

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0114496

(43) 공개일자 2020년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/32 (2015.01) A61K 31/7036 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/32 (2013.01)

A61K 31/7036 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0036372

(22) 출원일자 2019년03월28일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

황재관

서울특별시 서초구 신반포로 270, 136동 2501호(반포동, 반포자이아파트)

박지혜

경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 33, 212동 1703호(보라동, 민속마을신창미션힐아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인이름리온

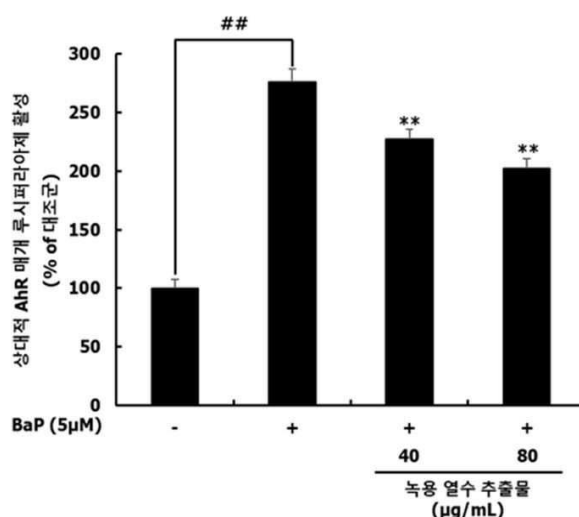
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 유효성분으로 함유하는 환경오염인자로부터 유도되는 방향족 탄화수소 수용체 매개성 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 AhR 매개성 질환의 예방 또는 치료에 이용되는 녹용 추출물 또는 이로부터 분리된 강글리오사이드의 새로운 용도에 관한 것으로, 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 유효성분으로 함유하는 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 환경오염인자로 인해 활성화된 AhR을 억제하고, 사이토크롬 P450 패밀리 효소의 발현을 억제하는 효과가 있는 바, 천식(asthma), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 기관지염(bronchitis), 안구건조증(xerophthalmia), 피부염(dermatitis), 아토피(atopy) 등과 같은 AhR 매개성 질환의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61P 27/02 (2018.01)

(72) 발명자

김창희

서울특별시 관악구 신원로 26, 103동 203호(
신림동, 신림동부아파트)

유지희

경기도 용인시 수지구 죽전로 267, 704동 1002호(
죽전동, 내대지마을건영캐스빌아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

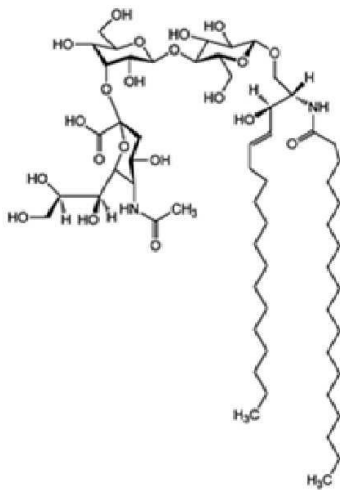
강글리오사이드(Ganglioside) 또는 녹용 추출물을 유효성분으로 함유하는, 방향족 탄화수소 수용체(Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 매개성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 2

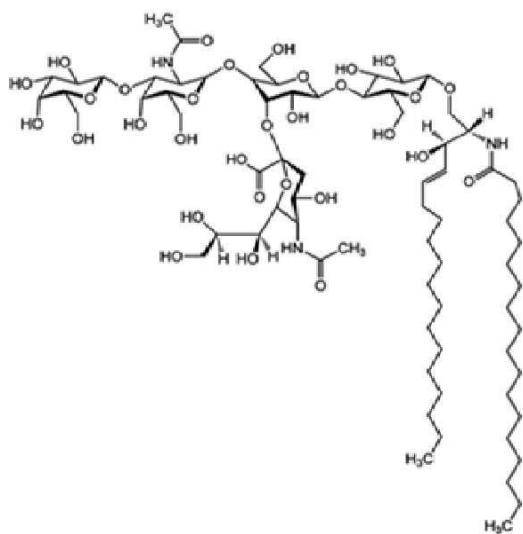
제1항에 있어서,

상기 강글리오사이드는 하기 화학식 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물.

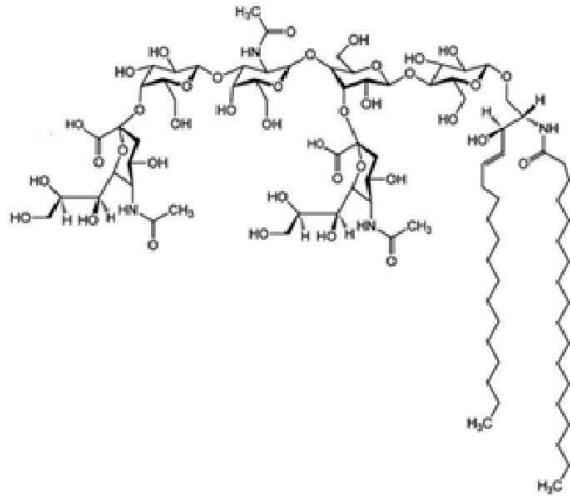
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 3

