

(11) 공개번호 10-2020-0079382
(43) 공개일자 2020년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/37 (2006.01) **A61P 1/04** (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/37 (2013.01)
A61P 1/04 (2018.01)

(21) 출원번호 **10-2018-0168486**

(22) 출원일자 **2018년12월24일**
심사청구일자 **2018년12월24일**

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자
이근옥
강원도 춘천시 한림대학길 1 한림대학교 생명과학
관 8411호
비카시 타파
#202, 23-2, Seongsim-ro, Chuncheon-si,
Gangwon-do
박성원
강원도 속초시 청대로232번길 13-9 (조양동)

(74) 대리인
특허법인키

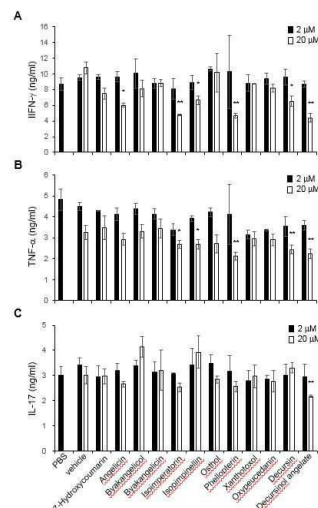
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료 조성물**

(57) 요약

본 발명은 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료 및 타입 17 헬퍼 T (Th17) 세포 반응에 대한 억제용 조성물 및 그 방법에 관한 것으로, 본 발명을 통하여 데커시놀 안젤레이트의 타입 17 헬퍼 T 세포 반응 대한 억제 효과를 확인하였고, DSS-유도된 대장염(colitis) 모델을 사용하여, DA 처리는 DSS 투여에 의하여 유도된 대장 조직 손상으로부터 보호 및 대장 단축, 체중 손실의 감소를 포함한 대장의 중증을 약화시켰으며, 대장염 마우스의 대장 조직에 중호구와 동반하는 Th17 세포들은 DA 처리에 의하여 현저하게 감소하였으므로 이러한 결과는 DA가 IBD와 같은 Th17 세포 반응과 관련된 염증 질환을 치료하는 잠재적인 치료제일 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 31628-3
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 농생명산업기술개발사업
연구과제명 노인성질환 관련 in vivo 및 in vitro 활성 검증
기 여 율 40/100
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2016.05.19 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M3A9D5A01073841
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 국가마우스표현형분석사업
연구과제명 마우스 면역표현형 및 감염 면역반응성 분석 기술 구축과 서비스 기반 확립
기 여 율 30/100
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2014.12.26 ~ 2019.07.19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018M3A9H3025030
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업
연구과제명 궤양성대장염 치료를 위한 맞춤형 분변미생물이식 기술개발
기 여 율 30/100
주관기관 연세대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서 상기 대장염은 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD), 과민성 대장염 증후군((irritable bowel syndrome, IBS), 궤양성 대장염(ulcerative colitis; UC) 및 크론병(Crohn's disease; CD)으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 유효성분으로 포함하는 타입 17 헬퍼 T (Th17) 세포 반응에 대한 억제용 조성물.

청구항 4

데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 대상에 처리하여 해당 대상에서 타입 17 헬퍼 T (Th17) 세포 반응을 억제하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 대상은 인간을 제외한 동물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 유효성분으로 포함하는 전염증성 사이토카인의 분비 억제용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 전염증성 사이토카인은 TNF-알파 또는 IFN-감마인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 대상에 처리하여 해당 대상에서 전염증성 사이토카인의 분비를 억제하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 대상은 인간을 제외한 동물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 유효성분으로 포함하는 CD4 T 세포에서 IL-17 발현 억제용 조성물.

청구항 11

데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 인 비트로에서 CD4 T 세포에 처리하여 해당 세포에서 IL-17 발현을 억제하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대장염은 대장에 염증이 발생하는 질환으로, 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD), 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)등을 포함한다.

[0003] 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD) 중 대표적인 질환인 궤양성 대장염(ulcerative colitis; UC)과 크론병(Crohn's disease; CD)은 아직 원인이 명확히 밝혀져 있지 않고 있으며, 복통과 더불어 심한 만성 설사와 혈성 설사를 일으킬 수 있으며, 완치가 힘들고 호전과 악화를 반복하는 특성이 있다. 궤양성 대장염은 대장의 점막에 진무름(미란)이나 궤양이 연속적으로 형성되는 질환으로, 혈변, 점혈변, 설사, 복통이 일어나고, 중증인 경우에는 발열, 체중감소, 빈혈 등의 전신성의 증상이 나타난다.

[0004] 또한, 궤양성 대장염은 위장관 어느 부위에서도 발생할 수 있다. 크론병은 입에서 항문에 이르는 소화관의 임의 부위에 궤양 등의 병변이 비연속적으로 발생하는 질환으로서, 복통, 설사, 혈변과 더불어, 중증의 경우에는 발열, 하혈, 체중감소, 전신권태감, 빈혈 등의 증상이 나타난다. 궤양성 대장염과 크론병은 병변과 염증 증상에 있어서 차이가 있지만 여러 면에서 유사한 양상을 보이기 때문에 두 질환의 구분이 서로 명확하지 않은 경우가 흔하다.

[0005] 종래, 궤양성 대장염 및 크론병의 발생율은 서양인에게 높다고 알려져 있었지만, 최근, 식습관 등의 생활습관의 변화로 인해 우리나라 등 동양에서도 환자수가 급증하고 있다. 그렇지만, 원인이 불분명한 이유도 있어 근본적 치료법은 확립되어 있지 않다. 이 때문에 완전한 치료를 목표로 하는 것이 아니라, 증상을 완해시키고, 이러한 상태를 가능한 한 장기간 유지하는 약제가 사용되고 있는 실정이다.

[0006] 이러한 대증요법을 위한 약제로서, 주로 아미노살리실산제제, 부신피질 스테로이드제, 면역억제제 등이 사용되지만, 다양한 부작용이 보고되고 있다. 예를 들어, 아미노살리실산제제로서 자주 사용되는 살라조설파피리딘은 구역질, 구토, 식욕부진, 발진, 두통, 간장해, 백혈구 감소, 이상 적혈구, 단백뇨, 설사 등의 부작용이 보고되고 있다. 또한 부신피질스테로이드제는 일반적으로는 프레드니솔론의 경구투여, 관장, 좌약, 정맥 주사 등으로 사용되지만, 위궤양이나 장기사용에 의한 대퇴골두 괴사 등 부작용이 강하다. 그러나 투약의 중단은 증상을 재발시키기 때문에, 이들 약제는 계속적으로 사용하지 않을 수 없다.

[0007] 따라서, 효과가 우수하면서도, 안전하고 부작용을 일으키지 않는 궤양성 대장염, 크론병 등의 장질환 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0008] 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS)도 마찬가지로 그 원인이 명확하지 않은 만성 복부 질환이다. 현재, IBS의 근본적인 치료제는 존재하지 않으며, 각 타입의 증상 경감을 목적으로 한 대증요법이 행해지고 있다. 예를 들어, 하리형 IBS에 대해서는 평활근의 수축을 억제하는 진경작용을 갖는 항콜린제가 사용되며, 변비형 IBS에는 염류 하제, 대체형 IBS에는 약제로 조절하기 곤란하고, 기본적으로 소화관 운동기능 개선제가 사용되고 있다.

[0009] 이러한 대장염을 치료하기 위하여, 부작용이 적은 천연물로부터 대장염을 치료할 수 있는 조성물을 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 예를 들어, 한국등록특허 제1466308호에는 지모 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장염 치료용 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 1526467호에는 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장염 치료용 조성물이 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 신규한 타입 17 헬퍼 T (Th17) 세포 반응에 대한 억제용 조성물 및 그 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 유효성분으로 포함하는 대장염 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 대장염은 염증성 대장 질환(Inflammatory bowel disease; IBD), 과민성 대장염 증후군(irritable bowel syndrome, IBS), 궤양성 대장염(ulcerative colitis; UC) 및 크론병(Crohn's disease; CD)으로 구성된 군으로부터 선택된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0014] 또 본 발명은 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 유효성분으로 포함하는 타입 17 헬퍼 T (Th17) 세포 반응에 대한 억제용 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 대상에 처리하여 해당 대상에서 타입 17 헬퍼 T (Th17) 세포 반응을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 대상은 인간을 제외한 동물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0017] 또 본 발명은 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 유효성분으로 포함하는 전염증성 사이토카인의 분비 억제용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 전염증성 사이토카인은 TNF-알파 또는 IFN-감마인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0019] 또 본 발명은 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 대상에 처리하여 해당 대상에서 전염증성 사이토카인의 분비를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0020] 또 본 발명은 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 유효성분으로 포함하는 CD4 T 세포에서 IL-17 발현 억제용 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)를 인 비트로에서 CD4 T 세포에 처리하여 해당 세포에서 IL-17 발현을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명에서 상기 대장염은 세균 감염이나 장 내용물의 병적 발효 등으로 인해 대장에 염증이 발생한 상태를 말하며, 감염성 대장염과 비감염성 대장염을 포함하는 개념이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물을 통해 예방 또는 치료가 가능한 구체적인 대장염의 종류는 염증성 대장 질환 또는 과민성 대장염 증후군 등이 있으나, 여기에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 염증성 대장 질환은 예를 들어 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 또는 크론병(Crohn's disease) 등이 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물을 통해 예방 또는 치료가 가능한 대장염은 급성 대장염과 만성 대장염 모두를 포함한다. 상기 급성 대장염은 급성으로 오는 대장 또는 결장의 염증을 말하는데, 염증으로 인해 점막이 손상되어 점액성 설사나 선혈 증상을 주로 보인다. 본 발명에서 급성 대장염은 일반적인 급성 감염성 대장염뿐만 아니라 급성 위막성 대장염 및 급성 궤양성 대장염을 포함한다.
- [0024] 상기 조성물이 약학적 조성물의 형태로 제공이 되는 경우에는, 본 발명의 상기 화합물 이외에 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.
- [0025] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 아울러, 펩티드 제제에 대한 경구투여용으로 사용되는 다양한 약물전달물질을 포함할 수 있다. 또한, 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코오스 및 글리콜 등을 포함할 수 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 등을 추가로 포함할 수 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)

