(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0130293
(43) 공개일자 2011년12월05일

(51) Int. Cl.
A61K 35/37 (2006.01) *A61K 35/12* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0049866
(22) 출원일자 2010년05월27일
심사청구일자 2010년06월17일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
정원교
광주광역시 서구 풍암동 한국아파트 102동 301호
최일환
부산광역시 연제구 연산9동 연산엘지아파트 108동 301호
(74) 대리인
이덕록

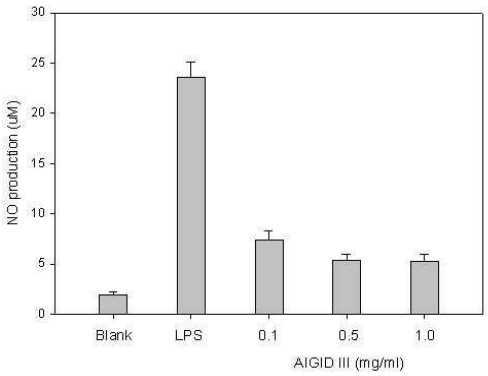
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 전복 소화 가수분해물을 함유하는 면역계 염증성 질환 예방 및 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 전복 육과 내장의 위 소장 소화 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 면역계 염증성 질환에 대한 예방 및 치료용 약제학적 조성물 및 상기 질환을 개선시킬 수 있는 건강기능식품 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 전복 소화 가수분해물은 염증반응 지표물질인 대식세포 내 NO 생성을 억제하며, 주요 면역조절인자들인 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), IL-1beta, TNF-alpha, IL-6에 대한 발현을 유의적으로 억제하며, 주요 염증 관련 인자들의 발현에 관여하는 핵 전사인자인 NF-κB의 핵 내로의 전이 및 활성을 억제함으로써 뛰어난 면역활성 효능을 나타내는 효과가 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 해당없음/해당없음

부처명 농림수산식품부/전라남도 완도군

연구관리전문기관

연구사업명 수산기술개발사업/완도군 연구용역사업

연구과제명 전복 소화분해시스템을 활용한 천연 항알러지 제품 개발/완도 특산 해조류 및 무척추동물 유래 기능성 시제품 연구 및 개발

기여율

주관기관 조선대학교/조선대학교

연구기간 2009년 6월 1일~2012년 5월 31일/2010년 5월 1일~2011년 4월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

전복 소화 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 면역계 염증성 질환에 대한 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전복 소화 가수분해물이 전복 육 또는 내장의 소화 가수분해물인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 전복 소화 가수분해물이 전복을 위장 조건 하에서 1차 가수분해시키고, 이어서 소장 조건 하에서 2차 가수분해 시키는 위-소장 가수분해 방법으로 제조된 것임을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 전복 소화 가수분해물이 세포 내 산화질소(NO) 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 전복 소화 가수분해물이 세포 내 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), IL-1beta, TNF-alpha, IL-6 에 대한 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6

전복 소화 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 면역계 염증성 질환에 대한 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전복 소화 가수분해물을 함유하는 면역계 염증성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 전복 육과 내장의 위 소장 소화 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 면역계 염증성 질환에 대한 예방 및 치료용 약제학적 조성물 및 상기 질환을 개선시킬 수 있는 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 패혈증과 같은 다발성 염증에 의하여 발생된 내독소는 대식세포, 림프구들을 자극하게 되고 이들 자극을 받은 면역세포는 TNF-a, IL-1, IL-6 및 IFN-r등의 다양한 사이토카인의 분비와 iNOS 및 COX-2 효소활성 증가가 중요한 역할을 한다. 분비된 사이토카인은 호중구 및 단핵세포를 자극하게 되며, 이들의 세포 내에 존재하는 NADPH dependent 산화효소계를 작동시켜 유리 산소기 (oxygen free radical)를 생성하여 장기에 손상을 일으키며 (Babier & Peters, 1981; Cross, 1987; Klebanoff et al., 1986), 사이토카인과 염증 매개 효소에 의해 자극을 받은 다핵구는 점도가 증가하여 혈관 내벽에 잘 붙게 되고, 울혈이 일어나게 되며 산화제의 생성을 가속화시켜 장기 손상을 악화 시킨다 (Mandell, 1988). 다량으로 발생한 유리산소 대사 물질은 체내에서 염증을 조장하고 대식세포의 식 작용을 저해하며 세포내 DNA의 변형 등을 일으키게 되어, 세포막의 손상을 일으키며 투과성을 증가시켜 세포의 기능을 상실하게 된다. 따라서 근본적인 염증 치료 및 억제를 위해서는 발병인자와 활성산소종 간의 상호기전 연구와 효과적인 억제효능 물질에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0003] 전복(abalone)은 원시복족목 전복과에 속하는 연체동물의 총칭이며, 이 중 참전복은 전복의 북방형 아종으로서, 긴 타원형의 껍데기는 두께가 얇고 표면이 울퉁불퉁하며, 물이 통과하는 3~4개의 흡수공(吸水孔)이 있다. 성숙

하면 암컷의 난소는 짙은 녹색을, 수컷의 정소는 연한 노란색 또는 유백색을 띤다. 수온이 낮은 북부 연안에 분포하고, 전복류 중에서는 가장 얕은 곳에 살며 수심 약 15m 이내이고 바닷물이 깨끗해 해조류가 많이 번식하는 곳에 서식한다. 미역, 다시마, 감태, 대황, 파래 등 해초류가 주식이며 한국과 일본에 분포한다. 수분함량이 많고 단백질, 지방의 함량은 적은 편으로 영양이 체내에서 잘 흡수되어 회복기의 환자나 노약자를 위한 건강식으로 많이 쓰인다.

