



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월29일
(11) 등록번호 10-2139265
(24) 등록일자 2020년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/366 (2006.01) A61K 36/07 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/366 (2013.01)
A61K 36/07 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0159126
(22) 출원일자 2018년12월11일
심사청구일자 2018년12월11일
(65) 공개번호 10-2020-0071410
(43) 공개일자 2020년06월19일
(56) 선행기술조사문헌
KR101446179 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한경대학교 산학협력단
경기도 안성시 중앙로 327(석정동)
(72) 발명자
강희완
경기도 안성시 대덕면 서동대로 4725, 105동 130
4호(롯데캐슬 센트럴시티)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 목질진흙버섯으로부터 추출된 스티릴파이론계 화합물을 유효성분으로 하는 면역 기능 강화용 조성물 및 이의 제조방법

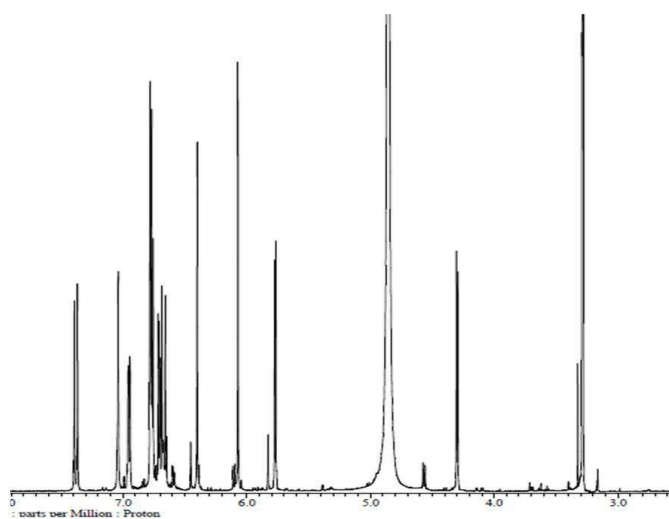
(57) 요약

본 발명은 목질진흙버섯 KACC93057P(Phellinus linteus) 유래의 스티릴파이론(styrylpyrone)계 화합물인 하이폴로민 비(hypholomine B)와 다발리아락톤(davallialactone)에 대한 세포의 증식 활성화와 면역 효과에 관한 기술이다.

본 발명의 여러 구현예에 따르면, 목질진흙버섯으로부터 폴리페놀 추출물인 스티릴파이론(styrylpyrone) 계열의 화합물을 유효성분으로 포함하는 면역 기능 강화용 조성물을 제공할 수 있다.

상기 조성물은 세포 증식과 면역을 활성화하는 등의 면역 기능 강화에 탁월한 효과를 나타내며, 식품 조성물 또는 약학 조성물로 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 37/04 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 116164-2

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발

연구과제명 목질진흙버섯의 안정적 생산을 기반으로 하는 면역강화 고 부가가치 가공식품개발

기 여 율 1/1

주관기관 머쉬아트영농조합법인

연구기간 2016.12.01 ~ 2018.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

하이폴로민 비 또는 다발리아락톤을 유효성분으로 하는 면역 기능 강화용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 하이폴로민 비 또는 다발리아락톤은 목질진흙버섯으로부터 추출된 추출물로부터 분리된 스티릴파이론계 화합물인 것을 특징으로 하는 면역 기능 강화용 식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 생체의(*in vitro*)에서 대식세포의 TNF- α 및 IL-6 생성량 증가를 활성화하는 것을 특징으로 하는 면역 기능 강화용 식품 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 목질진흙버섯 KACC93057P(*Phellinus linteus*) 유래의 스티릴파이론(styrylpyrone)계 화합물인 하이폴로민 비(hypholomine B)와 다발리아락톤(davallialactone)에 대한 세포의 증식 활성화와 면역 효과에 관한 기술이다.

배경기술

[0002] 상황버섯은 "버섯의 산삼"으로 일컫를 정도로 휘귀 하고 약리활성이 뛰어나며 일반적으로 목질진흙버섯(학명:*Phellinus linteus*)을 가리킨다. 목질진흙버섯(펠리너스린테우스)는 고산지대에 서식하고 있는 산뽕나무, 참나무 등의 고목에서 자생하는 매우 희귀한 담자균류의 다년생 버섯으로 상황이란 말은 뽕나무 상(桑)에 누를황(黃)으로 한의서에는 상이(桑耳) 상목이(桑木耳)등의 이름으로 기록되고 있으며 일본에서는 메시마코브라고 불리고 있다. 1967년 일본 국립 암 연구 센터에서 Sarcoma 180 고형암에 대해서 린테우스 상황버섯의 종양 저지율 96.7%을 발표 한 이후 전 세계적으로 연구의 기폭제가 되어 항암, 면역활성 기구해명과 다당체인 베타글루칸(β -Glucan)이 유효 성분으로 밝혀졌고, 2002년에는 미국식품의약국(FDA)로부터 세계 10대 항암식품으로 선정한 바 있다. 린테우스상황버섯은 자연살해세포(natural Killer, NK 세포), T-보조세포(T-helper cell), 세포독성세포 T 세포, 대식세포 등의 인체 면역기능을 활성화하여 암세포 성장을 억제하는 것으로 알려져 있다. 세계적으로

연구된 상황버섯의 약리효능은 대부분 목질진흙버섯을 재료로 하고 있다는 점에서 목질진흙버섯의 유효성이 인정되는 부분이다.

[0003] 이러한 식용버섯의 약리효과에 대해서도 지금까지 여러 분야에서 발표되어 왔으며, 고령화 사회를 맞이하게 된 현대에 이르러 먹으면서 건강을 증진시킨다고 하는 일석이조인 버섯식이에 의하여 이를 수 있는 역할이 크게 기대되고 있다. 수백만 년 동안 버섯은 바이러스와 박테리아 등의 침입자들을 막아내기 위해 체내에서 방어 물질들을 생산하여, 체내의 독성물질을 해독시키면서 환경에 적응하여왔다. 지금까지 알려진 약용 버섯들로부터, 이들이 생산하는 2차 대사산물인 이른바 방어 물질은 인류에게 수 천년 동안 안전하면서도 효과적인 의약품으로 알려져 왔다.

