



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0084827  
(43) 공개일자 2013년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)

A61K 31/37 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0005711

(22) 출원일자 2012년01월18일

심사청구일자 2012년01월18일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

최호영

서울특별시 성북구 석관동 407번지 래미안아파트 109동 1301호

함인혜

서울특별시 강남구 일원본동 목련타운아파트 102동 204호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

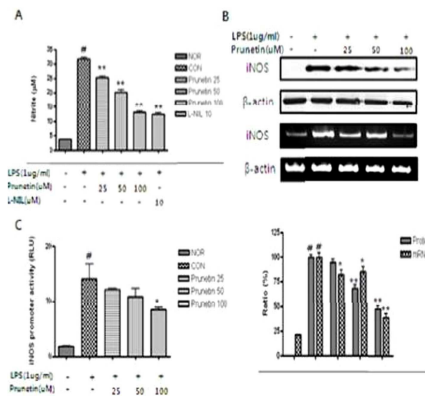
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 프루네티를 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 프루네티의 처리에 의해 염증 관련 인자인 산화질소, iNOS, COX-2, IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 발현 감소를 확인하였고, 또한, 프루네티를 전처리한 동물에 LPS를 처리하여 패혈증을 유도하였을 때, 프루네티를 전처리하지 않은 대조군 동물에 비해 생존률이 크게 개선된 것을 확인하였으므로, 이를 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**양갑식**

서울특별시 송파구 방이2동 54-3 402호

**이경진**

서울특별시 동대문구 청량리동 206-43 동창빌라 B  
동 101호

**이미화**

서울특별시 동대문구 회기동 102-81 301호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

프루네티(prunetin) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 패혈증 또는 패혈성 쇼크를 예방하고, 치료하는 것을 특징으로 하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 개체로의 주입 농도는 개체의 몸무게당 1 내지 15 mg인 것을 특징으로 하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 개체로의 주입 농도는 개체의 몸무게당 5 또는 10 mg인 것을 특징으로 하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 6

프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

### 청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 개선용 건강식품용 조성물.

## 청구항 8

프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 개선용 화장품 조성물.

## 청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 개선용 화장품 조성물.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 프루네티(prunetin) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 병원성 미생물은 대식세포 및 중성구(neutrophils)와 같은 포식 세포의 모집 및 활성화를 통하여 염증 반응을 향상시킨다. 이러한 활성화는 전염증 사이토카인 및 많은 다른 면역 기능, 세포 증식, 세포자멸사(apoptosis)(Diks SH et al., Journal of endotoxin research. 2001;7(5):335-48. Epub 2001/12/26. 및 Hayden MS et al., Genes & development. 2004;18(18):2195-224. Epub 2004/09/17.), 산화 스트레스 및 손상 에 연관된 유전자들의 증가된 전사(transcription)를 유도한다(Guzik TJ et al., Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society. 2003;54(4):469-87. Epub 2004/01/17. 및 Salvemini D et al., Free radical biology & medicine. 2002;33(9):1173-85. Epub 2002/10/26.).

[0003] 염증 반응에 관여하는 세포로서 대표적으로 대식세포가 있으며, 대식세포는 숙주 방어 기작에서 중요한 역할을 하며, 활성화되었을 때, 그들은 광범위한 종양 세포 및 미생물의 성장을 저해한다(Son K et al., Cancer research. 1995;55(23):5524-7. Epub 1995/12/01.). 산화질소(NO)는 대식세포의 세포 용해 기작에 관여하는 것으로 알려져 있다(Palmer RM et al., Nature. 1988;333(6174):664-6. Epub 1988/06/16). 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 및 IFN-감마(gamma)의 쥐 대식세포의 자극은 L-아르기닌(L-arginine) 및 분자적 산소로부터 산화질소의 많은 양의 생산을 촉매하는 유도성 산화질소 합성효소(inducible NO synthase, iNOS)의 발현을 유도한다(Hibbs JB et al., Science. 1987;235(4787):473-6. Epub 1987/01/23). NF-κB는 iNOS 및 TNF-α 유전자 발현의 전사적 조절에서 초기 역할을 하는 것으로 보인다(Chen F et al., Biochemical and biophysical research communications. 1995;214(3):985-92. Epub 1995/09/25). 자극되지 않은 세포에서, NF-κB는 NF-κB 저해제 단백질 IκB에 결합하는 p50/p65의 아단위(subunits)의 불활성화된 헤테로다이머(heterodimer)이다(Baeuerle PA et al., Annual review of immunology. 1994;12:141-79. Epub 1994/01/01).

[0004] 프루네티(prunetin), 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein), 글리시테인(glycitein), 바이오차닌 A(biochanin A) 및 포모노네티(formononetin)와 같은 아이소플라본(Isoflavones)은 피토에스트로겐(phytoestrogen)으로 불리는 피토케미컬(phytochemical)의 부류에 속한다. 아이소플라본의 천연 소재는 콩 및 콩 식품, 알팔파 새순 및 붉은 클로버를 포함하며, 프루네티는 주로 알콜 남용에 대해 활성이 있는 것으로 알려진 중국 약초인 쿠즈주(Kudzu) 뿌리에서 발견된다(Lukas SE et al., Alcoholism, clinical and experimental research. 2005;29(5):756-62. Epub 2005/05/18.).

[0005] 아이소플라본은 항암에서 심장혈관 보호 효과에 이르는 상당한 생물학적 활성을 가지고 있는 것으로 보인다 (Barnes S., The Journal of nutrition. 2004;134(5):1225S-8S. Epub 2004/04/29., Thomasset SC et al., International journal of cancer Journal international du cancer. 2007;120(3):451-8. Epub 2006/11/30., 및 Kurzer MS et al., Annual review of nutrition. 1997;17:353-81. Epub 1997/01/01). 아이소플라본의 시험관 내 및 생체내 활성 기작은 항산화제에서 항증식을 포함한다. 최근에, 몇몇의 연구는 이눌린(inulin), 레스베라톨(resveratol) 및 레티노산(retinoic acid)와 같은 많은 피토케미컬이 항-염증 효과를 가지는 것을 보고 하였다(Austenaa LM et al., The Journal of nutritional biochemistry. 2009;20(9):726-34. Epub 2008/10/18., Chung EY et al., The Journal of nutritional biochemistry. 2011;22(10):902-9. Epub 2010/12/30. 및 Koo HN et al., The Journal of nutritional biochemistry. 2003;14(10):598-605. Epub 2003/10/16). 하지만 프루네티가 전 염증 및 항 염증 반응을 조절하며, LPS로 유도된 패혈증이 있는 쥐에서 생존을 향상시키는 것은 알려진 바 없다.

[0006] 따라서, 본 발명자들은 프루네티가 항염증 활성을 갖는지 확인하였으며, 구체적으로, 프루네티의 처리에 의해 염증 관련 인자인 산화질소, iNOS, COX-2, IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 발현 감소를 확인하였고, 또한, 프루네티를 전처리 한 동물에 LPS를 처리하여 패혈증을 유도하였을 때, 프루네티를 전처리하지 않은 대조군 동물에 비해 생존률이 개선된 것을 확인하였으므로, 이를 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 프루네티(prunetin) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 프루네티(prunetin) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 아울러, 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0010] 프루네티의 처리에 의해 염증 관련 인자인 산화질소, iNOS, COX-2, IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 발현 감소를 확인하였고, 또한, 프루네티를 전처리한 동물에 LPS를 처리하여 패혈증을 유도하였을 때, 프루네티를 전처리하지 않은 대조군 동물에 비해 생존률이 크게 개선된 것을 확인하였으므로, 이를 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 프루네티(prunetin)의 화학적 구조 및 RAW 264.7 세포의 세포 생존능에 대한 프루네티의 영향을 나타낸 도이다.

