



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월08일

(11) 등록번호 10-1583777

(24) 등록일자 2016년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7048 (2006.01) **A61P 15/00** (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0091007

(22) 출원일자 2014년07월18일

심사청구일자 2014년07월18일

(56) 선행기술조사문헌

J. Pharm. Biomed. Anal., Vol.51, No.2,
pp.399-404(2009.03.25.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

최정혜

서울특별시 성동구 독서당로 191 극동아파트 8동
1111호

장대식

서울특별시 성북구 월계로 36길 27 꿈의숲대명루
첸아파트 102동 201호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유지열, 이승열

전체 청구항 수 : 총 2 항

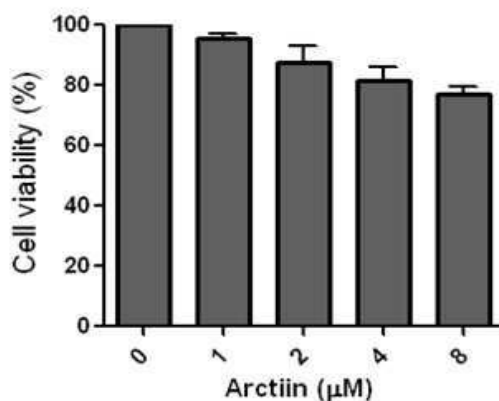
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 **아크틴의 신규 용도**

(57) 요약

본 발명은 아크틴의 신규 용도를 제공한다. 본 발명에 의해 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있다는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이재승

대구광역시 북구 매전로 17, 101동 2101호(매천동,
매천 화성파크드림)

곽호광

경기도 평택시 참이슬길 13, 103동 1201호(합정동,
참이슬아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A111881

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질병중심중개연구

연구과제명 자궁내막증의 진행에서 adipokine의 역할 규명

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교산학협력단

연구기간 2011.11.01 ~ 2014.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

아크틴을 유효성분으로 포함하고,

자궁내막증 세포의 성장, 자궁내막증 세포의 이동능, 또는 자궁내막증 세포의 부착능을 억제하는 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

아크틴을 유효성분으로 포함하고,

자궁내막증 세포의 성장, 자궁내막증 세포의 이동능, 또는 자궁내막증 세포의 부착능을 억제하는 자궁내막증 개선용 식품 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 아크틴의 신규 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 아크틴의 신규한 의약 또는 식품 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 자궁내막증(endometriosis)은 가임기 여성의 3~10%, 불임 여성의 25~35% 정도에서 나타나는 매우 흔한 부인과 질환으로 자궁내막조직이 자궁 이외의 장소(난소, 복강, 장관, 방광)에서 비정상적으로 증식하는 질환이다.

[0003] 자궁내막증은 월경통(dysmenorrhoea), 성교통(dyspareunia) 및 침범부위에 따른 다양한 통증을 증상으로 하며, 30~50%의 환자에서 불임의 원인으로 확인되고 있다.

[0004] 현재까지 수술을 통한 자궁내막 제거수술 외에 자궁내막증에 대한 근본적인 치료법이 없으며, 이러한 수술요법은 차후 임신에 제약을 줄 수 있으며 재발을 또한 높은 편이다.

[0005] 이처럼 자궁내막증은 치명적이지는 않지만 극심한 통증으로 인해 일상생활에 불편함이 있고 심한 경우 불임에까

지 이르는 질환으로, 여성의 삶의 질과 임신의 문제에서 심각하게 인식되어야 하고 반드시 극복해야 할 질병임에도 불구하고 아직까지 이렇다 할 예방 및 치료방법이 존재하지 않고 있다.

[0006] 따라서 여성, 특히 가임기 여성들에게 침습적인(invasive) 수술요법 등이 아닌 자연적이면서도 부작용이 낮은 새로운 개념의 자궁내막증 예방, 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

[0007] 한편, 아크틴(arctiin)은 피부미백 효과 등을 가진 것으로 알려져 있다(대한민국 특허 10-0855457 참조).

