

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0103402

(43) 공개일자 2024년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/37 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61P 1/00 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/37 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2022-0185526

(22) 출원일자 2022년12월27일

심사청구일자 2022년12월27일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

정길생

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명1로 152,
804동 1701호(오송힐데스하임아파트)

이현수

대구광역시 북구 대현남로6길 20, 302동 1902호(
대현동, 센트럴파크 대현)

김은남

대전광역시 유성구 문화원로 133(봉명동,
스톤빌), 505호

(74) 대리인

특허법인 공간

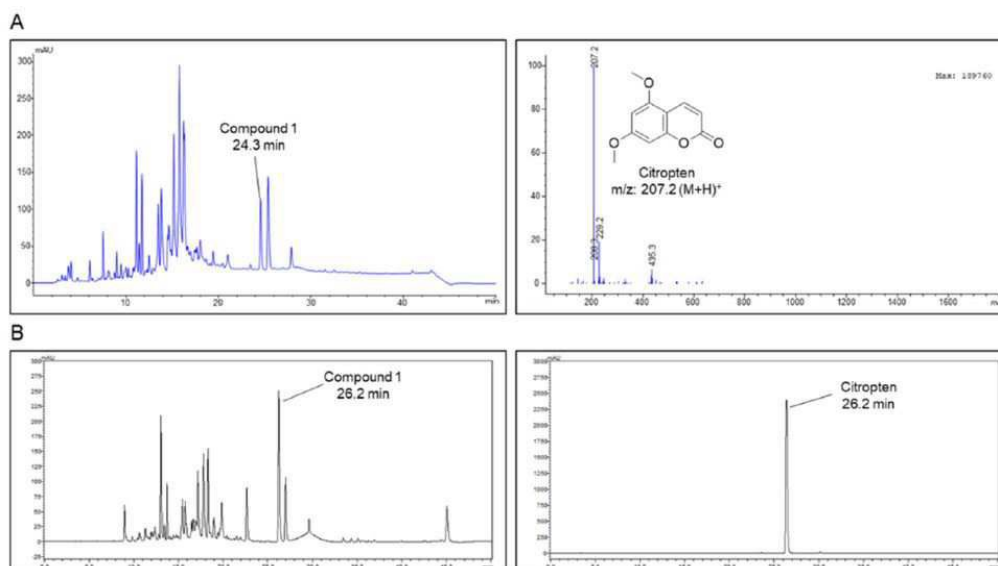
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 시트롭텐(citropten)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 시트롭텐(citropten)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 활성화된 T 세포 및 장상피세포를 억제하여 대장염 및 크론병을 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 37/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/32 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711174955
과제번호	2022R1A5A7085156
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업
연구과제명	라이프사이클 기반 시니어헬스 융합연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교산학협력단
연구기간	2022.09.01 ~ 2029.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

시트롭텐(citropten)을 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 염증성 장질환은 대장염 또는 크론병인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 시트롭텐(citropten)은 자극된 T 세포에서 IL-2, TNF α , IL-1, IL-8, ICAM1 및 VCAM1로 이루어지는 군으로부터 선택된 1 이상의 단백질 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 시트롭텐(citropten)은 자극된 T 세포에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 시트롭텐(citropten)은 자극된 장상피세포에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 시트롭텐(citropten)은 정제, 액제, 현탁액제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 경구 제제인 것을 특징으로 하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물.

청구항 7

시트롭텐(citropten)을 유효성분으로 함유하는 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 시트롭텐(citropten)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대장염은 감염, 알레르기 반응 및 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)을 포함한 여러 요인에 의해 유발되는 염증성 질환이다. IBD는 소화관의 만성 질환으로, 궤양성 대장염(ulcerative colitis, UC)과 크론병(Crohn's disease, CD)이 포함되며, 염증이 만성적이고 자발적으로 재발하는 것이 특징이다. IBD의 증상은

혈액과 점액을 함유한 묽은 변 또는 설사, 심한 복통, 탈수, 빈혈, 열, 체중 감소 등이 있다. 궤양성 대장염이 대장을 많이 발생하는 경우 심한 설사를 동반하여 하루에 10회 이상 설사를 하기도 하며 변실금이 나타나기도 하여 환자에게 매우 큰 고통을 준다.

[0003] IBD의 정확한 병인은 아직 밝혀지지 않았지만 조절되지 않는 과도한 면역 반응과 관련이 있음이 밝혀졌다(Fiocchi C., et al., 1998; Ko. J., et al., 2014). 또한 점막 T 세포의 제어되지 않는 활성화로 인해 IBD 증상이 나타나는 동안 점막 손상을 일으켜 조직 파괴뿐만 아니라 기능적 변화를 초래하는 것이 밝혀졌다(Neurath, M.F., et al., 2001). 장 상피세포는 병원체를 방어하는 1차 방어벽으로 중추적인 역할을 하기 때문에 IBD 동안 장 상피세포의 활성을 포함한 면역학적 항상성을 유지하는 것이 중요하다. 따라서 T 세포 및 장 상피 세포를 포함한 면역 병원성 반응의 억제 또는 방해가 잠재적인 치료 전략이 될 수 있다.

[0004] T 세포 수용체(T cell receptor, TCR) 및 주요 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) 분자와 항원성 펩타이드의 결합은 T 세포 매개 면역 반응을 유발하게 된다. 또한 CD28은 T 세포 활성화에서 보조자극분자로 관여한다. 즉, CD28은 CD28 반응 요소(CD28 response element, CD28RE)의 핵인자 카파비(nuclear kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NFκB) 결합 부위를 통해 NFκB 경로 활성화를 유도한다. 이 경로는 활성 상태에서 핵으로 전위하는 가장 중요한 전사 인자 중 하나로 잘 알려져 있다. 또한 장 상피 세포의 NFκB 경로가 염증성 대장염의 증상 발현 동안 면역 항상성 유지에 결정적인 역할을 한다는 것이 보고되었다(Bonizzi G., et al., 2004; Hayden M.S., et al., 2004). 그럼에도 불구하고 NFκB 경로의 활성화가 IBD 환자의 질병 활동에 관여한다는 사실을 고려할 때 NFκB 경로를 표적으로 하는 치료법을 개발하려는 노력은 여전히 미흡한 실정이다.

[0005] 한편, 시트롭텐(Citropten, 5,7-dimethoxycoumarin 또는 limettin, C₁₁H₁₀O₄)은 레몬(*Citrus limon*), 파파야(*Carica papaya*) 및 베르가못(*Citrus bergamia*)에서 분리되는 향산화 및 항암 활성을 포함한 다양한 생물학적 특성을 가진 쿠마린 유도체 중 하나이다. 시트롭텐은 B16 흑색종 세포에 대한 항증식 효과, 암종 조직의 MAPK 억제 효과, 쥐의 만성 우울증 유발 가벼운 스트레스에 대한 예방 효과 등 다양한 생물학적 기능이 있는 것으로 알려져 있다(Alesiani, D., et al., 2008; Fang J.Y., et al., 2005; Yang W., and Wang H., 2018). 이와 같이 시트롭텐의 다양한 활성이 알려져 있지만, 시트롭텐이 염증성 대장염에 대한 항염증 효과에 대한 연구는 아직 없다.

[0006] 한국공개특허 제10-2000-0046630호에는 시트롭텐을 포함하는 지질 추출물을 함유하는 피부 가려움증 완화용 조성물이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제10-0794445호에는 역시 시트롭텐을 포함하는 지질 추출물을 함유하는 알레르기 치료효과를 갖는 기능성 식품 조성물, 이를 이용한 천연차 및 그의 제조방법이 기재되어 있을 뿐, 시트롭텐이 염증성 대장염에 대한 항염증 효과에 대한 연구는 아직 전무한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2000-0046630호, 지질 추출물을 함유하는 피부 가려움증 완화용 조성물, 2000년07월25일. 공개.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-0794445호, 알레르기 치료효과를 갖는 기능성 식품 조성물, 이를이용한 천연차 및 그의 제조방법, 2008년01월07일. 등록.

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Fiocchi, C. Inflammatory bowel disease: Etiology and pathogenesis. Gastroenterology 1998, 115, 182-205.

(비특허문헌 0002) Ko, J.; Auyeung, K. Inflammatory Bowel Disease: Etiology, Pathogenesis and Current Therapy. Curr. Pharm. Des. 2014, 20, 1082-1096.

(비특허문헌 0003) Neurath, M.F.; Finotto, S.; Fuss, I.; Boirivant, M.; Galle, P.R.; Strober, W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: To die or not to die, that is the mucosal question. Trends Immunol. 2001, 22, 21-26.

