

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0125973 (43) 공개일자 2009년12월08일
(51) Int. Cl. A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0052087 (22) 출원일자 2008년06월03일 심사청구일자 2008년06월03일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내 (72) 발명자 박영인 서울특별시 강남구 압구정1동 369-1 현대아파트 20-302 동미숙 서울특별시 서초구 방배4동 808-4 그랑씨엘방배주 택 504호 성충기 광주광역시 북구 일곡동 816-3 동아아파트 105-1004 (74) 대리인 안소영	

전체 청구항 수 : 총 13 항

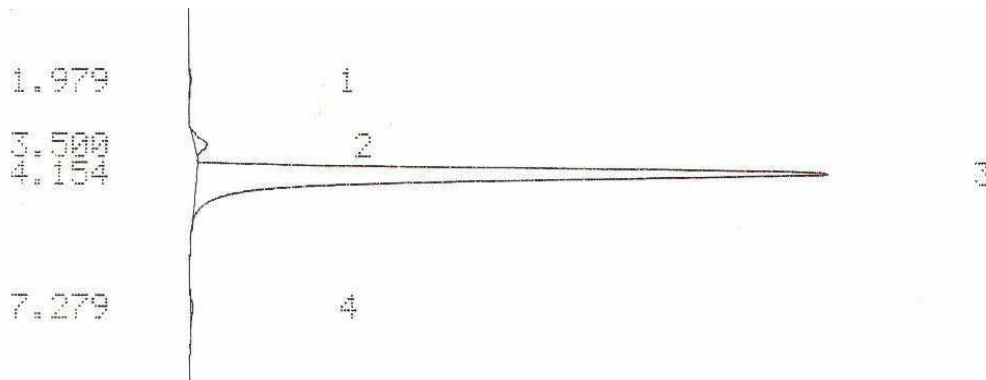
(54) 항안드로젠 조성물

(57) 요약

본 발명은 이카리틴을 유효성분으로 함유하는 항안드로젠 조성물 및 이카리틴 제조방법을 제공한다.

본 발명의 조성물은 항안드로젠작용을 나타내어 안드로젠관련질환 또는 상태의 예방 및 치료 또는 개선에 효과적이다. 또한 본 발명의 제조방법에 의해 순도 높은 이카리틴을 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

이카리틴을 유효성분으로 함유하는 항안드로겐 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 안드로겐의존질병 또는 증세의 치료 및 예방용인 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 안드로겐의존질병 또는 증세는 여드름, 안드로겐성 탈모, 전립선암, 남성형 다모증, 다낭성 난소증후군, 안드로겐 수용체를 갖는 균류의 감염증, 알츠하이머병, 골관절염, 유방캡슐형성증, 켈로이드(Keloids), 및 유착증 중에서 선택된 하나 이상인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적, 식품학적 또는 미용학적으로 허용되는 담체를 추가로 함유하는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이카리틴은 음양곽으로부터 추출된 이카리인을 가수분해하여 얻어진 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이카리틴은 에피메디움속 식물로부터 추출된 이카리인을 가수분해하여 얻어진 것인 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 에피메디움속 식물은 에피메디움 브레비코르눔(*Epimedium brevicornum*), 에피메디움 사기타툼(*Epimedium sagittatum*), 에피메디움 푸베센스(*Epimedium pubescens*), 에피메디움 우산렌스(*Epimedium wushanense*) 및 에피메디움 코레아눔(*Epimedium koreanum*)으로부터 선택된 하나 이상인 조성물.

