



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0014472
(43) 공개일자 2017년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/192 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/192 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0107905
(22) 출원일자 2015년07월30일
심사청구일자 2015년07월30일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
엄재영
서울특별시 동대문구 신이문로 9, 103동 301호(이문동, 금호어울림APT)
박진봉
서울특별시 도봉구 덕릉로 349, 406동 201호(창동, 창동주공4단지)
정윤우
서울특별시 동대문구 천장산로4가길 20, 201호(이문동)
(74) 대리인
위병갑

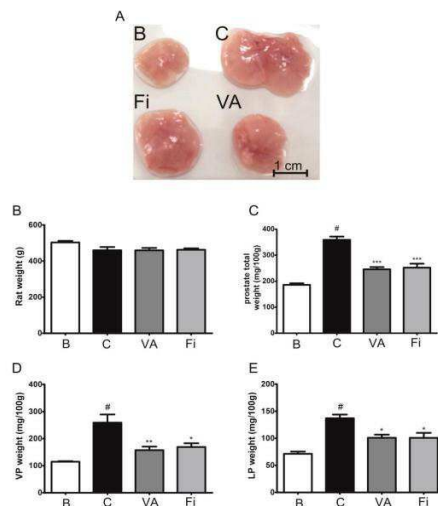
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 바닐릭산을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증의 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 전립선비대증을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 바닐릭산은 전립선비대증 실험동물 모델에서 전립선 조직의 크기와 무게를 유의하게 감소시켰으며, 상피세포 두께를 포함한 조직학적인 개선효과를 나타냈다. 또한 전립선비대증의 유발과 관련된 단백질 또는 인자들의 발현을 효과적으로 감소시켰다. 따라서 본 발명의 바닐릭산은 전립선비대증의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물이나 그 예방 및 개선을 위한 기능성 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/19 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

바닐릭산(vanillic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바닐릭산은 전립선 조직에서 5알파-환원효소(5 α -reductase)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 바닐릭산은 전립선 조직에서 안드로겐 수용체(androgen receptor), 에스트로겐 수용체(estrogen receptor) 및 스테로이드 수용체 공활성화 인자 1(steroid receptor coactivator 1)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 바닐릭산은 전립선 조직에서 과증식세포 마커인 사이토케라틴(cytokeratin)과 평활근 액틴(α -smooth muscle actin)의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

바닐릭산(vanillic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증의 예방 및 개선용 건강기능성 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 전립선비대증(BPH)과 관련된 바닐릭산(vanillic acid)의 신규한 용도에 관한 것으로, 전립선비대증을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있는 바닐릭산을 포함하는 약학적 조성물 및 건강기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전립선비대증(benign prostatic hyperplasia, BPH)은 전립선이 비대해져 방광 하부의 요로를 막아 소변의 흐름이 감소된 상태로 정의되었으나, 최근에는 남성에서 빈뇨(8회 이상/일), 야간뇨, 긴박뇨(강하고 갑작스런 요의), 절박뇨(소변을 참기 어려움), 지연뇨(소변의 배출이 지연됨), 단절뇨(소변의 흐름이 끊김), 배뇨시 힘을 주어야 하는 현상 등의 방광 배출 장애를 나타내는 증상을 통칭한 하부 요로증상의 호소로 정의되고 있다. 전립선비대증(BPH)은 남성에게서 나타나는 가장 흔한 만성 질환 중 하나로, 나이가 들어감에 따라 그 발병율이 높아지며, 연구대상 및 지역 등에 따라 편차는 있지만 50세 이상의 남성 중 거의 50%가 증상을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(McVary KT. BPH: epidemiology and comorbidities. Am J Manag Care. 2006;12(5 Suppl):S122-128).

[0003] 전립선비대증은 전립선의 기질세포(stromal cell) 및 상피세포의 증식과 관련이 있으며, 이에 따라 전립선이 확장되는 증상을 나타낸다(Roehrborn CG. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Int J Impot Res. 2008;20 Suppl 3:S11-18). 전립선비대증의 생물학적 기작에 대하여 아직까지 많은 부분이 밝혀져 있지는

않지만, 전립선비대증은 이질적(heterogenous) 질환으로 알려져 있으며, 그 환자들의 조직학적 다양성은 개인 맞춤형 치료의 가능성을 시사한다(Nicholson TM, et al. Sex steroid receptor expression and localization in benign prostatic hyperplasia varies with tissue compartment. Differentiation. 2013;85(4-5):140-149). 안드로겐(androgens)은 전립선비대증과 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 안드로겐이 전립선비대증의 직접적인 원인은 아닐 수도 있지만, 고환(testicular) 안드로겐은 전립선비대증의 발달에 필수적이다(McConnell JD. Prostatic growth: new insights into hormonal regulation. Br J Urol. 1995;76 Suppl 1:5-10). 특히, 안드로겐 디하이드로테스토스테론(androgen dihydrotestosterone, DHT)은 가장 결정적인 인자로 여겨진다. 여러 연구들에 따르면, BPH 환자에서 DHT의 혈청 농도가 비슷한 나이의 정상인보다 상승된 것을 확인할 수 있었다(Hammond GL, et al. Serum steroids in normal males and patients with prostatic diseases. Clin Endocrinol (Oxf). 1978;9(2):113-121). 전립선에서 핵막-결합 효소 스테로이드(nuclear membrane-bound enzyme steroid), 5알파-환원효소(5 α -reductase, 5AR)는 전립선의 주된 안드로겐인 테스토스테론(testosterone)을 DHT로 전환시킨다(McConnell JD. Prostatic growth: new insights into hormonal regulation. Br J Urol. 1995;76 Suppl 1:5-10). DHT는 테스토스테론 보다 안드로겐 수용체(AR)에 대한 친화력이 높아 더욱 효과가 큰 안드로겐으로 알려져 있다(Andriole G, et al. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5 α -reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. J Urol. 2004;172(4 Pt 1):1399-1403). 전체적으로 총 전립선 안드로겐의 거의 90 %가 주로 고환의 안드로겐으로부터 유래한 DHT의 형태이다. 전립선 세포 내부에서, 테스토스테론과 DHT는 모두 동일한 수용체(AR)에 결합하며, 이로 인해 안드로겐-의존적 유전자들의 전사와 해당 단백질 합성이 증가된다(Roehrborn CG. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Int J Impot Res. 2008;20 Suppl 3:S11-18). 이러한 직접적인 효과와 함께, 안드로겐은 성장인자와 그들의 수용체를 조절할 수 있으므로 전립선의 성장을 간접적으로 매개한다. 이러한 특정 수용체(AR)는, 세포질에서 안드로겐의 결합에 의해 활성화된 후 핵 안으로 이동하는 일종의 핵 수용체이다(Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, et al. Regulation of androgen action. Vitam Horm. 1999;55:309-352). 또한 AR은 키나아제(kinase) 신호전달경로의 유도나 세포내 칼슘 수준의 조절과 같은 추가적인 기능을 갖는다(Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgenbinding proteins in nongenomic androgen actions. Mol Endocrinol. 2002;16(10):2181-2187). 그러나 BPH의 생물학적 기작에서는, 유전자 발현을 조절하는 DNA 결합 전사인자로서의 기능이 가장 중요한 특징이다(Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. Endocr Rev. 1987;8(1):1-28). 안드로겐 조절 유전자들의 발현은 AR의 다양한 기능에 영향을 미치는 공동조절인자들(co-regulator)에 의해 영향을 받는다(Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. Endocr Rev. 2002;23(2):175-200). 이러한 공동 조절인자들은 BPH와 관련이 있을 수 있는 AR의 전사활성을 변화시킨다. AR의 공동 조절인자로 확인되는 단백질들은 30개 이상이며, 여기에는 스테로이드 수용체 공활성화 인자 1(steroid receptor coactivator 1, SRC-1), 안드로겐 수용체 공활성화 인자 70(androgen receptor coactivator 70, ARA70), 및 CREB (cAMP-response element binding protein)-결합 단백질(CBP)이 포함된다. 따라서 전립선에서 안드로겐의 활성화는 간접적으로 자가분비(autocrine) 및 근거리분비(paracrine) 경로를 통해 매개된다. AR의 기능을 도 2에 개략적으로 도시하였다.

