



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월07일

(11) 등록번호 10-1558477

(24) 등록일자 2015년10월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/155 (2006.01) **A61P 5/00** (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0113259
 (22) 출원일자 2013년09월24일
 심사청구일자 2013년09월24일
 (65) 공개번호 10-2015-0033358
 (43) 공개일자 2015년04월01일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020130129496 A*
 KR1020110119542 A
 Clinical Endocrinology. 2011.07., 75(1), 1-9
 쪽
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
 (72) 발명자
이은직
 서울 마포구 창전로 26, 103동 603호 (신정동, 서강GS아파트)
구철룡
 서울 용산구 이촌로71길 10, 210동 2005호 (이촌동, 한가람아파트)
 (74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 박제현

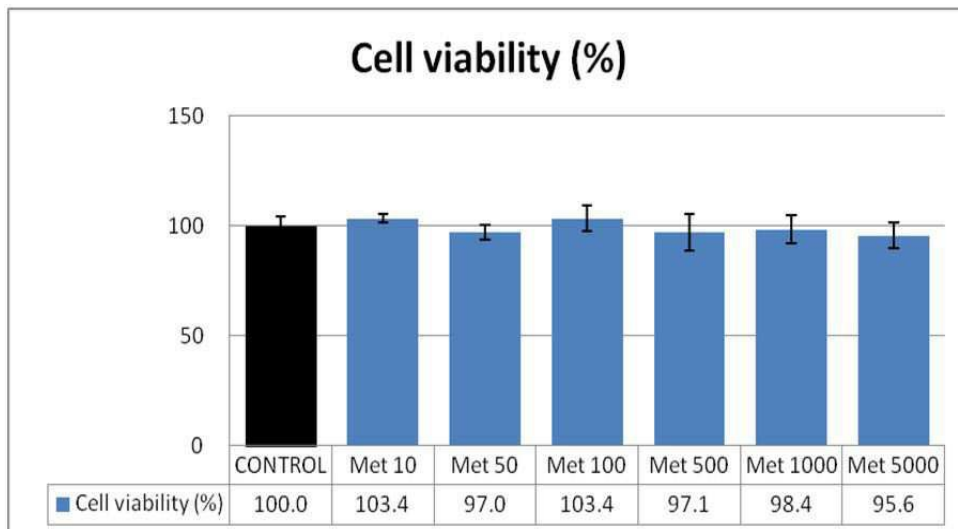
(54) 발명의 명칭 자가면역성 갑상선 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 바이구아니드(biguanide) 유도체, 보다 구체적으로는 메트포민(metformin)을 유효성분으로 포함하는 자가면역성 갑상선 질환(Autoimmune Thyroid Diseases)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 낮은 세포 독성을 가지면서도 히알루로난(Hyaluronan)의 생성 및 지방의 분화를 유의하게 억제함으로써 갑상선 자가항체에 의해 발생하는 다양한 병리적 상태, 예를 들어 갑상선 안구병증을 효과적으로 치료 또는 개선할 수 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

메트포민(metformin) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 갑상선 안구병증(thyroid-associated ophthalmopathy)의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 히알루로난(Hyaluronan) 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 PPAR γ , C/EBP α 및 C/EBP β 의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 바이구아니드(biguanide) 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 갑상선 안구병증을 비롯한 자가면역성 갑상선 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

갑상선 관련 질환은 갑상선의 기능이 항진되어 갑상선 호르몬이 과도하게 생성되어 신체의 신진대사가 비정상적으로 증가하는 질환인 갑상선 기능 항진증과, 갑상선 호르몬의 결핍으로 인하여 전신의 대사 과정이 느려지는 질환인 갑상선 기능 저하증이 있다. 갑상선 기능 항진증의 경우 치료를 하지 않고 장시간 방치하는 경우 심장에 합병증을 초래하여 부정맥이나 심부전이 나타날 수 있으며, 폐경기 이후의 여성에서 골다공증을 악화시키는 원인이 된다. 갑상선 기능 저하증은 갑상선 자체의 이상으로 인한 일차성 갑상선 기능 저하증과 뇌하수체 이상으로 인한 이차성 갑상선 기능 저하증으로 나뉘며, 일차성 갑상선 기능 저하증의 경우 유전적 원인, 갑상선 적출 수술, 방사성 옥소의 투여, 만성 림프구성 갑상선염 등 에 의해 갑상선 조직이 파괴되어 발생하며, 이차성 갑상선 기능 저하증의 경우 갑상선 호르몬의 분비를 자극하는 뇌하수체의 기능이 떨어진 경우에 발생한다. 이러한 갑상선 기능의 저하로 인해 대사 관정이 지나치게 느려져 변비, 무기력, 부종, 피로, 기억력 감퇴, 월경과다, 근육통 등을 일으키고, 추위를 잘 견디지 못하며, 땀이 잘 나지 않으며, 식욕은 감퇴되었는데도 체중은

