(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0063716
(43) 공개일자 2016년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/35 (2006.01) *A61K 31/357* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0167336
(22) 출원일자 2014년11월27일
심사청구일자 2014년11월27일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
강영희
강원도 춘천시 충열로 32, 103동 1102호 (우두동, 동부아파트)
강민경
제주특별자치도 제주시 광양7길 30, 3층 (이도이동)
(74) 대리인
특허법인태동

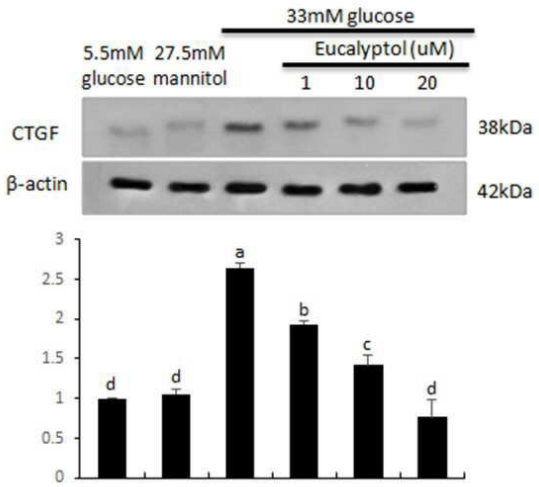
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **유칼립톨을 함유하는 신장 섬유증 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 유칼립톨을 유효성분으로 함유하는 당뇨병으로 인한 신장 섬유증을 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 CTGF 발현 감소, 제 4(IV)형 콜라겐 생성 감소, MT1-MMP 발현 증가, TIMP-2 활성을 감소시킴으로써 우수하게 신장 섬유증을 예방 및 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012H1B8A2026122
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 지역혁신인력양성사업
연구과제명 비만 및 비만유래 동맥경화 억제 소재의 기전적 탐색 및 건강기능 식품개발
기 여 율 1/1
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

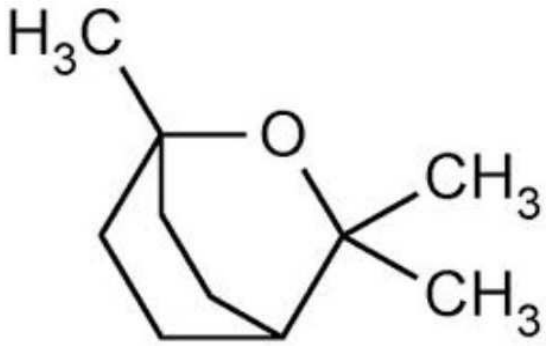
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 구조를 갖는 유칼립톨(eucalyptol)을 유효성분으로 함유하는 신장 섬유증 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신장 섬유증은,

당뇨병성 근위세뇨관 섬유화로 인한 것임을 특징으로 하는 신장 섬유증 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

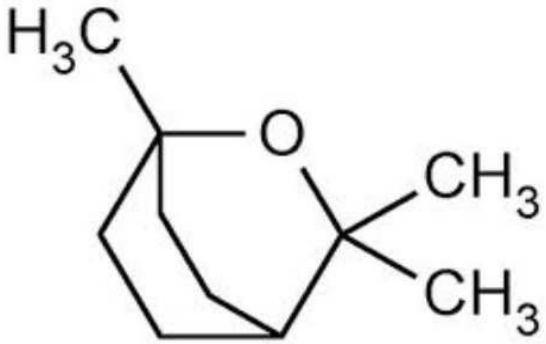
상기 유칼립톨은,

농도가 1~20 μM/mℓ인 것을 특징으로 하는 신장 섬유증 치료용 약학 조성물.

청구항 4

하기 화학식 1의 구조를 갖는 유칼립톨(eucalyptol)을 유효성분으로 함유하는 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 5

제4항에 있어서,

상기 신장 섬유증은,

당뇨병성 근위세뇨관 섬유화로 인한 것임을 특징으로 하는 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 유칼립톨은,

농도가 1~20 μM/mℓ인 것을 특징으로 하는 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유칼립톨을 유효성분으로 함유하는 신장 섬유증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 유칼립톨을 유효성분으로 함유하는 당뇨병성 근위세뇨관 섬유화로 인한 신장 섬유증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 생활수준의 향상과 인간수명의 증가로 인하여 급속도로 증가하고 있는 당뇨병은 전 세계적으로 주목받고 있는 만성질환이다.

[0003] 당뇨병은 대표적인 만성질환으로 포도당을 비롯한 여러 대사 장애로 망막, 신장 및 신경 등의 미세혈관 합병증과 중풍, 협심증, 심근경색증 및 말초 혈관 질환 등의 대혈관 합병증을 초래하며 사망률과 이환율을 증가시키며 삶의 질을 저하시키는 질환이다.

