

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0032354

(43) 공개일자 2025년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9789 (2017.01) A23L 33/105 (2016.01)

A61K 36/185 (2006.01) A61K 8/14 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0115082

(22) 출원일자 2023년08월31일

심사청구일자 2023년08월31일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

(72) 발명자

변상균

경기도 과천시 별양로 12, 306동 1402호(원문동, 래미안슈르)

이원중

세종특별자치시 나성북1로 51, 한신더휴리저브 603동 2003호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

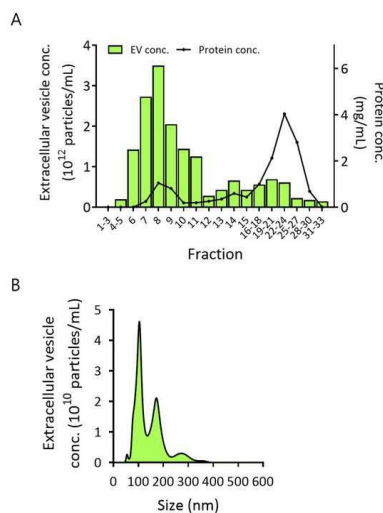
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 면역기능 증진 효능을 갖는 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클

(57) 요약

본 발명은 면역기능 증진 효능을 갖는 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 면역 증강용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게 본 발명의 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클은 단백질의 수용체를 자극하여 대식세포(macrophage)를 활성화시키고, 상기 대식세포의 활성화를 통한 면역 자극에 의해 면역 저하를 조절할 수 있는 면역 증강용 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2024.05)
A61K 8/14 (2013.01)
A61P 37/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A61K 2800/413 (2013.01)
A61K 2800/805 (2013.01)

(72) 발명자

김다현

서울특별시 서대문구 연희로35길 13-16, 401호

강수진

경기도 안산시 상록구 안산천서로4길 14, 402호(월
 피동, 중앙맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711197921
과제번호	00222997
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	식품 유래 세포막 소포체 연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2023.06.01 ~ 2026.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711188699
과제번호	2022R1A2C1091989
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	식물 세포막소포체 생산 공정 및 엔지니어링 플랫폼 기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2022.09.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 시금치를 착즙하여 착즙액을 수득하는 단계;
- (2) 상기 착즙액을 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계; 및
- (3) 상기 상층액을 한외여과 및 크기배제크로마토그래피를 수행하여 엑소좀 유사 베지클(exosome-like vesicle)을 수득하는 단계
- 를 포함하는 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 (2) 단계에서 원심분리는 500 내지 15,000 $\times g$ 로 2~5 $^{\circ}C$ 에서 40 내지 80 분간 실시하여 1차 상층액을 얻고 15,000 내지 25,000 $\times g$ 로 2~5 $^{\circ}C$ 에서 40 내지 80 분간 실시하여 2차 상층액을 얻는 것인, 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 (3) 단계에서 한외여과는 10 - 500 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지는 것인, 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클의 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 따른 방법에 의해 제조된 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클(exosome-like vesicle).

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 엑소좀 유사 베지클은 20 내지 500 nm의 직경을 갖는 것인, 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 엑소좀 유사 베지클은 1×10^7 particles/mL 내지 10×10^{12} 의 농도를 갖는, 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클.

청구항 7

제 4 항의 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 화장품 조성물.

청구항 8

제 4 항의 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 식품 조성물.

청구항 9

시금치 유래 20 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 엑소좀 유사 베지클을 포함하는 면역증강용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역기능 증진 효능을 갖는 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 면역 증강용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 면역계는 자연저항, 비특이성 면역체계 및 특이성 면역체계로 구분할 수 있다. 자연저항(1차 방어선)이란 미생물을 위시한 모든 침입자들을 그들의 종류에 관계없이 막아내는 해부생리학적 요소들을 말하며, 비특이적 면역(2차 방어선)은 자연저항을 돌파하여 체내로 들어온 침입자들을 제거하는 식세포로 구성된 방어체계를, 그리고 특이성 면역계(3차 방어선)는 림프구들로 구성된 면역체계를 말하는데, 이중 특이성 면역계는 기억능 그리고 자기와 비자기를 구분할 수 있는 능력을 지닌 고도로 발달한 면역체계이다.