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 10-0855457, 2008.9.1, 청구범위

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방에 효과를 나타내는 화합물의 신규 용도를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 과제는 상기에 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

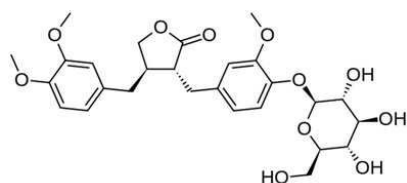
[0011] 본 발명자들은 놀랍게도 아크틴(arctiin)이 자궁내막증의 치료, 개선 및/또는 예방에 효과를 나타냄을 알게 되어 본 발명을 완성하였다.

[0012] 본 발명은 아크틴의 자궁내막증의 치료, 개선 및/또는 예방을 위한 의약 및/또는 식품 용도를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 아크틴을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 아크틴은 하기 화학식 1로 표시될 수 있는 공지의 화합물로, (3R,4R)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[3-methoxy-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]methyloxolan-2-on라 명명된 것일 수 있다.

화학식 1



[0015]

[0016] 아크틴은 합성된 것이거나, 아크틴을 함유하는 천연물(예를 들어, 우방자(牛蒡子) 등)에서 분리된 것일 수 있으며, 자체 제조하거나 시판되는 것일 수 있다. 상기 아크틴은 그의 약제학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있으며, 그 밖에 용매화물, 프로드럭의 형태일 수 있다.

[0017] 상기 치료 또는 예방은 상기 유효성분에 의한 자궁내막증세포의 성장 억제, 자궁내막증세포의 부착능 억제, 또는 자궁내막증세포의 이동능 억제 중에서 선택된 하나 이상에 의한 것일 수 있다.

[0018] 세포성장 억제는 세포생존 억제를 포괄하는 의미이고, 세포생존 억제는 세포사멸을 포괄하는 의미이다.

[0019] 또한, 본 발명은 아크틴을 유효성분으로 포함하는 자궁내막증 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.

[0020] 별도의 언급이 없는 한 상기 식품 조성물은 본 발명의 약학조성물에서 언급된 사항이 모순되지 않는 한 동일하

게 적용된다. 상기 '개선'은 '치료'에 포함되며, 상태 또는 증세가 호전되는 것을 의미한다.

[0021] 상기 식품조성물은 음료를 포함하는 식품에 다양하게 포함될 수 있고, 음료, 껌, 차, 건강기능식품 등의 형태일 수 있으며, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제 등의 제형으로 제제화할 수 있다. 상기 건강기능식품이라 함은 대한민국 건강기능식품에 관한 법률 제12669호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공을 포함한다. 이하 같다)한 식품을 말하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다. 상기 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 식품 첨가물은 케톤류, 글리신, 구연산나트륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0022] 본 발명은 또한 아크틴을 투여를 필요로 하는 인간을 포함한 포유류에게 아크틴을 투여하는 단계를 포함하는 자궁내막증 치료 또는 예방법을 제공하며, 아크틴의 자궁내막증 치료 또는 예방용 제제 제조를 위한 용도를 제공한다. 상기 투여되는 아크틴은 유효량의 아크틴일 수 있다.

[0023] 별도의 언급이 없는 한, 본 발명의 약학 조성물에서 언급된 사항은 모순되지 않는 한 본 발명의 방법, 및 용도에도 동일하게 적용된다.

[0024] 상기 아크틴 또는 조성물은 인간을 포함한 포유류에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 유효성분을 약학적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 제제화하여 투여할 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 파립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 및/또는 젤라틴 등을 첨가하여 제조한다. 또한, 마그네슘, 탈크 등 윤활제도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및/또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 주사가 가능한 액제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 비강세척제 및 좌제가 포함된다. 주사가 가능한 액제, 현탁제, 유제는 물, 비수성용제나 현탁용제와 유효성분을 혼합하여 제조할 수 있으며, 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사가 가능한 에스테르 등일 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및/또는 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사로 투여가능하다.

