



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년07월07일

(11) 등록번호 10-1534494

(24) 등록일자 2015년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/202 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0002998

(22) 출원일자 2014년01월09일

심사청구일자 2014년01월09일

(56) 선행기술조사문헌

논문1: 서울대학교 대학원 약학과

Docosahexaenoic acid improves vascular

function via Up-Regulation of SIRT1

Expression in Endothelial cells, 충남대학교 학

위논문, 권민아(2013.08.)*

KR1020120111726 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김국성

대전 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (대

흥동, 센트럴하이1단지)

정샛별

대전 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (대

흥동, 센트럴하이1단지)

(74) 대리인

특허법인다래

전체 청구항 수 : 총 6 항

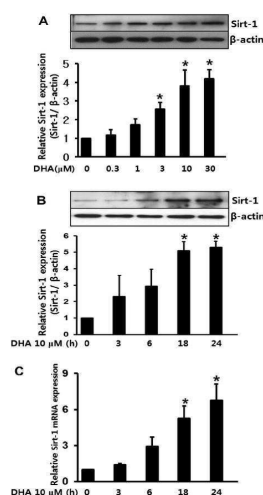
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 DHA를 포함하는 혈관 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 DHA (docosahexaenoic acid)를 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 혈중 NO (nitric oxide) 생성을 촉진시킴으로써 혈관 기능을 개선하는 효과를 나타내며, 심근경색, 동맥경화, 고혈압 등 혈관 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0023858

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원

연구과제명 아스피린과 Histone Deacetylase- 3에 의한 혈소판 eNOS 조절 연구 및 이를 활용한 심혈관계 질환 치료 기법 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교(의대)

연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

DHA (docosahexaenoic acid)를 유효성분으로 포함하는 혈관병증 예방 및 치료용 약학적 조성물로, 상기 조성물은 SIRT1 (silent information regulator 1) 발현 유도능, 혈중 NO(nitric oxide) 생성능을 갖고, 혈관 기능을 개선하는 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 혈관병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 혈관병증은 심근경색, 동맥경화 및 고혈압으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 혈관병증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

SIRT1 (silent information regulator 1) 발현 유도제인 DHA (docosahexanoic acid)를 유효성분으로 포함하여 혈관병증의 예방 및 치료를 위한 eNOS (endothelial nitric oxide synthase) 아세틸화 저감용 약학 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 약학 조성물은 eNOS 칼모둘린 결합 도메인의 라이신 496 또는 라이신 506 잔기의 탈아세틸화를 유도하는 것을 특징으로 하는 eNOS 아세틸화 저감용 약학 조성물.

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 약학 조성물은 혈중 NO(nitric oxide)의 생성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 eNOS 아세틸화 저감용 약

학 조성물.

청구항 11

청구항 8에 있어서,

상기 혈관병증은 심근경색, 동맥경화 및 고혈압으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 eNOS 아세틸화 저감용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 DHA(docosahexaenoic acid)를 유효성분으로 포함하는 혈관 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Sirt2(silent information regulator 2)는 NAD-의존성 히스톤 탈아세틸화 효소이며, SIRT1은 Sirt2의 포유류 상동기관(ortholog)으로서, 히스톤 및 eNOS와 같은 비-히스톤에서 라이신 잔기의 탈아세틸화를 타겟팅하며, eNOS 탈아세틸화를 통해 내피 의존성 혈관확장을 촉진한다.

[0003] 고도불포화지방산(n-3-polyunsaturated fatty acids; PUFAs)은 혈관 내피 기능, 면역 반응, 혈압 조절, 지질 상태, 세포 증식, 혈액 응고 및 염증에 유익한 역할을 한다. 그중 DHA(docosahexaenoic acid)는 혈관 내피 기능을 강화함으로써 래트와 사람에서 동맥 혈압 및 치명적인 부정맥을 감소시키며, 혈관 확장 메커니즘을 향상시킨다고 알려져 있다.

[0004] 그러나 혈관 내피 세포에서 eNOS의 활성화와 NO의 생물학적 이용가능성 증가에 대한 정확한 메커니즘에 대해서는 밝혀진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에, 본 발명의 목적은 혈관 기능 개선 효과를 갖는 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 이를 위하여, 본 발명은 DHA(docosahexaenoic acid)를 유효성분으로 포함하는 SIRT1(silent information regulator 1) 발현 유도용 조성물을 포함하는 혈관병증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명의 약학적 조성물은 SIRT1 발현을 조절함으로써 eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 탈아세틸화를 유도하는 것을 특징으로 하며, eNOS 칼모듈린 결합 도메인의 라이신 496 또는 라이신 506 잔기의 탈아세틸화를 유도할 수 있다.

