



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0081013
(43) 공개일자 2018년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/03 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01) A61L 29/00 (2006.01)
A61L 29/06 (2006.01) A61L 29/08 (2006.01)
A61M 16/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/03 (2013.01)
A61K 31/05 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0018476(분할)

(22) 출원일자 2018년02월14일

심사청구일자 2018년02월14일

(62) 원출원 특허 10-2017-0001752

원출원일자 2017년01월05일

심사청구일자 2017년01월05일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

정원교

부산광역시 남구 분포로 111, 128동 2101호(용호
동, 엘지메트로시티)

고석천

제주특별자치도 제주시 선덕로3길 12

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

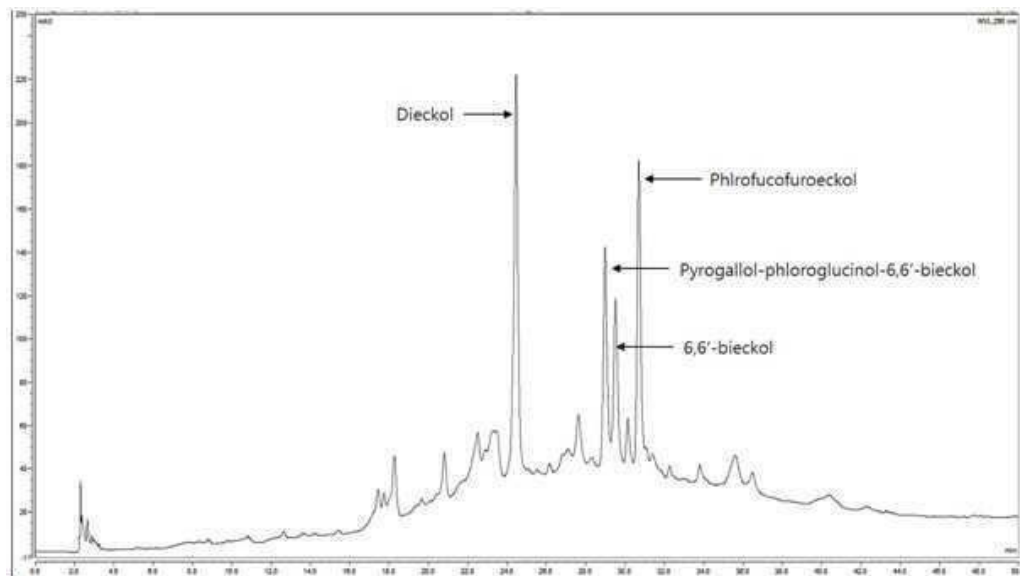
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 갈조류 추출물을 포함하는 협착 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 갈조류 추출물을 포함하는 협착 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 갈조류 유래 폴리페놀을 포함함으로써, 기관, 성대, 혈관 등의 협착에 우수한 예방 또는 치료 효과를 나타내는 협착 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/357 (2013.01)
A61L 29/005 (2013.01)
A61L 29/06 (2013.01)
A61L 29/08 (2013.01)
A61L 29/085 (2013.01)
A61M 16/0402 (2015.01)
A61L 2420/08 (2013.01)

(72) 발명자

정민선

부산광역시 해운대구 선수촌로 95, 107동 1102호(반여동, 센텀대림아파트)

이형신

부산광역시 남구 분포로 111, 132동 502호(용호동, 엘지메트로시티)

김성원

부산광역시 서구 감천로 262 (암남동 고신대학교 복음병원)

옥철호

부산광역시 영도구 동삼로108번길 23-15, 1동 201호(동삼동, 화신한바다빌라)

오정환

부산광역시 남구 분포로 111, 106동 1006호(용호동, 엘지메트로시티)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20150220
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	한국해양과학기술진흥원
연구사업명	해양수산생명공학기술개발사업
연구과제명	해양 생물 유래 생체진단치료용 적용소재 선정 및 효능검증
기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교산학협력단
연구기간	2016.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

감태 추출물을 포함하는 섬유증에 의한 협착 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 감태 추출물은 에탄올로 추출한 것인, 협착 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 협착은 기관 협착 또는 성대 협착인, 협착 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 추출은 70% 에탄올로 추출한 것인, 협착 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 감태 추출물은 콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 III, α -평활근 액틴, 혈관표피성장인자 및 전환성장인자- β 1(TGF- β 1)의 발현을 감소시키고, 헵 옥시데이즈-1(HO-1)의 발현을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 6

실험관 내에서, 섬유아세포에 감태 추출물을 처리하여 1)섬유아세포의 증식을 억제; 2)콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 III, α -평활근 액틴, 혈관표피성장인자 및 전환성장인자-베타1(TGF-베타1)의 발현을 감소; 및 3)헵 옥시데이즈-1(HO-1)의 발현을 증가시키는 방법.

청구항 7

인간을 제외한 동물모델에서, 감태 추출물을 처리하여, 1)섬유아세포의 증식을 억제; 2)콜라겐 타입 I, 콜라겐 타입 III, α -평활근 액틴, 혈관표피성장인자 및 전환성장인자- β 1(TGF- β 1)의 발현을 감소; 3)헵 옥시데이즈-1(HO-1)의 발현을 증가; 및 4)동물모델의 기도에서 콜라겐 축적을 감소시키는 방법.

