(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0010800
(43) 공개일자 2012년02월06일

(51) Int. Cl.
A61K 31/4709 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0072379
(22) 출원일자 2010년07월27일
심사청구일자 2010년07월27일

(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

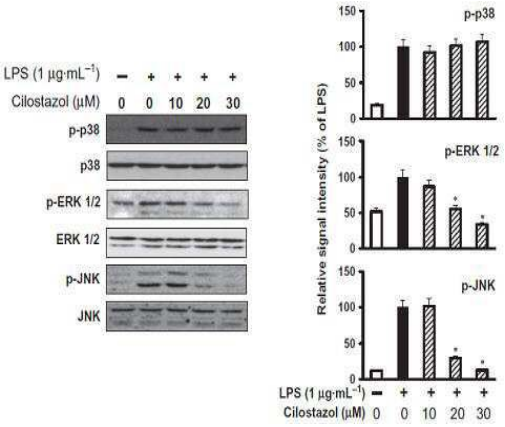
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환 치료 및 예방용 약학조성물

(57) 요 약

본 발명은 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환 치료 및 예방용 약학조성물에 관한 것에 관한 것이다. 상기 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염은 이미 다른 용도로 시중에 시판되고 있는 한편, LPS에 의해 소교세포를 활성화시킨 전염증성 및 신경독소 인자에 의한 신경손상 모델에서 NK-κB의 DNA 결합 및 전사 활성을 억제하고, p38 MAPK의 활성에 영향 없이 ERK 1/2 및 JNK를 억제함으로써 NK-κB 활성화의 상향 신호를 블로킹함으로써, NO, PGE_2, IL-1β, TNF-α 및 MCP-1을 농도 의존적 방식으로 억제시키므로 활성화된 소교세포에서 전염증 매개체 및 사이토카인 생성을 억제하여 퇴행성 신경질환의 치료 또는 예방용 약제나 식품으로써 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



(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 포함하는 퇴행성 신경질환의 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 퇴행성 신경질환의 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 퇴행성 신경질환의 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머 질환(AD), 파킨슨 질환(PD), 외상 후 스트레스 장애(trauma), 다발성 경화증(MS), 대뇌 허혈질환 및 근위축성측색경화증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 치료 및 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 퇴행성 신경질환의 치료 및 예방용 약학조성물.

청구항 6

실로스타졸 또는 이의 산부가염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 개선용 건강식품.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 건강식품은 건강기능식품 또는 건강음료인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 개선용 건강식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 외상 후 스트레스 장애, 다발성 경화증, 대뇌 허혈질환 및 근위축성 측색경화증과 같은 퇴행성 신경질환 치료 및 예방에 유용하게 이용될 수 있는 실로스타졸(cilostazol) 또는 이의 약리학적 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 소교세포는 분화된 대식세포(specialized macrophage)로, 뇌에 널리 분포한다. 소교세포는 성인의 중추신경(CNS)에 있어서 총 신경아교세포(glial cell)의 약 10 내지 20%를 구성한다(Fanarraga et al., 2009). 소교세포는 조직 잔해 및 죽은 세포들을 삼키는 식세포로서 작용할 뿐 아니라 뇌의 생체방어활동에 참여하는 역할을 수행할 수 있다. 소교세포는 또한 만성뇌질환에 있어서 다양한 신경 독소 및 전염증 매개체를 분비함으로써 신경염증을 증가시켜 신경세포사 및 탈수초의 원인이 된다(Glezer et al., 2007). 뇌손상 또는 신경성염증 자극에 대한 반응으로, 소교세포는 NO, PGE_2, 단핵세포 화학유인 단백질-1(MCP-1), 인터류킨-1 (IL-1), IL-6 및 종양괴사 인자-α(TNF-α)를 포함하는 전염증성 및/또는 세포독성 인자를 과다 생산할 수 있다. 상기 인자들이 알츠하이머 질환(AD), 파킨슨 질환(PD), 외상 후 스트레스 장애(trauma), 다발성 경화증(MS), 대뇌 허혈질환을 포함

하는 다양한 퇴행성 신경질환의 지료로서 알려져 왔다(McGeer and McGeer, 1995; Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999). 다시 말해, 과도한 전염증성 인자의 생성이 AD, PD, 외상 후 스트레스 장애, MS, 대뇌 허혈질환과 같은 병리에 있어서, 염증과 관련된 세포 독성의 중요 결정인자이다(Misko et al., 1995; Pasinetti and Aisen, 1998; Tomimoto et al., 2000). 소교세포에 있어서 전염증성 매개체의 감소가 이들 질환의 심한 증세를 약화시킬 수 있다(Liu and Hong, 2003; Eikelenboom and van Gool, 2004). 따라서, 소교세포의 활성화를 조절하는 것이 많은 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료에 유용할 것으로 생각되며 최근 이에 대한 활발한 연구가 국내외적으로 진행되고 있다.

[0003] 한편, 파킨슨병에 대한 현 치료법은 도파민 전구체인 L-DOPA를 투여함으로써 운동장애 증상을 완화시키는 것에 집중되어 있다. 그러나 불행히도 L-DOPA 투여는 삶의 질을 정상인에 가깝게 하지 못할 뿐 아니라, 만성적으로는 다양한 신체적, 정신적 역효과를 야기한다. 또 L-DOPA 자체가 신경독성이 있을 수 있다는 증거가 제기되고 있다. 무엇보다도, 파킨슨병에서 퇴행의 진행을 억제하는 치료법이나 예방법은 전무한 상태이다.

[0004] 알츠하이머 질병의 경우, 현재의 약제학적 치료법은 아세틸콜린스테라제 억제제 혹은 메만틴, N-메틸-D-아스파테이트 채널 차단제에 기초하고 있으며 현재 시크리타아제(secretase) 억제제 등 다양한 약물들의 개발이 시도되고 있으나 아직 임상에 적용 중인 물질은 없다. 근위축성측색경화증, 크로이츠펠트 야콥병 및 헌팅턴병과 같은 기타 퇴행성 신경질환들 역시 그 효과적인 치료법은 아직까지 개발되지 않은 상태이다.

[0005] 따라서 상술한 질병들의 병인에 기초한 보다 효과적인 치료 방법의 개발이 시급하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

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

[0007] 본 발명의 다른 목적은 실로스타졸(cilostazol) 또는 이의 산부가염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 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 소교세포의 활성화를 유도한다. 소교세포의 LPS에 의한 자극은 따라서 활성화된 소교세포에서 배출되는 다양한 전염증성 및 신경독소 인자에 의한 신경손상을 뒷받침하는 메커니즘을 연구하기 위한 유용한 모델이다(Kim et al., 2004a,b)

[0009] 이에, 본 발명자들은 마우스의 BV2 소교세포에서 LPS로 활성화된 전염증성 및 세포독성인자의 생성에 있어서 실로스타졸의 효과 및 작용 메커니즘을 최초로 규명함으로써, 실로스타졸의 다양한 퇴행성 신경질환의 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 퇴행성 신경질환의 치료 및 예방용 약학조성물을 제공한다.

[0011] 상기 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염은 NK-κB의 DNA 결합 및 전사 활성을 억제하고, p38 MAPK의 활성에 영향 없이 ERK 1/2 및 JNK를 억제함으로써 NK-κB 활성화의 상향 신호를 블로킹함으로써, NO, PGE_2, IL-1β, TNF-α 및 MCP-1을 농도 의존적 방식으로 억제시킬 수 있다.

