(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 7 월 7 일 (07.07.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/146016 A1

(51) 국제특허분류:
A23L 13/20 (2016.01) *A61K 35/32* (2006.01)
A23L 13/40 (2016.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/020127

(22) 국제출원일: 2021 년 12 월 29 일 (29.12.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

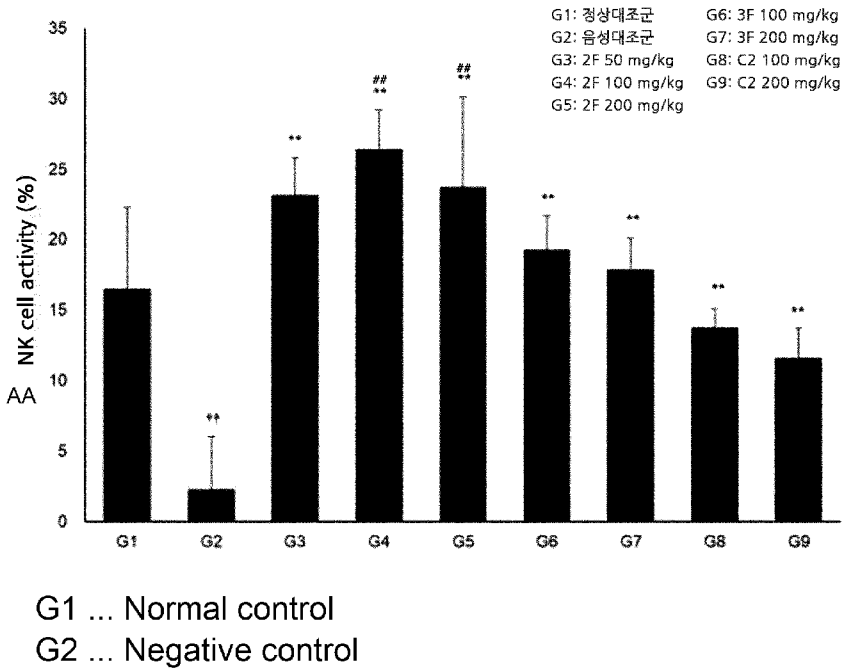
(30) 우선권정보:
10-2020-0187513 2020 년 12 월 30 일 (30.12.2020) KR
10-2021-0189206 2021 년 12 월 28 일 (28.12.2021) KR

(71) 출원인: 주식회사 유한건강생활 (YUHAN CARE CO., LTD.) [KR/KR]; 07335 서울특별시 영등포구 여의대로 108, 34층, Seoul (KR).

(72) 발명자: 강종수 (KANG, Jongsoo); 01370 서울특별시 도봉구 우이천로 367, 102동 203호, Seoul (KR). 정경인 (CHUNG, Kyung In); 05096 서울특별시 광진구 뚝섬로 34길 67, 12층 A1202호, Seoul (KR). 박일범 (PARK, Il Bum); 16325 경기도 수원시 장안구 정자로42번길 52, 738동 1101호, Gyeonggi-do (KR). 박현제 (PARK, Hyun Je); 15889 경기도 군포시 속달로210번길 7-1, B동 202호, Gyeonggi-do (KR). 송애리 (SONG, Aeri); 18441 경기도 화성시 동탄중앙로 51, 630동 1102호, Gyeonggi-do (KR). 엄세미 (EOM, Semi); 07283 서울특별시 영등포구 문래로4길 6, 202동 206호, Seoul (KR). 전혜진 (JEON, Hye Jin); 16995 경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 283, 108동 1501호, Gyeonggi-do (KR). 백신화 (BAEK, Sin Hwa); 31145 충청남도 천안시 서북구 천안천4길 20, 101동 3102호, Chungcheongnam-do (KR).

(54) **Title:** IMMUNO-POTENTIATING ENZYMATIC EXTRACT OF DEER ANTLER THAT EXCELLENTLY ENHANCES ACTIVITY OF IMMUNE CELL INCLUDING NK CELL

(54) **발명의 명칭:** NK 세포를 포함한 면역 세포 활성을 우수하게 증진시키는 면역 강화 녹용 효소분해 추출물



(57) **Abstract:** The present invention relates to an immune-potentiating composition and, more specifically, to a composition comprising as an active ingredient an enzymatic extract of deer antler with excellent NK cell activity, whereby the composition exhibits immuno-potentiation effects by proliferating immune cells and enhancing particularly NK cell activity and as such, can be utilized as a food composition and further as a health functional food or pharmaceutical composition for immuno-potentiation.

(57) **요약서:** 본 발명은 면역 증강용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 NK 세포 활성이 우수한 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함함으로써 면역세포를 증식시키고, 특히 NK 세포 활성을 증진시켜 면역 증강 효과를 나타내므로, 면역 증강용 식품 조성물, 나아가 건강기능식품 또는 약학 조성물로 활용될 수 있다.

WO 2022/146016 A1

[다음 쪽 계속]

(74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울특별시 서초구 동산로 23 베델회관 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: NK 세포를 포함한 면역 세포 활성을 우수하게 증진시키는 면역 강화 녹용 효소분해 추출물

기술분야

[1] 본 발명은 면역 증강용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 NK 세포 활성이 우수한 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 식품 조성물, 특히 면역 증강용 건강기능식품, 면역 증강용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 생활수준이 높아지고 식생활이 서구화되면서 영양과잉, 운동부족 등으로 인한 비만, 당뇨, 고혈압 및 심장병 등과 같은 생활 습관병(성인병) 발병이 높아지고 있다. 또한, 평균수명 연장으로 인한 노령화 사회로의 진입 속도가 빨라지면서 건강증진에 대한 관심이 높아지고 있다.

[3] 건강증진(health promotion)이란 질병, 특히 만성 퇴행성질환이나 감염증, 계속되는 스트레스에 대한 저항력의 증가 그리고 일상의 활동력의 증대를 꾀하는 것으로 그 방책으로는 영양의 개선, 면역기능 강화, 적절한 운동과 휴식, 정신적 활동의 지속 등 생활양식 전반에 미치는 관리가 필요하다.

[4] 특히, 면역력이 높으면 평소에 질병이 잘 걸리지 않으며, 설혹 질병에 걸리더라도 회복이 빠르다. 이러한 건강한 상태를 지속적으로 유지하면서 나이를 먹으면 수명이 연장되는 것은 자명한 일이다. 따라서 면역력은 인간의 건강과 수명에 직결되어 있으며, 건강을 유지하고 수명을 연장하기 위해서는 면역력을 관리하는 것이 필수적이라고 할 수 있겠다.

[5] 면역(Immune)이란, 인간 및 동물의 체내에서 외래성 및 내인성 이물질을 생리적으로 인식하여 배제하고, 항상성을 유지시키기 위한 기작을 일컫는다. 여기에서 이물질을 항원(antigen)이라고 하며, 이를 제거하는 과정에 수많은 종류의 백혈구 세포와 단백질이 관여한다. 면역은 크게 태어날 때부터 지니고 있는 선천면역과 후천적으로 생활 등에 적응되어 얻어지는 획득면역으로 구분된다.

[6] 선천면역(innate immunity)은 자연면역, 자연저항이라고도 한다. 항원에 대해 비특이적으로 반응하며 특별한 기억작용은 없다. 선천적인 면역체계로는 항원의 침입을 차단하는 피부·점액조직, 상산성의 위산, 혈액에 존재하는 보체(complement) 등이 있다. 세포로는 식균작용을 담당하는 대식세포(macrophage)와 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocyte), 감염세포를 죽일 수 있는 NK세포 등이 있다. 또한, 대식세포에 의해 생산되는 사이토카인(cytokine)이 있다. 실제로 대부분의 감염은 상기 선천면역에 의해 방어된다.

[7] 외부 감염에 대한 최초의 인식은 주로 대식세포(macrophage)가 수행한다. 대식세포가 항원을 탐식하는 과정에서 면역반응을 매개하는 사이토카인(cytokine)이 생산된다.

[8] 또한 사이토카인은 신체의 방어체계를 제어하고 자극하는 신호물질로 사용되는 당단백질로 면역, 감염병, 조혈기능, 조직회복, 세포의 발전 및 성장에 중요한 기능을 한다. 사이토카인은 국소부위에 염증을 유발함으로서 면역세포가 감염부위에 모이게 하는 기능을 가지고 있어, 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)이라 불리기도 한다. 가장 중요한 면역기능은 인터루킨, 인터페론 감마, 종양괴사인자로 알려진 사이토카인의 집단에 의해 수행된다. 이들 중 인터루킨(Interleukin)은 면역반응이 일어나는 여러 단계에 작용하여 면역반응을 조절함으로써 인체의 방어작용에 중요한 역할을 하는 물질로, 그 종류는 IL-1, IL-6, IL-12 등이 있다.

[9] 또한 NK 세포(Natural killer cell; 자연살해세포)는 항원에 의한 사전 감작 없이도 종양세포, 박테리아, 세포 내 기생생물 또는 바이러스에 감염된 숙주 세포를 제거하는 기능을 수행하며, 부적절한 골수 이식을 거부하고, T 세포의 면역반응을 조절하는 등 생체 내 면역계 방어기작의 제1선에서 작용하는 행동세포로서, NK세포의 활성이 뛰어날 경우 표적 세포를 공격 및 제거하는 능력 또한 증가하는 것으로 알려져 있다.

[10] 한편 녹용(Cervi Parvum Corun, Antler)은 매화록(梅花), 대록(大鹿) 또는 마록(馬鹿)의 숫사슴의 털이 밀생되고 아직 골질화되지 않았거나 약간 골질화된 어린 뿔을 절단하여 건조시킨 것으로, 자라기 시작한 지 2개월 이내의 각질화가 되지 않아 조직이 연하고 털이 골고루 덮여 있는 수컷의 뿔을 의미한다. 각질화가 되지 않은 사슴뿔은 약간 물렁하나, 시기적으로 가을에는 단단하게 각질화가 일어나 녹용이 효능이 떨어지는데, 이는 녹각이라 부른다.

[11] 동의보감 등의 고문헌에 따르면, 녹용은 강장, 생장발육 촉진. 보혈, 조혈, 오장육부의 항진, 심부전증 치료, 신체기능 항진, 신체활력 증강 및 신장의 이뇨기능 강화 등 많은 약리적 효능을 가지는 것으로 알려져 있다. 동물을 이용한 효능에 관한 연구로서는, 백서의 성장촉진, 조혈, 혈청 콜레스테롤 저하, 단백질 합성 촉진, 노화방지, 백서의 척추신경 효소활성 증대, 진통 및 항피로, 면역활성 증대 및 진정 작용 등이 있음이 보고되었다.

[12] 녹용의 생리활성 성분으로는, 아미노산, 인산칼슘, 탄산칼슘, 콜라겐, 인지질, 콘드로이틴(chondroitin), 글루코사민(glucosamine), 판토크린(pantocrin), 갱글리오사이드(ganglioside), 하이알루로닌산(hyaluronic acid) 등이 알려져 있다.

[13] 종래 한방에서 사용하는 녹용의 복용방법으로는, 건조 녹용을 여러 종류의 생약제들과 혼합, 분쇄한 후 물을 용매로 하여 가열 추출하여 그 여액을 복용하는 방법과, 건조 녹용과 생약제들을 분쇄하여 가루로 만든 뒤 환(丸)으로 해서 복용하는 방법이 주로 이용되고 있다. 추출하여 복용하는 것은 녹용의 유효성분을 흡수하기 쉬운 반면에 추출박에 포함되어 있는 유효성분을

활용하지 못하는 한계가 있었고, 환제형의 경우에는 녹용 자체를 섭취한다는 이점이 있으나 체내에서 유효성분의 완전한 흡수가 어렵다는 문제점이 있었다.

[14] 한국공개특허 제2005-0090041호에서는 녹용을 분쇄한 후 추출하고, 단백분해효소처리 및 염산 분해 처리를 하는 녹용 추출 방법을 기술하고 있는데, 추출, 단백분해효소처리 및 염산 분해 처리를 순차적으로 실시하므로 공정이 복잡하고, 인체에 유용한 생리활성물질이 분해되는 문제가 있었다.

[15] 또한 한국공개특허 제2013-0078724호에서는 녹용을 산성 조건에서 펩신과 지방분해효소로 처리한 후, 중성 조건에서 다시 단백질분해효소로 처리하는 방법을 기술하고 있는데, 단순히 유리 아미노산 함량 및 인지질의 함량이 증가되었다고만 기술하고 있을 뿐, 실제 생리활성이나 구체적 기능성에 대해서는 기술하고 있지 않은 한계가 있었다.

