



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0012157
(43) 공개일자 2012년02월09일

(51) Int. Cl.

A61K 31/4709 (2006.01) A61K 31/47 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0074140

(22) 출원일자 2010년07월30일

심사청구일자 2010년07월30일

(71) 출원인

인제대학교 산학협력단

경남 김해시 어방동 607 인제대학교 내

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

최일환

부산광역시 연제구 고분로 200, 연산 LG아파트
115동 1102호 (연산동)

정원교

광주광역시 서구 풍암동 한국아파트 102동 301호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

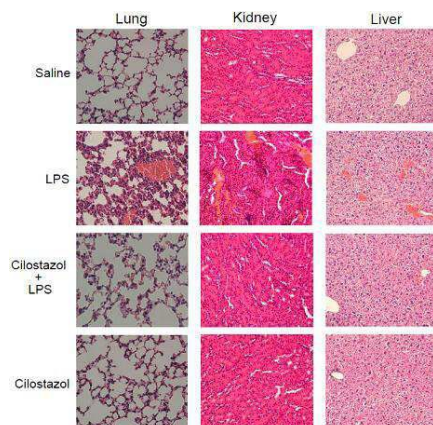
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것에 관한 것이다. 상기 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염은 이미 다른 용도로 시중에 시판되어 있어 안정성이 확보되어 있는 한편, NF- κ B 및 MAPK 신호전달경로를 블로킹함으로써 전염증성 사이토카인 생성이 농도 의존적으로 억제되어 과도한 전신 염증 반응을 억제할 수 있으며, 패혈증 또는 패혈증성 쇼크에서 나타나는 폐, 신장 및 간의 병리학적 변화를 완화시켜 패혈증 또는 패혈증성 쇼크의 치료 또는 예방용 약제나 식품으로써 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6c



(72) 발명자

예성수

부산광역시 부산진구 복지로 70, 현대i아파트
211-703호 (개금동)

박세광

부산광역시 부산진구 당감동 개금주공아파트 204동
807호

서수길

부산광역시 연제구 신금로5번길 8 (연산동)

특허청구의 범위

청구항 1

실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크의 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 약리학적 허용가능한 염은 옥살산, 말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산 및 벤조산 중에서 선택된 유기산이거나, 또는 염산, 황산, 인산 및 브롬화수소산 중에서 선택된 무기산에 의해 형성되는 산부가염의 형태인 것을 특징으로 하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 산제, 정제, 캡슐제, 주사제, 에어로졸 및 주사제로 이루어진 군에서 선택된 하나의 제형으로 제형화된 것임을 특징으로 하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크의 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 기관지 확장제, 항히스타민제, 소염진통제 및 항생제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 약제를 추가로 포함하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 약학조성물에 있어서 총 약학 조성물 100 중량부에 대하여 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염이 0.1 내지 50.0 중량부 포함된 것을 특징으로 하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 6

실로스타졸 또는 이의 산부가염을 유효성분으로 포함하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크의 개선용 건강식품.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 건강식품은 건강기능식품 또는 건강음료인 것을 특징으로 하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크의 개선용 건강식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 및 예방에 유용하게 이용될 수 있는 실로스타졸(cilostazol) 또는 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 패혈증(sepsis)은 병원성 그람 음성 세균이 생체에 감염된 경우 세포벽의 성분인 리포폴리사카라이드(LPS)가 독소로 작용하여 생체의 면역체계가 과도하게 활성화됨으로써 유발되는 염증 반응으로서, 전신에 감염증을 일으키거나 증상이 심할 경우 쇼크를 동반하기도 한다.

[0003] 패혈증은 병원 중환자 병동에 입원한 환자가 사망하는 주요한 원인이 되며, 이에 의한 치사율이 보통 30% 이상인 매우 심각한 질병이고, 의학기술의 발전에도 불구하고 아직도 전 세계적으로 수술의 후유증으로 감염이 되어 패혈증이 발생하는 경우도 많으며, 또한 신생아나 노인들과 같이 체내의 면역력이 약한 사람이 감염이 되었을 경우 패혈증으로 진행되는 경우도 많다.

[0004] 패혈증에 걸렸을 경우 대개 항생제 치료를 받게 되지만, 적절한 처치가 늦어져 균들이 많이 증식했을 경우나 항

생체에 내성이 강한 균주에 의해 감염이 되었을 경우에는 항생제만으로는 효과적인 치료를 할 수 없다. 이처럼 다양한 항생제에 대한 내성을 갖는 병원균이 점차로 증가하는 현상과 관련하여, 이의 치료가 매우 중요한 문제로 대두되고 있으나, 아직까지 이에 대한 적합한 치료제가 개발되지 못하고 있다.

[0005] 한편, 실로스타졸은 3'-5'-사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP)의 세포 내 수준을 포스포디에스테라제 3(PDE3)에 의한 가수분해를 억제함으로써 증가시키는데 도입되기 시작한 약물로서, 혈소판 응고 억제제, 혈관 확장제, 말초 혈관 질환의 허혈성 질환 치료의 치료제로 사용되어 왔다. 그러나, 패혈증 및 패혈증 쇼크에 미치는 실로스타졸의 영향에 대해서는 아직까지 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 실로스타졸(cilostazol) 또는 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 실로스타졸(cilostazol) 또는 이의 산부가염을 유효성분으로 포함하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 개선용 건강식품을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS), 즉, 세균 내독소는 염증 반응의 병인에 있어서 중요한 역할을 하는 다수의 주요 세포의 역할을 개시하며, 그람음성 세균의 감염 동안 패혈증 또는 패혈증성 쇼크를 유도한다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 LPS-유도 내독소 쇼크 모델에서 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 억제 효과를 나타내는 약물을 연구 개발하던 중, 실로스타졸이 LPS-유도 내독소 쇼크 모델에서 LPS에 의해 야기된 패혈증의 지표를 농도 의존적으로 억제하는 것을 밝혀냄으로써, 실로스타졸이 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 약학조성물로서 작용할 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 패혈증 또는 패혈증성 쇼크의 치료 및 예방용 약학조성물을 제공한다.

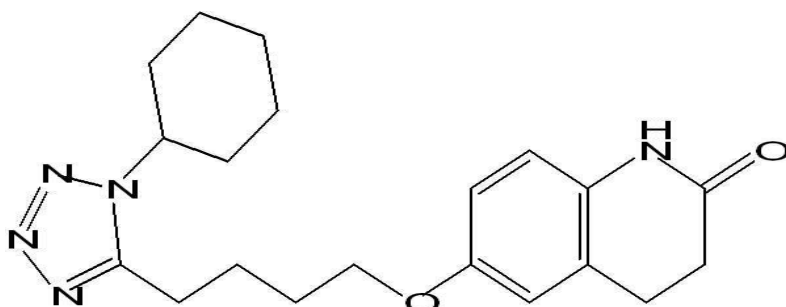
[0011] 상기 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염은 NF- κ B 및 MAPK(Mitogen-activated protein kinase) 신호전달경로를 블로킹함으로써 LPS 유도성 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α)을 억제시켜 항염증 효과를 가진다.

[0012] 상기 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염의 패혈증 또는 패혈증성 쇼크 치료 및 예방용 조성물로서의 용도를 LPS 유도 RAW 264.7 대식세포 및 LPS-유도 내독소 쇼크 마우스(C57BL/6 마우스) 모델을 통해 입증하였다.

[0013] 상기 실로스타졸은 3'-5'-사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP)의 세포 내 수준을 포스포디에스테라제 3(PDE3)에 의한 가수분해를 억제함으로써 증가시키는데 도입되기 시작한 약물로서, 혈소판 응고 억제제, 혈관 확장제, 말초 혈관 질환의 허혈성 질환 치료의 치료제로 사용되고 있으므로, 안전성이 확보된 화합물이다.