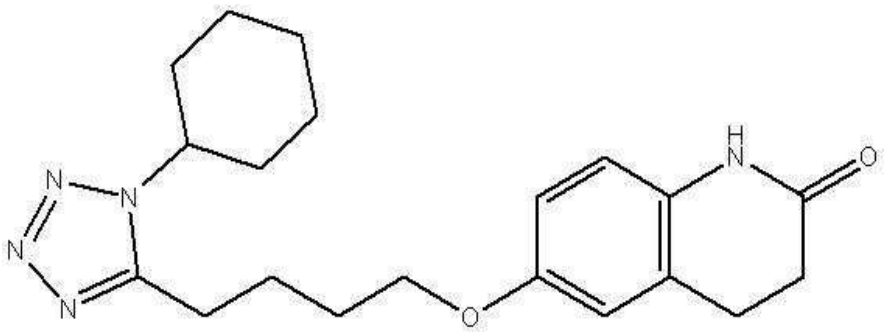
[0012] 상기 실로스타졸 또는 이의 약리학적 허용가능한 염의 퇴행성 신경질환의 치료 및 예방용 약학조성물으로서의 용도는 LPS에 의해 소교세포를 활성화시킨 전염증성 및 신경독소 인자에 의한 신경손상 모델을 통해 입증하였다.

[0013] 상기 퇴행성 신경질환으로는 알츠하이머 질환(AD), 파킨슨 질환(PD), 외상 후 스트레스 장애(trauma), 다발성 경화증(MS), 대뇌 허혈질환 또는 근위축성측색경화증 등이 포함될 수 있다.

[0014] 상기 실로스타졸은 먼저 3´-5´-사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP)의 세포내 수준을 포스포디에스터라제 3(PDE3)에 의한 가수분해를 억제함으로써 증가시키는데 도입되기 시작한 약물로서, 혈소판 응고 억제제, 혈관확장제, 말초 혈관 질환의 허혈성 질환 치료의 치료제로 사용되고 있으므로, 안전성이 확보된 화합물이다.

[0015] 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

[0016] 

[0017] 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.

[0018] 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.

[0019] 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.

[0020] 또한, 본 발명에 따른 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 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.

[0022] 상기 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 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.

[0023] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로즈 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0024] 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.

[0025] 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 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 주사제의 구체예로서, 글루코스 주사, 자일리톨 주사, D-만니톨 주사, 프룩토스 주사, 생리식염수, 덱스트란 40 주사, 덱스트란 70 주사, 아미노산 주사, 링거액, 락트산-링거액 등이 포함될 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 약학조성물인 액상 또는 분말상의 조성물은 유효성분인 실로스타졸에 용제, 기제, 희석제, 충전제, 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, 항산화제 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.

[0028] 상기 약학조성물의 유효성분인 실로스타졸의 퇴행성 신경질환의 치료 및 예방을 위한 유효량은 환자의 연령, 성별, 질환의 정도에 따라서 다르지만, 통상 0.1㎎/㎏ ~ 10.0㎎/㎏의 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, 치료기간 및 횟수 등에 따라 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

[0029] 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, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0030] 본 발명은 실로스타졸 또는 이의 산부가염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 개선용 건강식품을 제공한다.

[0031] 상기 건강식품은 건강기능식품 또는 건강음료의 형태로 제공될 수 있으며, 기능성 음료, 환제, 정제 또는 상기 성분을 건조 분말화하여 충진한 연질 또는 경질 캡슐제의 형태로 이용하는 것이 바람직하다.

[0032] 본 발명에 따른 실로스타졸 또는 이의 산부가염를 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.

[0033] 상기 건강식품은 식품학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시예로서, 본 발명의 건강식품이 음료인 경우에는 지시된 비율로 필수 성분으로서 실로스타졸 또는 이의 산부가염를 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 말토즈, 수크로즈, 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 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 예를들어 사카린, 아스파르탐 등을 사용할 수 있다.

[0034] 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.

[0035] 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

[0036] 본 발명에 따른 실로스타졸은 이미 다른 용도로 시중에 시판되고 있어 안전성이 확보된 화합물로 알려져 있는 한편, NK-κB의 DNA 결합 및 전사 활성을 억제하고, p38 MAPK의 활성에 영향 없이 ERK 1/2 및 JNK를 억제함으로써 NK-κB 활성화의 상향 신호를 블로킹함으로써, NO, PGE_2, IL-1β, TNF-α 및 MCP-1을 농도 의존적 방식으로 억제시켜 소교세포에서 전염증성 매개체 및 사이토카인 생성이 억제되어 퇴행성 신경질환과 관련된 병리학적 질환의 치료 또는 예방용 약제나 식품으로써 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1a 및 도 1b는 LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서 실로스타졸에 의한 NO 및 PGE_2의 억제를 나타내는 그래프이다. 각각의 값은 평균±표준오차(SEM)를 나타내며, 4회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다. *P<0.05는 실로스타졸 없이 LPS 처리한 세포로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 1a는 BV2 소교세포를 LPS(1㎍/㎖)을 넣고 24시간 동안 배양하기 전에, 다양한 농도의 실로스타졸(10, 20 및 30μM)을 6시간 동안 전 처리하고, 아질산염의 함유량을 Griess 반응을 이용하여 측정한 결과이다.

도 1b는 BV2 소교세포를 LPS(1㎍/㎖)을 넣고 24시간 동안 배양하기 전에, 다양한 농도의 실로스타졸(10, 20 및 30μM)을 6시간 동안 전 처리하고, 배양 배지의 PGE_2의 농도를 상업적인 ELISA 키트(b)를 이용하여 측정한 결과이다.

도 2는 BV2 소교세포의 세포생존율에 대한 실로스타졸의 효과에 관한 그래프이다. LPS(1㎍/㎖)을 넣고 24시간 동안 배양하기 전에, 다양한 농도의 실로스타졸(10, 20 및 30μM)을 6시간 동안 전 처리하고, MTT 환원 분석을 통해 세포 생존율을 평가하며, 상기 결과는 대조구 세포(실로스타졸 미첨가)에 대한 생존 세포의 백분율로 표현한다. 각각의 값은 평균±표준오차(SEM)를 나타내며, 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다.

도 3a 및 도 3b는 각각 LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서, 실로스타졸에 의한 iNOS 및 COX-2 단백질 발현의 억제를 나타내는 그래프와 실로스타졸에 의한 iNOS 및 COX-2 mRNA 발현의 억제를 나타내는 그래프이다. 각각의 값은 평균±표준오차(SEM)를 나타내며, 5회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다. *P<0.05는 실로스타졸 없이 LPS 처리한 세포로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 3a는 LPS(1㎍/㎖)을 넣고 24시간 동안 배양하기 전에, BV2 소교세포에 실로스타졸(10, 20 및 30μM)을 6시간 동안 전 처리하고, 세포 용해물을 준비하고 마우스 iNOS 또는 COX-2에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. β-액틴이 웨스턴 블롯 분석을 위한 내부 대조구로서 사용 되었다.

도 3b는 6시간동안 LPS를 처리한 후, LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서 iNOS 및 COX-2의 RT-PCR 분석 결과이다. GAPDH가 RT-PCR을 위한 내부 대조구로서 사용 되었다.

도 4a 내지 4c는 LPS로 자극된 BV2 소교세포에서 iNOS 및 COX-2 발현에 있어서 실로스타졸로 유도된 세포내 cAMP의 효과를 나타낸다.

