



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월20일
(11) 등록번호 10-2353436
(24) 등록일자 2022년01월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/423 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 1/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/423 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0122930
(22) 출원일자 2020년09월23일
심사청구일자 2020년09월23일
- (56) 선행기술조사문헌
Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech
Repub., 156:XX/1-5, 2012.
J. Nat. Prod., 80, 235, 2017.
J. Nat. Prod., 68, 891, 2005.
- (73) 특허권자
군산대학교산학협력단
전라북도 군산시 대학로 558 (미룡동,
군산대학교)
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
- (72) 발명자
노정래
전라북도 군산시 대학로 558 (미룡동,
군산대학교)
허정두
대전광역시 유성구 가정로 141
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

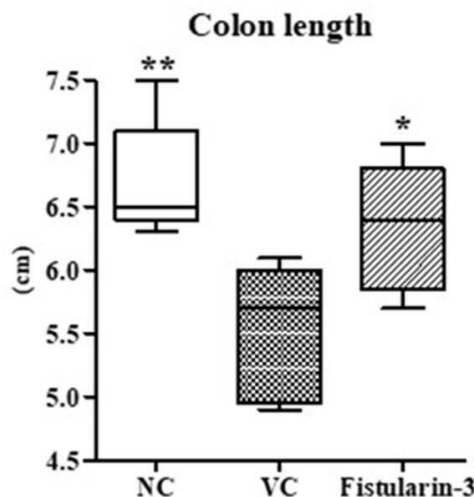
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 피스투라린-3을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명의 Fistularin-3은 DSS(dextran sodium sulfate)로 유도된 만성 장염 유도 마우스의 체중 감소, 설사 및 혈변 증상을 완화시키고 대장 길이를 회복시키며, 대장 점막고유층 내에 침윤한 면역 세포의 유세포 분석 결과 본 발명의 화합물 투여시 염증 완화 소견을 나타내는 것을 확인하였으므로 염증성 장 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 1/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

정은주

경상남도 진주시 동진로 33 (칠암동)

(72) 발명자

김나현

대전광역시 유성구 가정로 141

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525010160
과제번호	2017048812
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양수산생명공학기술개발(R&D)
연구과제명	해외해양생물로부터 사이토카인 조절을 통한 염증성 장 질환 치료제 신규 선도물질
도출	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	군산대학교산학협력단
연구기간	2020.02.01 ~ 2020.12.31

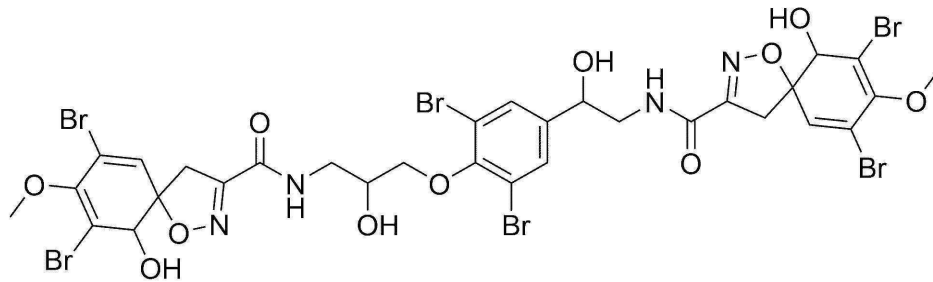
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 염증성 장 질환은 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 크론병(Crohn's disease), 베체트병(Behcet's disease) 또는 장염(enteritis)인, 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 설사 또는 혈변 증상을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 염증세포의 대장 침윤 정도를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

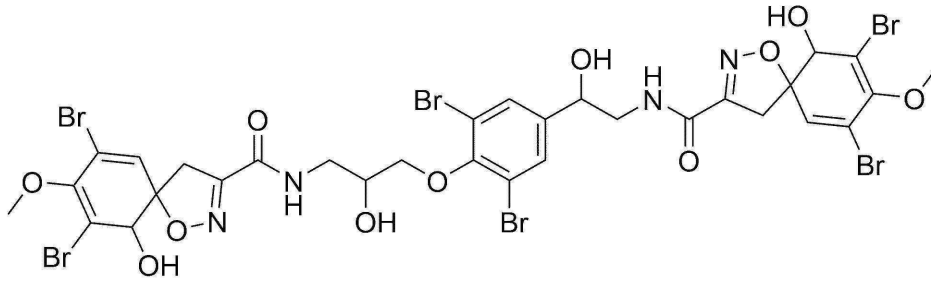
상기 약학적 조성물은 IL17A(interleukin-17A)를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환

환의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서,

상기 염증성 장 질환은 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 크론병(Crohn's disease), 베체트병(Behcet's disease) 또는 장염(enteritis)인, 염증성 장 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 피스튜라린-3을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 염증성 장질환은 호전과 악화를 반복하며 6개월 이상 만성적으로 소화기관에 염증을 일으키는 질환으로 아직까지 정확한 발병 원인이나 발병의 기전이 밝혀지지 않았으나, 대표적으로 크론병, 궤양성 대장염, 베체트병이 본 범주에 속하며, 넓은 의미로는 세균성, 바이러스성, 아메바성, 결핵성 장염 등의 감염성 장염과 허혈성 장질환, 방사선 장염, 만성 장염 등의 장에서 발생하는 모든 염증성 질환을 포함할 수 있다.

