



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월15일

(11) 등록번호 10-1602476

(24) 등록일자 2016년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/15 (2006.01) A61K 36/48 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0122317

(22) 출원일자 2014년09월15일

심사청구일자 2014년09월15일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120031861 A*

비특허 2 JOURNAL OF SCIENCE 2014*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

하운환

대전광역시 유성구 노은동로 187, 603동 901호 (지족동, 열매마을6단지)

이정훈

서울특별시 중구 난계로11길 33 (황학동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 6 항

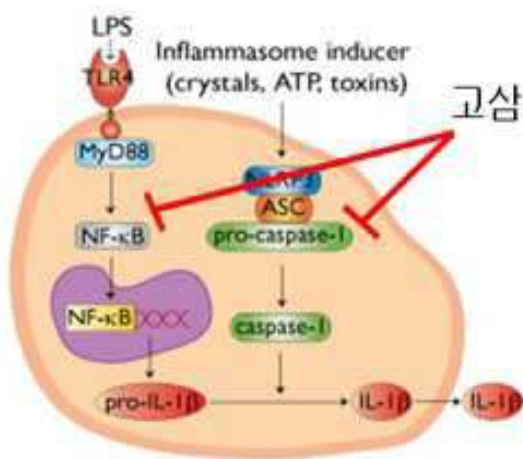
심사관 : 김도현

(54) 발명의 명칭 고삼 추출물을 이용한 염증 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 고삼(Sophora) 추출물을 이용한 염증 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, NF- κ B/IKK α / β 및 inflammasome/caspase-1의 활성을 저해하는 함염증 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 고삼 추출물을 이용한 함염증 물질의 스크리닝 방법은 일반적인 염증반응 뿐만 아니라 NF- κ B/IKK α / β 및 inflammasome/caspase-1의 활성 저해를 통한 염증반응까지 스크리닝할 수 있어, 효과적인 염증질환 예방 또는 치료제의 개발에 유용하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

신희성

경기도 용인시 기흥구 덕영대로2077번길 55, 106동
103호 (영덕동, 대명레이크빌아파트)

김용재

서울특별시 성북구 서경로 95-18, A동 101호 (정릉
동, 정은빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2059846

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)일반연구자지원사업 기본연구

연구과제명 녹농균 유래 항바이러스반응 유발 생체분자 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

다음 단계를 포함하는 염증 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법:

- (a) pro-caspase-1을 발현하는 세포에 인플라마솜(inflammasome)을 조절하여 pro-caspase-1 활성을 억제하는 후보물질 및 고삼 추출물을 각각 처리하는 단계;
- (b) 상기 인플라마솜(inflammasome)을 조절하여 pro-caspase-1 활성을 억제하는 후보물질을 처리한 군과 고삼 추출물을 처리한 군의 인플라마솜(inflammasome)에 의해 조절되는 pro-caspase-1 활성을 측정하는 단계; 및
- (c) 고삼 추출물 처리군과 비교하여, 인플라마솜(inflammasome)에 의해 조절되는 pro-caspase-1 활성이 유사하거나 억제된 후보물질 처리군의 후보물질을 염증 예방 또는 치료제로 선별하는 단계.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 세포에서 IL-1 β 발현을 측정하여 고삼 추출물 처리군과 비교하여, IL-1 β 발현이 유사하거나 억제된 후보물질 처리군의 후보물질을 염증 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 세포는 그람음성균 또는 그람양성균 감염에 의해 야기된 염증반응을 나타내는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 세포는 상피세포 또는 대식세포인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 염증은 녹농균 또는 황색포도상구균에 의한 감염증, 봉와직염, 림프관염, 요로감염증, 수막염, 복막염, 방광염, 호흡기 질환, 중이염, 폐렴, 화농성 염증 및 패혈증으로 구성된 군으로부터 선택된 미생물에 의한 감염성 질환인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 염증은 NF- κ B 및 인플라마솜(inflammasome)/카스파제-1(caspase-1) 신호기전이 연관된 다양한 염증반응을 포함하는 질환인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 고삼(Sophora) 추출물을 이용한 염증 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, NF- κ B/IKK α/β 및 inflammasome/caspase-1의 활성을 저해하는 항염증 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고삼은 장미목 콩과에 속하는 여러해살이 풀로서, 아시아에 많이 분포하고 있으며 다양한 약재에 널리 이용되어 왔다. 고삼은 매우 쓴맛을 가지고 있는데, 인체에 무해한 자연항생제 성분이 풍부하여 세균감염으로 야기되는 소화불량 및 통증등을 치료하는데 상당한 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 고삼에는 혈당을 낮추는 효능 외에 관상동맥혈류량 증가 및 심장근육 강화 효능이 있으며, 두피의 피부염을 치유하는 효능이 좋아 고삼성분을 이용한 샴푸제품도 출시되고 있다.

