



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0047244
(43) 공개일자 2009년05월12일

(51) Int. Cl.

A61K 31/661 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0113300

(22) 출원일자 2007년11월07일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

백상기

대전 서구 삼천동 가람아파트 15동 1506호

이혜영

대전 유성구 도룡동 385-15 로얄밸리 706호

이충현

대전 중구 유천동 현대아파트 110동 802호

(74) 대리인

유병선

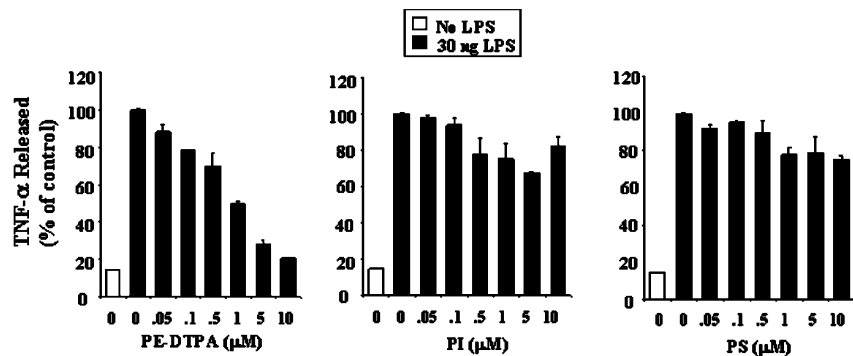
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) PE-DTPA의 새로운 용도

(57) 요약

본 발명은 종래 조영제 등으로 사용되던 PE-DTPA(Phosphatidyl ethanolamine diethylene triamine penta acetate)의 새로운 용도에 관한 것이다. 본 발명에서는 PE-DTPA(Phosphatidyl ethanolamine diethylene triamine penta acetate)가 그람-양성 박테리아의 수용체인 TLR2, 그람-음성박테리아의 수용체인 TLR4 모두에 신호를 전달해주는 CD14를 억제함으로써 병원균의 세포 내 신호 전달을 억제할 수 있음이 밝혀진다. 본 발명에서는 이러한 연구결과를 토대로 PE-DTPA를 유효성분으로 하는 CD14 매개 염증 및 면역반응 억제제가 제공된다.

대표도 - 도2

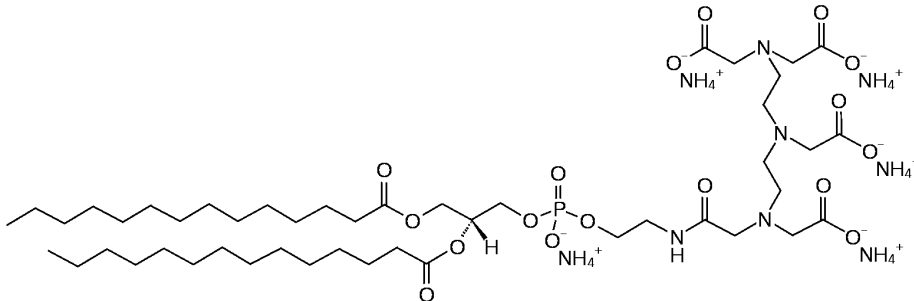


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 PE-DTPA(Phosphatidyl ethanolamine diethylene triamine penta acetate)를 유효성분으로 하는 CD14 매개 염증 및 면역반응 억제제.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, CD14와 결합하여 TLR2 및 TLR4에 대한 신호전달을 억제하는 것을 특징으로 하는 CD14 매개 염증 및 면역반응 억제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 염증 및 면역반응은 그람-양성 박테리아 및 그람-음성 박테리아의 감염에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 CD14 매개 염증 및 면역반응 억제제.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 염증 및 면역반응은 패혈증(sepsis, endotoxemia)인 것을 특징으로 하는 CD14 매개 염증 및 면역반응 억제제.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 염증 및 면역반응은 그람-음성 박테리아의 리포폴리사카라이드(LPS)에 의해 유발되는 패혈증인 것을 특징으로 하는 CD14 매개 염증 및 면역반응 억제제.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

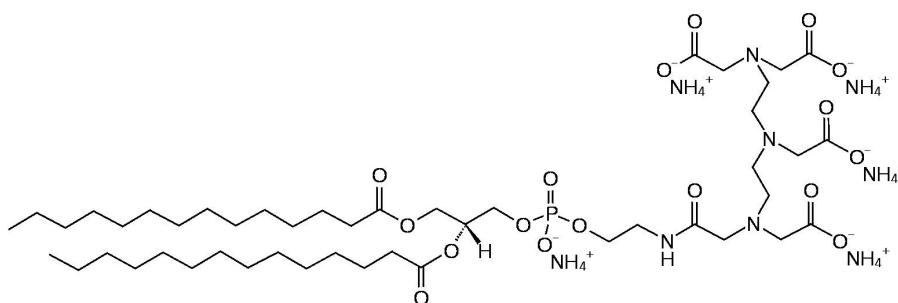
<1> 본 발명은 종래 조영제 등으로 사용되던 PE-DTPA(Phosphatidyl ethanolamine diethylene triamine penta acetate)의 새로운 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 PE-DTPA를 CD14가 매개하는 염증 및 면역반응을 억제하는 용도, 특히 패혈증(sepsis, endotoxemia) 등을 억제하는 용도로 사용하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 신체 내의 면역 시스템은 외부 병원균의 공격에 대해 방어하는 기작으로 발달되어 왔다. 이러한 면역 시스템은 선천성(내재성) 면역체계와, 특정 항원을 인식하고 그것에 대한 기억력을 지닌 적응성 면역 체계로 구성되어 있다. 적응성 면역 체계와 달리 선천성 면역체계는, 외부 항원의 공격에 대한 첫 번째 방어 체계로서, "패턴 인지 수용체"가 항원 분자의 특정 부분만을 인지하여 공격한다. 선천성 면역 시스템의 가장 중요한 유도자인 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide, LPS)는 그람-음성 박테리아의 외막의 구성성분이며 대식세포, 수지상 세포에서 인터루킨(interleukin, IL)-1, IL-6, IL-8, 그리고 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF)-α와 같은 염증반응을 유도하는 물질들을 분비시키도록 자극한다(Wang *et al.*, 2000).

