



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0076617
(43) 공개일자 2024년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 15/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2023.05)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0157826
(22) 출원일자 2022년11월22일
심사청구일자 2022년11월22일

(71) 출원인
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
임화선
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 124동 901호
송지수
경기도 이천시 이여로101번길 101-4, 101동 601호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
공병욱

전체 청구항 수 : 총 10 항

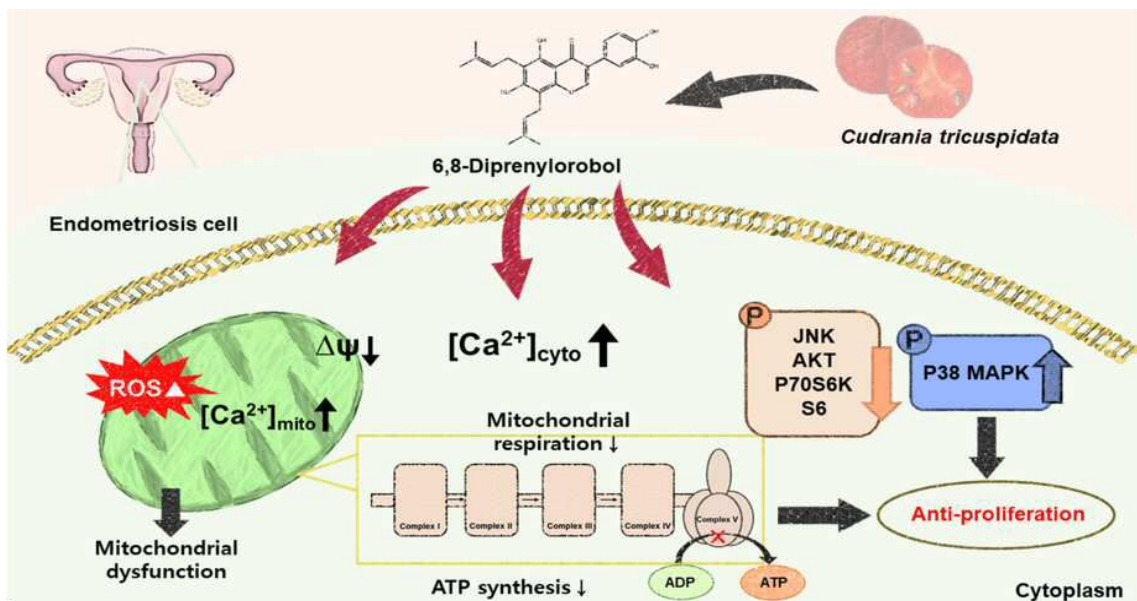
(54) 발명의 명칭 디프레닐로로볼을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 억제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 디프레닐로로볼을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 억제학적 조성물, 및 자궁내막증 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7



본 발명에 따른 디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 포함하는 약제학적 조성물은 자궁내막증 세포 내 증식 및 이동성을 억제하고, 용량 의존적으로 디프레닐로로볼의 처리에 따른 자궁내막증 세포주 내 활성산소 및 칼슘 이온의 농도를 증가시킬 뿐 아니라, 미토콘드리아의 호흡을 억제함으로써, 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아의 기능 장애를 유도할 수 있다. 더욱이, PI3K/AKT, 및 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제와 병용처리하는 경우, 자궁내막증 세포 증식의 억제에 있어서 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 자궁내막증을 예방 및 치료할 수 있는 의학 관련 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 15/02 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

송권화

충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호

박선우

경상남도 진주시 동진로 29, 602호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711155899
 과제번호 2021R1C1C1009807
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 멜라토닌에 의한 엑소좀 유래 운반 RNA 소편 기반 자궁내막증 개선 메커니즘 규명
 기여율 30/100
 과제수행기관명 성균관대학교
 연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465037168
 과제번호 HI22C1424000022
 부처명 보건복지부
 과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
 연구사업명 공익적 의료기술연구사업
 연구과제명 자궁내막증 연계 가임력 저하 극복을 위한 염증소체 조절 GPCR 타겟 발굴 및 안전성
 규명에 따른 임상 적용 기반 연구

기여율 30/100
 과제수행기관명 성균관대학교
 연구기간 2022.07.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711157986
 과제번호 2021R1A2C2005841
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
 연구과제명 멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기

지표 개발

기여율 30/100
 과제수행기관명 고려대학교
 연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345344020
 과제번호 2020R1I1A1A01067648
 부처명 교육부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 이공학학술연구기반구축
 연구과제명 꾸지뽕나무의 유효 활성 물질을 이용한 자궁내막증 치료효능 및 분자적 조절 네트워크

크 규명

기여율 10/100
 과제수행기관명 경상국립대학교
 연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 유효성분으로 포함하는, 자궁내막증 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 디프레닐로로볼은 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하는 것을 특징으로 하는 것인, 자궁내막증 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 미토콘드리아의 기능 장애는 다음으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 것인, 자궁내막증 예방 또는 치료용 억제학적 조성물:

- (a) 미토콘드리아의 막 전위의 탈분극;
- (b) 활성산소(ROS)의 생산량 증가;
- (c) 칼슘이온의 항상성 장애;
- (d) ATP 연관-세포 호흡의 감소; 또는
- (e) 이들의 조합.

청구항 4

제1항에 있어서, 디프레닐로로볼이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 하는, 자궁내막증 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 자궁내막증 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 타겟 억제제는 LY294002, U0126, 및 SB203580로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 자궁내막증 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 억제하는 타겟 억제제와 병용처리하는 것인, 자궁내막증 예방 또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자궁내막증 세포는 질 점막(vaginal mucosa), 자궁(uterus), 자궁외경부(cervix) 및 자궁내경부(endocervix)로부터 유래한 세포인, 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 9

디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 유효성분으로 포함하는, 자궁내막증 예방 또는 개선용 식품조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 식품조성물은 건강기능식품인, 자궁내막증 예방 또는 개선용 식품조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 디프레닐로로볼을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 디프레닐로로볼을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 자궁내막증(endometriosis; Em)은 자궁 내막 조직(난소, 골반, 장 또는 나팔관)이 자궁 이외의 조직에 부착하여 증식하는 질환으로, 가임기 여성의 약 10 내지 15%에서 발생하는 흔한 양성 부인과 질환에 해당한다. 자궁내막증은 모든 연령대에서 생길 수 있으나, 주요 유병 연령은 25~35세로 알려져 있으며 건강한 여성에 비해 자궁내막증 유병률을 50% 이상 증가시킨다.

[0004] 자궁내막증 관련된 주요 증상으로는 심한 월경통, 골반통, 배변통, 및 불임 등이 있다, 이에 대한 병리학적 기전에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있으나, 아직까지 정확한 발병 원인은 밝혀지지 않고 있다.

[0005] 자궁내막증의 주요 치료방법은 수술적 제거와 호르몬치료 방법이 알려져 있다. 수술적 제거에 따른 치료 방법에 있어서, 자궁내막증은 예후 인자를 기반으로 한 진단이 아닌, 증상 위주의 진단이 이루어지기 때문에 수술적 제거를 진행하여도 5년 내 재발률이 30~40%에 육박하는 것으로 알려져 있다(Busacca *et al.*, J Obstet Gynecol, 2006; Vignali *et al.*, J Minim Invasive Gynecol, 2005). 또한, 성선자극 호르몬 유리호르몬 효능제(GnRH agonist)나 아로마타제 저해제(aromatase inhibitor)를 이용한 호르몬 치료 방법이 사용될 수 있으나, 골감소, 무월경, 체중 증가, 우울 증 등의 부작용과 약제 저항성 등의 문제점이 보고된 바 있다(Gao *et al.*, Gynecol Oncol, 2014).

[0006] 최근에는 자궁내막증에 대한 치료 요법이 부작용이 적고 다양한 생리학적 효과를 나타내는 파이토케미컬(phytochemical)을 기반으로 한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히, 디프레닐로로볼(diprenylorobol)은 꾸지뽕 나무(*Cudrania tricuspidate*)의 줄기로부터 유래된 플라보노이드 계열의 물질 중 하나로 전통적으로 불면증, 허약, 여성질환에 효과가 좋다고 알려져 있다. 그 뿐만 아니라, 자궁경부암에서 세포 증식을 억제하고 세포사멸을 유도하는 등의 항암효과를 나타내며, 이 외에도 유방암과 대장암, 간암에서도 항암효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있다.

[0007] 이처럼, 디프레닐로로볼(diprenylorobol)의 다양한 생리 활성 효과들이 보고되고 있으나, 현재까지 자궁내막증 발병 및 진행에 대해 어떠한 치료 및 예방적 효과를 나타내는지에 대한 연구는 알려진 바가 없다.

