



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월11일
(11) 등록번호 10-1576610
(24) 등록일자 2015년12월04일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/185 (2006.01) A61P 15/00 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2014-0149986</p> <p>(22) 출원일자 2014년10월31일
심사청구일자 2014년10월31일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
CN101461918A*
KR1020140100608 A
KR1020140091159 A
CN102228601 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌</p> | <p>(73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)</p> <p>(72) 발명자
김선오
광주광역시 북구 양일로 52-1, 201동 1003호(연제동, 연제2차 대주피오레)</p> <p>정명아
광주광역시 서구 화운로83번길 28-7
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인유아이피</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 9 항

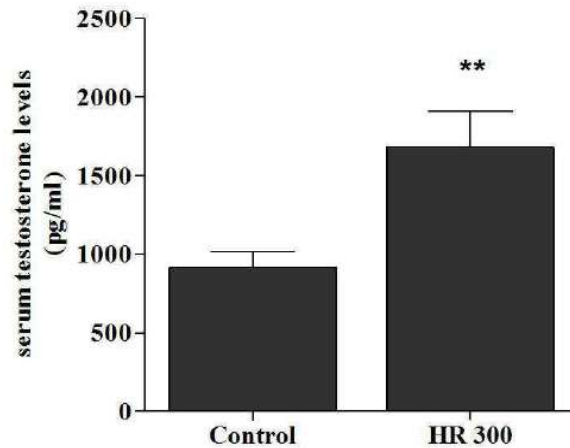
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **비타민나무 추출물을 함유하는 남성 갱년기 증후군 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 체내 테스토스테론의 분비를 증가시킴으로써 남성 갱년기로 인해 유발되는 증후군을 완화시킬 수 있는 비타민나무 추출물을 포함하는 조성물의 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약제학적 제제, 예방 또는 개선용 기능성 식품으로서의 신규 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이동욱

전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39, 203호(수창아
트빌아파트)

이선영

광주광역시 서구 상무시민로 65, 102동 404호(치평
동, 한국아파트)

최은진

광주광역시 남구 방림로 31, 108동 605호(방림동,
휴먼시아아파트)

오들리

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202, 503동 203호
(부영5차아파트)

배동혁

전라남도 화순군 칠층로 61-28, 104동 401호(대성
베르힐아파트)

최철웅

광주광역시 서구 풍암순환로14, 105동 203호(풍암
동, 호반중흥아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 추출물 및,

약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 분산제, 안정화제, 유회제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산, 펙트산염, 알긴산, 알긴산염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 방부제, 글리세린, 알코올 및 탄산화제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나로 구성되는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 있어서,

상기 비타민나무 추출물은 테스토스테론 분비를 증가시키는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 비타민나무 추출물은 비타민나무의 잎, 가지, 뿌리 및 열매로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나로부터 추출된 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 비타민나무 추출물은 탄소수 1 내지 4의 알코올을 포함하는 극성용매에 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 극성용매는 발효주정을 포함하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 극성용매는 발효주정을 20 내지 40%농도로 포함하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 남성 갱년기 증후군은 노화에 의해 유도된 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 남성 갱년기 증후군은 화학적 또는 외과적 거세에 의해 유도된 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 추출물 및,

약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 분산제, 안정화제, 유회제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나로 구성되는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약제학적 제제에 있어서,

상기 비타민나무 추출물은 테스토스테론 분비를 증가시키는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약제학적 제제.

청구항 9

삭제

청구항 10

비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 추출물 및,

식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산, 펙트산염, 알긴산, 알긴산염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 및 탄산화제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나로 구성되는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 개선용 기능성 식품에 있어서,

상기 비타민나무 추출물은 테스토스테론 분비를 증가시키는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 개선용 기능성 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 비타민나무 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군 예방 및 치료용 조성물, 보다 상세하게는, 체내 테스토스테론 분비를 증가시키는 비타민나무 추출물의 남성 갱년기 장애 개선, 남성 갱년기 질환에 대한 예방 및 치료용 의약품 및 건강 보조 식품의 천연소재로서의 신규 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

