



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0019387
(43) 공개일자 2023년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 13/12 (2006.01) A61P 9/04 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0074204
(22) 출원일자 2022년06월17일
심사청구일자 2022년06월17일
(30) 우선권주장
1020210100901 2021년07월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
김재형
서울특별시 영등포구 국회대로54길 29-1(영등포동7가)
이상윤
경기도 용인시 수지구 상현로 119-6, 101동 104호(상현동, 상현마을 성우5차아파트)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 호노키올을 포함하는 조성물 및 이의 내피 기능장애 질환의 예방, 개선 및 치료 용도

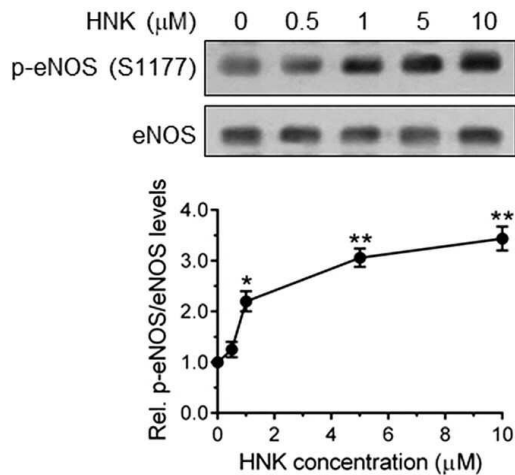
(57) 요약

본 발명은 호노키올(Honokiol), 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물 및 이의 내피 기능장애 질환(Endothelial dysfunction)의 예방, 개선 및 치료 용도에 관한 것이다.

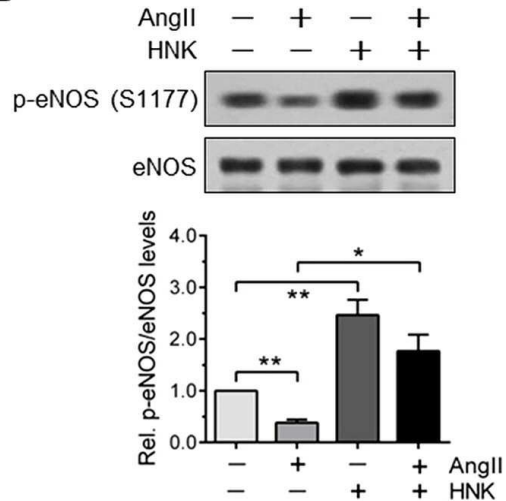
본 발명의 호노키올은 시스타티오닌 γ -리아제(Cystathionine γ -lyase, γ -cystathionase, CSE) 매개 황화수소(Hydrogen sulphide, H_2S) 생성에 관여하여 내피 기능장애 질환 개선 효과를 나타내는바, 고혈압 등을 포함하는 내피 기능장애 질환의 치료에 적용할 수 있다.

대표도 - 도2

A



B



(52) CPC특허분류

A61P 13/12 (2018.01)

A61P 9/04 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

A61P 9/12 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345322130

과제번호 2020R1I1A3074045

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)

연구과제명 Angiotensin II 유도 고혈압 제어관련 Honokiol 작용 기전 규명

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한림대학교

연구기간 2020.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

호노키올(Honokiol), 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 내피 기능장애 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 내피 기능장애 질환은 고혈압(Hypertension), 관상동맥 질환(Coronary artery disease), 만성심부전(Chronic heart failure), 말초동맥 질환(Peripheral artery disease), 신장병(Nephropathy) 및 만성신부전(Chronic renal failure)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 내피 의존성 혈관 확장을 유도하여 내피 기능장애 질환을 예방 또는 치료하는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 시스타티오닌 γ -리아제(Cystathionine γ -lyase)를 상향 조절하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 시스타티오닌 γ -리아제의 아세틸화를 촉진하는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 황화수소(Hydrogen sulphide) 생성을 촉진하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 시스타티오닌 γ -리아제의 분해를 억제하는 것인, 조성물.

청구항 8

제1항의 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 내피 기능장애 질환의 예방 또는 치료 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 내피 기능장애 질환은 고혈압, 관상동맥 질환, 만성심부전, 말초동맥 질환, 신장병 및 만

성신부전으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 10

호노키올, 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 식품적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 내피 기능장애 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 내피 기능장애 질환은 고혈압, 관상동맥 질환, 만성심부전, 말초동맥 질환, 신장병 및 만성신부전으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 12

호노키올, 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 시스타티오닌 γ -리아제의 분해 억제용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물인 것인, 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 조성물은 내피 기능장애 질환을 예방 또는 치료하는 것인, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 내피 기능장애 질환은 고혈압, 관상동맥 질환, 만성심부전, 말초동맥 질환, 신장병 및 만성신부전으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 호노키올(Honokiol), 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물 및 이의 내피 기능장애 질환(Endothelial dysfunction)의 예방, 개선 및 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 내피 기능장애 질환(Endothelial dysfunction)은 혈관 내피세포가 정상적인 기능을 수행하지 못하는 것으로서, 고혈압(Hypertension), 관상동맥 질환(Coronary artery disease), 만성심부전(Chronic heart failure), 말초동맥 질환(Peripheral artery disease), 신장병(Nephropathy), 및 만성신부전(Chronic renal failure), 당뇨병의 혈관 합병증 및 만성 질환의 심혈관 합병증을 포함하는 많은 심혈관 질환 및 관련 장애의 흔한 초기 특징이다.

[0004] 정상적인 상태에서, 내피(본질적으로 전체 혈관계의 안벽에 붙은 세포의 단일 층)는 혈관수축과 혈관 확장 간의 균형을 조절한다. 이는 또한 항응고 및 항혈소관 특성을 발휘하고 혈류와 나머지 신체 간의 물리적 장벽을 제공하여, 세포 수송 및 체액의 조직으로의 통과 모두를 조절한다.

[0005] 내피 기능장애 질환의 특징은 내피 의존적 혈관 확장의 손상이며, 이에 따른 임상적인 영향은 상당하다. 내피

기능장애 질환은 동맥벽의 손상을 초래하고, 검출가능한 죽상경화판의 존재 이전에 발생하여, 죽상동맥경화증에 대한 초기 표지로서 인식된다(Davignon, 2004). 상기에서 주목된 바와 같이, 내피 기능장애 질환은 혈관 평활근 세포(vascular smooth muscle cell, VSMC)의 수축을 초래하여, 혈관 수축과 고혈압을 초래한다. 또한, 내피 기능장애 질환은 혈관 수술 후 재협착 및 폐동맥 고혈압(Pulmonary arterial Hypertension, PAH)을 포함하는, VSMC의 증식을 수반하는 장애와 관련된다.

[0006] 많은 형태의 심혈관 질환을 초래하는 근본적인 결함인 죽상동맥경화증은, 동맥의 내층(내피)에 대한 물리적 결함 또는 손상이, 내피 기능장애 질환 및 혈관 평활근 세포의 증식을 수반하는 염증성 반응 및 백혈구의 이환 영역으로의 침투를 일으킬 때 발생한다. 결국, 죽상경화판으로 알려진 합병 병변이 형성될 수 있다. 이러한 판(plaque)은 콜레스테롤-함유 지질단백질 및 다른 물질의 침착물과 결합된 상기 언급된 세포를 포함한다. 이들 판은 적당한 혈액 순환을 직접적으로 방해하거나 또는 파열하여 심장마비, 뇌졸중 또는 다른 허혈 사례를 재촉하는 혈전(혈병)을 만들어 낼 수 있다(Hansson et al., 2006).

[0008] 한편, 호노키올(Honokiol, HNK)은 목련(*Magnolia officinalis*)의 페놀 추출물에서 분리된 화합물[2-(4-hydroxy-3-prop-2-enyl-phenyl)-4-prop-2-enyl-phenol]로, 산화 및 염증 반응 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한, HNK은 미토콘드리아의 시르투인-3(sirtuin-3, SIRT3)을 활성화하여 심장 비대와 같은 심혈관 질환을 예방하는 파이토케미컬 역할을 하는 것으로도 알려져 있다. 그러나, HNK이 CSE 매개 H₂S 생성에 관여하는지에 대해서는 명확히 알려진 바 없다.

[0010] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 HNK이 시스타티오닌 γ -리아제(Cystathionine γ -lyase, γ -cystathionase, CSE) 수준 및 아세틸화를 촉진하여 CSE 매개 황화수소(Hydrogen sulphide, H₂S) 생성에 관여함을 확인함으로써, HNK의 내피 기능장애 질환 개선 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 호노키올(Honokiol), 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 내피 기능장애 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 하나의 목적은 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 내피 기능장애 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 호노키올, 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 식품적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 내피 기능장애 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 호노키올, 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 시스타티오닌 γ -리아제(Cystathionine γ -lyase)의 분해 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0019] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 호노키올(Honokiol, HNK), 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 내피 기능장애 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

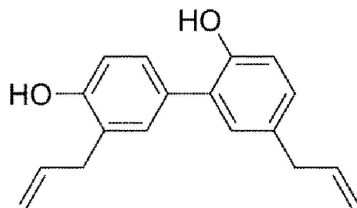
[0021] 본 발명에 있어서, 용어 "내피 기능장애 질환(Endothelial dysfunction)"은 혈관 내피세포가 정상적인 기능을 수행하지 못하는, 혈관 내피의 기능장애를 의미한다. 본 발명에 있어서, 내피 기능장애 질환의 특징은 내피 의존적 혈관 확장의 손상일 수 있다.

[0022] 상기 내피 기능장애 질환은 일 예로, 고혈압(Hypertension), 관상동맥 질환(Coronary artery disease), 만성심부전(Chronic heart failure), 말초동맥 질환(Peripheral artery disease), 신장병(Nephropathy) 및 만성신부전(Chronic renal failure) 등과 같은 질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명에 있어서, 용어 "고혈압(Hypertension)"은 뇌졸중 및 심부전을 비롯한 심혈관 질환의 주요 원인 질환이다. 동맥혈관의 확장과 수축은 혈압을 조절하는 중요한 인자이며, 고혈압은 동맥혈관의 수축으로 인해 혈압이 상승하여 발병될 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 용어 "호노키올(Honokiol, HNK)"은 목련(*Magnolia officinalis*)의 페놀 추출물에서 분리된 화합물[2-(4-hydroxy-3-prop-2-enyl-phenyl)-4-prop-2-enyl-phenol]로, 산화 및 염증 반응 억제 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한, HNK는 미토콘드리아의 시르투인-3(sirtuin-3, SIRT3)을 활성화하여 심장 비대와 같은 심혈관 질환을 예방하는 파이토크미컬 역할을 하는 것으로도 알려져 있다. 상기 HNK는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0026] [화학식 1]



[0029] 본 발명의 조성물은 호노키올 뿐만 아니라 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 모두 포함할 수 있다.

[0030] 상기 "유도체"는 화합물의 구조 일부를 다른 원자나 원자단으로 치환하여 얻어지는 화합물을 의미한다.

[0031] 상기 "입체이성질체"는 동일한 화학구조를 가지고 있고, 구성하는 원자 간의 결합 순서도 동일하지만 삼차원 구조는 서로 다른 화합물을 의미한다.