[0004] 특히, 수 천 종에 이르는 버섯 균류들은 독특하며 다양한 화합물들을 생산하는 것으로 알려져 있어 신약개발을 위한 좋은 소재로 이용할 수 있을 것이다.

[0005] 하지만 아직까지 버섯으로부터의 천연물 연구는 다른 미생물에 비해 저조한 편이며 특히 식용버섯 외에 영지, 표고, 차가버섯 등 전통 약용버섯에 대한 정확한 성분 및 함량분석 및 이들이 나타내는 효능에 대해서는 아직 명확히 연구된 바가 없어, 버섯을 소재로 한 천연약물의 개발은 미비한 상태이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제0590726호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위하여 목질진흙버섯 유래의 폴리페놀 추출물 및 이 추출물에 함유되어있는 스티릴파이론(styrylpyrone) 계열의 화합물 하이폴로민 비 또는 다발리아락톤을 유효성분으로 하여 세포증식과 면역을 증진 및 활성화시킬 수 있는 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 대표적인 일 측면에 따르면, 유효성분으로 하는 면역 기능 강화용 조성물에 관한 것이다.

[0009] 상기 하이폴로민 비 또는 다발리아락톤 화합물은 목질진흙버섯으로부터 추출된 추출물로부터 분리된 스티릴파이론계 화합물인 것이 바람직하다.

[0010] 상기 조성물은 생체외(*in vitro*)에서 대식세포의 TNF- α 및 IL-6 생성량 증가를 활성화하는 것이 바람직하다.

[0011] 본 발명의 다른 대표적인 일 측면에 따르면, 상기 조성물을 포함하는 항염증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 대표적인 일 측면에 따르면, 목질진흙버섯으로부터 분리된 하이폴로민 비 또는 다발리아락톤 화합물을 유효성분으로 하는 면역 기능 강화용 조성물의 제조방법에 있어서,

[0013] (A) 목질진흙버섯을 제1 용매로 추출하여 제1 용매 추출물을 수득하는 단계;

[0014] (B) 상기 제1 용매 추출물을 제2 용매로 분배 추출하여 폴리페놀 추출물을 수득하는 단계;

[0015] (C) 상기 폴리페놀 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 유효성분을 용출시키는 단계; 및

[0016] (D) 상기 용출된 용출액을 분리시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역 기능 강화용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0017] 상기 제1 용매는 탄소수 1 내지 6의 지방족 알콜, 탄소수 1 내지 10의 지방족 탄화수소, 또는 이들의 혼합물이

고,

[0018] 상기 제2 용매는 헥산, 에틸아세테이트, 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 여러 구현예에 따르면, 목질진흙버섯으로부터 폴리페놀 추출물인 스티릴파이론(styrylpyrone) 계열의 화합물을 유효성분으로 포함하는 면역 기능 강화용 조성물을 제공할 수 있다.

[0020] 상기 조성물은 세포 증식과 면역을 활성화하는 등의 면역 기능 강화에 탁월한 효과를 나타내며, 식품 조성물 또는 약학 조성물로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 실시예 1에서 추출된 하이폴로민 비의 ¹H NMR spectrum 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 실시예 1에서 추출된 하이폴로민 비의 ESI-mass spectrum 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 실시예 1에서 추출된 하이폴로민 비의 화학 구조식을 나타낸 것이다.
- 도 4는 실시예 2에서 추출된 다발리아락톤의 ¹H NMR spectrum 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 실시예 2에서 추출된 다발리아락톤의 ESI-mass spectrum 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 실시예 2에서 추출된 다발리아락톤의 화학 구조식을 나타낸 것이다.
- 도 7은 하이폴로민 비와 다발리아락톤의 대식세포 증식 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 다발리아락톤 및 하이폴로민 비의 DPPH 라디칼 소거능 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 다발리아락톤, 하이폴로민 비의 ABTS 라디칼 소거능 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 다발리아락톤과 하이폴로민 비의 항염증효과(NO value)를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 다발리아락톤 처리에 따른 면역관련 TNF-α 및 IL-6 생성량을 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 하이폴로민 비 처리에 따른 면역관련 TNF-α 및 IL-6 생성량을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.
- [0023] 본 발명에서는 세포 증식과 면역을 활성화하는 등의 면역 기능 강화에 탁월한 효과를 나타낼 수 있는 유효성분을 상기 목질진흙버섯으로부터 추출하여 이를 세포증식과 면역 및 항암 활성화시킬 수 있는 면역 기능 강화용 조성물로 제공하고자 하는 것이다.
- [0024] 상기와 같은 효능을 나타내는 목질진흙버섯의 항산화 주요성분들을 확인한 결과, 스티릴파이론(styrylpyrone) 계열의 화합물이 분리되었다.
- [0025] 상기 분리된 화합물들은 구조분석을 통하여 화학구조를 확인한 결과 스티릴파이론 계열의 화합물인 하이폴로민 비(Hypholomine B)와 다발리아락톤(Davallialactone)이 주 활성성분으로 이루어져 있음을 확인하였다. 이들 이외에도 스티릴파이론 계열의 폴리페놀 화합물이 함유되어 있으나, 미량의 성분으로 함유되어 통상의 방법으로는 분리할 수 없었다.
- [0026] 따라서, 본 발명의 일 측면에 따르면, 목질진흙버섯(기탁번호: KACC93057P)으로부터 분리된 하이폴로민 비 또는 다발리아락톤 화합물을 유효성분으로 하는 면역 기능 강화용 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 스티릴파이론계 화합물의 유효성분을 포함하는 상기 조성물은 생체의(*in vitro*)에서 대식세포의 증식을 활성화하는 것을 확인하였다.
- [0028] 또한, 상기 조성물은 생체의(*in vitro*)에서 대식세포의 TNF-α 및 IL-6 생성량 증가를 확인하였는데, 상기 TNF-

α 는 인체에 침입한 병원체에 대한 숙주의 방어에 관여하며, 상기 IL-6는 cytokines의 분비를 유도함으로써 인체의 면역반응을 조절한다고 알려져 있다. 즉, 상기 조성물을 면역 기능을 활성화하는데 효과적임을 확인하였다.

