHealthcare,UK)로 확인하였다.
- [0062] 면역조직학적 분석
- [0063] 안구 건조증을 유도한 후 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 마우스의 안구 조직을 10% 포르말린에 고정하고 파라핀 포매한 후, 4 μ m 두께로 박절하여 슬라이드글라스 위에 고정하였다. 그 다음 상기 슬라이드글라스를 에탄올에 침수시킨 후 BSA로 블로킹(blocking)시킨 후 항-CD11b 항체를 상온에서 3시간 동안 처리하였다. 그 다음 PBS로 세척한 후 FITC가 결합된 항-고트 2차 항체를 처리한 후, DAPI가 함유된 마운팅 용액으로 마운트한 후 eXcope, X3 디지털 카메라(DIXI Optics, 한국)가 장착된 BX-40 apparatus(Olympus, 일본)으로 관찰하였다.
- [0064] 통계학적 분석
- [0065] 결과는 표준오차(\pm SEM)로 나타냈으며, 실험 그룹간 차이에 대한 통계학적 유의성은 ANOVA(one-way analysis of variance) 검정, 터키 사후 검정, SPSS 17.0 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 결정하였다. 0.05 이하의 P 값은 통계학적 유의성을 갖는 것으로 판단하였다.
- [0066] **2-2. 실험결과**
- [0067] 눈물 생성량 및 눈물막 파괴 분석
- [0068] 안구 건조증을 유발시킨 마우스에 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 후 상기 기재한 방법으로 눈물 분비량 회복 효과와 눈물막 파괴시간 차단효과를 분석하였다. 그 결과, 도 1 및 도 2에서 보듯이, 0.1% 동백 추출물이 안구 건조증에 의해 감소된 눈물의 분비량을 촉진시키는 것으로 나타났으며, 안구 건조증에 의한 눈물막 파괴효과를 억제시키는 것으로 나타났다.
- [0069] 각막 상피세포의 손상정도 분석
- [0070] 안구 건조증을 유발시킨 마우스에 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 후 상기 기재한 방법으로 각막 상피세

포 손상 정도를 측정하기 위해 각막을 형광색소염색을 하였다. 그 결과, 도 3에서 보듯이, 0.01% 및 0.1% 동백 추출물이 안구 건조증에 의한 각막 상피세포 손상을 효과적으로 억제함을 확인하였다.

[0071] 면역조직학적 분석

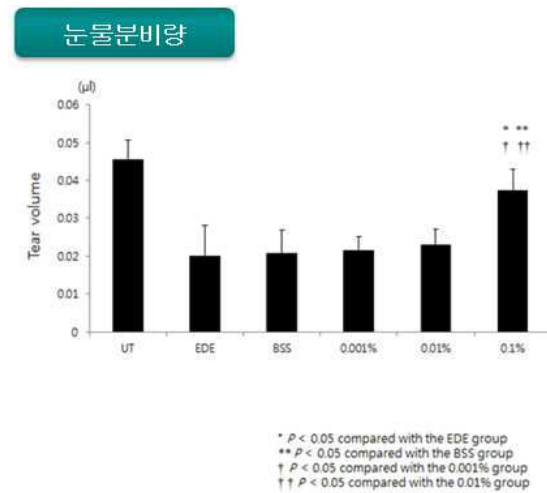
[0072] 안구 건조증을 유발시킨 마우스 모델에 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 후 각막에서 염증반응에 의한 대식세포의 침윤을 억제 할 수 있는지 확인하였다. 그 결과, 도 4에서 보듯이 0.1% 동백 추출물이 안구 건조증에 의해 유발된 대식세포의 침윤을 효과적으로 억제시킨 것을 확인할 수 있었다.

