

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) . Int. Cl.⁸*A61K 31/65* (2006.01)*A61P 19/02* (2006.01)*A61P 29/00* (2006.01)

(45) 공고일자

2006년02월24일

(11) 등록번호

10-0554859

(24) 등록일자

2006년02월17일

(21) 출원번호	10-1999-7001591	(65) 공개번호	10-2000-0035881
(22) 출원일자	1999년02월26일	(43) 공개일자	2000년06월26일
번역문 제출일자	1999년02월26일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/014723	(87) 국제공개번호	WO 1998/08480
국제출원일자	1997년08월21일	국제공개일자	1998년03월05일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 08/697,815 1996년08월30일 미국(US)

(73) 특허권자 더 리서치 파운데이션 오브 스테이트 유니버시티 오브 뉴욕
미국 뉴욕 12201-0009 알바니 피.오.박스 9

호스피탈 포 조인트 디지이즈
미국 뉴욕주 10016 뉴욕 이스트 17번 스트리트 301

(72) 발명자 아민아속알
미국뉴저지주07083유니온글렌우드코트156

아브람슨스티븐비
미국뉴욕주10508라이그린헤이븐로드27

골립론엠

미국뉴욕주11787스미쓰타운휘트니게이트29

라마무르씨눈가바람에스
미국뉴욕주11787스미쓰타운라이남코트10

맥나마라토마스에프
미국뉴욕주11777포트제퍼슨피.오.박스44

그린왈드로버트에이
미국뉴욕주11747멜빌바욱스홀코트5

트라츠먼하워드
미국뉴욕주10804뉴로첼로밸로드33

(74) 대리인

김영관
이병호
신현문
홍동오
정상구
이범래

심사관 : 이미정

(54) 일산화질소 생산을 억제하기 위한 테트라사이클린 화합물을 포함하는 약제학적 조성물

요약

본 발명은 생체내, 실험관내 또는 생체외 생물학적 시스템에서 일산화질소(NO)의 생산을 억제하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 NO의 생산을 억제하고/하거나 동형의 유도성 일산화질소 신타제(iNOS)의 발현 또는 활성을 억제하는 테트라사이클린 화합물을 사용한다. 바람직하게는, 테트라사이클린 화합물은 메탈로프로테이나제에 대해 억제 활성을 갖는다. 또한, 생물학적 시스템내에서 항세균 활성을 거의 가지지 않거나 전혀 가지지 않는 양의 테트라사이클린을 상기 생물학적 시스템에 제공하는 것이 바람직하다. 따라서, 바람직한 테트라사이클린 화합물은 자체의 항미생물 활성이 감소되거나 제거되도록 개질된 테트라사이클린 화합물이다. 이 방법은 예를 들어, 염증 상태를 포함하는, iNOS에 의해 중재된 NO 생산으로 특징화되는 포유동물에서의 의학 상태를 치료하는데 사용될 수 있다.

대표도

도 1A

색인어

일산화질소 생산 억제, 테트라사이클린

명세서

배경기술

본 발명은 생물학적 시스템에서 일산화질소의 생성을 감소시키기 위한 방법에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 포유 동물에서 유도성 일산화질소 신타제의 억제에 관한 것이다.

일산화질소(이후, NO라고 칭함)는 최근에 각종 세포에 의해 생산되어 이들 세포에 작용하며, 염증 및 자가면역-중재된 조직 파괴에 관여하는 다기능 중재자인 것으로 인식되고 있다. NO 생산은 일산화질소 신타제(또한 일산화질소 신테타제라고도 함, 이후 NOS로 칭함)라 불리는 편재하는 효소 군에 의해 촉매된다. NOS는 L-아르기닌(일반적인 아미노산)의 L-시트룰린 및 일산화질소로의 혼합 작용적 산화를 촉매하는, 포유 동물에서 천연적으로 발현되는 효소이다. 이 효소는 L-아르기닌의 구아니디노 질소를 제거하여 일산화질소를 형성시킨다. 몇몇의 동형 NOS 효소가 확인되었으며, 이들은 일반적으로 2개의 유형으로 분리된다: 구성적 NOS(이후 cNOS라고 칭함) 및 유도성 NOS(이후 iNOS라고 칭함). 일부 NOS 효소의 유형 및 작용에 관한 추가의 세부 사항이 예를 들어, 미국 특허 제5,478,946호 및 제5,468,630호에 밝혀져 있으며, 이들 전체의 기술은 본원에서 참조로 인용된다. 사람 유도성 NOS를 발현시킬 수 있는 cDNA 클론은 미국 특허 제5,468,630호에 기술되어 있다.

NOS 효소의 일산화질소 생성물은 형성 시 관련되는 동형 NOS 효소에 따라 시그널 분자 또는 유효기 분자로서 작용하는 것으로 여겨진다. 구성적 형태의 NOS는 소량의 NO를 생산하며, 이는 구아닐레이트 사이클라제를 활성화시키며 사이클릭 구아노신 모노포스페이트(cGMP)를 형성시킨다. 결국, cGMP는 내피-의존성 근육 이완 및 신경 전달을 포함하는 몇 가지 특이적 작용을 중재한다. 대조적으로, NO는 유도성 일산화질소 신타제(iNOS)로 지명된 유도성의 동형 효소에 의해 다량 생산된다. iNOS에 의해 생산된 NO는 대식구의 세포독성 활성을 중재하는 것으로 여겨진다. iNOS를 생산하는 다른 세포는 내피 세포, 신경망, 쿠퍼 세포(Kupffer cell) 및 간 세포, 및 사이토킨에 의해 자극된 뮤린 섬유아세포를 포함한다. NO는 또한 뇌에서의 화학적 전령자(messenger)이며, 별개의 동형 NOS에 의해 생산되는 것으로 여겨진다.

몇몇의 생리학적 활성은 NO에 기인하고 있다. 히스타민 및 브래디키닌과 같은 혈관활성제는 NO 생산을 자극한다. NO는 혈류 및 혈관 투과성을 증가시키는 강력한 혈관확장제이다. 인터루킨-1(IL-1)은 췌장 섬(pancreatic islet)에서 iNOS의 발현을 유도한다. NO는 췌장 섬 작용에 있어 IL-1의 억제 효과의 중재자인 것으로 여겨진다. iNOS의 다른 유도자는 세균 내독소이며, 이는 NO가 내독소 속 또는 패혈성 속의 중재자로서 관여함을 나타낸다. 효소의 다른 유도자는 감마 인터페론, 종양 괴사 인자 및 기타 염증성 사이토킨(참조: Collier et al., 1989)을 포함한다. 예를 들어, 종양 괴사 인자는 패혈성 속과 관련된 전신계적 저혈압에 관련되는 것으로 여겨진다.

NOS는 또한 다양한 염증 조직에서 과발현(증가된 양으로 및 종종 비정상적인 양으로 발현)되며, NO 합성 및 작용의 중재가 염증 및 자가면역 상태의 치료에 있어 새로운 시도를 제공할 수 있다는 가설을 가져왔다(참조: Vane et al. 1994, Schmidt et al. 1994). 반(Vane) 및 공동 연구자는 NO가 동물 모델에서 염증의 중요한 중재자임을 암시하였다(참조: Vane et al. 1994). 시험하는 경우, NO 형성은 자가면역 질환(즉, 류마티스 관절염, 전신 홍반성 낭창, 궤양성 대장염 및 크론 질환)에서 증가되는 것으로 밝혀졌으며, 몇몇의 전통적인 염증 증상(홍반 및 혈관 누출)은 NOS 억제제에 의해 회복된다(참조: Schmidt et al. 1994, Nathan et al. 1994, Marletta 1994). 조직 손상의 중재자로서 NO에 대한 가장 주목할 만한 사실은 이러한 질환의 동물 모델을 수행한 연구(참조: McCartney-Francis et al. 1993, Stefanovic-Racic et al. 1994) 및 사람 골관절염의 연구(OA)(참조: Amin et al. 1995a)와 류마티스 관절염(RA)의 연구(참조: Sakurai et al. 1995)를 포함하는 관절염 연구에서 밝혀졌다.

최근에 사람 OA의 영향을 받은 연골은 생체외 조건하에서 연골 손상을 유발하기에 충분한 양의 NO를 자발적으로 방출할 수 있는 것으로 관측되었다(참조: Amin et al. 1995a). "골관절염-영향을 받은 NOS"(OA-NOS)로 지명된 유도성 NOS는 OA-영향받은 연골에서 과발현되지만, 정상의 연골에서는 검출되지 않는다. 유도성 OA-NOS는 신경 NOS(α -NOS 항체 중 자체의 분자량 및 항체 가교-반응성에 기준) 및 133kD iNOS(NF- κ B 및 사이클로헥스아미드에 민감함, IL-1 β + TNF α + LPS에 의해 상향조절됨)과 유사한 특성을 갖는다. NO는 매트릭스 분해를 효능화시키며, 이는 프로테오글리칸 및 콜라겐 유형 II 합성의 억제(참조: Taskiran et al. 1994, Cao et al. 1996) 및 메탈로프로테이나제 활성의 상향조절(참조: Murrell et al. 1995)을 포함한다.

일산화질소 신타제의 몇몇 억제제는 확인되어 있다. 이들 억제제의 대부분은 L-아르기닌의 유도체 및 NOS 효소의 천연 기질이다. 예를 들어, N^G -메틸-L-아르기닌 및 L- N^{ω} -나트로아르기닌은 NO 합성의 경쟁적 억제제이다. 미국 특허 제5,358,969호는 급성 또는 만성 염증 질환에 있어서의 NO 형성의 억제를 기술하고 있다. 이 방법은 포유 동물에게 NO-억제량의 메틸-, 1,1-디메틸- 또는 아미노-치환된 구아니딘 화합물을 투여함을 포함한다(참조: 미국 특허 제5,246,970호 및 제5,246,971호).

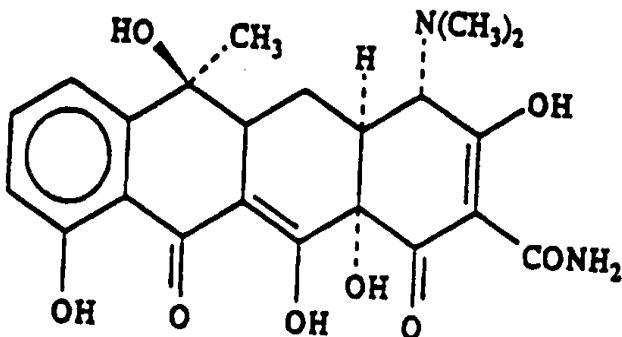
미국 특허 제5,216,025호는 특정의 저혈압 환자에 있어서 승압제를 효능화시키기 위한 NO 억제제로서의 용도를 기술하고 있다. 이들 억제제는 N^G -치환된 아르기닌을 포함하며, 여기서, 아르기닌의 구아니딘 아미노 그룹상의 수소는 다른 원자 또는 분자종에 의해 대체된다.

미국 특허 제5,478,946호는 일산화질소 신타제를 조절함으로써 cGMP의 수준을 간접적으로 조절하는 것으로 언급되는 불포화된 구아니디노 화합물을 기술하고 있다. 이들 화합물은 불포화된 구아니디노 골격내 다양한 부위에서 C₆-C₁₂ 아릴 그룹을 포함하는 각종 치환체를 포함할 수 있다.

미국 특허 제5,480,999호는 화학식 AB의 화합물을 기술하고 있으며, 여기서, A는 접근가능한 산 작용을 갖는 사이클로옥시계나제 억제제이고 B는 아르기닌 동족체이다. 화합물은 동일한 구조내에서 혼합된 사이클로옥시계나제- 및 NOS-억제 활성을 갖는 것으로 언급된다.

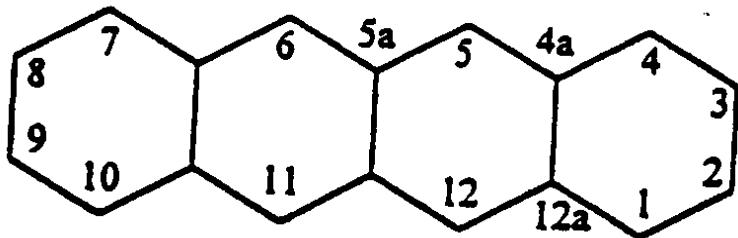
일산화질소의 생산은 또한 다른 방식으로 억제될 수 있다. 예를 들어, NO 생산은 테트라하이드로바이오프테린과 같은 iNOS의 보조인자의 활성을 간섭하는 화합물의 사용에 의해 억제할 수 있다. 또한, 대안적으로, NO의 총 생산은 일산화질소 스카빈저(scavenger)의 사용으로 감소시킬 수 있다. 이러한 유형의 방법에 사용하기 적합한 것으로 언급되는 화합물은 미국 특허 제5,449,688호에 기술되어 있으며, 이의 전체적인 기술은 본원에 참조로 도입된다. 테트라하이드로바이오프테린 합성 억제제는 예를 들면, 2,4-디아미노-6-하이드록시-피리미딘을 포함한다. NO 스카빈저는 예를 들면, 헤모글로빈 및 디에틸디티오카바메이트(DETC)를 포함한다.