증가하게 된다.

[0003] 최근 갑상선 관련질환 환자는 꾸준히 증가하는 추세이며, 국민건강보험공단 자료에 따르면 2002년부터 2009년까지 갑상선기능 저하증은 12만8천명에서 28만9천명으로 2.3배, 갑상선기능 항진증은 17만3천명에서 23만3천명으로 1.4배 증가하였으며, 기능 이상이 없더라도 자가면역 갑상선질환을 가지고 있는 환자들을 포함하면 그 수는 훨씬 많을 것으로 예상된다.

[0004] 갑상선 안구병증(thyroid-associated ophthalmopathy)은 자가면역성 갑상선 질환에 의해 유도되는 외안근과 결합조직에서의 만성염증질환이다. 갑상선 안구병증의 90% 정도가 그레이브스병 환자에서 발견되어 그레이브스 안구병증 (Graves' ophthalmopathy)이라고도 불리우며, 하시모토 갑상선염도 갑상선 안구병증의 원인이 된다. 갑상선 안구병증의 치료에 있어서도 갑상선을 제거하거나 호르몬 생성을 억제하는 기능항진증과 달리, 내과적 치료로는 면역요법이 시도되고 있으나 그 효과는 증상 완화를 기대하는 수준에 머물고 있는 실정이다. 아울러, 비선별적인 갑상선 기능 저하제의 사용이나 외과적인 수술을 통한 갑상선 조직 제거는 재발의 우려가 있고 지속적으로 갑상선 호르몬을 투여해야 할 뿐 아니라 비정상적인 신체 항상성을 나타내게 되는 문제점이 있다.

[0005] 1920년대 유럽에서 개발된 메트포민(metformin)은 혈당개선효과와 심혈관질환 예방효과가 확인되어 경구형 당뇨 치료제로 인체에 투여되어 오던 화합물이며, 간에서 AMPK(AMP-activated protein kinase)를 활성화함으로써 포도당신생합성을 막고, 세포에 포도당이 흡수되는 것을 촉진하여 대사증후군을 억제한다는 사실이 보고되었다. 그러나, 메트포민과 관련하여 자가면역성 갑상선 질환에 대한 치료 또는 개선효과는 알려진 바가 없다.

본 발명의 배경이 되는 기술로는 대한민국 공개특허공보 제10-2013-0129496호(2013. 11. 29.)가 있다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 자가면역성 갑상선 질환에 대한 효과적인 천연 치료제 조성물을 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 바이구아니드 유도체 화합물이 자가면역성 갑상선 질환에 대한 주요 표지자(indicator)/병리기전 물질의 발현량을 유의하게 감소시킴으로서 갑상선 안구병증을 비롯한 자가면역성 갑상선 질환의 예방 및 치료에 우수한 효과적이라는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

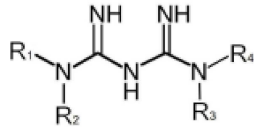
[0008] 따라서 본 발명의 목적은 자가면역성 갑상선 질환(Autoimmune Thyroid Diseases)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 바이구아니드(biguanide) 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 자가면역성 갑상선 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다:

[0011] **화학식 1**



[0012]

[0013] 상기 화학식에서, R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

[0014]

본 발명자들은 자가면역성 갑상선 질환에 대한 효과적인 천연 치료제 조성물을 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 바이구아니드 유도체 화합물이 자가면역성 갑상선 질환에 대한 주요 표지자(indicator)/병리기전 물질의 발현량을 유의하게 감소시킴으로서 갑상선 안구병증을 비롯한 자가면역성 갑상선 질환의 예방 및 치료에 우수한 효과적이라는 사실을 발견하였다.