[16] [선행기술문헌]

[17] [특허문헌]

[18] (특허문헌 1) 한국공개특허 제2005-0090041호

[19] (특허문헌 2) 한국공개특허 제2013-0078724호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[20] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 녹용을 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소로 분해시킨 NK 세포 활성이 우수한 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[21] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 생녹용 또는 냉동 녹용을 동결건조하는 동결건조 녹용 준비 단계; 및 상기 동결건조 녹용 10 중량부에 물 50 내지 500 중량부 및 효소 0.01 내지 1 중량부를 넣고 30 내지 60 ℃에서 1 내지 48 시간 동안 반응시키는 효소처리 단계;를 포함하고, 상기 효소는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소인 것을 특징으로 하는 면역 증강 활성을 가진 녹용 효소분해 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[22] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 녹용을 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소로 분해시킨 NK 세포 활성이 우수한 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[23] 본 발명은 상기 과제를 달성하기 위하여, 녹용을 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소로 분해시킨 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 식품 조성물을 제공한다.

[24] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 녹용 효소분해 추출물은 녹용을 녹용을 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소로 분해시킨 녹용 효소분해 추출물일 수 있다.

[25] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소는 곰팡이 유래의 프로테아제 및 펩티다아제의 복합물일 수 있다.

[26] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 곰팡이 유래의 프로테아제 및 펩티다아제의 복합물은 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) 유래의 엔도프로테아제 및 엑소펩티데이즈의 복합물일 수 있다.

[27] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 엔도프로테아제 및 엑소펩티데이즈의 복합물은 플라보자임(Flavourzyme)일 수 있다.

[28] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소는 바실러스 유래의 중성의 프로테아제일 수 있다.

[29] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 바실러스 유래의 중성의 프로테아제는 바실러스 아밀로리퀘팍시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*)의 수중 발효(submerged fermentation)에 의해 생산되는 중성의 메탈로(Zn) 엔도프로테아제일 수 있다.

[30] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 중성의 메탈로(Zn) 엔도프로테아제는 뉴트라아제(Neutrase)일 수 있다.

[31] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 녹용 효소분해 추출물은 생녹용 또는 냉동 녹용을 동결건조한 건조 녹용을 효소처리에 의해 가수분해시킨 녹용 효소분해 추출물일 수 있다.

[32] 또한 본 발명은 생녹용 또는 냉동 녹용을 동결건조하는 동결건조 녹용 준비 단계; 및 상기 동결건조 녹용 10 중량부에 물 50 내지 500 중량부 및 효소 0.01 내지 1 중량부를 넣고 30 내지 60 ℃에서 1 내지 48 시간 동안 반응시키는 효소처리 단계;를 포함하고, 상기 효소는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소인 것을 특징으로 하는 면역 증강 활성을 가진 녹용 효소분해 추출물의 제조방법을 제공한다.

[33] 또한 본 발명은 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소로 분해시킨 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 약학 조성물을 제공한다.

[34] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 녹용 효소분해 추출물은 녹용을 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소로 분해시킨 녹용 효소분해 추출물일 수 있다.

발명의 효과

[35] 본 발명의 NK 세포 활성이 우수한 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 면역세포를 증식시키거나 면역세포의 기능을 활성화시키므로 면역 증강용 식품 조성물, 나아가 건강기능식품 또는 약학

조성물로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[36] 도 1은 실험예 2에서 녹용 효소분해 추출물의 항원 자극 백혈구 면역 활성 증진 효과를 NanoString을 이용하여 면역관련 사이토카인 발현을 분석법을 이용하여 확인한 것으로, up-regulation 될수록 붉은색, down-regulation 될수록 푸른색으로 표시한 것이다.

[37] 도 2는 실험예 3에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 농도에 따른 대식세포에서의 산화질소 생성 효과를 비교한 그래프이다.

[38] 도 3은 실험예 4에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 농도에 따른 대식세포에서 iNOS 유전자 발현량을 비교한 그래프이다.

[39] 도 4는 실험예 4에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 농도에 따른 대식세포에서 COX2 유전자 발현량을 비교한 그래프이다.

[40] 도 5는 실험예 5에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 농도에 따른 TNF-α의 상대 발현량을 비교한 그래프이다.

[41] 도 6은 실험예 5에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 농도에 따른 IFN-γ의 상대 발현량을 비교한 그래프이다.

[42] 도 7은 실험예 5에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 농도에 따른 IL-6의 상대 발현량을 비교한 그래프이다.

[43] 도 8은 실험예 5에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 농도에 따른 IL-1β의 상대 발현량을 비교한 그래프이다.

[44] 도 9는 실험예 6에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 농도에 따른 배양시간의 변화에 따른 대식세포 증식능을 비교한 그래프이다.

[45] 도 10은 실험예 7에서 면역 억제 동물모델에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 투여 농도에 따른 NK 세포 활성을 비교한 그래프이다.

[46] 도 11은 실험예 7에서 면역 억제 동물모델에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 투여 농도에 따른 TNF-α 농도를 비교한 그래프이다.

[47] 도12는 실험예 7에서 면역 억제 동물모델에서 녹용 효소분해 추출물의 종류 및 투여 농도에 따른 인터페론 감마(IFN-γ) 농도를 비교한 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[48] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[49] 본 발명의 발명자들은 녹용 효소분해 추출물, 특히 녹용을 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소로 분해시킨 녹용 효소분해 추출물, 바람직하게는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소로 분해시킨 녹용 효소분해 추출물이 NK세포 활성이 우수하며, 면역 관련 사이토카인 발현을 증진시켜 면역 증강 활성을 나타냄을 확인하였다.

[50] 상기 녹용은 생후 2개월 이내의 골질화되지 않은 사슴의 뿔을 말한다.

[51] 상기 녹용은 저습도 환경에서 수 주에 걸쳐 자연건조시킨 건조 녹용을 사용할 수도 있으나, 바람직하게 본 발명에서는 생녹용 또는 냉동 녹용을 동결건조한 건조 녹용을 사용할 수 있다.

[52] 생녹용 또는 냉동 녹용을 자연건조시키거나 또는 동결건조 전 살균하기 위해 열탕처리하는 경우, 녹용 심부의 온도가 효소 실활 온도까지 상승하기 전에 내인성 효소의 작용에 의해 비특이적이고 불균일한 효소 분해가 발생하는 문제가 있다. 따라서 생녹용 또는 냉동녹용을 자연건조시키거나 동결건조 전 열탕처리하지 않고, 바로 동결건조할 경우 품질이 균일하며 면역 증강 활성이 뛰어난 녹용 효소분해 추출물 제조가 가능하다. 일단 동결건조시킨 건조 녹용은 통상의 방법으로 살균 후 사용할 수 있고, 예를 들어 120 내지 130 ℃에서 30초 내지 20분 열처리한 후 사용할 수 있다.

[53] 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.23.1의 효소, 예를 들어 펩신(pepsin), 아스파틱 프로테나아제(Aspartic proteinnase)와 같은 효소 또한 녹용 효소분해 추출물을 제조하더라도 면역 증강 효과를 나타내지 않는다. Pepsin은 아스파틱 엔도펩티데이즈로소 선택적으로 소수성, 특히 방향족 아미노산 잔기를 절단한다.

[54] 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소, 예를 들어 A-LAP, acidic M17 leucine aminopeptidase, AcLAP, adipocyte-derived leucine aminopeptidase, Aminopeptidase, "플라보자임(Flavourzyme)"(Novozyme 사) 등은 효소처리를 통해 녹용 효소분해 추출물을 제조할 경우 종래 녹용 열수 추출물 또는 초임계 녹용 추출물에 비해 훨씬 뛰어난 면역 증강 효과를 나타낸다. 상기 Flavourzyme은 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)의 수중 발효(submerged fermentation)에 의해 생산되는 엔도프로테아제 및 엑소펩티데이즈의 복합물이다.

[55] 또한 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소는 바실러스 유래의 중성의 프로테이제로서, 예를 들어 바실로라이신, 바실러스 메탈로엔도펩티다제, 아닐로자임 P10; 바실러스 메탈로프로테나제, 메가테리오펩티다제, "뉴트라아제(Neutrase)"(Novozyme 사) 등은 효소처리를 통해 녹용 효소분해 추출물을 제조할 경우 종래 녹용 열수 추출물 또는 초임계 녹용 추출물에 비해 훨씬 뛰어난 면역 증강 효과를 나타낸다. 상기 Neutrase는 바실러스 아밀로리퀘팍시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*)의 수중 발효(submerged fermentation)에 의해 생산되는 중성의 메탈로(Zn) 엔도프로테아제이다. Neutrase 외에 상기 효소 클래스에 속하는 박테리아 기원의 중성 메탈로프로테나제인"Protease N 'Amano'"(Amano Enzyme 사) 및 "Corolase N"(AB Enzymes 사) 등에 의해 효소처리된 녹용 효소분해 추출물들도 종래 녹용 열수 추출물 또는 초임계 녹용 추출물에 비해 훨씬 뛰어난 면역 증강 효과를 나타낸다.

[56] 그러나 UBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.21.62의 효소, 예를 들어 알칼라아제(Alcalase), 섭틸리신, 콜로라아제 N(colorase N), ALK-효소;

바실로펩티다제 A; 바실로펩티다제 B; 바실러스 섭틸리스 알칼라인 프로테나제 바이오프라제(bioprase); 바이오프라제 AL 15; 바이오프라제 APL 30; 콜리스티나제(colistinase); 섭틸리신 J; 섭틸리신 S41; 섭틸리신 센다이(섭틸리신 Sendai); 섭틸리신 GX; 섭틸리신 E; 섭틸리신 BL; 섭틸리신 A (Type VIII); 제네나제(genenase) I; 에스페라제(esperase); 맥사타제(maxatase); 서르모아제(thermoase) PC 10; 프로테아제 XXVII; 서르모아제; 슈페라제(superase); 섭틸리신 DY; 섭틸로펩티다제; SP 266; 사비나제(savinase) 8.0L; 사비나제 4.0T; 카주사제(kazusase); 프로테아제 VIII; 옵티마제; 옵티클린(opticlean); 바실러스 섭틸리스 알칼라인 프로테나제; protin A 3L; 사비나제; 사비나제 16.0L; 사비나제 32.0 L EX; 오리엔타제(orientase) 10B; 프로테아제 S 및 유사한 세린 엔도펩티다제들은 효소처리를 통해 녹용 효소분해 추출물을 제조하더라도 면역 증강 효과를 나타내지 않는다.

[57] 또한 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소 및 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.21.62의 효소의 복합물인 "프로타멕스(Protamex)"(Novozyme 사)의 경우에도 효소처리를 통해 녹용 효소분해 추출물을 제조하더라도 면역 증강 효과를 나타내지 않는다.

[58] 상기 녹용 효소분해 추출물 제조는 물에 적절한 양의 녹용과 효소를 투입하여 효소처리한다. 예를 들어 동결건조한 녹용과 같은 건조 녹용 10 중량부에 대하여 50 내지 500 중량부, 바람직하게는 100 내지 400 중량부의 물을 투입하고, 효소는 0.01 내지 1 중량부, 바람직하게는 0.02 내지 0.8 중량부, 더욱 바람직하게는 0.05 내지 0.5 중량부를 투입할 수 있으나, 그 투입량은 필요에 따라 임의로 변경하여 사용할 수 있다.

[59] 상기 효소처리 온도는 선택된 효소의 최적 온도에 따라 적절한 범위을 선택할 수 있고, 바람직하게는 30 내지 60 ℃, 더욱 바람직하게는 40 내지 55 ℃에서 반응시킬 수 있다.

[60] 상기 효소처리 시간은 효소처리에 의해 생성되는 펩타이드의 양, 펩타이드의 분자량 및 그 프로파일에 따라 적절한 시간을 선택할 수 있고, 바람직하게는 1 시간 이상, 더욱 바람직하게는 2 시간 이상, 더더욱 바람직하게는 3 시간 이상이며, 일정 시간 이상으로 효소처리하더라도 생산 수율에 미치는 영향이 거의 미미하고, 공정 비용만 상승할 수 있으므로 바람직하게는 48시간 이하, 더욱 바람직하게는 24시간 이하, 더더욱 바람직하게는 12 시간 이하로 반응시킨다.

[61] 상기 효소처리 단계 후에는 효소를 불활성화시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 효소 불활성화는 통상의 기술자에게 공지된 어떠한 방법을 적용하여도 되고, 예를 들어 85 ℃ 이상의 온도에서 20 분 이상 처리하여 불활성화 시킬 수 있다.

[62] 상기 '녹용 효소분해 추출물'은 녹용에 효소처리를 통해 얻어진 반응생성물, 이들로부터 분획한 분획물, 이들 분해물 또는 분획물을 추가적으로 농축한 농축물, 이를 정제 또는 분리한 정제물도 포함하고, 상기 반응생성물, 분획물,

농축물 또는 정제물을 건조한 건조물 또는 그를 분쇄한 분말을 포함하는 의미로 사용된다.