[0004] 당뇨병은 췌장의 베타세포에서 생성되는 인슐린 호르몬 부족 또는 인슐린 저항성의 이상과 나아가 이러한 두 가지 모두의 결함으로 발생하는 고혈당을 특징으로 하는 대사장애증후군이다. 이러한 당뇨병은 인슐린 의존형 당뇨병 (IDDM; Type I)과 인슐린 저항 및 인슐린 분비 손상에 의해 발생하는 인슐린 비의존형 당뇨병 (NIDDM; Type II)으로 나눌 수 있다.

[0005] 제I형과 제II형 당뇨병 모두에서 신장 질환, 심장 질환, 장 질환, 안과 질환, 신경 질환, 뇌졸증 등과 같은 다양한 합병증이 발생하게 되는데, 이는 장시간 동안 혈당과 인슐린 수준이 상승하여 만성신경질환과 심혈관질환이 발생하고, 단시간의 저혈당과 고혈당반응으로 급성 합병증을 야기시키게 된다.

[0006] 당뇨 환자의 주된 사망 요인은 외국에서는 심장질환이지만, 우리나라에서는 당뇨 합병증으로 인한 당뇨병성 신부전(diabetic renal failure)이 1순위로 보고되었다.

[0007] 당뇨병성 신증의 초기변화는 신장의 용적이 증가하고 단백뇨 배설이 증가하며, 사구체 및 세뇨관 기저막의 비후, 이후 사구체 혈관간질 증가, 세포 외 지질의 축적, 사구체 경화증 및 세뇨관 간질의 섬유화로 진행하게 된다. 특히, 고혈당이 이러한 변화를 유발하는 가장 중요한 인자이며, 이로 인해 신장 혈관간세포의 비정상적인 증식으로 혈관간조직이 비대해져서 결국 사구체 기저막이 비후하게 되고, 사구체 혈관내경이 좁아지게 된다.

[0008] 한편, 종래에 보고된 당뇨병성 신장 섬유증에 치료 효과가 있는 천연 물질로서, 대한민국 특허등록번호 제10-1063524호 (등록일자: 2011.09.01)에는, 검정옥수수 추출물, 대한민국 특허공개번호 제10-2011-0060993호 (공개일자: 2011.06.09)에는, 감초 추출물에 함유되어 있는 이소앙구스톤 A가 개시되어 있다.

[0009] 다만, 아직까지 유칼립톨(eucalyptol)의 당뇨병성 근위세뇨관 섬유증으로 인한 신장 섬유증의 치료능에 대해서는 전혀 개시된 바 없는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 유칼립톨을 유효성분으로 함유하여 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 CTGF 발현 감소, 제 4(IV)형 콜라겐 생성 감소, MT-1 MMP 발현 증가, TIMP-2 활성을 감소시킴으로써 당뇨병으로 인한 신장 섬유증을 예방 및 치료할 수 있는 조성물을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

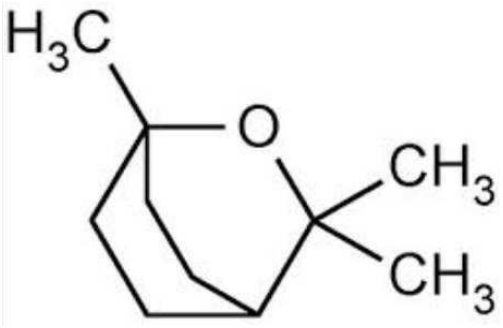
[0011] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 유칼립톨(eucalyptol)을 유효성분으로 함유하는 신장 섬유증 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 한편, 상기 신장 섬유증 치료용 약학 조성물에 있어서, 상기 신장 섬유증은 바람직하게 당뇨병성 근위세뇨관 섬유화로 인한 것일 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 하기의 화학식 1의 구조를 갖는 유칼립톨(eucalyptol)을 유효성분으로 함유하는 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0014] 한편, 상기 신장 섬유증 예방 및 치료용 식품 조성물에 있어서, 상기 신장 섬유증은 바람직하게 당뇨병성 근위세뇨관 섬유화로 인한 것일 수 있다.

[0015] [화학식 1]

[0016] 

[0017] 이하, 본 발명의 과제 해결 수단에 대해 상세히 설명하고자 한다.

[0018] 본 발명자들은 신장 섬유증을 예방 및 치료하는 생리활성물질을 탐색하는 과정에서 유칼립톨(eucalyptol)에 주목하게 되었다.

[0019] 일반적으로 유칼립톨은 유칼립투스(*Eucalyptus globulus*)의 잎에서 추출하여 오일을 정류 및 블렌딩한 에센셜 오일로서, 항염증, 항통증, 항바이러스, 해열 작용 등 다양한 생리 활성이 알려져 있는 물질이다.

[0020] 본 발명에서 유칼립톨은 본 기술이 속한 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 제조된 것을 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수도 있다.

