

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 9월 21일 (21.09.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/160079 A2

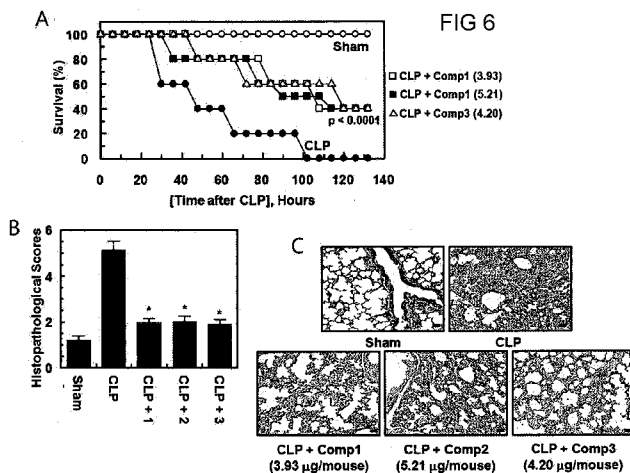
- (51) 국제특허분류:
A61K 31/4985 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61K 9/06 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002796
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 15일 (15.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0030680 2016년 3월 15일 (15.03.2016) KR
- (71) 출원인: 경북대학교 산학협력단 (KYUNGPPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 41566 대구시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교), Daegu (KR). 경북대학교 병원 (KYUNGPPOOK NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 41944 대구시 중구 동덕로 130, Daegu (KR).
- (72) 발명자: 배중섭 (BAE, Jong-Sup); 42282 대구시 수성구 옥수천로 7, 103 동 1603 호 (옥수동, 태왕월드하이츠아파트), Daegu (KR).
- (74) 대리인: 이희숙 (LEE, Hee Sook); 06141 서울시 강남구 테헤란로 33길 11, 9층 (역삼동, JS빌딩) 시원국제특허법률사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING DIKETOPIPERAZINE AS EFFECTIVE INGREDIENT FOR TREATMENT OF SYSTEMIC INFLAMMATORY DISEASE

(54) 발명의 명칭: 디케토피페라진을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환의 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising diketopiperazine as an effective ingredient for preventing or treating a systemic inflammatory disease and, more particularly, to a pharmaceutical composition comprising the diketopiperazine represented by any one of chemical formulas 1 to 3 as an effective ingredient for prevention or treatment of a systemic inflammatory disease. The method of the present invention inhibits the secretion of high mobility group box 1 (HMGB1) to regulate pre-inflammatory signaling and to suppress vascular inflammatory responses, thus finding useful applications in preventing and treating systemic inflammatory diseases.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2017/160079 A2



본 발명은 디케토피페라진을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학식 1 내지 화학식 3 중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 HMGB1(High mobility group box 1)의 분비를 억제하며 전염증성 시크널링을 조절하고 혈관 염증성 반응을 억제하여 전신염증질환의 예방 및 치료하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

디케토피페라진을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환의 치료용 약학적 조성물

【기술분야】

본 출원은 2016년 3월 15일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2016-0030680호를 우선권으로 주장하고, 상기 명세서 전체는 본 출원의 참고문헌이다.

본 발명은 디케토피페라진을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환의 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

패혈증은 심각한 감염에 의한 전신성 염증 반응으로 즉시 치료하지 않으면 쇼크, 여러 장기의 손상 및 사망을 유발할 수 있고, 최신 치료법에도 불구하고, 중환자실에서 사망의 주요 원인이다. 핵 전사 인자로 알려진 HMGB1은 패혈증의 후기 단계 매개물질(late mediator)로서 관여한다(Wang et al., 2009; Yang et al., 2004). 따라서 심각한 패혈증 환자의 혈청에 HMGB1의 농도가 높으면 사망률이 증가할 가능성이 있다(Karlsson et al., 2008).

이에 치명적인 전신성 염증의 후기 단계 매개물질을 표적으로 하는 것은 치료 범위를 확대하고, 연속적인 염증 반응의 유해한 효과를 억제하기 위한 새로운 접근 방식을 의미한다. HMGB1은 패혈증뿐만 아니라 다른 염증성 질환에서 임상적 개입에 대한 기회를 제공하는 분자 표적이다.

HMGB1(high mobility group box 1)은 비히스톤 핵 단백질로, 활성화된 대식세포, 수지상 세포 및 NK세포(natural killer cell)로부터 활발히 생성되며 부수적으로 괴저성 세포(necrotic cell)로부터 수동적 분비되고, 중요한 구조적 역할 및 유전자 전사 조절과 함께 내 핵 기능(intracellular nuclear function)하며, 그리고 세포 외 활성(extracellular activity)을 가진다. HMGB1은 인체내에서 흉선, 림프절, 고환, 태아의 간 등에서 높은 농도로 존재하며, 간세포와 뇌세포를 제외하면

대부분의 세포에서는 주로 핵 내에 존재하지만, 염증을 유발하는 물질에 의해 세포나 조직이 활성화되면 세포 밖으로 분비된다. 세포 내에서는 전사 조절 및 염색체 구조를 결정하는 DNA에 결합하며, 손상된 조직에서는 항상성 반응을 조절하는 위험 신호로서 작용한다(Gallucci and Matzinger, 2001).

HMGB1은 염증의 매개 물질로서, RAGE(receptor for advanced glycation end products), TLR(toll like receptor)-2, TLR-4에 높은 친화력으로 결합하며, 내피 세포에서 tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-6의 분비를 증가하고, nuclear factor (NF)- κ B, extracellular regulated kinase (ERK) 1과 2의 인산화를 증가시켜, HMGB1에 의한 염증반응을 유발한다(Bae, 2012; Hori et al., 1995; Park et al., 2004). 또한 HNGB1은 NF- κ B 소단위의 DNA-결합 활성(DNA-binding activity)을 향상시킴으로서 세포 접착 분자(cell adhesion molecules, CAMs)의 NF- κ B 의존적 발현을 촉진하고(Agresti et al., 2003), 내피세포에서 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin과 같은 세포 접착 분자의 발현을 유도한다(Andersson et al., 2000; Bae, 2012; Lotze and Tracey, 2005; Yang et al., 2006). 이는 백혈구의 소집(leukocyte recruitment)을 통하여 염증을 증가시킨다.

천연물에서 방부제(anti-septic)를 스크리닝 하는 과정에서, 해양 자원으로 부터 추출하여 독립적인 두 가지 발효 균주의 에틸 아세테이트 추출물은 HUVEC세포에서 HMGB1의 발현을 억제하는 효과를 나타냈다. 크로마토그래피를 반복하여, 3가지 디케토피페라진(cyclo (L-Pro-D-Val), cyclo (L-Pro-L-Tyr), cyclo (L-Pro-D-Leu))을 획득하였고, 이와 같이 프롤린을 포함하는 화합물은 발효 균주, 곰팡이 균주 및 다른 미생물로부터 획득할 수 있다(Cuong et al., 2015; Park and Strobel, 1994; Adamczeski et al., 1995).

여러 디케토피페라진 중 몇몇은 항생제와 소염 활동을 포함한 다양한 생물학적 활성이 있다고 알려졌지만, 인간 내피 세포 및 마우스에서 HMGB1- 또는 CLP- 매개된 패혈성 반응에 대한 프롤린을 함유하는 디케토피페라진의 항패혈성 효과는 알려져 있지 않다.

【발명의 상세한 설명】

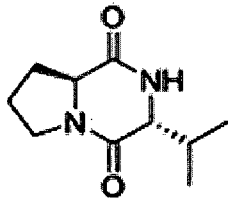
【기술적 과제】

이에 본 발명자들은 전신염증질환에 대한 치료물질을 연구하던 중, 디케토피페라진이 HMGB1의 분비를 억제하고 이와 관련된 분자적 매커니즘을 조절하여 HMGB1

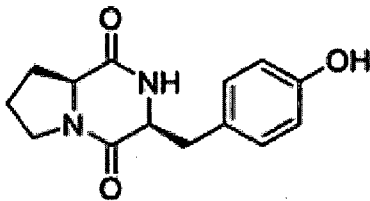
에 의해 매개된 염증성 반응을 억제하고, 전신염증질환 동물 모델에서 치료효과가 있는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

따라서 본 발명의 목적은 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

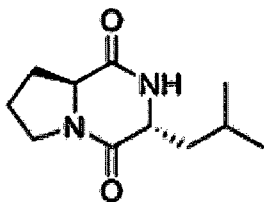
<화학식 1>



<화학식 2>

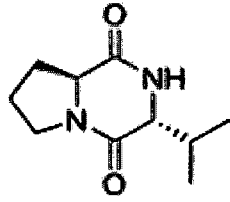


<화학식 3>

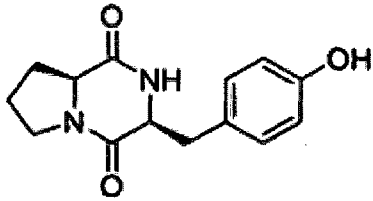


본 발명의 다른 목적은 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료용 제제를 제조하기 위한 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)의 용도를 제공하는 것이다.

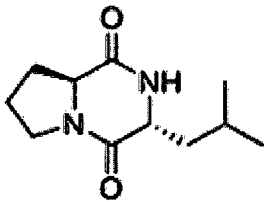
<화학식 1>



<화학식 2>

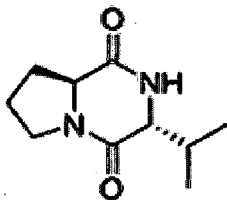


<화학식 3>

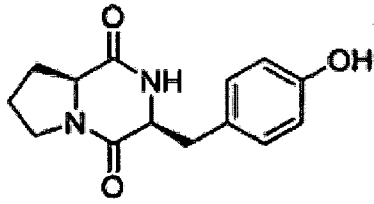


본 발명의 다른 목적은 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료 방법을 제공하는 것이다.

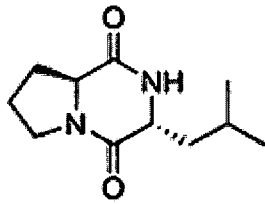
<화학식 1>



<화학식 2>



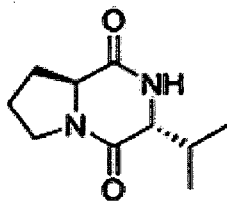
<화학식 3>



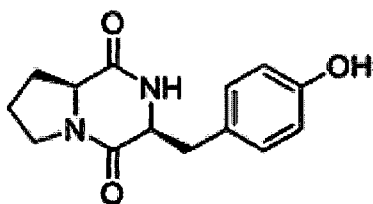
【기술적 해결방법】

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

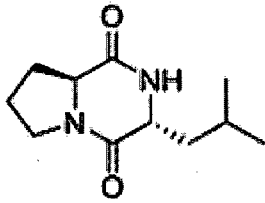
<화학식 1>



<화학식 2>

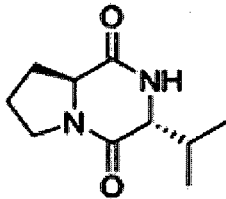


<화학식 3>

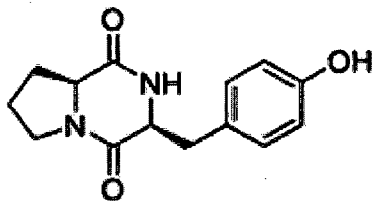


본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료용 제제를 제조하기 위한 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)의 용도를 제공한다.

