(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0041904
(43) 공개일자 2019년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/232 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0094221
(22) 출원일자 2018년08월13일
심사청구일자 2018년08월13일
(30) 우선권주장
1020170133186 2017년10월13일 대한민국(KR)

(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 14 항

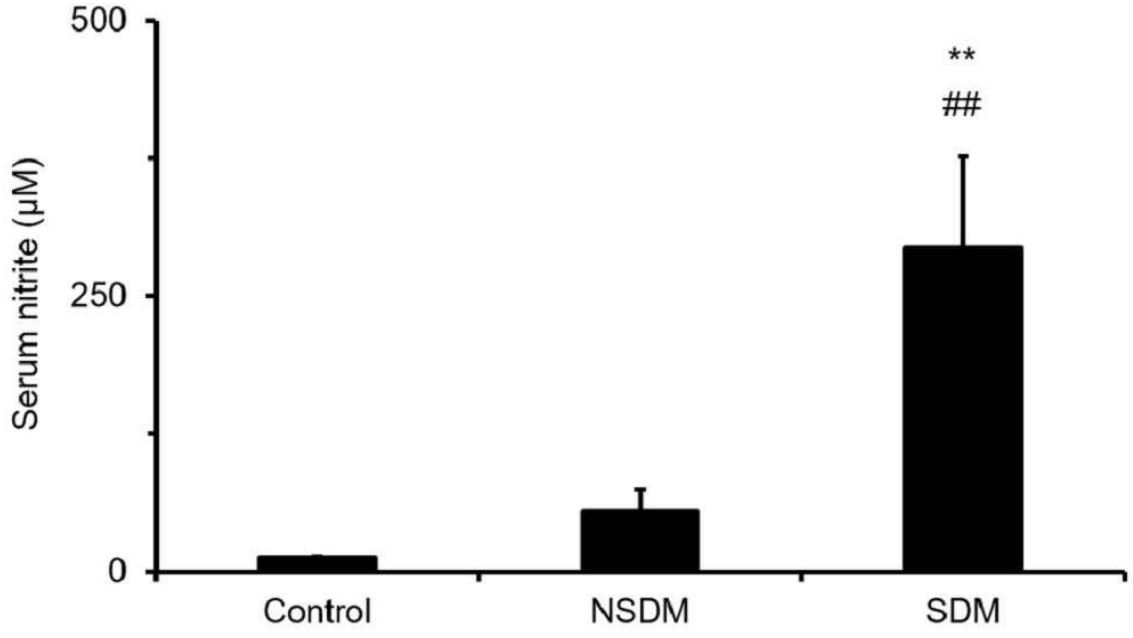
(54) 발명의 명칭 **혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델, 이의 제조방법 및 그 용도**

(57) 요 약

본 발명은 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물모델, 이의 제조방법 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 유전자 변이 없이 간단하게 생리학적으로 당뇨병을 유도할 수 있으며, 그 표현형이 혈중 산화질소 과다 생산, 혈관내피 기능부전 및 심박

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3



동수 감소로 나타나는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물모델에 관한 것이다. 본 발명에 따른 당뇨병 동물 모델은 기존의 모델과 비슷한 혈청 포도당 농도를 나타내고, 혈청 산화질소 농도가 임상의 제2형 당뇨환자와 유사하게 증가된 특성을 일 뿐만 아니라, 확실한 혈관내피기능부전 및 심박동수 감소를 가지고 있음과 동시에 이를 유도하는데 소요되는 기간이 획기적으로 단축되었으므로 본 발명의 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델이 당뇨병의 연구 및 당뇨로 인한 산화질소 과다 생성, 혈관내피기능부전 및 심박동수 감소의 기전 연구 또는 예방 및 치료용 의약품을 개발하는데 유용하다. 또한 본 발명은 리나릴 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 혈청 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소의 개선 또는 치료용 약학적 조성물과 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 비정상적으로 증가된 혈청 산화질소 및 혈관내피 기능부전을 정상화하는 효과가 확인되었는바, 혈청 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소의 개선 또는 치료에 의약품 및 건강기능식품으로 유용하다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/232 (2013.01)
A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2207/35 (2013.01)
A01K 2267/0362 (2013.01)
A01K 2267/0375 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016931081
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공학개인기초연구지원-기본연구
연구과제명	방향성 천연물의 저산소성 뇌혈관 손상 제어 기전 규명
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2016.11.01 ~ 2017.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

실험동물에 만성 부동 스트레스를 가한 다음, 췌장 베타 세포를 선택적으로 손상시키는 단계를 포함하는 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 만성 부동 스트레스는 실험 동물의 움직임을 매일 1시간~3시간씩, 20 내지 28일간 제한하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 실험동물의 움직임을 제한하는 것은 수건으로 감싼 후 테이프로 고정시키는 방법; 뚜껑이 있는 플라스틱 상자에 구속시키는 방법; 양쪽이 막힌 PVC (Polyvinylchloride) 관에 구속시키는 방법; 금속재질의 원통에 구속시키는 방법으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

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

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 췌장 베타 세포를 선택적으로 손상시키는 단계는 스트렙토조토신(streptozotocin)을 투여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 스트렙토조토신은 40mg/kg 내지 65mg/kg의 용량으로 단일 투여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 스트렙토조토신은 스트레스 적용 시작 후, 12일 내지 18일 사이에 투여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 혈관내피 기능부전은 당뇨 및 고혈압 관련 혈관질환을 야기시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 당뇨 및 고혈압 관련 혈관질환은 동맥경화, 심근경색, 협심증, 심장마비, 뇌졸중, 뇌출혈 및 뇌혈관 경색증으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 방법으로 제조되고, 다음 특성 중 하나 이상의 특징을 나타내는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물모델:

(i) 정상동물과 비교하여 혈중 산화질소 농도 증가;

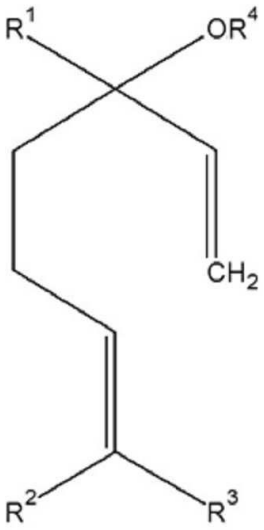
(ii) 정상동물과 비교하여 혈관내피 의존성 이완률 감소; 및

(iii) 정상동물과 비교하여 심박동수 감소.

