(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0033624
(43) 공개일자 2018년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *A61K 31/165* (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5008 (2013.01)
A61K 31/165 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0122780
(22) 출원일자 2016년09월26일
심사청구일자 2016년09월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
서홍석
서울특별시 용산구 한강대로 211, 101동 2804호(한강로1가, 대우 월드마크 용산)
(74) 대리인
특허법인 다해

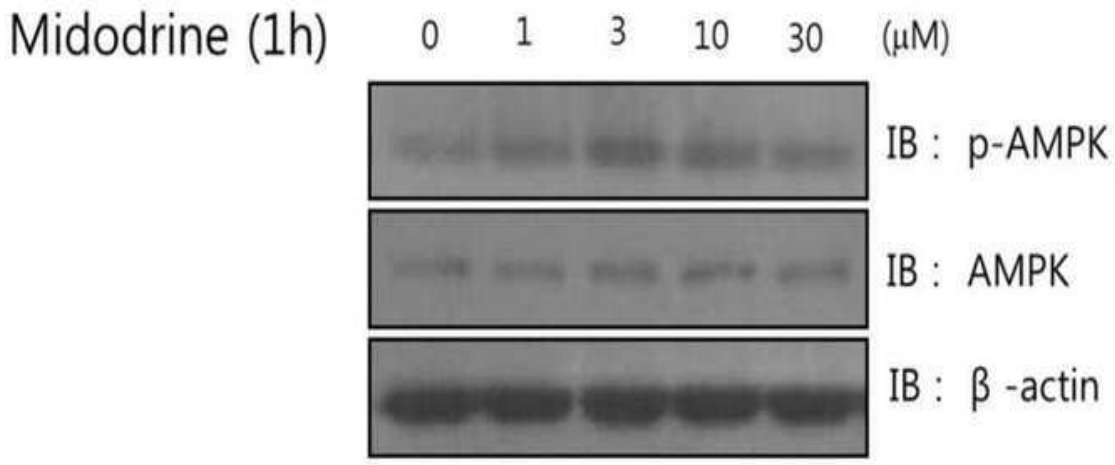
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **운동유사효과 유도 약물의 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은, α1-아드레날린 수용체 효능제(agonist)를 이용한 운동유사효과 유도용 약물의 스크리닝 방법, 및 상기 방법에 의해 스크리닝된 약물을 유효성분으로 함유하는 운동유사효과 유도용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의하면, *in vitro*에서 운동유사 효과를 일으키는 약물을 간편하고도 정밀도 높게 스크리닝할 수 있으며, 따라서 본 방법에 의해 스크리닝된 약물은 AMPK 활성화가 필요한 질환(대사질환, 심부전 및 염증)의 예방/치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
G01N 33/9433 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

α1-아드레날린 수용체 효능제(agonist)를 이용한, 운동유사효과 유도용 약물의 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 스크리닝 방법은 하기의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법:

(a) *in vitro*에서 세포에 α1-아드레날린 수용체 효능제를 처리하는 단계; 및

(b) 인산화-AMPK(AMP-activated protein kinase), PPAR-δ(Peroxisome Proliferator Activated Receptor-δ), 또는 PGC-1α(Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1α)의 발현을 측정하는 단계.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 스크리닝 방법은, (c) 효능제 미처리군에 비하여 상기 인산화-AMPK, PPAR-δ 또는 PGC-1α의 발현이 증가될 경우 처리 효능제를 약물로 선정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 발현은 웨스턴 블랏팅, 항체면역침강법, ELISA, 질량분석법, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RPA(RNase protection assay) 또는 노던 블랏팅을 이용하여 측정하는 것임을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 세포는 골격근, 심근, 간, 지방 및 췌장으로 이루어진 군에서 선택되는 조직의 세포인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 운동유사효과는 대사질환, 심혈관질환 및 염증질환으로 이루어진 군에서 선택되는 질환의 치료 효과인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 대사질환은 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 비만, 동맥경화 및 지방간으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 8

제 1 항의 방법에 의해 스크리닝된 약물을 유효성분으로 함유하는, 운동유사효과 유도용 약학 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 약물은 α1-아드레날린 수용체 효능제(agonist)인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 α1-아드레날린 수용체 효능제는 미도드린(midodrine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 운동유사효과는 대사질환, 심혈관질환 및 염증질환으로 이루어진 군에서 선택되는 질환

의 치료 효과인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 대사질환은 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 비만, 동맥경화 및 지방간으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, α1-아드레날린 수용체 효능제(agonist)를 이용한 운동유사효과 유도용 약물의 스크리닝 방법, 및 상기 방법에 의해 스크리닝된 약물을 유효성분으로 함유하는 운동유사효과 유도용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 운동 훈련은 골격근에서 표현형 변화를 일으키는 리모델링 프로그램을 활성화시킴으로써 운동 내성을 향상시키고, 적당한 운동은 대사질환이나 심질환 등의 병리 상태를 호전시키는데 효과적이다.

[0003] 특히, AMPK(AMP-activated protein kinase), PPAR-δ(Peroxisome Proliferator Activated Receptor-δ), PGC-1α(Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1α)는 운동 내성을 위한 골격근의 표현형 변화에 관여하는 중요 인자들로 알려져 있다.

[0004] 이때, AMPK는 α/β/γ 서브유닛들로 이루어진 헤테로트라이머성(heterotrimeric) 복합체로서 근육 수축 및 운동시 AMPK의 상위효소인 LKB1 및 CaMKK(Ca2+/calmodulin-dependent kinase kinase)에 의한 인산화에 의해 활성화되며, 글루코오스 항상성, 식욕, 및 운동 생리에 대한 세포/기관 대사의 주된 조절자이다. PPAR-δ는 골격근 대사의 전사 조절에 있어서 핵심적인 역할을 수행하며, PGC-1α는 미토콘드리아 생합성 및 기능의 조절자로서 에너지 대사에 관여하고, 골격근의 내성 운동에 의해서 활성화되는 유전자들을 조절하는 전사 공동활성화 인자이다.

[0005] AMPK는 동시에 여러 전사 프로그램들을 타겟팅할 수 있는 것으로 알려져 있는데, 이러한 전사 프로그램들은 PPAR-δ, PGC-1α와 같은 기질들에 의해서 조절되어 운동과 유사한 유전적 효과를 유발한다. 이와 관련하여, AMPK-PPARδ 신호 경로를 타겟팅하는 운동-유사 약물들이 내성 표현형에 대한 근육을 다시 프로그래밍하는 새로운 약제학적 전략이 될 수 있다는 점이 보고된 바 있다(Cell 2008, vol.134, pp405-415).

[0006] 또한, A-769662, 메트포르민(metformin), 5-아미노이미다졸-4-카르복시아미드-1-β-D-리포퓨라노사이드(AICAR) 및 레스베라트롤(resveratrol)과 같은 AMPK 활성화를 촉진하는 몇몇 약물들이 심부전증에 대해서 치료 효과를 발휘하는 것으로 보고된 바 있다. 심질환에 대한 AMPK의 보호 기능은 세포질 중 활성산소종 생산의 감소, 안지오텐신 II의 활성억제, 심장 트로포닌 I의 인산화, PGC-1α의 활성화, eNOS-NAD(P)H 산화효소 발현의 조절, 에스트로겐-관련 수용체의 조절 및 에너지 균형과 심장 내 신호전달의 조절 등의 중요한 기능들을 통해서 달성될 수 있는 바, AMPK 활성화는 직간접적으로 심근 기능을 향상시킬 수 있다.

[0007] 이와 같이, AMPK 활성화(인산화) 및 이와 관련된 인자들(PPAR-δ, PGC-1α)은 골격근 내에서의 글루코스 섭취(uptake), 에너지 대사 항상성 유지, 심기능 증대 등의 운동 유사 효과를 유도하기 때문에, 운동 유사효과에 의해 치료될 수 있는 대사질환, 심혈관질환, 염증질환 등의 타겟으로서 AMPK를 활성화시키는 약물에 대한 요구가 꾸준히 있어왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명자는 α1-아드레날린 수용체를 활성화시킬 경우 고혈압, 비만, 당뇨병 등의 대사질환, 심질환, 염증질환이 개선될 수 있음을 발견하고 그 작용 메커니즘을 예의 연구한 결과, α1-아드레날린 수용체가 활성화되면 활성형-AMPK, PPAR-δ 및 PGC-1α의 발현을 증가시키고 이를 통해서 골격근, 심근, 간 등의 다기관에서 운동유사효과를 일으킬 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 α1-아드레날린 수용체 효능제(agonist)를 이용한 운동유사효과 유도용 약물의 스크리닝 방법, 및 상기 방법에 의해 스크리닝된 약물을 유효성분으로 함유하는 운동유사효과 유도용 약학 조성물을

제공하는 것이다.