[0025] 본 발명의 조성물에 포함되거나, 용도 및 방법 중 사용되는 아크틴은 성인 여성 기준으로 1일 0.0001 ~ 100 mg/kg, 바람직하게는 0.001~10mg/kg의 용량으로 사용가능하다. 투여는 하루에 한번 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 본 발명의 범주는 상기 투여량 및 투여횟수에 의해 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.1~99.9중량% 함유할 수 있다.

[0027] 상기 아크틴은 약학적으로 또는 식품학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제 등을 첨가하여 제제화할 수 있으며, 제제화에 관한 내용은 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA 등의 문헌을 참조할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 의해 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 및/또는 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 아크틴의 자궁내막증세포 성장 억제에 의한 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 아크틴의 자궁내막증세포 이동 억제에 의한 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 아크틴의 자궁내막증세포의 부착능 억제에 의한, 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 실시예 및 제조예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명하나, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐으로 본 발명의 내용이 하기 실시예나 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 자궁내막증의 특징인 자궁내막증세포성장, 자궁내막증세포이동, 자궁내막증세포부착에 아크틴이 미치는 영향을 확인함으로써, 아크틴이 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과를 가짐을 아래와 같은 방법으로 확인하였다.
- [0032] 하기 실시예 중 RPMI 1640 배지, DMEM/F12 배지는 라이프 테크놀로지사(그랜드 아일랜드, 뉴욕, 미국)에서 입수하였고, cell tracker CMFDA는 인비트로젠(페이즈리, 영국)에서 입수하였다. 별도 언급이 없는 시약은 시그마사에서 입수하였다.
- [0033] <실시예 1> 아크틴의 자궁내막증세포 성장 억제에 의한 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인
- [0034] 1-1. 아크틴의 준비
- [0035] 실험에 사용된 arctiin(CAS number: 20362-31-6, Product number: ASB-00001977-025, IUPAC: (3R,4R)-4-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-3-[3-methoxy-4-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]methyloxolan-2-one)은 Primary Analytical standard급으로 ChromaDex(Irvine, CA 92618 USA)에서 입수하여 준비하였다.
- [0036] 1-2. 세포 준비
- [0037] 자궁내막증 여성의 활성 자궁내막증 조직을 이용하여 개발된, human immortalized endometriotic epithelial cells인 12Z 세포주를 자궁내막증 모델 세포로 준비하였다{Johann-Wolfgang-Goethe-Universitaet(Germany)의 Dr. Starzinski-Powitz 제공}. 이들 세포들은 기존에 알려진 활성 자궁내막증 조직(active endometrotic tissue)의 분자생물학적 성격과 유사함이 증명되어(Banu et al., 2008), 자궁내막증의 분자생물학적 연구에 대한 새로운 인 비트로 모델로 사용되고 있다.
- [0038] 세포는 RPMI 1640 및 DMEM/F12 배지(10% 우태아혈청, 100 U/ml 페니실린 G, 100g/ml 스트렙토마이신 첨가됨; 라이프 테크놀로지, 그랜드 아일랜드, 뉴욕) 중, 섭씨 37도, 5%이산화탄소-95%공기 조건에서 유지되었다.
- [0039] 1-3. 세포 생존 시험(cell viability assay)
- [0040] 세포 생존시험은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-dipheyltetrazoliumbromide; Sigma-Aldrich) 어췌이에 의하여었다. 세포는 96-웰 플레이트에 웰당 5×10^3 세포 농도로 식종하고, 24시간 배양하였다. 아크틴의 성장 억제 효과를 시험하기 위해, 각 세포는 4일간 1-1에서 준비된 아크틴(0, 1, 2, 4, 8 μ M)으로 처리하였다. 채취일에 25 μ l의 MTT 용액을 배지에 넣고, 세포는 4시간 동안 섭씨 37도에서 배양하였다. MTT염색된 배지를 제거 후, 세포를 30분간 DMSO(50 μ l)에서 용해하였다. 세포생존을 알아보기 위해, 광학밀도(optical density)를 마이크로플레이트 스펙트로미터(SpectraMax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여, 540nm에서 측정하였다.
- [0041] 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1은 아크틴 처리 농도에 따른 세포생존을 나타낸 것으로, x축은 아크틴 처리 농도를 나타내고, y축은 세포의 생존정도를 상대적으로 나타낸다.
- [0042] 도시된 바와 같이, 아크틴 처리군이, 처리되지 않은 군에 비해 자궁내막증 세포성장을 억제함을 알 수 있다.
- [0043] 이와 같은 결과로부터 아크틴이 자궁내막증 세포의 성장을 억제함을 알 수 있다.
- [0044] 결과적으로, 아크틴은 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 또는 예방할 수 있음을 알 수 있다.
- [0045] <실시예 2> 아크틴의 자궁내막증세포 이동 억제에 의한 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인

