(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016 년 10 월 13 일 (13.10.2016)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2016/163818 A2

(51) 국제특허분류:
A61K 31/05 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01) *A61K 9/48* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003728

(22) 국제출원일: 2016 년 4 월 8 일 (08.04.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0050411 2015 년 4 월 9 일 (09.04.2015) KR

(71) 출원인: **충북대학교 산학협력단 (CHUNGBUK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 28644 충청북도 청주시 서원구 충대로 1, Chungcheongbuk-do (KR).

(72) 발명자: **홍진태 (HONG, Jin Tae)**; 28162 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 1 로 152, 802-1801, Chungcheongbuk-do (KR). **이희범 (LEE, Hee Pom)**; 28160 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 3 로 31, 101-1827, Chungcheongbuk-do (KR). **함영완 (HAM, Young Wan)**; 84057 유타주 오렘시 웨스트 320 노스 1705, Utah (US). **김춘식 (KIM, Chun Sik)**; 28363 충청북도 청주시 흥덕구 비하로 57 번길 37, 206-1201, Chungcheongbuk-do (KR). **정헌상 (JUNG, Heon Sang)**; 28114 충청북도 청주시 흥덕구 옥산면 덕촌덕절길 48-35, Chungcheongbuk-do (KR). **김대환 (KIM, Dae Hwan)**; 28609 충청북도 청주시 서원구 경신로 67, 102-606, Chungcheongbuk-do (KR).

(74) 대리인: **특허법인 다래 (DARAE IP FIRM)**; 06133 서울시 강남구 테헤란로 131, 10 층 (역삼동, 한국지식재산센터), Seoul (KR).

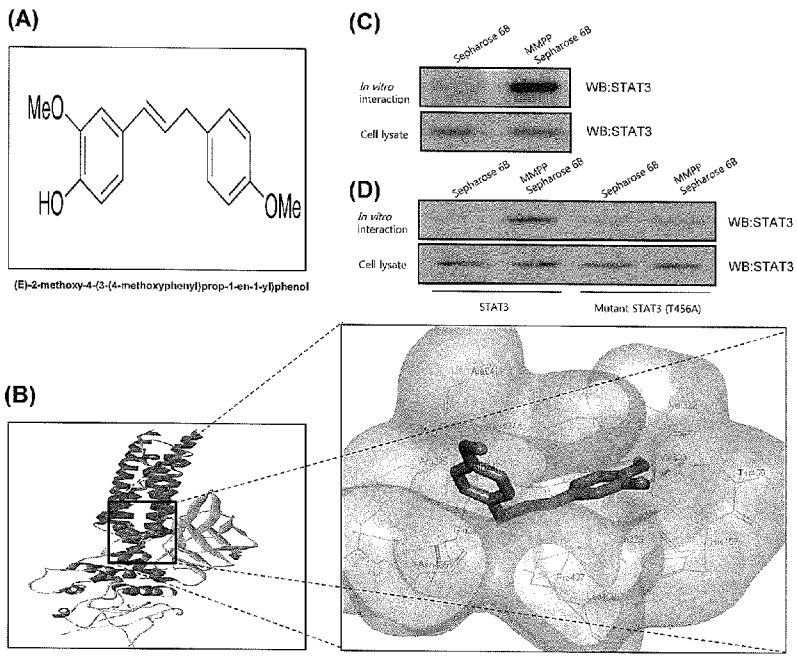
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ARTHRITIS OR INFLAMMATORY DISEASE CONTAINING 2-METHOXY-4-(3-(4-METHOXYPHENYL)PROPYL-1-EN-1-YL)PHENOL AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 또는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating arthritis or an inflammatory disease, the composition containing 2-methoxy-4-(3-(4-methoxyphenyl)propyl-1-en-1-yl)phenol or a pharmaceutically acceptable salt thereof as an active ingredient. The pharmaceutical composition according to the present invention exhibits excellent therapeutic efficacy for arthritis without side effects such as toxicity.

(57) 요약서: 본 발명은 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 또는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 관절염에 대해 독성 등의 부작용 없이 우수한 치료 효능을 발휘한다.

WO 2016/163818 A2

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))

명세서

발명의 명칭: 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 또는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 신규한 구조의 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀의 염증성 질환 또는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 염증은 손상이나 박테리아, 곰팡이, 바이러스 등 외부 감염원에 의해 자극되어 각종 염증 매개 인자 및 면역 세포에 의한 효소의 활성화, 염증 매개물질 분비, 체액 침윤, 세포의 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응이 일어나는 것을 말하며, 이로 인해 홍반, 부종, 발열, 통증 등과 같은 증상이 수반된다.

[3] 이와 같이 감염, 외상 등에 의해 손상된 조직의 구조와 기능을 복원하기 위한 생체의 방어 반응을 통칭하여 염증 반응이라 한다.

[4] 염증 부위로의 백혈구 세포의 이동은 감염에 대한 신속한 해결 및 다양한 외상으로부터 발생하는 조직 손상을 복구하는데 중요하다. 그러나 외부 감염원이 제거되지 않거나, 내부 물질이 원인이 되는 등 과도하거나 지속적인 염증 반응은 인체 조직의 손상과 암, 염증성 피부 질환, 관절염 등의 질환을 야기한다.

[5] 염증성 질환은 증상이나 병리학적 특징이 구분되는 급성 및 만성 염증성 질환으로 분류된다. 알러지나 세균과 바이러스의 감염과 같은 급성 염증의 국소적 증상은 혈류 및 혈관 크기의 변화, 혈관 투과성의 변화 및 백혈구의 침윤 등으로 나타난다.

[6] 이에 반하여 류머티스성 관절염, 죽상 동맥경화증. 만성 신장염, 간경화증 등을 비롯한 만성 염증의 주요 병리학적 특징은 염증 유발 요인이 제거가 되지 않아 염증부위로 단핵구, 호중구, 림프구, 형질세포들이 지속적으로 침윤하는 것으로, 그 결과 염증 반응이 만성화된다.

[7] 염증성 질환의 염증 반응에는 여러 인자가 관여하고 있다. 구체적으로, 염증 부위에서 발현되는 염증 매개 인자에는 싸이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 활성산소 중간생성물, 싸이클로옥시게나아제-2(cycloxygenase-2, COX-2), 5-리폭시게나아제(5-lipoxygenase, 5-LOX), 매트릭스 매탈로프로티나아제(matrix metalloproteinase, MMP) 등이 있으며 염증 반응의 발생 및 유지에 중요한 역할을 한다.

[8] 이러한 염증 매개 인자들의 발현은 전사인자인 NF-κB(nuclear factor κB),

STAT3(signal transducer and activator of transcription 3), AP-1(activator protein1), HIF-1a(hypoxia-inducible factor 1a) 등에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다.

[9] 일례로, 본 발명자들은 대한민국 특허공개 제2012-0094308호에서 2,4-비스(p-하이드록시페닐)-2-부텐알이 NF-κB의 불활성화를 유도하여 항염증 또는 항관절염 효과를 갖는 의약품으로 사용될 수 있음을 제안한 바 있다.

[10] 또한, 대한민국 특허공개 제2014-0093435호는 클로로겐산 유도체가 과도한 산화질소 생성을 억제하며 NF-κB의 활성을 저해하여 효과적인 항염증 활성을 갖는 염증성 질환 치료제로 사용될 수 있음을 언급하고 있다.

[11] 한편, NF-κB와 함께 STAT3 또한 염증성 및 면역 반응과 관련된 중요한 전사인자이다.

[12] 대표적인 염증성 질환인 관절염은 STAT3의 활성 억제를 통해 치료 및 예방이 가능하다.

[13] 관절염은 대표적인 연골 관련 질환으로 관절에 어떤 원인에 의해서든 염증성 변화가 생긴 것을 총괄해서 지칭하는 병명으로 뼈와 뼈 마디를 연결하여 매끈하게 움직이게 하는 연골이 소실되는 것을 말한다.

[14] 관절염은 퇴행성관절염 또는 골관절염, 류머티스성 관절염, 대퇴골두 무혈성괴사, 외상성 관절염, 결핵 및 화농성 관절염 등 여러 종류로 나뉜다. 현재, 우리나라에서 100만명 정도의 관절염 환자가 있으며, 여성이 남성보다 배 이상 많고 그 중에서도 특히 갱년기 여성에게서 많이 볼 수 있는 질환이다.

[15] 그중 골관절염(퇴행성 관절염)은 관절을 구성하는 여러 가지 성분 중에서 연골과 그 주위의 뼈에 퇴행성 변화가 나타나서 생기는 관절염으로 주로 체중을 많이 받는 관절, 즉 무릎 관절, 엉덩이 관절 등에 심한 통증이 나타나고 움직이기가 힘들어지며 오랫동안 방치할 경우 관절의 변형까지 초래하는 관절 질환이다.

[16] 골관절염은 노령화와 밀접한 연관을 갖는 대표적인 퇴행성 질환으로, 전 인구의 10~15% 정도가 앓고 있으며, 특히 65세 이상의 고령인구 중 60~80% 정도가 골관절염을 앓고 있다. 골관절염의 원인은 노쇠 현상이나 과다한 체중과 관계가 깊으며, 나이가 많아질수록 여성에게서 더 많이 그리고 더 심하게 나타난다. 초기 증상은 한 개 또는 두 개의 관절이 강직과 함께 쑤시는 듯한 동통이 나타나며, 장기화되면 관절의 변형 등을 초래하게 된다.

[17] STAT3와 관련한 관절염에 치료 효과는 다양한 문헌에서 제시하고 있다[*Jun*-Geol Ryu et al., Treatment of IL-21R-Fc control autoimmune arthritis via suppression of STAT3 signal pathwaymediated regulation of the Th17/Treg balance and plasma B cells, *Immunol*. Lett. 2015, 163(2), 143-150; *Boyle DL et al.,* The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid arthritis, *Ann Rheum* Dis. 2014 Nov 14; *JooYeon* Jhun et al., Red ginseng extract ameliorates autoimmune arthritis via regulation of STAT3 pathway, Th17/Treg balance, and osteoclastogenesis in mice and human., *Mediators* Inflamm. 2014; 2014:351856; *Seon*-

Yeong Lee et al., Interleukin-17 increases the expression of Toll-like receptor 3 via the STAT3 pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes, *Immunology*. 141(3), 353-361; *Jin*-Sil Park et al., JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation ofregulatory T Cells and Th17 cells, *J.* Immunol. 2014, 192(9), 4417-4424; *Eun*-Ji Yang et al., EGCG attenuates autoimmune arthritis by inhibition of STAT3 and HIF-1 α with Th17/Treg control. *PLoS One*. 2014, 9(2), e86062].

[18] 종래 관절염에 대한 일반적인 치료 방법은 진통제, 스테로이드제, 비스테로이드계 항염제 등의 약물 치료제 또는 글루코사민, 콘티로이틴 등의 연골 보호제를 이용하거나 인공관절 치환술 등의 수술적 처치 등이다. 약물 치료제의 경우, 통증이나 염증 반응 자체를 비특이적으로 완화시키고, 연골 보호제는 연골 세포에 영양을 공급해 주거나 충격을 완화시킴으로써 관절의 기능 소실을 최소화한다. 그러나 약물을 통한 치료는 통증을 감소시키는 목적이 크고, 약물에 의한 여러 장기의 기능 저하, 우울증, 세균 감염 등의 심각한 부작용이 발생할 수 있다.

[19] 따라서 부작용이 적고 안전성이 높고 효과적인 관절염 치료법의 지속적 개발이 요구되고 있다. 또한, 최근 고령화 사회로 진입하면서 인구 노령화가 급속이 진행됨에 따라 관절염 치료제 시장을 지속적인 증가 추세를 보이고 있다.

[20] 현재까지 관절염 치료제는 주로 생물학적 제제 개발이 신약개발 연구의 주류를 이루고 있으며 병인 기전에 근거한 TNF-α 억제제 개발 후 획기적인 치료 효과로 단기간 내에 높은 매출을 달성하였고 고부가 가치를 창출하였다.

[21] 일례로, 대한민국 특허등록 제10-1126164호는 온울금으로부터 추출된 정유를 유효성분으로 하며 TNF-α 생성을 억제하여 항염 활성을 가지며 관절염과 같은 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 조성물로 사용될 수 있음을 언급하였다.