[0004] 현재까지 밝혀진 염증성 장질환의 유력한 발병원인 중 한 가지는 염증매개물질(proinflammatory mediator)의 과도한 생성으로 인해 장내 항상성이 파괴되어 일어나는 것으로 생각되고 있다 (Singh UP et al., Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients, Cytokine. 2016 Jan;77:44-9). 염증매개물질은 선천성 면역에서 외부 이물질에 대한 방어 및 재구성에 중요한 역할을 하지만, 과도하게 분비된 염증매개물질은 장내 면역 항상성을 파괴시키고, 또한 면역세포의 장조직에 대한 침입을 유도시키고 이는 지속적인 염증매개물질을 발현시키며 심한 경우 암으로 발전하게 된다.

[0005] 최근에는 서구화되어 가는 생활 습관의 영향으로 인하여 우리나라에서도 발병 빈도가 증가하고 있는 추세이다. 특히 염증성 장 질환 환자의 경우 정상인에 비해 대장으로 발전할 가능성이 6배 이상 높기 때문에 적기에 치료가 필수적이나, 아직까지 염증성 장 질환을 근본적으로 치료할 수 있는 치료제가 개발되지 못한 실정이며, 프로스타글란딘(prostaglandins)의 생성을 차단하는 5-아미노살리실산(5-aminosalicylic acid, 5-ASA) 계통 약물 예를 들어, 설파살라진 등을 이용하거나 스테로이드류의 면역억제제를 사용하고 있으나, 치료 효과가 미미하거나 복부허실, 두통, 간질환, 소화성 궤양, 당뇨병, 스테로이드성 신장병 등과 같은 부작용이 문제가 되고 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 인식하고 연구한 끝에 해면(*Ecionemia acervus*)으로부터 분리한 화합물을 만성 장염이 유도된 동물모델에 투여한 결과, 마우스의 체중 감소, 설사와 혈변 증상을 완화시키고, 대장 길이가 회복되며 장 조직 내 침윤한 대식세포의 활성을 감소시킴을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

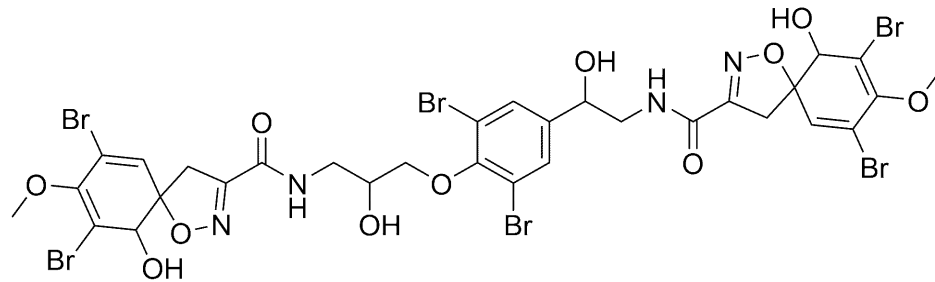
[0008] 본 발명의 일 목적은 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 일 목적은 염증성 장 질환의 예방 또는 개선용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

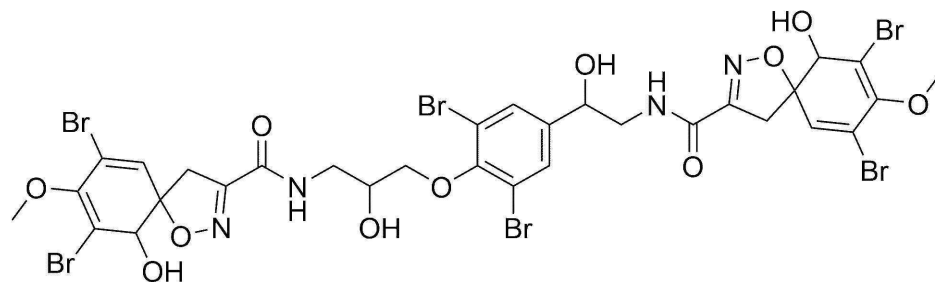
[0012] [화학식 1]



[0013]

[0015] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0016] [화학식 1]



[0017]

발명의 효과

[0019] 본 발명의 Fistularin-3은 DSS(dextran sodium sulfate)로 유도된 만성 장염 유도 마우스의 체중 감소, 설사 및 혈변 증상을 완화시키고 대장 길이를 회복시키며, 대장 점막고유층 내에 침윤한 면역 세포의 유세포 분석 결과 본 발명의 화합물 투여시 염증 완화 소견을 나타내는 것을 확인하였으므로 염증성 장 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 해면(*Ecionemia acevus*)에서 분리한 본 발명에 따른 실시예 1 화합물 Fistularin-3의 고해상도 질량 크로마토그램을 나타내는 도면이다.