테트라사이클린 및 이의 다수의 화학적 유도체는 특히 성공적인 부류의 항생제를 형성한다. 테트라사이클린 자체를 포함하는 특정의 테트라사이클린 화합물 및 스포로사이클린 등은 광범위한 세균에 대해 용도를 갖는 광범위한 스펙트럼의 항생제이다. 본 화합물인 테트라사이클린은 화학식



을 갖는다.

다수 환 핵의 번호매김 시스템은 다음과 같다:



테트라사이클린, 및 5-OH(테라마이신) 및 7-Cl(아우레오마이신) 유도체는 천연상태에서 존재하며 모두 잘 공지된 항생제이다. 천연 테트라사이클린은, 비둘 구조의 특정 요소는 유지되어야 하지만, 자체의 항생 특성을 상실하지 않으면서 개질될 수 있다. 기본적인 테트라사이클린 구조를 제조할 수 있는 개질 및 제조할 수 없는 개질은 문헌[참조: Mitscher (1978)]에 의해 고찰되어 왔다. 미셔(Mitscher)에 따르면, 테트라사이클린 환 시스템의 5 내지 9번 위치에서의 개질은 항생 특성을 완전히 상실함이 없이 달성될 수 있다.

그러나, 환 시스템의 기본 구조에 대한 변화 또는 1 내지 4번 또는 10 내지 12번에서의 치환체의 대체는 일반적으로 실질적으로 항생 활성을 거의 가지지 않거나, 필수적으로 항생 활성이 없는 합성 테트라사이클린을 가져온다. 예를 들어, 4-데디메틸아미노테트라사이클린은 일반적으로 비-항세균성 테트라사이클린인 것으로 여겨진다.

근년에, 신속하게 흡수되고, 반감기가 긴 테트라사이클린이 자체의 항미생물 활성과는 독립적으로 생물학적 효과를 발휘함이 확립되어 있다(참조: Golub et al. 1991, Golub et al. 1992, Uitto et al. 1994). 이러한 효과는 콜라겐나제(MMP-1), 겔라티나제(MMP-2) 및 스트로멜라이신(MMP-3)을 포함하는 매트릭스 메탈로프로테이나제의 억제, 및 병원성 조직 과괴의 예방(참조: Golub et al. 1991)을 포함한다. 류마티스 관절염(RA)과 같은 염증성 관절염에서, 이러한 매트릭스 메탈로프로테이나제는 류마토이드 활막의 균질물 및 배양물에서 확인되었고, 염증성 활액중에서 검출되었으며, 면역학적으로, 및 증식성 판누스(pannus) 및 활막에서의 반응계내 하이브리드화에 의해 위치한다(참조: Brinckerhoff 1991). 이들 메탈로프로테이나제는 OA-영향받는 관절내에서 상향조절되는 것으로 공지되어 있다(참조: Greenwald 1994, Mohtai et al. 1993). 흥미롭게도, 유(Yu, 1992)등은 또한, 독시사이클린의 예방적 투여로 개 모델에서 심각한 OA를 현저히 경감시키는 것으로 밝혀졌다. 관절염의 치료시 미노사이클린(반합성 테트라사이클린)의 안정성 및 효능을 평가하기 위한, 이중-블라인드(double-blind)의 무작위적인 다중심 시도는 이 약물이 약한 및 중증의 관절염 환자에게 안전하고 효과적임을 나타내고 있다(참조: Tilley et al. 1995). 더우기, 최근 연구는 또한 테트라사이클린 및 메탈로프로테이나제의 억제제가 종양 진행(참조: DeClerck et al. 1994), 골 흡수(참조: Rifkin et al. 1994) 및 맥관형성(참조: Maragoudakis et al. 1994)을 억제하며 소염 특성을 가질 수 있음을 제시하고 있다(참조: Ramanurthy et al. 1994).

그러나, 일반적으로 감염 치료에 효과적인 테트라사이클린 항생제의 사용은 바람직하지 않은 부작용을 초래할 수 있다. 예를 들어, 항생제인 테트라사이클린의 장기간 투여는 장내 균상과 같은 건강한 균상을 감소시키거나 제거할 수 있고, 항생제 내성 유기체 또는 효모 및 진균의 과성장을 초래할 수 있다. 따라서, 항미생물 활성이 약화되거나 결실된, 화학적으로 개질된 테트라사이클린이 항-콜라겐 분해 활성을 필요로 하는 곳에 사용하기에 바람직할 수 있다.

상기 고려의 측면에서, 특이적이고 효과적인 화합물을 사용하여 과도한 일산화질소 농도와 관련된 임상적 결과를 즉시 및 선택적으로 감소시킬 수 있는 새로운 방법으로 일산화질소 생산을 억제하는 기준 방법을 보완하는 것이 요구됨은 명백하다.

따라서, 본 발명의 목적중 하나는 새로운 부류의 일산화질소 억제제를 제공함으로써, 일산화질소 생산의 동정 및 일산화질소 생산 억제제의 사용시 상기 제한을 극복하는 것이다. 새로운 억제제는 NO 생산을 특이적으로 및 비교적 고 활성으로 억제하는 것으로 여겨진다. 더우기, 이러한 억제제 부류는 기타 목적을 위해 사람에게서 사용하도록 이미 입증된 장점을 지니며, 이는 임상적용의 신속한 채택에 대한 강한 기대를 하게한다. 기타 장점 및 목적은 숙련가들에게 용이하게 인지될 것이다.

발명의 요약

본 발명에 이르러 상기 목적 및 기타 목적이 규정된 결과를 달성하는데 효과적인 양의 테트라사이클린 화합물을 생물학적 시스템에 제공함으로써 이러한 생물학적 시스템내 일산화질소 생산 또는 일산화질소 신타제 발현 또는 활성을 억제하는 방법을 제공하는 본 발명에 의해 달성될 수 있음이 밝혀졌다.

바람직하게는, 이 방법은 시스템에 제공되는 수준의 항-미생물 활성을 실질적으로 가지지 않는 테트라사이클린 화합물을 사용한다. 테트라사이클린 화합물은 메탈로프로테이나제 억제 활성을 가진다는 점에서 또한 바람직하다. 매우 바람직한 테트라사이클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-3), 6-a-데옥시-5-하이드록시-4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-8), 4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-1), 독시사이클린 또는 미노사이클린을 포함한다.

하나의 양태에서, 이 방법은 생물학적 시스템내에서 일산화질소의 양을 감소시키기에 충분한 양의 테트라사이클린 화합물을 상기 생물학적 시스템에 제공함을 포함한다.

바람직하게는, 생물학적 시스템은 조직에서 일산화질소 생산이 증가됨을 특징으로 하는 상태를 갖는 포유 동물이다. 이 방법은 조직에서 유도성 일산화질소 신타제의 비정상적으로 높은 활성을 특징으로 하는 상태를 갖는 포유 동물의 생물학적 시스템에서 사용하기에 특히 적합하다. 본 발명의 방법에 의해 치료할 수 있는 이러한 상태는 예를 들면, 일산화질소-의존성 사구체 염증 및 골관절염과 같은 염증 질환을 포함한다.

본 발명은 또한 스테로이드성 약물 또는 비-스테로이드성 소염약물의 소염량을 생물학적 시스템에 추가로 제공함을 포함할 수 있다.

이 방법은 생물학적 시스템이 실험관내 세포 시스템 또는 생체외 조직 또는 기관 시스템인 경우, 및 일산화질소 생산의 측정된 양이 유도성 일산화질소 신타제의 발현 또는 활성을 지표인 경우에 또한 사용할 수 있다.

다른 양태에서, 본 발명은 포유 동물에서 일산화질소 생산을 억제하기에 충분한 양의 테트라사이클린 화합물을 상기 포유 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증 상태의 포유 동물을 치료하는 방법이다. 염증 상태는 급성 염증 상태 또는 만성 염증 상태일 수 있다.

다른 양태에서, 본 발명은 생물학적 시스템에서 유도성 일산화질소 신타제 발현 또는 활성을 억제하기에 충분한 양의 테트라사이클린 화합물을 상기 생물학적 시스템에 투여함을 포함하여, 상기 생물학적 시스템에서 유도성 일산화질소 신타제의 발현 또는 활성을 억제하는 방법이다.

따라서, 본 발명은 생체내, 실험관내 및 생체외 생물학적 시스템에서 일산화질소 생산을 억제하는 신규한 방법을 제공한다. 신규의 임상 치료 프로토콜은 특히 유도성 일산화질소 신타제의 발현을 방해함으로써, 일산화질소 생산(및 연속된 병리학)을 감소시키거나 제거하기 위해, 이러한 신규 방법을 사용하는 것이 가능하다. 증가된 NO 생산 또는 iNOS의 과발현을 특징으로 하는 각종 질환 및 상태는 본원에 기술된 바와 같은 테트라사이클린 화합물을 투여함으로써 치료될 수 있다. iNOS 발현량 또는 활성 정도 또는 NO 생산량을 나타낼 수 있는 신규의 검정 방법 또한 제공된다.

본 발명의 이러한 및 기타 장점은 본원에 설정된 상세한 기술 및 실시예로부터 명백할 것이다. 상세한 기술 및 실시예들은 본 발명의 이해를 증진시키나, 본 발명의 영역을 한정하는 것으로 의도되지는 않는다.

도면의 간단한 설명

본 발명의 바람직한 양태는 나열 및 기술의 목적을 위해 선택되나, 어떠한 방식으로든 본 발명의 영역을 한정하는 것으로 고려되지는 않는다. 본 발명의 특정 측면의 바람직한 양태는 첨부된 도면에 나타낸다:

도 1A 내지 도 1C는 독시사이클린 및 미노사이클린에 의해 관절 연골 기관 배양물에서 일산화질소의 용량-의존적 억제를 나타내는, 일련의 시간에 따른 그래프이다.

도 2A 내지 도 2B는 독시사이클린 및 미노사이클린에 의해 세포 배양물에서 뮤린 대식세포(RAW 264.7 세포)내 일산화질소 생산의 용량-의존적 억제를 나타내는, 일련의 시간에 따른 그래프이다.

도 3은 iNOS를 생산하기 위해 자극된(LPS에 의해 자극된) 뮤린 대식세포에 의한 L-[³H]-아르기닌에서 L-[³H]-시트룰린 전환시 용량-의존적 감소를 나타내는 박층 크로마토그래피(TLC) 플레이트의 스캐닝된 상을 도시한 것이다.

도 4는 독시사이클린 및 미노사이클린이 실험관내에서 LPS-자극된 뮤린 대식세포내 iNOS의 특이적 활성을 있어서 최소 효과를 가짐을 도시하는 막대 그래프이다.

도 5는 LPS 자극된 뮤린 대식세포에 의한 실험관내 iNOS 발현시 독시사이클린 및 미노사이클린에 의한 용량-의존적 억제를 나타내는 웨스턴 블로트의 농도계적 스캐닝을 도시한 것이다.

도 6A 및 도 6B는 독시사이클린(도 6A) 및 미노사이클린(도 6B)에 의한 LPS-자극된 대식세포에서 iNOS mRNA 합성의 특이적이고 용량-의존적인 억제를 나타내는, RT-PCR에 의해 생산된 mRNA의 전기영동적 분리의 상을 도시한 것이다.

도 6C 및 도 6D는 독시사이클린(도 6C) 및 미노사이클린(도 6D)에 의한 LPS-자극된 대식세포에서 iNOS mRNA 합성의 특이적이고 용량-의존적인 억제를 나타내는 노던 블로트의 형광상 스캐닝을 도시한 것이다.

바람직한 양태의 상세한 설명

본 발명은 실험관내, 생체내 및 생체외 생물학적 시스템에서 일산화질소(NO) 생산을 억제하는 방법에 관한 것이다. 이 방법은 검정 시스템, 즉 세포내에서 NO 생산, 또는 iNOS 발현 또는 활성을 검정하는데 사용하도록 채택될 수 있다. 바람직하게는, 이 방법은 포유 동물과 같은 살아있는 동물에서 NO 생산을 억제하는데 사용된다. 특히, 이 방법은 염증 질환 및 기

타 상태에서 증가된 또는 과도한 NO 생산에 의해 중재되거나 이와 관련된 병리학 및 기타 결과에 대해 포유 동물을 보호하는 수단을 제공한다. 이 방법은 일산화질소 생산 및/또는 유도성 일산화질소 신타제 발현 또는 활성의 억제제로서의 테트라사이클린 화합물의 사용을 포함한다.

본 발명은 테트라사이클린 화합물이 유도성 일산화질소 신타제에 의해 중재된 일산화질소의 생산을 억제한다는 출원인의 예측치 못한 관측을 기본으로 하여 개발되었다. 테트라사이클린 화합물은 콜라게나제와 같은 매트릭스 메탈로프로테이나제를 억제하는 것으로 공지되어 있다. 그러나, 유도성 일산화질소 신타제는 메탈로프로테이나제가 아니며, iNOS 활성 및 콜라게나제 활성간의 관계는 어느정도 확인되었다. 출원인은 또한 테트라사이클린이 iNOS를 발현할 수 있는 시스템에서 일산화질소의 생산을 억제한다는 것을 예측하기 위한 물리학적 또는 생화학적 기초를 잘 알지 못한다. 따라서, 항-메탈로프로테이나제 활성을 갖는 테트라사이클린 화합물이 또한 NO-생산 억제 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다는 것은 놀라운 일이다. 더욱 놀라운 사실은 콜라게나제의 억제제로서 테트라사이클린 화합물의 상대적 효능이 NO 생산의 억제제로서 이의 상대적인 효능에 있어 유사한 단계에 의해 반영되는 것으로 여겨진다는 것이다. 출원인은 현재 이러한 예상치 않았던 상관성을 설명할 이론적인 기초도 알고 있진 않으나, 이러한 관측 자체가 상승된 일산화질소 생산과 관련되거나 이로써 특성화되는 것으로 여겨지는 각종 질병의 현저한 치료학적 암시를 수반할 수 있으며, 치료 과정을 예측하는데 도움이 될 수 있다.