제1항에 있어서,

상기 강글리오사이드는 녹용 추출물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 녹용 추출물은 녹용을 물, 탄소수 1 내지 6의 유기용매, 아임계 유체 및 초임계 유체로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 용매 또는 초고압으로 추출한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 AhR 매개성 질환은 COPD(chronic obstructive pulmonary disease), 천식(asthma), 폐암(lung cancer), 폐렴(pneumonia), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 기관지염(bronchitis), 결막염(conjunctivitis), 안구건조증(xerophthalmia), 백내장(cataract), 녹내장(glaucoma), 피부염(dermatitis), 아토피(atopy), 건선(psoriasis), 여드름(acne), 습진(eczema), 피부암(skin cancer)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 방향족 탄화수소 수용체 매개성 질환의 예방 또는 치료에 이용되는 녹용 추출물 또는 강글리오사이드의 약학적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 방향족 탄화수소 수용체(Aryl hydrocarbon Receptor, AhR)는 벤젠 고리를 가진 체내 또는 외래 탄화수소 물질에 의해 활성화되면 핵 안으로 이동하여 이 물질들의 대사를 조절하는 세포질 수용체이며 전사인자이다(Cell Death Differ., 25: 1823-1836, 2018). AhR은 리간드가 결합되어 있지 않은 상태에서는 불활성 상태이며, 샤페론 단백질과 결합한 멀티단백질 복합체(multiprotein complex)로 존재한다(Int. J. Tryptophan Res., 8: 7-18, 2015).

벤젠고리를 가진 방향족 탄화수소 화합물들이 AhR의 리간드로 작용될 수 있으며, AhR이 리간드와 결합하면 활성화되게 된다. 활성화된 AhR은 단백질 구조가 변형되면서 핵 내로 이송되고 ARNT(Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator)와 이량체(dimer)를 형성하여 타겟 유전자의 프로모터에 위치한 제노바이오틱 반응성 요소(xenobiotic response element, XRE)에 결합함으로써, 전사인자로 작용한다(Int. J. Mol. Sci., 19: 3882, 2018).

[0004] AhR은 주로 XMEs(Xenobiotic Metabolizing Enzymes)의 전사인자로 작용하여 활성을 증가시킨다. XMEs에는 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 등과 같은 시토크롬 P450 패밀리 효소들이 있으며 AhR 리간드로 작용한 제노바이오틱 물질들의 대사과정에 중요한 역할을 하고 대사과정 중 발생하는 다양한 대사체와 산화적 스트레스로 인해 다양한 질병과 관련되어 있다(J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 147: 24-30, 2015). 특히 AhR은 피부, 폐, 장 등 다양한 기관의 장벽에 광범위하게 발현되며 체내 여러 기관에서 다양한 생리학적 역할을 수행하는 수용체이므로 제노바이오틱 물질에 의한 AhR의 과다 활성화는 암, 당뇨 그리고 COPD, 천식과 같은 폐질환, 아토피 피부염, 소양증과 같은 피부 질환, 간경화 등의 질병을 일으키며 면역 시스템에서도 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Biochim. Biophys. Acta., 1836: 197-210, 2013; Nat. Rev. Cancer, 14: 801-814, 2014; Nat. Immunol., 18: 64-73, 2017; Mol. Cell Biol., 25: 9360-9368, 2005; J. Allergy, 372384, 2012; Anticancer Res., 33: 1247-1256, 2013; Immunity, 48: 19-33, 2018).

[0005] 미세먼지(Particulate matter)는 대기오염물질의 일종으로 미세먼지 입자의 직경에 따라 PM₁₀은 입자크기 10 μ m 이하 미세먼지를 통칭하며 2.5 μ m 이하 초 미세먼지는 PM_{2.5}로 구분된다. 미세먼지는 주로 화석연료를 연소할 때 발생하며, 석탄의존도가 70%인 중국발 미세먼지가 상당부분을 차지한다. 한편, 황사는 중국 및 몽고 등의 내륙에 위치한 사막에서 작은 모래나 황토가 부유하여 상층 바람을 타고 멀리 수송되어, 지면 가까이 낙하하는 현상이다. 산업국가의 질병 약 25 ~33%가 환경적 위해 요인에 의해 발생한다. 유럽에서는 오염된 공기로 연간 약 31만 명이 조기에 사망하는 것으로 추정되고 있으며, 초미세먼지가 m³당 10 μ g가 증가할 경우 전체 사망률은 7% 증가한다. 국내에서 PM₁₀을 대기오염물질로 규제하고 있으며 이런 미세먼지 등 대기오염물질은 호흡기질환과 심장질환을 유발한다고 알려져 있다(J. Exp. Biol. Med., 232: 1109-1118, 2007; J. Biosci., 28: 77-81, 2003). 특히 PM_{2.5}는 일반 먼지보다 입자가 작아 하부 기관지 및 폐 실질까지 침착하여 호흡기계에 손상을 일으킬 수 있으며, 눈과 피부 모공 속에 깊숙이 들어가 피부 트러블을 일으키며, 자극성 피부염, 여드름, 알레르기 피부염, 결막염 등 피부와 눈 질환을 유발한다. 미세먼지 표면에 흡착된 다환 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)가 AhR에 결합한 후, ARNT와 이량체를 형성하여 세포질에 있었던 AhR을 핵 안으로 이송한다. 핵 안으로 들어온 AhR/ARNT는 XRE에 부착하여 AhR에 의해 매개되는 시토크롬 P450 효소들의 발현을 증가시키게 된다. 시토크롬 P450 효소들의 활성화로 제노바이오틱 물질들이 대사되게 되는데, 이 과정에서 과도한 산화적 스트레스가 발생하게 되고 다양한 면역반응이 일어나게 된다. 이로 인해 앞서 언급된 폐, 기관지, 피부, 눈 등의 기관에 손상을 초래하고 암과 면역 관련 질병이 발생하게 된다. 이에, 미세먼지와 황사에 의해 유발된 AhR 매개성 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 안전하고 효능이 높은 천연 소재의 개발이 필요하다.

