



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0056047
(43) 공개일자 2025년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 15/02 (2006.01) A61P 15/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2023.05)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0139934
(22) 출원일자 2023년10월18일
심사청구일자 2023년10월18일

(71) 출원인
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임화선
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 124동 901호
송지수
경기도 이천시 이여로101번길 101-4, 101동 601호
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호
(74) 대리인
공병욱

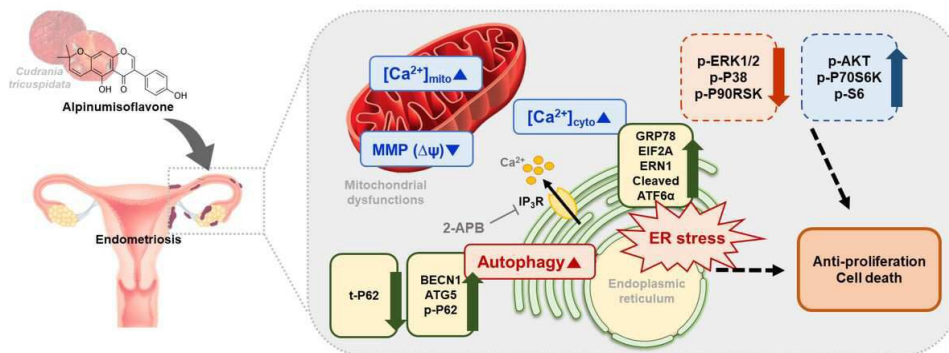
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 알피넴아이소플라본을 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 알피넴아이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 알피넴아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 이용하는 경우, 수술 및 호르몬 요법 대비 부작용이 적고 자궁내막증을 효과적으로 관리할 수 있어, 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61P 15/02 (2018.01)

A61P 15/08 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465039775
과제번호	HI22C1424000023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	공익적의료기술연구사업
연구과제명	자궁내막증 연계 가임력 저하 극복을 위한 염증소체 조절 GPCR 타겟 발굴 및 안전성
규명에 따른 임상 적용기반 연구	
기 여 율	40/100
과제수행기관명	성균관대학교산학협력단
연구기간	2021.07.01 ~ 2024.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711155899
과제번호	2021R1C1C1009807
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	멜라토닌에 의한 엑소좀 유래 운반 RNA 소편 기반 자궁내막증 개선 메커니즘 규명
기 여 율	30/100
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157986
과제번호	2021R1A2C2005841
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기
지표 개발	
기 여 율	30/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

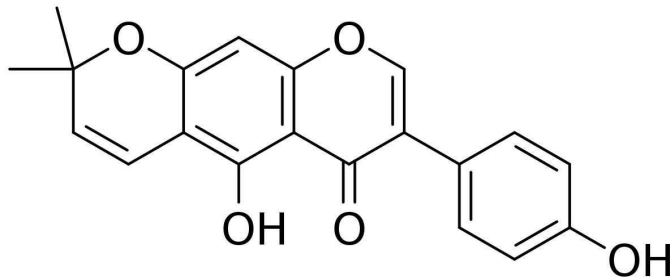
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 알피넨아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 알피넨아이소플라본 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 자궁내막 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 알피넨아이소플라본 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 자궁내막 세포 내 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하는 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 알피넨아이소플라본 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 자궁내막 세포 내 소포체 스트레스를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 알피넨아이소플라본 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 자궁내막 세포의 자가포식을 유도하는 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 6

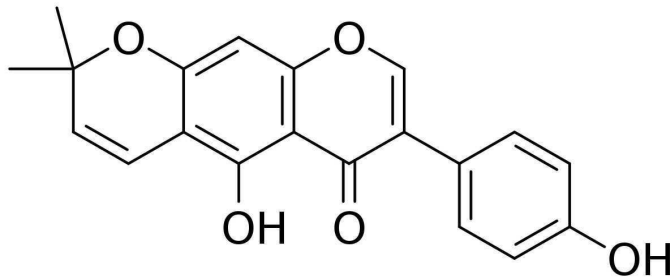
제1항에 있어서, 상기 자궁내막증 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁 외 임신 및 불임으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약제학적 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 알피넨아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물:

[화학식 1]



청구항 8

제7항에 있어서, 상기 자궁내막증 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁 외 임신 및 불임으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 건강기능 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알피넘아이소플라본(alpinumisoflavone)을 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 자궁내막증(endometriosis)은 가임기 여성 5~10%에 영향을 미치는 만성 부인과 질환으로, 자궁 외부의 난소, 골반, 장 또는 나팔관에 비정상적인 자궁내막 유사조직이 존재하는 부인과 질환이다. 자궁내막증의 증상으로는 골반통, 월경통, 배변통, 불임 등이 있고, 이러한 증상들로 인해 환자의 삶의 질이 저하되며, 난소암 유병률을 50% 이상 증가시킨다고 보고되었다. 자궁내막증의 발병 원인은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않아 정확한 진단이 어렵고, 최근에 들어서는 가임기 여성에서 자궁내막증의 유병률이 증가하고 있다.

[0004] 자궁내막증 치료를 위한 치료적 접근은 수술, 호르몬 요법, 또는 염증 억제 등이 있으며 주로 증상 완화에 초점을 맞추고 있다. 하지만, 수술의 경우, 재발 가능성이 높고, 호르몬 요법은 골감소, 무월경, 체중 증가, 우울증 등의 부작용이 유발되어, 치료의 한계가 존재한다.

[0005] 따라서, 자궁내막증 환자의 삶의 질 상생을 위해, 부작용이 적고 자궁내막증을 효과적으로 관리할 수 있는 치료제가 필요한 실정이다. 이에 따라, 최근 다양한 생리학적 효과를 나타내는 파이토케미컬을 기반으로 많은 연구가 진행되고 있다.

[0006] 알피넘아이소플라본(alpinumisoflavone)은 꾸찌뽕 나무의 열매로부터 유래된 프레닐화 아이소플라보노이드 계열 화합물 중 하나로 항에스트로겐, 항염증, 및 항골다공증 효능을 갖고 있다고 보고되었다. 뿐만 아니라, 알피넘아이소플라본은 난소암에서 세포증식을 억제하고, 세포사멸을 유도하는 항암 효과를 나타내며, 이외에도 간암과 신장암에서 항암효과를 나타낸다는 연구가 진행되어 있다. 하지만 알피넘아이소플라본의 자궁내막 세포의 증식을 억제하거나 세포사멸을 유도하는 효과는 알려진 바가 없다.