도 2는 해면(*Ecionemia acevus*)에서 분리한 본 발명에 따른 실시예 1 화합물 Fistularin-3의 수소 NMR 스펙트럼(상), 탄소 NMR 스펙트럼(하)을 나타내는 도면이다.

도 3은 마우스에 DSS를 급여하여 만성 장염을 유도하는 실험 기간 동안, 각 마우스 그룹의 체중을 나타내는 도면이다.

(NC: 정상 대조군

VC: 장염 대조군

Fistularin-3: Fistularin-3 투여군)

도 4는 마우스에 DSS를 급여하여 만성 장염을 유도하는 실험 기간 동안, 각 마우스 그룹의 체중 및 장염 증상을 바탕으로 산출한 질병 활성도(disease activity index, DAI)를 나타내는 도면이다.

도 5는 각 마우스 그룹의 질병 활성도의 AUC(area under the curve) 값을 구하여 마우스 그룹별로 실시한 일원 배치 분산 분석의 결과를 나타내는 도면이다.

도 6은 마우스에 DSS를 급여하여 만성 장염을 유도하는 실험 종료 후, 각 마우스 그룹으로부터 적출한 대장을 촬영한 사진을 나타내는 도면이다.

도 7은 마우스에 DSS를 급여하여 만성 장염을 유도하는 실험 종료 후, 각 마우스 그룹으로부터 적출한 대장의 길이를 그래프로 나타낸 도면이다.

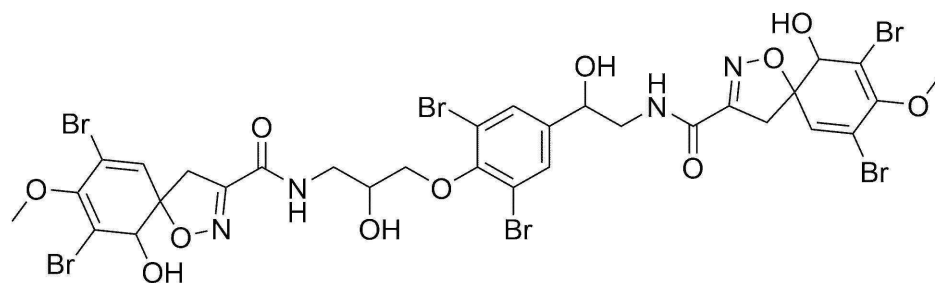
도 8은 마우스에 DSS를 급여하여 만성 장염을 유도하는 실험 종료 후, 각 마우스 그룹으로부터 적출한 대장의 점막고유층 내 면역세포의 유세포분석 결과를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염 증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[화학식 1]



상기 염증성 장 질환은 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 크론병(Crohn's disease), 베체트병(Behcet's disease) 또는 장염(enteritis)일 수 있다.

본 발명은 상기 약학적 조성물을 만성 장염이 유도된 동물 모델에 투여한 결과, 장염 대조군에 비해 체중 감소가 유의적으로 회복됨을 확인하였다(도 3 내지 도 5).

또한, 본 발명자들은 상기 약학적 조성물을 만성 장염이 유도된 동물 모델에 투여한 결과, 설사 및 혈변 증상을 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 4 및 도 5).

또한, 본 발명자들은 상기 약학적 조성물을 만성 장염이 유도된 동물 모델에 투여한 결과, 장염 대조군에 비해 대장 길이가 유의할 정도로 회복됨을 확인하였다(도 6 및 도 7).

또한, 본 발명자들은 상기 약학적 조성물을 만성 장염이 유도된 동물 모델에 투여한 후, 대장 점막고유층 내 면역세포의 유세포분석(Flow cytometry) 결과 염증 완화 조건이 나타남을 확인하였다(도 8).

따라서, 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 만성 장염 유도 마우스의 체중 감소, 설사와 혈변과 같은 임상 증상을 완화시키고 대장 점막고유층 내 염증 완화 조건을 나타내는데, 구체적으로 IL17A(interleukin-17A)를 감소시키고 염증세포의 대장 침윤 정도를 감소시킬 수 있으므로 염증성 장 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 포함할 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 조성물을 생체 내에 전달하는데 적합한 것이면 모두 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 담체는 Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc.에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 텍스트로스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 또는 이의 혼합물일 수 있다. 또한, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등과 같은 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다.

