



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0071835
(43) 공개일자 2010년06월29일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0130684

(22) 출원일자 2008년12월19일

심사청구일자 2008년12월19일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기
획팀

(72) 발명자

유진철

광주 남구 진월동 새한아파트 101-1202

김성준

광주광역시 광산구 양동 187-16

전홍성

광주 북구 문흥1동 현대아파트 102-203

(74) 대리인

최성용

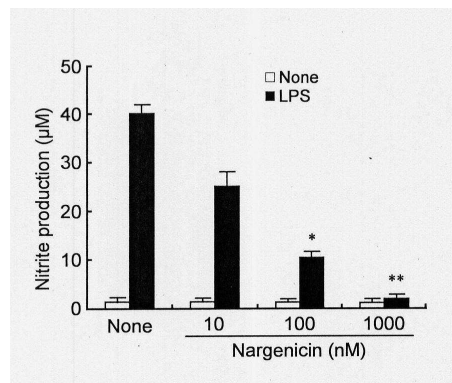
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 나르제니신을 포함하는 염증성 신경퇴행성 질환의 치료용 제약 조성물

(57) 요약

본 발명은 나르제니신을 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항염증제 및 염증성 신경 퇴행성 질환용 제약 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 BV-2 세포에 있어서 LPS-유발 유도성 질소 산화물 합성(iNOS) mRNA 발현 및 NO 생산을 완전히 억제시킬 수 있으므로 효율적인 항염증제 및 신경퇴행성 질환의 치료제로 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

나르제니신을 유효 성분으로 하고, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 염증성 신경 퇴행성 질환용 제약 조성물.

청구항 2

나르제니신을 유효 성분으로 하고, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 항염증성 제약 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나르제니신을 유효 성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항염증제 및 염증성 신경 퇴행성 질환용 제약 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 BV-2 세포에 있어서 LPS-유발 유도성 질소 산화물 합성(iNOS) mRNA 발현 및 NO 생산을 완전히 억제시킬 수 있으므로 효율적인 항염증제 및 신경퇴행성 질환의 치료제로 효과적으로 사용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 방선균은 풍부한 항생제 및 생물활성 물질원으로 잘 알려져 있으며, 산업에 있어서 상당히 중요하다. 이들은 자연계 또는 인위적인 환경에 널리 분포하고, 유기 물질의 분해에 중요한 역할을 수행한다.

[0003] 신경염증은 뇌허혈, 알츠하이머 질환, 파킨슨병, 헌팅톤 질환 및 근위축성 측색 경화증 등의 다양한 신경학적 및 신경퇴행성 질환의 발병에 수반되어 있다 (참고문헌: Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. Nat Rev Neurosci 2001;2:734-744). 뇌에 고유한 면역 세포인 미세아교 세포(microglia)는 전염증성 사이토카인, 산화 질소(NO) 및 기타 신경독 인자의 생산을 통하여 뇌염증에 있어서 특히 중요한 역할을 수행한다. 활성화된 미세아교세포로부터의 이들 분자는 주위의 뉴런을 직접적으로 손상시킬 수 있다(참조 문헌: Liu B, Wang K, Gao HM, Mandavilli B, Wang JY, Hong JS. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. J Neurochem 2001;77:182-189.). 따라서, 미세아교세포의 억압은 신경염증성 질환의 개선을 초래할 수 있다.

[0004] 리포폴리사카라이드(LPS)는 흔한 환경적 오염물로서, 생체 및 시험관내 연구에 있어서 적극적인 모델 면역자극제로서 널리 사용되어 왔다. 이전의 연구에 의하면, LPS는 미세아교세포를 자극하여 유도성 질소 산화물 합성(iNOS), NO 및 인터류킨(IL)-1, IL-6 및 종양 괴사 인자 (TNF- α) 등의 사이토카인류를 생산하는 것이 제안되었다(Gayle DA, Ling Z, Tong C, Landers T, Lipton JW, Carvey PM. Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and nitric oxide. Brain Res Dev Brain Res 2002;133:27-35.).

[0005] 미세아교세포 표면에서 LPS의 톨(Toll)-유사 수용체 4 (TLR4)에 대한 결합은 미토겐-활성화 단백질(MAP) 키나아제, 티로신 키나아제, 및 핵 인자 (NF)- κ B 활성화를 포함하는 다중 세포내 신호화(signaling) 경로의 활성화를 초래하여 iNOS 및 사이토카인류 유전자 발현을 매개하는 것이 보고되었다(참조 문헌: Jung DY, Lee H, Jung BY, Ock J, Lee MS, Lee WH, et al. TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN- β as a decision maker. J Immunol 2005;174:6467-6476.).

[0006] 최근의 연구에 의하면, 독시사이클린(doxycycline) 및 미노사이클린(minocycline) 등의 일부 항생제가 항염증 활성을 가지고 있으며, 미세아교세포의 활성화를 효율적으로 감소시키는 것이 제안되었다(참조문헌: Jantzie LL, Rauw GA, Todd KG. The effects of doxycycline administration on amino acid neurotransmitters in an animal model of neonatal hypoxia-ischemia. Neurochem Int 2006;49:717-728.).

[0007] 토양 세균(*Nocardia* species)으로부터 단리한 구조적으로 뚜렷한 항생제인, 나르제니신은 인체 세포에 있어서 MRSA 상에 강력한 항생 작용을 나타내었다(참조문헌: Celmer WD, Chmurny GN, Moppett CE, Ware RS, Watts PC,

Whipple EB. Structure of natural antibiotic CP-47,444. J Am Chem Soc 1980;102:4203-4209.).

