

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 2월 26일 (26.02.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/026123 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/22 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
A61K 31/20 (2006.01)
 - (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/007661
 - (22) 국제출원일: 2014년 8월 19일 (19.08.2014)
 - (25) 출원언어: 한국어
 - (26) 공개언어: 한국어
 - (30) 우선권정보:
10-2013-0098184 2013년 8월 19일 (19.08.2013) KR
 - (71) 출원인: 주식회사 엔지켐생명과학 (ENZYCHEM LIFESCIENCES CORPORATION) [KR/KR]; 305-732 대전시 유성구 문지로 193, KAIST-ICC 제 F741 호, Daejeon (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
 - (72) 발명자: 오세량 (OH, Sei-Ryang); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 안경섭 (AHN, Kyung Seop); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이수익 (LEE, Su Ui); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 신인식 (SHIN, In Sik); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권옥경 (KWON, Ok-Kyoung); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김승형 (KIM, Seung Hyung); 300-716 대전시 동구 대학로 62, Daejeon (KR). 전찬미 (CHUN, Chan Mi); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이태석 (LEE, Tae-Suk); 302-847 대전시 서구 청사서로 65, 101-406, Daejeon (KR). 한용해 (HAN, Yong-Hae); 133-819 서울시 성동구 성수1가, 75-7, Seoul (KR). 손기영 (SOHN, Ki Young); 104-803 서울시 영등포구 당산로 95 현대아파트 104-803, Seoul (KR). 강중구 (KANG, JongKoo); 362-230 충청북도 청주시 서원구 장전로 51, 103-901, Chungcheongbuk-do (KR). 김혜경 (KIM, Hye Kyung); 135-839 서울시 강남구 선릉로 90길 36, 10층, Seoul (KR).
 - (74) 대리인: 특허법인 신우 (SHINWOO PATENT & LAW FIRM); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 25길 15-4, 2층, Seoul (KR).
 - (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 규칙 4.17에 의한 선언서:
— 특허출원 및 특허를 받을 수 있는 출원인의 자격에 관한 선언 (규칙 4.17(ii))
- 공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING MONOACETYLDIACYLGLYCEROL COMPOUND AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTING OR TREATING CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASES

(54) 발명의 명칭 : 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition containing a monoacetyldiacylglycerol compound as an active ingredient for preventing or treating chronic obstructive pulmonary diseases, and a functional health food composition for treating or preventing chronic obstructive pulmonary diseases. The monoacetyldiacylglycerol compound of the present invention inhibits the IL-4 expression in EL-4 cells and inhibits the infiltration of inflammatory cells into the bronchial tube in an animal model. In addition, the compounds of the present invention have an excellent effect of inhibiting the expression of CXCL-1, TNF- α , or MIP-2, thereby overcoming side effects of the currently used therapeutic agents for chronic obstructive pulmonary diseases, having no toxicity, and exhibiting a superior therapeutic effect, and thus can be useful as a composition for preventing, treating, and alleviating chronic obstructive pulmonary diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 모노아세틸디아실글리세롤 화합물은, EL-4 세포에서 IL-4의 발현을 억제하고, 동물모델에서 기관지 내 염증세포 침윤을 억제한다. 또한, 본 발명의 화합물들은, CXCL-1, TNF- α 또는 MIP-2의 발현을 억제하는 효과가 우수한 바, 현재 사용되는 만성폐쇄성 폐질환 치료제의 부작용을 극복하고, 독성이 없으면서 치료효과가 탁월한 화합물로서 만성폐쇄성 폐질환 예방, 치료 및 개선용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2015/026123 A1

명세서

발명의 명칭: 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 조성물 기술분야

[1] 본 발명은 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 만성폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)은 폐의 비정상적인 염증반응으로 기도가 좁아지는 폐질환 중 하나이다. 만성폐쇄성 폐질환은 주로 유해입자나 가스의 흡입에 의해 발생하게 되며, 특히 흡연이 주요 원인으로 알려져 있다. 현재 우리나라의 40세 이상 만성폐쇄성 폐질환 유병률은 해마다 증가하는 추세이며, 또한 전 세계적으로도 만성폐쇄성 폐질환은 유일하게 유병률과 사망률이 증가하는 질환으로, 2020년에는 세계적으로 3번째 사망원인이 될 것으로 추정하고 있다. 흡연은 폐조직 내 강력한 자극물질로 작용하여, 다양한 전염증인자, 성장인자, 산화물질 및 화학주성인자들의 생성을 증가시키며, 염증성 신호전달체계를 활성화시켜 호중구 및 대식세포를 비롯한 많은 염증세포의 유주를 촉진시켜 폐염증을 더욱 악화시키게 된다. 담배연기 및 염증세포들에서 유래된 메탈로프로테나제(metalloproteinase)와 같은 단백분해 효소가 활성화되어 폐 간질조직 내 구성물을 파괴하게 된다. 이는 결국 폐조직의 비정상적인 변화, 이를테면 기도벽의 비후, 폐섬유화를 야기하여 폐기능을 저하시킨다. 따라서 만성폐쇄성 폐질환의 예방 및 치료를 위하여, 질병의 주요 원인인 폐 염증의 개선을 중점에 두고 다양한 물질들의 개발이 이뤄져 오고 있다. 그 중, 천식치료와 유사하게 만성폐쇄성 폐질환의 염증개선을 위한 스테로이드 제제 및 항생제의 치료는 매우 매력적인 치료방법이 될 수 있다. 그러나 스테로이드제제 및 항생제의 경우, 면역억제 및 면역관용 등으로 인한 많은 부작용이 발생할 수 있기 때문에 장기간 치료를 필요로 하는 만성폐쇄성 폐질환 환자에게는 적합하지 않다는 제한점이 있다.

[4]

[5] EC-18은 모노아세틸디글리세라이드(monoacyldiglyceride)의 일종으로서, 녹용으로부터 분리되었다. EC-18은 조혈작용이 있는 것으로 알려져 있으며, cecal-ligation-puncture를 이용한 패혈증 동물모델에서 전염증인자의 감소와 함께 동물의 생존률을 크게 증가시켰음이 개시되었으며, GLP(Good Laboratory Practice) 독성시험에서도 독성이 없는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 EC-18을 포함한 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물이 만성폐쇄성 폐질환에 있어서

어떠한 효과를 나타낼지에 대하여는 아직까지 개시된 바가 없다. 이에 본 발명자들은, 천연물 유래 혹은 새로운 화합물의 만성폐쇄성 폐질환 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 모노아세틸디아실글리세롤 화합물이 IL-4의 발현을 억제하고, CXCL-1, TNF- α 또는 MIP-2의 분비를 억제하며, 기관지 내 염증세포 침윤을 억제하여 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

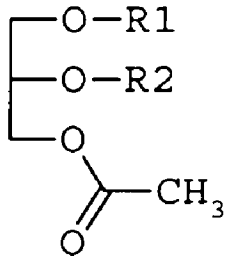
[7]

본 발명의 하나의 목적은, 하기 화학식 1로 표시되는 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[8]

[화학식 1]

[9]



[10]

상기 식에서 R1 및 R2는 각각 탄소수 14 내지 20의 지방산기이다.

