



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0134329

(43) 공개일자

2012년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/35 (2006.01) A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2011-0053172

(22) 출원일자

2011년06월02일

심사청구일자

2012년05월18일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김성훈

서울특별시 강남구 도곡동 타워팰리스 E동 2405호

정수진

서울특별시 동대문구 이문로38길 9 (이문동)

이효정

서울특별시 동대문구 회기로25길 31, 경희대학교 한의과대학 암예방소재개발연구센터 (회기동)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 베타-D-글루코스 펜타키스 (3, 4-디하이드록시-5-((3, 4, 5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 신장 세포의 이동을 억제하고, 수산칼슘석 결정의 성장을 억제하고, 신장 세포에서 수산칼슘석 결정 흡착을 억제하여, 신장결석 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0017956

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 폴리페놀성 물질을 함유한 한약의 신장결석의 치료 기전연구

주관기관 경희대 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트) (beta-D-glucose pentakis(3,4-dihydroxy-5-((3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxy)benzoate))를 유효성분으로 포함하는 신장 결석 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)는 신장 세포의 이동을 억제하는 것을 특징으로 하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)는 수산칼슘석 결정(cacium oxalate monohydrate crystal)의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는 신장 결석 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)는 신장 세포에서 수산칼슘석 결정(cacium oxalate monohydrate crystal) 흡착을 억제하는 것을 특징으로 하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신결석 또는 요석증은 신장결석 질환과 같이 비뇨기에 결석의 발생으로 정의되는 흔한 장애이다. 상기 장애는 심각한 건강 문제를 나타낸다. 신장결석은 소변 안에 녹아있는 미네랄이 결정이 형성되어 신장이나 방광 내부에 결석이 생긴 것을 말한다. 신장결석은 결석의 위치에 따라 신결석, 요관결석, 방광결석, 요도결석, 전립선결석으로 나눌 수 있다. 신장결석은 여러 원인요소들이 복합적으로 상호 작용하여 형성되는 것으로 추정되고 있다. 소변 내에서 요로결석을 형성하는 물질의 포화 및 과포화가 일어나게 되고, 이러한 물질들이 핵화를 이루고, 결정체 성장과 응집의 과정을 거치면서 결정체 정체를 통해 요로결석이 형성된다. 즉, 과포화(supersaturation) → 결정체핵(crystal nucleation) → 결정체 응집(crystal aggregation) 과정을 통해 결정이 형성되어 진다. 신장결석은 수산과 칼슘, 인산과 칼슘이 결합하거나 요산을 주성분으로 만들어진다. 특히, 신장결석의 성분은 칼슘석(수산칼슘석, 인산칼슘석)이 75~80%로 가장 흔하며, 요산석이 5~10%, 감염석이 5~15%, 그 다음으로 시스틴석이 1~2% 정도를 차지한다. 신장결석은 미국에서는 약 100만명 정도가 갖고 있는 것으로 추정될 만큼 흔한 신장 질환 중 하나이며, 우리나라에서도 환자의 수가 계속 증가되고 있는 실정이다. 이는 자연친화적 환경을 벗어나 산업화의 결과로 생각되어 지며, 도시화에 따른 식생활 및 생활방식의 변화에 따라 앞으로 현대병으로 발현될 가능성이 많은 질환이다. 수산칼슘석은 신장결석에 주요 성분이다. 소변으로부터 배출되는 수산칼슘석 양은 수산칼슘석 과포화 및 신장결석 형성에 중요한 영향을 미친다.

[0003] 이에, 본 발명자들은 정상 신장세포에서의 수산칼슘석 수준을 저하시킴으로써 신장결석을 예방 또는 치료할 수 있다는 점에 착안하여, 예의연구를 거듭한 결과, 본 발명의 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)가 신장 세포의 이동을 억제하고, 수산칼슘석 결정의 성장을 억제하고, 신장 세포에서 수산칼슘석 결정 흡착을 억제할 수 있음을 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

