(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년09월05일
(11) 등록번호 10-0755872
(24) 등록일자 2007년08월30일

(51) Int. Cl.
A61K 31/5513 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0096894
(22) 출원일자 2006년10월02일
심사청구일자 2006년10월02일
(56) 선행기술조사문헌
EP1323422 A1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
전병화
대전 서구 관저동 대자연마을아파트 106-805
손수창
대전 중구 문화동 263-6 홍익빌라 A-306
김선녀
대전 중구 문화1동 계룡맨션아파트 다동 501호
(74) 대리인
김원준

전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 김용

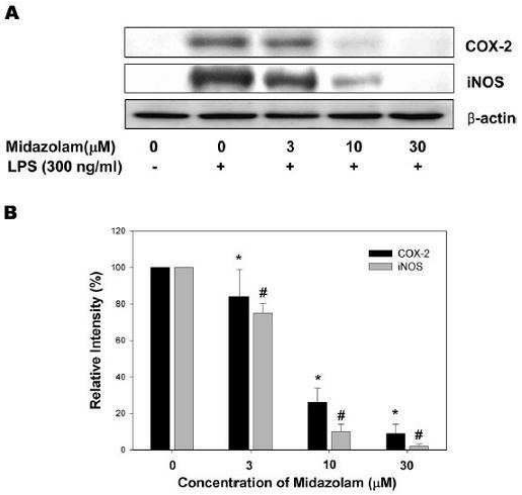
(54) 미다졸람을 함유하는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물

(57) 요 약

본 발명은 유효량의 미다졸람(midazolam) 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 함유하며 염증 유발의 억제를 통한 염증억제 효과를 갖는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 의한 조성물은 iNOS 또는 COX-2 유전자의 발현억제, NF-kB의 활성억제, NF-kB p65의 세포핵으로의 이동억제, MAPK p38의 인산화 억제 또는 활성산소의 생성억제 등을 통해 염증억제 효과를 나타낸다.

대표도 - 도1



(56) 선행기술조사문헌
JP2000186041 A
KR1020040095352 A
US6936605 B2

특허청구의 범위

청구항 1

유효량의 미다졸람 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 함유하며 염증유발의 억제를 통한 염증억제 효과를 갖는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 염증유발의 억제는 iNOS(inducible nitric oxide synthase) 또는 COX-2(cyclooxygenase-2) 유전자의 발현 억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 염증유발의 억제는 NF-kB(Nuclear factor-kB)의 활성억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 염증유발의 억제는 NF-kB p65(Nuclear factor-kB p65)의 세포핵으로의 이동억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 염증유발의 억제는 MAPK p38(mitogen-activated protein kinase p38)의 인산화 억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 염증유발의 억제는 활성산소의 생성억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 미다졸람의 유효함량은 0.001mg/㎖~0.01mg/㎖인 것을 특징으로 하는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<5> 본 발명은 미다졸람을 유효성분으로 하는 염증성 질환을 예방 및 억제, 치료하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

<6> 염증 질환은 감염, 외상, 면역학적 반응을 포함한 인체 내의 반응이다. 발열, 홍조, 부종, 통증 등의 급성 염증 증후가 있으며, 염증과정의 후반에는 염증부위로의 백혈구의 이동 및 사이토카인(cytokine), 분해효소

(degradative enzyme), 생활성 지질 중간체(bioactive lipid intermediate), 일과성 반응성 산소종(transient reactive oxygen species), 림프구(sensitized lmphocyte)의 생성 등 세포내 변화가 일어난다. 만성적인 염증 질환에서는 백혈구의 침윤에 의해 세포활성 및 세포사멸이 일어난다. 염증반응의 화학매개물 중 prostaglandins(PG)과 nitric oxide(NO)는 발암 및 염증의 진행과정에 중요한 매개물질로 알려져 있다.

<7> 염증이나 통증을 조절하는 약물 중 가장 흔히 사용되는 약물인 비스테로이드계 염증질환제(nonsteroidal antiinflammatory drugs) (NSAIDs)는 체내에 PG를 생성하는 COX(cyclooxygenase)를 저해함으로써 약리작용을 나타나는데 이 효소는 COX-1과 COX-2의 두 가지 이성체로 존재한다는 것이 밝혀졌다. 이중 COX-1은 정상상태에서 위장관 점막과 혈소판, 신장에서 세포 보호 작용과 조절 작용에 관여하는 PG류 생성에 관여하는 효소인데 반해, COX-2는 정상세포에서는 그 농도가 매우 낮으나 염증관련세포에서 여러 자극(cytokine, endotoxin, mitogen)에 의해 유도 발현되어 통증이나 염증에 관여하는 PG류 생성에 관여한다. 또한 nitric oxide synthase(NOS)는 혈관의 긴장도(vascular tone), 신경전달(neurotransmission), 세균 및 암세포의 사멸과 항상성 조절에 관여한다. 또한 높은 농도의 NO는 순환기 쇼크, 염증, 발암 등의 생리반응에서 나타난다. 신경성 NOS(Neuronal NOS)와 내피성 NOS(endothelial NOS)는 정상적인 상태에서 존재하며, 반면 iNOS(NOS type2)는 LPS, 사이토카인(cytokine) 등에 의해 유도 발현된다.