청구항 8

- (a) 이카리인을 함유하는 에피메디움속 식물로부터 용매를 이용하여 이카리인을 함유하는 추출물을 제조하는 단계;
- (b) 이카리인 함유 추출물을 산 가수분해하는 단계; 및
- (c) 산 가수분해물을 효소 가수분해하는 단계를 포함하는 이카리틴 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, (b)단계의 산 가수분해 조건은 이카리인 함유 추출물을 90%에탄올 중 3%황산으로 가수분해하는 것인 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서, (c)단계의 효소는 베타-글루코시다아제인 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적 조성물인 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 조성물은 식품조성물인 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 조성물은 화장품조성물인 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 항안드로겐 조성물 및 이카리틴 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 안드로겐은 남성호르몬으로 남성호르몬 의존성 세포의 종양, 남성형 탈모, 좌창(여드름), 유착증(특히 복부수술 이후 발생함), 켈로이드 등의 질병 또는 상태와 관련 있는 것으로 알려지고 있다.
- <3> 안드로겐의 작용기전은 DNA의 특정부위와 상호작용하는 단백질 전사인자인 안드로겐 수용체(AR: androgenic receptor)를 경유하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 테스토스테론 및 그보다 강한 동족체인 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)의 작용모드는 안드로겐 수용체에 대한 결합에 의존하며, 안드로겐이 안드로겐 수용체와 결합된 이후에 비로소 알앤에이 폴리머라제 II에 의한 전사가 일어나게 되어 안드로겐작용을 나타내는 것이다.
- <4> 항안드로겐 약물은 안드로겐 수용체에서 안드로겐결합이 일어나지 않도록 안드로겐에 의해 활성화되는 수용체부위를 차단하는 등의 작용을 하는 물질로, 안드로겐작용을 억제하는 약물을 의미한다.
- <5> 항안드로겐 약물은 안드로겐과 관련된 질병 또는 상태 등을 치료하거나 완화시키는 용도로 사용될 수 있다.
- <6> 예를 들어, 미국 등록특허 제5,264,619호에는 항안드로겐성 질환 및 이환 알켄이 개시되어 있으며, 이들은 항안드로겐 작용에 의해 여드름, 안드로겐성 탈모, 안드로겐 수용체를 갖는 균류의 감염증, 알츠하이머병, 골관절염, 유방캡슐형성증(특히 유방성형 후 발생함), 켈로이드(Keloids), 유착증의 예방 및 치료효과를 나타내는 것이 개시되어 있다.
- <7> 또한, 대한민국 등록특허 제10-0508681호에는 안드로겐 수용체 억제제가 개시되어 있으며, 항안드로겐 작용에 의해 전립선암, 여드름 등의 안드로겐 의존성 종양, 안드로겐성 탈모증 등 과안드로겐 증후군을 치료하는 효과를 나타내는 것이 개시되어 있다.
- <8> 또한, 전립선암 (The androgen receptor as putative therapeutic target in hormone-refractory prostate cancer. Recent Patents Anticancer Drug Discov. 2007 Nov;2(3):203-11), 여드름 등의 안드로겐 의존성 종양 (Dermatology of androgen-related disorders.Clin Dermatol. 2006 Jul-Aug;24(4):289-98), 안드로겐성 탈모증 (The importance of dual 5alpha-reductase inhibition in the treatment of male pattern hair loss: results of a randomized placebo-controlled study of dutasteride versus finasteride. J Am Acad Dermatol. 2006 Dec;55(6):1014-23), 남성형 다모증 (Hirsutism; Treatment of hirsutism with combined pill containing drospirenone, Gynecol Endocrinol. 2008 Apr;24(4):220-3), 다낭성 난소증후군 (The antiandrogenic effect of flutamide improves uterine perfusion in women with polycystic ovary syndrome, Fertil Steril. 2002 Jun;77(6):1136-40) 등 과안드로겐 증후군을 치료하는 효과를 나타내는 것이 다양한 문헌에 개시되어 있다.
- <9> 이카리틴(icaritin)은 배당체인 이카리인(icariin)에서 당이 떨어져 나간 형태로 이카리인을 가수분해하여 얻을 수 있다. 이카리인은 에피메디움속 식물 등에 함유되어 있으며, 에피메디움속 식물을 건조하여 생약으로 사용하는 경우, 생약명으로는 음양곽으로 알려져 있다.
- <10> 음양곽은 에피메디움 브레비코르눔(*Epimedium brevicornum*), 에피메디움 사기타툼(*Epimedium sagittatum*), 에피메디움 푸베센스(*Epimedium pubescens*), 에피메디움 우산렌스(*Epimedium wushanense*) 또는 에피메디움 코레아눔(*Epimedium koreanum*)의 건조된 지상부위로, 신장을 강화하고, 힘줄과 뼈를 튼튼하게 하고, 류마티스 증상을 완화하는 등의 효과를 갖는 것으로 알려져 있으나, 안드로겐과의 관련성에 관한 연구는 찾아보기 어렵다.
- <11> 또한, 음양곽의 배당체 성분인 이카리인은 단순한 산 가수분해 방식에 의해서 당을 분리하여 이카리틴을 얻는 것이 어렵다는 문제점이 있다.

발명의 내용

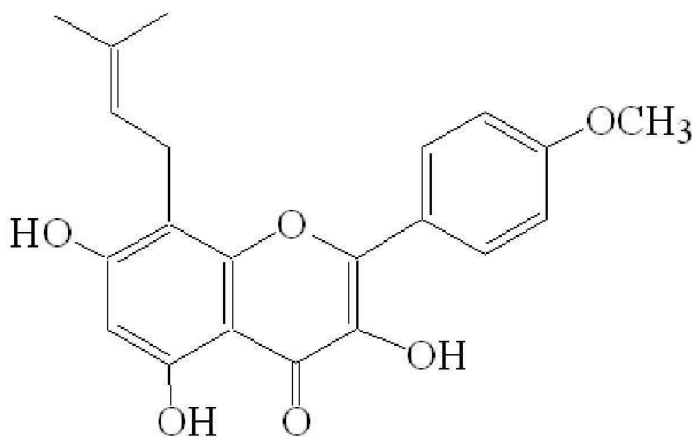
해결 하고자하는 과제

- <12> 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 항안드로겐 조성물을 제공하는 것이다.
- <13> 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 이카리틴의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