- <3> 그람-음성 박테리아의 성분인 LPS는 TLR4에 의해 인지된다 (Politorak *et al.*, 1998). LPS수용체는 LBP, CD14, 그리고 TLR4/MD-2 복합체로 구성되어 있다(Diks *et al.*, 2001). LPS의 자극을 받은 세포 내에서는 순환하고 있던 LBP와 CD14가 재빠르게 LPS와 결합한다. CD14는 혈액 내를 순환하거나, 또는 세포 표면에 글리코실포스파티딜이노시톨-연결된(glycosylphosphatidylinositol-linked) 단백질로서, 세포내 도메인이 없기 때문에 직접적인 신호 전달 능력은 없으나, TLR의 보조 수용체로서 LPS의 자극을 전달하는 데 꼭 필요한 분자이며 LPS수용체와 결합하여 신호를 전달하는데 중요한 역할을 한다(Akira *et al.*, 2001; Ulevitch and Tobias, 1995). 또한, CD14는 그람-음성박테리아 뿐만 아니라 그람-양성 박테리아에 대해서도 신호 전달을 도울 수 있는 중요한 역할을 하고 있다(Schroder *et al.*, 2003).
- <4> 비록 균체 내 독소가 선천성 면역 시스템을 유도하는 중요한 역할을 하고 있지만, 박테리아의 감염에 대한 극복에서 벗어나 과도한 활성화가 일어나게 되면 숙주 내에 유독한 염증 자극을 일으키기 시작하며, 심한 경우에는 치명적인 패혈 쇼크를 유도하게 된다(Opal and Huber, 2002).
- <5> 패혈증은 일반적으로 병원성 그람 음성 세균이 생체에 감염된 경우 세포벽의 성분인 LPS가 독소로 작용하여 생체의 면역체계를 과도하게 활성화시킴으로써 유발되는 염증반응이며, 이밖에도 그람-양성균 등의 감염에 의해 유도되거나 그들을 공격하려는 신체내의 과도한 방어 기작에 의해 발병되기도 한다. 이러한 방어 기작에는 사이토카인의 분비, 호중성구나 단핵구의 활성화, 그리고 신경내분비(neuroendocrine)나 보체 시스템의 활성화 등이 포함된다(Wheeler and Bernard, 1999). 패혈증은 보통 병원균의 침입 경로인 혈류에서부터 시작하여 혈액을 따라 이동하며 다양한 병원성 물질을 퍼뜨린다. 많은 기관의 외상이나 출혈 쇼크를 일으키며 직접적인 조직 손상 혹은 국소 빈혈 등을 유도하고, 위험수치로 떨어진 혈압과 더불어 심장, 허파, 신장, 혈관, 간 등 주요 신체 기관들을 동시에 붕괴시켜 버리는 무서운 질병이다(Bochud *et al.*, 2003). 패혈증은 수술 후 환자에게서 발생하는 가장 빈번한 합병증 중의 하나이며, 심한 경우 사망에 이르게 되는데 현재 병원 중환자 병동에 입원한 환자의 주요 사망원인이며, 미국 내에서만 연간 500,000 명 이상의 환자에게서 발생하는 것으로 알려져 있다(Sands *et al.*, 1997, Wheeler and Bernard, 1999). 패혈증의 치료는 주로 항생제에 의존하고 있지만 병원균의 침입을 방어하는 효과적인 치료제가 없어 치명적인 패혈 쇼크에 이르렀을 때 아직까지 생존율은 30% 밖에 되지 않는다고 알려져 있다(Angus *et al.* 2001).
- <6> 패혈증 치료 방법에 대한 연구는 초기 패혈증의 진행을 억제하거나, 예방을 위한 적절한 치료를 위해 균체 내 독소를 중화시켜 박테리아의 활성을 억제시키는 항미생물 활성을 지닌 물질을 재조합하거나, 세포 내 이들의 수용체와의 결합을 억제함으로써 신호 전달을 차단하는 치료방법이 연구되고 있다(Persing *et al.*, 2002; Hawkins *et al.*, 2004). 이에 따라 CD14의 단일 클론 항체나(Verbon *et al.*, 2001), TLR4와 결합하여 염증 반응을 억제하는 peptide(Yang *et al.*, 2005), MD-2를 억제하는 E5564(Eritoran)(Hawkins *et al.*, 2002) 등의 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한, LPS의 구조와 유사하게 합성된 물질들이 균체내 독소의 독성을 억제하는 억제제로 이용되어지고 있으며(Lien *et al.*, 2001), 염증 반응을 유도하는 물질이나 보체의 활성을 억제하여 패혈증의 진행을 저해시키는 물질들도 연구 중에 있다(Yang *et al.*, 2004; Shirota *et al.*, 2005). 이렇게 항생제 치료나 백신 외에 효과적인 패혈증 치료를 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나 실용화되고 있는 효과적인 치료제는 아직까지 없는 실정이다.
- <7> PE-DTPA(Phosphatidyl ethanolamine diethylene triamine penta acetate)는 킬레이트 화합물로 널리 사용되고 있는 DTPA(diethylene triamine penta acetate)와 인지질이 결합한 것으로, 하기 화학식 1로 표시되며, 현재 조영제 등으로 사용되고 있다.

<8> [화학식 1]



<9>

<10> 참고문헌

- <11> Angus D. C., W. T. Linde-zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, M. R. Pinsky 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit. Care Med.* 29:1472-1474
- <12> Akira S., K. Takeda and T. Kaisho 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2:675-680.
- <13> Barton B. E. and J. V. Jackson 1993. Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. *Infect Immun.* 61:1496-1499.
- <14> Bochud P. Y., T. R. Hawn and A. Aderem 2003. Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling. *J. Immunol.* 170:3451-3454.
- <15> Diks S. H., S. J. van Deventer and M. P. Peppelenbosch 2001. Lipopolysaccharide recognition, internalisation, signalling and other cellular effects. *J. Endotoxin Res.* 7:335-348.
- <16> Hawkins L. D., S. T. Ishizaka, P. McGuinness, H. Zhang, W. Gavin, B. DeCosta, Z. Meng, H. Yang, M. Mullarkey, D. W. Young, D. P. Rossignol, A. Nault, J. Rose, M. Przetak, J. C. Chow and F. Gusovsky 2002. A novel class of endotoxin receptor agonists with simplified structure, toll-like receptor 4-dependent immuno-stimulatory action, and adjuvant activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300:655-661.
- <17> Hawkins L. D., W. J. Christ and D. P. Rossignol 2004. Inhibition of endotoxin response by synthetic TLR4 antagonists. *Curr. Top Med. Chem.* 4:1147-1171.
- <18> Im J. Y., J. H. Yoon, Y.S. Kim and S. G. Paik 1999. Function of bcl-X proteins in nitric oxide-induced apoptosis in RAW264.7 macrophages. *Korean J. Immunol.* 21:229-235.
- <19> Japelj B., P. Pristovsek, A. Majerle and R. Jerala 2005. Structural origin of endotoxin neutralization and antimicrobial activity of a lactoferrin-based peptide. *J. Biol. Chem.* 280:16955-16961.
- <20> Kim J. I., C. J. Lee, M. S. Jin, C. H. Lee, S. G. Paik, H. Lee, and J. O. Lee 2005. Crystal structure of CD14 and its implications for lipopolysaccharide signaling. *J. Biol. Chem.* 280:11347 -11351.
- <21> Lien E., J. C. Chow, L. D. Hawkins, P. D. McGuinness, K. Miyake, T. Espevik, F. Gusovsky and D. T. Golenbock 2001. A novel synthetic acyclic lipid A-like agonist activates cells via the lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276:1873-1880.
- <22> Miller S. I., R. K. Ernst and M. W. Bader 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:36-46.
- <23> Opal S.M. and C. E. Huber 2002. Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock. *Crit. Care* 6: 125-136
- <24> Ozinsky A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder and A. Aderem 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13766-13771.
- <25> Persing D. H., R. N. Coler, M. J. Lacy, D. A. Johnson, J. R. Baldridge, R. M. Hershberg and S. G. Reed 2002. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol.* 10:S32-37.
- <26> Poltorak A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282 : 2085-2088.
- <27> Sands K. E. , D. W. Bates, P. N. Lanken, P. S. Graman, P. L. Hibberd, K. L. Kahn, J. Parsonnet, R. Panzer, E. J. Orav, D. R. Snyderman, E. Black, J. S. Schwartz, R. Moore, B. L. Johnson and R. Platt 1997. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA.* 278:234-240.