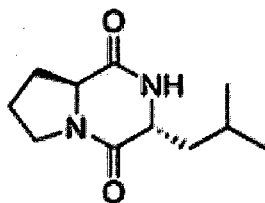
<화학식 1>



<화학식 2>



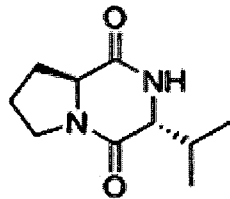
<화학식 3>



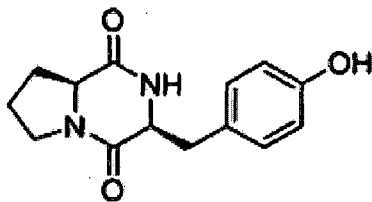
본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어

는 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료 방법을 제공한다.

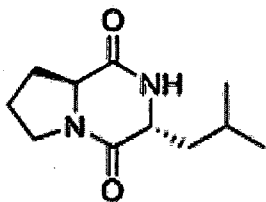
<화학식 1>



<화학식 2>



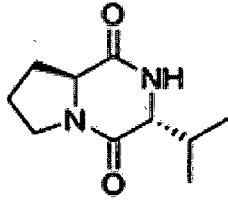
<화학식 3>



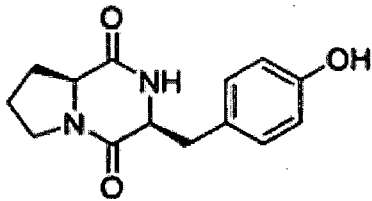
이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

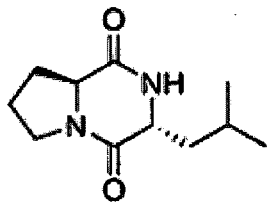
<화학식 1>



<화학식 2>



<화학식 3>



본 발명에서 ‘디케토피페라진(diketopiperazine)’은 유기화합물의 일종으로 2,5-디케토피페라진의 관용명이다. 이는 글리신무수물에 해당하며, 넓은 뜻으로는 치환기가 있는 경우에도 디케토피페라진이라고 한다. 이들은 결정성인 고체로서 α -아미노산이나 디펩티드를 에틸렌글리콜과 같은 끓는점이 높은 용매 내에서 끓이거나 이들 에스테르(유리형)를 가열하면 쉽게 생성된다. 특히 글리신 및 프롤린에스테르는 디케토피페라진화되기 쉬워 이 경우는 유리에스테를 얻는 것이 쉽지 않다. 단백질을 묽은 산 중에 특히 고온에서 가수분해할 때, 혹은 글리세롤에서 180℃도 부근으로 가열하면 여러 가지 디케토피페라진이 생성된다.

본 발명에서는 제주도에서 수집한 침전물과 해면동물에서 *Bacillus* 속 HC001 및 *Picicoccus* 속 12L081 박테리아를 추출하였다. 추출한 박테리아를 각각 배양한 뒤, 배양한 배지를 유기용매로 추출한 뒤 농축하였다. 농축물을 VLC로 분획하여 화학식 1 내지 화학식 3의 디케토피페라진을 획득하였다.

본 발명자들은 혈관내피세포에서 3가지 디케토피페라진이 HMGB1(High mobility group box 1)의 분비 억제뿐만 아니라 전염증성 시그널링 (proinflammatory signaling)을 억제한다는 사실을 처음으로 규명하였으며, 실제로 전신염증질환 동물 모델에서 디케토피페라진이 예방 또는 치료효과가 있다는 사실을 확인하였다.

이는 본 발명의 명세서 실시예에 잘 나타나 있다.

본 발명의 실시예에서 혈관내피세포인 HUVEC 세포를 이용하여 in vitro 상에서 디케토피페라진의 기능을 평가하였다. 혈관내피세포에 LPS를 처리하여 HMGB1의 분비를 유도한 뒤 3가지 디케토피페라진을 각각 처리한 결과, 3가지 디케토피페라진이 LPS에 의해 매개된 HMGB1의 분비를 억제하였다. 또한 HMGB1의 수용체인 TLR2, TLR4, RAGE의 발현을 억제하였으며, HMGB1에 의한 세포골격 재분배를 억제하였다. 또한 디케토피페라진이 HMGB1에 매개된 내피세포에서 백혈구의 이동을 억제하고, VCAM-1, ICAM-1, E-selection의 발현을 억제하여, HMGB1의 신호 전달 경로를 억제하였다. 게다가 디케토피페라진은 염증성 시그널 분자인 nuclear factor- κ B(NF- κ B), extracellular regulated kinases 1/2(ERK1/2)의 활성화 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6)의 생성을 억제하였다.

상기와 같은 효과를 in vivo 상에서 확인하기 위하여, CLP(cecal ligation and puncture)를 실시하여 전신염증질환 마우스 모델을 제작한 뒤 디케토피페라진의 영향을 확인하였다. 그 결과 디케토피페라진이 CLP 수술에 의한 HMGB1의 분비, 백혈구의 이동을 억제하고, 생존율을 높이며, 폐 손상을 억제하여 현저한 치료효과를 나타내었다.

상기와 같이 in vitro 및 in vivo 실험을 통하여, 3가지 디케토피페라진은 HMGB1의 분비를 억제하고, HMGB1에 의해 매개되는 염증성 반응을 억제하여, 전신염증질환을 치료하는 효과가 있다.

본 발명의 ‘전신염증질환(systemic inflammatory disease)’은 염증에 의해 유발되는 발열이나 빈맥, 빈호흡, 백혈구 증가증 등을 동반하는 전신적인 염증반응이다. 이는 감염 이외에도 급성 췌장염, 화상, 외상, 수술 등으로 발생할 수 있는 것으로, 성인형 스틸씨병(adult onset Still's disease, AOSD), 베체트병(Behcet

disease), 크론씨병(Crohn's disease), 연소형 특발성관절염(Juvenile idiopathic arthritis), 전신성 류마티스 질환, 피부발진, 포도막염 또는 전신 혈관염 등을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니다.

바람직하게는 HMGB1(High mobility group box 1)에 의해 매개되는 염증성 질환일 수 있고, 그 종류가 특별히 제한되지 않으나 예를 들어, 전신염증반응증후군(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 패혈증(sepsis), 패혈성 쇼크(septic shock), 급성 폐손상(Acute lung injury), 급성 신장 손상(Acute kidney injury), 다발성 장기 기능부전 증후군(Multiple organ dysfunction syndrome)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

상기 '전신염증반응증후군(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)'은 다양한 중증 임상적 손상에 대한 전신적인 염증반응으로, ACCP/SCCM의 정의에 따라 24시간 이내에 다음의 조건 중 2개 이상의 증상에 의해 진단할 수 있다:

- 체온 38°C (100.4°F) 초과 또는 36°C (96.8°F) 미만;
- 심박수(HR) 90회 박동/분 초과;
- 호흡수(RR) 20회 호흡/분 초과, 또는 동맥혈이산화탄소분압(P_{CO2}) 32 mmHg

미만, 또는 기계적 환기 필요; 및

- 백혈구 계수 (WBC) $12.0 \times 10^9/L$ 초과 또는 $4.0 \times 10^9/L$ 미만, 또는 10% 초과
의 미성숙 대상형 포함.

본 발명에서 '패혈증(sepsis)'은 감염에 의한 전신염증반응증후군으로, 저혈압, 저산소증, 핏뇨증, 대사성산증, 혈소판감소증, 의식장애 등이 나타날 수 있다. 패혈증은 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 전염증성 cytokine의 과도한 생성과 비정상적인 면역체계의 활성화에 의한 과염증반응(hyper-inflammatory response)의 결과이다. 이러한 비정상적인 과염증반응은 조직손상과 장기부전을 초래하게 된다. 단핵구와 대식세포는 다양한 감염성이나 비감염성 자극들에 반응하여 전염증반응(pro-inflammatory response)에 관여하는 다양한 염증 매개물질들을 분비한다. 정상적인 상태에서 염증은 인체를 방어하기 위한 조절 가능한 반응으로, 정상적인 상태에서 cytokine의 분비와 백혈구의 활성화는 염증을 유발하는 물질들을 제거할 정도로 적절하게 일어난다. 그러나 감염에 대한 부적절한 선천성 면역반응에 의해 유발된 과염증반응으로 인하여 패혈증이 발생하게 되고, 이에 따른 염증 매개물질들의 과도한 분비로 다발성 장기부전을 유발할 수 있다.

본 발명의 ‘급성 폐손상(Acute lung injury)’은 급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome, ARDS)라고도 불리며, 심장 외의 원인으로 인해 급성으로 시작된 폐 부종으로 고농도의 산소를 공급하여도 호흡곤란을 일으킨다. 이는 보통 원인 인자에 노출된 후 보통 수시간에서 이틀 정도에 나타나며, 다양한 원인으로 인해 발생한다. 가장 흔한 원인은 패혈증, 심한 외상이며, 세균이나 신체 손상에 의해 혈액으로 화학적 물질이 방출되어, 이것이 폐에 도달해 폐에서 심한 염증이 발생한다.

본 발명의 ‘급성 신장 손상(Acute kidney injury)’은 급성 신부전(acute renal failure, ARF)이라고도 불리며, 신장 기능이 수시간에서 수일에 걸쳐 급격하게 저하되는 것을 말한다. 신장 기능 저하의 결과로 신체 내에 질소 노폐물이 축적되어 혈액 내에 고질소혈증이 일어나고, 체액 및 전해질 균형에 이상이 생긴다. 원인으로서는 전반적인 신체기능 저하로 인하여 신장으로 가는 혈액이 부족한 경우(출혈, 구토, 설사, 저혈압, 심부전 등), 신장 자체의 이상(신장 혈관 이상, 고혈압, 급성 사구체 신염, 혈관염 등), 요도 및 방광 이상(전립선 비대증, 종양 등)이 있다. 증상은 의식 혼탁, 경련, 고혈압, 부정맥, 폐부종, 폐출혈, 식욕부진, 구토, 장 마비, 위장관 출혈, 허혈성 심장질환 등이 있다.

본 발명의 ‘다발성 장기 기능부전 증후군(Multiple organ dysfunction syndrome, MODS)’은 다발성 장기부전(multiple organ failure, MOF)이라고도 불리며, 외상, 수술 후 쇼크 또는 중증 감염증 등 치료경과중에 신체의 주요장기, 즉 심장, 폐, 간, 신장 등의 기능부전이 2개 이상 동시 또는 연속적으로 발생하는 상태를 말한다. 생명유지 활동이 극단적으로 어려워지기 때문에 치사율이 매우 높다. 2개 장기부전에서는 사망률 60-70%, 3개 장기 부전에서는 80-90%라고 한다. 장기부전 수가 늘어남에 따라 사망률은 상승하는데, 부전장기수를 증가시키는 기반에는 감염증이나 그에 따른 en dotoxemia가 중요한 역할을 하고 있다. 다발성 장기 부전은 교통사고와 같은 외부의 충격으로 인하여 다발성 장기부전이 선행하고 이를 계기로 숙주가 면역부전에 빠져, 감염증이 합병해서 더 악화하는 타입인 primary MOF와, 중증감염증이나 패혈증이 선행해서 terminal infection에서 다발성 장기부전이 발생하는 타입인 Secondary MOF로 구분한다.

본 발명에 따른 약학적 조성물은 디케토피페라진을 단독으로 함유하거나 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화 될 수 있으며, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.

약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 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. 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).

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 투여일 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다.

