



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월12일
(11) 등록번호 10-1947276
(24) 등록일자 2019년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/03 (2006.01) A23L 17/60 (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/03 (2013.01)
A23L 17/60 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0099746
(22) 출원일자 2017년08월07일
심사청구일자 2017년08월07일
(56) 선행기술조사문헌
JP2009242325 A
KR1020120064986 A
KR1020150138565 A
KR1020170050523 A

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
안동현
부산광역시 남구 분포로 111, 118동 2204호(용호
동, 엘지메트로시티)
박선희
경상북도 안동시 강남5길 54
(74) 대리인
위병갑

기술이전 희망 : 기술양도

전체 청구항 수 : 총 5 항

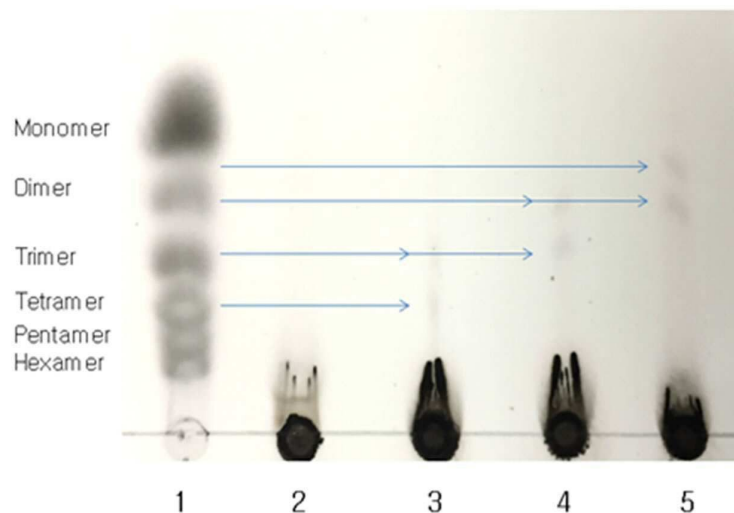
심사관 : 최원철

(54) 발명의 명칭 큰잎모자반 효소 분해물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 조성물

(57) 요약

본 발명은 큰잎모자반의 효소적 분해물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에
서 제조한 큰잎모자반 효소 분해물이 in vitro 상에서 비장세포의 사이토카인 분비량을 증가시켰으며, 경구 투여
로 인해 비장세포의 증식을 촉진하고, 면역 관련 사이토카인의 분비를 증가시켰으며, 혈청 내 면역 글로불린과
백혈구 및 림프구를 증가시키고, NK 세포의 활성을 증가시켰으므로, 이를 면역 증강 용도로 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 29/06 (2016.08)

A23L 33/10 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/202 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A6A1028677

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 해산식물 유래 향노화 소재 개발 및 분자 작용 메커니즘

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

쉬와넬라 오나이텐시스(*Shewanella oneidensis*) 배양액을 혼합한 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)의 효소 분해물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 큰잎모자반 효소 분해물은 큰잎모자반을 쉬와넬라 오나이텐시스(*Shewanella oneidensis*) 배양액으로 저분자화한 것인 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 큰잎모자반 효소 분해물은 쉬와넬라 오나이텐시스 배양액을 원심 분리하여 얻은 상층액과 큰잎모자반을 1:1 비율(v/v)로 혼합한 뒤, 12 내지 60시간 동안 반응시킨 것인 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 4

쉬와넬라 오나이텐시스 배양액을 혼합한 큰잎모자반 효소 분해물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 식품 조성물.

청구항 5

- 1) 쉬와넬라 오나이텐시스를 pH 9 및 25 내지 35℃의 조건에서 20 내지 30시간 동안 배양하는 단계;
- 2) 쉬와넬라 오나이텐시스 배양액을 원심분리하여 조효소액을 얻는 단계;
- 3) 큰잎모자반 분말을 제조하는 단계; 및
- 4) 단계 2)의 조효소액과 단계 3)의 큰잎모자반 분말을 혼합한 뒤, pH 9에서 12 내지 60시간 동안 반응시키는 단계를 포함하는, 큰잎모자반 효소 분해물을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 큰잎모자반의 효소적 분해물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역이란, 다양한 외부의 유해물질이나, 종양 등의 내적 요인 등으로부터 인체의 정상 조직을 방어하는 생체 기능을 의미한다. 면역기구는 우리 몸의 생명을 유지하는 방어 시스템이다. 면역기구의 기능을 저하시키는 요인은 매우 많으며, 예를 들어, 항생 물질, 스트레스, 알레르겐이 되는 식품류, 비만 등이 있다.

[0003] 면역력 저하는 세균이나 바이러스에 대한 인체의 저항성의 약화를 초래하고, 두통, 불면증, 소화불량, 우울증, 비만, 고혈압, 당뇨, 알레르기, 과민성 대장증후군 등의 직간접적인 원인이 될 수 있다. 이에 따라, 면역력 저하를 방지하고, 면역력을 증가시키기 위한 다양한 방법이 제시되고 있다. 면역질환은 포유류 면역계의 구성성분들이 포유류의 병리상태를 야기하거나, 매개하거나 또는 기타 공헌하는 질환으로서, 특히 염증성 장애는 전 세계에서 가장 중요한 건강 문제 중 하나이다. 염증은 일반적으로 외부 물질 또는 해로운 자극에 의한 숙주 침입에 대해 신체 조직의 국소화된 보호 반응이다. 염증의 원인은 박테리아, 바이러스 및 기생충과 같은 감염성 원인; 화상 또는 방사선 조사와 같은 물리적 원인; 독소, 약물 또는 산업적 제제와 같은 화학약품; 알레르기 및 자가면역 반응과 같은 면역적 반응, 또는 산화성 스트레스와 연관된 상태일 수 있다.