[0033] 본 발명의 조성물은 염, 특히 약학적으로 허용 가능한 염의 형태를 포함할 수 있다. 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염과 같이, 당 업계에서 통상적으로 사용되는 염을 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"이란 개체에게 비교적 비독성이고 무해한 유효 작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 본 발명 조성물의 이로인 효능을 저하시키지 않는 상기 조성물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0034] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0035] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카

본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

- [0036] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘 염을 제조하는 것이 적합하나 이들에 제한되는 것은 아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 조성물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼륨 및 칼슘 염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.
- [0039] 본 발명에서는 HNK이 시스타티오닌 γ -리아제(Cystathionine γ -lyase, γ -cystathionase, CSE) 수준 및 아세틸화를 촉진하여 CSE 매개 황화수소(Hydrogen sulphide, H_2S) 생성에 관여함을 확인함으로써, HNK의 내피 기능장애 질환 개선 효과를 최초로 규명하였다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 시스타티오닌 γ -리아제는 CSE 또는 CSE 단백질과 혼용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 조성물은 내피(내피세포) 의존성 혈관 확장을 유도하여 내피 기능장애 질환을 예방 또는 치료하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 일 예로, 상기 내피 의존성 혈관 확장은 본 발명 조성물의 CSE 단백질 상향 조절 효과에 의해 달성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에서, 인간 대동맥 내피 세포(Human aortic endothelial cells, HAECs) 및 실시예 1-1의 4개 마우스 군[AngII와 HNK이 동시 투여된 마우스(AngII+HNK 군), HNK만 투여된 마우스(HNK 군), AngII와 인산완충식염수가 동시 투여된 마우스(AngII 군), 인산완충식염수가 투여된(미처리) 대조군 마우스(Control 군)]에서 분리된 대동맥에서 AngII 군은 CSE 단백질 수준이 감소되었으나, HNK을 처리한 군에서는 AngII에 의한 CSE 하향 조절이 억제되어 CSE 단백질 수준이 증가되었다(도 4A-B). 또한, 상기 내인성 CSE 단백질 수준(도 4A) 및 CSE-Myc에 의해 발현되는 CSE 단백질 수준 모두 HNK 처리시에 AngII에 의한 CSE 하향 조절이 억제되어 증가하였다(도 4F).
- [0046] 이로부터, HNK이 단백질 수준에서 CSE를 상향 조절함을 확인하였다.
- [0048] 다른 일 예로, 상기 내피 의존성 혈관 확장은 본 발명 조성물의 CSE 단백질 아세틸화 촉진 효과에 의해 달성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에서, HAECs에서 AngII 처리는 CSE 아세틸화 수준을 감소시키나, HNK 처리시 AngII에 의해 감소된 CSE 아세틸화 수준이 유의하게 증가하였다(도 5A-B).
- [0050] 본 발명의 다른 일 구현예에서, HNK이 HDAC6 촉매 활성을 억제하여 CSE 단백질 상향 조절에 기여하는 것임을 확인하였다(도 5E, 도 6A-C).
- [0052] 또 다른 일 예로, 상기 내피 의존성 혈관 확장은 본 발명 조성물의 H_2S 생성 촉진 효과에 의해 달성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0053] 본 발명의 일 구현예에서, HAECs 또는 대동맥에 AngII를 단독 처리한 경우 H_2S 수준이 감소하였으나, HNK 전처

리 후 AngII을 처리한 경우에는 AngII에 의해 감소한 H₂S 수준이 회복되었다(도 3A-B).

- [0055] 또 다른 일 예로, 상기 내피 의존성 혈관 확장은 본 발명 조성물의 CSE 단백질 분해 억제 효과에 의해 달성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명의 일 구현예에서, HNK은 AngII 존재 유무에 관계없이 CSE 단백질의 폴리유비퀴틴화 수준을 감소시켰다(도 8A).
- [0057] 이로부터, HNK이 CSE 단백질 안정성과 아세틸화 수준을 증가시키는 것 외에도, HNK에 의해 유도된 CSE 아세틸화가 UPS 매개 CSE 단백질 분해를 억제함을 알 수 있다.
- [0059] 즉, 본 발명 조성물의 유효성분인 HNK은 HDAC6 매개 CSE 분해를 방해함으로써 다양한 생리적 손상을 회복시키는 데 기여하며, HNK 매개 HDAC6 억제는 아세틸화 의존성 CSE 안정화를 유도함으로써 H₂S 생성을 촉진하여 AngII 유도 내피 기능장애 질환을 개선할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여에 의해 내피 기능장애 질환을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 내피 기능장애 질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0062] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 약학적 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로, 구체적으로는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 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. 경구 투여를 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. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.
- [0066] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용가능한 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 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학적 조성물은 1일 0.0001 내지 500mg/kg으로, 구체적으로는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋을 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기

약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 다양한 포유동물에 다양한 경로로 투여할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한없이 포함하며, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 구체적으로는 경구 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 인간에 적용되는 의약품뿐만 아니라, 동물 의약품의 형태로도 사용될 수 있다. 여기에서, 동물이란 가축 및 반려동물을 포함하는 개념이다.

[0069] 본 발명의 다른 하나의 양태는 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 내피 기능장애 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0070] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0072] 본 발명에 있어서, 상기 내피 기능장애 질환은 일 예로, 고혈압, 관상동맥 질환, 만성심부전, 말초동맥 질환, 신장병 및 만성신부전 등과 같은 질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 본 발명에서 용어, "개체"는 내피 기능장애 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 제외한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 약학 조성물을 내피 기능장애 질환의 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다.

[0076] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 내피 기능장애 질환의 의심 개체에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0078] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0079] 본 발명의 약학 조성물은 내피 기능장애 질환을 예방 또는 치료하는 것을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체에든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 조류 및 어류 등 어느 것이나 사용할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의하여 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 호노키올, 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 식품적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 내피 기능장애 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0082] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0084] 본 발명에 있어서, 상기 내피 기능장애 질환은 일 예로, 고혈압, 관상동맥 질환, 만성심부전, 말초동맥 질환, 신장병 및 만성신부전 등과 같은 질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0086] 본 발명에서 용어, "개선"은 상기 조성물을 이용하여 내피 기능장애 질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0088] 본 발명에 있어서, 상기 식품 조성물은 염, 특히 식품학적으로 허용 가능한 염의 형태를 포함할 수 있으며, 이

에 대한 정의 및 상술은 상기 약학적으로 허용 가능한 염에 대해 기술한 바와 동일하다.

- [0089] 일 예로, 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 식품학적으로 허용가능한 염은 식품학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 유용하다. 하나의 예로, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다. 무기산으로는 염산, 황산, 브롬산, 아황산 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마산, 글루콘산, 메탄술폰산 등을 사용할 수 있다. 또한, 금속염으로는 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 사용할 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [0090] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0091] 본 발명의 식품 조성물에 포함할 수 있는 성분으로는, 필수 성분으로 유효성분을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 식품 조성물에서 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로, 구체적으로는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.
- [0092] 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에서 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함할 수 있다.
- [0093] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0094] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0095] 본 발명에서 상기 건강보조식품은 건강기능식품 및 건강식품 등을 포함할 수 있다.
- [0096] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정 보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0097] 본 발명의 식품 조성물을 포함하는 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.
- [0099] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 호노키올, 이의 유도체, 이의 입체이성질체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, CSE의 분해 억제용 조성물을 제공한다.
- [0100] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0103]

상기 조성물의 CSE 분해 억제 효과는 전술한 바와 같다.

[0105]

본 발명에 있어서, 상기 조성물은 내피 기능장애 질환을 예방, 치료 또는 개선하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0106]

본 발명에 있어서, 상기 내피 기능장애 질환은 일 예로, 고혈압, 관상동맥 질환, 만성심부전, 말초동맥 질환, 신장병 및 만성신부전 등과 같은 질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0108]

본 발명의 호노키올(Honokiol, HNK)은 시스타티오닌 γ -리아제(Cystathionine γ -lyase, γ -cystathionase, CSE) 매개 황화수소(Hydrogen sulphide, H_2S) 생성에 관여하여 내피 기능장애 질환 개선 효과를 나타내며, 고혈압 등을 포함하는 내피 기능장애 질환의 치료에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0110]

도 1은 안지오텐신 II(angiotensin II, AngII) 처리 마우스에 대한 호노키올(Honokiol, HNK)의 항고혈압 및 혈관 이완 효과를 나타낸 도이다. 수축기(A), 이완기(B) 및 평균(C) 혈압의 변화는 AngII 및/또는 HNK 처리 전, 처리 2주 후 또는 4주 후에 측정되었다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. [#]AngII vs control, ^{##}AngII vs AngII + HNK. ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$. (D, E) AngII 및/또는 HNK로 처리한 마우스에서 대동맥을 분리한 다음 와이어 근조영술을 사용하여 혈관 반응성을 측정하였다. 표시된 4개의 마우스 그룹에서 ACh(acetylcholine) (D) 및 SNP(sodium nitroprusside) (E)에 대한 용량 의존적 반응을 모니터링하였다. 마우스당 3-4개의 대동맥 고리가 사용되었다. 그룹 데이터는 GraphPad Prism 7 소프트웨어를 사용하여 4가지 매개변수가 있는 로지스틱 용량-반응 곡선으로 분석되었다. 이완 반응은 비선형 회귀(곡선 적합) 방법으로 준비하고 1 μ mol/L 페닐에프린을 사용하여 사전 구성 후 장력의 백분율로 계산하였다. 표시된 데이터 세트의 통계적 유의성은 최소 제곱 맞춤 및 추가 제곱합 F 테스트를 사용하여 결정되었다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. [#]AngII vs control, ^{##}AngII vs AngII + HNK. ^{***} $P < 0.001$.

도 2는 HNK에 의해 증가된 eNOS(endothelial nitric oxide synthase) 인산화(S1177)를 나타낸 도이다. (A) 인간 대동맥 내피 세포(Human aortic endothelial cells, HAECs)는 12시간 동안 표시된 농도의 HNK로 처리되었다. (B) HAECs는 표시된 조건에 따라 1시간 동안 HNK(5 μ M)로 전처리한 다음 12시간 동안 AngII(100 nM)로 처리하였다. 생성된 세포 용해물을 phospho-eNOS(S1177) 및 eNOS 항체를 사용하여 웨스턴블롯으로 분석하였다. phospho-eNOS의 면역 반응성을 eNOS의 면역 반응성으로 정규화하고 처리되지 않은 대조군과 비교하여 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

도 3은 AngII 유도 황화수소(Hydrogen sulphide, H_2S) 감소에 대한 HNK의 반대 효과를 나타낸 도이다. (A) HAECs(n = 9) 또는 (B) 분리된 마우스 대동맥(n = 6)을 디메틸 설폭사이드(dimethyl sulphoxide, DMSO) 또는 HNK(5 μ mol/L)로 1시간 동안 처리한 다음 AngII(100 nmol/L)의 존재 또는 부재 하에 12시간 동안 배양하였다. H_2S 수준은 NaHS로 얻은 표준 곡선의 선형 범위를 사용하여 계산하고 대조군에 대해 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. ^{**} $P < 0.01$. (C) HEK293 세포를 2일 동안 시스타티오닌 γ -리아제(Cystathionine γ -lyase, γ -cystathionase, CSE) siRNA(siCSE) 또는 대조군 siRNA(siCtrl)로 형질감염시켰다. (D) HEK293 세포를 1일 동안 CSE-Myc 또는 대조군 벡터 플라스미드로 형질감염시켰다. (C,D) H_2S 농도는 (A)와 같은 방법으로 측정하였다. 생성된 세포 용해물은 CSE 및 β -액틴(로딩 대조군) 면역블롯팅을 사용하여 분석되었다. H_2S 수준 및 CSE 단백질 수준은 대조군에 대해 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. ^{**} $P < 0.01$.