[63] 상기 농축물 또는 정제물의 제조를 위해 원리분리하거나, 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시키거나, 또는 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 부가할 수 있다.

[64] 본 발명은 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 식품 조성물에 관한 것이다.

[65] 상기 '식품 조성물'은 유효성분으로 녹용 효소분해 추출물 이외에, 식품 제조에 통상적으로 사용되는 식품의 기준 및 규격('식품공전')에 기재된 식품으로 사용 가능한 식품 원료, 식품첨가물 공전에 기재된 식품첨가물을 포함한다.

[66] 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상기 탄수화물은 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 설탕, 유당 등; 올리고당 또는 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 물엿, 사이클로덱스트린 등; 당알코올, 예를 들어 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등을 사용할 수 있다. 상기 향미제는 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[67] 상기 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 식품 조성물을 제조하는 경우 녹용 효소분해 추출물은 면역 증강 효능을 나타내는 함량이면 특별히 한정할 필요는 없으나, 예를 들어 0.1 내지 99 중량%, 0.5 내지 95 중량%, 1 내지 90 중량%, 2 내지 80 중량%, 3 내지 70 중량%, 4 내지 60 중량%, 5 내지 50 중량%로 포함될 수 있다.

[68] 상기 식품 조성물에서 유효성분인 녹용 효소분해 추출물은 섭취자의 상태, 체중, 질병의 유무나 정도 및 기간에 따라 다르지만, 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예들 들어 1일 투여량을 기준으로 1 내지 5,000 mg, 바람직하게는 5 내지 2,000 mg, 더욱 바람직하게는 10 내지 1,000 mg, 더더욱 바람직하게는 20 내지 800 mg, 가장 바람직하게는 50 내지 500 mg일 수 있고, 투여 횟수는 특별히 한정할 필요는 없으나 1일 3회 내지 1주일에 1회의 범위 내에서 통상의 기술자가 조절할 수 있다. 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다.

[69] 상기 식품 조성물은 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 엑스제, 젤리 제형, 티백 제형 또는 음료 제형일 수 있다.

[70] 또한 일반 식품에 면역 증강 기능성을 부여하기 위하여 상기 녹용 효소분해 추출물을 첨가할 수 있으며, 첨가가 가능한 식품은, 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어 식품위생법 제7조에 따른 식품의 기준 및 규격('식품공전')에 예시된 과자류, 빵 또는 떡류, 코코아가공품류 또는 초콜릿류, 식육 또는

알가공품, 어육가공품, 두부류 또는 묵류, 면류, 다류, 커피, 음료류, 특수용도식품, 장류, 조미식품, 드레싱류, 김치류, 젓갈류, 절임식품, 조림식품, 주류, 건포류, 기타 식품류 등에 첨가될 수 있다. 또한 축산물위생관리법 제4조에 따른 축산물의 가공기준 및 성분규격('축산물공전')에 예시된 유가공품, 식육가공품 및 포장육, 알가공품에 첨가될 수 있다.

[71] 한편 상기 녹용 효소분해 추출물은 NK세포 활성이 우수하며, 면역 관련 사이토카인 발현을 증진시키므로, 상기 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 하는 식품 조성물은 단독으로 "면역 증강에 도움을 주는 건강기능식품"으로 이용될 수 있다.

[72] 상기 '건강기능식품'은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 법적 기준에 따라 제조(가공을 포함)한 식품(건강기능식품에 관한 법률 제3조 제1호)을 말한다. 상기 '건강기능식품'은 국가마다 용어나 범위에 차이가 있을 수 있으나, 미국의 '식이 보충제(Dietary Supplement)', 유럽의 '식품 보충제(Food Supplemnet)', 일본의 '보건기능식품' 또는 '특정보건용식품(Food for Special Health Use, FoSHU)', 중국의 '보건식품' 등에 해당할 수 있다.

[73] 상기 식품 조성물 또는 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 식품첨가물로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 '식품첨가물공전'의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 따른다.

[74] 또한 상기 건강기능식품에는 상기 녹용 효소분해 추출물과 함께 "면역 증강에 도움을 주는 건강기능식품"에 사용되는 '기능성 원료'로 고시된 원료 또는 개별인정된 원료로서, L-글루타민, 게르마늄효모, 금사상황버섯, Enterococcus faecalis 가열처리건조분말, 당귀혼합추출물, 동충하초 주정추출물, 스피루리나, 클로렐라, 청국장균배양정제물(폴리감마글루탐산칼륨), 표고버섯균사체, 효모베타글루칸, 인삼다당체추출물 등의 면역 증강과 관련된 건강기능식품 소재를 복합하여 사용할 수 있다.

[75] 본 발명은 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 약학 조성물에 관한 것이다.

[76] 상기 '약학 조성물'은 유효성분으로 NK세포 활성이 우수하며, 면역 관련 사이토카인 발현을 증진시키는 녹용 효소분해 추출물 이외에, 약학 조성물 등의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[77] 상기 '면역 증강용 약학 조성물'은 면역항암제 또는 항암보조제일 수 있다. 상기 면역항암제는 면역인자의 발현을 유도하여 면역세포의 활성을 증가시켜 암세포를 사멸시키는 것이고, 상기 암세포는 고형암의 암세포일 수 있으며, 보다 상세하게 상기 고형암은 대장암, 유방암, 폐암, 위암, 상피성 난소암, 뇌암, 피부암 및 간암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 항암보조제는 항암제 투여에 의한 부작용을 완화시킬 수 있으며, 상기 항암제 투여에 의한 부작용은 체중 또는 면역 인자의 감소 및 악액질(cachexia)로

이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[78] 상기 '면역 증강용 약학 조성물'은 항바이러스용 백신의 효능을 증폭시키는 면역증강제일 수 있다. 상기 면역증강제는 항바이러스용 백신과 병행해서 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[79] 상기 항바이러스용 백신은, 인플루엔자, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 헤르페스 단순 바이러스(2형), 소아마비, 디프테리아, 백일해, 헤모필루스 B형 인플루엔자(Hib), 홍역, 유행성 이하선염, 풍진, 장티푸스열, 수두(치킨 폭스), 뎅그열, 엡스타인-바르 바이러스 감염, 사람 유두종 바이러스 감염, 폐렴구균 감염, 수막구균 감염, 폐렴알균 감염, 바이러스 수막염, 로타바이러스 감염, 진드기-매개 뇌염, 여행중 설사, 콜레라, 황열병 또는 결핵의 예방을 위한 인간용 백신일 수 있다.

[80] 상기 '담체'는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물이다. 상기 '희석제'는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물이다.

[81] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어, 유당, 포도당, 설탕, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다.

[82] 상기 약학 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 무엇보다도, 치료대상 개체의 상태, 치료 대상 질환의 특정한 카테고리 또는 종류, 투여 경로, 사용되는 치료제의 속성에 의존적일 것이다.

[83] 상기 약학 조성물은 체내에서 활성성분의 흡수도, 배설속도, 환자 또는 치료대상 동물의 연령 및 체중, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 1일 0.1 내지 1,000mg/kg, 바람직하게는 1 내지 500mg/kg, 더욱 바람직하게는 5 내지 250mg/kg, 가장 바람직하게는 10 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 이렇게 제형화 된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 일정시간 간격으로 수회 투여할 수 있다.

[84] 상기 약학 조성물은 개별적으로 예방제 또는 치료제로서 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[85] 상기 약학조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 트로키제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 그리고 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등의 비경구 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[86] 제형화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[87] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 녹용 효소분해 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 설탕 또는 유당, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[88] 비경구 투여를 위한 제제에는 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[89]

[90] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[91] 제조예 1: 녹용 분말의 제조

[92] 혈액을 포함하는 냉동 녹용(뉴질랜드 산)을 세척한 후 적절한 크기로 분쇄하여 동결건조한 후, 이를 다시 분쇄하고 123 ℃에서 7분 열처리하여 동결건조 녹용 분말을 제조하였다.

[93]

[94] 제조예 2: 녹용 효소분해 추출물의 제조

[95] 제조예 1의 녹용 분말 10 g을 취해 물 199 mL을 혼합하였다. 그 혼합물을 각 효소에 따른 필요 온도, 예를 들어 각각 Alcalase는 60℃, Flavourzyme, Neutrase 및 Protamex는 50℃, 로 수욕에서 100 rpm으로 교반하였다. 각각의 효소용액(100 mg/mL) 1 mL을 효소:기질 1:100 비율로 첨가하고 23시간까지 온도를 유지하며 교반하여 효소처리 하였다. 95℃ 수욕 상에서 85℃ 이상 유지하면서 20분 유지하여 효소를 불활성화시킨 후, 냉각한 효소 분해물을 25℃에서 원심분리하였다. 상층액을 물로 200 mL 정용하고 진공하에서 Celite545를 이용하여 여과 후 살균 및 건조하여 분말화 하였다. 분말은 생리활성 분석을 위해 -20℃에 보관하고, 이들 시료를 각각을 1F, 2F, 3F 및 5F라 하였다.

[96] Pepsin의 경우, 제조예 1의 녹용 분말 10 g을 취해 pH 2의 묽은 염산 199 mL을 혼합하였다. 그 혼합물을 50℃로 수욕에서 100 rpm으로 교반하였다. Pepsin 효소용액(100 mg/mL) 1 mL을 효소:기질 1:100 비율로 첨가하고 23시간까지 온도를 유지하며 교반하여 효소처리 하였다. 6 M 수산화나트륨 8 mL을 넣어 pH 5.5-6으로 조절하여 분해를 중단시키고, 95℃ 수욕 상에서 85℃ 이상 유지하면서

20분 유지하여 효소를 불활성화시킨 후, 냉각한 효소 분해물을 25℃에서 원심분리하였다. 상층액을 물로 200 mL 정용하고 진공하에서 Celite545를 이용하여 여과 후 살균 및 건조하여 분말화 하였다. 분말은 생리활성 분석을 위해 -20℃에 보관하고 이 시료를 4F라 하였다.

[97]

[98] 제조예 3: 대조군의 제조

[99] 녹용 효소분해 추출물의 대조군으로 녹용 초임계 추출물, 녹용 열수 추출물 및 VARNZ RepaiRx를 각각 C1 및 C2 및 C3라 하였다.

[100] 녹용 초임계 추출물(C1)은 제조예 1의 녹용 분말을 용매로 이산화탄소 및 에탄올, 추출압력 300 bar, 추출온도 40 ℃, 분리 압력 54 bar, 분리온도 40 ℃, 공급중량 49.7 g, 평균 이산화탄소 유속 7.9 g/min, 평균 에탄올 유속 2.0 g/min, 이산화탄소 공급 비율 22:1 및 에탄올 공급비율 3:1 조건으로 추출하며 매 15분마다 회수하여 진공 감압건조하여 제조하였다.

[101] 녹용 열수 추출물(C2)은 제조예 1의 녹용 분말 10 g을 물 200 mL 와 섞어 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 3시간동안 끓는 물에 열수 추출한 뒤 얼음으로 냉각하여 25℃에서 30분 간 25,000 g로 원심분리하였다. 상층액을 물로 200 mL 정용하고 진공하에서 Celite545를 이용하여 여과한 뒤 건조시킨 분말을 활성 분석을 위해 -20℃에 보관하였다.

[102] VARNZ RepaiRx는 미국특허 제07547761호에 따라 제조된 것으로 1/25로 희석한 것을 C3 시료로 사용하였다.

[103]

[104] 실험예 1: 녹용 효소분해 추출물의 수율

[105] 제조예 2에서 제조된 1F 내지 5F의 녹용 효소분해 추출물 및 대조군 C2의 농도를 측정하고 그로부터 계산한 수율을 표 1에 나타내었다.

[106] [표1]

구분	수율(%)
1F	12.7
2F	29.1
3F	36.3
4F	18.3
5F	44.0
C2	8.5

[107] 1F부터 5F까지 모든 효소로 처리한 녹용 효소분해 추출물들은 녹용 열수 추출물(C2)에 비해 높은 수율을 나타내었다. 녹용 효소분해 추출물 중에서도 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F), Neutrase를 이용한 녹용

효소분해 추출물(3F) 및 Protamex를 이용한 녹용 효소분해 추출물(5F)는 녹용 열수 추출물(C2)은 물론 다른 효소 Alcalase(1F) 및 Pepsin(4F)로 처리한 녹용 효소분해 추출물에 비해서도 약 2 내지 3 배 정도 높은 수율을 나타내었다.