청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소가 나타나는 당뇨 합병증 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

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

청구항 12

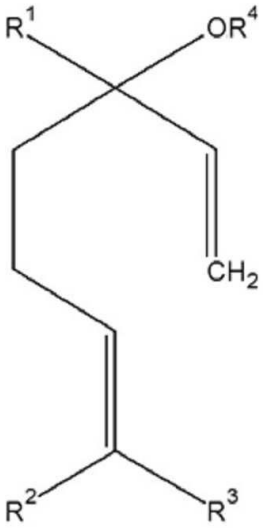
제11항에 있어서, 상기 R^1, R^2, R^3 는 메틸기이고, R^4는 아세틸기인 것을 특징으로 하는 당뇨 합병증 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및

심박동수 감소가 나타나는 당뇨 합병증 개선을 위한 건강기능식품 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

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

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 R^1, R^2, R^3 는 메틸기이고, R^4는 아세틸기인 것을 특징으로 하는 당뇨 합병증 개선을 위한 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물모델, 이의 제조방법 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 유전자 변이 없이 간단하게 생리학적으로 당뇨병을 유도할 수 있으며, 그 표현형이 혈중 산화질소 과다 생산, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소로 나타나는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물모델에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 리나릴 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 당뇨병으로 인한 산화질소 과다 생성, 혈관내피 기능부전, 심박동수 감소의 개선을 위한 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당뇨병(Diabetes Mellitus, DM)은 췌장의 베타세포 파괴로 절대적인 인슐린의 분비량이 부족하거나 말초조직에서의 인슐린에 대한 민감성 감소로 탄수화물, 단백질, 지방 등의 대사 이상을 초래하는 만성 질환으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며 다뇨, 다식, 다갈 등의 증상이 나타난다. 전 세계적으로 1980년에 4.7%로 추정되던 당뇨병 유병률이 2014년에는 8.5%로 약 두 배 증가 하였으며(WHO, 2016), 국내의 경우에도 당뇨의 연도별 진료 인원을 살펴보면 2011년 2,164천명에서 2015년 2,522천명으로 증가추세를 보였다(NHIS, 2016). 당뇨는 그 자체로는 큰 문제가 되지 않지만 지속적인 고혈당 상태는 과도한 활성산소 생성으로 연결된다. 과도한 활성산소는 그 자체로써 혈관내피세포의 기능 부전을 야기하는데, 이것은 당뇨병성 심혈관계 합병증의 시발점이 된다(Paneni *et al.*, 2013, *European Heart Journal.*, 34(31): 2436-2443). 또한, 제 2형 당뇨 질환 환자는 그렇지 않은 사람보다 혈중 산화질소(nitric oxide, NO)의 농도가 높다(Ozcelik & Algul, 2017, Cellular and Molecular Biology., 63(1): 49-52). 적정 수준의 산화질소는 혈관 확장 기능, 혈소판 억제 기능으로 심혈관계 질환을 예방하는데 도움이 되지만, 과도한 산화질소는 활성산소와 반응하여 세포 독성 물

질인 과산화 질산염(peroxynitrite, $ONOO^-$)을 생성하여 심혈관계 질환의 원인이 된다(Pacher & Beckman, 2007, Physiological reviews., 87(1): 315-424). 예를 들어, 당뇨 환자는 그렇지 않은 사람보다 과산화 질산염($ONOO^-$)에 특이적으로 나타나는 단백질 나이트로화 반응이 높게 나타남과 동시에, 혈관내피 기능에 관계되는 혈류 매개 확장 반응이 낮게 측정되었으며, 이 반응은 과산화 질산염($ONOO^-$)의 스캐빈저를 투여함으로써 회복되었다(Cassuto *et al.*, 2014, *Diabetes.*, 63: 1381-1393).

[0003] 한편, 당뇨병성 심혈관계 신경병증은 당뇨의 흔한 합병증 중 하나로, 당뇨 환자에서 증가된 사망률과 관련 있다(Maser *et al.*, 2003, *Diabetes Care.*, 26(6): 1895-1901). 당뇨 환자에서는 건강한 대상자에 비하여 불안정한 심근 전도의 원인이 되는 교감 신경 이상 지배 현상이 높았으며(Stevens *et al.*, 1998, *Circulation.*, 98(10): 961-968), 서맥성 부정맥으로 인하여 심박조율기를 삽입한 환자는 그렇지 않은 대상자에 비하여 당뇨 유병률이 25% 가량 높게 나타났다(Grimm *et al.*, 1990, *Pacing and Clinical Electrophysiology.*, 13(12): 2086-2090). 실제로, 제 2형 당뇨 환자는 당뇨가 없는 사람에 비하여 치명적인 서맥성 부정맥 중 하나인 3도 방실 차단의 유병률이 높은 것으로 보고되었으며(Movahed *et al.*, 2005, *Chest.*, 128(4): 2611-2614), 제 2형 당뇨 환자와 정상 대상인을 비교한 사례연구에서는 동성 서맥의 유병률이 제 2형 당뇨 환자 74%, 정상 대상인 41%로 당뇨 환자에서 유의미하게 높은 것으로 나타났다(Sarapultsev *et al.*, 2017, *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.*, 11: S567-S576).

[0004] 이처럼 당뇨병 및 당뇨병으로 인한 심혈관계 합병증은 전 세계 인류가 해결해야 할 당면과제로 대두되었으며, 이를 연구하기 위해 다양한 종류의 동물 모델이 개발되어 사용되고 있다. 특히 전체 당뇨의 90-95%를 차지하는 제2형 당뇨 질환 동물 모델의 경우, 유전자 조작 모델의 경우 경비가 많이 들고, 고지방 식이를 먹인 모델의 경우 당뇨가 유발되는데 오랜 시간이 소요되며, 췌장을 절제하는 수술적 방법을 통하여 당뇨를 유도하는 경우 기술적인 문제로 사용에 제한이 있다(Islam & Loots, 2009, *Methods and findings in experimental and clinical pharmachology.*, 31: 249-261).

