



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0010100
(43) 공개일자 2016년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) A61K 31/045 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0090968
(22) 출원일자 2014년07월18일
심사청구일자 2014년07월18일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
최정혜
서울특별시 성동구 독서당로 191 극동아파트 8동 1111호
장대식
서울특별시 성북구 월계로 36길 27 꿈의숲대명루 쉼아파트 102동 201호
정승현
서울특별시 동대문구 회기로29길 62, 103호(회경동)
(74) 대리인
유지열, 이승열

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 이소싸이페롤의 신규 용도

(57) 요약

본 발명은 이소싸이페롤의 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity) 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 및/또는 예방을 위한 의약 및/또는 식품 용도를 제공한다. 본 발명에 의해 암과 같은 부작용 가능성이 없거나 적으며 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity) 중에서 선택된 하나 이상을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있다는 장점이 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0068979

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국학술진흥재단

연구사업명 여성과학자지원사업

연구과제명 천연물 유래 선택적 에스트로겐 수용체 조절제의 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교

연구기간 2009.05.01 ~ 2012.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A111881

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질병중심중개연구

연구과제명 자궁내막증의 진행에서 adipokine의 역할 규명

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교산학협력단

연구기간 2011.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

이소싸이페롤(isocyperol)을 유효성분으로 포함하는 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만(Obesity) 중에서 선택된 하나 이상의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만(Obesity) 중에서 선택된 하나 이상은 에스트로겐 부족에 의한 것인 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 에스트로겐 부족은 난소절제 또는 폐경 중에서 선택된 하나 이상에 의한 것인 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 골질환은 골다공증, 골감소증 또는 치주질환 중에서 선택된 하나 이상인 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 죽상경화증인 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병 또는 알츠하이머병 중에서 선택된 하나 이상인 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 치료 또는 예방은 유파틸린의 에스트로겐 활성화에 의한 것인 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 에스트로겐 활성화는 선택적 에스트로겐 활성화인 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 선택적 에스트로겐 활성화는 에스트로겐 활성을 나타내되, 선택적으로 암세포 증식효과를 나타내지 않는 것인 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 암세포는 유방암세포 또는 자궁내막암세포인 약학 조성물.

청구항 11

이소싸이페롤(isocyperol)을 유효성분으로 포함하는 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만(Obesity) 중에서 선택된 하나 이상의 개선 또는 예방용 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 이소싸이페롤의 신규 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 이소싸이페롤의 골질환(bone disease),

갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity)과 같은 에스트로겐 부족에 의한 질환 또는 증세의 치료, 개선 또는 예방 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 이소싸이페롤(isocyperol)은 히로시 히키노 등에 의해 구조가 밝혀진 화합물이나(Chem. Pharm. Bull. 15(12) 1929~1933(1967) 참조), 약리 효과 등에 대해서는 알려진 것을 찾기 어렵다.
- [0003] 한편, 에스트로겐(estrogen)은 난소에서 생산되는 호르몬으로, 생리주기조절의 기능 외에도 여러 장기에서 다양한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 간에서 콜레스테롤 생산을 조절하고, 뼈에서는 골밀도를 유지하고, 자궁벽의 성숙에 작용한다. 또한 최근에는 신경세포의 생존과 지방생성과정에도 중요하게 작용함이 밝혀졌다.
- [0004] 이와 같은 에스트로겐이 폐경기에 난소 기능의 정지로 인하여 체내 농도의 저하가 일어나면, 혈중 에스트로겐이 감소되어 열성홍조, 발한, 불면증, 우울증, 및 두통 등을 포함하는 통상 갱년기 장애가 나타나게 되고, 골밀도 감소로 인한 골 질환이 발생할 수 있다. 또한, 체내 에스트로겐 감소로 혈관계에서 플라크(plaque)가 형성될 위험이 증가하여 죽상경화증 등과 같은 심혈관계 질환이 일어나며 신경세포의 손상에 따른 파킨슨과 알츠하이머 같은 퇴행성뇌질환이 증가하고 지방생성과정의 조절부재에 따른 비만이 일어날 수 있다(Deroo BJ, Korach KS. (2006) "Estrogen receptors and human disease" J Clin Invest. Mar;116(3):561-70.PMID: 16511588).
- [0005] 이와 같은 에스트로겐 감소로 인한 갱년기 장애 등을 개선하기 위해 동물유래 에스트로겐을 투여하는 호르몬 요법이 사용되었으나, 이는 유방암, 심혈관계질환, 발작, 혈액응고 등의 잠재적 부작용이 있음이 WHI(Women's health initiative)의 광범위 무작위-위약-조절 연구발표를 통해 보고되었다(Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial". JAMA 288 (3): 32133. PMID 12117397, Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. (2004). "Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial". JAMA 291 (14): 170112. PMID 15082697).
- [0006] 따라서, 이와 같은 부작용 가능성이 없거나 낮으며, 에스트로겐효과를 나타내어 에스트로겐 부족으로 인한 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity) 등에 효과를 나타내는 물질의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Hiroshi Hikino, Keitaro Aota, Tsunematsu Takemoto (1967). "Structure and Absolute Configuration of Cyperol and Isocyperol". Chem. Pharm. Bull. 15(12)1929~1933(1967)
- (비특허문헌 0002) Deroo BJ, Korach KS. (2006) "Estrogen receptors and human disease" J Clin Invest. Mar;116(3):561-70.PMID: 16511588
- (비특허문헌 0003) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial". JAMA 288 (3): 32133. PMID 12117397.
- (비특허문헌 0004) Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. (2004). "Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial". JAMA 291 (14): 170112. PMID 15082697.

