(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0028835
(43) 공개일자 2016년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4725 (2006.01) *A61K 31/4704* (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0117899
(22) 출원일자 2014년09월04일
심사청구일자 2014년09월04일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
노구섭
경상남도 진주시 가좌안골길21번길 5, 102동 701호 (가좌동, 가좌제일풍경채)
고진신
경상남도 진주시 진주대로815번길 11, 102동 1301호 (주약동, 주약현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

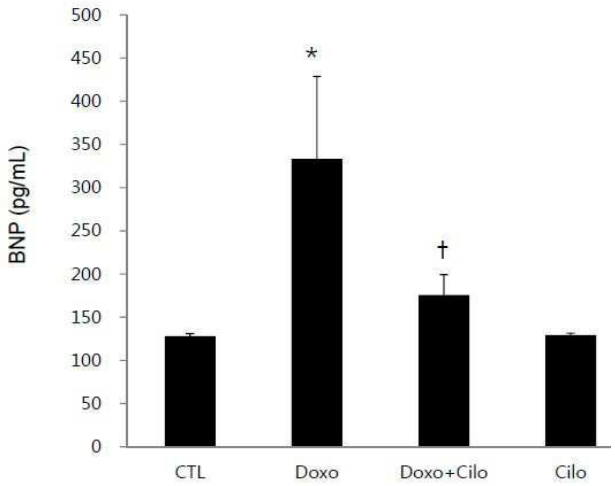
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **실로스타졸을 유효성분으로 포함하는 독소루비신에 의한 심부전 또는 확장성 심근병증의 예방용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 실로스타졸(cilostazol)을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신(doxorubicin)에 의해 특이적으로 유도되는 심부전 또는 확장성 심근병증의 예방용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약학 조성물은 독소루비신(doxorubicin) 항암제의 효과는 그대로 유지하면서, 상기 독소루비신(doxorubicin)만 처방했을 때의 부작용을 감소시키는 보조제로서의 실로스타졸을 유효성분으로 포함함으로써 상기 독소루비신(doxorubicin)의 안정성이 증진되어 항암치료의 효과를 향상시킬 수 있는 것이다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

박용휘

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

황진용

경상남도 진주시 강남로 45, 102동 1201호 (주약동, 금호석류마을아파트)

명 세 서

청구범위

청구항 1

실로스타졸(cilostazol)을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신(doxorubicin)에 의해 특이적으로 유도되는 심부전 또는 확장성 심근병증의 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 실로스타졸은 독소루비신에 의해 증가된 TLR4(toll-like receptor 4) 단백질의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 실로스타졸은 독소루비신에 의해 NF-κB p65(nuclear factor-kappaB p65) 단백질이 세포질에서 핵으로 이동(translocation) 되는 것을 저해하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 실로스타졸 이외에 약학적으로 허용 가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액 글리세롤 및 에탄올 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 실로스타졸 이외에 약학적으로 허용 가능한 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 경구 투여용인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

독소루비신 및 실로스타졸(cilostazol)을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신(doxorubicin)에 의해 특이적으로 유도되는 심부전 또는 확장성 심근병증의 부작용을 예방하는 것을 특징으로 하는 항암용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액 글리세롤 및 에탄올 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항암용 약학 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항암용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 실로스타졸을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신에 의해 특이적으로 발생하는 심부전 또는 확장성 심근병증의 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 통상적으로, 혈액종양, 악성종양, 연조직 육종을 포함한 광범위한 범위의 암치료에 사용되는 안트라사이클린(anthracyclines) 계열의 독소루비신은 주로 정맥 내 주사로 투여되며, 암세포의 DNA에 결합하거나 DNA 사이에 끼어 들어가서 없는 염기를 만들어, 암 세포의 복제를 억제하여 암세포를 죽이는 항암제이다.