[0005] 한편, 과도한 스트레스는 제2형 당뇨 질환의 변화 가능한 위험요인 중 하나로 잘 알려져 있다. 스트레스로 인한 시상하부-뇌하수체-부신 축의 활성화와 교감신경의 자극은 혈중 카테콜아민과 글루코코르티코이드를 증가시키고(Xie *et al.*, 2015, *Oral Oncology.*, 51(11): 991-997), 염증반응 매개 물질을 증가시킨다(Kiecolt *et al.*, 2003, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 100(15): 9090-9095). 최근 이러한 교감신경의 자극과 염증반응이 인슐린 저항 상태 및 포도당 대사 장애를 유발하는 주요한 요인임을 보여주는 연구 결과가 많이 보고되고 있다. 흰쥐를 대상으로 부동 스트레스를 14일간 적용한 결과, 포도당 불내성과 혈중 코르티코스테론이 증가되었으며, 골격근의 인슐린 수용체와 포도당 수송체의 발현이 줄어들었다(Morakinyo *et al.*, 2016, *Nigerian Journal of Physiological Sciences.*, 31(1): 23-29). 개심술을 받은 환자를 대상으로 한 실험에서는 급성 염증 반응으로 인한 코티졸의 상승이 인슐린 저항 상태를 예측하는 변수라고 설명하였으며(Lehrke *et al.*, 2008, *Critical Care*, 12(6): R157), 비만 환자를 대상으로 진행한 실험에서도 염증 반응으로 인한 tumor necrosis factor alpha (TNF-)와 interleukin 6 (IL-6)가 내당능장애에서 제2형 당뇨로의 전환을 예측하는 주요 인자라는 것이 보고되었다(Kubaaszek *et al.*, 2003, *Diabetes.*, 52(7): 1872-1876).

[0006] 상기 내용을 요약하자면, 기존의 제2형 당뇨 질환 동물 모델은 연구 경비가 많이 들 뿐만 아니라, 실험 결과를 얻기 위하여 많은 기간이 필요하다는 제한점이 있다. 또한, 현대인들은 신체적, 정신적, 환경적 스트레스에 과도하게 노출되어 있으며, 스트레스는 제2형 당뇨의 위험인자로써 당뇨병과 밀접한 연관성이 있기 때문에 당뇨병 연구를 위해서는 스트레스 상황을 반영한 당뇨 동물 모델이 절실한 실정이다. 그러나 스트레스의 영향을 고려한 당뇨 질환 동물 모델은 아직까지 알려진 바 없다.

[0007] 한편, 리나릴 아세테이트는 클라리세이지(Clary sage), 라벤더(Lavender), 네롤리(Neroli) 에센셜 오일에 다량 함유되어 있는 방향성 향료로서, 항염증(Peana *et al.*, 2002, *Phytomedicine.*, 9(8): 721-726), 항진통(So Hyun Yu and Geun Hee Seol., 2017, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, vol. 2017, Article ID 3954181, 7 pages), 항박테리아(Trombetta *et al.*, 2005, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 49(6): 2474-2478), 항연축 효과(de Sousa *et al.*, 2011, *Records of Natural Products.*, 5(2): 117-122)가 보고되어 있으며, 당뇨와 관련하여 리나릴 아세테이트의 AMP 키나제(AMP kinase)의 발현 또는 활성 증가 효과가 입증되어 특허로 개시된 바 있다(KR 10-2016-0110887). 그러나 당뇨 질환 동물 모델에서 리나릴 아세테이트가 산화질소 수준, 혈관내피 기능, 심박동수의 비정상적인 변화에 미치는 효과에 대하여는 아직까

지 알려진 바 없다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 기존 당뇨 질환 동물 모델의 제한점을 극복하고, 스트레스로 당뇨병을 유발하는 새로운 동물 모델을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 만성 부동 스트레스에 노출되고, 스트렙토조토신을 투여한 당뇨병 동물 모델의 경우, 혈중 산화질소의 수준을 반영하는 아질산염(nitrite, NO2-) 농도가 증가할 뿐만 아니라, 혈관내피 의존성 이완율 및 심박동수가 감소하는 것을 확인하고, 리나릴 아세테이트를 당뇨병 동물 모델에 처치 시에 당뇨병으로 인한 산화질소 과다 생성, 혈관 내피 기능 부전, 심박동수 감소가 개선되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델의 용도를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 리나릴 아세테이트를 유효성분으로 포함하는 당뇨병으로 인한 산화질소 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소의 개선을 위한 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품을 제공하는 것이다.

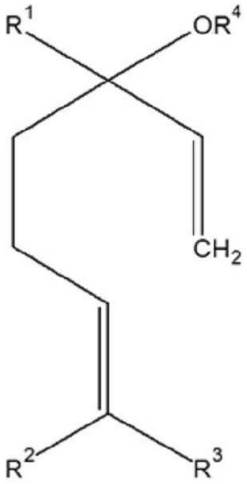
과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 실험동물에 만성 부동 스트레스를 가한 다음, 췌장 베타 세포를 선택적으로 손상시키는 단계를 포함하는 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델의 제조방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 다음 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병으로 인한 산화질소 과다 생성, 혈관 내피 기능 부전 및 심박동수 감소의 개선을 위한 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품을 제공한다.

[0020] [화학식 1]

[0021] 

[0022] 상기 화학식 1에서,

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

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 동물 모델은 제2형 당뇨의 원인 중 하나인 스트레스를 반영하고, 기존의 당뇨 실험 동물모델에 비교하여 제조방법이 단순하며, 단기간 내에 혈관 내피 기능 부전을 유발하기 때문에 비용 효율적이라는 장점이 있다.

[0025] 또한 본 발명의 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델은 당뇨병의 연구 및 당뇨로 인한 산화질소 과다 생성, 혈관 내피 기능 부전 및 심박동수 감소의 기전 연구 또는 예방 및 치료용 의약품을 개발하는데 유용하다.

[0026] 마지막으로 본 발명에 의한 당뇨병 동물 모델에서 리나릴 아세테이트가 과다 생성된 산화질소, 혈관 내피 기능 부전 및 심박동수 감소를 개선시키는 효과가 우수하다는 사실을 확인하였다. 이에 본 발명에 따른 조성물은 리나릴 아세테이트를 유효성분으로 포함함으로써, 당뇨병으로 인한 산화질소 과다 생성, 혈관 내피 기능 부전 및 심박동수 감소의 개선 및 치료를 위한 의약품 및 건강기능성 식품 등의 개발에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명의 당뇨 질환 동물 모델의 제조방법에 관한 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 정상군(Control), 스트렙토조토신 투여군(NSDM), 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM) 사이의 혈청 포도당 농도 차이를 나타낸 것이다. *P<0.05, **P<0.01 vs. Control.

도 3은 정상군(Control), 스트렙토조토신 투여군(NSDM), 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM) 사이의 혈청 아질산염(nitrite, NO2-) 농도 차이를 나타낸 것이다. **P<0.01 vs. Control, ##P<0.01 vs. NSDM.

