



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0130622
(43) 공개일자 2015년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/899 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)

A61K 36/06 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0057238

(22) 출원일자 2014년05월13일

심사청구일자 2014년05월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

전태훈

서울특별시 송파구 양재대로 1218 올림픽선수촌아파트 236동 1802호

한영숙

서울 강남구 삼성로64길 5, 105동 406호 (대치동, 대치현대아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

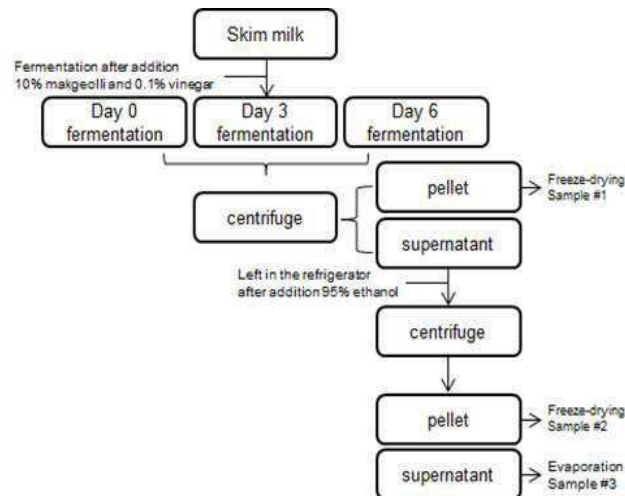
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 발효유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 발효유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 발효유 추출물은 세포 독성이 없으며, 면역세포인 T 세포와 대식세포에서 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킴으로서 면역작용을 억제하고, 염증성 장 질환 동물모델에서 대장 내의 염증을 완화시키는 우수한 효과를 가지고 있어, 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

임지영

서울특별시 마포구 성암로 91 현대아파트 101동
1602호

오세욱

경기도 성남시 분당구 내정로 152 파크타운롯데아
파트 128동 504호

선유정

인천광역시 부평구 부평문화로 37 동아1단지아파트
6동 1206호

최상필

서울특별시 동대문구 무학로44길 16, 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 911041-1

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물식품기술기획평가원

연구사업명 한식세계화응용연구사업

연구과제명 전통발효유 타락의 in vivo 건강기능성 규명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.12.30 ~ 2012.12.29

명세서

청구범위

청구항 1

발효유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 발효유는 막걸리를 종균으로 사용하여 젖산 발효시킨 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 추출된 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염증성 질환은 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 궤장염, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게닉 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 거대 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염, 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease), 출혈성 관절증(hemarthrosis), 헤노흐-셴라인자반병, 중심성 세망조직구증, 혈액소변증, 가족성 지중해열, 베체트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia) 및 염증성 피부질환으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 염증성 장 질환은 크론병(Chron's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병(intestinal Bechet's disease), 출혈성 직장 궤양, 회장 낭염 및 허혈성 장염으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

발효유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 발효유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증 반응은 병원체에 의한 감염이나 조직의 손상과 같은 다양한 요인에 의해 일어나는 생체 방어 반응으로, 감염 부위나 손상 부위에만 피해를 국한시키기 위한 초기 보호 작용을 수행한다. 대부분의 경우, 이러한 염증 반응은 내재 면역의 구성 요소를 이용한 병원성 요인의 제거 및 특이적 적응 면역의 유도 등으로 이어진다 (Hawiger J., Innate Immunity and Inflammation: A Transcriptional Paradigm. Immunologic Research. 23, pp.99-109, 2001). 염증에 수반되는 특징으로 알려진 발적, 부종, 열, 통증 등은 염증 부위에서의 염증 매개체와 사이토카인 등의 작용에 의한 혈관의 확장에 따른 국소혈류의 증가 및 국소혈류속도의 감소, 혈관의 투과성 증가에 따른 혈장성분의 혈관 외 유출 증가, 혈관내피세포의 순환면역세포에 대한 부착성 증가에 따른 면역세포의 혈관 외 유출 증가 및 화학주성에 의한 감염 부위로의 이동 증가와 같은 연속적인 면역 반응들의 결과이다 (Gallo RL, Murakami M, Takaaki O, Zaiou M., Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. J. Allergy. Clin. Immunol. 110, pp.823-831. 2002; Graeme B. Ryan, MB, and Guido M., Acute Inflammation. American Journal of Pathology. 86(1), pp.185-274, 1977). 조직 손상에 대한 반응으로서 일부 세포에서 생성되는 히스타민, 그리고 혈액 내에서 비활성화 상태로 존재하다가 조직 손상에 의해 활성화되는 저분자 펩티드성 키닌도 염증 관련 혈관 확장과 혈관의 투과성 증가에 기여한다 (Yamaki K, Thorlacius H, Xie X, Lindbom L, Hedqvist P, Raud J., Characteristics of histamineinduced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. British J.Pharmacol. 123, pp.390-399, 1998; Brocklehurst WE, Role of Kinins and Prostaglandins in Inflammation. Proc. Roy. Soc. Med. 64, pp.4-6, 1971).