도 4a는 세포에 10분 동안 LPS 및 실로스타졸(Cilo)로 처리한 후의 세포내 cAMP 수준을 나타낸다. 각각의 값은 평균±표준오차(SEM)를 나타내며, 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다. *P<0.05는 미처리한 세포(MED)로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 4b는 iNOS 및 COX-2 발현에 있어서, cAMP 증강제의 효과를 나타내는 그래프이다. 상기 그래프는 세포를 실로스타졸(Cilo, 30mM, 6시간). 폴스콜린(FSK, 10mM, 30분) 및 디부티릴-cAMP(dbC, 100mM 30분)로 전 처리하였고, LPS(1㎍/㎖)을 넣고 24시간 동안 자극시킨 결과이다.

도 4c는 LPS로 자극된 소교세포에서, SQ 22536, cAMP 길항제(SQ)에 의한 iNOS 및 COX-2 발현에 있어서 실로스타졸의 효과를 나타낸다. 상기 그래프는 세포를 SQ(30μM)을 10분 동안 전 처리하고 실로스타졸(30μM)을 6시간 동안 처리한 후, LPS(1㎍/㎖)을 넣고 24시간 동안 자극시킨 결과이다. iNOS 및 COX-2의 단백질 수준을 측정하기 위해 세포 용해물을 준비하였다. 각각의 값은 평균±표준오차(SEM)를 나타내며, 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다. *P<0.05는 실로스타졸 없이 LPS 처리한 세포로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 5a 및 도 5b는 LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서 전염증성 사이토카인에 대한 실로스타졸의 효과를 나타낸다. 세포들에 LPS 처리(1㎍/㎖)를 하기 전에 6시간 동안 표시된 농도의 실로스타졸을 전 처리하였고, LPS를 처리 후, 상층액 및 총 RNA를 각각 24시간 또는 6시간에 분리한 결과이다. 각각의 값은 평균±표준오차(SEM)를 나타내며, 3회의 독립적인 실험으로부터 얻어진 결과를 나타낸다. *P<0.05는 실로스타졸 없이 LPS 처리한 세포로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 5a는 24시간 배양 후에, 상층액에 존재하는 IL-1β 및 TNF-α 수준을 측정한 결과이다.

도 5b는 6시간 배양한 후, IL-1β 및 TNF-α mRNA 수준을 RT-PCT로 측정한 결과이다.

도 6a 및 6b는 LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서 MCP-1 생산에 대한 실로스타졸의 효과를 나타낸다. BV2 소교세포에 LPS(1㎍/㎖)로 배양하기 전에 6시간 동안 실로스타졸(10, 20 및 30μM)을 전 처리 하였고, LPS를 처리

후, 총 RNA 및 상층액을 각각 6시간 또는 24시간에 분리한 결과이다.

도 6a는 LPS를 6시간 동안 처리한 후, LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서, MCP-1 mRNA 유전자 발현의 RT-PCR 분석을 위해 총 RNA를 준비하였고, RT-PCR 결과 아래의 농도계측적(densitometric) 데이터는 이들 각각의 대조구와 비교한 배수 변화(fold change)로 나타낸다. 상기 결과는 3회의 독립적인 실험 결과를 나타낸다.

도 6b는 배양 배지에 있어서의 세포외의 MCP-1의 수준을 상업적인 ELISA 키트를 사용하여 측정한 결과이다. *P<0.05는 실로스타졸 없이 LPS 처리한 세포로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 7a 및 도 7b는 LPS로 자극된 소교세포에 있어서 NF-κB 활성에 대한 실로스타졸의 효과를 나타낸다.

도 7a는 핵 단백질(nuclear extract 4㎍)을 준비하였고, EMSA로 NF-κB의 DNA 결합 활성을 분석한 결과이다. 결합 특이성은 표지화된 올리고뉴클레오타이드로와 경쟁하는 비표지화된 프로브(100배 과량; 'cold'로서 나타냄)를 이용하여 측정하였다. BV2 소교세포는 LPS(1㎍/㎖)로 1시간 동안 자극하기 전에, 6시간 동안 비히클(vehicle) 또는 표시된 농도의 실로스타졸을 전 처리하였고, 상기 결과는 3회의 독립적인 실험 결과를 나타낸다. *P<0.05는 LPS만 처리한 그룹으로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

도 7b는 BV2 소교세포를 LPS(1㎍/㎖)로 1시간 동안 자극하기 전에, 30μM 실로스타졸로 처리한 결과를 나타낸다. 항-p65 항체 및 FITC-표지된 항-토끼 IgG 항체를 이용하여 p65 단백질의 위치를 결정하였으며, 상기 세포들은 공초점 레이저 주사 현미경을 이용하여 시각화되었다.

도 8은 BV-2 소교세포에서 LPS로 유도된 ERK-1/2, SAPK/JNK 및 p38 MAP 키나아제의 인산화에 대한 실로스타졸의 영향을 나타낸다. BV2 소교세포를 LPS(1㎍/㎖)로 30분 동안 배양하기 전에, 6시간 동안 비히클(vehicle) 또는 표시된 농도의 실로스타졸을 처리하였고, 세포 추출물을 준비하여 ERK-1/2, SAPK/JNK 및 p38의 인산화된 형태에 특이적인 항체로 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. *P<0.05는 실로스타졸 없이 LPS 처리한 세포로부터 유의차(significant difference)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] <실시예>

[0040] 1. 실험방법

[0041] (1) 세포배양(Cell culture)

[0042] 마우스 BV2 세포주(murine BV2 cell line)를 DMEM + 10% FBS + 100U/㎖ 페니실린 + 100㎍/㎖ 스트렙토마이신)의 배양배지를 이용하여 습식배양기(humidified incubator)에서 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 조건으로 보관하였다. 트립신처리(trypsinization)하여 계대 배양(confluent culture)하였다. 실험을 위하여, 처리(treatment) 전에, 세포들은 따뜻한 DMEM(페놀 레드 없이)로 두 번 세정하였고, 적어도 4시간 정도 혈청(serum) 없는 배지 처리를 해주었다. 모든 실험에 있어서, LPS(1㎍/㎖)을 첨가하기 전에 정해진 횟수로 실로스타졸을 처리하였다.

[0043] (2) 세포 생존력 분석(Cell viability assay)

[0044] 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 분석에 의해 측정되었다. BV2 세포를 24-웰 플레이트(well plate)에 웰 당 2×10^5 세포/㎖로 24시간 동안 배양 하였고, 이후 세정하였다. 다양한 농도의 실로스타졸과 함께 배양한 세포에 LPS(*Escherichia coli* 026:B6)를 24시간 처리하였고, 이후 0.5㎍/㎖ MTT의 용액에서 배양하였다. 세 시간 후, 상층액(supernatant)을 제거하였고, 포르마잔의 생성을 microplate reader(Dynatech MR-7000; Dynatech Laboratories)를 이용하여 540nm에서 측정하였다.

[0045] (3) 세포 내의 cAMP 측정

[0046] cAMP 수준이 측정제품 제조자의 프로토콜에 따라 Parameter™ ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정되었다. microplate reader를 이용하여 450nm의 흡광도(absorbance)가 측정되었다.