[0003] 독소루비신은 화학적 구조가 복잡하고, 생리학적 유체에 대한 용해도가 낮은 편이기 때문에 세포막에 대한 투과성이 낮다. 따라서, 타겟 암의 치료에 필요한 용량보다 과량 투여해야 한다. 세포막으로 투과되지 못한 독소루비신은 혈장 단백질과 결합하거나 혈류에서 비특이적으로 상호작용하여 부작용을 일으키기 때문에 높은 투여량은 매우 불리할 수밖에 없다. 독소루비신의 가장 심각한 부작용은 치명적인 심장 손상이며, 구역질, 구토, 심장부정맥, 맹장염 등의 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, 실로스타졸(cilostazol)은 6-[4-(1-사이클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디히드록-2-(1H)-퀴놀린으로 표시되는 강력한 선택적인 포스포디에스터라아제 타입 Ⅲ(PDE Ⅲ) 억제제이다. 실로스타졸은 혈소판 응집 억제제 및 혈관확장제로서 기능을 하며, 말초 동맥 질환 및 간헐성 파행 환자를 치료하는데 주로 사용되고 있다.

[0005] 상기 독소루비신을 항암제로 사용할 때 발생하는 부작용의 문제점을 해소하기 위하여, 제형을 개선하는 방법으로 독소루비신의 물성을 개질함으로써 부작용 문제를 해소하고자 노력하였다. 일례로, 한국등록특허 제1074430호에 항암 용도를 위한 독소루비신 제형이 개시되어 있으나, 물성의 개선은 여전히 미미한 실정이다.

[0006] 또한, 안트라사이클린(anthracyclines) 계열의 항암제인 독소루비신의 항암 효과는 그대로 유지하면서, 항암제 처방에 의한 부작용으로 발생하는 심부전 또는 확장성 심근병을 억제 또는 감소시키는 보조제로서의 실로스타졸(cilostazol)을 유효성분으로 포함하는 약학조성물은 개시된 바 없다.

[0007] 한편, 실로스타졸의 용도에 대하여 한국공개특허 제2011-0089851호에 장기 기능장애(diastolic dysfunction)를 앓고 있는 환자 치료용 약제(medicament)를 제조하기 위한, 포스포디에스테라제 타입 Ⅲ(PDE Ⅲ) 억제제 또는 Ca^{2+}-감작제(sensitizing agent)로서 개시되어 있고, 일본공개특허 제2009-242378호에 포스포디에스테라제 Ⅲ B(PDE3B) 저해제를 유효성분으로 하는 시스플라틴 효과 증감제에 관한 것이 개시되어 있지만, 독소루비신과 병용 처방하여 독소루비신의 부작용을 완화하는 효과에 대해서는 개시된 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 실로스타졸을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신에 의해 특이적으로 발생하는 심부전 또는 확장성 심근병증의 예방용 약학 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명은 실로스타졸을 병용투여하여 심부전의 정도 및 염증 관련 단백질의 발현이 경감되는 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 실로스타졸을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신에 의해 특이적으로 발생하는 심부전 또는 확장성 심근병증의 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 독소루비신 및 실로스타졸(cilostazol)을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신(doxorubicin)에 의해 특이적으로 유도되는 심부전 또는 확장성 심근병증의 부작용을 예방하는 것을 특징으로 하는 항암용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 실로스타졸을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신에 의해 특이적으로 유발되는 심부전 또는 확장성 심근병증의 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0012] 실로스타졸과 함께 병용투여함으로써 독소루비신만 투여했을 때 유발되는 심각한 부작용인 심부전 또는 확장성 심근병증을 감소시키는 효과가 있는 것이다. 즉, 본 발명의 약학 조성물은 독소루비신의 항암효과 효과는 그대로 유지하면서, 독소루비신에 의한 부작용을 완화시킴으로써, 독소루비신의 안전성을 향상시킨 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 약학 조성물을 투여한 마우스의 체중 및 심장의 무게 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2는 심장 초음파로 측정한 각 치료 군의 확장기 좌심실 내경 및 심실 구축률 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 심장근육의 조직학적 변화를 나타낸 도면이다.

