



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0051743
(43) 공개일자 2019년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/7048 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0181158

(22) 출원일자 2017년12월27일

심사청구일자 2017년12월27일

(30) 우선권주장

1020170147383 2017년11월07일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김태성

서울특별시 중랑구 묵동 신내두산대림아파트 512동 1203호

김도만

강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1 서울대학교 에그힐 320동 101호

전재형

서울특별시 서초구 양재대로2길 109(우편동 서초참누리에코리치 105동) 105동 102호

(74) 대리인

특허법인다나

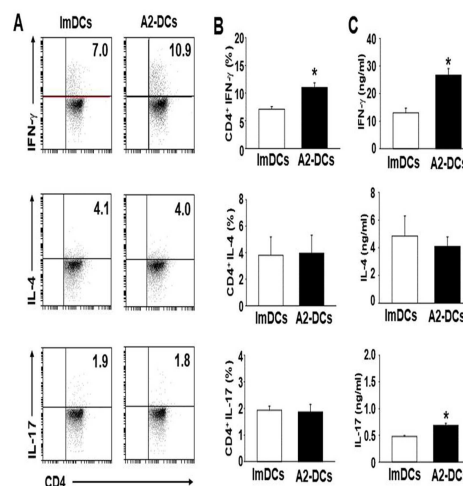
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 수용성 아스트라갈린 배당체에 의한 수지상 세포의 활성화 작용 및 면역 보강제로서의 용도

(57) 요약

본 발명은 수용성 아스트라갈린 배당체에 의한 수지상 세포의 활성화 작용 및 면역 보강제로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체는, 기존의 아스트라갈린에서 거의 관찰되지 않았던, 수지상 세포 활성화 유도 효과를 나타내었을 뿐만 아니라, 상기 활성화된 수지상 세포는 CD4⁺ T 세포 특이적인 면역 반응을 유의적으로 향상시킬 수 있었는바, 상기 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체 또는 상기 배당체에 의해 활성화된 수지상 세포는 면역 증강제 또는 면역 조절제의 유효 성분으로 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3D1A1021387

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래소재디스커버리사업

연구과제명 기능면역체기술 기반 생분해성 혁신형 펩타이드 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2018.02.01 ~ 2019.01.31

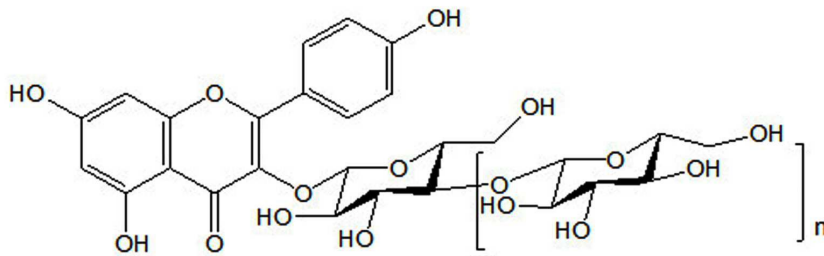
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 유효성분으로 포함하는, 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물.

[화학식 1]

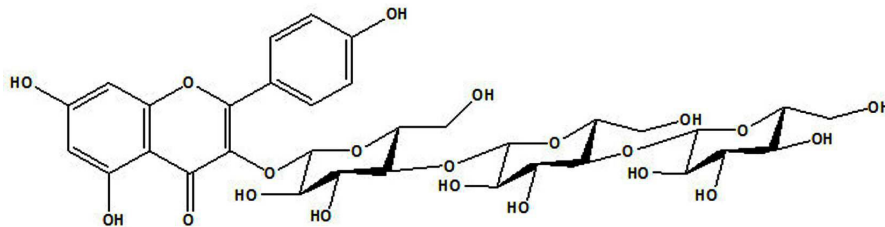


(상기 화학식 1에서, n은 1 내지 5의 정수이다.)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체는 하기 화학식 2로 표시되는 것인, 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물.

[화학식 2]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 수지상 세포는 CD80, CD86, 및 MHC 클래스 II 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 표면 항원에 양성적 면역학적 특성을 나타내는 것인, 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 수지상 세포는 IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p40로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 사이토카인의 분비가 증가된 것인, 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물.

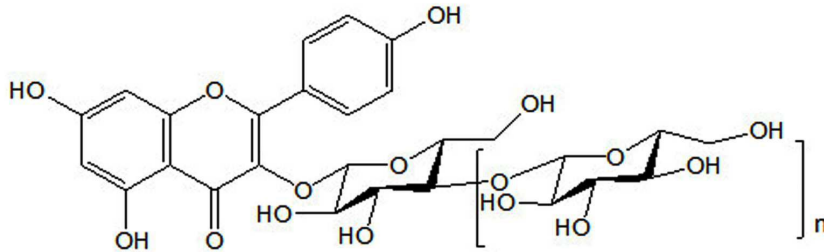
청구항 5

체외로 분리된 수지상 세포에 제1항에 따른 조성물을 처리하는 단계를 포함하는, 수지상 세포의 활성화 방법.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 조성물.

[화학식 1]

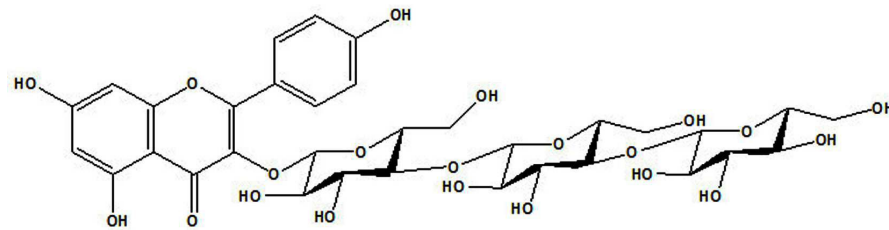


(상기 화학식 1에서, n은 1 내지 5의 정수이다.)

