



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0061918
(43) 공개일자 2025년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/618 (2015.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 19/02 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/618 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0146300
(22) 출원일자 2023년10월30일
심사청구일자 2023년10월30일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
강다원
경상남도 진주시 새평거리 30, 104동 2004호 (평
거동, 엠코타운더프라하)
(74) 대리인
특허법인태백

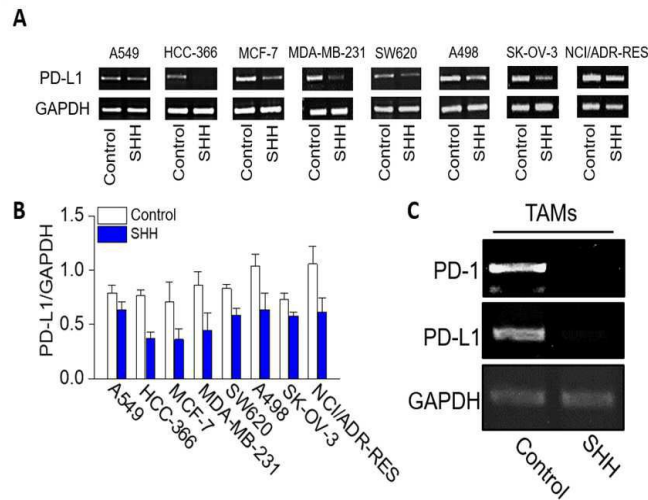
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 군소 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 완화용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용에 의한 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 군소 가수분해물이 PD-L1(Programmed death-ligand 1) 및 PD-1(Programmed Death-1) 발현을 억제하고, 항암제 부작용에 의해 발생하는 질환 중 하나인 류마티스 관절염 개선 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 항암제 부작용 예방, 완화 또는 개선용 조성물으로써, 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 19/02 (2018.01)

A61P 37/02 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/306 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/204 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345365707
과제번호	2021R1I1A3044128
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	통증의 신경면역 조절에 있어서 투포어 도메인 칼륨통로의 역할 규명
기 여 율	60/100
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711197916
과제번호	00219399
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	대사이상 간질환 연구센터
기 여 율	40/100
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2023.06.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 완화용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 군소 가수분해물은 PD-L1(Programmed death-ligand 1) 또는 PD-1(Programmed Death-1) 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항암제 부작용은 자가면역질환을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항암제는 면역항암제인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 면역항암제는 이필리무맙(Ipilimumab), 니볼루맙(nivolumab), 펌브로리주맙(pembrolizumab), 아테졸리주맙(atezolizumab), 더발루맙(durvalumab) 및 아벨루맙(avelumab)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 억제용 항암 보조제.

청구항 9

군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 자가면역질환은 항암제 부작용으로 발생하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 12

군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 완화용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암은 세계적으로도 심장질환 다음으로 높은 사망률을 나타내는 질병으로 매년 백만 명 이상의 새로운 환자들이 생겨나고 있다. 많은 나라의 연구팀들이 암의 발생기전이나 치료에 대한 연구를 위해 막대한 연구비를 투자해 왔으나 아직도 암은 난치성 질병으로 남아 있다.

[0003] 종양은 아직 그 발생 원인과 과정이 정확히 알려지지는 않았지만 일반적으로 종양은 정상세포가 가지고 있는 세포 분열의 특이성을 상실하여 일어나는 조직의 비정상적인 증식을 말한다. 즉, 암은 세포 증식을 제어하는 DNA가 이상을 일으킨 현상으로 변형된 DNA에 의해 염증, 이상증식, 혈관 생성 등 암의 생성과 관련 있는 유전자들을 활성화시켜 종양의 생성을 촉진한다. 이러한 DNA의 변형을 가져오는 원인으로는 크게 화학물질, 바이러스 및 유전적 요인이 있다. 즉 이러한 요인들이 발암 개시제(tumor initiator) 혹은 발암 촉진제(tumor promoter)로서 DNA에 작용함으로써 이들에 노출된 세포에 영향을 미쳐 발암 능력을 크게 강화시켜 주게 된다. 또한, 인간의 유전자 중에는 세포성장 및 분화를 조절하는 종양억제 유전자(tumor suppressor gene)가 있는데, 이는 정상세포의 암세포로의 변형을 억제하는 기능을 가지고 있다. 그러나 이들 유전자의 이상으로 세포 성장 억제 기능이 상실되면 세포는 과잉성장을 초래하게 되고 따라서 암을 유발하게 되는 것으로 알려져 있다. 정상세포가 암세포로 변형되는 과정은 여러 단계를 거쳐서 진행되는데, 즉 정상세포의 성장 억제 기능이 상실되면 빠르게 증식(proliferation) 및 분화(differentiation)되어 비정상적인 세포가 형성되고 이들의 과잉분열에 의해 종양이 형성되며 이어 영양분 공급을 위한 신생혈관 생성(angiogenesis) 과정을 거쳐 신체의 다른 부위로 전이(metastasis)된다.