- (비특허문헌 0004) Bonizzi, G.; Karin, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. Trends Immunol. 2004, 25, 280-288.
- (비특허문헌 0005) Hayden, M.S.; Ghosh, S. Signaling to NF- κ B. Genes Dev. 2004, 18, 2195-2224.
- (비특허문헌 0006) Alesiani, D.; Cicconi, R.; Mattei, M.; Montesano, C.; Bei, R.; Canini, A. Cell cycle arrest and differentiation induction by 5,7-dimethoxycoumarin in melanoma cell lines. Int. J. Oncol. 2008, 32, 425-434.
- (비특허문헌 0007) Fang, J.Y.; Richardson, B.C. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. Lancet Oncol. 2005, 6, 322-327.
- (비특허문헌 0008) Yang, W.; Wang, H. 5,7-Dimethoxycoumarin prevents chronic mild stress induced depression in rats through increase in the expression of heat shock protein-70 and inhibition of monoamine oxidase-A levels. Saudi J. Biol. Sci. 2018, 25, 253-258.
- (비특허문헌 0009) Henrique, D.M.; Ana, C.P.; Guilherme, T.P.B.; Helton, C.L.; Nelson, S.M.J.; Luciano, B.; Mark, W.; Jairo, K.B.; Gilberto, U.L.B. Furocoumarins and coumarins photoinactivate Colletotrichum acutatum and Aspergillus nidulans fungi under solar radiation. J. Photochem. Photobiol. B 2014, 131, 74-83.
- (비특허문헌 0010) Koelink, P.J.; Wildenberg, M.E.; Stitt, L.W.; Feagan, B.G.; Koldijk, M.; van' t Wout, A.B.; Atreya, R.; Vieth, M.; Brandse, J.F.; Duijst, S.; et al. Development of reliable, valid and responsive scoring systems for endoscopy and histology in animal models for inflammatory bowel disease. J. Crohn' s Colitis 2018, 12, 794-803.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 시트롭텐을 유효성분으로 함유하는 대장염의 예방, 개선 및 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 시트롭텐(citropten)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0011] 상기 시트롭텐은 5,7-디메톡시-2H-1-벤조피란-2-온 (5,7-Dimethoxy-2H-1-benzopyran-2-one)으로, lime, 레몬, 베르가못과 같은 감귤류에서 얻을 수 있으며, 분자식 $C_{11}H_{10}O_4$ 의 천연 유기화합물이다.
- [0012] 특히 시트롭텐은 lime 껍질 70% EtOH 추출물을 액체 크로마토그래피하여 고순도로 얻을 수 있다.
- [0013] 상기 염증성 장질환은 대장염 또는 크론병일 수 있다. 또한 상기 대장염은 만성 재발성 대장염, 만성 지속성 대장염 또는 급성 전격성 대장염을 포함하는 궤양성 대장염일 수 있다.
- [0014] 상기 시트롭텐은 자극된 T 세포에서 IL-2, TNF α , IL-1, IL-8, ICAM1 및 VCAM1로 이루어지는 군으로부터 선택된 1 이상의 단백질 발현을 억제하는 것을 특징으로 한다. 상기 시트롭텐은 자극된 T 세포로부터 IL-2 생산을 농도 의존적으로 억제할 수 있으며, T 세포 활성화 특이적 마커 중 하나인 CD69의 세포 표면 발현을 억제할 수 있다. 상기 시트롭텐(citropten)은 자극된 T 세포에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 억제하는 것을 특징으로 한다. 상기 자극된 T 세포에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 억제하는 것은 자극된 T 세포 내 p65ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준을 감소시키고, p65의 핵으로의 전좌를 억제하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 시트롭텐은 TNF α 로 처리하여 활성화된 장상피세포로부터 염증성 사이토카인 생성을 억제할 수 있다. 상기 염증성 사이토카인은 TNF α , IL-1 β 및 IL-8로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상일 수 있다. 또한 본 발명의 시트롭텐은 ICAM1 또는 VCAM1의 발현을 억제할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 시트롭텐은 TNF α 로 처리하여 활성화된 장상피세포에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 억제하는 것

을 특징으로 한다. 상기 자극된 장상피세포에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 억제하는 것은 자극된 장상피세포 내 p65ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준을 감소시키고, p65의 핵으로의 전좌를 억제하는 것일 수 있다.

- [0017] 본 발명의 시트롭텐은 DSS 유도 대장염 동물 모델에서 체중감소를 완화하고 정상적인 대변을 유도하며, 항문 출혈을 저감하여 염증성 대장염을 개선할 수 있다. 본 발명의 시트롭텐은 대장염이 유도된 대장조직 내 TNF α , IL-1 β 및 IL-8의 발현을 억제하고, ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준을 감소시킴으로써 대장의 염증 중증도를 완화시킬 수 있다.
- [0018] 본 발명의 시트롭텐은 장간막 림프절의 IL-2, IFN γ 및 IL-17의 발현수준을 감소시키고 장간막 림프절 내 ERK, p38 및 JNK 인산화 수준을 감소시켜 이펙터 T 세포의 활성을 약화시킴으로써 림프절병증을 완화시킬 수 있다.
- [0019] 본 발명의 시트롭텐은 세포독성 없이 시험관 내에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 통해 T 세포 및 장 상피세포의 활성을 효과적으로 조절하여 시트롭텐이 대장염을 포함하는 염증성 장질환 치료제로 작용할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 시트롭텐 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0021] 상기 시트롭텐은 전체 약학 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~50중량%, 더 바람직하게는 0.001~40중량%, 가장 바람직하게는 0.001~30중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0022] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 액제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제, 감미제, 산미제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 시트롭텐에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제, 산미제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween)-61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 500mg/kg/일의 범위이다. 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이며, 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 및 피부 도포에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 시트롭텐은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0025] 상기 조성물은 상기 시트롭텐 및 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함하는 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0026] 상기 건강기능식품은 시트롭텐이 전체 식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~99중량%, 더 바람직하게는 0.001~70중량%, 가장 바람직하게는 0.001~50중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0027] 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

[0028] 상기 건강기능식품은 염증성 장질환의 관해기에 복용함으로써 관해기를 연장하고 염증 질환을 예방 또는 개선할 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 시트롭텐(citropten)을 유효성분으로 포함하는 염증성 장질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 활성화된 T 세포 및 장상피세포를 억제하여 대장염 및 크론병을 포함하는 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 lime(key lime, *Citrus aurantifolia*)껍질 추출물에서 시트롭텐 분리 및 화학 구조를 나타낸 것이다. (A) lime 껍질 70% EtOH 추출물의 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)-질량 스펙트럼 및 시트롭텐의 $[M+H]^+$ 이온의 ESI-MS 스펙트럼. (B) HPLC-DAD(330nm)를 사용한 분리된 시트롭텐의 순도 평가.

도 2는 시트롭텐의 세포독성 여부를 확인한 결과이다. 0~40 μ M 시트롭텐을 24시간 처리 후, Jurkat T 세포 및 HT-29 세포의 (A) IncuCyte 이미징 시스템 결과 (B) MTT 분석 결과 (C) 아넥신V/PI 세포자멸사 분석 결과 (평균 $\pm$ SD).

도 3은 시트롭텐이 Jurkat T 세포의 활성화에 미치는 효과를 보여주는 결과이다. (A) 0~40 μ M 시트롭텐으로 1 시간 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD28 항체(7 μ g/mL, 좌측), PMA(100nM) 및 A23187-(1 μ M, 중간) 또는 SEE 로드된 Raji B 세포(우측)로 6시간 자극한 후, RT-qPCR로 측정된 IL-2의 mRNA 수준 (B) ELISA로 측정된 IL-2 단백질 수준 (C) 0~40 μ M 시트롭텐으로 1 시간 전처리된 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD28 항체 6시간 동안 자극 후, 생성된 IL-2의 웨스턴 블롯 분석 결과 (검출된 IL-2는 액틴의 강도로 정규화됨) (D) 0~40 μ M 시트롭텐으로 1 시간 전처리된 Jurkat 세포를 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD28 항체(7 μ g/mL)로 16시간 동안 자극 후, CD69 발현 세포의 유세포분석 결과. (결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

도 4는 시트롭텐이 재조합 TNF α 에 의해 활성화된 HT-29 세포에서 염증성 사이토카인의 생성에 미치는 효과를 보여주는 결과이다. 0~40 μ M 시트롭텐으로 1 시간 전처리된 Jurkat T 세포를 재조합 TNF α 10 ng/mL로 6시간 동안 자극 후, 실시간 정량적 PCR 분석을 통해 측정된 TNF α , IL-1 및 IL-8(A) 및 ICAM1 및 VCAM1(B)의 mRNA 수준 (값은 GAPDH로 정규화하여 최대값의 %로 표시됨.) (결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

도 5는 시트롭텐 전처리가 활성화된 Jurkat 및 HT-29에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로에 미치는 효과를 보여주는 결과이다. (A) 40 μ M 시트롭텐으로 전처리된 Jurkat 세포를 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD3 항체로 1 시간 자극 후, 핵 추출물 및 세포질 추출물 내의 p65, 세포질 추출물 내의 I κ B α 및 pI κ B α 의 웨스턴 블롯팅 결과 및 정량 결과 (핵 추출물의 경우 LaminB, 세포질 추출물의 경우 β -액틴으로 정규화함) (B) 0~40 μ M 시트롭텐으로 전처리된 Jurkat 세포를 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD3 항체로 30분간 자극 후, ERK, p38, JNK 및 이들의 인산화 단백질의 웨스턴 블롯 결과 및 인산화 수준 (총 단백질의 강도로 정규된 각 단백질의 인산화 비율로 표시함) (C) 40 μ M 시트롭텐으로 전처리된 HT-29 세포를 재조합 TNF α (10 ng/mL)로 1시간 동안 자극 후, 핵 추출물 및 세포질 추출물 내의 p65, 세포질 추출물 내의 I κ B α 및 pI κ B α 의 웨스턴 블롯팅 결과 및 정량 결과 (핵 추출물의 경우 LaminB, 세포질 추출물의 경우 β -액틴으로 정규화함) (D) 0~40 μ M 시트롭텐으로 전처리된 HT-29 세포를 재조합 TNF α (10 ng/mL)로 1시간 동안 자극 후, ERK, p38, JNK 및 이들의 인산화 단백질의 웨스턴 블롯 결과 및 인산화 수준 (총 단백질의 강도로 정규된 각 단백질의 인산화 비율로 표시함) (결과는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표현, * $p < 0.05$).