[0004] BPH는 조직학적 진단에 의해 알 수 있지만, 하부 요로(lower urinary tract) 증상과 관련이 되면 만성적이 된다. 전립선이 심각하게 확장된 남성의 경우에는 요폐, 잔뇨감, 약뇨 등의 삶의 질을 낮추는 여러 증상들이 나타나며, BPH를 방치할 경우 더욱 더 심하게 진전될 수 있다. 또한, 잔뇨로 인해 박테리아가 머물 수 있으며, 요로의 감염 위험이 증가한다. 이러한 BPH 환자들은 수술 또는 약물 치료가 필요하다. 경뇨도적 절제술(transurethral resection)은 BPH 환자에 대한 가장 흔한 수술방법이나, 출혈, 요도협착, 요실금 등의 부작용이 보고된 바 있다.

[0005] 전립선비대증의 약물 치료제는 크게 알파차단제와 안드로겐억제제(5알파-환원효소 억제제)로 분류된다. 알파차단제는 전립선요도의 압력과 긴장을 낮추어주는 약물로서 시중에서 판매되는 알파차단제로는 테라조신(terazosin), 독사조신(doxazosin), 탐스로신(tamsulosin), 알푸조신(alfuzosin) 등이 있다. 그러나 알파차단제는 전립선의 비대된 현상을 줄여주는 효과는 없으므로 일시적인 치료방법일 뿐이며, 어지럼증, 무기력증, 두통, 시야 장애 등의 부작용이 보고된 바 있다. 안드로겐억제제는 전립선의 비대 과정에서 핵심적인 역할을 수행하는 5알파-환원효소를 억제하여 전립선의 비대를 막아주는 약물이다. 5알파-환원효소 억제제로서 시중에는 피나스테리드(finasteride)와 두타스테리드(dutasteride) 등이 판매되고 있다. 그러나 이들 약물은 복용 후 효과가 나타날 때까지 시간이 오래 걸리며, 성기능 관련 부작용이 보고된 바 있다. 이와 같이 현재까지 시판되거나 개발 중인 약물들은 대부분 여러 부작용을 나타내고 있으므로, 새로운 기전의 전립선비대증 치료제를 개발할 필

요가 있다.

[0006] 바닐릭산(vanillic acid (VA), 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid)은 착향료(flavoring agent)로 사용되는 디하이드록시벤조익 유도체(dihydroxybenzoic derivative)이다. VA는 식물 중에서 당귀(*Angelica sinensis*)의 뿌리에 가장 많이 함유되어 있는 것으로 보고된 바 있다(Duke JA. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants: CRC Press LLC; 2001). 당귀는 특히 여성의 건강에 도움을 주는 한약재로 널리 사용되어 왔다. 하지만, 지금까지 VA가 전립선비대증(BPH)에 미치는 영향에 대해서는 보고된 바 없다.

[0007] 이에 본 발명자들은 테스토스테론(TP)으로 유도한 BPH 동물(rat) 모델을 이용한 실험을 통하여 바닐릭산이 전립선비대증의 여러 증상에 미치는 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 미국등록특허 8734859B1

발명의 내용

해결하려는 과제

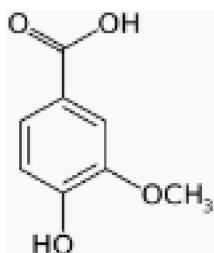
[0009] 본 발명의 목적은 바닐릭산(vanillic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 바닐릭산(vanillic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증의 예방 및 개선용 건강 기능성 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바닐릭산(vanillic acid; 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바닐릭산은 하기 화학식 1의 구조식으로 표시될 수 있다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바닐릭산은 전립선 조직에서 5 α -환원효소(5 α -reductase)의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바닐릭산은 전립선 조직에서 안드로젠 수용체(androgen receptor), 에스트로젠 수용체(estrogen receptor) 및/또는 스테로이드 수용체 공활성화 인자 1(steroid receptor coactivator 1)의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바닐릭산은 전립선 조직에서 과증식세포 마커인 사이토케라틴(cytokeratin) 및/또는 평활근 액틴(α -smooth muscle actin)의 발현을 감소시킬 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 바닐릭산(vanillic acid) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증의 예방 및 개선용 건강기능성 식품을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 건강기능성 식품에 포함된 바닐릭산은 전립선 조직에서 5 α -환원효소(5 α -reductase)의 발현을 감소시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바닐릭산은 전립선 조직에서 안드로겐 수용체(androgen receptor), 에스트로겐 수용체(estrogen receptor) 및/또는 스테로이드 수용체 공활성화 인자 1(steroid receptor coactivator 1)의 발현을 감소시킬 수 있으며, 전립선 조직에서 과증식세포 마커인 사이토케라틴(cytokeratin) 및/또는 평활근 액틴(α -smooth muscle actin)의 발현을 감소시킬 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 바닐릭산은 전립선비대증 실험동물 모델에서 전립선 조직의 크기와 무게를 유의하게 감소시켰으며, 상피세포 두께를 포함한 조직학적인 개선효과를 나타냈다. 또한 전립선비대증의 유발과 관련된 단백질 또는 인자들의 발현을 효과적으로 감소시켰다. 따라서 본 발명의 바닐릭산은 전립선비대증의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물이나 그 예방 및 개선을 위한 기능성 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 전립선의 구조를 나타낸 그림이다. 대부분의 전립선 암은 주변영역(peripheral zone, PZ), (BPH), (periurethral area), (transitional zone, TZ). BPH (urethra) (periurethral area), (adenoma).

도 2는 안드로겐 수용체의 정상적인 기능을 나타낸 그림이다(modified by Jonathan Marcus, based on the original drawing Dr.Marianne D Sadar). 테스토스테론(T)은 세포 안으로 들어가며, 만약 5 α -환원효소가 존재한다면, DHT (dihydrotestosterone)로 전환된다. 스테로이드 결합에 의해 안드로겐 수용체(AR)는 구조적 변화(conformational change)를 일으키고 열-충격 단백질(heat-shock proteins, hsp)을 방출시킨다. 스테로이드 결합 전후에는 인산화(P)가 일어난다. AR은 이합체화반응(dimerization), DNA 결합, 및 공활성화인자들의 결합(recruitment of coactivators)이 일어나는 핵으로 전위된다. 표적 유전자들은 전사된 후 단백질로 번역된다.

도 3은 전립선의 위치와 해부 사진이다. (A) 복강 내 생식기(SV, seminal vesicle; BL, bladder; P, prostate). (B) 분리된 기관의 복면(ventral view) (VP, ventral prostate), 및 (C) 배면(dorsal view) (DLP, dorsolateral prostate).