- [0029] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 목질진흙버섯(기탁번호: KACC93057P)으로부터 분리된 하이폴로민 비 또는 다발리아락톤 화합물을 유효성분으로 하는 면역 기능 강화용 조성물의 제조방법에 있어서,
- [0030] (A) 목질진흙버섯(기탁번호: KACC93057P)을 제1 용매로 추출하여 제1 용매 추출물을 수득하는 단계;
- [0031] (B) 상기 제1 용매 추출물을 제2 용매로 분배 추출하여 폴리페놀 추출물을 수득하는 단계;
- [0032] (C) 상기 폴리페놀 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 유효성분을 용출시키는 단계; 및
- [0033] (D) 상기 용출된 용출액을 분리시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역 기능 강화용 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0034] 먼저, 상기 목질진흙버섯은 그대로 사용하거나, 또는 버섯 자실체 및 균사체 양액을 사용하여 추출하기도 하며, 조 추출물은 필요에 따라서 상법에 따라서 더욱 정제하여 사용할 수도 있다.
- [0035] 바람직하게는 상기 목질진흙버섯은 0.01 내지 5 cm 크기로 절단한 것을 사용하는 것이 바람직하며, 상기 크기 범위를 벗어나는 경우에는 용매 추출하기 어려운 문제점을 갖게 되므로 바람직하지 않다.
- [0036] 이렇게 준비된 목질진흙버섯은 제1 용매로 추출하여 제1 용매 추출물을 수득한 후, 제 2용매로 분배 추출함으로써 폴리페놀 추출물을 수득하는 것이 바람직하다.
- [0037] 이때, 상기 제1 용매 및 제2 용매는 알콜류, 아세테이트류, 에테르류, 아세톤류 및 탄화수소류 중에서 선택된 1종 이상의 유기 용매를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0038] 더욱 바람직하게는 상기 제1 용매는 탄소수 1 내지 6의 지방족 알콜, 탄소수 1 내지 10의 지방족 탄화수소, 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하고, 상기 제2 용매는 헥산, 에틸아세테이트, 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하다. 상기 제1 용매와 제2 용매의 종류를 사용하였을 때 추출 수율이 2 배 이상 급격히 향상하는 것을 확인하였다.
- [0039] 이후, 상기 폴리페놀 추출물은 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 상술한 스틸릴파이릴계 화합물의 유효성분을 용출시킨 후, 용출된 유효성분을 메탄올을 사용하여 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피하는 과정을 통해 분리시키거나, 또는 상기 용출된 용출액을 40 ~60 % 메탄올을 사용하여 분취용 고속 액체 크로마토그래피(preparative HPLC)를 실시함으로써 각 성분을 분리하여 수득하는 것이 바람직하다.
- [0040] 본 발명에 따른 조성물의 제형은 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 젤, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 2000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 1000 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 그러나 원하는 치료 효과의 달성을 위해 요구되는 것보다 낮은 수준의 화합물의 용량에서 시작하여, 원하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 서서히 증가시키는 것은 당업계의 지식 내에 있으며, 바람직한 투여량은 나이, 성별, 체형, 체중에 따라 결정될 수 있다. 상기 조성물은 약제학상 허용 가능한 제약 제제로 제제화 되기 전에 추가로 가공될 수 있으며, 바람직하게는 더 작은 입자들로 분쇄 또는 연마될 수 있다. 또한 상기 조성물은 병태 및 치료되는 환자에 따라 달라질 것이지만, 이는 비-독창적으로 결정할 수 있다.
- [0042] 상기 조성물 중 유효성분의 농도는 1 nM 내지 1 M, 또는 1 μ M 내지 1 mM, 또는 0.1 mM 내지 0.2 mM, 또는 0.05 μ M 내지 5 μ M의 범위로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0043] 또한, 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는 동맥 또는 정맥 내로 투입하거나, 피하

로, 직장으로, 비강으로, 임의의 다른 비경구로도 투입될 수 있으며, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0044] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0045] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.

[0046] **제조예 1: 목질진흙버섯의 분말 제조**

[0047] 2년산 목질진흙버섯 KACC93057P를 53 °C에서 수분 함량이 12 중량%가 되도록 건조한 후, 건조된 버섯을 100 mesh(50 내지 150 μm)의 크기로 분쇄하고 분말을 정선하였다.

[0048] **실시예 1: 목질진흙버섯으로부터 hypholomine B 및 davallialactone 추출**

[0049] 제조예 1의 목질진흙버섯 분말을 탄소수 1 내지 6의 지방족 알콜 용매로 추출한 후, 헥산 및 에틸아세테이트가 혼합된 용매를 사용하여 분배 추출하여 폴리페놀 분획을 수득하였다. 그리고 난 후 폴리페놀 추출액을 클로로포름-메탄을 용리액을 사용하여 실리카젤 컬럼 크로마토그래피하여 용출된 용출액을 메탄올을 사용하여 세파덱스 LH-20 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 하이폴로민 비(hypholomine B) 및 다발리아락톤(davallialactone)을 수득하였다.

[0050] 단, 화학구조 동정은 정제된 화합물을 각각 CD₃OD 및 DMSO-d₆에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, 도 1, 4와 같이 ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.

