(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월31일
(11) 등록번호 10-1742023
(24) 등록일자 2017년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/69 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/69 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0070167
(22) 출원일자 2016년06월07일
심사청구일자 2016년06월07일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150043614 A
Experimenral and Molecular Pathology., 2012.08., Vol.93, No.1, pp 26-34
Journal of Pharmacy and Pharmacology., 2014.01., Vol.66, No.1 pp 62-72

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
가천대학교 산학협력단
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
(72) 발명자
박우재
인천광역시 연수구 해돋이로 84번길 30 103동 404호 (송도동, 금호어울림 아파트)
박주원
서울특별시 양천구 목동동로 350, 목동신시가지아파트 512동 106호
(74) 대리인
이원희

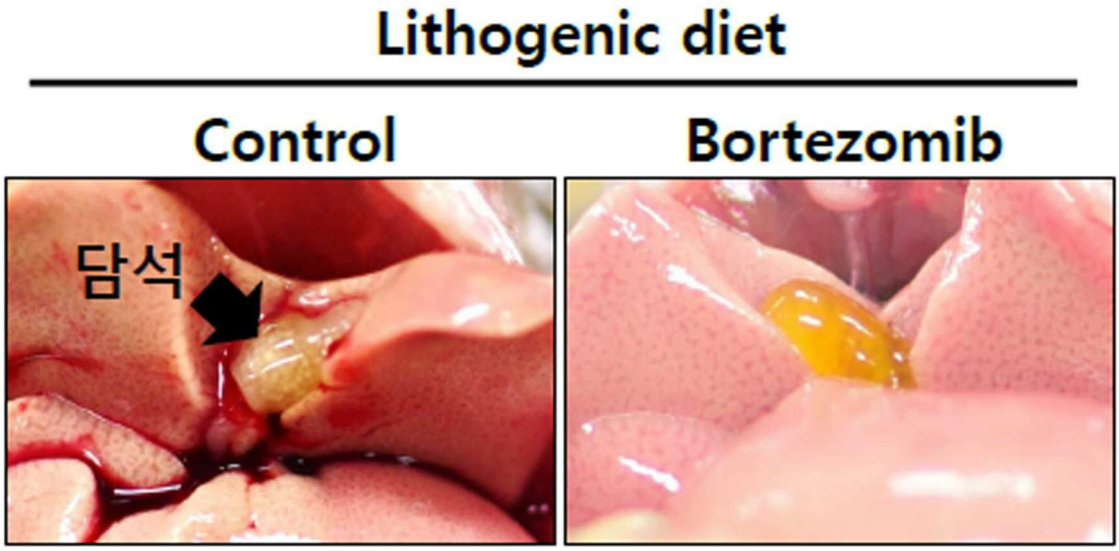
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 송호선

(54) 발명의 명칭 **보르테조밉을 유효성분으로 함유하는 담석증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 보르테조밉을 유효성분으로 함유하는 담석의 예방 또는 약학적 조성물에 관한 것으로, 보르테조밉을 고 콜레스테롤 식이를 섭취하는 쥐에 투여하였을 때 콜레스테롤에 의한 담석 생성을 억제하고, 담즙산 생성 및 분비와 관련된 Cyp7a1, Cyp7b1, PXR 및 NR0B2를 감소시키며, 콜레스테롤 분비와 관련된 ABCG5 및 ABCG8의 발현을 억제하고, 콜레스테롤 합성에 관련한 m-SREBP2 및 MHGR의 발현을 억제하였고, mSREBP2 및 HMGR 단백질 발현을 억제하였다. 또한 보르테조밉이 간세포주에서 Cyp7a1 단백질 발현을 농도 의존적으로 억제하면서 caspase-3 절단에 영향을 미치지 않는 것을 확인하여, 담즙산 및 콜레스테롤 생성 억제를 통하여 담석생성을 억제하는 것을 제시하여, 보르테조밉을 유효성분으로 함유하는 조성물은 담석증의 예방 및 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/10 (2013.01)
A61K 9/20 (2013.01)
A61K 9/48 (2013.01)
Y10S 514/877 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C2445
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건산업진흥원
연구사업명 보건의료기술연구개발사업-질환극복기술개발
연구과제명 스핑고지질 응용 염증성 장질환 치료제 개발 기반연구
기 여 율 40/100
주관기관 이화여자대학교
연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2013R1A1A1057912
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)(2013)-일반연구자지원사업-신진연구
연구과제명 스핑고지질의 지방산 길이 변화가 당뇨병에 미치는 영향
기 여 율 10/100
주관기관 이화여자대학교
연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2013R1A1A1076013
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업-신진연구지원사업
연구과제명 다양한 길이의 스핑고지질과 엔도사이토시스와의 연계성 연구
기 여 율 50/100
주관기관 가천대학교
연구기간 2015.12.01 ~ 2016.11.01

