



- (51) 국제특허분류:
A61K 31/155 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/009538
- (22) 국제출원일: 2014년 10월 10일 (10.10.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0121108 2013년 10월 11일 (11.10.2013) KR
10-2014-0030896 2014년 3월 17일 (17.03.2014) KR
10-2014-0134451 2014년 10월 6일 (06.10.2014) KR
10-2014-0134452 2014년 10월 6일 (06.10.2014) KR
- (71) 출원인: 가톨릭대학교 산학협력단 (THE CATHOLIC UNIVERSITY OF KOREA INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 137-701 서울시 서초구 반포대로 222, 가톨릭대학교 성의교정 내, Seoul (KR).

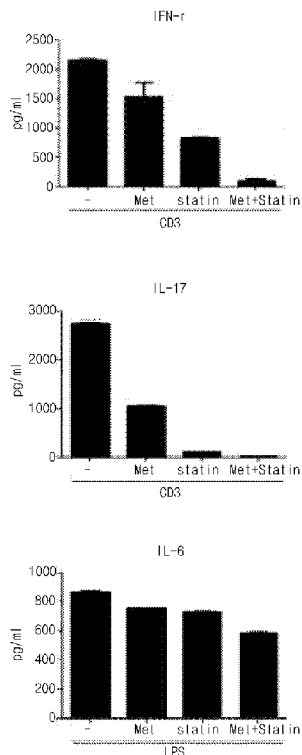
- (72) 발명자: 조미라 (CHO, Mi-La); 140-854 서울시 용산구 이촌로 156, 1103 호, Seoul (KR). 박성환 (PARK, Sung-Hwan); 137-779 서울시 서초구 서초중앙로 200, 20 동 1301 호, Seoul (KR). 박민정 (PARK, Min-Jung); 404-822 인천시 서구 새오개로 23, 2 동 5 반, Incheon (KR). 전주연 (JHUN, Joo-Yeon); 157-893 서울시 강서구 곰달래로 41 길 55, 101, Seoul (KR). 이성희 (LEE, Sung-Hee); 156-803 서울시 동작구 장승배기로 22 길 46-7, 202 호, Seoul (KR). 변재경 (BYUN, Jae-Kyeong); 150-096 서울시 영등포구 문래로 4 길 26, 102 동 1002 호, Seoul (KR). 정정희 (JEONG, Jeong-Hee); 137-803 서울시 서초구 고무대로 6-9, B 동 302 호, Seoul (KR). 이정아 (LEE, Jeong-Ah); 440-728 경기도 수원시 장안구 천천로 74 번길 92, 824 동 905 호, Gyeonggi-do (KR). 광승기 (KWOK, Seung-Ki); 137-930 서울시 서초구 신반포로 270, 123 동 1003 호, Seoul (KR). 이주하 (LEE, Jennifer); 135-838 서울시 강남구 선릉로 222, 대치아이파크아파트 109 동 1503 호, Seoul (KR). 주지현 (JU, Ji-Hyeon); 431-797 경기도 안양시 동안구 흥안대로 414 번길 39, 207 동 104 호, Gyeonggi-do (KR). 양철우 (YANG, Chul-Woo); 137-764 서울시 서초구 반포대로

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING AUTOIMMUNE DISEASE, USING COMPLEX OF METFORMIN AND STATIN

(54) 발명의 명칭 : 메트포민 및 스타틴의 복합제를 이용한 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물

[Fig. 2]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating autoimmune diseases, using a complex containing metformin, statin and, optionally, Coenzyme Q10. According to the present invention, a pharmaceutical composition for preventing or treating autoimmune diseases, which is the complex containing metformin, statin and, optionally, Coenzyme Q10, as active ingredients, can effectively inhibit the generation of inflammatory cytokines, can inhibit the generation of antibody-producing B cells or can reduce the activity thereof, has effects of inhibiting osteoclast differentiation and inhibiting joint destruction, and exhibits a remarkable effect of inhibiting the generation of foam cells, which generate arteriosclerotic plaque progenitor cells, and thus can be useful as an agent for treating immunological diseases including autoimmune diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 메트포민, 스타틴 및 선택적으로는 코엔자임 Q10을 포함하는 복합제를 이용한 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 메트포민, 스타틴 및 선택적으로는 코엔자임 Q10을 유효성분으로 포함하는 복합제인 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 염증성 사이토카인의 생성을 효과적으로 억제시킬 수 있고, 항체 생산 B 세포의 생성을 저해 또는 활성을 감소시킬 수 있으며, 파골세포의 분화를 억제하고 관절파괴를 억제하는 효과를 가지며 동맥경화반(Artherosclerotic plaque) 전구세포를 형성하는 거품세포(Foam cell)의 생성 억제 효과가 뛰어나 자가면역질환을 포함하는 면역질환의 치료제로서 유용하게 활용될 수 있다.



275, 118 동 603 호, Seoul (KR). **나현식 (NA, Hy-un-Sik)**; 137-807 서울시 서초구 반포대로 39 길 46, Seoul (KR). **이은정 (LEE, Eun-Jung)**; 472-501 경기도 남양주시 송산로 307 번길 16, 5313 동 1004 호, Gyeonggi-do (KR). **이선영 (LEE, Seon-Yeong)**; 443-800 경기도 수원시 영통구 권광로 290 번길 34-18, 1016 호, Gyeonggi-do (KR). **양은지 (YANG, Eun-Ji)**; 150-849 서울시 영등포구 도신로 68, 101 동 101 호, Seoul (KR). **손혜진 (SON, Hye-Jin)**; 150-833 서울시 영등포구 도신로 15 나길 10, B 동 301 호, Seoul (KR).

(74) **대리인: 특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP GROUP)**; 137-858 서울시 서초구 강남대로 343, 11 층, Seoul (KR).

(81) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 메트포민 및 스타틴의 복합제를 이용한 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 메트포민 및 스타틴의 복합제를 이용한 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [2] 아울러, 본 발명은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴의 복합제를 이용한 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 전 세계적으로 면역과민반응으로 인한 질환이 증가하고 있지만, 이러한 질환들의 발생에 대한 근본적인 원인 규명이 충분히 이루어지지 않은 상태이다. 현재 과도한 면역반응에 의한 질환의 치료방법으로는 면역억제제를 단독 또는 병용 투여함으로써 상기 질환에 의해 야기되는 각종 증상을 완화 내지 감소시키는 것이다.
- [4] 면역억제제란 항원의 작용에 대하여 숙주가 항체를 만드는 능력(체액성 면역반응) 또는 세포성 면역반응을 일으키는 능력을 저하시키거나 차단하기 위해 사용되는 다양한 물질들을 말한다. 이러한 면역억제제는 장기이식분야 뿐만 아니라 루푸스, 류마티스 관절염 등과 같은 자가면역질환과, 아토피, 알러지 등의 피부과민 반응에도 유용하게 사용될 수 있다. 우수한 면역억제제는 면역반응의 불균형을 조절할 수 있어야 하고, 인체에 대한 안전성이 확보되어야 하며, 장기간 치료시에 질환의 재발 발생 빈도가 낮아야 한다.
- [5] 현재 사용되고 있는 면역억제제로는 사이클로스포린 A와 FK506 등이 있는데, 이들은 복잡한 화학구조를 가진 천연물 유래의 화합물로서 원료 수급의 측면에서 고비용으로 인해 비경제적이고 장기투여로 인해 각종 부작용이 야기될 수 있다는 위험성을 내포하고 있다. 따라서 낮은 독성, 면역관용 유도와 함께 경제적인 생산이 가능한 새로운 면역억제제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.
- [6] 한편, 각종 병원체에 대한 생체 방어 시스템으로 면역계에서 중심적 역할을 담당하는 세포군의 하나로 T 세포가 있다. T 세포는 인체의 흉선에서 생성되며 일련의 분화 과정을 거치면서 고유의 특성을 지닌 T 세포로 분화하게 되는데, 분화를 완료한 T 세포는 그 기능에 따라 크게 1형 보조 세포(Th1)와 2형 보조 세포(Th2)로 구분된다. 이 중에서 Th1 세포의 주된 기능은 세포 매개성 면역에 관여하고, Th2 세포는 체액성 면역에 관여하며, 면역계에서 이러한 두 세포 집단은 서로 과활성화되지 않도록 서로 견제를 통해 면역계의 균형을 유지하고 있다.
- [7] 따라서 면역질환의 대부분은 이러한 두 면역 세포간의 불균형에 기인하는

것으로 볼 수 있는데, 예를 들어 Th1 세포의 활성이 비정상적으로 증가하는 경우 자가면역질환이 발생할 수 있고, Th2 세포의 활성이 비정상적으로 증가하는 경우 과민반응에 의한 면역질환이 발생하는 것으로 알려져 있다.

- [8] 한편, Th1 세포의 분화에 대한 최근 연구 결과에 따르면, Th1 세포의 활성을 조절할 수 있는 새로운 그룹인 면역조절 T 세포(Treg)의 존재가 알려지면서 이를 이용한 면역질환의 치료에 대한 연구가 대두되고 있는데, Treg 세포는 비정상적으로 활성화된 면역세포의 기능을 억제하여 염증 반응을 제어하는 특성이 있어, Treg 세포의 활성을 증가시키는 작용을 통해 면역질환을 치료하는 실험들이 많이 보고되고 있다.

- [9] 또한, Treg 세포 이 외에 분화 과정에서 만들어지는 또 다른 그룹으로 Th17 세포가 있는데, Th17 세포는 미분화 T세포의 분화 과정에서 Treg 세포의 분화와 유사한 과정을 거치며 형성되는 것으로 알려져 있다. 즉, Treg 세포와 Th17 세포의 분화는 공통적으로 TGF- β 의 존재 하에서 이루어지지만 Treg 세포의 경우 IL-6을 필요로 하지 않는 반면, Th17 세포의 경우에는 TGF- β 와 함께 IL-6가 존재하는 상황에서 분화를 한다. 또한, 분화된 Th17 세포는 IL-17을 분비하는 것을 특징으로 한다.

- [10] Th17 세포는 Treg 세포와는 달리 면역질환에서 보이는 염증반응의 최전방에서 관여하여 염증 반응의 신호를 최대화시켜 질병의 진행을 가속화시키는 것이 밝혀지고 있다. 그러므로 자가면역질환 중 Treg 세포에 의해 제어되지 않는 자가면역질환의 경우, Th17 세포 활성의 억제를 표적으로 한 자가면역질환의 치료제 개발이 크게 부각되고 있다.

- [11] 현재 사용되고 있는 면역질환치료제로는 T 세포에서의 신호변환 경로를 차단하는 면역 억제제가 가장 많이 사용되고 있는데, 이러한 면역억제제들은 독성, 감염, 임파종, 당뇨병, 진전(tremor), 두통, 설사, 고혈압, 오심, 신기능 장애 등의 부작용이 발생하는 문제점이 있다.

- [12] 또한, T 세포의 활성화를 억제하는 방법을 통해 면역질환을 치료하는 방법 이외에도 면역 세포로부터 분비되는 사이토카인의 양을 조절하는 치료법 및 면역 세포로부터 분비되는 사이토카인을 표적으로 하는 항체를 이용한 치료법이 개발 중에 있다. 그러나 이러한 방법은 실제적으로 임상실험을 거쳐 환자들에게 적용하기까지 많은 시간이 소요되어야 하고, 항체를 이용하는 방법은 항체 제작 과정에서 너무 많은 비용이 든다는 문제점이 있다.

- [13] 따라서 부작용이 없고 저렴하면서도 치료 효과가 우수한 새로운 면역질환 치료제 및 치료방법의 개발이 시급한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 발명은 보다 효과적인 자가면역질환 치료제를 개발하기 위해 연구하던 중, 메트포민(metformin) 및 스타틴(statin)을 병용 처리할 경우, 자가면역질환의 치료

효과가 매우 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[15] 따라서 본 발명의 목적은 메트포민 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[16] 또한, 본 발명의 목적은 면역질환이 유발된 개체에 메트포민 및 스타틴을 병용 투여하는 단계를 포함하는 면역질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

[17] 또한, 본 발명의 목적은 스타틴 및 메트포민을 1:30 ~ 1:70의 몰비로 포함하는 면역질환 치료용 복합제제를 제공하는 것이다.

[18] 또한, 본 발명자들은 면역질환을 치료할 수 있는 효과적인 치료제로서 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 모두 포함하는 복합제가 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 각각 포함하는 단일제에 비해 면역질환의 증상을 월등히 개선시켜 면역질환을 효과적으로 치료할 수 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[19] 따라서 본 발명의 목적은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[20] 또한 본 발명의 다른 목적은 면역질환이 유발된 개체에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 병용 투여하는 단계를 포함하는 면역질환의 치료방법을 제공하는 것이다.

[21] 나아가서는 본 발명의 다른 목적은 코엔자임 Q10, 스타틴(statin) 및 메트포민(Metformin)을 1:5~15:4500~5500의 몰비로 포함하는 면역질환 치료용 복합제제를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[22] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 메트포민 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[23] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물에는 스타틴 및 메트포민을 1:30 ~ 1:70의 몰비로 포함할 수 있다.

[24] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 염증성 사이토카인의 생성을 억제시키고, 항체 생산 B 세포의 생성을 저해 또는 활성을 감소시켜 자가면역질환의 치료 효과를 갖는 것일 수 있다.

[25] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 파골세포의 분화를 억제하고 관절파괴를 억제하는 효과를 갖는 것일 수 있다.

[26] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 동맥경화반(Artherosclerotic plaque) 전구세포를 형성하는 거품세포(Foam cell)의 생성을 억제하는 활성을 갖는 것일 수 있다.

[27] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 염증성 사이토카인은 IL-17, IFN- γ , IL-6 및 TNF- α 로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[28] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스

관절염(Rheumatoid Arthritis), 천식(Asthma), 피부염(Dermatitis), 건선(Psoriasis), 낭섬유증(Cystic Fibrosis), 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증(Post transplantation late and chronic solid organ rejection), 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 하시모토 갑상선(Hashimoto thyroiditis), 다발성근염(polymyositis), 경피증(scleroderma), 아디슨병(Addison disease), 백반증(vitiligo), 악성빈혈(pernicious anemia), 사구체신염(glomerulonephritis) 및 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 염증성장질환(Inflammatory Bowel Diseases), 자가면역성 당뇨병(Autoimmune Diabetes), 당뇨병 망막증(Diabetic retinopathy), 비염(Rhinitis), 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury), 혈관성형술 후 재협착(Post-angioplasty restenosis), 만성 폐색성 심장 질환(Chronic obstructive pulmonary diseases; COPD), 그레이브병(Graves disease), 위장관 알러지(Gastrointestinal allergies), 결막염(Conjunctivitis), 죽상경화증(Atherosclerosis), 관상동맥질환(Coronary artery disease), 협심증(Angina), 암 전이 및 소동맥 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

- [29] 또한, 본 발명은 면역질환이 유발된 개체에 메트포민(Metformin) 및 스타틴(statin)을 병용 투여하는 단계를 포함하는 면역질환의 치료방법을 제공한다.
- [30] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 투여는 메트포민 및 스타틴이 함께 함유된 복합제의 형태로 투여하거나, 메트포민 및 스타틴을 각각 개별적으로 동시에 투여하는 것일 수 있다.
- [31] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합제는 스타틴 및 메트포민이 1:30 ~ 1:70의 몰비로 포함될 수 있다.
- [32] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 천식, 피부염, 건선, 낭섬유증, 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선, 다발성근염, 경피증, 아디슨병, 백반증, 악성빈혈, 사구체신염 및 폐섬유증, 염증성장질환, 자가면역성 당뇨병, 당뇨병 망막증, 비염, 허혈-재관류 손상, 혈관성형술 후 재협착, 만성폐색성 심장 질환, 그레이브병, 위장관 알러지, 결막염, 죽상경화증, 관상동맥질환, 협심증, 암 전이 및 소동맥 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [33] 나아가 본 발명은 스타틴 및 메트포민을 1:30 ~ 1:70의 몰비로 포함하는 면역질환 치료용 복합제제를 제공한다.
- [34] 본 발명은 효과적인 자가면역질환의 새로운 치료제를 개발하기 위해 연구하던 중, 메트포민과 스타틴 계열의 약물을 복합처리하는 경우, 매우 효과적으로 자가면역질환을 치료할 수 있음을 규명한 점에 특징이 있다.
- [35] 따라서 본 발명은 메트포민 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는

- 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.
- [36] 본 발명의 조성물에 함유된 복합제의 성분 중, 메트포민은 당뇨병 치료효과가 있다고 알려진 화합물로서 한국공개특허 제2009-0005513호에 메트포민 말론산염에 항당뇨활성이 있다는 것이 개시되어 있으나 메트포민을 자가면역질환의 예방 및 치료에 사용한다는 내용에 대해서는 전혀 언급된 바가 없다.
- [37] 또한 본 발명의 복합제의 성분 중 다른 유효성분인 스타틴(STATIN) 계열의 약물은 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증과 같은 이상지질혈증 또는 심혈관계 질환 치료제로 사용되고 있으나, 본 발명과 같이 자가면역질환의 예방 및 치료에 사용한다는 내용에 대해서는 전혀 언급된 바가 없다.
- [38] 본 발명에서 사용할 수 있는 스타틴 계열의 약물은 실라스타틴(cilastatin), 나이스타틴(nystatin), 로바스타틴(lovastatin), 소마토스타틴(somatostatin), 프라바스타틴(pravastatin), 심바스타틴(simvastatin), 플루바스타틴(fluvastatin), 아토바스타틴(atorvastatin), 세르바스타틴(cervastatin), 울리나스타틴(ulinastatin) 및 로슈바스타틴(rosuvastatin)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 사용할 수 있고, 바람직하게는 로슈바스타틴을 사용할 수 있다.
- [39] 또한, 본 발명의 조성물에 함유된 메트포민 대 스타틴의 혼합은 1:3~1:10의 농도비로 혼합하여 사용할 수 있다.
- [40] 본 발명자들은 본 발명에서 규명한 메트포민과 스타틴의 복합제가 자가면역질환 치료에 효과적임을 실험을 통해 입증하였는데, 본 발명의 일실시예에 따르면, 이들 복합제는 이들 성분을 단독으로 사용한 경우에 비해 염증성 사이토카인의 생성을 효과적으로 억제시켰고, 항체 생산 B 세포의 생성을 저해 또는 활성을 감소시키는 활성도 우수한 것으로 나타났다.
- [41] 또한, 메트포민과 스타틴의 복합제는 이들 단독 처리군에 비해 파골세포 분화를 효과적으로 억제하고 관절파괴를 효과적으로 억제하는 활성이 있음을 규명하였고, 나아가 동맥경화반(Artherosclerotic plaque) 전구세포를 형성하는 거품세포의 생성도 효과적으로 억제하는 활성이 있음을 알 수 있었다.
- [42] 본 발명에서 상기 복합제가 억제할 수 있는 염증성 사이토카인은 이에 제한되지는 않으나, IL-17, IFN- γ 및 IL-6로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [43] 또한, 본 발명의 복합제가 치료할 수 있는 상기 자가면역질환은 이에 제한되지는 않으나, 류마티스 관절염, 천식, 피부염, 건선, 낭성유증, 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선, 다발성근염, 경피증, 아디슨병, 백반증, 악성빈혈, 사구체신염 및 폐섬유증, 염증성장질환, 자가면역성 당뇨, 당뇨 망막증, 비염, 허혈-재관류 손상, 혈관성형술후 재협착, 만성 폐색성 심장 질환, 그레이브병, 위장관 알러지, 결막염, 죽상경화증, 관상동맥질환, 협심증, 암 전이 및 소동맥 질환일 수 있다.
- [44] 상기 치료란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병,