청구항 8

감태 추출물을 포함하는 섬유증 예방 및 치료용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물이 코팅된 섬유증 또는 협착증 예방 또는 치료를 위한 체내 삽관용 튜브.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 조성물의 코팅층은 PCL(Polycaprolactone) 코팅층 상에 형성되는, 체내 삽관용 튜브.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 PCL 코팅은 클로로메탄에 PCL을 용해시켜 10%(w/v)의 PCL 용액으로 코팅한 것이며, 에탄올에 용해시킨 5%(w/v) 감태추출물이 코팅된 체내 삽관용 튜브.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 갈조류 추출물을 유효성분으로 포함하는 협착 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 협착(stenosis)은 기관(汽管) 협착, 성대 협착, 혈관 협착, 척추 협착, 유문 협착 등 신체 내 다양한 기관(器官)에서 일어나는 질환이다.

[0003] 기관 협착은 선천적 혹은 후천적으로 기관이 완전 또는 불완전하게 폐색되어 있는 상태를 말한다. 선천성 기관 협착은 드물게 나타나며, 기관 삽관 후 발생하는 후천적 기관 협착이 가장 흔하다. 후천적 기관 협착은 대부분 삽관 튜브의 커프에 의한 압박 손상 및 기관 절개 부위의 손상에 의해 발생한다. 삽관 시 가해진 자극으로 인해 기관 조직은 자연 치유 과정에서 염증성 육아조직이 증식되거나 반흔구축이 진행되어 기관 협착이 발생하게 된다. 성대 협착(성문하 협착)의 후천적인 발생 또한 경부의 외상, 장기간의 기관 내 삽관이 가장 흔한 원인으로 알려져 있다.

[0004] 기관 협착에 대한 치료는 병변 부위의 길이에 따라 결정된다. 가장 보편적인 방법은 병변 부위의 절제 및 단단 문합술이다. 그러나 병변 부위의 길이가 길어서 절제가 불가능한 경우에는 협착부위를 확장시키는 방법이나 협착부의 하방까지 관을 삽입하여 환기가 가능하게 하는 보존요법을 시행할 수도 있다.

[0005] 혈관 협착의 경우, 좁아진 혈관 부위에 스텐트 시술을 하게 되는데, 혈관 내부에 스텐트를 삽입하는 과정에서 혈관벽이 미세한 상처를 받게 된다. 이 때 자연 치유 과정에서 상처 부위의 혈관 내벽 조직이 과도하게 성장하면서 혈관이 다시 좁아지는 재협착이 발생할 수 있다. 이러한 혈관 재협착은 대부분 풍선혈관성형술로 치료하고 기타 내막 절제술을 하거나 스텐트 안에 다시 스텐트를 설치하는 경우도 있다.

[0006] 선행문헌 한국공개특허 2011-0111424호에는 기도 협착 영역을 확장시키기 위한 시스템에 대해 개시되어 있다. 카테터 내에 샤프트보다 더 큰 강성을 가진 속심을 구비하여 기도 내의 협착부로 전진이 용이하도록 설계한 것이다. 그러나 이러한 방법은 카테터 삽입 시 기도 내 손상이 발생할 수 있다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2011-0111424호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 갈조류 추출물을 포함하는 협착 예방 또는 치료용 조성물, 이를 포함하는 삽관 튜브를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 1. 갈조류 추출물을 포함하는 협착 예방 또는 치료용 조성물.

[0011] 2. 위 1에 있어서, 상기 갈조류 추출물은 알코올로 추출한 것인, 협착 예방 또는 치료용 조성물.

[0012] 3. 위 2에 있어서, 상기 알코올은 에탄올인, 협착 예방 또는 치료용 조성물.

[0013] 4. 위 1에 있어서, 상기 갈조류 추출물은 갈조류 유래 폴리페놀을 포함하는 협착 예방 또는 치료용 조성물.

[0014] 5. 위 4에 있어서, 상기 갈조류 유래 폴리페놀은 플로로탄닌인, 협착 예방 또는 치료용 조성물.

[0015] 6. 위 5에 있어서, 상기 플로로탄닌은 에콜(eckol), 디에콜(dieckol), 6,6'-비에콜(6,6'-bieckol), 8,8'-비에콜(8,8'-bieckol), 2-O-(2,4,6-트리하이드록시페닐)-6,6'-비에콜(2-O-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-6,6'-bieckol), 엑스톨로놀(eckstolonol), 푸코푸로에콜(fucofuroeckol), 플로로푸코푸로에콜(phlorofucofuroeckol), 2-플로로에콜(2-phloroeckol), 3-플로로에콜(3-phloroeckol), 7-플로로에콜(7-phloroeckol), 디플로레톨(diphlorethol), 트리플로레톨 A(triphlorethol A), 플로로탄닌 A(phlorotannin A),

피로겔롤-플로로글루시놀-6,6'-비에콜(pyrogallol-phloroglucinol-6,6'-bieckol) 및 플로로글루시놀(phloroglucinol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 협착 예방 또는 치료용 조성물.

7. 위 1에 있어서, 상기 갈조류는 감태인, 협착 예방 또는 치료용 조성물.

8. 위 1에 있어서, 상기 협착은 기관 협착 또는 성대 협착인, 협착 예방 또는 치료용 조성물.

9. 위 1 내지 8 중 어느 하나의 조성물이 코팅된 체내 삽관용 튜브.

10. 위 9에 있어서, 상기 조성물의 코팅층은 PCL(Polycaprolactone) 코팅층 상에 형성되는 신체 삽관용 튜브.