[0004] 한편, 전 세계적으로 의약품, 화장품, 기능성 식품 등을 개발하기 위한 연구는 광범위하게 실시되고 있으며, 특히, 의약품의 경우 종래의 화합물의 수가 한정되어 있기 때문에 급격하게 증가하던 신규 활성물질에 대한 개발

에 한계가 드러나 의약품으로 사용가능한 신규한 화학물질 개발 성장이 감소하고 있다. 따라서, 천연자원에서 유효한 생리활성물질을 개발하려는 시도가 많이 이루어지고 있다. 이러한 천연자원으로부터 유효성분을 분리하고 이들의 구조 및 효능을 규명하기 위해서는 적절한 생물활성 타겟 설정과 천연자원의 충분한 확보가 필수적이다.

[0005] 지구상에 존재하는 생물 중 해양생물은 육상식물에 비해 수직 우세와 다양성을 가지고 있음에도 불구하고 채집에 따른 비용 등의 문제로 인하여 상대적으로 많은 연구가 이루어지지 않고 있다. 이러한 해양생물 중에 해조류에는 육상식물에서 보기 어려운 생합성 경로를 가지고 있기 때문에 신규한 생리활성물질로 이용할 수 있는 무한한 가능성을 가지고 있다. 해조류는 우리나라에서 채취할 수 있는 종류 중에서 크게 녹조류, 갈조류, 홍조류로 나눌 수 있다. 녹조류로는 청각, 참홀파래, 참깃털말, 잎파래, 잎맥말 등이 있으며, 갈조류로는 패, 톳, 큰잎모자반, 큰그물바탕말, 참그물바탕말, 참가죽그물바탕말, 짝잎모자반 등이 있을 수 있으며, 홍조류로는 참곱슬이, 참까막살, 참도박, 참지누아리, 참풀가사리, 참화살깃산호말, 털엇가지풀, 털지누아리, 흑돌잎, 애기돌가사리, 애기우뚱가사리, 엇가지풀, 여린가위손말, 연가락말, 외톨개모자반, 외호늘풀, 우뚱가사리 등이 채집된다

[0006] 이와 같이 독성 위험이 적은 천연물 유래 활성 물질들에 대한 연구가 진행되는 추세에서, 면역 증강 효과 및 이를 통한 질병을 치료하기 위한 기능성 천연물질들을 발굴하기 위한 연구들이 진행되고 있으나, 아직까지 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)에 대한 연구가 미비한 상황이다.

[0007] 본 발명이 속하는 기술분야인 면역 증진과 관련된 종래 기술로는 커피박 발효물을 이용한 면역 증진용 조성물의 제조 방법에 관한 대한민국 등록특허 제 10-1509220호와, 울금 포함 복합물 추출물을 함유한 면역 증강용 조성물에 관한 대한민국 등록특허 제10-1484021호 등이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 큰잎모자반을 효소적으로 분해하고, 이의 면역 증강 효과를 in vitro 및 in vivo에서 밝힘으로써, 이를 면역 증강용 약학적 조성물, 및 면역 증강용 식품 조성물로 사용하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 효소 분해물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 큰잎모자반 효소 분해물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 식품 조성물을 제공한다.

[0011] 아울러, 본 발명은 큰잎모자반 효소 분해물을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 큰잎모자반 효소 분해물이 in vitro 상에서 비장세포의 사이토카인 분비량을 증가시켰으며, 경구 투여로 인해 비장세포의 증식을 촉진하고, 면역 관련 사이토카인의 분비를 증가시켰으며, 혈청 내 면역 글로불린과 백혈구 및 림프구를 증가시키고, NK 세포의 활성을 증가시켰으므로, 이를 면역 증강 용도로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 큰잎모자반 시간별 효소 분해물의 TLC를 이용하여 저분자화를 확인한 도면다.

도 2는 큰잎모자반 시간별 효소 분해물이 비장 세포에서 IFN- γ , IL-2, IL-6 및 IL-10의 분비량에 미치는 영향을 확인한 그래프이다.

도 3은 큰잎모자반 시간별 효소 분해물이 마이토젠을 처리하지 않은 (A), LPS에 의해 활성화된 (B), Con-A에 의해 활성화된 (C) 마우스의 비장세포 증식능에 미치는 영향을 확인한 그래프이다.

도 4는 큰잎모자반 시간별 효소 분해물이 경구 투여된 마우스의 마이토젠을 처리하지 않은 (A), LPS에 의해 활성화된 (B), Con-A에 의해 활성화된 (C) 비장세포로부터 IL-2의 분비량 증가를 확인한 그래프이다.

도 5는 큰잎모자반 시간별 효소 분해물이 경구 투여된 마우스의 마이토젠을 처리하지 않은 (A), LPS에 의해 활

성화된 (B), Con-A에 의해 활성화된 (C) 비장세포에서의 IFN- γ 의 분비량 증가를 확인한 그래프이다.

도 6은 큰잎모자반 시간별 효소 분해물이 경구 투여된 마우스의 혈청에서의 IgG1 및 IgG2a 분비량에 미치는 영향을 확인한 그래프이다.

도 7은 큰잎모자반 시간별 효소 분해물이 경구 투여된 마우스에서의 NK 세포 활성 증가를 나타낸 그래프이다.