여성은 폐경기가 오며 여성 호르몬이 급격히 감소하여 여러 가지적인 변화가 일어나게 되는데, 이를 갱년기라 한다. 통상 갱년기란 용어는 여성에 한정되어 사용되었으나, 근래에는 남성에서도 노화에 따라 남성 호르몬 생산의 점진적 감소로 인한 내분비 변화로 남성 갱년기 증후군의 개념이 대두되고 있다. 실제 남성 갱년기의 증상은 전립선 선암증 치료를 위한 화학적 또는 외과적 거세로부터 발생하는 증상과 유사하다. 정식 용어로는 2004년 국제남성노화학회(International Society for the Study of the Aging Male)에서 결정된 용어인 '후기발현 남성 성선기능저하증(late-onset hypogonadism, LOH)', '가령성 테스토스테론결핍증후군(age-associated testosterone deficiency syndrome, TDS)'이 있다. 남성갱년기 장애(Andropause)는 연령의 증가와 관련된 임상적 및 생화학적 증후군으로 전형적인 증상 및 혈청 테스토스테론 수준의 결핍으로 정의되고 있으며, 여러 신체기관의 기능에 부정적인 영향을 초래할 수 있다. 동반되는 증상으로는 성욕 및 발기 기능의 저하, 밤 시간 동안의 우울, 인지 능력의 감소, 피로, 체중 및 근육량의 감소, 피부위축 등의 예를 들 수 있다.

[0003]

치료를 위해서는 폐경기 여성에 에스트로겐 대체 요법을 사용하는 것과 유사한 방식으로 남성 호르몬 대체 요법의 사용 가능성이 주장되고 있다. 한 연구에 따르면, 남성 갱년기 환자들을 테스토스테론 운데카노에이트 40 × 2mg/일로 치료하는 경우 상당한 개선 효과가 얻어지는 것으로 보고된 바 있다. 그러나, 남성 호르몬의 투여는 간, 지질 상태, 심혈관 및 전립선 질환 등에 역효과를 미칠 수 있다는 위험성 또한 보고되어 있다. 또한, 선종 및 선암중에 비추어, 남성 갱년기에 기인하는 증상들을 갖는 환자의 약 30%는 남성 호르몬 대체 요법을 받을 수 없는 것으로 알려져 있다. 따라서, 호르몬 대체 요법의 단점을 제공하지 않는, 노화에 의한, 또는 화학적이나

외과적인 거세에 의해 유발된 남성 갱년기 증후군의 예방 및 치료에 유용한 신규 치료제의 개발이 필요하다.

- [0004] 의약품 개발 분야에서 천연물 유래 약학적 조성물의 이용이 전 세계적으로 증가하는 추세이다. 비타민나무는 보리수와 식물로서, 버드나무를 닮은 관목으로 동경 2-69도와 북위 27-69도 내의 여러 지역에서 자생한다. 비타민나무 유래 플라보노이드의 약리 활성화에 대해서는 항바이러스 효과 및 항염증 효과 등이 보고되어 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 미국공개특허 2005-0288325호 (2005.12.29)

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Morales, A. and Lunenfeld, B., Aging Male, 4:151-162, 2001
- (비특허문헌 0002) Rigatti P., Scattoni V., PSA: Antigene prostatico specifico. Edizioni Medico Scientifiche(EDIMES) Pavia, 1997

