(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0008429
(43) 공개일자 2020년01월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/20 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 36/185 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07C 59/125 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/20 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0082522
(22) 출원일자 2018년07월16일
심사청구일자 2018년07월16일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
백남인
경기도 화성시 동탄순환대로21길 53 1306동 403호(청계동, 롯데캐슬 알바트로스)
고정환
경기 고양시 덕양구 호국로 1059-72
강동호
서울특별시 마포구 광성로6길 16 (신수동)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 9 항

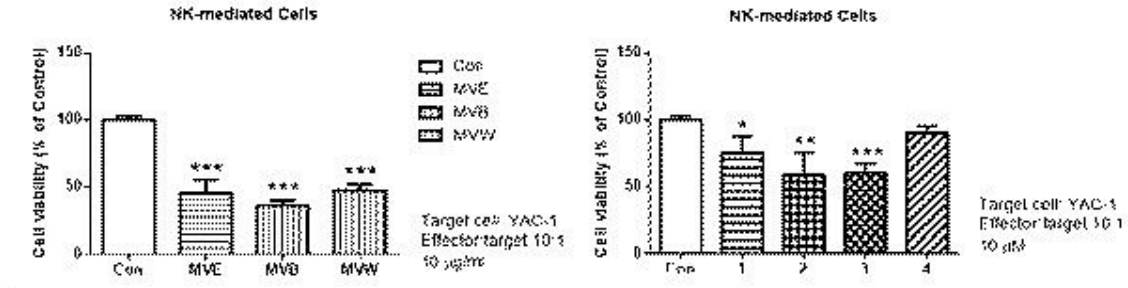
(54) 발명의 명칭 **아욱 유래 글리세라이드 화합물을 포함하는 종양 면역 조절용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 아욱으로부터 유래된 글리세라이드 화합물을 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물; 암 예방 또는 개선용 식품 조성물; 및 상기 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에서 아욱 분획물 및 아욱 유래의 글리세라이드 화합물에 의해 종양 세포에 대한 NK 세포의 활성을 향상시키고, 비장세포 증식 분석에서 안정성을 확인하였으므로, 항암용 조성물 및 암 예방 또는 개선용 건강기능식품으로서 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 36/185 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07C 59/125 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)

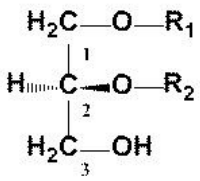
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항암용 약학적 조성물로서,

[화학식 1]



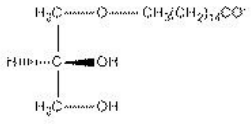
상기 화학식에서 R_1이 팔미토일(palmitoyl), 스테아로일(stearoyl), 리노레노일(linolenoyl) 및 리노레오일(linoleoyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, R_2가 수소(H) 및 리노레오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 항암용 약학적 조성물.

청구항 2

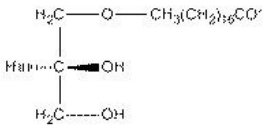
제1항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 2 내지 5로 표시되는 (2S)-1-O-팔미토일 글리세라이드((2S)-1-O-palmitoyl glyceride), (2S)-1-O-스테아로일 글리세라이드((2S)-1-O-stearoyl glyceride), (2S)-1-O-리노레노일 글리세라이드((2S)-1-O-linolenoyl glyceride) 및 (2S)-1,2-디-O-리노레오일 글리세라이드((2S)-1,2-di-O-linoleoyl glyceride)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 항암용 약학적 조성물.

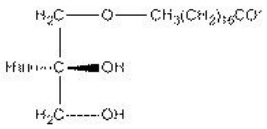
[화학식 2]



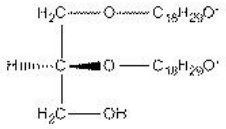
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화합물은 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 유래되는 것인, 항암용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화합물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 부틸렌글리콜 또는 이들의 혼합 용매로 추출되는 것인, 항암용 약학적 조성물.

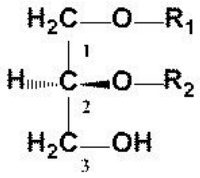
청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 NK 세포의 활성을 향상시키는 것인, 항암용 약학적 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

[화학식 1]



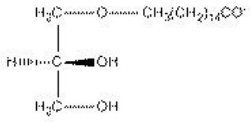
상기 화학식에서 R_1이 팔미토일(palmitoyl), 스테아로일(stearoyl), 리노레노일(linolenoyl) 및 리노레오일(linoleoyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, R_2가 수소(H) 및 리노레오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

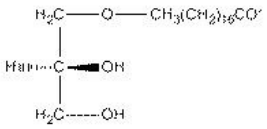
제6항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 2 내지 5로 표시되는 (2S)-1-O-팔미토일 글리세라이드((2S)-1-O-palmitoyl glyceride), (2S)-1-O-스테아로일 글리세라이드((2S)-1-O-stearoyl glyceride), (2S)-1-O-리노레노일 글리세라이드((2S)-1-O-linolenoyl glyceride) 및 (2S)-1,2-디-O-리노레오일 글리세라이드((2S)-1,2-di-O-linoleoyl glyceride)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

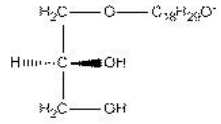
[화학식 2]



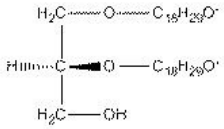
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



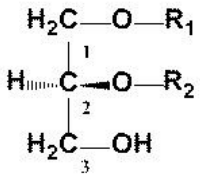
청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 화합물은 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 유래된 것인, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법으로서,

[화학식 1]