[11]

본 발명의 다른 목적은, 상기 약학적 조성물을 만성폐쇄성 폐질환의 발병 가능성이 있거나 만성폐쇄성 폐질환을 앓고 있는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[12]

과제 해결 수단

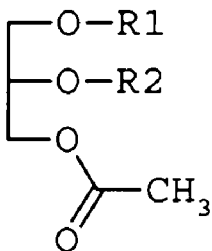
[13]

상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 하기 화학식 1로 표시되는 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[14]

[화학식 1]

[15]



[16]

상기 식에서 R1 및 R2는 각각 탄소수 14 내지 20의 지방산기이다. 본

명세서에서 지방산기는 지방산의 카르복실기에서 -OH기가 제외된 나머지 부분을 의미한다.

[17]

[18] 구체적으로, 본 발명의 만성폐쇄성 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, “모노아세틸디아실글리세롤 화합물”은 하나의 아세틸기와 2개의 아실기를 갖는 글리세롤의 유도체를 의미하며, 모노아세틸디글리세롤(MADG)이라고도 한다.

[19]

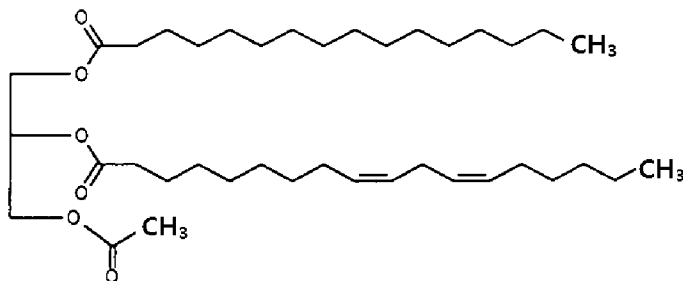
[20] 상기 화학식 1로 표시되는 모노아세틸디아실글리세롤 화합물에서 R1 및 R2는 각각 탄소수 14 내지 20의 지방산기일 수 있으며, 바람직하게는 팔미토일(palmitoyl), 올레오일(oleoyl), 리놀레오일(linoleoyl), 리놀레노일(linolenoyl), 스테아로일(stearoyl), 미리스토일(myristoyl) 또는 아라키도노일(arachidonoyl) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 더욱 바람직하게는 상기 R1 및 R2의 조합(R1/R2)은 올레오일/팔미토일, 팔미토일/올레오일, 팔미토일/리놀레오일, 팔미토일/리놀레노일, 팔미토일/아라키도노일, 팔미토일/스테아로일, 팔미토일/팔미토일, 올레오일/스테아로일, 리놀레오일/팔미토일, 리놀레오일/스테아로일, 스테아로일/리놀레오일, 스테아로일/올레오일, 미리스토일/리놀레오일 또는 미리스토일/올레오일 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 모노아세틸디아실글리세롤 화합물은 광학활성에 있어, (R)-형, (S)-형 또는 라세미체일 수 있다.

[21]

[22] 상기 모노아세틸디아실글리세롤 화합물은 바람직하게는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다.

[23] [화학식 2]

[24]



[25]

상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 1-팔미토일(palmitoyl)-2-리놀레오일(linoleoyl)-3-아세틸글리세롤(acetyl glycerol)이라고 하며, EC-18이라 명명되기도 한다. 상기 화합물의 R1과 R2는 각각 팔미토일과 리놀레오일에 해당한다.

[26]

[27] 상기 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물은 녹용으로부터 추출/분리되거나, 공지의 유기합성법(대한민국등록특허 제10-0789323호)으로 제조될 수 있다. 구체적으로, 녹용을 헥산으로 추출하고, 그 추출잔사를 다시 클로로포름으로 추출한 다음, 수득된 추출액을 감압증류하여 녹용의 클로로포름 추출물을 수득할 수 있다. 상기 추출에서 사용되는 추출용매인 헥산 및 클로로포름의 양은 각각 사용된 녹용이 잠길 정도의 양이면 충분하며, 일반적으로는 녹용 1kg에 대하여 헥산 및 클로로포름을 각각 4~5ℓ 정도의 비로 사용할 수 있으나, 추출용매의 종류와 사용량이 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 방법으로 수득한 녹용의 클로로포름 추출물을 계속해서 일련의 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 및 TLC 방법에 의해 더 분획화하고 정제하여, 본 발명에 사용되는 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물을 얻을 수 있다. 상기 크로마토그래피 정제 단계의 용리액으로는 클로로포름/메탄올, 헥산/에틸아세테이트, 헥산/에틸아세테이트/아세트산 등을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[28]

[29] 한편, 본 발명에 사용되는 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물을 화학적으로 합성하는 방법은 대한민국등록특허 제10-0789323호에 공개되어 있다.

구체적으로, (a) 1-R1-글리세롤의 3번 위치에 보호기를 붙여 1-R1-3-보호기-글리세롤을 제조하는 과정; (b) 1-R1-3-보호기-글리세롤의 2번 위치에 R2기를 도입하여 1-R1-2-R2-3-보호기-글리세롤을 제조하는 과정 및; (c) 1-R1-2-R2-3-보호기-글리세롤의 탈보호 반응 및 아세틸화 반응을 동시에 수행하는 과정을 포함할 수 있고, 필요에 따라 정제하여, 목적하는 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물을 합성할 수 있으며, 다른 방법으로는 포스파티딜콜린을 가아세트산 분해(acetolysis)하여 얻을 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 화학식 1의 화합물의 입체이성질체도 모두 본 발명의 범주 내로 포함할 수 있다.