상기 조성물을 제제화하는 경우, 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희

석제 또는 부형제를 첨가할 수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 경구용 제제 또는 비경구용 제제로 제형화될 수 있다. 경구용 제제로는 고형 제제 및 액상 제제가 포함될 수 있다. 상기 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 또는 트로키제일 수 있고, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제를 첨가하여 조제할 수 있다. 상기 부형제는 전분, 탄산 칼슘, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 또는 이의 혼합물일 수 있다. 또한, 상기 고형 제제는 윤활제를 포함할 수 있고, 그 예로는 마그네슘 스테arate, 탈크등이 있다. 한편, 상기 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제일 수 있다. 이때, 상기 액상 제제에는 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등과 같은 부형제가 포함될 수 있다.

[0038] 상기 비경구용 제제는 주사제, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 파우더 및 크림 등을 포함할 수 있다. 상기 주사제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제 등을 포함할 수 있다. 이때, 비수성용제 또는 현탁용제로서는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름이나, 에틸올레이트와 같이 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

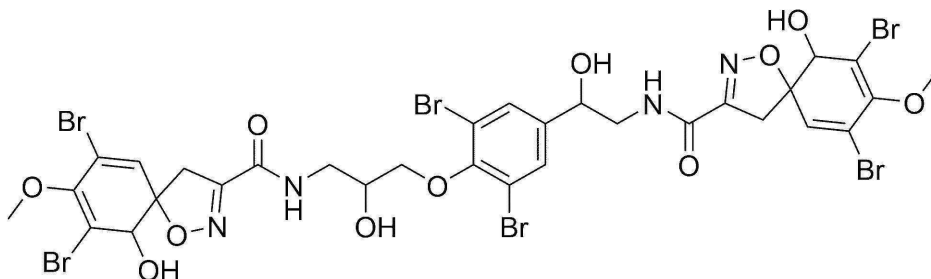
[0039] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 복강내, 직장내, 피하, 정맥, 근육내 또는 흉부내 주사 방식을 포함할 수 있다.

[0040] 상기 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 이는 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 환자의 민감도, 투여 시간, 투여 경로, 치료기간, 동시에 사용되는 약물 등에 따라 달라질 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명에 따른 약학 조성물에 포함되는 유효성분의 양은 0.0001 내지 100 mg/kg, 구체적으로 0.001 내지 70 mg/kg일 수 있다. 상기 투여는 하루에 1회 또는 수회일 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 병용 투여시, 투여는 순차적 또는 동시에 일 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 장 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0044] [화학식 1]



[0045]

[0046] 상기 염증성 장 질환은 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 크론병(Crohn's disease), 베체트병(Behcet's disease) 또는 장염(enteritis)일 수 있다.

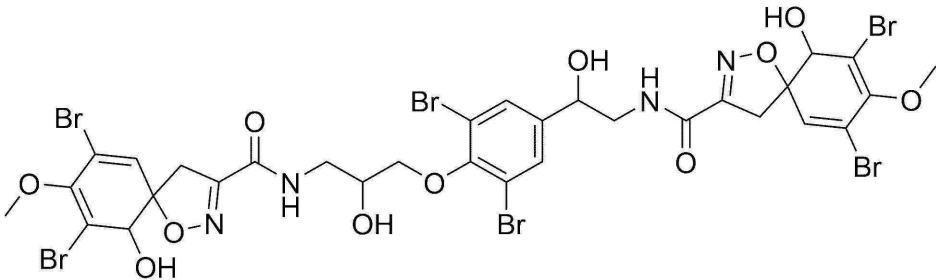
[0047] 본 발명의 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 이때, 첨가되는 유효성분의 함량은 목적에 따라 결정될 수 있고, 일반적으로는 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부일 수 있다.

[0048] 건강기능식품의 형태 및 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환의 형태일 수 있다. 상기 건강기능식품은 추가성분으로서 여러 가지 향미제, 감미제 또는 천연 탄수화물을 포함할 수 있다. 상기 감미제는 천연 또는 합성 감미제일 수 있고, 천연 감미제의 예로는 타우마틴, 스테비아 추출물 등이 있다. 한편, 합성 감미제의 예로는 사카린, 아스파르탐 등이 있다. 또한, 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드, 디사카라이드, 폴리사카라이드, 올리고당 및 당알코올 등일 수 있다.

[0049] 본 발명의 건강기능식품은 상기 서술한 추가성분 외에, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙스탄 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등을 더 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합으로 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 조성물의 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택될 수 있다.