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체는 하기 화학식 2인 것인, 면역 증강용 조성물.

[화학식 2]



청구항 8

제6항에 있어서, 상기 조성물은 $CD4^+$ T 세포 매개 면역을 활성화시키는 것인, 면역 증강용 조성물.

청구항 9

제5항에 따른 활성화된 수지상 세포를 포함하는, 면역 증강용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 조성물은 $CD4^+$ T 세포 매개 면역을 활성화시키는 것인, 면역 증강용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수용성 아스트라갈린 배당체에 의한 수지상 세포의 활성화 작용 및 면역 보강제로서의 용도에 관한

것이다.

배경 기술

- [0002] 체내에서는, 박테리아, 바이러스, 독소, 암세포, 다른 사람 혹은 동물의 혈액, 및 조직과 같은 외부 물질인 항원으로부터 신체를 보호하기 위하여 면역반응이 일어난다. 이러한 면역계는 크게 면역을 억제, 조절하는 메카니즘인 면역 관용(tolerance)과 면역을 증진하는 면역 반응 (immunity)으로 구성되며, 면역계는 이러한 두 가지 면역 작용이 적절한 균형을 이룸으로써, 면역 항상성을 유지하고 있다. 이렇게 유지되는 면역학적 균형은 다양한 원인에 의해 불균형이 초래될 수 있으며, 이러한 불균형은 결국 다양한 질병을 발생시키는 결과를 초래한다. 면역 관용의 기능이 면역 반응에 비해 상대적으로 강하거나, 이와 반대로 면역반응 기능이 면역관용 기능에 비해 강해질 경우, 면역학적 불균형이 초래될 수 있다. 예를 들어, 면역 반응에 비해 면역 관용 기작이 강해질 경우, 인체 면역계는 암의 발생이나 외부 바이러스 병원성 균 등의 침입이 용이하게 되어 암 또는 바이러스 및 세균성 질환을 발생시키게 되며, 이와 반대로 면역 반응성이 면역 관용 기능보다 강해질 경우는 자가 면역질환, 강력한 이식 거부 반응, 및 알러지성 질환과 같은 염증성 질환을 초래하게 된다. 따라서, 면역학적 관점에서 바라본 질병은 면역 시스템 항상성의 불균형에 의해 나타나는 결과물이며, 이러한 불균형의 조절을 통해 질병의 치료가 가능하다고 할 수 있다.
- [0003] 한편, 수지상 세포 (Dendritic Cell, DC)는 기원, 형태, 표현형, 기능, 성숙화 과정 등에 따라 다양한 특성을 지니게 되며, 특히, 상황에 따라 T 세포 반응을 촉진 또는 억제할 수 있는바, 체내 면역의 항상성을 조절하는 중요한 역할을 한다. 즉, 수지상 세포는 항원에 노출된 적이 없는 원시 T 세포 (naive T cell)를 자극시킬 수 있는 일차 면역 반응 (primary immune response)의 유도 능력을 지니며, 또한 면역 기억을 유도할 수 있는 특성을 갖는 유일한 면역세포이다. 수지상 세포가 강력한 면역반응 활성화 기능을 할 수 있는 것은 항원제시세포 (APC, Antigen Presenting Cell)로서 세포 표면에 MHC 분자 (I/II) 뿐만 아니라, 예컨대 CD80, CD86과 같은 보조자극 분자 (co-stimulatory molecules)와, 예컨대 ICAM-1 등과 같은 부착 분자 (adhesion molecule)를 고농도로 발현하고 있으며, 여러 가지의 사이토카인 (IFN- α , IL-12, IL-18 등)을 분비하기 때문인 것으로 알려져 있다.
- [0004] 수지상 세포 분화 또는 활성화는 말초 혈액 유래 단핵구 (monocytes) 또는 말초 혈액, 제대혈, 골수의 조혈모세포로부터 사이토카인을 활용하여 체외 세포 배양 (ex vivo culture)으로 이루어지고 있으며, 크게 두 단계로 구분된다. 1 단계는 단핵구, 조혈모세포와 같은 전구세포로부터 형질적, 기능적으로 미성숙 단계의 수지상 세포로의 분화를 유도한 것이며, 2 단계는 이들 미성숙 수지상 세포를 용도에 맞도록 형질적, 기능적으로 성숙시키는 분화물질을 이용한 성숙 수지상 세포로의 분화이다. 특히, 2단계에서 분화되는 수지상 세포의 형질과 기능은 분화물질 조절을 통해 면역강화 혹은 면역 억제의 명확히 구별되는 양상이 나타난다. 따라서 수지상 세포의 분화를 적절히 체외에서 조절하여 각종 면역질환 증상에 맞는 최적의 조건을 갖추는 것이 필요하며 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0005] 현재까지 다양한 분화유도 인자들을 이용한, 세포면역 기능성 강화를 위한 수지상 세포의 제조방법이 제시되어 왔다. 각종 사이토카인의 조합인 사이토카인 콕테일 (cytokine cocktail), 감염성 인자들이 공통적으로 보유하는 분자 패턴 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 또는 이들에 대한 수용체의 리간드 (toll like receptor ligands), 독성이 제거된 멸균된 세균, 피사를 유도한 암세포 등이 분화 유도 물질로 많이 활용되고 있다. 특히, 인위적으로 체외에서 제조한 미성숙 수지상 세포의 성숙을 유도하기 위해 LPS, 폴리(I:C)(poly(I:C)), LTA, CpG, flagellin 등 세균이나 바이러스 유래의 성분 또는 그에 상응하는 합성 분자들을 단독, 혹은 다양한 조합으로 사용하기도 한다. 대부분의 면역 질환은 Th1과 Th2 면역세포간의 균형이 중요하며, 암이나 천식, 아토피와 같이 Th2 면역세포가 활성화되어 있는 상황에서는 Th1 면역세포를 가동하기 위해 수지상 세포로부터 IL-12의 분비가 필요조건이다.
- [0006] 이러한 내용들을 토대로, 다양한 방법들이 수지상 세포를 성숙화시키기 위해 사용되어 왔다 (한국 등록특허 10-1749165). 그러나, 이들은 체외 분석에서 면역학적 활성 기능 증진 효과를 나타내었으나, 인체를 대상으로 한 임상연구에서는 결과가 미흡한 것으로 나타났다. 이는 체외 제조한 수지상 세포들이 세포성 면역의 유도에 필수적인 IL-12의 생산이 매우 낮고, 체내 투여되었을 때 생존율과 이동성이 낮으며, 전신성 면역 억제 환경에 의한 수지상 세포의 기능 상실 등이 그 이유인 것으로 보고되고 있다. 따라서, 수지상 세포의 분화 또는 활성화 기술을 통해 보다 효과적으로 체내에서 Th1 면역활성을 증가시킬 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