[0004] 특히, 완도 참전복(Haliotis discus hannai)은 완도의 청정 미역, 다시마 등을 주로 먹고 자라며, 타우린, 메티오닌 등 우수 아미노산이 풍부하며 비타민과 미네랄 또한 타 지역에 비해 그 함량이 매우 우수하다.

[0005] 종래 전복의 이용은 주로 참전복 껍질을 이용한 진주양식 방법, 예를 들어, 전복을 모패로 한 반구(반원)진주의 양식방법(대한민국 등록특허 제10-0005994호), 전복진주양식방법((대한민국 등록특허 제10-0002933호), 전복껍질을이용한진주의양식방법(대한민국 등록특허 제10-0090613호) 등과, 요리 재료로서 전복을 이용하는 방법, 예를 들어 전복껍질을 이용한 한방삼계탕과 흑미전복삼계탕 및 녹차전복삼계탕 조리방법(대한민국 등록특허 제10-0897947호), 전복 통조림의 제조방법 및 그에 의해 제조된 전복 통조림 (대한민국 등록특허 제10-0665131호), 전복 내장 젓갈의 제조방법 및 그에 의해 제조된 전복 내장젓갈(대한민국 등록특허 제10-0696887호), 주성분 전복분말을 포함하는 전복가루 및 이의 제조방법 (대한민국 특허출원 제10-2007-0022333호) 등에 국한되어 있었다.

[0006] 이에 본 발명에서는 완도산 참전복 (*Haliotis discus hannai*)이 가지는 생리활성물질을 탐색하고 체내 흡수율이 높은 흡수 직전 형태의 가수분해물을 제조하고, 이를 대상으로 대식세포 주 (macrophage)인 RAW 264.7를 통해 면역세포 내 항염증 효능을 평가하고 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 전복 소화 가수분해물의 면역계 염증성 질환에 대한 예방, 치료 및 개선용으로써의 신규한 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 본 발명의 목적은 전복 가식부위, 즉 육과 내장을 섭취하여 위 소장을 통해 흡수되기 직전의 소화분해물을 제조하여, 이들을 대상으로 면역계 염증성 질환에 대한 예방 및 치료 효능을 세포수준에서 수행하여 유의적인 결과를 확인함으로써 달성되었다.

[0009] 본 발명은 전복 소화 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 면역계 염증성 질환에 대한 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명 있어서, 상기 전복 소화 가수분해물은 전복 육 또는 내장의 소화 가수분해물인 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 전복 소화 가수분해물은 전복을 위장 조건 하에서 1차 가수분해시키고, 이어서 소장 조건 하에서 2차 가수분해시키는 위-소장 가수분해 방법으로 제조된 것임을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 전복 소화 가수분해물은 세포 내 산화질소(NO) 생성을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 전복 소화 가수분해물은 세포 내 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), IL-1beta, TNF-alpha, IL-6 에 대한 발현을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한 본 발명은 전복 소화 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 면역계 염증성 질환에 대한 예방 및 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 유효성분이라 함은 내재된 약리작용에 의해 그 의약품의 효능효과를 직접 또는 간접적으로 발현한다고 기대되는 물질 또는 물질군(약리학적 활성성분 등이 밝혀지지 않은 생약 등을 포함한다)으로서 주성

분을 포함하는 것을 의미한다.

[0016] 본 발명에 있어서, "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0017] 본 발명의 전복 소화 가수분해물을 포함하는 약제학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 전복 소화 가수분해물을 포함하는 약제학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 전복 소화 가수분해물을 포함하는 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출액에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calciumcarbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(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, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 전복 소화 가수분해물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 전복 소화 가수분해물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0021] 본 발명에 따른 전복 소화 가수분해물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사 및 피부에 직접 투여될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에 따른 전복 소화 가수분해물은 면역계 염증성 질환의 예방 및 개선 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 전복 소화 가수분해물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등이 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 전복 소화 가수분해물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0023] 본 발명의 식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 전복 소화 가수분해물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 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 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 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. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.

[0024] 상기 외에 본 발명의 전복 소화 가수분해물은 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, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 전복 소화 가수분해물은 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 전복 소화 가수분해물은 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0025] 본 발명에서는 전복 가식부위, 즉 육과 내장을 섭취하여 위 소장을 통해 흡수되기 직전의 소화분해물을 제조하여, 이들을 대상으로 면역계 염증성 질환에 대한 예방 및 치료 효능을 세포수준에서 수행하였으며 유의적인 결과를 확인하였다.

