



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0125941
(43) 공개일자 2022년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/899 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 31/352 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/899 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0029862

(22) 출원일자 2021년03월08일

심사청구일자 2021년03월08일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

양선아

경상북도 칠곡군 왜관읍 아곡5길 79, 동호빌리지 A동

이재열

대구광역시 남구 자유5길 72(대명동)

박세호

대구광역시 달서구 장산남로 33, 103동 1003호(용산동, 용산롯데캐슬그랜드)

(74) 대리인

특허법인태백

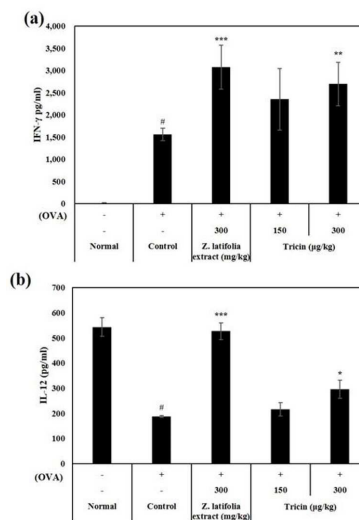
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 조성물을 제공하는 기술로, 상기 고장초 추출물 또는 트리신은 세포독성 없이 cAMP와 PMA 처리된 T 세포에서 T_H1 사이토카인인 IFN- γ 및 IL-12 생성을 증가시켰으며, 오브알부민 (OVA)로 감작시킨 동물모델의 비장에서도 IFN- γ 및 IL-12 생성을 증가시키는 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 조성물은 면역활성을 증가시킬 수 있는 면역증진용 약학조성물 및 건강식품으로 제공될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 31/352 (2013.01)

A61P 37/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345319955
과제번호	2018R1D1A1A02048746
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	퇴행성 뇌질환 예방 식용소재물질 평가를 위한 aquaporin 4 기반 in vitro 시스템
구축 및 적용 연구	
기 여 율	50/100
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425142789
과제번호	S2899005
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	산학연 Collabo R&D사업(R&D)
연구과제명	고장초의 면역조절활성 기반 아토피 개선 및 면역증진 식품소재 개발 및 제품화
기 여 율	50/100
과제수행기관명	주식회사마음푸드
연구기간	2020.06.29 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 고장초 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 면역증진용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서 상기 약학조성물은 산화질소 생성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 면역증진용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 약학조성물은 T_H1 사이토카인인 IFN- γ 및 IL-12 생성을 증가시켜 세포의 면역반응을 향상시키는 것을 특징으로 하는 면역증진용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여, 고장초 추출물 또는 트리신이 0.01 내지 90 중량부로 포함되는 것을 특징으로 하는 면역증진용 약학조성물.

청구항 6

고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 건강식품.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 면역은 체내에 존재하는 자기방어체계로서 외부로부터 침입해 오는 각종 물질이나 생명체를 이물질로 인식하여 제거하고 대사시키는 과정이다. 외부 자극에 의한 손상이나 병원 미생물의 침입으로부터 자신을 방어하기도 하지만 염증반응 등과 같이 자기 자신의 조직에 손상을 줄 수도 있다. 면역기능의 변화를 조절하여 정상으로 회복시키는 면역기능 증강 작용과 면역기능의 변화 폭을 줄여주는 작용으로 면역기능 억제 작용으로 구분될 수 있다. 과민 면역반응 완화는 외부 물질에 불리하게 반응하여 초래되는 알레르기 반응, 자기항원 또는 변형된 자기항원에 대한 반응 등 바람직하지 않게 증가된 면역 반응을 억제시키는 것을 의미한다.

[0003] 대식세포는 많은 라이소솜을 가지고 있으며, 이들은 산성 가수분해 효소와 과산화 효소를 함유하고 있어 미생물이나 종양세포 등을 활발하게 탐식한다. 이 세포는 인터페론- γ (IFN- γ) 등의 사이토카인 수용체를 가지고 있다. 이들은 산화질소(NO)와 인터페론, 인터루킨 및 종양괴사인자와 같은 사이토카인을 생산하며 T-세포로부터 생산되는 여러가지 사이토카인에 의해 기능이 증강될 수 있다. T-세포는 흉선에서 분화되며 CD4 양성인 T_H 세포(helper T-cell)와 CD8 양성인 T_C 세포(cytotoxic T-cell)로 나뉜다. CD4+ T_H 세포는 생산하는 사이토카인을 근거로 T_H1 및 T_H2 로 구분할 수 있다. 실험용 마우스의 T_H1 세포는 인터루킨-2(IL-2), IL-12 IFN- γ 등을 분비하는 반면, T_H2 세포는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 등을 분비한다. 그 외에 IL-3, 종양괴사인자- α (TNF- α), T_H1 세포는 세포 면역반응에 관여하며 세포독성 및 염증성 반응을 활성화한다. T_H2 세포에서 생성된 사이토카인은 항체 형성을 촉진시키는데, 특히 IgE의 생성을 도우며 호산구의 증식과 기능을 증강시킨다. 그러므로 T_H2