[0006] 녹용(*Cornu cervi pantotrichum*, antler)은 사슴과에 속하는 매화록, 마록 및 동속 근연 동물의 털이 밀생되고 골질화되지 않은 어린 뿔로 매년 재생되는 연골조직을 말하며, 각질화되지 않은 것은 녹용이고, 각질화된 것은 녹각이라 하는데, 우리나라를 비롯한 중국 및 일본 등의 동양권 국가들에서는 녹용을 오래전부터 최고의 보혈강장제로 널리 사용해 왔으며, 그 성장과 효능에 관해서는 본초강목과 동의보감 등의 문헌에 수록되어 있다.

[0007] 지금까지의 녹용에 관한 연구는 한방에서 임상적인 효과를 규명하고, 양방에서 녹용의 생리화학적 작용기작을 밝히는 정도에 국한되어 있었다. 최근 들어 녹용의 생리활성 성분에 대한 활발한 연구가 진행되고 있는데, 녹용은 추출물 수준에서 면역기능 증진, 항피로, 항혈전, 항노화, 혈압강하, 항염증작용 등 매우 다양한 효능이 있는 것으로 보고되었다(J. Ethnopharmacol., 145: 403-415, 2013; Evid. Based Complement. Alternat. Med., 540580, 2014). 녹용에 포함되어 있는 물질중 강글리오사이드(Ganglioside)는 글리코스핑고당지질(glycosphingolipid)의 하나로써 친수성인 당부분과 소수성인 세라마이드(ceramide)로 구성되어 있는 양쪽성 물질로서, 한 개 이상의 시알산(N-acetylneuraminic acid: sialic acid)을 가지고 있는 당지질이다. 강글리오사이드는 중추신경 조직 내에 존재하고 있으며 신경 기능과 세포막의 여러 가지 기능에 관여한다(Journal of Oleo Science, 60(10): 537-544, 2011). 또한, 암세포를 정상세포로 환원하는 기능(Clinical and Developmental Immunology, 2010: 814397)과 비만(FEBS Letter, 589: 3221-3227, 2015), 항염(International Immunopharmacology, 28(1): 136-145, 2015) 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0008] 그러나 지금껏 녹용 추출물 또는 강글리오사이드의 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개성 질환의 예방 또는 개선 효과에 대해서는 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 부작용 없이 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개성 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 기술을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 강글리오사이드(Ganglioside) 또는 녹용 추출물을 유효성분으로 함유하는, 방향족 탄화수소 수용체(Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 매개성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 유효성분으로 하는 AhR 매개성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 녹용 추출물 또는 강글리오사이드는 환경오염인자로부터 활성화된 AhR를 억제시키거나, AhR에 의해 매개되는 시토크롬 P450 패밀리 효소들의 발현량을 감소시키는 활성이 뛰어나므로, 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개성 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 COS-7 원숭이 신장세포에서 녹용 추출물 처리에 따른 AhR로부터 유도되는 XRE 매개 루시페라아제 활성 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 2는 피부 각질세포에서 녹용 추출물 처리에 따른 CYP1A1의 mRNA 발현량 감소 효과를 확인한 결과이다.

도 3은 COS-7 원숭이 신장세포에서 강글리오사이드 처리에 따른 AhR로부터 유도되는 XRE 매개 루시페라아제 활성 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 4는 피부 각질세포에서 강글리오사이드 처리에 따른 CYP1A1의 mRNA 발현량 감소 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 유효성분으로 함유하는 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명에서 상기 녹용 추출물은 사슴과에 속하는 매화록(*Cervus nippon* T.), 마록(*Cervus elaphus* L.), 대록(*Cervus canadensis* E.)의 뿔에 속하는 것으로, 상기 숫사슴의 골질화되지 않았거나 약간 골질화된 어린 뿔을 자른 다음 말린 것이 추출 대상이 될 수 있다.