[0015]

본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필 또는 이소프로필을 포함한다. C₁-C₃ 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C₁-C₃ 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0016]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1의 R₁ 및 R₂는 수소이고, R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 C₁-C₃ 알킬이다. 보다 구체적으로는, 상기 화학식 1의 R₃ 및 R₄는 메틸이다.

[0017]

R₁ 및 R₂가 수소이고, R₃ 및 R₄가 메틸인 화합물은 메트포민(metformin, N,N-디메틸이미도디카르보니미드 디아미드)이다. 메트포민은 현재 제2형 당뇨병 환자에 제일 먼저 처방되는 경구형 당뇨 치료제로서, 혈당개선효과와 심혈관질환을 예방하는 효과가 알려졌으며, 작용기전의 하나로 간에서 AMP-activated protein kinase (AMPK)를 활성화함으로써 포도당신생합성을 막고, 세포에 포도당이 흡수되는 것을 촉진하고, 대사증후군을 억제한다는 사실이 보고되었다. 그러나, 메트포민과 관련하여 자가면역성 갑상선 질환에 대한 치료 또는 개선효과는 알려진 바가 없다.

[0018]

본 발명의 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약제학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다.

[0019]

바람직하게는, 본 발명의 화합물의 약제학적 허용 가능한 염은 염산염, 브롬산염, 황산염, 인산염, 구연산염, 아세트산염, 트리플루오로아세트산염, 젯산염, 주석산염, 말레인산염, 푸마린산염, 글루콘산염, 메탄설폰산염, 글리콘산염, 숙신산염, 4-톨루엔설폰산염, 글루투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 또는 아스파르트산염으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여 형성되는 염이 모두 포함된다. 또한, 본 발명의 화합물은 용매화물(예를 들면 수화물)의 형태로도 존재할 수 있다.

[0020]

본 발명의 조성물은 자가면역성 갑상선 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 운환제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0021]

본 발명에서 용어 “갑상선 질환(thyroid gland disorder)”은 갑상선 기능의 이상으로 인하여 갑상선 호르몬의 분비가 과도하거나 또는 결핍되는 질환을 의미한다. 따라서 본 발명의 조성물로 치료되는 갑상선 질환은 갑상선 기능 항진증과 갑상선 기능 저하증을 모두 포함한다.

[0022]

갑상선 기능 항진증(hyperthyroidism)은 갑상선의 기능이 비정상적으로 활성화되어 갑상선 호르몬이 과도하게 생성됨으로서 신체의 신진대사가 비정상적으로 증가하는 질환이며, 갑상선 기능 저하증(hypothyroidism)은 갑상선 호르몬의 결핍으로 인하여 전신의 대사 과정이 느려지는 질환이다.

- [0023] 본 명세서에서 용어 “자가면역성 갑상선 질환(Autoimmune Thyroid Diseases)”은 갑상선에 대한 자가항체가 매개하는 면역반응에 의하여 갑상선 호르몬이 과다 분비되거나 또는 결핍되는 질환을 의미한다. 갑상선 호르몬 수용체에 대한 자가항체(Thyroid stimulating hormone receptor antibody, TRAb)가 생성되면 갑상선 호르몬이 과다 생산되어 갑상선 기능 항진증으로 진행하며, 반대로 갑상선 세포를 파괴하는 자가면역 항체(Thyroid stimulatory blocking antibody, TSBAb)가 생성되면 호르몬 분비가 감소하여 갑상선 기능 저하증으로 발전한다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 자가항체의 생성을 억제하거나 불활성화시킴으로써 효율적으로 자가면역반응을 조절, 자가면역성 갑상선 질환을 치료 또는 예방할 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a)질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b)질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c)질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물은 자가면역성 갑상선 질환 또는 이의 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 하며, 이에 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0026] 본 명세서에서, 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방되는 자가면역성 갑상선 질환은 갑상선 안구병증(thyroid-associated ophthalmopathy), 그레이브스 병(Graves’ disease), 하시모토 갑상선염(Hashimoto’s thyroiditis), 위축성 갑상선염(atrophic thyroiditis), 무통성 갑상선염(painless thyroiditis) 및 산후갑상선염(postpartum thyroiditis)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0028] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방되는 자가면역성 갑상선 질환은 갑상선 질환은 갑상선 안구병증(thyroid-associated ophthalmopathy)이다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 “갑상선 안구병증(thyroid-associated ophthalmopathy)”은 자가면역성 갑상선 질환에 의하여 안와 내 안와섬유세포에 염증반응 및 지방분화가 증가하여 안구가 돌출되는 질환을 의미한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 갑상선 안구병증의 가장 중요한 병리기전 중 하나인 히알루로난(Hyaluronan) 생성을 농도 의존적으로 억제하며, 지방의 분화를 유의하게 억제하고, 지방분화시 증가하는 PPAR γ , C/EBP α 및 C/EBP β 의 발현을 감소시킨다. 이러한 다각적인 실험적 증거에 의해, 본 발명자들은 본 발명의 조성물이 갑상선 안구병증의 효율적인 치료제로 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.
- [0030] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington’s Pharmaceutical Sciences*(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0031] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0034] 본 명세서에서 용어 “유효량”은 대상체에게 투여했을 때 대상체가 고통받거나 고통받을 것이 예상되는 상태를 치료하거나, 최소한 이를 개선할 수 있는 있을 만큼 유효한 조성물의 양을 의미한다.
- [0035] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.001-100 mg/kg이다.