도 8은 큰잎모자반 시간별 효소 분해물을 경구 투여한 마우스의 전혈에서 백혈구(WBC), 림프구(LY), 단핵구(MO) 및 중성구(NF)의 수치 증가를 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예에는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0016] 일 측면에서, 본 발명은 큰잎모자반 효소 분해물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 일 구현예에서, 큰잎모자반 효소 분해물은 큰잎모자반을 쉬와넬라 오나이텐시스 배양액으로 반응시킨 결과물일 수 있으며, 상기 쉬와넬라 오나이텐시스는 기탁번호 KCTC 18588P로 기탁된 *S. oneidensis* PKA 1008 균주일 수 있고, 큰잎모자반 효소 분해물은 큰잎모자반을 상기 균주 배양액으로 저분자화한 것일 수 있으며, 상기 균주 배양액은 조효소액으로 이용될 수 있고, 상기 조효소액은 알긴산 분해 활성을 가질 수 있다.
- [0018] 본 발명의 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 균주 (기탁번호 KCTC 18588P)의 최적 생육 조건은 pH 9.2% NaCl 및 30℃에서 24시간 동안 배양하는 것이며, 이의 조효소액은 pH9 및 30℃에서 효소 활성이 최대이고, 1시간 반응 시 3.5% 알긴산(working concentration)에서 1.001 g/l의 환원당을 생성할 수 있다.
- [0019] 일 구현예에서, 큰잎모자반 효소 분해물은 *S. oneidensis* PKA 1008 균주 배양액을 원심 분리하여 얻은 상층액과 큰잎모자반을 1:1 비율(v/v)로 혼합한 뒤, 12 내지 60시간 동안 반응시킨 결과물일 수 있다.
- [0020] 일 구현예에서, 상기 큰잎모자반은 큰잎모자반을 건조하여 분쇄한 분쇄물, 큰잎모자반을 추출한 뒤 동결건조한 분말 또는 큰잎모자반 추출물일 수 있으며, 큰잎모자반의 추출물은 추출 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예컨대 교반 추출, 진탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법으로 추출될 수 있다. 추출 용매로는 물, C₁-C₄의 저급 알코올과 같은 극성 용매나 헥산, 클로로 포름, 디클로로메탄 또는 에틸 아세테이트와 같은 비극성 용매, 또는 이들 중 2 이상의 혼합물을 사용할 수도 있다.
- [0021] 본 발명에서 사용된 용어 "추출물(extract)"이란 천연물로부터 분리된 활성성분 즉, 목적하는 활성을 보이는 물질을 의미한다. 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하는 추출과정으로 획득할수 있으며, 추출물의 건조 분말 또는 이를 이용하여 제형화된 모든 형태를 포함한다. 또한, 상기 추출물에는 상기 추출과정을 거친 추출물을 분획한 것도 포함된다.
- [0022] 본 명세서에서 사용된 용어, "면역 증강"은 본 발명의 큰잎모자반 효소 분해물 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 면역력이 증가되는 모든 행위를 의미한다. 즉, 면역세포에서의 사이토카인 분비를 증가시킴으로써 면역 반응을 촉진하는 기능, 또는 면역계의 세포의 활성을 증대시킴으로써 면역을 강화하는 기능을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 조성물은 사이토카인의 생성을 증가시킴으로써 면역증강 효과를 나타낼 수 있다. 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 IL-2, IL-6, IFN- γ 및 IL-10로 구성된 군으로부터 선택된 사이토카인의 생성을 증가시킨다. IL-2, IL-6 및 IFN- γ 는 세포성 면역을 조절하는 Th1 사이토카인이고, IL-10은 체액성 면역을 조절하는 Th2 사이토카인이며, 본 발명의 조성물은 Th1과 Th2 사이토카인의 생성을 모두 증가시킬 수 있기 때문에 세포성 면역과 체액성 면역 모두에 대하여 면역증강 효과를 발휘할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 NK 세포의 활성화를 증가시키며, NK 세포는 자연살해(Natural Killer) 세포로 바이러스 감염 세포, 암세포를 공격하며, 림프구에 속하지만 구조조직합성복합체(MHC) class I분자가 표면에 없는 세포만 비 특이적으로 공격하는 특성이 있어 선천성 면역계에 속한다.
- [0025] 본 발명의 면역 증강용 약학적 조성물은 이의 면역 증강 효과를 통해 면역 질환의 예방 또는 치료용도로 사용될 수 있다. 상기 면역 질환은 감기, 천식, 폐렴, 알러지성 비염, 알러지성 결막염, 아토피성 피부염, 알러지, 류마티스 관절염, 알츠하이머병, 자가면역성 갑상선 질환, 염증성 장질환, 재생불량성 빈혈, 홍반성 루푸스 또는

건설될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0026] 일 구현예에서, 상기 약학 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 단백질을 0.0001 내지 10 중량 %로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량 %를 포함한다.
- [0030] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 mg/ml이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 mg/ml이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0032] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다.
- [0033] 일 측면에서, 본 발명은 큰잎모자반 효소 분해물을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명에서 사용된 용어 "식품"이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.
- [0035] 본 발명의 식품 조성물은, 비제한적으로 각종 음료, 껌, 차, 과자, 비타민 복합체, 건강 보조식품 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 식품 조성물의 바람직한 섭취량은 섭취자의 상태 및 체중, 증상의 정도, 식품 형태, 섭취 기간에 따라 다르며 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 유효 성분이 1일 0.2mg/kg 내지 200mg/kg으로 섭취되도록 하는 것이 최적의 효과를 위해 바람직하다.

