(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0108290
(43) 공개일자 2018년10월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/03 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
C12N 5/0784 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/03 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0037843
(22) 출원일자 2017년03월24일
심사청구일자 2017년03월24일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
이준식
광주광역시 서구 풍암1로 53, 제105동 206호(풍암동, 현대삼환아파트)
김미은
부산광역시 부산진구 백양관문로 7, 210동 605호 (개금동, 개금주공아파트)
(74) 대리인
특허법인아이엠

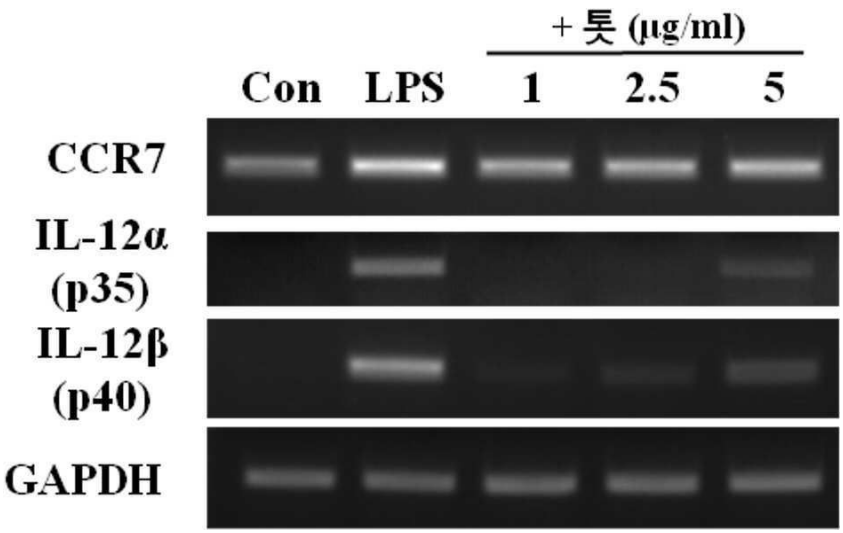
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **톳추출물을 이용한 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물**

(57) 요 약

본 발명은 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 톳(*Hijikia fusiforme Okamura*)추출물을 이용한 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물 및 성숙화유도방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12N 5/0639 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)
C12N 2500/76 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711036851
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (구)신진연구지원사업
연구과제명 Fox06에 의한 수지상세포 분화 및 T 세포 활성조절 기전 연구
기 여 율 1/2
주관기관 조선대학교산학협력단
연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525006134
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 해양수산생명자원확보및활용기반구축
연구과제명 해양바이오 지역특화 선도기술 개발(해조류 유래 식/의약 소재 개발)
기 여 율 1/2
주관기관 조선대학교산학협력단
연구기간 2016.08.01 ~ 2017.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

톳(*Hijikia fusiforme Okamura*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 추출물은 톳의 수용성추출물인 것을 특징으로 하는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 추출물은 CD80, Cd86, MHC class I, MHC class II의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 추출물은 CCR7, IL-12a(p35)와 IL-12b(p40) 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물.

청구항 5

생체로부터 분리된 미성숙 수지상 세포에 톳(*Hijikia fusiforme Okamura*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는 미성숙 수지상세포의 성숙화 유도 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 추출물은 톳의 수용성추출물인 것을 특징으로 하는 미성숙수지상세포의 성숙화 유도방법.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

상기 추출물은 CD80, Cd86, MHC class I, MHC class II의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 미성숙수지상세포의 성숙화 유도방법.

청구항 8

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

상기 추출물은 CCR7, IL-12a(p35)와 IL-12b(p40) 유전자 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 미성숙수지상세포의 성숙화 유도방법.

청구항 9

톳(*Hijikia fusiforme Okamura*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 건강기능성식품.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 추출물은 톳의 수용성추출물인 것을 특징으로 하는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 건강기능성식품.