[0036]

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 지속적으로 치료학적 유효량을 유지함으로써 약제의 복용횟수를 줄여 복용 순응도를 높일 수 있도록 서방형 제제로 제조될 수 있다. 서방형 제제는 본 발명의 유효성분 이외에 서방화 담체 및 기타 보조제를 포함하여 제제화 될 수 있다. 본 발명에서 이용되는 서방화 담체는 당업계에서 공지된 다양한 서방화 담체를 이용할 수 있으나, 구체적으로는 친수성 폴리머(polymer)이다.

발명의 효과

[0037]

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0038]

(a) 본 발명은 상기 화학식 1의 바이구아니드(biguanide) 유도체, 보다 구체적으로는 메트포민(metformin)을 유효성분으로 포함하는 자가면역성 갑상선 질환(Autoimmune Thyroid Diseases)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0039]

(b) 본 발명의 조성물은 낮은 세포 독성을 가지면서도 히알루로난(Hyaluronan)의 생성 및 지방의 분화를 유의하게 억제함으로써 갑상선 자가항체에 의해 발생하는 다양한 병리적 상태, 예를 들어 갑상선 안구병증을 효과적으로 치료 또는 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040]

도 1은 본 발명의 조성물이 섬유모세포에 대해 독성을 가지지 않음을 확인한 MTT 분석결과를 나타낸 그림이다.

도 2는 본 발명의 조성물이 갑상선안구병증의 병리기전 중 하나인 히알루로난 생성에 미치는 효능을 분석한 결과를 나타낸 그림이다. 섬유모세포에 메트포민을 24시간 동안 농도별(10, 50, 100, 500, 1000 및 5000 μ g/ml)로 처리한 후 10ng/ml TNF- α 를 처리하고 히알루로난의 생성을 ELISA kit로 분석한 결과, 메트포민은 10 μ M에서도 히알루로난 생성을 유의적으로 억제함을 확인하였다.

도 3은 본 발명의 조성물이 갑상선안구병증의 병리기전 중 하나인 지방분화에 미치는 효과를 농도별(10, 100 및 1000 μ g/ml)에서의 지방 형성을 특수 염색 없이 확인한 결과이다. 농도 증가에 따라 안와섬유모세포의 지방 형성이 억제되는 것을 확인할 수 있다.

도 4는 본 발명의 조성물이 갑상선안구병증의 병리기전 중 하나인 지방분화에 미치는 효과를 농도별(10, 100 및 1000 μ g/ml)에서의 oil-red o 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 그림이다. 농도 증가에 따라 안와섬유모세포의 지방 형성이 억제되는 것을 확인할 수 있다(X40).

도 5는 도 4의 결과를 고배율(X400)에서 확인한 결과이며 본 발명의 조성물이 갑상선안구병증의 병리기전 중 하나인 지방분화에 미치는 효과를 농도별(10, 100 및 1000 μ g/ml)에서의 oil-red o 염색을 통해 확인한 결과를 나타낸 그림이다.