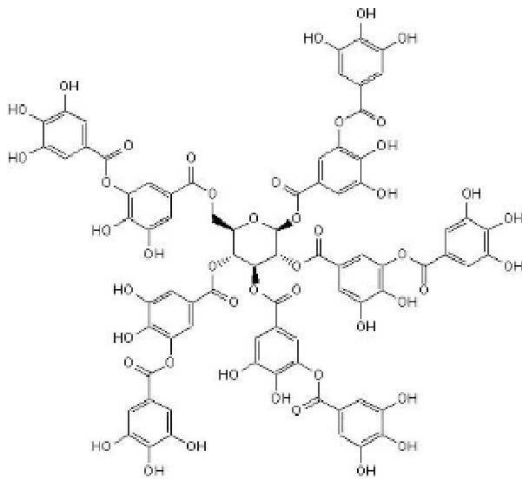
해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 신장 세포의 이동을 억제하고, 수산칼슘석 결정의 성장을 억제하고, 신장 세포에서 수산칼슘석 결정 흡착을 억제하는 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1의 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트) (beta-D-glucose pentakis(3,4-dihydroxy-5-((3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxy)benzoate))를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물을 제공한다:

[0006] [화학식 1]

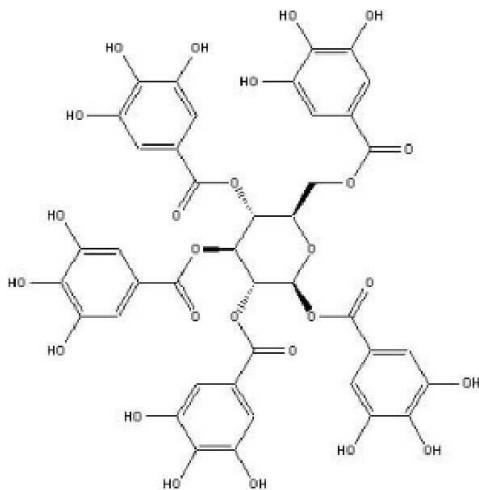


[0007]

[0008] 상기 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)는 CAS 번호 1401-55-4, 분자식 $C_{76}H_{52}O_{46}$, 분자량 1701.1985g/mol의 화합물로, 관용명어로, 갈로타닌(Gallotannin), 타닌산(Tannic acid), 타닌(Tannin), 갈로타닌 산(Gallotannic acid) 등으로 불린다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)는 신장 세포의 이동을 억제할 수 있다. 특히, 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트) 미처리한 대조군 또는 하기 화학식 2의 1,2,3,4,6-펜타-O-갈로일-베타-D-글루코오스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose, PGG)에 비하여, 신장세포의 이동 억제효과가 현저하다.

[0010] [화학식 2]



[0011]

[0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)

옥시)벤조에이트)는 수산칼슘석 결정(cacium oxalate monohydrate crystal)의 성장을 억제하는 효과가 현저할 수 있다.

- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)는 신장 세포에서 수산칼슘석 결정(cacium oxalate monohydrate crystal) 흡착을 억제하는 효과가 현저할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물 투여할 수 있다. 상기 신장결석 예방 및 치료용 조성물은 인비트로 신장세포 이동 억제 효과와 신장 세포에서 수산칼슘석 결정(cacium oxalate monohydrate crystal) 흡착을 억제효과를 확인할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 신장결석 예방 및 치료용 조성물은 본 발명의 효과를 해치지 않는 범위 안에서 약학적으로 허용 가능한 희석제, 결합제, 붕해제, 윤활제, pH 조절제, 산화방지제, 용해보조제 등의 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0016] 희석제는 슈가, 전분, 미결정셀룰로오스, 유당(유당수화물), 포도당, 디-만니톨, 알기네이트, 알칼리토금속류염, 클레이, 폴리에틸렌글리콜, 무수인산수소칼슘, 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있으며; 결합제는 전분, 미결정셀룰로오스, 고분산성 실리카, 만니톨, 디-만니톨, 자당, 유당수화물, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈(포비돈), 폴리비닐피롤리돈 공중합체(코포비돈), 히프로멜로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 천연검, 합성검, 코포비돈, 젤라틴, 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.
- [0017] 붕해제는 전분글리콘산나트륨, 옥수수전분, 감자전분 또는 전호화전분 등의 전분 또는 변성전분; 벤토나이트, 몬모릴로나이트, 또는 비검(veegum) 등의 클레이; 미결정셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 또는 카르복시메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류; 알긴산나트륨 또는 알긴산 등의 알긴류; 크로스카멜로스(croscarmellose)나트륨 등의 가교 셀룰로오스류; 구아검, 잔탄검 등의 검류; 가교 폴리비닐피롤리돈(crospovidone) 등의 가교 중합체; 중탄산나트륨, 시트르산 등의 비등성 제제, 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.
- [0018] 윤활제는 탈크, 스테아린산, 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 라우릴설페이트나트륨, 수소화식물성오일, 나트륨벤조에이트, 나트륨스테아릴푸마레이트, 글리세릴 베헤네이트, 글리세릴 모노레이트, 글리세릴모노스테아레이트, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 콜로이드성 이산화규소 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.
- [0019] pH 조절제는 초산, 아디프산, 아스코르빈산, 아스코르빈산 나트륨, 에테르산 나트륨, 사과산, 숙신산, 주석산, 푸마르산, 구연산(시트르산)과 같은 산성화제와 침강 탄산 칼슘, 암모니아수, 메글루민, 탄산 나트륨, 산화 마그네슘, 탄산 마그네슘, 구연산 나트륨, 삼염기칼슘인산염과 같은 염기성화제 등을 사용할 수 있다.
- [0020] 산화방지제는 디부틸 히드록시 톨루엔, 부틸레이티드 히드록시아니솔, 초산 토크페롤, 토크페롤, 프로필 갈레이트, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 선방출성 구획에서, 용해보조제는 라우릴황산나트륨, 폴리소르베이트 등의 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테류, 도큐세이트 나트륨, 폴록사머(poloxamer) 등을 사용할 수 있다.
- [0021] 또한, 지연방출성 제제를 만들기 위해 장용성 고분자, 수불용성 중합체, 소수성 화합물, 및 친수성 고분자를 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 장용성 고분자는 pH 5 미만의 산성 조건하에서 불용성이거나 또는 안정한 것으로, pH 5 이상인 특정 pH 조건하에서 용해되거나 또는 분해되는 고분자를 말하며, 예를 들어, 히프로멜로오스아세테이트숙시네이트, 히프로멜로오스프탈레이트(히드록시프로필메틸셀룰로오스 프탈레이트), 히드록시메틸에틸셀룰로오스프탈레이트, 셀룰로오스아세테이트프탈레이트, 셀룰로오스아세테이트숙시네이트, 셀룰로오스아세테이트말레이트, 셀룰로오스벤조에이트프탈레이트, 셀룰로오스프로피오네이트프탈레이트, 메틸셀룰로오스프탈레이트, 카르복시메틸에틸셀룰로오스 및 에틸히드록시에틸셀룰로오스프탈레이트, 메틸히드록시에틸셀룰로오스와 같은 장용성 셀룰로오스 유도체; 스티렌-아크릴산 공중합체, 아크릴산메틸-아크릴산 공중합체, 아크릴산메틸메타크릴산 공중합체(예컨대, 아크릴-이즈), 아크릴산부틸-스티렌-아크릴산 공중합체, 및 아크릴산메틸-메타크릴산-아크릴산옥틸공중합체과 같은 상기 장용성 아크릴산계 공중합체; 폴리(메타크릴산 메틸 메타크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓 L, 유드라짓 S, 에보닉, 독일), 폴리(메타크릴산 에틸아크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓 L100-55)와 같은 장용성 폴리메타크릴레이트 공중합체; 아세트산비닐-말레인산 무수물 공중합체, 스티렌-말레인산 무수물 공중합체, 스티렌-말레인산모노에스테를 공중합체, 비닐메틸에테르-말레인산 무수물 공중합체, 에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 비닐부틸에테르-말레인산 무수물 공중합체, 아크릴로니트릴-크릴산메틸·말레인산 무수물 공중합체, 및 아크릴산부틸-스티렌-말레인산 무수물 공중합체와 같은 장용성 말레인산계 공중합체; 및 폴리비닐알콜프탈레이

트, 폴리비닐아세탈프탈레이트, 폴리비닐부틸레이트프탈레이트 및 폴리비닐아세탈아세탈프탈레이트와 같은 장용성 폴리비닐 유도체가 있다.

[0023] 상기 수불용성 중합체는 약물의 방출을 제어하는 약제학적으로 허용가능한 물에 용해되지 않는 고분자를 말한다. 예를 들어, 수불용성 중합체는 폴리비닐아세테이트(예컨대, 콜리코트 SR30D), 수불용성 폴리메타크릴레이트 공중합체[예컨대, 폴리(에틸아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓 NE30D, 폴리(에틸아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트-트리메틸아미노에틸메타크릴레이트)공중합체(예컨대, 유드라짓RSP 0)등], 에틸셀룰로오스, 셀룰로오스 에스테르, 셀룰로오스 에테르, 셀룰로오스 아실레이트, 셀룰로오스 디아실레이트, 셀룰로오스 트리아실레이트, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 디아세테이트 및 셀룰로오스 트리아세테이트 등이 있다.