[0047] (4) 일산화질소(NO)의 생성

[0048] 상기 배양 상층액의 일산화질소(NO)의 농도는 Griess 시약(1% 설파닐아마이드(sulfanilamide)/0.1% N-(1-나프틸)-에틸렌디아민 디하이드로클로라이드)(N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride)/2.5% 인산(H_3PO_4))을 이용하여 일산화질소(NO)의 주요한 안정한 생성물인 나이트리트(nitrite)를 측정하여 결정하였다. 24-웰 플레이트(well plate)에서 세포(5×10^5 세포/㎖)가 24시간 동안 자극되었고, 이후 각 배양배지 100㎕가 동일 부피의 Griess 시약과 혼합되었다. 나이트리트의 수준은 540nm에서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader(Dynatech MR-7000; Dynatech Laboratories)를 이용하여 측정하였고, 나이트리트 농도는 기지 농도의 소듐 나이트리트(sodium nitrite)를 이용하여 생성한 표준곡선(standard curve)을 참조하여 계산하였다.

[0049] (5) RNA 분리 및 RT-PCR

[0050] BV2 세포를 12-웰 배양 플레이트에 웰 당 2×10^5 세포/㎖로 하룻밤 배양 하였고, 이후, 상기 세포들은 처리 전에 적어도 4시간동안 혈청이 없는 배지에서 더 배양하였다. 전체 RNA(total RNA)는 트리졸(Trizol) 시약(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 분리하였다. 세포로부터 얻어진 전체 RNA(1.0㎍)를 M-MLV 역전사 효소(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 역전사하여 cDNA를 합성하였다. PCR에 의해 상기 cDNA로부터 유도성 산화질소 합성효소(iNOS, inducible nitric oxide synthetase), 사이클로옥시나제-2(COX-2), IL-1β, TNF-α, 및 MCP-1 유전자들이 증폭되었다. 이 때 사용된 PCR 프라이머는 하기와 같다.

[0051] 1) 마우스의 iNOS 프라이머

[0052] 5′-ATGTCCGAAGCAAACATCAC-3′ (염기서열 1, 정방향 프라이머)

[0053] 5′-TAATGTCCAGGAAGTAGGTG-3′ (염기서열 2, 역방향 프라이머)

[0054] 2) 마우스의 COX-2 프라이머

[0055] 5′-CAGCAAATCCTTGCTGTTCC-3′ (염기서열 3, 정방향 프라이머)

[0056] 5′-TGGGCAAAGAATGCAAACATC-3′ (염기서열 4, 역방향 프라이머)

[0057] 3) 마우스의 IL-1β 프라이머

[0058] 5′-ATGGCAACTGTTCCTGAACTCAACT-3′ (염기서열 5, 정방향 프라이머)

[0059] 5′-TTTCCTTTCTTAGATATGGACAGGAC-3′ (염기서열 6, 역방향 프라이머)

[0060] 4) 마우스의 TNF-α 프라이머

[0061] 5′-ATGAGCACAGAAAGCATGATC-3′ (염기서열 7, 정방향 프라이머)

[0062] 5′-TACAGGCTTGTCACTCGAATT-3′ (염기서열 8, 역방향 프라이머)

[0063] 5) 마우스의 MCP-1 프라이머

[0064] 5′-CCTGCTGTTCACAGTTGCC-3′ (염기서열 9, 정방향 프라이머)

[0065] 5′-TGAGGTGGTTGTGGAAAAGG-3′ (염기서열 10, 역방향 프라이머)

[0066] PCR 증폭 산물은 아가로스 젤에서 전기 영동하여 확인 하였다.

[0067] (6) 웨스턴 블럿 분석(western blot analysis)

[0068] BV2 세포는 6-웰 배양 플레이트에 웰 당 4×10^5 세포/㎖로 하룻밤 배양 하였고, 이후, 상기 세포들은 처리 전에

적어도 4시간동안 혈청이 없는 배지에서 더 배양하였다. PBS로 세포들을 3번 세정하였고, 프로테아제 저해제 칵테일 알약(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 포함하는 용해 완충액(1% 트리톤(Triton) X-100, 1% 데옥시콜레이트(deoxycholate), 0.1% NaN_3)에서 용해시켰다. 동량의 단백질이 10% SDS-폴리아크릴아마이드 미니겔 상에서 분리되었다. 단백질들이 임모빌론 PVDF(Immobilon PVDF) 막(Millipore)에 옮기고, 이어서 5% 소 혈청 알부민(BSA)-Tris-buffered saline Tween(TBST, 100 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20)에서 상온에서 1시간동안 블로킹 시켰다. 유도성 산화질소 합성효소(iNOS), COX-2, p65(1:1000 희석; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 세포 외 신호조절 키나아제(ERK), 인산화된(p)-ERK 1/2(extracellular signal-regulated kinases 1 and 2), p38, p-p38, JNK(c-Jun N-terminal kinase)/스트레스에 의하여 활성화되는 키나아제(SARK) 및 p-JNK/SAPK (1:1000 희석; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)에 대한 특정 항체들을 5% BSA-TBST에 희석시켰다. 적절한 1차 항체로 배양 후, 막들은 양고추냉이 퍼옥시다제(horseradish peroxidase)에 결합된 2차 항체(1:10000 희석; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 함께 상온에서 1시간 동안 배양되었다. TBST에서 3번 세척한 후, ECL 검출 시스템(Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 면역반응 밴드를 시각화하였다. 대조실험(parallel experiment)에서, 핵 단백질은 제조자의 프로토콜에 따라 핵 추출(nuclear extraction) 시약(Pierce)을 이용하여 준비되었다.

[0069] (7) 사이토카인 분석(Cytokine assay)

[0070] 사이토카인 수준이 ELISA에 의해 측정되었다. R&D Systems의 ELISA 키트를 IL-1β, TNF-α 및 MCP-1 수준을 측정하는데 이용하였고, Cayman Chemical (Ann Arbor. MI, USA)의 키트를 PGE_2의 수준을 측정하는데 이용하였다. microplate reader를 이용하여 450nm에서 측정되었다.

[0071] (8) 전기영동 이동도 분석(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

[0072] NE-PER 핵 추출 시약(Pierce)을 이용하여 핵 단백질(Nuclear extract)이 준비되었다. 면역글로블린 κ-쇄 결합 부위(κB, 5′ -CCGGTTAACAGAGGGGGCTTTCCGAG-3′ -염기서열 11)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 겔 지연 분석(gel retardation assay)용 프로브로서 합성하였고, 상기 프로브를 비오틴(Pierce)으로 표지 하였다. 결합 반응에는 10㎍의 핵 단백질, 완충액(10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM 디티오트레이톨(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㎕로 상온에서 20분간 배양시켰다. 모든 실험에서, 반응 혼합물에 100배 과량의 표지 되지 않은 κB를 이용하여 DNA-결합 특이성을 확인하였다. 상기 반응 혼합물은 0.5X Tris-borate 완충액(Tris-HCl 89mM, 붕산 89mM, EDTA 2mM, pH 8.0)에서 5% 폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동 시킴으로써 분석되었다. 상기 반응을 나일론 막에 전사시켰고, LightShift chemiluminescent EMSA 키트(Pierce)을 이용하여 비오틴 결합된 DNA가 검출되었다.

