



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월29일
(11) 등록번호 10-2233955
(24) 등록일자 2021년03월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/28 (2006.01) A61K 31/365 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/28 (2013.01)
A61K 31/365 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0003601(분할)
- (22) 출원일자 2021년01월11일
심사청구일자 2021년01월11일
- (65) 공개번호 10-2021-0007022
- (43) 공개일자 2021년01월19일
- (62) 원출원 특허 10-2019-0040920
원출원일자 2019년04월08일
심사청구일자 2019년04월08일
- (56) 선행기술조사문헌
Korean Journal of Plant Resources. 2015.
Vol.28, No.3, pp.305-311.
(뒷면에 계속)

- (73) 특허권자
재단법인 전남바이오산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
- (72) 발명자
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 10 호반중흥1단지
아파트 105-203
윤효정
광주광역시 남구 제중로 11, 110동 701호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최석진

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 허명숙

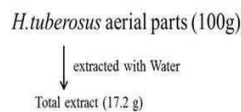
(54) 발명의 명칭 돼지감자 지상부 추출물 또는 이로부터 분리한 3-Hydroxy-8β-tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물을 유효성분으로 함유하는 면역관문억제제 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

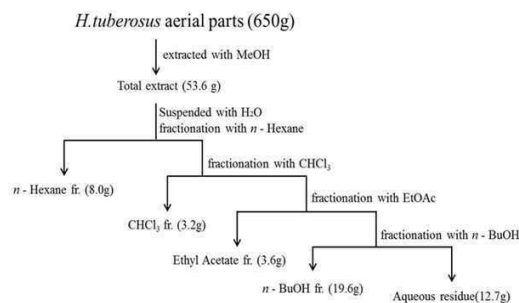
본 발명은 돼지감자 지상부 추출물 또는 이로부터 분리한 3-Hydroxy-8β-tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물을 유효성분으로 함유하는 면역관문억제제 약학조성물에 관한 것으로, 항 프로그램화 세포사멸-1 (Programmed cell death protein 1; PD-1)과 항 프로그램화 세포사멸 리간드-1 (Programmed death-ligand 1; PD-L1)의 상호작용을 방해 및 T세포의 활성을 증진함으로써 인체의 감염조직, 양성 종양, 변형조직 등을 공격하며, 면역 증강에 도움을 줄 수 있는 면역관문억제제 치료용 약학조성물을 제공한다.

대표도 - 도1

[돼지감자 열수 추출물]



[돼지감자 메탄올 추출물]



- (52) CPC특허분류
A61P 37/02 (2018.01)
- (72) 발명자
김재용
전라남도 순천시 왕궁길 60 (조례동, 중흥3차아파트) 304동 207호
김진영
광주광역시 북구 문산로 81, 201동 1005호
이슬기
전라남도 순천시 이수로 224-29(덕암동, 현대아파트) 102동 811호
조아라
광주광역시 남구 백양로 39번길 7-2, 푸르지오 301호
강후원
광주광역시 남구 독립로 70-1 (백운동, 우방아이유헬아파트) 107동 402호
임소정
광주광역시 서구 화개1로78번길 8 (금호동, 금호5차호반리젠시빌) 505동 303호
박성윤
전라남도 화순군 화순읍 광덕로 215 부영6차아파트 606동 705호
이규욱
전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136 성은연립주택 101동 404호
김영욱
전라남도 장흥군 장흥읍 동교3길 53
신자원
전라남도 장흥군 장흥읍 진골목길 4, 리치빌 306호
성락선
전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39 (수창아트빌아파트) 203호
이종대
서울시 서초구 잠원로 8길 35 래미안신반포팰리스 105-501
- (56) 선행기술조사문헌
KR102206682 B1*
KR1020130121321 A
ARC Journal of Cancer Science. 2015. Vol.1, Issue 1, pp.5-10.
Phytochemistry Letters. 2013. Vol.6, pp.21-25.
Journal of Separation Science.2017. Vol.40, No.7, pp.1457-1464.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
-

명세서

청구범위

청구항 1

돼지감자 (*Helianthus tuberosus* L.) 지상부 추출물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 면역관문억제제 효과를 갖는 항암제 내성 종양 치료용 약학적 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 돼지감자 지상부 추출물은 물 또는 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매 중에서 선택되는 어느 하나로부터 가용한 추출물인 것을 특징으로 하는 면역관문억제제 효과를 갖는 항암제 내성 종양 치료용 약학적 조성물

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 돼지감자 지상부 추출물이 0.1중량% ~ 99중량%으로 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 면역관문억제제 효과를 갖는 항암제 내성 종양 치료용 약학적 조성물

청구항 4

제1항에 있어서, 조성물은 돼지감자 지상부 추출물이 0.1 내지 200 mg/kg/체중/1일의 양으로 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 면역관문억제제 효과를 갖는 항암제 내성 종양 치료용 약학적 조성물

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 경피제, 좌제 또는 멸균 주사용 액중에서 선택되는 어느 하나로 제형화된 것을 특징으로 하는 면역관문억제제 효과를 갖는 항암제 내성 종양 치료용 약학적 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 돼지감자 지상부 추출물 또는 이로부터 분리한 3-Hydroxy-8β-tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물을 유효성분으로 함유하는 면역관문억제제 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체 면역기능은 항원인지와 동시에 이러한 동시자극과 동시 억제 신호의 조절을 통하여 전체적인 T세포 기능이 조절된다. 면역세포들은 인체의 감염조직 및 변형조직 등 변화로 인해 발현되는 항원을 감지하고 이러한 조직들을 제거한다. 하지만 암세포는 면역공격을 회피하기 위하여 종양미세환경을 변화시켜 면역기능을 억제하거나 T세포 면역관용 또는 면역편집 등을 통하여 면역회피를 추구한다. 이 회피전략의 하나로 면역관문 기능을 변화시켜 T세포의 기능을 억제한다. 즉, 면역관문은 암세포 파괴를 방해하는 단백질로 암은 면역관문(immune checkpoint)을 활성화시켜 T세포의 공격을 회피한다.

[0003] 즉, 면역관문억제제(immune checkpoint inhibitor)는 면역반응 회피 신호를 억제해 면역세포가 감염 및 변형 조직을 공격하게 하는 원리로, 면역반응을 자극시키는 단백질을 증진시키거나 면역반응을 억제하는 단백질(PD-1,

PD-L1)을 차단해 인체의 면역반응을 조절한다.