- [0028] 본 발명의 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화할 수 있다.
- [0030] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다.
- [0031] 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)에 기재되어 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 0.001 μ g 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1 μ g 내지 1,000mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설물 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.
- [0034] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [0035] 한편, 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 본 발명의 혼합물을 포함하는 조성물의 투여로 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 본 발명의 혼합물을 포함하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0036] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0037] 본 발명은 당귀(*Angelica gigas*)의 면역 조절 성분으로 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate; 이하, 'DA'라 함)를 동정하고 그것의 타입 17 헬퍼 T (Th17) 세포 반응 대한 억제 효과를 확인하였다. *Ex vivo* 헬퍼 T 세포 배양 실험은 DA가 CD4 T 세포의 생존 및 증식에 영향을 미치지 않고, IL-17 생산 및 Th17 세포의 분화를 방해하였다는 것을 나타내었다. DSS-유도된 대장염(colitis) 모델을 사용하여, 본 발명자들은 염증성 장 질환(IBD)의 치료를 위한 DA의 치료 능력을 결정하였다. DA 처리는 DSS 투여에 의하여 유도된 대장 조직 손상으로부터 보호 및 대장 단축, 체중 손실의 감소를 포함한 대장의 증상을 약화시켰다.
- [0038] 대장염 마우스의 대장 조직에 중호구와 동반하는 Th17 세포들은 DA 처리에 의하여 현저하게 감소하였다. 전체적으로, 본 발명의 결과는 DA가 IBD와 같은 Th17 세포 반응과 관련된 염증 질환을 치료하는 잠재적인 치료제일 수 있다는 것을 시사한다.
- [0039] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0040] 당귀의 항염 성분으로 Decursinol angelate는 CD4 T 세포의 전염증성 사이토카인 생성을 억제함
- [0041] 본 발명자들은 당귀의 화학적 성분의 *ex vivo* T 세포 활성화에 대한 효과를 class II-MHC restricted 및

ovalbumin 특이적인 OT-II T 세포를 사용하여 테스트하였다.

- [0042] 몇 종류 화합물로 처리는 CBA(cytokine bead array)에 의하여 측정된 항원-자극된 OT-II T 세포로부터 TNF-알파 및 IFN-감마와 같은 전염증성 사이토카인의 분비를 강력하게 약화시켰다(도 1A & B).
- [0043] 테스트된 화합물 중에서, DA(decursinol angelate)는 CD4 T 세포의 IL-17 생성을 현저하게 억제할 수 있었다(도 1C). IL-17는 Th17 세포에 의하여 주로 생성되고, 염증성 장 질환을 포함한 염증성 질환 및 자가 면역 질환과 관련된다. 따라서 본 발명자들은 IBD와 같은 Th17-관련된 염증성 질환 및 Th17 면역 반응에 대한 DA의 효과를 더욱 결정하였다.
- [0045] Decursinol angelate는 CD4 T 세포의 IL-17 발현 및 Th17 세포 분화를 저해함
- [0046] DA의 Th 서브세트에 대한 면역조절 활성을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 CD4 T 세포를 Th1, Th2, 및 Th17 세포 폴라라이징 조건 하에서 DA의 존재에서 배양하였다. 유동 세포 분석은 DA 처리는 Th17-폴라라이즈된 세포에서 용량 의존적으로 IL-17의 세포내 발현의 감소를 야기하였다는 것을 나타내었다(도 2A).
- [0047] DA는 또한 IFN-감마의 Th1 세포에서 발현을 저해하였지만, Th2 세포에서 IL-4의 발현에는 영향을 미치지 않았다(도 7a & 7b).
- [0048] 배양 상등액을 이용한 CBA 결과는 활성화된 Th17 세포로부터 IL-17 분비를 DA가 현저하게 억제한다는 것을 확인하였다(도 2B).
- [0049] 또한 본 발명자들은 IL-17A mRNA 발현이 DA-처리된 Th17 세포에서 감소된 것을 관찰하였고, 이것은 DA가 전사 레벨에서 IL-17의 유도를 저해한다는 것을 시사한다(도 2C).
- [0050] 비록 DA는 IFN-감마 및 TNF-알파의 유도를 항원-자극된 OT-II T 세포 및 Th1 세포에서 약화시켰지만(도 1 및 도 2), DA는 Th17 배양으로부터 이들 사이토카인의 생산에는 영향을 미치지 않았다(도 2B).
- [0051] *Rorc*의 mRNA 레벨(ROR γ t를 코딩하는) DA 처리에 의하여 Th17 세포에서 현저하게 약화되었지만, *Tbx21* (T-bet를 코딩하는)의 레벨은 영향이 없었다(도 2D).
- [0052] 이 결과들은 DA가 Th17 세포의 프로그래밍을 네가티브하게 조절하여 IL-17의 손상된 생성을 야기한다는 것을 시사한다.
- [0053] 본 발명자들이 Th17 배양으로부터 분비된 항염증성 사이토카인 IL-10을 측정하였을 때, 본 발명자들은 DA 처리에 의하여 IL-10의 증가된 생산이 관찰되지 않았다(도 2B). 심지어 Treg 폴라라이징 조건 하에서, DA는 FoxP3⁺ Treg 세포의 유도에 영향이 없었다(도 7c).
- [0054] 이 결과들은 DA의 Th17 세포에 대한 항염증 활성은 Treg 세포의 면역 조절에 대한 2차적인 효과에 기인하는 것은 아니라는 것을 시사한다.
- [0056] CD4 T 세포의 생존 및 증식에 대한 decursinol angelate의 효과
- [0057] DA이 항염 효과는 세포독성 및/또는 활성화된 CD4 T 세포의 익스팬전을 약화하여 기인하는 것 같다. 그러나 DA는 CD4 T 세포의 생존률을 40 mM 농도까지 영향이 없었다(도 3A).
- [0058] Annexin-V 염색 결과는 DA가 T 세포의 에팍토시스를 유도하지 않는다는 것을 나타내었다(도 3B).
- [0059] EdU 업테이크 어세이를 사용하여, 본 발명자들은 세포 사이클링 활성화된 CD4 T 세포에 대한 DA의 효과를 Th17 배양에서 측정하였다. 도 3C는 EdU⁺ 세포의 속도는 DA 처리에 의하여 감소하지 않았고, 이것은 DA가 CD4 T 세포의 생존 및 증식과 독립적으로 Th17 세포의 사이토카인 생성 및 분화를 네가티브하게 조절한다는 것을 시사한다.
- [0061] Decursinol angelate는 dextran sulphate sodium-유도된 대장염을 개선시킴
- [0062] DA가 IBD를 치료하는 치료 가능성을 가지는지를 탐구하기 위하여, 본 발명자들은 murine 궤양성 대장염(UC) 모

텔을 사용하였다.

- [0063] 7일간 음용수에 DSS를 주어진 마우스는 설사를 포함한 질환 증상 및 체중 감소와 관련된 UC 증상을 나타내었다(도 4A-C).
- [0064] 마우스를 2일 마다 DA로 처리하였을 때, DSS의 투여에 의하여 촉발된 체중 감소 및 대장염 증상은 현저하게 개선되었다(도 4A-C).
- [0065] 본 발명자들은 또한 비히클 처리된 마우스 보다 DA-처리된 마우스에서 대장의 길이 및 맹장의 크기가 더 길고 더 커진 것을 관찰하였다(도 4D).
- [0066] DA 처리는 전신성 염증의 지표인 plasma IL-6의 대장염-유도된 업레귤레이션을 현저하게 억제하였다(도 4E).
- [0067] 대장 절편의 조직학적 평가는 DSS 투여가 상피 구조의 파괴, 세포적 여과, 손상된 크립트(crypt) 구조 및 근육 비후(muscle thickening)를 포함하는 대장염의 조직병리학을 야기한다는 것을 나타내었다(도 4F).
- [0068] 대조적으로 DA 처리는 DSS-유도된 조직병리학적 변화 및 대장 내의 면역 세포 투과로부터 마우스를 보호하였다(도 4F). 이 결과들은 DA가 마우스에서 DSS-유도된 대장염의 증상 및 중증도를 개선할 수 있다는 증거를 제공한다.
- [0070] Decursinol angelate는 대장에서 중호구의 모집 및 Th17 세포의 DSS-유도된 활성화를 억제함
- [0071] DA의 Th17 반응에 대한 *in vivo*에서 저해 효과를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 DSS-투여한 마우스에서 대장의 상피 및 림프절을 취하여 면역 세포를 분리하고 특성을 살펴보았다.
- [0072] IL-17-생산하는 Th17 세포들은 대장염 유도에 의하여 점막 고유층(lamina propria), 장간막의 림프절 및 대장 transepithelium에서 크게 증가하였지만, IFN-감마-생산하는 Th1 세포들은 점막 고유층에서만 업레귤레이트되었다(도 5A). 흥미롭게도, DA 처리는 대장염 마우스에서 Th17 세포의 유도를 현저하게 감소시켰다(도 5A).
- [0073] 반면에, DA는 림프절과 대장 조직에서 DSS-촉발된 Th1 반응 세포들을 저해하지 않았다. *in vitro* 데이터와 일치되게(도 2), 이들 결과들은 DA의 Th17 반응의 기능 및 활성화에 대한 면역조절 가능성을 확인한다.
- [0074] 본 발명자들은 대장 조직에서 $CD11b^{+} Gr-1^{+}$ 세포의 큰 대장염 유도된 증가를 관찰하였다(도 5B).
- [0075] Th17 세포들의 감소된 유도와 일치하게, DA 처리는 대장염 마우스의 대장 조직에서 $CD11b^{hi} Gr-1^{hi}$ 호중구 군의 모집을 현저하게 약화시켰다(도 5B).
- [0076] DSS 투여에 대한 림프절과 대장 조직 내에서 항 염증성 Treg 세포들도 증가하였다. 비록 DA가 인 비트로에서 Treg 세포들의 IL-10 생성 및 FoxP3 유도에는 영향을 미치지 않았지만, DA 처리는 대장염 마우스의 대장 조직에서 Treg 세포들의 출현율을 크게 감소시켰다(도 7).
- [0077] 전체적으로, 본 발명의 데이터는 DA가 DSS-유도된 대장염을 Th17 세포들의 조절을 통하여 개선하고 이것은 대장 조직에서 호중구의 모집에 기여한다는 것을 시사한다.