[30]

[31] 본 발명에 의해 모노아세틸디아실글리세롤 화합물은 IL-4, CXCL-1, TNF- α 또는 MIP-2의 분비를 감소시킬 수 있음이 확인됨으로써, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있음이 확인되었다. 본 발명에서 용어, “만성폐쇄성 폐질환”은 유해한 입자나 가스의 흡입에 의해 폐에 비정상적인 염증 반응이 일어나면서 이로 인해 점차 기류 제한이 진행되어 폐 기능이 저하되고 호흡곤란을 유발하게 되는 호흡기 질환을 말한다. 만성폐쇄성 폐질환의 주된 증상은 만성적인 기침 또는 만성적인 가래(객담)을 비롯하여 호흡곤란 등이 있으며, 베타항진제, 항콜린제, 메틸잔틴제 등의 기관지 확장제 또는 부신피질 호르몬 흡입제 등이 대표적인 치료제로 사용된다. 본 발명에서 상기 만성폐쇄성 폐질환은 바람직하게는 만성 기관지염(chronic bronchitis) 또는 폐기종(emphysema)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 용어, “만성

기관지염(chronic bronchitis)”이란, 2년 연속, 1년에 3개월 이상 가래가 있고 기침이 지속되는 질환을 의미한다. 흡연, 대기오염, 직업적 노출 등의 자극에 의한 기관지 손상이 원인으로 추정되고 있으며, 주요 증상으로는 만성 기침, 가래, 운동시 호흡곤란 등이 있다. 또한, 만성폐쇄성 폐질환의 특징인 급성 악화가 있을 수 있으며, 이때에는 수시간에서 수일 사이 호흡곤란이 빠르게 악화되고 가래의 양이 늘어나거나 가래의 성상이 점액성에서 화농성으로 변하면서 진한 노란색이나 푸르스름한 색을 띄게 되고 점도가 높아져 뱉어내기 힘들어진다. 본 발명에서 용어, “폐기종(emphysema)”이란, 종말 세기관지(terminal bronchiole) 원위부 공기공간(airspace)의 파괴로 인하여 비정상적이며 영구적인 말초 기도 및 폐포의 확장상태를 의미한다. 유해 입자와 가스의 흡입에 의하여 발생하며, 임상적으로 가장 의미있는 위험인자는 흡연으로 알려져 있다. 주요 증상으로는 만성적인 기침과 가래, 호흡곤란 등이 있다. 본 발명에서 용어, “예방”은 상기 조성물의 투여로 만성폐쇄성 폐질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, “치료”는 상기 조성물에 의해 만성폐쇄성 폐질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[32]

[33] IL-4와 같은 사이토카인은 기관지 염증 뿐 만 아니라, 기도 과민성과 밀접한 관계가 있으며, 기도 과민성은 만성 폐쇄성 폐질환의 대표적 위험 인자이다(Chest 2004, 126(6), 1832-9). 따라서, IL-4 발현을 억제시키는 것은 기관지 염증을 억제하고 기도 과민성을 낮추어, 만성 폐쇄성 폐질환의 진행을 억제할 수 있다. TNF- α 와 같은 사이토카인과 MIP-2와 같은 CXC 케모카인은 폐혈관 순환에서부터 폐포로까지의 호중구의 트래피킹(trafficking) 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들은 모두 염증과 관련된 사이토카인 또는 케모카인들로서, 만성폐쇄성 폐질환의 경우, 호중구 수가 증가하며, 상기 사이토카인 또는 케모카인이 분비된다. 이에 기도에 염증이 생기고, 근육벽이 두꺼워지며, 점액 분비가 증가하여 기관지 폐쇄가 나타난다. 기관지가 폐쇄되면 폐포는 확장되고 손상되어 산소와 이산화탄소의 교환능력이 손상을 받게 되고, 호흡부전발생이 높아지게 된다. 특히, 이들 사이토카인 또는 케모카인은 COPD를 앓고 있는 환자들에게서 발현이 증가됨이 밝혀져, 만성폐쇄성 폐질환과의 연관성이 알려졌다. 따라서, 상기 IL-4, CXCL-1, TNF- α 및 MIP-2으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질의 분비를 억제시킴으로써 만성폐쇄성 폐질환 반응을 억제시킬 수 있다.

[34]

[35] 본 발명의 실시예에서는, i)생쥐 T 세포 림프종(mouse T cell lymphoma) 세포인 EL-4 세포에서 포볼미리스테이트 아세테이트(phorbol myristate acetate, PMA)에 의해 유도된 IL-4의 발현을 모노아세틸디아실글리세롤 화합물들에 의한 저해도를 측정 한 결과, EC-18을 포함한 다수의 모노아세틸디아실글리세롤

화합물들의 유의적인 저해활성을 확인하였으며(실시예 2), ii) 천식유발 동물모델에서 기관지 폐포 세척액 내의 CXCL-1, TNF- α 및 MIP-2의 발현량을 측정된 결과, CXCL-1, TNF- α 및 MIP-2 모두 COPD 유발군에서 정상대조군에 비하여 크게 증가된 반면, 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물(EC-18)의 투여군에서는 이들 인자들이 유의성있게 감소하였음을 확인하였다(실시예 6). 이는 상기 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물이 만성폐쇄성 폐질환의 치료에 유효함을 잘 보여주는 것이다.

[36]

[37] 또한, 상기 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물은, 기관지 주위의 염증세포 수를 감소시키거나 CD4⁺ 및 Neutrophils Gr-1⁺ 세포를 감소시킬 수 있음이 본 발명에 의해 확인되었다. CD4⁺ 세포는 면역을 촉진하는 세포로 알려져 있으며, 상기 세포가 과도하게 증가할 경우 자가면역이 발생할 수 있다. 만성폐쇄성 폐질환 환자의 경우 정상인보다 CD4⁺ 세포 수가 현저하게 증가하는 것으로 알려져 있다(Proceedings of the American Thoracic Society, Vol. 4, No. 7 (2007), pp. 512-521.). 한편, 만성폐쇄성 폐질환의 경우, Neutrophils Gr-1⁺ 세포 수 또한 증가한다(Eur Respir J 2011; 38: 285-294.; Nikota et al. Respiratory Research 2011, 12:39). 따라서, 상기 CD4⁺ 및 Neutrophils Gr-1⁺ 세포를 감소시킴으로써 만성폐쇄성 폐질환 반응을 억제시킬 수 있다.

[38]

[39] 본 발명의 일 실시예에서는, 트리판 블루 염색을 통해 폐조직 내 염증세포를 측정하고, 면역 형광염색 및 유세포분석을 통해 CD4⁺ 및 Neutrophils Gr-1⁺ 세포를 관찰한 결과, i) COPD 유발군 염증세포의 수가 현저히 증가됨이 관찰된 반면, 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물(EC-18) 투여군 모두에서, 염증세포의 수가 감소됨을 확인하였고(실시예 4), ii) COPD 유발군에서는 CD4⁺ 및 Neutrophils Gr-1⁺ 세포 수의 증가가 관찰된 반면, 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물(EC-18) 투여군 모두에서 CD4⁺ 및 Neutrophils Gr-1⁺ 세포 수가 현저하게 감소됨을 확인하였다(실시예 5). 이러한 결과 또한 상기 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물이 만성폐쇄성 폐질환의 치료에 유효함을 잘 보여주는 것이다.

[40]

[41] 본 발명의 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 포함하는 약학적 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 100.0 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50.0 중량%, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 20 중량%로 포함될 수 있다.