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 락토스,

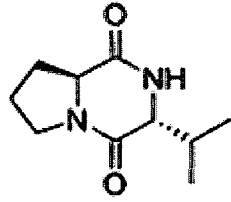
덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 항응집제, 윤햄제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 젤제, 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.

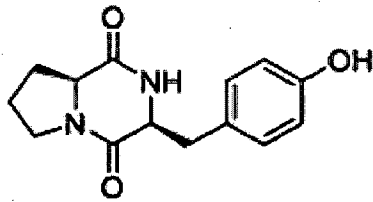
본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 0.01 μ g 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1 μ g 내지 500mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

본 발명은 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료용 제제를 제조하기 위한 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)의 용도를 제공한다.

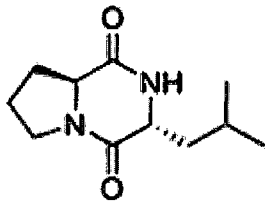
<화학식 1>



<화학식 2>

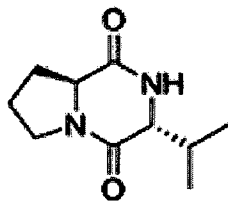


<화학식 3>

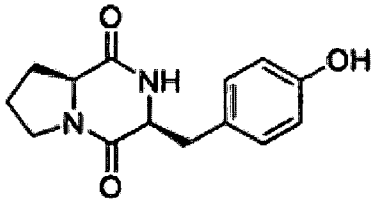


본 발명은 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료 방법을 제공한다.

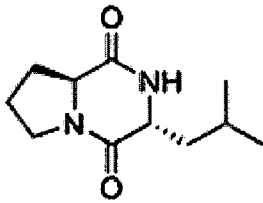
<화학식 1>



<화학식 2>



<화학식 3>



본 발명의 상기 ‘유효량’ 이란 개체에 투여하였을 때, 전신염증질환의 개선, 치료, 예방, 검출 또는 진단 효과를 나타내는 양을 말하며, 상기 ‘개체’ 란 동물, 바람직하게는 포유동물, 특히 인간을 포함하는 동물일 수 있으며, 동물에서 유래한 세포, 조직, 기관 등일 수도 있다. 상기 개체는 상기 효과가 필요한 환자 (patient) 일 수 있다.

본 발명의 상기 ‘치료’ 는 전신염증질환 또는 전신염증 관련 질환 또는 전신염증 관련 질환의 증상을 개선시키는 것을 포괄적으로 지칭하고, 이는 이러한 질환을 치유하거나, 실질적으로 예방하거나, 또는 상태를 개선시키는 것을 포함할 수 있으며, 전신염증질환 또는 전신염증 관련 질환으로부터 비롯된 한 가지 증상 또는 대부분의 증상을 완화시키거나, 치유하거나 예방하는 것을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【유리한 효과】

따라서, 본 발명은 디케토피페라진을 유효성분으로 포함하는 중증혈관질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법은 HMGB1(High mobility group box 1)의 분비를 억제하며 전염증성 시그널링을 조절하고 혈관 염증성 반응을 억제하여 전신염증질환의 예방 및 치료에 효과가 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 3가지 디케토피페라진(diketopiperazine)의 화학식을 나타낸 것이다 (A: 발린(Val)이 결합된 1번 화학식, B: 티로신(Tyr)이 결합된 2번 화학식, C: 류신(Leu)이 결합된 3번 화학식).

도 2는 3가지 디케토피페라진(diketopiperazine)이 HMGB1의 분비와 HMGB1 수용체의 발현에 미치는 영향을 나타낸 것으로, HUVEC 세포에 LPS(100 ng/mL)로 16시간 동안 자극한 후, 3가지 디케토피페라진 각각을 표시된 농도로 처리하였을 때 HMGB1의 분비량을 ELISA 방법으로 측정한 것(A), CLP를 수행한 수컷 C57BL/6 마우스(n=5)에 CLP로부터 12시간 후에 3가지 디케토피페라진을 각각 정맥주사하고, CLP로부터 24시간 후에 혈장 속 HMGB1 level을 ELISA로 측정한 것(B), Confluent HUVEC 세포에 HMGB1(1 µg/mL)을 16시간 처리하고, 1번 디케토피페라진을 6시간 동안 처리하였을 때, TLR-2(white bar), TLR-4(gray bar), RAGE(black bar) 수용체의 발현량을 cell-based ELISA로 측정한 것(C), MTT assay 방법으로 세포 생존성(cell viability)에 대한 3가지 디케토피페라진의 영향을 측정하여 5회의 독립적 실험의 mean ± SEM으로 나타낸 것이다(LPS: lipopolysaccharide, * $p < 0.05$ versus LPS alone(A), CLP alone(B), or HMGB1 alone(C)).

도 3은 HUVEC 세포를 LPS(A, 100 ng/mL, 4 h) 또는 HMGB1(B, 1 µg/mL, 16 h)으로 자극시킨 후, 각각의 농도로 3가지 디케토피페라진을 각각 6시간 처리하였을 때, HUVEC 단일층을 가로지른 Evans blue-결합된 알부민의 유출정도 측정에 의해 모니터링하여 세포의 투과성을 평가한 결과, HMGB1(H로 표시, 2 µg/mouse, i.v.) 또는 CLP(C로 표시, CLP 후 24h)로 마우스에 혈관투과(vascular permeability)를 유도한 후, 디케토피페라진을 주입하여, 복강 세척액(peritoneal washes)에 포함된 Evans blue 염료의 양을 측정하여 투과성을 평가하는 것으로 이의 효과를 확인한 결과(C, expressed as µg/mouse, n = 5)를 나타낸 것이다. 또한, HUVEC 세포들을 HMGB1(1 µg/mL, 16 h)으로 활성화시키고 서로 다른 농도의 디케토피페라진을 6시간 처리한 후, HMGB1에 의해 매개된 phospho-p38 발현에 대한 3가지 디케토피페라진의 영향을 ELISA로 측정한 결과(D)를 나타낸 것이다. E는 glass coverslip 위에서 배양한 HUVEC 세포 단일층을 HMGB1(1 µg/mL)으로 1시간 동안 자극하고 6시간 동안 각각 10씩 디케토피페라진을 6시간 동안 처리한 후, 형광표지된 F-actin으로 형광염색한 모습을 나타낸 것이다. 화살표는 세포사이의 틈(intercellular gap)을 나타낸다(P: PBS vehicle control, Comp: diketopiperazine, LPS: lipopolysaccharide, 결과는

5회의 독립적 실험의 mean \pm SEM으로서 나타냄, H/C는 CLP 또는 HMGB1 처리를 의미하는 것으로 'CLP/HMGB1'과 같은 의미). * $p < 0.05$ versus LPS alone(A) or HMGB1 alone(B, C, D).

도 4는 HUVEC 세포를 HMGB1(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 16시간동안 자극하고 다양한 농도로 3가지 디케토피페라진을 6시간 동안 처리한 후, HMGB1-매개 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin의 발현 정도를 나타낸 것(A), HUVEC monolayer에 대한 인간 호중구의 부착정도를 그래프(B)와 이미지(C)로 나타낸 것, HUVEC monolayer를 통한 인간 호중구의 이동(migration)을 분석한 결과를 나타낸 것(d)이다(P: PBS vehicle control, Comp: diketopiperazine, 결과는 5회의 독립적 실험의 mean \pm SEM으로서 나타냄, * $p < 0.05$ versus HMGB1). 또한, C57BL/6 수컷 마우스를 HMGB1(H로 표시, 2 μg per mouse, i.v.) 또는 CLP-수술(C로 표시, CLP 수술 후 24h)로 자극하고 lysozyme(0.57-5.72 μg per mouse, i.v.)을 주입하여, 상기 HMGB1 또는 CLP에 의해 매개된 백혈구의 복막강으로의 이동성을 분석한 결과(E)를 나타낸 것이다(H/C는 CLP 또는 HMGB1 처리를 의미하는 것으로 'CLP/HMGB1'과 같은 의미.P: PBS vehicle control, Comp: diketopiperazine, 결과는 5회의 독립적 실험의 mean \pm SEM으로서 나타냄, * $p < 0.05$ versus CLP/HMGB1).

도 5는 HUVEC 세포를 HMGB1(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 16시간동안 자극하고 다양한 농도로 3가지 디케토피페라진을 6시간 동안 처리한 후, HMGB1-매개 TNF- α 생성 정도를 측정된 결과(A), HMGB1-매개 IL-6 생성 정도를 측정된 결과(B), HMGB1-매개 NF- κ B p65의 활성화 정도를 분석한 결과(C) 및 HMGB1-매개 ERK1/2의 활성화 정도를 분석한 결과(D)를 나타낸 것이다(P: PBS vehicle control, Comp: diketopiperazine, 결과는 5회의 독립적 실험의 mean \pm SEM으로서 나타냄, * $p < 0.05$ versus HMGB1).

도 6은 수컷 C57BL/6 마우스들(n=20)에 CLP 후 12시간째 및 50시간째에 3가지 디케토피페라진을 각각 정맥투여하고, CLP 후 132시간까지 6시간마다 실험동물의 생존을 모니터링한 결과를 나타낸 것으로, 처리하지 않은 CLP mice(●로 표시) 및 sham-operated mice(○로 표시)들에는 살균한 식염수를 투여하였다.Kaplan-Meier survival analysis 방법으로 CLP군에 대비한(versus) 전체 생존률을 그래프(A)로 나타내었다(Comp: diketopiperazine, □: CLP 후 12시간 및 50시간째에 3,93씩 1번 디케토피페라진 투여군, ■: CLP 후 12시간 및 50시간째에 5.21씩 1번 디케

토피페라진 투여군. △: CLP 후 12시간 및 50시간째에 4.20씩 3번 디케토피페라진 투여군). 또한 CLP 후 96시간째에 안락사시켜 관찰한 폐조직의 조직병리학적 스코어(Histopathological score)를 나타낸 그래프(B)와 CLP 후 96시간째에 안락사시켜 수득한 폐조직을 H&E staining하여 현미경(200x)으로 관찰한 사진(C)을 나타낸 것이다. 이미지는 세 번의 독립적 실험을 대표한다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실험방법>

1. 시약

박테리아 lipopolysaccharide(LPS; serotype: 0111:B4, L5293), Evans blue 염료, HPLC 분류 용제, 크리스탈 바이올렛(crystal violet) 염료 및 항생제(페니실리린 G 및 스트렙토마이신)는 Sigma(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 인간 재조합 HMGB1은 Abnova(Taipei City, Taiwan)로부터 구입하였으며, FBS(Fetal bovine serum) 및 Vybrant DiD는 Invitrogen(Carlsbad, CA)으로부터 구입하였다. 추출 및 분류를 위한 유기용제인 메탄올(MeOH), 에틸 아세테이트(EtOA), n-헥산(n-hexane)은 덕산 화학(Duksan Chemical, Korea)에서 구입하였다. 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography)는 실리카겔로 코팅된 플레이트(Kieselgel 60F254, Germany)를 사용하였고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피는 Kieselgel 60(Art. No. 9385)을 사용하였다. UV 스펙트럼 및 HR-FABMS는 시마주 UV-1800(Shimadzu, Japan) 및 JMS 700(JEOL, Japan)을 각각 사용하였으며, NMR(nuclear magnetic resonance) 스펙트럼은 내부 표준에서 테트라메틸실란(tetramethylsilane, TMS)로 Bruker Avance Digital 500 NMR spectrometer(Karlsruhe, Germany)를 이용하여 측정하였다. TMS에 대한 화학 변화는 ppm(parts per million)으로 표시하였다. MPLC(Medium pressure liquid chromatography)는 Water 510 펌프(Waters, USA)와 연결된 Prep UV-10V(Yamazen, Japan)로 실시하였다. 모든 용매는 감압하에 40℃이하에서 증발시켰다.