[0051] 이하, 본 발명의 실시예 및 실험예를 하기에 구체적으로 예시하여 설명한다. 다만, 후술하는 실시예 및 실험예는 본 발명의 일부를 예시하는 것일 뿐, 본 발명에 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] <실시예 1> 화합물 Fistularin-3 분리를 통한 염증성 장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 준비



[0054]
[0055] Fistularin-3

[0056] IUPAC 네임: 7,9-dibromo-N-[3-[2,6-dibromo-4-[2-[(7,9-dibromo-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-azaspiro[4.5]deca-2,7,9-triene-3-carbonyl)amino]-1-hydroxyethyl]phenoxy]-2-hydroxypropyl]-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-azaspiro[4.5]deca-2,7,9-triene-3-carboxamide

[0058] 2018년 베트남에서 채집된 해면 *Ecionemia acervus*에서 분리하여 얻은 상기 화합물 Fistularin-3 (도 1, 도 2)을 포함하는 약학적 조성물을 준비하였다.

표 1

[0060] 실시예 1 화합물(Fistularin-3)의 NMR 스펙트럼 데이터(CD₃OD NMR 용매, 500 MHz for ¹H)

번호	탄소 화학적 이동값	수소 화학적 이동값
1, 1 ‘	75.49, CH / 75.45, CH	4.08, br s
2, 2 ‘	114.2, C	
3, 3 ‘	149.3, C	
4, 4 ‘	122.85, C / 122.78, C	
5, 5 ‘	132.24, CH / 132.18, CH	6.41, d(7.6)
6, 6 ‘	92.53, C / 92.50, C	
7, 7 ‘	40.11, CH ₂ 40.07, CH ₂	3.78, d(18.3) / 3.10, d(18.3) 3.75, d(18.3) / 3.05, d(18.3)
8, 8 ‘	155.23, C / 155.14, C	
9, 9 ‘	161.81, C / 161.70, C	
10	43.7, CH ₂	3.71, dd(13.9, 4.7) / 3.49, dd(13.9, 7.6)
11	70.1, CH	4.20, m
12	75.9, CH ₂	4.03, dd(9.3, 5.6) / 3.98, dd(9.3, 5.6)
13	153.3, C	
14	118.9, C	
15	131.8, CH	7.60, s
16	143.3, C	
17	71.6, CH	4.75, dd(7.3, 4.7)
18	47.7, CH ₂	3.47, dd(13.9, 4.7) / 3.41, dd(13.9, 7.3)

[0062] <실험예 1> 만성 장염 동물모델의 제조 및 Fistularin-3 투여

[0063] Japan SLC로부터 구매한 암컷 C57BL/6 마우스를 체중이 충분히 증가할 수 있도록 10일 이상의 순화기간을 준 후, 체중이 평균 19±2 g이 되면 무작위로 6마리씩 3개의 그룹으로 분리하여 개별 와이어 케이지에 넣어 실험을 진행하였다. 3개의 그룹은 각각 정상 대조군(NC: normal control), 장염 대조군(VC: vehicle control), 및 Fistularin-3 투여군(Fistularin-3)이다. 장염 대조군과 Fistularin-3 투여군의 마우스에 사람에서 발생하는 염증성 장 질환(inflammatory bowel disease, IBD)을 유도하기 위하여 DDS(dextran sodium sulfate)를 음수를

통해 투여하는 방법을 이용하였다. 구체적으로, 유도물질은 1.5% DSS(MP bioscience사의 colitis grade DSS를 구매하여 사용)를 7일간 음수로 급이하고 이후 7일간 멸균 사육수를 급이하는 것을 3회 반복하여 총 42일간 진행하였다(표 2). Fistularin-3 투여군 마우스에는 시험물질 Fistularin-3를 10 mg/kg의 용량으로 매일 1회 경구 투여하였다.

표 2

	1 cycle		2 cycle		3 cycle		
순화기간	1.5% DSS (7일)	물 (7일)	1.5% DSS (7일)	물 (7일)	1.5% DSS (7일)	물 (7일)	실험종료
	임상 증상 관찰 및 체중 측정						

<실험예 2> 임상 증상 및 체중 변화 관찰

Fistularin-3이 만성 장염 모델의 임상 증상 및 체중에 영향을 주는지 확인하기 위하여, 실험 기간 동안 각 마우스 그룹의 만성 장염 증상 및 체중 변화를 측정하였다. 구체적으로, 체중은 실험기간 동안 매일 1회 오전 9~10시 사이에 측정하였고, 장염 증상은 케이지 아래에 흰 종이를 깔고 하루 1회 배변 상태를 관찰하여 설사 및 혈변 유무를 기록하였다. 측정한 체중 및 장염 증상을 바탕으로 아래 표 3에 따라 질병 활성도(disease activity index, DAI)를 산출하였다. 질병 활성도(DAI score)는 기존의 참고 문헌을 바탕으로 변형하여 42일간 측정하여 그 변화 정도를 그래프로 나타내었으며, 질병 활성도 분석은 AUC(area under the curve) 값을 구하여 군별로 일원배치 분산분석을 실시하였다. 체중 변화를 기록한 결과를 도 3에 나타내었으며, 질병 활성도 분석 결과를 도 4에 나타내었다.