[0073] (9) 공초점 레이저 주사 현미경

[0074] 공초점 현미경을 이용한 간접적인 면역형광 분석으로 핵 인자-κB p65 핵 내 국소화(nuclear localization)가 검출되었다. BV2 소교세포(microglia)가 24-웰 플레이트에서 약 24시간 동안 글라스 커버슬립 상에 직접적으로 배양되었다. 1㎍/㎖의 LPS 및/또는 30㎍/㎖ 실로스타졸로 자극시킨 후, 세포들을 PBS에서 4% 파라포름알데히드로 고정시켰고, PBS에서 0.2% Triton X-100로 퍼미어블라이즈(permeablize)시켰고, 1.5% 정상 당나귀 혈청(Sigma)으로 블로킹시켰다. NF-κB p65에 대한 다클론항체(웰 당 1㎍)를 1시간 동안 처리하고, 이어서, 1시간 FITC-결합 당나귀 항-토끼 IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA)으로 배양하였다. PBS로 세척한 후, 커버슬립을 Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL, USA)에 탑재시켜, Zeiss LSM 510 레이저 스캐닝 공초점 장치를 이용하여 형광을 시각화시켰다.

[0075] (10) 통계학적 분석

[0076] 평균±표준오차(SEM) 통계적 유의를 나타내는 데이터 값은 Scheffe 테스트로 편차 분석을 통해 측정하였다. 통계적 유의로서 $P<0.05$의 값을 기준치로 삼았다.

[0077] 2. 실험 및 실험결과

[0078] (1) LPS로 자극된 BV2에 있어서, NO 및 PGE_2의 생성에 대한 실로스타졸의 영향

[0079] NO 생성을 측정하기 위하여 Griess 시약을 이용하여 상기 배양배지에 유리된 아질산염을 측정하였다. LPS(1㎍/㎖)을 첨가하기 전에 소교세포에 다양한 농도(0, 10, 20 및 30㎛M)의 실로스타졸을 6시간 동안 처리하였다. 도 1a를 참조하면, 대조군의 조건하에서 생성된 것과 비교할 때, LPS를 단독으로 처리하여 배양한 것이 상기 세포들로부터의 NO 생성이 현저하게 증가(약 15배)하였다. 하지만, 실로스타졸을 전 처리한 경우 LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서의 NO 생성 수준의 증가를 농도 의존전인 방식으로 억제하였다(도 1a 참조). 10㎛M 실로스타졸 처리로 상당한 억제가 관찰되었다.

[0080] 프로스타글란딘 E_2는 COX-2 활성의 가장 중요한 염증성 생성물을 의미하므로, 상층액에 존재한 PGE_2의 양을 측정하였다. 실로스타졸의 유무가 BV2 소교세포에 있어서의 LPS 유도성 PGE_2의 생성을 억제하는지 여부를 평가하기 위하여, 세포들에 6시간 동안 실로스타졸을 전 처리하였고, 이어서 1㎍/㎖의 LPS로 자극시켰다. 24시간 동안 배양한 후, 상기 세포 배양 배지를 채취하였고, ELISA를 이용하여 PGE_2의 생성이 측정되었다. 도 1b에 도시한 바와 같이, LPS를 단독으로 24시간 노출시킨 후, 상기 배양 배지에 존재하는 PGE_2의 양은 약 50배 증가하였다. 실로스타졸 전 처리(10 내지 30㎛M)는 농도 의존적으로 PGE_2의 합성을 감소시켰다.

[0081] MTT 분석을 이용하여 LPS의 유무에 따른, BV2 소교세포의 실로스타졸의 세포독성 효과가 평가하였다. 도 2를 참조하면, NO 및 PGE_2의 생성을 억제하는데 사용되는 농도(10 내지 30㎛M)에서는 세포 생존력에 영향을 미치지 않았다.

[0082] 즉, 상기 실험으로 실로스타졸이 LPS로 자극된 BV2 소교세포에서 증가된 NO 및 PGE_2의 생성을 농도 의존적으로 감소시키며, NO 및 PGE_2의 생성을 억제하는데 사용되는 농도인 30㎛M 이하의 농도에서 세포독성효과를 가지지 않음을 확인할 수 있었다.

[0083] (2) LPS 유도성 iNOS 및 COX-2의 단백질 및 mRNA 발현에 있어서의 실로스타졸의 영향

[0084] 실로스타졸의 수준과 iNOS 및 COX-2의 발현 사이의 상관관계를 실험하였다. 상기 iNOS 및 COX-2의 단백질 및 mRNA 발현에 있어서의 실로스타졸의 억제 효과는 각각 웨스턴 블럿 분석과 RT-PCR로 측정되었다. 도 3a를 참조하면, 24시간 1㎍/㎖ LPS 처리한 후, iNOS 및 COX-2의 단백질의 수준은 상당히 상향 조절되었고, LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서, 실로시타졸이 농도 의존적인 방식으로 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현을 상당히 감소시켰다. iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현에 있어서의 실로스타졸의 영향 또한 측정(도 3b 참조)되었다. LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서, 실로스타졸은 iNOS 및 COX-2의 mRNA 발현을 농도 의존적인 방식으로 상당히 감소시켰다. 상기 RT-PCR 분석 결과는 iNOS 및 COX-2 mRNA의 감소가 대응하는 단백질 수준의 감소와 관계됨을 보여주었다.

[0085] 즉, 상기 실험으로 LPS로 자극된 BV2 소교세포에서, 실로스타졸이 iNOS 및 COX-2의 단백질 및 mRNA 발현을 농도 의존적 방식으로 감소시킴을 확인할 수 있었다.

[0086] (3) LPS로 자극된 BV2 소교세포에서의 cAMP 생성에 대한 실로스타졸의 영향

[0087] 실로스타졸의 억제 효과와 관계된 세포내 신호전달 경로에 있어서 cAMP의 연루 가능성을 평가하기 위하여, BV2 소교세포에서 세포내 cAMP 수준에 있어서의 실로스타졸의 영향을 실험하였다. 세포내 cAMP의 수준은 LPS 단독 처리에 의해 약간 증가하였다. 도 4a를 참조하면, LPS 존재 여부와 관계없이 실로스타졸이 cAMP 수준을 증가시켰다.

[0088] iNOS 및 COX-2의 발현에 있어서, 폴스콜린(아데닐레이트 사이클라제의 직접적인 활성제) 및 디부티릴-cAMP(세포 침투 가능한 cAMP의 유사체)의 영향을 실험하였다. 도 4b를 참조하면, 폴스콜린 및 디부티릴-cAMP 모두 LPS 유도성 염증 반응에 어떤 영향도 미치지 않았다.

[0089] 또한, cAMP-의존성 또는 cAMP-독립적 실로스타졸의 작용을 검증하기 위하여, iNOS 및 COX-2 생성의 발현에 있어

서, SQ 22536 (아데닐레이트 사이클라제 억제제), 즉, 비가역적이며 선택적인 cAMP 길항제(antagonist)의 영향을 실험하였다. 도 4c를 참조하면, SQ 22536은 iNOS 및 COX-2의 발현에 있어서의 실로스타졸의 억제 효과에 영향을 미치지 않았다. 상기 결과는, 세포내 cAMP 신호전달 경로는 BV2 소교세포에서 LPS 유도성 iNOS 및 COX-2의 발현에 있어서의 실로스타졸의 억제 효과에 포함되지 않음을 암시한다.

[0090] 즉, 상기 실험으로 BV2 소교세포에서 LPS 유도성 iNOS 및 COX-2의 발현에 대한 실로스타졸의 영향과 관련하여, 실로스타졸의 iNOS 및 COX-2의 발현 억제 효과는 cAMP에 의존적이지 않음을 확인할 수 있었다.

