



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0042045
(43) 공개일자 2020년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01) A61K 31/08 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) C07C 43/15 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
A23L 29/03 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0121766

(22) 출원일자 2018년10월12일

심사청구일자 2018년10월12일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자
설근희
서울특별시 동대문구 고산자로 534, 108동 1003호
(제기동, 한신아파트)

신유경
서울특별시 성북구 개운사2길 17, 208호 (안암동5가)

(74) 대리인
이처영, 장제환

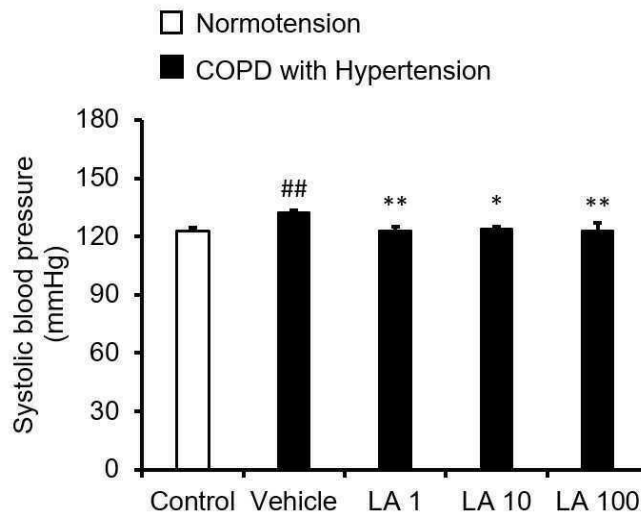
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델, 이의 제조방법 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델, 이의 제조방법 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 유전자 변이 없이 간단하게 생리학적으로 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델을 유도하는 방법 및 상기 방법에 의해 유도된 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델과 그 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 만성 폐쇄성 폐질환의 치료 또는 예방용 약학조성물 및 건강기능 식품에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2016.08)
A61K 31/08 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)
C07C 43/15 (2013.01)
A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2207/35 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/03 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345271071
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공학개인지초연구지원-기본연구
연구과제명	방향성 천연물의 저장소성 뇌혈관 손상 제어 기전 규명
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교
연구기간	2017.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델의 제조방법:

- (a) 대상동물에 만성 부동 스트레스를 가하고, 니코틴을 투여하여 고혈압을 유도하는 단계; 및
- (b) 상기 고혈압이 유도된 대상동물에 포신 판크레아틱 엘라스테이스(porcine pancreatic elastase, PPE) 및 리포폴리사카라이드(LPS)를 투여하여 만성 폐쇄성 폐질환을 유도하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 만성 부동 스트레스는 대상동물의 움직임을 매일 1~4시간씩, 10~30일간 제한하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 움직임의 제한은

- (i) 대상동물의 몸을 천으로 감싸서 고정시키는 방법;
- (ii) 상자에 구속시키는 방법; 및
- (iv) 양쪽이 막힌 원통에 구속시키는 방법으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 니코틴의 투여는 복강투여인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 니코틴은 대상동물의 단위체중 (kg) 당 100~2000 μ g으로 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 PPE 및 상기 LPS의 투여는 비강(intranasal)투여인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 PPE의 투여용량은 동물의 단위체중(kg)당 10 ~ 20단위의 용량으로 투여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 LPS의 투여용량은 동물의 단위체중(kg)당 50 μ g ~ 100 μ g의 용량으로 투여하는 것을 특징

으로 하는 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 PPE 및 LPS는 2~4일의 간격을 두고 각각 1주일에 한번씩 4주간 투여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 대상동물은 인간을 제외한 포유동물인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 동물모델은 폐동맥 혈관내피 기능부전을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 폐동맥 혈관내피 기능부전은 급성 폐 손상, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐기종, 폐부종 및 폐 고혈압으로 구성된 군에서 선택되는 폐질환을 야기시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

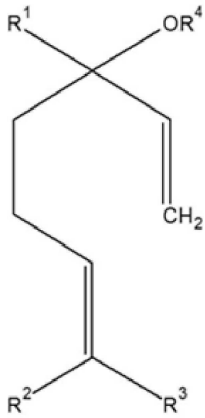
제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법으로 제조되고, 다음 특성 중 하나 이상의 특징을 나타내는 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물모델:

- (i) 정상동물과 비교하여 수축기 혈압 상승;
- (ii) 정상동물과 비교하여 폐포 직경 증가;
- (iii) 정상동물과 비교하여 기관지 폐포 세척액에서의 IL-6 (Interleukin 6) 수치 상승;
- (iv) 정상동물과 비교하여 기관지 폐포 세척액에서의 MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9) 수치 상승;
- (v) 정상동물과 비교하여 SNP (Sodium nitroprusside)에 의한 폐동맥 과다이완; 및
- (iv) 정상동물과 비교하여 폐조직의 eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) 발현 감소.

청구항 14

화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환의 치료 또는 예방용 약학조성물:

[화학식 1]



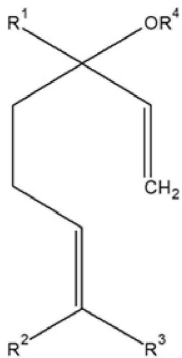
상기 화학식 1에서,

R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 (C_1 - C_6)알킬, 에스테르, 하이드록실기, 카보닐기, 알데히드기, 카르복실기 또는 아세틸기이다.