도 1a는 프루네티의 화학적 구조를 나타낸 도이다.

도 1b는 RAW 264.7 세포의 세포 생존능에 대한 프루네티의 영향을 나타낸 도이다;

y 축: 세포 생존능(cell viability); 및

x 축: 프루네티의 처리 농도(0, 25, 50 또는 100  $\mu$ M).

도 2는 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 산화 질소 생산, 유도성 산화질소 합성효소(inducible NO synthase, iNOS) 프로모터 활성화에 대한 프루네티의 효과를 나타낸 도이다.

도 2a는 프루네티(0, 25, 50 또는 100  $\mu$ M) 처리 후에 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)(1  $\mu$ g/ml)를 처리하였을 때 결과를 나타낸 도이다;

y축: 아질산염;

LPS(1  $\mu$ g/ml): 지질다당류 처리군;

prunetin(nM) 프루네티 처리군; 및

$\text{L-NIL}$ : 양성 대조군.

도 2b는 대조군, LPS 단독 처리 또는 LPS와 프루네티를 함께 처리한 군으로 부터 제조된 세포 용해물에 대하여 웨스턴 블랏 및 RT-PCR 결과를 나타낸 도이다.

도 2c는 pGL3-iNOS 프로모터(promoter)(-1592/+185) 벡터로 형질도입한 세포의 루시페라제 활성의 수준을 확인한 도이다;

iNOS promoter activity(RUL): iNOS 프로모터 활성.

도 3은 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도한  $\text{PGE}_2$  생산, COX-2발현 및 COX-2프로모터 활성화에 대한 프루네티의 영향을 나타낸 도이다.

도 3a는 프루네티를 처리한 후에, LPS로 처리한 군의  $\text{PGE}_2$  생산의 결과를 나타낸 도이다;

$\text{PGE}_2$  :  $\text{PGE}_2$  생산; 및

NS-398 : 양성대조군.

도 3b는 대조군, LPS 단독 처리 또는 LPS와 프루네티를 함께 처리한 군으로 부터 제조된 세포 용해물에 대하여 웨스턴 블랏한 결과를 나타낸 도이다.

도 3c는 pGL3-COX-2 프로모터(-965/+39) 벡터로 형질도입한 세포의 루시페라제 활성 수준을 나타낸 도이다;

COX-2 promoter activity(RLU) : COX-2 프로모터 활성.

도 4는 LPS로 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 프루네티의 영향을 나타낸 도이다.

도 4a는 pNF- $\kappa$ B-luc 리포터 컨스트럭트(construct)로 일시적으로 형질도입된 세포의 루시페라제 활성을 나타낸 도이다.

도 4b는 ELISA에 기초한 TransAm NF- $\kappa$ B 분석를 이용하여 측정된 RAW 264.7 세포 유래 핵 추출물에서 NF- $\kappa$ B(p65)에 대한 프루네티의 효과를 나타낸 도이다.

도 5는 LPS로 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화 및 NF- $\kappa$ B의 핵 전좌에 대한 프루네티의 효과를 나타낸 도이다.

도 5a는 프루네티를 처리한 후 LPS로 처리한 후 단백질을 준비하고, I $\kappa$ B $\alpha$  및 pI $\kappa$ B $\alpha$  특이적 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 5b는 대조군, LPS 단독 또는 LPS 및 프루네티를 함께 처리한 군으로부터 제조된 세포 용해물에 대하여 I $\kappa$  $\alpha$ , I $\kappa$  $\beta$  및 p-I $\kappa$  $\alpha$ / $\beta$  특이적 항체로 웨스턴 블랏한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 RAW 264.7 대식세포에서 항염증 효과에 MAPK가 관여하는지에 대해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6a는 대조군, LPS 단독 또는 LPS 및 프루네티를 함께 처리한 군으로부터 제조된 세포 용해물에 대하여 p-p38, p30, p-JNK, JNK, P-JNK, P-ERK 및 ERK 특이적 항체로 웨스턴 블랏한 결과를 나타낸 도이다.

도 6b는 대조군, LPS 단독 또는 LPS 및 프루네티를 함께 처리한 군에서 발현하는 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 양을 나타낸 도이다.

도 7은 RAW 264.7 대식세포에서 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 생산 및 mRNA 발현에 대한 프루네티

의 영향을 나타낸 도이다.

도 8은 LPS로 유도된 패혈성 쇼크로부터 쥐(mice)의 생존률을 증가시키는 프루네티의 치료적 잠재력을 나타낸 도이다.

도 8a는 프루네티의 전처리 후 LPS로 유도된 패혈성 쇼크 동물 모델에서 쥐의 생존의 개선을 나타낸 도이다.

도 8b LPS 주입 후 얻어진 혈청에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 수준을 ELISA로 확인한 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명은 프루네티(prunetin) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은, 구체적으로 패혈증 또는 패혈성 쇼크를 예방하고, 치료하는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0015] 상기 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 개체로의 주입 농도는 개체의 몸무게당 1 내지 15 mg일 수 있으며, 구체적으로 상기 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 개체로의 주입 농도는 개체의 몸무게당 5 또는 10 mg일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0016] 또한, 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 개선용 건강식품용 조성물을 제공한다.

[0017] 아울러, 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0019] 본 발명의 구체적인 실시예에서, RAW 264.7 대식세포에서 프루네티에 의한 LPS로 유도된 산화 질소 생산 및 유도성 산화 질소 합성효소(iNOS) 발현 저해를 확인하고자, RAW 264.7 대식세포주를 배양하였고, 세포를 25, 50 및 100  $\mu$ M의 농도로 프루네티(prunetin)와 함께 배양하거나, 양성 대조군으로 배양하였고, 그 후에 지시된 시간 동안 LPS 1  $\mu$ g/ml로 자극하였다. 배양 배지 안의 아질산염(Nitrite) 수준을 그리스(Griess) 반응 분석을 이용하여 확인하였고, 산화 질소(NO) 수준을 반영하는 것을 추정하였다. 그 결과, 프루네티는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 산화 질소 및 PGE<sub>2</sub> 염증 매개자의 생산에서 현저한 감소를 보였다(도 2a 및 3a 참조).

[0020] iNOS가 산화 질소를 생산하는 L-아르기닌의(L-arginine) 산화적 아미노기 이탈을 촉매하는 것으로 알려져 있기 때문에(Moncada *et al.*, 1991), 상기 iNOS 단백질 및 mRNA 발현을 웨스턴 블랏 및 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과, 도 2b와 같이, 프루네티는 현저히 LPS로 유도된 iNOS 단백질 및 mRNA 발현을 저해하였고, 이와 동일한 방식으로 이것은 산화질소의 생산을 저해하였다(도 2b 참조).

[0021] 프루네티에 의한 iNOS 발현 수준의 저해가 전사 수준에서 가해지는지를 확인하기 위해, 상기 NF- $\kappa$ B 부위를 포함하는 iNOS 유전자 프로모터의 전사 활성화를 분석하였다. 그 결과, 도 2d와 같이, LPS는 현저히 iNOS 프로모터 루시페라아제 활성을 향상시키며, 프루네티는 용량 의존적으로 상기 유도를 저해한다.

[0022] RAW 264.7 대식 세포에서 LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub> 생산에 대한 프루네티의 영향을 평가하기 위해, 효소 면역분석(enzyme immunoassay, EIA)으로 PGE<sub>2</sub>의 생산을 측정하였다. LPS(1  $\mu$ g/ml)로 자극한 세포는 자극하지 않은 대조군에 비해 현저한 PGE<sub>2</sub> 생산 증가를 유도하였다(도 3a 참조). 또한, 프루네티(25, 50 또는 100  $\mu$ M)의 처리는 현저히 LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub> 생산을 저해하였다.