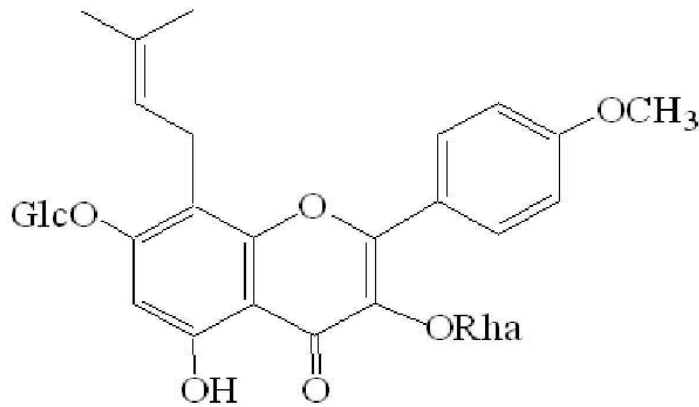
- <14> 본 발명은 이카리틴을 유효성분으로 함유하는 항안드로겐 조성물을 제공한다.
- <15> 본 발명은 또한, 이카리틴을 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는 안드로겐수용체 억제방법 및 본 발명의 조성물을 대상자에게 투여하는 단계를 포함하는 안드로겐 수용체 억제방법을 제공한다.
- <16> 상기 대상자는 인간을 포함한 포유류일 수 있다.
- <17> 또한, 본 발명은 이카리틴의 항안드로겐 용도 및 본 발명의 조성물의 항안드로겐 용도를 제공한다.
- <18> 이카리틴은 항안드로겐 작용을 나타내므로, 이카리틴을 여드름, 안드로겐성 탈모, 전립선암, 남성형 다모증, 다낭성 난소증후군, 안드로겐 수용체를 갖는 균류의 감염증, 알츠하이머병, 골관절염, 유방캡슐형성증(특히 유방성형 후 발생함), 켈로이드(Keloids), 또는/및 유착증 등 안드로겐의존질병의 치료, 개선, 또는/및 예방 등을 목적으로 이용할 수 있다.
- <19> 본 발명의 조성물은 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 화장품 조성물일 수 있다.
- <20> 이카리틴은 하기 화학식 1의 화합물이며, 하기 화학식 2의 화합물인 이카리인을 가수분해하여 얻어지거나, 합성될 수 있다. 이카리인은 에피메디움 브레비코르눔(*Epimedium brevicornum*), 에피메디움 사기타툼(*Epimedium sagittatum*), 에피메디움 푸베센스(*Epimedium pubescens*), 에피메디움 우산렌스(*Epimedium wushanense*) 또는 에피메디움 코레아눔(*Epimedium koreanum*) 등 에피메디움속 식물로부터 추출한 것을 사용할 수 있으며, 음양곽을 생약명으로 하는 약재로부터 추출된 것을 사용할 수 있다.
- <21> 이카리틴은 물, 에탄올 등과 갖은 약제학적으로 허용되는 용매에 의한 용매화된 형태 및 비용매화된 형태로 존재할 수 있다. 또한, 화학식 1 화합물은 상이한 다형체 형태로 존재할 수 있으며, 특허청구범위는 이러한 형태를 모두 포함한다.

화학식 1



<22>

화학식 2



<23>

<24> 본 발명의 조성물은 이카리틴을 유효성분으로 함유하는 안드로겐의존질병 또는 증세의 예방 및 치료용 조성물일 수 있다.

<25> 상기 안드로겐의존질병 또는 증세는 여드름, 안드로겐성 탈모, 전립선암, 남성형 다모증, 다낭성 난소증후군, 안드로겐 수용체를 갖는 균류의 감염증, 알츠하이머병, 골관절염, 유방캡슐형성증(특히 유방성형 후 발생함), 켈로이드(Keloids), 또는/및 유착증 등일 수 있다.

<26> 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 유효성분 이외에 추가로 약학적, 식품학적 또는/및 미용학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 제제화 할 수 있다.

<27> 약학적, 식품학적 또는/및 미용학적으로 허용되는 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 용매, 봉해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제를 부가적으로 첨가할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

<28> 본 발명의 약학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.

<29> 본 발명의 약학적 조성물은 목적에 따라 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로 등을 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

<30> 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 활성성분의 투여량은 체중 60kg 성인기준으로 이카리틴 0.1mg/kg ~ 500mg/kg의 범위 내에서 조절할 수 있다. 다만, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

<31> 또한, 본 발명의 식품 조성물은 안드로겐의존질병 또는 증세의 예방 또는 개선용일 수 있다.

<32> 상기 안드로겐의존질병 또는 증세는 여드름, 안드로겐성 탈모, 전립선암, 남성형 다모증, 다낭성 난소증후군, 안드로겐 수용체를 갖는 균류의 감염증, 알츠하이머병, 골관절염, 유방캡슐형성증(특히 유방성형 후 발생함), 켈로이드(Keloids), 또는/및 유착증 등일 수 있다.

<33> 본 발명의 식품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 담체와 함께 건조한 후 캡슐화하거나 기타 정제, 과립, 분말, 음료, 죽 등의 형태로 제형화할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 식품 형태로 제조 가능하다.

<34> 또한, 본 발명의 화장품 조성물은 안드로겐의존질병 또는 증세의 예방 또는 개선용일 수 있다.

<35> 상기 안드로겐의존질병 또는 증세는 여드름, 안드로겐성 탈모, 전립선암, 남성형 다모증, 다낭성 난소증후군, 안드로겐 수용체를 갖는 균류의 감염증, 알츠하이머병, 골관절염, 유방캡슐형성증(특히 유방성형 후 발생함), 켈로이드(Keloids), 또는/및 유착증 등일 수 있다.