본 발명은 실험관내, 생체외 또는 생체내 생물학적 시스템을 사용하여 수행할 수 있다. 용어 "생물학적 시스템"은 본원에서 본 발명의 방법이 실행될 수 있는 실험관내, 생체내 및 생체외 시스템을 포함하는 여러 시스템 유형을 언급한다. 예를 들어, 이 방법은 살아있는 포유 동물(생체내), 및 배양된 세포 시스템(실험관내) 및 배양된 기관 시스템(생체외)에서 사용될 수 있다. 본 발명의 생체내 실행은 의학적 및 수의학적 질병, 상태 및 증상의 경감 또는 완화시의 적용을 허용한다. 기타 용도는 실험적 또는 임상적 적용을 위해 실험실에서 사용될 수 있는 검정 시스템을 포함한다.

본 발명의 수단에 의해 치료가능한 의학적 또는 수의학적 상태는 포유 동물에서 일어난다. 포유 동물은 예를 들면, 사람, 및 개 및 고양이와 같은 애완 동물, 랙트 및 마우스와 같은 실험실 동물, 및 말 및 소와 같은 농장 동물을 포함한다.

본 발명은 백혈구(예: 호중구 및 대식구)와 같은 세포 및 기타 세포에 의한 유도성 일산화질소 신타제에 의한 일산화질소 생산과 관련될 수 있는 광범위한 스펙트럼의 질병의 예방 또는 치료에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 방법은 NO 생산이 정상적 및 비정상적 증가를 포함하는, 시스템내 정상 수준보다 실질적으로 증가된 상태를 회복시키거나 억제하는데 유용하다.

본 발명은 특히 염증 질환의 치료와 관련하여, 특히 사구체신염 및 골관절염과 관련하여 본원에 기술하고 있다. 이러한 예시적 치료에서는, 실험관내 및 생체외 모델이 당해 분야의 표준 상태로 사용되어 왔다. 예를 들어, 출원인은 NO 생산이 랙트 맥판막 세포를 감마 인터페론(γ IFN)으로 치료함에 의해 유도될 수 있는 모델을 사용하였다. 또한, 출원인은 OA 영향받은 연골 또는 리포폴리사카라이드-자극된 뮤린 대식구에서와 같이, NO 생산이 증가되는 다른 모델을 사용하였다. 이들 방법들은 생체내 치료법에 효과적일 것으로 예측될 수 있는 제제를 확인하는데 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명의 방법은 신장염 및 골관절염의 치료에만 한정되는 것이 아니라, NO 생산, 또는 iNOS 발현 또는 활성이 중요한 역할을 하는 각종의 다른 질환에도 적용되어야 함이 이해될 것이다.

예를 들어, NO는 말라리아, 노쇠, 당뇨병, 및 맥관 박동 및 신경변성 질환(예: 알츠하이머 질환 및 헌팅تون 질환)을 포함하는 다양한 의학적 상태에 관련되는 것으로 여겨진다. NO는 또한 재관류 관련된 손상에 이은 경색을 포함하는, 호중구가 심장 근육을 공격하는 것으로 밝혀져 있는 심장 질환에 관련되는 것으로 여겨진다. 더우기, 체장 섬에서 NO 합성의 유도는 유아 당뇨병의 발병에 기여한다. 이러한 상태의 많은 경우는 사이토킨 발현에 있어서의 변화를 특징으로 하기 때문에, 유도성 NOS의 비정상적인 고 발현 및 활성이 관련된 병리학의 주요 인자인 것은 명백하다. 본 발명은 이러한 질환들을 치료하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 주요 부류의 질환은 염증을 특징으로 하는 질환이다. 염증은 일반적으로 2개의 광범위한 범위의 상태, 즉 급성 염증 및 만성 염증으로 크게 분리될 수 있는 것으로 인식되어 있다. 급성 염증은 일반적으로 약 수분 내지 약 1 내지 2일로서 기간이 짧다. 이의 주요 특징은 혈류 증가, 유액 및 혈장 단백질의 삼출(부종) 및 임파구 주로 호중구의 유주(emigration)이다. 만성 염증은 기간이 보다 길며, 즉 수일 내지 수주 또는 심지어 그 이상이고, 임파구 및 대식구의 존재, 및 혈관 및 연결 조직의 증식과 관련된다[참조: Cotran et al. (1989), Chandrasoma & Taylor (1991)].

염증은 열, 홍조, 팽윤, 통증 및 기능 상실로 나타난다. 염증의 원인은 많으며 미생물 감염(예: 세균 및 진균 감염), 물리적 인자(예: 화상, 조사 및 외상), 화학적 제제(예: 독소 및 유발 물질), 조직 괴사 및 각종 유형의 면역학적 반응과 같은 인자들

을 포함한다. NO는 이러한 상해에 대한 면역 반응 및 염증 반응에서 생산된 다수의 반응성 생성물 중 하나인 것으로 여겨진다. 특히, 만성 염증에 있어 일반적인 상승된 수준의 NO 생산은 이러한 상태에서 흔히 관측되는 비 특이적인 조직 파괴에 기여하는 것 같다.

본 발명의 수단에 의해 치료가능한 염증 상태는 예를 들면, 골관절염, 류마チ스 관절염, 세균 및 진균(디프테리아 및 백일해를 포함)에 의한 급성 및 만성 감염, 급성 및 만성 기관지염, 정맥동맥 및 일반적인 감기를 포함하는 상부 호흡기 감염, 급성 및 만성 위장염 및 대장염, 급성 및 만성 방광염 및 요도염, 급성 및 만성 피부염, 급성 및 만성 결막염, 급성 및 만성 장막염(심막염, 복막염, 활막염, 흉막염 및 건염), 요독성 심막염, 급성 및 만성 담낭염, 급성 및 만성 질염, 급성 및 만성 포도막염, 약물 반응, 곤충에게 쏘이 상처, 화상(열, 화학물질 및 전기적 화상) 및 일광화상(sunburn)을 포함한다.

따라서, 본 발명의 방법은 이러한 NO-관련 상태를 예방, 억제 또는 완화시키는데 사용할 수 있다. 본 발명의 방법은 유도성 NOS의 과발현이 포함되는 어떠한 조건도 예방, 억제 또는 완화시키는데 사용할 수 있다.

이 방법은 생물학적 시스템에서 일산화질소 생산을 감소시키는데 효과적인 양의 테트라사이클린 화합물을 제공하거나 투여함을 포함한다. 이러한 억제는 유도성 일산화질소 신타제의 발현 또는 활성을 하강 조절할 수 있다. 예를 들어, 출원인은 독시사이클린(및 기타 테트라사이클린 화합물)이 세포 배양물에서 iNOS의 전사를 억제하는 것으로 여겨짐을 발견하였다. 이러한 효소의 감소된 발현은 통상적으로 조직에서 NO 생산의 감소를 초래할 것이다.

본 발명에 따라 사용된 테트라사이클린의 양은 iNOS 발현 또는 활성을 효과적으로 억제하는 양이다. 테트라사이클린 화합물의 양은, 이러한 양이 iNOS 발현 또는 활성을 현저히 감소시키거나, NO 생산을 감소시키는 경우, iNOA의 효과적인 억제량이다.

바람직하게는, 테트라사이클린 화합물은 항미생물 활성이 거의 없거나 전혀 없는 양으로 제공된다. 테트라사이클린 화합물은 미생물의 성장을 현저하게 방지하지 못하는 경우 효과적인 항미생물제가 아니다. 따라서, 이 방법은 자체의 항미생물 특성을 감소시키거나 제거하도록 화학적으로 개질된 테트라사이클린 화합물을 유리하게 사용할 수 있다. 이러한 화학적으로 개질된 테트라사이클린의 사용은 본 발명에서 바람직한데, 그 이유는 이들이 유리한 미생물을 무차별적으로 사멸시키고 내성 미생물을 출현시키는 바와 같은 특정의 단점을 피하면서, 이러한 화합물의 항미생물적 또는 항세균적 양의 사용을 동반하는 항미생물성 테트라사이클린보다 더욱 높은 수준으로 사용될 수 있기 때문이다.

본 발명은 또한 항세균 활성을 지닌 테트라사이클린 화합물을 사용할 수 있다. 그러나, 이러한 화합물은 실질적으로 항-세균 효과를 가지지 않으나 관련된 조직에서 iNOS 활성을 억제하는데 효과적인 양으로 사용되는 것이 바람직하다. 이러한 유형의 바람직한 화합물은 테트라사이클린, 독시사이클린, 테메클로사이클린 및 미노사이클린을 포함한다.

본 발명의 방법에 따라 유용한 테트라사이클린 화합물은 용량-의존적인 방식으로 유리한 효과를 나타내는 것으로 여겨진다. 즉, 광범위한 한계내에서, 다량의 테트라사이클린 화합물의 투여는 더욱 적은 양의 용량 투여 보다 더욱 큰 정도로 iNOS 활성을 억제하는 것으로 관측되었다. 더우기, 효능은 독성이 관측되는 수준 이하의 용량에서 관측된다.

대상에 대한 최대 용량은 바람직하지 않거나 내성이 아닌 부작용을 유발하지 않는 최대 용량이다. 예를 들어, 테트라사이클린 화합물은 약 0.1 mg/kg/일 내지 약 30 mg/kg/일 및 바람직하게는 약 1 mg/kg/일 내지 약 18 mg/kg/일의 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해서, 부작용은 임상적으로 현저한 항미생물 활성 또는 항세균 활성 및 독성 효과를 포함할 수 있다. 예를 들어, 약 50 mg/kg/일의 초과량은 사람을 포함하는 대부분의 포유동물에서 부작용을 유발할 것이다. 어떠한 경우에도, 전문의는 당해 분야의 기술 및 지식을 바탕으로 하여야 하고 본 발명은 기술한 현상을 달성하는데 효과적인 용량 제한없이 포함한다.

바람직한 임상적으로 개질된 테트라사이클린은 환 구조의 4번 위치에서 디메틸아미노 그룹을 결실하고 있는 것들이다. 이러한 화학적으로 개질된 테트라사이클린은 예를 들면, 4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-1), 4-데디메틸아미노-5-옥시테트라사이클린, 4-데디메틸아미노-7-클로로테트라사이클린(CMT-4), 4-하이드록시-4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-6), 5a,6-안하이드로-4-하이드록시-4-데디메틸아미노테트라사이클린, 6-데메틸-6-데옥시-4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-3), 4-데디메틸아미노-12a-데옥시테트라사이클린(CMT-7) 및 6-a-데옥시-5-하이드록시-4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-8)을 포함한다. 또한, 테트라사이클리노니트릴과 같이 니트릴을 생산하기 위해 2번 탄소 위치에서 개질된 테트라사이클린이 비-항세균성, 항-iNOS 제제로 유용하다.

항미생물 활성을 감소시키기 위해 개질된 테트라사이클린의 추가의 예는 6-a-벤질티오메틸렌테트라사이클린, 테트라사이클린의 모노-N-알킬화된 아미드, 6-플루오로-6-데메틸테트라사이클린 또는 11a-클로로테트라사이클린을 포함한다.

본 발명에 따라 사용하기에 적합한 특히 바람직한 테트라사이클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-3), 6- α -데옥시-5-하이드록시-4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-8), 4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-1), 독시사이클린 및 미노사이클린을 포함한다.

특정의 경우에, 단지 제한된 생분포를 갖는 테트라사이클린 화합물은 국소부위의 활성을 바람직할 수 있다. 실질적으로 이러한 국소 분포를 나타내는 CMT-2, CMT-6 및 기타 CMT가 보다 광범위한 전식적 억제를 나타내지 않으면서 상해 부위에서 iNOS 활성을 억제하는데 있어 자체의 국소 적용이 바람직하다. 예를 들어, 이러한 흡수되지 않는 CMT의 국소 적용은 경구 병변에서 바람직한데, 그 이유는 CMT가 팽윤되는 경우에서 조차 현저한 정도로 흡수되지 않기 때문이다.

따라서, 비히클내 약 25%(w/w) 이하의 양의 테트라사이클린 화합물의 국소 적용이 증상에 따라 적절하다. 더욱 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 10% 양의 테트라사이클린 화합물의 적용이 본 발명에 따른 iNOS를 효과적으로 억제하는 것으로 여겨진다. 이러한 양은 치료받는 대상에 있어 현저한 독성을 유발하지 않는 것으로 여겨진다.

