(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0094364
(43) 공개일자 2015년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 31/445* (2006.01) *A61P 15/00* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0015580
(22) 출원일자 2014년02월11일
심사청구일자 2014년02월11일

(71) 출원인
**계명대학교 산학협력단**
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
**조치흠**
대구 중구 달성로 56, 5층 산부인과 회의실 (동산동, 계명대학교동산의료원)
**신소진**
대구 중구 달성로 56, 5층 산부인과 회의실 (동산동, 계명대학교동산의료원)
**이현교**
대구 중구 달성로 56, 별관 지하1층 암연구소 (동산동, 계명대학교동산의료원)
(74) 대리인
**특허법인태백**

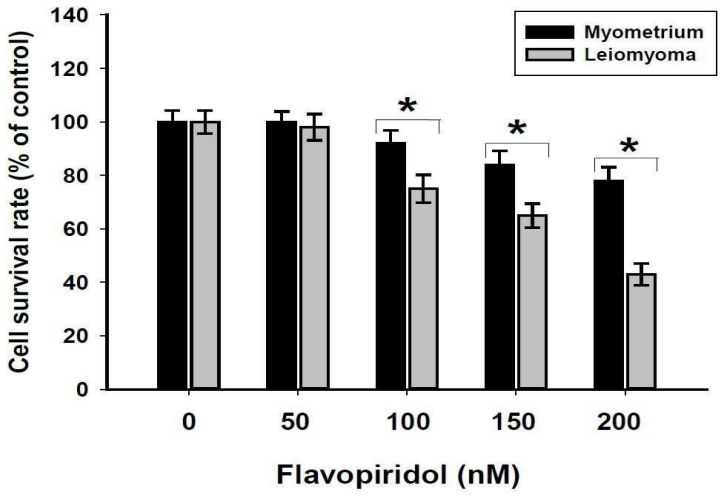
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 플라보피리돌이 자궁근종 세포에 선택적으로 작용하여 자궁근종 세포의 세포주기 진행과 관련된 유전자의 발현을 억제하여 세포의 주기의 진행을 차단하고 세포사멸을 유도함으로써 자궁근종 세포의 증식및 세포 생존능의 감소를 통하여 자궁근종을 예방하거나 치료할 수 있는 약학조성물 또는 건강식품조성물을 제공한다.

*대 표 도* - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2010-0021510
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연자지원사업(기본연구-모험연구)
연구과제명 자궁근종에서의 약물치료 모델제시와 동물 모델 구축
기 여 율 1/1
주관기관 계명대학교 산학협력단
연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 플라보피리돌은 선택적으로 자궁근종 세포의 세포주기 진행을 차단하여 세포증식을 억제하고 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 자궁근종 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 3

플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 약학조성물.

### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 약학조성물은 총 100 중량부에 대하여 플라보피리돌 0.01 내지 10 중량부를 포함하는 것을 특징으로 하는 자궁근종 예방 또는 치료용 약학조성물.

### 청구항 5

플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 개선 또는 예방용 건강식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하여 자궁근종 세포의 세포주기 진행을 차단하여 세포증식을 억제하고 세포사를 유도함으로써 자궁근종 예방 또는 치료에 제공되는 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 플라보피리돌은 Dysoxylum binectariferum의 줄기 껍질에서 최초 분리된 플라본 유도체이며, 사이클린 의존성 인산화효소(CDK)의 팬 억제제로 최초로 임상 개발된 물질이다. 플라보피리돌은 APT와 직접 경쟁하며, CDK2, CDK4 및 CDK6의 억제와 PI3K/AKT 신호전달 경로를 음성 조절함으로써, G1기 차단을 유도하여 세포주기의 진행을 억제하고 세포사를 유도할 수 있다.

[0003] 이러한 특징을 가진 플라보피리돌은 다양한 질환의 치료제로 연구되어 지고 있으나, 플라보피리돌을 이용한 자궁근종 예방 또는 치료에 관한 효과는 보고되어 지지 않았다.

[0004] 자궁근종은 일반적으로 근종, 섬유근종 또는 유섬유종이라 언급되어 지고 있으며, 자궁근 층으로부터 시작되는 평활근 종양으로 생식 나이의 여성 40% 이상에서 발병하고 있으며, 50대 이후 여성의 발병율은 70-80%로 급증하는 질병으로 현재 주요 관심질환 중 하나로 언급되고 있다. 자궁근종 환자들에게는 빈혈증, 월경 과다, 골반통, 불임, 자연유산, 비정상자궁출혈 및 습관성 유산과 같은 의료적으로 치료가 필요한 증상들이 나타나는데, 일부 의료방법이 자궁을 보존하고자 하는 여성들에서 적용될 수 있으나 자궁근종의 주요 치료방법은 외과적 수술이다.

[0005] 최근에는 고나도트로핀 방출 호르몬(gonadotropin-releasing hormone; GnRH)길항제를 이용하여 난소 호르몬의 순환 정도를 감소시키는 방법을 통하여 자궁근종을 관리하고 있으나, GnRH 길항제는 폐경기 여성들이 느끼는 피부의 열감과 같은 부작용의 주요 원인이 되며, 이러한 약물의 장기복용은 골다공증 및 심혈관 질환을 일으킬 수 있다.