발명의 효과

- [0079] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)의 타입 17 헬퍼 T (Th17) 세포 반응에 대한 억제 효과를 확인하였고, DSS-유도된 대장염(colitis) 모델을 사용하여, DA 처리는 DSS 투여에 의하여 유도된 대장 조직 손상으로부터 보호 및 대장 단축, 체중 손실의 감소를 포함한 대장의 중증을 약화시켰으며, 대장염 마우스의 대장 조직에 중호구와 동반하는 Th17 세포들은 DA 처리에 의하여 현저하게 감소하였으므로 이러한 결과는 DA가 IBD와 같은 Th17 세포 반응과 관련된 염증 질환을 치료하는 잠재적인 치료제일 수 있다는 것을 시사한다.

도면의 간단한 설명

- [0080] 도 1은 당귀의 면역조절 성분이 Decursinol angelate라는 것을 나타낸 그림.

(A) OT-II 마우스로부터 분리된 림프절 세포들을 당귀의 화학적 성분으로 처리하고 0.2 μ g/ml ova 펩타이드로 IL-2의 존재하에서 활성화하였다. OT-II T 세포 활성화 5일 후, 배양 상등액을 CBA 어세이로 분석하였다. 데이터는 세 독립적인 실험으로부터 얻은 평균($\pm$ SD) 사이토카인 레벨을 나타낸다: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

도 2는 DA가 Th17 분화 및 기능을 억제하는 것을 나타낸 그림,

정제된 CD4⁺ T 세포들을 활성화하고 5일 동안 DA의 존재 하에서 Th17 폴라라이징 조건 하에서 배양하였다.

(A) 세포들을 50 ng/ml PMA 및 1 μ g/ml ionomycin로 6시간 동안 처리하고 세포내 사이토카인 염색(ICS)에 의하여 분석하였다. 대표적인 FACS 프로파일을 살아있는 CD4 T 세포 게이트에서 나타냄: 삽도(inset) 넘버들은 세 독립적인 실험으로부터 얻은 IL-7⁺ 세포들의 평균($\pm$ SD) 퍼센트를 나타냄.

(B) Th17-폴라라이즈된 T 세포들을 anti-CD3e 및 anti-CD28로 24시간 동안 재자극화하고, 그 배양 상등액을 CBA로 분석하였다(C & D). CD4 T 세포들을 5일간 Th17 폴라라이징 조건 하에서 배양하고, qRT-PCR을 수행하였다. 기재된 mRNAs의 농도를 *Actb*의 것으로 표준화하고 세 반복 실험으로부터 상대적인 레벨의 평균($\pm$ SD)을 나타내었다: $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

도 3은 DA의 CD T 세포들의 생존 및 증식에 대한 효과를 나타낸 그림. 정제된 CD4 T 세포를 anti-CD3 및 anti-CD28로 DA의 존재 또는 부존재에서 3일간 활성화하였다. 세포 생존률(A)을 Ez-Cytox 키트로 결정하고, 에팍토시스(B)를 Annexin-V 염색으로 평가하였다. 데이터는 세 독립적인 실험으로부터 얻은 평균($\pm$ SD)을 나타낸다.

(C) CD4 T 세포를 A에서와 같이 배양하고 EdU로 12시간 동안 펄스한 후 유동 세포분석법으로 분석하였다. 살아있는 CD4 T 세포 게이트에서 대표적인 히스토그램을 나타내고, 세 독립적인 실험을 평균화한 EdU⁺ 세포의 평균($\pm$ SD)을 나타낸다.

도 4는 DA가 마우스에서 DSS-유도된 대장염을 개선한다는 것을 나타낸 그림,

(A) 실험 과정이 도식적 그림.

(B & C) 체중 및 대장염 중증도를 9일간 모니터하였다.

7일에서 체중(B) 및 질환 활성 지수(DAI)(C)의 평균($\pm$ SEM) 퍼센트를 $n = 6$ 에 대해 나타냄; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

(D) 9일에, 마우스를 안락사시키고 그 대장을 분리하여 촬영하였다. 대장 길이를 측정하였다.

(E) 9일 혈장에서 IL-6 레벨을 CBA로 분석하였다. (F) 포르말린-고정화된 대장을 절편화하고 hematoxylin 및 eosin (H&E)로 염색하였다. 대표적인 H&E 염색된 절편 및 조직학적 스코어의 평균($\pm$ SD)을 나타냄: $n = 3$; *, $p < 0.05$.

도 5는 DA가 DSS-투여된 마우스의 대장에서 Th17 세포들의 활성화 및 호중구의 모집을 약화시키는 것을 나타낸 그림.

(A) 마우스를 도 4에 나타낸 것과 같이 DSS-위터로 투여하고, 백혈구를 장간막 림프절(MLN), 대장 transepithelium (colon:TE) 및 점막 고유층(colon:LP)으로부터 분리하였다. 세포들을 50 ng/ml PMA 및 1 μ g/ml ionomycin으로 5시간 동안 자극하고 ICS으로 분석하였다. 살아있는 CD4 T 세포 게이트에서 IL-17⁺ 및/또는 IFN- γ ⁺ 세포들의 출현율을 나타내는 삽도 넘버를 가지는 대표적인 FACS 프로파일을 나타낸다. IL-17A⁺ 세포들의 평균($\pm$ SD) 퍼센트를 세 독립적인 실험으로부터 계산하였다.

(B) 대장 transepithelium 및 lamina에서 과립구 군의 투과를 유동세포분석법으로 분석하였다. 세 독립적인 실험으로부터 얻은 CD11b^{hi} Gr-1^{hi} 호중구의 평균($\pm$ SD) 출현율 및 살아 있는 백혈구 게이트에서 대표적인 FACS 프로파일을 나타냄.

도 6은 DA의 Th1, Th2, 및 Treg 세포 분화에 대한 효과를 나타낸 그림:

정제된 CD4⁺ T 세포들을 DA의 존재 또는 부존재에서 Th1 (a), Th2 (b) 및 Treg (c) 폴라라이징 조건 하에서 5일간 배양하였다.

(a & b) 세포들을 PMA 및 ionomycin으로 6시간 동안 재자극하고 세포내 사이토카인 염색으로 분석하였다. IFN-

g^+ 및 $IL-4^+$ 세포들의 평균($\pm$ SD) 출현율을 나타내는 샵도 넘버를 가지는 살아있는 CD4 T 세포 게이트에서 대표적인 FACS 프로파일을 나타냄.

(c) Treg 세포들을 5일간 배양하고 FoxP3 발현을 유동 세포분석법으로 측정하였다. $GITR^+ FoxP3^+$ 세포들의 평균($\pm$ SD) 출현율을 나타내는 샵도 넘버를 가지는 살아있는 CD4 T 세포 게이트에서 대표적인 FACS 프로파일을 나타냄.

도 7은 대장염 마우스의 대장에서 DA 처리가 Treg 세포들의 유도를 네가티브하게 조절한다는 것을 나타낸 그림.

림프구를 장간막 림프절 (MLN, a), 대장 transepithelium (colon:TE, b) 및 점막 고유층(colon:LP, c)으로부터 분리하여 FoxP3 염색 키트로 염색하였다. $GITR^+ FoxP3^+$ 세포들의 출현율을 나타내는 샵도 넘버를 가지는 $TCR^+ CD4^+$ 게이트된 세포들에서 대표적인 FACS 프로파일을 나타냄.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0081] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0082] 본 발명에서 사용된 Dextran sulphate sodium (Mr ~40000 kD)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)로부터 구입하였고, decursinol angelate를 포함한 당귀의 화학적 화합물은 건국대학교 임용호 교수로부터 제공받았다. IFN-g (XMG1.2), CD11b (M1/70) 및 Gr-1 (RB6-8C5)에 대한 Fluorophore 부착된 항체; IFN-g (XMG1.2), IL-12 (C17.8) 및 IL-4 (11B11)에 대한 중화 항체; CD3e (145-2C11) 및 CD28 (37.51)에 대한 항체 및 재조합 인간 IL-2는 BD biosciences (CA, USA)로부터 구입하였다. FITC 부착된 IL-17A 항체(eBio17B7)는 Thermo Fisher Scientific (MA, USA)로부터 구입하였다. 재조합 IL-6, IL-12, IL-4, IFN-g, human TGF-b, 및 인간 IL-23는 PeproTech (NJ, USA)로부터 구입하였다.
- [0084] 실시예 1; 마우스 및 대장염 모델
- [0085] OT-II 형질전환 마우스는 Mark Boothby (Vanderbilt University)로부터 제공받았다. C57BL/6J mice는 DBL (Seoul, Korea)로부터 구입하여 한림대 실험동물 센터에서 무균 조건에서 유지하였다.
- [0086] 모든 동물 실험은 한국 식약처 가이드라인에 준하여 수행하였다. 실험 프로토콜은 한림대 동물 실험 윤리위원회의 승인을 받았다.
- [0087] 7에서 8주령 마우스를 2.5 % DSS를 7일간 음용수를 통하여 투여하고 실험의 나머지는 증류수를 투여하였다. 대조군 마우스는 실험 전체를 증류수를 제공하였다. 4 mg/kg의 DA 또는 비히클을 도 4A에서 와 같이 2일 마다 복강내 주사하였다. 마우스의 체중을 매일 기록하였다.
- [0088] 질환 활성 지수를 아래와 같이 스코어하였다: 체중 감소('0': 감소 없음; '1': 감소 >1-5%; '2': 감소 >5 -10%; '3': 감소 >10-15; '4': 감소 >15-20%); 혈액의 존재('0': 부존재; '1': 존재) and 대변 굳기 ('0':단단 ;'1': 느슨; '2': 설사). 스코어는 더하여 최대 스코어 7점을 주었다.
- [0090] 실시예 2: $CD4^+$ T 세포 활성화 및 헬퍼 T 세포 배양
- [0091] OT-II 마우스의 림프절 세포를 10% FBS 및 1% penicillin-streptomycin이 보충된 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)에 0.2 ug/ml OVA₃₂₃₋₃₃₉ 펩타이드로 활성화하고 4 ng/ml IL-2로 5일간 배양하였다. $CD4^+$ T 세포를 제조업자의 지시에 따라서 C57BL/6J 마우스의 지라로부터 CD4 (L3T4) 마이크로비드(Miltenyi Biotech, Gladbach, Germany)를 사용하여 정제하였다.
- [0092] 정제된 T 세포를 플레이트 부착된 anti-CD3e (2.5 ug/ml) 및 가용성 anti-CD28 (2.5 ug/ml)로 활성화하였다. 배양물을 Th1 분화에 대하여 10 ng/ml IL-12 및 5 ug/ml anti-IL-4;Th2에 대해서 10 ng/ml IL-4, 5 ug/ml anti-IL-12 및 5 ug/ml anti-IFN-g; 및 Th17에 대해서 5 ng/ml TGF-b, 10 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-23, 5 ug/ml IL-12, 5 ug/ml IFN-g 및 5 ug/ml anti IL-4로 보충하였다. Treg 세포들을 5 ug/ml TGF-b 및 4 ng/ml

IL-2로 보충하였다.

