(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0045320
(43) 공개일자 2023년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/365 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 29/00 (2023.01) *A61P 31/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/365 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0128028
(22) 출원일자 2021년09월28일
심사청구일자 2021년09월28일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이근욱
강원도 춘천시 스포츠타운길 460, 105동 2605호
타파 비카쉬
강원도 춘천시 성심로 23-2, 202호
박성원
강원도 속초시 청대로232번길 13-9
(74) 대리인
구현서

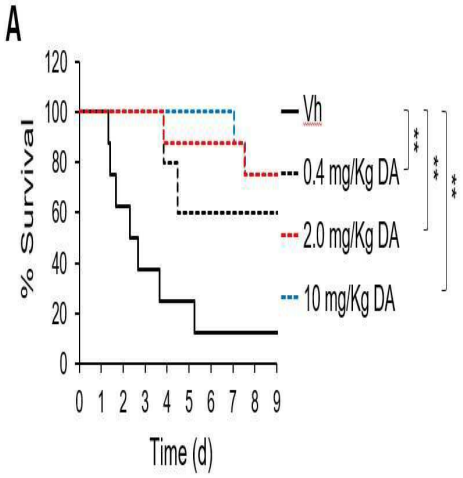
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 포함하는 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 패혈증 완화 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 포함하는 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 패혈증 완화 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 데커시놀 안젤레이트이 전염증성 대식세포의 기능적 활성을 조절하고 DA가 패혈증 관리에 잠재적인 치료제가 될 수 있다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 31/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

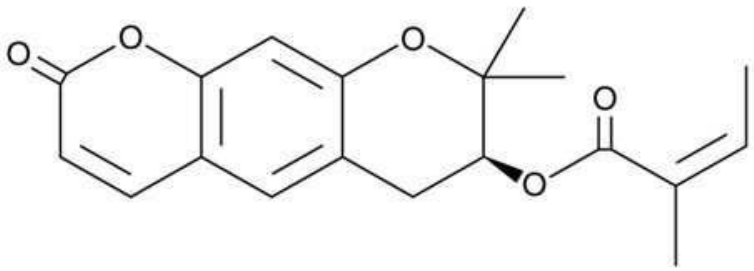
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711128120
과제번호 2014M3A9D5A01073841
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 국가마우스표현형분석기반구축
연구과제명 마우스 면역표현형 및 감염 면역반응성 분석 기술 구축과 서비스 기반 확립
기 여 율 1/2
과제수행기관명 한림대학교 산학협력단
연구기간 2014.12.26 ~ 2023.11.19
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345334155
과제번호 2021R1I1A3042761
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 지역대학우수과학자지원사업
연구과제명 대식세포 제어기술 기반 궤양성 대장염 치료 표적 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 한림대학교 산학협력단
연구기간 2021.06.01 ~ 2024.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 포함하는 패혈증 치료용 약학 조성물.



[화학식 1]

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 패혈증은 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 것인 패혈증 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 전염증성 사이토카인의 유도를 억제하는 것을 특징으로 하는 패혈증 치료용 약학 조성물.

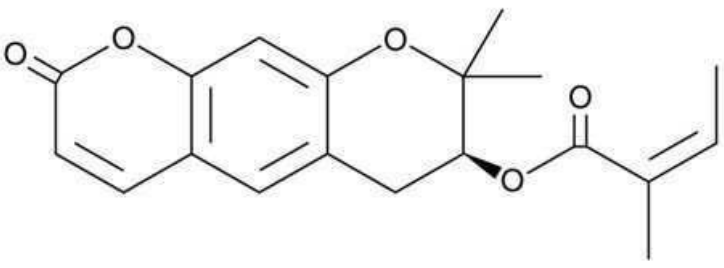
청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 대식세포의 박테리아 사멸 활성을 촉진하는 것을 특징으로 하는 패혈증 치료용 약학 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1의 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 포함하는 패혈증 예방 또는 개선용 식품 조성물.



[화학식 1]

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 패혈증은 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 것인 패혈증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 조성물은 전염증성 사이토카인의 유도를 억제하는 것을 특징으로 하는 패혈증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 조성물은 대식세포의 박테리아 사멸 활성을 촉진하는 것을 특징으로 하는 패혈증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

인 비트로에서 데커시놀 안젤레이트를 골수 유래 대식세포에 처리하여 상기 대식세포에서 공동자극 리간드 CD86, 클래스 II MHC 및 CD38의 LPS 유도 표면 발현을 약화시키는 방법.

청구항 10

인 비트로에서 데커시놀 안젤레이트를 골수 유래 대식세포에 처리하여 상기 대식세포에서 CD206 및 CD273을 포함하는 대안적으로 활성화된 대식세포와 관련된 마커의 표면 유도를 상향 조절하지 않는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 포함하는 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 패혈증 완화 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 대식 세포의 염증 반응을 조절하여 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 패혈증 완화 및 치료 효과를 나타내는 데커시놀 안젤레이트 화합물의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 패혈증(sepsis)은 미생물에 감염되어 전신에 심각한 염증 반응이 나타나는 상태를 말한다. 체온이 38도 이상으로 올라가는 발열 증상, 36도 이하로 내려가는 저체온증, 분당 24회 이상으로 증가한 호흡수(빈호흡), 분당 90회 이상의 심박수(빈맥), 혈액 검사상 백혈구 수의 증가 또는 현저한 감소 중 두 가지 이상의 증상을 보이는 경우를 전신성 염증 반응 증후군(systemic inflammatory response syndrome)이라고 부르며, 이러한 전신성 염증 반응 증후군이 미생물의 감염에 의한 것일 때 패혈증이라고 한다.

[0003] 미생물의 감염 경로를 잘 알 수 없는 경우도 있으나 맹장염, 중이염, 피부화농증, 욕창, 폐질환, 담낭염, 신우염, 골수염 등이 패혈증의 원인으로 알려져 있다.

[0004] 현재까지 패혈증의 치료를 위한 근본적인 치료제는 확인되지 않은 상태이며, 주로 항생제나 항진균제 주사로 치료한다.

[0005] 치료 약제와 기간은 미생물의 종류에 따라 결정하거나 환자의 상태에 따라 혈액투석 또는 수혈을 하기도 한다. 항생제와 항진균제가 잘 들으면 패혈증은 완치되기도 하지만, 약제에 내성이 있는 미생물에 감염되거나 면역력이 약한 환자이거나 또는 너무 늦게 치료를 시작하는 등의 경우에는 치료가 어려워 환자가 사망하기도 한다.

[0006] 패혈증의 치사율은 50~70% 정도로 매우 높은 편이며, 전세계적으로도 사망의 원인 중에서 높은 비중을 차지하는 것으로 알려져 있다.

[0007] FDA가 승인한 유일한 패혈증 치료제인 드로트레코긴 알파(drotrecogin alfa, Xigris)가 효능이 없는 것으로 판명되어, 2011년 시장에서 퇴출된 이후로 2012년까지 승인받은 중증 패혈증 치료제는 없는 상태이다(Ranieri, V

M et al, N Engl J Med, 366(22), 2055-2064, 2012)

[0008] 따라서 패혈증 치료제의 개발은 임상적으로 상당한 의의를 가지며 국내외적으로 패혈증 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0009] 데커신(decursin) 및 데커시놀 안젤레이트(decursinol angelate)는 한국산인 참당귀나 세발당귀, 바디나물 등에 존재한다.

[0010] 이들은 항종양 효과, 박테리아 성장 억제 효과, 순환계 질환 개선 효과, 대사 효소 억제 효과, 항염증 효과, 항산화 효과, 인지 개선 증진 효과, 피부 탄력 개선 효과, 피부 상처 치료 효과, 피부 미백 효과(손추영 외, 약학회지, 53(6), 303-313, 2009; 한국등록특허 제10-1575897호; 한국등록특허 제10-0379191호; 한국공개특허 제10-2011-0087803호) 등의 약리 작용이 있는 것으로 알려졌다.

[0012] [선행 특허 문헌]

[0013] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1575897호, 디커신을 유효성분으로 포함하는 화장료 또는 약학 조성물,2015년 12월 02일, 등록.

[0014] (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-0379191호, 멜라닌 합성 저해제로서의 데커신의 신규한 용도, 2003년 03월 26일, 등록.

[0015] (특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-1215379호, 데커시놀 유도체를 포함하는 약학적 조성물, 2012년 12월 18일,등록.

[0016] (특허문헌 0004) 한국공개특허 제10-2002-0029462호, 데커시놀을 포함하는 패혈성 쇼크 예방 및 치료용 조성물, 2002년 04월 19일, 공개.

[0017] (특허문헌 0005) 한국공개특허 제10-2011-0087803호, 데커신 및 데커시놀 안젤레이트를 포함하는 피부상처치료제, 2011년 08월 03일, 공개.

발명의 내용

해결하려는 과제

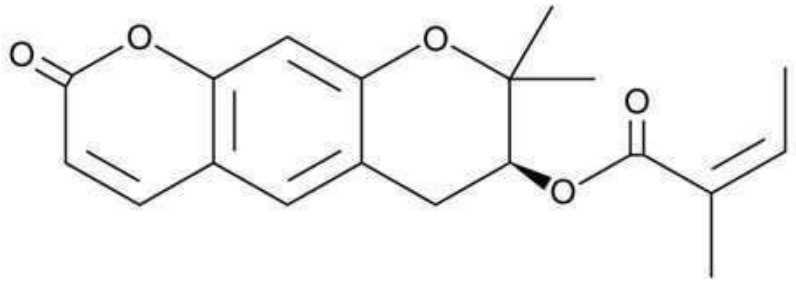
[0018] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신규한 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 패혈증 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 다른 목적은 신규한 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 패혈증 완화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 대식세포 염증 반응 조절제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 화학식 1의 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 포함하는 패혈증 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 

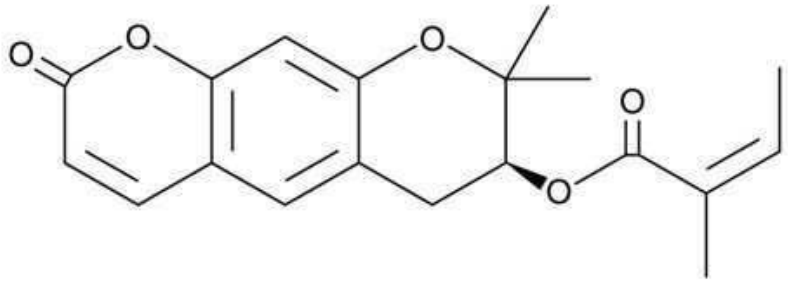
[0023] [화학식 1]

[0024] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 패혈증은 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0025] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 전염증성 사이토카인의 유도를 억제하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 대식세포의 박테리아 사멸 활성을 촉진하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0027] 또 본 발명은 하기 화학식 1의 데커시놀 안젤레이트를 유효성분으로 포함하는 패혈증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.



[0028]

[0029] [화학식 1]

[0030] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 패혈증은 메티실린 내성 황색 포도상 구균 감염에 의한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0031] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 전염증성 사이토카인의 유도를 억제하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0032] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 조성물은 대식세포의 박테리아 사멸 활성을 촉진하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0033] 또 본 발명은 인 비트로에서 데커시놀 안젤레이트를 골수 유래 대식세포에 처리하여 상기 대식세포에서 공동자극 리간드 CD86, 클래스 II MHC 및 CD38의 LPS 유도 표면 발현을 약화시키는 방법을 제공한다.

[0034] 또 본 발명은 인 비트로에서 데커시놀 안젤레이트를 골수 유래 대식세포에 처리하여 상기 대식세포에서 CD206 및 CD273을 포함하는 대안적으로 활성화된 대식세포와 관련된 마커의 표면 유도를 상향 조절하지 않는 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명의 데커시놀 안젤레이트는 참당귀 등으로부터 추출할 수도 있으며 기타 다른 화학적 합성의 방법에 의하여도 합성될 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 약학 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다.

[0037] “약학적으로 허용 가능”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애,현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

[0038] 또한, 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0039] 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로즈, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아라비아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산프로필, 탈크, 스테아르산마그네슘 및 광물유를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 안정화제, 결합제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0041] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 미결정셀룰로오스, 수크로스 또는 락토오스, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오스, 히프로멜로오스 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아르산마그네슘, 탈크 같은 활택제들도 사용된다.

[0042] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 유동파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0043] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0044] 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0045] 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질과 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다.

[0046] 본 발명의 데커시놀 안젤레이트 화합물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다.

[0047] 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여시간, 투여경로, 약물의 흡수, 분포 및 배설률, 사용되는 다른 약물의 종류 및 처방자의 판단 등에 따라 달라질 것이다.

[0048] 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.001㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0049] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은 데커시놀 안젤레이트 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 패혈증 또는 패혈성 쇼크의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0050] 상기 건강기능식품은 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 또는 가공한 식품을 지칭하는 것으로, 예를 들어 건강보조식품,기능성 식품, 영양제, 보조제 등을 모두 포함한다.

[0051] 상기 본 발명의 화합물은 전체 건강기능식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001중량% 내지 50중량%, 더 바람직하게는 0.01중량% 내지 30중량%, 가장 바람직하게는 0.01중량% 내지 10중량%로 하여 첨가될 수 있다.

[0052] 본 발명의 건강 기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

[0054] 이하 본 발명을 설명한다.

[0055] 본 발명자들은 참당귀(*Angelica gigas*)의 생리 활성 성분이 대식세포의 기능적 활성을 조절함을 보여주고 패혈증 마우스 모델을 사용하여 염증에 대한 효과를 조사했다.

[0056] 참당귀에서 추출한 12가지 다른 화합물 중 decursinol angelate(이하, 'DA'라 함)가 murine 대식세포에서 TNF-알파 및 IL-6의 유도를 억제하는 데 가장 효과적인 것으로 확인되었다.

[0057] 쥐가 치사량의 메티실린 내성 황색 포도구균(MRSA)에 감염되었을 때, DA 처리는 사망률과 균혈증을 개선하고 혈액과 간에서 CD38+ 대식세포 수 감소와 관련된 사이토카인 폭풍을 약화시켰다.

[0058] 시험관 내 연구에서 DA는 미생물 감염에 대한 반응으로 염증 유발 매개체의 발현에서 대식세포의 기능적 활성화를 억제하는 동시에 활성 산소 종의 생성을 증가시켜 박테리아를 죽이는 능력을 촉진하는 것으로 나타냈다. 기작적으로 DA 처리는 NF-κB 및 Akt 신호 전달 경로를 약화시켰다.

[0059] 흥미롭게도, IKK2의 활성 돌연변이체의 이소성 발현은 DA 처리에 의해 TNF-알파 생성의 억제를 보인 반면, Akt의 억제는 ROS 생성을 증가시켰다. 종합하면, 본 발명의 실험적 증거는 DA가 전염증성 대식세포의 기능적 활성을 조절하고 DA가 패혈증 관리에 잠재적인 치료제가 될 수 있음을 보여주었다.

발명의 효과

[0060] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이,

[0061] 참당귀에서 추출한 12가지 다른 화합물 중 decursinol angelate가 murine 대식세포에서 TNF-알파 및 IL-6의 유도를 억제하는 데 가장 효과적인 것으로 확인되었으며,

[0062] 쥐가 치사량의 메티실린 내성 황색 포도구균(MRSA)에 감염되었을 때, decursinol angelate 처리는 사망률과 균혈증을 개선하고 혈액과 간에서 CD38+ 대식세포 수 감소와 관련된 사이토카인 폭풍을 약화시켰으며,

[0063] 시험관 내 연구에서 decursinol angelate는 미생물 감염에 대한 반응으로 염증 유발 매개체의 발현에서 대식세포의 기능적 활성화를 억제하는 동시에 활성 산소 종의 생성을 증가시켜 박테리아를 죽이는 능력을 촉진하는 것으로 나타냈고,

[0064] 기작적으로 decursinol angelate 처리는 NF-κB 및 Akt 신호 전달 경로를 약화시켰다.

[0065] 따라서 이러한 것을 종합하면 decursinol angelate가 전염증성 대식세포의 기능적 활성을 조절하고 DA가 패혈증 관리에 잠재적인 치료제가 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 MRSA 감염 시 전염증성 대식세포의 침투 및 활성화를 나타낸 그림으로,

(A) 마우스를 2가지 다른 용량의 MRSA로 정맥내 감염시키고 사망률을 모니터링했다: n = 4.

(B) 혈장의 사이토카인 및 케모카인은 5 x 10^7 CFU MRSA로 감염 8시간 후 CBA에 의해 측정되었다. 사이토카인의 상대적인 양은 히트 맵으로 표시된다.

(C & D) 간, 폐 및 신장의 조직 용해물은 감염 8시간 후에 준비되었고 사이토카인 수준은 CBA에 의해 결정되었다. MCP-1(C) 및 IL-6(D)의 평균(± SD) 양이 표시된다. *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

(E) 조직 균질물의 단일 세포 현탁액은 유세포 분석을 위해 염색되었으며 대표적인 FACS 프로파일은 실행 가능한 CD45.2+ 게이트에서 CD11b+ F4/80+ 인구의 빈도로 표시된다. n = 3.