도 4는 심장의 심부전의 정도를 나타내는 BNP 측정결과를 나타낸 것이다.

도 5는 심근 세포의 염증반응 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 실로스타졸(cilostazol)에 의한 NF-kB p65 단백질의 핵 내 이동이 억제되는 효과를 나타낸 도면이다.

도 7은 NF-kB 신호전달경로의 최종 생산물인 COX-2 단백질의 농도를 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 실로스타졸을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신에 의해 특이적으로 발생하는 심부전 또는 확장성 심근병증의 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 실로스타졸은 독소루비신에 의해 증가된 TLR4(toll-like receptor 4) 단백질의 발현량을 감소시키며, 독소루비신에 의해 NF-κB p65(nuclear factor-kappaB p65) 단백질이 세포질에서 핵으로 이동(translocation) 되는 것을 저해하는 특징이 있다.

[0016] 상기 실로스타졸(cilostazol) 이외에 약학적으로 허용 가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액 글리세롤 및 에탄올 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 포함할 수 있다. 또한, 상기 실로스타졸(cilostazol) 이외에 약학적으로 허용 가능한 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 포함하는 것이 가능하다.

[0017] 임상 투여를 위해 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 기술을 이용하여 적합한 제형으로 제제화할 수 있고, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 본 기술분야의 통상의 전문가가 용이하게 결정할 수 있다.

[0018] 상기 약학 조성물은 경구투여 하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0019] 또한, 본 발명은 독소루비신 및 실로스타졸(cilostazol)을 유효성분으로 포함하며, 독소루비신(doxorubicin)에 의해 특이적으로 유도되는 심부전 또는 확장성 심근병증의 부작용을 예방하는 것을 특징으로 하는 항암용 약학 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 독소루비신 및 실로스타졸의 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액 글리세롤 및 에탄올 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 포함할 수 있으며, 상기 독소루비신 및 실로스타졸의 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 포함할 수 있다.

[0021] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0022] 재료 및 방법

[0023] 동물

[0024] 4주령 수컷 ICR 마우스를 코아텍 사(평택, 한국)로부터 구입하여 경상대학교 동물시설에서 관리 및 사육하였다. 모든 동물실험은 경상대학교의 연구기관 위원회의 승인을 받았으며, 실험동물 관리는 국립보건원 가이드에 따라 수행하였다. 마우스는 낮/밤을 12시간 주기로 관리하였으며, 마우스가 새로운 환경에 적응할 수 있도록 실험적 과정을 수행하기 1주일 전까지는 표준 급이 및 물을 공급하였고, 2주마다 체중을 측정하였다.

[0025] 약물투여

[0026] 마우스를 4 그룹으로 무작위 분류하였다. 대조군(CTL, n=10), 독소루비신만 처리한 실험군(Doxo, n=14), 실로스타졸과 독소루비신을 함께 처리한 실험군(Doxo+Clio, n=12), 실로스타졸(Cilo)만 처리한 실험군(Cilo, n=9)로 분류하여 약물을 투여하였다.

[0027] 상기 대조군 마우스에는 독소루비신 및 실로스타졸을 처방하는 6주 동안 생리식염수 또는 CMC를 복강 내 투여하였다.

[0028] 상기 독소루비신만 처리한 마우스 실험군은 15mg/kg의 양으로 독소루비신(아드리아마이신, 일동제약, 한국)을 일주일 간격으로 2주 동안 3번 복강 내 주사하였고, 이후 3주차부터 6주 될 때까지 생리식염수 또는 CMC를 복강 내 투여하였다.