도 4는 CSE 단백질 수준에 대한 AngII 및 HNK의 상호 효과를 나타낸 도이다. (A) 1시간 동안 HNK(5 μ mol/L)로 전처리된 HAECs를 표시된 대로 12시간 동안 AngII(100 nmol/L)로 처리하였다. (B) 도 1에 설명된 대로 4주 동안

AngII 및/또는 HNK를 투여한 마우스에서 대동맥 샘플을 분리하고, HAECs(A) 및 대동맥(B) 용해물의 CSE 및 β -액틴(로딩 대조군) 단백질 수준을 검출하였다. (C) AngII 또는 HNK로 처리된 HAECs의 CSE mRNA 수준은 qRT-PCR 분석에 의해 측정하였다. CSE 단백질(A,B) 및 mRNA(C) 수준은 각각 β -액틴 및 GAPDH 수준으로 정규화되었고 처리되지 않은 대조군에 비해 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (D) HAECs 또는 HEK293 세포를 2일 동안 미토콘드리아 시르투인-3(sirtuin-3, SIRT3) siRNA 또는 대조군 siRNA로 형질감염시켰다. (E) SIRT3-FLAG 또는 대조군 벡터 플라스미드를 1일 동안 HEK293 세포에 형질감염시켰다. (F) 1일 동안 CSE-Myc 플라스미드로 형질감염된 HAECs는 HNK(5 μ mol/L, 1h) 전처리 및/또는 AngII(100 nmol/L, 12h)로 처리되었다. (G) HAECs를 DMSO(대조군으로서) 또는 10 μ mol/L MG132로 1시간 동안 전처리한 다음, AngII(100 nmol/L)의 존재 또는 부재 하에 12시간 동안 배양하였다. HAECs(H) 또는 HEK293 세포(I)는 1시간 동안 DMSO 또는 HNK(5 μ mol/L)로 전처리한 후 표시된 시간 동안 10 μ mol/L CHX와 함께 배양하였다. (D-I), 생성된 세포 용해물을 표시된 항체를 이용하여 웨스턴블롯으로 분석하였다. 항-CSE(D,E,G-I) 및 항-Myc(F) 면역 반응성을 β -액틴의 면역 반응성으로 정규화하고 미처리된 대조군(D-G) 또는 각각의 0 시간째 대조군(H,I)과 비교하여 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

도 5는 HNK에 의한 CSE 및 α -튜불린의 아세틸화 수준 증가를 나타낸 도이다. (A), HAECs는 표시된 대로 1시간 동안 HNK(5 μ mol/L)로 전처리한 후 12시간 동안 AngII(100 nmol/L)로 처리하였다. 세포 용해물을 항-CSE 항체로 면역침전(IP)시킨 후, 항-Ace-K 항체 및 항-아세틸화 특이적(K40) α -튜불린 항체(Ace- α -tubulin)를 포함하는 지시된 항체로 IP 산물 및 세포 용해물을 웨스턴블롯하여 분석하였다. (B,C) (A)의 CSE IP 산물의 Ace-K 및 CSE 면역 반응성과 (A)의 세포 용해물의 α -튜불린 면역 반응성으로 정규화된 Ace- α -튜불린 면역 반응성은 미처리된 대조군에 대해 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (D) 대동맥 샘플은 도 4B와 같이 AngII 및/또는 HNK 주입 마우스에서 분리되었다. Ace- α -tubulin 면역 반응성은 (C)에서와 같이 정량화되었다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. *** $P < 0.001$. (E) 표시된 대로 CSE-Myc와 함께 야생형(WT) HDAC6-FLAG 또는 비활성(DC) HDAC6-FLAG로 동시 형질감염된 HEK293 세포에 항-Myc IP를 적용하였다. 세포 용해물 및 IP 생성물은 표시된 항체로 웨스턴블롯하여 분석하였다. Myc IP 산물 및 세포 용해물의 Ace-K 및 Myc 면역 반응성은 각각 CSE-Myc의 면역 반응성과 비교하여 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

도 6은 CSE 상향 조절로 이어지는 HNK에 의한 HDAC6 활성 억제를 나타낸 도이다. HAECs(A) 또는 HEK293 세포(B)를 12시간 동안 표시된 농도의 HNK로 처리하였다. (C) HAECs는 표시된 시간 동안 5 μ mol/L HNK로 처리되었다. (A-C) 생성된 세포 용해물을 표시된 항체로 웨스턴블롯하였다. CSE, Ace- α -tubulin 및/또는 HDAC6의 면역 반응성을 α -튜불린의 면역 반응성으로 정규화하고 미처리 또는 제로 시간 조건과 관련하여 정량화하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. (D) HDAC6 친화성 기질의 HDAC6 결합에 대한 HNK의 효과는 ELISA 기반 EpiQuik HDAC6 분석 키트를 사용하여 모니터링되었다. 시험관 내에서 HNK의 표시된 농도가 없거나 존재하지 않는 상태에서 정제된 HDAC6 단백질을 2시간 동안 배양한 후, 650 nm에서 흡광도를 측정하여 비색 변화를 감지하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (E) 벤조페논 함유 링커를 갖는 비오틴 표지된 합성 HNK(분자량: 1060.28)의 화학 구조. (F) HAECs 용해물은 대조군으로 비오틴 표지 HNK(5 μ mol/L) 또는 비오틴 유사체 단독으로 처리하거나 처리하지 않은 후 12시간 동안 준비한 다음 스트렙타비딘 아가로스(streptavidin agarose) 수지로 풀다운하였다. 세포 용해물 및 생성된 풀다운 샘플은 표시된 항체로 웨스턴블롯하였다. (G) 시험관 내 HDAC6 활성은 형광측정 HDAC6 활성 분석 키트를 사용하여 2 μ mol/L 투바신 또는 표시된 농도의 HNK의 부재 및 존재하에 검출되었다. HDAC6 활성은 HDAC6 단백질 단독 조건과 비교하여 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (H) AngII 처리 HAECs의 세포 용해물과 AngII 주입 마우스의 대동맥 추출물을 각각 도 5A,D에 표시된 대로 준비하였다. β -액틴으로 정규화된 HDAC6 및 CSE의 면역 반응성을 미처리된 대조군과 비교하여 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. ** $P < 0.01$.

도 7은 α -튜불린 아세틸화에 대한 HNK와 튜바스타틴 A(TubaA)의 결합 효과를 나타낸 도이다. (A) HAECs는 표시된 조건에 따라 12시간 동안 TubaA의 존재 하에 HNK 없이 또는 HNK로 처리되었다. 세포 용해물을 표시된 항체로 웨스턴블롯하였다. (B) (A)에서 α -튜불린 면역 반응성으로 정규화된 아세틸화 α -튜불린 면역 반응성은 처리되지 않은 대조군과 비교하여 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. ** $P < 0.01$.

도 8은 K73 잔기에서 CSE의 아세틸화 및 유비퀴틴화에 의한 CSE 분해의 조절을 나타낸 도이다. (A) HEK293 세포를 CSE-Myc 및 HA-유비퀴틴(Ub)으로 동시 형질감염시켰다. 형질감염 1일 후, 세포는 도 4F에 기재된 바와 같이 AngII 및/또는 HNK의 존재 또는 부재 하에 배양하였다. (B) CSE-Myc 야생형(WT) 또는 K73R 돌연변이로 형질감염된 HAECs를 5 μ mol/L HNK 존재 또는 부재 하에서 8시간 동안 배양하였다. (C) HAECs는 HA-Ub와 함께 CSE-Myc WT 또는 K73R 돌연변이로 공동 형질감염되었다. (A-C) 생성된 용해물은 항-Myc IP로 처리되었고 IP 산물 및 세포 용해물은 표시된 항체로 웨스턴블롯하였다. Myc IP 산물의 HA(A) 및 Ace-K(B) 면역 반응성은 미처리된 대조군 및 CSE-Myc WT의 면역 반응성과 비교하여 각각 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. (D) CSE-Myc WT 또는 K73R 돌연변이로 형질감염된 HEK293 세포를 2시간 동안 10 μ mol/L CHX의 존재 또는 부재 하에서 배양하였다. 세포 용해물을 표시된 항체로 웨스턴블롯하였다. 정규화 된 Myc 면역 반응성은 처리되지 않은 CSE-Myc WT의 면역 반응성과 비교하여 정량하였다. 값은 평균 $\pm$ SEM을 나타내었다. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0111] 이하 본 발명을 실시예에 의해 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

실시예 1. 호노키올(Honokiol, HNK)의 안지오텐신 II(angiotensin II, AngII)에 의한 혈관 수축 억제 효과 확인

1-1. 고혈압 유도 마우스 모델에서 AngII에 의한 혈압 상승 억제 확인

[0116] HNK[2-(4-hydroxy-3-prop-2-enyl-phenyl)-4-prop-2-enyl-phenol]가 혈압 상승을 억제하는지의 여부를 평가하기 위해, 마우스에 AngII와 HNK를 동시 투여하고 혈압을 측정하였다.

[0117] 구체적으로, 생후 12주 C57BL/6N 수컷 마우스(오리엔트바이오, 대한민국 성남)를 이소플루란(isoflurane) 용액으로 마취한 후 마우스 등에 피하 이식된 미세삼투압 펌프(Alzet model 1004, Cupertino)를 통해 AngII(Sigma-Aldrich)를 4주 동안 1 mg/kg/day로 주입하여, 마우스에 고혈압을 유도하였다. 대조군 마우스는 펌프 삽입 없이 동일한 수술을 받았다. AngII를 주입하는 동안 마우스에 HNK(#S2310, Selleckchem) 또는 인산완충식염수를 4주 동안 하루에 한 번 2 mg/kg/day로 복강내 주사하였다. HNK은 디메틸 설펡사이드(dimethyl sulphoxide, DMSO)에 용해하여 주사하였다. AngII와 HNK이 동시 투여된 마우스를 AngII+HNK 군, HNK만 투여된 마우스를 HNK 군, AngII와 인산완충식염수가 동시 투여된 마우스를 AngII 군, 인산완충식염수가 투여된(미처리) 대조군 마우스를 Control 군으로 명명하였다.

[0118] 혈압 측정을 위해, 비침습 CODA tail-cuff 혈압 모니터 시스템(Kent Scientific)을 이용하여 AngII 주입 전, 주입 2주 후 및 주입 4주 후에 마우스의 혈압을 측정하였다. 체압 기록 커프를 꼬리에 놓고 37℃로 설정된 플랫폼에서 수축기, 이완기 및 평균 혈압의 변화를 측정하였다. 마우스는 2주 동안 매일 홀더(holder)에서 훈련되었고 조용하고 어두운 환경을 유지하였다.

[0119] 그 결과, 도 1A-C와 같이, 수축기(도 1A), 이완기(도 1B) 및 평균(도 1C) 마우스 꼬리의 혈압은 AngII 주입 2주 후 및 주입 4주 후에 증가한 반면, AngII와 HNK를 동시 투여한 AngII+HNK 군에서는 혈압 상승이 둔화되었다.

1-2. 고혈압 유도 마우스 모델에서 AngII 유도 내피 의존성 혈관 수축 억제 확인

[0122] HNK이 혈관 반응성을 조절할 수 있는지의 여부를 평가하기 위해, 내피 세포에서 산화질소(nitric oxide, NO) 생성을 자극하여 혈관 이완을 유도하는 ACh(acetylcholine)에 대한 용량 의존적 반응을 모니터링하였다. 또한, 대동맥 고리의 내피 독립적 이완을 평가하기 위해 외인성 NO를 제공하는 SNP(sodium nitroprusside)에 대한 용량 의존적 반응을 모니터링하였다.

