



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0023246

(43) 공개일자 2016년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7076 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0109260

(22) 출원일자 2014년08월21일

심사청구일자 2014년10월01일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

박영미

서울특별시 강남구 언주로 110, 9동 506호 (개포동, 경남아파트)

(74) 대리인

안소영

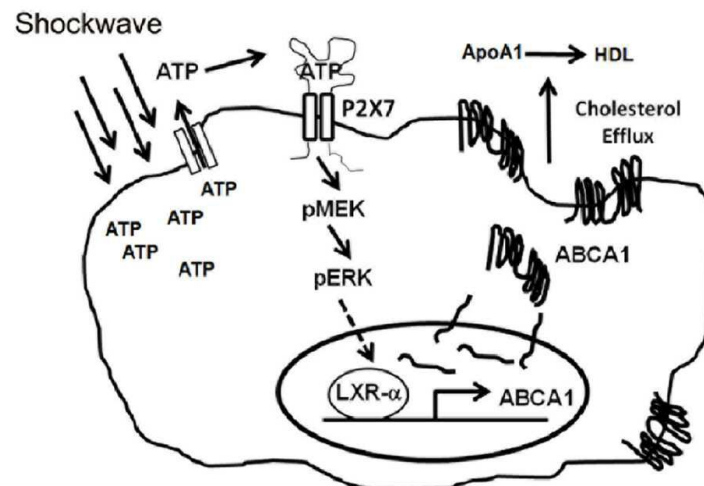
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 A T P를 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 ATP를 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 체외 충격파를 동물에게 가하는 단계를 포함하는, 동맥경화증을 예방 또는 치료 하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물 또는 치료 방법을 이용하면 동맥경화증을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012R1A1A1013250

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 염증병변으로부터 대식세포 이탈을 유도하여 동맥경화증 및 당뇨병을 동시에 치료하는 기
전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

ATP(adenosine triphosphate)를 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

체외 충격파를 동물에게 가하는 단계를 포함하는, 동맥경화증을 예방 또는 치료 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 체외 충격파는 0.056 mJ/mm^2 이하의 저에너지 체외 충격파인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 체외 충격파는 동물의 대동맥궁과 경동맥 및 쇄골하동맥 기시부를 포함한 영역을 덮는 흉골상연부에 가해지는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 ATP를 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동맥경화증, 또는 죽상 동맥경화증은 혈관의 가장 안쪽을 덮고 있는 내막(endothelium)에 콜레스테롤이 침착하고 내피세포의 증식이 일어난 결과 '죽종(atheroma)'이 형성되는 혈관질환인 죽상경화증과, 주로 혈관의 중간층에 퇴행성 변화가 일어나서 섬유화가 진행되고 혈관의 탄성이 줄어드는 노화현상의 일종인 동맥경화증을 통칭한다.

[0003] 동맥경화증은 사망률이 높고 각종 심혈관계의 합병증을 유발하나, 현재까지 동맥경화증을 직접적으로 치료할 만한 마땅한 치료제가 개발되지 않고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 ATP를 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은

[0006] ATP를 유효성분으로 포함하는 동맥경화증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명에 있어서 ATP가 동맥경화증 예방 또는 치료 효과를 나타내는 기전은 하기와 같다. 세포외로 방출된 ATP는 P2X7 수용체에 결합하여 MEK1/2 및 ERK1/2를 활성화하는 신호전달 캐스케이드를 촉발한다. ERK1/2의 활성화는 LXR-a 및 ABCA1의 전사를 촉진한다. ABCA1의 발현 증가는 세포로부터 증가된 콜레스테롤 유출을 야기하고 대식세포의 거품세포 형성을 감소시키는데, 이는 동맥경화 억제에 이끈다(도 6의 모식도 참조). 상기 기전에서 ATP의 증가는 체외 충격파, 바람직하게는 저에너지 체외 충격파를 가함으로써 이루어질 수도 있으며, 또는 ATP를 직접 투여함으로써 이루어질 수 있다.

[0008] 본 발명의 약학적 조성물 내 ATP의 함량은 질환의 증상, 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능

하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 5 내지 80 중량%, 바람직하게는 50 내지 80 중량%이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구현예로서, 상기 ATP는 1 내지 100 μM 포함될 수 있다. 그러나 ATP의 함량은 이에 제한되지 않는다.

[0009] 본 발명의 약학적 조성물 내 유효성분으로 함유되는 ATP는 약제학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등과 함께 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science (최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

[0010] 본 발명의 구현형태로써, 본 발명에 따른 ATP를 함유하는 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0011] 여기에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제, 기타 약제학적으로 허용가능한 첨가제를 포함할 수 있다.

[0013] 경구투여를 위한 고형제제로 제제화되는 경우, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 가능하며, 이러한 고형제제는 ATP 이외에 적어도 한 가지 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0014] 경구투여를 위한 액상제제로 제제화되는 경우, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 가능하며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0015] 비경구 투여를 위한 제제로 제제화되는 경우, 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위하여, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분인 ATP 함량을 기준으로 70kg의 성인 남성 기준 1일 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로, 바람직하게는 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이다.

[0017] 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 투여는 상기 투여량 및 투여횟수에 의해 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명의 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 경구로, 또는 복강내, 직장내, 정맥내, 근육내, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(Intracerebroventricular)로 주사 등에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는 정맥내로 투여할 수 있으며, 또는 카테터를 이용하여 동맥경화 병변이 있는 부위 또는 동맥경화 병변이 있을 것으로 추정되는 부위 부분에 투여할 수도 있다. 또는 염증 부위에서 코팅이 벗겨지고 ATP가 방출되도록 설계된 약제의 형태로서 경구 또는 비경구로 투여될 수 있다. 그러나 전달 경로는 이에 제한되지 않으며, ATP가 동맥경화 병변 부위에 도달할 수 있도록 하는 전달 경로이면 모두 적용될 수 있다.