청구항 11

제 9 항 또는 제 10항에 있어서,

분말, 과립, 정제, 캡슐 및 음료 중 어느 하나의 제형을 갖는 것을 특징으로 하는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 건강기능성식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 톳(*Hijikia fusiforme Okamura*)추출물을 이용한 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물 및 성숙화유도방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 톳(*Hijikia fusiforme Okamura*)은 모자반과, 톳 속에 속하고, 갈조류로 분류되는 해조류 중 하나로 우리나라의 서해안 및 남해안과 제주지역에 널리 분포하고 있으며, 우리나라뿐만 아니라 중국과 일본 등 아시아 지역에서 예로부터 식품으로 오래도록 섭취를 해왔다. 톳은 다량의 식이섬유소를 포함하고 있으며 뿐만 아니라 다양한 생리활성 물질을 포함하여 항산화, 항혈전, 항바이러스, 항암 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0003] 수지상세포(Dendritic Cell, DC)는 면역계에 존재하는 세포 중에서 항원을 전달하는 능력이 가장 강력한 항원제시세포(APC, Antigen Presenting Cell)이다. 수지상세포는 항원과 접한 적이 없는 원시 T 세포(naive T 세포)와 반응하여 면역을 유도할 수 있어 다른 항원제시세포와 달리 일차면역반응(primary immune response)을 효과적으로 유도하며, 이로 인해 강력한 면역기억을 유도할 수 있는 특성을 갖는 유일한 면역세포이다. 수지상세포가 면역반응을 강하게 유도할 수 있는 이유는 항원제시세포(APC, Antigen Presenting Cell)로서 세포 표면에 MHC 분자(I/II) 뿐만 아니라, 보조자극분자(co-stimulatory molecules)를 고농도로 발현하고 있으며, T 세포 활성화에 필요한 사이토카인(cytokine, IFN-alpha, IL-12, IL-18 등)을 분비하기 때문인 것으로 알려져 있다.

[0004] 또한, type 1 수지상세포는 IFN-alpha, IL-12 등 Th1 면역유도 관련 사이토카인을 분비하기 때문에 항원 특이적인 Th1 세포의 증식 및 세포독성T임파구 (CTL)의 활성화를 유도할 수 있어 면역요법에 유용하게 적용 가능하다.

[0005] 수지상세포를 항암면역치료에 활용하기 위해서는, 체외에서 수지상세포를 분화 제조하는 기술과 T 세포 면역을 효과적으로 유도하기 위한 성숙화 기술이 필수적이다. 체외에서 단핵구로부터 미성숙 수지상세포를 제조하는 방법이나 성숙화 과정은 전 세계적으로 아직 표준화 되어있지 못하다. 특히 분화 제조된 미성숙 수지상세포의 성숙화는 수지상세포를 림프절로 이동시켜 임파절의 원시 T 세포에 항원을 제시하여 Th1 면역반응을 유도할 수 있는 세포로 전환시키는 과정으로, 완전히 성숙한 수지상세포는 미숙한 수지상세포에 비해 세포 표면에 MHC I형 및 II형 분자, 및 T 세포 보조자극인자, 즉 CD80 및 CD86 등을 고농도로 발현한다. 또한, 성숙한 수지상세포는 다량의 사이토카인을 발현하며, 이들 사이토카인은 T 세포 면역반응 유도에 직접적으로 관여한다. 성숙화를 통

한 이러한 변화에 의해 수지상세포의 T 세포 면역반응 유도능이 크게 증가하게 된다.

[0006] 수지상세포 성숙화 기술로, 단핵구배양유래 배지(MCM: Monocyte Conditioned Media)를 사용하는 기술이 알려져 있다. 상기 MCM은 단핵구를 시험관에 배양하면서 수거한 배지가 성숙화 인자의 공급원으로서 사용된다. 그러나, MCM을 이용하는 방법의 경우, 외부의 위험 신호를 인식하여 단핵구가 분비하는 염증유발 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 분비량이 사람마다 변동 폭이 크기 때문에, 결과적으로 동일한 성숙화 조건의 제조공정을 유지하기 힘들 뿐 아니라, MCM 제조를 위하여 다량의 말초혈액단핵세포를 채취하여 사용해야 하는 매우 큰 단점이 있다. 이에, MCM을 대체할 수 있는 방법으로, MCM의 성분 중 중요한 사이토카인들을 조합하여 만든 cytokine cocktail (IL-1β, IL-6, TNF-α, PGE2)을 사용하는 기술이 개발되었다. Cytokine cocktail 을 사용할 경우 MCM의 문제점을 해결할 수 있을 뿐 아니라 기능면에서도 비교 우위를 보이는 수지상세포를 안정적으로 제조할 수 있다. 그러나 이들 성숙화 cytokine cocktail 만으로는 수지상세포의 성숙화가 충분히 유도되지 않는다.

[0007] 이와 같이 적응면역반응을 일으키는데 있어서는 수지상세포의 성숙화가 필수적으로 요구되지만, 종양미세환경 등에서는 종양세포의 다양한 세포반응으로 인하여 수지상세포의 표현형이 미성숙 상태로 존재하는 경우가 많으며 성숙화반응이 억제되어 있어 항종양면역반응을 일으키는데 어려움을 겪게되어 면역 관용 또는 면역반응이 결여되는 상태로 존재하게 된다. 따라서 종양미세환경과 같은 수지상세포의 면역반응을 저해하는 상태에서 다시 수지상세포의 성숙화를 유도하는 것은 암 면역치료 등 다양한 면역학적 치료방법을 개발하는데 중요한 방법으로 제시될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 톳(*Hijikia fusiforme Okamura*)추출물의 새로운 용도를 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 톳추출물을 유효성분으로 포함하여 미성숙수지상세포의 성숙화를 효과적으로 유도할 수 있는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물, 유도방법 및 건강기능성식품을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 톳(*Hijikia fusiforme Okamura*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물을 제공한다.