도 4는 바닐릭산(VA)이 체중 및 전립선 조직 무게지수에 미치는 영향을 보여준다[B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, 피나스테리드(finasteride) 처리 BPH 그룹]. (A) 전립선 조직의 시각적 비교. (B) 랫의 체중. (C) 총 전립선 지수. (D) VP (ventral prostate) 지수. (E) DLP (dorsolateral prostate) 지수. # B에 대해 $P < 0.05$; * C에 대해 $P < 0.05$

도 5는 바닐릭산(VA)이 전립선 조직의 조직학적 변화에 미치는 영향을 보여준다[B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, 피나스테리드(finasteride) 처리 BPH 그룹]. (A) H&E (x 200). (B) . (C) 4 (D) 6 (lumen). # B에 대해 $P < 0.05$; * C에 대해 $P < 0.05$

도 6은 5 α -환원효소(5AR)의 상대적인 단백질 발현을 웨스턴 블랏으로 분석한 결과이다[B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, 피나스테리드(finasteride) 처리 BPH 그룹]. 단백질 발현의 편차는 GAPDH에 대해 표준화하였다. 수치는 세 번의 독립된 실험 데이터의 평균 $\pm$ S.D. # B에 대해 $P < 0.05$; * C에 대해 $P < 0.05$

도 7은 항-안드로겐 수용체(AR) 항체를 이용한 전립선 조직의 면역조직화학적 염색 결과이다[B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, 피나스테리드(finasteride) 처리 BPH 그룹]. 위쪽 패널은 전립선 조직의 대표적인 현미경 사진이다(배율 x 200). 화살표는 항-AR 면역염색된 세포들을 나타낸다. 아래쪽 패널은 항-AR 항체에 의해 양으로(positively) 면역염색된 영역의 상대적인 밀도를 나타낸다. # B에 대해 $P < 0.05$; * C에 대해 $P < 0.05$

도 8은 항-에스트로겐 수용체 알파(ER α) 항체를 이용한 전립선 조직의 면역조직화학적 염색 결과이다[B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, 피나스테리드(finasteride) 처리 BPH 그룹]. 위쪽 패널은 전립선 조직의 대표적인 현미경 사진이다(배율 x 200). 화살표는 항-ER α 면역염색된 세포들을 나타낸다. 아래쪽 패널은 항-ER α 항체에 의해 양으로(positively) 면역염색된 영역의 상대적인 밀도를 나타낸다. # B에 대해 $P < 0.05$; * C에 대해 $P < 0.05$

도 9는 항-스테로이드 수용체 공활성화 인자 1(SRC1) 항체를 이용한 전립선 조직의 면역조직화학적 염색 결과이다[B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, 피나스테리드(finasteride) 처리

BPH 그룹]. 위쪽 패널은 전립선 조직의 대표적인 현미경 사진이다(배율 x 200). 화살표는 항-SRC1 면역염색된 세포들을 나타낸다. 아래쪽 패널은 항-SRC1 항체에 의해 양으로(positively) 면역염색된 영역의 상대적인 밀도를 나타낸다. # B에 대해 $P < 0.05$; * C에 대해 $P < 0.05$

도 10은 (A) 안드로젠 수용체(AR) 및 (B) 스테로이드 수용체 공활성화인자 1(SRC1)의 상대적인 단백질 발현을 나타내는 웨스턴 블랏 분석 결과이다[B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, 피나스테리드(finasteride) 처리 BPH 그룹]. 단백질 발현의 편차는 GAPDH에 대해 표준화하였다. 수치는 세 번의 독립된 실험 데이터의 평균 $\pm$ S.D. # B에 대해 $P < 0.05$; * C에 대해 $P < 0.05$

도 11은 항-고분자량 사이토케라틴 34 β E12 (34 β E12) 항체를 이용한 전립선 조직의 면역조직화학적 염색 결과이다[B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, 피나스테리드(finasteride) 처리 BPH 그룹]. 위쪽 패널은 전립선 조직의 대표적인 현미경 사진이다(배율 x 200). 화살표는 항-34 β E12 면역염색된 세포들을 나타낸다. 아래쪽 패널은 항-34 β E12 항체에 의해 양으로(positively) 면역염색된 영역의 상대적인 밀도를 나타낸다. # B에 대해 $P < 0.05$; * C에 대해 $P < 0.05$

도 12는 항-알파 평활근 액틴(α SMA) 고분자량 사이토케라틴 34 β E12 (34 β E12) 항체를 이용한 전립선 조직의 면역조직화학적 염색 결과이다[B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, 피나스테리드(finasteride) 처리 BPH 그룹]. 위쪽 패널은 전립선 조직의 대표적인 현미경 사진이다(배율 x 200). 화살표는 항- α SMA 면역염색된 세포들을 나타낸다. 아래쪽 패널은 항- α SMA 항체에 의해 양으로(positively) 면역염색된 영역의 상대적인 밀도를 나타낸다. # B에 대해 $P < 0.05$; * C에 대해 $P < 0.05$

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 바닐릭산의 전립선비대증의 예방, 개선 및 치료제로서의 신규한 용도를 제공한다. 본 발명의 바닐릭산(Vanillic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid)은 향신료로 이용되는 바닐린의 산화유도체로서, 당귀, 올리브, 쌀, 인삼, 아사이를 포함한 다양한 종류의 베리류에 풍부한 것으로 알려져 있으며, 그 항염효과가 밝혀진 바 있다. 본 발명의 바닐릭산은 위와 같은 식물의 추출물로부터 분리된 것을 이용할 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 시판되고 있는 어떠한 바닐릭산 화합물도 본 발명에 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명자들은 전립선비대증에 대한 바닐릭산의 개선효과를 알아보기 위하여 테스토스테론(testosterone)으로 유도된 전립선비대증(benign prostatic hyperplasia) 동물모델을 이용하여 연구를 진행하였다. Kato 등이 이전 연구에서 프로피온산테스토스테론(testosterone propionate)의 처리에 의해 전립선의 무게가 증가한다는 것을 보고하였기 때문에(Kato T, et al. BASIC STUDIES ON THE PROSTATE OF RAT UNDER VARIOUS HORMONAL ENVIRONMENT. Endocrinol Jpn. 1965;12:1-8), BPH의 랫(rat) 모델이 개발되었다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에서, 전립선비대증을 유발하지 않은 정상군과 테스토스테론 주입을 통해 전립선비대증을 유발한 군을 대조군으로 사용하였으며, 테스토스테론과 함께 바닐릭 산을 서혜부에 피하주사(5mg/kg)로 처치한 군을 실험군으로 사용하였다. 또한 치료효과를 비교하기 위해 현재 전립선비대증 치료제로 사용되고 있는 5 α -환원효소(5 α -reductase) 저해제인 피나스테리드(finasteride)를 처치한 쥐를 양성대조군으로 사용하였다. 본 발명의 일실시예에서, 4주간의 테스토스테론 주입을 통한 전립선비대증 유발 이후 추가적으로 실험약물을 6주간 투여한 후, 전립선 조직의 크기 및 무게 측정, 헤마톡시린-에오진 염색(hematoxylin&eosin staining), 웨스턴 블랏(western blot), 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 통하여 바닐릭산의 효과를 확인하였다.
- [0024] 그 결과, 바닐릭산은 테스토스테론 주입을 통해 증가된 전립선 조직의 크기와 무게를 유의하게 감소시켰으며(도 4, 표 1), 상피세포 두께를 포함한 조직학적인 개선효과를 나타냈다(도 5). 또한, 전립선 비대증의 주요한 유발 원인인 5 α -환원효소의 단백질 발현양이 바닐릭산 투여군에서 유의하게 감소함을 확인하였다(도 6). 또한, 전립선 조직에서 안드로젠 수용체(androgen receptor), 에스트로젠 수용체(estrogen receptor), 안드로젠 수용체의 공활성화 인자로 알려져 있는 스테로이드 수용체 공활성화 인자 1(steroid receptor coactivator 1)의 발현을 면역조직화학법과 웨스턴 블랏법을 통해 조사한 결과(도 7 내지 10), 바닐릭산이 이들 인자들의 발현을 유의하게 억제함을 확인하였다. 게다가 바닐릭산은 조직 내 과증식세포 마커인 사이토케라틴(cytokeratin)과 평활근 액틴(α smooth muscle actin)의 발현양 역시 감소시켰다(도 11 및 12).
- [0025] 이와 같이 본 발명의 실시예들은 바닐릭산의 전립선비대증에 대한 개선 및 억제 효과를 테스토스테론으로 유발시킨 전립선비대증 동물모델에서 증명한 것으로 볼 수 있으므로, 본 발명은 바닐릭산의 전립선비대증의 예방, 개선 및 치료제로서의 새로운 가능성을 제시한다.