발명의 내용

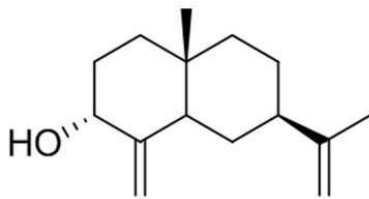
해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 암 등의 부작용 가능성이 없거나 낮으며, 에스트로겐 효과를 나타내어 에스트로겐 부족으로 인한 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만(Obesity) 등에 효과를 나타내는 물질의 신규 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 놀랍게도 하기 화학식 1로 표시되는 이소싸이페롤이 부작용 가능성이 없거나 낮으면서, 에스트로겐 활성을 나타냄을 알게 되어 본 발명을 완성하였다.

화학식 1



[0010]

[0011] 본 발명에서 '에스트로겐 활성'은 인간을 포함한 포유류의 체내에서 생성되는 에스트로겐이 나타내는 생리활성과 동일 또는 유사한 활성을 나타내는 것을 의미한다.

[0012] 본 발명은 이소싸이페롤의 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만(Obesity) 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 및/또는 예방을 위한 의약 및/또는 식품 용도를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 이소싸이페롤(isocyperol)을 유효성분으로 포함하는 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만(Obesity) 중에서 선택된 하나 이상의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 이소싸이페롤은 화학식 1로도 표시되는 공지의 화합물로, (7R)-4a-methyl-1-methylidene-7-prop-1-en-2-yl-2,3,4,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-ol라 명명된 것일 수 있다. 상기 이소싸이페롤은 합성된 것이거나, 이소싸이페롤을 함유하는 천연물에서 분리된 것일 수 있으며, 자체 제조하거나 시판되는 것일 수 있다. 상기 이소싸이페롤은 그의 약제학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있으며, 그 밖에 용매화물, 프로드럭의 형태일 수 있다.

[0015] 상기 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만(Obesity) 중에서 선택된 하나 이상은 에스트로겐 부족에 의한 것일 수 있으며, 상기 에스트로겐 부족은 난소절제 또는 폐경 중에서 선택된 하나 이상에 의한 것일 수 있다.

[0016] 상기 골질환은 바람직하게는 골다공증, 골감소증 또는 치주질환 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0017] 상기 심혈관계질환은 죽상경화증일 수 있다.

[0018] 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병 또는 알츠하이머병 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0019] 상기 치료 또는 예방은 이소싸이페롤의 에스트로겐 활성에 의한 것일 수 있으며, 상기 에스트로겐 활성은 선택적 에스트로겐 활성일 수 있다.