[0051] **실험예 1: 화학구조 분석**

[0052] 1. 하이폴로민 비의 화학구조 분석

[0053] ¹H NMR spectrum의 측정 및 해석

[0054] ¹H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.03 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-9), 6.95 (1H, dd, J = 7.5, 1.3 Hz, H-13), 6.78 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-12), 6.80 (1H, br. s, H-9'), 6.79 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-12'), 6.73 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-13') ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 proton이 관찰되었고, d 7.37 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-7), 6.69 (1H, d, J = 15.8 Hz, H-6) ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 proton, 5.79 (1H, d, J = 6.1 Hz, H-7'), 4.32 (1H, d, J = 6.1 Hz, H-6') ppm에서 sp³ methine proton, 6.42 (1H, s, H-4), 6.09 (1H, s, H-4') ppm에서 sp² methine proton이 관찰되었다(도 2). 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과, 하이폴로민 비(hypholomine B)와 잘 일치하였다.

[0055] Mass spectrum의 측정 및 해석

[0056] ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 hypholomine B로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 488.9에서 [M-H]⁻ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 490, 분자식 C₂₆H₁₈O₁₀의 hypholomine B로 동정되었으며 구조는 도 3과 같다

[0057] 2. 다발리아락톤의 화학구조 분석

- [0058] ¹H NMR spectrum의 측정 및 해석
- [0059] ¹H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.00 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-9), 6.92 (1H, dd, J = 8.2, 1.7 Hz, H-13), 6.76 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-8'), 6.73 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-12), 6.62 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-11'), 6.58 (1H, dd, J = 8.2, 2.0 Hz, H-12') ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 proton이 관찰되었고, 7.05 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-7), 6.58 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-6) ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 proton, 5.66 (1H, d, J = 13.2 Hz, H-6'), 4.06 (1H, d, J = 13.2 Hz, H-5') ppm에서 sp³ methine proton, 6.03 (1H, s, H-4), 5.40 (1H, s, H-3') ppm에서 methine proton, 2.01 (3H, s, H-1') ppm에서 methyl proton이 관찰되었다(도 5). 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과 다발리아락톤(davallialactone)과 잘 일치하였다.
- [0060] Mass spectrum의 측정 및 해석
- [0061] ¹H NMR spectrum을 측정한 결과 다발리아락톤으로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 463.1에서 [M-H]⁻ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 464, 분자식 C₂₅H₂₀O₉의 다발리아락톤으로 동정되었으며 구조는 도 6과 같다.
- [0062] **실험예 2: 다발리아락톤(davallialactone)과 하이폴로민 비(hypholomine B)의 세포증식 효과**
- [0063] 다발리아락톤(davallialactone)과 하이폴로민 비(hypholomine B)의 세포에 대한 독성을 조사하고자 실험을 실시하였다. 세포독성은 MTT assay로 측정하였으며, RAW 264.7 세포를 5×10⁴ cells/well이 되도록 96-well plate에 처리하여 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 16, 31, 63, 125, 250 μg/mL의 농도별로 제조한 다발리아락톤과 하이폴로민 비를 처리하고, 양성 대조구로서는 lipopolysaccharide(LPS)로 음성대조구(Control)는 식염수를 처리하고 22시간 배양하였다. 물질진흙버섯 KACC93057P에서 분리한 히스피딘(Hispidin)과 이노스카빈에이(inoscabin A)를 비교구로서 사용하였다. 배양 후 PBS 완충용액에 녹인 methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide(MTT 5 mg/mL) 용액을 각 well에 10 μL씩 첨가하고 다시 4시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 이후 상등액을 완전히 제거하고 dimethyl sulfoxide(DMSO) 100 μL를 각 well에 첨가하여 10분간 반응시켜 formazan 결정을 완전히 용해한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하여 동물세포의 생존율을 조사하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0064] 대식세포주에 대한 세포생존율을 확인한 결과 하이폴로민 비와 다발리아락톤은 16, 31, 63, 125, 250 μg/mL에서 농도 의존적으로 93%에서 170%의 대식세포생존율을 나타내었다. 반면에 비교구로 사용한 항산화 폐놀화합물인 히스피딘과 이노스카빈 A는 농도가 높아지면 세포생존율이 감소하는 경향치를 보였다. 따라서 하이폴로민 비와 다발리아락톤은 특징적으로 대식세포증식을 활성화하는 특성이 있는 것으로 확인되었다. 이는 하이폴로민 비와 다발리아락톤은 세포독성이 없으며 오히려 대식세포증식을 활성화함으로써 면역 증강에도 효과적임을 보여주는 결과이다.
- [0065] **실험예 3: 다발리아락톤과 하이폴로민 비의 항염증효과**
- [0066] RAW 264.7 세포를 96 well plate (4×10⁴ 개/well)에 200 μl씩 분주하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양한 후 하이폴로민 비와 다발리아락톤을 16, 31, 63, 125, 250 μg/mL에서 농도로 접종 후 37℃, 5% CO₂ 조건에서 30분간 배양한 후 LPS(Lipopolysaccharide)를 0.1 μg/ml 농도가 되도록 첨가하여 염증을 유발시키고 18시간 후 NO(Nitrate oxidation) 분석을 실시하였다. 배양시킨 세포를 꺼내어 각 well에서 상층액을 100 μl씩 96 well plate에 옮겨 Greiss reagent[Griess reagen A(0.1% NEDHC 수용액), griess reagent B (5% H₃PO₄, 1% Sulfanilamide 혼합수용액)를 각각 1:1비율로 혼합]를 동량으로 첨가하였다. 실온에서 반응 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 그 값을 NaNO₂를 사용하여 만든 표준(standard) 용액을 통해 표준값(대조군)을 얻은 후 표준값들의 직선 그래프에 대한 상대 값(y = ax + b일 때, x' = (y'-b) / a, x'는 NO 생성 값(μM), y'는 비교군 측정값)으로 계산하여 나타내었다.
- [0067] Lipopolysaccharide(LPS)를 넣어주면 tool-like receptor 4를 경유하여 대식세포에 활성화신호를 주고 inducible