- [0046] 자궁내막증은 자궁내막증세포의 이동(migration)을 특징으로 하므로, 트랜스웰 마이그레이션 어ッセイ(transwell migration assay)를 이용하여, 아크틴이 자궁내막증세포 이동 억제에 의한 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과를 확인하고자 하였다.
- [0047] 2-1. 아크틴 준비
- [0048] 실시예 1의 1-1.과 동일한 방법으로 아크틴을 준비하였다.
- [0049] 2-2. 세포 준비
- [0050] 실시예 1의 1-2.과 동일한 방법으로 세포를 준비하였다.
- [0051] 2-3. Transwell migration assay
- [0052] 자궁내막증 세포주(12Z)에 2-1.의 아크틴을 처리(처리 농도: 0, 5, 25, 50 μ M)한 후, 16, 24시간 후 자궁내막증 세포의 이동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 트랜스웰-이동 분석(transwell-migration assay)을 수행하였다.
- [0053] 구체적으로, 24웰-트랜스웰 플레이트(8 μ m pore size)에 자궁내막증 세포인 12Z 세포를 트랜스웰 플레이트의 윗부분(upper part)에 각각 분주한 후, 아크틴을 처리하였다. 아크틴 처리 16시간 또는 24시간 후, 트랜스웰 바깥쪽면의 막으로 이동한 세포들을 메탄올로 고정하여, 0.5%의 크리스탈 바이올렛으로 10분 동안 염색하였다. 상기의 트랜스웰 바깥쪽 면으로 이동한 세포들을 200 X 배율의 현미경으로 관찰하여 개수하여 그래프화 하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2의 좌측 그래프는 16시간 후의 결과이고, 우측 그래프는 24시간 후의 결과이다. 각각의 그래프에서 x축은 아크틴 처리 농도를 나타내고, y축은 자궁내막증세포의 이동정도를 상대적으로 나타낸다.
- [0054] 도 2에서 보는 바와 같이, 아크틴이 자궁내막증 세포의 이동성을 억제시킴을 알 수 있다.
- [0055] 그 결과 아크틴은 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 또는 예방할 수 있음을 알 수 있다.
- [0056] <실시예 3> 자궁내막증세포의 부착능 억제에 의한, 아크틴의 자궁내막증 치료, 개선 또는 예방 효과 확인
- [0057] 자궁내막증은 자궁내막세포가 복막 및 복강주위의 여러 장기에 부착(attachment), 착상(implantation)함을 특징으로 한다.
- [0058] 아크틴이 이와 같은 자궁내막증세포의 부착을 억제하는지 여부를 확인함으로써, 자궁내막증 치료 등의 효과를 나타내는지 여부를 확인하고자 하였다.
- [0059] 3-1. 아크틴 준비
- [0060] 실시예 1의 1-1.과 동일한 방법으로 아크틴을 준비하였다.
- [0061] 3-2. 세포 준비
- [0062] 실시예 1의 1-2.과 동일한 방법으로 세포를 준비하였다.
- [0063] 3-3. 자궁내막증세포 부착능 실험
- [0064] 자궁내막증 세포주(12Z)에 3-1.의 아크틴을 처리(0, 5, 25, 50 μ M)한 후, 시간에 따른(90분, 120분) 자궁내막세포 부착정도를 확인하였다.
- [0065] 구체적으로, 자궁내막증의 특징인 자궁내막증 세포가 복막 복강주위의 장기에 부착 및 착상하는 현상을 아크틴