도 4는 정상군 (Control), 스트렙토조토신 투여군(NSDM), 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM) 사이의 아세틸콜린(Acetylcholine, ACh)으로 유도된 흉부 대동맥 이완률 차이를 나타낸 것이다. **P<0.01 vs. Control, #P<0.05 vs. NSDM.

도 5는 정상군 (Control), 스트렙토조토신 투여군(NSDM), 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM) 사이의 심박동수 차이를 나타낸 것이다. **P<0.01 vs. Control, #P<0.05 vs. NSDM.

도 6는 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM), 리나릴 아세테이트 10mg/kg 치료를 받은 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM+LA10), 리나릴 아세테이트 100mg/kg 치료를 받은 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM+LA100) 사이의 혈청 아질산염(nitrite, NO2-) 농도 차이를 확인한

것이다. *P<0.05, **P<0.01 vs. SDM.

도 7은 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM), 리나릴 아세테이트 10mg/kg 치료를 받은 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM+LA10), 리나릴 아세테이트 100mg/kg 치료를 받은 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM+LA100) 사이의 아세틸콜린(Acetylcholine, ACh)으로 유도된 흉부 대동맥 이완률 차이를 확인한 것이다. *P<0.05, **P<0.01 vs. SDM.

도 8은 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM), 리나릴 아세테이트 10mg/kg 치료를 받은 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM+LA10), 리나릴 아세테이트 100mg/kg 치료를 받은 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM+LA100) 사이의 심박동수 차이를 나타낸 것이다. *P<0.05 vs. SDM.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 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 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0031] 본 발명에서 용어 "당뇨병"은 혈장 내 인슐린 수준의 절대적 혹은 상대적 결핍으로 인슐린 작용의 부족에 의한 만성 고혈당증을 특징으로 하면서 여러 특징적인 대사 이상을 수반하는 질환군을 의미한다. 당뇨병은 제1형 및 제2형으로 구분되는데, 제1형 당뇨병은 이전에 '소아 당뇨병'이라고 불렸으며, 인슐린을 전혀 생산하지 못하는 것이 원인이 되어 발생하는 질환이다. 인슐린이 상대적으로 부족한 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성(insulin resistance; 혈당을 낮추는 인슐린 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 것)을 특징으로 한다. 제2형 당뇨병은 식생활의 서구화에 따른 고열량, 고지방, 고단백의 식단, 운동 부족, 스트레스 등 환경적인 요인이 크게 작용하는 것으로 보이지만, 이 외에 특정 유전자의 결함에 의해서도 당뇨병이 생길 수 있으며, 췌장 수술, 감염, 약제에 의해서도 생길 수 있다. 본 발명에 있어서 상기 당뇨병은 제2형 당뇨병인 것이 바람직하나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0032] 한편, 상기 당뇨병은 일반적으로 당뇨병 합병증을 수반하며, 본 발명의 동물모델은 당뇨병뿐만 아니라 급성 또는 만성 당뇨병 합병증에 대한 동물모델로 사용될 수 있으며, 보다 바람직하게는 만성 당뇨병 합병증에 대한 동물모델로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에서 용어 "당뇨병 합병증"은 당뇨병으로 인하여 혈당이 높은 상태에서 치료를 받지 않아 고혈당인 상태가 지속됨에 따라 발생할 수 있는 다양한 병증을 모두 포함하여, 상기 합병증은 고혈당증(hyperglycemia), 고인슐린혈증(hyperinsulinemia), 고중성지방혈증(hypertriglyceridemia), 지질대사이상(dyslipidemia), 공복혈당장애(impaired fasting glucose), 내당능 이상(impaired glucose tolerance), 비만, 동맥경화증, 미세혈관병증, 신장질환, 심장질환, 족부궤양, 관절염, 골다공증, 뇌혈관 질환, 당뇨병성 망막증 및 그 외 하나 이상의 안과질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에서 용어 "심박동수"란 심장이 1분 동안 박동하는 횟수를 의미하며, 보통은 맥박수와 같다.

[0036] 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 제공해주고, 질환모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내고, 유전자들 간의 상호작용을 이해할수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초자료를 얻을 수 있다.

[0037] 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, 예를 들어, 상업용 소스로부터 이용할 수 있다. 이런 동물들은 실험용 동물 또는 다른 동물, 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.

[0039] 본 발명에서는 만성 스트레스를 가할 경우, 실험 동물에서 당뇨병 유도가 가능한지 확인하고자 하였다.

[0040] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 4주령의 수컷 흰 쥐를 정상군(control), 스텝토조토신 투여군(NSDM), 만성 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM)으로 분리하여 사육한 다음, SDM군에서 24일간 매일 2시간씩 양쪽이 막힌 PVC (Polyvinylchloride) 관에 구속시켜 만성 부동 스트레스를 적용하고, 스트레스 적용시작 후, 15일째 되는 날에 NSDM 및 SDM 군에게 스트렙토조토신을 65mg/kg 용량으로 복강 내 투여하여, 당뇨 유발을 확인한 개체를 1주일 후 심박동수 측정 후, 안락사를 실시하여 혈액 샘플 및 흉부 대동맥을 적출하였다(도 1).

[0041] 먼저, 혈중 포도당 농도 및 혈청 아질산염 농도를 측정한 결과, NSDM 및 SDM 군에서 대조군 대비 혈중 포도당 농도가 증가하는 것을 확인하였으며(도 2), 혈청 아질산염 농도의 경우, SDM 군에서 획기적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 3). 또한, 혈관내피 의존성 이완률을 평가한 결과, SDM군의 이완률이 가장 떨어지는 것을 확인할 수 있었다(도 4). 뿐만 아니라, 대조군 및 NSDM군 대비 SDM군의 심박동수가 감소하는 것을 확인하였다(도 5).