[0007] 본 발명자들은 자궁내막증의 예방, 개선 또는 치료에 유의한 효과를 제공하는 식물 유래 성분에 대해 연구한 결과, 꾸찌뽕 나무의 열매로부터 분리된 알피넘아이소플라본이 자궁내막 세포의 세포사멸 및 자가포식을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, 자궁내막 세포 내의 미토콘드리아 막전위 탈분극 및 칼슘이온 축적을 증가시키는 것을 확인하여, 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물로 사용될 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 미국 공개특허 US 2014/0011890 (2014.01.09 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 자궁내막증의 증상을 완화할 뿐 아니라, 질병의 진행을 억제하고 치료 및 예방에 유의한 효과를 제공하는 성분을 식물에서 발굴하고, 이를 포함하는 약제학적 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 알피넴아이소플라본이 자궁내막 세포의 세포사멸 및 자가포식을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, 자궁내막 세포 내의 미토콘드리아 막전위 탈분극 및 칼슘이온 축적을 증가시키는 것을 확인하여, 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물로 사용될 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 알피넴아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 알피넴아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물을 제공하는 것이다.

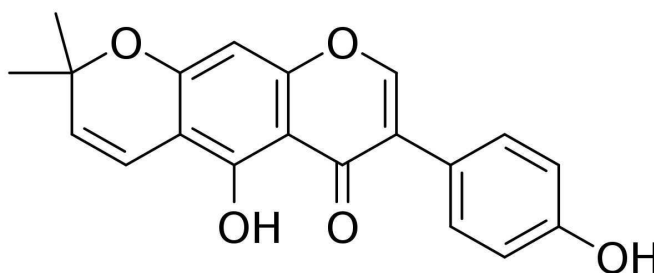
과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 자궁내막증의 증상을 완화할 뿐 아니라, 질병의 진행을 억제하고 치료 및 예방에 유의한 효과를 제공하는 성분을 식물에서 발굴하고, 이를 포함하는 약제학적 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 알피넴아이소플라본이 자궁내막 세포의 세포사멸 및 자가포식을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, 자궁내막 세포 내의 미토콘드리아 막전위 탈분극 및 칼슘이온 축적을 증가시키는 것을 확인하여, 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물로 사용될 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 알피넴아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 "알피넴아이소플라본(Alpinumisoflavone)"은, 꾸찌뽕 나무(*Cudrania tricuspidate*)의 열매로부터 유래된 프레닐화 아이소플라보노이드(prenylated isoflavonoid) 계열 화합물을 의미하며, 다음의 화학식 1로 표기된다:

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 "꾸찌뽕 나무(*Cudrania tricuspidate*)"는 우리나라를 포함하여 중국, 일본 등 동아시아에 널리 분포하는 뽕나무과(Moraceae)의 낙엽성 과수로, 다양한 약리 작용이 있는 것으로 알려지고 최근 그 효

능들이 과학적으로 밝혀지면서 각광받고 있다. 특히, 항균 및 항산화 작용, 항당뇨, 항고지혈증, 항고혈압, 항세포독성 등 다양한 기능성 소재 활용에 관한 연구가 보고되었으며, 이외에도 구찌뽕 나무로부터 추출된 다양한 유효한 성분의 새로운 활용 용도가 개척되고 있다.

[0020] 본 발명에 따른 상기 알피니아이스플라본은 무기산 또는 유기산으로부터 유도된 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 바람직한 염으로는 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산, 아세트산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 말론산, 석신산, 글루타르산, 푸마르산, 말산, 만델산, 타타르산, 시트르산, 아스코르빈산, 팔미트산, 말레인산, 하이드록시말레인산, 벤조산, 하이드록시벤조산, 페닐아세트산, 신납산, 살리실산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산 및 톨루엔설폰산으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명은 상기 알피니아이스플라본 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 이로부터 제조가능한 수화물, 용매화물 및 광학 이성질체를 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "수화물"은, 비공유적 분자간력(non-covalent intermolecular force)에 의해 결합된 화학양론적(stoichiometric) 또는 비화학양론적(non-stoichiometric) 량의 물을 포함하고 있는 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미한다. 본 발명의 상기 화학식 1으로 표시되는 화합물의 수화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 량의 물을 포함할 수 있다. 상기 수화물은 1당량 이상, 바람직하게는, 1당량 내지 5당량의 물을 함유할 수 있다. 이러한 수화물은 물 또는 물을 함유하는 용매로부터 본 발명의 상기 화학식 1으로 표시되는 화합물, 이의 이성질체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 결정화시켜 제조될 수 있다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "용매화물"은, 비공유적 분자간력에 의해 결합된 화학양론적 또는 비화학양론적 량의 용매를 포함하고 있는 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미한다. 그에 관한 바람직한 용매들로는 휘발성, 비독성, 및/또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들이 있다.

[0024] 본 발명에서 사용되는 용어 "이성질체 (isomer)"란, 동일한 화학식 또는 분자식을 가지지만 구조적 또는 입체적으로 다른 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미한다. 이러한 이성질체에는 호변이성질체 (tautomer) 등의 구조 이성질체와, 비대칭 탄소 중심을 가지는 R 또는 S 이성체, 기하이성질체 (trans, cis) 등의 입체 이성질체, 광학 이성질체(enantiomer)가 모두 포함된다. 이들 모든 이성질체 및 그것의 혼합물들 역시 본 발명의 범위에 포함된다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "유효성분으로 포함하는"이란, 상기 알피니아이스플라본의 약리학적 효능 또는 활성을 달성하는데 충분한 양을 포함하는 것을 의미하며, 약물의 전달, 안정화 및 제제화를 위하여 다양한 성분이 부가적으로 첨가될 수 있는 것을 포함하는 의미이다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어 "자궁내막증(endometriosis)"은 자궁내막 조직이 자궁 내강 표면 이외의 장소에서 증식하는 질환을 의미한다. 상기 자궁내막증은 가임기 여성의 약 10~15%에서 발생하며, 골반염, 골반유착, 난소 낭종, 자궁근종, 자궁 외 임신 및 불임의 중요한 원인이다. 자궁내막증의 병태생리를 보면 자궁내막 조직이 다른 조직 내로 침윤 또는 본래의 자리를 벗어나 원격 전이를 한다는 면에서 종양 세포와 상당히 유사한 성장, 발달을 한다고 할 수 있다.

[0027] 한편, 상기 자궁내막증은 병변의 위치와 침범된 장기, 병변의 정도에 따라 여러 가지 다양한 증상을 보이므로 진단이 어려운 질환에 속하며, 현재 자궁내막증의 진단에 사용되는 임상적 검사로는 질식 초음파 검사, 자기공명영상 검사(MRI), 혈액검사 또는 복강경 수술 검사 등이 있다. 최근 환자 개개인들의 유전적 특성을 이용하는 방법으로 자궁내막증의 여부를 진단하거나 치료 후 재발을 예측할 수 있는 유전적 지표를 활용하는 등 다양한 진단 방법이 개발되고 있다.

[0028] 상기 자궁내막증은 주로 복강 내 장기나 복막에 발생하며 장이나 폐 등 자궁과 멀리 떨어져 있는 인체 내 다른 장기에서도 발생할 수 있다. 난소에 발생하는 자궁내막증은 자궁내막종(endometrioma)이라고 일컫는다. 난소에 자궁내막증이 있는 경우 일반인보다 난소암 발생 위험성이 증가하게 된다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여에 의해 자궁내막증, 자궁내막증 합병증 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 보호적인 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여에 의해 자궁내막증, 자궁내막증 합병증 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게

변경하는 모든 행위를 의미한다.