[0004] 백혈구는 2차 또는 3차 방어선을 구성하여 1차 방어선을 돌파하여 체내에 들어온 이물을 담당하게 되며, 세균, 바이러스 감염 또는 염증 반응 시, 대식세포 및 림프구 활성의 조절은 의약품의 치료 효과의 결정에 있어서 중추적인 역할을 한다. 또한, 대식세포(Macrophage)는 다양한 기능을 가진 세포로 산화적 스트레스 상황에서 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 일산화산소(NO)를 생성하여 면역체계에서 중요한 역할을 한다. 상기 대식세포는 항원을 제시하거나(antigen-presenting), 종양을 없애거나(tumoricidal) 미생물세포를 죽이는 (microbicidal) 세포로서, 세포매개(cell-mediated) 또는 체액성 면역(humoral immunity)에 중심적인 역할을 하는 조절세포로, 활성화된 대식세포에서 생산되는 NO는 비특이적 숙주방어기작인 대식작용, 그리고 세균 및 암 세포의 증식억제 활성을 보인다. 특히, 대식세포에서 리포다당류(Lipopolysaccharide; LPS), 사이토카인, TNF- α 와 같은 자극에 의해 발현되는 iNOS는 장시간 동안 다량의 NO를 생산하여, NF κ B 활성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 활성화된 대식세포에 의한 슈퍼옥사이드 음이온(superoxide anion, O_2^-), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)와 같은 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 및 일산화질소(nitric oxide, NO)의 생산은 비특이적 면역에 있어서 중요한 세포독성 및 세포활성 억제기작이다.

[0005] 면역활성과 관련하여, 암환자의 경우, 방사성치료 또는 화학치료와 같은 항암 치료 시 조혈모세포들이 손상을 입게 되어 조혈세포와 면역세포들이 감소되고, 이로 인해 종종 조혈과 면역작용의 형성에 장애가 발생한다. 최근에는 이러한 암환자의 항암 치료에 의한 면역활성의 저하뿐만 아니라, 특정 질환을 가지지 않는 일반인의 경우에도 환경적인 이유나 생활습관에 의하여 면역력이 약화되는 것으로 보고되고 있다.

[0006] 이러한 사정으로 인하여, 현재 전 세계적으로 면역력 증강을 통해 건강을 증진시키고자 많은 식물 추출물이 약재나 의약품 또는 건강기능성 식품으로도 사용되고 있다.

[0007] 이러한 면역력을 증강시킬 수 있는 식물 추출물의 경우, 세균성 감염이나 바이러스 감염 또는 암세포에 의한 질환의 치료, 예방 또는 개선을 가능하게 하며, 이러한 효과는 항균 작용에 의한 것이라기 보다는 체내의 면역기능 개선에 의한 것이므로, 부작용 등의 문제로부터 자유로울 수 있는 장점이 있다. 일 예로, 서양주목의 수피로부터 얻어진 항암제인 택솔(Taxol)은 기존 특정 화합물 유래 치료제에 비하여 부작용이 문제되지 않은 장점을 갖는다.

