



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2011-0080984

(43) 공개일자

2011년07월13일

(51) Int. Cl.

A61K 36/484 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2010-0001448

(22) 출원일자

2010년01월07일

심사청구일자

2010년01월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

전태훈

서울특별시 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트
236동 1802호

이한형

서울특별시 마포구 성산2동 성산시영아파트 9동
405호

임지영

서울특별시 마포구 성산1동 256-11 진흥테크빌
402호

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 6 항

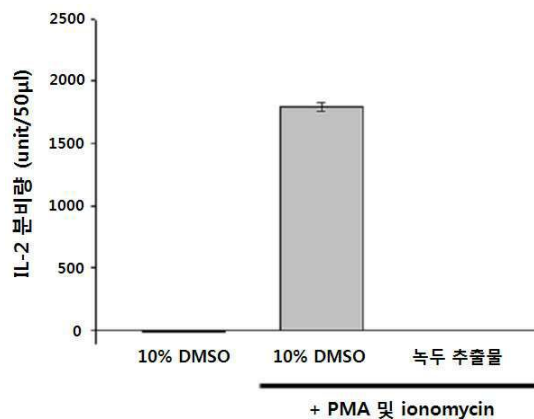
(54) 녹두 추출물을 함유하는 면역세포 증식 억제제

(57) 요약

본 발명은 녹두 추출물을 함유하는 면역세포 증식 억제제에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 녹두 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 상기 녹두 추출물을 이용하여 T 림프구의 IL-2 분비 및 IFN- γ 의 분비능력을 억제시킬 수 있다. 따라서 상기 녹두 추출물을 이용하여 면역세포의 증식을 억제할 수 있으며, 자가면역질환 또는 장기 또는 조직의 이식 거부 반응 등의 면역질환에 의한 면역질환의 예방 및 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109141031CG000

부처명 농림기술관리센터

연구관리전문기관

연구사업명 농림기술개발연구

연구과제명 녹두의 신규 항염증 성분과 사포닌 발효수식을 이용한 염증완화 유제품개발

기여율

주관기관 고려대학교 생명자원연구소

연구기간 2009 년 04 월 10 일 ~ 2010 년 04 월 09 일

특허청구의 범위

청구항 1

녹두 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역질환 치료 및 예방용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 녹두 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 에테르, 헥산 및 디클로로메탄으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료 및 예방용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 녹두 추출물은 T 림프구의 IL-2 분비 및 IFN- γ 의 분비능력을 억제하는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료 및 예방용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역질환 또는 장기 또는 조직의 이식 거부 반응인 것을 특징으로 하는 면역질환 치료 및 예방용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 자가면역질환은 류머티스성 관절염, 전신성 경피증, 전신 홍반성 낭창, 당뇨병, 아토피 피부염, 원형탈모증, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 궤양성 대장염, 다발성 근염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 뇌척수염, 섬유조직염, 측두동맥염을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역질환 치료 및 예방용 조성물.

청구항 6

시험관 내에서 면역세포에 녹두 추출물을 처리하는 것을 포함하는 면역세포 증식 억제 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 녹두 추출물을 함유하는 면역세포 증식 억제제에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 녹두 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항원(antigen)에 대한 면역반응이 일어나기 위해서는 항원 제시 세포들(antigen-presenting cells)에 의해 T 림프구가 적절한 활성화 신호를 받게 되고 [Smith-Garvin et al., 2009], 지속적인 세포증식을 통해 충분한 effector T 림프구가 생성되어야 한다. 항원 제시 세포가 먼저 외부에서 유래한 물질을 인식하면 항원을 포함하는 MHC(major histocompatibility complex)와 co-simulatory signal molecule들을 발현하게 된다. 이 두 종류의 주요 신호가 native 상태의 T 림프구를 자극하여 활성화단계로 진행하게 하는데, 먼저 항원/MHC와 T 림프구의

TCR/CD3 complex가 결합하여 1차적인 자극 신호를 전달하게 된다 [Dembic et al., 1986; Saito and Germain, 1987]. TCR/CD3 complex를 통한 신호는 CD3 ϵ , ζ 의 cytoplasmic tail 부분인 ITAM [Reth, 1989]의 인산화를 통하여 하부로 다양한 활성화 신호가 전달된다 [Imboden and Stobo, 1985]. 대표적인 co-stimulatory signal molecule인 CD28은 T 림프구에 존재하며, 항원 제시 세포의 CD80, CD86과 결합하여 T 림프구에 자극 신호를 전달한다 [Acuto and Michel, 2003]. 결합된 CD28/CD80, CD86은 T 림프구에 PI3K의 활성화를 유도하고 [Pages et al., 1994], 최종적으로 Akt, NF- κ B 등의 신호의 활성을 유도한다 [Narayan et al., 2006; Qiao et al., 2008]. 이렇게 T 림프구에 필요한 자극 신호들이 전달되면 T 림프구는 빠른 세포증식과 함께 여러 가지 기능을 하는 사이토카인(IL-2, IL-4, IFN- γ 등)을 분비하고, 활성화되어 면역반응을 유발시킨다 [Appleman et al., 2000].