[0024] 상기 소수성 화합물은 약물의 방출을 제어하는 약제학적으로 허용가능한 물에 용해되지 않는 물질을 말한다. 예를 들어, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 글리세릴 스테아레이트, 글리세릴 비헤네이트, 세틸 팔미테이트, 글리세릴 모노 올레이트 및 스테아린산과 같은 지방산 및 지방산 에스테르류; 세토스테아릴 알코올, 세틸알코올 및 스테아릴알코올과 같은 지방산 알코올류; 카르나우바왁스, 밀납, 및 미결정왁스와 같은 왁스류; 탈크, 침강탄산 칼슘, 인산일수소칼슘, 산화아연, 산화티탄, 카올린, 벤토나이트, 몬모릴로나이트 및 비검과 같은 무기질 물질 등이 있다.

[0025] 상기 친수성 고분자는 약물의 방출을 제어하는 약제학적으로 허용가능한 물에 용해되는 고분자 물질을 말한다. 예를 들어, 텍스트린, 폴리텍스트린, 텍스트란, 펙틴 및 펙틴 유도체, 알긴산염, 폴리갈락투론산, 자일란, 아라비노자일란, 아라비노갈락탄, 전분, 히드록시프로필스타치, 아밀로오스, 및 아밀로펙틴과 같은 당류; 히프로멜로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스 및 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨과 같은 셀룰로오스 유도체; 구아검, 로커스트 콩 검, 트라가칸타, 카라기난, 아카시아검, 아라비아검, 젤란검, 및 잔탄검과 같은 검류; 젤라틴, 카제인, 및 제인과 같은 단백질; 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 및 폴리비닐아세탈디에틸아미노아세테이트와 같은 폴리비닐유도체; 폴리(부틸 메타크릴레이트-(2-디메틸아미노에틸)메타크릴레이트-메틸메타크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓E100, 에보닉, 독일), 폴리(에틸 아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트-트리메틸아미노에틸- 메타크릴레이트 클로라이드) 공중합체 (예컨대, 유드라짓 RL, RS, 에보닉, 독일)과 같은 친수성 폴리메타크릴레이트 공중합체; 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리에틸렌 옥사이드와 같은 폴리에틸렌 유도체; 카보머 등이 있다.

[0026] 이외에도 착색제, 향료 중에서 선택된 다양한 첨가제로서 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 선택 사용하여 본 발명의 제제를 제제화할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 첨가제의 범위가 상기 첨가제를 사용하는 것으로 한정되는 것은 아니며, 상기한 첨가제를 선택에 의하여 통상 범위의 용량을 함유하여 제제화할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물을 포유류를 포함하는 대상체에 투여하여 신장결석 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 내피 투여, 비내 투여, 폐내투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여, 경막내 투여될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명에 따른 신장결석 예방 및 치료용 조성물은 일일 1회 또는 일정한 시간 간격을 두고 일일 2회 이상 투여될 수 있다.

[0031] 본 발명의 신장결석 예방 및 치료용 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0032] 본 발명의 신장결석 예방 및 치료용 조성물의 투여량은 본 발명의 신장결석 예방 및 치료용 조성물의 활성, 성별, 투여 시간, 투여 경로, 치료 기간 및 횟수 등에 따라 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서 상

기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 유효성분으로 포함하는 신장결석 예방 및 치료용 조성물은 신장 세포의 이동을 억제하고, 수산칼슘석 결정의 성장을 억제하고, 신장 세포에서 수산칼슘석 결정 흡착을 억제하여, 신장결석 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 MTT법으로 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-D-글루코오스의 정상 신장 상피세포주인 MDCK에서의 세포독성 측정 결과(처리 농도별 생존율)를 보여주는 히스토그램이다.

도 2는 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)의 정상 신장 상피세포주인 MDCK에서의 이동의 억제효과를 보여주는 히스토그램이다.

도 3은 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-D-글루코오스의 정상 신장 상피세포주인 MDCK에서의 이동의 억제효과를 보여주는 히스토그램이다.

도 4는 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)의 정상 신장 상피세포주인 MDCK에서의 이동의 억제효과를 보여주는 현미경 사진이다.

도 5는 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)에 의한 수산칼슘석 성장 억제효과를 보여주는 히스토그램이다.