발명의 효과

본 발명에 따른 갈조류 추출물을 포함하는 조성물은 협착에 대한 예방 또는 치료 효과가 있으며, 천연 자원으로부터 얻어진 물질을 유효성분으로 하기 때문에 부작용을 유발한 가능성이 낮아 안전성을 확보할 수 있으며, 약학 조성물 또는 의료 기기 등에 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 감태 추출물의 고성능액체크로마토그래피의 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 감태 추출물에 대한 사람 유래 기도 섬유아세포의 증식억제 효과를 측정한 결과이다.

도 3은 감태 추출물이 코팅된 기관 삽관 튜브의 모습을 나타낸 것이다.

도 4는 10% PCL 2번 코팅-5% 감태 추출물 코팅된 튜브의 폴리페놀 방출 양을 측정한 결과이다.

도 5는 10% PCL이 코팅된 튜브와 10% PCL 2번 코팅-5% 감태 추출물 코팅된 튜브를 삽관한 기관 협착 동물 모델의 섬유증 억제 효과를 단백질 수준에서 비교한 결과이다.

도 6은 10% PCL이 코팅된 튜브와 10% PCL 2번 코팅-5% 감태 추출물 코팅된 튜브를 삽관한 기관 협착 동물 모델의 섬유증 억제 효과를 mRNA 수준에서 비교한 결과이다.

도 7은 10% PCL이 코팅된 튜브와 10% PCL 2번 코팅-5% 감태 추출물 코팅된 튜브를 삽관한 기관 협착 동물 모델의 콜라겐 축적을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 구체적인 실시형태를 설명하기로 한다. 그러나 이는 예시에 불과하며 본 발명은 이에 제한되지 않는다.

본 발명은, 갈조류 추출물을 포함하는 협착 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명에서의 협착은 후천적으로 발생하는 것으로, 조직에 가해진 외부 손상으로 인한 자연 치유 과정에서 발생하는 협착일 수 있다. 외부 손상으로 인해 발생할 수 있는 협착으로는 기관(汽管) 협착, 성대 협착, 스텐트 시술 후 발생하는 혈관 재협착 등이 있다. 바람직하게 상기 협착은 기관(汽管) 협착 또는 성대 협착일 수 있다.

본 발명에서의 갈조류는 해양성이고 다세포 조류에 속하는 원생생물의 한 군을 말한다. 상기 갈조류는 미역, 다시마, 모자반, 톳, 감태 등일 수 있고, 바람직하게는 감태일 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 있어서, 갈조류 추출물은 열수 추출, 증류 추출, 용매 추출, 초음파 추출, 초임계 추출 등을 이용하여 제조될 수 있다. 갈조류 추출물의 제조방법의 일 예시를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 갈조류를 세척한 뒤, 분쇄하여 분말화한다. 분말화된 갈조류를 용매로 추출하여 갈조류 추출물을 얻는다. 상기 갈조류를 분말화하는 과정에서, 세척한 갈조류를 동결 건조한 뒤 분쇄하여 분말화할 수도 있다. 또한, 상기 갈조류 추출물은 용매를 휘발시키는 과정을 더 포함할 수도 있다. 상기 갈조류 추출물에 포함된 용매를 휘발시킨 후 동결 건조하여 추출물 분말을 얻고, 추출물 분말을 다시 용매에 용해하여 갈조류 추출물을 제조할 수 있다.

상기 갈조류 추출물은 알코올로 추출한 것일 수 있다. 상기 알코올은 저급 알코올일 수 있고, 바람직하게는 에탄올일 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 갈조류 추출물은 갈조류 유래 폴리페놀을 포함할 수 있다. 본 발명에서의 폴리페놀은 벤젠의 수소 원자 두 개 이상이 히드록시기로 치환된 분자를 말한다. 구체적으로 상기 폴리페놀은

플라보노이드류, 플로로탄닌류 등일 수 있다.