사이토카인은 항체 생성 및 알레르기 반응에서 흔히 발견된다. T_H1 과 T_H2 사이토카인은 서로 간에 억제기능을 가지고 있고, 동물의 감염증에서 항IL-4 항체와 항IFN- γ 항체로 질환의 경과를 변화시킬 수 있음이 밝혀졌으며 류마티스 관절염의 환자에 IFN- γ 를 주사하여 증상의 호전이 보고된 바 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2020-0077754호 (2020.07.01. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 조성물을 세포 면역활성을 증가시켜 면역을 증진시키기 위한 약학조성물 및 건강식품으로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 약학조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따르면, 고장초 추출물 또는 트리신은 세포독성 없이 cAMP와 PMA 처리된 T 세포에서 T_H1 사이토카인인 IFN- γ 및 IL-12 생성을 증가시켰으며, 오브알부인 (OVA)로 감작시킨 동물모델의 비장에서도 IFN- γ 및 IL-12 생성을 증가시키는 효과를 나타내는 것이 확인됨에 따라, 상기 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 조성물은 면역활성을 증가시킬 수 있는 면역증진용 약학조성물 및 건강식품으로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 대식세포에서 고장초 열수추출물의 세포독성(a) 및 산화질소(b) 생성 효과를 확인한 결과이다.

도 2는 EL-4 세포 (T 세포)에서 고장초 열수추출물과 트리신의 세포독성(a) 및 인터페론- γ (IFN- γ , b) 방출량을 확인한 결과이다.

도 3은 OVA 감작 마우스 모델 준비과정 및 시료 처리 과정을 나타낸 모식도이다.

도 4는 Balb/C 마우스의 비장세포에서 고장초 열수추출물과 트리신의 인터페론- γ (a) 및 인터루킨-12 (IL-12, b) 생성효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0012] 본 발명은 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 약학조성물을 제공할 수 있다.

[0013] 상기 고장초 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출되는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 열수추출물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 상기 약학조성물은 산화질소 생성을 증가시키는 것일 수 있다.

[0015] 또한, 상기 약학조성물은 T_H1 사이토카인인 IFN- γ 및 IL-12 생성을 증가시켜 세포의 면역반응을 향상시키는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 실시예에 따르면, EL-4 세포 (T 세포)를 24웰 세포 배양 플레이트에 5×10^5 cell/well로 분주한 후,

24시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하고, 각 웰에 cAMP와 PMA를 처리한 후 50, 100, 250 및 500 µg/ml 농도의 고장초 열수추출물과 50, 100, 250 및 500 ng/ml 농도의 트리신을 각각 처리하여 24시간동안 반응시킨 후 상층액 내 IFN-γ 수준을 확인하였다.

- [0017] 그 결과, 도 2a와 같이 모든 농도의 고장초 열수추출물과 트리신에서 세포독성이 나타나지 않는 것이 확인되었다. 또한, 도 2b와 같이 PMA와 cAMP를 이용하여 활성을 유도한 EL4 세포에 고장초 열수추출물과 트리신을 처리한 경우, T_H1 사이토카인인 IFN-γ 생성이 농도의존적으로 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0018] 상기 약학조성물은 약학조성물 총 100 중량부에 대하여, 고장초 추출물 또는 트리신이 0.01 내지 90 중량부로 포함되는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 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, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0023] 상기 고장초 추출물 또는 트리신의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 본 발명은 고장초 추출물 또는 트리신을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 건강식품을 제공할 수 있다.
- [0026] 상기 건강식품은 상기 고장초 추출물 또는 트리신 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0027] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 치료제의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0028] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 쥬코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제등을 들 수 있다.