[0043] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 실험동물에 만성 부동 스트레스를 가한 다음, 췌장 베타 세포를 선택적으로 손상시키는 단계를 포함하는 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델의 제조방법에 관한 것이다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 만성 부동 스트레스는 실험동물의 움직임을 제한하여 스트레스를 줄 수 있는 주기이면 제한없이 이용가능하나, 바람직하게는 실험동물의 움직임을 매일 1시간~3시간씩, 20 내지 28일간 제한하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0045] 본 발명에 있어서, 상기 실험동물의 움직임을 제한하는 것은 당업계에서 당업자가 통상적으로 수행하는 방법이면 제한없이 이용가능하나, 바람직하게는 수건으로 감싼 후 테이프로 고정시키는 방법; 뚜껑이 있는 플라스틱 상자에 구속시키는 방법; 양쪽이 막힌 PVC (Polyvinylchloride) 관에 구속시키는 방법; 금속재질의 원통에 구속시키는 방법으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0046] 본 발명에 있어서, 상기 실험동물은 인간을 제외한 포유동물일 수 있고, 바람직하게는 쥐, 생쥐 등 설치류, 개, 고양이, 토끼, 돼지, 소, 양, 염소로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, 가장 바람직하게는 생쥐(rat)일 수 있다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 췌장 베타 세포를 선택적으로 손상시키기는 단계는 당업계에서 당업자에 의해 통상적으로 사용될 수 있는 췌장 베타 세포를 선택적으로 손상시키는 모든 방법을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 스트렙토조토신을 투여하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 스트렙토조토신의 투여는 단독 고용량 주입 방식으로 투여시 40 내지 70mg/kg 이상, 바람직하게는 40 내지 65mg/kg를 사용하여 1회 투여할 수 있다. 또한, 당업계에서 당업자가 통상적으로 사용 가능한 모든 주입경로를 포함할 수 있으나, 정맥내 또는 복강내 투여하는 것이 바람직하다.

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 스트렙토조토신은 만성 부동 스트레스 적용 후, 12일내지 18일 사이에 투여하는 것이 바람직하다. 상기 범위를 벗어나는 경우 짧은 스트레스 적용 기간으로 인하여 스트레스에 의한 효과가 표현되지 않을 수 있으며, 스트레스 적용 기간이 길어질 경우 실험동물의 스트레스에 대한 적응 반응으로 인하여 스트레스 효과가 감소될 수 있다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 혈관내피 기능부전은 당뇨 및 고혈압 관련 혈관질환을 야기할 수 있으며, 상기 당뇨 및 고혈압 관련 혈관질환은 당업계에 알려진 모든 혈관 질환을 의미하며, 바람직하게는 동맥경화, 심근경색, 협심증, 심장마비, 뇌졸중, 뇌출혈 및 뇌혈관 경색증으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0052] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 특징으로 하는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델에 관한 것이다.

[0053] 즉, 본 발명은 상기 방법으로 제조되고, 다음 특성 중 하나 이상의 특징을 나타내는 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물모델에 관한 것이다:

[0054] (i) 정상동물과 비교하여 혈중 산화질소 농도 증가;

[0055] (ii) 정상동물과 비교하여 혈관내피 의존성 이완률 감소; 및

[0056] (iii) 정상동물과 비교하여 심박동수 감소.

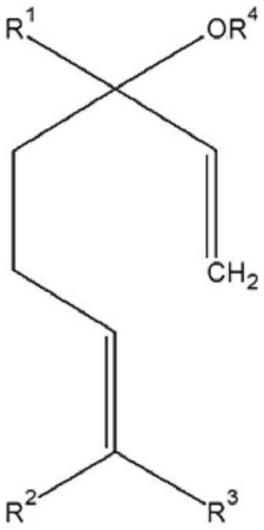
[0058] 한편, 본 발명에서는 상기 만성 스트레스에 노출된 당뇨병 동물 모델을 이용하여, 혈중 산화질소 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소를 개선할 수 있는 약물이 있는 지 확인하고자 하였다.

[0059] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 리나릴 아세테이트의 효과를 평가하기 위하여 SDM군에서 당뇨 유발 확인 후 1주일 간 SDM+LA10 군과 SDM+LA100 군에게 각각 리나릴 아세테이트를 10mg/kg, 100mg/kg 용량으로 복강 내 투여한 후 심박동수를 측정한 다음, 안락사를 실시하여 혈액 샘플 및 흉부 대동맥을 적출하였다(도 1).

[0060] 그 결과, SDM군에서 획기적으로 증가한 혈청 아질산염 농도가 리나릴 아세테이트 주사에 의해 감소하며, 특히 100mg/kg 주사군에서 정상 수준으로 감소하는 것을 확인하였다(도 6). 또한, SDM군에서 감소된 혈관내피 의존성 이완률이 리나릴 아세테이트 주사에 의해 증가하며, 특히 100mg/kg 주사군에서 정상 수준에 가깝게 회복되는 것을 확인할 수 있었다(도 7). 뿐만 아니라, SDM군에서 감소된 심박동수가 리나릴 아세테이트 주사에 의해 증가하며, 특히 100mg/kg 주사군에서 정상 수준에 가깝게 회복되는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[0062] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 혈중 산화질소의 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소가 나타나는 당뇨 합병증의 개선 및 치료를 위한 의약품 및 건강기능성 식품 등의 조성물에 관한 것이다:

[0063] [화학식 1]

[0064] 

[0065] 상기 화학식 1에서,

[0066] R^1, R^2, R^3 및 R^4는 각각 독립적으로 (C_1-C_6)알킬, 에스테르, 하이드록실기, 카보닐기, 알데히드기, 카르복실기 또는 아세틸기이다.

[0067] 본 발명에 있어서, 상기 R^1, R^2, R^3 는 메틸기이고, R^4는 아세틸기인 것을 특징으로 할 수 있으며, 이 화합물을 리나릴 아세테이트라고 한다.

[0068] 본 발명에 있어서, 상기 당뇨 합병증은 혈중 산화질소 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소로 인해 발생하는 질병이면 모두 포함할 수 있으며, 바람직하게는 동맥경화, 심근경색, 협심증, 심장마비, 뇌졸중, 뇌출혈 및 뇌혈관 경색증으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명에서 용어 “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 산화질소 과다 생성 및 혈관 내피 기능 부전이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 포함하는 의미이다.

[0071] 본 발명에서 용어 “개선”이란 증상의 예방, 개선, 치료 또는 이러한 증상의 발현 지연을 포함하는 의미이다.

[0072] 본 발명에서 용어 “기능성 식품”은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0074] 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.

[0075] 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.

[0076] 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 0.001~10mg/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.

[0077] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 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, 비수성용제, 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 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0078] 본 발명의 건강식품을 상기 리나릴 아세테이트를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0079] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스켓, 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.

[0080] 본 발명에 따른 리나릴 아세테이트는 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 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.

[0081] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 리나릴 아세테이트를 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 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리롤 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연향미제(타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0082] 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.