[22] 또한, 대한민국 특허등록 제10-1201549호는 두충 추출물을 유효성분으로 함유하여 항염증 활성과 파골세포 억제 효과를 갖는 류머티스성 관절염 치료제로서 사용될 수 있음을 언급하였다.

[23] 이들 특허들은 주로 생약 제제로 복용시 안정성은 높으나 관절염에 있어 근본적인 치료 효과를 기대하기 어렵다.

[24] [선행기술문헌]

[25] [특허문헌]

[26] (특허문헌 1) 대한민국 특허공개 제2012-0094308호

[27] (특허문헌 2) 대한민국 특허공개 제2014-0093435호

[28] (특허문헌 3) 대한민국 특허등록 제10-1126164호

[29] (특허문헌 4) 대한민국 특허등록 제10-1201549호

[30] [비특허문헌]

[31] (비특허문헌 1)Jianzhang Wu et al., Evaluation and Discovery of Novel Synthetic Chalcone Derivatives as Anti-Inflammatory Agents, J. Med. Chem. 2011, 54,

8110-8123

[32] (비특허문헌 2)Liping Cai et al., PATHWAYS BY WHICH INTERLEUKIN 17 INDUCES ARTICULAR CARTILAGE BREAKDOWN IN VITRO AND IN VIVO, Cytokine. 2001, 16(1), 10-21

[33] (비특허문헌 3)Jung Ok Ban et al., Anti-arthritis effects of(E)-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)-2-butenal are mediated by inhibition of the STAT3 pathway, Br. J. Pharmacol. 2014, 171(11), 2900-2912

[34] (비특허문헌 4)Jun-Geol Ryu et al., Treatment of IL-21R-Fc control autoimmune arthritis via suppression of STAT3 signal pathwaymediated regulation of the Th17/Treg balance and plasma B cells, Immunol. Lett. 2015, 163(2), 143-150

[35] (비특허문헌 5)Boyle DL et al., The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid arthritis, Ann Rheum Dis. 2014 Nov 14

[36] (비특허문헌 6)JooYeon Jhun et al., Red ginseng extract ameliorates autoimmune arthritis via regulation of STAT3 pathway, Th17/Treg balance, and osteoclastogenesis in mice and human., Mediators Inflamm. 2014; 2014:351856

[37] (비특허문헌 7)Seon-Yeong Lee et al., Interleukin-17 increases the expression of Toll-like receptor 3 via the STAT3 pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes, Immunology. 141(3), 353-361

[38] (비특허문헌 8)Jin-Sil Park et al., JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation ofregulatory T Cells and Th17 cells, J. Immunol. 2014, 192(9), 4417-4424

[39] (비특허문헌 9)Eun-Ji Yang et al., EGCG attenuates autoimmune arthritis by inhibition of STAT3 and HIF-1 α with Th17/Treg control. PLoS One. 2014, 9(2), e86062

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[40] 이에 본 출원인은 신규한 구조의 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀을 합성하였고, 상기 화합물이 STAT3의 활성 기전에 영향을 미친다는 사실을 확인하고 이의 용도에 대한 다양한 실험을 수행한 결과 관절염을 비롯한 다양한 염증성 질환에 사용할 경우 치료 및 예방 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[41] 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 구조의 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

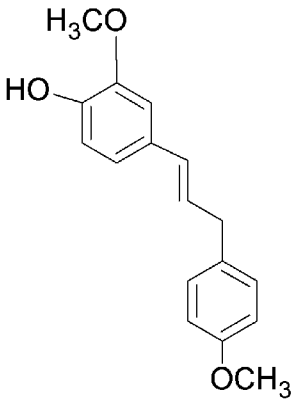
[42] 본 발명의 다른 목적은 신규한 구조의 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀 또는 이의 약학적으로 허용

가능한 염을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

과제 해결 수단

[43] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[44] [화학식1]



[45] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[46] 이때, 상기 조성물은 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[47] 본 발명에 따른 조성물은 STAT3와 관련된 모든 염증성 질환, 특히 관절염에 대해 독성 등의 부작용 없이 우수한 치료 효능을 발휘한다.

도면의 간단한 설명

[48] 도 1은 NF-κB 및 STAT3 경로 메커니즘을 보여주는 모식도이다.

[49] 도 2는 MMPP와 STAT3 간의 컴퓨터 도킹 실험결과를 보여주는 것으로,(A)는 MMPP 화학구조식,(B)는 MMPP와 STAT3의 DNA 결합 도메인 간의 3차원 모델링 결합 이미지,(C)는 MMPP와 STAT3의 풀다운 어세이 실험 결과이고,(D)는 결합된 STAT3 와 돌연변이 STAT3(T456A)의 풀다운 어세이 실험 결과이다.

[50] 도 3은 STAT3 경로 관여를 통한 MMPP 항염증효과에 대한 실험인 실험예 3의 결과로,(A)는 LPS 농도에 따른 NO 생성 실험결과이고,(B)는 iNOS, COX2의 실험 결과이고,(C)는 STAT3 및 NF-κB의 DNA 결합 활성을 보여주는 실험 결과이다.

[51] 도 4는 LPS-유도된 NO 생성, iNOS 및 COX-2의 발현, 세포생존능에 대한

MMPP의 억제효과 실험인 실험예 4의 결과로,(A)는 MMPP 농도에 따른 iNOS 활성을 보여주는 실험 결과이고,(B)는 MMPP 농도에 따른 NO 생성 실험결과이고,(C)는 iNOS, COX2 발현 실험 결과이고,(D)는 MMPP 농도에 따른 세포 생존능을 보여주는 이미지 및 그래프이다.

[52] 도 5는 실험예 4의 결과로, MMPP 농도에 따른(A)는 STAT3 루시퍼라제 활성 그래프이고,(B)는 과산화수소 생성 관련 결과 그래프이고,(C)는 PGE2 관련 결과 그래프이고,(D)는 IL-1β 그래프이고,(E)는 TNF-α 결과 그래프이고,(F)는 IL-6 관련 결과 그래프이다.

[53] 도 6는 실험예 5의 결과로,(A)는 MMPP 농도에 따른 STAT3의 DNA 결합활성 실험결과이고,(B)는 MMPP 농도에 따른 NF-κB 의 DNA 결합활성 실험결과이고,(C)는 STAT3 의 DNA결합활성 이미지이고,(D)는 MMPP 농도에 따른 STAT3, p-STAT3, p50, p65, IKK, p-IKK, IkB, p-IkB 실험결과이다.

[54] 도 7은 실험예 6의 결과로,(A)는 MMPP 유무에 따른 STAT3 및 NF-κB 활성 관련그래프 및 이미지이고,(B)는 MMPP 유무에 따른 iNOS, COX2관련 그래프 및 실험 결과이다.

[55] 도 8은 실험예 7의 결과로, TNF-α 존재 하에 (A)는 MMPP 유무에 따른 NO 및 과산화수소 결과 그래프이고,(B)는 iNOS, COX2 관련 그래프 및 이미지이고,(C)는 STAT3 활성 관련 실험결과이며,(D) NF-κB 활성 관련 실험결과이다.

[56] 도 9 실험예 8 결과로, LPS 및 TNF-α 존재 하에 MMPP 유무에 따라(A)는 NO 및 과산화수소 결과 그래프이고,(B)는 iNOS, COX2 관련 그래프 및 이미지이고,(C)는 STAT3 활성 관련 웨스턴 블롯 결과이며(D)는 NF-κB 활성 관련 실험결과이다.

[57] 도 10는 실험예 9의 결과로,(A)는 마우스의 발목 관절의 임상학 평가를 위한 사진이고,(B)는 이의 스코어,(C)는 염색 이미지,(D)는 iNOS 및 COX2의 이미지이다.

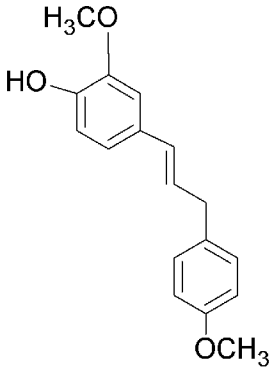
[58] 도 11은 실험예 9의 결과로,(A) 내지(C)는 MMPP 존재에 따른 STAT3 루시퍼라제 활성, 과산화수소 생성 및 PGE2를 보여주는 그래프이다.

[59] 도 12는 CAIA-유도 C57BL/6 마우스에서의 NF-κB 및 STAT3에 대한 MMPP 억제효과에 대한 실험결과로, (A)및 (B)는 NF-κB 및 STAT3의 DNA 결합활성에 대한 실험결과이고, (C) 및 (D)는 STAT3, p-STAT3, p50,p65, IKK, p-IKK, IkB, p-IkB 에 대한 실험결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

[60] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 신규한 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀의 새로운 용도를 제시한다:

[61] [화학식 1]

[62] 

[63] 상기 유효성분은 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀(2-methoxy-4-(3-(4-methoxyphenyl)prop-1-en-1-yl)phenol, 이하 'MMPP'라 한다)로 명명되며, 분자식이 $C_{17}H_{18}O_3$이고, 분자량이 270.3 g/cm^{3}를 갖는다.

[64] 상기 MMPP는 이의 광학 이성질체, 입체 이성질체, 다형체, 라세미 혼합물, 용매화합물, 수화물, 대사물질 및 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 바람직하기로 MMPP는(*E*)-2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀일 수 있다.

[65] 상기 MMPP는 STAT3(signal transducer and activator of transcription3)의 활성에 관여한다.

[66] STAT3는 활성화되지 않은 형태로 세포질(cytoplasm) 내에 존재하는 단백질로 'DNA 결합 인자'라고 불리는 그룹의 일부로 DNA 염기서열에 결합하며, DNA에 있던 유전정보를 RNA로 옮기는 전사의 과정을 조절하는 역할을 한다.

[67] 이에 STAT3은 염증 반응뿐만 아니라 면역 반응에 관여하여 관절염이나 암과 관련하여 중심적인 역할을 한다.

[68] 염증 반응과 관련하여, STAT3는 염증성 관절염에서 IL-6 유도 활액 침투에 결정적인 역할을 하며 산화제나 NO, iNOS, COX-2, IL-6, IL-1과 같은 염증 매개체들의 발현을 직접적으로 조절하는데 중요한 인자이다.

[69] STAT3의 활성화는 다양한 성장인자와 사이토카인에 의해 STAT3 전사활성 도메인(transactivation domain) 내의 티로신 잔기(tyrosine residue)가 인산화됨으로써 이루어진다. 이 인산화된 STAT3(p-STAT3)가 핵(nucleus) 안으로 들어가 염증 반응 및 종양 형성에 관련된 광범위한 표적 유전자의 발현을 유도한다.

[70] 특히, STAT3는 NF-κB와 상호작용하며 염증과 면역 반응에 관여하는 중요한 전사인자이다.

[71] STAT3는 iNOS 유전자의 전사 활성을 억제시키는 NF-κB의 p65와 복합체를 형성하여 물리적, 기능적 상호작용을 하며 이후 염증 매개체 및 사이토카인들과 함께 세포들을 자극한다. 이들 NF-κB와 STAT3가 일단 활성화되면 항세포 자멸사, 증식 촉진 및 면역 반응 유전자들의 발현을 조절한다.

[72] 본 발명에서는 화학식 1의 화합물이 발현 전 단계에서 IKK 및 STAT3의 활성을

억제시켜 TNF-α의 생성을 근본적으로 차단하여 기존 치료제의 단점인 TNF-α직접 저해로 인한 부작용 없이 다양한 염증성 질환에 대한 치료 및 예방 효과를 확보할 수 있다.

[73] 화학식 1의 화합물이 적용될 수 있는 염증성 질환은 발병 원인에 무관하며 NO, iNOS, COX-2, PGE2, TNF-α, lkB, 등과 같이 일련의 염증 반응을 일으키는 다양한 자극 요인들로 인하여 유발된 염증을 동반하는 질환을 포함하는 개념이다.

[74] 구체적으로는 상기 염증성 질환은 이에 제한되지 않으나, 패혈증, 패혈성 쇼크; 류머티스성 관절염, 골관절염, 강직 척추염; 혈관염, 흉막염, 심장막염, 허혈 관련 염증, 염증성 동맥류; 신장염; 간염; 만성 폐염증성 질환; 기관지 염증, 비염; 피부염; 위염; 대장염, 과민성 대장증후군; 감염에 의한 열 및 근육통으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[75] 바람직하기로, 상기 화학식 1의 화합물은 특히 관절염의 예방 또는 치료에 효과를 가진다. 상기 관절염은 이에 제한되지는 않으나, 골관절염, 류머티스성 관절염 및 화농성 관절염일 수 있고, 특히 류머티스성 관절염일 수 있다.

