



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0102806
(43) 공개일자 2022년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/122 (2006.01) A61K 36/70 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/122 (2013.01)

A61K 36/70 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0005185

(22) 출원일자 2021년01월14일

심사청구일자 2021년01월14일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

정길생

대구광역시 수성구 들안로 300, 102동 901호(수성동3가, 수성 코오롱 하늘채)

이현수

대구광역시 달서구 이곡동로 32, 201동 706호(이곡동, 성서와룡타운)

(74) 대리인

특허법인태백

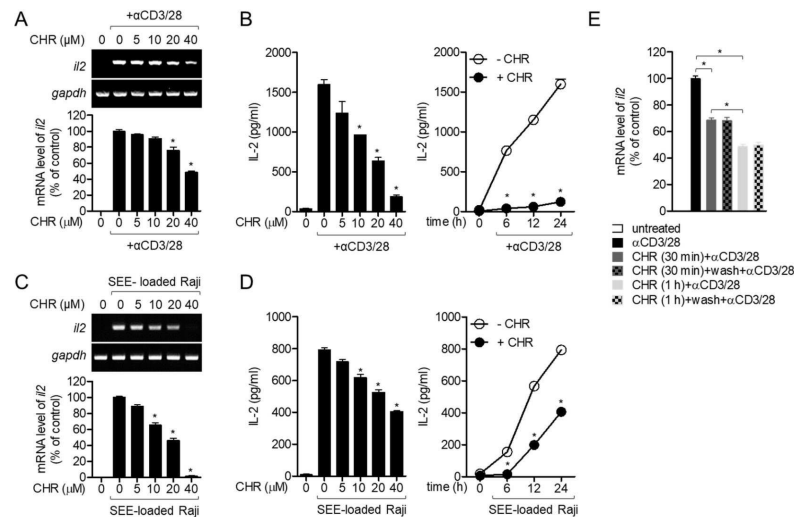
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 크리소파놀을 유효성분으로 포함하는 T 세포의 과활성 억제용 조성물, 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 크리소파놀(chrysophanol)을 유효성분으로 포함하는 T 세포의 과활성 억제용 조성물, 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 크리소파놀을 T 세포에 전처리 하면, 이후 항원 또는 B 세포와 같은 항원 제시세포에 의해 자극되어 활성화가 유도되어도 IL-2의 생산을 억제하고, CD40L이 표면에 발현되는 것을 억제하고, NF-κB 신호 경로 및 MAPK(mitogen activated protein kinase) 신호 경로를 억제하여 크리소파놀이 T 세포의 활성화를 억제하는 것을 확인함으로써, 크리소파놀을 T 세포의 과활성으로 발병하는 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 제공하고, 포함하는 T 세포 과활성 억제용 시약으로 제공한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/02 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345311903
과제번호	2016R1A6A1A03011325
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	약학연구소
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

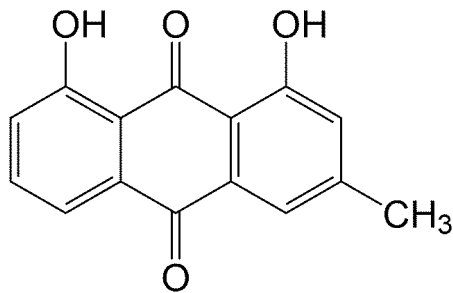
청구항 1

크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 면역 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 크리소파놀은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 크리소파놀은 소리쟁이(*Rumex crispus* L.)에서 추출된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 크리소파놀은 T 세포의 IL-2의 생산을 억제하고, T 세포 표면에 CD40L가 발현되는 것을 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 크리소파놀은 NF κ B 신호 경로 및 MAPK(mitogen activated protein kinase) 신호 경로를 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 면역 질환은 T 세포의 과활성으로 발병하는 질환인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 T 세포의 과활성으로 발병하는 질환은 자가면역 질환 또는 T 세포 악성 종양인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 자가면역 질환은 혈구탐식성 림프조직구증(Hemophagocytic lymphohistiocytosis), 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus), 기쿠치(Kikuchi) 병, 성인 스틸 병(Adult onset Still's disease), 베체트 병(Behcet disease), 제1형 당뇨병, 전신성 경화증(systemic sclerosis), 건선, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 및 그레이브스 갑상선 항진증(Graves hyperthyroidism)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 T 세포의 과활성에 의해 자가면역 질환 또는 T 세포 악성 종양이 유발된 환자에게 투여하기 위한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 T 세포 과활성 억제용 시약 조성물.

청구항 11

크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 면역억제용 조성물.

청구항 12

T 세포가 항원 또는 항원 제시 세포와 접촉하기 전에 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 염으로 전처리하는 단계;를 포함하는 T 세포의 활성 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 크리소파놀(chrysophanol)을 유효성분으로 포함하는 T 세포의 과활성 억제용 조성물, 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 각종 병원체에 대한 생체 방어 시스템으로 면역계에서 중심적 역할을 담당하는 세포군의 하나로 T 세포가 있다. T 세포는 인체의 흉선에서 생성되며 일련의 분화 과정을 거치면서 고유의 특성을 지닌 T 세포로 분화하게 되며, 세포 매개성 면역에 관여하거나, 체액성 면역에 관여하며, 서로 과활성화되지 않도록 균형을 유지하고 있다. T 세포는 선천적 면역 및 후천적 면역 사이의 매개하는 역할을 하므로, T 세포의 활성화를 조절하는 것이 매우 중요하다.

[0003] 그러나 T 세포가 과활성화되면 만성 염증과 같은 면역질환을 발병하게 되며, T 세포의 활성이 비정상적으로 증가하게 되면, 과민반응에 의한 자가면역질환이 발병한다. 대부분의 면역 반응은 자기(self)를 구성하고 있는 항원물질에 대해서는 해롭게 반응하지 않는 반면, 많은 비자기(non-self) 항원에 대해서는 이를 인식하고 반응하여 제거할 수 있는 능력을 가지고 있다는 것이다. 이처럼 자기항원에 대한 생체의 무반응을 면역학적 무반응성(immunologic unresponsiveness) 또는 관용(tolerance)이라 한다. 그러나 자기관용을 유도하거나 계속 유지하는데 있어서 문제가 생기게 되거나, 면역 반응을 유도하는 세포가 과도하게 활성화되면 자신의 조직을 공격하는 현상이 발생하면서 면역질환이 발병하게 된다.