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 비타민나무 추출물을 포함하는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 본 발명은 비타민나무 추출물을 유효성분으로 포함하는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 제제 및 기능성 식품을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 일 측면에 따르면, 비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 조성물이 제공된다.
- [0010] 또한, 상기 비타민나무 추출물은 비타민나무의 잎, 가지, 뿌리 및 열매로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나로부터 추출될 수 있다.
- [0011] 또한, 상기 비타민나무 추출물은 탄소수 1 내지 4의 알코올을 포함하는 극성용매에 가용한 추출물일 수 있다.
- [0012] 또한, 상기 극성용매는 발효주정을 포함할 수 있다.
- [0013] 또한, 상기 극성용매는 발효주정을 20 내지 40%농도로 포함할 수 있다.
- [0014] 또한, 상기 남성 갱년기 증후군은 노화에 의해 유도된 것일 수 있다.
- [0015] 또한, 상기 남성 갱년기 증후군은 화학적 또는 외과적 거세에 의해 유도된 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 치료용 약제학적 제제가 제공된다.
- [0017] 또한, 상기 약제학적 제제는 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방 또는 개선용 기능성 식품이 제공된다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 일 측면에 따른 비타민나무 추출물을 포함하는 조성물은 체내 테스토스테론 레벨을 상승시킬 수 있다. 이를 통하여, 근력 감소 및 피로 등을 포함하는, 남성 갱년기로 인해 유발되는 증상을 완화시킬 수 있으므로, 남성 갱년기 장애, 남성 질환의 예방, 개선 및 치료를 목적으로 의료산업 및 식품 산업 분야에서 이용될 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명의 일 측면에 따른 비타민나무 추출물을 포함하는 조성물은 정상세포의 세포사멸(apoptosis)을 유도하지 않아 인체에 대한 안전성이 우수하므로, 안전한 의약 또는 식품 첨가물로 사용될 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 일 측면에 따른 비타민나무 추출물을 포함하는 조성물은 천연 식물 유래 추출물을 포함함으로써, 기존 화학물질을 포함하는 조성물에 비해 독성 및 부작용으로 인한 문제를 저감시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명의 비타민나무 추출물이 TM3 세포에서 세포 독성을 나타내지 않는 것을 보여주는 도면이고,
- 도 2는 본 발명의 비타민나무 추출물이 TM3 세포에서 과산화수소(H₂O₂) 유도에 의한 세포독성에 대해 보호 효과를 나타내지 않는 것을 보여주는 도면이고,
- 도 3은 본 발명의 비타민나무 추출물이 TM3 세포에서 테스토스테론 분비를 증가시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이고,
- 도 4는 본 발명의 비타민나무 추출물이 TM3 세포에서 과산화수소(H₂O₂) 유도에 테스토스테론 분비를 증가시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이고,
- 도 5는 본 발명의 비타민나무 추출물이 노령의 수컷 쥐에서 체내 테스토스테론 분비를 증가시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이고,
- 도 6은 쥐의 근력을 측정하기 위해 이용한 로타로드(rotarod) 운동기구를 보여주는 도면이고,
- 도 7은 본 발명의 비타민나무 추출물이 노령의 수컷 쥐에서 근력을 증진시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이고,
- 도 8은 쥐의 피로도를 측정하기 위해 이용한 트레드밀(treadmill) 운동기구를 보여주는 도면이고,
- 도 9는 본 발명의 비타민나무 추출물이 노령의 수컷 쥐에서 피로도를 경감시키는 효과를 나타내는 것을 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명은 비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 약제학적 제제 및 기능성 식품에 관한 것이다.
- [0024] 이하, 본 발명에 대해 보다 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 비타민나무 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 비타민나무 추출물을 분리할 수 있는 비타민나무의 부분은 특별히 한정되지 않으며, 비타민나무의 잎, 가지, 뿌리 및 열매로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 이용할 수 있다. 바람직하게는 비타민나무의 잎, 가지 및 뿌리로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나가 선택되는 것이 좋다. 보다 바람직하게는, 비타민나무의 잎이 선택되는 것이 좋다. 이를 통상의 방법에 의하여 절단, 건조 및 분쇄하여 이용할 수 있다. 상기 건조는 자연건조 또는 동결건조를 이용할 수 있다.
- [0027] 상기 비타민나무 추출물의 분리방법은 특별히 한정되지는 않으나, 추출물을 제조하기 위해 당업계에서 통상적으로 이용하는 방법을 이용할 수 있다. 예를 들면, 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출, 초임계추출, 아임계추출, 고온추출, 고압추출, 초음파추출 등의 추출장치를 이용하는 방법 또는 XAD 및 HP-20을 포함하는 흡착 수지

를 이용하는 방법 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는, 추출 용매를 처리하여 열 수 추출한 후 감압 농축하여 수득할 수 있다.