2. 디케토피페라진의 획득

제주도에서 수집한 침전물과 해면 동물(marine sponge)에서 두 종의 박테리아, HC001 및 12L081을 추출하여 동정하였다. 두 종을 각각 동정한 결과 HC001은 *Bacillus* 속이며, 12L081은 *Picicoccus* 속인 것을 확인하였다.

Bacillus 속 HC001 및 *Picicoccus* 속 12L081 박테리아를 7일 동안 150rpm, 25°C의 조건으로 SYP SW 배지 35L에서 각각 배양한 뒤, 각 배양 배지를 EtOA 35L로 두 번 추출하였다. *Bacillus* 속 HC001 및 *Picicoccus* 속 12L081의 추출물을 농축하여 제조하였다. HC001의 추출물(1.9g)을 step-gradient elution 방법으로 실리카겔 VLC로 분획하였다. 디케토피페라진 1(2.5mg)과 디케토피페라진 2(1.6mg)를 획득하기 위하여, 분획물 E(CH₂Cl₂:MeOH=10:1로 추출, 195.5mg)로 예비 RP-HPLC(Phenomenex Luna 10 μ C18(2) 100, 250 × 21.20 mm, 10 μm, 6 mL/min, 20% CH₃CNinH₂O)를 실시하였다. 12L081의 추출물(2.7g)은 VLC로 분획하였고, 디케토피페라진 3(6.6mg)을 획득하기 위하여 분획물 D(CH₂Cl₂:MeOH=20:1로 추출, 539.1mg)를 예비 RP-HPLC(Phenomenex Luna 10 μ C18(2) 100 Å, 250 × 21.20 mm, 10 μm, 6 mL/min, 17% CH₃CNinH₂O)를 사용하여 추가로 정제하였다. 선행문헌(Fdhila et al., 2003; Jayatilake et al., 1996; Stierle et al., 1988)에 기재되어 있는 분광 데이터의 비교에 의해 디케토피페라진 1은 *cyclo*(1-Pro-d-Val), 디케토피페라진 2는 *cyclo*(1-Pro-l-Tyr), 디케토피페라진 3은 *cyclo*(1-Pro-d-Leu)로 확인하였다.

3. 실험동물 및 사육

몸무게가 27g인 6 내지 7주령 C57BL/6 수컷 마우스들을 Orient Bio Co.(Sungnam, KyungKiDo, Republic of Korea)로부터 구입하였고, 12일의 적응기간(acclimatization period) 후에 본 연구에 이용하였다. 실험동물들은 polycarbonate cage 당 5마리씩, 20-25°C의 온도, 40%-45%의 습도 및 12시간 주기의 낮/밤 순환 조건에서 사육되었다. 상기 적응기간 동안, 실험동물들은 일반 설치류 펠릿 사료(rodent pellet diet) 및 물을 자유식이(*ad libitum*)하였다. 모든 동물 실험은 한국 Institutional Animal Care and Use Committee of Kyungpook National University 의 승인 하에 수행되었다(IRB approval number, KNU2012-13).

4. CLP(Cecal ligation and puncture)

심각한 혈관염증을 유발하기 위하여, 수컷 마우스들은 small rodent gas anesthesia machine(RC2, Vetequip, Pleasanton, CA)을 통하여 주입된 2%

isoflurane(Forane, JW Pharmaceutical, South Korea)이 포함된 산소로 마취되었고, 최초에는 breathing chamber에서 마취하고 그 후에는 facemask를 사용하여 실험과정동안 자연스럽게 호흡할 수 있도록 하였다. CLP-유도 전신염증질환 모델은 Bae JS et al., 2014의 연구에서 묘사된 바와 같이 수행되었다. 간략하게, 2cm의 정중절개(midline incision)를 수행하여 맹장 및 인접한 소장을 노출시켰다. 그 후 맹장 끝부분(cecal tip)으로부터 5.0mm 떨어진 부분을 3.0-비단봉합사(silk suture)로 단단히 묶고, 높은 수준의 혈관염증을 유발하기 위하여 22-게이지의 바늘로 맹장에 구멍을 냈다(Rittirsch et al., 2009). 그 후, 상기 구멍 부위로부터 배설물을 압출시키기 위하여 맹장을 부드럽게 짜내었고(squeezed), 상기 맹장을 다시 복막강(peritoneal cavity)으로 복귀시켰다. 마지막으로 개복 부위(laparotomy site)를 4.0-silk로 봉합하였다. sham control 군의 실험동물은 맹장을 노출시킨 후 봉합 또는 구멍을 내는 과정 없이 복강으로 복귀시켰다. 상기 실험 프로토콜은 실험 전 the Animal Care Committee at Kyungpook National University(IRB No. KNU 2012-13)에 의해 승인 받았다.

5. 세포 배양

인간 탯줄 정맥 내피세포(Primary human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)는 Cambrex Bioscience(Charles City, IA)로부터 취득하였고, 이전 연구에 묘사된 바와 같이 유지시켰다(Bae et al., 2014; Ku and Bae, 2014; Ku et al., 2015a; Ku et al., 2015b; Ku et al., 2015c; Lee et al., 2015a; Lee et al., 2015b; Yoon et al., 2015). 간략하게, 세포는 성장보조제(Cambrex Bio Science)가 포함된 EBM-2(endothelial basal medium), 37°C 및 5% CO₂에서 포화상태로 배양하였다. HUVEC 세포는 Lee W et al., 2013 연구에서 묘사된 바와 같이 3-5계대 (passage) 배양하고 사용하였다. 인간 호중구(neutrophil)는 다섯명의 건강한 지원자로부터 정맥천자(venipuncture)에 의해 취득된 15 mL의 전혈로부터 분리되었고, Hofbauer R et al., 1998의 연구에서 묘사된 바와 같이 유지되었다.

6. ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)

세포배양 배지 또는 마우스 혈장에 포함되어 있는 HMGB1의 농도를 조사하기 위하여, Lee W et al., 2012의 연구에서 묘사된 바와 같이 경쟁적 ELISA를 수행하였다. 구체적으로 in vitro 실험에서 HUVEC 단일층(HUVEC monolayer)은 LPS(100 ng/mL)로 16시간 동안 처리되었으며, 그 후 0 내지 10 μM의 3가지 디케토피페라진

으로 6시간동안 처리되었다. 그 다음에, HMGB1의 농도를 조사하기 위하여 세포배양액을 수집하였다. ELISA를 수행하기 위하여, 96-well flat plastic microtiter plates(Corning Inc., Corning, NY)를 HMGB1 단백질과 함께 4°C에서 오버나잇(overnight)하여 코팅하였으며, 이때 0.02% sodium azide가 포함된 20 mM carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)를 사용하였다. 상기 plate를 0.05% Tween 20이 포함된 PBS 용액(PBS-T)으로 3회 세척한 뒤, 4°C에서 보관하였다. 상기 수집된 세포배양액은 동결건조(Lyophilization)시킨 후, 이를 anti-HMGB1 antibody(PBS-T에 1:1000로 희석됨, Abnova, Taipei City, Taiwan)와 함께 96-well round plastic microtiter plate에서 37 °C, 90분 동안 사전-배양(pre-incubate)하였고, 이를 상기 HMGB1으로 코팅된 플레이트에 옮긴 후, 30분 동안 실온에서 배양하였다. 그 후, 상기 플레이트를 PBS-T 용액으로 3회 세척하고, peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody(PBS-T에 1:2000로 희석됨, GE Healthcare Life Science, Pittsburgh)와 함께 실온에서 90분 동안 배양하였으며, 다시 PBS-T 용액으로 3회 세척하고, 200 μ l의 기질용액(100 μ g/mL *o*-phenylenediamine 및 0.003% H₂O₂)을 첨가하여 암실에서 상온으로 60분 동안 배양하였다. 반응은 8N H₂SO₄를 50 μ l 처리하여 종료하였고, 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

HUVEC 세포에서 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin과 같은 CAM들의 농도를 조사하기 위하여, Che et al., 2002 및 Kim et al., 2012의 연구에서 기술된 바와 같이 전세포 ELISA(whole cell ELISA) 방법이 적용되었다. 간략하게, HUVEC 세포의 융합된 단층(confluent monolayer)에 HMGB1(1 μ g/mL)을 16시간(VCAM-1 및 ICAM-1에 대한 실험) 또는 22시간(E-selectin에 대한 실험) 동안 처리하고, 그 후 0 내지 10 μ M의 3가지 디케토피페라진을 각각 6시간 동안 처리한 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척한 뒤 1% paraformaldehyde(50 μ l)로 상온에서 15분동안 고정시켰다. 3회 세척 후, mouse anti-human monoclonal antibody(VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin 각각에 대한 항체를 의미, PBS-T에 1:50으로 희석됨, Temecula, CA)를 100 μ l씩 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 1시간동안 배양하였다. 상기 배양된 세포들을 세척한 후, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody(Sigma)를 1:2000으로 희석시켜 100 μ l를 1시간동안 처리하였으며, 3회 세척한 후 *o*-phenylenediamine substrate(Sigma)를 이용하여 상기한 바와 같이 실험을 전개하였다. 비색 분석은 490nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3중으로 실시하였다.

상기와 같은 실험과정이 TLR2, TLR4 및 RAGE와 같은 HMGB1 수용체의 세포표면 발현을 모니터링하기 위해 이용되었으며, 이때 Santa Cruz Biotechnology

Inc.(Santa Cruz, CA)로부터 수득한 상기 리셉터별 특수항체(각각 A-9, H-80 및 A-9)들을 사용하였다.

인산화된 p38 MAPK, nuclear factor(NF)- κ B, TNF- α , ERK 1/2, IL-1 β 및 IL-6의 농도를 조사하기 위하여, 상업용 ELISA kit를 제조사의 프로토콜에 따라 사용하였다; IL-6, 전체(total) 및 인산화된 ERK 1/2, TNF- α 를 조사하는 데는 R&D Systems(Minneapolis, MN)로부터 구입한 ELISA kit를 사용하였고, 전체(total) 및 인산화된 p38, 전체(total) 및 인산화된 p65 NF- κ B를 조사하는 데는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, Catalog NO. #7170, #7252)로부터 구입한 ELISA kit를 사용하였다. ELISA plate reader(Tecan, Austria GmbH, Austria)를 이용하여 값을 측정하였다.

7. 세포 생존 에세이(Cell viability assay)

세포 생존의 지표로서 MTT assay 방법을 이용하였다. 세포들은 96-well plates에서 5×10^3 cells/well 의 밀도로 배양되었다. 24시간 후에, 세포들을 새 배지(fresh medium)로 세척하였으며, 3가지 디케토피페라진 1 내지 3을 각각 처리하였다. 48시간의 배양 후에, 세포들을 세척하고 100 μ l의 MTT(1 mg/mL)를 첨가하여 4시간 배양하였다. 마지막으로 dimethyl sulfoxide(DMSO) 150 μ l를 첨가하고, 생성된 formazan salt의 양을 microplate reader(Tecan Austria GmbH, Austria)를 사용하여 540 nm에서 OD(optical density)를 측정하였다.