[0021] 한편, 당뇨병성 신증은 신장내 세포외 기질(extracellular matrix: ECM)의 과다한 축적을 특징으로 하며, ECM의 축적은 그 생산과 분해의 균형에 의하여 조절되고, 사구체 혈관간질의 확장과 경화 및 세뇨관 간질의 섬유화를 유발한다.

[0022] 본 발명에서는 유칼립톨의 우수한 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 결합조직 성장인자(connective tissue growth factor, CTGF) 발현 감소 효과, 제 4(IV)형 콜라겐(collagen) 생성 감소 효과, 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase, MT-1 MMP) 발현 증가 효과, MT-1 MMP 억제제(Tissue Inhibitors of Metalloproteinase, TIMP)-2 활성 감소 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다. 이로부터, 본 발명의 유칼립톨에 당뇨병성 근위세뇨관 섬유증으로 인한 신장 섬유증을 우수하게 예방 및 치료할 수 있는 효능이 있음을 알 수 있었다.

[0023] 한편, 본 발명은 유칼립톨(eucalyptol)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신장 섬유증 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 신장 섬유증 치료용 약학 조성물에 포함되는 유칼립톨의 함량은, 예방 및 치료제의 사용방법, 복용자의 상태, 질환의 종류 및 질환의 중증 정도에 따라 바람직하게 조절하는 것이 좋다. 본 발명의 조성물에서 유칼립톨의 함량은 신장 섬유증 치료용 약학 조성물 중 0.000001~50중량%일 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 그러나 그 함량이 0.000001중량% 미만인 경우 신장 섬유증 치료 효과가 미미할 수 있으며, 50중량% 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 상승률이 낮아 비경제적일 수 있다.

[0025] 한편, 본 발명의 신장 섬유증 치료용 약학 조성물에 함유되는 유칼립톨(eucalyptol)의 농도는 바람직하게 1~20 μM/㎖인 것이 좋은데, 반드시 이에 한정되지는 아니한다.

[0026] 한편, 본 발명의 신장 섬유증 치료용 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이들은 1종 이상 사용될 수 있다. 또한, 예방 및 치료제가 약제인 경우 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등이 추가적으로 포함될 수 있다.

[0027] 한편, 본 발명의 신장 섬유증 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LPTIONS), 리니멘트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 안연고제(OPHTALMIC OINTMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPESIONS), 전제(DECOCTIONS), 침제(INFUSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITIORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLSMA), 캅셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 틴크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0028] 한편, 본 발명의 신장 섬유증 치료용 약학 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일예로, 본 발명의 신장 섬유증 치료용 약학 조성물은 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.1 내지 100 ㎎/㎏(체중)으로 1회 이상 투여가능하다. 그러나 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 따라 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.

[0029] 한편, 본 발명은 유칼립톨(eucalyptol)을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0030] 본 발명의 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물에 포함되는 유칼립톨의 함량은 바람직하게 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물 중 0.000001~50중량% 포함되는 것이 좋다. 0.000001중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미미하고, 50중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.

[0031] 한편, 본 발명의 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물에 함유되는 유칼립톨(eucalyptol)의 농도는 바람직하게 1~20 μM/㎖인 것이 좋은데, 반드시 이에 한정되지는 아니한다.

[0032] 한편, 본 발명의 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물은 바람직하게 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜렛, 빵류, 스넥류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나인 것인 것이 좋으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 의할 경우, 유칼립톨을 유효성분으로 함유하여 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 CTGF 발현 감소, 제 4(IV)형 콜라겐 생성 감소, MT-1 MMP 발현 증가, TIMP-2 활성을 감소시킴으로써 당뇨병으로 인한 신장 섬유증을 예방 및 치료할 수 있는 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 유칼립톨이 만성 고혈당에서의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 결합조직 성장인자(CTGF)의 발현 및 분비에 대해 억제활성을 나타내는 것을 보여주는 웨스턴 블롯 분석결과이다.

도 2는 유칼립톨이 만성 고혈당에서의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 제 4(IV)형 콜라겐 생성에 대해 감소활성을 나타내는 것을 보여주는 웨스턴 블롯 분석결과이다.

도 3은 유칼립톨이 만성 고혈당에서의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 MT-1 MMP 발현에 대해 증가 활성을 나타내는 것을 보여주는 웨스턴 블롯 분석결과이다.

도 4는 유칼립톨이 만성 고혈당에서의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 TIMP-2 활성을 감소시키는 것을 보여주는 웨스턴 블롯 분석결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0036] **[실험예 1: 유칼립톨의 결합조직 성장인자(Connective Tissue Growth Factor, CTGF) 발현 및 분비 억제 효과 확인]**

[0037] 본 실험예에서는 유칼립톨의 처리에 따른 인간의 신장 근위세뇨관세포(renal proximal tubular epithelial cells, RPTEC)의 결합조직 성장인자(Connective Tissue Growth Factor, CTGF)의 발현 정도를 확인하고자 하였다.