- <28> Schroder N. W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahringer, U. B. Gobel, J. R. Weber and R. R. Schumann 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J. Biol. Chem.* 278:15587-15594.
- <29> Shirota H., I. Gursel, M. Gursel and D. M. Klinman 2005. Suppressive oligodeoxynucleotides protect mice from lethal endotoxic shock. *J. Immunol.* 174:4579-4583.
- <30> Ulevitch R. J. and P. S. Tobias 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13:437-457.
- <31> Underhill D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti and A. Aderem 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815.
- <32> Verbon A., J.C M. Meijers, C. A. Spek, C. E. Hack, J. P. Pribble, T. Turner, P.E.P. dekkers. T. Axtelle. M. Levi, S.J.H. van Deventer, P.H. Reitsma, T. van der Poll 2003. Effects of IC14, an anti-CD14 antibody, on coagulation and fibrinolysis during low-grade endotoxemia in humans. *J. Infect. Diseases* 187:55-61.
- <33> Wang J. E., P.F. Jorgensen, M. Almlof, C. Thiemermann, S. J. Foster, A.O. Aasen and R. Solberg 2000 Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun.* 68:3965-3970.
- <34> Wheeler A. P. and G. R. Bernard 1999. Treating patients with severe sepsis. *N. Engl. J. Med.* 340:207-214.
- <35> Yang H., M. O. chani, J. Li, X. Qiang, M. Tanovic, H. E. Harris, S. M. Susarla, L. Ulloa, H. Wang, R. DiRaimo, C. J. Czura, H. Wang, J. Roth, H. S. Warren, M. P. Fink, M. J. Fenton, U. Andersson and K. J. Tracey 2004. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:296-301.
- <36> Yang Q. W., L. Mou, F. L. Lv, P.F. Zhu, Z. G. Wang, J. X. Jiang and J. Z. Wang 2005 Novel TLR4-antagonizing peptides inhibit LPS-induced release of inflammatory mediators by monocytes *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329:846-854.
- <37> Yoshimura A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski and D. Golenbock 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 163:1-5.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <38> 본 발명자들은 앞선 연구에서, CD14의 구조연구를 통하여 N-terminal 부분에 커다란 소수성 포켓을 가지고 있는데 이 부분이 LPS의 머리 부분과 결합하는 주 구조임을 밝혀내었다(Kim *et al.*, 2005)(도 1). 본 발명자들은 상기와 같은 연구결과를 통해, LPS와 구조적으로 비슷한 인지질이 CD14와 결합한다면 LPS와의 경쟁적인 자리다툼을 통해 LPS 신호전달을 억제할 수 있을 것임에 착안하여 본 발명에 이르게 되었다.
- <39> 본 발명은 LPS와 구조적으로 유사한 인지질을 대상으로 연구 실험을 통해, LPS에 의해 유발되는 면역질환인 패혈증(sepsis, endotoxemia) 등의 새로운 치료제를 찾는 것을 목적으로 한다. 특히, 본 발명에서는 병원균과 처음 결합하여 그람-양성 박테리아의 수용체인 TLR2, 그람-음성박테리아의 수용체인 TLR4 모두에 신호를 전달해주는 CD14를 억제함으로써 병원균의 세포 내 신호 전달을 억제할 수 있는 물질을 찾는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

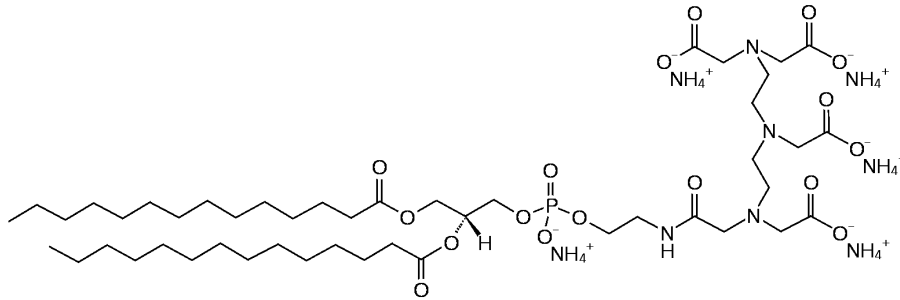
- <40> 본 발명에서는 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 여러 실험을 거쳐 종래 조영제 등으로 사용되던 PE-

DTPA(Phosphatidyl ethanolamine diethylene triamine penta acetate)가 그람-양성 박테리아의 수용체인 TLR2, 그람-음성박테리아의 수용체인 TLR4 모두에 신호를 전달해주는 CD14를 억제함으로써 병원균의 세포 내 신호 전달을 억제할 수 있음을 밝힌다.

<41> 본 발명에서는, 이러한 연구결과를 토대로,

<42> 하기 화학식 1로 표시되는 PE-DTPA(Phosphatidyl ethanolamine diethylene triamine penta acetate)를 유효성분으로 하는 CD14 매개 염증 및 면역반응 억제제가 제공된다. 상기 염증 및 면역반응은 그람-양성 박테리아 및 그람-음성 박테리아의 감염에 의해 유발되는 것, 특히 패혈증(sepsis, endotoxemia)을 포함하며, 상기 패혈증은 특히 그람-음성 박테리아의 리포폴리사카라이드(LPS)에 의해 유발되는 것을 포함한다.

<43> [화학식 1]



<44>

효 과

<45> 본 발명에서는 실험을 통해 PE-DTPA가 LPS와 경쟁적인 자리다툼을 통하여 CD14와 특이적으로 강한 결합을 이룸이 확인되며, PE-DTPA가 CD14 매개 염증 및 면역반응의 억제제, 특히 패혈증과 같은 그람-음성 박테리아 및 그람-양성 박테리아의 감염에 의해 유도되는 세포 내 신호 전달을 억제함으로써 CD14 매개 염증 및 면역반응 억제하는 효과적인 억제제가 될 수 있음이 확인된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<46> 본 발명자들은 앞선 연구 결과에서 CD14의 결정(crystal) 구조를 밝혀내었는데, CD14 의 N 말단 부분에 커다란 소수성 부분을 발견하였다(도 1). 그 부분은 LPS가 강력하게 결합하는 주요 위치로 보여 진다. 따라서 본 발명에서는, LPS와 구조가 비슷한 인지질들이 LPS 대신 CD14와 결합을 이룬다면 LPS의 신호 전달을 억제할 수 있을 것임에 착안하여 PS, PE, PI 등의 인지질과 CD14간의 결합을 측정하였다. 그 결과, 포스포에탄올아민(phosphoethanolamine)의 유도체인 PE-DTPA만이 CD14와 강한 결합을 이룸을 확인하였다.

<47> 또한, 본 발명에서는 그람-음성 박테리아의 신호 전달 억제를 확인하는 실험을 수행하였다. 사람 골수세포(myeloid cell)인 THP-1에서 LPS에 의해 유도되는 주요 사이토카인 중 하나인 TNF- α 의 분비량을 ELISA로 확인한 결과, PE-DTPA의 농도 의존적으로 TNF- α 의 분비량이 억제됨을 확인하였고, TNF- α 의 mRNA 발현도 마찬가지로 PE-DTPA에 의해 억제되었다. 그러나 PS, PE 그리고 PI 등의 인지질들은 TNF- α 의 분비에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

<48> 또한, 쥐의 대식세포인 RAW264.7에서 LPS에 의해 유도되는 산화질소(nitric oxide, NO)의 분비를 측정한 결과, PE-DTPA만이 현저하게 NO 생성을 억제하였다. PE-DTPA는 농도 의존적으로 NO의 분비량과 mRNA 발현을 억제하였으나, PS, PE 그리고 PI 등의 인지질들은 NO 생성을 억제하지 않았다.

<49> 또한, TLR4에 의해 활성화 되는 전사 인자인 NF- κ B 의 활성 역시 PE-DTPA에 의해 억제된다는 것을 확인하였다. 따라서 PE-DTPA가 특이적으로 그람-음성 박테리아의 신호 전달을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

<50> 사람의 전체 혈액을 채취하여 같은 실험을 수행한 결과, 혈액 내에서도 PE-DTPA에 의해 LPS의 신호 전달 억제 효과를 보인다는 것을 알아내었다. 즉, 사람 전체 혈액에서도 TNF- α 생성이 억제되는 것을 확인하였다. 그러나 PE-DTPA의 활성이 세포 내에서보다는 전체 혈액에서 약간 감소되는 것으로 나타났는데, 이는 배양액에서 키우는 세포의 조건과는 달리, 실제 혈액 내에 존재하는 인지질 성분이나 다른 혈구 성분들에 의해서 PE-DTPA의 활성이 약간 억제되는 것이라 여겨진다.