[0094] 실시예 3: 대장으로부터 세포 분리

[0095] 대장을 PBS로 3회 세척하고 37 ° C에서 0.015 % DTT 및 1 μM EDTA in RPMI 미디어의 존재에서 30분간 교반하였다. 상등액은 상피내선 세포(IEPs)를 포함하였다. 나머지 조직을 가위로 조각을 내고 37 ° C에서 1.5 ug/ml collagenase 및 0.5 ug/ml dispase를 포함하는 RPMI 배지에서 교반하여서 배양하였다. LP(Lamina propria) 세포를 포함한 세포 현탁액을 세척하고 70 μm strainer를 통과시키고 계수하고 유동세포분석기로 분석하였다.

[0097] 실시예 4: 유동 세포분석법

[0098] 세포를 FACS 세척 버퍼(1% FBS in DPBS)로 세척하고 fluorophore 부착된 항체로 30분간 배양하였다. 세포내 사이토카인 염색(ICS)을 위해서, 세포를 50 ng/ml PMA 및 1 μg/ml ionomycin로 Golgi-stop 시약(BD Biosciences)의 존재에서 6시간 동안 자극하였다. 세포들을 FACS 버퍼로 세척하고 PerCp-부착된 CD4 항체로 염색하였다. 그들을 4% paraformaldehyde로 고정화하고 1% saponin를 투과시킨 후 그 세포들을 FITC-부착된 anti-IL17A, PE-부착된 anti-IL-4, 및 APC-부착된 anti-IFN-γ 사이토카인으로 세포내 염색하였다. FoxP3 염색을 제조업자의 지시에 따라서 FoxP3 Staining Kit (ThermoFisher Scientific)로 수행하였다. 데이터를 FACS Canto II instrument (BD Biosciences)으로 얻어서 FlowJo V10 software로 분석하였다.

[0100] 실시예 5: CBA(Cytometric Bead Array)

[0101] Cytometric Bead Array를 제조업자의 지시에 따라서 BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit (BD biosciences)로 수행하였다. 요약하면 세포 상등액을 어세이 diluent로 연속하여 희석하고 혼합물 캡처 비드와 PE detection 시약으로 배양하였다. 2시간 후 샘플을 FACSCalibur (BD Biosciences)로 분석하였다.

[0103] 실시예 6: 세포 생존률 및 아팝토시스 어세이

[0104] CD4⁺ T 세포들을 2.5 ug/ml anti-CD3e 및 2.5 ug/ml anti-CD28로 활성화한 후 3일간 DA의 존재 또는 부존재에서 배양하였다. 그 세포 생존률 분석을 EZ-Cytox Enhanced 세포 Viability Assay 키트(DoGenBio, Seoul, Korea)로 제조업자의 지시에 따라서 수행하였다. 아팝토시스를 검출하기 위하여, 세포들을 Annexin V 결합 버퍼(25 mM CaCl₂, 140 mM NaCl 및 10 mM Tris -pH 7.4)로 세척하고 PE-부착된 Annexin V (BD Biosciences)로 30분간 배양한 후 FACS 분석을 수행하였다.

[0105] 실시예 7: EdU 업테이크 분석:

[0106] CD4⁺ T 세포들을 Th17 폴라라이징 조건 하에서 배양하고 그 EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) 업테이크 분석을 Click-iT Plus EdU Flow Cytometry Assay Kit (ThermoFisher)로 제조업자의 지시에 따라서 수행하였다. 요약하면, 하베스트 12 시간 전에 10 μM Edu로 펄스한 후, 그 세포들을 표면 마카로 염색하고 고정화하고 Click it 키트로 투과시켰다. EdU 업테이크를 검출하기 위하여, 세포들을 Alexa Fluor 647-부착된 검출 시약으로 염색하고 유세포분석기로 분석하였다.

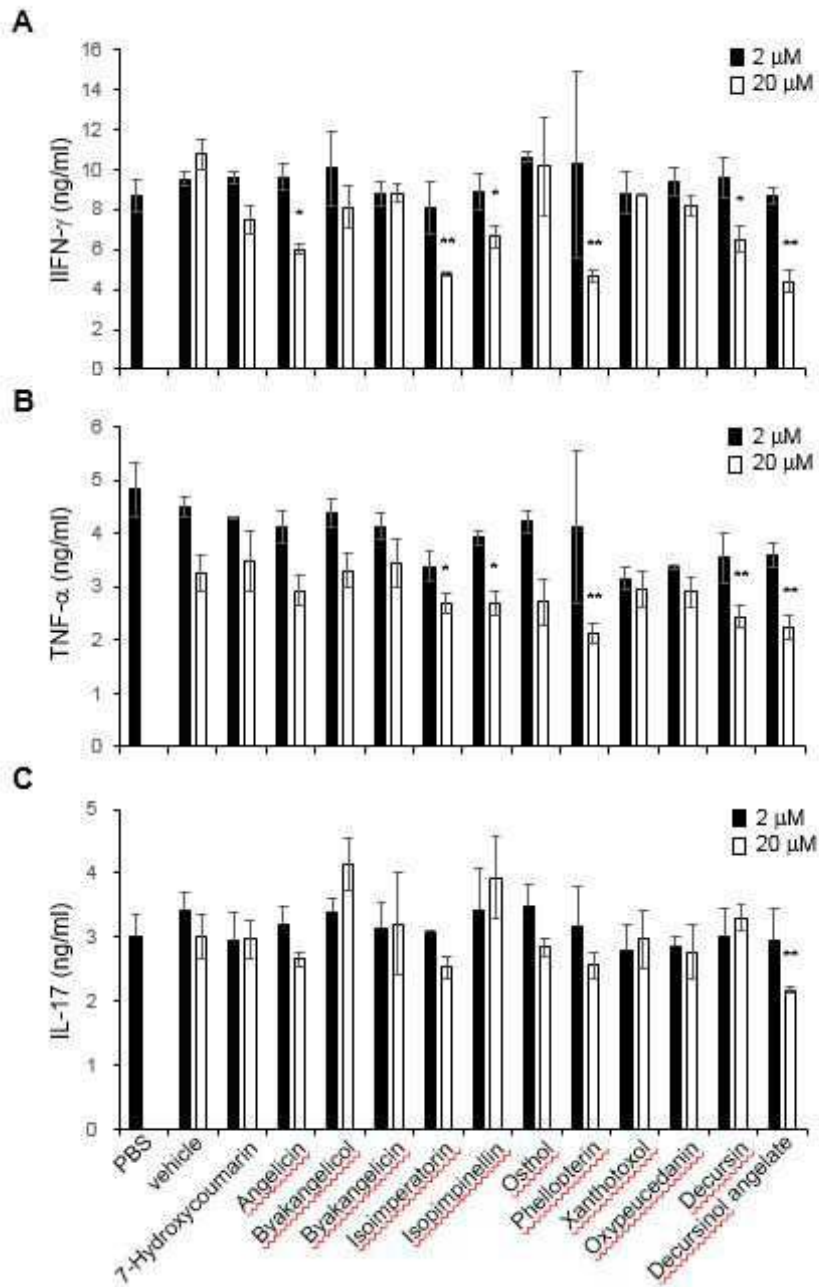
[0108] 실시예 8: 조직학

[0109] 클론을 formalin으로 고정하고, paraffin에서 충전하고, 5 μM 절편으로 절편화하였다. 조직 절편들을 hematoxylin 및 eosin 염색 시약으로 염색하고 조직학적 스코어(0-6)를 현미경 하에서 결정하였다. 세포 투과의 존재('0': 없음; '1': 흩어진 염증 foci; 다중 염증 foci, 및 '3': 경벽 세포 투과); crypt 조직 ('0': 정상; '1': 길어진 crypts의 존재, 및 '2': crypts의 부존재); 및 대장 벽에 부종('0': 부존재 및 '1': 부종의 존재)을 결정하였다.

[0111] 상기 본 발명의 실험은 적어도 2회 또는 3회 반복실험하였고, 다른 특별한 언급이 없으면, 3회 이상의 독자적인 실험의 결과를 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 샘플 간의 통계적 유의성은 unpaired 양측 t-test (Instat; GraphPad, Inc)으로 계산하였다. 도면에서, * 및 **는 각각 0.05 및 0.01 보다 적은 P값을 나타낸다.