[0012] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 추출물은 톳의 수용성추출물이다.

[0013] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 추출물은 CD80, Cd86, MHC class I, MHC class II의 발현을 증가시킨다.

[0014] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 추출물은 CCR7, IL-12a(p35)와 IL-12b(p40) 유전자 발현을 증가시킨다.

[0015] 또한, 본 발명은 생체로부터 분리된 미성숙 수지상 세포에 톳(*Hijikia fusiforme Okamura*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는 미성숙 수지상세포의 성숙화 유도방법을 제공한다.

[0016] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 추출물은 톳의 수용성추출물이다.

[0017] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 추출물은 CD80, Cd86, MHC class I, MHC class II의 발현을 증가시킨다.

[0018] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 추출물은 CCR7, IL-12a(p35)와 IL-12b(p40) 유전자 발현을 증가시킨다.

[0019] 또한, 본 발명은 톳(*Hijikia fusiforme Okamura*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 건강기능성식품을 제공한다.

[0020] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 추출물은 톳의 수용성추출물이다.

[0021] 바람직한 실시예에 있어서, 분말, 과립, 정제, 캡슐 및 음료 중 어느 하나의 제형을 갖는다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 톳추출물(*Hijikia fusiforme Okamura*)추출물은 세포독성을 가지지 않는 농도에서 수지상세포의 세포표면분자인 CD80, CD86, MHC class I, MHC class II의 발현을 증가시키는 효능을 가지므로, 이를 이용하여 다양한 항암치료시 면역반응을 증강시키는 특성을 갖는 미성숙수지상세포 성숙화유도용 약학조성물, 그 유도방법 및 기능성 식품소재로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 톳추출물이 처리된 마우스 미성숙수지상세포의 세포독성측정 결과 그래프이다.

도 2a는 본 발명의 실시예에 따른 톳추출물이 처리된 미성숙수지상세포의 마커인 CD11c와 성숙화 마커인 CD80, CD86를 함께 염색하여 측정한 결과그래프이고, 도 2b는 본 발명의 실시예에 따른 톳추출물이 처리된 미성숙수지상세포의 마커인 CD11c와 성숙화 마커인 MHC class I, MHC class II를 함께 염색하여 측정한 결과그래프다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 톳추출물이 수지상세포의 항원포식능에 미치는 효과를 나타낸 결과그래프이다.

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 톳추출물이 수지상세포의 사이토카인 발현에 미치는 효과를 나타낸 결과그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어는 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어를 선택하였으나, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있는데 이 경우에는 단순한 용어의 명칭이 아닌 발명의 상세한 설명 부분에 기재되거나 사용된 의미를 고려하여 그 의미가 파악되어야 할 것이다.

[0025] 이하, 첨부한 도면 및 바람직한 실시예들을 참조하여 본 발명의 기술적 구성을 상세하게 설명한다.

[0026] 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 동일한 참조번호는 동일한 구성요소를 나타낸다.

[0027] 본 발명의 기술적 특징은 톳추출물이 수지상세포의 세포표면분자인 CD80, CD86, MHC class I, MHC class II의 발현을 증가시키는 효능을 갖는다는 점에서 착안된 것으로 톳추출물의 새로운 용도인 미성숙수지상세포의 성숙화유도활성을 이용하여 다양한 항암치료시 면역반응을 증강시키는 특성을 갖는 미성숙수지상세포 성숙화유도용 약학조성물, 그 유도방법 및 건강기능성식품을 제공하는 것이다.

[0028] 즉, 수지상세포는 골수에서 유래된 전구체 세포에서 분화를 하여 높은 항원포식능을 가지는 미성숙한 수지상세포의 상태로 존재를 하다가 외부의 자극 및 항원을 인식하게 되면 미성숙 수지상세포의 성숙화가 진행되어 세포표면 분자의 발현이 증가되고 T 림프구 밀집지역으로 이동하여 적응면역반응을 개시하게 되므로, 적응면역반응을 일으키는데 있어서는 수지상세포의 성숙화가 필수적으로 요구되지만, 종양미세환경 등에서는 종양세포의 다양한 세포반응으로 인하여 수지상세포의 표현형이 미성숙 상태로 존재하는 경우가 많으며 성숙화반응이 억제되어 있어 항종양면역반응을 일으키는데 어려움이 있으므로, 종양미세환경과 같은 수지상세포의 면역반응을 저해하는 상태에서 다시 수지상세포의 성숙화를 유도하는 방법을 개발하는 것은 암 면역치료 등 다양한 면역학적 치료방법을 개발하는데 중요하기 때문이다.

[0029] 따라서, 본 발명의 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 약학조성물은 톳(*Hijikia fusiforme Okamura*) 추출물을 유효성분으로 포함한다.