[0008] 따라서, 본 발명자들은 상기 식물 성분 유래 물질을 이용하여 기존의 자궁내막증 치료에 대한 부작용 문제를 극

복하고 자궁내막증 환자의 삶의 질 상상을 위한 새로운 치료제 또는 보조제를 개발하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1075929호(등록일자: 2011.10.17)

발명의 내용

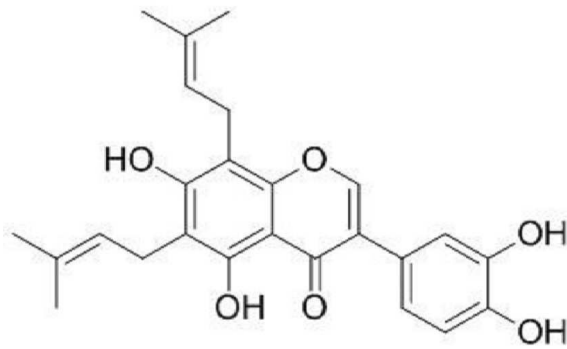
해결하려는 과제

- [0011] 본 발명자들은 자궁내막증의 증상을 완화할 뿐 아니라, 질병의 진행을 억제하고 치료 및 예방에 유의한 효과를 제공하는 성분을 식물에서 발굴하여 이를 포함하는 약제학적 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 꾸지뽕 나무(*Cudrania tricuspidate*)로부터 추출한 디프레닐로로볼(diprenylorobol)이 세포 증식에 관여하는 신호전달기전을 억제하고 미토콘드리아의 기능 장애를 유발함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 목적은 디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 디프레닐로로볼을 포함하는, 자궁내막증 예방 또는 치료를 위하여 신호전달기전 억제제와의 병용 투여용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 디프레닐로로볼을 포함하는 자궁내막증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 디프레닐로로볼 (diprenylorobol)을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명자들은 자궁내막증의 증상을 완화할 뿐 아니라, 질병의 진행을 억제하고 치료 및 예방에 유의한 효과를 제공하는 성분을 식물에서 발굴하여 이를 포함하는 약제학적 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 꾸지뽕 나무(*Cudrania tricuspidate*)로부터 추출한 디프레닐로로볼(diprenylorobol)이 세포 증식에 관여하는 신호전달기전을 억제하고 미토콘드리아의 기능 장애를 유발함을 규명하였다.
- [0018] 본 발명의 유효성분인 "디프레닐로로볼(diprenylorobol)"은 꾸지뽕 나무(*Cudrania tricuspidate*)로부터 분리되거나 정제되는 주요 생물 활성물질 중 하나로서, 플라보노이드(C3-C6-C3) 기본구조에 프레닐(C5)기가 작용기로 다양한 구조를 이루며 결합된 화합물인 프레닐화 이소플라보노이드(prenylated isoflavonoid)에 속하는, 다음의 화학식 I로 표시되는 화합물을 의미한다:

[0019] [화학식 I]



[0020]

[0021] 상기 꾸지뽕 나무(*Cudrania tricuspidate*)는 우리나라를 포함하여 중국, 일본 등 동아시아에 널리 분포하는 뽕나무과(Moraceae)의 낙엽성 과수로, 다양한 약리 작용이 있는 것으로 알려지고 최근 그 효능들이 과학적으로 밝혀지면서 각광받고 있다. 특히, 항균 및 항산화 작용, 항당뇨, 항고지혈증, 항고혈압, 항세포독성 등 다양한 기능성 소재 활용에 관한 연구가 보고되었으며, 이외에도 구찌뽕 나무로부터 추출된 다양한 유효한 성분의 새로운 활용 용도가 개척되고 있다.

[0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여에 의해 자궁내막증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 보호적인 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 자도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

[0023] 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료"란, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여에 의해 자궁내막증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적 조성물"이란, 특정한 목적을 위해 투여되는 조성물로, 본 발명의 목적상 자궁내막증, 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상을 예방하거나 또는 치료하기 위해 투여되는 것을 의미한다. 상기 약제학적 조성물은 약제학적 유효량의 디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 포함한다.

[0025] 상기 "약제학적 유효량"은 상술한 디프레닐로로볼의 약리학적 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적을 달성하는 한 특별히 제한되지 않으며, 약물의 전달, 안정화 및 제제화를 위하여 다양한 성분이 부가적으로 첨가될 수 있는 것을 포함한다.

[0026] 본 명세서에서 용어 "자궁내막증(endometriosis)"은 자궁내막 조직이 자궁 내강 표면 이외의 장소에서 증식하는 질환을 의미하며, 이소 자궁내막증으로도 명명할 수 있다. 자궁내막증의 병태생리를 보면 자궁내막 조직이 다른 조직 내로 침윤 또는 본래의 자리를 벗어나 원격 전이를 한다는 면에서 종양 세포와 상당히 유사한 성장, 발달을 한다고 할 수 있다. 한편, 상기 자궁내막증은 병변의 위치와 침범된 장기, 병변의 정도에 따라 여러 가지 다양한 증상을 보이므로 진단이 어려운 질환에 속하며, 현재 자궁내막증의 진단에 사용되는 임상적 검사로는 질식 초음파 검사, 자기공명영상 검사(MRI), 혈액검사 또는 복강경 수술 검사 등이 있다. 최근 환자 개개인들의 유전적 특성을 이용하는 방법으로 자궁내막증의 여부를 진단하거나 치료 후 재발을 예측할 수 있는 유전적 지표를 활용하는 등 다양한 진단 방법이 개발되고 있다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물의 유효성분인 디프레닐로로볼은 자궁내막증 세포주에서 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하는 것을 특징으로 한다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "미토콘드리아 기능 장애"는 정상적인 미토콘드리아의 생물학적 기능의 상실을 의미하며, 전자전달계(electron transport chain)의 효율 상실, ATP와 같은 고-에너지 분자의 합성 감소, 활성산소종(reactive oxygen species)의 생산 증가, 세포 호흡의 방해, 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential)의 감소, 미토콘드리아 단편화(mitochondrial fragmentation), 미토콘드리아 DNA의 돌연변이 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미토콘드리아의 기능 장애는 다음으로 이루어지는 것을 특징으로 한다:

(a) 미토콘드리아의 막 전위의 탈 분극; (b) 활성산소(ROS)의 생산량 증가; (c) 칼슘이온의 항상성 장애; (d) 세포 호흡의 감소; 또는 (e) 이들의 조합.