[0023] PGE<sub>2</sub> 생산에 대한 프루네티의 저해 효과가 이에 해당하는 유전자 발현의 조절에 연관되는지 조사하기 위해,

COX-2의 단백질 및 mRNA 수준을 웨스턴 블랏 및 RT-PCR로 각각 정량하였다. 도 3b와 같이, COX-2는 LPS로 단백질 및 mRNA 수준에서 현저히 상향조절되었고, 프루네티는 이러한 상향조절을 효과적으로 저해하였다(도 3b 참조). 또한, 프루네티는 LPS로 유도된 COX-2 프로모터 루시페라아제 활성을 용량 의존적으로 저해하였다(도 3d 참조). MTT 분석은 산화질소 및 생산에 대한 프루네티의 억제 효과는 일반적인 세포독성에 원인이 될 수 없음을 나타내었다(도 1b 참조). 이러한 결과는 프루네티가 전사적으로(transcriptionally) LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 유전자 발현을 하향 조절하는 것을 확인시켜 주었다.

[0024] 프루네티에 의한 LPS로 유도된 NF- $\kappa$ B 전사적(transcriptional) 및 NF- $\kappa$ B-DNA 결합 활성을 확인하기 위하여, pLuc-프로모터 벡터에 4 공간의(four spaced) NF- $\kappa$ B 결합 부위를 도입하여 만든 pNF- $\kappa$ B-luc 플라스미드로 NF- $\kappa$ B의 전사적 활성을 조사하였다. 프루네티의 전처리 LPS로 유도된 NF- $\kappa$ B 의존적 루시페라아제 활성을 농도 의존적으로 감소시켰다(도 4a 참조). DNA 결합 활성에 대한 프루네티의 효과를 확인하였을 때, 도 4b와 같이, 1 시간 동안 LPS(1  $\mu$ g/ml)는 그것의 일치하는 DNA 서열에 대해 NF- $\kappa$ B 결합 활성을 증가시켰다. 하지만, 1 시간 프루네티 전처리는 용량 의존적으로 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합을 감소시켰다(도 4b 참조).

[0025] NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B 결합에 의해 세포질에서 불활성화되고, I $\kappa$ B의 인산화 및 분해를 통해 활성화되며, 그 후에 LPS에 의해 선행되는 NF- $\kappa$ B 핵 전좌(nuclear translocation)가 된다. 따라서, 프루네티가 I $\kappa$ B의 인산화 및 그 후의 분해를 저해하는지에 대해 조사하였다. LPS 처리 후에 LPS로 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화가 증가된 것을 확인하였으며, 프루네티 처리는 현저히 이러한 인산화를 감소시켰다(도 5a 참조). 게다가, LPS로 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$  분해는 현저히 프루네티에 의해 저해되었다(도 5a 참조). 이러한 결과는 프루네티가 LPS로 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화 및 이것의 차후의 분해를 저해함으로써 NF- $\kappa$ B 활성을 저해하는 것을 제시한다.

[0026] 상기 IKK  $\alpha$ / $\beta$  매개하는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화는 LPS를 포함하는 모든 알려진 전염증 자극에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화에 필요하기 때문에, 시험관내 면역블랏으로 프루네티가 IKK 복합체 활성화를 감소시키는지 확인하였다. IKK  $\alpha$ , IKK  $\beta$  및 인산화된 IKK  $\alpha$ / $\beta$  항체로 웨스턴 블랏하여 LPS로 유도된 IKK  $\alpha$ / $\beta$  활성화에 대한 프루네티의 영향을 조사하였다. 도 5b와 같이, LPS는 강하게 IKK  $\alpha$ / $\beta$  인산화를 유도하는 반면 프루네티의 처리는 현저히 이러한 인산화를 감소시켰으나, 프루네티(50 또는 100  $\mu$ M)은 전체 세포의 IKK  $\alpha$  및 IKK  $\beta$  양에 거의 영향을 주지 않았다. 본 발명의 데이터는 프루네티가 IKK 복합체의 활성화를 유도하는 과정을 방지함으로써, LPS로 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화를 저해할 수 있음을 확인하였다.

[0027] 네 개의 MAPKs, ERK1/2, JNK 및 p38 MAPK는 IKK의존적 NF- $\kappa$ B 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에, RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 MAPKs의 인산화에 대한 프루네티의 영향을 조사하였다. 도 6과 같이, 프루네티는 농도 의존적으로 LPS에 의해 유도된 p38 및 JNK의 활성화를 저해하였으나, ERK1/2의 인산화에는 영향을 주지 않았다(도 6 참조). 이러한 결과는 프루네티가 LPS로 유도된 대식세포에서 iNOS 및 COX-2 발현의 억제를 유도하는 p38-NF- $\kappa$ B 및 JNK를 포함하는 신호 캐스케이드(cascade)를 저해할 수 있음을 제시한다.

[0028] NF- $\kappa$ B로 조절된 다른 전염증 사이토카인에 대한 프루네티의 영향을 평가하기 위해, 프루네티를 처리하고 LPS로 자극한 대식세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  생산 및 그들의 발현을 EIA 및 RT-PCR로 각각 조사하였다. 프루네티의 전처리는 농도 의존적으로 LPS로 유도한 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  생산 및 mRNA 발현을 감소시키는 것을 확인하였다(도 7 참조). 총괄하여, 프루네티는 iNOS 및 COX-2 발현뿐 아니라 NF- $\kappa$ B로 조절되는 광범위한 전염증 유전자 저해에 대한 잠재력을 갖는다.

[0029] 산화질소 및 사이토카인과 같은 NF- $\kappa$ B로 조절된 전염증 매개자는 패혈증의 발병에서 중요한 역할을 한다. LPS로 유도된 염증 매개자를 약화시키는 프루네티의 능력을 고려하여, 패혈증 동물 모델에서 프루네티의 효과를 조사하였다. 그 결과, LPS 주입(37.5 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>, 복강내)은 NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  혈청 수준을 현저히 증가시켰으나, 프루네티의 전처리(5, 10 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>, 복강내)는 이러한 염증 매개자의 생산을 현저히 감소시켰다(도 8b 참조). 그 뒤에, 프루네티가 패혈증 동안 생존을 개선시키는 것을 관찰하였다. 도 8a와 같이, LPS 주입은 쥐에 주입 후 24시간에 80% 치사율을 유도하였으나, 프루네티의 전처리는 72시간에 이것을 80~90%로 감소시켰다(도 8a 참조).

[0030] 따라서, 프루네티의 처리에 의해 염증 관련 인자인 산화질소, iNOS, COX-2, IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 발현 감소를 확인하였고, 또한, 프루네티를 전처리한 동물에 LPS를 처리하여 패혈증을 유도하였을 때, 프루네티를 전처리하지 않은 대조군 동물에 비해 생존률이 개선된 것을 확인하였으므로, 이를 항염 및 패혈성 쇼크의 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 사용할 수 있다.

[0031] 상기 프루네티는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능

한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서의 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다. 상기 프루네티의 약학적으로 허용가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 프루네티에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트)염 등이 있으며 당업계에서 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다. 또한, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 상기 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 프루네티를 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 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.