[0028] 상기 추출용매로는 극성용매를 이용할 수 있다. 극성용매로는 예를 들면, 물, 알코올, 아세트산, DMFO(dimethyl-formamide) 및 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 알코올로는 예를 들면, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올, 노말-부탄올, 1-펜탄올, 2-부톡시에탄올 및 에틸렌글리콜로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에 있어서, 비타민나무 추출물은 탄소수 1 내지 4의 알코올을 포함하는 극성용매에 가용한 추출물인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 에탄올을 포함하는 극성용매에 가용한 추출물인 것이 좋다. 상기 에탄올은 발효주정일 수 있다. 발효주정은 전분질 및 당질 원료 등을 효모로 발효시켜 만든 식물성 에탄올로 인체에 무해하여 주류, 식음료류, 화장품 및 추출용매 등의 용도로 사용된다. 통상 이용되는 발효주정의 에탄올 비율은 95% 이상이다. 상기 발효주정을 물에 희석하여 이용할 수 있으며, 희석된 발효주정의 농도는 20 내지 40%인 것이 바람직하다.

[0030] 추출용매를 처리하여 추출물을 분리할 시, 추출용매는 비타민나무 전체 건조 중량의 1 내지 100배로 첨가될 수 있다. 바람직하게는, 비타민나무 전체 건조 중량의 5 내지 20배로 첨가되는 것이 좋다.

[0031] 추출용매를 처리하여 추출물을 분리할 시의 온도는 10 내지 120℃ 일 수 있다. 바람직하게는, 30 내지 100℃ 일 수 있다. 상기 온도범위 내에서 1 내지 72시간 동안 추출하여 본 발명의 비타민나무 추출물을 분리할 수 있다. 바람직하게는 2 내지 12시간, 보다 바람직하게는 3 내지 7시간 동안 추출하여 본 발명의 비타민나무 추출물을 분리할 수 있다.

[0032] 본 발명의 비타민나무 추출물을 포함하는 조성물은 체내 테스토스테론 레벨을 증가시킨다. 이를 통하여, 테스토스테론의 분비 감소로 인해 유발되는 남성 갱년기 증후군의 예방, 개선 또는 치료에 이용될 수 있다. 본 발명에서 남성 갱년기 증후군은 남성 갱년기로 인해 유발되는 증후군, 남성 갱년기 장애 및 남성 갱년기로 인한 질환을 포함한다. 예를 들면, 호르몬 변화로 인한 기분변화, 수면장애, 체중 및 근육량의 감소, 근력 저하, 내장지방 증가, 성기능 장애, 인지능력 저하, 피로 및 우울증 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 남성 갱년기 증후군은 노화에 의해 유도되거나, 화학적 또는 외과적 거체에 의해 유도될 수 있다.

[0033] 본 발명의 비타민나무 추출물을 포함하는 조성물은 약제학적 제제로 제조될 수 있다. 본 발명의 약제학적 제제는 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 부형제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수 있다. 상기 제제는 분산제 또는 안정화제를 더 포함할 수 있다.

[0034] 필요에 따라, 상기 약제학적 제제는 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 예를 들면, 락토스, 덱스트로스, 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 오일이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 필요에 따라, 본 발명의 약제학적 제제는 상기 성분들 이외에 당업계에 공지된 첨가물을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나를 더 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 약제학적 제제는 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 피부 도포, 직장 주입, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 조절될 수 있으며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.01mg/kg 내지 10g/kg, 바람직하게는 1mg/kg 내지 1g/kg일 수 있다.

[0037] 본 발명의 비타민나무 추출물을 포함하는 조성물은 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 상기 기능성 식품이란 비타민나무 추출물을 식품소재에 첨가하여 제조된 식품이거나, 비타민나무 추출물을 캡슐, 분말, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 통상적인 의미의 건강 식품을 포함한다. 상기 식품의 종류로는, 예를 들면, 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디, 스낵, 과자, 피자, 면류, 껌, 아이스크림, 스프, 음료, 차, 비타민 복합제 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 필요에 따라, 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산, 펙트산염, 알긴산, 알긴산염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산화제, 과육 등을 더 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 좀 더 상세하게 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 첨부된 특허청구범위를 제한하는 것이 아니며, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 실시예에 대한 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[0040] **실시예**

[0041] <비타민나무 추출물의 제조>

[0042] 비타민나무의 잎, 가지 및 뿌리를 절단 분리하고 건조시켜 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 비타민나무를 균일하게 분쇄하여 분말로 만든 후, 비타민나무 분말 80kg에 물과 혼합한 30%의 발효주정을 10배 부피로 첨가하고 4시간동안 100℃온도에서 추출하였다. 여과지를 이용하여 여과하고 상등액을 감압 및 농축한 후에 동결 건조하여 비타민나무 30% 주정 추출물을 수득하였다.