[0004] 최근 수십 년간 진단과 치료기술의 발달로 다양한 항암제가 개발되어 암 환자 치료에 유의미한 성과가 나오고 있지만, 오심, 구토, 설사, 피로, 탈진, 탈모, 간 독성 등 항암제에 의한 부작용 역시 다수 보고되고 있어, 항암제 처방 및 사용에 제약이 있다. 따라서, 부작용을 최소화하는 항암제와 항암제의 부작용을 완화하는 항암보조제에 대한 연구가 활발히 진행 중인 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 KR 10-1173993(2012.08.08. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 항암제 부작용 예방 또는 완화용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 항암제 부작용 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 항암제 부작용 억제용 항암 보조제를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 자가면역질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 완화용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 군소 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

- [0013] 또한, 본 발명은 상기 군소 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 억제용 항암 보조제를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 군소 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 군소 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따르면, 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물이 PD-L1(Programmed death-ligand 1) 및 PD-1(Programmed Death-1) 발현을 억제하고, 항암제 부작용에 의해 발생하는 질환 중 하나인 류마티스 관절염 개선 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 항암제 부작용 예방, 완화 또는 개선용 조성물으로써, 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물(이하 샘플이라 함)이 콜라겐 유발 관절염(collagen induced arthritis; 이하 CIA라 함)에 미치는 영향을 확인하기 위해, CIA 유도 동물모델을 이용한 동물실험 과정에 대한 전반적인 모식도이다.
- 도 2는 샘플이 암세포에서 PD-L1(Programmed death-ligand 1) 및 PD-1(Programmed Death-1)의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, RT-PCR을 수행한 결과이다.
- 도 3은 샘플이 동물모델에서 CIA에 미치는 영향을 확인하기 위해, 임상 평가를 수행한 결과이다.
- 도 4는 샘플이 동물모델에서 CIA에 미치는 영향을 확인하기 위해, 조직 병리학적 평가; 및 마이크로컴퓨터 단층촬영(Micro-CT) 분석을 수행한 결과이다.
- 도 5는 샘플이 동물모델에서 항-CII 항체 및 염증성 사이토카인의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, ELISA 분석을 수행한 결과이다.
- 도 6은 샘플이 동물모델에서 간 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 혈청 내 AST(aspartate transaminase) 및 ALT(alanine transaminase) 수치를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 완화용 약학 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 군소 가수분해물은 PD-L1(Programmed death-ligand 1) 또는 PD-1(Programmed Death-1) 발현을 억제할 수 있다.
- [0023] 상기 항암제 부작용은 자가면역질환을 포함할 수 있고, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)일 수 있다.
- [0024] 상기 항암제는 면역항암제일 수 있고, 상기 면역항암제는 이필리무맙(Ipilimumab), 니볼루맙(nivolumab), 펌브로리주맙(pembrolizumab), 아테졸리주맙(atezolizumab), 더발루맙(durvalumab) 및 아벨루맙(avelumab)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 자가면역질환은 항암제 부작용으로 발생하는 것일 수 있고, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는

방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

- [0027] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 구산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.
- [0029] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 피부 외용제 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에 게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.
- [0033] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 “건강기능식품”이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0039] 상기 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 “식품 첨가물”로서의 적합 여부는

다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0040] 상기 “식품 첨가물 공전”에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0041] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다. 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능 식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충전 하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0042] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강 기능식품을 모두 포함한다.