- <36> 본 발명의 화장품 조성물의 제형은 통상의 방법에 따라 제조하며, 적당한 담체를 이용하여 로션제, 크림제 등의 형태로 제형화 할 수 있으며, 상기 기재한 것 외에도 모든 화장품 형태로 제조 가능하다.
- <37> 본 발명의 조성물은 국소로 투여될 수 있다. 국소투여는 피부 및/또는 모발에 대한 이카리틴(및 조성물)의 직접적인 적용을 의미한다. 본 발명의 국소용 조성물은 용액, 로션, 납고, 크림, 연고, 리포솜, 스프레이, 젤, 폼(foam), 롤러스틱(roller stick), 또는 피부과에서 일상적으로 사용되는 그 밖의 모든 제형의 형태일 수 있다.
- <38> 본 발명의 조성물은 또한, 클린싱(cleansing) 비누 또는 바아(bar)를 구성하는 고체제제로 구성될 수 있으며, 통상적인 제조방법에 따라 제조될 수 있다.
- <39> 본 발명의 조성물은 모발에 대해서 수성, 알콜성 또는 수성-알콜성 용액의 형태, 크림, 젤, 에멀전, 무스, 에어로졸 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 모발 보호 조성물 특히 샴푸, 모발-셋팅 로션, 트리팅 로션, 스타일링 크림 또는 젤, 염색 조성물, 모발 상실을 방지하기 위한 로션 또는 젤 등일 수 있다.
- <40> 본 발명의 조성물 내에서 이카리틴의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.001~99중량%의 양으로 함유될 수 있다.
- <41> 이카리틴은 단독으로 또는 항안드로젠 효과가 있다고 밝혀진 국소용 미녹시딜(Minoxidil) 및 그 유도체, 및 경구용 피나스테라이드(Finasteride) 등과 병행하여 항안드로젠 효과를 증가시킬 수 있다.
- <42> 또한, 본 발명은 (a) 이카리틴을 함유하는 에피메디움속 식물로부터 용매를 이용하여 이카리틴을 함유하는 추출물을 제조하는 단계; (b) 이카리틴 함유 추출물을 산 가수분해하는 단계; 및 (c) 산 가수분해물을 효소 가수분해하는 단계를 포함하는 이카리틴의 제조방법을 제공한다.
- <43> 상기 (b)단계는 이카리틴 함유 추출물을 90%에탄올 중 3%황산으로 가수분해하는 것일 수 있으며, 상기 (c)단계의 효소는 베타-글루코시다아제일 수 있다.
- <44> 구체적으로 본 발명의 이카리틴 제조방법은 이하와 같다.
- <45> (a)단계는 건조 음양곽 분말을 70% 메탄올로 가열추출을 3회 반복하여 여과한 후 감압 농축하여 메탄올 추출물 얻고, 메탄올 추출물을 물에 현탁시키고 CHCl_3 , 에틸아세테이트, 노말-부탄올(n-BuOH)로 순차적으로 분획한다. 에틸아세테이트추출물을 취하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피(에틸아세테이트 : 메탄올 : 물 = 10 : 2 : 1)를 이용하여 5개의 소분획(F1 - F5)을 얻은 후, 이카리틴의 함유가 확인된 분획을 취하여 이카리틴을 분리한다. 이카리틴이 함유된 분획을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (에틸아세테이트 : 메탄올 : 물 = 100 : 16.5 : 13.5)를 재실시하여 이카리틴의 순도를 높인 다음, 이어 세파덱스 컬럼크로마토그래피(Sephadex LH-20 column chromatography(MeOH))를 통해 정제된 이카리틴을 얻을 수 있다.
- <46> 이카리틴으로부터 (b)단계와 (c)단계를 거쳐 이카리틴을 제조할 수 있으며, 마일드 산가수분해(mild acidic hydrolysis)를 행하여 얻은 물질을, 다시 효소 가수분해를 행하여 이카리틴을 제조할 수 있다. 효소 가수분해물을 다시 에틸아세테이트로 추출, 농축하여 에틸아세테이트추출물을 얻고 이를 실리카겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 정제된 이카리틴을 얻을 수 있다.
- <47> 이카리틴은 단순한 산 가수분해 방식에 의해서 당을 분리하여 이카리틴을 얻는 것이 어려우며, 본 발명의 마일드 산 가수분해와 효소 가수분해에 의해 이카리틴을 제조하는 것이 가능하며, 정제에 의해 순도 높은 이카리틴의 제조가 가능하다.

효 과

- <48> 본 발명의 이카리틴을 함유하는 조성물은 항안드로젠작용을 나타내어 안드로겐관련질환 또는 상태를 예방 및 치료 또는 개선하는 것에 효과적이다. 또한 본 발명의 제조방법에 의해 순도 높은 이카리틴을 제조할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <49> 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 제시한다. 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- <50> <실시예 1> 이카리틴의 제조
- <51> 1) 재료
- <52> 2005년 5월 강원도 철원 재배지에 방문하여, 건조한 삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)의 지상부(생약명:

음양곽) 11 kg을 구입하여 전문가에게 감정, 인증받아 사용하였다.

2) 음양곽에서 이카리인 분리

가. 추출 및 용매 분획

- 건조 음양곽 분말 총 3.8kg을 70% 메탄올로 가열추출을 3회 반복하여 여과한 후 감압 농축하여 메탄올 추출물 970g을 얻었다.

- 메탄올 추출물을 물에 현탁시키고 CHCl_3 , 에틸아세테이트, 노말-부탄올(n-BuOH)로 순차적으로 분획하였다.

나. 컬럼 크로마토그래피에 의한 이카리인의 분리

- 에틸아세테이트추출물(61.3g) 중 60g을 취하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피(에틸아세테이트 : 메탄올 : 물 = 10 : 2 : 1)를 이용하여 5개의 소분획(F1 - F5)을 얻었다. 이 중 이카리인의 함유가 확인된 분획 F3(35.47g)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (에틸아세테이트 : 메탄올 : 물 = 100 : 16.5 : 13.5)를 재실시하여 이카리인의 순도를 높인 다음, 이어 세파덱스 컬럼크로마토그래피(Sephadex LH-20 column chromatography(MeOH))를 통해 정제된 이카리인 4.8 g을(수율 0.126%)얻었다.