이 억제하는지 확인하기 위해, 인간 복막 중피 세포(Human peritoneal methothelial cells)인 Met-5A 세포(American Type Culture Collection, ATCC)를 10%의 FBS, 100 U/ml의 페니실린 G 및 100 g/ml의 스트렙토마이신(Life Technologies, Grand Island, NY, U.S.A.), 및 400 nM의 hydrocortisone(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, U.S.A.)이 포함된 199 배지에서 5 % CO₂ 인큐베이터로 배양하였다. 상기 Met-5A 세포를 96-웰 플레이트에 분주하였다. Cell tracker green CMFDA로 표지한 자궁내막증 세포주인 12Z 세포(2×10^3 개/well)를 아크틴을 함유한 DMEM/F12배지와 섞은 후, 미리 분주해놓은 Met-5A 세포에 첨가하였다. 섞인 상기의 세포들은 섭씨 37도의 5% CO₂-인큐베이터에서 한 시간 동안 배양한 후, 플레이트를 뒤집고 칼슘 및 마그네슘이 들어있는 포스페이트-버퍼 용액(phosphate-buffered solution)으로 씻었다. 부착된 세포들을 490 nm의 파장으로 분석하여, 대조군을 100%로 놓고 부착된 세포들의 퍼센트를 계산하였다. 그 결과를 도 3의 그래프로 나타내었다. 도의 x축은 아크틴 처리시간(분)을 나타내고, y축은 자궁내막증세포의 부착율(%)을 나타낸다.

[0066] 그 결과, 아크틴이 농도의존적으로 자궁내막증세포의 부착능을 억제함을 알 수 있다.

[0067] 이와 같은 결과로부터, 아크틴은 자궁내막증세포의 부착능을 억제하여, 자궁내막증을 효과적으로 치료, 개선 또는 예방할 수 있음을 알 수 있다.

[0068] 상술한 실시예 1~3으로부터 확인한 바와 같이, 아크틴은 자궁내막증의 특징인 자궁내막증세포성장, 자궁내막증세포이동, 및 자궁내막증세포부착을 억제함을 알 수 있다.

[0069] 따라서, 아크틴이 자궁내막증의 치료, 개선 또는 예방에 효과적임을 알 수 있다.

[0070] <제조예 1> 약학 조성물의 제조

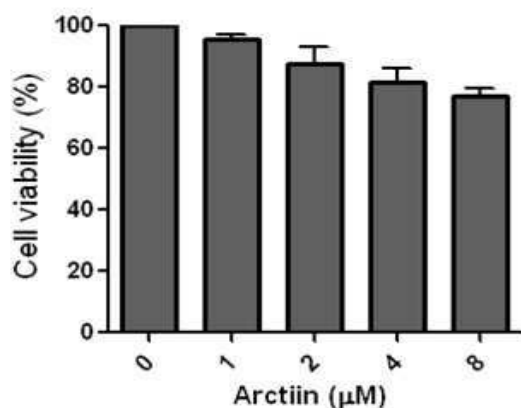
[0071] 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비한 아크틴 300mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0072] <제조예 2> 식품 조성물의 제조

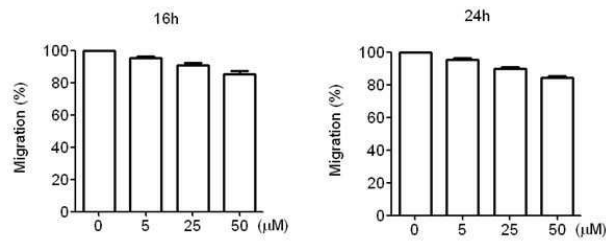
[0073] 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비한 아크틴(4중량 %), 액상과당(0.5중량%), 올리고당(2중량%), 설탕(2중량%), 및 식염(0.5중량%)에 물을 추가하여 잔량을 맞춘 후 균질하게 배합하여 순간 살균을 하여 건강음료를 제조하였다.

도면

도면1



도면2



도면3

