



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월26일
(11) 등록번호 10-2294268
(24) 등록일자 2021년08월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) A23L 5/20 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 5/23 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0007190
(22) 출원일자 2021년01월19일
심사청구일자 2021년01월19일
(56) 선행기술조사문헌
<158> 고들빼기(Crepidiastrum sonchifolium).
약업신문. [online], 2020.07.22., [2021.03.19.
검색], 인터넷: <URL:
http://www.yakup.com/pharmplus/index.html?mod
e=view&cat=132&cat2=462&nid=3000132370> 1부.*
KR1020140047790 A
KR1020160115874 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전남바이오산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
(72) 발명자
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 54, 106동 1807호
오교녀
광주 서구 월드컵4강로 28번길 50-18, 101동 403
호
(74) 대리인
최석진
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 3 항

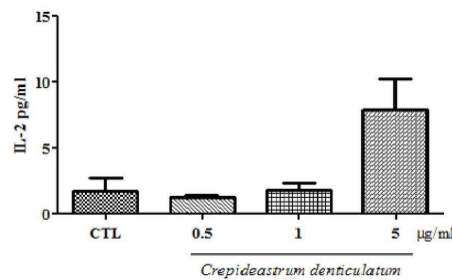
심사관 : 김현주

(54) 발명의 명칭 이고들빼기 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 건강기능성식품 조성물

(57) 요약

본 발명은 이고들빼기 잎 추출물을 유효성분으로 하는 면역증강용 약학 조성물에 관한 것으로, NO의 생성을 촉진하고, IL-2, IL-10 및 IFN- γ 의 사이토카인 생성을 유도함으로써 생체 면역을 증강시킬 수 있는 면역 증강용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자

김유진

전남 장흥군 장흥읍 건산남부길 31, 슬피아파트
102동 403호

신자원

전라남도 장흥군 장흥읍 진골목길 4, 리치빌 306호

이슬기

전라남도 순천시 이수로 224-29 102동 811호 (덕
암동, 현대아파트)

배동혁

전라남도 화순군 화순읍 칠층로 61-28 104동 401
호 (대리, 대성베르힐아파트)

김영옥

전라남도 장흥군 장흥읍 동교3길 53

홍지애

광주광역시 동구 계림로 30번길 15, 푸른길 두산위
브 203동 402호

오들리

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202 부영5차아파트
503동 203호

이학성

대전광역시 유성구 엑스포로 448(전민동, 엑스포아
파트) 106-1205

명세서

청구범위

청구항 1

이고들빼기(*Crepidiastrum denticulatum* (Houtt.) Pak&kawano) 및 열수추출물을 유효성분으로 포함하는 것인 면역증강용 건강 기능성 식품 조성물

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 면역증강용 건강기능성 식품 조성물은 이고들빼기열 추출물이 0.1 내지 2000mg/kg 체중/1일의 양으로 포함되어 제조되는 것인 면역증강용 건강 기능성 식품 조성물

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 면역증강용 건강 기능성 식품 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 또는 시럽으로 제형화된 것인 면역증강용 건강 기능성 식품 조성물

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 이고들빼기열 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 조성물에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 천연원료인 이고들빼기(*Crepidiastrum denticulatum* (Houtt.) Pak&kawano) 및 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 면역증강용 건강 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 면역은 생체의 내부 환경이 외부 인자에 대해 방어하는 현상이며, 면역엔 3가지 다른 구성요소가 있다. 우리 몸에는 피부, 기도, 점막이 있는데 이들은 감염을 막아주는 첫 번째 장벽 역할을 한다. 그러나 바이러스가 이 장벽을 뚫고 몸에 들어오면 우리가 갖고 있는 선천적 면역 반응이 작동하게 되고 이 반응이 충분치 않을 경우, 적응면역 체계를 작동시킨다. 적응 면역은 체계는 세포와 단백질을 포함하는 항체인데 몸이 항체를 만들어내기 위해서는 며칠 또는 몇 주가 걸린다.