CD11b+ F4/80+ 대식세포를 CD38의 표면 발현에 대해 추가로 분석하고 CD38+ 세포의 빈도를 갖는 히스토그램으로 표시했다.

도 2는 DA는 대식세포에서 염증성 사이토카인의 LPS 유도를 억제한다는 것을 보여주는 그림,

(A) 복막 대식세포를 A. gigas의 표시된 화합물로 전처리하고 8시간 동안 200ng/ml LPS로 활성화했다. 배양 상등액에서 IL-6 및 TNF-α의 생산은 CBA에 의해 측정되었다: n = 4.

(B) 본 발명의 decursinol angelate의 화학식 구조를 나타낸 그림.

(C) BMDM을 표시된 농도의 DA의 존재하에 24시간 동안 배양하고 세포 생존력을 평가했다.

(D) RAW 264.7 세포를 DA로 전처리하고 LPS의 존재 하에 8시간 동안 배양하였다. TNF-α, IL-6 및 MCP-1의 LPS 유도는 CBA에 의해 결정되었으며 표시된 사이토카인의 평균(± SD) 농도로 표시되었다: n = 4.

도 3은 DA는 메티실린 내성 S. 아우레우스 감염에 의해 유도된 패혈증을 완화하는 것을 보여주는 그림,

(A) 마우스를 표시된 용량의 DA로 3회 복강내 전처리하고 1 x 10^8 CFU MRSA로 정맥내 감염시켰다. Kaplan-Meier 플롯이 보여준다. n = 8.

(B) 혈장 내 TNF-α, IL-6 및 MCP-1의 양을 CBA로 측정했다.

(C) 혈액 및 신장의 세균 역가는 MRSA 감염 8시간 후 집락 형성 분석에 의해 결정되었다: n=6.

(D&E) CD11b+ F4/80+ 게이트(D)에서 CD38+ 세포의 빈도와 CD38+ 대식세포(E)의 평균(± S.D) 빈도가 있는 대표적인 히스토그램이 표시된다. n = 5.

도 4는 DA는 전염증성 사이토카인의 유도를 억제하면서 대식세포의 박테리아 사멸 활성을 촉진한다는 것을 나타낸 그림으로,

BMDM을 40 μM DA로 전처리하고 3 × 10^6 CFU MRSA와 함께 배양했다. 세포를 세척하여 MRSA 감염 0.5시간 후에 무세포 박테리아를 제거하고 새로운 무항생제 배지에서 추가로 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. BMDM을 용해하고 MRSA 감염 후 표시된 시간(0.5시간 및 2.0시간)의 박테리아 역가를 CFU로 결정했다: n = 5.

(B) 박테리아 사멸 효율은 "재료 및 방법"에 설명된 대로 계산되었다. 평균(± SD) 값이 표시된다.

(C & D) BMDM을 DA로 전처리하고 2시간 동안 3 × 10^6 CFU MRSA로 감염시켰다. BMDM의 ROS 수준은 H2DCFDA 및 유세포 분석법(C)을 사용하여 측정되었다. 배양 상층액에서 NO의 양은 아질산염 수준(D)으로 결정되었다.

(E) MRSA 감염에 대한 반응으로 BMDM의 사이토카인 생산은 시간 경과에 따라 CBA에 의해 결정되었다: n = 4.

도 5는 DA는 염증성 대식세포의 LPS 유도 기능 활성화를 억제한다는 것을 나타낸 그림으로,

(A) BMDM을 표시된 농도의 DA로 전처리하고 8시간 동안 200ng/ml LPS로 활성화했다. 배양 상등액에서 TNF-α, IL-6 및 MCP-1의 생산은 CBA에 의해 결정되었다: n = 4.

(B) 배양 상등액에서 아질산염의 양을 측정했다.

(C) BMDM을 20 μM의 DA로 사전 처리한 다음 표시된 시간 동안 LPS로 자극했습니다. 표시된 유전자를 인코딩하는 mRNA의 LPS 유도 발현은 실시간 PCR에 의해 정량화되었다: n = 3.

(D & E) BMDM은 20 μM DA로 전처리되었고 24시간 동안 LPS로 활성화되었다. CD38, CD86 및 I-A/I-E의 세포 표면 발현을 유세포분석에 의해 분석하였다.

표시된 표면 마커(E)의 대표적인 히스토그램(D) 및 평균(± S.D.) MFI가 표시된다. n = 3.

도 6은 DA는 NF-κB 및 Akt 신호 전달 경로를 조절하는 것을 나타낸 그림으로,

(A & B) BMDM을 20 μM DA로 전처리한 다음 시간 경과에 따른 LPS 자극을 가하고 표시된 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅으로 분석했다.

3개의 독립적인 실험에서 대표적인 면역블롯이 표시된다. α-tubulin 및 unphosphorylated 단백질에 대한 Immunoblotting을 loading control로 사용했다.

(C-E) RAW 264.7 세포를 표시된 플라스미드로 형질감염시키고 IKK2SSEE 및 AktDD의 이소성 발현을 웨스턴 블롯팅(C) 및 유세포 분석(D)에 의해 확인하였다.

세포는 DA로 전처리되었고, TNF-α의 분비는 LPS 활성화(E) 후 8시간에 결정되었다. LPS 자극 1시간 후, 세포를 표시된 항체로 웨스턴 블롯팅하여 분석하고, ROS 생산을 유세포 분석에 의해 결정하였다.

도 7은 MAPK 신호 전달 경로에 대한 DA의 효과를 나타낸 그림으로 BMDM을 20 μM DA로 전처리한 후 시간 경과에 따른 LPS 자극을 가하고 표시된 항체를 사용한 웨스턴 블로팅으로 분석했다.

2개의 독립적인 실험에서 대표적인 면역블롯이 표시된다. α-tubulin 및 unphosphorylated 단백질에 대한 Immunoblotting을 loading control로 사용했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0068] 본 발명에 사용된 화합물들과 기타 시약들에 대해서 decursinol angelate를 포함한 A. gigas의 12가지 화합물은 Yoogho Lim(건국대학교, 서울, 한국)에 의해 제공되었다: 각 화합물의 순도는 RP-C18 컬럼(Phenomenex, 미국 캘

리포니아주 토랜스)에 의하여 결정되었는데 적어도 98%이었다. 재조합 뮤린 대식세포 집락 자극 인자(M-CSF)는 PeproTech(미국 뉴저지주)에서 구입하고 재조합 뮤린 IL-4는 R&D 시스템(미국 미네소타)에서 구입했다.

[0069] 지질다당류(LPS)는 Sigma Aldrich(MO, USA)로부터 입수하였다. MK-2206은 Selleck(TX, USA)에서 구입했다.

[0070] α-tubulin, phosphor p65, p65, phospho-IκBα, IκBα, phosphor-Akt^{S437}, phospho-Akt^{T308}, Akt, phospho-Erk1/2, Erk1/2, phospho-p38 및 p38에 대한 1차 항체는 Cell Signaling Technologies(DV, USA)에서 입수하였다. PE-접합된 CD38(클론: 90) 항체(eBioscience, CA, USA)를 제외하고 CD11b(클론: M1/70), F4/80 유사 수용체(클론: 6F12), CD274(클론: MIH5), IA/IE(클론: M5/114.15.2) 및 CD86(클론: G1-7) 에 대한 형광단 결합 항체들은 BD Biosciences(CA, USA)에서 구입했다.

[0072] 마우스는 C57BL/6J 마우스는 DBL(서울, 한국)에서 구입했다. 모든 동물 실험은 한림대학교 동물연구소 동물관리위원회(한림 2018-57)에서 승인한 가이드라인과 실험 프로토콜에 따라 진행되었다. 동물의 생물학적 안전성 수준 2 시설에서 72시간 동안 순응시킨 후, 7-8주 된 마우스에 표시된 용량의 DA를 격일 3회 복강 내 투여한 다음 MRSA의 5×10^7 또는 1×10^8 CFU로 정맥내 감염시켰다. 감염 후 8시간에 심장 관류 후 간, 폐 및 신장을 분리하고 무게를 잰 후 기계적 균질화를 수행했다.

[0073] 요약하면, 장기를 1 ml PBS에 담그고 TissueLyser II(QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 강철 비드로 균질화했다. 사이토카인 측정을 위해, 균질액을 4° C에서 10분 동안 13,000 rpm으로 원심분리하고, 상청액을 세포측정 비드 ar-ray(CBA)(BD Biosciences CA, USA)로 분석했다.

[0075] 실시예 1; 박테리아 배양 및 콜로니 형성 어세이

[0076] MRSA(MW2 균주)는 37° C 진탕 배양기에서 2% NaCl이 보충된 3.5% Columbia Broth(BD Difco, NJ, USA)에서 밤새 배양되었다. 그런 다음, 박테리아 배양물을 1:50에서 새로운 배지에서 희석하고 3 x 10^8 CFUs/ml에 해당하는 0.5의 OD600으로 성장시켰다. 박테리아 배양물을 2회 세척하고 감염 전에 PBS에 재현탁시켰다.

[0077] 콜로니 형성 단위를 측정하기 위해 조직 균질물, 꼬리 정맥에서 수집한 혈액 또는 대식세포 용해물을 PBS에 연속적으로 희석하고 플라스틱 비드를 사용하여 1.5% 한천을 포함하는 컬럼비아 브로스 플레이트에 스프리드하였다. 플레이트에서 성장한 콜로니는 37° C에서 인큐베이션한 후 12시간 동안 세었고 밀리리터의 혈액 당 또는 조직 1g당 또는 조직당 CFU를 결정하였다.

[0079] 실시예 2: 대식세포

[0080] 마우스에 3% 티오글리콜레이트를 4일 동안 복강내 처리하고, 냉 PBS를 복막에 주입하여 복막 세척액을 수집하였다. 복막 세포를 세척하고, 계수하고, 10% FBS, 100단위/ml 페니실린 및 100㎍/ml 스트렙토마이신 및 0.1mM 베타-메르캅토에탄올을 함유하는 IMDM 배지에 재현탁시켰다. 웰 플레이트에 부착될 수 있도록 적어도 2시간 동안 기다린 후, 배지를 교체하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 부착성 복막 대식세포를 표시된 허브 화합물로 1시간 동안 전처리하고 200ng/ml LPS 세포로 8시간 동안 활성화했다.

[0081] 골수 유래 대식세포(BMDM)는 이전에 설명한 대로 준비되었다.

[0082] 요약하면, 골수 세포를 대퇴골 및 경골에서 분리하고 20ng/ml M-CSF의 존재하에 페트리 접시에서 7일 동안 배양하였다. 비효소적 세포 해리 용액(Corning, VA, USA)을 페트리 접시에 첨가하고 웰 플레이트에 파종하여 BMDM을 수확했다. RAW264.7 세포는 권형주(한림대학교, 춘천, 한국)에서 제공하였고 10% FBS가 보충된 DMEM에서 배양하였다.

[0083] RAW264.7 세포는 제조업체의 지침에 따라 FuGene® HD 형질감염 시약(Promega, WI, USA)을 사용하여 MSCV-Akt(DD)-IRES-Thy1.1[AKTDD], MSCV-IKK2(SSEE)-IRES-Thy1.1[IKK2SSEE] 또는 대조군 벡터[EV]로 형질감염되었다.

[0085] 실시예 3: 세포 생존력 분석

[0086] BMDM을 DA 존재 하에 24시간 동안 배양하고, 제조사의 지시에 따라 EZ-Cytox Enhanced Cell Viability Assay Kit(DoGenBio, Seoul, Korea)를 사용하여 세포 생존율을 평가하였다.

[0088] 실시예 4: 유세포 분석 및 사이토카인 측정

[0089] 단일 세포 현탁액은 Liu, Z.; Gu, Y.; Shin, A.; Zhang, S.; Ginhoux, F., Analysis of Myeloid Cells in Mouse Tissues with Flow Cytometry. *STAR protocols* **2020**, *1*, (1), 10002에서 설명한 대로 준비되었다.

[0090] 간, 폐 및 신장은 심장 관류 후 수확하고 조각으로 자른 다음 소화 완충액: Liberase DL 25㎍/ml, Liberase TL(Roche) 25㎍/ml 및 125㎍/ml의 DNase I(Sigma) 무혈청 RPMI 배지에서 37° C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 EDTA를 최종 농도가 1mM이 되도록 첨가하고 4° C에서 10분간 배양한 후 70㎛ 세포 여과기에 통과시켰다.

[0091] 세포를 RBC 용해 완충액과 함께 인큐베이션한 후, 생존 세포를 계수하고 FACS 세척 완충액(PBS 중 1% FBS)에 재현탁시켰다. 간, 폐 및 신장 및 시험관 내 배양에서 분리된 단일 세포 현탁액을 얼음 위에서 30분 동안 표면 마커에 대한 형광 표지된 항체로 염색했다.

[0092] FACS 완충액(PBS 중 1% FBS)에서 세척 및 재현탁한 후, 세포를 FlowJo V10 소프트웨어를 사용하여 FACS Canto II 기기(BD Biosciences)로 분석했다.

[0093] CD206의 세포내 염색을 위해, BMDM을 4% 파라포름알데히드로 고정하고, FACS 완충액에서 1% 사포닌으로 투과화시키고, APC-접합된 항-CD206 항체로 염색하였다. 대식세포는 생존 가능한 FSC 및 SSC 게이트에서 CD11b+ F4/80+ 세포로 제시되었다. 조직 균질액, 혈장 및 배양 상청액의 사이토카인 수준의 양은 제조업체의 지침에 따라 BD CBA 마우스 염증성 사이토카인 키트(BD Biosciences) 및 LEGENDplexTM 마우스 염증 패널(BioLegend)을 사용하여 측정되었다.

[0094] 실시예 5: 식균 작용 및 박테리아 사멸 분석

[0095] BMDM을 DA로 1시간 동안 전처리하고 무항생제 IMDM에서 MRSA의 3 x 10^6 CFU와 함께 배양했다. 그런 다음, 배양 30분 후, 나머지 무세포 박테리아를 PBS로 광범위하게 세척하고, BMDM을 즉시 용해하거나(식균 분석) 또는 0.2% Triton X-100를 사용하여 새로운 배지에서 추가 배양 90분 후(박테리아 사멸 분석) 용해하였다.

[0096] 살아있는 박테리아의 양은 컬럼비아 브로쓰 한천 플레이트에 대한 콜로니 형성 분석에 의해 결정되었다. 사멸 효율은 (A-B)/A x 100%로 계산하였다(여기서 A = 식균 분석에서 박테리아 역가 및 B = 사멸 분석에서 박테리아 역가).

[0098] 실시예 6: 활성산소 및 산화질소 측정

[0099] BMDM을 1시간 동안 DA로 전처리하고 2시간 동안 200ng/ml LPS 또는 MRSA의 3 × 10^6 CFU로 활성화했다. 활성산소의 생성은 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(H2DCFDA)의 산화를 감지하여 측정하였다.

[0100] 요약하면, BMDM을 37℃에서 5M H2DCFDA(Thermo Fisher Scientific)와 함께 20분 동안 배양하고 유세포 분석으로 분석했다. 배양 상층액의 아질산염 함량은 제조업체의 지침에 따라 Griess Reagent System(Promega, Madison, QI, USA)에 의해 측정되었다.

[0102] 실시예 7:정량적 실시간 PCR

[0103] TRIZOL 시약(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하여 총 RNA를 추출하고 ImProm-II Reverse Transcription System 키트(Promega, Madison, QI, USA)를 사용하여 cDNA로 역전사했다.

[0104] 표 1에 나열된 프라이머 쌍을 사용하여 SYBR qPCR mix(Toyobo, Osaka Japan) 및 CFX96 Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행했다.

[0105] 데이터를 각 샘플의 Actb 수준으로 정규화하고 비교 2ΔΔCt 방법으로 정량화했다.

표 1

[0106]

Gene name	Sequence (5' to 3')
Tnf	GATCGGTCCCCAAAGGGATG CACTTGGTGGTTTGCTACGAC
Il6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGATGTACTCCAGGTAGCTATGG
Cc12	AACTGCATCTGCCCTAAGGTAGGCATCACAGTCCGAGTCA
Nos2	TCCTGGACATTACGACCCCTCTCTGAGGGCTGACACAAGG
Actb	GGCACCACACCTTCTACAATGGGGGTGTTGAAGGTCTCAAAC

[0107] 표 1은 정량적 실시간 PCR 분석에 사용된 프라이머 서열을 나타냄

[0109] 실시예 8: 웨스턴 블로팅

[0110] 세포를 20mM HEPES(pH 7.4), 150mM NaCl 및 프로테아제 억제제 칵테일 및 포스파타제 억제제 칵테일(GenDEPOT, TX, USA)이 보충된 1% TritonX-100을 함유하는 용해 완충액에서 용해시켰다. 동일한 양의 용해물을 SDS-PAGE에서 분리하고 PVDF 멤브레인으로 옮겼다. 막을 5% 탈지유에서 표시된 1차 항체와 함께 2시간 동안 인큐베이션한 다음 HRP가 결합된 2차 항체와 1시간 동안 인큐베이션했다.