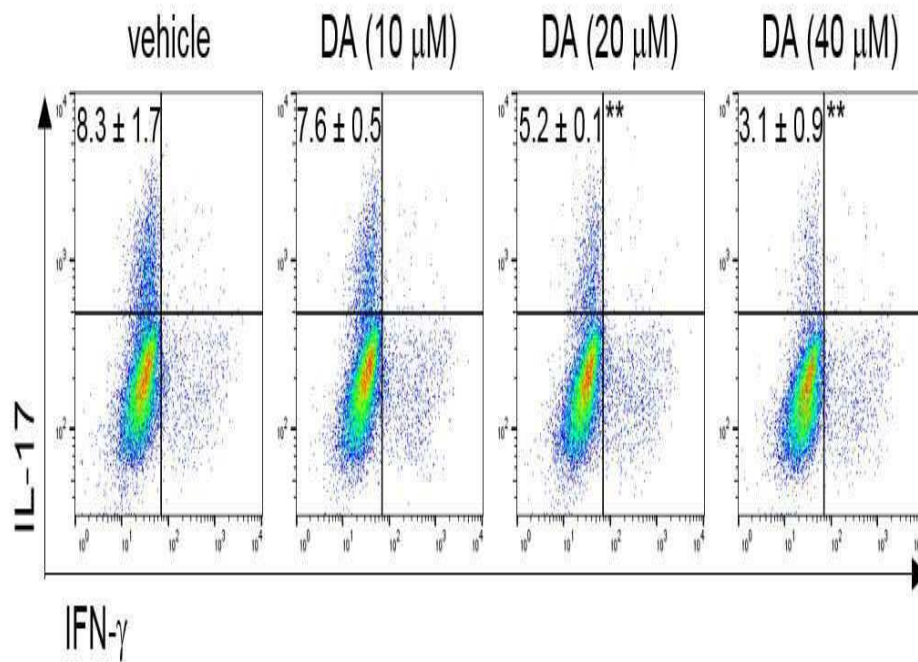
도면

도면1



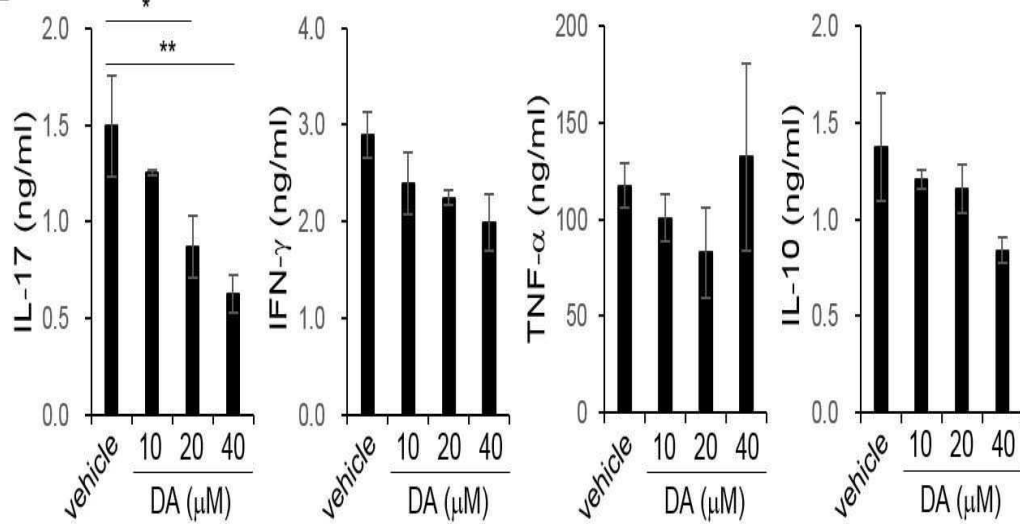
도면2a

A



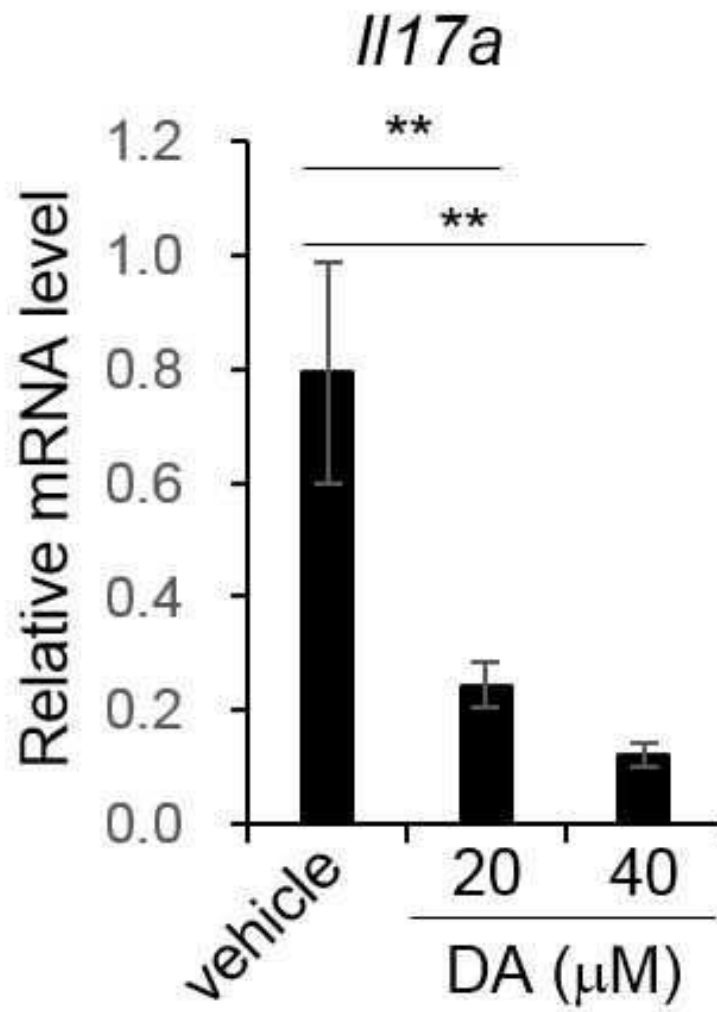
도면2b

B



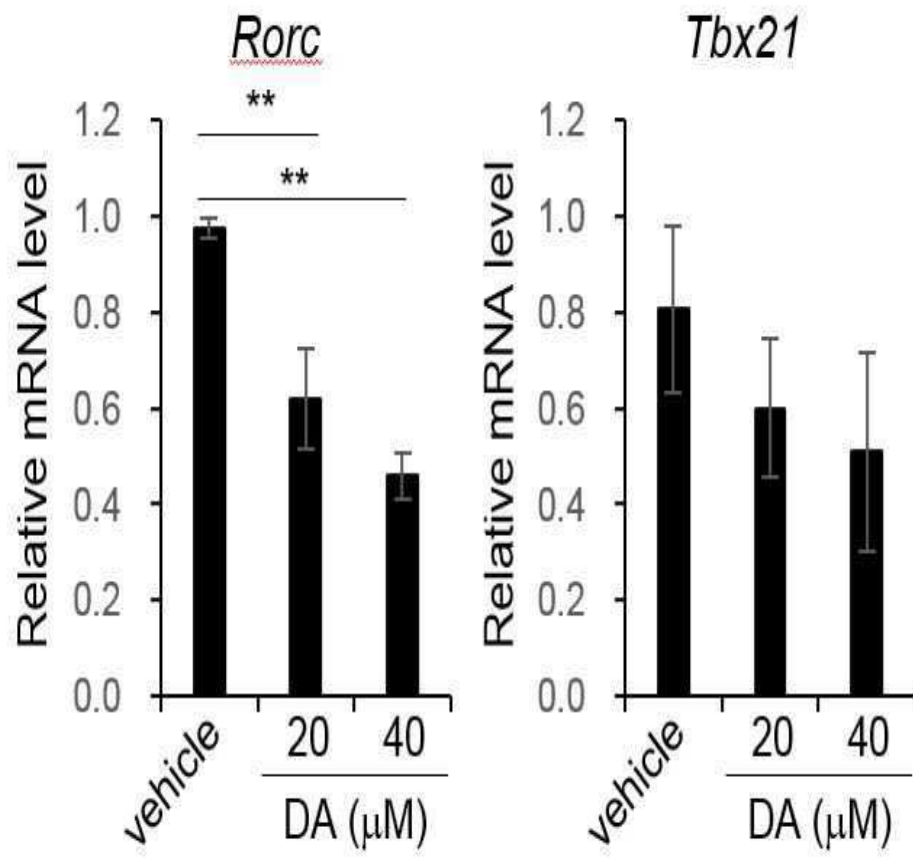
도면2c

C



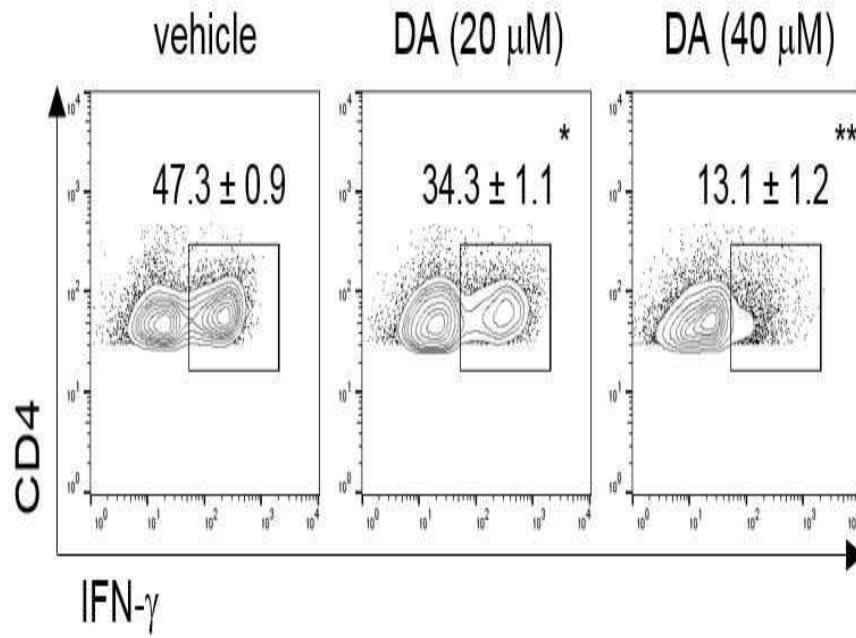
