



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년11월04일
(11) 등록번호 10-1080378
(24) 등록일자 2011년10월31일

(51) Int. Cl.

A61K 35/74 (2006.01) A61P 27/14 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01) A61P 11/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0121092

(22) 출원일자 2008년12월02일

심사청구일자 2008년12월02일

(65) 공개번호 10-2010-0062450

(43) 공개일자 2010년06월10일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020070005937 A*

JP2000159653 A*

US20080254014 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자

안경섭

대전광역시 유성구 노은동 열매마을아파트
803-201

이형규

대전광역시 유성구 어은동 99 한빛아파트 111동
101호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 19 항

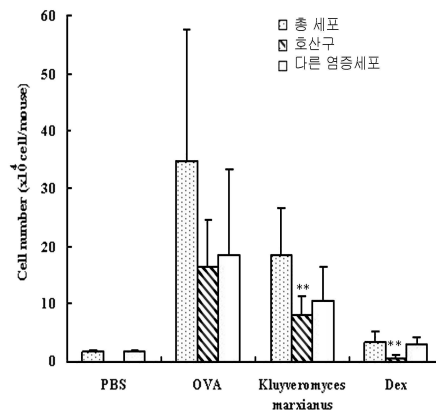
심사관 : 김미화

(54) 클루베라마이세스를 함유하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 클루베라마이세스(*Kluyveromyces marxianus*)를 함유하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 케피어 그레인(Kefir grain)에서 분리한 균주인 클루베라마이세스가 난백 알부민(ovalbumin)-유도 천식 동물 모델에서 기관지 폐포세척액의 사이토카인(IL-4, IL-5 및 IL-13)의 생산을 억제하고, 호산구 증가를 억제하며, 점액분비를 억제하며, RBL-1 세포에서 프로스타글란딘 및 류코트리엔의 분비를 억제함으로써 알러지, 염증 또는 기관지 천식 질환의 예방 및 치료를 위한 의약품 또는 건강기능식품의 유효성분으로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

권옥경

대전광역시 유성구 송강동 청솔아파트308-704

이미영

대전광역시 서구 관저동 관저리슈빌 108-202

김소영

대전광역시 동구 인동 한울아파트 101-1504호

오세량

대전광역시 유성구 지족동 834 인앤인주상복합 10
1동 904호

이상구

대전광역시 유성구 지족동 열매마을아파트 504-101

이중구

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 109-603

육지은

대전광역시 중구 산성동 268-8

김희성

전라남도 신안군 비금면 덕산리 읍동 123-8번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM 2110812

부처명 한국생명공학연구원

연구관리전문기관

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 염증 및 지질대사 조절을 표적으로 하는 전임상후보물질 개발

기여율

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2008.01.01-2008.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

클루베라마이세스(*Kluyveromyces*)를 유효성분으로 함유하는 천식 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 케피어 그레인(*Kefir grain*)에서 분리한 균주인 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 면역반응에 의한 염증세포 수의 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 염증세포는 호산구인 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 면역반응에 의한 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생산 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 면역반응에 의한 기관지 점액분비의 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 프로스타글란딘(*prostaglandin*)의 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 류코트리엔(*leukotrien*)의 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 클루베라마이세스 말시아누스(*Kluyveromyces marxianus var. marxianus*)인 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 10

약학적으로 유효한 양의 제 1항의 조성물을 포함하는 천식 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

클루베라마이세스(*Kluyveromyces*)를 유효성분으로 함유하는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 케피어 그레인(*Kefir grain*)에서 분리한 균주인 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 면역반응에 의한 염증세포 수의 증가를 억제하는 것을 특징으로 하

는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 염증세포는 호산구인 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 15

제 11항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 면역반응에 의한 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생산 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 16

제 11항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 면역반응에 의한 기관지 점액분비의 증가를 억제하는 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 17

제 11항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 프로스타글란딘(prostaglandin)의 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 18

제 11항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 류코트리엔(leukotrien)의 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 19

제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 클루베라마이세스는 클루베라마이세스 말시아누스(*Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*)인 것을 특징으로 하는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 클루베라마이세스(*Kluyveromyces marxianus*)를 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방 및 치료용 조성물, 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 1962년에 미국호흡기학회에서는 천식(asthma)을 기도에 공기의 흐름이 짧은 기간동안에 변화를 초래하는 병이라고 정의하였다. 여러 가지 자극에 대한 기도의 과민성을 그 특징으로 하며, 기도의 광범위한 협착에 의해 발생하는 천명(喘鳴), 호흡곤란, 기침 등의 임상 증세들은 자연히 혹은 치료에 의해 가역적으로 호전될 수도 있다. 대부분의 천식은 알레르기성이며, 호산구 등의 염증세포의 침윤을 동반한 기도의 만성 염증성 질환(chronic airway inflammation disease)으로 기도 과민성(bronchial hyperresponsiveness)과 기도개형(airway remodeling)이 특징이다(Liard R, et al., *Eur. Respir. J.*, 16, p615-620, 2000).

[0003] 병태생리학적인 면에서 보면 천식은 TH2 면역세포에서 생성하는 사이토카인에 의해 염증세포가 증식, 분화 및 활성화되어 기도 및 기도주변 조직으로 이동, 침윤하여 나타나는 만성 염증질환으로 인식되고 있다(Elias JA, et al., *J. Clin. Invest.*, 111, p291-297, 2003). 이때 염증 및 알러지성 질환을 유도하는 핵심적인 매개물질로는 류코트리엔류(leukotriens), 프로스타글란딘류(prostaglandines) 및 혈소판활성인자(platelet activating factor, PAF) 등이 있으며, 이들은 포스포리파아제 A2(phospholipase A2), 시클로옥시게나제(cyclooxygenase) 및 리폭시게나제(lipoxygenase)에 의하여 전구체인 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 생성된다.

[0004] 프로스타글란딘류는 특이한 세포표면 수용체와 결합하여 환식 아데노신모노포스페이트(cyclic Adenosine

Monophosphate, cAMP; 경우에 따라서는 환식 구아노신모노포스페이트, cGMP)의 세포내 농도를 증가시키는 작용을 한다. 환식 아데노신모노포스페이트의 증가에 의한 효과는 세포종류에 따라 다르며, 프로스타글란딘 A2(Prostaglandin A2, PGA2), 프로스타글란딘 B2(Prostaglandin B2, PGB2) 및 프로스타글란딘 C2(Prostaglandin C2, PGC2)는 혈압을 강하시키고, 프로스타글란딘 D2(Prostaglandin D2, PGD2) 및 프로스타글란딘 E1(Prostaglandin E1, PGE1)은 혈소판 응집을 억제하고 동통, 발열 등의 염증과정에 관여한다고 알려져 있다. 프로스타글란딘 D2는 특히 기관지 천식환자의 평활근을 수축하여 천식을 악화시키는 주범으로 알려져 있다.

[0005] 류코트리엔은 아라키돈산(arachidonic acid)으로부터 생체에서 생성되는 국소 작용성 호르몬 그룹을 구성하며, 중요한 류코트리엔으로는 류코트리엔 B4(LTB4), 류코트리엔 C4(LTC4), 류코트리엔 D4(LTD4) 및 류코트리엔 E4(LTE4)가 있다. 이들 류코트리엔의 생합성은 효소 5-리폭시게나제가 아라키돈산에 대하여 작용하여 류코트리엔 A4로서 알려진 에폭사이드(epoxide)를 생성시킴으로써 시작되며, 이것은 연속적인 효소반응 단계에 의해 다른 류코트리엔(LTB4, LTC4, LTD4, LTE4)으로 전환된다. 그 중 시스테인 류코트리엔(cysteinyl leukotrienes; LTC4, LTD4, LTE4)은 가장 강력한 기관지 수축작용과 호산구증가를 유도하는 물질이다(Barnes PJ, et al., *Pharmacol. Rev.*, 50, p515-596, 1998). 류코트리엔은 폐동맥질환, 예를 들면, 천식, 만성 기관지염 및 관련 폐쇄성 기도질환, 알러지성 비염, 접촉성 피부염, 알러지성 결막염 등의 알러지 및 알러지 반응, 관절염 또는 염증성 장 질환, 통증 등의 염증 등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Busse WW., *Am. J. Respir Crit Care Med.*, 157, pS210-S213, 1998). 그러므로 최근 히스타민 유리억제, 류코트리엔 C4 생성억제, 혈소판 활성화인자 생성억제 활성을 동시에 가지는 약물들이 알러지성 천식 치료제로서 주목을 받고 있다.

[0006] 호산구 역시 다량의 시스테인 류코트리엔을 생산하므로 이들의 기도 조직 및 기관지폐포액(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)에서의 증가는 천식을 악화시키는 중요한 요인이 된다(Underwood DC, et al., *Am. J. Respir Crit Care Med.*, 154, p850-857, 1996). 따라서 염증세포 활성화에 관여하는 IL-4, IL-5 및 IL-13 등의 사이토카인들도 기도 과민반응에 작용(Gani, F. et al., *Tecenti. Prog. Med.*, 89, p520-528, 1998)하여 염증 및 알러지 반응과 이로 인한 천식을 유발하는 주요 원인이 된다.