[0083] 그 밖에 본 발명의 리나릴 아세테이트는 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 리나릴 아세테이트 100중량부에 대하여 0~약 20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0085] 본 발명은 또 다른 관점에서, 1) 상기 당뇨병 동물 모델에 당뇨병 또는 당뇨병 합병증 개선 또는 치료제 후보물질을 투여하는 단계; 및 2) 상기 후보물질을 투여한 동물 모델을 후보물질을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 후보물질에 의해 혈당 수치가 감소되는 경우 이를 당뇨병 또는 당뇨병 합병증 개선 또는 치료제로 판단하는 단계;를 포함하는 당뇨병 또는 당뇨병 합병증 개선 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0087] 본 발명에 있어서 "후보물질"은 당뇨병 또는 당뇨병 합병증 개선 및 치료제로서 테스트할 물질을 의미하며, 예컨대 추출물, 단백질, 올리고펩티드, 소형 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오티드 및 광범위한 화합물 등의 임의 분자를 포함할 수 있다. 이러한 후보물질은 또한 천연물질뿐만 아니라, 합성물질도 포함한다.

[0088] 본 발명에 있어서 "개선"과 "치료"는, 상기 후보물질의 투여로 상기 동물모델의 당뇨병 또는 당뇨병 합병증 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0089] 본 발명에 있어서 "대조군"은 실험 결과가 제대로 도출되었는지 여부를 판단하기 위해 어떤 조작이나 조건도 가하지 않은 집단을 말하며, 실험의 직접적인 목적을 이루기 위해 설정된 집단인 실험군과 달리, 대조군은 실험군의 결과를 좀 더 확실하게 하기 위해 설정된 집단이다. 본 발명에서의 대조군은 바람직하게는 상기 당뇨병 또는 당뇨병 합병증 동물 모델에 후보물질을 처리하지 않은 집단을 말한다.

[0090] 본 발명에 있어서 당뇨병 동물 모델은 당뇨병 또는 당뇨병 합병증에 대한 질병 모델로서, 상기 스크리닝 방법에 의하여 얻은 물질을 당뇨병 또는 당뇨병 합병증 환자에 대한 치료물질의 탐색, 부작용 확인, 진단법의 개발 등에 다양하게 활용하여 당뇨병 또는 당뇨병 합병증과 이의 합병증에 대한 개선 또는 치료제를 개발할 수 있다.

[0091] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 (1)의 후보물질로는 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 또는 혈장 등이 있고, 상기 화합물은 신규 화합물 또는 널리 알려진 화합물일 수 있으며 바람직하게는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다.

[0092] 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[0094] 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.

[0096] **<참조예> 통계 분석**

[0097] 실험 결과를 SPSS version 24.0 (SPSS, Chicago, IL)로 분석하고 값을 평균±표준오차로 나타내었다. 또한 실험 그룹간의 일원분산분석(사후분석-LSD test)을 이용한 통계 분석을 수행하여 $P<0.05$를 통계적으로 유의미한 값으로 보았다.

[0099] **실시예 1. 만성 부동 스트레스와 스트렙토조토신 투여에 의한 제2형 당뇨 질환 동물 모델의 확립**

[0100] **1-1. 실험 동물의 준비**

[0101] 4주령의 건강한 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat, 90~110g)를 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 동물은 아크릴 케이지에서 케이지당 2마리씩 사육되었고, 12시간 낮/밤 사이클 및 온도 22-23℃ 유지하였다. 먹이와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 정상군(Control), 스트렙토조토신 투여군(NSDM), 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM)을 분리 사육하였다.

[0103] **1-2. 만성 부동 스트레스 적용**

[0104] 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM)을 실험 전기간(24일) 동안 매일 2시간씩 양쪽이 막힌 PVC (Polyvinylchloride) 관에 구속시킴으로써 만성 부동 스트레스를 적용하였다. 이에 반해 정상군(Control), 스트렙토조토신 투여군(NSDM)은 자유롭게 휴식하도록 하였다.

[0106] **1-3. 스트렙토조토신 투여**

[0107] 실험 15일 째에 스트렙토조토신 투여군(NSDM)과 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM)에 해당하는 흰쥐를 6시간 절식한 다음 스트렙토조토신을 65mg/kg 용량으로 복강내 투여 하였다. 스트렙토조토신은 투여 직전 차가운 sodium citrate buffer (0.1M, pH 4.5)에 녹여서 사용하였다. 정상군(Control)에는 동일한 부피의 sodium citrate buffer를 복강내 투여 하였다. 스트렙토조토신 투여 3일 후 혈중 포도당 농도를 확인하여 300mg/dl 이상인 개체만 추후 실험에 사용하였다. 모든 개체가 고혈당으로 확인되어 최종적으로 포함된 개체수는 정상군(Control) 6마리, 스트렙토조토신 투여군(NSDM) 8마리, 만성 부동 스트레스 적용 및 스트렙토조토신 투여군(SDM) 10마리인 것을 확인 하였다.

[0108] 당뇨 유발 확인 후 1주일 후 심박동수를 측정한 다음, 안락사를 실시하였다. 혈액 샘플을 원심 분리하여 포도당 농도와 아질산염 농도를 확인하기 위한 혈청을 분리하였다. 또한 혈관내피 의존성 이완률을 평가하기 위하여 흉부 대동맥을 적출하였다.

[0110] **실시예 2. 혈청 포도당 농도 및 혈청 아질산염(nitrite, NO2-) 농도 측정**

[0111] 혈청 포도당 농도는 효소표식면역 검사법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)으로 측정하였다. Serum glucose colorimetric assay kit (Cayman, Michigan, USA)를 사용하였으며, 제조사의 지침에 따라 시행하였다. 산화질소(nitric oxide, NO)는 매우 반응성이 높아 아질산염(nitrite, NO2-) 등의 중간체로 쉽게 전환되는 성질이 있다. 따라서 혈중 산화질소 농도를 평가하기 위하여 혈청 아질산염 농도를 측정하였다. 혈청 아질산염의 농도는 Greiss reagent (0.1% naphthylethylenediamide and 1% sulfanilamide)를 이용하여 optics microplate reader (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) 로 비색 정량하여 측정하였다.

[0112] 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이, 스트렙토조토신을 투여받은 NSDM 및 SDM 군 모두 혈청 포도당 농도가 Control 군보다 유의미하게 증가하는 것을 확인하였으며(각각 $P=0.001$, $P<0.001$), 도 3에 개시된 바와 같이, SDM 군에서 혈청 아질산염 농도가 Control 및 NSDM 군에 비하여 SDM 군에서 획기적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다($P=0.001$ vs. Control, $P=0.002$ vs. NSDM).