[0003] 고삼에 의한 염증반응 저해기전과 관련된 보고에 의하면 HMC-1 세포에서 NF- κ B/I κ B 기전 저해를 통해 염증성 사이토카인의 생산을 저해한다고 알려져 있으며(*Toxicology in Vitro* 23:251-258, 2009), B 세포에서 NF- κ B/I κ B 기전 저해를 통해 염증억제 작용을 한다는 보고(*International Immunopharmacology* 15:467-473, 2013)가 있어, 고삼이 항염증 반응에 관여함을 알 수 있다.

[0004] 염증반응은 면역매개물로 작용하는 염증성 사이토카인의 작용으로 야기되는 현상으로 이들 사이토카인의 발현 및 생산은 적절한 조절하에 있어야 한다. 하지만 이러한 조절이 정상적으로 이루어지지 않으면 급성 또는 만성 염증질환등을 초래하게 된다. 이와 관련된 염증성 사이토카인중에서 가장 중요한 것으로 알려진 인자는 IL-1 β 로서 대식세포, 상피세포를 포함하는 다양한 세포에서 발현되며, 면역세포를 상처부위로 불러들여 다양한 분자의 발현유도를 통해 국소부위 및 전체적인 면역반응을 야기하는 것으로 알려져 있다.

[0005] IL-1 β 단백질은 세포외로 분비되어 작용하는 사이토카인으로서, 전사 및 해독작용을 통해 생성된 IL-1 β 의 전구체는 269개의 아미노산으로 구성되지만 활성화된 inflammasome/caspase-1에 의해 절단되어 153개의 아미노산으로 구성된 17kDa의 단백질이 생성된 후 분비된다. 따라서 NF- κ B 기전에 의해 조절되는 IL-1 β 의 유전자 발현도 중요하지만, 전사 후 단백질 생성조절 단계가 더욱 중요하다.

[0006] 이전 보고(*Toxicology in Vitro* 23:251-258, 2009; *International Immunopharmacology* 15:467-473, 2013)에는 고삼이 전사에서 중요하게 작용하는 NF- κ B/I κ B 기전 저해를 통해 항염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있으나, I κ B 상위 신호분자인 IKK α/β 및 해독 후 분비에 관여하는 inflammasome/caspase-1에 대한 고삼의 작용기전에 대해서는 알려진바가 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 고삼 추출물을 이용한 염증 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 고삼이 I κ B 상위 신호분자인 IKK α/β 및 해독 후 분비에 관여하는 inflammasome/caspase-1 활성을 저해하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 고삼 추출물을 이용하여 NF- κ B/IKK α/β 및 inflammasome/caspase-1의 활성을 저해하는 항염증 물질을 효율적으로 스크리닝하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) IKK α/β 를 발현하는 세포를 IKK α/β 활성 억제 후보물질 및 고삼 추출물을 각각 처리하는 단계; (b) 상기 IKK α/β 활성 억제 후보물질을 처리한 군과 고삼 추출물을 처리한 군의 IKK α/β 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 고삼 추출물 처리군과 비교하여, IKK α/β 활성이 유사하거나 억제된 후보물질 처리군의 후보물질을 염증 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 염증 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, (a) caspase-1을 발현하는 세포를 caspase-1 활성 억제 후보물질 및 고삼 추출물을 각각 처리

하는 단계; (b) 상기 caspase-1 활성 억제 후보물질을 처리한 군과 고삼 추출물을 처리한 군의 caspase-1 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 고삼 추출물 처리군과 비교하여, caspase-1 활성이 유사하거나 억제된 후보물질 처리군의 후보물질을 염증 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 염증 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0011]