[0008] 따라서, 상대적으로 안전성에 대한 문제가 발생할 가능성을 최소화 할 수 있을 것으로 기대되는 천연물 중에서 면역증강 효과를 갖는 물질을 선택하여, 면역증강에 대한 면역증강 효과는 높고 부작용은 미약한 면역증강성분의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 국내 특허 제 10-1705548 호(2017.02.06)

(특허문헌 0002) 국내 특허 제 10-2349970 호(2022.01.06)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 시금치를 착즙하여 착즙액을 수득하는 단계; 상기 착즙액을 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계; 및 상기 상층액을 한외여과 및 크기배제크로마토그래피를 수행하여 엑소좀 유사 베지클(exosome-like vesicle)을 수득하는 단계를 포함하는 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클(exosome-like vesicle)을 제공하는데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 화장품 조성물을 제공하는데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 식품 조성물을 제공하는데 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 시금치 유래 20 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 엑소좀 유사 베지클을 포함하는 면역증강용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 제공한다.

[0017] 일 측면에서, 상기 엑소좀 유사 베지클은 직경 20 내지 500 nm의 크기를 갖는 것일 수 있다.

[0018] 다른 측면에서, 상기 유효성분은 면역 기능을 증진시키는 것일 수 있다.

[0019] 또한, 본 명세서에 개시된 기술은 상기 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클(exosome-like vesicle)을 제조하는 방법으로서,

[0020] (1) 시금치를 착즙하여 착즙액을 수득하는 단계;

[0021] (2) 상기 착즙액을 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계; 및

[0022] (3) 상기 상층액을 초원심분리하여 엑소좀 유사 베지클(exosome-like vesicle)을 수득하는 단계를 포함하는 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클의 제조방법을 제공한다.

[0023] 일 측면에서, 상기 (2)단계에서 원심분리는 500 내지 15,000 ×g에서 40 내지 80 분간 실시하여 1차 상층액을 얻고 15,000 내지 25,000 ×g에서 40 내지 80 분간 실시할 수 있다.

[0024] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (3)단계에서 한외여과는 10 - 500 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지는 것으로 실시할 수 있다.

[0025] 또한, 본 명세서에 개시된 기술은 시금치 유래 20 내지 500 nm의 평균 직경을 갖는 엑소좀 유사 베지클을 포함하는 면역증강용 조성물을 제공한다.