[0114] **실시예 3. 혈관 내피 의존성 이완 측정**

[0115] 적출된 흉부 대동맥은 즉시 Krebs solution (118.3mM NaCl, 1.22mM KH_2PO_4, 4.78mM KCl, 11.1mM glucose, 25mM $NaHCO_3$, 2.5mM $CaCl_2$, and 1.2mM $MgCl_2$)에서 주변 결합조직을 제거하고 2-mm 절편으로 만들었다. 이 절편을

Krebs solution (온도 37℃, 산소 95%/이산화탄소 5% 유지)이 들어있는 챔버에 담근 후 근수축변환기(Mechano-transducer 620M, DMT, Aarhus, Denmark)에 연결시켰다. 초기 장력을 1.0g으로 설정 및 50분 동안 안정화 시킨 후 실험을 진행하였다. Phenylephrine (PE, 10μM)로 20분동안 혈관을 수축시켜 Plateau에 도달하였을 때 Acetylcholine (ACh, 10μM)을 첨가하여 혈관 내피 의존성 이완 능력을 평가하였다. 혈관 내피 의존성 이완률(%)은 {(PE 최대 수축력-ACh 최대 이완력)/(PE 최대 수축력-초기 장력)}*100 의 공식으로 구하였다.

[0116] 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이, 혈관내피 의존성 이완률은 Control 및 NSDM 군에 비하여 SDM 군에서 유의미하게 감소하는 것을 확인하였으며(P=0.002 vs. Control, P=0.014 vs. NSDM), 이에 비해 NSDM 군은 Control 군에 비하여 혈관 내피 의존성 이완률이 감소하는 경향만 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0118] **실시예 4. 심박동수 측정**

[0119] 심박동수는 쥐꼬리를 이용하여 비침습적으로 측정하였다(CODA HT-4, Kent Scientific Corporation, USA).

[0121] **실시예 5. 상기 당뇨병 동물 모델에서 리나릴 아세테이트의 효과 측정**

[0122] 리나릴 아세테이트가 상기 당뇨병 동물 모델에 미치는 효과를 평가하기 위하여 만성 부동 스트레스 및 스트렙토조토신 투여로 제조한 상기 당뇨병 동물 모델에 1주일 간 매일 리나릴 아세테이트 10mg/kg 또는 100mg/kg 농도로 복강내 주사를 시행하였다. 실시예 1의 방법에 의한 SDM군 23마리는 당뇨병 대조군(SDM) 10마리, 리나릴 아세테이트 10mg/kg 주사군(SDM+LA10) 6마리, 리나릴 아세테이트 100mg/kg 주사군(SDM+LA100) 7마리로 무작위 배정하였다. 리나릴 아세테이트 주사 1주일 후 안락사를 실시하여 혈청 아질산염 농도와 혈관내피 의존성 이완률을 평가하였다.

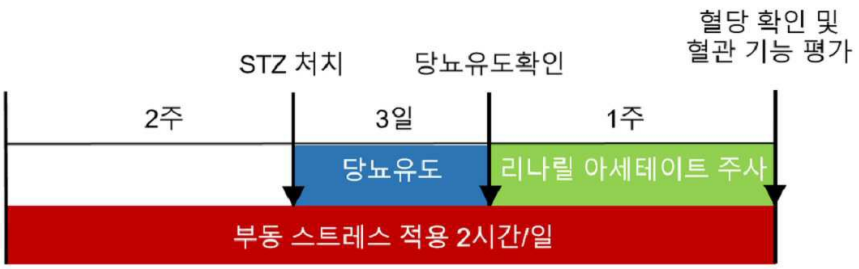
[0123] 그 결과, 도 6에 개시된 바와 같이, 리나릴 아세테이트 10mg/kg 및 100mg/kg를 투여 받은 그룹 모두 혈청 아질산염 농도가 SDM 군보다 유의미하게 감소하는 것을 확인하였으며(각각 P=0.015, P=0.001), 도 6에 개시된 바와 같이, 리나릴 아세테이트 10mg/kg 및 100mg/kg를 투여 받은 그룹 모두 혈관내피 의존성 이완률이 SDM 군보다 증가하는 것을 확인할 수 있었다(각각 P=0.049, P=0.002). 또한, 도 8에 개시된 바와 같이, 리나릴 아세테이트 100mg/kg를 투여 받은 그룹에서 심박동수가 SDM 군보다 증가하는 것을 확인할 수 있었다(P=0.017).

[0124] 이는 본 발명의 리나릴 아세테이트가 산화질소 과다 생성, 혈관내피 기능부전 및 심박동수 감소의 개선 및 치료에 탁월한 효과를 가지고 있다는 것을 확인한 것이다.

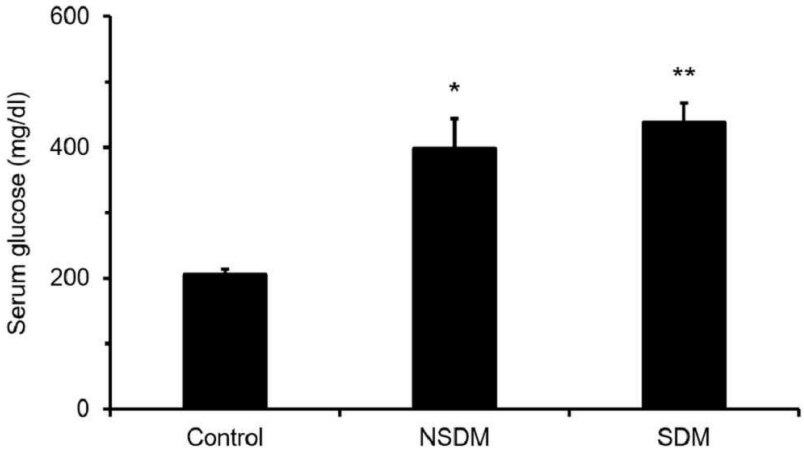
[0126] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