[0006] 그러므로, 자궁근종 환자에게 외과적 수술 없이, 안전하고 효과적인 치료방법의 연구가 필요한 실정이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2007-7009411호 공보

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공함으로써, 기존의 자궁근종 치료에 사용되었던 약물의 부작용 문제를 해결하고 자궁근종 환자들에게 외과수술 이외의 약물을 이용한 치료를 통하여 자궁을 보존할 수 있는 효과적인 치료방법을 제공하는데 있다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 플라보피리돌은 선택적으로 자궁근종 세포의 세포주기 진행을 차단하여 세포증식을 억제하고 세포사를 유도할 수 있다.

[0011] 또한 본 발명은 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0012] 상기 약학조성물은 총 100 중량부에 대하여, 플라보피리돌 0.01 내지 10 중량부를 포함할 수 있다.

[0013] 다른 구체예로 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 개선 또는 예방용 건강식품 조성물로 제공한다.

### 발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 플라보피리돌을 유효성분으로 함유한 조성물은 자궁근종 세포에만 선택적으로 작용하여 자궁근종 세포의 세포주기와 관련된 단백질의 발현을 억제함으로써, 세포주기의 진행을 차단하고 세포증식을 억제하며, 세포사를 유도함으로써, 정상 자궁근 세포에는 영향을 주지 않으면서 자궁근종을 예방 또는 치료할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 플라보피리돌의 자궁근종 세포 항증식 효과를 나타낸 MTT 분석 결과로 플라보피리돌 24시간 처리 후 생존한 세포를 백분율로 나타내었으며, *P<0.05이다.

도 2는 플라보피리돌에 의한 자궁근종 세포의 DNA 합성 억제를 확인한 결과로 24시간 동안 플라보피리돌을 50, 100, 150 및 200nM로 처리한 후 10μM BrDU를 24시간 동안 표지하고 그 결과를 대조군 세포의 BrDU 백분율에 대한 상대값으로 나타내었으며, *P<0.05이다.

도 3은 플라보피리돌 처리에 따른 세포주기 확인 결과로 24시간 동안 플라보피리돌을 처리한 후 세포유동계수분석을 통하여 확인한 결과이며, 결과 값은 전체 세포의 백분율에 각 주기의 세포 수를 나타낸 것이다.

도 4는 플라보피리돌에 의한 자궁근종 세포의 세포주기와 관련된 단백질 발현 효과를 확인한 것으로, 플라보피리돌 24시간 처리 후 세포에서 단백질을 추출하여 면역블롯팅 분석을 진행한 결과이며 대조군으로 β-액틴을 사용하였다.

도 5는 사람 유래 자궁근종 이종이식 후 헤마톡실린&에오신 염색을 통한 조직학적 평가 결과와 α 평활근 액틴, 데스민, 에스트로겐 수용체 α(ER) 및 프로게스테론 수용체(PR)에 대한 항체를 이용하여 조직이식 모델과 세포이식 모델에 면역화학분석을 진행한 결과이며, 각각의 사진은 ×200배 하였다.

도 6은 이종이식된 종양에 플라보피리돌 투여 효과를 나타낸 결과로, A는 이종이식된 동물 모델에 3주간 플라보피리돌을 각각 5.0 또는 7.5 mg/kg 투여한 실험군과 DMSO를 처리한 대조군의 이식된 종양의 크기 변화를 측정한 결과이고 B는 각각의 실험군과 대조군에 형성된 종양을 나타낸 사진이며, C는 각각의 플라보피리돌투여 군과 DMSO 대조군의 약물처리 중단 후 종양의 무게를 측정한 결과이며, *P<0.05이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0016] 본 발명은 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 플라보피리돌은 선택적으로 자궁근종 세포의 세포주기 진행을 차단하여 세포증식을 억제하고 세포사를 유도할 수 있다.

[0018] 보다 상세하게는 자궁근종 세포에 플라보피리돌을 처리한 실험군과 DMSO를 처리한 대조군의 세포 생존능을 분석한 MTT 실험 결과, 도 1과 같이 플라보피리돌을 처리한 실험군에서 플라보피리돌의 용량의존적으로 자궁근종 세포 수가 감소하였으며, 특히 200nM 플라보피리돌을 처리한 실험군에서 자궁근종 세포의 생존 수가 50% 이상 감소된 것이 확인된 반면, 플라보피리돌을 정상 자궁근 세포에 처리한 결과에서는 정상 자궁근 세포의 유의적 감소가 확인되지 않았다.

[0019] 또한 플라보피리돌에 의한 자궁근종 세포의 증식능력을 확인하기 위하여 진행한 비색면역 분석결과, 도 2와 같이 플라보피리돌을 처리한 자궁근종 세포의 DNA 합성이 감소된 것이 확인되었으며 상기 MTT 실험결과와 유사하게 자궁근종 세포의 증식이 억제된 결과가 확인되었다.

[0020] 상기 결과에 대한 플라보피리돌이 자궁근종 세포에 미치는 영향을 분석하기 위하여 100 또는 200nM의 플라보피리돌을 처리한 실험군의 유동세포계수분석(FACS)과 웨스턴 블롯을 진행하였으며, 유동세포계수분석(FACS)결과인 도 3과 같이, 플라보피리돌을 처리한 실험군의 자궁근종 세포의 주기가 G1기로 멈춰있는 것이 확인되었다.

[0021] 또한 도 4의 웨스턴 블롯 결과, CDK 억제자인 $p21^{cip/wafl}$ 와 $p27^{kipl}$ 의 발현이 증가된 반면, CDK2, CDK4 및 Cyclin A의 발현은 감소되어 있었다.