[42]

[43] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[44]

[45] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으나, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 조성물은 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체이든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 인간, 조류 및 어류 등 어느 개체이나 적용할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의

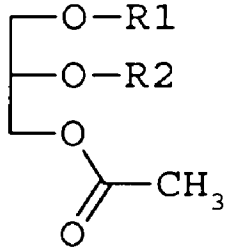
통상적인 방법이라면 제한없이 포함한다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[46]

[47] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[48] [화학식 1]

[49]



[50] 상기 화학식 1로 표시되는 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물에서 R1 및 R2는 각각 탄소수 14 내지 20의 지방산기일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[51]

[52] 구체적으로, 본 발명의 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품 조성물에 포함시킬 수 있다. 상기 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물 및 만성폐쇄성 폐질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 본 발명에서 용어, "개선"은 상기 조성물을 이용하여 만성폐쇄성 폐질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[53]

[54] 본 발명의 조성물을 건강기능식품에 포함하여 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 또는 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 바람직하게는 15 중량부 이하, 보다 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 조절 및 위생을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물을 포함할 수 있는 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 구체적인 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스포, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있고, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함할 수 있으며, 동물을 위한

사료로 이용되는 식품을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물이 음료의 형태로 사용될 경우에는 통상의 음료와 같이 여러 가지 감미제, 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로스과 같은 디사카라이드, 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨과 같은 당알콜일 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 이에 제한되지는 않으나, 본 발명의 조성물 100 ml 당 바람직하게는 약 0.01 내지 0.04g, 보다 바람직하게는 0.02 내지 0.03g일 수 있다. 상기 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제 및 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제일 수 있다. 상기 외에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[55]

[56] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 만성폐쇄성 폐질환의 의심개체에 투여하는 단계를 포함하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 본 발명에서 상기 만성폐쇄성 폐질환의 의심 개체는 만성폐쇄성 폐질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 만성폐쇄성 폐질환 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다. 만성폐쇄성 폐질환에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 만성폐쇄성 폐질환 의심 개체에 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[57]

[58] 본 발명의 치료 방법은 상기 화학식 1의 모노아세틸디아실글리세롤류 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시

사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[59]

발명의 효과

[60] 본 발명의 모노아세틸디아실글리세롤 화합물은, EL-4 세포에서 IL-4의 발현을 억제하고, 동물모델에서 기관지 내 염증세포 침윤을 억제한다. 또한, 본 발명의 화합물들은, CXCL-1, TNF- α 또는 MIP-2의 발현을 억제하는 효과가 우수한 바, 현재 사용되는 만성폐쇄성 폐질환 치료제의 부작용을 극복하고, 독성이 없으면서 치료효과가 탁월한 화합물로서 만성폐쇄성 폐질환 예방, 치료 및 개선용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[61]

발명의 실시를 위한 형태

[62] 이하, 본 발명을 하기 실시예에서 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 이들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[63]

[64] 제조예 1: 표준담배 추출물(Cigarette smoking; CS) 제조

[65] 제조예 1-1: 실험재료

[66] 표준담배 CM7(Coresta Monitoring Cigarette 7, Heir Borgwaldt, Germany) 60 개피 및 이소프로판올(isopropanol), 에탄올(Merck, Germany), n-헵타데케인(n-heptadecane, Sigma-Aldrich, USA)을 사용하고, 실험장비는 자동흡연장치(Automatic smoking machine, ISO 3308 규격품, 모델: RM20, Heir Borgwaldt)를 사용하였다.

[67]

[68] 제조예 1-2: 표준담배연기의 포집

[69] 표준담배 CM7(Coresta Monitoring Cigarette 7, Heir Borgwaldt, Germany) 연기응축물 포집은 ISO3402 규정에 의거하여 흡연실(온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 5\%$)에서 실시하였으며, ISO3308 규정에 의거 RM20(Heir Borgwaldt, Germany) 자동흡연장치(ISO3308 규격품)를 이용하여 흡연부피 $35.0 \pm 0.3 \text{ ml}$, 흡연주기 60 ± 0.5 초, 흡연시간 2.00 ± 0.02 초, 그리고 꽂초길이는 팁 페이퍼(tip paper) 길이+3 mm(overwrap+3 mm)가 되도록 ISO 표준 흡연 방법으로 켈런담배를 연소시키고, 92 mm 캠브리지 필터(cambridge filter, ISO3308 규격품)로 담배연기응축물을 포집하였다(ISO3308, 2000).

[70]

[71] 제조예 1-3: 표준담배 담배연기응축물 추출

[72] 담배연기응축물이 포집된 캠브리지 필터(cambridge filter)를 켈런용 파이프(cigarette holder)에서 분리하여 각각 100 ml 삼각플라스크에 넣고

추출용매 이소프로판올(isopropanol) 50 ml씩을 가하여 잘 흔든 다음, 실온에서 8시간 이상 방치하여 추출하였다. 추출 후 여과하고 감압여과 농축기로 농축하였으며 3개의 삼각플라스크에 들어있는 농축액을 신틸레이션 바이알(scintillation vial)에 모으고 질소 가스를 이용하여 완전 농축하였다

[73]

[74] 제조예 1-4: 총 입자상 물질(TPM) 함량의 계산

[75] 표준담배 주류연 중 TPM의 함량은 하기 수학적 식 1을 이용하여 계산되었다.

[76] [수학적 식 1]

[77]

$$TPM = \frac{W_{FHA} - W_{FHB}}{N}$$

[78] TPM: 총 입자상 분진 물질(mg/cig), W_{FHA} : 흡연 후 Filter Holder의 무게,[79] W_{FHB} : 흡연 전 Filter Holder의 무게, N: 한 Trap당 흡연한 개피 수(cig.)

[80]

[81] 실시예 1: EL-4 세포에서 모노아세틸디아실글리세롤 화합물의 세포독성 평가

[82] 소태아 혈청(Fetal Bovine Serum)을 10% 첨가한 RPMI 배지(Gibco)에, 마우스 T 림프종 세포인 EL-4 세포를 5×10^4 cells/ml의 농도로 현탁하고, 100 μ l씩 96 웰-플레이트에 접종하여 12시간 동안 배양하였다. 다음으로, 하기 표 1에 나타낸 바와 같은 종류 및 농도의 모노아세틸디아실글리세롤 화합물(MADG)로 상기 배양액을 처리한 후, 24시간 동안 추가로 배양하였다. 세포 수를 셀 수 있는 CCK-8(Dojindo사) 키트에서 설명한 대로, CCK-8 용액을 10 μ l 씩 첨가하고, 최소 30분에서 최대 4시간 동안 반응시킨 후, 570 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다. 세포생존율(cell viability)은 하기 수학적 식 1에 따라 계산하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 수학적 식 1에서 음성대조군은 DMSO를 0.2% 처리한 배양액을 나타낸다. 하기 표 1에서, PLAG는 1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-acetylglycerol, POAG는 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-acetylglycerol, PSAG는 1-palmitoyl-2-stearoyl-3-acetylglycerol, PPAG는 1-palmitoyl-2-palmitoyl-3-acetylglycerol, OPAG는 1-oleoyl-2-palmitoyl-3-acetylglycerol, OSAG는 1-oleoyl-2-stearoyl-3-acetylglycerol, LPAG는 1-linoleoyl-2-palmitoyl-3-acetylglycerol, LSAG는 1-linoleoyl-2-stearoyl-3-acetylglycerol을 나타낸다.