<8> 패혈증(Sepsis)은 다기관부전증(multi organ failure)의 가장 큰 원인의 하나로, 아직도 높은 사망률을 보이고 있다. 그람-음성 박테리아의 바깥 막의 구성요소인 LPS(lipopplysaccharide)는 패혈증을 유발하는 가장 중요한 요인으로 알려져 왔다. 활성화된 대식세포(macrophage)는 염증 반응에 관여하며 다양한 사이토카인(cytokine)을 생산하여 순환계에 분비하여 패혈증에서 발생하는 생리특성에 영향을 미친다. 그람-음성 박테리아의 주된 외막(outer membrane)인 LPS는 단핵구/대식세포와 혈관내피세포(endothelial cell)과 같은 다양한 포유동물 세포를 활성화시키고 패혈증에서 체계적인 변이를 일으킨다. LPS는 NF-kB와 MAPK의 활성화를 유도하는 signaling pathway를 시작하게 하는 것으로 알려져 왔다. NF-kB의 활성화는 IkB의 serine 잔기 32와 36번이 인산화와 인산화에 이은 ubiquitination, IkB의 분해, 그에 수반된 NF-kB의 분비 및 이동을 일컫는다.

<9> 사이토카인(cytokine)이나 nitric oxide(NO)와 같은 전염증 매개물질는 다양한 염증질환에서 중추적인 역할을 한다. 패혈증에서, NO의 과잉 발현은 조직의 손상에 가장 중요한 영향을 미치는 요인의 하나로 여겨지고 있다. mitogen, cytokine이나 박테리아의 LPS와 같이 염증을 야기하는 자극에 의해 대식세포는 COX-2나 iNOS를 발현한다. 축적된 데이터에 의하면 이러한 COX-2와 iNOS는 많은 염증 과정에 포함되어 있고 다양한 암을 유발하는 것으로 알려져 있어, COS-2와 iNOS가 염증과 암유발에서 중요한 역할을 담당하는 것을 알 수 있다. 그러므로 이러한 염증 인자들을 조율할 수 있다면 LPS 유도성 염증반응을 호전시킬 수 있을 것이라 여겨진다.

<10> 대식세포는 조직손상에 대한 염증반응에 주요한 구성요소 중 하나이다. 활성 산소종(ROS)의 급격한 증가는 LPS와 전염증 cytokine(예를 들면 TNF-α나 IL-1β)과 같은 염증 자극에 의해 유발되며 DNA 합성, 전사 요소 활성화, 유전자 발현 및 증식과 같은 다수의 세포 기능의 변화를 야기한다. MAPK pathway와 MAPK에 의해 매개된 전염증 매개물질의 생성은 적어도 부분적으로는 NF-kB/ROS sensitive 메카니즘에 의존적인 산화환원반응(redox)으로 알려져 왔다.

<11> 염증이나 통증을 조절하는 약물 중 NSAIDs는 인체 내에서 염증 반응에 관여하는 PG류 이외에 위점막 보호, 혈소판기능과 관련된 PG의 생성도 억제하여, 위장관 장해나 출혈 등의 부작용도 함께 나타나게 된다.

<12> 따라서 부작용이 없고 염증관련 유전자 및/또는 관련물질의 활성억제 등을 선택적으로 할 수 있는 새로운 염증 예방/치료제의 개발이 요구되고 있다.

<13> 본 발명자들은 종래 마취제로 널리 사용되며 부작용이 보고된 바 없는 벤조다이아제핀(benzodiazepine) 계열의 진정효과를 가지는 유도체인 미다졸람(midazolam)이 염증예방 및 치료효과를 가진다는 사실을 최초로 발견하여 깊이 연구한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<14> 본 발명의 목적은 배양된 대식세포에서 미다졸람의 항염증 작용을 확인하는 것이다.

<15> 본 발명의 또 다른 목적은, 종래 마취제로 사용되는 미다졸람의 새로운 기능을 밝혀내고 이에 기초하여 미다졸람을 유효성분으로 하는 염증성 질환을 예방 및 억제, 치료하는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<16> 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 유효량의 미다졸람(midazolam) 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 함유하며 염증유발의 억제를 통한 염증억제 효과를 갖는 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

<17> 본 발명에서 상기 염증유발의 억제는 ① iNOS(inducible nitric oxide synthase) 또는 COX-2(cyclooxygenase-2) 유전자의 발현억제 ② NF-kB(Nuclear factor-kB)의 활성억제 ③ NF-kB p65(Nuclear factor-kB p65)의 세포핵으로의 이동억제 ④ MAPK p38(mitogen-activated protein kinase p38)의 인산화 억제 또는 ⑤ 활성산소의 생성억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 한다.

<18> 본 발명에 의한 약제학적 조성물에서 미다졸람의 유효함량은 0.001mg/mℓ~0.01mg/mℓ인 것이 바람직하다.

<19> 본 발명에 의한 약제학적 조성물에 사용되는 미다졸람의 작용효과를 확인하기 위해 다음과 같은 실험이 수행되었다.

<20> 대식세포 셀라인 중 하나인 RAW264.7 cell을 이용하여, western blot analysis를 통해 미다졸람이 Mitogen-activated protein kinase의 작용과 전염증 매개물질(proinflammatory mediator)에 미치는 영향을 측정하였다. Nuclear factor-kB(NF-kB)의 활성화와 NF-kB의 p65 서브유닛의 이동을 luciferase assay와 면역세포화학(immunocytochemistry)을 이용하여 측정하였다. 활성산소(superoxide)의 생성정도는 lucigenin chemiluminescence를 이용하여 측정하였다.