도면2d

D



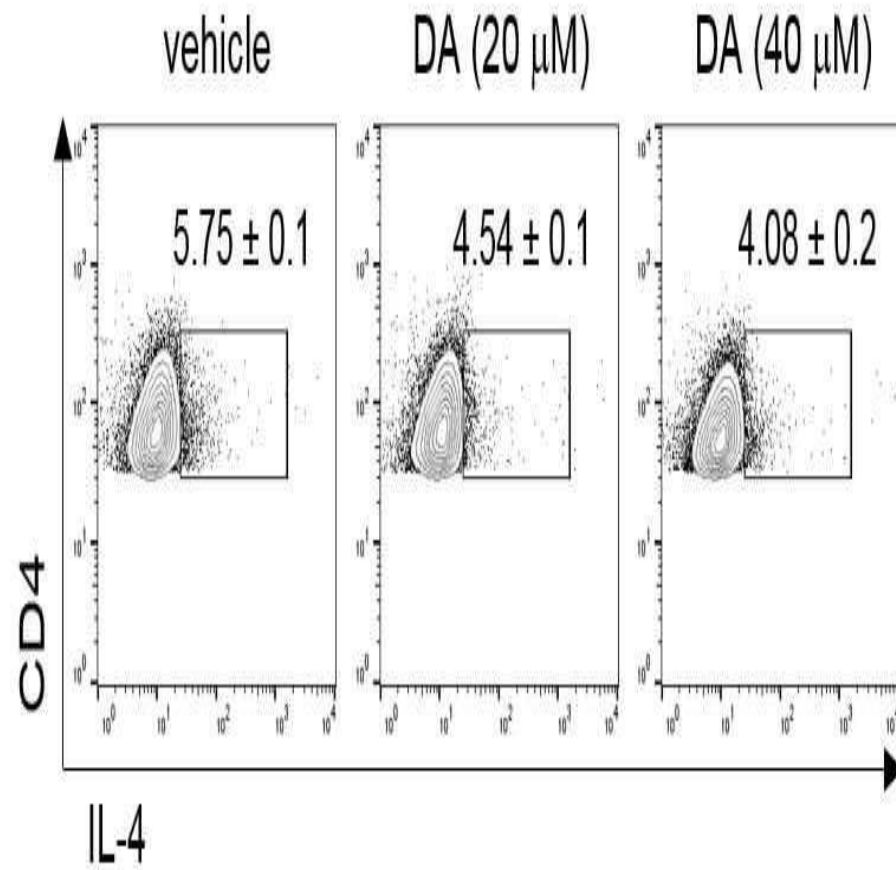
도면3a

a



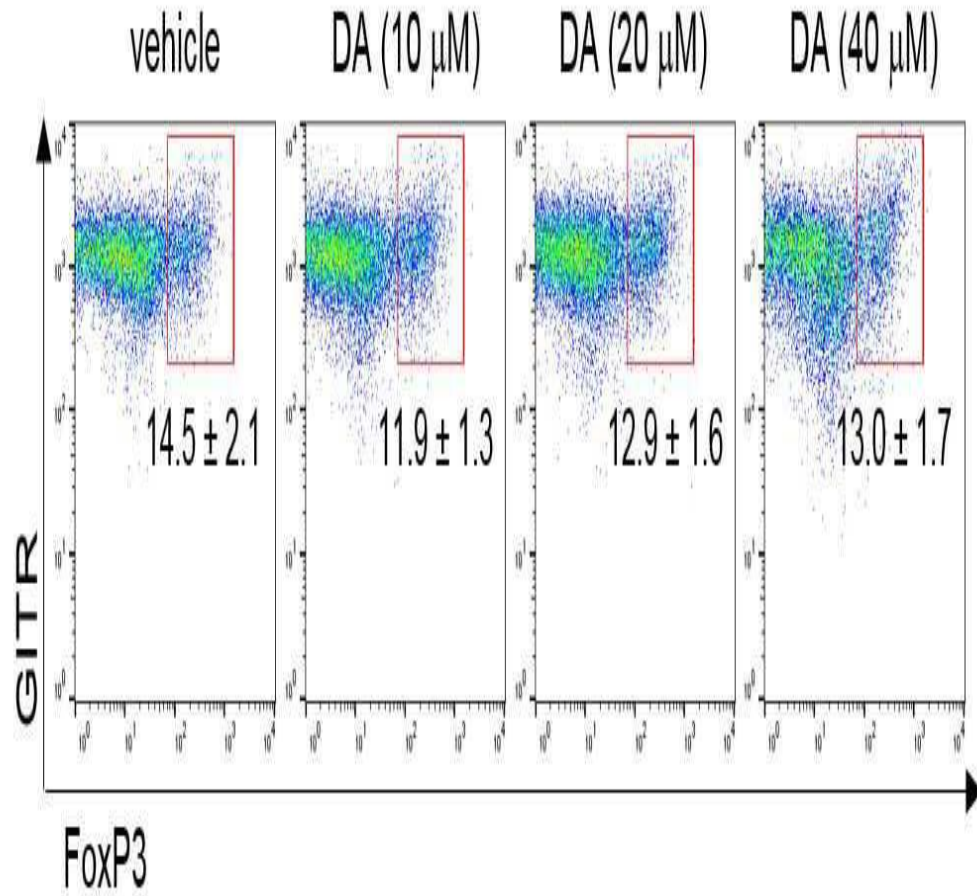
도면3b

b



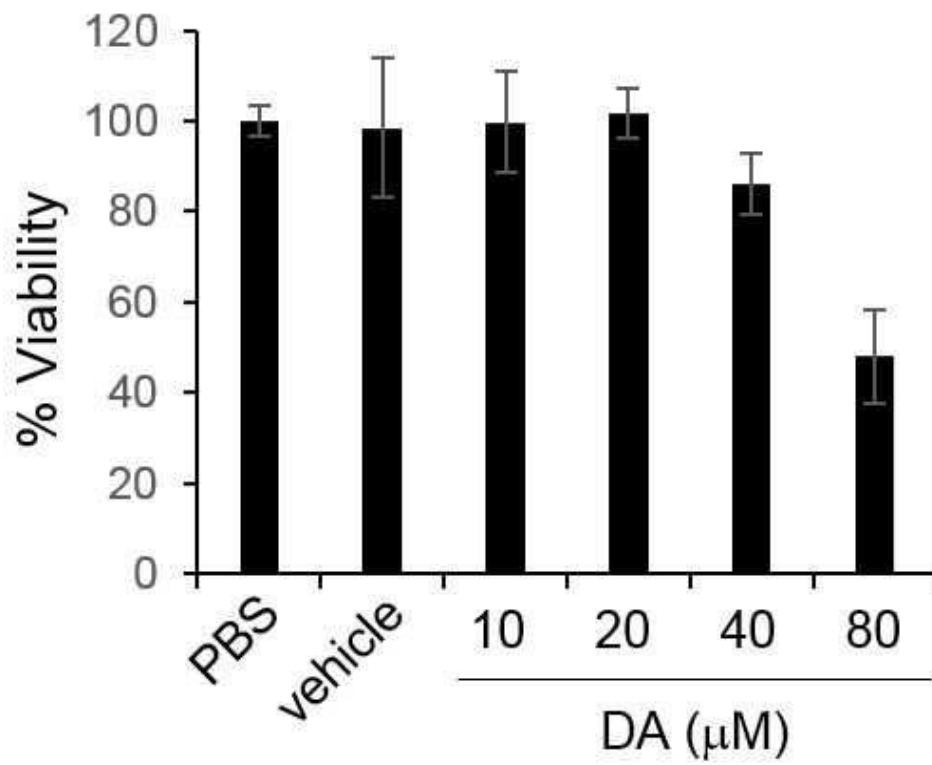
도면3c

C



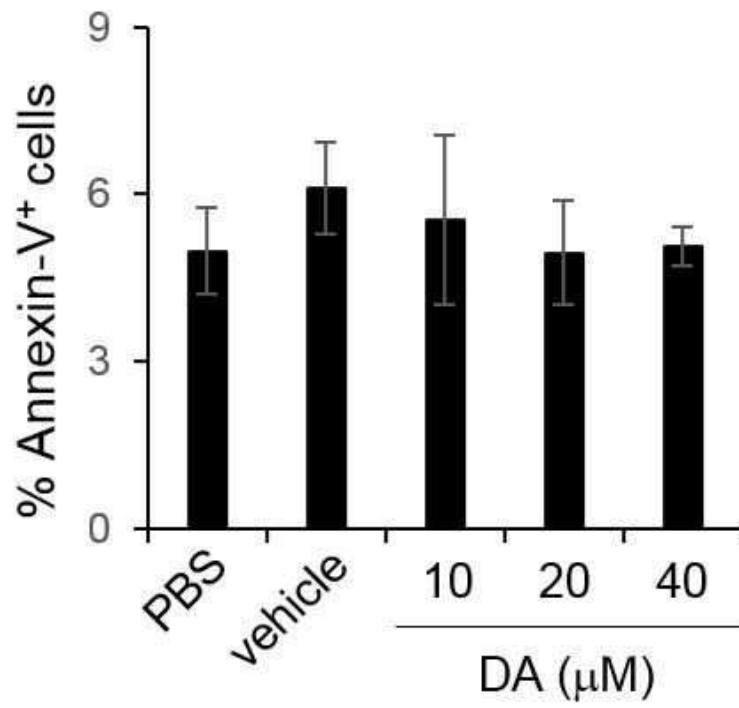
도면4a

A