[0021] 구체적으로, 상기 녹용 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6의 유기용매 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출할 수 있다. 이때, 상기 유기용매는 C1 내지 C6의 저급 알코올(alcohol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌 클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane), 시클로헥산(cyclohexane) 및 석유에테르(petroleum ether)로 이루어진 군으로부터

선택된 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0022] 추출 시 건조된 녹용을 분쇄한 후, 물, 알코올 또는 이의 혼합물을 분쇄된 녹용 무게의 2배 내지 20배를 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 3배 내지 10배를 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃인 것이 바람직하며, 60℃ 내지 100℃인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0023] 추출시간은 1시간 내지 10시간인 것이 바람직하며, 2시간 내지 5시간인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0024] 추출방법은 냉침, 초음파 추출 또는 환류냉각 추출방법이 모두 이용가능하며, 환류 냉각 추출방법을 이용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 추출 회수는 1회 내지 5회인 것이 바람직하며, 2회 내지 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

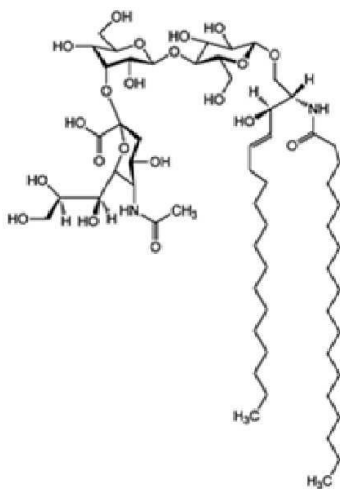
[0025] 또한, 상기 녹용 추출물은 초고압, 아임계 유체 또는 초임계 유체 추출법에 의해 수행될 수 있다.

[0026] 추출에 사용되는 녹용은 수확한 후 세척하여 그대로 사용하거나 건조하여 사용할 수 있다. 건조방법으로는 양건, 음건, 열풍건조 및 자연 건조하는 방법을 모두 사용할 수 있다. 또한, 추출효율을 증대시키기 위해 녹용 또는 그 전체를 분쇄기로 분쇄하여 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명에서 상기 강글리오사이드는 글리코스핑고당지질의 하나로서 친수성인 당부분과 소수성인 세라마이드로 구성되어 있는 양쪽성 물질로서 한 개 이상의 시알산을 가지고 있는 당지질이다.

[0029] 본 발명의 일구현예에서, 상기 강글리오사이드는 하기 [화학식 1]로 표시되는 강글리오사이드 GM3 (ganglioside GM3)일 수 있다.

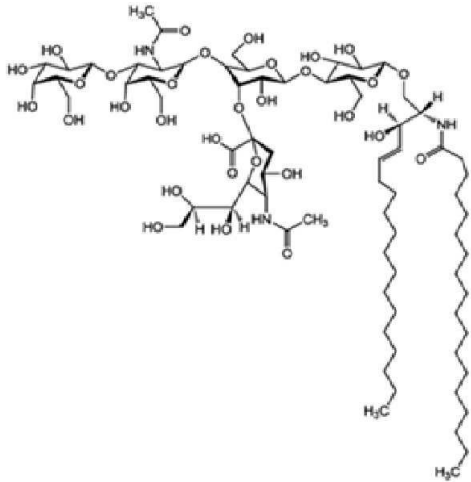
[0030] [화학식 1]



[0031]

[0032] 본 발명의 일구현예에서, 상기 강글리오사이드는 하기 [화학식 2]로 표시되는, 강글리오사이드 GM1 (ganglioside GM1)일 수 있다.

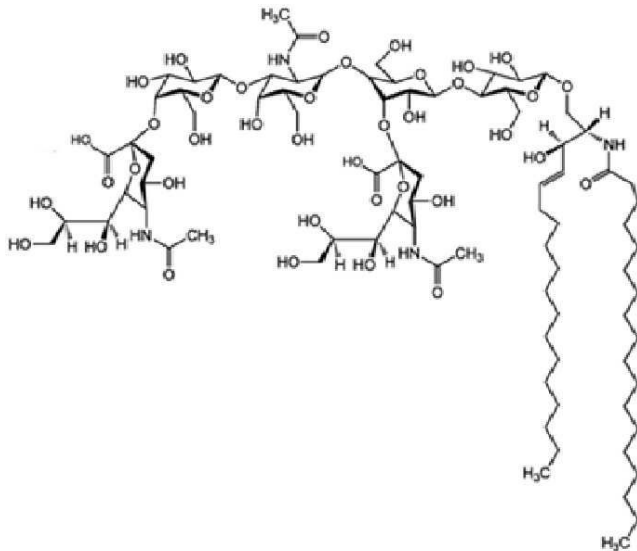
[0033] [화학식 2]



[0034]

[0035] 본 발명의 일구현예에서 상기 강글리오사이드는 하기 [화학식 3]으로 표시되는, 강글리오사이드 GD1a (ganglioside GD1a) 일 수 있다.