<21> 여러 실험 결과, 미다졸람은 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 유도되는, COX-2와 iNOS의 과잉조절을 농도 의존적(약 3~30uM)으로 억제함을 확인하였다. 또한 LPS에 의해 유도된 IkB-α의 분해와 NF-kB 전사 활성 역시 미다졸람에 의해 억제되었다. NF-kB의 p65 서브유닛의 세포핵으로의 이동도 미다졸람에 의해 저해되었다. 더불어 미다졸람은 p38 MAPK의 인산화와 LPS에 의해 유도되는 활성산소의 생성을 억제함도 확인되었다.

<22> 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 유효량의 미다졸람을 포함하여 염증유발 생체인자의 유전자 발현을 억제하는 등의 작용을 하므로 소염 또는 염증억제 효과를 갖는다. 이때 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 미다졸람 및 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 약제학적으로 허용되는 약학적 제제, 예를 들면 주사제, 액제, 시럽제, 정제, 캡슐제, 약침액 등으로 제제화하여 염증질환 치료 및 예방용 약으로 이용될 수 있다.

<23> 또한 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 임상적으로 투여시 정맥, 척추강, 경구, 복강, 피하 투여 등의 방법으로 통상적인 투여방법에 따라 투여할 수 있다.

<24> 또한 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 임상적 투여용량은 환자의 연령, 증상, 투여제형 또는 약물의 종류에 따라 다양하게 조절할 수 있다. 특정한 상태에서 바람직한 투여량을 결정하는 것은 공지된 기술에 해당한다.

<25> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 실시예는 본 발명을 설명하기 위해 예시적으로 열거한 것일 뿐 이에 의해 본 발명의 기술적 사상의 범위나 내용이 변경되거나 축소되는 것은 아니다. 실시예에서는 미다졸람의 기작과 효과에 대해서만 검토·실험하였으나 실시예에 의해 항염증 작용이 있음이 확인된 미다졸람을 절절한 농도로 조성물화하는 것과, 만들어진 조성물을 다양한 방식으로 투여할 수 있음은 당업자에게 있어 용이한 일일 것이다.

<26> 실시예에 사용된 세포주 및 물질과 실험방법 및 분석방법은 다음과 같았다.

<27> **(1) 사용된 세포주 및 물질**

<28> 본 실시예에서는 쥐의 대식 세포주 RAW264.7이 사용되었다. RAW264.7 세포주는 Abelson Ieukemia 바이러스가 형질도입된 BALB/c mice(Nramp $1^{D169/D169}$)로부터 분리한 불사화(immortalized) 대식 세포주이다. RAW264.7과 human embryonic kidney 293(HEK293) 세포주는 American Type Culture Collection(Rockvile, MD)에서 분주받았다. 이들 세포주는 5%의 이산화탄소와 95%의 공기가 혼합된 37℃ 수분 공급형 인큐베이터 환경에서 유지·배양되었다. 배양액으로는 10% Fetal Bovine Serum, penicillin 100U/ml, streptomycin 100㎍/ml을 보충한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Gibco, Grand Island, NY)을 사용하였다.

<29> 예비실험에서, 0.9% NaCl을 이용하여 미다졸람을 희석하였을 때, 미다졸람의 용해도에 아무런 영향이 없었다. 게다가 0.9% NaCl에 의한 세포의 처리는 LPS 유도성 COX-2의 발현에 아무런 영향력을 보이지 않았다(데이터 미도시). 이러한 이유로 미다졸람(Roche)은 0.9% NaCl 수용액에 녹여서 사용하였으며, 용매 대조군으로는 0.9% NaCl 수용액을 선택하였다.

<30> 대식세포의 활성화를 유도하기 위해 박테리아의 내독소(endotoxin) LPS (300ng/ml)를 사용하였다. 기타 *E. coli* serotype 026:B6의 LPS, 인간 TNF-α, β-actin, NADPH의 환원형(Sigma), Horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit과 anti-mouse antibody(Amersham, UK), 웨스턴 블럿에 사용된 항체 anti-iNOS, IkB-α (Santa Cruz), anti-COX-2(BD Biosciences), anti-phospho-p38 및 anti-extracellular signal-regulated kinase(Cell Signaling) 등을 사용하였다.

<31> **(2) 실험방법 및 분석방법**

<32> **① Western blot analysis**

<33> 웨스턴 블럿 분석을 위하여, RAW264.7 cell은 20mM Tris-Cl, pH 7.5 100mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 1mM Na_3VO_3, 1mM β-glycerophosphate, 4mM Na pyrophosphate, 5mM NaF, 1% Triton X-100 및 protease inhibitor cocktail을 포함하는 100㎕의 lysis 완충용액에서 harvest되었다. lysate는 12,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 40㎍의 단백질(9% iNOS, 10% COX-2, 12.5% IkB-α, phospho-p38 및 phosphoextracellular signal-regulatedkinase)을 SDS-PAGE를 이용하여 분리하고 polyvinylidene difluoride membrane에서 전기영동하였다. 5% skim milk로 상온에서 2시간 동안 블록킹한 후 블럿은 특이적인 primary antibody와 함께 1:1000의 비율로 4℃에서 overnight incubation 하고, horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody로 검출하였다. 블럿을 위해 ECL kit(Pierce)를 이용하였다.