청구항 15

화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 만성 폐쇄성 폐질환 개선용 건강기능 식품:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 (C_1 - C_6)알킬, 에스테르, 하이드록실기, 카보닐기, 알데히드기, 카르복실기 또는 아세틸기이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델, 이의 제조방법 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 유전자 변이 없이 간단하게 생리학적으로 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델을 유도하는 방법 및 상기 방법에 의해 유도된 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델과 그 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 만성 폐쇄성 폐질환의 치료 또는 예방용 약학조성물 및 건강기능 식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic obstructive pulmonary disease; COPD)은 만성적인 염증 반응에 의한 점진적이고

비가역적인 기류 제한 및 호흡곤란을 특징으로 하는 질환으로, 만성 기관지염으로 인한 작은 기도의 폐쇄와 폐기종으로 인한 기도의 구조적 변화를 포함한다. 이러한 만성 폐쇄성 폐질환은 전 세계적으로 2억 명이 넘는 사람들에게 영향을 미치는 주요한 공중 보건 문제로 여겨지며, 매년 수백만 명의 사망을 초래한다. 특히, 만성 폐쇄성 폐질환에서 동반 질환이 흔하게 발생하는데, 이는 삶의 질 감소 및 사망률 증가와 관련 있다. 고혈압은 이러한 동반 질환 중 가장 흔하게 발생하며 (Divo *et al.*, 2012, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, 186: 155-161), 만성 폐쇄성 폐질환 환자에서 고혈압의 유병률이 그렇지 않은 환자보다 높은 것으로 보고되었다 (Chen *et al.*, 2015, *The Lancet Respiratory Medicine.*, 3: 631-639). 그러나 만성 폐쇄성 폐질환과 동반 질환의 동시적인 치료는 임상 상황에서 흔하게 겪는 문제일 뿐만 아니라, 종종 과소평가되는 경우가 있기 때문에 문제 해결을 위해서는 동반 질환을 가진 만성 폐쇄성 폐질환에서의 병태 생리학적 특성을 명확히 할 필요가 있다.

[0003] 한편, eNOS는 혈관내피세포에서 분비되어 혈관 이완 인자인 Nitric oxide (NO)를 합성하는데 중요한 역할을 하는 효소로써, 혈관내피 기능부전 시 eNOS의 부족으로 인한 NO 결핍을 보이는 것으로 잘 알려져 있다. 폐동맥 혈관내피 기능부전은 만성 폐쇄성 폐질환 환자에서 흔하게 보이는 문제이며, 폐조직에서 eNOS 발현은 비흡연자에 비하여 만성 폐쇄성 폐질환의 주된 위험 요소인 흡연자에서 더 낮은 것으로 보고된 바 있다 (Barbera *et al.*, 2001, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, 164(4): 709-713). 특히, 만성 폐쇄성 폐질환 환자가 건강한 대상자에 비하여 전신 혈관내피 기능부전은 보이지 않았는데 (MacLay *et al.*, 2009, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.*, 180(6): 513-520), 이는 만성 폐쇄성 폐질환 상태에서는 폐동맥 내피세포가 전신 혈관내피세포에 비하여 더욱 취약할 수 있음을 시사한다. 동물 모델에서 고려되어야 할 중요한 요소는 생물학적 효과를 동물 모델로부터 인간 대상자에게 재현이 가능 한가 하는 것이므로, 만성 폐쇄성 폐질환의 동반 질환 및 폐동맥 혈관내피 기능부전과 같은 임상 상황을 잘 반영한 동물모델이 절실하다.

[0004] 현재까지 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델로써, 실험동물을 담배 연기에 노출 시키는 방법, 카스파제 단계를 활성화시켜 세포자멸사를 유도하는 방법, 효소를 주입하여 폐포벽을 파괴시키는 방법, 식이를 중단하는 방법, 염증 유발 인자를 주입하는 방법이 알려져 있으며 (Wright *et al.*, 2008, *American Journal of physiology-lung cellular and molecular physiology.*, 295(1): L1-L15), 선행 특허로 보고된 폐질환 관련 동물 모델을 살펴보면, 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 동물(대한민국 특허공개 10-2012-0082271), 인슐린 유사 성장 인자 2를 활용한 폐기종 동물 모델(대한민국 특허공개 10-2015-0009448), 자가 면역 질환에 의한 만성 폐쇄성 폐염증 동물 모델(대한민국 특허공개 10-2014-0008841), 호흡기 염증 동물모델(대한민국 특허공개 10-2015-0025217), 대식세포의 극성이 조절된 마우스 모델(대한민국 특허공개 10-2017-0124404) 및 폐 섬유증 동물모델(대한민국 특허공개 10-2016-0108269)이 특허로 개시된 바 있으나, 이들은 폐의 병리적인 특성 및 염증반응에 초점을 두었으며, 유전자 조작 모델의 경우에는 환경적인 위험요인을 반영하지 못하고 연구 경비가 많이 소모된다는 단점이 있다. 특히, 고혈압과 같은 동반질환을 고려함과 동시에 폐동맥 기능에 초점을 맞추어 개발된 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델은 제시된 바 없다.

[0005] 한편, 리나릴 아세테이트는 라벤더, 클라리세이지 에센셜 오일 등에 풍부하게 함유된 무색의 방향성 향료로서, 다양한 병태생리적인 상황에서 예방 또는 치료효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 그 예로써, 리나릴 아세테이트는 카라기닌으로 유도된 부종의 부피를 감소시키는 효과 (Peana *et al.*, 2002, *Phytomedicine.*, 9(8): 721-726), 에탄올 유도성 위궤양으로 인한 손상 부위를 감소시키는 효과 (Barocelli *et al.*, 2004, *Life Sciences.*, 76(2004): 213-223), 급성 니코틴에 노출된 흰쥐에서의 심혈관계 보호효과 (Kim *et al.*, 2017, *Environmental Health and Preventive Medicine.*, 22(42): 1-7), 허혈성 손상으로부터 보호하는 효과 (Hsieh *et al.*, 2018, *Plos One.*, 13(5): e0198082), 및 고혈압 흰쥐에서 올메사탄으로 인한 장의 과다운동을 예방하는 효과 (Kwon *et al.*, 2018, *Biomedicine & Pharmacotherapy.*, 102(2018): 362-368)가 있는 것으로 보고되었다. 또한, 선행 특허에 따르면, 리나릴 아세테이트의 AMP kinase의 발현 또는 활성 증가 효과(대한민국 특허공개 10-2016-0110887), 항균 활성 효과(대한민국 특허공개 10-2006-0071396, 대한민국 특허공개 10-2009-0085186)가 입증되어 특허로 개시된 바 있으나, 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델에서 리나릴 아세테이트가 혈압, 폐포 크기, 기관지폐포세척액의 염증인자, 폐동맥 혈관 긴장도에 미치는 효과에 대해서는 현재까지 보고된 바 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 폐동맥 기능 부전의 특징적인 현상이 현저하게 나타나는 폐동맥 과다이완과 고혈압이 동반된 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델을 제작하였으며, 상기 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델에 리나릴 아세테이트를 처리하는 경우, 만성 폐쇄성 폐질환으로 인한 수축기 혈압 상승, 폐포 직경 증가, 기관지 폐포 세척액에서의 염증 수치 상승 및 SNP에 의한 폐동맥 과다