도 6은 농도별(10, 100 및 1000 μ g/ml) 메트포민 하에서 지방분화시 증가하는 PPAR γ , C/EBP α 및 C/EBP β 의 발현이 감소됨을 웨스턴 블롯팅을 통해 관찰함으로써 본 발명의 조성물이 지방분화를 효율적으로 억제함을 확인한 결과를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041]

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.

[0042]

실시예

[0043]

갑상선안병증의 안와지방결체조직에서 안와 섬유모세포 분리 배양

[0044]

갑상선안병증 환자에서 안와감압술 시행후 안와 지방결체조직으로부터 안와 섬유모세포를 일차 배양하였다. 비교실험을 위해 갑상선안병증이 없는 정상인을 대상으로 시행한 위눈꺼풀성형술 또는 안와수술 등을 통해 안와 지방결체조직을 얻어, 정상 안와 섬유모세포도 일차 배양하였다. 배양방법은, 조직을 웨스코트 가위(wescott scissors)로 잘게 절단 후, 콜라게나아제(collagenase) II(3mg/ml in HBSS, 1.5% BSA)을 1시간 동안 37°C에서 혼든 다음, 300g에 5분간 원심분리함으로써 부유지방세포와 지방구(fat globule)를 제거하였다. 2차례 PBS로 세척한 후 10 % FBS(fetal bovine serum)를 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지용액에 넣은 후 CO₂배양기 (5% CO₂, 37°C)내에서 배양하였다. 2-3일 간격으로 배양배지를 교체하면서 융합된 세포들을 트립신-EDTA용액으로 박리하여 계대배양하였다.

[0045]

지방 분화 (adipogenesis)

[0046]

6-웰 플레이트에 안와 섬유모세포를 분주한 후, 세포가 컨플루언스(confluence)에 도달하면 지방전구세포의 지방분화를 유도하였다. 유도제로는 기본 세포 배지용액인 10 % FBS를 첨가한 DMEM에 PPAR γ 아고니스트, 로지글리타존(10 mM, Cayman, Ann Arbor, MI, USA), 33 mM 비오틴, 17 mM 판토테닉산, 10 mg/ml 트랜스페린, 0.2nM T3, 1mM 인슐린(Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) 및 0.2mM 카바프로스타글란딘(cPGI2; Calbiochem, La Jolla, CA, USA), 1mM 텍사메타손 및 0.1mM 이소부틸메틸잔틴을 추가하여 사용하였다. 지방분화는 10일 동안 지속하며, 2-3일 간격으로 배지와 약물을 교체하였다.

[0047]

세포 독성 테스트

[0048]

메트포민의 세포 독성 테스트는 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di phenyltetrazolium bromide) 분석기 (CellTiter 96 Aqueous nonreactive cell proliferative assay, Promega)를 이용하여 측정하였다. MTT 분석은 각 웰에 안와 섬유모세포를 배양하고, 본 발명의 메트포민을 농도별(10-5000 μ M)로 24시간 동안 처리함으로써 수행하였다. 이후 48 시간 배양한 뒤 MTT 용액 20 μ l를 투여하고 4시간 경과 후 ELISA 플레이트 리더에서 490nm 파장의 UV로 광밀도(OD)를 측정하여 세포성장 억제를 비교하였다. 대사가 왕성한 세포에서 발견되는 디하이드로게네이즈(dehydrogenas) 효소에 의해서 MTS는 포르마잔으로 바뀌며, 490 nm 자외선으로 측정되는 흡광도의 정도가 배양 시 살아있는 세포의 수와 직접 비례한다. 실험은 3번 반복하여 그 평균치를 비교하였고, 그 결과 메트포민은 안와 섬유모세포에 독성이 없음을 확인하였다(도 1).

[0049]

히알루로난(Hyaluronan) ELISA

[0050]

12-웰 플레이트에 안와 섬유모세포를 분주한 후, 메트포민을 10-5000 μ g/ml 농도에 따라 24시간 동안 처리한 후, TNF- α 를 이용하여 세포에 자극을 주었다. 이 세포 배양액을 수집하여 히알루로난 ELISA 키트(Echelon, Salt Lake City, UT, USA)을 이용하여 히알루로난 농도를 측정하였다. 흡광도는 405 nm에서 측정하고 농도를 계산하였다. ELISA 분석 결과, 메트포민은 낮은 농도(10 μ M)에서도 히알루로난 생성을 효율적으로 억제함을 확인하였다(도 2).