- [0031] 본 발명에서 사용되는 용어 "약제학적 조성물"이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물로, 본 발명의 목적상 자궁내막증 자궁내막증 합병증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 예방하거나 또는 치료하기 위해 투여되는 것을 의미한다. 상기 약제학적 조성물은 약제학적 유효량의 알피넵아이소플라본 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다.
- [0032] 본 발명의 약제학적 조성물은 분말, 과립, 정제, 피복정제, 환제, 당의 정제, 캡슐제, 액제, 현탁액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 좌약, 관장제, 에멀전제, 페이스트제(pastes), 연고제, 크림제, 로션제, 산제, 분무제 또는 현탁액으로 제형화될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 락토오즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이다.
- [0034] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 부형제, 안정제, 희석제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용가능한 담체, 운반제, 부형제, 안정제 또는 희석제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0036] 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 자궁내막증, 자궁내막증 합병증 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상에 대한 예방, 경감 또는 치료적 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다. 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 조성물의 사용량은 환자의 나이, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 화합물이 자궁내막증의 치료에 유용한 혈중 농도가 되도록 충분한 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 조성물의 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 체중, 나이 등에 따라 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 약제학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 뇌내 투여, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 알피넵아이소플라본 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 자궁내막 세포의 증식을 억제한다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 자궁내막 세포는 질 점막(vaginal mucosa), 자궁(uterus), 자궁외경부(cervix) 및 자궁내경부(endocervix)로부터 유래한 세포일 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 자궁내막 세포는 구체적으로, 질 점막(vaginal mucosa)으로부터 유래한 VK2/E6E7 세포주일 수 있으며, 자궁(uterus), 자궁외경부(cervix) 및 자궁내경부(endocervix)로부터 유래한 End1/E6E7 세포주일 수 있다.

- [0044] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 상기 알피넵아이소플라본은 자궁내막 세포주의 세포주기 정지를 유도함으로써 자궁내막 세포의 증식을 억제시키는 것으로 확인되었다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 알피넵아이소플라본 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 자궁내막 세포 내 미토콘드리아의 기능 장애를 유발한다.
- [0046] 본 발명에서 사용되는 용어 "미토콘드리아 기능 장애"는, 정상적인 미토콘드리아의 생물학적 기능의 상실을 의미하며, 전자전달계(electron transport chain)의 효율 상실, ATP와 같은 고-에너지 분자의 합성 감소, 활성산소종(reactive oxygen species)의 생산 증가, 세포 호흡의 방해, 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential)의 감소, 미토콘드리아 단편화(mitochondrial fragmentation), 미토콘드리아 DNA의 돌연변이 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 미토콘드리아의 기능 장애는 다음 중 어느 하나를 포함한다: (a) 미토콘드리아의 막 전위의 탈분극; (b) 칼슘이온의 항상성 장애; (c) ATP 연관-세포 호흡의 감소; 또는 (d) 이들의 조합.
- [0048] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 상기 알피넵아이소플라본은 자궁내막 세포에서 미토콘드리아의 막 전위를 감소시켜 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 유도하고, 이로 인해 세포질 및 미토콘드리아 기질에서의 비정상적인 칼슘이온이 축적되어 칼슘이온의 항상성 장애를 일으키며, 자궁 내막중 세포의 기초 호흡, 최대 호흡, ATP 생산 등을 포함하는 세포 호흡을 억제시킴으로써, 미토콘드리아의 기능 장애를 유발시키는 것으로 확인되었다.
- [0049] 본 발명에서 사용되는 용어 "미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$)"는 산화적 인산화에서 에너지 저장 과정에 필수적인 양성자 펌프에 의해 생성되는 전위를 의미한다. 상기 미토콘드리아 막 전위는 본 발명이 속하는 분야에 널리 알려진 통상적인 방법, 예를 들어, JC-1, Rhodamine B hexyl ester, MitoTracker Red CMXRos, Rhodamine 6G, DiS-C3(3), HRB & HR101 또는 TMRE(tetramethylrhodamine, methyl ester) 염색 방법 등을 이용하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에서 칼슘 이온의 세포 내 전기화학적 전위는 다양한 이온 채널, 펌프 및 교환체에 의해 유지되어 다양한 세포 신호 경로를 조절하는 역할을 한다. 특히, 칼슘 이온 신호는 세포 증식과 세포 자멸사를 조절하는 활성산소(ROS)의 생산과 밀접한 관련이 있다. 교란된 칼슘 이온의 항상성은 심각한 산화 스트레스를 유발할 뿐만 아니라, 칼슘 이온 저장소로 작용하는 미토콘드리아에 칼슘 이온 스트레스를 가하여 미토콘드리아와 미토콘드리아의 막에 유해한 영향을 미친다. 따라서, 칼슘 이온의 항상성 장애는 미토콘드리아 외막의 불안정화를 유도함으로써, 미토콘드리아의 심각한 기능 장애를 초래한다.
- [0051] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 알피넵아이소플라본 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 자궁내막 세포 내 소포체 스트레스를 증가시킨다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 소포체는 스트레스 감지, 신호 기능 및 세포 소기관의 항상성 조절과 같은 주요 기능을 수행하는 역할을 한다. 소포체 스트레스는 칼슘 이온을 세포질로 내보내는 것과 관련이 있으며, 세포질에 칼슘 이온이 축적되면 자가포식 및 세포사멸 경로가 억제된다. ERN1(IRE1A로도 알려짐)의 활성화는 소포체 매개 미토콘드리아 세포사멸을 유도하고 MAPK/JNK의 활성화를 통해 BCL-2의 항세포사멸 효과를 억제한다. 인산화된 EIF2A는 단백질 번역을 억제하고 GADD43의 발현을 촉진하는데, 이는 성장 억제와 관련이 있다.
- [0053] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알피넵아이소플라본은 GRP78, p-EIF2A, ERN1 및 ATF6 α 와 같은 단백질의 발현을 증가시켜 세포 내 스트레스를 증가시키는 것으로 확인되었다.
- [0054] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 알피넵아이소플라본 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 자궁내막 세포의 자가포식(autophagy)을 유도시킨다.
- [0055] 본 발명에서 사용되는 용어, "자가포식(autophagy)"이란, 손상된 소기관 및 기타 세포 구성 요소에 대한 분해 과정을 의미하며, 세포 생존을 촉진하거나 세포 사멸을 유도한다. 최근 자가포식은 세포 사멸 경로로 인식되었으며, 여기서 세포 사멸 기능은 소포체 스트레스와 PI3K/AKT/mTOR의 하향 조절을 통해 유도될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알피넵아이소플라본은 자가포식의 단백질 발현을 증가시키고 AMPK 인산화를 증가시켜 자가포식을 유도시키는 것으로 확인되었다.
- [0057] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 자궁내막 세포의 증식과 관련된 신호전달기전을 조절하

는 것을 특징으로 한다.