- [0037] 일 측면에서, 본 발명은 큰잎모자반 효소 분해물을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0038] 일 구현예에서, 상기 큰잎모자반 효소 분해물을 제조하는 방법은 *S. oneidensis* PKA 1008 균주를 pH 9 및 25 내지 35℃의 조건에서 20 내지 30시간 동안 배양하는 단계; *S. oneidensis* PKA 1008 균주 배양액을 원심분리하여 조효소액을 얻는 단계; 큰잎모자반 분말을 제조하는 단계; 및 단계 2)의 조효소액과 단계 3)의 큰잎모자반 분말을 혼합한 뒤, pH 9에서 12 내지 60시간 동안 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0040] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0042] <실시예> 큰잎모자반의 효소 분해물 제조
- [0043] 부산 연안 송정 앞바다에서 사멸기에 접어들어 분해가 진행 중인 녹조류 구멍갈파래(*U. pertusa*)로부터 분리하여 한국생명공학연구원에 기탁한 쉬와넬라 오나이텐시스(*Shewanella oneidensis*, *S. oneidensis*) PKA 1008 균주 (기탁번호 KCTC 18588P)를 이의 최적조건인 pH9, 2% NaCl 및 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 원심분리기(UNION 32R, Hanil. Co., Kimpo, Korea)를 이용하여 4℃에서 10,000×g로 30분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 조효소액으로 수득하였으며, 조효소액의 활성은 517 U/mL이었다.
- [0044] 큰잎모자반 효소 분해물을 제조하기 위하여, 큰잎모자반을 건조하여 분쇄한 분말과 10 mM phosphate buffer (pH 9)를 이용하여 80 mg/mL 농도로 제조하였으며, *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액의 최적 생육 조건인 pH 9로 맞추기 위해 1 N NaOH를 이용하였다. 여기에, 상기에서 제조한 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액을 1:1 비율(v/v)로 첨가하고 미생물의 오염을 방지하기 위해 반응 전체 부피의 0.02% sodium azide를 첨가하였다. 조효소액과 큰잎모자반의 반응은 30℃에서 0, 3, 6, 12, 24, 48 및 60 h 동안 수행되었고, 반응이 완료된 분해액을 끓는 물에 10분간 처리하여 효소불활성화 시켰다. 그 후 10,000×g, 10분, 4℃에서 원심분리하여 얻은 상층액을 동결건조하고 -20℃에서 보관하였다.
- [0046] <실험예 1> 효소 분해물 특성 분석
- [0047] 상기 실시예에서 동결건조된 각 반응 시간별 (0, 24, 48 및 60 h) 효소 분해물 시료들을 각각 20 mg/mL로 용해시킨 후 최종액의 80%가 되도록 에탄올을 첨가하여 12 h 동안 조당을 추출하였다. 그 후, 4℃에서 7,500 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 건조시켜 에탄올을 제거한 후 실험에 사용하였다. 분해물의 저분자화는 TLC(thin-layer chromatography)를 이용하여 확인하였다. 실리카 겔(Silica gel) F254 플레이트에 저분자화된 시료들을 각각 5 μ l씩 스팟팅한 후 1-butanol : methanol : water (4 : 1 : 2 v/v/v) 전개액을 이용하여 전개하였다. 전개 후 10% 황산첨가 에탄올 용액을 분무하여 110℃에서 30분간 가열하였다. 표준혼합물(Standard mixture)로는 셀로올리고당(celooligosaccharide)을 사용하였으며, 셀로비오스(cellobiose), 셀로트리오스(cellobiose), 셀로테트라오스(cellobiose), 셀로펜타오스(cellobiose), 셀로헥사오스(cellobiose)는 Megazyme사 (Megazyme Co., Wicklow, Ireland)에서 구입하였으며, 글루코오스(glucose)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.
- [0048] 본 발명의 큰잎모자반 효소 분해물의 저분자화를 확인한 결과, 효소 반응 24h 이후 저분자화되어 테트라머(tetramer) 및 트라이머(trimer)로 분해되었으며, 반응 48h에서 트라이머 및 다이머(dimer)로 분해되었고, 최종 60h 반응물에서는 다이머로 분해된 것을 확인하였다 (도 1).
- [0050] <실험예 2> 비장세포에서의 사이토카인 분비 촉진능
- [0051] 상기 실시예에서 제조한 큰잎모자반 효소 분해물의 면역 증진 활성을 in vitro에서 확인하기 위하여, 마우스로부터 분리한 비장세포에서의 큰잎모자반 효소 분해물에 의한 사이토카인 (IFN- γ , IL-2, IL-6 및 IL-10) 분비량을 측정하였다.
- [0052] 구체적으로, 생후 6주령의 수컷, Balb/c 마우스 (오리엔트바이오, Seongnam, Korea)를 온도 20±2℃, 습도 50±10%, 12 h 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 1주일간 예비 사육한 후, 경추탈골로 희생시키고 무균적으로 비장을 적출하였다. 본 실험은 부경대학교 동물실험 윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받아 시행하였다 (승인번호 2015-04). 적출한 비장에서 세포를 유리시키기 위해 조직 그라인더(tissue grinder)를 이용하여 균질화한 세포현탁액을 4℃, 1,800 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 그 후, 10분간 RBC 파쇄 버퍼(lysis buffer) (Tris-buffered ammonium chloride; 0.87% NH₄Cl, pH 7.2)에 정치시켜 적혈구를 제거하고 10% FBS(Hyclone, Victoria, Austria)-RPMI 1640 배지를 첨가하여 2×10⁶ cells/mL 농도로 희석하였다. 희석된 비장세포 현탁액에

큰잎모자반 효소 분해물을 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 각각 첨가하고, 대조군으로 0.01 M PBS(Phosphate buffered saline, pH 7.2)를 첨가하여 37°C, 5% CO_2 인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo, Tokyo, Japan)에서 72 h 동안 배양하였다. Anti-mouse IFN- γ , IL-2, IL-6 및 IL-10 mAb를 웰 (Nunc, Roskilde, Denmark)에 넣은 후 4°C에서 하룻밤 동안 코팅시켰다. PBST(0.01 M PBS, pH 7.2, 0.05% Tween 20)로 세척하고 10% FBS용액으로 1 h 동안 실온에서 블로킹한 후 세포 배양 상층액을 넣어 실온에서 2 h 반응시켰다. 비오티닌화된 anti-mouse IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 mAb와 HRP(streptavidin-horseradish peroxidase) 컨쥬게이트를 넣어 실온에서 1 h 반응시켰다. PBST로 세척하고 OPD(o-phenylenediamine) 및 H_2O_2 를 첨가한 시트르산 버퍼(citrate buffer) (pH 5.0)을 넣어 30분 동안 암소에서 발색시켰다. 반응을 정지시키기 위해 2 N H_2SO_4 를 첨가한 후 마이크로플레이트 리더기 (model 550, Bio-Rad, California, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하는 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 분석법을 이용하여, 비장세포 배양 상층액의 IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 사이토카인 분비량을 측정하였다.