- [0004] PD-1과 같은 저해성 면역 관문의 신호전달을 차단하는 것은 효과적인 치료 방법인 것이 입증되었다. PD-1은 활성화된 T세포, 자연살해 T세포, B 세포 및 대식세포 상에 발현되는 세포 표면 수용체이다. 이것은 T세포의 활성화를 방지하는 고유한 부정적 피드백 시스템으로서 가능하며, 이어서 자가 면역을 감소시키고 자기 내성을 촉진시킨다.
- [0005] 나아가 PD-1은 바이러스 감염 등과 같은 질환에서 항원-특이적 T 세포 반응의 억제에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. PD-L1 단백질은 지질다당류 및 GM-CSF 치료에 반응하여 대식세포 및 수지상세포에 대해, 그리고 T세포 수용체 및 B세포 수용체 신호전달시에는 T세포 및 B세포에 대해 상향 조절된다.
- [0006] 이에 따라 전통적으로 우리 몸에 유익하다고 알려진 약재료에 대해 새로운 방법으로 접근하여 약리학적으로 부작용이 적은 면역관문억제제 치료용 약학적 조성물의 시도가 증가하고 있다.
- [0007] 한편, 돼지감자(*Helianthus tuberosus* L.)는 뚱딴지라고 불리며, 국화과의 다년생 식물로 알려져 있다. 돼지감자는 땅속의 지하부와 줄기를 포함한 지상부로 나눌수 있으며, 지하부는 땅속줄기의 끝이 굽어져서 덩이줄기가 발달한다. 줄기는 곧게 서고 가지가 갈라지며 높이가 1.5~3m이고 센털이 있고, 잎은 줄기 밑 부분에서는 마주나고 윗부분에서는 어긋나며 긴 타원 모양이며, 끝이 뾰족하며 가장자리에 톱니가 있고 밑 부분이 좁아져 잎자루로 흘러 날개가 된다.
- [0008] 지상부인 꽃은 8~10월에 피고 줄기와 가지 끝에 지름 8cm의 두상화(頭狀花:꽃대 끝에 꽃자루가 없는 많은 작은 꽃이 모여 피어 머리 모양을 이룬 꽃)를 이루며 달리며, 두상화 가장자리에 있는 설상화는 노란 색이고 11~12개이며, 두상화 가운데 있는 관상화는 노란색, 갈색, 자주색이다. 총포는 반구형이고, 총포 조각은 바소 모양이며 끝이 뾰족하다.
- [0009] 열매는 수과이고, 덩이줄기는 길쭉한 것에서 울퉁불퉁한 것까지 모양이 매우 다양하고 크기와 무게도 다양하다. 덩이줄기 껍질 색깔도 연한 노란 색, 갈색, 붉은색, 자주색으로 다양한데, 껍질이 매우 얇아 건조한 공기에 노출하면 금방 주름이 지고 속살이 파삭해진다. 덩이줄기를 식용으로 재배하였으나 지금은 인가 근처에서 야생으로 자라며 일부에서는 가축의 사료로 쓰기 위해 심기도 한다. 또한, 돼지감자는 천연인슐린이라 하여 혈당조절에 뛰어난 이눌린을 함유하고 있어 당뇨병 치료에 좋은 효력이 있다.
- [0010] 한편 면역관문억제제는 화학합성을 통한 제품들이 주를 이루고 있으며, 원료등을 외국의 제약회사로부터 수입하여 제조되므로 약품의 단가가 높아지고 화학합성으로 만들어지므로 부작용이 있을 수 있다
- [0011] 따라서 돼지감자와 같은 천연물의 효능을 연구하여 부작용이 거의 없고 면역을 증진시켜 질병의 예방과 회복에 도움이 되는 물질을 개발하기 위해 노력하고 있으나, 아직까지는 돼지감자에 대한 영양학적 가치나 생리활성 기능성에 대한 관련정보가 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 본 발명과 관련이 있는 선행기술로서 국내 공개특허공보 제10-2012-0021349호는 당뇨병의 치료 또는 예방 효능이 있는 돼지감자에 관한 것으로, 유산균을 이용하여 돼지감자를 발효시킴으로써 항당뇨 효능이 우수하며 기호성이 높은 기능성 식품 및 약제학적 조성물을 개시하고 있다.
- (특허문헌 0002) 국내 공개특허공보 제10-2011-0135513호는 돼지감자를 열풍 건조시켜 일정량의 수분을 제거한 후 분쇄하고 첨가물을 혼합하여 반죽을 형성하여 반죽을 소정의 크기로 80~100℃에서 구운 후 50℃에서 열풍 건조시킴으로서 수분이 제거되어 장기간 보관이 가능한 돼지감자를 포함한 식품 제조방법에 관한 구성이 개시되어 있다.
- (특허문헌 0003) 국내 공개특허공보 제10-2011-0124526호는 돼지감자 분말의 제조방법 및 그 돼지감자 분말을 이용한 돼지감자 차와 음료에 관한 것으로, 돼지감자를 세척하고, 2~10mm의 두께로 절단하는 원료 준비단계와; 절단한 돼지감자를 30~50℃의 온도에서 수분함량이 13% 이하가 될 때까지 건조시키는 건조단계와; 건조시킨 돼지감자를 볶는 볶음단계와; 볶은 돼지감자를 20~80mesh의 크기로 분쇄하는 분쇄단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 구성이 개시되어 있다.
- (특허문헌 0004) 국내 등록공보 제10-0496119호는 돼지감자 60~72 중량%에 생약제인 숙지황 10~16 중량%, 산수

유 6~10 중량%, 산약 3~3.5 중량%, 사인 3~3.5 중량%, 복령 3~3.5 중량%, 오미자 3~3.5 중량%를 첨가하여 형성하고, 상기 추출액은, 추출액 24~35.5 중량%에, 정제수 61~64 중량%와, 감미료인 사과, 배, 모과중 선택된 어느 하나의 농축액 1~7 중량%, 대추농축액 1~2 중량%, 영지 농축액 0.5~1 중량%, 감초 농축액 0.5~1 중량%, 아스파탐, 스테비오사이드, 솔비톨, 올리고당중 선택된 어느 하나의 인공 감미료 0.5~1 중량%를 원료로 한 돼지감자 및 생약제를 함유한 드링크 제조방법에 관한 구성이 개시되어있다.