테트라사이클린 화합물의 배합되거나 조화된 국소 및 전신적 투여는 본 발명하에 고려된다. 예를 들어, CMT-2 또는 CMT-6과 같은 비-흡수성 테트라사이클린 화합물은 국소 투여될 수 있는 반면, CMT-1, CMT-3, CMT-7 또는 CMT-8과 같이 대상에서 실질적으로 흡수되고 효과적으로 전신계에 분포될 수 있는 테트라사이클린은 전신체적으로 투여된다.

테트라사이클린 화합물은 조직내 염증을 억제할 수 있는 부형제와 함께 투여될 수 있다. 함께 투여될 수 있는 바람직한 소염제는 스테로이드, 및 바람직하게는 비-스테로이드성 소염 약물(NSAID)을 포함한다. 적합한 NSAID는 이러한 화합물의 다양한 부류로부터 선택될 수 있다. 이러한 부류는 예를 들면, 아세틸살리사이클산 및 디플루니살과 같은 살리사이클레이트; 인도메타신, 술린닥, 톨메틴, 디클로페낙 및 에토돌락과 같은 아세트산, 플루르비프로펜, 나프록센 및 케토프로펜과 같은 프로피온산 및 메클로페나메이트와 같은 페나메이트, 및 피록시캄과 같은 옥시캄을 포함한다. 일반적으로, NSAID의 양은 영향받은 조직에 있어 염증을 억제하기에 충분한 양이다. 소염 양은 사용된 NSAID 및 기타 이해된 인자에 의존할 것이며, 숙련된 전문의에 의해 용이하게 측정될 수 있다.

본 발명의 방법에 사용하기에 바람직한 약제학적 조성물은 당해 분야의 전문의에 의해 이해되는 것으로서 적합한 약제학적 담체(비히클) 또는 부형제내 테트라사이클린 화합물을 포함한다. 비경구 투여(예: 정맥내 주사)가 테트라사이클린의 바람직한 수송 경로이며, 적절한 희석제 및 담체와 함께 테트라사이클린 화합물을 포함하는 조성물이 용이하게 제제화된다. 장내 사용 또한 고려되며, 정제와 같은 제형이 화합물을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 달리는, 테트라사이클린 화합물의 수송은 국소 적용을 포함할 수 있다. 따라서, 담체는 국소적 사용에 바람직하게 적합하다. 이러한 국소용으로 적합한 것으로 고려되는 조성물은 젤제, 크림제(salves), 로션제 및 연고제를 포함한다. 테트라사이클린 화합물의 비-항미생물적 양은 피부에 직접 적용될 수 있는 예비-포장된 외과적 또는 화상 드레싱 또는 밴드를 제공하기 위한 지지체 기재 또는 매트릭스 등과 함께 도입될 수 있다.

다음 실시예는 본 발명을 추가로 이해하는데 있어 도움이 되도록 제공된다. 사용된 특정 물질 및 조건은 본 발명을 추가로 예시하기 위한 의도이며 본 발명의 정당한 영역을 한정하는 것은 아니다.

실시예 1

신장 맥관막 세포를 50U/mL의 감마 인터페론(IFN- γ) 및 10 μ g/mL의 세균 리포폴리사카라이드(LPS)를 함유하는 배지에서 배양한다. 시험 배지는 (a) 어떠한 첨가제도 함유하지 않거나, (b) CMT-5 및 적절한 항-콜라게나제 활성을 가지지 않는 테트라사이클린을 함유하거나, (c) CMT-1 및 중간 정도의 항-콜라게나제 활성을 갖는 테트라사이클린 유도체를 함유하거나, 또는 (d) 높은 수준의 항-콜라게나제 활성을 갖는 CMT-3 및 CMT-8 유도체를 함유한다. CMT 첨가제는 1, 2.5, 5 및 10 μ g/mL의 농도에서 포함된다. NO 생산은 그레이스 반응(Greiss reaction)으로 검정하며, iNOS 함량은 웨스턴 분석으로 측정한다.

CMT-3 및 CMT-8에 대한 신장 맥관막 세포의 노출은 24 내지 72시간에 NO 생산의 시간-의존적 억제를 초래한다. 48시간째에, 이 효과는 5 μ g/mL($P<0.01$)에서 최대(>80%)이다. 세포와 CMT-1의 항온처리는 높은 약물 농도(10 μ g/mL)에도 불구하고 48시간 후에 NO 생산의 현저하지 않은 억제를 거의 유발하지 않는다(대조군의 약 60%). NO 생산에 있어서의 변화는 5 μ g/mL에서 48시간동안 테트라사이클린 화합물에 대한 노출후, 웨스턴 분석에 의해 측정된 세포내 iNOS 함량에 있어서의 변화에 의해 필적한다. 그러나, CMT-5는 NO 생산 또는 iNOS 발현에 있어서 분리가능한 효과를 지니지 않는다.

신장 손상을 유발하기 위한 IFN- γ 의 사용은 당해 분야에 공지된 사구체신염의 모델이다. 사구체신염은 NO의 증가된 생산을 특징으로 한다. 따라서, 당해 분야의 숙련가는 NO 생산의 억제에 대한 방법들을 입증하기 위한 이러한 모델의 능력을 인지할 것이다. 상기 나타낸 결과는 특정의 화학적으로 개질된 테트라사이클린 화합물, 즉 항-콜라겐분해 활성을 갖는 화합물이 신장 맥관막 세포에서 NO 생산을 억제할 수 있음을 나타낸다. 더욱 특이적으로, 이들 화합물은 이들 세포에서 iNOS 단백질 합성을 억제하는데 효과적이다. 따라서, 최소 농도에서, 이들 제제는 NO-의존적인 사구체 염증을 치료하는데 유용할 것이다. 그러나, 더욱 일반적으로, 사구체신염 모델에 있어서 이들 화합물의 용도는 비정상적인 NO 생산을 특징으로 하는 다른 생물학적 시스템 및 다른 병리학적 상태에서 이들 화합물에 대한 NO 생산 억제 활성을 암시한다.

실시예 2 내지 실시예 6

본 발명자들은 리포풀리사카라이드-자극된 뮤린 대식세포에서의 iNOS 활성 및 생체외 상태에서 골관절염 영향을 받은 사람 연골로부터의 일산화질소의 자발적인 방출에 있어 테트라사이클린 화합물의 작용을 평가하였다. 이들 동형 효소 모두는 실험관내 하이드로코르티손 및 TGF- β 에 의한 약리학적 방해에 대해 뚜렷한 민감성을 나타낸다(참조: Amin et al. 1995a). 하기 실시예 2 내지 실시예 6에서 기술된 바와 같이, 본 발명에 이르러, 본 발명자는 (a) 독시사이클린 및 미노사이클린 모두가 iNOS의 활성을 억제하고(미노사이클린 \geq 독시사이클린) 유도성 OA-NOS의 활성을 억제하며(독시사이클린 $>$ 미노사이클린); (b) 독시사이클린 및 미노사이클린이 iNOS mRNA에서의 iNOS 발현 및 단백질 발현을 억제함으로써 이의 특이적 활성을 하향 조절하며; (c) 아세틸화제 또는 iNOS의 경쟁적 억제제(즉, L-아르기닌의 동족체)와는 달리, 독시사이클린 및 미노사이클린이 L-아르기닌에서 L-시트룰린으로의 전환 검정에서 실험관내 iNOS의 촉매적 활성을 직접 억제하지 않음을 발견하였다.

실시예 2

사람 OA 영향받은 연골내 유도성 OA-NOS 발현시 테트라사이클린의 효과

본 발명자들은 테트라사이클린, 즉 독시사이클린 또는 미노사이클린이 생체외 상태에서 사람 OA-NOS 활성을 차단할 수 있는지의 여부를 시험한다. 일반적으로 허용되는 약리학적으로 관련된 농도를 앞서의 보고(참조: Greenwald 1994, Yu et al. 1991, Cole et al. 1994, Mallya et al. 1994)를 기준으로하여 본 연구를 위해 선택한다. OA 영향받은 연골을 무릎 교환 수술을 하고 수술전 2주 이상동안 스테로이드/비스테로이드 소염 약물을 투여받지 않아 진전된 OA를 갖는 환자로 부터 입수한다. OA 영향받은 연골 조각(도 1A 내지 도 1C)을 생체외 조건하에 24, 48 및 72시간동안 독시사이클린 또는 미노사이클린 5 내지 80 μ g/mL가 보충된 0.1% BSA/내독소가 없는 배지(참조: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)에서 배양한다.

기관 배양에서 OA-iNOS의 검정을 앞서 기술한 바와 같이 기본적으로 수행한다(참조: Amin et al. 1995a). 요약하면, OA 영향받은 연골을 인큐베이터(37°C)내에서 24 내지 72시간 동안 5 내지 80 μ g/mL의 독시사이클린 및 미노사이클린의 존재 또는 부재(대조군)하에 배양한다. NOS의 활성을 ELISA 판독기를 사용하는 변형된 그리스 반응(참조: Gilliam et al. 1993)에 의해 배지내에서 적합한 최종 생성물 및 니트라이트의 양을 평가함으로써 상이한 시간 간격으로 모니터한다. 0, 24, 48 및 72시간째에 자발적으로 방출된 NO의 양(니트라이트 측정에 의해 측정한 것으로서)은 각각 0, 4.8 \pm 0.38, 16.4 \pm 0.7 및 17.8 \pm 0.9 μ M이다. 데이터는 방출된 니트라이트의 μ M ± 표준편차(SD)로 나타내며, 3 내지 4회 수행한 결과이다. 통계는 쌍을 이루지 않은 스튜던트 시험을 사용하여 유도한다. 도 1A 내지 도 1C는 일련의 시간에 따른 그래프(1A = 24시간; 1B = 48시간 및 1C = 72시간)를 나타내며, 이는 상이한 환자로부터의 샘플을 사용한 1 내지 3회의 동일한 실험을 나타내는 데이터를 요약한 것이다.

도 1A 내지 도 1C의 결과는 독시사이클린 및 미노사이클린 각각이 용량-의존적 방식으로 OA 영향받은 연골에서의 NO 생산을 현저히 억제함을 나타낸다. 이들 결과는 또한 독시사이클린이 OA-NOS 활성을 억제하는 자체 능력에 있어 더욱 강력함을 나타낸다. 예를 들어, 72시간째에, 독시사이클린에 대한 IC₅₀은 미노사이클린에 대한 54 μ g/mL와 비교하여 32 μ g/mL이다. 이들 실험은 추가로 독시사이클린 및 미노사이클린이 생체외 OA-NOS에 의한 NO의 직면한 생산을 차단할 뿐 아니라, 니트라이트가 대조군 배양물중에 지속적으로 축적되는 조건하에서 72시간 이상동안 연골 기관 배양물내 니트라이트 축적을 감소시킴을 나타낸다. 본 연구에서 NO 생산을 억제한 독시사이클린의 농도는 매트릭스 메탈로프로테이나제의 억제에 요구되는 것과 비교가능하다(참조: Greenwald 1994, Yu et al. 1991, Cole et al. 1994, Mallya et al. 1994). 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제는 연골 분해에 있어 현저한 효과를 지닌다(참조: Cole et al. 1994, Mitchell et al.

1994). 콜라게나제 및 젤라티나제와 같은 단백질분해 효소의 활성을 억제함으로써 연골 분해를 방해하는 20 내지 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 독시사이클린의 효과는 또한 결국 프로테오글리칸 상실을 차단하고 프로테오글리칸 상실과 관련된 세포 사멸을 감소 시킨다(참조: Cole et al. 1994).

실시예 3

뮤린 대식세포에 있어서 iNOS에 대한 테트라사이클린의 효과

본 발명자들의 최근 연구는 사람 유도성 OA-NOS가 크기, 면역반응성, 및 TGF- β 및 하이드로코르티손(참조: Amin et al. 1995a)에 대한 민감성을 기준으로 하여, 뮤린 및 사람 iNOS로부터 명백함을 타나낸다. 따라서, 본 발명자들은 또한 자극된 뮤린 거대세포에서 iNOS에 의한 NO의 생산에 있어 테트라사이클린의 효과를 평가하였다.

RAW 264.7 뮤린 대식세포 세포(참조: American Type Culture Collection, Rockville, MD)를 1 내지 2시간동안 독시사이클린 또는 미노사이클린(5 내지 $80\mu\text{g}/\text{mL}$)의 존재 및 부재하에 배양한 후 LPS(참조: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)의 첨가를 통한 활성화에 의해 iNOS를 유도시킨다(참조: Stuehr et al. 1991). 항온처리한지 14 내지 20시간 후, 베지를 사용하여 변형된 그리스 반응에 의한 니트라이트 축적을 평가한다(참조: Gilliam et al. 1993). 데이타는 도 2A 내지 도 2B에 나타낸다. 이 값은 주어진 시간 간격에서 축적된 니트라이트의 μM 로 나타낸다($n=3$). 통계는 쌍을 이루지 않은 스튜던트 시험을 사용하여 유도한다. 데이타는 3회의 유사한 실험중 하나를 나타낸다.