이완이 개선되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

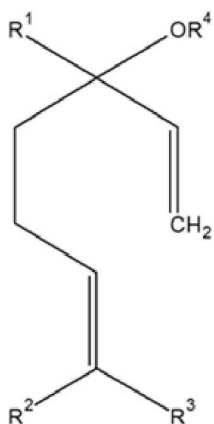
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델을 제공하는데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환의 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 만성 폐쇄성 폐질환 개선용 건강기능 식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

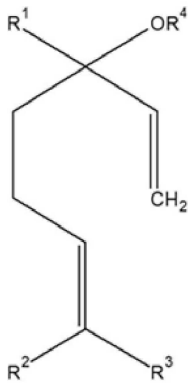
- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 대상동물에 만성 부동 스트레스를 가하고, 니코틴을 투여하여 고혈압을 유도하는 단계; 및 (b) 상기 고혈압이 유도된 대상동물에 포신 판크레아틱 엘라스테이즈(porcine pancreatic elastase, PPE) 및 리포폴리사카라이드(LPS)를 투여하여 만성 폐쇄성 폐질환을 유도하는 단계를 포함하는 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조되고, 다음 특성 중 하나 이상의 특징을 나타내는 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물모델을 제공한다:
- [0013] (i) 정상동물과 비교하여 수축기 혈압 상승;
- [0014] (ii) 정상동물과 비교하여 폐포 직경 증가;
- [0015] (iii) 정상동물과 비교하여 기관지 폐포 세척액에서의 IL-6 (Interleukin 6) 수치 상승;
- [0016] (iv) 정상동물과 비교하여 기관지 폐포 세척액에서의 MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9) 수치 상승;
- [0017] (v) 정상동물과 비교하여 SNP (Sodium nitroprusside)에 의한 폐동맥 과다이완; 및
- [0018] (iv) 정상동물과 비교하여 폐조직의 eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) 발현 감소.
- [0019] 본 발명은 또한, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환의 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다:
- [0020] [화학식 1]



- [0021]
- [0022] 상기 화학식 1에서,
- [0023] R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 (C_1-C_6) 알킬, 에스테르, 하이드록실기, 카보닐기, 알데히드기, 카르복실기 또는 아세틸기이다.

[0024] 본 발명은 또한, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 만성 폐쇄성 폐질환 개선용 건강기능 식품을 제공한다.:

[0025] [화학식 1]



[0026] [0027] 상기 화학식 1에서,

[0028] R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 (C_1 - C_6)알킬, 에스테르, 하이드록실기, 카보닐기, 알데히드기, 카르복실기 또는 아세틸기이다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물모델은 기존의 만성 폐쇄성 폐질환 실험동물 모델에 비교하여 폐동맥 혈관내피 기능부전이 특징적으로 나타남과 동시에 만성 폐쇄성 폐질환의 전형적인 특징인 폐포 확장 및 염증반응이 단기간 내에 나타나므로 기전 연구 또는 예방 및 치료용 의약품 개발에 비용 효과적이며 유용하게 사용될 수 있으며, 본 발명에 따른 만성 폐쇄성 폐질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물은 만성 폐쇄성 폐질환을 효율적으로 치료하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 정상군(Control), 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(Vehicle), 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg, 100mg/kg 치료를 받은 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(각각 LA 1, LA 10, LA 100) 사이의 수축기 혈압 차이를 나타낸 것이다. $##P<0.01$ vs. Control, $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs. Vehicle.

도 2는 정상군(Control), 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(Vehicle), 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg, 100mg/kg 치료를 받은 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(각각 LA 1, LA 10, LA 100) 사이의 폐포 직경 차이를 나타낸 것이다. $#P<0.05$, $##P<0.01$ vs. Control, $**P<0.01$ vs. Vehicle.

도 3은 정상군(Control), 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(Vehicle), 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg, 100mg/kg 치료를 받은 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(각각 LA 1, LA 10, LA 100) 사이의 기관지폐포세척액의 IL-6 농도 차이를 나타낸 것이다. $#P<0.05$, $###P<0.001$ vs. Control, $*P<0.05$, $***P<0.001$ vs. Vehicle.

도 4는 정상군(Control), 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(Vehicle), 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg, 100mg/kg 치료를 받은 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(각각 LA 1, LA 10, LA 100) 사이의 기관지폐포세척액의 MMP-9 활성 차이를 나타낸 것이다. $##P<0.01$, $###P<0.001$ vs. Control, $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs. Vehicle.

도 5는 정상군(Control), 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(Vehicle), 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg, 100mg/kg 치료를 받은 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(각각 LA 1, LA 10, LA 100) 사이의 SNP로 유도된 폐동맥 이완을 차이를 나타낸 것이다. $#P<0.05$ vs. Control, $*P<0.05$ vs. Vehicle.