[0014] 본 발명에 따른 실로스타졸, 즉, 6-[4-(1-시클로헥실-1H-테트라졸-5-일)부톡시]-3,4-디하이드로퀴놀린-2(1H)-온 화합물은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물이다.

화학식 1



[0015]

- [0016] 본 발명에 따른 실로스타졸의 약리학적으로 허용가능한 염은 산부가염의 형태일 수 있다. 예를 들어, 실로스타졸을 약리학적으로 허용가능한 산과 반응시켜 용이하게 제조할 수 있다. 약리학적으로 허용가능한 산으로는, 예를 들어, 옥살산, 말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산과 같은 유기산, 및 염산, 황산, 인산, 브롬화수소산과 같은 무기산이 포함된다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 실로스타졸 또는 이의 약리학적으로 허용가능한 염은 산제, 정제, 캡슐제, 주사제, 에어로졸 및 주사제로 이루어진 군에서 선택된 하나의 제형으로 제형화 될 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 약학조성물에서는, 총 약학 조성물 100 중량부에 대하여 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염이 0.1 내지 50.0 중량부 포함될 수 있다. 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염이 0.1 중량부 미만으로 포함될 경우, 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염의 약리학적 효과가 미비할 수 있으며, 50.0 중량부를 초과할 경우 경제적이지 않을 수 있다.
- [0019] 본 발명에 따른 약학조성물은 기관지 확장제, 항히스타민제, 소염진통제 및 항생제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 약제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0020] 예를 들어, 상기 기관지 확장제로는 β -효능제, 항콜린제, 메틸잔틴 등을 사용할 수 있고, 상기 항히스타민제로는 아크리바스틴(acrivastine), 세티리진(cetirizine), 데슬로라타딘(desloratadine), 페소페나딘(fexofenadine), 레보세티리진(levocetirizine), 로라타딘(loratadine), 미졸라스틴(mizolastine), 아일메마진(ailmemazine), 클로세티리진(chlocetirizine), 클레마스틴(clemastine), 시프로헵타딘(cyproheptadine), 하이드록시진(hydroxyzine), 케토티펜(ketotifen), 프로멘타진(promenthazine) 등을 사용할 수 있고, 상기 소염진통제로는 아스피린(aspirin), 디클로페낙(diclofenac), 페노프로펜(fenoprofen), 플루비프로펜(flurbiprofen), 이부프로펜(ibuprofen), 인도메타신(indomethacin), 케토프로펜(ketoprofen), 나프록센(naproxen), 피록시캄(piroxicam), 숄린닥(sulindac), 셀레코시브(celecoxib), 발데코시브(valdecoxib), 로페코시브(rofecoxib) 등을 사용할 수 있으며, 상기 항생제로는 세팔로스포린계 항생제, 페니실린계 항생제, 퀴놀론계 항생제, 아미노글리코사이드계 항생제, 베타락탐계 항생제 등을 사용할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0023] 상기 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 흡입제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0024] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0025] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0026] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0027] 주사제의 구체예로서, 글루코스 주사, 자일리톨 주사, D-만니톨 주사, 프룩토스 주사, 생리식염수, 텍스트란 40 주사, 텍스트란 70 주사, 아미노산 주사, 링거액, 락탄산-링거액 등이 포함될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 약학조성물인 액상 또는 분말상의 조성물은 유효성분인 실로스타졸에 용제, 기제, 희석제, 충전

제, 증량제 등의 액상 또는 분말상의 조성물의 형태를 부여하는 부형제; 용해 보조제, 가용화제, 완충제, 등장화제, 유화제, 계면활성제, 안정화제, 현탁화제, 분산제, 증점제, 활택제, 결합제, 부착 방지제, 분무제 등의 액상 또는 분말상의 형태가 유지되는 것을 돕는 기능을 가지는 보조제; 보존제, 살균제, 방부제, 감미제, 향미제, 방향제, 착색제, 향산화제 등의 사용상의 성질을 개선하는 목적으로 첨가되는 첨가제 등을 필요하게 따라 함유시키고, 통상의 방법에 따라 경비 투여 제제 또는 경구 흡입 투여 제제로서 제조될 수 있다.

[0029] 상기 약학조성물의 유효성분인 실로스타졸의 폐혈증 또는 폐혈증성 쇼크의 치료 및 예방을 위한 유효량은 환자의 연령, 성별, 질환의 정도에 따라서 다르지만, 통상 1.0mg/kg ~ 5.0mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 발명에 따른 약제 조성물의 정확한 1일 투여량은 투여방법이나 치료조건에 따라 상이하나, 경구 투여 시 성인의 경우 매일 2 회 투여하는 것이 바람직하다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 의사의 의학적 판단 하에 환자의 연령, 건강정도, 체중, 배설율, 식이, 질병 중증도, 사용된 추출물의 활성, 성별, 투여 시간, 투여 경로, 치료 기간 및 횟수 등에 따라 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

[0030] 본 발명에 따른 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁 내 경막 또는 뇌 혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0031] 본 발명은 실로스타졸 또는 이의 산부가염을 유효성분으로 포함하는 폐혈증 또는 폐혈증성 쇼크의 개선용 건강 식품을 제공한다.

[0032] 상기 건강식품은 건강기능식품 또는 건강음료의 형태로 제공될 수 있으며, 기능성 음료, 환제, 정제 또는 상기 성분을 건조 분말화하여 충전한 연질 또는 경질 캡슐제의 형태로 이용하는 것이 바람직하다.

[0033] 본 발명에 따른 실로스타졸 또는 이의 산부가염을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어 각종 식품류, 캔디, 초코릿, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 각종 건강보조 식품류 등이 있고 분말, 과립, 정제, 환제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0034] 상기 건강식품은 식품학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시예로서, 본 발명의 건강식품이 음료인 경우에는 지시된 비율로 필수 성분으로서 실로스타졸 또는 이의 산부가염을 함유하는 것 이외에는 액체 성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 이때, 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당, 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스, 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올을 들 수 있다. 또, 상기 향미제로는 천연향미제, 예를 들어, 타우마틴, 스테비아 추출물, 헤바우디오시드 A, 글리시르히진과 합성 향미제 예를 들어 사카린, 아스파르탐 등을 사용할 수 있다.

[0035] 상기 음료 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0036] 상기 건강식품에 함유된 실로스타졸 또는 이의 산부가염의 유효 용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

발명의 효과

[0037] 본 발명에 따른 실로스타졸은 이미 다른 용도로 시중에 시판되고 있어 안전성이 확보된 화합물로 알려져 있는 한편, NF- κ B 및 MAPK 신호전달경로를 블로킹함으로써 전염증성 사이토카인 생성이 농도 의존적으로 억제되어 과도한 전신 염증 반응을 억제할 수 있으며, 폐혈증 또는 폐혈증성 쇼크에서 나타나는 폐, 신장 및 간의 병리학적 변화를 완화시켜 폐혈증 또는 폐혈증성 쇼크의 치료 또는 예방용 약제나 식품으로써 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 RAW 264.7 세포의 세포 생존율에 대한 실로스타졸의 영향을 나타내는 그래프이다. LPS(100ng/ml)을 24

시간동안 처리하기 전에 12시간 동안 정해진 농도(0, 10, 20, 30, 40 및 50 μ M)의 실로스타졸을 처리하고, 세포 생존율을 MTT 환원 분석으로 측정하여, 대조구 세포(실로스타졸 및 LPS 미첨가)에 대한 생존 세포의 백분율로 표시한 결과이다. 각각의 값은 평균 $\pm$ 표준편차(SD)를 나타내며, 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다.