발명의 효과

[0012]

본 발명에 따른 고삼 추출물을 이용한 항염증 물질의 스크리닝 방법은 일반적인 염증반응 뿐만 아니라 NF- κ B/IKK α/β 및 inflammasome/caspase-1의 활성 저해를 통한 염증반응까지 스크리닝할 수 있어, 효과적인 염증질환 예방 또는 치료제의 개발에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0013]

도 1은 고삼에 의한 항염증 반응 작용기전을 나타낸 도식도이다.

도 2는 그람음성균인 녹농균(Pa) 감염에 의해 야기된 염증반응 저해에 미치는 고삼(Sophora)의 효능을 폐 상피세포(A549) 및 대식세포(RAW 264.7, THP-1)에서 IL-1 β 유전자발현(A, B, C) 및 단백질분비(D) 측정으로 분석한 것이다.

도 3은 녹농균외에 그람양성균인 황색포도상구균(Sa) 및 염증반응유도에 많이 사용하는 PMA (phorbol myristate acetate) 처리를 통해 야기된 염증반응 저해에 미치는 고삼(Sophora)의 효능을 대식세포(THP-1)에서 IL-1 β 유전자발현 측정으로 분석한 것이다.

도 4는 녹농균(Pa) 감염에 의해 야기된 염증반응 저해에 미치는 고삼의 효능은 NF- κ B 기전저해를 통해 일어나는데, 특히 IKK α/β 의 상위에서 작용하는 IKK α/β 의 저해를 통해 작용하여 야기되는 것을 상피세포(B) 및 대식세포(C)에서 분석한 것이다.

도 5는 고삼이 보이는 항염증반응은 전사과정에서 작용하는 NF- κ B 기전 외에 IL-1 β 의 분비에 요구되는 inflammasome/caspase-1의 저해를 통해 이루어지는 것을 분석한 것이다.

도 6은 고삼은 세포 독성 없이, 항염증 활성을 나타내는 것을 분석한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0015]

본 발명에서는, 고삼 추출물을 처리한 상피세포 및 대식세포에서 염증성 사이토카인 IL-1 β 의 발현과 생성뿐만 아니라, NF- κ B/IKK α/β 및 inflammasome/caspase-1의 활성 억제를 통한 고삼 추출물의 항염증 효과를 확인하였다. 고삼 추출물은 NF- κ B 신호기전을 통한 항염증 효능을 나타내므로 NF- κ B의 상위 기전인 IKK α/β 의 활성을 측정하여, 고삼 추출물의 NF- κ B 기전을 통한 항염증 효과를 확인하였다.

[0016]

따라서, 본 발명은 일관점에서 (a) IKK α/β 를 발현하는 세포를 IKK α/β 활성 억제 후보물질 및 고삼 추출물을 각각 처리하는 단계; (b) 상기 IKK α/β 활성 억제 후보물질을 처리한 군과 고삼 추출물을 처리한 군의 IKK α/β 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 고삼 추출물 처리군과 비교하여, IKK α/β 활성이 유사하거나 억제된 후보물질 처리군의 후보물질을 염증 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 염증 예방 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0017]

또한, 고삼 추출물이 inflammasome 기전을 통한 항염증 효능을 나타냄을 caspase-1 활성을 측정하여 확인하였다.

[0018]

따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (a) caspase-1을 발현하는 세포를 caspase-1 활성 억제 후보물질 및 고삼 추출물을 각각 처리하는 단계; (b) 상기 caspase-1 활성 억제 후보물질을 처리한 군과 고삼 추출물을 처리한 군의 caspase-1 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 고삼 추출물 처리군과 비교하여, caspase-1 활성이 유사하거나 억제된 후보물질 처리군의 후보물질을 염증 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 포함하는 염증 예방 또는 치료제의 스

크리닝 방법에 관한 것이다.