도 2A 내지 도 2B는 배양한지 14시간(도 2A) 및 20시간(도 2B)째에 독시사이클린 5 내지 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 존재하에 LPS로 자극시킨 세포내에서 니트라이트 축적의 농도-의존적인 억제를 나타낸다. 본 실험에서 독시사이클린의 IC_{50} 은 이들 세포내 14시간 배양시 $72\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 20시간 배양시 $22\mu\text{g}/\text{mL}$ 이다. 동일한 세트의 실험에서, 미노사이클린은 또한 5 내지 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위의 농도로 투여된다. 미노사이클린에 대한 IC_{50} 은 LPS로 자극시킨 RAW 264.7 세포에서 14시간 배양시 $17\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 20시간 배양시 $12\mu\text{g}/\text{mL}$ 이다. 비록 독시사이클린 및 미노사이클린의 효능에 있어 현저한 차이가 20시간의 배양시 관측되지 않는다 해도(IC_{50} 기준), 미노사이클린과 비교하여 독시사이클린의 현저히 높은 농도가 이들 2개 시간 간격에서 iNOS 중재된 NO 생산을 >50% 억제하는데 요구된다.

상기 실시예 2 및 실시예 3은 독시사이클린 및 미노사이클린 모두가 OA 영향받은 관절 연골 및 LPS로 자극된 뮤린 대식세포 모두에서 NO 생산을 억제함을 나타낸다. 또한, 이들 실험은 iNOS 및 유도성 OA-NOS가 TGF- β 및 하이드로코르티손에 대한 이들 효소의 공지된 민감성외에, 독시사이클린 및 미노사이클린에 대한 명백한 민감성을 가짐을 나타낸다(참조: Amin et al. 1995a). 이러한 측면에서, 2개의 상이한 세포 유형(즉, 호중구 및 섬유아세포)에서 2개의 상이한 형태인 콜라게나제, MMP-8($\text{IC}_{50} 7\text{--}15\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 MMP-1($\text{IC}_{50} 140\mu\text{g}/\text{mL}$)이 테트라사이클린에 대해 뚜렷한 민감성을 나타낸다는 것은 주목해야 할 만큼 흥미로운 것이다(참조: Suomalainen et al. 1992). 더우기, 2개의 밀접하게 관련된 세포주에서 발현된 동일한 효소는 테트라사이클린에 대해 상이한 민감성을 가질수 있다는 것을 주목하여야 한다. 예를 들어, 2개의 조골세포주, 즉 UMR 106-01($\text{IC}_{50} >200\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 ROS 17/2.8($\text{IC}_{50} = 20\text{--}30\mu\text{g}/\text{mL}$)에서, 젤라티나제 활성에 대한 평가시 독시사이클린에 대한 상이한 민감성이 밝혀졌다(참조: Vernillo et al. 1993). 연골 조각 및 대식구 세포내 NOS 활성에 있어 테트라사이클린의 차등적인 IC_{50} 에 기여할 수 있는 다른 인자는 연골을 침투하여 연골세포에서 작용하는 이들 약물의 특성에 기인할 수 있다(참조: Gilman et al. 1993).

실시예 4 내지 실시예 6

상기 실시예 2 및 실시예 3을 기본으로 하여, 본 발명자들은 뮤린 대식구 모델에서 NOS 발현에 대한 테트라사이클린의 작용 메카니즘을 밝히기로 결정하였다. 이러한 모델은 (a) iNOS의 생화학, 효소학 및 분자 생물학이 이들 세포에서 잘 특성화되어 있고(참조: Nathan et al. 1994, Stuehr et al. 1991, Salvermini et al. 1993, Xie et al. 1994); (b) 독시사이클린 및 미노사이클린에 대한 iNOS의 차등적인 민감성이 밝혀졌다(참조: Vernillo et al. 1993). 연골 조각 및 대식구 세포내 NOS 활성에 있어 테트라사이클린의 차등적인 IC_{50} 에 기여할 수 있는 다른 인자는 연골을 침투하여 연골세포에서 작용하는 이들 약물의 특성에 기인할 수 있다(참조: Gilman et al. 1993).

RAW 264.7 유도된 세포를 사용하여, 본 발명자들은 다음의 가설을 실험하였다. 테트라사이클린은 (i) iNOS 단백질의 발현에 영향을 미치지 않으면서 iNOS의 촉매 활성만을 감소시킬 수 있거나; (ii) iNOS의 촉매 활성 및 iNOS 단백질의 발현 모두를 감소시킴으로써 궁극적으로 매질내 니트라이트의 축적을 감소시킬 수 있거나; 또는 (iii) iNOS 단백질의 발현을 감소시킴으로써, 효소의 특이적 활성 및 연속적인 니트라이트의 생산을 감소시킬 수 있다.

이들 다른 가설들을 시험하기 위하여, 본 발명자들은 (i) 세포 유리된 추출물중 iNOS의 촉매 활성, (ii) 효소의 특이적 활성, (iii) 단백질 수준으로의 iNOS의 합성 및 (iv) iNOS mRNA의 축적에 있어서 독시사이클린 및 미노사이클린의 작용을 실험하였다. 이들 실험을 하기 실시예 4 내지 실시예 6에 기술한다.

실시예 4A

iNOS의 촉매 활성에 있어서 테트라사이클린의 효과

뮤린 대식구 세포(RAW 264.7)을 20 내지 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 독시사이클린 또는 미노사이클린, $10\mu\text{M}$ 하이드로코르티손(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 제조원) 또는 $75\mu\text{M}$ L-NMMA 와 함께 1 내지 2시간동안 배양하고 이어서, LPS를 $100\text{ng}/\text{mL}$ 에서 첨가하고 16 내지 18시간동안 배양한다. 세포 유리된 추출물을 각각의 경과시간 말기에 제조한다. iNOS에 대한 특이 활성을 아민(Amin)등(1995b) 및 바이아스(Vyas) 등(1996)이 기술한 바와 같이 L-[^3H]-아르기닌에서 L-[^3H]-시트룰린으로의 전환을 모니터함에 의해 세포 유리된 추출물중에서 측정한다.

세포 유리된 추출물을 다음과 같이 제조한다: LPS와 함께 배양함으로써 유도한 후, 세포를 4°C 에서 펠렛화하고 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 키모스타틴, 안티파인, 류펩틴 및 웨스타틴 각각을 함유하는 트리스 완충액(10mM , pH 7.4)중에 재현탁시킨다. 세포를 신속한 동결-해동의 3회 주기후 풀리트론 PT 1200 균질화기(Kinematica AG, Switzerland 제조원)내에서 분해한다. 분해물을 4°C 에서 60분동안 16,000rpm에서 원심분리하고 혼탁액을 세포 유리된 추출물로서 사용한다.

추출물중의 단백질을 표준물로서 BSA를 사용하는 BCA 검정 시약으로 측정한다(참조: Smith et al. 1985). iNOS 검정용 반응 혼합물은 트리스 50mM (pH 7.8); BSA $1\text{mg}/\text{mL}$; DTT 1mM ; CaCl_2 2mM ; FAD $10\mu\text{M}$; BH₄ $10\mu\text{M}$; L-아르기닌 $30\mu\text{M}$ 및 NADPH 1mM 로 이루어진다. 이 반응 혼합물은 L-[^3H]-아르기닌 $1\mu\text{L}(250\text{nM})$ 와 함께 스파이크한다(참조: Dupont NEN, Boston, MA)($1\text{mCi}/\text{mL} = 37.0 \text{ MBq}/\text{mL}$). 20분 후, 반응 혼합물을 90°C 에서 5분동안 가열하여 검정을 종결시킨다. $10\mu\text{L}$ (약 100,000cpm)의 상층액을 활성화된 AVICEL TLC 플레이트(Analtech, Newark, DE 제조원)상에 스트리밍한다. TLC 플레이트를 에탄올:물:암모니아(80:16:4)로 이루어진 용매 시스템중에서 전개시킨다. L-[^3H]-시트룰린에 대한 스폟의 적량은 바이오스캔 시스템 200 이미징 스캐너(Bioscan System 200 Imaging Scanner)로 수행한다.

도 3은 pmol 시트룰린/분/mg 단백질로서 나타낸, 각종 실험 조건하에서의 iNOS 효소의 특이 활성을 나타낸다. 억제%는 중재자의 부재하에 LPS 자극된 세포에 대한 비교를 나타낸다. 이 데이터는 3개의 유사한 실험중 하나를 나타낸다. 도 3에 나타낸 것으로서, 독시사이클린 또는 미노사이클린에 대한 뮤린 대식구의 노출은 대조군의 LPS 자극된 활성과 비교시 용량 의존적 방식으로 세포 분해물중에서 iNOS의 촉매 활성을 억제한다. 20 , 40 및 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서의 독시사이클린은 iNOS 활성을 각각 57%, 72% 및 85%로 현저히 차단하며, 동일한 농도에서의 미노사이클린은 또한 iNOS 활성을 각각 45%, 69% 및 69%로 차단한다. 예상된 바와 같이, 양성 대조군인 $10\mu\text{M}$ 하이드로코르티손 및 $75\mu\text{M}$ L-NMMA는 iNOS 활성을 각각 60% 및 64% 차단한다. 세포 분해물중에서 iNOS 활성을 차단하는 독시사이클린 및 미노사이클린에 대한 IC₅₀은 약 20 내지 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ 이다.

실시예 4B

실험관내에서 iNOS의 특이 활성에 대한 테트라사이클린의 효과

최근 연구는 독시사이클린이 효소에서의 직접적인 작용을 통해 콜라게나제 활성을 억제함을 나타낸다(참조: Yu et al. 1991, Smith et al. 1994). 제안된 메카니즘중 하나는 프로콜라게나제가 독시사이클린의 존재하에서 활성시 단편의 불활성화를 감소시킨다는 것이다. 본 발명자들은 최근에 아스파린 및 N-아세틸 이미다졸과 같은 아세틸화제(참조: Amin et al. 1995b) 및 L-아르기닌과 같은 경쟁적 억제제(참조: Schmidt et al. 1994, Nathan et al. 1994, Marletta 1994)가 실험관내에서 iNOS 촉매 활성을 억제함을 밝혔다. iNOS 활성에 있어서 독시사이클린 및 미노사이클린의 직접적인 효과를 평가하기 위하여, 본 발명자들은 RAW 264.7 세포를 이들 제제의 부재하에 16시간동안 LPS로 유도시키고 L-아르기닌에서 L-시트룰린으로의 전환 검정에서 iNOS 효소 공급원으로서 세포 유리된 추출물을 제조하였다.

효소 함유 세포 유리된 추출물의 별개 분취량은 독시사이클린 20 내지 $80\mu\text{g}/\text{mL}$, 미노사이클린 20 내지 $80\mu\text{g}/\text{mL}$, 1mM N-아세틸 이미다졸 및 $200\mu\text{M}$ L-NMMA 각각을 사용하여 공동 인자를 가함으로써 효소 반응을 개시하기 전 15분동안 예비 배양한다. 메탄올(MeOH), NAI(N-아세틸 이미다졸)용 담체를 포함하는 각종 중재제를 기술한 바와 같이 iNOS 반응을

개시하기 위해 공동-인자를 첨가하기 15분 전에 가한다. 특이 활성을 평가하고 억제%를 원 LPS-자극된 추출물과 비교하며, 100% 특이 활성은 200pmol 시트룰린/분/mg 단백질이다. 도 4에 나타낸 데이터는 2개의 유사한 실험중 하나를 나타낸다.

도 4는 N-아세틸 이미다졸 또는 L-NMMA와는 달리, 독시사이클린 및 미노사이클린이 세포 유리된 추출물중에서 iNOS의 특이 활성에 대한 현저한 효과를 지니지 않음을 나타낸다. 미노사이클린 및 독시사이클린은 세포 유리된 추출물중에서 iNOA에 의해 촉매된 진행하는 L-아르기닌에서 L-시트룰린으로의 반응을 차단할 수 없다. 이들 실험은 iNOS에 대한 이들 약물의 작용이 프로콜라게나제와 같은 메탈로프로테이나제에 대해 보고된 것과 구별됨을 나타낸다(참조; Yu et al. 1991, Smith et al. 1994).

실시예 5

iNOS 단백질 발현에 있어서 테트라사이클린의 효과

테트라사이클린이 iNOS의 활성에 직접적으로 영향을 미치지 않음을 나타내는, 상기 데이터를 기준으로 하여, 본 발명자들은 iNOS 단백질 발현을 실험하였다. RAW 264.7 세포를 독시사이클린 또는 미노사이클린(20 내지 80 μ g/mL)의 존재 또는 부재하에, 또는 하이드로코르티손(10 μ M)의 존재하에 16 내지 18시간동안 LPS 100ng/mL로 활성화시킨다. 세포 유리된 추출물을 상술한 바와 같이 제조한다. 추출물을 특이적인 항-iNOS 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 133kD iNOS에 대해 분석한다.