[0010] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은, α1-아드레날린 수용체 효능제(agonist)를 이용한, 운동유사효과 유도용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 스크리닝 방법은 (a) *in vitro*에서 세포에 α1-아드레날린 수용체 효능제를 처리하는 단계; 및 (b) 인산화-AMPK(AMP-activated protein kinase), PPAR-δ(Peroxisome Proliferator Activated Receptor-δ), 또는 PGC-1α(Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1α)의 발현을 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 스크리닝 방법은, (c) 효능제 미처리군에 비하여 상기 인산화-AMPK, PPAR-δ 또는 PGC-1α의 발현이 증가될 경우 처리 효능제를 약물로 선정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 단계 (b)에서 발현은 웨스턴 블랏팅, 항체면역침강법, ELISA, 질량분석법, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RPA(RNase protection assay) 또는 노던 블랏팅을 이용하여 측정하는 것임을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 단계 (a)에서 세포는 골격근, 심근, 간, 지방 및 췌장으로 이루어진 군에서 선택되는 조직의 세포인 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 운동유사효과는 대사질환, 심혈관질환 및 염증질환으로 이루어진 군에서 선택되는 질환의 치료 효과인 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 대사질환은 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 비만, 동맥경화 및 지방간으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명은, 상기 방법에 의해 스크리닝된 약물을 유효성분으로 함유하는, 운동유사효과 유도용 약학 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 약물은 α1-아드레날린 수용체 효능제(agonist)인 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 α1-아드레날린 수용체 효능제는 미도드린(midodrine) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 운동유사효과는 대사질환, 심혈관질환 및 염증질환으로 이루어진 군에서 선택되는 질환의 치료 효과인 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 대사질환은 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 비만, 동맥경화 및 지방간으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 방법에 의하면, 운동유사 효과를 일으키는 약물을 *in vitro*에서 간편하고도 정밀도 높게 스크리닝할 수 있으며, 따라서 본 방법에 의해 스크리닝된 약물은 AMPK 활성화가 필요한 질환(대사질환, 심질환 및 염증질환 등)의 예방/치료에 안전하고도 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1a 및 1b는 각각 래트 골격근 세포주(L6)와 마우스 심근 세포주(HL1)에서, 미도드린에 의해 α1-아드레날린 수용체(α1-AR)를 활성화시킬 경우 AMPK 활성형(인산화형)인 p-AMPK의 단백질 발현이 증가됨을 보여주는 웨스턴 블랏 결과이다.

도 2a 내지 2c는 4주령의 래트로 이루어진 3개의 그룹에서 1개월에 걸쳐서 확장기/수축기 혈압을 측정한 결과를 나타내고, 도 2d는 심장박동수를 측정한 결과이다(청색: 대조군, 적색: 미도드린 투여군, 녹색: 아테놀롤 투여군).

도 3a는 기저 4주령 대조군 래트(I), 미도드린 투여 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)의 골격근에서 α1-AR의 단백질 발현상태를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이고, 도 3b 내지 3d는 상기 래트 그룹의 심근, 골격근 및 간 각각에서 AMPK-PPARδ-PGC1α의 단백질 발현상태를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과이다.

도 4a는 기저 4주령 래트(I), 미도드린 투여 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)의 대동맥 조직에서, 도 4b는 상기 래트 그룹의 심근 조직에서, 각각 혈관수축, 일산화질소 생성, 산화적 스트레스, 및 염증과 관련된 유전자들의 mRNA 발현 수준을 확인한 노던블랏 결과이다.

도 5는 기저 4주령 래트(I), 미도드린 투여 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)의 골격근에서 SDH(succinate dehydrogenase) 효소 활성도를 측정한 결과이다.

도 6은 기저 4주령 래트(I), 미도드린 투여 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)의 심근, 골격근 및 간에서 ELISA 방법으로 ATP 수준을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은, α1-아드레날린 수용체 효능제(agonist)를 이용한 운동유사효과 유도용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명에서는, α1-AR 효능제가 α1-AR 자극에 의해 향상된 심근 수축이라는 본래 효과 뿐만 아니라, AMPK 활성화를 통해서 심근, 골격근, 간 등의 다기관에 대해서 부가적인 운동-유사 효과를 발휘할 수 있음을 발견하여 고안된 것이다.

[0027] 따라서, 본 발명의 스크리닝 방법은 *in vitro*에서 세포에 α1-아드레날린 수용체 효능제를 처리하고, 인산화-AMPK(AMP-activated protein kinase), PPAR-δ(Peroxisome Proliferator Activated Receptor-δ), 또는 PGC-1α(Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1α)의 발현을 측정하여, 효능제 미처리군에 비하여 상기 단백질 발현이 증가될 경우 처리 효능제를 약물로 선정함으로써 달성될 수 있다.

[0028] 본 발명의 방법에 있어서, α1-아드레날린 수용체 효능제는 α1-아드레날린 수용체에 작용하여 활성화시키는 물질이면 특별한 제한은 없다. 아드레날린 수용체는 α1, α2, β라는 3가지 타입이 있으며, 본 발명에서는 α1 타입의 수용체에 작동하는 공지의 화합물들 중에서 운동시의 효과와 유사한 효과를 발휘하는 약물을 스크리닝하는 것을 목적으로 한다.

[0029] 본 발명의 방법에 있어서, p-AMPK, PPAR-δ, PGC-1α의 발현은 단백질 또는 mRNA의 수준을 측정함으로써 확인할 수 있다. 이때, 단백질 수준을 측정하는 방법에 제한은 없으나, 예를 들면 웨스턴 블랏팅, 항체면역침강법, ELISA 또는 질량분석법을 이용할 수 있으며, mRNA의 수준을 측정하는 방법에 제한은 없으나, 예를 들면 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RPA(RNase protection assay) 또는 노던 블랏팅을 이용할 수 있다.

[0030] 본 발명의 방법에 있어서, α1-아드레날린 수용체 효능제를 처리하는 대상 세포에 제한은 없으나, 예를 들면 골격근, 심장근, 간, 지방 또는 췌장 조직의 세포일 수 있다.

[0031] 본 발명의 방법에 있어서, 운동유사효과란 심장 기능개선(수축력 증가), 근육의 인슐린 예민도 증가 및 산화인산화기능 증진, 고혈압 하강, 콜레스테롤 감소, 지방축적 및 체중 감소, 혈중 염증감소 등 운동시 발휘되는 생리효과를 의미하며 특별한 제한은 없으며, 이에 의해 대사질환, 심혈관질환, 염증질환 등의 치료 효과를 달성할 수 있다.

[0032] 본 발명의 방법에 있어서, 대사질환(Metabolic Disease)이란 포도당, 지방, 단백질 등의 대사 이상에서 기원하는 질병을 의미하며, 예를 들면 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 비만, 동맥경화, 지방간 등을 들 수 있다.

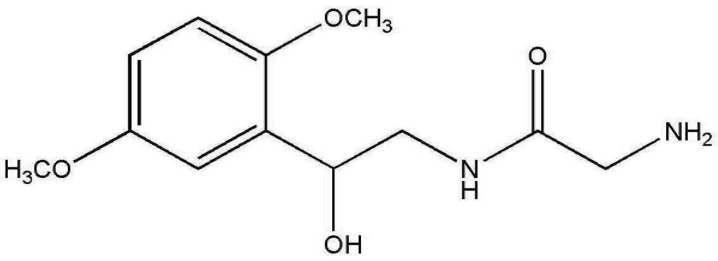
[0033] 또한, 본 발명은, 상기 방법에 의해 스크리닝된 약물을 유효성분으로 함유하는 운동유사효과 유도용 약학 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명의 조성물에 있어서, 약물은 α1-아드레날린 수용체 효능제로서 α1-아드레날린 수용체에 작용하여 활성화시키는 물질이면 특별한 제한은 없으나, 예를 들면 미도드린(midodrine), 이의 유사체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염일 수 있다.

[0035] 이때, 미도드린 화합물은 아마틴(amatine), 프로아마틴(proamatine), 구트론(gutron) 등의 상표명으로

판매되고, 그 IUPAC 명은 (RS)- N-[2-(2,5-디메톡시페닐)-2-히드록시에틸]글리신아미드 ((RS)- N-[2-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-hydroxyethyl]glycinamide)으로서, 하기 화학식 I로 표시된다.

[0036] [화학식 1]

[0037] 

[0038] 미도드린은 투여 후 생체 내에서 목적 화합물로 변화되는 약물 전구체(prodrug)이며, 생체내 투여후 활성대사산물인 데스글리미도드린(desglymidodrine)으로 변화되어 α1-아드레날린 수용체를 활성화시키고, 이어서 AMPK 활성화를 통하여 최종적으로 운동-유사 효과를 유도할 수 있다.

[0039] 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 "약학적으로 허용가능한 염"을 형성할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용 가능한 염은 산 부가 염과 같이, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 것으로 특별히 제한되는 것은 아니다. 바람직한 약학적으로 허용 가능한 산 부가 염으로는, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 과염소산, 또는 브롬산과 같은 무기산; 초산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 푸마린산, 말레산, 말론산, 프탈산, 숙신산, 젖산, 구연산, 시트르산, 글루콘산, 타타르산, 살리실산, 말산, 옥살산, 벤조산, 엠본산, 아스파르트산, 또는 글루탐산과 같은 유기산을 들 수 있다. 유기염기 부가염 제조에 사용될 수 있는 유기염기로는 트리스(히드록시메틸)메틸아민, 디시클로헥실아민 등을 예로 들 수 있다. 아미노산 부가염기 제조에 사용될 수 있는 아미노산으로는 알라닌, 글라이신 등의 천연아미노산을 예로 들 수 있다.