[0004] T세포 중 T helper(Th) 세포에는 Th1과 Th2 세포가 있으며 Th1 세포는 interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) 등의 사이토카인을, Th2 세포는 interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10) 등을 주로 생성한다. Th1 세포와 Th2 세포는 서로 배타적으로 작용하며 면역반응에서 이들이 생성하는 사이토카인이 중요한 역할을 담당하게 된다.

[0005] IL-2는 세포독성을 나타내는 T림프구를 상당 기간 성장 유지 시킬 수 있기 때문에 림프구 배양액에 존재하는 T 세포 성장 인자 (T cell growth factor, TCGF)로 불리었다. 그 후 유전자 재조합으로 만든 IL-2를 이용하여 T 세포를 비롯하여 자연살해 세포(natural killer cell, NK cell), lymphocyte-activated killer (LAK) 세포, B 세포 성장인자, 단구 계열 세포의 자극인자 등의 활성을 보인다는 것이 밝혀지게 되었다.

[0006] IFN- γ 는 산에 불안정한 인터페론인 II형 인터페론으로서 산에 안정된 인터페론인 I형 인터페론과는 구분되며 I형 인터페론은 α 와 β 가 포함된다. IFN- γ 의 생성은 T세포와 NK세포가 마이토젠, 항체, 혹은 항원에 의해서 자극을 받음으로써 나타난다. IFN- γ 는 MHC항원 발현, 대식세포 활성화, NK 세포 활성화, IgG 아이소타입의 조절, 항바이러스활성, nitric oxide synthase (NOS) 유도 등에 관여한다.