다. 동정 및 순도 시험

- 이카리인의 동정은 표준품과 HPLC 및 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FAB-MS의 직접 비교에 의하여 확인하였다. 이카리인 표준품(ChromaDex Inc.)과의 공-스파팅(co-spotting)에 의한 동정 및 순도를 확인하기 위해 다음과 같은 조건 하에 HPLC를 행하였다. HPLC 크로마토그램은 도 1에 나타내었다.

- HPLC 조건:

HPLC 펌프: Jasco 980 Series

컬럼: Atlantis C₁₈ (4.6 × 150 mm)

이동상: MeOH: H₂O (2:1)

유속: 1 mL/min

주입부피: 10 μL

검출: 230 nm

정제된 이카리인은 황색분말(Yellow powder)의 성상이며, 화학식은 $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$, LC-MS 및 FAB-MS에 의해 측정된 분자량은 676이며, 스펙트럼 데이터로부터 화학식 2의 화합물인 이카리인임을 확인하였고, HPLC를 통해 94.8%의 순도를 나타냄을 확인하였다.(Preparative isolation and purification of three flavonoids from the Chinese medicinal plant *Epimedium koreanum* Nakai by high-speed counter-current chromatography. J Chromatogr A. 2005 Jan 28;1064(1):53-7)

- $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.57 (1H, s, OH-5), 7.88 (2H, d, $J=8.7$, H-2', 6'), 7.11 (2H, d, $J=8.7$, H-3', 5'), 6.64 (1H, s, H-6), 5.14 (1H, d, $J=7.0$, anomeric proton), 3.85 (3H, s, OCH_3), 1.69 (3H, s, H-14), 1.60 (3H, s, H-15), 0.78 (3H, d, $J=5.7$, H-6")

- $^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 178.6 (C-4), 161.7 (C-7), 160.8 (C-5), 159.4 (C-4'), 157.6 (C-9), 153.3 (C-2), 134.9 (C-3), 131.4 (C-13), 130.9 (C-2', 6'), 122.5 (C-12), 122.4 (C-1'), 114.4 (C-3', 5'), 108.6 (C-8), 105.9 (C-10), 102.3 (C-1"), 100.8 (C-1''), 98.4 (C-6), 77.5 (C-3''), 76.9 (C-5''), 73.7 (C-2''), 71.4 (C-4''), 71.0 (C-3''), 70.6 (C-2''), 70.4 (C-5''), 60.9 (C-6''), 55.8 (OCH_3), 25.8 (C-14), 21.7 (C-11), 18.2 (C-6'), 17.7 (C-15)

- FAB-MS m/z : 677 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 531 $[\text{M}+\text{H}-\text{Rha}]^+$, 369 $[\text{M}+\text{H}-\text{Rha}-\text{Glc}]^+$

4) 가수분해를 통한 이카리틴의 분리

- <73> 이하와 같이 마일드 산가수분해(mild acidic hydrolysis)(90% 에탄올 중 3% 황산)을 행하여 얻은 물질을 다시 효소 가수분해(베타-글루코시다아제, pH 5.0, 하룻밤)를 행하여 에틸아세테이트로 추출, 농축하여 에틸아세테이트추출물을 얻고 이를 실리카겔 컬럼크로마토그래피 (에틸아세테이트:메탄올 = 5:1)를 실시하여 이카리틴을 얻었다.
- <74> 가. 마일드 산 가수분해
- <75> - 둥근 플라스크에 90%에탄올 중 3% H₂SO₄ 100ml에 이카리인 100mg을 넣고 오일배쓰에서 환류를 90분간 실시하였다.
- <76> - 열음을 넣어 즉시 반응을 멈추게 하고, 감압 증발시켰다.
- <77> - 에탄올을 진공증발농축기에서 날려 보내고 물이 남으면 에틸아세테이트를 동량 가하여 추출하였다.
- <78> - 얻은 에틸아세테이트층에 물 3 - 4회 세척하여 중성을 pH 종지로 확인하였다.
- <79> - 에틸아세테이트층을 증발시켜 산 가수분해물을 얻었다.
- <80> 나. 효소 가수분해
- <81> - 다음과 같이 각각 A, B 용액을 제조하여 B 용액을 교반하면서 천천히 A 용액을 가하여 교반 인큐베이터(shaking incubator)에서 37 °C 하에 24시간 반응시켰다.
- <82> A 용액 : 산 가수분해물 50 mg을 45 ml 메탄올(aqueous methanol)에 녹였다.
- <83> B 용액 : 0.1M 아세트산 완충액 (pH 5.0) 120ml에 베타-글루코시다아제 170mg을 용해시켰다.
- <84> 다. 정제
- <85> - 실리카겔 컬럼 크로마토그래피법(에틸아세테이트:메탄올 = 5:1)을 행하여 정제된 이카리틴 1.3 g(수율 0.034%)을 얻었다.
- <86> 라. 동정 및 순도 시험
- <87> - 가수분해를 통해 얻은 정제된 이카리틴을 ¹H, ¹³C-NMR, EI-MS를 통하여 동정하고 HPLC로 순도를 확인하였다. HPLC 크로마토그램은 도 2에 나타내었다.
- <88> - HPLC 조건:
- <89> HPLC 펌프: Jasco 980 Series
- <90> 컬럼: Atlantis C₁₈ (4.6 × 150 mm)
- <91> 이동상(Mobile phase): 아세토니트릴(100%)
- <92> 유속: 1 mL/min
- <93> 주입부피: 10 μL
- <94> 검출: 230 nm
- <95> 정제된 이카리틴의 화학식은 C₂₁H₂₀O₆, EI-MS에 의해 측정된 분자량은 368이며, 스펙트럼 데이터로부터 화학식 1 화합물인 이카리틴임을 확인하였고, HPLC를 통해 97%의 순도임을 확인하였다.
- <96> - ¹H-NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) δ : 2.437, 2.557 (each 3H, *s*, C_{14,15}-Me), 4.236(2H, *m*, H-11), 4.652 (3H, *s*, OMe), 5.985 (1H, *brt*, H-12), 6.29 (1H, *s*, H-6), 7.93 (2H, *d*, J=11Hz, H-3',5'), 8.93(2H, *d*, J=8.5Hz, H-2',6'), 10.25 (1H, *s*, C₇-OH), 11.53 (1H, *s*, C₃-OH), 13.16(1H, *s*, C₅-OH)
- <97> - ¹³C-NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) δ :185.878 (C-4), 170.972 (C-7), 170.129 (C-5), 167.951(C-4'), 163.179 (C-9), 155.822 (C-2), 145.569 (C-3), 140.668 (C-13), 138.822 (C-2',6'), 133.223 (C-1'), 132.143 (C-12), 123.748 (C-3',5'), 115.284 (C-8), 112.691 (C-10), 107.492 (C-6), 65.036 (OCH₃), 35.079 (C-14), 30.849