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 명세서는 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클(exosome-like vesicle)을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다. 본 명세서는 시금치 유래 추출물이 아닌 시금치에서 유래한 엑소좀 유사 베지클, 구체적으로 시금치 세포외액에서 유래한 엑소좀 유사 베지클을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.
- [0028] 예시적인 일 구현예에 있어서, 상기 시금치(Spinacia oleracea L.)는 원산지가 아프가니스탄 주변의 중앙아시아 지역인 것으로 알려져 있다. 재배지는 북부온대지방에 널리 분포하고 아열대나 열대 고지대에서도 재배되고 있다. 또한, 내한성이 강해서 한대지역까지도 재배가 되고 있으며, 이른 봄에 생산되는 푸른 채소로서 중요한 위치를 차지한다. 명아주과에 속하는 자웅이주의 1~2년생 작물로서 비타민류, 철분, 칼슘 등이 다른 채소 보다 많이 함유되어 있는 알칼리성 채소이고, 섬유질이 적어 완화제(緩和劑)로서 또는 빈혈증, 신장병과 어린이들의 골반발육에 특효가 있는 보건의료식품이며, 여성미용에도 좋아 그 수요가 연중 계속되고 또한 늘어나고 있다.
- [0029] 본 명세서에서 "엑소좀 유사 베지클(exosome-like vesicle)"은 세포에서 분비되어 세포외 공간으로 방출된 나노 크기의 세포외 소낭, 즉 세포밖 베지클(extracellular vesicle)을 의미하는 것으로서, 상기 베지클은 엑소좀을 포함하며 엑소좀과 나노 크기의 베지클 구조 및 그 조성물이 유사한 베지클을 모두 포함하는 최광의 개념이다.
- [0030] 상기 엑소좀 유사 베지클은 다포체(multivesicular body)가 외포 작용으로 원형질막과 융합하여 세포외 공간으로 방출된다. 또한, 상기 엑소좀 유사 베지클은 세포막 성분으로 이루어진 지질 이중막에 의해 내부와 외부가 구분되며, 세포의 세포막 지질과 막 단백질, 유전 물질 및 세포질 성분을 가지고 있어 세포의 성질과 상태를 간접적으로 파악할 수 있게 해준다. 또한, 상기 엑소좀 유사 베지클은 다른 세포 및 조직에 결합하여 막 구성요소, mRNAs, miRNAs, 단백질(성장 호르몬, 사이토카인 등) 등을 전달해 주고, 이들 전달 물질을 수용 세포에 전달해 줌으로써 세포-세포 간 소통을 매개하는 세포외 전달체로 작용한다.
- [0031] 본 명세서에서 "시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클"은 시금치 세포에서 분비된 나노 크기의 엑소좀 유사 베지클을 의미한다. 상기 엑소좀-유사 베지클은 시금치의 세포외액(extracellular fluid)으로부터 분리될 수 있으며, 분리된 엑소좀 유사 베지클은 전체적으로 또는 부분적으로 본래 존재하는 조직 또는 세포로부터 물리적으로 분리될 수 있다.
- [0032] 일 측면에서, 상기 엑소좀 유사 베지클은 20 내지 500 nm의 직경을 갖는 세포밖 베지클일 수 있다. 다른 측면에서, 상기 엑소좀 유사 베지클은 20 nm 이상, 30 nm 이상, 40 nm 이상, 50 nm 이상, 60 nm 이상, 70 nm 이상, 80 nm 이상, 90 nm 이상 또는 100 nm 이상인 반면, 500 nm 이하, 450 nm 이하, 400 nm 이하, 350 nm 이하, 300 nm 이하, 250 nm 이하, 200 nm 이하 또는 150 nm 이하의 직경을 갖는 세포밖 베지클일 수 있다.
- [0033] 일 측면에서, 상기 엑소좀 유사 베지클은 1×10^7 particles/mL 내지 10×10^{12} particles/mL의 농도를 갖는, 세포밖 베지클일 수 있다. 상기 엑소좀 유사 베지클은 1×10^7 particles/mL 이상, 1×10^8 particles/mL 이상, 4×10^8 particles/mL, 또는 9×10^8 particles/mL 이상인 반면, 10×10^{12} particles/mL 이하, 9×10^{12} particles/mL 이하, 8×10^{12} particles/mL 이하, 7×10^{12} particles/mL 이하, 6×10^{12} particles/mL 이하 또는 5×10^{12} particles/mL 이하의 농도를 갖는 세포밖 베지클일 수 있다.
- [0034] 다른 측면에서, 상기 엑소좀 유사 베지클은 예컨대, 표적 세포에서 원하는 기능을 효율적으로 수행할 수 있도록 막 성분이 화학적 또는 물리적으로 변형된 것일 수 있다. 예를 들어, 엑소좀 유사 베지클의 막 성분이 티올기(-SH) 또는 아민기(-NH₂)를 이용하여 화학적인 방법으로 변형되거나, 엑소좀 유사 베지클에 표적유도 물질, 세포막융합 물질, 폴리에틸렌글리콜을 화학적으로 결합시켜 막 성분이 화학적으로 변형된 것일 수 있다.
- [0035] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엑소좀 유사 베지클은 초원심분리(ultracentrifugation), 분별 원심분리(Differential Centrifugation), 등밀도 원심분리(Equilibrium Density Centrifugation), 밀도 구배(density gradient), 여과(filtration), 투석(dialysis) 및 자유 유동 전기이동(free-flow electrophoresis)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 방법을 사용하여 분리할 수 있으나, 엑소좀 유사 베지클의 분리방법이 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 밀도 구배는 밀도가 다른 물질을 구분할 때 가장 많이 사용되는 방법으로서, 본 명세서에 따른 엑소좀 유사 베지클은 밀도가 구분되어 밀도 구배를 통해 분리할 수 있다. 이 방법의 구체적인 예로는 피콜(ficoll), 글리세롤(glycerol), 수크로즈(sucrose), 염화세슘(cesium chloride), 이오딧사놀(iodixanol) 등의 밀도 기울기 분리 재료를 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 측면에서, 밀도 구배는 초원심분리 등과 함께 사용될 수 있다. 다른 측면에서, 엑소좀 유사 베지클을 선별하기 위해 겔 여과(gel filtration) 또는 한외여