[0022] 상기 결과들로부터 플라보피리돌이 자궁근종 세포에 선택적으로 CDK 유전자의 발현을 억제함으로써 세포주기의 진행을 차단하고 세포사를 유발하여 자궁근종 세포의 증식과 세포 생존을 감소시키는 것이 확인되었다.

[0023] 또한 본 발명은 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0024] 상기 약학조성물은 총 100 중량부에 대하여, 플라보피리돌 0.01 내지 10 중량부를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 구체예에서, 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 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 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0029] 상기 플라보피리돌의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및

기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 다른 구체예로 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 개선 또는 예방용 건강식품 조성물로 제공한다.

[0032] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품은 유효성분인 본 발명에 따른 플라보피리돌 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0033] 상기 건강식품에 함유된 플라보피리돌의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0034] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0036] **<실시예 1> 자궁근종 조직 수집**

[0037] 자궁근종 및 인접한 정상 자궁근층 조직을 자궁절제술로 얻었으며 자궁절제술은 계명대학교 동산 의학센터에서 수행되었다. 환자로부터 정보 동의서를 얻었으며, 시료의 수집 및 처리는 계명대학교 동산 의학센터의 윤리위원회의 안내에 따라 수행되었다.

[0038] 자궁근종 조직은 선택적으로 자궁근종에 대한 자궁절제술을 받은 여성의 가장 큰 섬유종의 중심부에서 주변부까지 수집하였다. 수집된 조직의 중심부는 5 ㎜ 부피로 제한하였으며 주변부는 캡슐에서 외부 5 ㎜ 까지로 보았다. 모든 자궁근층 내 평활근종을 포함하여 석회화하였으며 수증변성 자궁근종은 제외시켰다.

[0039] 환자는 40-48세의 여성으로 평균나이는 45세이었으며, 수술 전 최소 6개월 동안 호르몬 치료를 받지 않은 환자를 대상으로 월경주기의 증식기 단계 3 샘플 및 분비기 단계의 3 샘플을 수집하였다.

[0040] 섬유종 조직은 무균상태로 수집하여 즉시 100 units/mL의 항생제를 포함한 인산완충용액(phosphate-buffered saline; PBS)에 담그고 아이스 존재하에서 수술실에서 실험실로 운반하였다.

[0041] **<실시예 2> 초대 자궁근종 세포 배양**

[0042] 조직을 차가운 PBS로 두 번 반복 세척 후 멸균된 배양 디쉬에 5㎜ 조각으로 잘랐다. 상기 잘라진 조각을 25mM HEPES, 100 units/mL의 항생제, 1.5 mg/mL 콜라게나아제 IV(Sigma-Aldrich, USA) 및 0.2 mg/mL의 DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)이 첨가되어진 Hanks´Balanced salts(HBSS: Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)가 들어있는 50 mL 코니칼 튜브로 옮겨 담았다.

[0043] 모든 튜브를 항온수조에서 37℃유지하여 3시간 동안 교반시켰다.

[0044] 소화되지 않은 조직은 여과하고 1000 rpm으로 5분간 원심분리하여 얻은 세포 펠렛을 HBSS로 세척한 후 10% 태아소혈청(FBS), DMEM/F12 및 100 units/mL의 항생제로 구성된 배지에 분산시켰다.

[0045] 세포 분리 과정 후 자궁근종 세포의 특징 분석과 세포의 정확성을 확인하기 위하여 섬유아세포에 존재하는 중간경 필라멘트 단백질의 종류인 비멘틴 항체를 이용하였으며 추가적으로 데스민(desmin) 염색을 통하여 자궁근층의 평활근 세포를 식별하였다.

[0046] **<실시예 3> 세포 생존능 분석**

[0047] 세포 생존 수를 분석하기 위하여, 비색 3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸리움 브로마이드(colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT)분석을 수행하였다.

[0048] 먼저, 24-well 플레이트의 한 well당 정상 자궁근 세포와 자궁근종 세포를 $1\times10^5$ cell/mL로 분주하고 각각의 세포가 플레이트에 부착될 때까지 배양하였다. 세포 부착 후 플라보피리돌 50, 100, 150 및 200 nM과 대조군으로 DMSO가 포함된 배지로 교체하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후 MTT 시약을 첨가하고 37 ℃에서 추가로 3시간 동안 인큐베이션하여 495 nm로 광학밀도(Optical density; OD)를 측정하였다.

[0049] 세포 생존은 배지만 들어있는 well의 백그라운드 OD값을 뺀 후 대조군 well의 OD값으로 테스트 well의 OD값을 나누어 표준화하였으며, 세 번 반복 측정하여 유의 값과 표준편차를 계산하였다.

[0050] MTT 분석을 통하여 플라보피리돌이 정상 자궁근 세포와 자궁근종 세포 성장에 미치는 영향을 분석한 결과, 도 1과 같이 플라보피리돌을 처리한 실험군에서는 용량 의존적으로 세포의 생존이 감소되었다. 특히 200 nM 플라보피리돌을 처리한 실험군에서는 50% 이상 세포생존이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0051] 또한 정상 자궁근층 세포에 플라보피리돌을 처리한 경우, 세포 성장에 어떠한 감소를 나타내지 않았다. 상기 결과로부터 플라보피리돌이 정상 자궁근층 세포에는 영향을 주지 않은 반면, 자궁근종 세포의 성장을 억제하는 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0052] **<실시예 4> 세포 증식 분석**

[0053] 플라보피리돌의 DNA 합성 억제능력을 비색 면역분석을 통한 DNA에 포함되어 있는 5-브로모-2'-데옥시우리딘(BrDU)의 양을 평가하여 확인하였다.