[0008] 많은 항생제가 이들의 항-미생물 효과와는 무관한 다양한 작용을 가지고는 있으나, 나르제니신은 항-미생물 작용 외의 다른 작용을 가지고 있는 것은 아직까지 보고된 바가 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 따라서, 본 발명자들은 토양 시료로부터 채취된 방선균 균주에서 생산된 나르제니신에 대한 항-염증 효과를 규명하는데 관심을 가지고, LPS 자극 동안 미세아교세포의 활성화에 대한 나르제니신의 잠재적인 항-염증 효과를 탐색한 결과, 이들이 유도성 질소 산화물 합성(iNOS) 및 NO 생산을 완전히 억제시킬 수 있으므로 효율적인 항염증제 및 신경퇴행성 질환의 치료제로 효과적으로 사용될 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제 해결수단

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 일면에 있어서 나르제니신을 포함하는 항염증성 제약 조성물 및 염증성 신경퇴행성 질환의 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

효 과

[0011] 본 발명에 따른 나르제니신을 포함하는 제약 조성물은 BV-2 세포에 있어서 LPS-유발 유도성 질소 산화물 합성(iNOS) mRNA 발현 및 NO 생산을 완전히 억제시킬 수 있고, 또한, 나르제니신에 의한 iNOS 단백질 발현의 억제는 iNOS mRNA의 억제에 비례하였음을 밝혀 내었으며, 이들 결과는 나르제니신이 iNOS 유전자의 전사 및 발현 모두를 억제하는 것으로 나타났으므로 이것이 효율적인 항염증제 및 신경퇴행성 질환의 치료제로 사용될 수 있음을 제시한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

[0013] 본 발명은, 일면에 있어서, 나르제니신을 포함하는 신경퇴행성 질환의 치료용 제약 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은, 추가의 일면에 있어서, 나르제니신을 포함하는 항-염증성 질환의 치료용 제약 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명자들은 MRSA에 유효한 항생물질을 개발하고자 전라남도에서 채취한 토양으로부터 600여 종류의 방선균을 분리하였으며, 분리된 토양 방선균 중에서 MRSA에 유효한 항생물질을 생산하는 균주를 선별하고, 이에 대한 생리화학적 분석 및 16s rDNA 유전자 염기서열 분석 결과, 상기 선별된 균주는 방선균류의 신규한 종임이 확인되었다. 유전학적인 증거 및 외관상 나타나는 표현형에 근거하여 본 발명의 신규한 균주는 노카르디아 종(*Nocardia sp.*)의 타입 CS682로 명명하였다.

[0016] 본 발명에 따른 방선균 단리물인 *Nocardia sp.* CS682의 배양 브로스는 메티실린 내성 *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 특이적인 높은 항균 활성을 나타냈다. MRSA 및 *Micrococcus leuteus*에 대하여 활성을 갖는 CS-682로부터의 정제 물질은 $C_{28}H_{37}NO_8$ (M+, 515.25)로서 특이한 마크로리드 항생제, 나르제니신으로 확인되었다.

[0017] 본 발명에 있어서는 상기 나르제니신의 항염증제로서의 사용 가능성에 대하여 예의 연구하였고, 후술하는 바와 같이 나르제니신은 신경퇴행성 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 밝혀내었다.

[0018] 일부 최근 연구에 의하면 항생 물질은 항세균, 항염증성 및 신경보호 작용을 포함하는 다양한 생물학적 작용들을 갖는 것이 제안되었다(참조문헌: Filipovic R, Zecevic N. Neuroprotective role of minocycline in co-cultures of human fetal neurons and microglia. Exp Neurol 2008;211:41-51.). 미노사이클린은 항염증 및 신경 보호 효과를 갖는 가장 잘 알려진 항생제이나, 일부 보고들에 의하면 신경학적인 질환의 다양한 동물 모델에서 미노사이클린의 해로운 효과가 제안되었다(참조문헌: Fernandez-Gomez FJ, Gomez-Lazaro M, Pastor D, Calvo S, Aguirre N, Galindo MF, et al. Minocycline fails to protect cerebellar granular cell cultures against malonate-induced cell death. Neurobiol Dis 2005;20:384-391.).

[0019] 본 발명자들의 연구는 노카르디아속 균주(*Nocardia sp.* CS682)로부터의 항생물질인 나르제니신이 다른 항생물질(참조문헌: Lee JC, Ahn TH, Kang SS, Moon C, Bae CS, Kim SH, et al. Single oral dose toxicity evaluation of CS682, a fermentation product of Korean soil bacteria, in rats. Lab. Anim. Res

2007;23:401-404.)에 비하여 인간 세포 및 동물에 있어서 매우 낮은 독성을 가짐을 밝혀내었다.