- [0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 갈조류 추출물 내에 폴리페놀의 농도는 고형분 기준으로 2 중량% 이상, 바람직하게는 5중량% 이상 일 수 있다. 상기 범위 미만에서는 협착 억제 효과가 나타나지 않을 수 있다. 본 발명에서 갈조류 유래 폴리페놀의 함량 상한을 특별히 제한하지는 않으나, 첨가에 따른 효과의 증대가 더 이상 나타나지 않은 경우 등을 고려하면, 그 상한은 예를 들면 80 중량% 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 갈조류 추출물 내의 폴리페놀의 농도는 추출 용매의 사용량, 시간 등을 조절하여 제어할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 갈조류 유래 폴리페놀은 예를 들면, 플로로탄닌일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서의 플로로탄닌은 플로로글루시놀(phloroglucinol)을 모노머로 하여 구성된 올리고머를 말한다. 바람직하게 플로로탄닌은 에콜(eckol), 디에콜(dieckol), 6,6'-비에콜(6,6'-bieckol), 8,8'-비에콜 (8,8'-bieckol), 2-O-(2,4,6-트리하이드록시페닐)-6,6'-비에콜 (2-O-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-6,6'-bieckol), 엑스톨로놀(eckstolonol), 푸코푸로에콜 (fucofuroeckol), 플로로푸코푸로에콜(phlorofucufuroeckol), 2-플로로에콜(2-phloroeckol), 3-플로로에콜(3-phloroeckol), 7-플로로에콜 (7-phloroeckol), 디플로레톨(diphlorethol), 트리플로레톨 A(triphlorethol A), 플로로탄닌 A(phlorotannin A), 피로겔롤-플로로글루시놀-6,6'-비에콜 (pyrogallol-phloroglucinol-6,6'-bieckol), 플로로글루시놀(phloroglucino)등일 수 있다. 보다 바람직하게 상기 플로로탄닌은 에콜(eckol), 디에콜(dieckol), 6,6'-비에콜(6,6'-bieckol), 엑스톨로놀(eckstolonol), 플로로푸코푸로에콜(phlorofucufuroeckol), 트리플로레톨 A(triphlorethol A), 피로겔롤-플로로글루시놀-6,6'-비에콜(pyrogallol-phloroglucinol-6,6'-bieckol) 일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 갈조류 유래 폴리페놀을 포함하는 조성물은 협착을 예방 또는 치료하기 위하여 의약품 또는 의료기기에 적용될 수 있다. 바람직하게 상기 조성물은 체내 삽관용 튜브에 적용될 수 있다. 예를 들어, 기관 협착 또는 성대 협착의 경우 튜브 삽관 후 부작용에 의해 발생하는 경우가 많기 때문이다. 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 체내는 삽관용 튜브가 적용될 수 있는 기관(器管)을 가진 대상의 체내일 수 있다. 바람직하게는 사람 또는 동물의 체내일 수 있다.
- [0033] 갈조류 유래 폴리페놀을 포함하는 조성물을 체내 삽관용 튜브에 코팅하는 방법의 일 예시는 다음과 같다. (a) 튜브를 준비하는 단계, (b) 상기 튜브에 갈조류 유래 폴리페놀을 포함하는 조성물을 코팅하는 단계, (c) 상기 코팅된 튜브를 세척하는 단계 및 (d) 상기 세척된 튜브를 건조하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 갈조류 유래 폴리페놀을 포함하는 조성물의 코팅층은 PCL(Polycaprolactone) 코팅층 상에 형성될 수 있다. PCL 코팅층은 폴리페놀의 방출을 조절하는 효과를 낼 수 있다. 이에 따라, 갈조류 유래 폴리페놀을 포함하는 조성물을 튜브에 코팅하는 단계 이전에 PCL(Polycaprolactone) 용액을 코팅하는 단계를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, (a) 튜브를 준비하는 단계, (b) 상기 튜브에 PCL 용액을 코팅하는 단계, (c) 상기 건조된 튜브에 갈조류 유래 폴리페놀을 포함하는 조성물을 코팅하는 단계, (d) 상기 PCL-폴리페놀이 코팅된 튜브를 세척하는 단계 및 (e) 상기 세척된 튜브를 건조하는 단계를 포함할 수 있다. 더 바람직하게는 (b) 단계를 반복하여 복수의 PCL 코팅층을 형성할 수 있다. 필요에 따라, (b) 단계 이후에 PCL 용액이 코팅된 튜브를 건조하는 단계를 더 포함할 수도 있다.
- [0035] 상기 갈조류 유래 폴리페놀을 포함하는 조성물을 체내 삽관 튜브에 코팅하는 방법의 예시로는 용액 도포, 필름 코팅, 전기 방사, 3차원 프린팅 기법 등이 있다.
- [0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 첨부된 특허청구범위를 제한하는 것이 아니며, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 실시예에 대한 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.
- [0038] **실시예**
- [0039] **실시예 1. 감태 추출물의 제조**
- [0040] 갈조류인 감태를 제주도에서 채집하였다. 채집한 감태를 흐르는 물에 3번 세척하여 염분, 착생식물 그리고 표면에 묻은 모래 등을 제거하였다. 그리고 조심스럽게 깨끗한 물에 씻은 후 -80 ℃에 보관하였다. 동결된 감태를 동결 건조한 후, 미세하게 분쇄하였다. 분말화된 감태를 70% 주정(에탄올)을 이용하여 3회 추출하고 감압여과를 통하여 잔사를 제거하였다. 그 후, 40 ℃에서 감압농축기를 이용하여 주정을 휘발시킨 후, 동결건조를 통하여

추출물 분말을 획득하였다. 추출물 분말을 에탄올에 용해하여 감태 추출물을 얻었다.

[0042] 실험예 1. 감태 추출물의 폴리페놀 및 일반 성분 함량 측정

[0043] 실시예 1에서 얻은 감태 추출물의 폴리페놀 함량 측정을 수행하였다. 폴리페놀 함량 측정은 Shetty 등에 준하여 수행하였으며, 추출물 1 mL에 95% 에탄올 용액 1 mL와 증류수 5 mL를 넣어 혼합한 후, 50% 폴린-씨오칼테우 시약 (Folin-Ciocalteu reagent, Sigma Chemical, St. Louis, MO) 0.5 mL를 넣고 5분간 반응시켰다. 여기에 5% 탄산나트륨 (Na_2CO_3) 용액 1 mL를 가한 후, 어두운 상태에서 1시간 동안 반응시키고 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준검량곡선은 갈산(gallic acid)을 표준물질로 사용하여 동일한 방법으로 작성된 표준 곡선으로부터 총 폴리페놀 함량으로 환산하였다.

[0044] 또한, 감태 추출물의 일반성분은 AOAC법에 따라 수분함량은 105℃ 상압건조법, 조지방은 속실텟(Soxhlet) 추출법, 조단백질은 킬달 (Kjeldahl)법 조회분은 550℃ 건식회화법으로 분석하였으며, 탄수화물 함량은 추출 고형분의 총량에서 수분, 회분, 조단백질, 조지방 그리고 폴리페놀 함량을 뺀 값으로 나타내었다 (표 1).