<51> 상기와 같은 PE-DTPA의 박테리아 신호 전달 억제 효과가 어떠한 기작으로 이루어지는지 알아보고자 생체 물질

간 결합 반응 (SPR Analysis) 실험을 수행하였다. 그 결과, PE-DTPA는 CD14와 매우 빠르게 결합하기 시작하여 강한 결합력을 이루고 비가역적으로 거의 해리되지 않는다는 결과를 얻어내었다. 그러나 MD-2와는 높은 농도에서도 전혀 결합을 이루지 않았으며, 후천적 면역에 관여하는 CD40 분자와, 생체 내에 많이 존재하는 단백질 중 하나인 IgG와는 전혀 결합을 이루지 않음을 확인하였다. 또한, PS와 PE는 같은 실험조건에서 CD14와 전혀 결합을 이루지 않음을 확인할 수 있었다.

<52> In vitro 실험뿐만 아니라 생체 내에서도 PE-DTPA의 효과를 기대할 수 있을지 알아보기로 C57BL/6 쥐에 갈락토사민(Galactosamine)과 LPS를 복강주사 하여 패혈 쇼크를 유도한 쥐와 PE-DTPA를 함께 투여한 쥐를 관찰하여 보았다. 그 결과, 패혈 쇼크를 유도한 쥐는 24시간 이내에 90% 이상의 사망률을 보임을 확인하였으나, PE-DTPA를 함께 투여한 쥐는 PE-DTPA의 농도에 의존적으로 높은 생존율을 보였고 25 mg/kg의 농도에서는 100% 생존함을 확인하였다. 25 mg/kg의 농도는 에리토란(Eritoran, E5564; 일본의 Aisai (주) 제약회사에서 MD-2 차단 패혈증 억제제로 개발하여 현재 임상 3기 실험 진행 중이며, 효과적인 패혈증 억제제로 알려져 있다)보다 비교적 많은 양이긴 하지만 에리토란은 BCG로 유도된 패혈 쇼크 억제를 위하여 미정맥 주사를 하였고, 본 발명에서는 복강 주사를 하였기 때문에 혈액이나 다른 기관으로 퍼져나가는 농도 면에서 차이를 보이는 것이라 생각되어 진다. 패혈 쇼크를 견뎌내고 생존한 쥐는 한 달 이상 생존함을 관찰하였고, 패혈 쇼크가 유도된 쥐의 간에서 심각한 과열 현상이 나타남을 관찰하였다. 이러한 결과는 PE-DTPA가 세포 신호 전달에서 뿐만 아니라 생체 내에서도 박테리아에 의해 유도되는 패혈 쇼크를 억제하는 치료제로 사용될 수 있음을 보여주는 것이다.

<53> 본 발명에서 PE-DTPA는 비교적 높은 농도로 처리되어 LPS의 신호 전달을 억제하는데, 이는 PE-DTPA는 생체 내에도 존재하는 일반적인 인지질인 점을 감안할 때, 인체를 포함한 생체에서 충분히 사용 가능한 농도로 볼 수 있다. 본 발명에서는 이러한 실험결과를 토대로 인체에 적용될 수 있는 PE-DTPA 투여량을 산정한다. 패혈증을 포함하는 CD14 매개 염증 및 면역반응 억제제로서 인체에 적용될 수 있는 PE-DTPA의 투여량은 1~25 mg/kg이다. PE-DTPA는 인체에 대한 투여방법이 특별히 제한되지 않으며, 경구, 주사, 경피 등 인체에 적용 가능한 공지의 다양한 투여방법에 의해 투여될 수 있고, 특히 주사 및 경구로 투여될 수 있다.

<54> 본 발명에서 “억제”는 염증 및 면역반응의 발현을 억제하는 것과 발현된 염증 및 면역반응을 치료하는 것을 모두 포함하는 의미이다.

<55> 이하 구체적인 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 다음의 실시예에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 특허청구범위의 균등범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능한 것은 물론이다.

<56> 실험재료 및 실험방법

<57> 1. 세포 배양 및 실험 동물

<58> BALB/c 생쥐에서 기원된 단핵구/대식세포 세포주인 RAW264.7과 Human embryonic kidney 세포인 293T는 ATCC(American type culture collection)에서 분양받았다. 세포 배양에 사용한 배지 및 시약은 GIBCO_{BRL} (Life technologies, USA)에서 구입하였다. RAW264.7과 293T 세포는 DMEM(Dulbeccos' modified Eagle's medium)에, Human myeloid 계통인 THP-1과 U937 세포는 RPMI-1640 (Hyclone, USA)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT, USA)과 항생제(100 U/ml penicillin-G and 100 U/ml streptomycin)를 넣고 5%의 CO₂ 농도를 유지하면서 37 °C 습식 배양기에서 키웠다. 8~10 주령 C57BL/6 수컷은 대한 바이오링크에서 구입하였다.

<59> 2. 시약 및 기구

<60> RAW264.7과 THP-1에서 그람-음성균과 그람-양성균의 자극을 주기 위해 사용한 LPS는 시그마사(Sigma, Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 전체 RNA 추출에 사용한 트리졸 시약은 GIBCO_{BRL}사에서, RNA 보호를 위해 사용한 디에틸피로카보네이트(diethyl pyrocarbonate, DEPC)는 시그마사 (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 역전사 반응을 위한 MMLV-RT(Molony-murine leukemia virus reverse transcriptase), T4 DNA ligase, 올리고 dT 와 dNTPs는 프로메가(Promega)사 (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. Taq DNA 폴리머라제는 솔젠트(Solgent)사 (Korea)에서 구입하였고, 유전자 도입에 사용한 Superfect는 퀴아젠(Qiagen)사 (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. TNF- α 측정에 사용된 anti-human TNF monoclonal antibody, biotinylated anti-human TNF monoclonal antibody, avidin-horseradish peroxidase conjugated reagent는 BD 사 (BD Biosciences Inc., USA)에서 구입하였다.

<61> 실험에 사용된 주요 기자재는 microplate ELISA reader (Molecular Devices, USA), Victor3 1420-012 (Perkin Elmer 사), Biomolecular Interaction Analysis System (BIAcore, Sweden) 등이다.

<62> **3. ELISA(Enzyme-linked immunosorbent Assay)**

<63> THP-1 세포 (1.2×10^4 /96 well plate)에 PE-DTPA와 PS, PE 등을 농도별로 처리하고 30분 배양시킨 후에 30 ng/ml LPS를 각각 처리하여 배양한다. 1/250 로 희석된 Anti-human TNF monoclonal antibody 로 96-well 코팅 배양접시를 24시간 동안 코팅한 후 10% FBS/PBS 를 넣고 상온에서 1시간 반응시켜서 비특이적인 결합을 배제시킨 후에 배양된 세포의 상등액만 얻어 2시간 반응시킨다. PBST (0.05% Tween 20/PBS)로 5번 세척하고, Biotinylated anti-human TNF monoclonal antibody, avidin-horseradish peroxidase conjugated reagent 를 각각 1/250로 희석하여 동량의 비율로 섞어준 후 상온에서 1시간 동안 결합시켰다. 다시 PBST로 7번 세척한 뒤, substrate solution (Tetramethylbenzidine, TMB)으로 반응을 준 후 30분 후에 1 M H_3PO_4 로 반응을 중단시켰다. 상온에서 10분 동안 반응시킨 뒤 ELISA 리더 (Molecular Devices)의 파장 540 nm에서 측정하였다.

<64> **4. 아질산염(NO_2^-) 측정(Griess법)**

<65> RAW264.7 세포에 PE-DTPA와 LPS를 처리한 후 상등액 100 μ l 를 96-well 배양접시에 넣고 그리스 시약(Griess reagent) A (0.2% naphthylethylene diamine dihydrochloride)와 그리스 시약 B (2 % sulfanilamide, 5% H_3PO_4)를 동량으로 섞어 100 μ l를 넣고 반응시킨 후 ELISA reader (Molecular Devices)의 파장 540 nm에서 측정하였다. $NaNO_2$ 를 0부터 100 μ M 까지 단계적으로 배지에 희석한 것을 표준 그래프로 사용하였다.