표 3

체중 손실	① 장염 대조군(VC)의 당일 평균 체중 - 모든 장염 유도군의 당일 체중 (단, 음의 값은 0으로 평가)
설사 (loose stool)	② 0=증상 없음(negative), 1=중등도(moderate), 2=중증(severe)
혈변 (blood in the stool)	③ 0=증상 없음(negative), 2=증상 있음(positive) (혈변에 가중치를 두고 평가)
DAI	①+②+③

그 결과, 정상 대조군(NC)은 점차적으로 체중이 증가하였으나, 장염 대조군(VC) 및 Fistularin-3 투여군(Fistularin-3)은 DSS cycle 마다 체중의 감소가 관찰되었으며, 3번째 cycle에서 가장 큰 폭의 체중 감소가 관찰되었다. Fistularin-3 투여군에서는 체중 변동의 폭이 장염 대조군에 비해 작은 것을 확인하였다(도 3). 또한, Fistularin-3 투여군에서 DAI AUC 수치는 평균 43.94 ± 23.31 로 장염 대조군 57.74 ± 19.29 와 비교하여 유의적으로 감소함을 확인하였다(도 4 및 도 5).

<실험예 3> 대장 길이 측정

Fistularin-3이 만성 장염 동물모델의 대장 길이에 영향을 주는지 확인하기 위하여, 실험 종료 후 각 마우스를 안락사한 후 부검하여 대장을 적출하고, 회맹연접부부터 항문까지 펼쳐서 자를 대고 대장의 길이를 측정하고 사진을 촬영하였으며 이후 대장 조직은 세로 절개하여 내강을 비우고 cold PBS로 세척하였다. 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

그 결과, 장염 대조군의 대장 길이는 평균 5.52 ± 0.54 cm로 관찰되었고 이에 비해 Fistularin-3 투여군의 대장 길이는 평균 6.34 ± 0.51 로 장 길이 회복이 관찰되었다(도 6 및 도 7).

<실험예 4> 점막고유층 내 면역세포의 유세포 분석

대장 점막고유층 내에 침윤한 면역세포에서 CD4⁺T 세포와 CD11b⁺ 단핵 세포(mononuclear cell)를 분석하기 위하여 FACScelestaTM으로 유세포 분석을 실시하였다. 구체적으로 각 마우스 대장의 점막고유층(lamical propia) 세포 분리를 위하여 EDTA 첨가 PBS 용액으로 상피세포를 제거하고 collagenase VIII 처리를 통해 단일 세포를 획득

하였다. 이후 percoll gradient 용액을 이용하여 면역세포만을 추출하였다. 얻어낸 세포는 고정하기 전 단계에서 fixable viability dye 염색 및 CD4, CD11b 표면 항원 염색을 하였다. 이후 세포 고정 및 투과화(permeabilization) 과정을 거쳐 세포 내 전사 인자(transcription factor)(ROR γ T, foxp3) 및 사이토카인(cytokine) 염색을 실시하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

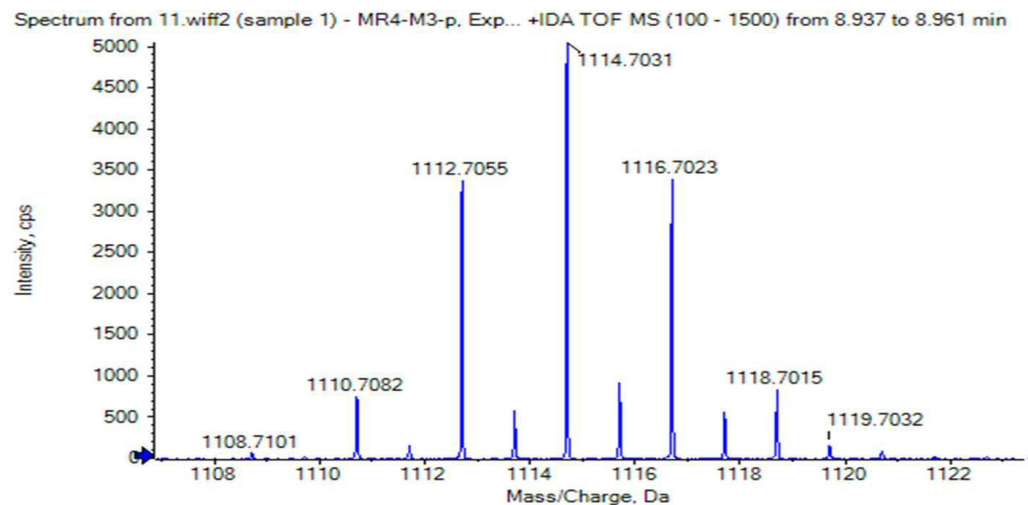
[0078] 그 결과, Fistularin-3 투여군에서 CD4+ T세포 및 CD11b+ 단핵 세포의 절대 수치(# events)는 감소하였으나 전체 면역세포 중 비율(FVD, %)은 CD4+ T세포는 증가하고 CD11b+ 세포는 감소하였다. 따라서 염증세포의 대장 침윤 정도는 감소하였으며, 그 중에서도 CD11b+을 나타내는 대식세포 및 단핵수의 개체군 감소는 장염의 완화 소견으로 판단된다. 추가적인 CD4+ T세포 분석에서 전-염증성 세포(pro-inflammatory cell)인 Th17(T helper 17)의 감소 및 해당 세포가 분비하는 IL17A(interleukin-17A) 감소가 관찰되었으며, 염증 조절 인자로 알려진 Foxp3+(forkhead box P3) 세포가 절대수치와 전체 면역세포 중 비율이 모두 증가하였음을 관찰하였다. 따라서 CD4+ T세포 내에서도 염증이 완화된 소견을 나타낸 것으로 판단된다(도 8).