[0003] 감염 부위에서의 염증 반응은 병원체에 대한 대식세포의 반응에 의해 개시된다. 병원체에 의해 활성화된 대식세포가 생성하는 반응성 활성산소종 및 활성질소종(예를 들어 NO), 프로스타글란딘, fb 코트리엔 등과 같은 염증 매개체, 그리고 TNF- α , IL-6 및 IL-8 등과 같은 염증유발성 사이토카인 등이 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Renauld JC, New insights into the role of cytokines in asthma. J. Clin. Pathol. 54, pp.577-589, 2001; Blake GJ, Ridker PM, Tumour necrosis factor- α , inflammatory biomarkers, and atherogenesis. Eur. Heart J. 23, pp.345347, 2002).

[0004] 염증성 장 질환(Inflammatory Bowel Disease, IBD)은 장에 만성적인 원인 불명의 염증을 일으키는 질환으로 궤양성 대장염과 크론병을 포함한다. 염증성 장 질환의 발생 원인이나 병태생리에 대해서는 아직까지도 명확히 알려져 있지 않지만, 유전적 요인, 장내 세균이나 음식물 등의 환경적 요인, 면역학적 요인 등이 복합적으로 발생 기전에 관여하리라 추정되고 있다.

[0005] 최근 여러 다양한 실험동물 모델의 개발, 새로운 연구 기술의 발전에 힘입어 유전적, 환경적 인자와 면역학적 이상이 염증성 장 질환에 복합적으로 작용한다는 가설이 받아들여지고 있다(Fiocchi C. Gastroenterology. 115:182, 1998). IBD 동물모델 확립 방법에는 여러 가지가 있으나, DSS(dextran sulfate sodium)로 궤양성 대장염을 유발한 동물모델이 유효 성분에 대한 치료 효과를 연구하는데 있어서 가장 좋은 모델이라고 보고되고 있다(Elson CO et al. Gastroenterology. 109:1344, 1995).

[0006] 한편, 타락은 한국의 전통 발효유로서 우유에 막걸리를 종균으로 하여 젖산발효 시킨 고유한 발효유를 말한다 (Lee YD et al. Korean J Food & Nutr 23:664, 2010). 발효유는 우유 성분 이외에 유산균에 의해 생성된 유기산, 아미노산, 펩티드 등이 포함되어 있어 식품으로서의 영양적 가치가 있을 뿐만 아니라(Gilliland SE. FEMS Microbiol Rev. 7:175, 1990), 장내에 존재하는 유해 세균의 성장 억제 및 이로운 세균의 성장 증진(Adolfsson O et al. Am J Clin Nutr. 80:245, 2004), 콜레스테롤의 저하 등 성인병의 예방과 건강증진에 우수한 기능이 있는 것으로 보고되고 있다(Rim KH et al. Kor J Env Hlth Soc. 19: 77, 1993). 그러나 현재까지 발효유의 염증성 질환, 특히 염증성 장 질환에 대한 치료 효과에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

[0007] 이에 본 발명자들은 생체 독성이 없고 염증성 질환에 대한 치료 효과가 우수한 새로운 약물을 개발하기 위해 연구를 수행한 결과, 발효유 추출물이 면역 세포에서 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고, 특히 염증성 장 질환 동물모델에서 대장 내의 염증을 완화시키는 우수한 치료 효과를 가지고 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 발효유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 발효유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 발효유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 발효유 추출물은 세포 독성이 없으며, 면역세포인 T 세포와 대식세포에서 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킴으로써 면역작용을 억제하고, 염증성 장 질환 동물모델에서 대장 내의 염증을 완화시키는 우수한 효과를 가지고 있어, 염증성 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따른 발효유 추출물의 수득 과정을 나타낸 도이다.
 도 2는 본 발명에 따른 발효유 추출물이 면역세포의 세포 생존도에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
 도 3은 본 발명에 따른 발효유 추출물이 면역세포의 세포 증식능에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
 도 4는 본 발명에 따른 발효유 추출물이 면역세포에서 염증성 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
 도 5는 본 발명에 따른 발효유 추출물이 염증성 장 질환 동물모델에서 체중 변화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
 도 6은 본 발명에 따른 발효유 추출물이 염증성 장 질환 동물모델에서 대장 조직의 손상에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
 도 7은 본 발명에 따른 발효유 추출물이 염증성 장 질환 동물모델의 MLNs에서 염증성 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 발효유 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
 [0014] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물을 포함한다.
 [0015] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
 [0016] 본 발명에서 “발효유”는 유원료를 막걸리를 종균으로 사용하여 젖산 발효시킨 것으로, 타락이라고도 한다. 상기 유원료는 우유, 염소유, 낙타유, 양유, 마유 또는 산양유를 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 상기 우유는 탈지유 또는 부분탈지유를 포함하며, 이에 제한되지 않는다.
 [0017] 본 발명에서 “추출물”은 적절한 용매를 이용하여 발효유로부터 추출한 것이며, 예를 들어 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 또한, 상기 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 회석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
 [0018] 본 발명에서 유효성분인 발효유 추출물은 하기와 같이 수득될 수 있다.
 [0019] 먼저, 탈지유에 막걸리와 식초를 첨가하여 발효시킨다. 이 때, 발효는 3일 이상 수행되는 것이 바람직하다. 상기 발효유를 원심분리하여 침전물을 동결건조 한 후, 적당한 양의 용매를 첨가하여 완전히 침지되도록 한다. 추