[0043] <세포독성 측정>

[0044] 본 발명의 비타민나무 추출물의 효과를 확인하기에 앞서, 세포에 독성을 나타내지 않으며, 세포 사멸을 유도하지 않으면서 효과를 낼 수 있는 적합한 농도를 결정하기 위해 세포 독성 검사를 수행하였다. 비타민나무 추출물의 세포 독성은 쥐의 고환세포에서 유래한 TM3세포주를 대상으로 측정하였다. TM3 세포는 DMEM에 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 배지에서 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양한 것을 사용하였다.

[0045] TM3 세포를 96-well plate에 1×10⁵ cells/ml 농도로 넣고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 비타민나무 추출물을 1, 3, 10, 30 및 100µg/ml 농도로 각 well에 처리하고 24시간동안 배양하였다. MTT 용액을 첨가하고 3시간이 지난 후 상층액을 제거하고 DMSO를 well당 100µl씩 첨가한 후 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 1에 도시하였다. 참고로, 도 1 내지 도 5, 도 7 및 도 9에 도시한 모든 측정된 결과는 평균과 표준편차로 표기하고, 통계적 유의성 검증은 Student's t-test 분석법을 이용하여 p값이 0.05 미만(p<0.05)인 경우를 통계학적으로 유의하다고 보았다.

[0046] 도 1을 참고하면, 비타민나무 추출물은 처리한 모든 농도에서 TM3 세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0047] <과산화수소 유도 세포독성에 대한 세포 보호 효과 측정>

[0048] 활성산소종인 과산화수소(Hydrogen peroxide, H₂O₂)가 유도하는 세포독성에 대한 세포 보호 효과를 TM3 세포를 대상으로 측정하였다. TM3 세포를 96-well plate에 1×10⁵ cells/ml 농도로 넣고 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 각 well에 비타민나무 추출물과 과산화수소를 처리하고 24시간동안 배양하였다. 비타민나무 추출물의 농도는 각 well당 1, 3, 10, 30 및 100µg/ml 가 되도록 하고 과산화수소는 모든 well에 동일하게 200µM 이 되도록

록 처리하였다. MTT 용액을 첨가하여 3시간 후 상층액을 제거하고 DMSO를 well당 100 μ l씩 첨가한 후 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 도 1의 결과에 근거하여 과산화수소에 의해 세포독성 유도된 세포 생존도를 측정하고 그 결과를 도 2에 도시하였다.

[0049] 도 2를 참고하면, 과산화수소에 의한 세포독성이 유도된 TM3 세포는 정상군에 비해 68.6%의 생존도를 나타내 세포 생존도가 유의하게 감소하였다(^{###} $p < 0.001$). 비타민나무 추출물은 과산화수소에 의해 세포독성이 유도된 TM3 세포의 생존도를 증가시켰으나, 비타민나무 추출물을 처리하지 않은 군에 비해 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이를 통하여, 비타민나무 추출물은 과산화수소에 의해 유도되는 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다.

[0050] <TM3 세포의 테스토스테론 분비 증가 효과 측정>

[0051] TM3 세포를 6-well plate에 2×10^5 cells/ml 농도로 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. FBS free DMEM 배지에 비타민나무 추출물을 1, 3, 10, 30 및 100 μ g/ml 농도가 되도록 혼합하여 각 well에 처리하고 24시간 배양하였다. 상층액을 취한 후 Testosterone ELISA kit(ADI-900-065, ENZO Life Sciences, U.S.A)를 이용하여 테스토스테론 함량을 측정하고, 그 결과를 도 3에 도시하였다.

[0052] 도 3을 참고하면, 비타민나무 추출물을 처리한 경우 테스토스테론 레벨이 농도 의존적으로 유의성있게 증가한 것을 확인할 수 있다. 이를 통하여, 비타민나무 추출물이 TM3 세포의 테스토스테론 분비를 증가시킨 것을 확인할 수 있다.