[0007] 클루베라마이세스를 분리한 캐피어(Kefir)는 티벳버섯이라고 알려져 있는데 실제로는 버섯의 일종이 아니라 유기산 생성균(유산균)인 박테리아와 효모로 구성되어 있으며 이러한 미생물 복합체가 성장하면서 다당을 비롯한 유기산 등을 분비하여 우유가 젤상으로 발효되어 마치 떠먹는 요구르트처럼 된 것이다. 캐피어는 유산균과 효모가 점물질인 다당(polysaccharide)에 의해 엉겨 복합체인 캐피어 그레인(Kefir grain)을 형성하게 되는 데, 일반인들이 가정에서 배양하여 음료 형태로 복용하고 있는 실정으로 매일 배양해야 하는 번거로움으로 인해 시간과 공간의 제약을 받으며 배양 과정에서 발생할 수 있는 오염 및 변질 여부를 방지할 수 없는 상황이다. 또한, 생균수, 맛, 유효 성분 등 동일한 발효 조건으로 생산해 내기가 어려웠었다. 이러한 점을 개선하기 위하여 일정한 조건에서 캐피어를 제조한 후 동결건조하여 캐피어 분말을 제조하는 방법도 공개되었다(대한민국특허 공개번호 1987-0003704).

[0008] 그리고, 지금까지 캐피어의 생리활성은 항균효과, 정장작용, 면역증강 및 항암효과가 탁월하다고 알려져 있으며(Meydani SN, Ha WK. *Am J Clin Nutr.*, 71(4), p861-72, 2000), 캐피어 분말 및 이의 추출물, 및 그로부터 분리된 캐피란이 항알러지, 항염증 및 항천식 활성을 가지고 있음이 보고된 바 있으나(대한민국 등록특허 제 10-0685285호 참조), 상기 캐피어 그레인에서 분리된 개별 미생물 단독으로 상기 약리활성을 가지고 있다는 보고된 바 없다.

[0009] 또한, 캐피어 그레인에는 대표적인 유산균으로 락토바실러스(Lactobacillus) 속인 Lactobacillus brevis, Lactobacillus kefir, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, Lactobacillus kefiranofaciens, Lactococcus lactis subsp. lactis, Lactococcus lactis subsp. lactis var. diacetylactis, Lactococcus lactis subsp. cremoris가 있으며, 류코노스톡(Leuconostoc) 속으로는 Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides, Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum, Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris, Leuconostoc lactis 등이 있으며 이외에도 스트렙토코쿠스 테르모필루스(Streptococcus thermophilus), 아세트박터 아세티(Acetobacter aceti), 아세트박터 라센스(Acetobacter rasens) 등과 같이 한 종류가 아닌 여러 종류의 유산균이 함께 존재하는 것으로 알려져 있다. 또한, 효모로는 본 발명의 클루베라마이세스(Kluyveromyces marxianus var. marxianus) 뿐아니라 사카로 마이세스 케파이어(Saccharomyces kefir),

토룰라 케파이어(*Torula kefir*), 캔디다 케파이어(*Candida kefir*) 등이 함께 존재하는 것으로 알려져 있다.

[0010] 따라서 케피어의 항알러지, 항염, 항천식효과를 개별적인 균주에서도 얻을수 있음을 밝힘으로서 다른 균체의 오염으로 인한 위생상의 문제나 온도 및 시간 등 발효 조건의 변화에 따른 제품의 상태가 변하는 문제점 등을 해결할 수 있으며, 일반적으로 유산균 제품의 경우 유산균의 생균수를 높게 유지하는 방법이 매우 중요한데, 단일 균주로 제한함으로써 pH 영역(4-4.5), 온도 등 배양조건을 단순화시킬수 있다는 장점이 있다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 케피어의 공생균체의 일원인 클루베라마이세스를 단독으로 천식 동물모델과 동물세포 실험에서 그 효과를 시험하였고, 그 결과, 케피어에 버금가는 항알러지, 항염증 및 항천식 효과가 있다는 놀라운 사실을 확인하였다. 구체적으로, 클루베라마이세스가 난백알부민으로 감작된 천식 동물 모델의 기관지 폐포세척액에서 사이토카인인 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생성을 억제하고, 호산구 증가를 억제하며, 점액분비를 억제하며, 주요 조절인자인 류코트리엔 C4와 프로스타글란딘 E2의 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 클루베라마이세스(*Kluyveromyces marxianus*)를 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증 또는 천식 질환 예방 및 치료용 조성물, 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 클루베라마이세스(*Kluyveromyces marxianus*)를 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 알러지, 염증 또는 천식 질환에 걸린 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 치료방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방방법을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은 클루베라마이세스를 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

효 과

[0017] 본 발명의 클루베라마이세스는 난백알부민(ovalbumin) 유도 천식 동물 모델에서 기관지 폐포세척액의 사이토카인인 IL-4, IL-5 및 IL-13의 생성을 억제하는 활성, 호산구 증가를 억제하는 활성, 기관지 점액분비를 억제하는 활성, 천식의 주요조절인자인 프로스타글란딘 E2와 류코트리엔 C4의 생성을 저해하는 활성을 가짐으로써 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물 또는 건강기능식품의 유효성분으로 유용하게 이용될 수 있다.

[0018] 이전에 케피어 분말이 항알러지, 항염증 및 항천식 활성을 가지고 있다고 보고된 바 있으나 케피어의 공생균체의 일원인 클루베라마이세스 단독으로도 이와 유사하거나 그 이상의 활성을 가지고 있음은 당업자가 용이하게 예측할 수는 없다. 또한, 케피어 분말은 복잡한 과정을 통해 제조되기 때문에 대량 생산에 있어서 비용이 많이 들고 비효율적인 반면에, 클루베라마이세스 자체는 저가로 용이하게 생산할 수 있으므로 경제적이고 효율적인 대량생산이 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 알려지, 염증 또는 천식의 형성을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료" 및 "개선"은 본 발명의 조성물의 투여로 알려지, 염증 또는 천식의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "개체"는 본 발명의 조성물을 투여하여 알려지, 염증 또는 천식의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜 또는 위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 이는 개체의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 클루베라마이세스(*Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*)를 유효성분으로 함유하는 알려지, 염증 또는 천식 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 클루베라마이세스는 캐피어 그레인(Kefir grain)에서 분리 및 동정한 균주인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0027] 상기 클루베라마이세스의 분리 및 동정은 일반적인 효모의 분리 및 동정 방법을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0028] 상기 일반적인 효모의 분리 및 동정 방법으로는 1) 형태적 특성, 2) 생리적 특성, 또는 3) DNA 염기서열 분석 및 핵 DNA간의 상보성 분석 등의 분자생물학적인 특성을 이용하는 방법들이 있다.
- [0029] 본 발명에서는 캐피어 그레인에 우유를 첨가한 후 배양하여 배양액을 제조한 다음, 상기 배양액으로부터 MRS 배지를 이용하여 형태학적으로 유산균으로부터 분리한 다음, 생화학적 특성을 이용한 API kit로 동정하여 클루베라마이세스를 수득하였다.
- [0030] 본 발명의 클루베라마이세스는 면역반응에 의한 염증세포, 특히 호산구의 증가를 억제하는 활성, 사이토카인인 IL-4, IL-5 및 IL-13의 증가를 억제하는 활성, 기관지 점액분비의 증가를 억제하는 활성, 프로스타글란딘(prostaglandin) 및 류코트리엔(leukotrien)의 생성을 저해하는 활성을 가지고 있다.
- [0031] 본 발명에서는 클루베라마이세스가 염증 관련 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해, 난백알부민으로 감작된 동물모델을 이용하여 기관지폐포세척액의 호산구수 및 그 외 염증 세포수를 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 클루베라마이세스를 처리하는 경우 난백알부민의 감작에 의해 증가되는 염증 세포수를 약 50% 정도 감소시켰으며, 호산구수 역시 50% 이상 감소시켰다(표 1 및 도 1 참조).
- [0032] 본 발명에서는 클루베라마이세스가 염증에 관련된 사이토카인에 미치는 영향을 알아보기 위해, 난백알부민으로 감작된 동물모델을 이용하여 기관지폐포세척액의 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5) 및 인터루킨-13(IL-13)의 함량을 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 클루베라마이세스를 처리하는 경우 난백알부민의 감작에 의해 증가되는 인터루킨-4, 인터루킨-5 및 인터루킨-13의 생산량을 각각 약 75 ~ 80%, 25 ~ 30% 및 25 ~ 30% 정도를 감소시켰다(표 2, 도 2 내지 도 4 참조).
- [0033] 본 발명에서는 클루베라마이세스가 기도과민성에 미치는 영향을 알아보기 위해, 난백알부민으로 감작된 동물모델에서 기도저항측정기를 이용하여 기도 과민성 반응을 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 클루베라마이세스를 처리하는 경우 난백알부민의 감작에 의해 증가되는 기도 과민성이 호전되는 것을 확인할 수 있었다(표 3 및 도 5 참조).
- [0034] 본 발명에서는 클루베라마이세스가 기관지 염증세포 및 상피세포에 미치는 영향을 알아보기 위해, 난백알부민으로 감작된 동물모델의 폐조직을 조직병리학적으로 관찰하였다. 그 결과, 폐조직의 폐포와 세기관지는 난백알부

민에 의해 천식이 유발되었고, 상피세포가 손상되었으며, 세기관지 주변에 호산구를 비롯한 많은 염증세포가 침윤된 반면에, 본 발명의 클루베라마이세스를 처리한 경우는 호산구를 비롯한 염증세포가 현저하게 감소되었고 상피세포의 손상도 거의 보이지 않았다. 이는 상기 클루베라마이세스에 의한 기도폐포세척액으로부터 검사한 세포수의 감소현상과 일치한다는 것을 알 수 있다(도 6 참조).