[0019] 본 발명은 체외 충격파를 동물에게 가하는 단계를 포함하는, 동맥경화증을 예방 또는 치료 하는 방법을 제공한다.

[0020] 상기 동물은 인간, 마우스, 햄스터, 랫트, 페렛, 기니피그, 토끼, 개, 영장류, 돼지 등이 있으며, 보다 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0021] 체외 충격파(Extracorporeal Shock Wave)는 초음파와 같이 물 또는 연조직을 통과하여 전파되는 종방향의 음파

이다. 초음파와 달리, 충격파는 짧은 바늘 형태의 양성 스파이크를 아주 짧은 시간(< 1 μ s)에 갖고 인장기(tensile phase)가 이어지는 단일 압력 펄스이며 최대 100 MPa의 진폭을 갖는다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 체외 충격파는 저에너지 체외 충격파일 수 있다. 바람직하게는 상기 체외 충격파는 0.056 mJ/mm² 이하의 저에너지 체외 충격파일 수 있다. 그러나 에너지 강도는 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명에 있어서, 상기 체외 충격파는 동물의 대동맥궁과 경동맥 및 쇄골하동맥 기시부를 포함한 영역을 덮는 흉골상연부에 가해질 수 있다. 그러나 체외 충격파가 직접적으로 가해진 부분 이외에도 동맥경화 병변 개선 효과가 나타나기 때문에, 상기 체외 충격파가 가해지는 부분은 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명은 ATP의 동맥경화증 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0025] 또한 본 발명은 체외 충격파의 동맥경화증 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0026] 본 발명은 또한 ATP를 유효성분으로 함유하는, 골형성 촉진용 건강기능식품을 제공한다. "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 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.

[0027] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 조성물 또는 치료 방법을 이용하면 동맥경화증을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 체외 충격파가 고지방식이를 급이한 마우스에서 동맥경화증 병변에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 2는 체외 충격파가 대식세포의 거품세포화 및 콜레스테롤 배출에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 3은 체외 충격파가 마우스 복막 대식세포, 인간 제대동맥 혈관 내피세포 및 마우스 대동맥에서 ABCA1 발현에 미치는 효과를 나타낸 도이다.

도 4는 체외 충격파에 의한 ABCA1 발현 유도가 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)의 인산화에 기인함을 확인한 도이다.

도 5는 ATP가 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)의 인산화 및 ABCA1 발현 유도를 유발함을 확인한 도이다.

도 6은 본 발명의 체외 충격파에 의한 항-동맥경화의 기전을 나타낸 모식도이다.

도 7은 본 발명의 체외 충격파를 흉골상연부에 가하는 과정을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 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.

[0031] 본 발명에서 실험결과는 평균 $\pm$ S.E.M. 으로 표기되었다. 통계분석은 unpaired two-tails Student t-test를 사용하였다. P value가 0.05미만 구간은 유의미한 것으로 간주하였다. 모든 실험은 최소한 3-4번 반복되었다. 단백질이나 RNA 양은 b-actin 이나 GAPDH 로 정규화되었고 대조군에 대한 상대적 증가와 감소 정도를 측정하였다. 통계분석을 위하여 GraphPad Prism Software를 사용하였다.

[0032] <실시예 1> 체외충격파의 동맥경화증 병변에 대한 효과 확인

[0033] 1-1. 체외충격파의 동맥경화증 병변에 대한 효과 확인

[0034] Apoe null 마우스를 이화여자대학교의 오구택 교수로부터 제공받아 본 실험에 사용하였다. PCR을 통하여 상기 마우스의 유전자형을 확인하고, 12시간 밤/12시간 낮 주기로 유지하였다.

[0035] 이유를 마친 4주령의 수컷 Apoe null 마우스에 10주간 고지방식이(20% fat, 0.15% cholesterol)를 시켜 동맥경

화증을 유도하였다. 마우스를 2개 군으로 나누어 실험군(n=10)에는 N₂O/O₂에 혼합한 이소플루란을 흡입시켜 마취한 후 Dornier AR2 ESWT 장비(Dornier MedTech, Germany)를 이용하여 체외 충격파(0.056 mJ/mm², 6Hz, 1000impulses)를 마우스의 경동맥 분지부 및 쇄골하동맥 분지부를 포함하는 대동맥궁 부분을 덮는 흉골상연부에 3-4일 간격으로 10주간 가하였다(도 7의 모식도 참조). 대조군(n=8)에는 체외 충격파를 처치하지 않았다.

[0036] 10주 후 식이를 중단시키고 CO₂를 이용하여 마우스를 안락사시켰다. 그 후 심장과 대동맥을 PBS로 관류시킨 후 박리하였다. 심장은 OCT (Sakura)에 포매시키고 바로 드라이아이스를 이용하여 동결시켰다. 대동맥은 근위부 상행 대동맥으로부터 장골동맥 하단까지 박리하였고 외막의 지방(adventitial fat)을 제거하였다. 대동맥의 정면 관찰(en face analysis)를 위하여 대동맥을 종축으로 가르고 실리콘 플레이트에 고정된 후 10% 포름알데히드를 함유한 PBS 에 넣어 밤사이 고정하였다. 고정된 대동맥을 Oil-red O(ORO)로 4시간 동안 염색하고 PBS로 씻어내어 사진촬영하였다. 대동맥 전체 넓이 대한 동맥경화증 병변 면적을 Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) 프로그램 사용하여 측정하였다. 대동맥궁, 하행대동맥, 장골동맥 하부의 3 부분으로 나누어서 관찰하였다.