[0040] 본 발명에서 "약학 조성물"은 기존 치료 활성 성분, 기타 보조제, 약제학적으로 허용가능한 담체 등의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 및 에탄올 등을 포함한다.

[0041] 상기 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0042] 본 발명에서 "투여량"은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여횟수, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하게 조절될 수 있음은 당업자에게 명백하다.

[0043] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0044] 본 발명에서 "약학적 유효량"은 투여되는 질환 종류 및 중증도, 환자의 연령 및 성별, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정되며 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0045] 본 발명의 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 "투여방법"에는 제한이 없다. 예를 들면, 경구 투여, 동맥주사, 정맥 주사, 경피 주사, 비강 내 투여, 경기관지 투여 또는 근육 내 투여 등이 포함된다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.

[0046] 본 발명에 따른 조성물은 AMPK 활성화, 및 PPARδ 및 PGC-1α의 발현 증가를 통해서 골격근 및 심장근에 대해서 운동 유사 효과를 달성할 수 있고, 이는 다양한 대사질환, 심부전, 염증 등의 질환 치료에 효과적으로 이용될 수 있음을 의미한다.

[0047] 본 발명에서는, α1-AR 효능제가 α1-AR 자극에 의해 AMPK를 활성화시키는 것과 독립적으로, PPAR-δ 및 PGC-1α의 발현을 증가시켜 심장기능을 향상시킴을 확인하였는 바, 이는 운동 훈련이 심장 단편 단축을 40-50%까지 증가시키고, 수축 및 이완 양자 모두의 속도를 향상시키기 때문이다.

[0048] 따라서, α1-AR 효능제는 심장 수축의 직접적 자극에 대한 삼중 효과 및 그 운동 효과를 통해서, 또한 심장, 근

육 및 간을 포함하는 다기관에서의 α1-AR 자극에 의한 운동-유사 AMPK-PPARδ 활성화라는 간접적 효과를 통해서 심장 기능을 향상시킴으로써, *in vivo*에서 운동 내성을 향상시키는데 기여하는 것으로 판단된다.

[0049] 이와 같이, α1-AR 자극에 의해서 AMPK-PPARδ 활성화라는 심장 운동-유사 효과가 나타나고, 부가적으로 PPARδ 및 PGC-1α 발현 증가라는 다른 운동-유사 프로그램을 작동시키는 AMPK-독립적 심장 운동 효과가 나타난다는 사실은 본 발명에서 최초로 밝힌 것이다.

[0050] 구체적으로, 본 발명에서는, α1-AR 자극 효과가 심근세포, 골격근 세포에서 운동-유사 유전자들의 발현에 미치는 효과를 분석하였으며, 이를 사람의 대사증후군과 유사한 증상을 보이는 동물인 자발성 고혈압쥐(SHR)를 사용하여 *in vivo*에서 심장, 골격근 및 간에 미치는 효과와 비교하였다.

[0051] 또한, α1-AR 자극 효과가 심장 기능/크기, 혈압, 염증성 사이토카인, 활성산소종 수준, 아디포넥틴, ATP 수준, SDH(succinate dehydrogenase) 효소의 활성도, 지방 수준, 및 안지오텐신 II AT-1 수용체의 발현 등에 미치는 효과를 관찰하였다.

[0052] 그 결과, 사람의 대사증후군에 해당하는 자발성 고혈압쥐(SHR)는 초기 단계에서 혈압이 지속적으로 상승하지만, α1-AR 효능제에 의해 α1-AR를 자극시 심장, 골격근, 간에서 AMPK, PPAR-δ, PGC-1α의 활성화 및 발현증가를 야기하고, 심장 비대 또는 추가적인 혈압 상승 없이 심장 수축성을 증가시킨다는 사실을 밝혔다.

[0053] 또한, α1-AR 자극시 혈액에서는 염증성 사이토카인, ROS, 및 콜레스테롤 수준이 감소하고, 심근에서 AMPK 자극에 대한 PPARδ 및 PGC-1α 활성화의 비율은 골격근과 간에서의 수치보다 더 높음을 확인하였다. 이러한 결과들은 운동 유사 AMPK-PPARδ 활성화와 관련되며, α1-AR 자극에 의한 근육수축 효과와는 독립적인 것임을 의미하며, 약리학적으로 자극된 심근 수축작용이 심장 AMPK-PPARδ-PGC1α 활성화에 기여한다는 점을 최초로 보고한 것이다.

[0054] 또한, 본 발명에서는, α1-AR 효능제가 다른 운동 유사효과 유발 약물들(아테놀롤)에 비해서 더욱 효과적이라는 사실을 밝혔는데, 이는 α1-AR 효능제가 심장 수축성을 향상시키는 이중 효과를 가지는 반면에, 다른 약물들은 심장 근육 수축에 대한 직접적인 수축 작용 없이 운동-유사 효과만을 발휘하기 때문이다. 또한, 다른 운동 유사제는 각각의 기능을 높이기 위하여 여러 약물을 혼합하여 사용되고 있으나, α1-AR 효능제는 한종류의 물질로도 이러한 운동효과를 다기관에 동시다발로 나타내는 장점이 있다.

[0055] 또한, 본 발명에서는, 미도드린으로 처리된 래트들에서 좌심실 박출계수가 아테놀롤 처리된 동물들만큼 증가하였지만, 심장에서의 인산화된 AMPK는 실험 그룹들 사이에 차이가 있음을 밝혔다. α-1 AR이 심장에 대해서 우호적인 효과를 나타냄에도 불구하고, α-1 AR 자극의 정도가 장기적 예후면에서는 중요한 것으로 판단되는데, 이는 심장 α-1 AR 드라이브의 고도로 지속된 보강이 수축성 기능장애, 점진적 섬유화 및 모세포 단백질 유전자의 재활성화에 대해서 병리적 리모델링을 야기하기 때문이다.

[0056] 또한, 본 발명에서는, α1-AR 자극에도 불구하고 심장 비대가 나타나지 않음을 밝혔는데, 이는 안지오텐신 II의 억제 작용, 자극성 자가소화작용(autophagy) 등에 대한 AMPK의 효과에 기인하는 것으로 보인다. 나아가, 본 발명에 따르면, 좌심실 질량은 아테놀롤 처리된 군에서보다 미도드린 처리된 군에서 더 작았으며, 이는 심장 ATI 발현의 차이로서 설명될 수 있을 것이다.

[0057] 또한, 본 발명에서는, 미도드린 장기 투여가 아테놀롤 처리와 유사하게, SHR에서 혈압 상승을 완화시킴을 밝혔으며, 혈압은 직접적 α1-AR 자극의 혈관 수축과 α1-AR 자극을 수반하는 AMPK 활성화를 통한 혈관 확장 사이의 균형 상태를 보여주는 마커로 판단할 수 있으므로, 초기 SHRs에서 α1-AR 자극은 혈압 강하 및 심장 기능 강화에 효과적임을 알 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명에서는, *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해서, 근육 운동과는 무관하게, α1-AR 자극이 골격근에서 AMPK-PPAR-δ-PGC1α 발현을 활성화시킨다는 점을 최초로 밝혔다. 이러한 운동 관련 유전자 발현이 지구적 운동(endurance exercise)을 유지하기 위한 적응 반응 중 하나라는 점에 대해서는 이미 보고된 바 있다.

[0059] 또한, 본 발명에서는, α1-AR 자극시, ROS 수준이 감소하고, 간에서도 AMPK-PPAR-δ-PGC1α 활성화가 유도되었으며, 대사/생화학적 반응/염증 반응에 대해서 전신적 효과를 나타내고, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 및 HDL-콜레스테롤 수준이 현저히 감소함을 확인하였다.

[0061] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하

기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0063] **[실시예]**

[0064] **실시예 1: 실험방법**

[0065] **1-1. 시료**

[0066] TRIzol® 시약은 Invitrogen (CA,USA)으로부터 구입하였다. Power cDNA 합성 키트 및 Maxime PCR PreMix 키트는 iNtRON Biotechnology (Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea)로부터 구입하였다. PREP™ 단백질 추출 용액 및 사전염색된 단백질 크기 마커는 iNtRON Biotechnology로부터 구입하였다. 항-AMPKα (전체 형태의 α 서브유닛), 및 항-포스포-AMPKα(Thr172에서 인산화) 1차 항체는 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였다. 항-토끼 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Clarity Western ECL Substrate 키트는 Bio-rad (Hercules, CA, USA)로부터 구입하였다. X-선 필름은 Agfa (Mortsel, Belgium)로부터 구입하였으며, 현상 및 고정 키트는 Kodak (Rochester, NY, USA)으로부터 구입하였다. 래트 아디포넥틴 검출 ELISA 키트는 Abcam (Cambridge, UK)으로부터 구입하였다.

[0067] **1-2. 골격근/심근 세포에서 AMPK에 대한 α1-AR 자극의 *in vitro* 효과**

[0068] *in vitro* 실험에서 근육의 α1-AR 자극이 운동효과와 관련이 있는지 확인하기 위하여 운동시 증가하는 대표 단백질인 AMPK 발현을 먼저 확인하고, 골격근, 심근 및 간에서 AMPK와 더불어 PPARδ 및 PGC-1의 발현이 증가될 것이라는 전제하에 하기와 같이 *in vivo* 동물실험을 진행하였다.