도 6은 DSS 유도 대장염 마우스 모델에서 시트롭텐의 효과를 보여주는 결과이다. (A) IBD 유도의 실험 계획 모식도. (B) IBD 유도 7일 동안 각 군 마우스의 체중 변화. (C) IBD 유도 7일 동안 각 군 마우스의 대변 점수. (D) IBD 유도 7일 째에 각 군 마우스 항문의 대표 사진. (E) IBD 유도 7일 동안 각 군 마우스의 질병 활동 지수 ($n = 5/\text{그룹}$, 평균 $\pm$ SD, * $p < 0.05$)

도 7은 시트롭텐의 DSS 유도 대장염에서 대장 조직에 미치는 효과를 나타낸 결과이다. (A) DSS 유도 7일째 각 마우스 군의 대장 대표 사진. (B) DSS 유도 7일째 각 마우스 군의 대장 길이. (C) DSS 유도 7일째 각 마우스 군 대장의 H&E로 염색사진 (스케일바 : 500 μ m) (D) DSS 유도 7일째 각 마우스 군 대장의 조직학적 점수 (E) DSS

유도 7일째 각 마우스 군 대장의 RT-qPCR을 통한 TNF α , IL-1 β 및 IL-8의 mRNA 수준 (GAPDH로 정규화되었으며 최대 %로 표시됨) (F) DSS 유도 7일째 각 마우스 군 대장 조직 내 ERK, p38, JNK 및 이들의 인산화 단백질의 웨스턴 블롯 결과 및 인산화 수준 (총 단백질의 강도로 정규된 각 단백질의 인산화 비율로 표시함) (n = 5/그룹, 평균 $\pm$ SD, * $p < 0.05$).

도 8은 시트롭텐의 DSS 유도 대장염에서 장간막 림프절 조직에 미치는 효과를 나타낸 결과이다. (A) DSS 유도 7일째 각 마우스 군의 장간막 림프절 대표 사진. (B) DSS 유도 7일째 각 마우스 군의 장간막 림프절 길이 및 무게. (C) DSS 유도 7일째 각 마우스 군 대장의 RT-qPCR을 통한 IL-2, IFN γ 및 IL-17의 mRNA 수준 (GAPDH로 정규화되었으며 최대 %로 표시됨) (D) DSS 유도 7일째 각 마우스 군 대장 조직 내 ERK, p38, JNK 및 이들의 인산화 단백질의 웨스턴 블롯 결과 및 인산화 수준 (총 단백질의 강도로 정규된 각 단백질의 인산화 비율로 표시함) (n = 5/그룹, 평균 $\pm$ SD, * $p < 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 여기서 소개되는 내용은 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공한 것이다.

[0032] <실시예 1. lime 껍질 추출물로부터 시트롭텐의 분리>

[0033] lime(key lime, *Citrus aurantifolia*)은 운향과 귤속의 잡종 재배식물로, 껍질에서 다량의 시트롭텐을 얻을 수 있다.

[0034] lime은 2020년 대구약령한약시장에서 구입하고, 식물표본(KMU-2020-04-08)은 계명대학교 약학대학에 기탁하였다. 상기 lime의 과육을 제거하고 분리된 껍질을 건조하였다. 건조된 lime 껍질 265.0g을 실온에서 70% EtOH 1L에 1일 동안 침지시킨 다음, 60℃에서 2시간 동안 추출하였다. 이후, 상기 알코올 추출물을 진공에서 증발시켜 잔류물 41.2g을 생성한 다음, 생성된 잔류물을 물에 현탁하여 현탁액을 *n*-헥산, 에틸아세테이트(EtOAc) 및 *n*-부탄올로 연속적으로 분배하였다. 이 중, *n*-헥산 분획(16.00g, Fr.1)을 헥산-EtOAc(0-100 헥산/EtOAc v/v%)의 구배 용리의 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분배하여 14개의 분획(Fr. 1-14)을 얻었다. 분리된 분획, Fr. 1-1-8의 백색 침전물 87.6mg을 클로로포름에서 재결정하여 화합물 1 11.6mg을 얻었다. 분리된 화합물 1에 대해 ^1H 및 ^{13}C 핵자기공명 및 액체크로마토그래피-질량 분광 분석을 실시한 결과, 화합물 1은 이전에 보고된 문헌과 분석 결과를 비교하여 시트롭텐으로 동정되었다(Henrique, D.M. and Ana, C.P., 2014).

[0035] 화합물 1 (시트롭텐): ^1H NMR 결과 (500 MHz, CDCl_3) δ : 8.00 (d, $J=9.7$ Hz, 1H, H-4), 6.40 (d, $J=1.7$, 1H, H-8), 6.67 (d, $J=2.3$, 1H, H-8), 6.27 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, H-6), 6.20 (d, $J=9.0$ Hz, 1H, H-6), 6.15 (d, $J=9.2$ Hz, 1H, H-3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR 결과 (500 MHz, CDCl_3) δ : 163.8 (C-7), 161.7 (C-2), 157.0 (C-5), 156.9 (C-8a), 138.9 (C-4), 110.0 (C-3), 104.1 (C-4a), 94.9 (C-6), 92.9 (C-8), 56.0 (OCH_3), 55.9 (OCH_3).

[0036] 또한, lime 껍질 70% EtOH 추출물을 액체 크로마토그래피-질량 분석을 수행하여 시트롭텐을 분석하였다. lime 껍질 70% EtOH 추출물을 액체 크로마토그래피하여 26.2분에 검출된 화합물 1의 MS 스펙트럼을 얻은 후, MS 스펙트럼의 양이온 모드에서 분리된 화합물 1은 207.2의 질량 대 전하 비율을 나타냈다(도 1A). 또한, 분리된 시트롭텐의 순도를 HPLC-DAD를 이용하여 평가한 결과, 시트롭텐의 순도는 약 98.65%임을 확인하였다(도 1B).

[0037] <실시예 2. 시트롭텐의 세포독성 확인>

[0038] 시트롭텐이 T 세포 및 상피세포에서 세포독성을 유발하는지 여부를 확인하였다. 결장직장 선암종 장 상피세포 유래 HT-29 세포 및 급성 T 세포 백혈병 T Cell 림프구 유래 Jurkat T 세포를 각각 $1 \times 10^4/\text{well}$ 로 웰에 시딩하고, 시트롭텐(CTP) 0, 10, 20 및 40 μM 이 되도록 각 웰에 처리한 다음, 24시간 동안 배양하고 IncuCyte 이미징 시스템으로 세포를 주황색으로 자동 표시하고 세포 생존률을 확인하여 도 2A에 나타내었다. 도 2A에서 보는 바와 같이, Jurkat T 세포 및 HT-29 세포의 컨플루언시는 최대 40 μM 의 시트롭텐 처리에도 영향을 받지 않았다.