- [0058] 보다 구체적으로, 상기 억제학적 조성물은 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 "PI3K(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)"은 세포 주기, 세포 운동성 및 세포사멸(apoptosis)와 같은 많은 세포성 기능에 관여하는 신호전달 분자이다. PI3K는 세린/트레오닌 키나아제(kinase), 예를 들어 PDK1 및 AKT를 포함하는 일부 단백질을 활성화시키는 제2메신저(messenger) 분자를 생산하는 지질 키나아제이다. PI3K는 3개의 클래스로 나뉘어지고, 클래스 I은 PI3K α , PI3K β , PI3K δ 및 PI3K γ 로 불리는 4개의 상이한 PI3K를 포함한다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 "MAPK(mitogen-activated protein kinase)"신호전달기전은 세포의 성장, 분화 및 스트레스 반응과 같은 세포 활동과 연관이 있다. 이는 하위 조절 단백질의 인산화를 통해 활성화되는 MAPK 신호전달 캐스케이드로서, 7개의 MAPKK 동족체뿐만 아니라, 4개의 대등한 MAPK 경로로 ERK1/ERK2, JNK, 및 p38가 잘 알려져 있다.
- [0061] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알피넨아이소플라본은 PI3K/AKT 신호전달기전의 하위 조절단백질인 AKT, P70, 및 S6 단백질, 또는 MAPK 신호전달기전과 관련된 ERK1/2, P38, 및 JNK 단백질 인산화 양상을 조절함으로써 자궁내막 세포의 세포증식을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [0062] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 자궁내막증 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁 외 임신 및 불임으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 알피넨아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 억제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물을 제공한다.
- [0064] 본 발명에서 사용된 용어 "개선"이란, 본 발명에 따른 알피넨아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0065] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드(monosaccharide), 예를 들어 포도당(glucose), 과당(fructose) 등; 디사카라이드(disaccharide), 예를 들어 말토스(maltose), 수크로오스(sucrose), 올리고당(oligosaccharide) 등; 및 폴리사카라이드(polysaccharide), 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨(xylitol), 소르비톨(sorbitol), 에리트리톨(erythritol) 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 및 합성 향미제를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분 외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식품 조성물은 건강기능식품을 포함한다. 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6722호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 식품을 의미한다.
- [0067] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡슐 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기준에 공인된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과

립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0068] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 자궁내막증 합병증은 골반염, 골반유착, 난소낭종, 자궁근종, 자궁 외 임신 및 불임으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0069] 본 발명의 식품 조성물의 경우, 상술한 본 발명의 일 양태인 약제학적 조성물에 포함된 알피넨아이소플라본을 그대로 이용가능하며, 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복되는 내용을 원용하며, 그 기재는 생략하도록 한다.

발명의 효과

[0071] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0072] (a) 본 발명은 알피넨아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0073] (b) 본 발명은 알피넨아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물을 제공한다.

[0074] (c) 본 발명의 알피넨아이소플라본(Alpinumisoflavone) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 이용하는 경우, 수술 및 호르몬 요법 대비 부작용이 적고 자궁내막증을 효과적으로 관리할 수 있어, 자궁내막증 및 자궁내막증 합병증의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0076] 도 1은 자궁내막 세포 내 알피넨아이소플라본이 세포증식, 세포주기, 세포의 이동성에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸다.

도 2는 자궁내막 세포 내 알피넨아이소플라본 처리에 따른 세포사멸 유도 및 미토콘드리아 막 전위 손실을 분석한 결과를 나타낸다.

도 3은 자궁내막 세포 내 알피넨아이소플라본 처리에 따른 세포 내 및 미토콘드리아 내 칼슘이온 축적 양상을 분석한 결과를 나타낸다.

도 4는 자궁내막 세포 내 알피넨아이소플라본과 칼슘 억제제 병용 처리에 따른 칼슘이온 축적 양상의 변화를 분석한 결과를 나타낸다.

도 5는 자궁내막 세포 내 알피넨아이소플라본 처리에 따른 미토콘드리아 호흡의 변화를 분석한 결과를 나타낸다.

도 6은 자궁내막 세포 내 알피넨아이소플라본 처리에 따른 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 경로 관련 단백질 발현을 측정된 결과를 나타낸다.

도 7은 자궁내막 세포 내 알피넨아이소플라본 처리에 따른 소포체 스트레스 및 자가포식 조절 단백질의 활성 조절 효과를 측정된 결과를 나타낸다.

도 8은 자궁내막 세포 내 알피넨아이소플라본에 의한 세포 증식 억제 기전 및 세포사멸 기전을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0079] 실시예

[0081] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 “% “는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0083] 실험예 1: 세포 배양

[0084] 자궁내막 세포주인 VK2/E6E7, End1/E6E7 세포는 ATCC에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층 배양을 위해 케라티노사이트 무혈청 배지 및 DMEM/F12 1:1 배지에 10% FBS가 함유된 배지를 사용하였다. 정상 상피세포는 Lifeline cell technology (Frederick, MD, UA)에서 구매하여 사용하였으며, ReproLife™를 사용하였다. 자궁내막 세포주(VK2/E6E7, End1/E6E7) 및 정상 세포주는 37℃, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

[0086] 실험예 2: BrdU를 이용한 알피넨아이소플라본의 세포 증식 억제 분석

[0087] 본 발명자들은 알피넨아이소플라본 처리시, 자궁내막 세포의 증식능력에 미치는 영향을 확인하고자, brdU 세포 증식 평가를 진행하였다.

[0088] 먼저, 배양한 5×10^3 개의 VK2/E6E7, End1/E6E7, 정상 상피 세포를 각각 배지와 함께 96 well에 분주하였다. 그 후, 알피넨아이소플라본을 용량 의존적 (0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M)으로 처리하여 48시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 실험을 수행하였다.

[0089] 구체적으로, 48시간 배양 후, 10 μ M BrdU(Bromodeoxyuridine)를 각 well에 넣고, 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 배양하였다. 그 다음, 세포를 고정하고 anti-BrdU-POD 용액을 넣고, 상온에서 90분 동안 반응시킨 후, 세 차례 세척하였다. 마지막으로 100 μ L의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate을 넣은 후 반응시키고, ELISA 리더기를 이용하여 370 nm, 492 nm의 파장대에서 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다. 이외에도 5 μ M 2-Aminoethoxydiphenyl borate과 함께 알피넨아이소플라본을 처리하거나 처리하지 않은 조건에서 BrdU를 이용해서 세포증식을 측정하였다.

[0091] 실험예 3: 세포 주기 분석

[0092] 본 발명자들은 알피넨아이소플라본에 의한 자궁내막 세포의 세포주기 변화 양상을 확인하기 위하여, 유세포 분석을 진행하였다.