[0037] 도 1a는 대조군(Control) 및 실험군(Shockwave, SW)의 대동맥을 정면에서 관찰한 사진이다. 도 1b는 대조군 및 실험군에서 정면에서 관찰한 대동맥의 총 면적 당 동맥경화 병변의 면적을 계산하여 %로 나타내고 S.E.M.과 함께 그래프로 나타낸 것이다. 도 1a 및 도 1b에서 체외 충격파를 가한 군의 마우스는 충격파를 가하지 않은 군과 비교하여 동맥경화증 병변이 50% 정도로 적게 나타남을 알 수 있다(p=0.003)(도 1a, 1b).

[0038] 도 1c는 대조군 및 실험군에서 대동맥궁, 하행대동맥, 장골동맥 하부 각각에 있어서, 해당 부위의 정면에서 관찰한 대동맥의 총 면적 당 동맥경화 병변의 면적을 계산하여 그래프로 나타낸 것이다. 대동맥궁의 경우 실험군이 대조군보다 동맥경화 병변의 면적이 50% 적게 나타났고(p=0.005), 하행대동맥과 장골동맥 하부의 경우 각각 30%, 40% 적게 나타났다(p=0.04, p=0.01)(도 1c).

[0039] 또한 상기 분리된 마우스의 대동맥의 대동맥동(aortic sinus)부분을 8 μm 두께로 동결절편화하여 헤마톡실린&에오신(H&E)(도 1d) 또는 Oil-red-O (ORO)(Sigma에서 구입)(도 1e 및 1f)로 염색하여 동맥경화 병변을 조직학적으로 관찰하였다. 실험군 및 대조군에서 대표적인 도를 도 1d 내지 도 1f로 나타내었다.

[0040] 각 도에서 상단은 대조군에 해당하고, 하단은 실험군에 해당한다.

[0041] 도 1d에서 H&E 염색 상으로 상단의 대조군은 동맥경화 플라크가 형성되어 대동맥동 내강이 좁아져 있으나, 하단의 실험군은 대동맥동 내에 플라크가 유의하게 적게 나타남을 확인할 수 있다. 도 1e 및 도 1f에서 ORO 염색상으로 상단의 대조군에서 대동맥동 내강의 동맥경화 플라크에 포함된 지질이 붉게 염색되어 확인되나, 하단에서는 동맥경화 플라크 및 지질이 염색된 부분이 유의하게 적게 나타남을 알 수 있다.

[0042] 상기 결과로부터 체외 충격파를 동맥경화가 발생한 부분에 가한 경우 동맥경화 병변이 유의하게 감소함을 알 수 있다. 특히 체외 충격파를 직접적으로 가한 부분 뿐 아니라 직접적으로 가하지 않았던 하행대동맥과 장골동맥 하부의 경우에도 동맥경화 병변이 감소하였는데, 이로부터 체외 충격파에 의해 영향을 받은 혈류가 충격파를 직접적으로 받지 않은 부분에도 영향을 미쳐 동맥경화 병변 개선에 유익한 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0043] 1-2. 체외 충격파가 혈중 콜레스테롤 농도, 체중 및 사료 섭취량에 미치는 영향 확인

[0044] 상기 1-1의 마우스를 안락사시키기 하루 전 체중을 측정하고, 혈액을 채취하여 혈장 내 지질 농도를 측정하였다(HDL, LDL, VLDL은 HDL/LDL/VLDL assay kit (BioVisioin, USA)를 사용하여 측정. TG 와 NEFA는 Wako assay kit을 사용하여 측정). 사료 섭취량은 고지방 식이가 급이되고 체외 충격파가 가해진 10주 간 주당 1-3일씩 측정되었다. 양방 스튜던트 t-검정을 사용하여 검정하였다. 결과는 평균±S.E.M.으로 나타내었으며, 하기 표 1과 같다.

[0045] [표 1]

	TG(mg/dL)	NEFA (mg/dL)	HDL(mg/dL)	LDL/VLDL(mg/dL)	Body weight (g)	food uptake (g/day)
Control mice	272.6 ± 70.74	1.699 ± 0.072	26.15 ± 7.789	358.3 ± 3.842	32.65 ± 0.542	2.221 ± 0.178
Shockwave treated mice	200.1 ± 48.17	1.156 ± 0.1053	21.55 ± 4.431	338.2 ± 15.73	31.44 ± 0.381	2.179 ± 0.089

[0046] TG; triacylglycerol, NEFA; non-esterified fatty acid, HDL; high density lipoprotein, LDL/VLDL; low

[0047]

density lipoprotein/very low density lipoprotein.

[0048] <실시예 2> 체외 충격파가 대식세포의 거품세포화 및 콜레스테롤 배출에 미치는 영향 확인

[0049] 대식세포에 의한 콜레스테롤 조절은 동맥경화에 있어서 중요한 역할을 수행한다. 다량의 지질을 포함한 대식세포는 조직학적으로 세포내에 거품이 있는 것처럼 보이므로 거품세포(foam cell)라고 불리는데, 대식세포의 거품세포화는 동맥경화증 발병 기전의 초기 단계에서 매우 중요하게 작용한다. 거품세포 형성은 대식세포에서 콜레스테롤 섭취 및 배출 사이의 균형이 깨질 때 발생하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명자들은 체외 충격파 처리가 대식세포의 거품세포화 및 콜레스테롤 배출에 미치는 영향을 확인하기 위해 하기의 실험을 수행하였다.

[0050] 이하의 실험에 사용한 마우스 복막 대식세포는 하기의 방법으로 준비하였다. C57BL/6 마우스에 4% thioglycolate (1 ml)를 복강내 주사 후 4일째에 복강세척을 통하여 복막 대식세포를 추출하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 원심분리(1000 rpm, 5 분)하고 10% FBS를 함유한 RPMI 배양액을 넣어 37 °C, 5% CO₂환경에서 배양하였다. 3-4 시간 후 plate에 부착하지 않은 세포는 제거되었고 부착한 대식세포만이 실험에 사용되었다.