- [0019] 또한, 본 발명에서는 일반적인 염증반응의 기작은 NF- κ B/I κ B를 통해 일어나므로, 고삼 추출물에 의한 IL-1 β 의 발현 및 생성 억제를 확인하였다.
- [0020] 따라서, 본 발명에 있어서 상기 세포에서 IL-1 β 발현을 측정하여 고삼 추출물 처리군과 비교하여, IL-1 β 발현이 유사하거나 억제된 후보물질 처리군의 후보물질을 염증 예방 또는 치료제로 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 그람음성균 감염에 의해 야기된 염증반응을 나타내는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 녹농균 감염에 의해 야기된 염증반응을 나타내는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 상피세포 또는 대식세포인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 A549 및 RAW 264.7, THP-1인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 염증은 녹농균에 의한 감염증, 봉와직염, 림프관염, 요로감염증, 수막염, 복막염, 방광염, 호흡기 질환, 중이염, 폐렴, 화농성 염증 및 패혈증으로 구성된 군으로부터 선택된 미생물에 인한 감염성 질환인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 염증은 NF- κ B 신호기전이 연관된 다양한 염증반응을 포함하는 질환인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

- [0026] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명 할 것이다.

[0027] 실시예 1: 고삼 추출물, 세포 배양 및 IL-1 β 의 발현 분석

- [0028] 고삼은 한국식물추출물은행(<http://extract.kribb.re.kr>)에서 건조된 상태로 분양받아 DMSO에 녹여 사용하였다. 염증반응 유발정도 조사를 위해 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 발현을 real-time Q-PCR을 이용하여 유전자 수준 및 ELISA와 immunoblotting을 이용하여 단백질 수준에서 분석하였다.
- [0029] RPMI-1640 배지에서 A549와 THP-1 세포를 배양하였으며, DMEM 배지에서 RAW 264.7 세포를 배양하였다. 각각의 배지에 10% fetal bovine serum을 추가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 의 조건으로 배양하였다. 배양된 세균이 세포 하나당 5-10 cfu가 되도록 4시간 동안 처리하고, 세포를 TRIzol을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA를 Reverse Transcription kit를 이용하여 cDNA를 제조하고, SYBR Green PCR Master Mix를 이용하여 real-time Q-PCR을 실시하였다.
- [0030] IL-1 β 의 발현은 다음의 프라이머를 사용하여 분석하였다.
- [0031] IL-1 β : 5'-AAACAGATGAAGTGCTCCTCCAGG-3'(서열번호 1) 및 5'-TGGAGAACACCACTTGTTGCTCCA-3'(서열번호 2).
- [0032] mIL-1: 5'-TGGTGTGTGACGTTCCATT-3'(서열번호 3) 및 5'-CAGCACGAGGCTTTTTGTTG-3'(서열번호 4).
- [0033] ELISA를 이용한 IL-1 β 의 분비는 Thermo사의 human IL-1 β ELISA kit를 이용하여 측정하였다. Immunoblotting을 이용한 IL-1 β 의 생산은 Cell Signaling사의 IL-1 β 항체를 이용하여 분석하였다.

[0034] 실시예 2: IL-1 β 발현조절을 통한 고삼의 항염증 효과 확인

- [0035] LB 배지(yeast extract, 0.5%; tryptone, 1%; and NaCl, 0.5%; all w/v)에서 대표적인 그람음성균 중 하나인 녹농균을 배양하였으며, TSB (Tryptic Soy Broth) 배지에서 대표적인 그람양성균 중 하나인 황색포도상구균을 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 교반하여 배양한 후, 녹농균을 처리하여 염증을 야기시켰다. 염증반응을 저해하는 고삼(Sophora)의 효능을 폐 상피세포(A549) 및 대식세포(mouse RAW 264.7, human THP-1)에서 IL-1 유전자 발현(도 2A, B, C) 및 단백질분비(도 2D) 측정으로 분석하였다.

[0036] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 고삼 처리에 의해 A549, THP-1 및 RAW 264.7 세포 모두에서 IL-1 β 의 발현이 크게 감소함을 확인하였다.

[0037] 또한, 고삼에 의한 IL-1 β 발현 억제제는 녹농균 뿐만아니라 황색포도상구균 및 염증반응유도에 많이 사용하는 PMA가 처리된 세포에서도 동일하게 나타남(도 3)에 따라, 일반적인 염증저해효능임을 알 수 있었다.