8. *in vitro* 투과성 에세이(Permeability assay)

내피세포의 투과성(Endothelial cell permeability)은 Qureshi et al., 2008에 기술된 two-compartment chamber model을 이용하여 기능적 세포 단일층(functional cell monolayer)을 가로지른 Evans blue-결합된 알부민의 유출을 분광광도 측정(spectrophotometric measurement)하는 방법에 의해 정량하였다. 간략하게, HUVEC 세포들은 3 μ m pore size, 12mm 직경의 transwell에 5×10^4 /well로 분주되었고, 3일 동안 배양되었다. 이렇게 생성된 HUVEC 융합 단층(Confluent monolayers of HUVEC)에 HMGB1(1 μ g/mL, 16h)을 처리하고, 그 후 3가지 디케토피페라진을 6시간동안 처리하였다.

9. 면역형광염색

10% FBS를 포함하는 완전배지(complete media)에서 0.05% Poly-L-Lysine으로

코팅된 glass cover slip 위에 HUVEC 세포들을 융합(confluence) 상태까지 배양하여, 48시간동안 유지하였다. 세포들을 HMGB1($1\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 1시간동안 자극시킨 후, 6시간동안 3가지 디케토피페라진을 처리 또는 비처리하였다. 세포골격 염색을 위하여, 세포들을 4% formaldehyde용액(in PBS, v/v)으로 실온에서 15분동안 고정하고, 0.05% Triton X-100 용액(in PBS)을 15분 처리하여 투과화(permeabilize) 시킨 후, 상기 투과화된 세포에 blocking buffer(5% BSA in PBS)를 4°C 에서 오버나잇 처리하여 블로킹(blocking)하였다. 그 후, 세포들을 fluorescein phalloidin(F 432; Molecular Probes, Invitrogen)으로 표지된 F-actin과 함께 4°C 에서 오버나잇 배양하였다. 핵은 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI)로 대비염색하였고, 630x magnification에서 confocal microscopy(TCS-Sp5, Leica microsystem, Germany)로 시각화하였다.(Fuseler et al., 2006에 기재된 바와 같치 p65 핵 전이의 정량을 계산하였다.

10. *In vitro* 이동성 에세이(migration assay)

세포 이동성 에세이는 $8\mu\text{m}$ pore size filter를 포함하는 6.5mm직경의 transwell plate에서 수행되었다. HUVEC 세포(6×10^4)들을 3일동안 배양하여, 융합된 내피세포 단일층을 수득하였다. 상기 세포 단층을 HMGB1($1\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 16시간 처리하고 3가지 디케토피페라진을 6시간동안 처리한 후, transwell plate의 상부(upper compartment)에 인간 호중구를 첨가하였다. 그 후 상기 Transwell plate는 37°C , 5% CO_2 조건에서 2시간동안 배양되었다. 그 후 upper chamber의 세포들은 흡인되었으며(aspirated), 필터의 윗부분에 위치한 비이동성 세포들은 면봉을 이용하여 제거되었다. 필터의 아랫부분에 위치한 인간 호중구 세포들은 8% glutaraldehyde로 고정된 후, 0.25% crystal violet을 포함하는 20% methanol(w/v)을 첨가하여 염색되었다. 각각의 실험은 duplicate well에서 두 번 반복되었으며, 무작위로 선택된 9개의 high power microscopic field(HPF; $200\times$)들에서 이동성 세포의 개수가 카운팅(counting)되었다. 이러한 결과는 이동 지표(migration index)로서 나타내어진다.

11. *In vivo* 투과성 및 백혈구 이동성 에세이

in vivo 실험을 위하여, 수컷 마우스들을 작은 설치류 가스 마취 기계를 통해 전달되는 산소 내에 2% 이소플루란(isofluran, JW제약)으로 마취한 뒤, 안면 마스크로 호흡할 수 있도록 하였다. 마우스에 HMGB1($2\mu\text{g}/\text{mouse}$)을 정맥주사(i.v.)하

여 16시간동안 처리한 뒤 6시간 동안 3가지 디케토피페라진을 처리하였다.

in vivo 투과성 분석을 위해, 1% Evans blue dye solution(in normal saline)을 각 마우스에 정맥주사하였다. 30분 후에, 각 마우스들을 희생시켰으며, 5mL의 일반 식염수로 복막강을 세척하여 복막삼출물(peritoneal exudate)들을 수집하고 10분 동안 200Xg으로 원심분리하였다. 상등액의 흡광도는 650nm에서 측정되었다. 혈관 투과성은 Bae JS et al., 2012의 연구에서 기술된 바와 같이, Evans blue dye의 표준 곡선에 따른 복막강(peritoneal cavity)으로 누설(leak)된 염료의 양($\mu\text{g per mouse}$)으로서 나타내었다.

백혈구 이동을 평가하기 위하여, CLP-받은 마우스 및 마우스에 HMGB1($2\mu\text{g}/\text{mouse}$, in normal saline)을 정맥주사(i.v.)하여 16시간동안 처리한 뒤 3가지 디케토피페라진을 각각 처리하였다. 6시간 후에, 상기 마우스들을 희생시키고 복막강을 5 mL의 일반 식염수로 세척하였다. $20\mu\text{L}$ 의 상기 복막액(peritoneal fluid)을 0.38 mL Turk' s solution(0.01% crystal violet in 3% acetic acid)과 혼합하고, 광학현미경을 이용하여 백혈구의 수를 카운팅(counting)하였다.

12. 세포-세포 부착 어세이

내피 세포의 단핵 세포 부착정도는 이전 연구에서 기술된 바와 같이 단핵 세포의 형광표지방법에 의해 평가되었다(Akeson and Woods, 1993; Bae and Bae, 2011; Kim et al., 2001). 간략하게, 호중구($1.5 \times 10^6/\text{mL}$, $200\mu\text{L}/\text{well}$)세포들을 Vybrant DiD dye로 표지하고, 세척 및 자극된 HUVEC 세포들에 상기 호중구 세포들을 첨가하였다. 상기 자극된 HUVEC 세포는, HUVEC 세포 단층을 HMGB1($1\mu\text{g}/\text{mL}$)으로 16시간동안 처리하고 다시 6시간동안 3가지 디케토피페라진을(0 내지 $10\mu\text{M}$) 각각 처리하였다.

13. 헤마톡실린 & 에오신 염색 및 병리조직학적 시험

5 마리의 수컷 C57BL/6 마우스들에 CLP 를 수행하고 각각 12시간 및 50시간 후에, 3가지 디케토피페라진을 정맥주사하였다. 마우스들은 CLP 후 96시간째에 안락사 시켰다. 상기 마우스들에서 폐조직의 표현형 변화를 분석하기 위하여 각 마우스로부터 폐 샘플들을 적출하였고, 잔류 혈액을 제거하기 위하여 PBS(pH 7.4)로 3회 세척한 후 4% formaldehyde solution(in PBS(pH 7.4), Junsei, Tokyo, Japan)으로 4°C 에서 20시간동안 고정하였다. 상기 고정 후, 각 샘플들은 일련의 증가되는 농도의 에탄올 수용액(ethanol series)으로 탈수되었고, 파라핀 포매된 후, $4\mu\text{m}$ 두

게로 절편화되어 슬라이드(slide)에 올려 놓았다. 상기 슬라이드들은 60℃ 오븐에서 탈파라핀화(deparaffinize)되었고, 재수화(rehydrate)된후, hematoxylin(Sigma)으로 염색되었다. 과도한 염색을 제거하기 위하여 각 슬라이드들을 0.3% acid alcohol에 3회 급속침지(quick-dip)시켰으며, eosin(Sigma)으로 대비염색하였다. 그 후, 커버슬립(coverlip)으로 상기 슬라이드를 마운팅(mounting)하기 전에, 일련의 증가되는 농도의 에탄올 수용액(ethanol series) 및 자일렌(xylene)을 이용하여 과도한 염색을 제거하였다. 폐 조직구조(pulmonary architecture), 조직 부종(tissue edema) 및 염증성 세포의 침윤(infiltration of inflammatory cell)을 평가하기 위한 폐 표본에 대한 광학현미경분석은, 전술한 바와 같이 블라인드 관찰자(blinded observation)에 의해 수행되었다(Ozdulger et al., 2003). 상기 관찰 결과는 하기의 4 등급으로 분류되었다: 등급 1은 정상 조직병리(normal histopathology)를 나타내고, 등급 2는 소량의 호중구 백혈구 침윤을 나타내며, 등급 3은 중간정도의 호중구 백혈구 침윤, 혈관주위 부종(perivascular edema) 형성 및 폐 조직구조의 부분적 파괴를 나타내고, 등급 4는 밀도 높은 호중구 백혈구 침윤, 농양(abscess) 형성 및 완전한 폐 조직구조 파괴를 포함하는 것을 의미한다.

14. 통계적 분석

각 실험은 적어도 3회씩 독립적으로 반복되었다. 모든 데이터들은 평균± 평균의 표준오차(mean± standard error of the mean(SEM))로 나타내었다. 생존 분석은 KaplanMeier method를 이용하여 수행되었다. 통계적 분석은 SPSS for Windows, version 16.0(SPSS, Chicago, IL)을 이용하여 수행되었다. 0.05 미만의 P-값은 통계학적으로 유의미한 것으로 생각되었다.

<실시에 1>

LPS- 및 CLP-매개(mediated) HMGB1 분비에 있어서 디케토피페라진의 영향

HMGB1은 LPS에 의해 인간 내피세포 및 해양 대식세포에서 분비되는 것을 밝혔다(Bae and Rezaie, 2011; El Gazzar, 2007; Mullins et al., 2004). Chen et al., 2004의 연구결과와 일치하게, LPS(100 ng/mL)는 HUVEC 세포로부터 HMGB1의 분비를 자극하였다. LPS-매개 HMGB1 분비에 대한 디케토피페라진의 영향을 조사하기 위하여, 내피세포들을 100ng/mL LPS로 16시간동안 처리하여 자극하고, 0 내지 10 μM농도의 도 1의 3가지 디케토피페라진을 6시간동안 처리하였다. 또한 in vivo상에서의 효과를 확인하기 위하여, CLP를 실시한 마우스모델을 사용하였다.

그 결과 도 2에서 보이는 바와 같이, LPS를 처리한 HUVEC세포에 3가지 디케토피페라진을 처리하였을 때 LPS에 의해 유도된 HMGB1의 분비량이 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났으며, 디케토피페라진을 단독으로 처리한 경우에는 HMGB1 분비에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 2A 참조). 또한, CLP에 의해 전신염증질환을 유발시킨 마우스에 디케토피페라진을 처리하였을 때, HMGB1의 분비량이 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났으며, 정상 마우스에 디케토피페라진을 처리한 경우는 HMGB1의 분비에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 2B 참조).

한편, HUVEC 세포에 디케토피페라진을 처리하였을 때 HMGB1 수용체인 TLR2, TLR4, RAGE의 발현량을 확인하였다. HMGB1을 처리한 결과 TLR2, TLR4, RAGE의 발현량이 증가하였으나, 디케토피페라진(화합식 1)을 처리하였을 때, 농도에 따라 TLR2, TLR4, RAGE의 발현량이 감소하는 것을 확인하였다(도 2C 참조).

디케토피페라진이 세포 생존성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 24시간 동안 디케토피페라진을 처리한 HUVEC세포에 대한 MTT assay를 실시하였다. 그 결과, 디케토피페라진은 세포 생존에 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 2D 참조).