(C-11), 27.482 (C-15)

<98> - EI-MS (m/z) 368(100), 353(78), 313(59), 300(44), 165(11), 135(33)

<99> <실시예 2> PC3/AR 세포를 이용한 이카리틴의 항안드로겐 효과 확인

<100> PC3 세포(ATCC, 미국)에 안드로겐 수용체(AR) 플라스미드(pCMV 플라스미드에 AR 염기서열을 첨가하여 제조함.)를 일시적으로 트랜스펙션시킨 PC3/AR 세포에 안드로겐 반응 요소(androgen responsive element)를 함유하고 있는 pMMTV-Luc 플라스미드(MMTV 프로모터를 pGL3 베이직벡터(basic vector)에 삽입하여 제조함)와 트랜스펙션 효율(transfection efficiency)을 측정하기 위해 레닐라 루시퍼라아제를 발현하는 플라스미드(pRL vector, 프로메가, 미국)를 공-트랜스펙션(co-transfection)(Exgene 500 키트 사용, MBI Fermentas)시켜 PC3/AR세포를 준비하였다.

<101> 준비된 PC3/AR세포에 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)(와코, 일본) 또는/및 실시예 1의 이카리틴을 표 1의 농도로 48시간 동안 처리한 후 발현된 루시퍼라아제의 활성도를 듀얼 루시퍼라아제 어쎬이 키트(프로메가, 미국)로 측정하였다.

표 1

<102>

구분	DHT	이카리틴
DHT처리	1×10^{-8} M	-
DHT/이카리틴처리(1×10^{-6} M)	1×10^{-8} M	1×10^{-6} M
DHT/이카리틴처리(5×10^{-6} M)	1×10^{-8} M	5×10^{-6} M
DHT/이카리틴처리(10×10^{-6} M)	1×10^{-8} M	10×10^{-6} M
DHT/이카리틴처리(20×10^{-6} M)	1×10^{-8} M	20×10^{-6} M
DHT/이카리틴처리(50×10^{-6} M)	1×10^{-8} M	50×10^{-6} M

<103> 상대적인 루시퍼라아제 활성 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3의 NT는 아무런 처리를 하지 않은 대조군을 의미한다. 그 결과 PC3/AR 세포에서 이카리틴이 농도의존적으로 항안드로겐 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 실시예 1의 이카리틴 50×10^{-6} M 처리한 PC3/AR세포에서 이카리틴 처리하지 않은 경우에 비하여 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)의 작용을 53.8% 정도 저해하는 것으로 나타났다.

<104> <실시예 3> 이카리틴의 항안드로겐 효과 확인 - 이카리틴의 안드로겐과 안드로겐수용체 결합 저해 실험

<105> 이카리틴의 안드로겐과 안드로겐수용체 결합 저해 효과 확인은 김 등 (Effects of 2,4-D and DCP on the DHT-Induced Androgenic Action in Human Prostate Cancer Cells, 2005, TOXICOLOGICAL SCIENCES 88(1), 52-59)의 방법에 따라 실시하였다.

<106> CHO/AR 세포(ATCC에서 구입한 세포주에 pCMV-AR을 트랜스펙션시켜 제조함)를 준비하였다.

<107> 준비된 세포에 [^{3} H]로 표지된 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)(와코, 일본)과 이카리틴을 각각 하기 표에 기재된 농도로 처리하고 2시간 방치한 후 세포를 포스포에이트 완충 생리식염수로 2회 세척한 후 2% SDS, 10% 글리세롤, 10mM 트리스를 함유하고 있는 완충액(pH 6.8)으로 세포를 수거한 후 방사선량을 측정함으로써, [^{3} H]로 표지된 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)과 안드로겐 수용체의 결합율을 측정하였다. 그 결과를 도 4(▲)에 나타내었다. 이카리틴의 농도증가에 따라 [^{3} H]로 표지된 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)의 안드로겐 수용체와 결합율이 감소하는 것으로 나타났다.

표 2

<108>

구분	DHT	이카리틴
이카리틴 무처리군	5nM	-
이카리틴 처리군(5nM)	5nM	5nM
이카리틴 처리군(50nM)	5nM	50nM
이카리틴 처리군(500nM)	5nM	500nM

또한, 준비된 세포에 [³H]로 표지된 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)(와코, 일본)과 비표지된 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)을 각각 하기 표에 기재된 농도로 상기 이카리틴의 경우와 동일하게 처리하고, 방사선량을 측정함으로써, [³H]로 표지된 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)과 안드로겐 수용체의 결합율을 측정하였다. 그 결과를 도 4(◆)에 나타내었다. 비표지된 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)의 농도증가에 따라 [³H]로 표지된 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)의 안드로겐 수용체와 결합율이 감소하는 것으로 나타났다.