- [0031] 구체적으로, 디프레닐로로볼이 자궁내막증 세포에서 미토콘드리아의 막 전위를 감소시켜 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 유도하고, 증가한 활성산소종(ROS)의 생산량에 의해 산화 스트레스가 유도되며, 세포질 및 미토콘드리아 기질에서의 비정상적인 칼슘이온이 축적되어 칼슘이온의 항상성 장애를 일으키고, 자궁내막증 세포의 기초 호흡, 최대 호흡, ATP 생산 등을 포함하는 세포 호흡을 억제시킴으로써, 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하는 것을 확인하였다.
- [0032] 상기 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, $\Delta \psi_m$)는 산화적 인산화에서 에너지 저장 과정에 필수적인 양성자 펌프에 의해 생성되는 전위를 의미한다. 상기 미토콘드리아 막 전위는 본 발명이 속하는 분야에 널리 알려진 통상적인 방법, 예를 들어, JC-1, Rhodamine B hexyl ester, MitoTracker Red CMXRos, Rhodamine 6G, DiSC-3(3), HRB & HR101 또는 TMRE(tetramethylrhodamine, methyl ester) 염색 방법 등을 이용하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)은 산소를 포함하고 세포에서 다른 분자와 쉽게 반응하는 불안정한 분자 종류를 의미한다. 세포 내에 활성산소종이 축적되면, DNA, RNA, 단백질 등이 손상되어 세포가 사멸할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 활성산소종(ROS)은 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), 과산화물(peroxide), 초과산화물(superoxide, O_2^-), 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, $\cdot OH$), 알콕시 라디칼(alkoxy radical, $RO\cdot$), 퍼옥시 라디칼(peroxy radical, $ROO\cdot$), 유기 하이드로퍼옥사이드(organic hydroperoxide, $ROOH$), 일중항 산소(singlet oxygen, O_2) 및 알파-산소(alpha-oxygen, $\alpha-O$)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 상기 칼슘 이온의 세포 내 전기화학적 전위는 다양한 이온 채널, 펌프 및 교환체에 의해 유지되어 다양한 세포 신호 경로를 조절하는 역할을 한다. 특히, 칼슘 이온 신호는 세포 증식과 세포 자멸사를 조절하는 활성 산소(ROS)의 생산과 밀접한 관련이 있다. 교란된 칼슘 이온의 항상성은 심각한 산화 스트레스를 유발할 뿐만 아니라, 칼슘 이온 저장소로 작용하는 미토콘드리아에 칼슘 이온 스트레스를 가하여 미토콘드리아와 미토콘드리아의 막에 유해한 영향을 미친다. 따라서, 칼슘 이온의 항상성 장애는 미토콘드리아 외막의 불안정화를 유도함으로써, 미토콘드리아의 심각한 기능 장애를 초래하여 세포 자멸사를 초래하게 된다.
- [0036] 본 발명의 실시예에서, 본 발명의 약제학적 조성물 내 디프레닐로로볼(diprenylorobol)에 의해 자궁내막증 세포주의 세포주기 정지를 유도하는 것을 확인하고, 세포 증식 핵 항원(PCNA) 발현이 억제되는 것을 웨스턴 블롯을 통해 확인함으로써 디프레닐로로볼에 의해 자궁내막증 세포의 증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0037] 따라서, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물의 유효성분인 디프레닐로로볼은 자궁내막증 세포주에서 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0038] 구체적으로, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 자궁내막증 세포의 증식과 관련된 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 한다.
- [0039] 보다 구체적으로, 상기 약제학적 조성물은 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0040] 상기 PI3K(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)은 세포 주기, 세포 운동성 및 세포사멸(apoptosis)와 같은 많은 세포성 기능에 관여하는 신호전달 분자이다. PI3K는 세린/트레오닌 키나아제(kinase), 예를 들어 PDK1 및 AKT(PKB로도 알려짐)를 포함하는 일부 단백질을 활성화시키는 제2메신저(messenger) 분자를 생산하는 지질 키나아제이다. PI3K는 3개의 클래스로 나뉘어지고, 클래스 I은 PI3K α , PI3K β , PI3K δ 및 PI3K γ 로 불리는 4개의 상이한 PI3K를 포함한다.
- [0041] 또한, 상기 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달기전은 세포의 성장, 분화 및 스트레스 반응과 같은 세포 활동과 연관이 있다. 이는 하위 조절 단백질의 인산화를 통해 활성화되는 MAPK 신호전달 캐스케이드로서, 7개의 MAPKK 동족체 뿐 아니라, 4개의 대등한 MAPK 경로로 ERK1/ERK2, JNK, p38 및 ERK5가 잘 알려져 있다.
- [0042] 구체적으로, 본 발명의 실시예에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물 내 디프레닐로로볼이 PI3K/AKT 신호전달기전의 하위 조절단백질인 P70S6K 및 S6 단백질, 또는 MAPK 신호전달기전과 관련된 P38 단백질 인산화 양상을 조

절함으로써 자궁내막증 세포의 세포증식을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다.

- [0043] 본 발명에 따른 억제학적 조성물은 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 억제하는 타겟 억제제, 즉, 신호전달기전 억제제를 더 포함하여 자궁내막증 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0044] 상기 "신호전달기전 억제제"는 자궁내막증 세포 내 세포의 성장, 활성 및 기능에 관여하는 신호전달 분자의 발현 또는 이의 활성을 억제하는 물질을 의미한다.
- [0045] 구체적으로, 상기 신호전달기전 억제제는 PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달기전의 하위 조절 단백질의 발현 또는 활성 억제제이다.
- [0046] 보다 구체적으로, 상기 신호전달기전 억제제는 PI3K(phosphatidylinositol-3-kinase) 억제제, AKT(protein kinase B) 억제제와 MAPK(mitogen-activated protein kinase)와 관련된 ERK1/2(extracellular signalregulated kinase), 및 P38 억제제를 포함할 수 있고, 예를 들어, PI3K 억제제는 LY294002, Wortmmanin, LY3023414, ME401, GSK1059615 등일 수 있고, ERK1/2 억제제는 U0126, FR180204, SCH772984, PD98059 등일 수 있으며, P38 억제제는 SB203580, SB202190, BIRB796, JX-401 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 신호전달기전 억제제는 LY294002, U0126, 및 SB203580로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 따라서, 기존의 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전 억제제를 더 포함하여 얻어진 조성물을 이용하여 디프레닐로로볼에 의한 신호전달기전의 억제 효과가 향상될 것을 기대할 수 있다.
- [0050] 추가적으로, 본 발명에 따른 억제학적 조성물은 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 억제하는 타겟 억제제, 즉, 신호전달기전 억제제와 병용처리하는 것일 수 있다.
- [0051] 상술한 바와 같이, 본 발명의 디프레닐로로볼을 포함하는 억제학적 조성물은 그 자체로 디프레닐로로볼에 의한 자궁내막증 세포주에서의 세포 증식을 억제하는 효과를 나타낼 수 있으나, 상기 디프레닐로로볼과 기존의 신호전달기전 억제제를 병용처리한 경우, 보다 우수한 세포 증식 억제 효과를 기대할 수 있다.
- [0052] 상기 병용처리는 본 발명의 억제학적 조성물을 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 처리될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 처리되는 것을 모두 포함한다.
- [0054] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 자궁내막증 세포는 질 점막(vaginal mucosa), 자궁(uterus), 자궁외경부(cervix) 및 자궁내경부(endocervix)로부터 유래한 세포일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 자궁내막증 세포는 질 점막(vaginal mucosa)으로부터 유래한 VK2/E6E7 세포주일 수 있으며, 자궁(uterus), 자궁외경부(cervix) 및 자궁내경부(endocervix)로부터 유래한 End1/E6E7 세포주일 수 있다.
- [0056] 본 발명의 실시예에서, 본 발명에 따른 억제학적 조성물을 상기 VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포주에 처리함으로써 세포증식의 억제효과를 확인할 수 있었다. 또한, 상기 억제학적 조성물을 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전 억제제과의 병용 처리함으로써 보다 개선된 세포증식 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0058] 본 명세서에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것을 의미한다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 억제학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0060] 상기 억제학적 조성물은 제형에 따라 억제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 "억제학적으로 허용 가능한 담체"는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 것으로 본 발명의 유효성분인 디프레닐로로볼과 약리학적으로 양립할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 억제학적으로 허용 가능한 담체는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 번분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스,

물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 미네랄 오일 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0063] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 필요에 따라, 상기 성분들 이외에 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 봉해제, 습윤제, 감미제, 향미제, 보존제 등을 추가로 포함하여 제조될 수 있다.
- [0064] 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 디프레닐로로볼의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 구체적으로, 통상의 방법에 따라 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 비경구형 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0066] 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들어, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로즈, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 형태로, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외의 여러 가지 부형제, 예를 들어, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)61, 카 카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제를 모두 사용할 수 있다.
- [0069] 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0070] 본 발명에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.
- [0071] 본 발명의 약제학적 조성물의 유효 투여량은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 증상의 경중도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법 및 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0072] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 투여 방법은 정맥내(intravenous), 복강내(intraperitoneal), 근육내(intramuscular), 동맥내(intraarterial), 구강(intraoral), 심장내(intracardiac), 골수내(intramedullary), 경막내(intrathecal), 경피(percutaneous), 장관(intestinal), 피하(subcutaneous), 뇌내(intracerebral), 척수내(intraspinal), 설하(sublingual) 또는 국부 투여용 주사 등의 통상적인 방법으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 유효성분으로 포함하는, 자궁내막증 예방 또는 개선용 식품조성물을 제공한다.
- [0075] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식품조성물의 유효성분인 디프레닐로로볼은 자궁내막증 세포주에서 미토콘드리아의 기능 장애를 유발하는 것을 특징으로 한다.
- [0076] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미토콘드리아의 기능 장애는 다음으로 이루어지는 것을 특징으로 한다: (a) 미토콘드리아의 막 전위의 탈 분극; (b) 활성산소(ROS)의 생산량 증가; (c) 칼슘이온의 항상성 장애; (d) 세포 호흡의 감소; 또는 (e) 이들의 조합.
- [0077] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 약제학적 조성물의 유효성분인 디프레닐로로볼은 자궁내막증 세포주에서 세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다.