[76] 류머티스성 관절염(RA)은 만성 관절 염증 및 다양한 뼈 및 연골 부식 정도에 따라 그 중증이 달라진다. 반응성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 및 염증성 반응은 RA와 관련이 있다. 이들은 인터루킨-1(IL-1), 인터루킨-6(IL-6) 및 TNF-α를 포함하는 전염증성 사이토카인의 생산에 영향을 줘 RA의 발생에 중요한 역할을 한다.

[77] 전사인자 NF-κB는 전염증성 사이토카인의 발현, 산화성 및 염증성 매개체의 생성을 조절하고, RA를 발생시키는 역할을 한다. 특히, NF-κB는 일반인과 비교하여 RA 환자들에게서 높은 수치가 관찰된다. p50 결핍 마우스는 야생 마우스와 비교하여 류머티스성 관절염의 발병이 크게 저감된다. 이와 유사하게, p65가 부족한 마우스의 경우 류머티스성 관절염 유도 골연화(osteolysis)로부터 관절 조직이 보호된다. 따라서, NF-κB는 RA 환자들에게 적절한 약제의 타깃이 될 수 있다.

[78] 류머티스성 관절염 내 만성 염증 및 관절 파괴의 주요 매개로 STAT3가 알려져 있다.

[79] RA 환자들의 활막 조직 내 강한 인산화가 일어났다. 일반인보다 RA 환자들에게서 활막 세포 및 림프구 내에서 STAT3의 과발현이 관찰되었다. 그러나 관절에서의 주요 음성 STAT3의 과발현은 효과적으로 CIA(collagen-induced arthritis) 모델을 개선한다. 더욱이, STAT3는 활액 섬유아세포 증식에 중요하고, 파골세포에 지속적인 작용을 통해 염증 및 관절 파괴를 심각하게 유도한다. STAT3 활성화는 사이토카인 증폭을 유도에 따른 RA-관련 징후의 주요 요인의 역할을 한다. 이에, 토파시티닙, 에티갈로카테킨-3-갈레이트(EGCG) 및 메토트렉세이트와 같은 여러 개의 항산화 및 항염증 화합물은 STAT3 신호의 억제를 통해 RA 치료에 효과적인

것으로 알려졌다. 예를 들어 CP690,550 처리는 STAT3 억제를 통한 사이토카인 루프를 억제하고, 이에 따라 RA의 발생을 증가시킨다. 따라서, STAT3는 잠재적 치료 타겟이 되며, RA 내 만성 염증 및 관절 파괴를 방지한다. 이는 또한 STAT3가 NF-κB가 상보적으로 상호 작용이 이루어지는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 면역 세포 내 NF-κB 및 STAT3 간의 기능적 상호 관계는 전염증 사이토카인의 생성을 조절한다. 나아가 NF-κB 및 STAT3의 상호 관계는 IL-6 생성을 통해 RA의 발생 내에서 매개되는 것으로 알려져 있다.

[80] 본 발명의 화합물은 항산화 특성이 있어 STAT3의 인산화 억제로 STAT3의 억제를 통한 항염증 반응을 갖는다. 또한, 류머티스성 관절 조직 내 뼈의 붕괴 및 섬유화를 저감시키는 효과가 있다.

[81] 본 발명의 실험예에 따르면 류머티스성 관절염을 유도한 마우스 모델에 MMPP를 투여한 결과 STAT3 경로의 억제를 통해 류머티스성 관절염을 저감할 수 있음을 확인하였다.

[82] 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 약학적 조성물로 적용할 경우, 상기 조성물은 이 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유한다.

[83] 약학적으로 허용 가능한 염은 유기산, 예를 들면 포름산, 아세트산, 프로피온산, 락트산, 부티르산, 이소부티르산, 트리플루오로아세트산, 말산, 말레산, 말론산, 푸마르산, 숙신산, 숙신산 모노아미드, 글루탐산, 타르타르산, 옥살산, 시트르산, 글리콜산, 글루쿠론산, 아스코르브산, 벤조산, 프탈산, 살리실산, 안트라닐산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 및 메탄술폰산과의 염; 무기산, 예를 들면 염산, 브롬산, 황산, 인산, 질산, 탄산 및 붕산과의 염이 포함된다.

[84] 상기 언급된 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1의 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[85] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 리튬, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은 염(예를 들면, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[86] 나아가, 아미노산을 사용하여 약학적으로 허용 가능한 염을 만들 수 있다. 아미노산염으로는 예를 들면, 글라이신, 알라닌, 페닐알라닌, 발린, 라이신, 글루타믹산 등의 천연 아미노산을 제조하는 것이 제약상 적합하다.

[87] 본 발명의 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로

허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[88] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘, 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[89] 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다.

[90] 상세하게는, 제형화 할 경우 통상 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.

[91] 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[92] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[93] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[94] 구체적으로, 본 발명의 조성물에서 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 100 mg, 바람직하게는 3 내지 30 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로

나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[95] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

[96] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 보다 구체적으로 설명하지만, 하기의 실시예들은 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 여기에 국한된 것은 아니다.

[97] 제조예 . 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀의 제조

[98] 25 ㎖의 플라스크 반응기에 4-이오도-2-메톡시페놀(4-iodo-2-methoxyphenol, 500 mg, 2.0 mmol)과 4-알릴아니솔(4-allylanisol, 313 mg, 2.0 mmol)을 넣은 후, 여기에 트리페닐 포스핀(105 mg, 0.4 mmol), $Pd(OAc)_2$(44.9 mg, 0.2 mmol), 및 트리부틸아민(451 mg, 1.9 mmol)을 첨가한 후, 45℃에서 2시간 동안 반응시켰다.

[99] 얻어진 화합물은 플래시 실리카겔 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트, 3:1, v/v)에 통과시켜 정제하여 표제 화합물(119 mg, 수율 22%, 다크 브라운 색상의 액체)을 제조하였다.

[100] - 질량 분석 HRMS(ESI) *m/z* $[M+H]^+$ cacld. 271.1329, found 271.1332

[101] - ^{1}H-NMR: d($CDCl_3$) 7.32(d, 2H, J = 8.0 Hz), 6.88(d, 1H, J = 9.0 Hz), 6.86(d, 2H, J = 9.0 Hz), 6.76(d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.75(s, 1H), 6.40(d, 1H, J = 16.0 Hz), 6.21(dt, 1H, J = 16.0 Hz, J = 6.5 Hz), 5.54(s, 1H), 3.89(s, 3H), 3.82(s, 3H), 3.48(d, 2H, 7.0 Hz)

[102] 평가 방법

[103] 본 실험예에서 사용한 방법을 하기에 정리하였다.

[104] **1. 풀다운 분석(Pull Down assay)**

[105] 풀다운 분석은 단백질 복합체를 구분해내는 방법으로 단백질-단백질 상호작용을 알아보기 위한 분석이다. MMPP와 상호작용하는 단백질을 알아보기 위해 MMPP를 시아노젠 브롬화 에폭시 활성화 세파로즈 6B(Sigma, St Louis, Missouri, United States)와 결합시켰다.

[106] **2. 플라스미드 제작:** 템플레이트로서 전장 *Mus* musculus STAT3 cDNA를 이용하여 *Mus* musculus STAT3의 코딩 영역을 PCR로 증폭시켰다. 정제된 PCR 산물을 EcoRI 및 XhoI로 double-digested 한 다음, pcDNA3.1 벡터 내로 subcloned 하였다. pcDNA3.1 플라스미드는 거대세포바이러스(cytomegalovirus) 프로모터, pUC 오리진(pUC origin), 및 앰피실린 저항 유전자를 포함한다. STAT3(T456A) 돌연 변이 유발은 Cosmogenetech(Seoul, Korea)에서 수행하였고, 돌연변이는 시퀀싱하여 조직적으로 체크하였다. RAW264.7 세포는 24-웰 플레이트당 $1x10^5$ cells 밀도로 처리하였다. 90% 융합을 위해 24시간 성장시킨 후, PTI-MEN 내 플라스미드 및 리포텍타민의 혼합물을 이용하여 상기 세포를 돌연변이

STAT3(T456A) 플라스미드(Cosmogenetech, Seoul, Korea)로 감염시켰다. 감염된 세포는 12시간 동안 LPS(1 μg/ml), 및 서로 다른 농도의 MMPP(1-4 μg/ml) 로 처리하였다. 제조된 샘플은 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[107] **3. RAW 264.7 세포 배양**. 마우스 대식세포 유사 세포주인 RAW 264.7를 American Type Culture Collection(Cryosite, Lane Cove, NSW, Australia)로부터 구입하였다. DMEM(Dulbecco's modified Eagle?s medium) 배지, 페니실린, 스트렙토마이신, 및 소태아 혈청은 Gibco Life Technologies(Rockville, MD, USA)로부터 구입하였다. RAW 264.7 세포는 10% 소태아 혈청, 100 U/ml 페니실린, 및 100 μg/ml 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지 내에 37℃에서 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

[108] **4. 인간** 활막세포 배양(Human synoviocyte culture). 순천향대 의학 센터의 의과대에서 연구 프로토콜 및 인간 조직 세포의 사용 연구를 승인하였다. 1987개정 American College of Rheumatology 분류에 따라 진단된 류머티스성 관절염의 환자로부터 세포를 얻었다. 활막 조직 샘플은 장기간 류머티스성 관절염(남성, 여성 각각 2면, 나이평균 65±21.3세, 평균 발병 기간 10년 이상) 환자의 무릎 관절로부터 얻었다; FLS(fibroblast-like synoviocytes)을 상기 언급한 바에 따라 배양하였다. 간단히, FLS는 가열 활성 FBS(Gibco Life Technologies) 및 50 U·mL-1페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 DMEM 배양 배지(Gibco Life Technologies) 내 배양 디쉬(Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)에서 배양하였다. 모든 배양 및 인큐베이터는 5% CO_2 분위기 하에서 인큐베이터 37℃에서 수행하였다. 배지는 3일마다 교환하였다. 세포는 5 및 10번째 사이의 것을 사용하였다.

[109] **5. 세포활성분석.** 세포수를 측정하기 위해 24-웰 플레이트($5x10^4$ cells/well)에 세포를 주입하였다. 이 세포를 트립신화하고, 1,500 rpm에서 5분간 원심 분리하여 펠렛화한 다음, 10ml의 PBS에 재부유시켰다. 다음으로, 0.2% 트리판 블루 0.1ml을 세포 현탁액(0.9ml)으로 주입하였다. 이어서, 현탁액 1방울을 Neubauer 챔버에 주입하고, 생존 암 세포를 카운트하였다. 염색된 세포는 사멸한 것으로 간주하였고, 트리판 블루로 염색되지 않은 것은 생존하는 것으로 카운트하였다. 각각은 분석은 3번 중복하였다.

[110] **6. 아질산(Nitrite) 분석.** RAW 264.7 세포를 96-웰 플레이트에 각 웰당 $1x10^4$ 개 투여하고, 24시간 동안 다양한 농도의 MMPP를 첨가 또는 비첨가 조건 하에서 LPS(1 mg/ml) 및 TNF-α(10 ng/ml)를 첨가 및 비첨가 하였다. 상등액 내 아질산 축적은 iNtRON biotechnology(Seongnam, Korea)사 제품의 질산화물 킷트를 이용하여 분석하였다.

[111] **7.** PEG2 및 사이토카인 분석. 배양된 RAW 264.7 세포 내에서 ELISA kit(R&D Systems)로부터 구입한 킷트를 이용하여 PGE2 분석을 수행하였다.

[112] **8.** ROS 분석. ELISA kit(Cell Biolabs Inc)로부터 구입한 킷트를 이용하여 ROS 분석을 수행하였다.

[113] **9. 세포감염**. RAW 264.7 세포($5x10^4$ cells/well)을 24-웰 플레이트에 주입하고, OPTI-MEN 내 리포텍타민 PLUS와 플라스미드 혼합물을 이용하여 STAT3-liciferase reporter 플라스미드와 iNOS-luciferase reporter 플라스미드를 일시적으로 세포 감염시켰다.

[114] **10.EMSA(Electromobility** shift assay) 분석. RAW 264.7 세포를 24시간 동안 배양하여 EMSA 분석을 수행하였다. 프로틴 밴드의 상대 밀도는 MyImage를 이용하여 스캐닝하였고 Labworks 4.0 software(UVP, Inc.)로 정성 분석을 수행하였다.