[0051] 이하의 실험에 사용한 산화 저밀도지단백은 하기의 방법으로 준비하였다. LDL을 인간 혈장에서 초고속원심분리법에 의하여 분리하였다. 상기 LDL을 5 μM CuSO₄을 함유한 PBS에 6시간 37 °C에서 배양함으로써 산화 저밀도지단백 (oxidatively modified LDL (oxLDL))을 만들었다. 산화반응은 EDTA (100 μM)를 함유한 PBS에 투석시킴으로써 마치게 하였다.

[0052] 2-1. 거품세포화에 미치는 영향 확인

[0053] 배지에 마우스 복막 대식세포주를 4개 군으로 나누어, 제1군에는 아무런 처리도 하지 않고, 제2군에는 Dornier AR2 ESWT 장비를 이용하여 체외 충격파를 처리하고(0.045 mJ/mm², 8Hz, 1000 impulses) 산화 저밀도지단백(oxidized LDL (oxLDL))을 처리하지 않고, 제3군에는 체외 충격파는 처리하지 않고 산화 저밀도지단백 50 μg/ml와 18시간 동안 배양하고, 제4군에는 체외 충격파를 처리하고 산화 저밀도 지단백과 50 μg/ml와 18시간 동안 배양하였다. 상기 세포주를 4% 파라포름알데히드로 20분간 고정하였고 PBS로 씻은 후 0.5% ORO 용액으로 10분간 염색하였다. 증류수로 세척 후 ORO 염색된 세포 중 10개 이상의 lipid droplets을 가진 세포를 현미경을 통하여 계수하였다.

[0054] 도 2a에서 상단은 좌측부터 각각 제1군 및 제2군, 하단은 좌측부터 각각 제3군 및 제4군의 결과에 해당한다. 이로부터 산화 저밀도지단백을 처리하면 거품세포화가 증가하나 체외 충격파의 처리에 의해 거품세포화가 감소함을 알 수 있다. 도 2b는 제3군과 제4군의 결과를 나타낸 그래프인데, 체외 충격파에 의해 대식세포의 거품세포화가 약 25% 감소됨을 알 수 있다.

[0055] 또한 상기 마우스 복막 대식세포주를 용해시키고 cholesterol assay kit(Abcam에서 구입)를 사용하여 세포내 콜레스테롤 수치를 측정하였다. 결과는 2c에 나타내었다. 도 2c에서 좌측부터 제1군 내지 제4군에 해당한다. 산화 저밀도지단백을 처리하지 않은 세포에서 세포내 콜레스테롤 수치는 체외 충격파 처리에 의해 약 10% 감소하며 (p=0.006), 산화 저밀도지단백을 처리한 세포에서는 체외 충격파가 세포내 콜레스테롤 수치는 약 16% 감소시킴을 알 수 있다 (p=0.04).

[0056] 2-2. 콜레스테롤 배출에 미치는 영향 확인

[0057] 또한 형광물질의 일종인 BODIPY(boron-dipyrromethene)로 표지한 콜레스테롤(TopFluor에서 구입)을 300 μl 포함하는 배지에서 마우스 복막 대식세포주를 1시간 동안 배양하고, RPMI 배지로 세척한 후, 2 μg/ml의 acyl-coA:cholesterol acyltransferase (ACAT) 저해제를 포함하는 RPMI 배지에서 18 시간 동안 배양된 ApoA-I (20 μg/ml)과 함께 4시간 동안 배양하였다. 그 후 상기 마우스 복막 대식세포주를 2개 군으로 나누어 실험군에는 체외 충격파를 처리하고 대조군에는 아무런 처리를 하지 않았다. 그 후 각 군의 세포로부터 배출된 배양액 속의 BODIPY-콜레스테롤을 형광계측법(fluorometry)으로 측정하였다.

[0058] 결과는 도 2d에 나타내었다. 마우스 복막 대식세포는 섭취한 BODIPY-콜레스테롤을 아포지단백 A1(apoA1)의 형태로 배출하는데, 체외 충격파는 BODIPY-콜레스테롤의 배출(efflux)을 약 1.7 배 증가시킴을 알 수 있다(p=0.04) (도 2d).

[0059] <실시예 3> 체외 충격파가 마우스 복막 대식세포, 인간 제대동맥 혈관 내피세포 및 마우스 대동맥에서 ABCA1 발현에 미치는 효과 확인

[0060] 3-1. 마우스 복막 대식세포에서 ABCA1 및 ABCG1 발현에 미치는 영향 확인

[0061] ABCA1과 ABCG1 단백질은 대식세포의 주요한 콜레스테롤 배출 단백질에 해당한다. 따라서 마우스 복막 대식세포를 2개 군으로 나누어 1개 군은 실험군으로 하여 체외 충격파를 처치하고 나머지 1개 군은 대조군으로 하였다. 체외 충격파 처치 2, 6, 18, 24시간 후에 각각 세포를 용해시키고 각 군에서 ABCA1과 ABCG1 단백질의 발현을 확인하였다.

[0062] 결과는 도 3a에 나타내었다. 도 3a에서 실험군에서 대조군보다 ABCA1과 ABCG1 단백질의 발현이 각각 약 2배 증가하였음을 알 수 있다.

[0063] 또한 전사적 수준에서 ABCA1의 발현에 미치는 영향을 확인하고자, 각 군에서 Trizol 시약(Invitrogen, USA)을 이용하여 RNA를 분리한 후 iScript™ cDNA synthesis Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 cDNA를 제작하고, 반-정량적 역전사효소 PCR(semi-quantitative reverse transcriptase-PCR)을 수행하여 ABCA1의 mRNA 수준을 측정하였다. ABCA1의 발현을 유도하는 효소로 알려진 Liver X-receptor (LXR)-α의 mRNA 수준도 함께 측정하였다. 측정 결과는 GAPDH의 mRNA 수준에 대하여 정규화하였다. 실험은 3-4반복적으로 수행하였다.