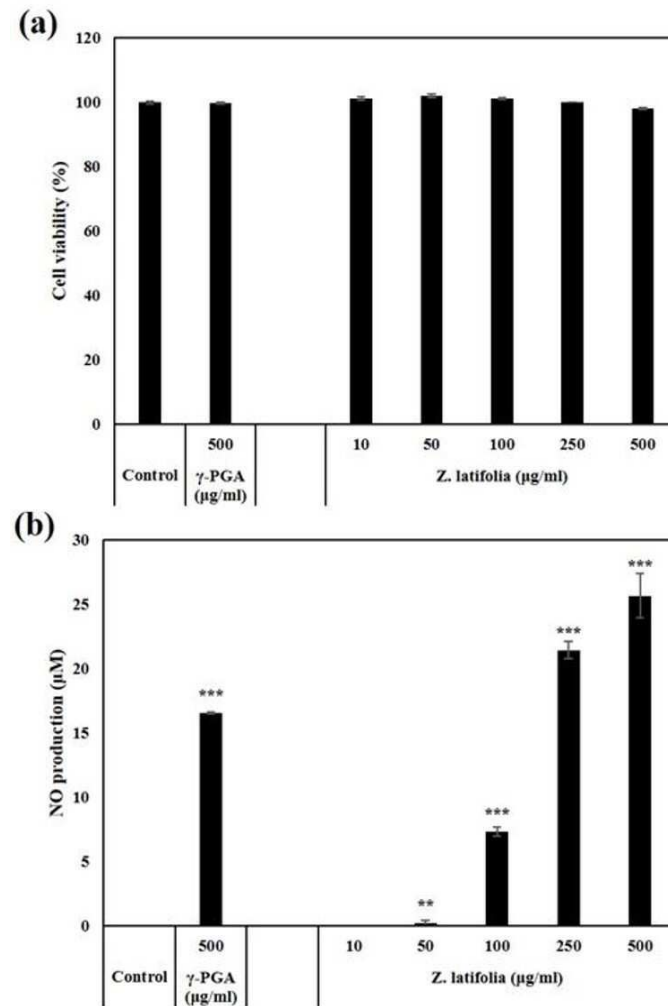
- [0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0032] <실험예>
- [0033] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0035] 1. 시료 준비
- [0036] 고장초 (*Z. latifolia*)는 건조하여 사용하였으며, 원물의 20 배 가수하여 80℃에서 6시간 추출 후 동결건조하여 사용하였으며, 트리신 (tricin)은 ChromaDex (USA)에서 구매하여 사용하였다.
- [0038] <실시예 1> 고장초 추출물의 세포독성 및 산화질소 생성 효과 확인
- [0039] Raw264.7 대식세포를 이용하여 고장초 추출물의 세포독성 및 산화질소 생성 효과를 확인하였다.
- [0040] 96-웰 세포 배양 플레이트에 1×10^5 cell/well로 분주한 후, 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 각 웰에 고장초 열수추출물을 10, 50, 100, 250 및 500 µg/ml로 처리하고 24시간 반응시켰다. 이후 100 µl의 상층액에 griess reagent를 넣은 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0041] 그 결과, 도 1a와 같이 고장초 열수추출물의 모든 농도에서 세포 독성은 확인되지 않았으며, 도 1b와 같이 고장초 열수추출물이 처리된 Raw264.7 세포에서 면역지표인 산화질소 (NO) 생성이 유도된 것을 확인할 수 있었다.
- [0043] <실시예 2> 고장초 추출물과 트리신의 세포독성 및 IFN-γ 방출 효과 확인
- [0044] EL-4 세포 (T 세포)를 24웰 세포 배양 플레이트에 5×10^5 cell/well로 분주한 후, 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 각 웰에 cAMP (cyclic adenosine monophosphate)와 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)를 처리하고 50, 100, 250 및 500 µg/ml 농도의 고장초 열수추출물과 50, 100, 250 및 500 ng/ml 농도의 트리신을 각각 처리한 후 24시간 동안 반응시켰다. 이후 5,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 세포와 상층액을 분리하고, ELISA kit(R&D system)를 이용하여 상층액내 IFN-γ 수준을 확인하였다.
- [0045] 그 결과, 도 2a와 같이 모든 농도의 고장초 열수추출물과 트리신에서 세포독성이 나타나지 않는 것이 확인되었다. 또한, 도 2b와 같이 PMA와 cAMP를 이용하여 활성을 유도한 EL4 세포에 고장초 열수추출물과 트리신을 처리한 경우, T_H1 사이토카인인 IFN-γ 생성이 농도의존적으로 증가된 것을 확인할 수 있었다.
- [0047] <실시예 3> OVA 감작 마우스 모델의 비장세포에서 IFN-γ 및 IL-12 방출량 확인
- [0048] Balb/C 마우스를 7일간 적응시킨 후, 도 3과 같은 과정으로 20 µg의 OVA를 2.25 mg의 수산화알루미늄(aluminum hydroxide)에 흡착시켜 PBS에 용해시킨 후 복강에 주사하여 1차 감작시켰다. 1차 감작 7일 경과 후, 20 µg의 OVA를 2.25 mg의 수산화알루미늄에 흡착하여 복강에 주사하여 2차 감작시켰다. 고장초 열수추출물 300 mg/kg 및 트리신 150 및 300 µg/kg을 각각 2차 복강 주사한 날에서부터 11일 간 증류수에 혼탁하여 1일 1회 경구 투여하였으며, 28일째 CO₂를 이용하여 마우스를 희생시켰다.
- [0049] 상기 희생된 마우스의 비장세포를 적출하여 배양한 후 생성되는 T_H1 사이토카인의 방출량을 확인하였다.
- [0050] 그 결과, 도 4a와 같이 대조군과 대비하여 고장초 열수추출물과 트리신의 T_H1 사이토카인인 IFN-γ의 방출량이 각각 97.2% 및 72.9% 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4b와 같이 IL-12의 방출량은 대조군과 대비하여 고장초 열수추출물은 180.7%, 트리신은 57.9% 증가한 것으로 확인되었다.