도 6은 정상군(Control), 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(Vehicle), 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg, 100mg/kg 치료를 받은 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환군(각각 LA 1, LA 10, LA 100) 사이의 폐조직 eNOS 발현 차이를 나타낸 것이다. $##P<0.01$, $###P<0.001$ vs. Control.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0032] 본 발명에서는 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 실험동물에서 전형적인 만성 폐쇄성 폐질환의 특징을 보임과 동시에 폐동맥 혈관내피 기능부전 유도가 가능한지 확인하고자, 쥐를 부동스트레스에 노출시키면서, 니코틴을 복강 내 주사하여 고혈압을 유도하고, PPE와 LPS를 처리하여, 만성 폐쇄성 폐질환을 유도하였다. 고혈압과 만성 폐쇄성 폐질환 유도를 수행한 마우스의 경우, 수축기 혈압이 증가하는 것을 확인하였으며(도 1), 폐포 직경이 증가하는 것을 확인하였다(도 2). 또한, 기관지폐포 세척액에서 IL-6 및 MMP-9 활성이 증가하는 것을 확인하였다(도 3, 도 4). SNP에 의한 폐동맥 이완율이 증가한 반면(도 5), 폐 조직의 eNOS 활성은 감소하는 것을 확인하고(도 6), 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델을 확립하였다.
- [0033] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 대상동물에 만성 부동 스트레스를 가하고, 니코틴을 투여하여 고혈압을 유도하는 단계; 및 (b) 상기 고혈압이 유도된 대상동물에 포신 판크레아티크 엘라스테아제(porcine pancreatic elastase, PPE) 및 리포폴리사카라이드(LPS)를 투여하여 만성 폐쇄성 폐질환을 유도하는 단계를 포함하는 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델의 제조방법에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 만성 부동 스트레스는 대상동물의 움직임을 매일 1~4시간씩, 10~30일간 제한하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 움직임의 제한은
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 만성 부동 스트레스는 실험동물의 움직임을 제한하여 스트레스를 줄 수 있는 방법이면 제한 없이 이용가능하나, 바람직하게는 실험동물의 움직임을 매일 2시간씩, 21일간 제한하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 실험동물의 움직임을 제한하는 것은 당업계에서 당업자가 통상적으로 수행하는 방법이면 제한 없이 이용가능하나, 바람직하게는 수건으로 감싸서 고정시키는 방법; 뚜껑이 있는 플라스틱 상자에 구속시키는 방법; 양쪽이 막힌 PVC 재질 혹은 금속재질의 원통에 구속시키는 방법으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 니코틴의 투여는 복강투여인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 니코틴은 대상동물의 단위체중 (kg) 당 100~2000 μ g로 투여하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 PPE 및 상기 LPS의 투여는 당업계에서 당업자가 통상적으로 사용 가능한 모든 주입경로를 포함할 수 있으나, 비강으로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 PPE의 투여용량은 동물의 단위체중(kg)당 10 ~ 20단위의 용량으로 투여하고, 상기 LPS의 투여용량은 동물의 단위체중(kg)당 50 μ g ~ 100 μ g의 용량으로 투여하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 PPE 및 LPS는 2~4일의 간격을 두고 각각 1주일에 한번씩 4주간 투여하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 대상동물은 인간을 제외한 포유동물인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 쥐, 생쥐 등 설치류, 개, 고양이, 토끼, 돼지, 소, 양, 염소로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, 가장 바람직하게는 쥐(rat)일 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 동물모델은 폐동맥 혈관내피 기능부전 또는 폐동맥 과다이완을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 폐동맥 혈관내피 기능부전은 급성 폐 손상, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐기종, 폐부종 및 폐고혈압으로 구성된 군에서 선택되는 폐질환을 야기시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법으로 제조되고, 다음 특성 중 하나 이상의 특징을 나타내는 폐동맥 과다이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물모델에 관한 것이다:
- [0044] (i) 정상동물과 비교하여 수축기 혈압 상승;
- [0045] (ii) 정상동물과 비교하여 폐포 직경 증가;
- [0046] (iii) 정상동물과 비교하여 기관지 폐포 세척액에서의 IL-6 (Interleukin 6) 수치 상승;