도 2는 RAW 264.7 세포에 있어서의 LPS로 유도된 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성에 대한 실로스타졸의 영향을 나타낸다. RAW 264.7 세포에 LPS(100ng/ml) 처리하기 전에 12시간 동안 실로스타졸(0, 10, 20, 30 및 40 μ M)을 처리하였고, LPS 처리 후, 총 RNA 및 상층액을 각각 6시간 또는 24시간에 분리한 결과이다. 도 2A는 배양 배지 내의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 세포의 수준을 상업적인 ELISA 키트를 이용하여 측정된 결과이다. 도 2B는 실로스타졸을 처리하고 6시간 배양 후, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 mRNA의 수준을 RT-PCR로 측정된 결과이다. *P<0.05는 실로스타졸 없이 LPS 처리한 세포로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 3은 RAW 264.7 세포에 있어서의 사이토카인 생성에 대한 세포 내 cAMP의 영향을 나타낸다. 도 3A는 세포 내 cAMP 수준을 나타낸다. 세포들에 LPS(100ng/ml), 실로스타졸(40 μ M) 및 db-cAMP(100 μ M)을 3분 동안 처리하였다. 각각의 값은 평균 $\pm$ 표준편차(SD)를 나타내며, 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다. *P<0.05는 실로스타졸 처리한 세포로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다. 도 3B는 마우스 RAW 264.7 세포에 있어서 SQ 22536에 의한 TNF- α 생성에 대한 실로스타졸의 영향을 나타낸다. 상기 세포에 SQ 22536을 30분 동안 전 처리하고, 실로스타졸(40 μ M)을 12시간 처리하고 난 후, LPS(100ng/ml)로 24시간을 자극시킨 결과이다. 배양 배지 내의 TNF- α 의 세포의 수준을 상업적인 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다. 각각의 값은 평균 $\pm$ 표준편차(SD)를 나타내며, 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다. *P<0.05는 실로스타졸 없이 LPS 처리한 세포로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 4는 LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에 있어서의 NF- κ B 활성화에 대한 실로스타졸의 영향을 나타낸다. 도 4A는 RAW 264.7 세포를 LPS(100ng/ml)로 1시간 동안 자극시키기 전에 40 μ M의 실로스타졸을 전 처리 하였고, 그리고 나서 세포 내의 p65 단백질의 위치를 항-p65항체 이어서 FITC-표지된 항-토끼 IgG 항체를 처리하고 공초점 레이저 주사 현미경을 이용하여 측정하였다. 도 4B는 핵 추출물(5 μ g)을 준비하여 EMSA를 이용하여 NF- κ B의 DNA 결합 활성을 분석한 결과이다. RAW 264.7 세포를 LPS(100ng/ml)로 2시간 동안 자극하기 전에 비히클(vehicle) 또는 표시된 농도의 실로스타졸로 전 처리 하였으며, 상기 결과는 3번의 독립적인 실험 결과를 나타낸다.

도 5는 RAW 264.7 세포에 있어서의 LPS로 유도된 ERK-1/2, SAPK/JNK 및 p38 키나아제의 인산화에 대한 실로스타졸의 영향을 나타낸다. RAW 264.7 세포에 LPS(100ng/ml)를 넣고 배양(p-ERK-1/2 및 p-SAPK/JNK의 경우 30분 처리, p-p38의 경우 15분 처리)하기 전에 비히클(vehicle) 또는 표시된 농도의 실로스타졸로 전 처리 하였다. 도 5A는 세포 추출물을 준비하여 ERK-1/2, SAPK/JNK 및 p38의 인산화된 형태에 특이적인 항체로 웨스턴 블롯을 수행한 결과로, 상기 결과는 3번의 독립적인 실험 결과를 나타낸다.

도 6a 내지 6f는 LPS로 유도된 폐혈증성 쇼크에 빠진 마우스를 치료하기 위한 실로스타졸의 약리학적 효과를 나타낸다. LPS를 주입하기 16시간 및 30분 전에 실로스타졸(1 및 5mg/kg)을 복강 주사(intraperitoneal injection)로 투여하였다.

도 6a는 LPS를 정맥 주사로 투여한 후 10일 동안 생존율(각 실험군 당 10마리 마우스)을 모니터링한 결과이다.

도 6b는 LPS 투여(2.5mg/kg) 1시간 후, 심장 천자(cardiac puncture)로 채혈하여 혈청 샘플을 수득하고, 4시간 후 수득한 혈청 샘플 내의 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 수준을 ELISA를 이용하여 측정된 결과이다. 각각의 5마리의 실험동물에 3번의 독립적인 실험을 수행하였고, 각각의 값은 평균 $\pm$ 표준편차(SD)를 나타내며, 상기 결과는 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다. *P<0.05는 LPS 처리한 마우스로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 6c는 LPS를 주입하기 16시간 및 30분 전에 실로스타졸(5.0mg/kg)을 복강에 투여한 후의 폐, 신장 및 간 조직의 영향을 보여주는 현미경 사진(200 배율)이다. 폐, LPS 주입 후 14시간 후, 폐, 신장 및 간을 적출하고, 10% 포르말린으로 고정하고 헤마톡실린 및 에오신으로 염색한 각 조직 절편의 사진이다. 폐간질(pulmonary interstitium)에서의 중증 충혈(massive congestion) 및 세포침윤과 신장 수질 및 간의 심각한 출혈이 관찰되었다(LPS 참조). LPS를 주입하기 전에 실로스타졸을 전 처리함으로써, 상기 조직학적 변화가 억제되었다.

도 6d는 LPS를 복강 투여 후 16시간 후, 내독소 쇼크 마우스의 혈청 내 ALT 및 AST 수치에 대한 실로스타졸의 영향을 나타낸다. 각각의 값은 평균 $\pm$ 표준편차(SD)를 나타내며, *P<0.05는 LPS 처리한 마우스로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 6e는 페 W/D 비를 나타내는 그래프를 나타낸다. 각각의 값은 평균±표준편차(SD)를 나타내며(실험군 당 n=5), *P<0.05는 실로스타졸 없이 LPS 처리한 마우스로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 6f는 LPS로 유도된 NF-κB 활성화에 대한 실로스타졸의 억제 효과(5.0mg/kg)를 나타낸다. LPS 주입 후 1시간 후, 페를 적출하여 상기 페로부터 추출한 핵 추출물을 비오틴-표지된 κB 올리고뉴클레오타이드와 함께 배양시키고, 5% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기 영동한 결과이다. 경쟁제(competitor)로 100배 초과 cold κB 또는 관련 없는 모티프(irrelevant motif)인 CRE를 첨가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

<실시예>

1. 시약준비

실로스타졸, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS(*Escherichia coli* 026:B6)), p-니트로페닐 포스페이트 및 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(MTT)를 Sigma Chemical사(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 역전사-PCR(RT-PCR) 시약을 Promega(Madison, WI)로부터 구입하였다. LightShift chemiluminescent 전기영동 이동도 분석 시약, 핵 및 세포질 추출 시약, ECL(enhanced chemiluminescence)-검출 시약을 Pierce (Rockford, IL)로부터 구입하였다. 토끼 항-마우스 p65 및 IκB 항체를 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다. ERK, 인산화(p)-ERK 1.2, p38, p-p38, JNK/SAPK 및 p-JNK/SAPK에 대한 항체를 Cell Signaling Technology(Beverly, MA)로부터 구매하였다. β-actin에 대한 항체를 Sigma사로부터 구입하였다. 세포-배양 배지(RPMI), FBS(fetal bovine serum) 및 페니실린/스트렙토마이신을 Gibco/BRL Life Technologies Inc.(Grand Island, NY)로부터 입수하였다. 나머지 모든 시약은 Chemical Co.으로부터 구입하였다.