명 세 서

청구범위

청구항 1

보르테조밉(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 담석증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 보르테조밉은 Cyp7a1, Cyp7b1, PXR, NR0B2, ABCG5, ABCG8, m-SREBP2 및 MHGR으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 보르테조밉은 Cyp7a1, mSREBP2 및 HMGR으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 보르테조밉(bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 담석증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 담석은 담낭(쓸개) 또는 담도(담즙이 분비되는 길)에 생긴 결석(돌)을 의미한다. 담즙은 하루 평균 700-800 ml 정도 만들어 지며, 콜레스테롤, 지방, 담즙산, 빌루루빈 등을 포함하는데, 이 담즙이 담낭안에서 비정상적으로 농축되면 담석이 형성된다. 담낭 안에서 만들어지는 담석은 대부분 콜레스테롤 담석으로, 콜레스테롤의 과포화 상태로 인해 콜레스테롤 결정체가 만들어지고 이것이 뭉쳐져 콜레스테롤 담석이 된다.

[0004] 담석증을 치료하는 방법에는 수술요법, 내시경치료(내시경으로 돌을 빼내는 치료법), 쇄석술(담석을 부숴서 빼내는 방법), 약물요법 등이 있다. 수술요법은 전신마취 및 수술로 인한 위험이 따르며, 내시경치료는 전신마취도 필요 없고 몸에 칼을 대는 수술을 하지 않고도 담석을 한번에 완전히 제거할 수 있기 때문에 비교적 안전하나 시술과 관련하여 췌장염이나, 출혈, 천공 등이 발생할 위험이 있고 이전에 위장수술을 하였거나, 내시경으로 담관으로 접근이 안 되는 경우에는 적용할 수가 없다. 담석증도 신석증이나 요로결석증처럼 쇄석술로 결석을 부스러뜨려 몸밖으로 배출시키는 치료법을 쓸 수 있다. 그러나 담석증의 경우 요로결석증과는 달리 그 효과가 저조하고 설사 치료되었다 해도 재발하는 경우가 많기 때문에 현재는 극히 제한된 경우에만 사용하고 있다. 담낭담석은 복강경 수술 또는 개복수술을 시행하며 담관담석의 경우 내시경적 역행성 담도 조영술을 이용해 제거한다.

[0005] 담석증을 치료하는 가장 손쉬운 방법은 약물 요법이라 할 수 있겠으나, 약물요법은 일부 환자에서만 담석의 용해가 가능하고 적어도 1년 이상 약을 매일 먹어야 하며 약을 중단하면 담석이 재발한다는 단점 때문에 지금은 담석의 치료법보다는 담석 치료 후 재발방지를 위해서 쓰이고 있다. 따라서 담석증 치료를 위한 효과가 뛰어난 약물 개발이 필요한 실정이다.