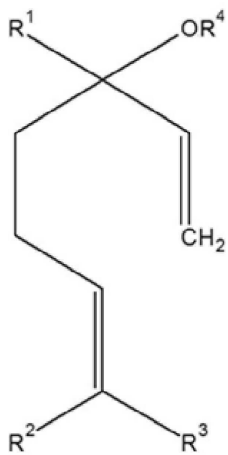
- [0047] (iv) 정상동물과 비교하여 기관지 폐포 세척액에서의 MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9) 수치 상승;
- [0048] (v) 정상동물과 비교하여 SNP (Sodium nitroprusside)에 의한 폐동맥 과다이완; 및
- [0049] (iv) 정상동물과 비교하여 폐조직의 eNOS (Endothelial nitric oxide synthase) 발현 감소.
- [0050] 본 발명에서 용어 "만성 폐쇄성 폐질환"은 만성적인 염증 반응에 의한 기류 제한 및 호흡곤란을 특징으로 하는 질환을 의미하며, 만성 기관지염과 폐기종이 이에 포함된다. 만성 기관지염은 염증으로 인한 가래 생산과 동시에 기관지 섬모가 마비되어 기관지가 가래에 막히게 됨으로써 발생하며, 폐기종은 염증 반응으로 인해 폐포에 존재하는 호중구 및 대식세포가 활성화 되고 엘라스타제를 분해하는 $\alpha 1$ -antitrypsin 효소가 억제됨으로써 폐포 벽이 파괴되어 발생한다. 만성 폐쇄성 폐질환은 환경적 위험요인으로써 흡연이 가장 크게 작용하는 것으로 여겨진다. 이 외에도 대기오염, 미세먼지, 연료의 연소로부터 나온 연기흡입, 기타 호흡기 질환의 후유증에 의해서도 생길 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명에서 용어 "만성 폐쇄성 폐질환의 동반질환"은 만성 폐쇄성 폐질환 포함 2개 이상의 질병과정이 공존하는 것을 의미하며, 상기 동반질환은 고혈압, 폐동맥 고혈압, 고지혈증, 관상 동맥 질환, 울혈성 심부전, 뇌졸중, 부정맥, 당뇨, 만성 신장 질환, 암, 퇴행성 관절 질환, 골다공증, 위식도 역류질환, 우울증, 불안, 발기 부전, 양성 전립선 비대증 중에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에서 용어 "수축기 혈압"이란 심장이 수축할 때 혈관 벽에 가해지는 압력을 의미한다.
- [0053] 본 발명에서 용어 "동물 모델"이란 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물을 말한다. 사람의 질병 연구에 있어 질환모델 동물이 의미를 갖는 것은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질병 연구에 있어 생체의학 질환모델 동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공하고, 질환모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내고, 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초자료를 얻을 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 용어 "동물" 또는 "실험동물"은 인간 이외의 임의의 포유류 동물을 의미한다. 상기 동물은 배아, 태아, 신생아 및 성인을 포함하는 모든 연령의 동물을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 동물들은, 토끼, 설치류(예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 및 기니피그), 소, 양, 돼지, 염소, 말, 개, 고양이, 새(예를 들어, 닭, 칠면조, 오리, 거위), 영장류(예를 들어, 침팬지, 원숭이, 붉은털원숭이)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0055] 본 발명에서는 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 실험동물에서 전형적인 만성 폐쇄성 폐질환의 특징을 보임과 동시에 폐동맥 혈관내피 기능부전 유도가 가능한지 확인하고자 하였다.
- [0056] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 4주령의 수컷 흰쥐를 3주 간 매일 2시간 씩 부동 스트레스에 노출시키며, 니코틴 0.8mg/kg을 복강 내 주사하였다. 실험 22일째에는 니코틴 3mg/kg을 복강 내 주사하여 고혈압을 유도하였다. 만성 폐쇄성 폐질환은 PPE와 LPS를 이용하여 유도하였다. 흰쥐를 아이소플루레인으로 흡입마취 시킨 후, PPE (15unit)는 매주 1일째 4주간, LPS (87.5 μ g)는 매주 4일째 4주간 비강 내 투여하였다. 마지막 비강 내 투여로부터 일주일 뒤 혈압 측정 후 안락사를 실시하여 기관지폐포세척액 샘플 및 폐조직을 적출하였다.
- [0057] 먼저, 혈압 측정 결과, Vehicle 군에서 Control 군보다 수축기 혈압이 증가하는 것을 확인하였으며(도 1), 폐포 직경의 경우, Vehicle 군에서 Control 군보다 증가하는 것을 확인하였다(도 2). 또한, 기관지폐포세척액에서 IL-6 및 MMP-9 활성이 Vehicle 군에서 Control 군보다 증가하는 것을 확인하였다(도 3, 도 4). SNP에 의한 폐동맥 이완율은 Vehicle 군에서 Control 군에 비하여 증가한 반면(도 5), 폐 조직의 eNOS 활성은 Vehicle 군에서 Control 군보다 감소하는 것을 확인하였다(도 6).
- [0058] 본 발명의 일 실시예에서는 리나릴 아세테이트의 효과를 평가하기 위하여 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg, 또는 100 mg/kg 를 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델에 복강 내 주사하였으며, 구체적으로 PPE 또는 LPS의 비강 내 주입 2시간 전에 처리하였다. 마지막 투여 일주일 후 혈압 측정 후 안락사를 실시하여 기관지 폐포세척액 샘플, 폐조직, 폐동맥을 적출하였다.
- [0059] 그 결과, 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg 및 100mg/kg를 투여 받은 그룹 모두 수축기 혈압이 vehicle 군보다 유의미하게 감소하며(도 1), 리나릴 아세테이트 100mg/kg를 투여 받은 그룹에서 폐포 직경이 vehicle 군보다 감소하는 것을 확인하였다(도 2). 또한, 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg 및 100mg/kg를 투여 받은 그룹 모두 기관지폐포세척액의 IL-6 농도가 vehicle 군보다 감소하며(도 3), 리나릴 아세테이트 10mg/kg 및 100mg/kg를

투여 받은 그룹에서 기관지폐포세척액의 MMP-9 활성이 vehicle 군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 4). 뿐만 아니라, 리나릴 아세테이트 100mg/kg를 투여 받은 그룹에서 SNP에 의한 폐동맥 이완율이 vehicle 군보다 유의미하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며(도 5).

[0060] 따라서 상기 결과들로 비추어 볼 때, 본 발명에 따른 리나릴 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 조성물은 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환으로 인한 수축기 혈압 상승, 폐포 직경 증가, 기관지 폐포 세척액에서의 염증 지표 상승, SNP에 의한 폐동맥 과다 이완의 개선 및 예방을 위한 의약품 및 건강기능성 식품 등의 조성물로 사용될 수 있다.

[0061] 리나릴 아세테이트의 유도체인 화학식 1의 화합물을 사용하는 경우, 동일 내지 유사한 폐동맥 과다 이완의 개선 및 예방효과를 나타낼 수 있다.

[0062] [화학식 1]



[0063]

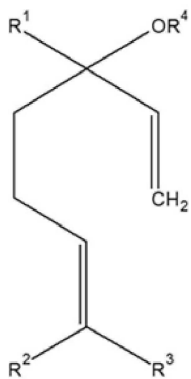
[0064] 상기 화학식 1에서,

[0065] R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 (C_1 - C_6)알킬, 에스테르, 하이드록실기, 카보닐기, 알데히드기, 카르복실기 또는 아세틸기이다.