[0043] 본 발명에서 용어 “예방”은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 항암제 부작용 또는 자가면역질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0044] 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 항암제 부작용 또는 자가면역질환이 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[0045] 본 발명에서 용어 “개선”은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 항암제 부작용 또는 자가면역질환의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 말한다.

[0047] 또한, 본 발명은 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 억제용 항암 보조제를 제공한다.

[0049] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0051] [실험예 1] 샘플 제조

[0052] 본 실험의 샘플인 군소(*Aplysia kurodai*) 가수분해물을 제조하기 위해, 군소(통영 잠수기조합에서 구매)를 깨끗이 씻고 데친 다음 다졌다. 다진 군소에 플라보르자임(Flavourzyme, 2%)을 직접 첨가하고, 구연산 분말을 사용하여 pH를 6.0으로 조정 한 후, 60℃에서 15시간 동안 배양하였다. 효소 반응을 비활성화하기 위해, 혼합물을 100℃에서 10분간 가열하고, 200-mesh 스크린 체로 여과하였다. 여과한 용액을 회전식 진공 증발기(WCR-P6, 대한과학(주), 원주, 한국)를 사용하여 Brix 값이 50에 도달하도록 농축하였다. 농축한 가수분해물에 3배 부피의 에탄올을 첨가하고, 교반하여 침전이 일어날 때까지 12시간 동안 방치하였다. 그 후, 침전물을 동결건조하고 분말로 분쇄한 후, 실험에 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. 실험 시 건조한 군소 가수분해물을 1g/mL 농도로 증류수로 희석하였다.

[0054] [실험예 2] 세포배양

[0055] 인간 비소세포폐암 세포주(A549 및 HCC-366), 인간 유방암 세포주(MCF-7 및 MDA-MB-231), 대장암 세포주(SW620), 신장암 세포주(A498) 및 난소암 세포주(SK-OV-3)는 한국 세포주 은행(KCLB, 서울, 대한민국)에서 구입하였고, 난소암 세포주(NCI/ADR-RES)는 ATCC에서 구입하였다. 상기 세포주들은 10% 태아 소 혈청(FBS; Gibco-BRL) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(100 μg/mL)을 보충한 DMEM/F12(Gibco-BRL)(SW620 및 SK-OV-3 세포주 배양에 사용); 또는 DMEM(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)(SW620 및 SK-OV-3 세포주 외의 세포주 배양에 사용) 배지에서 37℃ 및 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 배양 배지는 2일마다 교체하였다.

[0057] [실험예 3] 종양 관련 대식세포 생성

[0058] THP-1 세포(2×10^5 세포/mL)(한국세포주은행에서 구입)를 6 웰 플레이트에 분주(seeding)하고, RPMI 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포에 150nm PMA(propidium monoazide)를 첨가하여 대식세포와 유사한 표현형으로 분화시켰다. 24시간 후, 분화한 대식세포를 A549 세포와 1:1 비율로 4일 동안 공동 배양하여 종양 관련 대식세포(Tumor-Associated Macrophage; TAM)를 생성하였다.

[0060] [실험예 3] 실험동물 준비

[0061] 수컷 DBA/1J 마우스(7~8주령)는 Central Lab. Animal(서울, 대한민국)에서 구입하였다. 마우스는 사료 및 물을 자유롭게 제공하였고, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 조건의 병원체가 없는 시설에서 사육하였다. 실험(수술) 당일과 매주 마우스의 체중을 측정하였다. 모든 실험은 국립보건원 지침(PNU-2020-2757)에 따라 부산대학교 기관동물실험윤리위원회의 승인을 받고 수행하였다(승인번호 : PNU-2020-2757).