[0008] 본 발명의 약학적 조성물은 eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 탈아세틸화를 유도함으로써 혈중 NO(nitric oxide)의 생성능을 갖는다.

[0009] 본 발명에 있어서 상기 혈관병증은 심근경색, 동맥경화 및 고혈압으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 혈중 NO(nitric oxide) 생성을 촉진시킴으로써 혈관 기능을 개선하는 효과를 나타내며, 심근경색, 동맥경화, 고혈압 등 혈관 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 DHA에 의한 SIRT1 발현 증가 효과를 나타내는 실험 결과로서, 도 1A는 DHA 농도 의존적으로 SIRT1 발현이 증가하는 것을 나타내며, 도 1B는 DHA 처리 시간이 증가할수록 SIRT1 발현이 증가하는 것을 나타내며, 도 1C는 DHA 처리 시간이 증가할수록 SIRT1 mRNA 발현이 증가하는 것을 정량적으로 나타낸 결과이다.

도 2는 DHA에 의한 eNOS의 탈아세틸화 유도 효과를 나타내는 실험 결과로서, 도 2A는 DHA 농도가 증가할수록 아세틸화 라이신이 감소하는 것을 나타내며, 도 2B는 RNAi에 의해 SIRT1 발현을 억제하였을 때 eNOS 탈아세틸화에 영향이 없음을 나타낸 결과이다.

도 3은 DHA에 의한 NO 증가를 나타내는 실험 결과로서, 도 3A는 DHA 농도가 증가할수록 SIRT1 발현 증가와 함께 NO 생성량이 증가하는 것을 나타내며, 도 3B는 eNOS의 탈아세틸화에 관여하는 라이신 잔기가 K469 및 K506이라는 것을 입증하는 결과이다.

도 4는 DHA가 래트 대동맥 고리에서 SIRT1 발현을 증가시키고, 생물학적으로 이용 가능한 NO 생성을 증가시킨다는 점을 나타내는 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0013] 본 발명은 DHA(docosahexaenoic acid)를 유효성분으로 포함하는 혈관병증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 조성물은 본 발명의 약학적 조성물은 SIRT1 발현을 조절함으로써 eNOS(endothelial nitric oxide synthase)의 탈아세틸화를 유도하며, 혈관 내피 세포에서 생물학적으로 이용 가능한 NO(nitric oxide) 생성을 촉진함으로써 혈관 기능을 개선할 수 있다.

[0015] 본 발명의 조성물은 심근경색, 동맥경화 및 고혈압을 포함하는 혈관병증의 예방 및 치료용 약학적 조성물일 수 있다.

[0016] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 도포하여 사용할 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제는 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제가 있으며 이들 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.

[0017] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 체중, 심혈관의 손상 정도, 질환의 진행 정도 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있지만 일반적으로는 성인 1kg 당 0.01 mg 내지 10 g, 바람직하게는 1 mg 내지 5 g의 용량으로 투여될 수 있다. 또, 단위 제형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다. 그러나 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0018] 또한 본 발명의 조성물은 식품 조성물일 수 있다. 상기 식품이란 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 조성물을 첨가하는 것도 포함된다.

[0019] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0020] **<실험 방법 및 재료>**

[0021] **1. 세포 배양 및 생존력 분석법**

[0022] 세포 시료 HUVECs는 클로네텍스(USA)에서 구입하였으며, 내피 성장 배지에서 배양하였다. HUVEC의 생존력에 대한 DHA의 효과는 ADAM-MC 자동 세포 계수기(Digital Bio, KR)로 측정하였다.

[0023] **2. 항체 및 면역블로팅 방법**

[0024] 항-eNOS 항체 및 항-SIRT1 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology, USA)에서 구입하였으며, 항-아세틸 라이신 항체는 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology, USA)에서 구입하였다.