과(ultrafiltration)를 사용할 수 있다. 또 다른 측면에서, 크기가 작은 분자를 제거하기 위해 여과 대신 투석을 사용할 수 있다. 또 다른 측면에서, 자유 유동 전기이동을 사용할 수 있다.

- [0037] 본 발명에서, "면역증강"이라 함은 면역세포의 초기활성화 과정에서 비특이적으로 항원에 대해 면역반응을 촉진하는 기능 또는 면역계의 세포의 활성을 증대시킴으로써 면역을 강화하는 기능을 의미한다.
- [0038] 예시적인 일 구현예에서, 상기 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클은 (1) 시금치로부터 시금치 외 세포외액을 포함하는 액즙을 수득하는 단계; (2) 상기 액즙을 원심분리하여 상층액을 수득하는 단계; 및 (3) 상기 상층액을 초원심분리하여 엑소좀 유사 베지클을 수득하는 단계를 포함하여 수득될 수 있다.
- [0039] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (1)단계에서 액즙은 시금치에서 짜낸 액체로서, 열이나 효소를 가하지 않고, 기계적 분해, 화학 물질 처리 등의 방법을 적절하게 사용하여 수득할 수 있다. 일 측면에서, 액즙은 시금치를 착즙하여 수득할 수 있으며, 상기 착즙 공정은 당해 기술분야에 알려진 방법에 따라 통상의 기술자가 적절하게 선택하여 실시할 수 있다.
- [0040] 바람직하게는 상기 (2)단계에서 원심분리는 500 내지 15,000 ×g에서 40 내지 80 분간 실시하여 1차 상층액을 얻고 15,000 내지 25,000 ×g에서 40 내지 80 분간 실시할 수 있다.
- [0041] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (3)단계에서 한외여과는 10 - 500 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지는 것으로 실시할 수 있다. 바람직하게는 50-150 kDa으로 적용할 수 있다.
- [0042] 예시적인 일 구현예에서, 상기 (3)단계에서 실시한 크기 배제 크로마토그래피로부터 얻은 각 분획물에 입도 분석을 수행하여, 50 내지 150 nm의 평균 직경을 갖는 분획물을 얻는다. 구체적으로, 본 발명의 실시예에서는 Izon science 사로부터 제조된 qEV original로 채워진 컬럼(70 nm)에 인산완충액(1 X PBS, pH 7.4)을 첨가하여 평형시킨 정지상에, 시금치 착즙액을 로딩하고, 해당 컬럼에 인산완충액(1 X PBS, pH 7.4)을 용리액으로 주입하여 분획물을 회수한다.
- [0043] 예시적인 일 구현예에서, 상기 유효성분은 단백질의 수용체를 자극하여 대식세포(macrophage)를 활성화시키고, 상기 대식세포의 활성화를 통한 면역 자극에 의해 면역 저하를 조절할 수 있는 면역증강용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0044] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 면역 증진에 유효한 양의 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 이를 필요로 하는 대상에게 적용하는 것을 포함하는 면역 증진 방법을 제공한다.
- [0045] 또 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 대상의 면역 증진을 위한 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 제공한다.
- [0046] 일 구현예에서, 상기 엑소좀 유사 베지클은 대상체에서 M2 유형 대식세포의 수를 증가시키는 것일 수 있다.
- [0047] 일 구현예에서, 상기 엑소좀 유사 베지클은 비장세포의 활성화 지표인 IFN- γ 생성량을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0048] 일 구현예에서, 상기 엑소좀 유사 베지클은 대식세포 활성화 지표인 TNF- α 의 생성량을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0049] 본 발명은 또한 상기 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 유효성분으로 포함하는 면역 증진용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0050] 상기 화장품 조성물에는 유효성분 이외에 기능성 첨가물 및 일반적인 화장품 조성물에 포함되는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 상기 기능성 첨가물로는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스펅고 지질 및 해조 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 성분을 포함할 수 있다. 이외에 포함되는 배합 성분으로는 유지 성분, 보습제, 에멀리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.
- [0051] 상기 화장품 조성물은 제형이 특별히 한정되지 않으며, 목적하는 바에 따라 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어, 분말, 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 샴푸, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클렌저로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 제형으로 제조될 수 있다.