- [0078] 구체적으로, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 억제학적 조성물은 자궁내막증 세포의 증식과 관련된 신호전달기전, 즉, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0079] 본 발명의 식품 조성물의 경우, 상술한 본 발명의 일 양태인 억제학적 조성물에 포함된 디프레닐로로볼을 그대로 이용가능하며, 본 명세서 기재의 과도한 복잡성을 피하기 위해 중복되는 내용을 원용하며, 그 기재는 생략하도록 한다.
- [0081] 본 명세서에서 사용된 용어 "개선"이란 본 발명에 따른 디프레닐로로볼을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 자궁내막증의 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0082] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드(monosaccharide), 예를 들어 포도당(glucose), 과당(fructose) 등; 디사카라이드(disaccharide), 예를 들어 말토스(maltose), 수크로오스(sucrose), 올리고당(oligosaccharide) 등; 및 폴리사카라이드(polysaccharide), 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨(xylitol), 소르비톨(sorbitol), 에리트리톨(erythritol) 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 및 합성 향미제를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분 외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0083] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식품 조성물은 건강기능식품을 포함한다. 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6722호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 식품을 의미한다.
- [0084] 또한, 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 유효성분으로 포함하는 억제학적 조성물 또는 식품조성물을 대상(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 자궁내막증의 예방, 치료 또는 개선 방법을 제공한다.
- [0085] 본 발명의 치료방법, 또는 개선방법의 대상 질병인 자궁내막증은 상기 억제학적 조성물 또는 식품조성물의 대상 질병과 관련하여 정의한 것과 같다.
- [0086] 본 명세서에서 사용된 용어, "투여" 또는 "투여하다"는 본 발명의 조성물의 치료적, 또는 개선적 유효량을 상기 대상 질환을 겪는 대상(개체)에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 의미한다.
- [0087] 상기 조성물의 "치료적 유효량"은 조성물을 투여하고자 하는 대상(subject)에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 조성물의 함량을 의미하며, 이에 "예방적 유효량"을 포함하는 의미이다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어, "대상(subject)"은 인간, 마우스, 랫트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 및 붉은털 원숭이 등을 포함하는 포유류이다. 가장 구체적으로는, 본 발명의 대상은 인간이다.
- [0088] 본 발명의 상기 자궁내막증의 예방, 개선 또는 치료방법은, 본 발명의 일 양태인 억제학적 조성물, 또는 식품조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이므로, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서의 과도한 중복성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0090] 본 발명에 따른 디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 포함하는 억제학적 조성물은 식물에서 추출된 물질을 원료로 함으로써 화학적 합성물에 비해 체내 독성 내지 부작용을 최소화할 수 있으며, 자궁내막증 세포의 증식을 억제하고, 세포질 및 미토콘드리아 내 칼슘 및 활성산소의 축적을 증가시킬 뿐 아니라, 미토콘드리아의 호흡을 조절함으로써 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아의 기능 장애를 유도할 수 있다. 또한, PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제와 병용처리하는 경우, 자궁내막증 세포 증식의 억제에 있어서 시너지 효과를 얻을 수 있는바, 본 발명의 디프레닐로로볼(diprenylorobol)을 유효성분으로 포함하는 조성물은 자궁내막증을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 관련 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0092] 도 1은 자궁내막증 세포(VK2/E6E7 및 End1/E6E7) 내 6,8-디프레닐로로볼(6,8-diprenylorobol)의 용량의존적 투여에 따른 세포 증식(a,b) 세포 핵 항원(PCNA)의 발현양상(c), 및 세포주기 변화(d)를 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 자궁내막증 세포 내 6,8-디프레닐로로볼의 용량의존적 투여에 따른 미토콘드리아 막 전위 변화(a,b), 및 활성산소 생산량 변화(c,d) 양상을 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 자궁내막증 세포 내 6,8-디프레닐로로볼의 용량의존적 투여에 따른 자궁내막증 세포질 및 미토콘드리아 내 칼슘이온 농도 증가 양상을 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 자궁내막증 세포 내 6,8-디프레닐로로볼과 칼슘 억제제의 병용 처리에 따른 자궁내막증 세포질(a,b) 및 미토콘드리아(c,d) 내 칼슘이온 농도의 변화를 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 5는 자궁내막증 세포 내 6,8-디프레닐로로볼에 의한 미토콘드리아 호흡 조절을 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 6은 자궁내막증 세포 내 6,8-디프레닐로로볼의 용량의존적 투여에 따른 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로 조절 양상을 분석한 결과를 나타낸다: (a) PI3K/AKT 및 MAPK의 신호전달분자(AKT, P70S6K, S6 및 P38)의 인산화 패턴, 및 (b) 약리학적 억제제와의 병용 처리에 따른 PI3K/AKT 및 MAPK의 신호전달분자(AKT, P70S6K, S6 및 P38)의 인산화 패턴.
- 도 7은 자궁내막증 세포 내 6,8-디프레닐로로볼 처리에 따른 세포 증식 억제 기전을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0093] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0094] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0096] 실시예

[0098] 준비예 1. 실험 재료 준비 및 세포 배양

[0099] 준비예 1.1. 실험 재료

- [0100] 6,8-디프레닐로로볼(6,8-diprenylorobol)(Cat No. CFN97705)은 Chem Faces(Wuhan, China)에서 구매하였고, DMSO(dimethyl sulfoxide)(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)에 의해 용해시켰다. 조성물에 의한 신호전달기전을 확인하기 위하여 phospho-AKT, P70S6K, S6, 및 P38 단백질 및 total-AKT, P70S6K, S6, 및 P38에 대한 항체를 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)사로부터 구매하였다. 이외, PCNA 항체는 각각 Santa Cruz Biotechnology사에서 구매하였다. 또한, 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 LY294002(Cat No. 9910)를 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)로부터 구매하여 사용하였다.

[0102] 준비예 1.2. 세포 배양

- [0103] 자궁내막증 세포주인, VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 세포의 단층 배양을 위해서 케라티노사이트 무혈청 배지(keratinocyte serum-free medium)(Cat. No. 17005-042, Gibco, Waltham, MA, USA) 및 10% FBS(fetal bovine serum)가 함유된 DMEM/F12 1:1 배지(Cat. No. SH30023.01, Cytiva, Marlborough, MA, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)를 사용하여 배양하였다.

- [0104] 1차 정상 자궁내막 상피세포는 Lifeline Cell Technology(Frederick, MD, USA)에서 구입하였고, 제조사의 지침

에 따라 ReproLifeTM 생식 배지(Cat. No. LL-0068, Lifeline Cell Technology)에서 배양하였다.

[0106] 실시예 1. 디프레닐로로볼(diprenylorobol)에 의한 자궁내막증 세포의 증식 조절

[0107] 실시예 1.1 세포 증식 능력 분석

[0108] 자궁내막증 세포(VK2/E6E7 및 End1/E6E7) 및 1차 정상 자궁내막 상피세포 내에서 디프레닐로로볼(diprenylorobol)의 용량 의존적 처리에 따른 세포의 증식 능력을 확인하고자, BrdU(bromodeoxyuridine) Cell Proliferation ELISA Kit(Cat No. 11647229001, Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 각 세포의 증식 능력을 평가하였다.

[0109] 각각의 세포를 96-well cell culture plate에 5×10^3 cells/100 μ l로 배양한 다음, 37°C/5% CO₂ 인큐베이터에서 다양한 농도의 디프레닐로로볼(0, 0.5, 1, 2 μ M)을 처리하였다. 48시간 후, 10 μ M BrdU를 각 well에 추가로 첨가하고, 37°C/5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 동안 배양하였다. 그 다음, VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포에 BrdU를 라벨링(labeling)하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 사용하여 상온에서 90분간 인큐베이션 시킨 후, 3차례 씻어주었다. 마지막으로 100 μ l의 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine substrate으로 세포를 반응시켜 ELISA 리더기를 이용하여 370 nm 및 492 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 확인하였다.

[0110] 또한, 음성대조군으로서 정상 자궁내막 세포에서 디프레닐로로볼의 독성을 확인하기 위해, 1차 자궁내막 상피세포를 이용하여 세포 증식 능력을 확인하였다.

[0111] 결과는 도 1의 a 및 b에 나타내었다.

[0112] 도 1의 a에 나타낸 바와 같이, 디프레닐로로볼의 용량 의존적 처리에 대한 반응으로 VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포 증식이 점차 감소하였다. 구체적으로, 2 μ M 디프레닐로로볼에 의해 VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포의 증식이 50% 이상 감소한 것을 확인하였다.

[0113] 반면, 도 1의 b에 나타낸 바와 같이, 디프레닐로로볼은 정상 자궁내막 상피 세포의 세포증식을 8%만 감소시켰을 뿐, 정상 자궁내막 상피 세포의 증식에는 거의 영향을 주지 않는 것을 확인하였다.

[0115] 실시예 1.2. 세포 증식 핵 항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)의 발현 분석

[0116] 상기 실시예 1.1.에서 확인되었던 디프레닐로로볼에 의한 자궁내막증 세포의 증식이 감소된 결과를 바탕으로, VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포에서 디프레닐로로볼의 처리 유무에 따른 PCNA의 발현 변화를 분석하고자, 면역형광 분석을 수행하였다.

[0117] 형광 이미지를 위해 공초점 배양플레이트(SPL, Daejeon, Korea)에 배양 후, 48시간 동안 디프레닐로로볼(0 및 2 μ M)을 처리하여 37°C/5% CO₂에서 배양하였다. 이후, 세포를 세척하고 메탄올로 고정한 뒤 1차 PCNA 항체(Cat. No. sc-56, SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 함께 16시간 동안 배양하였다. 그런 다음, PCNA에 대한 2차 항체(Cat. No. 11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하였고 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI, Cat. No. AD8417, Sigma)로 핵 염색을 수행하였다. 마지막으로, 면역형광 분석은 LSM710 공초점 현미경(Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)을 사용하여 수행하였다.