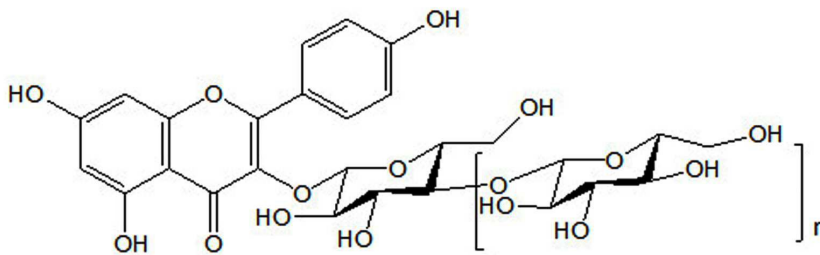
해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은, 수지상 세포의 활성화에 의한 체내 면역 반응을 증진시키기 위하여 예의 노력한 결과, 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체의 처리에 따른 수지상 세포 및 $CD4^+$ T 세포의 활성화를 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 유효성분으로 포함하는, 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물 및 이의 용도를 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 조성물 및 이의 용도를 제공하는데 있다.
- [0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 유효성분으로 포함하는, 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물을 제공한다.

[화학식 1]



- [0014]
- [0015] (상기 화학식 1에서, n은 1 내지 5의 정수이다.)

- [0016] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 수지상 세포는 CD80, CD86, 및 MHC 클래스 II 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 표면 항원에 양성의 면역학적 특성을 나타내는 것일 수 있고, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p40로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 사이토카인의 분비가 증가된 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 체외로 분리된 수지상 세포에 상기 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는, 수지상 세포의 활성화 방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체 또는 상기 배당체의 처리에 의해 활성화된 수지상 세포를 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 $CD4^+$ T 세포 매개 면역을 활성화시킬 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체 또는 상기 배당체의 처리에 의해 활성화된 수지상 세포를 개체에 처리하는 단계를 포함하는, 면역 증진방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체는, 기존의 아스트라갈린에서 거의 관찰되지 않았던, 수지상 세포 활성화 유도 효과를 나타내었을 뿐만 아니라, 상기 활성화된 수지상 세포는 $CD4^+$ T 세포 특이적인 면역 반응을 유의적으로 향상시킬 수 있었는바, 상기 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체 또는 상기 배당체에 의해 활성화된 수지상 세포는 면역 증강제 또는 면역 조절제의 유효 성분으로 폭넓게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은, 본 발명에 따른 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체에 의한 수지상 세포 표면 상 활성화 표지 분자의 발현의 증가를 확인한 결과이다.

도 2는, 본 발명에 따른 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체에 의한 수지상 세포의 면역 증가성 사이토카인의 분비 증가를 확인한 결과이다.

도 3은, 시험관 내에서, 본 발명에 따른 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체가 처리된 수지상 세포에 의한 $CD4^+$ T 세포의 INF- γ 분비 증가를 확인한 결과이다.

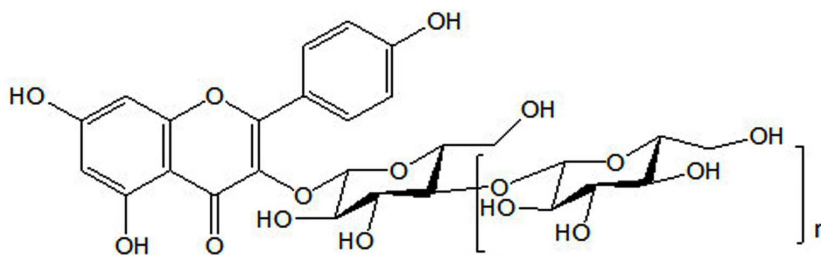
도 4는, 생체 내에서, 본 발명에 따른 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체가 처리된 수지상 세포의 주입에 의한 림프절 $CD4^+$ T 세포의 INF- γ 분비 증가를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

[0025] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 유효성분으로 포함하는, 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물; 수지상 세포의 활성화를 유도하기 위한 상기 배당체의 의약적 용도; 및 상기 배당체를 개체에 처리하는 단계를 포함하는 수지상 세포의 활성화 방법을 제공한다.

[0026] [화학식 1]



[0027]

(상기 화학식 1에서, n은 1 내지 5의 정수이다.)