[0039] 시트롭텐의 세포 독성을 MTT 분석을 통해 다시 확인하였다. Jurkat T 세포 및 HT-29 세포를 시트롭텐의 각 농도로 상기와 동일하게 처리하여 24시간 배양 후, MTT(2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)를 500 $\mu\text{g/mL}$ 첨가

하여 2시간 동안 배양 후, 상등액을 버리고 바닥에 있는 formazan 결정을 200 μ L의 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 용해시켰다. 플레이트를 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 대조군(0 μ M)에 대한 비교치(%)로 계산하여 도 2B에 나타내었다. 도 2B에서 보는 바와 같이, 시트롭텐은 Jurkat 및 HT-29 세포에서 대조군과 유사한 생존력을 나타내어 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[0040] 시트롭텐 처리가 Jurkat 및 HT-29 세포에서 세포자멸사-관련 세포 사멸을 유도하는지 확인하기 위해 AnnexinV/PI 세포사멸 분석을 수행하였다. Jurkat T 세포 및 HT-29 세포를 시트롭텐의 각 농도로 상기와 동일하게 처리하여 24시간 배양 후, AnnexinV/PI apoptosis kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 AnnexinV 및 PI로 염색하였다. 이후, 유세포 분석을 통해 세포를 획득하고 모든 단일 세포는 BD 소프트웨어를 사용하여 게이팅하였다. AnnexinV 및 PI 이중 양성 세포는 이중 플롯에서 얻었다. AnnexinV/PI 이중 양성 세포의 집단은 유세포 분석 결과는 도 2C에 나타내었다. 도 2C에서 보는 바와 같이, 최대 40 μ M의 시트롭텐 처리에도 AnnexinV 및 PI를 발현하는 Jurkat 및 HT-29 세포의 백분율을 변경되지 않았으며, 이러한 결과를 통하여 최대 40 μ M의 시트롭텐 처리에도 Jurkat 및 HT-29 세포의 생존력에 부정적인 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0041] <실시예 3. 시트롭텐의 T 세포 활성화 억제 효과 확인>

[0042] 염증 반응에서 T 세포의 활성화는 대장염의 병인에 중추적인 역할을 한다. 따라서 시트롭텐이 T 세포 활성화에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다.

[0043] 본 발명에서는 T 세포 자극을 위해 항 CD3 및 항 CD28 항체를 사용한 TCR 매개 자극, PMA 및 A23187 처리 및 초항원이 적재된 Raji B 세포와의 공동 배양 시스템을 포함하는 3가지 시험관 내 모델을 사용하였다.

[0044] Jurkat T 세포를 5×10^5 /well 로 플레이트에 분주하고 0, 10, 20 및 40 μ M의 시트롭텐을 각각 처리한 1시간 동안 배양하였다. 이후, TCR 매개 자극을 위해서 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD28 용해성 항체(7 μ g/mL)로 Jurkat T 세포를 자극하였다. PMA/A23187 자극을 위해서 Jurkat T 세포를 100 nM PMA 및 1 μ M A23187로 처리했다. 또한 1시간 동안 SEE(staphylococcal enterotoxin E) 초항원(1g/mL)으로 펄싱된 동일한 수의 Raji B 세포와 6시간 동안 공동 배양하고, IL-2의 mRNA 수준을 실시간 정량 PCR(RT-qPCR)로 측정하여 도 3A에 나타내었다.

[0045] RT-qPCR은 처리 후 세포를 수득하여 TRIZOL 시약으로 용해시킨 후, 총 RNA를 분리하였다. RNA의 역전사는 RT PreMix kit(Enzynomics, Daejeon, Korea)를 이용하여 수행하였다. 본 발명에 사용된 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다. PCR 증폭은 1 μ L의 cDNA/대조군 및 유전자 특이적 프라이머로, SYBR Premix Ex Taq를 사용하여 DNA Engine Opticon 1 연속 형광 검출 시스템(MJ Research, Waltham, MA, USA)에서 수행되었다. 각각의 PCR 반응조건은 95 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초 및 40 cycle에서 플레이트 판독(형광 생성물 검출)을 실시하였으며, 용융 곡선 분석은 0.2 $^{\circ}$ C 간격으로 수집된 형광 데이터와 함께 온도를 60 $^{\circ}$ C에서 95 $^{\circ}$ C까지 천천히 상승(0.1 $^{\circ}$ C/s)하여 dsDNA 생성물을 특징화하고, 유전자의 mRNA 수준은 GAPDH로 정규화하였다. 유전자 발현은 하기 방정식 [유전자 발현 = $2^{-\Delta \Delta CT}$, 여기서 $\Delta \Delta CT = (CT \text{ 표적} - CT \text{ GAPDH})$]을 사용하여 계산하였다.

표 1

구분	서열번호	서열
human <i>IL-2</i>	1	(Forward) 5'-CAC GTC TTG CAC TTG TCA C-3'
	2	(Reverse) 5'-CCT TCT TGG GCA TGT AAA ACT-3'
human <i>TNFα</i>	3	(Forward) 5'-CCT ACC AGA CCA AGG TCA AC-3'
	4	(Reverse) 5'-AGG GGG TAA TAA AGG GAT TG-3'
human <i>IL-1β</i>	5	(Forward) 5'-GGA TAT GGA GCA ACA AGT GG-3'
	6	(Reverse) 5'-ATG TAC CAG TTG GGG AAC TG-3'
human <i>IL-8</i>	7	(Forward) 5'-GTG CAG TTT TGC CAA GGA GT-3'
	8	(Reverse) 5'-TTA TGA ATT CTC AGC CCT CTT CAA AAA-3'
human <i>ICAM1</i>	9	(Forward) 5'-AGC GGC TGA CGT GTG CAG TAA T-3'
	10	(Reverse) 5'-TCT GAG ACC TCT GGC TTC GTC A-3'
human <i>VCAM1</i>	11	(Forward) 5'-GAT TCT GTG CCC ACA GTA AGG C-3'
	12	(Reverse) 5'-TGG TCA CAG AGC CAC CTT CTT G-3'
human <i>GAPDH</i>	13	(Forward) 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3'
	14	(Reverse) 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
mouse <i>TNFα</i>	15	(Forward) 5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3'
	16	(Reverse) 5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'

mouse <i>IL-1</i>	17	(Forward) 5'-ATA ACC TGC TGG TGT GTG AC-3'
<i>β</i>	18	(Reverse) 5'-AGG TGC TGA TGT ACC AGT TG-3'
mouse <i>IL-8</i>	19	(Forward) 5'-ATG GCT GCT CAA GGC TGG TC-3'
	20	(Reverse) 5'-AGG CTT TTC ATG CTC AAC ACT AT-3'
mouse <i>IL-2</i>	21	(Forward) 5'-TGA GCA GGA TGG AGA ATT ACA GG-3'
	22	(Reverse) 5'-GTC CAA GTT CAT CTT CTA GGC AC-3'
mouse <i>Ifng</i>	23	(Forward) 5'-TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA-3'
	24	(Reverse) 5'-TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG-3'
mouse <i>IL17</i>	25	(Forward) 5'-TCC CCT CTG TCA TCT GGG AAG-3'
	26	(Reverse) 5'-CTC GAC CCT GAA AGT GAA GG-3'
mouse <i>GAPDH</i>	25	(Forward) 5'-GCA CAG TCA AGG CCG AGA AT-3'
	26	(Reverse) 5'-GCC TTC TCC ATG GTG GTG AA-3'

[0047] 도 3A에서 보는 바와 같이, 시트롭텐의 전처리는 활성화된 Jurkat T 세포에서 IL-2의 mRNA 수준을 용량 의존적 방식으로 억제함을 보여주었다.

[0048] 또한 시트롭텐이 활성화된 T 세포로부터 IL-2의 방출을 억제하는지 확인하기 위하여 시트롭텐이 농도별로 처리된 Jurkat T에서 방출된 IL-2의 양을 ELISA를 통해 확인하여 도 3B에 나타내었다. 24시간동안 T 세포를 자극하는 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 시트롭텐을 처리하고 T 세포를 자극한 후, 수득한 Jurkat T 세포에서 방출된 IL-2 단백질 발현량을 DuoSet® ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하여 도 3B에 나타내었다. 도 3B에서 보는 바와 같이, 활성화된 T 세포로부터 방출된 IL-2는 시트롭텐에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인하였다.

[0049] 또한, 시트롭텐이 자극된 T 세포로부터 IL-2 생산을 차단하는지 여부를 조사하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 세포질 IL-2를 검출하고 그 결과를 도 3C에 나타내었다. 상기와 유사한 방법으로 1×10^6 /well의 Jurkat T 세포에 시트롭텐을 농도별로 1 시간 처리한 후, 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD28 용해성 항체(7 μ g/mL)로 6 시간 자극하였다. 이후, 세포를 수득하여 RIPA 완충용액에서 용해시킨 후, 8~12% SDS-PAGE에서 전개시키고 PVDF 멤브레인(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 옮기고 멤브레인을 5% 탈지유(1시간)로 차단하였다. 이후, 멤브레인을 0.1% Tween 20(TBS-T) 및 3% 탈지유를 함유하는 TBS에서 IL-2 1차 항체와 함께 밤새 인큐베이션한 후, 0.1 μ g/mL 퍼옥시다제 표지된 2차 항체와 함께 2시간 동안 배양하고 ImageQuant LAS 4000(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 사용하여 ECLWestern 블로팅 검출 시약(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 밴드를 시각화하였다. 검출된 밴드는 β -액틴과 비교하여 배수 변화로 표시하였다. 도 3C에서 보는 바와 같이, 시트롭텐으로의 전처리가 활성화된 T 세포에서 IL-2 생산을 농도의존적으로 하향 조절함을 보여주었다.