[0004] 전 세계적으로 면역질환으로 진단받는 환자가 증가하고 있으며, 이에 면역질환의 원인에 대한 연구가 지속되고 있으며, 면역 세포의 과도한 활성화로 발병되는 질환의 치료방법을 구체적으로 개선하기 위한 다양한 면역억제제가 개발되고 있다. 면역억제제란 항원의 작용에 대하여 숙주가 항체를 만드는 능력(체액성 면역반응) 또는 세포성 면역반응을 일으키는 능력을 저하시키거나 차단하기 위해 사용되는 다양한 물질들을 말한다. 이러한 면역억제제는 장기이식 분야뿐만 아니라 루푸스, 류마티스 관절염 등과 같은 자가면역질환과, 아토피, 알러지 등의 피부과민 반응에도 유용하게 사용될 수 있다. 우수한 면역억제제는 면역반응의 불균형을 조절할 수 있어야 하고, 인체에 대한 안전성이 확보되어야 하며, 장기간 치료시에 질환의 재발 발생 빈도가 낮아야 한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허공보 제10-2020-0011515호 (2020. 02. 03. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 크리소파놀(chrysophanol)을 유효성분으로 포함하는 T 세포의 과활성 억제용 조성물, 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 크리소파놀을 T 세포에 전처리 하면, 이후 항원 또는 B 세포와 같은 항원 제시세포에 의해 자극되어 활성화가 유도되어도 IL-2의 생산을 억제하고, CD40L이 표면에 발현되는 것을 억제하고, NF κ B 신호 경로 및 MAPK(mitogen activated protein kinase) 신호 경로를 억제하여 크리소파놀이 T 세포의 활성화를 억제하는 것을 확인함으로써, 크리소파놀을 T 세포의 과활성으로 발병하는 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 제공하고, 포함하는 T 세포 과활성 억제용 시약으로 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 면역 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 T 세포 과활성 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 면역억제용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 T 세포가 항원 또는 항원 제시 세포와 접촉하기 전에 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 염으로 전처리하는 단계;를 포함하는 T 세포의 활성 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 크리소파놀을 T 세포에 전처리 하면, 이후 항원 또는 B 세포와 같은 항원 제시세포에 의해 자극되어 활성화가 유도되어도 IL-2의 생산을 억제하고, CD40L이 표면에 발현되는 것을 억제하고, NF κ B 신호 경로 및 MAPK(mitogen activated protein kinase) 신호 경로를 억제하여 크리소파놀이 T 세포의 활성화를 억제하는 것을 확인함으로써, 크리소파놀을 T 세포의 과활성으로 발병하는 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 제공하고, 포함하는 T 세포 과활성 억제용 시약으로 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 T 세포에 대한 크리소파놀(chrysophanol)의 세포 독성을 평가한 결과이다. CHR은 크리소파놀(chrysophanol)을 의미한다.

도 2는 크리소파놀(chrysophanol)이 T 세포의 IL-2 생산에 미치는 영향을 평가한 결과이다. CHR은 크리소파놀(chrysophanol)이고, SEE는 포도상구균 장독소 E(staphylococcal enterotoxin E)이다.

도 3은 크리소파놀(chrysophanol)이 활성화 T 세포의 CD40L 발현에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 4는 크리소파놀(chrysophanol)이 T 세포와 B 세포의 접합에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 5는 크리소파놀(chrysophanol)이 T 세포의 NF κ B 신호 전달 경로에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

도 6은 크리소파놀(chrysophanol)이 T 세포의 MAPK 신호 전달 경로에 미치는 영향을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0014] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0015] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수

치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.

- [0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0017] 본 발명은 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 면역 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0018] 상기 크리소파놀은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 1,8-디하이드록시-3-메틸안트라센-9,10-디온 (1,8-dihydroxy-3-methylantracene-9,10-dione)이다. 상기 크리소파놀은 크리소판산(Chrysophanic acid)이라고도 알려져 있는 식물 화학물질이며, 소리쟁이(*Rumex crispus* L.)에서 분리 추출될 수 있다.
- [0019] 상기 크리소파놀은 T 세포의 IL-2의 생산을 억제하고, T 세포 표면에 CD40L가 발현되는 것을 억제하는 활성을 갖고, NF κ B 신호 경로 및 MAPK(mitogen activated protein kinase) 신호 경로를 억제하는 활성을 갖는다. 따라서 상기 크리소파놀은 T 세포가 활성화되는 것을 억제하는 효과가 있다.
- [0020] 상기 면역 질환은 T 세포의 과활성으로 발병하는 질환으로 상기 T 세포의 과활성으로 발병하는 질환은 자가면역 질환 또는 T 세포 악성 종양이며, 구체적으로 상기 자가면역 질환은 혈구탐식성 림프조직구성증(Hemophagocytic lymphohistiocytosis), 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus), 기쿠치(Kikuchi) 병, 성인 스틸 병(Adult onset Still's disease), 베체트 병(Behcet disease), 제1형 당뇨병, 전신성 경화증(systemic sclerosis), 건선, 다발성 경화증(multiple sclerosis), 및 그레이브스 갑상선 항진증(Graves hyperthyroidism)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 약학적 조성물은 T 세포의 과활성에 의해 자가면역 질환 또는 T 세포 악성 종양이 유발된 환자에게 투여하기 위한 것이다.
- [0022] 상기 약학적 조성물은 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 외용제 형태로 제형화될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 전분, 당, 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 및 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 윤활제, 포비돈, 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 및 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 및 희석제는 대상체에게 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.
- [0024] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여된다. 또한 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 대상체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에서 용어 “예방”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 T 세포 과활성 억제용 시약 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 면역억제용 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 T 세포가 항원 또는 항원 제시 세포와 접촉하기 전에 크리소파놀(chrysophanol) 또는 이의 염으로 전처리하는 단계;를 포함하는 T 세포의 활성 억제 방법을 제공한다.
- [0029] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실험예 및 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실험예

및 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실험예 및 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0030] <실험예> 실험 재료 및 방법

[0031] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0032] 1. 세포

[0033] Jurkat T 세포 및 Raji B 세포는 한국 세포주 은행(대한민국, 서울)에서 구입하였다. 세포는 10% FBS(fetal bovine serum), 100 µg/mL의 스트렙토마이신(streptomycin), 100 units/mL의 페니실린 G(penicillin G), 및 2 mM의 L-글루타민(L-glutamine)을 포함하는 RPMI 배지(대한민국 경산 웰진)에서 배양되었다. 세포는 5% CO₂ 조건의 가습 인큐베이터에서 37℃로 배양되었다.