또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 치료란 용어는 "치료하는"이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 자가면역질환의 치료 또는 치료요법은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:

- [45] (1) 자가면역질환의 성장을 저해함, 즉, 그 발달을 저지시킴,
- [46] (2) 자가면역질환의 확산을 예방함, 즉, 전이를 예방함,
- [47] (3) 자가면역질환을 경감시킴,
- [48] (4) 자가면역질환의 재발을 예방함, 및
- [49] (5) 자가면역질환의 증상을 완화함(palliating).
- [50] 본 발명에 따른 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 메트포민 및 스타틴 화합물 또는 이들의 염을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 자가면역질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.
- [51] 본 발명에 따른 메트포민 및 스타틴 화합물 또는 그의 염의 약학적으로 유효한 양은 각각 0.5 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 5 mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 자가면역질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [52] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [53] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- [54] 또한, 본 발명에 따른 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물은 자가면역질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

- [55] 따라서 본 발명은 메트포민 및 스타틴을 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약제를 제공할 수 있으며, 나아가 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 면역억제제를 제공할 수 있다.
- [56] 나아가 본 발명은 면역질환이 유발된 개체에 메트포민 및 스타틴을 병용 투여하는 단계를 포함하는 면역질환의 치료방법을 제공할 수 있다.
- [57] 앞서서도 기술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 면역질환의 치료방법은 메트포민 및 스타틴을 함유하는 복합제제를 투여하는 방법 또는 이들 성분을 모두 병용 투여하는 방법을 통해 수행할 수 있는데, 즉, 메트포민 및 스타틴의 2가지 성분이 하나의 캡슐에 포함된 단일 조성물(single composition)의 형태로 사용될 수 있고 또는 각 성분이 개별적으로 포장된 개별적인 조성물(separate composition)을 함께 투여하는 형태로 사용될 수 있다.
- [58] 그리고 상기 조성물이 개별적인 조성물인 경우에는, 상기 조성물을 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여할 수 있다.
- [59] 또한, 적절한 투여 경로는, 예를 들어, 경구, 비강, 투과점막, 또는 장 투여 격막내, 직접 심실내, 복강내, 또는 안내 주사뿐만 아니라, 근육내, 피하, 정맥, 골수 주사를 포함한 비경구 전달을 포함할 수 있다.
- [60]
- [61] 또한, 본 발명은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [62] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 상기 코엔자임 Q10, 스타틴 및 메트포민을 1:5~15:4500~5500의 몰비로 포함할 수 있다.
- [63] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 염증성사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-17로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 발현을 감소 또는 억제시킬 수 있다.
- [64] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 파골세포 분화를 감소시키거나, 염증성세포의 침윤을 억제할 수 있다.
- [65] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 소장 및 대장의 길이를 정상상태와 같이 유지 시키는 효과를 가질 수 있다.
- [66] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역질환, 염증성질환 및 세포, 조직 또는 기관의 이식거부(transplantation rejection)질환으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.
- [67] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 면역질환은 베체트병, 다발성 근육염 또는 피부 근육염, 자가면역 혈구감소증, 자가면역 심근염, 아토피피부염, 천식, 일차성간경변, 피부근염, 굿파이처 증후군, 자가면역 뇌수막염, 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스, 에디슨병, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 자가면역성 간염, 자가면역성 이하선염, 크론병, 인슐린 의존성 당뇨병, 이영양성 수포성 표피박리증, 부고환염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑바레 증후군,

- 하시모토병, 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상천포창, 건선, 류마티스열, 류마티스 관절염, 유육종증, 피부 경화증, 척추관절증, 갑상선염, 혈관염, 백반증, 점액수종, 악성빈혈 및 궤양성 대장염 중에서 선택될 수 있다.
- [68] 또한, 본 발명은 면역질환이 유발된 개체에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 병용 투여하는 단계를 포함하는 면역질환의 치료방법을 제공한다.
- [69] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 투여는 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴이 함께 함유된 복합제의 형태로 투여하거나, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 각각 개별적으로 동시에 투여하는 것일 수 있다.
- [70] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합제는 코엔자임 Q10, 스타틴 및 메트포민이 1:5~15:4500~5500의 몰비로 포함될 수 있다.
- [71] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 면역질환은 자가면역질환, 염증성질환 및 세포, 조직 또는 기관의 이식거부(transplantation rejection)질환으로 이루어진 군 중에서 선택된 것일 수 있다.
- [72] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 면역질환은 베체트병, 다발성 근육염 또는 피부 근육염, 자가면역 혈구감소증, 자가면역 심근염, 아토피피부염, 천식, 일차성간경변, 피부근염, 굿파이처 증후군, 자가면역 뇌수막염, 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스, 애디슨병, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 자가면역성 간염, 자가면역성 이하선염, 크론병, 인슐린 의존성 당뇨병, 이영양성 수포성 표피박리증, 부고환염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑바레 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상천포창, 건선, 류마티스열, 관절염, 유육종증, 피부 경화증, 척추관절증, 갑상선염, 혈관염, 백반증, 점액수종, 악성빈혈, 미토콘드리아 관련 증후군 및 궤양성 대장염 중에서 선택된 것일 수 있다.
- [73] 나아가 본 발명은 코엔자임 Q10, 스타틴 및 메트포민을 1:5~15:4500~5500의 몰비로 포함하는 면역질환 치료용 복합제제를 제공한다.
- [74] 본 발명자들은 면역 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 새로운 약물을 연구하던 중, 본 발명의 메트포민 화합물에 주목하였는데 메트포민은 당뇨병 치료효과가 있다고 알려진 바 있다. 또한, 한국공개특허 제2009-0005513호에 메트포민 말론산염에 항당뇨활성이 있다는 것이 개시되어 있으나 메트포민을 면역 질환의 예방 및 치료에 사용한다는 내용에 대해서는 전혀 언급된 바가 없다.
- [75] 또한, 코엔자임 Q10(coenzyme Q10)은 체내에서 합성되는 지용성 비타민류 물질로 영양소의 대사에 관여하며 항산화력이 비타민 E보다 우수한 것으로 알려져 있고, 비타민 Q(vitamin Q)라고도 한다. 화학식은 $C_{59}H_{90}O_4$ 이고, 고등어, 쫄치, 정어리 등의 등푸른 생선과 현미, 계란, 두류, 시금치, 땅콩 등의 견과류에도 포함되어 있다. 코엔자임 Q10은 육류 등의 음식을 통해 소량을 얻을 수 있으나 대부분은 체내에서 만들어지며, 코엔자임 Q10은 당질을 에너지로 바꾸어 혈당을 감소시키며 비타민 E와 같이 항산화 작용을 하여 세포막의 산화를 막고 산소 이용율을 높이는 작용도 한다. 또한 정자를 활성화 시키고

활성산소의 생성을 억제하는 항산화능이 우수하여 동맥경화나 고혈압과 같은 심혈관계질환, 암, 뇌출혈, 알츠하이머병, 당뇨병 등의 질병을 예방해 주는 효과도 있다고 알려져 있다.

- [76] 또한, 로수바스타틴(rosuvastatin)은 크레스토라는 상품명을 가진 고지혈증 치료제로서 해로운 콜레스테롤을 감소시키고, 유익한 콜레스테롤을 증가시키는 효과를 지닌 고지혈증 치료제로 알려진 바 있다. 로수바스타틴은 간에서 콜레스테롤 합성을 억제하는 'HMG-CoA 환원효소 저해제' 또는 '스타틴'이라 부르는 지질저하제이며, 40개국 3만 명 이상의 환자를 대상으로 한 갤럭시 프로그램이라는 대규모 임상실험을 통하여 어떤 스타틴 제제보다 유효성과 안정성에 대하여 집중적이고 엄격한 심사를 거쳐왔다. 임상시험 결과해로운 콜레스테롤인 LDL 콜레스테롤을 최고 63%까지 감소시키고, 유익한 콜레스테롤인 HDL 콜레스테롤은 최고 8.9%까지 증가시켰으며, 중성지방을 낮추는데도 효능을 보이는 것으로 나타났다.
- [77] 유럽공동지침(JEG)이 가이드라인으로 제시한 고지혈증 치료 목표치 도달률에서도 80%를 상회하였는데, 이는 기존에 시판되는 다른 스타틴제제들 보다 뛰어난 수치로서 심혈관 질환을 치료하는 대표 약물인 아스피린을 대체할 가능성도 전망된다.
- [78] 한편, 앞서 배경기술에도 기재한 바와 같이, 현재 사용되고 있는 면역질환의 치료제로는 면역 억제제, 핵산 길항제, 대사 길항제 등이 사용되고 있다. 그리고 대중요법으로서 항염증제, 혈액 응고 길항제 등도 사용되고 있다. 그러나 이들 약물의 효과는 충분하지 않으며 면역 억제제에 대해서는 당뇨병, 신장 장애, 감염증의 유발 등의 부작용이 알려져 있고, 핵산 길항제, 대사 길항제의 사용은 간(肝) 장애, 골수 장애 등의 부작용이 다발하고 있다.
- [79] 따라서 본 발명은 종래 개발된 치료제에 비해 부작용은 적으면서도 치료 효과가 우수한 면역질환의 새로운 치료제를 제공하기 위한 것으로, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴의 3가지 성분을 모두 포함하는 복합제제가 면역질환을 치료할 수 있는 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 규명하였다.
- [80] 특히, 본 발명의 일실시예에 따르면, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 각각 단독으로 처리한 군에 비해 이들을 병용 투여한 결과, 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-17, Th1 및/또는 Th17의 발현을 월등히 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 12의 A 및 도 13 참조).
- [81] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴의 병용 투여가 관절염 치료 효과가 우수한지 확인하기 위하여 관절염 유도 동물을 제작한 후, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 각각을 단독 처리군과 이들을 복합 처리한 군으로 나누어 관절염 지수를 측정한 결과, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 각각 단독 처리한 군에 비해 이들을 병용처리한 군에서 관절염 지수가 현저히 감소되는 것으로 나타났다(도 16 참조).
- [82] 또한, 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합제제는 파골세포 분화

- 억제 효과도 단독 처리한 군에 비해 우수한 것으로 나타났다(도 19a 참조).
- [83] 따라서 상기의 결과를 통해 본 발명자들은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 모두 포함하는 복합제제가 면역질환 뿐만 아니라 과골세포 이상으로 유발되는 관절염 및 골다공증과 같은 질환도 치료할 수 있다는 것을 알 수 있었다.
- [84] 나아가 본 발명자들은 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합제제가 염증성 장 질환을 치료할 수 있는지를 확인하기 위하여 염증성 장 질환 유도 동물모델을 제작한 뒤 이들 성분을 단독처리한 군과 복합제제로 처리한 군 및 현재 염증성 장 질환 치료 약물로 사용 중인 설파살라진(sulfasalazine)을 투여한 군을 대상으로 치료 효과를 분석한 결과, 설파살라진을 투여한 군보다 본 발명의 복합제제를 처리한 군이 장 길이 변화 및 몸무게 변화에서도 염증성 장 질환을 현저하게 개선 및 치료하는 효과가 있는 것으로 조사되었고, 장 조직에서 조직의 손상이 적고 세포 침식 정도가 적음을 알 수 있었다(도 20a, 도 20b 및 21 참조).
- [85] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴의 복합제제는 염증성 장질환을 효과적으로 억제할 수 있으며 나아가 자가면역질환의 치료에도 사용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [86] 본 발명에서 상기 염증성 장질환은 장에 발생하는 원인 불명의 만성적인 염증을 뜻하며, 통상적으로 특발성 염증성 장질환인 궤양성 대장염과 크론병을 지칭하지만 우리나라에 비교적 흔한 장형 베체트병도 이에 속한다고 할 수 있다. 넓은 의미로는 세균성, 바이러스성, 아메바성, 결핵성 장염 등의 감염성 장염과 허혈성 장질환, 방사선 장염 등의 모든 장에 발생하는 염증성 질환을 통칭하기도 한다.
- [87] 그러므로 본 발명은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 면역질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [88] 본 발명의 조성물에 함유되는 상기 3가지 화합물인 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴은 이들 각각의 화합물 자체, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 상기 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.
- [89] 본 발명에 따른 화합물은 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것을 사용할 수 있다.
- [90] 상기 본 발명에 따른 메트포민 화합물은 천연으로부터 분리되거나 당업계에 공지된 화학적 합성법으로 제조된 것 모두를 사용할 수 있으며, 본 발명의

면역질환 치료를 위한 복합제에 함유되는 3가지 주요 성분의 함량은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴은 이를 필요로 하는 개체에 메트포민을 40~60mg/kg, 코엔자임 Q10을 4~6mg/kg 및 스타틴을 8~12mg/kg의 양으로 투여할 수 있다.

[91] 상기에서 본 발명의 복합제에 포함될 수 있는 각 성분의 함량범위는 앞서 기재된 범위 내로 포함하는 것이 바람직한데, 기재된 범위를 벗어날 경우, 복합제가 제대된 제형 및 활성을 위한 제제로 제조될 수 없으며, 치료 효과도 미비한 문제점이 있어, 상기 기술된 범위내에서 복합제를 제조하여야 한다.

[92] 또한, 본 발명에 따른 상기 조성물이 치료할 수 있는 대상 질환은 면역질환일 수 있으며, 본 발명에서 상기 면역질환은 포유류 면역계의 구성성분들이 포유류의 병리상태를 야기하거나, 매개하거나 또는 기타 공헌하는 질환을 의미한다. 또한, 면역 반응의 자극 또는 중단이 그 질병의 진행에 보상적인 효과를 갖는 질환을 모두 포함할 수 있는데, 본 발명에서는 과민성 면역반응으로 인해 야기되는 질환들을 포함할 수 있다. 이러한 면역질환의 예로는 이에 제한되지는 않으나, 자가면역질환; 염증성질환; 및 세포, 조직 또는 기관의 이식거부(transplantation rejection)질환 등을 모두 포함할 수 있다.

[93] 또한, 모든 정상 개체에 있어서 가장 중요한 특성 중의 하나는 자기(self)를 구성하고 있는 항원물질에 대해서는 해롭게 반응하지 않는 반면, 비자기(non-self) 항원들에 대해서는 이를 인식하고 반응하여 제거할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이처럼 자기항원에 대한 생체의 무반응을 면역학적 무반응성(immunologic unresponsiveness) 또는 관용(tolerance)이라고 한다.

[94] 그러나 이러한 자기관용을 유도하거나 계속 유지하는데 있어서 문제가 생기게 되면 자기항원에 대하여 면역반응이 일어나게 되고, 이로 인하여 자신의 조직을 공격하는 현상이 발생하는데 이러한 과정에 의해 발생하는 질환을 자가면역질환이라고 한다.

[95] 또한, 염증성 질환이란 염증유발인자 또는 방사선조사 등 유해한 자극으로 인해 인체 면역체계를 과도하게 항진시켜 대식세포와 같은 면역세포에서 분비되는 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1(interleukin-1), IL-6, 프로스타글란딘(prostaglandin), 루코트리엔(leucotriene) 또는 산화질소(nitric oxide, NO)와 같은 염증유발물질(염증성 사이토카인)에 의해 유발되는 질환을 말한다.

[96] 한편, 성공적인 장기 이식을 위해서는 이식할 세포 및 장기에 대한 수혜자의 면역 거부반응을 극복해야 한다. 이식면역거부반응의 주요 매개체는 T 세포로서, 이식편(graft)에 발현되어 있는 주조직적합성분자(major histocompatibility complex, MHC)를 T 세포 수용체(T cell receptor)가 인지함으로써 면역반응이 유도되어 이식거부반응이 발생되게 된다. 따라서 이러한 이식면역거부반응을 감소시키기 위해 면역억제제들이 사용되고 있는데 이러한 면역억제제들의 공통된 목적은 이식편에 대한 T 세포-매개 면역반응을 억제하는 것이며, 최근에는 조절 T 세포를 이용하여 면역반응을 억제함으로써 이식거부질환을 치료하려는 방법이 시도되고 있다.

- [97] 구체적으로 본 발명에서 적용할 수 있는 상기 면역질환의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, 베타트병, 다발성 근육염/피부 근육염, 자가면역 혈구감소증, 자가면역 심근염, 아토피피부염, 천식, 일차성간경변, 피부근염, 굿파이처 증후군, 자가면역 뇌수막염, 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스, 애디슨병, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 자가면역성 간염, 자가면역성 이하선염, 크론병, 인슐린 의존성 당뇨병, 이영양성 수포성 표피박리증, 부고환염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑바레 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상천포창, 건선, 류마티스열, 류마티스 관절염, 유육종증, 피부 경화증, 척추관절증, 갑상선염, 혈관염, 백반증, 점액수종, 악성빈혈, 궤양성 대장염 등을 포함할 수 있다.
- [98] 또한 본 발명에서 상기 치료란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 치료란 용어는 치료하는이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 면역질환의 치료또는 치료요법은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [99] (1) 면역질환의 성장을 저해함, 즉, 그 발달을 저지시킴,
- [100] (2) 면역질환의 확산을 예방함, 즉, 전이를 예방함,
- [101] (3) 면역질환을 경감시킴,
- [102] (4) 면역질환의 재발을 예방함, 및
- [103] (5) 면역질환의 증상을 완화함(palliating).
- [104] 본 발명에 따른 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 면역질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.
- [105] 본 발명에 따른 복합제제에 함유된 성분 중, 메트포민은 40 ~ 60 mg/day/체중kg일 수 있으며, 코엔자임 Q10은 4 ~ 6 mg/day/체중kg, 스타틴은 8 ~ 12 mg/day/체중kg일 수 있다. 상기 약학적으로 유효한 양은 면역질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [106] 또한, 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘

스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[107] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[108] 또한, 본 발명에 따른 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물은 면역질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[109] 따라서 본 발명은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 유효성분으로 함유하는 조성물을 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약제를 제공할 수 있으며, 나아가 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 면역억제제를 제공할 수 있다.