[0035] 본 발명에서는 클루베라마이세스가 기관지 점액 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해, 난백알부민으로 감작된 동물모델의 폐조직으로부터 고블렛(goblet) 세포의 과증식을 관찰하였다. 그 결과, 본 발명의 클루베라마이세스를 처리하는 경우 난백알부민의 감작에 의해 증가되는 점액분비를 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 7 및 도 8 참조).

[0036] 본 발명에서는 클루베라마이세스가 염증 및 천식에 관여하는 프로스타글란딘 및 류코트리엔에 미치는 영향을 알아보기 위해, RBL-1(rat basophilic leukemia) 세포를 배양한 후 클루베라마이세스를 다양한 농도로 처리한 다음 프로스타글란딘 및 류코트리엔 농도를 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 클루베라마이세스의 처리농도에 의존적으로 프로스타글란딘 및 류코트리엔의 생성이 저해되는 것을 확인하였다(표 4, 표 5, 도 9 및 도 10 참조).

[0037] 따라서, 본 발명의 클루베라마이세스는 난백알부민 유도 천식 동물 모델에서 기관지 폐포세척액의 사이토카인(IL-4, IL-5 및 IL-13)의 생산을 억제하고, 호산구 증가를 억제하며, 점액분비를 억제하며, RBL-1 세포에서 프로스타글란딘 및 류코트리엔의 분비를 억제함으로써 알러지, 염증 또는 기관지 천식 질환의 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있음을 알 수 있다.

[0038] 본 발명의 클루베라마이세스를 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0039] 상기 클루베라마이세스는 임상 투여 시에 경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0040] 즉, 본 발명의 클루베라마이세스는 실제 임상 투여 시에 경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 클루베라마이세스에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0041] 본 발명의 클루베라마이세스의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 클루베라마이세스의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명의 클루베라마이세스는 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 알러지, 염증 또는 천식 질환에 걸린 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 치료방법을 제공한다.

[0044] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방방법을 제공한다.

[0045] 상기 조성물은 클루베라마이세스에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0046] 상기 조성물은 임상 투여 시에 경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.

[0047] 상기 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 클루베라마이세스의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

- [0048] 상기 방법은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0049] 아울러, 본 발명은 클루베라마이세스를 유효성분으로 함유하는 알러지, 염증 또는 천식 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 클루베라마이세스는 난백알부민 유도 천식 동물 모델에서 기관지 폐포세척액의 사이토카인(IL-4, IL-5 및 IL-13)의 생산을 억제하고, 호산구 증가를 억제하며, 점액분비를 억제하며, RBL-1 세포에서 프로스타글란딘 및 류코트리엔의 분비를 억제함으로써 알러지, 염증 또는 기관지 천식 질환의 예방 및 개선용 건강식품의 유효성분으로 이용할 수 있음을 알 수 있다.
- [0051] 본 발명의 클루베라마이세스를 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 클루베라마이세스를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0052] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 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.
- [0053] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스나 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.
- [0054] 상기 외에 본 발명의 클루베라마이세스는 여러가지 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. 그밖에 본 발명의 클루베라마이세스는 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

실시예

- [0055] 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0056] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0057] <실시예 1> 클루베라마이세스(*Kluyveromyces marxianus*)의 제조
- [0058] 캐피어 그레인(Kefir grain)은 대전과 충청남도 지역 민가에서 소지한 캐피어 그레인을 분양 받아 멸균수로 세척한 후 우유에 2%씩 접종하여 25℃에서 20 ~ 24시간 정치 배양하였으며 발효 후 냉장고에서 2 ~ 7일간 숙성시키는 방법으로 계속적으로 캐피어 발효를 통해 캐피어 그레인을 보존하였다(대한민국 등록특허 제 10-0663785호 참조).
- [0059] 상기 캐피어 그레인에 존재하는 클루베라마이세스(*Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*)를 동정하기 위해,

캐피어 그레이인을 분쇄기로 분쇄 및 균질화하여 농도별로 희석하고난 다음, 락토바실리 MRS 배지(Difco. USA), ROGOSA SL 배지(Difco. USA), APT 배지(Difco. USA), M17 배지(Difco. USA), BCP plate counting 배지(Eiken Chemical Co., Ltd., Japan)에 도말하여 배양하였다. 각각의 배양된 평판배지로부터 형태학적으로 구별되는 콜로니(colony)를 선별하였고, 선별된 균주는 생화학적 특성을 통한 1차 동정을 위하여, API 50CHL kit(Biomerieux, France)를 이용하여 동정하였다. 보다 정확한 동정을 위하여 16S rDNA의 유전자 서열 분석을 수행하였다. 그 결과, 상기 균주를 배양배지에 30℃에서 24시간 동안 seed 배양(100 mL medium/500 mL flask)하였고, 5L 발효조(Hanil science industrial., Korea)를 이용하여 seed를 10% 접종하여 30℃, 0.5 vvm, 200 rpm에서 24시간 동안 배양하였다. 그리고, 균체를 얻기위해 배양액을 6000 rpm 속도로 20분간 원심분리하였고, 이렇게 침전된 균주는 다시 액상 50 ml의 부형제 현탁액(증류수 100 ml에 식물성크림 50 g, 탈지분유 50 g을 현탁)과 혼합하여 -80℃ 이하에서 동결건조한 후 분말화하였다.

[0060] <실험예 1> 기관지폐포세척액의 호산구 분석

[0061] <1-1> 실험동물의 기도 감작과 항원 투여

[0062] 8주된 특정병원체 미감염 백서 암컷(Balb/c)(무게: 약 20g)을 (주)오리엔트(Seoul, Korea)에서 구입한 후, 2주간격으로 2 mg 수산화알루미늄(Sigma A8222)과 난백알부민 20μg(Sigma A5503)을 현탁한 인산완충용액(pH 7.4) 100 μl을 2회 복강에 주입하여 감작시켰다. 실험 시작 후 28일, 29일, 30일째 초음파 분무기를 사용하여 1% 난백알부민을 첨가한 인산완충용액을 20분간 마우스가 들어있는 밀폐된 용기에 분무하였으며, 음성대조군으로 기도감작도 일으키지 않은 마우스군(5마리), 대조군으로 기도감작 후 PBS 50 mg/kg를 투여한 군(5마리), 양성대조군으로 항천식약인 텍사메타손 4 mg/kg을 투여한 군(5마리), 실험군으로서 상기 <실시예 1>에서 수득한 클루베라마이세스(*Kluyveromyces marxianus*) 50 mg/kg을 인산완충용액에 현탁한 후에 항원투여하기 1시간 전에 경구투여한 군(5마리)으로 실험을 하였다. 마지막 항원투여 후 24시간 뒤에 과량의 펜토바비탈(pentobarbital, Sigma P3761)을 투여하여 치사시킨 후 기관지 절개를 수행하였다. 기관지폐포세척액(BALF)은 기관에 카눌라(cannula) 삽입방법으로 0.5 ml씩 3회 흡입하여 수득하였다.

[0063] <1-2> 난백알부민으로 감작된 동물모델에서 기관지폐포세척액의 호산구 분석 실험

[0064] 상기 실험예 <1-1>에서 수득한 각 실험군의 기관지폐포액 100 μl을 슬라이드에 놓고 사이토스핀 기기(cytospin, 한일, 한국)를 사용하여 원심분리를 하여 세포를 슬라이드에 고정하였다. 트리판블루(Trypan blue)로 염색하여 죽은 세포를 제외한 총 세포수를 헤모사이토미터를 이용하여 계산하였으며 3번 반복하여 측정하였다(Daigle I, et al., *Swiss Med. Wkly.*, 131, p231-237, 2001). 호산구 수는 디프-퀵(Diff-Quik) 시약(Sysmex, Cat No. 38721, Switzerland)으로 염색한 후 판별하고 총세포수와 동일한 방법으로 계산하였다. 통계학적인 분석은 Student's t-test로 수행하였으며 유의성 판별은 p 값으로 표현하였다.

[0065] 상기 실험 수행의 결과, 표 1 및 도 1에서 보는 바와 같이 음성대조군으로서 기도 감작하지 않은 경우의 기관지 폐포액의 총 염증세포(inflammatory cell) 수는 $1.6 \pm 0.3 \times 10^4$ cells/mouse이었으며, 그 중 호산구(eosinophil)는 전혀 관찰되지 않았다. 양성대조군으로서 난백알부민으로 감작시키고 PBS 투여 후 항원투여한 군에서는 총 염증세포수가 $34.8 \pm 22.9 \times 10^4$ cells/mouse로 20배 이상 증가하였다. 클루베라마이세스의 경우 총 염증세포수가 $185 \pm 82 \times 10^4$ cells/mouse로 50% 가량 감소하였으며 호산구 수 역시 50% 이상 감소한 것으로 관찰되었다. 난백알부민 감작군에 대한 클루베라마이세스 처리군과 텍사메타손 처리군의 호산구 수에 대한 유의성 값은 0.05이하로 모두 유의하게 감소한 것을 볼 수 있었다(표 1 및 도 1).