[0034] 2. 시약 및 항체

[0035] MTT (1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan) 분말, CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) 및 CMRA (5-(((4-chloromethyl) benzoyl) amino) tetramethyl rhodamine) 세포 염색 염료는 Sigma Chemical Co. (미국 미주리 주 세인트 루이스)에서 구입하였다. 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체는 Bioxcell (West Lebanon, NH, USA)에서 구입하였다. 인간 IL-2 DuoSet[®] ELISA 키트는 R & D Systems (미국 미네소타 주 미니애폴리스)에서 구입하였다. SEE(Staphylococcal enterotoxin E)는 Toxin Technology (Sarasota, FL, USA)에서 구입하였다. NE-PER 핵/세포질 추출 시약 키트 및 ECL 웨스턴 블롯팅 검출 시약은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

[0036] 항-CD40L 중화 항체는 InvivoGen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 웨스턴블롯용 항-CD40L 및 항-β-액틴 항체는 Santa Cruz Biotechnology (미국 텍사스 주 달라스)에서 구입하였다. 항-p65, 항-PARP, 항-IκBα, 항-인산화 IκBα (S32), 항-인산화 ERK (T202/Y204), 항-ERK, 항-인산화 p38 (T180/Y182), 항-p38, 항-인산화 JNK (T183/Y185), 항-JNK, 항-인산화 c-Jun (S73) 및 항-c-Jun 항체들은 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다.

[0037] 3. 소리쟁이(*Rumex crispus* L.)로부터 크리스오파놀(Chrysophanol)의 분리

[0038] 본 실험에서 사용된 크리스오파놀(Chrysophanol)은 소리쟁이(*Rumex crispus* L.)의 말린 잎에서 분리하였다. 건조된 소리쟁이(*Rumex crispus* L.) 잎 1 kg을 실온에서 24 시간 동안 70% 에탄올(EtOH)로 3회 추출하였다. 에탄올(EtOH) 추출물 230 g을 1 L의 증류수(H₂O)에 현탁하고, 1 L의 n-헥산(n-hexene)과 1 L의 EtOAc로 분획하였다. 4.5 g의 n-헥산 분획물과 27.1 g의 EtOAc 분획물을 실리카겔(6.5 X 60 cm; 70-230 mesh)상에서 개방 컬럼 크로마토그래피로 반복 정제하여 크리스오파놀(Chrysophanol)을 분리/정제하였다. 분리된 크리스오파놀(Chrysophanol)은 ¹H 및 ¹³C-NMR 분광기(JEOL JNM-ECA 500)로 분석되었고, 공지된 스펙트럼 데이터를 대조하여 크리스오파놀(Chrysophanol)을 확인하였다.

[0039] 4. MTT 분석

[0040] RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 배지 또는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 배양된 Jurkat T 세포를 1 X 10⁵ /mL 내지 2 X 10⁴ /mL 농도로 접종하고, 0 내지 40 µM의 크리스오파놀(Chrysophanol)을 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 상등액을 버리고 세포에 500 µg/mL의 MTT를 1.5 시간 동안 처리하였다. 상등액을 제거하고 150 µL의 DMSO를 첨가하여 formazan crystal을 용해하였다. 540 nm에서 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도와 대조(대조군의 %)하여 세포 생존력을 계산하였다.

[0041] 5. 세포 계수에 의한 성장률 평가

[0042] RPMI 배지 또는 DMEM 배지에서 배양된 Jurkat T 세포를 1 X 10⁵ /mL 내지 2 X 10⁴ /mL 농도로 접종하고, 40 µM의 크리스오파놀(Chrysophanol)을 처리하였다. 세포수는 매 24 시간 마다 계수하고, 선 그래프로 표시하였다.

[0043] 6. 유세포 분석을 통한 세포사멸(Apoptosis) 분석

[0044] RPMI 배지 또는 DMEM 배지에서 배양된 Jurkat T 세포를 1 X 10⁵ /mL 내지 2 X 10⁴ /mL 농도로 접종하고, 0 내지

40 μM 의 크리소파놀(Chrysophanol)을 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 Annexin V 및 PI(propidium iodide)로 염색하고, 유세포 분석을 통해 세포사멸을 평가하였다. 세포 사멸 집단은 점 도표로 표시하였다.

[0045] 7. T 세포 자극

[0046] 5×10^5 /mL 농도의 Jurkat T 세포를 0-40 μM 농도의 크리소파놀(Chrysophanol)로 37°C에서 1 시간 동안 전처리하였다. 이 후, 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD3 및 7 $\mu\text{g/mL}$ 의 가용성 항-CD28로 코팅된 플레이트로 6 시간 내지 24 시간 동안 세포를 자극하였다. 초항원(superantigen) 자극을 위해, Raji B를 37°C에서 30 분 동안 1 $\mu\text{g/mL}$ SEE(staphylococcal enterotoxin E)로 펄싱(pulsing)하고, Jurkat T 세포를 SEE-pulsed Raji B 세포와 6 시간 내지 24 시간 동안 공-배양(co-cultured)하였다.

[0047] 8. mRNA 수준 평가

[0048] TRIzol 시약 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 총 RNA를 분리하고, RT PreMix (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 RNA의 cDNA 로의 역전사하였다. 사용된 각 유전자의 프라이머 세트는 하기 표 1과 같다.