[0036] [화학식3]



[0037]

[0038] 본 발명의 강글리오사이드는 천연으로부터 분리 정제하거나, 상업적으로 구입하여 사용하거나 또는 당 업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조할 수 있다.

[0039] 바람직하게 본 발명의 강글리오사이드는 천연으로부터 분리 정제될 수 있다. 더 바람직하게는, 녹용(매화록 (Cervus nippon T., 마록(Cervus elaphus L.), 대록(Cervus canadensis E.)의 어린 뿔)으로부터 분리 정제될 수 있다.

[0040] 바람직하게는 본 발명의 강글리오사이드는 녹용에서 당업계에 공지된 용매 추출법 및 크로마토그래피를 이용한 분리방법에 의해 분리, 정제될 수 있다.

[0042] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명에 따른 조성물은 AhR의 활성을 감소시키고 AhR에 의해 매개되는 유전자의 발현량을 감소시킴으로써 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개성 질환 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 AhR 매개 질환 예방 및 완화 효과를 가지며, 이러한 AhR 매개 질환은 환경오염인자에 의한 피부, 폐, 기관지, 눈 등의 기관에 발병하는 질환으로서 당업계에 보고된 질병인 것이 바람직하며, 이를 예방

및 보호하는 것을 말한다.

- [0045] 본 발명의 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개 폐/기관지 질환은 COPD(chronic obstructive pulmonary disease), 천식(asthma), 폐암(lung cancer), 폐렴(pneumonia), 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 기관지염(bronchitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개 눈 질환은 결막염(conjunctivitis), 안구건조증(xerophthalmia), 백내장(cataract), 녹내장(glaucoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개 피부 질환은 피부염(dermatitis), 아토피(atopy), 건선(psoriasis), 여드름(acne), 피부암(skin cancer), 습진(eczema)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 본 발명에서 환경오염인자는 PAH, 미세먼지, 담배연기, 황사 및 중금속으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food), 식품 첨가제(food additives) 및 사료 등의 모든 형태를 포함하며, 인간 또는 가축을 비롯한 동물을 취식대상으로 한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0052] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 녹용 추출물 또는 강글리오사이드 또는 이의 염 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 녹용 추출물 또는 강글리오사이드와 AhR 질환 예방 및 완화에 효과에 개선효과가 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [0053] 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 일반 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마야말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 젓, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물 유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0054] 또한, 영양보조제로는 이에 한정되지 않지만 캡슐, 타블렛, 환 등에 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 녹용 추출물 또는 강글리오사이드 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용(건강음료)할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 녹용 추출물 또는 강글리오사이드와 AhR 질환 예방 및 완화에 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 AhR 매개 질환 예방 및 완화를 조성물이 건강음료 조성물로 이용되는 경우, 상기 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.
- [0056] 녹용 추출물 또는 강글리오사이드는 AhR 매개 질환 예방 및 완화를 식품 조성물의 유효성분으로 함유될 수 있는데, 그 양은 AhR 매개 질환 예방 및 완화 작용을 달성하기에 유효한 양으로 특별히 한정되는 것은 아니나, 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%일 수 있으며, 0.01 내지 50 중량% 인 것이 바람직하다. 본 발명의 식품 조성물은 녹용 추출물 또는 강글리오사이드와 함께 AhR 매개 질환 예방 및 완화에 효과가 있는 것으로

알려진 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있다.

[0057] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0059] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0061] [실시예]

[0062] 실시예 1. 녹용 추출물의 제조

[0063] 1-1. 녹용 열수 추출물의 제조

[0064] 건조된 녹용을 믹서로 분쇄한 다음, 분쇄한 녹용 100 g을 물 1 L에 넣고 3시간 80℃에서 추출하였다. 추출된 시료는 와트만(Whatman) 2번 여과지로 감압여과하고, 여과된 추출액을 진공 회전 농축기로 농축하여 용매성분을 제거한 후 녹용 열수 추출물을 얻었다.

[0066] 1-2. 녹용 메탄올 추출물의 제조

[0067] 메탄올을 사용하여 50℃에서 추출하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하여 녹용 메탄올 추출물을 얻었다.

[0069] 1-3. 녹용 에탄올 추출물의 제조

[0070] 100% 에탄올, 70% 에탄올, 50% 에탄올, 30% 에탄올을 사용하여 50℃에서 추출하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하여 녹용 에탄올 추출물을 얻었다.

[0072] 1-4. 녹용 에틸아세테이트 추출물의 제조

[0073] 100% 에틸아세테이트를 사용하여 50℃에서 추출하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하여 녹용 에틸아세테이트 추출물을 얻었다.

[0075] 1-5. 녹용 헥산 추출물의 제조

[0076] 100% 헥산을 사용하여 50℃에서 추출하였다는 점을 제외하고는 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하여 녹용 헥산 추출물을 얻었다.