표 1

종류	마우스 1마리당 총 염증세포수(천)	마우스 1마리당 호산구 수(천)
정상 마우스	16 이하	관찰되지 않음
난백알부민 감작-인산완충용액 처리군	348 ± 229	163 ± 83
난백알부민 감작-클루베라마이세스 처리군	185 ± 82	80 ± 34

난백알부민 감작-텍사메타손 처리구	35 ± 18	6 ± 4
--------------------	---------	-------

<실험예 2> 사이토카인(IL-4, IL-5, IL-13) 분석

상기 실험예 <1-1>에서 수득한 각 실험구의 기관지폐포액의 사이토카인(cytokine)인 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5) 및 인터루킨-13(IL-13)의 함량을 측정하기 위하여, 상기 사이토카인에 특정 반응하는 ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, USA)를 사용하였으며, 제조사의 방법에 따라 각 사이토카인의 함량을 측정하였다.

상기 실험 결과, 표 2, 도 2 내지 도 4에서 보는 바와 같이 난백알부민으로 감작된 쥐의 경우 기관지폐포액의 인터루킨-4, 인터루킨-5 및 인터루킨-13의 생산이 크게 증가됨이 관찰되었으며, 특히 클루베라마이세스 처리구에서는 인터루킨-4와 인터루킨-5의 생산이 각각 77.7%, 25.4% 저해되었는데, 이는 캐피어의 52.5%(인터루킨-4)와 전혀 활성이 없었던 것(인터루킨-5)에 비하면 매우 뛰어난 저해효과이다(대한민국 등록특허 제 10-0685285호 참조). 반면, 인터루킨-13의 생산은 29.8% 저해된 것을 볼 수 있었다(표 2, 도 2 내지 도 4).

표 2

종류	IL-4 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)
정상쥐	3.3 ± 2.6	6.43 ± 5.3	12.5 ± 7.1
난백알부민 감작-인산완충용액 처리구	11.4 ± 7.8	20.6 ± 9.2	67.7 ± 5.3
난백알부민 감작-클루베라마이세스 처리구	2.5 ± 2.4	15.4 ± 5.3	47.6 ± 19.5
난백알부민 감작-텍사메타손 처리구	1.8 ± 3.0	10.9 ± 6.6	39.3 ± 5.8

<실험예 3> 호흡률 측정

기도과민반응(airway hyper-responsiveness, AHR)을 *in vivo* 상태에서 측정하는 방법에는 마취하에서 기관에 관을 삽입한 상태에서 압력을 측정하는 방법(De Sanctis GT, et al., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 108, p11-20, 2001)과 마취를 하지 않고 자연상태의 운동을 유지하면서 체적변동 측정기(whole body plethysmograph)를 사용하여 수학적으로 계산된 기도의 폐색을 반영하는 수치인 Enhanced Pause (Penh)를 측정하는 방법이 있다(Tomkinson A, et al., *Am. J. Respir Crit Care Med.*, 163, p721-730, 2001).

본 발명에서는 상기 실험예 <1-1>에서 1% OVA/PBS 용액의 3일 연속 분무 흡입 후 24시간 뒤에 두 번째 방법을 이용하여 모든 쥐들의 움직임이 자유롭고 의식이 있는 상태를 유지하면서 기압 체적 변동측정기를 사용하여 기도과민성 반응을 측정하였다. 기도 과민성의 기저치는 3분 동안의 측정치의 평균을 사용하고, 이후 메타콜린을 6.25 mg/ml에서 25 mg/ml까지 점차적으로 높여가면서 각 농도마다 3분씩 초음파연무기를 사용하여 흡입시킨 후, 3분 동안 각각의 기도 과민성의 정도를 기도저항측정기로 측정하였다. 기도 과민성의 정도는 각각의 메타콜린을 투여한 후 측정한 Penh값과 PBS를 흡입한 후 측정한 Penh값과 비교하여 증가된 비율로 표시하였다.

수학적 식 1

$$\text{기도과민반응 정도} = \frac{\text{메타콜린투여후측정한Pehn}}{\text{PBS흡입후측정한Pehn}}$$

상기 실험 결과, 표 3 및 도 5에서 보는 바와 같이 클루베라마이세스 처리구는 메타콜린의 농도에 따라 기도 과민성이 호전되는 것을 확인할 수 있었다(표 3 및 도 5).

표 3

종류 \ 메타콜린(mg/ml)	0	6.25	12.5	25
정상쥐	0.40 ± 0.10	0.51 ± 0.10	0.79 ± 0.11	1.67 ± 0.68
난백알부민 감작-인산완충 용액	0.62 ± 0.21	2.80 ± 0.36	4.88 ± 0.88	5.52 ± 0.61
난백알부민 감작-클루베라마이세스	0.63 ± 0.13	2.09 ± 0.32	4.12 ± 0.66	4.77 ± 0.58
난백알부민 감작-텍사메타손	0.46 ± 0.07	0.98 ± 0.19	3.01 ± 0.49	3.29 ± 0.69

<실험예 4> 조직병리학적 방법을 이용한 항천식 효과 규명

조직병리학적 실험을 위해서는 쥐 폐조직을 10% 중성완충-포르말린으로 24시간 고정한 후 파라핀 포매(embedding)를 실시하였다. 포매 조직은 4 mm 두께로 절단하여 절편을 만들고 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신 와이(Eosin Y; ThermoShandon, Pittsburgh, PA)으로 염색하였고 이어서 Dako-봉입액(Dakocytomation, Denmark)으로 봉입하였다. 염색과 봉입을 한 후, 슬라이드는 광학현미경으로 검경하였으며 기관지 염증세포의 침윤정도는 두 사람의 이중맹검(double-blind screen)법으로 정량화하였다.

상기 실험 결과, 도 6에서 보는 바와 같이 폐조직의 폐포와 세기관지는 난백알부민에 의해 천식이 유발되고, 인산완충용액만을 투여한 대조군에서는 상피세포가 손상되어 있는 것을 알 수 있으며, 세기관지 주변에 호산구를 비롯한 많은 염증세포가 침윤되어 있는 것을 알 수 있다. 반면에, 클루베라마이세스를 투여한 실험군에서는 호산구를 비롯한 염증세포가 현저하게 감소되었고 상피세포의 손상도 거의 보이지 않았다. 이는 상기 <실험예 1>에서 클루베라마이세스에 의한 기도폐포세척액으로부터 검사한 세포수의 감소현상과 일치함을 확인할 수 있었다(도 6).

<실험예 5> 기관지 점액 억제 효과

기관지 재형성(remodeling)이 일어나면 끈끈한 점액분비가 과도하게 일어나는데 점액을 분비하는 세포인 고블렛(goblet) 세포가 과도하게 증식되었는지를 조사하기 위해 상기 <실험예 4>에서 실시한 폐 조직 절편을 Periodic acid-Schiff(PAS, IMEB INC)로 염색하였다.

상기 실험 결과, 도 7에서 보는 바와 같이 난백알부민-유도 쥐의 기관지에서는 고블렛세포의 과증식(hyperplasia)이 일어나는데 반해 인산완충용액(PBS)만을 처리한 대조군에서는 과증식이 나타나지 않음을 확인하였다. 도 8에서 보는 바와 같이 PAS 염색수치는 난백알부민군에서는 46.06 ± 4.18 로 매우 높게 나타난 반면 클루베라마이세스를 투여한 실험군에서는 33.94 ± 5.64 로 그 수치가 감소하였으므로 점액분비 억제 활성이 있음을 확인할 수 있었다(도 7 및 도 8).

<실험예 6> RBL-1 세포에서의 프로스타글란딘(prostaglandin) 생성 저해 효과

클루베라마이세스의 프로스타글란딘 생성 저해 활성 실험을 위해 ATCC에서 구입한 RBL-1(rat basophilic leukemia) 세포를 배지(100 units/ml 페니실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신, 10 mg/ml 겐타마이신, 2 mM L-글루타민, 0.1 mM 비필수아미노산, 10 % 우태혈청을 함유하는 RPMI 1640)를 사용하여 배양하였으며, 실험을 위해 세포를 5×10^5 cells/ml의 농도로 96-웰 플레이트(well plate)에 200 μ l씩 분주하였다. 상기 플레이트에 음성대조군으로는 DMSO를 0.1%로, 양성대조군으로는 인도메타신(Indomethacin) 1 μ M, 실험군으로는 클루베라마이세스를 10, 50 및 100 μ g/ml의 농도로 혼합하여 37℃의 CO₂ 배양기 내에서 10분 동안 배양한 후, 이온운반체인 A23187을 10 μ M 농도로 처리한 다음, 다시 37℃의 CO₂ 배양기 내에서 20분 동안 배양한 후, 반응물을 원심분리(4℃, 250xg, 5분)하였다. 상층액으로부터 유리된 프로스타글란딘의 양을 프로스타글란딘 측정 키트(PGE₂ assay kit; R&D systems, Minneapolis, USA)를 사용하여 측정하였다.

상기 실험 결과, 표 4 및 도 9에서 보는 바와 같이 클루베라마이세스의 처리농도에 의존적으로 프로스타글란딘

의 생성이 저해되는 것을 확인하였다(표 4 및 도 9).

표 4

종류	PGE ₂ (pg/ml)
DMSO	48.0 ± 24.1
클루베라마이세스 10 ug/ml	46.3 ± 5.4
클루베라마이세스 50 ug/ml	26.2 ± 7.6
클루베라마이세스 100 ug/ml	18.5 ± 1.6
인도메타신 1 uM	3.5 ± 1.0

<실험예 7> RBL-1 세포에서의 류코트리엔(leukotrien) 생성 저해 효과

클루베라마이세스의 류코트리엔 생성 저해 활성 실험을 위해 상기 <실험예 6>과 동일한 세포처리를 하였으며, 양성대조군으로는 질루톤(Zileuton) 1 uM을 처리하였다. 상기로부터 얻은 상층액에서 유리된 류코트리엔의 생성량을 LTC₄ 측정 키트(LTC₄ assay kit; Cayman, USA)를 사용하여 측정하였다.