[0030] 상술된 바와 같이 톳추출물이 세포독성을 가지지 않는 농도에서 수지상세포의 성숙화 마커로 알려진 CD80, Cd86, MHC class I, MHC class II의 발현을 농도의존적으로 증가시키기 때문이다. 그 결과 본 발명의 약학조성물을 경구 또는 비경구적으로 투여하여 인간을 포함한 포유류의 항암치료 등 다양한 면역학적 치료시 면역반응을 증강시키기 위해 사용될 수 있다.

[0031] 여기서, 톳 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 추출 용매를 사용하여 분리할 수 있다. 추출 용매로는 추출공정에서 일반적으로 사용할 수 있는 용매를 사용할 수 있는데, 물, 탄소수 1-4개의 무수 또는 함수 저급 알코올, 아세톤, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄 및 1,3-부틸렌 글리콜로 구성된 군으로부터 선택되는 용매를 사용하여 추출될 수 있다. 일 구현예로서 톳 추출물은 톳의 수용성추출물, 특히 실시예에 기재된 바와 같이 에탄올추출물일 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학조성물은 톳추출물을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약리학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 더 포함할 수 있다. 혼합물로 제공되는 경우, 유효성분인 톳추출물은 약학조성물에 0.01 내지 99 중량%로 포함될 수 있다.

[0033] 담체 또는 부형제로는 물, 덱스트린, 칼슘카보네이드, 락토스, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수, 덱스트로스, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이들은 1종이상 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체 및 부형제는 모두 사용가능하다.

[0034] 또한 본 발명의 약학조성물을 약제화하는 경우, 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0035] 개별 투약 형태에서 이의 유효성분인 톳추출물의 함량은 1회에 투여되는 양으로, 예컨대 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배일 수 있다. 본 발명의 약학조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 병용되는 약물을 고려하여 결정하는 것이 좋으며, 예컨대 1회 유효성분을 기준으로 하였을 때 10 ㎍/ml 이하의 농도로, 1일 1 내지 5회 투여할 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.00001-100 mg/kg(체중)일 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

[0036] 다음으로, 본 발명의 미성숙수지상세포의 성숙화유도용 건강기능성식품은 상술된 약학조성물에 포함되는 톳추출물을 유효성분으로 포함함으로써 미성숙수지상세포의 성숙화를 유도하여 수지상세포의 세포표면분자인 CD80, CD86, MHC class I, MHC class II의 발현을 증가시키는 활성을 갖게 되므로 항암치료 등 다양한 면역학적 치료 시 면역반응을 증강시키기 위한 목적으로 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명에서 '건강기능성식품'이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 건강기능성식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 톳추출물을 첨가할 수 있는 건강 기능성 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다. 추가로, 특수영양식품(예, 조제유류, 영,유아식 등), 건강보조식품, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 음료(예, 과실,채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상술된 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0039] 본 발명의 건강 기능성 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 물, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0040] 이와 같이 본 발명의 건강기능성식품은 상술된 바와 같이 다양한 제형을 갖는데, 특히 분말, 과립, 정제, 캡슐 및 음료 중 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0041] 일 구현예로서, 본 발명의 건강기능성식품을 음료로 구현하는 경우 필수 성분으로서 본 발명의 톳추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0042] 또한, 미성숙수지상세포의 성숙화를 유도하기 위한 것을 목적으로 하는 건강기능성식품에서도 유효성분인 톳추출물의 함량은 10 ㎍/ml 이하의 농도로 포함될 수 있을 것이다. 경우에 따라서는 1일 당 0.00001-100 mg/kg(체중)일 수 있다. 본 발명의 기능성식품에 포함되는 유효성분의 농도는 복용목적, 복용자의 상태, 필요기간 등을 고려하여 결정할 수 있으며 특정 범위의 농도로 한정되지 않는다.

[0043] 실시예 1

[0044] 톳 (*Hijikia fusiforme Okamura)*은 완도에서 겨울에 채집된 것으로 해수를 제거하기 위하여 담수로 3회 세척을 시행하였다. 세척한 톳을 90℃ 건조기에서 24시간 동안 건조하여 수분을 제거한 후, 믹서기를 이용하여 가루 상태로 만들었다. 톳 가루 100 g을 80% 에탄올 900 ml에 넣고 교반하며 2일째에 3MM 필터용지에 걸러서 톳 추출물을 수거하였다. 위 방법을 3번 반복하여 총 6일간 톳을 추출한 후 획득한 톳 추출물은 감압농축기를 이용하여 농축한 후 동결건조기를 이용하여 용매를 모두 제거하고 가루 상태의 톳 추출물을 획득하였다. 획득한 톳 추출물을 멸균된 3차 증류수에 1㎍/ml 농도로 녹여 약학조성물1(1 ㎍/ml)을 제조하였다.