[0029] 실로스타졸과 독소루비신을 함께 처리한 마우스 실험군(Doxo+Clio, n=12)에는 15mg/kg의 양으로 독소루비신(아드리아마이신, 일동제약, 한국)을 일주일 간격으로 3번 복강 내 주사하였고, 실로스타졸은 (50mg/kg, 오츠카 제약 (주), 도쿠시마, 일본) 독소루비신 복강 내 투여와 병용하여, 주당 5일 동안(5일 동안 투여하고, 이틀 동안 투여하지 않기를 반복함) 6주간 투여하였다. 즉, 첫 2주간은 독소루비신과 실로스타졸을 병용 투여하였고, 3주차부터 6주까지는 실로스타졸만 투여하였다.

[0030] 실로스타졸(Cilo)만 처리한 마우스 실험군(Cilo, n=9)에는 주당 5일 동안(5일 동안 투여하고, 이틀 동안 투여하지 않기를 반복함) 6주간 실로스타졸만 투여하였다. 상기 실로스타졸은 0.9% 생리 식염수에 용해된 0.5%의 카르복실메틸셀룰로오스 나트륨염(carboxylmethylcelluose sodium salt; CMC)와 혼합하여 사용하였다.

[0031] 심장 평가(Cardiac Assessment)

[0032] 2차원 및 M 모드 심 초음파는 VIVID Q 시스템 (GE 헬스, WAUWATOSA WI)과 12 MHz의 선형 배열 변환기를 사용하여 평가하였다. 최종 이완기(LVEDD)에서와 최종 수축기(LVESD)에서 좌심실 내부 치수는 M-모드 방식으로 측정하였다.

[0033] 하기 식(1)을 이용하여 마우스의 좌심실(LV) 부분 단축을 계산하였다.

[0034] [(LVEDD - LVESD)/LVEDD]×100 식(1)

[0035]

[0036] 조직 수집 및 시료 준비

[0037] 조직 분석을 위해 마우스 (그룹당 n = 4)은 졸레틸(zoletil)로 마취한 후, 인산 완충 식염수 0.1 ㎖ (PBS)에 용해시킨 4% 파라포름알데히드로 헤파린 염(heparized saline)으로 심장에 관류하였다.

[0038] 여섯 시간 동안 고정한 후, 심장 조직을 파라핀 포매(paraffin embedding) 하고 5㎛ 간격으로 절단(section)하였다. 심장 조직 섹션은 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 염색을 하였다. 상기 섹션은 BX51 광학 현미경 (올림푸스, 도쿄, 일본)에서 시각화하고, 디지털 이미지를 획득하였다.

[0039] 혈청 BNP 농도의 측정

[0040] BNP(brain natriuretic peptide)의 혈청 농도는 정량적으로 제조업체의 지침에 따라 BNP 마우스 효소 면역 분석법 (ELISA) 키트를 사용하여 측정하였다.

[0041] 세포질과 핵 분획

[0042] 세포질과 핵 분획을 위해, 심장을 신속하게 적출하고, 빙냉(ice-cold) PBS에 보관하였다. 빙냉(ice-cold) 용해 완충액(10mM의 HEPES-KOH [pH7.9], 1.5mM $MgCl_2$, 10mM KCl, 1㎍/㎖ 아프로티닌(aprotinin), 3㎍/㎖ 펩스타틴(pepstatin), 0.5㎍/㎖ 류펩틴(leupeptin), 0.2mM PMSF, 0.5mM DTT)으로 잘게 부순 후에 조직파쇄 하였다.

[0043] 웨스턴 블랏 분석

[0044] 상기 그룹당 5 내지 7마리의 마우스에서 단백질을 추출하기 위하여 동결심장조직을 용해(lysis) 완충용액[15mM HEPES (pH 7.9), 0.25M 수크로스(sucrose), 60mM KCl, 10mM NaCl, 1mM 에틸렌글리콜 테트라아세트산(ethylene glycol tetraacetic acid), 1mM 페닐메틸술폰닐 플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride), 및 2mM NaF]으로 파쇄하였다.TLR4, NF-kB, COX-2 단백질 특이 항체를 이용하여 분석하였다. 밴드의 크기는 α-튜불린(tubulin)으로 정량화하였고, 화학발광 기질(Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 가시화하였다. Multi-Gauge V3.0 이미지 분석 프로그램(후지필름 도쿄, 일본)을 이용하여 밴드 밀도를 분석하였다.