[0052]

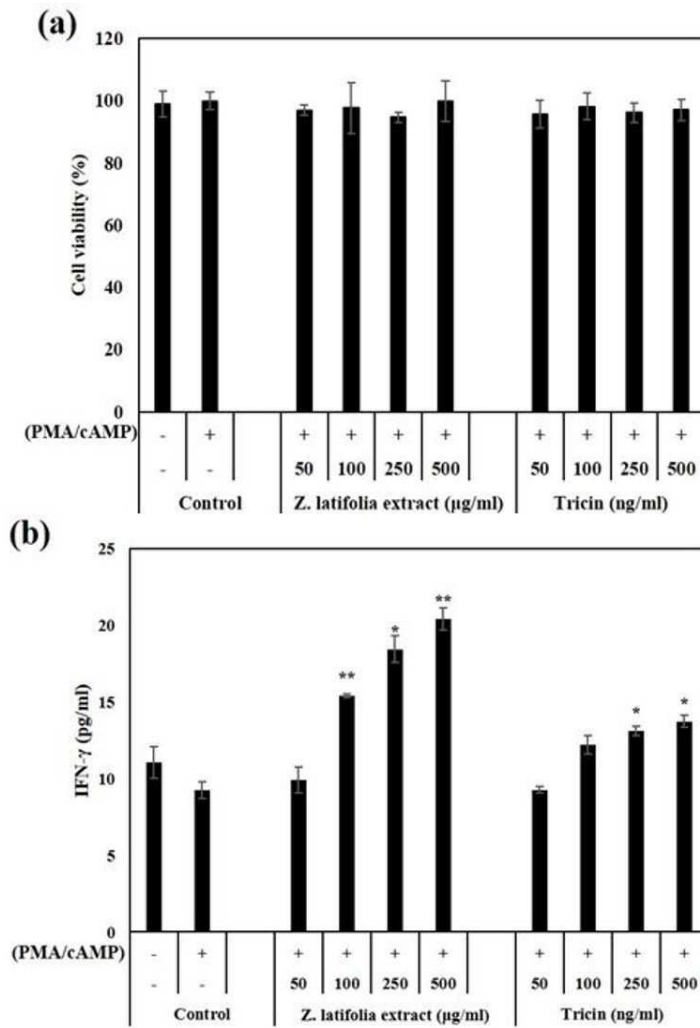
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

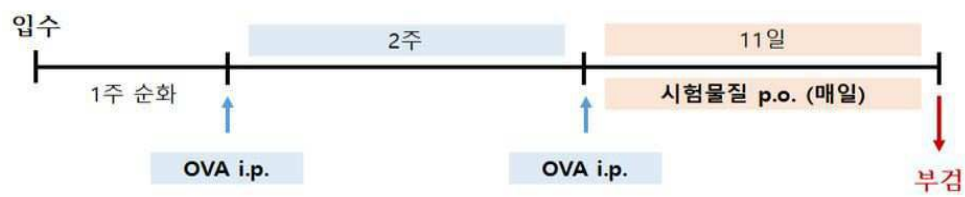
도면1



도면2



도면3



도면4