[83] [수학적 식 1]

[84]

$$\text{세포 생존율}(\%) = \frac{\text{MADG 처리군의 OD}_{570\text{nm}} \text{ 값}}{\text{음성 대조군의 OD}_{570\text{nm}} \text{ 값}} \times 100$$

[85] 표 1

[Table 1]

| 시 료 | 농도(μg /ml) | EL-4 세포생존율(% 평균 \pm 편차) | 시 료 | 농도(μg /ml) | EL-4 세포생존율(% 평균 \pm 편차) |
|-----------------|---------------------------|------------------------------|-----------|---------------------------|------------------------------|
| 음성 대조군 | 0 | 100.00 \pm 0.58 | 음성 대조군 | 0 | 100.00 \pm 2.20 |
| PLAG(E C-18) | 5 | 101.94 \pm 1.47 | PPAG | 5 | 106.28 \pm 1.39 |
| | 10 | 97.54 \pm 8.05 | | 10 | 105.84 \pm 1.38 |
| | 20 | 91.82 \pm 3.48 | | 20 | 96.59 \pm 0.69 |
| | 50 | 92.67 \pm 3.43 | OPAG | 5 | 98.04 \pm 0.94 |
| | 100 | 95.29 \pm 2.89 | | 10 | 98.91 \pm 1.68 |
| | 200 | 99.74 \pm 6.14 | | 20 | 99.56 \pm 2.86 |
| POAG | 5 | 106.94 \pm 2.69 | OSAG | 5 | 102.62 \pm 2.18 |
| | 10 | 106.39 \pm 1.19 | | 10 | 100.98 \pm 2.37 |
| | 20 | 98.90 \pm 1.16 | | 20 | 100.22 \pm 0.68 |
| PSAG | 5 | 98.46 \pm 0.33 | LPAG | 5 | 99.67 \pm 1.15 |
| | 10 | 100.66 \pm 1.25 | | 10 | 98.91 \pm 0.50 |
| | 20 | 103.30 \pm 2.15 | | 20 | 99.13 \pm 1.18 |
| | | | LSAG | 5 | 103.82 \pm 1.80 |
| | | | | 10 | 101.85 \pm 1.00 |
| | | | | 20 | 98.15 \pm 1.82 |

[86] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 모노아세틸디아실글리세롤 화합물(MADG) 농도에 따른 EL-4 세포의 세포생존율을 관찰한 결과, EC-18은 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았으며, 그 외 화합물들은 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다.

[87]

[88] **실시예 2: 모노아세틸디아실글리세롤 화합물의 EL-4 mRNA 발현 억제**

[89] 실시예 1의 결과를 토대로, 상기 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 투여하고, EL-4 세포에서의 PMA에 의한 IL-4 mRNA의 발현 억제 효과를 측정하였다. 구체적으로, PMA(1 ng/mL)로 유도된 IL-4 mRNA의 발현량을 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time polymerase chain reaction, real-time PCR, quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)을 이용하여 측정하였다. 세포준비는 6 웰-플레이트에 EL-4세포를 1×10^6 cells/well의 농도로 분주하여 12 시간 동안 배양한 후, 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 20

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 1시간 동안 처리하고, PMA를 $1 \text{ ng}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 후, 12시간 동안 배양하였다. Total RNA를 추출하기 위해서, Trizol B(invitrogen사, 미국)을 사용하여 리보핵산(RNA)을 추출하였고, 정량 후, Omniscript RT kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 상보적 핵산(cDNA)를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형과 하기 표 2에 나타낸 IL-4 및 GAPDH 프라이머를 각각 혼합하고, PCR mix(PCR Master Mix, Bioneer, Korea)를 사용하여 94°C 에서 5분간 변성(Denaturation)을 하고, 95°C 에서 30초, 60°C 에서 45초, 72°C 에서 45초로 30 사이클(cycle) 반응시킨 후, 72°C 에서 10분간 효소를 불활성화시키는 PCR을 수행하였다. 이와 같이 측정된 EL-4 세포의 IL-4 mRNA의 발현 억제율을 하기 표 3에 나타내었다. 하기 표 3에서 각 시료 명칭은 표 1에서 설명한 바와 같다.

[90] 표 2

[Table 2]

| 유전자 | 프라이머 | |
|-------|-----------|-------------------------------------|
| IL-4 | sense | 5`- GAA TGT ACC AGG AGC CAT ATC -3` |
| | antisense | 5`- CTC AGT ACT ACG AGT AAT CCA -3` |
| GAPDH | sense | 5`- AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG -3` |
| | antisense | 5`- ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA -3` |

[91]

[92] 표 3

[Table 3]

| 시료 | 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$) | PMA($1 \text{ ng}/\text{mL}$) | IL-4 mRNA의 발현량(PMA 처리군에 대한 상대적 %) | 저해율(%) |
|---------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------|
| 음성 대조군 | 0 | - | 72.13 ± 7.13 | - |
| PMA 처리군 | 0 | + | 100.01 ± 5.91 | - |
| PLAG | 20 | + | 78.17 ± 6.26 | 21.83 |
| POAG | 20 | + | 75.47 ± 13.15 | 24.53 |
| PSAG | 20 | + | 70.49 ± 17.78 | 29.51 |
| PPAG | 20 | + | 48.62 ± 19.38 | 51.38 |
| OPAG | 20 | + | 58.58 ± 21.74 | 41.42 |
| OSAG | 20 | + | 55.84 ± 25.77 | 44.16 |
| LPAG | 20 | + | 61.11 ± 27.49 | 38.89 |
| LSAG | 20 | + | 41.62 ± 17.61 | 58.38 |

[93] 상기 표 3에서 나타난 바와 같이, PMA를 처리한 군에서 IL-4의 발현량이

증가하였고, 이를 기준(100%)으로 볼 때, 모노아세틸디아실글리세롤 화합물들은 20 내지 50%의 발현 억제율을 나타내었다.