NO synthase(iNOs)의 발현에 영향을 주어 NO를 합성한다. LPS는 Gram 음성세균의 세포벽을 구성하는 성분으로 염증 유발원으로 알려져 있다. 도 10는 LPS를 처리하고 다발리아락톤과 하이폴로민 비를 첨가하였을 때 NO생성이 농도 의존적으로 감소하는 항염증효과를 나타낸 것으로 다발리아락톤과 하이폴로민 비 처리구에서는 250 μg/mL에서는 비 처리구와 유사한 NO 생성이 억제되어 높은 항염증 효과가 있는 것으로 나타났다. 한편, LPS를 포함하지 않은 대식세포는 NO를 거의 생성하지 않았지만 LPS만을 첨가했을 때 NO가 100 μM까지 증가하였다. 산화질소(NO)는 자유 라디칼로서 심혈관계, 신경계 및 면역계의 전달 물질로 세포 내 항상성 유지, 신경전달 물질의 운반, 항암작용 등의 기능을 한다. 이것이 과량 생성되면 진신적 염증을 유발하여 생체에 여러 부정적인 영향을 미칠 수 있으나 적정량의 산화질소 생성은 선천성 면역의 중요한 인자로 여겨진다. 따라서 다발리아락톤과 하이폴로민 비는 염증수치를 급격히 억제시킴으로서 궁극적으로는 면역기능에 역할을 하는 것으로 확인할 수 있었다.

[0068] **실험예 4: 다발리아락톤과 하이폴로민 비의 면역활성 증가**

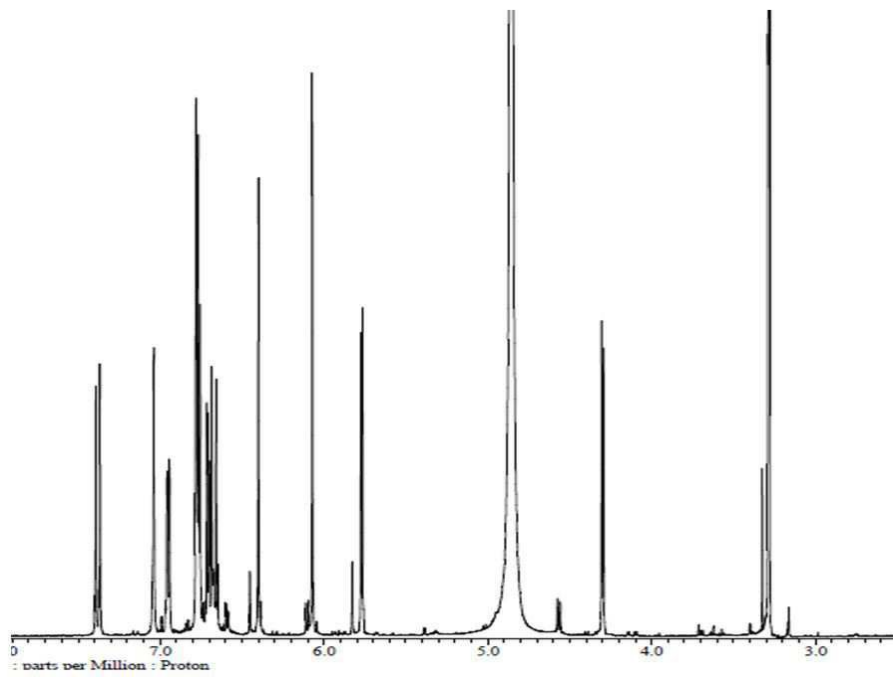
[0069] TNF-α는 인체에 침입한 병원체에 대한 숙주의 방어에 관여하며 IL-6는 transforming growth factors와 granulocyte-monocyte colony-stimulating factor와 같은 cytokines의 분비를 유도함으로써 인체의 면역반응을 조절한다고 알려져 있다. 따라서 다발리아락톤과 하이폴로민 비처리에 따르는 TNF-α 및 IL-6 생산량을 조사하여 면역활성 효과를 조사하였다.

[0070] 먼저, RAW 264.7 세포를 5×10^5 cells/well이 되도록 24-well plate에 처리하여 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 농도별로 제조한 다발리아락톤과 하이폴로민 비와 면역활성 자극제로 사용되는 세균의 외막성분인 Lipopolysaccharide(LPS) 1 μg을 처리하고 22시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 상등액을 이용하여 TNF-α 및 IL-6의 생성량을 ELISA kit(Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ, USA)으로 측정하였다. TNF-α 및 IL-6 생성량은 kit에 포함된 TNF-α 및 IL-6의 농도별 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