[0003] 이와 같은 면역반응의 메커니즘을 토대로 각각의 신호전달 체계를 방해하는 면역억제 방법들이 연구되어 왔다. 항원제시세포에 의한 항원전달 억제 방법, T 림프구의 신호 전달 과정(CD3, Calcineurin- Ca^{2+} signal) 또는 중간 신호물질의 기능 억제, T 림프구의 활성화에 중요한 사이토카인의 기능 억제, T 림프구의 세포분열을 통한 증식억제 등 다양한 방법으로 면역을 억제하기 위한 방법이 사용되고 있다.

[0004] 그러나 현재 면역억제제로 사용되고 있는 물질들은 높은 비용부담과 장기적인 투여로 인한 부작용이 발생하고 있다. 점차 면역억제제가 사용되는 분야인 장기이식과 자가면역질환이 증가하고 있는 현 시점에서 기존의 문제점을 극복할 수 있는 저렴한 비용의 면역억제제의 개발이 필요한 상황이다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 녹두 추출물을 면역세포를 활성화시킨 세포에 처리하는 경우, T림프구의 IL-2 분비 및 IFN- γ 의 분비능력을 억제시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 면역반응에 관여하는 T 림프구의 IL-2 분비 및 IFN- γ 의 분비능력을 억제시키는 효과를 갖는 녹두 추출물을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 녹두 추출물을 이용한 면역질환 치료 및 예방용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 녹두 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역질환 치료 및 예방용 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 녹두 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 에테르, 헥산 및 디클로로메탄으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매로 추출되는 것이 바람직하다.

[0010] 본 발명의 상기 녹두 추출물은 T 림프구의 IL-2 분비 및 IFN- γ 의 분비능력을 억제하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 면역세포로부터 발현되어 분비된 IL-2 및 IFN- γ 를 정량적으로 측정할 경우, 본 발명의 녹두 추출물의 처리로 인해 IL-2 및 IFN- γ 의 분비량이 감소됨을 확인하였다.

[0011] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 면역질환은 T 세포들의 활성화로 인해 발생하는 어떠한 질병도 될 수 있으며, 구체적으로 자가면역질환 또는 장기 또는 조직의 이식 거부 반응 임을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 상기 “자가면역질환”은 숙주조직에 반응하는 항체 및 내인성의 자기 펩타이드에 스스로 반응하는 면역세포들이 유도되는 질병으로, 자기 면역반응을 조절하는 시스템에 이상이 생겨 나타나는 것으로, 자가 항체나 자가 항원에 반응하는 T 세포들의 활성화로 인해 발생하는 질병을 통칭한다. T 세포나 B 세포들은 다양한 특이성을 갖도록 무작위적으로 분화하는데, 이 과정에서 자가 항원에도 특이적으로 결합하여 활성화될 수 있는 세포들이 생겨날 수 있으며 이를 자가인식(self-recognition)이라 한다. 상기 자가인식을 막기 위해 인체의 면역계에는 면역관용이 존재하며, 체내에서 면역관용에 실패하고 자가인식을 하는 면역세포들이 활성화되는 경우 자가면역질환이 일어난다. 자가면역질환은 유전적 요인(부적절한 MHC발현), 내부/외부 항원, 사이토카인 조절 이

상, 면역 억제 기능의 파괴, 기관의 결함 등의 원인으로 인해 발생한다.