- [0020] 나르제니신이 항염증성 시약으로 사용될 수 있는지를 찾아내기 위하여, 본 발명자들은 미세아교세포 작용을 억제하는 세포 및 분자 상의 메커니즘을 연구하였다. 본 발명자들이 알기로는 나르제니신의 항염증성 효과에 관한 연구가 없다.
- [0021] 본 발명자들은 처음으로 나르제니신이 BV-2 미세아교세포에 있어서 미세아교세포 활성화 및 LPS-유발 IL-1 β , TNF- α , iNOS 발현 및 NO 생산을 억제할 수 있음을 발견하였다. 미세아교세포의 활성화는 염증성 사이토카인류 및 NO를 방출하고, 이어서 이웃하는 방관자 뉴우런의 세포사멸을 유발한다. 다양한 자극원에 의해 활성화된 미세아교세포로부터의 과도한 NO 및 사이토카인 생산은 독성을 가질 수 있으며 신경 세포 치사를 매개할 수 있음이 제시된 바 있다. 염증성 신경퇴행 질환의 실험 모델에 있어서 가장 널리 사용되는 LPS는 전염증성 사이토카인류의 상당한 상승과 이어지는 NO 방출과 함께 미세아교세포의 활성화를 유도한다(참조문헌: Hou RC, Chen HL, Tzen JT, Jeng KC. Effect of sesame antioxidants on LPS-induced NO production by BV2 microglial cells. *Neuroreport* 2003;14:1815-1819.).
- [0022] 이들 이전의 연구에 일치되게, 본 발명자들의 결과는 상당히 증가된 NO 수준을 나타내었고(도 1 참조), 관심있는 IL-1 β , 및 TNF- α 등의 사이토카인을 현저히 유발하였으며(도 2 및 3 참조), 나르제니신 전처리하는 BV-2 미세아교세포에 있어서 NO, IL-1 β , 및 TNF- α 생산을 상당히 완하시켰다(도 1, 2 및 3 참조). 이들 결과로부터, 나르제니신이 LPS-유도 미세아교세포 활성화에 대하여 항염증성 작용을 갖는 것이 명백하다.
- [0023] NO는 NOS 패밀리(family) 아이소자임에 의해 발생하여 L-아르기닌을 L-시트룰린 및 NO로 전환시키는 것으로 알려져 있다(참조문헌: Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997;100:2417-2423.). iNOS 레벨은 미세아교세포에서 정상적으로 낮으나, iNOS는 LPS 처리를 포함하는 다양한 자극원에 응답하여 고도로 상승되게 조절될 수 있다.
- [0024] 일부 신경 독소 또는 LPS는 iNOS의 상승-조절을 유도하고, 이어지는 미세아교세포에서 NO 생산을 유도하는 반면, iNOS를 직접 억제할 경우 LPS-매개 미세아교세포의 활성화가 효율적으로 감소되었다(참조문헌: Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol* 2005;193:279-290.).
- [0025] 본 발명자들은 1M 나르제니신이 BV-2 세포에 있어서 LPS-유발 iNOS mRNA 발현 및 NO 생산을 완전히 약화시킬 수 있음을 밝혀내었다(도 1 및 2 참조). 또한, 나르제니신에 의한 iNOS 단백질 발현의 약화는 iNOS mRNA의 약화에 비례하였다(도 3C 참조).
- [0026] 이들 결과는 나르제니신이 iNOS 유전자의 전사 및 발현 모두를 억제하는 효율적인 항염증제임을 제시한다.
- [0027] 축적된 결과들에 의하면 iNOS 및 많은 염증성 사이토카인류가 NF- κ B를 포함하는 전사 인자들에 의해 조절됨을 나타낸다(참조 문헌: Christman JW, Blackwell TS, Juurlink BH. Redox regulation of nuclear factor kappa B: therapeutic potential for attenuating inflammatory responses. *Brain Pathol* 2000;10:153-162.).
- [0028] 인산화 및 이어지는 I κ B- α 방출 NF- κ B의 분해는 핵을 전이시켜 iNOS, IL-1 β , 및 TNF- α 등의 표적 유전자 내의 프로모터 영역에 결합시키는 것으로 알려져 있다. 따라서, I κ B- α 의 인산화 레벨을 조절함으로써 전사적 활성을 차단하는 것은 iNOS 및 염증성 사이토카인류를 억제한다. 그러한 가정에 일치되게, 도 4는 나르제니신의 전처리에 의해 LPS-매개된 인산화 및 I κ B- α 의 분해를 효율적으로 억제하였음을 나타낸다. 이들 결과는 나르제니신이 아마도 I κ B- α 의 조절을 통하여 iNOS, IL-1 β , 및 TNF- α 의 발현을 억제하였음을 제시한다.
- [0029] 결론적으로, 이러한 연구 결과는 미세아교세포에 있어서 항염 효과를 가지며, 나르제니신이 NO 생산 및 BV-2 미세아교세포에 있어서 PLS에 의해 유발되는 iNOS, IL-1 β , TNF- α mRNA/단백질 발현을 억제하였음을 처음으로 나타낸다. 또한, 나르제니신의 그러한 억제 효과는 NF- κ B 활성화의 억압을 통한다. 나르제니신의 작용 기전이 완전히 밝혀지지는 않았으나, 상기 결과는 나르제니신이 염증관련 신경퇴행성 질환의 유력한 치료제가 될 수 있음을 의미한다.
- [0030] 본 발명에 따른 항염증제 및(또는) 염증성 신경퇴행성 질환의 치료제는 나르제니신을 유효 성분으로 포함하고, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0031] 본 발명에 따른 항염증제 및 염증성 신경퇴행성 질환의 치료제의 유효성분으로 함유되는 나르제니신은 약학적으로 허용가능한 결합체(예, 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필셀룰로오스), 봉해제(예, 카복시메틸셀룰로오스 칼슘, 전분글리콜산나트륨), 희석제(예, 옥수수전분, 유당, 콩기름, 결정셀룰로오스, 만니톨), 활택제(예, 스테