[0032] 상기 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 함유하는 염증, 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 및 치료용 약학적 조성물은 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제(elixirs) 등이 있는데, 이들 제형은 상기 유효성분 이외에 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 습윤제, 봉해제, 활택제, 결합제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 1종 이상 사용할 수 있다. 봉해제로는 한천, 전분, 알긴산 또는 이의 나트륨염, 무수인산일수소 칼슘염 등이 사용될 수 있고, 활택제로는 실리카, 탈크, 스테아르산 또는 이의 마그네슘염 또는 칼슘염, 폴리에틸렌 글리콜 등이 사용될 수 있으며, 결합제로는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 하이드록시프로필셀룰로오스 등이 사용될 수 있다. 이외에도 락토즈, 텍스트로오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로오스, 글리신 등을 희석제로 사용할 수 있으며, 경우에 따라서는 일반적으로 알려진 비등 혼합물, 흡수제, 착색제, 향미제, 감미제 등을 함께 사용할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사제, 정맥주사제, 근육 내 주사제 또는 흉부 내 주사제를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 프루네티 또는 약학적으로 허용되는 이의 염을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조할 수 있다.

[0035] 상기 조성물은 멸균되거나 또는 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염, 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다. 필요한 경우, 본 발명에 따른 상기 조성물은 기타의 약제, 예를 들면, 다른 치료제와 조합하여 투여할 수도 있다.

[0036] 본 발명의 상기 조성물을 단위 용량 형태로 제형화하는 경우, 유효성분으로서 프루네티 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 약 0.1 ~ 1,500 mg의 단위 용량으로 함유되는 것일 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 나이 및 질병의 특수한 성질과 심각성과 같은 요인에 따라 의사의 처방에 따른다. 그러나, 성인 치료에 필요한 투여량은 투여의 빈도와 강도에 따라 하루에 약 1 ~ 500 mg 범위가 보통이다. 성인에게 근육 내 또는 정맥 내 투여 시 일 회 투여량으로 분리하여 하루에 보통 약 5 ~ 300 mg의 전체 투여량이면 충분할 것이나, 일부 환자의 경우 더 높은 일일 투여량일 수 있다.

[0037] 본 발명의 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 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.

- [0039] 본 발명의 조성물의 구체적인 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 0.03 g/kg으로, 구체적으로 0.001 내지 10 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0040] 이하 실시예를 통해 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명한다.
- [0041] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] <실시예 1> RAW 264.7 대식세포에서 프루네티네에 의한 LPS로 유도된 산화 질소 생산 및 유도성 산화 질소 합성효소(iNOS) 발현 저해
- [0043] <1-1> 세포 배양 및 시료 처리
- [0044] RAW 264.7 대식세포주는 Korea Cell Line Bank(Seoul,Korea)로부터 구입하였다. 상기 세포를 10% FBS, 페니실린(100 유닛(unit)/ml) 및 스트렙토마이신 황산염(streptomycin sulfate)(100  $\mu$ g/ml)로 보충된 DMEM에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 습기가 있는 공기에서 배양하였다. 세포를 25, 50 및 100  $\mu$ M의 농도로 프루네티네(prunetin)과 함께 배양하거나, 양성 대조군으로 배양하였고, 그 후에 지시된 시간 동안 LPS 1  $\mu$ g/ml으로 자극하였다. DMSO에 희석된 다양한 농도의 시험 화합물을 배지에 더하였다. DMSO의 최종 농도는 0.05%를 초과하지 않았다.
- [0045] <1-2> 아질산염 확인
- [0046] RAW 264.7 세포를 24 웰에  $5 \times 10^5$  세포/웰에 두었고, 그 후에 다양한 농도의 (25, 50, 또는 100  $\mu$ M) 프루네티네의 부재 또는 존재하에 24시간 동안 LPS(1  $\mu$ g/ml)가 있거나 없이 배양하였다. 배양 배지안의 아질산염(Nitrite) 수준을 그리스(Griess) 반응 분석을 이용하여 확인하였고, 산화 질소(NO) 수준을 반영하는 것을 추정하였다.
- [0047] 그 결과, 프루네티네는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 산화 질소 및 PGE<sub>2</sub> 염증 매개자의 생산에서 현저한 감소를 보였다(도 2a 및 3a). 따라서, 본 발명자들은 프루네티네의 항염증 효과를 조사하였고, 시험관 내 대식세포 모델로 상기 원인이 되는 기작을 확인하는 것을 착수하였다. 도 2a와 같이, 프루네티네(25, 50 또는 100  $\mu$ M)은 용량 의존적으로 LPS로 유도된 산화질소의 생산을 저해하였다. L-NIL(10  $\mu$ M)를 양성 산화질소 생산 저해제로 사용하였다.
- [0048] <1-3> 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)
- [0049] iNOS가 산화 질소를 생산하는 L-아르기닌의(L-arginine)산화적 아미노기 이탈을 촉매하는 것으로 알려져 있기 때문에(Moncada *et al.*, 1991), 상기 iNOS 단백질 발현을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. RAW 264.7 세포를 원심분리 및 인산완충수용액(phosphate-buffered saline, PBS)으로 세척하여 수집하였다. 상기 세척된 세포 펠렛(pellet)을 류펩틴(leupeptin) 및 아프로티닌(aprotinin)을 각각 5  $\mu$ g/ml을 포함하는 추출 용해 완충액(extraction lysis buffer)(50 mM HEPES pH 7.0, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 5 mM Na fluoride 및 0.5 mM Na orthovanadate)에 20분 동안 4℃에서 부유하였다. 세포 잔해를 미세원심분리 바로 후에 상청액을 신속히 동결함으로써 제거하였다. 상기 단백질 농도를 제조업자의 지시에 따라, Pierce BCA 단백질 분석 시약을 이용하여 확인하였다. 처리되거나 처리되지 않은 세포 추출물 유래 세포 단백질 30  $\mu$ g을 10-12% SDS-PAGE로 분리 후에 PVDF막으로 전기이동시켰다. 상기 면역블랏(immunoblot)을 차단 용액(5% 스킵 밀크(skim milk))과 함께 하룻밤 동안 4℃에서 배양시킨 후 1차 항체와 함께 4 시간 동안 배양하였다. 블랏(Blot)을 트윈 20/트리스-완충 식염수(Tween 20/Tris-buffered saline)로 4 회 세척하였고, 1:1000로 희석한 겨자무 과산화수소(horseradish peroxidase)가 접합된 2차 항체로 2 시간 동안 상온에서 배양하였다. 블랏을 다시 트윈 20/트리스-완충 식염수로 3회 세척한 후에 개선된 화학발광(chemiluminescence)(Amersham Life Science)로 현상하였다.