[0111] Enhanced Chemiluminescence kit(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하여 X선 필름에서 단백질 밴드를 검출했다.

[0112] 본 발명에서 실험은 3회 반복하였으며, 최소 3번의 독립적인 실험의 결과를 평균 ± S.D.로 표시하였다.

[0113] 통계적 분석은 unpaired Student's t-test(Instat; GraphPad Inc. San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. Kaplan-Meier 로그 순위 테스트는 R(The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)을 사용하여 수행되었다. 0.05 미만의 p-값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0115] 상기 실시예의 결과를 하기에 기술한다.

[0116] MRSA 감염은 염증 유발 표현형과 관련된 대식세포를 활성화함

[0117] 미생물 감염에 대한 선천성 면역은 후속 적응 면역을 지시하는 것과 동시에 침입하는 병원체를 제거하는 데 중요하다.

[0118] 면역 조절 허브 화합물을 정의하기 전에 동물 모델을 사용하여 MRSA 감염에 의해 촉발된 타고난 면역 반응을 평가했다. MRSA로 C57BL/6 마우스의 정맥내 감염은 패혈성 사망을 초래했으며, 여기서 1 x 10^8 CFU로의 감염은 100% 치사율을 유도하기에 충분했다(도 1A).

[0119] 감염 후 8시간 후, 패혈증 증상과 관련된 혈장(도 1B)에서 IL-6, IFN-γ, TNF-α 및 MCP-1을 포함한 전염증성 사이토카인 및 케모카인의 생성이 확인되었다. 유사하게, MCP-1 및 IL-6의 조직 발현은 간, 폐 및 신장에서 실질적으로 유도되었다(도 1C 및 1D).

[0120] 대식세포는 미생물 감염에 대한 초기 선천 면역을 담당하는 주요 개체군 중 하나이기 때문에 조직 및 말초 혈액에서 단핵구/대식세포 개체군을 조사했다. 유세포 분석은 CD11b+ F4/80+ 세포가 MRSA 감염 후 8시간에 간, 폐, 신장 및 말초 혈액에서 고도로 농축되었음을 보여주었다(도 1E).

[0121] 더욱이, 이러한 대식세포는 전염증성 대식세포의 표지자인 CD38의 발현에 의해 보여지는 바와 같이 전염증성 표현형(소위 M1)을 나타내었다. 이러한 결과는 MRSA 감염에 대한 초기 면역 반응에서 대식세포의 중요성을 확인시켜 주었다.

[0122] DA는 대식세포에서 염증성 사이토카인의 LPS 유도 생성을 억제함

[0123] 병원체 감염에 의한 패혈증 관리에 관여하는 A. gigas의 생리활성 화합물을 확인하기 위해 먼저 복막 대식세포

를 이용하여 A. gigas의 12가지 주요 성분에 대한 항염 효과를 평가하였다. A. gigas의 화합물 중 decursinol angelate(DA)는 LPS로 활성화된 대식세포에서 염증성 사이토카인 IL-6과 TNF-α의 분비를 현저하게 억제하였다(Fig. 2A & 2B).

[0124] decursin이 RAW264.7 및 THP-1 세포주에서 TNF-α와 같은 염증 매개체의 LPS 유도를 억제하는 것으로 보고되었지만, 본 발명자들은 1차 마우스 대식세포에 대한 decursin의 비교적 약한 효과를 관찰했다. 40 μM까지의 DA는 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으며, 이는 IL-6 및 TNF-α의 감소된 양이 DA의 세포독성 효과로 인한 것이 아님을 시사한다(도 2C).

[0125] 대식세포에 대한 면역조절 효과는 쥐 단핵구/대식세포 RAW264.7 세포주를 사용하여 추가로 확인되었다. DA 전처리는 LPS 활성화 RAW264.7 세포에서 TNF-α, IL-6 및 MCP-1의 생성을 유의하게 억제했다(도 2D).

[0126] 따라서, 본 발명자들은 DA가 시험관 내에서 대식세포의 전염증 반응을 조절하는 항염증 활성을 가지고 있음을 밝혀냈다.

[0127] DA는 MRSA 감염으로 인한 패혈증 증상을 완화

[0128] 생체 내 DA의 항염증 잠재력을 결정하기 위해 우리는 DA로 복강 내 마우스를 전처리하고 치사량의 MRSA로 정맥내 감염시켰다.

[0129] 도 3A의 Kaplan-Meier 분석에 의해 나타난 바와 같이, MRSA 감염에 의해 유도된 패혈증 사망에 대한 DA의 용량의존적 보호 효과를 관찰하였다. MRSA 감염 시 TNF-α, IL-6 및 MCP-1과 같은 전염증 매개체의 유도는 개선된 패혈증 증상과 관련될 수 있는 DA로 마우스를 전처리했을 때 유의하게 약화되었다(도 3B).

[0130] 더욱이, 신장 및 말초 혈액의 박테리아 역가는 DA로 처리된 마우스에서 실질적으로 감소한 반면(도 3C),

[0131] 간 및 폐의 세균 역가는 DA로 처리된 마우스와 비히클 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 흥미롭게도, 유세포 분석은 간 및 말초 혈액에서 CD11b+ F4/80+ 세포에 대한 CD38의 세포 표면 유도가 DA 처리에 의해 감소된 반면 CD11b+ F4/80+ 집단의 유병률은 DA 및 비히클이 있는 마우스(도 3D 및 3E) 사이에 유사하였다 .

[0132] 시험관 내 실험(도 2)과 일치하여, 이러한 결과는 DA가 병원성 박테리아에 대한 반응으로 대식세포의 전염증 활성화를 조절할 수 있음을 보여준다.

[0133] 종합적으로, DA는 염증 유발 사이토카인의 생성을 억제하고 균혈증을 개선하는 동시에 대식세포의 기능적 활성을 변경함으로써 패혈증 증상을 완화한다.

[0134] DA는 MRSA에 대한 반응으로 전염증성 사이토카인의 유도를 억제하면서 대식세포의 박테리아 사멸 능력을 향상시킴

[0135] 생체 내 감염 실험에서 DA 처리는 MRSA 감염 시 전염증성 사이토카인의 유도를 약화시켰을 뿐만 아니라 신장과 혈장의 박테리아 부하를 억제했다. 대식세포는 간문맥에서 배출된 병원체를 신장과 같은 다른 기관으로 전파하는 데 중요한 간에서 감염원의 주요 식세포이다.

[0136] 대식세포의 식세포 기능에 대한 DA의 효과를 확인하기 위해 본 발명자들은 는 시험관 내에서 MRSA와 함께 BMDM을 직접 배양했다. MRSA로 30분 동안 배양한 후, 우리는 DA로 전처리된 BMDM과 비히클 사이의 박테리아 흡수에서 유의한 차이를 관찰하지 못했다(도 4A).

[0137] 그러나 대식세포가 1.5시간 동안 추가로 배양되었을 때 BMDM의 살아있는 박테리아 역가는 대조군 BMDM과 비교하여 DA 처리에 의해 현저히 감소했다(도 4A).

[0138] 이 결과는 DA가 대식세포의 사멸 능력을 상향 조절하지만 침입하는 병원체의 더 이른 식세포 흡수를 상향 조절하지 않는다는 것을 시사한다(도 4B).

[0139] 섭취한 박테리아를 죽이는 능력의 효능은 phagosomal 성숙과 활성 산소종(ROS) 및 산화질소(NO)와 같은 항균 효과기의 유도에 의해 촉진된다. 본 발명자들은 MRSA와 함께 배양할 때 BMDM에서 ROS와 NO의 강력한 유도를 관찰했다(도 4C 및 4D). 흥미롭게도, DA 처리는 MRSA에 의해 유도된 ROS 생성을 향상시킨 반면 NO의 생성을 억제했다(도 4C 및 4D).

[0140] 이러한 결과는 ROS 및 NO와 같은 항균 효과기 분자의 생산에 뚜렷한 영향을 미친다는 것을 의미한다. MRSA에 의한 BMDM의 감염은 TNF-α, IL-12, IFN-γ 및 IL-10을 포함하는 일련의 염증 매개체의 분비를 강력하게 상향 조절했다(도 4D). 이 강력한 활성화 조건에서도 DA는 대식세포에서 염증성 사이토카인의 생성을 강력하게 억제했

다(도 4D).

[0141] 이러한 데이터는 DA가 MRSA에 대한 대식세포의 기능적 활성을 조절할 수 있음을 나타내며, 이는 MRSA에 감염된 마우스에서 개선된 균혈증 및 사이토카인 폭풍에 기여할 수 있다.

[0143] DA는 대식세포의 기능적 활성화를 조절함

[0144] 대식세포의 기능적 활성화에 대한 면역조절 효과를 추가로 정의하기 위해 본 발명자들은 DA가 LPS에 의해 촉발된 대식세포의 전염증성(소위 'M1') 활성화를 조절할 수 있는지 여부를 결정했다. 도 2A에 나타난 복막 대식세포에 대한 효과와 일치하게, DA로 전처리하면 BMDM에서 LPS로 유도된 TNF-α, IL-6 및 MCP-1 생성이 억제되었다(도 5A).

[0145] mRNA의 정량화는 이러한 전염증 매개체를 코딩하는 유전자의 발현이 DA 처리에 의해 감소되었음을 보여주었으며(도 5B), 이는 전사 수준에서의 조절을 나타낸다.

[0146] DA는 또한 LPS로 활성화된 BMDM에서 NO 생성을 억제했으며(도 5C), 이는 iNOS를 코딩하는 유전자의 발현 감소와 관련이 있다(도 5B).

[0147] LPS 자극에 의한 대식세포의 활성화는 전염증 활성과 관련된 세포 표면 마커를 상향 조절한다. 유세포 분석은 DA가 BMDM에서 공동자극 리간드 CD86, 클래스 II MHC(I-A/I-E) 및 CD38의 LPS 유도 표면 발현을 약화시키는 것으로 나타냈다(도 5D 및 5E).

[0148] 그럼에도 불구하고, DA 처리는 CD206 및 CD273을 포함하는 대안적으로 활성화된 대식세포(소위 'M2')와 관련된 마커의 표면 유도를 상향 조절하지 않았다(데이터는 표시되지 않음). 일관되게, 항염증성 사이토카인 IL-10의 생산은 도 4D에 도시된 DA에 의해 상향조절되지 않고 감소하였다.

[0149] 전반적으로, 이러한 결과는 DA가 전염증성 대식세포의 기능적 분극을 억제하지만 면역조절 대식세포의 분극화를 촉진하지 않는 면역조절 가능성을 가지고 있음을 보여준다.

[0151] DA는 Akt 억제와 독립적으로 NF-κB 경로를 억제함

[0152] DA가 대식세포의 염증 반응을 조절하는 분자 메커니즘을 조사하기 위해, 본 발명자들은 전염증 매개체의 발현과 관련된 세포 신호의 생화학적 분석을 수행했다.

[0153] MAPK 및 NF-κB 신호 전달 경로는 각각 AP-1 및 NF-κB 이량체의 전사 활성화를 통해 TNF-α와 같은 전염증성 사이토카인의 발현을 촉진한다. MAPK 경로는 Erk1/2 및 p38의 인산화에 의해 미미하게 영향을 받았지만(도 7), IκBα 및 NF-κB p65의 LPS 유도 인산화는 BMDM에서 DA 처리에 의해 분명히 약화되었다.(도 6A).

[0154] 흥미롭게도, DA는 LPS 자극에 의해 유도된 Akt의 인산화도 억제했다(도 6B). DA 처리에 따른 NF-κB 및 Akt 신호 전달 경로의 기여도를 평가하기 위해 우리는 RAW264.7 세포를 구성적으로 활성인 형태의 IKK2 및 Akt로 형질감염시키고 TNF-α의 분비를 측정했다(도 6C 및 6D).

[0155] IKK의 활성 돌연변이체(IKK2SSEE)를 발현하는 RAW264.7 세포는 대조군 벡터(EV)로 형질감염된 세포보다 더 많은 TNF-α를 생성하여, TNF-α의 발현에서 NF-κB 경로의 중요성을 확인시켜주었다(도 6E). 대조군 세포의 결과와 대조적으로, DA는 $IKK2^{SSEE}$로 형질감염된 세포에서 TNF-α의 LPS 유도를 억제할 수 없었다(도 6E).

[0156] 따라서, 본 발명자들은 전염증성 사이토카인 생성에서 NF-?B 신호 전달 경로의 감쇠가 DA에 의해 교란될 수 있다고 제안했다. 반면에, TNF-α의 LPS-유도는 EV로 형질감염된 세포에서보다 Akt의 구성적 활성 돌연변이체(AktDD)를 발현하는 세포에서 덜 효율적이었고, DA는 여전히 TNF-의 LPS-유도를 약화시킬 수 있었다. (도 6E).

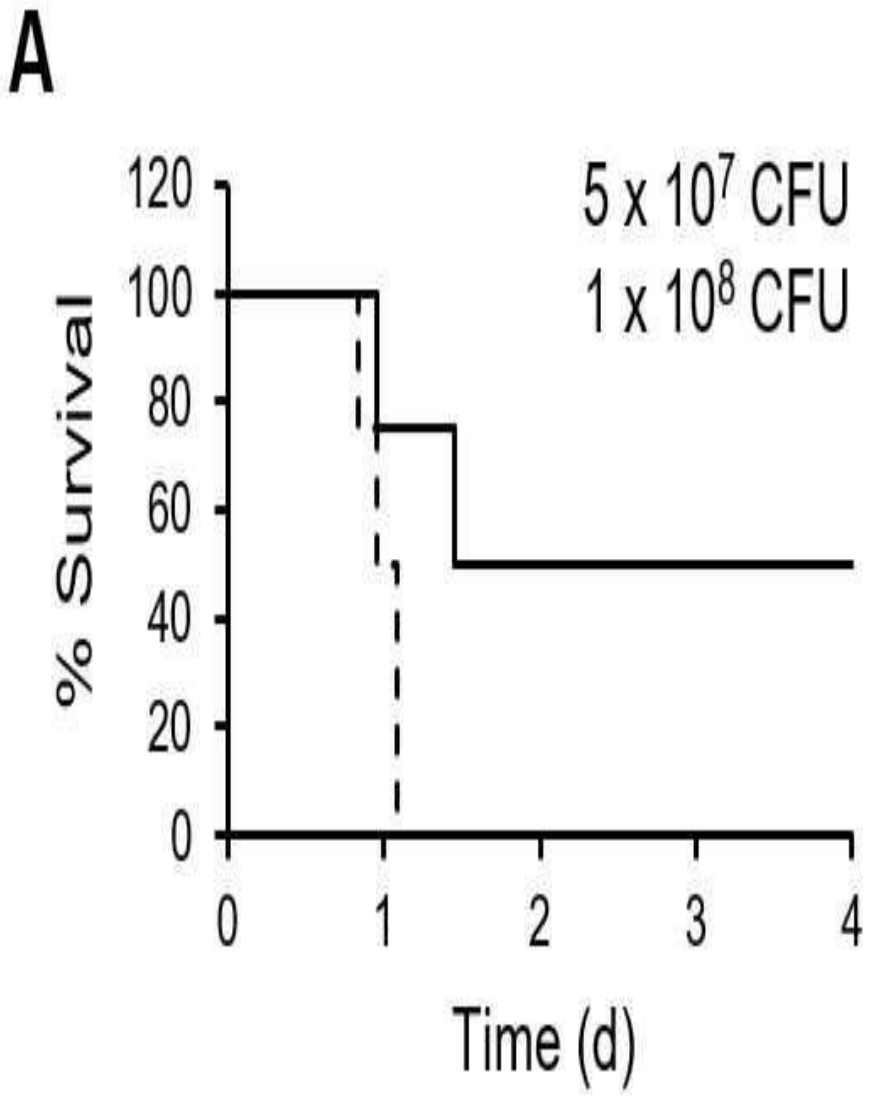
[0157] Akt 신호 전달에 대한 DA의 영향을 더 자세히 설명하기 위해 Akt 억제제인 MK-2206으로 BMDM을 전처리했다. MK-2206의 존재하에 Akt의 인산화가 완전히 폐지된 반면, LPS에 의해 유도된 IκBα 및 NF-κB p65의 인산화는 약간 상향 조절되었다(도 6F). 그러나, DA는 MK-2206으로 전처리된 세포에서 IκBα 및 NF-κB p65의 LPS 유도 인산화를 억제할 수 있다(도 6F).

[0158] MK-2206 처리는 TNF-α의 생성에 영향을 미치지 않았지만(데이터는 표시되지 않음), DA 처리와 유사하게 대식세포에서 LPS-유도 ROS 생성을 향상시켰지만 DA에는 추가 효과가 없었다(도 6G).