(특허문헌 0005) 국내 등록특허공보 제10-0591539호는 곡물류와 종실류 및 1종 이상의 생약제의 건조분말을 유효성분으로 하는 건강보조식품 조성물에 관한 것으로서, 조성물은 곡물류와 종실류로서 현미, 귀눈이콩, 양파를 함유하고 생약제로서 돼지감자, 구기자, 오미자, 울무, 복분자, 두충, 오가피, 산약, 인진쑥, 당귀, 황정, 함초 및 톳을 유효성분으로 함유하며, 상기 조성물에 영양보조성분을 임의로 더욱 첨가하여 된 당뇨병과 같은 각종 성인병의 예방 및 개선효과가 있는 건강보조식품 조성물에 관한 구성을 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 화학성분을 주원료로 한 면역관문억제제의 주원료를 국내 토종자원인 돼지감자 지상부 추출물 및 이들 추출물로부터 분리한 3-Hydroxy-8β-tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 을 이용하여 독성 및 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있는 면역관문억제 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 돼지감자 지상부 추출물 또는 이로부터 분리한 3-Hydroxy-8β-tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물을 유효성분으로 함유하는 면역관문억제제 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 과제를 해결하기 위하여, 건조된 돼지감자 지상부는 탄소수 1 내지 5의 알코올 또는 이들의 혼합용매 중 어느 하나에서 가용한 추출물을 포함한다. 상기 추출물은 극성에 따라 분획한 후 활성이 가장 높은 *n*-hexane 분획물을 Silica gel을 이용하여 open column을 실시하고, 위 open column에서 얻어진 분획물을 이용하여 Prep-LC RP C18을 수행하여 분취액을 분리한다. 위 과정에서 얻어진 분취액 구조 동정을 위해 NMR, MS이용, 구조를 동정하는 과정으로 이루어진다

발명의 효과

[0015] 본 발명은 돼지감자 지상부 추출물 또는 이로부터 분리한 3-Hydroxy-8β-tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물을 유효성분으로 하는 면역관문억제제 치료용 약학적 조성물은 항 프로그램화 세포사멸-1 (Programmed cell death protein 1; PD-1)과 항 프로그램화 세포사멸 리간드-1 (Programmed death-ligand 1; PD-L1)의 상호작용 방해와 면역세포인 T세포의 활성을 증식시킴으로써 감염조직 및 변형조직 등을 공격하여, 면역 증강에 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 돼지감자 지상부 추출물 및 극성에 의한 분획물의 제조과정을 나타낸 그림이다.
- 도 2은 돼지감자 지상부 추출물 (열수, 메탄올), 용매 분획 (*n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, *n*-butanol, H₂O) 을 HPLC로 나타낸 그림이다.
- 도 3은 돼지감자 지상부 추출물의 *n*-헥산분획물로부터 활성물질을 분리하는 방법을 나타낸 그림이다.
- 도 4은 돼지감자 지상부 추출물로부터 분리한 화합물의 구조를 나타낸다.
- 도 5은 돼지감자 지상부 추출물로부터 분리한 NMR스펙트럼 분석 결과를 나타낸다.
- 도 6은 돼지감자 지상부 추출물에 대한 항 프로그램화 세포사멸 리간드-1 (Programmed death-ligand 1; PD-L1) 단백질 발현의 변화를 나타낸 그림이다.
- 도 7은 돼지감자 지상부 메탄올 추출물의 3-Hydroxy-8β-tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물이 PD-L1의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.

도 8은 돼지감자 지상부 메탄올 추출물이 마우스로부터 분리한 thymus세포의 T세포 활성화를 나타낸 그림이다.

도 9는 돼지감자 지상부 메탄올 추출물로부터 분리한 3-Hydroxy-8β-tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물이 마우스로부터 분리한 thymus세포의 T세포 활성화를 나타낸 그림이다.

도 10은 돼지감자 지상부 메탄올 추출물이 슈반세포(SC4 Nf2-/schwann luci) nude mouse 피하이식 모델에서의 양성종양 활성에 의한 마우스의 체중변화(%) 및 양성 종양 크기(mm3)를 측정한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 돼지감자 지상부 추출물 또는 이로부터 분리한 3-Hydroxy-8β-tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물을 유효성분으로 하는 면역관문제제 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로 구체적인 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 보다 상세히 설명한다.

[0018] **1. 돼지감자 지상부 추출물 제조**

[0019] 도 1은 돼지감자 지상부 추출물 및 극성에 의한 분획물의 제조과정을 나타낸 그림이다. 돼지감자 지상부 100g에 증류수 2L를 가하고, 환류추출과정을 3회 반복하였다. 얻어진 추출물을 감압 농축하여 17.2g의 열수 추출물을 얻었다.

[0020] 돼지감자 지상부 650g을 메탄올 13L를 가하고, 초음파 추출과정을 4회 반복하였다. 얻어진 추출물을 감압 농축하여 53.6g의 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물을 메탄올 400ml와 증류수 3600ml을 첨가한 다음 이로부터 용매 극성에 따라 순차적으로 분획을 진행하였다.

[0021] **2. 돼지감자 지상부 추출물 (열수, 메탄올), 용매 분획 (n-hexane, CHCl3, EtOAc, n-butanol, H2O)**

[0022] 상기에서 얻은 각 분획을 감압 농축한 결과, 헥산 분획, 클로로포름 분획, 에틸아세테이트 분획, 부탄올 분획, 물 분획을 각각 8.0g(14.9%), 3.2g(6.1%), 3.6g(6.9%), 19.6g(36.6%), 12.7g(23.7%) 을 얻을 수 있었다. 도 2는 돼지감자 지상부 추출물 (열수, 메탄올), 용매 분획을 HPLC로 나타낸 그림이다.

[0023] **3. 돼지감자 지상부의 n-hexane 분획물로부터 화합물 분리**

[0024] 상기에서 얻은 분획 중 n-헥산 분획 8.0g에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(63-200 mesh ASTM, Merck)를 수행하였다. 이때 용리액으로는 n-헥산과 아세톤의 혼합 용매(200 : 1 → 아세톤)를 사용하였으며, 이를 수행하여 9개의 분획(H1-H9)을 회수하고 감압 농축하였다. 소분획 H8 (300mg) 에 대하여 HPLC RP C18을 수행하여 H8-1-H8-5 분취액을 얻었다. 도 3은 돼지감자 지상부 추출물의 n-헥산 분획물로부터 활성물질을 분리하는 방법을 나타낸 그림이다.