[0054] 상기 비색 면역분석은 세포 증식 효소 결합 면역 분석(ELISA)와 BrDU-비색 키트(Roche Diagnostics)를 이용하여 수행하였다.

[0055] 자궁근종 세포를 96 well 플레이트의 한 well당 $1\times10^4$ 세포로 분주하고 24시간 배양 후 100, 200 nM의 플라보피리돌을 처리하였으며 분석 방법은 제조사의 설명서에 따라 수행하였고, 그 결과에 따라 나타난 분석 색은 490 nm에서 측정하였다.

[0056] 생존 세포 수의 감소가 증식 억제 때문인지를 확인하기 위하여 상기 비색면역 분석을 통하여 DNA 속으로 함입된 BrDU의 발현량을 플라보피리돌을 처리한 실험군과 처리하지 않은 대조군에서 확인하였다.

[0057] 그 결과 도 2와 같이, 플라보피리돌을 처리한 실험군에서 DNA 합성이 감소된 것이 확인되었으며, 그 결과로부터 세포증식의 감소가 유도되었다. 특히 200 nM 플라보피리돌을 처리한 실험군의 DNA 합성 감소가 가장 크게 나타났으며, DNA합성 감소에 따라, 세포 생존능 및 세포 성장의 감소 또한 확인되었다.

[0058] **<실시예 5> 플라보피리돌에 의한 세포주기 변화 확인**

[0059] 세포주기의 분포를 확인하기 위하여, 자궁근종 세포에 24시간 동안 100 또는 200 nM의 플라보피리돌을 처리한 후 세포를 수확하고 PBS로 세척하여 냉각된 70% 에탄올로 고정시켰다.

[0060] 상기 고정된 세포를 0.1% RNase A와 50㎍/mL 프로피리디움 요오드화물이 포함된 PBS에 현탁시켰다.

[0061] DNA 형광 발광은 유동세포계수분석기(FACS Calibur™; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 측정하고 세포 주기단계의 백분율은 DNA 히스토그램을 기본으로 하여 ModFit LT™ software (Becton Dickinson, USA)을 통하여 확인하였다.

[0062] 플라보피리돌이 세포주기에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 방법으로 수행한 유동세포계수분석 결과 도 3과 같이, G1 주기 상태의 자궁근종 세포 비율이 플라보피리돌의 용량의존적으로 증가된 것이 확인되었는데, 100nM을 처리한 실험군과 200nM을 처리한 실험군 모두 43 %와 54 % 증가된 것으로 나타났다.

[0063] 또한 G2 주기의 세포 비율이 18% 와 22%로 증가한 반면, S 주기의 세포 비율은 각각 19 % 와 14 %로 감소하였다.

[0064] **<실시예 6> 플라보피리돌에 의한 자궁근종 세포의 세포주기 조절 단백질 변화 확인**

[0065] 자궁근종 세포에 100 또는 200 nM 플라보피리돌을 24시간 처리한 후 EDTA(Thermo Scientific, USA)와 단백질 분해 효소 및 인산 가수분해 효소 억제제를 포함한 1×RIPA 버퍼(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사

용하여 세포를 수집하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0066] 단백질 농도는 단백질 분석 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 정량하였으며, 정량된 단백질의 일부를 적출하여 8-15% 소디움 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔에 분주하고 전기영동한 후 Semi-Dry Transfer Cell(Bio-Rad, USA)을 이용하여 나이트로셀룰로스 막에 트랜스퍼하였다.

[0067] 상기 단백질이 트랜스퍼된 막을 5% 탈지유를 녹인 트리스-버퍼 살린용액(Tris-buffered saline; TBS)으로 블로킹하고 세척 후 트랜스퍼 막에 일차 항체로 CDK2, CDK4, 레티노블라스토마(Rb)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), $p21^{cip/waf1}$, $p27^{kip1}$ (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA), Cyclin A (Abcam, Cambridge, MA, USA) 및 β-actin (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 처리하여 인큐베이션하고 호레디쉬 과산화효소가 결합된 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology, USA)와 반응시킨 후 화학발광(ECL) 시스템(Thermo Scientific, USA)를 통하여 단백질 밴드를 시각화하였다.

[0068] 각 밴드의 밀도를 Chemi-doc XRS imaging system (Bio-Rad, USA)을 이용하여 분석하였으며 그 결과는 대조군 %로 나타내었다.

[0069] 웨스턴 블롯 결과 도 4를 참고하면, $p21^{cip/waf1}$ 와 $p27^{kip1}$ 의 발현은 현저하게 증가한 반면, CDK2, CDK4, Rb 및 Cyclin A은 감소하였다.

[0070] 상기 결과로부터 플라보피리돌이 CDK2, CDK4 및 Cyclin A의 발현을 감소시키고 $p21^{cip/waf1}$ 와 $p27^{kip1}$ 의 발현을 증가시킴으로써 자궁근종 세포의 G1기 증가를 유도한 것으로 확인되었다.