BCA 시약(참조; Pierce, Rockford, IL)으로 평가된 동량의 단백질(25 내지 50 μ g)을 SDS-PAGE 겔에 부하하고 염색하여 겔상의 단백질 밴드의 강도를 실험함으로써 각종 단백질 분획의 농도를 입증한다. 웨스턴 블롯 분석을 동일한 세포 추출물로부터 수행한다. 웨스턴-블로팅된 막을 공급자에 의해 규정된 바와 같이 특이적인 항-iNOS 모노클로날 항체(참조; Transduction Laboratories, Lexington, KY)를 사용하여 프로브화한다. 동일한 블롯을 레자드 제임스 엘(James L. Lessard: Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH) 박사에 의해 일반적으로 제공되는 항-액틴 항체를 사용하여 브로브화한다. 이 블롯을 ECL 웨스턴 블롯 시스템을 사용하여 전개한다(참조; Amersham, Arlington Heights, IL). 밴드의 적량은 몰레큘러 다이나믹(Molecular Dynamics: Sunnyville, CA)으로부터의 밀도계를 사용하여 수행한다. 도 5가 대표적이다.

도 5는 독시사이클린(20 μ g/mL에서 11%, 40 μ g/mL에서 24% 및 80 μ g/mL에서 65%) 및 미노사이클린(20 μ g/mL에서 14%, 40 μ g/mL에서 49% 및 80 μ g/mL에서 83%)의 존재하에 iNOS 단백질 발현의 용량-의존적 억제를 나타낸다. 비교시, 양성 대조군인 하이드로코르티손은 43% 억제를 제공한다(이 데이터는 4개의 유사한 실험중 하나를 나타낸다). 20 내지 80 μ g/mL에서 독시사이클린 또는 미노사이클린으로 처리한 동일한 샘플내 β -액틴 합성 수준에 있어 현저한 차이는 없으므로(데이터는 나타내지 않음), 이는 iNOS에 대한 독시사이클린 및 미노사이클린의 효과가 특이적임을 나타낸다.

테트라사이클린 유도체 각각에 대한 니트라이트 축적 및 단백질 발현의 억제를 위한 IC₅₀은 NOS 활성의 억제에 대해 측정한 단백질 발현의 억제에 대한 가설과 유사하게 일치한다. 더우기, 두 약물은 iNOS 단백질 발현을 억제하지만 세포 유리된 추출물중에서 L-아르기닌에서 L-시트룰린으로의 전환을 차단하지 않으므로, 본 발명자들은 근본적으로 iNOS 단백질 발현의 억제에 기인하는 iNOS의 촉매 활성에 있어서의 감소가 독시사이클린 및 미노사이클린으로 처리한 세포내 니트라이트의 감소된 축적에 관여한다고 결론지었다.

실시예 6A

iNOS mRNA의 발현에 있어서 테트라사이클린의 효과

독시사이클린 및 미노사이클린은 iNOS 단백질 발현의 억제, 특이 활성 및 니트라이트의 축적을 가져오는 효소의 합성 이전에 iNOS를 억제할 수 있다. 이러한 가설은 대식구에서, TGF- β 1, 사이클로스포린, 하이드로코르티손, NF- κ B 억제제 및 어느 정도의 Fe⁺⁺가 mRNA 발현을 감소시키고 연속하여 iNOS 단백질의 전사율을 감소시킴에 의해 iNOS 발현을 억제한다는 관측을 기본으로 한다(참조; Nathan et al. 1994, Vodovotz et al. 1993). 또한, 프레일쉬프터(참조; Pfeilschifter et al. 1995) 등에 의한 최근 연구는 엑사메타손이 다중 수준에서 작용하여(iNOS의 전사 포함) 맥관막 세포내 IL-1 β -유도된 iNOS 발현을 억제함을 나타낸다. 따라서, 테트라사이클린이 iNOS 단백질 발현을 억제하는 농도를 측정하기 위하여, 독시사이클린 및 미노사이클린의 존재 또는 부재하에 LPS로 처리한 RAW 264.7 세포를 반-적량적 RT-PCR에 의해 iNOS mRNA에 대해 분석한다.

세포내 iNOS 및 β -액틴 mRNA의 존재는 총 RNA의 역전사(RT)에 이은 cDNA의 PCR 증폭으로 분석한다. iNOS에 대한 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 각각 5'-ACG GAC AAG CTT AGA TCT GGA GCA GAA GTG-3'(142번 내지 171번)(서열 1) 및 5'-CTG CAG GTT GGA CCA CTG GAT CCT GCC GAT-3'(767번 내지 796번)(서열 2)이다. β -액틴에 대한 센스 및 안티센스 프라이머는 각각 5'-TCC TTC GTT GCC GGT CCA CA-3'(44번 내지 63번)(서열 3) 및 5'-CGT CTC CGG AGT CCA TCA CA-3'(534번 내지 552번)(서열 4)이다. iNOS cDNA의 예측된 PCR 생성물은 654bp이며, β -액틴 cDNA에 대한 것은 508bp이다. 폴리머라제 쇄 반응은 DNA 열 주기(참조: Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)로 수행한다. 전체 RNA를 TRI-시약(MRC Inc., Cincinnati, OH 제조원)을 사용하여 추출한다. cDNA를 SuperScriptTM RNase H 트랜스크립타제(Gibco BRL, Gaithersburg, MD 제조원)을 사용하여 동량(1 내지 5 μ g)의 전체 RNA로부터 제조한다. 동량의 cDNA를 사용하여 PCR에 의해 mRNA를 증폭시킨다. PCR 증폭은 1.5mM MgCl₂, 500ng iNOS 프라이머, 100ng의 β -액틴 프라이머, 0.2mM의 각각의 dNTP, 2.5 단위의 Taq DNA 폴리머라제(Gibco 제조원)를 함유하는 50 μ L 용액중에서 수행한다. cDNA를 증폭시키기 위한 주기 조건은 iNOS 및 β -액틴 모두에 대해 94°C에서 1분, 55°C에서 1 내지 2분 및 72°C에서 3분으로 30 주기이다. PCR 생성물을 1.0% 아가로즈 겔상에서 전기영동에 의해 분석한다.

RAW 264.7 세포내 iNOS 및 β -액틴 mRNA 발현의 RT-PCT 분석은 LPS ± 독시사이클린 또는 미노사이클린을 사용한 자극후 수행한다. RAW 세포를 독시사이클린/미노사이클린 또는 10 μ M 하이드로코르티손의 존재 또는 부재하에 LPS로 자극시킨다. 동량의 RNA를 상술한 바와 같이 iNOS 및 β -액틴 발현에 대해 분석한다.

도 6A 및 도 6B는 독시사이클린 및 미노사이클린이 iNOS 단백질 발현을 또한 억제하는 20 내지 40 μ g/mL의 농도에서 용량-의존적 방식으로 iNOS mRNA 발현을 현저히 억제(>50%)시킴을 나타낸다. 예상되는 바와 같이, 하이드로코르티손-처리된 세포는 LPS-자극된 세포와 비교하여 감소된 iNOS mRNA(50 내지 100%)를 나타낸다. "RT-대조군"은 RAW 264.7 세포로부터의 주형으로서 LPS-자극된 RNA를 사용한 리버스 트랜스크립타제의 부재하에서의 RT-PCR 반응물의 제조를 나타낸다. RT-대조군 샘플은 mRNA를 전혀 생산하지 않는다. 이 데이터는 2개의 유사한 별개의 실험중 하나를 나타낸다. iNOS PCR 시그날은 도 6A 및 도 6B에서 나타낸 바와 같이 β -액틴으로 정상화된다.

실시예 6B

iNOS mRNA의 발현에 있어 테트라사이클린의 효과

실시예 6A에 기술된 바와 동일한 별개의 iNOS mRNA 분리 공정에서, RAW 세포를 독시사이클린 및 미노사이클린, 및 10 μ M 하이드로코르티손의 존재 및 부재하에 LPS로 자극시킨다. 이 세포에 의해 발현된 iNOS mRNA의 노던 블롯 분석을 수행하여 독시사이클린 및 미노사이클린의 존재하에서 iNOS 발현의 효과를 상세히 평가한다. 프로브는 상술한 바와 같은 iNOS 및 β -액틴 cDNA 프로브이다.

이 경우에, 전체 RNA를 TRI 시약(MRC Inc., Cincinnati, OH)을 사용하여 분리한다. 노던 블롯 분석을 문헌[참조: Church and Gilbert (1984)]에 기술된 바와 같이 수행한다. 요약하면, 30 μ g의 RNA를 1% 아가로즈 포름알데하이드 겔중 전기영동에 적용시킨다. 다음 겔을 모세 작용을 통해 나일론 막(참조: Zeta Probe, Bio-Rad Laboratories, Melville, NY)상에 이전시킨다. 이 막을 커닝함 제임스(James Cunningham) 박사(Harvard Medical School, Boston, MA)로부터의 일종의 선물인 [³²P]-dCTP 표지된 iNOS cDNA(4kb SmaI 단편)으로 하이브리드화한다. 하이브리드화한 후, 이 블롯을 코닥 X-선 필름(Kodak, Rochester, NY)에 -70°C에서 강화 스크린을 사용하여 24 내지 48시간 동안 노출시킨다. β -액틴 프로브는 클론테크(ClonTech; Palo Alto, CA)에서 입수하며 상술한 바와 같이 프로브화한다. iNOS/ β -액틴의 강도의 적량은 형광 영상을 사용하여 수행한다(참조: Molecular Dynamics, Sunnyville, CA).

도 6C 및 도 6D는 독시사이클린(도 6C) 및 미노사이클린(도 6D)의 존재 및 부재하에서 mRNA 발현을 나타내는 노던 블롯을 나타낸다. iNOS mRNA 발현의 용량-의존적 억제는 모든 경우에서 입증되었다. iNOS 발현의 억제%는 β -액틴 시그날에 의해 정상화시킨다. 독시사이클린에 대해, mRNA 발현의 억제는 20 μ g/mL에서 68%, 40 μ g/mL에서 75% 및 80 μ g/mL에서 79%인 반면, 하이드로코르티손은 발현을 73% 억제한다. 미노사이클린의 경우, mRNA 발현의 억제는 20 μ g/mL에서 39%, 40 μ g/mL에서 49% 및 80 μ g/mL에서 77%인 반면, 하이드로코르티손은 발현을 76% 억제한다. 도 6C 내지 도 6D에 나타낸 데이터는 2회의 유사한 실험 중 하나를 나타낸다.

함께, 실시예 6A 및 6B는 독시사이클린 및 미노사이클린 20 내지 40 μ g/mL이 iNOS mRNA 발현을 현저히 차단함을 나타낸다. 이들 실험은 독시사이클린 및 미노사이클린의 iNOS 상에서의 작용이 또한 iNOS mRNA 발현 수준이며 이는 모든

세포 추출물중에서 감소된 NOS 단백질 및 효소의 특이 활성에 기여함을 나타낸다. 심지어 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 테트라사이클린도 mRNA 수준에서 iNOS 발현을 완전히 억제할 수 없으므로, 이들 약물의 존재시 일부 NO 생산에 대한 문제점이 남는다. 실험중 본 단계에서, 본 발명자들은 테트라사이클린이 iNOS 전사를 억제하는지 또는 iNOS mRNA가 분해에 대해 더욱 민감하도록 하는지, 또는 이들 모두에 대해 알지 못한다. 각종 효소 및 세포 작용에 있어 독시사이클린 및 미노사이클린의 효과의 광범위한 스펙트럼에 기인하여, 일반적인 표적(예: NF- κ B)을 유추할 수는 없다. iNOS 발현(mRNA, 특이 활성 및 니트라이트 축적)에 있어 독시사이클린/미노사이클린의 억제 효과는 40 내지 $80\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 최상에 이르며, 이 이상에서 NOS 활성의 추가의 억제는 달성되지 않음에 주목한다. 따라서, 이들 화합물은 NOS 활성을 >95% 억제할 수 있는 효소의 경쟁적 억제제(예: L-NMMA)와는 상이하다. 그러나, 약리학적 농도에서 테트라사이클린은 본 발명자의 연구에서 NOS 활성의 >50% 억제를 달성한다. 이는 생체내에서 NOS 억제의 심지어 중간정도의 효과(10 내지 50%)도 관절염의 동물 모델에서 관측되는 바와 같이(참조: Stetanovic-Racic et al. 1994), 염증 현상(예: 발 팽윤)에 있어 밝혀진 약독화 효과를 가질수 있으므로 중요하다.

다른 발명자들에 의한 이전의 발견과 함께 본 발명자들의 데이터는 테트라사이클린이 자체의 항미생물 활성에 의존적인 다수의 작용을 발휘함을 나타낸다. 본 발명에 이르러 이들 작용들은 NOS 발현 및 NO 생산의 억제외에 MMP의 억제, 종양 진행의 억제, 골 재흡수의 억제(참조: DeClerck et al. 1994, Rifkin et al. 1994), 맥관형성의 억제(참조: Maragoudakis et al. 1994) 및 염증의 억제(참조: Ramamurthy et al. 1994)와 같은 이미 공지된 작용을 포함한다. 본 발명자들은 테트라사이클린의 몇가지 특성(참조: Greenwald et al. 1994)이 다른 다수작용성 시그널 분자, 즉 상기 나열한 많은 병리학적 상태 및 전염병에 있어서의 유사한 효과를 발휘하는 것으로 알려진(참조: Vane et al. 1994, Schmidt et al. 1994, Murrell et al. 1995, Farias-Eisner et al. 1994, Kasten et al. 1994, Pipili-Synitos et al. 1993, Pipili-Synitos et al. 1994), NO를 표적화하는 새로이 발견된 이들의 능력이 부분적으로 기인할 수 있다고 결론지었다. 본 발명자들의 연구는 또한 테트라사이클린이 유사한 IC₅₀에서 MMP에 대한 이중 효과, 즉 (a) 효소 농도에서 MMP의 특이 활성의 억제(참조: Yu et al. 1991, Smith et al. 1994) 및 (b) MMP 활성을 상향 조절하는 것으로 보고된 NO 생산의 억제(참조: Murrell et al. 1995)를 발휘함을 나타낸다. 또한, NO는 연골에 있어서 IL-1의 몇몇 대사 활성(참조: Taskiran et al. 1994, Cao et al. 1996, Murrell et al. 1995)을 중재하는 것으로 공지되어 있기 때문에, 테트라사이클린에 의한 NOS 활성의 억제는 관절내 연골 분해에 있어서의 추가의 보호 효과를 발휘할 수 있다.