[0025] **4. 화합물의 구조 동정**

[0026] 상기 실시예에서 분리, 정제된 화합물의 구조를 동정하기 위하여 성상, 분자량, 질량분석, NMR 분석을 수행하였다. 도 4는 돼지감자 지상부 추출물로부터 분리한 화합물의 구조를 나타낸다.

[0027] 4-1. 화합물 H8-5의 화합물 분석 결과

[0028] 성상 : 황색의 시럽 분자식 : C₂₀H₂₂O₆

[0029] Positive ESIMS (m/z) : 358.1483 [M+H]⁺

[0030] ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d₄) : 도 5 참조

[0031] ¹³C-NMR (150 MHz, Methanol-d₄) : 도 5 참조

[0032] 분석결과 H-1의 δH 6.13, 5.52은 각각 더블렛 시그널로 나타나며 δc120.4(C-13)의 CH₂ 와 δc 171.7(C-12)의 카르보닐기의 시그널과 함께 세스퀴테펜 락톤임을 확인하였다. 다른 메틸렌 그룹은 δc 41.5(C-9)와 H-9의 δH 2.82, 2.92의 CH₂ 시그널로 나타내었다.

[0033] ¹H, ¹³C-NMR스펙트럼에서 스무 개의 탄소로 구성된 화합물을 분석한 결과, 네 개의 바이닐 메틸그룹 H-20, 19, 14, 15 위치의 δH 1.75, 1.76, 2.17, 2.33, 다섯 개의 메틴 프로톤 H-5, 7 위치의 δH 3.56, 3.42, 산소가 결합된 구조 H-6, 8 위치의 δH 5.74, 4.00, 하나의 올레핀 성 H-18 위치의 δH 6.76을 나타내었다. C-16 위치의 δc 168.5의 에스테르 카르보닐기를 포함한 아홉 개의 4차탄소, C-12 위치의 δc 171.07의 락톤 카르보닐기, C-

2 위치의 δ_c 190.5의 불포화된 카르보닐기의 시그널을 나타내었다.

[0034] 이 화합물은 올레핀 성 H-18 위치의 δ_H 6.76과 바이닐 메틸그룹 H-20, 19 위치의 δ_H 1.75, 1.76으로 구성된 tigloyl 그룹을 사이드 체인으로 갖고 있다. tigloyl 에스테르의 시그널은 C-17, 18, 19, 20 위치의 δ_c 129.2, 140.1, 14.6 12.2로 표시되었다.

[0035] HMBC 스펙트라에서 δ_H 5.74(H-8)와 δ_C 168.5(C-16)의 상관관계에 의해서 δ_C 66.6(C-8)의 화학시프트를 나타내었다. 도 5은 돼지감자 지상부 추출물로부터 분리한 NMR 스펙트럼 분석 결과를 나타낸다.

[0036] **5. 돼지감자 지상부 추출물이 PD-L1의 발현에 미치는 영향**

[0037] 세포를 60mm dish 에 3.5×10^5 세포로 균일하게 분포시킨 후 24시간 안정화 시킨다. 24시간 후 고갈 및 시료를 처리한다. 시료처리 24시간 후 PBS로 두 번 세척하여 1x lysis buffer로 용해한다. 상온에서 30 분간 세포를 용해시킨후, 4 °C 12000 rpm에서 15 분간 원심 분리한다.

[0038] 원심분리 후 상층액만 모아 -20 °C에서 보관하여 사용한다. 단백질분석기법 (Immunoblotting) 을 위해 단백질 25 μ g/lane을 10% SDS-Polyacrylamide gel 상에서 전기영동하고, membrane은 5% Skim milk를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시킨다. 1차 항체는 Tris Buffered saline에 1:1000 비율로 처리하였으며, 다음날 TBST (Tris Buffered saline-Tween 20)에 세 번 washing 후 2차 항체는 3% skim milk에 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody (2차 항체) 를 1:1000 비율로 1 시간 처리한 후 immunoblotting 한다.

[0039] 도 6은 돼지감자 지상부 추출물에 대한 항 프로그램화 세포사멸 리간드-1 (Programmed death-ligand 1; PD-L1) 단백질 발현의 변화를 나타낸 그림이다. 돼지감자 지상부 추출물에 대한 MDA-MB-231 세포의 (Programmed death-ligand 1; PD-L1) 의 발현 억제를 나타낸 결과이다. 즉, 돼지감자 지상부 추출물을 농도별 (10, 50, 100, 200 μ g/ml) 로 처리하였다. 메탄올 추출물과 핵산 분획물에서 (Programmed death-ligand 1; PD-L1)의 단백질 발현이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 6).

[0040] **6. 돼지감자 지상부의 메탄올 추출물로부터 분리한 3-Hydroxy-8 β -tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물이 PD-L1의 발현에 미치는 영향**

[0041] 세포를 60mm dish 에 3.5×10^5 세포로 균일하게 분포시킨 후 24시간 안정화 시킨다. 24시간 후 고갈 및 시료를 처리한다. 시료처리 24시간 후 PBS로 두 번 세척하여 1x lysis buffer로 용해한다. 상온에서 30분간 세포를 용해시킨 후 , 4 °C 12000 rpm에서 15 분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액만 모아 -20 °C에서 보관하여 사용한다. 단백질분석기법 (Immunoblotting)을 위해 단백질 25 μ g/lane을 10% SDS-Polyacrylamide gel 상에서 전기영동하고, membrane은 5% Skim milk를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시킨다.

[0042] 1차 항체는 Tris Buffered saline에 1:1000 비율로 처리하였으며, 다음날 TBST (Tris Buffered saline- Tween 20)에 세 번 washing 후 2차 항체는 3% skim milk에 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody (2차 항체)를 1:5000 비율로 1 시간 처리한 후 immunoblotting 한다.