나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0052] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0055] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속염, 지방산 헤미에스테르염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있다.
- [0058] 아울러, 본 발명의 화장료 조성물에서 상기 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클은 전체 조성물 100 중량부에 대해 0.0001~10 중량부 정도로 포함될 수 있다.
- [0060] 본 발명은 또한 상기 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 유효성분으로 포함하는 면역 증진용 식품 조성물을 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 식품 조성물은 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 식품 조성물일 수 있다. 상기 식품 조성물은 기능성 식품 조성물, 구체적으로 면역증강 개선 또는 예방용 건강기능성식품일 수 있다.
- [0062] 상기 식품이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품으로, 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것일 수 있고, 통상적인 의미로서 건강기능성식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제 등을 모두 포함하는 의도이다.
- [0063] 본 발명의 식품은 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영양아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류 등), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실채소류 음료, 발효음료류, 두유류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 건강기능성식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0064] 본 발명에서, "건강기능식품"이라 함은 일반 식품에 본 발명의 일 구체예의 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다. 기능성은 물성 및 생리 기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 일반식품에 첨가할 경우, 일반 식품의 물성 및 생리 기능성이 향상될 것이고, 본 발명은 이러한 향상된 기능의 식품을 포괄적으로 '건강 기능식품'이라 정의한다.
- [0065] 본 발명의 상기 면역증강용 조성물에서, 상기 건강기능식품 조성물은 상기 시금치 유래의 엑소좀 유사 베지클을 유효성분으로 단독으로 포함할 수 있고, 이외 제형, 사용 방법 및 사용 목적에 따라 추가 성분 즉, 식품학적인

로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다.

- [0066] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물은 상기 유효성분 이외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등의 부성분 또는 첨가제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0067] 또한, 상기 담체, 부형제 또는 희석제는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아키시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다
- [0068] 일 구현예로서, 본 발명은 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클 및 부형제를 포함하는 면역증강용 조성물로 제공될 수 있다.
- [0069] 이때 상기 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클은 전체 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001 내지 50 중량%, 더 바람직하게는 0.001 내지 40 중량%, 가장 바람직하게는 0.001 내지 30 중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0070] 상기 면역 증강용 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 액제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 증진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 감미제, 산미제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 시금치 유래 엑소좀에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테라인산 마그네슘, 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, 산미제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)-61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 면역증강용 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0072] 본 발명의 면역증강용 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 및 피부 도포에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 면역증강용 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

발명의 효과

- [0074] 본 발명의 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클은 단백질의 수용체를 자극하여 대식세포(macrophage)를 활성화시키고, 상기 대식세포의 활성화를 통한 면역 자극에 의해 면역 저하를 조절할 수 있는 면역 증강용 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0076] 도 1은 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클을 시금치로부터 수득한 과정을 나타낸 것이다.
- 도 2의 A는 크기 배제 크로마토그래피 분석에 따른 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 농도 및 단백질 농도를 나타낸 것이며, B는 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 나노입자트래킹 분석한 결과이다.
- 도 3은 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 면역 증진 효능을 분석하기 위해, 비장세포의 활성화 지표인 IFN- γ 의 생성량을 확인한 것이다.
- 도 4는 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 면역 증진 효능을 분석하기 위해, 대식세포의 활성화 지표인 TNF- α 의 생성량을 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0077] 이하, 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[0080] 실시예 1: 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클 분리 방법