<66> **5. RNA 추출**

<67> THP-1 세포 (1×10^6 cells/10 cm dish)에 PE-DTPA를 30분 먼저 처리한 후 1 μ g/ml LPS를 처리한 세포를 수거하여 PBS로 세척한 후 트리졸 시약 700 μ l를 넣어 용해하였다. 클로로포름을 트리졸의 10분의 1배 (70 μ l) 첨가하고 잘 섞은 후 원심 분리하여 단백질을 침전시키고 상등액을 얻었다. 이 상등액에 동량의 이소프로판올을 넣고 얼음에서 15분 반응시킨 후 원심 분리하여 RNA 를 침전시키고 80% 에탄올/DEPC로 세척하였다. 최종적으로 DEPC가 첨가된 멸균수에 녹이고 얻은 전체 RNA는 260 nm 흡광도에서 정량하였고, $-70^\circ C$ 에서 보관하였다.

<68> **6. 역전사 증합 효소 연쇄 반응(reverse transcription- polymerase chain reaction; R T - P C R)**

<69> 역전사 반응은 10 mM dNTP mixture 2 μ l, 5 $\times$ RT buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT) 4 μ l, 0.5 μ g/ μ l oligo dT 1 μ l, 열 변성시킨 전체 RNA 4 μ g ($70^\circ C$, 5분), 200 U/ μ M-MLV RTase 0.5 μ l를 각각 넣고 최종 20 μ l 에 맞추어 0.02% diethyl pyrocarbonate (DEPC) 가 처리된 멸균수로 부피를 맞춘 후 $37^\circ C$ 에서 1시간 동안 반응시켰다. $70^\circ C$ 에서 다시 5분간 가열한 후 얼음에서 급냉시켜서 M-MLV RTase를 비활성화 시켰다.

<70> 위의 과정으로 합성된 cDNA 중 1 μ l를 Taq DNA polymerase 1 μ l, 10 $\times$ PCR buffer (750 mM Tris-HCl (pH 9.0), 150 mM ammonium sulfate, BSA (1 mg/ml), 25 mM $MgCl_2$) 2 μ l, 2.5 mM dNTP mixture 4 μ l 와 각각 TNF- α 와 β -actin 에 대한 10 pmol primer 1 μ l 씩과 섞어서 다음의 수행 조건에서 증폭하였다. $94^\circ C$ 에서 2분으로 pre-denature 시킨 후, $94^\circ C$ 에서 30초간 denaturation, $58^\circ C$ 에서 30초간 annealing, $72^\circ C$ 에서 1분간 elongation 을 수행하는 조건으로 23회 반복한 다음, $72^\circ C$ 에서 4분 동안 post-elongation을 수행하였다. 전기영동으로 1% agarose gel 상에서 나타난 변화양상을 관찰하였다.

<71> **7. 세포 증식 측정(MTT 법)**

<72> RAW264.7 세포와 THP-1 세포를 96-well 배양접시 (1.2×10^4 cells/well)에 넣고 10 μ M PE-DTPA 혹은 0.5 μ g/ml LPS를 처리한 것과 처리하지 않은 세포를 각각 12, 24, 36 시간 동안 배양하였다. 각각에 대해 MTT를 4시간 동안 처리한 후, 원심분리기를 이용하여 세포만을 남긴 뒤 96-well 배양접시 각각의 well 에 0.04 N HCl/Iso-propanol 100 μ l를 처리하여 상온에 20분 동안 반응시킨 뒤 ELISA 리더 (Molecular Devices) 의 파장 570 nm에서 측정하였다.

<73> **8. 일시적 유전자 전달 및 형광 측정을 이용한 NF- κ B의 활성 확인**

<74> 12 well 배양접시에 1.2×10^5 세포를 깔아 12시간 동안 배양한 후 무혈청 배지 75 μ l 와 Superfect 7.5 μ l, 그리고 plasmid DNA 1.5 μ g (0.6 μ g TLR4, 0.6 μ g MD-2, 0.3 μ g CD14, 0.1 μ g NF- κ B reporter gene, 0.01 μ g

pRL-SV) 을 첨가하여 섞어 주고 10분간 반응시킨 후 혈청이 첨가된 배지를 400 μ l 첨가한다. 3시간 동안 배양한 후 배양액을 바꾸어 주고 24시간 동안 배양하는 동안 PE-DTPA와 LPS 혹은 LTA, PGN을 처리한다. 처리된 세포를 얻어 1 $\times$ lysis buffer 로 세포를 깨뜨린 후 Victor3 1420-012 (Perkin Elmer 사)를 이용하여 NF- κ B promoter의 luciferase 활성도를 확인하였다.

<75> 9. SPR 분석

<76> SPR (Surface Plasmon Reonance)을 이용한 단백질 간의 결합력 측정은 BIAcore 3000™을 사용하였다. 고정화는 먼저 CM5 Chip의 carboxylmethylated dextran 표면을 0.05 M N-hydroxy-succinimide (NHS)와 0.2 M N-ethyl-N-(3-diethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)의 1:1 혼합액으로 활성화 시킨다. 그 후 정제된 CD14 단백질을 각각 pH 4.0의 소듐 아세테이트 완충용액에 50 μ g/ml의 농도로 주입하여 resonance units(RU) 값이 1000에서 8000 사이가 되도록 칩 표면에 고정화시킨다. 1 RU는 약 1 pg/mm²의 고정화된 단백질 양을 나타낸다. 그 후 pH 8.8의 에탄올아민-HCl 70 μ l로 처리되지 않은 부분을 차단한 후 0.1% 트리톤 X-100으로 비공유결합을 이룬 단백질을 제거하였다.

<77> 0.5 M NaCl/PBS 완충용액 (pH 7.2)에 PE-DTPA를 1-150 μ M 의 농도별로 센서 칩 표면에 흘려보내 고정화된 CD14와의 결합 정도를 측정한다. 또한, 20~500 μ g/ml의 LPS도 마찬가지로 실험하였다. Kinetic constant를 결정하기 위해서 우리는 25℃에서 실험을 수행하였고, 유속은 30 μ l/min 으로 하였다.

<78> 10. 실험 동물의 복강 주사

<79> 8주령된 C57BL/6 수컷에 패혈증을 유도하기 위하여 쥐의 복강에 16 mg/mouse D-galactosamine 과 100 ng/mouse LPS 를 주입하였다. 쥐의 생존율을 확인 한 후에 PE-DTPA를 농도 별로 복강 주사하여 4일 동안 관찰하였다.

<80> 결과

<81> 1. THP-1 사람 골수세포에서 LPS 자극에 대한 PE-DTPA의 역할

<82> 대식세포에서 LPS의 자극을 받으면 염증 반응을 일으키는 여러 가지의 사이토카인이 생성되어 분비된다. 그 중에 가장 대표적인 것이 TNF- α 이다. 따라서 사람 골수세포(myeloid cell) THP-1에서 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 분비와 PE-DTPA에 의한 억제 효과를 알아보았다. THP-1 사람 골수세포에서 LPS 자극에 의하여 분비되는 TNF- α 의 양을 정량적으로 알아보고, PE-DTPA가 TNF- α 생성에 끼치는 영향을 알아보기로 ELISA 실험을 수행하였다. ELISA는 TNF- α 의 포획 항체를 사용하여 ELISA 반응 배양접시를 코팅한 후에, LPS 0.3 μ g 으로 자극을 준 세포와 PE-DTPA를 LPS와 함께 처리 한 세포의 상층액을 코팅된 배양접시에 결합시킨다. 그 후에, TNF- α 검출 항체와 퍼옥시다제(oxidase)가 결합된 2차 항체를 반응시키고 효소에 대한 기질을 주입하여 반응시켜 정량적으로 TNF- α 의 분비량을 측정할 수 있다. 역시 PE-DTPA를 LPS보다 30분 먼저 처리하고, 6시간 동안 배양하여 ELISA를 수행한 결과, 도 2에서 보는 바와 같이 PE-DTPA를 처리한 세포에서는 TNF- α 의 분비량이 농도의존적으로 확연히 감소함을 나타내었다. PE-DTPA를 5 μ M 처리하였을 경우에 80% 이상의 TNF- α 분비 억제를 보였다. 그러나 다른 인지질 계열인 PI 와 PS를 처리한 세포에서는 높은 농도를 처리하였음에도 불구하고 TNF- α 분비의 차이가 보이지 않음을 확인하였다. 따라서 PE-DTPA는 다른 인지질과 달리 특이적으로 LPS 신호 전달을 억제함으로써 TNF- α 분비를 감소시킴을 확인하였다.