[0026] 이를 위하여 본 발명에서는 라디칼에 의해 주로 유도되는 면역반응인 염증반응에 대한 억제효능을 검토하기 위해 염증유발인자인 LPS 처리된 대식세포에 대하여 AIGID III에 대한 효능을 검토하였다. 그 결과 AIGID III는 염증반응 지표물질인 대식세포 내 NO 생성을 억제하였으며, 주요 면역조절인자들인 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), IL-1beta, TNF-alpha, IL-6에 대한 발현을 유의적으로 억제함으로써 뛰어난 면역활성 효능을 가지는 것으로 나타났다. 또한 주요 염증 관련 인자들의 발현에 관여하는 핵 전사인자인 NF-B의 핵 내로의 전이 및 활성을 억제함을 알 수 있었다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따른 전복 소화 가수분해물은 염증반응 지표물질인 대식세포 내 NO 생성을 억제하며, 주요 면역조절인자들인 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), IL-1beta, TNF-alpha, IL-6에 대한 발현을 유의적으로 억제하며, 주요 염증 관련 인자들의 발현에 관여하는 핵 전사인자인 NF-κB의 핵 내로의 전이 및 활성을 억제함으로써 뛰어난 면역활성 효능을 나타내는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 체내 소화가수분해 시스템 및 공정도를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명에서 제조된 전복 소화 가수분해물을 나타낸 사진이다. 좌측으로부터 AIGID I > 100 kDa; AIGID II 100 - 10 kDa; AIGID III: 10 - 5 kDa; AIGID IV: 5 - 1 kDa.

도 3은 LPS-자극 RAW 264.7 세포에서 NO 생성에 대한 AIGID III의 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 RAW 264.7 세포에 대한 AIGID III의 세포독성 효과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 RT-PCR 분석법을 이용한 LPS-자극 RAW 264.7 세포에서 염증성 인자의 유전자 발현에 대한 AIGID III의 효과를 나타낸 도이다.

도 6은 LPS-자극 RAW 264.7 세포에서 NF-κB 활성에 대한 AIGID III의 효과를 나타낸 도이다. (a) 공초점 주사 전자현미경을 이용한 핵에서의 NF-κB의 분화를 나타낸 것, (b) EMSA 분석법에 의한 NF-κB의 DNA 결합 활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0030] **실시예 1 : 전복 소화 가수분해물 (abalone gastrointestinal digests) 제조**

[0031] 본 발명에 따른 전복 체내 소화 가수분해물의 제조는 정 등의 방법 (Jung et al. 2007a) 및 대한민국 등록특허 제10-0680066호(2007.02.01)에 따라 수행하였다(도 1 참조). 단계별 위-소장 가수분해 조건은 다음과 같다:

[0032] 1 단계 : 위(胃) 소화조건과 동일한 pH 1.8-2.2으로 맞춘 1차 기질에 대하여, 펩신 (EC 3.4.23.1)을 기질 대 효소비 250:1, 온도 35~40℃, 반응시간 1시간 30분~2시간으로 위 소화 (gastric digestion) 조건 하에서 가수분해 시킨다.

[0033] 2 단계 : 상기 1 단계에서 얻은 1차 가수분해물을, 담즙산염 혼합물(0.125 M 타우로콜레이트, 0.125 M 글리코데옥시콜릭산), 1 M CaCl, 0.25M 비스트리스 (pH 6.5), 0.1%(w/v) 및 돼지췌장 리파아제 (porcine pancreatic lipase, EC 3.1.1.3)와 함께 섞은 후, pH 7.8-8.0 하에서 트립신(EC 3.4.21.4)과 α-키모트립신(EC 3.4.21.1)을 이용하여 기질 대 효소비 250:1, 온도 35~40℃, 반응시간 2시간~3시간으로 소장 (intestinal digestion) 조건 하에서 2차 가수분해 시킨다.

[0034] 상기와 같은 조건에 따라, 먼저 전복의 가식부위인 육 및 내장을 분리하여 생리식염수로 수차례 세척한 후 동결건조하여 분말화하였다. 각각 전복 육 및 전복 내장 분말 시료 20 g에 증류수를 100 ㎖ 가하고, 위(胃) 소화조건과 동일한 pH 1.8~2.2으로 맞춘 1차 기질에 대하여, 펩신 (Pepsin, EC 3.4.23.1)을 250:1, 온도 35~40℃, 반응시간 1시간 30분~2시간으로 위(胃)조건과 유사한 환경에서 1차 가수분해 시켰다.

[0035] 상기에서 얻어진 1차가수분해물에 담즙산염 혼합물 (0.125 M 타우로콜레이트, 0.125 M 글리코데옥시콜릭산), 1 M 염화칼슘 (CaCl), 0.25 M 비스트리스 (Bistris, pH 6.5), 0.1%(w/v) 돼지췌장 리파아제 (porcine pancreatic lipase, EC 3.1.1.3)들과 함께 섞은 후, pH 8.0로 맞춘 2차 기질에 대해여, 트립신 (trypsin, EC 3.4.21.4)과 알파카이모트립신 (α-chymotrypsin, EC 3.4.21.1)을 250:1, 온도 35~40℃, 반응시간 2시간~3시간으로 소장(小腸) 조건과 유사한 환경에서 2 차 가수분해 시켰다.