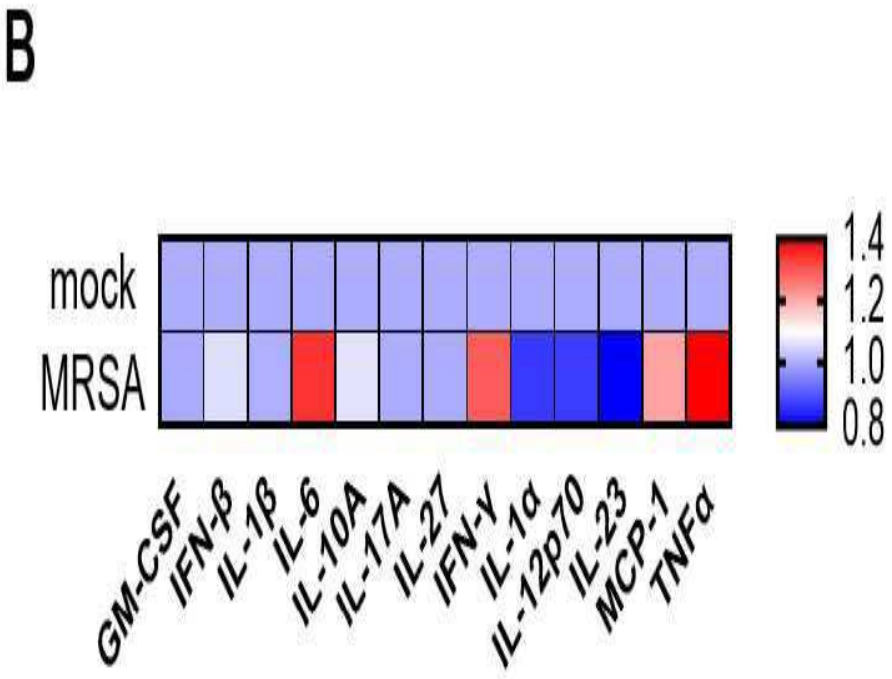
[0159] 종합하면, NF-κB 및 Akt 신호 전달 경로에 대한 DA의 작용은 대식세포의 기능적 활동을 차등적으로 조절할 수 있다.

도면

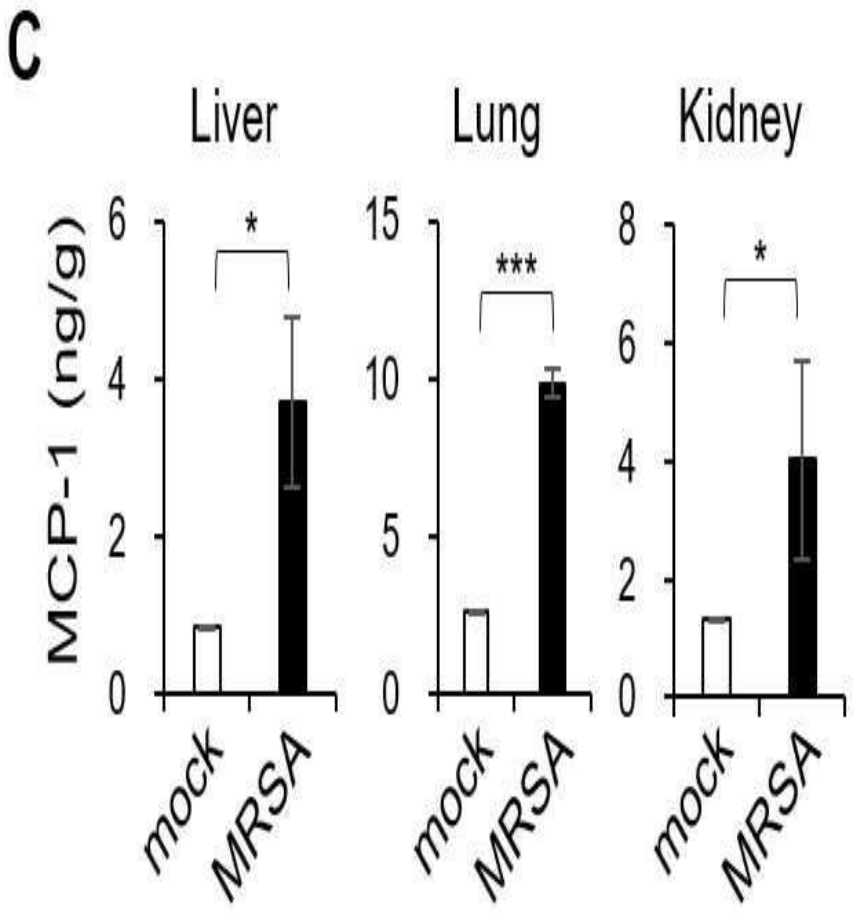
도면1a



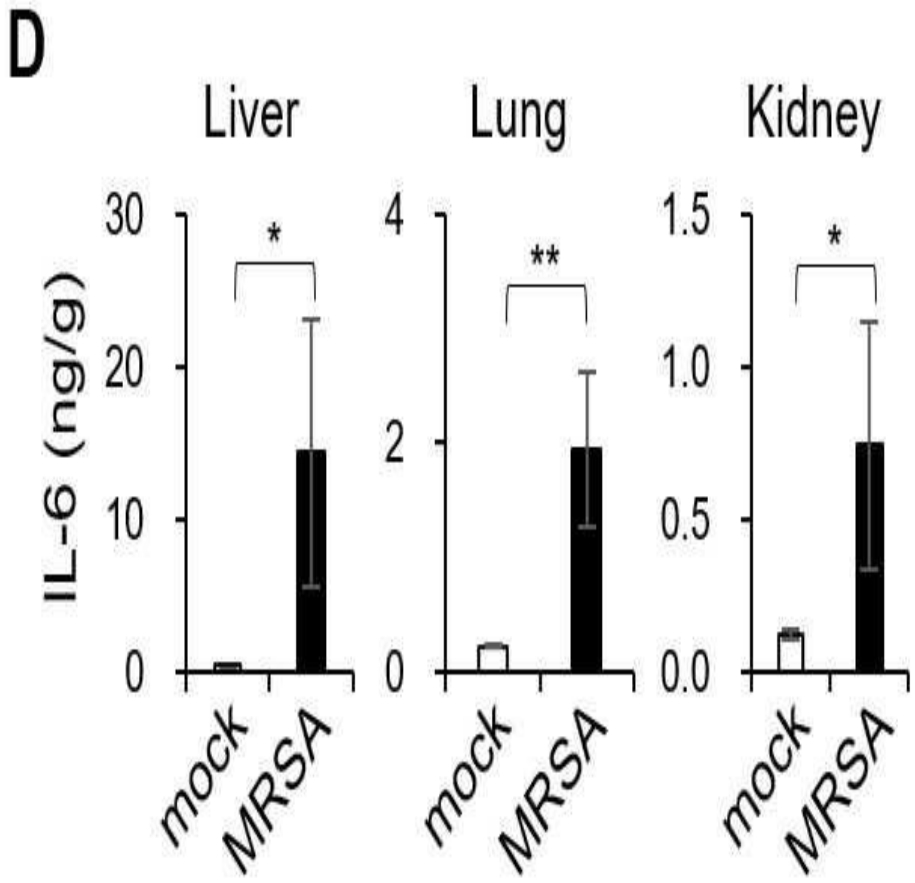
도면1b


B
mock
MRSA
1.4
1.2
1.0
0.8
GM-CSF
IFN-β
IL-1β
IL-6
IL-10A
IL-17A
IL-27
IFN-γ
IL-1α
IL-12p70
IL-23
MCP-1
TNFα

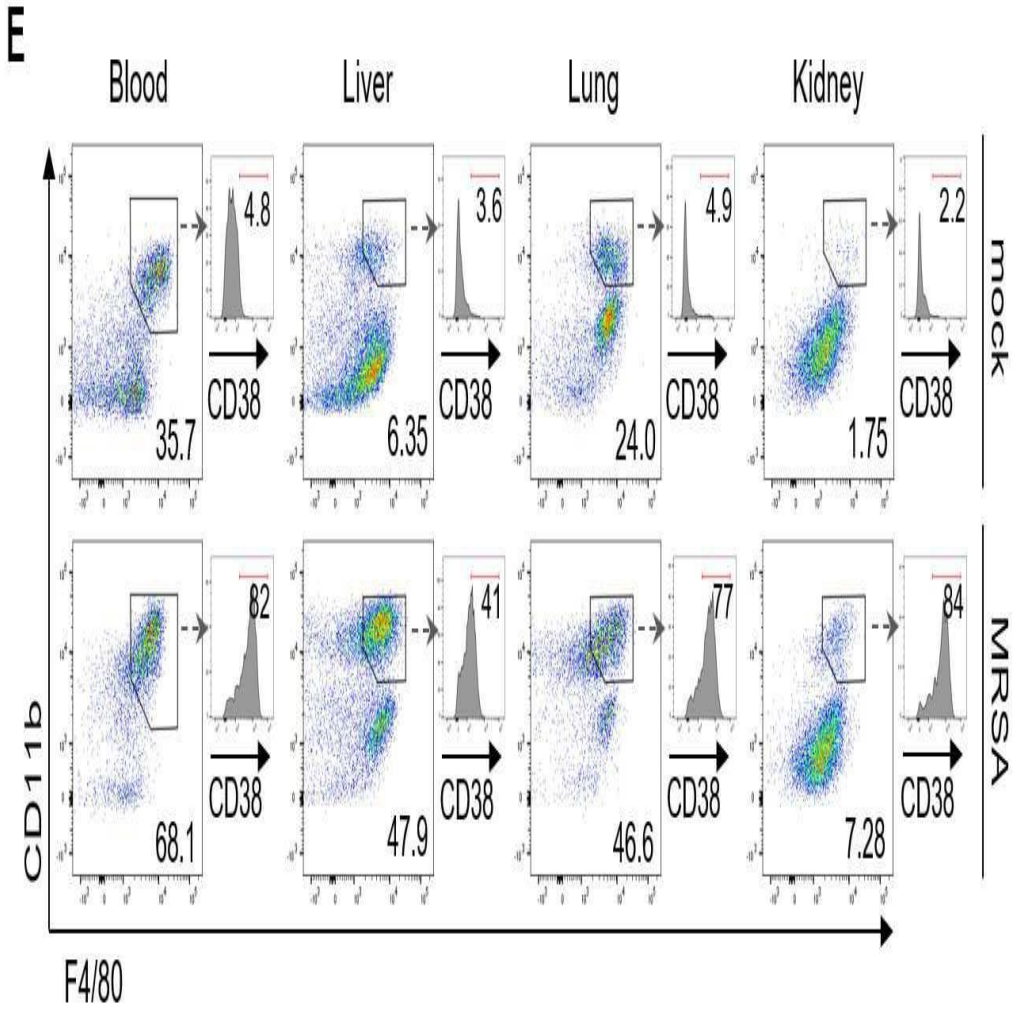
도면1c


c
Liver
Lung
Kidney
MCP-1 (ng/g)
6
4
2
0
15
10
5
0
8
6
4
2
0
*
***
*
mock
MRSA
mock
MRSA
mock
MRSA

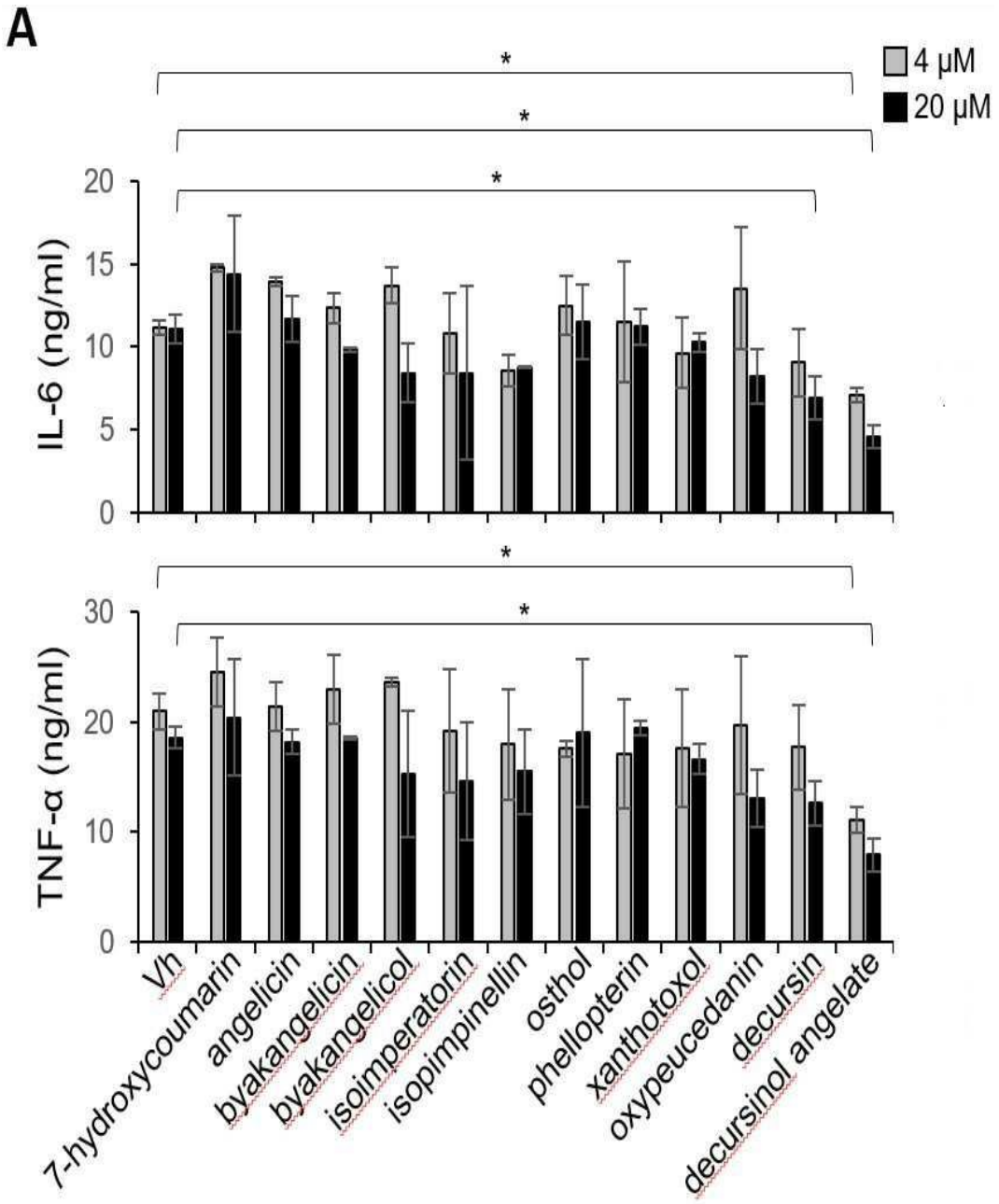
도면1d


D
Liver
Lung
Kidney
IL-6 (ng/g)
30
20
10
0
4
2
0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
*
mock
MRSA
mock
MRSA
mock
MRSA

도면1e

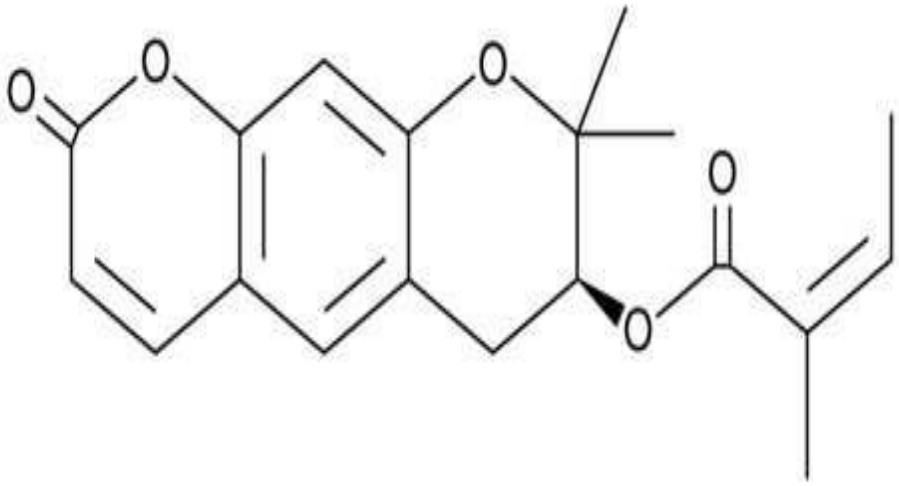

E
Blood
Liver
Lung
Kidney
mock
MRSA
CD11b
F4/80
CD38
35.7
4.8
6.35
3.6
24.0
4.9
1.75
2.2
68.1
82
47.9
41
46.6
77
7.28
84