- [0007] IL-10은 Th2 세포에서 생성되어 Th1 세포의 사이토카인 생성을 방해한다. 그래서 초기에는 이 분자를 사이토카인 생성 억제인자(cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF)라 하였다. 그러나 유전자 재조합 IL-10에 의해서 다양한 활성들이 추가로 밝혀지게 되었다. IL-10은 Th2 세포, 대식세포, 활성화 T세포, 비만세포 등 비교적 여러 세포들에서 생성되고 있다. 기능 또한 여러 가지 억제성 활성화와 자극성 활성을 보여주고 있다.
- [0008] 이고들빼기(*Crepidiastrum denticulatum* (Houtt.) Pak&kawano)는 산과 들의 건조한 곳에서 자라며 우리나라의 전국과 일본, 중국 등에 분포하는 국화과 2년생의 고들빼기 속에 속하는 식물이다. 식물의 뿌리는 굵고 통통하여 예로부터 고들빼기와 마찬가지로 김차, 장아찌 등으로 이용했고 봄철 입맛이 없을 때 식욕을 돋아주는 식욕 촉진제 역할을 했다. 또한, 암 예방 효과의 지표가 되는 효소인 퀴논 리덕타아제를 비롯한 간의 해독 및 항산화 효소의 활성을 증진 시키는 치코릭산이 풍부하다.
- [0009] 이고들빼기의 줄기는 높이 30~120cm, 가지가 많이 갈라지고 자주색을 띤다. 줄기잎은 어긋나며, 주걱형으로 밑이 줄기를 조금 감싸고 가장자리에 불규칙한 치아상 톱니가 있다. 줄기 위쪽 잎은 밑이 둥근 귀 모양으로 줄기를 감싼다. 뿌리잎은 꽃이 필 때 시든다. 잎 뒷면은 분을 칠한 듯한 흰색이다. 꽃은 8~10월에 가지와 줄기 끝에서 머리 모양 꽃이 산방꽃차례처럼 달리며, 노란색이다. 꽃 싸개 잎이 2장 있다. 열매는 수과, 검은 갈색이다.
- [0010] 최근 신종 코로나바이러스로 인해 다시 면역에 대한 관심이 높아지고 있다. 면역력이 떨어지는 아이와 고령의 노인층, 당뇨 환자, 심혈관계 질환자들의 면역력을 향상시키기 위해 전통적으로 알려진 국내 천연자원인 이고들빼기와 같은 천연물의 효능을 연구하여 부작용이 거의 없고 질병의 예방과 회복에 도움이 되는 물질을 개발하고자 한다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 대한민국 특허출원 제10-2012-0113915호
(특허문헌 0002) 대한민국 특허등록 제10-1710303호
(특허문헌 0003) 대한민국 특허등록 제10-1871115호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 천연자원인 이고들빼기를 추출하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 이고들빼기 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역증강 기능을 갖는 기능성 식품 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 우리나라 천연자원인 이고들빼기 추출물을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 면역증강용 조성물을 제공하고자 한다. 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 이고들빼기 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역증강 기능을 갖는 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 면역증강 기능을 갖는 기능성 식품 조성물의 추출방법은 이고들빼기를 증류수로 수세한 다음 증류수와 혼합하여 열수추출 또는 탄소수 1 내지 5의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상을 추출용매로 사용하여 추출할 수 있다.
- [0017] 상기 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 또는 이들의 혼합 용매 중 어느 하나에서 가용한 추출물을 유효성분으로 포함하는 추출물은 0.01 내지 99.9 중량 %의 양으로 포함하는 이고들빼기 면역 증강용 기능성 식품 조성물이 제공된다. 또한, 면역증강용 건강기능성 식품 조성물은 이고들빼기 추출물이 0.1 내지 2000mg/kg 체중/1일의 양으로 포함하여 제조된다.
- [0018] 상기 조성물은 정제 및 캡슐제, 연질 캡슐제, 과립제, 액제 또는 음료 중에서 선택된 하나 이상의 형태로 제조될 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 면역 증강 기능을 갖는 이고들빼기 추출물은 in vitro 상에서 마우스 비장세포 증식 및 IL-2, IL-10, IFN- γ 과 같은 면역 사이토카인 분비량을 증가시킴으로써 면역 증강에 유용한 기능성 식품 조성물로 유용하게 이용되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 이고들빼기 추출물에 대한 독성을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 이고들빼기 추출물에 대한 비장세포의 IL-2 cytokine 수준의 변화이다.
- 도 3은 이고들빼기 추출물에 대한 비장세포의 IL-10 cytokine 수준의 변화이다.
- 도 4는 이고들빼기 추출물에 대한 비장세포의 IFN- γ cytokine 수준의 변화이다.
- 도 5는 건강식품 제조를 위한 본원발명의 이고들빼기 잎 열수 추출물의 농축액을 나타낸다.
- 도 6은 건강식품 제조를 위한 본원발명의 이고들빼기 잎 열수 추출물의 농축액을 건조한 분말을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 구체적인 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 상세히 설명하기로 한다.

[0024] 1. 이고들빼기 추출물 제조

[0025] 1.1 이고들빼기 열수추출물의 제조

[0026] 건조된 이고들빼기 잎 100g을 증류수로 수세한 다음 증류수로 500ml을 가하여, 환류 추출기 100℃에서 3시간 동안 가열, 추출하였다. 여과지(와트만 41번)를 이용하여 여과한 후, 여액을 감압 농축하였다.

[0027] 여과 후 남은 잔사에 다시 동량의 증류수를 사용하여 동일 과정으로 2번 더 추출, 여과 및 감압 농축하였다. 농축된 열수 추출물을 동결건조기를 이용하여 50℃에서 48시간 동결 건조시켰다. 이상의 방법으로 상기 열수 추출물은 추출 용매에 따라 이고들빼기 잎 열수 추출물 10g (10%)을 수득하여 하기 실험예의 시료로 사용 하였다.

[0029] 2. 이고들빼기 추출물에 대한 세포독성 검증

[0030] 2.1 대식세포 배양

[0031] 대식세포 Raw 264.7 cell을 DMEM 배지와 10% FBS 및 100 unit/ml PS가 포함된 성장배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 세포수의 증식에 따른 과밀도 현상을 해소하기 위하여 매 48시간 마다 계대 배양을 실시하여 적정 수의 세포를 유지하였다.