[0028]

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어, "수지상 세포 (dendritic cell)"는 항원을 세포 내부로 흡수하고 이를 처리하여 항원 또는 항원으로부터 유래된 펩타이드를 MHC (major histocompatibility complex) 클래스 I 복합체 또는 MHC 클래스 II 복합체와 함께 제시하는 전문적 항원 제시 세포 (professional antigen presenting cell)를 의미한다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 용어, "수지상 세포의 활성화"는 성숙 수지상 세포 (mature dendritic cells; "mDC")의 표현형의 일부 특성을 갖는 수지상 세포를 생성하는 것으로서, 부분적으로(partially) 또는 불완전하게 (incompletely) 성숙된 형태 및 표현형적 특성을 나타내는 수지상 세포를 생성하는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 활성화된 수지상 세포는 CD80, CD86, 및 MHC 클래스 II 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 표면 항원에 양성의 면역학적 특성을 나타내고, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p40로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 사이토카인의 분비가 증가된 수지상 세포로 정의할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

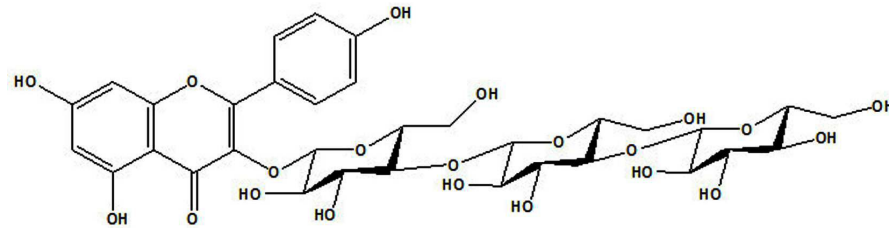
[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어, "개체"는 수지상 세포의 활성화를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0032] 본 발명에 따른 아스트라갈린 (astragaloside, kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside)은 세 개의 페놀 고리 구조를 포함하는 플라보노이드 중 하나인 캠페롤 (kaempferol)에 글루코오스가 베타결합을 하고 있는 물질로서, 식물의 잎과 꽃에 분포되어 있으며 천연물 한방 소재 성분으로 알려져 있다. 아스트라갈린은 비교적 작은 분자량 (448.39g/mol)을 갖으며, 항산화능력 등의 효능을 가지는 것으로 알려져 있다. 그러나, 아스트라갈린은 수용성이 낮고 장내 흡수가 잘되지 않아 그 자체로는 식품이나 약제 등에 적용함에는 어려움이 있었다. 이러한 문제를 해결 위하여, 상기 화학식 1의 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 합성하였으며, 이의 생리적 활성을 평가하던 중, 예기치 않게 기존의 아스트라갈린에서는 관찰되지 않았던, 수지상 세포의 활성화 유도 효과를 새롭게 규

명하였다는 점에서, 본 발명의 기술적 의의가 있다.

[0033] 상기 아스트라갈린 배당체는 예컨대, 하기 화학식 2의 kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosyl-(16)-O- β -D-galactopyranoside일 수 있으나, 당업계의 기술 수준에 비추어 볼 때, 당업자는 상기 갈락토사이드 단위체의 수를 적의 변경하여 실시할 수 있는 것으로 이해할 수 있다.

[0034] [화학식 2]



[0035]

[0037] 한편, 본 발명의 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물은 배지 조성물 또는 약학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다.

[0038] 상기 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체는 수지상 세포의 성숙, 활성화, 또는 분화 과정에서 사용될 수 있는 배지에 포함될 수 있다.

[0039] 상기 배지로는 예를 들어, 혈청 (우태아 혈청, 말 혈청 또는 인간 혈청)이 함유된 배지, RPMI 시리즈 (예컨대, RPMI 1640), Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle), α -MEM, Iscove's MEM, 199 배지, CMRL 1066, F12, F10, DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium), DMEM과 F12의 혼합물, Waymouth's MB752/1, McCoy's 5A 및 MCDB 시리즈를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 배지에는 다른 성분, 예를 들어, 항산화제 (예컨대, β -머캅토에탄올) 또는 항생제 (예컨대, 페니실린/스트렙토마이신) 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0040] 상기 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체는 수지상 세포의 활성화를 위한 약학적 조성물에 포함될 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0042] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0043] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0044] 구체적으로, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에서 활성 성분의 흡수율, 불활성율 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 1일 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 1 내지 30 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 또는 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

- [0045] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 피하, 정맥, 근육 또는 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0047] 또한, 본 발명의 일 양태로서, 본 발명은 체외로 분리된 수지상 세포에 상기 수지상 세포 활성화 유도용 조성물을 처리하는 단계를 포함하는, 수지상 세포의 활성화 방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명에 따른 수지상 세포의 활성화 방법은, 전술한 수지상 세포의 활성화 조성물에서 기술한 바 있는 기술적 구성을 이용하기 때문에 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0050] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 조성물; 체내 면역 증진을 위한 상기 배당체의 의약적 용도; 및 상기 배당체를 개체에 처리하는 단계를 포함하는, 면역 증진 방법을 제공한다.
- [0051] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 상기 화학식 1로 표시되는 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체가 처리된 수지상 세포를 유효성분으로 포함하는, 면역 증강용 조성물; 체내 면역 증진을 위한 상기 수지상 세포의 의약적 용도; 및 상기 수지상 세포를 개체에 처리하는 단계를 포함하는, 면역 증진 방법을 제공한다.
- [0052] 본 발명에 따른 면역 증강용 조성물 등은, 전술한 수지상 세포의 활성화 조성물에서 기술한 바 있는 기술적 구성을 이용하기 때문에 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [0053] 본 명세서에서 사용되는 용어, "면역 증강" 또는 "면역 증진"은 초기 면역 반응을 유도하거나 항원에 대한 기존의 면역 반응을 측정 가능할 정도로 증가시키는 것을 의미하며, 본 발명의 목적상, 상기 면역 증강 또는 증진은 $CD4^+$ T 세포 매개 면역을 활성화시키는 것을 나타낼 수 있다. 본 발명에서는, 상기 화학식 1의 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체, 또는 상기 배당체가 처리된 수지상 세포는 $CD4^+$ T 세포의 INF- γ 분비를 증가시키고, 이에 따라, Th1 세포 분화 유도만을 특이적으로 증진시킴을 새롭게 규명하였는바, 이러한 점에서 본 발명은 기술적 의의가 있다.
- [0054] 한편, 본 발명의 면역 증강용 조성물은 약학적 조성물의 형태로 제공될 수 있으며, 보다 구체적으로, 면역 보강제 또는 백신의 형태로 제조될 수 있다. 이와 관련된 첨가물, 제형 등은 전술한 수지상 세포의 활성화 유도용 조성물에 기술한 바와 같다.
- [0055] 또한, 본 발명의 면역 증강용 조성물은 건강기능식품의 형태로 제공될 수 있다. 상기 건강기능식품은 특별히 이에 제한되지 않으나, 건강 기능성 식품, 영양 보조제, 영양제, 파머푸드 (pharmafood), 건강보조식품, 뉴트라슈티칼 (nutraceutical), 디자인어 푸드, 식품 첨가제 등의 모든 형태의 식품이 될 수 있는데, 바람직하게는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 건강기능식품은 식품제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어, 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르트암 등)를 사용할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민류, 광물(전해질), 식이성분, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 면역 증강용 조성물은 면역 증강을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로