상기 화학식에서 R_1이 팔미토일(palmitoyl), 스테아로일(stearoyl), 리노레노일(linolenoyl) 및 리노레오일(linoleoyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, R_2가 수소(H) 및 리노레오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 화합물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아욱으로부터 유래된 글리세라이드 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항암용 약학적 조성물; 암 예방 또는 개선용 식품 조성물; 및 상기 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 약초 요법(herbal therapy) 또는 식물의약(phytomedicine)으로 알려진 바와 같이, 식물, 식물 부분 또는 식물-유래 물질의 치료적 용도는 일반적으로 보완 대체 의학의 형태로 간주되어 왔다. 현재 약초 요법은 부작용 등으로 인해 새로운 치료법 개발을 필요로 함에도 불구하고, 약초의 낮은 독성 및 이러한 약초의 면역 자극제로서의 용도를 지지하는 경험적인 역사로 인해, 통합 의약으로서 치료학적으로 적용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 한의학에서 많이 사용되는 본초 중 하나로서, 황기(*Astragalus membranaceus*) 분획 추출물에 대한 연구에서는 자연적인 면역 메커니즘을 조절하여 특정한 감염 질환 및 종양 질환의 발명 및 진행을 방해할 수 있음을 입증한 바 있다.

[0004] 화학적 암 예방(Chemoprevention)이란 식물 영양소나 약초를 이용하여 암을 예방하거나 치료하는 행위를 말하고, 이 분야는 면역학, 분자생물학, 후성유전학, 약학 등 여러 생명과학을 기반으로 서양 의학과 동양 의학을 아우르는 융합 의학으로 미래의 암 정복에 대한 기대를 모으고 있다. 화학적 암 예방은 식품을 포함한 다양한 천연 물질의 사용을 통해 질병 과정을 지연, 차단 또는 역전시킬 수 있고, 이전의 연구에서 커큐민(Curcumin)과 같은 다양한 식품 물질이 잠재적인 치료제로 연구되어 왔다.

[0005] 이와 관련하여, 아욱(*Malva verticillata*)의 안전성이 한국의 식품의약품안전처(KMFDS) 및 국제 식품 규격위원회(CAC)에 의해 입증되었다. 아욱(Chinese mallow)은 동아시아에서 허브티 및 약초로서 대중적으로 사용된 다엽성 식물이다. 지난 수십년 동안, 식품으로서의 아욱의 용도는 동 아시아에 널리 알려져 있고, 세계적으로 소비자들은 아욱을 쉽게 식품으로서 찾을 수 있다. 아욱 씨앗은 또한 이뇨제, 완화제, 최유제로서 전통적인 중국 약용 제제로서 사용되어 왔다. 이러한 의약적 용도에도 불구하고, 아욱의 지상부의 화학적 구성성분 및 생물학적 활성에 대해서는 잘 알려져 있지 않았다.

[0006] 또한, 천연 식물 오일은 디아실글리세롤 또는 모노아실글리세롤과 같은 부분적인 아실글리세라이드를 대량으로 함유하는 것으로 알려져 있다. 아실글리세라이드와 같은 지방 소립(LD: Lipid droplet)은 지질의 저장 및 대사 회전을 조절하는 동적인 소기관이며, 이들은 막 및 지질 수송, 단백질 저장, 단백질 분해 등에 있어 중요한 역할을 한다. 또한, 아실글리세라이드는 항-신경염증 활성을 가지는 것으로 보고되었다(Wu XY et al, Chemical constituents of the rare cliff plant Oresitrophe rupifraga and their antineuroinflammatory activity. Chem. Biodivers. 13:1030-1037 (2016))

[0007] NK 세포는 바이러스에 감염된 세포나 암세포를 직접 파괴하는 면역 세포로서, 선천적인 면역을 담당하는 혈액 속 백혈구의 일종으로, 간과 골수에서 성숙한다. '자연살해세포'라고도 한다. 즉, NK 세포의 주 기능은 바이러스에 감염된 세포나 암세포를 직접 공격해 없애는 것이다. 바이러스에 감염된 세포나 암세포는 다른 세포와 달리 세포 표면에 특정 단백질(MHC Class I)이 적어지는 것 등의 이상이 생기는데, NK 세포가 이 이상을 감지해 바이러스에 감염된 세포나 암세포를 인지한다고 알려져 있다. NK 세포가 바이러스에 감염된 세포나 암세포를 공격할 때는 퍼포린(perforin)을 분비해 감염 세포나 암세포의 세포막에 구멍을 내고, 여기에 그랜자임(granzyme)을 내어 이 세포들을 사멸시키는 것이다. 이 밖에 다른 면역 세포의 증식을 유도하는 등의 역할을 하는 면역 반응을 일으키는 물질인 케모카인(chemokine) 및 사이토카인(cytokine)을 분비할 수도 있다. 최근 몇몇의 연구를 통해, NK 세포는 선천 및 후천 면역 시스템의 특성을 모두 가지는 것으로 입증되었다. 특히 NK세포가 암세포를 공격해 암세포의 발생과 증식, 전이를 막는다는 것 외에도 암이 재발하는데 가장 중요한 역할을 하는 암 줄기세포를 효과적으로 제어할 수 있다는 것이 밝혀지며, NK세포를 이용한 항암치료 연구가 진행되어 왔다.