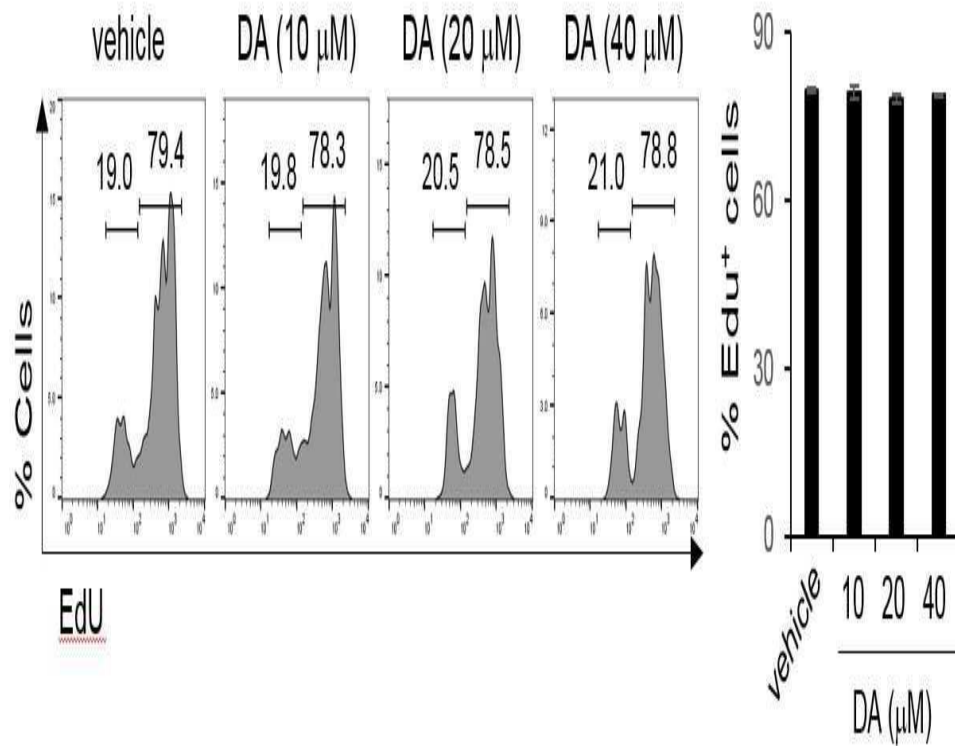
도면4b

B



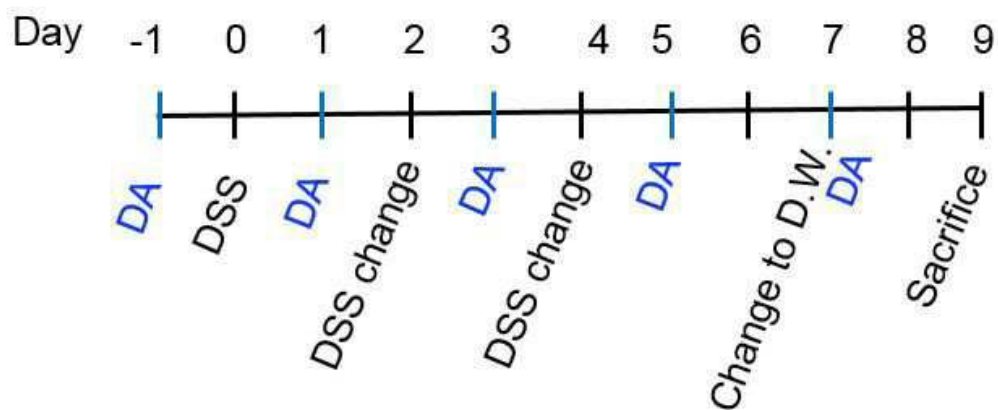
도면4c

C



도면5a

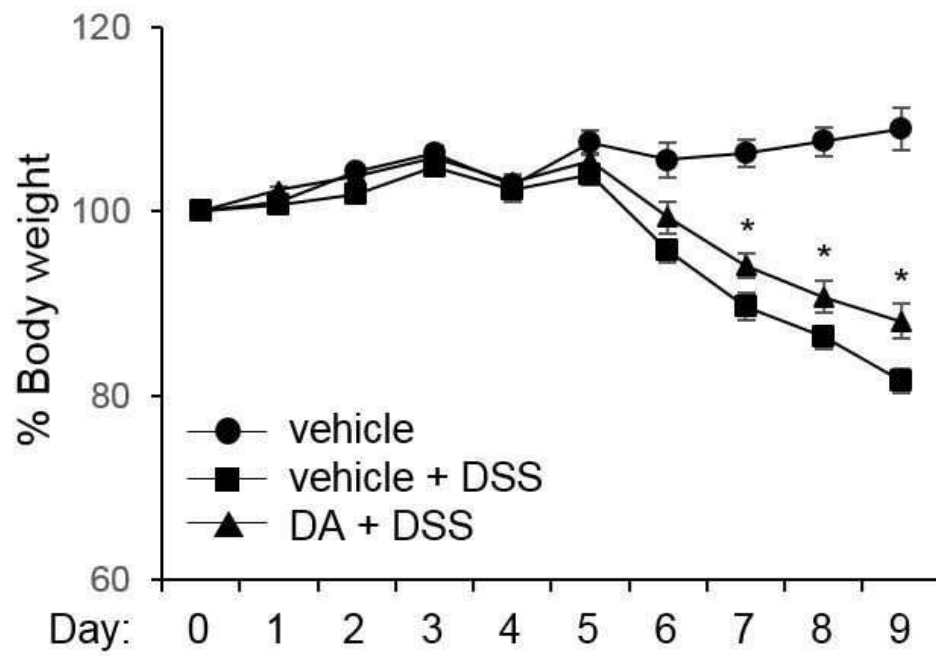
A



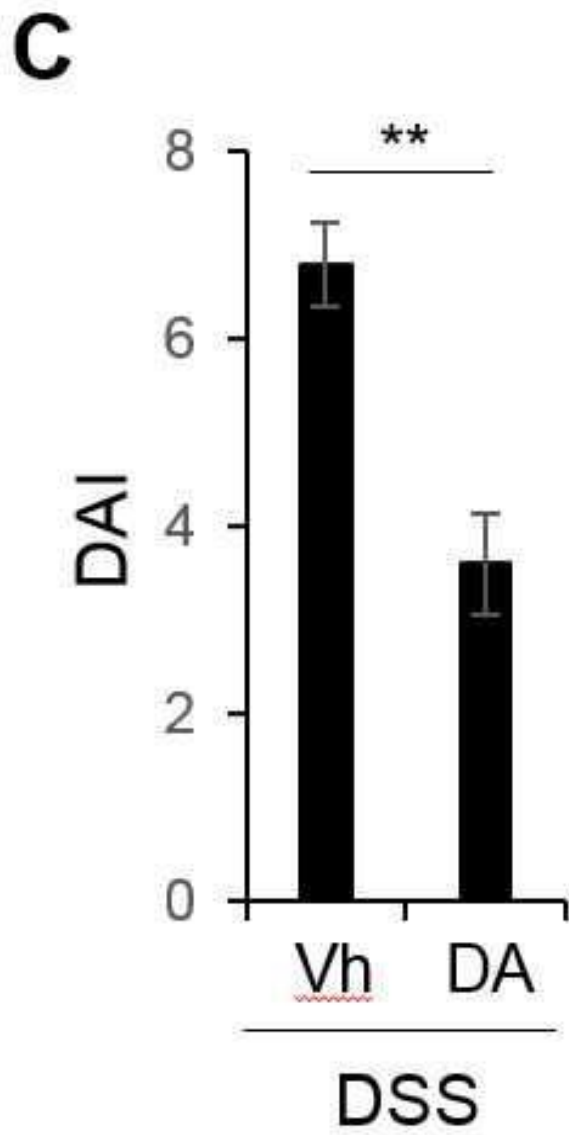
* Decursinol angelate (DA): 4 mg/kg (i.p)