[110] 나아가 본 발명은 면역질환이 유발된 개체에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 병용 투여하는 단계를 포함하는 면역질환의 치료방법을 제공할 수 있다.

[111] 앞서서도 기술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 면역질환의 치료방법은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 함유하는 복합제제를 투여하는 방법 또는 이들 성분을 모두 병용 투여하는 방법을 통해 수행할 수 있는데, 즉, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴의 3가지 성분이 하나의 캡슐에 포함된 단일 조성물(single composition)의 형태로 사용될 수 있고 또는 각 성분이 개별적으로 포장된 개별적인 조성물(separate composition)을 함께 투여하는 형태로 사용될 수 있다.

[112] 그리고 상기 조성물이 개별적인 조성물인 경우에는, 상기 조성물을 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여할 수 있다.

[113] 또한, 적절한 투여 경로는, 예를 들어, 경구, 비강, 투과점막, 또는 장 투여 격막내, 직접 심실내, 복강내, 또는 안내 주사뿐만 아니라, 근육내, 피하, 정맥, 골수 주사를 포함한 비경구 전달을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[114] 본 발명은 메트포민 및 스타틴의 복합제를 이용한 자가면역질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 메트포민 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 복합제인 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 염증성 사이토카인의 생성을 효과적으로 억제시킬 수 있고, 항체 생산

B 세포의 생성을 저해 또는 활성을 감소시킬 수 있으며, 과골세포의 분화를 억제하고 관절과괴를 억제하는 효과를 가지며 동맥경화반(Artherosclerotic plaque) 전구세포를 형성하는 거품세포(Foam cell)의 생성 억제 효과가 뛰어나 메트포민 및 스타틴을 유효성분으로 하는 복합제는 자가면역질환의 치료제로서 매우 유용하게 활용될 수 있다.

- [115] 아울러, 본 발명에 따른 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 병용투여에 의한 면역질환의 치료는 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 각각 단독으로 처리한 군에 비해 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-17, Th1 또는 Th17의 발현을 월등히 억제시키고, 관절염 유도 동물 모델 및 염증성 장질환 유도 동물모델에서 이들 면역질환을 효과적으로 치료할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [116] 도 1a 및 도 1b는 Th17 세포 분화 조건 하에서 메트포민 및 로슈바스타틴을 단독 및 복합 처리한 후, 세포내에서 IL-17과 IFN- γ 의 생성정도를 FACS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [117] 도 2는 TCR 자극 조건 하에서 메트포민 및 로슈바스타틴을 단독 및 복합 처리한 후, 세포내에서 IL-17, IL-6 및 IFN- γ 의 생성정도를 FACS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [118] 도 3은 TCR 자극 조건 하에서 메트포민 및 로슈바스타틴을 단독 및 복합 처리한 후, 세포내에서 TNF- α 생성정도를 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [119] 도 4는 관절염 유발 마우스 모델을 대상으로 메트포민 및 로슈바스타틴을 단독 및 복합 처리한 후, 관절염 지수 분석 및 혈청 내 IgG, IgG2a의 수준을 측정하는 결과를 나타낸 것이다.
- [120] 도 5는 메트포민 및 로슈바스타틴을 단독 및 복합 처리한 후, 비만관절염 치료 효과를 확인한 결과이다.
- [121] 도 6a 및 도 6b는 관절염 유발 마우스 모델을 대상으로 메트포민 및 로슈바스타틴을 단독 및 복합 처리한 후, 마우스의 혈액을 분리하고 혈액세포 CD4+T 세포를 분리한 후, 상기 세포내에서 IFN- γ 와 IL-17의 발현정도를 FACS로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [122] 도 7은 LPS를 처리하여 B 세포를 활성화 시킨 후, 메트포민 및 로슈바스타틴을 단독 및 복합 처리한 다음, plasma B 세포수를 측정한 결과와 배양액에서의 IgG, IgG1, IgG3의 항체분비 정도를 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [123] 도 8은 LPS를 처리하여 B 세포를 활성화 시킨 후, 메트포민 및 로슈바스타틴을 단독 및 복합 처리한 다음, 배양액에서의 IgG2a의 항체분비 정도를 ELISA로 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [124] 도 9는 RANKL 처리에 따른 과골세포 분화 조건에서 메트포민 및 로슈바스타틴을 단독 및 복합 처리한 후, 과골세포 마커인 TRAP, MMP9, β 3

intergrin을 PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

- [125] 도 10은 인간 대식세포주인 THP-1 세포에 PMA(phorbol 12'-myristate 13'-acetate)를 처리하여 세포를 활성화 시킨 후, 메트포민과 로슈바스타틴의 단독 처리에 따른 거품 세포 생성 억제 정도를 Oil Red O 용액 염색방법을 수행하여 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [126] 도 11은 인간 대식세포주인 THP-1 세포에 PMA(phorbol 12'-myristate 13'-acetate)를 처리하여 세포를 활성화 시킨 후, 메트포민과 로슈바스타틴의 병용 처리에 따른 거품 세포 생성 억제 정도를 Oil Red O 용액 염색방법을 수행하여 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- [127] 도 12의 A는 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합제제의 TNF- α 억제 정도를 확인한 결과이다.
- [128] 도 12의 B는 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합제제의 세포독성 정도를 알아보기 위하여 MTT assay 분석을 한 결과이다.
- [129] 도 13은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합제제의 IL-17 억제 정도를 확인한 결과이다.
- [130] 도 14는 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합제제의 염증성사이토카인인 TNF- α 및 IL-6 억제 정도를 확인한 결과이다.
- [131] 도 15는 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합제제의 IgG, IgG1, IgG2a 항체 분비 감소 정도를 확인한 결과이다.
- [132] 도 16은 자가면역질환이 유발된 동물모델에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 각각의 단독 처리군 및 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합 처리군에서의 관절염지수를 나타낸 결과이다.
- [133] 도 17은 자가면역질환이 유발된 동물모델에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 복합 처리한 후 염증성 사이토카인 조절 효과가 있는지를 확인한 결과이다.
- [134] 도 18은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합제제의 비만관절염 치료 효과를 확인한 결과이다.
- [135] 도 19a는 정상 마우스의 골수세포를 분리하여 M-CSF와 RANKL을 처리하고 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 각각 및 병용 처리한 후 파골세포 분화 정도를 나타낸 사진이다.
- [136] 도 19b는 정상 마우스의 골수세포를 분리하여 M-CSF와 RANKL을 처리하고 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 각각 및 병용 처리한 후 파골세포 분화와 관련되어 있는 유전자들의 발현 정도를 확인한 결과이다.
- [137] 도 20a 내지 20c는 정상 동물군, 염증성 장질환 유도 동물 모델군, 염증성 장 질환 유도 동물 모델에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 병용 처리한 군 및 염증성 장 질환 유도 동물 모델에 설파살라진을 투여한 군으로 실험동물을 구분하여 실험동물의 무게, 소장 두께, 대장의 길이 및 염증성 장 질환 지수를 측정 한 결과이다.

[138] 도 21은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 복합제제에 장 조직에서의 조직 파괴 억제 효과가 있는지를 조직 염색을 통해 확인한 결과이다.

[139] 도 22는 염증성 장질환 유도 동물 모델군, 염증성 장 질환 유도 동물 모델에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 병용 처리한 군 및 염증성 장 질환 유도 동물 모델에 설파살라진을 투여한 군으로 실험동물을 구분하여 염증성 사이토카인 발현 정도를 측정한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[140] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[141]

[142] <실시예 1> 메트포민 및 스타틴 병용처리에 따른 Th1/Th17 조절 효과

[143] 본 발명자들은 메트포민과 스타틴의 병용처리가 자가면역질환을 효과적으로 치료할 수 있는지 확인하기 위해 이들 성분을 병용 처리하였을 때, 세포내에서 Th1/Th17 조절효과를 분석하였다. 즉, 이를 위해 Th17 조건(CD3 1 μ g/ml, CD28 1 μ g/ml, anti-IL-4 2 μ g/ml, anti-IFN- γ 2 μ g/ml, TGF-beta 2ng/ml, IL-6 20ng/ml)하에서 C57BL/6 정상마우스로부터 분리한 CD4⁺T 세포를 3일간 배양한 후, 세포들을 대상으로 메트포민 1mM, 로슈바스타틴(Rosuvastatin) 20 μ M을 각각 단독 및 복합처리한 후, 세포내에서 IL-17과 IFN- γ 양을 FACS로 분석하였다.

[144] 분석 결과, 도 1a 및 도b에 나타난 바와 같이, 아무것도 자극하지 않은 Th17 분화 조건에서는 염증성 사이토카인인 IFN- γ 와 IL-17의 양이 증가되어 있는 것으로 나타난 반면, 메트포민이나 스타틴을 단독처리한 군의 경우, 아무것도 처리하지 않은 군에 비해 IFN- γ 와 IL-17의 양이 감소된 것으로 나타났으나, 메트포민이나 스타틴을 병용처리한 군의 경우, 이들을 단독 처리한 군에 비해 더 우수한 효율로 IFN- γ 와 IL-17의 양이 감소되어 있는 것으로 나타났으며, 특히, 병용처리 했을때는 IFN- γ 는 메트포민 또는 스타틴 단독 처리군에 비해 4-20배 이상 더 의미있게 생성이 억제되었고, IL-17은 단독 대비 2.5-6배 더 감소되는 것으로 나타났다.

[145] 또한, 본 발명자들은 TCR 자극 조건(CD3 1 μ g/ml, CD28 1 μ g/ml) 또는 LPS(100ng/ml)조건 하에서 메트포민 1mM, 로슈바스타틴 20 μ M로 단독 또는 복합 처리를 하여 3일간 배양한 후 배양액을 얻어 IFN- γ 와 IL-17, IL-6양을 ELISA로 측정하여 이들 사이토카인의 발현양을 분석하였다.

[146] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 메트포민이나 스타틴을 단독처리한 군에 비해 메트포민과 스타틴을 같이 처리한 조건에서 의미있게 염증성 사이토카인인 IFN- γ (2-3배)와 IL-17(3-10배), IL-6(1.5배)의 수준이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[147]

[148] <실시예 2> 메트포민 및 스타틴 병용처리에 따른 TNF- α 조절효과[149] 본 발명자들은 메트포민과 스타틴의 병용처리가 자가면역질환을 효과적으로 치료할 수 있는지 확인하기 위해 이들 성분을 병용 처리하였을 때, 세포내에서 염증성사이토카인 중 하나인 TNF- α 의 조절효과를 분석하였다.[150] 즉, 이를 위해 TCR 자극 조건(CD3 1 μ g/ml, CD28 1 μ g/ml) 또는 LPS(100ng/ml)조건 하에서 메트포민 1mM, 로슈바스타틴 20 μ M로 단독 또는 복합 처리를 하여 3일간 배양한 후 배양액을 얻어 TNF- α 양을 ELISA로 측정하여 이들 사이토카인의 발현양을 분석하였다.[151] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 메트포민이나 스타틴을 단독처리한 군에 비해 메트포민과 스타틴을 같이 처리한 조건에서 의미있게 TNF- α 양이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[152]

[153] <실시예 3> 동물모델을 대상으로 메트포민 및 스타틴 병용처리에 따른 자가면역질환 치료효과 분석

[154] 메트포민과 스타틴의 병용처리가 실제로 자가면역질환이 유발된 마우스 동물에게 투여할 경우, 효과적인 치료 효능이 있는지 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 관절염이 유발된 마우스를 제조하기 위해 CIA로 유도하여 관절염 발병 마우스를 제조한 후, 1주일에 3회 복강 내 메트포민(50mg/kg)과 스타틴(10mg/kg)을 투여한 후, 2주일이 지난 시점에 관절염 지수를 측정하였다.

[155] 분석 결과, 관절염이 유발된 마우스를 대상으로 메트포민과 스타틴을 단독 투여한 군에 비해 이들을 병용투여한 군의 경우, 관절염 유도가 거의 억제되어 관절염이 발병되지 않는 것으로 나타났다(도 4 참조). 또한, 2주간 약물을 투여 후 마우스로부터 채혈하고 혈청을 수득한 후, IgG, IgG2a의 양을 ELISA로 측정하였다.

[156] 측정결과, 메트포민이나 스타틴 단독처리에 비해 메트포민과 스타틴을 같이 투여한 관절염 유발 마우스에서는 IgG 및 IgG2a의 수준이 유의하게 감소되는 것으로 나타났다(도 4 참조).

[157] 나아가 관절염 유도 마우스에 각각의 약물투여를 2주간 진행한 후 마우스의 혈액을 분리하여 혈액세포 CD4+T cell에서 IFN- γ 와 IL-17의 양을 FACS로 분석한 결과, 이전의 in vitro 결과와 마찬가지로 메트포민이나 스타틴 단독처리에 비해 메트포민과 스타틴을 같이 처리한 조건에서 의미있게 염증성 사이토카인 레벨이 감소되는 것으로 나타났다(도 6a 및 6b 참조).

[158]

[159] <실시예 4> 동물모델을 대상으로 메트포민 및 스타틴 병용처리에 따른 난치성 비만관절염 치료효과 분석

[160] 비만은 당뇨병이나 동맥경화 등 각종 성인병의 원인이 될 뿐만 아니라

관절염에도 악영향을 미친다는 것은 이미 널리 알려져 있는 사실이다. 본 발명자들은 메트포민 및 로수바스타틴 병용처리가 비만에서 유발된 난치성 비만관절염에도 효과가 있는지를 확인하기 위하여 5주령의 DBA/1J마우스에 60kcal 고지방 식이를 유도하여 비만을 유도하였다.

[161] 또한, 비만 유도와 함께 관절염을 유도하기 위하여, 제 2형 콜라겐(CII)을 2mg/ml이 되도록 0.1N 아세트산 용액에 녹인 후 투석 완충액(dialysis buffer, 50mM Tris, 0.2N NaCl)으로 투석하여 M. 투베르쿨로시스(tuberculosis)를 함유하는 complete Freund's adjuvant(CFA, Chondrex)와 동량으로 섞은 후 상기 마우스의 꼬리 기저부에 피하 주사하여 면역원을 마리당 100 μ l(즉 100 μ l/100 μ g)로 주사하였다(1차 주사). 이로부터 2주 후 동일한 CII를 동량의 incomplete Freud's adjuvant(IFA, Chondrex)와 섞은 후 100 μ l(즉 100 μ l/100 μ g)를 꼬리에 주사하였다(2차 주사).

[162] 2차 주사를 통한 2차 면역 후 매일 3주동안 메트포민(20mg/kg)과 스타틴(10mg/kg)을 각각 주입하였고, 각 군은 5마리씩을 대상으로 진행하여 관절염 평가를 진행하였다. 첫 번째 접종을 시작점으로 하여 3주 후부터 실험의 내용을 알고 있지 않은 관찰자 세 명이 일주일에 두 번씩 관절 염증의 위중도를 평가하여 61일까지 관찰하였다. 이 때 관절염 평가는 마리당 2차 접종 때 CII/CFA를 투여한 다리를 제외한 나머지 세 다리에서 아래의 척도에 따라 매긴 점수를 합하여 3으로 나눈 평균치를 얻고, 다시 각 동물 모델에서 3명의 관찰자가 얻은 수치를 합산하여 나눈 평균치를 사용하였다. 관절염 평가에 따른 점수와 기준은 다음과 같다.

[163] -평가 기준-

[164] 0점: 부종이나 종창이 없다.

[165] 1점: 발 또는 발목관절에 국한된 경한 부종과 발적

[166] 2점: 발목관절에서 족근골(metatarsal)에 걸친 경한 부종과 발적

[167] 3점: 발목관절에서 족근골에 걸친 중등도의 부종과 발적

[168] 4점: 발목에서 다리 전체에 걸쳐 부종과 발적이 있는 경우

[169]

[170] 각각의 처리군을 대상으로 난치성 비만관절염에 대한 관절염 평가점수를 확인한 결과, 아무것도 처리되지 않은 대조군에서는 관절염지수가 높게 나타났으나, 메트포민 또는 로수바스타틴을 각각 처리한 군에서는 관절염 평가지수가 낮아졌으며, 본 발명의 메트포민과 로수바스타틴을 병용 처리한 군에서는 메트포민 또는 로수바스타틴을 각각 처리한 군보다 더 월등한 비만관절염 치료 효과가 있음을 알 수 있었다(도 5 참조).

[171]

[172] <실시예 5> 메트포민과 스타틴 병용처리에 의한 B 세포 활성화 및 자가항체 생산 조절 효과

[173] 메트포민과 스타틴의 병용투여가 B 세포의 항체 분비에 어떠한 영향을

미치는지 조사하기 위해, LPS를 처리하여 B 세포를 활성화 시키는 조건을 만든 후, 상기 활성화된 B 세포에 메트포민과 스타틴을 단독처리 또는 병용처리 하여 3일간 배양한 다음, plasma B cell(B220-CD138+ cell)의 활성을 FACS로 관찰하였다.

- [174] 분석 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 메트포민이나 스타틴 단독처리에 비해 메트포민과 스타틴을 같이 처리한 조건에서 의미있게 plasma B cell(%)가 감소되는 것으로 나타났고, 또한 배양조건에서 얻은 배양액에서 항체 양을 ELISA로 측정한 결과에서도 IgG, IgG1, IgG3, IgG2a의 항체분비가 메트포민이나 스타틴 단독처리에 비해 메트포민과 스타틴을 같이 처리한 조건에서 현저히 감소되는 것으로 나타났다(도 7 및 8 참조).