[0069] **1-3. 동물 실험**

[0070] 자발성 고혈압쥐 (Spontaneously Hypertensive Rat; SHR)는 유전성 고혈압이 발현되는 실험 동물로서, 인간의 원발성 고혈압과 가장 유사한 고혈압을 발현시키는 것으로 알려져 있다. SHR은 대개 4~6주령에 혈압이 상승하기 시작하여, 8~12주령에 본격적인 고혈압이 발현된다. SHR은 심비대, 심부전 및 신장애 등과 같은 고혈압성 표적 장기의 손상을 흔히 동반하기 때문에, 원발성 고혈압, 특히 심장병변을 지닌 고혈압에 대한 동물 모델로서 관련 연구에 폭넓게 사용되고 있다.

[0071] 3주령의 자발적 고혈압쥐 (SHRs)를 표준화된 조건 하에서 보관하였는 바 (21 ℃, 41% 내지 62% 습도), 규칙적인 낮/밤 (10/14 시간) 사이클을 가해주고, 물 및 실험실 먹이에 자유롭게 접근하도록 하였다. 모든 동물 실험들은 고려대학교 동물 과학 규칙에 부합하여 수행하였다 (KUIACUC-2012-100). 실험 과정들 및 수용 조건들은 고려대학교 동물 실험 위원회의 승인을 받았다.

[0072] 적응 1주 후에, 래트들을 하기와 같이 4개 군들 중 하나 (군 당 6 마리 래트)로 할당하였다: 그룹 I (기저 대조군, 4주령에 희생), 그룹 II (4주 동안 미도드린 투여), 그룹 III (4주 동안 아테놀롤 (atenolol) 투여), 및 그룹 IV (4주 동안 약제 투여 없는 대조군). 그룹 I 및 그룹 IV는 어떠한 약물도 없이 표준 유지 먹이를 주었고 (K-H4 펠렛, Ssniff), 그룹 II는 음용수 중 미도드린과 함께 (0.2 mg/kg/d) 동일한 먹이를 주었으며, 그룹 III은 음용수 중 아테놀롤과 함께 (1 mg/kg/d) 동일한 먹이를 주었다.

[0073] 혈압은 Visitech BP2000 system (Visitech Systems Inc.)을 사용하여 꼬리-절단 체플레티스모그래피에 의해서 매 7일 동안 측정하였다.

[0074] 그룹 I 중의 동물들은 4주령에서 안락사시킨 반면, 다른 그룹들의 래트들은 4주 동안 처방한 다음, 8주령에서 안락사시켰다. 혈액 샘플들은 하대 정맥으로부터 채취하였으며, 심장, 대동맥, 간, 골격 근육, 및 내장 지방은 깨끗하게 절개하여 중량을 재었다. 수거된 장기들은 -80 ℃ 냉장고 또는 침지 고정을 위한 10% 포르말린 중에 보관하였다.

[0075] **1-4. 심장의 에코심박동기록 (echocardiographic) 검사**

[0076] Zoletil® (8 mg/kg) 및 xylzine (2 mg/kg)을 근육 주사하여 마취시킨 이후에, 래트들을 좌측으로 눕혀놓고 M-모드 에코 영상들을 얻었다. 모든 검사는 12 MHz 트랜스듀서를 구비한 Vivid 7 (GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA)을 사용하여 수행하였다. 유두근 수준에서 좌심실에 대한 최적 2차원 단축 영상을 획득한 이후에, M-모드 트레이싱을, 동시에 심전도 기록을 수행하면서 100 mm/s의 속도로 기록하였다. M-모드 트레이싱에 대한 적어도 3회 연속 심장 사이클로부터 American Society for Echocardiography 방법의 변형 방법을 사

용하여, 심장벽 두께, 부피, 및 질량을 측정하였다.

[0077] **1-5. 혈액 생화학, 염증 마커, 활성 산소종, ATP 및 아디포넥틴의 측정**

[0078] 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 및 트리글리세라이드의 농도를 측정하기 위해서 효소 발색법(Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany)을 사용하였다. 또한, 프로토콜에 따라서 사이토카인들(인터루킨 (IL)-1α, IL-1β, IL-6, IL-4, IL-10, 및 TNF-α)에 대해서, 4-plex cytokine Milliplex panel (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)을 사용하여 염증성 마커들에 대한 혈청 분석을 수행하였다. 획득은 Luminex 100 플랫폼 상에서 수행되었으며, 데이터는 Multiplex 분석기를 사용하여 분석하였다. 활성 산소종 및 아디포넥틴은 ELISA 키트 (MBS815494, Mybiosource)를 사용하여 측정하였다. 측정된 혈액 아디포넥틴 수준을 내장 지방 중량 (g)에 대해 수정하였다.

[0079] **1-6. 조직의 ATP 및 ROS 측정을 위한 ELISA 방법**

[0080] 0.02g의 간조직을 500 ㎕의 PBS 중에서 균질화하였다. 균질액을 1500×g (또는 5000 rpm)에서 15분 동안 원심분리한 이후에, 상등액에 대해서 측정을 수행하였다. 기준 물질 또는 샘플들 100 ㎕를 항체 사전-코팅된 마이크로적정 플레이트 중의 적당한 웰에 부은후 잔여 용액 10 ㎕를 샘플에 첨가하였다. 50 ㎕의 컨주게이트를 각 웰에 첨가하고 혼합한 다음, 커버를 덮은 플레이트를 37 ℃에서 1시간 동안 배양하였다. 각각 50 ㎕의 기질 A 및 B를 각각의 웰에 첨가하고, 37 ℃에서 15 분 동안 배양하였다. 각각의 웰에 정지 용액을 첨가한 후, 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 450 nm에서 광학 밀도를 측정하였다.

[0081] **1-7. 골격근의 SDH(succinate dehydrogenase) 효소 활성도 측정방법**

[0082] 웰 당 PBS 용액 1 ml 당 단백질분해효소 저해제 칵테일 10 ㎕를 첨가하여 웰 당 500 ㎕ 씩 준비하고, 1 M 인산완충용액 25 ㎕×25 = 625 ㎕, 0.2M 소듐 숙시네이트 125 ㎕×25 = 3125 ㎕, NBT 25 ㎕×25 = 625 ㎕, D.W 235 ㎕×25 = 5875 ㎕를 섞어 만든 배양용액을 웰 당 410 ㎕ 준비하여, 반응 20 분 전에 37℃로 데워두었다. 골격근육 조직 0.02 g 당 위에서 미리 준비한 PBS 500 ㎕를 넣고 파쇄기로 갈되, 짧은 시간 동안 나누어 갈아서 온도가 상승하여 효소가 파괴되지 않게 준비했다. 13000 rpm, 4 ℃에서 5분 동안 원심분리 후 상층액을 수득하여 새로운 튜브에 옮겼다. 배양용액 410 ㎕를 미리 튜브에 넣어두고 샘플 90 ㎕를 넣어 효소반을을 시켰다. 또 다른 튜브에 D.W 410 ㎕를 넣고 샘플 90 ㎕를 넣고 희석액의 흡광도를 측정하였다. 앞서 준비한 효소반응의 튜브와 다른 튜브를 각각 37℃ 물 중탕에 넣고 30 분 동안 반응시킨 후, 얼음에 튜브를 삽입하여 반응을 종료시킨 후, 96 웰 플레이트에 200 ㎕ 씩 분주하여 흡광도 550nm로 측정하고, 결과값을 다음과 같은 식에 적용하여 숙신산 데하이드로게나아제(SDH)의 효소 활성도를 계산하였다.

[0083] 효소 활성도= (효소반응 흡광도 값 - 효소액 희석액 흡광도 값) / 단백질 정량값 (브래드포드 595nm)

[0084] **1-8. 대동맥 및 심장에서 mRNA 발현을 정량하기 위한 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)**

[0085] 전장 RNA를 제조사 사용지침에 따라서 TriZol 시약을 사용하여 추출하였다. 상보적인 DNA는 Power cDNA Synthesis 키트를 사용하여 전장 RNA로부터 합성하였으며, 안지오텐신 II 타입 I 수용체 (AT1R), 내피 일산화질소 합성효소 (eNOS), 수퍼옥사이드 디스뮤타아제 (SOD), gp91-phox (NADPH), 종양 괴사 인자-alpha (TNF-α), 및 GAPDH에 대한 중합효소 연쇄반응은 PCR Premix 키트를 사용하여 수행하였다.

[0086] **1-9. 웨스턴 블랏**

[0087] 단백질 추출물들의 단백질 함량은 브래드포드 방법을 사용하여 측정하였다. 추출된 단백질들 (20 ~ 30 ug)을 10% SDS-PAGE 겔 상에 로딩하였다. 웨스턴 블랏 분석은 AMPKα, 인산화된 AMPKα, PPARδ 및 PGC-1α에 대한 1차 항체를 사용하여 수행하였다. 영상들은 Kodak GBX 현상기 및 고정 시약을 사용하여 수동으로 얻었다.