[0025] eNOS의 라이신 아세틸화는 아세틸 라이신(Ac-K) 항체로 면역침강시킨 eNOS의 면역블로팅에 의해 측정하였다. 2 μ g의 항체를 1 mg의 세포 용해물(lysate) 또는 조직 균질액에서 하룻밤 동안 배양하여 eNOS의 면역침강을 수행하였으며, 다음으로 4시간 동안 30- μ L 단백질 A-세파로스 슬러리(Amersham, USA)를 첨가하였다. 세척 후 면역침강물을 SDS-PAGE 젤 로딩 버퍼에서 넣고, 전기영동에 의해 분리하였으며, 니트로셀룰로스 필터로 옮겨서 eNOS 및 Ac-K 항체와 적당한 퍼옥시다제 결합 2차 항체(Santa Cruz, USA)로 검출하였다. 화학발광 신호는 Super Signal West Pico or Femto Substrate (Pierce, USA)로 현상하였다. 적당한 1차 및 2차 항체를 사용하여 50 μ g 전체 세포 용해물 또는 조직 균질액의 웨스턴 블롯을 수행하였고, Quantity One 소프트웨어(Bio-Rad, USA)를 이용한 Gel Doc 2000 Chemi Doc 시스템으로 블롯을 이미지화, 정량화 하였으며, β -액틴을 대조군으로 하여 표준화하였다.

[0026] **3. Real-time PCR 방법**

[0027] 세포 또는 쥐의 가슴 대동맥으로부터 AGPC법(Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform)을 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. Super Script III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, USA)를 사용한 Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA)로 RT-PCR을 수행하였으며, 인간 SIRT1의 프라이머로서 5'-AAG TAC AAT CCA CTC CGG AAT GA-3'과 5'-GGG CCC CAG GGA TGA AG-3'를 사용하였다. 인간 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 대조군으로 사용하였으며, 이의 프라이머로는 5'-ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG-3'과 5'-CAT ACC AGG AAA ATG AGC TTG-3'를 사용하였다. 프라이머 이량체의 이상 형성을 체크하기 위해 해리곡선을 관찰하였다.

[0028] **4. RNA 간섭 및 트랜스펙션 방법**

[0029] 인증된 SIRT1의 siRNA (5'-GCA ACA GCA UCU UGC CUG AUU UGU A-3', 인간 SIRT1 mRNA의 1152-1175 잔기)와 적절한 iRNA 대조군은 Invitrogen(네덜란드)에서 구입하여 사용했다. 10-100 nM siRNA 이중체(duplexes)의 단일 트랜스펙션은 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen)을 이용하여 수행되었으며, 유전자 녹다운을 위해 37°C의 이산화탄소 인큐베이터에서 세포를 배양하였다.

[0030] **5. 조직학적 분석 방법**

[0031] 탈파라핀화된 래트와 마우스 대동맥 고리를 투과성이 있는 절편으로 자르고, Vectrastain Universal Quick Kit (PK-8800, Vector Laboratories)를 이용하여 처리하였다. SIRT1 1차 항체는 1:50으로 희석하였고, 비오티닐화된 2차 항체와 함께 배양하였으며, 스트렙타미딘 퍼옥시다제 용액, 3,3'-디아미노 벤지딘 퍼옥시다제 기질 및 헤마톡실린 대조염색 시약으로 시각화하였다. 절편은 Zeiss Axiovert 200 현미경을 이용하여 디지털 이미지화 하였다.

[0033]

6. 아질산염(nitrite) 및 질산염(nitrate) 분석 방법

[0034]

NO의 대사물질인 아질산염(nitrite, NO_2^-) 및 질산염(nitrate, NO_3^-)은 안정적인 NO 분해 생성물로서 상용화된 Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit(Cayman Chemicals, USA)를 이용하여 정량화하였다. 10-kDa 컷오프 필터(Micro-con YM10 Millipore)를 사용하여 배지의 단백질을 제거하였고, 형광을 뺀 값을 표준화하여 전체 단백질 양을 구하였다.

[0035]

7. 혈관 반응성 측정 방법

[0036]

3~4월령 Wistar-Kyoto 래트를 펜토바르비탈 나트륨을 과량 주입하여 희생시키고, 빠르게 흉골 중앙부를 절개(mid-sternal split)하여 가슴 대동맥을 절개한 후, 차가운 Krebs buffer(118.3 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 2.5 mM CaCl_2 ; 1.2 mM KH_2PO_4 ; 25 mM NaHCO_3 ; 1.2 mM MgSO_4 ; 11 mM glucose; 0.0026 mM CaNa_2EDTA)에 넣었다. 대동맥에서 여분의 지방을 씻어내고, 가로로 5~10개의 고리(2.0~3.0 mm)를 잘라내었다. 각각의 고리는 30 μM DHA로 처리한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며, 대동맥 고리에서 생물학적으로 이용 가능한 NO는 종래 알려진 방법으로 측정하였다.