- [175] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 메트포민과 스타틴을 병용처리 할 경우, B 세포에 의한 자가항체 생산을 억제하여 면역반응을 효과적으로 조절할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[176]

- [177] <실시예 6> 메트포민과 스타틴 병용처리에 의한 파골세포 분화 및 관절 파괴 제어 효과분석

- [178] 메트포민과 로슈바스타틴의 복합처리에 따른 파골세포 조절에 미치는 영향을 조사하기 위해 RAW 264.7 세포주를 대상으로 파골세포로 분화시킬 수 있는 RANKL을 50ng을 처리하고 이와 동시에 메트포민 1 μ M과 로슈바스타틴 5 μ M을 각각 단독 및 메트포민 0.2 μ M과 로슈바스타틴 1 μ M을 병용 처리하여 Osterocast의 마커를 확인 하였다. 구체적으로는, 24-웰에 48시간 배양시킨 세포로부터 추출한 RNA로부터 cDNA를 합성한 후 파골세포 마커인 TRAP, MMP9, β 3 intergrin을 PCR로 조사하였다. RT-PCR은 Light Cycler FastStart DNAmaster SYBR green I(Takara) 형광 염료로 ABI PCR 장치를 이용하여 수행하였고, 이를 위한 반응 화합물은 1 μ g으로 합성한 cDNA를 1/3로 희석한 것 1 μ l, Light Cycler FastStart DNAmaster SYBR green I(Takara) 10 μ l, Taqman probe(Applied biosystems) 1 μ l를 혼합한 후 증류수로 최종 부피를 20 μ l로 만들어 사용하였다. 반응 조건은 TRAP은 57°C 30초, MMP9 64°C 30초, β 3 intergrin 60°C 30초를 40회 반응시켰다. Cycle threshold(Ct) 값을 분석 하여 TRAP, MMP9, β 3 intergrin의 mRNA의 발현양을 house keeping gene인 β -actin의 mRNA 발현양과의 상대정량으로 나타내었다. 상기 RT-PCR에서 사용한 프라이머는 MMP9(Forward : 5-CTG TCC AGA CCA AGG GTA CAG CCT-3(서열번호 1)/ Reverse : 5-GAG GTA TAG TGG GAC ACA TAG TGG-3(서열번호 2)), TRAP(Forward : 5-TCC TGG CTC AAA AAG CAG TT-3(서열번호 3)/ Reverse : 5-ACA TAG CCC ACA CCG TTC TC-3(서열번호 4)), beta3 intergrin(Forward :5-CCA CAC GAG GCG TGA ACT-3(서열번호 5)/ Reverse : 5-CTT CAG GTT ACA TCG GGG TGA-3(서열번호 6))을 사용하였다.

- [179] 분석 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 파골세포 분화인자들의 생성을

메트포민과 로슈바스타틴을 단독 처리한 군에 비해 병용처리한 군에서 보다 효과적으로 억제하고 있는 것으로 나타났다.

[180]

[181] <실시예 7> 메트포민 및 스타틴 단독처리에 의한 거품 세포(Foam cell) 제어 효과 조사

[182] 나아가 본 발명자들은 인간 대식세포주인 THP-1 세포에 160nM 농도의 PMA(phorbol 12'-myristate 13'-acetate)를 처리하여 세포를 활성화 시킨 후 PAF(platelet-activating factor)를 10 μ g/ml 처리함과 동시에 메트포민(0.2, 1 μ M)과 로슈바스타틴(1, 5, 20 μ M)을 각각 또는 병용 처리한 후, 동맥경화를 유발시키는 것으로 알려진 동맥경화반(Artherosclerotic plaque) 전구세포를 형성하는 거품세포(Foam cell) 생성 정도를 Oil Red O 용액(시그마 알드리치) 염색을 통해 측정하였다.

[183] 그 결과 도 10에 나타낸 바와 같이, 메트포민과 로슈바스타틴을 처리함에 따라 거품세포의 생성은 억제되는 것으로 나타났다.

[184]

[185] <실시예 8> 메트포민 및 스타틴 병용처리에 의한 거품 세포 제어 효과 조사

[186] 인간 대식세포주인 THP-1 세포에 160nM 농도의 PMA(phorbol 12'-myristate 13'-acetate)를 처리하여 세포를 활성화 시킨 후 PAF(platelet-activating factor)를 10 μ g/ml 처리와 동시에 메트포민(1, 5, 20 μ M)과 로슈바스타틴(5, 20 μ M)과 병용투여(Metformin 1 μ M + Rosuvastatin 5 μ M), (Metformin 1 μ M + Rosuvastatin 20 μ M)로 처리하여 동맥경화를 유발하는 동맥경화반(Artherosclerotic plaque) 전구세포를 형성하는 거품세포 생성 정도를 Oil Red O 용액(시그마 알드리치) 염색을 통해 측정하였다.

[187] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 메트포민이나 로슈바스타틴 단독 처리 군에 비해 병용 처리 했을 때 거품 세포의 생성이 2~2.5배 정도로 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다.

[188]

[189] <실시예 9> 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로슈바스타틴을 함유한 복합제의 제조

[190] 메트포민 5mM, 코엔자임 Q10 1 μ M, 로슈바스타틴 10 μ M을 균일하게 혼합한 후 20 메쉬의 체를 사용하여 체과한 후 유동층 과립기에 넣고 60°C에서 10 분간 열을 가했다. 히드록시프로필셀룰로오즈 6 g을 물 120 ml에 녹여 결합액을 제조한 후 제조한 결합액을 분당 7 ml의 속도로 분무하여 1차 과립을 제조하고 20 메쉬의 체로 체과하였다. 보글리보스 0.18 g과 히드록시프로필셀룰로오즈 6 g을 물 120 ml에 잘 교반하여 용해한 후 이를 상기 제조한 과립에 분무하여 2차 과립을 제조하였다. 20 메쉬의 체로 체과한 다음 건조하여 완성하였다.

[191]

[192] <실시예 10> 본 발명의 면역질환 치료용 복합제제를 이용한 면역질환 치료 효과분석

[193] **<10-1> TNF- α 사이토카인 측정**

[194] 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴을 함유한 복합제제가 염증 조절 효과가 있는지 여부를 알아보기 위하여, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 각각을 단독 처리한 군 및 이들을 함유한 복합제제를 처리한 군을 대상으로 염증성 자극 인자인 TNF- α 의 생성정도를 분석하였는데, LPS(10mg/ml)를 3일간 자극하는 조건에 메트포민, 코엔자임Q10, 로수바스타틴을 단독 또는 복합제제를 함께 투여하여 비장세포를 자극하였다.

[195] 배양된 상층액을 모아 mouse TNF- α , sandwich ELISA를 이용하여 TNF- α 발현 정도를 확인하였는데, 구체적으로 먼저, 96웰 플레이트(well plate)에 단클론성 anti-TNF- α 2 μ g/ml로 4°C에서 밤새 반응시켰으며, 반응 후 차단용액(1% BSA/PBST)으로 비 특이적 결합을 차단시켰다. TNF- α recombinant를 1/2씩 연속 희석하여 스탠다드(standard)로 사용하였고, 세포배양 상층액을 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 그리고 나서 바이오틴(biotinylated) anti-TNF- α 를 2시간 동안 실온 반응 시키고 4회 세척 후 ExtraAvidin-Alkaline Phosphatase conjugate를 희석하여 첨가하고 실온에서 2시간 반응시켰으며, 이후 PNPP/DEA 용액을 넣고 발색하였고, 발색 후 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[196] 그 결과, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴을 각각 처리한 군보다 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴의 복합제를 처리한 군에서 염증성사이토카인인 TNF- α 의 생성이 더 효과적으로 억제되었음을 알 수 있었다(도 12의 A 참조).

[197]

[198] **<10-2> MTT 분석**

[199] 본 발명자들은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제가 세포에 독성을 유발시키는지 확인하기 위해 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 각각과 본 발명의 복합제를 상기 실시예 <10-1>에서 사용한 세포에 3일 동안 처리한 후, 수확 4시간 전에 3-(4,5 dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 화합물을 첨가하여 4시간 동안 반응 후 DMSO를 각 웰에 처리하여 650nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[200] 그 결과, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 각각을 처리한 군 및 복합제 처리 군 모두에서 세포독성이 관찰되지 않았다(도 12의 B 참조). 따라서 본 발명의 복합제가 세포에 특별히 독성을 유발시키지 않아 안정성이 있음을 알 수 있었다.

[201]

[202] **<실시예 11> 본 발명의 복합제제에 의한 IL-17 생성억제 활성 분석**

[203] 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴을 함유한 복합제제가 염증성 사이토카인인 IL-17의 생성을 억제하는 활성이 있는지를 다음과 같은 방법으로 조사하였다.

[204] 먼저, DBA1/J 정상 마우스군의 CD4 T 세포를 분리하였으며 분리된 세포에

CD3 0.5 μ g/ml, CD28 1 μ g/ml, IL-6 20ng/ml, TGF- β 2ng/ml, anti-IFN γ mAb, anti-IL-4 mAb 의 조건으로 Th17 세포로 분화시켰다. 이후 분화된 세포에 메트포민 1mM, 코엔자임 Q10 10 μ M 및 로수바스타틴 1 μ M을 각각 단독으로 처리하고 동시에 이들 성분을 모두 포함하는 복합제제를 상기 세포에 처리한 후, 단클론성 anti-TNF- α 2 μ g/ml로 4°C에서 밤새 반응시키고, 반응 후 차단용액(1% BSA/PBST)으로 비 특이적 결합을 차단하였다. IL-17 recombinant를 1/2씩 연속 희석하여 스탠다드(standard)로 사용하였고, 세포배양 상층 액을 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 biotinylated anti-IL-17-a로 2시간 실온 반응시키며 반응 후 4회 세척 하고 ExtraAvidin-Alkaline Phosphatase conjugate를 희석하여 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 또한, 반응 후 PNPP/DEA 용액을 넣고 발색시켰으며, 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

- [205] 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 각각의 단독 조건 및 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합 처리 조건 시료로 3일 자극 후, 배양된 상층액을 모아 mouse TNF- α , sandwich ELISA를 이용하여 IL-17 발현 정도를 조사한 결과, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴을 각각 처리한 군보다 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴을 복합제제를 처리한 군에서 염증성사이토카인인 IL-17 의 생성이 더 유의적으로 억제되었음을 알 수 있었다(도 13 참조).

[206]

- [207] <실시예 12> 본 발명의 복합제제에 의한 염증성 사이토카인 분비 조절능 효과 분석

- [208] 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴을 함유한 복합제제가 염증을 조절하는 효과가 있는지를 알아보기 위하여 메트포민 및 로수바스타틴을 단독 처리한 군, 메트포민과 로수바스타틴을 병용 투여한 군 및 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴을 모두 함유한 복합제제 처리군을 대상으로 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6 생성 정도를 분석하였다.

- [209] 상기의 처리군에 LPS(10mg/ml)를 3일간 자극하여 비장세포를 자극하였으며, 배양된 상층액을 모아 mouse TNF- α , sandwich ELISA를 이용하여 TNF- α 및 IL-6 발현 정도를 확인하였는데, 구체적으로 먼저, 96 웰 플레이트(well plate)에 단클론성 anti-TNF- α 또는 anti-IL-6 2 μ g/ml로 4°C에서 밤새 반응시키고, 반응 후 차단용액(1% BSA/PBST)으로 비 특이적 결합을 차단하였다. TNF- α 또는 IL-6 recombinant를 1/2씩 연속 희석하여 스탠다드(standard)로 사용하며, 세포배양 상층액을 넣고 실온 2시간 반응하였다. 그리고 나서 바이오티닐(biotinylated) anti-TNF- α 또는 anti-IL-6을 2시간 실온 반응 시키고 4회 세척 후 ExtraAvidin-Alkaline Phosphatase conjugate를 희석하여 첨가하고 실온에서 2시간 반응시켰으며, 이후 PNPP/DEA 용액을 넣고 발색하였고, 발색 후 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

- [210] 그 결과, 메트포민 및 로수바스타틴을 각각 처리한 군, 메트포민과

로수바스타틴을 병용 투여한 군 보다 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴의 복합제제를 처리한 군에서 염증성사이토카인인 TNF- α 및 IL-6의 생성이 더 효과적으로 억제되었음을 알 수 있었다(도 14 참조).

[211]

[212] <실시예 13> 본 발명의 복합제제에 의한 항체 조절 효과 분석

[213] 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴을 함유한 복합제제에 항체를 조절할 수 있는 효과가 있는지를 알아보기 위하여 하기와 같이 실험을 하였다.

[214] 먼저, anti-IgG, IgG1, IgG2a 항체를 상온에서 2시간 동안 96-웰 마이크로펄터 플레이트(well microtitier plate)에 도포한 다음 희석해 둔 혈청 샘플을 well당 50 μ l씩 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 0.05% Tween 20(Amresco)이 포함된 TBS(pH 8.0)용액으로 3번씩 세척 후, anti-IgG, IgG1, IgG2a HRP 항체를 1시간 동안 반응시키고, 위의 용액으로 세척한 후 TMB +H₂O₂ system(KPL, Gaithersburg, MD)으로 발색하였다. 이는 450nm에서 흡광도로 읽었으며, 항체 측정 결과는 흡광도 자체로 표시하였다.

[215] 그 결과, 메트포민 및 로수바스타틴을 각각 처리한 군, 메트포민과 로수바스타틴을 병용 투여한 군 보다 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴의 복합제제를 처리한 군에서 IgG, IgG1, IgG2a의 항체 분비가 현저히 감소하였음을 알 수 있었다(도 15 참조).

[216]

[217] <실시예 14> 본 발명의 복합제제에 의한 관절염 치료 효과

[218] <14-1> 관절염 지수 측정

[219] 본 발명자들은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴의 복합제제가 실제로 관절염을 효과적으로 치료할 수 있는지 확인하기 위하여 먼저 DBA1/J 마우스에 type II collagen 100 μ g/CFA(Complete Freund's Adjuvant)를 마우스 꼬리 피하에 주입하고, 유도 2주 후 type II collagen 100 μ g/IFA(incomplete Freund's Adjuvant)을 꼬리 피하에 재 주입하여 관절염이 유도된 마우스를 제조하였다. 이후 관절염이 유도된 마우스에 메트포민 50mg/kg, 코엔자임 Q10 5mg/kg 및 로수바스타틴 10mg/kg을 각각 매일 경구투여 하였고, 본 발명의 복합제제 역시 매일 경구투여 한 뒤, 25일째에 각각의 실험군을 대상으로 관절염 지수를 측정하였다.

[220] 그 결과, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 각각을 단독 투여한 군에 비해 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴의 복합제제를 처리한 군이 관절염 지수가 현저히 감소되는 것으로 나타났다(도 16 참조).

[221]

[222] <14-2> 본 발명의 복합제제에 의한 염증성 사이토카인 조절 효과

[223] 본 발명자들은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제가 관절염 질환 동물모델에서 염증성 사이토카인을 조절할 수 있는지를 확인하기 위해, 관절염 유발 마우스의 비장세포 1 $\times$ 10⁶의 세포에 anti-CD4 PerCP, anti-CD25 PerCP Ab를 처리하고 surface 항체 염색 후 세포 내 사이토카인 IL-17, IFN- γ 과 Foxp3

Ab로 염색하여 Th17세포, Th1 및 Treg세포의 population을 유세포분석기를 이용하여 분석하였다.

- [224] 그 결과, 관절염 유발 마우스 모델에 비해 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴이 각각 처리된 관절염 유발 마우스의 비장세포에서 병인세포인 Th1 및 Th17 세포는 감소되어 있었으며, Treg 세포는 다소 증가한 것으로 나타났으나, 본 발명의 복합제제를 처리한 군에서는 상기 3가지 성분을 단독 처리한 군에 비해 Th1 및 Th17 세포 감소는 더 우수하였고, Treg 세포의 증가도 더 높은 것으로 나타났다(도 17 참조).

[225]

[226] **<14-3> 본 발명의 복합제제에 의한 파골세포 분화 억제 효과**

- [227] 본 발명자들은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제가 파골세포 분화 억제 효과가 있는지를 확인하기 위하여, 관절염 동물모델의 경골(tibia)과 비골(femur)로부터 골수 세포를 분리한 다음, 분리된 세포는 2×10^5 의 세포로 플레이트팅하였으며, M-CSF(macrophage-colony stimulating factor) 10 ng/ml을 처리하여 각 웰의 세포를 3일간 배양 후 상층액을 제거하고, 인산완충액으로 세척한 후, 새로운 배지로 교환하였다. 각각의 웰에 M-CSF 10ng/ml, RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand) 50ng/ml을 처리하고, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 각각의 단독 처리 및 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합 처리하여 2일간 배양하였다. 2일간의 배양 완료 후, 새로운 α -MEM 배지로 교환하고 M-CSF, RANKL, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 각각의 단독 처리 및 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합 처리하여 한 번 더 자극한 후, TRAP 염색하여 파골세포 분화를 관찰하였다.

- [228] 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합 주입 동물모델에서의 파골세포의 분화도를 확인하기 위하여 대조군으로 M-CSF와 RANKL 을 처리한 동물모델과 비교한 결과 M-CSF와 RANKL 을 처리한 동물모델은 파골세포가 분화되었으며 반면에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 각각을 단독 처리한 경우, 파골세포 분화가 덜 분화되어 분화 억제되었으며, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합 처리한 경우는 이들을 단독으로 처리한 경우보다 파골세포의 분화가 확연하게 억제되었음을 알 수 있었다(도 19a 및 19b 참조).

[229]

[230] **<14-4> 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제에 의한 파골세포 분화와 관련되어 있는 유전자 발현 억제 효과**

- [231] 상기 실시예 <14-3>의 파골세포 분화조건에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합 처리하여 배양한 세포로부터 RNA를 분리하고 cDNA를 합성한 후 파골세포 마커인 TRAP, MMP9, β 3 integrin을 PCR로 조사하였다.

- [232] RT-PCR은 Light Cycler FastStart DNAmaster SYBR green I(Takara) 형광 염료로 ABI PCR 장치를 이용하여 수행하였고, 이를 위한 반응 화합물은 1 μ g으로 합성한

cDNA를 1/3로 희석한 것 $1\mu\text{l}$, Light Cycler FastStart DNAmaster SYBR green I(Takara) $10\mu\text{l}$, Taqman probe(Applied biosystems) $1\mu\text{l}$ 를 혼합한 후 증류수로 최종 부피를 $20\mu\text{l}$ 로 만들어 사용하였다.

- [233] 반응 조건은 TRAP은 57°C 30초, MMP9 64°C 30초, $\beta 3$ intergrin 60°C 30초, Cathepsin K 60°C 30초를 40회 반응시켰다. Cycle threshold(Ct) 값을 분석 하여 TRAP, MMP9, $\beta 3$ intergrin, Cathepsin K 의 mRNA의 발현양을 하우스 키핑 유전자(house keeping gene)인 β -actin의 mRNA 발현양과의 상대정량으로 나타내었다.