도면2a

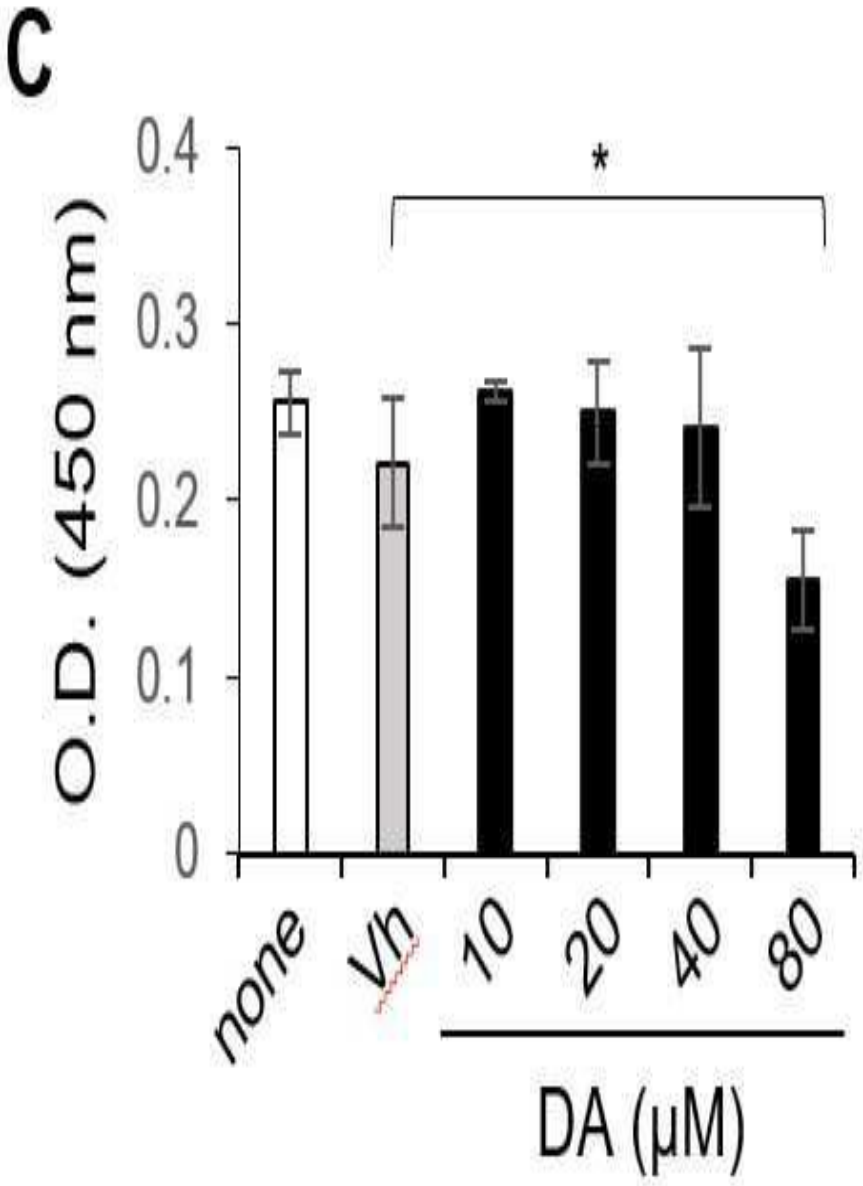

A
4 μM
20 μM
IL-6 (ng/ml)
TNF-α (ng/ml)
Vh
7-hydroxycoumarin
angelicin
byakangelicin
byakangelicol
isoimperatorin
isopimpinellin
osthol
phellopterin
xanthotoxol
oxypeucedanin
decursin
decursinol angelate

도면2b

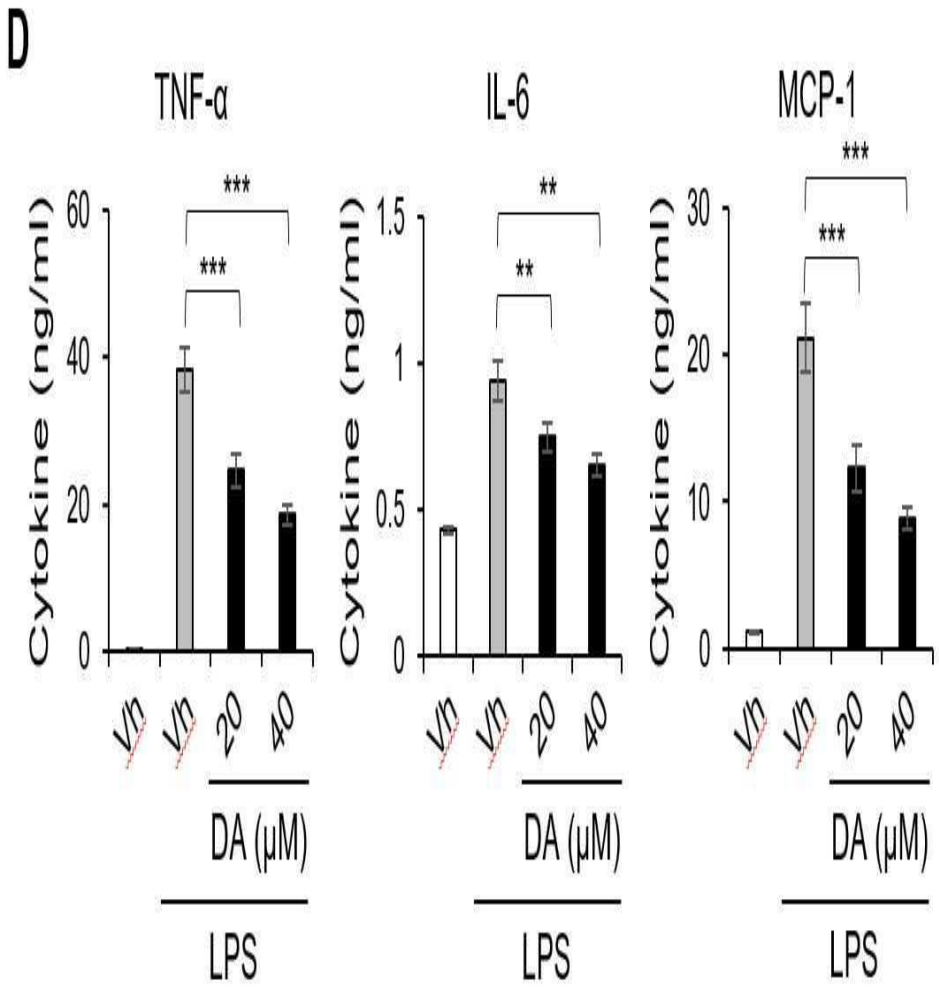
B



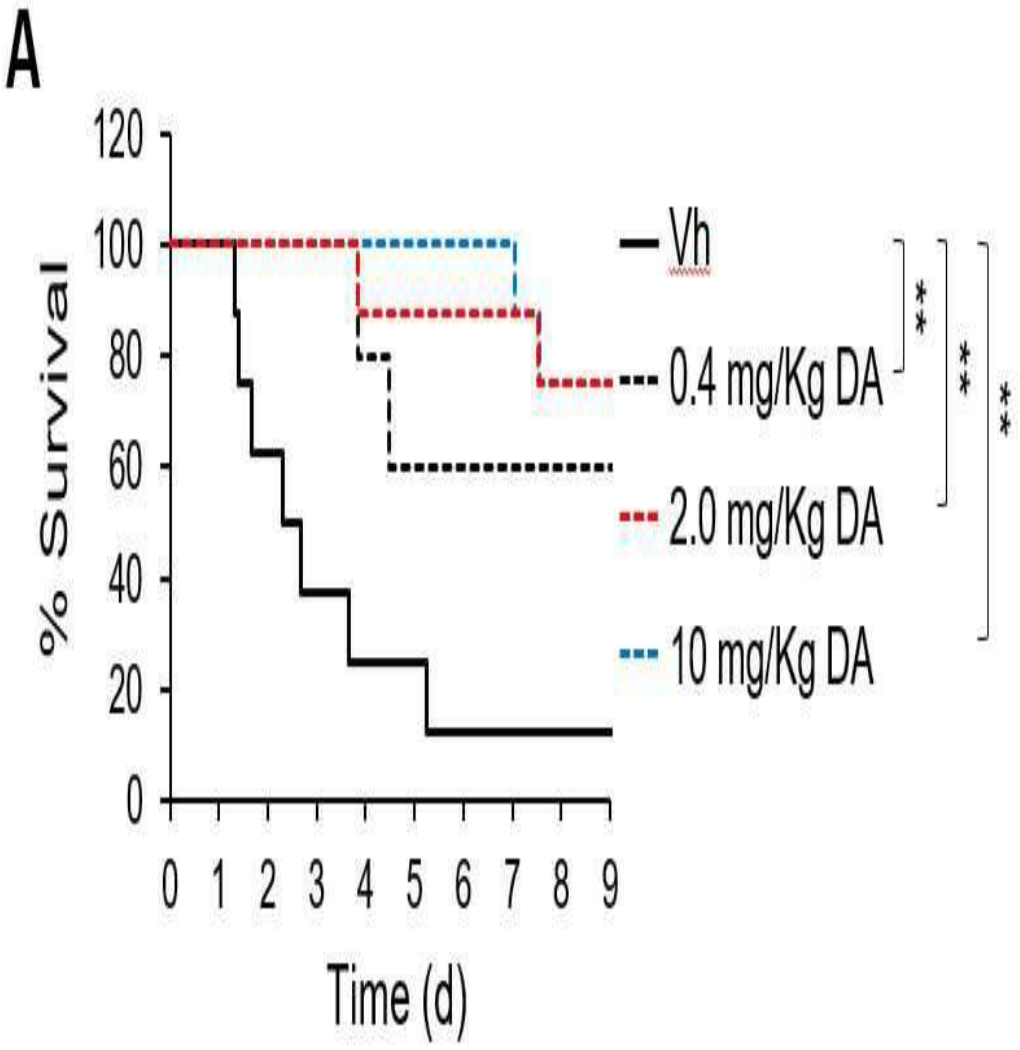
도면2c



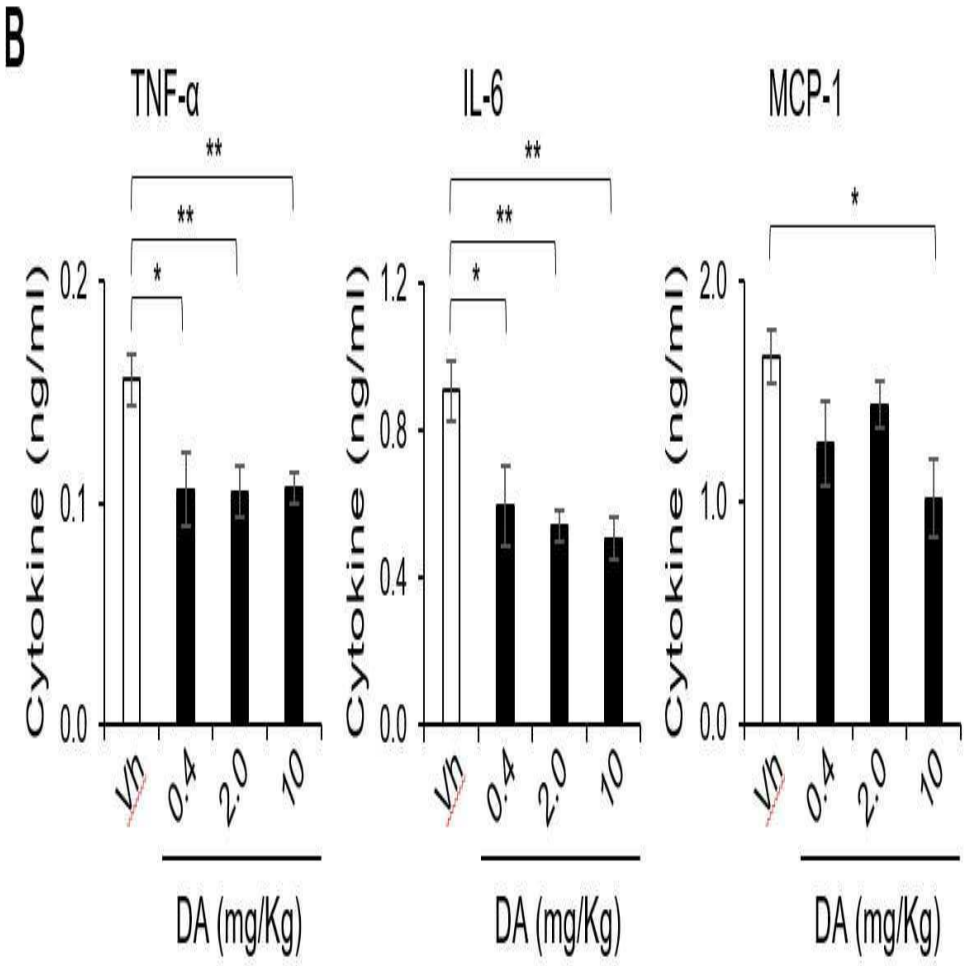
도면2d


D
TNF-α
IL-6
MCP-1
Cytokine (ng/ml)
60
40
20
0
1.5
1
0.5
30
10
***
**
Veh
20
40
DA (μM)
LPS

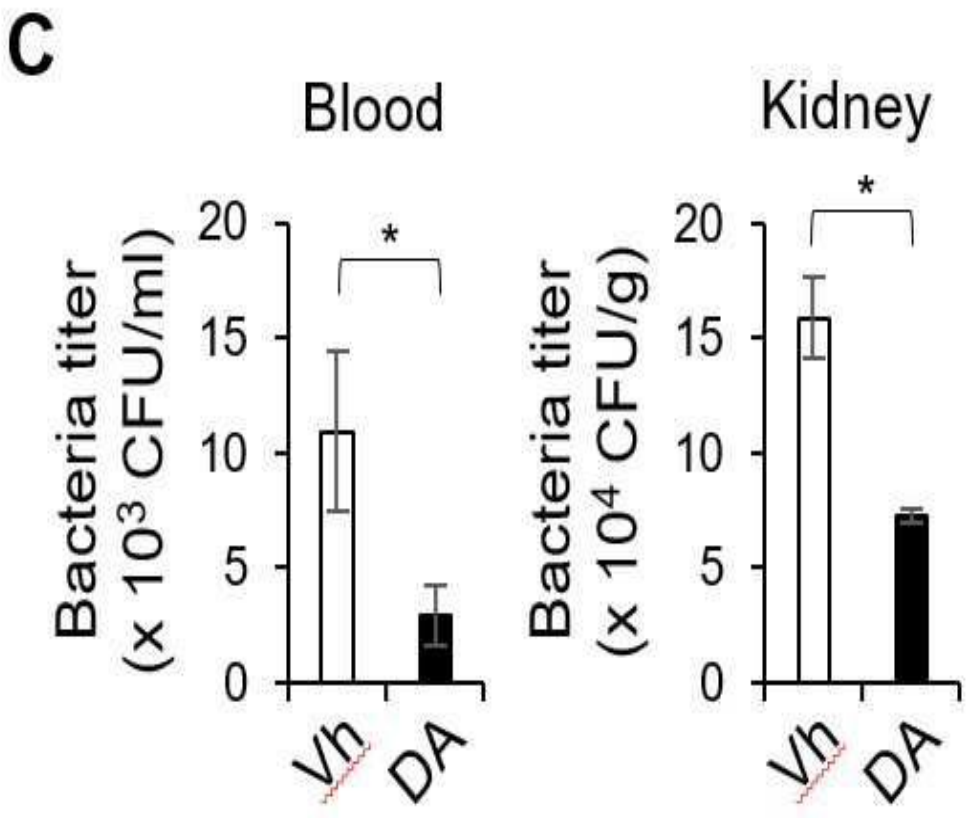
도면3a


A
120
100
80
60
40
20
0
% Survival
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Time (d)
Vh
0.4 mg/Kg DA
2.0 mg/Kg DA
10 mg/Kg DA
**
**
**