- [0050] 그 결과, 도 2b와 같이, 프루네티는 현저히 LPS로 유도된 iNOS 단백질 발현을 저해하였고, 이와 동일한 방식으로 이것은 산화질소의 생산을 저해하였다.
- [0051] <1-4> RNA 제조 및 역전사 중합효소 연쇄 반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT PCR)
- [0052] iNOS가 산화 질소를 생산하는 L-아르기닌의(L-arginine)산화적 아미노기 이탈을 촉매하는 것으로 알려져 있기 때문에(Moncada *et al.*, 1991), 상기 iNOS mRNA 발현을 RT-PCR로 각각 확인하였다. 총 세포내 RNA를 Easy Blue kits (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 분리하였다. 각 시료로부터, 1  $\mu$ g RNA를 MuLV 역 전사효소, 1 mM 디옥시리보뉴클레오티드 3인산염(deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP) 및 올리고(oligo)(dT<sub>12-18</sub>) 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l를 이용하여 역전사하였다. PCR 분석을 상기 cDNA 제조물의 부분 표본(aliquot)에 COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 및  $\beta$ -액틴( $\beta$ -actin)(내부 표준으로서) 유전자 발현을 탐지하기 위하여 열 순환기(thermal cycler)(Perkin Elmer Cetus, Foster City, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 반응을 1 단위(unit) Taq DNA 중합효소(polymerase), 0.2 mM dNTP,  $\times 10$  반응 완충액(reaction buffer) 및 100 pmol 5' 및 3' 프라이머를 포함하는 25  $\mu$ l의 부피에서 수행하였다. 2 분 동안 95 $^{\circ}$ C에서 초기 변성 후에, 26 또는 30 증폭 사이클(cycle)을 iNOS(1 분 95 $^{\circ}$ C 변성, 1 분 60 $^{\circ}$ C 어닐링(annealing) 및 1.5 분 72 $^{\circ}$ C 연장), COX-2 (1 분 94 $^{\circ}$ C, 1 분 60 C 및 1 분 72 $^{\circ}$ C), TNF- $\alpha$  (1 분 94 $^{\circ}$ C, 1 분 55 $^{\circ}$ C 및 1 분 72 $^{\circ}$ C), IL-1 $\beta$ (1 분 94 $^{\circ}$ C, 1 분 60 $^{\circ}$ C 및 1 분 72 $^{\circ}$ C) 및 IL-6 (1 분 94 $^{\circ}$ C, 1 분 56 $^{\circ}$ C 및 1 분 72 $^{\circ}$ C)로 수행하였다. 본 발명에서 사용된 상기 PCR 프라이머는 하기에 기재된 것이고, Bioneer (Seoul, Korea)에서 구입하였다: 센스 가닥(sense strand) iNOS, 5'-AAT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT-3', 안티-센스 가닥(anti-sense strand) iNOS, 5'-GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC-3'; 센스 가닥 COX-2, 5'-GGA GAG ACT ATC AAG ATA GT-3', 안티-센스 가닥 COX-2, 5'-ATG-GTC AGT AGA CTT TTA CA-3'; 센스 가닥 TNF- $\alpha$ , 5'-ATG AGC ACA GAA AGC-ATG ATC-3', 안티-센스 가닥 TNF- $\alpha$ , 5'-TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT-3'; 센스 가닥 IL-1 $\beta$  5'-TGC AGA GTT CCC CAA CTG GTA CAT C-3'; 안티-센스 가닥 IL-1 $\beta$  5'-GTG CTG CCT AAT GTC CCC TTG AAT C-3'; 센스 가닥 IL-6, 5'-GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC-3', 안티-센스 가닥 IL-6, 5'-AAG TGC-ATC ATC GTT GTT CAT ACA-3'; 센스 가닥  $\beta$ -액틴(actin), 5'-TCA TGA AGT GTG ACG- TTG ACA TCC GT-3', 안티-센스 가닥  $\beta$ -액틴, 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT- GCA CGA TG-3'. 증폭 후에, 상기 PCR 반응을 2% 아가로스 젤(agarose gel)에서 전기영동하였고, 브롬화 에티듐(ethidium bromide)로 염색하고 UV 조사하여 가시화하였다.
- [0053] 그 결과, 도 2b와 같이, 프루네티는 현저히 LPS로 유도된 iNOS mRNA 발현을 저해하였고, 이와 동일한 방식으로 이것은 산화질소의 생산을 저해하였다.
- [0054] <1-5> NF- $\kappa$ B 전사 인자 분석
- [0055] 프루네티에 의한 iNOS 발현 수준의 저해가 전사 수준에서 가해지는지를 확인하기 위해, 상기 NF- $\kappa$ B 부위를 포함하는 iNOS 유전자 프로모터의 전사 활성화를 분석하였다. RAW 264.7 세포 ( $5 \times 10^7$ )를 조직 배양 접시에 접종하였고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>에서 하룻밤 동안 배양하였다. 프루네티 및/또는 LPS 처리후에, 핵 단백질을 Active Motif Nuclear Extract Protocol (Active Motif, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출하였고, 용해물의 총 단백질 농도를 BCA Protein Assay kit (Pierce)를 이용하여 확인하였다. 5  $\mu$ g의 핵 추출물에서 NF- $\kappa$ B p65 아단위(subunit)의 활성화를 제조업자의 지시에 따라 NF- $\kappa$ B p65 ELISA에 기초한 전사 인자 분석 키트(NF- $\kappa$ B p65 ELISA-based transcription factor assay kit)(TransAM<sup>TM</sup> assay; Active Motif)로 확인하였다. 상기 NF- $\kappa$ B를 탐지하는 항체는 NF- $\kappa$ B가 활성화되었을 때만 접근가능한 p65의 에피토프(epitope)를 인식한다. 상기 450 nm에서 비색 측정값을 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(VersaMax; Molecular Devices)에서 확인하였다. 키트와 함께 제공된 상기 양성대조군 저캣(Jurkat) 핵 추출물을 분석 특수함을 평가하는 것에 이용하였다.
- [0056] 그 결과, 도 2d와 같이, LPS는 현저히 iNOS 프로모터 루시페라아제 활성을 향상시키며, 프루네티는 용량 의존적으로 상기 유도를 저해한다.
- [0057] <1-6> 플라스미드, 일시적인 형질 전환 및 루시페라아제 분석