- [234] 표 1

[Table 1]

사용한 프라이머의 서열

MMP9	정방향	5'-CTG TCC AGA CCA AGG GTA CAG CCT-3'	서열번호 1
	역방향	5'-GAG GTA TAG TGG GAC ACA TAG TGG-3'	서열번호 2
TRAP	정방향	5'-TCC TGG CTC AAA AAG CAG TT-3'	서열번호 3
	역방향	5'-ACA TAG CCC ACA CCG TTC TC-3'	서열번호 4
beta3 intergrin	정방향	5'-CCA CAC GAG GCG TGA ACT-3'	서열번호 5
	역방향	5'-CTT CAG GTT ACA TCG GGG TGA-3'	서열번호 6
Cathepsin K	정방향	5'-CAG CAG AGG TGT GTA CTA TG-3'	서열번호 7
	역방향	5'-GCG TTG TTC TTA TTC CGA GC-3'	서열번호 8

- [235] 따라서 본 발명자들은 상기의 결과를 통해 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴(rosuvastatin, 상품명: 크레스토)의 복합체가 파골세포와 관련된 유전자의 발현 억제를 통해 파골세포 분화를 억제할 수 있으며 따라서 관절염을 효과적으로 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

- [236]

- [237] **<14-5> 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제에 의한 난치성 비만관절염 치료 효과**

- [238] 비만은 당뇨병이나 동맥경화 등 각종 성인병의 원인이 될 뿐만 아니라 관절염에도 악영향을 미친다는 것은 이미 널리 알려져 있는 사실이다. 본 발명자들은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제가 비만에서 유발된 난치성 비만관절염에도 효과가 있는지를 확인하기 위하여 5주령의 DBA/1J마우스에 60Kcal 고지방 식이를 유도하여 비만을 유도하였다.

- [239] 또한, 비만 유도와 함께 관절염을 유도하기 위하여, 제 2형 콜라겐(CII)을 2mg/ml이 되도록 0.1N 아세트산 용액에 녹인 후 투석 완충액(dialysis buffer,

50mM Tris, 0.2N NaCl)으로 투석하여 M. 투베르쿨로시스(tuberculosis)를 함유하는 complete Freund's adjuvant(CFA, Chondrex)와 동량으로 섞은 후 상기 마우스의 꼬리 기저부에 피하 주사하여 면역원을 마리당 $100\mu\text{l}$ (즉 $100\mu\text{l}/100\mu\text{g}$)으로 주사하였다(1차 주사). 이로부터 2주 후 동일한 CII를 동량의 incomplete Freund's adjuvant(IFA, Chondrex)와 섞은 후 $100\mu\text{l}$ (즉 $100\mu\text{l}/100\mu\text{g}$)를 꼬리에 주사하였다(2차 주사).

[240] 2차 주사를 통한 2차 면역 후 매일 3주동안 메트포민(20mg/kg)과 스타틴(10mg/kg) COQ10(5mg/kg)를 각각 주입하였고, 각 군은 5마리씩을 대상으로 진행하였고 관절염 평가를 진행하였다. 첫 번째 접종을 시작점으로 하여 3주 후부터 실험의 내용을 알고 있지 않은 관찰자 세 명이 일주일에 두 번씩 관절 염증의 위중도를 평가하여 61일까지 관찰하였다. 이 때 관절염 평가는 마리당 2차 접종 때 CII/CFA를 투여한 다리를 제외한 나머지 세 다리에서 아래의 척도에 따라 매긴 점수를 합하여 3으로 나눈 평균치를 얻고, 다시 각 동물 모델에서 3명의 관찰자가 얻은 수치를 합산하여 나눈 평균치를 사용하였다. 관절염 평가에 따른 점수와 기준은 다음과 같다.

[241] -평가 기준-

[242] 0점: 부종이나 종창이 없다.

[243] 1점: 발 또는 발목관절에 국한된 경한 부종과 발적

[244] 2점: 발목관절에서 족근골(metatarsal)에 걸친 경한 부종과 발적

[245] 3점: 발목관절에서 족근골에 걸친 중등도의 부종과 발적

[246] 4점: 발목에서 다리 전체에 걸쳐 부종과 발적이 있는 경우

[247]

[248] 각각의 처리군을 대상으로 난치성 비만관절염에 대한 관절염 평가점수를 확인한 결과, 메트포민과 로수바스타틴을 병용 처리한 군에서 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 관절염 평가 지수가 낮아져 비만관절염의 치료에 효과가 있음을 알 수 있었으나, 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제를 처리한 경우 메트포민과 로수바스타틴을 병용 처리한 군보다 더 월등한 비만관절염 치료 효과가 있음을 알 수 있었다(도 18 참조).

[249]

[250] <실시예 15> 본 발명의 복합제제에 의한 염증성장질환 치료 효과

[251] <15-1> 염증성 장 질환 동물모델 제작

[252] 본 발명자들은 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제가 염증성 장 질환을 치료할 수 있는지를 확인하기 위하여, 먼저 염증성 장 질환 유도 동물모델을 제작하였다. 시험동물은 C57BL/6(H-2kb) 마우스를 사용하였으며, 염증성 장질환 유도 동물모델을 제조하기 위해, 마우스에 3.5% 텍스트란 설페이트 소듐(dextran sulfate sodium, DSS) 물을 4일간 음용하게 하여 염증성 장 질환 유도 동물 모델을 제작하였다.

[253]

[254] **<15-2> 본 발명의 복합제제에 의한 염증성장질환 치료 효과**

[255] 본 발명자들은 실험동물을 염증성 장 질환이 유도되지 않은 정상 동물 모델군, 염증성 장 질환 유도 동물 모델군, 염증성 장 질환 유도 동물에 현재 염증성 장 질환 치료 약물로 사용중인 설파살라진(sulfasalazine) 50mg/kg을 투여한 군 및 염증성 장 질환 유도 동물에 본 발명의 메트포민 50mg/kg, 코엔자임 Q10 5mg/kg 및 로수바스타틴 10mg/kg을 투여한 복합제제를 투여한 군으로 4개의 그룹으로 나누고, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제를 투여한 군 및 설파살라진(sulfasalazine)을 투여한 군은 질환 유도 3일 후부터 각각의 약물을 5mg의 농도로 경구 투여하였다.

[256] 각각의 동물 군을 대상으로 실험동물의 무게 변화, 장 길이 및 염증성 장 질환 지수를 측정한 결과, 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제는 염증성 장 질환 지수에서 대조군인 염증성 장 질환 유도 동물 모델 및 현재 염증성 장 질환 치료 약물로 사용 중인 설파살라진(sulfasalazine)을 투여한 군보다 염증성 장 질환을 억제하는 효과가 컸고, 장 길이 변화 및 몸무게 변화에서도 염증성 장 질환을 현저하게 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다(도 20a 내지 20c 참조).

[257]

[258] **<15-3> 본 발명의 복합제제에 의한 장 조직에서의 조직 파괴 억제 효과**

[259] 본 발명자들은 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제가 장 조직에서의 조직 파괴 억제 효과가 있는지를 확인하기 위하여, 염증성 장 질환 유도 동물 모델군, 염증성 장 질환 유도 동물에 현재 염증성 장 질환 치료 약물로 사용중인 설파살라진(sulfasalazine)을 투여한 군 및 염증성 장 질환 유도 동물에 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제를 투여한 군으로 3개의 그룹으로 나누고, 각 마우스군의 대장 조직을 분리하여 파라핀에 포매한 후 조직을 7 μ m 두께의 절편을 만들어 슬라이드에 부착하였다. 기본 염색을 진행하기 전에 자일렌을 이용하여 탈 파라핀 과정을 수행하였으며, 염색약은 대부분 수용액이므로 조직이 붙은 슬라이드를 고농도의 알코올에서 저농도의 알코올 수용액으로 처리하여 함수(hydration)시켰고, 헤마톡실린(hematoxylin) 수용액으로 일차염색을 한 후 에오신(eosin)으로 이차염색을 하는데 처음에는 진하게 염색한 후 알코올 용액으로 과도하게 염색된 표본의 염색정도를 적당하게 맞추는 분별(differentiation) 과정을 거쳐 염색했다.

[260] 조직학적 검사 결과, 염증성 장 질환 동물의 장 조직은 조직 손실이 많고, 많은 면역 세포들이 침식(infiltration)된 것을 확인할 수 있었으나 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합 주입 동물모델에서는 조직의 손상이 적고 세포 침식 정도가 적음을 알 수 있었다(도 21 참조).

[261]

[262] **<15-4> 본 발명의 복합제제에 의한 장 조직에서의 염증성사이토카인 억제 효과**

분석

- [263] 본 발명자들은 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제가 장 조직에서의 염증성사이토카인 억제 효과가 있는지를 확인하기 위하여, 현재 염증성 장 질환 치료 약물로 사용 중인 설파살라진(sulfasalazine)을 투여한 군과 본 발명의 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제를 투여한 군으로 나누어 이들의 대장조직을 분리하였으며, 파라핀에 포매한 후 조직을 7 μ m 두께의 절편을 만들어 슬라이드에 부착하였다. 면역화학염색법을 이용하여 TNF- α , VEGF, IL-8, IL-6, IL-17 로 염색하여 광학현미경으로 분석하였다.
- [264] 그 결과, 대조군인 염증성장질환 동물군에서는 대장 조직에서 염증성 사이토카인이 증가되어 있으나, 설파살라진을 투여한 군 및 메트포민, 코엔자임 Q10 및 로수바스타틴 복합제제 처리군에서는 염증성 사이토카인의 발현이 현저하게 억제되어 있음을 알 수 있었다(도 22 참조).
- [265]
- [266] 이제까지 본 발명에 대하여 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.
- [267]
- [268] 본 발명은 하기 국가연구개발사업 프로그램의 지원에 의해 수행되었다.
- [269] 1. 과제고유번호: HI09C1555
- [270] 2. 연구사업명: 보건의료연구개발사업
- [271] 3. 연구과제명: 고형장기 이식에서 Th17세포군 조절을 통한 항체생산 면역반응 제어와 면역 관용법 개발
- [272] 4. 주관기관명: 가톨릭대학교 산학협력단
- [273] 5. 부처명: 보건복지부
- [274] 6. 연구관리전문기관: 한국보건산업진흥원
- [275] 7. 연구기간: 2013-12-01~2014-11-30

산업상 이용가능성

- [276] 본 발명에 따른 메트포민 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 복합제인 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 염증성 사이토카인의 생성을 효과적으로 억제시킬 수 있고, 항체 생산 B 세포의 생성을 저해 또는 활성을 감소시킬 수 있으며, 과골세포의 분화를 억제하고 관절 파괴를 억제하는 효과를 가지며 동맥경화반(Artherosclerotic plaque) 전구세포를 형성하는 거품 세포의 생성 억제 효과가 뛰어나므로, 메트포민 및 스타틴을 유효성분으로 하는

복합제는 자가면역질환 치료분야에서 매우 유용하게 활용될 수 있다.

- [277] 아울러, 본 발명은 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴 병용투여에 의한 면역질환의 치료는 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 각각 단독으로 처리한 군에 비해 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-17, Th1 및/또는 Th17의 발현을 월등히 억제시키고, 관절염 유도 동물 모델 및 염증성 장질환 유도 동물모델에서 이들 면역질환을 효과적으로 치료할 수 있으므로, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 조성물을 면역질환 치료 분야에서 유용하게 사용할 수 있다.

[278]

[279]

청구범위

- [청구항 1] 메트포민 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 조성물에는 스타틴 및 메트포민을 1:30 ~ 1:70의 물비로 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 조성물은 염증성 사이토카인의 생성을 억제시키고, 항체 생산 B 세포의 생성을 저해 또는 활성을 감소시켜 자가면역질환의 치료 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 조성물은 파골세포의 분화를 억제하고 관절과괴를 억제하는 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 조성물은 동맥경화반(Artherosclerotic plaque) 전구세포를 형성하는 거품세포(Foam cell)의 생성을 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 청구항 3에 있어서,
상기 염증성 사이토카인은 IL-17, IFN- γ , IL-6 및 TNF- α 로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 스타틴은 실라스타틴(cilastatin), 나이스타틴(nystatin), 로바스타틴(lovastatin), 소마토스타틴(somatostatin), 프라바스타틴(pravastatin), 심바스타틴(simvastatin), 플루바스타틴(fluvastatin), 아토바스타틴(atorvastatin), 세르바스타틴(cervastatin), 울리나스타틴(ulinastatin) 및 로슈바스타틴(rosuvastatin)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,
상기 자가면역질환은 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis), 천식(Asthma), 피부염(Dermatitis), 건선(Psoriasis), 낭섬유증(Cystic Fibrosis), 고형장기 이식 후기 및 만성 거부증(Post transplantation late and chronic solid organ rejection), 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 하시모토 갑상선염(Hashimoto thyroiditis), 다발성근염(polymyositis), 경피증(scleroderma), 아디슨병(Addison disease), 백반증(vitiligo), 악성빈혈(pernicious

anemia), 사구체신염(glomerulonephritis) 및 폐섬유증(pulmonary fibrosis), 염증성장질환(Inflammatory Bowel Diseases), 자가면역성 당뇨(Autoimmune Diabetes), 당뇨 망막증(Diabetic retinopathy), 비염(Rhinitis), 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury), 혈관성형술후 재협착(Post-angioplasty restenosis), 만성 폐색성 심장 질환(Chronic obstructive pulmonary diseases; COPD), 그레이브병(Graves disease), 위장관 알러지(Gastrointestinal allergies), 결막염(Conjunctivitis), 죽상경화증(Atherosclerosis), 관상동맥질환(Coronary artery disease), 협심증(Angina), 암 전이 및 소동맥 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

- [청구항 9] 면역질환이 유발된 개체에 메트포민 및 스타틴을 병용 투여하는 단계를 포함하는 면역질환의 치료 방법.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 투여는 메트포민 및 스타틴이 함께 함유된 복합제의 형태로 투여하거나, 메트포민 및 스타틴을 각각 개별적으로 동시에 투여하는 방법.
- [청구항 11] 청구항 10에 있어서, 상기 복합제는 스타틴 및 메트포민이 1:30 ~ 1:70의 몰비로 포함되어 있는 방법.
- [청구항 12] 청구항 9에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 천식, 피부염, 건선, 당뇨병, 고형장기 이식 후 기 및 만성 거부증, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선, 다발성근염, 경피증, 아디슨병, 백반증, 악성빈혈, 사구체신염 및 폐섬유증, 염증성장질환, 자가면역성 당뇨, 당뇨 망막증, 비염, 허혈-재관류 손상, 혈관성형술 후 재협착, 만성폐색성 심장 질환, 그레이브병, 위장관 알러지, 결막염, 죽상경화증, 관상동맥질환, 협심증, 암 전이 및 소동맥 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [청구항 13] 스타틴 및 메트포민을 1:30 ~ 1:70의 몰비로 포함하는 면역질환 치료용 복합제제.
- [청구항 14] 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 유효성분으로 포함하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 15] 청구항 14에 있어서, 상기 코엔자임 Q10, 스타틴 및 메트포민을 1:5~15:4500~5500의 몰비로 포함하는 것을 특징으로 하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

- [청구항 16] 청구항 14에 있어서,
상기 조성물은 염증성사이토카인인 TNF- α , IL-6 및 IL-17로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나의 발현을 감소 또는 억제시키는 것을 특징으로 하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 17] 청구항 14에 있어서,
상기 조성물은 파골세포 분화를 감소시키거나, 염증성세포의 침윤을 억제하는 것을 특징으로 하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 18] 청구항 14에 있어서,
상기 조성물은 소장 및 대장의 길이를 정상상태와 같이 유지시키는 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 19] 청구항 14에 있어서,
상기 면역질환은 자가면역질환, 염증성질환 및 세포, 조직 또는 기관의 이식거부(transplantation rejection)질환으로 이루어진 군 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 20] 청구항 19에 있어서,
상기 면역질환은 베체트병, 다발성 근육염 또는 피부 근육염, 자가면역 혈구감소증, 자가면역 심근염, 아토피피부염, 천식, 일차성간경변, 피부근염, 굿파이처 증후군, 자가면역 뇌수막염, 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스, 애디슨병, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 자가면역성 간염, 자가면역성 이하선염, 크론병, 인슐린 의존성 당뇨병, 이영양성 수포성 표피박리증, 부고환염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑바레 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상천포창, 건선, 류마티스염, 관절염, 유육종증, 피부 경화증, 척추관절증, 갑상선염, 혈관염, 백반증, 점액수종, 악성빈혈, 미토콘드리아 관련 증후군 및 궤양성 대장염 중에서 선택된 것을 특징으로 하는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 21] 면역질환이 유발된 개체에 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 병용 투여하는 단계를 포함하는 면역질환의 치료방법.
- [청구항 22] 청구항 21에 있어서,
상기 투여는 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴이 함께 함유된 복합제의 형태로 투여하거나, 메트포민, 코엔자임 Q10 및 스타틴을 각각 개별적으로 동시에 투여하는 방법.
- [청구항 23] 청구항 21에 있어서,

상기 복합제는 코엔자임 Q10, 스타틴 및 메트포민이
1:5~15:4500~5500의 몰비로 포함되어 있는 방법.

[청구항 24]

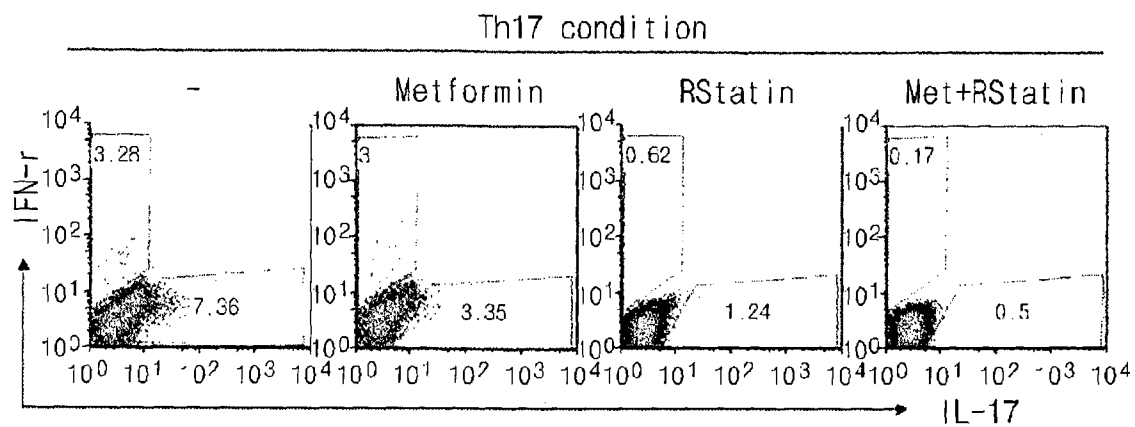
청구항 21에 있어서,

상기 면역질환은 자가면역질환, 염증성질환 및 세포, 조직 또는
기관의 이식거부(transplantation rejection)질환으로 이루어진 군
중에서 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 25]

코엔자임 Q10, 스타틴 및 메트포민을 1:5~15:4500~5500의 몰비로
포함하는 면역질환 치료용 복합제제.