도 6은 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)의 정상 신장 상피세포주인 MDCK에서의 수산칼슘석 흡착 억제효과를 보여주는 히스토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 하기 실시예들에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예들은 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 설명일 뿐 실시예들에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0036] 실시예 1. 세포독성

[0037] 정상 신장 상피세포주인에 대한 세포독성을 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)법으로 측정하였다. 96-웰 배양 플레이트에 MDCK(Maddin-Darby canine kidney) 세포주(Mayo clinic(미국)의 John C. Lieske로부터 입수함)를 1×10^4 세포수/웰에 시딩(seeding)하고 24시간 후에 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)[santa-cruz사의 갈로타닌(sc-202619), 분자량(M.W) 1701.1985]를 농도별(0, 6.25, 12.25 및 25 μ M)로 처리하였다. 24시간 배양한 후, 배양액(DMEM 배지)을 모두 버리고 50 μ l의 MTT 용액(1mg/ml in PBS(phosphate buffered saline))를 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 플레이트를 PBS로 세척한 후, 100 μ l의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하고 상온에서 20분동 방치하였다. microplate reader(Molecular Devices Co.)를 사용하여, 570nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0038] 실시예 2. 액제 제제 제조

[0039] 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)[santa-cruz사의 갈로타닌(sc-202619), 분자량(M.W) 1701.1985]의 건조된 분말 10mg을 0.058ml의 100% 에탄올에 용해하여 100mM로 만들어 농도별로 액제를 제조하였다.

[0040] 실시예 3. 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)의 정상 신장 상피세포에서의 이동 실험

[0041] 정상 신장 상피세포주인 MDCK(Maddin-Darby canine kidney) 세포주(Mayo clinic(미국)의 John C. Lieske로부터 입수함)를 35-mm 플레이트(plate)에 첨가하고, 혈청이 포함된 배지(10% FBS와 1% 페니실린/스트렙토마이신을 보충한 DMEM 배지)에서 24시간 배양한 뒤 혈청이 없는 배지(DMEM 배지)로 교환하여 6시간 더 배양하였다. 200 μ l 팁(tip)을 이용하여 세포가 부착된 플레이트의 중앙을 스크래치 하였다. 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 농도별로 처리하고, 24시간 후, 200 μ l 팁(tip)을 이용하여 세포가 부착된 플레이트의 중앙을 스크래치 하였다. 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 농도별로 처리하고, 24시간 후, 200 μ l 팁(tip)을 이용하여 세포가 부착된 플레이트의 중앙을 스크래치 하였다.

드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)를 농도별(0, 5 및 10 μ M)로 처리하고 24 시간 배양한 후, Diff-Quick Solution(Sysmex Co., Japan)으로 염색했다. 현미경(Axiovert S 100 light microscope (Carl Zeiss, USA)상에서 이동된 세포를 계수했다(도 2 및 도 4 참조).

[0042] 비교예로, 하기 화학식 2의 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-D-글루코오스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose, PGG)를 이용하여, 상기와 실질적으로 동일한 방법으로 실험을 하였다(도 3 참조).

[0043] 비교예인 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-D-글루코오스(PGG)의 경우, 5 μ M에서 25%, 10 μ M에서 50%의 세포이동 억제효과를 가짐에 비해, 본 발명의 실시예인 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)는 5 μ M에서 40%, 10 μ M에서 70%의 세포이동 억제 효과를 가져, 세포이동 억제효과가 현저함을 확인할 수 있었다.

[0044] 실시예 3. 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)에 의한 수산칼슘석 성장 억제 실험

[0045] 90 mM NaCl과 10 mM 트리스 완충용액(Tris buffer, pH 7.2)에 8mg의 수산칼슘석 결정(calcium oxalate monohydrate crystal, BDH Limited, Poole, England)을 더하여, 수산칼슘석 결정 슬러리(calcium oxalate monohydrate crystal slurries)를 준비한다. 상기 슬러리는 원심분리기로 1,100rpm에서 잘 섞여지도록 하여 하룻밤 동안 평형을 유지시켰다. 슬러리가 준안정(metastable) 상태의 수산칼슘석 용액 2ml에 추가되었으며, 준안정(metastable) 상태의 수산칼슘석 용액은 0.5 mM Ca(칼슘 양이온), 0.5 mM 옥살레이트(oxalate), 90 mM NaCl, 10 mM 트리스 완충용액(Tris buffer, pH 7.2)으로 이루어져있다. 연속 녹음 분광 광도계(모델명 Cary)로 214 nm에서 400초 동안 모니터링 하였고, 데이터의 정리는 람다 7 분광 광도계(Perkin Elmer Corp., Norwalk CT, USA)를 사용하였다. 샘플을 번갈아 가며 측정기에 넣으며 측정 하였다.