[0071] **<실시예 7> 동물 준비**

[0072] 8주령 암컷 NSG(NOD-scid IL2Rgamma$^{null}$)생쥐들을 Jackson Laboratory (USA)에서 구매한 후 혈청의 에스트로겐 농도를 높은 수준으로 유지하기 위하여 17β-에스트라디올 0.05 mg을 60일 동안 유지되는 서방제형 17β-에스트라디올 펠렛(Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) 1알을 생쥐의 몸에 삽입하여, 생쥐 내에서 0.05 mg 17β-에스트라디올이 60일 동안 유지되도록 하였다.

[0073] 상기 17β-에스트라디올 펠렛은 이식수술 2일 전에 주입하였으며 동물은 마이크로 아이솔레이터 케이지(micro isolator cages)에 넣어 무균 환경시설에 별도로 보관하였으며, 12시간 명/암 주기와 22℃ 주위온도를 유지하여 사육하였다.

[0074] 모든 사육자재는 사용 전에 멸균처리하였으며, 동물들은 실험실 임의 양으로 식이와 물을 공급받았다.

[0075] **<실시예 8> 사람 자궁근종 이종이식 동물모델의 확립**

[0076] 해부학적, 생리학적 및 조직병리학적 변화를 비교하기 위하여 전통적인 방법의 조직이식 동물모델과 새로운 방법의 세포이식 동물모델을 확립하였다.

[0077] 사람 자궁근종 조직 또는 세포를 동물에 이식하기 위하여 NSG 생쥐에 케타민 80 mg/mL 및 자일라진 20 mg/mL의 혼합물 30μL를 복강에 주사하여 마취시켰다.

[0078] 먼저 사람 자궁근종 조직을 이식하기 위하여 난소절제술 3일 후 3 mm 작은 상처부위를 각 동물의 오른쪽 측면 피부에 형성하고 에스트로겐과 프로게스테론 혼합물을 투여하였다. 상기 실시예 1의 자궁근종 환자로부터 얻은 조직을 마트리겔(Becton Dickinson, USA)에 담근 후 피하에 삽입하고 상처부위를 봉합술로 폐쇄하였다.

[0079] 또 다른 방법은 사람 자궁근종 세포를 NSG 생쥐에 이식하는 방법으로 실시예 2와 같이 초대배양된 $1\times10^7$개의 사람 자궁근종 세포를 0.5 mL 마트리겔(Becton Dickinson, USA)과 실온에서 부드럽게 혼합하며 5분간 가온한 세포를 1cc 주사기를 이용하여 암컷 NSG 생쥐의 피부 아래에 주사하였다.

[0080] 상기 두 가지 방법의 이식은 30분 안에 완료되었으며 생쥐와 형성된 병변은 일주일에 한 번씩 면밀히 관찰되었다.

[0081] **<실시예 9> 사람 자궁근종 이종이식 동물모델의 조직학적 평가**

[0082] 이식 수술 후 8주 뒤, 상기 조직과 초대 세포 이종이식 동물모델을 안락사시키고 병리학적 평가를 수행하였다. 조직은 조직 형태의 총체적 시료들을 수집하여 조사하였으며 상기 동물모델은 마취 또는 수술과 관련된 합병증이 나타나지 않았다.

[0083] 상기 동물모델에서 채취한 조직을 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 포매하여 헤마톡실린과 에오신(H&E) 조직학적 평가를 수행하였다.

[0084] 또한 평활근종의 전형적인 조직학적 특징을 평가하기 위하여 항-알파 평활근 액틴(anti-alpha smooth muscle actin; αSMA; Dako, USA) 및 데스민(desmin; Abcam, USA)을 이용한 면역조직화학법을 수행하였으며, 에스트로겐 수용체(ER)과 프로게스테론 수용체(PR)의 발현을 평가하기 위하여 항-ER α 항체 및 항-PR 항체(Dako, Carpinteria, CA, USA)를 사용하였다.

[0085] 상기 조직학적 분석 결과 도 5와 같이, H&E 염색된 세포 이식모델에서 조직 이식 모델과 유사한 다양한 크기의 혈관의 현저한 증식과 잘 구분되는 결절을 확인할 수 있었다.

[0086] 또한 αSMA 발현을 평활근의 특정 마커로 분석하여 두 이식 모델의 αSMA와 데스민 수준 비교한 결과, 두 이식 모델의 자궁근종 세포 모두 αSMA와 데스민 단백질이 강한 양성을 나타내었다.

[0087] 그러나 종양은 망상의 소용돌이형 수축세포 다발인 반면, 자궁근종 세포는 길쭉하고 타원형인 핵과 산성 세포질을 가진 것으로 나타났으며, 풍부한 세포외 기질과 광범위한 세포의 혈류도 확인되었다.

[0088] 또한 상기 ER 및 PR 항체를 이용한 면역 조직학 분석 결과 도 5를 참고하면, 두 이식 모델의 ER 및 PR 단백질 수준과 세포 증식이 유사하게 나타났다.

[0089] **<실시예 10> 이종이식된 자궁근종 종양에서 플라보피리돌의 효과 확인**

[0090] 플라보피리돌의 효과를 평가하기 위하여, 종양의 부피는 일주일에 두 번 손으로 디지털 버니어 캘리퍼스를 이용하여 측정하였으며, 측정된 종양의 부피는 (최소 지름$^2$×최대 지름)/2 공식을 이용하여 계산하였다.

[0091] 종양의 크기가 대략 30 내지 45㎜$^3$ 로 만져서 알 수 있는 크기가 되었을 때, 생쥐를 무작위로 대조군과 플라보피리돌 실험군(n=5)으로 나누었다.