이에 염증성 질환의 환자에서 HMGB1의 높은 혈장 농도는 나쁜 예후와 높은 사망률과 관계된 것으로 알려져 있다. 게다가 HMGB1의 약학적 억제제는 엔도톡신(endotoxin)에 대한 반응으로 급성 염증 동물 모델에서 생존율을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Sama et al., 2004). 그러므로 CLP-유도된 HMGB1의 분비가 디케토피페라진에 의해 억제되는 것은 혈관 염증질환의 치료에 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

<실시에 2>

LPS-, HMGB1- 또는 CLP-매개 세포장벽(barrier) 붕괴에 있어 디케토피페라진의 효과

HUVEC세포의 장벽 온전성(barrier integrity, 장벽 통합성)에 대한 디케토피페라진의 효과를 조사하기 위하여 투과 에세이(permeability assay)가 수행되었다. 3가지 디케토피페라진(10 μ M)의 단독처리는 장벽 온전성(barrier integrity)을 변화시키지 못했다(도 3A 참조). 대조적으로, LPS는 내피세포의 세포막장벽(endothelial membrane barriers)의 분열 및 붕괴를 유도하는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2014; Wolfson et al., 2011; Yang et al., 2005). HUVEC 세포들은

LPS(100 ng/mL) 또는 HMGB1(1 μ g/mL)을 처리한 후, 다양한 농도의 3가지 디케토피페라진을 6시간동안 처리하였다. 그 결과 도3에서 보이는 바와 같이, 3가지 디케토피페라진은 LPS-매개 세포막 붕괴를 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다(도 3A 참조). 또한 HMGB1은 장벽 온전성(barrier integrity)의 분열 및 붕괴를 유도하는 것으로 알려져 있다. 3가지 디케토피페라진은 HMGB1-매개 세포막 붕괴를 농도-의존적으로 감소시키는 결과를 나타냈다(도 3B 참조).

*in vivo*상에서 상기 효과를 확인하기 위하여, 마우스에서 HMGB1- 또는 CLP-에 의해 유도된 혈관 투과성(vascular permeability)을 평가한 결과, 디케토피페라진은 HMGB1- 또는 CLP-에 의해 유도되는 evans blue 염료의 복막 누설(peritoneal leakage)을 현저하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다(도 3C 참조).

HMGB1은 p38 MAPK의 인산화를 촉진하는 것에 의해 전염증성(proinflammatory) 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(Qin et al., 2009; Sun et al., 2009). HUVEC세포에서 HMGB1에 의해 유도된 p38 MAPK의 활성화를 3가지 디케토피페라진이 억제하는지를 알아보기 위하여, 상기 세포들은 HMGB1으로 활성화시킨 후, 6시간 동안 디케토피페라진을 처리한 뒤, 인산화된 p38 MAPK의 수준(level)을 산정하였다. 그 결과, HMGB1은 인산화된 p38의 발현을 증가시켰으며, 이는 디케토피페라진을 처리하였을 때 현저히 억제되는 것으로 나타났다(도 3D 참조). 이러한 결과는 디케토피페라진의 처리가 마우스에서 HMGB1-매개 내피세포 붕괴를 억제하고, 인간 내피세포의 장벽 온전성(barrier integrity)을 유지한다는 것을 증명한다.

세포골격 단백질(Cytoskeletal protein)은 세포의 온전성(integrity) 및 모양을 유지하기 위해 중요하다(Schnittler et al., 2001). 게다가, 사이토카인 자극(cytokine stimulation)에 기인하는 액틴(actin) 세포골격의 재분배, 세포의 분리 및 세포-세포 접촉의 상실(loss of cell-cell contact)은 내피세포 단층 투과성(endothelial monolayer permeability) 증가와 관계되어있다. 그러므로, HUVEC세포 단층(HUVEC monolayer)을 F-actin-labeled fluorescein phalloidin으로 면역형광 염색하는 방법에 의해 HUVEC 세포에서 액틴 세포골격 배치(actin cytoskeletal arrangement)에 대한 3가지 디케토피페라진의 영향을 조사하였다. Control군의 HUVEC세포들은 몇몇 액틴 필라멘트 다발들(actin filament bundles)이 세포 경계에 위치함과 함께, 세포 전체적으로 F-actin의 무작위 분포를 나타냈다. HUVEC 세포에서 HMGB1(1 μ g/mL) 처리에 의하여 유도된 장벽의 붕괴(Barrier disruption)는 세포 사이의 틈(paracellular gap) 생성을 동반하였다(도 3E에서 화살표로 표시). 디케

토피페라진(10 μ M)의 처리는 밀집한(dense) F-actin ring들의 생성과 함께 HMGB1에 의해 유도된 세포사이의 틈 생성을 억제하였다(도 3E 참조).

이는 디케토피페라진이 내피세포에서 F-actin 재분배와 관련되어 HMGB1-매개 형태학적 변화 및 틈(gap) 형성을 억제함을 제시하며, 그렇게 함으로서 혈관 장벽의 온전성(vascular barrier integrity)을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예3>

HMGB1-매개된 CAM(cell-adhesion molecule)들의 발현, 호중구 접착 및 이주에 대한 디케토피페라진의 효과

HMGB1이 내피세포의 표면에서 ICAM-1, VCAM-1 및 E-selectin과 같은 CAM들의 세포표면 발현을 증가시킴으로서 염증성 반응을 매개하고, 그 때문에 내피(endothelium)를 가로질러 염증 부위에 백혈구의 이동 및 부착을 촉진한다(Andersson et al., 2000; Fiuza et al., 2003; Park et al., 2003; Treutiger et al., 2003).

HMGB1으로 자극된 내피세포에서 CAM들의 발현에 대한 디케토피페라진의 영향을 조사하기 위하여, HMGB1으로 자극된 후 디케토피페라진으로 처리된 HUVEC 세포에서 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin의 발현을 ELISA 방법으로 모니터링하였다. 또한, 내피세포에 백혈구의 부착 및 백혈구의 내피세포 투과 이동(transendothelial migration, TEM)은 전염증성 반응에 있어서 중요한 단계이다. 그러므로, CAM들의 발현이 향상된 백혈구 부착과 부합하는지와 디케토피페라진이 HMGB1으로 자극된 HUVEC세포에 대하여 단핵구(monocyte)의 부착을 억제할 수 있는지를 조사하였다.

그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, HMGB1은 VCAM-1, ICAM-1, E-selection의 표면 발현량을 증가시키고, 디케토피페라진은 VCAM-1, ICAM-1, E-selection의 발현을 억제하는 것으로 나타났다(도 4A 참조). 이는 디케토피페라진의 CAM들의 발현 억제효과는 HMGB1의 신호 전달 경로를 억제하는 것을 통해 매개되는 것을 의미한다. 또한, 디케토피페라진은 HMGB1으로 자극된 HUVEC세포에 대한 인간 호중구의 부착을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났으며(도 4B, C 참조), 추가 연구에서 HUVEC 세포에 호중구의 부착과 차후의(subsequent) 호중구 TEM 사이에 관계가 있음을 밝혔고, 디케토피페라진은 이러한 단계를 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다(도 4D 참조).

*in vivo*상에서 상기 효과를 확인하기 위하여, 마우스에서 디케토피페라진의 처리 하에 HMGB1- 또는 CLP-에 의해 유도된 백혈구 이동을 조사하였다. 그 결과,

HMGB1 및 CLP는 마우스의 복막강(peritoneal cavity)으로 백혈구의 이동을 상당히 촉진하였으나, 디케토피페라진은 농도에 따라 백혈구의 이동을 현저히 억제하는 것으로 나타났다(도 4E 참조).

이러한 결과는 디케토피페라진이 내피세포로부터 내독소-매개(endotoxin-mediated) HMGB1의 분비를 억제하는 것뿐만 아니라 분비된 HMGB1의 전염증성 시그널링 효과(proinflammatory signaling effect)를 억제하며, 그 때문에 HMGB1에 의해 유도된 CAM들의 증가, 백혈구 부착 및 이동과 같은 염증성 경로(inflammatory pathway)에서 증폭과정을 억제한다는 것을 나타낸다.

<실시에 4>

HMGB1에 의해 자극된 NF- κ B 및 ERK의 활성화 및 HMGB1에 의해 자극된 TNF- α 및 IL-6의 생성에 대한 디케토피페라진의 효과

염증성 사이토카인은 감염에 대한 효과적인 염증 과정의 개시에 필요하나, 과잉 생산은 여러 시스템의 장기 기능 장애 및 사망률과 관련되어 있다(Blackwell and Christman, 1996; Pinsky et al., 1993). HMGB1 및 LPS는 모두 인간 내피세포에서 NF- κ B의 핵 전좌(nuclear translocation), p38 MAPK의 인산화가 상당히 증가 되도록 유도한다. NF- κ B 및 ERK1/2의 활성화는 전염증성 반응을 위해 필요하다. 이전의 연구들은 혈관 염증성 반응에 있어서 HMGB1에 의한 NF- κ B 및 ERK 1/2의 활성화를 보고하였다. 따라서 HMGB1에 의해 활성화된 HUVEC 세포에서 염증성 시그널 분자들의 활성화 및 TNF- α 및 IL-6의 생산에 대한 디케토피페라진의 잠재적 영향을 조사하기 위하여, 세포들에 HMGB1을 16시간 처리하여 활성화시키고, 6시간동안 디케토피페라진을 처리하여 인큐베이션하였다.

그 결과 도 5에서 보이는 바와 같이, TNF- α (도 5A 참조), IL-6(도 5B 참조)가 HMGB1에 의해 생성이 증가되었으나, 디케토피페라진의 처리 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 또한, NF- κ B(도 5C 참조), ERK1/2(도 5D 참조)는 HMGB1에 의해 활성화가 증가하는 것으로 나타났으나 디케토피페라진의 처리 농도에 따라 활성화가 감소하는 것으로 나타났다. 또한 디케토피페라진은 IL-1 α 및 IL-1 β 와 같은 염증성 마커들의 생성도 억제한다(데이터 미도시). 이러한 결과는 디케토피페라진이 인간 내피세포에서 전염증성 반응의 유도와 관련된 중요한 신호에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.

<실시에 5>

CLP-유도 패혈증의 사망률에 있어 디케토피페라진의 보호 효과

디케토피페라진이 CLP-유도 패혈증의 치사(lethality)로부터 마우스를 보호할 수 있는지 조사하기 위하여, 마우스들을 대상으로 CLP 수술 후 3가지 디케토피페라진을 각각 주입하였다. CLP 수술 24시간 후에 실험동물들은 떨림(shivering), 거친 털(bristled hair) 및 쇠약(weakness) 등과 같은 패혈증의 증상을 나타냈다. CLP 수술 12시간 후 3가지 디케토피페라진(1(3.93 mg/mouse), 2(5.21 mg/mouse), 및 3(4.20 mg/mouse))을 한번 주입하는 것은 CLP에 의해 유도된 죽음을 막지 못하였다(데이터 미도시). 따라서 CLP 후 12시간 및 50시간 후에 두 번 디케토피페라진을 주입하였으며, Kaplan-Meier survival analysis 에 따라 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다($p < 0.0001$, 도 6A 참조).

이는 3가지 디케토피페라진이 HMGB1 분비 및 HMGB1 매개 염증성 반응을 억제하는 것은 패혈증 및 패혈성 쇼크의 관리를 위한 치료적 전략을 제시한다.