[0008] 상기와 같은 배경 하에, 본 발명자들은 NK 세포 활성을 향상시키고, 궁극적으로 종양 면역 조절을 통한 항암 효과를 가진 천연물 유래의 화합물을 찾고자 예의 노력한 결과, 아욱 지상부 분획물 및 이로부터 유래된 글리세라이드 화합물을 분리 및 동정하였고, 비장세포 증식 분석(splenocyte proliferation assay)을 통해 안정성을 확인하였으며, 아욱 분획물 및 상기 화합물을 종양세포인 YAC-1 세포에 처리하였을 때 세포 독성 효과를 가지며,

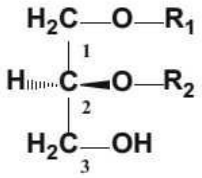
NK 세포의 활성을 향상시키는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항암용 약학적 조성물로서,

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] 상기 화학식에서 R_1이 팔미토일(palmitoyl), 스테아로일(stearoyl), 리노레노일(linolenoyl) 및 리노레오일(linoleoyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, R_2가 수소(H) 및 리노레오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 항암용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

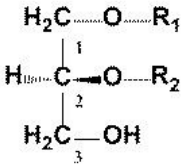
[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 상기 화합물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

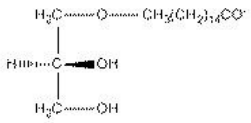
[0018] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 항암용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] [화학식 1]



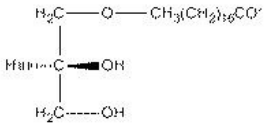
[0020]

[0021] [화학식 2]



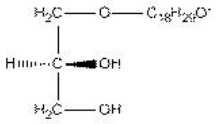
[0022]

[0023] [화학식 3]



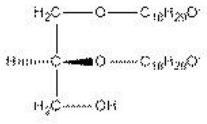
[0024]

[0025] [화학식 4]



[0026]

[0027] [화학식 5]



[0028]

[0029] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 R_1은 팔미토일(palmitoyl), 스테아로일(stearoyl), 리노레노일(linolenoyl) 및 리노레오일(linoleoyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, R_2는 수소(H)일 수소(H) 및 리노레오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물일 수 있다.

[0030] 구체적으로는 상기 화학식 2 내지 5로 표시되는 (2S)-1-O-팔미토일 글리세라이드((2S)-1-O-palmitoyl glyceride), (2S)-1-O-스테아로일 글리세라이드((2S)-1-O-stearoyl glyceride), (2S)-1-O-리노레노일 글리세라이드((2S)-1-O-linolenoyl glyceride) 및 (2S)-1,2-디-O-리노레오일 글리세라이드((2S)-1,2-di-O-linoleoyl glyceride)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 글리세라이드 화합물의 항암 효과는 기존에 알려진 바 없고 본 발명에서 최초로 확인하였다.

[0032] 본 발명은 아욱 분획물 및 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 항암 효과를 가지고, 구체적으로는 NK 세포의 항-종양 활성을 향상시키는 종양 면역 조절 효과를 갖는다는 기술사상에 기초하며, 이는 본 발명자들에 의하여 최초로 규명된 것이다.

[0034] 본 발명에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 분리하여 동정한 것일 수 있다. 이 때, '아욱 (*Malva verticillata*)'은 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있다. 상기 아욱 추출물은 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어, 지상부, 뿌리, 줄기, 잎 뿐만 아니라 아욱 조직 배양물로부터 추출하여 생산할 수 있고, 특히 아욱 지상부를 사용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에서 '아욱 추출물'은 아욱 지상부를 대상으로 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 에틸아세테이트, 부탄올, 및 이들의 혼합용매로 이루어진 군으로부터 선택되는 용매, 보다 구체적으로, 메탄올을 용매로 하여 추출한 결과물일 수 있다. 또한, 추출 온도는 20 내지 100℃, 20 내지 80℃, 30 내지 60℃, 40 내지 50℃일 수 있고, 추출 기간은 약 1시간 내지 4일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용하여 추출할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 항암 효과를 가지는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하기 위해 아욱 추출물을 생산하는 방법이라면 제한되지 않고 이용할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 '분획물'은 다양한 구성성분을 포함하는 혼합물로부터 특정성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서는 아욱 추출물을 용매 분획법, 한외여과 분획

법, 크로마토그래피 분획법 등의 다양한 방법으로 분획한 결과물 등을 포함한다.

[0037] 이외에도, 본 발명의 화합물은 아욱을 제외한 다른 천연 공급원으로부터 분리된 것일 수 있고, 당업계에 공지된 방법을 통해 화학적으로 합성하거나 시판되는 물질일 수 있으며, 이를 포함하여 입수 경로에 관계없이 본 발명에서 사용할 수 있다.

[0038] 구체적으로 본 발명의 일 실시예에서는 아욱 분획물을 처리할 경우 종양 세포에 대응하는 NK 세포의 세포 독성 활성을 유의적으로 증가시켜 항암 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한, 비장세포 증식 분석에서 유의적인 독성을 나타내지 않음을 확인하여 아욱 분획물의 안정성을 확인하였다.

[0040] 본 발명에서 '약학적으로 허용 가능한 염'은 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 구체적으로는 상기 화학식 2 내지 5로 표시되는 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기부가염을 의미한다. 이러한 염으로는 약학적으로 허용되는 유리산 (free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 있다.