표 1

수분	조회분	조단백질	조지방	탄수화물	폴리페놀
6.09%	5.12%	4.95%	13.66%	24.19%	45.99%

[0047] 감태 추출물의 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 분석은 선형상 농도 구배 용매 시스템을 사용하여 C18 역상 컬럼에 5 mg/mL의 감태 추출물을 20 μL 씩 직접적으로 주입하였다. 이동상은 메탄올-물로 다음과 같이 비율에 변화를 주었다. 0.1% 포름산이 포함된 메탄올과 0.1% 포름산이 포함된 물을 0에서 50분 동안 5에서 100%로 흘려주었고, 유속은 0.5 mL/min이었으며, UV 흡광도 290 nm에서 측정하였다.

[0048] 감태 추출물에는 다량의 폴리페놀이 포함되어 있으며(표 1), HPLC 결과를 통해 감태 추출물에 포함된 폴리페놀은 플로로탄닌류인 것으로 확인되었다 (도 1). 실시예 1의 감태 추출물은 디에콜(dieckol), 6,6'-비에콜(6,6'-bieckol), 피로겔롤-플로로글루시놀-6,6'-비에콜(pyrogallol-phloroglucinol-6,6'-bieckol), 플로로푸코푸로에콜(phlorofucofuroeckol)의 화합물을 포함하고 있다.

[0050] 실험예 2. 감태 추출물의 섬유아세포 증식 억제 효과

[0051] 사람 유래 기도 섬유아세포인 Hs 680.Tr human tracheal fibroblast cell를 사용하였다. 동결되어있던 세포를 37℃의 항온수조(waterbath)에 녹이고 배지를 첨가한 후, 원심분리기를 이용하여 100 g (747 rpm)에서 3분 동안 원심분리 하였다. 그리고 펠렛(pellet)은 남기고 상등액을 모두 제거한 후, 새 배지를 첨가하여 현탁(suspension)시킨 후 100 mm 디쉬(dish)에 계대배양(subculture) 하였다.

[0052] 위와 같이 준비된 각각의 섬유아세포에 최종농도 0, 25, 50, 100, 200 및 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 실시예 1의 추출물 분말을 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해시킨 추출물 용액을 각각 처리하였다. 감태 추출물 처리 1일차, 3일차, 5일차에 세포증식억제 효과를 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) 어세이를 통하여 확인하였고, 그 결과 그래프를 도 2에 나타내었다.

[0053] 도 2를 참조하면, 감태 추출물이 섬유아세포의 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 감태 추출물을 처리한 1일차에는 처리 농도에 관계없이 무처리 세포와 유사한 세포 증식률을 보였다. 처리 3일차부터 섬유아세포 증식 억제 효과가 나타났다. 무처리 세포의 증식률과 비교하였을 때, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 폴리페놀을 포함한 감태 추출물을 처리한 섬유아세포에서 증식 억제 효과가 나타났다. 감태 추출물 처리 5일차에서도 동일하게 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 폴리페놀을 포함한 감태 추출물을 처리한 섬유아세포에서 증식 억제 효과가 나타났고, 3일차보다 5일차에서 섬유아세포의 증식 억제 효과가 더 커진 것을 확인할 수 있었다.

[0055] 실시예 2-3 및 비교예 1

[0056] 비교예 1. PCL용액으로만 코팅된 삽관 튜브의 제조

[0057] 클로로메탄에 PCL(Polycaprolactone)을 용해시켜 10% PCL 용액을 준비한 후, 실리콘 재질의 삽관 튜브를 10% PCL 용액에 담그는 방법으로 코팅하였다. PCL 코팅 후 흡 후드(Hume hood)에서 24시간 동안 공기 건조(air-dry)하였다.

[0058] 도 3의 (a)는 어떤 코팅도 하지 않은 튜브, (b)는 10% PCL이 코팅된 튜브(비교예 1)의 모습을 나타낸 것이다.

[0060] 실시예 2-3. PCL 용액 및 감태 추출물로 코팅된 삽관 튜브의 제조

[0061] 클로로메탄에 PCL을 용해시켜 10% PCL 용액을 준비한 후, 실리콘 재질의 삽관 튜브를 10% PCL 용액에 튜브를 담그는 방법으로 코팅하였다. PCL 코팅은 코팅된 감태 추출물의 약물 전달을 조절하기 위해서이다. PCL 코팅 후 흡 후드(Hume hood)에서 2시간 동안 공기 건조(air-dry) 하였다. PCL 코팅을 2번 수행하기 위해서 동일한 방법으로 10% PCL 용액을 튜브에 한번 더 코팅한 후 튜브를 흡 후드에서 24시간 동안 공기 건조하였다.

[0062] 70% 에탄올에 감태 추출물의 분말을 녹여 만든 5%(w/v) 감태 추출물 용액에 건조과정을 거친 튜브를 담그어 교반기 위에서 24시간 동안 상온에서 코팅하였다. 코팅한 후 증류수를 이용하여 튜브를 20번 약하게 흔들어서 (inverting) 세척하였다. 이와 같은 세척방법을 5회 실시하였다. 흡 후드에서 튜브를 24시간 동안 공기 건조한 후 4℃, 암실에서 보관하였다. 도 3은 감태 추출물이 코팅된 기관 삽관 튜브의 모습을 나타낸 것이다. 도 3의 (c)는 10% PCL 1번 코팅-5% 감태 추출물 코팅된 튜브(실시예 2), (d)는 10% PCL 2번 코팅-5% 감태 추출물 코팅된 튜브(실시예 3)를 나타낸 것이다.