[0064] 실험에 사용한 프라이머의 서열은 하기 표 2와 같다.

[0065] [표 2]

유전자 명칭	방향	서열	서열 번호
ABCA1	정방향	5' -AGT ACC CCA GCC TGG AAC TT-3'	1
	역방향	5' -AGC TGT CCT TGG TCA GCT TC-3'	2
LXR-α	정방향	5' -GGA TAG GGT TGG AGT CAG CA-3'	3
	역방향	5' -GG AGC GCC TGT TAC ACT GTT-3'	4
GAPDH	정방향	5' -ATG GTG AAG GTC GGT GTG-3'	5
	역방향	5' -ACC AGT GGA TGC AGG GAT-3'	6

[0066] 결과는 도 3b에 나타내었다. 도 3b에서 실험군에서 대조군보다 시간이 경과할수록 ABCA1과 (LXR)-α의 mRNA 수준이 증가함을 확인할 수 있다.

[0068] 3-2. 인간 제대동맥 혈관 내피세포에서 ABCA1 발현에 미치는 영향 확인

[0069] 혈관 내피세포의 ABCA1 발현이 증가되면 동맥경화증 예방 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 따라서 인간 제대동맥 혈관 내피세포(human umbilical vein endothelial cells (HUVEC))를 2개 군으로 나누어 1개 군은 실험군으로 하여 체외 충격파를 처치하고 나머지 1개 군은 대조군으로 하였다.

[0070] 결과는 도 3c에 나타내었다. 도 3c에서 체외 충격파 처치시 에너지 레벨에 비례하여 ABCA1 발현이 증가됨을 확인할 수 있다.

[0071] 3-3. 마우스 대동맥에서 ABCA1 발현에 미치는 영향 확인

[0072] 상기 실시예 1에서와 동일하게 4주령의 수컷 Apoe null 마우스에 고지방식이를 시켜 동맥경화증을 유도하고, 마우스를 2개 군으로 나누어 실험군에는 체외 충격파(0.056 mJ/mm², 6 Hz, 1000 impulses)를 마우스의 경동맥 분지부 및 쇄골하동맥 분지부를 포함하는 대동맥궁에 3-4일 간격으로 10주간 가하였고, 대조군에는 체외 충격파를 처치하지 않았다. 10주 후 마우스의 대동맥궁에서 세포를 추출하고 용해시킨 후, 단백질을 추출하고 ABCA1 단백질의 발현을 웨스턴 블롯을 이용하여 확인하였다.

[0073] 결과는 도 3d 및 3e에 나타내었다. 도 3d 및 3e에서 대조군과 비교하여 실험군에서 대동맥궁 내의 ABCA1 단백질 발현량이 1.5배 이상 유의하게 증가하였음을 알 수 있다.

[0074] <실시예 4> 체외 충격파에 의한 ABCA1 발현 유도가 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)의 인산화에 기인함을 확인

[0075] 4-1. 체외 충격파가 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)의 인산화에 미치는 영향 확인

[0076] 체외 충격파가 ABCA1 발현을 유도하는 기전은 확인하고자 하기의 실험을 수행하였다. 마우스 복막 대식세포주를 2개 군으로 나누어 실험군에는 체외 충격파를 가하고 대조군에는 아무런 처치를 하지 않았다.

[0077] 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % NP-40. 단백질 저해제 콕테일(Roche)과 포스파타제 저해제(10 mM phenyl methylsulfonyl fluoride/PMSF, 1% 소듐 파이로포스페이트(sodium pyrophosphate), 10 mM 소듐 플루오라이드(sodium fluoride), 및 2 mM sodium vanadate)를 함유한 완충액으로 녹인 후, 20 μg의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)로 분리한 후 PVDF 멤브레인

(Millipore)에 옮기고 면역블롯에 이용하였다. phospho-Akt (Ser473) (Santa Cruze), phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)(Santa Cruze), phospho-JNK (Thr183/Tyr185)(Cell signaling) 와 phospho-p38MAPK(Thr180/Thr182)(Cell signaling) 항체를 사용하였다. β -actin (Santa Cruz) 항체는 정규화를 위해 사용되었다. 밴드의 강도는 ImageJ(<http://rsbweb.nih.gov/ij>)를 이용하여 분석하였다. mitogen-activated protein kinases (MAPKs)의 하나인 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)의 인산화를 측정하고, 또한 상기 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)의 인산화를 담당하는 효소인 MAPK/ERK kinase 1/2 (MEK1/2)의 수준을 측정하였다.

[0078] 결과는 도 4a 및 4b에 나타내었다. 도 4a에서 대조군과 비교하여 실험군에서 인산화된 ERK (Thr202/Tyr204)가 약 3 내지 5배 증가함을 확인할 수 있다. 도 4b에서 대조군과 비교하여 실험군에서 MAPK/ERK kinase 1/2 (MEK1/2)의 수준이 증가함을 확인할 수 있다.

[0079] **4-2. ERK 저해제에 의해 체외 충격파의 효과가 억제됨을 확인**

[0080] 상기 4-1의 결과를 확인하기 위하여, 마우스 복막 대식세포주에 ERK 저해제인 U0126(Enzo Life Sciences에서 구입)을 전-처리한 후, 상기 세포주를 2개 군으로 나누어 실험군에는 체외 충격파를 가하고 대조군에는 아무런 처치를 하지 않았다. 그리고 면역 블롯을 수행하여 ABCA1 단백질 발현을 확인하였다. 실험 방법은 상기 4-1과 동일하고, ABCA1(Abcam) 항체를 사용하였다. 또한 반-정량적 역전사효소 PCR을 통하여 mRNA 발현을 확인하였다.