[0038] (1) 세포 배양

[0039] 인간의 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)는 Lonza에서 구입하여 배양하였다. RPTEC는 0.5% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 2mM 글루타민(Glutamine), 100 U/㎖ 페니실린(Penicillin), 100 mg/㎖ 스트렙토마이신(Streptomycin)이 첨가되어 있는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 Nutrient Mixture F-12가 1:1로 함유된 배지에 5 g/㎖ 인슐린(insulin), 5 g/㎖ 하이드로코르티손(hydrocortisone), 0.5 g/㎖ 에피네프린(epinephrine), 10 g/㎖ 트랜스페린(transferrin), 3 ng/㎖ 인간 상피세포성장인자(Epithelial growth factor), 6.5 ng/㎖ 트리요오드티로닌(triiodothyronine)이 첨가된 배지를 이용하여 37℃, 5% 이산화탄소(CO_2) 조건에서 배양하였다.

[0040] 상기 배양된 배지를 만성 고혈당으로 인한 세뇨관 경화증과 같은 상황을 유도하기 위하여 33mM 글루코오스(Glucose)를 첨가한 배지에서 3일 동안 처리하였다. 그 후, 33mM 글루코오스(Glucose)를 첨가한 배지에서 유칼립톨을 농도별로 0 μM/㎖, 1 μM/㎖, 10 μM/㎖, 20 μM/㎖씩 3일 동안 각각 처리하였다. 또한, 삼투압 대조군으로 5.5mM 글루코오스와 27.5mM 마니톨(Mannitol)이 각각 함유된 배지에서 신장 근위세뇨관세포를 3일간 배양

하였다.

[0041] (2)웨스톤 블롯

[0042] 상기 각각 배양된 신장 근위세뇨관세포를 1% β-메르캅토에탄올(β-Mercaptoethanol), 1M β-글리세로포스페이트(β-Glycerophosphate), 0.1M Na_3VO_4, 0.5M 불화소다(NaF), 프로테아제 억제인자 칵테일(Protease Inhibitor Cocktail)을 포함한 완충액(Buffer)으로 분해(Lysis)시킨 후, 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 수득하였다. 상기 상층액을 10% SDS-PAGE 겔(Gel)상에서 70V로 전기영동 하였다. 겔(Gel)상에 있는 단백질은 니트로셀룰로우스 막(Nitrocellulose Membrane)으로 전이시킨 다음, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 3% 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)에 3시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 그 후, CTGF의 일차항체(Rabbit polyclonal antibody, Peprotech)로 니트로셀룰로우스 막(Nitrocellulose membrane)과 교반하면서 4℃에서 하룻밤 배양하고 이차항체(Goat Anti-rabbit Horseradish Peroxidase, Jackson ImmunoResearch Lab., West Grove, PA, USA)로 1시간 동안 배양하였다. 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)에 전이된 단백질은 이모빌론 웨스턴 화학발광의 겨자무과산화효소 기질(Immobilon western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate, Millipore Corp., Billerica, MA)로 검출하여 각각 X-ray 필름으로 촬영하였다.

[0043] 실험결과, 삼투압 대조군은 CTGF의 발현 및 분비가 적었으나, 3일간 고혈당에 노출된 근위세뇨관세포는 CTGF의 발현 및 분비가 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만, 고혈당에 노출된 근위세뇨관세포에 유칼립톨을 10 μM/㎖ 이상 처리하였을 때, 삼투압 대조군 수준으로 CTGF의 발현 및 분비가 억제됨을 확인할 수 있었다 (도 1).

[0044] 도 1은 유칼립톨이 만성 고혈당에서의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 결합조직 성장인자(CTGF)의 발현 및 분비 억제활성을 나타낸 웨스턴 블롯 분석결과이다.

[0045] **[실험예 2: 유칼립톨의 제 4(Ⅳ)형 콜라겐 생성 감소 효과 확인]**

[0046] 본 실험예에서는 유칼립톨의 처리에 따른 인간의 신장 근위세뇨관세포(renal proximal tubular epithelial cells, RPTEC)의 제 4(Ⅳ)형 콜라겐의 생성 정도를 확인하고자 웨스톤 블롯을 실시하였다.

[0047] 상기 실험예 1의 (1)에서 배양된 각각의 신장 근위세뇨관세포에 분해 완충액(Lysis Buffer)을 처리하여 세포 추출물을 준비하였다. 상기 세포 추출물의 단백질 분리는 8% SDS-PAGE로 수행하였다. 그 후, 전기 영동된 단백질 밴드들은 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% 탈지분유를 처리한 다음 제 4(Ⅳ)형 콜라겐 단백질의 일차항체(Rabbit polyclonal antibody collagen type IV, membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT-1 MMP) and TIMP-2, Santa Cruz Biotechnology)를 1000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, 이차항체(Goat Anti-rabbit Horseradish Peroxidase (Jackson ImmunoReasearch Lab.)로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)에 있는 제 4(Ⅳ)형 콜라겐 단백질은 이모빌론 웨스턴 화학발광의 겨자무과산화효소 기질(Immobilon western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate, Millipore Corp., Billerica, MA)로 검출한 후, 각각 X-ray 필름으로 촬영하였다.