표 1

유전자		염기서열	서열번호
human <i>i12</i>	F	5' -CAC GTC TTG CAC TTG TCA C-3'	1
	R	5' -CCT TCT TGG GCA TGT AAA ACT-3'	2
human <i>cd401</i>	F	5' -GCC AGT TTG AAG GCT TTG TG-3'	3
	R	5' -ACT TAT GAC ATG TGC CGC AA-3'	4
human <i>gapdh</i>	F	5' -CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'	5
	R	5' -AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'	6

[0050] 기존 PCR 조건은 하기와 같다: 94°C에서 30초 동안 denaturation 단계, 60°C에서 20초 동안 annealing 단계, 및 72°C에서 40초 동안 extension 단계를 포함하는 28 사이클; 이후에 72°C에서 7 분 동안 denaturation 단계. 정량적 PCR 분석을 위해, SYBR Premix Ex Taq (Takara, Japan)를 사용하여 DNA Engine Opticon 1 연속 형광 검출 시스템 (MJ Research, Waltham, MA, USA)에서 PCR 증폭을 수행하였다. 총 반응 부피는 1 μL 의 cDNA/대조군 및 유전자 특이적 프라이머를 포함하는 10 μL 로 사용하였다. 각 PCR 반응은 하기와 같다: 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 및 플레이트 판독(형광 제품 감지) 단계를 포함하는 38 사이클; 이후에 72°C에서 7 분 동안 extension 단계. dsDNA 생성물을 특정하기 위해, 0.2°C 간격으로 수집된 형광 데이터를 통해 60°C에서 95°C로 0.2°C/s 속도로 천천히 온도를 올리면서 용융 곡선을 분석하였다. *i12* 및 *cd401*의 mRNA 수준은 *gapdh*의 mRNA 수준으로 정규화되었고 대조군의 %로 기술하였다. 유전자 발현의 변화 배수(fold change)는 식(1)을 사용하여 계산하였다.

[0051] [식 1]

$$[0052] \text{fold change} = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

[0053] 여기서, $\Delta \Delta CT$ = 시간 x의 (CT 타겟-CT *gapdh*) - 시간 0의 (CT 타겟-CT *gapdh*) 이다. 시간 x는 임의의 시점을 나타내고, 시간 0은 *gapdh*로 정규화된 대조군 세포에서 표적 유전자의 1x 발현을 나타낸다.

[0054] 9. ELISA를 통한 IL-2 측정

[0055] 1×10^5 /mL의 Jurkat T 세포를 고정된 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD3 항체 및 가용성 7 $\mu\text{g/mL}$ 의 항-CD28 항체로 24 시간 동안 자극하였다. Jurkat T 세포를 SEE-pulsed Raji B 세포와 24 시간 동안 공-배양하였다. 배양 후, 활성화된 T 세포 또는 접합으로부터 상등액을 수집하고, 생성된 IL-2의 양은 제조사의 지침에 따라 ELISA DuoSet[®] ELISA 키트로 측정하였다.

[0056] 10. 웨스턴 블롯

[0057] 배양된 1×10^6 /mL의 Jurkat 세포를 얼음 조건에서 30분 동안 포스파타아제(phosphatase) 억제제가 포함된

RIPA 버퍼로 용해하였다. 용해물을 4°C 14,000 rpm 조건으로 30분 동안 원심분리하고, 약 30 µg의 용해물을 8-12% SDS-PAGE 겔로 분리하였다. 단백질을 PVDF 막(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 이동시켰다. 막을 5% 탈지유에서 1 시간 동안 차단하고, 행구고, 표시된 1 차 항체와 함께 3% 탈지유에서 밤새 배양하였다. 막을 TBS-T로 5 회 세척하고, 0.1 µg/mL의 퍼옥시다아제 표지 2차 항체와 함께 2 시간 동안 반응시켰다. TBS-T에서 5 회 세척한 후, 밴드를 ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 사용하여 ECL Western blotting 검출 시약 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 시각화하였다.

[0058] 11. 유동 세포 계측법에 의한 표면 분자의 발현 측정

[0059] T 세포 표면에서 CD40L의 발현은 유세포 분석으로 측정하였다. 항-CD3 및 항-CD28 항체로 자극된 Jurkat T 세포를 5×10^5 /mL 농도로 수확하고, 얼음 조건에서 30분 동안 APC와 접합된 항-CD40L 항체로 염색되었다. 세포 표면의 CD40L 발현을 유세포 분석으로 확인하고, 히스토그램 그래프로 표시하였다. 평균 형광 강도는 선 그래프로 표시하였다.

[0060] 12. 접합 분석(Conjugation Assay)

[0061] 1×10^5 /mL의 CMFDA-염색된 Jurkat T 세포를 40 µM의 크리스�파놀(Chrysophanol)로 1 시간 동안 전처리하였다. 1×10^5 /mL의 CMRA-염색된 Raji B 세포를 1 µg/mL의 SEE로 1 시간 동안 펄스화 하였다. 이 후, Jurkat T 세포와 Raji B 세포를 혼합하고 30분 또는 24 시간 동안 배양하였다. 일부는 항 -CD40L 중화 항체를 배양 전에 Jurkat T 세포에 처리하였다. 접합은 이중 양성 집단에서 유세포 분석으로 확인하였다. 현미경 이미지를 위해 세포를 플레이트에 접종하고, 1 시간 또는 24 시간 동안 배양하였다. IncuCyte에서 이미지를 수득하였다. 녹색 세포 (Jurkat T 세포)와 주황색 세포 (Raji B 세포) 사이의 접합을 각 이미지에서 계수하고, 전체 T 세포로 접합된 T 세포 접합 비율을 계산하였다.

[0062] 13. 통계 분석

[0063] 수행된 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 데이터를 기반으로 평균값 $\pm$ SEM을 계산하여 그래프로 표시하였다. 유의성(p 값)을 얻기 위해 일원 분산 분석을 사용하였다. *는 $p < 0.05$ 를 의미하며, 유의한 것으로 간주하였다.