- [0058] 상기 쥐 iNOS 프로모터 플라스미드(promoter plasmid)(pGL3-iNOS; -1592/+185) 및 COX-2 프로모터 플라스미드(pGL3-COX-2; -965/+39)를 기존에 기재된 바와 같이(Kraemer et al., 1996; Lowenstein et al., 1993) 제조하였다. RAW 264.7 세포를 제조업자의 지시에 따라 리포펙타민(Lipofectamine LTX<sup>TM</sup>)(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 pGL3-COX-2, pGL3-iNOS 또는 NF- $\kappa$ B-Luc 리포터 플라스미드(reporter plasmid)와 함께 상기 pHRL-TK 플라스미드(promega, Madison, WI)를 더하여 공동-형질전환(co-transfected)하였다. 형질전환 4시간 후에, 세포에 프루네티를 1 시간 동안 처리한 후에 LPS (1  $\mu$ g/ml)로 18 시간 동안 자극하였다. 각 세포를 차가운 인산완충식염수로 세척한 후에 세포를 용해하였고 루시페라아제 활성을 Promega luciferase assay system (Promega, Madison, CA, USA)을 이용하여 확인하였다.
- [0059] <실시예 2> RAW 264.7 대식세포에서 프루네티에 의한 LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub> 생산 및 COX-2 발현 저해
- [0060] <2-1> 세포 생존능 분석
- [0061] 세포 생존능을 살아있는 세포에서만 활성이 있는 미토콘드리아의 탈수효소에 의한 무색의 MTT(Sigma, St. Louis, MO)로부터 형성된 푸른색 포르마잔(formazan)의 형성에 기초하여 측정하였다. RAW264.7 대식세포를 웰(well)당  $4 \times 10^3$  세포의 농도로 96웰 플레이트에 24시간 동안 놓았고, 세척하였다. 다양한 농도의 프루네티(prunetin)과 배양된 세포를 LPS (*E.coli* 026:B6; Sigma, St. Louis, MO)와 함께 24시간 동안 배양하였고, 그 후에 0.5 mg/ml MTT 용액 안에서 배양하였다. 생존능을 비색(colorimetric) MTT분석을 이용하여 결정하였다.
- [0062] 그 결과, MTT 분석은 산화질소 및 생산에 대한 프루네티의 억제 효과가 일반적인 세포독성에 원인이 될 수 없음을 나타내었다(도 1b).
- [0063] <2-2> 효소-연관 면역흡착 분석(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)
- [0064] 배양 배지 및 혈청 안의 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 수준을 효소 면역분석(enzyme immunoassay, EIA)(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 정량하였다. ELISA 결과의 정량을 제조업자의 지시에 따라, 450 nm의 파장으로 설정하고, 40 nm로 수정한 빛 흡수율(absorbance)인 ELISA 플레이트 리더(plate reader)(VersaMax; Molecular Devices)를 이용하여 수행하였다.
- [0065] 그 결과, LPS(1  $\mu$ g/ml)로 자극한 세포는 자극하지 않은 대조군에 비해 현저한 PGE<sub>2</sub> 생산 증가를 유도하였다(도 3a). 또한, 프루네티(25, 50 또는 100  $\mu$ M)의 처리는 현저히 LPS로 유도된 PGE<sub>2</sub> 생산을 저해하였다. NS398(5  $\mu$ M)을 PGE<sub>2</sub> 생산을 저해하는 양성 대조군으로 사용하였다. PGE<sub>2</sub> 생산에 대한 프루네티의 저해 효과가 이에 해당하는 유전자 발현의 조절에 연관되는지 조사하기 위해, COX-2의 단백질 및 mRNA 수준을 웨스턴 블랏 및 RT-PCR로 각각 정량하였다. 도 3b와 같이, COX-2는 LPS로 단백질 및 mRNA 수준에서 현저히 상향조절되었고, 프루네티는 이러한 상향조절을 효과적으로 저해하였다. 또한, 프루네티는 LPS로 유도된 COX-2 프로모터 루시페라아제 활성을 용량 의존적으로 저해하였다(도 3d). 이러한 결과는 프루네티가 전사적으로(transcriptionally) LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 유전자 발현을 하향 조절하는 것을 확인시켜 주었다.
- [0066] <실시예 3> 프루네티에 의한 LPS로 유도된 NF- $\kappa$ B 전사적(transcriptional) 및 NF- $\kappa$ B-DNA 결합 활성 감소
- [0067] 누적된 데이터는 NF- $\kappa$ B가 LPS 또는 전염증 사이토카인에 의해 매개되는 염증 반응의 주요한 조절 구성원이고, iNOS 및 COX-2 프로모터는 이러한 유도가능한 유전자 발현에 필요한 NF- $\kappa$ B 부위를 포함하는 것을 나타낸다. 실험적으로 상기 프루네티에 의한 NF- $\kappa$ B 조절을 확인하기 위하여, pLuc-프로모터 벡터에 4 공간의(four spaced) NF- $\kappa$ B 결합 부위를 도입하여 만든 pNF- $\kappa$ B-luc 플라스미드로 NF- $\kappa$ B의 전사적 활성을 조사하였다. 세포를 상기 플라스미드로 일시적으로 형질전환시켰고, 그 후에 프루네티의 존재 또는 부재 하에 1  $\mu$ g/ml LPS로 자극하였다. 프루네티의 전처리는 LPS로 유도된 NF- $\kappa$ B 의존적 루시페라아제 활성을 농도 의존적으로 감소시켰다(도 4a). DNA 결합 활성에 대한 프루네티의 효과를 더 확인하기 위하여, NF- $\kappa$ B 전사 인자 분석을 프루네티가 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합 활성을 바꾸는지 확인 하기 위해 수행하였다. 도 4b와 같이, 1 시간 동안 LPS(1  $\mu$ g/ml)는 그것의 일치하는 DNA 서열에 대해 NF- $\kappa$ B 결합 활성을 증가시켰다. 하지만, 1 시간 프루네티 전처리는 용량

의존적으로 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합을 감소시켰다.

[0068]

[0069] <실시예 4> 프루네티에 의한 IKK 복합체 활성화의 저해에 의한 NF- $\kappa$ B 활성의 음성적 조절

[0070] NF- $\kappa$ B는 I $\kappa$ B 결합에 의해 세포질에서 불활성화되고, I $\kappa$ B의 인산화 및 분해를 통해 활성화되며, 그 후에 LPS에 의해 선행되는 NF- $\kappa$ B 핵 전좌(nuclear translocation)가 된다. 따라서, 다음으로 프루네티가 I $\kappa$ B의 인산화 및 그 후의 분해를 저해하는지에 대해 조사하였다. RAW 264.7 대식세포에 1 시간 동안 프루네티(25, 50 또는 100  $\mu$ M)를 전처리하였고, 그 후에 1  $\mu$ g/ml LPS를 10분 동안 처리하였다. LPS 처리 후에 LPS로 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화가 증가된 것을 확인하였으며, 프루네티 처리는 현저히 이러한 인산화를 감소시켰다(도 5a). 게다가, LPS로 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$  분해는 현저히 프루네티에 의해 저해되었다(도 5a). 이러한 결과는 프루네티가 LPS로 유도된 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화 및 이것의 차후의 분해를 저해함으로써 NF- $\kappa$ B 활성을 저해하는 것을 제시한다. 이것을 확인하기 위해, NF- $\kappa$ B (p65/p50 헤테로다이머(heterodimer))의 핵 전좌를 조사하였다. LPS가 I $\kappa$ B $\alpha$  분해와 함께 p65 및 p50의 핵으로의 전좌를 현저히 유도하며, 프루네티 처리는 p65 및 p50의 핵 전좌를 현저히 억제하는 것을 확인하였다(도 5a). 이러한 발견은 프루네티가 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화 및 분해의 저해로 NF- $\kappa$ B-DNA 결합을 예방하는 것을 나타낸다. 상기 IKK $\alpha$ / $\beta$  매개하는 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화는 LPS를 포함하는 모든 알려진 전염증 자극에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화에 필요하기 때문에, 시험관내 면역블랏으로 프루네티가 IKK 복합체 활성화를 감소시키는 지 확인하였다. IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  및 인산화된 IKK $\alpha$ / $\beta$  항체로 웨스턴 블랏하여 LPS로 유도된 IKK $\alpha$ / $\beta$  활성화에 대한 프루네티의 영향을 조사하였다. 도 5b와 같이, LPS는 강하게 IKK $\alpha$ / $\beta$  인산화를 유도하는 반면 프루네티의 처리는 현저히 이러한 인산화를 감소시켰으나, 프루네티(50 또는 100  $\mu$ M)은 전체 세포의 IKK $\alpha$  및 IKK $\beta$  양에 거의 영향을 주지 않았다. 본 발명의 데이터는 프루네티가 IKK 복합체의 활성화를 유도하는 과정을 방지함으로써, LPS로 유도된 NF- $\kappa$ B 활성화를 저해할 수 있음을 확인하였다.

[0071] <실시예 5> 프루네티에 의해 유도된 항염증 반응에서 p38 및 JNK MAPK 경로의 개입

[0072] 네 개의 MAPKs, ERK1/2, JNK 및 p38 MAPK는 IKK의존적 NF- $\kappa$ B 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에, RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 MAPKs의 인산화에 대한 프루네티의 영향을 웨스턴 블랏으로 조사하였다.

[0073] 그 결과, 도 6과 같이, 프루네티는 농도 의존적으로 LPS에 의해 유도된 p38 및 JNK의 활성화를 저해하였으나, ERK1/2의 인산화에는 영향을 주지 않았다(도 6). 이러한 결과는 프루네티가 LPS로 유도된 대식세포에서 iNOS 및 COX-2 발현의 억제를 유도하는 p38-NF- $\kappa$ B 및 JNK를 포함하는 신호 캐스케이드(cascade)를 저해할 수 있음을 제시한다.

[0074] <실시예 6> 프루네티에 의한 LPS로 유도된 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  생산 및 mRNA 발현 저해

[0075] NF- $\kappa$ B로 조절된 다른 전염증 사이토카인에 대한 프루네티의 영향을 평가하기 위해, 프루네티를 처리하고 LPS로 자극한 대식세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  생산 및 그들의 발현을 EIA 및 RT-PCR로 각각 조사하였다.