[0041] 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레산 (maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산 (fumaric acid), 만데르산, 프로피온산 (propionic acid), 구연산 (citric acid), 젖산 (lactic acid), 글리콜산 (glycollic acid), 글루콘산 (gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산 (glutaric acid), 글루쿠론산 (glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산 (hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 또한, 염기를 사용하여 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상, 또는 식품상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0043] 본 발명의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은 달리 명시되지 않는 한, 상기 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트 (메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트 (토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[0044] 본 발명에서 용어 '암'은 세포의 사멸 조절과 관련된 질병으로서, 정상적인 세포 사멸 균형이 깨지는 경우 세포가 과다하게 증식하게 됨으로써 생기는 질병을 일컫는다. 이러한 비정상적 과다 증식 세포들은 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성하고, 체내의 정상적인 구조를 파괴하거나 변형시키게 되는데, 이러한 상태를 암이라고 한다. 일반적으로 종양(tumor)이라 하면 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자란 덩어리를 의미하며, 양성 종양에 비해 성장속도가 매우 빠르고, 주변 조직에 침윤하면서 전이(metasis)가 일어나 생명을 위협하는 악성 종양을 통상적으로 '암(cancer)'이라 한다. 암의 종류로는 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중프종, 식도암, 취암, 대장암, 간암, 위암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 대장암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑생종 및 피부암을 포함하나, 상기 예들에 의해 본 발명의 암의 종류가 본 발명의 암의 종류가 한정되는 것은 아니다. 상기 암은 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로는 종양 면역 조절에 의해 항암 효과를 나타내는 암일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 또한, 본 발명에서 '종양 면역'은 암 면역이라고도 하며, 종양 세포를 대상으로 하는 면역을 의미한다. 또한, 본 발명에서 '면역 조절'는 아욱 분획물, 및 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 종양 세포를 대상으로 하는 면역을 조절하는 모든 행위를 의미한다.

[0046] 본 발명에서 항암 효과는 NK 세포의 항-종양 활성을 향상시킴으로써 달성되는 것일 수 있다. 구체적으로 본 발

명의 일 실시예에서는 본 발명의 아욱 분획물 및 상기 화학식 2 내지 5로 표시되는 화합물을 처리할 경우, NK-sensitive 종양 세포인 YAC-1에 대응하는 NK 세포의 활성을 증가시킴으로써 항암 효과를 나타냄을 확인하였다. 또한, 아욱 분획물 및 상기 화학식 2 내지 5로 표시되는 화합물의 비장세포 증식 분석을 통해 이들의 안정성을 확인하였다.

[0047] 나아가, 본 발명의 일 실시예에서는 면역 조절 활성에 있어, 모노아실 글리세라이드 화합물(화합물 1 내지 3)이 디아실 글리세라이드 화합물(화합물 4)에 비해 NK 세포 매개된 종양 세포의 생존능을 더욱 감소시키고, 모노아실 글리세라이드 화합물의 지방산의 탄소수가 길고 불포화 지방산을 포함할수록(화합물 3), 지방산의 탄소수가 짧고 포화 지방산을 포함한 모노아실 글리세라이드 화합물(화합물 1 또는 2)에 비해 NK 세포 활성을 더욱 증가시킴을 확인하였다. 즉, 본 발명의 아욱 분획물 및 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 종양 세포에 대응하는 면역 세포 기능의 활성화를 통해, 항암용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있을 것이다.

[0048] 본 발명에서 '약학적 조성물'은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0049] 또한, 각각의 제형에 따라 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

[0050] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 혼합 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose), 락토오스 (Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0051] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

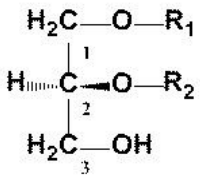
[0052] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구투여하거나 비경구투여할 수 있으며, 비경구투여시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있다.

[0053] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 상기 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 또는 암 예방, 치료, 또는 개선 효과를 나타내는 기타 약학적 활성 화합물과 결합하여 또는 적당한 집합을 이루어 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0056] 본 발명의 다른 양태로서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물로서,

[0057] [화학식 1]



[0058]

[0059] 상기 화학식에서 R_1이 팔미토일(palmitoyl), 스테아로일(stearoyl), 리노레노일(linolenoyl) 및 리노레오일(linoleoyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, R_2가 수소(H) 및 리노레오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0060] 화합물, 약학적으로 허용 가능한 염, 암 예방 또는 개선에 대한 설명은 전술한 바와 같다. 또한, 본 발명의 아욱 분획물 및 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 항암 효과에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0062] 본 발명에서 '예방'은 아욱 분획물 및 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 상기 조성물의 섭취로 상기 암의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0063] 본 발명에서 '개선'은 상기 조성물의 섭취로 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 종양의 크기를 감소시키는 등의 모든 행위를 의미한다.

[0064] 본 발명에서 식품 조성물은 유효성분인 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 이외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있다.

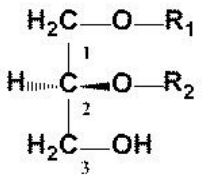
[0065] 본 발명에서 '식품보조첨가제'란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0066] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능식품'이란 특정보건용 식품, 기능성 식품, 건강식품과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미하는데, 상기 식품은 탈모 관련 질환의 예방 또는 개선에 유용한 효과를 얻기 위하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 다양한 형태로 제조될 수 있다. 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 암 예방 또는 개선을 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0067] 본 발명의 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있고, 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다. 구체적으로, 상기 식품은 본 발명의 식품 조성물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등으로 사용될 수 있다. 당업자의 선택에 따라 식품에 포함될 수 있는 적절한 기타 보조성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함한다.