[0081] 결과는 도 4c 및 4d에 나타내었다. 도 4c에서 U0126 처리시 체외 충격파 처리에도 불구하고 ABCA1 단백질 발현이 증가하지 않는 것으로 나타나며, 도 4d에서 U0126 처리시 체외 충격파 처리에도 불구하고 ABCA1 mRNA 발현이 증가하지 않음을 알 수 있다.

[0082] **<실시예 5> ATP가 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)의 인산화 및 ABCA1 발현 유도를 유발함을 확인**

[0083] **5-1. 체외 충격파에 의한 ATP 분비 확인**

[0084] 마우스 복막 대식세포주에 체외 충격파를 가한 후 각각 0, 3, 8, 15분 후에 배지 내에 포함된 ATP의 양을 측정하였다. 결과는 도 5a에 나타내었다. 도 5a에서 체외 충격파 처리 후 3분까지 ATP 분비가 유의하게 증가하였고, 그 후 점차 감소하나 어느 정도 유지됨을 알 수 있다.

[0085] **5-2. P2X7 차단제에 의하여 체외 충격파의 효과가 억제됨을 확인**

[0086] 상기 5-1의 결과로부터 본 발명자들은 체외 충격파의 효과는 ATP 분비 증가에 기인하는 것으로 예측하였다. ATP는 대식세포에 다량 발현되는 P2X7 수용체에 결합하는 것으로 알려져 있다. 따라서 P2X7 수용체를 차단하면 ATP의 작용이 억제되어 ABCA1 발현 및 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)의 인산화가 일어나지 않을 것으로 예측하고 하기의 실험을 수행하였다.

[0087] 마우스 복막 대식세포주에 P2X7 수용체 차단제(blocker)인 KN62를 처리하지 않거나 각각 0.2 μ M 및 10 μ M 처리한 후, 체외 충격파를 가하였다. 웨스턴 블롯을 이용하여 ABCA1 발현을 관찰한 결과, KN62를 처리한 경우 체외 충격파를 가한 경우에도 ABCA1 발현이 나타나지 않았다(도 5b). 또한 웨스턴 블롯을 이용하여 인산화된 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)를 측정한 결과, KN62를 처리한 경우 체외 충격파를 가한 경우에도 ERK1/2 (Thr202/Tyr204)의 인산화가 일어나지 않았다(도 5c).

[0088] **5-3. ATP가 ABCA1 발현에 미치는 영향 확인**

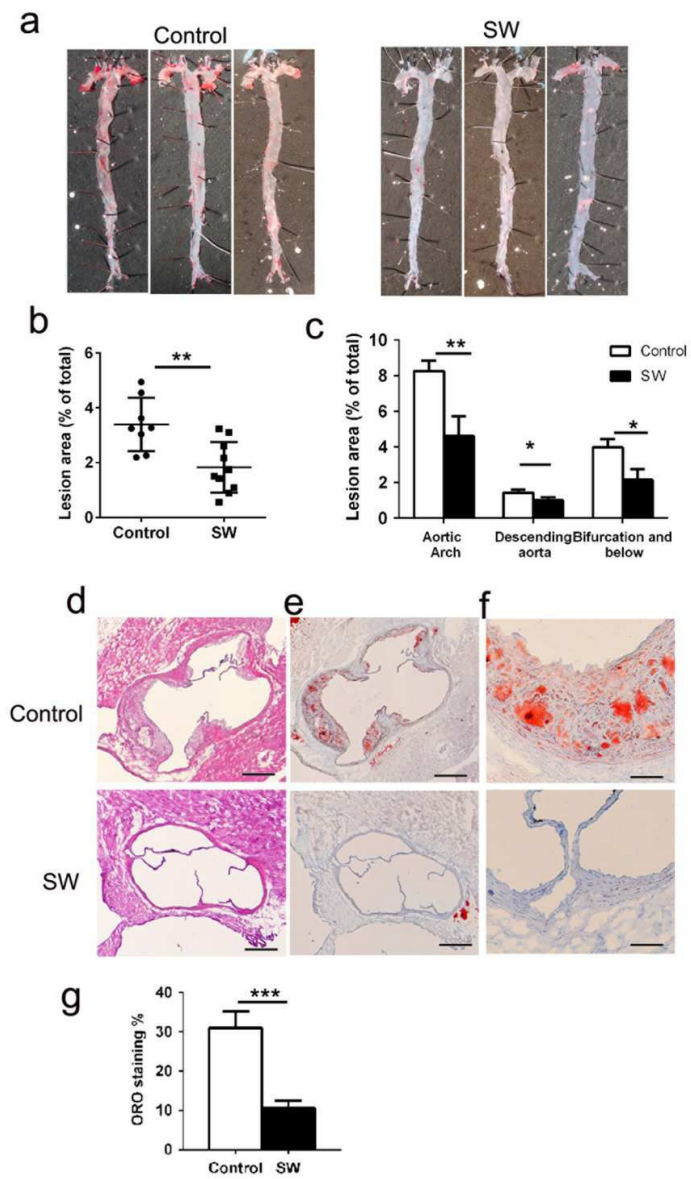
[0089] 상기 5-1 및 5-2의 결과에 기초하여, 본 발명자들은 체외 충격파에 의해 ATP를 유도하지 않고, 직접적으로 세포에 ATP를 처리하여도 ABCA1 발현이 증가할 것으로 예측하였다. 따라서 이를 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0090] 마우스 복막 대식세포주에 각각 1, 10, 100 μ M의 ATP를 처리하고, 웨스턴 블롯을 이용하여 ABCA1 단백질 발현을 확인하였다. 결과는 도 5d에 나타내었다. 도 5d에서 ATP를 처리한 경우 농도 의존적으로 ABCA1 단백질 발현이 증가하며, 100 μ M의 ATP를 처리한 경우 ATP를 처리하지 않은 경우보다 약 2배 ABCA1 단백질 발현이 증가함을 알 수 있었다.