[0062] 상기 마우스를 이용하여 CIA(collagen induced arthritis) 유도 마우스를 제작하였다. 실험 0일차에 마우스 꼬리 밑부분에 $100 \mu\text{g}$ 의 소 II형 콜라겐(type II collagen; 이하 CII라 함)(Chondrex Inc., 미국 워싱턴주 레드몬드)을 피내 주사(intradermal injection)하고, 동일한 양의 CFA(Complete Freund's Adjuvant, Sigma-Aldrich, 미국 미주리주 세인트루이스)로 유화하였다. 실험 21일차에 동일한 부피의 CII emulsion 및 IFA(Incomplete Freund's adjuvant, 콘드렉스)로 유화하여 면역력을 강화하였다. CII 주입 시 정상 마우스는 면역 집중하고 PBS로 부스팅하였다. 실험군은 하기와 같이 설정하였다($n=7 \sim 8$). 도 1과 같이, 샘플은 실험 22~35일차에 1g/kg/day 용량으로 경구 투여하였고, 류마티스 관절염 치료제로 사용하는 메토타렉세이트(methotrexate; 이하 MTX라 함)(Sigma-Aldrich)를 양성대조군으로 사용하였으며, MTX는 실험 22~35일 차에 3일에 1회씩 1mg/kg 의 용량을 복강 내 투여하였다.

[0063] 1) 대조군(Normal) : 증류수 경구 섭취한 마우스

[0064] 2) CIA 단독 투여군(CIA)

[0065] 3) 샘플 투여군(CIA+SHH) : 샘플 경구 투여한(1g/kg/day) CIA 유도 마우스

[0066] 4) 양성대조군(CIA+MTX) : MTX 복강 내 투여한($1\text{mg/kg/every 3 day}$) CIA 유도 마우스

[0068] [실험예 4] 통계분석

[0069] 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(mean $\pm$ SD)로 나타냈다. 실험군간 차이를 분석하기 위해, 정규성 테스트 후 일원 분산 분석(one-way ANOVA/Bonferroni test) 또는 Kruskal-Wallis/Mann-Whitney test를 수행하였다(OriginPro2020, OriginLab Corp., 미국 노샘프턴, MA, 미국). 통계적 유의성 기준은 $p < 0.05$ 값을 고려하였다.

[0071] [실시예 1] RT-PCR 분석

[0072] 샘플이 암세포에서 PD-L1(Programmed death-ligand 1) 및 PD-1(Programmed Death-1)의 유전자 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, RT-PCR을 수행하였다. 제조업체의 지침에 따라, Trizol 시약(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 암세포에서 총 RNA를 추출하였다. 그 후, oligo dT(DiaStar RT Kit, SolGent, 대전, 한국)를 사용하여 세포에서 얻은 $3 \mu\text{g}$ 의 총 RNA로부터 첫 번째 가닥 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA는 분광광도계(NanoDrop® ND-1000, NanoDrop Technologies, 미국 윌밍턴, DE)를 사용하여 정량화하고, G-Taq 중합효소(코스모제네텍, 서울, 대한민국)를 사용한 PCR 증폭을 위한 템플릿으로 사용하였다. PCR 프로토콜은 94°C 에서 5분간 초기 변성(initial denaturation), 32 cycle의 94°C 에서 30초, $55 \sim 60^\circ\text{C}$ 에서 30초간 어닐링 단계(annealing), 72°C 에서 30초간 연장(extension), 72°C 에서 10분간 최종 연장 단계(final extension)로 구성하였다. 생성한 PCR 산물은 에티듐 브로마이드(Ethidium bromide)으로 염색한 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)에서 분리하고, 밴드를 추출하여 ABI PRISM® 3100-Avant 유전자 분석기(미국 캘리포니아주 칼스배드, Applied Biosystems)를 사용하여 직접 시퀀싱하였다. PCR에 사용한 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

유전자	GenBank Acc. No.	서열(5'→3')	종(species)	예상 크기(bp)
PD-1(sense)	L27440.1	TATGGTGGTGCCGACTACAA	human	492
PD-1(antisense)	L27440.1	CCCATAGTCCACAGAGAACACA	human	492
PDL1(sense)	AY254342.1	TATGGTGGTGCCGACTACAA	human	388
PDL1(antisense)	AY254342.1	TGGCTCCCAGAATTACCAAG	human	388
GAPDH(sense)	NM_002046.7	CCCATGTTTCGTCATGGGTGT	human	145
GAPDH(antisense)	NM_002046.7	TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA	human	145