[0037]

실시예 1 : DHA의 세포독성 실험

[0038]

DHA가 내피 세포 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, PI 염색법을 이용한 HUVEC 생존력을 실험하였다. 0.3 ~ 30 μM 의 DHA에 노출시킨 HUVEC과 대조군을 비교하였을 때 생존력에 영향이 없는 것으로 나타났으며, 이로부터 DHA 처리에 세포독성이 없음을 알 수 있었다.

[0039]

실시예 2 : SIRT1의 발현에 대한 DHA의 효과

[0040]

DHA와 SIRT1 발현의 연관 관계를 알아보기 위하여, HUVEC을 0.3 ~ 30 μM 의 DHA와 함께 24시간 동안 배양하였고, 10 μM 의 DHA와 함께 3 ~ 24시간 동안 배양함으로써 DHA가 SIRT1 단백질 발현에 영향을 미치는지 실험하였다. 배양이 끝난 세포를 수거하여 웨스턴 블롯 및 RT-PCR을 수행하였다.

[0041]

그 결과를 도 1에 나타내었다. SIRT1 단백질의 발현은 DHA 농도 의존적으로 증가하였으며(도 1A), DHA에 노출되는 시간이 증가함에 따라 SIRT1 단백질(도 1B) 및 mRNA(도 1C)의 발현이 증가함을 알 수 있었다.

[0042]

실시예 3 : DHA의 eNOS 아세틸화에 대한 영향

[0043]

SIRT1은 eNOS를 포함하여 많은 히스톤 및 비히스톤 단백질을 조절하는 것으로 알려져 있다. DHA가 내피 세포에서 NOS의 탈아세틸화에 관여하는지 알아보기 위하여, RNAi에 의해 내생적 SIRT1의 발현을 차단시킨 HUVECs에서 eNOS의 아세틸화를 분석하였다.

[0044]

그 결과를 도 2에 나타내었으며, DHA에 의해 유도된 SIRT1 발현의 증가는 DHA 농도 의존적으로 라이신 잔기에서 내생적 eNOS의 아세틸화를 감소시킨다는 것을 알 수 있었다. 또한 이와 유사하게 니코틴아마이드(NAM)로 내생적 eNOS의 활성을 억제했을 때 아세틸 라이신 eNOS 발현 수준이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 2A).

[0045]

또한 eNOS의 아세틸화가 SIRT1 발현을 변화시키는지 실험한 결과, SIRT1 RNAi에 의해 SIRT1 발현을 감소시켰을 때 DHA에 의한 eNOS 라이신 잔기의 아세틸화의 감소가 억제된다는 것을 확인하였다(도 2B). 이와 같은 결과는 DHA가 SIRT1의 발현을 증가시킴으로써 NOS의 라이신 잔기에서 아세틸화를 감소시킨다는 점을 시사한다.

[0046]

실시예 4 : DHA의 NO 생성에 대한 영향

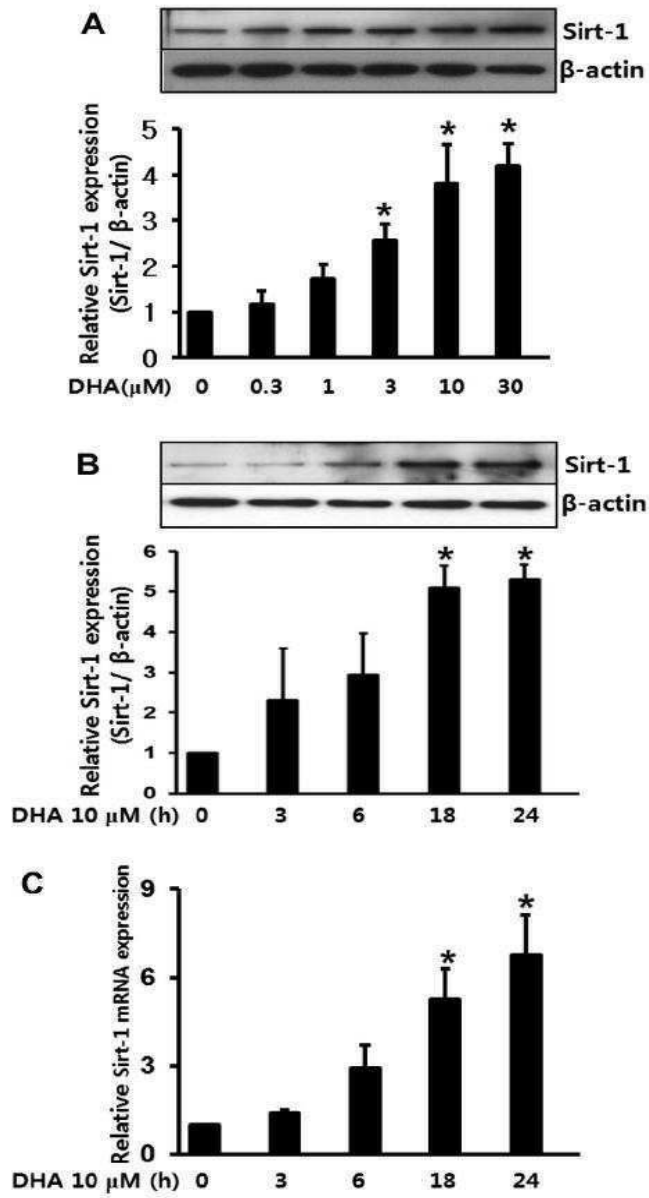
[0047]