[0036] 2 차 가수분해 후, 얻어진 2차 가수분해물을 원심분리 (10,000×g, 15분, 4℃)하여 상층액 만 회수한 다음, 100 Da 이하 분자량 투과막을 장치한 전기투석장치 (electrodialyzer, Micro Acilyzer model G3, 아사히 화학공업사 제품, 도쿄, 일본)를 이용하여 투석한 다음 동결 건조하여 위-소장 소화분해 시스템을 거친 전복 육 및 전복 내장 소화 가수분해물로 사용하였다.

[0037] 수득한 전복 내장 소화 가수분해물 (AIGIDs)은 한외여과막 시스템 내에서 다양한 분자량 별로 분획, 농축, 탈염하였으며, 각 전복 내장 소화 가수분해물들은 분자량 별로 AIGID I (> 100 kDa), AIGID II (100 - 10 kDa), AIGID III (10 - 5 kDa), 및 AIGID IV (5 - 1 kDa) 로 명명하였다.

[0038] 상기 분획들에 대한 분자량에 대한 정보를 하기 표 1 및 도 2에 나타내었다.

표 1

[0039]

	명칭	MW 범위
전복 내장 소화 가수분해물(AIGIDs) 분획	- AIGID I - AIGID II - AIGID III - AIGID IV	> 100 kDa 100 - 10 kDa 10 - 5 kDa 5 - 1 kDa

[0040] **실험예**

[0041] 본 실험예에서는 상기 실시예 1에서 제조한 전복 육 및 전복 내장 소화 가수분해물을 대상으로 면역세포 내 항염증 효능을 대식세포 주 (macrophage)인 RAW 264.7 내에서 검토하였다.

[0042] 대식세포주 (mouse macrophges RAW 264.7, American Type Cultrue Collection분양)는 100 U/ml penicillin/strptomycin, 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM배지에서 37, 5% CO_2의 조건 하에서 배양하였다. 2~3일마다 한번씩 계대배양하여 세포주를 유지하였다.

[0043] 염증 매개 인자로써 중요한 역할을 하는 NO에 대한 억제 효능을 확인하기 위하여, LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 대식세포에 농도별로 전복 내장 가수분해물을 처리하여 NO 생성능을 측정함으로써 염증반응 억제 효과를 측정하였다.

[0044] 또한 RAW 264.7 세포를 배양하여 염증유발인자인 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하였다. 샘플을 농도별로 처리한 다음 이들 인자들에 대한 영향을 분자세포수준에서 확인하기 위하여 주요 면역조절인자인 NO (nitric oxide) (Fig 37, A) 및 iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), IL-1beta, TNF-alpha, IL-6 등에 대한 발현 정도를 평가하기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

[0045] **실험예 1 : 대식세포 내 NO 생성 억제 효능**

[0046] 대식세포(macrophage)는 조직에서 볼 수 있는 단핵식세포로 골수의 조혈성 간세포에서 형성된다. 단핵구아세포 및 전단구기를 거쳐서 단구기를 지난 후, 혈액내로 들어가서 약 40시간 순환한다. 그 후에 조직에 들어가서 크기, 식세포활성 및 lysosome 효소량이 증가하여 대식세포가 된다. 대식세포는 세포표면에 Ig 항원을 가지고 있어 이물 배제기능이 있으며, 또 항원을 포착하고 이것을 처리한 후 T-림프구에 넘기는 작용이 있어 항원제공세포 (antigen presenting cell; APC)라고도 한다.

[0047] 대식세포의 기능에는 비특이적 식작용 및 세포흡수작용, Fc 수용체 및 보체수용체에 의해서 중개되는 옵소닌 작용을 받은 미생물에 대한 특이적 식작용, 섭취된 미생물의 살해, T 및 B 림프구에 대한 항원의 출현, 라이소자임, ㅋ콜라게나아제, 엘라스타아제, 산 하이드롤라아제 등의 많은 효소, 몇 개의 보체성분 및 응고인자, 프로스타글란딘, 류코트리엔 및 몇 개의 조절분자 (interferon, interleukin-1)를 포함한 여러 가지 산물의 분비 등이 있다. 또 대식세포는 iNOS 및 다양한 사이토카인과 매개하여 면역활성에 관여하며, 림포카인의 일종인 인터페론(대식세포 활성화인자)에 의해 활성화된다.

[0048] 산화질소(NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈소판 응집억제, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NO를 생성하는 효소인 NO 신타아제(NOS)는 아르기닌의 구아니디노 질소를 산화시켜 시트룰린과 NO를 생성하게 된다. NOS는 내피(ecNOS, type III NOS), 신경 NOS (ncNOS, type I NOS) 및 유도성 NOS (iNOS, type II)로 크게 나뉘는데, ecNOS와 ncNOS가 구조 형태(constitutive form)로 적은 기저 생성률을 가지고 있고, 칼슘/칼모둘린에 의존적이다. 반면에 iNOS는 유도성 형태로 자극에 의해 많은 양의 NO를 생성하고, 칼슘에 비의존적이다. iNOS는 대식세포 외에도 췌장베타세포, 내피세포, 혈관평활근세로, 메산기움 세포(mesangial cell) 등에도 분포하고 있다. iNOS는 평상시 세포에서는 활성 및 발현이 거의 없으나, LPS, IFN-r, IL-1과 TNF-a등의 자극에 의해 활성화되어 장시간동안 다량의 NO를 생성하여 병원균을 죽이거나 세포 독성을 나타낼 수 있다. 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면 쇼크에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.