[0043] 도 7은 상기 실시 예1에서 얻은 분획 중 n-핵산 분획에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 9개의 분획(H1-H9)을 얻었다. 이러한 분획물을 10 μ g/ml씩 삼중음성 유방암세포에 처리하여 PD-L1 (Programmed death-ligand 1)의 발현을 확인한 결과, 대조군에 비해 유의성 있게 PD-L1의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0044] 돼지감자 지상부 n-핵산 분획에 대하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 얻은 9개의 분획(H1-H9) 중 소분획 H8 (300mg)에 대하여 HPLC RP C18을 수행하여 H8-1-H8-5 분취액을 얻었다. 이 분취액을 10 μ g/ml씩 MDA-MB-231 세포에 처리하여 PD-L1 (Programmed death-ligand 1)의 발현을 확인한 결과, 대조군에 비해 H8-5 분취액에서 유의하게 PD-L1의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0045] 따라서 대조군에 비해 H8번 분획물과 H8-5 분취액에서 유의하게 PD-L1의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 7). H8-5 분취액은 3-Hydroxy-8 β -tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물로 확인하였다.

[0046] **7. 돼지감자 지상부 추출물 및 3-Hydroxy-8 β -tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물 이 마우스로부터 분리한 thymus세포의 증식 측정**

[0047] 6주령의 ICR 수컷 마우스 생쥐를 경추 탈골하여 치사시키고 무균적으로 thymus(흉선)을 적출하여 100 mesh망 위에서 분쇄하여 single 세포로 만들었다. 단핵 세포층만 치하여 12,000 rpm에서 5분씩 3회 원심분리하여 thymus

세포를 준비하였다.

[0048] thymus(T세포)를 5×10^4 cells/well 가 되도록 10% heat-inactivated FBS가 함유된 DMEM 배지로 희석하여 96 well plate에 100 uL 씩 분주하였다. 돼지감자 메탄을 추출물을 10, 50, 100 및 200 ug/mL 및 H8 분획물 및 H8-5(3-Hydroxy-8 β -tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin)화합물 1, 5 ug/mL 농도로 희석하여 분주하였으며, 30 분 후 1 ug/mL ConA(concanavali A)를 처리하여 37°C의 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 암 조건에서 5 mg/mL 농도의 WST-1 (water soluble tetrazolium salts) solution을 첨가하여 2시간 반응 후 440 nm에서 O.D 값을 측정하였다.

[0049] 도 8은 돼지감자 지상부 메탄을 추출물에 대한 T세포 증식능 효과를 나타낸다. T세포의 mitogen인 ConA (1 ug/mL)를 처리하여 대조군으로 사용하였다. 대조군은 정상적으로 유도 하는 것을 확인하였으며, ConA (1 ug/mL)과 돼지감자 지상부 메탄을 추출물 10, 50, 100 및 200 ug/mL을 함께 첨가하여 확인한 결과 ConA 단독으로 처리한 군보다 더 높게 T세포의 증식능을 유도하는 것을 확인하였다.

[0050] 도 9은 돼지감자 지상부 메탄을 추출물로부터 분리한 3-Hydroxy-8 β -tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물을 T세포 증식능 효과를 나타낸다. T세포의 mitogen인 ConA (1 ug/mL)를 처리하여 대조군으로 사용하였다. 대조군은 정상적으로 유도 하는 것을 확인하였으며, 3-Hydroxy-8 β -tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물을 1, 5 ug/mL 농도에서 ConA (1 ug/mL) 보다 T세포의 증식능을 유도하는 것을 확인하였다.

[0051] 따라서 3-Hydroxy-8 β -tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 화합물은 T세포의 활성을 유도하는 물질인 것을 알 수 있었다.

[0052] **8. 돼지감자 지상부 메탄을 추출물에 대한 독성 검증**

[0053] 돼지감자 지상부 메탄을 추출물을 포함하는 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 경피제, 좌제 또는 멸균 주사용 액 등으로 제형화되어 경구투여나 주사로 피검자에 적용될 수 있으며, 돼지감자 지상부 메탄을 추출물이 10 내지 200 mg/kg 체중/1일의 양으로 포함하여 적용될 수 있다. 이를 확인하기 위하여 식약처의 예규에 따라 SD rat (male, 6주령, (주)오리엔트 바이오)를 대상으로 돼지감자 지상부 메탄을 추출물을 구강 투여를 통해 랫트 당 10 - 200mg/kg을 1일 간격으로 계속 투여하였으며, 14일간 치사를 및 체중을 조사하였다.

[0054] 돼지감자 지상부 메탄을 추출물을 투여한 랫트의 치사를 및 체중변화량을 살펴보면 돼지감자 지상부 메탄을 추출물은 투여량에 관계없이 랫트의 생존율에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한 돼지감자 지상부 메탄을 추출물을 처리한 실험군은 정상적인 체중 증가를 나타내었다. 이와 같은 결과는 돼지감자 지상부 메탄을 추출물을 200 mg/kg 까지 경구 투여하더라도 급성 독성을 보이지 않음을 확인하였다.

[0055] **9. 돼지감자 지상부 메탄을 추출물에 의한 슈반세포(SC4 Nf2-/schwann luci) nude mouse 피하이식 모델에서의 양성종양 활성 효과**

[0056] 액체 질소 속에서 냉동보관 중이던 슈반세포를 녹인 후 세포 배양을 실시하였다. 세포의 배양은 CO₂ incubator(Forma,USA) 내에서 온도 37°C와 CO₂농도 5%로 맞춰서 배양 하였다. 배양 최종일에 모든 슈반세포를 수거하여 계수하고 serum-free media를 이용하여 세포 농도를 3.4×10^5 cells/ml로 조절 하였다. 이렇게 조절된 세포 배양액을 마우스당 0.3 ml(1×10^5 cells/mouse)씩 우측의 견갑부와 흉벽 사이의 액와부위 피하에 주입 하였다.

[0057] 그 후 돼지감자 지상부 메탄을 추출물을 투여하기 위하여 Tween 20을 생리식염수에 녹여 5% Tween 20을 만들어 돼지감자 지상부 메탄을 추출물을 5% Tween20 용매에 10 mg/ml의 농도로 조제하였다. 조제된 시료는 마우스 20g 당 0.2 ml(10 ml/kg)씩 암세포 이식 다음날부터 주 5회 투여스케줄로 총 20회 반복 복강투여 하였다(days 1-5, 7-11, 14-18, 21-25)

[0058] 도 10은 슈반세포(SC4 Nf2-/schwann luci) nude mouse 피하이식 모델에 돼지감자 지상부 추출물을 투여한 전, 후 일반적인 증상을 관찰한 결과 체중에는 변화가 없었으며, 암세포 이식 후 측정 가능한 양성 종양이 형성 되었을 때부터 28일까지 총 10회 개체별로 vernier caliper를 이용하여 3방향을 측정한 후 length X width X height / 2의 계산식으로 표현한 결과 양성종양의 크기가 감소함을 확인할 수 있었다.