[0053] 그 결과, IFN- γ 분비량은, 대조구인 PBS 처리구($35.15 \pm 2.91 \text{ pg/mL}$)에 비해 분비량이 증가에 비해 효소 분해물을 처리한 군들에서 증가하였으며, 효소 분해물을 50 $\mu\text{g/mL}$ 처리한 경우 조효소액과 큰잎모자반의 반응 시간 0 h, 24 h 및 48 h에 따라 각각 $46.80 \pm 3.88 \text{ pg/mL}$, $57.77 \pm 7.75 \text{ pg/mL}$ 및 $65.30 \pm 6.79 \text{ pg/mL}$ 로 나타났으며, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 각각 $61.88 \pm 3.88 \text{ pg/mL}$, $80.39 \pm 8.72 \text{ pg/mL}$ 및 $93.41 \pm 5.82 \text{ pg/mL}$ 로 나타나, 큰잎모자반과 조효소의 반응 시간이 증가함에 따라, 농도의존적으로 IFN- γ 분비가 증가하는 것으로 나타났다. 또한, IL-2 분비량은, 각 농도에서의 분비량이 대조구 ($74.90 \pm 2.91 \text{ pg/mL}$)에 비해 높은 값을 보였으며, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 조효소액과 큰잎모자반의 반응 시간이 24 h인 군에서 $87.24 \pm 0.97 \text{ pg/mL}$ 로 가장 높았고, 반응 시간 48 h 군은 $85.18 \pm 5.82 \text{ pg/mL}$ 으로 유의적인 차이가 없었다. 또한, IL-6 분비량은 효소 분해물을 처리한 군이 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조구 ($8.42 \pm 5.55 \text{ pg/mL}$)에 비해 현저히 증가함을 알 수 있었고, 특히 효소 반응 48 h의 효소 분해물을 처리한 군이 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 각각 $118.82 \pm 12.68 \text{ pg/mL}$ 및 $268.45 \pm 3.96 \text{ pg/mL}$ 으로 가장 높은 값을 나타냈다. 아울러, IL-10 분비량은 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조구의 분비량 $121.29 \pm 0.00 \text{ pg/mL}$ 보다 48 h 처리 시 $424.03 \pm 13.38 \text{ pg/mL}$ 으로 나타나 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었으며, 특히, 48 h 처리구는 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 $687.36 \pm 2.23 \text{ pg/mL}$ 로 0 h 처리구 ($438.23 \pm 11.15 \text{ pg/mL}$)보다 사이토카인의 분비가 약 1.5배 증가하여 IL-2, IL-6, IFN- γ 분비량 증가보다 더욱 높은 폭의 분비량 증가를 나타내었다 (도 2). 이를 통해, 큰잎모자반에 *S. oneidensis* PKA 1008 유래 조효소를 처리한 효소 분해물의 면역 조절능을 확인할 수 있었다.

[0055] <실험예 3> 효소 분해물의 투여에 의한 in vivo 면역 증강 활성 확인

[0056] 3-1. 비장 및 흉선 무게 측정

[0057] 마우스에 효소 반응 시간별 큰잎모자반의 효소 분해물을 50, 100 및 200 mg/kgbody weight 농도로 2주간 경구투여하고 디에틸 에테르를 이용하여 마우스를 마취 및 희생시켰다. 희생한 마우스로부터 면역장기인 비장 및 흉선을 적출하고 이의 무게를 측정하여 체중에 대한 백분율을 계산함으로써 각 장기에 대한 상대적 장기 무게를 도출하였다.

표 1

Group	Dose (mg/kgBW)	Spleen indexa (mg/g)	Rate (group/NC)	Thymus indexb(mg/g)	Rate (group/NC)
NC	0	3.8 ± 0.1	1.00	1.6 ± 0.2	1.00
0 h	50	3.6 ± 0.3	0.95	1.5 ± 0.1	1.00
	100	3.5 ± 0.2	0.93	1.4 ± 0.3	0.92
	200	3.6 ± 0.2	0.99	1.5 ± 0.1	1.01
24 h	50	3.5 ± 0.1	0.92	1.5 ± 0.2	0.94
	100	3.4 ± 0.2	0.91	1.7 ± 0.2	1.10
	200	3.7 ± 0.3	0.98	1.7 ± 0.2	1.02
48 h	50	3.5 ± 0.1	0.93	1.6 ± 0.2	1.00
	100	3.5 ± 0.3	0.88	1.5 ± 0.1	0.91
	200	3.6 ± 0.3	0.89	1.5 ± 0.2	0.91

[0059] Spleen index=spleen weight/body weight.

[0060] Thymus index=thymus weight/body weight.

[0061] 그 결과, 큰잎모자반과 조효소의 반응 시간에 따라 비장 및 흉선의 무게가 대조군에 비해 유의미하게 변화하지는 않은 것으로 나타났다 (표 1).

[0063] 3-2. 비장세포의 증식능 확인

[0064] 웰 플레이트에 상기 실험예 3-1에서 분리한 비장세포로부터 얻은 비장세포를 2×10^6 cells/mL 농도로 분주하고 20 h 동안 전 배양하였다. 그 후 마이트젠(mitogen)으로 1 μ g/mL LPS와 3 μ g/mL ConA를 첨가하여 37℃의, 5% CO₂ 인큐베이터 (MCO-15AC, Sanyo, Tokyo, Japan)에서 46 h 동안 본 배양하였다. 그 후 5 mg/mL MTT (thiazol blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Co.) 용액을 첨가하여 2 h 동안 재배양하였다. 상층액을 제거하기 위해 4℃에서 879×g로 10분 동안 원심분리한 뒤, 각 웰에 DMSO를 첨가하고 마이크로플레이트 리더기 (Model 550, Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도 [optical density, O.D.]를 측정하였다. 측정된 흡광도를 이용한 세포증식능은 하기의 수학적 식 1로 계산하였다.

수학적 식 1

$$\text{Proliferation index (\%)} = (\text{sample O.D.} / \text{control O.D.}) \times 100$$

[0065]

[0066] 그 결과, 큰잎모자반과 조효소액을 24 h 반응시킨 효소 분해물이 경구투여 농도에 의존적으로 비장세포의 증식능이 증가하는 것으로 나타났으며, LPS 및 ConA를 처리한 비장세포의 경우에서도 마이트젠을 전혀 처리하지 않은 비장세포와 유사한 경향을 나타내었다 (도 3).

[0068] 3-3. 사이토카인 분비량 측정

[0069] 큰잎모자반의 효소 분해물의 경구 투여에 의한 면역증진 활성을 확인하기 위하여, 상기 실험예 3-1 및 3-2를 통해 큰잎모자반 효소 분해물을 경구 투여한 마우스로부터 분리한 비장 세포에서의 IFN- γ 및 IL-2 분비량을 실험예 2와 동일한 방법으로 측정하였다.