[0093] 구체적으로, 배양한 5×10^3 개의 VK2/E6E7, End1/E6E7, 정상 상피 세포에 알피넨아이소플라본을 용량 의존적 (0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M)으로 처리하고 48시간 동안 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

[0094] 그 다음, 트립신을 사용하여 세포를 배양접시에서 떼어낸 후, 0.1% BSA/PBS로 워싱을 진행하였고, 70% 에탄올을 이용하여 24시간 동안 세포를 고정시켰다. 이후, 0.1% BSA/PBS로 세척하고 RNase A(Sigma) 처리 하에서 PI 염색을 수행하였다. 염색된 용액을 FACS 튜브에 옮기고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도 및 세포 주기를 분석하였다.

[0096] 실험예 4: 세포 이동성 분석

[0097] 본 발명자들은 알피넨아이소플라본이 자궁내막 세포의 이동성에 미치는 영향을 측정하기 위해, Ibidi사의 이동 배양 접시 인서트(Migration culture dish insert)를 사용하여 세포 이동성을 분석하였다.

[0098] 구체적으로, 자궁내막 세포 (VK2/E6E7, End1/E6E7)를 배양 접시 내 구획된 칸에 넣고, 세포가 가득 메워질 때까지 배양하였다. 이후, 배양 접시 내 구획을 위한 삽입물을 제거하여 세포와 세포 간 이동할 수 있는 500 μ m의 공간을 확보하였다. 그 다음, 알피넨아이소플라본이 포함된 배지를 넣고, 추가적으로 세포를 37℃, 5% CO₂ 인큐

베이터 내 배양시켰다. 배양 중, 세포 간 상호작용 및 이동성에 의해 세포 사이 공간이 메워지는 양상을 광학현미경 DM3000 (Leica)로 관찰 및 이동한 공간을 촬영한 뒤, 이동거리를 계산하여 정량화하였다.

[0100] **실험예 5: Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석**

[0101] 본 발명자들은 알피넵아이소플라본에 의한 자궁내막 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포사멸 진단 키트 I (BD Sciences)를 사용하여 실험을 진행하였다.

[0102] 먼저, VK2/E6E7, End1/E6E7 세포를 6 well에 배양한 다음, 알피넵아이소플라본을 용량의존적(0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M)으로 처리하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 이후 트립신을 사용하여 세포를 떼어내고 PBS로 세포를 세척하였다. 그 다음, 1 mL의 1X binding buffer와 세포를 천천히 혼합시키고, 원심 분리하여 세포 Pellet을 획득하였다. Pellet에 200 μ L의 1X binding buffer를 넣고, 세포를 재현탁한 후, 1.5 mL의 브라운 튜브에 현탁액 100 μ L를 옮기고 Annexin V와 PI 5 μ L를 첨가하여 15분 동안 실온 조건에서 세포를 염색시켰다. 이후, 1X binding buffer를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮기고, 유세포 분석기로 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0104] **실험예 6: JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정**

[0105] 본 발명자들은 알피넵아이소플라본에 의한 자궁내막 세포의 미토콘드리아 막전위 변화 (MMP)를 확인하기 위해, mitochondria staining kit (Cat no: CS0390, sigma-aldrich)를 사용하여 미토콘드리아 막전위를 측정하였다.

[0106] 구체적으로, 자궁내막 세포주 End1/E6E7 및 VK1/E6E7을 6 well에 배양한 뒤, well에 알피넵아이소플라본을 용량의존적(0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M)으로 첨가하고 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 떼어내고 원심분리를 하여 세포 pellet을 획득하였다. 세포 pellet은 JC-1 staining solution에 재현탁 후, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분간 배양하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하고 1X JC-1 staining buffer로 위상한 후, 유세포 분석기를 이용해 미토콘드리아 막전위 변화를 분석하였다.

[0108] **실험예 7: Fluo-4 및 Rhod-2 염색을 통한 세포 및 미토콘드리아 내부 칼슘 농도 분석**

[0109] 본 발명자들은 알피넵아이소플라본에 의한 자궁내막 세포 내 또는 미토콘드리아 내 칼슘 농도를 확인하기 위해, 3 μ M의 fluo-4 acetocymethyl ester (AM) (invitrogen)와 3 μ M rhod-2를 사용하여 실험을 진행하였다.

[0110] 먼저, 세포를 6 well에 배양한 뒤, 알피넵아이소플라본을 용량의존적(0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M)으로 처리하거나, 2-Aminoethoxydiphenyl borate(2-APB)와 병용으로 처리하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어내고, PBS로 세척하였다. 세척 후, 3 μ M의 fluo-4 또는 3 μ M rhod-2를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 20분간 세포를 염색시켰다. 염색이 완료되면, PBS로 위상을 진행하고 FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포분석기로 형광 강도를 분석하여 세포 내 또는 미토콘드리아 내 칼슘 농도를 측정하였다.

[0112] **실험예 8: 미토콘드리아 호흡 조절 분석**

[0113] 본 발명자들은 알피넵아이소플라본의 자궁내막 세포에 대한 미토콘드리아 호흡 조절 효과를 확인하기 위해, XF Cell mitostress 키트를 구입하여 실험을 진행하였다.

[0114] 구체적으로, 자궁내막 세포를 24 well에 접종하고, 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 16시간 배양한 다음, 알피넵아이소플라본 50 μ M을 처리하였다. 이후, 두 세포주에 올리고마이신, FCCP, 로테논 및 안티마이신 A를 연속으로 처리하여 다양한 미토콘드리아 호흡 매개 변수를 계산하였다.

[0116] **실험예 9: 단백질 발현 분석**

[0117] 본 발명자들은 알피넨아이소플라본 처리 시, 자궁내막증 발달과 관련된 단백질 발현을 분석하기 위해, western blot 분석을 진행하였다.

[0118] 구체적으로, 자궁내막 세포에 알피넨아이소플라본을 용량 의존적 또는 신호전달 기전 억제제와 병용 처리한 다음, 처리된 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-red, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95℃에서 5분간 변성하였으며, 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동을 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주었다. 그 후, membrane에 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음, cheiluminescence detection (Supersignal west pico, pierce, Rockford, IL, USA) 시약을 사용하여 chemiDoc EQ system과 Quantity one software (Bio-red) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0120] **실험예 10: 통계 분석**

[0121] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0123] **실시예 1: 인간 자궁내막 세포주에서 알피넨아이소플라본의 세포 증식 억제 효과**

[0124] 본 발명자들은 알피넨아이소플라본의 자궁내막 세포 증식 능력에 미치는 영향을 확인하고자, brdU 세포 증식 평가, 세포 주기 분석, 세포 이동성 분석을 진행하였으며, 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0125] 도 1의 A에 나타난 바와 같이, 알피넨아이소플라본은 자궁내막 세포의 증식을 End1/E6E7에서 64%, VK2/E6E7에서 51% 정도 감소시켰다. 또한, 도 1의 B에 나타난 바와 같이, 정상세포주에 알피넨아이소플라본을 처리하여 독성을 확인한 결과, 세포 증식이 18%만 감소하였다.