[0045] 통계 분석

[0046] 시간 또는 실험군 (즉, CTL, Doxo, Doxo + Cilo, Cilo)에 따른 차이는 일원분산분석(ANOVA; one-way analysis of variance)의 스튜던트-뉴만-쿨스 검정(Student-Newman-Keuls test)의 *post-hoc* 분석 또는 오직 두 그룹간을 비교하는 Student's t-test로 통계분석을 실시하였다.

[0047] 분석 값은 평균±평균의 표준 오차(SEM)로 표현하였으며, P 값이 0.05 미만일 때($P < 0.05$), 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0048] **실시예 1. 마우스의 체중 및 심장의 무게 변화 분석**

[0049] 본 발명의 약학 조성물을 투여한 마우스의 체중 및 심장의 무게 변화를 측정하였다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 각 실험군에서 0(초기), 2, 4 및 6주에 마우스의 몸무게를 측정하였다(A). 6주 후, 실험군 간의 체중 및 심장의 무게변화를 살펴보면, 대조군(CTL)과 실로스타졸(Cilo)만 투여한 실험군에서는 지속적인 몸무게의 증가가 관찰되었으나, 독소루비신(Doxo)만 투여한 실험군에서는 의미 있는 몸무게 감소가 관찰되었고, 독소루비신과 실로스타졸을 병용 투여한 실험군(Doxo+Cilo)에서는 몸무게의 감소가 둔화되는 것이 관찰되었다(B).

[0050] 또한, 6주 후, 마우스의 심장을 열었을 때, Dox군의 심장크기가 CTL군에 비해 심장의 크기가 작은 것을 관찰되었고, 심장에 흉수(pleural effusion)가 차 있는 것이 관찰되었다. 심장 무게를 측정하였을 때, Doxo군에서 뚜렷한 감소가 있었으나, Doxo+Cilo군에서는 심장 무게가 보존되는 것을 확인하였다(C).

[0051] **실시예 2. 확장기 좌심실 내경 및 심실 구축률 변화 분석**

[0052] 상기한 4 그룹의 실험군에 대하여 확장기 좌심실 내경 및 심실 구축률의 변화를 분석하기 위하여 심장초음파 측정을 실시하였다. 결과는 도 2에 개시한 바와 같이, Doxo군에서는 심실의 확장(B) 및 심실 수축률(C) 저하된 것이 관찰되었으나 Doxo+Cilo군에서는 심실 확장이 관찰되지 않았고, 심실 수축률의 저하도 경감되는 것을 확인할 수 있었다.

[0053] **실시예 3. 심장근육의 조직학적 변화 분석**

[0054] 상기한 4 그룹의 실험군의 심장근육 조직의 조직학적 변화를 분석하기 위하여 H&E 염색을 실시하였다. 도 3에 나타낸 결과로부터, Doxo군의 심근육에서 근육조직의 결손 및 공포화가 진행됨을 확인할 수 있었고, 독소루비신과 실로스타졸(Cilostazol) 병용 투여하였던 실험군에서의 심근육 손상 정도가 상기 Doxo군의 심근육 손상 정도보다 적게 되었음을 확인하였다.

[0055] **실시예 4. 심장의 심부전의 정도를 나타내는 BNP 측정**

[0056] 본 발명의 약학 조성물이 독소루비신에 의해 특이적으로 야기되는 심부전에 미치는 영향을 확인하기 위하여 BNP 측정을 실시하였다.