[0049] 본 실험예에서는 염증 매개 인자로써 중요한 역할을 하는 NO에 대한 억제 효능을 확인하기 위하여, LPS로 염증반응이 유도된 RAW 264.7 대식세포에 농도별로 전복 내장 가수분해물을 처리하여 NO 생성능을 측정함으로써 염증반응 억제 효과를 판단할 수 있었다.

[0050] 도 3에 나타낸 바와 같이, AIGID III는 농도 의존적으로 NO의 생성을 억제하는 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

[0051] **실험예 2 : 전복 내장 가수분해물 (AIGID III)에 대한 세포 생존율**

[0052] 본 실험예에서는 분자량별로 획분된 전복내장 가수분해물들 중 상기 실험예 1에서 NO 생성저해능이 가장 뛰어난 AIGID III 처리 후 면역세포 (macrophage RAW 264.7)에 대한 시료의 세포독성을 확인한 결과, 무처리 군의 세포생존률 (blank: 100% cell viability)과 거의 비슷한 값을 보였다.

[0053] 또한 해당 시료는 정상세포 (human fibroblast MRC-5)와 암세포 (Human promyelocytic leukemia cells HL60)의 성장률에 대해서도 유의적 영향을 나타내지 않았음을 확인하였다(도 4 참조).

[0054] **실험예 3 : 대식세포 내 주요 염증관련 인자에 대한 억제효능**

[0055] 본 실험예에서는 전복 내장 가수분해물에 대한 주요 면역조절인자에 대한 영향을 분자수준에서 상세히 검토하기 위해 세포 내 발현량을 RT-PCR로 분석한 결과, iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX-2 (cyclooxygenase-2), IL-1beta, TNF-alpha, IL-6 에 대한 발현을 유의적으로 억제함으로써 뛰어난 면역활성 효능을 가지는 것으로 나타났다(도 5 참조).

[0056] 시클로옥시게나아제(Cyclooxygenase; COX)는 시클로옥시게나아제와 퍼옥시다아제 활성을 모두 가지고 있는 효소이다. 시클로옥시게나아제 기능으로서 아라키돈산을 프로스타글란딘(PEG 2)으로 변환하고, 퍼옥시다아제 기능으로서는 엔도퍼옥시다아제를 프로스타글란딘으로 변환시키며, 프로스타글란딘은 프로스타글란딘, ㅌ트트롬복산, 그리고 프로스타시클린의 전구체로 사용된다. COX는 COX-1 과 COX-2 로 2 가지 아형이 존재하며, COX-1은 모든

세포에 존재하며, 정상 세포의 항상성을 유지하는데 관여한다. 반면, COX-2는 급성 염증반응에서 프로스타글란딘의 합성에 관여하며, 포볼 에스테르, LPS, 그리고 사이토카인에 의해 발현이 유도된다 . 그러므로 COX-2 는 비스테로이드성 항염 약물개발에 있어서 항염증 효과를 시험하는데 사용된다. 따라서 추출물의 COX 저해능력을 측정하여 추출물의 항염증 효과를 뒷받침 할 수 있다.

[0057] 면역 반응이 적절하게 일어나기 위하여는 여러 면역세포들의 직접적인 또는 간접적인 상호작용이 있어야 한다. 예를 들어, B 세포가 항체를 생산하는 데에는 T 세포의 작용을 받아야한다. 이때, B 세포 표면에 있는 MHC와 T 세포 표면에 있는 TCR 사이의 직접적인 결합이 중요하다는 것은 앞에서 설명하였다. 즉, 면역세포의 상호작용에는 한 세포 표면에 있는 수용체와 다른 세포 표면에 있는 수용체간의 직접적으로 결합을 통한 세포간의 연락(communication)이 중요한 수단이 되고 있다. 면역반응에서의 세포 상호 작용은 이와 같이 수용체간의 직접적인 접촉에 의하여 나타나기도 하지만, 종종 이러한 직접적인 상호작용과 더불어 세포가 분비해낸 단백질에 의하여 나타나는 경우도 많이 있다. 이들 단백질들은 어떤 세포에 의해 만들어져, 그 세포 밖으로 분비되며, 다시 자신이나 이웃한 세포 또는 먼 곳에 있는 세포에 작용한다. 이러한 단백질들은 작용한 세포의 증식과 분화를 유도하기도 하며, 기능과 활성의 변화를 유도할 수 있기 사이토카인은 여러 가지 면역세포들에 의하여 만들어지며, 여러 가지 면역세포의 활성화 (activation), 성장 (growth), 분화 (differentiation)등에 영향을 미칠 수 있다. 사이토카인 단백질들은 자연면역과 획득면역 반응에 관여할 뿐 아니라, 면역세포의 성숙과정에서도 중요한 작용을 나타낸다. 사이토카인 중에서 식균작용이 있는 단핵세포에 의해서 만들어지는 것을 모노카인이라고 부르기도 하며, 림프구가 만들어 다른 림프구의 작용을 조절하는 것을 림포카인 또는 인터류킨(IL)이라고 부르기도 한다. 또한, 골수의 전구세포로부터 각종 면역세포의 성숙을 조절하는 사이토카인들을 콜로니 자극 인자(CSF)라고 부르기도 한다. 때문에 일반적으로 사이토카인이라고 부른다.