[0070] IL-2의 분비량을 확인해본 결과, 마이트젠을 처리하지 않은 처리구의 경우 대조군에서 62.36 ± 1.94 pg/mL의 분비량을 보였으며 24 h 동안 효소 반응한 효소 분해물을 50, 100 및 200 mg/kg 농도로 각각 경구투여한 처리군에서, 75.59 ± 7.75 , 89.98 ± 2.91 및 107.80 ± 2.91 pg/mL로 나타나 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다. LPS 및 ConA를 처리한 비장세포의 경우에서도 24 h 효소 반응한 효소 분해물에서 대조군과 비교했을 때 농도 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다 (도 4). 아울러, IFN- γ 분비량 측정 결과, 마이트젠을 처리하지 않은 처리구의 경우 대조군에서 63.97 ± 8.72 pg/mL의 분비량을 보였으나, 24 h 효소 반응한 효소 분해물에서 100 mg/kg으로 처리하였을 때 78.33 ± 9.69 pg/mL였고, 200 mg/kg으로 처리하였을 때 82.44 ± 13.57 pg/mL으로 효소 분해물 처리에 의해 분비량이 증가함을 확인하였다. LPS를 처리한 비장세포의 경우, 대조군에서 118.08 ± 3.87 pg/mL의 분비량에 비해 24 h 효소 반응한 효소 분해물을 200 mg/kg으로 처리하였을 때 197.59 ± 11.63 pg/mL으로 약 1.6배의 분비 증가를 보임을 확인하였다. ConA를 처리한 비장세포의 경우, 24 h 효소 반응한 효소 분해물에서 대조군보다 높은 수치로 농도 의존적으로 증가하였다 (도 5).

[0072] 3-4. 혈청내 IgG1 및 IgG2a 측정

[0073] 혈청의 IgG1과 IgG2a량을 측정하기 위해 ELISA법을 이용하였다. 구체적으로, Anti-mouse IgG1, IgG2a mAb를 1:250의 비율로 희석하여 48-웰에 넣은 후 4℃에서 오버나이트(overnight)하여 코팅하였다. 그 후, PBST (0.01 M PBS, pH 7.2, 0.05% Tween 20)로 세척하고 10% FBS용액으로 1 h 동안 실온에서 블로킹한 후 큰잎모자반 효소 분해물을 경구 투여한 마우스로부터 분리한 혈청을 넣어 실온에서 2 h 동안 반응시켰다. 비오틴화된 anti-mouse IgG1, IgG2a mAb와 HRP 컨쥬게이트를 1:250의 비율로 같이 희석하여 각 웰에 분주하여 1 h 동안 실온에서 반응시켰다. PBST로 세척하고 OPD 및 H₂O₂를 첨가한 시트르산 버퍼 (pH 5.0)을 넣어 30분 동안 암소에서 발색시켰다. 반응을 정지시키기 위해 2 N H₂SO₄를 첨가한 후 마이크로플레이트 리더기로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0074] 그 결과, 혈청 내 면역 글로불린인 IgG1 및 IgG2a가 대조군에 비해 효소분해물의 경구투여시 증가되어

있었으며, 특히, IgG2a의 경우, 대조군은 $7269.84 \pm 573.26 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났고, 24 h 효소 처리한 분해물은 100 mg/kg 처리구에서 $8616.07 \pm 510.15 \mu\text{g/mL}$, 48 h 효소 처리한 분해물은 200 mg/kg 처리구에서 $9656.97 \pm 578.52 \mu\text{g/mL}$ 로 나타나 더욱 크게 증가함을 확인할 수 있었다 (도 6).

[0076] 3-5. NK 세포 활성

[0077] 상기 실험예 3-1 및 3-2를 통해 큰잎모자반 효소 분해물을 경구 투여한 마우스로부터 분리한 비장 세포 (effect cell)와 표적 세포(target cell)로서 YAC-1 세포 (KCLB No. 40160, Korean Cell Line Bank, Korea)을 이용하였다 (비장세포:YAC-1이 200:1, 100:1 및 50:1). 효소 반응 시간별 큰잎모자반의 효소 분해물을 투여한 각 군의 마우스로부터의 분리된 비장세포는 RPMI 1640 배지를 첨가하여 2×10^7 cells/mL 및 1×10^7 cells/mL 농도로 희석하였다. 희석된 비장 세포 배양액 100 μL 를 96-웰 플레이트에 주입하였다. 그 후, YAC-1 세포배양액 100 μL 를 넣어 1×10^5 cells/mL 농도로 맞춰주고 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터 (MCO-15AC)에서 44 h 동안 배양하였다. 그 후, 5 mg/mL MTT를 첨가하여 4 h 동안 배양하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0078] 그 결과, 효소 분해물을 처리하기 전과 48 h 동안 효소 반응한 분해물을 투여한 마우스의 NK 세포 활성(% cytotoxicity)은 비장세포:YAC-1의 비율이 200:1, 100:1, 50:1인 경우 농도의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 그에 반해, 24 h 동안 효소 반응한 분해물을 투여한 마우스는 200:1의 경우 대조군에서 $24.37 \pm 5.00\%$ 를 나타낸 것에 비해 50, 100 및 200 mg/kg 처리구에서 각각 27.39 ± 5.02 , 33.64 ± 3.99 및 $35.45 \pm 6.02\%$ 로 나타나 농도의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 100:1, 50:1의 경우도 마찬가지로 대조군에 비해 농도의존적으로 증가함을 확인하였었다 (도 7).

[0080] 3-6. 혈액 내 혈구 확인

[0081] 큰잎모자반 효소 분해물을 경구 투여한 마우스의 혈액 내 혈구를 확인하기 위하여, 마우스로부터 채취한 전혈을 이용하여 일반 혈액 검사(CBC)를 혈구 측정기 (Hemavet 950 analyzer, Drew Scientific Inc., Waterbury, US A)로 시행하여 백혈구, 림프구, 단핵구 및 중성구의 수치를 측정하였다.