[0053] <과산화수소 유도 조건에서 TM3 세포의 테스토스테론 분비 증가 효과 측정>

[0054] TM3 세포를 24-well plate에 2×10^5 cells/ml 농도로 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. FBS free DMEM 배지에 비타민나무 추출물 및 과산화수소를 혼합하여 각 well에 처리하고 24시간 배양하였다. 비타민나무 추출물의 농도는 각 well당 1, 3, 10, 30 및 100 μ g/ml 가 되도록 하고 과산화수소는 모든 well에 동일하게 200 μ M 이 되도록 처리하였다. 상층액을 취한 후 Testosterone ELISA kit(ADI-900-065, ENZO Life Sciences, U.S.A)를 이용하여 테스토스테론 함량을 측정하고 그 결과를 도 4에 도시하였다.

[0055] 도 4를 참고하면, 과산화수소 세포독성이 유도된 TM3 세포의 테스토스테론 농도는 세포독성 유도되지 않은 TM3 세포에 비해 유의성 있게 감소하였다([#] $p < 0.05$). 과산화수소 세포독성이 유도된 TM3 세포에 1, 3 및 10 μ g/ml 농도로 비타민나무 추출물이 처리된 경우 테스토스테론 분비가 유의성있게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0056] <체내 테스토스테론 분비 증가 효과 측정>

[0057] in vivo 레벨에서의 테스토스테론 분비 증가 효과는 노령 수컷 쥐를 이용하여 확인하였다. 생후 6개월령의 수컷 쥐를 1주일간 적응시킨 뒤, 비타민나무 추출물을 투여한 실험군과 투여하지 않은 대조군으로 나누어 실험에 사용하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 23 \pm 1 $^{\circ}$ C, 습도 45 \pm 5%, 명암은 12시간 주기로 자동 조명 조절하고, 물과 식이는 자유롭게 섭취시켰다. 실험군은 비타민나무 추출물을 300mg/kg 농도로 증류수에 녹여 매일 오전 같은 시간에 경구투여 하였으며, 대조군은 동량의 증류수를 경구투여 하였다. 경구투여는 7일동안 하고, 마지막 경구투여 후 쥐 꼬리에서 혈액을 채취한후 4000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청을 대상으로 Testosterone ELISA kit(ADI-900-065, ENZO Life Sciences, U.S.A)를 이용하여 테스토스테론 함량을 측정하고 그 결과를 도 5에 도시하였다.

[0058] 도 5를 참고하면, 비타민나무 추출물을 투여한 실험군(HR300)에서는 대조군에 비해 혈청내 테스토스테론 농도가 83% 가량 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$). 이를 통하여, 비타민나무 추출물이 쥐의 체내에서 테스토스테론 분비를 증가시킨 것을 확인할 수 있다.

[0059] <근력 강화 효과 측정>

[0060] 비타민나무 추출물의 근력 강화 효과는 도 6에 도시한 회전가능한 원통형의 로타로드(rotarod)를 이용하여 노령 수컷 쥐에게 운동을 시켜 근력상태를 평가하여 측정하였다. 사용한 쥐의 월령, 사육조건 및 비타민나무 추출물의 투여 조건은 상기 체내 테스토스테론 분비 증가 효과 측정 실험과 동일하게 하고, 투여 마지막날에 회전속도 20rpm의 로타로드 원통 위에서 쥐들을 강제로 걷게하여 로타로드에 적응시켰다. 24시간 후, 동일한 속도로 회전하는 원통위에 다시 쥐들을 올려 걷게하고, 쥐들이 원통위에서 균형을 잃고 떨어지는 시간을 측정하였다. 측정된 결과는 도 7에 도시하였다.