산업상 이용가능성

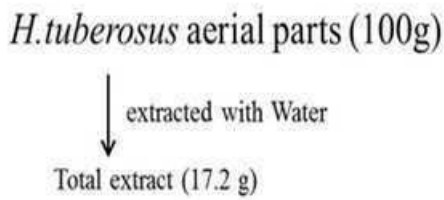
[0059]

본 발명의 돼지감자 지상부 추출물 및 이로부터 분리한 3-Hydroxy-8 β -tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin 을 유효성분으로 하는 면역관문억제 치료용 약학적 조성물은 항 프로그램화 세포사멸 리간드-1 (Programmed death-ligand 1; PD-L1) 의 발현 억제활성, T세포의 활성 증진 및 양성종양 활성 억제를 시켜, 면역관문억제제 치료에 기여한다.

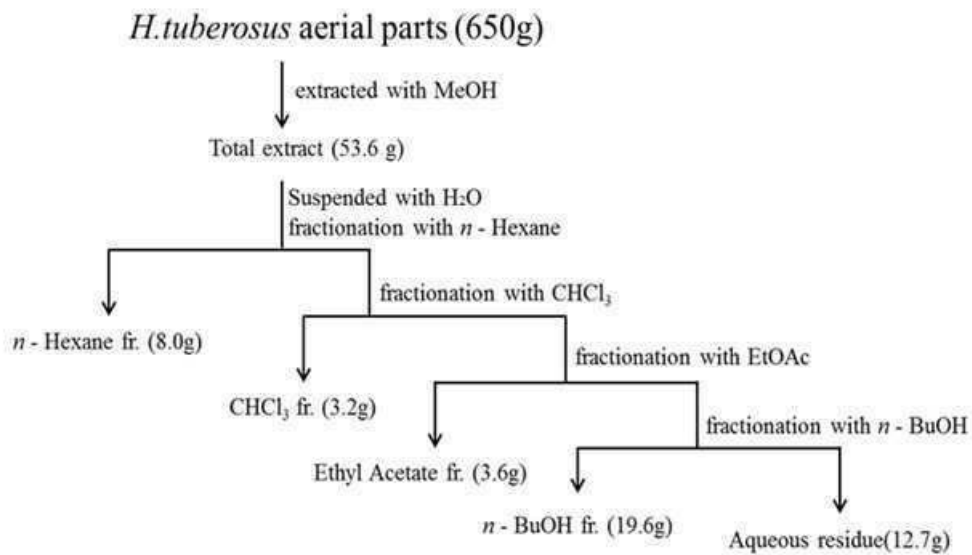
도면

도면1

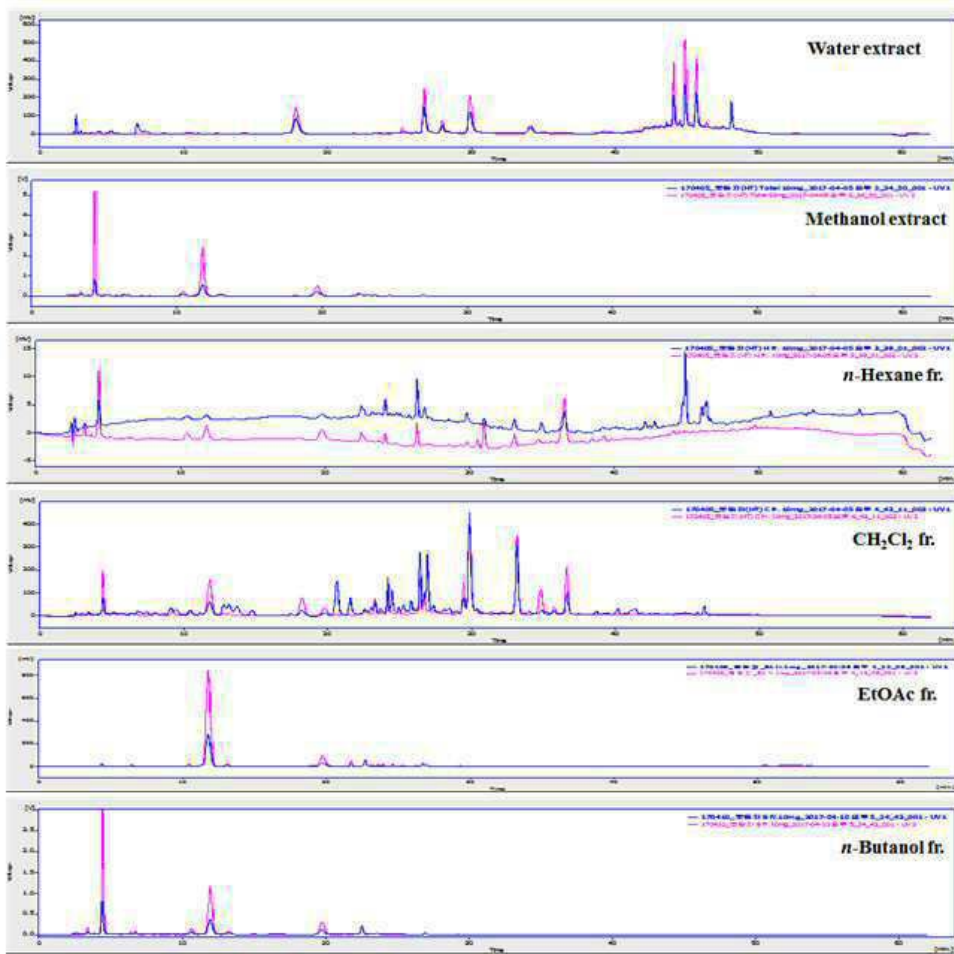
[돼지감자 열수 추출물]