[0064] 실시예 1. 크리스�파놀의 세포 독성

[0065] 안트라퀴논(anthraquinone) 계열인 크리스�파놀(chrysophanol)은 증식을 조절하고, 암세포의 세포 사멸을 일으키기 때문에, 항암 작용을 나타낸다. 크리스�파놀(chrysophanol)이 Jurkat T 세포에서 세포 독성을 나타내는 지 여부를 확인하기 위해, 다양한 배지에서 다양한 세포 농도로 세포 독성이 나타나는지 평가하였다.

[0066] RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 배지 또는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에 세포를 1×10^5 /mL 내지 2×10^4 /mL 농도로 배양하고 세포 생존율, 성장 속도, 및 세포 사멸 집단을 확인하였다.

[0067] 도 1A에 나타난 바와 같이, Jurkat T 세포의 세포 생존율을 MTT로 분석한 결과, 1×10^5 /mL의 Jurkat T 세포에서는 40 µM의 크리스�파놀을 처리하여도 세포 독성이 나타나지 않았다. 도 1B에 나타난 바와 같이, Jurkat T 세포의 성장 속도를 세포 계수로 분석한 결과, DMEM에서 배양된 Jurkat T 세포는 RPMI에서 배양된 Jurkat T 세포에 비해 성장 속도가 현저히 감소하였다. 도 1C에 나타난 바와 같이, Jurkat T 세포의 세포 사멸 집단을 유세포 분석으로 확인한 결과, 크리스�파놀이 처리된 1×10^5 /mL의 Jurkat T 세포에서는 전-세포사멸이 나타나지 않았다. 상기 결과는 크리스�파놀은 Jurkat T 세포에 대해 RPMI 배지에서 세포 독성이 없고, 세포 사멸을 유발시키지 않는 것으로 나타났다.

[0068] 실시예 2. 크리스�파놀이 T 세포의 IL-2 생산에 미치는 영향

[0069] T 세포 수용체(TCR)에 의해 매개되는 자극 조건에서 크리스�파놀이 T 세포의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위해, 활성화된 T 세포에서 생성되는 초기 T 세포 활성화 마커인 *il2*의 mRNA 및 IL-2의 수준을 측정하였다. 도 2A 및 2B에 나타난 바와 같이, 크리스�파놀로 전처리된 Jurkat T 세포는 *il2*의 mRNA 수준이 감소하고, IL-2의 생산 수준을 감소하는 것으로 나타났다.

[0070] 항원 제시 세포인 B 세포는 면역학적으로 시냅스를 형성하여 T 세포의 활성화를 유도하는 프라이밍 신호를 제공한다. 크리스�파놀이 B 세포와 상호작용하는 T 세포의 활성화에 영향을 주는지 확인하기 위해, 초항원(superantigen)인 SEE(staphylococcal enterotoxin E)로 펄스화된 Raji B 세포로 Jurkat T 세포를 활성화하였

다. 도 2C 및 2D에 나타난 바와 같이, 크리소파놀이 처리된 경우 SEE-펄스화 Raji B 세포로 Jurkat T 세포를 자극하여도 *il2*의 mRNA 수준이 감소하고, IL-2의 생산 수준을 감소하는 것으로 나타났다.

[0071] 크리소파놀로 억제된 T 세포의 활성이 회복되는지 여부를 확인하기 위해, 크리소파놀 처리 전/후의 *il2*의 mRNA 수준을 비교하였다. 도 2E에 나타난 바와 같이, 30분 또는 1 시간 동안 크리소파놀로 전처리된 T 세포에서는 *il2*의 mRNA 수준이 현저히 감소하였고, 전처리 후 크리소파놀을 제거하자 *il2*의 mRNA 수준이 처리 전으로 회복되지 않는 것으로 나타났다. 또한, 크리소파놀을 처리하는 시간이 길수록 *il2*의 mRNA 수준이 크게 감소하는 것으로 나타났다. 상기 결과는 크리소파놀은 Jurkat T 세포에 대해 비가역적으로 활성을 억제하는 효과가 있다는 것을 입증한다.

[0072] **실시예 3. 크리소파놀이 T 세포의 CD40L 발현에 미치는 영향**

[0073] CD40L은 T 세포의 표면에 발현되는 분자로, T 세포의 활성화 유도 및 유지의 주요 역할을 한다. 크리소파놀이 B 세포와 결합된 T 세포의 활성을 억제하는 효과가 있는 것을 확인하고, 크리소파놀이 T 세포에서 CD40L의 발현에 영향을 미치는지 평가하였다.

[0074] Jurkat T 세포를 40 μ M의 크리 소파 놀로 1 시간 동안 전처리하고, 항-CD3/CD28 항체로 3 시간 내지 48 시간 동안 자극하였다. 도 3A에 나타난 바와 같이, 크리소파놀을 전처리하는 경우, 활성화된 T 세포에서 *cd40l*의 mRNA 수준이 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 도 3B에 나타난 바와 같이, 크리소파놀을 전처리하는 경우, 활성화된 T 세포에서 CD40L의 단백질 수준이 크리소파놀 전처리 용량에 의존적으로 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 도 3C에 나타난 바와 같이, 유세포 분석으로 T 세포 표면에 발현된 CD40L을 평가한결과, 활성화된 T 세포에서 대해 CD40L의 발현이 CD3/CD28 항체로 증가하지만, 크리소파놀을 전처리하는 경우, T 세포 표면에서 CD40L의 발현이 감소하는 것으로 나타났다.

[0075] T 세포에서 발현된 CD40L은 T 세포의 활성화를 개시하기 위한 공동 자극 신호를 제공한다. 상기 결과는 크리소파놀이 T 세포에서 CD40L의 발현을 억제하는 것으로 나타났으며, 이는 크리소파놀이 T 세포의 활성화를 억제한다는 것을 입증한다.

[0076] **실시예 4. 크리소파놀이 T 세포와 B 세포의 접합에 미치는 영향**

[0077] 상기와 같이 크리소파놀이 T 세포의 활성화를 억제하는 활성이 있다는 것을 확인함에 따라, 크리소파놀이 T 세포의 활성화의 초기 단계 및 후기단계에 영향을 미치는지 평가하였다. T 세포의 활성화는 처음 30 분을 초기 단계로, 이후 24 시간을 후기 단계로 구분하며, 크리소파놀이 T 세포 활성화 초기 30분 또는 이후 24 시간에서 B 세포와 T 세포의 접합체 형성에 영향을 미치는지 평가하였다.