[0006] 보르테조밉은 프로테아좀 억제제 타입의 항암제로, 프로테아좀은 세포 내 기구의 한 부분으로 세포의 분열과 생존을 조절하는 여러 단백의 농도를 조절하는 등 세포 내에서 많은 기능을 담당한다. 보르테조밉은 이 프로테아좀을 억제함으로써 세포의 자가사멸(자살)을 유도한다. 현재, 보르테조밉은 다발성 골수종에 주로 사용되며, 림프종 등 다양한 암에 사용되고 있으나, 본 발명의 담석증 치료에 관련한 보고는 전무하다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 담석증 치료를 위한 새로운 물질을 찾고자 노력하던 중, 보르테조밉을 고 콜레스테롤 식이를 섭취하는 쥐에 투여하였을 때 콜레스테롤에 의한 담석 생성을 억제하고, 담즙산 생성 및 분비와 관련된 Cyp7a1, Cyp7b1, PXR 또는 NR0B2를 감소시키며, 콜레스테롤 분비와 관련된 ABCG5 및 ABCG8의 발현을 감소시켰고, 콜레스테롤 합성에 관련한 m-SREBP2 및 MHGR의 발현을 억제하였으며, mSREBP2 또는 HMGR단백질 발현이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 보르테조밉이 간세포주에서 농도 의존적으로 Cyp7a1의 발현을 억제하며, caspase-3 절단에는 영향을 주지 않는 것을 확인함으로써, 보르테조밉의 담석 생성 억제를 통한 담석증의 치료 효과를 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 보르테조밉(bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 담석증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 보르테조밉(bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 담석증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에서 보르테조밉(bortezomib)은 고 콜레스테롤 식이를 섭취하는 쥐에서 담석 생성을 억제하고, 담즙산 생성 및 분비와 관련된 Cyp7a1, Cyp7b1, PXR 및 NR0B2 mRNA 발현을 억제하며, 콜레스테롤 분비와 관련된 ABCG5 및 ABCG8의 mRNA 발현을 억제하고, 콜레스테롤 합성에 관련한 m-SREBP2 및 MHGR mRNA의 발현을 억제하였고, Cyp7a1. m-SREBP2 및 MHGR 단백질 발현을 억제하였다. 또한 Hep3B 간세포주에서 농도 의존적으로 Cyp7a1 단백질의 발현을 억제하면서, caspase-3 절단을 유도 하지는 않아, 상기 보르테조밉은 담즙산 및 콜레스테롤 생성 억제를 통하여 담석생성을 억제함으로써, 보르테조밉을 유효성분으로 함유하는 조성물은 담석증의 예방 또는 치료를 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 lithogenic 식이에 의한 담석 생성과 보르테조밉(bortezomib)에 의한 담석생성 억제효과를 나타낸 도이다.

도 2는 보르테조밉에 의한 담석생성 관련 유전자 발현 변화를 나타낸 도이다.

도 3은 보르테조밉에 의한 담석생성 관련 단백질 발현 변화를 나타낸 도이다.

도 4는 보르테조밉 투여 생쥐의 간에서 세포사멸관련 인자인 caspase-3의 절단(cleavage)을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 보르테조밉(Bortezomib)을 유효성분으로 함유하는 담석증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 보르테조밉은 Cyp7a1, Cyp7b1, PXR, NR0B2, ABCG5, ABCG8, m-SREBP2 및 HMGR으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자 발현을 억제하는 것을 특징으로 한다.

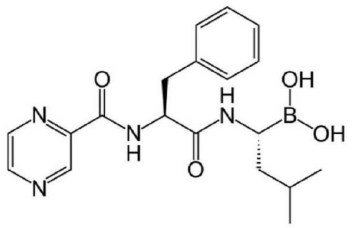
[0019] 또한, 상기 보르테조밉은 Cyp7a1, mSREBP2 및 HMGR으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 발현을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 구체적인 실시예에서 보르테조밉을 고 콜레스테롤 식이를 섭취하는 쥐에 투여하였을 때 담석 생성을 억제하고(도 1 및 표 1참조), 담즙산 생성 및 분비와 관련된 Cyp7a1, Cyp7b1, PXR 및 NR0B2 mRNA 발현을 억제하며, 콜레스테롤 분비와 관련된 ABCG5 및 ABCG8의 mRNA 발현을 억제하고, 콜레스테롤 합성에 관련한 m-SREBP2 및 MHGR mRNA의 발현을 억제하였고(도 2 참조), 간세포주에서 보르테조밉 이 Cyp7a1, mSREBP2 또는 HMGR 단백질 발현을 억제하는 것을 확인하였으며(도 3참조), 또한, 보르테조밉이 caspase-3 절단에 영향을 미치지 않음을 확

인함으로써, 상기 담석생성 관련인자의 발현 억제가 세포사멸에 의한 것이 아님을 밝혔다(도 4참조).