출 용매로는 당업계에서 일반적으로 사용하는 무기 또는 유기용매를 제한없이 사용할 수 있으며, 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로부터 선택된 용매가 바람직하다. 추출은 바람직하게는 2 내지 10℃에서 12 시간 내지 48시간 동안 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 추출물을 다시 원심분리하여 상등액을 분리하고, 이를 증발시킨 후 최종 발효유 추출물을 수득한다.

[0020] 본 발명에서 “염증성 질환”이란 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 췌장염, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 거대 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염, 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease), 출혈성 관절증(hemarthrosis), 헤노흐-헨라인자반병, 중심성 세망조직구종, 혈액소병증, 베체트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐형성장애(broncho-pulmonary dysplasia) 또는 염증성 피부질환을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명에서 “염증성 장 질환”이란 크론병(Chron's disease), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 장형 베체트병(intestinal Bechet's disease), 출혈성 직장 궤양, 회장 낭염 또는 허혈성 장염을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명에 따른 발효유 추출물은 세포 독성이 없으며, 면역세포인 T 세포와 대식세포에서 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킴으로서 면역작용을 억제하고, 염증성 장 질환 동물모델에서 대장 내의 염증을 완화시키는 우수한 효과를 가지고 있다.

[0023] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 발효유 추출물은 염증성 질환, 특히 염증성 장 질환에 대한 치료 효과가 우수하므로, 이와 관련된 의약품 또는 건강기능식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 조성물은 발효유 추출물과 함께 염증성 질환의 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다.

[0025] 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. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 약학적 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, 메틸 히드록시 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. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

- [0028] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 발효유 추출물은 1일 0.1 내지 10000 mg/kg(체중)의 양으로 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물은 개체에게 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 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 발효유 추출물은 염증성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다.
- [0032] 본 발명에서, "건강기능식품"이란 질병의 예방 및 치료, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.
- [0033] 본 발명의 발효유 추출물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 발효유 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 발효유 추출물은 원료에 대하여 15 중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물이 포함될 수 있는 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 혼합 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0035] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.
- [0036] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0037] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0038] **실시예 1: 발효유 추출물의 수득**
- [0039] 탈지유에 10% 막걸리와 0.1% 식초를 첨가한 후, 0일, 3일, 6일간 발효하였다. 상기 각 발효물을 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리한 후, 침전물을 동결건조한 것을 1번 샘플로 하였다. 상기 분리된 상등액에 95% 에탄올을 첨가하고 4℃에서 24시간 방치한 후 다시 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하였다. 상기 침전물을 동결 건조하여 수득된 것을 2번 샘플로 하였으며, 상등액을 증발시킨 후 남은 것을 3번 샘플로 하였다. 이하 실험예

에서는 3번 샘플을 이용하였으며, 구체적인 수득 과정을 도 1에 나타내었다.

[0040] **실험예 1: 발효유 추출물 처리에 의한 면역세포의 세포 생존도 측정**

[0041] 상기 실시예 1에서 수득한 발효유 추출물 처리가 면역세포의 세포 생존도(cell viability)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0042] 먼저, 생쥐 T 림프구인 RMA 세포주 또는 생쥐 대식세포주인 J774 세포주를 6 웰 플레이트에 5×10^5 /well의 농도로 분주하였다. RMA 세포주는 10% 우태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 25mM HEPES를 함유한 RPMI-1640(invitrogen) 배지에서 배양하였고, J774 세포주는 10% 우태아 혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 DMEM(invitrogen) 배지에서 배양하였다. 상기 실시예 1에서 수득한 발효유 추출물을 10% DMSO(sigma)를 포함한 PBS에 녹인 후, 총 배양액 부피의 1/100을 취하여, 최종 농도가 0.1% DMSO로 1000 ug/ml, 500 ug/ml 또는 200 ug/ml의 농도가 되도록 각 세포에 처리하였다. 24시간 후에 세포 생존도를 유세포 분석기(flow cytometry)를 이용하여 측정하였다. 이 때 PI(Propidium Iodide)low 세포를 생존한 것으로 간주하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0043] 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 발효유 추출물은 RMA 세포주와 J774 세포주의 생존도에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[0044] **실험예 2: 발효유 추출물 처리에 의한 면역세포의 세포 증식능 측정**

[0045] 상기 실시예 1에서 수득한 발효유 추출물 처리가 면역세포의 세포 증식(cell proliferation)에 미치는 영향을 측정하기 위하여 WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] 어색이를 수행하였다.