그 결과, 도 2와 같이, 샘플 처리군(SHH; see hare hydrolysates)은 비소세포폐암(A549 및 HCC-366), 유방암(MCF-7 및 MDA-MB-231), 대장암(SW620), 신장암(A498) 및 난소암(SK-OV-3 및 NCI/ADR-RES) 세포주에서 대조군(Control; 샘플 미처리군) 대비 PD-L1 발현이 유의하게 감소하였고(도 2A 및 도 2B), 중앙 관련 대식세포에서도 대조군 대비 샘플 처리군에서 PD-1 및 PD-L1 발현이 유의하게 감소하였다(도 2C).

[실시예 2] 임상 평가

샘플이 동물모델에서 CIA에 미치는 영향을 확인하기 위해, 임상 평가를 수행하였다. 마우스를 면밀히 관찰하고, 1차 CII 주사 후, 일주일에 3번씩 점수를 매겼다. 각 사지(4개의 발)에 대해 3명의 연구자가 다음 기준에 따라 4점 척도로 독립적으로 점수를 매겼다: 0; 정상 발, 1; 족지 또는 발목 관절에 국한된 홍반과 가벼운 부종, 2; 발목에서 족지까지 확장된 홍반과 가벼운 부종, 3; 발목에서 중족골 관절까지 확장된 홍반과 중간 정도의 부종 및 4; 발목, 발, 발가락을 아우르는 홍반과 심한 부종 또는 사지의 강직증. 네 발의 점수를 모두 합산하여 관절염 점수를 매겼다.

그 결과, 도 3과 같이, 대조군(Normal) 대비 CIA 단독 투여군(CIA)에서 발의 염증 반응; 및 발의 두께가 유의하게 증가한 반면, CIA 단독 투여군 대비 샘플 투여군(CIA+SHH) 및 양성대조군(CIA+MTX)에서 발의 염증 반응; 및 발의 두께가 유의하게 감소하였다.

[실시예 3] 조직 병리학적 평가

샘플이 동물모델에서 CIA에 미치는 영향을 확인하기 위해, 조직 병리학적 평가를 수행하였다. 마우스를 36일째에 희생시키고, 발목 관절을 채취하여 10% 인산염 완충 포르말린에 24시간 동안 고정하고, 관절을 RDO-Gold 탈석기(미국 펜실베이니아주 핏필드, 전자 현미경 과학)에서 3일간 탈석한 후, 탈수하여 파라핀에 담았다. 조직 절편(두께, 3μm)을 준비하고, H&E(Hematoxylin & Eosin, Sigma-Aldrich) 및 사프란인 O(Safranin O, Sigma-Aldrich)로 염색했다.

활액 염증 및 증식은 다음 기준에 따라 H&E 염색을 사용하여 결정했다: 0; 염증 징후 없음, 1; 내막층이 약간 두꺼워지거나 기저층에 일부 침윤 세포가 있음, 2; 내막층이 약간 두꺼워지고 기저층에 일부 침윤 세포가 있음, 3; 내막층이 두꺼워지고 기저층에 세포가 유입되고 활막 공간에 세포가 있음 및 4; 많은 염증 세포가 고도로 침윤된 활막이 있음.

연골 손상은 다음 기준에 따라 사프란인-O 염색을 사용하여 결정했다: 0; 파괴 없음, 1; 단일 부위에 국한된 최소 침식, 2; 제한된 부위에 경미하거나 중간 정도의 침식, 3; 더 광범위한 침식 및 4; 일반적인 파괴. 염색된 표본은 가상 현미경(Axio Scan.Z1, 독일 하이텐하임, Carl Zeiss)을 사용하여 시각화했다. 조직학적 평가는 3명의 관찰자가 독립적으로 수행하였으며, 결과는 관찰자 점수의 평균으로 나타났다.

그 결과, 도 4와 같이, 대조군(Normal) 대비 CIA 단독 투여군(CIA)에서 관절염성 염증; 활막 증식; 및 관절 연골 및 뼈 손실 증상이 유의하게 나타났고, CIA 단독 투여군 대비 샘플 투여군(CIA+SHH) 및 양성대조군(CIA+MTX)에서 상기 증상이 유의하게 감소하였다.