[0073] 염증매개 사이토카인 발현 분석

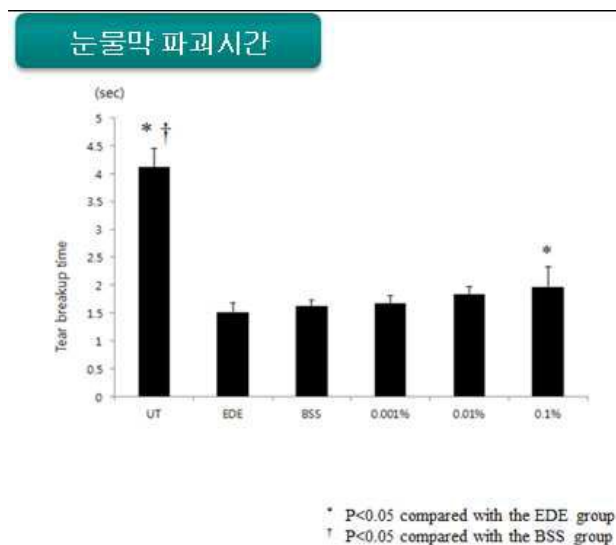
[0074] 안구 건조증을 유발시킨 마우스 모델에 동백 추출물이 포함된 점안액을 처리한 후 결막조직에서 염증반응에 의한 염증성 사이토카인 증가를 억제할 수 있는지 확인하기 위해 결막조직내에 존재하는 염증성 사이토카인 단백질 발현량 측정하였다. 그 결과, 도 5에서 보듯이, 0.001%, 0.01% 및 0.1% 동백 추출물이 안구 건조증에 의해 유발된 염증성 사이토카인의 발현량을 효과적으로 감소시키는 것을 확인하였다.

도면

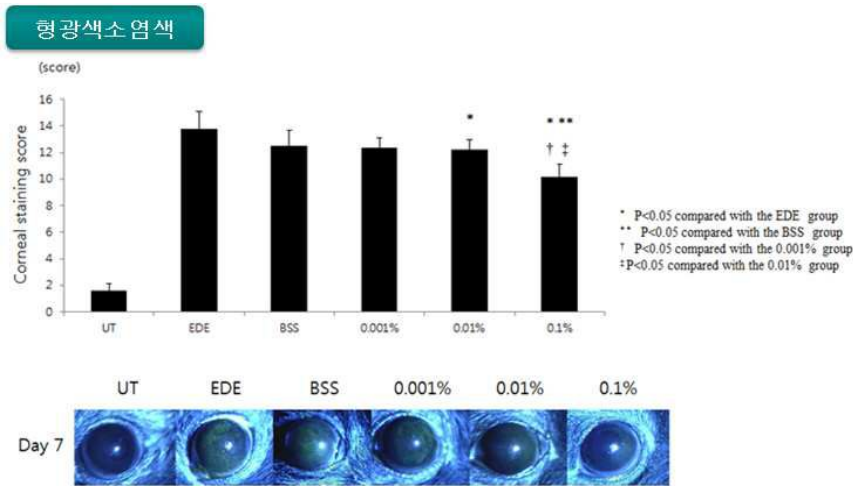
도면1



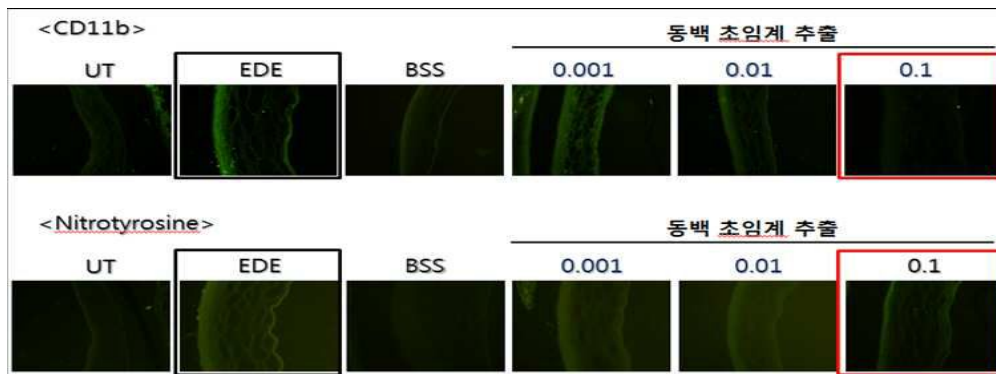
도면2



도면3



도면4



도면5

염증성 사이토카인의 농도

(pg/ml)	IFN- γ	IL-1 β	IL-6	IL-17	IP-10	MIG	TNF- α
UT	3.664937	12.12515	12.65169	2.59238	8.83333	27.82851	1.695673
EDE	14.52659	45.61062	20.87494	4.49582	23.42909	46.22705	3.942908
BSS	13.03661	38.71259	19.68748	4.03453	18.32381	43.51132	2.72414
0.001%	11.39339	35.5884	17.36007	3.688524	15.76084	38.04993	2.041385
0.01%	10.73009	35.64311	14.85672	3.616361	13.91513	34.76621	2.029618
0.1%	9.572348	33.68775	14.75164	3.07375	13.75289	34.16945	2.004381