[0126] 또한, 자궁내막증 발달과 관련된 에스트로겐 수용체 베타의 발현을 확인한 결과, 알피넨아이소플라본 처리에 의해 에스트로겐 수용체 베타 발현이 감소하였고 (도 1의 C), 세포주기 및 세포 이동을 통해서 알피넨아이소플라본이 자궁내막 세포증식에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다 (도 1의 D 및 E).

[0127] 따라서, 이러한 결과는, 알피넨아이소플라본은 자궁내막 세포주에서 세포 증식을 억제시켜 자궁내막증 치료에 도움을 줄 수 있다는 것을 의미한다.

[0129] **실시예 2: 인간 자궁내막 세포에서 알피넨아이소플라본 처리에 따른 미토콘드리아 막전위 및 세포사멸 유도 양상 분석**

[0130] 본 발명자들은 알피넨아이소플라본이 자궁내막 세포에서 세포사멸 및 미토콘드리아 막전위 손상을 유도하는지 확인하고자 하였으며, 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0131] 도 2의 A에 나타난 바와 같이, 알피넨아이소플라본은 End1/E6E7에서 최대 197%, VK2/E6E7에서 최대 334%까지 용량 의존적으로 세포사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

[0132] 미토콘드리아 막전위 탈분극을 유도함으로써 미토콘드리아 기능에 미치는 영향을 분석한 결과, 알피넨아이소플라본은 자궁내막 세포주인 End1/E6E7에서는 최대 217%, VK2/E6E7에서는 최대 720%까지 미토콘드리아 막 손실 비율을 증가시키는 것을 확인하였다.

[0133] 따라서, 이러한 결과는 알피넨아이소플라본이 미토콘드리아 기능 장애를 기반으로 자궁내막 세포의 사멸을 유도시켜 자궁내막증 치료에 도움을 줄 수 있다는 것을 의미한다.

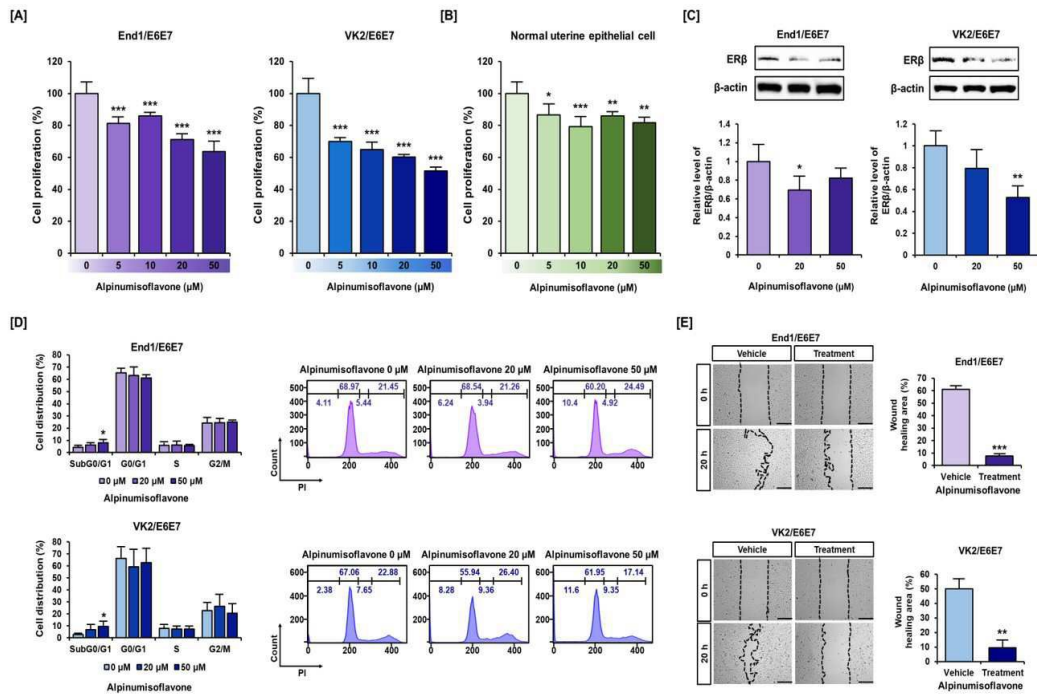
[0135] **실시예 3: 알피넨아이소플라본에 의한 자궁내막 세포질 및 미토콘드리아 내 칼슘이온 농도 증가 양상 분석**

[0136] 본 발명자들은 알피넨아이소플라본이 자궁내막 세포에서 세포질 및 미토콘드리아 내 칼슘이온 농도 증가 양상을 분석하였으며, 그 결과는 도 3 및 도 4에 나타내었다.