[0092] 대조군에는 0.1 % DMSO가 포함된 생리식염수를 실험군 생쥐에게는 5.0 또는 7.5 mg/kg의 플라보피리돌을 각각 복강에 일주일에 5일씩 3주간 투여하였다.

[0093] 그 후 약물투여 없이 2주간 종양의 성장을 디지털 버니어 캘리퍼스를 사용하여 모니터링하고 플라보피리돌을 투여하기 시작한 때의 종양의 크기를 100%로 하여 종양 부피의 백분율을 계산하였다.

[0094] 그 결과 도 6A를 참고하면, 3주간 플라보피리돌을 투여한 후 플라보피리돌 처리 실험군의 종양 성장은 대조군과 비교하여 현저한 감소를 나타냈으며, 플라보피리돌 투여 종료 후의 종양 크기 분석결과인 도 6C에서도 종양의 부피가 현저한 감소를 나타내는 것이 확인되었다.

[0095] 상기 결과로부터 플라보피리돌은 이종이식된 사람 자궁근종의 성장을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0096] 이하, 본 발명의 약학조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0097] **<제제예 1> 주사제의 제조**

[0098] 플라보피리돌 10 ㎎, 소디움 메타비설파이트 3.0 ㎎, 메틸파라벤 0.8 ㎎, 프로필파라벤 0.1 ㎎ 및 주사용 멸균 증류수 적량을 혼합하고 통상의 방법으로 최종 부피가 2 ㎖이 되도록 제조한 후, 2 ㎖ 용량의 앰플에 충전하고 멸균하여 주사제를 제조하였다.

[0099] **<제제예 2> 정제의 제조**

[0100] 플라보피리돌 10 ㎎, 유당 100 ㎎, 전분 100 ㎎ 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.

[0101] **<제제예 3> 캡슐제의 제조**

[0102] 플라보피리돌 10 ㎎, 유당 50 ㎎, 전분 50 ㎎, 탈크 2 ㎎ 및 스테아린산 마그네슘 적량을 혼합하고 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0103] 이하, 본 발명에 따른 플라보피리돌을 이용한 건강식품 제조예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아니라 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0104] **<제조예 1> 건강식품의 제조**

[0105] 플라보피리돌 10 ㎎, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 ㎍, 비타민 E 1.0 ㎎, 비타민 B 1 0.13 ㎎, 비타민 B 2 0.15 ㎎, 비타민 B 6 0.5 ㎎, 비타민 B 12 0.2 ㎍, 비타민 C 10 ㎎, 비오틴 10 ㎍, 니코틴산아미드 1.7 ㎎, 엽산 50 ㎍, 판토텐산 칼슘 0.5 ㎎), 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 ㎎, 산화아연 0.82 ㎎, 탄산마그네슘 25.3 ㎎, 제1인산칼륨 15 ㎎, 제2인산칼슘 55 ㎎, 구연산칼륨 90 ㎎, 탄산칼슘 100 ㎎, 염화마그네슘 24.8 ㎎)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.

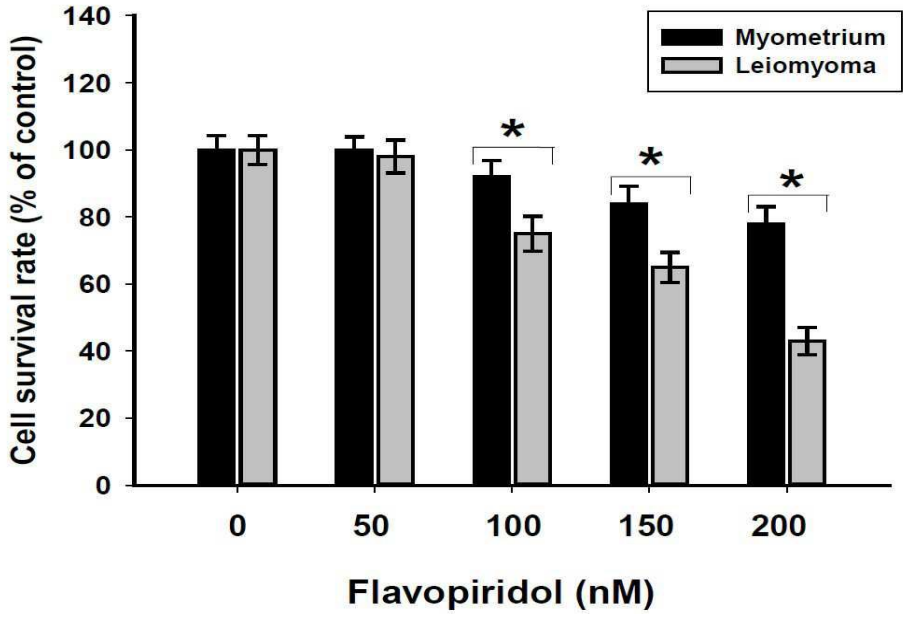
[0106] **<제조예 2> 건강음료의 제조**

[0107] 플라보피리돌 10 ㎎, 구연산 1000 ㎎, 올리고당 100 g, 매실농축액 2 g, 타우린 1 g 및 정제수를 가하여 전체 900 ㎖가 되도록 하며, 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하였다.