[0088] **1-10. 통계적 분석**

[0089] 혈압의 경우, 얻어진 혈압 기록들 전체를 분석하였다 [4주령 내지 8주령된 3개 동물군들에 대한 측정]. 혈압 수치는 ANOVA를 사용하여 비교하였으며, p 수치 <0.05인 경우를 유의미한 것으로 간주하였다. 연속적 변수들은 평균 ± 표준편차 (SD)로 기록하였다. 4개 군들에 걸친 변수들의 전반적 차이값들은 Kruskal-Wallis 테스트를 사용하여 분석하였다. 두 개 군들 사이의 차이값들은 Mann-Whitney U-테스트를 사용하여 평가하였다. 0.05 미만의 p-수치들은 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다. 모든 통계적 분석은 SPSS (ver. 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다.

[0091] **실시예 2: 실험결과**

[0092] **2-1. 골격근/심근 세포에서 α1-AR 자극시 AMPK의 인산화에 대한 *in vitro* 효과**

[0093] AMPK 및 AMPK 인산화(활성화)에 대한 α1-AR(α1-아드레날린 수용체) 자극 효과를 *in vitro*에서 확인하기 위하여, 래트 골격근 세포주(L6)와 마우스 심근 세포주(HL1)에 α1-AR 효능제인 미도드린을 처리하였다.

[0094] 그 결과, 도 1a 및 1b에 나타낸 바와 같이, 골격근 세포의 AMPK가 α1-AR 자극에 의하여 발현되었으며, 인산화된 AMPK 발현이 미도드린의 농도에 따라 증가되었는 바, α1-AR 자극이 AMPK의 활성화에 관여함을 알 수 있었다. 또한, 미도드린 투여로 인한 α1-AR 자극은 골격근 이외에 심근 세포에서도 같은 양상으로 AMPK의 발현 및 인산화 반응이 나타났다.

[0095] 따라서, 골격 근육에서 미도드린이 작용하여 나타나는 변화(AMPK 활성화)가 심근에서도 기존에 알려진 심근 수축기능 향상과 동시에 나타내기 때문에 (AMPK 활성화 + 심근 수축 증가), α1-AR 자극으로 추가적인 심근 운동 효과가 나타나고 있다는 것을 알 수 있다. 즉, 인 비트로 실험에서 이제까지 단순히 심근세포의 수축력만 증가할 가능성만 알려진 바 있으나, 본 실시예에서는 골격근 및 심근세포에서 AMPK 증가 및 인산화가 증가되어 운동 효과 관련 작용이 예상되었다.

[0097] **2-2. *in vivo* 동물모델에서 심장기능/체중/혈압에 대한 α1-AR 효능제 투여효과**

[0098] 미도드린 투여시 *in vivo* 골격근에서도 AMPK, PPAR-δ 및 PGC-1α가 증가된다면, 골격근에서 운동효과가 이미 증명된 AMPK-PPARδ-PGC1α 동시발현 캐스캐이드가 심근 수축기능 향상에 영향을 준다고 간주할 수 있을 것이므로, 상기 실시예 2-1의 *in vitro* 효과에서 나아가 *in vivo*에서 심장 기능, 체중, 혈압을 확인하였다.

[0099] **심장기능/체중**

[0100] 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 8주령 래트의 에코심박동 데이터로부터, 미도드린 투여 래트 그룹 II 및 아테놀롤 투여 래트 그룹 III의 좌심실 성능이 미투여 대조그룹 IV의 해당 수치보다 더 높은 것으로 나타났다.

[0101] 또한, 좌심실 질량은 그룹 II에서 가장 낮았지만, 심장 질량은 그룹들 사이에서 유의미한 차이점이 관찰되지 않았으며, 그룹 III이 가장 높은 체중을 나타내었다.

[0102] [표 1]

[0103]

패러미터	미도드린 (그룹 II)	아테놀롤 (그룹 III)	대조군 (그룹 IV)	*p*-수치
확장기 좌심실 격막, mm	1.46 ± 0.13^a	1.50 ± 0.13^a	1.45 ± 0.11^a	0.3256
확장기 좌심실 후벽, mm	1.54 ± 0.13^a	1.67 ± 0.16	1.54 ± 0.15^a	0.0046
확장기 좌심실 내부 크기, mm	6.06 ± 0.42^a	6.33 ± 0.35^a	6.37 ± 0.72^a	0.1082
수축기 좌심실 내부 크기, mm	3.32 ± 0.54^a	3.43 ± 0.28^a	3.82 ± 1.01	0.0445
좌심실 구획 단축률, %	45.48 ± 6.25^a	45.70 ± 5.82^a	38.77 ± 8.59	0.0019
좌심실 박출 계수, %	81.55 ± 6.12^a	82.00 ± 5.31^a	73.87 ± 10.13	0.0007
ASE 에 의한 좌심실 질량, g	1.04 ± 0.06	1.10 ± 0.07^a	1.07 ± 0.12^a	0.0313
체중, g	238.24 ± 11.69^a	296.46 ± 16.73^b	236.20 ± 7.58^a	0.009
심장 무게, g	1.47 ± 0.16^a	1.47 ± 0.15^a	1.78 ± 0.35^a	0.062

[0105] **혈압/심장박동수**

[0106] 4주령의 래트로 이루어진 3개의 그룹(청색: 대조군, 적색:미도드린 투여군, 녹색: 아테놀롤 투여군)에서 1개월에 걸쳐서 확장기/수축기 혈압을 측정하였다.

[0107] 그 결과, 도 2a 내지 2c에 나타낸 바와 같이, 4주령부터 확장기 및 수축기 혈압 모두가 자발적 고혈압쥐(SHRs; 대조군)에서 증가하기 시작하였고, 미도드린 투여그룹 II 및 아테놀롤 투여그룹 III은 약물 투여 1주일 경과 후부터 확장기/수축기 혈압 모두가 감소되었으며, 이러한 효과는 조사 기간 종료 시점까지 지속되었다. 그룹 II

및 그룹 III의 확장기 및 수축기 혈압 모두 실험 2주차부터 4주차까지, 대조군(SHRs)의 혈압들보다 낮았다 ($p<0.05$).

[0108] 또한, 도 2d에 나타낸 바와 같이, 심장 박동은 실험 말미에 아테놀롤 그룹에서 가장 낮았다.

[0110] **2-3. 심근, 골격근, 대동맥, 간에서 AMPK, PPAR-δ, PGC-1α 단백질 발현**

[0111] 골격근에서 α1-AR의 존재를 확인하기 위하여, 기저 4주령 대조군 래트(I), 미도드린 투여 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)의 골격근에서 α1-AR의 단백질 발현상태를 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 그룹 IV에서 α1-AR가 가장 높은 발현을 나타내었다.

[0112] 또한, 심근, 골격근, 간에서 AMPK, PPAR-δ, PGC-1α 단백질의 발현상태를 각각 웨스턴 블랏팅으로 확인한 결과, 도 3b(심근), 도 3c(골격근) 및 도 3d(간)에 나타낸 바와 같이, 심근의 경우에 인산화된 AMPK 단백질의 발현은 그룹 I이 그룹 IV보다 높았으며($p<0.05$), 미도드린 처리그룹 II는 대조군 그룹 IV보다 심근, 골격근에서 현저하게 높은 AMPK 발현을 나타내었지만, 아테놀롤 처리그룹 III는 동일한 나이의 대조군 그룹 IV과 비교할 때 해당 기관들에서 더 높은 AMPK 단백질의 발현을 나타내지는 않았다.

[0113] 특이한 점은, 심근에서는 AMPK 증가에 비하여 PGC-1α와 PPAR-δ의 증가가 훨씬 크지만, 골격근에서는 AMPK 증가에 비하여 PGC-1α와 PPAR-δ의 증가가 훨씬 덜하다는 점이다. 이는, 심근의 운동효과가 AMPK 활성화와 더불어 직접적으로 PGC-1α와 PPAR-δ의 발현을 증가시키는데 반하여, 골격근은 운동을 상대적으로 많이 하고 있지 않았기 때문에 비교적 AMPK에 비하여 PGC-1α와 PPAR-δ가 증가하지 않음을 의미한다.

[0115] **2-4. 대동맥 및 심장에서 안지오텐신 II AT-1 수용체, eNOS, SOD, NADPH, TNFα, MCP 유전자 발현**

[0116] 대동맥 및 심근 조직에서, 기저 4주령 래트(I), 미도드린 투여한 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)에 대하여, 각각 혈관수축, 일산화질소 생성, 산화적 스트레스, 및 염증과 관련된 유전자들의 mRNA 발현 수준을 노던블랏으로 확인하였다.

[0117] 그 결과, 도 4a에 나타낸 바와 같이, 대동맥에서 안지오텐신 II AT1R의 mRNA 발현은 2가지 대조군(그룹 I 및 IV)에 비해서 그룹 II 및 III에서 더 낮았다. 또한, eNOS 발현은 그룹 II에서 가장 낮았지만 다른 그룹들과 유의미한 차이점이 관찰되지는 않은 반면, SOD 발현은 그룹 II에서 가장 높았다. NAD(P)H 옥시다아제의 gp91-phox (Nox-2) mRNA 발현은 그룹 I에서 더 높았지만, 약물 투여와는 무관하게 8주령된 자발성 고혈압쥐들 사이에서 다르지는 않았다. TNFα 발현은 그룹 II에서 가장 낮았고 그룹 III에서는 중간 정도였으며 그룹 IV에서 더 높고, 그룹 I에서 가장 높았다.