<34> **② Transfection과 Reporter assay**

<35> NF-kB의 활성화에 대한 미다졸람의 영향을 관찰하기 위해, NF-kB가 감염된 HEK293 세포를 사용하여 reporter assay를 실행하였다. LPS의 toll-like receptor는 HEK293 cell에서는 발현되지 않고, TNF-α가 대식세포에서 LPS에 의해 생성되므로 LPS대신 NF-kB 활성화를 자극하기 위하여 TNF-α를 사용하였다. 감염을 위해서 6 well plate에서 $5X10^4$ cells을 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 1㎍ NF-kB luciferase 혹은 Renilla luciferase로 감염시켰다. cotransfection 실험을 위해서 동일 몰량의 각 plasmid를 1㎍/well로 감염시켰다. 감염 1일 후 세포들을 미다졸람이 처리된 환경과 그렇지 않은 환경 하에서 TNF-α (15ng/ml)처리로 자극하여 luciferase 생성이 측정가능해지는 8시간 동안 배양하였다. 세포들을 수확하고 제조자(Promega)의 매뉴얼에 따라 dual luciferase assay를 하였다. Luciferase activity는 Luminoskan Ascent(Thermo Labsystems)를 이용 측정하였다.

<36> **③ Immunofluorescent staining**

<37> LPS에 의해 유도되는 NF-kB p65의 이동에 미치는 미다졸람의 영향을 RAW264.7 세포의 면역형광 염색(immunofluorescent staining)에 의해 측정하였다. NF-kB의 이동은 LPS 처리 후 30분 이내에 일어나기 때문에, RAW264.7 세포를 미다졸람의 존재 또는 부재 하에 30분간 LPS(300 ng/ml)로 처리하였다. 면역형광 염색을 위하여, RAW265.7 세포를 glass coverslip 위에 성장시켰다. 미다졸람 또는 LPS에 노출시킨 후, 1% glutaldehyde로 세포를 고정하고 0.25% triton X-100으로 세포투과능을 향상시킨 후 2% bovin serum albumin으로 1시간 동안 blocking하였다. Coverslip을 1% bovin serum albumin에서 rabbit anti-p65(1:100) primary antibody를 사용하여 4℃에서 overnight하여 배양하였다. 세포를 세척하고, fluorescein isothiocyanate-labeled secondary antibody에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 다시 세척하고, 5㎍/㎖ propidium iodide로 핵을 볼 수 있도록 10분간 염색한 후 세척하였다. Zeiss confocal microscope (Oberkochen)으로 coverslip의 형광을 관측하였다.

<38> **④ 활성산소 측정**

<39> LPS에 의해 생성되는 활성산소(O^{2-})에 미다졸람이 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위해 Raw264.7 세포를 18시간 동안 미다졸람이 있는 환경과 없는 환경에서 LPS에 노출시키고 Lucigenin-enhanced chemiluminescence assay를 시행하였다. Lucigenin-enhanced chemiluminescene assay는 이전에 보고된 것처럼(17~19) 활성산소 생산 정도를 분석하기 위해 수행되었다. Lucigenin(bis-N-methylacridinium nitrate)는 활성산소의 존재하에 특히 발광한다. 간단히, RAW264.7($1X10^5$세포)를 Krebs-HEPES buffer(100mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.97mM $CaCl_2$, 1.2mM $MgSO_4$, 1.03mM K_2HPO_4, 25mM $NaHCO_3$, 20mM Na-HEPES, pH 7.4)를 함유하는 scintillation vial에 옮겼으며, 이때 최종농도 5μM이 되도록 lucigenin을 첨가하였다. chemiluminescence는 100μM의 NADPH를 첨가한 후 2분간 기록하였으며, 발광량에서 blank의 발광량을 감하여 활성산소가 생성되었는지를 측정하는데 이용

하였다. 수치는 $1X10^5$ 세포 당 상대적인 빛의 양으로 나타내었다.

<40> **⑤ 통계 분석**

<41> 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. Student t test를 이용하여 대조군과 drug 처리군 간의 통계적 유의성을 검증하였다. P value<0.05 것을 유의하다고 판정하였다.

<42> **실시예 1 : LPS에 의해 유도되는 COX-2 및 iNOS의 발현 억제효과 실험**

<43> 대식세포에서 전염증 매개물질의 발현에 미다졸람이 어떤 영향을 미치는지 고찰하였다.

<44> 대식세포에 미다졸람(3~30μM)을 전처리하고, 300ng/mℓ의 LPS에 18시간 동안 노출시켰다. iNOS와 COX-2의 발현 정도는 Western blot analysis를 통하여 측정하였다(도 1). 도에서 (A) 미다졸람은 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 보여주는 웨스턴 블럿 사진(이때 대조구로 β-Actin을 사용)이며, (B)는 densitometry 데이터로서 세 개의 각각의 실험에 대해서 평균±SEM을 나타낸다. * 및 #는 p<0.05인 유의한 데이터를 의미한다.