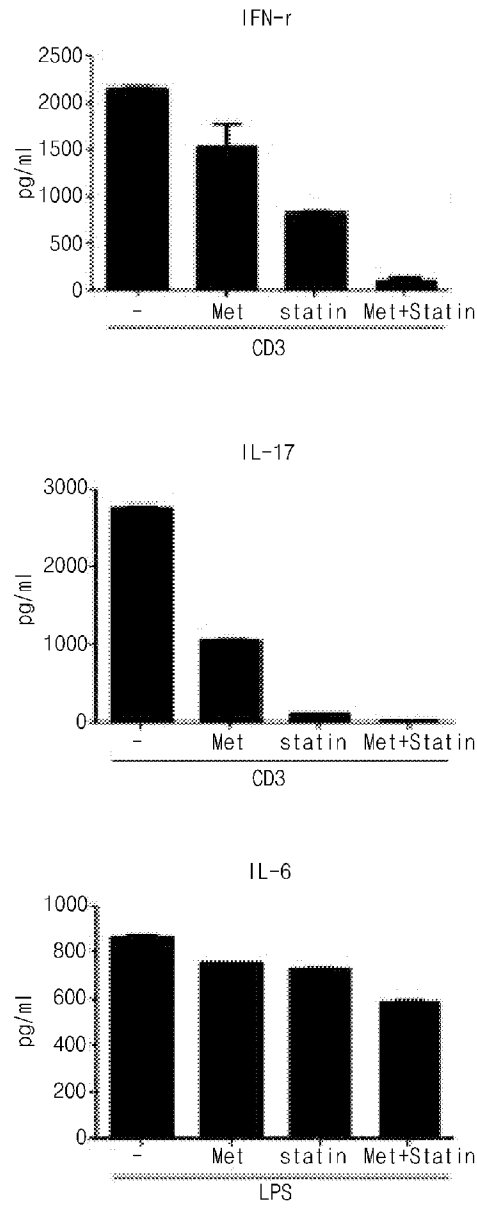
[Fig. 1a]



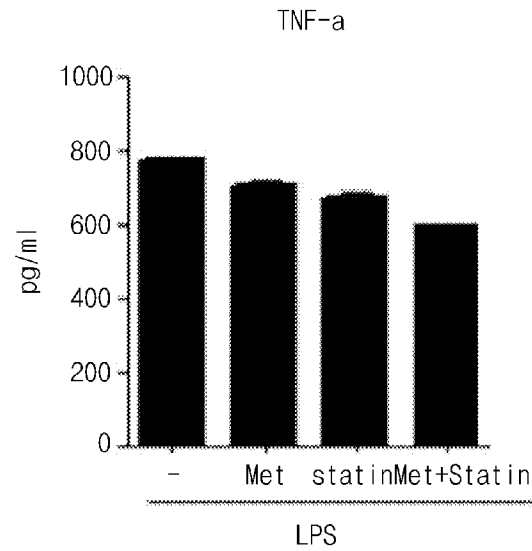
[Fig. 1b]



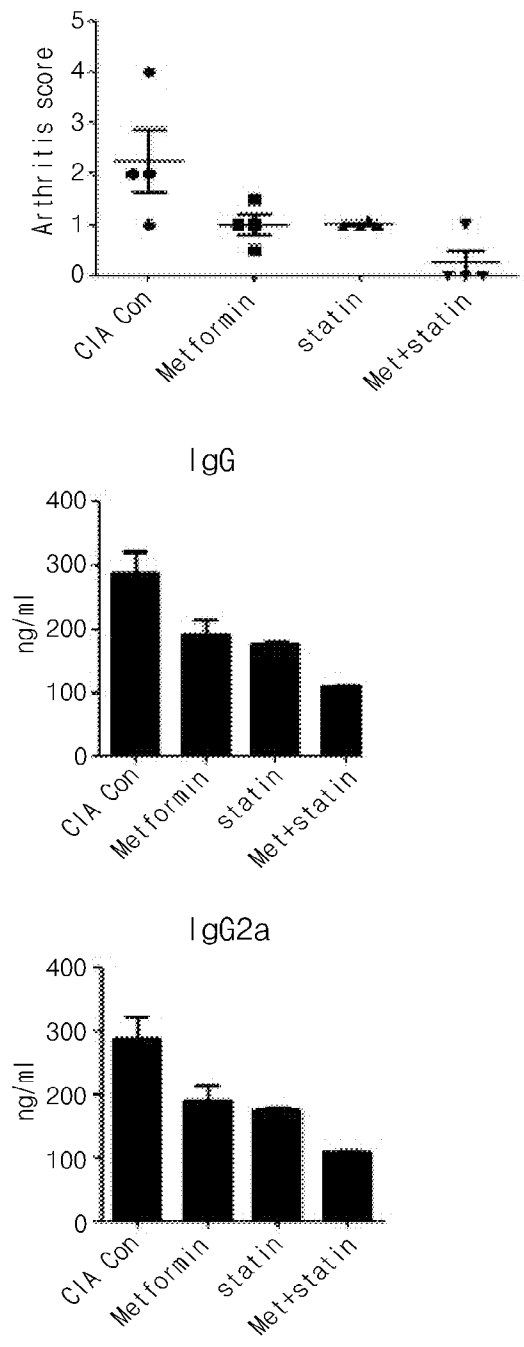
[Fig. 2]



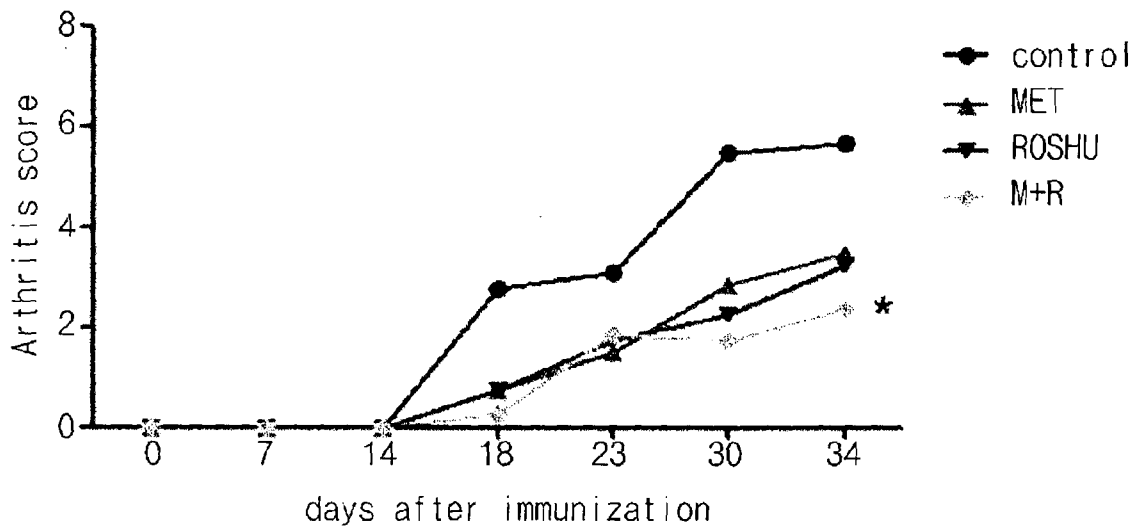
[Fig. 3]



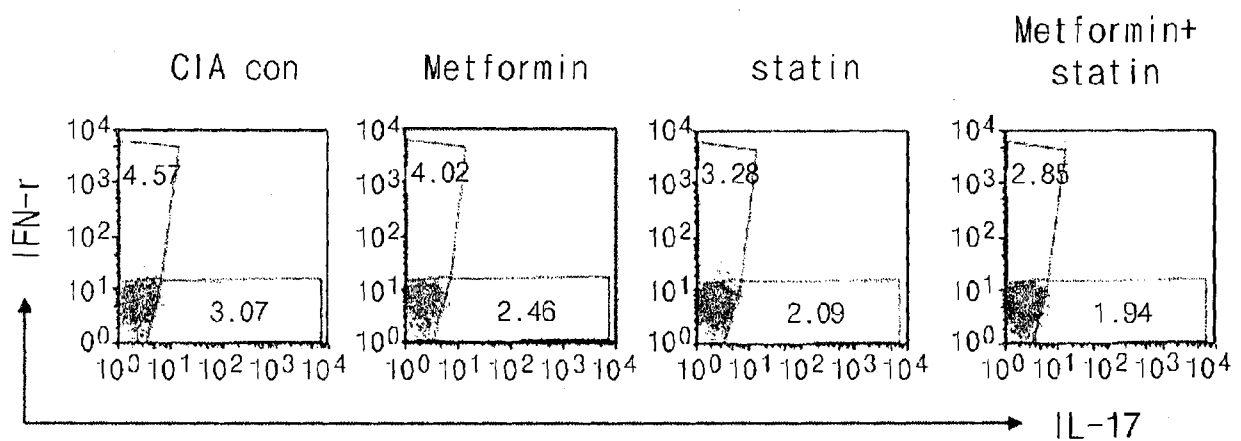
[Fig. 4]



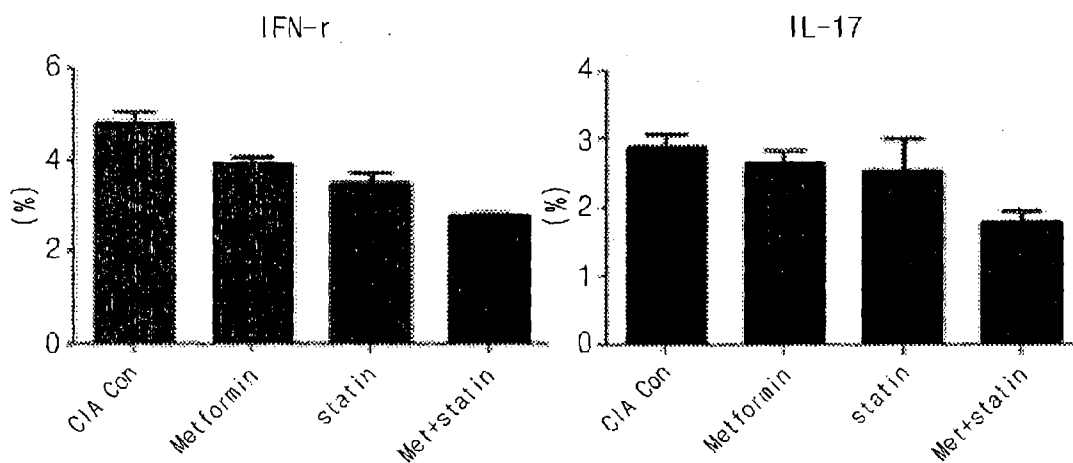
[Fig. 5]



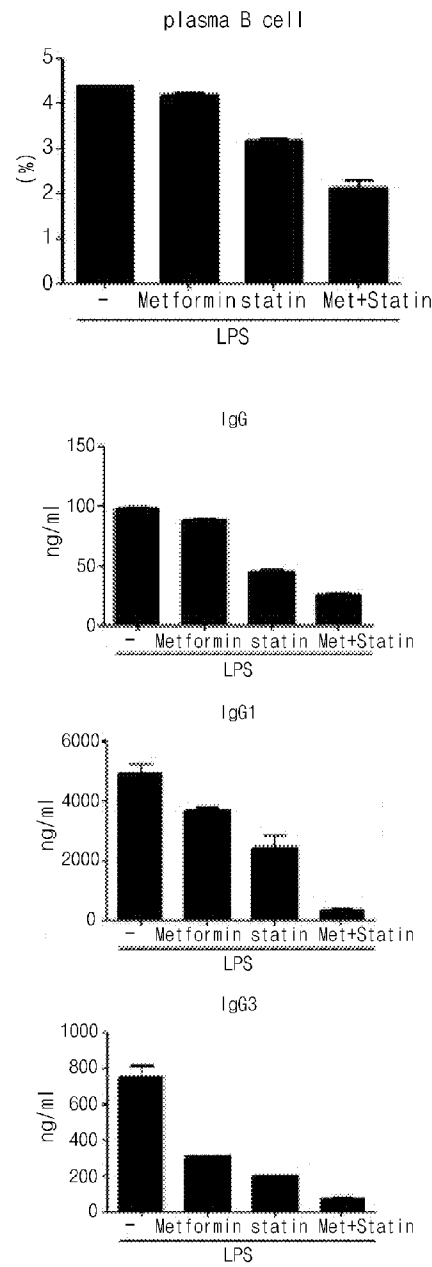
[Fig. 6a]



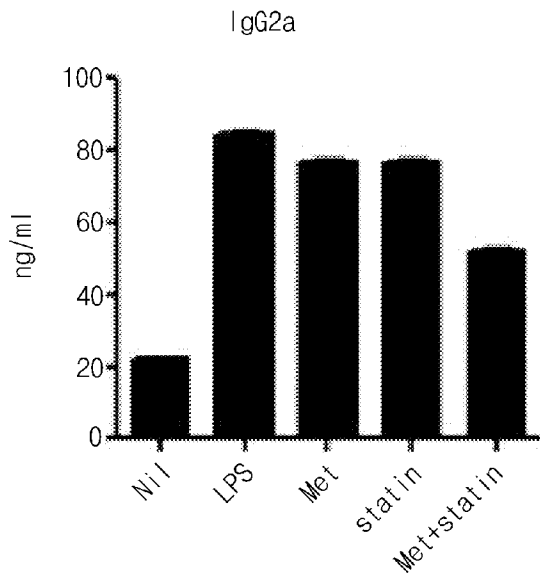
[Fig. 6b]



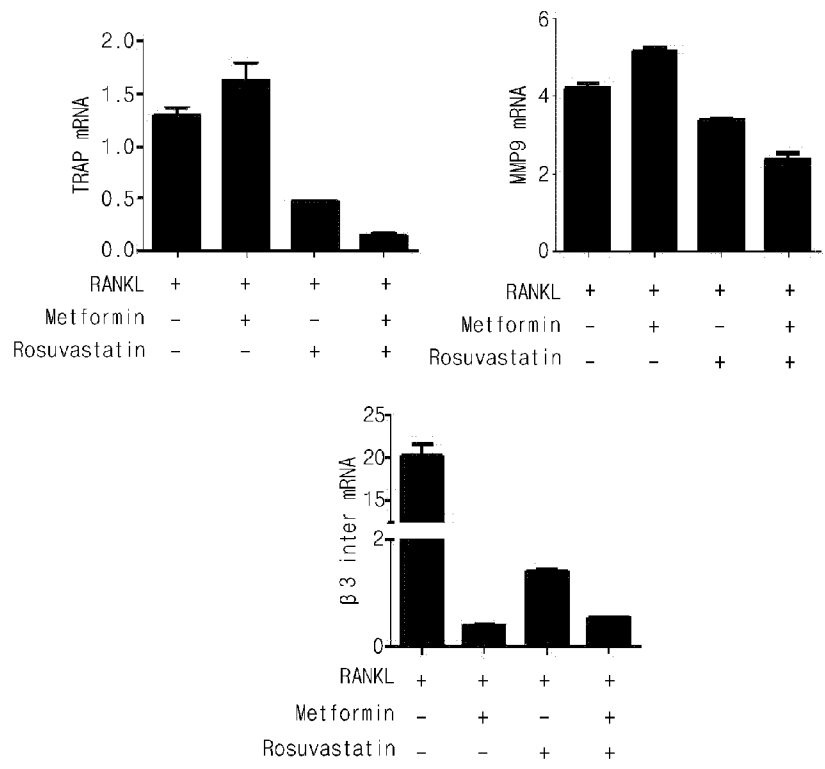
[Fig. 7]



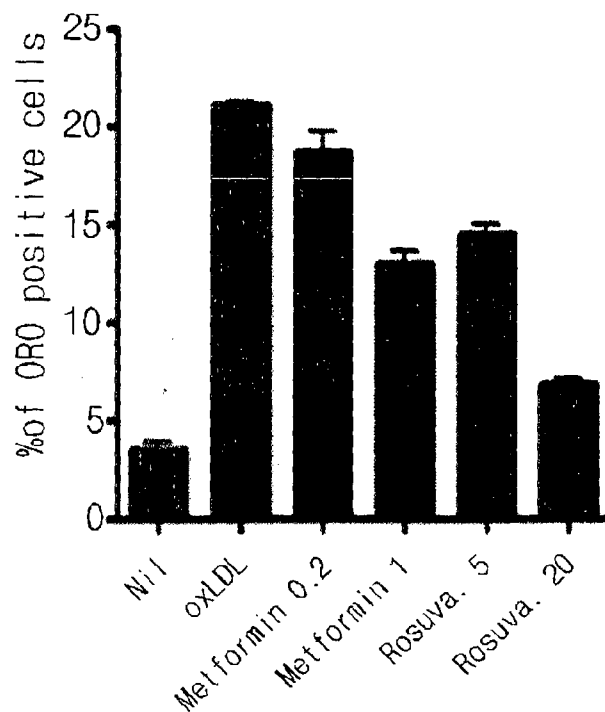
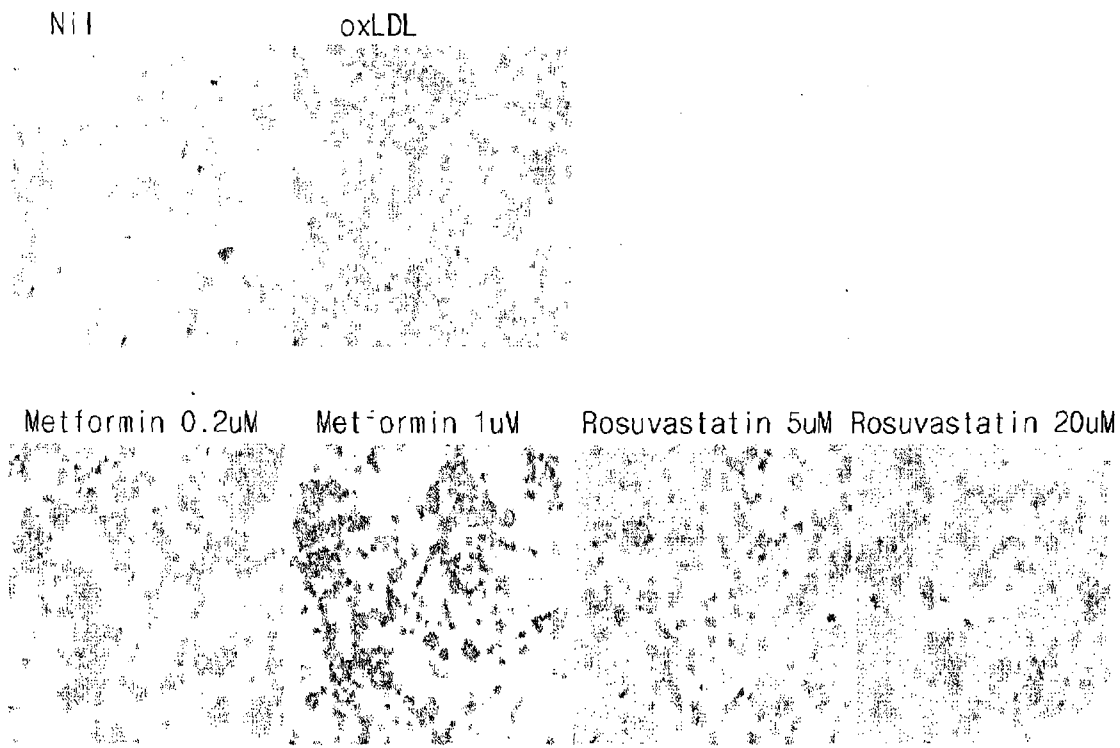
[Fig. 8]