2. 실험방법

(1) 세포배양(Cell culture)

American Type Culture Collection((Manassas, VA, U.S.A.))으로부터 입수한 RAW264.7 대식세포(macrophage)를 10% FBS, 10U/ml 페니실린 및 100μg/ml을 포함하는 RPMI에서 37℃, 5% 이산화탄소(CO₂) 습한 공기 조건(humidified air environment)에서 배양되었다.

(2) 세포 생존력 분석(Cell viability assay)

세포 생존력은 살아있는 세포에서만 활성을 갖는 미토콘드리아 탈수소효소(mitochondrial dehydrogenase)의 탈수소 효소 작용에 의하여 무색의 MTT가 청색의 포르마잔(formazan)으로 생성되는 것에 기초한 MTT 환원 분석에 의해 측정되었다. RAW264.7 대식세포를 96-웰 플레이트(well plate)에 웰 당 4×10³ 세포/ml로 24시간 동안 배양 하였고, 이후 세정하였다. 다양한 농도의 실로스타졸과 함께 배양한 세포에 LPS(*Escherichia coli* 026:B6; Sigma, St Louis, MO)를 24시간 처리하였고, 이후 0.5μg/ml MTT의 용액에서 배양하였다. 세 시간 후, 상층액(supernatant)을 제거하였고, 포르마잔의 생성을 microplate reader(Dynatech MR-7000; Dynatech Laboratories)를 이용하여 540nm에서 측정하였다.

(3) 세포 내의 cAMP 측정

cAMP 수준을 측정제품의 제조자의 프로토콜에 따라 Direct cAMP Enzyme Immunoassay Kit (Sigma, St Louis, MO)를 이용하여 측정하였다. microplate reader를 이용하여 405nm의 흡광도(absorbance)를 측정하였다.

(4) 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis)

- [0051] 상기 세포들을 PBS로 3번 세정하였고, 프로테아제 저해제 콕테일 알약(Roche Diagnostics, Mannheim, German y)을 포함하는 용해 완충액(1% 트리톤(Triton) X-100, 1% 데옥시콜레이트(deoxycholate), 0.1% NaN_3)에서 용해 시켰다. 동량의 단백질이 10% SDS-폴리아크릴아마이드 미니겔 상에서 분리되었고, 임포빌론 폴리비닐리덴 디플 루오라이드(PVDF) 막(Millipore)에 옮겨졌다. 적절한 1차 항체로 배양시킨 후, 상기 막들은 양고추냉이 퍼옥시 다제(horseradish peroxidase)에 결합된 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 배양되었다. TBST로 3번 세정한 후, ECL 검출 시스템(Pierce)을 이용하여 면역반응 밴드를 시각화하였다. 대조실험(parallel experiment)에서, 핵 단백질은 제조자의 프로토콜에 따라 nuclear extraction 시약(Pierce)을 이용하여 준비되었다.
- [0052] (5) ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)
- [0053] IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 수준을 ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, 12 MN)를 이용하여 측정하였다. 측정 제품의 제조자의 프로토콜에 따라, ELISA plate reader(Dynatech MR-13 7000; Dynatech Laboratories)를 이용하여 ELISA 결과의 정량화를 수행하였다.
- [0054] (6) 전기영동 이동도 분석(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)
- [0055] NE-PER nuclear extraction 시약(Pierce)을 이용하여 핵 단백질(Nuclear extract)이 준비되었다. 면역글로블린 κ -쇄 결합부위(κ B, 5' -CCGGTTAACAGAGGGGGCTTCCGAG-3' -염기서열 1)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 겔 지연 분석(gel retardation assay)용 프로브로서 합성하였다. 본 실험에서 3' 프로브의 말단을 비오틴으로 표 지화한 비-방사성 방법을 수행하였다. 결합 반응에는 5 μ g의 핵 단백질, 완충액(10mM Tris, pH 7.5, 50mM KCl, 5mM MgCl_2 , 1mM 디티오프레이톨(DTT), 0.05% Nonidet P-40 및 2.5% 글리세롤), 50ng의 폴리(dI-dC) 및 20fM 비오틴 결합된 DNA이 포함 되었다. 상기 반응은 최종 부피 20 μ l로 상온에서 20분간 배양시켰다. 반응 혼합물에 100배 과량의 cold κ B 또는 무관계한 올리고뉴클레오타이드(cAMP 반응 부위(cAMP response element, CRE)의 첨가를 통해 경쟁 반응을 수행하였다. 상기 반응 혼합물은 0.5X TER 완충액(Tris-HCl(pH 8.0) 89mM, 붕산 89mM, EDTA 2mM)에서 5% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동 시킴으로써 분석되었다. 상기 반응을 나일론 막에 전사시켰고, LightShift chemiluminescent EMSA 키트(Pierce)를 이용하여 비오틴 표지화된 DNA가 검출되었다.
- [0056] (7) 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal laser scanning microscopy)
- [0057] 공초점 현미경을 이용한 간접적인 면역형광 분석으로 핵 인자- κ B p65 핵 내 국소화(nuclear localization)를 측정하였다. RAW264.7 대식세포가 24-웰 플레이트에서 약 24시간 동안 글라스 커버슬립 상에 직접적으로 배양되 었다. 100ng/ml의 LPS 및/또는 40 μ M 실로스타졸로 자극시킨 후, 세포들을 PBS에서 4% 파라포름알데히드로 고정 시켰고, PBS에서 0.2% Triton X-100을 퍼미어블라이즈(permeablize)시켰고, 1.5% 정상 당나귀 혈청(Sigma)으로 블로킹시켰다. NF- κ B p65에 대한 다클론항체(웰 당 1 μ g)를 1시간 동안 처리하고, 이어서, 1시간 FITC-결합 당 나귀 항-토끼 IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)을 처리하여 배양하였다. PBS 로 세척한 후, 커버슬립을 Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA)에 탑재시켜, Plan-Apochromat 100X/Oil DIC objective (Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 Axiovert 100 현미경에 부착된 Zeiss LSM 510 레이저 스캐닝 공초점 장치를 이용하여 형광이 시각화시켰다.
- [0058] (8) 역전사효소-중합효소연쇄반응(RT-PCR)
- [0059] 총 RNA(total RNA)는 트리졸(Trizol) 시약(Invitrogen, CA)을 이용하여 분리하였다. 상기 세포로부터 얻어진 전체 RNA(1.0 μ g)를 M-MLV 역전사 효소(Promega, Madison, WI)를 이용하여 역전사하여 cDNA를 합성하였다. IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 GAPDH 유전자를 코딩하는 역전사로 형성된 cDNA를 하기 표 1의 선택적인 프라이머들을 이용하여 PCR로 증폭시켰다.