[108]

[109] 실험예 2: 녹용 효소분해 추출물의 항원 자극 백혈구 면역 활성 증진 효과

[110] 백혈구는 12명의 지원자(NZ Blood, Wellington, New Zealand)로부터 공급받은 혈액 샘플을 이용하여 분리하였다. 적혈구 용해 시약(TAC buffer: 85 mM Tris, 78 mM NH4Cl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)은 37℃로 예열하여 사용하였다. 각 전혈 5 mL에 TAC buffer 45 mL을 첨가하여 37℃ water bath에 10분간 정치한다. 500 xg로 10분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 PBS(0.1 M EDTA) 25 mL로 골고루 부유시킨다. 동일한 방법으로 원심분리 한 후 상등액을 제거하고 RPMI1640(Sigma-Aldrich, 5%의 FCS 첨가) 5mL로 부유시킨다. 해당 실험에 사용된 백혈구 세포의 수는 1 X 10^7 cells/mL이다.

[111] 96-well plate에 50 ㎕의 분리한 백혈구를 분주한 후, 각각 25 ㎕의 RPMI/FCS(control) 또는 제조예 2의 녹용 효소분해 추출물 및 대조군들을 각각 1/100으로 희석하여 첨가하여 37℃/5% CO2 incubator에 3시간 정치하였다. 25 ㎕의 stimulator를 첨가하여 37℃/5% CO2 incubator에 2시간 정치한다. Stimulator는 각각 SEB(200 ng/mL Staphylococcus enterotoxin B; Sigma-Aldrich), PWM(2 μg/mL pokeweed mitogen; Sigma-Aldrich), lipopolysaccharide(LPS)(4 ng/mL LPS; Sigma-Aldrich) 이다. Cell lysate는 plate를 350 x g 원심분리한 후 상등액을 제거하고 10 ㎕/well의 Buffer RLT로 부유시켜 사용하였다.

[112] 항원 자극 백혈구 면역 활성 증진 효과는 NanoString을 이용하여 면역관련 사이토카인 발현을 분석법을 이용하여 도 1에 나타내었다. 도 1에서 up-regulation 될수록 붉은색, down-regulation 될수록 파란색으로 표시하였고, 도 1에서 붉은색 및 파란색은 P<0.05이고, 주황색 및 하늘색은 P<0.1을 나타낸다.

[113] 효소 종류에 따른 녹용 효소분해 추출물의 면역 관련 유전자 증진 효과를 살펴보면, Alcalase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(1F)는 녹용 분말의 제조방법에 관계없이 유전자 증진 효과를 나타내지 않았다.

[114] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물 중에서 동결건조 녹용 효소분해 추출물(2F)는 1FNB1, 1L12B, IL17A, IL2, IL4 및 IL9 총 6 종 유전자의 발현을 증가시켰다.

[115] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물 중에서 동결건조 녹용 효소분해 추출물(3F)는 IFNB1, IL10, IL12B, IL17A, IL2 및 IL9 총 6 종의 유전자 발현을 증가시켰다.

[116] Pepsin을 이용한 녹용 효소분해 추출물 중에서 동결건조 녹용 효소분해 추출물(4F)는 어떠한 유전자 발현도 증가시키지 않았다.

[117] Protamex를 이용한 녹용 효소분해 추출물 중에서 동결건조 녹용 효소분해 추출물(5F)는 어떠한 유전자 발현도 증가시키지 않았다.

[118] 대조군 C1, C2 및 C3는 면역 관련 어떠한 유전자 발현도 증진시키지 않았으며, C3는 PTGS2 유전자 발현만 증진시켰다.

[119] 녹용 효소분해 추출물의 면역 관련 사이토카인 발현 증진 활성은 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 및 Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F)에서 높은 활성을 나타내었고, 다른 효소로 처리하거나 효소 처리하지 않은 경우는 면역 관련 사이토카인 발현 증진 활성이 매우 낮았다.

[120] 이후 실험에는 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F), Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F), Pepsin을 이용한 녹용 효소분해 추출물(4F), Protamex를 이용한 녹용 효소분해 추출물(5F) 및 녹용 열수추출물(C2)를 이용하여 실시하였다.

[121]

[122] 실험예 3: 녹용 효소분해 추출물의 대식세포의 산화질소 생성 효과

[123] 마우스 유래 대식세포인 RAW 264.7 세포주를 DMEM (Cat No. 11995-065, Gibco BRL, U.S.A), FBS (Lot No. AE29155306, Hyclone, U.S.A.) 및 Antibiotic-antimycotic 100x (Batch No. ADD670076, Biopredic International, France)를 각각 445 mL, 50 mL 및 5 mL 혼합한 배지에서 37 ℃, 5% CO2 조건의 CO2 인큐베이터 (MCO-20AIC, Sanyo, Japan)에서 배양하고, 사용 전까지 2-3일 간격으로 계대배양하여 사용하였다.

[124] 녹용 효소분해 추출물의 대식세포 산화질소(NO) 생성 효과를 확인하기 전 시료의 세포독성을 확인하기 위해 MTT 분석을 실시하였다. 활성화된 RAW 264.7 세포주를 3×10^4 cells/well로 96 웰 플레이트에 각각 분주하고 24시간 동안 37 ℃, 5% CO2 인큐베이터에서 배양하였다. 녹용 효소분해 추출물 시료를 0.001 내지 100 mg/mL로 농도별로 조제한 배지로 교환하고 24시간 배양 후 cck-8 (Cat No. CK04-13, Dojindo, Japan) 10 μl를 첨가하여 37 ℃, CO2 인큐베이터에서 1시간 추가 배양하고, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정상대조군의 세포생존율 대비 각 시료의 농도별 세포생존율을 구하였다.

[125] 녹용 효소분해 추출물 시료 2F, 3F, 5F 및 C2는 각각 0.5, 2.5, 6 및 50 mg/mL 이하에서는 세포독성을 나타내지 않았다.

[126] 산화질소 생성 효과는 RAW 264.7 세포주를 6 웰 플레이트에 5×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 양성대조군 및 농도별로 제조한 시료 함유 배지로 교환한 후 24 시간 추가 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 1000 rpm에서 5분동안 원심분리하고 새로운 튜브에 상층액을 옮긴 후, NO production kit (Cat No. ADI-917-020, Enzo, U.S.A)의 protocol에 따라 시험을 실시하고, NO 생성량은 540 nm 파장에서 측정된 흡광도의 값을 표준곡선의 4-Parameter logic regression을 이용하여 정량하여 도 2에 나타내었다.

[127] 시험물질을 처리하지 않은 정상대조군(N)은 14.89 μmole/L 의 산화질소를 생성하였다. 양성대조군(LPS 1μg/mL)은 47.74 μmole/L 의 산화질소를 생성하였으며 정상대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다($p < 0.01$).

[128] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군(100, 500 μg/mL)의 산화질소 생성량은 각각 25.73, 39.65 μmole/L 의 값으로 농도에 따라 증가하였으며 정상대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$ 및 $p < 0.01$).

[129] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F) 처리군(500, 1000 μg/mL)의 산화질소 생성량은 각각 30.42, 29.39 μmole/L 의 값으로 정상대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였으나($p < 0.01$ 및 $p < 0.01$), 500 μg/mL 동일 농도로 처리한 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군에 비해서 증가폭은 약 23.3% 낮은 값을 나타내었다.

[130] Protamex를 이용한 녹용 효소분해 추출물(5F) 및 녹용 열수추출물(C2) 처리군에서는 정상대조군과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다.

[131] 대식세포에서의 산화질소 생성량은 포유류 면역계에서 외부물질에 대해 방어작용을 하는 대식세포의 활성화 유무를 알 수 있는 지표로서, Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F)이 산화질소 생성량에 있어서 가장 우수하고, 다음은 Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F)임을 확인할 수 있었다.

[132]

[133] 실험예 4: 녹용 효소분해 추출물의 iNOS 및 COX2 유전자 발현 증대 효과

[134] iNOS 및 COX-2 유전자 발현량은 RAW 264.7 세포주를 6 웰 플레이트에 5×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 양성대조군 및 농도별로 제조한 시료 함유 배지로 교환한 후 24 시간 추가 배양하였다. 세포를 수거하여 RNA extract kit (Cat No. 74106, Quigen, Germany)의 protocol에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 Infinite?? 200 Pro (TECAN, Switzerland)를 이용하여 260 nm 및 280 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량 후, 농도에 맞게 희석하였다. TOPreal One-step kit (Cat No. RT432M, enzynomics, Korea)를 iNOS 및 COX2의 유전자 발현량 측정을 실시했고, 모든 반응은 β-actin으로 보정하고 정상대조군을 기준으로 $2^{-\Delta\Delta}$CT 방법으로 정규화하여, iNOS의 상대 발현량은 도 3에, COX2의 상대 발현량은 도 4에 각각 나타내었다.

[135] 도 3에서 양성대조군 (LPS, 1 μg/mL)의 iNOS 발현량은 67.37 배로 증가하였으며 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

[136] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군(100, 500 μg/mL)의 iNOS 발현량은 정상대조군과 비교하여 각각 21.55, 30.45 배로 농도에 따라 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$ 및 $p < 0.01$).

[137] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F) 처리군(500 μg/mL)의 비교하여

iNOS 발현량은 정상대조군과 비교하여 21.74 배로 증가하였으나($p < 0.01$), 500 μg/mL 동일 농도로 처리한 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군에 비해서 증가폭은 약 28.4% 낮은 값을 나타내었다.

[138] 녹용 열수추출물(C2) 처리군(500 μg/mL)의 iNOS 발현량은 정상대조군에 1.93 배로 증가하였으나, Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 및 Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F)에 비해서는 현저히 낮은 값을 나타내었다.

[139]

[140] 한편 도 4에서 양성대조군 (LPS, 1 μg/mL)의 COX2 발현량은 264.54 배로 증가하였으며 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

[141] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군(100, 500 μg/mL)의 COX2 발현량은 정상대조군과 비교하여 각각 7.82, 17.49 배로 농도에 따라 유의적으로 증가하였다($p < 0.01$ 및 $p < 0.01$).

[142] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F) 처리군(500 μg/mL)의 비교하여 COX2 발현량은 정상대조군과 비교하여 8.86 배로 증가하였으나($p < 0.01$), 500 μg/mL 동일 농도로 처리한 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군에 비해서 증가폭은 약 49.3% 낮은 값을 나타내었다.

[143] 녹용 열수추출물(C2) 처리군(500 μg/mL)의 COX2 발현량은 정상대조군과 비교하여 0.98 배로 차이가 없었다.

[144]

[145] iNOS 는 활성화된 대식세포에서 L-arginine 를 통해 NO 를 생성하는 작용에 관여하는 유전자이며 COX2 는 NO 생성 및 다른 사이토카인에 의해 증가되는 유전자로서, 두 유전자 모두 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F)에서 발현량이 가장 현저히 증가하고, 다음은 Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F)에서 증가하였음을 확인할 수 있었다.

[146]

[147] 실험예 5: 녹용 효소분해 추출물의 면역 관련 사이토카인 증대 효과

[148] 실험예 4와 동일한 방법으로 TOPreal One-step kit를 이용하여 면역 관련 사이토카인 TNF-α, IFN-γ, IL-6 및 IL-1β 상대 발현량을 측정하여 각각 도 5, 도 6, 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[149]

[150] 도 5에서 양성대조군(LPS 1 μg/mL)의 TNF-α 발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$).

[151] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군(100, 500 μg/mL)의 TNF-α 발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 각각 3.17 및 3.58 배로 농도에 따라 유의적으로 증가하였다($p < 0.01$ 및 $p < 0.01$).

[152] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F) 처리군(500, 1000 μg/mL)의 TNF-α

발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 각각 3.2 및 3.38 배로 농도에 따라 유의적으로 증가하였다($p < 0.01$ 및 $p < 0.01$).

[153] Pepsin을 이용한 녹용 효소분해 추출물(4F) 처리군(100, 500, 2000 μg/mL), Protamex를 이용한 녹용 효소분해 추출물(5F) 처리군(100, 500, 2000 μg/mL) 및 녹용 열수추출물(C2) 처리군(100, 500 μg/mL)은 모든 처리농도에서 TNF-α 발현량이 정상대조군과 비교하여 차이가 없었다.

[154]

[155] 또한 도 6에서 양성대조군(LPS 1 μg/mL)의 IFN-γ 발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

[156] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군(100, 500 μg/mL)의 IFN-γ 발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 각각 0.44 및 0.59 배 통계적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$ 및 $p < 0.05$).

[157] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F) 처리군(500 μg/mL)의 IFN-γ 발현량도 정상대조군(N)과 비교하여 0.54 배 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

[158] 그러나 녹용 열수추출물(C2) 처리군(500 μg/mL)은 IFN-γ 발현량이 정상대조군(N)과 비교하여 차이가 없었다.

[159]

[160] 또한 도 7에서 양성대조군(LPS 1 μg/mL)의 IL-6 발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

[161] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군(100, 500 μg/mL)의 IL-6 발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 각각 2.0 및 2.97 배로 농도에 따라 증가하였으며, 500 μg/mL 처리 농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$).