[0078] 1-6. 녹용 초고압 추출물의 제조

[0079] 건조된 녹용을 믹서로 분쇄한 다음, 18% 에탄올 76 mL을 폴리에틸렌(polyethylene) 팩에 넣고 밀봉한 후 초고압 추출장치(Frescal MFP-7000; Mitsubishi Heavy Industries, Tokyo, Japan)를 이용하여 추출하였다. 초고압 추출 조건은 추출압력이 320 MPa, 추출시간은 5 min 이었다. 이후, 상기 실시예 1-1과 동일한 방법을 수행하여 녹용 초고압 추출물을 얻었다.

[0081] 1-7. 녹용 초임계 추출물의 제조

[0082] 건조된 녹용을 믹서로 분쇄 한 다음, 분쇄한 녹용 시료 1 g을 시료 카트리지에 충전하고 초임계 장치(SFX 3560, Isco Inc., Lincoln, NE, USA)를 이용하여 추출하였다. 초임계 유체 추출 조건은 추출 압력이 40 MPa, 추출 온도는 50℃, 초임계 이산화탄소의 유속은 60 mL/min, 추출 시간은 60 min이었다. 초임계 추출이 완료되면, 추출 장치의 압력을 낮춰 초임계 유체 상태를 해제하여 녹용 초임계 추출물을 얻었다.

[0084] 1-8. 녹용 아임계 추출물의 제조

[0085] 분쇄한 녹용 50 g을 1 L 물과 함께 아임계 추출장치(Biovan, Gyeonggi, Korea)의 아임계수 반응기에 넣고 밀폐하였다. 밀폐 후, 반응기의 온도를 200℃로 압력은 20 MPa로 상승시켰으며, 반응기의 온도가 200℃에 도달하면 상기 온도를 20분간 유지하여 추출을 하였다. 20분 후 추출물의 냉각수가 공급되는 저장탱크로 이송하여 30℃까지 급속 냉각시킨 후, 부유 잔사를 분리하기 위해 3,600 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상등액만 취하였다. 동결건조기(ilShin Lab Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 물을 전부 제거함으로써 녹용 아임계 추출물을 제조하였다.

[0087] [실험예]

[0088] 실험예 1. 녹용 추출물의 AhR에 의해 매개되는 루시페라아제 억제 활성 확인

[0089] COS-7 원숭이 신장세포 (ATCC, Manassas, VA, USA)를 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM; Hyclone)에서 배양하여 24-웰 플레이트에 24시간 이상 배양하였다. Transfection을 위해 혈청이 없는 DMEM (Hyclone)에 plus reagent (Aptabio, Gyeonggi, Korea)와 XRE plasmid를 함께 섞고 15분 간 인큐베이션 시켰다. 그 후, lipofecter reagent (Aptabio)를 혼합하여 상온에 다시 15분간 인큐베이션 시킨 다음 세포에 처리하였다. 4 시간 후, 10% FBS (Hyclone)이 포함된 DMEM (Hyclone)에서 세포를 24 시간 안정화 시켰다. 안정화 후, 다환 방향족 탄화수소에 속하는 물질 benzo(a)pyrene (BaP; Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 5 μM와 함께 실시예 1-1에서 제조한 녹용 열수 추출물을 40 μg/mL 및 80 μg/mL으로 처리하였다. 24 시간이 지난 후, proteinase inhibitor cocktail (Sigma-aldrich)이 포함된 NP-40 lysis buffer (Elpis, Daejeon, Korea)로 세포를 용해시켰다. 루시페라아제 활성 정도를 luciferase substrate (Promega, Madison, WI, USA)를 넣어준 다음 Microlumateplus LB 96V luminometer (Berthold, Wildbad, Germany)를 사용하여 측정하였다.

[0090] 그 결과, [도 1]에 나타난 바와 같이, BaP는 XRE 통제 하에 있는 루시페라아제의 활성을 유의적(^{##} $p < 0.01$)으로 증가시켰으나, 녹용 추출물을 처리함에 따라 증가한 루시페라아제 활성이 유의적(^{**} $p < 0.01$)으로 감소됨을 확인하였다. 이는 본 발명의 녹용 추출물이 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개 질환을 예방하거나 치료하는 효과가 우수하다는 것을 의미한다.

[0092] 실험예 2. 녹용 추출물의 CYP1A1 발현량 저해 활성 확인

[0093] 피부 각질세포인 HaCaT (ATCC)을 10% FBS (Hyclone)가 함유된 DMEM (Hyclone)와 함께 6-웰 플레이트에 2×10^5 cell/mL이 되도록 넣었다. 세포밀도가 약 80~85%가 되었을 때, 5 μM BaP(Sigma-aldrich)와 함께 실시예 1-1의 녹용 열수 추출물을 40과 80 μg/mL로 24시간 처리하였다. 배양이 끝난 뒤, TRIzol시약(Takara, Tokyo, Japan)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA는 나노드랍(NanoDrop 1000; Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)을 이용하여 정량하였다. 정량된 16 μL RNA를 Reverse Transcriptase Premix (Elpis)와 PCR 기계(Gene Amp PCR System 2700; Applied Biosystems, MA, USA)를 이용하여 42℃ 60분, 95℃ 5분의 조건에서 cDNA로 합성하였다. 16 μL의 생성된 cDNA 중 1 μL의 cDNA, 하기의 특정 프라이머(Bioneer, Daejeon, Korea) 그리고 PCR premix (Elpis)로 95℃에서 30초, 60℃에서 1분, 72℃에서 1분을 30번 반복하여 PCR을 수행하였다. PCR로 인해 증폭된 cDNA를 1.5% agarose gel로 전기영동하여 분리하였으며, G:BOX EF imaging system (Syngene)을 이용하여 cDNA band를 확인하였다.