[0051]

분화된 지방 세포의 오일 레드 O 염색

[0052]

0.5% (w/v)의 오일 레드 O(oil red O) 용액을 준비하고, 이를 3:2의 비율로 멸균된 증류수와 희석하여 지방세포의 염색용 시약으로 사용하였다. 6-웰 플레이트에 안와 섬유모세포를 분주한 후, 세포가 컨플루언스에 도달하면 지방전구세포의 지방분화를 10일 간 유도하였다. 지방분화가 모두 끝나면, 배지를 모두 제거하고 PBS를 이용하여 2번 세척한 후, 3.7% (w/v) 포르말린을 이용하여 세포를 1시간 동안 고정하였다. 고정 후, 오일 레드 O 워킹 솔루션을 1시간 동안 처리하고, 증류수를 이용하여 2번 세척한 뒤 이를 현미경(Olympus, Melville, NY, USA)을 이용하여 확인하였다. 관찰 결과, 메트포민은 농도 의존적으로 지방의 분화를 억제함을 확인하였다(도 3 내지 5)

[0053]

[0054]

웨스턴 블롯팅

[0055]

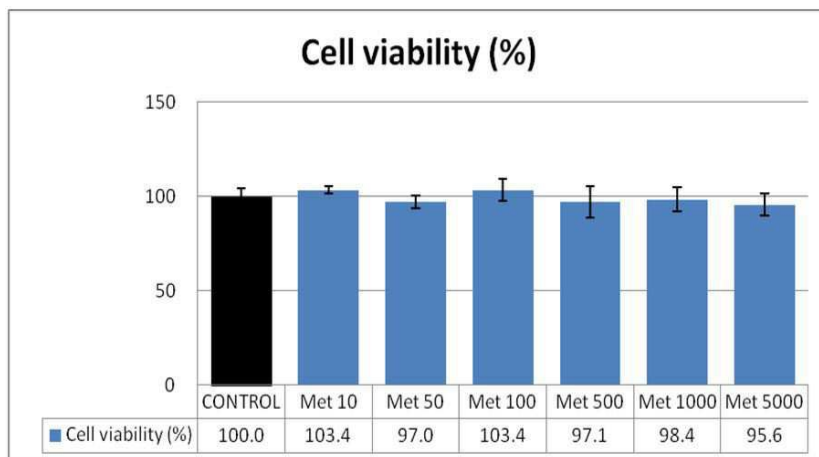
항원 에피토프와 반응하는 항체를 이용하여 단백질 혼합물 중에서 원하는 단백질(antigen)만을 찾는 방법으로 갑상선암병증의 안와지방결체조직에서 메트포민의 지방분화 유도 중 지방분화 억제 효과를 살펴보았다. 안와지방결체조직 세포에 연지방 추출물을 50, 100 µg/ml를 지방분화 유도 10일 동안 처리하였다. 세포용해물(lysate)을 얻은 후 세포용해 완충액에 단백질 분해효소 억제제와 포스파타제 억제제를 첨가한 후 20분 동안 얼음에서 보관하였다. 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 얻은 후, 단백질 정량을 하여 각 실험군마다 동일한 단백질 양을 만들었다. 10% SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리하고, 분리된 단백질을 PVDF 막(Millipore, MA, USA)에 옮겨주었다. 5% 탈지유를 이용하여 막에 있는 비특이적 결합부위를 모두 블로킹하였다. 일차항체인 PPAR γ , C/EBP α , C/EBP β , p-P65, P65, HO-1 및 β -actin을 24시간 동안 4°C에서 보관한 후 이차항체를 1시간 동안 특수발색 기질(chromogenic substrate)을 이용하여 처리하였다. 메트포민을 10, 100 및 1000 µM 처리했을 때, 지방분화 관련인자인 PPAR γ , C/EBP α , C/EBP β 의 발현을 감소시킴을 확인할 수 있었다(도 6).