[0038] **실시예 3: NF- κ B/IKK α / β 및 inflammasome/caspase-1 발현조절을 통한 고삼의 항염증 효과 확인**

[0039] NF- κ B 발현 리포터를 이용한 분석을 통해 도 4A에 나타난 바와 같이 고삼에 의한 NF- κ B 활성 억제를 확인하였다. 또한, IKK 상위에서 작용하는 IKK α / β 의 활성화에 미치는 고삼의 효과를 immunoblotting으로 분석하였다.

[0040] 그 결과, 도 4B와 C에 나타난 바와 같이, 고삼에 의한 IKK α / β 억제 효능을 확인하였다.

[0041] 또한, IL-1 β 의 분비를 위해 필요한 inflammasome/caspase-1의 활성화를 immunoblotting으로 확인한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 고삼이 inflammasome/caspase-1의 활성을 억제하는 것을 확인하였다.

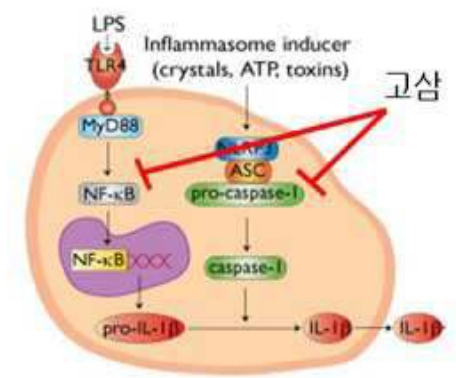
[0042] **실시예 4: 고삼에 의한 세포독성 측정**

[0043] 고삼이 보이는 항염증 반응이 세포독성 유발에 의한 것인지 조사하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 이를 위해 고삼을 세포에 일정시간 처리한 후, MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)를 2시간 동안 처리하여 490nm에서 흡광도를 측정한 결과, 항염증 반응을 나타내는 고삼 농도에서는 세포독성이 거의 없는 것으로 확인되었다(도 6).

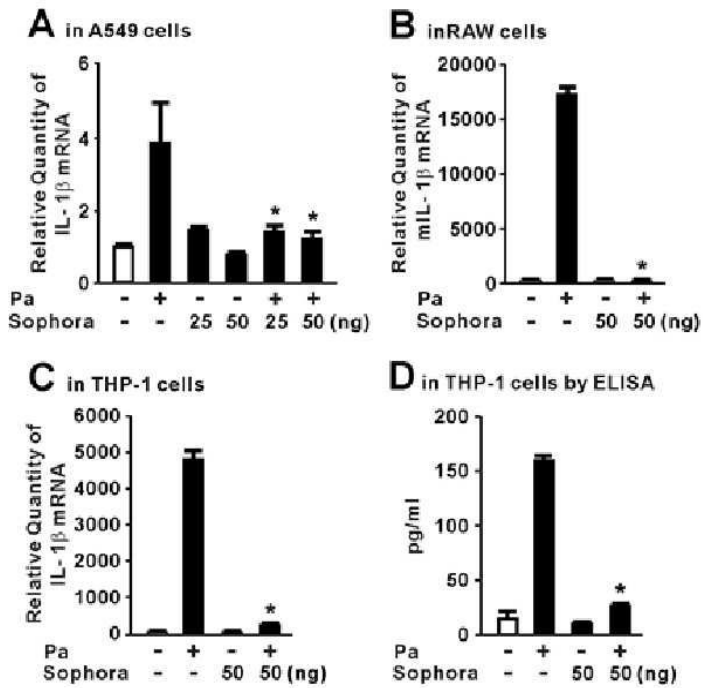
[0044] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점을 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