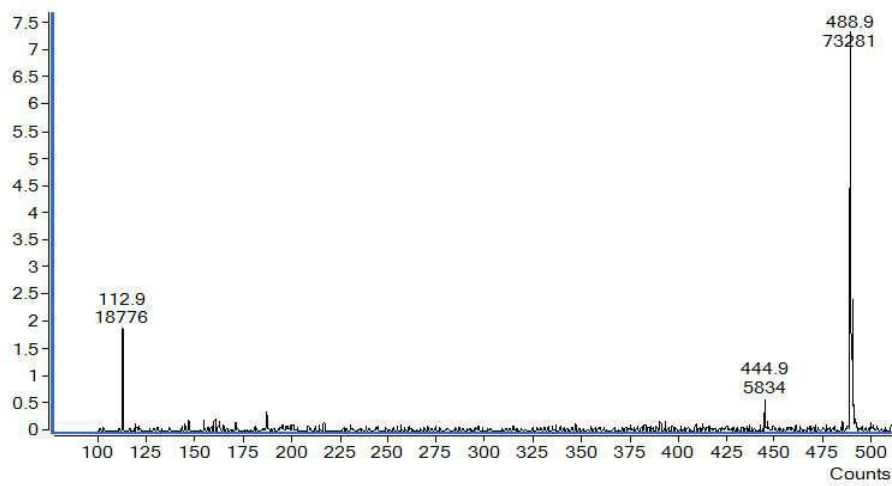
[0071] 다발리아락톤과 하이폴로민 비의 대식세포주에 대한 TNF-α 와IL-6 생성량은 도 11, 12와 같다. 다발리아락톤 처리 구에서 TNF-α 생성량은 LPS 단독 처리구(678.54 pg/mL)에 비하여 농도 의존적으로 752 pg/mL, 839 pg/mL, 1019 pg/mL, 1033 pg/mL으로 높게 생성하였다. IL-6 처리 구에서도 유사한 경향치를 보여 다발리아락톤 12.5 μg/mL 처리 구에서부터 LPS단독처리 구 201 pg/mL 비하여 306 pg/mL로 증가하기 시작하여 다발리아락톤 100 μg/mL 처리 구에서 1094 pg/mL로 5배 이상 증가되었다. 하이폴로민 비 처리 구에서의 TNF-α 생성량은 농도 의존적으로 752 pg/mL, 839 pg/mL, 1019 pg/mL, 1033 pg/mL으로 TNF-α를 생성하였다. IL-6 처리 구에서도 유사한 경향치를 보여 다발리아락톤 25 μg/mL 처리 구에서부터 LPS단독처리 구(201 pg/mL)보다 290 pg/mL로 증가하기 시작하여 100 μg/mL 처리 구에서 965 pg/mL로 4.8배 이상 IL-6 생산량이 증가되었다. 대식세포주에 대한 cytokine 생성은 인체에 침입한 병원체 및 종양세포 들에 대한 제거 활성을 증진한다고 알려져 있다. 다발리아락톤과 하이폴로민 비를 처리함으로써 TNF-α와 IL-6의 생성량이 증가하는 결과로 cytokine의 생성을 촉진하여 인체의 면역력을 증진할 것으로 판단된다.