- [0026] 본 발명의 일 양태로서, 상기와 같은 전립선비대증의 치료 효과를 나타내는 본 발명의 실시예에 따른 실험결과들을 토대로, 본 발명은 바닐릭산을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 상기 바닐릭산 화합물은 염, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 있으며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.
- [0028] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양의 바닐릭산을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 전립선비대증의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말하며, 전립선비대증의 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다. 또한, 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에 따른 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 전립선비대증의 증상의 예방 및 개선용 조성물은 전립선비대증의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.
- [0031] 나아가 본 발명의 바닐릭산은 세포에 대한 독성을 유발하지 않고 부작용을 일으키지 않아 안정성이 있어 체내에 안심하고 사용할 수 있으므로, 본 발명은 다른 양태로서 바닐릭산을 포함하는 전립선비대증의 예방 및 개선을 위한 식품용 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명의 바닐릭산 화합물을 유효성분으로 포함하는 전립선비대증의 예방 및 개선용 식품 조성물은 전립선비대증 증상의 예방 및 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.
- [0033] 본 발명에 따른 전립선비대증 증상의 예방 및 개선용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조 식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명에서 상기음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음

료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 전립선비대증 증상의 예방 및 개선용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0036] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본 발명의 전립선비대증 증상의 예방 및 개선용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 전립선비대증 증상의 예방 및 개선용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0039] <실시예 1>

[0040] 실험재료 및 방법

[0041] <1-1> 시약

[0042] 바닐릭산($\geq 97\%$ 순도)은 Sigma-Aldrich Inc.(MO, USA)에서 구입하여 100% DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹였다. 프로피온산테스토스테론(testosterone propionate, TP)은 Wako pure chemical industries, Ltd(Osaka, Japan)에서, 피나스테리드(finasteride)($\geq 97\%$ 순도)는 Sigma-Aldrich Inc.(MO, USA)에서 각각 구입하였다. AR, ER α (estrogen receptor α) 및 SRC1에 대한 항체들은 Pierce biotechnology(IL, USA)에서, 5AR 및 34 β E12에 대한 항체들은 Abcam Inc.(MA, USA)에서, ARA70에 대한 항체는 Aviva systems biology(CA, USA)에서, α SMA에 대한 항체는 Sigma-Aldrich Inc.(MO, USA)에서 각각 구입하였다.

[0043] <1-2> 실험동물

[0044] 초기 체중이 200-220g인 12주령의 수컷 Sprague-Dawley(SD) 랫(rat)(n = 56)을 대한 실험동물센터(대한 바이오텍, 대한민국, 음성)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물들은 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도 및 상대습도 70%로 유지되는 무균실에서 12시간의 명(light)/암(dark) 주기로 사육하였다. 물과 실험실 표준 먹이(CJ Feed Co., Ltd., 대한민국, 서울)는 제한 없이 공급하였다.

[0045] <1-3> 실험방법

[0046] 실험동물의 사타구니 부분(inguinal region)에 TP(5 mg/kg)를 4주간 매일 피하주사하는 전처리를 통해 전립선비대증(BPH)을 유도하였다. 대조군을 설정하기 위해, 14마리의 랫(rat)에게는 TP 대신 옥수수 기름과 함께 에탄올을 처리하였다. 위 4주간의 전처리 후에 BPH가 유도된 랫들을 임의로 3그룹으로 나누고, TP 처리를 하지 않은 랫들은 정상 대조군으로 구분하였다. 이에 따라 실험대상 랫들은 다음 네 그룹으로 분리되었다: (a) 옥수수 기름과 함께 에탄올을 처리한 정상 대조군; (b) 옥수수 기름과 함께 TP를 처리한 BPH(전립선비대증) 그룹; (c) TP(5 mg/kg)와 함께 BPH 유도에 흔히 사용되는 5ARI 계열의 피나스테리드(finasteride)(1 mg/kg)를 처리한 양성 대조군 그룹; 및 (d) TP(5 mg/kg)와 함께 VA(5 mg/kg)를 처리한 그룹.

[0047] VA 및 Fi는 BPH 유도를 위한 4주간의 전처리 후에 6주간 하루에 한 번씩 실험동물에게 투여되었다. 실험동물들은 4주째와 6주째 희생되었다. 마지막 처리 후에 실험동물들을 밤새 굶기고 이산화탄소를 이용하여 안락사시켰다. 후대정맥(caudal vena cava)으로부터 혈액 샘플을 얻었다. 혈액을 함유한 관(tubes)을 실온에서 2시간 동안 유지하고, 4℃에서 3000 x g로 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 추가적인 실험에 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 손상되지 않은 본래대로의 전립선 조직을 조심스럽게 분리 및 제거하고, PBS로 세척한 뒤 무게를 재었다. 체중(100 g)에 대한 전립선 무게(g)의 비율로 상대적인 전립선 무게를 계산하였다. 전립선 조직을 반으로 나누어, 한 쪽 절반은 조직형태학적 분석을 위해 10% 포르말린(formalin)에 고정시키고 파라핀에 포매시켰고, 나머지는 추가적인 실험에 사용할 때까지 80℃에서 보관하였다.