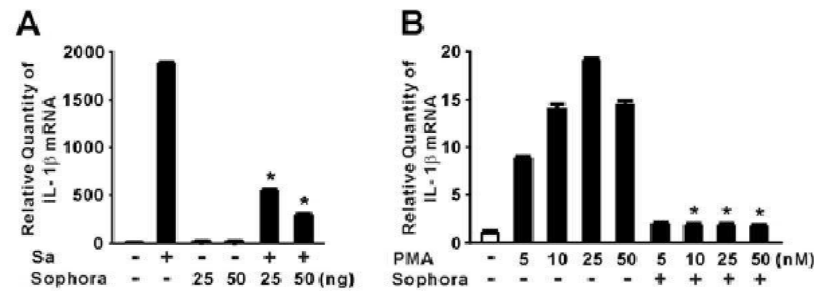
도면1



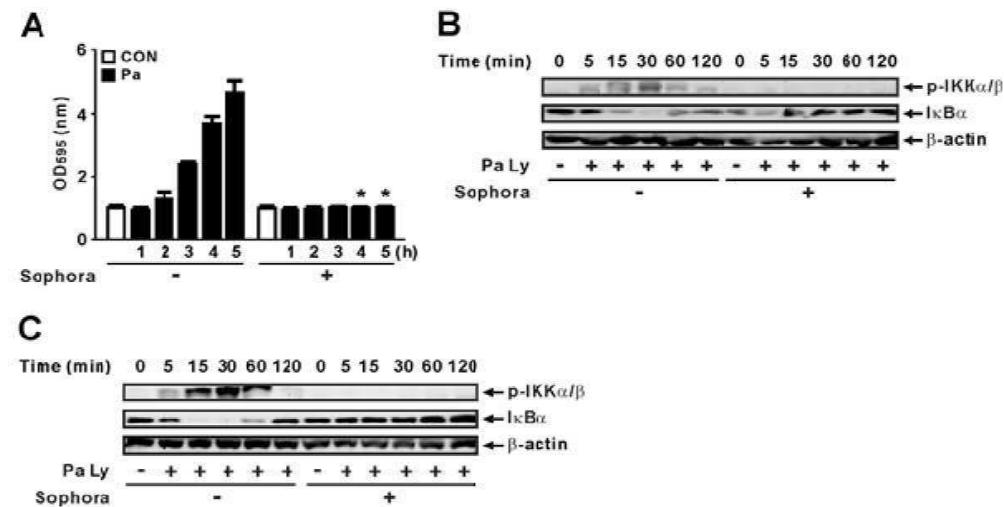
도면2



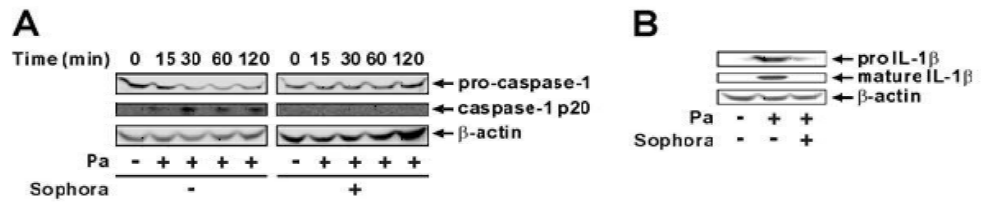
도면3



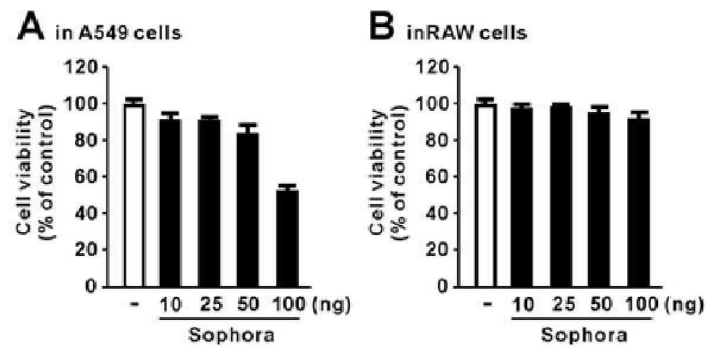
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Screening Methods of Preventing or Treating Agent of Inflammation
Using Sophora flavescens Extract
- <130> P14-B254
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> IL-1-f
- <400> 1
- aaacagatga agtgctcctt ccagg
- <210> 2
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> IL-1-r

<400>	2	
tggagaacac cacttgttgc tcca		24
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mIL-1-f	
<400>	3	
tggtgtgtga cgttccatt		20
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mIL-1-r	
<400>	4	
cagcacgagg ctttttgtt g		21