<실시예 6>

CLP-유도 폐 손상에 대한 디케토피페라진의 보호효과

CLP-유도성 폐 손상에 대한 디케토피페라진의 보호효과를 확인하기 위하여, CLP-유도 폐 손상에 대한 디케토피페라진의 효과를 조사하였다. CLP 받은 수컷 C57BL/6 마우스($n=5$)들에 CLP 후 12시간 및 50시간째에 디케토피페라진(1(3.93 mg/mouse), 2(5.21 mg/mouse), and 3(4.20 mg/mouse))을 정맥투여하고, CLP 후 96시간째에 안락사시켜 폐조직을 관찰하였다.

그 결과 도 6에서 보이는 바와 같이, 광학현미경을 통한 관찰에서 sham군의 폐 사이에는 유의적인 차이가 없었다(데이터 미도시). CLP 군에서, 간질조직(interstitium) 및 허파파리(alveolar spaces)로 염증성 세포들의 광범위한 침윤(massive infiltration)과 함께 간질성 부종(interstitial edema)이 관찰되었으며, 폐 구조가 심각하게 손상되었다(도 6B, C 참조). CLP 수술 후 디케토피페라진(Comp)을 처리한 군에서는 CLP군과 비교하여, 형태학적인 변화가 적게 나타났으며 폐구조가 보존되고 폐손상 스코어(lung injury score)가 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 6B, C 참조).

【산업상 이용가능성】

이상 살펴본 바와 같이 본 발명은 디케토피페라진을 유효성분으로 포함하는 중증혈관질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 방법은

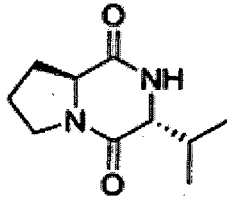
HMGB1(High mobility group box 1)의 분비를 억제하며 전염증성 시크널링을 조절하고 혈관 염증성 반응을 억제하여 전신염증질환의 예방 및 치료하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

【청구의 범위】

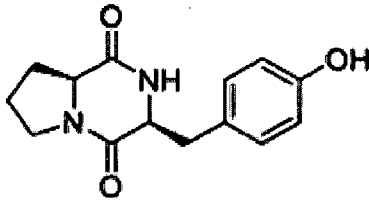
【청구항 1】

하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)을 유효성분으로 포함하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료용 약학적 조성물.

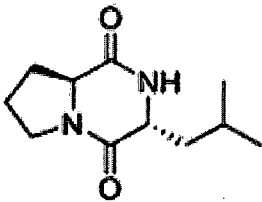
<화학식 1>



<화학식 2>



<화학식 3>



【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 전신염증질환은 HMGB1(High mobility group box 1)에 의해 매개되는 염증성 질환인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

【청구항 3】

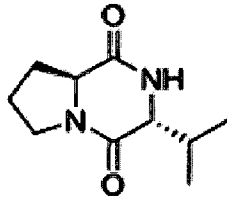
제2항에 있어서, 상기 HMGB1에 의해 매개되는 전신염증질환은 전신염증반응

증후군(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 패혈증(sepsis), 패혈성 쇼크(septic shock), 급성 폐손상(Acute lung injury), 급성 신장 손상(Acute kidney injury), 다발성 장기 기능부전 증후군(Multiple organ dysfunction syndrome)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

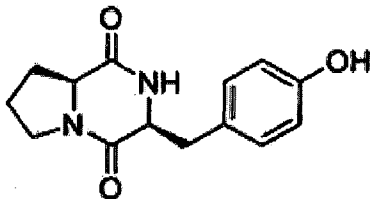
【청구항 4】

전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료용 제제를 제조하기 위한 하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)의 용도.

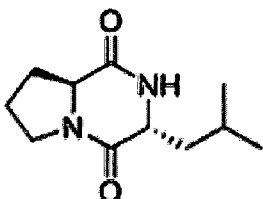
<화학식 1>



<화학식 2>



<화학식 3>



【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 전신염증질환은 HMGB1(High mobility group box 1)에

의해 매개되는 염증성 질환인 것을 특징으로 하는 용도.

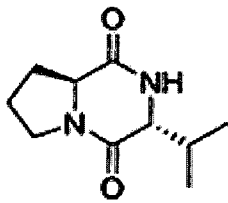
【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 HMGB1에 의해 매개되는 전신염증질환은 전신염증반응 증후군(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 패혈증(sepsis), 패혈성 쇼크(septic shock), 급성 폐손상(Acute lung injury), 급성 신장 손상(Acute kidney injury), 다발성 장기 기능부전 증후군(Multiple organ dysfunction syndrome)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

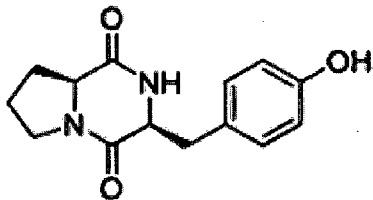
【청구항 7】

하기 화학식 1 내지 화학식 3중 어느 하나로 표시되는 디케토피페라진(diketopiperazine)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 특징으로 하는 전신염증질환(systemic inflammatory disease)의 치료 방법.

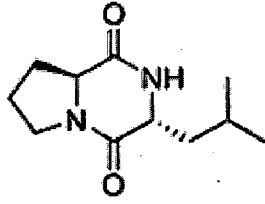
<화학식 1>



<화학식 2>



<화학식 3>

**【청구항 8】**

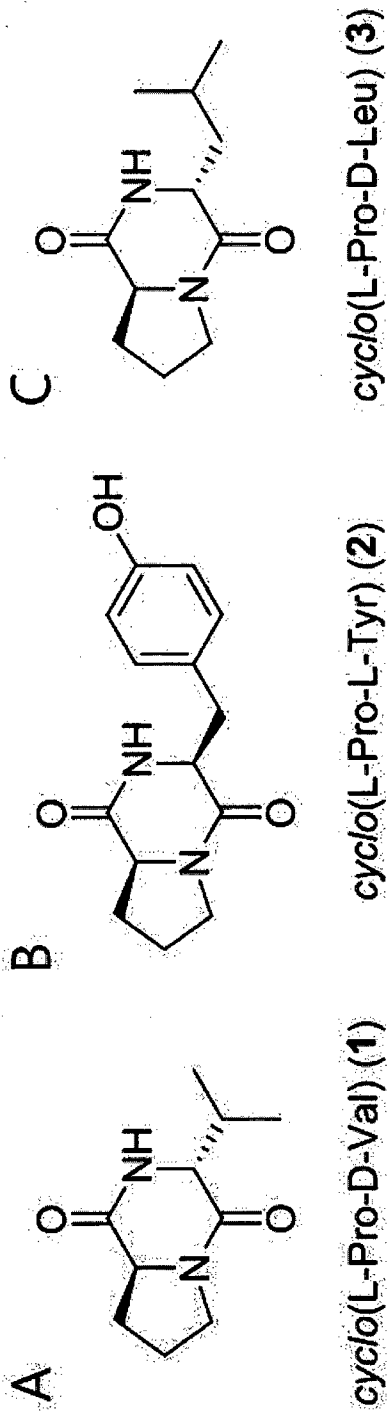
제7항에 있어서, 상기 전신염증질환은 HMGB1(High mobility group box 1)에 의해 매개되는 염증성 질환인 것을 특징으로 하는 치료 방법.

【청구항 9】

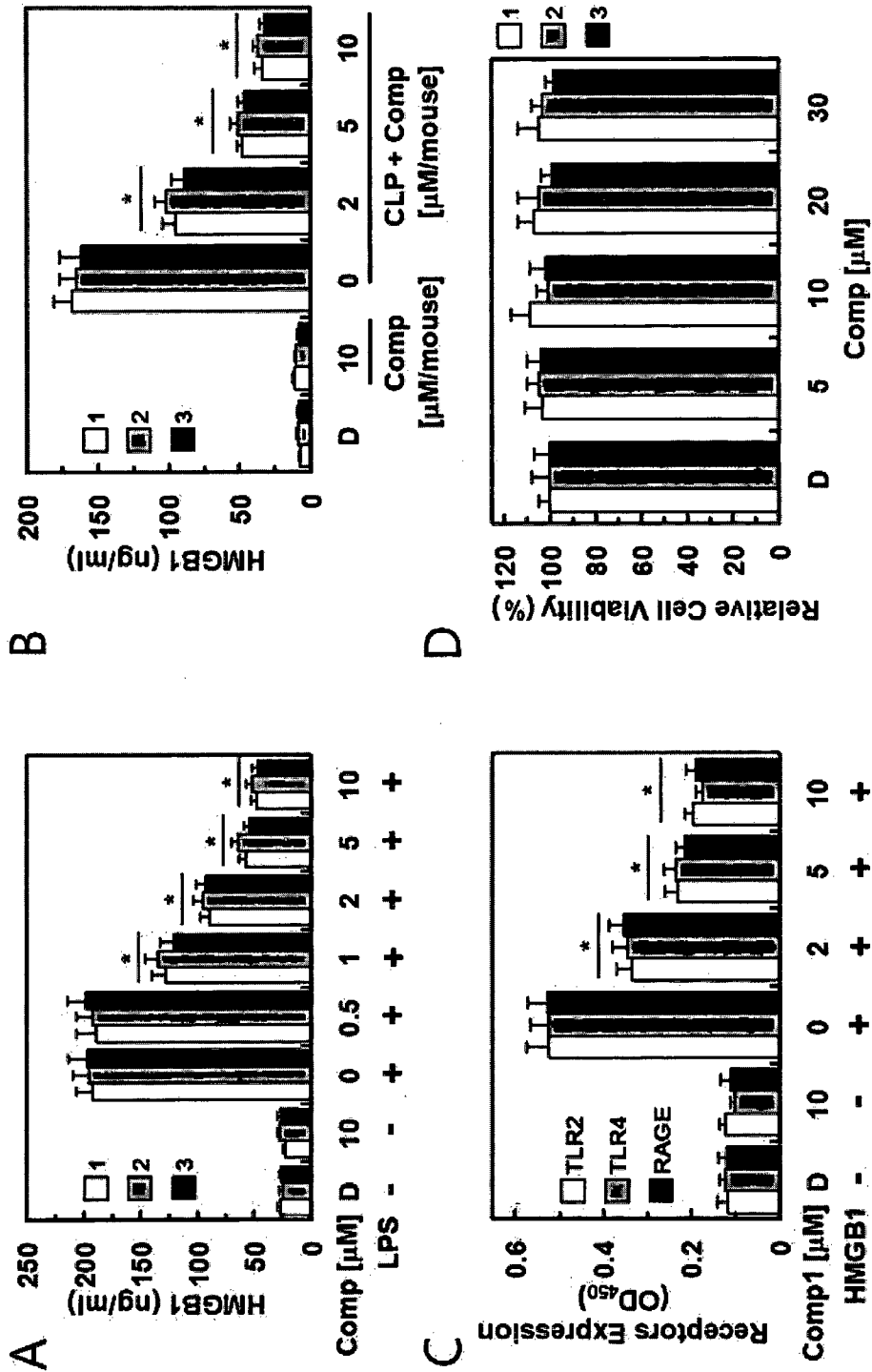
제8항에 있어서, 상기 HMGB1에 의해 매개되는 전신염증질환은 전신염증반응 증후군(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 패혈증(sepsis), 패혈성 쇼크(septic shock), 급성 폐손상(Acute lung injury), 급성 신장 손상(Acute kidney injury), 다발성 장기 기능부전 증후군(Multiple organ dysfunction syndrome)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 치료 방법.