[115] **11.루시퍼라제** 활성 분석. RAW264.7 세포를 24-웰 플레이트에 $1x10^5$ cells/well개로 주입하였다. 90% 성장 후, OPTI-MEN 내 STAT3 siRNA(Santa Cruz Biotechnology) 또는 돌연변이 STAT3(T456A) 플라스미드 및 WelFect-EX PLUS의 혼합물을 이용하여 STAT3 siRNA(Santa Cruz Biotechnology) 또는 돌연변이 STAT3(T456A) 플라스미드를 일시적으로 세포 감염시켰다. 감염된 세포를 LPS(1 ㎍/ml) 및 서로 다른 농도의 MMPP(1-4 ㎍/ml)로 12시간 동안 처리하였다. 루시퍼라제 활성은 루시퍼라제 분석 킷트(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였다.

[116] **12.** 웨스턴 블럿 분석 전세포(whole cell)의 용해물(lysate), 세포질 추출물(cytosolic extract) 및 핵 추출물(nuclear extract)을 수득하였다. SDS-PAGE와 웨스턴 블럿 분석은 공개된 문헌 1과 문헌 2에 기재된 바에 따라 수행하였다. 간략히 설명하면, 6-웰 플레이트에 $5x10^5$ cells/well의 세포를 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포들을 MMPP 또는 DMSO로 24시간 동안 처리하였다. 상기 처리 후 세포들을 PBS로 2회 세척하고 용해시켰다. 용해된 세포의 단백질들은 10~15% SDS-PAGE 상에서 분리하였다. 단백질들을 PVDF 멤브레인으로 이동시키고, 상기 PVDF 멤브레인은 5% 탈지 분유를 포함하는 TBS/T-버퍼로 2.5시간 동안 상온에서 블로킹(blocking)하였다. 상기 단백질들이 이동된 멤브레인은 Cdk2, Cdk4, Cdk6, cyclin B1, cyclin D1, cyclin E1, Bcl-2, Bax, caspase-3, caspase-8, STAT3, phspho-STAT3, β-actin 및 histone h1에 대한 생쥐 단일클론 항체를 제1차 항체로 사용하여 분석하였다. 단백질의 발현은 화학발광시약(chemiluminescence reagent, Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Buckinghamshire, UK)을 이용하여 시각화하였으며, CCD 카메라(Fusion-FX, Fisher BioTech, Ltd., Wembley, Australia)가 장착된 디지털 화학발광 이미징 시스템(digital chemiluminescence imaging system)을 통하여 측정하였다.

[117] **13. 비장세포**(Splenocyte) NO 분석. 비장을 채취하여 작은 조각으로 절단한 후, 체관부(tissue sieve)(200 mesh/2.5 cm)를 통과시켜 PBS 내 단일 셀 현탁액을 제조하였다. 상기 현탁액을 1500rpm으로 4분 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 침전물질을 PBS로 3회 세척 후 2 ML RPMI1640 complete media 내 현탁시켰다. 세포를 트리판 블루 염색 배제(trypan blue dye exclusion)로 세포를 측정하였다.

세포 밀도는 3x10^6 cells/mL.로 카운트되었다. 3x10^6 개 세포를 5 ㎍/ml conA를 함유하는 RPMI 1640에 현탁시키고, 5% CO_2 분위기 하에서 37℃에서 배양시켰다. 48시간 이후, 세포를 10 mg/ml 메틸-α-D-피라노사이드를 포함하는 RPMI 1640 내 30분 동안 현탁시켰다. 세포를 수집하고, PBS로 3회 세척하였다. 10 pg/ml IL-2 사이토카인이 함유된 1 mL RPMI 1640 내에 1x10^6 cells개를 현탁시키고, 5% CO_2 분위기 하에서 37℃에서 24시간 동안 배양시켰다. NO 분석은 전술한 바를 따른다.

[118] **14.** C57BL/6 마우스의 류머티스성 관절염 유도. 류머티스성 관절염을 유도하기 위해 7주령 수컷 마우스의 복강 내(intraperitoneal, i.p.)로 안티콜라겐-II mAbs(CII-Ab, Arthrogen-CIA Arthritogenic Monoclonal Antibody, # 53010: Chondrex, Inc., WA, USA)를 첫째날 주입하고, 3째날에 LPS 50㎍을 주입하였다. 관절염 심각도를 평가하기 위해, 하기 기준에 의해 스코어링 시스템을 수행하였다.

[119] 0. 홍반 및 부기 없음

[120] 1. 발목뼈(tarsals) 및 발목 관절에 미미한 홍반 관찰

[121] 2. 발목 관절에서부터 중족부(midfoot)까지 미미한 홍반 및 부기 관찰

[122] 3. 발목 관절로부터 중족골(metatarsal)까지 확장된 홍반 및 부기 관찰

[123] 4. 발목, 발, 및 손가락 전체에 홍반 및 심각한 부기 관찰

[124] 최종 조합 스코어는 최대 스코어가 16이 되도록 매일 기록하였다. 18일째, 마취 후 마우스를 방사선 검사 박스에 위치시켜 X-레이를 90cm 거리가 되도록 조절하였다. 관절염 뒷발의 방사선 분석은 0.01초 동안 40 KW로 X-ray machine(BLD-150RK, Hradec Kralove, Czech Republic)를 조사하여 수행하였다.

[125] **15.면역조직화학 분석.** 공지 방법에 의해 아비딘-비오틴-페록시다제 방법을 이용해 면역 조직화학 분석을 수행하였다. 마우스로부터 채취한 관절 조직 샘플을 포르말린으로 고정하고 파라핀에 임베드시켰다. 이들은 4㎛으로 연속적으로 섹션화하였다. 각 섹션은 헤마톡실린/에오신(H&E), 항 COX-2 및 iNOS 항체(Caymen Chemical, Ann Arbor, MI)로 염색하였다.

[126] **16. 혈액 카운트 테스트.** 헤파린화된 혈액을 통해 HIE cell counter(Technicon Instruments, Miles Laboratories, Tarrytown, NY)를 이용하여 총 호중성 백혈구(neutrophile) 및 단핵 백혈구(monocyte)의 수를 카운트하였다.

[127] **17. 분자** 모델링. MMPP 도킹 연구는 AutoDock를 이용하여 수행하였다. STAT3 다이머 코어 분절(PDB ID: 3CWG)의 x-레이 결정 구조로부터 미인산화된 STAT3 모노머를 추출하여 이용하였다. 먼저, STAT3 모노머에 AutodockTools 을 이용하여 극성 수소 원자를 첨가하였다. MMPP의 3차원 구조를 ChemBio3D and Discovery Studio 3.5 Client를 이용하여 설계하였고, MMPP 리간드를 분자 시뮬레이션 동안 8 회전가능한 싱글 본드로부터 자유로이 회전하도록 하였다. 그리드 박스 내 STAT3를 중앙에 위치시키고, 그 크기는 전체 모노머를 포함하도록 조절하였다. 도킹 실험은 결합 모드에 따라 default, 16, 24, 32, 40 및

60의 여러 수치로 복수회로 수행하였다. MMPP와 STAT3 사이의 결합 이미지는 Discovery studio visualizer 4.0로 얻었다.

[128] **18. 데이터 분석**. Shapiro-Wilk normality test를 사용하는 SPSS version 18.0. Data를 이용하여 ANOVA 통계학적 분석을 수행하였고, 이어서 이들 간 비교를 위해 post-hoc Tukey test를 수행하였다. 통계학적인 유의성을 위해 얻어진 결과를 평균±표준 편차(SD)로 표현하였고, $P<0.05$로 하였다.

[129] **실험예** 1. 세포 독성 분석(MTT 분석)

[130] RAW 264.7 대식세포는 마우스 대식세포로 10 % FBS를 함유한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배지 200 ㎖에 MMPP로 처리한 후 1시간 동안 안정화시켰다.

[131] MTT 시약을 0.5 ㎎/㎖가 되도록 첨가한 후 37℃ 배양기에서 배양하였다. 세포의 70%가 결정을 형성했을 때 배지 모두 제거한 후 100 ㎖의 DMSO를 넣어 결정을 다 녹였다. 이어서, 550 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

[132] **실험예** 2. MMPP와 STAT3 사이의 상호작용 분석

[133] 본 실험예 2에서는 Induced Fit Docking of Schrodinger Suite 2011에 의거하여 MMPP와 STAT3 간의 컴퓨터 도킹 실험(computational docking experiment)을 수행하였다. 도 2의(B)에 따르면, MMPP는 STAT3의 DNA 결합 도메인(Thr456)에 -8.2 kcal/mol 친화도로 결합됨을 알 수 있다. 이로 인해, MMPP는 STAT3의 DNA 결합 블로킹에 의해 STAT3의 키나아제 활성을 저해함을 알 수 있다. 도2의 이미지는 UCSF 키메라 프로그램(Schrodinger, 2011)에 의해 생성되었다.

[134] MMPP와 STAT3간의 상호작용을 확인하기 위한 풀다운 분석을 실시하였다. MMPP는 에폭시-활성 세파로스 6B와 접합된다. STAT3 재조합 단백질 또는 STAT3 단백질을 함유하는 세포 용해물(lysates)와 세파로스 6B 비드(Sepharose 6B beads)에 접합된 MMPP의 상호 작용을 이용하여 풀다운(pull-down assays) 분석을 수행하였다. 도 2의(C)를 참조하면, MMPP가 RAW 264.7 세포들로부터 STAT3를 함유하는 재조합 STAT3 단백질 또는 세포 용해질 간 상호 작용이 있음을 알 수 있다. 또한, 도 2(D)를 보면, STAT3와 비교하여 돌연변이 STAT3 Thr456A에 MMPP의 결합이 감소함을 알 수 있다.

[135] **실험예** 3. STAT3 반응 메커니즘에 대한 MMPP 항염증효과(*in vitro*)

[136] 본 실험예 3에서는 돌연변이 STAT3(T456A)의 돌연변이 형태를 이용하여 RAW 264.7 세포 내 MMPP의 염증 반응 관여를 확인하였다.

[137] 돌연변이 STAT3(T456A) 플라즈미드 DNA로 RAW 264.7 세포를 형질전환하였다. 그리고 나서 24시간 경과 후, 형질 전이된 세포에 1 mg/ml의 리포사카라이드(LPS)을 단독으로 처리하거나 LPS와 MMPP를 함께 처리하였다.

[138] 돌연변이 STAT3(T456A)를 RAW 264.7 세포 내에 형질전이한 후, NO 생성, iNOS 및 COX2 발현, 뿐만 아니라 STAT3 및 NF-κB 활성을 측정하였다. 도 3의(c)를 따르면, STAT3 및 NF-κB의 활성은 RAW 264.7 세포 내에서 돌연변이

STAT3(T456A)에 의해 소멸됨을 알 수 있다.

[139] 추가로, 도 3의(A) 및(B)를 참조하면, NO 생성, iNOS 및 COX2 발현은 RAW 264.7 세포 내에서 돌연변이 STAT3(T456A)에 의해 소멸되었다. 이러한 결과는 MMPP가 STAT3 DNA 결합 사이트 내에 Thr 456로 공유 결합되고, 이에 따라 STAT3의 DNA 결합 활성의 방지에 의해 STAT3 활성이 억제됨을 의미한다.

[140] **실험예** 4. RAW 264.7 세포 내 LPS-유도 항염증 반응에 대한 MMPP 억제 효과 분석

[141] 본 실험예 4에서는 MMPP가 RAW 264.7 세포 내에서 LPS-유도 감염 인자의 생성을 억제하는지에 대한 여부를 알아보기 위해 수행하였다. RAW 264.7 세포는 일시적으로 iNOS-루시퍼라아제 컨스트럭트(iNOS- luciferase construct) 로 감염시키고, LPS(1㎍/ml) 단독 또는 MMPP 및 LPS를 함께 처리하여 12시간 동안 활성화시켰다.

[142] 12시간 배양된 세포로부터 동일한 양의 전체 단백질(20 ㎍/lane)을 10% SDS-page로 처리하였고, iNOS 및 COX-2 의 발현이 항체를 이용한 워스턴블롯을 이용하여 탐지되었다. B-actin 단백질이 대조군으로 사용되었다.