[0123] 구체적으로, 상기 실시예 1-1의 4개 마우스 군(AngII+HNK 군, HNK 군, AngII 군 및 Control 군)별로 대동맥 고

리(aorta rings)를 분리하고 근조영 측정(myographic measurements)을 수행하였다. 등척성 수축(isometric contractions)은 와이어 myograph 시스템(model 620 DMT, Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark)을 이용하여 측정하였다. 대동맥 고리에 60mmol/L KCl을 주입하고 Krebs 완충액으로 세척한 후 수동 스트레칭을 반복한 뒤 60분 동안 평형을 유지하였다. 혈관은 페닐에프린($1 \mu\text{mol/L}$)으로 15분 동안 미리 수축시킨 다음, 0.1nmol/L ~ $10 \mu\text{mol/L}$ 의 ACh에 대한 용량 의존적 반응을 모니터링하고, 세척 및 재평형 후 동일 용량 범위의 SNP에 대한 용량 의존적 반응을 모니터링하였다.

[0124] 그 결과, ACh는 대조군에서 페닐에프린으로 사전 수축된 대동맥 고리를 용량 의존적으로 이완시켰고, AngII 투여군에서는 ACh에 의한 대동맥 고리 이완이 유의하게 감소되었으며(도 1D), AngII+HNK 군에서는 AngII로 인해 감소된 혈관 이완이 회복되었다(도 1D).

[0125] 반면, ACh의 결과와 달리 SNP는 4개 마우스 군 간에 차이가 없었다(도 1E).

[0126] 이로부터, HNK이 AngII 유도 내피 의존성 혈관 수축을 억제함을 확인하였다.

[0128] 1-3. 세포에서 eNOS 활성화 수준 확인

[0129] 내피 세포에서 eNOS(endothelial nitric oxide synthase)는 인산화되어 활성화된 후 혈관 이완에 관여하는 NO를 생성하므로, HNK이 5' 말단으로부터 1177 번째 아미노산 잔기가 인산화된 eNOS인 phospho-eNOS(Ser1177) 수준에 영향을 미치는지의 여부를 분석하였다.

[0130] 구체적으로, 이전 방법(Chi Z, et al., Pharmacol Res., 2019;146:104281)에 따라 인간 대동맥 내피 세포(Human aortic endothelial cells, HAECs)를 3일 간격으로 계대배양하고, 3~5회 계대배양한 세포를 5×10^4 cells/cm²의 밀도로 배양 접시에 시딩하고 밤새 배양한 후, HNK를 단독 처리 또는 AngII 및 HNK 동시 처리하였다.

[0131] HNK 단독 처리의 경우, 세포에 12시간 동안 0~10 μM 농도의 HNK를 처리하였다.

[0132] AngII 및 HNK 동시 처리의 경우, 세포를 HNK 5 μM 로 1시간 동안 전처리한 후 12시간 동안 AngII 100 nM을 처리하였다.

[0133] 상기와 같이 처리된 세포를 이전 방법(Tran MH, et al., J Cell Mol Med., 2018;22:4117-4129.)에 따라 용해 버퍼로 용해한 후, 세포 용해물을 항-phospho-eNOS 항체(Ser1177, #9571, Cell Signaling Technology) 및 항-eNOS 항체(#32027, Cell Signaling Technology)를 사용한 웨스턴블롯으로 분석하였다. phospho-eNOS의 면역 반응성은 eNOS의 면역 반응성으로 정규화되었고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.

[0134] HNK을 단독 처리한 결과, HNK은 HAECs에서 용량 의존적으로 phospho-eNOS 수준을 증가시켰다(도 2A).

[0135] 또한, AngII는 phospho-eNOS 수준을 하향 조절하였으나, HNK은 AngII에 의한 phospho-eNOS 수준 감소를 회복시켰다(도 2B).

[0136] 이로부터, HNK이 eNOS 활성화에 관여함으로써 혈관 이완에 영향을 줌을 확인하였다.

[0138] 실시예 2. HNK의 AngII에 의해 감소된 황화수소(Hydrogen sulphide, H₂S) 회복 효과 확인

[0140] AngII는 혈관 이완을 유도하는 H₂S 수준을 감소시키므로, HNK이 HAECs 및 마우스 대동맥에서 생성되는 H₂S 수준에 영향을 미치는지의 여부를 분석하였다.

[0141] 구체적으로, HAECs에 HAECs(n = 9) 또는 대조군 마우스로부터 분리된 마우스 대동맥(n = 6)을 HNK 또는 DMSO 5 $\mu\text{mol/L}$ 로 1시간 동안 처리한 다음 AngII 100 nmol/L을 처리 또는 처리하지 않은 조건에서 12시간 동안 배양하였다. H₂S 수준은 이전 방법(Kartha RV, et al., Anal Biochem., 2012;423:102-108.)에 따라 한천 트래핑 방법을 사용하여 결정하였다. 황화아연으로 포획된 H₂S는 화학 반응을 통해 메틸렌 블루로 전환되었다. H₂S 수준은 NaHS로 얻은 표준 곡선의 선형 범위를 사용하여 계산하고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.

- [0142] 그 결과, HAECs 또는 대동맥에 AngII을 단독 처리한 경우 AngII 처리 12시간 후 H₂S 수준이 감소하였으나, HNK 전처리 후 AngII을 처리한 경우에는 AngII에 의해 감소한 H₂S 수준이 회복되었다(도 3A-B).
- [0144] 다음으로, 내피 세포에서 시스타티오닌 γ -리아제(Cystathionine γ -lyase, γ -cystathionase, CSE)에 의해 생성된 H₂S가 혈관 확장을 유도하는 것으로 알려져 있는바, 이를 확인하기 위해 CSE을 코딩하는 CSE 유전자가 녹다운된 세포 또는 CSE 과발현 세포에서 생성되는 H₂S 수준을 측정하였다.
- [0145] 구체적으로, 이전 방법(Chi Z, et al., Pharmacol Res., 2019;146:104281)에 따라 인간 배아 신장 293(human embryonic kidney 293, HEK293) 세포를 배양하였다.
- [0146] 세포에서 CSE 유전자를 녹다운시키기 위해, CSE 유전자를 표적으로 하는 이중 가닥 소형 간섭 RNA(siRNA) (5'-GGUUAUUUAUCCUGGCUGUU-3', 서열번호 1) 또는 대조군 siRNA(5'-UUCUCCGAACGUGUACACGUUU-3', 서열번호 2)를 Opti-MEM I(Thermo Fisher Scientific)에서 Lipofectamine RNAiMAX(Thermo Fisher Scientific)와 혼합하고, 혼합물을 배양된 HEK293 세포에 2일 동안 처리하였다.
- [0147] 세포에서 CSE를 과발현시키기 위해, HEK293 세포를 Lipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 CSE-Myc 플라스미드(#RC231191, OriGene Technologies) 또는 대조군 벡터 플라스미드로 1일 동안 처리하여 형질감염시켰다.
- [0148] CSE 단백질 수준은 상기 실시예 1-3과 동일한 방법으로 항-CSE 항체(#sc-374249, Santa Cruz Biotechnology) 및 대조군으로 항- β -액틴 항체(#sc-1616, Santa Cruz Biotechnology)를 이용한 웨스턴블롯을 수행하여 분석하였다. H₂S 농도는 상기와 동일한 방법으로 측정하였다. H₂S 농도 및 CSE 단백질 수준은 대조군을 기준으로 정량하였다.
- [0149] 그 결과, siRNA 매개 CSE 유전자 녹다운은 CSE 단백질 수준을 약 65% 감소시켰으며, H₂S 농도도 약 60% 감소되었다(도 3C).
- [0150] 또한, CSE-Myc 플라스미드 매개 CSE 과발현은 CSE 단백질 수준을 약 3.0배 증가시켰으며, H₂S 농도도 약 2.3배 증가되었다(도 3D).
- [0151] 이로부터, 세포에서의 CSE 단백질 수준이 H₂S 농도와 관련이 있음을 확인하였다.

[0153] 실시예 3. HNK의 프로테아좀 분해에 대한 CSE의 안정성 향상 효과 확인

[0155] 3-1. 세포 또는 대동맥에서 CSE 단백질 수준 확인

- [0156] 상기 실시예 2의 결과로부터 세포에서의 CSE 단백질 수준이 H₂S 농도와 관련이 있음을 확인함에 따라, HNK이 세포 또는 대동맥에서의 CSE 단백질 수준에 영향을 미치는지의 여부를 분석하였다.
- [0157] 구체적으로, HNK 처리에 따른 세포에서의 CSE 단백질 수준을 분석하기 위해, HAECs를 HNK 또는 DMSO 5 μ mol/L로 1시간 동안 처리한 다음 AngII 100 nmol/L을 처리 또는 처리하지 않은 조건에서 12시간 동안 배양하였다.
- [0158] 또한, HNK 처리에 따른 대동맥에서의 CSE 단백질 수준을 분석하기 위해, 상기 실시예 1-1의 4개 마우스 군(AngII+HNK 군, HNK 군, AngII 군 및 Control 군)으로부터 대동맥을 분리하였다.
- [0159] HAECs 및 대동맥에서의 CSE 단백질 수준을 분석하기 위해, 배양된 HAECs 및 수득한 대동맥을 용해하고, 각 용해물 1.5 mg을 항-CSE 항체 5 μ g과 함께 4시간 동안 4°C에서 배양하였다. 배양 후 형성된 면역 복합체를 30 μ L Protein A/G PLUS-Agarose IP 시약(Santa Cruz Biotechnology)으로 2시간 동안 포획하고 용해 버퍼로 5회 세척한 뒤, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하여 분석하였다. CSE 단백질 수준은 β -액틴 수준으로 정규화되었고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.
- [0160] 그 결과, HAECs 및 실시예 1-1의 4개 마우스 군에서 분리된 대동맥에서 AngII 군은 CSE 단백질 수준이 감소되었

으나, HNK을 처리한 군에서는 AngII에 의한 CSE 하향 조절이 억제되어 CSE 단백질 수준이 증가되었다(도 4A-B).

[0162] **3-2. 세포에서 CSE 유전자의 mRNA 수준 확인**

[0163] HNK이 세포에서의 CSE 유전자의 mRNA 수준에 영향을 미치는지의 여부를 qRT-PCR법으로 분석하였다.

[0164] 구체적으로, RNeasy Mini Kit(Qiagen)를 사용하여 HNK 5 $\mu\text{mol/L}$ 로 1시간 동안 처리한 HAECs 또는 AngII 100 nmol/L로 12시간 동안 처리한 HAECs로부터 총 RNA를 수득 및 정제하고, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix(Toyobo, Osaka, Japan)를 사용하여 수득한 총 RNA 1 μg 로부터 cDNA를 각각 합성하였다. 그런 다음, TOPreal qPCR 2X PreMIX SYBR Green 및 low ROX 시약(Enzynomics, Daejeon, Republic of 한국)을 이용하여 ABI7900 qPCR machine(Applied Biosystems)에서 qRT-PCR을 수행하였다. 이때 사용한 프라이머는 다음과 같다: CSE forward 5'-GGTTTCCTGCCACACTTCCA-3'(서열번호 3) 및 CSE reverse 5'-CATCCAGTGCTGCCACTGCT-3'(서열번호 4); GAPDH forward 5'-AAAATCAAGTGGGCGATGC-3'(서열번호 5) 및 GAPDH reverse 5'-AGGAGGCATTGCTGATGATCT-3'(서열번호 6). 상대적인 mRNA 발현 수준은 GAPDH 수준으로 정규화되었고 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.