[0045] 실시예 2

[0046] 톳추출물의 농도를 2.5㎍/ml 로 한 것을 제외하면 실시예1과 동일한 방법으로 약학조성물2(2.5 ㎍/ml)를 제조하였다.

[0047] 실시예 3

[0048] 톳추출물의 농도를 5 ㎍/ml 로 한 것을 제외하면 실시예1과 동일한 방법으로 약학조성물3(5 ㎍/ml)을 제조하였다.

[0049] 실험예 1

[0050] 1. 세포배양

[0051] 골수 유래 마우스 수지상세포를 다음과 같이 배양하였다.

[0052] C57BL/6 마우스(8-10주령)를 구입하여 대퇴골 및 경골에서 골수를 분리하였다. 분리된 골수는 단일세포로 분리한 후 적혈구를 용해하고 세포배양용 RPMI-1640 배지에서 4시간 배양한다. 4시간 후, 세포를 다시 떼어낸 후 GM-CSF가 포함된 배지에서 6일간 배양을 하고 2일마다 세포배양액을 새로 교체하였다. 6일째에 비-부착성 수지상세포 및 약하게 부착된 수지상세포를 미성숙 수지상세포로 이용하였다.

[0053] 2. 세포독성능 평가

[0054] 상술된 바와 같이 골수 유래 전구체로부터 GM-CSF를 사용하여 미성숙 수지상세포를 유도한 후, 6일째에 실시예1 내지 3에서 얻어진 약학조성물1 내지 3(1, 2.5, 5 ㎍/ml)을 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 배양된 수지상세포는 Annexin/PI staining 을 통하여 세포독성을 판별하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 데이터는 4번의 개별반복 실험 결과를 대표한다.

[0055] 도 1에 도시된 바와 같이, 톳추출물의 농도가 5 mg/ml인 약학조성물3의 경우에도 수지상세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다.

[0056] 실험예 2

[0057] 실시예1 내지 3에서 얻어진 톳추출물을 유효성분으로 포함하는 약학조성물1 내지 3에 의해 수지상세포의 표현형이 달라지는지 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같이 약학조성물 1 내지 3(1, 2.5, 5 ㎍/ml)을 처리한 후 수지상세포의 표현형을 분석하고 그 결과를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[0058] 수지상세포의 표현형은 세포표면분자를 유세포 분석방법을 이용하여 분석하였다. 6일째에 약학조성물1 내지 3 및 LPS (양성대조군)을 처리한 세포를 24시간 배양 후 파이펫팅을 하여 회수한다. 회수된 세포는 차가운 PBS를 이용하여 2회 세척을 해준다. 세척된 세포에 FITC가 부착된 항-CD11c항체(수지상세포의 마커)와 PE가 부착된 항-CD80, CD86, MHC class I, MHC class II 항체(성숙화마커)를 조합하여 처리한 후, 4℃ 냉장고에서 30분간 반응시킨다. 염색된 세포는 다시 차가운 PBS를 이용하여 2회 세척한 뒤, 4% paraformaldehyde 이용하여 고정하였다. 고정된 세포는 FC500 (Beckman coulter)기기를 이용하여 측정한 후, kaluza software(Beckman coulter)를 이용하여 분석하였다. 데이터는 4번의 개별반복 실험 결과를 대표한다.

[0059] 도 2a 및 도 2b에 도시된 바와 같이 약학조성물1 내지 3(1, 2.5, 5 ㎍/ml)은 수지상세포의 성숙화 마커로 알려

진 CD80, Cd86, MHC class I, MHC class II의 발현을 농도의존적으로 증가시킴을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 약학조성물1 내지 3에 포함된 톳 추출물이 수지상세포의 세포표현형을 성숙화 상태로 유도한다는 것을 나타낸다.

[0060] 실험예 3

[0061] 미성숙 수지상세포는 항원을 포식하기 위하여 엔도사이토시스(endocytosis)의 기능이 높게 나타나지만 성숙된 수지상세포에서는 이러한 항원포식능이 감소되어 나타나는 것이 특징이다. 수지상세포의 항원포식능에 톳이 미치는 영향을 확인하기 위하여 다음과 같이 배양 6일째의 수지상세포에 약학조성물 3(5 ㎍/ml)과 LPS(양성대조군)을 처리한 후 FITC-dextrand로 처리하고 수지상세포 마커인 CD11c를 염색하여 수지상세포가 포식한 FITC-dextran의 양을 측정했고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0062] 수지상세포의 항원포식능을 분석하기 위해 미성숙 수지상세포를 4℃와 37℃에서 1 mg/ml의 FITC-dextran(sigma)를 처리하여 40분간 반응시켰다. 반응이 끝난 세포는 4% paraformaldehyde를 이용하여 고정을 하고 고정된 세포는 PE가 결합된 항-CD11c항체로 염색하였다. 염색된 세포는 유세포 분석기로 측정한 후 kaluza software를 이용하여 분석하였다. 실험 결과는 4번은 개별반복 실험을 대표한다.