[162] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F) 처리군(500, 1000 μg/mL)의 IL-6 발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 각각 1.85 및 1.83 배로 농도에 따라 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$ 및 $p < 0.05$).

[163] Pepsin을 이용한 녹용 효소분해 추출물(4F) 처리군(100, 500, 2000 μg/mL), Protamex를 이용한 녹용 효소분해 추출물(5F) 처리군(100, 500, 2000 μg/mL) 및 녹용 열수추출물(C2) 처리군(100, 500 μg/mL)은 모든 처리농도에서 IL-6 발현량이 정상대조군(N)과 비교하여 차이가 없었다.

[164]

[165] 또한 도 8에서 양성대조군(LPS 1 μg/mL)의 IL-1β 발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

[166] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군(100, 500 μg/mL)의 IL-1β 발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 각각 3.18 및 6.9 배로 농도에 따라 증가하였으며, 500 μg/mL 처리 농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$).

[167] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F) 처리군(500 μg/mL)의 IL-1β

발현량은 정상대조군(N)과 비교하여 2.82 배로 유의적으로 증가하였으나($p < 0.05$), 500 μg/mL 동일 농도로 처리한 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군에 비해서 증가폭은 약 59.1% 낮은 값을 나타내었다.

[168] 녹용 열수추출물(C2) 처리군(500 μg/mL)은 모든 처리농도에서 IL-1β 발현량이 정상대조군(N)과 비교하여 차이가 없었다.

[169]

[170] 실험예 6: 녹용 효소분해 추출물의 대식세포 증식능

[171] 활성화된 RAW 264.7 세포주를 5×10^3 cells/well로 96 웰 플레이트에 각각 분주하고 24시간 동안 37 ℃, 5% CO2 인큐베이터에서 배양하였다. 양성대조군 및 농도별로 조제한 녹용 효소분해 추출물을 포함한 배지로 교환하고 24시간 배양 후 cck-8 (Cat No. CK04-13, Dojindo, Japan) 10 μl를 첨가하여 37 ℃, CO2 인큐베이터에서 1시간 추가 배양하고, Infinite?? 200 Pro (TECAN, Switzerland)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정상대조군의 세포 증식률 대비 각 농도별 세포증식률을 구하여 도 9에 나타내었다.

[172] 세포증식능은 시험물질 투여전 (0h)을 기준으로 시험물질 처리 후 시간대별 세포증식율을 계산하였으며, 통계처리는 각각의 시점 별 정상대조군을 기준으로 산출하였다.

[173] 정상대조군은 24, 48 및 72 시간에서 각각 2.35, 6.09 및 14.52 배로 세포가 증식하였고, 양성대조군(LPS, 1μg/mL)은 24, 48 및 72 시간에서 각각 2.8, 11.3 및 17.7 배로 세포 증식이 증가하였으며 특히 24 시간과 48 시간 시점에서 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$ 및 $p < 0.01$).

[174]

[175] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 처리군(100, 500 μg/mL)은 시험물질 처리 48 시간에서 각각 10.6, 11.0 배로 정상대조군의 48 시간의 세포증식율과 비교하여 증가하였으며 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.01$, $p < 0.01$). 72 시간에서는 각각 21.68, 20.71 배로 정상대조군의 72 시간에 비해 세포 증식이 증가하였다.

[176] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F) 처리군 (500 μg/mL)은 48, 72 시간에서 각각 11.2 및 22.4 배로 정상대조군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$).

[177] 녹용 열수추출물(C2) 처리군 (500 μg/mL)은 모든 측정 시점에서 2.18, 6.34 및 15.90 배로 정상대조군과 차이를 보이지 않았다.

[178]

[179] 실험예 7: 면역 억제 동물모델에서 녹용 효소분해 추출물 투여에 따른 면역력 개선 효과

[180] 녹용 효소분해 추출물이 면역력 저하 동물모델에서 NK 세포 활성, 인터페론 감마(IFN-γ) 농도 및 TNF-α 농도를 측정하여 면역력 개선에 미치는 영향을

평가하였다.

[181] Balb/c 마우스를 6마리씩 9 그룹, 정상대조군(G1), 음성대조군(G2) 및 시험물질투여군(G3 내지 G9)으로 나누고, Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F)을 50 mg/kg, 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여군(각각 G3, G4 및 G5), Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F) 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여군(각각 G6 및 G7), 녹용 열수추출물(C2) 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여군(각각 G8 및 G9)으로 설정하여 시험물질을 투여하였다. 정상대조군을 제외한 음성대조군(G2) 및 시험물질투여군(G3 내지 G9)은 면역억제를 유도하기 위하여 cyclophosphamide (CP)를 70 mg/kg 의 용량으로 시험물질 투여 전 3 일동안, 그리고 시험물질 투여 13 일 째에 복강투여하였다. 시험물질은 14 일 동안 1 일 1 회 경구투여 하였고, 정상대조군(G1) 및 음성대조군(G2)은 시험물질 대신 부형제를 경구투여하였다. 모든 시험군은 매일 일반증상 관찰 및 주 2 회 체중을 측정하였다.

[182] 체중은 정상대조군(G1)에 비해 음성대조군(G2)에서 감소하였으나 시험물질투여군(G3 내지 G9)의 체중변화는 음성대조군(G2)와 통계적으로 차이가 없었다.

[183]

[184] 1. NK 세포 활성 증진 효과

[185] 시험물질 투여 14 일 후, 부검을 실시하여 비장을 적출한 후, 비장세포를 분리하여 NK 세포 활성을 측정하였다.

[186] NK 세포 활성은 상용화된 LDH assay kit (Cat.No.: 04744926001, Roche Diagnostics GmbH)를 사용하여 실시하였다. Effector cell로 분리된 비장세포를 사용하고 target cell은 mouse lymphoma 세포주인 YAC-1 세포를 사용하였다. Effector cell (1×10^6 cells/well)과 target cell (1×10^4 cells/well)을 50:1의 비율로 섞어 4시간 배양하였다. Effector cell에 의해 target cell이 공격받아 방출하는 LDH의 양을 측정하여 도 10에 나타내었다.

[187] NK 세포는 선천성 면역에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 미생물에 의해 감염된 세포나 암세포를 직접 살해하고 사이토카인을 분비하여 단핵구 및 수지상 세포를 활성화시키는 역할을 한다.

[188] 도 10에 따르면 NK세포 활성이 정상대조군(G1)은 16.5%이었으나, 음성대조군(G2)에서 2.3%로 정상대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.01$).

[189] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F)을 50, 100 및 200 mg/kg로 투여한 G3, G4 및 G5군은 NK세포 활성이 각각 23.1, 26.4 및 23.7%의 값으로 음성대조군(G2)과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.01$). 또한 동일 농도의 녹용 열수추출물(G8, G9)와 비교해서도 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$ 및 $p < 0.01$).

[190] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F)을 100 및 200 mg/kg로 투여한 G6

및 G7은 NK세포 활성이 각각 19.3 및 17.9%의 값으로 음성대조군(G1)과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$ 및 $p < 0.01$). 그러나 동일 농도의 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F)과 비교했을 때에는 NK세포 활성이 낮았고, 또한 동일 농도의 녹용 열수추출물(G8 및 G9)와 비교해서도 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[191] 녹용 열수추출물(C2)을 100 및 200 mg/kg로 투여한 G8 및 G9는 NK세포 활성이 각각 13.8 및 11.6%의 값으로 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였으나, 동일 농도의 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F) 및 Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F)에 비해서는 낮은 값을 나타내었다.

[192]

[193] 2. 혈액 내 면역 사이토카인 분석

[194] Th1 세포에 의해 분비되는 대표적인 사이토카인은 TNF-α 및 IFN-γ로 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극하는 사이토카인으로 알려져 있다. 상기 부검 시 채취한 혈액은 상온에서 15~30분간 방치 후 원심분리하여 혈청을 분리한 후, TNF-α (Cat.No.: MTA00B, R&D systems) 및 IFN-γ (Cat.No.: MIF00, R&D systems) ELISA 키트를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 IFN-γ 농도를 측정하여 각각 도 11 및 도 12에 나타내었다.

[195]

[196] 도 11에서 정상대조군(G1)의 혈액 내 TNF-α 농도는 9.7 pg/mL이고, 음성대조군(G2)의 값은 12.2 pg/mL 로 면역 억제가 유도된 음성대조군(G2)에서 정상대조군(G1)과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.01$).

[197] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F)을 50, 100 및 200 mg/kg로 투여한 G3, G4 및 G5은 TNF-α 농도가 각각 10.1, 10.3 및 10.0 pg/mL 의 값으로 저, 중 및 고농도 투여군에 투여 농도에 관계없이 음성대조군(G1)과 비교하여 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$, $p < 0.05$ 및 $p < 0.05$).

[198] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F)을 100 및 200 mg/kg로 투여한 G6 및 G7은 TNF-α 농도가 각각 10.6 및 10.3 pg/mL 의 값으로 중농도에서는 음성대조군(G2)과 유의적인 차이가 없었고, 고농도에서만 음성대조군(G2)에 비해 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

[199] 따라서 Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F)는 50 mg/kg 저농도 투여군에서 TNF-α 농도가 음성대조군(G2)에 비해 유의적으로 감소된 반면, Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F)은 200 mg/kg 고농도 투여군에서 TNF-α 농도가 음성대조군(G2)에 비해 유의적으로 감소를 확인할 수 있었다.

[200] 또한 녹용 열수추출물(C2)을 100 및 200 mg/kg로 투여한 G8 및 G9는 음성대조군(G1)과 비교하여 TNF-α 농도에 유의적인 차이가 없었다.

[201]

[202] 도 12에서 정상대조군(G1)의 혈액 내 IFN-γ 농도는 12.7 pg/mL이고, 음성대조군(G2)의 값은 10.2 pg/mL 로 면역 억제가 유도된 음성대조군(G2)에서

정상대조군(G1)과 비교하여 통계적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.01$).

[203] Flavourzyme을 이용한 녹용 효소분해 추출물(2F)을 50, 100 및 200 mg/kg로 투여한 G3, G4 및 G5은 IFN-γ 농도가 각각 10.8, 11.4 및 11.7 pg/mL 의 값으로 음성대조군(G2)과 비교하여 농도에 따라 증가하고, 특히 100 및 200 mg/kg 투여한 G4 및 G5에서 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$ 및 $p < 0.01$). 또한 동일 농도의 녹용 열수추출물(G8 및 G9)와 비교해서도 통계적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$ 및 $p < 0.01$).

[204] Neutrase를 이용한 녹용 효소분해 추출물(3F)을 100 및 200 mg/kg로 투여한 G6 및 G7, 그리고 녹용 열수추출물(C2)을 100 및 200 mg/kg로 투여한 G8 및 G9는 음성대조군(G2)과 차이가 없었다.

[205]

[206] 아래에 본 발명의 녹용 효소분해 추출물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[207] 제제예 1: 산제의 제조

[208] 제조예 2의 녹용 효소분해 추출물 분말 20 mg

[209] 유당 100 mg

[210] 탈크 10 mg

[211] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[212] 제제예 2: 정제의 제조

[213] 제조예 2의 녹용 효소분해 추출물 분말 10 mg

[214] 옥수수전분 100 mg

[215] 유당 100 mg

[216] 스테아린산 마그네슘 2 mg

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

[218] 제제예 3: 캡슐제의 제조

[219] 제조예 2의 녹용 효소분해 추출물 분말 10 mg

[220] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[221] 락토오스 14.8 mg

[222] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[223] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[224] 제제예 4: 과립제의 제조

[225] 제조예 2의 녹용 효소분해 추출물 분말 1,000 mg

[226] 비타민 혼합물 적량

[227] 비타민 A 아세테이트 70 μg

[228] 비타민 E 1.0 mg

[229] 비타민 B1 0.13 mg

[230] 비타민 B2 0.15 mg

[231] 비타민 B6 0.5 mg

[232] 비타민 B12 0.2 μg

[233] 비타민 C 10 mg

[234] 비오틴 10 μg

[235] 니코틴산아미드 1.7 mg

[236] 엽산 50 μg

[237] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[238] 무기질 혼합물 적량

[239] 황산제1철 1.75 mg

[240] 산화아연 0.82 mg

[241] 탄산마그네슘 25.3 mg

[242] 제1인산칼륨 15 mg

[243] 제2인산칼슘 55 mg

[244] 구연산칼륨 90 mg

[245] 탄산칼슘 100 mg

[246] 염화마그네슘 24.8 mg

[247] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[248] 제제예 5: 음료 제형의 제조

[249] 제조예 2의 녹용 효소분해 추출물 분말 1,000 mg

[250] 구연산 1,000 mg

[251] 올리고당 100 g

[252] 매실농축액 2 g

[253] 타우린 1 g

[254] 정제수를 가하여 전체 900 mL

[255] 통상의 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.