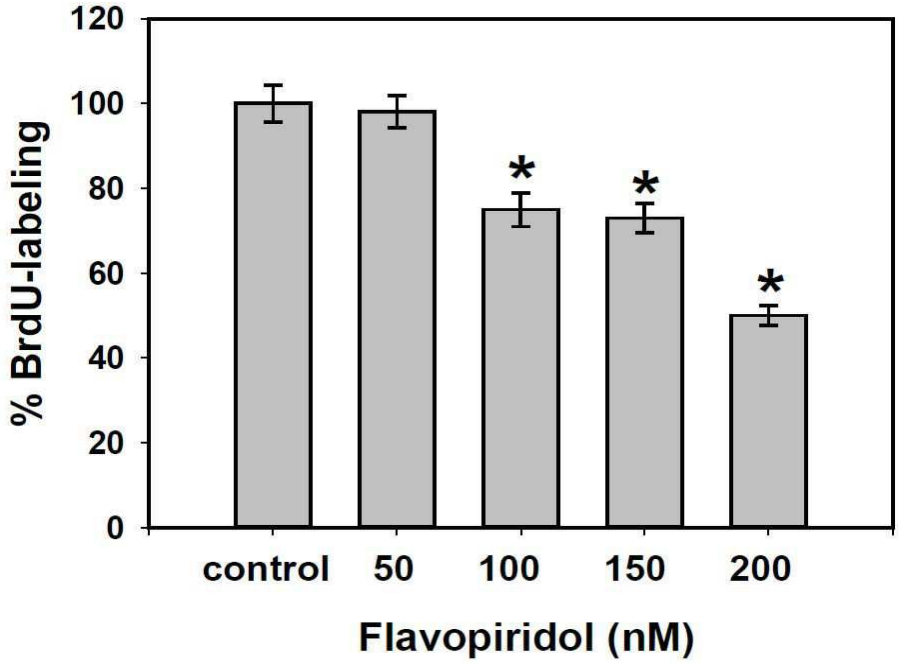
[0108] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

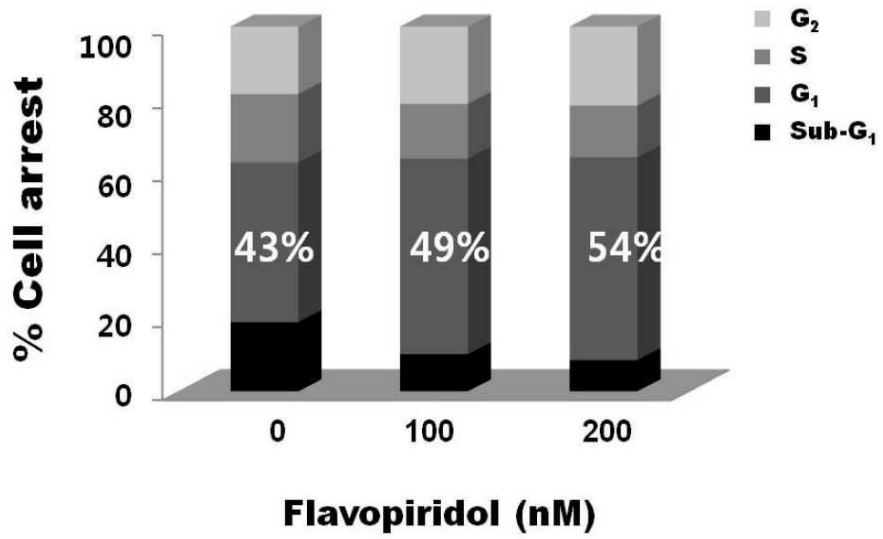
### 도면1



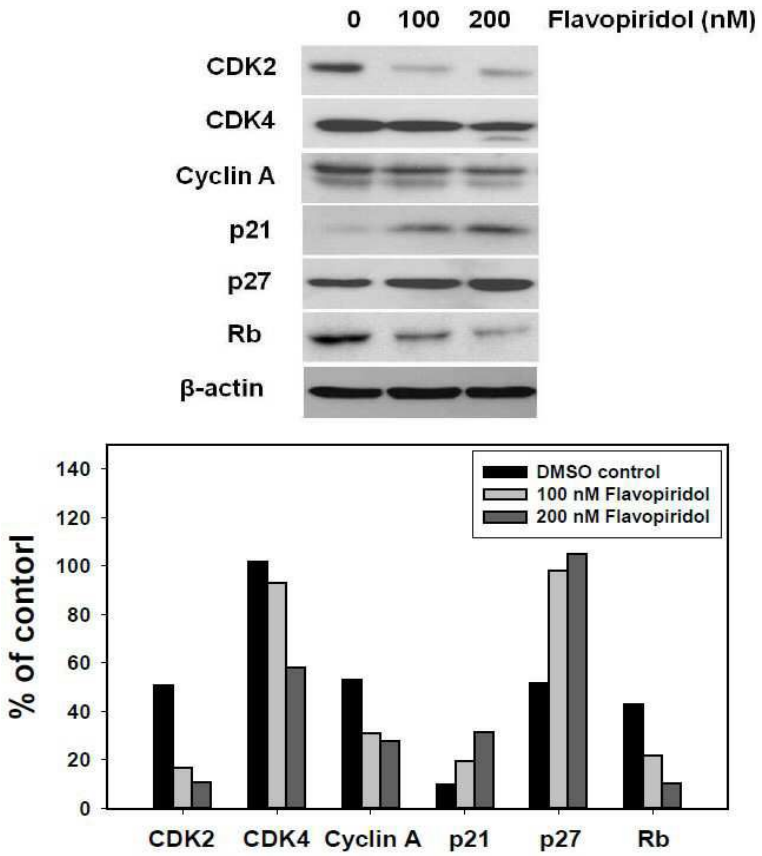
도면2


120
100
80
60
40
20
0
% BrdU-labeling
*
*
*
control
50
100
150
200
Flavopiridol (nM)