[0048] <1-4> 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin and Eosin, H&E) 염색 및 면역조직화학(IHC)

[0049] 포르말린에 고정된, 파라핀-포매된 전립선 표본을 4μm 두께의 조직 섹션으로 절단하였다. 자일렌(xylene)에서 섹션들을 탈파라핀(deparaffinized)하고, 연속적인(serial) 알콜에서 재수화하였다. 150μl의 0.1 % 트립신 워킹 용액(trypsin working solution)(D.W. 7 ml 안에 트립신 0.4 ml, 칼슘 0.01 g, 염화물 0.01 g으로 구성)을 15 분간 처리한 후에, 위 섹션들을 소 태아 혈청(FBS)으로 블로킹하였다. H&E 염색을 위해, 위 섹션들을 헤마톡실린에서 5분간 염색한 후에, 물로 5분간 세척하였다. 그 후 공지의 방법에 따라 섹션들을 에오신으로 30초간 염색하고, 탈수화하고, 마운팅하였다. 면역염색을 위해 섹션들을 1:50의 비율로 희석한 AR, ERα, SRC1, 5AR, α SMA 또는 34βE12의 1차 항체들로 4℃에서 밤새 배양한 후, 1:500으로 희석한 HRP (horseradish peroxidase)-결합된 아피니퓨어(affinipure) 염소 항-토끼 IgG (Jackson Immunoresearch lab., PA, USA) 또는 HRP-결합된 아피니퓨어(affinipure) 염소 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch lab., PA, USA)와 함께 실온에서 30분간 배양하였다. 검출 시스템의 첨가에 이어, 과산화수소의 존재 하에 DAB (diaminobenzidine)를 사용하여 반응을 시각화하였다. 슬라이드는 Olympus IX71 Research Inverted Phase 현미경(Olympus Co., Tokyo, Japan)을 사용하여 확인하였고, 밀도는 ImageJ 1.47v 소프트웨어(National Institute of Health, MD, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0050] <1-5> 웨스턴 블랏팅 어세이(Western blotting assay)

[0051] 준비된 전립선 조직을 조각들로 자르고 Bullet Blender 균질화 키트(Next Advance Inc., NY, USA)를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 조직들을 얼음-냉각된 RIPA 버퍼로 용해시킨 후 4℃에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 불용성 물질들을 제거하였다. 다음으로, 추출된 단백질들의 총 농도를 브래드포트법을 이용하여 측정하였다. 상층액의 단백질들은 8% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하고, PVDF (polyvinylidenedifluoride) 막으로 이동시켰다. 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 및 5% 스킵 밀크(skim milk)를 함유한 0.05 % Tween-20 (TBST) (pH 7.6)으로 실온에서 1시간 동안 블락킹한 후, 막(membrane)을 TBST로 세척하고, 적절한 1차 항체(AR, SRC1 또는 5AR)와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 이어서 블랏(blot)들을 HRP (horseradish peroxidase)-결합된 아피니퓨어(affinipure) 염소 항-토끼 IgG(Jackson Immunoresearch lab., PA, USA) 또는 HRP-결합된 아피니퓨어(affinipure) 염소 항-마우스 IgG (Jackson Immunoresearch lab., PA, USA)와 함께 배양시켰다. PVDF (polyvinylidene difluoride) 막은 Millipore (MA, USA)에서 구입하였으며, 단백질 어세이 시약은 Bio-Rad (CA, USA)에서 구입하였다. 단백질 신호들의 화학발광 강도는 ImageJ 1.47v 소프트웨어(National Institute of Health, MD, USA)를 사용하여 정량화하였다.

[0052] <1-6> 통계분석

[0053] 데이터 값은 평균 ± S.D로 표시하였다. 평균 값들의 편차는 IBM SPSS Statistics 22 소프트웨어(International Business Machines Corp., NY, USA)를 사용한 one-way ANOVA 또는 one-tailed Student's t test로 분석하였다. P < 0.05 의 값을 통계적 유의성을 갖는 것으로 간주하였다.

[0054] <실시예 2>

[0055] 실험결과

[0056] <2-1> TP-유도 BPH 랫에서 전립선 샘플의 수집

[0057] 도 3A의 복부절개 사진에서처럼 전립선의 위치를 결정하였다. 복측 전립선(ventral prostate, VP) 및 배외측 전립선(dorsolateral prostate, DLP)을 도 3B (ventral view) 및 C (dorsal view)에 각각 나타낸 순서에 따라 절개하였다.

[0058] <2-2> VA가 전립선 무게에 미치는 영향

[0059] 도 4A는 본 발명의 일실시예에 따른 4종류의 실험동물 그룹들의 전립선 조직의 시각적 차이를 나타낸다. 체중, 총 전립선무게, VP (ventral prostate) 무게, 및 DLP (dorsolateral prostate) 무게를 표 1에 나타내었다.

【표 1】 VA가 전립선 조직의 무게에 미치는 영향

	B	C	VA	Fi
체중 (g)	503.4 ± 17.2	459.7 ± 40.6	459.3 ± 29.5	462.5 ± 17.9
총 전립선 (mg)	938 ± 91	1756 ± 319#	1188 ± 185*	1232 ± 228*
VP (mg)	578 ± 39	1196 ± 366#	724 ± 156*	713 ± 68*
DLP (mg)	360 ± 52	600 ± 70#	540 ± 221*	410 ± 53*

- 수치는 세 번의 개별적 실험들로부터 얻은 데이터들의 평균 ± S.D

- B, 정상 대조군 그룹; C, TP-유도 BPH 그룹; VA, VA 처리 BPH 그룹; Fi, finasteride 처리 BPH 그룹.

- # B와 비교할 때 $P < 0.05$; * C와 비교할 때 $P < 0.05$

[0060]

[0061] TP 처리와 무관하게 랫들의 체중에 유의성 있는 변화는 나타나지 않았다(표 1, 도 4B).

[0062] TP에 의해 유도된 BPH 그룹은 1756 ± 319 mg 의 총 전립선 무게를 나타냈으며, 이는 정상 대조군 그룹(938 ± 91 mg)에 비하여 818 mg이나 무거운 상당히 높아진 값이다. 반면에, TP 그룹에 비하여, VA 처리 그룹은 568 mg 이나 낮아진 총 전립선 무게(1188 ± 185 mg)를 나타냈으며, 피나스테리드(finasteride) 그룹(1232 ± 228 mg)은 524 mg이나 낮아진 무게를 나타냈다.

[0063] VP는 크기와 무게 모두에서 각 그룹의 DLP보다 컸다. 정상 대조군, TP-유도된 BPH 그룹, VA 처리 그룹, 피나스테리드 처리 그룹은 각각 578 ± 39 mg, 1196 ± 366 mg, 724 ± 156 mg, 713 ± 68 mg 의 VP 무게, 및 360 ± 52 mg, 600 ± 70 mg, 540 ± 2221 mg, 410 ± 54 mg 의 DLP 무게를 각각 나타내었다.

[0064] <2-3> VA가 전립선 지수(prostate index)에 미치는 영향

[0065] 전립선 지수는 체중(100 g)으로 전립선 조직(total, ventral, 또는 dorsolateral) 무게(mg)로 나뉘어서 계산하였다. 도 4C에 나타낸 바와 같이, TP의 투여는 정상 대조군 랫(Blank 그룹)에 비하여 총 전립선 무게 지수를 상당히 향상시켰다. 반면에 VA 처리는 TP 처리 그룹에 비하여 총 전립선 무게 지수를 상당히 감소시켰다.

[0066] TP 처리 그룹과 비교할 때, 피나스테리드 처리 그룹에서도 유사한 효과가 관찰되었다. 백분율로 나타낼 경우 VA 및 피나스테리드에 의한 억제효과는 TP-유도된 BPH 그룹과 비교할 때 각각 31.55% 및 29.78%였다.

[0067] VP 지수 및 DLP 지수에도 유사한 효과들이 관찰되었다(도 4D 및 E). 또한 TP의 투여는 VP 및 DLP 지수를 대조군(blank 그룹)에 비하여 상당히 향상시켰다. VA 그룹과 피나스테리드 그룹은 VP 및 DLP 지수를 TP 처리 그룹에 비해 상당히 감소시켰다. 억제 효과를 백분율로 나타내면, VP 지수에 대해서는 VA 그룹과 피나스테리드 그룹이

각각 39.33 % 및 34.73 %의 억제 효과를, DLP 지수에 대해서는 각각 23.22% 및 25.74%의 억제 효과를 나타냈다.