[0020] 상기 선택적 에스트로겐 활성은 에스트로겐 활성을 나타내되, 선택적으로 암세포 증식효과를 나타내지 않는 것일 수 있으며, 상기 암세포는 유방암세포 또는 자궁내막암세포일 수 있다.

[0021] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.1-99.9중량% 함유할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 이소싸이페롤(isocyperol)을 유효성분으로 포함하는 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease)

또는 비만 (Obesity) 중에서 선택된 하나 이상의 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.

[0023] 별도의 언급이 없는 한 상기 식품 조성물은 본 발명의 약학조성물에서 언급된 사항이 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다. 상기 '개선'은 '치료'에 포함되며, 상태 또는 증세가 호전되는 것을 의미한다.

[0024] 상기 식품조성물은 음료를 포함하는 식품에 다양하게 포함될 수 있고, 음료, 껌, 차, 건강기능식품 등의 형태일 수 있으며, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제 등의 제형으로 제제화할 수 있다. 상기 건강기능식품이라 함은 대한민국 건강기능식품에 관한 법률 제12669호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공을 포함한다. 이하 같다)한 식품을 말하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다. 상기 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 케톤류, 글리신, 구연산나트륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0025] 본 발명은 또한 이소싸이페롤을 투여를 필요로 하는 인간을 포함한 포유류에게 투여하는 단계를 포함하는 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity) 중에서 선택된 하나 이상의 치료 또는 예방법을 제공하며, 이소싸이페롤의 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity) 중에서 선택된 하나 이상의 치료 또는 예방용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다. 상기 투여되는 이소싸이페롤은 유효량의 이소싸이페롤일 수 있다.

[0026] 별도의 언급이 없는 한, 본 발명의 약학 조성물에서 언급된 사항은 모순되지 않는 한 본 발명의 방법, 및 용도에 동일하게 적용된다.

[0027] 상기 이소싸이페롤 또는 조성물은 인간을 포함한 포유류에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 유효성분을 약학적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 제제화하여 투여할 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 및/또는 젤라틴 등을 첨가하여 제조한다. 또한, 마그네슘, 탈크 등 윤활제도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및/또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 주사가 가능한 액제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 비강세척제 및 좌제가 포함된다. 주사가 가능한 액제, 현탁제, 유제는 물, 비수성용제나 현탁용제와 유효성분을 혼합하여 제조할 수 있으며, 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가 가능한 에스테르 등일 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및/또는 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사로 투여가능하다.

[0028] 본 발명의 조성물에 포함되거나, 용도 및 방법 중 사용되는 이소싸이페롤은 성인 여성 기준으로 1일 0.0001 ~ 100 mg/kg, 바람직하게는 0.001~10mg/kg의 용량으로 사용가능하다. 투여는 하루에 한번 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 범주는 상기 투여량 및 투여횟수에 의해 제한되지 않는다.

[0029] 상기 이소싸이페롤은 약학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등을 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 의해 암과 같은 부작용 가능성이 없거나 적으며 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity) 중에서 선택된 하나 이상을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 실시예 및 제조예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명하나, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하

기 위한 것일 뿐으로 본 발명의 내용이 하기 실시예나 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0032]

<실시예 1> 이소싸이페롤의 에스트로겐 활성 확인

[0033]

에스트로겐 활성을 나타내는 물질이 에스트로겐 부족으로 인한 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환 (neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity)에 효과적임은 잘 알려져 있다(Estrogen receptors and human disease. Deroo BJ, Korach KS. J Clin Invest. 2006 Mar;116(3):561-70. Review.PMID: 16511588 참조). 따라서, 에스트로겐이 다양한 에스트로겐 반응 세포(estrogen responsive cell)에서 에스트로겐과 유사한 활성을 나타냄을 다음 실험을 통해 확인함으로써, 이소싸이페롤이 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질환 (neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity) 등에 효과적임을 확인하였다.