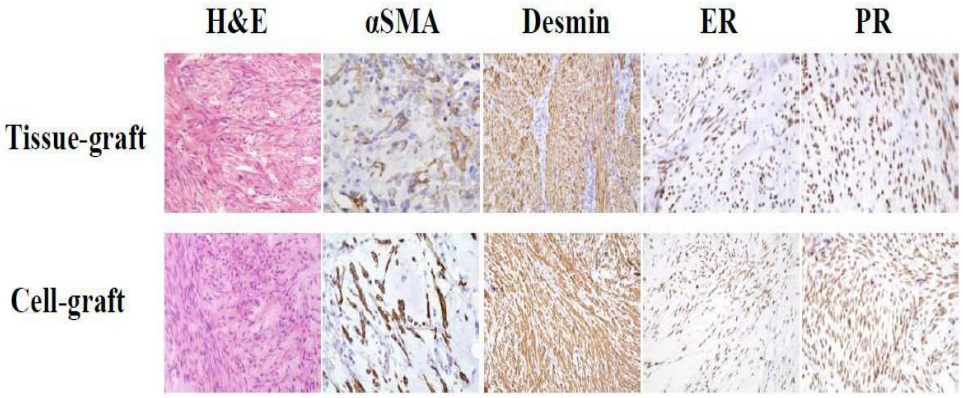
도면3


100
80
60
40
20
0
% Cell arrest
43%
49%
54%
G2
S
G1
Sub-G1
0
100
200
Flavopiridol (nM)

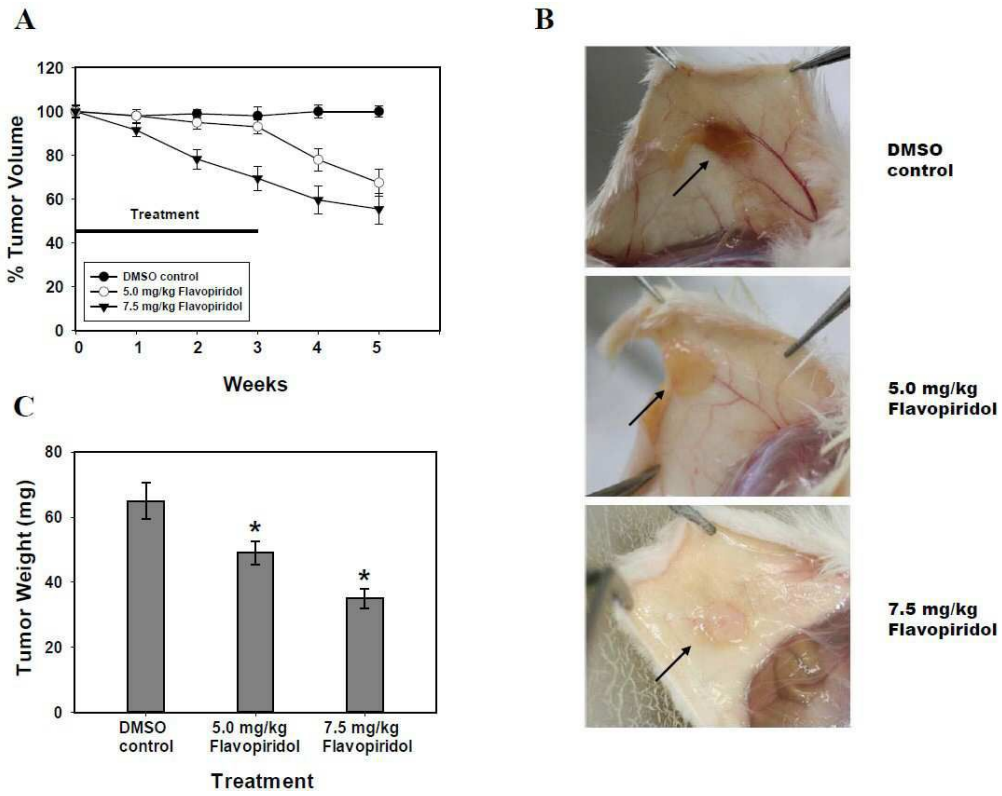
도면4


0
100
200
Flavopiridol (nM)
CDK2
CDK4
Cyclin A
p21
p27
Rb
β-actin
DMSO control
100 nM Flavopiridol
200 nM Flavopiridol
% of contorl
140
120
100
80
60
40
20
0
CDK2
CDK4
Cyclin A
p21
p27
Rb

도면5


H&E
αSMA
Desmin
ER
PR
Tissue-graft
Cell-graft

도면6


A
% Tumor Volume
Weeks
Treatment
DMSO control
5.0 mg/kg Flavopiridol
7.5 mg/kg Flavopiridol
B
DMSO control
5.0 mg/kg Flavopiridol
7.5 mg/kg Flavopiridol
C
Tumor Weight (mg)
DMSO control
5.0 mg/kg Flavopiridol
7.5 mg/kg Flavopiridol
Treatment