[94]

[95] 실시에 3: 폐쇄성 폐질환 모델 및 시료 투여

[96] COPD 생쥐 모델은 8주령 BALB/c 수컷 생쥐를 7% 클로랄 수화물(chloral hydrate)로 마취한 후, LPS 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 표준담배 추출물(Cigarette smoking; CS) 4 mg/ml을 1:1로 혼합한 혼합물(LPS+CS 혼합물)을 주 1회 3주간 코에 100 μl 를 기관내(intratracheal) 흡입시켜 COPD 모델을 만들었다. 즉, LPS+CS 혼합물을 마취를 약간만 시킨 후 움직임이 없을 때 생쥐의 앞니를 고무밴드로 고정시킨 상태에서 코와 입에 각각 50 μl 씩 합 100 μl 를 기관내(intratracheal) 흡입시켰다. EC-18은 농도별로 30 mg/kg 와 60 mg/kg을 0.5% CMC(carboxmethylcellulose sodium)에 녹여, PS+CS 혼합물 100 μl 를 기관내(intratracheal) 흡입하기 1시간 전에 경구투여하였다. 실험군은 (i) 아무런 처리를 하지 않은 정상군 (Intact), (ii) LPS+CS를 처리한 대조군 (COPD-control), (iii) LPS+CS를 처리 1시간 전 EC-18을 30 mg/kg 경구투여한 실험군, (iv) LPS+CS 혼합물의 처리 1시간 전 EC-18을 60 mg/kg 경구투여한 실험군으로 나누었다. 실험 종료 후 각 군 생쥐의 혈액, 폐포세척액 및 폐조직을 분리하였다.

[97]

[98] 실시에 4: 기관지 폐포세척액(BAL fluid; BALF) 분비 및 총세포수 측정

[99] 혈액 채혈 후 해부하여 폐포세척액(BALF)으로부터 세포를 분리하기 위해 FBS-free/DMEM 배양액 1 ml을 넣은 주사기를 기관지(trachea)에 주입시키고 끈으로 묶어 고정한 후, 3회 순환 시켜 분리하여 ACK 용액을 37°C에서 5분 동안 처리하여 적혈구를 용해시키고, 다시 FBS-free/DMEM 배양액으로 세척한 후 0.04% 트리판 블루(trypan blue)로 염색한 후 총 세포 수를 측정하였고, 그 결과는 하기 표 4와 같았다.

[100] 표 4

[Table 4]

| Group | Inflammatory cell count | | | |
|---------|-------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| | Total cell (10^6) | % inhibition | Neutrophil | % inhibition |
| NC | 20.1±4.41 | - | 0.5±0.12 | - |
| COPD | 95.4±16.99 [#] | - | 202.8±24.48 [#] | - |
| EC18-30 | 81.0±12.14 | 15.1 | 196.9±31.61 | 3 |
| EC18-60 | 52.8±10.41 [*] | 44.8 | 116.8±37.43 [*] | 42 |

[101] 그 결과 상기 표 4와 같이, 만성폐쇄성 폐질환(COPD)에 있어 폐 염증은 중요한 특징으로, 염증세포 가운데 호중구 수의 증가가 관찰되었다. COPD 유발군은 정상대조군에 비하여 기관지 폐포세척액 내 총 염증세포 수의 증가가

관찰되었으며, 또한 염증세포 가운데 호중구의 수가 현저하게 증가하였다. 반면, 약물투여군인 EC-18 30 mg/kg 투여군에서는 총 염증세포수가 15.1% 억제되었으며, 호중구의 수는 큰 변화가 관찰되지 않다. EC-18 60 mg/kg 투여군에서는 총 염증세포가 44.8%(P<0.05) 억제되었으며, 호중구의 수 또한 42%(P<0.05) 억제되었다.

[102]

[103] 실시예 5: 유세포 분석을 통한 CD4⁺ 및 Neutrophils Gr-1⁺ 세포수 측정

[104] 분리한 BAL 세포들을 5×10^5 세포로 조정 한 후, 4°C에서 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)을 실시하였다. 각각에 PE-anti-CD4(553047, BD Pharmingen) 및 PE-anti-Gr-1(553128, BD Pharmingen)을 넣고 30분간 얼음에서 반응시켰다. 반응 후 3회 이상 인산완충 생리식염수로 수세한 후 유세포분석기(flow cytometer)의 Cell Quest 프로그램 (643274, BD Biosciences)을 이용하여 CD4⁺ 그리고 Gr-1⁺Neutrophil⁺ 세포빈도를 백분율(%)로 분석한 후, 총 세포수(total cells)를 적용하여 각 조직에서의 절대 총 세포수(absolute number)를 산출하였다.

[105] 표 5

[Table 5]

| Group | Cell count | | | |
|---------|--|--------------|---|--------------|
| | CD4 ⁺ cell (10 ⁴) | % inhibition | Neutrophil+Gr-1 ⁺ (10 ⁴) | % inhibition |
| NC | 7.5±1.49 | - | 0.4±0.08 | - |
| COPD | 510.1±157.65 | - | 33.9±8.19 | - |
| EC18-30 | 308.2±66.78 | 39.6 | 20.0±6.97 | 40.9 |
| EC18-60 | 152.8±66.25 | 70.0 | 12.6±4.93 | 62.7 |

[106] 그 결과 상기 표 5와 같이, COPD 유발군은 CD4⁺ 및 Neutrophils+Gr-1⁺ 세포수가 정상대조군에 비하여 모두 크게 증가하였다. 반면, EC-18 30 mg/kg 투여군에서는 COPD 유발군에 비교하여 CD4⁺ 세포수가 39.6%, Neutrophils+Gr-1⁺ 세포수가 40.9%(P<0.05) 억제되었으며, 60 mg/kg 투여군에서는 CD4⁺ 세포수가 70.0%, Neutrophils+Gr-1⁺ 세포수가 62.7%(P<0.05) 억제되었다.

[107]

[108] 실시예 6: ELISA법에 의한 폐포세척액 내의 CXCL-1, TNF- α 및 MIP-2의 발현량 측정

[109] 생쥐에서 분리한 폐포세척액에서 CXCL-1, TNF- α 및 MIP-2 수준을 enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)로 측정하였다. CXCL-1, TNF- α 및 MIP-2의 각 항체(antibody)를 코팅(coating) 완충용액(291195, R&D System)에 희석하여 microwell에 코팅(coating)한 후 4°C에서 overnight하였다. 각 well을 3회

워싱(washing) 완충용액으로 세척한 후에 혈청(10배 희석)을 100 μ l씩 분주하였다. 1시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 워싱(washing) 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated (DY998, R&D System) 100 μ l를 처리하고, 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암실에서 30분간 방치한 후, 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader(Emax, Molecular Devices) 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 발현 억제율을 계산한 결과는 하기 표 6과 같았다.