【도면】

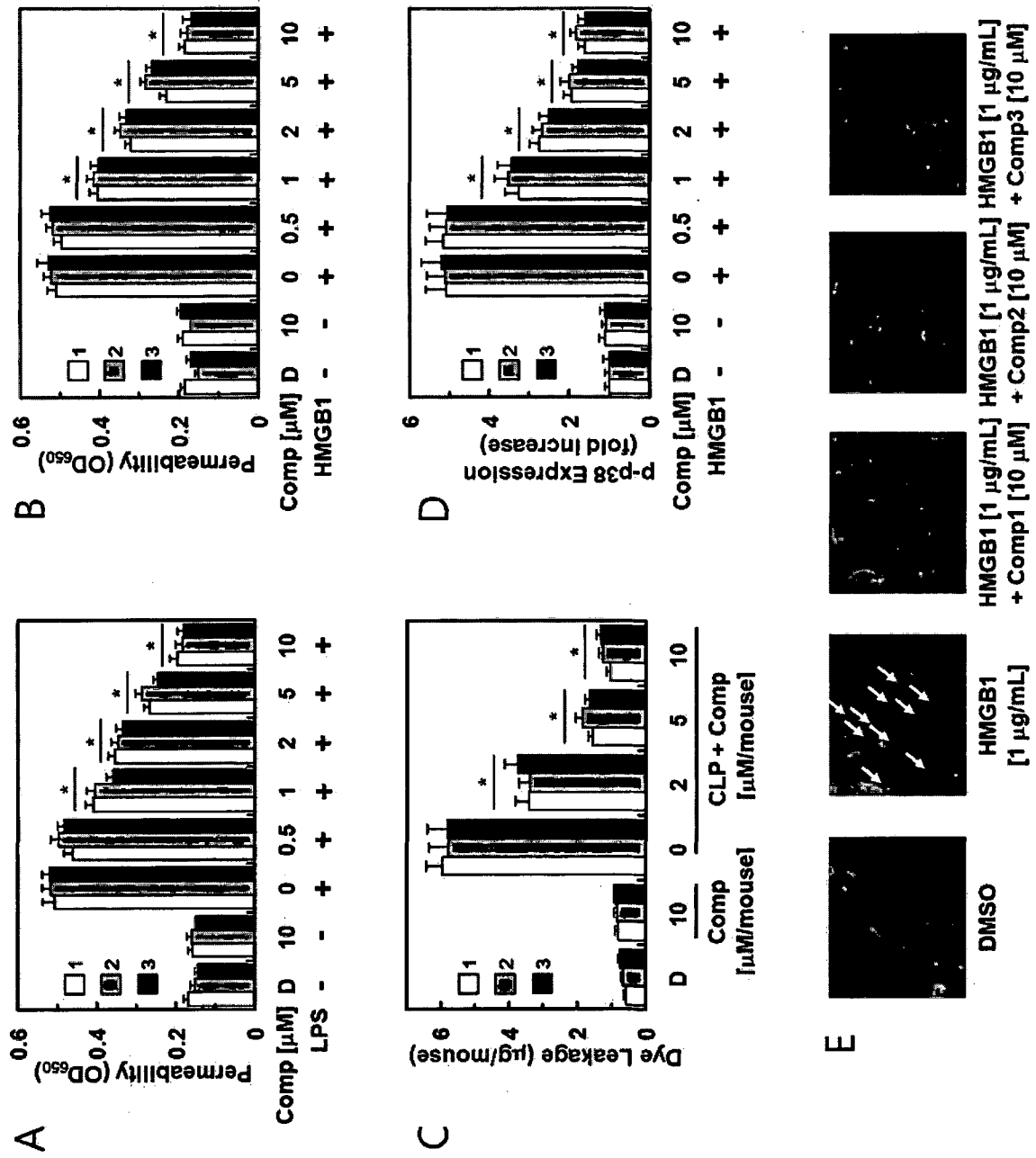
【도 1】



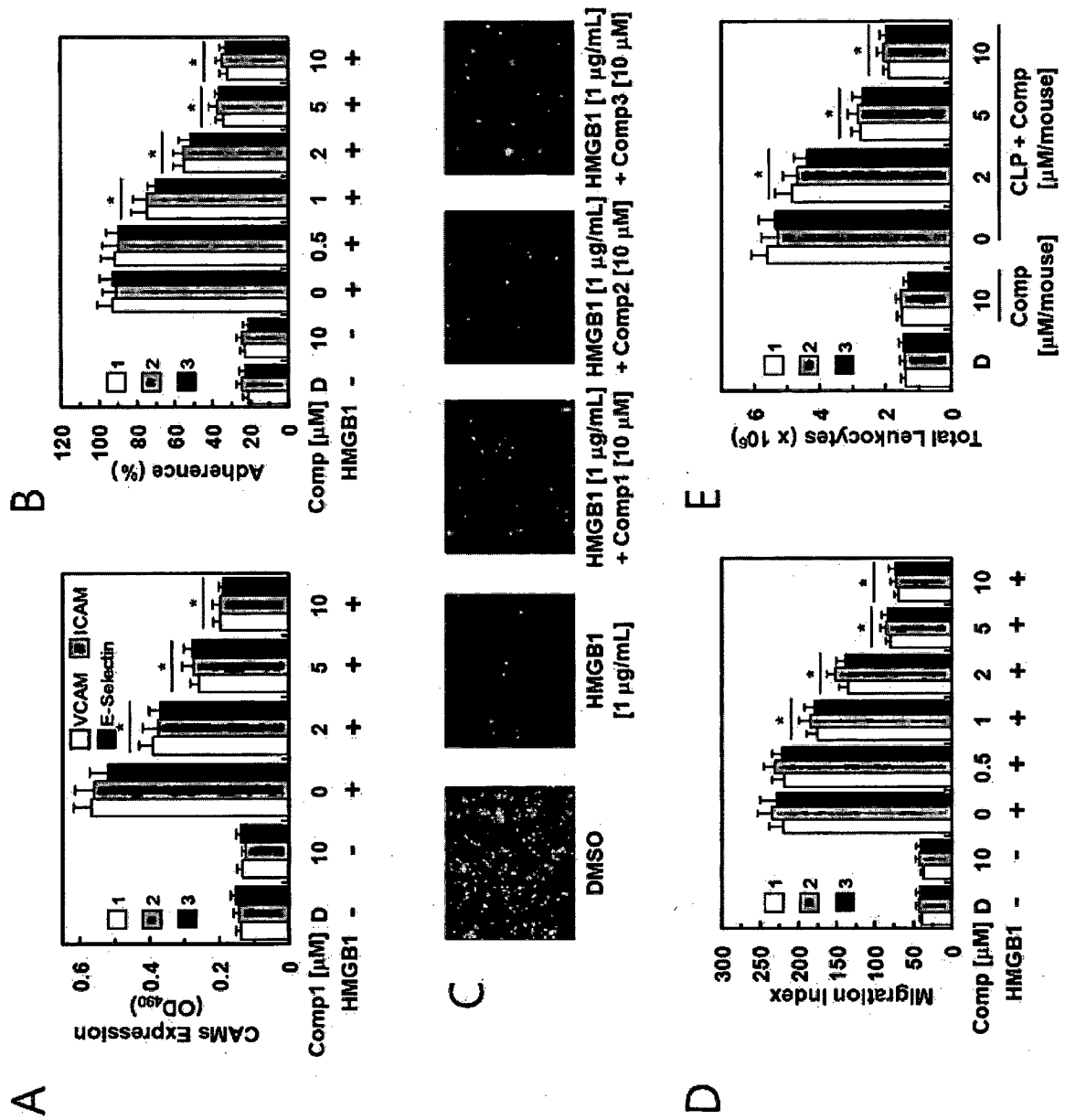
[도 2]



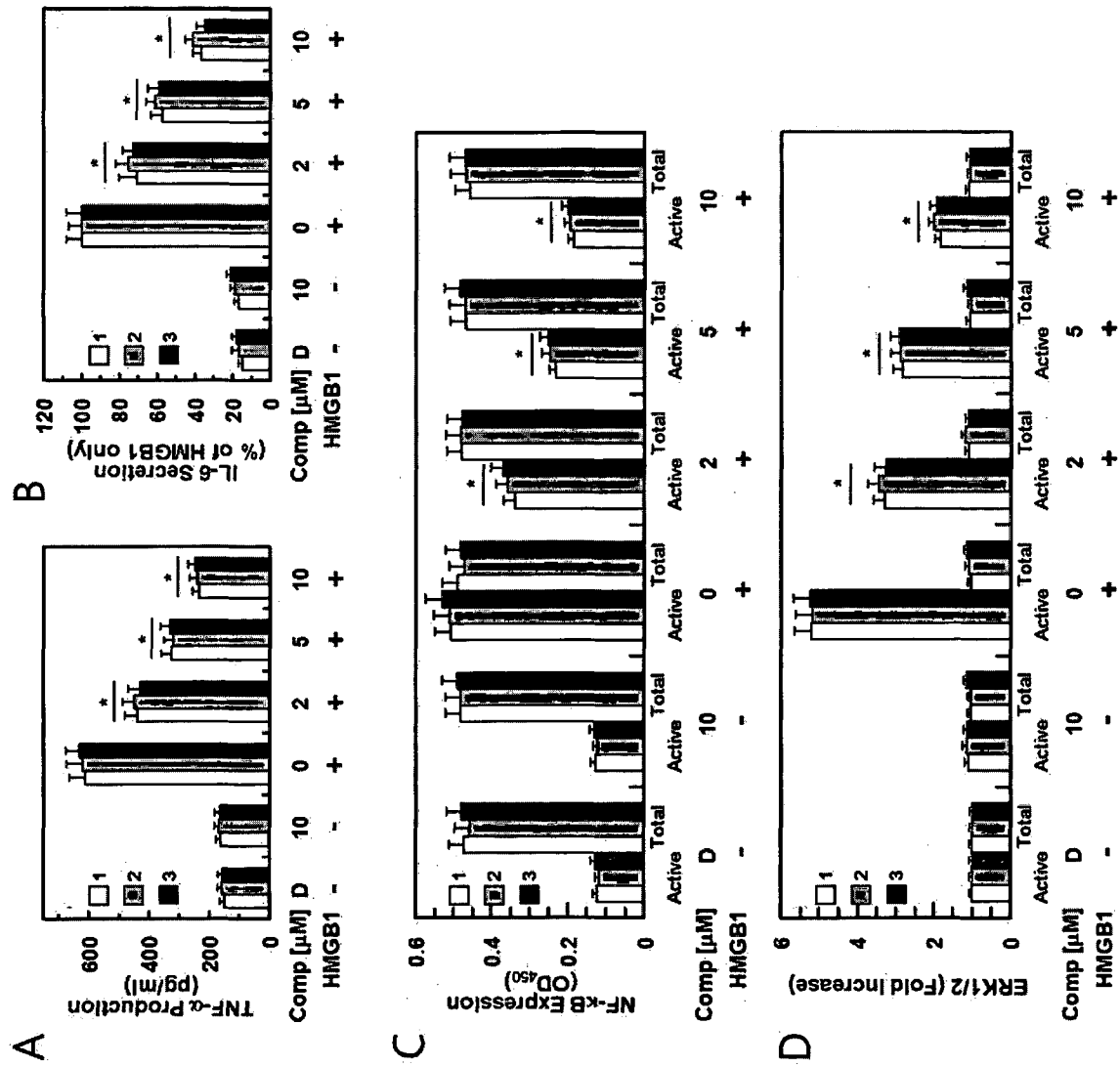
[도 3]



【도 4】



【도 5】



[5 6]