[0068] <2-4> VA가 상피 두께에 미치는 영향

[0069] 도 5A는 4주 및 6주차에 측정된 전립선의 상피 두께를 나타낸다. TP 처리 그룹($68.10 \pm 16.15 \mu\text{m}$)은 정상 랫 그룹($42.10 \pm 12.33 \mu\text{m}$)에 비해 4주차의 전립선 상피 두께에 있어서 상당한 증가($26.00 \mu\text{m}$)를 나타냈다. 하지만, 4주차에 VA 처리군($36.30 \pm 9.11 \mu\text{m}$)은 TP 처리군에 비하여 상피 두께를 상당히 감소($31.80 \mu\text{m}$)시켰으며, 피나스테리드 그룹($42.23 \pm 9.13 \mu\text{m}$)도 TP 처리군에 비하여 $25.87 \mu\text{m}$ 를 감소시켰다. 6주차에 측정된 상피 두께의 경우 역시 유사한 결과를 나타냈으나, 그 차이는 더 작았다. 즉, TP 그룹($74.77 \pm 24.27 \mu\text{m}$)은 정상 대조군($53.20 \pm 14.70 \mu\text{m}$)에 비하여 상피 두께를 상당히 증가($21.57 \mu\text{m}$)시켰고, VA 그룹($55.83 \pm 11.80 \mu\text{m}$)과 피나스테리드 그룹($54.67 \pm 15.41 \mu\text{m}$)은 TP 그룹에 비해 상피 두께를 상당히 감소시켰다(각각 $18.94 \mu\text{m}$ 및 $20.10 \mu\text{m}$ 감소시킴).

[0070] <2-5> VA가 내강(lumen) 면적 변화에 미치는 영향

[0071] TP의 투여로 인해 전립선 조직 세포의 내강(lumen) 면적은 정상(blank) 그룹에 비해 상당히 감소되었다. 하지만, VA를 4주간(도 5C) 또는 6주간(도 5D) 처리함에 따라 전립선 내강 면적이 BPH 그룹에 비해 상당히 증가($P < 0.05$)한 것을 확인하였다.

[0072] 또한, 피나스테리드를 4주간(도 5C) 및 6주간(도 5D) 매일 처리한 경우에도 TP 처리 그룹에 비해 전립선 내강 면적을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0073] 한편, VA를 6주간 처리한 경우보다 4주간 처리한 경우에 더 큰 효과를 확인할 수 있었으므로, 이후의 실험에서는 4주차의 전립선 샘플을 이용하였다.

[0074] <2-6> VA가 5 α -환원효소(5AR)의 단백질 발현에 미치는 영향

[0075] 각 그룹간의 5AR (5 α -reductase)의 차이를 조사하기 위하여, 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 5AR의 발현은 TP 처리에 의해 정상 대조군에서보다 거의 3배나 상승하였다. 반면에, VA 처리에 의해 5AR의 발현은 TP 처리군에 비해 46.73 %나 억제되었으며, VA의 이러한 억제 효과는 피나스테리드 처리군의 억제 효과(45.64 %)보다 높았다.

[0076] <2-7> VA가 안드로젠 수용체(AR)의 면역조직화학적 발현에 미치는 영향

[0077] 면역염색된 전립선 슬라이드에 대한 현미경 관찰로 BPH 진단의 주된 인자 중 하나인 AR (androgen receptor)의 발현을 조사하였다. TP 처리군은 정상 대조군에 비해 AR의 발현수준을 상승시켰다(도 7). VA 처리 및 피나스테리드 처리는 각각 52.66 % 및 67.58 %의 비율로 AR의 발현을 억제시켰다.

[0078] <2-8> VA가 에스트로젠 수용체(ER)의 면역조직화학적 발현에 미치는 영향

[0079] 전립선에서 ER α 및 ER β 의 자극이 증식 또는 항-증식 기작을 유도할 수 있다는 증거들이 보고된 바 있다(Ellem SJ, Risbridger GP. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. Ann N Y Acad Sci. 2009;1155:174-186).

[0080] 전립선의 면역염색 결과, TP-유도 BPH 그룹에서 ER α 의 수준이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 하지만, VA 처리는 ER α 발현을 TP 처리군에 비해 49.40 % 감소시켰으며, 피나스테리드 처리는 ER α 발현을 TP 처리군에 비해 74.05 % 감소시켰다(도 8).

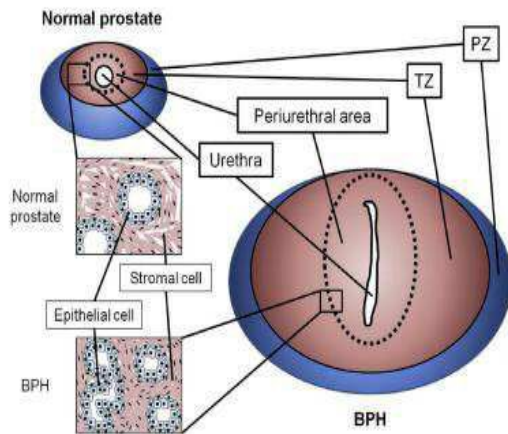
[0081] <2-9> VA가 스테로이드 수용체 공활성화 인자 1(SRC1)의 면역조직화학적 발현에 미치는 영향