- [0013] 본 발명의 상기 “장기 또는 조직의 이식 거부 반응”은 세포매개성 면역반응에 의해 유발되는 질병이다. 인체는 체내에 침입하는 세균 또는 바이러스 등의 외부물질에 대항하기 위한 복잡한 방어 메커니즘을 갖고있다. 면역계를 이루는 이러한 메커니즘은 질병을 유발하는 미생물과 생명을 구하는 이식세포를 구별할 수 없어, 양쪽 모두 외부물질로 간주하여 면역계의 공격을 받음으로 인해 이식 거부반응이 유발된다. T 세포 매개반응은 수용자의 림프구가 공여자의 MHC를 만났을 때 개시된다. 즉, 숙주 T 세포가 이식 장기 내의 가지세포를 만나거나 공여자의 가지세포가 수용자의 림프절로 유입된 후 면역작용이 시작되는데, 활성화된 CD4 T 세포는 지연과민반응에서 나타나는 사이토카인을 분비, 혈관투과성을 증가시키고 림프구, 대식구와 같은 단핵세포의 국소 침윤을 일으키며, 침윤된 대식구에 의해 미세혈관 손상, 조직 허혈 및 이식조직 파괴가 일어난다. 그러나 T 림프구가 이식편에 염증과 손상을 며칠 내지 몇 개월에 걸쳐 일으키면서 상기와 같은 세포매개성 반응이 억제되면 이식편은 안전할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 자가면역질환은 류머티스성 관절염, 전신성 경피증, 전신 홍반성 낭창, 당뇨병, 아토피 피부염, 원형탈모증, 건선, 천포창, 천식, 아프타구내염, 만성 갑상선염, 궤양성 대장염, 다발성 근염, 다발성 경화증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 자가면역성 뇌척수염, 섬유조직염, 측두동맥염 등을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 시험관 내에서 면역세포에 녹두 추출물을 처리하는 것을 포함하는 면역세포의 증식 억제 방법을 제공한다.
- [0016] a) 객체로부터 RMA세포를 분리하는 단계;
- [0017] b) 상기 RMA세포를 세포 배양하는 단계;
- [0018] c) 상기 배양된 세포에 PMA, ionomycin 처리하는 단계;
- [0019] d) 상기 배양된 세포에 녹두 추출물을 처리하는 단계.
- [0020] 상기 c)단계의 PMA, ionomycin 물질은 T 세포가 활성화 되도록 신호적 자극을 주는 물질로 실제 항원에 의한 T 세포의 활성화작과 같은 역할을 하여 면역반응이 일어나는 것 같은 환경을 만들어 준다.
- [0021] 본 발명의 면역질환 치료 및 예방용 조성물은 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들은 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.
- [0022] 본 발명에 따른 치료용 약제의 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.01 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 녹두 추출물의 크로마토그램(chromatogram) 결과를 나타낸다.
- 도 2는 T 림프구의 사이토카인 발현 전사 측정 결과를 나타낸다.
- 도 3은 면역세포로부터 발현되어 분비된 IL-2의 분비량 측정 결과를 나타낸다.
- 도 4는 면역세포로부터 발현되어 분비된 IFN- γ 의 분비량 측정 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0025] 실시예 1. 녹두 추출물의 추출 방법 및 추출물 처리 방법

- [0026] 본 발명에 사용된 녹두는 남양식품에서 구입하였으며, 상기 녹두를 분쇄한 후 추출에 이용하였다.

[0027] 먼저, 녹두 분말 200 g에 1 L의 n-hexane을 가한 후 3 시간 동안 환류냉각 장치로 추출하여 지방을 제거하였다. 상기 지방이 제거된 녹두 분말을 건조시켜 회수한 후, 1 L의 100 % 에탄올을 가하여 3 시간 동안 2차 환류 추출을 수행하였다. 상기의 과정이 완료된 추출시료를 40 °C 이하에서 감압 농축한 후, 동결 건조시켜 분말화 하였다. 이후, 녹두 추출물을 Diaion HP-20(Mitsubishi chemicals, Japan) 수지를 이용하여 분리하였다. 에탄올로 환류 추출한 추출물(2 g)을 Diaion HP-20 수지가 충전(bed volume 400 ml)된 컬럼에 주입하여 흡착시킨 후, 0, 20, 40, 60, 80, 100 %의 에탄올을 step gradient 이동상으로 하여 8 ml/min의 속도로 용출시키고, fraction collector(EYELA DC-1500, Japan)을 이용하여 50 ml씩 수집하였다. 수집된 aliquots은 여러 파장(210, 254, 280, 330, 450 nm)에서 용출패턴을 분석하였으며, 최종적으로 254 nm의 흡광패턴을 기준으로 크로마토그램(chromatogram)을 얻어내었다. 상기 얻어진 크로마토그램은 도 1에 나타내었다.

[0028] 도 1에 나타낸 것과 같이, 녹두 추출물은 여러 단편(fraction)의 용출 패턴을 보이는데, 본 발명에서는 실제로 F1(fraction 1)의 녹두 추출물을 사용하였다.