[0022] 보르테조밉(Bortezomib)은 하기 화학식 1로 표시되며, 디펩티드 보론산 유도체로서 Ki가 0.6 nmol/L인 고도로 선택적인 강력한 가역성 프로테아솜 저해제이다(Adams, et al., Semin. Oncol., 28(6): 613-619 (2001)).

[0023] [화학식 1]



[0024]

[0026] 미국 국립 암연구소(National Cancer Institute)의 관련 연구에 의하면, 보르테조밉은 일련의 종양주에 대하여 세포독성을 나타내고, 인간 전립선에서 항종양 활성을 나타내며(Frankel et al., Clin. Cancer Res., 6(9): 3719-3728, 2000), 폐암 이종 이식 모델에 대하여 항암 활성이 보고된바 있다(Oyaizu et al., Oncol. Rep., 8(4): 825-829, 2001). 또한, 보르테조밉의 항암 활성 이외에도, 백혈병과 신생혈관 질환에 대한 억제 활성이 공지되어 있다.

[0028] 본 발명의 담석 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 보르테조밉에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 투여를 위해서는 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 산제, 정제, 캡슐제, 환, 과립 또는 주사액제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0029] 본 발명의 담석 예방 또는 치료용 약학적 조성물은, 통상적인 방법에 의해 정제, 캅셀제, 산제, 과립제, 현탁제, 유제, 시럽제, 기타 액제로 제형화될 수 있다.

[0030] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여용 제형, 예를 들면 정체, 트로치제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 또는 우성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀젼, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제(elixirs)로 제제화된다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕해제, 스테아르산 마르네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유된다. 캡슐제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유한다.

[0031] 또한, 본 발명의 담석 예방 및 치료용 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 보르테조밉와 함께 물에서 혼합하여 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.

[0032] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택되나, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 보르테조밉을 0.0001 ~ 500 mg의 양으로 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며, 0.001 ~ 100 mg의 양으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0033] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0035] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.

[0036] 단 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한

정되는 것은 아니다.

[0038] **<실시예 1> 담석생성 유도 및 보르테조밉(bortezomib) 투여**

[0039] 쥐는 라온바이오 회사에서 구매하였고, 8주된 C57BL/6 쥐 5마리를 한 그룹으로 하여 대조군에는 DMSO(dimethyl sulfoxide; 0.1%)를 식염수에 희석하여 주사하고, 실험군은 보르테조밉을 0.5 mg/kg/week용량으로 일주일에 한 번씩 12주간 주사하였다. 주사와 동시에 lithogenic diet(1% 콜레스테롤 및 0.1% 콜레이트(cholate))를 양쪽 그룹에 제공하여 총 12주간 lithogenic diet 식이를 먹였다. 12주 후에는 밤중 단식(약 14시간 단식)을 한 후 안락사시켜 담석 발생여부를 확인하고 간과 혈액을 -80℃에 보관하였다.

[0041] **<실시예 2> 세포배양 및 보르테조밉 처리**

[0042] Hep3b세포주(human hepatoma cell line)는 10% FBS(fetal bovine serum) 및 1% penicillin-streptomycin (Hyclone)를 포함한 DMEM배지에서 37℃, 5% CO_2 환경에서 배양 하였다. 일주일에 2번씩 subculture를 진행하여 30-80%정도의 confluency를 유지하였다. 보르테조밉은 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 100uM의 농도로 용해하였고, 이를 1/2000, 1/4000로 희석하여 각각 25nM, 50nM 농도의 보르테조밉을 포함하는 배지 조성을 만들어 세포에 48시간 동안 처리하였다.