본 발명자의 연구는 테트라사이클린이 메탈로프로테이나제에 대해 보고된 바와 같이 효소 수준에서의 직접적인 억제 뿐만 아니라, NOS mRNA 발현의 억제를 통해 iNOS 활성을 억제함으로써, 단백질 발현 및 NOS 활성에 있어서의 감소를 초래함을 나타낸다. 본 화합물의 테트라사이클린 그룹의 독특한 특성은 이들이 각종 병리학적 상태에 대한 NO의 안전하고 허용 가능한 중재자로서의 후보물질이 되도록 한다.

따라서, 본 발명의 바람직한 양태로 현재 여겨지는 것들이 본원에 기술되어 있다 하더라도, 당해 분야의 숙련가들은 본 발명의 취지를 벗어남이 없이 다른 및 기타 양태를 수행할 수 있음을 인지할 것이며, 이러한 추가의 변형 및 변화 모두는 본원에 설정된 청구의 범위의 진정한 영역에 포함되는 것으로 의도된다.

인용문헌

- Amin, A.R., Di Cesare, P., Vyas, P., Attur, M., Tzeng, E., Billiar, T.R., Stuchin, S.A. & Abramson, S.B. (1995a) *J. Exp. Med.* 182, 2097-2102.
- Amin, A.R., Vyas, P., Attur, M., Leszczynska-Piziak, J., Patel, I.R., Weissman, G. & Abramson, S.B. (1995b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7926-2930.
- Brinckerhoff, C.E. (1991) *Arthritis Rheum.* 34, 1073-1075.
- Cao, M., Westerhausen-Larson, A., Niyibizi, C., Kavalkovich, K., Georgescu, H.I., Rizzo, C.F., Stefanovic-Racic, M. & Evans, C.H. (1996) *42nd Ann. Mtg. Orthoped. Res. Soc.*, p. 533.
- Chandrasoma & Taylor (1991) *Concise Pathology*, 1st ed., Appleton & Lange, pp. 34-44.
- Church, G.M. & Gilbert, W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991-1995.
- Cole, A.A., Chubinskaya, S., Chlebek, K., Orth, M.W., Luchene, L.L. & Schmid, T.M. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 414-415.
- Collier et al. (1989) *Trends in Pharmacol. Sci.* 10, 427-431.
- Cotran, Kumar & Robbins (1989) *Robbins Pathologic Basis of Diseases*, 4th ed., W. B. Saunders Company, pp. 40-41.
- DeClerck, Y.A., Shimada, H., Taylor, S.M. & Langley, K.E. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 222-232.
- Farias-Eisner, R., Sherman, M.P., Aeberhard, E. & Chaudhuri, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9407-0411.
- Gilliam, M.B., Sherman, M.P., Griscavage, J.M. & Ignarro, L.J. (1993) *Anal. Biochem.* 212 (2), 359-365.
- Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S. & Taylor, P., eds. (1993) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed. (McGraw-Hill, New York).
- Golub, L.M., Ramamurthy, N.S. & McNamara, T.F. (1991) *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2, 297-322.
- Golub, L.M., Sorsa, T. & Suomalainen, K. (1992) *Curr. Opin. Dent.* 2, 80-90.
- Greenwald, R.A. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 181-198.
- Greenwald, R.A. & Golub, L.M., eds. (1994) *Inhibition of Matrix Metalloproteinases: Therapeutic Potential*. *Annals N.Y. Acad. Sci.* Vol. 732, 1-507.
- Kasten, T.P., Colin-Osdoby, P., Patel, N., Osdoby, P., Kruckowski, M., Misko, T.P., Settle, S.L., Currie, M.G. & Nickols, G.A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3569-3573.
- Mallya, S.K., Hall, J.E., Lee, H.M., Roemer, E.J., Simon, S.R. & Golub, L.M. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 303-314.
- Maragoudakis, M.E., Peristeris, P., Missirlis, E., Aletras, A., Andriopoulou, P. & Haralabopoulos, G. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 280-293.
- Marietta, M.A. (1994) *Cell* 78, 927-930.
- McCartney-Francis, N., Allen, J.B., Mizel, D.E., Albina, J.E., Xie, Q.W., Nathan, C.F. & Wahl, S.M. (1993) *J. Exp. Med.* 178, 749-754.
- Mitchell, P.G., Lopresti-Morrow, L., Yocum, S.A., Sweeney, G.J. & Reiter, L.A. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 395-397.
- Mitscher, L.A. (1978) *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*, Ch. 6, Marcel Dekker, New York.
- Mohtai, M., Smith R.L., Schurman, D.J., Taub, Y., Torti, F.M., Hutchinson, N.I., Stetler-Stevenson, W.G. & Goldberg, G.I. (1993) *J. Clin. Inv.* 92, 179-185.
- Murrell, G.A.C., Jang, D. & Williams, R.J. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 206, 15-21.
- Nathan, C. & Xie, Q. (1994) *Cell* 78, 915-918.
- Pfeilschifter, J., Walker, G., Eberhardt, W. & Kunz, D. (1995) *Endothelium* 3 (suppl.), S51.
- Pipili-Synetos, E., Sakkoula, E., Haralabopoulos, G., Andriopoulou, P., Peristeris, P. & Maragoudakis, M.E. (1994) *Br. J. Pharmacol.* 111, 894-902.
- Pipili-Synetos, E., Sakkoula, E. & Maragoudakis, M.E. (1993) *Br. J. Pharmacol.* 108, 855-857.
- Ramamurthy, N., Greenwald, R., Moak, S., Scuibba, J., Goren, A., Turner, G., Rifkin, B. & Golub, L. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 427-430.
- Rifkin, B.R., Vernillo, A.T., Golub, L.M. & Ramamurthy, N.S. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 165-180.
- Sakurai, H., Kohsaka, H., Liu, M.F., Higashiyama, H., Hirata, Y., Kanno, K., Saito, I. & Miyasaka, N. (1995) *J. Clin. Inv.* 96, 2357-2363.

- Salvemini, D., Misrao T.P., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G. & Needleman, R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7240-7244.
- Schmidt, H.H.H.W & Walter, U. (1994) *Cell* 78, 919-925.
- Smith, G.N., Jr., Brandt, K.D. & Hasty, K.A. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 436-438.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goede, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.B. (1985) *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Stefanovic-Racic, M., Meyers, K., Meschter, C., Coffey, J.W., Hoffman, R.A. & Evans, C.H. (1994) *Arthritis Rheum.* 37, 1062-1069.
- Stuehr, J.D., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weiss, M.S. & Nathan, C.F. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7773-7777.
- Suomalainen, K., Sorsa, T., Golub, L.M., Ramamurthy, N., Lee, H.M., Uitto, V.J., Saari, H. & Konttinen, Y.T. (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 227-229.
- Taskiran, D., Stefanovic-Racic, M., Georgescu, H. & Evans, C.E. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 200, 142-148.
- Tilley BC, Alarcon GS, Heyse SP, Trentham DE, Neuner R, Kaplan DA, Clegg DO, Leisen JCC, Buckley L, Cooper SM, Duncan H, Pillemeter SR, Tuttleman M, Fowler SE. Minocycline in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med.* 122:81-89 (1995).
- Uitto, V.J., Firth, J.D., Nip, L. & Golub, L.M. (1994) *Annals N.Y. Acad. Sci.* 732, 140-151.
- Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J. & Willoughby, D.A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2046-2050.
- Vermillo, A.T., Ramamurthy, N.S., Lee, H.M., Mallya, S., Auszmann, J., Golub, L.M. & Rifkin, B.R. (1993) *J. Dent. Res.* 73, 367A.
- Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q.W. & Nathan, C. (1993) *J. Exp. Med.* 178, 605-613.
- Vyas, P., Attur, M., Ou, G.M., Haines, K.A., Abramson, S.B. & Amin, A.R. (1996) In *The Biology of Nitric Oxide*, Part 5. Moncada, S., Stampler, J., Gross, S., and Higgs, E. A. (eds.) Portland Press Proceedings, p. 44.
- Xie, Q.W., Kashiwabara, Y. & Nathan, C. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 4705-4708.
- Yu, L.P., Jr., Smith, G.N., Jr., Hasty, K.A. & Brandt, K.D. (1991) *J. Rheumatol.* 18, 1450-1452.
- Yu, L.P., Jr., Smith, G.N., Jr., Brandt, K.D., Myers, S.L., O'Connor, B.L. & Brandt, D.A. (1992) *Arthritis Rheum.* 35, 1150-1159.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

포유동물에 의해 내생적으로 생산되는 일산화질소의 양을 감소시키기에 충분한 양의 테트라사이클린 화합물을 포함하는, 내생적 일산화질소의 증가를 특징으로 하는 사구체 신염, 세균 감염, 진균 감염, 말라리아, 디프테리아, 백일해, 급성 및 만성 기관지염, 정맥동염, 상부 호흡기 감염, 일반적인 감기, 급성 및 만성 위장염, 대장염, 급성 및 만성 방광염, 요도염, 급성 및 만성 피부염, 급성 및 만성 결막염, 급성 및 만성 장막염, 심막염, 복막염, 활막염, 흉막염, 건염, 요독성 심막염, 급성 및 만성 담낭염, 급성 및 만성 질염, 급성 및 만성 포도막염, 곤충에게 쏘이 상처, 노쇠, 혈관성 졸중, 알츠하이머병, 헌팅تون 질환, 열에 의한 화상, 화학물질에 의한 화상, 전기에 의한 화상 및 일광화상으로부터 선택되는 질환(또는 상태)을 갖는 포유동물을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 테트라사이클린 화합물이 실질적으로 포유동물 시스템내에서 항-미생물 활성을 가지지 않는 약제학적 조성물.

청구항 3.

제1항에 있어서, 테트라사이클린 화합물이 메탈로프로테이나제 억제 활성을 갖는 약제학적 조성물.

청구항 4.

제1항에 있어서, 테트라사이클린 화합물이 6-데메틸-6-데옥시-4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-3), 6- α -데옥시-5-하이드록시-4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-8), 4-데디메틸아미노테트라사이클린(CMT-1), 독시사이클린 또는 미노사이클린인 약제학적 조성물.

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

제1항에 있어서, 스테로이드성 또는 비-스테로이드성 소염제의 소염 양을 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

삭제

청구항 12.

삭제

청구항 13.

삭제

청구항 14.

삭제

청구항 15.

삭제

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

청구항 20.

삭제

청구항 21.

삭제

청구항 22.

삭제

청구항 23.

삭제

청구항 24.

삭제

청구항 25.

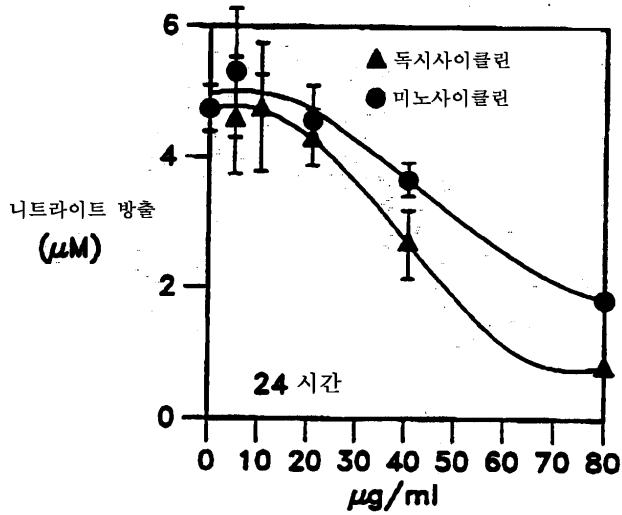
삭제

청구항 26.