상기 실험 결과, 표 5 및 도 10에서 보는 바와 같이 질루톤에 비해서는 그 활성이 미약하지만, 농도의존적으로 류코트리엔 C₄의 생성을 저해함을 알 수 있었다.

표 5

종류	LTC ₄ (pg/ml)
DMSO	86.0 ± 17.8
클루베라마이세스 10 ug/ml	83.0 ± 10.0
클루베라마이세스 50 ug/ml	77.5 ± 8.1
클루베라마이세스 100 ug/ml	71.8 ± 4.6
질루톤 1 uM	26.5 ± 2.5

하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

<제조예 1> : 약학적 제제의 제조

1. 산제의 제조

클루베라마이세스 2 g

유당 1 g

상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

2. 정제의 제조

클루베라마이세스 100 mg

옥수수전분 100 mg

유 당 100 mg

스테아린산 마그네슘 2 mg

[0102] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0103] 3. 캡슐제의 제조

[0104] 클루베라마이세스 100 mg

[0105] 옥수수전분 100 mg

[0106] 유 당 100 mg

[0107] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0108] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0109] 4. 환의 제조

[0110] 클루베라마이세스 1 g

[0111] 유당 1.5 g

[0112] 글리세린 1 g

[0113] 자일리톨 0.5 g

[0114] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0115] 5. 과립의 제조

[0116] 클루베라마이세스 150 mg

[0117] 대두추출물 50 mg

[0118] 포도당 200 mg

[0119] 진분 600 mg

[0120] 상기의 성분을 혼합한 후, 30 % 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60 ℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

[0121] <제제예 2> : 식품의 제조

[0122] 본 발명의 클루베라마이세스를 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0123] 1. 밀가루 식품의 제조

[0124] 본 발명의 클루베라마이세스를 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0125] 2. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0126] 본 발명의 클루베라마이세스를 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0127] 3. 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0128] 본 발명의 클루베라마이세스를 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를

제조하였다.

[0129] 4. 유제품(dairy products)의 제조

[0130] 본 발명의 클루베라마이세스를 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0131] 5. 선식의 제조

[0132] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0133] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0134] 본 발명의 클루베라마이세스를 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0135] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 클루베라마이세스를 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0136] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0137] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0138] 클루베라마이세스(3 중량부),

[0139] 영지(0.5 중량부),

[0140] 지황(0.5 중량부)

[0141] <제제예 3> : 음료의 제조

[0142] 1. 건강음료의 제조

[0143] 액상과당(0.5 %), 올리고당(2 %), 설탕(2 %), 식염(0.5 %), 물(75 %)과 같은 부재료와 본 발명의 클루베라마이세스 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

[0144] 2. 야채주스의 제조

[0145] 본 발명의 클루베라마이세스 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0146] 3. 과일주스의 제조

[0147] 본 발명의 클루베라마이세스 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml 에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

산업이용 가능성

[0148] 본 발명은 클루베라마이세스(*Kluyveromyces marxianus*)를 함유하는 알리지, 염증 또는 기관지 천식 질환의 예방 및 치료를 위한 의약품, 및 건강기능식품 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0149] 도 1은 기도 감작한 후 기관지 폐포 세척액의 총염증세포수와 호산구수에 대한 클루베라마이세스가 미치는 영향을 나타낸 그래프이다:
- [0150] PBS: PBS만 투여한 음성대조군의 경우,
- [0151] OVA: 난백알부민으로 감작시킨 대조군의 경우,
- [0152] *Kluyveromyces marxianus*: 클루베라마이세스를 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 실험군의 경우, 및
- [0153] Dex: 텍사메타손을 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 양성대조군의 경우.
- [0154] 도 2는 폐포 세척액에서 인터루킨 4의 함량을 나타낸 그래프이다:
- [0155] PBS: PBS만 투여한 음성대조군의 경우,
- [0156] OVA: 난백알부민으로 감작시킨 대조군의 경우,
- [0157] *Kluyveromyces marxianus*: 클루베라마이세스를 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 실험군의 경우, 및
- [0158] Dex: 텍사메타손을 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 양성대조군의 경우.
- [0159] 도 3은 폐포 세척액에서 인터루킨 5의 함량을 나타낸 그래프이다:
- [0160] PBS: PBS만 투여한 음성대조군의 경우,
- [0161] OVA: 난백알부민으로 감작시킨 대조군의 경우,
- [0162] *Kluyveromyces marxianus*: 클루베라마이세스를 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 실험군의 경우, 및
- [0163] Dex: 텍사메타손을 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 양성대조군의 경우.
- [0164] 도 4는 폐포 세척액에서 인터루킨 13의 함량을 나타낸 그래프이다:
- [0165] PBS: PBS만 투여한 음성대조군의 경우,
- [0166] OVA: 난백알부민으로 감작시킨 대조군의 경우,
- [0167] *Kluyveromyces marxianus*: 클루베라마이세스를 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 실험군의 경우, 및
- [0168] Dex: 텍사메타손을 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 양성대조군의 경우.
- [0169] 도 5는 기도 감작한 후, 메타콜린 흡입으로 인한 기관지 수축의 완화정도를 나타낸 그래프이다.
- [0170] 도 6은 기도 감작한 후, 기관지 폐포를 조직화학적으로 분석한 그림이다:
- [0171] A: 기도 감작하지 않은 경우,
- [0172] B: 난백알부민으로 기도 감작한 경우,
- [0173] C: 클루베라마이세스를 처리한 후 난백알부민으로 기도 감작한 경우, 및
- [0174] D: 텍사메타손을 처리한 후 난백알부민으로 기도 감작한 경우.
- [0175] 도 7은 기도 감작 후, 기관지를 PAS 염색한 것을 나타낸 그림이다:
- [0176] A: 기도 감작하지 않은 경우,
- [0177] B: 난백알부민으로 기도 감작한 경우,
- [0178] C: 클루베라마이세스를 처리한 후 난백알부민으로 기도 감작한 경우, 및
- [0179] D: 텍사메타손을 처리한 후 난백알부민으로 기도 감작한 경우.
- [0180] 도 8은 상기 도 7에서 나타난 고블렛 세포의 과증식을 정량화한 그래프이다:
- [0181] PBS: PBS만 투여한 음성대조군의 경우,
- [0182] OVA: 난백알부민으로 감작시킨 대조군의 경우,
- [0183] *Kluyveromyces marxianus*: 클루베라마이세스를 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 실험군의 경우, 및

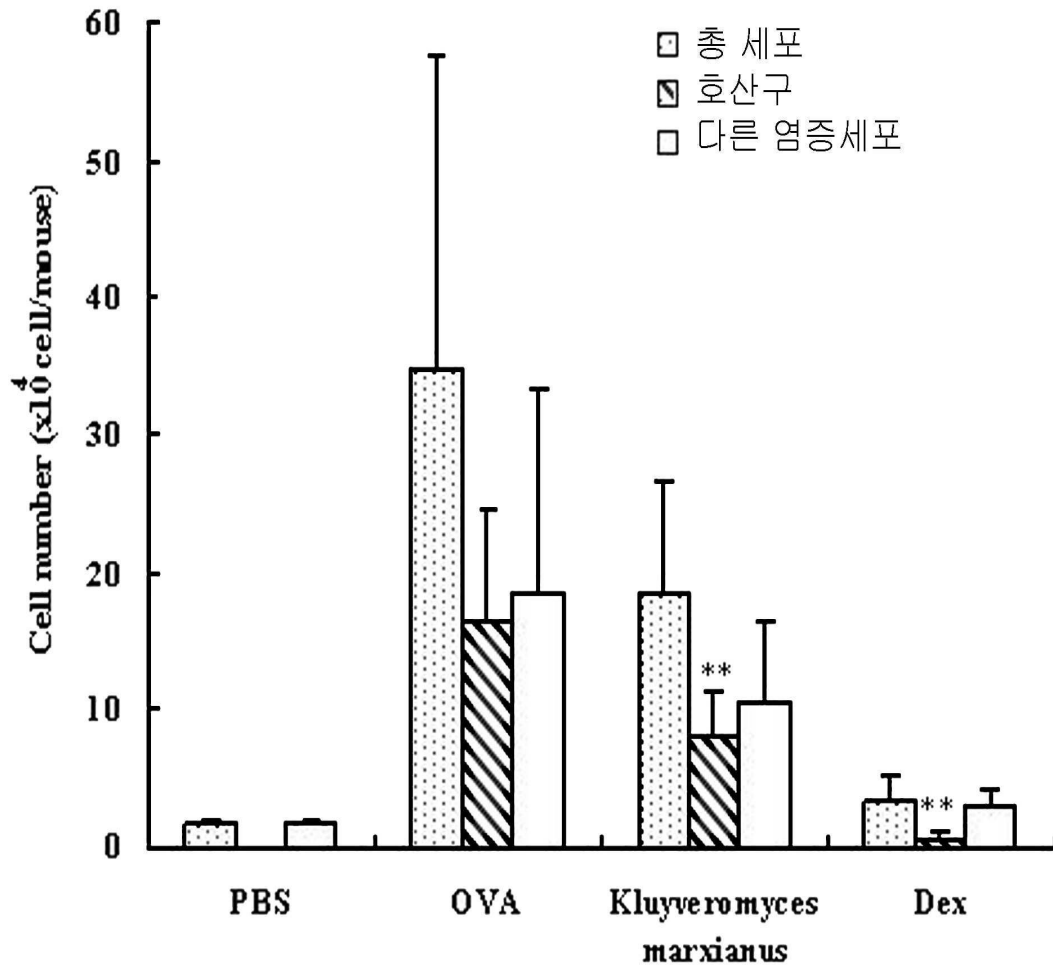
[0184] Dex: 텍사메타손을 투여한 후 난백알부민으로 감작시킨 양성대조군의 경우.