[0165] 그 결과, AngII 및 HNK은 CSE 유전자의 mRNA 수준에 대한 영향이 거의 없는 것으로 확인되어, CSE 단백질 수준의 변화가 전사와는 관련이 없음을 확인하였다(도 4C).

[0167] **3-3. 세포에서 미토콘드리아 시르투인-3(sirtuin-3, SIRT3) 단백질 수준 확인**

[0168] HNK은 미토콘드리아의 SIRT3 단백질을 활성화하는 것으로 알려져 있으므로, SIRT3을 코딩하는 *SIRT3* 유전자가 녹다운된 세포 또는 SIRT3 과발현 세포에 HNK을 처리하여 SIRT3이 HNK 매개 CSE 조절에 관여하는지의 여부를 분석하였다.

[0169] 구체적으로, 세포에서 CSE 유전자를 녹다운시키기 위해, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 CSE 유전자를 표적으로 하는 SIRT3 siRNA(5'-CUGUGCCUAGUUGAACGGCAA-3', 서열번호 7) 또는 대조군 siRNA(서열번호 2)를 HAECs 또는 HEK293 세포에 2일 동안 형질감염시켰다.

[0170] 세포에서 SIRT3를 과발현시키기 위해, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 HEK293 세포를 pcDNA3.1-SIRT3-FLAG(#13814, Cambridge) 또는 대조군 벡터 플라스미드로 형질감염시켰다.

[0171] 상기와 같이 제조한 *SIRT3* 유전자가 녹다운된 세포 또는 SIRT3 과발현 세포에 HNK 또는 DMSO 5 $\mu\text{mol/L}$ 를 1시간 동안 처리하였다. CSE 단백질 수준은 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하여 분석하였다. *SIRT3* 유전자 녹다운 및 SIRT3 과발현 여부는 항-SIRT3 항체(#2627, Cell Signaling Technology)를 사용하여 확인하였다. CSE 단백질 수준은 β -액틴 수준으로 정규화되었고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.

[0172] 그 결과, *SIRT3* 유전자가 녹다운된 HAECs 및 HEK293 세포는 HNK 처리 시 CSE 단백질 수준이 대조군 siRNA로 형질전환된 세포와 유사한 수준으로 증가하였다(도 4D).

[0173] 또한, HEK293 세포에서 SIRT3의 과발현은 HNK에 의한 CSE 상향 조절에 큰 영향이 없었다(도 4E).

[0174] 이로부터, HNK의 CSE 상향 조절은 SIRT3를 통해 매개되지 않음을 확인하였다.

[0176] **3-4. CSE를 구성적으로 발현하는 세포에서 CSE 단백질 수준 확인**

[0177] 상기 실시예 3-1의 결과로부터 HNK을 처리한 군에서는 AngII에 의한 CSE 하향 조절이 억제되어 CSE 단백질 수준이 증가한 것을 확인하였으므로, 이러한 내인성 유전자 발현과 무관하게 거대세포바이러스(cytomegalovirus) 프로모터 활성화에 의해 구성적으로 CSE가 발현되는 경우에도 HNK이 세포에서의 CSE 단백질 수준에 영향을 미치는지의 여부를 분석하였다.

[0178] 구체적으로, 세포에서 구성적으로 CSE를 발현시키기 위해, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 HAECs를 CSE-Myc 플라스미드(#RC231191, OriGene Technologies) 또는 대조군 벡터 플라스미드로 형질감염시켰다.

[0179] 상기와 같이 제조한 CSE를 구성적으로 발현하는 세포를 HNK 또는 DMSO 5 $\mu\text{mol/L}$ 로 1시간 동안 처리한 다음

AngII 100 nmol/L을 처리 또는 처리하지 않은 조건에서 12시간 동안 배양하였다. CSE 단백질 수준을 분석하기 위해, 배양된 세포를 용해하고, 세포 용해물 1.5 mg을 각각 항-CSE 항체 및 항-Myc 마우스 단일클론 항체(#sc-40, Santa Cruz Biotechnology) 5 µg과 함께 4시간 동안 4℃에서 배양하였다. 배양 후 형성된 면역 복합체를 30 µL Protein A/G PLUS-Agarose IP 시약(Santa Cruz Biotechnology)으로 2시간 동안 포획하고 용해 버퍼로 5 회 세척한 뒤, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하여 분석하였다. 형질전환 여부는 항-Myc 결과로부터 확인하였다. CSE 단백질 수준은 β-액틴 수준으로 정규화되었고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.

[0180] 그 결과, 내인성 CSE 단백질 수준(도 4A) 및 CSE-Myc에 의해 발현되는 CSE 단백질 수준 모두 HNK 처리시에 AngII에 의한 CSE 하향 조절이 억제되어 증가하였다(도 4F).

[0181] 이로부터, HNK이 단백질 수준에서 CSE를 상향 조절함을 확인하였다.

[0183] 3-5. CSE 단백질의 안정성에 대한 영향 확인

[0184] 프로테아좀 억제제가 처리된 세포에 AngII을 처리한 후 CSE 단백질 수준을 확인하였다.

[0185] 구체적으로, HAECs를 프로테아좀 억제제인 MG132 또는 DMSO 10 µmol/L로 1시간 동안 전처리한 다음, AngII 100 nmol/L을 처리 또는 처리하지 않은 조건에서 12시간 동안 배양하였다. CSE 단백질 수준은 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하여 분석하였다. CSE 단백질 수준은 β-액틴 수준으로 정규화되었고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.

[0186] 그 결과, HAECs에 프로테아좀 억제제를 전처리시 AngII 매개 CSE 하향 조절이 억제되어 MG132 단독 처리만으로도 CSE 단백질 수준이 상향 조절됨을 확인하였다(도 4G).

[0188] 다음으로, HNK이 CSE 단백질 안정성에 미치는 영향을 표준 CHX(cycloheximide) 추적법으로 분석하였다.

[0189] 구체적으로, HAECs 또는 HEK293 세포를 1시간 동안 HNK 또는 DMSO 5 µmol/L로 전처리한 후 단백질 합성 억제제인 CHX 10 µmol/L와 함께 0~4 시간 동안 배양하였다. CSE 단백질 수준은 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하여 분석하였다. CSE 단백질 수준은 β-액틴 수준으로 정규화되었고 0 시간째의 CSE 단백질 수준을 기준으로 정량하였다.

[0190] 그 결과, HAECs에 단백질 합성 억제제만을 처리할 경우 CSE 단백질 수준은 급격히 감소하였으나, HNK을 전처리한 HAECs에서는 CSE 단백질 수준이 유의미하게 높았다(도 4H).

[0191] 또한, HNK을 전처리한 HEK293 세포에서 시간 의존적으로 CSE 분해가 지연됨을 확인하였다(도 4I).

[0192] 이로부터, CSE가 HNK에 의해 약화될 수 있는 AngII 자극 및 정상 상태 조건에서 프로테아좀 분해를 위한 단백질 기질을 구성함을 확인하였다.

[0194] 실시예 4. HNK 매개 HDAC6 억제에 따른 CSE 단백질 상향 조절 효과 확인

[0196] 4-1. 세포에서 CSE 단백질 아세틸화 수준 및 α-튜불린 아세틸화 수준 확인

[0197] CSE의 HDAC6 매개 탈아세틸화가 프로테아좀 분해를 촉진하므로, HNK이 HDAC6을 통해 CSE 아세틸화 수준을 조절할 수 있는지의 여부를 분석하였다.

[0198] 구체적으로, HAECs를 HNK 또는 DMSO 5 µmol/L로 1시간 동안 처리한 다음 AngII 100 nmol/L을 처리 또는 처리하지 않은 조건에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 용해하고, 세포 용해물을 항-CSE 항체로 처리하여 면역침전(Immunoprecipitation, IP)시켜 침전물(CSE IP 산물, IP: CSE)을 생성하였다. CSE IP 산물 및 세포 용해물에 대해 항-아세틸화 라이신 항체[Ace-K(Ace-Lys), #9441, Cell Signaling Technology] 및 항-CSE 항체(#12217-1-AP, ProteinTech)를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0199] 또한, 이전 방법(Hubbert C, et al., Nature., 2002;417:455-458)에 따라 항-아세틸화 특이적(K40) α-튜불린

항체(Ace- α -tubulin, #12152, Cell Signaling Technology) 및 항- α -튜불린 항체(#T5168, Sigma-Aldrich)를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하여, HDAC6의 기질인 α -튜불린의 아세틸화 수준을 평가하였다.

- [0200] CSE IP 산물에서의 CSE 아세틸화 수준 및 세포 용해물에서의 α -튜불린 아세틸화 수준은 각각 CSE 면역 반응성과 아세틸화 특이적 α -튜불린 면역 반응성으로 정규화되었고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였으며, 그 결과를 도 5B-C에 나타내었다.
- [0201] 또한, 상기 실시예 1-1의 4개 마우스 군(AngII+HNK 군, HNK 군, AngII 군 및 Control 군)으로부터 분리한 대동맥에서의 α -튜불린 아세틸화 수준도 상기와 동일한 방법으로 아세틸화 특이적 α -튜불린 면역 반응성으로 정규화되었고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.
- [0202] 그 결과, HAECs에서 AngII 처리는 CSE 아세틸화 수준을 감소시키나, HNK 처리시 AngII에 의해 감소된 CSE 아세틸화 수준이 유의하게 증가하였다(도 5A-B).
- [0203] 이와 유사하게 HAECs에서 α -튜불린 아세틸화 수준은 AngII 처리시 감소하였으나, HNK 처리시 AngII에 의해 감소된 α -튜불린 아세틸화 수준이 유의하게 증가하였다(도 5A-C).
- [0204] 또한, 대동맥에서도 α -튜불린 아세틸화 수준이 HAECs에서와 동일한 경향을 나타내었다(도 5D).

[0206] 4-2. 야생형 HDAC6 또는 탈아세틸라제 결핍 HDAC6 돌연변이를 발현하는 세포에서 CSE 아세틸화 수준 확인

[0207] 야생형 HDAC6 또는 탈아세틸라제 결핍 HDAC6 돌연변이를 발현하는 세포를 제조하기 위해, 상기 실시예 3-4와 동일한 방법으로 HEK293 세포를 CSE-Myc 플라스미드 및 야생형(WT) HDAC6-FLAG 플라스미드[pcDNA-HDAC6-FLAG(#30482, Cambridge)], 또는 CSE-Myc 플라스미드 및 비활성(DC) HDAC6-FLAG 플라스미드[pcDNA-HDAC6.DC-FLAG(#30483, Cambridge)]로 동시 형질감염시켰다. 상기 형질감염된 HEK293 세포를 각각 용해하고, 세포 용해물을 항-Myc 항체로 처리하여 면역침전(IP)시켜 침전물을 생성하였다(MYC IP 산물, IP: MYC). MYC IP 산물 및 세포 용해물에 대해 항-아세틸화 라이신 항체, 항-Myc 항체 및 항-FLAG 항체(#F1804, Sigma-Aldrich)를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다.