[0034]

1-1. 이소싸이페롤의 준비

[0035]

이소싸이페롤(isocyperol; CAS NO.20085-00-1)은 향부자에서 분리하여 준비하였다. 2011년 경동시장(대한민국, 서울)에서 구입한 향부자를 장대식 교수(경희대학교, 대한민국)가 확인하고 경희대학교 약학대학 천연물화학실에 voucher specimen (CYR01-02011)로 기탁하였다. 기탁한 표본과 동일한 종류의 건조, 분쇄한 향부자(*Cyperus rotundus* L.) 근경 2.8 kg에 80% EtOH 10L를 가하여 상온에서 3반복 추출하고, 회전농축기로 감압농축하여 80% EtOH 추출물 399 g을 얻었다. 추출물을 증류수 2 L에 현탁시킨 후 2 L의 *n*-hexane을 가하여 총 3번 용매분획하여 *n*-hexane 분획물 45.8 g을 획득하였다. *n*-Hexane 분획에 대하여 silica gel 컬럼크로마토그래피($\phi 6.0 \times 44$ cm, 70-230 mesh, *n*-hexane-EtOAc = 1:0 $\rightarrow$ 0:1, 최종적으로 MeOH 100 % v/v)를 실시하여 18개의 분획물(H01~H18)을 얻었다. 이 중에서 분획물 H7[eluted with *n*-hexane-EtOAc (19:1 v/v); 2.08 g]에 대해 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피($\phi 3.6 \times 72$ cm, CH₂Cl₂-MeOH = 1:1 v/v)를 실시하여 isocyperol 60 mg을 분리하였다. 분리된 화합물의 구조는 NMR data 분석과 참고문헌과의 비교분석을 통하여 결정하였다.

[0036]

1-2. 세포의 준비

[0037]

MCF-7(에스트로겐 수용체 양성 인간 유방암 세포주), Ishikawa(에스트로겐 수용체 양성 자궁내막암 세포주), MG-63{인간 골육종(osteosarcoma); 골아세포(osteoblast) 유사 세포주}를 ATCC(American Type Culture Collection)에서 입수하였다. 세포는 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml 페니실린, 및 100 U/ml 스트렙토마이신이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eable's medium)에서 섭씨 37도, 5% 이산화탄소하에서 배양하였다.

[0038]

1-3. 루시페라제 실험(luciferase assay)

[0039]

루시페라제 실험은 에스트로겐 수용체에 에스트로겐 활성을 나타내는 물질이 결합하여 루시페라제 활성을 나타내는 정도를 측정함으로써 에스트로겐 활성 여부를 판정하는 실험으로, 하기와 같은 방법으로 실험하였다. 시약은 별도 언급이 없는 한 Gibco(Karlruhe, 독일)에서 구입한 것을 사용하였다.

[0040]

루시페라제 리포터 플라스미드는 3 $\times$ ERE TATA luc.(addgene, cambridge, 미국)를 사용하였고, 트랜스팩션을 조절하기 위해 내부 컨트롤 플라스미드인 phRenilla-luciferase-CMV (Promega, Mannheim, 독일)를 함께 트랜스팩션하였다. 배양은 6 웰 플레이트에 2×10^5 세포/웰의 농도로 하여, 100U/ml 페니실린, 100mg/ml 스트렙토마이신, 1mM 소듐 피루베이트, 1mM 글루타민, 및 차콜 텍스트란 처리된 10% fetal bovine serum(FBS)이 보충된 페놀레드 미함유 DMEM(Dulbecco's modified Eable's medium)에서 실시하였다. 세포를 50~60% 컨플루언스(confuence)로 배양한 후, 배지는 제거하였고 세포는 제조업자의 지시에 따라 섭씨 37도, 5% 이산화탄소 하에서 6시간 동안 플라스미드 DNA 컨스트럭트와 2 μ g/ml의 폴리에틸렌아민(PEI)를 함유하는 혈청미함유 OPTI-MEM 배지 상에 두었다. 웰당 1 μ g의 3 $\times$ ERE TATA luc와 100ng의 phRL-CMV 플라스미드를 트랜스팩션하였다.