[0185] 도 9는 RBL-1 세포에 클루베라마이세스를 처리한 후, 프로스타글란딘의 분비량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

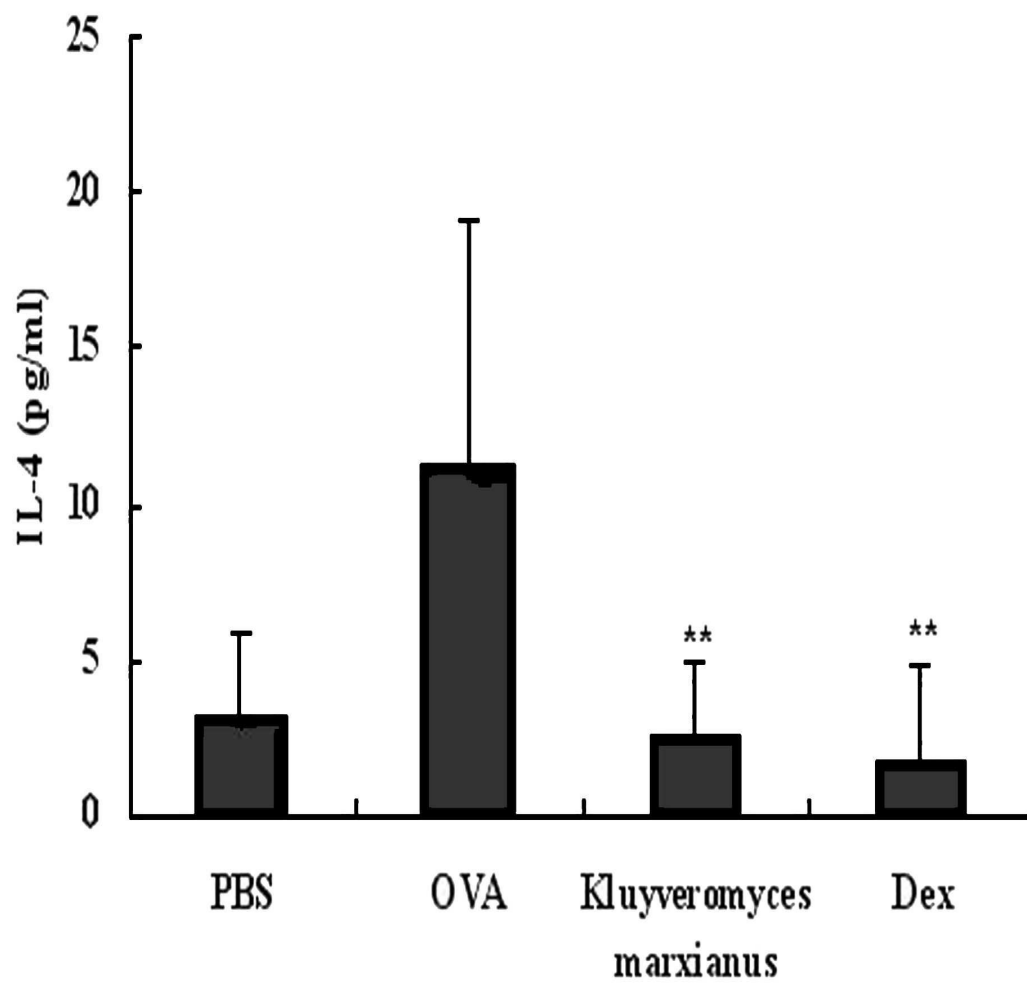
[0186] 도 10은 RBL-1 세포에 클루베라마이세스를 처리한 후, 류코트리엔의 분비량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도면