[0080] 상기 실험을 통해 DSS를 통해 만성 장염이 유도된 마우스에 화합물 Fistularin-3을 투여한 결과 체중 감소 및 설사 등의 임상증상이 완화됨을 확인하였으며, 장 조직에서 염증세포 침윤 감소에 따른 장염 완화, Th17 감소 및 Foxp3 T 세포 증가를 확인하였다. 따라서 Fistularin-3은 만성 장염 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

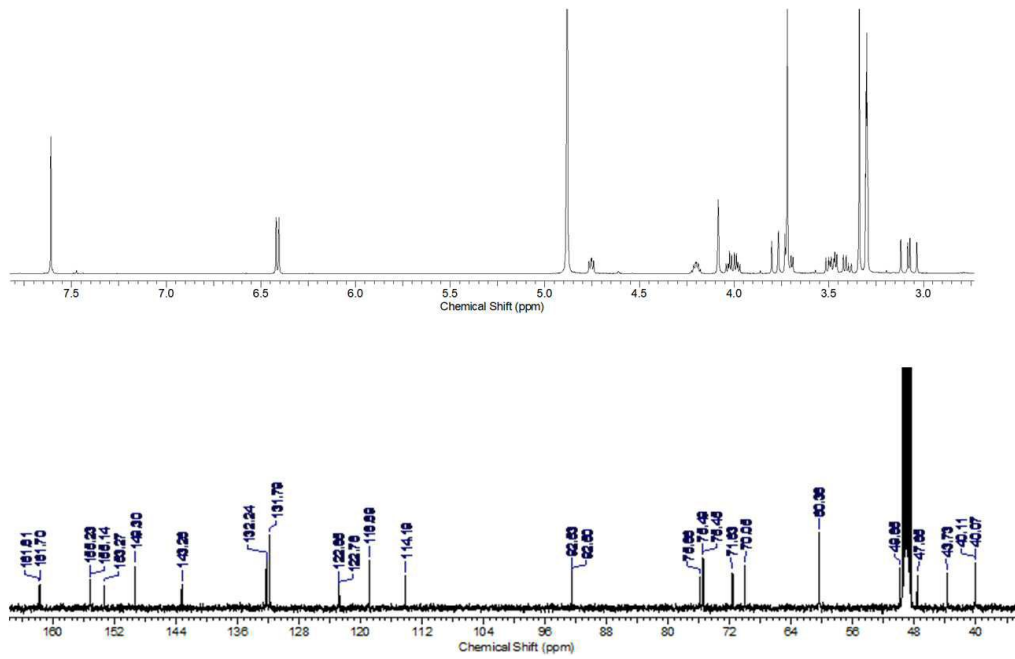
[0082] 이상, 본 발명을 바람직한 제조예, 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