- [0082] SRC1 (steroid receptor coactivator 1)은 최초로 동정된 스테로이드 수용체 작용 조절인자(steroid receptor action regulators)의 멤버이다(Onate SA, et al. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. Science. 1995;270(5240):1354-1357). SRC1은 AR과 상호작용하며, 리간드-종속적 및 독립적 전이활성(transactivation)을 모두 증가시켜 안드로겐-조절(androgen-regulated) 유전자들의 전사를 증가시킨다(Ueda T, et al. Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells. J Biol Chem. 2002;277(41):38087-38094; 및 Ma H, et al. Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins. Mol Cell Biol. 1999;19(9):6164-6173).
- [0083] 도 9에서와 같이, SRC1 양성 영역은 TP 처리에 의해 대조군에서 보다 매우 상향조절되었다. 반면에 VA 처리는 SRC1 발현을 72.50 % 정도 감소시켰으며, 피나스테리드 처리는 71.97 % 감소시켰다.
- [0084] <2-10> VA가 AR 및 SRC1의 단백질 발현에 미치는 영향
- [0085] 상기 IHC 결과들을 확인하기 위하여 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 도 10A에 나타난 바와 같이, VA 처리 그룹 및 피나스테리드 처리 그룹 모두 AR의 단백질 발현을 감소시켰으며, 그 억제율은 각각 51.13 %와 73.44 % 였다. 반면에, TP-유도 BPH 그룹은 정상 대조군에 비해 그 발현을 두 배 증가시켰다.
- [0086] 또한, SRC1의 단백질 발현을 측정하기 위하여 추가적인 웨스턴 블랏 분석을 수행한 결과, IHC 결과와 일치하게, SRC1은 TP 처리에 의해 증가하였으며, VA 처리는 SRC1 발현을 38.63 % 감소시켰고, 피나스테리드 처리는 47.54 % 감소시켰다(도 10B).
- [0087] <2-11> VA가 고분자량 사이토케라틴(cytokeratin) 34 β E12의 면역조직학적 발현에 미치는 영향
- [0088] 고분자량 사이토케라틴 34 β E12 (34 β E12)는 전립선암 상피의 기저세포(basal cell)에서는 발현되지만 암에서는 그렇지 않기 때문에, 이전 연구에서 고분자량 사이토케라틴 34 β E12 (34 β E12)는 전립선암에 대한 좋은 마커로 여겨졌다. 이전 연구에 따르면 34 β E12는 BPH 조직에서 면역염색에 의해 양성적으로 나타났으며, 특히 염증 주변 영역에서 나타났다(Mahapokai W, et al. Cell kinetics and differentiation after hormonal-induced prostatic hyperplasia in the dog. Prostate. 2000;44(1):40-48).
- [0089] 34 β E12의 향상된 수준은 비-암종 세포의 증식을 의미할 수 있다. 도 11에서와 같이, 34 β E12는 TP 처리 그룹에서 정상 대조군에 비해 상승하였다. 반면에 VA 처리 및 피나스테리드 처리는 34 β E12의 상승을 억제하여 거의 정상 대조군 수준의 발현량을 나타냈다.
- [0090] <2-12> VA가 α -평활근(smooth muscle) 액틴(actin)의 면역조직화학적 발현에 미치는 영향
- [0091] BPH의 원인이 아직 완전히 밝혀져 있지는 않지만, 섬유성근기질(fibromuscular stroma)의 형태 계측학적 우위(morphometrical predominance)는 그것이 주로 전립선 기질세포(stromal cell)들의 불균등한 과증식에 의해 발생한다는 것을 시사한다(McNeal J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. Urol Clin North Am. 1990;17(3):477-486; 및 Chagas MA, Babinski MA, Costa WS, Sampaio FJ. Stromal and acinar components of the transition zone in normal and hyperplastic human prostate. BJU Int. 2002;89(7):699-702). 또한, 기질세포의 아형(subtypes) 중에서, 활성화된 알파-평활근 액틴(α -smooth muscle actin, α SMA) 양성 근섬유아세포(myofibroblasts)는 BPH에서 연결조직의 주된 구성원이다(Schauer IG, et al. Elevated epithelial expression of interleukin-8 correlates with myofibroblast reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. Urology. 2008;72(1):205-213; 및 Schauer IG, et al. Keratinocyte-derived chemokine induces prostate epithelial hyperplasia and reactive stroma in a novel transgenic mouse model. Prostate. 2009;69(4):373-384).
- [0092] 이전의 연구결과들에 일치하게, TP 처리에 의해 α SMA의 발현은 5배까지 상향조절되었고, 상피 주변에 밴드와 유사한 형태를 만들었으나, VA 및 피나스테리드 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다(도 12).

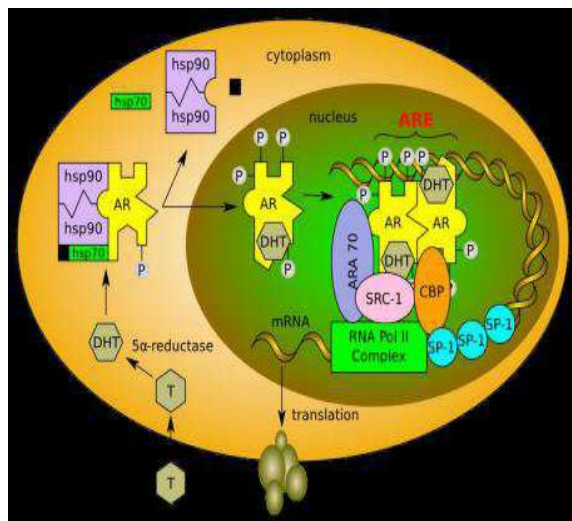
[0093] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