DHA가 eNOS에 의한 NO 생성을 조절할 수 있는지 알아보기 위하여, 24시간 동안 DHA로 처리한 HUVECs 배지에 대한 아질산염(nitrite) 및 질산염(nitrate) 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

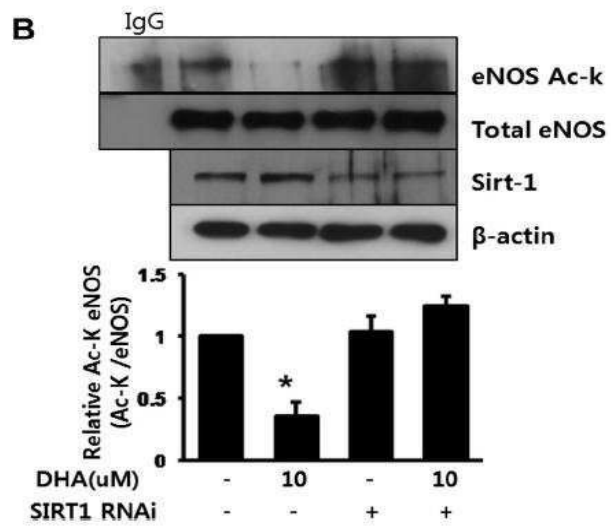
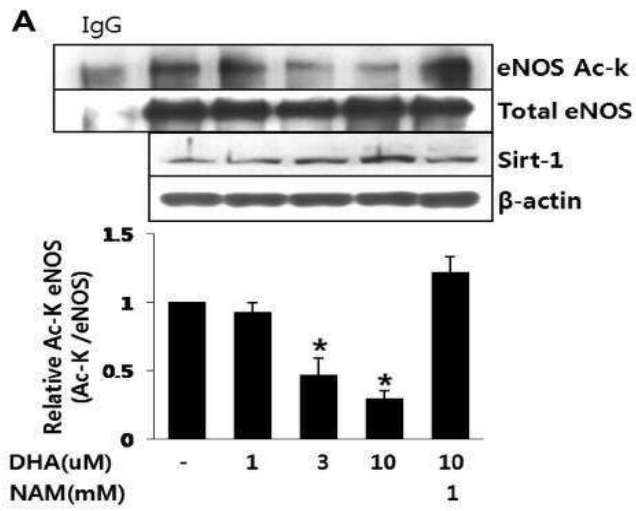
- [0048] 그 결과 DHA 농도에 따라 SIRT1 발현 수준이 증가하였으며, 그와 동시에 eNOS에 의한 NO 생성이 증가하였다. 그러나 SIRT1 RNAi가 주입된 HUVECs에서는 DHA에 의해 NO 레벨이 증가하지 않았다(도 3A). 이로부터 DHA는 HUVECs에서 NOS의 탈아세틸화를 유도하며, 내피 세포에서 eNOS의 아세틸화는 DHA에 의해 유도되는 SIRT1 발현과 반대의 관계가 있음을 알 수 있었다.
- [0049] SIRT1에 의하여 어떤 라이신 잔기가 조절되는지 알아보기 위하여 eNOS 칼모듈린 결합 도메인 (calmodulin-binding domain, CBD)에서 라이신496과 라이신506 잔기를 아세틸화되지 않는 알지닌으로 치환시켰다 (K496R, K506R). 그 결과, 야생형(WT) eNOS에서 NO 생성이 현저하게 증가된 것과 대조적으로, 라이신 잔기가 알지닌으로 치환된 eNOS(K496R) 또는 eNOS(K506R)을 주입한 HEK293 세포에서는 NO가 생성되지 않았다. 또한, WT ENOS와 대조적으로 eNOS(K496R) 또는 eNOS(K506R)를 주입한 HEK293 세포에서는 DHA에 의한 NO 생성의 증가도 발견되지 않았다(도 3B). 이와 같은 결과로부터, K496 및 K506이 DHA에 의한 NO 생성을 자극시키는 데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.
- [0050] **실시예 5 : DHA의 내피 의존성 혈관 긴장도의 영향**
- [0051] DHA에 의해 매개되는 내피 의존성 혈관 긴장도(endothelium-dependent vascular tone) 조절에 있어서 SIRT1의 발현이 중요한 역할을 하는지 알아보기 위하여, 래트 대동맥 고리에 24시간 동안 DHA를 처리한 후 혈관 운동 신경 기능을 정상화하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0052] 그 결과, 대조군에 비하여 DHA를 처리한 래트 대동맥 고리에서 SIRT1의 발현이 증가한 것을 확인하였고(도 4A, B), 내피 의존성 혈관 이완에는 영향이 없음을 알 수 있었으며(도 4C), DHA를 처리한 대동맥 고리에서 생물학적으로 이용 가능한 NO 레벨이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 4D). 이와 같은 결과로부터 DHA가 SIRT1 발현을 조절함으로써 NO의 혈관 내 생물학적 이용 가능성에 중요한 역할을 한다는 점을 알 수 있었다.