아린산 마그네슘, 탈크), 감미제(예, 백당, 과당, 솔비톨, 아스파탐), 안정제(카복시메틸셀룰로오스나트륨, 알파 또는 베타 싸이클로덱스트린, 비타민 C, 구연산, 백납), 보존료(예, 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 안식향산나트륨) 및 향료(예, 에틸바닐린, 마스킹후레바, 멘톨후라보노, 허브향)와 혼합하여 정제, 캡셀제, 연질캡셀제, 액제, 연고제 또는 주사제와 같은 약학적 제제로 제조될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 비경구제의 형태로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0032] <나르제니신의 급성 독성 실험>

[0033] 6 내지 7주령 된 비설치류 비글견을 대상으로 본 발명의 나르제니신을 경구 투여하여 24시간 내의 개체 사망율을 조사하였으며, 이때 암컷은 6 내지 8kg인 개체를, 수컷은 7 내지 9kg인 개체를 각각 8마리 사용하였다. 그 결과, 5g/kg 까지 죽은 개체가 발생하지 않아, 본 발명의 나르제니신은 kg당 5g까지도 급성독성을 관찰할 수 없을 만큼 안전하므로, 나르제니신의 세포 독성은 다른 임상적으로 이용되는 마크로라이드 항생제에 비하여 매우 낮다.

[0034] <유효량>

[0035] 본 발명에 있어서의 약제조성물 중 유효성분인 나르제니신의 투여량은 환자의 연령, 성별, 증상, 투여방법 또는 예방목적에 따라, 체중 kg 당 6 내지 30mg을 일일 1회 내지 3회 분복할 수 있다. 특히 증상을 나타내는 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여 시간, 투여 방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 당업자가 투여량을 변화시킬 수도 있다.

[0036] <통계적 분석>

[0037] 시험 데이터는 평균 SEM으로 나타났다. 데이터는 먼저 일방향분산분석(one-way factorial analysis of variance, ANOVA)를 사용하여 분석하였다. 이어서, Student's *t*-test 또는 Turkey's test를 수행하여 처리된 시료와 비교하였다. $p < 0.05$ 가 유의한 것으로 판단하였다.

[0038] <실시예>

[0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0040] 본 발명의 실시예에서 사용되는 대장균(*Escherichia coli*) 111:B4로 부터의 LPS는 시그마사(Sigma, St. Louis, Missouri, USA). 로부터 구입하였다. IkB- α , 및 포스포-IkB- α (클론 5A5)에 대한 항체들은 Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, Massachusetts, USA)로부터 입수하였다. 안티-액틴 및 안티-iNOS 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, California, USA)로부터 구매하였다.

[0041] 실시예 1: 토양 방선균의 분리

[0042] 나르제니신을 생산하는 방선균을 분리하기 위하여, 본 발명자들은 전국에서 채취한 토양을 40℃에서 건조 시켜 곱게 파쇄한 뒤, 방선균의 특징인 열에 강한 성질을 이용하여 다른 미생물로부터 선별하기 위하여 80℃ 건조 오븐(drying oven)에서 1 내지 2 시간 동안 열처리하였다. 열처리된 토양 시료 5 내지 10 g에 1% NaCl 및 0.01% Tween 80이 첨가된 멸균 증류수 10 내지 20 ml를 첨가하여 교반 배양한 후, 상층액에 항곰팡이제(antifungal agent)인 코모졸(comozol) 200 mg과 나이스타틴(nystatin) 100 mg 및 항박테리아제(antibacterial agent) 반코마이신(vancomycin) 5 mg을 각각 첨가하여 배지위에 접종하고 10 내지 15 일 동안 출현하는 방선균을 분리하였다.

[0043] 상기한 과정을 통하여 총 600여 종류의 방선균을 분리하였으며, 분리된 방선균은 다시 고체배지에서 순수 배양하여 각각의 방선균의 포자를 20% 글리세롤(glycerol)에 넣어 -85℃에 보존하고 6 개월마다 계대 보존하였다.

[0044] 상기 분리한 방선균을 OSYM-Agar 배지(2% 귀리분(oatmeal), 1% 건조효모(dried yeast), 1% 만니톨, 1% 콩분(soy bean meal) 및 2% 한천(agar)에서 성장시키고, 30 ℃에서 5~7일 동안 인큐베이션시켰다. 원심분리를 통하여 상층액만 회수하여 이를 항-MRSA 물질 검색용 시료로 사용하였다. MRSA 균주의 보존은 보관용 접시(vial)에 최종 글리세롤의 농도가 20%가 되도록 한 후, -80℃에 보존하여 사용하였다.

[0045] 나르제니신의 생산을 위하여, 말토오스 1%, 귀리분 0.3%, 효모추출물 0.3%, 콩분 0.3% 및 CaCO₂(pH 7.0) 0.1%로

이루어진 발효 브로쓰를 로타리식 교반기 상에서 30 °C에서 180 rpm으로 인큐베이션시켰다. 배양 브로쓰의 안티-MRSA 활성은 종이판 확산법에 의해 검사하였다. 균주 CS682는 높은 안티-MRSA 활성을 나타내었으며, 이 균주를 항생제 생성을 위하여 단리하였다.