청구범위

[청구항 1] 녹용을 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소로 분해시킨 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 식품 조성물.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 효소는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 식품 조성물.

[청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소는 곰팡이 유래의 프로테아제 및 펩티다아제의 복합물인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 식품 조성물.

[청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 곰팡이 유래의 프로테아제 및 펩티다아제의 복합물은 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) 유래의 엔도프로테아제 및 엑소펩티데이즈의 복합물인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 식품 조성물.

[청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 엔도프로테아제 및 엑소펩티데이즈의 복합물은 플라보자임(Flavourzyme)인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 식품 조성물.

[청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소는 바실러스 유래의 중성의 프로테아제인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 식품 조성물.

[청구항 7] 제 6 항에 있어서, 상기 바실러스 유래의 중성의 프로테아제는 바실러스 아밀로리퀘팍시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*)의 수중 발효(submerged fermentation)에 의해 생산되는 중성의 메탈로(Zn) 엔도프로테아제인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 식품 조성물.

[청구항 8] 제 7 항에 있어서, 상기 중성의 메탈로(Zn) 엔도프로테아제는 뉴트라아제(Neutrase)인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 식품 조성물.

[청구항 9] 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 녹용 효소분해 추출물은 생녹용 또는 냉동 녹용을 동결건조한 건조 녹용을 효소처리에 의해 가수분해시킨 녹용 효소분해 추출물인 것을 특징으로 하는 면역 증강용 식품 조성물.

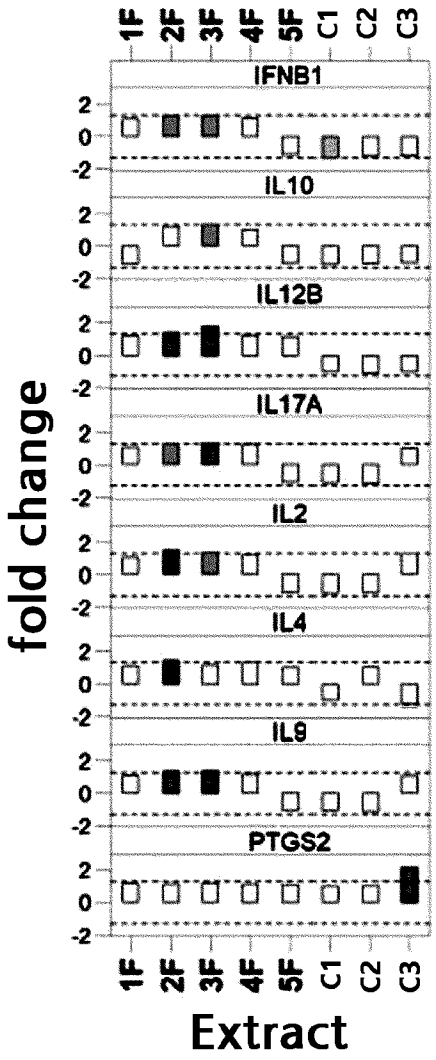
[청구항 10] 생녹용 또는 냉동 녹용을 동결건조하는 동결건조 녹용 준비 단계; 및
상기 동결건조 녹용 10 중량부에 물 50 내지 500 중량부 및 효소 0.01 내지 1 중량부를 넣고 30 내지 60 ℃에서 1 내지 48 시간 동안 반응시키는 효소처리 단계;를 포함하고,
상기 효소는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소인 것을 특징으로 하는 면역 증강 활성을 가진 녹용 효소분해 추출물의 제조방법.

[청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 효소는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의

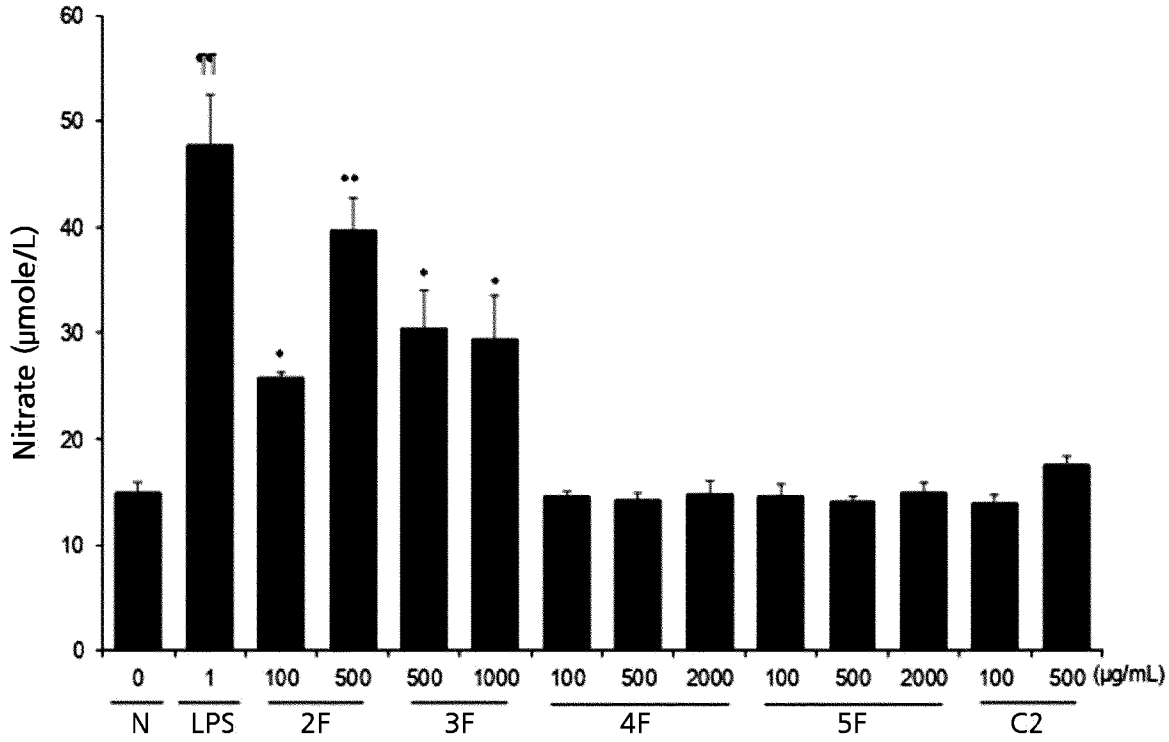
효소인 것을 특징으로 하는 면역 증강 활성을 가진 녹용 효소분해 추출물의 제조방법.

[청구항 12] 녹용을 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.11.1의 효소 또는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.4.24.28의 효소로 분해시킨 녹용 효소분해 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 약학 조성물.

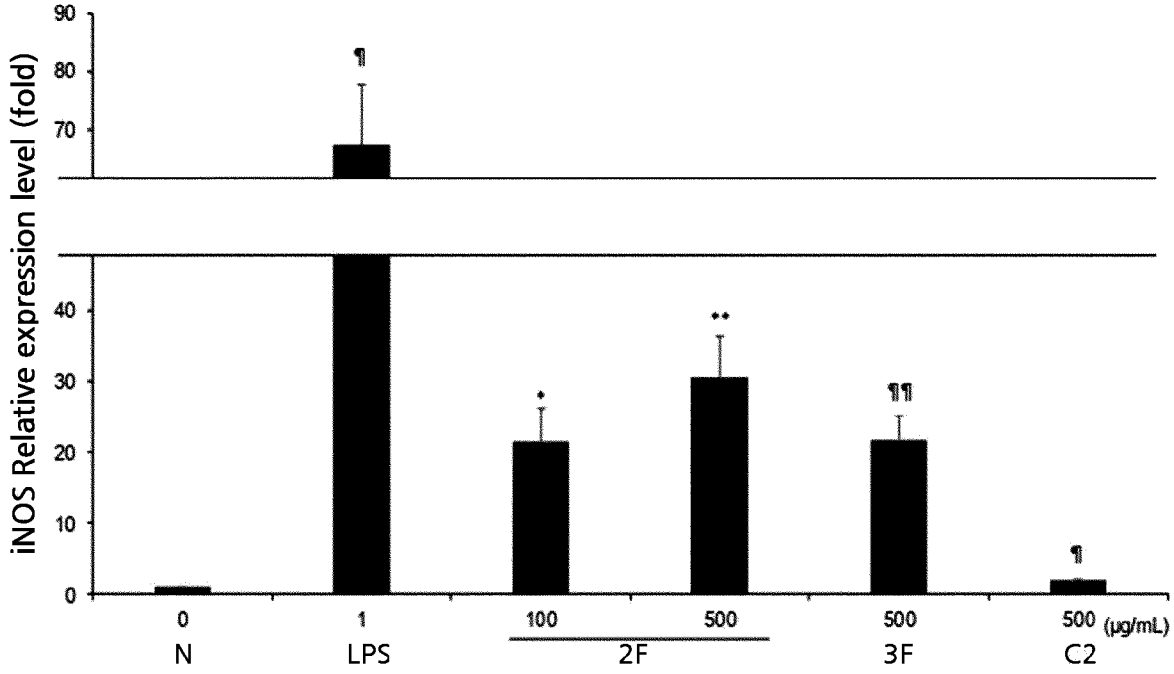
[도1]


1F
2F
3F
4F
5F
C1
C2
C3
IFNB1
IL10
IL12B
IL17A
IL2
IL4
IL9
PTGS2
2
0
-2
fold change
Extract

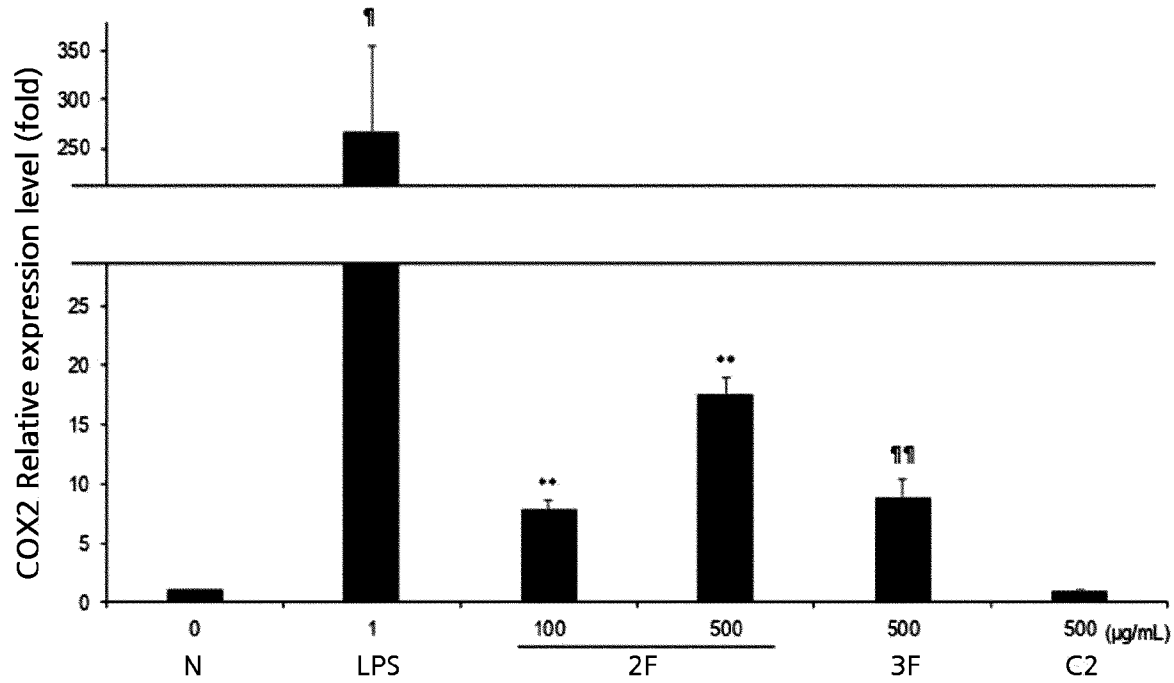
[도2]


Nitrate (μmole/L)
60
50
40
30
20
10
0
0
1
100
500
500
1000
100
500
2000
100
500
2000
100
500 (μg/mL)
N
LPS
2F
3F
4F
5F
C2