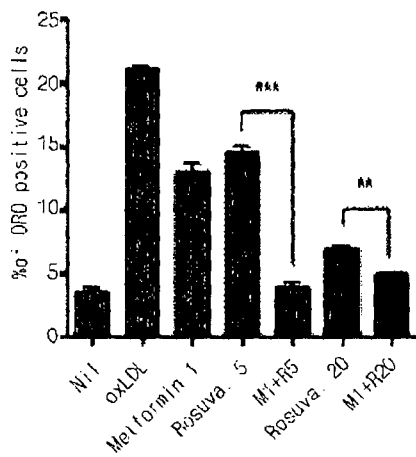
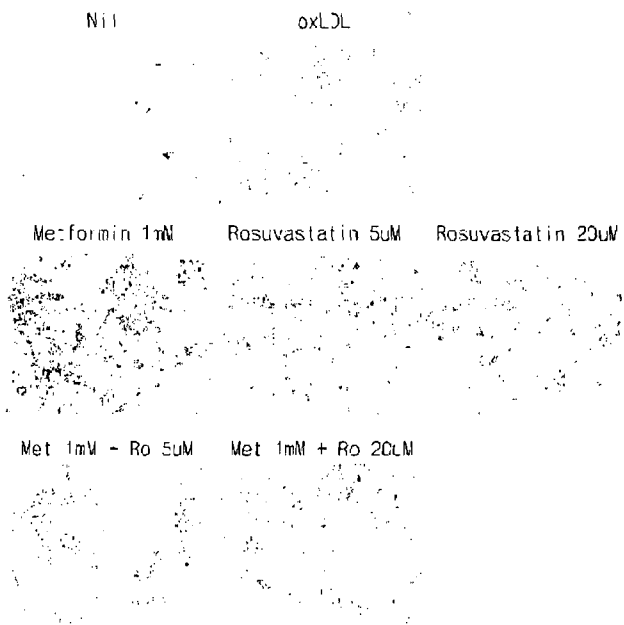
[Fig. 9]



[Fig. 10]

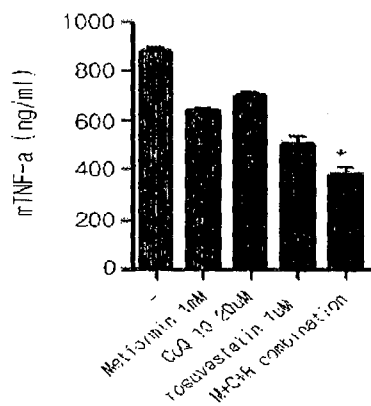


[Fig. 11]

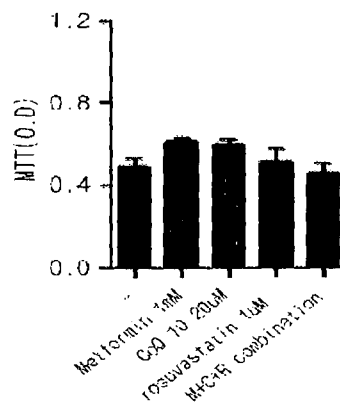


[Fig. 12]

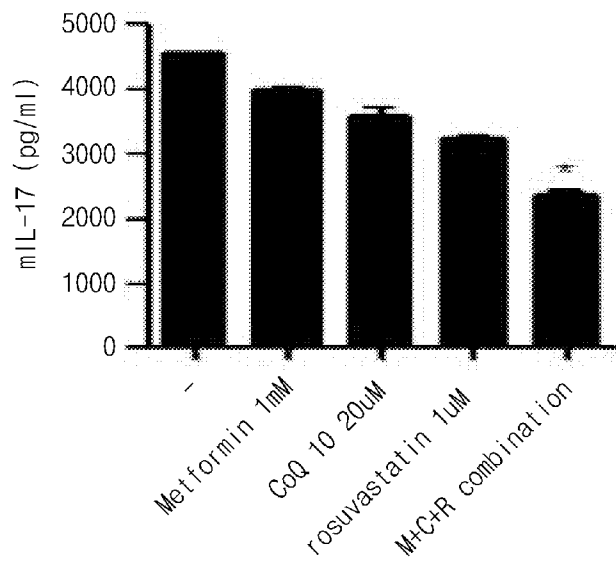
A



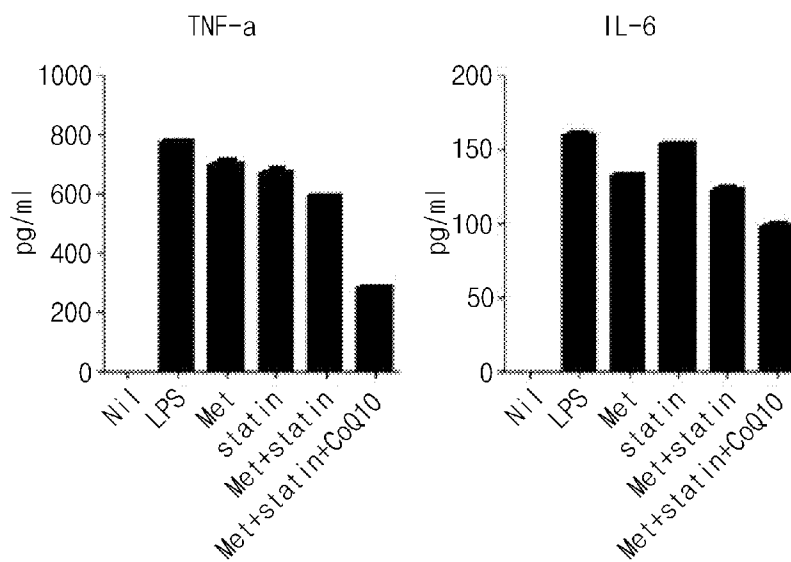
B



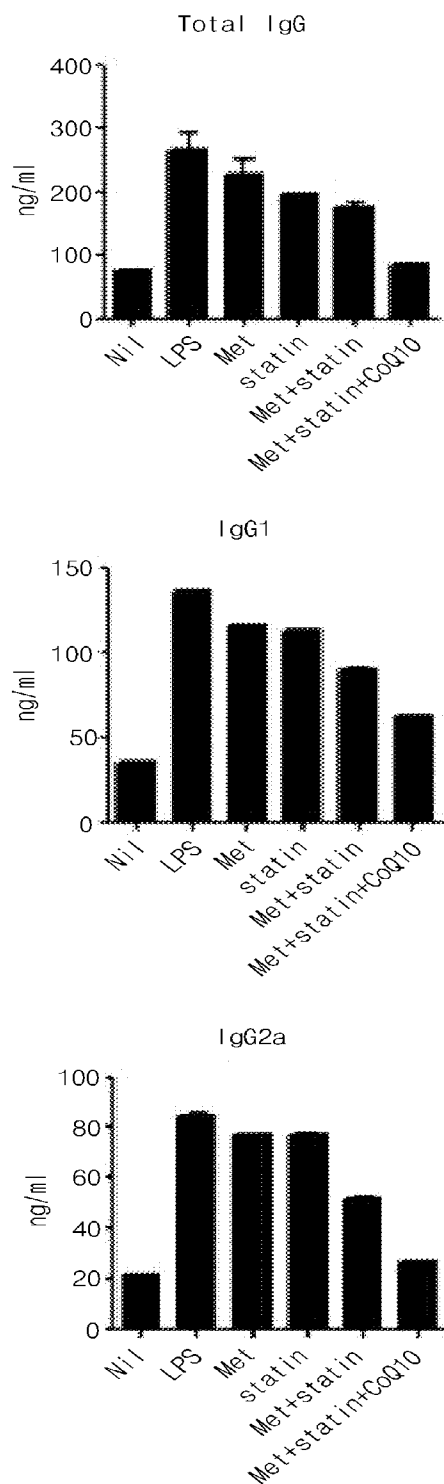
[Fig. 13]



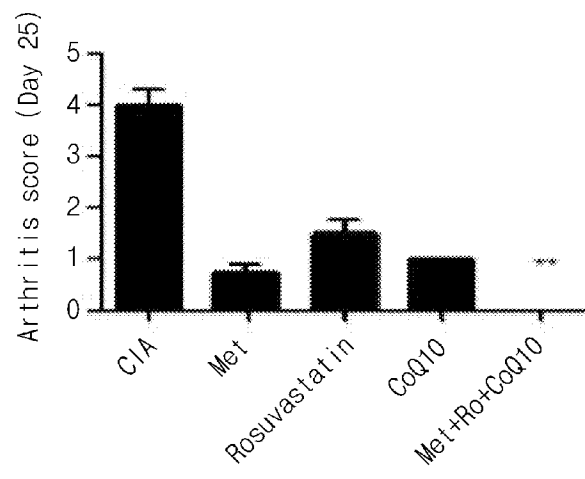
[Fig. 14]



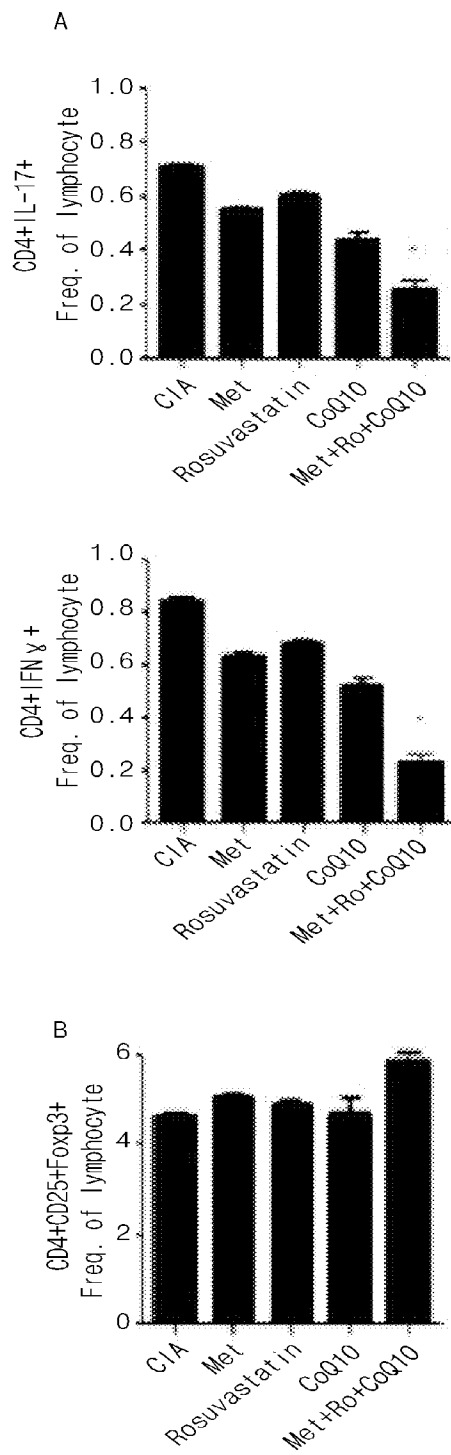
[Fig. 15]



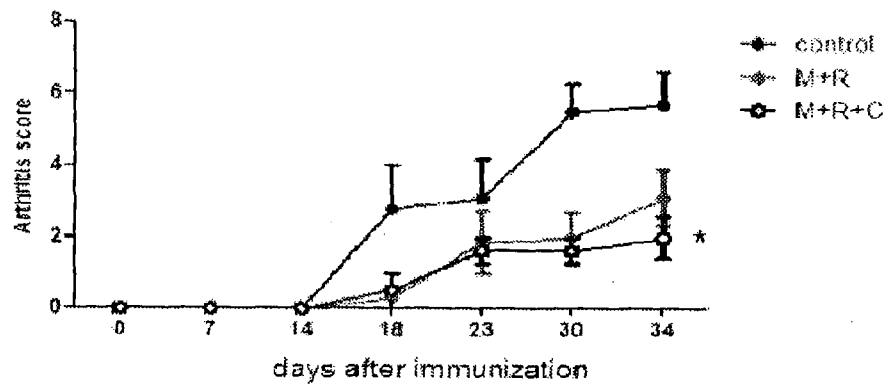
[Fig. 16]



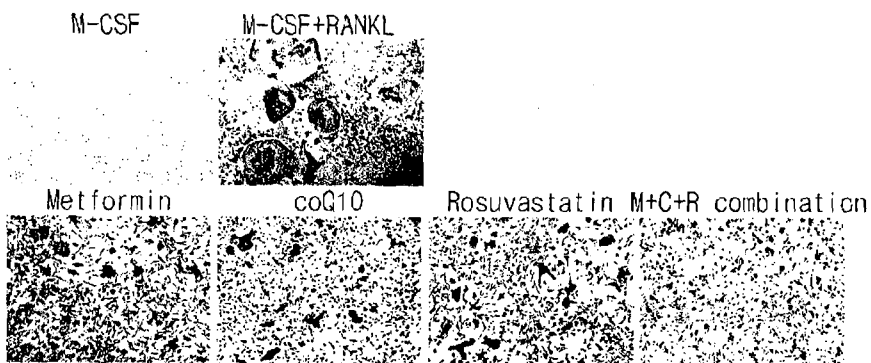
[Fig. 17]



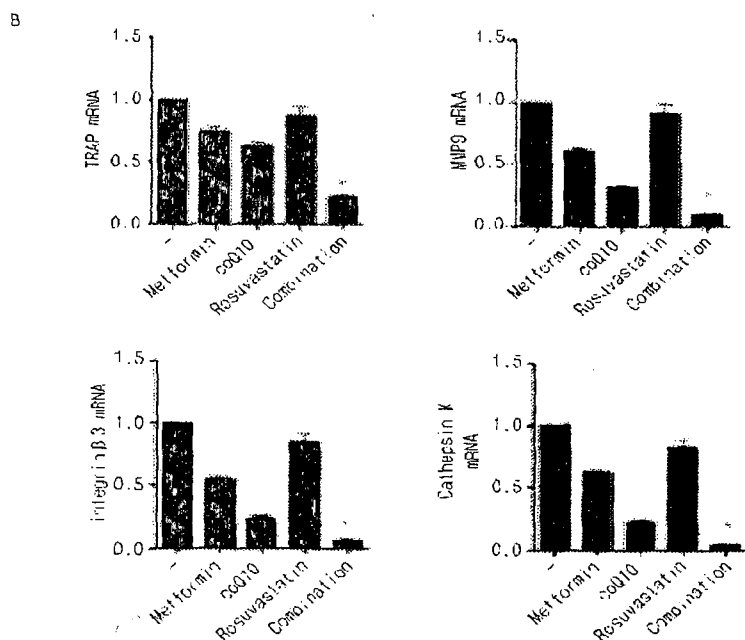
[Fig. 18]



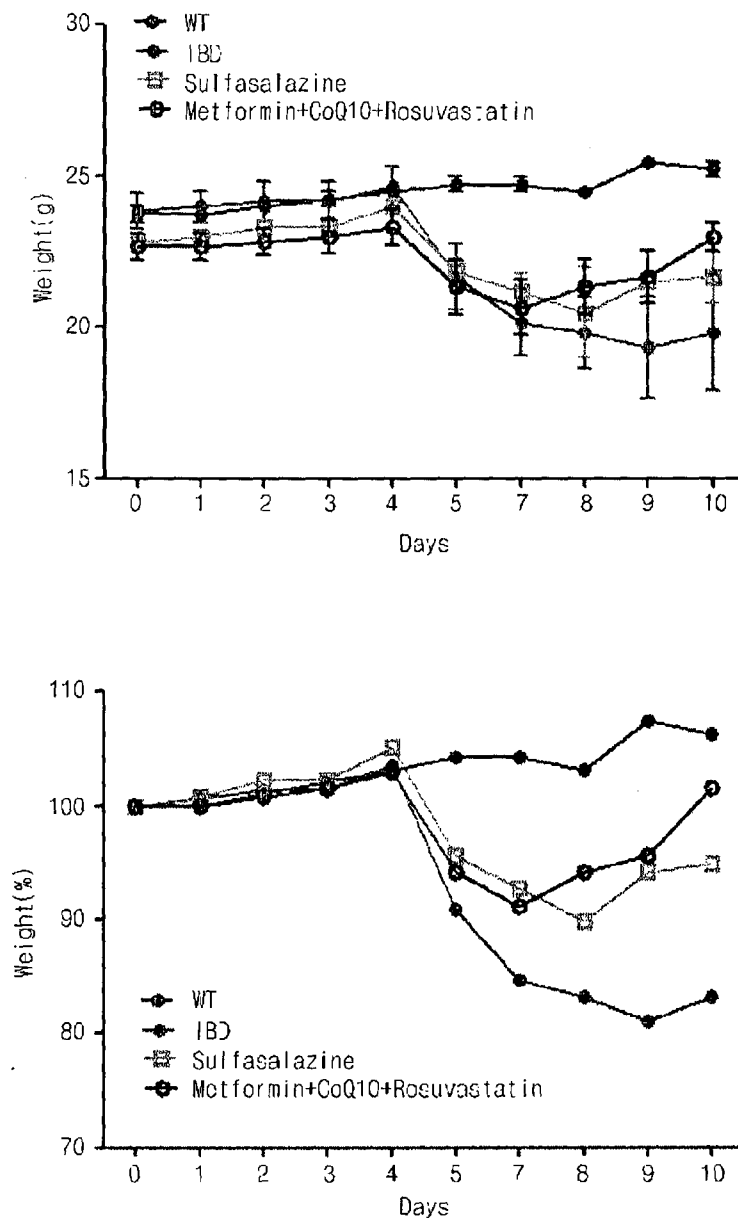
[Fig. 19a]