[0046] **실시예 2: 나르제니신의 분리 및 정제**

[0047] 상기 토양 세균인 노카르디아 종(*Nocardia* sp.) CS682로부터 나르제니신을 정제하였다. 구체적으로, 노카르디아 속 균주(*Nocardia* sp. CS682)의 5-일 배양 브로쓰 (10 L) 를 8,000 g에서 20 분 동안 원심분리시켰다. 균사체 케이크를 버리고, 수용액을 5 L의 에틸아세테이트로 2회 추출하였다. 추출된 에틸아세테이트 분획을 증발시키고 건조시킨 분말(1 g)을 메탄올(5 ml)에 녹였다. Sephadex LH-20 (291 ml, 1.5 x 110 cm) 상의 겔 투과 및 연속적인 실리카 겔 컬럼 (17 ml, 1.2 x 15 cm; Merck, Germany) 크로마토그래피를 수행하고, 헥산-에틸아세테이트 (2:1)로 용출하여 나르제니신을 분리하였다. 정제된 화합물의 구조는 핵자기 공명(¹H NMR and ¹³C NMR; Varian Unity Inova 300, Varian, USA), 푸리에 변환 적외선 분광학(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR; Equinox 55, Bruker, Germany), 및 전자분사 이온화 질량 분석법(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS; ABI Mariner API-TOF, Perceptive Biosystems, USA)에 의해 분석하였다. 분자량이 516.83인 정제된 나르제니신(C₂₈H₃₇NO₈)을 원액으로서 DMSO에 용해시켰다. 모든 실험에 있어서, 최종 농도의 DMSO는 0.1%를 초과하지 않도록 첨가하였다.

[0048] **실시예 3: 세포 배양 및 처리 절차**

[0049] 쥐의 미세아교세포주, BV-2를 10% 태아송아지 혈청 및 페니실린 (100 unit/ml)-스트렙토마이신(100 g/ml) 으로 보충한 DMEM 배지로 37 °C에서 5% CO₂ 하에 배양시켰다. 보통, 배양 배지는 임의의 처리에 앞서 0.5% FBS를 포함하는 새로운 배지로 교환하여 혈청 효과를 줄였다. 모든 실험에 있어서, 세포들은 LPS의 첨가전에 나르제니신으로 30분 동안 처리하였다.

[0050] **실시예 4: 산화 질소 에세이**

[0051] 나르제니신이 BV-2 미세아교세포에서 LPS-유도 NO 생산을 억제하는지의 여부에 대하여 알아보고자 시험을 하였다. NO의 생산은 배양 배지 중의 질산염의 측정에 의해 측정하였다. 세포 상층액을 LPS 처리 24 시간 후에 수집하여 동일 용적의 Griess 시약 (1% 술파닐아마이드, 0.1% 나프틸에틸렌디아민 디하이드로클로라이드 및 2.5% 인산)과 혼합하였다. 흡광도는 플레이트 판독기(VersaMax; Molecular Devices, USA). 를 사용하여 540 nm에서 판독하였다. 질산 나트륨을 표준으로 사용하여 질산염의 농도를 계산하여 M으로 나타내었다.

[0052] NO 생산에 대한 나르제니신의 효과를 결정하기 위하여, BV-2 세포들을 나르제니신을 3개의 다른 투여량(10, 100, 1000 ng/ml)으로 30 분 동안 처리하고, LPS (0.5 g/ml)를 첨가한 후, 24 시간 후에 질산염의 농도를 배양 배지 중에서 측정하였다. LPS 쉐린지에 앞서 나르제니신으로 전처리한 배양물 중의 NO의 양은 각각 38% (10 nM 나르제니신), 75% (100 nM 나르제니신) 및 95% (1 M 나르제니신) 감소하였다. (도 1 참조).

[0053] 도 1은 LPS-활성화시킨 BV-2 미세아교세포에 있어서 NO 생산에 미치는 나르제니신의 효과를 나타내는 그래프이다. BV-2 세포들을 LPS 처리(0.5 g/ml)에 앞서 정해진 농도로 30분 동안 나르제니신으로 전처리하였다. LPS 처리 24 시간 후에 세포 배지 중의 질산염 레벨을 그리스 반응(Griess reaction)에 의해 결정하였다. 나르제니신은 BV-2 미세아교 세포에 있어서 농도-의존 방식으로 NO의 LPS-유도 생산을 상당히 감소시킨 반면, 나르제니신 자체는 NO의 기저 수준에 영향을 미치지 않았다. 모든 값은 3회의 독립적인 실험의 평균 SEM을 나타냈다. **p*<0.05 및 **LPS 단독에 비하여 *p*<0.01.

[0054] 세포 생존능 분석 결과 세포 증식이나 세포독성이 본 연구에서 상기 농도의 LPS 또는 나르제니신의 실험적 처리에 의해 영향을 받지 않은 것으로 나타났다(테이터는 나타내지 않음).

[0055] **실시예 5: 사이토카인에 미치는 나르제니신의 영향**

[0056] 총 RNA는 트리졸 시약(Invitrogen, USA) 을 사용하여 배양 세포로부터 단리하였다. RT-PCR을 위하여, 총 RNA 1 g을 MMLV 역전사효소(Invitrogen, USA)를 사용하여 제조원의 지시에 따라 역전사시켰다. PCR은 적절한 프라이머 세트 및 정상화를 위한 GAPDH 내부 표준을 사용하여 Taq 폴리머라아제(Perkin-Elmer, USA)로 수행하였다. 다음의 프라이머 세트를 PCR에 사용하였다.