[0069] 본 발명의 다른 양태로서, 아욱 추출물 또는 이의 분획물로부터 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리하는 단계를 포함하는, 상기 화합물의 제조방법으로서,

[0070] [화학식 1]



[0071]

[0072] 상기 화학식에서 R_1이 팔미토일(palmitoyl), 스테아로일(stearoyl), 리노레노일(linolenoyl) 및 리노레오일(linoleoyl)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이고, R_2가 수소(H) 및 리노레오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0073] 구체적으로는 상기 제조방법에 의해 제조되는 화합물은 전술한 화학식 2 내지 5로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 상기 아욱, 추출물, 분획물, 화합물에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0076] 본 발명에서 아욱 분획물, 아욱 유래의 글리세라이드 화합물에 의해 종양 세포에 대한 NK 세포의 활성을 향상시키고, 비장세포 증식 분석에서 안정성을 확인하였으므로, 본 발명의 조성물은 항암용 조성물 및 암 예방 또는 개선용 건강기능식품의 개발에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1는 아욱 분획물 및 화합물 1-4의 비장세포 증식에 대한 효과를 나타낸 것이다 ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.001$; MVE: 아욱 EtOAc 분획물, MVB: *n*-BuOH 분획물, MVW: 아욱 물 분획물, 1: (2S)-1-*O*-palmitoyl glyceride, 2: (2S)-1-*O*-stearoyl glyceride, 3: (2S)-1-*O*-linolenoyl glyceride, 4: (2S)-1,2-di-*O*-linoleoyl glyceride).

도 2은 아욱 분획물 및 화합물 1-4의 NK 세포 활성에 대한 효과를 나타낸 것이다 ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0079] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0081] **<실시예 1> 일반적인 실험 과정 및 식물 재료**

[0082] **1-1. 일반적인 실험 과정**

[0083] GC-MS 스펙트럼은 Shimadzu GC-MS-QP2010 Plus spectrometer(Kyoto, Japan) 상에서 기록하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약은 Dutchefa Bichemie B.V.(Haarlem, The Netherlands)에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 대정 화학(경기도, 한국)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), RPMI 1640 배지, 소 태아 혈청(FBS), 인산 완충 생리식염수(PBS), L-글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신은 Invitrogen Life Technologies Inc.(Carlsbad, CA, USA)에서 수득하였다. 별도로 명시되지 않는 한, 모든 시약을 분석용 품위(analytical grade)로 사용하였다.

[0085] **1-2. 식물 재료**

[0086] 본 실시예에서 사용한 아욱 (*Malva verticillata*) 지상부는 2016년 4월에 한국 남양주시의 상업 농장에서 수집

하였고, 표본 시료 (KHU20160419)를 경희대학교 천연물 화학 (Natural Product Chemistry) 실험실에 보관하였다.

[0088] **1-3. 통계 분석**

[0089] 데이터는 Prism 5 Statistical Software package (GraphPad, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 모든 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차 (standard error of the mean; SEM)로 표현하였다. 그룹 간의 통계학적 비교는 반복적인 일원 분산 분석 (one-way ANOVA)과 Tukey test를 사용하여 수행하였다. $p < 0.05$, 0.01 및 0.001은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0091] **<실시예 2> 아욱 분획물의 제조**

[0092] 건조한 아욱의 지상부 (3.1 kg)를 80% 메탄올 (MeOH, 54.0 L X 5)로 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물을 여과지(6 ㎛, 70 mm)를 통해 여과하고 43 ℃에서 감압 하에 증발시켜 794g의 추출물을 수득하였다. 수득한 메탄올 추출물을 물 (2 L)에 현탁시키고, 에틸아세테이트 (EtOAc, 2 L X 4) 및 *n*-부탄올 (*n*-BuOH, 2 L X 4)로 연속하여 추출하였다. 각 층을 농축시켜 에틸아세테이트 분획물 (MVE, 80g), *n*-부탄올 분획물 (MVB, 77g) 및 물 분획물 (MVW, 637g)을 수득하였다.

[0094] **<실시예 3> 아욱의 *n*-BuOH 분획물로부터 화합물의 분리 및 동정**

[0096] **3-1. 아욱의 *n*-BuOH 분획물로부터 화합물의 분리**

[0097] 상기 실시예 2의 *n*-부탄올 분획물 (MVB, 77g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (ϕ 10 X 15cm)에 적용시키고 클로로포름($CHCl_3$)-메탄올(MeOH)-물(H_2O) (25 : 3 : 1 → 22 : 3 : 1 →? 20 : 3 : 1 →? 18 : 3 : 1 →? 15 : 3 : 1 →? 12 : 3 : 1, 각각 18.8L)를 용리액으로 하여 분리한 결과, 14개의 분획물 (MVB-1 내지 MVB-14)을 수득하였다.

[0098] 분획물 MVB-9 (4.0 g, 용출 부피/총 부피(V_e/V_t) 0.384-0.557)을 ODS 컬럼 크로마토그래피 (ϕ 2.5 X 6 cm) 에 적용시키고 메탄올-물 (3 : 2 → 2 : 1 → 2 : 5 : 1 → 3 : 1 → 5 : 1, 각각 3.6 L)로 용출시켜 분리한 결과 16개의 분획물 (MVB-9-1 내지 MVB-9-16)을 수득하였다. 이 중, 분획물 MVB-9-5 (383.9 mg, V_e/V_t 0.116-0.263)를 ODS 컬럼 크로마토그래피 (ϕ 2.5 X 6 cm)에 적용시키고 아세톤-물 (2 : 3, 8.0 L)로 용출시켜, 14개의 분획물 (MVB-9-5-1 내지 MVB-9-5-14)과 함께 정제된 **화합물 1** [MVB-9-5-4, 22.8 mg, V_e/V_t 0.038-0.053, TLC (Kie 60 F_{254}) R_f 0.20, $CHCl_3$-MeOH-물 (8 : 3 : 1), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.83, 아세톤-물 (2 : 1)]을 수득하였다. 이 중, 분획물 MVB-9-2 (115.8 mg, V_e/V_t 0.004-0.009)를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (ϕ 2.5 X 15 cm)에 적용시키고 $CHCl_3$-MeOH-물 (20 : 3 : 1 → 18 : 3 : 1 → 15 : 3 : 1 → 12 : 3 : 1, 각각 1.7 L)로 용출시켜, 17개의 분획물 (MVB-9-2-1 내지 MVB-9-2-17)과 함께 정제된 **화합물 2** [MVB-9-2-11, 16.1 mg, V_e/V_t 0.745-0.794, TLC (Kie 60 F_{254}) R_f 0.65, $CHCl_3$-MeOH-물 (65 : 35 : 10), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.71, MeOH-물 (3 : 1)]을 수득하였다.