도면5b

B

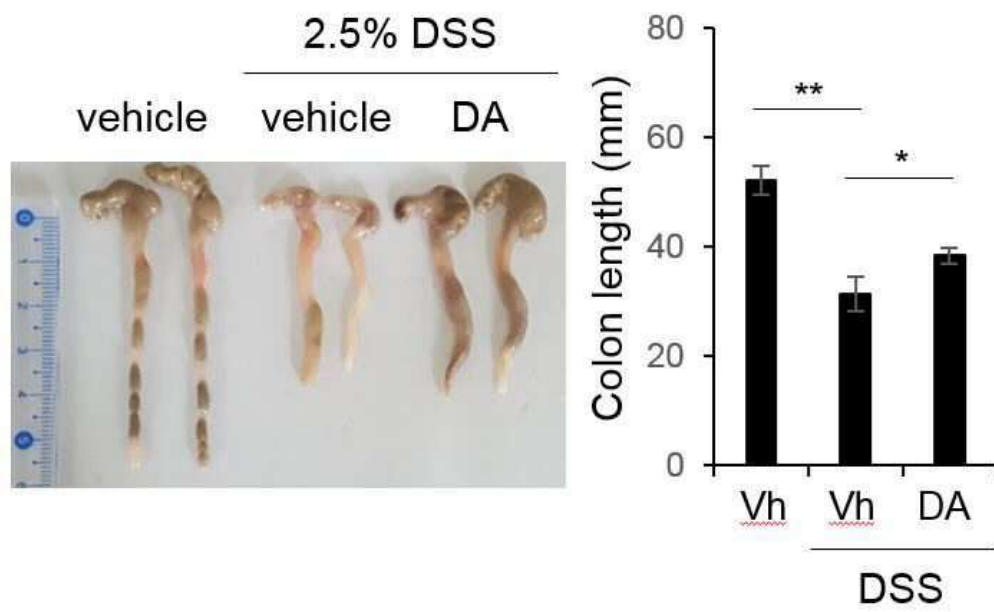


도면5c



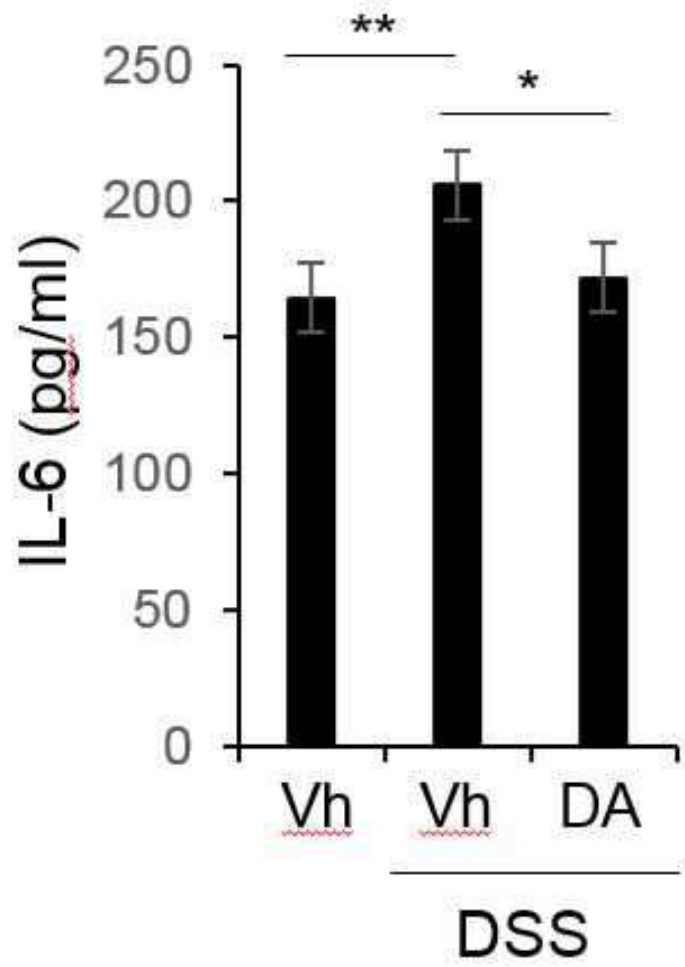
도면5d

D



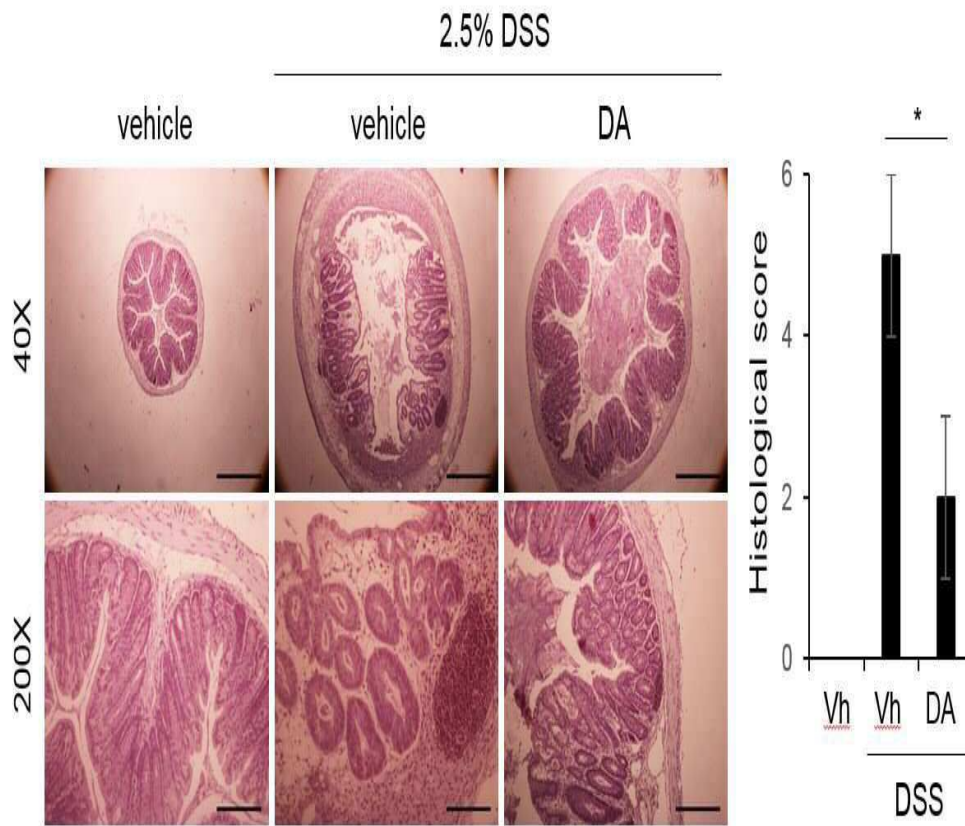
도면5e

E



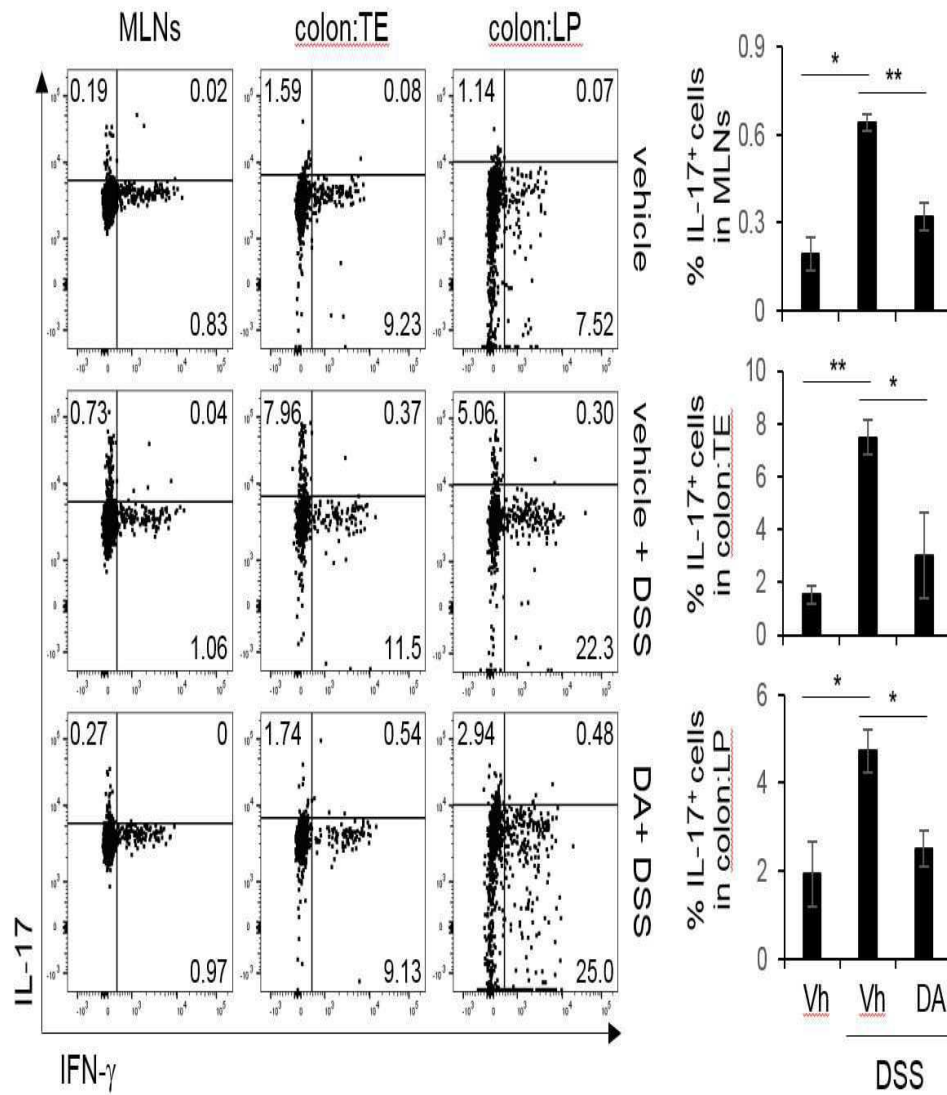
도면5f

F



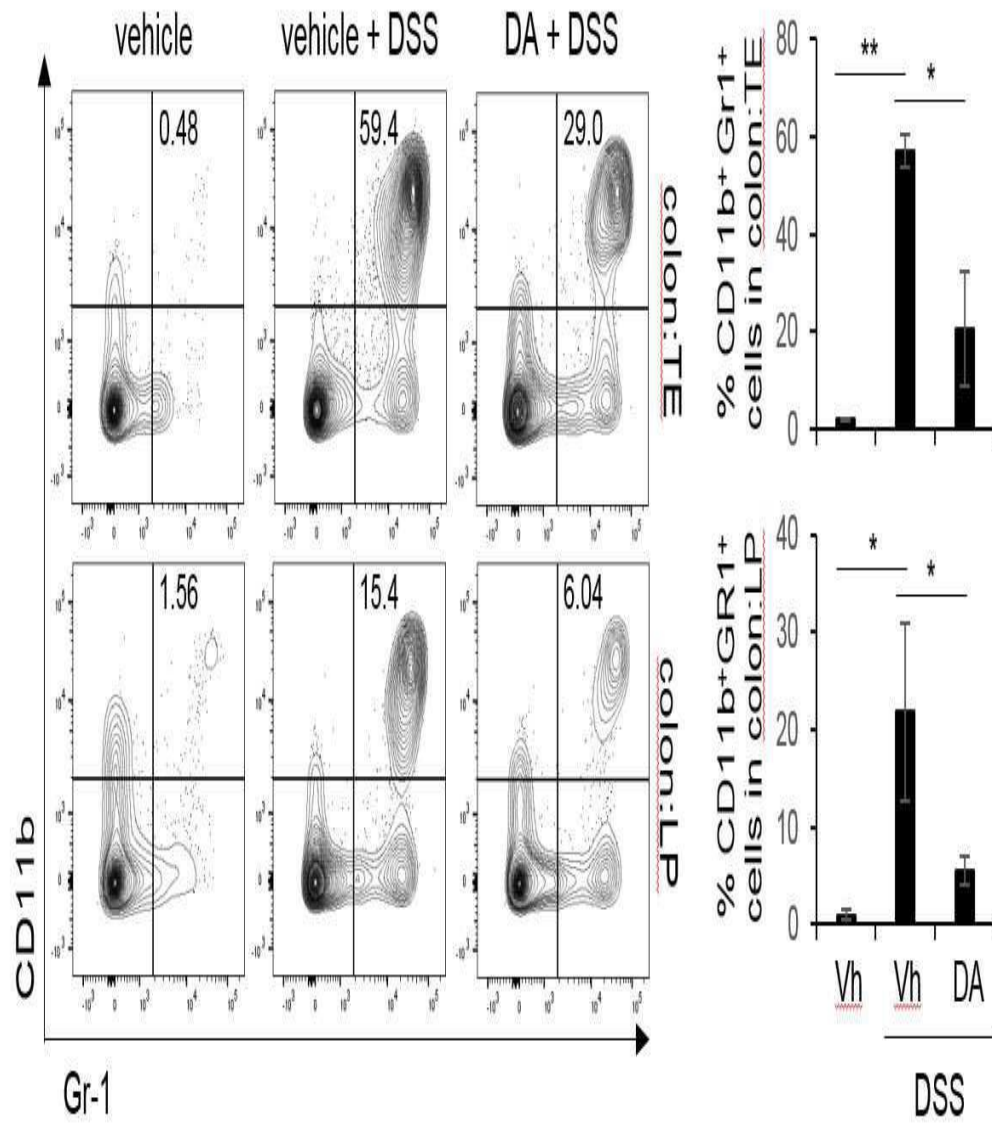
도면6a

A



도면6b

B



도면7