[0046] 먼저, 생쥐 T 림프구인 RMA 세포주 또는 생쥐 대식세포주인 J774 세포주를 96 웰 플레이트에 5×10^4 /well의 농도로 분주하였다. 상기 실험예 1과 동일한 세포 배양 배지 조성을 이용하였으며, 세포 활성화를 위하여 RMA 세포주는 PMA를 10 ng/ml, 이오노마이신(ionomycin)을 1 ug/ml의 농도로 처리하였고, J774 세포주는 LPS를 1 ug/ml의 농도로 처리하였다. 상기 실시예 1에서 수득한 발효유 추출물을 10% DMSO(sigma)를 포함한 PBS에 녹인 후, 총 배양액 부피의 1/100을 취하여, 최종 농도가 0.1% DMSO로 1000 ug/ml, 500 ug/ml 또는 200 ug/ml의 농도가 되도록 각 세포에 처리하였다. 48시간 후 EZ-CYTOX WST 키트를 이용하여 세포 증식능을 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0047] 도 3에 나타낸 바와 같이, 발효 6일차의 발효유 추출물은 RMA 세포주와 J774 세포주에서 모두 세포 증식 능력을 감소시킴을 확인하였다.

[0048] **실험예 3: 발효유 추출물 처리에 의한 면역세포의 염증성 사이토카인 전사 억제 측정**

[0049] 상기 실시예 1에서 수득한 발효유 추출물 처리가 면역세포의 염증성 사이토카인 분비에 미치는 영향을 측정하기 위하여 역전사 연쇄증합반응(RT-PCR)을 수행하였다.

[0050] 먼저, 생쥐 T 림프구인 RMA 세포주 또는 생쥐 대식세포주인 J774 세포주를 6 웰 플레이트에 5×10^5 /well의 농도로 분주하였다. 상기 실험예 1과 동일한 세포 배양 배지 조성을 이용하였으며, 세포 활성화를 위하여 RMA 세포주는 PMA를 10 ng/ml, 이오노마이신(ionomycin)을 1 ug/ml의 농도로 처리하였고, J774 세포주는 LPS를 1 ug/ml의 농도로 처리하였다. 상기 실시예 1에서 수득한 발효유 추출물을 10% DMSO(sigma)를 포함한 PBS에 녹인 후, 총 배양액 부피의 1/100을 취하여, 최종 농도가 0.1% DMSO로 1000 ug/ml, 500 ug/ml 또는 200 ug/ml의 농도가 되도록 각 세포에 처리하였다. 48시간 후 각 세포에 트리졸(Trizol, invitrogen) 1ml당 클로로포름(Chloroform, sigma) 200ul를 넣고 전체 RNA를 분리하였다. 추출한 mRNA(1ug)를 주형으로 RT-PCR을 수행하여 cDNA를 복제하였다. 상기 cDNA를 주형으로 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 연쇄증합반응(PCR)을 수행하였다. 수득된 PCR 산물을 EtBr(sigma)이 함유된 2% 아가로스 겔(invitrogen)에 로딩한 후, UV하에서 분석하였다. 이 때 역전사 효소는 Superscript III(invitrogen)을 사용하였으며, 증합효소는 Tag polymerase(gene craft)를 사용하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

표 1

[0051]

Primer sequences	product size (bp)	GeneBank Access number
mIL1 β F: 5' -CCAGGATGAGGACATGAGCACC -3' R: 5' -ATCCACACTCTCCAGCTGCAGG -3'	358	NM_008361
mIL2 F: 5' -TGGAGCAGCTGTTGATGGACCTAC -3' R: 5' -CACCACAGTTGCTGACTCATCATCG -3'	308	NM_008366
mIL6 F: 5' -ACCGCTATGAAGTTCTCTCTGC -3' R: 5' -TAGCCACTCCTTCTGTGACTCCA -3'	561	NM_031168
mIL12 β F: 5' -CTGCCACAAAGGAGGCGAGACTC -3' R: 5' -CATATTTATTCTGCTGCCGTGCTTC -3'	389	NM_008352
mIFN γ F: 5' -CTGAGACAATGAACGCTACACACTGC -3' R: 5' -AACAGCTGGTGGACCACTCGGAT -3'	433	NM_008337
mINOS F: 5' -CAAGTACGAGTGGTCCAGGAGC -3' R: 5' -CTGTGTGGTGGTCCATGATGGTC -3'	314	NM_010927
mTNF α F: 5' -GACGTGGAAGTGGCAGAAGAGG -3' R: 5' -TGACGCGCAGAGAGGAGTTGAC -3'	502	NM_013693
mGAPDH F: 5' -ATGACCACAGTCCATGCCATC -3' R: 5' -CCTGCTTCACCACCTTCTTG -3'	271	NM_008084
m, mouse; F, forward (sense) primer; R, reverse (antisense) primer		