[0061] 도 7을 참고하면, 로타로드 운동을 통해 근력상태를 평가한 결과, 비타민나무 추출물을 투여한 실험군(HR300)의 로타로드 운동시간이 대조군의 로타로드 운동시간에 비해 유의미하게 증가하여, 비타민나무 추출물이 노령 수컷 쥐에서 근력 강화 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

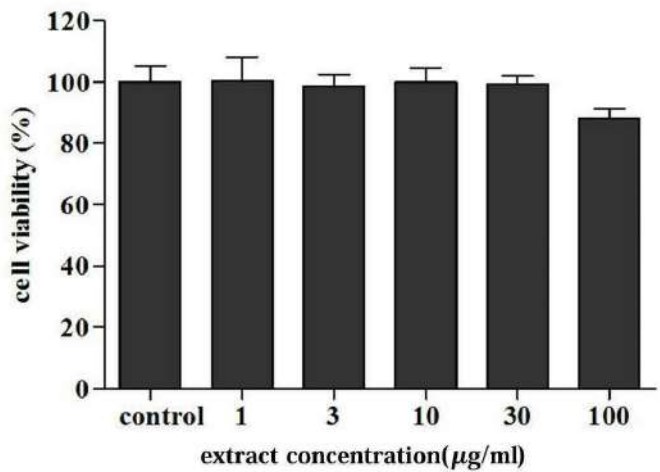
[0062] <피로도 개선 효과 측정>

[0063] 비타민나무 추출물의 피로도 개선 효과는 도 8에 도시한 전기 혐오자극을 이용한 트레드밀(treadmill) 운동장치를 노령 수컷 쥐에게 적용하여 측정하였다. 트레드밀 운동장치의 회전물 회전속도는 20rpm으로 하고, 각도는 지상과 20°의 각도로 전기자극관 쪽으로 기울게 하였다. 사용한 쥐의 월령, 사육조건 및 비타민나무 추출물의 투여 조건은 상기 체내 테스토스테론 분비 증가 효과 측정 실험과 동일하게 하고, 투여 마지막날에 10분간 적응 훈련을 시켰다. 24시간후, 동일한 속도로 회전하는 트레드밀 운동장치 위에 쥐들을 올려 달리도록 하고, 쥐들이 탈진하여 더이상 달리지 못하는 한계시점까지를 운동시간으로 설정하여 비타민나무 추출물의 항피로 효과 활성을 측정하였다. 측정된 결과는 도 9에 도시하였다.

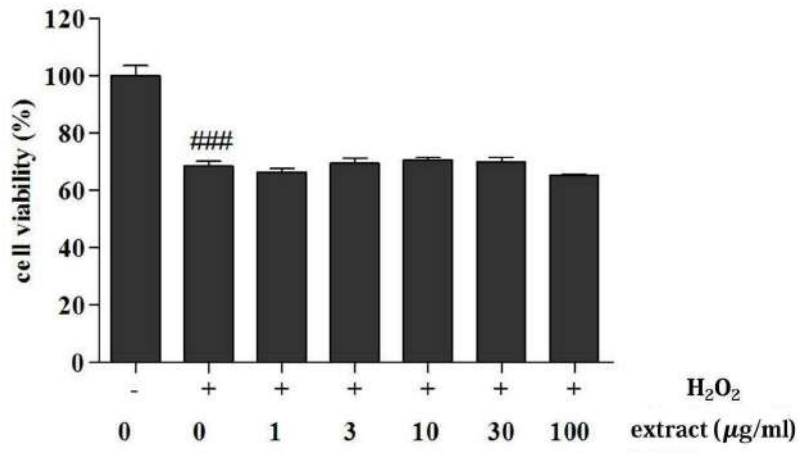
[0064] 도 9를 참고하면, 트레드밀 운동을 통해 항피로 효과 활성을 측정한 결과, 비타민나무 추출물을 투여한 실험군(HR300)의 트레드밀 운동시간이 대조군의 트레드밀 운동시간에 비해 유의미하게 증가하여($p < 0.05$), 비타민나무 추출물이 노령 수컷 쥐에서 피로도 개선 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