[0066] 본 발명에 있어서, 상기 R^1 , R^2 , R^3 는 메틸기이고, R^4 는 아세틸기인 것을 특징으로 할 수 있으며, 이 화합물을 리나릴 아세테이트라고 한다.

[0067] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 폐동맥 과다 이완 및 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환의 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것이다:

[0068] [화학식 1]



[0069]

[0070] 상기 화학식 1에서,

[0071] R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 (C_1 - C_6)알킬, 에스테르, 하이드록실기, 카보닐기, 알데히드기, 카르복실기 또는 아세틸기이다.

[0072] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다.

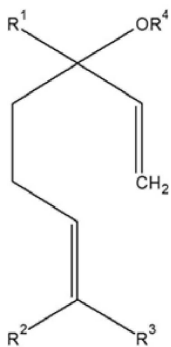
[0073] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입 방식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0074] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001~100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01~1mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0075] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0076] 또 다른 관점에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 만성 폐쇄성 폐질환 개선용 건강기능 식품에 관한 것이다:

[0077] [화학식 1]



[0078] [0079] 상기 화학식 1에서,

[0080] R^1 , R^2 , R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 (C_1 - C_6)알킬, 에스테르, 하이드록실기, 카보닐기, 알데히드기, 카르복실기 또는 아세틸기이다.

[0081] 본 발명의 건강식품은 상기 화학식 1의 화합물(예를 들면, 리나릴 아세테이트)를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0082] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0083] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물(예를 들면, 리나릴 아세테이트)는 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로 건강식품 중의 상기 리나릴 아세테이트(Linalyl acetate)의 양은 전체 식품중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은

100ml를 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0084] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화학식 1의 화합물(예를 들면, 리나릴 아세테이트)를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연향미제(타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0085] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증징제(치즈, 초콜릿 등). 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.

[0086] 그 밖에 본 발명의 화학식 1의 화합물(예를 들면, 리나릴 아세테이트)은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 화학식 1의 화합물 100중량부에 대하여 0~약 20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0087] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0088] <참조예> 통계 분석

[0089] 실험 결과를 평균표준오차로 나타내었으며, SPSS version 22.0 (IBM, USA)로 분석하였다. 또한 실험 그룹간의 일원분산분석(사후분석-LSD test)을 이용한 통계 분석을 수행하여 $P < 0.05$ 를 통계적으로 유의미한 값으로 보았다.

[0090] 실시예 1. 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델의 확립

[0091] 1-1. 실험 동물의 준비

[0092] 4주령의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 동물은 케이지 당 4마리씩 사육하였으며, 12시간 낮/밤 사이클 및 온도 22~23℃ 유지하였다. 먹이와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 정상혈압군(Control) 또는 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 그룹(Vehicle)으로 무작위 배정하였다.

[0093] 1-2. 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델의 확립

[0094] 만성 폐쇄성 폐질환 및 고혈압을 동시에 유도하였다. 고혈압은 부동 스트레스와 니코틴 주입에 의하여 유도되었다. 상세하게는, 흰쥐를 3주간 매일 2시간씩 부동 스트레스에 노출시키며, 니코틴 0.8mg/kg을 복강 내 주사하였다.

[0095] 만성 부동 스트레스는 실험동물의 움직임을 매일 2시간씩, 21일간 제한하여 수행하였으며, 수건으로 감싸서 고정시키는 방법; 뚜껑이 있는 플라스틱 상자에 구속시키는 방법; 양쪽이 막힌 PVC 재질 혹은 금속재질의 원통에 구속시키는 방법 등을 사용할 수 있으며, 본 실시예에서는 상기 방법 중 양쪽이 막힌 PVC 재질의 원통에 구속시키는 방법으로 수행하였다.

[0096] 22일째에는 니코틴 3mg/kg을 복강 내 주사하여 고혈압을 유도하였다. 이에 반해 정상혈압군(Control)은 부동 스트레스 대신에 자유롭게 휴식하도록 하였으며, 니코틴 대신에 같은 용량의 생리 식염수를 복강 내 주사하였다. 만성 폐쇄성 폐질환은 PPE와 LPS를 이용하여 유도하였다. 흰쥐를 아이소플루레인으로 흡입마취시킨 후, PPE (15unit)는 매주 1일째 4주간, LPS (87.5µg)는 매주 4일째 4주간 비강 내 투여하였다. 이에 반해 정상혈압대조군(Control)에는 같은 용량의 phosphate-buffered saline (PBS)를 비강 내 투여하였다. 마지막 비강 내 투여로부터 일주일 뒤 혈압 측정 후 안락사를 실시하였다.

[0097] 실시예 2. 수축기 혈압 측정

[0098] 수축기 혈압은 쥐꼬리에서 비침습적인 방법으로 측정되었다(CODA HT-4, Kent Scientific Corporation, USA). 그 결과, 도 1에 개시된 바와 같이, Vehicle 군에서 수축기 혈압이 정상혈압대조군(Control)보다 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다($P=0.003$).

[0099] **실시예 3. 폐포 직경 측정**

[0100] 안락사시킨 흰쥐로부터 얻어진 폐 조직을 10 % 파라포름알데하이드로 고정시킨 후 파라핀으로 블록화하였다. 4 μ m의 두께로 절단된 파라핀 절편을 hematoxylin and eosin (H&E)으로 염색 한 다음 형광 현미경 (Nikon, Japan)으로 200배 배율 하에서 관찰하였으며, 폐포 직경은 NIS-element 이미지 소프트웨어 (Nikon, Japan)를 사용하여 측정하였다. 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이, Vehicle 군에서 폐포 직경이 정상혈압대조군(Control) 군보다 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다($P=0.006$).