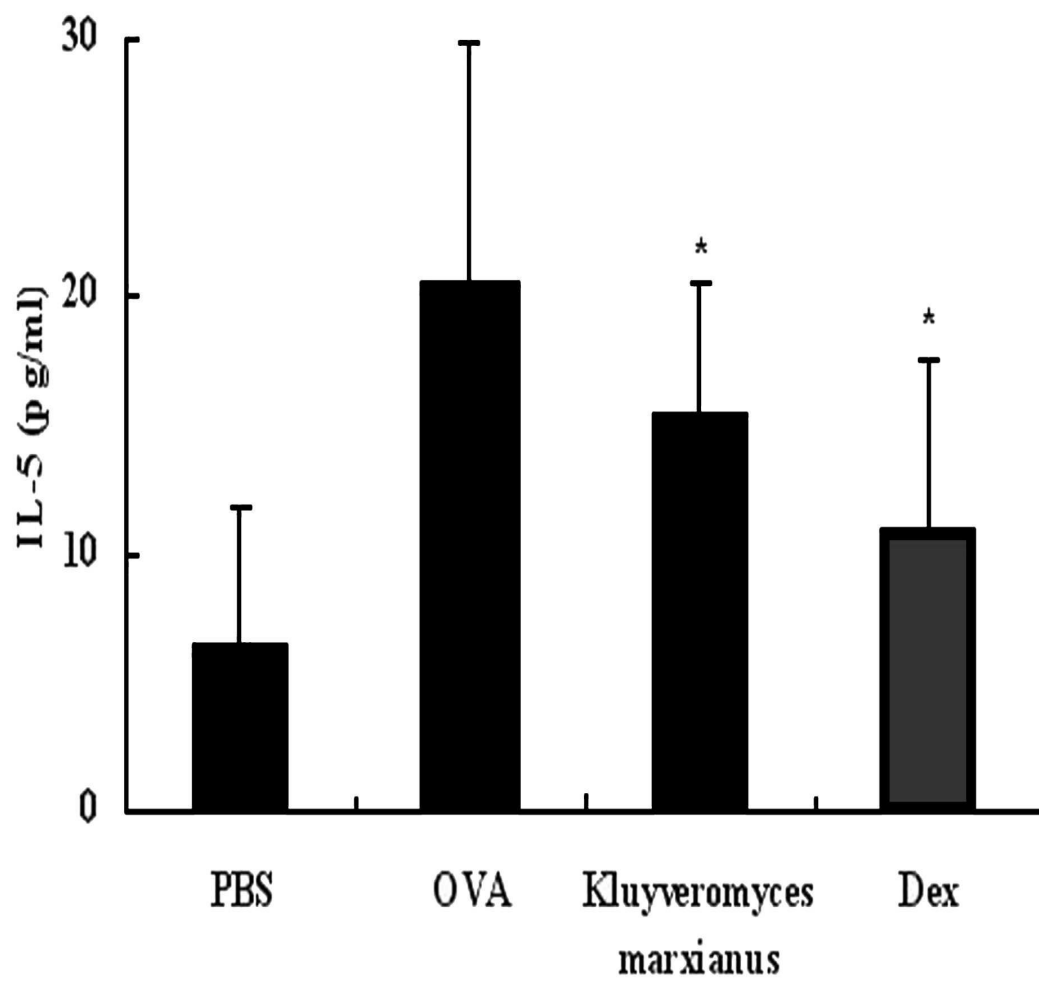
도면1



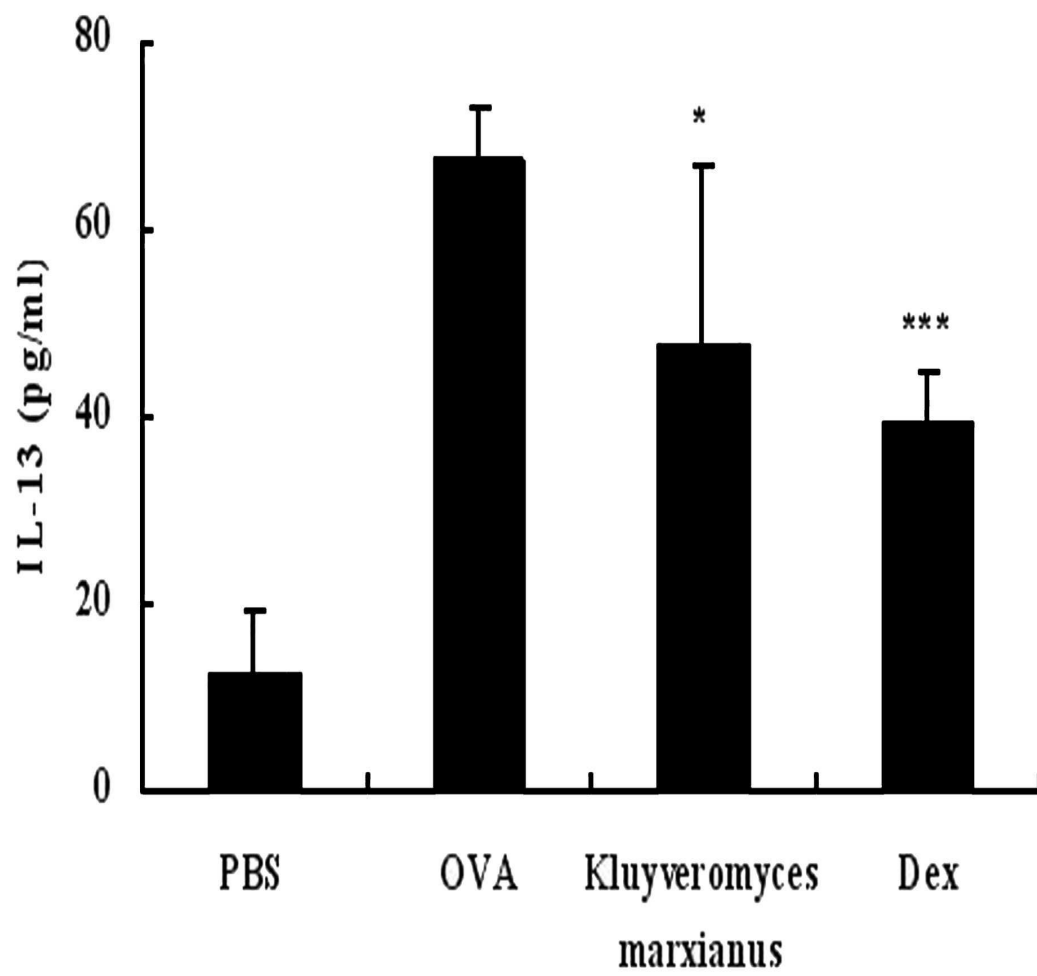
도면2



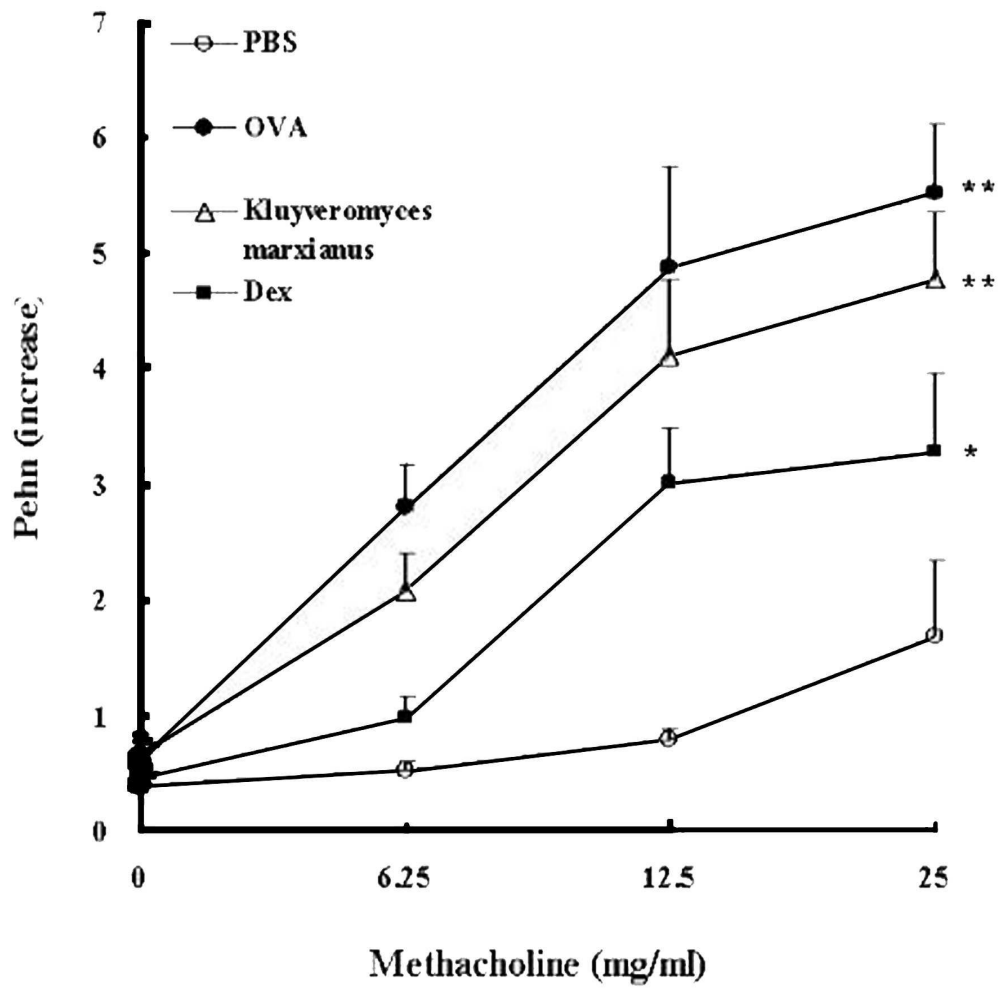
도면3



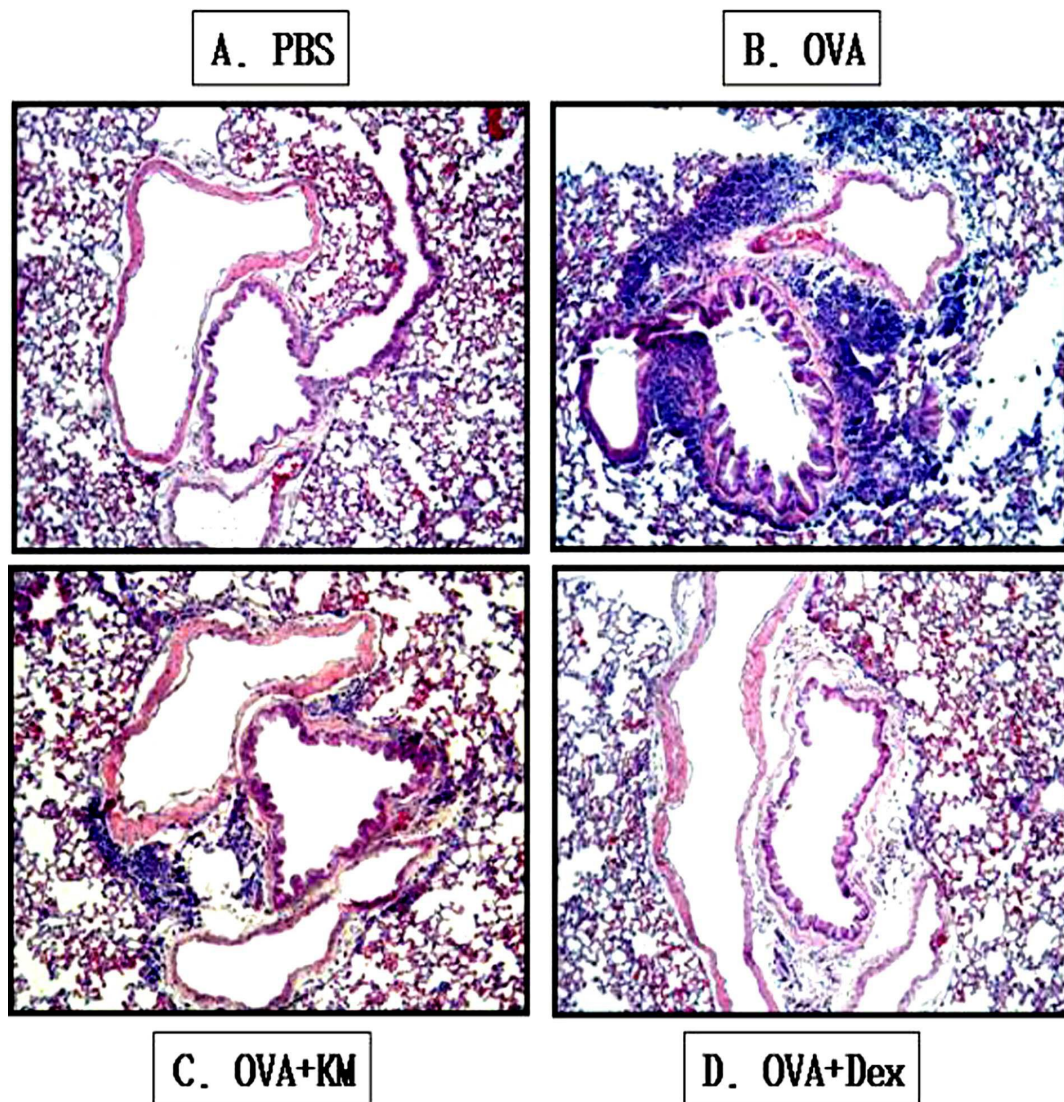