[0057] 결과는 도 4에 개시한 바와 같이, CTL군과 비교하여 Doxo군에서 BNP가 현저히 상승 되었고, Doxo+Cilo군에서는

BNP 상승이 Cilo 투여로 인해 경감되는 결과를 보여 본 발명의 약학 조성물이 심부전의 진행을 완화 또는 경감시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0058]

[0059] **실시예 5. 심근세포의 염증반응 평가**

[0060] **1) TLR 단백질 발현량 분석**

[0061] 본 발명의 약학 조성물이 독소루비신에 의해 발생되는 염증반응에 미치는 영향을 확인하기 위하여 염증반응에 관련된 TLR4 단백질의 발현량을 웨스턴 블랏 기법으로 분석하였다.

[0062] 도 5에 개시한 바와 같이, Doxo군에서의 TLR4 단백질 발현량이 CTL군에 비해 현저히 증가됨을 확인할 수 있었으며, Doxo+Cilo군에서는 상대적으로 TLR4 단백질의 발현량 증가되지 않았고, 대조군과 비슷한 수준의 발현정도를 보였다(B).

[0063] **2) 실로스타졸에 의한 NF-kB p65의 핵 내 이동 억제**

[0064] 본 발명의 약학 조성물이 독소루비신에 의해 NF-kB p65이 세포질에서 핵으로 이동하는 것을 억제하는 것을 확인하기 위하여 웨스턴 블랏을 실시하였다.

[0065] 도 6에 개시한 바와 같이, Doxo군에서 NF-kB p65 단백질이 세포질보다 핵 내의 단백질 양이 높음을 확인하였고(A), Doxo+Cilo군에서는 NF-kB p65 단백질의 발현량이 핵보다 세포질이 높다는 것을 확인함으로써 실로스타졸이 NF-kB p65 단백질이 세포질에서 핵으로 이동하는 것이 억제되었음을 알수 있었다(B). 한편, cilostazol만 투여한 실험군의 결과로부터, 실로스타졸이 핵내의 NF-kB p65 단백질 발현을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다(C).

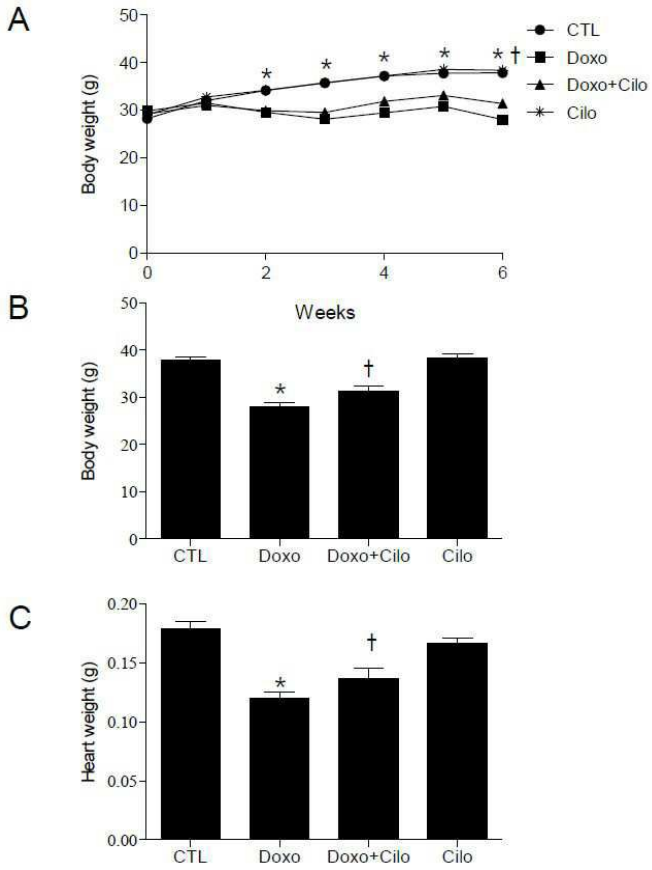
[0066] **3) NF-kB 신호전달경로의 최종생성물인 COX-2의 농도 측정**

[0067] NF-kB 신호전달경로의 최종생성물인 COX-2 단백질의 발현량의 변화를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏 분석을 실시하였다.