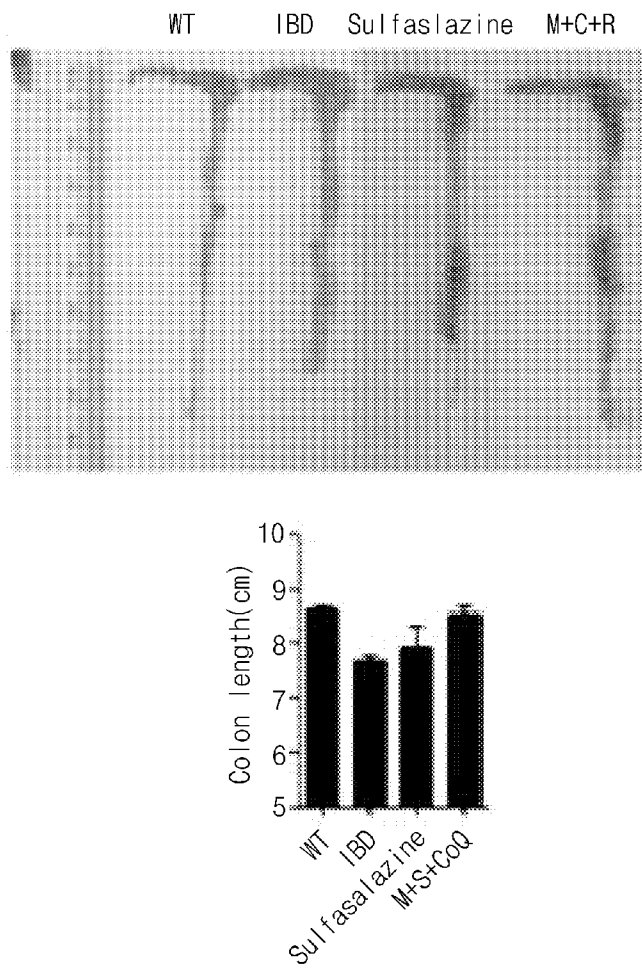
[Fig. 19b]



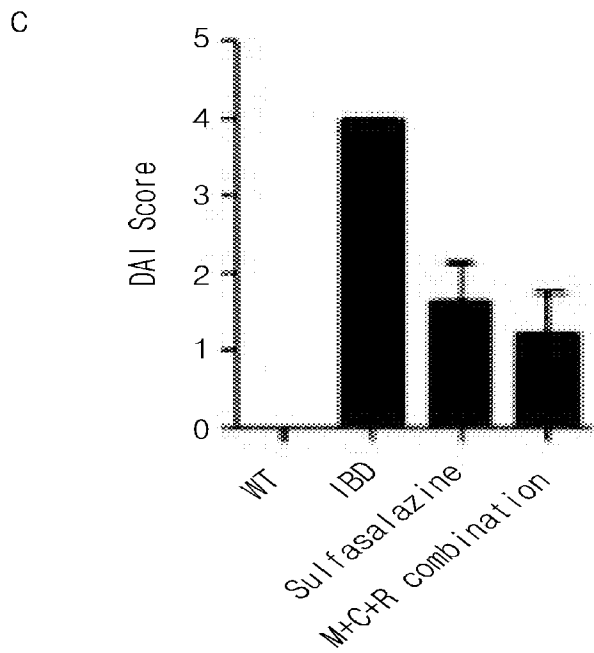
[Fig. 20a]



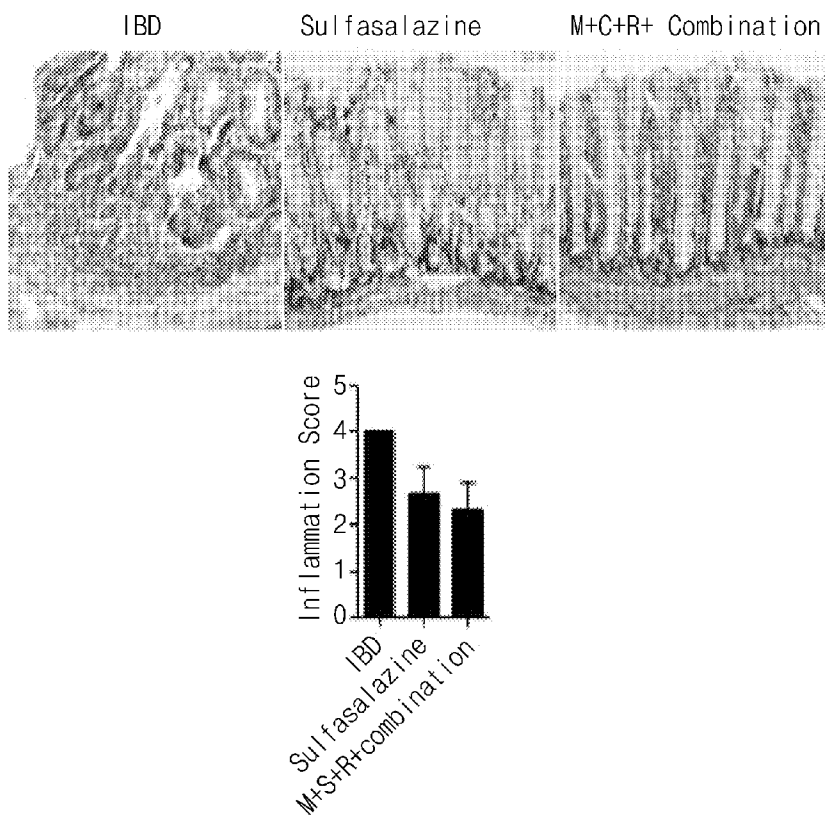
[Fig. 20b]



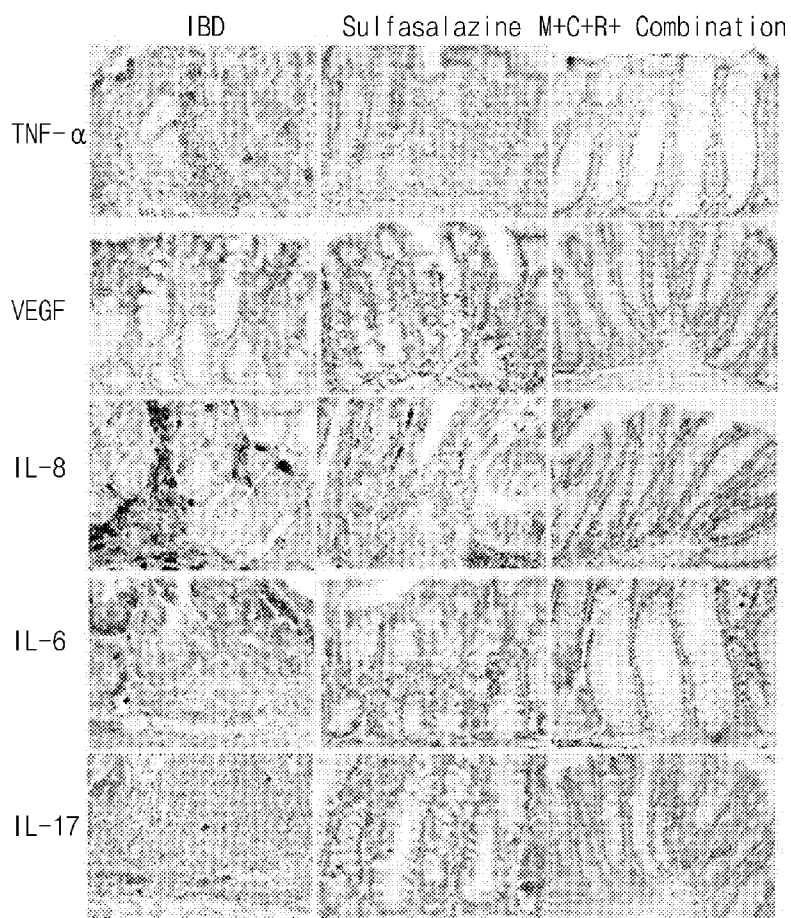
[Fig. 20c]



[Fig. 21]



[Fig. 22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/009538**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 31/155(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/155; A61K 31/505; A61K 31/625; A61K 38/28; A61K 31/225; A61P 35/00; A61P 37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: metformin, statin, autoimmune, immunity, cytokine**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAINTLIA, AJAIB S. et al., "Combinatorial effect of metformin and lovastatin impedes T-cell autoimmunity and neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis", Journal of Clinical & Cellular Immunology, 30 June 2013, vol. 4, no. 3, thesis number 149	1-8,13
Y	See abstract; and pages 1, 4, 5, 7, 8.	14-20,25
Y	BESSLER, HANNA et al., "Coenzyme Q10 decreases TNF- α and IL-2 secretion by human peripheral blood mononuclear cells", Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2010, vol. 56, pp. 77-81 See abstract; and pages 79-80.	14-20,25
X	KRYSIAK, ROBERT et al., "Lymphocyte-suppressing and systemic anti-inflammatory effects of high-dose metformin in simvastatin-treated patients with impaired fasting glucose", Atherosclerosis, 2012, vol. 225, pp. 403-407 See abstract; pages 405-406; and table 3.	1-8,13
A	US 2013-0035316 A1 (SUH, Hea Ran et al.) 07 February 2013 See abstract; and claim 1.	1-8,13-20,25
A	US 2005-0209128 A1 (CAMERON, Norman E. et al.) 22 September 2005 See abstract; and paragraph [0011].	1-8,13-20,25



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 JANUARY 2015 (15.01.2015)

Date of mailing of the international search report

16 JANUARY 2015 (16.01.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/009538

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **9-12, 21-24**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9-12 and 21 to 24 pertain to a method for treatment of the human, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/009538

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0035316 A1	07/02/2013	CN 102762209 A	31/10/2012
		EP 2519240 A2	07/11/2012
		JP 2013-516409 A	13/05/2013
		KR 10-1451180 B1	17/10/2014
		KR 10-2012-0112689 A	11/10/2012
		WO 2011-081493 A2	07/07/2011
		WO 2011-081493 A3	10/11/2011
US 2005-0209128 A1	22/09/2005	AR 025512 A1	04/12/2002
		AT 367162 T	15/08/2007
		AT 485823 T	15/11/2010
		AU 2000-23047 B2	07/08/2003
		AU 2304700 A	25/08/2000
		AU 763970 B2	07/08/2003
		BR 0007996 A	30/10/2001
		CA 2368186 A1	10/08/2000
		CA 2368186 C	03/06/2008
		CN 1196488 C	13/04/2005
		CN 1338937 A	06/03/2002
		CZ 20012806 A3	13/02/2002
		CZ 302881 B6	04/01/2012
		CZ 302893 B6	11/01/2012
		DE 60035575 D1	30/08/2007
		DE 60035575 T2	03/04/2008
		DE 60045168 D1	09/12/2010
		DK 1150678 T3	08/10/2007
		DK 1897546 T3	17/01/2011
		EE 05556 B1	15/08/2012
		EE 05621 B1	15/02/2013
		EE 200100405 A	15/10/2002
		EE 201200015 A	15/10/2012
		EP 1150678 A1	07/11/2001
		EP 1150678 B1	18/07/2007
		EP 1897546 A1	12/03/2008
		EP 1897546 B1	27/10/2010
		ES 2286995 T3	16/12/2007
		ES 2352803 T3	23/02/2011
		GB 0001662 D	15/03/2000
		HK 1041223 A1	09/11/2007
		HK 1118209 A1	29/07/2011
		HU 0105138 A2	29/04/2002
		HU 0105138 A3	28/11/2002
		HU 227642 B1	28/10/2011
		IL 144730 A	30/12/2010
		IL 208330 D	30/12/2010
		IS 2793 B	15/08/2012
		IS 2820 B	15/12/2012
		IS 6016 A	20/07/2001
		IS 8978 A	23/08/2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/009538

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		JP 2002-536332 A	29/10/2002
		JP 2012-051898 A	15/03/2012
		JP 2014-065718 A	17/04/2014
		KR 10-0699757 B1	27/03/2007
		MX PA01007821 A	19/08/2004
		MY 138289 A	29/05/2009
		NO 20013812 A	02/10/2001
		NO 330400 B1	04/04/2011
		NZ 513061 A	30/06/2003
		NZ 525419 A	24/12/2004
		NZ 536433 A	31/08/2006
		PL 198098 B1	30/05/2008
		PL 350312 A1	02/12/2002
		PT 1150678 E	14/09/2007
		PT 1897546 E	15/12/2010
		RU 2239456 C2	10/11/2004
		SI 1150678 T1	29/02/2008
		SI 1897546 T1	28/02/2011
		SK 11102001 A3	09/05/2002
		SK 286854 B6	05/06/2009
		SK 287792 B6	04/10/2011
		TR 200102229 T2	21/12/2001
		TW I230067 B	01/04/2005
		US 2009-0186908 A1	23/07/2009
		US 2012-0041010 A1	16/02/2012
		US 6894058 B1	17/05/2005
		WO 00-45818 A1	10/08/2000
		ZA 200105885 A	17/10/2002

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/155(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/155; A61K 31/505; A61K 31/625; A61K 38/28; A61K 31/225; A61P 35/00; A61P 37/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 메트포민, 스타틴, 자가면역, 면역, 사이토카인

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	PAINTLIA, AJAIB S. 외, "Combinatorial effect of metformin and lovastatin impedes T-cell autoimmunity and neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis", Journal of Clinical & Cellular Immunology, 2013.06.30, 4권, 3호, 논문번호 149 요약; 및 페이지 1, 4, 5, 7, 8 참조.	1-8,13
Y		14-20,25
Y	BESSLER, HANNA 외, "Coenzyme Q10 decreases TNF- α and IL-2 secretion by human peripheral blood mononuclear cells", Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2010, 56권, 페이지 77-81 요약; 및 페이지 79-80 참조.	14-20,25
X	KRYSIAK, ROBERT 외, "Lymphocyte-suppressing and systemic anti-inflammatory effects of high-dose metformin in simvastatin-treated patients with impaired fasting glucose", Atherosclerosis, 2012, 225권, 페이지 403-407 요약; 페이지 405-406; 및 표 3 참조.	1-8,13
A	US 2013-0035316 A1 (SUH, HEARAN 외) 2013.02.07 요약; 및 청구항 1 참조.	1-8,13-20,25
A	US 2005-0209128 A1 (CAMERON, NORMAN E. 외) 2005.09.22 요약; 및 단락 [0011] 참조.	1-8,13-20,25



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 01월 15일 (15.01.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 01월 16일 (16.01.2015)

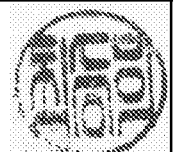
ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관

최승희

전화번호 +82-42-481-8740



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 9-12, 21-24
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 9-12 및 21-24는 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2013-0035316 A1	2013/02/07	CN 102762209 A EP 2519240 A2 JP 2013-516409 A KR 10-1451180 B1 KR 10-2012-0112689 A WO 2011-081493 A2 WO 2011-081493 A3	2012/10/31 2012/11/07 2013/05/13 2014/10/17 2012/10/11 2011/07/07 2011/11/10
US 2005-0209128 A1	2005/09/22	AR 025512 A1 AT 367162 T AT 485823 T AU 2000-23047 B2 AU 2304700 A AU 763970 B2 BR 0007996 A CA 2368186 A1 CA 2368186 C CN 1196488 C CN 1338937 A CZ 20012806 A3 CZ 302881 B6 CZ 302893 B6 DE 60035575 D1 DE 60035575 T2 DE 60045168 D1 DK 1150678 T3 DK 1897546 T3 EE 05556 B1 EE 05621 B1 EE 200100405 A EE 201200015 A EP 1150678 A1 EP 1150678 B1 EP 1897546 A1 EP 1897546 B1 ES 2286995 T3 ES 2352803 T3 GB 0001662 D HK 1041223 A1 HK 1118209 A1 HU 0105138 A2 HU 0105138 A3 HU 227642 B1 IL 144730 A IL 208330 D IS 2793 B IS 2820 B IS 6016 A IS 8978 A	2002/12/04 2007/08/15 2010/11/15 2003/08/07 2000/08/25 2003/08/07 2001/10/30 2000/08/10 2008/06/03 2005/04/13 2002/03/06 2002/02/13 2012/01/04 2012/01/11 2007/08/30 2008/04/03 2010/12/09 2007/10/08 2011/01/17 2012/08/15 2013/02/15 2002/10/15 2012/10/15 2001/11/07 2007/07/18 2008/03/12 2010/10/27 2007/12/16 2011/02/23 2000/03/15 2007/11/09 2011/07/29 2002/04/29 2002/11/28 2011/10/28 2010/12/30 2010/12/30 2012/08/15 2012/12/15 2001/07/20 2011/08/23

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		JP 2002-536332 A	2002/10/29
		JP 2012-051898 A	2012/03/15
		JP 2014-065718 A	2014/04/17
		KR 10-0699757 B1	2007/03/27
		MX PA01007821 A	2004/08/19
		MY 138289 A	2009/05/29
		NO 20013812 A	2001/10/02
		NO 330400 B1	2011/04/04
		NZ 513061 A	2003/06/30
		NZ 525419 A	2004/12/24
		NZ 536433 A	2006/08/31
		PL 198098 B1	2008/05/30
		PL 350312 A1	2002/12/02
		PT 1150678 E	2007/09/14
		PT 1897546 E	2010/12/15
		RU 2239456 C2	2004/11/10
		SI 1150678 T1	2008/02/29
		SI 1897546 T1	2011/02/28
		SK 11102001 A3	2002/05/09
		SK 286854 B6	2009/06/05
		SK 287792 B6	2011/10/04
		TR 200102229 T2	2001/12/21
		TW I230067 B	2005/04/01
		US 2009-0186908 A1	2009/07/23
		US 2012-0041010 A1	2012/02/16
		US 6894058 B1	2005/05/17
		WO 00-45818 A1	2000/08/10
		ZA 200105885 A	2002/10/17