도면4



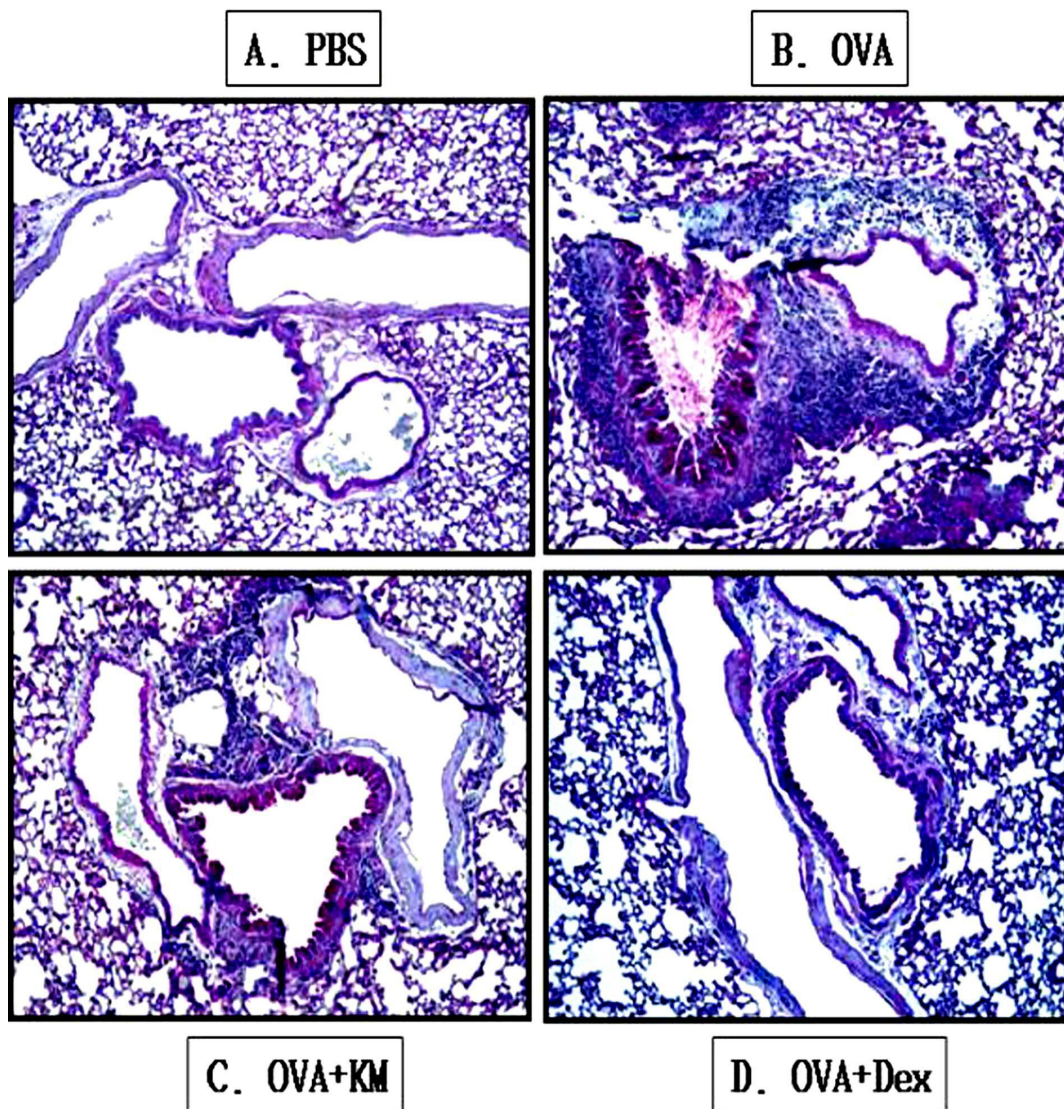
도면5



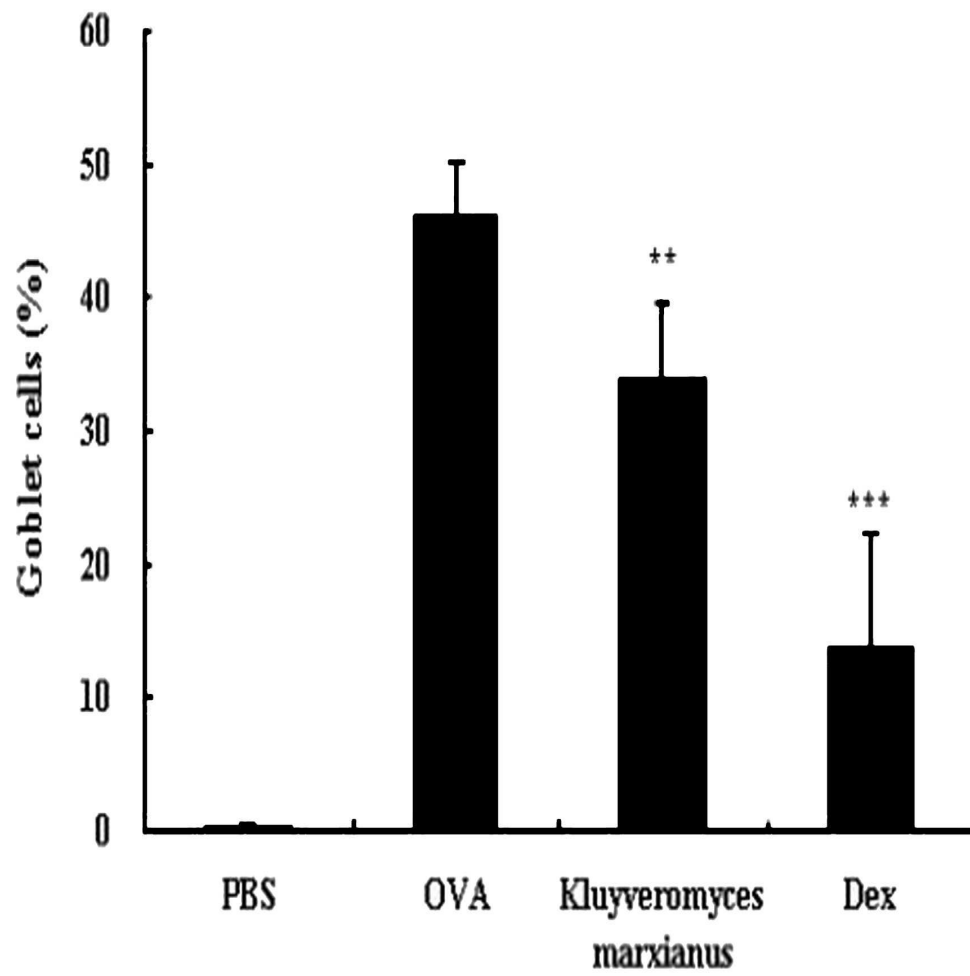
도면6



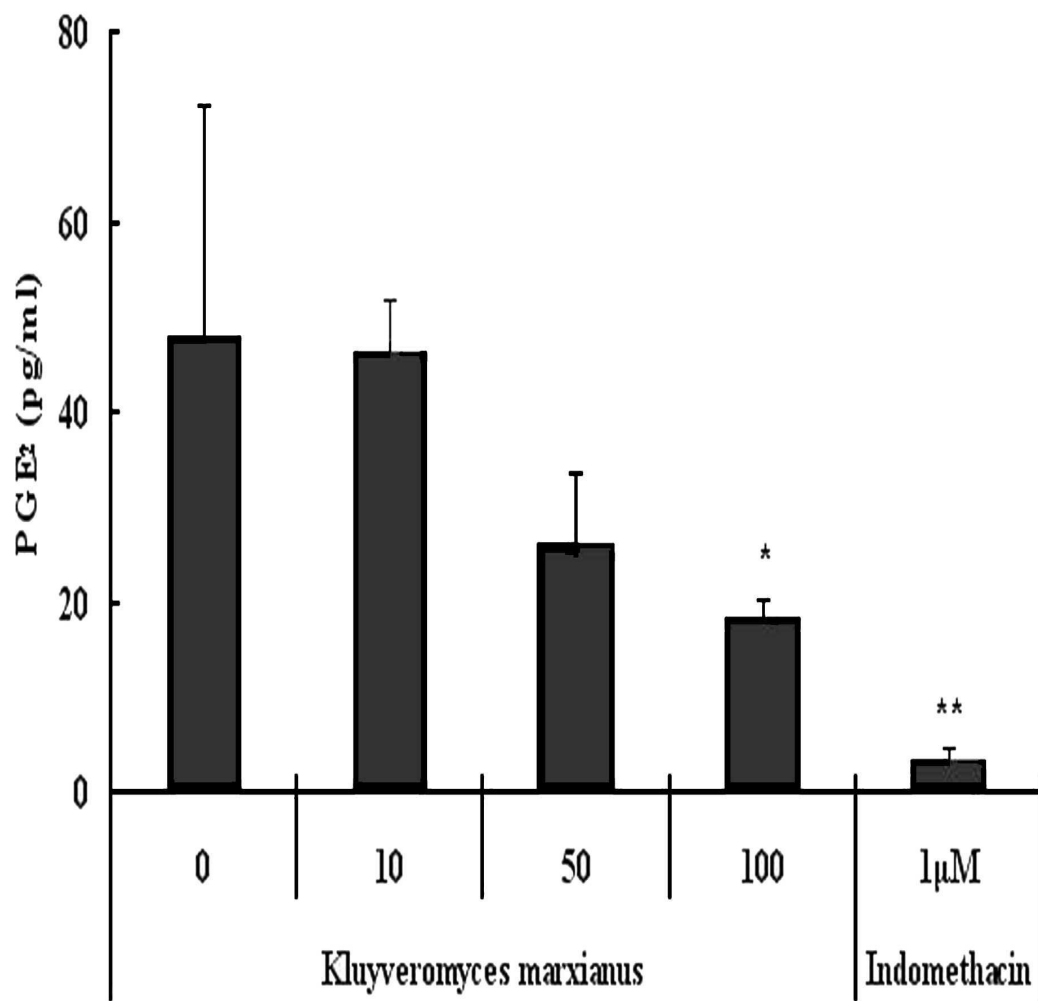
도면7



도면8



도면9



도면10