[실시예 4] 마이크로컴퓨터 단층 촬영(Micro-CT) 분석

[0087] 샘플이 동물모델에서 CIA에 미치는 영향을 확인하기 위해, 마이크로컴퓨터 단층 촬영(Micro-CT) 분석을 수행하였다. 실험 36일째에 마이크로컴퓨터 단층 촬영기(Quantum FX, 미국 매사추세츠주 퍼킨 엘머)를 사용하여 마우스의 뒷발 컴퓨터 단층 촬영 이미지를 획득하였다. 마우스의 발목 관절은 90kV의 튜브 전압, 160 μ A의 튜브 전류, 20 μ m 해상도 및 2분 스캔 시간 조건으로 스캐닝(scanning)하였다.

[0088] 그 결과, 도 4와 같이, 대조군(Normal) 대비 CIA 단독 투여군(CIA)에서 관절 파괴 증상이 유의하게 나타난 반면, CIA 단독 투여군 대비 샘플 투여군(CIA+SHH) 및 양성대조군(CIA+MTX)에서 상기 증상이 유의하게 감소하였다.

[0089]

[0090] [실시예 5] ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)

[0091] 샘플이 동물모델에서 항-CII 항체 및 염증성 사이토카인의 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, ELISA 분석을 수행하였다. 샘플 또는 MTX의 최종 투여 24시간 후(실험 36일 차) 심장 막천자를 통해 혈액 샘플을 채취하였다. 혈청은 원심분리하여 수집하였다. 마우스 항-CII 항체(IgG, IgG1 및 IgG2a; Chondrex Inc., 미국 워싱턴주 레드몬드), 마우스 TNF- α , 마우스 IL-6 및 마우스 IL-1 β /12(R&D Systems, 미국 미네아폴리스, 미네소타주)는 제조업체의 지침에 따라 ELISA 키트를 사용하여 단백질 발현을 측정하였다. 흡광도는 마이크로플레이트 판독기(Tecan; Infinite™ M200 PRO; 스위스 메네도르프)를 사용하여 450nm에서 측정하였다.

[0092] 그 결과, 도 5와 같이, 대조군(Normal) 대비 CIA 단독 투여군(CIA)에서 혈청 내 IgG(Immunoglobulin G), IgG1(Immunoglobulin G1), IgG2a(Immunoglobulin G2a), IL-1 β (Interleukin-1 β), IL-6(Interleukin-6) 및 TNF- α (tumor necrosis factor- α)의 농도가 유의하게 증가한 반면, CIA 단독 투여군 대비 샘플 투여군(CIA+SHH) 및 양성대조군(CIA+MTX)에서 상기 6종의 단백질 농도가 유의하게 감소하였다.

[0094] [실시예 6] 간 독성 분석

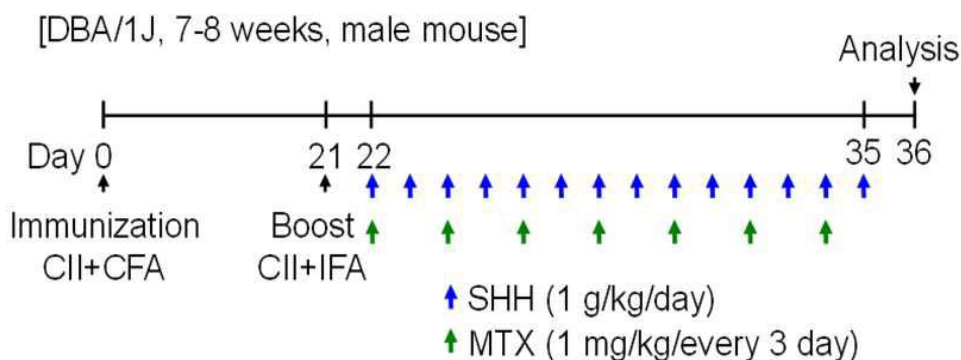
[0095] 샘플이 동물모델에서 간 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 샘플 또는 MTX의 최종 투여 24시간 후(실험 36일차) 혈액 샘플을 채취했다. 혈청 내 AST(aspartate transaminase) 및 ALT(alanine transaminase) 수치는 국제 임상 화학 연맹 표준 방법을 사용하여 GC Labs(한국, 용인)에서 측정하였다.