[0041]

트랜스팩션 기간 경과 후, 차콜 텍스트란 처리된 10% FBS가 보충된 페놀미함유 DMEM으로 교체하였고, 세포는 이소싸이페롤 처리 전에 섭씨 37도, 5% 이산화탄소 하에서 하룻밤 배양하였다.

[0042]

18시간 배양 후 배지는 이소싸이페롤 함유 배지로 교체하였다. 단백질을 24시간 후 추출하였고, 제조사의 지시

에 따라 듀얼 루시퍼라제 애세이 키트(Dual Luciferase Assay kit; Promega, Madison, WI)를 이용하여 루미노 미터(luminometer, Molecular devices, Sunnyvale, CA)로 파이어플라이와 레닐라 루시퍼라제 활성(firefly and Renilla luciferase activity)을 측정하였다.

[0043] 모든 실험은 3배수로, 최소한 3회 실시하였다. 루시퍼라제 실험을 위해 총 세포 라이세이트(lysate)를 준비하여, 파이어플라이 루시퍼라제 활성을 분석하였고, 제조사(프로메가)의 지시에 따라 레닐라 루시퍼라제 활성으로 표준화하였다.

[0044] 비교를 위해 이소싸이페롤 대신 에스트로겐 활성 실험시 표준물질인 17-β-에스트라디올(이하, E2로 약칭한다.)을 처리한 군을 비교군으로 하였고, 이소싸이페롤이나 E2를 처리하지 않은 것을 제외하고 이소싸이페롤 처리군과 동일하게 처리한 미처리군을 대조군으로 하였다.

[0045] 이소싸이페롤과 E2 처리 농도는 하기 표 1~3에 기재되어 있으며, 미처리군에 대한 루시퍼라제 활성을 기준인 1로 하여 상대적인 배수를 표에 나타내었다.

[0046] 각종 세포에 대한 루시퍼라제 실험 결과를 하기 표에 나타내었다. 표 1은 MG63 세포에 대한 결과이고, 표 2는 이시가와 세포에 대한 결과이며, 표 3은 MCF7 세포에 대한 결과이다.

표 1

군 (농도)	미처리 (-)	E2처리 (10 ⁻⁷ M)	이소싸이페롤처리 (0.4uM)	이소싸이페롤처리 (2uM)	이소싸이페롤처리 (10uM)
루시퍼라제 활성 (배)	1.0	3.53	1.24	1.74	2.41

표 2

군 (농도)	미처리 (-)	E2처리 (10 ⁻⁷ M)	이소싸이페롤처리 (0.4uM)	이소싸이페롤처리 (2uM)	이소싸이페롤처리 (10uM)
루시퍼라제 활성 (배)	1.0	2.50	0.99	1.37	1.41

표 3

군 (농도)	미처리 (-)	E2처리 (10 ⁻⁷ M)	이소싸이페롤처리 (0.4uM)	이소싸이페롤처리 (2uM)	이소싸이페롤처리 (10uM)
루시퍼라제 활성 (배)	1.0	3.34	1.02	1.39	1.84

[0050] 상기 결과로부터 이소싸이페롤은 다양한 에스트로겐 반응 세포(estrogen responsive cell)인 유방암세포, 자궁 내막암세포, 골아세포 등에서 에스트로겐과 유사한 활성을 나타냄을 알 수 있다.

[0051] 이와 같은 결과로부터, 에스트로겐 활성을 나타내는 이소싸이페롤이 에스트로겐 부족에 의해 발생할 수 있는 골 질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 심혈관계질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌질

환 (neurodegenerative disease) 또는 비만 (Obesity) 등의 치료, 개선 및/또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0052] <실시예 2> 이소싸이페롤의 선택적 에스트로겐 활성화에 의한 부작용 억제 효과 확인

[0053] 종래 동물성유래 에스트로겐이 세포성장을 야기하여 위험요소(risk factor)가 될 수 있다고 알려진 유방암 세포와 자궁내막암 세포를 이용하여, 이소싸이페롤의 부작용 억제 효과를 확인하였다.