[0118] 결과는 도 1의 c에 나타내었다.

[0119] 도 1의 c에 나타낸 바와 같이, 2 μ M 디프레닐로로볼을 처리한 VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포 모두에서 면역반응성 PCNA의 발현이 유의하게 감소하였다. 구체적으로, 모든 자궁내막증 세포에서 50% 이상의 감소된 PCNA 발현을 확인하였다.

[0121] 실시예 1.3. 세포 주기 분석

[0122] 디프레닐로로볼에 의한 자궁내막증 세포의 세포주기 변화 양상을 확인하고자 하였다.

[0123] 먼저, VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포를 100 mm 배양 접시에서 70% confluence까지 배양한 후, 디프레닐로로볼(0,

0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 및 2 μM)을 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 수집하여 0.1% BSA 함유 PBS로 세척한 후, 70% 에탄올을 넣고 4°C에서 24시간 동안 세포를 고정하였다. 그 다음, 원심분리기로 세포를 수집하여 0.1% BSA 함유 PBS로 2번 세척 후, RNase A(Cat No. R6513, Sigma-Aldrich) 처리 하에서 PI(propidium iodide) 염색을 30분간 수행하였다. FACSCalibur flow cytometer(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 형광 광도를 분석하여 각 세포 주기에 해당하는 세포의 수를 측정하였다 상대 형광(relative fluorescence)은 PE 채널을 사용하여 감지하였다.

[0124] 결과는 도 1의 d에 나타내었다.

[0125] 2 μM 디프레닐로로볼로 처리된 VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포에서 세포 주기 정지가 일어났음을 확인하였다. 구체적으로, End1/E6E7 세포에서 SubG0/G1기의 상대적인 세포 집단의 점차적 증가를 나타냈으나, 상기 두 세포 모두에서 G2/M기 세포 집단은 디프레닐로로볼 처리에 의해 점진적으로 감소하는 양상을 나타내었다.

[0127] 결과적으로, 디프레닐로로볼에 의해 자궁내막증 유사 세포주의 증식이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0129] **실시예 2. 디프레닐로로볼(diprenylorobol)에 의한 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아 막 전위(Mitochondrial Membrane Potential, MMP)(ψ_m) 탈분극 및 활성산소 생산량 양상 분석**

[0130] 디프레닐로로볼에 의한 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아의 기능에 미치는 효과를 확인하고자, 미토콘드리아 막 전위 변화 및 활성산소 생산량 양상을 분석하였다.

[0132] **실시예 2.1. 미토콘드리아 막 전위(MMP)(ψ_m)의 탈분극 확인**

[0133] 미토콘드리아는 많은 요인에 의해 유도되는 세포자멸사(apoptosis)에 결정적인 역할을 하고, 미토콘드리아 막 전위의 감소는 이른 세포자멸사의 특징이다. JC-1은 세포사멸 세포에서 미토콘드리아 막 전위 검출을 위한 선택 마커로서, 친지방성의 양이온성 염료이다. 이는 세포 내에서 단량체로 존재하고, 낮은 농도에서 미토콘드리아 막을 탈분극시켜 녹색 형광을 나타낸다. 하지만, 고농도에서 염료는 J-응집체를 형성하는데 넓은 여기 스펙트럼을 나타내고, ~590 nm에서 방출 최대치를 나타내며, 세포 내 정상 분극된 미토콘드리아는 붉은색 형광을 나타낸다.

[0134] 따라서, 디프레닐로로볼에 의한 VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포 내 미토콘드리아 막 전위(MMP) 변화를 확인하고자, mitochondria staining kit(Cat No. CS0390, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 미토콘드리아 막 전위를 측정하였다.

[0135] 자궁내막증 세포주 VK2/E6E7 및 End1/E6E7을 6 well에서 배양한 뒤, 디프레닐로로볼을 용량 의존적으로 처리하여 48시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 이후, 트립신을 이용하여 세포를 떼어내고 원심분리를 수행하여 세포 pellet을 수득한 후, 상기 세포에 JC-1 staining solution을 첨가하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터에서 20분간 배양하였다. 이후, 각 세포를 1 x JC-1 staining buffer로 세척한 다음 FACSCalibur flow cytometer를 이용하여 세포의 미토콘드리아 막 전위차를 측정하였다.

[0136] 결과는 도 2의 a 및 b에 나타내었다.

[0137] 도 2의 a 및 b에서 나타난 바와 같이, 디프레닐로로볼은 VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포에서 모두 미토콘드리아 막의 탈분극을 유도하는 것을 확인하였다. 구체적으로, 2 μM 디프레닐로로볼 처리에 의한 MMP 손실률은 각각 VK2/E6E7 세포에서 최대 581% ($p < 0.001$), End1/E6E7 세포에서 673%($p < 0.001$)까지 증가하였다.

[0139] **실시예 2.2. 활성산소(ROS) 생산량 변화 양상 분석**

[0140] 일반적으로, 암세포와 같은 비정상 세포는 높은 대사율과 미토콘드리아 기능 장애로 인해 정상 세포에 비해 ROS 수준이 증가하여 산화 스트레스에 대한 민감성이 증가하는 것으로 잘 알려져 있다.

[0141] 본 실시예에서는 디프레닐로로볼 처리에 따른 자궁내막증 세포 내 산화 스트레스의 조절 여부를 확인하고자, peroxide 존재 하에 DCF(2',7-dichlorofluorescein)로 변환되어 형광을 띄는 DCFH-DA(2',7-

dichlorofluodichlorescin diacetate)(sigma)를 이용하여, 상기 세포에서 디프레닐로로볼의 용량 의존적 처리에 따른 활성산소 생산량의 변화를 분석하였다.

[0142] 먼저, 자궁내막증 세포주 VK2/E6E7 및 End1/E6E7을 6 well에서 배양한 뒤, 트립신을 이용하여 세포를 떼어내고 원심분리를 수행하여 세포 pellet을 수득하였다. 이 후, PBS로 1회 세척하고 10 μ M의 DCFH-DA를 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 30분 동안 배양하였다. 그 다음, 세포를 PBS로 2회 세척하고 디프레닐로로볼을 용량 의존적으로 1시간 동안 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양한 뒤, 처리된 세포를 PBS로 다시 세척하여 FACSCalibur flow cytometer를 이용하여 DCF 형광 광도를 측정하였다.

[0143] 결과는 도 2의 c 및 d에 나타내었다.

[0144] 도 2의 c 및 d에 나타난 바와 같이, 모든 세포주에서 디프레닐로로볼의 용량 의존적 처리에 따라 활성 산소(ROS) 생산이 증가한 것을 확인하였다. 특히, ROS 생산량은 VK2/E6E7에서 최대 207%(p < 0.05), End1/E6E7에서 최대 252%(p < 0.01)까지 증가시키는 것을 확인하였다.

[0146] 결과적으로, 디프레닐로로볼 처리에 따라 자궁내막증 세포 내에서 미토콘드리아 기능 장애를 유발하고 산화 스트레스 완충 시스템을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0148] 실시예 3. 디프레닐로로볼(diprenylorobol)에 의한 자궁내막증 세포질 및 미토콘드리아 내 칼슘이온 농도 증가 양상 분석

[0149] 세포 내 칼슘 이온은 세포 증식과 세포 자멸사를 조절하는 활성산소(ROS)의 생산과 밀접한 관련이 있으며, 칼슘 이온의 항상성 장애는 세포 내 미토콘드리아의 기능 장애로 이어질 수 있다.

[0150] 본 실시예에서는 자궁내막증 세포에서 칼슘 항상성에 대한 디프레닐로로볼의 간접 효과를 측정하기 위해 각각 세포질 및 미토콘드리아 기질에서의 칼슘 축적을 확인할 수 있는 Fluo-4 및 Rhod-2 염료를 이용하여 칼슘이온의 농도 증가 양상을 분석하였다.

[0151] 먼저, 자궁내막증 세포주 VK2/E6E7 및 End1/E6E7을 6 well에서 배양한 뒤, 디프레닐로로볼을 용량 의존적으로 처리하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 이용하여 세포를 떼어내고 PBS로 세척한 뒤, 3 μ M의 Fluo-4 및 Rhod-2를 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분간 염색을 수행하였다. 그 다음, PBS로 세척한 후, FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 FACSCalibur flow cytometer를 이용하여 형광 광도를 분석함으로써 세포 내 또는 미토콘드리아 내 칼슘 농도를 측정하였다.

[0152] 결과는 도 3에 나타내었다.