<83> 그람-음성균에 의하여 발현되는 TNF- α mRNA 발현량과 PE-DTPA의 관계를 알아보기로 역전사 PCR을 수행하였다. 대조군과 1 μ g/ml의 LPS가 처리된 사람 골수 U937 세포에 1 μ M, 10 μ M의 PE-DTPA를 함께 처리하여 12 시간 동안 배양한 후, mRNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다. 도 3에서는 PE-DTPA를 LPS와 함께 처리하였을 경우에 농도에 의존적으로 TNF- α mRNA 발현이 억제됨을 보이고 있다. 이 결과로 PE-DTPA가 사람 골수세포에서 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 의 발현을 억제시킨다는 것을 알 수 있다.

<84> 이러한 억제 효과가 PE-DTPA가 세포 내에 독성을 띄어 나타난 결과인지 알아보기로, 사람 골수세포 THP-1에 PE-DTPA와 다른 인지질들을 처리한 후 세포의 증식 상태 및 생존율을 MTT 방법을 통하여 측정하였다(도 4). PE-DTPA, PS, PE는 모두 24시간에서 약 5% 미만의 세포 죽음을 확인하였고, 36 시간 이후에 회복되는 것으로 보아, 인지질에 의한 세포 독성은 나타나지 않음을 확인하였다.

<85> 2. RAW 264.7 대식세포에서 PE-DTPA의 LPS 신호 전달 억제 역할

<86> PE-DTPA가 RAW264.7 대식세포에서 LPS의 신호 전달을 억제하는지 알아보기 위하여 LPS에 의해 유도되는 산화질소(Nitric Oxide, NO)의 분비량을 측정하였다. 대식 세포에서 LPS의 양이 0.5 μ g 일 때 NO가 가장 많이 발현한

다는 기존의 보고 때문에 내생적인 NO의 분비량을 알아보는 실험에서 LPS의 양을 0.5 μg 으로 선택하였다(Im *et al.*, 1999). 먼저 1 μM , 10 μM , 100 μM 의 PE-DTPA과 PS, PE를 96 well 배양접시에 각각 처리 한 후 30분 후에 0.5 μg 의 LPS를 24시간 동안 처리하였다. PE-DTPA의 효과를 더욱 확실히 보고자 pre-treatment 방법을 사용하였다. LPS를 24시간 동안 처리한 후에 배지에 축적된 아질산염(nitrite)의 농도를 측정하였다. 그 결과, LPS만 처리한 세포에서는 아무것도 처리하지 않은 세포에서 보다 5배 이상 아질산염이 생성되는데, PE-DTPA를 LPS와 함께 처리한 세포에서는 PE-DTPA의 농도에 의존적으로 아질산염의 생성이 억제되는 것을 확인하였다(도 5). 반면에 PS나 PE를 LPS와 함께 처리한 세포에서는 아질산염의 생성이 LPS만 처리한 세포에서 생성되는 아질산염의 양과 별다른 차이가 보이지 않았다. 그러므로 PE-DTPA가 대식세포에서 LPS 처리에 의해 유도된 아질산염 생성을 억제시킴을 확인하였다.

<87> 3. 사람 전체 혈액에서 PE-DTPA의 억제 역할

<88> 사람 단핵구에서 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 의 분비가 PE-DTPA에 의해 억제된다는 것을 확인한 것과 마찬가지로, 이번에는 사람 전체 혈액에서도 같은 결과를 보일 수 있을지 알아보려고 실험하였다. EDTA가 처리된 혈액에 LPS의 자극을 주고, PE-DTPA를 농도 별로 처리한 후에, 혈구를 가라앉히고 혈장만을 얻어 분비된 TNF- α 의 양을 ELISA로 측정하였다. 그 결과, 전체 혈액에서는 10 ng LPS의 자극만으로 3시간 후에 TNF- α 의 분비량이 최대를 나타내는 것을 확인하였다. 도 6에서 보는 바와 같이, PE-DTPA의 농도에 의존적으로 혈액 내의 TNF- α 분비가 억제됨을 알 수 있다. PE-DTPA는 5 μM 의 농도에서 혈액 내 LPS에 의해 분비되는 TNF- α 를 50% 정도 감소시킴을 여러 번의 실험을 통하여 검증하였다. 이전까지의 실험과 마찬가지로, PS나 PE를 LPS와 함께 처리하였을 경우에는 혈액 내 신호 전달에 영향을 미치지 못함을 알 수 있다. 따라서 세포 수준에서 뿐만 아니라 사람의 혈액 내에서도 PE-DTPA가 그람-음성균의 자극에 의한 신호전달을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

<89> 4. PE-DTPA의 활성 기작

<90> LPS는 세포 내 수용체인 TLR4/MD-2 복합체를 통하여 세포 내로 신호를 전달하게 되면, 최종적으로 핵에서 전사 요소인 NF- κ B가 발현되게 된다. PE-DTPA가 LPS의 신호를 억제하면 이러한 신호 전달에 어떤 영향을 끼치는지 알아보았다. TLR4와 MD-2가 발현되지 않는 HEK293 세포에 NF- κ B reporter gene과 TLR4, MD-2, 그리고 CD14를 transfection 한 후에, luciferase 활성도를 측정하였다. 도 7에서와 같이 PE-DTPA의 농도에 따라서 NF- κ B의 발현이 억제됨을 확인하였다. 또한, CD14가 없이 TLR4, MD-2만 transfection한 세포에서는 PE-DTPA에 의한 NF- κ B의 억제가 이루어지지 않고 정상 수준으로 발현됨을 보아 PE-DTPA의 신호 전달 경로에 CD14가 필수적임을 알 수 있었다. 따라서 PE-DTPA는 CD14를 경유한 LPS의 신호 전달 경로를 억제함을 알 수 있다(도 7).

<91> 5. 고정화된 CD14와 PE-DTPA의 결합력 측정

<92> CD14와 PE-DTPA 사이의 결합력 측정을 위하여 regeneration/binding/wash의 과정을 반복 수행하였다. 우선 CM5 센서 칩 표면에 CD14를 고정화 시킨 후에 LPS (20~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 PE-DTPA (1~150 μM)을 각각 흘려주어 RU 값으로 나타나는 단백질 사이의 결합력을 측정하였다. 도 8은 CD14와 LPS, PE-DTPA의 농도에 따른 결합력을 sensogram으로 나타내고 있다.

<93> 모든 sensogram 결과는 수용체와 리간드간의 결합에서 수용체를 고정화 시키지 않은 보정 값을 빼준 결과이다. PE-DTPA는 농도 의존적으로 CD14와 강한 결합을 이루고 거의 해리되지 않음을 확인하였다. 그러나 TLR 수용체 복합체를 이루는 MD-2와는 전혀 결합하지 않았으며 혈액 내에 다량 존재하는 IgG분자 등과도 전혀 결합을 이루지 않는 것을 확인하였다. 또한, 다른 인지질인 PS와 PE는 CD14와 전혀 결합하지 않음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로, PE-DTPA가 특이적으로 TLR 수용체 신호전달에 관여하여 수용체의 리간드 인지를 억제함을 확인하였다.

<94> 단백질 간의 결합력(K_{on})과 해리도(K_{off})의 비율은 BIAevaluation software를 사용하여 baseline model로 맞추어 결과를 얻었다. 최종 단백질간의 결합력(KD) 값은 K_{off}/K_{on} 으로 나타내었다. 결과는 다음의 표 1과 같다.