[0076] 그 결과, 프루네티의 전처리는 농도 의존적으로 LPS로 유도한 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  생산 및 mRNA 발현을 감소시키는 것을 확인하였다(도 7). 총괄하여, 프루네티는 iNOS 및 COX-2 발현뿐 아니라 NF- $\kappa$ B로 조절되는 광범위한 전염증 유전자 저해에 대한 잠재력을 갖는다.

[0077] <실시예 7> 프루네티에 의한 생체 내 염증 매개자 저해 및 LPS로 유도된 패혈증 사망으로부터 쥐 보호 효과

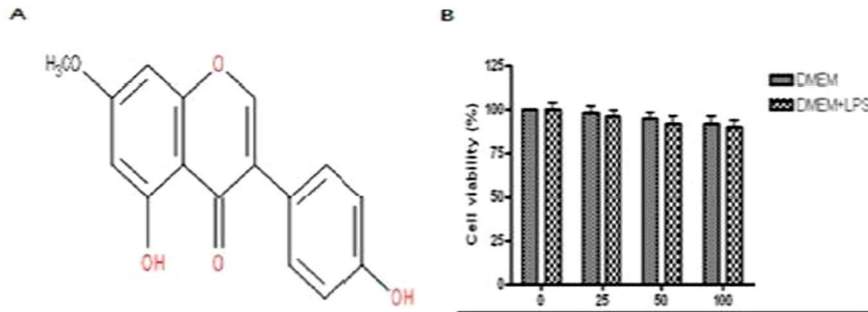
[0078] 산화질소 및 사이토카인과 같은 NF- $\kappa$ B로 조절된 전염증 매개자는 패혈증의 발병에서 중요한 역할을 한다. LPS로 유도된 염증 매개자를 약화시키는 프루네티의 능력을 고려하여, 패혈증 동물 모델에서 프루네티의 효과를 조사하였다. 모든 동물 관리 및 실험 절차를 대학 지침을 준수하였으며, 경희대학교 약학대학 동물 관리 및 실험 동물의 사용에 대한 윤리 위원회의 승인을 받았다. 수컷 C57BL/6 쥐를 Samtaco사로부터 구입하였다. 동물을 20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C의 변함없는 온도에서 사육하였고, 12시간 암/명 주기하에 실험적 표준 실험 사료를 주었다.

[0079] 쥐에서 패혈증에 대한 프루네티의 효과를 확인하였을 때, LPS 주입(37.5 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$ , 복강내)은 NO, TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  혈청 수준을 현저히 증가시켰으나, 프루네티의 전처리(5, 10 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$ , 복강내)는 이러한 염증 매개자

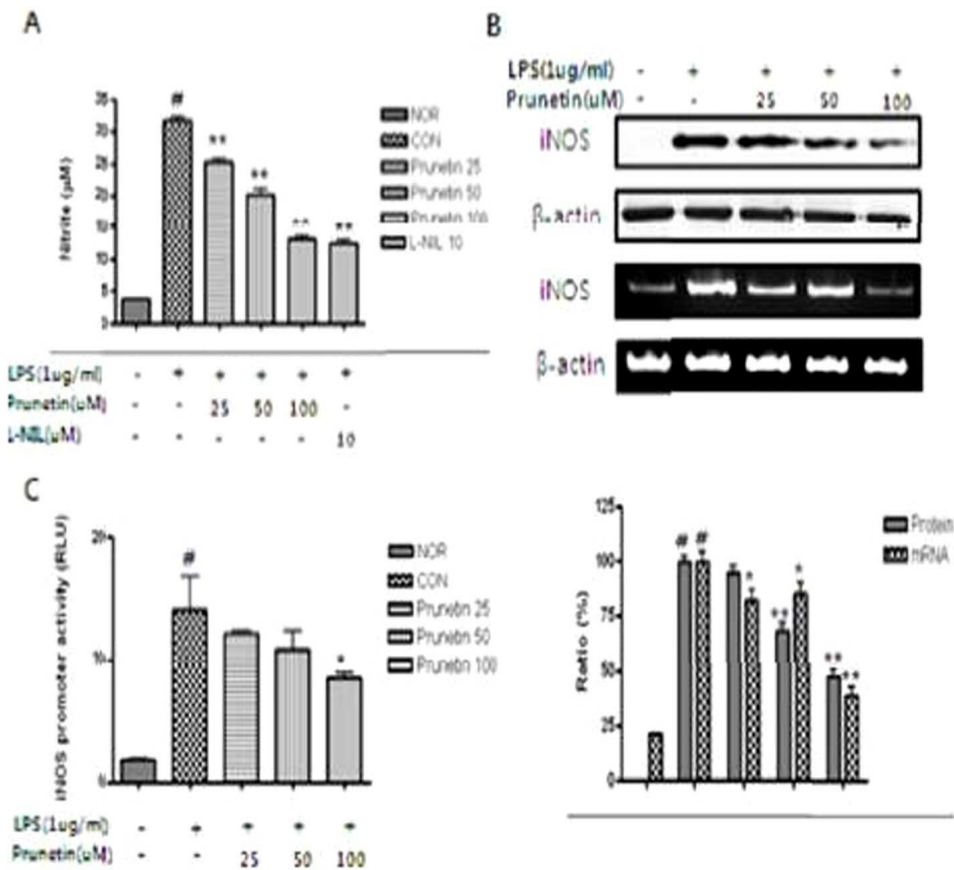
의 생산을 현저히 감소시켰다(도 8b). 그 뒤에, 프루네티가 패혈증 동안 생존을 개선시키는 것을 관찰하였다. 도 8a와 같이, LPS 주입은 쥐에 주입 후 24시간에 80% 치사율을 유도하였으나, 프루네티의 전처리는 72시간에 이것을 80~90%로 감소시켰다.