[0096] 그 결과, 도 6과 같이, 대조군(Normal) 대비 양성대조군(CIA+MTX)에서 AST 및 ALT 수치가 유의하게 증가하였고, CIA 단독 투여군(CIA) 및 샘플 투여군(CIA+SHH) 간의 AST 및 ALT 수치에 대한 유의한 차이는 나타나지 않았다.

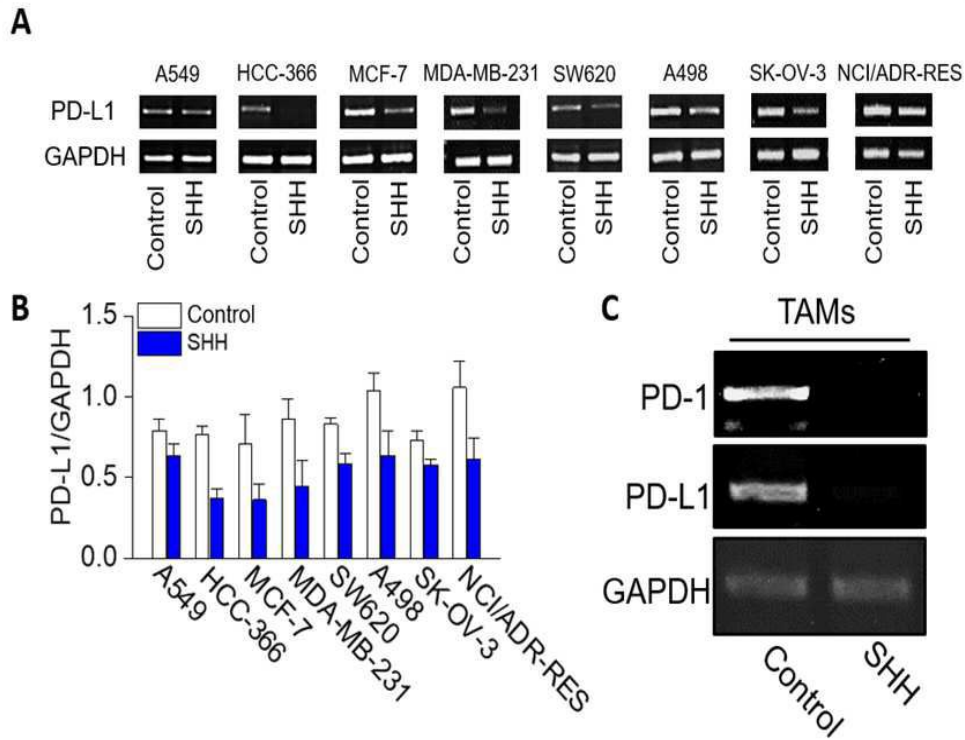
[0098] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