표 1

유전자	프라이머	염기서열	Accession number
TNF- α	정방향 프라이머	5' -ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3' (염기서열 2)	NM013693.1
	역방향 프라이머	5' -TACAGGCTTGTCACCTCGAATT-3' (염기서열 3)	
IL-1 β	정방향 프라이머	5' -CTCGTGTGTCGGACCCATAT-3' (염기서열 4)	NM008361.3
	역방향 프라이머	5' -TTGAAGACAAACCGCTTTTCCA-3' (염기서열 5)	
IL-6	정방향 프라이머	5' -GAAGACTCTGGCTTTGTCTT-3' (염기서열 6)	NM03168.1
	역방향 프라이머	5' -TGGGAAATCGTGGAATGAG-3' (염기서열 7)	
GAPDH	정방향 프라이머	5' -TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' (염기서열 8)	XR031141.1
	역방향 프라이머	5' -GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' (염기서열 9)	

(9) 생체 내의 내독소 쇼크 모델(In vivo endotoxin shock model)

본 실험에서 사용되는 모든 실험동물(암컷 C57BL/6 마우스)은 인제대 약대 동물실험 윤리위원회에서 승인된 프로토콜에 따라 처리되었다. 쥐(murine)의 내독소 쇼크는 LPS를 정맥주사(intravenous injection)함으로써 유도하였다. 내독소-쇼크 마우스에서의 사이토카인 수준에 대한 실로스타졸의 효과는 LPS(2.5mg/kg)를 주입하기 전, 16시간 및 30분(각각 1mg/kg 및 5mg/kg를 정맥주사로)에 실로스타졸을 투여하여 측정하였다. DMSO에 실로스타졸의 배액(stock solution)을 용해시키고, PBS로 희석시켰다. 1시간 후 수득되는 혈청(serum) 샘플로 TNF- α 를 측정하였고, 4시간 후 수득되는 혈청 샘플로 IL- β 및 IL-6를 측정하였다. 10일 동안 매일 상기 마우스들의 생존율을 모니터링 하였다.

(10) 조직학적 검사(Histological examination)

상기 마우스에 LPS를 노출시킨 후 14시간 후, 조직학적 검사를 위해 상기 마우스의 폐, 신장 및 간을 적출하고, 10% 중성 완충 포르말린(neutral buffered formalin)으로 고정시켰다. 조직을 에탄올(graded ethanol)로 탈수시키고, 파라핀으로 포매(embedding)하였다. 다음으로 상기 조직 샘플을 마이크로톰을 이용하여 5 μ m로 잘라내어 유리 슬라이드 상에 올려놓고 파라핀을 제거하고, 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin)으로 염색하였다.

(11) 간 기능 측정

혈청 내 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 수치의 증가 여부를 측정함으로써, 간 기능 장애(Liver dysfunction)를 평가하였다. 상기 혈청 샘플은 마우스에 LPS를 노출시킨 후 6시간 후 수득되었다. 혈청의 ALT 및 AST 농도를 상업적인 키트를 이용하여 제조사(Asanpharm, Seoul, Korea)의 지시에 따라 측정하였다.

(12) 폐부종(pulmonary edema) 측정

폐부종을 평가하는 지표로서 상기 마우스의 부종폐/건조폐 비(wet-to-dry weight ratio, W/D 비)를 사용하였다. 실험에서 사용된 LPS 처리 마우스는 LPS 주입 후 12시간 된 것을 사용하였다. 상기 마우스로부터 폐를 적출하여 수분을 포함하고 있는 무게(wet weight)를 측정하였다. 그리고 나서, 상기 적출된 폐를 50 $^{\circ}$ C 오븐에 넣고 24시간동안 건조시킨 후, 건조 무게(dry weight)를 측정하였다. 상기 W/D 비는 수분을 포함하고 있는 무게를 건조 무게로 나누어서 계산하였다.

- [0069] (13) 통계학적 분석
- [0070] 데이터 값은 평균±표준편차(SD)로 나타내었다. 각 실험군 간의 통계적인 유의는 unpaired Student's t-test를 이용하여 측정하였다. 통계적 유의로서 P<0.05의 값을 기준으로 삼았다.
- [0071] 2. 실험 및 실험결과
- [0072] (1) LPS로 유도된 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 생성에 대한 실로스타졸의 영향
- [0073] 실로스타졸의 세포독성(cytotoxicity)으로 인한 전염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)의 억제 가능성을 배제시키기 위하여, 실로스타졸(10 μ M 내지 50 μ M)을 처리한 RAW 264.7 대식세포에 MTT 분석을 수행하였다(도 1 참조). 50 μ M 농도의 실로스타졸을 처리한 경우, 세포 생존율이 감소한다는 것이 관찰되었다. 반면, 10 내지 40 μ M 농도에서는 세포 생존율에 실로스타졸이 영향을 미치지 않는다는 것이 알 수 있었다. 따라서, 이후 실험에서는 실로스타졸을 처리할 때 10 내지 40 μ M 농도를 선택하여 실시하였다.
- [0074] 다음으로, IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인에 대한 실로스타졸의 영향을 분석하였다. RAW 264.7 대식세포에 다양한 농도의 실로스타졸을 12시간 동안 처리한 후, LPS(100ng/ml)로 24시간 동안 자극시킨 후, 배양 배지 내의 사이토카인 수준을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 도 2A에 도시된 바와 같이, LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 수준이 증가하였고, 실로스타졸을 처리함으로써 농도 의존적 방식으로 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 수준이 상당히 감소되었다.
- [0075] 대조 실험(parallel experiment)으로, RT-PCR로 수행하여 실로스타졸이 전사 수준에서 사이토카인의 발현을 억제하는지 여부를 평가하였다. 도 2B에 도시된 바와 같이, RAW 264.7 대식세포에 LPS를 처리하기 전에 서로 다른 농도의 실로스타졸을 처리한 결과 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 mRNA 발현이 농도 의존적으로 감소되었다. 따라서, 상기 실험 결과는 실로스타졸이 염증 반응에 관계된 상기 유전자들의 발현을 농도 의존적으로 억제한다는 것을 보여주었다.
- [0076] (2) LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포의 cAMP 생성에 대한 실로스타졸의 영향
- [0077] 실로스타졸은 cAMP PDE3의 선택적인 억제제로서 세포 내의 cAMP 수준을 증가시킨다. cAMP 신호전달 경로에 의존하는 전염증성 사이토카인의 과다발현에 대한 실로스타졸의 억제효과를 평가하기 위하여, RAW 264.7 대식세포의 세포 내 cAMP 수준에 대한 실로스타졸의 영향을 실험하였다. 세포 내 cAMP 수준이 실로스타졸에 의해 증가되지 않았다. 반면에, 디부티릴-cAMP(100 μ M, 세포 침투 가능한 cAMP의 유사체)을 처리한 경우, 세포 내의 cAMP 수준이 상당히 증가하였다(도 3A 참조).
- [0078] 또한 실로스타졸의 cAMP에 대한 독립적인 작용을 확인하기 위하여, TNF- α 생성의 발현에 대한 SQ 22536(10 μ M, 아데닐레이트 사이클라제 억제제), 즉, 비가역적이며 선택적인 cAMP 길항제(antagonist)의 영향을 실험하였다(도 3B 참조). 상기 실험 결과, SQ 22536은 TNF- α 발현에 대한 실로스타졸의 억제효과에 영향을 미치지 않았다. 상기 결과는 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인 발현에 대한 실로스타졸의 억제 효과에는 세포 내 cAMP 신호전달 경로가 포함되지 않음을 암시한다.
- [0079] (3) LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에 있어서 실로스타졸의 NF- κ B 활성화 억제
- [0080] NF- κ B의 활성화는 전염증성 사이토카인의 유도에 필수적이다. LPS에 대한 반응으로 RAW 264.7 대식세포에서 NF- κ B의 활성화와 실로스타졸에 의한 NF- κ B의 활성화의 억제 효과를 실험을 통해 확인하였다(도 4 참조). LPS에 의해 활성화된 NF- κ B가 핵으로 들어가서 유전자의 발현을 유도함은 알려져 있으므로, LPS로 유도된 NF- κ B p65 핵 전좌(nuclear translocation)에 대한 실로스타졸의 영향을 실험하였다(도 4A 참조). 공초점 이미지는 NF- κ B p65가 정상적으로는 세포질에 격리(도 4A의 Medium 참조)되어 있으나, LPS로 RAW 264.7 대식세포를 자극한 후, NF- κ B p65의 핵 내 축적이 강하게 유도됨을 보여주었다(도 4A의 LPS 참조). LPS로 유도된 NF- κ B p65의 전좌가 실로스타졸을 전 처리함으로써 완전하게 파괴되었다(도 4A의 LPS+cilostazol 참조). LPS 자극 없이 실로스타졸만을 전 처리한 경우, 상기 세포들에서는 NF- κ B p65의 핵 전좌는 유도되지 않았다(도 4A의 cilostazol

참조). 상기 결과는 실로스타졸이 LPS 자극으로 유도된 NF- κ B p65의 전좌를 억제하는 효과를 가짐을 보여주었다.