[0052]

도 4에 나타난 바와 같이, J774 세포주에서 발효 6일차의 발효유 추출물 처리에 의해 IL-12 β , INOS, IL-6 및 IL-1 β 등 염증성 사이토카인의 발현이 감소함을 확인하였다. 또한, RMA 세포주에서 발효 6일차의 발효유 추출물 처리에 의해 IL-2와 IFN- γ 등 염증성 사이토카인의 발현이 감소하였다.

[0053]

실험예 4: 염증성 장 질환 동물 모델을 이용한 발효유 추출물의 항염증 효과 검증

[0054]

4-1 : 실험동물 설계, 및 체중 및 대장 변화 측정

[0055]

20g 내외의 8주령 암컷 Balb/c 생쥐를 오리엔트 바이오(한국)에서 구입하였다. 실험 전 1주일 동안 12시간 마다 낮과 밤이 바뀌는 온도 22℃의 사육실에서 적응기간을 가졌으며, 하기 표 2의 실험설계대로 실험을 진행하였다.

표 2

[0056]

day	1 to 7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
procedure	pre-treatment	DSS treatment							observation						
	daily body weight														
															colon collection

[0057]

보다 구체적으로, 생쥐를 4개의 그룹으로 무작위로 나누어 7일 동안 시료를 경구 투여하였다. 첫 번째 그룹과 두 번째 그룹은 PBS를 투여하였고, 세 번째 그룹은 상기 실시예 1에서 수득한 발효 6일차의 발효유 추출물을 500 mg/kg의 농도로 투여하였으며, 네 번째 그룹은 양성 대조군으로 기준에 염증 치료제로 사용되는 설파살라진(sulfasalazine)을 100 mg/kg의 농도로 투여하였다. 7일 후부터 첫 번째 그룹은 물을 자유급수 하였고, 나머지

세 그룹은 4% DSS(Dextran sodium sulfate; 분자량 5000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)를 물에 섞어 일주일 동안 자유급수 하였다. 실험기간 동안 매일 체중 변화를 측정하였으며 DSS를 처리하는 일주일 기간에도 각 시료를 경구투여하였다. 이후 7일간 관찰기간을 거친 후 21일차에 생쥐를 희생시켜 대장 길이 및 무게를 측정하였다. 실험 기간 동안의 체중 변화를 도 5에 나타내었으며, 대장 길이 및 무게 측정 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

Group	Colon length (cm)	Colon weight (mg)
Untreated (n=2)	8.55±0.05	0.881±0.003
DSS (n=3)	6.50±0.29	0.744±0.046
DSS + SSZ (n=3)	7.73±0.15	0.823±0.029
6day#3 (n=3)	7.27±0.15	0.732±0.059
DSS, Dextran Sulfate Sodium; SSZ, Sulfasalazine; 6day#3, Fermented for 6days and fractionated#3		

도 5에 나타난 바와 같이, DSS만 처리하여 염증성 장 질환을 유도한 그룹에서는 지속적으로 체중이 감소하였으나, 발효 6일차의 발효유 추출물을 투여한 그룹에서는 DSS만 처리한 그룹에 비해 체중이 높게 측정되었다.

또한, 표 3에 나타난 바와 같이, DSS만 처리하여 염증성 장 질환을 유도한 그룹에서는 대장의 길이가 크게 감소하였으나, 발효 6일차의 발효유 추출물을 투여한 그룹에서는 DSS만 처리한 그룹에 비해 대장 길이의 감소 정도가 완화된 것을 확인하였다.