[0050] 활성화된 T 세포는 세포 표면에 T 세포 활성화 특이적 마커 중 하나인 CD69를 발현한다. 따라서 시트롭텐이 활성화된 T 세포에서 CD69의 발현에 영향을 미치는지 유동 세포측정법을 사용하여 모니터링하였다.

[0051] 농도별 시트롭텐으로 전처리된 5×10^5 /well의 Jurkat T 세포를 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD28 용해성 항체(7 μ g/mL)로 16시간 자극하였다. 이후, 세포를 APC 접합된 항-CD69 항체로 염색 후, 유세포분석을 통해 형광을 측정하여 도 3D에 나타내었다. 도 3D에 나타난 바와 같이, CD69의 강도는 40 μ M 시트롭텐 전처리에 의하여 현저하게 감소하였다. 이러한 결과는 시트롭텐이 활성화된 T 세포로부터 IL-2 생성 및 CD69 발현을 포함한 T 세포 활성화를 효과적으로 억제함을 시사한다.

[0052] <실시예 4. 시트롭텐의 장 상피 세포에서 염증성 사이토카인 생성 억제 확인>

[0053] 시트롭텐이 재조합 TNF α 로 처리하여 활성화된 HT-29로부터 염증성 사이토카인 생성을 조절하는지 확인하였다. HT-29 세포를 0, 10, 20 및 40 μ M의 시트롭텐으로 각각 1시간 동안 전처리한 후, 재조합 TNF α 10 ng/mL으로 6시간 동안 자극했다. 이후, 상기 실시예 3과 유사한 방법으로 실시간 정량적 PCR 분석을 통해 TNF α , IL-1 β , IL-8, ICAM1 및 VCAM1의 mRNA 수준을 측정하여 도 4A 및 도 4B에 나타내었다. 값은 GAPDH로 정규화하여 최대값의 %로 표시하였다. 도 4A 및 도 4B에서 보는 바와 같이, TNF α , IL-1 및 IL-8을 포함하는 전염증성 사이토카인의 mRNA 수준은 용량 의존적으로 전염증성 사이토카인의 mRNA 수준을 감소시켰음을 확인하였다. 또한 시트롭텐 농도 의존적으로 TNF α 에 의하여 활성화된 HT-29 세포의 ICAM1 및 VCAM1의 mRNA 수준이 하향 조절되었다. 이러한 결과는 시트롭텐 전처리가 전염증성 사이토카인의 생성 및 표면 분자의 발현 측면에서 HT-29 세포의 활성을 효과적으로 조절한다는 것을 나타낸다.

[0054] <실시예 5. 시트롭텐의 활성화된 Jurkat 및 HT-29에서 NF κ B 및 MAPK 신호 경로 억제 확인>

[0055] NF κ B는 T 세포 활성화에 관여하는 주요 전사 인자 중 하나라는 것은 잘 알려져 있다. 시트롭텐 전처리가 T 세포 수용체(T-cell receptor, TCR) 매개 활성화에서 NF κ B 신호 전달 경로에 영향을 미치는지 조사하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 통해 p65의 핵 번역을 평가했다.

[0056] 0, 40 μ M의 시트롭텐(CTP)으로 전처리한 Jurkat 세포를 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD28 항체 (7 μ g/mL)로 1시간 자극한 다음, NE-PER kit를 이용하여 세포를 용해시키고 핵 추출물 및 세포질 추출물을 분리하였다. 이후, 핵 추출물 및 세포질 추출물에서 p65의 핵전좌와 I κ B α 의 인산화를 웨스턴 블롯팅으로 확인하고 검출된 단백질은 핵 추출물의 경우 LaminB, 세포질 추출물의 경우 β -액틴으로 정규화하여 도 5A에 나타내었다.

[0057] 도 5A에서 보는 바와 같이, 항-CD3/CD28 항체로 활성화된 T 세포에서 p65의 핵으로의 전좌를 증가시켰으며, 시트롭텐으로 전처리는 이를 감소시켰다. 동시에 시트롭텐으로 전처리한 활성화된 T 세포의 세포질 내 p65는 증가하였다. 또한 활성화된 T 세포에서 시트롭텐 전처리에 의해 I κ B α 의 활성을 조사한 결과, 도 5A에서 보는 바와 같이, 활성화된 T 세포에서 급격히 증가된 I κ B α 의 인산화는 시트롭텐으로 전처리에 의해 상당히 억제되었음을 확인하였다.

[0058] 상기 결과를 바탕으로 활성화된 T 세포에서 시트롭텐 전처리에 의해 MAPK 신호 전달 경로가 영향을 받는지 추가로 조사하였다. 상기와 유사한 방법으로 Jurkat 세포를 0, 10, 20 및 40 μ M의 시트롭텐(CTP)으로 전처리한 후, 항-CD3 항체(20 μ g/mL) 및 항-CD28 항체 (7 μ g/mL)로 30분간 자극한 다음, ERK, p38, JNK 및 이들의 인산화 수준을 상기와 같은 방법으로 확인하여 도 5B에 나타내었다. 도 5B에서 보는 바와 같이, 이 TCR 매개 자극에 의해 ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준이 증가되었지만 시트롭텐으로 전처리에 의하여 시트롭텐 용량 의존적으로 ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준이 억제되었다.

[0059] TNF α 에 의해 활성화된 HT-29 세포에서도 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 통한 시트롭텐의 조절 효과가 나타나는지 확인하고자 HT-29 세포를 재조합 TNF α 로 자극하는 것을 제외하고 상기와 동일한 방법으로 p65의 핵 전좌, I κ B α 의 인산화, ERK, p38, JNK의 인산화 수준에 대한 시트롭텐의 효과를 확인하여 도 5C 및 도 5D에 나타내었다. 도 5C 및 도 5D에서 보는 바와 같이, TNF α 에 의해 활성화된 HT-29 세포에서도 항-CD3/CD28 항체로 활성화된 T 세포에서와 매우 유사하게 활성화된 HT-29 세포에서 증가한 p65의 핵 전좌를 감소시켰으며, 증가된 I κ B α 의 인산화를 억제하였다. 또한, 활성화된 HT-29 세포에서 증가한 ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준을 용량 의존적으로 억제하였다. 즉, 시트롭텐 전처리는 활성화된 HT-29 세포에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로에 부정적인 영향을 미쳤음을 확인하였다. 이러한 결과는 시트롭텐을 사용한 전처리가 시험관 내에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 통해 T 세포 및 상피 장 세포의 활성을 억제함을 시사한다.

[0060] <실시예 6. DSS 유도 대장염 동물 모델에서 시트롭텐의 효과 확인>

[0061] 시트롭텐이 생체 내에서 염증성 대장염에 개선 효과가 있는지 알아보기 위해 DSS 유도 대장염 모델을 사용하여 이를 확인하였다. 20마리의 마우스를 다음과 같이 4개의 그룹으로 분류하였다: 담수를 공급한 마우스(water), 7일 동안 2.5% 덱스트란 황산염 나트륨(Dextran Sulfate Sodium, DSS)을 함유한 물을 공급한 마우스(DSS water), 7일 동안 2.5% DSS를 함유한 물을 공급하고 10 mg/kg의 시트롭텐을 매일 경구 투여를 받은 마우스(DSS water + CTP10), 7일 동안 2.5% DSS를 함유한 물을 공급하고 40 mg/kg의 시트롭텐을 매일 경구 투여를 받은 마우스(DSS water + CTP40). 도 6A에 실험 시간표를 모식화하여 나타내었다. 체중의 변화를 7일 동안 조사하였고, 대장염 병변의 진행 정도를 측정하기 위해 병리학적 기준에 따라 1일 대변점수를 측정하였다. 대변 점수는 매일 대변 모양의 변화를 확인하여 0(정상), 2(뭉은 변), 4(설사)로 나타내었다. 또한 염증성 대장염의 진행 정도를 공개된 기준에 따라 평가하기 위해 체중의 상대적 감소, 대변의 모양, 대변 및 항문 부위의 출혈을 포함하는 질병 활성 지수(Disease activity index, DAI)를 모니터링하였으며, 채점 기준은 다음과 같았다: 체중 감소: 0(손실 없음), 1(1-5%), 2(5-10%), 3(10-20%) 및 4(20% 이상); 대변 형태: 0(정상), 2(뭉은 대변) 및 4(설사); 및 항문 부위 출혈: 0(혈액 없음), 1(헤모컬트 양성), 2(헤모컬트 양성 및 육안 펠렛 출혈) 및 4(항문 주변 출혈).

[0062] 도 6B에서 보는 바와 같이, 2.5% DSS를 함유한 물을 먹인 마우스는 심각한 염증 반응으로 인해 마우스의 체중이 크게 감소했으며, 시트롭텐의 경구 투여는 DSS 함유 물 투여로 인한 체중 감소를 보호했다. 또한 도 6C에서 보는 바와 같이, 시트롭텐의 경구 투여를 받은 대장염 마우스는 대변 점수를 하향 조절함을 확인하였다. 도 6D는 실험 7일째에 찍은 마우스의 항문 사진으로, 시트롭텐을 경구 투여한 마우스 그룹에서 항문 출혈이 개선됨을 알 수 있었다. 또한 7일간 평가된 질병 활성 지수(DAI)는 시트롭텐의 경구 투여가 대장염 모델에서 다양한 질병 수준을 감소시키는 것을 확인했다. 이러한 결과는 시트롭텐의 경구 투여가 염증성 대장염의 징후를 개선함을 시

사한다.