표 1

	CD14				TLR2	
Ligand	LPS	PE-DTPA	PE	PS	LTA	PE-DTPA
IC ₅₀ (M)	1.33×10^{-5}	9.52×10^{-8}	NB*	NB	5.22×10^{-6}	4.95×10^{-7}

6. 패혈증 유도한 쥐에서 PE-DTPA의 패혈 쇼크 억제 역할

C57BL/6 mice 는 낮은 농도의 LPS 와 D-갈락토사민을 함께 주입했을 때, 심한 패혈 쇼크를 일으키며 죽는다는 보고가 있었다(Barton *et al.*, 1993). 100 ng/mouse의 LPS 와 16 mg/mouse의 갈락토사민을 함께 쥐의 복강에 주사하면, 90% 이상의 쥐가 15 시간 이내에 발열, 기관 손상 등의 패혈 쇼크를 일으키며 죽는데, 특히 간의 파열을 일으키며, 간세포의 사멸을 일으키는 것을 확인하였다. 15시간 이후에도 생존해 있는 쥐를 해부하여 기관을 관찰해 본 결과, 이미 죽은 쥐와 마찬가지로 쥐의 간에서 부분적인 파열이 일어남을 관찰할 수 있었다. 이렇게 패혈 쇼크를 일으키게 하는 모델 시스템을 확립한 후에, PE-DTPA가 생체 내에서 어떻게 작용하는지 알아보았다. 9주 된 21 g의 C57BL/6 수컷에 패혈 쇼크를 유도한 후, PE-DTPA를 복강 주사 하여 쥐의 생존율을 관찰하였다. 그림에서 보는 바와 같이, PE-DTPA 2.5 mg/kg을 주입하였을 때에는 50%의 생존율을 보였으며, 5 mg/kg을 주입하였을 때에는 70%, 25 mg/kg을 주입하였을 때에는 100%의 생존율을 보임을 확인할 수 있었다(도 9). 또한, 패혈 쇼크에 의한 기관 손상과 PE-DTPA의 영향을 알아보고자, 해부하여 비교해본 결과, PE-DTPA를 투여하여 생존한 쥐의 간은 정상인데 반하여, 패혈 쇼크를 일으키고 죽은 쥐에서는 간이 검붉은 색으로 전체적인 파열 증세를 보였으며, 간의 형태도 살아있는 쥐의 간과 달리 흐물흐물해진 것으로 관찰되었다(도 10). 또, 죽은 쥐의 간의 무게는 1.67 g, 생존한 쥐는 1.51 g으로 약 0.16 g의 차이를 보여 죽은 쥐의 간세포에서는 세포 사멸이 일어나며 염증 반응을 유도하는 세포들이 집중적으로 모인 것으로 간주된다. 이 결과로서, PE-DTPA는 *in vitro* 뿐만 아니라 생체 내에서도 박테리아의 감염에 의해 유도되는 패혈증의 억제제로서 작용한다는 것을 확인하였다.

산업이용 가능성

본 발명에서 밝힌 효능에 따라 PE-DTPA는 CD14가 매개하는 염증 및 면역반응 억제제로서의 새로운 용도로 사용될 수 있으며, 특히 그람-양성 박테리아 및 그람-음성 박테리아의 감염에 의해 유발되는 염증 및 면역반응, 특히 패혈증 등의 치료제로서 사용될 수 있다. 이밖에도 박테리아 감염에 의하여 부수적으로 일어나는 혈관내 혈액응고작용과 피브린 활성화(activation of fibrinolysis)에 대한 억제제로도 사용가능성이 있다.

또한, 본 발명에서 확인된 실험결과들을 토대로, 앞으로 인지질질의 꼬리 부분을 구조적으로 변형시켜 CD14와의 결합력을 더욱 높인 새로운 화합물을 개발한다면, 그람-음성 박테리아와 그람-양성 박테리아 모두의 신호를 억제할 수 있는 좋은 치료제로 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 LPS와 결합하는 주 구조로 N-터미널 부분에 소수성 포켓을 가지고 있는 CD14의 구조이다.

도 2는 PE-DTPA 등의 농도에 따른 TNF- α 의 생성량을 측정한 결과이다.

도 3은 PE-DTPA를 LPS와 함께 처리하였을 경우 농도 의존적으로 TNF- α mRNA 발현이 억제됨을 보여주는 역전사 PCR 수행 결과이다.

도 4는 사람 골수세포 THP-1에 PE-DTPA와 다른 인지질들을 처리한 후 세포의 증식 상태 및 생존율을 MTT 방법을 통하여 측정한 결과이다.

도 5는 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되는 산화질소(Nitric Oxide, NO)의 분비량을 측정한 결과이다.

도 6은 사람 전체 혈액에서 LPS에 의해 유도되는 TNF- α 의 분비를 측정한 결과이다.

도 7은 TLR4-MD-2로 형질 전환된 세포에서 PE-DTPA가 NF- κ B의 발현에 미치는 영향을 측정한 것이다.

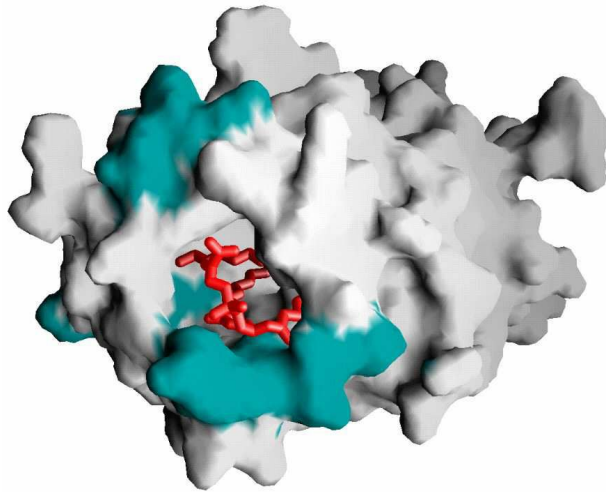
<107> 도 8은 PE-DTPA와 CD14의 결합력을 측정한 결과이다.

<108> 도 9는 패혈증 유도한 쥐에서 PE-DTPA가 패혈 쇼크 억제에 미치는 영향을 보여주는 그래프로, 대조군(■) 및 PE-DTPA를 각각 2.5 mg/kg (●), 5 mg/kg (▲), 25 mg/kg (◆) 투여한 경우의 결과이다.

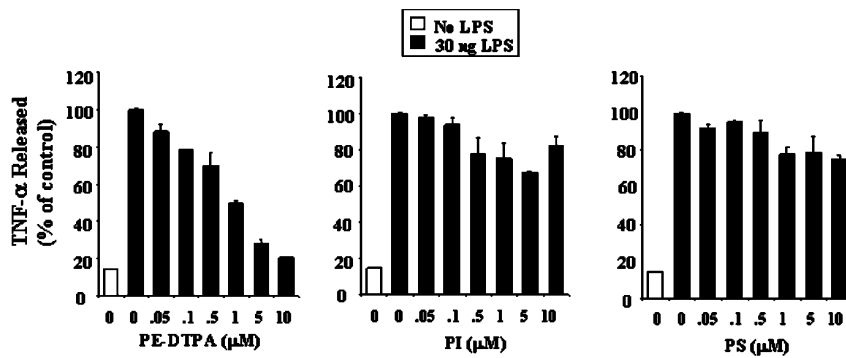
<109> 도 10은 패혈 쇼크에 의한 간 손상 정도를 해부하여 비교해본 결과이다.