## 도면

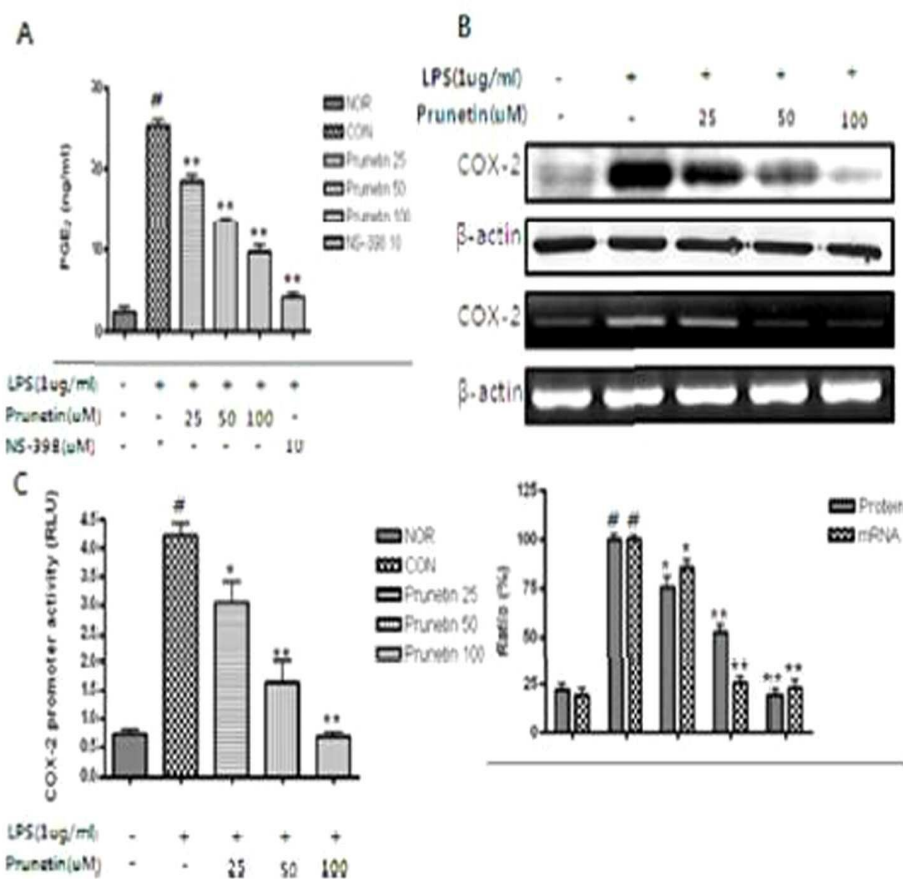
### 도면1



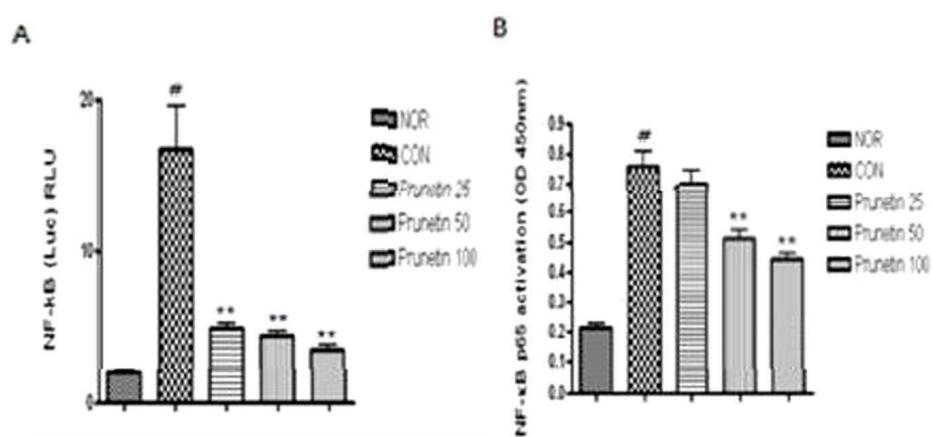
### 도면2



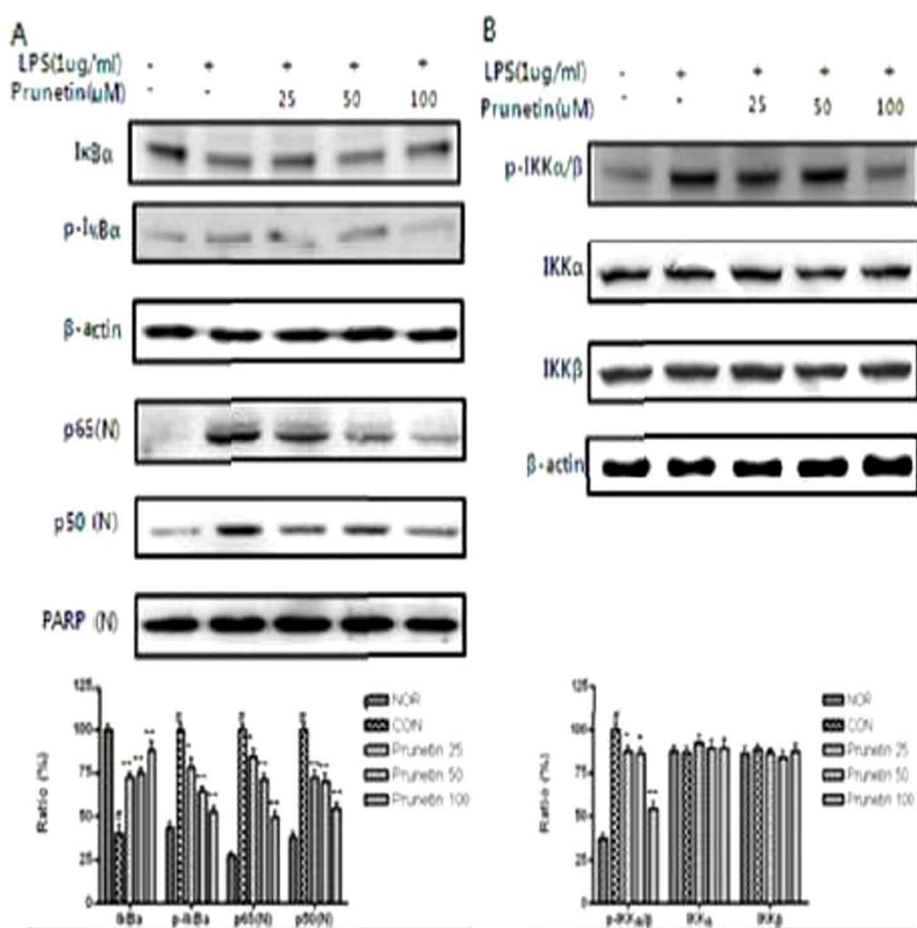
도면3



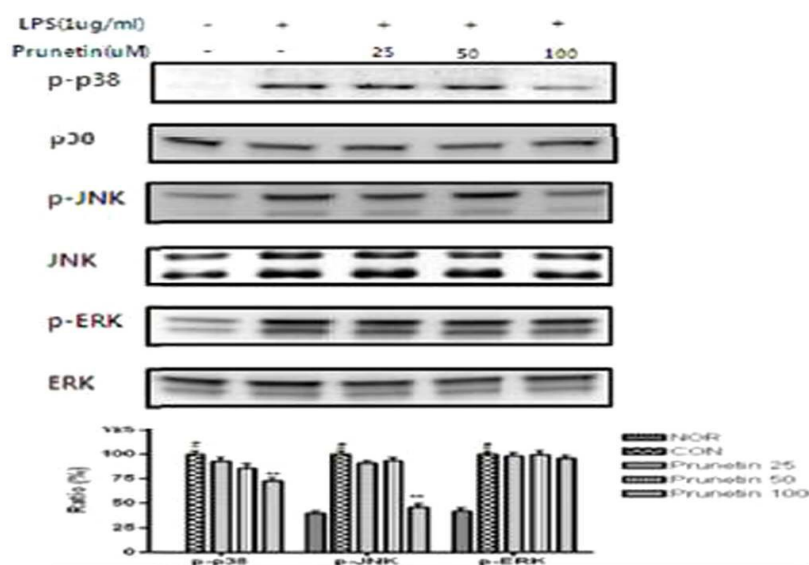
도면4



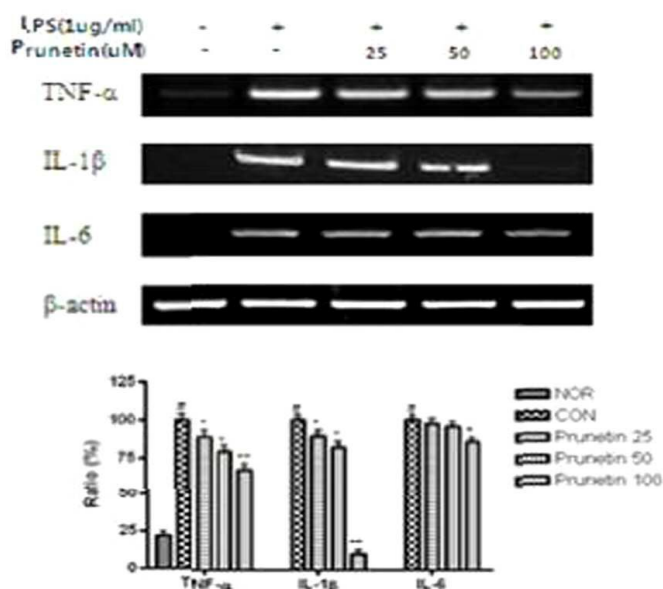
도면5



도면6



도면7



도면8