[0118] 또한, 도 4b에 나타낸 바와 같이, 심근에서 안지오텐신 II AT1R의 mRNA 발현은 상기 대동맥의 결과와 유사하게 그룹 II에서 가장 낮았고 그룹 III에서는 중간 정도였다. eNOS 발현은 그룹들 사이에서 차이가 없었으며, SOD는 그룹 IV보다 그룹 II에서 현저하게 더 높은 수준으로 발현되었다. 대동맥(혈관) 조직과는 대조적으로, NAD(P)H 옥시다아제의 gp91-phox (Nox-2) mRNA 발현은 약물 투여와는 무관하게 그룹들 사이에 차이가 없었다. TNFα의 심근 발현은 미도드린 투여에 반응하여 감소하지 않았다.

[0120] **2-5. 사이토카인, 활성 산소종, 아디포넥틴, 지방 프로파일에 미치는 α1-AR 효능제 투여 효과**

[0121] 미도드린의 장기 투여가 사이토카인(IL, TNFα), 활성 산소종(ROS), 아디포넥틴(adiponectin) 발현 및 지방 프로파일에 미치는 효과를 확인하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0122] [표 2]

	Basal control (Group I)	Midodrine (Group II)	Atenolol (Group III)	Control (Group IV)	p-value
IL-1β (μg/ml)	0.22 ± 0.20[a]	0.46 ± 0.422[a]	2.02 ± 1.53[a]	1.23 ± 1.45[a]	0.194
IL-1α (μg/ml)	1.94 ± 1.09[a]	0.14 ± 0.32[b]	5.51 ± 2.64[c]	0.15 ± 0.35[b]	0.004
IL-6 (μg/ml)	4.50 ± 0.20[a]	4.82 ± 0.49[a]	5.62 ± 1.42[a]	5.48 ± 1.15[a]	0.360
TNF-α(μg/ml)	3.60 ± 0.65[a]	2.64 ± 1.64[a]	8.35 ± 1.36[b]	5.36 ±1.94[a]	0.006
IL-4 (μg/ml)	1.72 ± 0.26[a]	1.84 ± 0.21[a]	2.94 ± 0.90[b]	2.28 ± 0.50[ab]	0.030
IL-10 (μg/ml)	12.34 ± 0.89[a]	12.15 ± 0.37[a]	15.33 ± 2.79[b]	13.52 ± 1.66[a]	0.094
ROS (ng/ml)	186.8 ± 25.7[a]	204.9 ± 27.5[a]	223.1 ± 45.4[a]	254.8 ± 16.8[a]	0.254
Adiponectin (ng/ml/g)	74796.6± 13898.0[a]	7585.8 ± 182.3[b]	6136.5 ± 574.7[b,c]	5455.8 ± 709.7[c]	<0.001

[0123]

[0124] 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 전염증성 사이토카인(IL-1β 및 IL-6)의 수준은 그룹들 사이에 유의미하게 다르지는 않았으며, IL-1α 수준은 그룹 I 보다는 그룹 II에서 더 낮은 반면 그룹 III에서 현저하게 증가되었고, TNF-α 발현 또한 다른 그룹들보다 그룹 III에서 현저하게 증가되었으며, IL-4 및 IL-10은 다른 그룹들에 비해서 그룹 III에서 약간 더 높았다.

[0125] 또한, 활성 산소종(ROS) 수준은 미도드린 투여그룹 II이 아테놀롤 투여그룹 III 및 미투여 8주령 대조군 IV에 비해서 더 낮았으나, 이러한 차이는 통계적으로 유의미한 수준은 아니었다.

[0126] 또한, α1-AR 자극이 어떻게 AMPK를 활성화시키는지 확인하기 위하여 AMPK의 상류 분자인 아디포넥틴 수준을 측정한 결과, 그룹 II가 그룹 IV에 비해서 내장지방 무게당 현저히 높은 혈청 아디포넥틴 수준을 나타내었다.

[0127] 지방 프로파일과 관련하여서는, 하기 표 3에 나타낸 바와 같이, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤은 약물 투여군(그룹 II 및 IV)에 비해서 대조군(그룹 I 및 IV)에서 더 높았으나, 트리글리세라이드 수준은 그룹들 사이에 별 차이가 없었다.

[0128] [표 3]

Lipids, (SI/L)	Basal control (Group I)	Midodrine (Group II)	Atenolol (Group III)	Control (Group IV)	*p*-value
Total cholesterol	1.69 ± 0.29	0.73 ± 0.15[a]	1.01 ± 0.27[a]	1.66 ± 0.17	<0.001
LDL cholesterol	0.43 ± 0.06	0.15 ± 0.04[a]	0.15 ± 0.03[a]	0.40 ± 0.03	<0.001
HDL cholesterol	0.81 ± 0.08	0.49 ±0.11[a]	0.52 ± 0.04[a]	0.87 ± 0.15	<0.001
Triglyceride	0.83 ± 0.33[a]	0.43 ± 0.12[a]	0.77 ± 0.33[a]	0.77 ± 0.31[a]	0.092

[0129]

[0131] 또한, TCA 회로 인자인 succinate dehydrogenase(SDH) 효소 활성도를 골격근에서 측정한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 미도드린 투여그룹 II에서 가장 높게 증가함을 알 수 있었다($p<0.01$).

[0133] **2-6. 조직 ATP 수준 비교**

[0134] 기저 4주령 래트(I), 미도드린 투여한 래트(II), 아테놀롤 투여 래트(III) 및 미투여 8주령 대조군 래트(IV)에 대하여, 심장, 골격근 및 간에서 ATP 수준을 ELISA 방법으로 측정하여 비교하였다.

[0135] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 미도드린 또는 아테놀롤 처리 그룹의 심장 조직에서는 ATP 수준이, 심장의 더 높은 수축 활성에도 불구하고 대조군 SHRs의 수치보다 높게 관찰되었다.

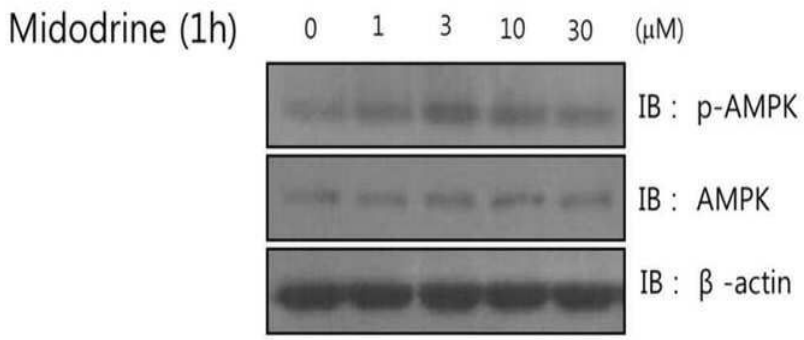
[0137] 이상의 결과들에 의하면, α1-AR 효능제에 의한 α1-AR 자극은, 운동 없이도 골격근, 간 및 혈관에 운동유사 효

과라는 유익한 변화를 초래하며, 심장 비대 또는 혈압 상승을 수반하지 않으면서 좌심실의 박출 계수를 향상시키고, 염증을 감소시키며, 자발성 고혈압쥐의 초기 생애 중 초기 고혈압 시기에 생화학적 반응들을 변화시킴을 알 수 있다. 이는, 직접적으로 자극된 심장 근육 수축, 심장 운동 유사 효과, 및 AMPK 활성화와 관련된다.

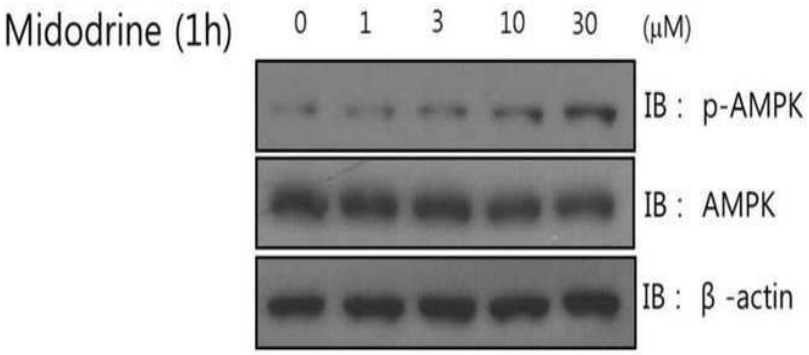
[0139] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