[0048] 실험결과, 삼투압 대조군은 제 4(Ⅳ)형 콜라겐 단백질의 생성이 적었으나, 3일간 고혈당에 노출된 근위세뇨관세포는 제 4(Ⅳ)형 콜라겐 단백질의 생성이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만, 고혈당에 노출된 근위세뇨관세포에 유칼립톨을 10 μM/㎖ 이상 처리하였을 때, 삼투압 대조군 수준으로 제 4(Ⅳ)형 콜라겐 단백질의 생성이 억제됨을 확인할 수 있었다 (도 2).

[0049] 도 2는 유칼립톨이 만성 고혈당에서의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 제 4(Ⅳ)형 콜라겐 생성 감소 활성을 나타낸 웨스턴 블롯 분석결과이다.

[0050] **[실험예 3: 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase, MT-1MMP)의 발현 증가 효과 확인]**

[0051] 본 실험예에서는 유칼립톨의 처리에 다른 인간의 신장 근위세뇨관세포(renal proximal tubular epithelial cells, RPTEC)의 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase, MT-1 MMP)의 발현 정

도를 확인하고자 웨스톤 블롯을 실시하였다.

[0052] 상기 실험예 1에서 배양된 각각의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)에 분해 완충액(Lysis Buffer)을 처리하여 세포 추출물을 준비하였다. 상기 세포 추출물의 단백질 분리는 10% SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동된 단백질 밴드들은 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 3% BSA를 처리한 다음 MT-1 MMP 단백질의 일차항체(Rabbit polyclonal antibody membrane type 1-matrix metalloproteinase, Santa Cruz Biotechnology)를 1000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, 이차항체(Goat Anti-rabbit Horseradish Peroxidase (Jackson ImmunoReasearch Lab.))로 1시간 동안 반응시켰다. 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)에 있는 막형 기질단백질 분해효소(Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase, MT-1 MMP)는 이모빌론 웨스턴 화학발광의 겨자무과산화효소 기질(Immobilon western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (Millipore Corp., Billerica, MA))로 검출하여 각각의 근위세뇨관세포를 X-ray 필름으로 촬영하였다.

[0053] 실험결과, 삼투압 대조군인 근위세뇨관세포(5.5mM glucose, 27.5mM mannitol 대조군)는 세포외기질(extracellular matrix, EMC) 관련 조절 단백질 효소 마커인 MT-1 MMP의 발현량이 증가하였으나, 3일간 고혈당에 노출된 근위세뇨관세포(RPTEC)에서는 MT-1 MMP의 발현량이 현저하게 감소하였다. 하지만, 고혈당에 노출된 근위세뇨관세포에 유칼립톨을 10 μM/㎖ 이상 처리하였을 때, 삼투압 대조군 수준으로 MT-1 MMP의 발현량이 증가됨을 확인할 수 있었다(도 3).

[0054] 도 3은 유칼립톨이 만성 고혈당에서의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 MT-1 MMP 발현 증가 활성을 나타낸 웨스턴 블롯 분석결과이다.

[0055] **[실험예 4: TIMP(Tissue Inhibitors of Metalloproteinase)-2의 발현 감소 효과 확인]**

[0056] 본 실험예에서는 유칼립톨의 처리에 따른 인간의 신장 근위세뇨관세포(renal proximal tubular epithelial cells, RPTEC)의 MT-1 MMP를 억제하는 효소인 TIMP(Tissue Inhibitors of Metalloproteinase)-2의 발현 정도를 확인하고자 웨스톤 블롯을 실시하였다.

[0057] 상기 실험예 1에서 배양된 각각의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)에 분해 완충액(Lysis Buffer)을 처리하여 세포 추출물을 준비하였다. 상기 세포 추출물의 단백질 분리는 15% SDS-PAGE를 수행하였다. 전기영동된 단백질 밴드들은 니트로셀룰로스 막(Nitrocellulose Membrane)으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 3% BSA를 처리한 다음 TIMP-2 단백질의 일차항체(Rabbit polyclonal antibody Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 , Santa Cruz Biotechnology)를 1000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, 이차항체(Goat Anti-rabbit Horseradish Peroxidase (Jackson ImmunoReasearch Lab.))로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)에 있는 TIMP(Tissue Inhibitors of Metalloproteinase)-2의 발현은 이모빌론 웨스턴 화학발광의 겨자무과산화효소 기질(Immobilon western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (Millipore Corp., Billerica, MA))로 검출하여 X-ray 필름으로 각각 촬영하였다.