[0081] 다음으로, EMSA로 NF- κ B의 DNA 결합 활성에 있어서의 실로스타졸의 영향을 측정하였다. LPS는 NF- κ B의 DNA 결합 활성의 상당한 증가를 야기하였다(도 4B 참조). 이와 대조적으로, 실로스타졸의 처리는 LPS로 유도된 증가된 NF- κ B의 DNA 결합 활성을 상당히 감소시켰다(도 4B 참조). 즉, 상기 실험으로 LPS로 자극된 활성화된 RAW 264.7 대식세포에서, 실로스타졸의 처리는 LPS로 유도된 NF- κ B의 DNA 결합 활성을 감소시키므로, RAW 264.7 대식세포에서의 NF- κ B 신호경로가 억제되어 전염증성 매개체의 하향 조절되며, 항염증 활성을 가져, 폐혈증 및 폐혈증성 쇼크 예방 및 치료에 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0082] (4) LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에 있어서 MAP 키나아제의 인산화에 대한 실로스타졸의 영향

[0083] MAP 키나아제는 세포 반응의 조절에 중요한 역할을 한다. 실로스타졸의 LPS로 유도된 염증성 사이토카인의 생성 억제 매커니즘에 MAP 키나아제 경로가 포함되는지 여부를 알아보기 위하여, LPS로 자극된 RAW 264.7 대식세포에서 ERK-1/2, p38 및 JNK/SAPK의 활성화에 대한 실로스타졸의 영향을 실험하였다(도 5 참조). LPS에 의한 자극으로 ERK-1/2, p38 및 JNK/SAPK의 인산화가 유도된 반면, 상기 세포에 실로스타졸을 처리할 경우, 투여량 의존적인 방식으로 ERK-1/2, p38 및 JNK/SAPK MAP 키나아제 활성이 상당히 감소되었다. 상기 결과는 실로스타졸이 ERK-1/2, p38 및 JNK/SAPK MAP 키나아제 신호전달 경로를 억제시킴으로써 LPS로 유도된 전염증성 사이토카인 발현을 억제시킬 수 있음을 보여준다.

[0084] (5) 마우스에서의 LPS로 유도된 폐혈증성 쇼크에 대한 실로스타졸의 억제 효과

[0085] 생체 내의 실로스타졸의 항염증 효과를 검증하기 위하여, 치명적인 내독소혈증(lethal endotoxemia)을 갖는 마우스의 생존율에 대한 실로스타졸의 영향을 실험하였다. 상기 마우스에 LPS(20mg/kg, 도 6a 참조)를 주입하기 전, 16시간 및 30분에 실로스타졸 또는 비히클(vehicle)을 처리하였다. LPS 투여는 하루 이내에 모든 마우스의 죽음을 야기 시켰다. 실로스타졸을 낮은 투여량(1mg/kg)으로 처리할 경우 보호 효과를 가지지 않았다. 반면, 5 mg/kg의 실로스타졸의 투여는 LPS를 주입한 동물의 생존율(90%)을 상당히 향상시켰다.

[0086] 몇몇 내독소혈증 모델에서 전염증성 사이토카인이 폐혈증성 쇼크의 중요 매개체임이 밝혀져 있으므로, 마우스의 혈청 내의 LPS로 유도된 사이토카인에 대한 실로스타졸의 영향을 실험하였다(도 6b 참조). LPS로 자극된 마우스에 있어서의 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 의 혈청 내 농도를 측정하였다. 5mg/kg의 실로스타졸의 투여로 LPS로 유도된 혈청 내에 증가된 사이토카인이 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0087] 폐혈증 및 다발성 장기부전(MOF)의 병리학적 상태에 있어서의 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 와 같은 사이토카인의 역할과 내독소 또는 LPS가 파종성 혈관내 응고(disseminated intravascular coagulation, DIC), 전신성 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome)을 야기한다는 것은 알려져 있다. DIC는 심각한 임상 상태로, 전형적으로 장기부전 및 출혈이 나타나며, 높은 치사율을 보인다. 따라서, 조직 손상에 대한 실로스타졸(5mg/kg)의 영향을 실험하기 위하여, LPS 주입 후, 실험동물로부터 조직을 적출하였다(도 6c 참조). 다양한 조직에서의 폐혈증성 쇼크로 유도된 형태학적 변화(morphological change)를 관찰하였다. 식염수로 처리한 동물로부터 수득한 조직절편과 비교할 때(도 6c의 Saline 참조), LPS에 노출된 마우스로부터 수득한 조직절편에서, 염증성 세포의 조직 및 폐포 침윤, 및 폐부종으로 특징화되는 두드러진 염증성 변화와(도 6c의 LPS, Lung 참조), 신장 수질(renal medulla)(도 6c의 LPS, Kidney 참조) 및 간(도 6c의 LPS, Liver 참조)의 심각한 출혈(hemorrhage)이 관찰되었다. 그러나, LPS 주입 전에 실로스타졸을 처리한 LPS 주입 마우스에서, LPS로 야기되는 폐, 신장 및 간에서의 조직병리학적 변화가 감소되었다(도 6c의 LPS+Cilostazol 참조).

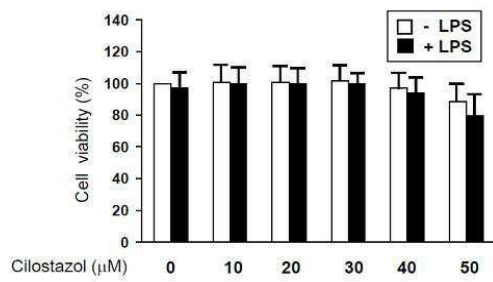
[0088] 실로스타졸의 간 보호(hepatoprotective) 효과를 측정하기 위하여, 폐혈증이 유도된 마우스에서의 혈청 내의 AST 및 ALT 수치를 측정하였다. 정상 상태에서, 간 세포에는 AST 및 ALT가 존재한다. 간 세포의 손상일 발생하면, ALT 및 AST는 혈액 내로 배출된다. 따라서, 증가된 ALT 및 AST 수치는 세포손상과 관련된 증가된 막 투과성의 병리학적 증후(pathological manifestation)를 나타낸다. LPS 처리를 처리한 대조군의 마우스의 ALT 및 AST 평균 수치는 각각 65 IU/L 및 302 IU/L로, LPS 처리 후 6시간 이내에 ALT 및 AST 수치가 급격하게 증가함을 보여주었다(도 6d 참조). 반면에 LPS 처리전에 실로스타졸을 처리한 마우스의 ALT 및 AST 평균 수치는 각각 34 IU/L 및 173 IU/L을 나타냈다. 이는 조직학적 검사 결과와 일치하는 결과로, 실로스타졸은 ALT 및 AST 수치를 낮추는 효과를 보여주었다. 상기 결과는 실로스타졸이 LPS로 유도된 병리학적 변화를 약화시킨다는 것과 실로스

타졸이 생체 밖 및 생체 내 모두에서 항염증 작용을 할 수 있음을 보여준다.