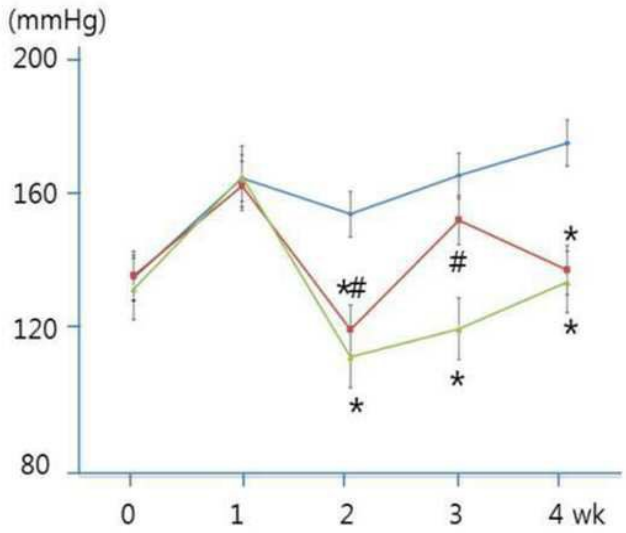
도면1a



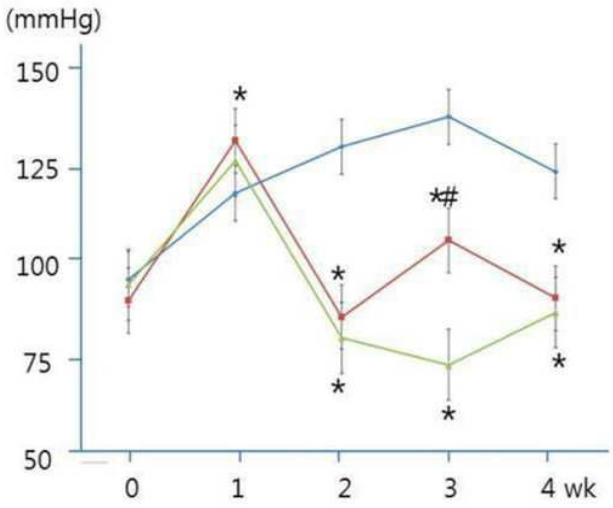
도면1b



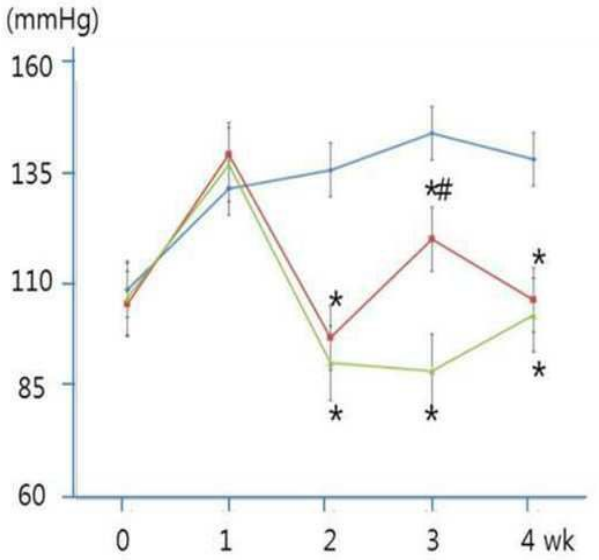
도면2a



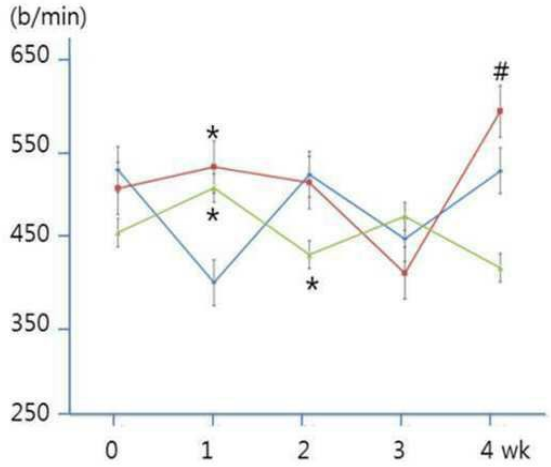
도면2b



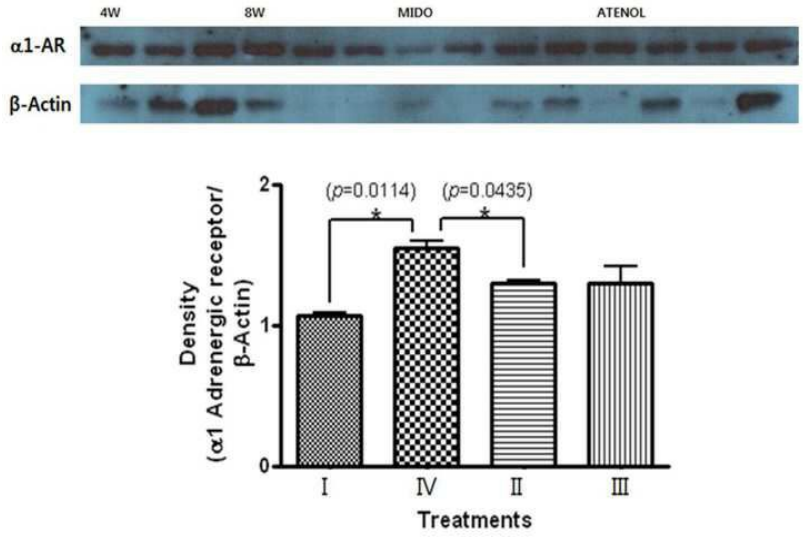
도면2c


(mmHg)
160
135
110
85
60
0
1
2
3
4 wk
*
*#
*
*
*
*

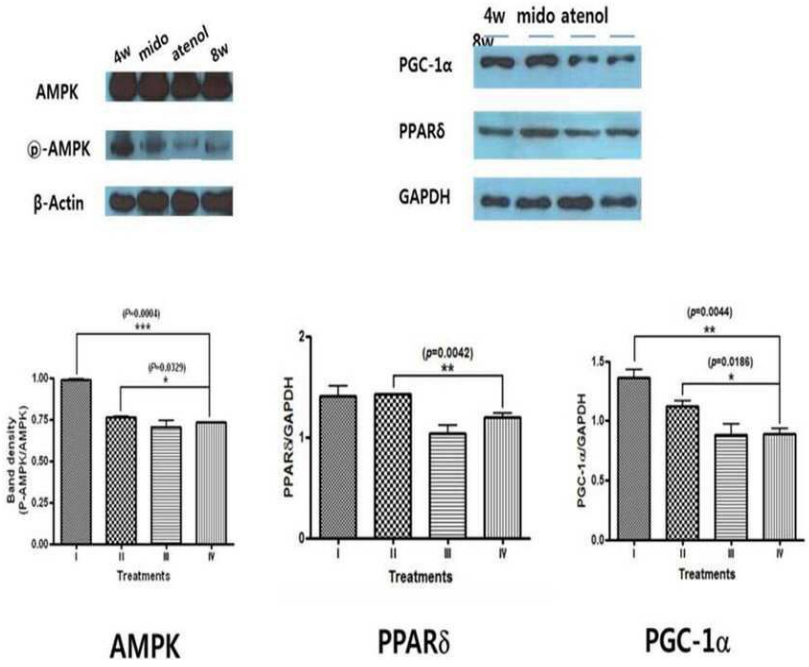
도면2d


(b/min)
650
550
450
350
250
0
1
2
3
4 wk
*
*
*
#

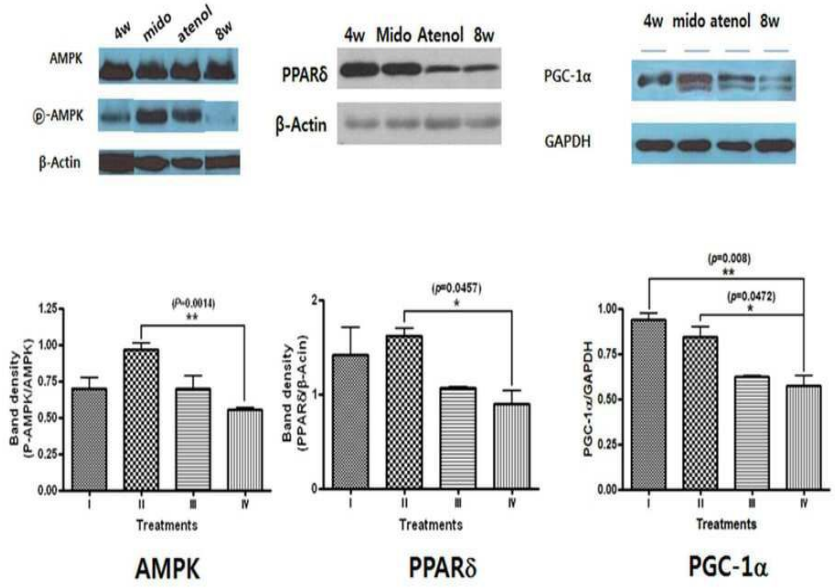
도면3a


4W
8W
MIDO
ATENOL
α1-AR
β-Actin
(p=0.0114)
(p=0.0435)
Density
(α1 Adrenergic receptor/
β-Actin)
Treatments