[143] 현미경을 통해 형태적 변화(Morphological changes)를 관찰하였으며 세포 생존성은 MTT 분석을 통해 측정되었다.

[144] LPS(1 mg/ml) 및 MMPP(0~4 mg/ml)를 함께 처리한 결과, LPS-유도 세포 내 iNOS 루시퍼라제(luciferase) 활성(도 4(a)), NO 발현(도 4(b)), iNOS 및 COX-2(도 4(C))는 농도 의존적 방식으로 감소함을 알 수 있다. 그러나, 도 4의(D)에 따르면, LPS 유도 RAW 264.7 세포의 생존 능력은 4 mg/ml까지 영향이 없었으며, 이러한 결과로부터 본 MMPP가 독성이 없음을 알 수 있다.

[145] 나아가, MMPP가 관련 유전자 발현의 억제를 통해 ROS, PGE_2 및 전염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokines) 생성을 억제하는지 여부를 확인하였다.

[146] RAW 264.7 세포는 일시적으로 STAT-3 루시퍼라아제 구조체(STAT3-luciferase construct) 로 감염시키고, LPS(1 ㎍/ml) 단독 또는 MMPP 및 LPS를 함께 처리하여 12시간 동안 활성화시켰다. 이후 루시퍼라이제의 활성, ROS, PGE2 및 전염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)을 확인하였다.

[147] 도 5의(A) 내지(D)에 따르면, MMPP(0~4 mg/ml)가 농도 의존적으로 LPS-유도 STAT3 루시퍼라제 활성, ROS, PGE_2 발현, 및 전염증 사이토킨(TNF-α, IL-6 및 IL-1) 수준을 억제함을 알 수 있다.

[148] **실험예** 5. NF-κB 및 STAT3 활성에 대한 MMPP 억제 효과 분석

[149] 본 실험예 5에서는 MMPP가 NF-κB 활성을 억제하여 RAW 264.7 세포 내 iNOS 및 COX-2 발현 억제를 유도하는지를 확인하였다.

[150] RAW 264.7 세포에 LPS 단독, 또는 LPS 및 MMPP를 30분간 처리하였고, EMSA(Electrophoretic mobility shift assays)를 이용하여 NF-κB 및 STAT3의 DNA 결합활성을 조사하였다. 또한 동일한 양의 전체 단백질(20 ㎍/lane)을 10% SDS-page로 처리하였고, STAT3, P-STAT3, p50, p65, IKK, lκB, p-lκB 가

웨스턴블롯을 통해 탐지되었다. B-actin 단백질 또는 히스톤 H이 대조군으로 사용되었다.

[151] 도 6의(B) 및(D)에 따르면, LPS 는 강력한 NF-κB DNA 결합 활성, 전사활성, NF-κB 서브유닛 p65 및 p50의 핵 전위(nuclear translocation), IκB 분해를 유발하였다. 이러한 것들은 MMPP의 공동처리에 의해 농도의존적 방식으로 약화됨을 알 수 있었다. 게다가 도 6의(D)에 따르면, MMPP는 IKKb 및 IKKa의 LPS-유도 인산화를 억제함을 알 수 있다. STAT3는 염증성 및 면역 반응에 포함된 중요한 레독스 전사 인자이며, NF-κB와 상호작용함을 알 수 있다. 이때 MMPP가 RAW 264.7 세포 내 STAT3 활성을 감소하는지의 여부를 확인하였고, 그 결과를 도 6의(A) 및(C)에 나타내었다. 도 6(C)에 따르면, STAT3의 LPS-유도 인산화를 MMPP가 억제함을 알 수 있다.

[152] **실험예** 6. RAW 264.7 세포 내 MMPP의 전염증(pro-inflammatory) 효과에 대한 STAT3 경로 분석

[153] 본 실험예 6에서는 RAW 264.7 세포내 LPS-유도 전염증 반응에 대한 MMPP의 보호 효과에 대해서 STAT3 siRNA의 효과를 분석하였다.

[154] 먼저, STAT3 siRNA로 감염된 RAW 264.7 세포를 이용하여 LPS-유도된 전염증 반응에 대한 MMPP의 보호 효과를 연구하였다.

[155] RAW 264.7 세포는 STAT3 siRNA로 감염시키고, 그러고 나서 24시간 경과후, 감염된 세포는 1 mg/ml LPS 단독 또는 MMPP와 함께 처리하였다. 그 결과 NO 생성, iNOS 및 COX2의 발현, NF-κB의 DNA 결합 활성이 측정되었다.

[156] 그 결과 STAT3 넉다운(knockdown) 세포는 LPS-유도 NO 생성, iNOS and COX2 발현및 NF-κB 활성에 대한 MMPP의 억제 효과가 제한되었다(도 7의(A).

[157] 다음으로, RAW 264.7 세포 내 STAT3 억제제의 효과가 제한됨을 연구하였다. RAW 264.7 세포는 STAT3 억제제(20mM) 단독 또는 MMPP와 함께 처리하였으며 마찬가지로 NO 생성, iNOS 및 COX2의 발현, NF-κB의 DNA 결합 활성이 측정되었다. 그 결과 STAT3 억제제는 LPS-유도된 NO 생성, iNOS 및 COX2 및 NF-κB에 대한 MMPP의 억제 효과가 완전히 제한되었다(도 7의(B)). 이러한 실험결과는 MMPP의 항염증 효과에 있어서 STAT3 경로가 매우 중요함을 의미한다.

[158] **실험예** 7. TNF-α 유도 RAW 264.7 세포 내 NO and ROS 생성, iNOS and COX2 발현, 및 NF-κB 및 STAT3 활성의 억제 효과 분석

[159] 본 실험예 7에서는 TNF-α 처리된 RAW 264.7 세포 내에서의 MMPP의 항염증에 대한 실험을 수행하였다.

[160] MMPP(4 mg/ml)와 함께 TNF-α(10 ng/ml)를 24시간 처리한 경우, TNF-α(10 ng/ml)로 유도된 NO 및 ROS 생성(도 8의(A)), iNOS 및 COX2 발현(도 8의(B)), STAT3 및 NF-κB 활성(도 8의(C) 및(D))이 RAW 264.7 세포 내에서 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 RAW 264.7 내 보여진 바와 같이 MMPP의 항염증 활성이 지속성이 있음을 의미한다.

[161] **실험예** 8. LPS 또는 TNF-α 처리된 활막 세포 내 NO 및 ROS 생성, iNOS 및 COX2 발현, NF-κB 및 STAT3 활성에 대한 MMPP 억제 효과 분석

[162] 본 실험예 8에서는 LPS and TNF-α 처리된 활막 세포 내 MMPP의 항염증 효과를 알아보기 위해 실험을 수행하였다.

[163] MMPP(4 mg/ml)와 함께 LPS(1 mg/ml) 또는 TNF-α(10 ng/ml)를 24시간 동안 처리한 처리군에서 LPS(1 mg/ml) 또는 TNF-α(10 ng/ml) 유도 NO 및 ROS 생성(도 9(A)), iNOS 및 COX2 발현(도 9(B)), STAT3 및 NF-κB 활성(도 9(C) 및(D))은 활막 세포 내에서 감소함을 확인하였다.

[164] **실험예** 9. CAIA로 유도된 항염증 및 류머티스성 관절염, 및 관련 항염증 유전자 발현에 대한 MMPP 억제 효과 분석

[165] 본 실험예 9에서는 류머티스성 관절염에 효과가 있도록 MMPP의 항산화 및 항염증 효과가 류머티스성 관절염에 효과가 있는지를 연구하였고, 그 결과 MMPP가 CAIA(Collagen Antibody-Induced Arthritis)모델에서 항관절염효과가 있음을 확인하였다.

[166] 도 10의(A)를 보면, 7주령 수컷 C57BL/6 마우스에 18일 동안 매일 MMPP(5 mg/kg, p.o.)(0.5㎕ DMSO를 함유하는 100㎕ PBS에 용해), 비히클(음성 대조군) 또는 인도메타신(indomethacin)(5 mg/kg, p.o./용해 후 100㎖ PBS에 용해)을 투여하였다. 도 10의(B)를 보면, 마지막 처리 날(18일째), MMPP(5 mg/kg)으로 처리한 그룹에서 임상학적 스코어(약 4.67)가 CAIA 그룹의 임상학적 스코어(약 14) 보다 66.5% 낮았다. 그리고 인도메타신(5 mg/kg)으로 처리한 그룹은 CAIA 그룹보다 64.8% 크게 나타났다.

[167] 콜라겐 주입된 마우스의 뒷발에 대한 방사선 검사결과 콜라겐 주입된 마우스의 발에서 조직부종 및 골 파괴가 발견되었다. 그러나 이러한 효과는 MMPP(5 mg/kg)에 의해 상당하게 저감되었으며, 이러한 효과는 도 10(B)의 인도메타신(5 mg/kg)과 비견할만하다. CAIA 마우스의 발목 관절의 조직병리학적 평가를 통해 부분적으로 뼈 붕괴(pannus) 및 섬유화가 발생함을 확인하였다. 이와 반대로, 도 10의(C)를 보면, 골 파괴 및 섬유화의 정도는 MMPP(5mg/kg)를 처리한 CAIA 마우스에서 크게 저감되었다. CAIA 마우스로부터 얻어진 발명 관절 조직의 면역조직학적 및 웨스턴 블랏 분석을 수행하였고, 그 결과인 도 10의(C) 및(D)를 보면, 관절 주위의 섬유화 조직 구조 내 우선적으로 국소화된 COX2 및 iNOS의 양성 반응이 뚜렷하게 나타났다.

[168] 또한 MMPP가 혈액 세포 수를 변화시키는지 여부를 확인하였다. 이는 RA 진단하고 병의 진행을 모니터링하며 치료하기 위해 일반적으로 실시된다. 도 11(A)를 보면, 대조군의 마우스와 비교하여, CAIA 마우스로부터 호중구 및 단구의 수가 크게 증가하였다. 또한, 도 11(B)를 보면, 대조군의 마우스와 비교하여, CAIA 마우스의 비장 T-임파구 내 NO 생성이 크게 증가하였다.

[169] 더불어 NF-κB와 STAT3의 DNA 결합 활성이 EMSA에 의해 확인되었다. 동일한 양의 전체 단백질(20 ㎍/lane)을 10% SDS-page로 처리하였고, STAT3, P-STAT3,

p50, p65, IKK, lκB, p-lκB 가 웨스턴블롯을 통해 탐지되었다. B-actin 단백질 또는 히스톤 H이 대조군으로 사용되었다. 그 결과 MMPP가 CAIA-유도 발목 관절 조직 내 STAT3 DNA-결합 활성(도 12(a)), NF-κB STAT3 DNA-결합 활성(도 12(b)), pSTAT3, p50 및 p65 핵 전위, 및 IkB, IKKb 및 IKKa의 인산화를 억제시킴을 알 수 있다.(도 12(c), 12(d))

[170] 한편, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[171] 제제예 1. 산제의 제조

[172] 하기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[173] 화학식 1의 화합물 2 g

[174] 유당 1 g

[175] 제제예 2. 정제의 제조

[176] 하기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[177] 화학식 1의 화합물 100 ㎎

[178] 옥수수전분 100 ㎎

[179] 유당 100 ㎎

[180] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[181] 제제예 3. 캡슐제의 제조

[182] 하기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[183] 화학식 1의 화합물 100 ㎎

[184] 옥수수전분 100 ㎎

[185] 유당 100 ㎎

[186] 스테아린산 마그네슘 2 ㎎

[187] 제제예 4. 주사제의 제조

[188] 통상적인 주사제의 제조방법에 따라, 하기 성분들을 제시된 함량으로 함유시켜 주사제를 제조하였다.