도면

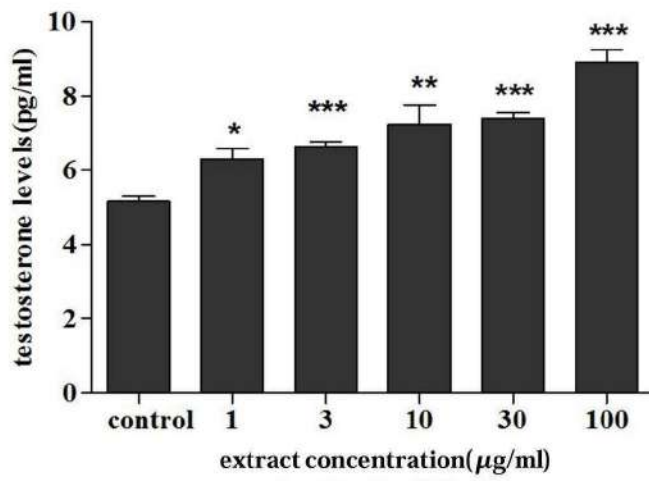
도면1



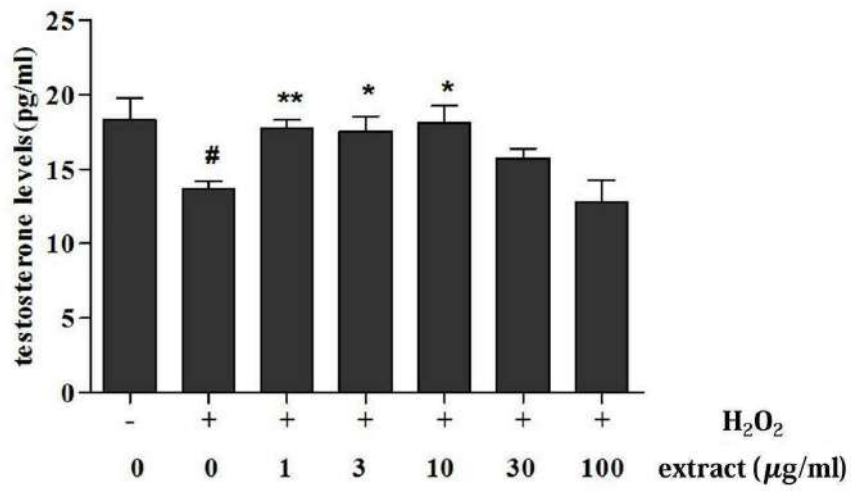
도면2



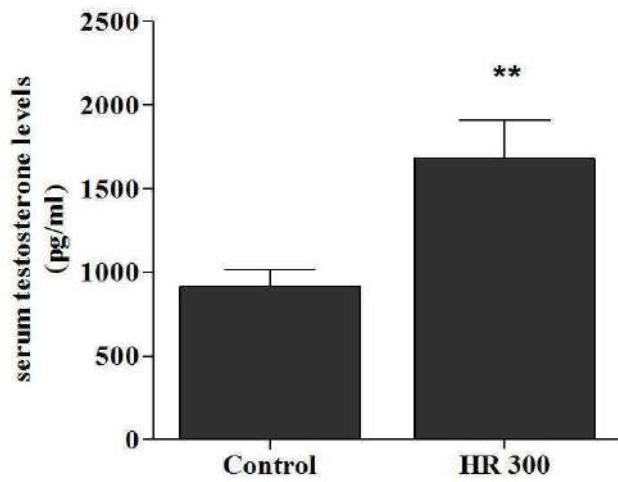
도면3



도면4



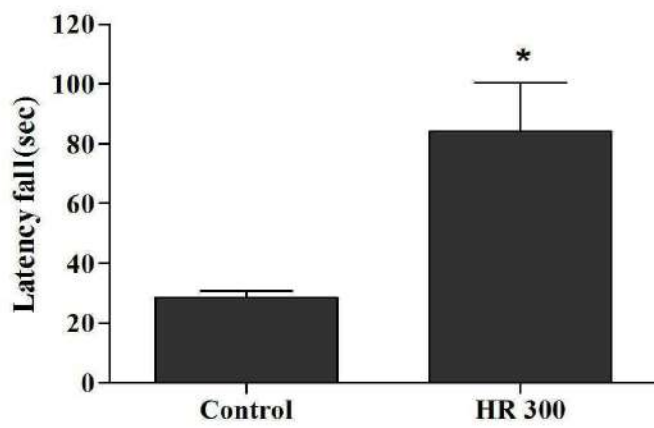
도면5



도면6



도면7



도면8



도면9