[0063] 도 3의 (c)와 (d)를 참조하면, 튜브를 PCL 용액으로 2번 코팅함으로써 더 많은 양의 감태 추출물이 코팅됨을 확인할 수 있다.

[0065] 실험예 3. 감태 추출물로 코팅된 튜브의 폴리페놀 방출량 측정

[0066] 실시예 3(도 3의 (d))에서 방출되는 폴리페놀의 양을 측정하고자, 실시예 3의 튜브를 PBS 10 mL에 담그고 37℃에 두어, 폴리페놀이 방출되는 양을 측정하였다. PBS에 튜브를 담그고 24시간이 지난 후, PBS 100 μL를 꺼내 폴리페놀 어세이를 실시하였다.

[0067] 표준곡선(standard curve) 작성을 위해 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 및 1,000 μg/ml 농도의 플로로글루시놀(phloroglucinol)을 준비한 후, 96웰 플레이트에 각각 20 μL 분주하였다. PBS 시료도 96웰 플레이트에 20 μL 분주하였다. 그 다음, 96웰 플레이트에 1 N 폴린-씨오칼테우 시약 (Folin-Ciocalteu reagent) 100 μL씩 첨가하였고, 호일로 감싼 뒤 상온에서 3분 동안 반응시켰다. 반응 후, 7.5% 탄산나트륨(Na₂CO₃) 80 μL를 추가로 첨가한 뒤 호일로 빛을 차단하고 상온에서 20분 동안 반응시켰다. 765 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 내 폴리페놀의 양을 정량하였다.

[0068] 동일한 방법으로 24시간 마다, 최대 7일까지 폴리페놀 어세이를 하여 방출 양을 측정하였다.

[0069] 도 4는 실시예 3(도 3의 (d))의 폴리페놀 방출 양을 측정한 결과이다. 실제 병원에서 환자에게 기도 삽관을 최대 7일까지만 진행하므로 7일까지의 폴리페놀 방출 양을 측정하였다. 폴리페놀은 1일째부터 방출되기 시작하는 것으로 나타났다.

[0070] 기도 삽관은 최대 7일까지만 진행되므로 삽관 후 초기부터 폴리페놀이 방출되는 것은 협착 예방 또는 치료에 효과적이다. 또한 마지막 7일째까지 지속적으로 폴리페놀이 방출되고, 방출되는 폴리페놀의 양도 급격한 증감없이 서서히 증가하므로 튜브 삽관 기간 동안 폴리페놀의 방출 지속성이 우수함을 알 수 있다.

[0072] 실험예 4. 기관 협착 동물 모델의 제조

[0073] 실험동물로는 2.0-2.5 kg 된 수컷 뉴질랜드 흰 토끼를 사용하였으며, 토끼의 기도에 레이저를 10 W 파워로 2초 동안 조사하여 협착을 유발하였다.

[0075] 실험예 5. 단백질 발현 수준에서 본 감태 추출물의 섬유증 억제 효과 확인

[0076] 비교예 1의 튜브(도 3의 (b))와 실시예 3의 튜브(도 3의 (d))를 각각 기관 협착이 유발된 토끼(실험예 4)의 기도에 삽관하였다. 삽관 후 1일, 3일 뒤에 토끼의 기도를 적출하여 단백질 발현을 확인하였다.

[0077] 단백질 발현을 확인하는 방법으로는 웨스턴 블랏(Western blot)을 이용하였다. 적출한 토끼의 기도와 용해 버퍼(lysis buffer)를 조직파쇄기에 넣고 파쇄하였다. 그 후, 원심분리를 시행하였다. 원심분리 후, 상층액을 새 튜브에 옮기고, 상층액 속 단백질의 양을 정량하였다. 25 ug의 단백질을 각각 SDS-PAGE(polyacrylamide gel)에 로딩하여 전기영동을 진행하였다. 그리고 겔에 있는 단백질을 멤브레인(membrane)으로 옮기기 위해 전기를 걸어 주었다(electrotransfer). 그 후, Collagen type I, α -SMA, VEGF, β -Actin를 각각 인식하는 1차 항체(antibody)와 단백질을 반응시킨 후, 각 1차 항체를 인식하는 호스-래디쉬 퍼옥시데이즈(HRP, horse-radish peroxidase)가 결합되어있는 2차 항체와 반응시켰다. 그리고 ECL(enhanced chemiluminescence) 용액을 이용하여 단백질 발현 정도를 확인하였다.

[0078] 도 5는 비교예 1과 실시예 3의 튜브(도 3의 (d))를 삽관한 기관 협착 동물 모델의 섬유증 억제 효과를 단백질 수준에서 비교한 결과이다. 콜라겐 축적과 섬유증의 대표적인 마커인 콜라겐 타입 I(Collagen type I), α -평활근 액틴(α -SMA, α -smooth muscle actin), 혈관표피성장인자(VEGF, Vascular endothelial growth factor)의 단백질 발현을 비교하였다. 콜라겐 타입 I 단백질과 α -평활근 액틴(α -SMA)은 PCL만 코팅한 튜브보다 PCL-감태 추출물 코팅된 튜브에서 발현이 감소하였고, 섬유증이 일어나면서 발현이 증가하는 혈관표피성장인자(VEGF) 또한 PCL-감태 추출물 튜브를 삽관 시 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 혈관표피성장인자의 경우, PCL만 코팅한 튜브를 삽관하였을 경우 삽관 1일 차에 비해 3일 차에서 발현이 증가하였으나, PCL-감태 추출물 코팅된 튜브를 삽관하였을 경우에는 3일 차에 발현이 감소하였다.