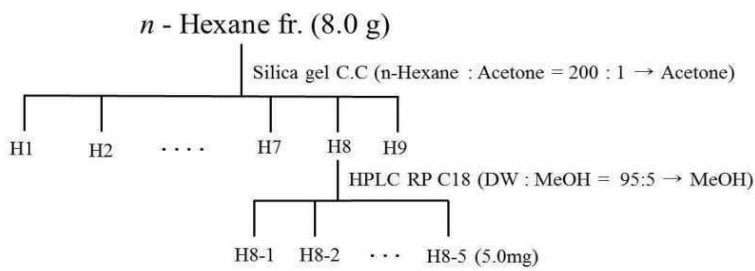
[돼지감자 메탄올 추출물]



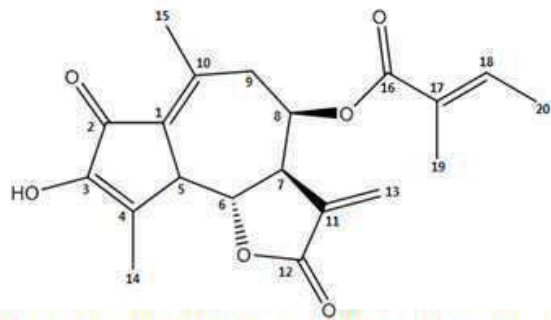
도면2



도면3



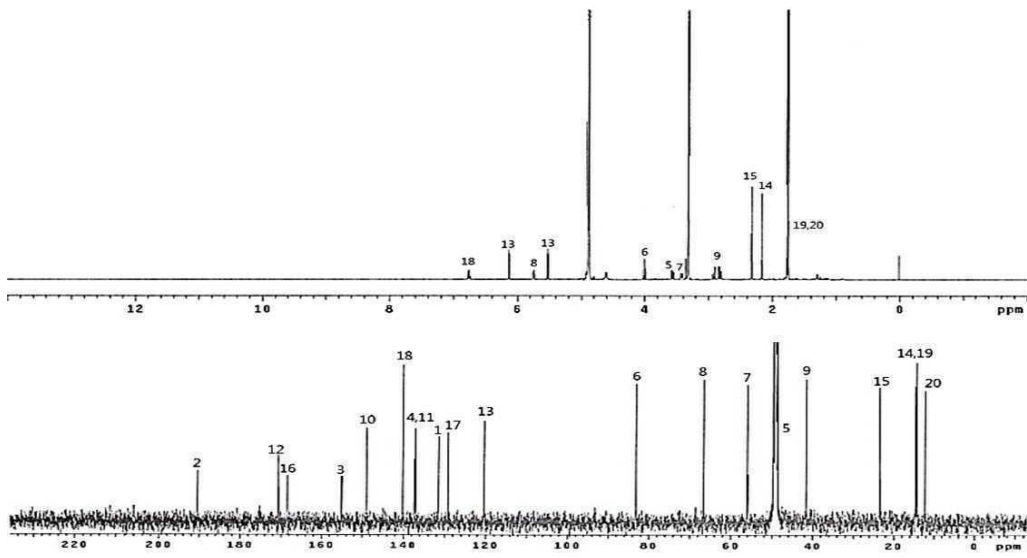
도면4



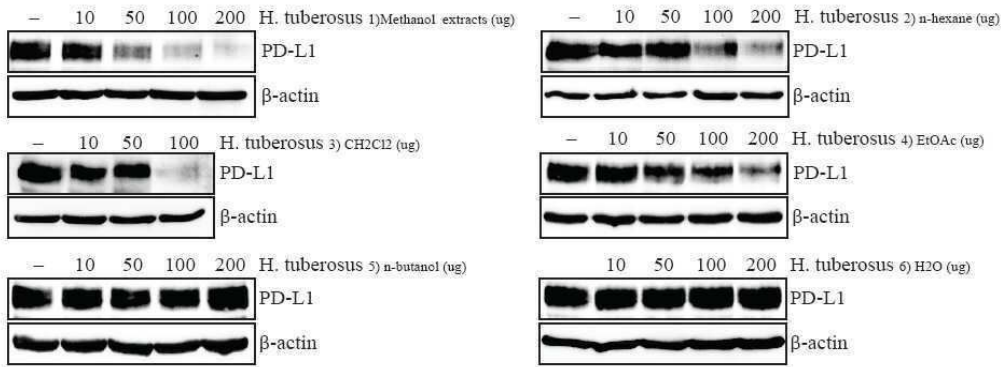
(3-Hydroxy-8 β -tigloyloxy-1,10-dehydroariglovin)

| No. | δ_H (J=Hz) | δ_C | dept | HMBC |
|-----|--|------------|-----------------|------------------------|
| 1 | | 131.5 | C | 49.3, 41.5, 23.4 |
| 2 | | 190.5 | C | 23.4, 14.3 |
| 3 | | 155.1 | C | 49.3 |
| 4 | | 137.4 | C | 49.3, 14.3 |
| 5 | 3.56, d, J=10.0 | 49.3 | CH | 155.1, 14.3 |
| 6 | 4.00, t, J=10.5, 10.0 | 83.1 | CH | 66.6, 49.3, 23.4, 14.3 |
| 7 | 3.42, m | 56.0 | CH | 120.4, 66.6, 41.5 |
| 8 | 5.74, d, J=6.5 | 66.6 | CH | 41.5 |
| 9 | 2.92, d, J=11.6/ 2.82, dd, J=11.6, 6.5 | 41.5 | CH ₂ | 66.6, 23.4 |
| 10 | | 148.9 | C | 66.6, 41.5 |
| 11 | | 137.1 | C | 120.4, 66.6 |
| 12 | | 170.7 | C | 120.4 |
| 13 | 6.13d, J=3.5/5.52, d, J=3.0 | 120.4 | CH ₂ | |
| 14 | 3.42, m | 137.4 | CH | 120.4, 66.6, 41.5 |
| 15 | 2.33, s | 23.4 | CH ₃ | 148.9, 131.5, 41.5 |
| 16 | | 168.5 | C | 140.1, 66.6 |
| 17 | | 129.2 | C | |
| 18 | 6.76, m | 140.1 | CH | 14.6 |
| 19 | 1.76, s | 14.6 | CH ₃ | |
| 20 | 1.76, m | 12.2 | CH ₃ | |