표 3

구분	DHT	[³ H]표지 DHT
[³ H]표지 DHT 무처리	5nM	-
[³ H]표지 DHT 처리(5nM)	5nM	5nM
[³ H]표지 DHT 처리(50nM)	5nM	50nM
[³ H]표지 DHT 처리(500nM)	5nM	500nM

상기 결과로부터 이카리틴에 의해 안드로겐과 안드로겐수용체의 결합이 저해됨을 확인할 수 있으며, 이러한 결과는 이카리틴의 항안드로겐작용의 기전이 안드로겐과 안드로겐수용체의 결합 저해에 의한 수 있음을 나타내는 것이다.

<실시에 4> 이카리틴의 항안드로겐 효과 확인 - 이카리틴의 안드로겐과 결합한 안드로겐수용체의 핵내이동 저해 실험

pAR-GFP를 일시적으로 발현시킨 PC3세포(PC3세포(ATCC)에, GFP백터(Invitrogen)에 AR을 클로닝한 플라스미드를 트랜스팩션 시킴)를 준비하였다.

pAR-GFP가 발현된 PC3세포에 대하여 실시예 1의 이카리틴 및/또는 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)을 하기 표에 기재된 농도로 처리한 후 30분 경과시 GFP-AR이 핵으로 이동하는 양상을 공초점 현미경(LSM 510 META, 자이스사)으로 관찰하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5의 대조군은 이카리틴 및 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)을 처리하지 않은 pAR-GFP가 발현된 PC3세포에 대한 관찰결과이다.

표 4

	이카리틴농도	DHT농도
이카리틴처리	1×10^{-6} M	-
이카리틴/DHT처리	1×10^{-6} M	1×10^{-9} M
DHT처리	-	1×10^{-9} M

이카리틴 처리하였을 때는 AR-GFP가 핵내로 이동하지 않았으며, 이카리틴과 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)을 동시 처리하였을 때에도 AR-GFP가 핵내로 이동하지 않았다.

반면, 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)을 처리하였을 때 많은 세포의 AR-GFP가 핵내로 이동되었다.

상기 결과로부터 이카리틴 단독처리에 의해 안드로겐 수용체가 핵으로 이동하지 않아 안드로겐 작용을 나타낼 수 없도록 하며, 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)이 결합한 안드로겐 수용체가 핵내로 이동하는 것을 이카리틴이 저해하는 것으로 보인다.

안드로겐은 안드로겐 수용체와 결합하여 핵안드로겐으로 이동한 후 안드로겐 반응 요소(androgen responsive element)와 작용하여 안드로겐 작용을 나타내므로, 5-알파 디히드로테스토스테론(DHT)이 결합한 안드로겐 수용체의 핵내로 이동하는 것을 이카리틴이 저해함으로써 항안드로겐 작용을 나타낸다.

상기 실시예 2 내지 4의 결과로부터 이카리틴은 안드로겐이 수용체와 결합하는 것의 저해, 수용체와 결합된 안드로겐이 핵내로 이동하는 것의 저해 등의 기전에 의해 항안드로겐 작용을 나타내는 것으로 보인다.

<121> 상기 이카리틴의 항안드로겐 작용에 의해 여드름, 안드로겐성 탈모, 전립선암, 남성형 다모증, 다낭성 난소증후군, 안드로겐 수용체를 갖는 균류의 감염증, 알츠하이머병, 골관절염, 유방캡슐형성증(특히 유방성형 후 발생함), 켈로이드(Keloids), 또는 유착증 등 안드로겐의존질환을 예방 및 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<122> 도 1은 본 발명의 제조방법중 일 실시예에 따라 제조된 이카리틴의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

<123> 도 2는 본 발명의 제조방법중 일 실시예에 따라 제조된 이카리틴의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

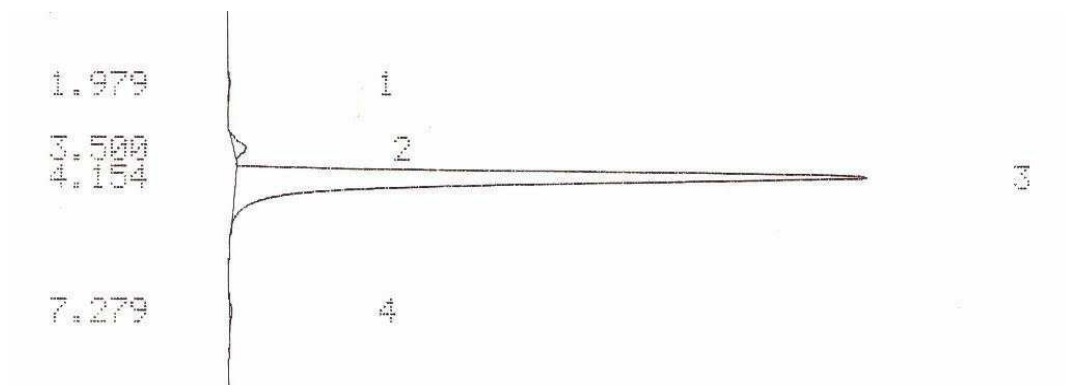
<124> 도 3은 PC3/AR세포에서 이카리틴의 항안드로겐 효과측정을 위한 루시페라아제 활성측정 결과를 나타낸 그래프이다.