도면

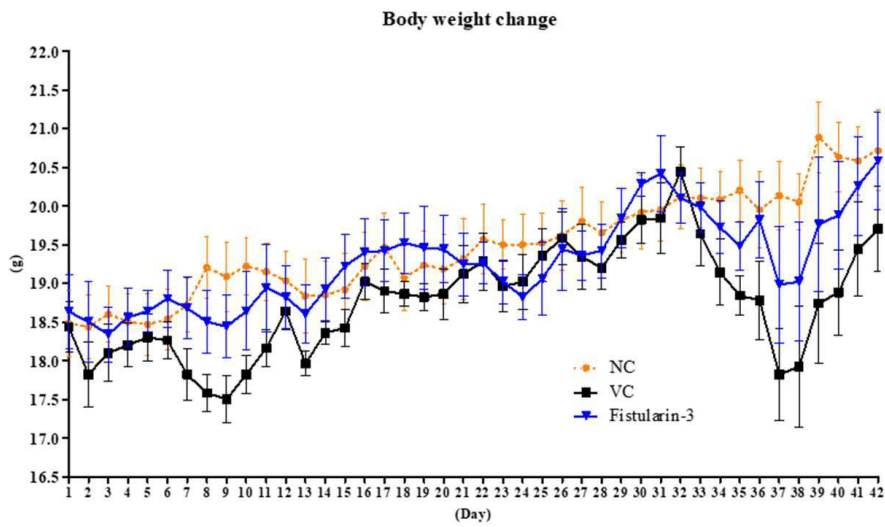
도면1



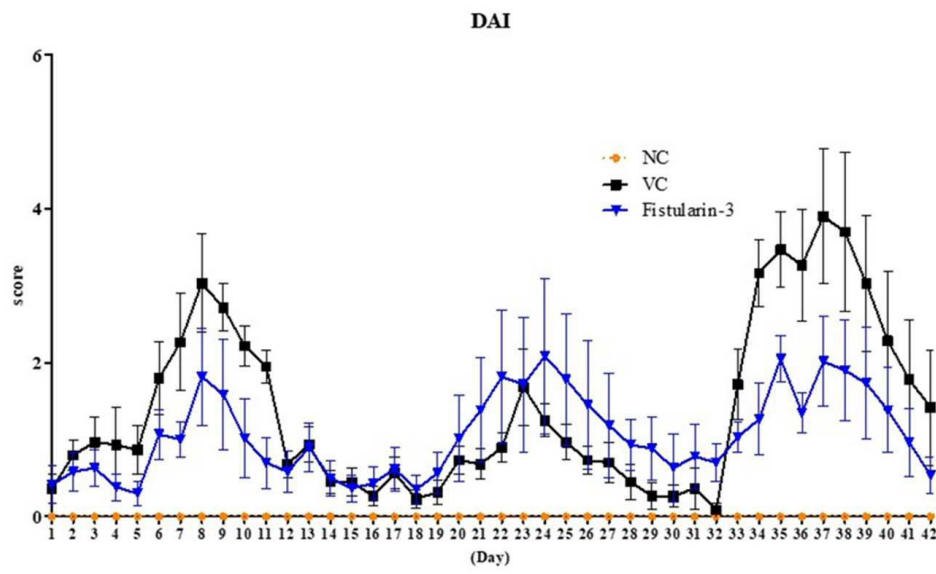
도면2



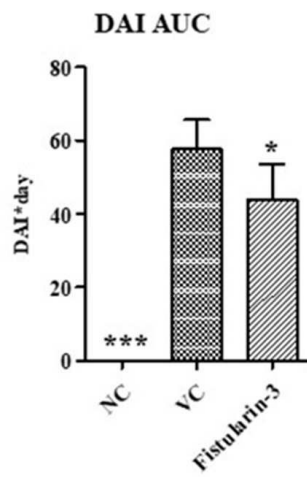
도면3



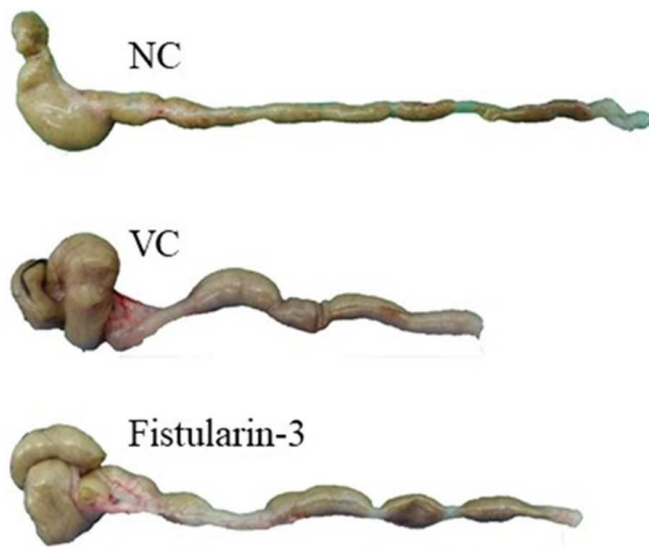
도면4



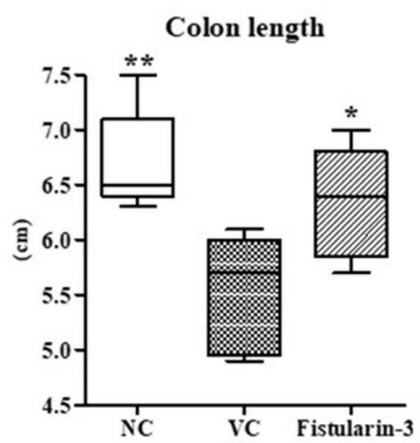
도면5



도면6



도면7



도면8