[0080] 실험예 6. mRNA 발현 수준에서 본 감태 추출물의 섬유증 억제 효과 확인

[0081] 비교예 1의 튜브(도 3의 (b))와 실시예 3의 튜브(도 3의 (d))를 각각 기관 협착이 유발된 토끼(실험예 4)의 기도에 삽관하였다. 삽관 후 1일, 3일 뒤에 토끼의 기도를 적출하여 mRNA 발현을 확인하였다.

[0082] 토끼의 기도를 적출한 후, 적출한 조직을 트리졸(Trizol) 용액과 함께 조직파쇄기를 이용하여 완전히 파쇄하였다. 이후, 클로로포름(Chloroform)을 넣고 5분 동안 반응시켰으며 13,000 rpm과 4 °C 조건에서 원심분리를 15분 동안 진행하였다. 원심분리 후 RNA 층을 새로운 튜브로 옮기고 이소프로판올(isopropanol)을 넣고 섞은 후 15분 동안 반응시켰다. 동일한 조건에서 원심분리를 진행한 뒤, 상층액을 모두 버리고 75 % 에탄올을 첨가하여 섞어 준 후, 다시 한번 더 동일한 조건에서 원심분리를 진행하였다. 상층액을 모두 제거한 뒤 16시간 동안 건조시킨 후 mRNA를 RNase가 없는 증류수로 희석시켰다. mRNA를 cDNA로 합성시킨 후, cDNA로 RT-PCR을 이용하여 협착유발 조직에서의 mRNA 발현을 비교하였다.

[0083] 도 6은 비교예 1의 튜브와 실시예 3의 튜브(도 3의 (d))를 삽관한 기관 협착 동물 모델의 섬유증 억제 효과를 mRNA 수준에서 비교한 결과이다. 콜라겐 축적과 섬유증의 대표적인 마커인 콜라겐 타입 III(Collagen type III), α -평활근 액틴(α -SMA, α -smooth muscle actin), 헴 옥시데이즈-1(HO-1, Heme oxygenase-1), 전환성장인자- β 1(TGF- β 1, Transforming growth factor β 1)의 mRNA 발현을 비교하였다. PCL만 코팅한 튜브보다 PCL-감태 추출물 코팅된 튜브에서 콜라겐 타입 III, α -평활근 액틴(α -SMA) 및 전환성장인자- β 1(TGF- β 1)의 mRNA 발현이 감소하였다. 헴 옥시데이즈-1(HO-1)는 항산화 효과를 나타내는 마커로 섬유화증을 억제하는 것으로 알려져 있다. PCL만 코팅한 튜브보다 PCL-감태 추출물 코팅된 튜브에서 헴 옥시데이즈-1(HO-1)의 발현이 증가하였다. 도 5 및 도 6의 결과를 참조하면 감태 추출물은 섬유화 관련 인자들의 mRNA 및 단백질 발현을 억제하고, 섬유화 억제 관련 인자의 발현을 촉진시키는 것으로 나타났다.

[0085] 실험예 7. 감태 추출물의 콜라겐 축적 억제 효과 확인

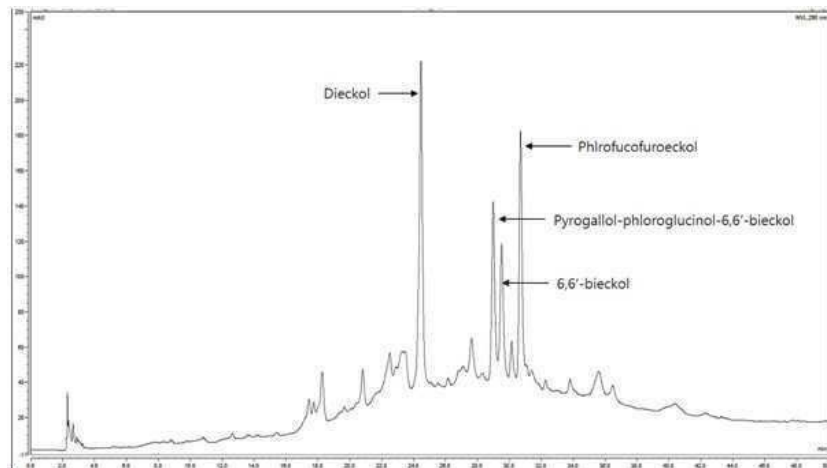
[0086] 비교예 1의 튜브(도 3의 (b))와 실시예 3의 튜브(도 3의 (d))를 각각 기관 협착이 유발된 토끼(실험예 3)의 기도에 삽관하였다. 삽관한 지 7일 후 튜브를 제거하였고, 튜브 제거 4주 후에 토끼의 기도를 적출하였다. 적출한 토끼의 기도를 Masson's trichrome 법을 이용하여 기도에 축적된 콜라겐을 염색하였다.