[0056]

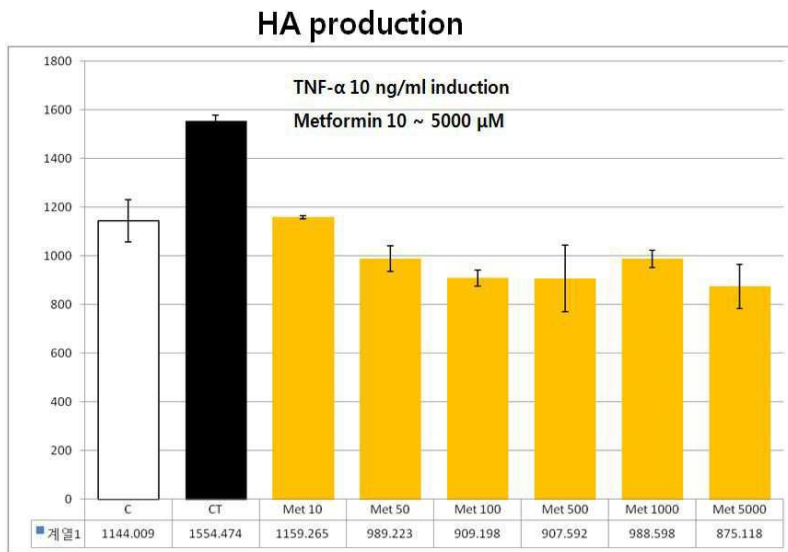
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

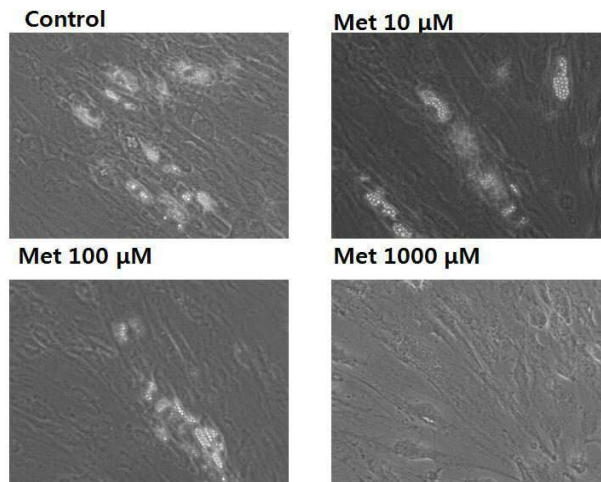


도면2



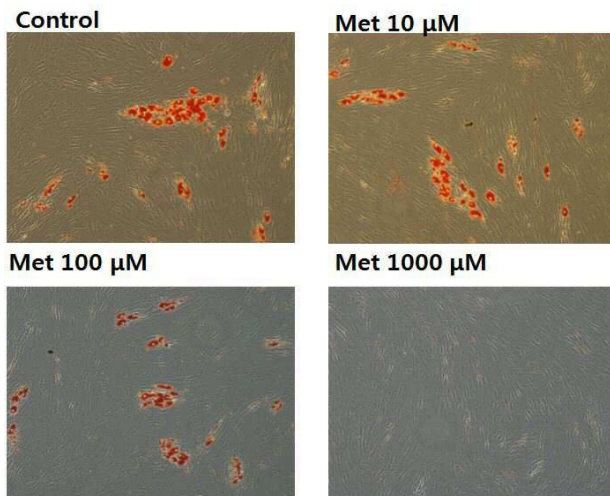
도면3

Adipogenesis



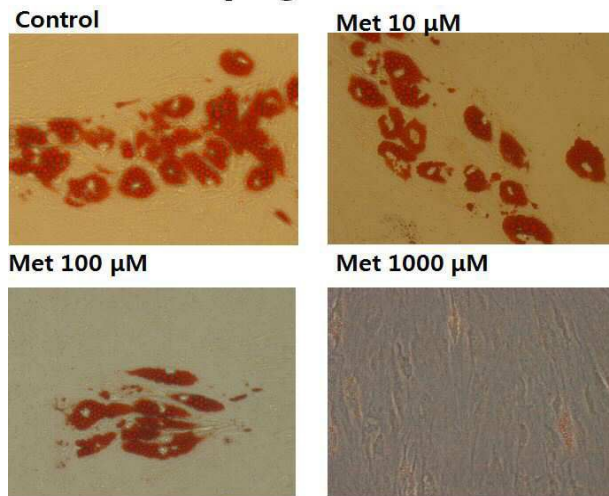
도면4

Adipogenesis



도면5

Adipogenesis



도면6