[0032] 2.2 이고들빼기 추출물의 세포 독성 측정

[0033] Raw 264.7 cell을 24-well plate에 1×10^5 cells/ml로 분주하여 24시간 배양한 후 serum free DMEM에 이고들빼기 추출물을 농도별(0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 μ g/ml)로 처리하였으며 30분 후 5ug/ml의 lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 후 24시간 배양하였다. 24시간 뒤에 PBS로 씻어주고 각 well에 PBS 1ml 씩 분주하고 XTT를 250 μ l씩 첨가하여 가볍게 흔들어 혼합하였다. 2시간 동안 37° 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양한 후 microplate reader(Synergy HT, BioTek Instruments Inc.)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 이고들빼기 추출물에 대한 세포독성이 없는 것을 확인하였다(도 1).

[0035] 3. 이고들빼기 추출물에 대한 비장세포 사이토카인 분비량 측정

[0036] 3.1. 비장세포 추출 및 배양

[0037] 6주령의 Bablc/c 수컷 생쥐를 경추 탈골하여 치사시키고 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망 위에서 분쇄하여 single 세포로 만들었다. 단핵 세포층만 취하여 12,000rpm에서 5분씩 3회 원심 분리하여 비장세포를 준비하였다. 비장세포를 1×10^5 cells/ml이 되도록 10% heat-inactivate FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 96 well plate에 100 μ l씩 분주하였다.