[0029] 우선, F1 녹두 추출물을 10 % DMSO(sigma)를 포함하는 PBS에 녹인 후, 총 배양액 부피의 1/100을 취하여 세포에 처리하여, 최종적으로 0.1 % DMSO로 5 % CO₂를 포함하는 37 °C 배양기에서 3일 동안 배양시켰다. 세포는 생쥐(mouse) T 림프구 세포주인 RMA(Lian et al., 1998) 세포를 분리하여 96 well round 조직 배양 플레이트에 1×10⁵/well 농도의 세포를 10 % 송아지 혈청을 함유한 RPMI 배지에서 배양시켰다. 추출된 RMA 세포를 생체 외(in vitro)에서 자극 신호를 주기 위해서, PMA(sigma) 50 ng/ml과 ionomycin(sigma) 500 ng/ml을 동시에 처리하였다. 상기 두 물질은 T 세포가 활성화 되도록 신호적 자극을 주는 물질로써, 실제 항원에 의한 T 세포의 활성화 작용과 같은 역할을 하여 면역반응이 일어난 것 같은 환경을 만들어 주어 처리한 녹두 추출물이 면역반응에 어떤 역할을 하는지 알 수 있다.

[0030] 실시예 2. 녹두 추출물 처리에 의한 T 림프구의 사이토카인 발현 전사 억제

[0031] 역전사 연쇄중합반응(RT-PCR)을 이용하여 녹두 추출물이 T 림프구의 사이토카인 발현 전사에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다.

[0032] 먼저, 상기 실시예 1에 나타낸 것과 같이 RMA 세포에 녹두 추출물을 처리한 후, 트리졸(Trizol, invitrogen) 1 ml당 200 µl의 클로로포름(Chloroform, sigma)을 넣고 전체 RNA를 분리하였다. 추출한 mRNA(2 µg)를 주형으로 RT-PCR을 수행하여 cDNA를 복제하였다. 이후, 상기 cDNA를 주형으로 하여 유전자 database에서 얻은 염기서열에 따라 프라이머를 제작한 후, 연쇄중합반응(PCR)을 이용하여 각각의 유전자를 얻었다. 상기 제작된 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다.

[0033] [표 1. 프라이머]

	프라이머		PCR product size	GenBank number
생쥐 IL-2	정방향	5'-TGG AGC AGC TGT TGA	308 bp	NM_008366.2
	역방향	3'-CAC CAC AGT TGC TGA		
생쥐 INF-γ	정방향	5'-CTG AGA CAA TGA ACG CTA CAC ACT GC	433 bp	NM_008337.2
	역방향	3'-AAC AGC TGG TGG ACC ACT CGG AT		
생쥐 GDPDH	정방향	5'-ATG ACC ACA GTC CAT GCC ATC	271 bp	NM_008084.2
	역방향	3'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG		

[0035] 이후, EtBr(sigma)이 함유된 1.5 % agarose gel(invitrogen)에 각각의 PCR product를 로딩(loading)하여 사이토카인 발현 전사를 확인하였다. 이때, 역전사 효소는 Superscript III(invitrogen)를 사용하였으며, 중합효소는 Tag polymerase(gene craft)를 사용하였다. 상기 사이토카인 발현 전사 결과는 도 2에 나타내었다.

[0036] 도 2에 나타낸 것과 같이, 녹두 추출물을 함유한 배지에서 배양시킨 생쥐 T 림프구 세포주인 RMA 세포주가 PMA

및 ionomycin의 처리 시에도 IL-2 및 IFN- γ 의 전사량이 감소하는 것을 관찰할 수 있으며, 대조군(GAPDH)과의 비교에서도 유의한 차이가 관찰된다. 상기 GAPDH는 세포내에서 발현량이 세포의 조건에 따라 잘 변하지 않는 유전자로써, 본 발명의 T 림프구의 사이토카인 발현량 조사에서 세포내 기준으로 사용되었다.

[0037] 실시예 3. ELISA 이용한 IL-2 분비능력 억제

[0038] 녹두 추출물 처리에 의한 면역세포의 IL-2의 분비능력을 알아보기 위해, indirect sandwich ELISA 방법을 이용하였다. 세포의 배양은 실시예 1에서와 같이 동일한 조건으로 수행하였으며, 배양 3일 후 배양액(상층액)을 가지고 분석을 실시하였다.