[0091] (4) LPS 유도성 TNF-α 및 IL-1β 생성에 있어서의 실로스타졸의 영향

[0092] TNF-α 및 IL-1β와 같은 전염증성(proinflammatory) 사이토카인에 있어서의 실로스타졸의 영향을 분석하였다. BV2 소교세포를 LPS 존재(1㎍/㎖) 또는 부존재 하에서 24시간동안 실로스타졸(10, 20 및 30μM)을 처리하여 배양한 후 상기 배양 배지의 사이토카인 수준을 ELISA로 측정하였다. 도 5a에 도시한 바와 같이, LPS로 자극된 BV2 소교세포를 배양한 배지의 TNF-α 및 IL-1β 수준이 증가하였고, 이러한 TNF-α 및 IL-1β 수준의 증가는 실로스타졸의 처리에 의해 농도의존적 방식으로 상당히 감소되었다. 대조실험(parallel experiment)에서, RT-PCR을 수행하여 실로스타졸이 전사 수준에서 사이토카인의 발현을 억제하는지 여부를 측정하였다. 도 5b에 도시한 바와 같이, LPS 처리 전에, BV2 소교세포에 서로 다른 농도의 실로스타졸 6시간 처리함으로써 IL-1β 및 TNF-α mRNA의 투약 의존적 감소를 야기하였다. 따라서, 상기 결과는 실로스타졸이 염증 반응과 관계된 이들 사이토카인의 발현을 농도 의존적인 방식으로 억제한다는 것을 나타낸다.

[0093] 즉, 상기 실험으로 BV2 소교세포에서, 실로스타졸이 LPS 유도성 TNF-α 및 IL-1β 단백질 및 mRNA 발현을 농도 의존적 방식으로 감소시킴을 확인할 수 있었다. 퇴행성 신경질환에서 뇌의 소교세포는 TNF-α 및 IL-1β이 과다 발현되므로, 실로스타졸이 TNF-α 및 IL-1β의 과다 발현을 억제시킴으로써 퇴행성 신경질환 예방 및 치료에 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0094] (5) LPS로 자극된 MCP-1 단백질 및 mRNA 발현에 있어서의 실로스타졸의 영향

[0095] RT-PCR 및 ELISA를 이용하여 실로스타졸이 LPS로 자극된 MCP-1의 생성을 억제하는지 여부에 대하여 실험(도 6a 및 6b 참조)하였다. 도 6a를 참조하면, LPS 처리된 소교세포에서 MCP-1의 mRNA의 발현이 상당한 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 발현 증가(유도)가 BV2 소교세포 배양 시 실로스타졸을 첨가함으로써 상당히 억제되었다. ELISA 결과는 RT-PCR 결과와 일맥상통하게, MCP-1 분비가 LPS로 처리된 BV2 소교세포 배양에서 증가되며, 실로스타졸이 활성화된 BV2 소교세포로부터 방출되는 MCP-1의 분비를 상당히 억제시킨다는 것을 보여준다(도 6b 참조).

[0096] 즉, 상기 실험으로 LPS로 자극된 활성화된 BV2 소교세포에서, 실로스타졸이 MCP-1 단백질 및 mRNA 발현을 감소시킴을 확인할 수 있었다. AD, MS, HIV 치매, 허혈성 질환 및 뇌손상을 포함하는 다수의 중추신경 질환에서 상향 조절되는 MCP-1 발현을 억제시킬 수 있으므로, 퇴행성 신경질환 예방 및 치료에 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0097] (6) NF-κB 활성에 있어서의 실로스타졸의 영향

[0098] iNOS 및 COX-2 유전자의 유도에 NF-κB 활성이 필수적이다. 실로스타졸이 전염증 및/또는 세포독성 인자 발현을 억제하는 메커니즘을 밝히기 위하여, EMSA에 의해 NF-κB의 DNA 결합 활성에 있어서의 실로스타졸의 영향이 측정하였다(도 7a 참조). LPS 처리는 NF-κB의 DNA 결합 활성의 상당한 증가를 야기하였다. 이와 대조적으로, 실로스타졸의 처리는 LPS로 유도된 NF-κB의 DNA 결합 활성을 상당히 감소시켰다.

[0099] 즉, 상기 실험으로 LPS로 자극된 활성화된 BV2 소교세포에서, 실로스타졸의 처리는 LPS로 유도된 NF-κB의 DNA 결합 활성을 감소시키므로, 소교세포에서의 NF-κB 신호경로가 억제되어 전염증 매개체가 하향 조절되며, 항염증 활성을 가져, 퇴행성 신경질환 예방 및 치료에 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0100] (7) NF-κB의 핵 전좌(nuclear translocation)에 있어서의 실로스타졸의 영향

[0101] NF-κB의 핵으로의 전좌와 같은 LPS로 유도된 NF-κB p65 핵 전좌에 있어서의 실로스타졸의 영향에 LPS 자극에

이은 NF-κB 의존성 전사가 요구되는지를 조사하였다. 상기 NF-κB p65의 세포 내 위치는 면역형광 염색 및 공초점 현미경으로 시각화함으로써 조사되었다(도 7b의 medium 참조). 공초점 이미지는 NF-κB p65가 정상적으로는 세포질에 격리(도 7b의 LPS 참조)되어 있으나, LPS로 BV2 소교세포를 자극한 후, NF-κB p65의 핵 내 축적이 강하게 유도됨을 보여주었다. LPS로 유도된 NF-κB p65의 전좌는 상기 세포들에 실로스타졸을 전 처리함으로써 완전하게 파괴되었다(도 7b의 LPS+cilostazol 참조). LPS 자극 없이 실로스타졸만을 전 처리한 경우, 상기 세포들에서는 NF-κB p65의 핵 전좌는 유도되지 않았다(도 7b의 cilostazol 참조). 상기 결과로 실로스타졸에 의한 NF-κB 활성의 억제가 BV2 소교세포에 있어서의 NO, PGE_2 및 전염증성 사이토카인의 억제에 원인이 되는 메커니즘일 수 있음을 알 수 있었다.

[0102] 즉, 상기 실험으로 LPS로 자극된 활성화된 BV2 소교세포에서, 실로스타졸의 처리는 LPS로 유도된 NF-κB p65의 핵 전좌가 억제되어, 소교세포에서의 NF-κB 신호경로가 억제되므로 전염증 매개체가 하향 조절되며, 항염증 활성을 가져, 퇴행성 신경질환 예방 및 치료에 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0103] (8) LPS로 자극된 BV2 소교세포에 있어서 MAP 키나아제의 인산화에 대한 실로스타졸의 영향

[0104] 세포 성장 및 분화 조절과, 사이토카인 및 스트레스에 대한 세포 반응 조절에 있어서, MAP 키나아제는 NF-κB의 활성화에 중요한 역할을 한다. 이에 본 실험은 LPS 자극에 대한 BV2 소교세포에 있어서 iNOS 및 COX-2 유전자의 발현을 조절하는 신호 캐스케이드를 밝히기 위해 디자인 되었다.