[0044] **<실험예 1> 보르테조밉(Bortezomib)의 담성생성 억제**

[0045] 보르테조밉의 담석 생성 억제 효과를 확인하기 위하여, <실시예 1>의 방법으로 쥐에 lithogenic diet식이를 12주간 투여하였다. 그 결과, 담석발생율이 대조군(DMSO)에서는 60% (5마리중 3마리)였으나, 보르테조밉(0.5 mg/kg/week)을 함께 투여한 군에서는 담석발생율이 0% (5마리중 0마리)인 것을 할 수 있었다(표1 및 도 1).

표 1

[0046]

Lithogenic diet	DMSO	Bortezomib
담석발생율 (%)	60	0

[0048] **<실험예 2> 보르테조밉의 담성생성 관련 유전자 발현 억제**

[0049] <실시예 1>에서와 같이 담석을 유도하고 보르테조밉을 투여하거나(bortexomib) 또는 투여하지 않은(Control)동물의 간조직을 이용하여 realtime-PCR을 실시하여 담즙산 생성과 관련된 유전자인 Cyp7a1, Cyp7b1, Cyp8b1 및 Cyp27a1, 그리고 Cyp7a1의 발현 조절 요소인 FXR, PXR, NR0B2 및 HNF4a, 콜레스테롤을 담즙으로 분비하는 전달자(transporter)인 ABCG5, ABCG8 또는 담즙산을 담즙으로 분비하는 전달자인 BAAT의 유전자 발현을 확인하였다. RealtimePCR을 실시하기 위하여 <실시예 1>에서 준비한 간조직에서 RNeasy kits (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 mRNA를 추출하였고, 이후 Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Hudson, NH)를 이용하여 cDNA를 제작하였다. Real time PCR을 진행하기 전까지 cDNA는 -20도에 보관하였다. ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Waltham, MA)을 이용하여 40번의 PCR(polymerase chain reaction) 사이클을 거쳐 mRNA의 발현량을 측정하고 이를 그래프로 계산하였다.

[0050] 그 결과, 보르테조밉 투여군에서 대조구에 비하여 Cyp7a1, Cyp7b1, PXR, NR0B2, ABCG5 또는 ABCG8 발현이 감소하고, Cyp8b1의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 2A, B). 상기 결과는 보르테조밉이 담즙으로 콜레스테롤 분비를 억제하고, 담즙산 생성을 저해함으로써 담석 생성을 억제하는 것을 제시한다.

[0052] **<실험예 3> 보르테조밉의 담석생성 관련 단백질 발현 억제**

[0053] 보르테조밉에 의한 담석생성 관련 단백질 발현 변화를 확인하기 위하여 <실시예 1>과 같이 lithogenic 식이를 투여한 생쥐에 보르테조밉을 투여하고, 간조직을 적출하여 담즙생성의 속도조절효소(rate limiting enzyme)인 CYP7A1의 발현을 western blot으로 분석하여 확인하였다. Western blot을 실시하기 위하여 RIPA 버퍼(50 mM of Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM of NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and protease inhibitors, phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, St Louis, MO))를 이용하여 간조직 또는 세포를 갈아준 후 4도에서 30분간 보관하여 완전히 세포가 분해되도록 하였다. 12000 rpm, 10분, 4도에서 고속원심분리 후 상층액을 취하여 단백질 정량을 실시하여 50 ug에 해당하는 단백질을 6X sample loading buffer(150 mM, Tris-Cl, pH 6.8, 6% SDS, 12% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, 0.1% bromophenol blue)에 넣고 95℃에서 5분간 끓였다. 그 후 10% SDS gel에 걸어 단백질 분리를 실시하고, nitrocellulose membrane에 트랜스퍼 하였다. 일차 항체를 4℃에서 밤새 반응 시키고, 4회 세척 후 이차 항체를 실온에서 1시간 붙였다. ECL Western Blotting