[0078] 도 4A 및 4B에 나타난 바와 같이, T 세포와 B 세포의 접합물은 T 세포의 활성화 초기 단계인 30분에서 가장 높게 나타났으며, 접합물은 T 세포의 활성화 후기 단계인 24 시간에서는 T 세포와 B 세포의 접합물이 초기 단계에 비해 감소하는 것으로 나타났다. 초기 단계인 30분에서는 크리소파놀의 전처리 유무와 관련 없이 T 세포와 B 세포의 접합물이 높게 나타났다. 그러나 후기 단계인 24 시간에서는 크리소파놀을 전처리한 경우 대조군에 비해 T 세포와 B 세포의 접합물이 낮게 나타났다. 크리소파놀의 전처리로 인해 T 세포 표면에서 CD40L의 다른 유도가 세포의 접합을 증가시키는지 여부를 확인하기 위해, CD40L 항체를 처리하였다. 그 결과, CD40L 항체를 처리한 경우, T 세포와 B 세포의 접합물이 상승하였으며, 이러한 결과는 크리소파놀을 전처리한 경우와 유사하게 나타났다.

[0079] T 세포의 활성화에 대한 CD40L의 발현이 미치는 영향을 확인하기 위해, T 세포와 B 세포를 접합시키고, CD40L 중화 항체를 처리하여 IL-2 생산 변화를 평가하였다. 도 4C에 나타난 바와 같이, IL-2의 생산량은 CD40L 중화 항체를 처리하자 억제되는 것으로 나타났으며, 크리소파놀을 전처리한 경우에도 IL-2의 생산량이 감소하는 것으로 나타났다.

[0080] IncuCyte 이미징 시스템을 사용하여 현미경 이미지를 통해 크리소파놀이 CD40L의 발현이 제한된 T 세포와 B 세포의 접합에 영향을 미치는지 확인하였다. 세포를 플레이트에 접종하고, T 세포와 B 세포의 접합체를 IncuCyte® 이미징 시스템으로 확인하였다. 도 4D 및 4E에 나타난 바와 같이, 흰색 화살표는 T 세포와 B 세포의 접합체를 나타내며, 접합된 T 세포의 비율은 총 T 세포의 백분율로 계산하였다.

[0081] 상기 결과는 T 세포 표면에 유도된 CD40L은 말단기의 면역학적 시냅스 조절에 중추적인 역할을 한다는 것을 의미한다. 또한, 크리소파놀로 T 세포를 전처리한 경우, T 세포에서 CD40L 발현이 하향 조절됨에 따라 T 세포와 B 세포의 접합을 조절하지 못하여 T 세포의 활성화가 감소시킨다는 것을 의미한다.

[0082] 실시예 5. 크리소파놀이 활성화된 T 세포의 NF κ B 신호 경로에 미치는 영향

[0083] 활성화된 T 세포에서 IL-2 생산과 관련된 여러 신호경로 중에서 NF κ B 신호 경로는 중앙 조절자 중 하나로 간주된다. T 세포 활성화에 대한 크리소파놀의 억제 효과가 NF κ B 경로와 관련이 있는지 확인하기 위해, 크리소파놀이 전처리된 T 세포에서 p65 전위를 웨스턴 블롯으로 평가하였다.

[0084] Jurkat T 세포를 40 μ M의 크리 소파 놀로 1 시간 동안 전처리하고, 항-CD3/CD28 항체로 1 시간 동안 자극하였다. 핵 또는 세포질 추출물에서 전위된 p65, I κ B α 및 인산화된 I κ B α 의 존재량을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 검출된 밴드는 핵 추출물에서의 발현량은 PARP(poly (ADP-ribose) polymerase)에 대한 발현량으로 정규화하고, 세포질 추출물에서의 발현량은 β -actin으로 정규화 하여 막대 그래프로 나타냈다.

[0085] 도 5에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블롯 결과 CD3/CD28 항체를 사용하여 T 세포를 자극하면 세포질의 p65가 핵으로 전위되는 것으로 나타났다. 그러나 T 세포를 크리소파놀로 전처리한 경우, p65가 세포질에서 핵으로 전위되는 것이 감소하는 것으로 나타났다. 또한, T 세포를 크리소파놀로 전처리한 경우, I κ B α 의 분해가 감소하고, I κ B α 의 인산화 수준이 감소하는 것으로 나타났다. 상기의 결과는 크리소파놀이 활성화된 T 세포에서 NF κ B 경로를 차단시키는 활성이 있다는 것을 입증한다.

[0086] 실시예 6. 크리소파놀이 활성화된 T 세포의 MAPK 신호 경로에 미치는 영향

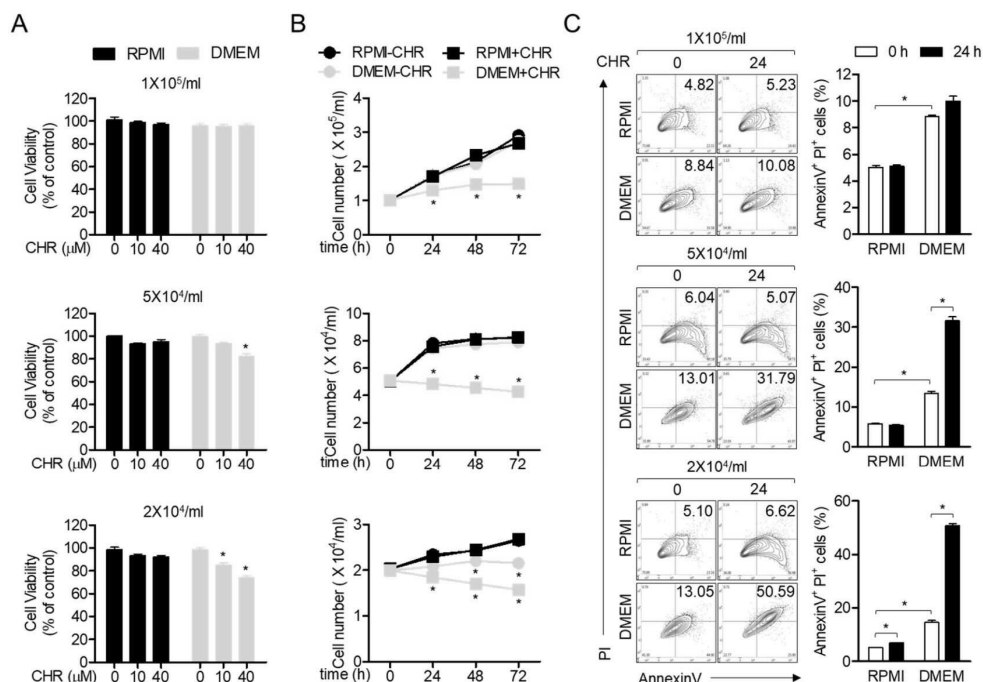
[0087] 크리소파놀이 활성화된 T 세포에서 MAPK(mitogen activated protein kinase) 신호 경로에 영향을 미치는지 확인하기 위해, ERK(extracellular signal-regulated kinases), p38, JNK(c-Jun N-terminal kinases), 및 c-Jun의 인산화 수분을 측정하였다.