[0099] 분획물 MVB-8 (3.5 g, V_e/V_t 0.128-0.383)을 ODS 컬럼 크로마토그래피 (ϕ 4.5 X 8 cm) 에 적용시키고 메탄올-물 (3 : 1 → 4 : 1 → 5 : 1 → 6 : 1, 각각 1.0 L)로 용출시켜 분리한 결과, 17개의 분획물 (MVB-8-1 내지 MVB-8-17)과 함께 정제된 **화합물 3** [MVB-8-5, 71.5 mg, V_e/V_t 0.055-0.647, TLC (Kie 60 F_{254}) R_f 0.81, $CHCl_3$-MeOH-물 (8 : 3 : 1), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.52, MeOH-물 (5 : 1)]을 수득하였다.

[0100] 분획물 MVB-5 (2.4 g, V_e/V_t 0.036-0.051)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (ϕ 3.5 X 15 cm) 에 적용시키고 에틸아세테이트-*n*-부탄올-물 (30 : 3 : 1, 2.4 L)로 용출시켜 분리한 결과, 13개의 분획물 (MVB-5-1 내지 MVB-5-13)과 함께 정제된 **화합물 4** [MVB-5-12, 76.4 mg, V_e/V_t 0.766-0.874, TLC (Kie 60 F_{254}) R_f 0.19, EtOAc-*n*-

BuOH-물 (8 : 3 : 1), TLC (RP-18 F_{254S}) R_f 0.65, 아세톤-물 (1 : 4)]를 수득하였다.

[0102] **3-2. 분리된 화합물의 동정**

[0103] 실시예 3-1에서 수득한 화합물 1 내지 4를 대상으로 NMR, IR, FAB-MS 및 GC-MS 분석을 수행하여, 각 화합물의 구조를 동정하였다.

[0105] 화합물 1을 분석한 결과는 다음과 같다.

[0106] - 담황색 왁스 (pale yellow wax)

[0107] - $[\alpha]_D$ -1.2° (*c* 0.10, $CHCl_3$)

[0108] - 녹는점 98-100 ℃

[0109] - positive FAB-MS *m/z* 331 $[M+H]^+$

[0110] - IR (KBr, ν) 3383 cm^{-1}(hydroxyl absorbance band), 1723 cm^{-1}(ester absorbance band)

[0111] - ^{1}H-NMR (CD_3OD, 400 MHz, δ_H): 0.88 (3H, t, *J* = 7.2, H-16'), 1.27-1.34 (24H, overlapped, H-4'-15'), 1.59 (2H, m, H-3'), 2.33 (2H, t, *J* = 8.0, H-2'), 3.87 (2H, m, H-3), 3.96 (1H, m, H-2), 4.10 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.4, H-1a);

[0112] - ^{13}C-NMR (100 MHz, CD_3OD, δ_C): 14.4 (C-16'), 23.6 (C-15'), 25.9 (C-3'), 29.9-30.1 (C-4'-13'), 33.0 (C-14'), 34.9 (C-2'), 66.1 (C-1), 67.4 (C-3), 69.8 (C-2), 175.1 (C-1');

[0113] - GC-MS t_R = 10.27 분 (palimic acid methyl ester)

[0114] 분석 결과, 화합물 1은 포화 지방산을 가진 모노글리세라이드이고, 구체적으로는 (2S)-1-*O*-팔미토일 글리세라이드임을 확인하였다.

[0116] 화합물 2를 분석한 결과는 다음과 같다.

[0117] - 담황색 왁스 (pale yellow wax)

[0118] - $[\alpha]_D$ +1.5° (*c* 0.10, $CHCl_3$)

[0119] - positive FAB-MS *m/z* 359 $[M+H]^+$

[0120] - IR (KBr, ν) 3386 cm^{-1}(hydroxyl absorbance band), 1724 cm^{-1}(ester absorbance band)

[0121] - ^{1}H-NMR (CD_3OD, 400 MHz, δ_H): 0.88 (3H, t, *J* = 7.2, H-18'), 1.27-1.34 (28H, overlapped, H-4'-17'), 1.59 (2H, m, H-3'), 2.34 (2H, t, *J* = 8.0, H-2'), δ: 3.90 (2H, m, H-3), 3.96 (1H, m, H-2), 4.10 (1H, dd, *J* = 11.4, 4.4, H-1a);

[0122] - ^{13}C-NMR (CD_3OD, 100 MHz, δ_C): 14.2 (C-18'), 22.7 (C-17'), 25.1 (C-3'), 29.4-30.0 (C-4'-15'), 173.6 (C-1');

[0123] - GC-MS t_R = 14.37 분 (stearic acid methyl ester)

[0124] 분석 결과, 화합물 2는 포화 지방산을 가진 모노글리세라이드이고, 구체적으로는 (2S)-1-*O*-스테아로일 글리세라이드임을 확인하였다.

[0126] 화합물 3을 분석한 결과는 다음과 같다.