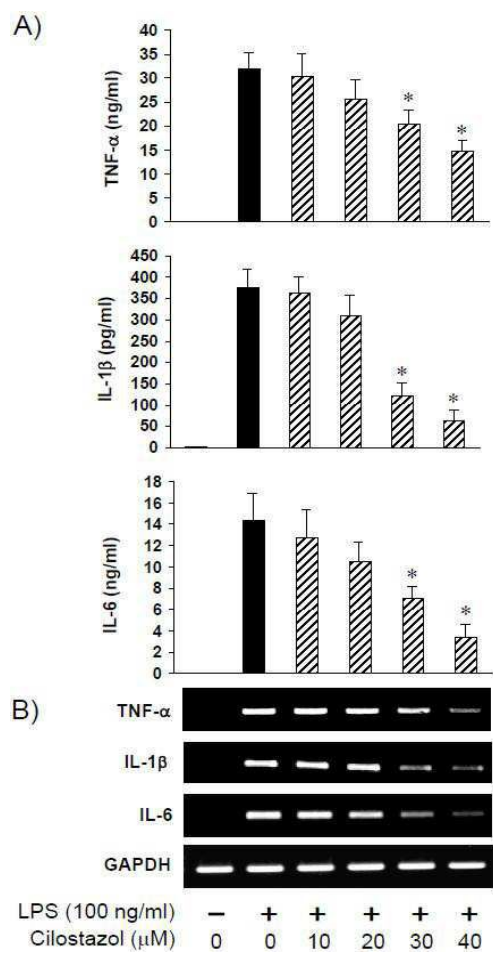
- [0089] 실로스타졸의 폐부종 억제 효과를 측정하기 위하여 상기 마우스의 부종폐/건조폐(W/D) 비를 측정하였다. 상기 폐의 폐부종의 지표로서의 W/D 비는 LPS 주입 후에 3.55 ± 0.06 에서 4.05 ± 0.2 로 증가하였다. 반면 실로스타졸(5 mg/kg)을 전 처리한 마우스에서 W/D 비의 증가가 상당히 감소되어 최종 수치가 3.65 ± 0.14 를 나타냈다(도 6e 참조). 상기 결과는 실로스타졸이 LPS로 유도된 병리학적 변화를 약화시킨다는 것과 실로스타졸이 생체 밖 및 생체 내 모두에서 항염증 작용을 할 수 있음을 보여준다.
- [0090] 폐혈증성 쇼크에서 NF- κ B 활성화가 병원적 역할(pathogenic role)을 함으로, 생체 내의 NF- κ B 활성화에 실로스타졸의 억제 작용을 하는지 여부를 확인하기 위하여, 폐에서의 LPS 유도성 NF- κ B 활성화를 실험하였다(도 6f 참조). 본 실험에서, LPS로 자극된 실험군에서 실로스타졸의 전 처리(5mg/kg)는 NF- κ B 밴드의 농도를 상당히 감소시켰다.
- [0091] 본 발명의 실시예들을 통하여, 실로스타졸이 세포 수준에서 MAPK 및 NF- κ B활성을 하향 조절하여, IL- β , IL-6 및 TNF- α 의 발현을 억제하므로, 폐혈증 또는 폐혈증성 쇼크의 주 증상인 전신성 염증 반응과 관련된 과다한 염증 반응을 조절할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 LPS-유도 내독소 쇼크 마우스(C57BL/6 마우스) 모델을 통해 실로스타졸이 생체 내에서도 폐혈증 또는 폐혈증성 쇼크의 전신성 염증 반응을 억제하며 폐, 신장 및 간 조직 손상을 억제시킬 수 있음을 입증하였다. 따라서, 실로스타졸 및 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물이 폐혈증 또는 폐혈증성 쇼크의 예방, 치료 또는 개선 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0092] 이하, 본 발명의 실로스타졸을 함유하는 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함은 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0093] <제제예 1> 산제의 제조
- [0094] 실로스타졸 20mg, 유당 100mg 및 탈크 10mg을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0095] <제제예 2> 정제의 제조
- [0096] 실로스타졸 20mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2 mg을 혼합한 후 통상의 정제의 제조 방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0097] <제제예 3> 캡슐제의 제조
- [0098] 실로스타졸 20mg, 옥수수전분 100mg, 유당 100mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조 방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0099] <제제예 4> 에어로졸의 제조
- [0100] 실로스타졸 10mg, 에탄올 100mg, 클로로디플루오로메탄 300mg의 성분을 갖는 에어로졸 용액을 제조하였다.
- [0101] <제제예 5> 주사제의 제조
- [0102] 실로스타졸 10mg과 염화나트륨 90mg을 주사용 증류수 적량에 용해시켜 주사제(처방 100ml)를 제조하였다.
- [0103] <제제예 6> 건강식품의 제조
- [0104] 실로스타졸 10mg, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B 1 0.13mg, 비타민 B 2 0.15mg, 비타민 B 6 0.5mg, 비타민 B 12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg), 무기질 혼합물 적량(황산제 1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산마그네슘 25.3mg, 제1 인산칼슘 15mg, 제2 인산칼슘 55mg, 구연산칼슘 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.
- [0105] <제제예 7> 건강음료의 제조
- [0106] 실로스타졸 10mg, 구연산 1000mg, 올리고당 100g, 매실농축액 2g, 타우린 1g 및 정제수를 가하여 전체 900ml가 되도록 하며, 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 채득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하였다.