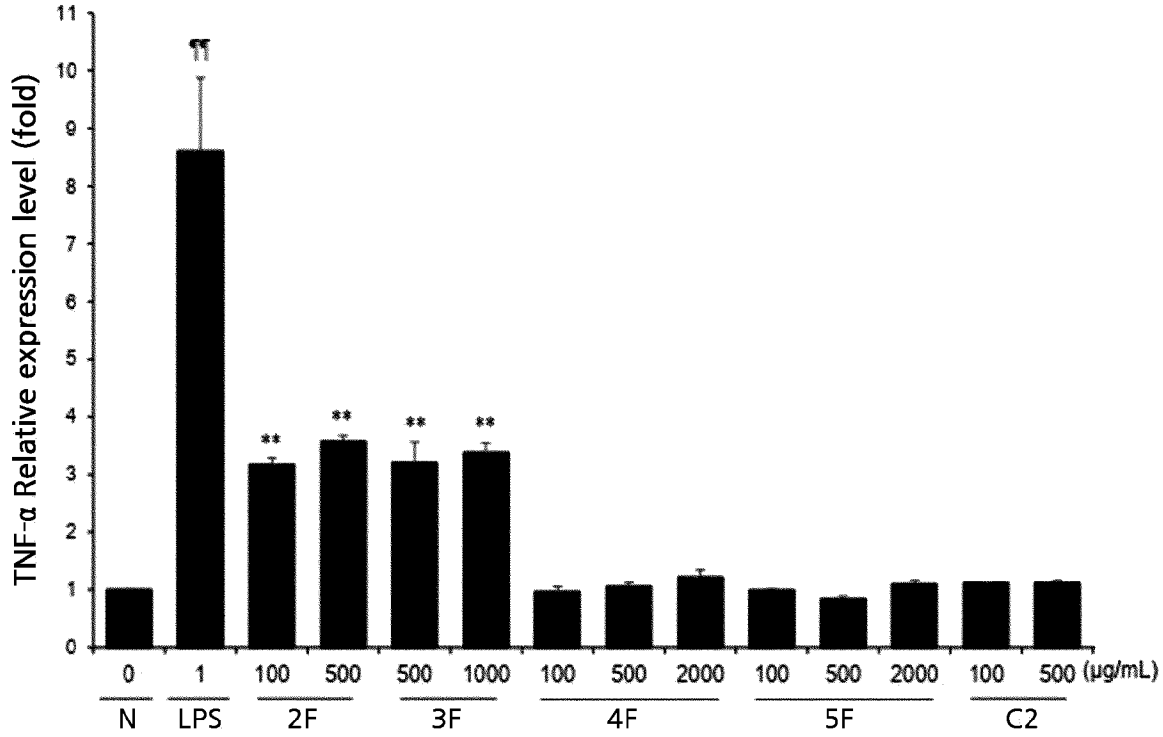
[도3]


iNOS Relative expression level (fold)
90
80
70
40
30
20
10
0
¶
*
**
¶¶
¶
0
1
100
500
500
500 (μg/mL)
N
LPS
2F
3F
C2

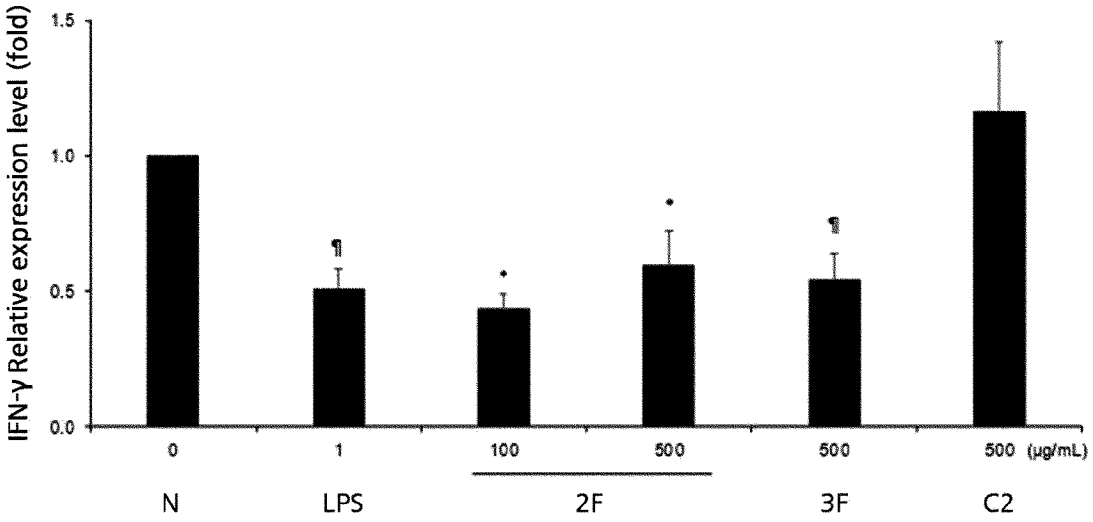
[도4]


COX2 Relative expression level (fold)
350
300
250
25
20
15
10
5
0
¶
**
**
¶¶
0
1
100
500
500
500 (μg/mL)
N
LPS
2F
3F
C2

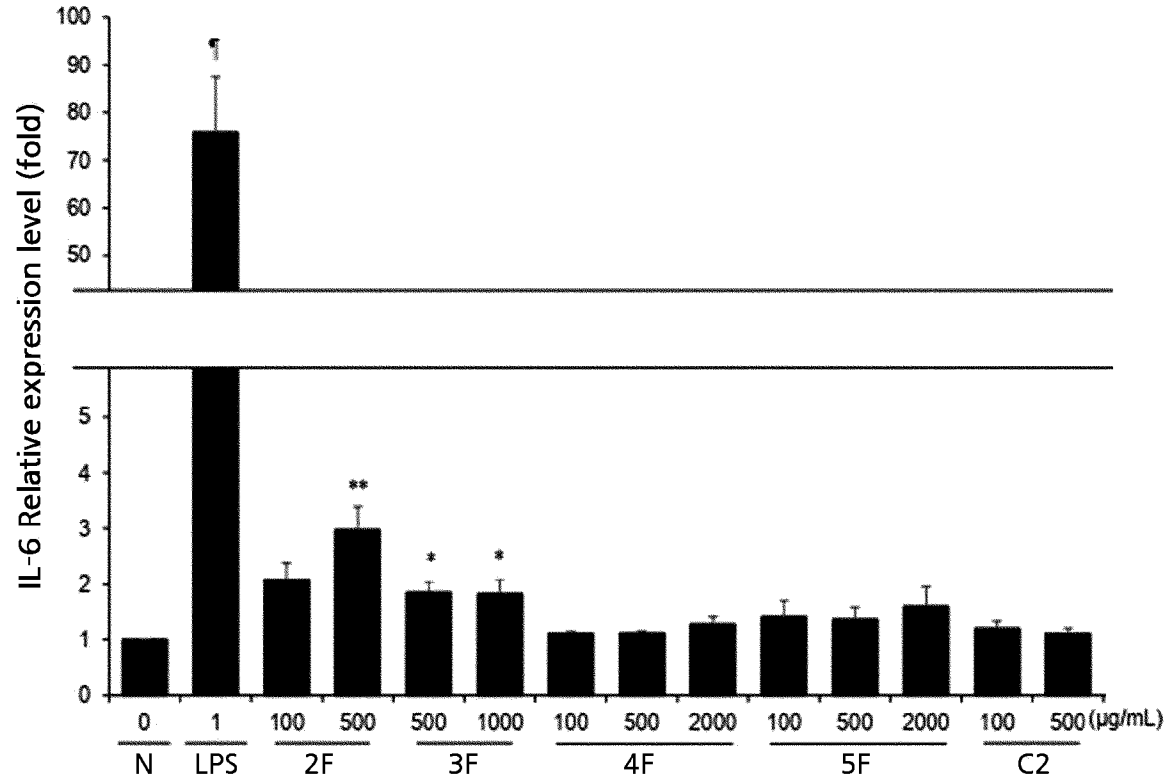
[도5]


TNF-α Relative expression level (fold)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
¶¶
**
**
**
**
0
1
100
500
500
1000
100
500
2000
100
500
2000
100
500
(μg/mL)
N
LPS
2F
3F
4F
5F
C2

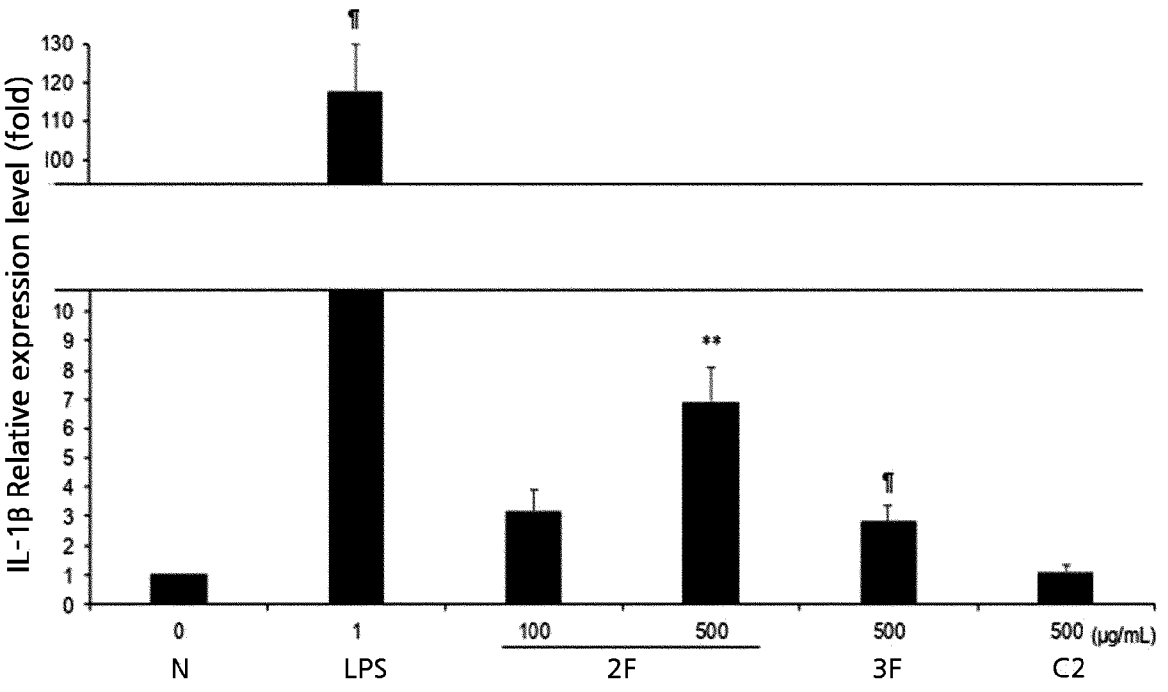
[도6]


IFN-γ Relative expression level (fold)
0.0
0.5
1.0
1.5
¶
*
*
¶
0
1
100
500
500
500
(μg/mL)
N
LPS
2F
3F
C2

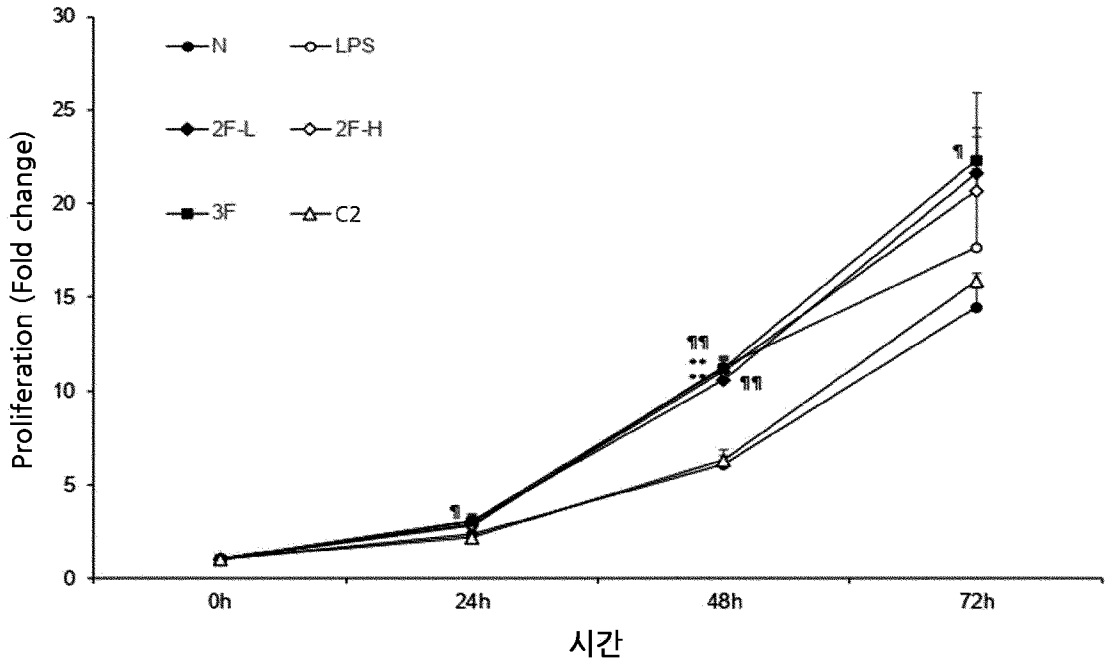
[도7]