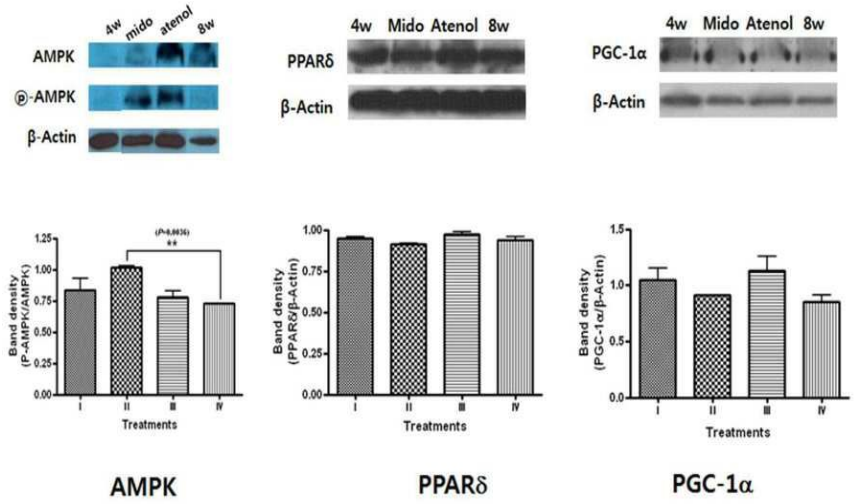
도면3b


4w
mido
atenol
8w
AMPK
Ⓟ-AMPK
β-Actin
PGC-1α
PPARδ
GAPDH
Band density
(P-AMPK/AMPK)
PPARδ/GAPDH
PGC-1α/GAPDH
Treatments
AMPK
PPARδ
PGC-1α

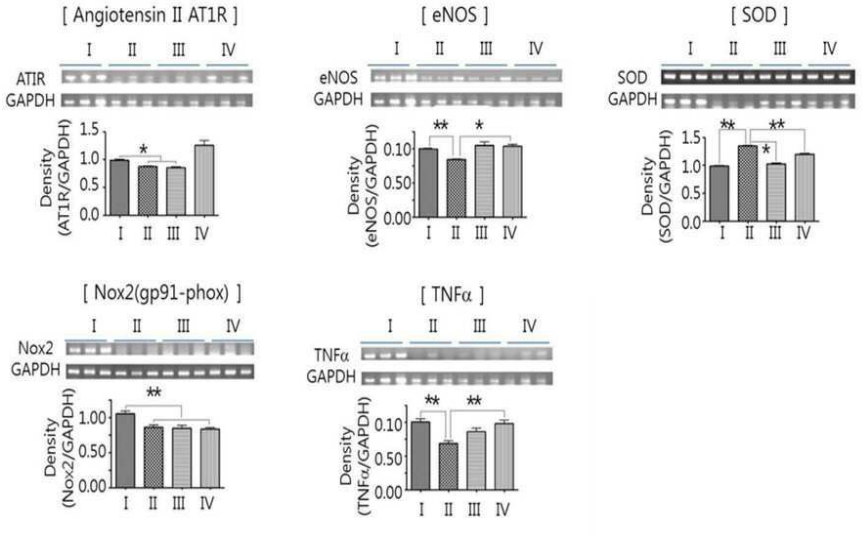
도면3c


4w mido atenol 8w
AMPK
ⓟ-AMPK
β-Actin
4w Mido Atenol 8w
PPARδ
β-Actin
4w mido atenol 8w
PGC-1α
GAPDH
Band density (P-AMPK/AMPK)
Band density (PPARδ/β-Actin)
PGC-1α/GAPDH
Treatments
AMPK
PPARδ
PGC-1α

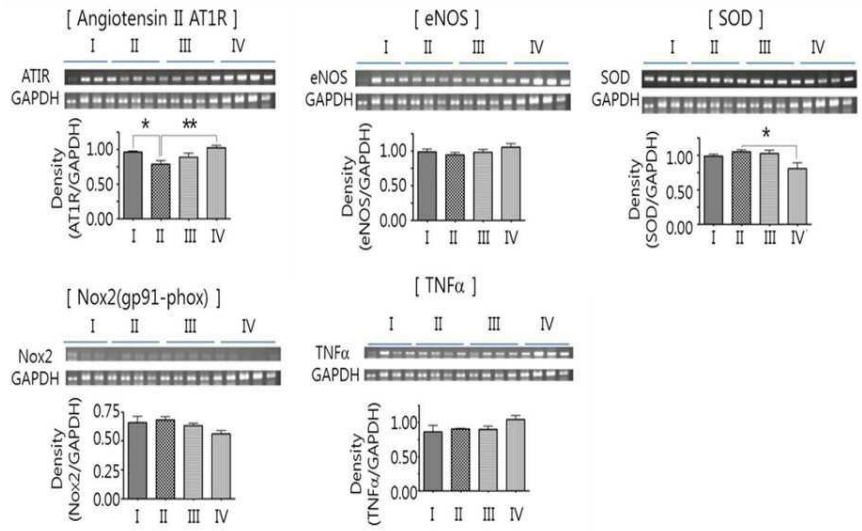
도면3d


4w mido atenol 8w
AMPK
ⓟ-AMPK
β-Actin
4w Mido Atenol 8w
PPARδ
β-Actin
4w Mido Atenol 8w
PGC-1α
β-Actin
Band density (P-AMPK/AMPK)
Band density (PPARδ/β-Actin)
Band density (PGC-1α/β-Actin)
Treatments
AMPK
PPARδ
PGC-1α

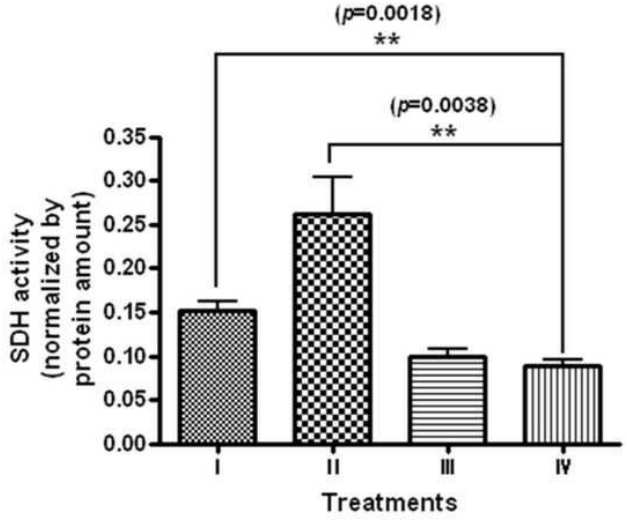
도면4a


[Angiotensin II AT1R]
I II III IV
ATIR
GAPDH
Density (AT1R/GAPDH)
[eNOS]
eNOS
GAPDH
Density (eNOS/GAPDH)
[SOD]
SOD
GAPDH
Density (SOD/GAPDH)
[Nox2(gp91-phox)]
Nox2
GAPDH
Density (Nox2/GAPDH)
[TNFα]
TNFα
GAPDH
Density (TNFα/GAPDH)

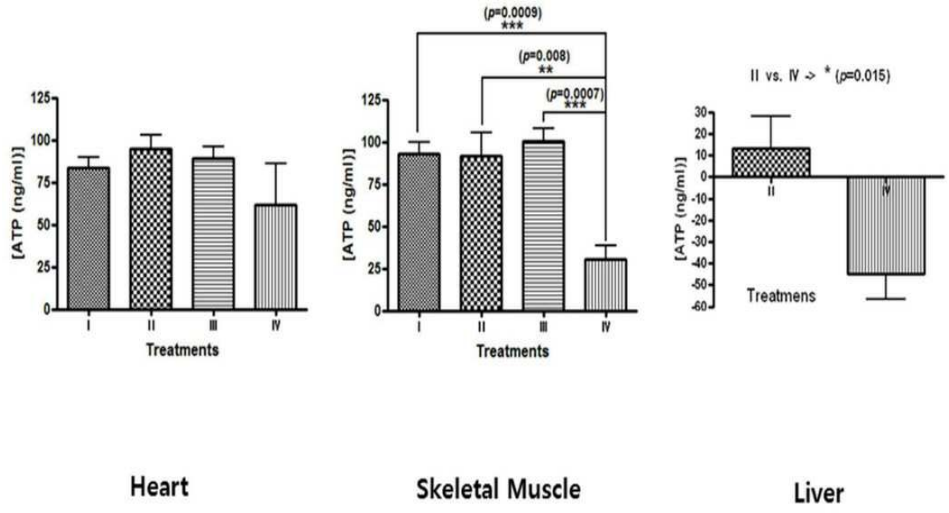
도면4b


[Angiotensin II AT1R]
I II III IV
ATIR
GAPDH
Density (AT1R/GAPDH)
[eNOS]
eNOS
GAPDH
Density (eNOS/GAPDH)
[SOD]
SOD
GAPDH
Density (SOD/GAPDH)
[Nox2(gp91-phox)]
Nox2
GAPDH
Density (Nox2/GAPDH)
[TNFα]
TNFα
GAPDH
Density (TNFα/GAPDH)

도면5


(p=0.0018)
**
(p=0.0038)
**
SDH activity
(normalized by
protein amount)
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
I
II
III
IV
Treatments

도면6


[ATP (ng/ml)]
125
100
75
50
25
0
I
II
III
IV
Treatments
(p=0.0009)
***
(p=0.008)
**
(p=0.0007)
***
II vs. IV -> * (p=0.015)
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
Treatmens
Heart
Skeletal Muscle
Liver