가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0058] 본 발명의 식품 조성물은, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적 (예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 추출물은, 식품 또는 음료의 제조 시에 식품 또는 음료의 원료 100 중량부에 대하여 0.1 내지 70 중량부, 바람직하게는 2 내지 50 중량부 첨가될 수 있다. 상기 추출물의 유효 용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 상기 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제, 기타 영양제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명의 건강 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 배당체를 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0060] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0062] 이하의 실시예에서는, 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 생쥐 골수에서 분리한 수지상 세포에 처리하여, 수지상 세포 활성화 유발, 및 이의 활성화에 기여하는 세포 내 신호전달 체계를 개시한다. 수지상 세포 활성화는 전술한 바와 같이, 세포 표면 활성화 표지 인자들의 발현 증가, 및/또는 면역 증가성 사이토카인 증가로 정의되며, T 세포 분화 활성화는 T 세포에서 분비하는 사이토카인의 증가로 정의된다. 또한, 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체가 처리된 수지상 세포가 투여된 생쥐의 면역 기관에서, T 세포 분화의 활성화를 실험적으로 증명하였다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0064] [실험예]

[0065] 실험예 1. 실험재료 및 실험 방법

[0066] 1-1.아스트라갈린 갈락토사이드 배당체의 제조

[0067] 아스트라갈린 4.45g, 유당 27.38g, 및 바실러스 서큘란스 (*Bacillus circulans*)에서 유래한 락타아제 600 단위 (효소활성 단위)가 포함된 인산칼륨 버퍼 (pH 6.0, 용액 중 농도 20mM) 효소혼합 수용액 200ml를 제조하였다. 상기 효소혼합 수용액을 60℃에서 16시간 동안 중탕으로 반응시켜서 배당체, kaempferol-3-O-β-D-glucopyranosyl-(16)-O-β-D-glactopyranoside을 수득하였다 (상기 화학식 2 참조, 이하에서는 상기 배당체를 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체 또는 수용성 아스트라갈린 배당체로 명명함.).

[0069] 1-2. 시험관 내 수지상 세포 활성화 표지 인자 측정

[0070] 분리된 수지상 세포는 10 내지 100 μ M의 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체가 첨가된 48-웰 플레이트에서 5×10^5 cells/well로 배양되었다. 음성 대조군으로 배지만 첨가된 군, 양성 대조군으로 리포폴리사카라이드 (LPS, lipopolysaccharide) 처리군을 사용하였고, 비교군으로는 100uM의 아스트라갈린을 사용하였다. 상기의 배양을 18시간 진행한 후, MHCII, CD80, CD86 발현 정도를 유세포분석법으로 확인하였다.

[0072] 1-3. 시험관 내 또는 생체 내 T 세포 분화 표지 인자 측정

[0073] 분리된 수지상 세포는 24-웰 플레이트에서 5×10^4 cells/ well로 배양되었고, 공생 배양을 위하여 ovabulin (OVA)으로 2시간 동안 pulse하였다. 이와 함께 상기 수지상 세포에 50-200uM의 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체를 6시간 동안 처리하였다. 음성 대조군으로 배지만 첨가된 군, 양성 대조군으로 리포폴리사카라이드 (LPS, lipopolysaccharide) 처리군을 사용하였다. 시험관 내 실험의 경우, 분리된 OT-II T 세포와 72시간 동안 공생 배양을 실시하였다. 생체 내 실험의 경우에는, OT-II 생쥐의 발바닥에 피하 주사로 상기 배양된 각각의 수지상 세포를 주사한 뒤, 이로부터 1주일 후, 발바닥 근처 림프절을 채취하여 72시간 동안 OVA와 함께 배양을 하였다. 림프절 세포 중 CD4 발현 T 세포를 형광 항체로 표지하고, IFN- γ , IL-4 그리고 IL-17 발현 정도를 유세포 분석법으로 확인하였다.

[0075] 1-4. 역전사 중합효소연쇄반응

[0076] 분리된 수지상 세포는 24-웰 플레이트에서 1.5×10^6 cells/well로 6시간 배양되었고, 여기에, 10-100uM의 아스트라갈린 갈락토사이드 배당체가 처리되었다. 음성 대조군으로 배지만 첨가된 군, 양성 대조군으로 리포폴리사카라이드 (LPS, lipopolysaccharide) 처리군을 사용하였다. 상기 배양된 수지상 세포로부터 RNA를 분리하여 역전사 반응으로 cDNA가 획득되었다. 사이토카인들의 발현 정도를 측정하기 위해 획득된 cDNA를 주형 (template)으로 사용하고, 각각 IL-6 프라이머(sense, 5'-TGAACAACGATGATGCACTT; anti-sense, 5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAA-3'), IL-1 β 프라이머(sense, 5'-CTAAAGTATGGGCTGGACTG-3'; anti-sense, 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTC), TNF- α 프라이머(sense, 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG-3'; anti-sense, 5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAA-3'), IL-12p40 프라이머(sense, 5'-TTATGC AAATTGTGAGCTTG-3'; anti-sense, 5'-AGCTTCTTCATGTCTCCAAA-3'), GAPDH 프라이머(sense, 5'-ACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'; anti-sense, 5'-ATTCAAGAGAGTAGGGAGGG-3')를 이용해 중합효소연쇄반응으로 사이토카인들의 mRNA 발현을 비교하였다.