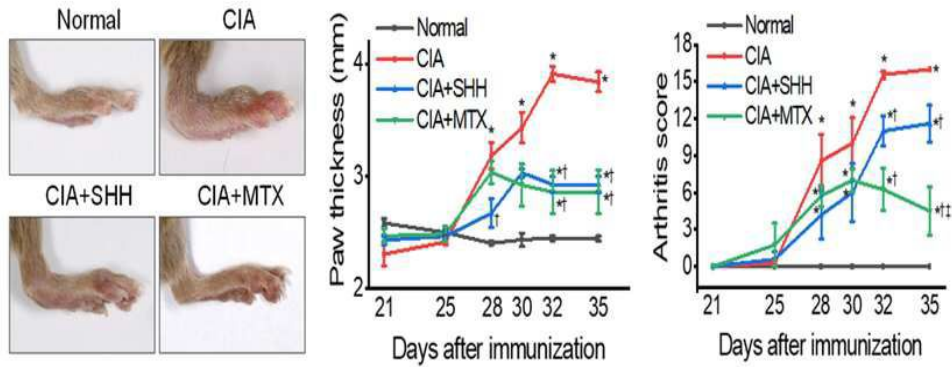
도면1



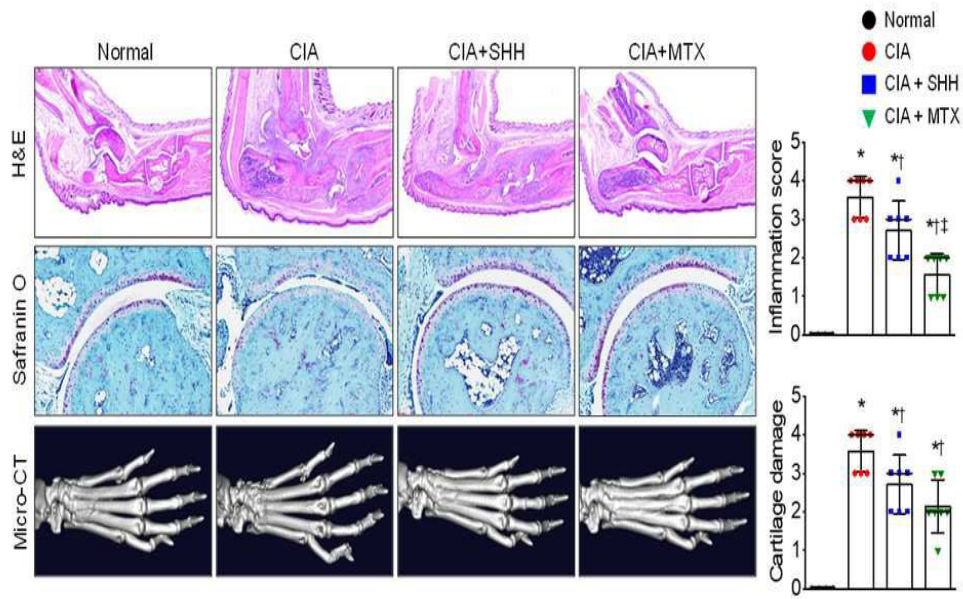
도면2



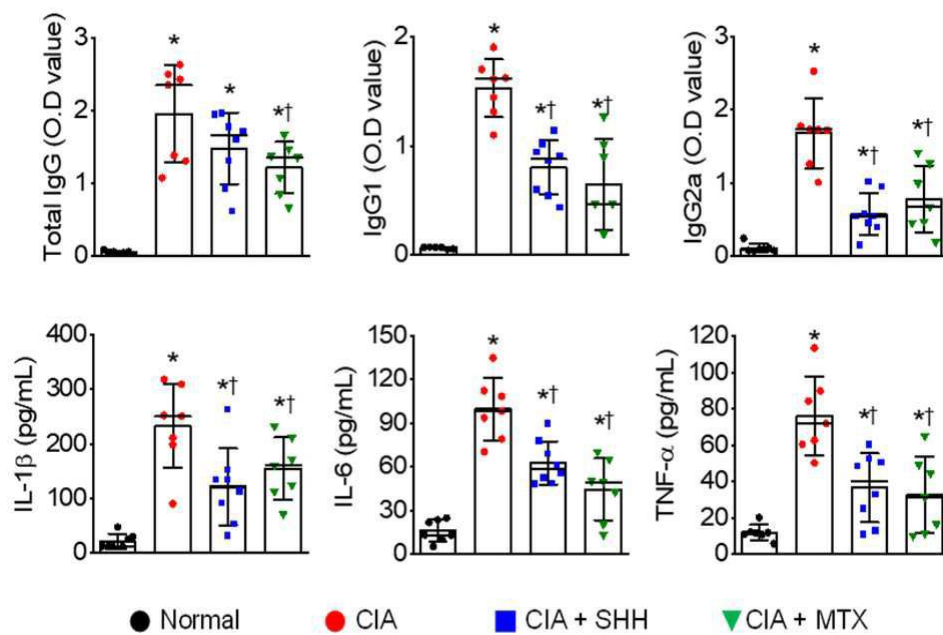
도면3



도면4



도면5



도면6