[0153] 디프레닐로로볼에 의해 자궁내막증 두 세포주(VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포)의 세포질 및 미토콘드리아의 기질에 칼슘이 축적되는 양상을 확인하였다. 구체적으로, 세포 내 세포질 칼슘 수준은 음성대조군에 비해 VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포에서 각각 285% 및 258% 증가하였다.

[0155] 또한, 인간 자궁내막증 유사 세포주에서 디프레닐로로볼에 의한 칼슘 유입의 메커니즘을 확인하고자, 칼슘 억제제인 2-APB(2-aminoethoxydiphenyl borate) 또는 RUR(ruthenium red)를 디프레닐로로볼과 병용처리함으로써 세포질 및 미토콘드리아 기질에서의 칼슘 변화를 확인하였다.

[0156] 결과는 도 4에 나타내었다.

[0157] 디프레닐로로볼의 단독 처리와 비교하여, 칼슘 억제제 및 디프레닐로로볼의 병용처리된 세포에서 칼슘 축적 정도가 완화된 것을 확인할 수 있었다.

[0158] 구체적으로, 도 4의 a 및 b에 나타난 바와 같이, 2-APB와 디프레닐로로볼의 병용처리에 의해 자궁내막증 세포의 세포질에서 칼슘 축적이 상대적으로 감소된 것을 확인하였으며, 특히, VK2/E6E7 세포에서 352%에서 165%로, End1/E6E7에서 678%에서 325%로 완화된 것을 확인하였다.

[0159] 이와 유사하게, 도 4의 c 및 d에서 자궁내막증 세포의 미토콘드리아 기질에서 칼슘 이온의 축적은 RUR과 디프레

닐로로볼의 병용처리에 의해 VK2/E6E7에서 185%에서 142%로, End1/E6E7에서 171%에서 130%로 완화된 것을 확인하였으나, 상기 2-APB와의 병용처리에 따른 자궁내막증 세포의 세포질에서의 유의적인 차이를 나타낸 것과 달리, RUR 병용처리에 따른 미토콘드리아에서는 유의적인 차이가 나타나지 않는 것을 확인하였다.

[0161] 결과적으로, 자궁내막증 세포에서 디프레닐로로볼 처리에 의한 칼슘 항상성 장애를 유발하여 미토콘드리아 기능에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었고, 또한, 이러한 칼슘 축적이 주로 세포질에서 일어난다는 것을 확인할 수 있었다.

[0163] **실시예 4. 디프레닐로로볼(diprenylorobol)에 의한 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아 호흡 조절 분석**

[0164] 디프레닐로로볼에 의한 자궁내막증 세포 내 미토콘드리아의 기능에 미치는 영향을 확인하고자, Seahorse XFe 분석기를 사용하여 Seahorse XF Cell Mito Stress 테스트를 수행함으로써, 디프레닐로로볼에 의한 미토콘드리아 호흡 조절 분석을 실시하였다.

[0165] 먼저, 자궁내막증 세포 VK2/E6E7 및 End1/E6E7를 24 well에서 37℃/5% CO₂ 조건으로 16시간 배양한 다음, 디프레닐로로볼을 처리하였다. 이 후, 두 세포주에 올리고마이신(oligomycin), FCCP, 로테논(Rotenone) 및 안티마이신 A(antimycin A)를 연속으로 처리하여 다양한 미토콘드리아 호흡 매개변수를 계산하였다.

[0166] 결과는 도 5에 나타내었다.

[0167] 도 5의 a 및 b에 나타난 바와 같이, 올리고마이신 처리 전 디프레닐로로볼 처리로 인해 세포의 기저 호흡수가 감소한 것을 확인하였다. 유사하게, FCCP 유도 후, 디프레닐로로볼이 처리된 세포의 최대 호흡수는 음성대조군(비히클 처리된 세포)에 비해 낮은 것을 확인하였다.

[0168] 또한, 도 5의 c 및 d에서 나타난 바와 같이, 미토콘드리아 호흡 조절에 있어서, 디프레닐로로볼의 처리에 의해 기초 호흡, 최대 호흡 및 ATP 생산이 모두 감소된 것을 확인하였다.

[0170] 결과적으로, 자궁내막증 세포에 디프레닐로로볼을 처리하였을 경우, ATP-연관 호흡이 감소되면서 미토콘드리아 기능 장애에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

[0172] **실시예 5. 디프레닐로로볼(diprenylorobol)에 의한 자궁내막증 세포 내 세포증식 관련 신호전달기전 조절 양상 분석**

[0173] 디프레닐로로볼에 의해 유도되는 자궁내막증 세포의 증식 억제에 영향을 미치는 신호전달기전을 확인하기 위하여, 증식과 연관된 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달물질, 즉, 상기 신호전달기전의 하위에서 조절되는 타겟 신호전달 단백질의 인산화 양상을 웨스턴 블롯을 이용하여 분석하였다.

[0174] VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포에 디프레닐로로볼을 용량 의존적 또는 신호전달기전 억제제와 병용처리한 다음, 처리된 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay(Bio-rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95℃에서 5분간 변성하였으며, 10% SDS-PAGE Gel에 동일한 양으로 로딩하여 전기영동을 통해 단백질을 분리한 후, 겔에서 분리된 단백질을 니트로셀룰로오스 막으로 옮겨 주었다. 이 후, 1차 및 2차 항체(Cat No. 5450-00110, SeraCare, MA, USA)를 차례로 인큐베이션 시킨 다음, chemiluminescence detection(Supersignal west pico, pierce, Rockford, IL, USA) 시약을 사용하여 단백질을 검출하였다. 면역블롯은 화학발광을 통해 검출되었고 ChemiDoc EQ 시스템 및 Quantity one software 기기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

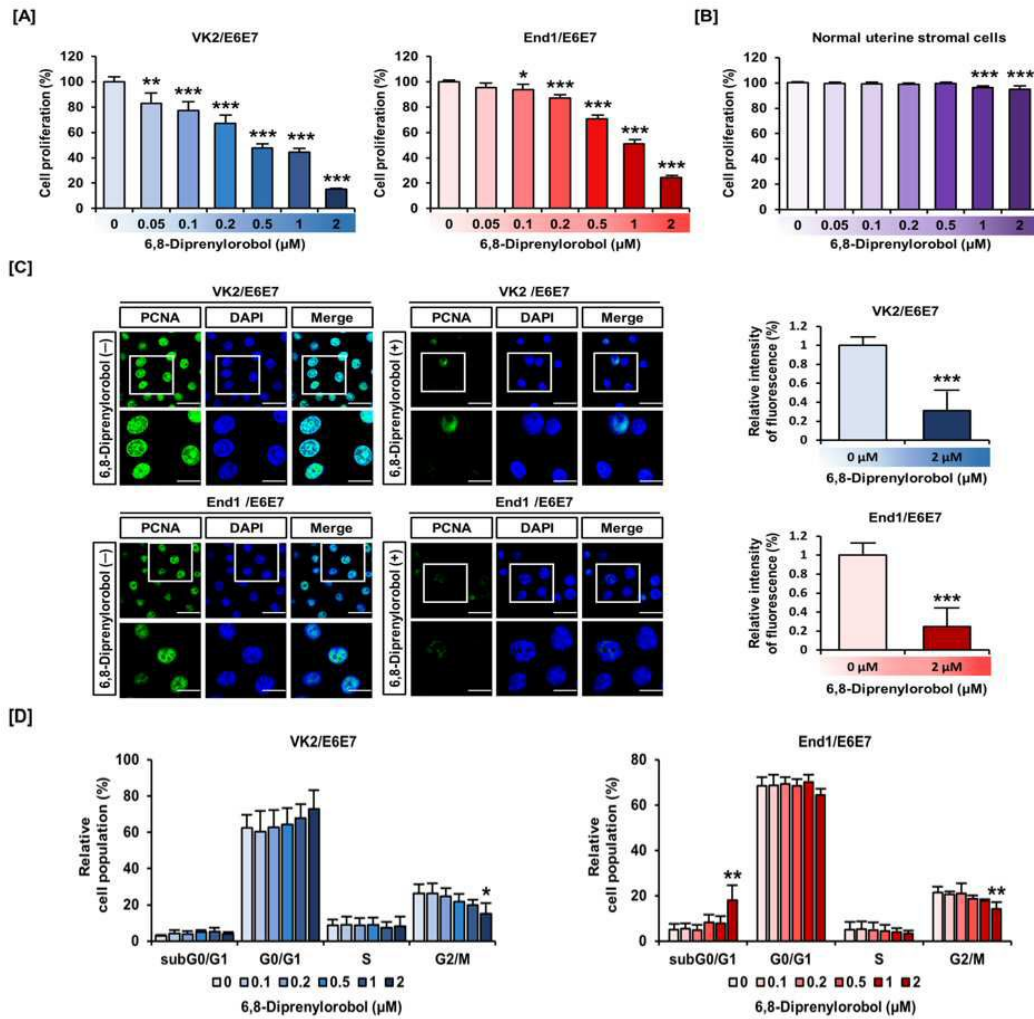
[0175] 결과는 도 6의 a 에 나타내었다.