<45> 도 1에 나타난 것과 같이 LPS는 iNOS와 COX-2의 발현을 유도하였으며, LPS의 자극을 받지 않은 세포에서는 iNOS와 COX-2가 감지되지 않았다. 그러나 미다졸람을 전처리한 경우 LPS의 자극을 받은 세포라도 농도 의존적(약 3~30μM)으로 COX-2와 iNOS의 발현이 억제되었다. 특히 고농도(30μM)의 미다졸람은 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS와 COX-2발현을 완벽하게 억제함을 알 수 있다.

<46> 정리하자면, 3~30μM 범위에서 미다졸람은 전염증 매개물질로 알려진 iNOS와 COX-2의 발현을 억제하였다. 임상에서 쓰이는 benzodiazepine계열의 혈장농도는 0.1~50μM 이다. 본 실시예에 의하면 임상에서 투여된 미다졸람이 대식세포에서 전염증 매개물질의 억제를 통하여 항염증작용을 나타낼 수 있음을 시사한다. 말초형태의 benzodiazepine 결합부위가 쥐의 대식세포에 존재한다. 따라서 본 실시예는 미다졸람이 말초형태의 benzodiazepine 결합부위를 통하여 대식세포에서 항염증 효과를 나타내는 것을 보여준다.

<47> **실시예 2 : NF-kB 활성 억제효과 실험**

<48> **(1)** 미다졸람이 IkB의 분해를 직접적으로 저해하는지 여부를 확인하기 위하여 대식세포 RAW264.7를 LPS에 30분간 노출시킨 후 IkB-α 단백질의 양의 변화를 측정하였다(도 2의 A). 도 2의 A는 RAW264.7세포에서 IkB-α의 분해에 대한 미다졸람의 효과를 보여주는 웨스턴 블럿 사진(이때 대조구로 β-Actin을 사용)이다.

<49> 도 2의 A에서 볼 수 있듯이, LPS는 IkB-α의 분해를 야기하였다. 그러나 미다졸람을 전처리한 경우 IkB-α의 분해를 유의적으로 억제하였다. 따라서 미다졸람이 LPS에 의해 유도되는 IkB-α의 분해를 차단하여 NF-kB 활성을 저해할 수 있음을 유추할 수 있다.

<50> **(2)** NF-kB는 COX-2와 iNOS의 프로모터 유전자의 *cis*-elements에 결합하여 이들의 전사를 조절하는 것으로 잘 알려져 있다. 이를 확인하기 위하여 NF-kB luciferase 활성에 대한 미다졸람의 영향을 확인하였다(도 2의 B). 도 2의 B에서 luciferase의 활성을 fold change %로 나타내었다. 효소활성값은 4번의 분리된 실험에 대한 평균±표준편차로 나타내었다.

<51> 도 2의 B에서 볼 수 있듯이 미다졸람은 TNF-α에 의해 유도된 luciferase 활성의 증가를 완벽하게 억제하였다. 본 실시예에 의하면 미다졸람은 LPS-유도성 IkB 분해를 저해하고(하거나) promoter elements에 binding 하는 능력을 억제하는 것에 의해 NF-kB 활성을 저해하는 것으로 판단된다.

<52> **(3)** LPS에 노출된 후 NF-kB에 의해 매개되는 전사를 위해서는 NF-kB p50/p65 heterodimer가 핵으로 이동되어야 한다. NF-kB 이동에 대한 미다졸람의 효과를 관찰하기 위하여, LPS로 자극된 RAW264.7 대식세포에서 p65 핵 이동에 대한 미다졸람의 효과를 알아보았다.

<53> 먼저 RAW264.7 세포를 미다졸람의 존재(30μM) 또는 부재하에 LPS (300ng/mℓ)로 30분간 처리하였다. 처리된 세포를 고정하고 NF-kB p65 항체(green)와 propidium iodide(PI)로 핵을 염색한 후 면역형광 현미경으로 관측하였다(도 2의 C). 도 2의 C에 의하면 LPS에 의한 RAW 세포의 처리는 확연하게 NF-kB p65 subunit의 핵으로의 이동을 유도하며, 미다졸람은 이러한 이동을 차단함을 알 수 있다.

<54> **실시예 3 : p38 MAPK의 인산화 저해효과 실험**

<55> 미다졸람이 LPS에 의해 유도되는 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성을 저해하는지 여부를 확인하

는 실험을 수행하였다.

<56> 이를 위해 미다졸람을 처리한 대식세포에서 p38 MAPK의 인산화 정도를 관찰하였다(도 3). 도 3은 RAW264.7세포에서 MAPK 및 ERK의 활성화에 대한 미다졸람의 효과를 보여주는 웨스턴 블럿 사진(이때 대조구로 β-Actin을 사용)이다.

<57> LPS 처리 30분 경과시에 p38 MAPK의 인산화가 유도되었다가 50분 내에 기저 수준으로 회복되었다. 미다졸람의 처리는 LPS에 의해 유도된 p38 활성을 완벽히 억제하였다(도 3의 A). 반면 미다졸람은 LPS에 의해 유도된 extracellular signal-regulated kinase(ERK)의 활성화는 억제하지 않았다(도 3의 B).