[0105] 실로스타졸에 의한 염증의 억제가 MAP 키나아제 경로에 의해 조절되는지 여부에 대하여 알아보기 위하여, 웨스턴 블럿 분석에 의해 LPS로 유도된 ERK-1/2, JNK 및 p38 키나아제의 인산화에 있어서의 실로스타졸의 영향을 실험하였다. LPS로 BV2 세포를 자극한 후, ERK-1/2, JNK 및 p38 키나아제가 인산화 되었고, LPS로 유도된 MAP 키나아제 활성에 있어서의 실로스타졸의 영향을 실험하였다. 도 8에 도시한 바와 같이, 실로스타졸(20 또는 30μM)은 ERK-1/2 및 JNK의 활성은 상당히 감소시키나, p38 키나아제의 인산화에는 영향을 주지 않았다. 총 ERK-1/2 및 JNK의 양은 LPS 또는 실로스타졸 처리에 의해 영향 받지 않았다. 상기 결과는 LPS-매개 iNOS 및 COX-2 발현 동안, ERK-1/2 및 JNK 경로가 주로 관련됨을 암시한다.

[0106] 즉, 상기 실험으로 LPS로 자극된 활성화된 BV2 소교세포에서, p38 MAPK의 활성에 영향 없이 ERK 1/2 및 JNK를 억제함으로써 LPS로 유도된 iNOS 및 COX-2 발현 및 NF-κB 활성화에 억제 효과를 나타내어, 퇴행성 신경질환 예방 및 치료에 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0107] 이하, 본 발명의 실로스타졸을 함유하는 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함은 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0108] **<제제예 1> 산제의 제조**

[0109] 실로스타졸 20㎎, 유당 100㎎ 및 탈크 10㎎을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0110] **<제제예 2> 정제의 제조**

[0111] 실로스타졸 20㎎, 옥수수전분 100㎎, 유당 100㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2 ㎎을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0112] **<제제예 3> 캅슐제의 제조**

[0113] 실로스타졸 20㎎, 옥수수전분 100㎎, 유당 100㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2㎎을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0114] **<제제예 4> 에어로졸의 제조**

[0115] 실로스타졸 10㎎, 에탄올 100㎎, 클로로디플루오로메탄 300㎎의 성분을 갖는 에어로졸 용액을 제조하였다.

[0116] **<제제예 5> 주사제의 제조**

[0117] 실로스타졸 10㎎과 염화나트륨 90㎎을 주사용 증류수 적량에 용해시켜 주사제(처방 100㎖)를 제조하였다.

[0118] **<제제예 6> 건강식품의 제조**

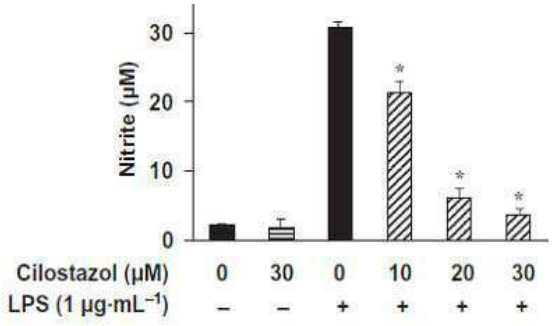
[0119] 실로스타졸 10㎎, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트70㎍, 비타민 E 1.0㎎, 비타민 B 1 0.13㎎, 비타민 B 2 0.15㎎, 비타민 B 6 0.5㎎, 비타민 B 12 0.2㎍, 비타민 C 10㎎, 비오틴 10㎍, 니코틴산아미드 1.7㎎, 엽산 50㎍, 판토텐산 칼슘 0.5㎎), 무기질 혼합물 적량(황산제 1철 1.75㎎, 산화아연 0.82㎎, 탄산마그네슘 25.3㎎, 제1 인산칼륨 15㎎, 제2 인산칼슘 55㎎, 구연산칼륨 90㎎, 탄산칼슘 100㎎, 염화마그네슘 24.8㎎)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.

[0120] **<제제예 7> 건강음료의 제조**

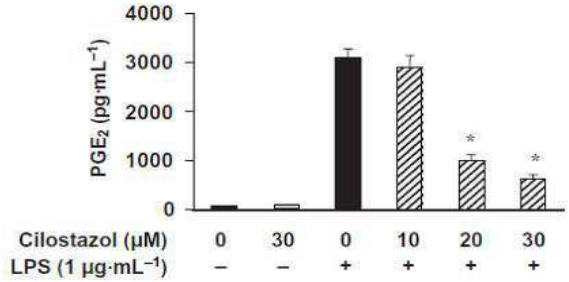
[0121] 실로스타졸 10㎎, 구연산 1000㎎, 올리고당 100g, 매실농축액 2g, 타우린 1g 및 정제수를 가하여 전체 900㎖가 되도록 하며, 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하였다.