[0058] 실험결과, 삼투압 대조군인 근위세뇨관세포(5.5mM glucose, 27.5mM mannitol 대조군)는 TIMP-2의 발현량이 적었으나, 3일간 고혈당에 노출된 근위세뇨관세포(RPTEC)에서는 TIMP-2의 발현량이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만, 고혈당에 노출된 근위세뇨관세포에 유칼립톨을 10 μM/㎖ 이상 처리하였을 때, 삼투압 대조군 수준으로 TIMP-2의 발현량이 감소함을 확인할 수 있었다 (도 4).

[0059] 도 4는 유칼립톨이 만성 고혈당에서의 인간 신장 근위세뇨관세포(RPTEC)의 TIMP-2 활성을 감소시키는 것을 보여주는 웨스턴 블롯 분석결과이다.

[0060] **[실시예 1: 신장 섬유증 치료용 약제 조성물 제조]**

[0061] 본 실시예에서는 하기와 같이 신장 섬유증 치료용 약제 조성물을 제조하였다.

[0062] (1) 산제 제조

[0063] 유칼립톨 2 g에 유당 1 g을 혼합하고, 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0064] (2) 정제 제조

[0065] 유칼립톨 100 ㎎, 옥수수전분 100 ㎎, 유당 100 ㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2 ㎎을 혼합한 후, 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0066] (3) 캡슐제 제조

[0067] 유칼립톨 100 ㎎, 옥수수전분 100 ㎎, 유당 100 ㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2 ㎎을 혼합한 후, 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0068] (4) 주사제 제조

[0069] 유칼립톨 100 ㎎에 주사용 증류수 적량을 가하여 용해시키고, pH를 약 7.5로 조절한 다음 2 ㎖ 용량의 앰플에 충진 및 멸균시하여 주사제를 제조하였다.

[0070] **[실시예 2: 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물 제조]**

[0071] 본 실시예에서는 하기와 같이 신장 섬유증 예방 및 개선용 식품 조성물을 제조하였다.

[0072] (1) 선식 제조

[0073] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 준비하였다. 검정콩, 검정깨 및 들깨 각각을 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 후 배전 및 분쇄하여 입도 60메쉬의 분말로 준비하였다. 이후, 현미 30중량%, 율무 15중량%, 보리 20중량%, 찹쌀 9중량%, 들깨 7중량%, 검정콩 8중량%, 검정깨 7중량%, 유칼립톨 3중량%, 영지 0.5중량% 및 지황 0.5중량%을 혼합하여 선식을 제조하였다.

[0074] (2) 츄잉껌 제조

[0075] 껌 베이스 20중량%, 설탕 76.9중량%, 향료 1중량%, 물 2중량% 및 유칼립톨 0.1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 츄잉껌을 제조하였다.

[0076] (3) 캔디 제조

[0077] 설탕 60중량%, 물엿 39.8중량%, 향료 0.1중량% 및 유칼립톨 0.1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 캔디를 제조하였다.

[0078] (4) 비스킷 제조

[0079] 박력 1급 25.59중량%, 중력 1급 22.22중량%, 정백당 4.80중량%, 식염 0.73중량%, 포도당 0.78중량%, 팜쇼트닝 11.78중량%, 암모니움 1.54중량%, 중조 0.17중량%, 중아황산나트륨 0.16중량%, 쌀가루 1.45중량%, 비타민 B_1 0.0001중량%, 비타민 B_2 0.0001중량%, 밀크향 0.04중량%, 물 20.6998중량%, 전지분유 1.16중량%, 대용분유 0.29중량%, 제일인산칼슘 0.03중량%, 살포염 0.29중량% 및 분무유 7.27중량%와 유칼립톨 1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 비스킷을 제조하였다.

[0080] (5) 건강음료 제조

[0081] 꿀 0.26중량%, 치옥토산아미드 0.0002중량%, 니코틴산아미드 0.0004중량%, 염산리보플라빈나트륨 0.0001중량%, 염산피리독신 0.0001중량%, 이노시톨 0.001중량%, 오르트산 0.002중량%, 물 98.7362중량% 및 유칼립톨 1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 건강 음료를 제조하였다.

[0082] (6) 소시지 제조

[0083] 돈육 65.18중량%, 계육 25중량%, 전분 3.5중량%, 대두단백 1.7중량%, 식염 1.62중량%, 포도당 0.5중량% 및 글리세린 1.5중량%와 유칼립톨 1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 소시지를 제조하였다.