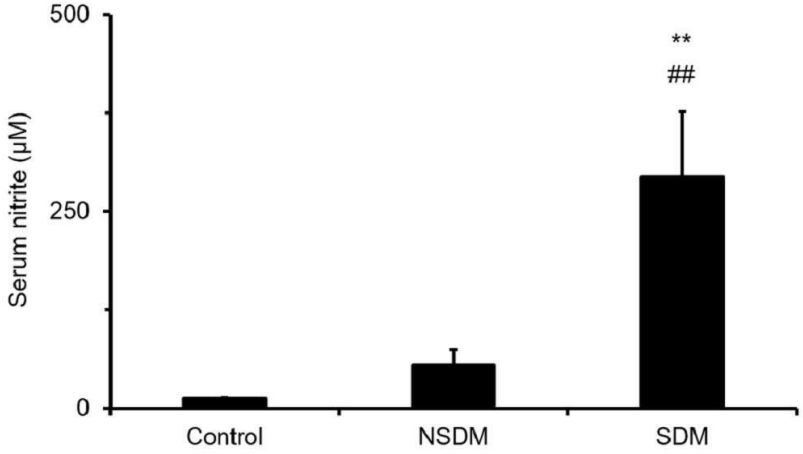
도면1



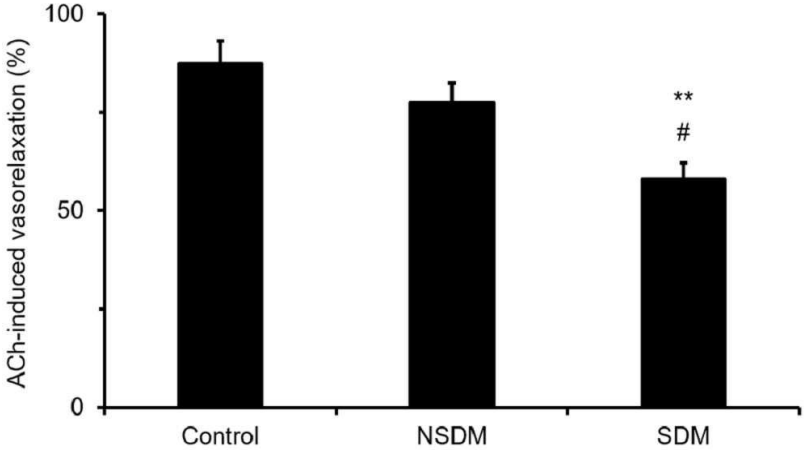
도면2


600
400
200
0
Serum glucose (mg/dl)
*
**
Control
NSDM
SDM

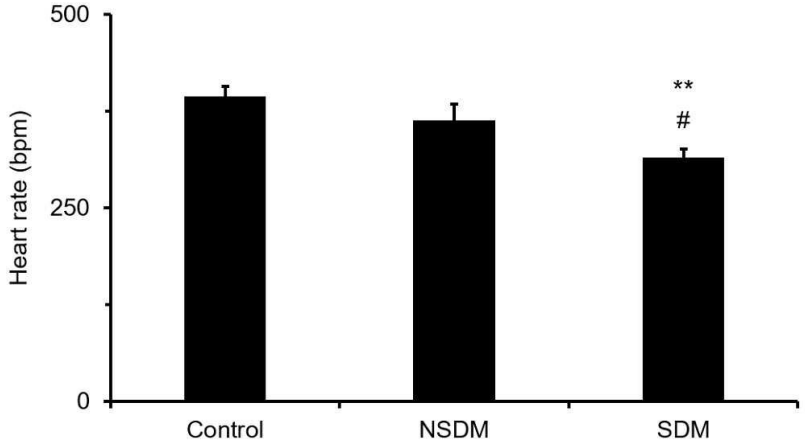
도면3


500
250
0
Serum nitrite (μM)
**
##
Control
NSDM
SDM

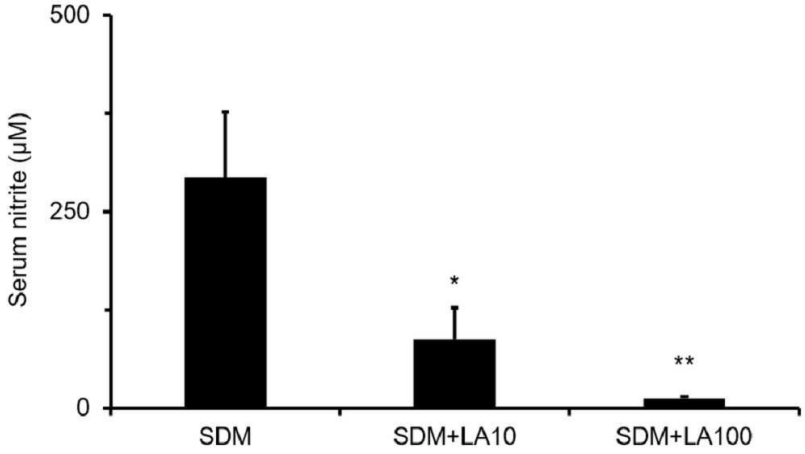
도면4


100
50
0
ACh-induced vasorelaxation (%)
**
#
Control
NSDM
SDM

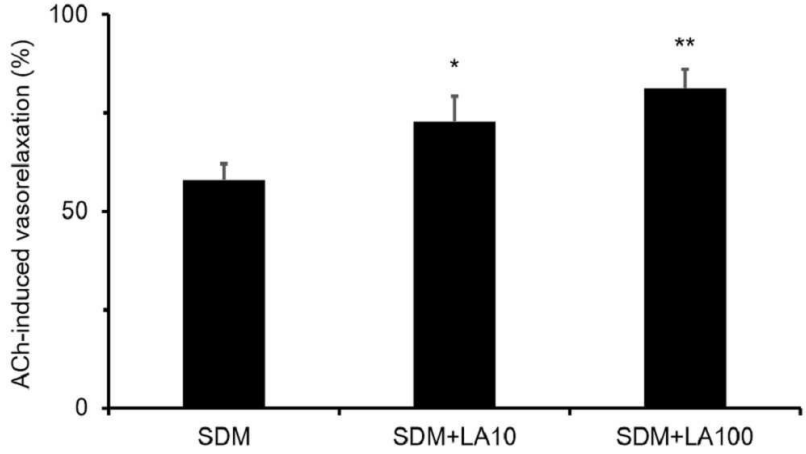
도면5


500
250
0
Heart rate (bpm)
**
#
Control
NSDM
SDM

도면6


500
250
0
Serum nitrite (μM)
*
**
SDM
SDM+LA10
SDM+LA100

도면7


100
50
0
ACh-induced vasorelaxation (%)
*
**
SDM
SDM+LA10
SDM+LA100

도면8