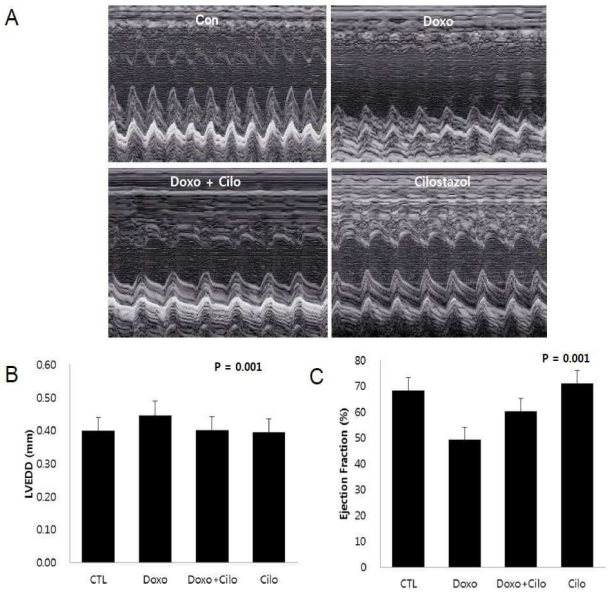
[0068] 도 7에 개시한 바와 같이, Doxo군에서는 CTL군보다 COX-2 단백질의 발현량이 현저하게 증가하였음을 확인할 수 있었고, Doxo+Cilo군에서는 COX-2 단백질의 발현량이 증가하지 않고 유지되고 있음을 확인할 있었다. 따라서, 독소루비신에 의해 유발되는 염증반응이 병용 투여된 실로스타졸에 의해 조절됨을 확인할 수 있었다(B).

도면

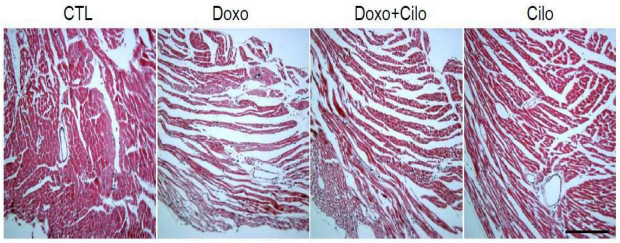
도면1


A
Body weight (g)
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo
Weeks
B
Body weight (g)
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo
C
Heart weight (g)
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo

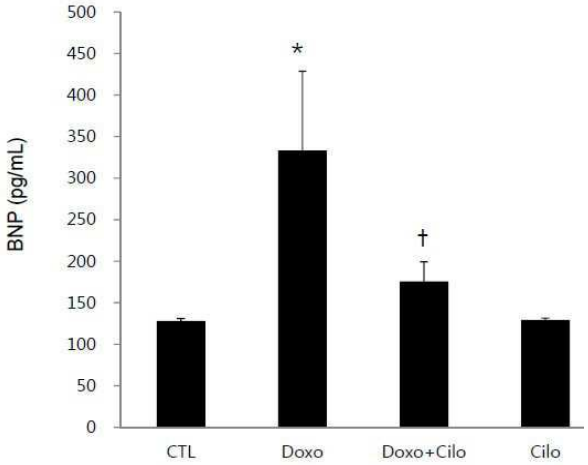
도면2


A
Con
Doxo
Doxo + Cilo
Cilostazol
B
P = 0.001
LVEDD (mm)
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo
C
P = 0.001
Ejection Fraction (%)
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo

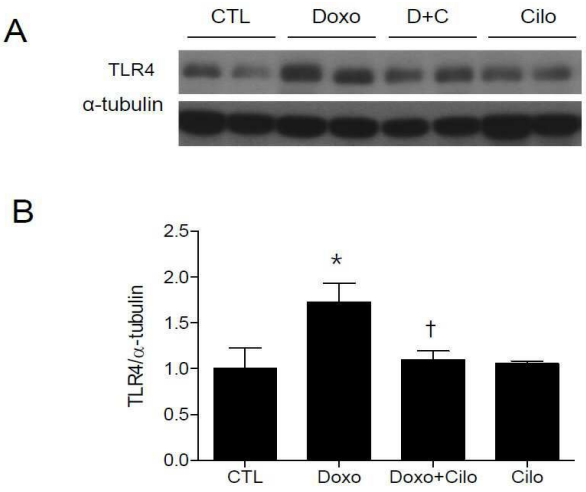
도면3


CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo

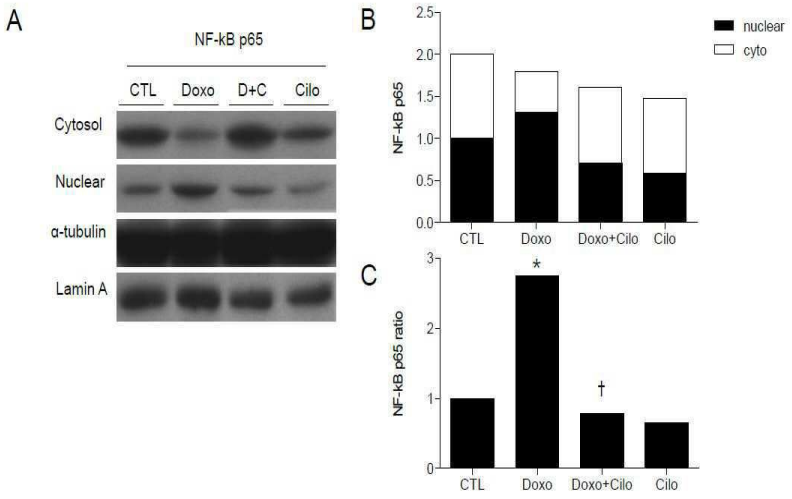
도면4


BNP (pg/mL)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
†
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo

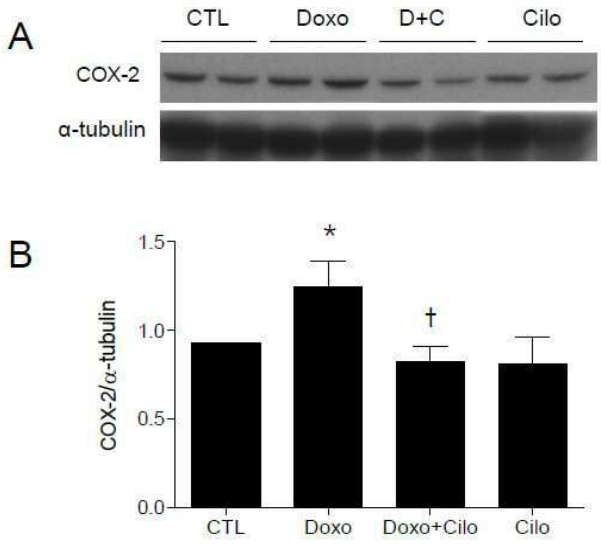
도면5


A
CTL
Doxo
D+C
Cilo
TLR4
α-tubulin
B
TLR4/α-tubulin
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
†
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo

도면6


A
NF-kB p65
CTL
Doxo
D+C
Cilo
Cytosol
Nuclear
α-tubulin
Lamin A
B
nuclear
cyto
NF-kB p65
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo
C
NF-kB p65 ratio
3
2
1
0
*
†
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo

도면7


A
CTL
Doxo
D+C
Cilo
COX-2
α-tubulin
B
COX-2/α-tubulin
1.5
1.0
0.5
0.0
*
†
CTL
Doxo
Doxo+Cilo
Cilo