[0084] (7) 건강보조식품 제조

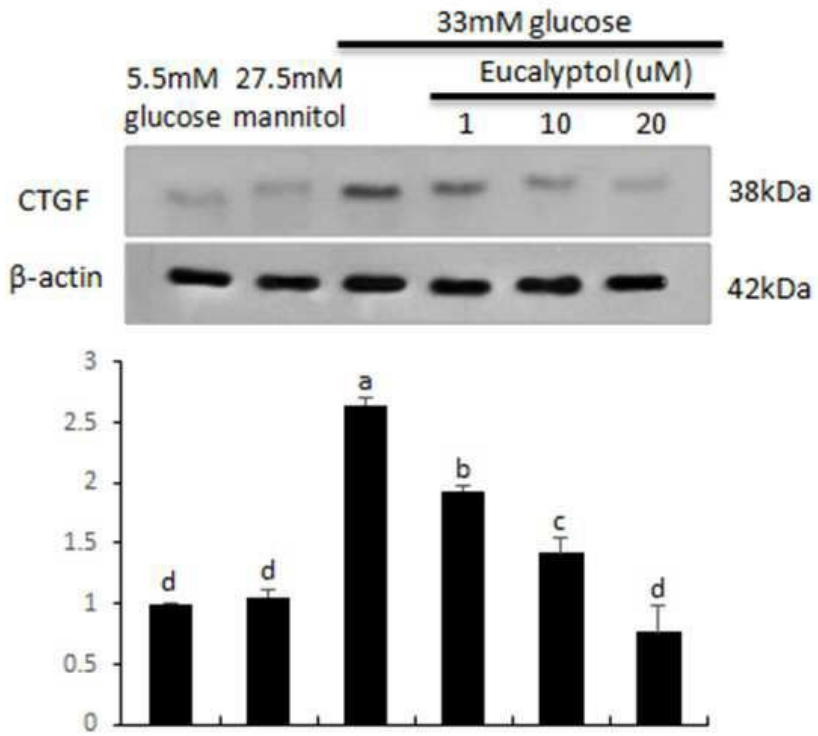
[0085] 스피루리나 55중량%, 구아검효소 분해물 10중량%, 비타민 B_1 염산염 0.01중량%, 비타민 B6 염산염 0.01중량%, DL-메티오닌 0.23중량%, 스테아린산 마그네슘 0.7중량%, 유당 22.2중량% 및 옥수수전분 1.85중량%와 유칼립톨 10중량%를 배합하여 통상의 방법으로 정제형 건강보조식품을 제조하였다.

[0086] (8) 주류 제조

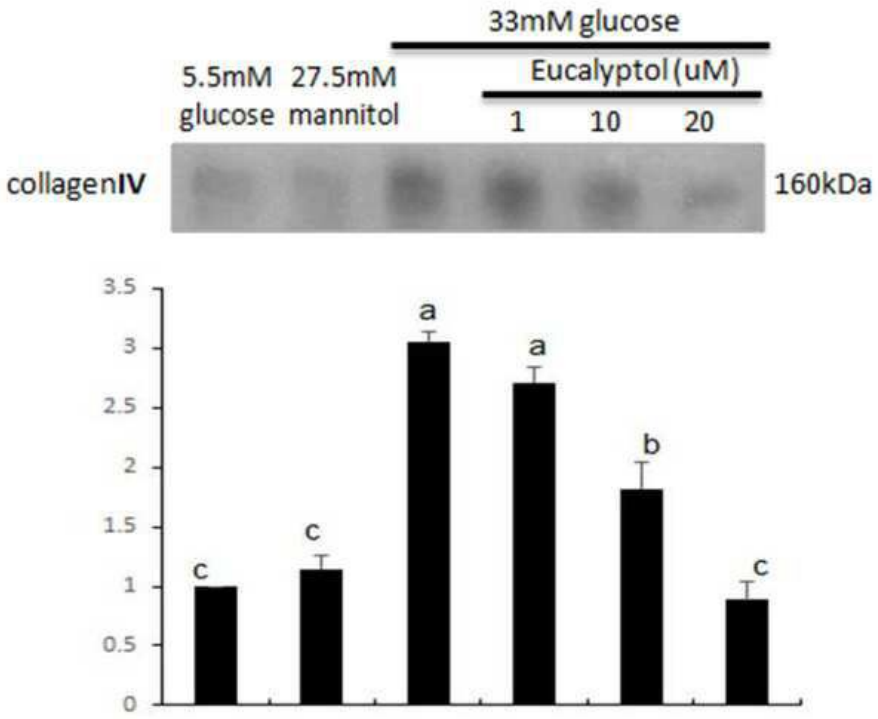
[0087] 유칼립톨 0.5중량%를 소주, 맥주, 양주 또는 과실주와 혼합하여 에멀전 상태로 만든 후, 진공상태에서 7,000 rpm으로 15분간 원심분리하거나 고속믹서기로 9,000 rpm에서 혼합하여 유칼립톨이 함유된 주류를 제조하였다.