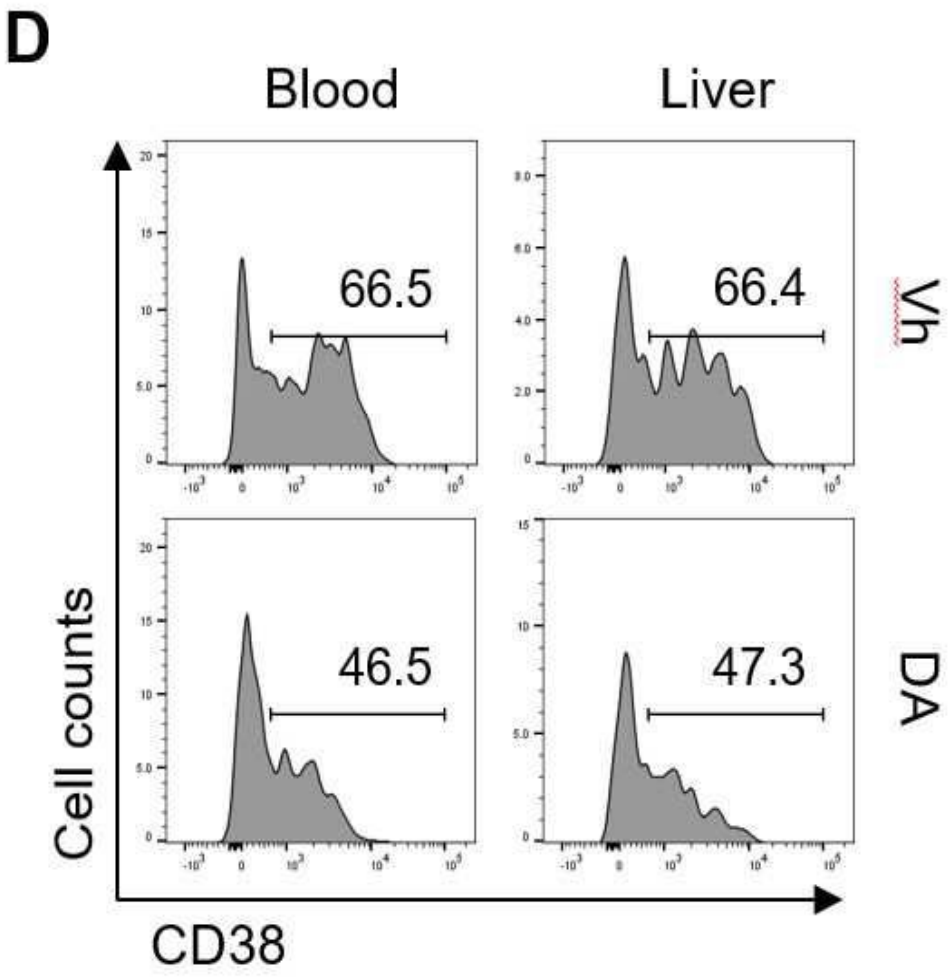
도면3b


B
TNF-α
IL-6
MCP-1
Cytokine (ng/ml)
0.0
0.1
0.2
0.4
0.8
1.2
1.0
2.0
*
**
Veh
0.4
2.0
10
DA (mg/Kg)

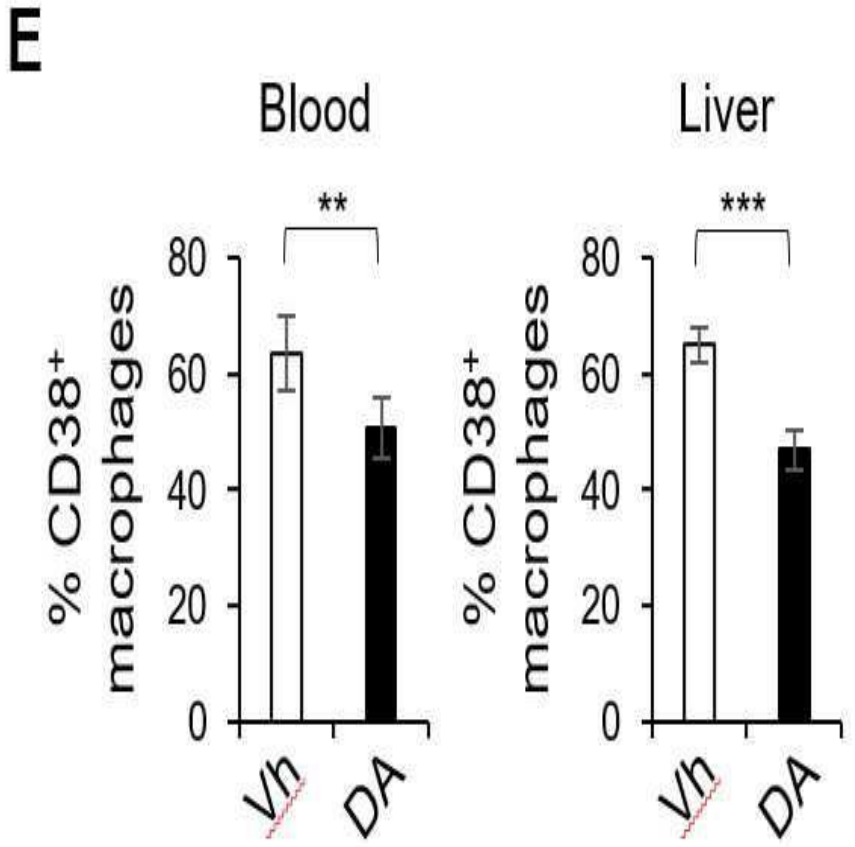
도면3c


C
Blood
Kidney
Bacteria titer
(x 10³ CFU/ml)
Bacteria titer
(x 10⁴ CFU/g)
20
15
10
5
0
*
Vh
DA