표 1

[0094]

유전자	프라이머 종류	염기서열(5'→3')	서열번호
CYP1A1	Forward primer	5'-CTACCCAACCTTCCCTGAAT-3'	1
	Reverse primer	5-CGCCCCCTGGGGATGTAAAA-3'	2
GAPDH	Forward primer	5-ATTGTTGCCATCAATGACCC-3	3
	Reverse primer	5-TCGCCCCACTTGATTTTGA-3	4

[0096]

그 결과, [도 2]에 나타낸 바와 같이 BaP를 처리하였을 때 AhR에 의해 매개되는 CYP1A1 mRNA 발현량이 증가하였으나, 녹용 추출물을 처리함에 따라 CYP1A1 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다. 이는 본 발명의 녹용 추출물이 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개 피부질환을 효율적으로 감소시킨다는 것을 의미한다.

[0098]

실험예 3. 강글리오사이드의 AhR에 의해 매개되는 루시페라아제 억제 활성 확인

[0099]

강글리오사이드의 AhR에 의해 매개되는 루시페라아제 억제 활성을 확인하기 위하여 강글리오사이드 GM3 (Cayman, Ann Arbor, MI, USA)를 0.5 μ M 또는 1 μ M, 강글리오사이드 GM1 (Cayman) 또는 강글리오사이드 GD1a (Cayman)를 각각 1 μ M로 세포에 처리하여 실험예 1과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

[0100]

그 결과, [도 3]에 나타난 바와 같이, BaP는 XRE 통제 하에 있는 루시페라아제의 활성을 유의적($^{##}p < 0.01$)으로 증가시켰으며, 강글리오사이드를 처리함에 따라 증가한 루시페라아제 활성이 유의적($^{**}p < 0.01$)으로 감소됨을 확인하였다. 이는 본 발명의 강글리오사이드가 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개 질환을 효율적으로 감소시킨다는 것을 의미한다.

[0102]

실험예 4. 강글리오사이드의 CYP1A1 발현량 저해 활성 확인

[0103]

강글리오사이드의 CYP1A1 mRNA 발현량 저해 활성을 알아보기 위하여 강글리오사이드 GM3 (Cayman)를 0.5 μ M 또는 1 μ M 및 강글리오사이드 GM1 (Cayman) 및 강글리오사이드 GD1a (Cayman)를 각각 1 μ M로 세포에 처리하여 실험예 3과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

[0104]

그 결과, [도 4]에 나타낸 바와 같이 BaP를 처리하였을 때 AhR에 의해 매개되는 CYP1A1 mRNA 발현량이 증가하였으나, 강글리오사이드를 처리함에 따라 농도 의존적으로 감소됨을 확인하였다.

[0106]

이하, 본 발명에 따른 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 유효성분으로 포함하는 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개 질환 예방 및 완화용 식품의 제조 예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다. AhR 매개 질환 예방 및 완화 활성이 우수한 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 가지고 하기과 같은 조성 성분 및 조성비에 따라 제조예 :식품을 통상적인 방법에 따라서 제조하였다.

[0108]

[제조예 1] 식품

[0109]

1-1. 건강식품의 제조

[0110]

상기 실시예 1 내지 2의 녹용 추출물 또는 강글리오사이드 1000 mg, 비타민 A 아세테이트 70 μ L, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B1 0.13 mg, 비타민 B2 0.15 mg, 비타민 B6 0.5 mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5 mg, 황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼륨 90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg를 혼합하여 제조할 수 있으며, 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.

[0112] 1-2. 건강음료의 제조

[0113] 상기 실시예 1 내지 2의 녹용 추출물 또는 강글리오사이드 1000 mg, 구연산 1000 mg, 올리고당 100 g, 매실농축액 2 g, 타우린 1 g에 정제수를 가하여 전체 900 mL 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강음료 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0115] 1-3. 츄잉껌

[0116] 껌 베이스 20 중량%, 설탕 76.9 중량%, 향료 1 중량% 및 물 2 중량%와 상기 실시예 1 내지 2의 녹용 추출물 또는 강글리오사이드 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

[0118] 1-4. 캔디

[0119] 설탕 60 중량%, 물엿 39.8 중량% 및 향료 0.1 중량%와 상기 실시예 1 내지 2의 녹용 추출물 또는 강글리오사이드 0.1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 캔디를 제조하였다.