[0088] 도 6에 나타난 바와 같이, CD3/CD28 항체에 의해 ERK, p38, JNK 및 c-Jun의 인산화 수준이 30분 이내에 증가하였으나, T 세포를 크리소파놀로 전처리한 경우, ERK, p38, JNK 및 c-Jun의 인산화 수준이 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타났다. 또한, T 세포를 전처리하는 크리소파놀의 용량이 증가함에 따라 ERK, p38, JNK 및 c-Jun의 인산화 수준이 대조군에 비해 감소하는 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 상기 결과는 크리소파놀이 T 세포 활성화를 억제하는 활성에 MAPK 경로가 관련이 있다는 것을 입증한다.

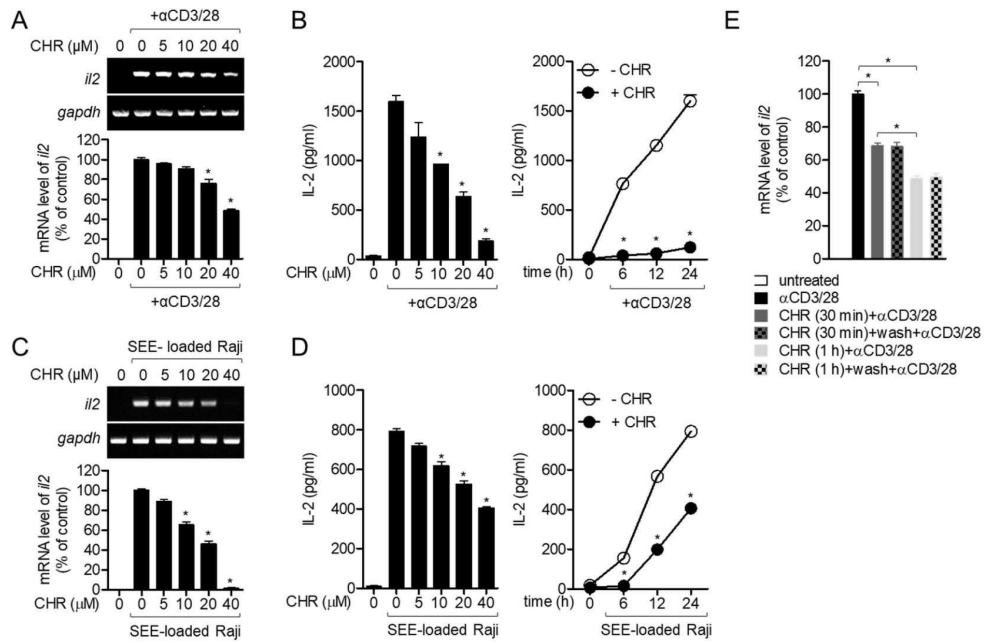
[0089] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