[0057] IL-1에 대한 5'-ATGGCAACTGTTCTGAA(서열번호 1) 및 5'-TTTAGGAAGACACGGATTC(서열번호 2);

- [0058] IL-6IL-6에 대한 5'-GCCTTCCTACTTCACAA(서열번호 3) 및 5'-TAGGTTTGCCGAGTAGAT(서열번호 4);
- [0059] IL-10에 대한 5'-CACTGTATGCTGCCTGCTC(서열번호 5) 및 5'-TCTTCACCTGCTCCACTGCC(서열번호 6);
- [0060] iNOS에 대한 5'-GTGTTCCACCAGGAGATGTTG(서열번호 7) 및 5'-CTCCTGCCCACTGAGTTCGTC(서열번호 8);
- [0061] TNF- α 에 대한 5'-CCATGAGCAACGAAAGCAT(서열번호 9) 및 5'-TTCACAGAGCAATGACTCC(서열번호 10);
- [0062] GAPDH에 대한 5'-GGTGCTGAGTATGTCGTGGA(서열번호 11) 및 5'-GACACATTGGGGGTAGGAAC(서열번호 12).
- [0063] LPS-활성화시킨 BV-2 미세아교세포에 있어서 iNOS 발현으로서 사이토카인에 미치는 나르제니신의 효과를 조사하였다. 먼저 RT-PCR을 수행하여 몇 개의 전염증성(proinflammatory) 사이토카인 및 iNOS의 mRNA 발현 레벨을 검사하였다 (도 2 참조).
- [0064] 도 2는 BV-2 미세아교 세포에 있어서 사이토카인 및 iNOS의 LPS-유도 mRNA 발현에 미치는 나르제니신의 효과를 나타내는 사진. 세포들을 나르제니신(1 M)으로 30 분 동안 처리하고, LPS (0.5 g/ml)를 첨가하여 4 시간 동안 처리하였다. IL-1, IL-6, IL-10, iNOS, 및 GAPDH의 mRNA 레벨을 RT-PCR에 의해 결정하였다. BV-2 세포들은 LPS 자극 없이 IL-1, IL-6, IL-10, 및 TNF- α 에 대한 소량의 mRNA 전사물을 발현하였고, LPS의 처리는 IL-1, iNOS and TNF- α 의 상승 조절을 유도하였다. 그러나, IL-6 및 IL-10의 발현 레벨은 약간 감소하였다. LPS 자극 전에 나르제니신으로 30 분 동안 처리한 경우에는 IL-1, iNOS 및 TNF- α 의 LPS-유도 상승 조절을 상당히 감소시켰으나, IL-6 및 IL-10의 발현에는 유의한 효과는 없었다. 밴드 강도는 농도계 분석에 의해 측정하였고 정규화된 정량 값은 각 밴드의 하단에 표기하였다.
- [0065] LPS를 처리하지 않은 BV-2 미세아교세포는 IL-1, IL-6, IL-10, 및 TNF- α 등의 사이토카인류에 대해 근소한 레벨의 mRNA를 지속적으로 발현하였다. LPS (0.5 g/ml) 처리는 IL-1 및 TNF- α 의 mRNA 레벨에 있어서 상당한 증가를 유도하였으나, 나르제니신(1 M) 전처리하는 LPS-유도 IL-1 및 TNF- α mRNA 레벨을 효율적으로 억압하였다. IL-6 및 IL-10의 발현은 LPS 단독 또는 LPS + 나르제니신에 의해 약간 변화하였으나 통계적으로 유의한 정도는 아니었다. iNOS mRNA의 기저 레벨은 검출할 수 없었으나, LPS 처리는 상당히 증가된 iNOS mRNA 레벨을 생산하였고, 나르제니신의 전처리하는 대조군 레벨에 대하여 iNOS mRNA 발현을 억압하였다(도 2 참조).
- [0066] **실시예 6: 효소면역분석 (ELISA) 및 웨스턴 블롯 분석**
- [0067] BV-2 배양물 중의 IL-1 β 및 TNF- α 의 단백질 수준은 상업적인 ELISA 키트 (R&D Systems, USA)를 제조원의 지시에 따라 측정하였다. TNF- α 의 양은 배양 상층액을 사용하여 결정하였다. 그러나, IL-1 β 수준은 LPS 처리 후 배양 배지 중의 낮은 농도에 기인하여 전체 세포 용해물을 사용하여 측정하였다. 450 nm에서의 흡광도는 플레이트 판독기에서 판독하고 사이토카인은 pg/ml로 나타내었다. iNOS, I κ B- α , 및 포스포-I κ B- α 의 분화 발현은 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정하였다. 다양한 실험 조건에서 성장한 BV-2 세포를 PBS로 2회 세척하고, 이어서 RIPA 완충액(PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% 소듐 데옥시콜레이트, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml 페닐메틸설포닐 플루오리드, 30 mg/ml 아프로티닌 및 1 mM Na₃VO₄)에 용해시켰다. 추가의 세포 용해물의 제조물은 PVDF 멤브레인으로 전기이동시키고, 증강된 ECL 화학발광 키트(GE Healthcare, USA)에 의한 단백질 검출을 상기한 바에 따라 수행하였다(참조문헌: Cho HS, Kim S, Lee SY, Park JA, Kim SJ, Chun HS, Protective effect of the green tea component, L-theanine on environmental toxins-induced neuronal cell death. Neurotoxicology 2008;29:656-662.).
- [0068] BV-2 세포에 있어서 나르제니신 및 LPS의 처리 후에 IL-1 및 TNF- α 단백질 생산의 조정 능력(modulation)을 조사하기 위하여 ELISA 분석을 수행하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0069] 도 3은 배양된 BV-2 세포에 있어서 사이토카인 및 iNOS의 단백질 발현에 미치는 나르제니신의 억제 효과를 나타내는 도면이다. 24 시간 자극 동안 LPS 및 나르제니신에 대한 BV-2 세포의 반응을 ELISA에 의해 정량화하였다 (A에서 IL-1 ELISA, B에서 TNF- α ELISA). 나르제니신은 LPS-자극 BV-2 세포 모두에서 IL-1 및 TNF- α 생산을 상당히 감소시켰다. 값은 4회의 독립적인 실험의 평균 SEM으로 나타났다. *LPS 단독에 비하여 $p < 0.05$. iNOS 단백질의 발현은 16 시간 LPS-자극시킨 세포에서 웨스턴 블롯 분석 (C)에 의해 평가하였다. 나르제니신 전처리하는 iNOS의 LPS-유도 상승 조절을 농도 의존적으로 상당히 억제하였다. 상대 농도계 밀도는 미처리 대조군의 값에 대한 비율로 평가하였다. *LPS 단독에 비교하여 $p < 0.05$.
- [0070] 도 3에 나타난 바와 같이, IL-1 및 TNF- α 의 LPS-유도 생산에 대한 나르제니신의 억제 효과는 상당하였다. 나르