[0038] 3.2 이고들빼기 추출물에 대한 사이토카인 분비량 측정

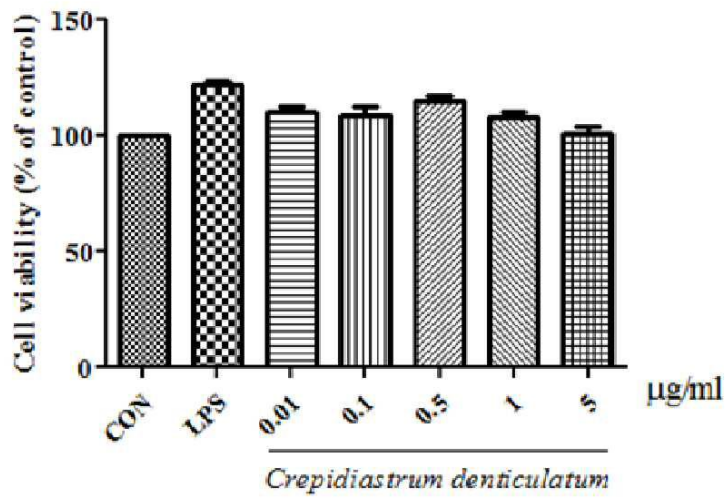
- [0039] 비장세포가 분비하는 사이토카인 (IL-2, IL-10, IFN- γ) 농도 측정은 ELISA법을 이용하여 측정하였다. 생성된 사이토카인의 양을 Duoset sandwich ELISA Mouse kit(R&D system, USA)를 사용하여 측정하였다.
- [0040] ELISA용 96well plate에 각 cytokine 측정에 특성화된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100 μ l씩 분주해 하루 동안 처리한 후, 그다음 날, washing buffer로 1차 항체를 세척한 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워 주기 위해 buffer를 넣어 2시간 동안 처리한 뒤 세척용 완충액으로 씻어내었다.
- [0041] standard, sample을 100 μ l씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 희석된 완충액을 각 well에 100 μ l씩 분주하고 2시간 동안 처리한다. 이 과정이 끝나면 세척용 완충액을 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 기질을 100 μ l 넣어 반응시킨 뒤, ELISA reader 570nm에서 흡광도를 측정하고 Standard curve를 이용해 세포에서 생성된 사이토카인의 양을 계산하였다.
- [0042] 도 2, 3, 4는 이고들빼기 추출물에 대한 비장세포 IL-2, IL-10 및 IFN- γ 사이토카인 분비량을 나타낸다. 도 2에 나타낸 바와 같이 IL-2 분비의 경우, 이고들빼기 열수 추출물 5 μ g/ml 농도에서 control(1.87 \pm 2.42 pg/ml) 대비 10.09 \pm 5.50 pg/ml 으로 분비량이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0043] 도 3은 쥐의 비장세포에서 IL-10 분비량에 대한 이고들빼기 열수 추출물의 효과를 나타낸다. 세포는 오직 물로만 처리되고 24시간 동안 처리하였다. 데이터 값들은 각각의 실험으로부터 평균 \pm 의 중복값을 나타낸다. 도 3에 나타낸 바와 같이 IL-10 생성은 control에서는 7.90 \pm 1.15 pg/mL인데 반하여 이고들빼기 열수 추출물 1ug/mL 농도에서 9.88 \pm 7.90 pg/mL, 5ug/mL 농도에서 10.98 \pm 5.50 pg/mL으로 control에 비하여 그 분비량이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다.
- [0044] 도 4는 쥐의 비장세포에서 IFN- γ 분비량에 대한 이고들빼기 열수 추출물의 효과를 나타낸다. 세포는 오직 물로만 처리되고 24시간 동안 처리하였다. 데이터 값들은 각각의 실험으로부터 평균 \pm 의 중복값을 나타낸다. 도 4에 나타낸 바와 같이 IFN- γ 생성은 control에서는 40.50 \pm 80.64 pg/ml인데 반하여 이고들빼기 열수 추출물 1ug/mL 농도에서 65.83 \pm 39.98, 5ug/mL 농도에서 106.00 \pm 23.52 pg/ml으로 control에 비하여 그 분비량이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다.
- [0045] 이상의 결과를 종합하면 본 발명은 이고들빼기 열 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역증강용 건강 기능성 식품 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 IL-2, IL-10 및 IFN- γ 의 사이토카인 생성을 유도함으로써 생체 면역을 증강시키는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0047] **4. 이고들빼기 추출물을 이용한 건강식품 제조**
- [0048] 이고들빼기 열 추출물을 유효성분으로 하는 면역 증강용 약학적 조성물 또는 건강식품 조성물은 정제 및 캡슐제, 연질 캡슐제, 과립제, 액제 형태로 제조될 수 있다. 도 5는 건강식품 제조를 위한 본원발명의 이고들빼기 열 열수 추출물의 농축액을 나타내고, 도 6는 이고들빼기 열 열수 추출물의 농축액을 건조한 분말을 나타낸다.
- [0049] 본원발명의 또 다른 실시 형태에 따르면, 상기 조성물은 음료 첨가제로 제조할 수 있다. 상기 면역 증강용 약제 또는 건강식품은 상기 이고들빼기 열 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물이 0.01 내지 99.9중량%로 포함되도록 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 예멸전, 시럽, 에어로졸, 경피제, 좌제 또는 멸균 주사용 액으로 제형화하여 제조할 수 있다. 또한, 면역증강용 건강기능성 식품 조성물은 이고들빼기 열 추출물이 0.1 내지 2000mg/kg 체중/1일의 양으로 포함하여 제조된다.