- [0208] Myc IP 산물에서의 CSE 아세틸화 수준 및 세포 용해물에서의 CSE-Myc 수준은 각각 CSE 면역 반응성과 CSE-Myc 면역 반응성에 대해 비교하여 정량하였다.
- [0209] 그 결과, CSE-Myc 아세틸화 수준은 야생형 HDAC6을 과발현하는 세포보다 탈아세틸라제 결핍 HDAC6 돌연변이를 과발현하는 세포에서 현저히 높았다(도 5E). 또한 Myc IP 산물에 공침된 HDAC6-FLAG의 존재는 CSE와 HDAC6 간에 상호작용이 가능함을 시사하였다.
- [0210] 이로부터 HNK이 HDAC6에 의해 매개되는 AngII 유도 CSE 및 α -튜불린 탈아세틸화를 억제하여 CSE 및 α -튜불린의 아세틸화 수준을 증가시킴을 확인하였다.

[0212] 4-3. HNK 농도별 또는 처리 시간별 세포에서 CSE 단백질 수준 및 α -튜불린 아세틸화 수준 확인

- [0213] HNK 농도별 CSE 단백질 수준, α -튜불린 아세틸화 수준 및 HDAC6 단백질 수준을 확인하기 위해, HAECs를 12시간 동안 0~10 μ M의 HNK로 처리하였다.
- [0214] HNK 농도별 CSE 단백질 수준 및 α -튜불린 아세틸화 수준을 확인하기 위해, HAECs 또는 HEK293 세포를 12시간 동안 0~10 μ M의 HNK로 처리하였다.
- [0215] 또한, HNK 처리 시간별 CSE 아세틸화 수준 및 α -튜불린 아세틸화 수준을 확인하기 위해, HAECs를 0~12시간 동안 5 μ mol/L HNK로 처리하였다.
- [0216] 세포 용해물에 대해 항-CSE 항체, 항-아세틸화 특이적(K40) α -튜불린 항체 및 항-HDAC6 항체(#7558, Cell Signaling Technology)를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하였다. CSE 단백질 수준, α -튜불린 아세틸화 수준 및 HDAC6 단백질 수준은 α -튜불린 면역 반응성으로 정규화되었고 미처리된 대조군 또는 0 시간점을 기준으로 정량하였다.
- [0217] 그 결과, HNK은 HAECs(도 6A) 및 HEK293 세포(도 6B)에서 용량 의존적으로 CSE 단백질 수준 및 α -튜불린 아세

틸화 수준을 상향 조절하였다.

[0218] 또한, CSE과 아세틸화된 α -튜불린 수준은 HAECs에서 HNK 치료의 시간 경과 동안 증가하였다(도 6C).

[0219] 이로부터, CSE 단백질 수준과 α -튜불린 아세틸화 수준 간에 양의 상관관계가 있음을 확인하였으며, HNK이 HDAC6 촉매 활성을 억제하여 CSE 단백질 상향 조절에 기여하는 것임을 확인하였다.

[0221] 4-4. HNK와 HDAC6 간의 특이적 결합 확인

[0222] HDAC6 친화성 기질과 HDAC6 간의 결합에 HNK이 영향을 미치는지의 여부를 확인하였다.

[0223] 구체적으로, HDAC6에 대한 HNK 결합은 이전 방법(Lee S-H, et al., Chem Pharm Bull., 2019;67:966-976.)에 따라 비색 ELISA 기반 EpiQuik HDAC6 분석 키트(EpiGentek #P-4046, Farmingdale)를 사용하여 분석하였다. 최종 농도 10 $\mu\text{mol/L}$ 의 HNK을 HDAC6 친화성 기질로 코팅된 플레이트 웰에 첨가하고 정제된 HDAC6 대조군 단백질 160ng과 함께 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 대조군으로 비오틴 표지된 합성 HNK(도 6E)를 첨가하였다. 비색 변화는 650 nm에서 흡광도를 측정하여 감지하였다.

[0224] 또한, HAECs를 비오틴 표지된 합성 HNK(도 6E) 5 $\mu\text{mol/L}$ 로 12시간 동안 처리한 후, 비오틴 표지 HNK로 처리되거나 처리되지 않은 HAECs의 용해물 0.6 mg을 4°C에서 밤새 25 μL 스트렙타비딘 아가로스 수지(#20347, Thermo Fisher Scientific)와 혼합하여 폴다운하였다. 생성된 폴다운 샘플 및 세포 용해물에 대해 항-HDAC6 항체를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0225] 그 결과, HDAC6 결합 활성은 HNK에 의해 용량 의존적으로 감소되어(도 6D), HNK-HDAC6 결합이 기질에 대한 HDAC6 결합 친화도를 방해함을 확인하였다.

[0226] 또한, 비오틴 표지된 합성 HNK(Biotin-HNK)은 HDAC6에 대한 결합 친화도를 나타내었으며, HNK이 제외된 비오틴 링커(Biotin-linker)와 결합된 스트렙타비딘은 폴다운 분석에서 유의미한 HDAC6 결합 친화도를 나타내지 않아(도 6F), HNK와 HDAC6 간에 특이적 결합이 일어남을 확인하였다.

[0228] 4-5. HDAC6의 효소 활성 확인

[0229] HNK이 HDAC6의 효소 활성에 영향을 미치는지의 여부를 확인하였다.

[0230] 구체적으로, HDAC6 디아세틸라제 활성은 제조사 프로토콜에 따라 HDAC6 활성 분석 키트(fluorometric HDAC6 Activity Assay Kit, BioVision #K466-100, Milpitas)를 사용하여 분석하였다. 인간 HDAC6 효소 및 합성 아세틸화 펩티드 기질을 함유하는 반응 혼합물 100 μL 을 HDAC6 억제제인 튜바신(tubacin) 2 $\mu\text{mol/L}$ 또는 HNK 0~10 μM 의 존재 또는 부재 조건에서 37°C, 30분 동안 배양하였다. 형광 강도는 380 nm 여기 및 490 nm 방출에서 마이크로플레이트 판독기(Synergy H1 모델, BioTek Instruments)를 사용하여 측정하였다. HDAC6의 효소 활성은 HDAC6이 단독으로 처리된 조건과 비교하여 정량화되었다.

[0231] 그 결과, HNK은 5 및 10 $\mu\text{mol/L}$ 농도에서 HDAC6 매개 탈아세틸화 반응을 억제하여, HDAC6에 대해 직접적인 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(도 6G).

[0233] 4-6. 세포 및 대동맥에서 HDAC6 단백질 수준 확인

[0234] 상기 실시예 4-1(도 5A 및 D)과 동일한 방법으로 AngII 처리 HAECs의 세포 용해물과 AngII 처리 마우스의 대동맥 용해물을 각각 준비하고, 항-CSE 항체 및 항-HDAC6 항체를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하였다. CSE 단백질 수준 및 HDAC6 단백질 수준은 β -액티노로 정규화되었고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.

[0235] 또한, α -튜불린 아세틸화에 대한 HNK와 튜바스타틴 A(tubastatin A, TubaA)의 결합 효과를 확인하기 위해, HAECs를 TubaA(#S8049, Selleckchem) 0~5 μM 의 존재 하에 HNK 5 μM 의 존재 또는 부재 조건에서 12시간 동안 배양하였다. 세포 용해물에 대해 항-아세틸화 특이적(K40) α -튜불린 항체 및 항- α -튜불린 항체를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴블롯을 수행하였다. α -튜불린 아세틸화 수준 및 α -튜불린 수준은 α -튜불린 면역 반응성으로 정규화되었고 미처리된 대조군을 기준으로 정량하여 도 7B에 나타내었다.

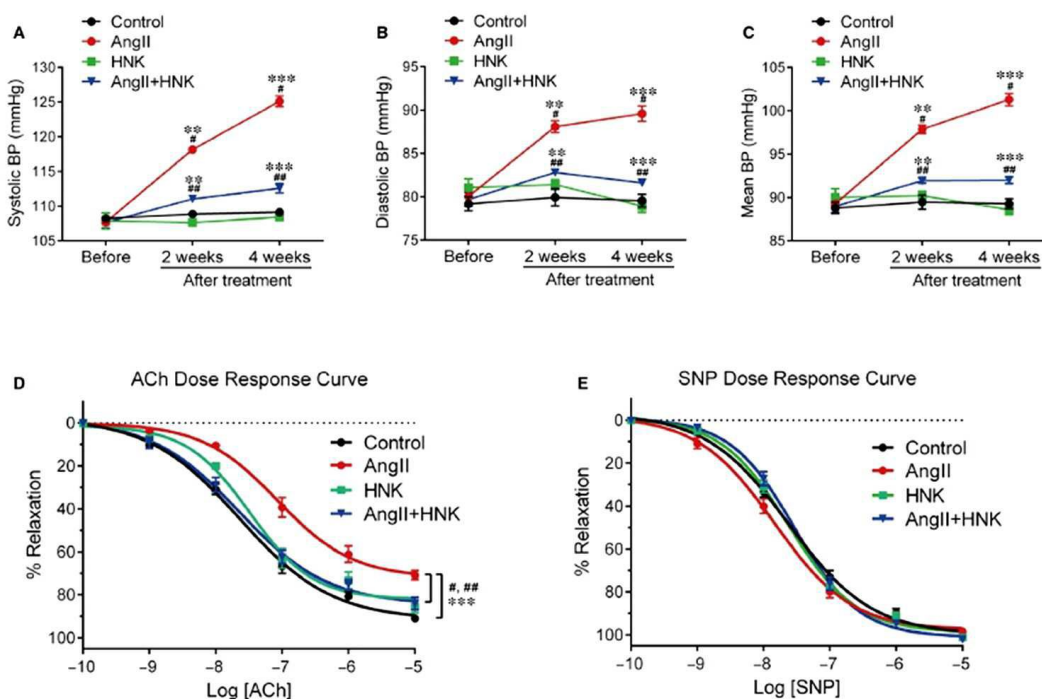
- [0236] HNK이 TubaA와 함께 처리되었을 때, HNK은 상대적으로 낮은 농도($1 \mu\text{mol/L}$)의 TubaA에서만 TubaA에 비해 상대적으로 높은 α -튜불린 아세틸화 수준을 나타내어, HDAC6 억제에 추가적인 효과를 나타내었다(도 7A). 도 6A에서 확인된 바와 같이, HDAC6 단백질 수준은 HNK에 의해 실질적으로 영향을 받지 않았다.
- [0237] 대조적으로, 증가된 HDAC6 단백질 수준은 AngII 처리된 HAECs 및 마우스 대동맥에서 CSE 단백질 수준을 감소시켰다(도 6H).
- [0238] 이로부터, AngII 매개 HDAC6 상향 조절이 CSE 탈아세틸화를 유도하여 프로테아좀 분해를 유발하는 반면, HNK 처리시에는 HNK의 HDAC6 활성화에 대한 억제 효과로 인해 상기 분해가 차단됨을 확인하였다. 즉, HNK 매개 HDAC6 억제는 CSE 아세틸화를 유도하여 CSE 상향 조절에 기여함을 알 수 있다.
- [0240] **실시예 5. HNK에 의해 유도된 CSE 아세틸화의 단백질 분해 억제 효과 확인**
- [0242] 상기 실시예 4의 결과로부터, HNK이 AngII에 의해 유도된 CSE의 프로테아좀 분해를 차단함을 확인함에 따라, CSE-Myc 및 HA-유비퀴틴으로 동시 형질감염된 HEK293 세포를 사용하여 CSE 유비퀴틴화에 대한 잠재적 효과를 확인하였다.
- [0243] 구체적으로, HEK293 세포를 CSE-Myc 및 pRK5-HA-ubiquitin(Ub) (#17608, Addgene)으로 동시 형질감염시켰다. 형질감염 1일 후, 세포는 상기 실시예 3-4(도 4F)와 동일한 방법으로 AngII 및/또는 HNK의 존재 또는 부재 하에 배양하였다. 세포 용해물은 상기 실시예 4-2(도 5E)와 동일한 방법으로 면역침전(IP)시켜 침전물을 생성하였다. MYC IP 산물 및 세포 용해물에 대해 항-HA 항체(#MMS-101R, Covance), 항-Myc 항체 및 항-HDAC6 항체를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다. CSE 유비퀴틴화를 검출하기 위해 용해 완충액에 N-에틸말레이미드(10mmol/L)를 보충하였다. Myc IP 산물의 HA 면역 반응성은 미처리된 대조군을 기준으로 정량하였다.
- [0244] 그 결과, CSE-Myc의 폴리유비퀴틴화 수준 증가는 야생형 CSE-Myc(약 45kD)보다 분자량이 더 큰 다중 밴드로 표시되고 그 수준은 각각 감소하였다. 이는 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(ubiquitin-proteasome system, UPS)을 통한 CSE 단백질 분해를 유도하는 AngII 처리(도 8A)에서 확인되었다. 반대로, HNK은 AngII 존재 유무에 관계없이 CSE-Myc의 폴리유비퀴틴화 수준을 감소시켰다(도 8A).
- [0245] 이로부터, HNK이 CSE 단백질 안정성과 아세틸화 수준을 증가시키는 것 외에도, HNK에 의해 유도된 CSE 아세틸화가 UPS 매개 CSE 단백질 분해를 억제함을 알 수 있다.
- [0247] 다음으로, 이전 연구에서 단백질 유비퀴틴화 및 아세틸화와 관련하여 CSE 단백질의 5' 말단으로부터 73번째 아미노산 잔기인 K73이 주요 표적 부위임이 보고된 바 있으므로(Elia A, et al., Mol Cell. 2015;59:867-881.), CSE-Myc 플라스미드를 이용하여 CSE에 대한 돌연변이체(K73R) 유발 벡터를 제작하고, 이를 상기와 동일한 방법으로 세포에 형질감염시킨 후 항-Myc IP를 사용하여 아세틸화 및 유비퀴틴화 효율을 분석하였다.
- [0248] 구체적으로, CSE-Myc 주형을 이용하여 제작한 K73R 돌연변이 유발 벡터는 K73R forward (5'-GGAATTGCCTTGAAAGAGCAGTGGCAGCACTGG-3', 서열번호 8) 및 K73R reverse (5'-CCAGTGCTGCCACTGCTCTTCAAGCAATTCC-3', 서열번호 9)의 프라이머를 이용하여 제조사 프로토콜에 따라 돌연변이 유발 키트(QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies)를 사용하여 제작하였다. CSE-Myc 야생형(WT) 플라스미드 또는 K73R 돌연변이 유발 벡터로 각각 형질감염된 HAECs를 $5 \mu\text{mol/L}$ HNK 존재 또는 부재 하에서 8시간 동안 배양하였다.
- [0249] 또한, HAECs를 HA-Ub와 함께 상기 플라스미드 또는 K73R 돌연변이 유발 벡터로 공동 형질감염시켰다.
- [0250] 각 세포 용해물은 상기 실시예 4-2(도 5E)와 동일한 방법으로 면역침전(IP)시켜 침전물을 생성하였다. MYC IP 산물 및 세포 용해물에 대해 항-아세틸화 라이신 항체, 항-HA 항체 및 항-Myc 항체를 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 웨스턴 블롯을 수행하였다. Myc IP 산물의 Ace-K 면역 반응성은 CSE-Myc WT의 면역 반응성과 비교하여 각각 정량하였다.
- [0251] 그 결과, K73R 돌연변이체의 아세틸화 수준은 HNK 존재 유무에 관계없이 야생형 CSE보다 낮았다(도 8B).