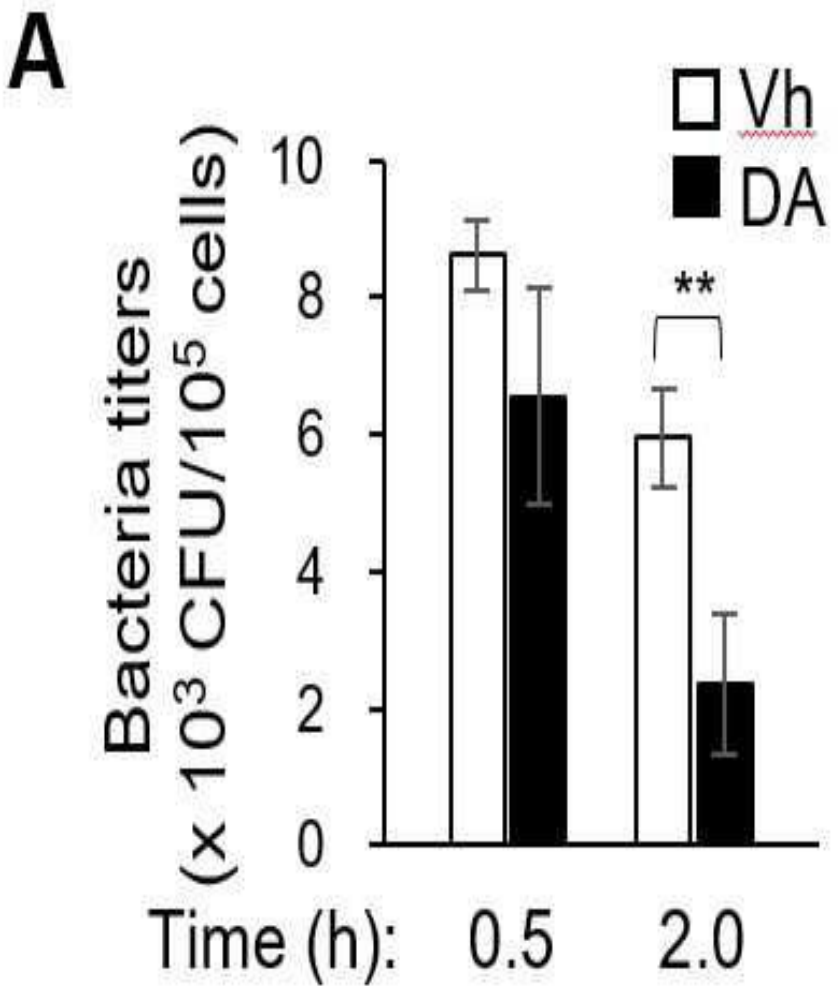
도면3d



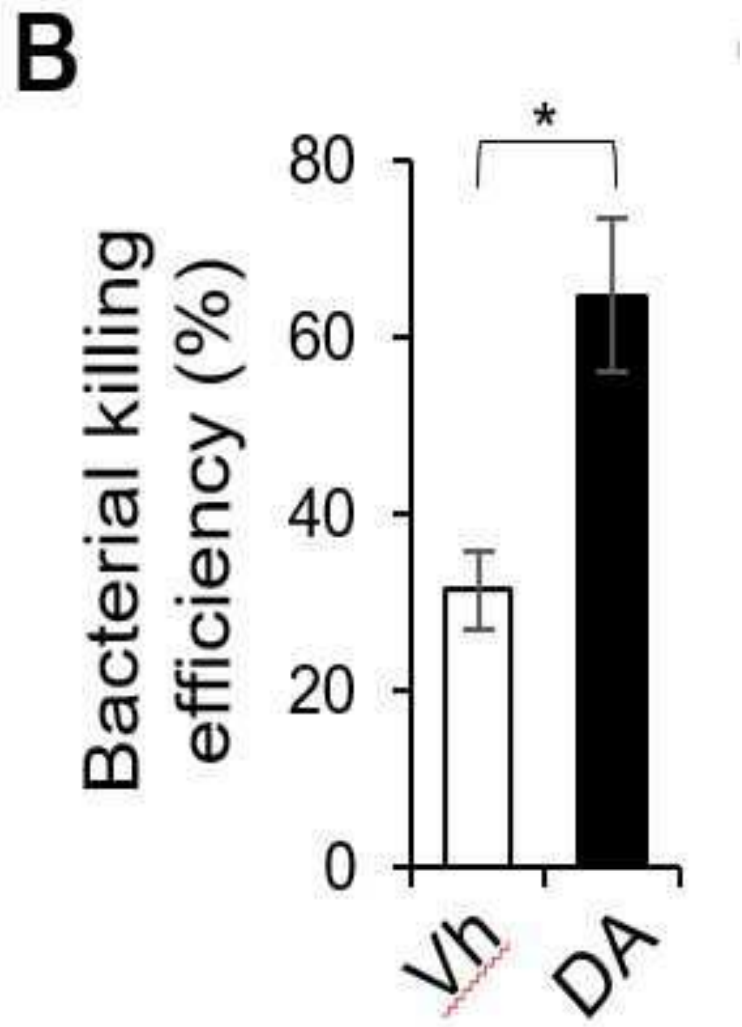
도면3e



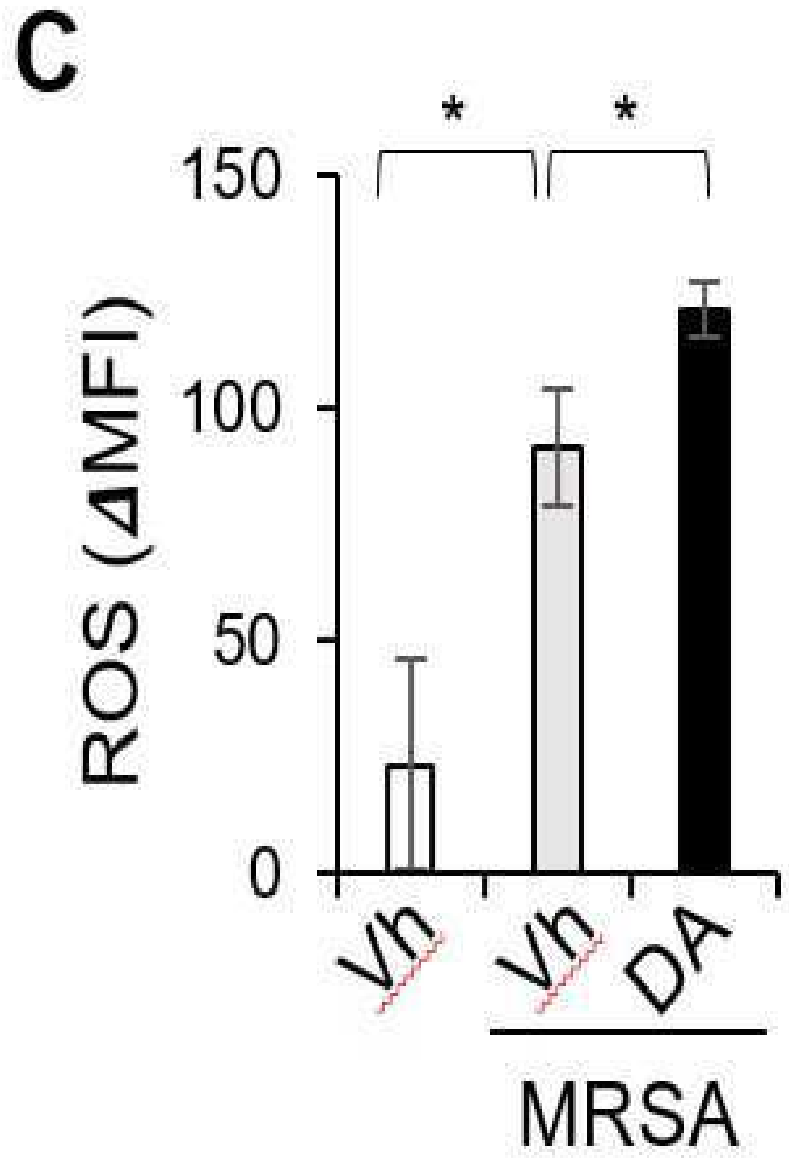
도면4a


A
Vh
DA
**
Bacteria titers
(x 10³ CFU/10⁵ cells)
10
8
6
4
2
0
Time (h):
0.5
2.0

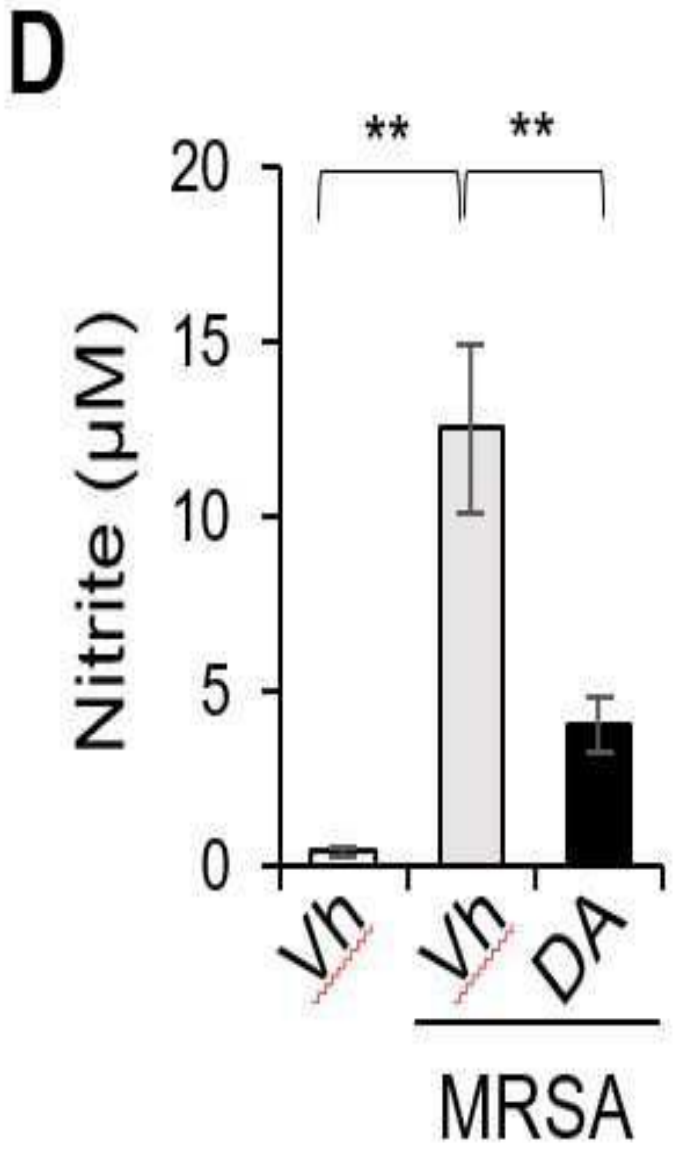
도면4b



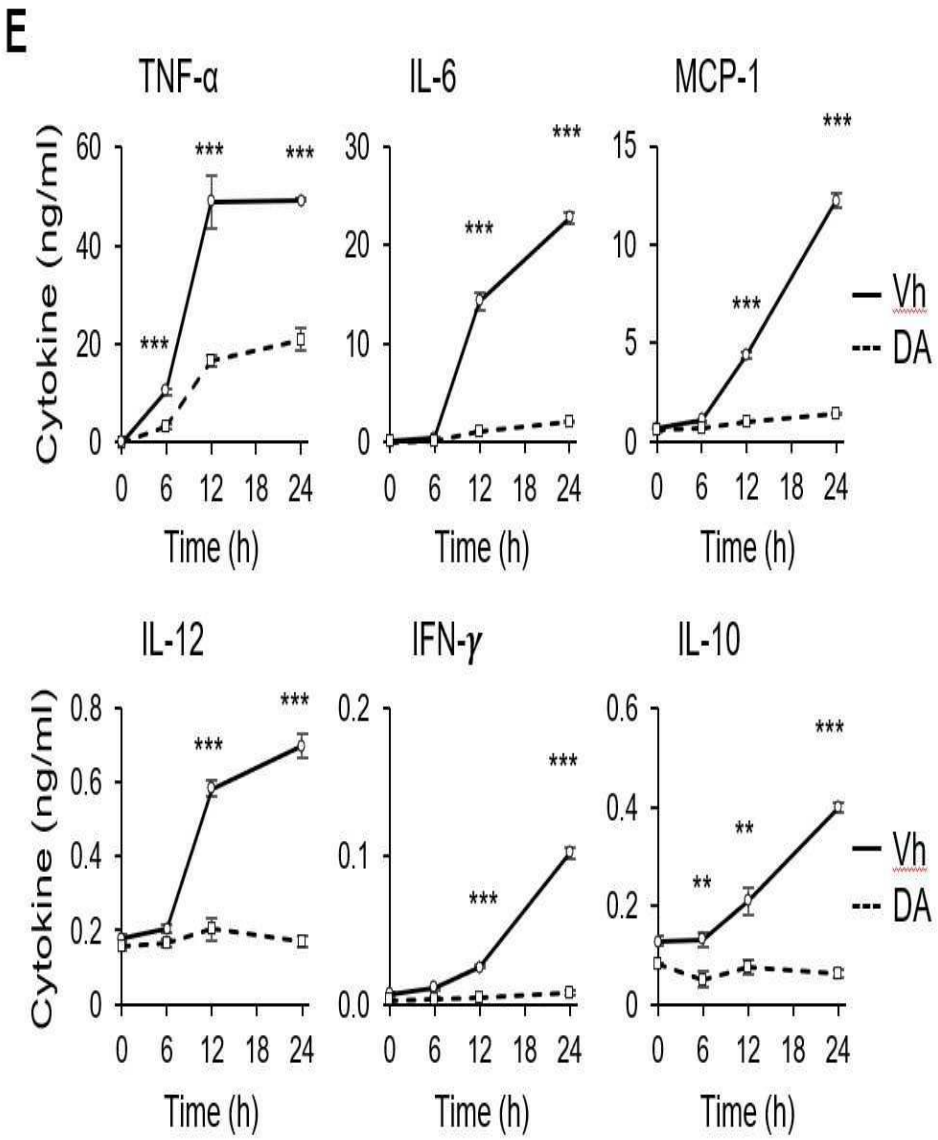
도면4c



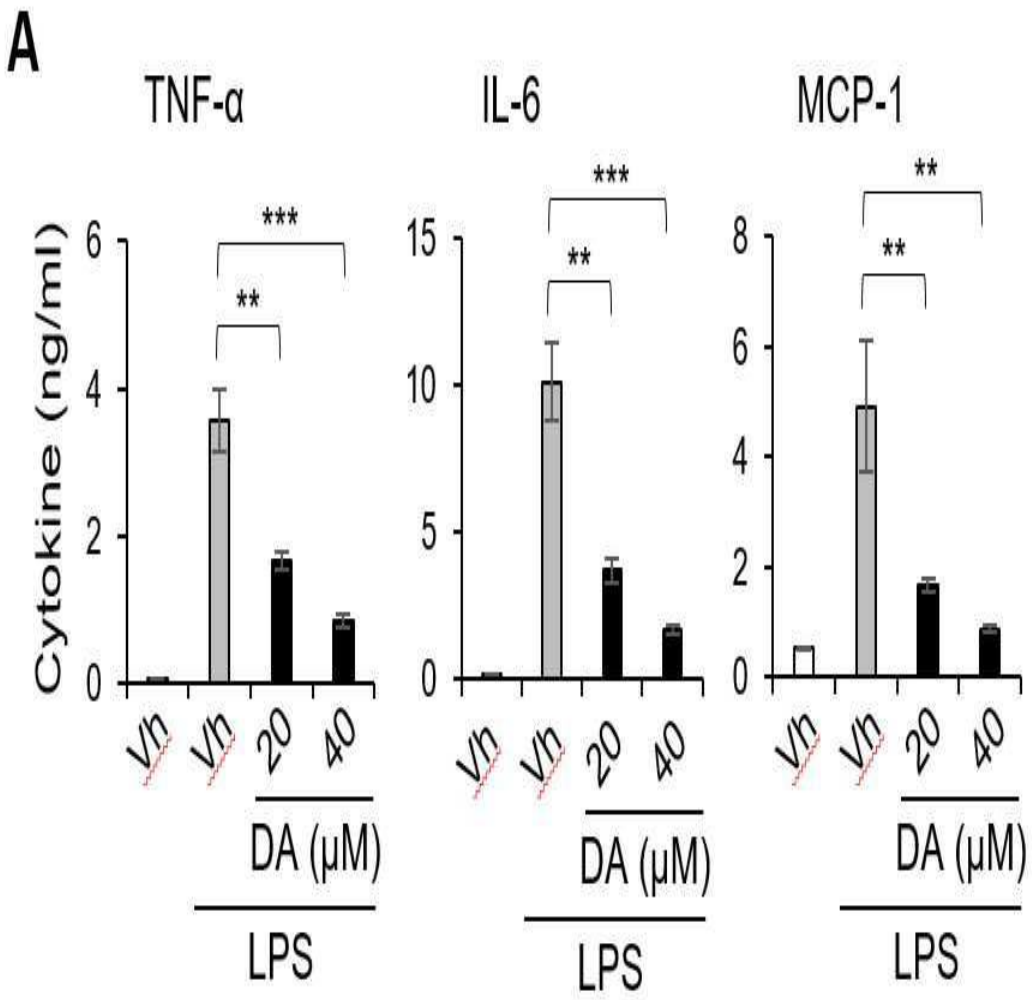
도면4d



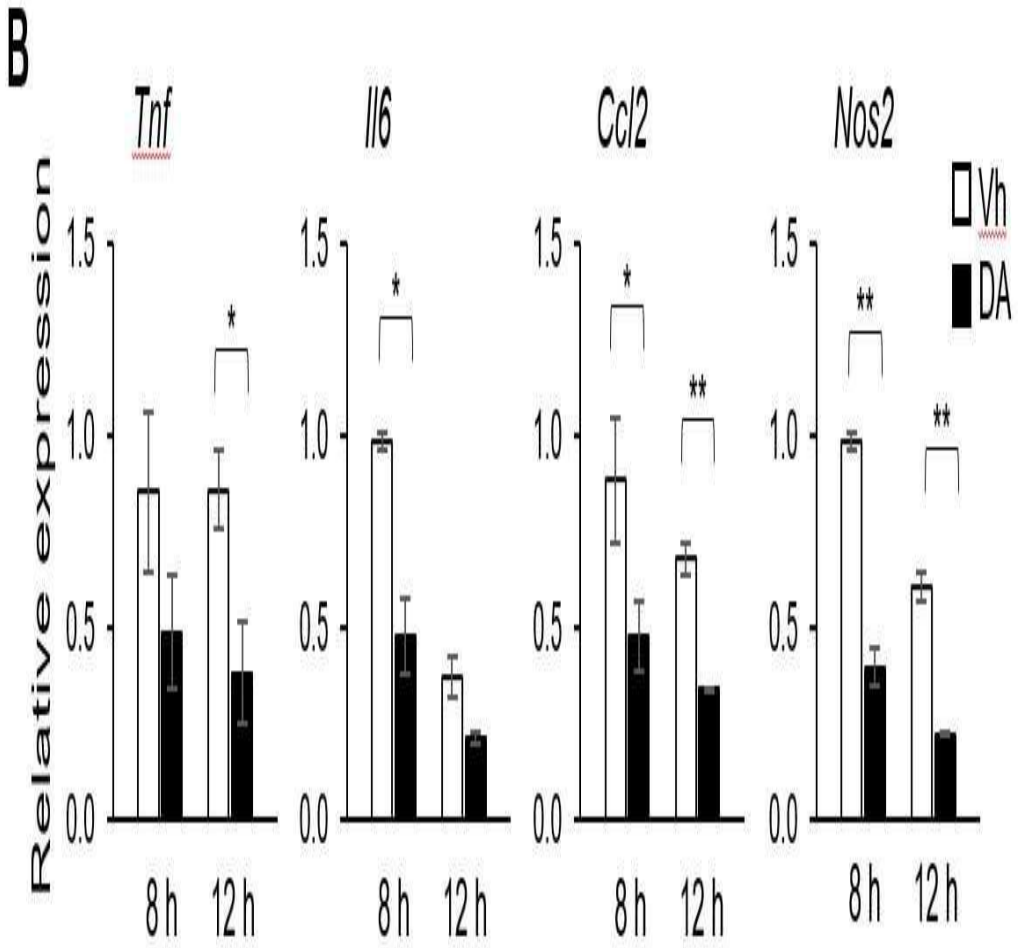
도면4e



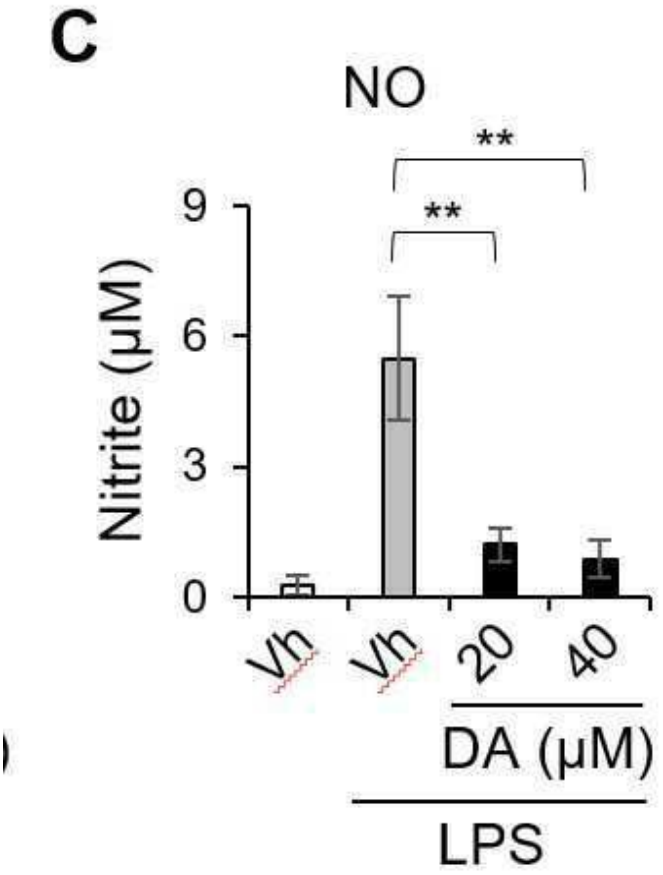
도면5a



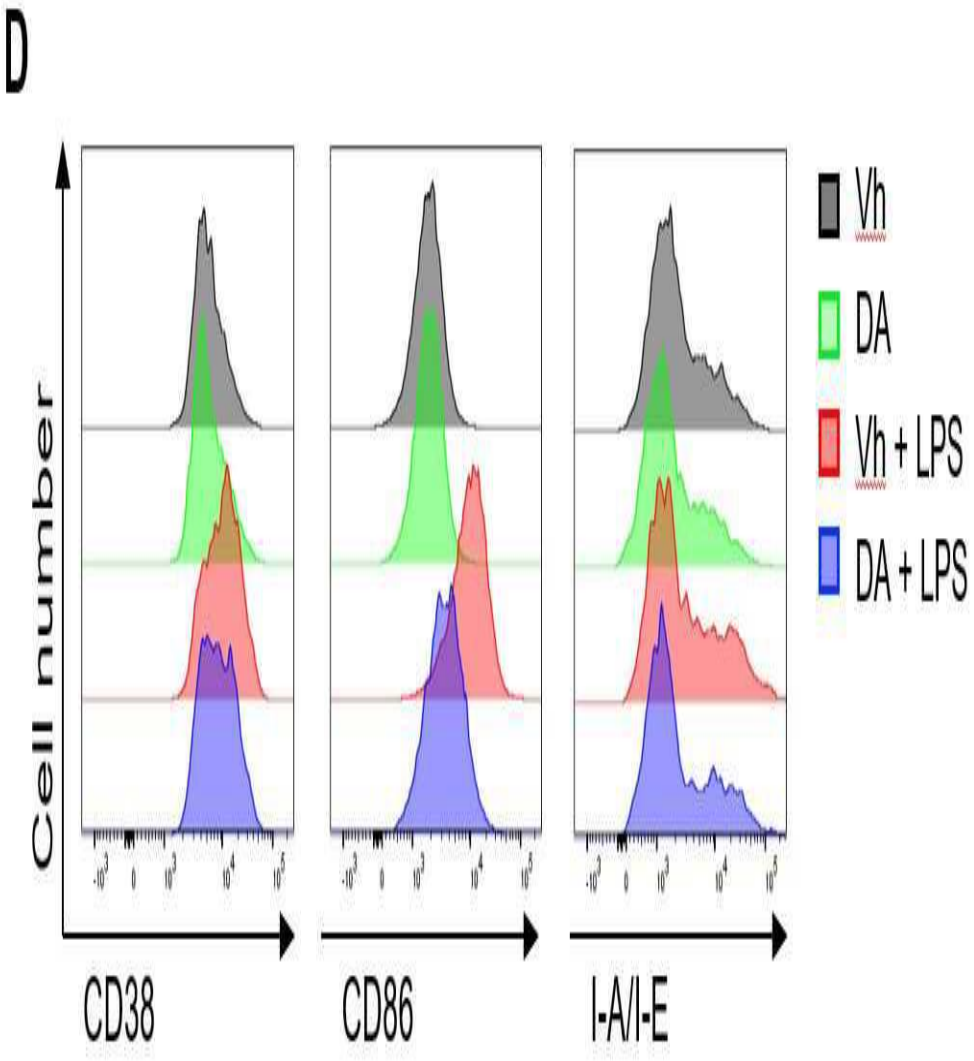
도면5b


B
Tnf
Il6
Ccl2
Nos2
Vh
DA
Relative expression
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
8h
12h