[110] 표 6

[Table 6]

| Group | CXCL-1 (pg/mL) | % inhibition |
|---------|----------------|--------------|
| NC | 71.9±15.93 | - |
| COPD | 312.6±63.16 | - |
| EC18-30 | 264.3±79.77 | 15.4 |
| EC18-60 | 142.9±26.99 | 54.3 |

[111] 상기 표 6에 나타난 바와 같이, COPD 유발군은 기관지폐포 세척액내 CXCL-1의 생성이 정상대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 하지만, 약물투여군인 EC-18 투여군은 COPD 유발군에 비교하여, 30 mg/kg 투여군에서는 15.4%, 60 mg/kg 투여군에서는 54.3%(P<0.01) 억제되었다.

[112] 표 7

[Table 7]

| Group | TNF- α (pg/mL) | % inhibition |
|---------|-----------------------|--------------|
| NC | 1.5±0.34 | - |
| COPD | 35.0±9.68 | - |
| EC18-30 | 22.4±13.98 | 36.0 |
| EC18-60 | 13.4±5.33 | 61.8 |

[113] 또한, 상기 표 7에 나타난 바와 같이, COPD 유발군은 기관지폐포 세척액내 TNF- α 의 생성이 정상대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 하지만, 약물투여군인 EC-18 투여군은 COPD 유발군에 비교하여, 30 mg/kg 투여군에서는 36.0%, 60 mg/kg 투여군에서는 61.8%(P<0.05) 억제되었다.

[114] 표 8

[Table 8]

| Group | MIP-2 (pg/mL) | % inhibition |
|---------|---------------|--------------|
| NC | 12.0±1.75 | - |
| COPD | 48.7±15.02 | - |
| EC18-30 | 28.9±5.72 | 40.6 |
| EC18-60 | 17.6±4.07 | 63.8 |

[115] 또한, 상기 표 8에 나타난 바와 같이, COPD 유발군은 기관지폐포 세척액내 MIP-2의 생성이 정상대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 하지만, 약물투여군인 EC-18 투여군은 COPD 유발군에 비교하여, 30 mg/kg 투여군에서는 40.6%, 60 mg/kg 투여군에서는 63.8%($P<0.05$) 억제되었다.

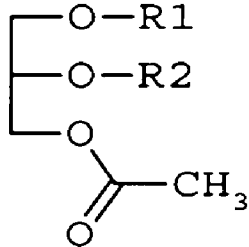
[116]

[117] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]

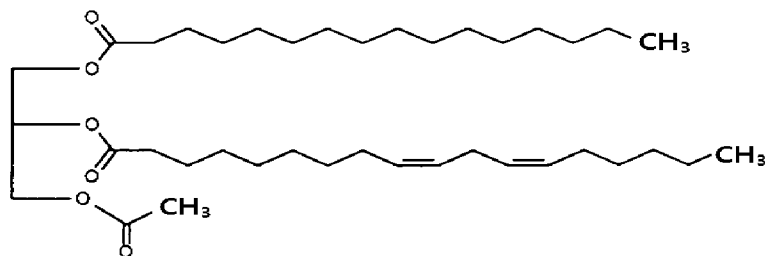


[청구항 2] 상기 식에서 R1 및 R2는 각각 탄소수 14 내지 20의 지방산기이다. 제1항에 있어서, 상기 R1 및 R2는 각각 팔미토일(palmitoyl), 올레오일(oleoyl), 리놀레오일(linoleoyl), 리놀레노일(linolenoyl), 스테아로일(stearoyl), 미리스토일(myristoyl), 아라키도노일(arachidonoyl)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 R1 및 R2의 조합(R1/R2)은 올레오일/팔미토일, 팔미토일/올레오일, 팔미토일/리놀레오일, 팔미토일/리놀레노일, 팔미토일/아라키도노일, 팔미토일/스테아로일, 팔미토일/팔미토일, 올레오일/스테아로일, 리놀레오일/팔미토일, 리놀레오일/스테아로일, 스테아로일/리놀레오일, 스테아로일/올레오일, 미리스토일/리놀레오일, 미리스토일/올레오일로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 모노아세틸디아실글리세롤 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것인 조성물.

[화학식 2]



[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 모노아세틸디아실글리세롤 화합물은 녹용으로부터 분리된 것인 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 만성폐쇄성 폐질환은 만성 기관지염 또는

폐기종(Emphysema)인 것인 조성물.

[청구항 7]

제1항에 있어서, 상기 모노아세틸디아실글리세롤 화합물은 IL-4, CXCL-1, TNF- α 및 MIP-2 수준으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질의 분비를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

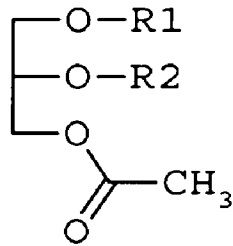
[청구항 8]

제1항에 있어서, 상기 모노아세틸디아실글리세롤 화합물은, 기관지 또는 혈관 주위의 염증세포 수를 감소시키거나 CD4⁺ 또는 Neutrophils⁺Gr-1⁺ 세포수를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 9]

제1항에 있어서, 상기 조성물은 화학식 1로 표시되는 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 0.001 내지 50 중량%로 함유하는 것인 조성물.

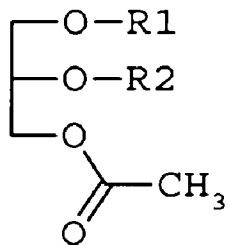
[화학식 1]



[청구항 10]

상기 식에서 R1 및 R2는 각각 탄소수 14 내지 20의 지방산기이다. 하기 화학식 1로 표시되는 모노아세틸디아실글리세롤 화합물을 유효성분으로 함유하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



[청구항 11]

상기 식에서 R1 및 R2는 각각 탄소수 14 내지 20의 지방산기이다. 제10항에 있어서, 상기 R1 및 R2는 각각 팔미토일(palmitoyl), 올레오일(oleoyl), 리놀레오일(linoleoyl), 리놀레노일(linolenoyl), 스테아로일(stearoyl), 미리스토일(myristoyl), 아라키도노일(arachidonoyl)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[청구항 12]

제10항에 있어서, 상기 R1 및 R2의 조합(R1/R2)은 올레오일/팔미토일, 팔미토일/올레오일, 팔미토일/리놀레오일,

팔미토일/리놀레노일, 팔미토일/아라키도노일,
팔미토일/스테아로일, 팔미토일/팔미토일, 올레오일/스테아로일,
리놀레오일/팔미토일, 리놀레오일/스테아로일,
스테아로일/리놀레오일, 스테아로일/올레오일,
미리스토일/리놀레오일, 미리스토일/올레오일로 구성되는
군으로부터 선택되는 것인 조성물.