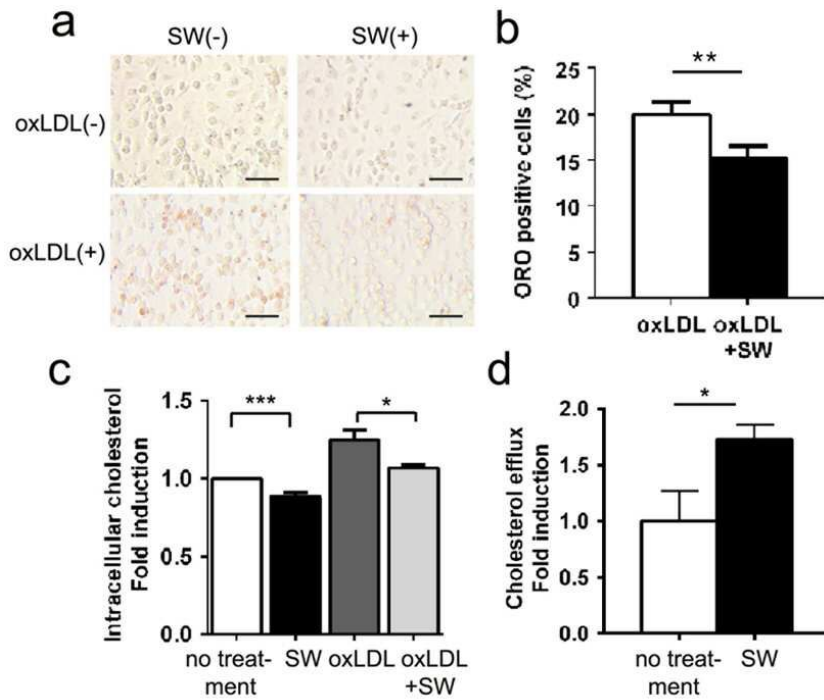
[0091] 또한 마우스 복막 대식세포주에 P2X7 수용체 차단제(blocker)인 KN62(Sigma에서 구입)를 처리하지 않거나 각각 0.2 μ M 및 10 μ M 처리한 후, 아무런 처리를 하지 않거나 ATP를 처리하였다. 그 결과 KN62를 0.2 μ M 처리한 경우 ATP를 처리한 경우에도 ABCA1 발현이 감소했으며, KN62를 10 μ M 처리한 경우에는 ABCA1 발현이 거의 나타나지 않았다(도 5e).