제니신은 LPS-유도 IL-1 생산을 65% 감소시켰고, TNF- α 생산을 59% 감소시켰다. iNOS 단백질의 레벨은 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다.

[0071] 도 3C에 나타난 바와 같이, 나르제니신 전처리하는 iNOS 단백질 발현을 농도 의존적 방식으로 일관된 감소를 유도하였다. 농도계 분석에 의하면 LPS 처리전에 나르제니신(10-1000 nM)으로 전처리한 배양물에 있어서 iNOS 단백질 레벨이 각각 32%(10 nM 나르제니신), 35% (100 nM 나르제니신), 및 67% (1 M 나르제니신) 감소하였음을 나타낸다.

[0072] 한편, 전염증성 전사 인자인 NF- κ B는 iNOS 및 다양한 사이토카인 등의 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다. 휴지 세포에 있어서 NF- κ B는 I κ Bs에 의해 세포질에서 격리된다. 다양한 조건에 의한 세포의 자극은 I κ Bs의 급속한 인산화 및 분해를 초래하고, 이는 활성 NF- κ B를 방출하여 전염증성 표적 유전자의 전사를 유발한다.

[0073] 따라서, 본 발명자들은 iNOS 발현 및 전염증성 사이토카인류(IL-1, TNF- α) 발현에 대한 나르제니신의 억제 작용이 I κ B- α 조절에 관련된 것인지의 여부에 대하여 시험하고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0074] 도 4는 BV-2 미세아교 세포에 있어서 I κ B- α 의 LPS-유도 인산화 및 분해에 미치는 나르제니신의 조정 효과를 나타내는 도면이다. 세포들을 나르제니신(1 M)의 존재 및 부재하에 LPS (0.5 g/ml)으로 1 시간 동안 자극하였다. LPS 는 I κ B- α 의 인산화 및 분해를 유도하였다. 그러나, 나르제니신은 BV-2세포에 있어서 I κ B- α 의 LPS-매개 인산화 및 분해를 상당히 억제하였다. 포스포-I κ B- α 및 I κ B- α 의 발현은 특이 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 시험하였고 각 밴드의 강도는 농도계 분석에 의해 평가하였다. 안티-액틴 항체를 정규화에 사용하였다. 모든 값은 3회의 독립적인 실험의 평균 SEM으로 나타났다. *미처리 대조군에 비교하여 $p < 0.05$.

[0075] 도 4에 나타난 바와 같이, LPS (0.5 g/ml) 자극은 I κ B- α 인산화 (6.7 배) 및 후속적인 I κ B- α (2.5 배)의 분해의 상당한 상승 조절을 유발하였다. 그러나, 나르제니신 전처리하는 BV-2 세포에 있어서, I κ B- α 의 인산화 및 이어지는 분해를 완전히 차단하였다(도 4 참조).

[0076] 이들 결과는 나르제니신이 BV-2 미세아교 세포에 있어서 I κ B- α 분해 및 후속적인 NF- κ B 활성화의 억압을 통하여 iNOS 및 전염증성 사이토카인류의 발현을 억제함을 나타낸다.

산업이용 가능성

[0077] 이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명의 나르제니신을 포함하는 조성물은 BV-2 세포에 있어서 LPS-유발 유도성 질소 산화물 합성(iNOS) mRNA 발현 및 NO 생산을 완전히 약화시킬 수 있으므로 효율적인 항염증제 및 신경퇴행성 질환의 치료제로 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 LPS-활성화시킨 BV-2 미세아교세포에 있어서 NO 생산에 미치는 나르제니신의 효과를 나타내는 그래프도.