도면

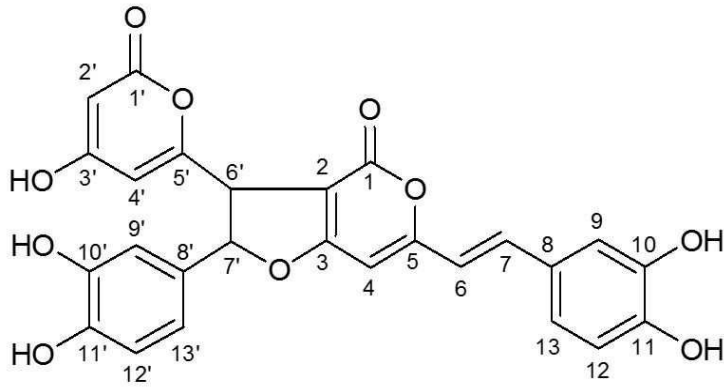
도면1



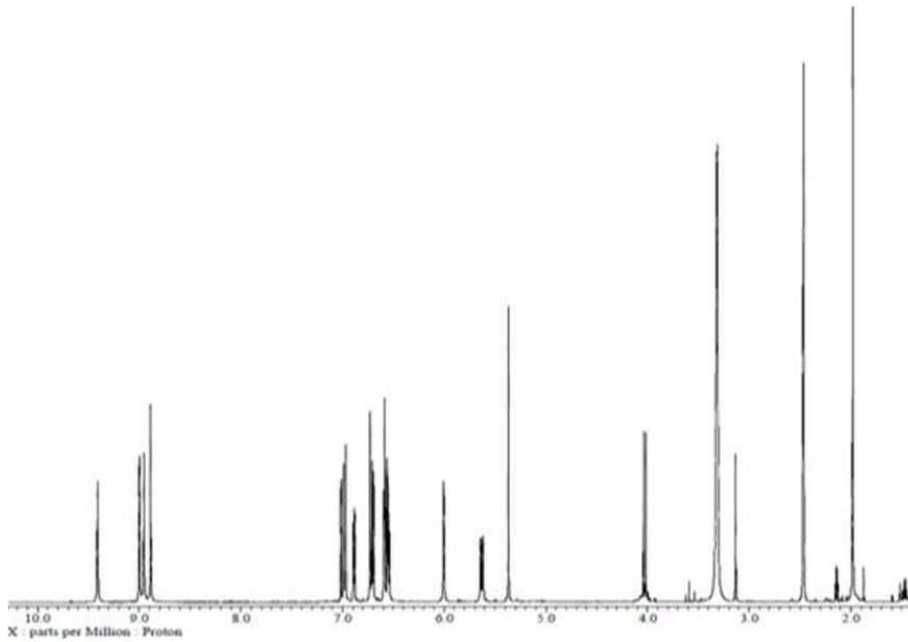
도면2



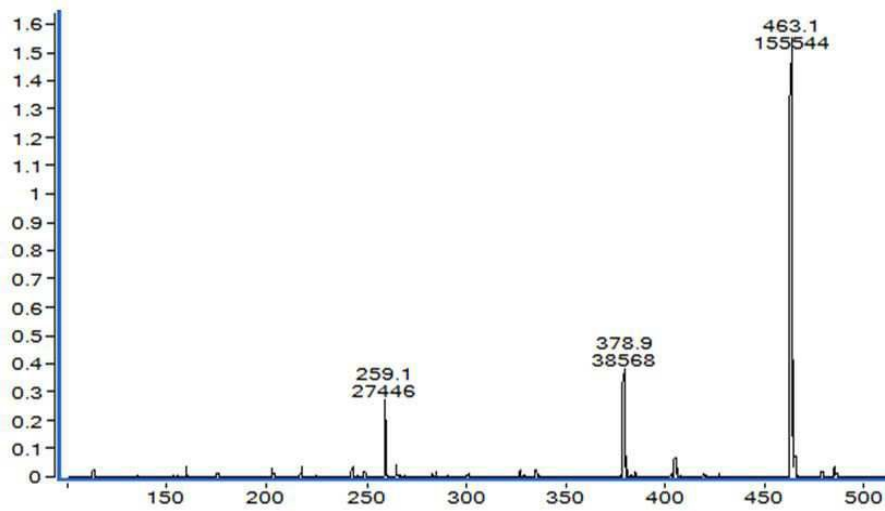
도면3



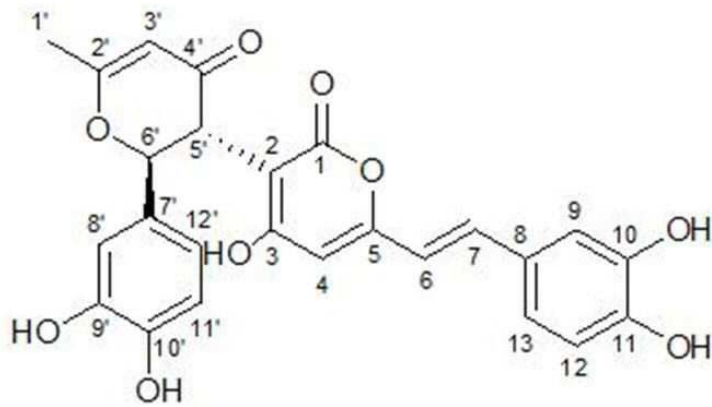
도면4



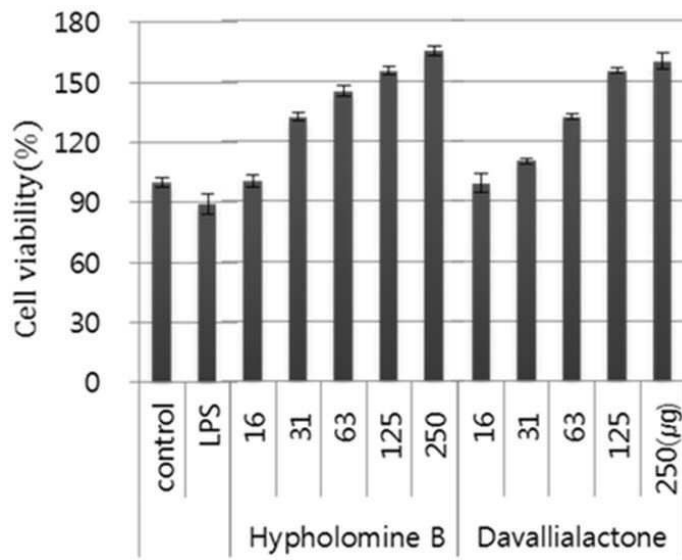
도면5



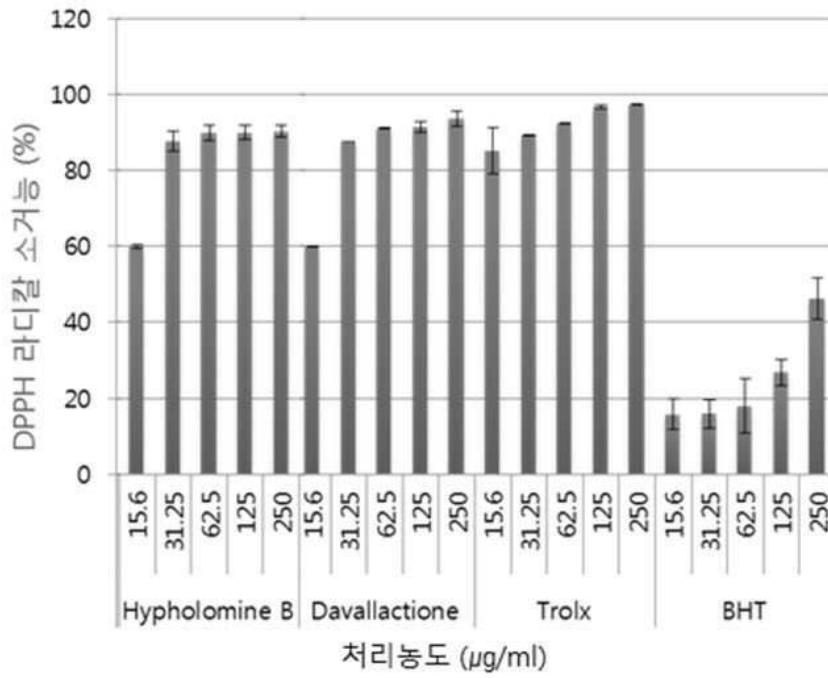
도면6



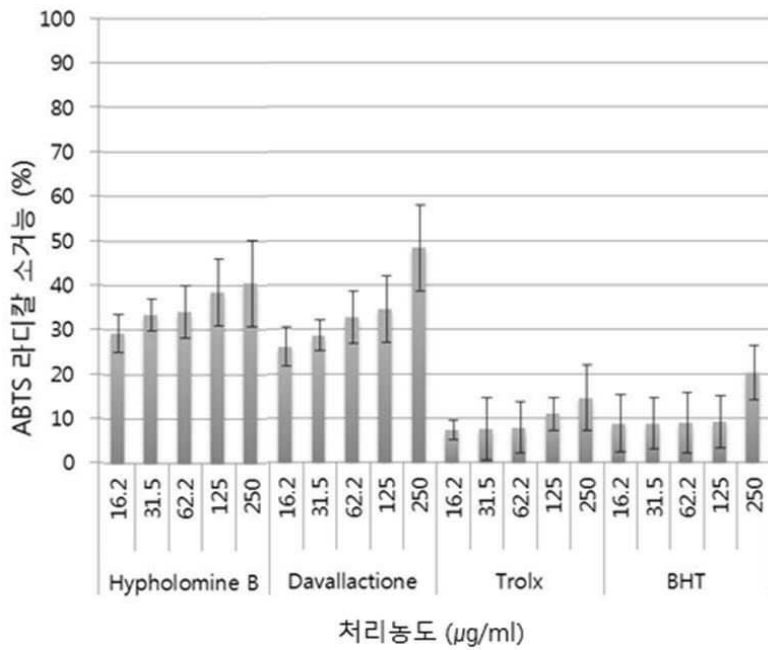
도면7



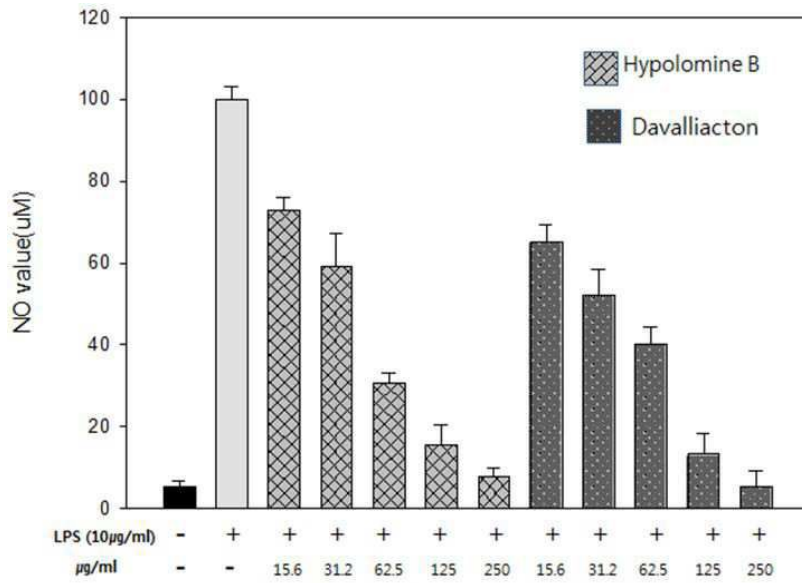
도면8



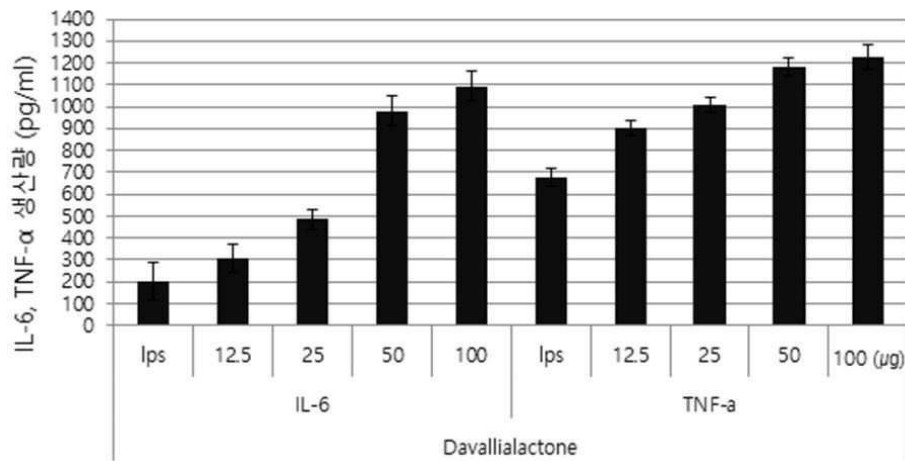
도면9



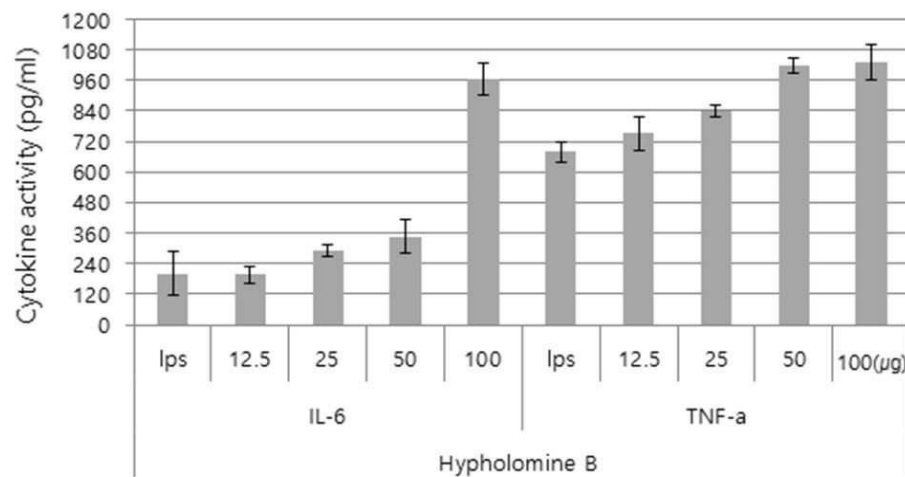
도면10



도면11



도면12



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2

【변경전】

제1항에 있어서,

상기 하이폴로민 비 또는 다발리아락톤 화합물은 목질진흙버섯으로부터 추출된 추출물로부터 분리된 스티릴파이론계 화합물인 것을 특징으로 하는 면역 기능 강화용 식품 조성물.

【변경후】

제1항에 있어서,

상기 하이폴로민 비 또는 다발리아락톤은 목질진흙버섯으로부터 추출된 추출물로부터 분리된 스티릴파이론계 화합물인 것을 특징으로 하는 면역 기능 강화용 식품 조성물.

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

하이폴로민 비 또는 다발리아락톤 화합물을 유효성분으로 하는 면역 기능 강화용 식품 조성물.

【변경후】

하이폴로민 비 또는 다발리아락톤을 유효성분으로 하는 면역 기능 강화용 식품 조성물.