[0082] 그 결과, 혈액 내 존재하는 백혈구(WBC), 림프구(LY), 단핵구(MO) 및 중성구(NE)의 수치가 효소 분해물의 경구 투여 농도에 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 24 h 및 48 h 동안 효소 반응한 분해물의 경우 대조군에 비해 높은 수치를 나타내었다. 특히, 백혈구와 림프구의 경우는 24 h 동안 효소 반응한 큰잎모자반 효소 분해물 처리군에서 가장 높은 증가율을 나타내어 면역증진 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다 (도 8).

[0084] 3-7. 통계처리

[0085] 본 발명의 모든 실험 결과의 통계처리는 SAS program(Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 평균값을 분산분석한 후, Duncan의 다중검정법으로 $P < 0.05$ 수준에서 항목들 간의 유의적 차이를 검정하였다.

수탁번호

[0086]

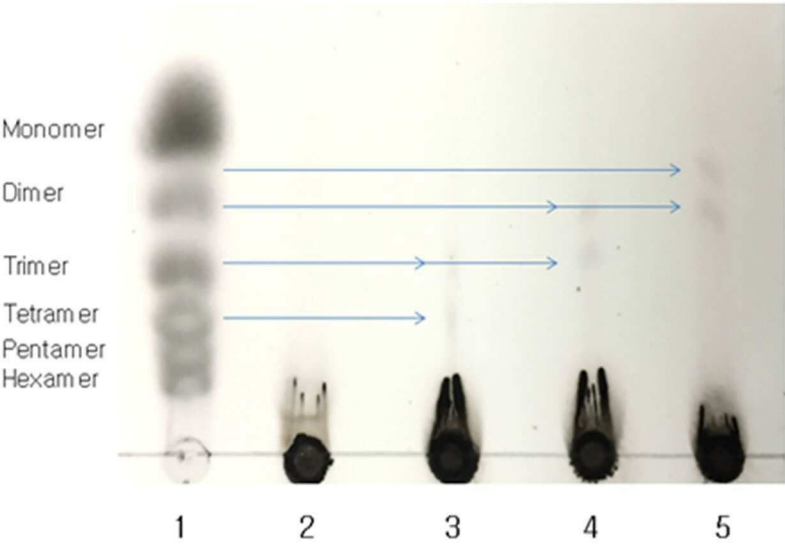
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18588P