[0046] 도 5를 참조하면, 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)는 수산칼슘석 성장을 현저하게 저해함을 확인할 수 있었다.

[0047] 실시예 4. 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)의 정상 신장 상피세포에서의 칼슘 옥살레이트 모노하이드레이트 흡착 실험

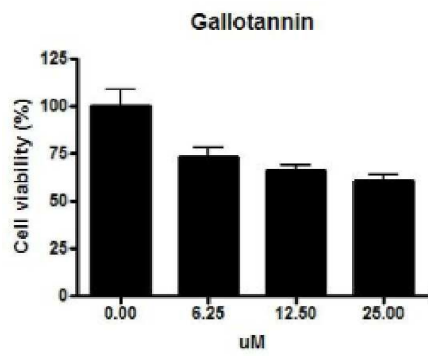
[0048] 정상 신장 상피세포주인 MDCK(Maddin-Darby canine kidney) 세포주(Mayo clinic(미국)의 John C. Lieske로부터 입수함)에 다양한 농도로(0, 1 및 10 μ M) 갈로타닌을 24시간동안 처리한 후 DMEM 배지 제거 후 PBS(phosphate buffered saline)로 3 회 세척해 주었다. [14 C] COM 결정 현탁액(calcium oxalate crystal suspension)을 MDCK 세포에 첨가하여 주었고, 2분 후 부유물(suspension) 제거 후, PBS로 3 회 세척하였다. MDCK 세포를 끊어서 5ml의 신티레이션 바이알(Sigma-Aldrich)에 넣는다. 신티레이션 바이알에 3ml의 신티레이션 콕테일(scintillation cocktail, scintillation vial, Emulsifier Safe Scintillation mixture; PerkinElmer)을 넣어준 후 베타 섬광 계수기beta scintillation counter(Berkman Coulter, Fullerton, CA)를 이용하여 측정하였다.

[0049] 도 6를 참조하면, 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)는 정상 신장 상피세포에서의 칼슘 옥살레이트 모노하이드레이트 흡착을 현저하게 억제함을 확인할 수 있었다.

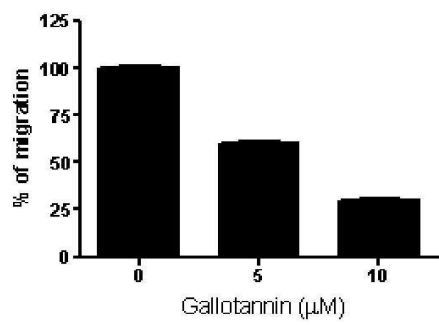
[0050] 본 발명의 실시예들에 따르면, 베타-D-글루코스 펜타키스(3,4-디하이드록시-5-((3,4,5-트리하이드록시벤조일)옥시)벤조에이트)가 신장 세포의 이동을 억제하고, 수산칼슘석 결정의 성장을 억제하고, 신장 세포에서 수산칼슘석 결정 흡착을 억제하여, 신장결석 예방 및 치료에 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

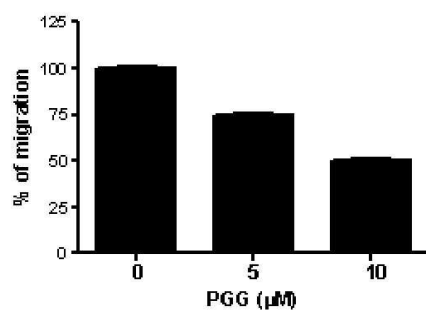
도면1



도면2



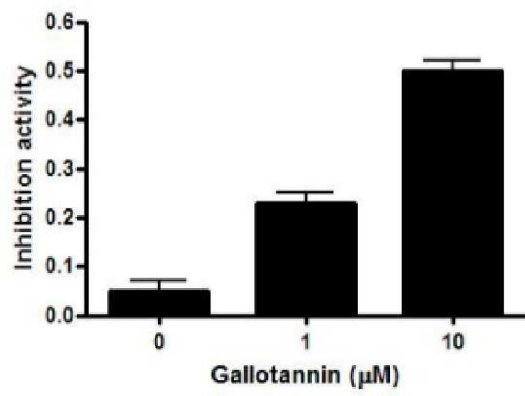
도면3



도면4



도면5



도면6