[0058] 일반적으로 염증반응은 우리 몸의 여러 기능을 조절하며 최근에는 암, 당뇨 등 많은 질환에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 염증반응을 조절하는 중요한 인자는 사이토카인들로 알려져 있다.

[0059] 혈중 사이토카인의 증가는 염증성 손상에 일차적인 숙주의 반응이다. 사이토카인은 대식세포, 단핵구, 림파구, 내피세포로부터 유리되는 글리코펩타이드이다. 이들은 특정한 수용체에 결합하여 반응을 일으킨다. 이러한 사이토카인은 패혈증의 단계에 따라 증가하는 것으로 보인다. 그러나 일상적으로 임상적인 사용은 크지 않을 것으로 보인다. 왜냐하면 사이토카인은 수분 밖에 안 되는 짧은 반감기를 가지고 있고 수용체 길항제와 결합하여 빠르게 농도를 감소시킨다. 또한 수술이나 자가면역질환 같은 많은 비감염성 원인에 의해 유도 될수 있다. 종양괴사인자(TNF-a), IL-1, IL-6, IL-8, IL-10이 패혈증과 연관된 가장 중요한 사이토카인이다.

[0060] 이들 싸이토카인들은 여러 면역세포들에서 발현되며 우리 몸의 중요한 기능을 조절하는 중요한 단백질들이며 이들 중 IL-1은 가장 먼저 밝혀진 염증 싸이토카인으로 가장 중요한 염증조절 인자다. IL-1은 활성화된 단핵식균세포, 상피세포 (epithelial cells), 혈관내피세포 (endothelial cell)등에 의해 만들어져 염증반응을 매개하는 사이토카인이다. IL-1에는 IL-1a와 IL-1c 두 가지 형이 있는 데, 적은 양에서는 CD4 T 세포와 B 세포의 활성화하며, 염증세포를 자극할 수 있다. 그러나 IL-1이 과량 만들어지면 호르몬으로 작용하여 발열, 급성기반응(acute phases response)등이 나타난다. IL-1은 전구체 IL-1 상태로 세포 안에 저장되어 있다가 염증신호가 오면 잘려져서 활성을 갖는 IL-1으로 만들어진 후 세포 밖으로 나가 여러 기능을 조절한다. IL-1의 혈중 농도가 패혈성 쇼크에서 상승되어 있어 IL-1 농도 상승은 질병의 중증도와 비례관계가 성립되어있다. 동물실험에서 패혈증 쇼크에서의 IL-1의 중심적 역할을 직접 증명하였다.

[0061] IL-6는 주로 대식세포나 T-임파구, 섬유모세포 등에서 분비되는 전구염증성 사이토카인으로 B-임파구에서 면역글로불린의 생성을 유도하고, T-임파구의 증식과 세포독성 T-세포로 분화시키는 역할을 한다. 뿐만 아니라 감염에 대한 급성 반응에 관여하는 주된 사이토카인 중 한 가지이다. 감염 및 전신적 염증과 관련된 생리학적 반응의 심한 정도와 밀접하게 관련되어있는 IL-6는 패혈증 환자에서 1000배 이상 증가된다.

[0062] TNF-a는 그람음성세균 감염에 의해서 만들어지는 데, 세균의 세포막에 있는 내독소 (bacterial endotoxin)인 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 활성화된 림프구에 의해서 만들어진다. LPS의 양이 적은 경우는 TNF-a가 적은 양 생성되어, 백혈구나 혈관세포에 작용하여 국소적인 염증반응이 나타나 항원이 제거된다. 그러나 패혈증(septicemia)과 같이 LPS가 다량 존재하게 되면 TNF-a가 너무 많이 만들어져 조직의 손상이나 전신혈관응고(DIC, systemic Shwartzman reaction)와 같은 심각한 결과를 초래할 수 있다. 심한 경우는 내독소 쇼크(endotoxin shock)로 사망에까지 이를 수도 있다. 또한, 과량의 TNF-a는 endocrine hormone의 작용을 나타내어, 체온 상승 (endogenous pyrogen)을 유발할 수 있으며, 간세포 (hepatocyte)에 작용하여 급성기반응단백질(acute phase reactant protein)들을 혈액 내로 만들게 한다. 낮은 양의 TNF-a는 염증반응에서 백혈구들이 혈

관내피세포에 부착하는 것을 촉진하며, 염증세포들의 미생물 살해능력을 증가시키며, 단핵 포식세포에 작용하여 여러 가지 염증반응에 관여하는 사이토카인을 생산하게 만들어 염증반응을 촉진한다. 또한 T 와 B 세포의 활성화에 공동 자극제로 작용하기도 한다. TNF-a는 또한 CSF의 합성을 유도할 수도 있으며, I 군 MHC의 발현을 증가시키기도 한다. TNF-a는 또한 종양세포에 작용하여 세포자살 (apoptosis)를 유도하기도 한다.