<58> p38MAPK pathway는 단핵구-대식세포 계통(lineage)의 세포에서 cytokine 생성에 포함되어 있다고 알려져 있다. 본 실시예에서 미다졸람은 LPS에 의해 유도된 p38 활성화를 저해하였다. c-Jun N-terminal kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38과 같은 MAPK는 LPS에 의해 매개되는 COX-2와 iNOS의 발현에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히 p38MAPK의 저해는 iNOS와 COX-2의 프로모터 활성의 저해를 통해 전염증 cytokine의 생성을 방지하는 것으로 알려져 있다. 따라서 미다졸람에 의한 p38의 저해는 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켜 궁극적으로 항염증 효과를 나타냄을 알 수 있다.

<59> **실시예 4 :활성산소종(Reactive Oxygen species) 생성 억제효과 실험**

<60> 미다졸람이 활성산소(superoxide)의 생성을 저해하는지 연구하기 위하여, NADPH에 의한 활성산소의 생성을 lucigenin-enhanced chemiluminescence 방법에 따라 측정하였다(도 4).

<61> LPS는 RAW 264.7 세포에서 NADPH에 의해 활성산소의 생성을 야기하였다. 미다졸람 처리시 기본적인 NADPH에 의한 활성산소의 생성은 억제되지 않았지만 LPS에 의해 유도되는 활성산소의 생성은 현저하게 억제되었다.

<62> 실시예 3 및 4의 결과에 의하면 대식세포에서 p38 MAPK 활성화와 LPS에 의해 유도되는 활성 산소의 생성는 미다졸람에 의해 억제·차단됨을 알 수 있다. 따라서 p38 MAPK의 저해는 미다졸람에 의해 유도된 활성산소 생성의 저해에 기인하는 것이라 유추할 수 있다.

<63> 미다졸람의 항염증 작용을 설명하는 가능한 메카니즘은 LPS에 의해 유도된 활성산소의 저해를 포함한다. 실시예에 의하면 기저상태의 ROS 생성은 미다졸람에 의해 유의하게 저해되지는 않았으나, LPS에 의해 증가된 활성산소는 미다졸람의 전처리에 의해 크게 저해되는데, 이는 미다졸람이 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 신호전달(signaling pathway)을 특이적으로 저해할 수 있음을 시사한다. 대식세포의 활성화에 의한 ROS의 과량 생성은 염증과 조직손상의 발병에 중요한 역할을 한다. 따라서 미다졸람에 의한 ROS 생성의 억제는 산화 스트레스에 의한 기관의 장애(dysfunction)에 유효할 것이다.

발명의 효과

<64> 본 발명에 의하여 염증관련 유전자 및/또는 관련물질의 활성억제 등을 선택적으로 할 수 있는 미다졸람을 함유하며, 부작용이 없는 새로운 염증 예방 및 치료용 약제학적 조성물이 가능하게 된다.

<65> 본 발명에 의하여 염증환자를 위한 염증 예방/치료를 위한 약제의 선택폭을 넓히는 효과를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 미다졸람이 대식세포의 전염증 매개물질 생성을 억제함을 보여주는 블럿 사진 및 그래프.

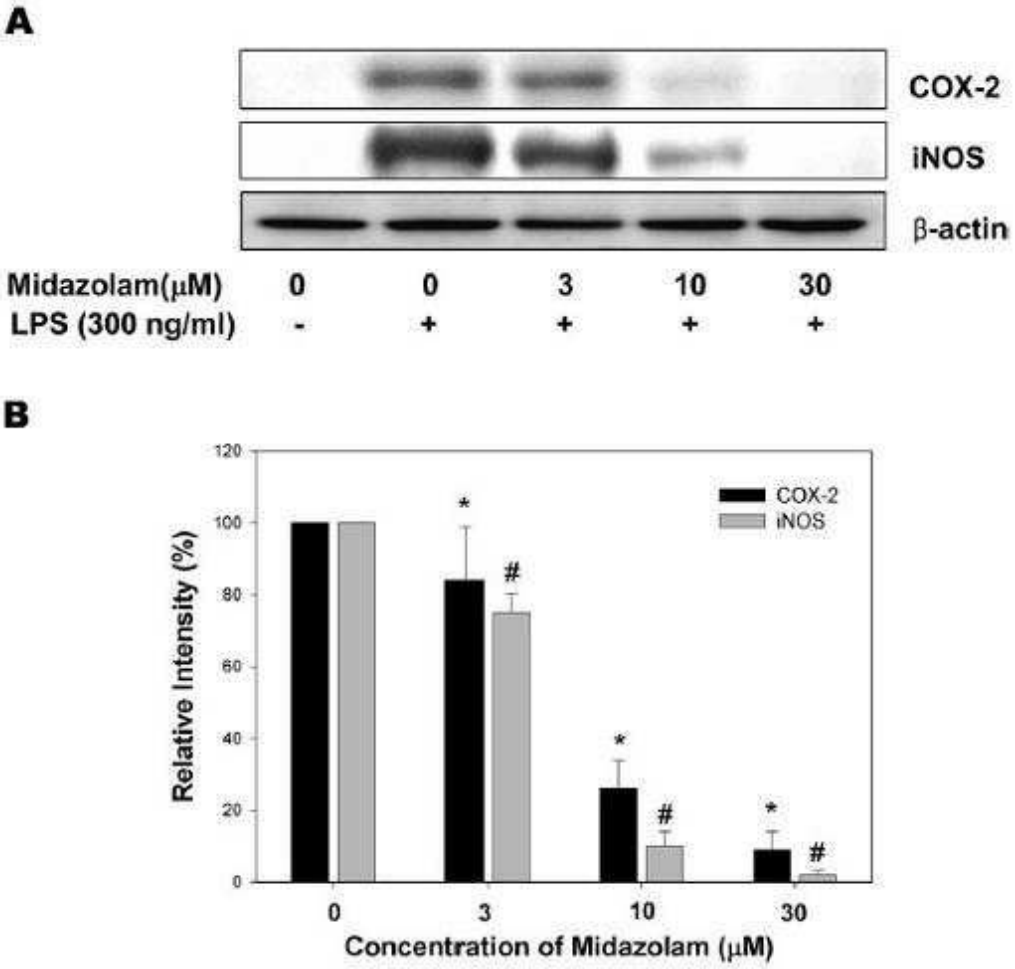
<2> 도 2는 미다졸람이 LPS-유도성 NF-kB 활성을 억제함을 보여주는 블럿 사진, 그래프 및 면역형광 결과 사진.