도면

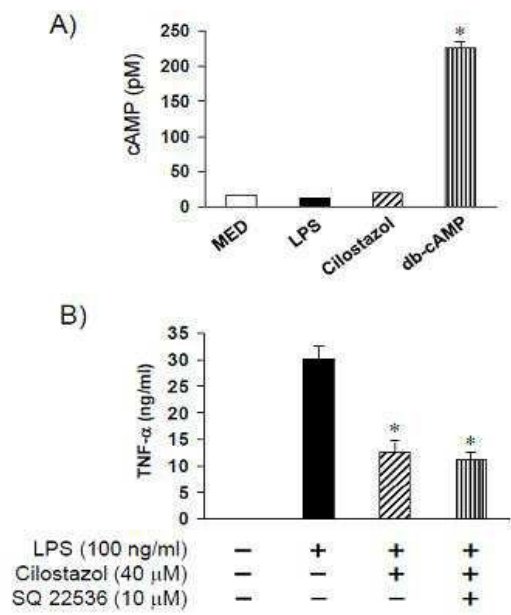
도면1



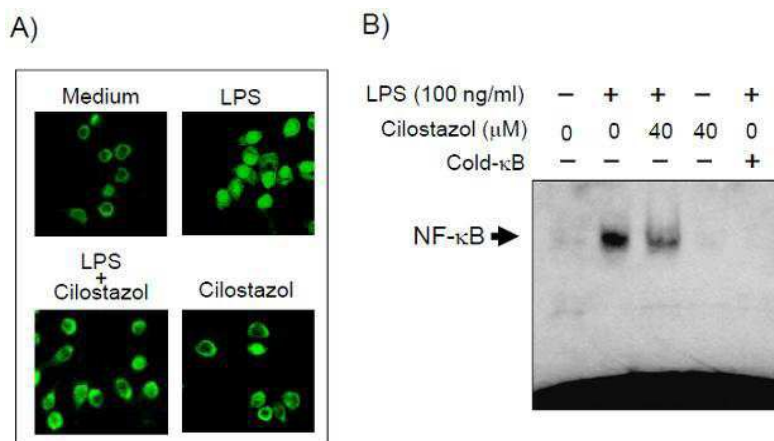
도면2



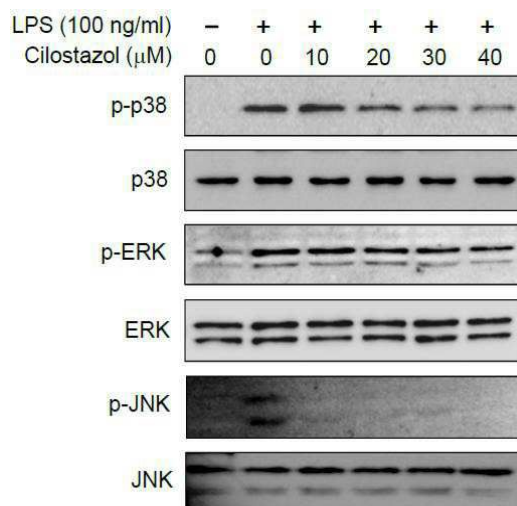
도면3



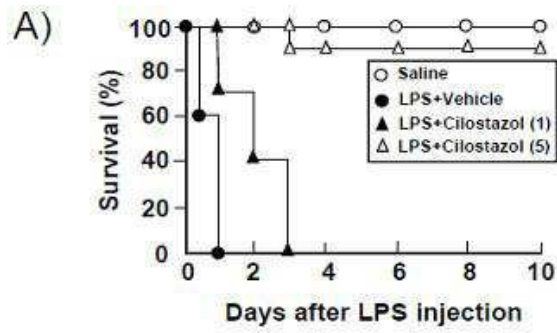
도면4



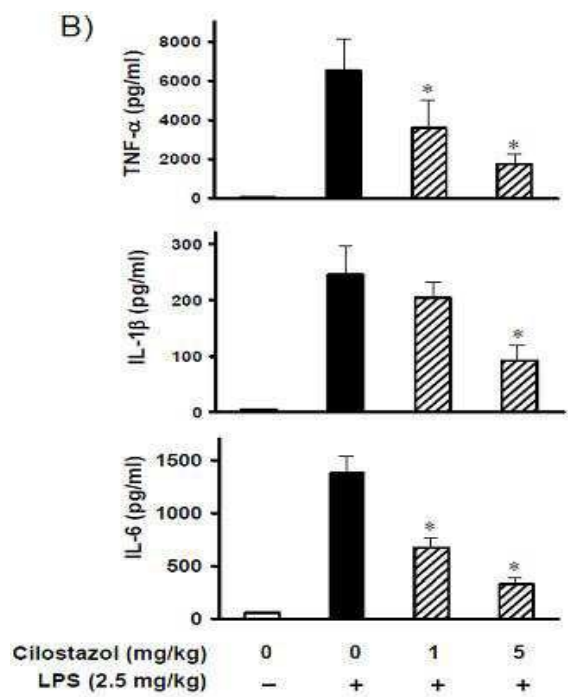
도면5



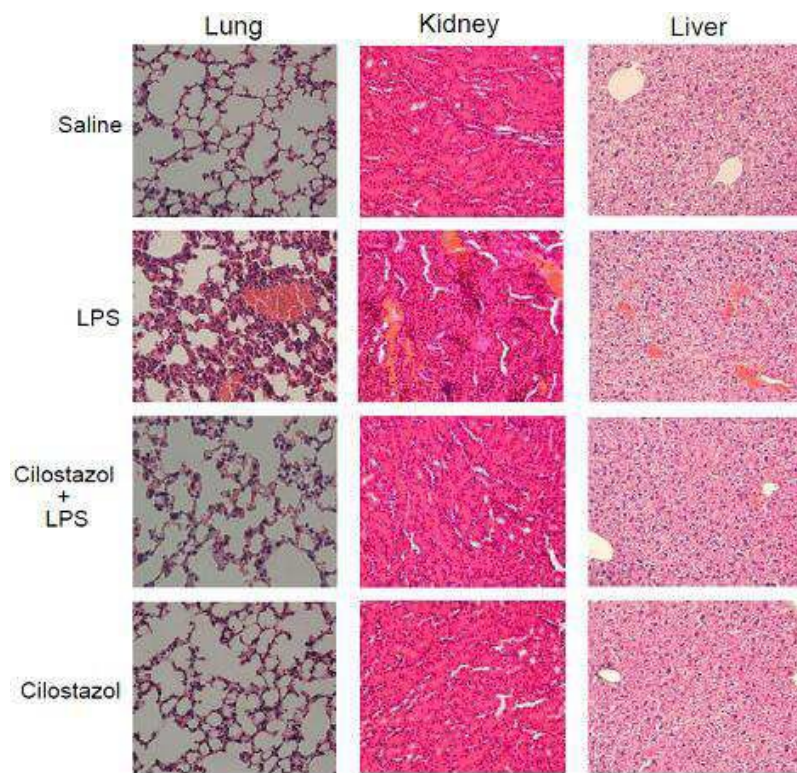
도면6a



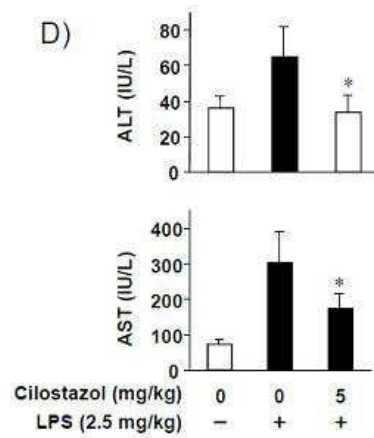
도면6b



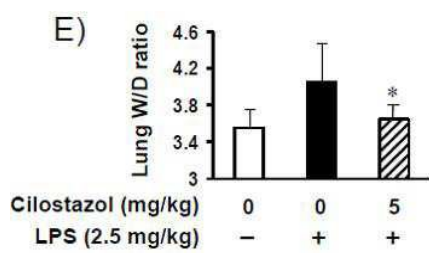
도면6c



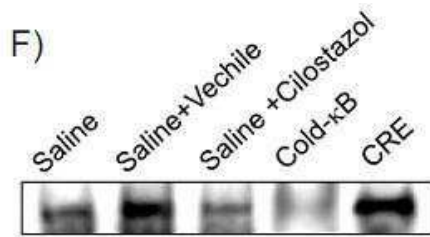
도면6d



도면6e



도면6f



서 열 목 록

- <110> Inje University Industry-Academic Cooperation Foundation
Chosun Univesity Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING AND PREVENTING SEPSIS OR
SEPTIC SHOCK COMPRISING CILOSTAZOL OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE
SALTS THEREOF
- <130> DP-2010-0369
- <160> 9
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> immunoglobulin kappa-chain binding site
- <400>
1
ccggttaaca gagggggcctt tccgag 26
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> forward primer for amplification tumor necrosis
factor-alpha(TNF-alpha) gene in mouse
- <400> 2
atgagcacag aaagcatgat c 21
- <210> 3
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification tumor necrosis
factor-alpha(TNF-alpha) gene in mouse

<400> 3

tacaggcttg tcactcgaat t 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification interleukin-1beta(IL-1beta) gene
in mouse

<400> 4

ctcgtgctgt cggaccata t 21

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification interleukin-1beta(IL-1beta) gene

in mouse

<400> 5

ttgaagacaa accgcttttc ca 22

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification interleukin-6(IL-6) gene in
mouse

<400> 6

gaaggactct ggctttgtct t 21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification interleukin-6(IL-6) gene in

mouse

<400> 7

tgggaaatcg tggaaatgag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification GAPDH gene in mouse

<400> 8

ttcaccacca tggagaaggc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification GAPDH gene in mouse

<400> 9

ggcatggact gtggtcatga 20