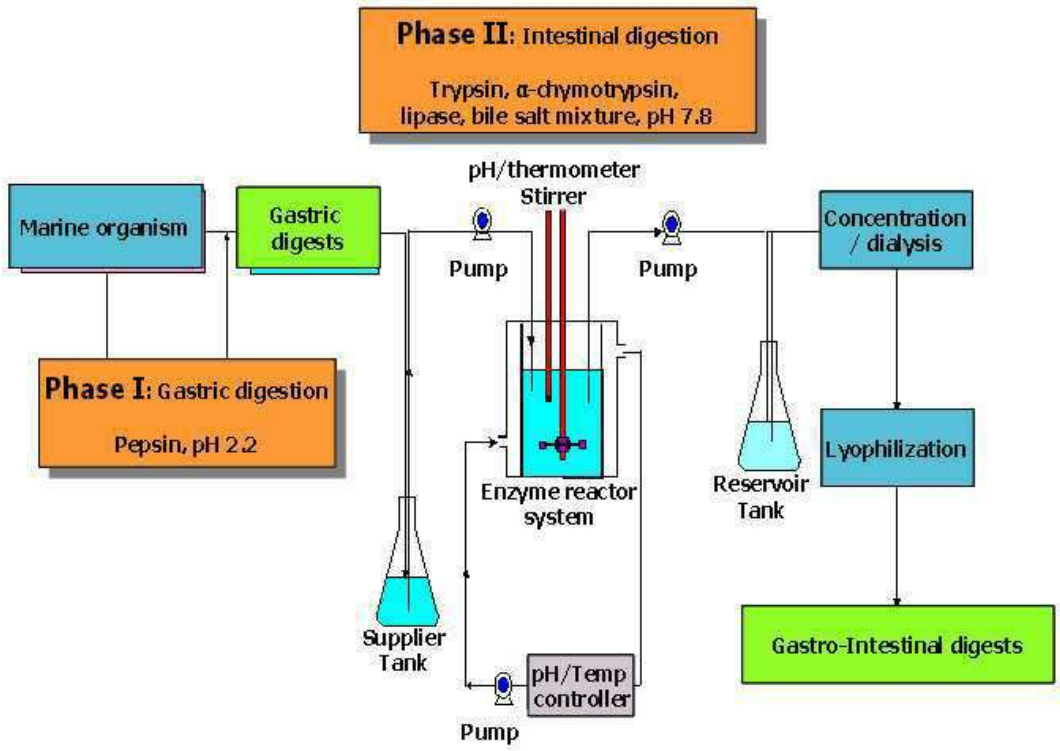
[0063] 또한 염증 관련 세포 (RAW 264.7)를 대상으로 실시한 핵 전사인자인 NF-B의 핵 내로의 전이 및 활성에 대한 전복 내장 가수분해물의 영향을 관찰하였다. 그림 6과 같이 AIGID III은 염증 관련 분자들의 발현 억제를 핵전사인자의 조절 수준을 통하여 억제됨을 알 수 있었다.

[0064] NF-κB(Nuclear factor-κB)는 전사인자의 Rel 패밀리에 속하는 헤테로다이머 단백질로 NF-κB는 정상적으로 세포질에 IBs라는 억제 단백질과 결합되어 불활성상태로 존재한다. NF-κB 활성을 유도한다고 알려진 TNF-a, IL-1, 미토겐, LPS 및 바이러스 감염 등 여러 자극에 의하여 IBs가 인산화 되면 NF-κB가 IBs로 부터 떨어져 나와 핵으로 이동한다. 핵으로 이동한 NF-κB는 주로 염증 및 면역반응에 관여하는 여러가지 유전자의 프로모터 부위에 결합하여 이들 유전자를 발현시키는데, NF-κB에 의해 조절되는 염증 및 면역반응 조절물질에는 인터류킨(IL)-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, 종양 괴사 인자(TNF)-a, 인터페론-γ, 과립성 대식세포-콜로니 자극 인자(granular macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF), I 및 II 군 MHC, 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 그리고 여러가지 부착 분자(adhesion molecules) 등 매우 다양하다.

[0065] NF-κB는 염증에 관여하는 전염증성 사이토카인 및 부차분자의 유전자를 발현시키기 때문에 초기 염증 반응 조절에 중요한 전사인자로 알려져 있다. 아울러 NF-κB는 패혈증의 시작과 진행과정에도 염증관련 분자의 발현을 조절하는 역할을 하는 것으로 밝혀져 있어, 염증반응에 의한 다양한 질환의 치료의 표적 물질로써 NF-B는 그 중요성이 강조되고 있다.