- [0081] (단계 1) 시금치 원물을 수돗물로 1차적으로 세척한 후 초순수 증류수를 이용하여 2차적으로 세척하였다. 이후 과도를 이용하여 토막을 낸 후 착즙기를 이용하여 착즙하였다. 이후 큰 물질을 제거하기 위하여 먼 주머니를 통해 여과하여 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클을 포함하는 착즙액을 제조하였다.
- [0082] (단계 2) 단백질 및 세포벽을 제거하기 위해 8,000 x g로 1시간 동안, 4℃에서 원심분리를 진행 후 상층액을 다시 20,000 x g 에서 1시간 동안 4℃에서 다시 원심분리하였다.
- [0083] (단계 2) 본 발명에서는 10 - 500 kDa의 컷오프(cut-off) 값을 가지는 한외 여과 및 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클 분리 및 정제를 진행하였다.
- [0084] 한외여과는 100 kDa의 컷오프를 가지는 Amicon Ultra®10kDa Centrifugal filter (Merck Millipore, Cat.No: UFC901024)에 착즙 용액을 넣어주고 5,000 xg로 3시간 동안 원심분리를 진행한 후 얻어진 상층액을 크기 배제 크로마토그래피를 진행하였다.
- [0085] 크기 배제 크로마토그래피는 qEV original/70 nm(Izon science, Cat.No: SP1)사용하여 진행하였다. 이전 단계에서 여과된 시금치 착즙 용액 0.5 mL를 qEV original 컬럼에 주입하고 용액이 모두 크기 배제 크로마토그래피 비드로 넘어가게 되면 인산완충액(1 X PBS, pH 7.4) 용액을 넣어주어 평형시킨 정지상에, 양과 착즙액을 로딩하였다. 내려오는 용액을 하나의 1.5 mL 튜브에 0.5 mL씩 담아 결과적으로 총 18개의 튜브(총 33 분획)를 얻었다(도 1). 이 중 엑소좀 유사 베지클의 농도가 가장 높은 7 ~ 9 분획(4~6번째 튜브)의 용액을 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클로 사용하였다.

[0087] 실시예 2: 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 나노입자트래킹 분석

- [0088] 실시예 1에서 수득한 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 크기와 농도를 나노입자 트래킹 분석 (nanoparticle tracking analysis, NTA)을 수행하였다. 우선 분리한 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 튜브를 각각 PBS로 1:100로 희석시킨 후 NTA를 이용하여 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 농도와 크기 분포도를 측정하였다.

- [0089] 그 결과, 평균 사이즈는 142.4 nm이며, 2.8×10^{12} particles/mL의 농도를 가짐을 확인하였다(도 2).

[0091] 실시예 3: 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 면역 증진 효과 확인

- [0092] 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 면역 증진 효능을 분석하기 위해, 비장세포의 활성화 지표를 확인하였다. 이를 위하여, 8주령 C57/BL6 마우스에서 비장(spleen)을 적출하였다. 적출한 비장을 40 μ m 스트레이너로 갈아준 뒤, Red blood cell lysis Buffer로 Red blood cell을 제거한 후 원심분리하여 적혈구를 용해 및 제거하였다. 분리된 비장세포(Splenocyte)는 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)와 1% 페니실린 스트렙토마이신

(penicillin-streptomycin)이 첨가된 PMI1640(Roswell Park Memorial Institute medium)사용하여 96-웰 플레이트(well plate)에 씨딩(seeding)하고 anti-CD3와 CD28를 처리하여 비장세포를 활성화하였다. 이후 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클를 처리하여 37℃, 10% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후, 원심분리를 통해 상층액을 획득하고 mouse IFN- γ DuoSet ELISA kit (R&D system)을 활용하여 IFN- γ 생성량을 측정한 결과, 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클 처리군이 대조군 대비 높은 IFN- γ 생성량을 보이는 것을 확인할 수 있었다(도 3 참조).