4-2 : 대장의 조직학적 검사

상기 실험에 4-1의 각 생쥐의 대장 말단 부분을 수득하여 조직학적 검사를 수행하였다. 각 시료를 10% 포르말린 용액에 고정한 후, 에탄올로 탈수한 후에 파라핀에 고정하였다. 4 micron-thick sections을 준비하고 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 모든 조직학적 평가는 블라인드 상태에서 validated scoring system으로 진행되었다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

도 6에 나타난 바와 같이, DSS만 처리하여 염증성 장 질환을 유도한 그룹에서는 대장에 심한 crypt loss가 나타났으며, 상피세포의 파괴와 염증성 세포 침입이 관찰되었다. 그러나 발효 6일차의 발효유 추출물을 투여한 그룹에서는 대장 조직의 손상 정도가 크게 완화된 것을 확인하였으며, 이를 통해 발효유 추출물이 염증성 장 질환에 대한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

4-3 : 염증성 사이토카인 발현확인

상기 실험에 4-1의 각 생쥐의 MLNs(mesenteric lymphnodes)에서 RNA를 추출하였다. MLN의 세포들을 단일 세포 수준으로 분리한 후 트리졸(Trizol, invitrogen) 1 ml당 클로로포름(Chloroform, sigma) 200 ul를 넣어 전체 RNA를 분리하였다. 추출한 mRNA(1 ug)를 주형으로 RT-PCR을 수행하여 cDNA를 복제하였다. 상기 cDNA를 주형으로 상기 표 1의 프라이머를 이용하여 연쇄중합반응(PCR)을 수행하였다. 수득된 PCR 산물을 EtBr(sigma)이 함유된 2% 아가로스 겔(invitrogen)에 로딩한 후, UV하에서 분석하였다. 이 때 역전사 효소는 Superscript III(invitrogen)을 사용하였으며, 중합효소는 Tag polymerase(gene craft)를 사용하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

도 7에 나타난 바와 같이, 발효 6일차의 발효유 추출물을 투여한 그룹에서는 DSS만 처리하여 염증성 장 질환을 유도한 그룹에 비해 염증성 사이토카인의 발현이 감소함을 확인하였다.

이상의 실험 결과를 통하여, 본 발명에 따른 발효유 추출물은 면역세포인 T 세포와 대식세포에서 염증성 사이토카인의 발현을 감소시킴으로서 면역작용을 억제하며, 염증성 장 질환 동물모델에서 우수한 치료 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

[0068] 이하 본 발명의 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0069] **제제예 1. 약학적 제제의 제조**

[0070] 1. 산제의 제조

[0071]	발효유 추출물	20 mg
[0072]	유당	100 mg
[0073]	탈크	10 mg

[0074] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0075] 2. 정제의 제조

[0076]	발효유 추출물	10 mg
[0077]	옥수수전분	100 mg
[0078]	유당	100 mg
[0079]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0080] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0081] 3. 캡슐제의 제조

[0082]	발효유 추출물	10 mg
[0083]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0084]	락토오스	14.8 mg
[0085]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

[0086] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0087] 4. 주사제의 제조

[0088]	발효유 추출물	10 mg
[0089]	만니톨	180 mg
[0090]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0091]	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	26 mg

[0092] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0093] 5. 액제의 제조

[0094]	발효유 추출물	20 mg
[0095]	이성화당	10 g
[0096]	만니톨	5 g
[0097]	정제수	적량

[0098] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0099] **제제예 2. 식품 제제의 제조**

[0100] 1. 건강식품의 제조

[0101]	발효유 추출물	100 mg
[0102]	비타민 혼합물	적량
[0103]	비타민 A 아세테이트	70 g
[0104]	비타민 E	1.0 mg
[0105]	비타민 B1	0.13 mg
[0106]	비타민 B2	0.15 mg
[0107]	비타민 B6	0.5 mg
[0108]	비타민 B12	0.2 g
[0109]	비타민 C	10 mg
[0110]	비오틴	10 g
[0111]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0112]	엽산	50 g
[0113]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0114]	무기질 혼합물	적량
[0115]	황산제1철	1.75 mg
[0116]	산화아연	0.82 mg
[0117]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0118]	제1인산칼륨	15 mg
[0119]	제2인산칼슘	55 mg
[0120]	구연산칼륨	90 mg
[0121]	탄산칼슘	100 mg
[0122]	염화마그네슘	24.8 mg

[0123] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0124] 2. 건강음료의 제조

[0125]	발효유 추출물	100 mg
[0126]	비타민 C	15 g
[0127]	비타민 E(분말)	100 g
[0128]	젖산철	19.75 g