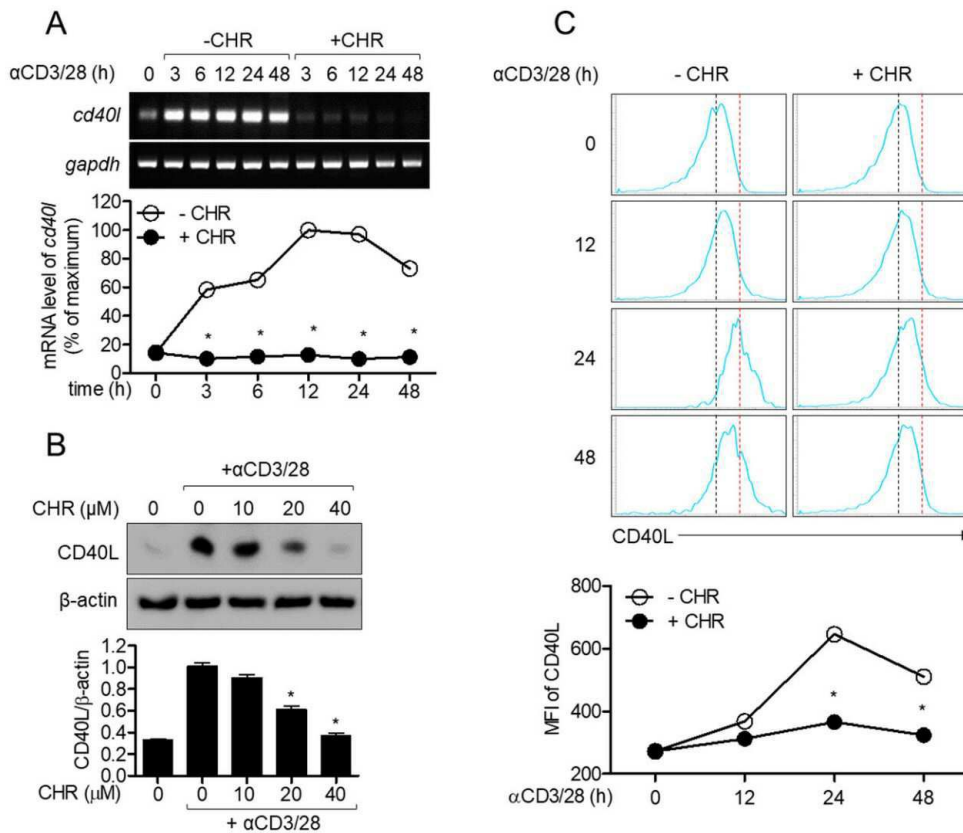
도면1



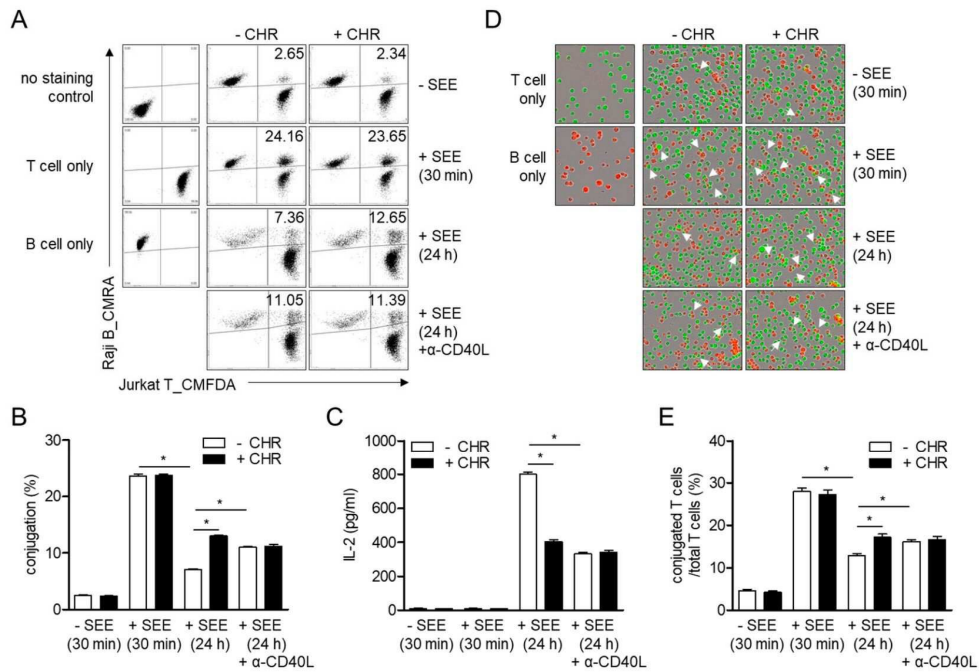
도면2



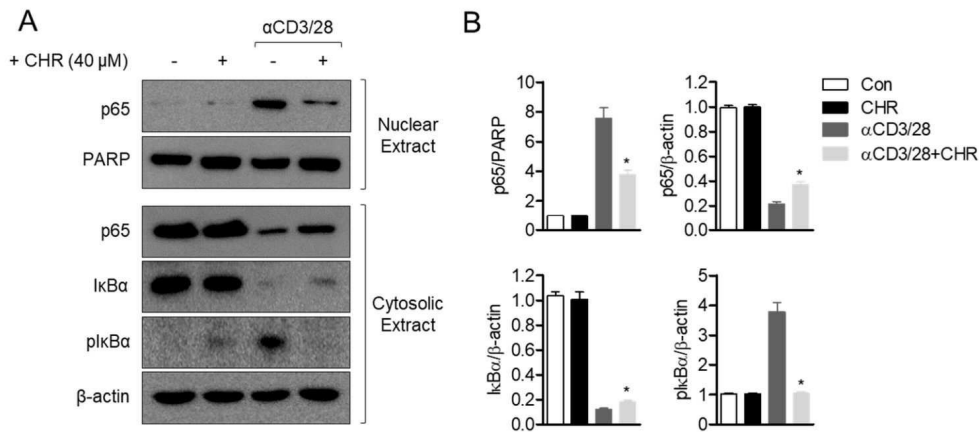
도면3



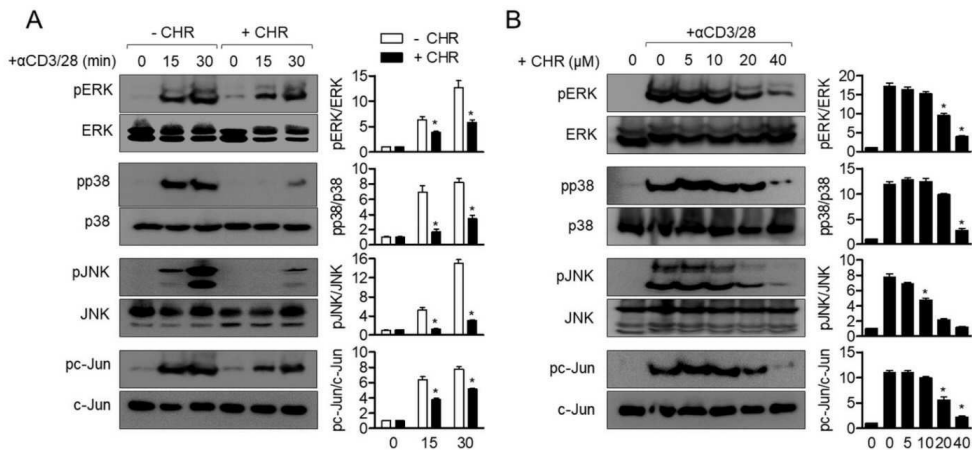
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Compositions for inhibiting overactivity of T cells comprising
chrysophanol as an active ingredient, and uses thereof

<130> ADP-2020-0494

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human il2-f

<400> 1

cacgtcttgc actgtcac 19

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> human il2-r

<400> 2

ccttcttggg catgtaaaac t 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human cd40l-f

<400> 3

gccagtttga aggctttgtg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human cd40l-r

<400> 4

acttatgaca tgtgccgcaa

20

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human gapdh-f

<400> 5

cggagtcaac ggatttggtc gtat

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human gapdh-r

<400> 6

agccttctcc atggtggtga agac

24