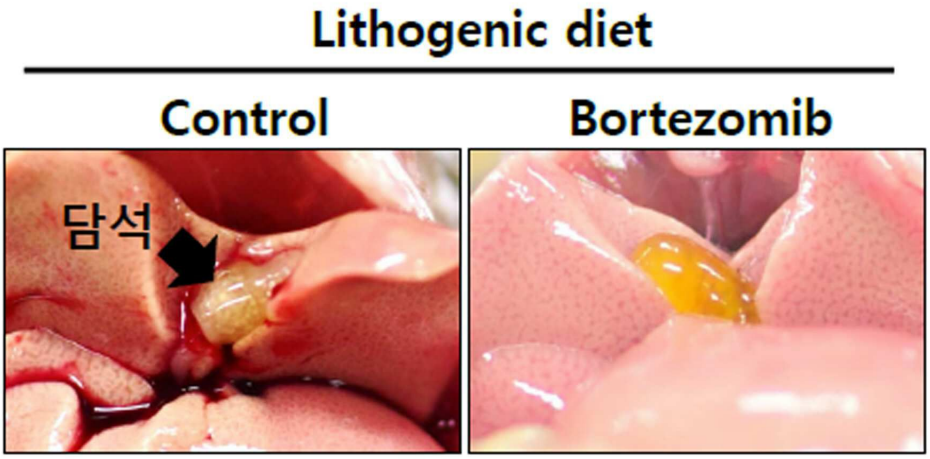
Detection Reagents (Amersham Biosciences, Little Chalfont Bucks, UK)와 ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 단백질 발현을 측정하였다. 그 결과, 보르테조밉을 투여한 생쥐에서(Bort) 보르테조밉을 투여하지 않은 대조구(Cont)에 비하여 CYP7A1의 발현이 감소한 것을 확인하였다. 또한 콜레스테롤 합성에 중요한 단백질인 mSREBP2(mature form of sterol regulatory element-binding protein-2) 및 HMGR(HMG-CoA reductase) 단백질의 발현이 감소하였다(도 3,A). 또한, 간세포주인 Hep3B에 보르테조밉 25 nM 또는 50 nM을 48시간 동안 처리한 결과, 농도 의존적으로 CYP7A1 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 3B). 상기 결과로 부터, 보르테조밉이 간세포의 콜레스테롤 합성과 담즙산 생성을 억제함으로써, 담석생성을 억제함을 확인하였다.