[0101] **실시예 4. Interleukin-6 (IL-6) 및 Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 측정**

[0102] 원심분리한 기관지 폐포 세척액으로부터 얻어진 상층액에서 IL-6 및 MMP-9을 측정하였다. IL-6는 IL-6 ELISA kit (PeproTech, UK)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. MMP-9 단백질은 1mg/ml 젤라틴이 함유된 8% SDS-PAGE를 사용하여 zymography 방법으로 측정하였다. 전기영동한 젤을 2.5% Triton X-100으로 1시간 동안 재생시킨 후, 10mM CaCl_2 및 0.02% NaN_3 을 함유하는 50mM Tris-Cl 완충액(pH 7.4)에서 20시간 동안 항온배양한 뒤, 0.5% Coomassie Brilliant Blue (Sigma, USA)로 2 시간동안 염색하여 MMP-9의 밴드를 가시화시켰다. 그 결과, 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, Vehicle 군에서 IL-6 및 MMP-9 활성이 정상혈압대조군(Control) 군보다 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(각각 $P<0.001$).

[0103] **실시예 5. 폐동맥 혈관 이완 능력 평가**

[0104] 주변 결합조직 제거 후 2-mm 로 나뉜 폐동맥 절편을 PSS (온도 37°C, 산소 95%/이산화탄소 5% 유지)가 들어있는 챔버에 담근 후 근수축변환기(Mechano-transducer 620M, DMT, Denmark)에 연결시켰다. 초기 장력을 0.3g으로 설정 및 60분 동안 안정화시킨 후 실험을 진행하였다. KCL 40mM 로 혈관을 수축시킨 다음 Plateau에 도달하였을 때 sodium nitroprusside (SNP, 1 μ M)을 첨가하여 이완능력을 평가하였다. SNP에 의한 혈관 이완율(%)은 $\{(\text{KCL 최대 수축력}-\text{SNP 최대 이완력})/(\text{KCL 최대 수축력}-\text{초기 장력})\} \times 100$ 의 공식으로 계산하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, SNP에 의한 혈관 이완율은 Vehicle 군에서 정상혈압대조군(Control)에 비하여 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다($P=0.015$).

[0105] **실시예 6. endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 발현량 측정**

[0106] eNOS 발현은 폐 조직에서 측정하였다. 폐 조직을 균질화시킨 후, Protein Extraction Kit (iNtRON, Korea)를 이용하여 용해하였다. 그 후 원심분리하여 얻은 상층액에서 eNOS의 발현량을 Western blotting 분석 방법으로 측정하였다. 1차 또는 2차 항체는 모두 Santa Cruz Biotechnology (USA)로부터 구입한 것을 사용하였다. 그 결과, 도 6에 개시된 바와 같이, Vehicle 군에서 폐 조직의 eNOS 활성이 정상혈압대조군(Control) 보다 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다($P=0.001$).

[0107] **실시예 7. 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델에서 리나릴 아세테이트의 효과 측정**

[0108] 리나릴 아세테이트가 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델에 미치는 효과를 평가하기 위하여 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg, 또는 100 mg/kg 를 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환 동물 모델에 복강 내 주사하였으며, 구체적으로 PPE 또는 LPS의 비강 내 주입 2시간 전에 처치하였다. 흰쥐는 리나릴 아세테이트 1mg/kg 주사군(LA 1), 리나릴 아세테이트 10mg/kg 주사군(LA 10), 리나릴 아세테이트 100mg/kg 주사군(LA 100)에 무작위 배정되었다. 마지막 리나릴 아세테이트 투여로부터 일주일 뒤 혈압 측정 후 안락사를 실시하여 기관지폐포 세척액과 폐조직을 채취하였고, 폐동맥에서 SNP에 의한 혈관 이완 능력을 평가하였다. 자세한 방법은 실시예 2 내지 실시예 6에 기술한 바와 같다.

[0109] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg 및 100mg/kg를 투여한 그룹 모두 수축기 혈압이 vehicle 군보다 유의미하게 감소하여 정상혈압대조군(Control) 수준으로 회복되는 것을 확인하였으며(각각 $P=0.009$, $P=0.016$, $P=0.005$), 도 2에 나타난 바와 같이, 리나릴 아세테이트 100mg/kg를 투여 한 군에서 폐포 직경이 vehicle 군보다 감소하여 정상 수준화되는 것을 확인할 수 있었다($P=0.006$). 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 리나릴 아세테이트 1mg/kg, 10mg/kg 및 100mg/kg를 투여 받은 그룹 모두에서 기관지폐포세척액의 IL-6 농도가 vehicle 군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었으며(각각 $P=0.025$, $P=0.040$, $P=0.001$), 도 4에 나타난 바와 같이, 리나릴 아세테이트 10mg/kg 및 100mg/kg를 투여한 군에서 기관지폐포 세척액의 MMP-9 활성이

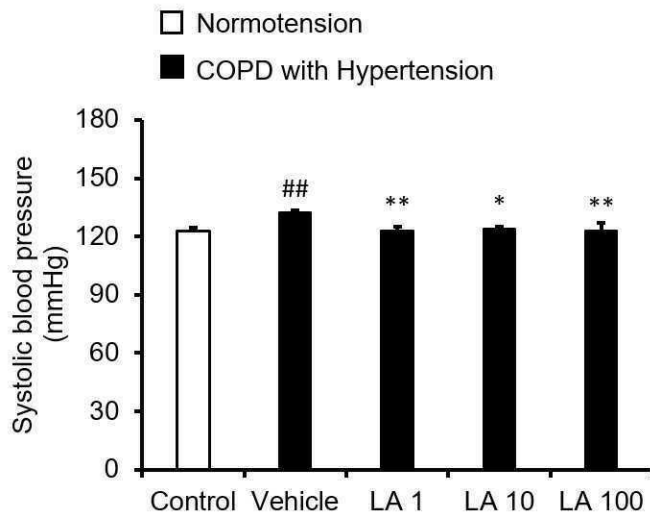
vehicle 군보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다(각각 $P=0.035$, $P=0.002$). 뿐만 아니라, 도 5에 나타난 바와 같이, 리나릴 아세테이트 100mg/kg를 투여한 그룹에서 SNP에 의한 폐동맥 이완률이 vehicle 군보다 유의미하게 감소하는 것을 확인할 수 있었으며($P=0.017$), 이는 거의 정상혈압대조군(Control) 수준까지 회복되었다.