- [0252] 또한, K73R 돌연변이체 발현 세포는 야생형 CSE 발현 세포에 비해 상대적으로 낮은 CSE 유비퀴틴화 수준을 나타내었다(도 8C).
- [0253] 이로부터, K73가 CSE 아세틸화 및 유비퀴틴화 모두에 있어 주요 부위임을 확인하였다.
- [0255] 상기 결과로부터, CSE의 K73 돌연변이체가 아세틸화 및 유비퀴틴화에 모두 내성을 나타냄을 확인한바, K73R 돌연변이체가 야생형보다 더 안정한지를 확인하기 위해 상기 야생형 또는 K73R 형질감염 세포를 CHX로 처리하였다.
- [0256] 구체적으로, CSE-Myc WT 또는 K73R 돌연변이로 형질감염된 HEK293 세포를 CHX 10 $\mu\text{mol/L}$ 의 존재 또는 부재 하에서 2시간 동안 배양하고 상기 실시예 3-5와 동일한 방법으로 웨스턴블롯 분석하였다. 정규화된 Myc 면역 반응성은 처리되지 않은 CSE-Myc WT의 면역 반응성과 비교하여 정량하였다.
- [0257] 그 결과, K73R 단백질 수준은 야생형보다 상대적으로 높았으며, CHX가 처리되지 않은 조건에서의 K73R 단백질 수준도 야생형에 비해 높게 유지되었다(도 6D).
- [0258] 이로부터, CSE는 K73 유비퀴틴화를 통해 분해되고, 상기 K73 유비퀴틴화는 K73 탈아세틸화에 의해 촉진되며 아세틸화에 의해 억제됨을 확인하였다.
- [0260] 상기 실시예의 결과로부터, HNK는 CSE 매개 H_2S 생성에 관여하여 내피 기능장애 질환 개선 효과를 나타내므로, 고혈압 등을 포함하는 내피 기능장애 질환의 치료에 적용할 수 있음을 확인하였다.

[0262] 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 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