[0176] 도 6의 a에 나타난 바와 같이, PI3K/AKT 신호전달기전의 관련 단백질인 AKT, P70S6K 및 S6 단백질의 인산화는 디프레닐로로볼의 용량 의존적 처리에 따라 두 세포주에서 모두 감소한 것을 확인하였고, MAPK 신호전달기전과 관련된 P38 단백질의 발현은 디프레닐로로볼 처리에 따라 두 세포주에서 모두 증가한 것을 확인하였다.

- [0178] 이를 통해, 디프레닐로로볼은 자궁내막증 세포 내에서 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 불활성화시킴으로써 자궁내막증 세포의 증식을 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0180] **실시예 6. 디프레닐로로볼(diprenylorobol)과 약리학적 억제제의 병용 투여에 의한 자궁내막증 세포 내 신호전달물질 인산화 패턴 분석**
- [0181] 상기 실시예 5에서 확인된 디프레닐로로볼에 의해 조절되는 난소암 내 신호전달기전에 있어서, 이들의 신호전달 단백질을 억제하는 약리학적 억제제를 병용 투여함으로써, 신호전달물질 인산화 패턴을 분석하여 디프레닐로로볼에 의한 약리학적 억제제의 상승효과를 확인하고자 하였다.
- [0182] 본 실시예에서 디프레닐로로볼과의 병용처리를 위한 약리학적 억제제는 LY294002(PI3K 억제제)을 사용하여, 상기 실시예 5에 기재된 방법에 따라 수행하였다.
- [0183] 결과는 도 6의 b에 나타내었으며, VK2/E6E7 및 End1/E6E7 세포의 증식에 있어서, 증식과 관련된 PI3K/AKT 신호전달기전 하위 단백질의 인산화는 디프레닐로로볼 단독 처리한 세포와 비교하여, 약리학적 억제제를 병용 투여하였을 때 모든 End1/E6E7세포에서 증식을 효과적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0185] 결과적으로, 디프레닐로로볼은 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달경로를 통해 자궁내막증 세포증식을 조절하여 이를 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 신호전달경로를 억제하는 약리학적 억제제를 병용 처리함으로써 인해 추가적으로 세포 증식이 감소하는 것을 확인하였으며, 구체적으로, 본 발명의 디프레닐로로볼과 신호전달 억제제를 병용 처리시, 세포 증식 억제 효과가 효율적으로 개선됨을 확인할 수 있었다.
- [0187] **통계 분석**
- [0188] 본 실험결과는 SAS(statistical analysis system) 통계 프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. $p < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

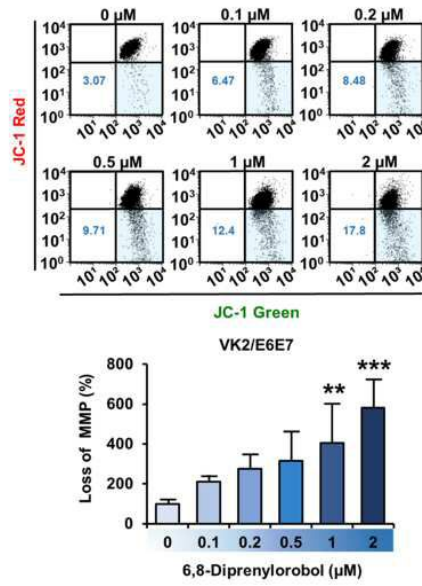
도면

도면1

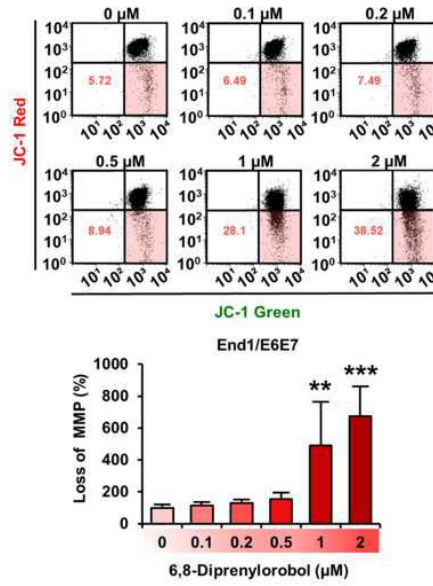


도면2

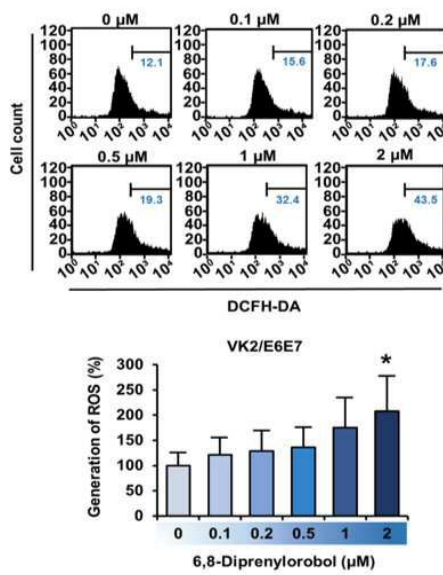
[A]



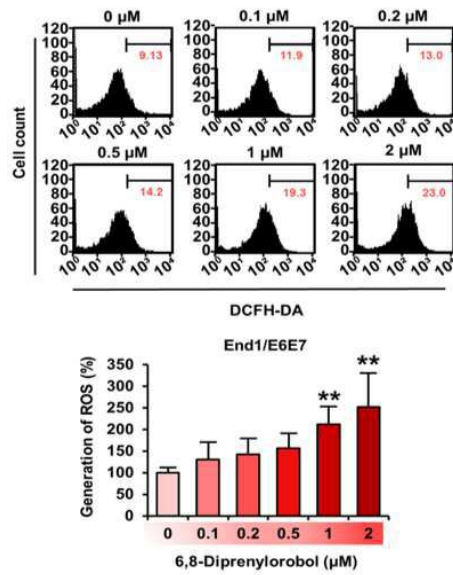
[B]



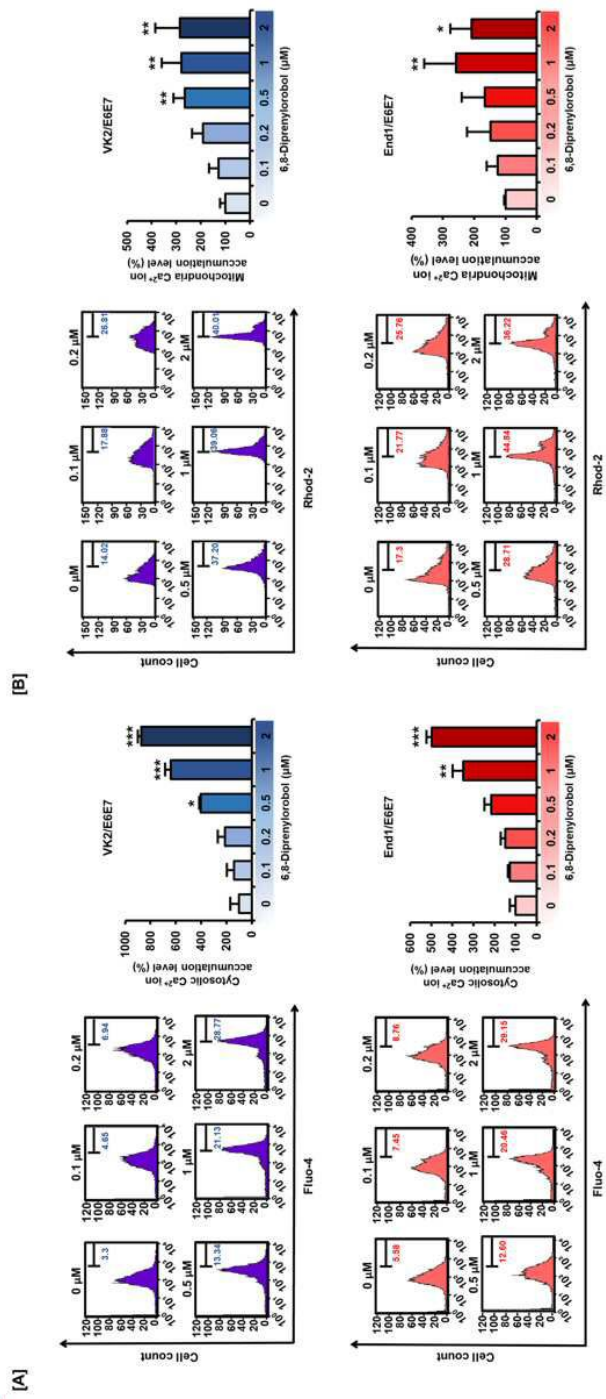
[C]