도면

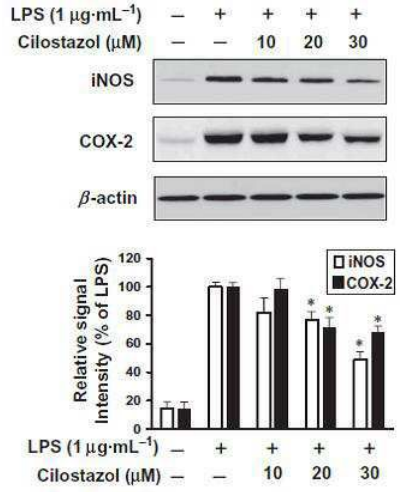
도면1a



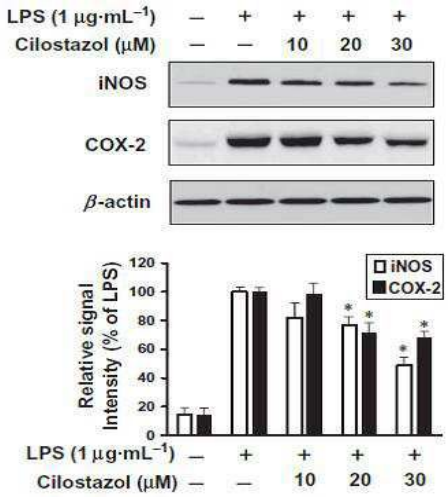
도면1b



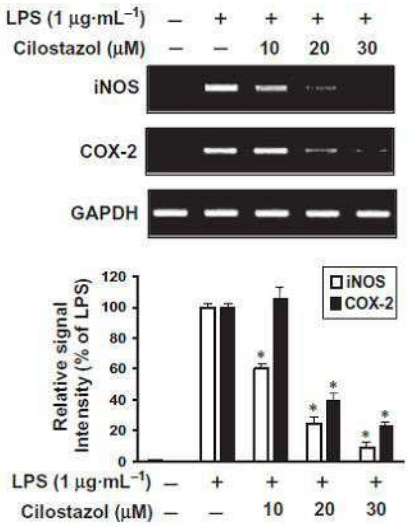
도면2



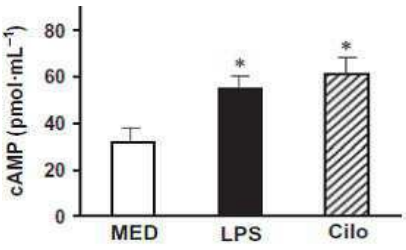
도면3a



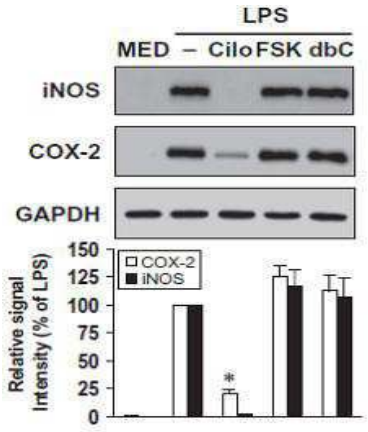
도면3b



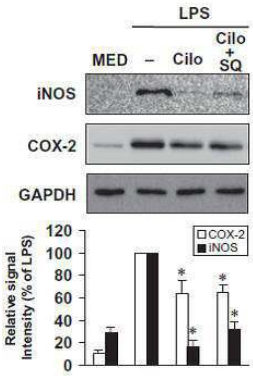
도면4a



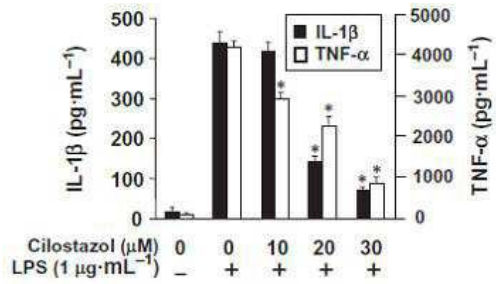
도면4b



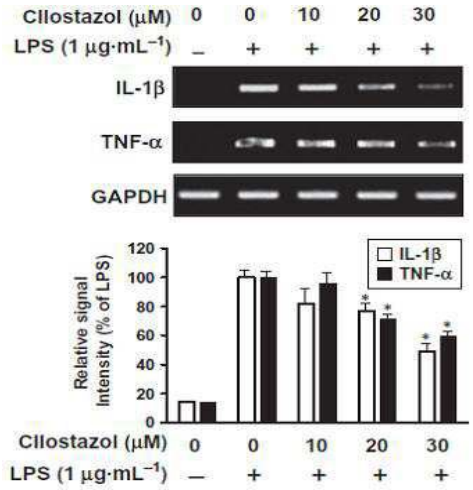
도면4c



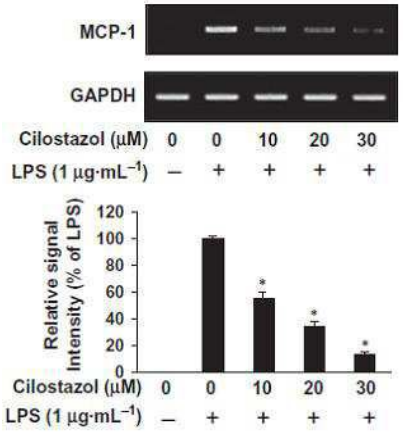
도면5a



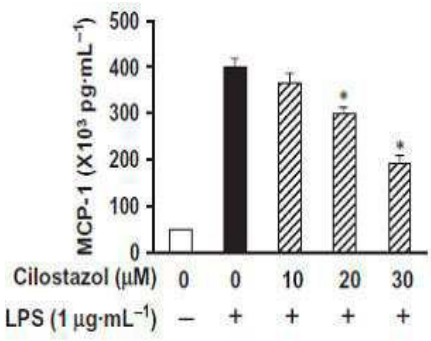
도면5b



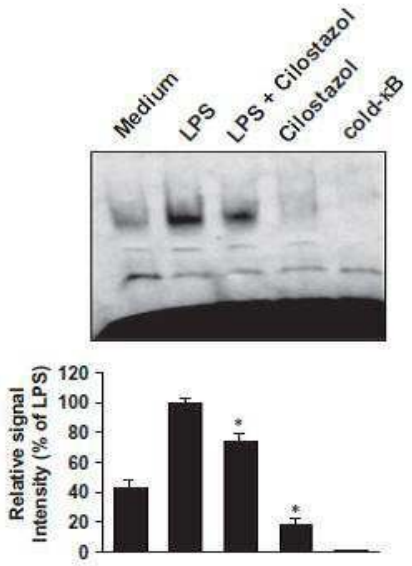
도면6a



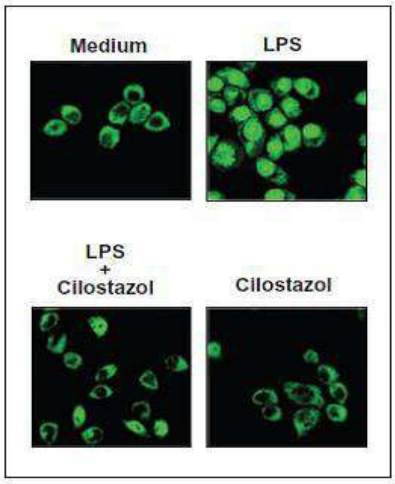
도면6b



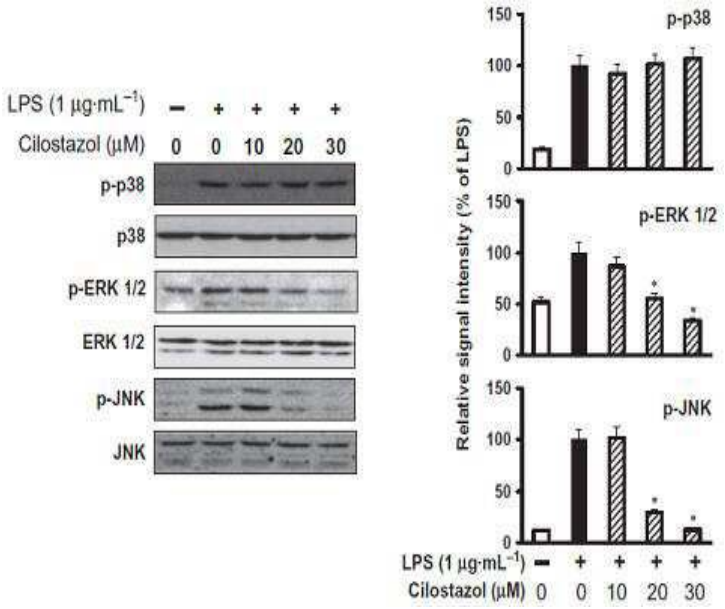
도면7a


Medium
LPS
LPS + Cilostazol
Cilostazol
cold-κB
Relative signal Intensity (% of LPS)
120
100
80
60
40
20
0
*
*

도면7b


Medium
LPS
LPS + Cilostazol
Cilostazol

도면8



서 열 목 록

<110> Inje University Industry-Academic Cooperation Foundation

Chosun Univesity Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING AND PREVENTING NEURODEGENERATIVE DISEASE COMPRISING CILOSTAZOL OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALTS THEREOF

<130> DP-2010-0319

<160> 11

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification inducible nitric oxide synthetase(iNOS) gene(iNOS) in mouse

<400> 1

atgtccgaag caaacatcac 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification inducible nitric oxide synthetase(iNOS) gene in mouse

<400> 2

taatgtccag gaagtaggtg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification cyclooxynase-2(COX-2) gene in mouse

<400> 3

cagcaaatcc ttgctgttcc 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification cyclooxynase-2(COX-2) gene in mouse

<400> 4

tgggcaaaga atgcaaacat c 21

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

atggcaactg ttcctgaact caact 25

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

tttcctttct tagatatgga caggac 26

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

atgagcacag aaagcatgat c 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

tacaggcttg tcactcgaat t 21

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) gene in mouse

<400> 9

cctgctgttc acagttgcc 19

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification monocyte chemoattractant

protein-1(MCP-1) gene in mouse

<400> 10

tgaggtggtt gtggaaaagg 20

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> immunoglobulin kappa-chain binding site

<400> 11

ccggttaaca gaggggggctt tccgag 26