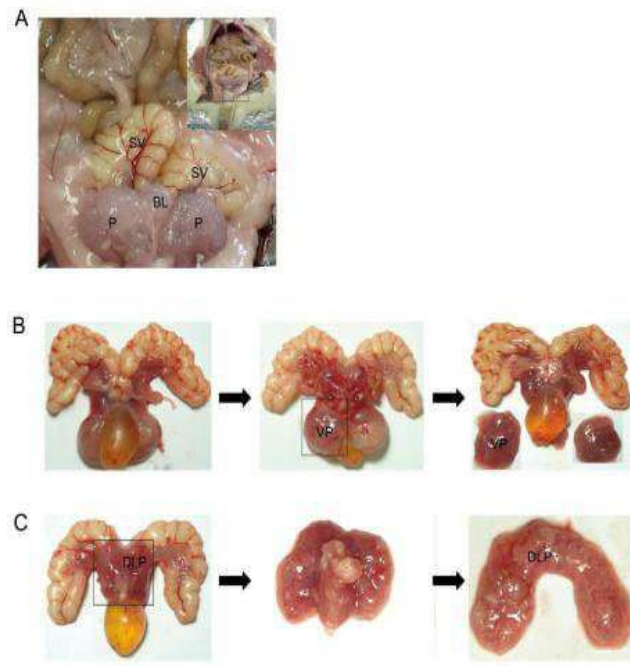
도면1



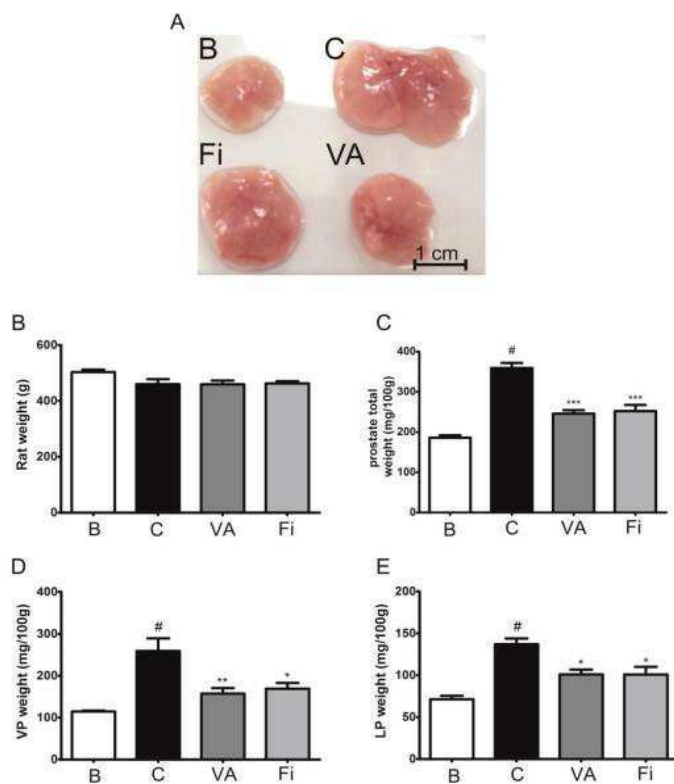
도면2



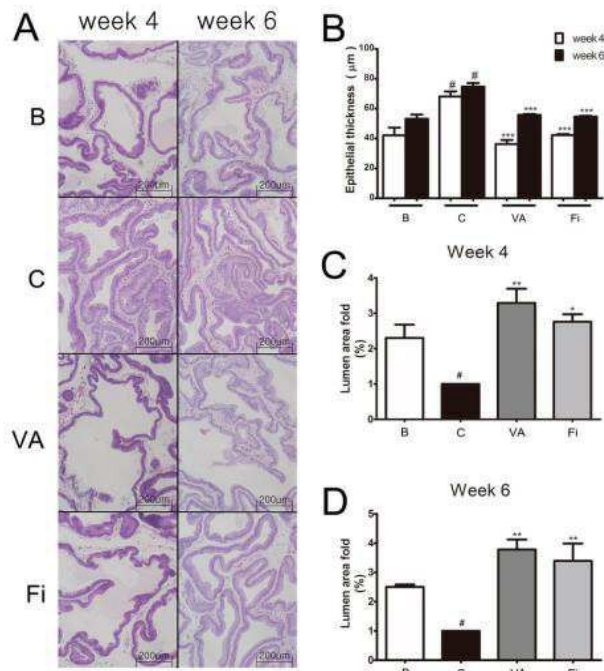
도면3



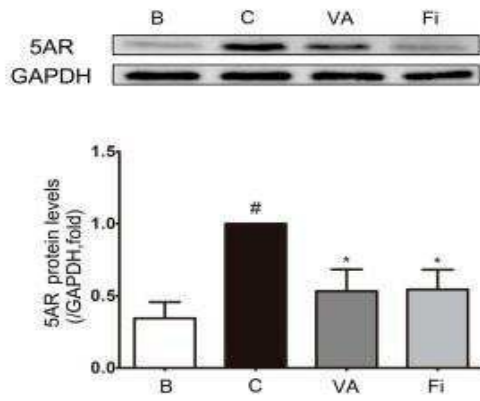
도면4



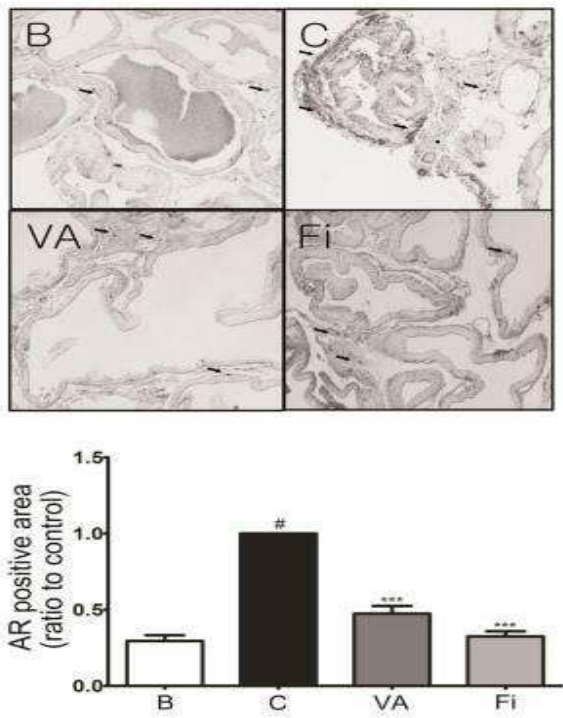
도면5



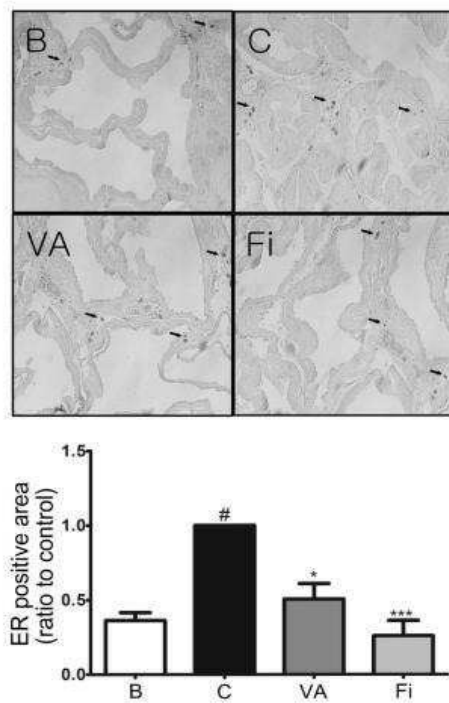
도면6



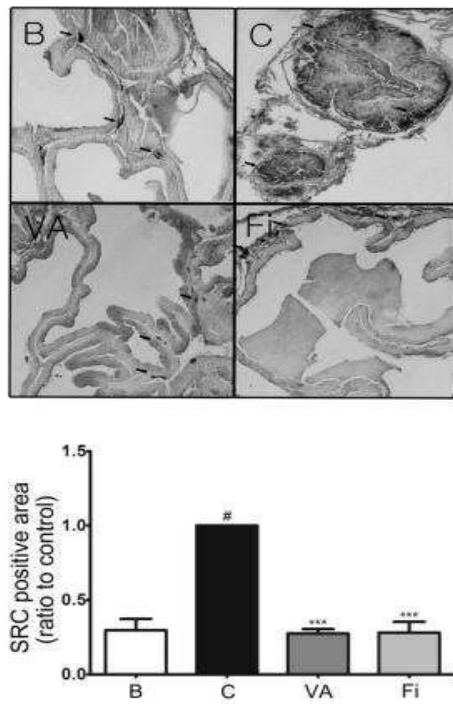
도면7



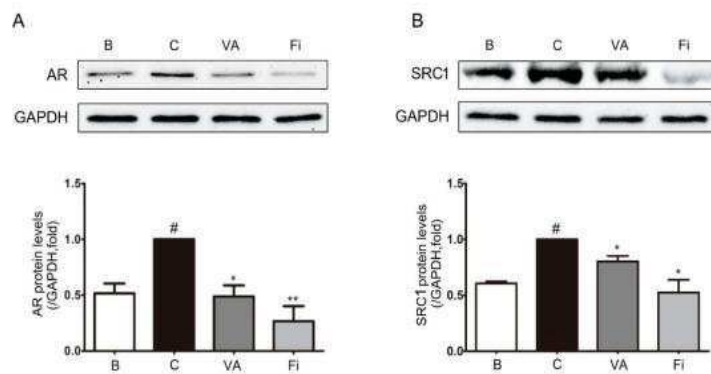
도면8



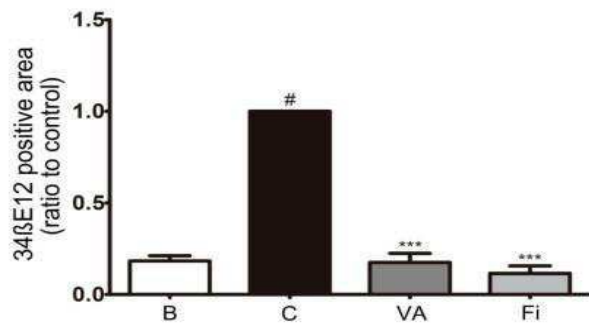
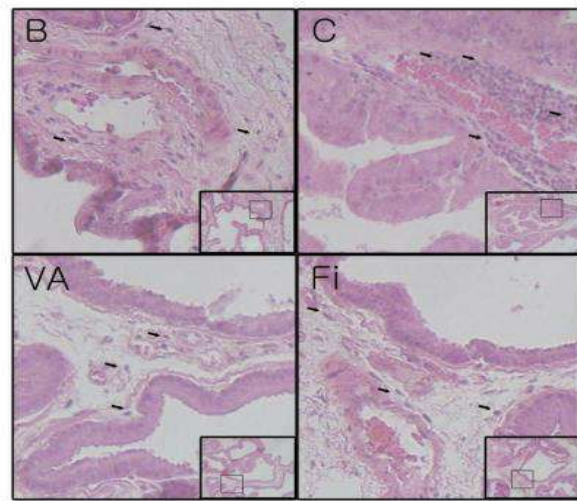
도면9



도면10



도면11



도면12