[0055] **<실험예 4> 보르테조밉의 담석생성 억제 기전 확인**

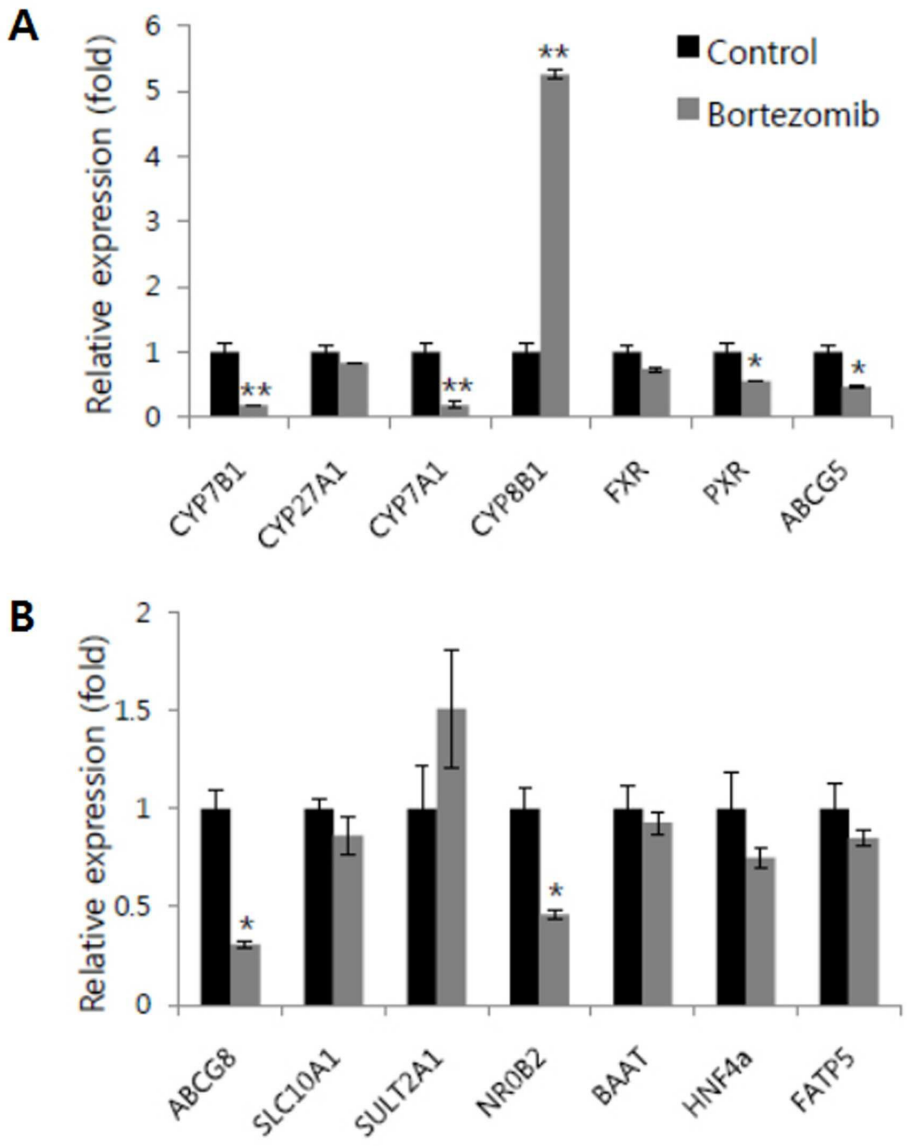
[0056] <실험예 2> 및 <실험예 3>에서 확인한 보르테조밉에 의한 콜레스테롤 합성 및 담즙산 생성 억제효과가 간세포 사멸에 의한 것일 가능성을 제외하기 위해, <실시예 1>의 방법으로 담석을 유도하고, 보르테조밉을 투여한 생쥐의 간에서 세포자살(apoptosis)의 주요 신호분자인 caspase-3의 절단(cleavage)를 확인하였다. 그 결과, 대조구(Con)와 보르테조밉 투여(Bort)모두 caspase-3의 절단이 일어나지 않는것을 확인하였다(도 4). 이는 보르테조밉에 의한 담석생성 억제효과는 간세포 사멸에 의한 것이 아니라 담즙산과 콜레스테롤 생성 억제에 의한 것임을 제시한다.