[0063] <실시예 7. DSS 유도 대장염 동물 모델에서 시트롭텐의 대장 조직 내 효과 확인>

[0064] 시트롭텐의 경구투여가 DSS에 의하여 유도된 대장에 대한 조직 화학적 변화를 확인하였다. 먼저 상기 실시예 6에서 실험한 각 군의 마우스를 실험 7일째에 희생시켜 대장을 적출하고 그 길이를 측정하여 도 7A 및 도 7B에 나타내었다. 도 7A 및 도 7B에서 보는 바와 같이, 2.5% DSS 물을 먹인 쥐의 대장이 염증으로 인해 길이가 수축되었으며, 시트롭텐의 경구 투여는 용량 의존적 방식으로 대장 길이 감소를 예방했음을 보여주었다. 이후 상기 대장 조직 절편을 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin & eosin, H&E) 염색하여 도 7C에 나타내고, 상기 획득한 H&E 조직 염색에서 조직학적 점수를 Koelink, P.J. 등(2018)의 방법에 따라 측정하여 도 7D에 나타내었다. 도 7C에서 보는 바와 같이, DSS에 의하여 유도된 대장염에 의한 장 구조의 붕괴는 시트롭텐의 경구 투여에 의해 회복되었음을 나타내었다. 특히, 염증세포의 침윤, 상피 손상 및 음와 병변이 용량 의존적으로 개선되었다. 또한, 도 7D에서 보는 바와 같이, 시트롭텐의 경구 투여는 결장 조직의 염증 중증도를 개선한 것을 확인하였다.

[0065] 시트롭텐이 DSS에 의하여 유도된 대장에서 전염증성 사이토카인 생성을 감소시키는지 여부를 확인하였다. 상기에서 적출한 각 군의 마우스 대장 조직 내 TNF α , IL-1 β 및 IL-8의 mRNA 수준을 상기 실시예 3과 유사한 방법으로 실시간 정량적 PCR을 사용하여 결정하고 그 결과를 도 7E에 나타내었다. 도 7E에서 보는 바와 같이, 시트롭텐의 경구 투여가 결장 조직에서 DSS유도 대장염에서 증가된 TNF α , IL-1 β 및 IL-8의 mRNA 수준을 용량 의존적 방식으로 감소시켰다.

[0066] DSS 유도 대장염 동물 모델에서 시트롭텐의 경구 투여가 염증 반응을 억제하는 방법과 in vitro 결과와의 연관성을 입증하기 위해 결장 조직을 사용하여 상기 실시예 3과 유사한 방법으로 ERK, p38, JNK 및 이들의 인산화 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 그 결과를 도 7F에 나타내었다. 도 7F에서 보는 바와 같이, DSS에 의하여 증가된 대장 조직의 ERK, p38 및 JNK의 인산화는 시트롭텐 투여에 의하여 용량 의존적으로 감소하였으며, 이는 ERK, p38 및 JNK를 포함하는 MAPK 신호전달 경로가 대장염 모델에서 시트롭텐에 의해 조절됨을 시사한다.

[0067] <실시예 8. DSS 유도 대장염 동물 모델에서 시트롭텐의 T 세포 활동에 대한 효과 확인>

[0068] T 세포의 활동은 대장염의 주요 역할을 한다. 이에 따라 DSS 유도된 대장염 동물 모델의 장간막 림프절에 관한 정보를 수집하여 다른 그룹의 T 세포 활성화를 비교했다. 상기 실시예 6에서 실험한 각 군의 마우스를 실험 7일째에 희생시켜 장간막 림프절을 적출하고 그 길이 및 무게를 측정하여 도 8A 및 도 8B에 나타내었다. 도 8A 및 도 8B에서 보는 바와 같이, DSS 유도된 대장염 동물 모델에서 장간막 림프절의 길이 및 무게가 증가하였으며, 시트롭텐 투여에 의하여 이러한 증가가 감소되었다.

[0069] 시트롭텐이 대장염 모델에서 이펙터 T 세포의 활성을 억제하는지 알아보기 위해 DSS 유도 마우스의 장간막 림프절에서 RT-qPCR을 통해 IL-2, IFN γ 및 IL-17의 mRNA 수준을 측정하여 그 결과를 도 8C에 나타내었다. 도 8C에서 보는 바와 같이, DSS 유도 마우스의 장간막 림프절에서 증가된 IL-2, IFN γ 및 IL-17의 mRNA 수준은 시트롭텐에 의하여 상당히 감소하였다. 또한 DSS 유도 마우스의 장간막 림프절 내 ERK, p38, JNK 및 이들의 인산화 단백질 수준을 웨스턴 블로팅으로 확인하여 in vitro 결과와 in vivo 발현 간의 관계를 확인하였다. 도 8D에서 보는 바와 같이, DSS 투여에 의하여 증가된 ERK 및 JNK 인산화는 장간막 림프절에서 시트롭텐의 경구 투여에 의해 감소되었으며, p38 또한 DSS에 의하여 증가되어 시트롭텐에 의하여 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 시트롭텐의 적용이 DSS 유도 대장염 동물 모델에서 이펙터 T 세포의 활성을 약화시킨다는 것을 시사한다.

[0071] 상기와 같이, 본 발명에서 시트롭텐이 생체 내에서 DSS로 유도된 대장염의 증상을 완화시키는 것을 확인하였다. 즉, 시트롭텐은 세포독성 없이 시험관 내에서 NF κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 통해 T 세포 및 장 상피 세포의 활성을 효과적으로 조절하는 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 시트롭텐이 염증성 대장염 치료제의 성분으로서 유망한 잠재력을 가지고 있음을 시사한다.

[0072] IL-2를 포함한 활성화된 T 세포의 이펙터 사이토카인은 용해성 형태의 내분비, 주변분비 또는 자가분비 증식에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 자극 후 방출된 IL-2의 양이 중요하다. 여러 보고에서 이때 생성된 사이토카인이 VAMP 계열 또는 SNAP 분자를 포함하는 소포 이동 분자에 의해 엄격하게 제어되는 분비 과정을 거친다는 것이 밝혀졌다. 이에 따라 본 발명에서는 T 세포 활성화에 대한 시트롭텐의 억제 효과가 사이토카인 방출의 소포 이동과 관련이 있는지를 조사하기 위해 TCR 매개 자극 후에 생성되는 세포질 IL-2를 검출했다. 그 결과, 도 3C와 같이, T 세포 활동에 대한 시트롭텐의 조절 효과가 신호 경로의 하향 조절을 포함한 내재적 메커니즘을 통한 것임을 보여주었다. 또한 시트롭텐이 세포 표면에서 T 세포 활성의 마커인 CD69의 발현을 가소시키

는 결과(도 3D)는 시트롭텐이 T 세포 활성화에 대한 본질적인 억제를 유도할 수 있음을 뒷받침한다.

[0073] T 세포 및 B 세포를 포함하는 림프구는 장간막 림프절로 이동하여 항원을 만나고 염증성 대장염 동안 프라이밍 되고 증식하는 것으로 알려져 있다. 대장염 동안 장간막 림프절로 이동하는 세포의 수가 증가함에 따라 장간막 림프절의 크기와 무게가 증가하는 것이 알려졌으며, 이러한 림프절병증은 감염이나 알레르기 반응을 포함한 염증 반응 동안 국소 림프절의 종창으로 정의된다. 본 발명에서도 DSS에 의하여 장간막 림프절의 길이와 무게의 변화가 발견되었으며, 시트롭텐은 이러한 장간막 림프절의 길이와 무게를 상당히 감소시켰다(도 8B). 이러한 결과는 시트롭텐이 DSS 유발 대장염 동안 염증 반응의 조절에 의해 림프절병증의 징후를 개선함을 시사한다.

[0074] NF κ B 신호 전달 경로는 T 세포 활성화 및 분화에서 가장 중요한 전사 인자 중 하나이며, IL-12를 포함하여 필요한 사이토카인의 유도를 통해 Th1으로의 분극화에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 또한 NF κ B가 Th17 분화의 마스터 전사 인자인 ROR γ t(Retinoic-acid-receptor-related orphan receptor gamma)의 유전자 발현에 긍정적인 영향을 미침으로써 나이브 T 세포로부터 Th17 분화에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다. 본 발명에서는 시트롭텐이 시험관 내에서 NF κ B 신호 전달 경로를 통해 T 세포 활성화를 제어함을 보여주었다(도 5A).