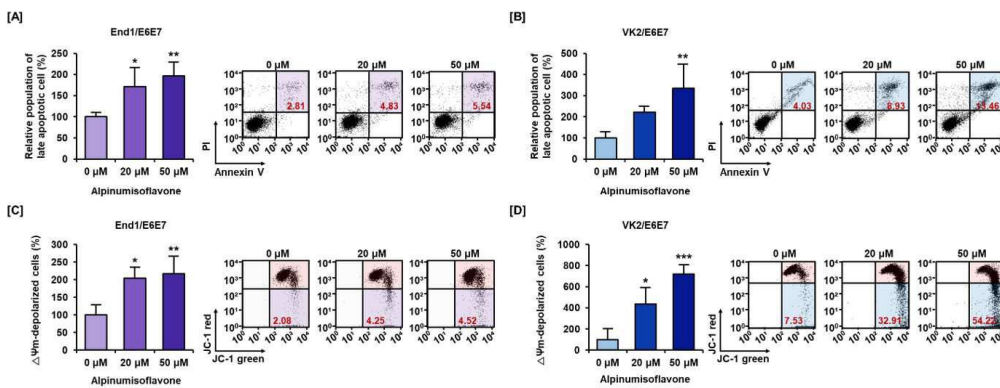
- [0137] 도 3에 나타난 바와 같이, 알피넨아이소플라본에 의해 세포질에서 End1/E6E7은 222%, VK2/E6E7은 412%까지 칼슘이 축적이 증가하였고, 미토콘드리아의 기질에서는 End1/E6E7은 266%, VK2/E6E7에서는 446%까지 칼슘이 축적이 증가되는 것을 확인하였다 (도 3의 A 내지 D).
- [0138] 이외에도 칼슘 억제제인 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB)를 사용하여 알피넨아이소플라본에 의한 칼슘 유입기전을 확인한 결과, 알피넨아이소플라본 단독처리보다 억제제와 병용처리 하였을 때, 칼슘 축적 정도가 완화된 것을 두 세포주에서 모두 확인할 수 있었다(도 4의 A 및 B).
- [0139] 또한, 알피넨아이소플라본과 2-APB 병용처리를 통해 세포증식에 미치는 영향을 확인한 결과, 알피넨아이소플라본에 의해 감소되었던 세포증식이 약간 완화된 것을 확인할 수 있었다 (도 4의 C 및 D).
- [0140] 이러한 결과는, 자궁내막 세포에서 알피넨아이소플라본이 칼슘항상성을 방해한다는 것을 나타내며, 칼슘 이온 수치의 조절장애는 세포사멸을 유발하는 요인 중 하나이지만 자궁내막증의 경우 주요 원인은 아닐 수 있다는 것을 의미한다.
- [0142] **실시예 4: 알피넨아이소플라본에 의한 자궁내막 세포 내 미토콘드리아 호흡 조절 분석**
- [0143] 본 발명자들은 자궁내막 세포에 대한 미토콘드리아 호흡 조절 효과를 확인하기 위해, 알피넨아이소플라본을 자궁내막 세포에 처리한 후, Seahorse XFe를 이용해 분석하였으며, 그 결과는 도 5에 나타내었다.
- [0144] 도 5에 나타난 바와 같이, 올리고마이신 처리 전 알피넨아이소플라본 처리 시, 세포의 기저 호흡수는 처리하지 않은 세포보다 호흡 수가 낮게 측정되었다. ATP 생산량과 최대 호흡수 또한 알피넨아이소플라본이 처리되지 않은 세포보다 처리된 세포에서 낮게 측정되었다 (도 5의 A 내지 D).
- [0145] 이러한 결과는, 자궁내막 세포에 알피넨아이소플라본을 처리하였을 때 ATP-연관 호흡이 감소되면서 미토콘드리아 기능장애에 영향을 미친다는 것을 의미한다.
- [0147] **실시예 5: 알피넨아이소플라본에 의한 자궁내막 세포 내 세포증식 관련 신호전달기전 분석**
- [0148] 본 발명자들은 알피넨아이소플라본에 의한 자궁내막증 내 세포증식 연관 PI3K/AKT, MPAK 신호전달기전 구성 단백질 인산화효소들의 인산화 양상을 웨스턴 블롯을 통해 분석하였으며, 그 결과는 도 6에 나타내었다.
- [0149] 도 6에 나타난 바와 같이, AKT, P70, S6 단백질의 인산화가 감소하고, ERK1/2, p-P38, p-JNK 단백질 인산화가 증가하는 것으로 나타났다 (도 6의 A 내지 F).
- [0150] 따라서, 이러한 결과는, 알피넨아이소플라본이 PI3K/AKT, MAPK 신호전달기전을 조절함으로써 자궁내막 세포의 증식을 억제시킨다는 것을 의미한다.
- [0152] **실시예 6: 알피넨아이소플라본에 의한 자궁내막 세포 내 소포체 스트레스 및 자가포식 조절 분석**
- [0153] 본 발명자들은 알피넨아이소플라본 (0, 20, 50 μ M)의 용량의존적 처리를 통해 자궁내막 세포 내 소포체 스트레스 변화 양상을 확인하고자, 소포체 스트레스 반응 인자들의 인산화 양상을 웨스턴 블롯을 통해 분석하였으며, 그 결과는 도 7의 A 및 B에 나타내었다.
- [0154] 도 7의 A 및 B에 나타난 바와 같이, 알피넨아이소플라본의 용량 의존적 처리에 따라 자궁내막 세포 End1/E6E7, VK2/E6E7 내 소포체 스트레스가 증가되는 것으로 나타났다.
- [0155] 이외에도 알피넨아이소플라본이 자궁내막증 내 자가포식 양상을 유도하는지 확인하기 위해, 자가포식을 검증할 수 있는 단백질들의 발현을 웨스턴 블롯을 통해 분석하였으며, 그 결과는 도 7의 C 및 D에 나타내었다.
- [0156] 그 결과, 자궁내막 세포 내 알피넨아이소플라본의 처리에 의하여 오토파고솜 형성 및 자가포식을 유도하는 양상이 나타남을 확인하였다.
- [0157] 따라서, 이러한 결과는, 알피넨아이소플라본이 자궁내막증 내에서 소포체 스트레스를 증가시키고, 자가포식을 유도함으로써, 자궁내막 세포의 증식을 억제시킨다는 것을 의미한다.