[0063] 도 3에 도시된 바와 같이 약학조성물 3(5 ㎍/ml)을 처리한 수지상세포에서 항원포식능이 낮아졌음을 확인하였고 양성대조군인 LPS를 처리한 군에서도 항원포식능이 감소하였음을 확인하였다. Dextran과 수지상세포의 비특이적 결합을 배제하기 위하여 4℃에서 동일한 실험을 시행하였고, 낮은 온도에서 수지상세포는 dextran에 대하여 반응하지 않음을 확인하였다. 그 결과, 수지상세포의 엔도사이토시스(endocytosis)는 항원포식능의 활성화 반응에 의한 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 톳 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 약학조성물이 수지상세포의 성숙화를 유도한다는 것을 나타냄을 알 수 있다.

[0064] 실험예 4

[0065] 톳추출물을 유효성분으로 포함하는 약학조성물이 수지상세포의 기능적 성숙화에 미치는 영향을 확인하기 위하여 배양 6일째의 미성숙 수지상세포에 약학조성물1 내지 3(1, 2.5, 5 ㎍/ml)과 LPS(양성대조군)을 처리한 하여 6시간 배양하였다. 케모카인과 사이토카인의 발현은 RT-PCR 방법을 이용하여 CCR7, IL-12a와 IL-12b의 mRNA 발현수준을 확인하였고 그 결과를 도 4에 나타내었다. 실험 결과는 4번은 개별반복 실험을 대표한다.

[0066] 도 4에 도시된 바와 같이, 수지상세포의 기능적 성숙화의 또 다른 지표가 되는 사이토카인과 케모카인의 발현이 톳 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학조성물1 내지 3이 처리되어 성숙된 수지상세포에서 발현이 증가되었다. 즉 CCR7은 수지상세포의 이동에 관여하는 대표적인 케모카인이며 IL-12는 Th1 T 세포의 분화를 유도하는 사이토카인으로써 수지상세포의 적응면역반응 개시에 중요한 역할을 하는데, 도 4로부터 알 수 있듯이, 본 발명의 약학조성물3이 처리된 군에서 특히 CCR7, IL-12a(p35)와 IL-12b(p40) 유전자 발현이 강력하게 증가되었음을 알 수 있다. 이러한 결과는 유효성분인 톳 추출물이 수지상세포의 기능적 성숙화를 유도한다는 것을 나타낼 뿐만 아니라, 농도 의존적으로 성숙화 유도능이 향상되는 것을 보여준다.

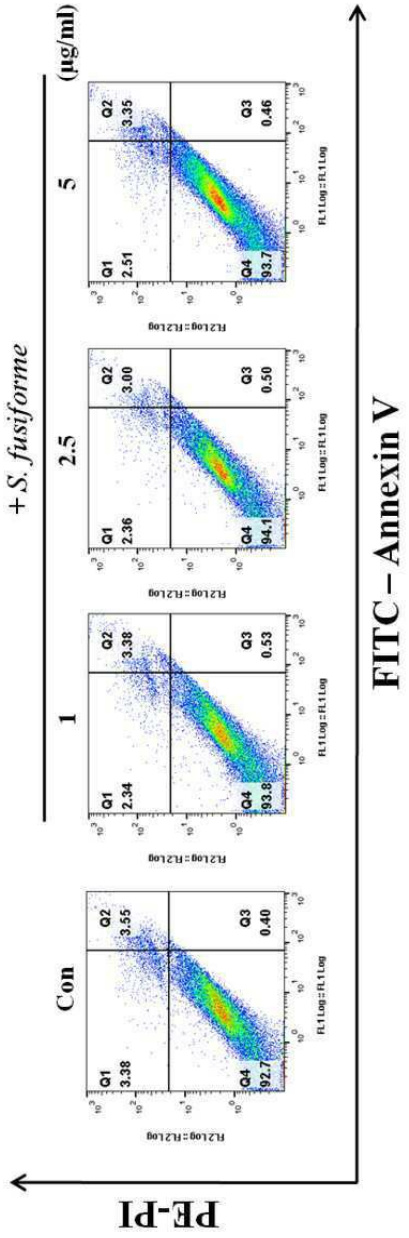
[0067] 이상의 실험결과들을 통해 본 발명에서는 톳추출물이 미성숙수지상세포에 처리되면 수지상세포의 성숙화 마커로 알려진 CD80, Cd86, MHC class I, MHC class II의 발현을 농도의존적으로 증가시킬 뿐만 아니라, CCR7, IL-12a(p35)와 IL-12b(p40) 유전자 발현을 농도의존적으로 증가시켜 성숙화를 유도하는 것을 증명하였다.