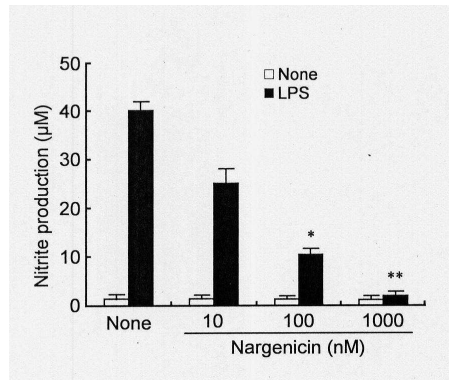
[0079] 도 2는 BV-2 미세아교 세포에 있어서 사이토카인 및 iNOS의 LPS-유도 mRNA 발현에 미치는 나르제니신의 효과를 나타내는 사진.

[0080] 도 3은 배양된 BV-2 세포에 있어서 사이토카인 및 iNOS의 단백질 발현에 미치는 나르제니신의 억제 효과를 나타내는 도면.

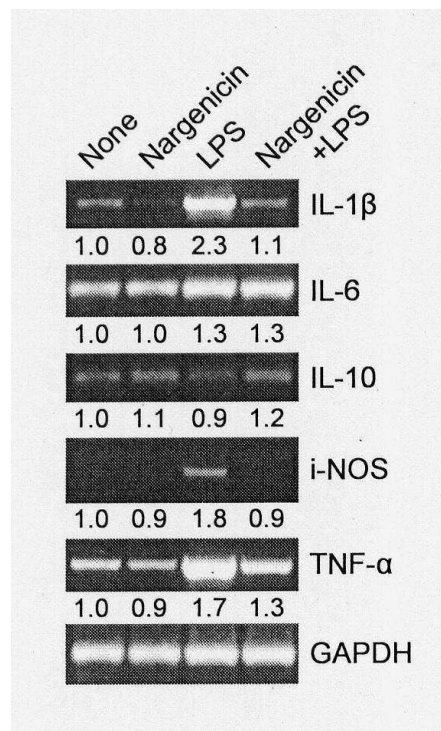
[0081] 도 4는 BV-2 미세아교 세포에 있어서 I κ B- α 의 LPS-유도 인산화 및 분해에 미치는 나르제니신의 조정 효과를 나타내는 도면.

도면

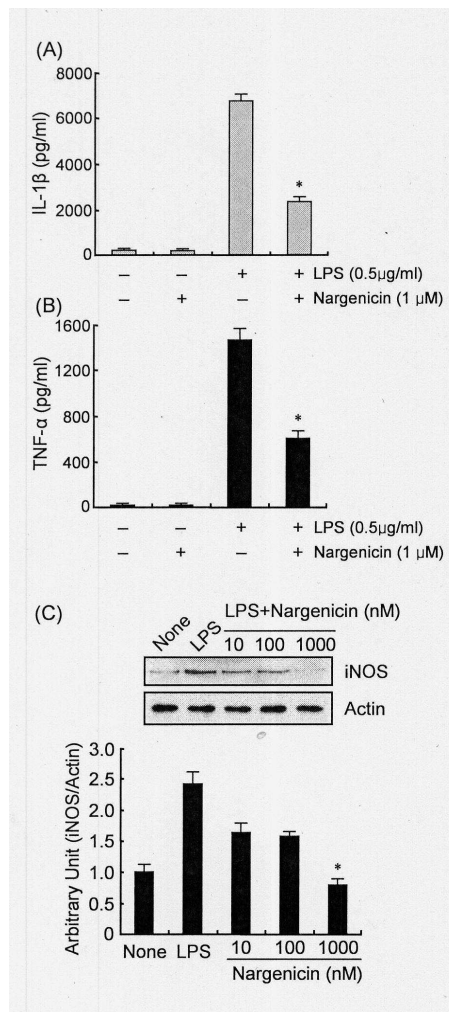
도면1



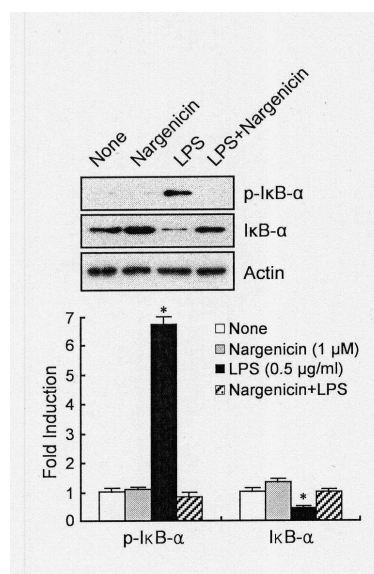
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Chosun University Industry-Academic Cooperation Foundation
 <120> Pharmaceutical composition for treating inflammatory
 neurodegenerative diseases comprising nargenicin

<130> pkr-0192

<160> 12

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 1
 atggcaactg ttcttgaa 18

<210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 2
 tttaggaaga cacgattc 19

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 3
gccttccta cttacaa 18

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
taggtttgcc gagtagat 18

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
cactgctatg ctgcctgctc 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
tcttcacctg ctccactgcc 20

<210> 7

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 7
 gtgttcacc aggagatgtt g 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 8
 ctctgccca ctgagttcgt c 21

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 9
 ccatgagcaa cgaaagcat 19

<210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 10
ttcacagagc aatgactcc 19

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
ggtgctgagt atgtcgtgga 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
gacacattgg gggtaggaac 20