[0127] - 짙은 녹색 왁스 (dark green wax)

[0128] - $[\alpha]_D$ +3.5° (*c* 0.10, $CHCl_3$)

[0129] - positive FAB-MS *m/z* 353 $[M+H]^+$

[0130] - IR (KBr, ν) 3386 cm^{-1}(hydroxyl absorbance band), 1722 cm^{-1}(ester absorbance band), 1621 cm^{-1}(double bond absorbance band)

[0131] - ^{1}H-NMR (CD_3OD, 400 MHz, δ_H): 0.96 (3H, t, *J* = 7.2, H-18'), 1.30-1.35 (8H, overlapped, H-4'-7'), 1.60 (2H, m, H-3'), 2.07 (4H, m, H-8'-17'), 2.34 (2H, t, *J* = 8.0, H-2'), 2.80 (4H, overlapped, H-11',14'), 3.90 (2H, m, H-3), 3.96 (1H, m, H-2), 4.10 (1H, dd, *J* = 11.4, 6.0, H-1b), 4.17 (1H, dd, *J* = 11.4, H-1a), 5.27-5.40 (6H, overlapped, H-9',10',12',13',15',16');

[0132] - ^{13}C-NMR (CD_3OD, 100 MHz, δ_C): 14.6 (C-18'), 21.5 (C-17'), 26.0 (C-3'), 26.4 (C-11'), 26.5 (C-14'), 28.1 (C-8'), 30.2-30.7 (C-4'-7'), 34.9 (C-2'), 66.2 (C-1), 67.4 (C-3), 69.9 (C-2), 128.2 (C-15'), 128.8 (C-10'), 129.2 (x 2, C-12',13'), 131.0 (C-9'), 132.7 (C-16'), 175.3 (C-1');

[0133] - GC-MS t_R = 13.76 분 (linolenic acid methyl ester)

[0134] 분석 결과, 화합물 3은 불포화 지방산을 가진 모노글리세라이드이고, 구체적으로는 (2S)-1-*O*-리노레노일 글리세라이드임을 확인하였다.

[0136] 화합물 4를 분석한 결과는 다음과 같다.

[0137] - 담황색 왁스 (pale yellow wax)

[0138] - $[\alpha]_D$ -2.0° (*c* 1.00, $CHCl_3$)

[0139] - negative FAB-MS *m/z* 615 $[M-H]^-$

[0140] - IR (KBr, ν) 3389 cm^{-1}(hydroxyl absorbance band), 1725 cm^{-1}(ester absorbance band), 1610 cm^{-1}(double bond absorbance band)

[0141] - ^{1}H-NMR (CD_3OD, 400 MHz, δ_H): 0.89 (6H, t, *J* = 6.8, H-18',18''), 1.28-1.32 (28H, overlapped, H-4'-7',4''-7'',15'-17',15''-17''), 1.60 (4H, m, H-3',3''), 2.06 (8H, overlapped, H-8',8'',14',14''), 2.30 (2H, t, *J* = 7.6, H-2'), 2.33 (2H, t, *J* = 7.6, H-2''), 2.80 (4H, m, H-11',11''), 3.96 (2H, m, H-3), 4.17 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.4, H-1b), 4.43 (1H, dd, *J* = 12.0,2.8, H-1a), 5.20 (1H, m, H-2), 5.32-5.36 (8H, overlapped, H-9',9'',10',10'',12',12'',13',13'');

[0142] - ^{13}C-NMR (CD_3OD, 100 MHz, δ_C): 14.5 (x 2, C-18',18''), 21.8 (x 2, C-17',17''), 23.8 (x 2, C-17',17''), 26.0 (x 2, C-3',3''), 26.5 (x 2, C-11',11''), 28.2 (x 4, C-8',8'',14',14''), 30.2-30.8 (C-4'-7',4''-7'',15'-16',15''-16''), 34.9 (C-2'), 35.1 (C-2''), 63.9 (C-3), 64.7 (C-1), 72.0 (C-2), 129.2 (x 4, C-10',10'',12',12''), 131.1 (x 4, C-9',9'',13',13''), 174.6 (C-1'), 174.9 (C-1');

[0143] - GC-MS t_R = 13.99 분 (linoleic acid methyl ester)

[0144] 분석 결과, 화합물 4는 2개의 불포화 지방산을 가진 디아실글리세라이드이고, 구체적으로는 (2S)-1,2-디-*O*-리노레오일 글리세라이드임을 확인하였다.

[0146] **<실시예 4> 비장세포 증식 분석(Spelnocyte proliferation assay)**

[0148] 모든 실험 과정은 Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication, #80-23, 1996 개정) 및 경희대학교 동물 관리 및 사용 지침에 따라 수행하였다. 성인 수컷 ICR 마우스 (7-10주령)를 Young Bio Lab Co.(오산, 한국)으로부터 수득하였다. 마우스를 음식과 물을 자유로이 공급하며 12시간의 빛/어둠 주기 하에 표준 실험실 동물 시설에서 유지 관리하였다.

[0149] 비장세포(Splenocyte) 분리를 위해, ICR 마우스로부터 무균 상태로 각 비장을 제거하였고, 냉각된 HBSS에서 보관하였다. 비장세포를 세포 여과기에서 주사기의 말단부로 부드럽게 균질화함으로써, 단일 세포 현탁액을 제조하였고 HBSS로 세척하였다. 세포 현탁액은 400 x g에서 원심분리하였고, 적혈구 용해 완충액으로 15분 동안 추가로 인큐베이션하였다. 이후, 세포를 400 x g에서 원심분리하였고, 세척하였고, RPMI 1640 배지(10% FBS로 보충됨)에서 배양하였다. 1차 마우스 비장세포를 5% CO_2 대기 인큐베이터에서 37 ℃에서 10% FBS로 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다.

[0151] YAC-I (KCLB no. 40160) 세포주는 한국 세포주 은행(Korean Cell Line Bank, 서울, 한국)으로부터 구매하였다. 세포주는 RPMI 1640 배지 또는 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 생장시켰고, 5% CO_2, 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 모든 실험에 있어, 5번 미만의 계대 접종(passage)의 세포 배양액을 사용하였다.