[189] 화학식 1의 화합물 100 ㎎

[190] 만니톨 180 ㎎

[191] $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 26 ㎎

[192] 증류수 2974 ㎎

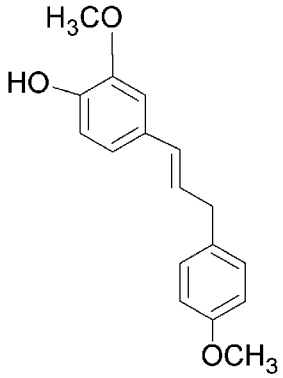
산업상 이용가능성

[193] 본 발명에 따른 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀은 STAT3와 관련된 모든 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용 가능하다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물:

[화학식 1]

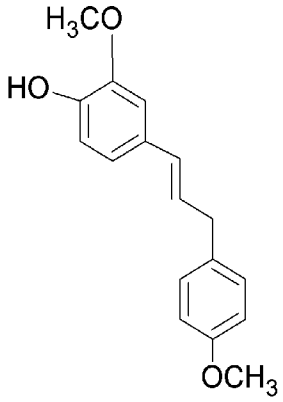


[청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 패혈증, 패혈성 쇼크; 류머티스성 관절염, 골관절염, 강직 척추염; 혈관염, 흉막염, 심장막염, 허혈 관련 염증, 염증성 동맥류; 신장염; 간염; 만성 폐염증성 질환; 기관지 염증, 비염; 피부염; 위염; 대장염, 과민성대장증후군; 감염에 의한 열 및 근육통으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

[청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 염증성 질환 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

[청구항 4] 하기 화학식 1로 표시되는 2-메톡시-4-(3-(4-메톡시페닐)프로필-1-엔-1-일)페놀 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물:

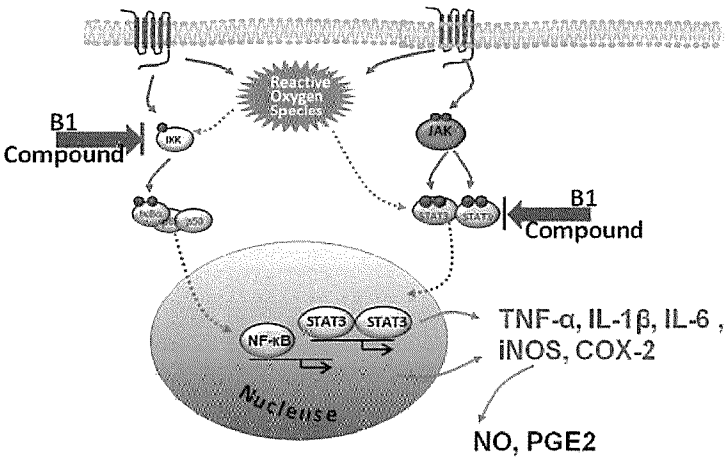
[화학식 1]



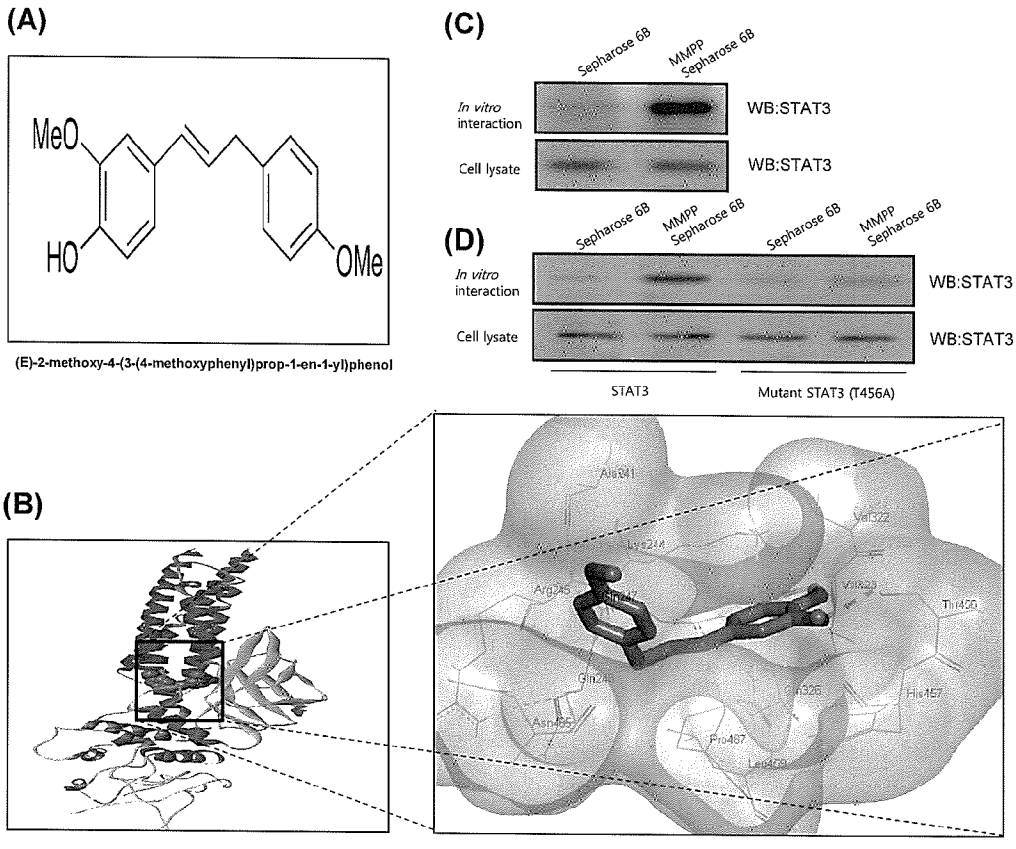
[청구항 5] 청구항 4에 있어서, 상기 관절염은 골관절염, 류머티스성 관절염 또는 화농성 관절염인 것을 특징으로 하는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

[청구항 6] 청구항 4에 있어서, 상기 조성물은 STAT3 매개 질환의 예방 또는 치료를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 관절염 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

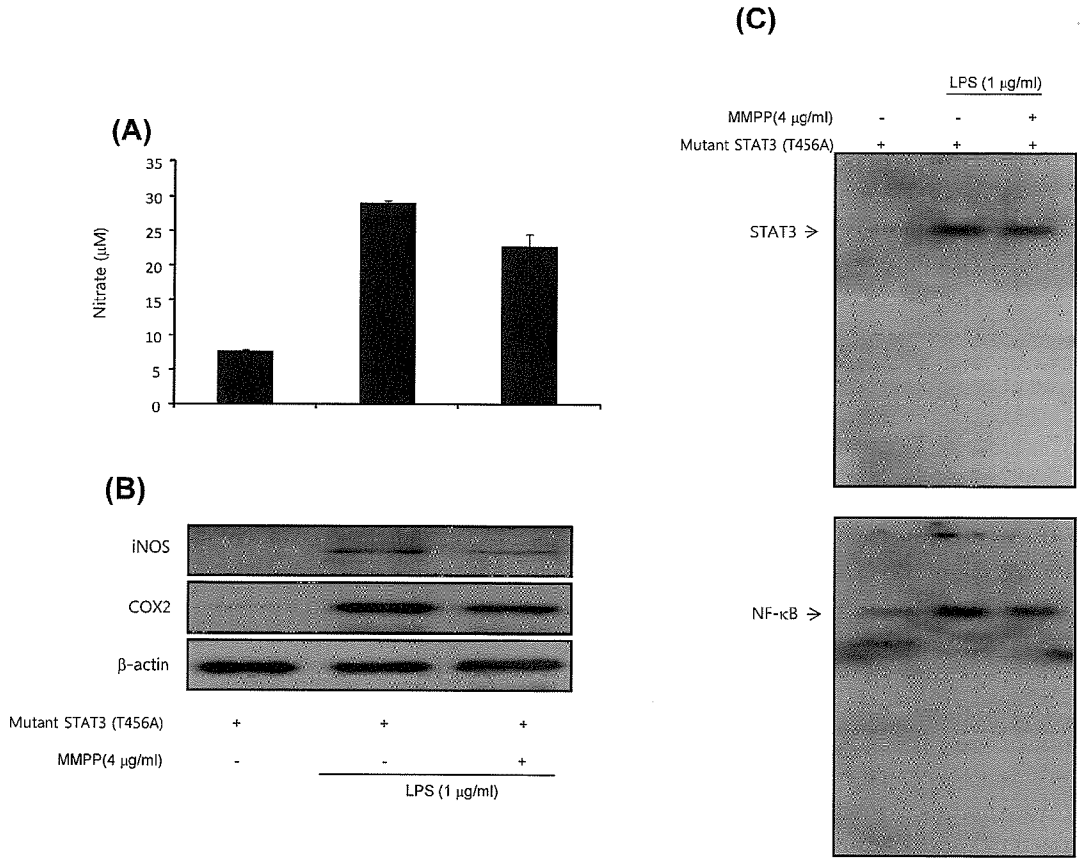
[도1]


Reactive Oxygen Species
B1 Compound
IKK
JAK
B1 Compound
NF-κB
STAT3
STAT3
Nucleus
TNF-α, IL-1β, IL-6 , iNOS, COX-2
NO, PGE2

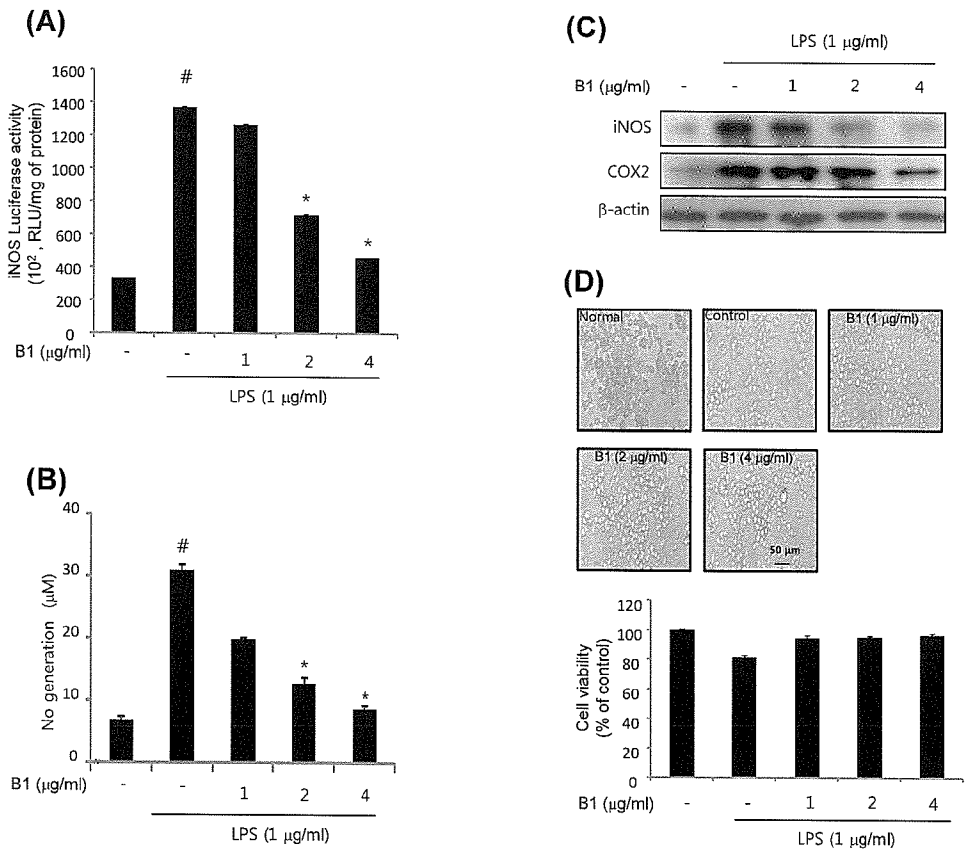
[도2]


(A)
MeO
HO
OMe
(E)-2-methoxy-4-(3-(4-methoxyphenyl)prop-1-en-1-yl)phenol
(B)
(C)
Sepharose 6B
MMPP Sepharose 6B
In vitro interaction
WB:STAT3
Cell lysate
WB:STAT3
(D)
Sepharose 6B
MMPP Sepharose 6B
Sepharose 6B
MMPP Sepharose 6B
In vitro interaction
WB:STAT3
Cell lysate
WB:STAT3
STAT3
Mutant STAT3 (T456A)