도면

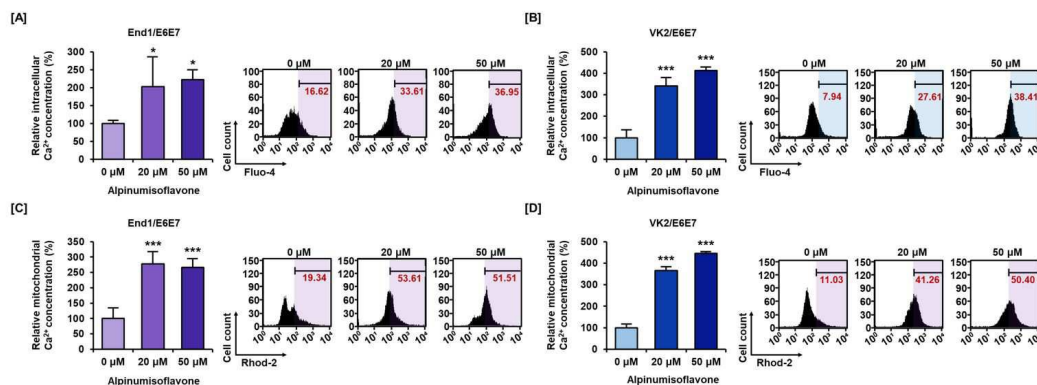
도면1



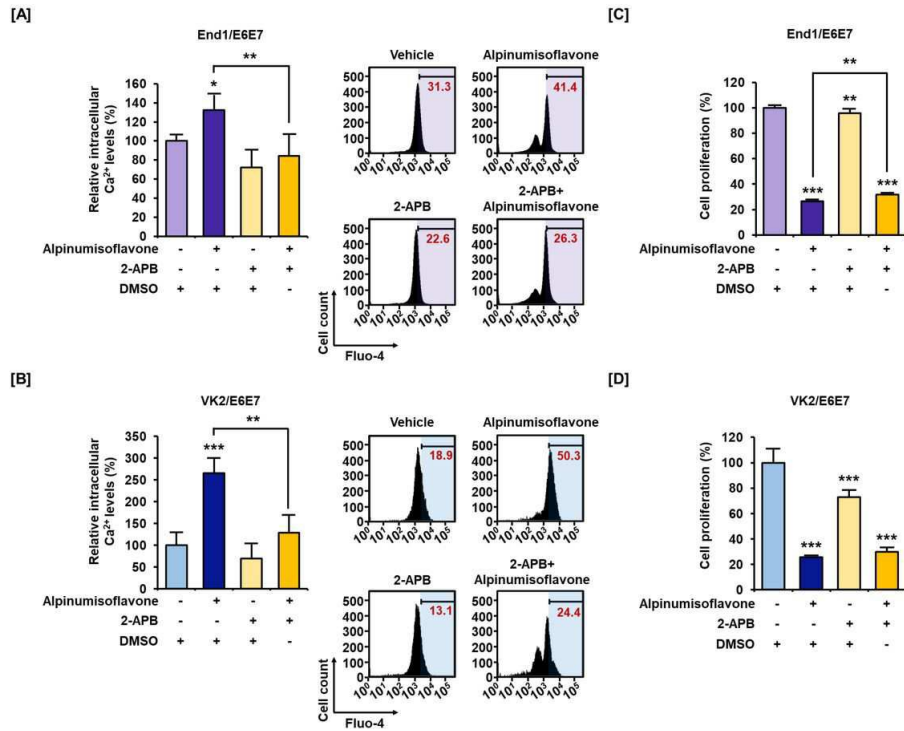
도면2



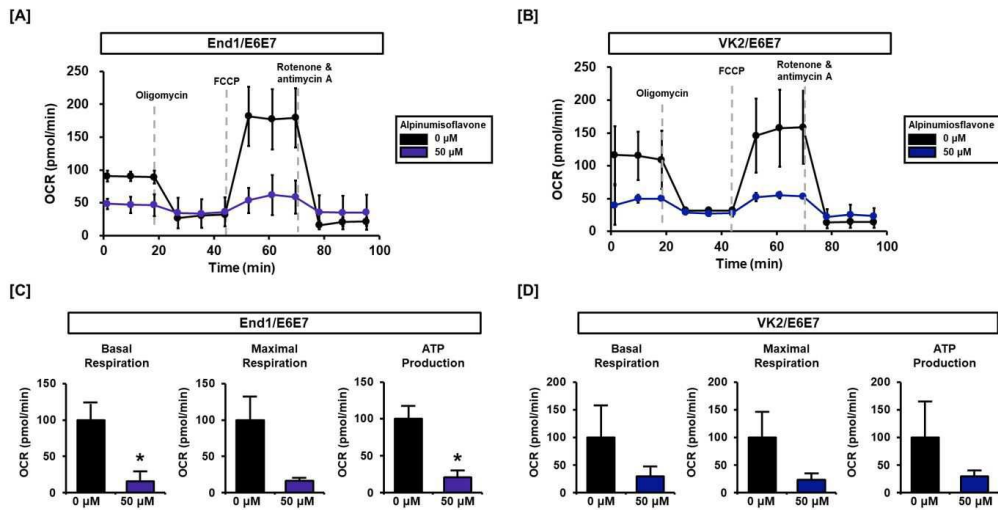
도면3



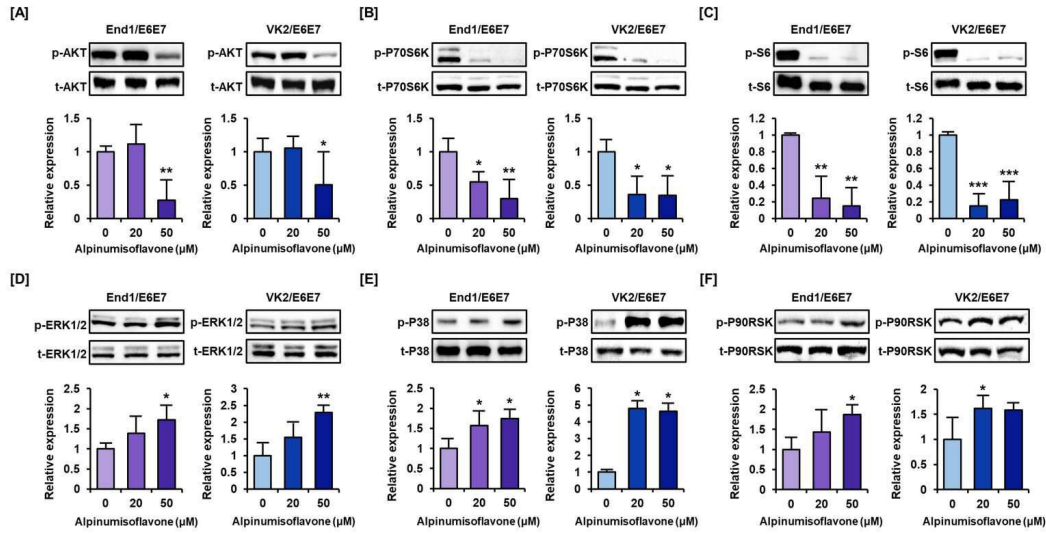
도면4



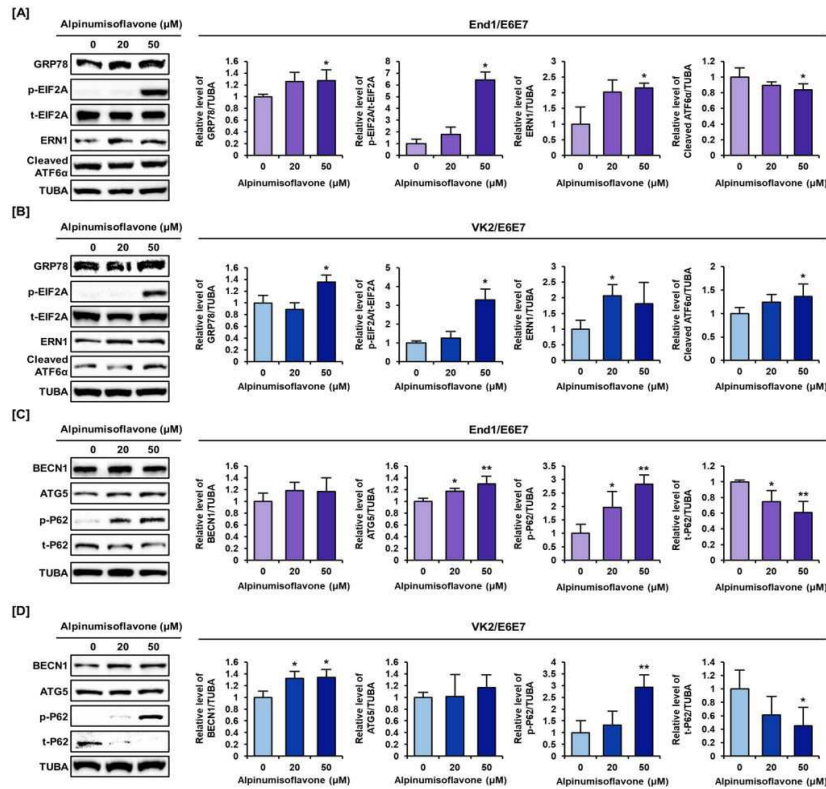
도면5



도면6



도면7



도면8