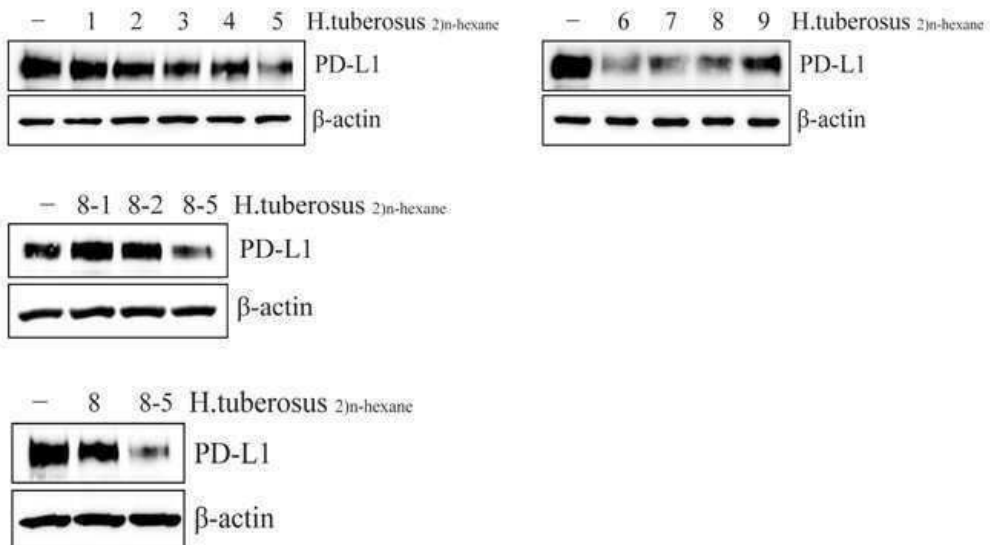
도면5



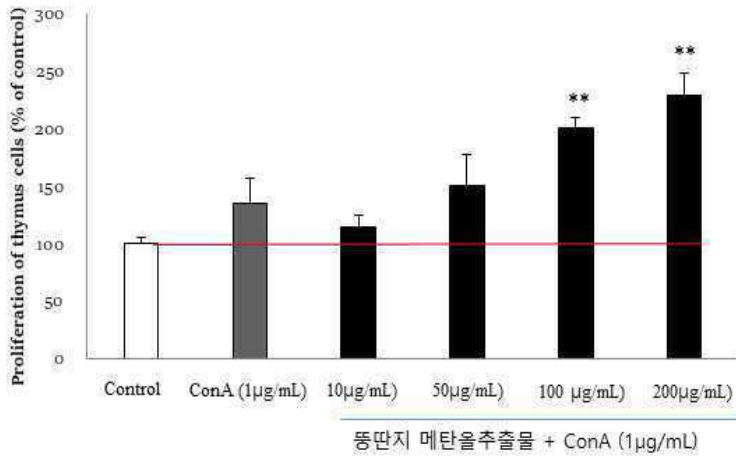
도면6



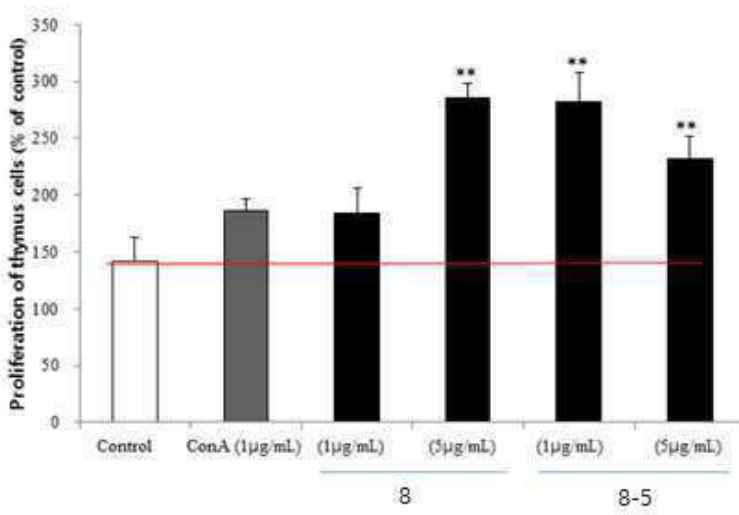
도면7



도면8



도면9



도면10

| Group (n=6) | Doses (mg/kg) | Days after treatment | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------------|----------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Day 0 | 2 | 4 | 7 | 9 | 11 | 14 | 16 | 18 | 21 | 23 | 25 | 28 | 30 |
| Vehicle | | 100.0 ±0.0 | 101.8 ±1.6 | 97.5 ±2.7 | 103.8 ±3.2 | 105.2 ±3.0 | 105.3 ±3.4 | 107.1 ±3.5 | 107.0 ±2.7 | 109.5 ±4.2 | 109.3 ±3.3 | 109.4 ±3.3 | 112.8 ±4.2 | 115.6 ±3.6 | 116.7 ±3.7 |
| Sample A | 100 | 100.0 ±0.0 | 99.7 ±1.7 | 96.3 ±1.9 | 101.5 ±1.7 | 102.3 ±1.5 | 102.2 ±0.9 | 105.9 ±1.7 | 105.3 ±2.1 | 107.2 ±3.2 | 109.8 ±2.6 | 109.8 ±4.2 | 111.7 ±3.2 | 113.3 ±4.9 | 116.0 ±6.9 |

| Group (n=6) | Doses (mg/kg) | Days after treatment | | | | | | | | | |
|-------------|---------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Day 0 | 11 | 14 | 16 | 18 | 21 | 23 | 25 | 28 | 30 |
| Vehicle | | 0.0 ±0.0 | 24.9 ±2.2 | 46.8 ±1.9 | 87.0 ±15.2 | 114.4 ±14.4 | 230.0 ±32.7 | 334.2 ±37.5 | 449.7 ±51.4 | 664.7 ±46.7 | 833.4 ±62.9 |
| Sample A | 100 | 0.0 ±0.0 | 14.6 ±4.6 *** | 31.5 ±7.6 *** | 59.2 ±14.3 ** | 74.7 ±20.3 ** | 137.5 ±51.3 ** | 203.7 ±65.1 ** | 270.5 ±93.1 ** | 429.6 ±119.9 ** | 564.2 ±179.6 ** |
| | | | 41.1 | 32.7 | 32.0 | 34.7 | 40.2 | 39.1 | 39.8 | 35.4 | 32.3 |

Significant figures (t-TEST) : * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001(vs Vehicle)
 †Inhibition Rate (% vs Vehicle)