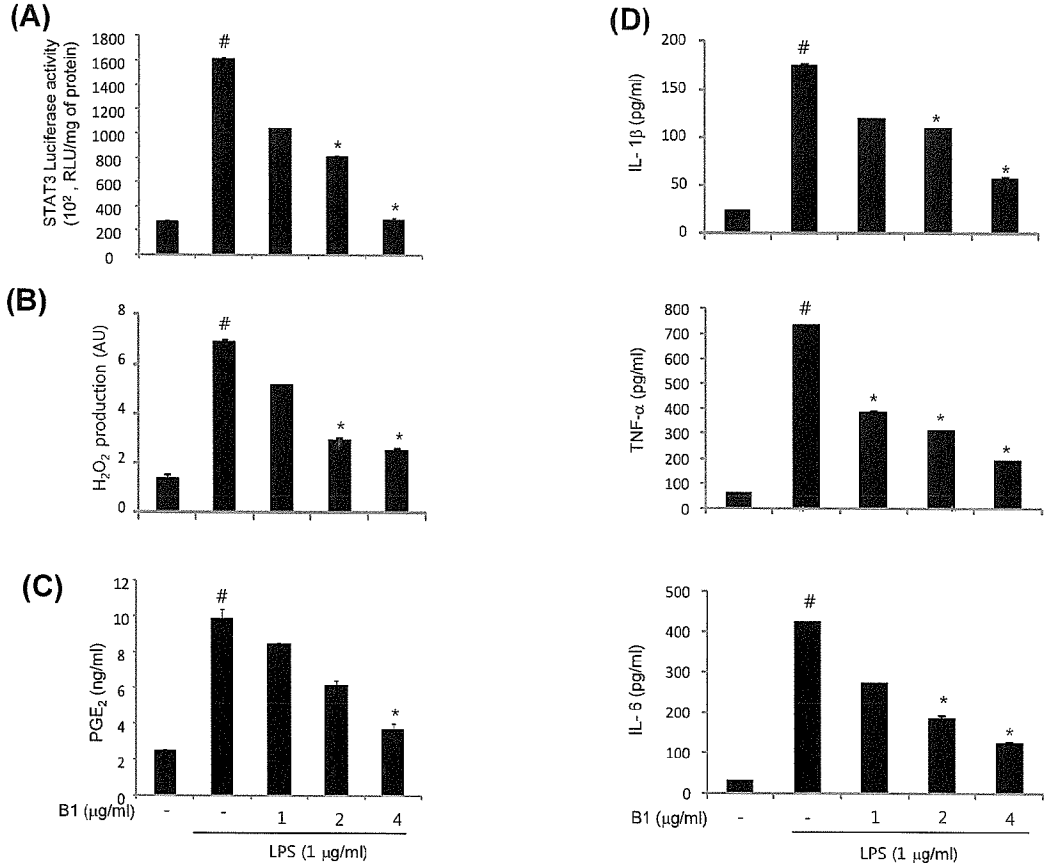
[도3]


(A)
Nitrate (μM)
35
30
25
20
15
10
5
0
(B)
iNOS
COX2
β-actin
Mutant STAT3 (T456A) + + +
MMPP(4 μg/ml) - - +
LPS (1 μg/ml)
(C)
LPS (1 μg/ml)
MMPP(4 μg/ml) - - +
Mutant STAT3 (T456A) + + +
STAT3
NF-κB

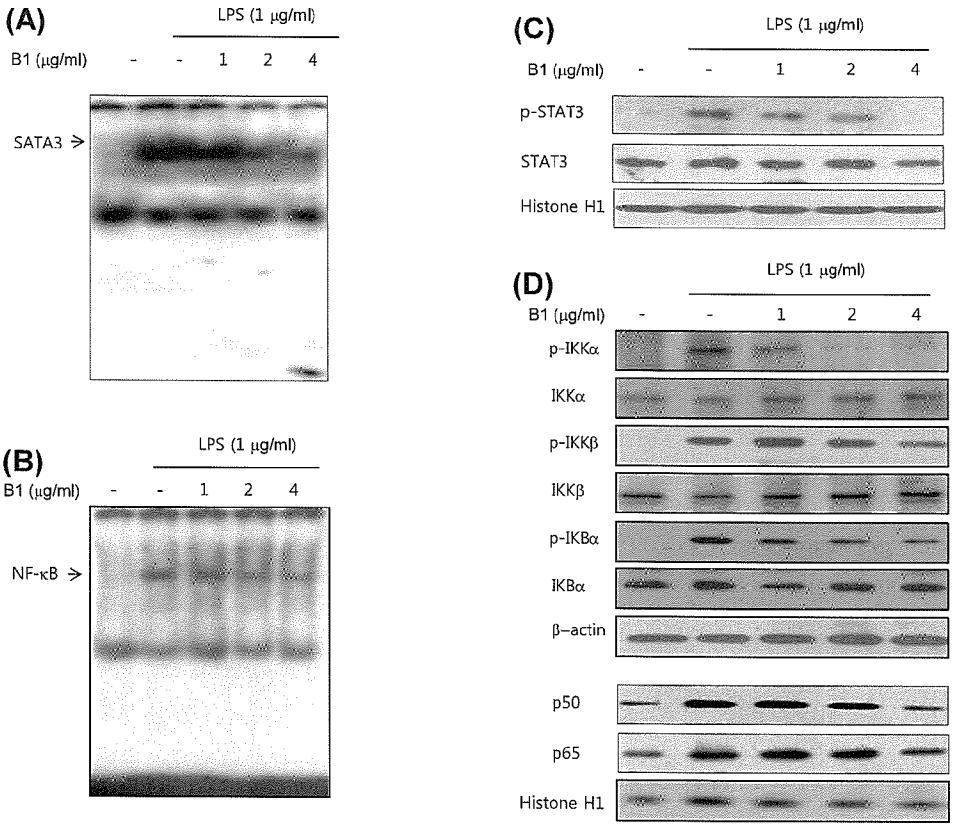
[도4]


(A)
iNOS Luciferase activity (10², RLU/mg of protein)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
#
*
*
B1 (μg/ml) - - 1 2 4
LPS (1 μg/ml)
(B)
No generation (μM)
40
30
20
10
0
#
*
*
B1 (μg/ml) - - 1 2 4
LPS (1 μg/ml)
(C)
LPS (1 μg/ml)
B1 (μg/ml) - - 1 2 4
iNOS
COX2
β-actin
(D)
Normal
Control
B1 (1 μg/ml)
B1 (2 μg/ml)
B1 (4 μg/ml)
50 μm
Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
B1 (μg/ml) - - 1 2 4
LPS (1 μg/ml)

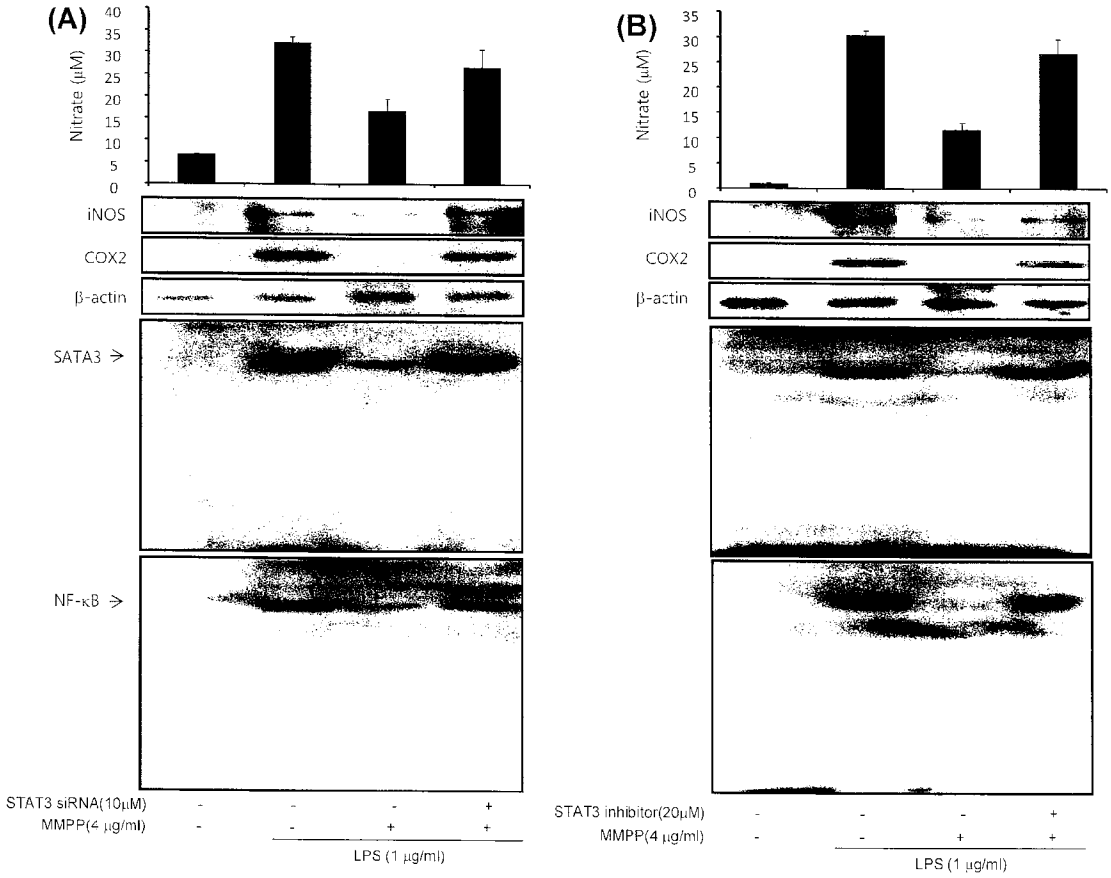
[도5]


(A)
STAT3 Luciferase activity (10², RLU/mg of protein)
(B)
H2O2 production (AU)
(C)
PGE2 (ng/ml)
(D)
IL-1β (pg/ml)
TNF-α (pg/ml)
IL-6 (pg/ml)
B1 (μg/ml) - - 1 2 4
LPS (1 μg/ml)

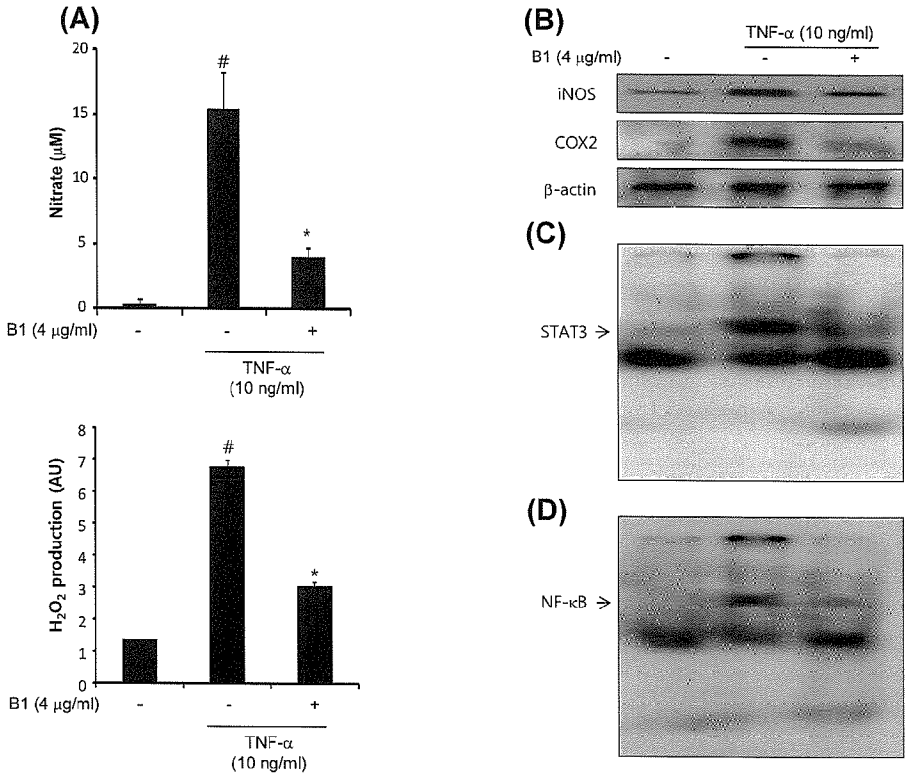
[도6]


(A)
LPS (1 μg/ml)
B1 (μg/ml) - - 1 2 4
SATA3
(B)
NF-κB
(C)
p-STAT3
STAT3
Histone H1
(D)
p-IKKα
IKKα
p-IKKβ
IKKβ
p-IKBα
IKBα
β-actin
p50
p65
Histone H1