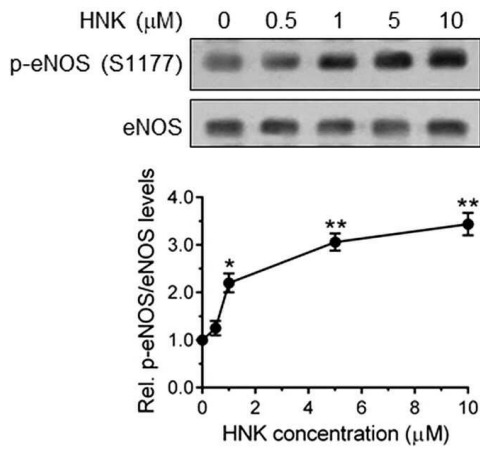
도면

도면1

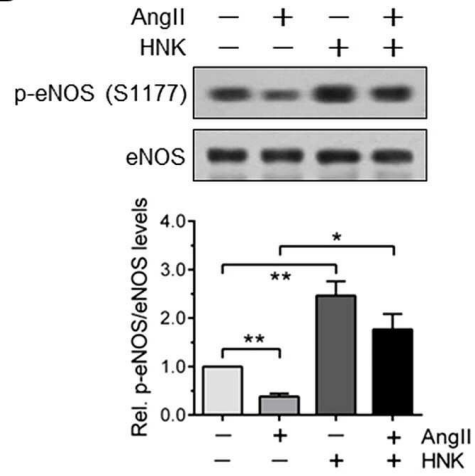


도면2

A

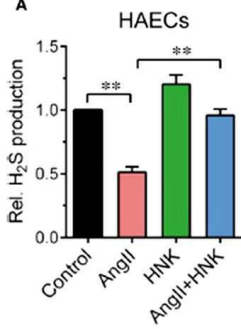


B

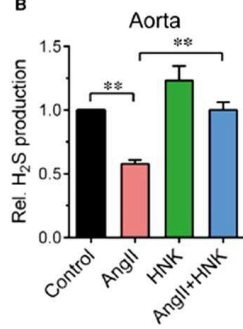


도면3

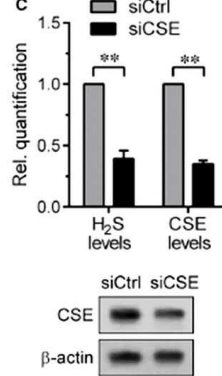
A



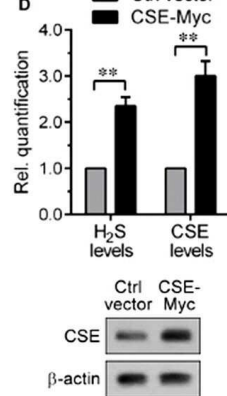
B



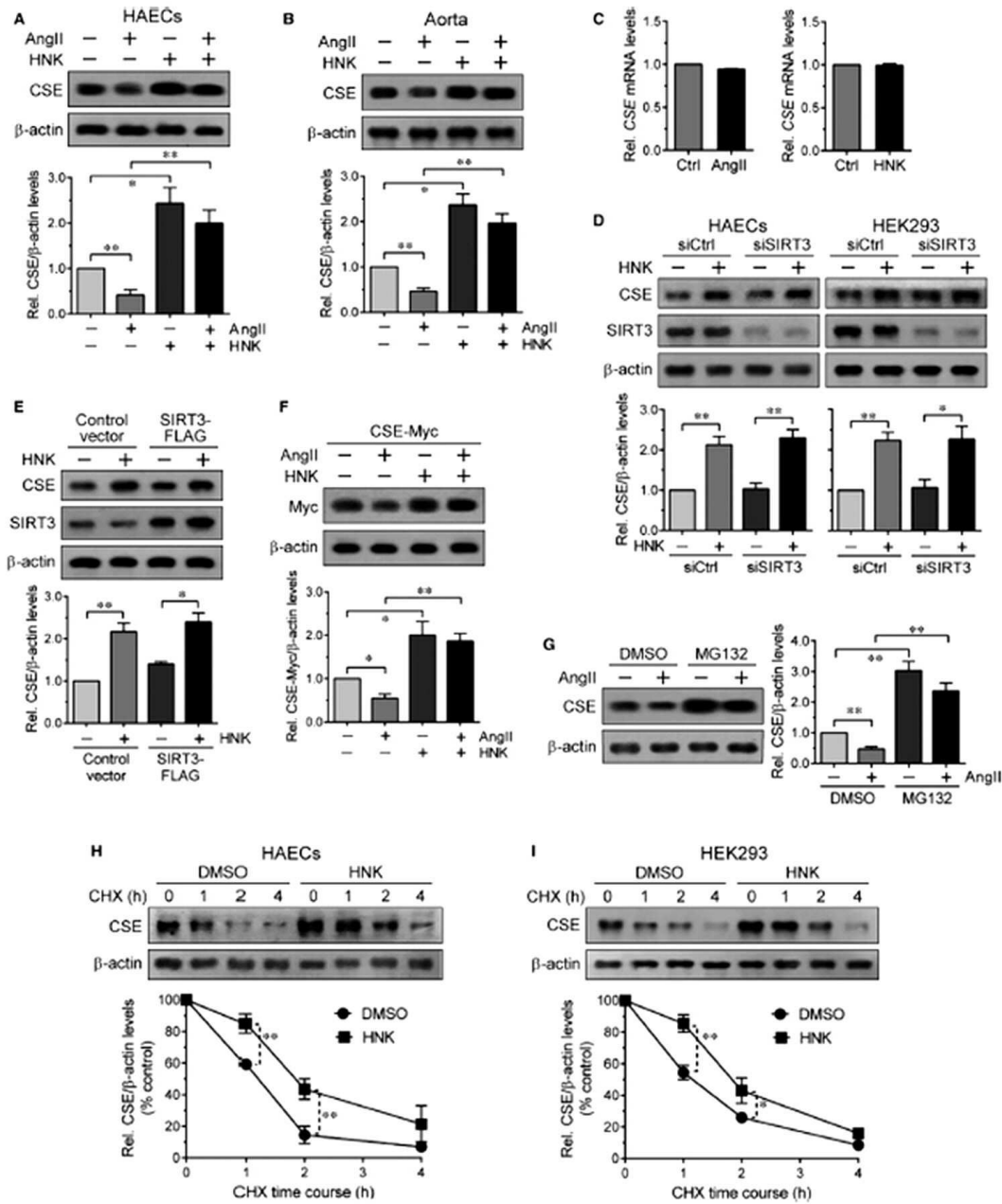
C



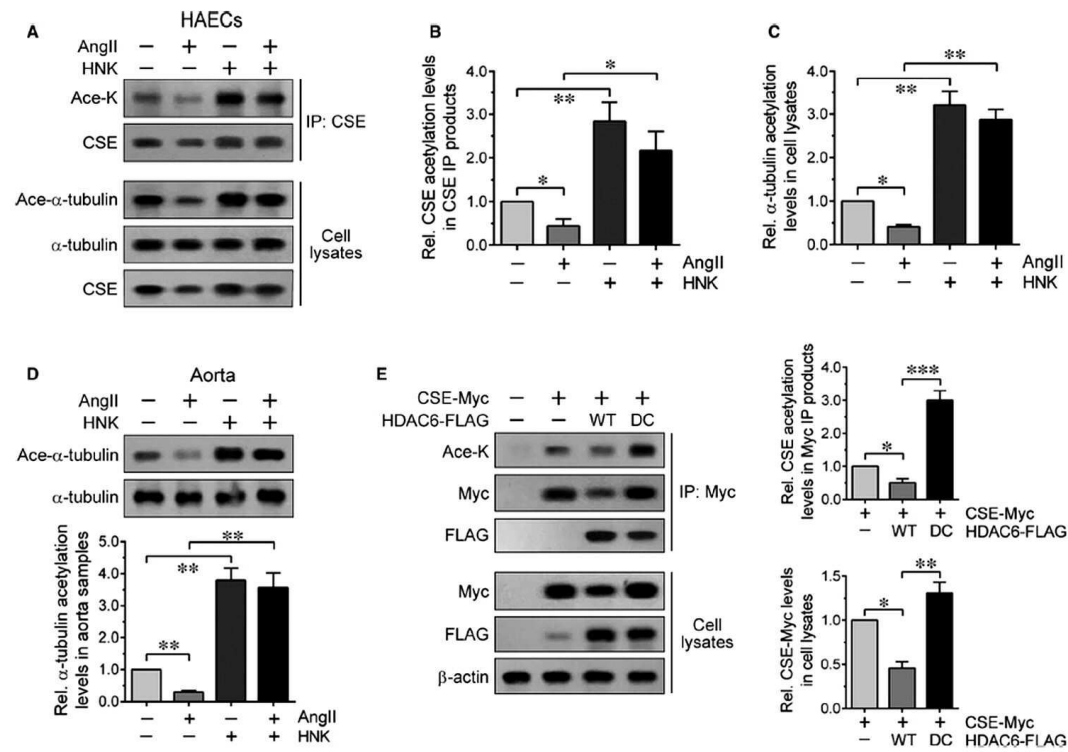
D



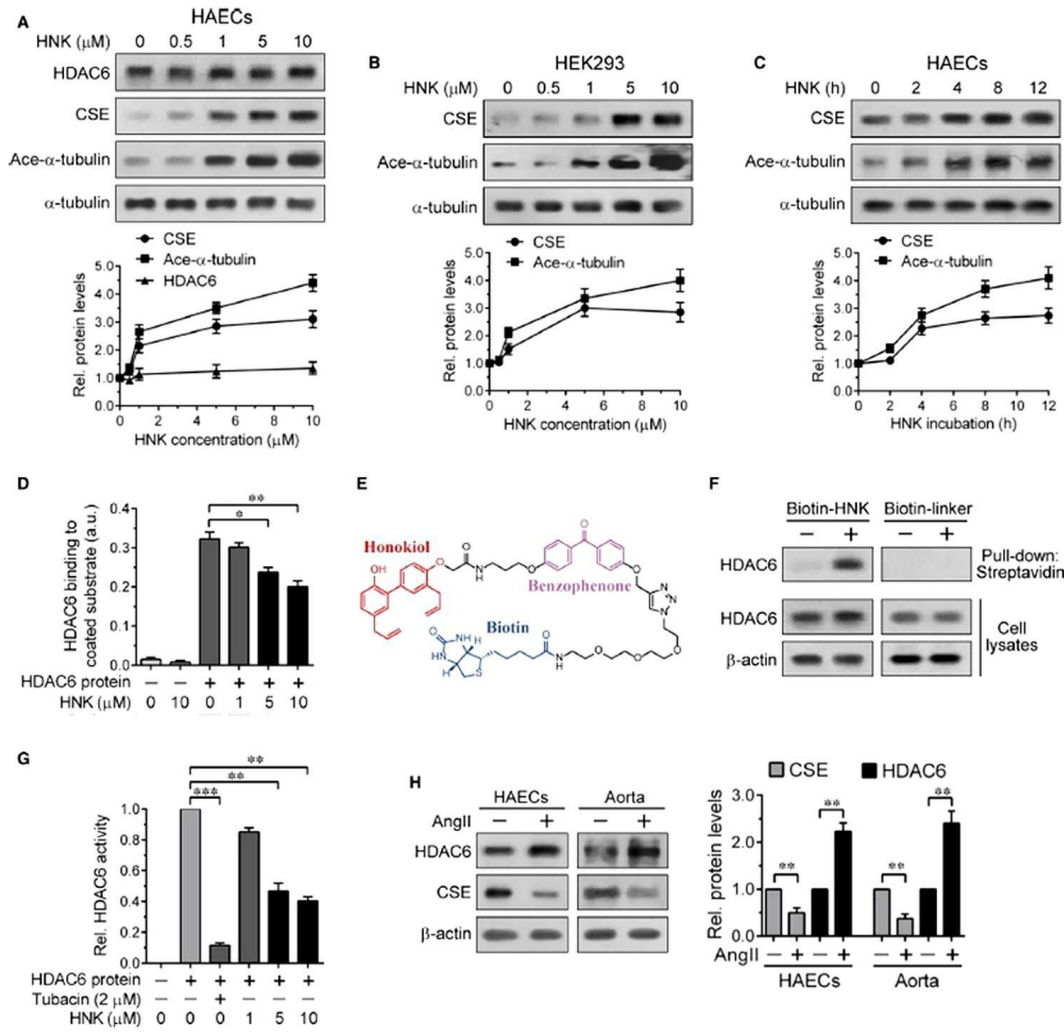
도면4



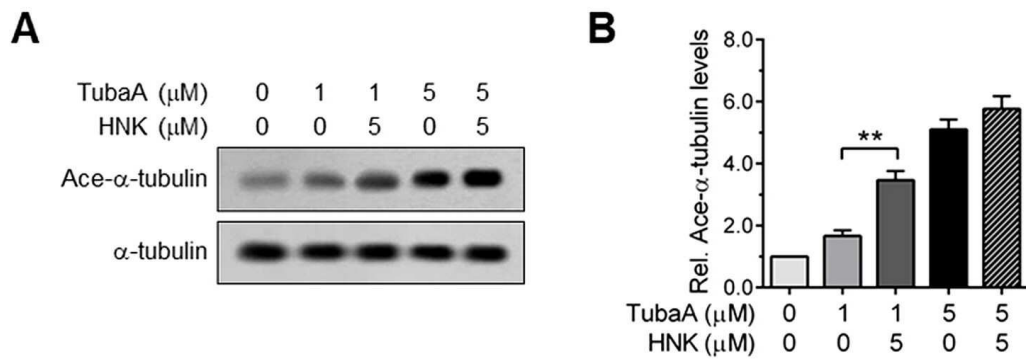
도면5



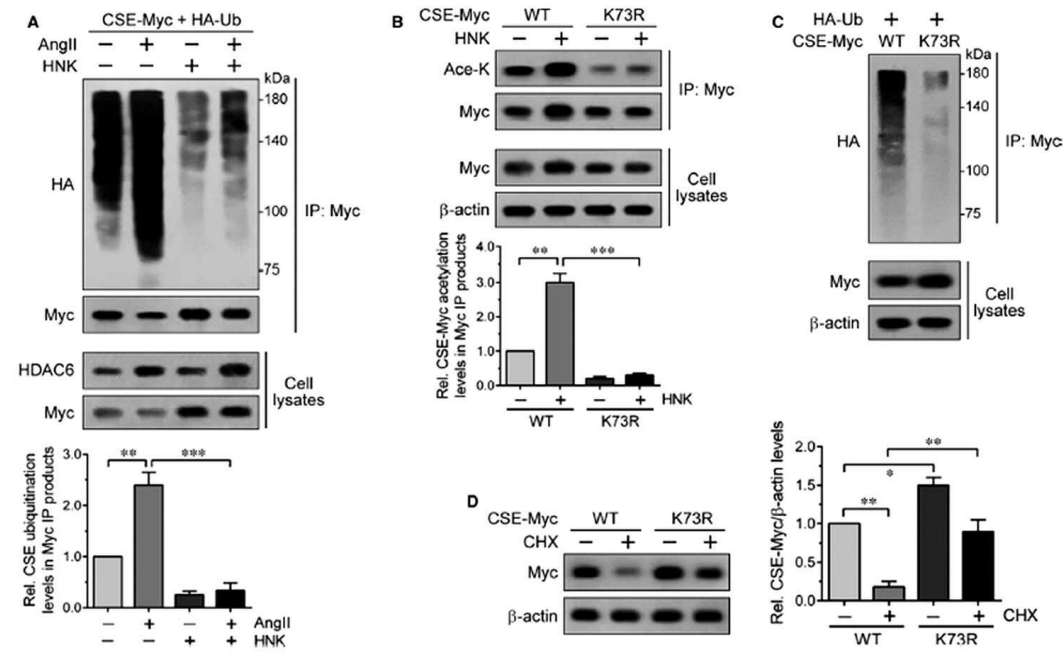
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION
- <120> A composition comprising honokiol and use thereof for prevention,
improvement and treatment of endothelial dysfunction
- <130> KPA201061-KR-P1
- <150> KR 10-2021-0100901
- <151> 2021-07-30
- <160> 9
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CSE siRNA
- <400> 1
gguuauuuuau ccugggcugu u

- <210> 2
- <211> 22
- <212> RNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	control siRNA	
<400>	2	
uucuccgaac	guguucacgu uu	22
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CSE forward	
<400>	3	
ggtttcctgc	cacattcca	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CSE reverse	
<400>	4	
catccagtgc	tgccactgct	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH forward	
<400>	5	
aaaatcaagt	ggggcgatgc	20
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	GAPDH reverse	
<400>	6	
aggaggcatt	gctgatgatc t	21
<210>	7	
<211>	21	

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SIRT3 siRNA
 <400> 7
 cugugccuag uugaacggca a 21

<210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K73R forward
 <400> 8
 ggaattgcct tgaagagca gtggcagcac tgg 33

<210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> K73R reverse
 <400> 9
 ccagtgtgc cactgtcttt tcaaggcaat tcc 33