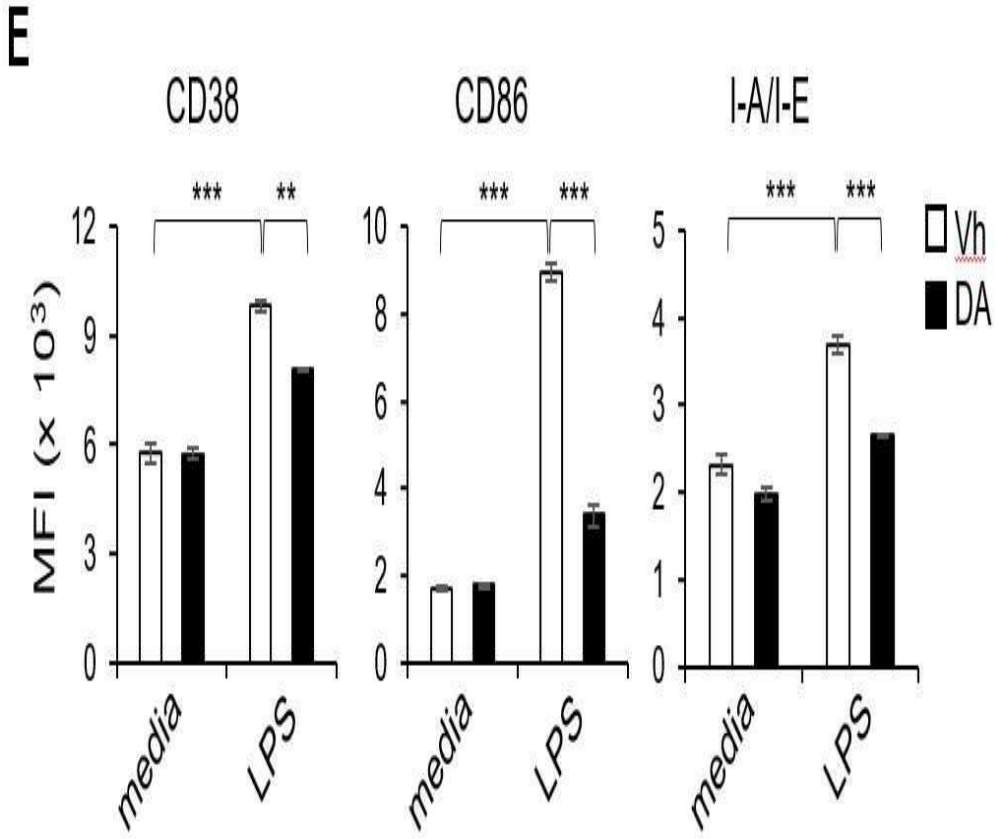
도면5c



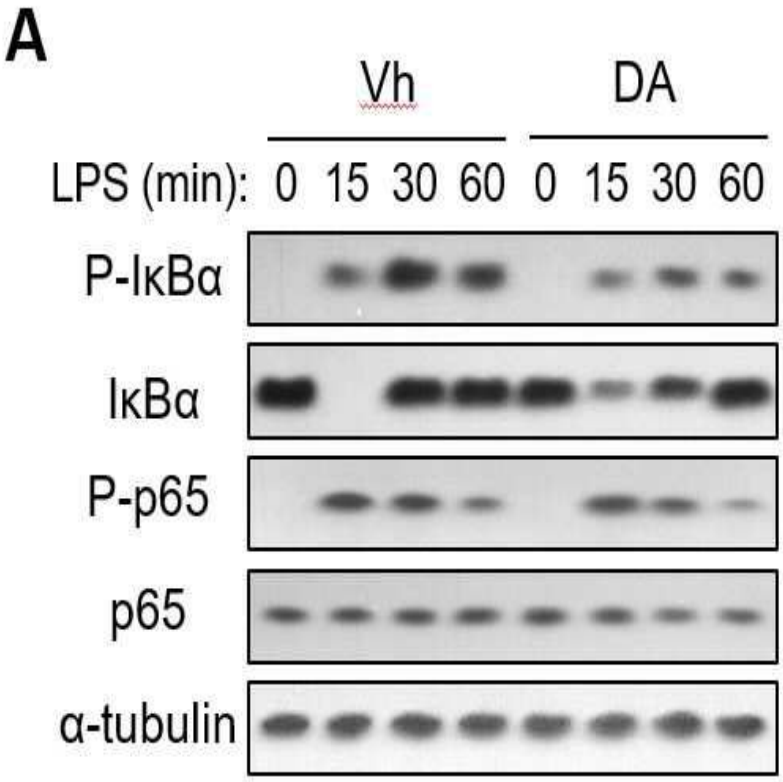
도면5d



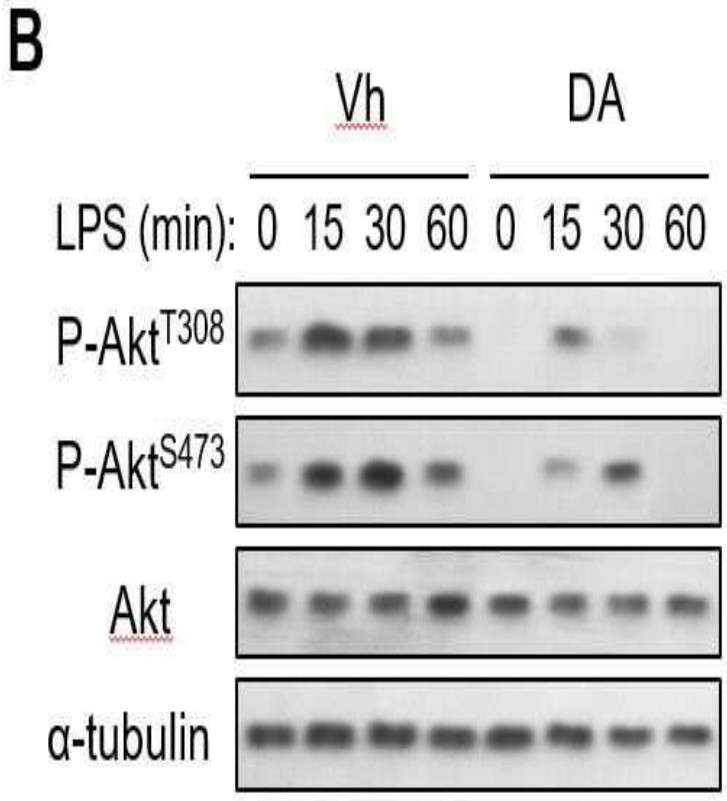
도면5e



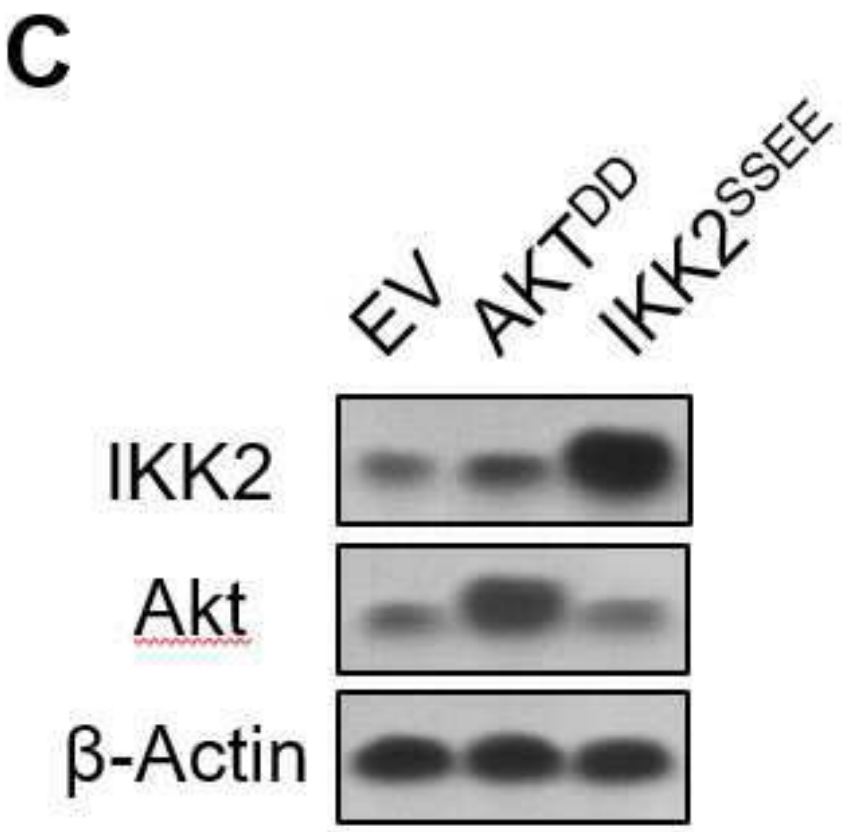
도면6a



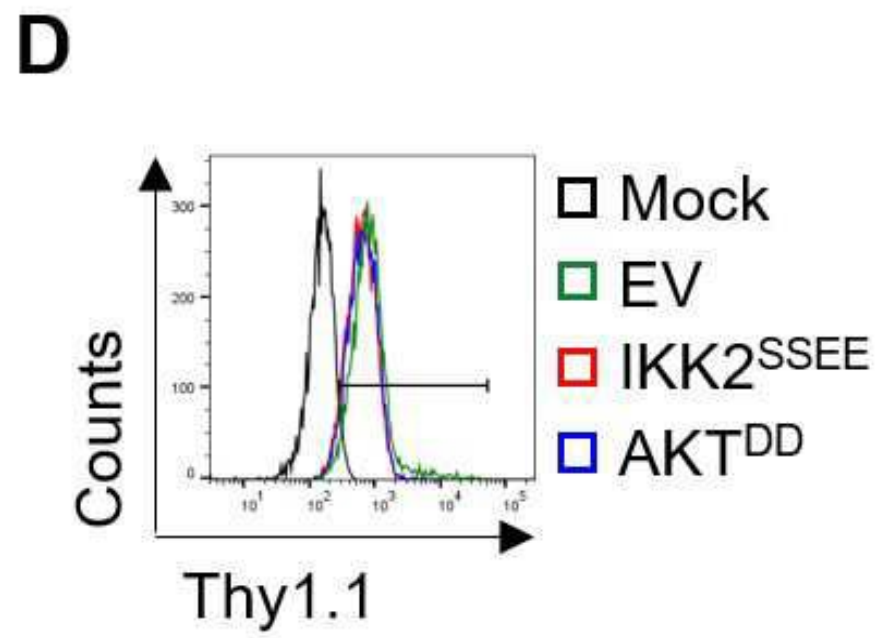
도면6b


B
Vh
DA
LPS (min): 0 15 30 60 0 15 30 60
P-Akt^T308
P-Akt^S473
Akt
α-tubulin

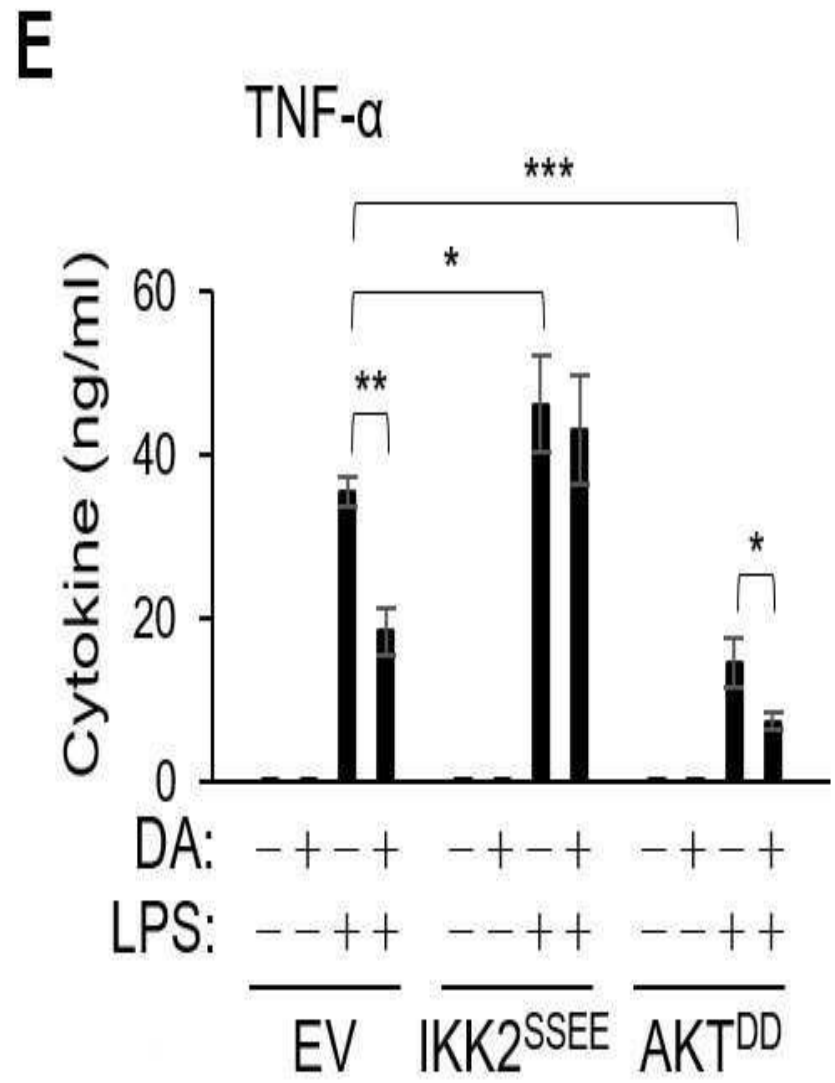
도면6c



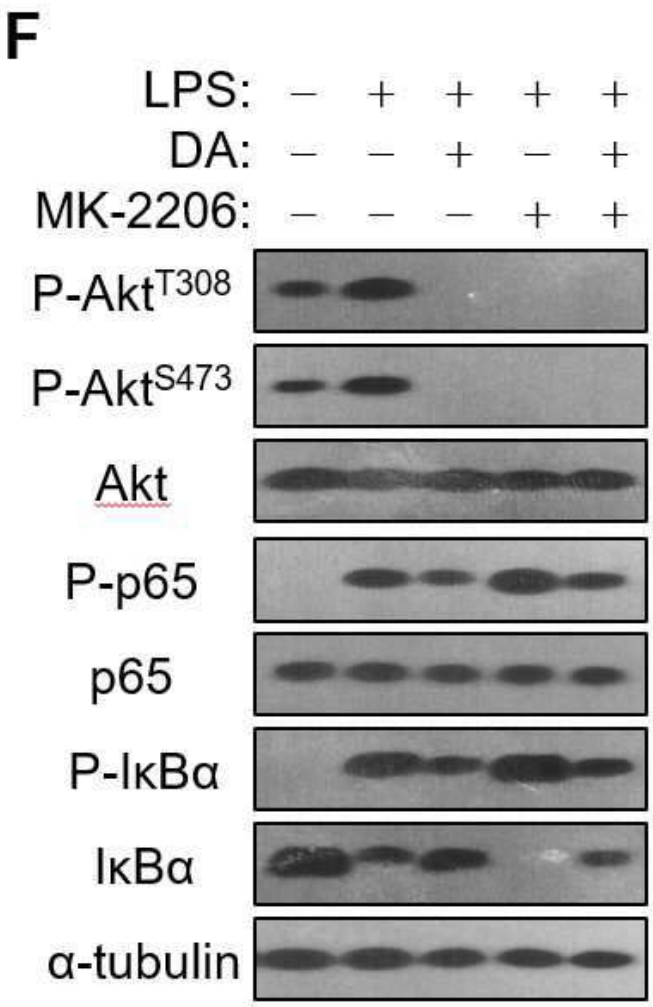
도면6d



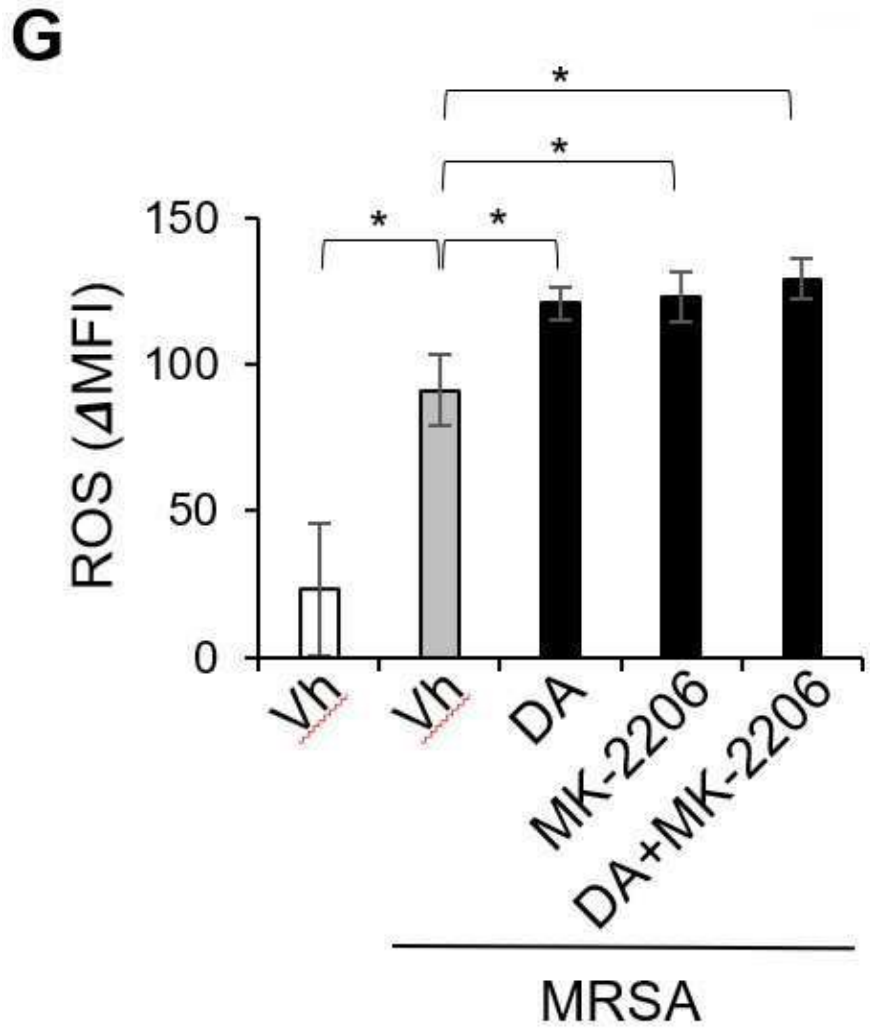
도면6e



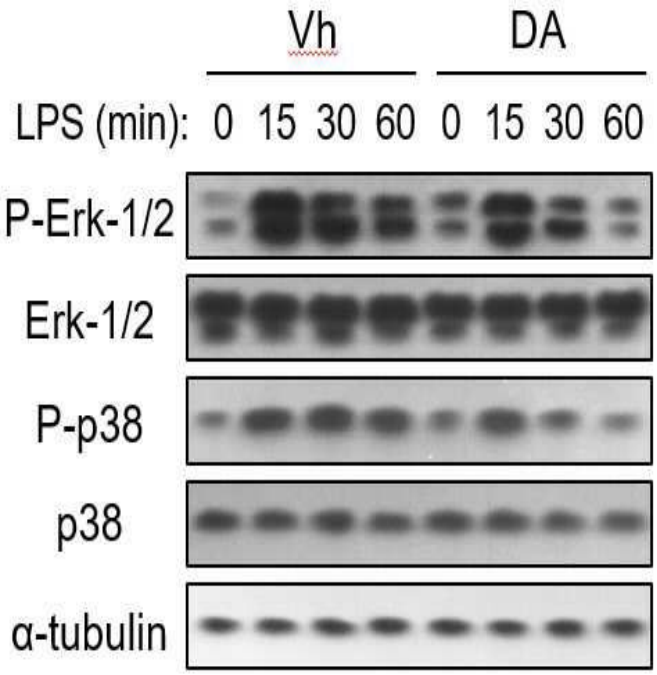
도면6f


F
LPS: − + + + +
DA: − − + − +
MK-2206: − − − + +
P-AktT308
P-AktS473
Akt
P-p65
p65
P-IκBα
IκBα
α-tubulin

도면6g



도면7


Vh
DA
LPS (min): 0 15 30 60 0 15 30 60
P-Erk-1/2
Erk-1/2
P-p38
p38
α-tubulin