<125> 도 4는 5-알파 디하이드로테스토스테론(DHT)와 안드로겐 수용체의 결합에 대한 이카리틴의 영향을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

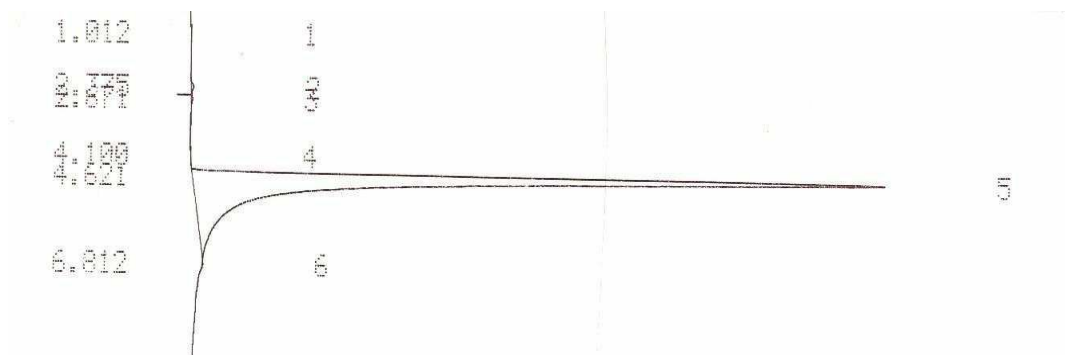
<126> 도 5는 이카리틴의 안드로겐과 결합한 안드로겐수용체의 핵내이동 저해 효과를 확인한 결과를 나타낸 그림이다.

도면

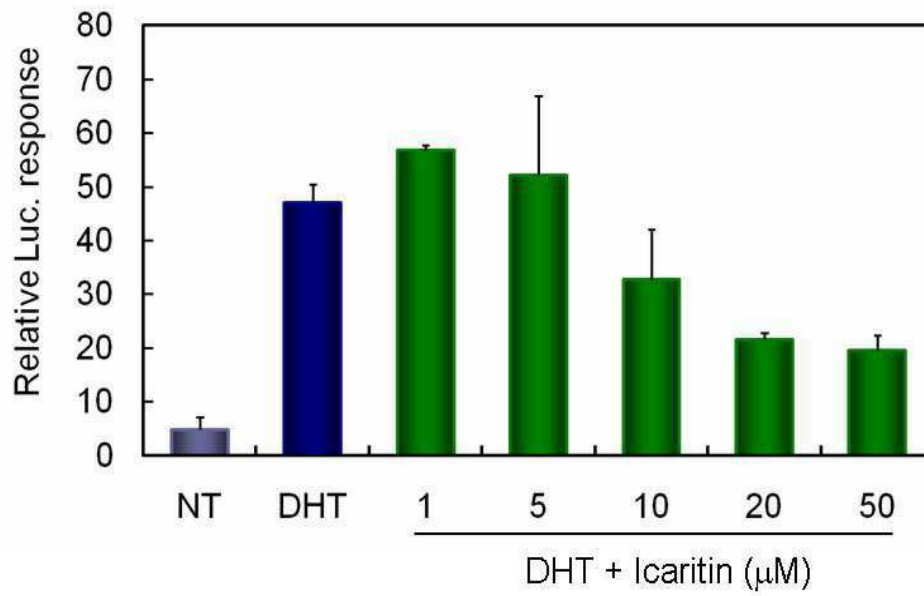
도면1



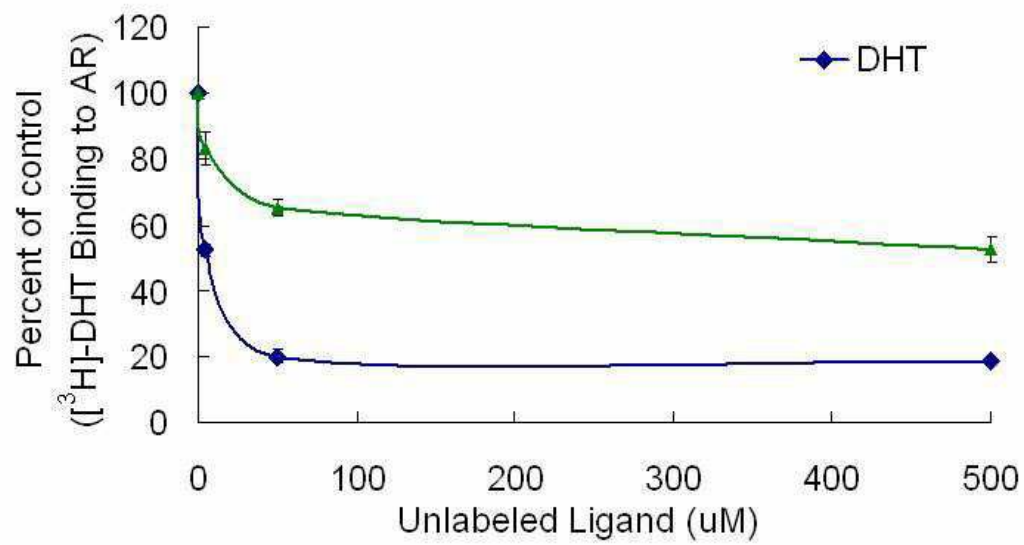
도면2



도면3



도면4



도면5