도면

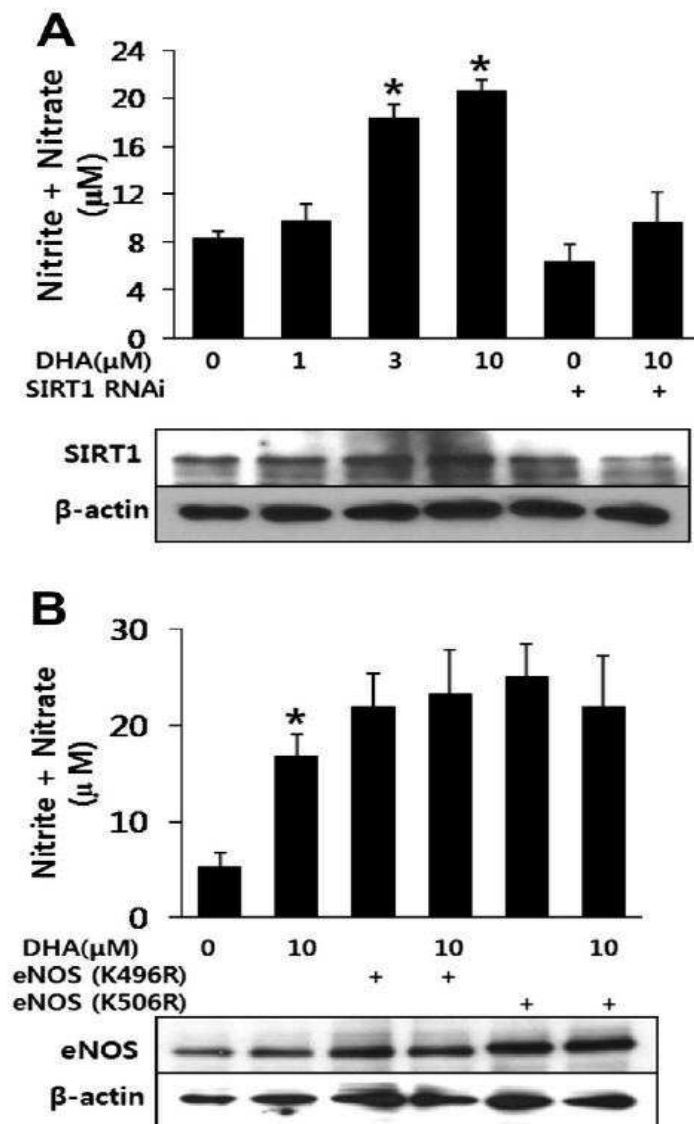
도면1



도면2



도면3



도면4