[0068] 따라서, 본 발명의 톳추출물이 미성숙수지상세포의 성숙화유도활성을 가지므로 이들이 항암치료 등 면역학적 치료시 면역반응을 증강시키는 새로운 약학조성물은 물론 기능성 식품 소재로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

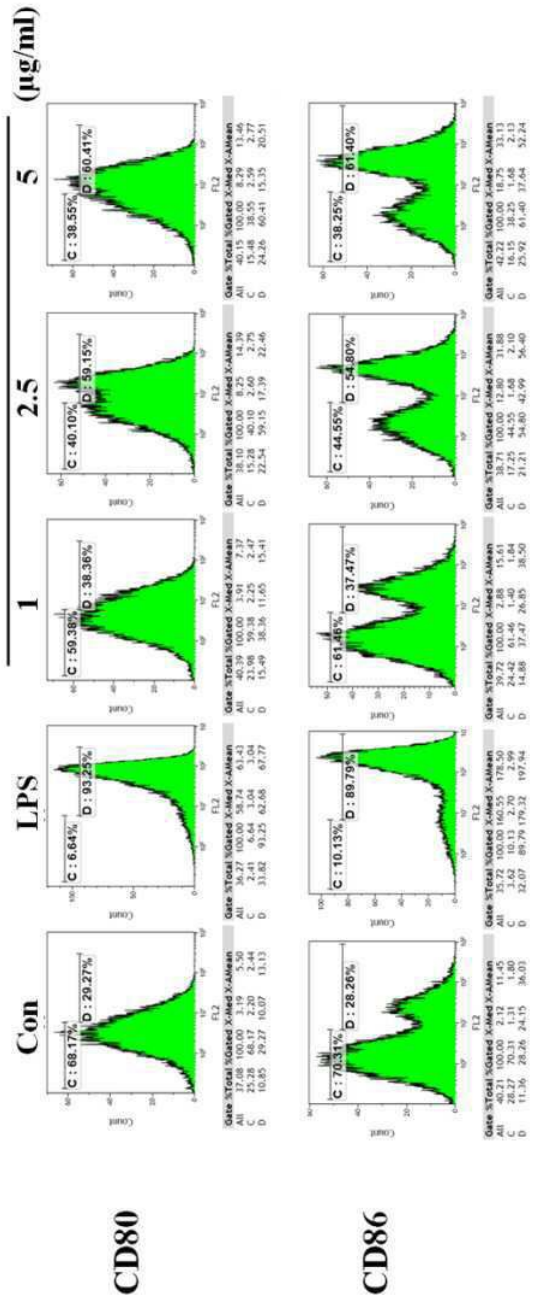
[0069] 본 발명은 이상에서 살펴본 바와 같이 바람직한 실시 예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시 예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능할 것이다.