도면

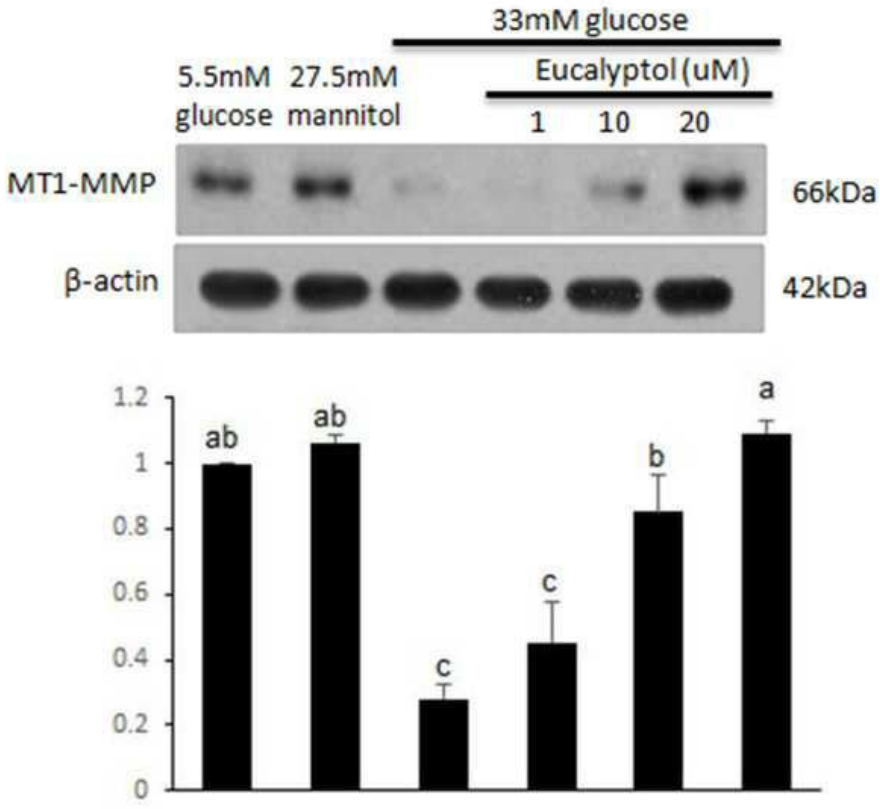
도면1



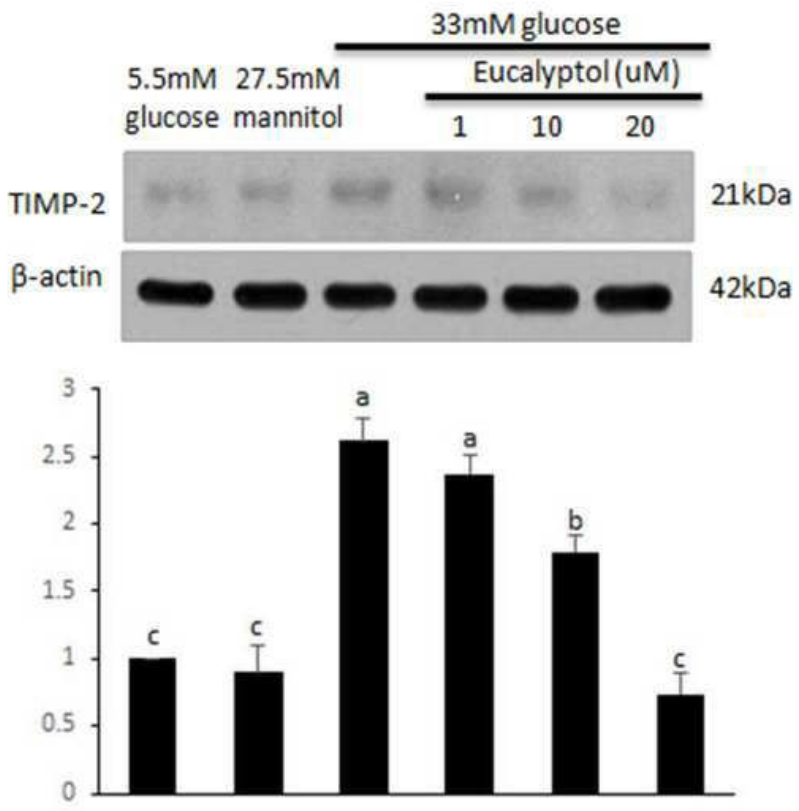
도면2


33mM glucose
5.5mM glucose
27.5mM mannitol
Eucalyptol (uM)
1
10
20
collagenIV
160kDa
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
a
a
b
c
c
c
c

도면3


33mM glucose
5.5mM glucose
27.5mM mannitol
Eucalyptol (uM)
1
10
20
MT1-MMP
66kDa
β-actin
42kDa
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
ab
ab
c
c
b
a

도면4


33mM glucose
Eucalyptol (uM)
5.5mM glucose
27.5mM mannitol
1
10
20
TIMP-2
21kDa
β-actin
42kDa
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
a
a
b
c
c
c