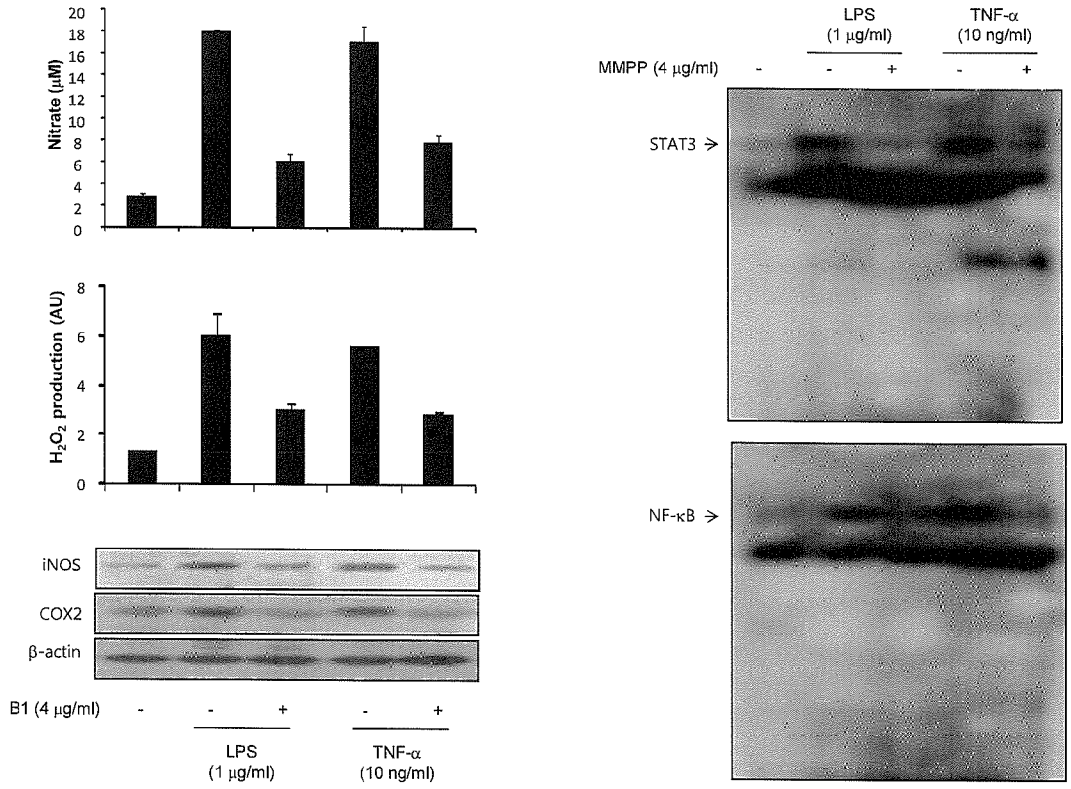
[도7]


(A)
Nitrate (μM)
iNOS
COX2
β-actin
SATA3
NF-κB
STAT3 siRNA(10μM)
MMPP(4 μg/ml)
LPS (1 μg/ml)
(B)
Nitrate (μM)
iNOS
COX2
β-actin
STAT3 inhibitor(20μM)
MMPP(4 μg/ml)
LPS (1 μg/ml)

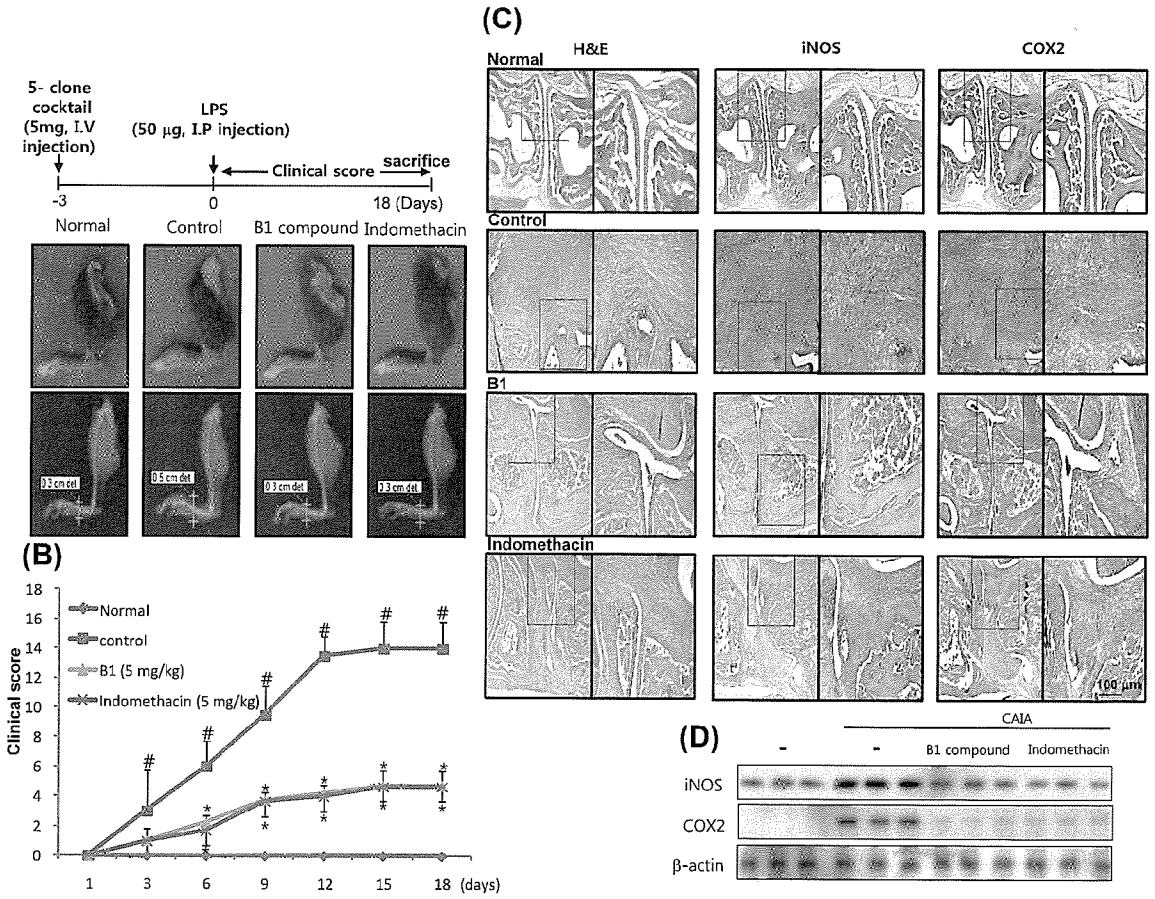
[도8]


(A)
Nitrate (μM)
B1 (4 μg/ml)
TNF-α (10 ng/ml)
H2O2 production (AU)
(B)
TNF-α (10 ng/ml)
B1 (4 μg/ml)
iNOS
COX2
β-actin
(C)
STAT3
(D)
NF-κB

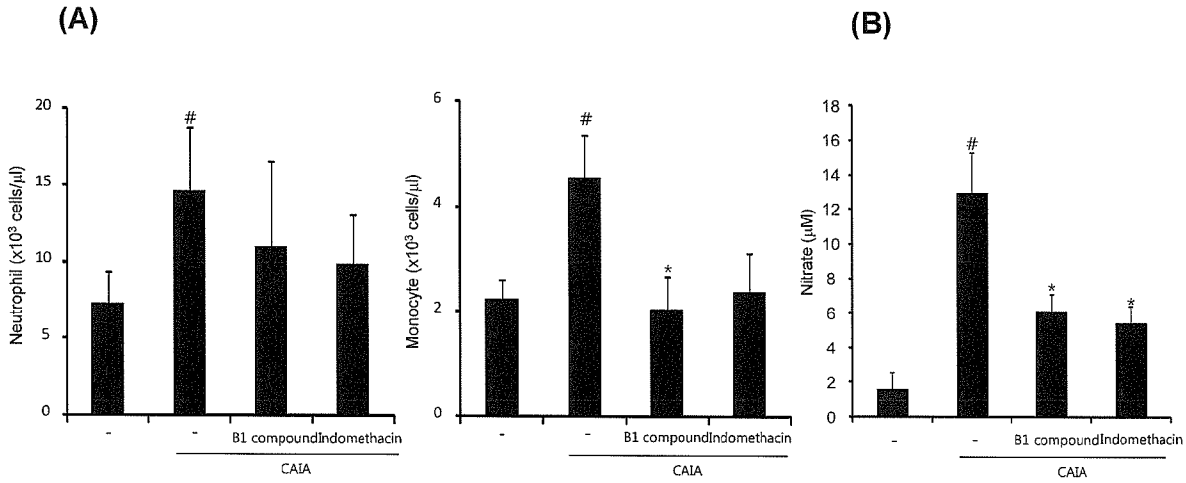
[도9]


Nitrate (μM)
H_2O_2 production (AU)
iNOS
COX2
β-actin
B1 (4 μg/ml)
LPS (1 μg/ml)
TNF-α (10 ng/ml)
MMPP (4 μg/ml)
STAT3
NF-κB

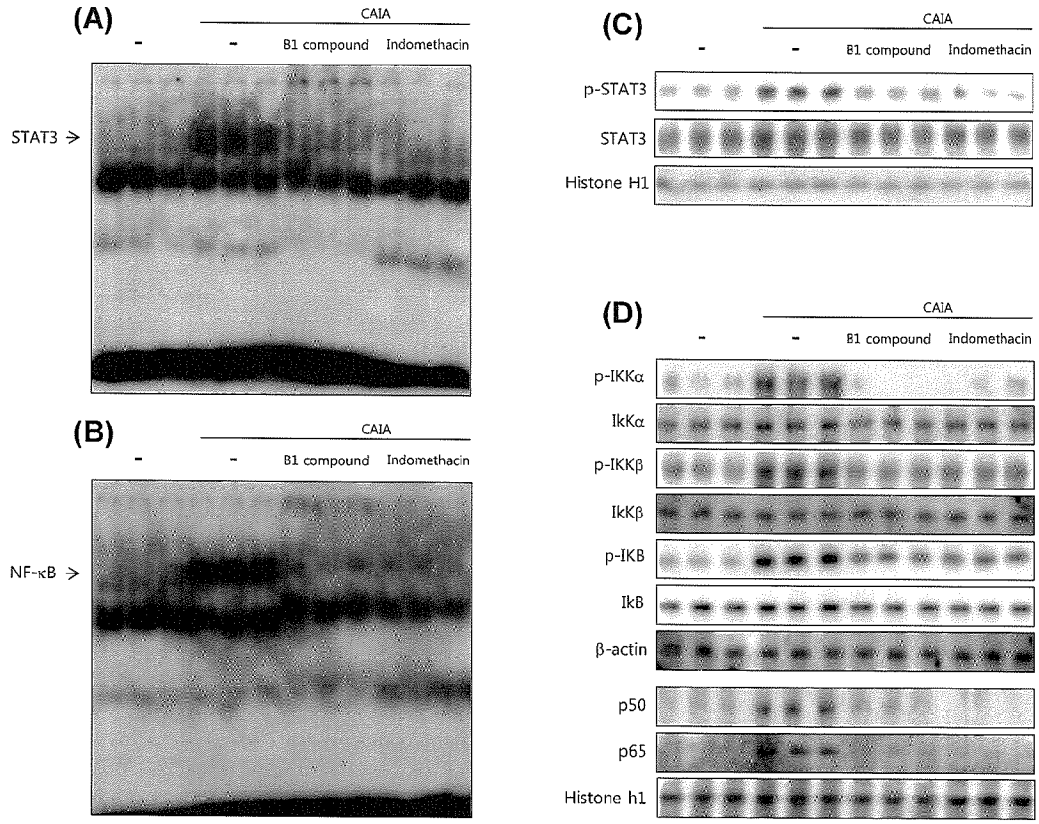
[도10]


5- clone cocktail (5mg, I.V injection)
LPS (50 μg, I.P injection)
Clinical score
sacrifice
-3
0
18 (Days)
Normal
Control
B1 compound
Indomethacin
(B)
Clinical score
Normal
control
B1 (5 mg/kg)
Indomethacin (5 mg/kg)
(days)
(C)
H&E
iNOS
COX2
Normal
Control
B1
Indomethacin
100 μm
(D)
CAIA
B1 compound
Indomethacin
iNOS
COX2
β-actin

[도11]


(A)
(B)
Neutrophil (x10³ cells/μl)
Monocyte (x10³ cells/μl)
Nitrate (μM)
#
*
-
-
B1 compound
Indomethacin
CAIA

[도12]


(A)
STAT3
(B)
NF-κB
(C)
p-STAT3
STAT3
Histone H1
(D)
p-IKKα
IkKα
p-IKKβ
IkKβ
p-IKB
IkB
β-actin
p50
p65
Histone h1
CAIA
-
-
B1 compound
Indomethacin