도면

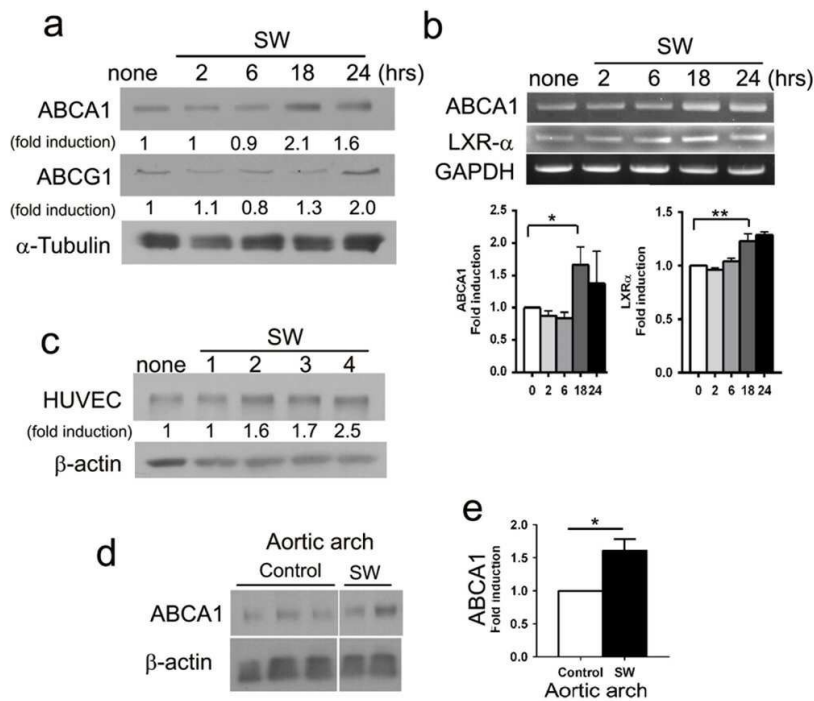
도면1



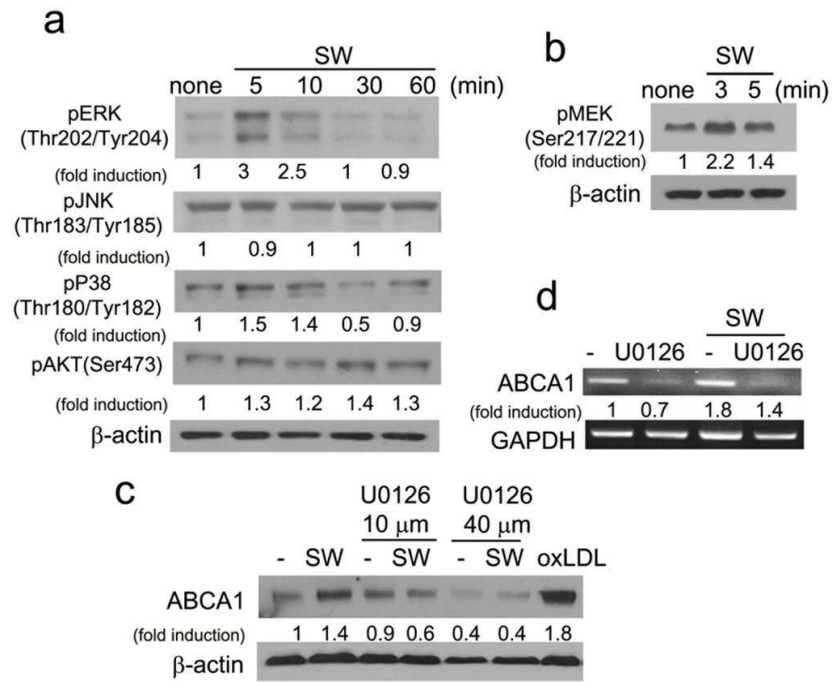
도면2



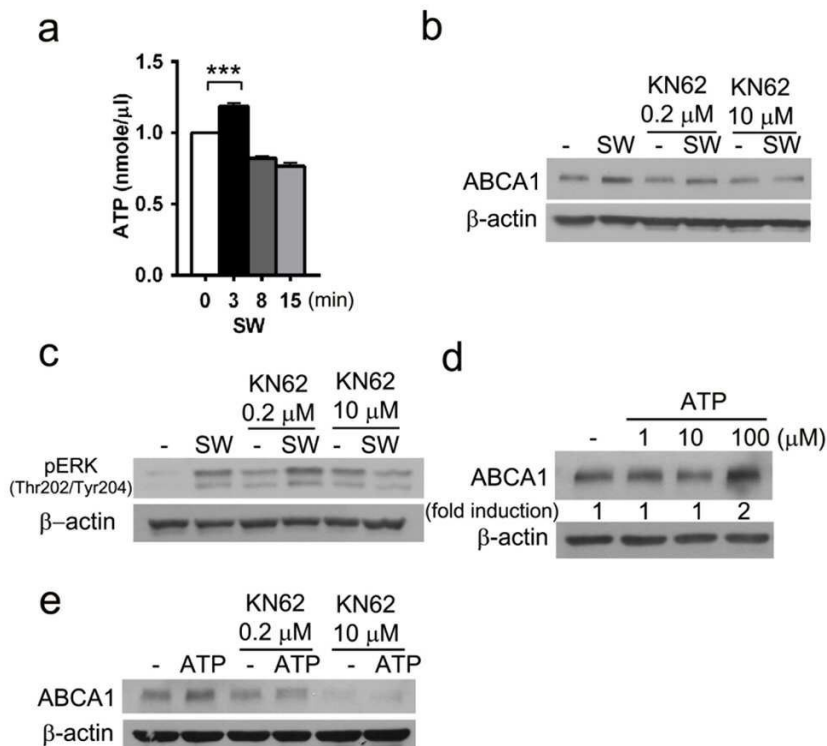
도면3



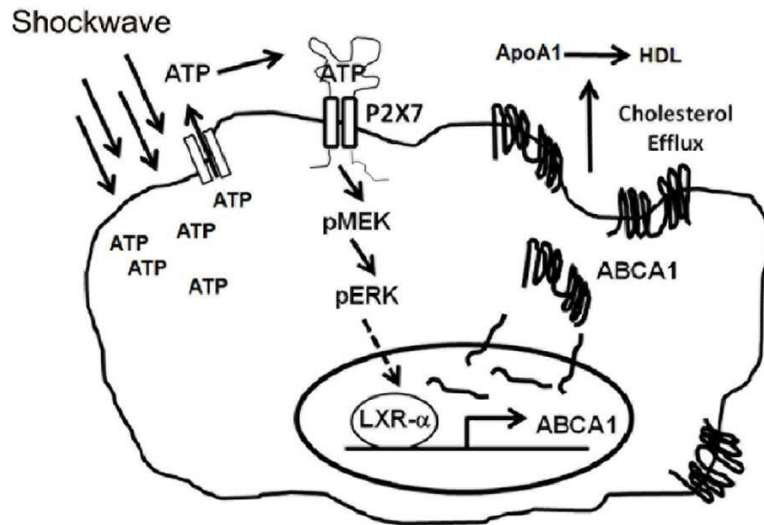
도면4



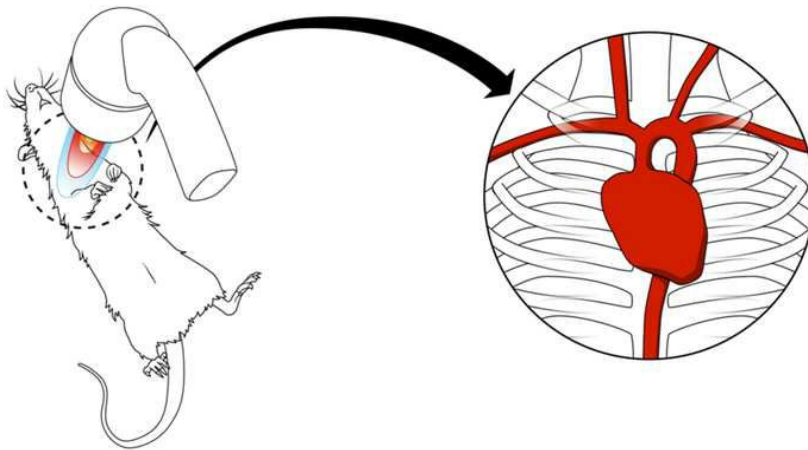
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> A composition for treating atherosclerosis comprising ATP as an active ingredient
- <130> P14-081-EWHA
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for ABCA1

<400> 1

agtaccccag cctggaactt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for ABCA1

<400> 2

agctgtcctt ggtcagcttc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for LXR-alpha

<400> 3

ggatagggtt ggagtcagca 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for LXR-alpha

<400> 4

ggagcgcctg ttacactgtt 20

<

210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for GAPDH

<400> 5

atggtgaagg tcggtgtg 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for GAPDH

<400> 6

accagtggat gcagggat

18