[0093]

시금치 유래 엑소좀 유사 베지클의 면역 증진 효과를 확인하기 위해, 면역세포주인 RAW 264.7 (입수처: ATCC)를 12-웰 플레이트(well plate)에 씨딩(seeding)하고, 10% 소 태아혈청(Fetal Bovine Serum)와 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)을 사용하여 37° C, 10% CO₂ 배양기(Thermo scientific)에서 24시간 동안 배양시켰다. 24시간 동안 배양 후, 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클를 처리하여 48시간 동안 배양시켰다. 48시간 배양 후 배지를 회수하여 13000 rpm, 2분, 4℃에서 원심분리 후 상층액을 획득하였다. 획득한 배지를 mouse DuoSet ELISA kit (R&D system)를 활용하여 대식세포의 활성화 지표 TNF- α 생성을 확인한 결과, 시금치 유래 엑소좀 유사 베지클이 대조군 대비 높은 TNF- α 생성량을 보이는 것을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

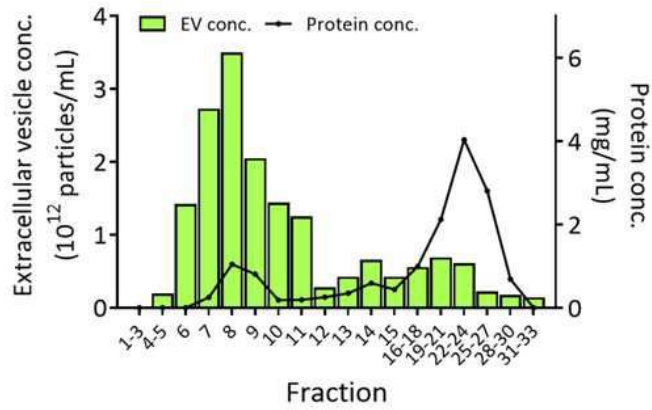
도면

도면1

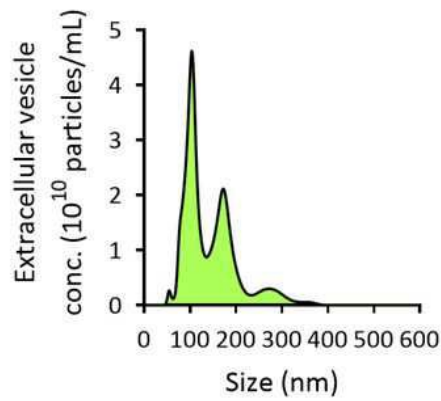


도면2

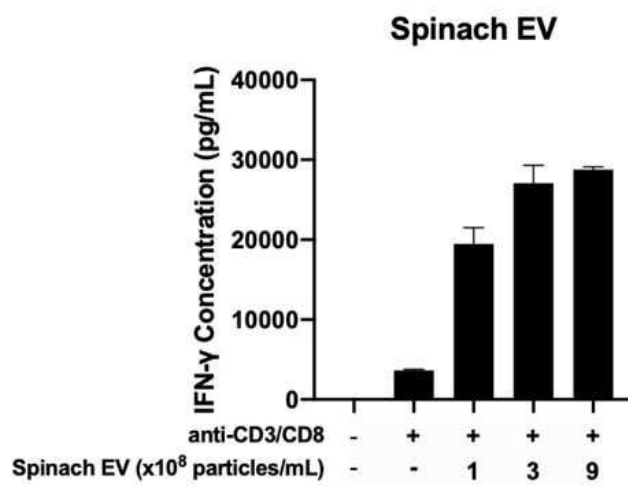
A



B



도면3



도면4