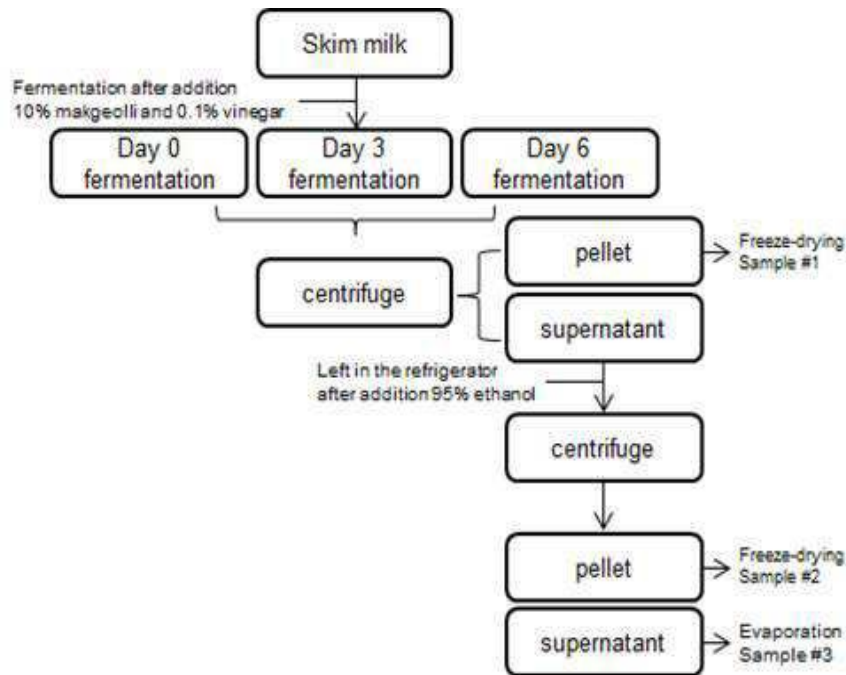
[0129]	산화아연	3.5 g
[0130]	니코틴산아미드	3.5 g
[0131]	비타민 A	0.2 g
[0132]	비타민 B1	0.25 g
[0133]	비타민 B2	0.3 g
[0134]	물	정량

[0135] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

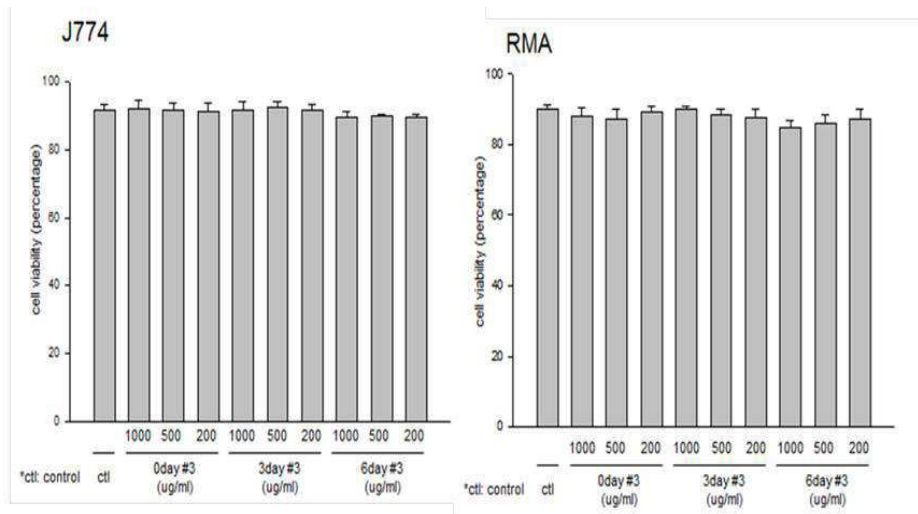
[0136] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