[0078] 1-5. 효소면역측정법

[0079] 분리된 세포의 상층액을 샌드위치 엘라이자 (ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay)기법으로 cytokine의 정량을 수행하였다. 플레이트 표면에 코팅 항체를 붙인 후 blocking buffer를 통해 비특이적 결합을 막았다. 세포의 상층액과 control로 쓰일 standard 재조합 단백질을 넣은 후 biotin 항체를 붙여 진행을 하였다. 이어서, HRP와 OPD 과정을 거친 뒤, 여기에 황산을 첨가하여 이에 따른 발색을 비교하였다.

[0081] 1-6. 유세포 분석

[0082] 세포 표면 분자의 경우, FACS 완충액에 단일세포 혼탁액을 준비하고 형광 항체를 1/500 비율로 첨가해 상온에서 15분 동안 염색하였다. 세포 내부 염색이 필요한 경우, 세포 표면 분자 염색 후 세포 고정 및 세포막 투과화 (permeabilization)를 Cytofic/Cytoperm과 Perm/Wash solution (BD Bioscience, San Diego, CA)을 이용해 진행하였다. 이어서, 형광 항체를 1/500 비율로 첨가해 4℃에서 1시간 동안 염색하였다. 유세포 분석은 FACScuri (BD Bioscience)를 이용하여 수행되었다.

[0084] 1-7. 통계적 분석

[0085] 대조군과 실험군의 차이는 paired Students's *t*-test에 의해서 평가되었으며, P-values < 0.05 인 경우, 그 결과가 유의한 것으로 판단하였다.

[0087] [실시예]

[0088] 실시예 1. 수지상 세포 표면 상의 활성화 표지 분자의 발현 증가

[0089] 본 실시예에서는, 수지상 세포에 대한 수용성 아스트라갈린 배당체의 작용을 확인하기 위하여, 생쥐의 골수에서 수지상 세포를 분리하고, 100ng/ml LPS, 100uM의 아스트라갈린 (A0)과 100uM의 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)을 처리하였다 (도 1). 구체적으로, 상기 수지상 세포를 총 7일간 배양을 하였으며, 3 일째와 5 일째에 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 첨가하였고 7 일째에 아스트라갈린과 수용성 아스트라갈린 배당체를 각각 100uM 농도로 처리하였다. 100uM의 아스트라갈린과 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)를 처리하고 18 시간 후, 수지상 세포 표면의 CD11c^{hi} MHCII, CD80, CD86 발현을 유세포 분석으로 확인한 결과 (도 1의 A, B), 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)에 의해 수지상 세포 활성화 표지 분자인 MHCII, CD80, CD86이 유의적으로 증가함을 알 수 있었다 (3회 반복실험 결과, *P<0.01, 미처리군에 대하여). 또한, 수지상 세포에 10, 50, 100 μM 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)를 처리하고 18 시간 후에 활성화된 CD11c^{hi} MHCII, CD80, CD86 수지상 세포 비율을 확인한 결과 (도 1의 C, D), 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)에 의해 농도 의존적으로 활성화된 수지상 세포의 비율이 증가함을 확인할 수 있었다 (3회 반복실험 결과, *P<0.01, 미처리군에 대하여). 특히, 수지상 세포 활성화를 유발하는 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)의 효과는, 아스트라갈린 (A0)에서 전혀 관찰되지 않았으나, 수용성 아스트라갈린 배당체로 변형이 되었을 때만 관찰되는 상기 배당체 고유의 효과임을 확인할 수 있었다.

[0091] 실시예 2. 수지상 세포의 면역 증가성 사이토카인의 분비 증가

[0092] 수지상 세포의 활성화가 진행되면, 상기 수지상 세포는 면역 반응과 관련된 면역 증가성 사이토카인들을 분비하는 것으로 알려져 있다. 상기 실시예 1에서는 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)가 수지상 세포를 활성화를 유도할 수 있음을 확인하였으나, 본 실시예에서는 상기 수지상 세포가 분비하는 면역 증가성 사이토카인의 양을 비교 분석하였다. 수지상 세포를 100ng/ml LPS, 10, 50, 100uM의 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)로 각각 처리하였다. 6시간 배양 후, 사이토카인의 발현을 역전사 중합효소연쇄반응으로 측정된 결과 (도 2의 A, B), 수용성 아스트라갈린 배당체 처리군 (A2)에서 면역 증가성 사이토카인인 IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12p40의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다 (3회 반복실험 결과, *P<0.01, 미처리군에 대하여). 또한, 효소면역측정법으로 IL-12p40과 IL-12p70의 단백질 정량이 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)의 농도 의존적으로 이들의 양이 증가함을 확인할 수 있었다 (3회 반복실험 결과, *P<0.01, 미처리군에 대하여).