[0087] 도 7은 비교예 1의 튜브와 실시예 3의 튜브(도 3의 (d))를 삽관한 기관 협착 동물 모델의 콜라겐 축적을 비교한 결과이다. 도 7의 a, a'는 결합 조직 부분이고, b, b'는 연골 부분이며 연골에도 콜라겐이 존재하므로 같이 염

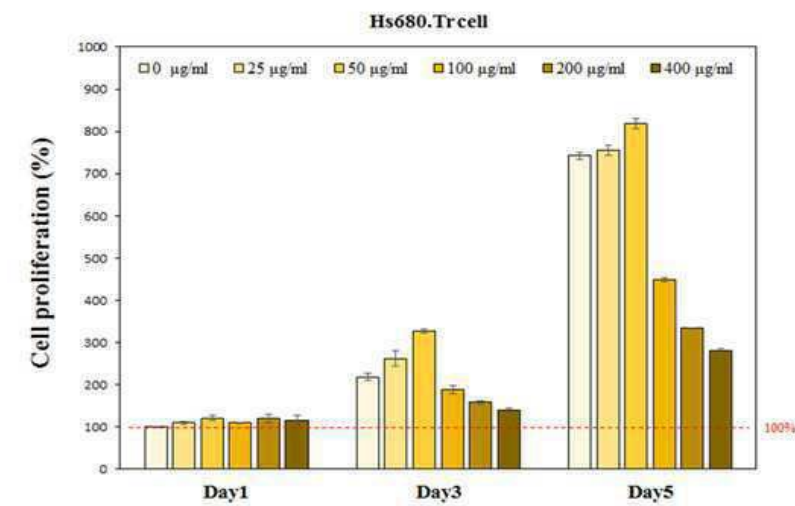
색이 되었다. a와 a'를 비교하면, PCL만 코팅한 튜브보다 PCL-감태 추출물 코팅된 튜브에서 콜라겐 축적이 더 억제되는 것으로 나타났다.

도면

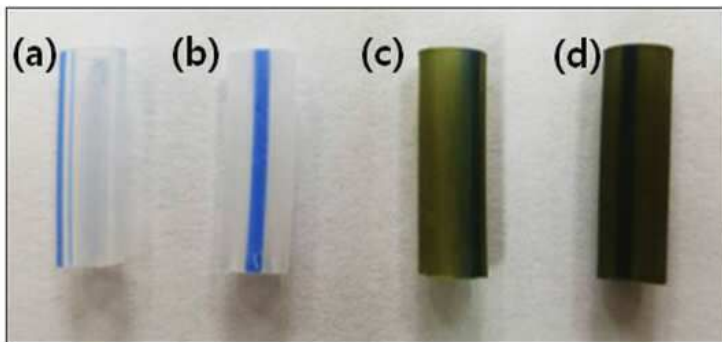
도면1



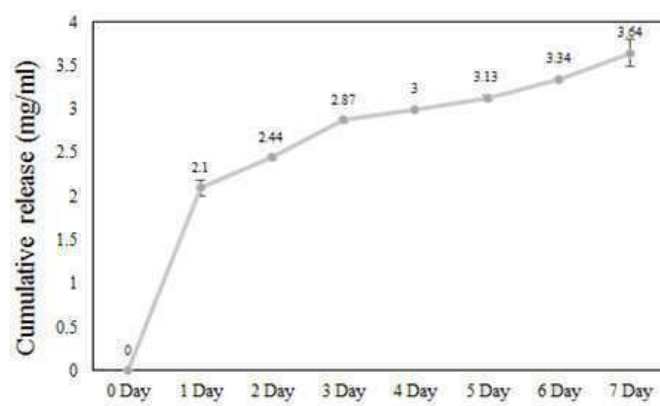
도면2



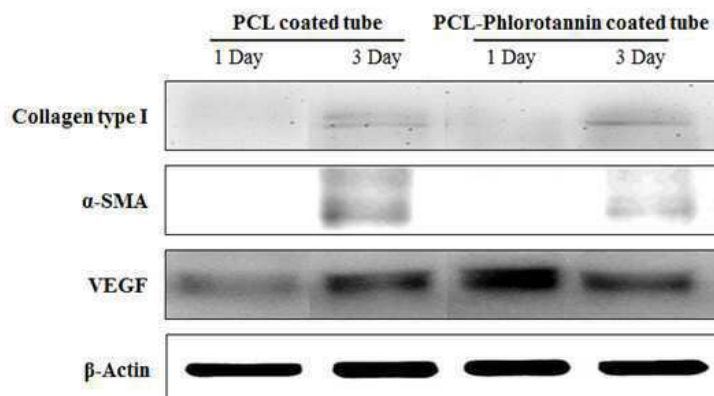
도면3



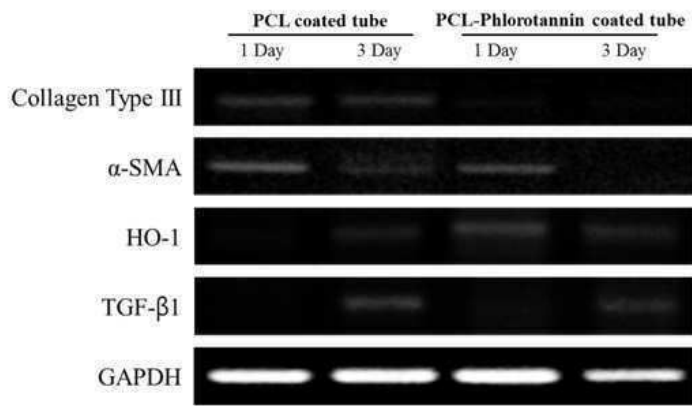
도면4



도면5



도면6



도면7