산업상 이용가능성

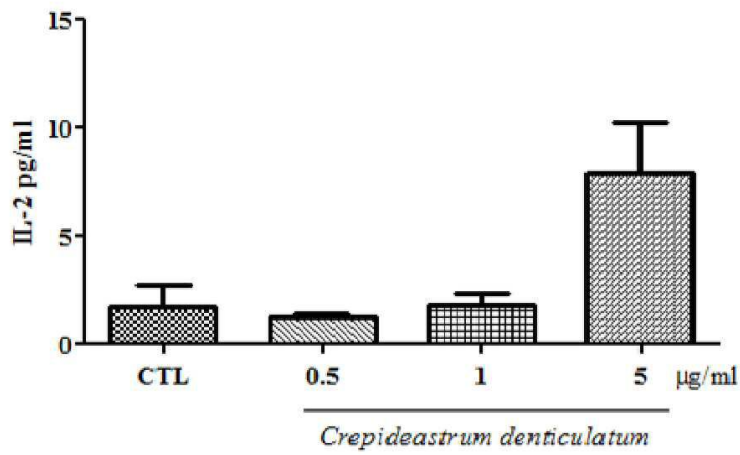
- [0051] 본 발명의 이고들빼기 추출물을 유효성분으로 하는 면역 증강용 기능성 식품 조성물은 in vitro 상에서 마우스 비장세포 증식 및 IL-2, IL-10 및 IFN- γ 과 같은 면역 사이토카인 분비량을 증가시킴으로써 면역증진을 활성화시키는 효과가 확인되었고, 면역 증강에 유용한 기능성 식품 조성물로 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 제조 원료를 자연에서 서식하는 식물로 대체함으로써 제조생산단가 절감과 산업화를 통한 수입대체 및 수출 효과 기대를 할 수 있다.

도면

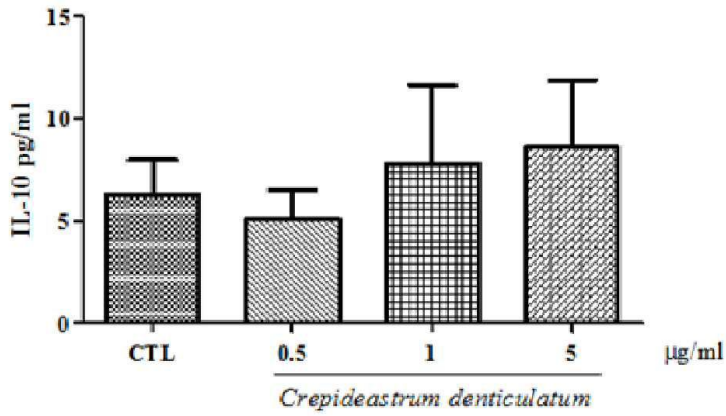
도면1



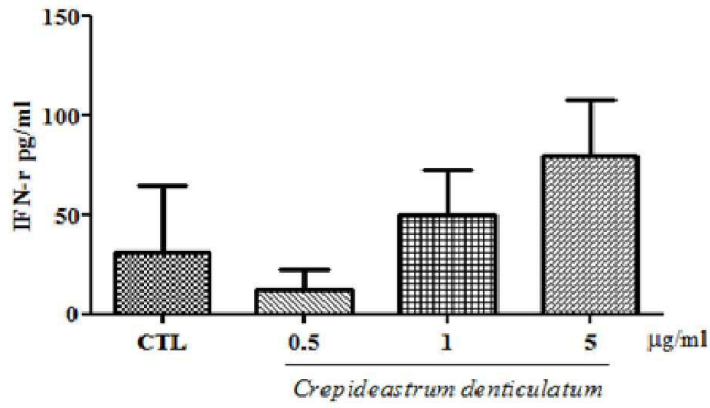
도면2



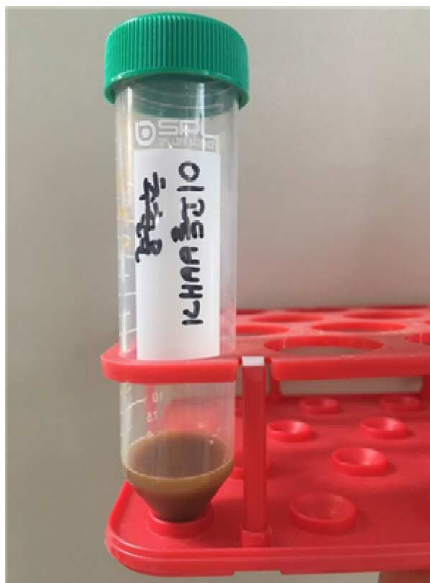
도면3



도면4



도면5



도면6