[0153] 비장세포 증식을 측정하기 위해 MTT 분석을 사용하였다. 결론적으로, 4 x 10^6 세포/웰의 50 ㎍을 96-웰 배양 플레이트에 시딩하였다. 2시간 후, 각각의 세포에 각 분획물의 10 ㎍/mL 및 각 화합물의 10 μM을 48시간 동안 처리하였다. MTT 용액을 첨가하였고, 세포를 추가로 4시간 동안 인큐베이션하였다. 배지를 제거한 후, MTT-포르마잔 산물을 용해시키기 위해 DMSO를 각 웰에 첨가하였다. 생성된 흡광도를 570 및 630 nm에서 microtitier plate reader(Synergy HT, Multi-mode microplate reader, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 측정하였다. 세포 증식은 대조군 세포에 대한 처리된 샘플 생세포(viable cell)의 백분율로 표현하였다. 모든 시험은 4회 반복하여 수행하였다.

[0154] 아울러, 실시예 2 및 3으로부터 수득한 아욱 지상부 유래의 분획물의 10 ㎍/mL 및 화합물 1 내지 4의 10 μM 각각은 비장세포에 유의적인 독성을 나타내지 않으므로, 이들 농도를 모든 분석에 사용하였다.

[0156] 비장세포에 아욱 분획물 및 화합물 1 내지 4를 처리한 결과, **도 1**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 아욱 유래 분획물 및 화합물 1 내지 4의 처리는 비장세포 증식에 유의적인 영향을 미치며, 구체적으로는 EtOAc 분획물, *n*-BuOH 분획물 및 화합물 3은 음성 대조군에 비하여 각각 약 1.5- 및 1.2배 증식을 유도하였다.

[0157] 이를 통해, 아욱 유래 분획물 및 화합물 1 내지 4는 비장세포에 어떠한 유의적인 독성을 나타내지 않으므로, 이들 분획물 및 화합물의 안정성을 확인하였다.

[0159] **<실시예 5> 세포독성 NK 세포 분석**

[0161] NK 세포 활성을 측정하기 위해, non-adherent 비장세포를 effector 세포로 사용하였고, NK-sensitive 종양 세포인 YAC-1을 표적 세포로 사용하였다 [10:1의 E:T 비율이 되도록, 4 x 10^6 세포/웰의 50 μL effector (E)를 2 x 10^5 표적 (T) 세포/웰의 100 μL에 첨가하였다]. 분획물 (10 ㎍/mL) 또는 화합물(10 μM)의 존재 또는 부재하에, 96-웰 플레이트에서 배양하였고, 24시간 동안 5% CO_2 인큐베이터, 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 이후, MTT 분석에 의해 NK 세포의 종양 사멸 활성을 측정하였다. NK 세포 활성은 하기 식에 따라, 대조군과 비교한 세포 생존능에 의해 표현하였다. YAC-1 세포 생존능의 감소는 NK 세포의 활성의 증가, 즉 항-종양 활성의 증가로

판단하였다.

[0163] 세포 생존능 = $(OD_{sample} - OD_{effector\ control})/OD_{target\ control}$ x 100

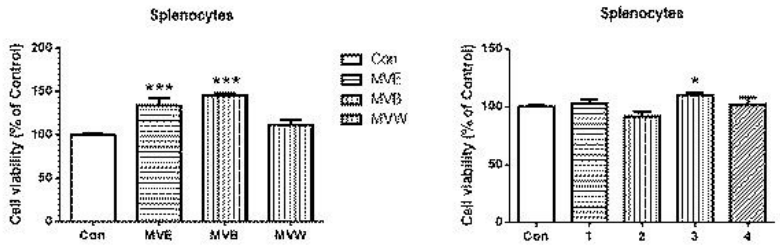
[0165] NK-sensitive 종양 세포인 YAC-1에 대한 비장세포의 세포 독성을 분석한 결과, **도 2**에서 확인할 수 있는 바와 같이, 아욱 분획물 및 화합물 1 내지 4의 처리는 NK 세포의 세포 독성을 증가시키고, 구체적으로는 모든 분획물 및 화합물 1 내지 3을 처리한 경우에 대조군에 비하여 NK 세포의 세포 독성을 각각 약 65% 및 50% 증가시켰다. 이를 통해, 아욱 유래 분획물 및 화합물 1 내지 4는 NK 세포의 세포 독성 활성을 유의적으로 증가시켜, 이들 분획물 및 화합물들의 존재 하에 종양 세포에 대응하는 선천성 면역 반응이 증가됨을 알 수 있었다.

[0166] 특히, 아욱 분획물 중 *n*-BuOH 분획물을 처리할 경우에 가장 효과적인 면역 조절 활성을 나타내고, 또한 이로부터 분리된 화합물들 중 화합물 1 내지 3을 처리할 경우에 우수한 면역 조절 활성을 나타냄을 확인하였다. 보다 구체적으로, 면역 조절 활성에 있어 모노아실 글리세라이드 화합물(화합물 1 내지 3)이 디아실 글리세라이드 화합물(화합물 4)에 비해 NK 세포 매개된 종양 세포의 생존능을 더욱 감소시키고, 모노아실 글리세라이드 화합물의 지방산의 탄소수가 길고 불포화 지방산을 포함할수록(화합물 3) 지방산의 탄소수가 짧고 포화 지방산을 포함한 모노아실 글리세라이드 화합물(화합물 1 또는 2)에 비해 NK 세포 활성을 더욱 증가시킴을 확인하였다.

[0168] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2