[0094] 실시예 3. 수용성 아스트라갈린 배당체가 처리된 수지상 세포에 의한 CD4⁺ T 세포의 INF-γ 분비 증가 (in vitro)

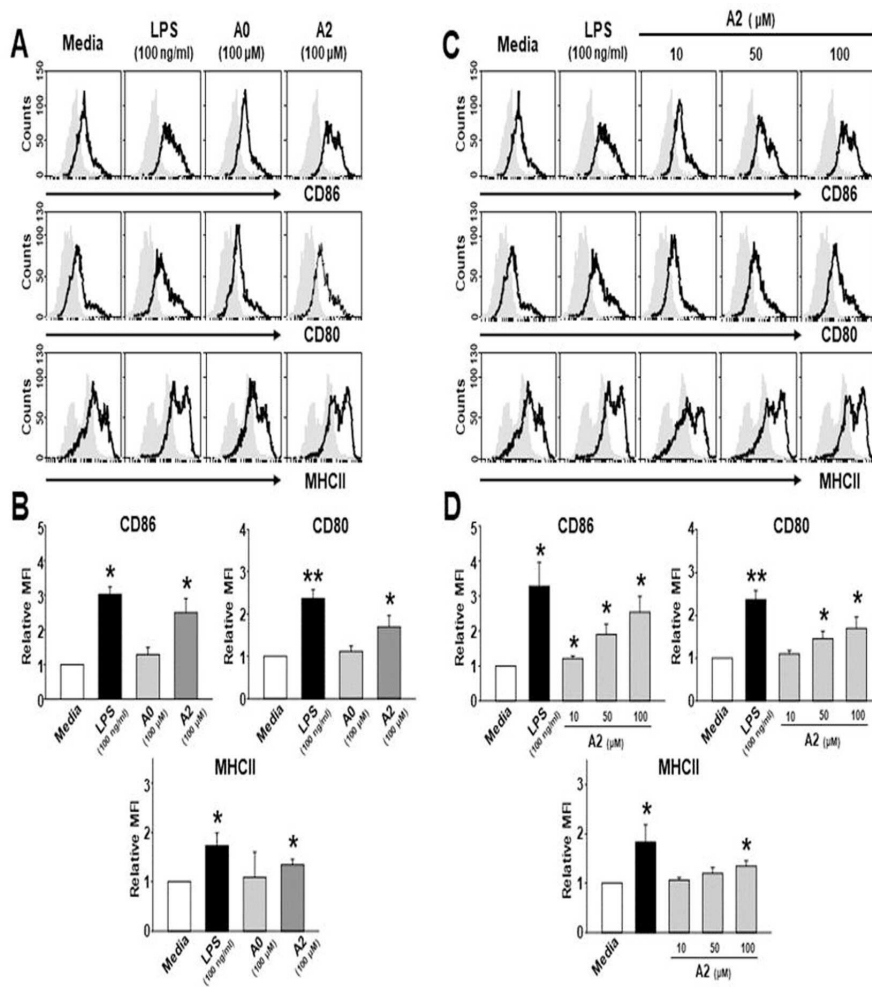
[0095] 본 실시예에서, 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)가 수지상 세포 활성화를 유도하는 경우, T 세포의 분화 역시 촉진되는지 확인하고자 하였다. 이를 위하여, OVA를 pulse하고, 50, 100, 200uM 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2) 또는 100 ng/ml LPS가 처리된 수지상 세포를 OT-II 생쥐에서 분리한 CD4 양성 T 세포와 공생 배양하였다. 72 시간 배양 후, T 세포의 분화 정도를 유세포 분석과 효소면역측정법으로 측정된 결과 (도 3), 수용성 아스트라갈린 배당체 처리군 (A2)에서 농도 의존적으로 INF-γ가 유도되는 것을 확인할 수 있었다 (3회 반복실험 결과, *P<0.01, **P<0.05, ***P<0.001 미처리군에 대하여). 반면, IL-4와 IL-17는 변화가 없었다. 즉, 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)로 활성화된 수지상 세포는 Th1 세포를 특이적으로 유도함을 확인할 수 있었다.

[0097] 실시예 4. 수용성 아스트라갈린 배당체가 처리된 수지상 세포 주입에 의한 림프절 CD4⁺ T 세포의 INF-γ 분비 증가 (in vivo)

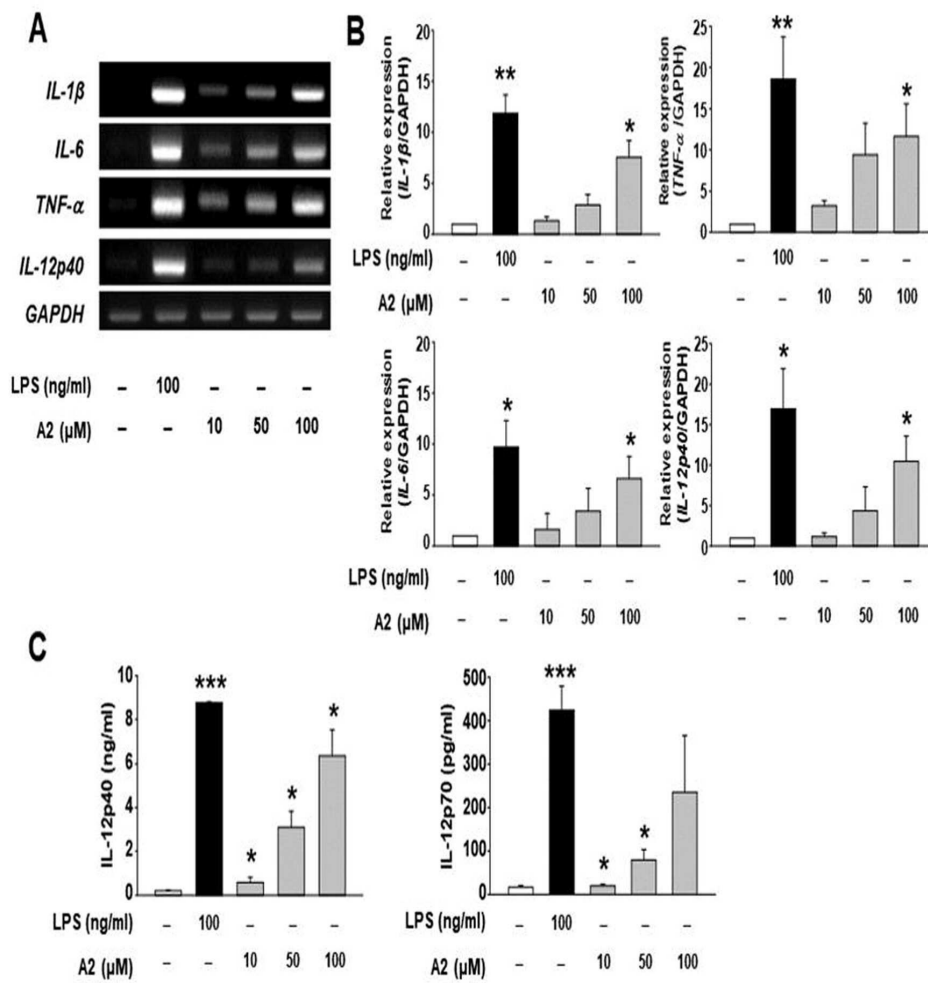
- [0098] 본 실시예에서는, 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)에 의해 활성화된 수지상 세포가 생체 내에서도 T 세포 분화 유도 효과를 갖는지 확인하고자 하였다.
- [0099] 이를 위하여, OVA를 pulse하고 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)가 처리된 수지상 세포를 OT-II 생쥐의 발바닥에 피하 주사하고 림프절에서 T 세포 분화 반응을 확인하였다. 수지상 세포 주입 1주 후 림프절을 분리하여 72 시간 배양하여 CD4 양성 T 세포의 분화 정도를 유세포 분석과 효소면역측정법으로 측정하였다. 그 결과 (도 4), INF- γ 생성이 증가함을 확인할 수 있었지만 IL-4와 IL-17은 변화가 없음을 알 수 있었다 (3회 반복실험 결과, *P<0.01, 미처리군에 대하여). 즉, 생체 내 실험에서도 역시, 수용성 아스트라갈린 배당체 (A2)에 의해 활성화된 수지상 세포는 Th1 세포 분화 유도만 증진시킴을 확인하였다.
- [0101] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