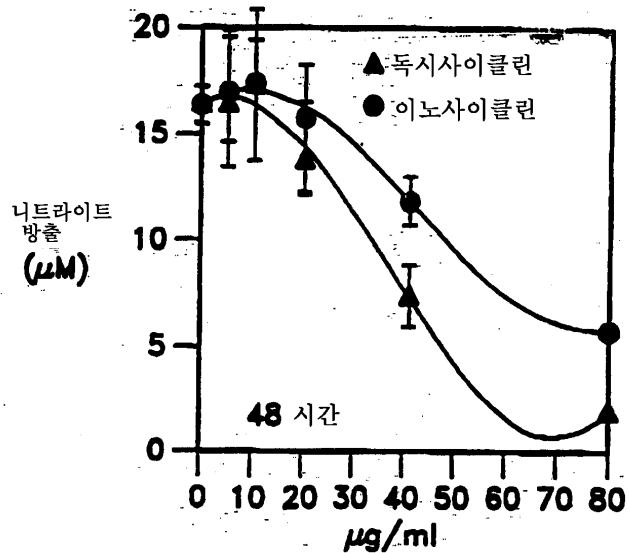
삭제

도면

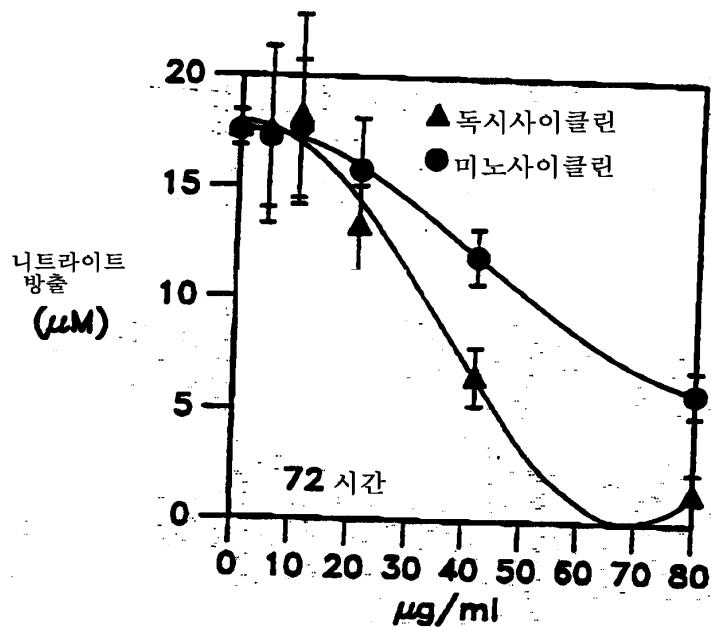
도면1A



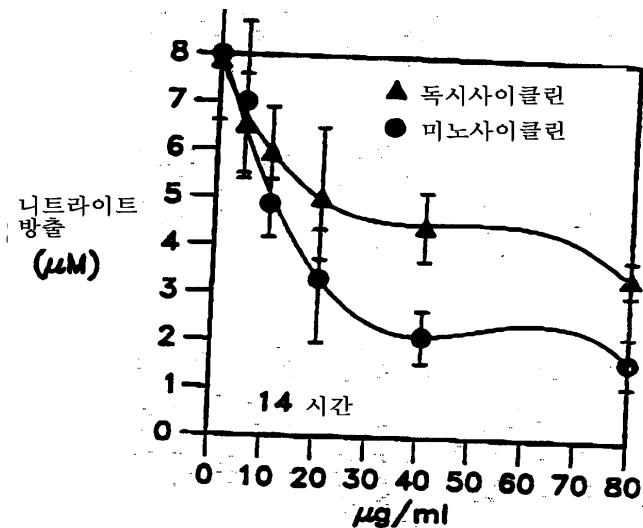
도면1B



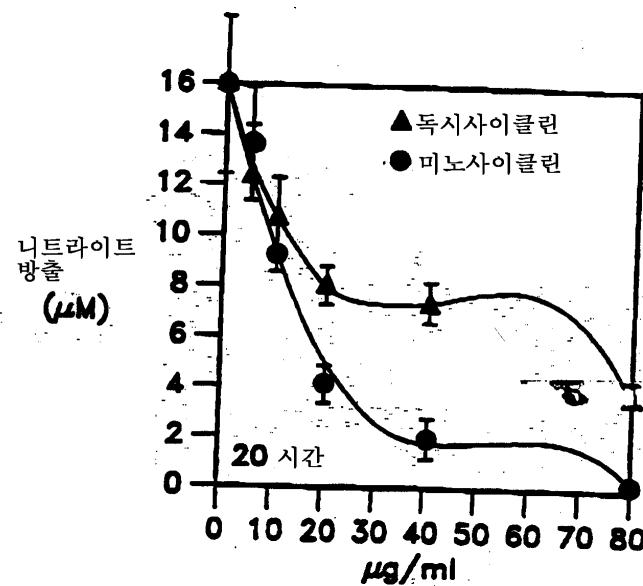
도면1C



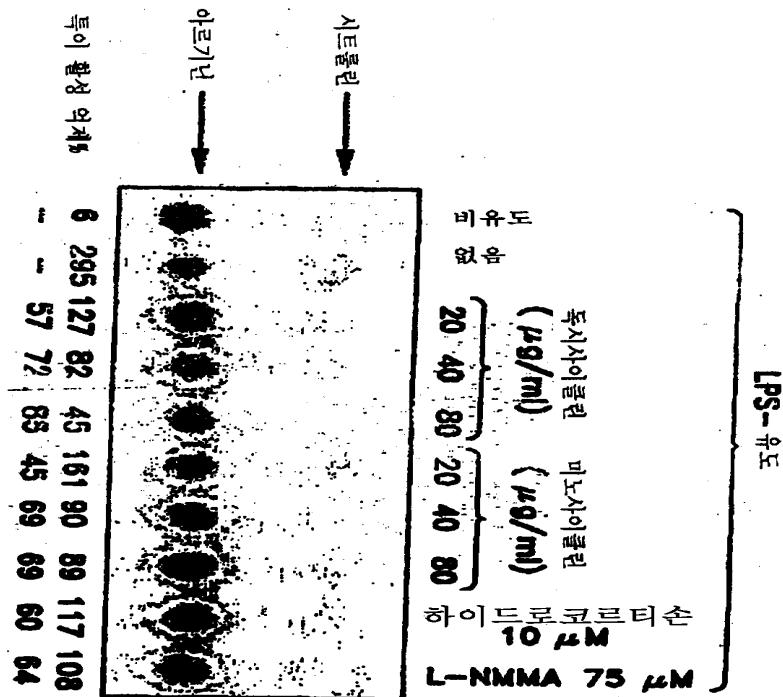
도면2A



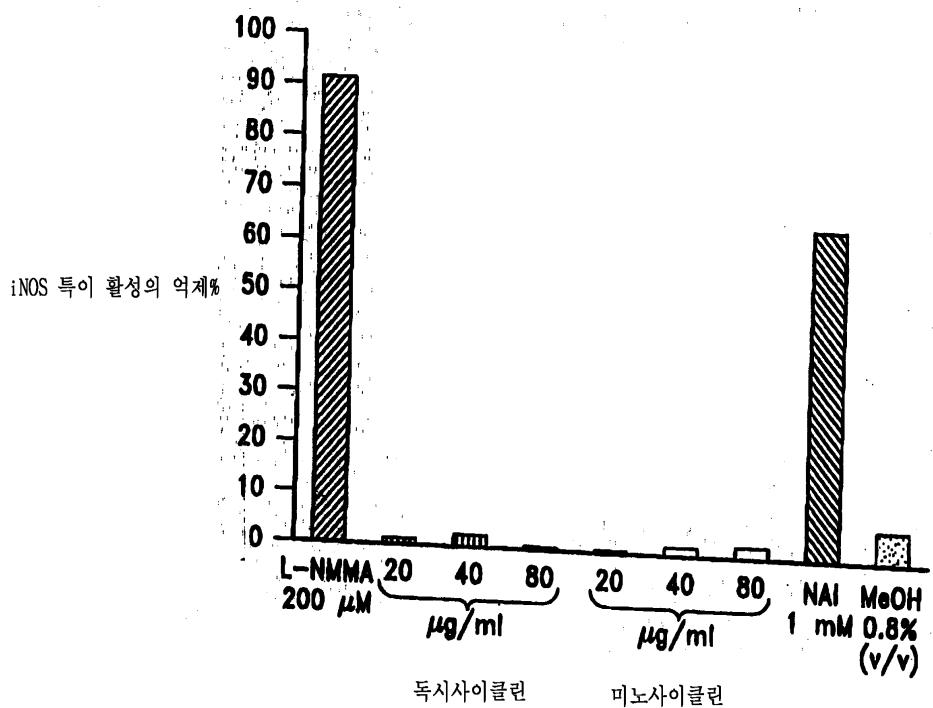
도면2B



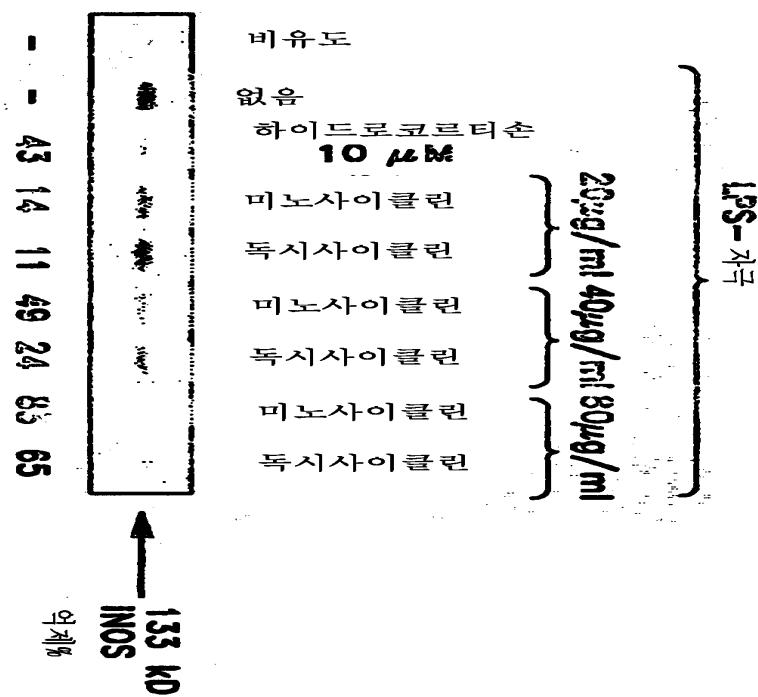
도면3



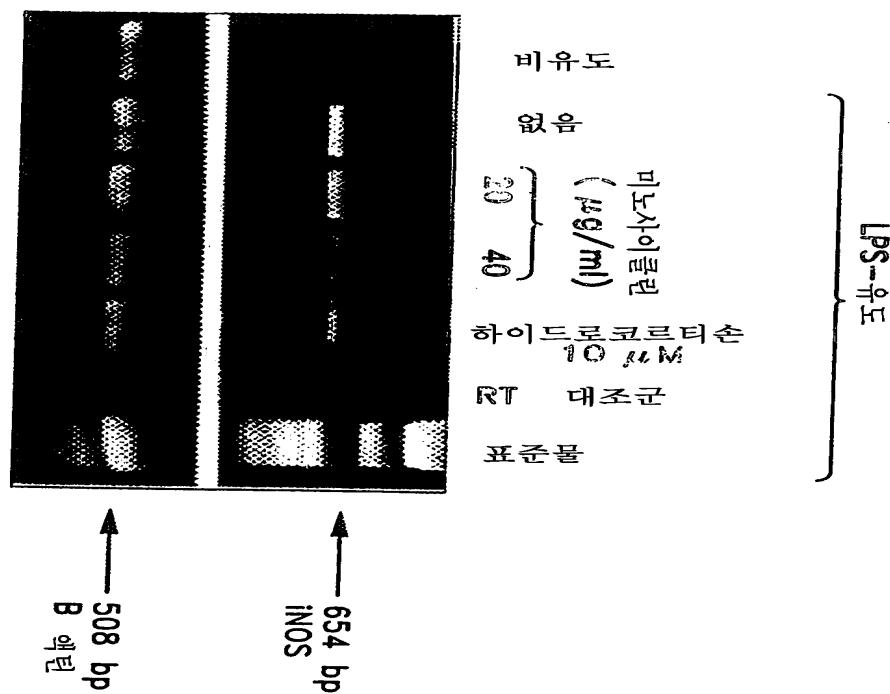
도면4



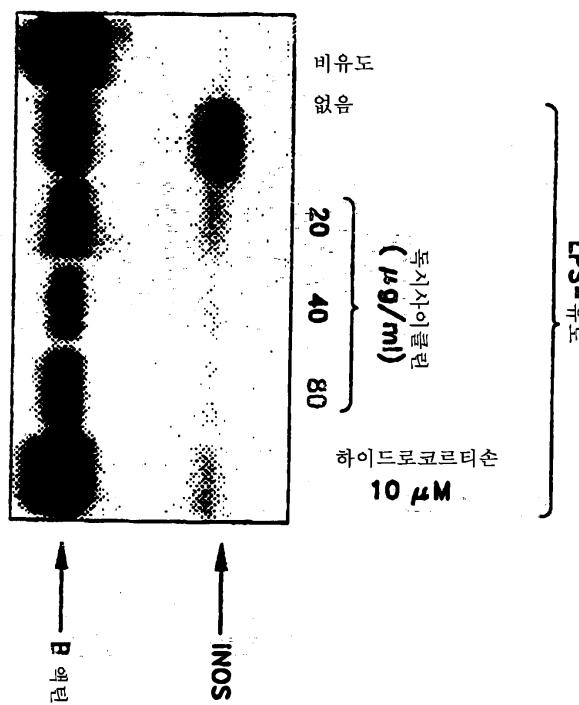
도면5



도면6B



도면6C



도면6D