도면

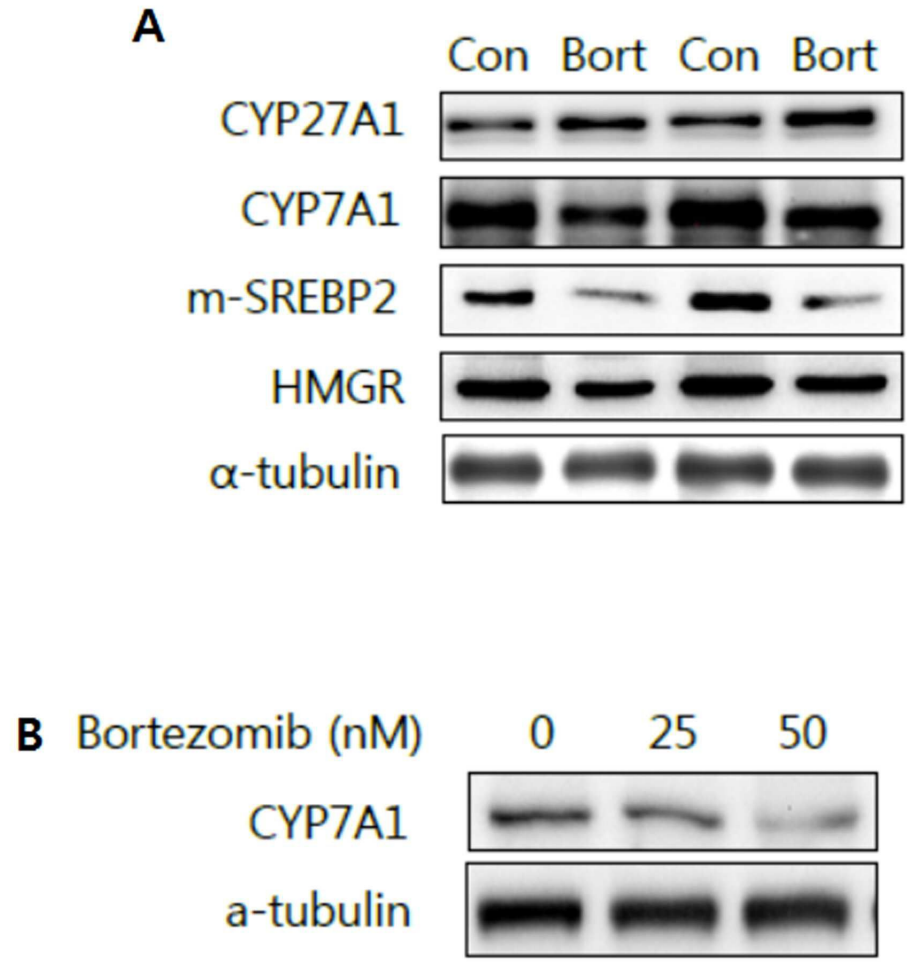
도면1



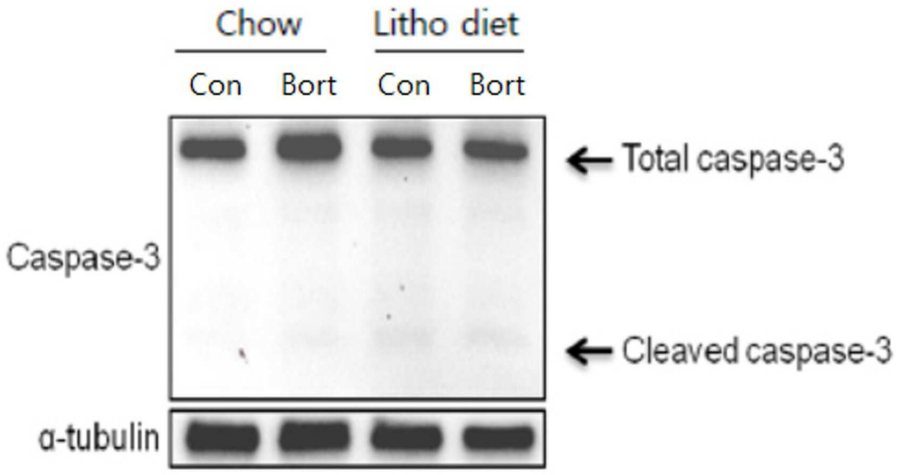
도면2


A
Relative expression (fold)
6
5
4
3
2
1
0
Control
Bortezomib
**
**
**
*
*
CYP7B1
CYP27A1
CYP7A1
CYP8B1
FXR
PXR
ABCG5
B
Relative expression (fold)
2
1.5
1
0.5
0
*
*
ABCG8
SLC10A1
SULT2A1
NR0B2
BAAT
HNF4a
FATP5

도면3


A
Con
Bort
Con
Bort
CYP27A1
CYP7A1
m-SREBP2
HMGR
α-tubulin
B
Bortezomib (nM)
0
25
50
CYP7A1
a-tubulin

도면4


Chow
Litho diet
Con
Bort
Con
Bort
Caspase-3
Total caspase-3
Cleaved caspase-3
α-tubulin