[0039] 먼저, 포획 항체(Capture antibody)(anti-mouse IL-2, BD Bioscience)를 ELISA용 플레이트에 코팅한 후, 배양액을 넣어 4 °C에서 12 시간 반응시켰다. 그리고 결합된 사이토카인을 확인하기 위해 biotinylated anti-mouse IL-2(BD Bioscience)와 SA-HRP(Jackson ImmunoResearch Inc.)를 이용하여 면역세포로부터 발현되어 분비된 IL-2를 정량적으로 측정하였다. 측정 결과는 도 3에 나타내었다.

[0040] 도 3에 나타난 것과 같이, 녹두 추출물을 함유한 배지에서 배양시킨 생쥐 T 림프구 세포주인 RMA 세포주의 IL-2의 분비량이 PMA 및 ionomycin의 처리 시에도 감소하는 것을 관찰할 수 있다.

[0041] 실시예 4. ELISA 이용한 INF- γ 분비능력 억제

[0042] 녹두 추출물 처리에 의한 면역세포의 IFN- γ 의 분비능력을 알아보기 위해, indirect sandwich ELISA 방법을 이용하였다. 세포의 배양은 실시예 1에서와 같이 동일한 조건으로 수행하였으며, 배양 3일 후 배양액(상층액)을 가지고 분석을 실시하였다.

[0043] 먼저, 포획 항체(Capture antibody)(anti-mouse IFN- γ , BD Bioscience)를 ELISA용 플레이트에 코팅한 후, 배양액을 넣어 4 °C에서 12 시간 반응시켰다. 그리고 결합된 사이토카인을 확인하기 위해 biotinylated anti-mouse IFN- γ (BD Bioscience)와 SA-HRP(Jackson ImmunoResearch Inc.)를 이용하여 면역세포로부터 발현되어 분비된 IFN- γ 를 정량적으로 측정하였다. 측정 결과는 도 4에 나타내었다.

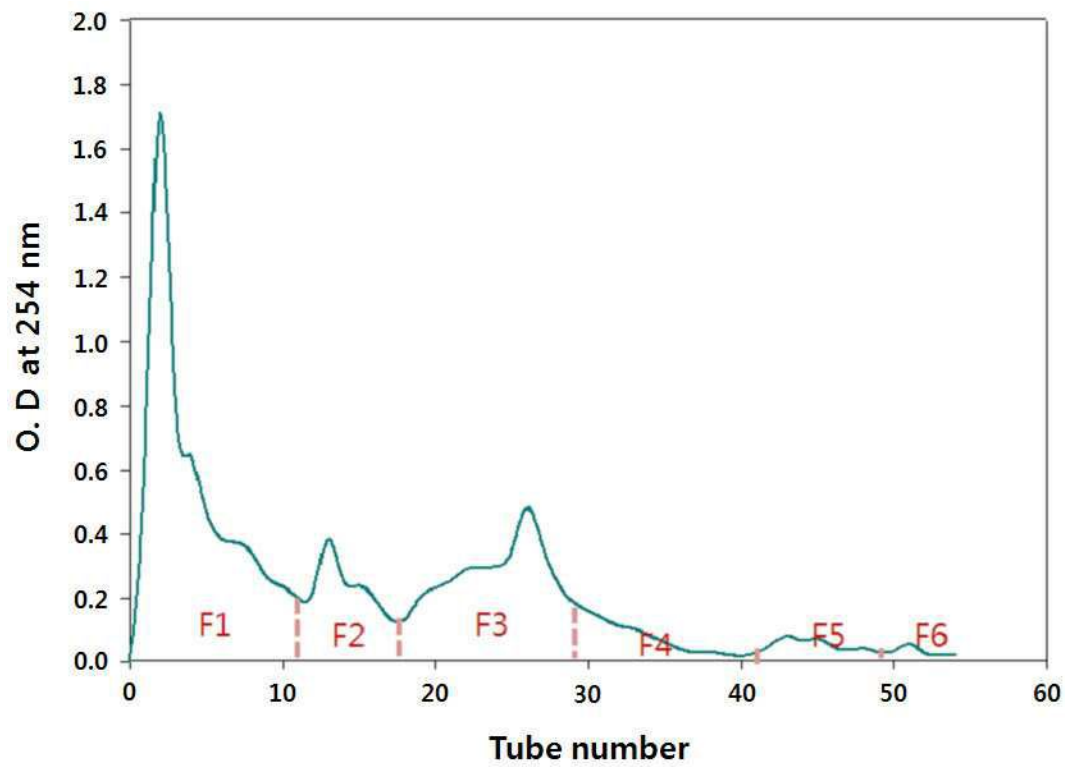
[0044] 도 4에 나타난 것과 같이, 녹두 추출물을 함유한 배지에서 배양시킨 생쥐 T 림프구 세포주인 RMA 세포주의 IFN- γ 의 분비량이 PMA 및 ionomycin의 처리 시에도 감소하는 것을 관찰할 수 있다.