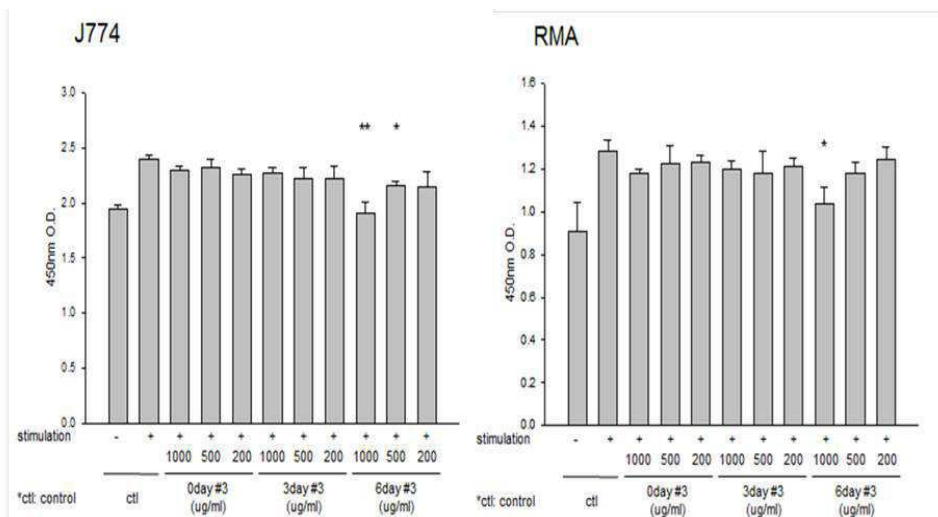
도면1



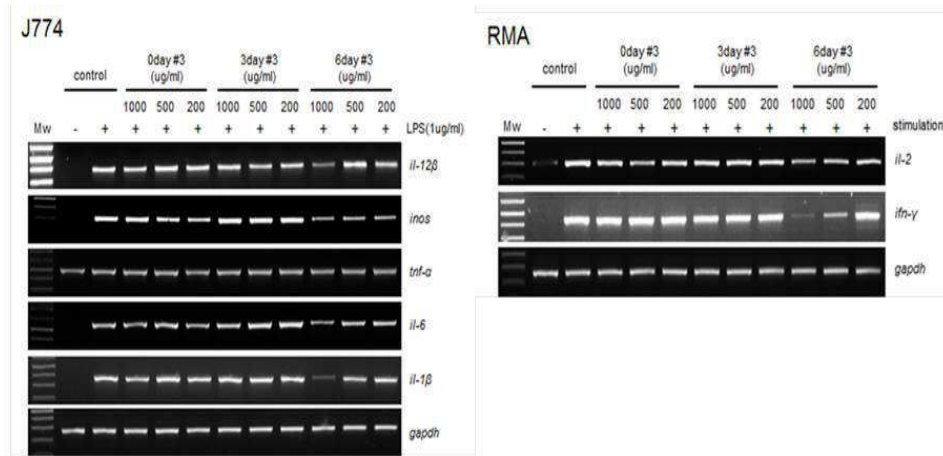
도면2



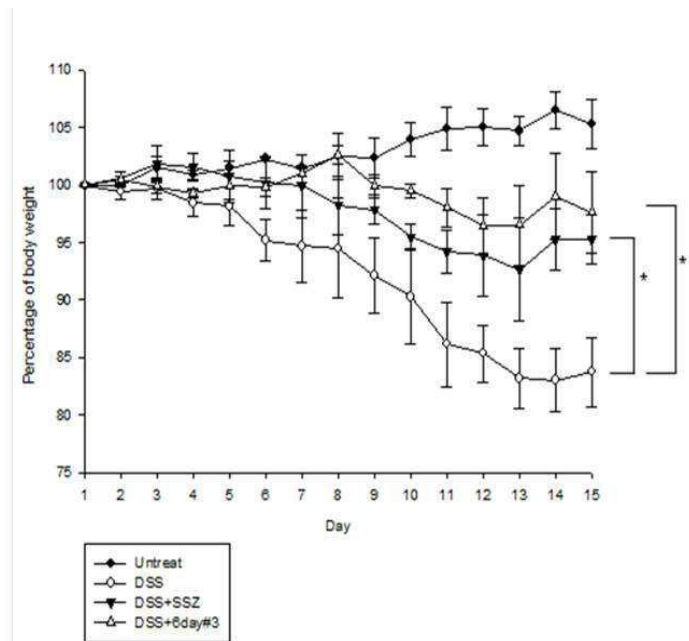
도면3



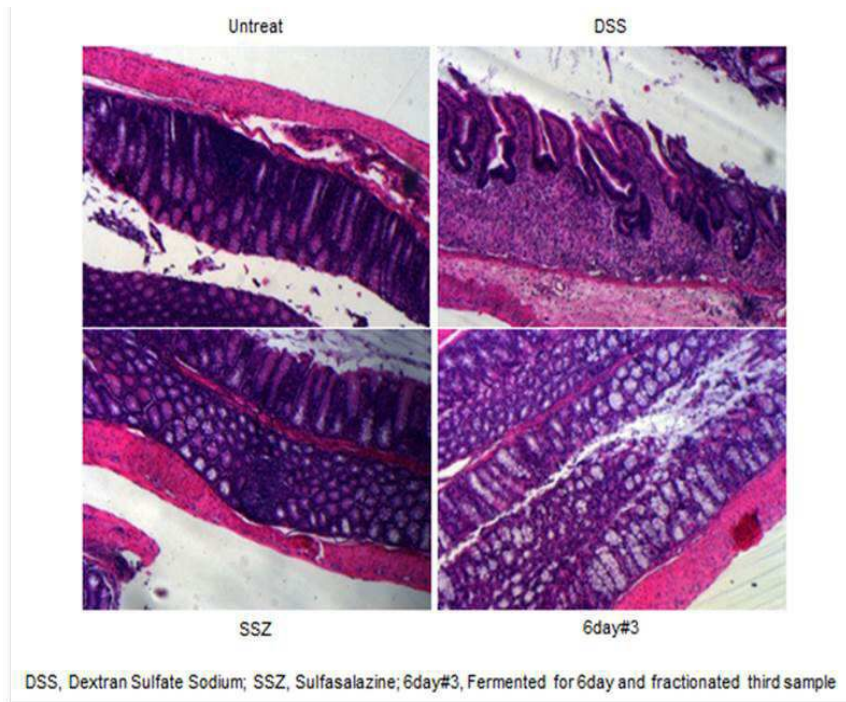
도면4



도면5



도면6



도면7