IL-6 Relative expression level (fold)
100
90
80
70
60
50
5
4
3
2
1
0
¶
**
*
*
0 1 100 500 500 1000 100 500 2000 100 500 2000 100 500 (μg/mL)
N LPS 2F 3F 4F 5F C2

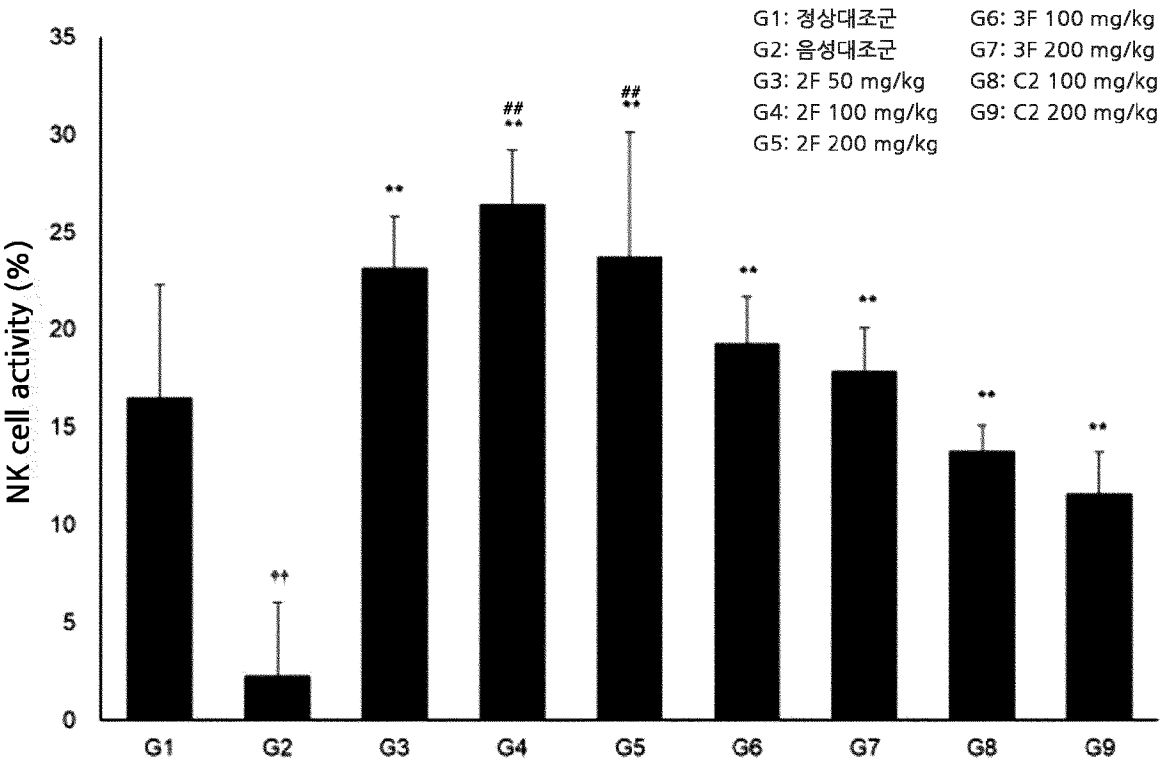
[도8]


IL-1β Relative expression level (fold)
130
120
110
100
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
¶
**
¶
0 1 100 500 500 500 (μg/mL)
N LPS 2F 3F C2

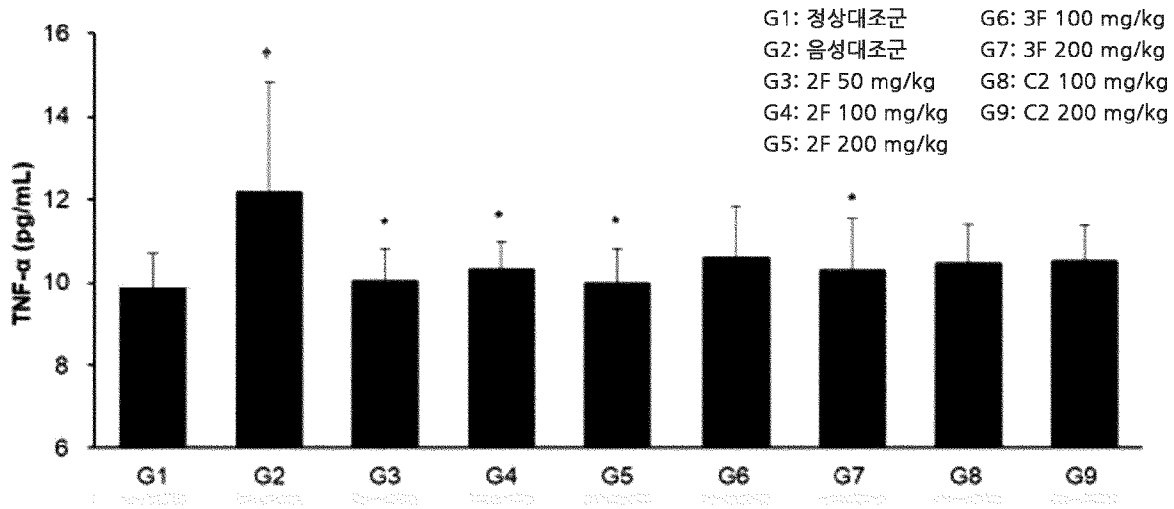
[도9]


N
LPS
2F-L
2F-H
3F
C2
Proliferation (Fold change)
0
5
10
15
20
25
30
0h
24h
48h
72h
시간

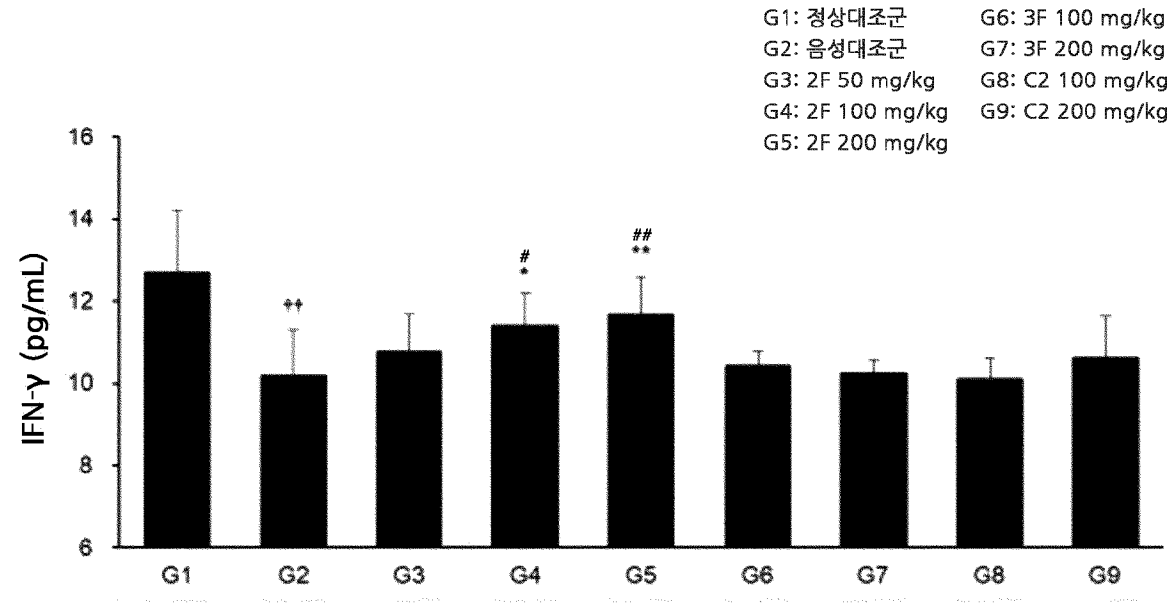
[도10]


G1: 정상대조군
G2: 음성대조군
G3: 2F 50 mg/kg
G4: 2F 100 mg/kg
G5: 2F 200 mg/kg
G6: 3F 100 mg/kg
G7: 3F 200 mg/kg
G8: C2 100 mg/kg
G9: C2 200 mg/kg
NK cell activity (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9

[도11]


G1: 정상대조군
G2: 음성대조군
G3: 2F 50 mg/kg
G4: 2F 100 mg/kg
G5: 2F 200 mg/kg
G6: 3F 100 mg/kg
G7: 3F 200 mg/kg
G8: C2 100 mg/kg
G9: C2 200 mg/kg
TNF-α (pg/mL)
16
14
12
10
8
6
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9

[도12]


G1: 정상대조군
G2: 음성대조군
G3: 2F 50 mg/kg
G4: 2F 100 mg/kg
G5: 2F 200 mg/kg
G6: 3F 100 mg/kg
G7: 3F 200 mg/kg
G8: C2 100 mg/kg
G9: C2 200 mg/kg
IFN-γ (pg/mL)
16
14
12
10
8
6
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
G9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/020127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L 13/20(2016.01)i; **A23L 13/40**(2016.01)i; **A61K 35/32**(2006.01)i; **A61P 37/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L 13/20(2016.01); A23C 9/123(2006.01); A23L 29/00(2016.01); A23L 33/00(2016.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 35/12(2006.01); A61K 35/32(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 녹용(Cervi Parvum Corun), 효소분해 추출물(enzymatic extract), 뉴트라아제(neutrase), 플라보자임(flavourzyme), 면역 증강(immunity boosting), 동결건조(freeze drying)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	전남대학교. 녹용 소비 활성화를 위한 가공기술 개발. 농축산물부가가치향상기술개발 최종보고서. 20 September 2017, pp. 1-212 (Chonnam National University. Development of processing technology for promoting the consumption of velvet antler. A Final Report on the Development of Value Added Technology for Agricultural and Livestock Products.) See pages 19, 41, 54-56 and 102-117.	1-12
A	KR 10-2018-0015343 A (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 13 February 2018 (2018-02-13) See entire document.	1-12
A	KR 10-1822752 B1 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) 29 January 2018 (2018-01-29) See entire document.	1-12
A	KR 10-2020-0119011 A (CHOI, Hak Joo) 19 October 2020 (2020-10-19) See entire document.	1-12

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 April 2022	**11 April 2022**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2006-0128117 A (KIM, Hyen-Soo) 14 December 2006 (2006-12-14) See entire document.	1-12
A	KR 10-2012-0057699 A (JBT CO., LTD.) 07 June 2012 (2012-06-07) See entire document.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/020127

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2018-0015343 A	13 February 2018	KR 10-1917422 B1	09 November 2018
KR 10-1822752 B1	29 January 2018	None	
KR 10-2020-0119011 A	19 October 2020	KR 10-2021-0045366 A	26 April 2021
		KR 10-2227709 B1	12 March 2021
KR 10-2006-0128117 A	14 December 2006	None	
KR 10-2012-0057699 A	07 June 2012	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/020127

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23L 13/20(2016.01)i; **A23L 13/40**(2016.01)i; **A61K 35/32**(2006.01)i; **A61P 37/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A23L 13/20(2016.01); A23C 9/123(2006.01); A23L 29/00(2016.01); A23L 33/00(2016.01); A23L 33/10(2016.01); A61K 35/12(2006.01); A61K 35/32(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 녹용(Cervi Parvum Corun), 효소분해 추출물(enzymatic extract), 뉴트라아제(neutrase), 플라보자임(flavourzyme), 면역 증강(immunity boosting), 동결건조(freeze drying)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	전남대학교, '녹용 소비 활성화를 위한 가공기술 개발', 농축산물부가가치향상기술개발 최종보고서, 2017.09.20, 1-212 장 19, 41, 54-56, 102-117 장	1-12
A	KR 10-2018-0015343 A (전남대학교산학협력단) 2018.02.13 전체 문헌	1-12
A	KR 10-1822752 B1 (전남대학교산학협력단) 2018.01.29 전체 문헌	1-12
A	KR 10-2020-0119011 A (최학주) 2020.10.19 전체 문헌	1-12
A	KR 10-2006-0128117 A (김현수) 2006.12.14 전체 문헌	1-12

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2022년04월11일(11.04.2022)	**2022년04월11일(11.04.2022)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/020127

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2012-0057699 A (주식회사 제이비티) 2012.06.07 전체 문헌	1-12

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/020127

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0015343 A	2018/02/13	KR 10-1917422 B1	2018/11/09
KR 10-1822752 B1	2018/01/29	없음	
KR 10-2020-0119011 A	2020/10/19	KR 10-2021-0045366 A	2021/04/26
		KR 10-2227709 B1	2021/03/12
KR 10-2006-0128117 A	2006/12/14	없음	
KR 10-2012-0057699 A	2012/06/07	없음	