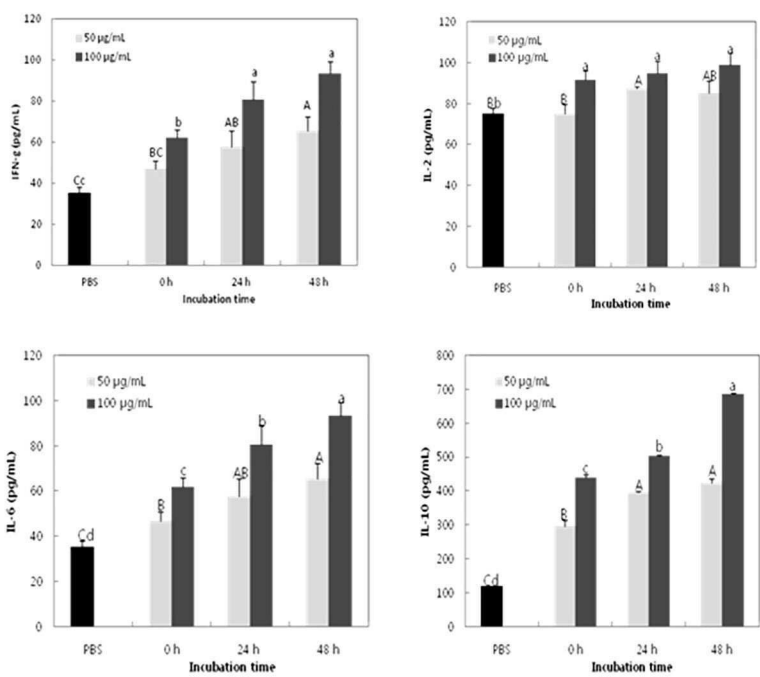
수탁일자 : 20170728

도면

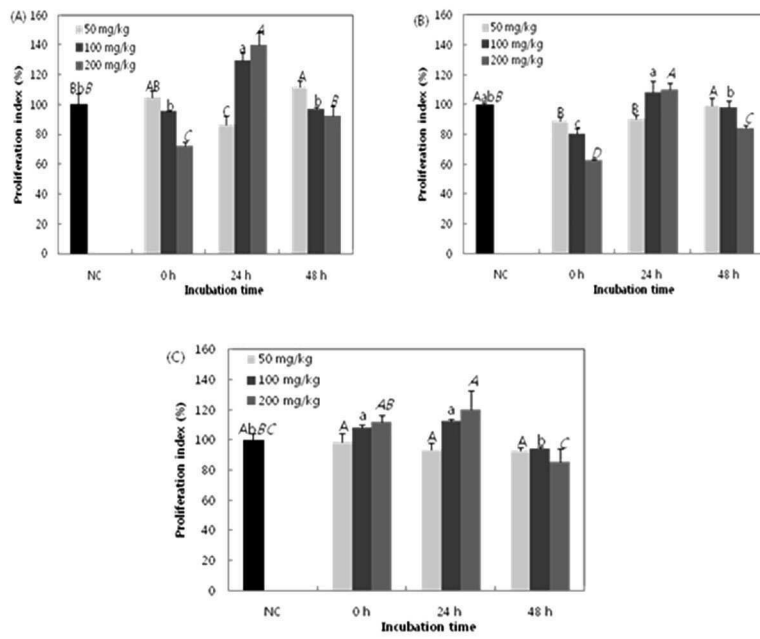
도면1



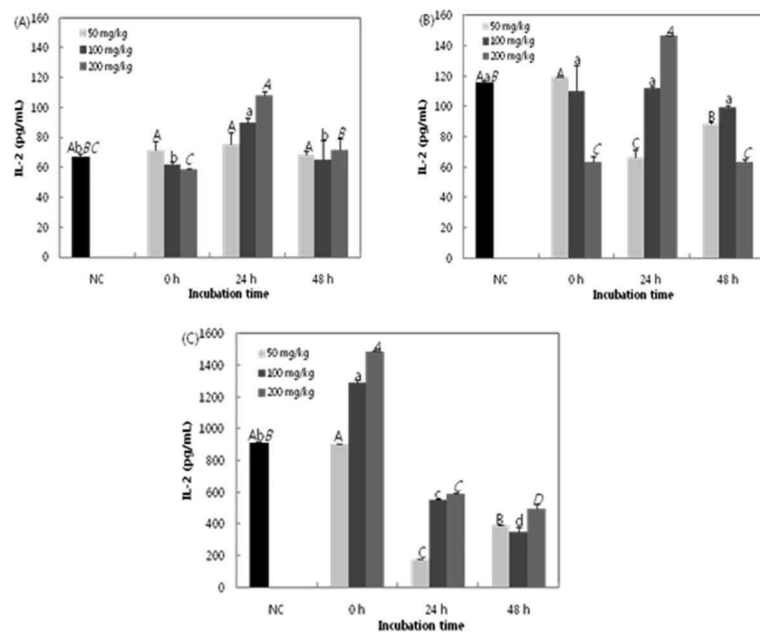
도면2



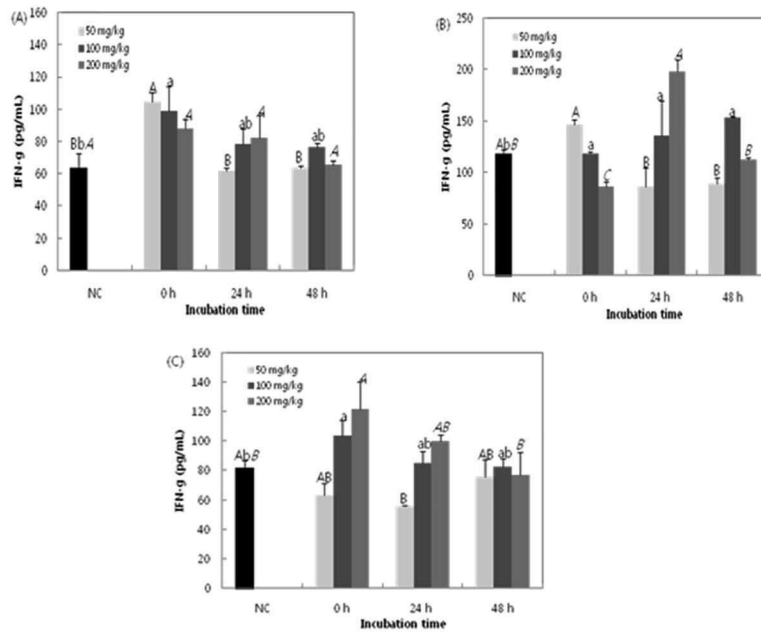
도면3



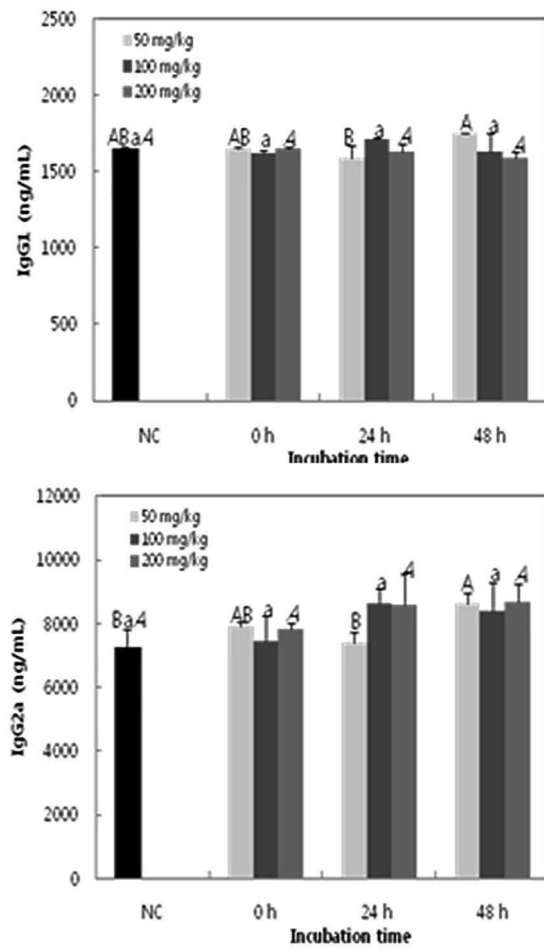
도면4



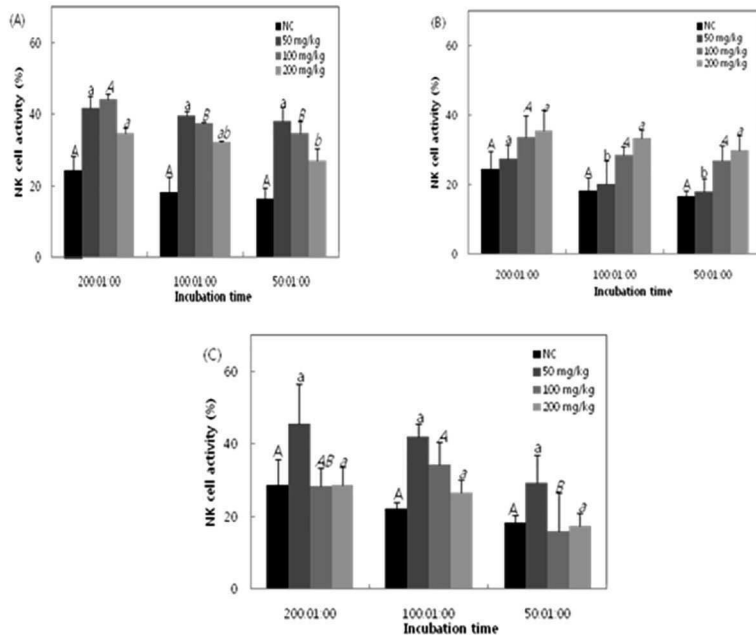
도면5



도면6



도면7



도면8