도면

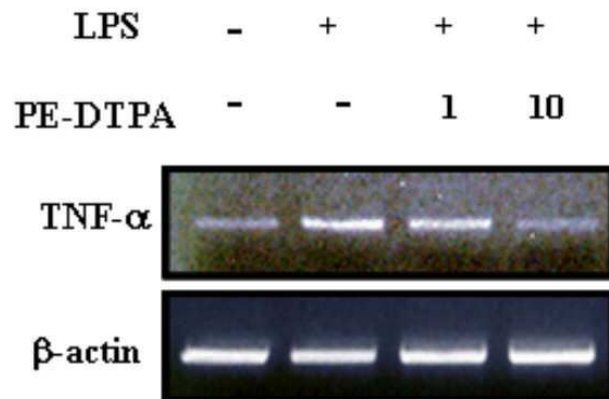
도면1



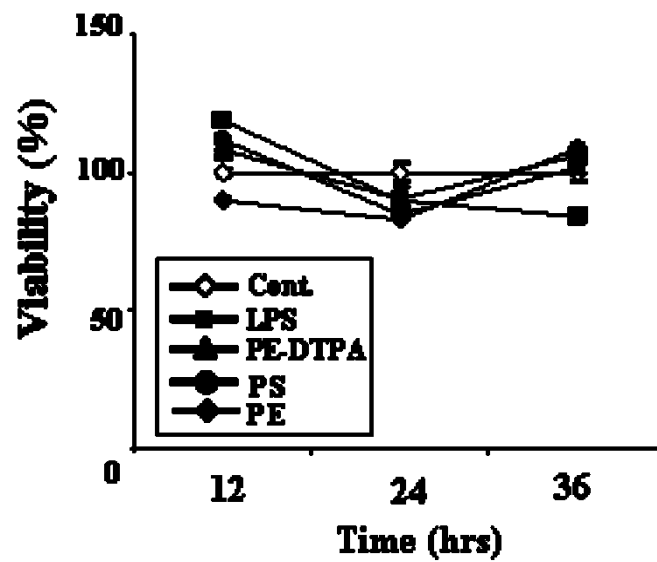
도면2



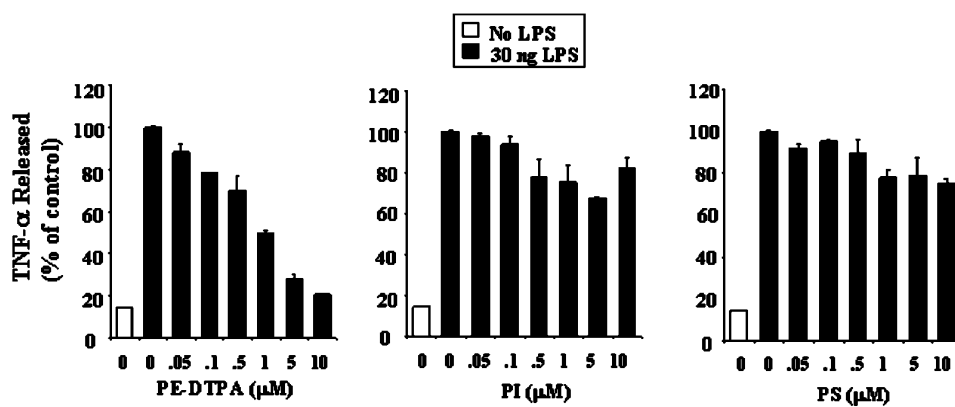
도면3



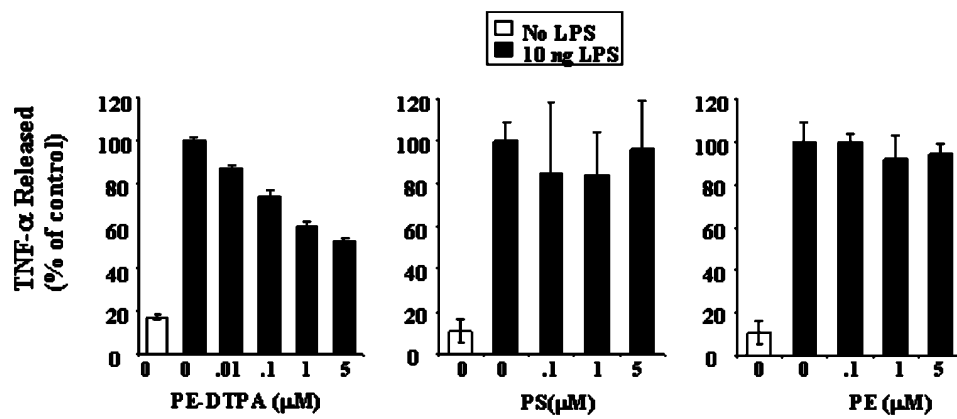
도면4



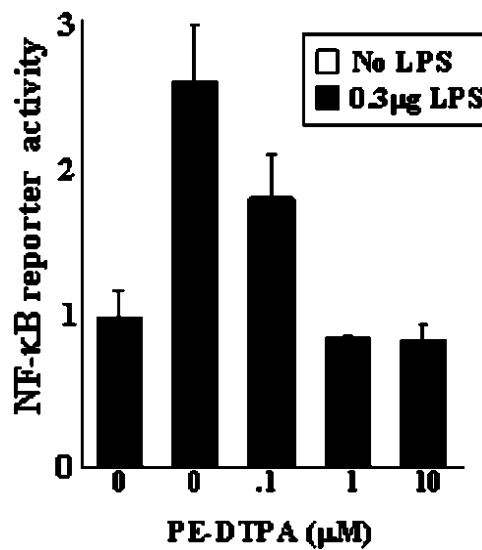
도면5



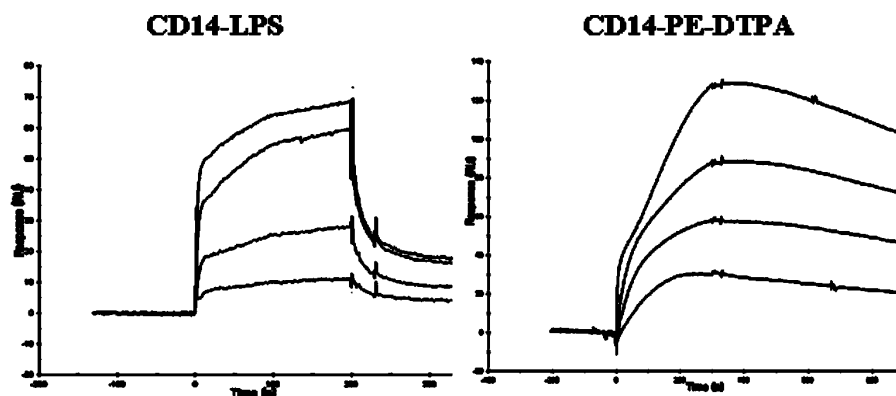
도면6



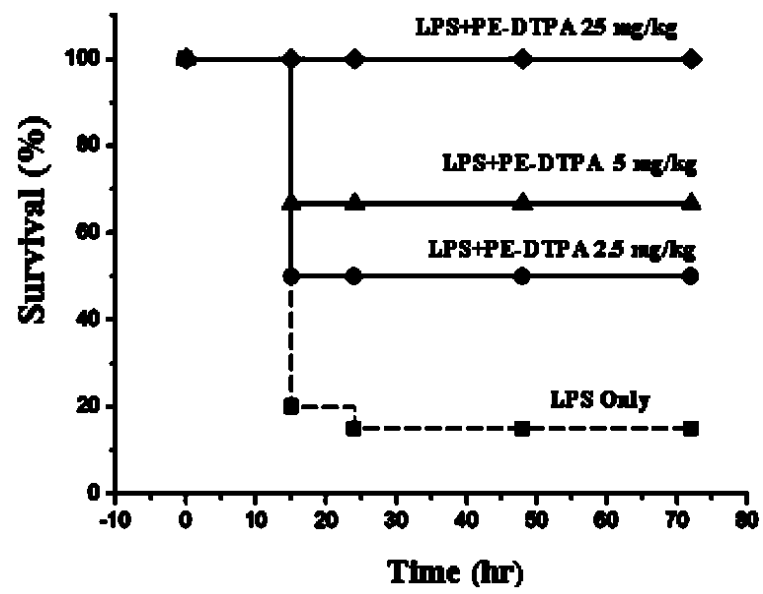
도면7



도면8



도면9



도면10