도면

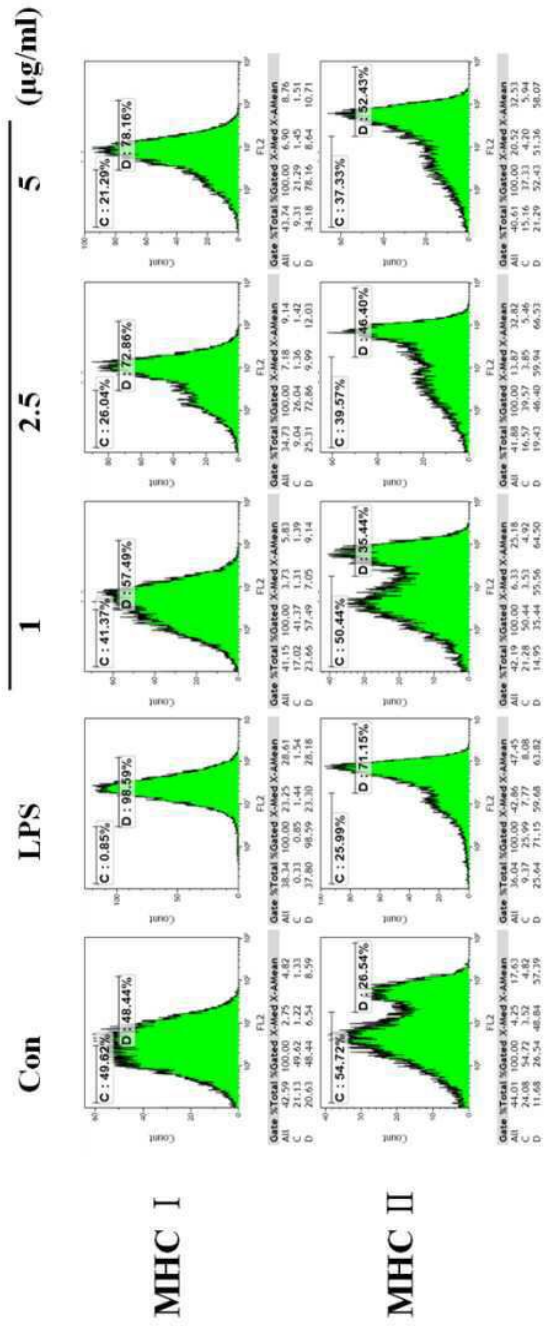
도면1


+S. fusiforme
Con
1
2.5
5
(μg/ml)
PE-PI
FITC – Annexin V
Q1 3.38
Q2 3.55
Q3 0.40
Q4 92.7
Q1 2.34
Q2 3.38
Q3 0.53
Q4 93.8
Q1 2.36
Q2 3.00
Q3 0.50
Q4 94.1
Q1 2.51
Q2 3.35
Q3 0.46
Q4 93.7

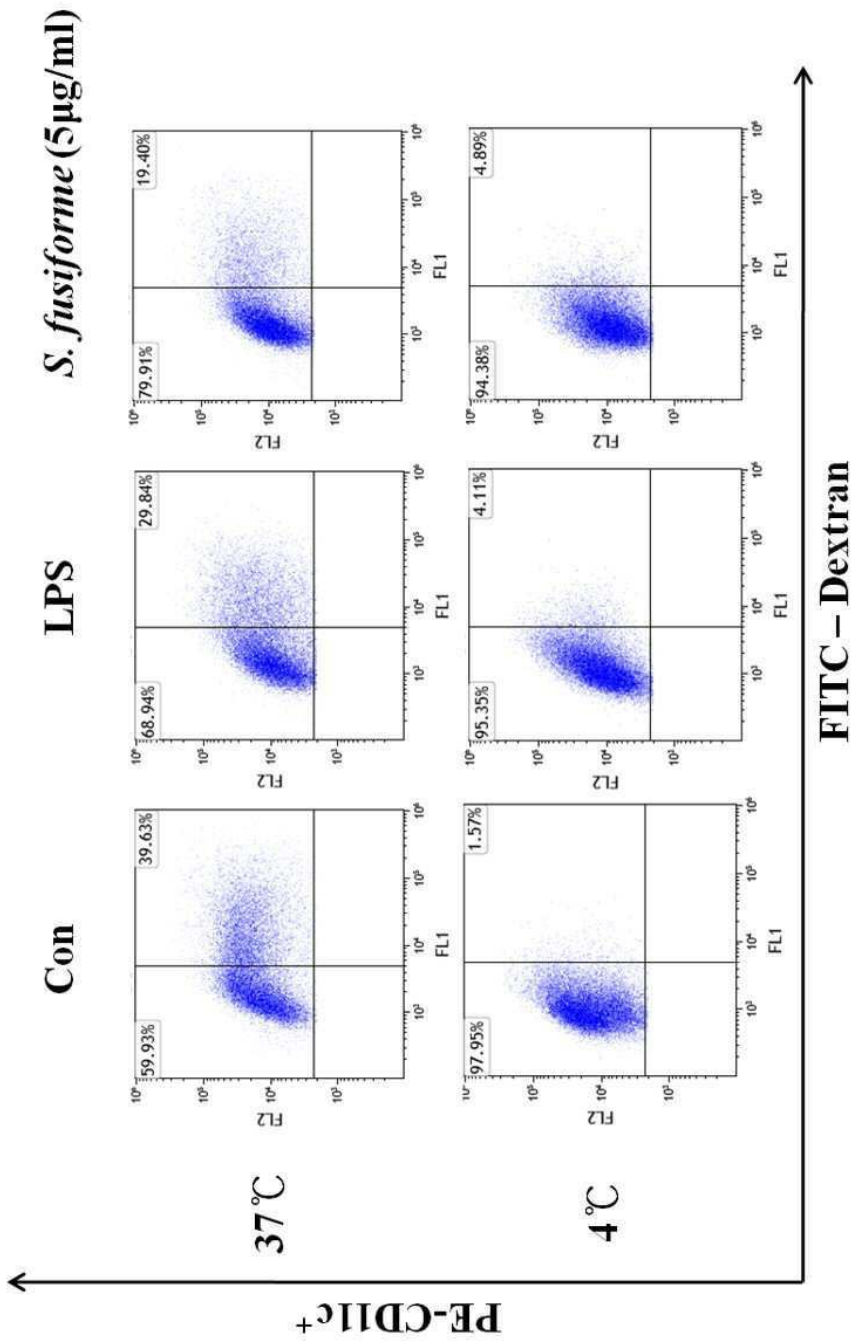
도면2a



도면2b



도면3


Con
LPS
S. fusiforme (5μg/ml)
37℃
4℃
PE-CD11c+
FITC – Dextran
FL1
FL2
39.63%
59.93%
29.84%
68.94%
19.40%
79.91%
1.57%
97.95%
4.11%
95.35%
4.89%
94.38%

도면4