[청구항 13]

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 비인간 개체에
투여하는 단계를 포함하는, 만성폐쇄성 폐질환의 예방 또는
치료방법.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/007661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/22(2006.01)i, A61K 31/20(2006.01)i, A61P 11/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/22; A61P 25/00; A61K 35/32; A61K 38/20; A61K 31/20; A61P 11/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: monoacylglyceride, EC-18, deer antlers, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), health functional food

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | KR 10-2006-0047447 A (KIM, Sang Hee) 18 May 2006 See abstract, claims 1-2, 4, 6, 12-13, pages 7, 9. | 1-13 |
| A | US 2010-0010087 A1 (HONG, J. J.) 14 January 2010 See abstract, claims 1-16, paragraphs [0036], [0049]. | 1-13 |
| A | KR 10-2005-0103259 A (KIM, Sang Hee) 27 October 2005 See abstract, claims 1-10, pages 5-6. | 1-13 |
| A | KR 10-2000-0071887 A (JEON, Kil Ja et al.) 25 November 2000 See abstract, claim 1. | 1-13 |
| PX | SHIN, I.-S. et al., "EC-18, a synthetic monoacylglyceride (1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-acetylglycerol), attenuates the asthmatic response in an aluminum hydroxide/ovalbumin-induced model of asthma", International Immunopharmacology, 21 November 2013(Published online), vol. 18, pp. 116-123 See abstract, pages 120, 122. | 1-13 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family


Date of the actual completion of the international search

17 DECEMBER 2014 (17.12.2014)

Date of mailing of the international search report

17 DECEMBER 2014 (17.12.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR


 Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/007661

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member | Publication date | | |
|--|------------------|----------------------|------------------|-------------------|------------|
| KR 10-2006-0047447 A | 18/05/2006 | CA 2562897 C | 15/03/2011 | | |
| | | CN 1946392 A | 11/04/2007 | | |
| | | CN 1946392 B | 29/12/2010 | | |
| | | EP 1740169 A1 | 10/01/2007 | | |
| | | EP 1740169 B1 | 05/09/2012 | | |
| | | JP 2007-534681 A | 29/11/2007 | | |
| | | JP 4892473 B2 | 07/03/2012 | | |
| | | KR 10-0767701 B1 | 18/10/2007 | | |
| | | KR 10-0885679 B1 | 25/02/2009 | | |
| | | KR 10-2006-0122795 A | 30/11/2006 | | |
| | | US 2008-0200543 A1 | 21/08/2008 | | |
| | | US 2010-0137435 A1 | 03/06/2010 | | |
| | | US 7662853 B2 | 16/02/2010 | | |
| | | WO 2005-112912 A1 | 01/12/2005 | | |
| | | US 2010-0010087 A1 | 14/01/2010 | WO 2010-006261 A1 | 14/01/2010 |
| | | KR 10-2005-0103259 A | 27/10/2005 | NONE | |
| KR 10-2000-0071887 A | 25/11/2000 | EP 1061932 A1 | 27/12/2000 | | |
| | | EP 1061932 B1 | 25/01/2006 | | |
| | | KR 10-0283010 B1 | 02/04/2001 | | |
| | | KR 10-0291743 B1 | 15/05/2001 | | |
| | | KR 10-1999-0062375 A | 26/07/1999 | | |
| | | WO 99-26640 A1 | 03/06/1999 | | |

| A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/22(2006.01)i, A61K 31/20(2006.01)i, A61P 11/00(2006.01)i | | |
|---|---|---|
| B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/22; A61P 25/00; A61K 35/32; A61K 38/20; A61K 31/20; A61P 11/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC | | |
| 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 모노아세틸디아실글리세롤, EC-18, 녹용, 만성폐쇄성 폐질환(COPD), 건강기능식품 | | |
| C. 관련 문헌 | | |
| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재 | 관련 청구항 |
| A | KR 10-2006-0047447 A (김상희) 2006.05.18 요약, 청구항 1-2, 4, 6, 12-13, 페이지 7, 9 참조. | 1-13 |
| A | US 2010-0010087 A1 (HONG, J. J.) 2010.01.14 요약, 청구항 1-16, 단락 [0036], [0049] 참조. | 1-13 |
| A | KR 10-2005-0103259 A (김상희) 2005.10.27 요약, 청구항 1-10, 페이지 5-6 참조. | 1-13 |
| A | KR 10-2000-0071887 A (전길자 외) 2000.11.25 요약, 청구항 1 참조. | 1-13 |
| PX | SHIN, I.-S. 외, "EC-18, a synthetic monoacyldiglyceride (1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-acetyl-glycerol), attenuates the asthmatic response in an aluminum hydroxide/ovalbumin-induced model of asthma", International Immunopharmacology, 2013.11.21(온라인 공개), 18권, 페이지 116-123 요약, 페이지 120, 122 참조. | 1-13 |
| <input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오. | | |
| * 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌 | | |
| 국제조사의 실제 완료일 2014년 12월 17일 (17.12.2014) | 국제조사보고서 발송일 2014년 12월 17일 (17.12.2014) | |
| ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140 | 심사관 최승희 전화번호 +82-42-481-8740 |  |

| 국제조사보고서에서 인용된 특허문헌 | 공개일 | 대응특허문헌 | 공개일 | | |
|-----------------------|------------|----------------------|------------|-------------------|------------|
| KR 10-2006-0047447 A | 2006/05/18 | CA 2562897 C | 2011/03/15 | | |
| | | CN 1946392 A | 2007/04/11 | | |
| | | CN 1946392 B | 2010/12/29 | | |
| | | EP 1740169 A1 | 2007/01/10 | | |
| | | EP 1740169 B1 | 2012/09/05 | | |
| | | JP 2007-534681 A | 2007/11/29 | | |
| | | JP 4892473 B2 | 2012/03/07 | | |
| | | KR 10-0767701 B1 | 2007/10/18 | | |
| | | KR 10-0885679 B1 | 2009/02/25 | | |
| | | KR 10-2006-0122795 A | 2006/11/30 | | |
| | | US 2008-0200543 A1 | 2008/08/21 | | |
| | | US 2010-0137435 A1 | 2010/06/03 | | |
| | | US 7662853 B2 | 2010/02/16 | | |
| | | WO 2005-112912 A1 | 2005/12/01 | | |
| | | US 2010-0010087 A1 | 2010/01/14 | WO 2010-006261 A1 | 2010/01/14 |
| | | KR 10-2005-0103259 A | 2005/10/27 | 없음 | |
| KR 10-2000-0071887 A | 2000/11/25 | EP 1061932 A1 | 2000/12/27 | | |
| | | EP 1061932 B1 | 2006/01/25 | | |
| | | KR 10-0283010 B1 | 2001/04/02 | | |
| | | KR 10-0291743 B1 | 2001/05/15 | | |
| | | KR 10-1999-0062375 A | 1999/07/26 | | |
| | | WO 99-26640 A1 | 1999/06/03 | | |