[0054] 구체적으로, BrdU(5-Bromo-3-deoxyuridine) assay를 이용하여, 이소싸이페롤의 부작용 억제 효과를 확인하였다.

[0055] 2-1. 이소싸이페롤의 준비

[0056] 실시예 1-1.에서와 동일한 방법으로, 이소싸이페롤을 준비하였다.

[0057] 2-2. 세포의 준비

[0058] 실시예 1-2.에서와 동일한 방법으로, 이시가와 세포와 MCF7 세포를 준비하였다.

[0059] 2-3. BrdU 실험(BrdU assay)

[0060] 세포증식의 정도를 파악하기 위해 상용화된 BrdU kit (Roche Molecular Biochemicals, Germany)를 사용하여, BrdU 실험(BrdU assay)을 실시하였다. 세포(1×10^5 세포수/ml)는 세포 배양판(12-well plate)에 분주 하여 섭씨 37도, 5% CO₂ 하에서 48시간 배양한 후, well 당 10 uM BrdU를 넣고 DNA가 분열할 때 결합하는 BrdU 농도를 측정하였다. 7일 배양 후 세포를 고정시키고 DNA를 변성(denaturation) 시킨 다음, 항-BrdU-POD 단클론 항체를 넣어 세포에 있는 BrdU에 결합시키고, 항원-항체 면역 복합체를 ELISA 플레이트 리더(ELISA reader, Thermo scientific, USA)를 이용하여 450 nm에서 O.D 값을 측정 하였다.

[0061] 이소싸이페롤과 E2 처리 농도는 하기 표 4 ~ 5에 기재되어 있으며, 아무것도 처리하지 않은 미처리군을 기준으로 상대적인 세포증식 정도를 표에 나타내었다.

[0062] 각각의 암세포에 대한 실험 결과를 하기 표에 나타내었다. 표 4는 이시가와 세포에 대한 결과이며, 표 5는 MCF7 세포에 대한 결과이다.

표 4

군 (농도)	미처리 (-)	E2처리 (10^{-7} M)	이소싸이페롤처리 (2uM)	이소싸이페롤처리 (10uM)
세포증식 (배)	1.00	1.22	1.01	1.02

표 5

군 (농도)	미처리 (-)	E2처리 (10^{-7} M)	이소싸이페롤처리 (2uM)	이소싸이페롤처리 (10uM)

세포증식 (배)	1.00	1.21	1.03	1.03
-------------	------	------	------	------

- [0065] 상기 결과로부터 이소싸이페롤은 에스트라디올과 달리 암세포 증식효과를 나타내지 않으므로, 유방암, 자궁내막암 등의 유발 가능성이 없거나 낮으므로, 에스트라디올과 같은 에스트로겐이 나타내는 부작용 가능성이 낮거나 없게 되는 효과가 있음을 알 수 있다.
- [0066] 결과적으로, 실시예 1~2에서 살펴본 바와 같이, 이소싸이페롤은 선택적으로 작용하여 에스트라디올과 같은 에스트로겐이 나타내는 부작용 가능성이 낮거나 없게 되며, 골질환 등에 효과적임을 알 수 있다.
- [0067] 따라서, 이소싸이페롤은 골다공증, 골감소증 또는 치주질환 등을 포함하는 골질환(bone disease), 갱년기 장애(menopausal disorder), 죽상경화증 등을 포함하는 심혈관계질환(cardiovascular disease), 파킨슨병 또는 알츠하이머병 등을 포함하는 퇴행성뇌질환(neurodegenerative disease) 또는 비만(Obesity) 중에서 선택된 하나 이상의 치료, 개선 및/또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.
- [0068] <제조예 1> 약학 조성물의 제조
- [0069] 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비한 이소싸이페롤 300mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0070] <제조예 2> 식품 조성물의 제조
- [0071] 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비한 이소싸이페롤(4중량%), 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량%), 및 식염(0.5중량%)에 물을 추가하여 잔량을 맞춘 후 균질하게 배합하여 순간 살균을 하여 건강음료를 제조하였다.