[0110] 상기 실험 결과로부터 리나릴 아세테이트가 폐동맥 과다 이완과 고혈압을 동반한 만성 폐쇄성 폐질환으로 인한 수축기 혈압 상승, 폐포 직경 증가, 기관지 폐포 세척액에서의 염증 지표 상승 및 SNP에 의한 폐동맥 과다이완의 개선 및 예방에 탁월한 효과를 가지고 있음이 확인되었다.

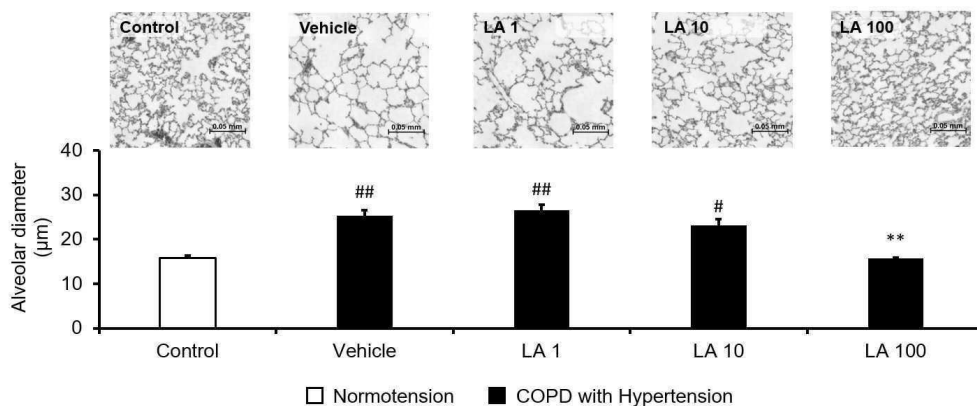
[0111] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

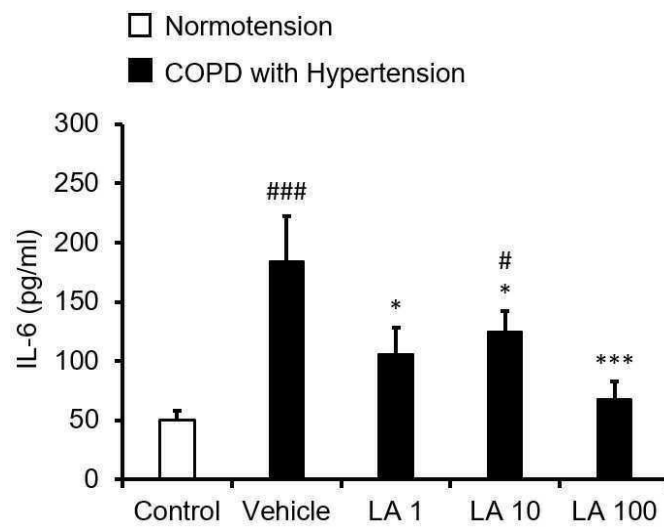
도면1



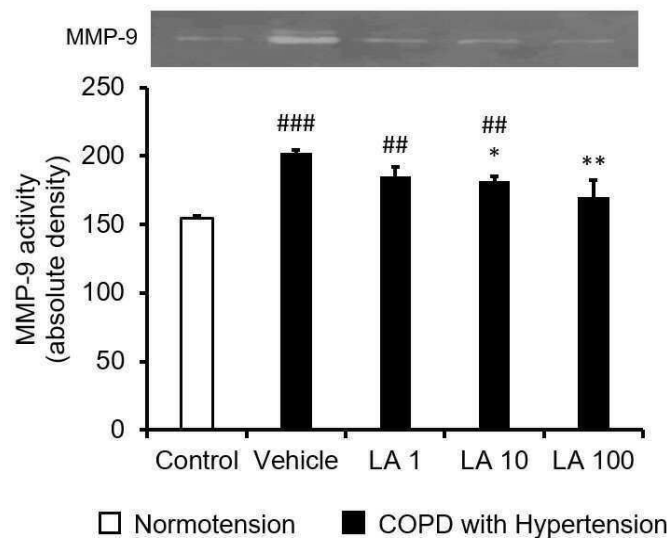
도면2



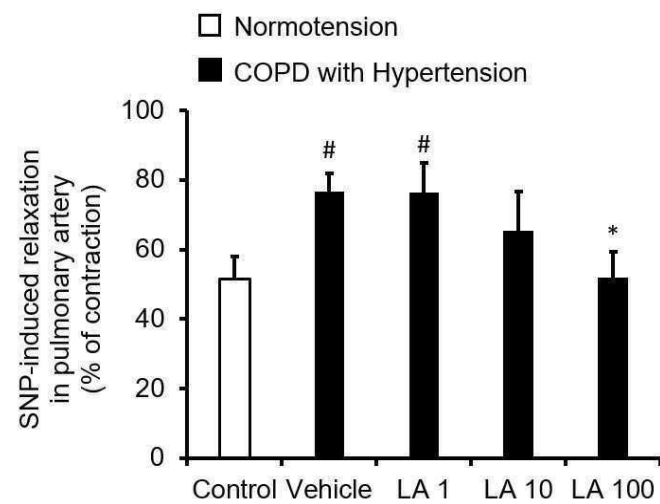
도면3



도면4



도면5



도면6