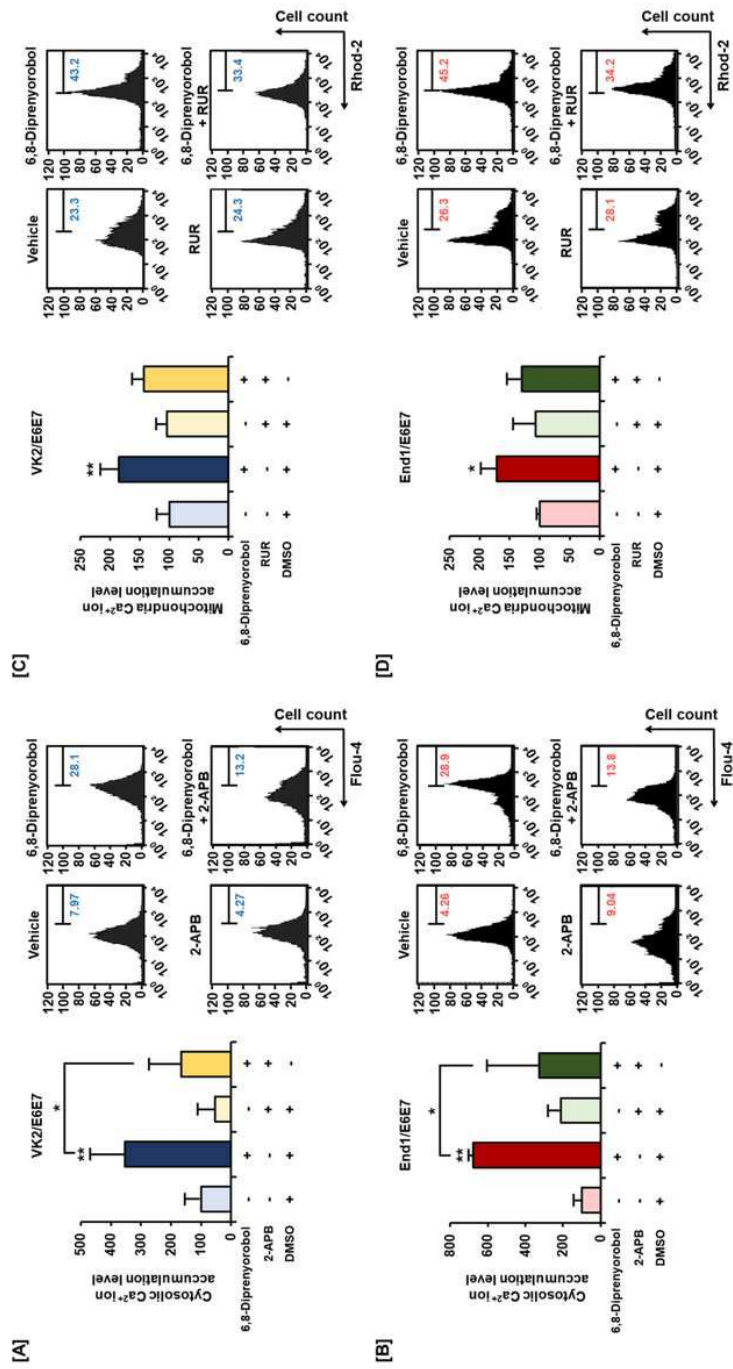
[D]



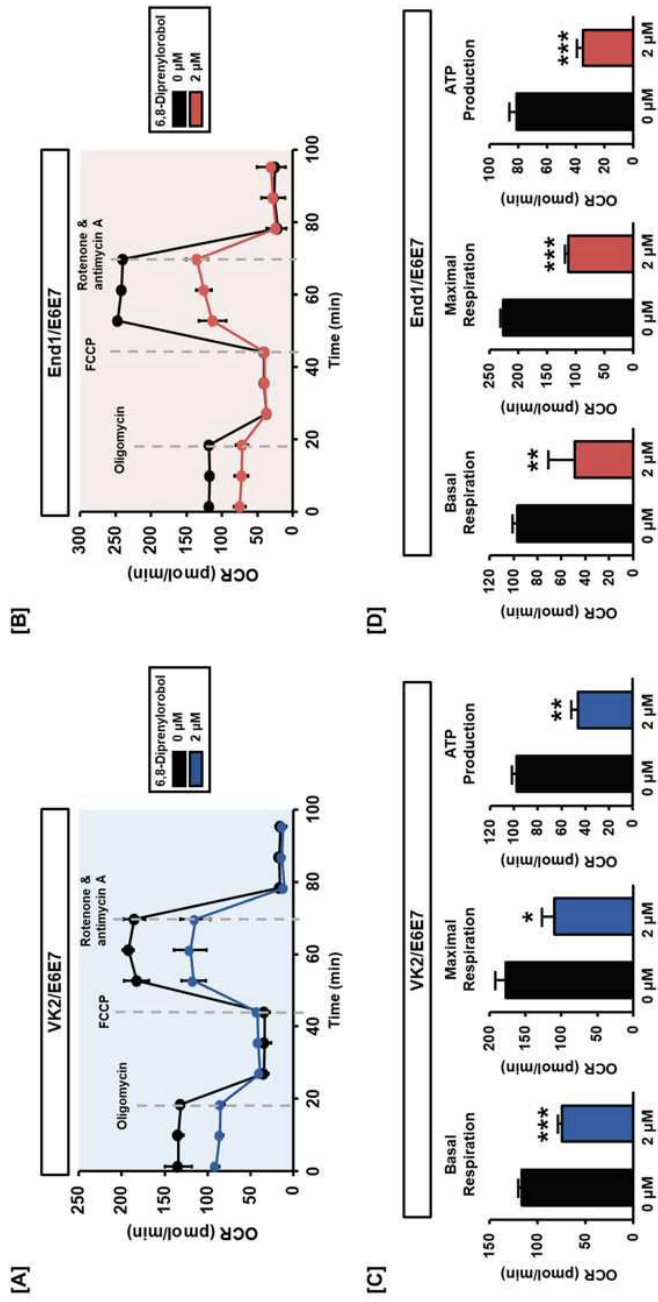
도면3



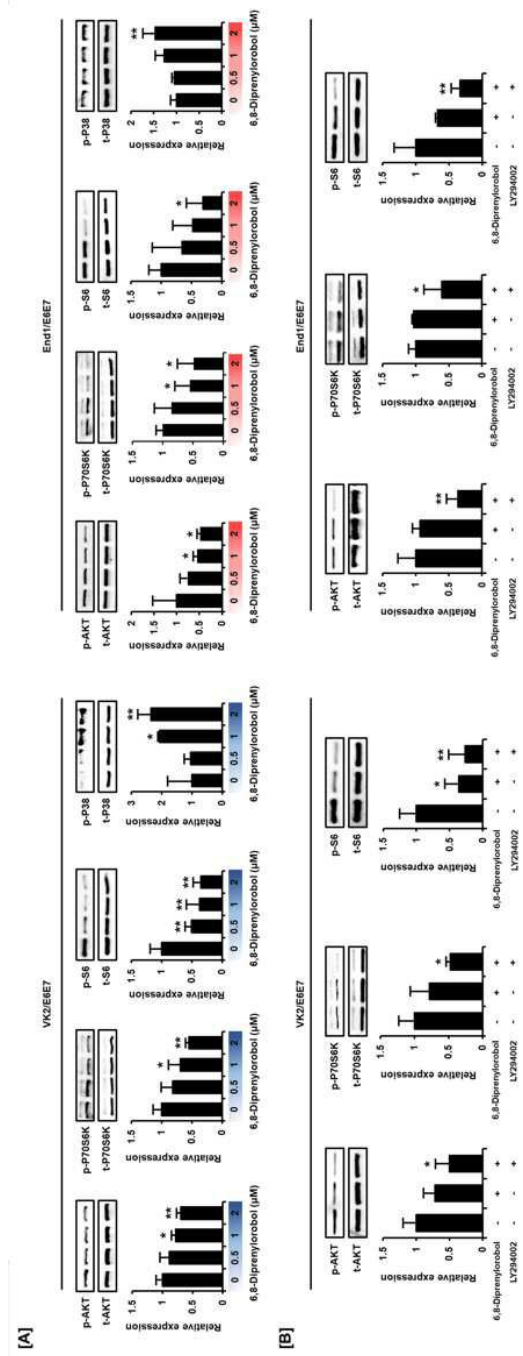
도면4



도면5



도면6



도면7