[0121] 1-5. 비스킷

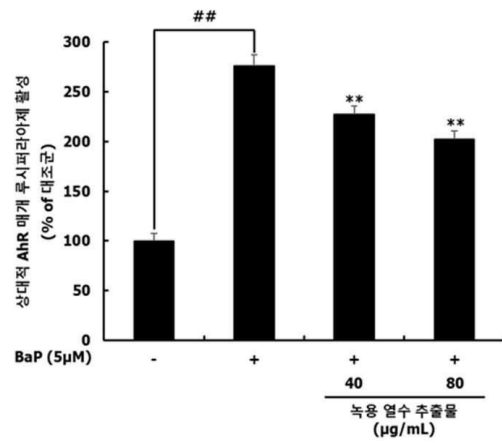
[0122] 박력 1급 25.59 중량%, 중력 1급 22.22 중량%, 정백당 4.80 중량%, 식염 0.73 중량%, 포도당 0.78 중량%, 팜쇼트닝 11.78 중량%, 압모늄 1.54 중량%, 중조 0.17 중량%, 중아황산나트륨 0.16 중량%, 쌀가루 1.45 중량%, 비타민 B 0.0001 중량%, 밀크향 0.04 중량%, 물 20.6998 중량%, 전지분유 1.16 중량%, 대용분유 0.29 중량%, 제1인산칼슘 0.03 중량%, 살포염 0.29 중량% 및 분무유 7.27 중량%와 상기 실시예 1 내지 2의 녹용 추출물 또는 강글리오사이드 1 중량%를 배합하여 통상의 방법으로 비스킷을 제조하였다.

산업상 이용가능성

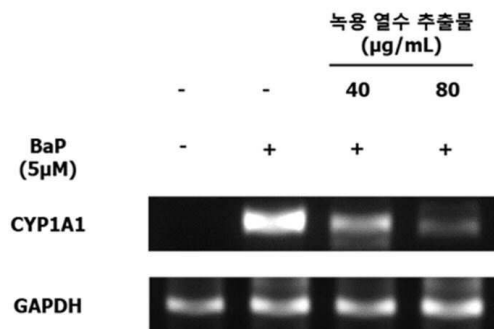
[0124] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명은 녹용 추출물 또는 강글리오사이드를 유효성분으로 함유하는 환경오염인자로부터 유도되는 AhR 매개 질환 예방 및 완화용 조성물에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명의 녹용 추출물 및 강글리오사이드는 환경오염인자로부터 활성화된 AhR을 억제시켰으므로 환경오염인자에 의한 AhR 매개 질환 예방 및 완화에 우수한 효과가 있다. 또한 피부 세포에서 AhR에 의해 매개되는 CYP1A1 유전자 발현을 감소시켰으므로, 환경오염인자에 의한 AhR 매개 피부질환 완화 및 예방에 우수한 효과가 있다. 따라서 본 발명의 녹용 추출물 및 강글리오사이드는 천연물이므로 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있으며, AhR 매개 질환 예방 및 완화에 탁월한 효과를 보이는 조성물을 제공할 수 있으므로 산업상 이용가능성이 높다.

도면

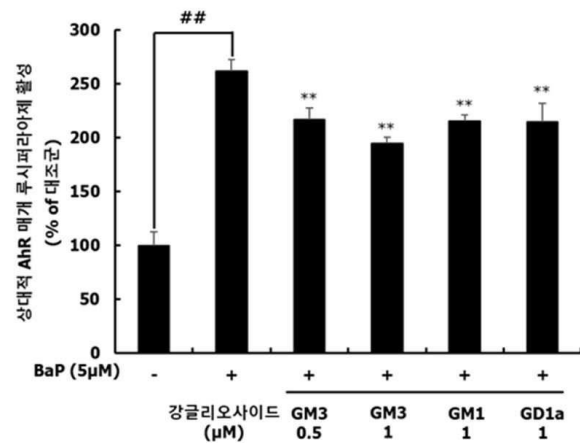
도면1



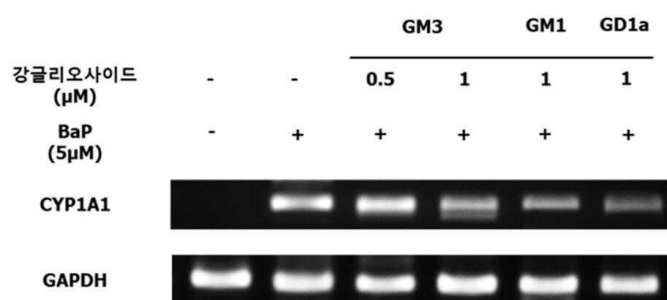
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Composition for preventing or treating aryl hydrocarbon
receptor-mediated diseases derived from environmental pollutants
comprising deer antler extract and gangliosides

<130> 1065518

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for CYP1A1

<400> 1

ctaccaacc cttccctgaa t

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for CYP1A1

<400> 2

cgccccttgg ggatgtaaaa

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for GAPDH

<400> 3

attgttgcca tcaatgaccc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for GAPDH

<400> 4

tcgccccact tgattttgga

20