<3> 도 3은 미다졸람이 LPS 유도성 p38MAPK 활성을 저해함을 보여주는 블럿 사진.

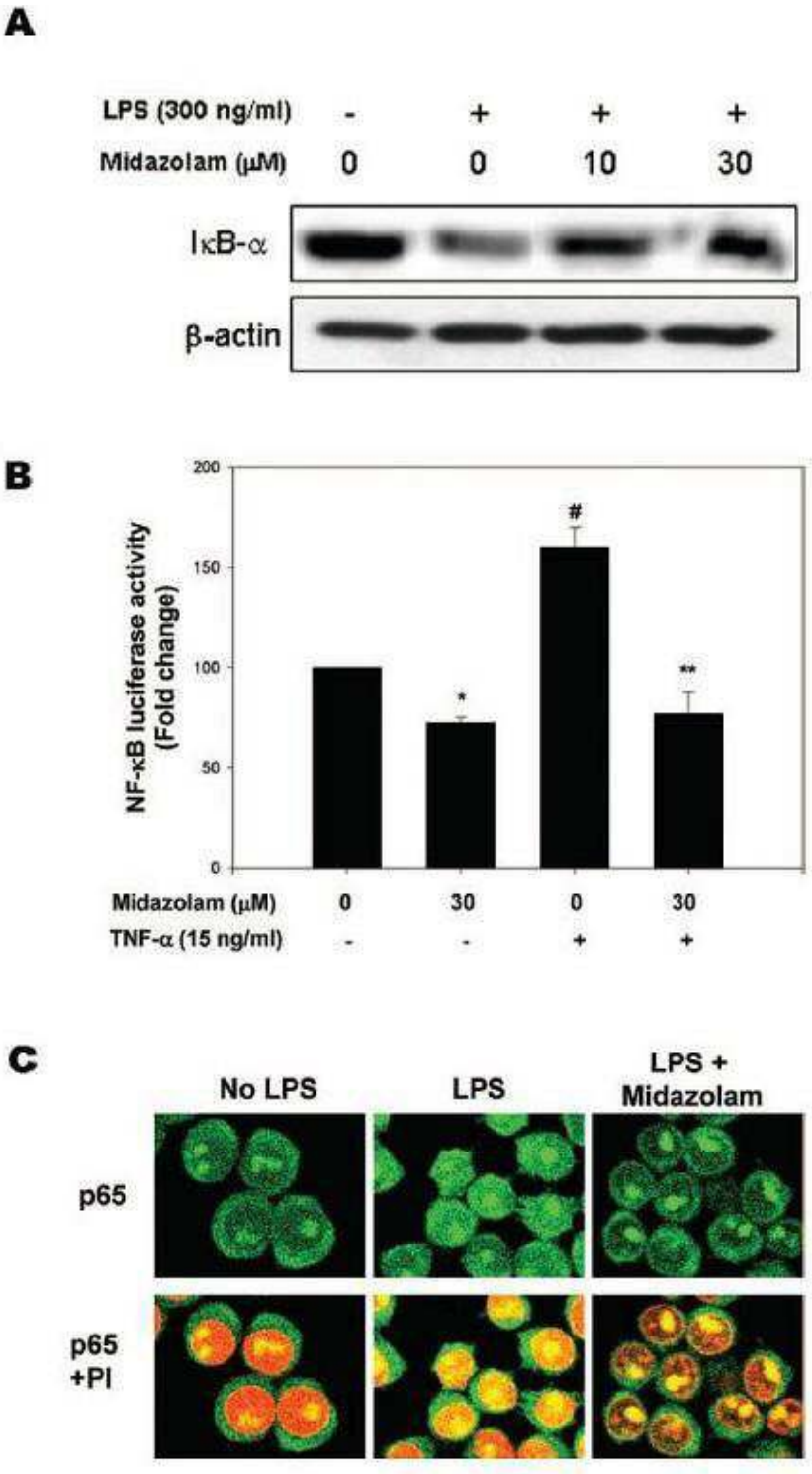
<4> 도 4는 미다졸람이 LPS에 의해 유도되는 활성산소의 생성을 억제함을 보여주는 그래프.