[0075] 또한 장간막 림프절에서 IFN 및 IL-17의 mRNA 수준이 DSS 유도 대장염 모델에서 시트롭텐 투여에 의해 조절된다는 것을 확인하였으며(도 8C), 이러한 결과는 시트롭텐 투여가 NF κ B 신호 전달 경로의 조절을 통해 염증성 대장염의 병인에서 가장 중요한 소단위인 Th1 및 Th17 이펙터 T 세포로의 T 세포 분화에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

[0076] MAPK는 대장염을 포함한 여러 염증성 질환과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. MAPK 중에서 염증 반응에서 가장 많이 평가되는 서브유닛인 ERK1/2 경로는 IBD의 진행 및 발달과 IL-1 및 IL-21과 같은 전염증성 사이토카인의 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 특히 p38의 억제제 연구 결과는 p38의 인산화가 IBD 조직에서 극적으로 강화된다는 것을 보여주었다. 또한, 여러 연구에서 IBD 환자에서 JNK의 높은 인산화 수준이 검출되었으며, JNK의 억제제 분석 결과 염증 유발성 사이토카인의 발현이 동물 모델의 억제제 투여군에서 상당히 하향 조절되었음을 밝혔다. 이에 따라 본 발명에서는 ERK, p38 및 JNK의 인산화 수준이 시트롭텐 투여에 의해 DSS 그룹의 결장 조직에서 현저하게 감소됨을 발견하였다(도 7F). 이러한 결과는 상피 장 세포의 활성화에 대한 시트롭텐의 조절 효과를 보여주는 시험관 내 데이터와 매우 관련이 있다(도 5D).

[0077] 한편, 접착 분자로 알려진 ICAM1 및 VCAM1의 발현은 염증성 대장염 환자의 장 상피 세포에서 상향 조절되는 것으로 알려져 있다. ICAM과 VCAM1의 발현증가는 백혈구가 염증성 대장염의 병변으로 이동하는 데 중요한 역할을 하기 때문에 여러 연구에서 염증성 대장염의 치료 표적으로 ICAM1과 VCAM1의 활성을 차단할 검토하고 있다. 이는 백혈구의 이동과 염증성 백혈구와 장 상피 세포 사이의 상호 작용이 염증성 대장염 발병에 매우 중요함을 시사한다. 본 발명에서는 시트롭텐 처리가 TNF α 처리를 통해 활성화된 장 상피 세포에서 ICAM1 및 VCAM1의 mRNA 수준을 완화한다는 것을 확인했다(도 4B). 또한 시트롭텐 처리에 의해 대장염 발병 시 백혈구의 화학 유인물질인 IL-8의 발현이 하향조절됨을 확인하였다. ICAM1, VCAM1 및 IL-8의 발현에 대한 시트롭텐의 이러한 조절 효과는 염증성 대장염에 대한 신약 개발에 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

[0078] 또한 상기 시트롭텐은 궤양성 대장염 및 크론병을 포함하는 염증성 장질환의 관해기에 장기 복용함으로써 염증 발생기를 완화하고 직접적인 예방, 개선 및 치료 효과를 기재할 수 있다.

[0079] <제제예 1. 약학적 제제>

[0080] 제제예 1-1. 정제의 제조

[0081] 본 발명의 시트롭텐 200mg을 락토즈 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활성 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0082] 제제예 1-2. 주사액제의 제조

[0083] 본 발명의 시트롭텐 100mg, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100mL를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0084] <제제예 2. 건강기능식품의 제조>

[0085] 제제예 2-1. 건강기능식품의 제조

[0086] 본 발명의 시트롭텐 2g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg,

비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0087]

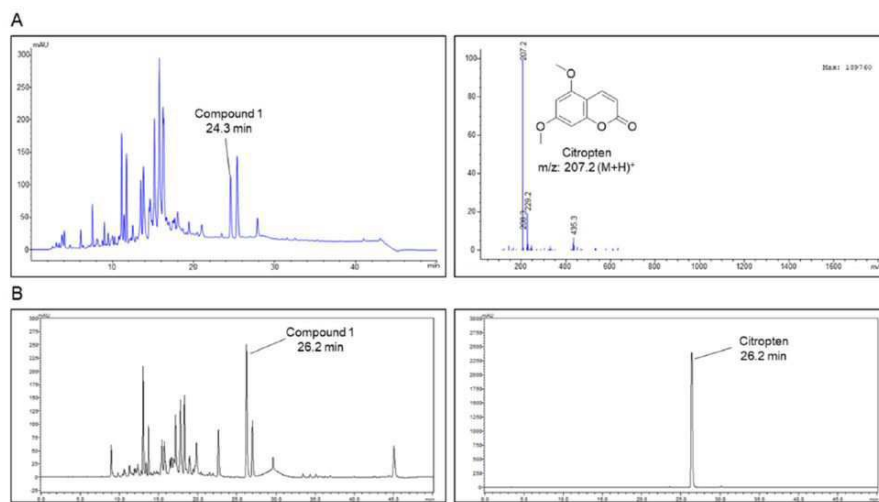
제제예 2-2. 건강기능성 음료의 제조

[0088]

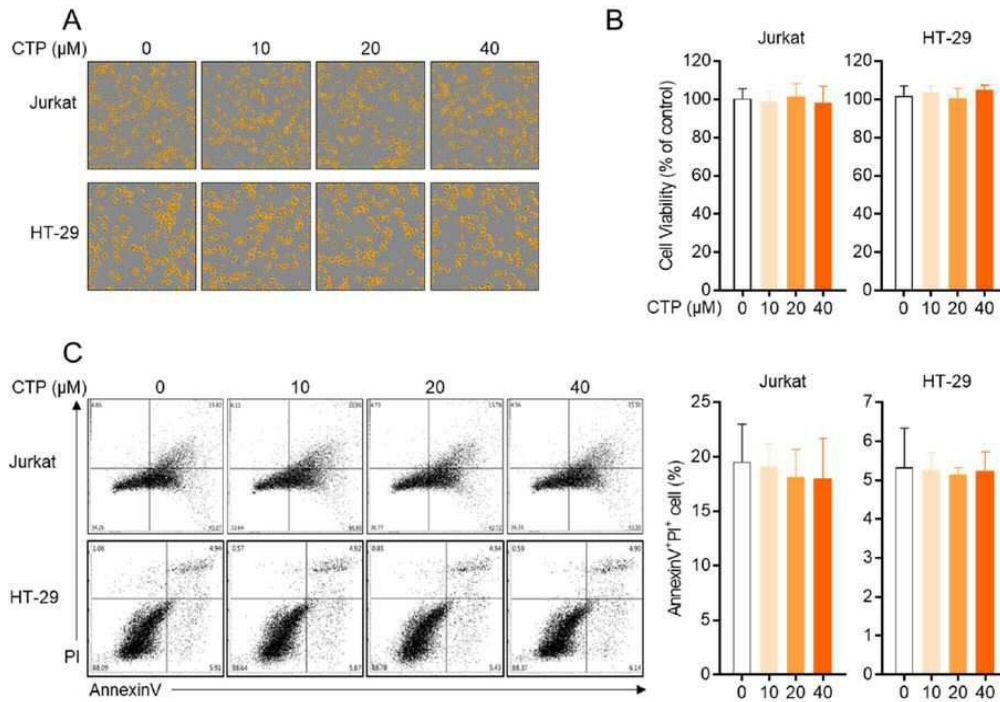
본 발명의 시트로펜 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