도면

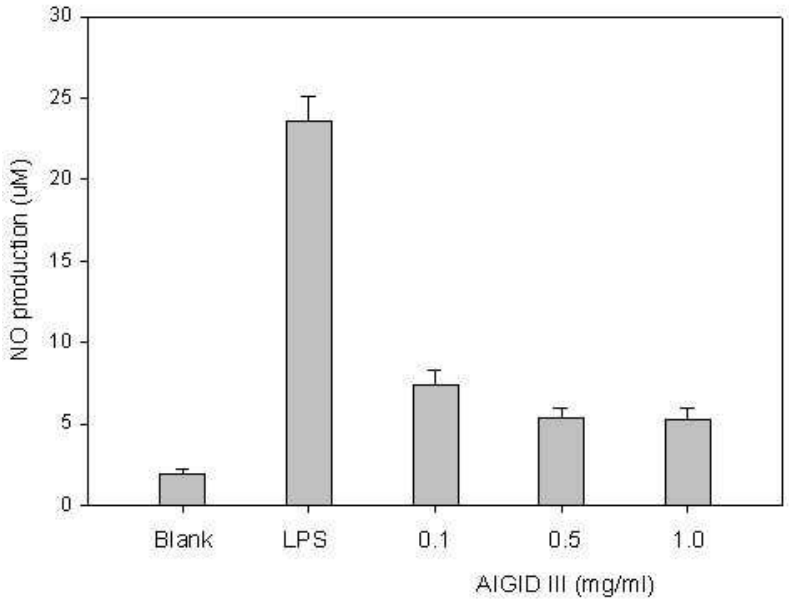
도면1



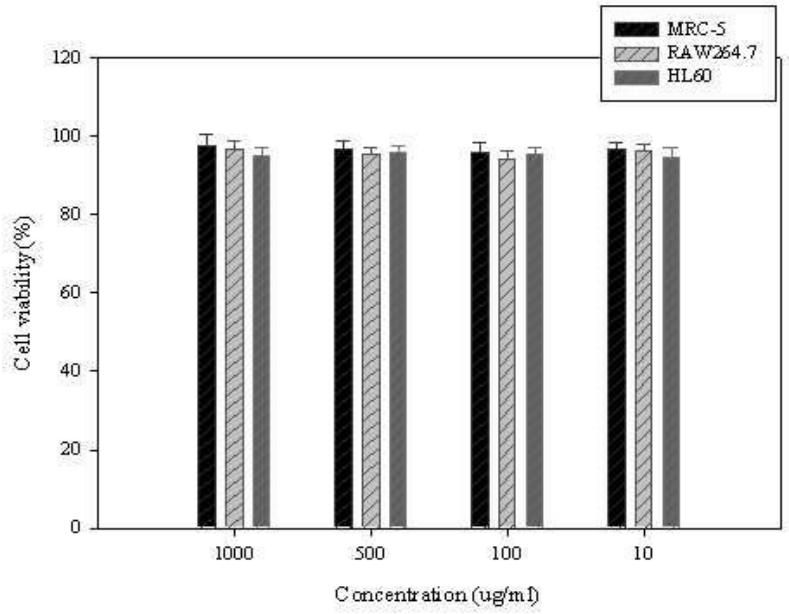
도면2



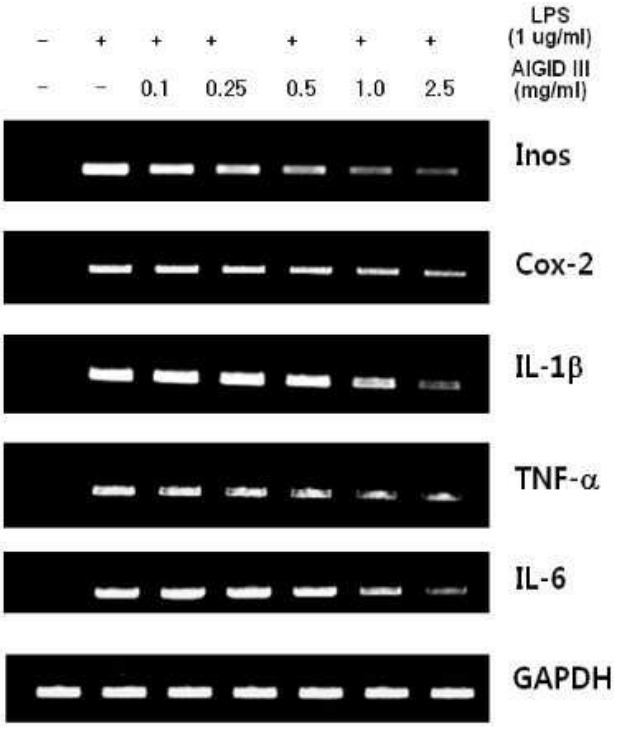
도면3


30
25
20
15
10
5
0
NO production (uM)
Blank
LPS
0.1
0.5
1.0
AIGID III (mg/ml)

도면4


MRC-5
RAW264.7
HL60
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
1000
500
100
10
Concentration (ug/ml)

도면5


LPS
(1 ug/ml)
AIGID III
(mg/ml)
- + + + + + +
- - 0.1 0.25 0.5 1.0 2.5
Inos
Cox-2
IL-1β
TNF-α
IL-6
GAPDH

도면6