도면

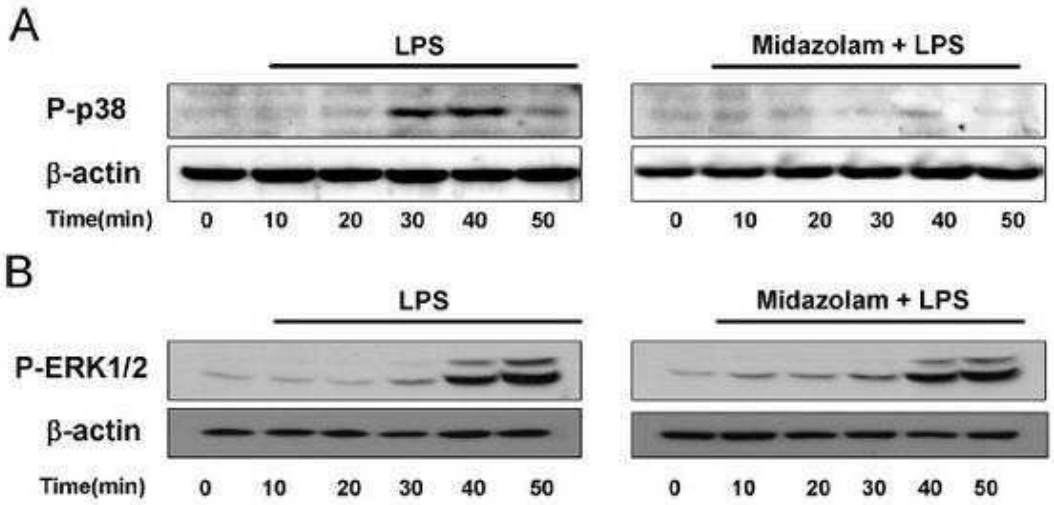
도면1


A
COX-2
iNOS
β-actin
Midazolam(μM) 0 0 3 10 30
LPS (300 ng/ml) - + + + +
B
Relative Intensity (%)
120
100
80
60
40
20
0
COX-2
iNOS
*
#
0
3
10
30
Concentration of Midazolam (μM)

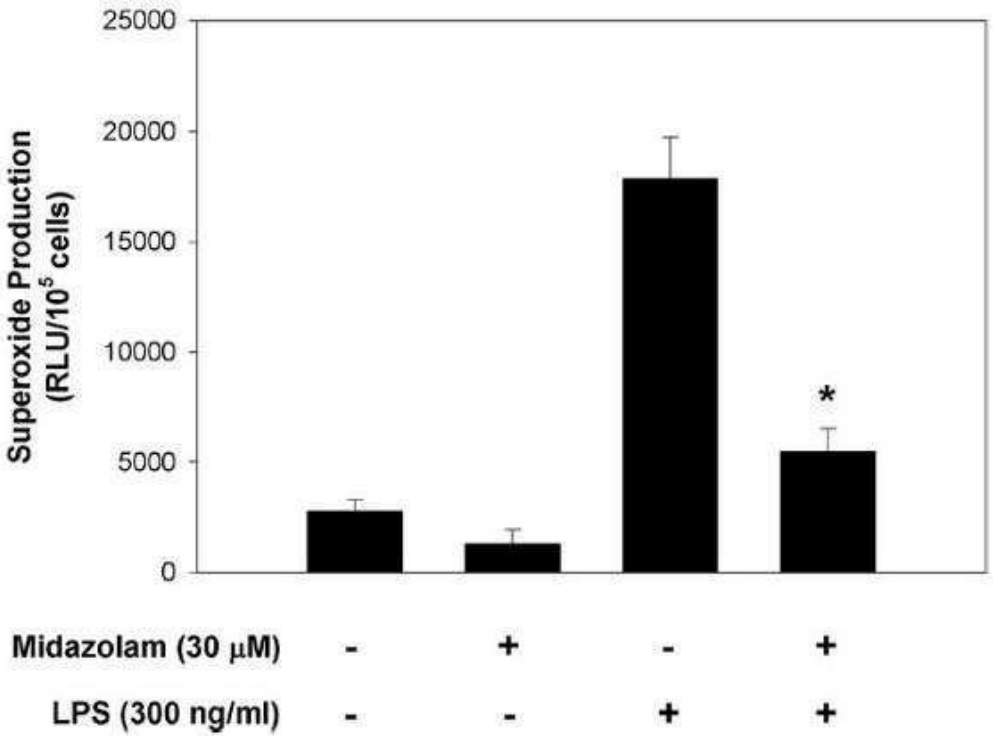
도면2


A
LPS (300 ng/ml) - + + +
Midazolam (μM) 0 0 10 30
IκB-α
β-actin
B
NF-κB luciferase activity (Fold change)
200
150
100
50
0
#
*
**
Midazolam (μM) 0 30 0 30
TNF-α (15 ng/ml) - - + +
C
No LPS
LPS
LPS + Midazolam
p65
p65 +PI

도면3


A
LPS
Midazolam + LPS
P-p38
β-actin
Time(min)
0 10 20 30 40 50
0 10 20 30 40 50
B
LPS
Midazolam + LPS
P-ERK1/2
β-actin
Time(min)
0 10 20 30 40 50
0 10 20 30 40 50

도면4


Superoxide Production
(RLU/10^5 cells)
25000
20000
15000
10000
5000
0
*
Midazolam (30 μM) - + - +
LPS (300 ng/ml) - - + +