도면

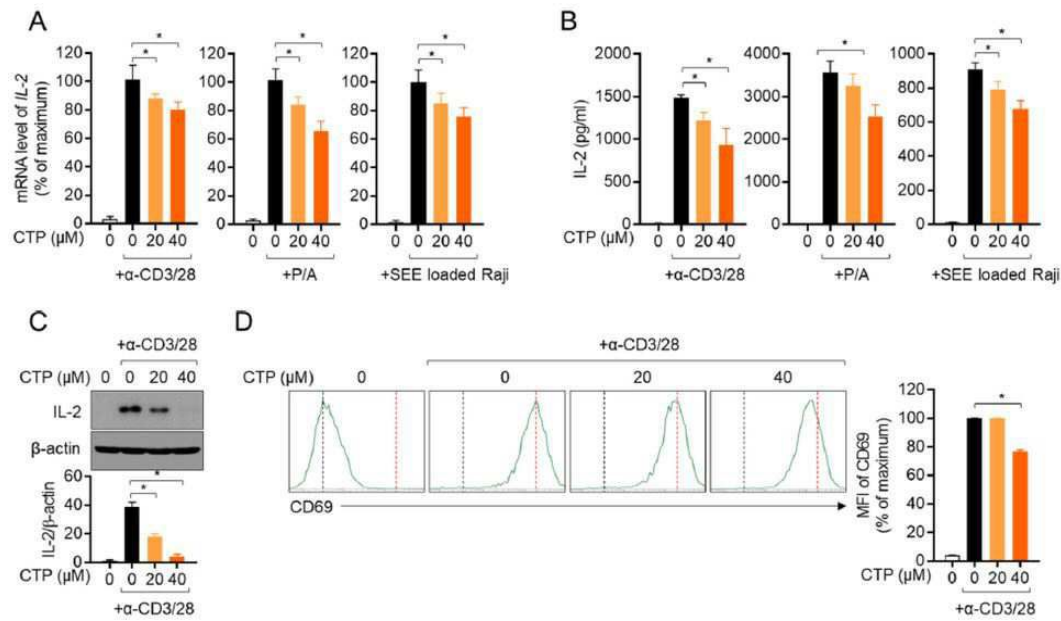
도면1



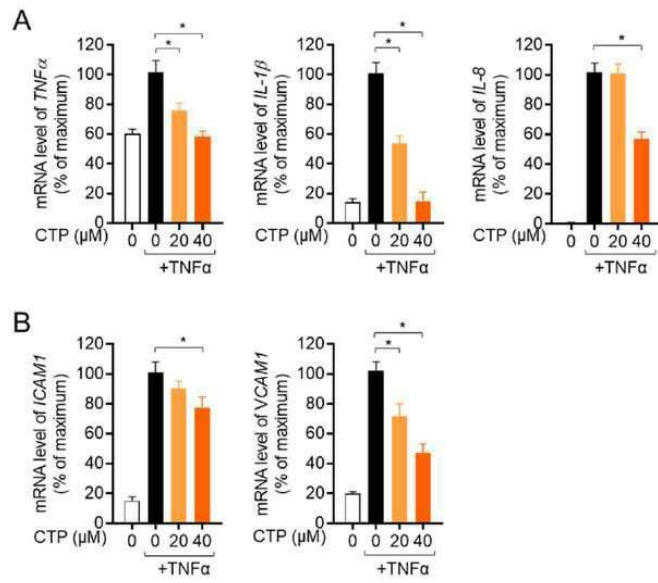
도면2



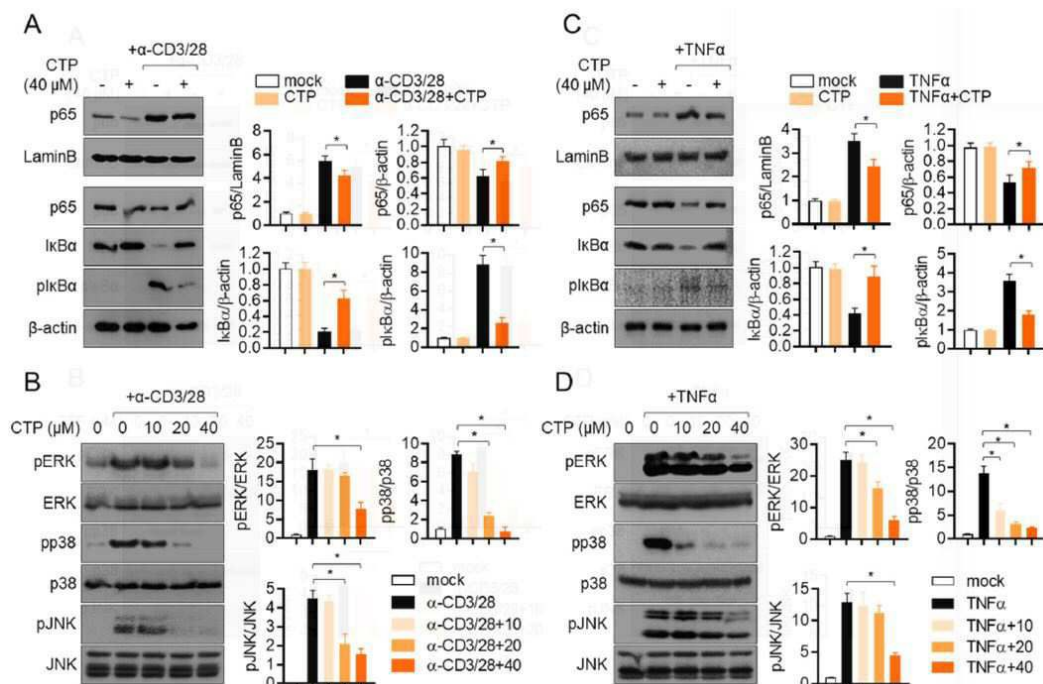
도면3



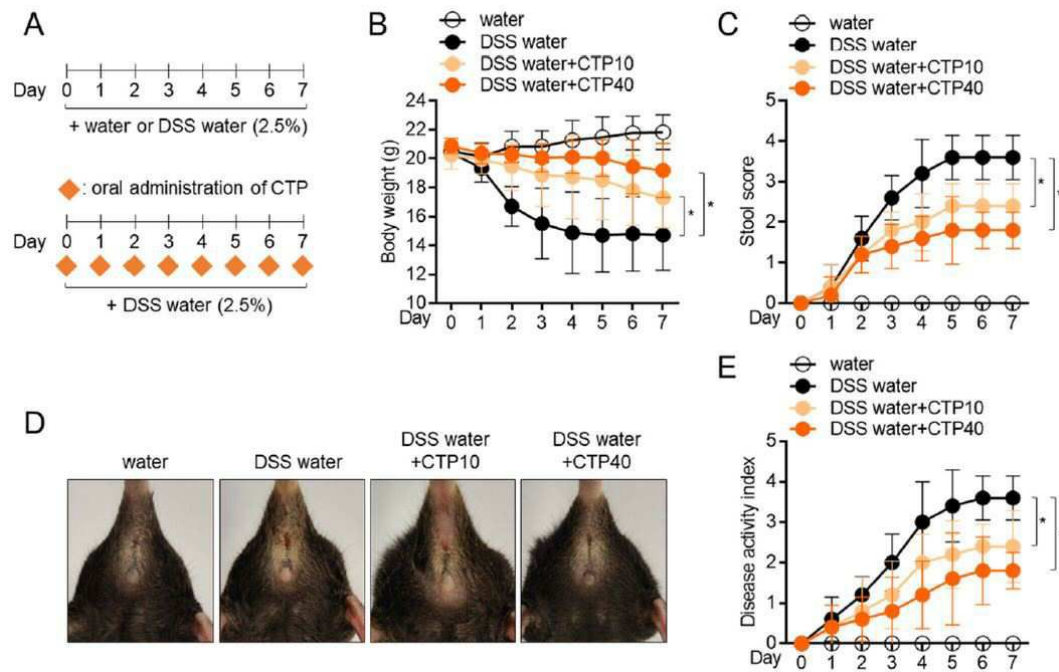
도면4



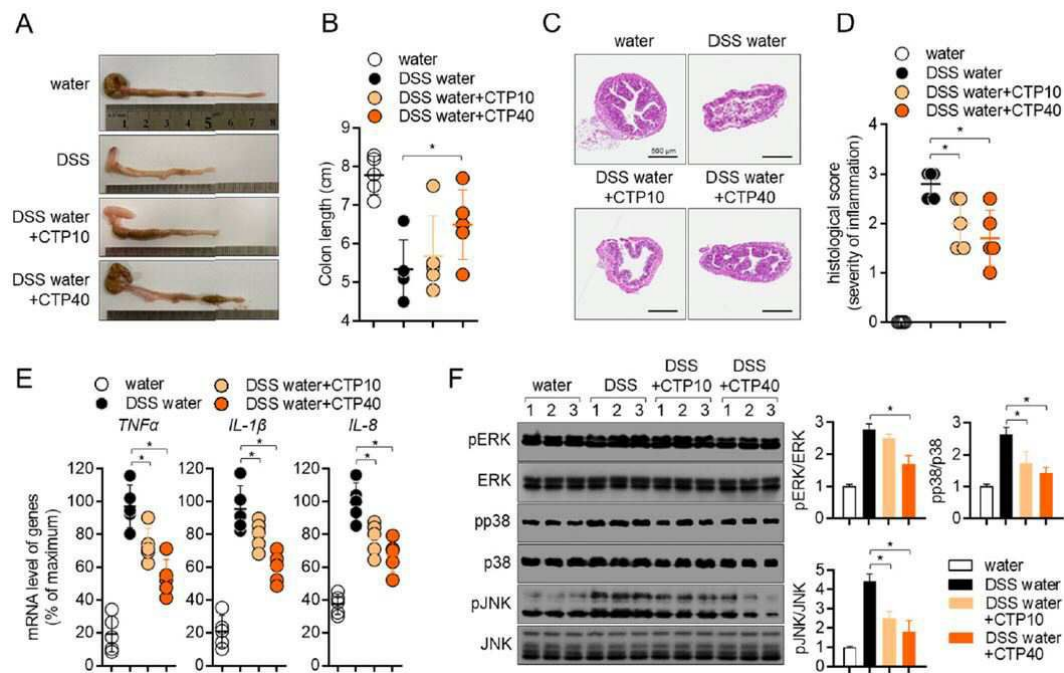
도면5



도면6



도면7



도면8