산업상 이용가능성

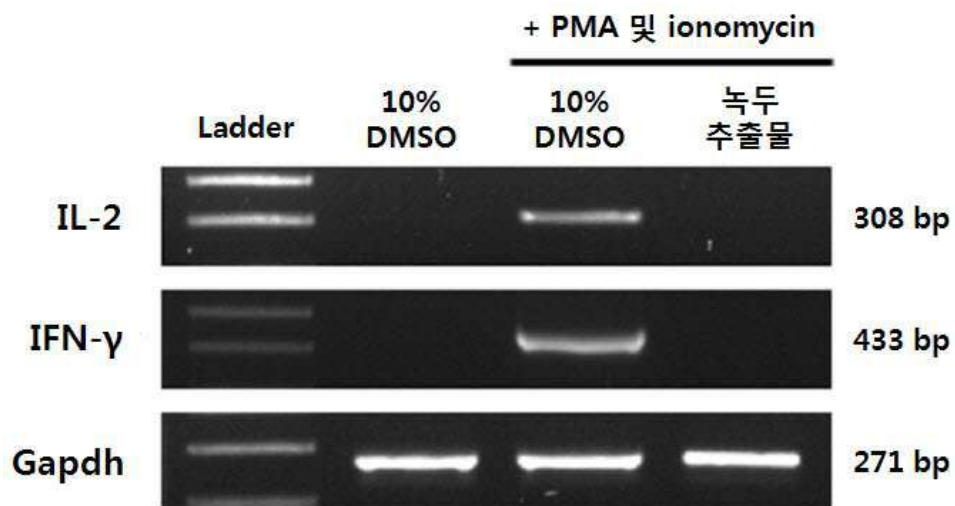
[0045] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 녹두 추출물을 이용하여 T 림프구의 IL-1 분비 및 IFN- γ 의 분비능력을 억제시킬 수 있다. 따라서 상기 녹두 추출물을 이용하여 면역세포의 증식을 억제할 수 있으며, 자가면역질환 또는 장기 또는 조직의 이식 거부 반응 등의 면역질환에 의한 면역질환의 치료 및 예방용 조성물로서의 사용이 기대된다.

도면

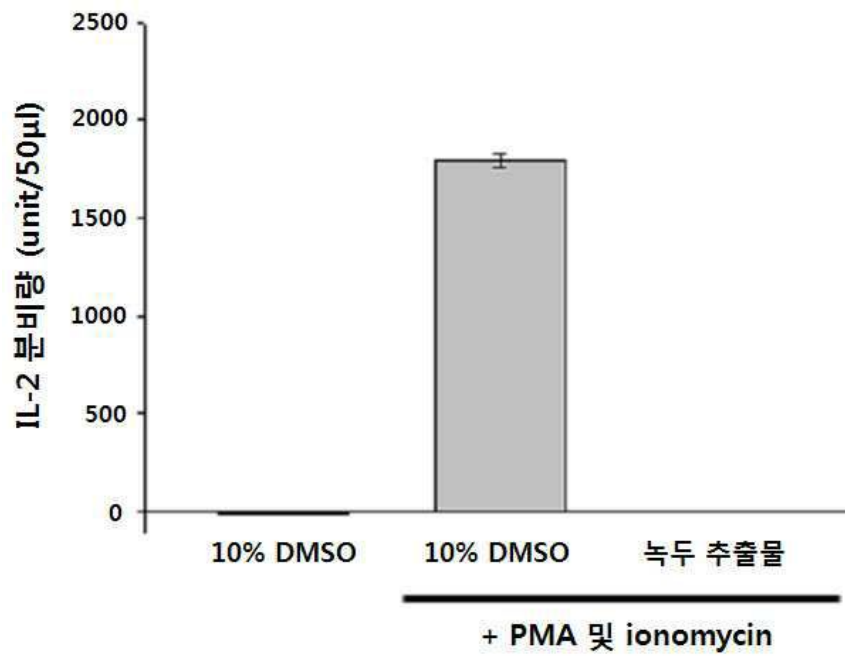
도면1



도면2



도면3



도면4