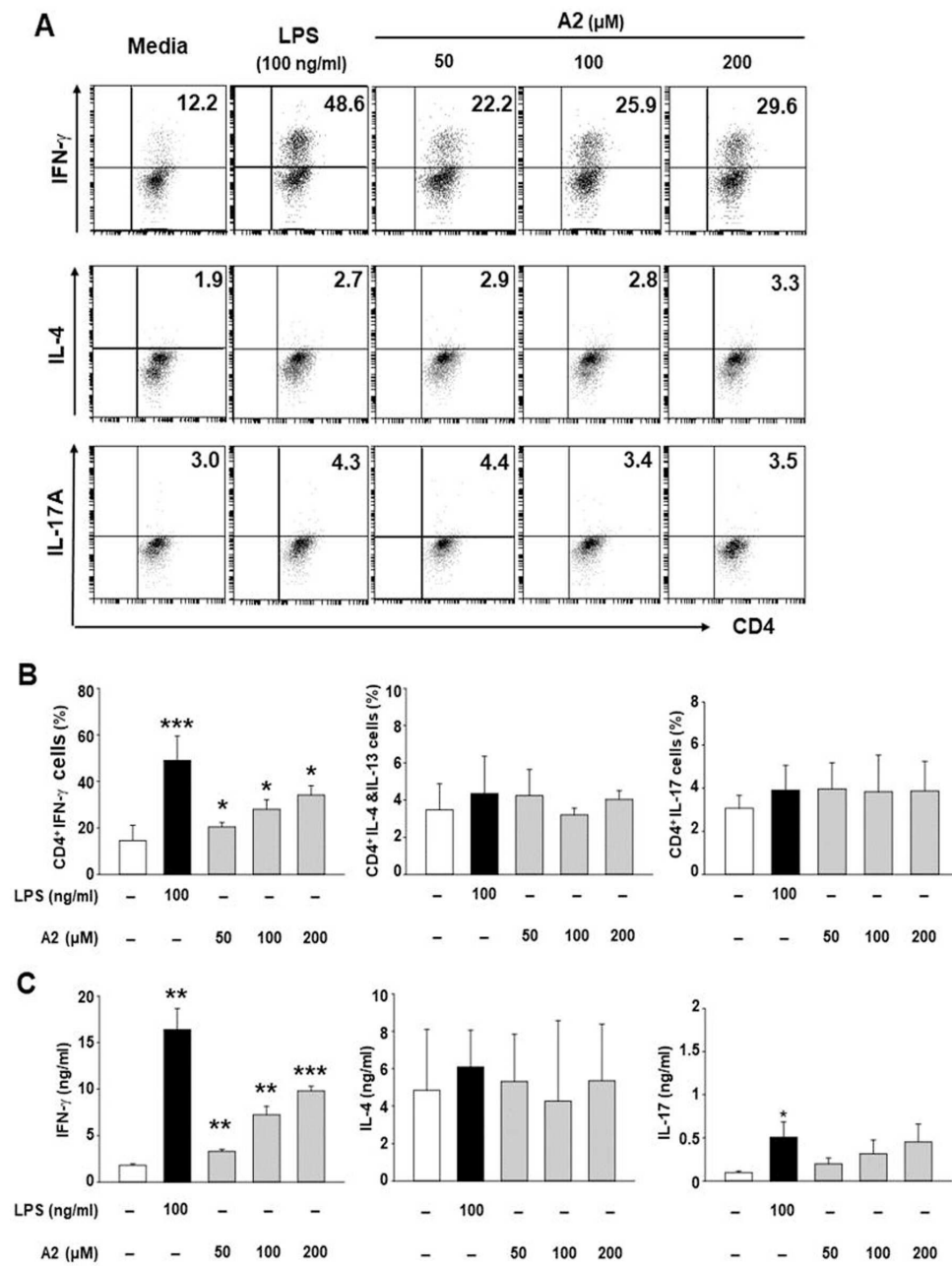
도면1



도면2



도면3



도면4

